

BIOSENZORY NA STANOVENIE SACHARIDOV

JÁN TKÁČ, JURAJ ŠVITEL a ERNEST ŠTURDÍK

Katedra biochemickej technológie, Chemicko-technologická fakulta, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
e-mail: tkac@chelin.chtf.stuba.sk.

Došlo dňa 22. VI. 1999

Kľúčové slová: biosenzory, monosacharidy, disacharidy, polysacharidy, potraviny

Obsah

1. Úvod
2. Detekcia monosacharidov
 - 2.1. Glukóza
 - 2.2. Fruktóza
 - 2.3. Galaktóza
 - 2.4. Xylóza
3. Analýza sacharidov obsahujúcich glukózu v molekule
 - 3.1. Disacharidy
 - 3.1.1. Sacharóza
 - 3.1.2. Laktóza
 - 3.1.3. Maltóza
 - 3.1.4. Laktulóza
 - 3.2. Polysacharidy
 - 3.2.1. Škrob
 - 3.2.2. Glykogén
 - 3.2.3. Pullulán
4. Stanovenie ďalších sacharidov

1. Úvod

Sacharidy tvoria veľkú skupinu látok (monosacharidy až polysacharidy) a zároveň patria k látkam, ktoré je nutné monitorovať v medicíne (množstvo glukózy v krvi), vo fermentačnom priemysle (najmä on-line monitorovanie procesov), v nápojoch a potravinách ako jeden z najdôležitejších akostných ukazovateľov, ale i ako indikátor šetrnosti spracovania (laktulóza sa prirodzene v mlieku nenachádza, vzniká izomerizáciou laktózy pri vyššej teplote). Koncentrácie cukrov je veľmi dôležité sledovať metódami, ktoré sú rýchle, selektívne, presné, lacné, atď. Týmto nárokom vyhovujú biosenzory, predovšetkým pre skíbenie analytických princípov s výhodami, ktoré poskytuje špecifická interakcie substrát-biologická časť. Biosenzor teda pozostáva z dvoch častí: biologickej a prevodníka. Biologická časť rozpoznáva substrát a táto interakcia sa prostredníctvom prevodníka mení na fyzikálnu veličinu (najčastejšie prúd alebo napätie). Využitím amperometrickej detekcie snímame prúd, ktorý je úmerný koncentrácii stanovovanej látky, v prípade potenciometrickej detekcie je potenciál

úmerný logaritmu koncentrácie analyzovanej látky. Entalpicke biosenzory, nazývané aj termistory, poskytujú univerzálny detekčný princíp, pretože uvoľňovanie, alebo spotreba tepla je typická pre všetky biochemické deje. Biosenzory s optickým prevodníkom fungujú tak, že biokatalyzátor produkuje alebo spotrebúva látku s optickými vlastnosťami a meranie koncentrácie analytu sa prevádza na meranie vhodnej optickej veličiny, napríklad absorpcie, emisie svetla, fluorescencie.

2. Detekcia sacharidov

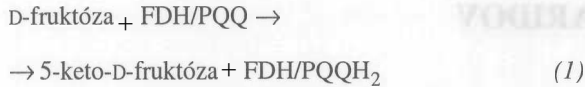
K najdôležitejším monosacharidom z hľadiska monitorovania, či už v potravinách alebo fermentačnom priemysle patria glukóza, fruktóza, galaktóza a xylóza. Glukóza a fruktóza a galaktóza sú hexózy, xylóza s piatimi uhlíkmi v molekule patrí k pentózam.

2.1. Glukóza

Glukóza bola prvým analytom detegovaným biosenzorom¹ a je zároveň najčastejšie stanovovaným analytom, čo možno dokumentovať aj tým, že z 2152 záznamov týkajúcich sa hesla biosensor* pripadá na heslo biosensor* and glucose* 486 záznamov, čo je takmer 23 % (Medline databáza, bez časového obmedzenia). Na tému glukózových biosenzorov bolo publikovaných niekoľko kníh^{2,3}, niekoľko prehľadných článkov, s využitím amperometrickej^{4,5} potenciometrickej^{6,7} a entalpickej detekcie⁸. Nedávno bol publikovaný v Chemických listoch prehľadný článok o optickej detekcii glukózy⁹. Vzhľadom na všetky tieto skutočnosti sa obmedzím len na stručnú charakteristiku glukózových biosenzorov. Na detekciu glukózy sa používajú dva enzýmy: glukózaoxidáza a NAD-dependentná glukóza dehydrogenáza. Najčastejším princípom stanovenia je amperometrická detekcia vznikajúceho peroxidu vodíka, alebo spotreba kyslíka pri oxidácii (11 a 12), pričom prúd tečúci elektródou je úmerný koncentrácii glukózy. Použitím glukóza dehydrogenázy (19) sa musí redukovaný NAD regenerovať použitím enzýmu diaforázy a mediátora (4 a 5) a reoxidáciou mediátora elektródou tečie prúd úmerný koncentrácii glukózy. Okrem amperometrickej detekcie sa používa aj potenciometrická detekcia protónov vznikajúcich oxidáciou glukózy glukóza dehydrogenázou (19) a optická detekcia žiarenia vznikajúceho reakciou luminolu s peroxidom vodíka (13), ktorý je produktom oxidácie glukózy (12). Okrem toho sa glukóza dá stanoviť termistorom, keď sa deteguje teplo vzniknuté oxidáciou glukózy glukózaoxidázou.

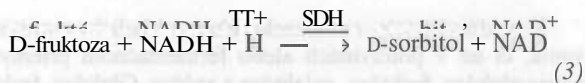
2.2. Fruktóza

Základom stanovenia fruktózy je jej oxidácia pomocou enzýmu fruktóza dehydrogenázy (FDH, EC 1.1.99.11), ktorá obsahuje v molekule naviazaný koenzým pyrrolochinolínchinón (PQQ) podľa rovníc (7) a (2).

