

Dihidroxi-aceton mérése bioszenzorral

Szabó Erika, Adányiné Kisbocskói Nóra, Váradi Mária

Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, Budapest

Érkezett: 1994. július 4.

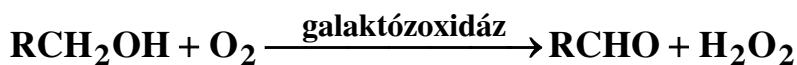
A dihidroxi-acetont (DHA) az élelmiszeripar mint aromafokozót és antioxidánst használja fel, a kozmetikai ipar pedig, mint mesterséges barnító szert. Meghatározására több módszer ismert. Az egyik legelterjedtebb módszer a Schoorl-féle redukáló cukor meghatározás, melynél alkalmazott reakció azonban nem szelektív. A vékonyréteg kromatográfiás eljárás a DHA kvalitatív meghatározására alkalmas. Gázkromatográfiás és folyadékkromatográfiás meghatározással mind kvalitatív, mind pedig kvantitatív elemzések végezhetőek. Rutin analitikai célokra az enzim-tesztcsomagot alkalmazzák leginkább. Ezek a módszerek azonban drágák, munka- és időigényesek.

Célul tűztük ki gyors, rutin módszer kidolgozását a DHA meghatározására, amely mind sorozatmérések elvégzésére, mind fermentációs folyamatok nyomon-követésére alkalmas.

Az utóbbi években a rögzített enzimek analitikai alkalmazása új lehetőségeket nyitott. Előtérbe kerültek a bioszenzor kutatások és alkalmazások (Scheller, Schubert, 1992).

A Központi Élelmiszeripari Kutató Intézetben már több éve foglalkozunk bioszenzorok kutatásával. Az elmúlt években gyümölcslevekből glükóz (Váradi és mtsai. 1994), fermentléből maltóz (Váradi és mtsai. 1993) és különböző típusú sörmintákból alkohol meghatározására alkalmas enzimcellát fejlesztettünk ki. Jelen kutatásaink a galaktóoxidáz enzim alkalmazásán alapuló szenzorok kifejlesztésére irányulnak.

A galaktóoxidáz (EC.1.1.3.9.) a széles specifitású enzimek közé tartozik. Az általa katalizált reakció során a szubsztráton lévő primer alkohol csoport aldehid csoporttá alakul, miközben H_2O_2 keletkezik az alábbi reakció szerint:



Az enzim szubsztrátja a galaktóz és a galaktóz tartalmú szénhidrátokon kívül az aceton, dihidroxi-aceton, glicerin és a gliceraldehid lehet.

A galaktóoxidáz által katalizált oxidáció mechanizmusa nem teljesen ismert folyamat. Whittaker (1988) azonosított egy nem

fém tartalmú, aminosavakat tartalmazó gyököt az enzimből. Véleménye szerint ez az enzimgyök az enzimből a Cu II - Cu I átalakulást katalizálja.

Schumacher és mtsai. (1994) galaktóz-szenzorral galaktóz, laktóz, melibióz, raffinóz, keményítő és dihidroxi-aceton méréséről számoltak be. Az általuk készített galaktóz mérő bioszenzorral, melynél platina elektródon rögzítették a két féligáteresztő membrán közé zárt galaktóz-oxidázt, a dihidroxi-acetonra kapták a legnagyobb látszólagos aktivitás értéket (mintegy 5,99-szer nagyobbat, mint galaktóz esetén).

Lundbäck és Olsson (1985) rögzített enzimmel töltött oszloppal elemezték a dihidroxi-aceton mérésének lehetőségét. Vizsgálataik során tanulmányozták a galaktóz, raffinóz és dihidroxi-aceton szubsztrát hatására kapott amperometriás jel nagyságát.

Jelen közleményünkben az ún. vékonyréteg enzimműcellán alapuló DHA mérésre alkalmas bioszenzor kifejlesztéséről számolunk be.

