

## **Biosenzory a ich aplikácie v analýze potravín**

JÁN TKÁČ - ERNEST ŠTURDÍK - JURAJ ŠVITEL

**SÚHRN.** Práca obsahuje stručnú charakteristiku biosenzorov so špecifikáciou základných výhod a nevýhod. Podrobnejšie sa venuje činnosti jednotlivých prevodníkov (amperometrický, potenciometrický, entalpický, optický, konduktometrický a piezoelektrický), použitým biomolekulám (enzýmy, bunky a protilátky), ale aj spôsobom imobilizácie. V práci sú vymenované možnosti použitia biosenzorov v analýze sacharidov, alkoholov, organických kyselín, ďalších organických látok, anorganických látok, ako i použitie biosenzorov v nevodnom prostredí. V závere sú stručne popísané možnosti rozvoja biosenzorov v budúcnosti.

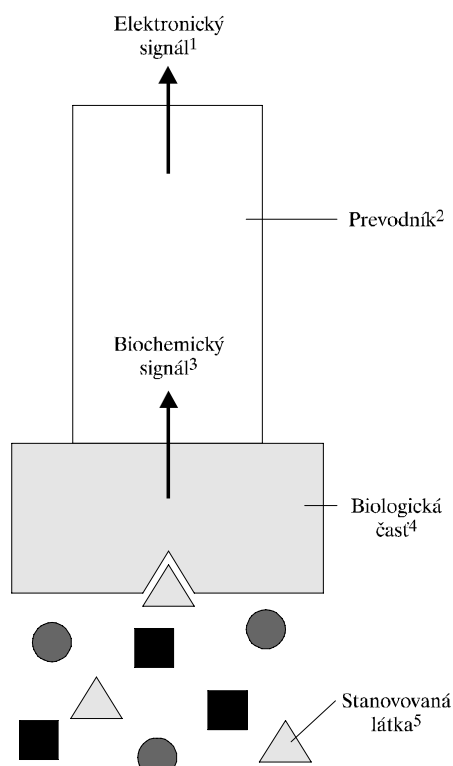
**KLÚČOVÉ SLOVÁ:** biosenzor, analýza potravín, organická fáza, prevodník, biologická časť

### **1. Úvod**

Vývoj a využitie biosenzorov je progresívny analytický odbor, ktorý v sebe zahŕňa poznatky z oblasti biológie, chémie, fyziky a matematiky a svojimi aplikačnými výstupmi zasahuje do oblastí fermentačného, potravinárskeho a farmaceutického priemyslu, do analytickej chémie, poľnohospodárstva, medicíny, životného prostredia i petrochémie. Biosenzor je zariadenie, ktoré pozostáva z biologickej časti nachádzajúcej sa v tesnom kontakte s fyzikálnochemickým prevodníkom, alebo je súčasťou prevodníka (pozri obr. 1). Výsledkom takéhoto usporiadania je elektronický signál, ktorý je proporcionálny koncentrácii analytu. Spojenie týchto dvoch odlišných oblastí kombinuje v sebe špecifitu a senzitivitu biologického systému so silou elektrotechniky a počítačovej techniky. Takýmto analytickým zariadením sa rozšíri špecifita i rozsah stanoviteľných substrátov oproti senzorom založeným

---

Ing. Ján TKÁČ, Doc. Ing. Ernest ŠTURDÍK, CSc., Ing. Juraj ŠVITEL, CSc., Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava. e-mail: tkac@chelin.chtf.stuba.sk



OBR. 1. Základný princíp práce biosenzora.  
FIG. 1. Principle of operation of a biosensor.

1 - electronic signal, 2 - transducer, 3 - biochemical signal, 4 - biological part, 5 - analyte.

TABUĽKA 1. Komponenty, ktoré môžu byť súčasťou biosenzora.  
TABLE 1. Components, which can be used as biosensor member.

