

STANOVENIE VÝZNAMNÝCH LÁTOK V NÁPOJOCH BIOSENZORMI

JÁN TKÁČ, JURAJ ŠVITEL a ERNEST ŠTURDÍK

Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovenská republika, e-mail:tkac@chelin.chtf.stuba.sk

Došlo dňa 6. V. 1998

Kľúčové slová: biosenzory, nápoje, sacharidy, alkoholy, organické kyseliny, anorganické látky

Obsah

1. Úvod
2. Stanovenie etanolu
3. Detekcia sacharidov
 - 3.1. Glukóza
 - 3.2. Fruktóza
 - 3.3. Sacharóza
4. Analýza organických kyselín
 - 4.1. Kyselina mliečna
 - 4.2. Kyselina jablčná
 - 4.3. Kyselina šťavelová
5. Stanovenie ostatných zložiek
 - 5.1. Glycerol
 - 5.2. Sírčitany
 - 5.3. Fosfáty
 - 5.4. Ďalšie analyty
6. Záver

1. Úvod

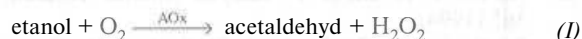
Vývoj a využitie biosenzorov je progresívny analytický odbor, ktorý v sebe zahŕňa poznatky z oblasti biológie, chémie, fyziky a matematiky a svojimi aplikačnými výstupmi zasahuje do oblastí fermentačného, potravinárskeho a farmaceutického priemyslu, do analytickej chémie, poľnohospodárstva, medicíny,

životného prostredia i petrochémie. Biosenzor je zariadenie, ktoré pozostáva z biologickej časti, ktorá sa nachádza v tesnom kontakte s fyzikálnochemickým prevodníkom, alebo je súčasťou prevodníka. Výsledkom takéhoto usporiadania je elektronický signál, ktorý je proporcionálny koncentrácii analytu. Spojenie týchto dvoch odlišných oblastí kombinuje v sebe špecifitu a senzitivitu biologického systému so silou elektro-techniky a počítačovej techniky. Takýmto analytickým zariadením sa rozšíri špecifita i rozsah stanoviteľných substrátov oproti senzore založeným na princípe fyzikálnochemického prevodníka. Rôznymi kombináciami biologickej časti s prevodníkom možno docieľiť veľké množstvo rôznych konštrukcií¹. Základné charakteristiky biosenzorov aj s ich významom sú uvedené v tab. I (cit.²).

Overenie vhodnosti použitia biosenzorov sa realizuje na reálnych vzorkách, ktorými bývajú obyčajne rôzne nápoje, porovnaním s referenčnou analytickou metódou. Zo všetkých zložiek nápojov sa budeme bližšie zaoberať stanovením etanolu, cukrov (glukóza, fruktóza, sacharóza), kyselín (mliečna, jablčná, šťavelová), glycerolu a organických látok (sírčitany, fosfáty).

2. Stanovenie etanolu

Základom stanovenia etanolu biosenzorom je reakcia, pri ktorej sa etanol oxiduje enzýmom alkoholoxidázou (AOx, EC 1.1.3.13) alebo alkoholdehydrogenázou (ADH, EC 1.1.1.1) na acetaldehyd. V prípade použitia alkoholoxidázy oxidácia etanolu prebieha podľa rovnice (7).



Redukovaná forma AOx odovzdá elektróny prostredníctvom mediátora amperometrickému prevodníku a meraný prúd je úmerný koncentrácii etanolu vo vzorke. Jednoduchším spôsobom je použitie kyslíkovej elektródy ako prevodníka. Meria sa úbytok prúdu, ktorý je priamo úmerný koncentrácii etanolu. Druhým spôsobom konštrukcie etanolového biosenzora je využitie enzýmu alkohol-dehydrogenázy, ktorá si vyžaduje kofaktor NAD⁺ (nikotínamidadenín dinukleotid). Na povrchu biosenzora prebieha nasledujúca reakcia (2).

Tabuľka I

Základné charakteristiky biosenzorov

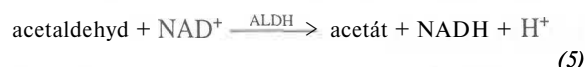
Termín	Význam
Senzitivita	smernica krivky, vyjadrená ako výstup na jednotku koncentrácie
Selektivita	schopnosť zariadenia merať jeden chemický komponent v prítomnosti ďalších komponentov
Dynamický rozsah	rozsah koncentrácií, pri ktorých je senzitivita väčšia než nula
Čas odozvy	čas, za ktorý dosiahne výstupná veličina hodnotu 63 % konečnej hodnoty
Reprodukovateľnosť	presnosť, väčšinou vyjadrená ako odchýlka, štandardná odchýlka alebo variačný koeficient
Detekčný limit	koncentrácia, pri ktorej hodnota výstupnej veličiny je rovná dvojnásobku štandardnej odchýlky
Životnosť	využitelný čas biosenzora, vyjadrený ako skladovacia, alebo operačná stabilita
Stabilita	percento zmeny senzitivity v čase



Redukovaný NAD sa dá elektrochemicky reoxidovať na povrchu prevodníka a meria sa prúd, ktorý je úmerný koncentrácii etanolu. Priama reoxidácia prebieha na všetkých typoch elektród až pri vysokých potenciáloch (0,9 V), pri ktorých interferujú mnohé látky a dochádza k tvorbe dimérov NAD-u. Pre konštrukciu biosenzorov je výhodnejšia reoxidácia NAD-u prostredníctvom enzýmu diaforázy (DP, EC 1.6.99.-) uvedená v rovniciach (3) a (4).



Redukovaný mediátor M_{red} sa následne reoxiduje na povrchu prevodníka (4). Prúd potrebný na reoxidáciu mediátora je v tomto prípade priamo úmerný koncentrácii etanolu. Ako mediátor sa môže použiť napríklad hexakynoželezitan draselný, ktorý sa elektrochemicky reoxiduje pri potenciáli 300 mV vs. SCE (oproti nasýtenej kalomelovej elektróde). Etanolový biosenzor bol skonštruovaný použitím alkoholdehydrogenázy (2), a vznikajúci acetaldehyd je substrátom enzýmu aldehyddehydrogenázy (ALDH, EC 1.2.1.5), ktorá ho premieňa podľa rovnice (5) na acetát.



