



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyésszmérnöki Kar

**SZERVES FÁZISBAN MŰKÖDŐ ENZIM ALAPÚ
BIOSZENZOROK FEJLESZTÉSE ÉS ALKALMAZÁSA
ÉLELMISZERMINTÁK VIZSGÁLATÁRA**
PhD értekezés

Készítette: Adányiné dr. Kisbocskói Nóra
okl. vegyésszmérnök

Témavezető: Dr. Váradi Mária
kém. tud. kand.
egyetemi magántanár

Készült a
Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet
Analitikai Osztályán



2003

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. OLDÓSZEREK ALKALMAZÁSA ENZIMES FOLYAMATOKBAN	7
2.1.1. Szerves oldószerek hatása a biokatalizátorokra	8
2.1.2. A víz szerepe az enzimek szerves közegben való működésében	9
2.1.3. A szerves oldószerek kiválasztása	11
2.1.4. Oldószerek osztályozása Ray szerint	12
2.1.5. A szerves oldószerek jellemzése	14
2.1.6. Szerves oldószerek csoportosítása	17
2.1.7. A szubsztrát és a termék polaritásának szerepe	18
2.1.8. Vízrel telített oldószerek alkalmazása	19
2.2. ENZIMEK ALKALMAZÁSA SZERVES KÖZEGBEN	20
2.2.1. Az enzimek aktivitásának növelése szerves közegben	20
2.2.2. Hőstabilitás növelése	21
2.2.3. A pH hatása	22
2.2.4. Szubsztrát specifitás változása	23
2.3. SZERVES FÁZISÚ BIOSZENZOROK	24
2.4. A BIOKATALITIKUS ANYAG RÖGZÍTÉSE	26
2.5. A SZERVES OLDÓSZEREK ALKALMAZÁSÁNAK ELŐNYEI ÉS HÁTRÁNYAI	29
2. 6. ENZIM ALAPÚ BIOSZENZOROK MŰKÖDÉSE SZERVES KÖZEGBEN	30
2.6.1. Glükóz meghatározása szerves közegben	30
2.6.2. Kataláz enzimet tartalmazó bioszenzorok működése	31
2.6.3. Koleszterin oxidáz enzimet tartalmazó bioszenzorok működése	33
2.6.4. Tirozináz enzimet tartalmazó bioszenzorok működése	35
2.6.5. Peroxidáz alapú bioszenzorok	37
2.6.6. Foszfolipáz D és kolin oxidáz alkalmazása bioszenzorokban	38
2.6.7. Butiril kolin észteráz és kolin oxidáz alkalmazása bioszenzorokban	38
3. KÍSÉRLETI RÉSZ	40
3.1. ANYAGOK ÉS ESZKÖZÖK	40
3.2. A FIA RENDSZER LEÍRÁSA	41
3.3. EREDMÉNYEK	43
3.3.1. Glükóz mérés szerves közegben	43
3.3.1.1. A mérőrendszer kialakítása és az enzimcella készítése	43
3.3.1.2. A polarizáló feszültség megválasztása	45
3.3.1.3. Oldószerek kiválasztása oldott glükóz oxidáz enzimmel	46
3.3.1.4. Glükóz mérése különböző vezetőső koncentrációjának függvényében	50

3.3.1.5. Glükóz mérése szerves oldószerekben a puffer mennyiségének függvényében	54
3.3.1.6. Glükóz mérése a puffer pH-jának függvényében	57
3.3.1.7. Az áramlási sebesség hatásának vizsgálata	58
3.3.1.8. Kalibrációs görbék	60
3.3.1.9. Élelmiszerminták vizsgálata	61
3.3.2. Kataláz alapú bioszenzor	62
3.3.2.1. Mérő rendszer	63
3.3.2.2. Hidrogén-peroxid bomlása az idő függvényében	64
3.3.2.3. Amperometriás jelek a vezetősók mennyiségének függvényében	65
3.3.2.4. Rögzített kataláz enzim aktivitása a pH függvényében	66
3.3.2.5. Amperometriás jel a vivőoldatban levő puffer mennyiségének függvényében	67
3.3.2.6. Kalibráció görbék, statisztikai értékelés	69
3.3.2.7. Minták vizsgálata	71
3.3.3. Koleszterin meghatározására alkalmas bioszenzor	74
3.3.3.1. Mérő rendszer	74
3.3.3.2. Inkubációs idő hatása a koleszterin mérésre	74
3.3.3.3. Hőmérséklet hatása a koleszterin mérésre	75
3.3.3.4. Amperometriás jel a vivőoldatban levő toluol mennyiségének függvényében	76
3.3.3.5. Amperometriás jelek a vezetősók mennyiségének függvényében	77
3.3.3.6. Amperometriás jelek a puffer mennyiségének és pH-jának függvényében	79
3.3.3.7. Koleszterinoleát konverziója koleszterinné bienzimes cella alkalmazásakor	80
3.3.3.8. Koleszterin mérésének statisztikai paraméterei	82
3.3.3.9. Tojássárgák koleszterintartalmának vizsgálata	83
3.3.3.10. Vajkészítmények, zsír és margarinok koleszterintartalmának vizsgálata	84
3.3.3.11. Szárastészták tojástartalmának vizsgálata	87
4. ÖSSZEFOGLALÁS	88
5. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI	92
6. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	93
7. IRODALOMJEGYZÉK	94
NYILATKOZAT	102

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek,

Dr. Váradi Mária

kémiai tudományok kandidátusának,

egyetemi magántanárnak

a disszertáció elkészítéshez nyújtott szakmai segítségéért,

hasznos útmutatásaiért.

Megköszönöm

Tóthné Dr. Markus Marianna

főmunkatársnak

a glükóztartalom referencia méréseinek elvégzését,

valamint **közvetlen kollégáimnak** a mérések elvégzéséhez
nyújtott segítségüket.

1. BEVEZETÉS

Az enzimes minőségi analízis első lépéseit már a XIX. század közepén megtették, amikor Osann 1845-ben torma peroxidázzal (HRP) mutatta ki hidrogén-peroxid jelenlétét. Néhány évvel később Schönbein (1851) a hidrogén-peroxid legkisebb kimutatható koncentrációját is meghatározta. Néhány olyan enzimes analitikai eljárás bevezetésére is sor került, amelyek romlás indikátorként mutatták egyes élelmiszerek hőkezelésének elégséges illetve elégtelen voltát. A mennyiségi enzimes analízis kezdetét a múlt század 30-as éveire tehetjük, amikor Warburg és munkatársai (1935, 1948) felfedezték a hidrogénátvivő enzimeket és koenzimjeiket.

Az enzimek szerves fázisban való alkalmazásáról már 1913-ban közöltek eredményt (Laane és mtsai., 1987). A biotechnológiában kétségtelenül az egyik legnagyobb áttörés a reakció olyan közegben történő lejátszódása, amelynek polaritása jóval kisebb, mint a vízé. Természetes állapotban sok enzim kapcsolódik nem poláris, sejtes elemhez, különösen membránokhoz. Ezért a vizes, erősen poláris környezet gyakran kedvezőtlenebb a biokatalizátor számára, mint egy kevésbé poláris környezet, amelyben csökkenhet az aktivitás, a specifitás és a stabilitás (Brink és mtsai., 1988). Az elmúlt évtizedek kutatásai igazolták, hogy az enzimek hatékonyan működnek nemcsak vizes, hanem szerves fázisban is (Kazandjian és Klibanov, 1985, Klibanov, 1986).

Jóllehet az enzimológusok bizonyították, hogy az enzimek aktivitása megmarad, sőt sokszor növekszik a szerves fázisban, mégis a bioszenzorok fejlesztése során majd két évtized kellett ahhoz, hogy szerves fázisban működő bioszenzorok is kifejlesztésre kerüljenek. Az első, nagy érdeklődést kiváltó leírást Hall és munkatársai (1988a,b) publikálták, majd ezután több kutatócsoport kezdett ezzel a témával foglalkozni (Iwuoha és mtsai., 1994, Saini és mtsai., 1991, Wang és mtsai., 1992, 1993, Campanella és mtsai., 1992b).

A vizes fázisban alkalmazott bioszenzorok vizsgálata a különböző pufferoldatok összetételére, pH-jára, hőmérsékletére korlátozódott. A szerves oldószerek alkalmazhatóságának vizsgálata elsősorban az enzim aktivitásának,

a szubsztrát stabilitásának és specifitásának változására, valamint a különböző valós minták nehézkes és munkaigényes minta-előkészítésének egyszerűsítésére irányult. A szerves fázisú bioszenzorok alkalmazásakor az oldószer a szubsztrát oldhatóságában, valamint a szubsztrát, az enzim és az enzim-szubsztrát komplex stabilitásában játszik fontos szerepet. Az enzimek szerves fázisban való működésének felderítése jelentősen növelte a bioszenzor technika alkalmazási lehetőségeit. Kinetikai vagy termodinamikai okokból vizes közegben nem alkalmazható reakciók ezen túl a megfelelő szerves közegben vizsgálhatók. Az alkalmazott szerves közeg hatására, a reakcióelegy fizikai-kémiai tulajdonságainak függvényében (pl. a hidratáció foka, polaritás és hidrofobicitás) azonban változhat az enzim specifitása. Az enzim elektródok szerves fázisban való alkalmazásának lehetőségeit számos publikáció foglalta össze (Saini és mtsai, 1991, Wang és mtsai, 1993). Ugyanakkor ki kell emelni, hogy a szerves fázisú bioszenzorok alkalmazásának legfőbb előnye, hogy közvetlen vizsgálati lehetőséget biztosít egy sor vízben egyáltalán nem, vagy csak részben oldható szubsztrát számára, amelyek azonban bizonyos szerves oldószerekben jól oldódnak. A különböző oldószerek alkalmazása tehát lehetőséget biztosít arra, hogy a megfelelő oldószer kiválasztásával minden olyan vegyületet meghatározhassunk a megfelelően kialakított szerves fázisú bioszenzorral, amely redox enzimnek szubsztrátja.

Az irodalmi összefoglalóban ismertetett publikációkban egy-két kivételtől eltekintve (Wang, 1990, Mannino és mtsai, 1994), a szerzők kevert, ill. álló rendszerben végzett mérésekről számoltak be. Sokan megemlítik, hogy az elektródokat hosszabb-rövidebb ideig pufferoldatban kondicionálták a szerves fázisban való alkalmazás előtt és után.

A Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet (KÉKI) Analitikai Osztályán kb. 15 éve foglalkozunk enzim alapú bioszenzorok fejlesztésével. A kutatásainkban gyümölcslevekből glükóz, fermentlevekből maltóz, galaktóz, tejtermékekből laktóz, sörmintákból alkohol, valamint a D- és L-aminosavak arányának kimutatására dolgoztunk ki eljárást. Egy illetve két enzim rögzítésével vékonyrétegcellát készítettünk, és az enzimes reakció vagy reakciók során keletkező hidrogén-peroxidot amperometriás cellában mértük. Ezen eredményeink alapján a bioszenzorok alkalmazási körét szerves fázisban történő mérésekre

kívántuk kiterjeszteni.

Munkánk során folyamatosan áramló szerves fázisú rendszerben működő enzim alapú amperometriás bioszenzorok kialakítását tűztük ki célul. Glükóz, hidrogén-peroxid valamint koleszterin meghatározására fejlesztettünk ki eljárásokat. Vizsgálni kívántuk az enzimek működési feltételeit, a legfontosabb biokémiai és elektrokémiai paramétereket optimalizáltuk. A kidolgozott eljárásokat élelmiszerek vizsgálatánál alkalmaztuk, egyszerű minta előkészítéseket dolgoztunk ki.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A szerves fázisú bioszenzorok alkalmazása a bioanalitikai eljárások új ágát képviseli. Olyan egyszerű, gyors mérési módszerek kidolgozására nyílik lehetőség, amelyek pl. a petrolkémia, gyógyszer- és élelmiszeripar területén szerves fázisban előforduló szubsztrátok mennyiségi meghatározására alkalmasak. Fontos feladat pl. az étkezési olajok zsírsavösszetételének, illetve az összetétel változásának nyomon követése, amely tájékoztatást adhat az avasodás mértékéről. Ugyancsak lehetőség nyílik a gázolajok alkoholtartalmának meghatározására alkalmas bioszenzorok kifejlesztésére (Saini és Turner, 1991).

2.1. Oldószerek alkalmazása enzimes folyamatokban

A szerves oldószerek jelentős változást idéznek elő az enzim aktivitásában és specifitásában. Ennek oka, hogy az enzimek struktúrája számos nem-kovalens kötéstől függ, mint amilyen a hidrogénkötés, az ionos kötés, hidrofób kölcsönhatás, valamint a van der Waals féle kötőerők, amelyekkel az enzimek szerkezeti stabilitása vizes közegben kialakul. A szerves oldószerek azonban ezeket a kölcsönhatásokat módosíthatják, megváltoztatva ezáltal az enzimek kinetikai és termodinamikai tulajdonságait. Az oldószer hidrofóbicitása, permittivitása, víztartalma befolyásolhatja az enzim-szubsztrát kötés kialakulását, ezáltal módosítva az enzim szubsztrát specifitását és aktivitását is (Dordick 1991; Dordick 1992).

Az enzimek katalitikus működésüket csak akkor fejthetik ki, ha megőrzik természetes tulajdonságaikat. A szerves oldószerekben az enzimmolekulát, természetes konformációjának biztosítása érdekében, jól definiált vízburok veszi körül. A vízburok elvesztése, vagy erős deformációja, amelyet a szerves oldószerek okozhatnak, felborítja a már említett kölcsönhatások rendszerét, csökkentve ezáltal a katalitikus aktivitást. Ha a szerves oldószer specifikusan reagál az enzim molekulával, akkor gátolja, ill. részben vagy teljesen denaturálja azt. Ettől a hatástól ismét csak a hidratált állapot védheti meg az enzimeket a szerves oldószerben gazdag rendszerekben.

Mivel a hidrofíli oldószerek elvonják az enzim környezetéből az esszenciális vizet, az első szerves fázisú bioszenzorok működését hidrofób oldószerek jelenlétében vizsgálták (Hall és mtsai, 1988a,b). A hidrofób oldószerek bioszenzoros alkalmazásakor különös figyelmet fordítottak az enzim aktív centrumának hidratálására, a vízburok megtartására.

2.1.1. Szerves oldószerek hatása a biokatalizátorokra

Az egyfázisú szerves oldószerekben az enzimek oldhatósága, illetve oldhatatlansága jelentősen befolyásolja az enzimekatalízis kinetikáját, hiszen mind a részecskéken belüli, mind pedig a külső diffúzió csökkenti az enzimek reakció sebességét. Az enzimeket diffúziós tulajdonságaik szerint két csoportba lehet osztani.

- A kevésbé aktív enzimek esetében a diffúzió nem befolyásolja jelentősen az enzim kinetikáját. Zaks és Klibanov (1986) az N-acetil-L-fenilalanin átészterezési reakcióját vizsgálták oktánban. Tapasztalataik szerint a reakció sebessége nem változott, ha az α -kimotripszin enzim szemcséinek mérete 5-270 μm között változott. Ennek oka, hogy az α -kimotripszin aktivitása három nagyságrenddel kisebb szerves fázisban, mint vizes közegben.
- Az aktív enzimek esetében azonban sokszor a diffúzió a sebesség-meghatározó lépés. A részecskék közötti és a külső diffúzió kiküszöbölésére a heterogén fázisú rendszerekben alkalmazott eljárások bizonyultak eredményesnek. Kazandjian és munkatársai (1986) nagy felületű hordozóra porlasztva rögzítették az enzimeket. Mivel az enzimek nem oldódtak az adott oldószerekben, nem volt szükséges kovalens kötések kialakítása. HRP enzimet üveggyöngyön rögzítve az o-fenilén-diamin oxidációjának sebessége benzolban 160-szor volt nagyobb, mint rögzítés nélkül. Hasonló növekedést tapasztaltak, ha a p-krezol oxidációját rögzített HRP enzimmel dioxánban végezték.

Az enzim molekulák és a szerves oldószerek térbeli szétválása csökkent, ha az enzimeket szerves oldószerekben oldható oldallánccal (pl. polietilén-glikol, PEG) módosították. Ezek a módosított enzimek oldhatóak egy sor poláris és apoláris oldószerben, az aktivitás megőrzésére azonban továbbra is szükség

van bizonyos mennyiségű víz jelenlétére. Feltehető, hogy a PEG láncok az enzim körül víz-megtartó védőburkot alakítanak ki (Khmelnitsky és mtsai., 1988).

A diffúzió csökkentése a reakcióelegy intenzívebb keverésével is elérhető volt. A vizes vagy folyadék-folyadék rendszerektől eltérően az egyfázisú szerves oldószerekben végbemenő reakciók során az erős keverés nem vezetett az enzim molekulák degradációjához.

A szerves oldószer az enzimreakciót többféleképpen is befolyásolhatja:

- Az oldószer, megváltoztatva az enzimfehérje másodlagos illetve harmadlagos szerkezetét, a hidrogénkötéseket, a hidrofób kölcsönhatásokat, enzim gátlást vagy inaktiválódást okozhatnak. Ez a hatás megfigyelhető mind a kétfázisú rendszerekben-, mind pedig a vízoldható szerves oldószereket kis koncentrációban tartalmazó vizes rendszerekben oldott enzimek esetében. Ugyanakkor az egyfázisú oldószerekben oldhatatlan enzimek gyakran kedvezően stabilnak és aktívnak mutatkoznak (Klibanov, 1989).
- Az oldószer reakcióba léphet a termék vagy a szubsztrát molekulákkal, ezúton befolyásolva az enzim aktivitását. Kazandjian és munkatársai (1986) kutatásai szerint a kloroform jelenléte szignifikánsan csökkentette a peroxidáz aktivitását a fenolok oxidációja során.
- A szerves oldószer reakcióba léphetnek az enzim közvetlen környezetében lévő esszenciális vízzel is, megbontva az enzim molekulát védő hidrátburkot. Az erősen poláris oldószer nagyobb mennyiségű vizet oldhatnak, eltávolítva ezzel a szükséges vízburkot az enzim aktív centrumának környezetéből, míg a hidrofób oldószer kevésbé képesek megbontani az enzimhez kötődő vízburkot.

2.1.2. A víz szerepe az enzimek szerves közegben való működésében

Amint már többször említettük, az enzimek működéséhez feltétlenül szükség van bizonyos mennyiségű víz jelenlétére a szerves fázisban. Ez a megállapítás a hidrofil oldószer esetében fokozottan igaz, mivel a vízmentes oldószer

elvonják a vizet az enzim környezetéből.

Az enzimek fizikai és kémiai tulajdonságai a víz direkt vagy indirekt szerepétől függenek minden nem-kovalens kölcsönhatásban, amelynek az enzim konformáció megtartásában van jelentős szerepe. Amíg azonban az egyértelmű, hogy a biokémiai reakciókhoz szükség van víz jelenlétére, kevésbé tisztázott, hogy mennyi is az optimális víz mennyisége. A minimálisan szükséges víz mennyisége adott körülmények között függ az oldószertől, az alkalmazott enzimtől, valamint a szubsztráttól.

Korábban feltételezték, hogy a hidratált enzimmolekulák mindegyikét néhány molekula rétegvastagságú vízburok veszi körül (Dordick, 1989). A víz rétegvastagságának becslése különböző megfontolásokat tett szükségessé. Zaks és Klibanov (1988) feltételezése szerint egy vékony hidrátburok jelenléte szükséges, ami az enzim mikrokozonyetét védi. Ez a burok pufferként működik az enzim felszíne és az oldószer tömege között. Az enzim aktivitását, működését a hidrátburkon kívüli molekulák ebben az esetben nem befolyásolhatnák. Ezt a gondolatot a szerves oldószerekre kiterjesztve, lehetővé válna, hogy a sértetlen hidrátburokban az enzim megőrizze aktivitását, a szerves oldószer tömeghatása tehát nem befolyásolná az enzim mikrokozonyetét. Kísérletekkel igazolták, hogy oktánban az α -kimotripszin működéséhez enzim molekulánként kb. 50 molekula víz kell (Zaks, Klibanov, 1986). A polifenoloxidáz kloroformban kb. 0,5% vizes puffer jelenlétében (kb. $3,5 \times 10^7$ db vízmolekula/enzimmolekula), míg a HRP toluolban már 0,25% pufferral hatékonyan működik (Dordick, 1989).

A hidratálás hatását vizsgálták a katalitikus aktivitásra és a fehérje szerkezetére nézve szubtilizin esetében különböző oldószerekben (pl. ciklohexán, diklórmétán, acetonitril), és megállapították, hogy a kezdeti hidratáció okozhatja a fehérje másodlagos szerkezetének merevvé válását az oldószerral való kezelés nyomán. Az enzimeket különböző mennyiségű vizet tartalmazó szerves oldószerekkel vizsgálva kiderült, hogy néhány enzim optimális mennyiségű víz és megfelelő oldószer jelenlétében nagyobb aktivitást mutat, mint vizes fázisban (Partridge és mtsai, 1998a).

2.1.3. A szerves oldószerek kiválasztása

Az adott bioreakcióhoz alkalmas oldószer kiválasztásakor számos tényezőt kell figyelembe venni.

- Az első fontos szempont, az oldószer kompatibilitása a szubsztráttal. Cukrok, pl. csak hidrofil, vízzel elegyedő oldószerekben oldódnak, pl. piridinben vagy dimetil-formamidban. A hidrofób oldószerek tehát nem alkalmasak az enzimkatalizálta cukor módosításokhoz, mivel nem jön létre reakció az oldhatatlan szubsztrát és enzim között (Dordick, 1989).
- Ehhez hasonló jelentőségű a keletkező termékek és az oldószer kompatibilitása is. A poláris termékmolekulák az enzim közvetlen közelében maradnak, ezáltal termék gátlás, vagy nem kívánatos mellékreakció következhet be, pl. polifenoloxidáz reakciója során hexánban. A poláris kinonszármazékok nem oldódnak az apoláris hexánban, hanem az enzim molekula közvetlen közelében polimerizálódnak, ezzel jelentősen csökkentve az enzim aktivitását. Poláris oldószert (pl. kloroformot) alkalmazva azonban a kinonok nem polimerizálódnak (Kazandjian és Klibanov, 1985.).
- A kiválasztott oldószer a reakció szempontjából inert legyen, pl. átészterezési reakcióknál az oldószer nem lehet észter, vagy alkohol, mert nemkívánatos mellékreakciók léphetnek fel.
- Az oldószerek kiválasztását jelentősen befolyásolják azok fizikai tulajdonságai, a sűrűség, a viszkozitás, a felületi feszültség, nem utolsósorban pedig a biztonságtechnikai problémák, a toxicitás, az éghetőség, a hulladék elhelyezése, valamint a járulékos költségek.

Tekintettel arra, hogy a megfelelő oldószer kiválasztására nincsenek bevált módszerek, számos oldószer jöhet szóba, a választás sokszor önkényes. Ezeket a problémákat felismerve több kutatócsoport modelleket dolgozott ki, összefüggést teremtve az egyes oldószerek fizikai-kémiai tulajdonságai és a vizsgált enzim aktivitása között.

2.1.4. Oldószer osztályozása Ray szerint

Az enzimek katalitikusan aktív formájának megőrzésében a hidrofób kölcsönhatások játsszák a legfontosabb szerepet. A konformáció megőrzésének mértékére utalhat az a változás, amely a vízburokban kötött molekulák szerves oldószer molekulákra történő kicserélődésekor lép fel a fehérje szerkezetében. Az enzim molekulákkal való kölcsönhatásra vonatkozó tapasztalati eredmények alapján Ray (1971) az oldószereket három csoportba osztotta:

1. Az enzim – oldószer kölcsönhatás erős: pl. víz, glicerin, etilén-glikol, etanol-amin, és formamid, stb.
2. Az enzim – oldószer kölcsönhatás közepes: pl. metil-formamid, dimetil-formamid, stb.
3. Az enzim – oldószer kölcsönhatás gyenge: pl. metanol, etanol, toluol, stb.

Az enzimekkel való kölcsönhatás az első csoportba tartozó oldószereknél a legerősebb, kevésbé intenzív a második csoportba tartozó oldószerek esetében, míg a harmadik csoportba tartozó oldószerekkel szinte nincs kölcsönhatás. Ray szerint az első csoportba tartozó oldószerek hatásának fő oka, hogy ezekben a molekulákban legalább két olyan központ van, ami körül hidrogénkötés alakulhat ki. A molekulák közötti kötések hatására a hidrogénhídkötések egy merev, termodinamikailag kedvezőtlen szerkezetet biztosítanak az oldott, szolvofób molekulák körül. Az első osztályba tartozó oldószerek közül ezek a hatások a vízben és a glicerinben a legerősebbek (Khmelnitzky és mtsai, 1988).

A fentiek alapján feltételezték, hogy a fehérje molekulák szerkezetének megőrzésében az elsődleges szerepet a hidrofób kölcsönhatások játsszák, az enzimes reakciókban tehát az első csoportba tartozó oldószerek vehetnének részt, pl. a glicerin. A kísérletek azt bizonyították, hogy az első csoportba tartozó glicerin és etilén-glikol tényleg kevésbé inaktíválja az enzimeket, mint pl. a második csoportba tartozó dimetil-formamid. Növekvő szerves oldószer arányánál az enzimaktivitás sokszor csökken. Ugyanakkor számos esetben tapasztalható, hogy nagy mennyiségű szerves oldószert (10-30% felett) alkalmazva bizonyos enzimek jelentős aktivitás növekedést mutatnak a vizes reakcióhoz képest. (Martinek, Semenov, 1981, Martinek és mtsai., 1977.) Ez az

aktivitás növekedés néha igen jelentős, több

tízszeres is lehet, mivel a szerves oldószer alkalmazásával egyrészt konformáció változás következik be, másrészt a szerves oldószer közvetlenül is részt vehet az enzimes reakcióban mint egy további nukleofil ágens (Singh és Wang, 1979).

Az enzimes reakciók közegeként sokszor igen előnyös a vízdoldható szerves oldószerek használata, pl. az amino- és karboxilsav észter szintézisek esetében (Weetall, 1985), karbamid-, glicerofoszfát- és peptidkötések kialakításakor peptidekben (West, Wong, 1986) és fehérjékben (Homandberg, Laskowski, 1979.). A fenti alkalmazások során a szerves oldószerben kis víz koncentráció mellett a reakció-egyensúly a szintézis irányába tolódik el a hidrolízis helyett.

Ezek a reakciók azonban csak a nemvizes komponens 50-70%-áig játszódnak le, nagyobb koncentráció esetén az enzimaktivitás hirtelen csökken. Ilyenkor a szerves oldószer helyettesíti a vízmolekulákat a fehérjemolekula felszínén, oly mértékig megbontva ezzel az enzim molekula hidratációs állapotát, hogy a katalitikusan aktív konformáció jelenléte az oldatban megszűnik, a molekula denaturálódik és/vagy kicsapódik. Bizonyos esetben a szerves oldószer aránya még a 80-90%-ot is elérhet anélkül, hogy az enzim inaktiválódna, bár ez inkább a kivételek közé tartozik. Glicerín és más poliol adagolásával az enzimek katalitikus aktivitása még 5-10% víz koncentráció mellett is megmarad. A fehérjék a polialkoholok hatására ugyanis alig denaturálódnak a többi szerves oldószerhez képest, a fehérjét körülvevő vízburok pedig sokkal erősebben hidratálja a molekulákat, mint ha csak vizes oldatban lennének. Poliolok oldatában tehát az enzimmolekulákat körülvevő hidrátburok sértetlen marad és ezáltal nem bomlik meg a természetes szerkezeti konformáció sem. Ezek az oldószerek látszólag megfelelő környezetet biztosítanak az enzimek számára, azonban a pozitív tapasztalatok ellenére sem ajánlhatók az enzimes reakciók közegeként. Fő hátrányuk részint nagy viszkozitásuk, valamint az, hogy kis polaritású szubsztrátok nem oldhatóak bennük (Homandberg és mtsai, 1978, Homandberg és Laskowski, 1979, Nilsson és Mosbach, 1984).

Nem szabad figyelmen kívül hagyni azonban azt a tényt sem, hogy a szerves fázisban teljesen denaturált enzim még a mesterségesen előidézett változás

ellenére is igen gyakran működik katalizátorként, amint ezt az α -kimotripszin vizsgálata is igazolta (Klysov és mtsai, 1975). Az enzim dimetil-szulfoxidban denaturált állapotban is katalizálta különböző szubsztrátok hidrolízisét, mivel képes nemspecifikus polifunkciós polimer katalizátorként működni, nukleofil csoportja különböző, különösen közepes és kis polaritású szubsztrátokat hasít le.

2.1.5. A szerves oldószerek jellemzése

A szerves fázisú bioszenzorok készítéséhez felhasználható oldószerek száma korlátozott, mivel sok oldószer inaktiválja vagy denaturálja az enzimet.

Számos vizsgálatot végeztek annak érdekében, hogy megfelelő összefüggést találjanak az enzim aktivitása és az oldószer polaritását jellemző valamely ismert paraméter között, mint a dipólus momentum (μ), a permittivitás (ϵ), vagy a viszkozitás (η). A dipólus momentum az oldószer molekula szerkezetétől függő fizikai tulajdonsága, amíg a permittivitás az oldószer egész tömegére vonatkozik. Mindkét fizikai jellemző mutat bizonyos összefüggést az oldat polaritásával, azonban egyik paraméter sem alkalmazható általánosan (Laane és mtsai, 1987).

Brink és Tramper (1985) az ún. Hildebrand oldhatósági együtthatót (δ) használták a szerves oldószerek polaritásának jellemzésére. A Hildebrand oldhatósági együttható nem más mint az oldószer kohéziós energiasűrűségének négyzetgyöke, amely az egységnyi mennyiségre vonatkoztatott teljes molekulakohéziót mutatja. Az adott oldószerre vonatkozó Hildebrand oldhatósági együttható a következő egyenlet segítségével határozható meg (ahol p - nyomás, ΔH^v - moláris párolgási hő, R - gázállandó, T - hőmérséklet, M - moláris tömeg, ν - kinematikai viszkozitás):

$$\delta = \left(\frac{p(\Delta H^v - RT)}{M} \right)^{1/2}$$

Az egyenlet szerint tehát a Hildebrand oldhatósági együttható automatikusan csökken a növekvő molekulatömeg mellett. Kísérletek alapján megállapították,

hogy nagy a biokatalitikus aktivitás az olyan oldószerekben, amelyeknél igen kicsi az oldószer polaritása ($\delta < -8$), és viszonylag nagy az oldószer molekulatömege ($M > 150$). További vizsgálatok bizonyították azonban, hogy a Hildebrand oldhatósági együttható nem jellemzi a polaritást megfelelően, kiváltképpen az apoláris oldószerknél nagy az eltérés, valamint a Hildebrand oldhatósági együttható és a molekulatömeg az egyenlet alapján nem függetlenek egymástól.

Az enzim és az oldószer kapcsolatának jellemzésére adott oldószerben a Laane és munkatársai (1987) által bevezetett $\log P$ érték (ahol P az adott oldószer megoszlási hányadosa víz és 1-oktanol kétfázisú rendszerben) fogadható el a legtágabb határok között.

$$P = [\text{oldószer}]_{\text{oktanol}} / [\text{oldószer}]_{\text{víz}}$$

A $\log P$ értékek az oldószer hidrofóbicitásának jellemzésére alkalmasak és igen egyszerűen meghatározhatók az egyes hidrofób csoportok állandói alapján. (Rekker, Kort, 1979).

Minél nagyobb az adott oldószer $\log P$ értéke, annál inkább hidrofób jellegű (1. táblázat). Az oldószer molekulásúlya nem befolyásolja a hidrofób, ill. hidrofil tulajdonságot. A $\log P$ számított és tapasztalati értékei között csak a viszonylag bonyolult molekulák polaritási értékeinél találtak eltérést, ezért ezeket az állandókat kísérletekkel kellett meghatározni.

Két oldószerből álló keverékek esetében az oldat polaritását a következő általános, félig empirikus egyenlet alapján lehet meghatározni:

$$\log P_{\text{keverék}} = X_1 \log P_1 + X_2 \log P_2$$

ahol X_1 és X_2 az 1., ill. a 2. oldószer móltörtje.

Oldószer	log P	Vízoldhatóság
dimetilszulfoxid	-1,3	∞
dioxán	-1,1	∞
metanol	-0,76	∞
acetonitril	-0,33	∞
etanol	-0,24	∞
aceton	-0,23	∞
ecetsav	-0,23	∞
metilacetát	0,16	33%
propanol	0,28	∞
propionsav	0,29	0-10% 18 °C, 0-40% 25 °C
tetrahidrofurán	0,49	jól oldódik
dietilamin	0,64	jól oldódik
etilacetát	0,68	8,5% v/v
piridin	0,71	0-40% v/v
butanol	0,80	n 0-20%v/v, i 0-14-16%v/v
dietiléter	0,85	1.2% v/v 20 °C
fenol	1,5	8,2% v/v
hexanol	1,8	0,6% v/v
kloroform	2,0	0,17% v/v
toluol	2,5	0,067% v/v
oktanol	2,9	0,096% v/v
tetraklórmetán (széntetraklorid)	3,0	0,08% v/v
hexán	3,5	0,0013% v/v

1. táblázat Oldószer log P értékei és oldhatósága

(Laane és mtsai. 1987, Perry 1968)

2.1.6. Szerves oldószerek csoportosítása

Összevetve a log P értékeket az enzimek katalitikus aktivitásának eredményeivel, megállapították, hogy az oldószer polaritása és az enzim aktivitása között felállítható bizonyos összefüggés, amely arra utal, hogy az adott szerves oldószer mennyire dehidratálja az enzimet, megbontva a biokatalizátort stabilizáló esszenciális hidrátburkot. Az oldatok polaritásának jellemzésére leginkább a log P érték alkalmas minden egyéb mérőszámmal szemben, a log P és az enzimek aktivitása között fennálló korreláció független az alkalmazott rendszertől. A log P teljesít minden olyan követelményt, aminek egy jó indikátor szám eleget tesz:

- A log P az oldószer polaritás direkt mérőszáma, nem pedig indirekt, mint a δ , ϵ , μ és α .
- A log P értéke standard módszerrel könnyen meghatározható, vagy számítható a hidrofób csoport állandók alapján.
- A log P igen széles értéktartományban érzékenyen reagál a polaritás különbségekre.