Biologická časť <sup>1</sup>	Prevodník <sup>2</sup>
organizmy	potenciometrický
tkanivá, pletivá	amperometrický
bunky	konduktometrický
organely	optický
membrány	kalorimetrický
enzýmy	akustický
enzýmové systémy	mechanický
protilátky	piezoelektrický
kofaktory	
receptory	
nukleové kyseliny	

1 - biological part, 2 - transducer.

na princípe fyzikálnochemického prevodníka. Rôznymi kombináciami biologickej časti s prevodníkom možno doceliť veľké množstvo rôznych konštrukcií [1]. Možné kombinácie sú veľmi dobre zreteľné z tabuľky 1.

Vývoj biosenzorov je prudko sa rozvíjajúca oblasť, čo možno dokumentovať aj tým, že od roku 1985 vychádza časopis *Biosensors and Bioelectronics*, ktorý sa venuje výhradne vývoju a aplikáciám biosenzorov. Dôvodom, prečo k prudkému rozvoju biosenzorov dochádza až v posledných 15 rokoch je viacero. Jedným z nich je rýchly rozvoj počítačovej techniky a mikroelektroniky. Ďalším dôvodom sú požiadavky praxe v oblasti biotechnológie, riadenia procesov, atď., ktoré si vyžadujú veľmi rýchly spôsob stanovenia rôznych látok, pokiaľ možno on-line systémom. Výhody, ktoré poskytuje využitie biosenzorov oproti iným analytickým technikám sú: rýchlosť analýzy (trvanie niekoľko sekúnd až minút), špecifita (jeden substrát, prípadne niekoľko podobných substrátov), citlivosť (koncentrácie  $10^{-2}$  –  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup>), možnosť merania stanovovanej látky bez predúpravy vzorky a použitia ďalších reakčných činidiel (väčšinou len nariadenie vzorky), nižšia cena, jednoduchosť obsluhy, možnosť použitia biosenzorov v prenosných zariadeniach. Nevýhody, ktoré biosenzory majú, a ktoré bránia ich masovejšiemu využitiu sú: mnohokrát nízka stabilita biologickej časti (enzýmu), nie sú to zatiaľ štandardné metódy požadované normami, paleta analytov stanoviteľných biosenzormi je limitovaná komerčnou dostupnosťou príslušných biokatalyzátorov.

Perspektívnymi oblasťami využitia biosenzorov je oblasť klinických analýz, predovšetkým pri kontinuálnom monitorovaní metabolitov a liečiv. Takisto v potravinárskom priemysle si biosenzory nájdu svoje miesto pri hodnotení kvality potravín stanovením cudzorodých látok, čerstvosti, šetrnosti spracovania i vhodného skladovania výrobkov. V oblasti biotechnológií biosenzory nachádzajú uplatnenie pri monitorovaní procesu fermentácie vďaka možnosti zasahovať a riadiť proces prakticky v reálnom čase. Rastúci záujem o ochranu životného prostredia kladie dôraz na stanovenie rôznych toxických látok, akými sú napríklad herbicídy a pesticídy všeobecne, prípadne veľmi rýchle stanovenie úrovne biologického znečistenia vody.

## 2. História biosenzorov

Vôbec prvým biosenzorom bol detektor skonštruovaný Clarkom a Lyonsom v roku 1962 [2]. L. C. Clark je medzi biochemickou verejnosťou známy skôr ako vynálezca kyslíkovej elektródy, ktorá sa podľa neho aj volá [3]. Pôvodný motív na využitie Clarkovej kyslíkovej elektródy bolo sledovanie koncentrácie rozpustného kyslíka v krvi počas klinických zásahov. Spomí-

naný autor na povrch kyslíkovej elektródy imobilizoval enzým glukózaoxidázu a tento prvý biosenzor okrem koncentrácie kyslíka stanovoval aj koncentráciu glukózy. Prvý patent na biosenzory bol publikovaný v roku 1970 tiež Clarkom. Tento patent pokrýval oblasť použitia enzýmov, ktoré konvertujú rozličné substráty za produkcie hydrogénperoxidu. Autor sa vysporiadal aj s problémom interferencie, keď použil systém dvoch elektród, pričom jedna bola pokrytá enzýmom a druhá slúžila len na odčítanie prúdu pozadia [4]. V roku 1969 sa firma Yellow Springs Instrument (USA) začala zaoberať komerčným využitím glukózového biosenzora na priame meranie obsahu glukózy v 25 ml vzorky krvi a v roku 1974 uviedli po počiatkových problémoch na trh prístroj s názvom Model 23 YSI analyzátor.