Vznikajúce protóny sa stanovia potenciometricky.

Na prípravu etanolových biosenzorov bola použitá alkoholoxidáza imobilizovaná na sférické sklené a uhlíkové častice³, na membránu z kolagénu⁴, na metakrylátový kopolymér⁵ v spojení s amperometrickým prevodníkom, alkoholdehydrogenáza imobilizovaná kovalentným prichytením na modifikovanú celulóзовú membránu s následným zosietením glutardialdehydom⁶, do tela uhlíkovej pastovej elektródy⁷⁻⁹, „screen-printing“ technológiou na PVC substrát¹⁰ takisto v spojení s amperometrickým prevodníkom. Etanolový biosenzor bol tiež skonštruovaný adsorpciou enzýmov alkoholdehydrogenázy a aldehyddehydrogenázy na FET-tranzistore a zosietením parami glutardialdehydu¹¹. Etanolový biosenzor bol pri-

Tabuľka II

Charakteristiky etanolových biosenzorov

Linearita [mM]	Detekčný limit [mM]	Stabilita	Čas odozvy [s]	Detektor	Biologická časť	Citácia
0,17-1,71	0,085	—	35	amperometrický	AOx	3
5-110	-	90 % 9d 30°C	120	amperometrický	ADH	6
Po 0,003 ^a	-	0 % 8d 25°C	150	kyslíková elektróda	<i>Gluconobacter oxydans</i>	12
1,5-25 ^b	-	95 % 7m 4°C	35	amperometrický	ADH	8
Po 12	—	-	20	amperometrický	ADH	7
Po 1000 ^b	-	70 % 30d 25°C	300	amperometrický	ADH	9
Po 35	-	90 % 49d 25°C	180	amperometrický	ADH	10
5-65 ^c	5-10 ^c	40 % 15d 30°C	30	kyslíková elektróda	<i>Pichia pastoris</i>	13

^a Obj. %, ^b logaritmická závislosť, ^c mg.l⁻¹, - nepublikovaný údaj

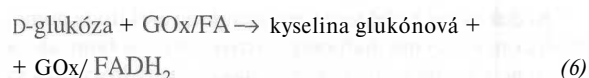
pravený aj imobilizáciou buniek *Gluconobacteroxydans* do želatíny s následným zosietením glutardialdehydom¹² a permeabilizovaných buniek *Pichia pastoris* uchytených medzi dve teflónové membrány¹³. V oboch týchto prípadoch bol ako detektor použitá kyslíková elektróda. V tab. II sú prehľadne uvedené charakteristiky etanolového biosenzora.

Stanovenie etanolu v reálnych vzorkách biosenzorom je len o niečo menej presnejšie (odchýlka 1,8-6,7 %) než štandardnými metódami (odchýlka 1,3-5,5 %). Táto odchýlka je väčšinou spôsobená nešpecifitou enzýmu, ktorý, ako už sám názov napovedá, je schopný oxidovať viacero alkoholov (etanol, 1-propanol, 2-propanol, butanol)¹⁰. Odchýlka medzi stanovením etanolu biosenzorom a referenčnou analytickou metódou (fotometria, GC) sa pohybuje okolo hodnoty 2 %, výnimkou je prípad biosenzora, kde nebola použitá vonkajšia membrána (odchýlka až 28 %).

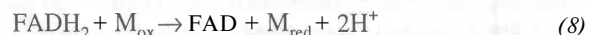
3. Detekcia sacharidov

3.1. Glukóza

Základnou reakciou stanovenia glukózy je jej oxidácia, za prítomnosti enzýmu glukózaoxidázy (GOx, EC 1.1.3.4), ktorý obsahuje kofaktor FAD (flavínadenínindinukleotid) v molekule enzýmu, alebo za prítomnosti enzýmu glukózadehydrogenázy (GDH, EC 1.1.1.47). Činnosť prvého z nich si môžeme popísať rovnicami (6) a (7).



V tomto prípade sa úbytok kyslíka zaznamenaná kyslíkovou elektródou a pokles koncentrácie kyslíka je úmerný koncentrácii glukózy vo vzorke. V prípade použitia iného amperometrického prevodníka, ako kyslíková elektróda, sa dá FAD reoxidovať za použitia mediátora, ako to ukazuje rovnica (8).

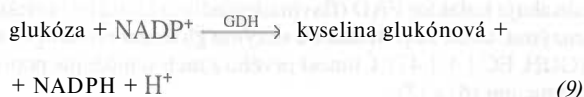


Tabulka III
Charakteristiky glukózových biosenzorov

Linearita [mM]	Detekčný limit [mM]	Stabilita	Čas odozvy [s]	Detektor	Biologická časť	Citácia
0,2–47 ^a	–	87 % 6m 4 °C	90	amperometrický	GOx	14
0,1–5 ^b	–	50 % 10d	–	amperometrický	GOx	15
5–500 ^c	–	–	–	–	–	–
Po 500	–	–	130	amperometrický	GOx	16
7.10 ⁻⁷ –5.10 ⁻⁴	–	–	180	chemiluminiscenčný	GOx	23
0,1–500	–	–	60	kyslíková optroda	GOx	24
0,01–1,5	0,005	85 % 60d 4 °C	35	amperometrický	GOx	3
Po 1,8	–	75 % 20d 25 °C	120	kyslíková elektróda	<i>A. niger</i>	26

^a Koncentrácia glukózy v g.l⁻¹, ^b bez dialyzačnej membrány, ^c s dialyzačnou membránou, – nepublikovaný údaj

Redukovaný mediátor sa oxидуje na povrchu elektródy tak, že odovzdá elektróny. Prírastok prúduje úmerný koncentrácii glukózy vo vzorke. Glukózový senzor môže byť skonštruovaný aj použitím enzýmu glukózadehydrogenázy (GDH), ako to ukazuje rovnica (9).



Redukovaný kofaktor sa regeneruje na elektróde pomocou mediátora a enzýmu diaforázy, rovnakým spôsobom, ako je to popísané v rovniciach (3) a (4). Glukózadehydrogenáza sa dá využiť aj pri potenciometrickom stanovení glukózy, ako to naznačuje rovnica (9).