Sokkal pontosabban lehetne azonban az oldószereket aszerint jellemezni, hogy mennyire torzítják, befolyásolják a biokatalizátor - víz kapcsolatot, vagy azzal, hogy a szerves oldószer behatol-e a vízburok szerkezetébe, vagy egyszerűen félretolja a szükséges vízburkot. A vízburok torzításának mértékét a szerves oldószerek vízben való oldhatóságával jellemezték.

Az oldószereket ezen tulajdonságuk alapján három csoportba sorolták be.

log P	vízben való oldhatóság 20 °C, % v/v
log P < 2	>0,4
2 < log P < 4	0,04-0,4
log P > 4	<0,04

2. táblázat Összefüggés az oldószerek tulajdonságai között

Különböző biokatalizátorok szerves oldószerben való viselkedésének vizsgálata alapján a következő általános szabályok vonhatók le:

- Azok az oldószeres, amelyek $\log P$ értéke kisebb 2-nél, nem alkalmasak biokatalitikus reakciók közegének, mivel nagyon erősen torzítják a szükséges vízburkot, ezáltal inaktíválva, vagy denaturálva a biokatalizátort.
- Azok az oldószeres, amelyek $\log P$ értéke 2 és 4 között van, gyengén torzítják a vízburkot és biológiai aktivitásra való hatásuk mértéke nem jósolható meg előre.
- Azok az oldószeres, amelyeknél a $\log P$ nagyobb, mint 4, nem befolyásolják / torzítják a vízburkot, a biokatalizátor aktív marad.

A $\log P$ -t mint a polaritás kvantitatív mértékét alkalmazzák, nem egészen korrekt azonban az a meghatározás, hogy $\log P$ a hidrofobicitást jelöli, amely a polaritással arányos. A hidrofobicitás helyett a tudományos nyelvben egyre gyakrabban használják a polaritást.

A $\log P$ értékek ismerete alapján sem lehet azonban egyértelműen eldönteni, melyik oldószer alkalmazható hatékonyan, hiszen már többen leírták, hogy olyan oldószeres is jól alkalmazhatóak enzimes reakciók oldószeréül, amelyek esetében a $\log P < 2$.

2.1.7. A szubsztrát és a termék polaritásának szerepe

Eddig csak az oldószeres polaritásának a biokatalitikus reakciókra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A biokatalízis további optimalálásánál azonban figyelembe kell venni a szubsztrát, a termék, valamint a köztesfázis polaritásának hatását is. A köztesfázisok közötti tömegtranszport folyamatok figyelmen kívül hagyásával, csak a polaritások hatását vizsgálva megállapítható, hogy akkor érhető el nagy biokatalitikus reakciósebesség, ha a következő feltételek szerint választják ki a szerves oldószereseket (kivéve a szubsztrát inhibíció esetét):

1. $|\log P_i - \log P_s|$ valamint $|\log P_{cph} - \log P_p|$ értéke legyen minimális, hogy a köztesfázisban biztosítva legyen a nagy szubsztrát koncentráció.
2. $|\log P_{cph} - \log P_s| - |\log P_i - \log P_p|$ értéke legyen elég nagy, hogy a szubsztrát koncentrációja a folytonos fázisban alacsony legyen.

ahol, $\log P_s$ - a szubsztrát polaritása, $\log P_i$ - a köztesfázis polaritása, $\log P_{cph}$ - a folytonos fázis polaritása, $\log P_p$ - a termék polaritása.

2.1.8. Vízzel telített oldószerek alkalmazása

A vízelvonó hatás csak a vízzel elegyedő vagy vízzel nem telített oldószerekben érvényesül. A bioszenzorok alkalmazásakor azonban a szerves oldószer rendszerint vízzel telített, az oldószer vagy tartalmazza mindkét fázist, vagy használat előtt vízzel telítik.

A modell alapján azok az oldószerek, amelyek $\log P$ értéke nagyobb 4-nél (pl. dekanol, hexadekán, diftalát észterek), alkalmasak pl. a propén epoxidálásának biokatalitikus reakciójához. Ezzel szemben azonban azok az oldószerek, amelyeknek $\log P$ értéke kisebb, mint 2, (pl. rövid láncú alkoholok, vízben oldódó oldószerek, rövid szénláncú észterek és éterek, stb.) nem alkalmasak a biokatalízis oldószeréül. Azonban ez a modell sem ad megfelelő magyarázatot pl. a lipáz piridinben, a szubtilizin dimetil-formamidban, vagy a HRP hidrofób, vízben oldhatatlan oldószerekben való igen nagy aktivitására. Ezt az eltérést a $\log P$ értelmezésének kiterjesztésével lehet megmagyarázni. A vízzel telített oldószerek alkalmazásakor a $\log P$ a következő egyenlet szerint számítható ki: (x - a vízzel oldhatóság móltörtben).

$$\log P_{\text{korrigált}} = (1-x)\log P_{\text{oldószer}} + x \log P_{\text{viz}}$$

A fenti kísérletek értelmezése során azonban nem egyértelmű a katalitikus aktivitás definíciója. Szigorú különbséget kellene tenni az enzim stabilitása és a szorosán vett katalitikus aktivitása között. A $\log P$ értékek legtöbbször értelmezése során az enzimet több órán át az adott oldószerben áztatták, majd ezután mérték az aktivitást. Ez az adat inkább a stabilitásra, és nem az aktivitásra jellemző. Sokkal pontosabb lenne a modell, ha az enzimek kinetikai paramétereit mérnék, a k_{kat} és a K_M értékeket. Így az oldószerek hatását az enzim aktivitására igen pontosan meg lehetne határozni a mért kezdeti szakasz kinetikai paramétereire alapján.

2.2. Enzimek alkalmazása szerves közegben

2.2.1. Az enzimek aktivitásának növelése szerves közegben

Liofilizált enzimeket szerves oldószerekben szuszpendálva igen kis aktivitást tapasztaltak. Kamat és munkatársai (1992) matematikai modellek segítségével bizonyították, hogy az egyes szemcséken belül és kívül a szemcsék méretétől függően nő a diffúzió. Arra is rámutattak, hogy szuperkritikus oldatokban a diffúzió növekedténél következtében nőtt az enzimek aktivitása. Az enzimek aktivitásának ill. stabilitásának növelésére különböző eljárások alkalmazhatóak, elsősorban az immobilizálás, az enzimek kémiai módosítása és az enzim fehérje szerkezetének módosítása (Janecek, 1992).

Rees és Halling (2001) kutatásai szerint a biokatalizátor aktivitása a részecskék előkészítésétől függ. Szerves fázisban alkalmazott mátrixon adszorbeált enzim könnyen hozzáférhető, aktivitása lényegesen nagyobb, mint a liofilizált enzimé. Partridge és munkatársai (1998b) új eljárást dolgoztak ki enzimek gyors, gazdaságos dehidratálására, amelynek eredményeként nagy enzimaktivitású preparátumok készíthetők. Az enzimeket szilikagélen adszorbeálták, így az enzim igen nagy felületen oszlott el, biztosítva ezáltal a szerves fázisban a jó hozzáférést. A vizes fázis eltávolítása után a rögzített enzimet n-propanolban áztatták, ahol az oldószer gyorsan elvonta a vizet az enzim környezetéből, azonban az enzim nagy része aktív maradt. A készítményt felhasználásig propanolban tárolták.

Enzimeket felület aktív anyagokkal együtt apoláris szerves oldószerbe keverve a felület aktív molekulák spontán reverz micellákat képeznek, amelyek belsejében az oldott enzim aktivitása megmarad, pl. a pirogallol peroxidáz katalizálta oxidációjának sebessége akár százszorosa lehet, mint vizes fázisban. A felületaktív anyagok töltésének függvényében változik a micellák mérete (Dickinson, Fletscher, 1989).

Guo és Dong (1997) ugyancsak az enzimek rögzítéséhez alkalmazott mátrix hatását vizsgálták, és megállapították, hogy polihidroxil cellulóz alapú kriohidrogél vagy szerves-hidrogél formában az enzimek vízmentes közegben

is működnek.

Almarsson és Klibanov (1996) kutatásai szerint vízmentes oldószerekben (pl. 1,4-dioxán, acetonitril, széntetraklorid) szuszpendált proteáz aktivitása az átészterezési reakciókban akár százszorosára is nőtt, ha denaturáló hatású szerves oldószert (dimetil szulfoxid vagy formamid) adagoltak. Ugyanezek a vegyületek vizes fázisban nem befolyásolták az enzim működését. Feltételezésük szerint e hatásnak oka az enzim molekulák közötti fehérje-fehérje kapcsolat módosításában keresendő. Kermasha és munkatársai (2001) hasonló vizsgálatokat végeztek a tirozináz enzimmel. Az enzim aktivitását heptánban, toluolban, diklórometánban, és diklóretánban vizsgálták. Az oldószerekbe acetont adagolva minden esetben nőtt az aktivitás, azonban 12,5% fölötti aceton koncentráció már gátolta a tirozináz működését.

Az enzimeket szerves oldószerekben oldható oldallánccal (pl. PEG, lipidek, felületaktív anyagok) módosítva olyan komplex vegyületeket készítettek, amelyek nem vizes fázisban oldhatóak. Pl. hidrofób alkoholok transzglykolálása sikeresen elvégezhető β -galaktozidáz lipid komplexével vízmentes diizopropil éterben (Khmelnitsky, O Rich, 1999, Khmelnitsky és mtsai., 1988).

Az enzimek felszínén lévő aminosavak töltésének megváltoztatásával befolyásolni lehetett az enzim molekula közvetlen közelében az aktivitás megőrzéséhez szükséges vízmolekulák mennyiségét. Az enzim felszínén a poláros aminosavakat apolárisra cserélve kevesebb vízre volt szükség az aktivitás megőrzéséhez, mint az eredeti szerkezetet megtartva (Gorman, Dordick, 1992, Arnold, 1988).

2.2.2. Hőstabilitás növelése

Az enzimek biotechnológiai alkalmazásának egyik akadály a magasabb hőmérséklet iránti érzékenységük. Vizes fázisban magas hőmérsékleten a fehérjék elsődleges szerkezetének megváltozása miatt az enzimek inaktiválódnak. A hőmérséklet hatására végbemenő inaktiválódáshoz vezető káros reakciókhoz azonban víz jelenléte szükséges. Így nem meglepő, hogy az enzimek igen hőstabilakká válnak szerves közegben. A lipáz pl. vizes fázisban

100 °C-on másodpercek alatt teljesen denaturálódik. Ezzel szemben tributilint tartalmazó heptanolban a lipáz fél élet ideje 100 °C-on 12 óra (Zaks, Klibanov, 1984). Ayala és mtsai (1986) a citokróm oxidázt és az ATP-ázt vizsgálták 90 °C-on toluolban és megállapították, hogy a felezési idő 100-szorosára nőtt, ha az oldószer víztartalmát 0,3%-ra csökkentették.

2.2.3. A pH hatása

Az enzimek szerves közegben való működésének következő kérdése a reakció pH-ja. Szerves fázisban (a vizes fázis hiányában) a pH nem határozható meg, bár az enzim közvetlen környezetében kis mennyiségben vannak protonok.

Korábbi kutatások szerint a szerves fázisban használt enzimek "emlékeznek" a liofilezésnél ill. a rögzítésnél használt oldat pH-jára, a puffer sóinak jelenlétére. Szerves oldószerekben már nem változnak meg a fehérjék korábban ionizált csoportjai, ezért az enzim kémiai állapota változatlan marad az utolsó oldott állapotához képest. Ezek szerint a biokémiai reakció optimalizálása során azt kell figyelembe venni, hogy az alkalmazott enzimet milyen összetételű és pH-jú pufferből liofilizálták (Zaks, Klibanov, 1986). Triantafyllou és munkatársai (1997) kutatásai szerint az enzim aktivitását az előkészítés során jelentősen befolyásolni lehet. Ha az enzimet megfelelő sókkal együtt immobilizáljuk, vagy liofilizáljuk, akkor megváltozhat az enzim működése, elsősorban a diffúziós gátlás csökkenése miatt.

Halling (2000) szerint a fehérjékben a töltéssel rendelkező aminosavakhoz rendszerint ellen-ion kapcsolódik, intramolekuláris ion-párt alkotva. Az ellenionok jelenléte szorosan összefügg a fehérje töltéssel rendelkező csoportjainak protonáltsági állapotával, sav-bázis tulajdonságával.

Xu és Klibanov (1996) az enzimek pH-memória hatását vizsgálva megállapították, hogy a szubtilizin enzim csak liofilizálás után mutatta ezt a hatást, míg ugyanazt az enzimet keresztkötéseket tartalmazó kristályos formában alkalmazva nem mutatott pH-memória hatást. Ennek alapján feltételezhető, hogy a kétféle készítményben az enzim különböző protonált formában volt jelen. A kristályos enzim mechanikai tulajdonságai jobbak voltak, azonban a liofilizált készítmény aktivitása növelhető volt az előkészítés

során.

Harper és munkatársai (2000) az enzimek szerves fázisban való működésének vizsgálata során szerves fázisban oldódó puffereket illetve sókat alkalmaztak. Kutatásaik szerint a tridodecil-amin (TDA) és annak hidroklorid sója (TDA·HCl) jelenlétében a szubtilizin aktivitása apoláris oldószerekben (pl. toluol, hexán) befolyásolható. A sók arányát változtatva, az enzim aktivitása a TDA mennyiségének növelésével arányosan nőtt. A kutatók feltételezése szerint ennek egyik lehetséges oka, hogy a TDA ionpárt képez az enzim karboxil csoportjaival, stabilizálva ezáltal az enzim ionizációs állapotát, ezáltal befolyásolva a katalitikus aktivitását.

2.2.4. Szubsztrát specifitás változása

Az enzimeket kis víztartalmú oldószerekben szuszpendálva megváltozik a vízburok körülöttük, és rigidebbé válnak. Ennek következtében a nagyobb szubsztrát molekulák nehezebben tudnak az aktív centrumhoz kerülni, pl. a lipáz a terciér-alkoholokat csak vizes oldószerben képes átalakítani, míg a kisebb első- és másodrendű alkoholokat minden közegben (Zaks, Klibanov, 1984). A szerves oldószerek a szubsztrátok kötését a látszólagos K_M értékének változása miatt is befolyásolják. Az oldószerek polaritása az enzimek enantioszelektivitását is módosítja.

Fukui és munkatársai (1980) egész sejteket rögzítettek szteroidok átalakítására majdnem (közel) vízmentes közegben. A *Nocardia rhodocorus* sejteket különböző hidrofobicitású poliuretán gélekbe rögzítve vizsgálták a koleszterin oxidációjának katalízisét és megállapították, hogy a hidrofób ill. hidrofíll gélek jelenlétében más termékek keletkeztek. Kazandjian és munkatársai (1986) ugyancsak a koleszterin oxidációját vizsgálták és a toluolt találták alkalmas oldószernek.

Brink és Tramper (1986) számos biológiai epoxidáló és hidroxilező katalizátort vizsgáltak közel vízmentes közegben. Mikrobiális úton állítottak elő metil-oxiránt n-hexadekán oldatban *Mycobacterium* sp. sejteket kalcium-alginát gélben rögzítve. Kazandjian és Klibanov (1985) a térspecifikus aromás hidroxilezést vizsgálták. Rögzített polifenol oxidázzal a fenolok o-kinonokká

való katalitikus oxidálását vizsgálták különböző oldószerekben. Az enzim vizes fázisban gyorsan inaktiválódott, mivel a keletkezett o-kinonok polimerizálódtak, kloroformban azonban nem lépett fel ez a mellékreakció.

A szerves oldószerekben az egyik leggyakrabban alkalmazott enzim a torna peroxidáz (HRP). A reakció során a fenolok peroxidatív úton történő polimerizációját katalizálja az enzim. Vizes fázisban kis molekula tömegű termékek keletkeznek mivel a dimer és trimer termékek már oldhatatlanok, és polimerizációjuk során az enzimet bevonva akadályozzák annak működését, míg pl. a p-fenilfenol polimerizációja során dioxánban (15% vízben) kb. 50-szer nagyobb molekulatömegű termék keletkezett (Dordick és mtsai. 1987).

Rariy és Klibanov (2000) száraz liofilizált, illetve előzőleg hidratált enzimkészítmények enantioszelektivitását hasonlították össze különböző vízmentes oldószerben, és megállapították, hogy szubtilizin és α -kimotripszin esetében a hidratált enzim flexibilitása nőtt, azonban az enantioszelektivitása nem változott, vagy csökkent.

2.3. Szerves fázisú bioszenzorok

A bioszenzorok csoportosítása több szempont szerint történhet, azokat pl. az alkalmazott biokatalitikus anyag alapján, vagy a detektálás típusa szerint lehet osztályozni. Tekintettel arra, hogy korábbi munkánkban már részletesen ismertettük ezen csoportosításokat, jelen disszertációban ezekre nem kívánunk kitérni (Adányiné Kisbocskói, 1993).

Mintegy két évtizede ismeretes, hogy az enzimek szerves fázisban is képesek működni. Ennek értelmében, tehát olyan bioszenzorok kifejlesztésére is lehetőség van, amelyben a rögzített biológiai komponens szerves fázisban működik. A legnyilvánvalóbb előnye ennek a bioszenzoros összeállításnak a detektálható analitikumok tartományának kiszélesítése olyan vízoldhatatlan, hidrofób komponensek irányába, amelyek közvetlen meghatározására vizes fázisban nincs lehetőség. Másik, talán kevésbé nyilvánvaló előnye az, ha a biológiai reakciót egy organikus réteggel elválasztjuk a vizes fázisú mintától, a hidrofil komponensek okozta interferencia csökken és könnyen megvalósítható

a mintában jelenlévő hidrofil analitikumokból egy komponens kinyerése, elkülönítése.

A bioszenzorokat alkalmazó analitikai eljárások kezdetét Clark és Lyons (1962) glükóz oxidáz alapú enzim elektródot leíró cikke jelentette. Azóta az enzim alapú amperometriás szenzorok több figyelmet kaptak, mint bármelyik más biomolekulát tartalmazó amperometriás rendszerek. Ennek oka az enzimek különleges szelektivitása és nagy katalitikus aktivitása. Az enzim alapú bioszenzorokban az enzim szelektivitását az elektród felszínén való gyors elektron átmenettel kapcsolhatjuk össze. Az amperometriás bioszenzorokat rendszerint az érzékenységük, a válasz linearitása, működési stabilitásuk és tárolási tulajdonságaik alapján értékeljük. Az elektron átvitel biztosításának, gyorsításának érdekében a bioszenzoroknál gyakran alkalmaznak elektrokatalitikus sajátosságú vegyületeket, mediátorokat. Az alkalmazott vegyületek sokasága, az egyéb elektron közvetítő technikák, az enzim immobilizálásának széles köre, valamint az elektród módosításának lehetőségei igen tág teret biztosítanak a bioszenzor kutatók számára. A bioszenzorok alkalmazásának legfőbb célja, hogy összetett mátrixból is egyszerűen meghatározható legyen az adott szubsztrát koncentrációja. Ennek megvalósításához nagy hangsúlyt kell fektetni az enzim immobilizálásánál alkalmazott mátrix kiválasztására, a rögzítés technikájára, valamint az enzim és elektród között elektron közvetítő szerepet játszó vegyületek vizsgálatára. A széleskörű fejlesztések ellenére is a komplex minták előkészítése maradt a bioszenzoros vizsgálatok legfontosabb feladata.

Az első szerves fázisban működő enzim elektródot Hall és munkatársai (1988a,c) fejlesztették ki, akik kloroformban működő amperometriás szenzort készítettek. Polifenoloxidázt használtak fenol származékok (pl. p-krezol) meghatározására. Az enzimelektród grafit-fóliából készült nylon membránnal bevonva, amelyen előzetesen adszorpcióval rögzítették az enzimet. A p-krezol mérése során a lineáris mérési tartomány 1–100 μM volt. Változó intenzitású használat és megfelelő tárolás esetén az enzimelektródot mintegy 200-204 napig lehetett használni.

Hall és munkatársai (1988a) hívták fel a figyelmet a szerves fázisban működő

enzimelektrodok használatának másik előnyére. Az apoláris reagensek nagyobb koncentrációban alkalmazhatók, a vizsgálandó analitikum meghatározásának lineáris tartománya nő, a mellékreakciók száma csökken (pl. polifenol oxidáz reakciója).

Miyabayashi és munkatársai (1989) potenciometriás enzimelektrod kifejlesztéséről számoltak be. Mágneses részecskékhez α -kimotripsint adszorbeáltak, amelyet mágneses mező kialakításával kötöttek az elektrod hegyére. A mágneses teret módosítva változtatni tudták a rögzített enzim mennyiségét, és így különböző hidratáltsági fokú diizopropil-étert, illetve toluolt használva nyomon tudták követni a kimotripsin katalizálta észterszintézist. Az enzimreakció eredményeként bekövetkező potenciálváltozás detektálásához Pt-elektrodot használtak. Vizsgálataik során kimutatták, hogy a kapott jel nagysága jelentősen függött az oldószer hidratációjától (Dordick, 1989, Zaks, Klibanov, 1988).

2.4. A biokatalitikus anyag rögzítése

Az oldott enzimekhez képest az immobilizált enzimek gyakran nagyobb katalitikus aktivitást mutatnak, jobban ellenállnak a tömény szerves oldószereknek az aktivitás teljes elvesztése nélkül, illetve az enzim féléletidejének növekedését is megfigyelték. Ezeknek az adatoknak az általánosítása elég nehéz, mivel nagyon kevés tanulmány foglalkozik az enzimek szerves oldószerekben való viselkedésével. A rögzítés következtében előfordulhat, hogy a vízkoncentráció a hordozó hidrophil tulajdonságai miatt az immobilizált enzimmolekulák közvetlen környezetében nagyobb, mint az oldat teljes tömegében. Másrészt pedig többnyire hidrolitikus enzimeket vizsgáltak, amelyekről ismert, hogy akkor is képesek a hidrolízist nem specifikusan katalizálni, amikor az aktív centrum denaturálódott.

- Adszorpció - A legegyszerűbb eljárás, amikor az elektrod felszínén a biokatalitikus anyag van der Waals erővel és H-kötésekkel kapcsolódik. Rendszerint grafit fólián, alumínium-oxidon és szénszálon lehet ezt az eljárást alkalmazni. Fizikai adszorpcióval igen egyszerűen lehet hidrofób oldószerekben alkalmazható elektrodokat készíteni, feltéve, hogy az enzim

és az elektród egyéb anyagai nem oldódnak. Némely hidrofil oldószerben vagy oldószer-víz keverékében azonban az elektród felületén lévő enzimmag közvetlen kapcsolata esetenként megszakad, mivel az oldószer verseng az enzimmaggal az elektród felületén az elektrosztatikus kölcsönhatásért.

- Konjugálás – Az enzimeket az elektród, vagy egy membrán felszínén bifunkciós keresztkötő vegyületeket alkalmazva (pl. glutáraldehiddel, vagy 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid és N-hidroxiszukcinimid (EDC/NHS) reagensek segítségével szukcinimid észter képzéssel) rögzítették (Palmer, 1991). A szenzorok stabilak, mind hidrofil, mind pedig hidrofób oldószerekben. Polietilén-glikolt (PEG) is alkalmaztak pl. tirozináz rögzítéséhez fenolok meghatározására cigaretta filterből (Adeyoju és mtsai, 1996). Annak ellenére, hogy a keresztkötő vegyületek alkalmazásakor megnövekedett a szenzorok enzimkötő képessége és stabilitása, az enzimek aktív centrumában és annak környékén található aminosav maradékok is részt vehetnek a keresztkötési reakciókban, gátolva ezzel az aktív centrumhoz való hozzáférés lehetőségét a szubsztrát molekulák számára. Ez a zavaró hatás csökkenthető, ha kis molekula tömegű természetes fehérjéket (pl. BSA-t) is rögzítünk a szenzor készítése során. Ennek eredményeképpen stabil és rövid válaszidejű szenzorok nyerhetőek.
- Gélbe- vagy filmbezáras - Az egyik legelterjedtebb rögzítési mód mind a vizes, mind pedig a szerves fázisban alkalmazott enzim elektródok (OPEE) fejlesztése során. Cosnier és munkatársai (1998) glükóz oxidázt és polifenol oxidázt rögzítettek elektrokémiai módszerrel. Oxidatív elektropolimerizációval két-, illetve háromrétegű poli(pirrol-laktobiózamid) filmet képeztek az elektród felszínén, amelyben az enzimeket rögzítették. A kialakított filmréteg hatására nőtt a bioszenzorok érzékenysége és élettartama a szerves fázisban.

Vidal és munkatársai (1999, 2000) ugyancsak elektroszintézissel készítettek polimer rétegeket az elektród felszínén. A polipirrol polimer filmben rögzítették a glükóz oxidáz és a koleszterin oxidáz enzimeket.

Kínai kutatócsoport amperometriás bioszenzort készített tirozináz enzim rögzítésével fenolok vizsgálatára. Az enzimet optimalizált összetételű szilikon szol-gél mátrixban rögzítették. A szubsztrátok sorrendje a tirozináz enzim specifitása alapján a vizsgált szerves oldószerben a következő volt: katechin>fenol>p-krezol (Wang, Dong, 2000, Wang és munkatársai, 2000). Hall és munkatársai (1988a) tirozináz enzimet alkalmaztak fenol meghatározására kloroformban. Ebben a hidrofób környezetben a tirozináz a fenolok oxidációját katalizálja a megfelelő elektroaktív kinonná. Connor és munkatársai (1989) az enzimet szilikon-pasztában oszlatták el grafit elektródon való immobilizálás előtt. Az enzimelektrod érzékenységét jelentősen befolyásolták a gél és az analitikum közötti hidrofób kölcsönhatások. Li és munkatársai (1998) HRP enzimet rögzítettek szilikon-gélben szénpaszta elektród felületén. Vizsgálták a szubsztrátok aktivitási sorrendjét és a látszólagos K_M értékeket.

Iwuoha és munkatársai (1997a) peroxid bioszenzort készítettek, úgy hogy platina korong elektródon polianilin (PANI) filmmel rögzítették az enzimet, majd polivinil-szulfonáttal vonták be. Az elektród acetoneban, acetonitrilben, propanolban, tetrahidrofuránban is aktív volt.

- Biokompozit elektródok - Ezek az elektródok reagens nélküli elektródként alkalmazhatók úgy, hogy az elektrokatalizátor a szenzor anyagának része. Szerves fázisban két fő típusuk használatos:

1. Szénpaszta elektród: Wang és munkatársai (1991) HRP enzimet rögzítettek grafit por és epoxi gyanta keverékében. Az enzimelektroddal peroxidok koncentrációját mérték acetonitrilben. Hátrányt jelentett az alkalmazás során, hogy szerves oldószerben a kötőanyag vagy az elektron szállításáért felelős mediátor egy része kioldódott az alapoldatba és ezzel még bonyolultabbá vált a rendszer kinetikája.

Nistor és munkatársai (1999) tirozináz alapú bioszenzort készítettek különböző összetételű polimer membránokkal (Eastman AQ, Nafion). Összehasonlították az enzim elektródok működési paramétereit, alkalmazhatóságát.

Vieira és Fatibello-Filho (2000) szénpaszta elektródot készítettek úgy, hogy az elektród alapanyagát édes burgonya levével és paraffinnal

keverték össze, az édes burgonya leve ugyanis jelentős mennyiségű peroxidázt tartalmaz. Az így készített bioszenzor alkalmasnak bizonyult kozmetikai szerekben lévő hidrokinon meghatározására szerves fázisban.

2. A redox enzimek felszínén levő anionos aminosavak (lizin) megkötésére hosszú láncú polikationos vezető polimert alkalmaztak. A keletkezett komplexeket keresztkötésekkel rögzítették az elektród felszínén, tehát közvetlen kapcsolat keletkezett az elektród és az enzim redox katalitikus centruma között a vezető polimerlánc révén. Iwuoha és munkatársai (1994) nagy mólsúlyú redox Os-polimerhez ($[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{PVP})_{20}\text{Cl}]\text{Cl}$) kapcsolták a glükóz oxidáz enzimet glutáraldehid keresztkötésekkel. Az enzim és a makromolekulák között a szubsztrát és termék molekulák számára könnyen átjárható háromdimenziós háló képződött. A víz szerepét vizsgálva a szerzők megállapították, hogy a polaritás növelésével nőtt az aktív kötőhelyek flexibilitás. Ennek köszönhetően 1-2% v/v víz jelenléte szerves oldószerben már jelentősen növelte egyes enzimek katalizálta reakciók sebességét.

2.5. A szerves oldószer alkalmazásának előnyei és hátrányai

A szerves oldószer alkalmazásának számos előnye van mind a biotechnológiai eljárások során, mind pedig a bioszenzorok alkalmazásakor, azonban néhány hátrányt is meg kell említeni: (Dordick, 1989, Brink és mtsai., 1988, Cosnier, 1999)

A szerves oldószer alkalmazásának előnyei:

- csökken a szubsztrát illetve a termék gátlás,
- nagyobb szubsztrát illetve termék koncentráció érhető el, nő az apoláris szubsztrátok oldhatósága,
- a reakcióegyensúly eltolható a szubsztrát és / vagy termék megosztásával a megfelelő fázisok között,
- a szubsztrát illetve a termék hidrolízise megakadályozható,
- a biokatalizátor immobilizálás nélkül, vagy adszorpcióval rögzítve

alkalmazható,

- csökken a mikrobiális szennyezés lehetősége,
- a víz jelenlétében fellépő nemkívánatos mellékreakciók visszaszoríthatók,
- egyszerű a termék kinyerése az alacsony forrponú oldószerekből,
- a szerves oldószerekben sokszor nő az enzimek termikus stabilitása.

A szerves oldószerek alkalmazásának hátrányai:

- a biokatalizátor denaturálódhat, bizonyos esetben működését a szerves oldószer gátolja,
- oldószer járulékos költségeivel és környezeti hatásával (megsemmisítés, tisztítás) is számolni kell.

2. 6. Enzim alapú bioszenzorok működése szerves közegben

Röviden összefoglaljuk azokat az eredményeket, amelyeket különböző kutatócsoportok szerves fázisban működő elektrokémiai bioszenzorok, enzimelektrodok fejlesztése terén értek el.

2.6.1. Glükóz meghatározása szerves közegben

A glükóz oxidáz enzim (GOx) a bioszenzoros kutatásoknál az egyik legismertebb, és legtöbbet alkalmazott enzim. Népszerűségének oka, hogy könnyen hozzáférhető és viszonylag olcsó. Az enzimreakció sajátosságai jól ismertek, gyakran új mérés technikák kikísérletezéséhez, első bemutatásához glükóz oxidázt használnak. Ennek ellenére kevesen tanulmányozták a GOx működését szerves oldószerekben.

Kröger és munkatársai (1998) a GOx aktivitását vizsgálták különböző koncentrációjú víz-alkohol elegyekben, alkoholként metanolt, etanolt, i-propanolt használva. A mérést amperometriásan végezték az oxidáció során keletkezett hidrogén-peroxid detektálásával. A kísérletek eredménye alapján megállapították, hogy etanol jelenlétében az oxidációs reakció sebessége nőtt, míg a metanol csökkentette azt.

Iwuoha és Smyth (1994a) forgó Glassy Carbon elektródon BSA és glutáraldehid segítségével immobilizálták a GOx-ot, a méréseket 2-butanolban ferrocén- monokarbonsav (FMCA) mediátor jelenlétében +0,3 V polarizáló feszültségnél végezték. A gyors elektródválasz miatt az FMCA alkalmas mediátornak bizonyult, az eredmények alapján azonban a 2-butanolban az enzim aktivitása nem haladta meg a vizes oldatban elérhető értéket. Ugyanez a szerzőpáros ciklikus voltammetriás méréseket is végzett acetonitril-víz rendszerben (90%+10% v/v), amely 0,1 M KCl-t és 2,5 mM FMCA-t tartalmazott. A voltammogramot glükóz jelenlétében 0 - +0,6 V között felvéve az optimális féllépcső potenciál +0,27 V-nál volt, ami megegyezett az FMCA oxidációs féllépcső potenciáljának. Acetonitrilben az FMCA oxidációs árama (96 μ A), majdnem a kétszerese a vizes fázisban mért értéknek (52, ill. 55 μ A). Ezek szerint a reakció sebesség acetonitriles közegben nagyobb volt, mint vizes közegben (Iwuoha és Smyth, 1994b).

Campanella és munkatársai (1998a) a glükóz oxidáz enzimet κ -karragén gélben immobilizálták, majd az enzimet tartalmazó gélkorongot oxigénelektrodon dialízis membránnal rögzítették és 15 percig foszfát pufferban áztatták. A glükóz oxidáz vizsgálata során kloroform (0,09% víz), etilacetát (1,5% víz), acetonitril (2,45% víz) használatakor kaptak értékelhető jeleket, kevesebb víz jelenlétében a bioszenzor nem adott választ.

Iwuoha és munkatársai (1994) a GOx enzimet redox Os-makromolekulával komplexben FAD-dal együtt rögzítették. Bár 100% acetonitrilben is kaptak enzimes jelet a szerzők, a maximális jelet 20% víz jelenlétében (igen éles csúcs) nyerték. Más oldószer alkalmazásakor gyakran 1-2% víz jelenléte is elegendőnek bizonyult.

2.6.2. Kataláz enzimet tartalmazó bioszenzorok működése

A kataláz enzim a hidrogén-peroxid és más hidroperoxid származékok bomlását katalizálja. Magner és Klibanov (1995) kísérletei igazolták, hogy az enzim szerves oldószerekben is megőrzi aktivitását, ezért lehetővé vált szerves fázisú bioszenzorokban való alkalmazása. Vizsgálataik szerint a marha májból izolált kataláz enzim a t-butil hidroperoxid bomlását szerves oldószerekben sokkal

gyorsabban katalizálja, mint vizes oldatban.

Wang és munkatársai (1995) Glassy Carbon elektród felszínén poli(észter-szulfonsav)polimerrel (Eastman-AQ) immobilizálták a kataláz enzimet. Az elektródot 0,05 M tetraetil-ammónium-toluén-4-szulfonátot (TEATS) tartalmazó acetonitrilben, illetve acetonban alkalmazták. Horozova és munkatársai (2002) grafit elektród felszínén Nafion alapú gélbe ágyazva rögzítették a kataláz enzimet, majd acetonitrilben vizsgálták a peroxid koncentrációt 0-40 μM méréstartományban a felszabaduló oxigén mérésén keresztül.