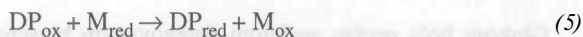


PQQH₂ sa najčastejšie regeneruje hexakvanoželezitanom draselným, ako mediátorom¹⁰, pričom sa na elimináciu kyseliny askorbovej využíva askorbát oxidáza^{11,12}. Fruktózadehydrogenáza bola imobilizovaná aj do fosfolipidovej vrstvy vytvorenej na povrchu zlatej elektrody s následnou ampérometrickou detekciou fruktózy¹³.

Okrem fruktózadehydrogenázy bola na stanovenie fruktózy použitá aj sorbitoldehydrogenáza (SDH, EC 1.1.1.14), ktorá redukuje fruktózu na sorbitol.

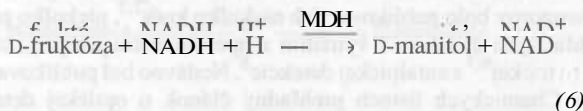


NAD⁺ sa regeneruje prostredníctvom enzýmu diaforázy (DP, EC 1.6.99.-) a mediátora M podľa rovníc (4) a (5).

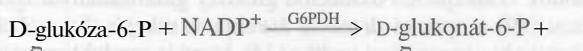
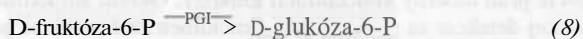
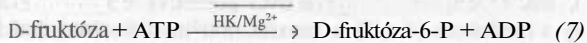


a mediátor sa redukuje na elektróde a prúd tečúci elektródou je úmerný koncentrácii fruktózy.

Fruktóza bola stanovená aj použitím enzýmu manitoldehydrogenázy (MDH, EC 1.1.1.67), podľa rovnice (6).

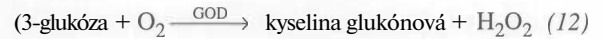
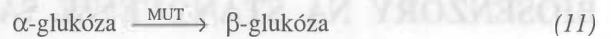


Pri tejto metóde sa fluorimetricky stanoví úbytok NADH počas reakcie, ktorý je priamo úmerný koncentrácii fruktózy vo vzorke¹⁴. Spektrofotometricky sa stanoví fruktóza za prítomnosti enzýmov hexokinázy (HK, EC 2.7.1.1), glukóza-fosfátizomerázy (PGI, EC 5.3.1.9) a glukóza-6-fosfátdehydrogenázy (G6PDH, EC 1.1.1.49) vyjadrená rovnicami (7), (8) a (9).



$\text{NADPH} + \text{H}^+$ (9) hydrogenáza (GDH, EC 1.1.1.47), ktorý je oveľa citlivejší na glukózu, rovnica (75).

Produkcia redukovaného NADP sa stanoví spektrofotometricky pri 340 nm. Izomerizáciou fruktózy glukóza izomerázou (GI, EC 5.3.1.5) dostaneme glukózu (70), ktorá bola stanovená koimobilizáciou glukózaoxidázy (GOD, EC 1.1.3.4) a mutarotázy (MUT, EC 5.1.3.3), podľa rovníc (11) a (72).



Peroxid vodíka reaguje s luminolom za vzniku 3-aminofalátu a svetla (13), ktoré bolo detegované chemiluminiscenčným detektorom¹⁶.

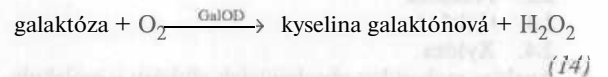


Fruktózový biosenzor bol skonštruovaný adsorpciou *S. cerevisiae* na acetylcelulózoú membránu v spojení s CO₂ detektorom⁴⁰.

Fruktóza bola stanovená v nealkoholických nápojoch^{10,14}, v jablkách a citrónoch¹², pomarančoch, citrónoch, kiwi, jahodách a karfirole¹¹.

2.3. Galaktóza

Galaktóza sa takmer výlučne stanovuje galaktózaoxidázou (GalOD, EC 1.1.3.9), čo je vidieť z rovnice (14), i keď na konštrukciu laktózoového biosenzora bola použitá aj galaktózadehydrogenáza.



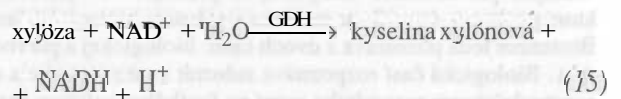
Vznikajúci peroxid vodíka¹⁷, alebo úbytok kyseliny¹⁸ je detegovaný amperometricky. Bol skonštruovaný galaktózoový biosenzor s využitím polymérov (Nafion, Nafion + poly(1,3-diaminobenzén), poly(1,3-diaminobenzén)) na elimináciu interferencií kyseliny askorbovej, močoviny a acetaminofénu, galaktózoový biosenzor na detekciu galaktózy obsahujúcich sacharidov, ako sú laktóza, stachyóza, melibióza a rafinóza⁴⁷, keďže galaktózaoxidáza nie je špecifická len na galaktózu, ale aj mikroelektronický biosenzor s imobilizovanou galaktózaoxidázou v polypyrrole na mikročipe s rozmermi len 16x16 mm (cit.²⁰).

Na detekciu peroxidu vodíka vznikajúceho oxidáciou galaktózy galaktózaoxidázou (14) bol použitý chemiluminiscenčný detektor (13).

Galaktóza bola stanovená v plazme¹⁹, ale aj pri monitorovaní fermentácie rekombinantnej *S. cerevisiae*.