Felhasznált anyagok és eszközök

Anyagok

Galaktózoxidáz (EC. 1.1.3.9., 110 unit/mg liofilizált por) (Sigma)
A többi vegyszer kereskedelemből kapható, a.l.t. tisztaságú volt.

A DHA mérő enzimműcella felépítése

Mérőrendszerünk kialakításakor Váradi és mtsai (1993) által publikált maltózmérő bioszenzort vettük alapul.

A puffertároló edényből a megfelelő összetételű és pH-jú puffert műanyag csővezetékén keresztül perisztaltikus pumpa (Minipuls 3, Gilson) továbbította a vékonyrétegcellába, melyben kifeszített fehérjemembránon (sertésvékonybél) glutáraldehiddel rögzítettük a szükséges mennyiségű galaktóz-oxidáz enzimet. Az enzimműreakcióhoz szükséges hőmérsékletet termosztát biztosította. A standardokat és a fermentleveket egy 20 µl-es mintahurokkal rendelkező injektoron (Rheodyne) keresztül juttattuk a rendszerbe. Az enzimműreakció során termelődő H₂O₂ mennyiségét amperometriás cellával - mely egy Pt-szál mérőelektródból, Ag/AgCl referencia elektródból és Pt-cső segédelektródból állt - határoztuk meg. Az itt kapott amperometriás áram nagyságát polarográf (Universal Polarograph OH-105, Radelkis) mérte és regisztrálta.

Referencia módszerként a DHA-t glicerinkinázzal ATP jelenlétében reagáltatva NADH fotometriás mérésére visszavezetve határoztuk meg 340 nm-en (Glicerín UV-tesztcsomag, Boehringer, UV-VIS fotométer, Pye Unicam SP6-550).

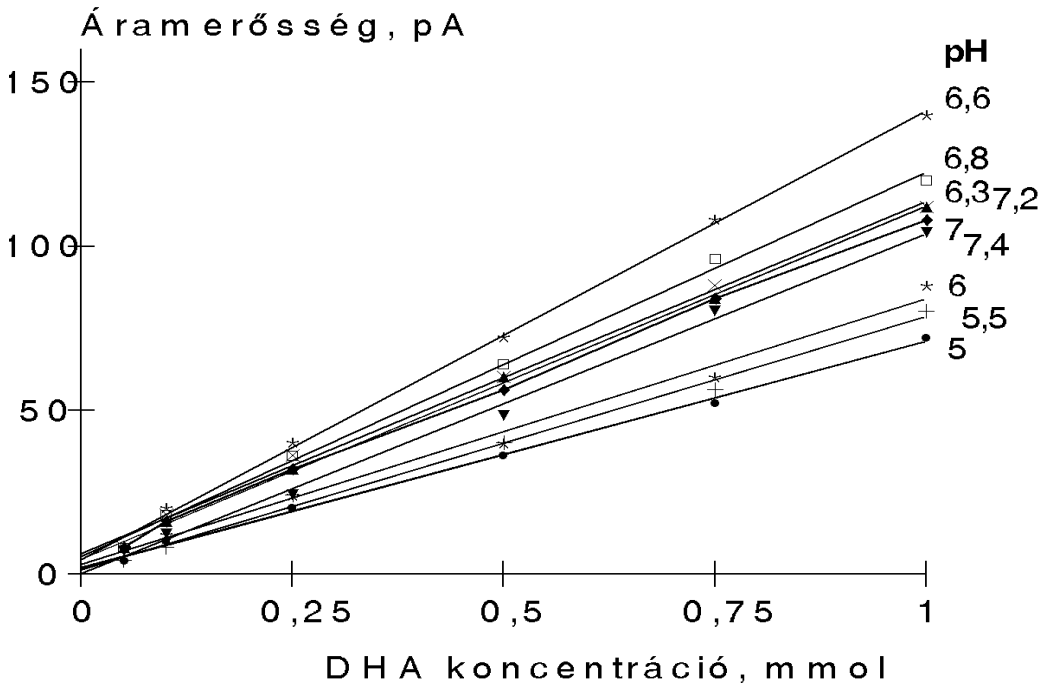
EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

1. A DHA mérés optimalizálása

1.1 Puffer pH-jának hatása a DHA mérésre

Az optimális pH kiválasztásához Michaelis-féle foszfát pufferből készítettünk különböző pH-jú pufferoldatokat (Analitikai kézikönyv, 1987). A méréseket 5,0; 5,5; 6,0; 6,3; 6,6; 6,8; 7,0; 7,2; 7,4 pH-jú oldatokkal végeztük.

