



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

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).

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.

Vizsgálataink a következőkre terjedtek ki:

A glükóz meghatározására alkalmas mérőrendszer kifejlesztése során:

- Oldott glükóz oxidáz enzimmel végzett kísérletekkel megállapítottuk, hogy acetonitrilben 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 kereskedelemben 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 acetonitrilben (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 koefficiens: 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 koleszterinoleát 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 koleszterinoleát 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, magarin és libazsír összeskoleszterin 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 tésztaminták gyors minőségellenőrzésére.

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 koleszterinoleát bontásának hatékonyságát.
6. A kifejlesztett módszerek használhatóságát minden esetben élelmiszerminták vizsgálatával bizonyítottam. Az minták előkészítésére gyors, egyszerű eljárásokat dolgoztam ki.

**Az értekezés témakörében az utolsó 5 évben megjelent és benyújtott
tudományos közlemények jegyzéke**

- Várad, M., **Adányi, N.**, Szabó, E.E., Trummer N. (1999): Determination of the ratio of D-and L-amino acid oxidase enzyme reactor coupled to amperometric detection, *Biosensors & Bioelectronics* **14** 335-340.
- Adányi, N.**, Szabó, E.E., Várad, M. (1999): Multi-enzyme biosensors with amperometric detection of lactose in milk and dairy products, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch A* **209** 220-226
- Adányi, N.**, Szamos J., Szabó E.E., Várad M. (1999): Interfacial enzyme partitioning as a tool for constructing biosensors. *Acta Alimentaria* **28** 329-338.
- Trummer, N., **Adányi, N.**, Várad, M., Szendrő, I. (2001): Modification of the surface of integrated optical wave-guide sensors for immunosensor applications. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **371** 21-24.
- Székács, A., Trummer, N., **Adányi, N.**, Várad, M., Szendrő, I. (2003): Development of a non-labeled immunosensor for the herbicide trifluralin *via* OWLS detection. *Anal Chim Acta* **487** 31-42.
- Adányi, N.**, Várad, M. (2003) Study of the behaviour of catalase based thin-layer biosensor used in organic-phase FIA system. *Biosensors & Bioelectronics* (submitted)
- Adányi, N.**, Várad, M. (2003): Development of organic phase amperometric biosensor for measuring cholesterol in food samples. *Int J Food Research* (submitted)
- Adányi, N.**, Szabó, E.E., Tóth-Markus, M., Várad, M. Sammartino, M.P., Tomassetti, M., Campanella, L. (2003): Investigation of organic-phase amperometric biosensor for measuring glucose in FIA system. *Anal Chim Acta* (submitted)
- Szabó, E.E., **Adányi, N.**, Várad, M., Sammartino, M.P., Tomassetti, M., Campanella, L. (1999): New biosensor systems to determine polyphenols in wines. *Euro. Food Chem. X. Budapest, Hungary* (438-444)
- Várad, M., **Adányi, N.**, Szabó, E.E., Campanella, L., Sammartino, M.P., (2002): Flow injection analysis using an organic phase enzyme electrode (OPEE). 6th National Conference on Sensors and Microsystems, Pisa, Italy, 2/5/2001 (Eds:G.Di Natale, A. D'Amico, D. Donadio.) World Scientific (London), pp. 27-34.

Eredményeinkről rendszeresen beszámoltunk külföldi és hazai konferenciákon.

Más témakörben az utolsó 5 évben megjelent tudományos közlemények jegyzéke

- Adányi, N.**, Váradi, M., Sziklai-László, I., Snyder, P., Snyder, R.D., Cser, Á. (2002): Determination of selenium balance in healthy children by AAS-hydride generation and by INAA technique. *Acta Alimentaria* **31**(3) 227-234.
- Léder, I., Czukor, B., **Adányi-Kisbocskói, N.**, Baráth, Á., Beczner, J., Daood, H. (2001): Tönkölybúza. *Táplálkozás - Allergia - Diéta* **6** 39-46.
- Molnár, J., **Adányi, N.**, Sármán, B., Pusztai, P., Somogyi, A. (1999): Higher serum zink concentrations in type I diabetics under intensive insulin treatment. (Magasabb szerum cink koncentráció intenzív inzulinkezelésben részesülő I. típusu diabeteszes betegeknél) *Proc. VIII. Intern. Symp. on Trace Element Budapest, September 1998* (Ed.: Pais, I.) 162-164.
- Cser, M.Á.: Sziklai-László, I., **Adányi, N.**, Snyder, P., Snyder, R.D (2000).: Selenium balance in healthy American and Hungarian children living in Budapest, Hungary. In: *Metal Ions in Biology and Medicine* (eds.: Centeno J.A., Collery P, Vernet G., Finkelman R.B., Gibb H., Etienne J.C.) John Libbey Eurotext, Paris, **6**. 248-250.
- Cser, M.Á., Kovács, I., Bocskai, E., **Adányi, N.**, Sziklai-László, I.(2001): Blood lead (Pb) and selenium (Se) in chronic rhinitis and asthma bronchiale and in healthy Hungarian children and adults. *Proc. 9. International Trace Element Symposium, Budapest, 2000. Sept* (Ed: I. Pais) 78-91.
- Cser, M.Á., Kovács, I., Bocskai, E., **Adányi, N.**, Sziklai-László, I.(2002): Blood lead(Pb) and selenium (Se) in chronic rhinitis and asthma bronchiale in healthy Hungarian children and adults. in: *Metal Ions in Biology and Medicine* **7** (eds.: Khassanova, L., Collery, P., Khassanova, M.Z., Etienne, J.C.) John Libbey, Paris, 175-180
- Kovács, I., Stocker, A., Sziklai-László, I., **Adányi, N.**, Cser, M.Á. (2002): Selenium (Se) status and inflammation markers in diseases influenced by air pollution. in: *Metal Ions in Biology and Medicine* **7** (eds.: Khassanova, L., Collery, P., Khassanova, M.Z., Etienne, J.C.) John Libbey, Paris, 512-516.