2.4. Xylóza

V literatúre nie je popísaný selektívny biosenzor na stanovenie xylózy. Najej stanovenie sa využíva enzým glukóza-dehydrogenáza (GDH, EC 1.1.1.47), ktorý je oveľa citlivejší na glukózu, rovnica (75).



redukovaný NAD je stanovený spektrofotometricky.

Xylóza bola stanovená mikrobiálne baktériami *Gluconobacter oxydans* za použitia kyslíkovej elektrody²³ a FET-tran-

zistora²⁴, keď interferovali glukóza, glycerol, sorbitol, xylitol, arabitól, xylóza a arabinóza.

3. Analýza sacharidov obsahujúcich glukózu v molekule

Di- a polysacharidy obsahujúce molekulu glukózy sa stanovujú na základe rozštiepenia väzby (väzieb) hydrolázou, ktorou môže byť invertáza (16), β -galaktozidáza (27) a (25), glukoamyláza, alebo α -glukozidáza (23), α -amyláza a P-amyláza (26) a pullulanáza (27) za produkcie glukózy, ktorá sa najčastejšie stanoví glukózaoxidázou (77) a (72) za produkcie peroxidu vodíka a vznikajúci peroxid vodíka, alebo ubúdajúci kyslík sa určí amperometricky.

Takto môžu byť stanovené nielen disacharidy (sacharóza, laktóza, maltóza, atď), ale aj vyššie sacharidy, ako napríklad škrob.

Výnimkou je stanovenie sacharózy termistorom, keď sa deteguje teplo uvoľnené hydrolýzou sacharózy invertázou a nenasleduje už detekcia glukózy.

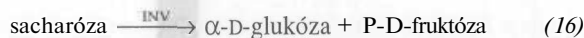
3.1. Disacharidy

K disacharidom obsahujúcim glukózu v molekule patrí: sacharóza (O- α -D-glukopyranozyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fruktofuranóza), laktóza (O- β -D-galaktopyranozyl-(1 \rightarrow 4)-D-glukopyranóza), maltóza (O- α -D-glukopyranozyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopyranóza), atď. Disacharidom je aj laktulóza (4-O- β -D-galaktopyranozyl-D-fruktofuranóza), ktorá sa v mlieku prirodzene nenachádza, ale vzniká v alkalickom roztoku laktózy, alebo zahriatím mlieka izomerizáciou laktózy.

3.1.1. Sacharóza

Sacharóza je najdôležitejšie reprezentant spomedzi disacharidov, nachádzajúca sa v potravinách, nápojoch a vo fermentačných pódach. Stanovenie sacharózy biosenzorom sa realizuje použitím invertázy, ktorá ju hydrolyzuje na fruktózu a glukózu, a tá je následne oxidovaná za produkcie elektrochemicky aktívnych látok (peroxid vodíka, kyslík alebo protóny), ktoré sú detegované na elektróde. V prípade použitia glukózaoxidázy je jej substrátom P-anomérom glukózy a preto je nutné použiť mutarotázu, ktorá premieňa α -formu na P-formu. Použitím mutarotázy dôjde nielen k rýchlejšej odozve, ale aj k zosilneniu signálu, na druhej strane k zúženiu lineárneho rozsahu.

Najčastejšie je sacharóza stanovovaná amperometricky po hydrolýze invertázou (INV, EC 3.2.1.26) na α -glukózu a β -fruktózu, izomerizáciou α -glukózy na β -glukózu mutarotázou (MUT) a oxidáciou β -glukózy glukózaoxidázou (GOD), podľa rovníc (77), (12) a (16).



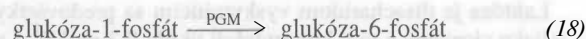
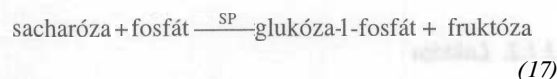
Ubúdajúci kyslík je detegovaný kyslíkovou elektródou²⁹.

Ak stanovujeme sacharózu, väčšinou sa vo vzorkách nachádza aj glukóza, ktorá ovplyvňuje presnosť stanovenia, v prípade konečnej detekcie glukózy uvoľnenej hydrolýzou sacharózy. Tento problém sa dá vyriešiť niekoľkými spôsobmi:

- po stanovení glukózy glukózovým biosenzorom bola do reakčnej sústavy pridaná imobilizovaná invertáza a odči-

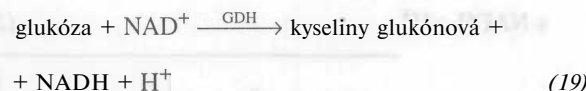
taním týchto dvoch hodnôt určená výsledná koncentrácia sacharózy vo vzorke²⁵,

- glukózu možno eliminovať použitím enzýmov glukózaoxidázy, mutarotázy a katalázy imobilizovaných do anti-inferenčnej vrstvy^{26,27} (obr. 1),
- množstvo glukózy stanovené glukózovým biosenzorom odčítané od hodnoty sacharózy stanovenej sacharózovým biosenzorom je zrejme najpriamočiarejšie riešenie, bez predbežnej úpravy vzorky alebo dodatočného spracovania údajov, poskytuje priamo koncentráciu analytu²⁸,
- enzymatickým odstránením glukózy pred analýzou sacharózy glukózadehydrogenázou,
- zriedením vzorky pri FIA analýze tak, aby glukóza prítomná vo vzorke spôsobovala interferenciu²⁹ do 3 %,
- imobilizáciou troch enzýmov: sacharózafosforylázy (SP, EC 2.4.1.7), fosfoglukomutázy (PGM, EC 5.4.2.2) a glukóza-6-fosfátdehydrogenázy (G6P-DH), konverziou podľa rovníc³⁰ (9), (17) a (18).