A kísérletekhez 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 mmol koncentrációjú DHA standardokat használtunk, az áramlási sebességet 0,31 ml/perc-re a termosztát hőmérsékletét pedig 30°C-ra állítottuk be.



1. ábra: Az amperometriás jel pH függése

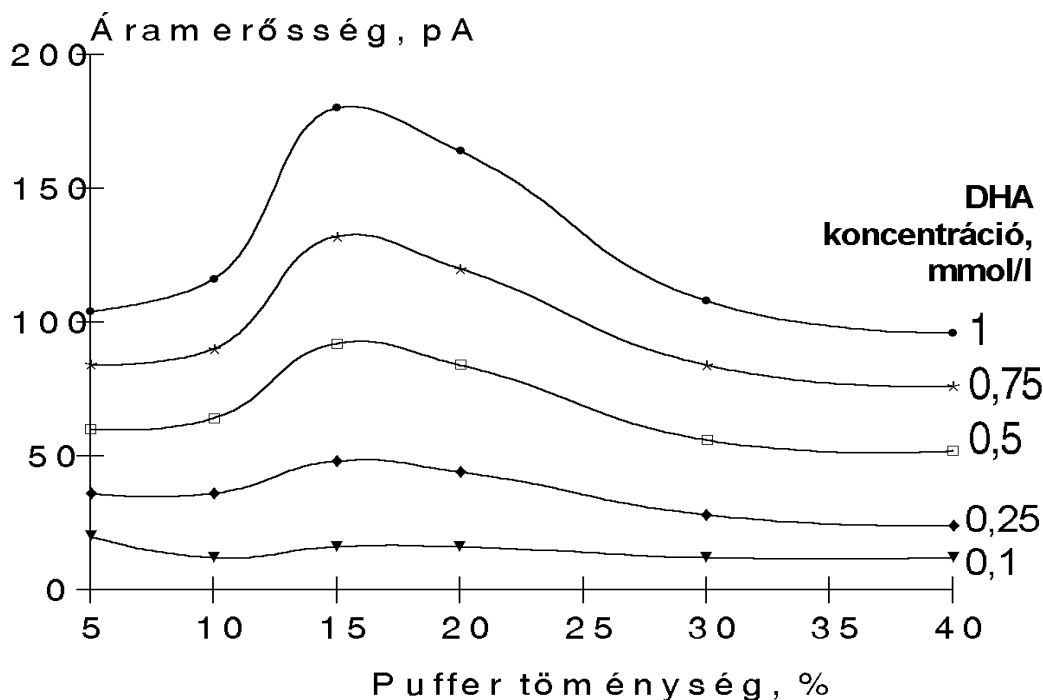
Az 1. ábrán látható, hogy 5,0; 5,5 és 6,0-os pH-jú pufferoldatok alkalmazásakor valamennyi standard esetén igen kicsi amperometriás jeleket kaptunk. 6,3 pH-tól a kapott amperometriás jelek nagysága növekszik, majd 6,8-as pH-tól ismételt csökkenés tapasztalható. Az amperometriás jel nagysága, és a standardok közötti linearitás a 6,6 pH-jú foszfát puffer használata során volt a legjobb (a 6,6-os pH-jú Michaelis puffer 5,442 g/l KH_2PO_4 -et és 4,752 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -t tartalmazott).