Olasz kutatócsoport kataláz enzimet tartalmazó szenzort készített, az enzimet κ -karragén gélben rögzítve hidrogén-peroxid nem vizes közegben való meghatározására. Vízzel telített és vízmentes oldószereket - kloroformot (0,03% víz), klórbenzolt (0,01%), toluolt (0,02%) és etilacetátot (0,02%) használva vizsgálták a szerves fázisú enzim elektród (OPEE) alkalmazhatóságát. A kifejlesztett kataláz alapú OPEE-t gyógyászati- és kozmetikai-alapanyagok és termékek hidrogén-peroxid tartalmának meghatározására alkalmazták. Ezekhez a vizsgálatokhoz a dioxán (0,4% víz) bizonyult alkalmas oldószernek, mivel a krémek, kenőcsök feloldására ez volt a legmegfelelőbb. Olíva olajok mesterségesen előidézett avasodását is vizsgálták és megállapították, hogy a szerves hidroperoxidok koncentrációja kb. 45-50 óra sütés után jelentősen megnő, ami alátámasztotta korábbi eredményeiket, miszerint kb. ugyanennyi idő kellett az olívaolajokban lévő polifenol tartalom csökkenéséhez (Campanella és mtsai. 1996a,b, 1998c, 2001, Campanella és Tomassetti, 1996).

Hyun és munkatársai (1996) polivinil-alkohol (PVA) membránban rögzítve vizsgálták a kataláz enzim stabilitását és megállapították, hogy PEG-gel keverve jelentősen nőtt az enzim aktivitása és stabilitása szerves oldószerekben. Az enzim aktivitása függött a PEG móltömegétől, a legjobb eredményt a 3350-6000 móltömegű PEG-gel érték el. A hatást Khmel'nitsky és munkatársai (1988) ugyancsak bemutatták, és arra vezették vissza, hogy a PEG molekulák erősen hidratált láncai vízburokkal veszik körül az enzimmolekulákat, ezáltal megőrizve aktivitásukat. Az enzimet körülvevő

vízburkok jelentőségét ugyancsak bizonyította, hogy vízdoldható szerves oldószerek teljesen inaktiválják az enzim-PEG komplexet, mivel a víz eltávolításával tönkreteszik a vízburkot.

2.6.3. Koleszterin oxidáz enzimet tartalmazó bioszenzorok működése

A koleszterin koncentrációjának meghatározása a klinikai analitika területén fontos feladat. A vér koleszterin szintje felvilágosítást adhat a beteg állapotáról. Az egészségre gyakorolt hatása miatt a koleszterin koncentráció mérése az élelmiszeriparban is nagy jelentőséggel bír, hisz a koleszterin szegény diéta segítségével számos érrendszeri betegség megelőzhető. Ennek köszönhető, hogy széles körben alkalmazható eljárásokat dolgoztak ki, elsősorban a GC és TLC technika terjedt el. Ezeknek az eljárásoknak a kétségtelenül nagy pontossága, jó reprodukálhatósága mellett azonban jelentős hátránya, hogy igen sok munkát igényel a minták mérésre való előkészítése. Az élelmiszerekben a koleszterinnek csak kb. 30 %-a szabad, kb. 70%-a azonban kötött formában található, elsősorban észterkötéssel kapcsolódik zsírsavakhoz (Karam és Chang, 1994). Ebből következik, hogy a minták koleszterint tartalmazó része nem, vagy rendkívül csekély mértékben oldódik vízben, illetve puffer oldatban. A koleszterin élelmiszerekből való meghatározásához a mintát káliumhidroxid oldattal való elszappanosítás után extrahálják, majd a szerves fázist bepárolják. Mivel ez a minta előkészítési mód rendkívül munkaigényes, a kutatók a módszer egyszerűsítésére törekedtek, és vizsgálták, miként lehet a nagy szelektivitást biztosító enzimes reakciókat alkalmazni. A klinikai vizsgálatok során megfelelőnek bizonyult a vérérumok koleszterintartalmának meghatározására az a módszer, miszerint a mintákat TRITON-X 100-ban, illetve i-propil-alkoholban oldva vizes fázisban határozzák meg (Situmorang és mtsai, 1999).

Ram és munkatársai (2001) a koleszterin észterázt (CE) és a koleszterin oxidázt (COD) kollagén membránon, illetve vezető polimer mátrixban rögzítették, és a felszabadult hidrogén-peroxidot amperometriásan mérték. Vidal és munkatársai (2000) ugyancsak amperometriásan határozták meg a koleszterin tartalmat vizes fázisban mesterséges (FMCA) és természetes

mediátorok (flavin nukleotidok) jelenlétében, míg Gobi és Mizutani (2001) poli-sztirol-szulfonát segítségével a peroxidázzal bevont Au-alkántiolát mikroelektródon monomolekuláris rétegben rögzítették a COD-ot. A bioszenzor lineáris mérés tartománya 0,2-3,0 mM volt 0 V polarizációs potenciált alkalmazva. Brahim és munkatársai (2001, 2002) elektrokémiai polimerizációval polipirrol hidrogélben rögzítették a COD-ot platina-fólia elektród felszínén. Bongiovanni és munkatársai (2001) pirolitikus grafitelektród felületén polimer filmben rögzítették az enzimeket, majd az enzimelektródot áramló injektációs rendszerben (FIA) alkalmazták.

Több kutatócsoport FIA rendszerben alkalmazható töltött oszlopban rögzítette az enzimeket, majd a keletkezett hidrogén-peroxidot amperometriás peroxidáz elektróddal (Yao és mtsai., 1985), illetve színreakcióval (Krug és mtsai., 1992, Baticz, Tömösközi, 2002) határozta meg.

Már a hetvenes évek óta ismert, hogy a CE és COD enzimek szerves oldószerekben is működnek. Buckland és munkatársai (1975) ismertették elsőként, hogy a *Nocardia* sejtekben lévő enzimek szerves fázisban bontják a koleszterint, elsősorban apoláris oldószerekben, toluolban, hexadékanban, széntetrakloridban, éterben bizonyították az enzim aktivitását. Liu és munkatársai (1996) szerint a hosszú szénláncú szénhidrogénekben, amelyeknek log P értéke nagy (hexán, dodekán, hexadékan), sokkal jobb a konverzió foka, mint kis log P értékű oldószerekben (etilacetát, dietil éter). Az enzim reakció sebességét egymagában nem határozza meg sem az oldószer apolaritása sem pedig a vízzel való elegyedési készsége (Narayan, Klibanov, 1993, Zaks, Klibanov, 1988). Kazandjian és munkatársai (1986) a víz jelenlétének hatását vizsgálták a COD működésére, és azt találták, hogy a koleszterin oxidációjának sebessége toluolban 0,4% v/v foszfát puffer (0,1 mM, pH 7,0) jelenlétében volt maximális, 27 nM/perc.

Dordick (1989) COD-ot, Pineiro-Avila és munkatársai (1998) pedig HRP és COD keverékét adszorbeálták üveggyöngyön majd a hordozót enzimreaktorba töltve pufferral telített toluolban oxidálták a koleszterint. Az adott tartózkodási idő alatt keletkező hidrogén-peroxid mennyiségét szerves fázisban p-anizidin színreakciójával határozták meg. Kumar és munkatársai (1999) új

hordozóanyagot, a Formvart (polivinil formal) alkalmazták az enzim rögzítésére. A hidrofób jellegű membrán élettartama szerves oldószerben igen hosszúnak bizonyult (10 nap). Vizsgálataik szerint a membránban rögzített enzim pH és hő stabilitása nagyobb volt, mint a natív enzimé.

Campanella és munkatársai (1996b) vízzel telített kloroformban tetrabutilammónium-toluol-4-szulfonát (TBATS) vezető elektrolit alkalmazását javasolták. Pena és munkatársai (2001) ferrocianid mediátor jelenlétében COD és HRP rögzítésével, teflonnal módosított grafitelektróddal határozta meg tojássárgájának koleszterintartalmát.

Klibanov (1986) a vízben rosszul oldódó koleszterint kismennyiségű szerves oldószerrel extrahálva mérte. Ez az eljárás alkalmas volt egyrészt a vizes fázisban a kimutatási határnál alacsonyabb koncentrációban jelenlevő szubsztrát töményítésére, másrészt pedig a szelektív extrakció segítségével csökkent a zavaró vegyületek hatása. Rong-Zhen-Zhang és munkatársai (1999) tojássárgájának minta-előkészítésére dolgoztak ki egy igen egyszerű eljárást. A tojássárgáját vízben oldották, majd éter és petroléter elegyével extrahálták a mintából annak koleszterin tartalmát. Fordított fázisú HPLC-vel (acetonitril-2-propanol, 80%+20% v/v) mérve a koleszterin tartalmat, nem volt különbség az elszappanosítás, illetve az extrakció után vizsgált minták esetében kapott koncentráció értékek között. Johnson és munkatársai (1995) a minta-előkészítés során a korábban alkalmazott metanol-kloroformos extrakció helyett az n-hexán-2-propanol elegyét alkalmazták megfelelő eredménnyel.

Hall és Turner (1991) COD alapú bioszenzort készítettek koleszterin vajban és margarinban történő meghatározására. Koleszterin oxidáz enzimet alumínium oxid szemcséken rögzítettek, amelyet az oxigénelektrod mérőeleménél helyeztek el. Kloroform és hexán elegyében a szenzor 1-10 mM méréstartományban működött.

2.6.4. Tirozináz enzimet tartalmazó bioszenzorok működése

A szerves fázisban végzett mérések esetében az egyik leggyakrabban alkalmazott enzim a polifenol oxidáz enzim, más néven tirozináz, amely regioszelektivitása miatt fontos szerepet tölt be a fenolok hidroxilálásában.

Mivel a kinon vizes fázisban polimerizálódik, célszerű szerves fázisban való alkalmazásuk.

Zhang és munkatársai (2001) vizes és szerves fázisban egyaránt alkalmazható tirozináz alapú bioszenzorról számoltak be. Az elektród az enzimmal és a pufferoldattal együtt egy hidrofil dialízis membránnal volt elzárva a szerves közegtől, így téve lehetővé az enzimelektród alkalmazását szerves közegben is. A mérés érzékenysége, a lineáris méréstartomány és a válaszidő az oldószerek és a szubsztrátok relatív hidrofobicitásától függően változott.

Wang és munkatársai (1993) módosított Glassy Carbon elektródot készítettek, amelyet FIA rendszerben használtak. Az elektród felszínére Eastman-AQ polimer oldattal kevert tirozináz és peroxidáz enzimet vittek fel, majd megszáritották. Az enzimelektródot acetonitril-víz (96%+4% v/v) 0,05 M tetraetil-ammonium-toluol-4-szulfonátot tartalmazó keverékében használták, amely alkalmasnak bizonyult antibakteriális gyógyszerkészítmények fenoltartalmának meghatározására.

Campanella és kutatócsoportja több éve vizsgálják a tirozináz immobilizálásának lehetőségeit, tanulmányozzák az enzimet tartalmazó OPEE-k működését különböző közegekben, és a kifejlesztett enzimelektród sokszínű gyakorlati alkalmazásáról is számos cikkben számoltak be. A tirozináz enzimet κ -karragénen rögzítették, illetve 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrokloriddal és N-hidroxi-szukcinimiddel (EDC-NHS) immobilizálták egy nylon membránon, majd ezt dialízis membránnal Clark-típusú oxigénelektródra rögzítették és -0,65 V-on polarizálták az elektródot.

Vizsgálták, hogy különböző oldószerekben, illetve azok keverékében hogyan változik a tirozináz enzim specifitása alapján a szubsztrátok sorrendje. A kísérletek során n-hexán; n-hexán-kloroform (75%+25% v/v); n-hexán-kloroform (50%+50% v/v); n-hexán-kloroform (25%+75% v/v); kloroform és vízzel telített kloroform alkalmasságát vizsgálták a különböző szubsztrátok meghatározásának érdekében. A fenti szerves oldószerek közül az n-hexán bizonyult a legmegfelelőbbnek, a reakciósebességet illetően a szubsztrátok sorrendje a következő volt: p-Cl-fenol >> o-krezol > o-Cl-fenol > p-krezol > gvajakol. A polifenolok kimutatására alkalmas OPEE szenzort olíva olajok

polifenoltartalmának meghatározására alkalmazták. A kifejlesztett OPEE-t mintegy 15 napig tudták használni (Campanella és mtsai., 1992b, 1994a,b, 1996a).

A bőrgyógyászatban alkalmazott kenőcsök, olajok gyakran tartalmaznak kb. 0,1% koncentrációban Cl-krezolt, amely sem vízben, sem pedig a már korábban alkalmazott szerves oldószerekben nem oldódott maradéktalanul, azonban a tirozináz alapú bioszenzorok alkalmasak ezen szubsztrát koncentrációjának meghatározására (Campanella és mtsai., 1992a).

Hall és munkatársai (1988a, b) polifenol oxidáz enzim működését vizsgálták kloroformban. Az enzimet grafit fólia elektródon rögzítve 0,1 M TBATS kloroformos oldatába merítették. A szenzorral p-krezol koncentrációját vizsgálták szennyvizekben. A kísérleteket álló rendszerben végezték, a kloroformos oldatot használat előtt Na-foszfát pufferral (50 mM, pH 7,0) telítették.

Mannino és munkatársai (1994) a tirozináz alapú enzimelektrod rendkívül érdekes alkalmazási területéről számolnak be. Állandó szubsztrátkoncentráció biztosítása mellett lehetőség nyílik a különböző élelmiszerek (pl. zsírok, olajok) víztartalmának meghatározására. A víz ebben az esetben aktivátorként szerepel, hiszen az enzimek szerves fázisban való működéséhez jelenléte feltétlenül szükséges. A szerzők kimutatták, hogy 1% víztartalomig az enzim aktivitása lineárisan függ a víz koncentrációjától.

2.6.5. Peroxidáz alapú bioszenzorok

Schubert és munkatársai (1991) hexacianoferrát(II)-tal kevert HRP oldatot porlasztottak az elektródként alkalmazott grafit fóliára, majd TBATS mint vezetősót oldottak a szerves oldószerekben.

A peroxidáz enzim a szerves oldószerekben igen könnyen denaturálódott, elvesztette aktivitását. Stabil, szerves fázisban is alkalmazható bioszenzorok készítésére az enzimet komplex képzéssel módosították. Iwouha és munkatársai (1997a) az NHS-sel módosított peroxidáz enzimet osmium bis(bipiridil)poli(4-vinilpiridin) polimeren glutáraldehiddel rögzítették. A mérések során alkalmazott szerves oldószerekben vezetősóként 0,1 M TEATS-ot oldottak.

Későbbi munkájukban Pt korong elektródon PANI és polivinil-szulfonát (PVS) elegyét elektropolimerizálták. A HRP enzimet az így képzett filmben ugyancsak elektrokémiai kötéssel immobilizálták. A bioszenzor megfelelő aktivitást mutatott a különböző szerves oldószerekben, bár a kinetikai vizsgálatok szerint minden oldószernél más és más a lineáris méréstartomány (Iwouha és mtsai, 1997b).

2.6.6. Foszfolipáz D és kolin oxidáz alkalmazása bioszenzorokban

Foszfolipáz D és kolin oxidáz rögzítésével Campanella és munkatársai (1998b) bienzimes szenzort készítettek lecitin szerves fázisban történő meghatározására. A meghatározáshoz szükséges enzimeket dialízis membránon, illetve κ -karragén gélben rögzítették. Az enzimeket tartalmazó membránokkal Clark-típusú elektród mérőfelületét vonták be. Élelmiszerek (tojássárgája, szójaliszt és olaj, tejsokoládé, stb.) lecitintartalmát mérték, és az eredményeket enzimes-fotometriás módszerrel kapott eredményekkel hasonlították össze. A méréseket n-hexán-kloroform (50%+50% v/v) elegyében végezték. A reakció rétegek közül a κ -karragén gélben történő rögzítést javasolják, mivel így rövidebb a válaszidő, hosszabb a szenzor élettartama, valamint alacsonyabb a szenzor alsó méréshatára is.

2.6.7. Butiril kolin észteráz és kolin oxidáz alkalmazása bioszenzorokban

Montesinos és munkatársai (2001) acetilkolin észteráz aktivitásának gátlása alapján határozták meg vízzel elegyedő oldószerekben a mezőgazdaságban sokszor alkalmazott klórpírifosz-etil-oxon peszticid koncentrációját.

Campanella és munkatársai (1999) szerves fázisban alkalmazható, az enzim működésének gátlása alapján működő bienzimes elektródot készítettek peszticidek és karbamát meghatározására. A kísérletek során az említett enzimeket egyrészt dialízis membránnal közvetlenül rögzítették Clark-típusú oxigén elektródra, másrészt κ -karragén-gélben adszorbeáltatva ugyancsak membránnal erősítették az elektród felületére. A mérések során paraoxon, malathion, etilparation, aldicarb, carbaril szubsztrátokkal vizsgálták az

amperometriás jelek nagyságának alakulását. A méréseket -650 mV potenciálon végezték, szerves fázisként pedig vízzel telített kloroform-n-hexán (50%+50% v/v) elegyét használták. A kísérletek során κ -karragénes reakció réteg bizonyult jobbnak, a vizsgált szubsztrátok közül pedig a legnagyobb amperometriás jelet a paraoxon adta, mindemellett ennél volt a válaszidő a legrövidebb is (6 sec).

3. KÍSÉRLETI RÉSZ

3.1. Anyagok és eszközök

Kísérleteinkhez az alábbiakban felsorolt anyagokat, vegyszereket és műszereket használtuk fel:

Bovine serum albumin (BSA), mikrobiológiai tisztaságú, Phylaxia

Fehérjemembrán (sertésvékonybél), kereskedelmi

Ferrocén-monokarbonsav (FMCA), Sigma Chemical Co. (St. Louis, MA, USA)

Sucrose / D-Glucose / D-Fructose teszt csomag, Boehringer (Mannheim, Németország)

Glükóz oxidáz enzim (E.C.1.1.3.4.), 23.900U/g, *Aspergillus niger*, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MA, USA)

Kataláz enzim (E.C.1.11.1.6), 2390 U/mg, Bovine liver, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MA, USA)

Koleszterin észteráz enzim (E.C.3.1.1.13) 638 U/g, Bovine Pancreas, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MA, USA)

Koleszterin oxidáz enzim (E.C.1.1.3.6.) 150 U/mg, *Pseudomonas*, ICN Biomedicals Inc.(Aurora, Ohio, USA)

Koleszterinoleát, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MA, USA)

Tetrabutylammónium-p-toluolszulfonát (TBATS), ALDRICH (Steinheim, Németország)

Szerves oldószerek HPLC minőségűek, CARLO ERBA (Milano, Olaszország)

A munkánk során alkalmazott további vegyszerek alt. minőségű kereskedelmi termékek voltak.

pH-mérő - OP-271 pH-Ion Analyzer, Radelkis

ESA Coulochem II Elektrokémiai detektor - ESA Coulochem II (USA)

Vékonyréteg típusu amperometriás cella, Mo. 5040 (ESA, USA)

HPLC pumpa - ESA (USA)

Polarográf - OH-105 Universal Polarograph, Radelkis

Injektor - 20 µl-es mintahurokkal, Rheodyne Inc., (Cotati, CA, USA)

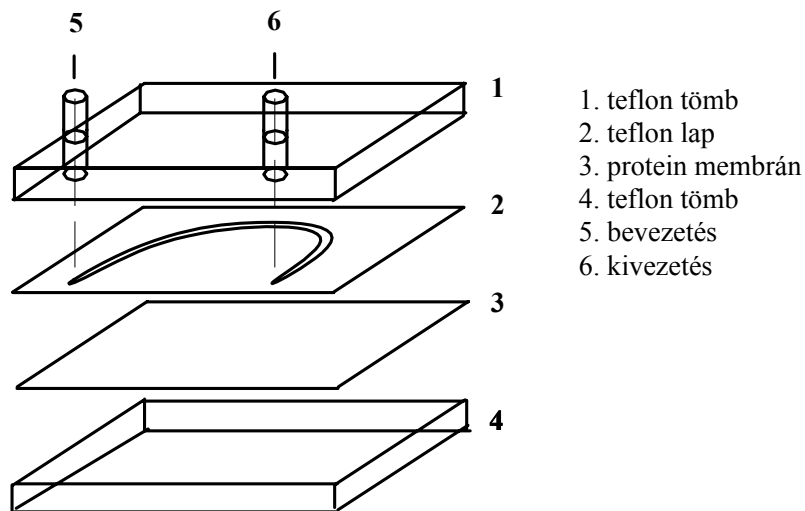
UV-VIS fotométer, SP6-550 Pye Unicam

3.2. A FIA rendszer leírása

Méréseinket a kitűzött célunknak megfelelően folyamatosan áramló rendszerben injektálásos mérés technikával végeztük. Mérőcellaként a glükóz és más szubsztrátok meghatározására alkalmas bioszenzort fejlesztettünk ki, amely kialakításakor egyaránt figyelemmel kellett lenni az áramló rendszernek megfelelő geometriai kialakításra, a kémiai, biokémiai reakciókhoz szükséges optimális körülmények megteremtésére, ez esetben a szerves oldószerek alkalmazásának követelményeire is. Tekintettel arra, hogy a különböző enzimek alkalmazásakor a kialakított mérőrendszer elrendezésén változtatni kellett, az áramlási diagramot az adott fejezetben külön ismertetjük.

Az enzimek rögzítésére kísérleteink során a Havas és mtsai. (1981) ötlete alapján már korábban továbbfejlesztett (Adányiné Kisbocskói, 1993) vékonyréteg cellát alkalmaztunk, azonban a szerves oldószerek használata miatt ezt a konstrukciót is módosítani kellett. A kialakított vékonyréteg cella felépítését az 1. ábra mutatja be. A korábban plexiből készült tömb helyett most olyan anyagot kerestünk, amely a szerves oldószereknek ellenáll, és könnyen megmunkálható. Ennek a feltételnek a teflon jól megfelelt, ezért az enzimmembrán teflon tömbből készítettük el. Az alsó teflon tömbön (4) került kifeszítésre az a természetes fehérje membrán (3), amelyre az enzimet immobilizáltuk. Erre egy 0,5 mm vastag teflon lapot helyeztünk (2), amelyen egy 120mm hosszú, 2,5 mm széles U alakú járatot alakítottunk ki. Ez az a vékony réteg, ahol az oldat áramlik és kölcsönhatásba kerül a rögzített enzimmel. A (1) teflon tömbbel fedtük le a cellát, ezen a teflonlapon kialakított járatnak megfelelően 2 furat van, amelyek fém kivezetéssel (5,6) végződnek. A

két furat az oldat be-, illetve kilépésének a helye. A cellát hat csavarral rögzítettük.



1. ábra Vékonyrétegcella

A vékonyréteg cella készítésekor olyan fehérje membránt használtunk, amelyhez könnyen és stabilan lehet az enzimeket rögzíteni. Ennek a követelménynek igen jól megfelelt a sertésvékonybél, amely mint érdes felületű természetes fehérjemembrán megfelelő rögzítést biztosított az enzimeknek.

A fehérjemembránt több órán át desztillált vízben áztattuk, hogy a konzerváló só kioldódjon belőle. Többszöri átmosás után a membránt pufferoldattal is átöblítettük. A teflontömbön kifeszítettük a fehérjemembránt, leitattuk a felesleges pufferoldatot, szikkadni hagytuk, majd ráhelyeztük a teflonlapot. A furatoknak megfelelően óvatosan átyukasztottuk a membránt. A fehérjemembránra a teflonlapnak megfelelő járatba felkentük a már előkészített enzimoldatot. A glutáraldehid oldatból 50 μ l-t gyors, határozott mozdulattal elterítettünk az enzimrétegen és egy kicsit összekevertük. Az így elkészített immobilizált enzimréteget szobahőfokon száradni hagytuk, rátettük a teflonlapot, majd a felső teflonlappal lefedve összezsavaroztuk.

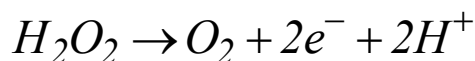
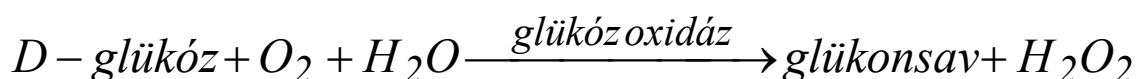
A fent leírtak szerint elkészített cellát beillesztettük a már korábban leírt folyamatos áramlású mérési rendszerbe, majd először glicinoldattal alaposan átmostuk, hogy a fölöslegben levő glutáraldehidet eltávolítsuk.

3.3. Eredmények

Feladatunk a szerves fázisban alkalmazható bioszenzorok kifejlesztése, biokémiai és elektrokémiai működési paramétereik optimalizálása volt, a szenzort jellemző statisztikai paraméterek meghatározása, majd pedig a kidolgozott eljárások alkalmazása élelmiszer mintákon.

3.3.1. Glükóz mérés szerves közegben

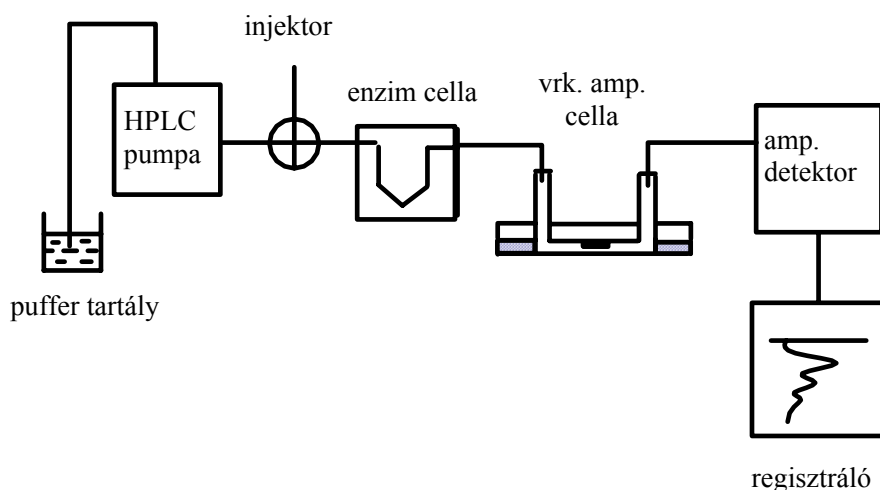
A glükóz koncentráció meghatározásának alapjául a glükóz glükóz oxidáz enzim által katalizált reakciója szolgált. A reakció során keletkező hidrogén-peroxid mennyisége arányos a glükóz mennyiségével, amelyet az amperometriás mérőcellával detektálhatunk. A vizsgált reakció a következő volt:



3.3.1.1. A mérőrendszer kialakítása és az enzimcella készítése

Méréseink során a glükózból keletkezett hidrogén-peroxid mennyiségét közvetlenül határoztuk meg az átfolyó amperometriás elektród cellában. A vizsgálatokhoz a következőkben ismertetett folyamatosan áramló rendszerű műszer összeállítást alkalmaztuk (2. ábra). A vivőoldat tároló edényéből a megfelelő összetételű oldat a HPLC pumpa közvetítésével folyamatosan, állandó térfogatsebességgel áramlott az analíziscsatornán át. A standardoldatokat és a mintaoldatokat az injektorral (20 µl térfogatú looppal) adagoltuk a rendszerbe. A biokatalitikus anyag, az enzim a vékonyréteg cellában volt rögzítve, amelynek felépítését és készítését már ismertettük. A reakció során keletkezett hidrogén-peroxid koncentrációját az amperometriás vékonyréteg kialakítású mérőcellában elhelyezett elektródokkal mértük. A

mérőelektród Glassy Carbon elektród, a vonatkozási elektród platina volt. A mérőcellából az oldat a hulladékgyűjtőbe jutott. Az amperometriás detektor biztosította a mérőcellában a polarizációs feszültséget és mérte az amperometriás áramot. A mért jeleket számítógépen gyűjtöttük, vagy a voltammogramok alapján közvetlenül feldolgoztuk.



2. ábra A mérőrendszer felépítése

Méréseinkhez az enzimet az általunk kifejlesztett vékonyréteg-cellában rögzítettük. Az enzim rögzítés módjának kidolgozása során alapvető feladat volt, hogy a keletkezett enzimiréteg kellően stabil legyen, ugyanakkor ne inaktiválódjék. Ennek érdekében korábbi kutatásaink során részletesen vizsgáltuk, illetve meghatároztuk az enzimoldat és a keresztkötések kialakításáért felelős glutáraldehid oldat optimális koncentrációját (Váradis és mtsai., 1995). Mind az enzimoldat, mind pedig a glutáraldehid oldat koncentrációjának meghatározásakor arra törekedtünk, hogy legyen elég híg az egyenletes felhordáshoz, elterítéshez, de egyúttal elég tömény is ahhoz, hogy mechanikailag stabil réteg keletkezzen.

Glükóz oxidázt, bovine serum albumint és glutáraldehidet különböző koncentrációban tartalmazó oldatokkal készítettünk vékonyréteg-cellákat. Glükóz oxidázból 5,0 - 15 mg-ot, míg bovine serum albuminból 2,5 - 10 mg-ot oldottuk fel 200 µl pufferoldatban. A 25 %-os glutáraldehidből pufferrel 1,5 és 2,5 %-os oldatot készítettünk.

A cellák készítése alapján megállapíthattuk, hogy ha 7,5-10 mg bovine serum albumint adunk az enzimoldathoz, akkor az enzimréteg mechanikailag nem stabil, a szárítás után könnyen megsérül, lepattogzik. Ha a glutáraldehid-oldat túl híg (1,5%), a használat közben hamarabb lemosódik az enzimréteg, a rögzítés kevésbé hatékony, a cella élettartama csak pár nap. Ha a 12,5 – 15 mg glükóz oxidáz enzimet mértünk be, a rögzített réteg a mérés közben levált és eltömítette a rendszert. A cellák készítése és vizsgálata szerint a következő oldatok alkalmazásával tudtuk a legstabilabb vékonyrétegcellát készíteni (Adányiné Kisbocskói, 1993):

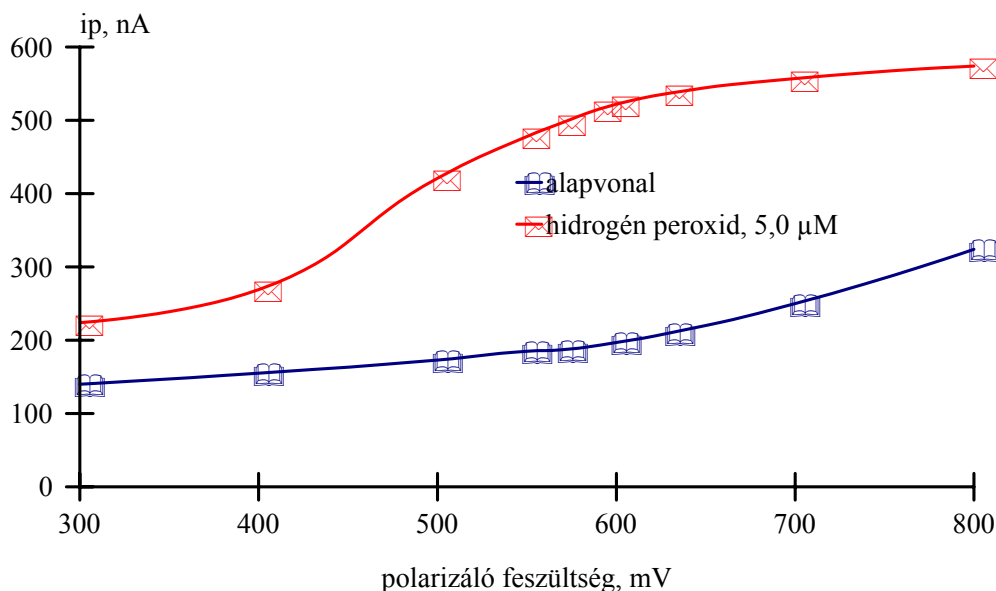
1. Enzimoldat: 10 mg glükóz oxidáz enzim (23.900 U/g) + 5 mg BSA 200 μ l acetát pufferben (pH 6) oldva.
2. Glutáraldehid-oldat: 50 μ l 2,5 %-os glutáraldehid oldat.

Fenti eredmények csak a glükóz oxidáz enzim rögzítésére vonatkoznak, azonban tájékoztatásul szolgáltak a további enzimek rögzítéséhez is. Általános következtetésként azonban levonható, hogy a glutáraldehid koncentrációja minden esetben 2,5% v/v legyen, a BSA koncentrációja pedig nem haladhatja meg az 5 mg/200 μ l koncentrációt, mert különben sérülékeny réteg keletkezik. Az enzimek rögzítésre alkalmas mennyiségét minden esetben külön kell vizsgálni, mert az a molekulák eltérő fehérjeszerkezetétől is függ.

3.3.1.2. A polarizáló feszültség megválasztása

A hidrogén-peroxid detektálásához alkalmazható elektródpotenciál meghatározására acetonitril (+1 mg/100ml TBATS + 6% v/v Na-acetát puffer, pH 6) vivőoldatban vizsgáltuk a hidrogén-peroxid jelét a polarizáló feszültség függvényében. Méréseink során a mérőelektród potenciálját 300-800 mV között lépésenként változtatva vizsgáltuk az áramló oldatban a hidrogén-peroxid standardoldatok áramintenzitás jelét. A standardoldatok jele mellett az alapvonal jelének növekedését is vizsgáltuk, hiszen az alapvonal stabilitása befolyásolja a mérések megbízhatóságát. A mért pontokból szerkesztett dinamikus voltammogram (3. ábra) alapján látható, hogy a hidrogén-peroxid standardokra mérhető amperometriás jel 400 mV polarizáló feszültség fölött kezd el nőni. Az alapvonal 630 mV-ig stabil, majd növekszik. A hidrogén-

peroxid jele az alapvonalhoz képest 600 mV-nál volt a legnagyobb, azonban ezen a potenciálon az alapvonal már enyhén nőtt és nagyobb volt a jelek szórása is. Ezért a méréseinkhez 590 mV-on polarizált elektródot alkalmaztunk.