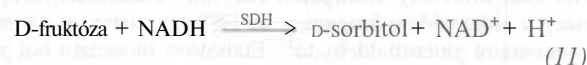
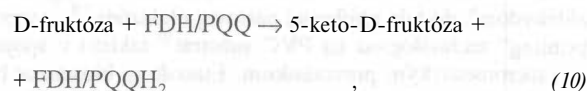
V prípade glukózového biosenzora sa takmer výlučne využíva enzým glukózaoxidáza, ktorá bola imobilizovaná do tela uhlíkovej pastovej elektródy¹⁴, na membránu z tenkého čreva a následne zosietená glutardialdehydom¹⁵, do polypyrolu^{16,17}, na modifikované sklené guľôčky¹⁸, na sférické sklené a uhlíkové častice³, „screen-printing“ technológiou¹⁹, do fosfolipidovej membrány²⁰, do chitínovej membrány²¹, do pastovej elektródy modifikovanej silanizovaným ferocénom²². Vo všetkých týchto glukózových biosenzoroch sa ako prevodník používa amperometrický prevodník. Pri glukózovom biosenzore s glukózaoxidázou a peroxidázou imobilizovanou na komerčných preparátoch membrán, ako sú polyvinylénfluoridová a polyamidová membrána²³, a s imobilizovanou glukózaoxidázou adsorbovanou na uhlíkovú čerň a zosietenú glutardialdehydom²⁴ bol použitý optický prevodník. Okrem týchto enzýmových glukózových biosenzorov boli použité aj mikrobiálne biosenzory, ktoré boli skonštruované imobilizáciou buniek *Gluconobacteroxydans* do želatíny a zosietenú glutardialdehydom²⁵, alebo imobilizáciou mycélia *Aspergillus niger*, ktoré bolo uchytené medzi dve dialyzačné membrány²⁶. V oboch týchto prípadoch bol ako detektor použitá kyslíková elektróda. Ďalším prístupom pri konštrukcii glukózového biosenzora bola imobilizácia glukózadehydrogenázy parami glutardialdehydu na FET-tranzistor¹¹. Najdôležitejšie charakteristiky glukózových biosenzorov sú zhrnuté v tab. III.

Stanovenie glukózy v reálnych vzorkách biosenzorom je presnejšie (odchýlka 0,5–4,6 %) než štandardnými metódami

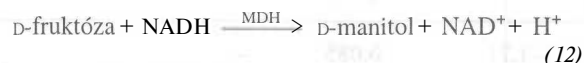
(odchýlka 2,7–7,7 %). Tento rozdiel je spôsobený tým, že pri najčastejšie používanej referenčnej analytickej metóde – spektrofotometrii interferujú zložky vzoriek, prípadne sa mení koncentrácia analytov vplyvom úpravy vzorky. Odchýlka medzi stanovením glukózy biosenzorom a spektrofotometrickou metódou sa pohybuje okolo hodnoty 2,7 %, výnimkou sú vzorky s nízkym obsahom glukózy, kde je odchýlka až 42 %.

3.2. Fruktóza

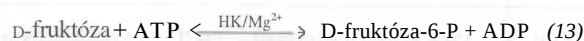
Základom stanovenia fruktózy je jej oxidácia pomocou enzýmu fruktózadehydrogenázy (FDH, EC 1.1.99.11), ktorá obsahuje v molekule naviazaný koenzým pyrolchinolínchinón (PQQ) podľa rovnice (10) a redukcia pomocou sorbitoldehydrogenázy (SDH, EC 1.1.1.14) a mediátora M vyjadrená rovnicou (11).



PQQH₂ sa regeneruje rovnakým princípom, ktorý je naznačený v rovnici (8) a NAD⁺ obdobne ako v rovniciach (3) a (4) a prúd tečúci elektródou je úmerný koncentrácii fruktózy vo vzorke. Fruktóza bola stanovená aj použitím enzýmu manitoldehydrogenázy (MDH, EC 1.1.1.67), podľa rovnice (12).



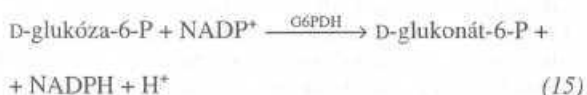
Pri tejto metóde sa fluorimetricky stanoví úbytok NADH počas reakcie. Úbytok NADH je priamo úmerný koncentrácii fruktózy vo vzorke. Spektrofotometricky sa stanoví fruktóza za prítomnosti enzýmov hexokinázy (HK, EC 2.7.1.1), glukózafosfátizomerázy (PGI, EC 5.3.1.9) a glukóza-6-fosfátdehydrogenázy (G6PDH, EC 1.1.1.49) vyjadrená rovnicami (75), (14) a (15).



Tabulka IV
Charakteristiky fruktózových biosenzorov

Linearita [mM]	Detekčný limit [mM]	Stabilita	Čas odozvy [s]	Detektor	Biologická časť	Citácia
Po 10,7	—	90 % 75d 4 °C	150	amperometrický	FDH	27
Po 0,7	—	40 % 22d 4 °C	20	amperometrický	FDH	29
0,08-1,6	0,03	—	—	optický	HK, PGI, G6PDH	30
3–30 ^a	—	75 % 12t 6 °C	—	optický	MDH	32
0,02-2	1 ^a	40 % 30d 5 °C	—	amperometrický	FDH	33
Po 1	—	30 % 2t 5 °C	60	amperometrický	FDH	28
0,01-1	—	60 % 2m 4 °C	—	amperometrický	FDH	31

^a Koncentrácia v µM, - nepublikovaný údaj



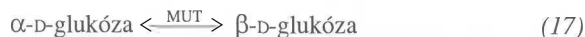
Produkcia redukovaného NADP sa stanoví spektrofotometricky pri 340 nm.