1.2. Pufferkoncentráció hatása a DHA mérésre

A rendszer működését befolyásoló tényezők közül a puffer koncentráció hatásának vizsgálatát indokoltnak tartottuk, mivel ez befolyásolhatja az enzim aktivitását és hatást gyakorolhat az amperometriás mérésekre is.

A vizsgálatokhoz 10-szeres töménységű, 6,6-os pH-jú Michaelis-féle foszfát puffert készítettünk, melyből 5, 10, 15, 20, 30, 40 %-os puffer oldatokat hígítva végeztük a kísérleteket. Az oldatok pH-ját minden esetben 6,6-ra állítottuk be. Az áramlási sebesség 0,31 ml/perc, a hőmérséklet 30 °C volt. Az amperometriás jeleket 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; mmol koncentrációjú DHA standardokat használva mértük.

A 2. ábrán megfigyelhető, hogy az 5-10 és 30-40 %-os foszfát puffert alkalmazva az amperometriás jelek igen kicsik. A jelek nagysága 10-30 %-os puffer koncentráció között jelentősen nőtt. Az amperometriás jel a legmagasabb értékét 15 %-os pufferkoncentrációnál érte el, és itt a standardok közötti linearitás is megfelelő.



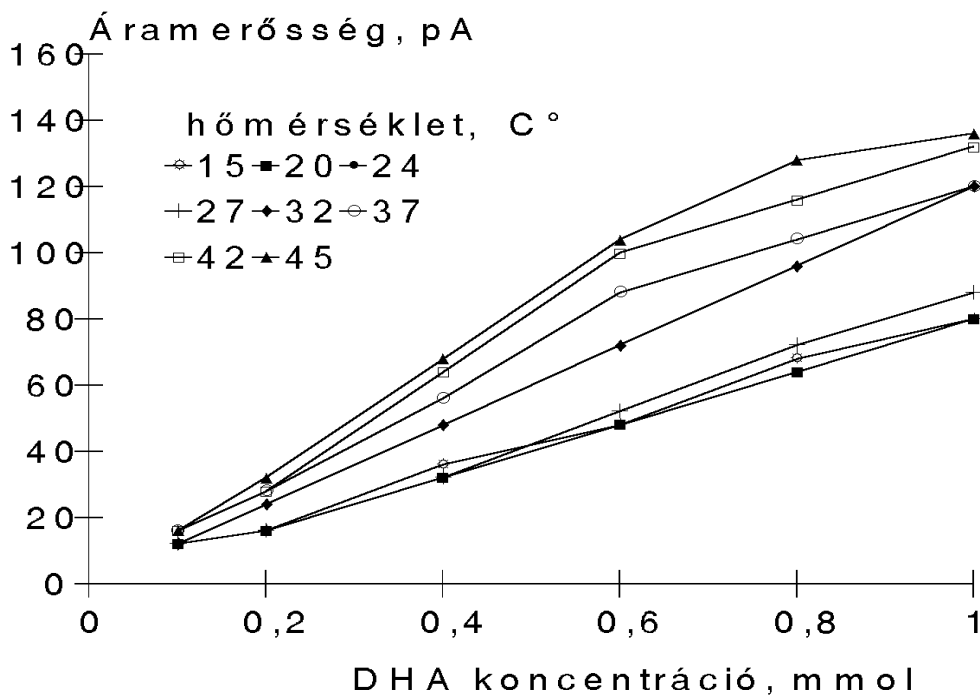
2. ábra: Az amperometriás jel függése a foszfát puffer koncentrációjától

1.3. Hőmérséklet hatása a DHA mérésre

A hőmérséklet enzimcellára gyakorolt hatásának vizsgálatát az enzimreakció hőmérsékletfüggése tette indokolttá. A vizsgálatokat a következő hőmérsékleteken végeztük el: 15; 20; 24; 27; 32; 37; 42; 45°C. A mérésekhez 0,31 ml/perc áramlási sebességet és 6,6-os pH-jú foszfát puffert használtunk, melynek koncentrációja 15 % volt. Az optimális enzimműködéshez szükséges hőmérséklet érték kiválasztásához 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mmol koncentrációjú DHA standardokat injektáltunk a rendszerbe. A hőmérsékleti határok kiválasztásakor szem előtt kellett tartanunk, hogy a 45°C feletti hőmérséklet az enzim inaktiválódásához vezethet.