Potvrdením poznatku, že prítomnosť mutarotázy zvyšuje citlivosť sacharózového biosenzora niekoľkonásobne je práca, ktorá tiež konštatuje, že použitím dvoch jednoenzýmových membrán je lineárny rozsah širší v dôsledku difúzičných bariér³¹. Imobilizáciou všetkých troch enzýmov na guľičky s kontrolovanou veľkosťou pórov sa podarilo skonštruovať biosenzor s lineárnym rozsahom v rámci 4 rádov³² (0,025-100 mM).

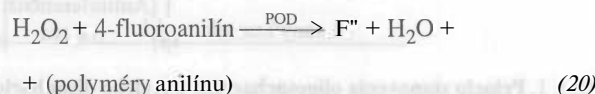
Okrem spomínaných troch enzýmov (GOD, MUT, INV), boli na konštrukciu použité imobilizované enzýmy invertáza (INV) a glukózadehydrogenáza (GDH) s potenciometrickou detekciou (FET-tranzistor) podľa rovnice³⁰ (19), ale aj spektrofotometrickou analýzou redukovaného NAD-u (cit.³³):



Imobilizáciou troch enzýmov: sacharózafosforylázy (SP), fosfoglukomutázy (PGM) a glukóza-6-fosfátdehydrogenázy (G6P-DH) bol tiež skonštruovaný optický biosenzor, pričom bol použitý spektrofotometrický detektor na detekciu redukovaného kofaktora³⁴ (rovnice 9, 17 a 18).

Na detekciu sacharózy bol použitý FET-tranzistor, ktorý detegoval kyselinu glukónovú, vznikajúcu hydrolýzou sacharózy, izomerizáciou α -glukózy na P-glukózu a oxidáciou P-glukózy glukózaoxidázou³⁵ (rovnice 77, 72 a 16).

Velmi zaujímavým princípom je stanovenie sacharózy pomocou fluorid citlivého polovodiča, ktorým sa peroxid vodíka uvoľnený oxidáciou glukózy stanoví peroxidázou (POD, EC 1.11.1.7) (20):



Signál senzora je tak úmerný koncentrácií sacharózy³⁶.

Chemiluminiscenčným detektorom využívajúc reakciu peroxidu vodíka uvoľneného oxidáciou glukózy (73) a (16), bola sacharóza detegovaná FIA systémom (flow injection analysis) ¹⁶.

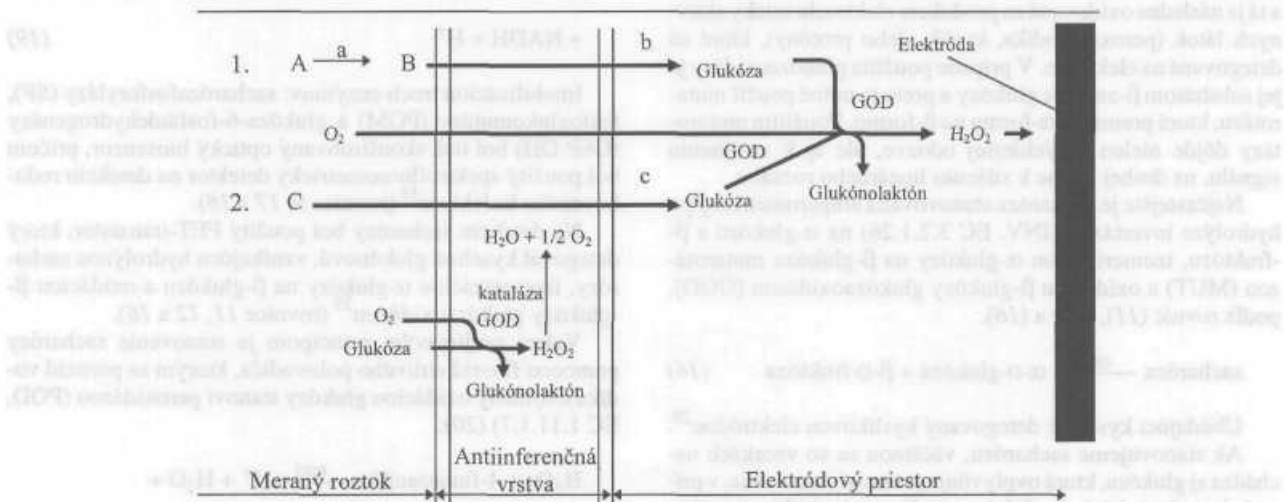
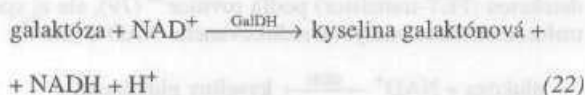
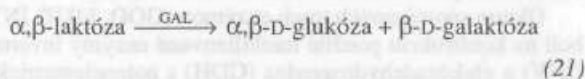
Sacharózový biosenzor bol skonštruovaný imobilizáciou invertázy na porézne sklenené guľičky s detekciou uvoľneného tepla hydrolyzy termistorom ³⁷.

Okrem enzýmových boli skonštruované aj mikrobiálne sacharózové biosenzory s viazaním bunčových stien *Saccharomyces cerevisiae* a glukózaoxidázy ³⁸ a aj bimikrobiálny senzor využívajúci imobilizované baktérie *Gluconobacter oxydans* (glukózadehydrogenázová aktivita) a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (obsah invertázy) ³⁹ s detekciou kyslíkovou elektródou, ale aj imobilizáciu *S. cerevisiae* s použitím CO₂ senzora ⁴⁰.

Sacharózovým biosenzorom boli stanovované rozličné druhy vzoriek, predovšetkým nealkoholické nápoje ^{27,28,33,34,41}, med ^{28,41}, víno i múka ⁴¹ fermentačné médiá s kultiváciou rekombinantnej *E. coli* ³⁵, *S. cerevisiae* ⁴², hydrolyzáty sacharózy ³⁷ atď.