Pri príprave fruktózového biosenzora bola fruktózadehydrogenáza imobilizovaná do tela pastovej elektródy²⁷, na povrch pastovej elektródy²⁸, do vrstvy fosfolipidu, keď sa najprv materiál elektródy aktivoval a na takúto elektródu sa adsorbovala vrstva fosfolipidu s enzýmom²⁹, na aktivované sklenené guľôčky s kontrolovanou veľkosťou pórov a následné zosietenie glutardialdehydom³⁰ na povrch elektródy zosietením hovädzieho sérového albuminu glutardialdehydom³¹. Fruktózový biosenzor bol pripravený aj kovalentnou imobilizáciou manitoldehydrogenázy na modifikované guľôčky z polyvinylalkoholu a následné zosietenie glutardialdehydom³², kovalentnou imobilizáciou fruktózadehydrogenázy na amino-derivát membrány a zosietenie glutardialdehydom³³. Všetky základné charakteristiky biosenzorov sú zhrnuté v tab. IV.

Stanovenie fruktózy v nápojoch biosenzorom je presnejšie (odchýlka približne 0,8 %) než štandardnými metódami (odchýlka približne 3 %). Odchýlka medzi stanovením fruktózovým biosenzorom a referenčnou analytickou metódou (fotometria, LC) je okolo 2,4 %.

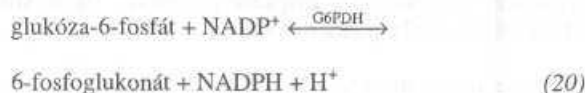
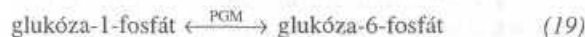
3.3. Sacharóza

Základným princípom stanovenia sacharózy je jej hydrolyza pomocou enzýmu invertázy (INV, EC 3.2.1.26) na α-D-glukózu a fruktózu a následnú izomerizáciu na P-D-glukózu mutarotázou (MUT, EC 5.1.3.3) a oxidáciu β-D-glukózy pomocou glukózaoxidázy (GOx, EC 1.1.3.4), ako to dokumentujú rovnice (16) a (77).



β-D-Glukóza sa dá stanoviť buď enzýmom glukózaoxi-

dázou, alebo glukózadehydrogenázou, ako bolo spomenuté pri glukózovom biosenzore. Ďalším spôsobom stanovenia sacharózy je použitie enzýmov sacharózafosforylázy (SP, EC 2.4.1.7), fosfoglukózamutázy (PGM, EC 5.4.2.2) a glukóza-6-P-dehydrogenázy (G6PDH, EC 1.1.1.49), ako to popisujú rovnice (18), (19) a (20).



Prírastok NADPH je stanovený spektrofotometricky. Sacharóza bola stanovená cez P-D-glukózu, ktorá vzniká hydrolyzou pomocou invertázy, ako je to zrejmé z rovnice (16) a (77), použitím enzýmu glukózadehydrogenázy za použitia potenciometrického detektora, ako to ukazuje rovnica (9).

Na prípravu sacharózového biosenzora boli použité enzýmy glukózaoxidáza, mutarotáza a invertáza za použitia amperometrického prevodníka imobilizované na modifikované sklenené guľôčky¹⁸, priamo na kyslíkovú elektródu spolu s hovädzím sérovým albumínom, zosietené glutardialdehydom a prekryté membránou³⁴, imobilizované napolyamidovú membránu a zosietené spolu s hovädzím sérovým albumínom glutardialdehydom³⁵. Sacharózový biosenzor bol pripravený imobilizáciou všetkých troch spomínaných enzýmov na kolagénovú membránu⁴, na acetátcelulózovú membránu³⁶, imobilizáciou invertázy a glukózadehydrogenázy na FET tranzistor a zosietením parami glutardialdehydu¹¹, imobilizáciou enzýmov sacharózafosforylázy, fosfoglukózamutázy a glukóza-6-fosfátdehydrogenázy na aktivované sklenené guľôčky, za použitia optického prevodníka³⁷, imobilizáciou bunkovej steny *Saccharomyces cerevisiae* spolu s glukózaoxidázou a hovädzím sérovým albumínom na nylonovú sieťku zosietenú glutardialdehydom a následnou fixáciou na kyslíkovú elektródu³⁸ a imobilizáciou permeabilizovaných buniek *Zymomonas mobilis* a invertázy do želatíny a prerytím nylonovou sieťkou na povrch pH elektródy³⁹. Všetky základné charakteristiky sacharózového biosenzora sú uvedené v tab. V. Odchýlka medzi stanovením sa-

Tabulka V
Charakteristiky sacharózových biosenzorov

Linearita [mM]	Detekčný limit [mM]	Stabilita	Čas odozvy [s]	Detektor	Biologická časť	Citácia
–	–	–	180	amperometrický	GOx, INV, MUT	18
0,003–7	–	100 % 11m 4 °C	1–6 min	kyslíková elektroda	GOx, INV, MUT	34
0,03–1,5 ^b	–	90 % 50d 20 °C	2 min	kyslíková elektroda	GOx, INV, MUT	35
0,0001–0,2 ^c	0,2 ^a	–	6 min	optický	SP, PGM, G6PDH	37
Po 1,3	–	100 % 8t 25 °C	3 min	kyslíková elektroda	GOx, <i>S. cerevisiae</i>	38

^a Údaj v μM , ^b koncentrácia sacharózy v g.l⁻¹, ^c v semilogaritmickej vyjadrení, – nepublikovaný údaj

charózy referenčnou analytickou metódou (fotometria, HPLC) a biosenzorom je približne 2,4 %.

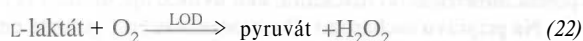
4. Analýza organických kyselín

4.1. Kyselina mliečna

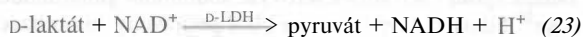
Kyselina mliečna (laktát) je opticky aktívna látka a preto existuje v dvoch optických izoméroch, ako L- a D-kyselina mliečna. Oba tieto izoméry sa dajú stanoviť biosenzorom za použitia enzýmov L-laktátdehydrogenázy (L-LDH, EC 1.1.1.27) a D-laktátdehydrogenázy (D-LDH, EC 1.1.1.28), ako je to vyjadrené v rovnici (27), prípadne použitím L-laktát oxidázy (LOD, EC 1.1.3.2), podľa rovnice (22).



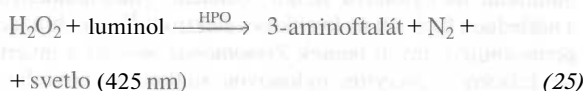
Redukovaný kofaktor sa reoxiduje, ako je vidieť z rovníc (3) a (4).