Az elvégzett kísérletek során az amperometriás jel maximális értékét 32 és 45°C között érte el (3. ábra). 37, 42 és 45°C hőmérsékleteken

azonban a jel csak 0,6 mmol DHA standard koncentrációig lineáris, 0,8 és 1,0 mmol DHA koncentrációnál már telítési görbéhez hasonlóan letörik. Ezért választásunk a 32°C-ra esett, ahol a standardok közötti linearitás is megfelelő. A vékonyrétegcella 32°C-on való temperálását indokolja az is, hogy ezen a hőmérsékleten kevésbé kell számolnunk a pufferoldat buborékosodásával és az enzimefehérjék inaktiválódásával.



3. ábra: Az amperometriás jel hőmérsékletfüggése

1.4. Az áramlási sebesség optimalizálása

Az optimális áramlási sebesség meghatározását a következő áramlási sebességértékek beállítása mellett végeztük el: 0,25; 0,31; 0,36; 0,42; 0,48; 0,54; 0,59 ml/perc. Minden sebesség értéknél 3 standard (0,50; 0,75; 1,00 mmol koncentrációjú) injektálásakor mértük az amperometriás jel nagyságát.

Az optimális áramlási sebesség kiválasztásakor figyelembe kellett vennünk, hogy lassúbb áramlás esetén a minta több időt tölt a cellában, több enzim-szubsztrát átalakulásra van lehetőség. Nagyobb amperometriás jeleket kaptunk, amelyek szélesek és lassú lefutásúak voltak, emiatt az óránként mérhető minták száma is igen kevés (10-15). Ezzel szemben a túlságosan nagy áramlási sebességnél az enzim-szubsztrát kapcsolat létrejöttének, a termék keletkezésének valószínűsége az igen rövid tartózkodási idő miatt csökken, az enzim lemosódása a vékonyrétegről megnőhet. Az így kapott amperometriás jelek kicsik, a csúcsok keskenyek, határozott lefutásúak, ezáltal több minta elemzésére nyílik lehetőség.

Méréseink során arra törekedtünk, hogy a kapott jel nagysága és az óránként injektálható minták száma egyaránt optimális legyen. Ezeket a követelményeket figyelembe véve a 0,36 ml/perc áramlási sebességnél kaptunk megfelelő értékeket. (30 minta/óra).

1.5. Mikroelemek hatása a DHA mérésére

Egyes általánosan létfontosságúnak és élettanilag kedvezőnek tekintett mikroelemek hatást gyakorolhatnak a galaktóoxidáz enzimre és annak működésére, ezáltal befolyásolhatják a kapott eredményeket.

A méréseket az optimálisnak talált körülmények között végeztük el. A pufferhez egyenként 0,1 mg/l koncentrációban Co II; Zn II; Cu II; Ca II; Mn II; Sn IV; Fe III; Mo VI; Mg II; Se II sókat adtunk és mértük a DHA standardsor injektálásakor kapott amperometriás jelek nagyságát. A Fe; Mg és a Se esetében enzimaktivitást növelő, míg a Co; Zn; Ca és a Mn esetén enzimaktivitást csökkentő hatást tapasztaltunk.

A továbbiakban vizsgáltuk, hogy a Fe-t; Mg-ot és a Se-t különböző koncentrációban, illetve ezeket kombinálva adva a foszfát-pufferhez hogyan befolyásolják a kapott jel nagyságát. Eredményeink alapján a legnagyobb jelet akkor kaptuk, amikor 0,1 mg/l Se-t és 0,1 mg/l Mg-t együttesen adtunk a pufferoldathoz. Az így kapott amperometriás jelek nagysága meghaladja azokat az értékeket, amelyeket akkor kaptunk, amikor a két fém hatását külön-külön vizsgáltuk.