3.1.2. Laktóza

Laktóza je disacharidom vyskytujúcim sa predovšetkým v mlieku cicavcov a to v koncentrácii okolo 0,3 mol.l⁻¹. Laktóza sa dá stanoviť biosenzorom dvomi spôsobmi, jedným z nich je jej hydrolyza β-galaktózidázou (GAL, EC 3.2.1.23), pričom boli publikované práce bez imobilizácie mutarotázy i s jej imobilizáciou a následnou oxidáciou β-D-glukózy, druhým z nich je hydrolyza (3-galaktózidázou (21) a oxidácia galaktózaoxidázou (GalOD) (14) a galaktózadehydrogenázou (GalDH), podľa rovnice (22).



Obr. 1. Princíp stanovenia oligosacharidov (A) alebo disacharidov (C) v prítomnosti glukózy použitím glukózu eliminujúcej vrstvy; a - hydroláza oligosacharidu (v prípade, že A = škrob, tak a = α-amyláza, B = dextrín + maltóza, b = glukoamyláza), c - hydroláza disacharidu, v prípade, že C = laktóza, tak c = β-galaktózidáza), GOD = glukózaoxidáza)

Imobilizáciu β-galaktózidázy a glukózaoxidázy bolo skonštruovaných niekoľko laktózových biosenzorov ^{31,43} ako aj koimobilizáciu mutarotázy ^{44,45,46}. Z rovnice (21) je vidieť, že aj v prípade analýzy laktózy máme podobný problém ako pri stanovení sacharózy vo vzorkách obsahujúcich glukózu v prípade, že koncovým stanovujúcim analytom laktózového biosenzora je glukóza. Tento problém sa dá obísť alebo použitím glukózu eliminujúcej vrstvy s imobilizovanou glukózaoxidázou a katalázou (obr. 1), alebo stanovením laktózy biosenzorom, keďže cieľovou molekulou galaktóza s imobilizovanou galaktózaoxidázou ^{46,47}.

Na simultánne stanovenie laktózy v prítomnosti glukózy bol použitý aj spôsob, ktorý je zreteľný ⁴⁸ z obr. 2.

Okrem použitia glukózaoxidázy bola laktóza stanovená aj potenciometricky imobilizáciou β-galaktózidázy a glukóza-dehydrogenázy (GDH) stanovením protónov vodíka ³⁰ (19) a glukózaoxidázy, keď sa potenciometricky stanovila vznikajúca kyselina glukónová FET-tranzistorom ⁴⁵ (12).

Velmi zaujímavým spôsobom stanovenia laktózy je použitie biosenzora založeného na imobilizácii transportného proteínu laktóza permeázy do dvojvrstvy lipidu, ktorou je pokrytá tenká fólia z kremíka. Transportom laktózy cez membránu sa kotransportujú aj protóny, ktoré spôsobia pokles pH, ktorý je detegovaný fluorescenčne reakciou protónov s farbivom ⁴².

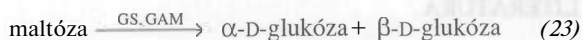
Laktózový biosenzor bol skonštruovaný imobilizáciou β-galaktózidázy a glukózaoxidázy a peroxid vodíka bol detegovaný chemiluminiscenčne po reakcii s luminolom za produkcie 3-aminoftalátu a svetla ^{16,21} (13).

Laktóza môže byť stanovená aj mikrobiálnym senzorom založeným na imobilizácii geneticky manipulovaného kmeňa *E. coli*, s glukózaoxidázou ⁵⁰, ale aj imobilizáciou buniek *Gluconobacter oxydans* spolu s permeabilizovanými kvasinkami *Kluyveromyces marxianus* ⁵⁹ v kombinácii s kyslíkovou elektródou a buniek *S. cerevisiae* s použitím CO₂ detektora ⁴⁰.

Laktóza bola stanovená predovšetkým vo vzorkách mliek, pasterizovaného ^{44,46,51}, odtučneného ^{45,46}, plechovkového ⁴⁶, sušeného ⁴⁴, ale aj v moči ⁵² a pri monitorovaní fermentácie ^{21,29,35,42}.

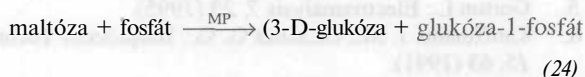
3.1.3. Maltóza

Maltóza je disacharid, ktorý sa voľne v prírode nevyskytuje, vzniká hydrolyzou škrobu, skladá sa z dvoch jednotiek glukózy. Je významná najmä v potravinárstve. Na jej stanovenie sa využíva imobilizácia glukoamylázy (GAM, EC 3.2.1.3) s glukózaoxidázou³¹, α -glukozidázy (GS, EC 3.2.1.20) spolu s glukózaoxidázou^{31,34}, (12 a 23), ale aj koimobilizácia α -glukozidázy (GS) s glukózadehydrogenázou a stanovenie vznikajúcich protónov FET-tranzistorom³⁰ (19) a (23).