Celkové množstvo kyseliny mliečnej vo vzorke sa dá stanoviť použitím enzýmov L-laktát oxidázy (LOD), D-laktátdehydrogenázy (D-LDH) a peroxidázy (HPO, EC 1.11.1.7), vyjadrené rovnicami (22), (23) a (24).



Celková koncentrácia laktátu vo vzorke je takto úmerná spotrebe kyslíka, ktorá je detegovaná kyslíkovou elektródou. Na detekciu L-laktátu bol použitý aj optický senzor použitím enzýmov laktát oxidázy (LOD) a peroxidázy (HPO), vyjadrené rovnicami (22) a (25).



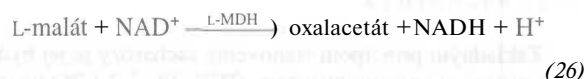
Na detekciu emitovaného svetla bol použitý optický senzor.

D- a L-Laktátdehydrogenáza boli imobilizované do uhlíkovej pasty a na detekciu bol použitý amperometrický prevodník⁷, D-laktátdehydrogenáza bola imobilizovaná do neónovým svetlom polymerizovateľnej membrány z vinylalkoholu a D-laktát bol detegovaný amperometrickým prevodníkom⁴⁰. L-Laktát oxidáza, D-laktátdehydrogenáza a peroxidáza boli imobilizované do polyazetidínového polyméru a kyslíkovou elektródou bol detegovaný D-laktát⁴¹, L-laktát bol detegovaný amperometricky imobilizáciou L-laktát oxidázy do polyméru tvoreného polypyrólom a poly(o-fenyléndiamínom)⁴². Laktátový biosenzor bol pripravený imobilizáciou laktát oxidázy na povrch sklovitého uhlíka pokrytého membránami z poly-L-lyzínu a poly(4-styrénsulfonátu)⁴³, „screen-printing“ technikou⁴⁴, imobilizáciou s hovädzím sérovým albumínom a zosietením glutardialdehydom⁴⁵, na modifikované sklenené guľôčky¹⁸, na nylonovú membránu⁴⁶ a adsorpciou buniek *Pseudomonas putida* na filtračný papier⁴⁷. Laktátový senzor bol pripravený imobilizáciou peroxidázy a laktát oxidázy na aktivovanú polyamidovú membránu spolu s hovädzím sérovým albumínom⁴⁸. Charakteristiky laktátových biosenzorov sú uvedené v tab. VI.

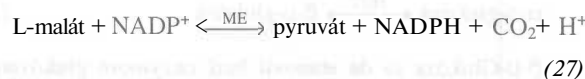
Stanovenie laktátu v reálnych vzorkách biosenzorom je presnejšie (odchýlka 2,3–3,4 %) než štandardnými metódami (odchýlka približne 4,7 %). Rozdiel medzi stanovením laktátu biosenzorom a referenčnou analytickou metódou (fotometria, HPLC) je asi 3,2%.

4.2. Kyselina jablčná

Kyselina L-jablčná (malát) sa dá stanoviť aplikáciou troch rôznych prístupov. Prvým z nich je použitie enzýmu L-malátdehydrogenázy (L-MDH, EC 1.1.1.37), rovnica (26).



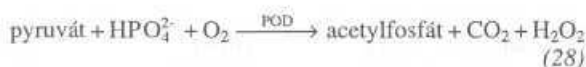
Redukovaný kofaktor sa reoxiduje na povrchu elektródy, ako je to naznačené v rovniciach (3) a (4) odovzdaním elektrónov a prúd je úmerný koncentrácii kyseliny jablčnej vo vzorke. Druhým z nich je použitie „malic“ enzýmu (ME, EC 1.1.1.40), a v druhom kroku použitie enzýmu pyruvát oxidázy (POD, EC 1.2.3.3), ako je to zrejme z rovníc (27) a (28).



Tabulka VI
Charakteristiky laktátových biosenzorov

Linearita [mM]	Detekčný limit [mM]	Stabilita	Čas odozvy [s]	Detektor	Biologická časť	Citácia
0,01-1,5	0,009	6t 4 °C	240	amperometrický	L-LDH	27
0,01-3,5 ^a	0,01	4t 4 °C	240	amperometrický	D-LDH	27
Po 0,5	-	-	150	kyslíková elektróda	L-LOD	46
0,5-5,0	-	60 % 35d 5 °C	-	kyslíková elektróda	<i>P. putida</i>	47
0,01-1	-	40 % 5m 4 °C	180	amperometrický	D-LDH, DP	40
0,05-3	0,025	-	120	amperometrický	LOD, D-LDH, HPO	41
Po 10	-	-	-	amperometrický	LOD	42
Po 0,3	0,0001	40 % 2m 4 °C	5	amperometrický	LOD	43
Po 100 ^b	-	100 % 4m 4 °C	-	amperometrický	LOD	45
Po 1,25 ^c	5 ^d	-	-	optický	LOD, HPO	48

^a D-Laktát, ^b v mg.l⁻¹, ^c údaj v μmol, ^d údaj v nmol, - nepublikovaný údaj



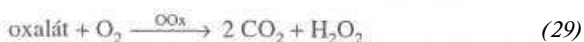
Vznikajúci peroxid vodíka sa stanoví na platínovej elektróde. Tretím princípom je potenciometrické stanovenie vzniknutého protónu, reakciou kyseliny jablčnej s „malic“ enzýmom, podľa rovnice (27).

Pri konštrukcii malátového biosenzora bola imobilizovaná L-malátdehydrogenáza do uhlíkovej pasty²⁷, „malic enzyme“ imobilizovaný na chemicky modifikovaný nylon a následne zosieťovaný glutardialdehydom spolu s hovádzím sérovým albumínom, ako prevodník bol použitý potenciometrický detektor⁴⁶. Imobilizáciou pyruvát oxidázy, „malic enzýmu“ na acetát-celulózovú membránu⁴⁹ a adsorpciou buniek *Pseudomonas putida* na filtračný papier⁴⁷ bol tiež skonštruovaný malátový biosenzor, použitím amperometrického detektora. Základné charakteristiky malátového biosenzora sú uvedené tab. VII.