2. A DHA mérés statisztikai értékelése

Stabilitás vizsgálatot végeztünk, hogy az optimálisnak talált paramétereket alkalmazva megállapítsuk, az 1,0 mmol-os standardot többször egymás után injektálva hogyan változik az amperometriás jel nagysága a foszfát puffert, illetve a mikroelemekkel (0,1 mg/l Mg és 0,1 mg/l Se) kiegészített puffert alkalmazva. A kapott eredményeket az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: Az amperometriás jel nagyságának és szórásának változása a pufferhez adott mikroelemek hatására.

	Mintaszám m	Átlag, (pA)	Szórás, (pA)	Százalékos szórás (%)
Foszfát puffer	11	31,86	0,96	3,01
Foszfát puffer + Mg + Se	17	37,59	0,66	1,76

Megállapítható, hogy a 0,1 mg/l Se-t és a Mg-ot tartalmazó pufferoldat nemcsak az amperometriás jel nagyságát, hanem a cella stabilitását is megnöveli.

Az általunk készített vékonyrétegcellák kb. 1000 minta mérésére voltak alkalmasak, ez idő alatt az aktivitásuk az eredetinek mintegy 40 %-ára csökkent. Standard oldatok rendszeres mérésével azonban az ebből eredő hiba kiküszöbölhető.

3. Galaktóoxidáz cella aktivitása egyéb szénhidrátokkal szemben

Mint azt a bevezetésben említettük, a galaktóoxidáz enzim széles specificitású enzim, nem szelektív a DHA-ra. Ezért az optimális paraméterek beállítása után azt vizsgáltuk, hogy a különböző szénhidrátokat milyen aktivitással bontja a galaktóoxidáz enzim.

A vizsgálatokhoz a következő szénhidrátokból - galaktóz, laktóz, raffinóz, glicerín - készített 0,50 mmol és 1,00 mmol-t tartalmazó standard oldatokat alkalmaztunk.

Méréseink során a DHA konverzióját 100 %-nak tekintettük, és a további szubsztrátok aktivitását ehhez viszonyítottuk. Kísérleteink alapján a galaktóz aktivitása 23,3 %, a laktózé 4,7 %, a raffinózé 15,8 % és a gliceriné 1,6 % volt. Ennek alapján megállapítható, hogy a DHA mérést a galaktóz jelentősen befolyásolná, továbbá a laktóz és raffinóz is zavaró hatást okozhat, a vizsgált fermentációban azonban a szóban forgó szénhidrátok nincsenek jelen a fermentlében.

4. DHA fermentációs minták mérése bioszenzorral

Az optimális paraméterek megállapítása után a szenzort alkalmaztuk a KÉKI Biomérnöki Osztályán folyó *Gluconobacter oxidans* fermentációja során termelődő dihidroxi-aceton meghatározására.