3. ábra Hidrogén-peroxid amperometriás jele a polarizáció feszültség függvényében (acetonitril + 1 mg/100ml TBATS + 6% v/v Na-acetát puffer, pH 6)

3.3.1.3. Oldószerek kiválasztása oldott glükóz oxidáz enzimmel

Munkánk kezdeti lépéseként vizsgáltuk, hogy melyik szerves oldószer alkalmazható a folyamatosan áramló rendszerben. Az irodalmi részben megismert eljárások esetében jónak talált vivőoldat összetételét nem volt célszerű átvenni a mérő rendszer felépítéséből adódó jelentős különbségek miatt. Így változtatni kellett az alkalmazott vivőoldatok összetételén, mivel az enzimeket gyakran kvázi vizes közegben rögzítették (pl. membránnal határolva) az OPEE-k készítésekor, illetve gyakran volt lehetőség az elektródot pufferben regenerálni az egyes mérések között. Az oldószerek kiválasztása során több szempontot kellett figyelembe venni, így a szerves oldószerek hidrofób tulajdonságait, a viszkozitást, a lobbanás pontot. Vizsgálataink során n-butilalkohollal (log P:0,8), dioxánnal (log P:-1,1), acetonitrillel (log P:-0,33), 2-propanollal (log P:0,28), n-oktánollal (log P:2,9), n-hexánnal (log P:3,5) készítettünk oldatokat. Kísérleteinkben 1, illetve 10%-ban foszfát (0,2

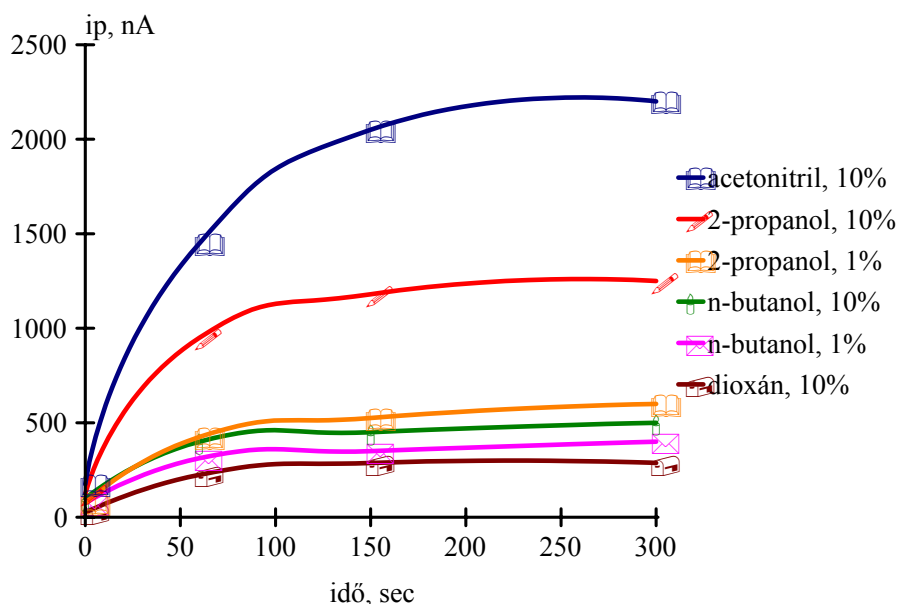
M, pH 6) és acetát (0,2 M, pH 6) puffert adagoltunk a felsorolt szerves oldószerekhez. Megfigyelésünk szerint az oldószerekhez mind 1%-ban, mind pedig 10%-ban foszfát puffert adagolva csapadék képződött. Acetát puffert alkalmazva csapadékképződést nem tapasztaltunk, ezért a továbbiakban az acetát puffert alkalmaztuk.

Az n-oktilalkohol - puffer keverék minden esetben gyorsan szétvált, két fázis keletkezett, az oldószer ugyanakkor rendkívül sűrű, viszkózus folyadék, amely nem alkalmas a FIA rendszerben való használatra. Az n-hexán az összekeverés után ugyancsak rendkívül gyorsan szétvált, nem lehetett megfelelően injektálni, illetve folyamatosan áramoltatni a rendszerben. Ezzel a két oldószerral nem dolgoztunk tovább, annak ellenére, hogy sok kutató sikerrel alkalmazta álló rendszerben történő mérések során.

A továbbiakban tehát n-butilalkohollal, dioxánnal, acetonitrillel, 2-propanollal folytattuk vizsgálatainkat. Az adott oldószerekhez 1 illetve 10% v/v koncentrációjú Na-acetát puffert (0,2 M, pH 6) adtunk, és ezeket az elegyeket alkalmaztuk a standardok elkészítéséhez, valamint vivőoldatként az amperometriás detektorhoz. A különböző oldószerekben mértük a hidrogén-peroxid standard oldat (5 μ M) amperometriás jelét 590mV polarizációs feszültségnél. Az oldott enzim katalitikus hatásának vizsgálatára a fenti elegyekkel 2 ml 1 mM koncentrációjú glükóz standard oldatot készítettünk és 50 μ l 2 mg/ml töménységű glükóz oxidáz enzim oldatot adagolva vizsgáltuk, hogy mérhető-e a keletkező hidrogén-peroxid koncentrációja az idő függvényében. Az enzim oldatot Na-acetát pufferrel készítettük. A méréseket az enzimes oldatot injektálva az enzim hozzáadásától számított 0., 60., 150. és 300. másodpercben végeztük.

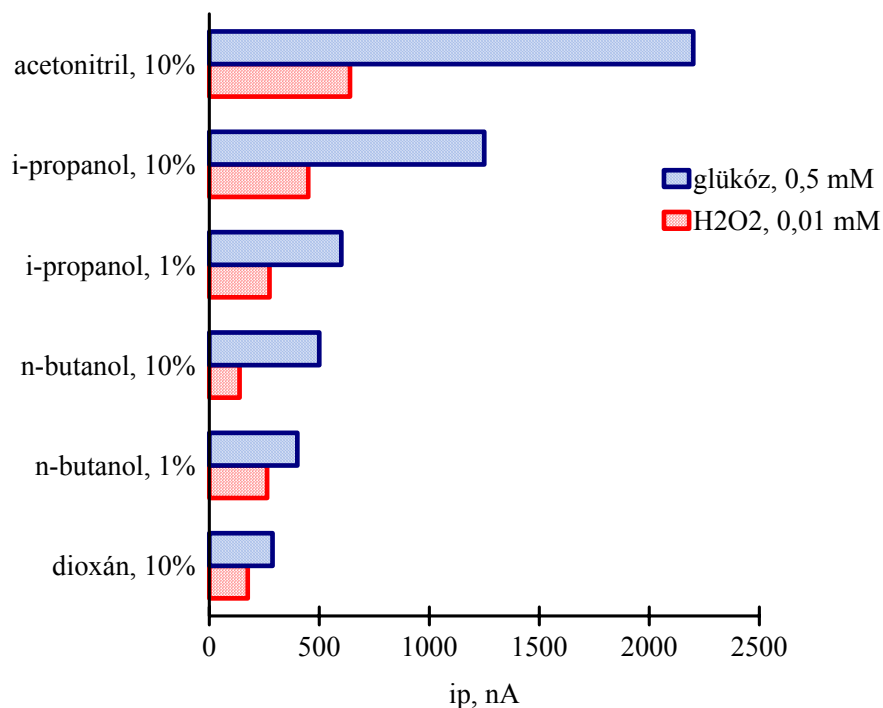
Az oldott enzimmel végzett kísérletek során (4. ábra) acetonitrillel, 2-propanollal, n-butanollal és dioxánnal kaptunk értékelhető jeleket 10% v/v puffert adagolva, azonban az acetonitril+1% puffer és a dioxán+1% puffer elegyében nem kaptunk jeleket, az enzim szemmel láthatóan kicsapódott. Az n-butanolban, illetve a dioxánban nyert jelek igen alacsonyak voltak az acetonitrillel és a 2-propanollal mért értékekhez képest. Iwuoha és munkatársai (1995) mérései alapján az oldószerek sorrendje a mért áramintenzitás jelek

alapján acetonitril, tetrahidrofurán, aceton, és 2-butanol volt. Megállapították, hogy a GOx/Pt elektróddal szerves fázisban mérve gyorsabban érték el a maximális jelet. A válaszidő pedig az áramló rendszerekben rendkívül fontos szerepet játszik.

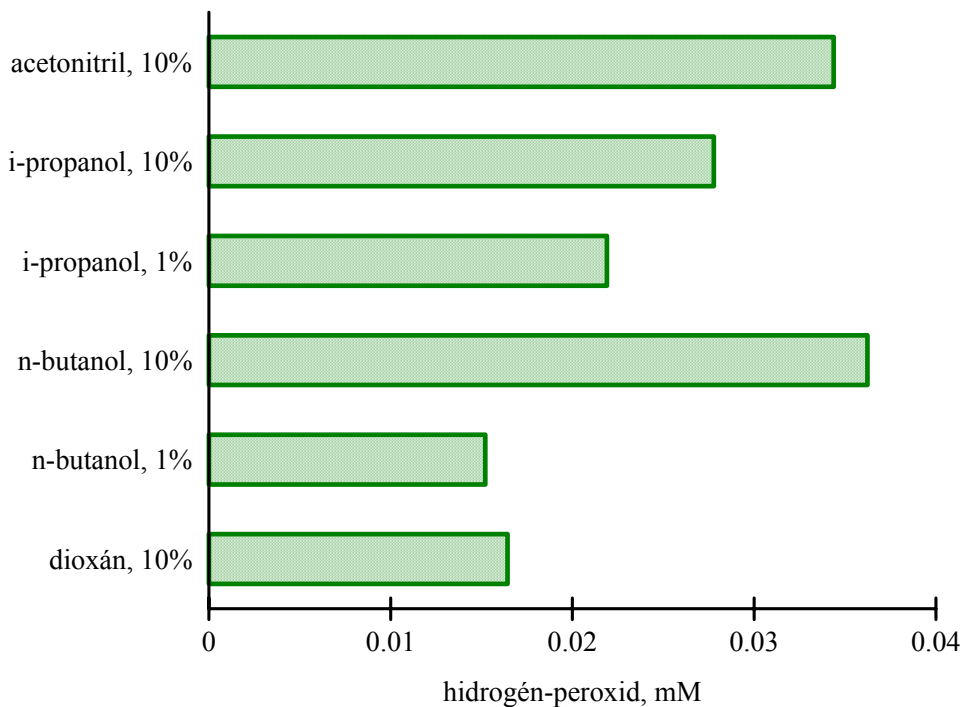


4. ábra I_p -idő függvény különböző víz-organikus oldószer elegyekben oldott glükóz oxidáz enzimmel (2 ml 1mM glükóz oldat + 50 μ l 2 mg/ml GOx oldat, 590 mV vs. Pt)

Az 5. ábra alapján megállapítottuk, hogy mind a hidrogén-peroxid standard (0,01 mM), mind pedig a glükóz standard (0,5 mM) jele az acetonitrilben és a 2-propanolban volt a legnagyobb, azonban a 6. ábra szerint a glükóz és a hidrogén-peroxid jelének arányát ábrázolva az acetonitrilben és az n-butanolban volt a legnagyobb a konverzió. Annak ellenére, hogy ez az értelmezés vitatható (mediátor szerepe miatt), a konverziót mint hidrogén-peroxid koncentrációt tüntettük fel. A továbbiakban a vizsgálatainkat az amperometriás jelek nagysága miatt acetonitrillel és 2-propanollal folytattuk.



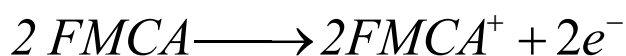
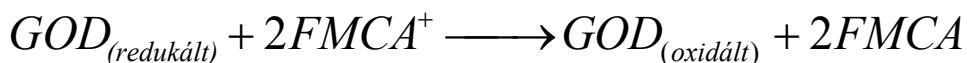
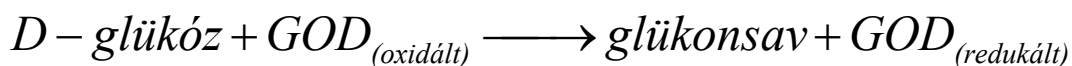
5. ábra Amperometriás jelek különböző oldószerekben (2 ml 1mM glükóz oldat + 50 µl 2 mg/ml GOx oldat, polarizációs feszültség 590 mV vs. Pt)



6. ábra A glükóz és a hidrogén-peroxid amperometriás jelének aránya a különböző oldószerekben (2 ml 1mM glükóz oldat + 50 µl 2 mg/ml GOx oldat, polarizációs feszültség 590 mV vs. Pt)

3.3.1.4. Glükóz mérése különböző vezetősó koncentrációjának függvényében

Miután az oldott enzimes mérésekkel kiválasztottuk, hogy a továbbiakban a FIA rendszerben az acetonitrilt és az n-propanolt alkalmazzuk, elkészítettük az enzimműködést, és elsőként a méréshez szükséges vezetősók koncentrációját vizsgáltuk. Két szerves só, az FMCA és a TBATS viselkedését tanulmányoztuk. Kutatások szerint az FMCA helyettesítheti a természetes oxigént, mint reakciópartnert az enzim katalizálta oxidáció során, kiküszöbölve ezzel az oxigénkoncentráció analitikai jelre gyakorolt hatását. Az FMCA mediátor reverzibilis redox rendszerként vesz részt az enzim reakcióban a következő egyenletek szerint (Tóth, Gyurcsányi, 2002).

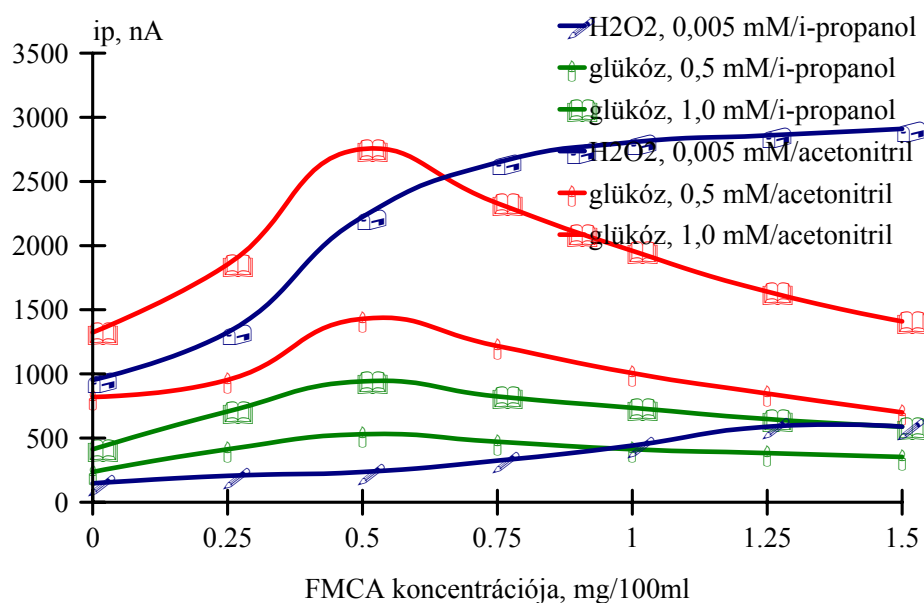


Kísérleteink során mind a FMCA-t, mind a TBATS-t 0-1,5 mg/100 ml koncentráció tartományban adagoltuk a 6% acetát puffert tartalmazó szerves oldószerhez. A mérésekhez szükséges hidrogén-peroxid standardot (5 µM) és a glükóz mintákat (0,5 és 1,0 mM) minden esetben az aktuális összetételű oldószer eleggyel készítettük és azzal a vivőoldattal mértük, az áramlási sebesség 0,8 ml/perc volt. Külön elemeztük a hidrogén-peroxid standardra és a glükóz mintákra kapott jelek nagyságát, mert ennek alapján lehet eldönteni, hogy bizonyos változások az enzimes reakciót vagy az amperometriás detektálást befolyásolják. Abban az esetben, amikor az oldószer vezetősót tartalmazott, a görbék a várakozásnak megfelelően minden esetben jelentősen nőttek.

A ferrocén-monokarbonsav adagolásakor az acetonitrilben a hidrogén-peroxid standard amperometriás jele már 0,25-0,75 mg FMCA/100 ml adagolásakor jelentősen, kb. 2,5-szeresére nőtt. I-propanolban azonban sokkal kisebbek voltak az amperometriás jelek, és csak akkor tapasztaltunk változást amikor az

oldat 0,75 mg FMCA/100 ml- nél több szerves sót tartalmazott.

A glükóz standardokra mért áramintenzitás értékek kicsit más képet mutattak a mintákat a rögzített glükóz oxidáz enzimet tartalmazó vékonyréteg-cellán keresztül áramoltatva. Azt tapasztaltuk, hogy mindkét oldószernél a 0,50 mg FMCA/100 ml volt az optimális koncentráció (7. ábra). Amíg a ferrocén-monokarbonsavat ennél kisebb koncentrációban adagoltuk, jelentősen nőttek a jelek, azonban ha 0,50 mg FMCA/100 ml-nél töményebb oldattal mértünk, az amperometriás jelek nagysága csökkent. Az acetonitriles mérések során a jelek az optimális ferrocén-monokarbonsav koncentrációnál a kiindulási érték kétszeresére nőttek, ennél töményebb oldat használatakor azonban a jelek csökkentek, a mérések reprodukálhatósága romlott, valamint a glükóz oxidáz enzimet tartalmazó enzimcella élettartama hirtelen csökkent, feltételezhető volt, hogy a ferrocén-monokarbonsav gátolja az enzim működését.

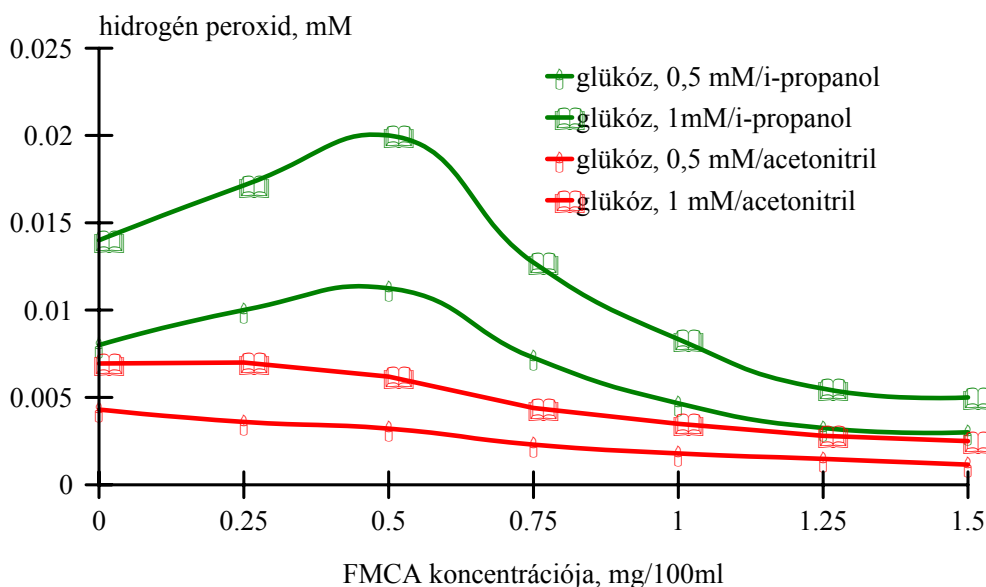


7. ábra Amperometriás jelek a FMCA koncentrációjának függvényében
(5% v/v Na-acetát puffer, pH 6)

Ennek a feltételezésnek az igazolására megvizsgáltuk, hogy a mért görbék alapján az adott glükóz standard amperometriás jele mekkora hidrogén-peroxid jelnek felel meg (8. ábra). Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy bár i-propanolban nagyobb volt a konverzió, az enzim aktívabb volt, az amperometriás detektálásnál azonban az acetonitriles vivőoldatban kaptunk

nagyobb jeleket a hidrogén-peroxid mérése során. A görbék alapján is látszik, hogy 0,5 mg/100 ml-nél nagyobb koncentrációban adagolt FMCA hatására mindkét oldószerben csökkent a GOx aktivitása. A továbbiakban tehát 0,50 mg/100 ml FMCA jelenlétében mértünk.

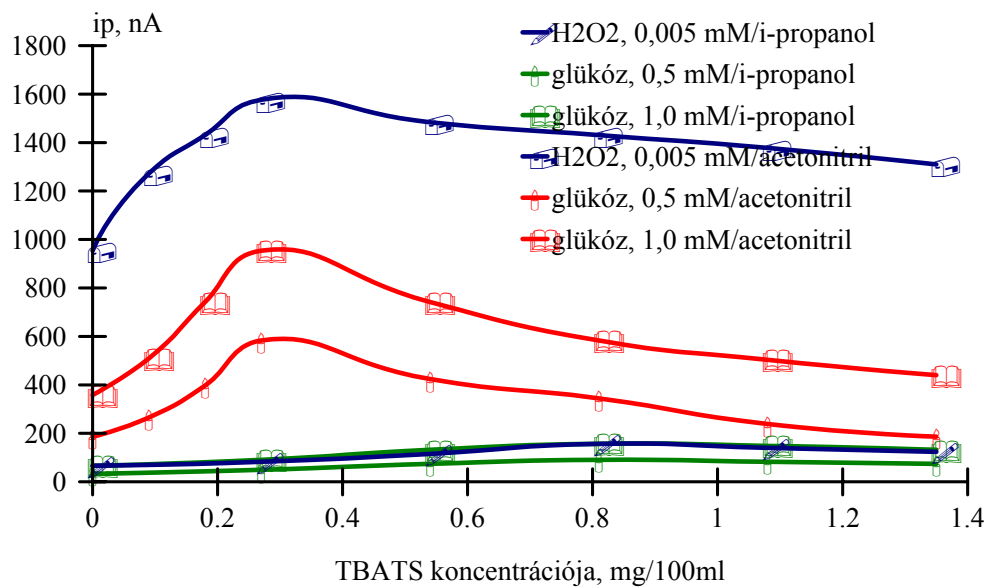
A ferrocén-monokarbonsav jelenléte jelentős szerepet játszott az amperometriás jel növekedésében a szerves oldószerben. Ennek oka elsősorban az lehet, hogy nincs szükség oxigén jelenlétére az oldószerben, az amperometriás jel kialakulásához az enzim katalizálta oxidációban redukált ferrocén származék is hozzájárulhat.



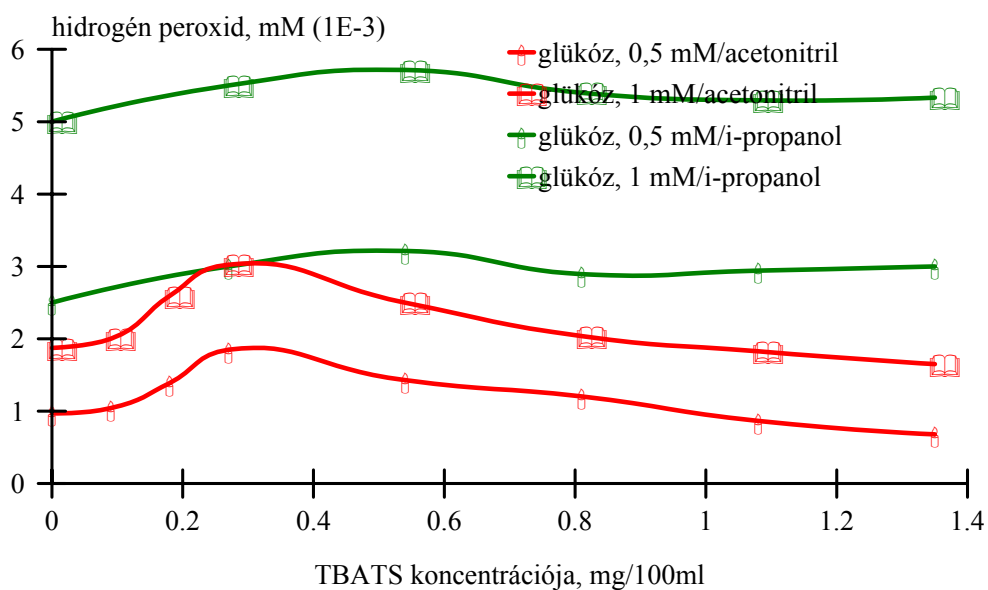
8. ábra Glükóz/hidrogén-peroxid konverziója a ferrocén-monokarbonsav koncentrációjának függvényében (5% v/v Na-acetát puffer, pH 6)

Az oldószerekhez TBATS-t adagolva a hidrogén-peroxid amperometriás jele mindkét oldószert vizsgálva nőtt, az acetonitril esetében 0,27 mg TBATS/100 ml, míg 2-propanollal 0,80 mg TBATS/100 ml adagolásakor kaptuk a legnagyobb jelet, de ez a jel csak kb. tizede volt az acetonitrilben mért jelnek. A glükóz standardokra mért eredmények, hasonlóan a hidrogén-peroxid mérési eredményeihez, lényegesen nagyobbak voltak acetonitrilben. A görbék optimum értékei megegyeztek a hidrogén-peroxidra kapott görbék maximumával (9. ábra). A mérések reprodukálhatóságát és az enzimműködés tartamát vizsgálva nem tapasztaltunk hirtelen változást a TBATS

mennyiségének növelésekor.



9. ábra Amperometriás jelek a TBATS mennyiségének függvényében (5% v/v Na-acetát puffer, pH 6)



10. ábra Glükóz/hidrogén-peroxid konverziója a TBATS koncentrációjának függvényében (5% v/v Na-acetát puffer, pH 6)

A mért jelek alapján a keletkezett hidrogén-peroxid mennyiségét ábrázolva (10. ábra) azt tapasztaltuk, hogy a propanolos oldatban sokkal kisebb hatása van a TBATS-nek, mint az acetonitril alkalmazásakor. Ismét nagyobb volt a konverzió a propanolos vivőoldattal, az enzim aktivitása nagyobb volt, az

amperometriás detektálás viszont az acetonitriles vivőoldatban volt hatékonyabb. A görbék alapján azt is megállapíthattuk, hogy nagyobb koncentrációban adagolt TBATS hatására csak az acetonitrilben csökkent a GOx katalizálta reakció sebessége. A továbbiakban tehát 0,27 mg TBATS-t adagoltunk az acetonitriles oldathoz, míg a propanoloshoz 0,80 mg-ot.

3.3.1.5. Glükóz mérése szerves oldószerekben a puffer mennyiségének függvényében

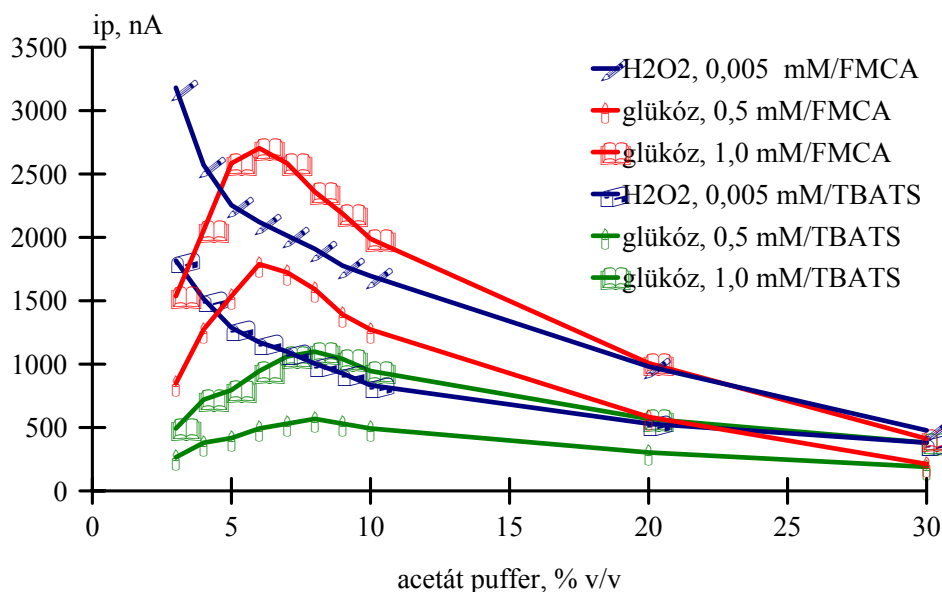
A vezetősók optimális mennyiségének meghatározása után vizsgáltuk, hogy a szerves oldószernek mennyi vizet, illetve puffert kell tartalmaznia ahhoz, hogy az enzim megőrizhesse aktivitását, ne denaturálódjon. Ehhez a mérésorozathoz az acetonitrilt mindkét vezetősó jelenlétében 3-30% v/v, míg a i-propanolt 3-40% v/v mennyiségű acetát pufferrel elegyítettük. A standardokat mindig az aktuális vivőoldattal hígítottuk és vizsgáltuk hogyan alakul a hidrogén-peroxid és a glükóz standardok amperometriás jele.

A hidrogén-peroxid jele mindkét vezetősó jelenlétében csökkent a puffer koncentrációjának növekedésével. A ferrocén-monokarbonsavas acetonitrillel történő mérések során a glükóz standardokra akkor kaptunk maximális jeleket, mikor a vivőoldat 6% acetát puffert tartalmazott. A puffer koncentrációt növelve már nem csak a hidrogén-peroxid, hanem a glükóz jele is folyamatosan csökkent (11. ábra).

A cella élettartamát vizsgálva feltűnt, hogy amikor a vivőoldat 4% puffernél kevesebbet tartalmazott, a cella néhány mérés, illetve viszonylag rövid mosás után kimerült, nem lehetett a glükóz standardok jelét mérni. Ennek oka az irodalmi adatok alapján valószínűleg abban rejlik, hogy a rögzített enzim molekulák körül nem volt megfelelő a hidrátburok. Az enzimcellát pufferral mostuk hosszabb ideig, azonban ez után sem kaptunk jeleket, az enzim denaturálódott. Mikor az oldat 4%-nál több acetát puffert tartalmazott, a cella élettartama jelentősen megnőtt, 6%-nál több mint 100 mérést végeztünk el jelentősebb aktivitáscsökkenés nélkül.

TBATS-t tartalmazó acetonitriles oldatban a hidrogén-peroxid jele hasonlóan alakult, mint FMCA-val mérve, igaz, hogy a jelek kisebbek voltak. A puffer

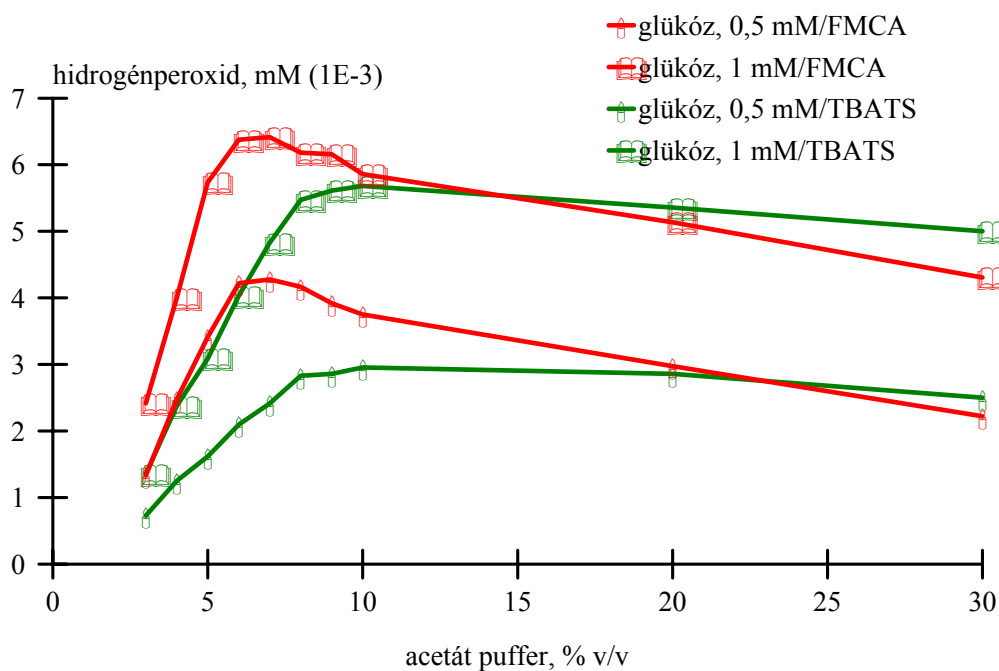
optimális koncentrációja a glükóz mérésekor 8% v/v-nak adódott. Bár a glükóz standardokra kapott jele a 3-4% v/v puffert tartalmazó vivőoldat használatakor a TBATS jelenlétében is jóval kisebbek voltak, mint 6-8% v/v-nál, az enzimcella nem merült olyan gyorsan ki, mint a ferrocén-monokarbonsavas oldat alkalmazásakor. Feltételezhetjük tehát, hogy nemcsak a vízburok megbomlása, hanem a FMCA jelenléte is hozzájárult az enzim aktivitásának irreverzibilis csökkenéséhez.