Veľká odchýlka medzi stanovením biosenzorom a referenčnou analytickou metódou vo vzorke červeného vína (42,9 %), je spôsobená nízkou koncentráciou kyseliny jablčnej vo vzorke (okolo 0,1 g.l⁻¹). Rozdiel medzi stanovením malátu biosenzorom a referenčnou analytickou metódou (fotometria, HPLC) je 6 %, v jednom prípade dokonca 42 %.

4.3. Kyselina šťavelová

Základom stanovenia kyseliny šťaveľovej (oxalátu) biosenzorom je reakcia popísaná rovnicou (29), využívajúca enzým oxalát oxidázou (Ox, EC 1.2.3.4)⁵⁰.



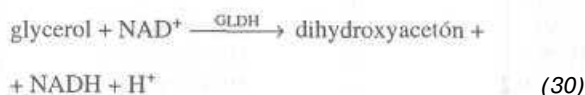
Pokles koncentrácie kyslíka vplyvom jeho spotreby enzýmom sa stanoví na kyslíkovej elektróde. Enzým bol imobilizovaný na aktivovanej polyamidovej membráne. Senzor vykazuje lineárnu odozvu v rozsahu koncentrácií 5.10⁻³–10⁻¹ M. Čas odzvy sa pohyboval v rozsahu od 20 sekund po 1 minútu v závislosti od koncentrácie kyseliny šťaveľovej vo vzorke.

Biosenzor pracoval pri teplote 30 °C a pH 4,0. Skladovacia stabilita pri 4 °C bola veľmi dobrá, senzor vykazoval 100 % aktivitu počas 120 dní. Bola pozorovaná iba 3 % relatívna štandardná odchýlka. Pri analýze vzoriek nealkoholických nápojov bola ako referenčná metóda použitá spektrofotometrická metóda. Priemerná odchýlka medzi oboma metódami bola 31 %.

5. Stanovenie ostatných zložiek

5.1. Glycerol

Na stanovenie glycerolu sa využíva jeho oxidácia za prítomnosti enzýmu glyceroldehydrogenázy (GLDH, EC 1.1.1.6) a kofaktora, vyjadrená rovnicou (30).



Redukovaný NAD sa oxiduje na materiále elektródy, takže nie je potrebná diaforáza. Enzým bol imobilizovaný kovalentne na rozličné nosiče (organické i anorganické)⁵¹. Glyceroldehydrogenáza spolu s NAD-om bola imobilizovaná do membrány z poly(L-lyzínu) a poly(dimetylamoetyl)metylmetakrylátu i želatíny⁵². Z reakcie (30) je jasné, že vznikajúci redukovaný NAD sa dá detegovať spektrofotometricky pri 340 nm (cit.⁵³), alebo potenciometricky sa dajú stanoviť vznikajúce protóny s imobilizovanou glyceroldehydrogenázou v polyakrylamidovom géli⁵⁴. Ďalším prístupom konštrukcie bola imobilizácia enzýmov glycerolkinázy (GLK, EC 2.7.1.30) a glycerolfosfát oxidázy (GLPO, EC 1.1.3.21) uchytením v tele mikrodialyzačnej elektródy⁵⁵ alebo na nylonovú membránu⁵⁶, ich činnosť je vyjadrená rovnicami (31) a (32). Vznikajúci peroxid vodíka bol stanovený amperometricky.



Tabuľka VII
Charakteristiky malátových biosenzorov

Linearita [mM]	Detekčný limit [mM]	Stabilita	Čas odozvy [s]	Detektor	Biologická časť	Citácia
Po 1,2	0,01	6 týždňov	240	amperometrický	L-MDH	27
1–500 ^a	0,0005	4 % 6d 25 °C	60	amperometrický	ME, POD	49
Po 4 ^{b,c}	0,1 ^b	-	60	potenciometrický	ME	46
Po 5	—	100 % 10d 5 °C	300	kyslíková elektroda	<i>Pseudomonas putida</i>	47

^a Koncentrácia v $\mu\text{mol.l}^{-1}$, ^b koncentrácia v g.l^{-1} , ^c v semilogaritmickom vyjadrení, - nepublikovaný údaj

Tabuľka VIII
Charakteristiky glycerolových biosenzorov

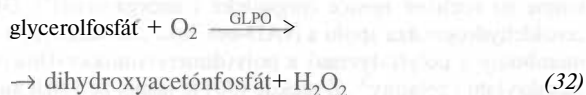
Linearita [mM]	Detekčný limit [mM]	Stabilita	Čas odozvy [s]	Detektor	Biologická časť	Citácia
20–200 ^a	—	85 % 3m 4 °C	120	amperometrický	G1DH	51
0,5–500 ^a	—	—	20	amperometrický	G1K, G1PO	53
Po 10	—	—	20	amperometrický	G1DH	55
0,0001–0,5	0,07 ^a	75 % 50d 4 °C	180	amperometrický	G1K, G1PO	56
0,1–100 ^b	—	—	600	potenciometrický	G1DH, DP	54

^a Údaj v μM , ^b v semilogaritmickom vyjadrení, - nepublikovaný údaj

Tabuľka IX
Charakteristiky siričitanových biosenzorov

Linearita [mg.l ⁻¹]	Detekčný limit [mg.l ⁻¹]	Stabilita	Čas odozvy [s]	Detektor	Biologická časť	Citácia
1–20	1	-	300	amperometrický	<i>T. thiooxidans</i>	61
5–50 ^a	5	100 % 30d 4 °C	1200	potenciometrický	<i>T. thiooxidans</i>	62
Po 50	-	100 % 84d 4 °C	240	kyslíková elektroda	SOx	59
0,04–0,2	—	50 % 15d 4 °C	120	kyslíková elektroda	SOx	57
10–1000 ^b	3 ^a	2m	-	optický	SOx, HPO	60

^a V semilogaritmickom vyjadrení, ^b koncentrácia v ng.ml^{-1} , - nepublikovaný údaj



Základné charakteristiky glycerolového biosenzora sú uvedené v tab. VIII. V prípade stanovenia glycerolu je rozdiel medzi stanovením biosenzorom a spektrofotometrickou metódou približne 1,6 %.