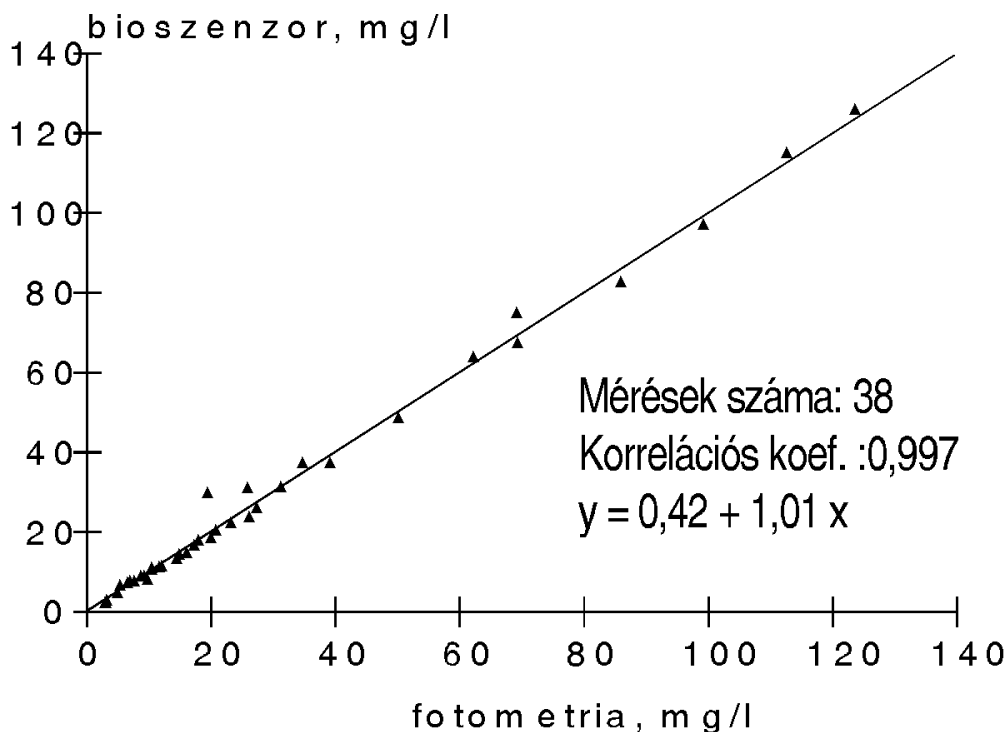
A *Gluconobacter oxidans* törzsek képesek különböző vegyületek parciális oxidációjára. A szorbitból szorbózt, glükózból glükonsavat, etanolból ecetsavat, glicerínből dihidroxi-acetont fermentálnak. Ez utóbbi tulajdonságát felhasználva fejlesztették ki a glicerínből fermentációs úton megvalósuló dihidroxi-aceton előállítását (Vereckey és mtsai, 1993).

A DHA fermentáció két lépésben történt. Az első lépésben direkt fermentációval előállították a szükséges sejttömeget. A második fermentációs lépésben a nem szaporodó sejttömeg, mint glicerindehidrogenáz enzimhordozó segíti a kívánt reakciót. A szubsztrátgátlás kiküszöbölése céljából a második fermentációs lépcsőt rátáplálásos technikával végezték.

A biomassa előállításánál ATCC 621 *Gluconobacter oxidans* törzset használtak fel. A tápoldat 5% glicerínből, 0,5% élesztőextraktból, 0,1% KH_2PO_4 -ből készült.

A bioszenzoros mérésekhez a fermentáció második lépcsőjének tizedik órájától vettünk mintákat. Ez esetben ugyanis már nem kellett számolnunk a glicerín zavaró hatásával. A minták DHA tartalmát enzimes-fotometriás módszerrel is megvizsgáltuk. Eredményeink a

4. ábrán láthatók. 38 fermentációs mintát megmérve, a két mérés összehasonlításakor 0,997-es korrelációt kaptunk. Ez az érték azt jelzi, hogy a bioszenzoros mérés a fotometriás mérésekkel jól egyező eredményeket adott, tehát alkalmas annak kiváltására.



3. ábra: A bioszenzoros és az enzimes fotometriás mérési eredmények összehasonlítása