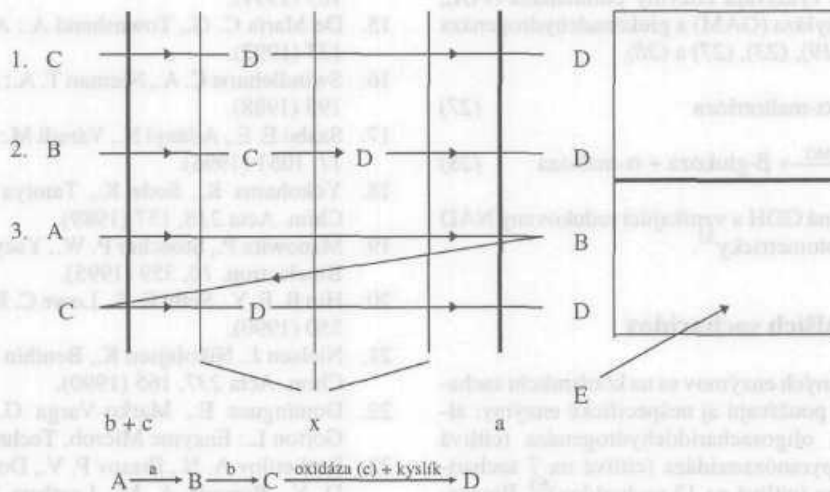
Maltóza môže byť stanovená aj oxidáciou P-D-glukózy glukózaoxidázou za uvoľnenia kyseliny glukónovej, ktorá je potom detegovaná potenciometricky FET-tranzistorom³⁵ (12).

Na stanovenie maltózy bol použitý aj enzým maltózaforyláza (MP) v kombinácii s glukózaoxidázou (11) a (12), ako to ukazuje nasledujúca rovnica:



a peroxid vodíka vznikajúci oxidáciou P-D-glukózy glukózaoxidázou je detegovaný amperometricky na Pt elektróde⁵³. Táto reakcia by sa dala využiť na stanovenie maltózy v prítomnosti glukózy rovnako ako v prípade stanovenia sacharózy sacharózaforylázou, pričom nie je potrebné imobilizovať izomerázu.

Podobne ako v prípade stanovenia sacharózy bola stanovená aj maltóza fluorid citlivým polovodičom imobilizáciou glukoamylázy (23), glukózaoxidázy a peroxidázy³⁶ (12) a (20) a chemiluminiscenčne imobilizáciou glukoamylázy a glukózaoxidázy (12) a (23), keď peroxid vodíka reaguje s luminolom¹⁶ (13).



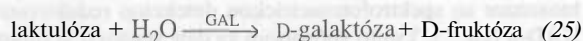
Obr. 2. Simultánne stanovenie sacharózy, laktózy a škrobu v prítomnosti glukózy; A - sacharóza, laktóza, škrob, B - α -D-glukóza, C - β -D-glukóza, D - peroxid vodíka, E - elektróda, a - invertáza, β -galaktozidáza, amyloglukozidáza, b - mutarotáza, c - glukózaoxidáza, x - celulózozá membrána⁵⁰. V prípade, že stanovovanou látkou je sacharóza (prípade 3), tak A = sacharóza, tá je rozštiepená invertázou (a) na α -glukózu (B), ktorá je izomerizovaná na β -glukózu (C) mutarotázou (b). Vznikajúca β -glukóza je oxidovaná glukózaoxidázou (c) na peroxid vodíka (D), ktorý je detegovaný na elektróde. Ak sa vo vzorke spolu so sacharózou nachádza aj glukóza (α -glukóza (prípade 1) alebo β -glukóza (prípade 2)), tá rovno prejde cez membránu a bude cez peroxid vodíka detegovaná. Sacharóza bude detegovaná so spozdením spôsobeným jedným časom potrebným na jej hydrolyzou, ale aj difúziou spôsobenou usporiadaním experimentu

Maltóza bola stanovená aj použitím mikrobiálneho biosenzora adsorpciou *Bacillus subtilis* na filtračný papier za použitia kyslíkovej elektródy⁵⁴ a adsorpciou *S. cerevisiae* na acetylcelulózoú membránu s použitím CO_2 detektora⁴⁰.

Maltózovým biosenzorom bol monitorovaný priebeh fermentácie *E. coli*;³⁵, *B. subtilis*²⁹, *S. cerevisiae*⁴² a pivovarských kvasiniek⁵⁵, i analýza múky, medu, nealkoholických nápojov a vína⁴¹.

3.1.4. Laktulóza

Je disacharidom zloženým z galaktózy a fruktózy. Biosenzorom sa dá stanoviť po hydrolyze β -galaktozidázou (GAL), rovnica (25) a oxidáciou fruktózy fruktózadehydrogenázou (FDH) spolu s mediátorom (hexakvanoželezitan draselný), podľa rovnic (7) a (2).



Redukovaný mediátor je potom oxidovaný na screen-printed elektróde a prúd tečúci elektródou je úmerný koncentrácii laktulózy⁵⁶.

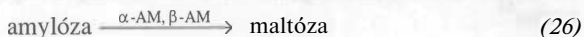
3.2. Polysacharidy

Polysacharidy sa skladajú z väčšieho počtu monosacharidových jednotiek. Najčastejšie sa vyskytujúci polysacharidmi sú celulóza, škrob a glykogén, pričom biosenzormi boli stanovované najmä škrob, glykogén (rozvetvený živočíšny polysacharid) a pullulán.

3.2.1. Škrob

Škrob sa skladá z vo vode rozpustnej zložky amylozy a nerozpustnej zložky amylopektínu. Biosenzorom sa dá sta-

noviť len amylóza. Na jej detekciu sa najčastejšie využíva imobilizácia α -amylázy (α -AM, EC 3.2.1.1), glukoamylázy (GAM), glukózaoxidázy a mutarotázy (11), (12), (23), (26) a detekcia kyslíkovou elektródou^{48,57}, pričom v práci Watanabeho⁴⁸ bol škrob stanovený simultánne spolu s glukózou podľa obr. 2.



Koimobilizáciou troch enzýmov β -amylázy (β -AM, EC 3.2.1.2), glukoamylázy a glukózaoxidázy, s detekciou vznikajúceho peroxidu vodíka s 4-fluoroanilínom³⁶ fluorid citlivým polovodičom bol tiež pripravený biosenzor na stanovenie škrobu, pozri rovnicu (20).