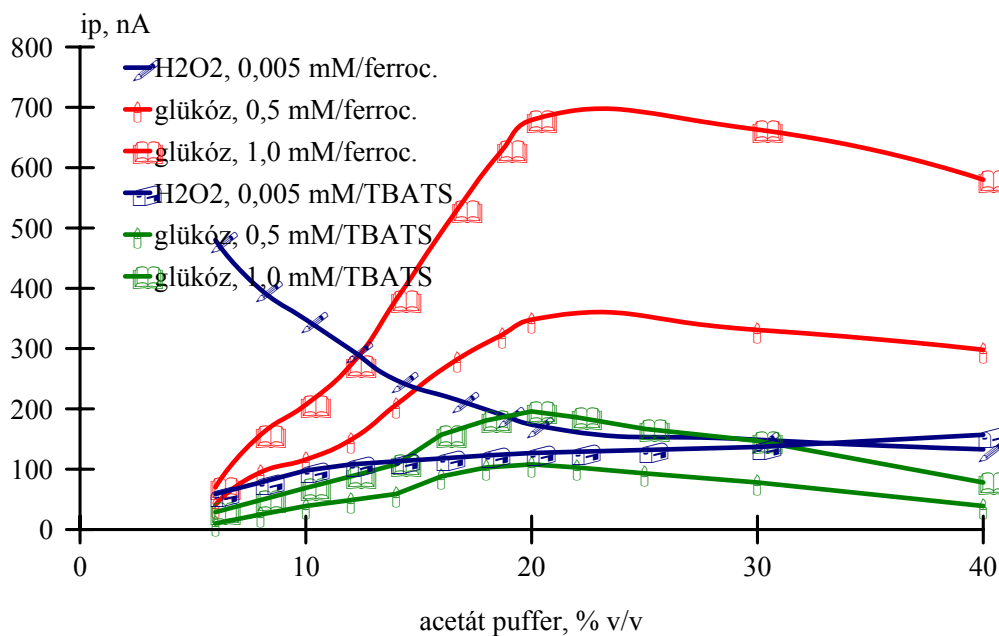
11. ábra Amperometriás jelek acetonitrilben a puffertartalom függvényében (0,27 mg/100 ml TBATS, 0,5 mg/100 ml FMCA)

A glükóz konverzióját acetonitrilben vizsgálva (12. ábra) megállapíthattuk, hogy FMCA jelenlétében 6-8% puffernál többet tartalmazó oldatban kb. 20%-kal csökkent a jel, míg a TBATS-t tartalmazó oldatot áramoltatva 10% puffertartalom fölött nem változott számottevően, a puffertartalom tehát nem befolyásolta az enzim működését. A 10. és 11. ábrákat összehasonlítva megállapíthattuk, hogy a standardokra mért jelek nagyságának csökkenése a hidrogén-peroxid amperometriás jelének változásából adódott. A továbbiakban az FMCA/acetonitril vivőoldatot 6% v/v pufferral kevertük, míg a TBATS/acetonitril alkalmazásakor 8% v/v puffert használtunk.

Iwuoha és Smyth (1994b) álló fázisban végzett mérései során TEATS vezetősőt alkalmazva 80% v/v acetonitrilben kaptak maximális jeleket.



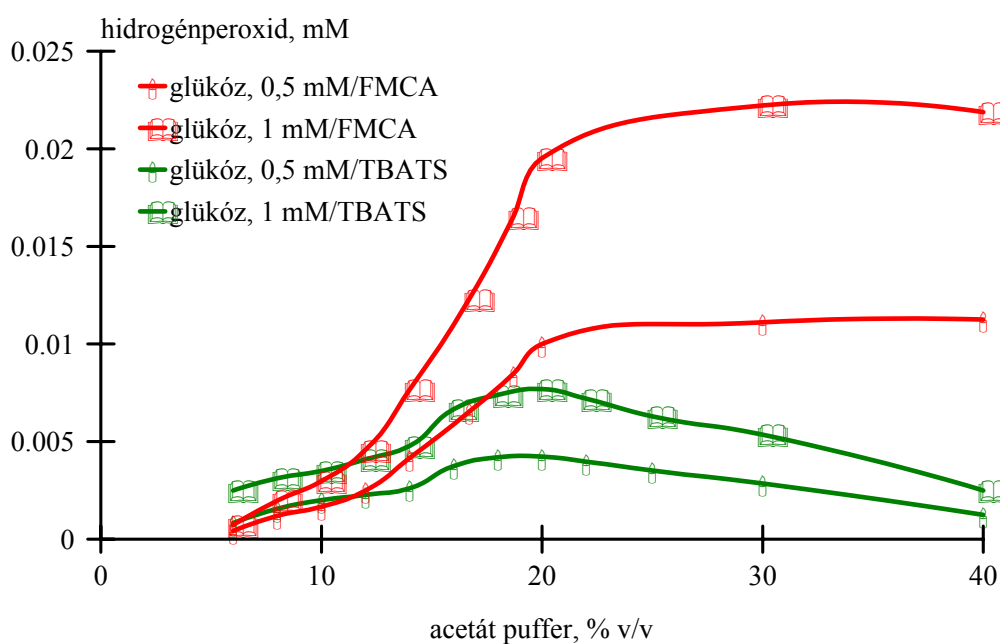
12. ábra Glükóz/hidrogén-peroxid konverziója acetónitrilben (0,27 mg/100 ml TBATS, 0,5 mg/100 ml FMCA)



13. ábra Amperometriás jelek i-propanolban a puffer mennyiségének függvényében (0,8 mg/100 ml TBATS, 0,5 mg/100 ml FMCA)

A puffer mennyiségét az i-propanolos oldatban növelve a hidrogén-peroxid standard jele FMCA jelenlétében kb. ötödére csökkent, míg a TBATS hatására

alig változott, kb. másfélszeresére nőtt. A glükóz standardok jelét vizsgálva azonban megállapíthattuk, hogy a görbék nagyságát jelentősen befolyásolta a puffer mennyisége (13. ábra). A csúcsok nagysága 20%-os puffer koncentrációig nőtt, majd TBATS alkalmazásakor csökkent, míg FMCA jelenlétében a görbék nagysága nem változott számottevően. Ferrocén-monokarbonsav jelenlétében a jel a kiindulási érték hétszeresére nőtt a puffer mennyiségének növelése során. A glükóz konverzióját vizsgálva (14. ábra) hasonló lefutású görbéket kaptunk, mint az előző esetben, mivel a hidrogén-peroxid jele sem változott 20% puffer mennyiség fölött. A FMCA-t tartalmazó oldat esetében azonban a jelek kb. húszszorosára nőttek, hiszen a hidrogén-peroxid jele csökkent, a glükózé azonban nőtt. Az eredmények alapján feltételeztük, hogy a 20%-nál több puffert tartalmazó FMCA/i-propanol oldattal mérve a szerves oldószerhatása jelentősen csökkent, az eredmények a pufferrel mérhető amperometriás jelekkel közel azonosak.



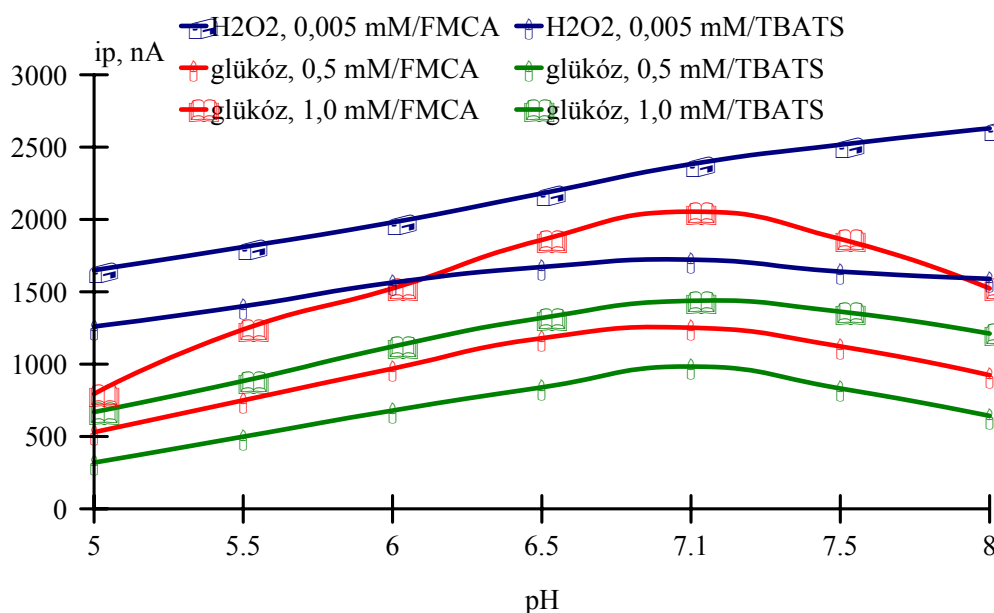
14. ábra Glükóz/hidrogén-peroxid konverziója 2-propanolban (0,8 mg/100 ml TBATS, 0,5 mg/100 ml FMCA)

3.3.1.6. Glükóz mérése a puffer pH-jának függvényében

Következőkben azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja az acetátpuffer pH-ja a

méréseinket. A kísérleteket csak acetonnitrilt alkalmazva végeztük el, mivel ebben az esetben a jelek lényegesen nagyobbak voltak, amint azt már az előzőekben bemutattuk. Az acetátpuffer pH-ját 5-8 érték között változtattuk, (annak ellenére, hogy az acetát puffert pH 4-6 között célszerű alkalmazni) és a korábbiakban optimálisnak talált koncentrációban (6% v/v) adagoltuk a vezetősót tartalmazó acetonnitrilhez.

Megállapítható, hogy a pH sokkal kisebb mértékben befolyásolta a méréseket, mint ahogyan vizes közegben. A mért görbék pH-7-nél voltak a legnagyobbak mindkét vezetősó alkalmazásakor (15. ábra). A glükóz oxidáz enzim működésének optimauma pH 5,5-nél van natív állapotban, míg a glutáraldehiddel rögzített enzimet vizes közegben alkalmazva pH optimauma 6.0 volt. (Váradí és mtsai, 1995).

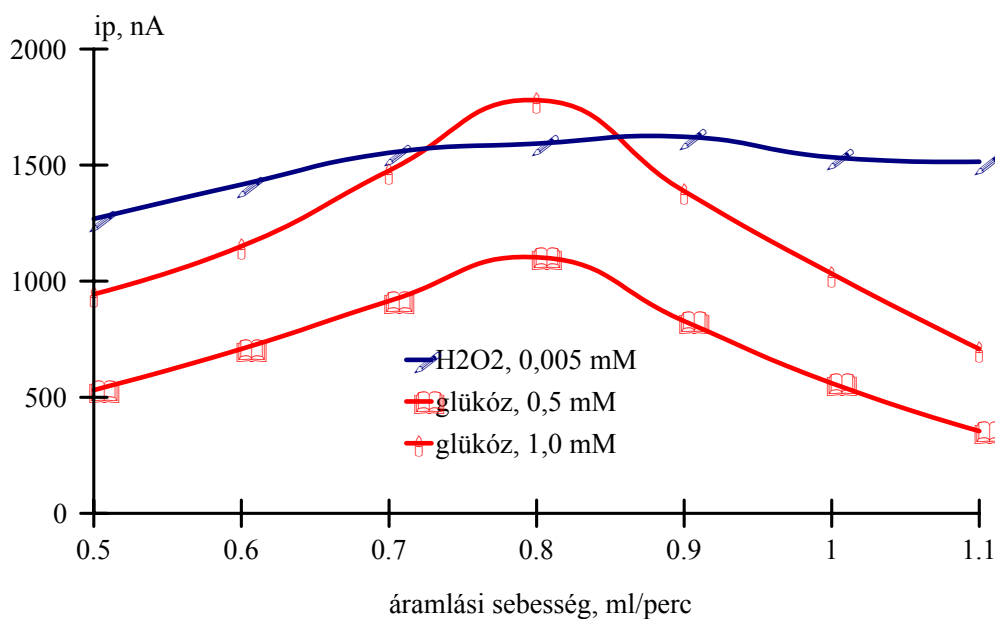


15. ábra Puffer pH-jának hatása a glükózmérésre (acetonnitril + 0,27 mg/100 ml TBATS + 8% v/v acetát puffer, illetve 0,5 mg/100 ml FMCA, + 6% v/v acetát puffer)

3.3.1.7. Az áramlási sebesség hatásának vizsgálata

Eddig elsősorban a biokémiai és elektrokémiai reakciókra közvetlenül ható

paraméterek hatásait vizsgáltuk, azonban az áramló rendszerek egyik legfontosabb működési paramétere az áramlási sebesség. Tekintve, hogy az áramlási sebesség hatása független az alkalmazott vivőoldattól, ezért mind a biokémiai reakcióra mind pedig az elektrokémiai detektálásra való hatását csak egy oldószer összeállításánál vizsgáltuk, mégpedig az eddig legnagyobb jeleket adó acetonitril + 0,5 mg FMCA/100ml + 6% v/v puffer összetételű oldatnál.

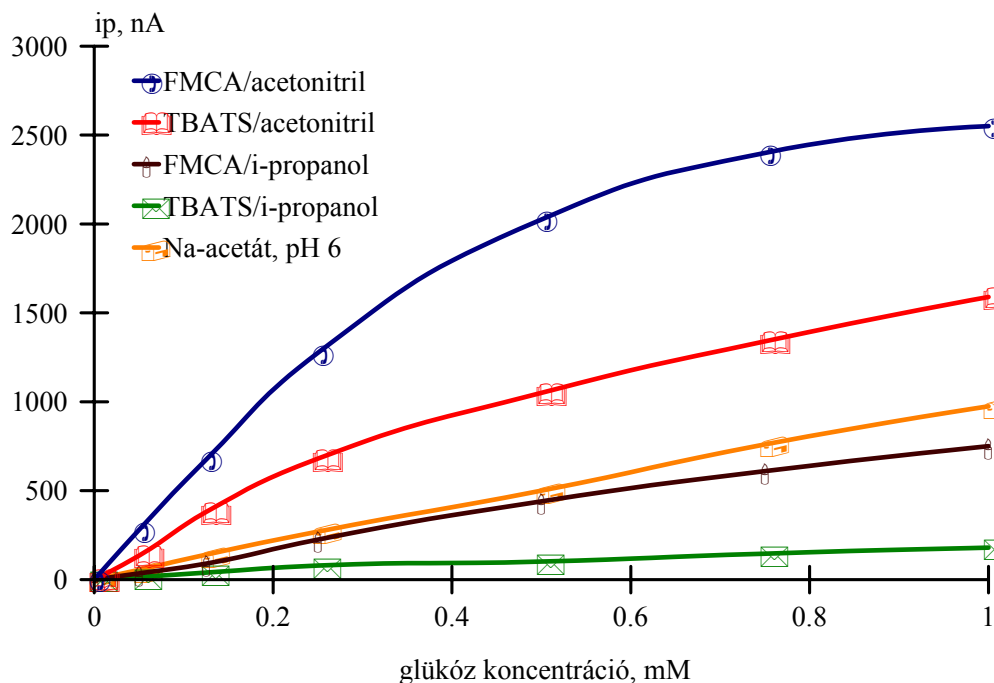


16. ábra Amperometriás jelek az áramlási sebesség függvényében (acetonitril/0,5 mg/100 ml FMCA+6% v/v acetát puffer, pH 6,0)

Amint a 15. ábrán látható, a H₂O₂ standardra mért amperometriás jelek alig változnak mérés során. Ez az amperometriás vékonyréteg cella geometriai kialakításának köszönhető, mivel az általunk vizsgálnál sokkal nagyobb áramlási sebesség tartományban ad közel azonos jeleket. A glükóz oxidációjának elemzése alapján megállapítottuk, hogy lassabb áramlási sebesség esetén, amikor a minta több időt töltött a vékonyréteg cellában, a csúcs alatti területet figyelembe véve több szubsztrát molekula alakult át, nagyobb áramintenzitást mértünk, azonban a diszperzió következtében a csúcsok szélesebbek voltak. Ezzel szemben nagyobb sebességnél kisebb amperometriás jel keletkezett, a csúcsok azonban igen keskenyek, kompaktaak voltak. A glükóz standardokra mért görbék nagyságát elsősorban a vékonyréteg-cellában végbemenő enzimreakció hatásfoka befolyásolta, nem a hidrogén-peroxid mérése volt a meghatározó lépés. A két hatás eredményeként

a legnagyobb görbét 0,8 ml/perc áramlási sebességnél mértük, ezért a továbbiakban ezt a sebességet alkalmaztuk.

3.3.1.8. Kalibrációs görbék



17. ábra Kalibrációs görbék

A mérőrendszer működésének optimalizálása után a megfelelő paraméterek alkalmazásával a legfontosabb kísérleti összeállításokhoz 0,1-1 mM koncentráció tartományban kalibrációs görbét készítettünk a glükóz méréséhez (17. ábra). Az összehasonlítás kedvéért az acetát pufferral mérhető görbét is feltüntettük. Oldószerként acetonitrilt alkalmazva mindkét vezetősót használva nagyobb jeleket kaptunk, mint vizes fázisban. Az FMCA-val mérve mintegy ötszörösére nőttek a jelek a kezdeti, lineáris mérési szakaszon, a TBATS-sel mérve pedig kb. kétszeresére. A lineáris mérési tartomány azonban mindkét esetben kisebb volt, 0,5 mM glükóz koncentráció felett már nem volt lineáris a kalibrációs görbe. Az FMCA-val 2-propanolt áramoltatva közel azonos nagyságú jeleket kaptunk, mint az acetát pufferral, míg TBATS-t használva a jelek kb. harmadára csökkentek a vizes fázisban mért jelekhez képest. Az eredményeket a 3. táblázatban foglaltuk össze, feltüntetve egy közepes

standard amperometriás jelének és a mérés szórásának (n=5) változását is a különböző oldószer elegyekben.

	Lineáris mérési tartomány (mM glükóz)	0,25 mM glükózra mért amp. jel (nA, n=5)
FMCA/acetonitril	0,05 – 0,5	1280 ± 63
TBATS/ acetonitril	0,05 – 0,5	680 ± 32
FMCA/2-propanol	0,05 – 1,0	230 ± 14
TBATS/2-propanol	0,05 – 1,0	80 ± 11
acetát puffer	0,05 – 1,0	270 ± 32

3. táblázat Glükózmérés statisztikai értékelése

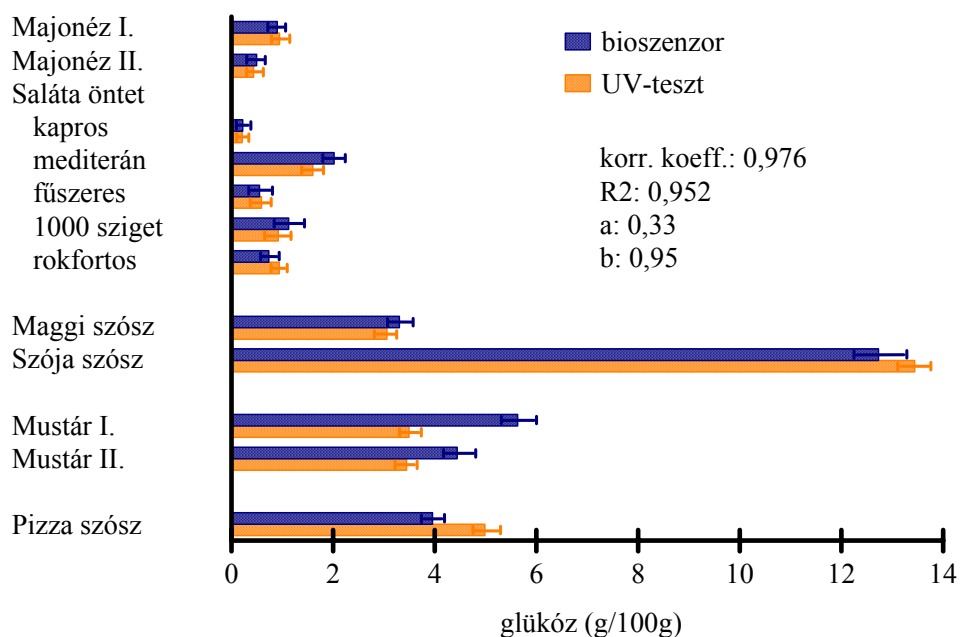
3.3.1.9. Élelmiszerminták vizsgálata

Az általunk kifejlesztett szerves fázisú bioszenzorral olyan élelmiszerminták glükóztartalmát kívántuk meghatározni, amelyek vizes fázisban nem oldhatók, ezért a minta-előkészítés hosszadalmasabb munkát igényelt volna. A minták kereskedelemben kapható majonézok, saláta öntetek, mustárok, fűszeres szósz készítmények voltak. A minták előkészítése rendkívül egyszerű volt, mivel elég volt a minta bemérése (0,1-0,2 g) után azt 5 ml acetonitrilben enyhén felmelegíteni (kb 40 °C-ra), ekkor a zsírok, olajok megolvadtak, a vizesfázisban oldott szubsztrátok az acetonitrillel elegyedtek. A mintákból hűtés és centrifugálás után 0,1 ml-t 2, illetve 10 ml-re hígítottuk az FMCA-t és puffert tartalmazó vivőoldattal.

A minták glükóztartalmát enzimes spektrofotometriás eljárással is meghatároztuk, az eredményeket összehasonlítottuk (18. ábra). A referencia mérést vizes fázisban végeztük. A glükózt ATP jelenlétében hexokináz enzim katalizálta reakcióban foszforiláltuk, majd NADP^+ jelenlétében glükóz-6-foszfát dehidrogenázzal D-glükonát-6-foszfát és NADPH keletkezett. A NADPH koncentrációját, amely arányos a kiindulási glükóz koncentrációval, 334, 340 vagy 365 nm-en mértük.

Vizsgálataink alapján az eredmények jól megfelelnek egymásnak, a szerves fázisban a glükózcella alkalmas számos nagy zsír-, illetve olajtartalmú élelmiszer gyors, megbízható vizsgálatára. Az eredmények alapján csak a mustárok glükóztartalmának eredményében adódott eltérés, ennek oka azonban további vizsgálatokat igényel, ami már nem tartozik e munka körébe. Feltételezésünk szerint az eltérés a mustárban található glükózinolát jelenlétéből adódhat. Mirozináz enzimmel víz hatására i-tiocianát és glükóz szabadul fel, a keletkező glükóz növelheti a jelet, míg az i-tiocianát gátolhatja a GOx működését.

Az immobilizált glükóz oxidáz enzimmel elsősorban modellként kívántuk vizsgálni a FIA rendszerben alkalmazott szerves fázisú bioszenzorok viselkedését, az egyes paraméterek hatását az enzim működésére. Fenti eredményeink alapján lehetőségünk nyílt más enzimek rögzítésével további szerves fázisban működő bioszenzor kifejlesztésére.

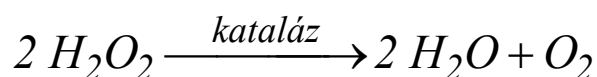


18. ábra Élelmiszerminták glükóztartalma

3.3.2. Kataláz alapú bioszenzor

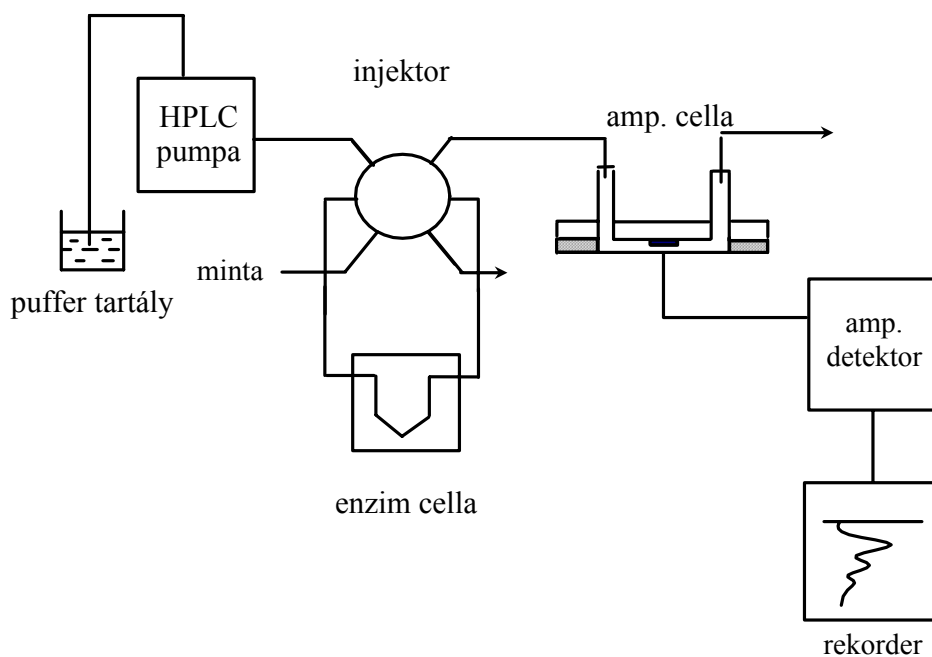
A kataláz enzim is megőrzi aktivitását különböző szerves oldószerekben, ezért vált lehetővé szerves fázisú bioszenzorban való alkalmazása. A kataláz a

hidrogén-peroxid vagy más hidroperoxid származékok bomlását katalizálja.



Az egyenlet szerint egyaránt lehetőség lenne a hidrogén-peroxid fogyását nyomon követni, illetve a keletkezett oxigén koncentrációját mérni. Amperometriás direkt oxigén mérést csak akkor végezhetünk volna, ha a felszabadított oxigént alacsonyabb feszültségen mérnénk, mint a peroxid vegyületeket. Kísérleteink során a hidrogén-peroxid fogyását követtük nyomon a már korábban is alkalmazott +590 mV polarizációs feszültségen, így a mintákban lévő adalékanyagok, esetlegesen elektrokémiai aktív anyagok hatása is kiszűrhető volt, amint arra a továbbiakban még utalunk.

3.3.2.1. Mérő rendszer



19. ábra A mérőrendszer felépítése

A kataláz enzimet rögzítve az oldatban lévő hidrogén-peroxid fogyását határoztuk meg, ezért minden esetben mértük a kiindulási értéket és az enzimreakció után megmaradt szubsztrát mennyiségét. A mérési elrendezést a

glükózméréshez képest a fentiek miatt módosítanunk kellett (19. ábra). Az enzimes vékonyrétegcellát az injektor mintahurok helyére csatlakoztattuk, ezáltal a mintát közvetlenül a cellába injektáltuk. A mintát injektálás után azonnal a mérő ágba fordítva mértük a minta kiindulási hidrogén-peroxid koncentrációját, majd a mintát újra injektálva meghatározott tartózkodási idő után pedig a csökkenés szintjét. Minden mintát kétszer mértük egymás után. Az amperometriás jel és a minta hidrogén-peroxid koncentrációja jól definiált függvénykapcsolatban van egymással. Az így kialakított stopped-flow típusúnak nevezhető rendszerben igen egyszerűen lehetett a minták tartózkodási idejét változtatni, nem volt szükséges bonyolult áramlási rendszer összeállítása.

A mérő rendszer kialakítása után az enzim rögzítésének módját is vizsgáltuk, összehasonlítottuk, hogyan módosulnak az eredmények ha az eddig alkalmazott BSA mellett PEG 6000-rel együtt immobilizáljuk a kataláz enzimet a cella készítésekor. A PEG 6000 alkalmazására azért került sor, hogy a kataláz molekulák közvetlen környezetében biztosítsa a működésükhöz szükséges megfelelő vízburkot. A következő összetételben rögzítettük az enzimet:

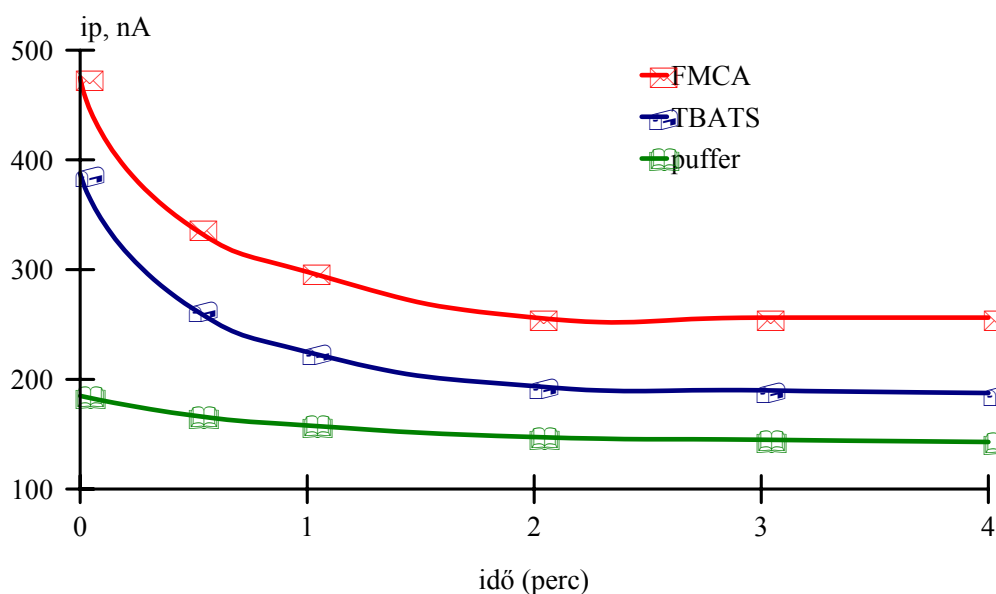
1. 30 mg kataláz enzim (2390 U/mg), 5 mg BSA 200 µl pufferban, majd 50 µl 2,5%-os glutáraldehiddel összekeverve.
2. 30 mg kataláz enzim (2390 U/mg), 20 mg PEG 6000, 4 mg BSA 200 µl pufferban, majd 50 µl 2,5%-os glutáraldehiddel összekeverve.

Az immobilizálásban való módosítás hatása a szükséges pufferoldat koncentrációjának meghatározásakor vált igazán láthatóvá, ezért csak azon kísérletek ismertetésekor térünk erre ki.

3.3.2.2. Hidrogén-peroxid bomlása az idő függvényében

A mérőrendszer kialakításának érdekében először a kataláz enzim működésének időbeli alakulását vizsgáltuk (20. ábra). A mintát az enzimcellába injektálás után megállítottuk, majd az enzimcellában eltöltött idő növelésével meghatároztuk a kiindulási hidrogén-peroxid koncentrációjának csökkenését. A méréseket tehát úgynevezett stopped-flow rendszerben végeztük. A maximális jelcsökkenést kb. 2 perc elteltével detektáltuk, azonban

1 perc után már a csökkenés kb. 80%-a mérhető. A jelesökkenés vizsgálatokor nem tapasztaltunk jelentős különbséget az acetonitrilben a két különböző vezetőső esetében kapott eredmények között.



20. ábra Hidrogén-peroxid amperometriás jele acetonitrilben az idő függvényében (0,02 mM H₂O₂, 0,5 mg FMCA/100ml, ill. 0,5 mg TBATS/100ml, + 6% v/v acetát puffer)

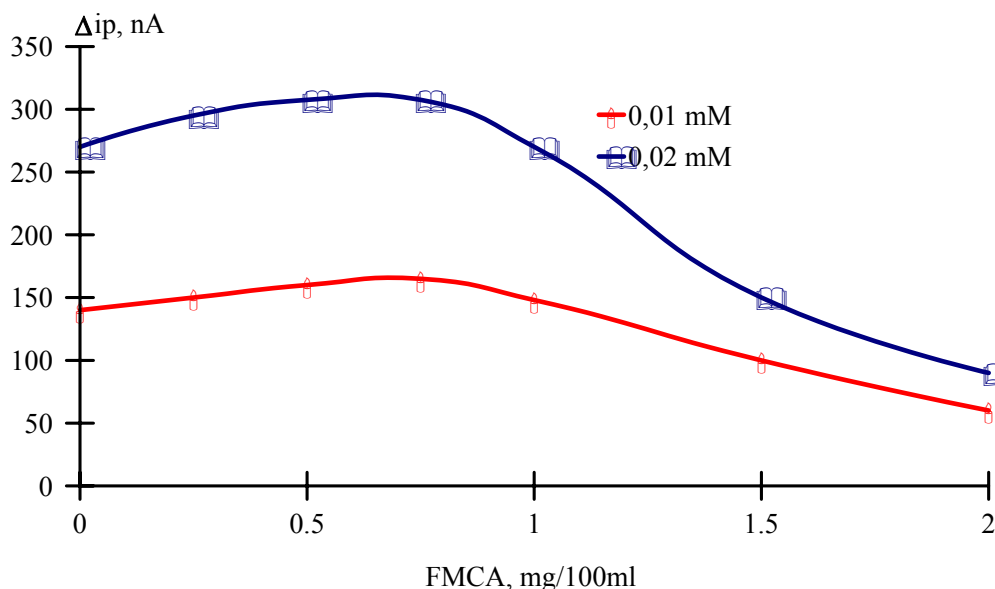
Kísérleteink során a továbbiakban a mintákat kétszer, közvetlenül az injektálás után és két perc tartózkodási idő elteltével mértük, az amperometriás jel különbsége arányos volt a hidrogén-peroxid koncentrációjával. A méréseket az előkísérletek alapján minden esetben szoba hőmérsékleten és 0,8 ml/perc áramlási sebességet alkalmazva végeztük.

3.3.2.3. Amperometriás jelek a vezetősők mennyiségének függvényében

Korábbi vizsgálatokra és a rögzített kataláz enzimmel végzett előkísérletekre alapozva a továbbiakban vivőoldatként csak acetonitrilt alkalmaztunk.

FMCA-t és TBATS-t 0-2 mg/100 ml koncentrációban adagoltuk az acetát puffert (6% v/v, pH 6) tartalmazó szerves oldószerhez és vizsgáltuk, miként változnak az amperometriás jelek a vezetősők koncentrációjának függvényében. FMCA-t adagolva az oldathoz kb. 10%-kal nőtt az amperometriás jelek különbsége (21. ábra), a különbség maximuma 0,75

mg/100 ml koncentrációjánál volt. A ferrocén-monokarbonsavat nagyobb koncentrációban adagolva a jelek közötti különbség, a mérések reprodukálhatósága, valamint a kataláz enzimet tartalmazó enzimcella élettartama egyaránt csökkent. Feltételezésünk szerint az FMCA 0,8 mg/100ml-nél nagyobb koncentrációban gátolja az enzim működését.

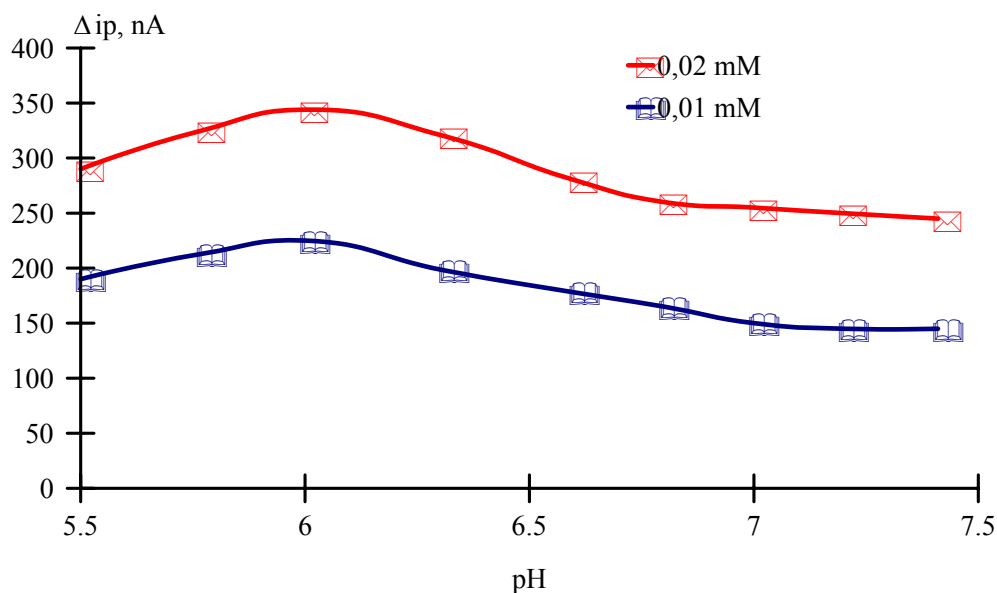


21. ábra Amperometriás jelek különbsége a ferrocén-monokarbonsav koncentrációjának függvényében (acetonitril, 6% puffer)

Az acetonitrilhez TBATS-t adagolva az enzim inaktiválására utaló jeleket nem tapasztaltunk, maximális jeleket 0,27 mg/100 ml adagolásakor kaptunk.