IRODALOM

- Analitikai kézikönyv, (1987) Főszerk.:Pungor E. Műszaki Könyvkiadó, Budapest.
- Lundbäck, H., Olsson, B. (1985): Amperometric determination of galactose, lactose and dihidroxi-acetone using galactose oxidase in a flow injection system with immobilized enzyme reactors and on-line dialysis. *J. Analytical Letters*, **18**(B7), 971-889.
- Scheller, F., Schubert, F. (1992): Biosensors, Elsevier Science Publishing Co.
- Schumacher, D., Vogel, J., Lerche, U. (1994): Construction and applications of an enzyme electrode for determination of galactose and galactose-containing saccharides. *J. Biosensors & Bioelectronics* **9**, 85-90.
- Váradí, M., Adányi, N., Nagy, G., Rezessy-Szabó, J. (1993): Studying the bienzyme reactor with amperometric detector for measuring maltose. *J. Biosensors & Bioelectronics*, **8**, 339-345.
- Váradí, M., Adányi, N., Szabó, E. (1994): New types of sensors for food industry. International Physical Conference on Foods, Budapest, 1994. május 24-28, Proceeding, in press
- Vereckey, G., Rezessy-Szabó, J., Hoschke, Á.(1993): Partial oxidation with *Gluconobacter oxidans* strain in feed-batch fermentation. *Acta Alimentaria*, **22**, 77-78.
- Whittaker, M.M., Whittaker, J.W. (1988): The active side of galactose oxidase. *J. Biol. Chem.* **263**, 6074-6080.

Dihidroxi-aceton mérése bioszenzorral

Szabó E., Adányiné Kisbocskói N., Váradi M.

Jelenlegi kutatásaink során kifejlesztettünk egy, a dihidroxi-aceton mérésére alkalmas bioszenzort, mely igen alkalmas eszköz rutin analitikai feladatok megoldására. A bioszenzor egy vékonyrétegcellából - melyben galaktóoxidáz enzimet rögzítettünk - és egy, az enzimreakció során keletkező hidrogénperoxid mérésére alkalmas amperometriás cellából épült fel. A mérőcellát folyamatosan áramló rendszerben alkalmaztuk, így lehetőség nyílt akár sorozatmérések elvégzésére, akár pedig fermentációs folyamatok nyomonkövetésére. A szenzor dihidroxi-acetonra való nagyfokú érzékenysége lehetővé tette, hogy az optimális paraméterek meghatározása után DHA mérésre használjuk a KÉKI Biomérnöki Osztályán folyó fermentációs kutatási munkák alkalmával. Referencia módszerként enzimes fotometriás méréseket végeztünk. A kapott 0,997-es korreláció igazolja, hogy a bioszenzoros mérések eredményei jól megfelelnek a fotometriás mérésekkor kapott értékeknek, tehát alkalmas annak kiváltására.

Determination of Dihydroxyacetone by Biosensor

Szabó, E., Adányiné Kisbocskói, N., Váradi, M.

In our recent research a biosensor was developed determining dihydroxyacetone, which has proved to be very suitable for solving analytical problems. The biosensor consists of a thin layer cell with immobilized galactose oxidase, and an amperometric cell to determine the hydrogen peroxide produced. The high sensitivity for dihydroxyacetone made its use possible in fermentation processes also investigated in Central Food Research Institute. As a reference method we used enzymatic analysis. The correlation of 0.997 proves that the results given by the biosensor agree with those given by the reference method, so that method can be replaced by our new one.

Dihydroxyacetone-messung mit Biosensor

Szabó, E., Adányiné Kisbocskói, N., Váradi, M.

Während unserer Forschungsarbeit wurde ein Biosensor für die Messung von Dihydroxyacetone entwickelt, der geeignet ist Routinanalysen durchzuführen. Der Biosensor besteht aus einer Dünnschichtzelle, in der Galaktoseoxidase-Enzym befestigt ist, und aus einer amperometrischen Zelle, welche geeignet ist, das während der Enzymreaktion entstehende Hydrogenperoxid zu messen. Die Meßzelle wurde in einem FIA System verwendet, so konnten sowohl Serienmessungen durchgeführt, als auch Fermentationsprozesse kontrolliert werden. Die hohe Sensibilität des Sensors dem DHA gegenüber machte es möglich, daß wir ihn nach Bestimmung der optimalen Parameter zur Messung von DHA verwenden, bei unseren Forschungen in der Fermentation im Zentralinstitut für Lebensmittelforschung. Als Referenzmethode wurden enzym-fotometrische Messungen durchgeführt. Wir haben eine Korrelation von 0,997 erhalten, die bestätigt, daß der Biosensor geeignet ist, die fotometrische Meßmethode abzulösen.