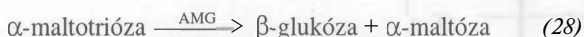
Imobilizáciou α -amylázy, glukoamylázy, glukózadehydrogenázy s mutarotázou (77), (79), (23), (26) bol pripravený biosenzor so spektrofotometrickou detekciou redukovaného NAD-u (cit.⁵⁸). Týmto spôsobom sa dajú stanoviť aj oligosacharidy a maltóza.

3.2.2. Glykogén

Glykogén je polysacharid skladajúci sa z rozvetvených jednotiek glukóz usporiadaných 1 \rightarrow 4 a 1 \rightarrow 6 väzbami. Na jeho stanovenie sa využíva hydrolýza α -amylázou na oligosacharidy a maltózu (26) a ich hydrolýza na glukózu glukoamylázou (23). Vznikajúca glukóza bola stanovená glukózadehydrogenázou imobilizovanou s mutarotázou (77) a (19) a stanovený bol redukovaný NAD spektrofotometricky⁵⁹.

3.2.3. Pullulán

Je polymérom obsahujúcim maltotriózové jednotky spojené α -1,6-glykozidickými väzbami. Tento polysacharid vzniká asimiláciou glukózy kvasinkami *Aureobasidium pullulans* a na jeho detekciu sa využívajú enzýmy pullulanáza (PUL, EC 3.2.1.41), glukoamyláza (GAM) a glukózadehydrogenáza (GDH) podľa rovnic (79), (23), (27) a (28).



a β -glukóza je stanovená GDH a vznikajúci redukovaný NAD je stanovený spektrofotometricky³³.

4. Stanovenie ďalších sacharidov

Okrem už spomínaných enzýmov sa na konštrukciu sacharidových biosenzorov používajú aj nespecifické enzýmy: aldozadehydrogenáza⁶⁰, oligosachariddehydrogenáza (citlivá na 16 sacharidov)⁶¹, pyranózaoxidáza (citlivá na 7 sacharidov)⁶² a hexózaoxidáza (citlivá na 13 sacharidov)⁶³. Biosenzor skonštruovaný imobilizáciou takéhoto enzýmu je vhodný na stanovenie sacharidov v komplexných vzorkách, kde sa ako výsledok požaduje celkové množstvo sacharidov, prípadne utilizovateľných sacharidov. Príkladmi ich využitia by boli analýza lignocelulózového hydrolyzáta, hydrolyzátoz škrobu, obilnín atď.

Ďalší spôsob využitia biosenzorov s nespecifickými enzy-

mami je ich spojenie s kvapalinovou chromatografiou, keď sa pomocou HPLC jednotlivé sacharidy rozseparujú s detegujú biosenzorom ako detektorom. Takýmto spôsobom bol skonštruovaný systém pozostávajúci z kvapalinovej chromatografie a biosenzora ako detektora s imobilizovanou pyranóza oxidázou (*Phanerochaete chrysosporium*) spolu s peroxidázou na detekciu glukózy, xylózy a galaktózy počas fermentácie *Pichiapastoris*⁶⁴.

LITERATURA

- Clark L. C., Lyons C.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 702, 29 (1962).
- Turner A. P. F., Karube I.: *Biosensors. Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, Oxford 1987.
- Scheller F., Schubert F.: *Biosensoren*. Birkhäuser Verlag, Berlin 1989.
- Heller A.: Curr. Opin. Biotechnol. 7, 50 (1996).
- Gorton L.: Electroanalysis 7, 23 (1995).
- Kauffmann J. M., Guibault G. G.: Bioprocess Technol. 75, 63 (1991).
- Efremenko V. I., Stolbin S. V., Grekov L. I.: Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 26, 11 (1990).
- Danielsson B.: J. Biotechnol. 15, 187 (1990).
- Chudobová I., Vrbová E.: Chem. Listy 90, 295 (1996).
- Xie X., Kuan S. S., Guibault G. G.: Biosens. Bioelectron. (5,49)(1991).
- Matsumoto K., Baeza J. J., Mottola H. A.: Anal. Chem. 65, 1658 (1993).
- Ikeda T., Matsushita F., Senda M.: Biosens. Bioelectron. 6,299(1991).
- Kinnear K. T., Monbouquette G.: Anal. Chem. 69, 1771 (1997).
- Kiba N., Inoue Y., Furusawa M.: Anal. Chim. Acta 243, 183(1991).
- De María C. G., Townshend A.: Anal. Chim. Acta 267, 137 (1992).
- Swindlehurst C. A., Nieman T. A.: Anal. Chim. Acta 205, 195 (1988).
- Szabó E. E., Adányi N., Váradi M.: Biosens. Bioelectron. 77, 1051 (1996).
- Yokohama K., Sode K., Tamiya E., Karube I.: Anal. Chim. Acta 278, 137 (1989).
- Manowitz P., Stoecker P. W., Yacynych A. M.: Biosens. Bioelectron. 10, 359 (1995).
- Hin B. F. Y., Sethi R. S., Lowe C. R.: Sens. Actuators B1, 550 (1990).
- Nielsen J., Nikolajsen K., Benthin S., Villadsen J.: Anal. Chim. Acta 237, 165(1990).
- Domínguez E., Marko-Varga G., Hahn-Hägerdal B., Gorton L.: Enzyme Microb. Technol. 16, 216 (1994).
- Reshetilov A. N., Iliasov P. V., Donova M. V., Dovbnaya D. V., Boronin A. M., Leathers T. D., Greene R. V.: Biosens. Bioelectron. 72, 241 (1997).
- Reshetilov A. N., Donova M. V., Dovbnaya D. V., Boronin A. M., Leathers T. D., Greene R. V.: Biosens. Bioelectron. 77, 401 (1996).
- Scheller F., Karsten Ch.: Anal. Chim. Acta 155, 29 (1983).
- Olsson B., Stalbm B., Johansson G.: Anal. Chim. Acta 779,203(1986).