3.3.2.4. Rögzített kataláz enzim aktivitása a pH függvényében

Acetát puffert alkalmazva vizsgáltuk a kataláz enzim aktivitását a pH függvényében (22. ábra). A vivőoldat acetonitril + 0,75 mg FMCA/100 ml +6% pufferoldat volt és két különböző koncentrációjú hidrogén-peroxid standardot (0,01 ill. 0,005 mM) mértünk. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a maximális értéket a rögzített enzim esetén pH 6,0-nál találtuk, míg a natív enzim optimális pH-ja irodalmi adatok szerint 7,0.



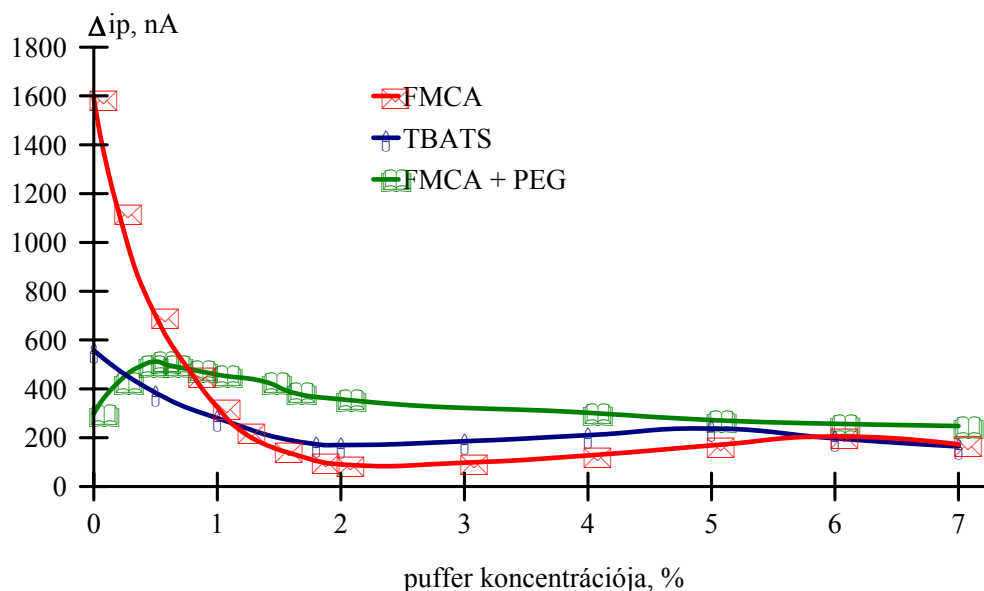
22. ábra Amperometriás jelek különbsége a puffer pH-jának függvényében (Acetonitril + 0,75 mg FMCA/100 ml + 6% puffer)

3.3.2.5. Amperometriás jel a vivóoldatban levő puffer mennyiségének függvényében

A vezetősók optimális mennyiségének meghatározása után vizsgáltuk, hogy a szerves oldószereknek mennyi puffert kell tartalmaznia ahhoz, hogy az enzim megőrizhesse aktivitását, ne denaturálódjon. Ennek vizsgálatához mindkét vezetősó jelenlétében az oldat 7% v/v puffert tartalmazott, a standardok készítéséhez pedig 0-7% v/v koncentráció tartományban adagoltuk a puffert, majd vizsgáltuk, hogyan alakult a hidrogén-peroxid csökkenés amperometriás jele. Ebben a kísérletsorozatban a PEG 6000-et tartalmazó és nem tartalmazó cella működését is összehasonlítottuk.

A PEG 6000-et nem tartalmazó enzimcellával mérve a jelek maximális különbségét kvázi vízmentes közegben kaptunk az FMCA-t tartalmazó acetonitril alkalmazása során (23. ábra). Az oldószerek mindig tartalmaznak minimális mennyiségű vizet, HPLC minőségű acetonitrilnél <0,01%. Feltételezhető, hogy a kataláz molekulák biokatalitikus aktivitása nagyobb a minimális vizet tartalmazó közegben. A puffer mennyiségét 2%-ig növelve drasztikusan csökkent a jel nagysága, majd 2-5% között enyhén nőtt. A puffer mennyiségét 5% fölött tovább növelve a hidrogén-peroxid jelének különbsége

ismét folyamatosan csökkent. Az eredményeket a PEG 6000-et tartalmazó enzimcellával mért eredményekkel összehasonlítva megállapíthattuk, hogy a vízburok stabilitását biztosító PEG jelenlétében alig volt eltérés a jelek különbségében a puffer koncentrációjának függvényében.

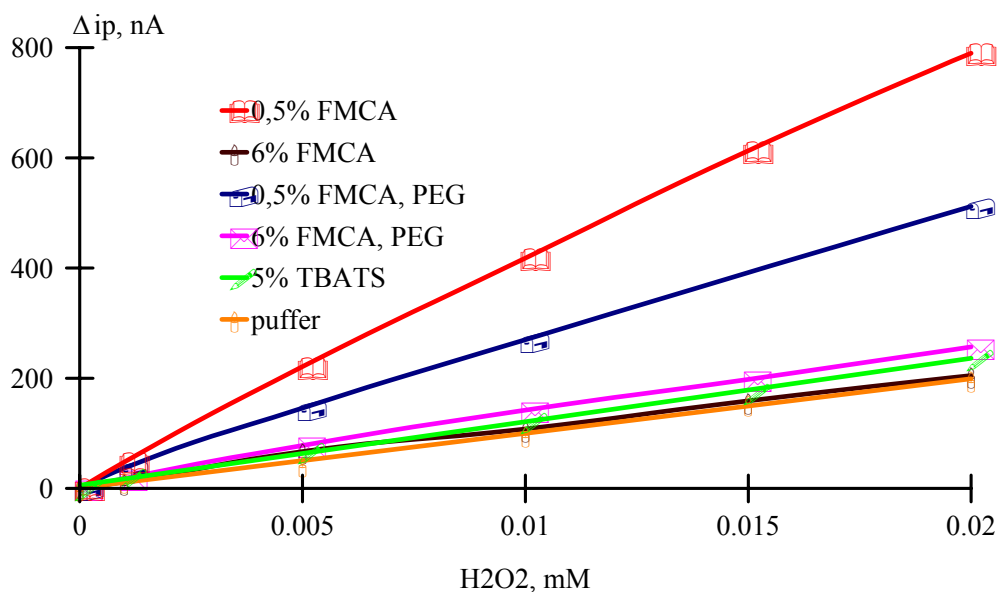


23. ábra Hidrogén-peroxid amperometriás jele az oldatban lévő puffer mennyiségének függvényében (0,02 mM H₂O₂, acetonitril +0,75 mg FMCA/100 ml, illetve 0,27 mg TBATS/100ml)

A PEG 6000 nyilvánvalóan megőrizte az enzim molekulái körül a vízburok azáltal, hogy a vízóldat átáramoltatása során feltöltődött vízzel. Így közel független a reakció sebessége a vízkoncentrációtól. Ha a víz, illetve puffer mennyisége növekedett, akkor 0-0,5% között alig a kétszeresére nőtt a jelek nagysága, majd 2%-tól folyamatosan csökkent. A TBATS-t tartalmazó oldószerrel hasonló lefutású görbét kaptunk, mint az FMCA-val, a jelek különbsége azonban lényegesen kisebb volt. A vizsgált görbék alapján a 2-7% puffert tartalmazó standardok mérésekor nem volt jelentős különbség az FMCA-t és a TBATS-t tartalmazó acetonitrillel mért jelek között. Ebben a tartományban TBATS esetén a jelek maximuma 5%-nál, míg FMCA-t tartalmazó oldatban 6%-nál volt.

3.3.2.6. Kalibráció görbék, statisztikai értékelés

Az optimális működési paraméterek meghatározása után a vizsgált kísérleti összeállításokhoz kalibrációs görbét készítettünk hidrogén-peroxid koncentrációjának megállapításához (24. ábra).



24. ábra Kalibrációs görbék különböző vivőoldatokban

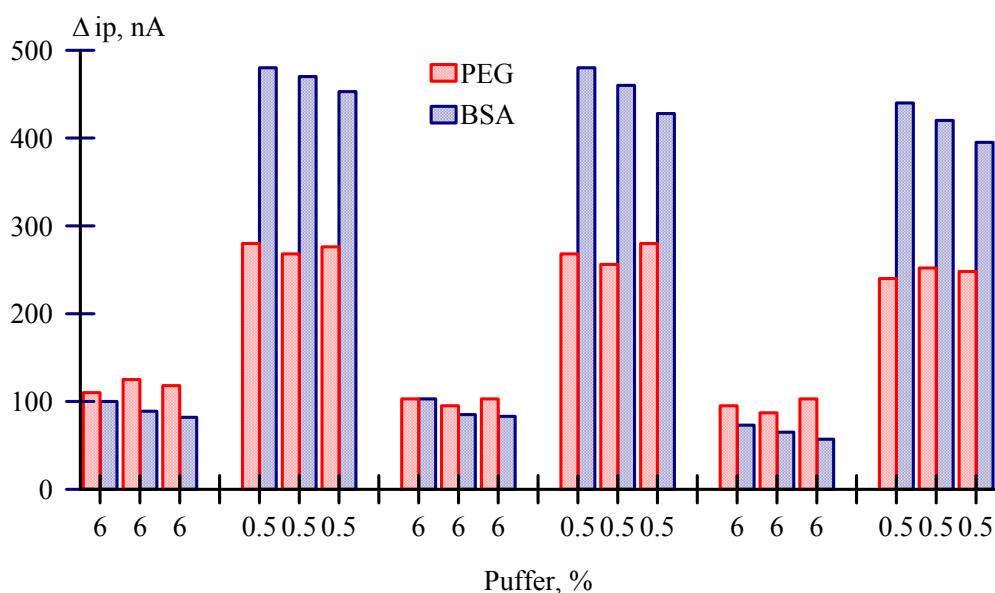
Az összehasonlítás kedvéért feltüntettük a vizes fázisban mért görbét is. A standardok hidrogén-peroxid tartalmának meghatározásához a legnagyobb jeleket a 0,5% v/v puffert tartalmazó mintákból mértük, amikor az enzimcella nem tartalmaz PEG 6000-et. PEG 6000 jelenlétében a jelek nagysága azonos körülmények között egyharmadával volt kisebb, mint az előző esetben, azonban a párhuzamos mérések közötti szórás kisebb volt. Az 5-6% v/v puffert tartalmazó vivőoldatban közel azonos nagyságúak a jelek, de a PEG 6000-et tartalmazó cellával mérhető jelek ebben az esetben is kisebbek. A legkisebb jeleket vizes fázisban mértük. Az 4. táblázatban a standardok amperometriás jelét és szórás értékeit (n=5) hasonlítottuk össze.

A 25. ábrán a PEG nélkül és PEG jelenlétében rögzített katalázal egymásután mért jeleket mutattuk be. Jól megfigyelhető, hogy PEG 6000 nélkül 0,5% v/v pufferral végzett mérések során a jelek folyamatosan csökkentek, míg PEG 6000 jelenlétében jól reprodukálható, stabil eredményeket kaptunk. Ha a kifejlesztett módszert hidrogén-peroxid meghatározására kívánjuk alkalmazni (pl. kozmetikumok, kenőcsök vizsgálatánál), célszerű a PEG 6000-et

tartalmazó enzimcellával mérni.

	0,01 mM H ₂ O ₂ (nA)	Szórás (%)	0,02 mM H ₂ O ₂ (nA)	Szórás (%)
0,5% puffer, FMCA	418 ± 19	4,5	790 ± 28	3,5
6% puffer, FMCA	108 ± 5	4,6	206 ± 9	4,4
5% puffer, TBATS	123 ± 6	4,9	237 ± 10	4,2
0,5% puffer, FMCA, PEG	270 ± 9	3,3	512 ± 13	2,5
6% puffer, FMCA, PEG	142 ± 5	3,5	257 ± 7	2,7
Puffer	98 ± 6	6,1	198 ± 8	4,2

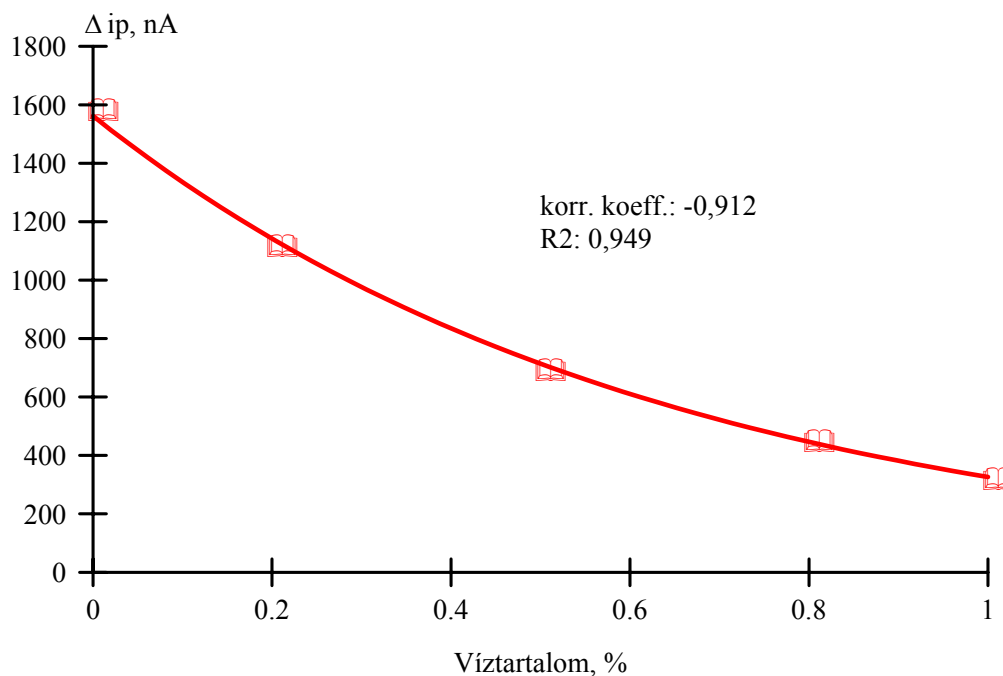
4. táblázat Hidrogén-peroxid standardok amperometriás jele és szórása (n=5)



25. ábra Hidrogén-peroxid amperometriás jele különböző cellákkal mérve (0,01 mM H₂O₂, FMCA/acetonnitril)

Mint már a 23. ábrán bemutattuk, a PEG 6000-et nem tartalmazó enzimcellával mérve FMCA jelenlétében 0-2% puffer koncentráció között a jelek hirtelen csökkentek. Az eredmények alapján alkalmas módszert dolgozhattunk ki kis víztartalmú minták nedvességtartalmának indirekt meghatározására, ha a mintákat azonos koncentrációjú szubsztráttal hígítjuk, és mérjük az áramintenzitás jeleket. A közvetett mérés során az azonos szubsztrátra kapott jel és a minta víztartalma között szoros negatív összefüggés van. A mérésre

alkalmas méréstartomány 0,05-1% víz volt (26. ábra). A kalibrációs pontokra exponenciális görbét illesztve a korrelációs koefficiens: -0,912, míg az R^2 : 0,949 volt.

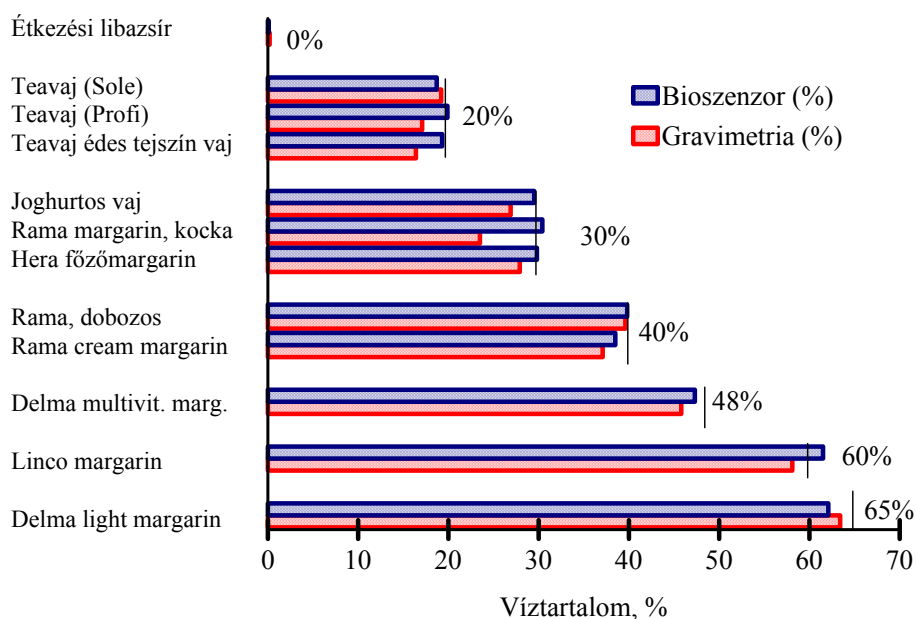


26. ábra Kalibrációs görbe minták víztartalmának meghatározására

3.3.2.7. Minták vizsgálata

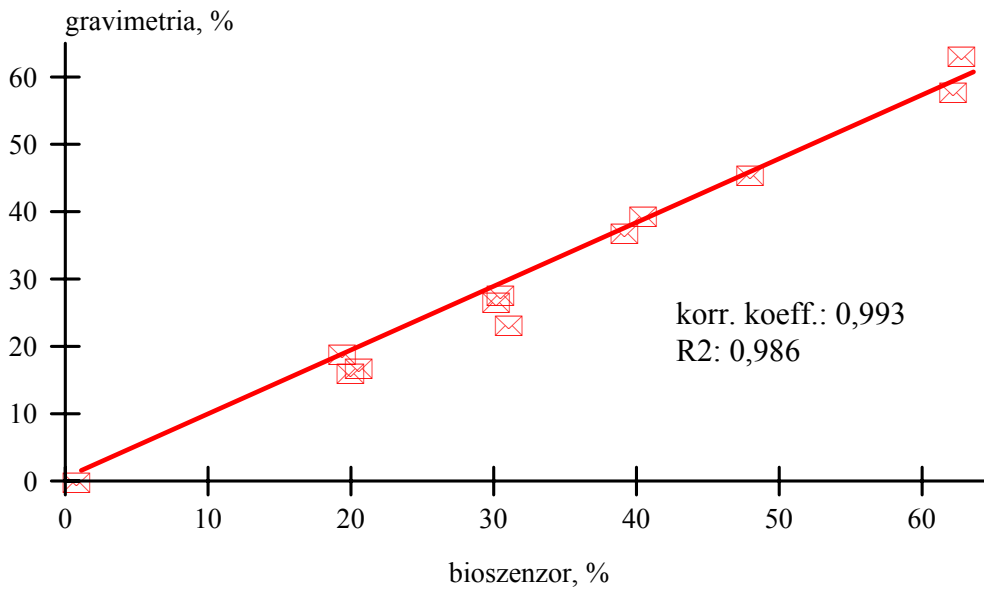
Kereskedelmi vaj és margarinminták víztartalmát határoztuk meg rögzített kataláz enzimen alapuló bioszenzorral a kifejlesztett közvetett eljárással. A minták előkészítése rendkívül egyszerű volt, mivel elég volt 0,1-0,2 g homogenizált mintát 5 ml acetonitrilben 40 °C-ra felmelegíteni, ekkor a zsírok, olajok megolvadtak, a víz az acetonitrillel elegyedett. Az oldatot hirtelen lehűtve a zsírok, olajok kiváltak, az acetonitriles fázist lecentrifugáltuk, majd a mintából 0,1 ml-t kivéve elegyítettük a minta várható víztartalmától függően 2, vagy 10 ml szubsztrátot tartalmazó oldattal. Mint az eredményekből látható, igen széles tartományban vizsgáltuk a mintákat, hiszen a közel 0% vizet tartalmazó libazsíról a 65% tartalmú light margarin termékekig igyekeztünk válogatni. Eredményeinket az AOAC szerinti hivatalos (AOAC Method 920.116) gravimetriás módszerrel hasonlítottuk össze (27. ábra) és

megállapítottuk, hogy az eredmények jól megfelelnek egymásnak, valamint a termékeken deklarált maximális víztartalom értékeknek is. A két módszer közötti korrelációt mutatja be a 28. ábra, amely szerint a korrelációs koefficiens 0,993 volt.

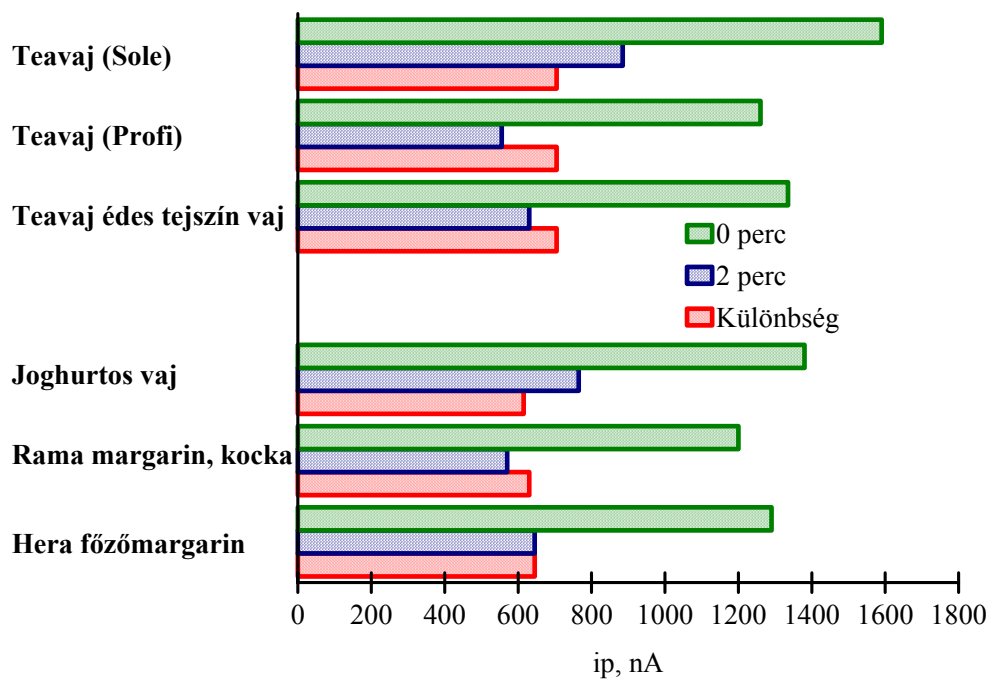


27. ábra Minták víztartalmának meghatározása bioszenzorral

A 3.3.2. fejezetben utaltunk már arra, hogy a mérés során nem a keletkező oxigént mértük, hanem a hidrogén-peroxid fogyását. Igaz, hogy így két mérés különbségét kellett vizsgálnunk, azonban a mintákban levő, és az amperometriás mérést zavaró elektroaktív anyagok hatása kiszűrhető. A 29. ábrán a közel azonos víztartalmú minták amperometriás jeleit hasonlítottuk össze. Látható, hogy a jelek az adalékanyagoktól függően változtak, (pl. vitaminok, sók) azonban a jelek különbsége, és ez utal a víztartalomra, közel állandó. Az ábrán az eltérések a különböző mintabemérésekből származnak, amit a kiértékelés során természetesen figyelembe vettünk.



28. ábra Minták víztartalmának összehasonlítása

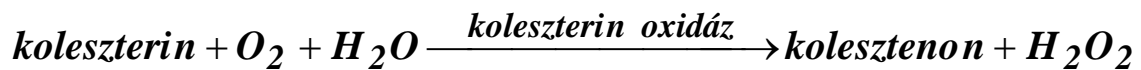
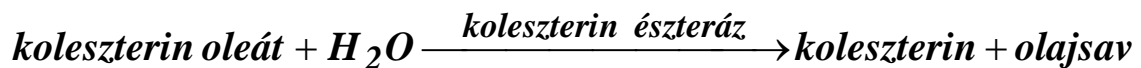


29. ábra Minták víztartalmára mért amperometriás jelek

Az általunk kidolgozott eljárásnak még több felhasználási lehetősége is kínálkozik, pl. szerves fázisban végbemenő folyamat nyomonkövetése, amennyiben az víz keletkezésével vagy fogyásával jellemezhető.

3.3.3. Koleszterin meghatározására alkalmas bioszenzor

A koleszterin nagy része az élelmiszerekben zsírsavakhoz kötve található, ezért az összes koleszterin meghatározásához első lépésben az észterkötést kellett bontani koleszterin észterázzal, majd a szabaddá vált koleszterinből koleszterin oxidáz segítségével keletkező hidrogén-peroxid mennyiségét mértük. A szabad koleszterin meghatározására koleszterin oxidáz (COD) enzimet, míg az összes koleszterin vizsgálatához koleszterin észteráz (CE) és COD enzimeket tartalmazó szerves fázisú bioszenzorokat fejlesztettünk ki.



3.3.3.1. Mérő rendszer

A méréseinket a kataláz alapú bioszenzornál már ismertetett stopped-flow rendszerben végeztük (3.3.2.1. fejezet). Az enzimes vékonyrétegcellát ismét az injektor mintahurok helyére csatlakoztattuk, ezáltal a mintát közvetlenül a cellába injektáltuk.

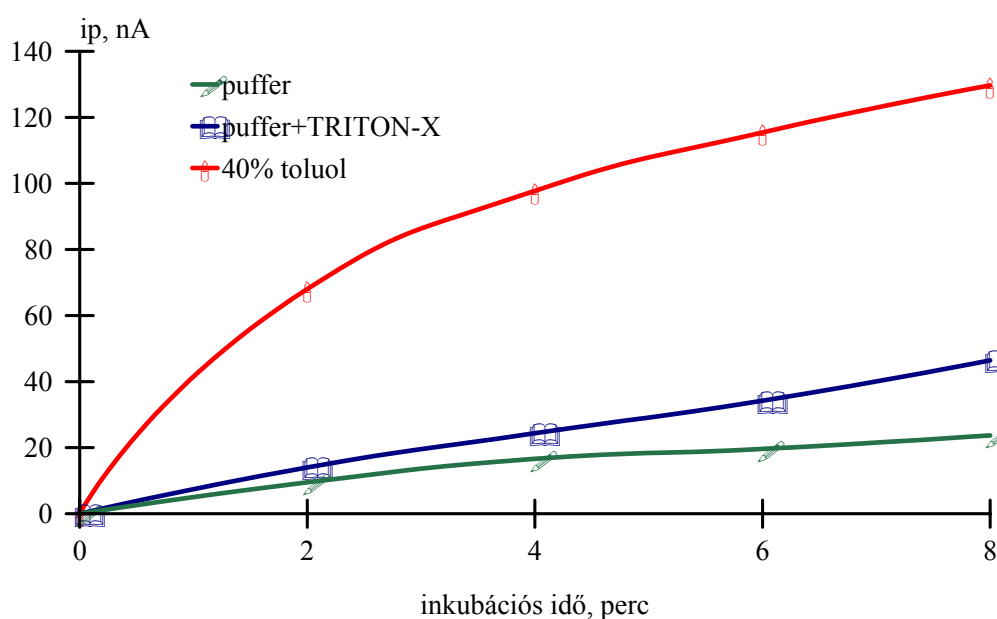
Kísérleteink során először a szabad koleszterin meghatározására alkalmas COD-ot tartalmazó enzimcella működésének feltételeit vizsgáltuk, majd az összes koleszterin meghatározására alkalmas módszert dolgoztunk ki a két enzimet rögzítve. A következő enzimcellák készítésére került sor:

1. 12 mg COD enzim, 150 U/mg, 5 mg BSA 200 µl acetát pufferban (pH 7), majd 50 µl 2,5% v/v-os glutáraldehiddel összekeverve.
2. 12 mg COD enzim, 150 U/mg, 12 mg CE enzim 638 U/g, 5 mg BSA 200 µl acetát pufferban (pH 7), majd 50 µl 2,5% v/v-os glutáraldehiddel összekeverve.

3.3.3.2. Inkubációs idő hatása a koleszterin mérésre

A mérőrendszer kialakításának érdekében először a rögzített COD enzim működésének időbeli alakulását vizsgáltuk (30. ábra). A mérések során a

mintát a cellában megállítva növeltük az enzimcellában eltöltött időt. Az összehasonlítás kedvéért a COD enzim aktivitását puffer oldatban, puffer + TRITON X-100 keverékében és acetonitril + 40% toluol keverékében vizsgáltuk. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a puffer oldatban mérhető jelekhez képest a TRITON X-100 alkalmazásakor kb. kétszer akkora jeleket kaptunk, 6-8 perc elteltével már jól mérhető jeleket kaptunk. A szerves oldószerek alkalmazásával 4 perc elteltével lényegesen nagyobb áramintenzitás csúcsokat mértünk, mint vizes fázisban. Szerves fázisban az amperometriás jelek folyamatosan nőttek a cellában töltött idő hosszával, két perc után már jól mérhető jeleket kaptunk, azonban figyelembe véve, hogy a későbbiek során két enzim együttes katalizáló hatásának jelét kívánjuk mérni, ezért minden esetben 4 perc elteltével mértük az amperometriás jelet. Ennél hosszabb tartózkodási idő alkalmazása nem volt indokolt, mivel a jelek már nem változtak jelentősen.

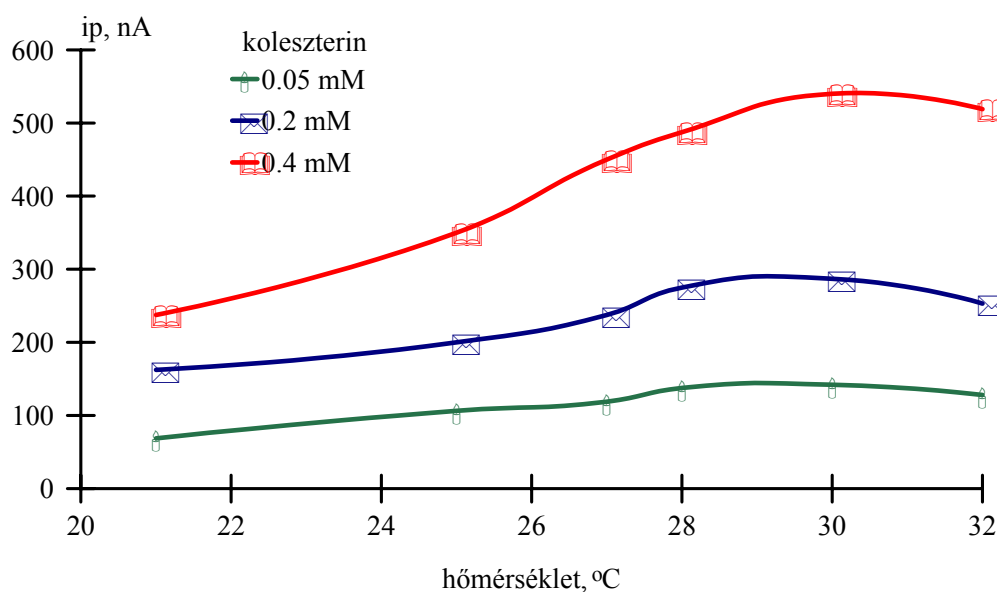


30. ábra Amperometriás jel az inkubációs idő függvényében (0,2 mM koleszterol)

3.3.3.3. Hőmérséklet hatása a koleszterin mérésére

Az enzimreakció optimális hőmérsékletének meghatározására vizsgáltuk a koleszterinből keletkező hidrogén-peroxid mérésekor keletkező amperometriás jelek nagyságát. Az enzimcellát egy termosztálható vízfürdőbe helyeztük, majd

a termosztát hőmérsékletét 21-32 °C között változtatva megállapítottuk, hogy a hőmérséklet emelésének hatására 4 perc elteltével lényegesen nagyobb áramintenzitás csúcsokat mértünk, mint 21 °C-on (31. ábra). A legnagyobb jeleket 30 °C-nál kaptuk, azonban ekkor a szerves oldószerben már jelentős buborékképződés indult meg, amely zavarta az amperometriás mérést. A biztonság kedvéért a méréseket 28 °C-on végeztük, ahol a jelek már elég nagyok, de még nem keletkeznek buborékok.