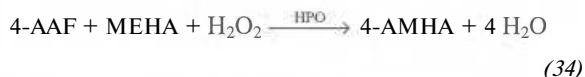
5.2.. Siričitany

Na stanovenie siričitanov sa využíva enzým sulfitoxidáza (SOx, EC 1.8.3.1) imobilizovaná na nylonovú membránu⁵⁷, na organickú vodivú soľ⁵⁸, fyzickým uchytením na kyslíkovú

elektrodu⁵⁹ podľa rovnice (33). Z tejto rovnice vyplýva, že pri všetkých konštrukciách siričitanových biosenzorov bola ako prevodník použitá kyslíková elektroda.



Na konštrukciu sulfitového biosenzora boli použité enzýmy sulfitoxidáza spolu s peroxidázou imobilizované na aktívovaných sklenených gulôčkach. Peroxidáza katalyzuje oxidatívnu kondenzáciu 4-aminofenazónu (4-AAF) s 3-metyl-N-etyl-N'-(β-hydroxyetyl)anilínu (MEHA) v prítomnosti peroxidu vodíka za vzniku derivátu anilínu (AMHA), podľa reakcie (34), na detekciu bol použitý optický detektor⁶⁰.



Na stanovenie siričitanou bol využitý aj enzýmový komplex baktérií *Thiobacillus thiooxidans*, ktoré sú schopné oxidovať siričitan na síran za spotreby kyslíka. Na toto stanovenie sa využívajú dva prístupy, jedným z nich je stanovenie úbytku kyslíka počas reakcie⁶¹ a druhý prístup je stanovenie zmeny pH počas reakcie⁶². V prvom prípade boli bunky imobilizované uchytením medzi dve celulózoové membrány a v druhom prípade adsorbované na membránový filter. Charakteristiky siričitanových biosenzorov sú zhrnuté v tab. IX.

Medzi stanovením siričitanov biosenzorom a referenčnou analytickou metódou je rozdiel asi 4 %.

5.3. Fosfáty

Fosfáty boli vo vzorkách stanovené na základe inhibície kyselý fosfatázy (AF, EC 3.1.3.2) fosfátmi⁶³ (55).



Glukóza reaguje s glukózaoxidázou (GOx) podľa rovnice (6) a (7), za spotreby kyslíka. Prítomný fosfát vo vzorke pôsobí inhibične a posúva rovnováhu (35) na ľavú stranu, čím sa uvoľní menej glukózy, čo sa prejaví vzrastom koncentrácie kyslíka a teda aj prúdu. Linearizáciou vzťahu prúd-koncentrácia bola dosiahnutá lineárna odpoveď v rozsahu 0,09–1,4 mM. Čas odozvy biosenzora bol menej ako 5 minút a detekčný limit 0,06 mM. Stabilita biosenzora bola dobrá (životnosť 10–16 dní). Biosenzor pracoval s presnosťou 1,7 %. Vzorka vína bola stanovená biosenzorom a spektrofotometrickou metódou s odchýlkou 3,5 %.

5.4. Ďalšie analyty

Okrem už spomínaných analytov by sa vo vzorkách nápojov dali stanoviť mnohé iné látky, ako laktóza, maltóza, oligosacharidy, vitamín C, aminokyseliny, reziduá pesticídov, dusičnany a mnohé ďalšie.

6. Záver

Stanovenie spomínaných analytov bolo v mnohých prípadoch presnejšie, ako stanovenie referenčnou analytickou metódou, pričom odchýlka medzi oboma metódami sa najčastejšie pohybovala v rozsahu od 2 % do 6 %. Stanovenie biosenzorom sa vyznačovalo rýchlosťou (čas odozvy zvyčajne do 3 minút) a takmer žiadnou predúpravou vzorky. Na stabilitu pozitívne vplývala imobilizácia enzýmu do uhlíkovej pastovej elektródy a koimobilizácia spolu s hovádzím sérovým albumínom, keď si biosenzory zachovávali takmer pôvodnú aktivitu niekoľko mesiacov. Veľmi stabilnými boli mikrobiálne biosenzory (*Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pseudomonas putida*, *Thiobacillus thiooxidans*), ktoré si uchovávali 100 % aktivitu až tri mesiace skladovaním pri 4 °C.

Táto práca je súčasťou riešenia týchto projektov: 2/5059/98, 2/4149/97 a 1/6252/99.