27. Matsumoto K., Kamikado H., Matsubara H., Osajima Y.: *Anal. Chem.* **60**, 147 (1988).
28. Xu Y., Guibault G. G.: *Anal. Chem.* **61**, 782 (1989).
29. Schgerl K., Brandes L., Dullau T., Holzhauer-Rieger K., Hotop S., Hbner U., Wu X., Zhou W.: *Anal. Chim. Acta* **249**, 87 (1991).
30. Kullick T., Beyer M., Henning J., Lerch T., Quack R., Zeitz A., Hitzmann B., Scheper T., Schgerl K.: *Anal. Chim. Acta* **296**, 263 (1994).
31. Filipiak M., Fludra K., Gocimiska E.: *Biosens. Bioelectron.* **11**, 355 (1996).
32. Leite V., Leao I. C., de Vasconcelos G. F. V., Pimentel M. C. B., Silva V. L., Melo E. H. M., Filho J. L. L.: *Biotechnol. Tech.* **9**, 345 (1995).
33. Ogbomo I., Kittsteiner-Eberle R., Englbrecht U., Prinzing U., Danzer J., Schmidt H.-L.: *Anal. Chim. Acta* **249**, 137 (1991).
34. Kogure M., Mori H., Arika H., Kojima Ch., Yamamoto H.: *Anal. Chim. Acta* **337**, 107 (1997).
35. Schgerl K., Brandes L., Wu X., Bode J., Ree J. L., Brandt J., Hitzmann B.: *Anal. Chim. Acta* **279**, 3 (1993).
36. Menzel C., Lerch T., Scheper T., Schgerl K.: *Anal. Chim. Acta* **317**, 259 (1995).
37. Mandelius C. F., Blow L., Danielsson B., Mosbach K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 135 (1985).
38. Barliková A., Švorc J., Miertuš S.: *Anal. Chim. Acta* **247**, 83 (1991).
39. Švitel J., Čurilla O., Tkáč J.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* **27**, 153 (1998).
40. Mascini M., Memoli A.: *Anal. Chim. Acta* **182**, 113 (1986).
41. Tzouwara-Karayanni S., Crouch S. R.: *Food Chem.* **35**, 109 (1990).
42. Kullick T., Bock U., Schubert J., Scheper T., Schgerl K.: *Anal. Chim. Acta* **300**, 25 (1995).
43. Albery W. J., Kalia Y. N., Magner E.: *J. Electroanal. Chem.* **325**, 83 (1992).
44. Narinesingh D., Stoute V. A., Davis G., Ngo T. T.: *Anal. Biochem.* **194**, 16 (1991).
45. Puchades R., Maquieira A., Torró L.: *Analyst* **118**, 855 (1993).
46. Hamid J. A., Moody G. J., Thomas J. D. R.: *Analyst* **114**, 1587 (1989).
47. Schumacher D., Vogel J., Lerche U.: *Biosens. Bioelectron.* **9**, 85 (1994).
48. Watanabe E., Takagi M., Takei S.: *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 99 (1991).
49. Kiefer H., Klee B., John E., Stierhof Y. D., Jähnig F.: *Biosens. Bioelectron.* **6**, 233 (1991).
50. Švorc J., Miertuš S., Barliková A.: *Anal. Chem.* **62**, 1628 (1990).
51. Tkáč J., Švitel J.: *Bull. Potr. Výskumu* **36**, 113 (1997).
52. Pfeiffer D., Ralis E. V., Makower A., Scheller F. W.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **49**, 255 (1990).
53. Hwel S., Haalck L., Conrath N., Spener F.: *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 413 (1997).
54. Renneberg R., Riedel K., Liebs P., Scheller F.: *Anal. Lett.* **17**, 349 (1984).
55. Váradí M., Adányi N., Nagy G., Rezessy-Szabó J.: *Biosens. Bioelectron.* **8**, 339 (1993).
56. Mayer M., Genrich M., Knecke W., Bilitewski U.: *Anal. Chim. Acta* **324**, 37 (1996).
57. Vrbová E., Pecková J., Marek M.: *Starch* **45**, 341 (1993).
58. Emnéus J., Gorton L.: *Anal. Chim. Acta* **276**, 303 (1993).
59. Emnéus J., Gorton L.: *Anal. Chim. Acta* **276**, 319 (1993).
60. Smolander M.: *Anal. Chim. Acta* **280**, 119 (1993).
61. Tessema M., Ruzgas T., Gorton L., Ikeda T.: *Anal. Chim. Acta* **310**, 161 (1995).
62. Petivalský M., Skládál P., Macholán L., Volc J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **59**, 1226 (1994).
63. Maes P. C., Nagels L. J.: *Anal. Chim. Acta* **284**, 281 (1993).
64. Buttler T., Lidén H., Jansson J. A., Gorton L., Marko-Vargha G., Jeppson H.: *Anal. Chim. Acta* **324**, 103 (1996).

J. Tkáč, J. Švitel, and E. Šturdík (*Department of Biochemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*): **Biosensors in the Determination of Saccharides**

The article presents a survey of biosensors applied in the determination of selected monosaccharides (glucose, fructose, galactose and xylose), disaccharides (saccharose, lactose, maltose and lactulose) and polysaccharides (starch, glycogen and pullulane). A concise description of constructional details of a biosensor is included: connection of the biological part to the physicochemical transducer. The enzyme systems used in detection of saccharides are described in detail. Attention was directed to the application of oxidative enzymes (oxidase or dehydrogenase) in detecting monosaccharides, further to the construction of multienzyme biosensors for the detection of di- and polysaccharides and to practical applications of biosensors mainly in food analysis.