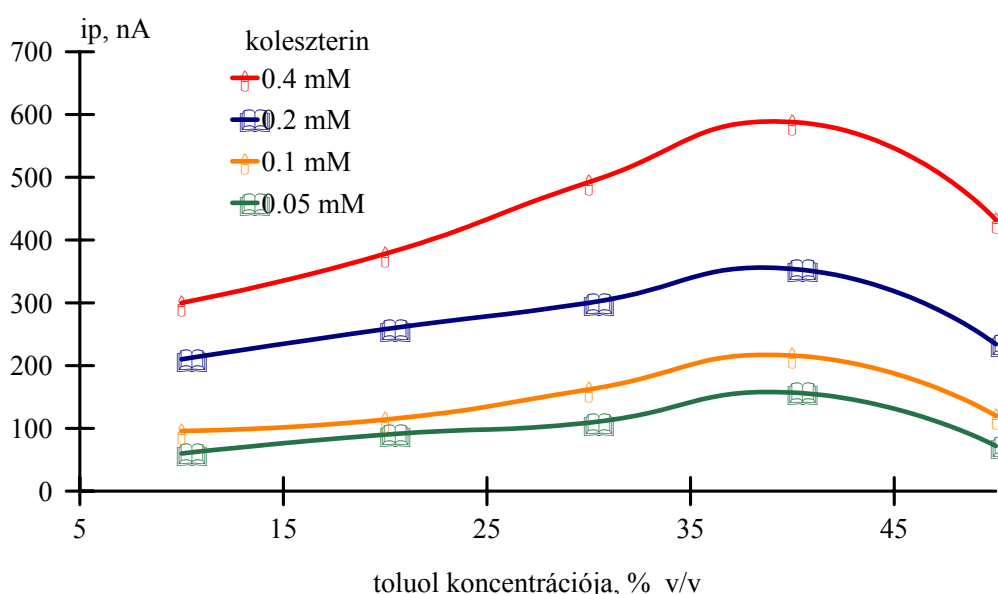


31. ábra Hőmérséklet hatása a koleszterin mérésre (acetonitril + 0,4 mg FMCA/100 ml + 40% v/v toluol+ 2,4 % v/v puffer, pH 6,6)

3.3.3.4. Amperometriás jel a vivőoldatban levő toluol mennyiségének függvényében

Korábbi eredményeink alapján oldószerként acetonitrilt használtunk, azonban az irodalmi hivatkozások szerint a COD aktivitása a hidrofób oldószerben nagyobb, mint hidrofílnál (2.6.3. fejezet). Az apoláris oldószerben azonban csak olyan kis mennyiségű víz oldható, amely nem biztosítja áramló rendszerben az enzim védő hidrátburok jelenlétét. Ezért a korábbi méréseinkhez jól alkalmazható FMCA-t tartalmazó acetonitriles oldathoz adagoltunk toluolt, és vizsgáltuk a koleszterin enzim oxidációja során keletkező amperometriás jeleket (32. ábra). 10% v/v-nál kevesebb toluolt tartalmazó oldattal a jelek alig voltak kiértékelhetőek. A toluol

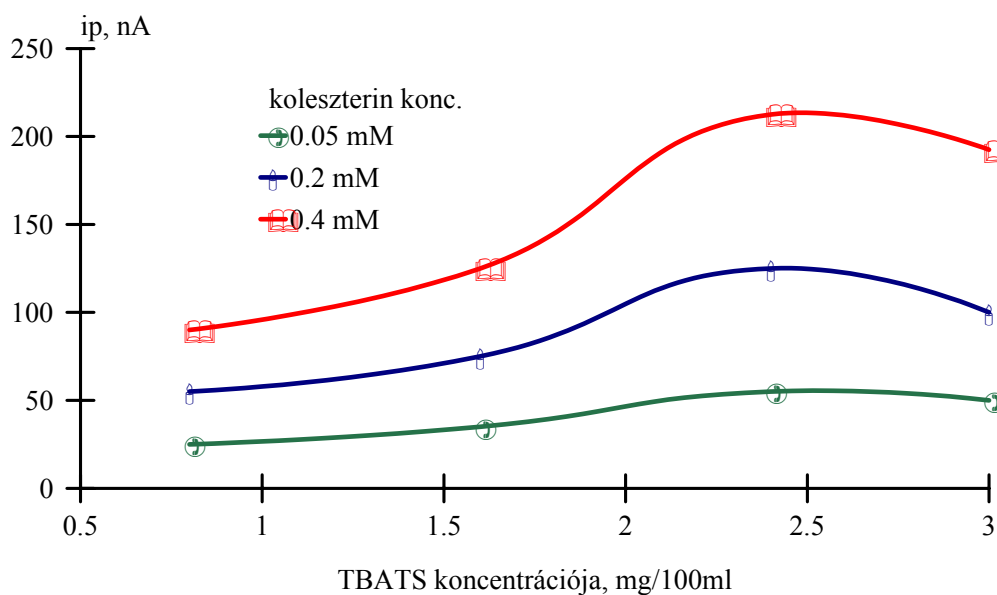
mennyiségét 10-40% v/v között változtatva az amperometriás jelek kétszeresére nőttek, ennél töményebb toluolt alkalmazva azonban a jelek hirtelen csökkentek. Pineiro-Avila és munkatársai (1998) pufferrel telített toluolban COD-ot és HRP-t tartalmazó bienzimes reaktorral fotometriás detektálással mérték a minták koleszterin koncentrációját. Megállapításaikat a mi eredményeinkkel összehasonlítva azt a következtetést vonhattuk le, hogy bár az enzimreakció számára a nagyobb toluol koncentráció megfelelő volt, a keletkezett hidrogén-peroxid áramintenzitás jele azonban csökkent.



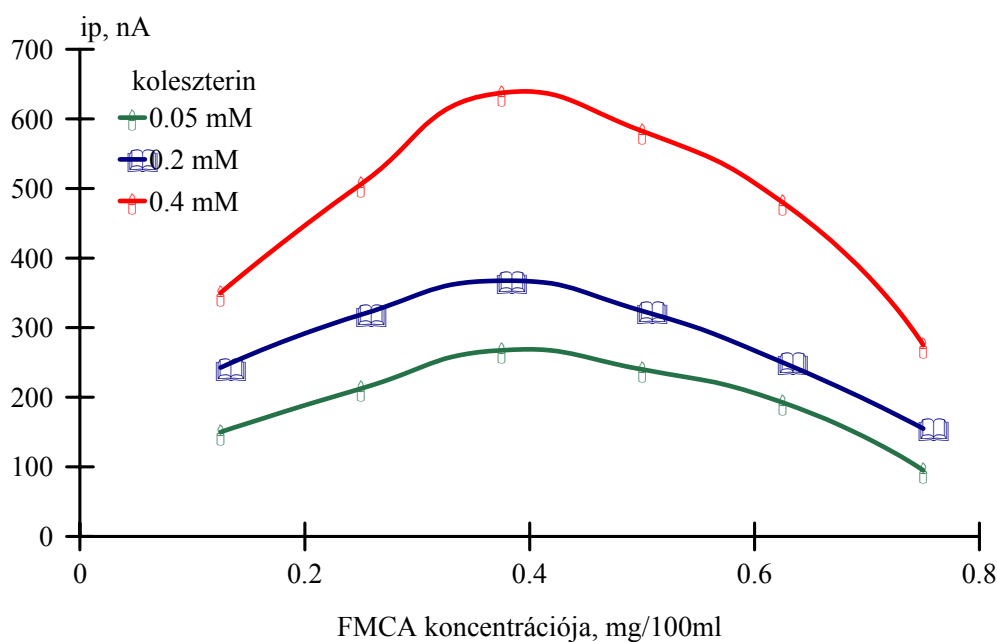
32. ábra Hidrogén-peroxid amperometriás jele a vivőoldatban lévő toluol koncentrációjának függvényében (acetonitril + 0,4 mg FMCA/100 ml + 2,4 % v/v puffer, pH 6,6)

3.3.3.5. Amperometriás jelek a vezetősók mennyiségének függvényében

A vezetősók optimális mennyiségének a meghatározásához a TBATS-t 0-3 mg/100 ml, az FMCA-t pedig 0-0,8 mg/100 ml koncentráció tartományban adagoltuk a 2,4% v/v koncentrációjú acetát puffert és 40% v/v toluolt tartalmazó acetonitril elegyhez.



33. ábra Amperometriás jelek a TBATS koncentrációjának függvényében
(acetonitril + 40% v/v toluol + 2,4% v/v acetát puffer, pH 6,6)



34. ábra Amperometriás jelek az FMCA koncentrációjának függvényében
(acetonitril + 40% v/v toluol + 2,4% v/v acetát puffer, pH 6,6)

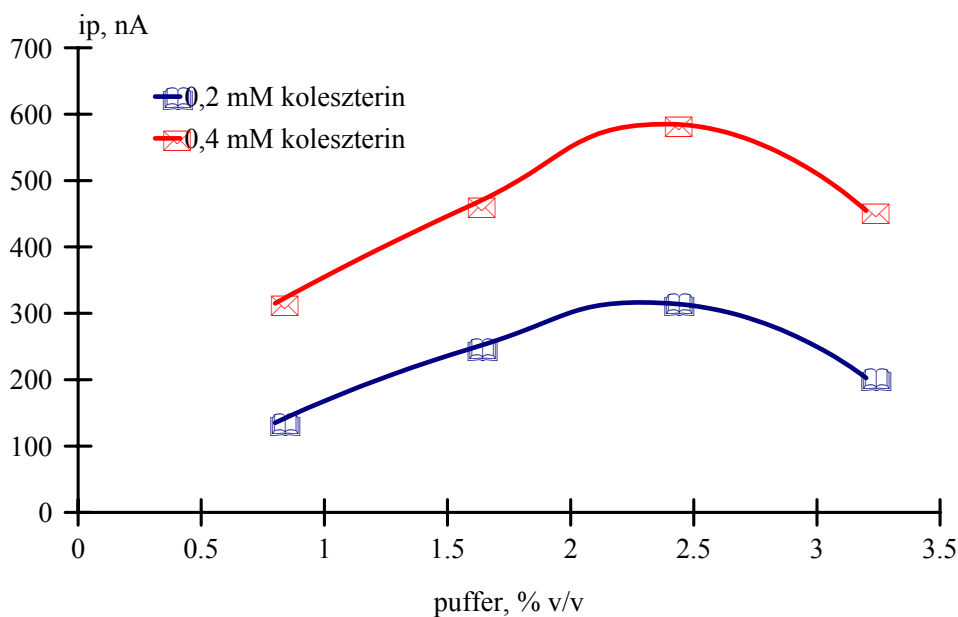
Az acetonitril-toluol keverékhez TBATS-t adagolva azt tapasztaltuk, hogy a jelek kismértékben nőttek (33. ábra). Jelentősebb jelnövekedést a 1,5-2,5 mg/100 ml tartományban észleltünk, kb. kétszeresére nőttek a jelek, azonban 3 mg/100 ml koncentrációt alkalmazva már ismét kissé csökkentek.

A ferrocén-monokarbonsavat adagolva az acetonitril-toluol keverékébe az optimális koncentráció 0,375 mg/100 ml-nek adódott (34. ábra). Az FMCA adagolásakor 0,1-0,4 mg/100 ml között nőttek az amperometriás jelek, utána azonban határozottan csökkentek. Ezért a továbbiakban 0,375 mg/100 ml FMCA-t alkalmaztunk.

3.3.3.6. Amperometriás jelek a puffer mennyiségének és pH-jának függvényében

Acetát puffert alkalmazva vizsgáltuk a COD enzim aktivitását a puffer koncentrációjának (35. ábra) és pH-jának függvényében. Korábbi vizsgálataink során, amikor az acetonitriles oldathoz adagoltuk a megfelelő mennyiségű puffert, nem voltak oldhatósági problémák, azonban a koleszterin méréséhez alkalmazott vivőoldatban az acetonitrilt toluollal elegyítettük, a toluolban pedig csak igen kis mennyiségű víz oldódik (>0,05%). Az acetát puffer koncentrációját tehát csak szűk határok között változtathattuk, mert elsőrendű szempont volt, hogy a mérés során stabil vivő oldatot alkalmazzunk, ne legyen szétválás. 0-3,2% v/v között adagolva a puffert, 0-0,8% v/v között nem kaptunk értékelhető jeleket, míg 0,8-2,4% v/v pufferral a jelek egyre nőttek. Mikor az oldat 2,8%-nál több puffert tartalmazott, az amperometriás jelek csökkentek. A továbbiakban tehát 2,4% v/v puffer koncentrációt alkalmaztuk.

A natív COD enzim optimális pH-ja irodalmi adatok alapján vizes fázisban 7,6. Vizsgáltuk, hogyan változott az immobilizálás hatására az enzim optimális pH-ja, illetve a puffer pH-ja hogyan befolyásolja a jelek nagyságát. Bebizonyosodott, hogy ebben az esetben a puffer pH-ja nem játszik olyan fontos szerepet, mint korábbi kísérleteink során, pH 5,8-7 között a jel nagyság közel állandónak mutatkozott, a további méréseinkhez pH 6,6 puffert használtuk.



35. ábra Amperometriás jelek a puffer mennyiségének függvényében (acetonitril + 0,375 mg FMCA/100 ml + 40% toluol)

3.3.3.7. Koleszterinoleát konverziója koleszterinné bienzimes cella alkalmazásakor

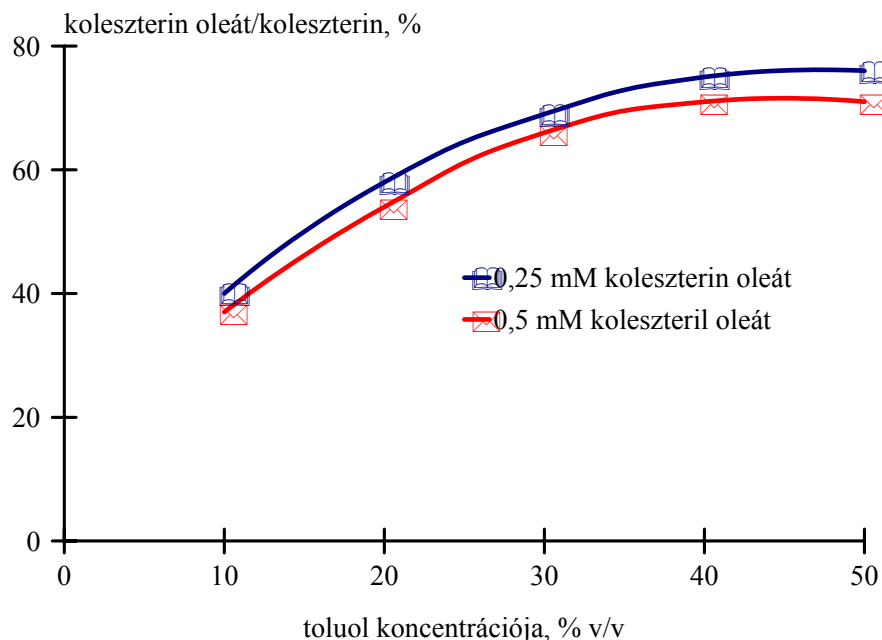
Az összes koleszterin meghatározására a CE és COD enzimeket együtt rögzítettük az enzimcellában. Az összes koleszterin meghatározásakor standardként a koleszterinoleát bomlásának hatásfokát vizsgáltuk. Az alkalmazott enzimek arányát a 5. táblázat szerint vizsgáltuk. A cellákkal mértük az azonos töménységű koleszterinoleát és koleszterin injektálásakor kapott áramintenzitás nagyságát, és ezek arányából kiszámítottuk a konverzió mértékét. A továbbiakban a 12 mg COD enzimet, 12 mg CE enzimet és 5 mg BSA-t tartalmazó enzimcellát alkalmaztuk, amint azt a 3.3.3.1. fejezetben már említettük.

Az előkísérleteink alapján a két enzimet tartalmazó cella alkalmazásával hasonló eredményeket kaptunk, mint amiket a COD alkalmazásánál ismertettünk. A koleszterin-oleát konverziója elsősorban az oldatban lévő toluol mennyiségétől függően változott (36. ábra). 10-40% toluolt tartalmazó vivő folyadékban a koleszterin-oleátból keletkező koleszterin mennyisége 37-40%-ról 71-75%-ra nőtt. Ha az oldat 40%-nál több toluolt tartalmazott, akkor a konverzió mértéke nem csökkent, csak az amperometriás jel. Ebből ismét arra

következtethettünk, hogy a toluol mennyiségének növelése az enzimek reakció sebességét nem befolyásolja negatívan.

COD enzim	CE enzim	BSA	Konverzió foka (%)
7 mg	12 mg	5 mg	65
12 mg	5 mg	5 mg	57
12 mg	10 mg	5 mg	70
12 mg	12 mg	5 mg	75
15 mg	15 mg	5 mg	leperreg az enzim réteg

5. táblázat Koleszterin-oleát konverziója koleszterinné a cellában rögzített enzimek koncentrációjának függvényében (acetonitril + 0,375 mg FMCA/100 ml + 40% toluol + 2,4% v/v acetát puffer, pH 6,6)

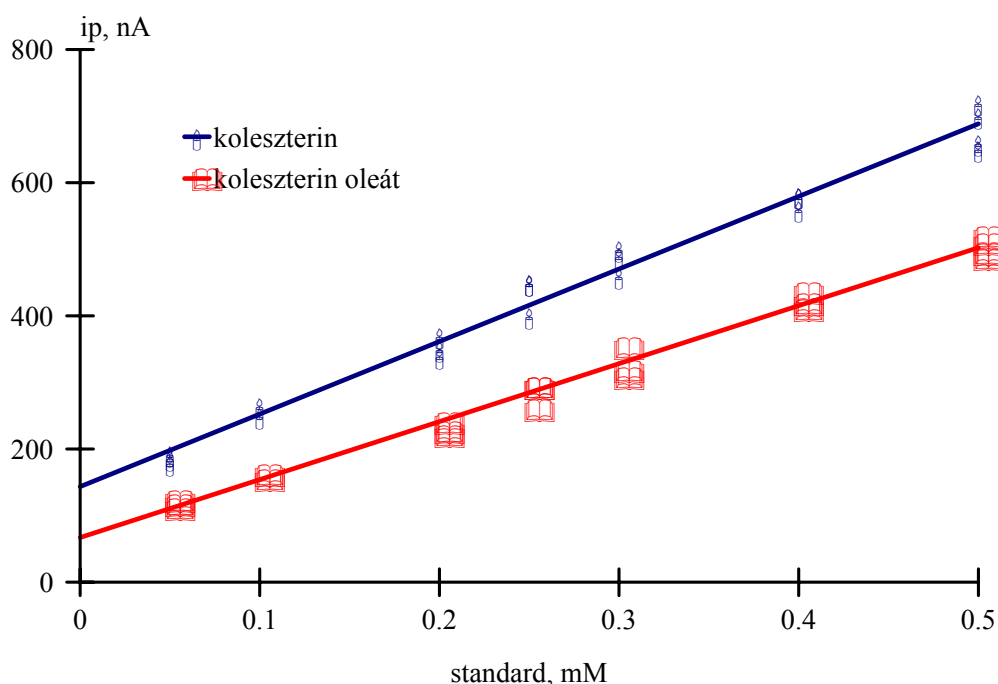


36. ábra Koleszterin-oleát konverziója koleszterinné (acetonitril + 0,375 mg FMCA/100 ml + 40% toluol + 2,4% v/v acetát puffer, pH 6,6)

3.3.3.8. Koleszterin mérésének statisztikai paraméterei

Az optimális működési paraméterek meghatározása után kalibrációs görbét készítettünk a szabad és az összes koleszterin meghatározásához (37. ábra). A koleszterin és a koleszterin-oleát standardok mérésével készített kalibrációs görbék eltérésének oka az észter bomlásának kb. 75%-os konverziós foka. A 6. táblázatban az egyes standardok amperometriás jelét és annak szórását mutatjuk be. A szórásokat minden esetben 5 párhuzamos mérés eredményéből számoltuk ki.

Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy mindkét szubsztrát mérésekor a méréstartomány 0,05-0,5 mM között volt. A korrelációs koefficiens a koleszterin esetében 0,967, míg a koleszterin-oleát mérésekor 0,972 volt.



37. ábra Kalibrációs görbék a szabad és összes koleszterin meghatározásához

A kidolgozott módszer segítségével vajak, margarinok, étkezési zsír, tojássárgája és különböző minőségű száraztészta összes koleszterintartalmát határoztuk meg. A minta előkészítés a különböző minták esetében a mátrixoknak megfelelően változott. A minták hígításakor alkalmazott

acetonitriles oldat 100 ml-e 0,625 mg FMCA-t és 4 ml acetát puffert (0,2 M, pH 6,6) tartalmazott.

Standard (mM)	Koleszterin (nA)	RSD (%)	Koleszterin-oleát (nA)	RSD (%)
0.10	255.0 ± 25.4	9.2	186.8 ± 18.3	10.2
0.25	415.3 ± 28.9	6.7	296.7 ± 18.8	6.4
0.50	630.0 ± 29.4	4.6	472.5 ± 22.1	4.7

6. táblázat Koleszterin és koleszterin-oleát standardok mérésének statisztikai értékelése (n=5)

3.3.3.9. Tojássárgák koleszterintartalmának vizsgálata

Két különböző helyről származó tojássárgának vizsgáltuk az összes koleszterin tartalmát. A tojássárgáját elválasztottuk a fehérjétől, majd a homogenizált tojássárgájából 0,2 g-ot mértünk be 10-10 párhuzamos mintához. A minták közül ötöt közvetlenül vizsgáltunk, öthöz pedig a hígítás előtt koleszterin-oleát standardot adtunk (0,25 ml 10mM koleszterin-oleát standard) annak érdekében, hogy a minta előkészítés hatékonyságát vizsgáljuk. Ezzel a hozzáadott standarddal a minta koncentrációját 0,1 mM koleszterin-oleáttal növeltük meg. A mintákat rázóüvegekben 20 ml desztillált vízzel 10 percig összeráztunk. A rázatás után 10 ml toluolt adtunk az oldathoz, majd 10 percig kiráztuk, hogy a koleszterin a szerves fázisban oldódjon, majd kétszeres desztillált vízzel történő mosás után a toluolos fázis 2 ml-ét 3 ml acetonitriles oldattal elegyítve mértük az oldatok koleszterintartalmát.

A 7. táblázatban összefoglalt eredmények alapján megállapítottuk, hogy a koleszterin-oleát standardot 86-93%-ban nyertük vissza a fent ismertetett minta előkészítés során. Az eredmények alapján elmondható, hogy a minta előkészítése megfelelő a minták összes koleszterintartalmának meghatározására. A tojássárgák általunk mért koleszterintartalma (1135, ill. 1310 mg/100 g) megfelelt az élelmiszer összetevőket összefoglaló táblázat

adatainak (1120 mg/100 g, McCance, Widdowson, 1992).

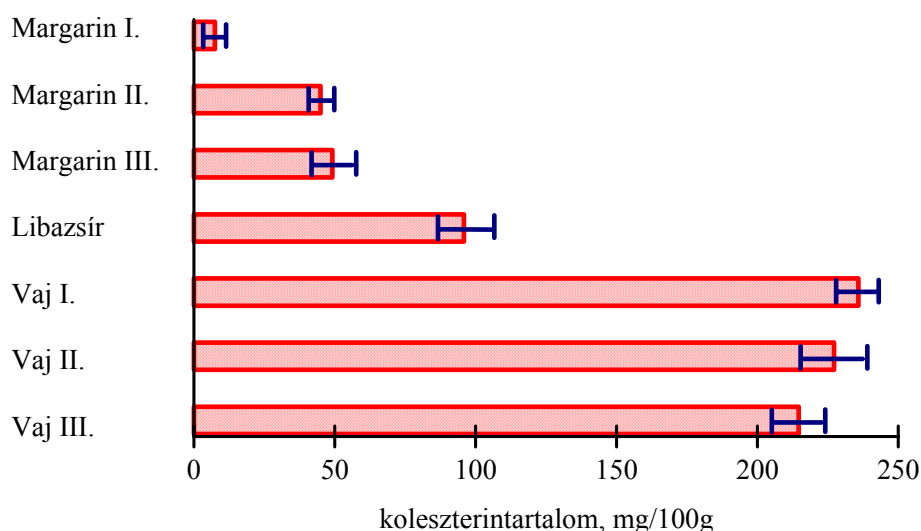
Minta	Összes koleszterin (mM)	Standard addíció után mért összes koleszterin (mM)	Visszanyerés (%)	Összes koleszterin (mg/100g)
Tojássárgája I.	0.235 ± 0.018	0.328 ± 0.013	93	1135 ± 87
Tojássárgája II.	0.271 ± 0.015	0.357 ± 0.019	86	1310 ± 73

7. táblázat Tojássárgája koleszterintartalmának meghatározása (n=5)

3.3.3.10. Vajkészítmények, zsír és margarinok koleszterintartalmának vizsgálata

Az általunk vizsgált vajak különböző gyártók termékei voltak, a margarinok között volt csak növényi zsiradékot tartalmazó, valamint növényi és állati zsiradékot egyaránt tartalmazó zsírszegény termék. A homogenizált mintákból 0,5g-ot mértünk be 5-5, illetve a margarinok vizsgálatához 10-10 párhuzamos mintához. A margarin minták közül ötöt közvetlenül vizsgáltunk, öthöz pedig a toluol adagolása előtt koleszterin-oleát standardot adtunk (0,125 ml 10mM koleszterin-oleát standard) annak érdekében, hogy a minta előkészítés hatékonyságát vizsgáljuk. Ezzel a hozzáadott standarddal a minta koncentrációját 0,1 mM koleszterin-oleáttal növeltük meg. A mintákat 5 ml toluollal 10 percig kevertettük. Az oldatból centrifugálás után 2 ml-t kivéve 3 ml acetonitriles oldattal elegyítve mértük az összes koleszterintartalmat.

A vajak, margarinok, libazsír összes koleszterin tartalmának eredményeit a 38. ábra mutatja be. Az eredmények alapján megállapíthattuk, hogy a vaj minták (214,6-235,8 mg/100g) koleszterintartalma megfelelt az élelmiszer összetevőket összefoglaló táblázat adatainak (230 mg/100mg, McCance, Widdowson, 1992).



38. ábra Minták összes koleszterintartalmának meghatározása bioszenzorral

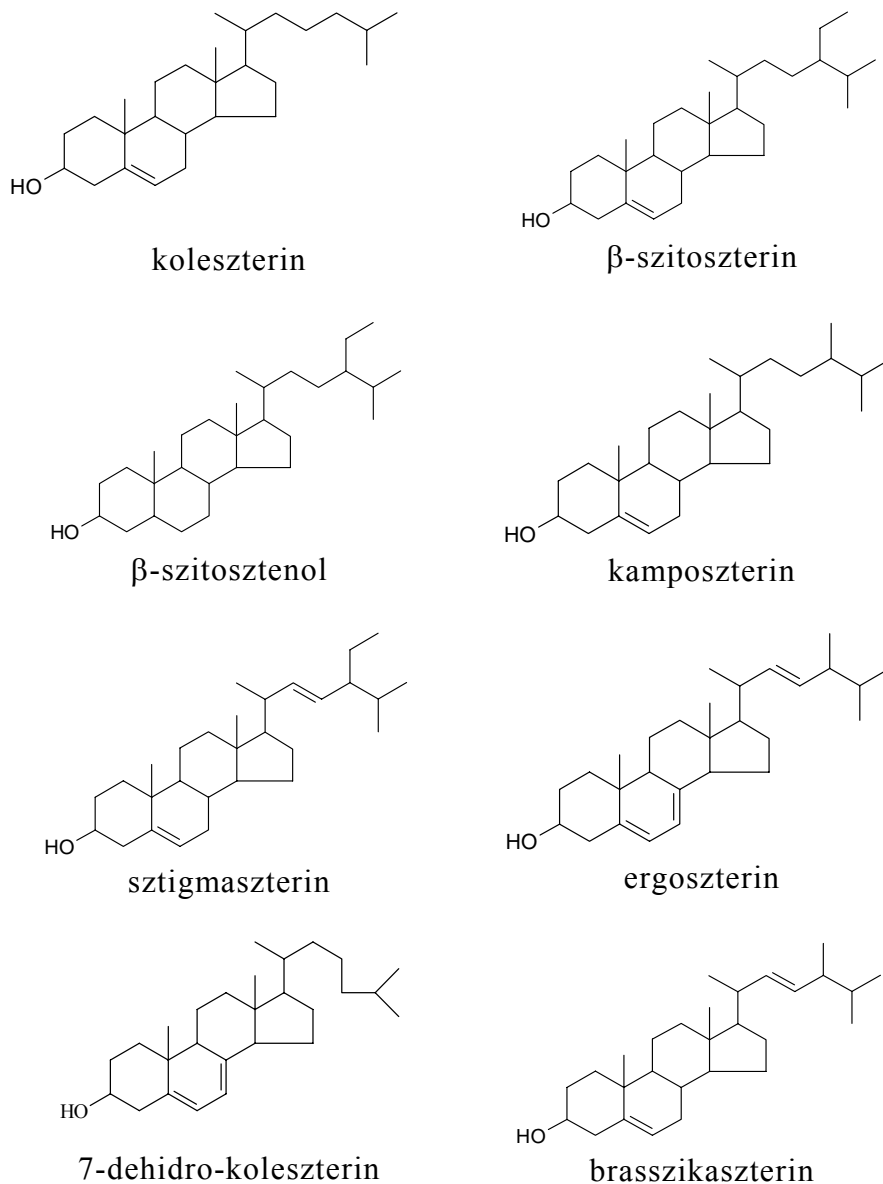
A margarinkok mérése során a csak növényi zsírokat tartalmazó mintára 7,5 mg/100g koleszterin koncentrációt, míg a csökkentett energiatartalmú margarinkokra 45,0 illetve 49,1 mg/100g koleszterintartalmat mértünk. Az eredményeket standard addícióval is ellenőriztük, mert a kalibrációs görbék 0,1 mM alatt nem adtak megfelelő eredményt. A 8. táblázatban összefoglalt eredmények alapján látható, hogy a hozzáadott standard visszanyerése 83-88% volt, ami megfelelt a mintaelőkészítés követelményeinek.

Minta	Összes koleszterin (mM)	Standard addíció után mért összes koleszterin (mM)	Összes koleszterin (mg/100g)
Margarin I.	0,025 ± 0,012	0.108 ± 0.006	7,5 ± 4,8
Margarin II.	0,059 ± 0,015	0.147 ± 0.009	45,0 ± 8,3
Margarin III.	0,068 ± 0,015	0.154 ± 0.008	49,1 ± 7,5

8. táblázat Margarín minták koleszterintartalmának meghatározása

A margarinkok a napraforgóra jellemző szterineket tartalmazzák, amelyek a β -szitoszterin, a brassicaszterin és a camposzterin (Choong és mtsai. 1999). A *Pseudomonas* eredetű COD enzim vizes fázisban elsősorban a 3β -hidroxik csoportokat tartalmazó szubsztrátokra specifikus (39. ábra): koleszterin (100%), dihidroxikoleszterin (78%), ergoszterin (51%), sztigmaszterin (40%),

sztigmasztanol (32%), valamint 7-dehidro-koleszterin (24%) (Lee és mtsai.1989). Feltételezzük, hogy a β -szitoszterin oxidálásának sebessége lényegesen kisebb, mint a koleszteriné és az általunk alkalmazott dinamikus rendszerben alig befolyásolja a mérésüket.



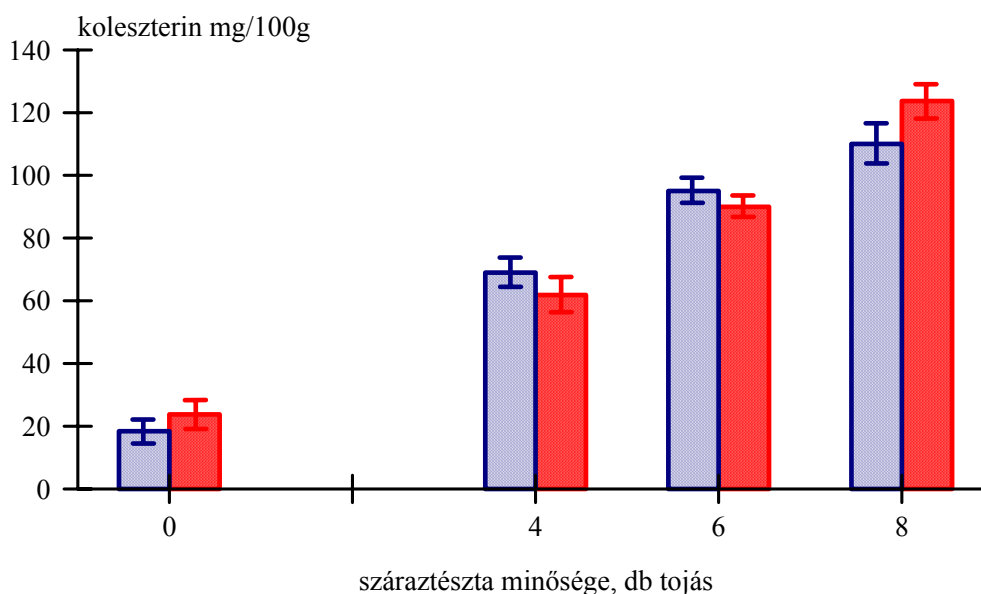
39. ábra Szterin vegyületek kémiai felépítése

Ezt a feltételezést Hall és Turner (1991) vizsgálata is alátámasztja, miszerint álló rendszerben alkalmazott bioszenzorral 30 perc után volt kimutatható a β -szitoszterin jelenléte, de a mért koncentráció lényegesen kisebb volt, mint a referencia módszerrel mért érték. Annak ellenére, hogy nem tudunk egyértelműen különbséget tenni az egyes szterinek között, azonban a

bioszenzoros mérés igen alkalmas a minták gyors ellenőrzésére (pl. a margarin minta tartalmaz-e állati zsiradékot, a vajak zsiradék összetétele, minősége megfelelő-e).

3.3.3.11. Szárzleszták tojástartalmának vizsgálata

A továbbiakban különböző tojástartalmú (0, 4, 6, 8) szárzleszták összes koleszterintartalmát vizsgáltuk. A ledarált szárzlesztából 2 g-ot rázótolcsérben 20 ml (1:1) hígítású sósav oldattal 10 percig ráztuk, majd 10 ml toluolt adtunk az oldathoz és ismét 10 percig ráztuk. A toluolos fázist kétszer mostuk desztillált vízzel és 2 ml-t 3 ml acetonnitriles oldattal elegyítve mértük a minták összes koleszterintartalmát. Az eredmények alapján (40. ábra) megállapíthattuk, hogy jól elkülöníthetőek a különböző tojástartalmú minták egymástól. Az eljárás alkalmasnak bizonyult tesztaminták minőségének gyors ellenőrzésére, amellyel kiszűrhetőek a nem megfelelő termékek.



40. ábra Szárzleszták koleszterintartalma

4. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásaink során szerves fázisban működő bioszenzorokat fejlesztettünk ki, amelyeket folyamatosan áramló rendszerben alkalmaztuk. A korábban általunk kidolgozott módosított enzimcellában rögzített glükóz oxidáz enzim viselkedését, mint modell-rendszer, részletesen tanulmányoztuk szerves oldószerekben. Az eredmények alapján készítettünk kataláz alapú mérőcellát, majd pedig szabad és összes koleszterin meghatározására alkalmas eljárást dolgoztunk ki. Minden esetben vizsgáltuk a módszerek alkalmazhatóságát az élelmiszerekben lévő szubsztrátok mennyiségi elemzésére.