LITERATÚRA

1. Turner A. P. F., Karube I., Wilson G. S.: *Biosensors. Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, Oxford 1987.
2. Kisaalita W. S.: *Biosens., Bioelectron.* 7, 613 (1992).
3. Mayer M., Ruzicka J.: *Anal. Chem.* 68, 3808 (1996).
4. Bertrand C., Coulet P. R., Gautheron D. C.: *Anal. Chim. Acta* 126, 23 (1981).
5. Hall C. E., Datta D., Hall E. A. H.: *Anal. Chim. Acta* 323, 87 (1996).
6. Kitagawa, Y., Kitabatake K., Suda M., Maramatsu H., Ataka T., Mori A., Tamiya E., Karube I.: *Anal. Chem.* 63, 2391 (1991).
7. Boujtita M., Chapleau M., Murr N.: *Anal. Chim. Acta* 319, 91 (1996).
8. Boujtita M., Murr N.: *J. Food Sci.* 60, 201 (1995).
9. Katrlík J., Švorc J., Stredňanský M., Miertuš S.: *Biosens. Bioelectron.* 13, 181 (1998).
10. Sprules S. D., Hartley I. C., Wedge R., Hart J. P., Pittson R.: *Anal. Chim. Acta* 329, 215 (1996).
11. Kullick T., Beyer M., Henning J., Lerch T., Quack R., Zeitz A., Hitzmann B., Scheper T., Schügerl K.: *Anal. Chim. Acta* 296, 263 (1994).
12. Švitel J., Čurilla O.: *Kvas. Prum.* 42, 241 (1996).
13. Chen J. Ch., Naglak J. T., Wang Y. H.: *Biotechnol. Prog.* 8, 161 (1992).
14. Švorc J., Miertuš S., Katrlík J., Stredňanský M.: *Anal. Chem.* 69, 2086 (1997).
15. Váradí M., Adányi N., Szabó E. E.: *Acta Aliment.* 24, 365 (1995).
16. Centonze D., Zambonin G. C., Palmisano F.: *J. AOAC Int.* 80, 829 (1997).
17. Yon-Hin B. F. Y., Smolander M., Crompton T., Lowe C. R.: *Anal. Chem.* 65, 2067 (1993).
18. Chen R. L. C., Matsumoto K.: *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 813 (1995).
19. Wang J., Pamidi P. V. A., Park D. S.: *Anal. Chem.* 68, 2705 (1996).
20. Šnejdárková M., Rehák M., Otto M.: *Anal. Chem.* 65, 665 (1993).
21. Ohashi E., Karube I.: *J. Biotechnol.* 40, 13 (1995).
22. Losada J., Cuadrado I., Morán M., Casado C. M., Alonso B., Barranco M.: *Anal. Chem. Acta* 338, 191 (1997).
23. Blum L. C.: *Enzyme Microb. Technol.* 75, 407 (1993).
24. Dremel B. A. A., Schaffar B. P. H., Schmid R. D.: *Anal. Chim. Acta* 225, 293 (1989).
25. Švitel J., Čurilla O., Tkáč J.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27, 153 (1998).
26. Katrlík J., Švorc J., Rosenberg M., Miertuš S.: *Anal. Chim. Acta* 331, 225 (1996).
27. Katrlík J.: *Dizertačná práca*. CHTF STU, Bratislava 1997.
28. Ikeda T., Matsushita F., Senda M.: *Biosens. Bioelectron.* 6, 299 (1991).
29. Kinnear K. T., Monbouquette H. G.: *Anal. Chem.* 69, 1771 (1997).
30. De María C. G., Townshend A.: *Anal. Chim. Acta* 261, 137 (1992).
31. Xie X., Kuan S. S., Guibault G. G.: *Biosens. Bioelectron.* 6, 49 (1991).

32. Kiba, N., Inoue, Y., Furusawa, M.: *Anal. Chim. Acta* **243**, 183 (1991).
33. Matsumoto K., Hamada O., Ukedo H., Osajima Y.: *Anal. Chem.* **58**, 2732 (1986).
34. Xu Y., Guibault G. G.: *Anal. Chem.* **61**, 782 (1989).
35. Macholán L., Konečná H.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **48**, 798 (1983).
36. Watanabe E., Takagi M., Takei S.: *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 99 (1991).
37. Kogure M., Mori H., Ariki H., Kojima C., Yamamoto H.: *Anal. Chim. Acta* **337**, 107 (1997).
38. Barlíková A., Švorc J., Miertuš S.: *Anal. Chim. Acta* **247**, 83 (1991).
39. Park J.-K., Ro H.-S., Kim H.-S.: *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 217 (1991).
40. Montagné M., Marty J.-L.: *Anal. Chim. Acta* **375**, 297 (1995).
41. Mazzei F., Azzoni A., Cavalieri B., Botré F., Botré C.: *Food Chem.* **55**, 413 (1996).
42. Palmisano F., Centonze D., Quinto M., Zamboni P. G.: *Biosens. Bioelectron.* **11**, 419 (1996).
43. Mizutani F., Yabuki S., Hirata Y.: *Anal. Chim. Acta* **314**, 233 (1995).
44. Collier W. A., Janssen D., Hart A. L.: *Biosens. Bioelectron.* **11**, 1041 (1996).
45. Kim N., Haginoya R., Karube I.: *J. Food Sci.* **61**, 286 (1996).
46. Palleschi G., Volpe G., Compagnone D., Notte E., Esti M.: *Talanta* **41**, 917 (1994).
47. Ukedo, H., Yamamoto N., Sawamura M., Kosunose H.: *Anal. Sci.* **77**, 941 (1995).
48. Berger A., Blum L. J.: *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 979 (1994).
49. Messia M. C., Compagnone D., Esti M., Palleschi G.: *Anal. Chem.* **68**, 360 (1996).
50. Assolant-Vinet C. H., Bardeletti G., Coulet P. R.: *Anal. Lett.* **20**, 513 (1987).
51. Prodromidis M. I., Stalikas C. D., Tzouwara-Karayanni S. M., Karayannis M. I.: *Talanta* **43**, 27 (1996).
52. Laurinavicius V., Kurtinaitiene B., Gureviciene V., Boguslavsky L., Geng L., Skotheim T.: *Anal. Chim. Acta* **330**, 159 (1996).
53. Davidson M. B., Karjala R.: *J. Lipid Res.* **11**, 609 (1970).
54. Chen A. K., Starzmann J. A.: *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 971 (1982).
55. Murphy L. J., Galley P. T.: *Anal. Chem.* **66**, 4345 (1994).
56. Merchie B., Girard A., Maisterrena B.: *Anal. Chim. Acta* **263**, 85 (1992).
57. Campanella L., Cipriani P., Martini T. M., Sammartino M. P., Tomassetti M.: *Anal. Chim. Acta* **305**, 32 (1995).
58. Korell U., Lennox R. B.: *J. Electroanal. Chem.* **351**, 137 (1993).
59. Smith V. J.: *Anal. Chem.* **59**, 2256 (1987).
60. De Castro M. D. L., Fernández-Romero J. M.: *Anal. Chim. Acta* **311**, 281 (1995).
61. Kawamura Y., Kubo N., Arata H., Ito Y., Tamura M., Yamamoto K.: *J. AOAC Int.* **77**, 1052 (1994).
62. Nakamura K., Saegusa K., Kurosawa H., Amano Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 379 (1993).
63. Campanella L., Cordatore M., Mazzei F., Tomassetti M., Volpe G.: *Food Chem.* **44**, 291 (1992).

J. Tkáč, J. Švitel, and E. Šturdík (*Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*): **Determination by Biosensors of Important Substances in Beverages**

The review summarizes the application of biosensors in the analysis of alcoholic and non-alcoholic beverages. It describes the construction and fundamental characteristics (linearity, detection limit, response time and stability) of biosensors for the determination of ethanol, glucose, saccharose, fructose, glycerol, lactic, malic and oxalic acid, sulfites and phosphates. A comparison of the determination making use of biosensors with reference methods exhibits a very good agreement.