Vizsgálataink a következőkre terjedtek ki:

A glükóz meghatározására alkalmas mérőrendszer kifejlesztése során:

- Oldott glükóz oxidáz enzimmel végzett kísérletekkel megállapítottuk, hogy acetónitrilben és 2-propanolban mutatott az enzim aktivitást, a továbbiakban ezeket az oldószereket alkalmaztuk.
- Ferrocén-monokarbonsavat (FMCA) és a tetrabutil-ammónium-toluol-4-szulfonát (TBATS) vezetősók hatását tanulmányoztuk a 6% v/v acetát puffert (pH 5) tartalmazó szerves oldószerekben, és az amperometriás jelek alapján meghatároztuk optimális mennyiségüket.
- Vizsgáltuk a puffer mennyiségének és pH-jának szerepét a vivőoldatban.
- A FIA rendszerben 0,8 ml/perc áramlási sebességet találtuk megfelelőnek.
- Kalibrációs görbék segítségével különböző elegyekben összehasonlítottuk a lineáris méréstartományt, az eredmények szórását, a görbék meredekségét.
- Az általunk kifejlesztett szerves fázisú bioszenzorral kereskedelembe kapható majonézok, saláta öntetek, mustárok, fűszeres szószkészítmények glükóztartalmát határoztuk meg, és megállapítottuk, hogy az eredmények jó egyezést mutatnak a vizes fázisban végzett enzimes UV-spektrofotometriás módszerrel mért értékekkel

(korrelációs koefficiens: 0,976).

A kataláz enzim alapú mérőrendszer kifejlesztése során:

- Stopped-flow típusú áramlási elrendezést alakítottunk ki annak érdekében, hogy a standardok és a minta megfelelő időt tölthessen az enzimcellában. A kataláz enzim működésének időbeli alakulását vizsgálva megállapítottuk, hogy 2 perc elteltével már megfelelő nagyságú és stabil jeleket detektálhattunk acetónitrilben (5% v/v puffer).
- Az enzim rögzítésének módját vizsgálva összehasonlítottuk, hogyan módosulnak az eredmények, ha a cella készítésekor az eddig alkalmazott bovine serum albumin (BSA) mellett polietilén-glikol (PEG) 6000-rel együtt immobilizáljuk a kataláz enzimet.
- FMCA mediátor és TBATS vezetősó hatását tanulmányoztuk a szerves oldószerekben, és meghatároztuk az enzim működéséhez, illetve az amperometriás jel detektálásához szükséges mennyiségét.
- Vizsgáltuk a puffer mennyiségének és pH-jának szerepét az oldatban, és igen nagy különbséget találtunk a polietilén-glikolt 6000-et (PEG) tartalmazó és nem tartalmazó enzimcellával mért eredmények között.
- PEG jelenlétében 0,5% puffert tartalmazó vivőoldattal a standardok jele ugyan kisebb volt, mint a PEG 6000 nélkül, azonban a párhuzamos mérések közötti szórás kisebb, a cella élettartama pedig hosszabb volt. Megállapítottuk, hogy ha a kifejlesztett eljárást hidrogén-peroxid meghatározására kívánjuk alkalmazni (pl. kozmetikumok, kenőcsök), célszerű a PEG 6000-et tartalmazó enzimcellával mérni.
- PEG 6000-et nem tartalmazó cellával indirekt mérési eljárást dolgoztunk ki kis víztartalmú minták nedvességtartalmának meghatározására. A vízmentes oldószerben oldott mintákhoz minden esetben azonos mennyiségű szusztrátot (hidrogén-peroxid) adagoltunk és mértük az amperometriás jeleket. A közvetett mérés során az azonos szubsztrátra kapott jel a minta víztartalmával szoros összefüggést mutatott. A mérésre alkalmas tartomány 0,05-1% víz volt.
- Kereskedelmi vaj- és margarinminták víztartalmát határoztuk meg

rögzített kataláz enzimen alapuló bioszenzorral a kifejlesztett közvetett eljárással. Eredményeinket az AOAC szerinti hivatalos (AOAC Method 920.116) gravimetriás módszerrel hasonlítottuk össze és megállapítottuk, hogy az eredmények jó egyezést mutattak egymással (korrelációs koeficiens: 0,993), valamint a termékeken deklarált maximális víztartalom értékekkel is.

A szabad és összes koleszterin meghatározására kifejlesztett mérőrendszer:

- A szabad koleszterin meghatározására alkalmas koleszterin oxidázt (COD) tartalmazó enzimcella működésének tanulmányozása érdekében először a rögzített COD enzim működésének időbeli alakulását vizsgáltuk, és megállapítottuk, hogy 4 perc tartózkodási idő szükséges a koleszterin katalitikus oxidálásához és a megfelelő jel eléréséhez.
- Az enzimreakció optimális hőmérsékletének meghatározására után a méréseket 28 °C-on végeztük.
- Tekintettel arra, hogy a COD aktivitása a hidrofób oldószerekben nagyobb, mint hidrofilban, ezért a korábbi méréseinkhez jól alkalmazható ferrocén-monokarbonsavat tartalmazó acetonitriles oldathoz toluolt adagoltunk, és vizsgáltuk az enzim aktivitására gyakorolt hatását. Az amperometriás jelek nőttek a toluol adagolásának hatására.
- FMCA és TBATS hatását tanulmányoztuk a szerves oldószer elegyben, és meghatároztuk az enzim működéséhez, illetve az amperometriás jel detektálásához szükséges koncentrációt.
- Acetát puffert alkalmazva vizsgáltuk a COD enzim aktivitását a puffer mennyiségének és pH-jának függvényében. A toluol jelenlétében a puffer mennyiségét csak szűk határok között változtattuk, majd a sorozatmérésekhez 2,4% pufferkoncentrációt alkalmaztunk.
- Az összes koleszterin meghatározására a koleszterin észteráz (CE) és COD enzimeket együtt rögzítettük az enzimcellában. Az összes koleszterin meghatározásakor standardként a koleszterin-oleát bomlásának hatásfokát vizsgáltuk, és megállapítottuk, hogy toluol

jelenlétében a CE gyorsabban bontja az észtert.

- Az optimális működési paraméterek meghatározása után vizsgáltuk a lineáris méréstartományt és az eredmények szórását és megállapítottuk, hogy a méréstartomány mindkét szubsztrát mérésekor 0,05-0,5 mM között volt. A korrelációs koefficiens a koleszterin esetében 0,967, míg a koleszterin-oleát mérésekor 0,972 volt.
- Két különböző helyről származó tojásminták sárgájának vizsgáltuk az összes koleszterin tartalmát. A mérések megbízhatóságának ellenőrzésére hozzáadott standarddal vizsgáltuk a visszanyerést (86-93%). A tojássárgák általunk mért koleszterintartalma (1135 ill. 1310 mg/100 g) megegyezett az élelmiszer összetevőket összefoglaló táblázat adataival.
- Kereskedelmi vaj, margarin és libazsír összes koleszterin tartalmának meghatározásakor az eredmények jó egyezést mutattak az élelmiszer összetevőket összefoglaló táblázat adataival.
- Vizsgáltuk a különböző tojástartalmú (0, 4, 6, 8) száraztészták összes koleszterintartalmát, az esetleges minőségi hibák kiszűrésére. Az eljárás alkalmasnak bizonyult tesztaminták gyors minőségellenőrzésére.

Munkánk alapján megállapítható, hogy az enzimek szerves oldószerekben való alkalmazásának lehetőségét jelentősen befolyásolta az alkalmazott oldószer összetétele, a bioszenzoros eljárások fejlesztésekor rendkívül körültekintő vizsgálatokra volt szükség.

Az élelmiszerminták előkészítése során arra törekedtünk, hogy lehetőleg egyszerű eljárásokat dolgozzunk ki, ezért a különböző típusú élelmiszerek sorozatvizsgálata előtt minden esetben ellenőrizni kell, hogy az adott eljárás megfelel-e, vagy bizonyos módosításra szorul.

5. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI

1. Glükóz oxidáz enzimet vékonyréteg cellában rögzítve szerves FIA rendszerben alkalmazható amperometriás bioszenzort fejlesztettem ki, és igazoltam, hogy a korábban vizes fázisban alkalmazott glükózmérő szenzor alkalmas szerves fázisban való mérések elvégzésére.
2. Megfelelően hosszú reakcióidőt biztosító mérési elrendezést dolgoztam ki és rögzített kataláz enzimet immobilizálva hidrogén-peroxid meghatározására alkalmaztam. Az enzim rögzítése során vizsgáltam a polietilén-glikol 6000-et tartalmazó, illetve nem tartalmazó cellák közötti különbséget, és megállapítottam, hogy a cella PEG jelenlétében alkalmas a hidrogén-peroxid koncentrációjának meghatározására.
3. Kataláz alapú cellával a szubsztrátot azonos mennyiségben adagolva elsőnek fejlesztettem ki indirekt mérési eljárást az alacsony víztartalmú élelmiszerekben lévő víz mennyiségének gyors meghatározására.
4. Szabad koleszterin meghatározására koleszterin oxidáz enzimet tartalmazó cellát fejlesztettem ki, és vizsgáltam az enzim aktivitásának változását apoláris oldószerek jelenlétében.
5. Összeskoleszterin meghatározására koleszterin észteráz és koleszterin oxidáz enzimeket rögzítve bienzimes vékonyréteg cellát készítettem, és vizsgáltam a koleszterin-oleát bontásának hatékonyságát.
6. A kifejlesztett módszerek használhatóságát minden esetben élelmiszerminták vizsgálatával bizonyítottam. Az élelmiszerminták előkészítésére gyors, egyszerű eljárásokat dolgoztam ki.

6. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BSA	marha szérum albumin
CE	koleszterin észteráz
COD	koleszterin oxidáz
EDC	1-etil-3(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid
FIA	áramló injektálós rendszerben
FMCA	ferrocén-monokarbonsav
GO _x	glükóz oxidáz
HRP	torma peroxidáz
NHS	N-hidroxiszukcinimid
OPEE	szerves fázisú enzim elektród
PANI	polianilin
PEG	polietilén-glikol
PVA	polivinil-alkohol
PVS	polivinil-szulfonát
TBATS	tetrabutyl-ammónium-toluol-4-szulfonát
TDA	tridodecil-amin
TEATS	tetraetil-ammónium-toluol-4-szulfonát

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Adányiné Kisbocskói, N. (1993): Szelektív biokatalitikus érzékelők és analitikai reaktorok fejlesztése élelmiszeripari és biotechnológiai alkalmazásra (egyetemi doktori értekezés), BME
- Adeyolu, O., Iwuoha, E.I., Smyth, M.R., Leerch, D. (1996): High-performance liquid chromatographic determination of phenols using a tyrosinase based amperometric biosensor detection system. *Analyst*, **121**. 1885-1890.
- Almarsson, Ö., Klivanov, A.M. (1996): Remarkable activation of enzymes in nonaqueous media by denaturing organic cosolvents. *Biotech. Bioeng.* **49**. 87-92.
- Arnold, F.H. 1988: Protein design for nonaqueous solvents. *Prot. Eng.* **2**, 21-25.
- Ayala, G., Tuena de Gomey-Puyou, M., Gomez-Puyou, A., Darszon, A. (1986): Thermostability of membrane enzymes in organic solvents. *FEBS Lett.* **203**, 41-43.
- Baticz, O., Tömösközi, S. (2002): Determination of total cholesterol content in food by flow injection analysis with immobilized cholesteol oxidase enzyme reactor. *Nahrung* **46**. 46-50.
- Bongiovanni, C., Ferri, T., Poscia, A., Varalli, M., Santucci, R., Desideri, A. (2001): An electrochemical multienzymatic biosensor for determination of cholesterol. *Bioelectrochemistry* **54**. 17-22.
- Brahim, S., Narinesingh, D., Guiseppi-Elie, A. (2001): Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole-hydrogel membrane. *Anal.Chim.Acta* **448**. 27-36.
- Brahim, S., Narinesingh, D., Guiseppi-Elie, A. (2002): polypyrrole-hydrogel composites for the constuction of clinically important biosensors. *Biosens. Bioelectr.* **17**. 53-59.
- Brink, L.E.S., Tramper, J. (1985): Optimization of organic solvents in multiphase biocatalysis. *Biotech. Bioeng.* **27**. 1258-1269.
- Brink, L.E.S., Tramper, J. (1986): Modelling the effects of mass transfer on kinetics of propene epoxidation of immobilized *Mycobacterium* cells: 1. Pseudo-one-substrate conditions and negligible product inhibition. *Enzyme Microb. Technol.* **8**. 281-288.
- Brink, L.E.S., Tramper, J., Luyben, K.Ch.A.M., Van't Riet, K. (1988): Biocatalysis in organic media. *Enzyme Microb. Technol.* **10**. 736-742.
- Buckland, B.C., Dunnill, P., Lilly, D., (1975): the enzymatic transformation of water-insoluble reactants in nonaqueous solvents. Conversion of cholesterol to cholest-4-ene-3-one by a *Nocardia* sp. *Biotech.. Bioeng.* **17**. 815-826.
- Campanella, L., De Luca, S., Sammartino, M.P., Tomassetti, M. (1999): A new organic phase enzyme electrode for the analysis of organophosphorus pesticides and carbamates. *Anal.Chim.Acta* **385**. 59-71.
- Campanella, L., Favero, G., Sammartino, M.P., Tomassetti, M. (1998a): Further

- development of catalase, tyrosinase and glucose oxidase based organic phase enzyme electrode response as a function of organic solvent properties. *Talanta*, **46**. 595-606.
- Campanella, L., Favero, G., Fortuney, A., Sammartino, M.P., Tomassetti, M. (1994a): An enzyme sensor for quality control of olive oil directly operating in n-hexane solutions. *Life Chemistry Reports*, **11**. 363-371.
- Campanella, L., Favero, G., Persi, L., Sammartino, M.P., Tomassetti, M., Visco, G. (2000): Organic phase enzyme electrodes: applications and theoretical studies. *Anal. Chim. Acta*, **426**, 235-247.
- Campanella, L., Favero, G., Sammartino, M.P., Tomassetti, M. (1996a): An organic-phase enzyme sensor for polyphenol determination in olive oil. *Polyphénols Actualites*, **14**. 9-12.
- Campanella, L., Fortuney, A., Sammartino, M.P., Tomassetti, M. (1994b): Tyrosinase biosensor response as a function of physical properties of organic solvents. *Talanta*, **41**. 1397-1404.
- Campanella, L., Martini, U., Sammartino, M.P., Tomassetti, M. (1996b): The effect of organic solvent properties on a catalase enzyme sensor for monitoring hydrogen peroxide in nonaqueous solutions. *Electroanalysis* **8**. 1150-1154.
- Campanella, L., Pacifici, F., Sammartino, M.P., Tomassetti, M. (1998b): A new organic phase bienzymatic electrode for lecithin in food products. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **47**. 25-38.
- Campanella, L., Roversi, R., Sammartino, M.P., Tomassetti, M. (1998c): Hydrogen peroxide determination in pharmaceutical formulations and cosmetics using a new catalase biosensor *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **18**, 105-116.
- Campanella, L., Sammartino, M.P., Sbrilli, R., Tomassetti, M. (1992a): Analytical comparison of an enzyme-amperometric method for chlorocresol determination in ointments with colorimetry and liquid chromatography *J. Pharmaceuticals and Biomedical Analysis*, **10** 751-755.
- Campanella, L., Sammartino, M.P., Tomassetti, M. (1992b): New enzyme sensor for phenol determination in non-aqueous and aqueous medium. *Sensors and Actuators B*, **7**. 383-388.
- Campanella, L., Sammartino, M.P., Tomassetti, M., Zannella, S. (2001): Hydroperoxide determination by a catalase OPEE: application to the study of extra virgin olive oil rancidification process. *Sens. Actuators B: Chemical*, **76**. 158-165.
- Campanella, L., Tomassetti, M. (1996): Biosensors for food analysis in aqueous and non-aqueous media. *Food Technol. Biotechnol.* **34**. 131-141.
- Choong, Y.M., Lin, H.J., Wang, M.L. (1999): A rapid gas chromatographic method for direct determination of free sterols in animal and vegetable fats and oils. *J Food Drug Analysis* **7**. 279-290
- Clark, L.C., Lyons, C. (1962): Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. NY Acad.* **102**. 29-45.

- Connor, M.P., Sanchez, J., Wang, J., Smyth, M.R., Mannino, S. (1989): Silicone-grease-based immobilization method for the preparation of enzyme electrodes. *Analyst*, **114**, 1427-1429.
- Cosnier, S. (1999): Biomolecule immobilized on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. *Biosens. Bioelectr.* **14**, 443-456.
- Cosnier, S., Lepellec, A., Guidetti, B., Rico-Lattes, I. (1998): Enhancement of biosensor sensitivity in aqueous and organic solvents using a combination of poly(pyrrole-lactobionamide) films as host matrices. *J.Electroanal.Chem.* **449**, 165-171.
- Dickinson, M., Fletcher, P.D.I. (1989): Enzymes in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **11**. 55-56
- Dordick, J.S. (1989): Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **11**. 194-211.
- Dordick, J.S. (1991): Recent developments in nonaqueous enzymology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**. 401-407.
- Dordick, J.S. (1992): Designing enzymes for use in organic-solvents. *Biotechnol. Prog.* **8**. 259-267.
- Dordick, J.S., Marletta, M.A., Klibanov, A.M. (1987): Polymerization of phenols catalyzed by peroxidase in nonaqueous media. *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 31-36.
- Fukui, S., Ahmed, S.A., Omata, T., Tanaka, A. (1980): Bioconversion of lipophilic compounds in non-aqueous solvents. Effect of gel hydrophobicity on diverse conversions of testosterone by gel-entrapped *Nocardia rhodocrous* cells *Eur.J.Appl.Microbiol.Biotechnol.* **10**, 289-301.
- Gobi, K., Mizutani, F. (2001): Layer-by-layer construction of an active multilayer enzyme electrode applicable for direct amperometric determination of cholesterol. *Sensors and Actuators B*, **4062**, 1-6.
- Gorman, L.A., Dordick, J.S. (1992): Organic solvents strip water off enzymes. *Biotech. Bioeng.* **39**. 392-397.
- Guo, Y., Dong, S. (1997): Organic phase enzyme electrodes based on organohydrogel. *Anal. Chem.* **69**, 1904-1908.
- Hall, G.F., Best, D.J., Turner, A.P.F., (1988a): Amperometric enzyme electrode for the determination of phenols in chloroform. *Enzyme Microb. Technol.* **10**. 543-546.
- Hall, G.F., Best, D.J., Turner, A.P.F. (1988b): The determination of p-cresol in chloroform with an enzyme electrode used in organic phase. *Biosens. Bioelectr.* **8**. 197-203.
- Hall, G.F., Best, D.J., Turner, A.P.F. (1988c): The determination of p-cresol in chloroform with an enzyme electrode used in the organic phase. *Anal.Chim.Acta* **213**. 113 -119.
- Hall, G.F., Turner, A.P.F. (1991): An organic phase enzyme electrode for cholesterol. *Anal.Lett.* **24**. 1375.

- Halling, P.J. (2000): Biocatalysis in low-water media: understanding effects of reaction conditions. *Current Opinion in Chemical Biology*, **4**, 74-80.
- Harper, N., Moore, B.D., Halling, P.J. (2000): Tridodecylammonium salt and its hydrochloride salt: an organo-soluble buffer for subtilisin Carlsberg in non-polar organic solvents. *Tetrahedron Letters*, **41**, 4223-4227.
- Havas, J., Porjesz, E., Nagy, G., Pungor, E. (1981): *Magyar Kémiai Folyóirat*, 87.évf. **11**, 514-519.
- Homandberg, G.A., Laskowski, M. (1979): Enzymatic resynthesis of the hydrolyzed peptide bond(s) in ribonuclease S. *Biochemistry*, **18**, 586-592.
- Homandberg, G.A., Mattis, J.A., Laskowski, M. (1978): Synthesis of peptide bonds by proteases. Addition of organic cosolvents shifts peptide bond equilibria toward synthesis. *Biochemistry*, **17**, 5220-5227.
- Horozova, E., Dimcheve, N., Jordanova, Z. (2002): Study of catalase electrode for organic peroxides assays. *Bioelectrochemistry*, **58**, 181-187.
- Hyun, J., Young, J.Y., Ryu, D. (1996): A biosensor stabilized by polyethylene glycol for monitoring of hydrogen peroxide in organic solvent media. *Enzyme and Microbial. Technology*. **19** (1) 50-56.
- Iwuoha, E.I., de Villaverde, D.S., Garcia, N.P., Smyth, M.R., Pingarron, J.M. (1997a): Reactivities of organic phase biosensors. 2. The amperometric behaviour of horseradish peroxidase immobilised on a platinum electrode modified with an electrosynthetic polyaniline film. *Biosens. Bioelectr.* **12**, 749-761.
- Iwuoha, E.I., Smyth, M.R. (1994a): Reactivity of a glucose oxidase electrode in a polar organic solvent. *Anal. proc.* **31**, 19-21.
- Iwuoha, E.I., Smyth, M.R. (1994b): Organic-phase application of an amperometric glucose sensor. *Analyst* **119**, 265-267.
- Iwuoha, E.I., Smyth, M.R., Lyons, M.E.G. (1995): Solvent effects on the reactivities of an amperometric glucose sensor. *J Electroanal Chem* **390** 35-45.
- Iwuoha, E.I., Smyth, M.R., Lyons, M.E.G. (1997b): Organic phase enzyme electrodes: kinetics and analytical applications. *Bios. Bioelectr.* **12**, 53-75.
- Iwuoha, E.I., Smyth, M.R., Vos, J.G. (1994): Amperometric glucose sensor containing nondiffusional osmium redox centers: Analysis of organic-phase responses. *Electroanalysis*, **6**, 982-989.
- Janecek, Š. (1993): Strategies for obtaining stable enzymes. *Process Biochemistry* **28** 435-445.
- Johnson, J.H., McIntyre, P., Zdunek, J. (1995): Automated sample preparation for cholesterol determination in foods. *J Chromatogr A* **718**, 371-81.
- Kamat, S., Beckman, E.J., Russell, A.J. (1992): Role of diffusion in non-aqueous enzymology I. *Enzyme Microb. Technol.* **14**(4) 265-271
- Karam, W.G., Chiang, J.Y.L. (1994): Expression and purification of human cholesterol 7 α -hydroxylase in *E. Coli*. *J.Lipid Res.* **35**, 1222-2131.

- Kazandjian, R.Z., Dordick, J.S., Klibanov, A.M. (1986): Enzymatic analyses in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 417-421.
- Kazandjian, R.Z., Klibanov, A.M. (1985): Regioselective oxidation of phenols catalyzed by polyphenol oxidase in chloroform. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 5448-5450.
- Kermasha, S., Bao, H., Bisakowski, B. (2001): Biocatalysis of tyrosinase using catechin as substrate in selected organic solvent media. *J. Molec. Catal. B:Enzymatic*, **11**, 929-938.
- Khmelnitsky, Y.L., O Rich, J. (1999): Biocatalysis in nonaqueous solvents. *Current Opinion in Chemical Biology*, **3**, 47-53.
- Khmelnitsky, Yu.L., Lavashov, A.V., Klyachko, N.L., Martinek, K. (1988): Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 710-724.
- Klibanov, A.M. (1989): Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents *Trends in Biochemical Sciences*, **14** (4) 141-144.
- Klibanov, A.M. (1986): Enzymes that work in organic solvents. *Chemtech* June. 354-358.
- Klysov, A.A., Viet, N.V., Berezin, I.V. (1975): The reactions of α -Chymotrypsin and related proteins with ester substrates in non-aqueous solvents. *Eur.J.Biochem.* **59**, 3-7.
- Kröger, S., Setford, S.J., Turner, A.P.F. (1998): Assessment of glucose oxidase behaviour in alcoholic solutions using disposable electrodes. *Anal.Chim.Acta*, **368**, 219-231.
- Krug, A., Suleiman, A.A., Guilbault, G.G., Kellner, R. (1992): Colorimetric determination of free and total cholesterol by flow injection analysis with a fiber optic detector. *Enzyme Microb Technol* **14**, 313-316.
- Kumar, H., Kumar, A., Kumari, P., Jyotirmai, S., Tulsani, N.B. (1999): Immobilization of cholesterol oxidase on Formvar using organic solvents. *Biotechnol Appl Biochem.* **30** 231-233.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. (1987): Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 81-87.
- Lee, S.Y., Rhee, H.I., Tae, W.C., Shin, J.C., Park, B.K. (1989): Purification and characterization of cholesterol oxidase from *Pseudomonas* sp. and taxonomic study of the strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 542-546.
- Li, J., Tan, S.N., Oh, J.T. (1998): Silica sol-gel immobilized amperometric enzyme electrode for peroxide determination in the organic phase. *J.Electroanal.Chem.* **448**, 69-77.
- Liu, W.H., Hwang, W.C., Tsai, M.S. (1996): Bioconversion of cholesterol to cholestenone in aqueous/organic two phase reactors. *Enzyme Microb. Techn.* **18**, 184-189.
- Magner, E., Klibanov, A.M. (1995): The oxidation of chiral alcohols catalyzed by catalase in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **46**, 175-179.
- Mannino, S., Cosio, M.S., Wang, J. (1994): Organic-phase enzyme biosensor for

- moisture determination in food products. *Analyst*, **119**, 2001-2003
- Martinek, K., Klibanov, A.M., Berezin, I.V. (1977): *J. Solid-Phase Biochem.* **2**, 343-385.
- Martinek, K., Semenov, A.N. (1981): Enzymes in organic synthesis: physicochemical means of increasing the yield of end product in biocatalysis. *J. Appl. Biochem.* **3**, 93-126.
- McCance, Widdowson (1992): The composition of foods. RSC MAFF
- Miyabayashi, A, Reslow, M. Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1989): A potentiometric enzymatic electrode for monitoring in organic solvents. *Anal.Chim.Acta*, **219**, 27-36.
- Montesinos, T., Pérez-Munguia, S., Valdez, F., Marty, J.L. (2001): Disposable cholinesterase biosensor for the detection of pesticides in water-miscible organic solvents. *Anal. Chim.Acta*, **431**, 231-237.
- Narayan,V.S., Klibanov, A.M. (1993): Are water-immiscibility and apolarity of the solvent relevant to enzyme efficiency? *Biotech. Bioeng.* **41**. 390-393.
- Nilsson, K., Mosbach, K., (1984): Peptide synthesis in aqueous-organic solvent mixtures with α -chymotrypsin immobilized to tressyl chloride-activated agarose. *Biotech. Bioeng.* **26**, 1146-1154.
- Nistor, C., Emnéus, J., Gorton, L., Ciucu, A., (1999): Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds. *Anal.Chim.Acta*, **387**, 309-326.
- Osann, G. (1845): *Poggendorfs Ann.*, **67**, 372.
- Palmer, T. (1991): Understanding enzymes. In. *Ellis Horwood series in Biochemistry and Biotechnology*, ed A. Wiseman, pp.1-28. Ellis Horwood, England
- Partridge, J., Dennison, P.R., Moore, B.D., Halling, P.J. (1998a): Activity and mobility of subtilisin in low water organic media? hydration is more important than solvent dielectric. *Biochim. Biophys. Acta*, **1386**, 79-89.
- Partridge, J., Halling, P.J., Moore, B.D. (1998b): Practical route to high activity enzymes preparation for synthesis in organic media. *Chem. Commun.* **7**. 841-842.
- Pena, N., Ruiz, G., Reviejo, A.J., Pingarron, J.M. (2001): Graphite-teflon composite bienzyme electrodes for the determination of cholesterol in reversed micelles. Application to food samples. *Anal. Chem.* **73**. 1190-1195.
- Perry, J.H. (1968): *Vegyézmérnökök kézikönyve*. Műszaki Könyvkiadó, Budapest
- Pineiro-Avila, G., Salvador, A., de la Guardia, M. (1998): Flow injection determination of free and total cholesterol in animal greases using enzymes in non-aqueous media. *Analyst*, **123**, 999-1003.
- Ram, M.K., Bertoncetto, P., Ding, H., Paddeu, S., Nicolini, C. (2001): cholesterol biosensors prepared by layer-by-layer technique. *Biosens. Bioelectr.* **16** 849-856.
- Rariy, R.V., Klibanov, A.M., (2000): On the relationship between enzymatic

- enantioselectivity in organic solvents and enzyme flexibility. *Biocatalysis and Biotransformation*, **18**, 401-407
- Ray, A., (1971): Solvophobic interactions and micelle formation in structure forming nonaqueous solvents. *Nature*, **231**, 313-315.
- Rees, D.G., Halling, P.J. (2001): Chemical modification probes accessibility to organic phase: proteins on surfaces are more exposed than in lyophilized powders. *Enzyme Microb. Technology*, **28**, 282-292.
- Rong-Zhen-Zhang, Long-Li, Shu-Tao-Liu, Ru-Ming-Chen, Ping-Fan-Rao, (1999): An improved method of cholesterol determination in egg yolk by HPLC. *J. Food Biochem.* **23**. 351-361.
- Saini, S., Hall, G.F., Downs, M.E.A., Turner, A.P.F. (1991): Organic phase enzyme electrodes. *Anal.Chim. Acta* **249**. 1-15.
- Saini, S., Turner, A.P.F. (1991): Biosensors in organic phases -, *Biochemical Society Transactions*, **19** 28-31.
- Schönbein, C.F. (1851): *J. Prakt. Chem.* **53**. 69.
- Singh, T.J., Wang, J.H. (1979): Stimulation of glycogen phosphorylase kinase from rabbit skeletal muscle by organic solvents. *J. Biol.Chem.*, **254**, 8466-8472.
- Situmorang, M., Alexander, P.W., Hibbert, D.B. (1999): Flow injection potentiometry for enzymatic assay of cholesterol with a tungsten electrode sensor. *Talanta* **49/3**. 639-649.
- Tóth, K., Gyurcsányi, E.R.. (2002): Szenzorok az analitikai kémiában. *Magyar Tudomány* **12**. 1614-1623.
- Triantafyllou, A.Ö., Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1997): How do additives affect enzyme activity and stability in nonaqueous media? *Biotech. Bioeng.* **54**. 67-76.
- Váradí M., Adányi N., Szabó E.E. (1995): Determining glucose content in juices with biosensor. *Acta Alimentaria* **24**(4) 365-377.
- Vidal, J.C., Garcia, E., Castillo, J.R. (1999): In situ preparation of overoxidized PPy/oPPD bilayer biosensors for the determination of glucose and cholesterol in serum. *Sens. Actuators B:Chemical*, **57**, 219-226.
- Vidal, J.C., Garcia-Ruiz, E., Castillo, J.R. (2000): Strategies for the improvement of an amperometriccholesterol biosensor based on electropolymerization in flow system: use of charge-transfer mediators and platinization of the electrode. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **24**, 51-63.
- Vieira, I.C., Fatibello-Filho, O. (2000): Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. *Talanta*, **52**. 681-689.
- Wang, B., Dong, S. (2000): organic-phase enzyme electrode for phenolic determination based on a functionalized sol-gel composite. *J.Electroanal.Chem.* **487**. 45-50.
- Wang, B., Zhang, J., Dong, S. (2000): Silica sol-gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-

- based biosensor. *Biosens. Bioeng.* **15**. 397-402.
- Wang, J. (1990): Modified electrodes for electrochemical detection in flowing streams. *Anal. Chim. Acta.* **234**. 41-48.
- Wang, J., Freiha, B., Naser, N., Romero, E., Wollenberger, U. (1991): Amperometric biosensing of organic peroxides with peroxidase-modified electrodes. *Anal. Chim. Acta*, **254**, 81-88.
- Wang, J., Lin, Y., Chen, L. (1993): Organic-phase biosensors for monitoring phenol and hydrogenperoxide in pharmaceutical antibacterial products. *Analyst*, **118**. 277-280.
- Wang, J., Reviejo, A.J., Mannino, S. (1992) Organic phase enzyme electrode for the determination of phenols in olive oils. *Anal. Lett.* **25**. 1399-1409.
- Wang, J., Rivas, G., Liu, J. (1995): A catalase electrode for organic-phase enzymatic assays. *Anal.Lett.* **28**. 2287-2295.
- Warburg, O. (1948): Wasserstoffübertragende Fermente, Verlag Dr. W. Saenger, Berlin
- Warburg, O., Christian, W., Griese, A. (1935): *Biochem. Z.*, **282**. 157.
- Weetall, H.H. (1985): Enzymatic gallic acid esterification. *Biotechnol. Bioeng.* **27**. 124-127.
- West, J.B., Wong, G.G.H. (1986): Enzyme-catalyzed irreversible formation of peptides containing D-amino acids. *J. Org. Chem.* **51**. 2728-2735.
- Xu, K., Klibanov, A.M. (1996): pH control of the catalytic activity of cross-linked enzyme crystals in organic solvents. *J.Amer. Chem.Soc.* **118**. 9815-9819.
- Yao, T., Sato, M., Kobayashi, Y., Wasa, T. (1985): Amperometric assays of total and free cholesterols in serum by the combined use of immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase reactors and peroxidase electrode in a flow system. *Anal. Biochem.* **149**. 387-391.
- Zaks, A., Klibanov, A.M. (1984): Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science*, **224**. 1249-1251.
- Zaks, A., Klibanov, A.M. (1986): Substrate specificity of enzymes in organic solvents vs. water is reversed. *J.Am.Chem.Soc.* **108**. 2767-2768.
- Zaks, A., Klibanov, A.M. (1988): Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.* **263**. 3194-3201.
- Zhang, S., Zhao, H., John, R. (2001): A dual-phase biosensing system for the determination of phenols in both aqueous and organic media. *Anal.Chim.Acta*, **441**. 95-105.

NYILATKOZAT

Alulírott **Adányiné dr. Kisbocskói Nóra** kijelentem, hogy ezt a doktori értekezést magam készítettem és abban csak a megadott forrásokat használtam fel. Minden olyan részt, amelyet szó szerint, vagy azonos tartalomban, de átfogalmazva más forrásból átvettem, egyértelműen, a forrás megadásával megjelöltem.

Budapest, 2003. szeptember 9.

.....
aláírás