### 3. Prevodníky

Fyzikálnochemický prevodník je schopný detegovať zmeny, ktoré vznikajú po interakcii enzýmu so substrátom tak, že biointerakcia sa prevádza na vhodný analytický signál, ktorým obyčajne býva prúd, alebo potenciál. Podľa definície a klasifikácie IUPAC, by sa mali okrem biosenzorov rozlišovať bioanalytické systémy, ktoré vyžadujú pri meraní ďalšie operácie a biosondy, ktoré sú buď na jedno použitie, alebo nemôžu sledovať koncentráciu analytu kontinuálne. Zo všetkých spomínaných prevodníkov je v literatúre najviac citovaný amperometrický prevodník, čo sa týka citlivosti, ceny, selektivity, univerzálnosti, rozsahu a jednoduchosti použitia [5]. Výhody a nevýhody jednotlivých prevodníkov sú uvedené v tabuľke 2. V tabuľke 3 sú základné charakteristiky biosenzorov aj s ich významom.

#### 3.1. Amperometrický prevodník

Najfrekvencovanejším prevodníkom je amperometrický prevodník v spojení so špecifickou oxidázou alebo dehydrogenázou. Tento prevodník je polarizovaný konštantným potenciálom a enzým pri oxidácii substrátu odovzdáva elektróny elektróde (nie priamo, ale prostredníctvom iných molekúl, ktorými môžu byť kosubstrát, kofaktor alebo mediátor), pričom veľkosť tečúceho prúdu je úmerná koncentrácii analytu. Oxidácia glukózy za prítomnosti glukózaoxidázy (GOD) vyjadrená v rovniciach 1 a 2 je príkladom nepriamej výmeny elektrónov prostredníctvom kosubstrátu (kyslíka). V týchto rovniciach vystupuje kofaktor enzýmu FAD - flavínadenín-dinukleotid.



Pri tejto reakcii sa dá monitorovať:

- prírastok hydrogénperoxidu, buď amperometricky, keď sa hydrogénperoxid na elektróde oxiduje, alebo použitím peroxidázy za prítomnosti organickej látky, ktorá oxidáciou mení svoje vlastnosti a tie sa dajú detegovať. Počas reakcie koncentrácia hydrogénperoxidu stúpa a rastie s koncentráciou oxidovanej látky a v ustálenom stave je prúd tečúci elektródou (úmerný koncentrácii hydrogénperoxidu) úmerný koncentrácii analyzovanej látky,

Tabuľka 2. Porovnanie vlastností prevodníkov.  
TABLE 2. A comparison of transducers parameters.

Prevodník <sup>1</sup>	Výhody <sup>2</sup>	Nevýhody <sup>3</sup>
Amperometrický <sup>4</sup> a) O <sub>2</sub> elektróda <sup>5</sup> b) detekcia H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (elektróda z Au, Pt alebo uhlíka) <sup>6</sup>	jednoduchý, vysoká selektivita, vysoká citlivosť, lineárna závislosť signálu od koncentrácie	elektrochemické interferencie, nízka selektivita
Potenciometrický <sup>7</sup>	jednoduchý, spoľahlivý	pomalá odozva, vyžaduje si stabilnú referenčnú elektródu, nelineárna závislosť signálu od koncentrácie, citlivý na elektronický šum
Optický <sup>8</sup>	ľahká miniaturizácia, nezávislý od elektrochemických interferencií	interferencia svetlom okolia, požiadavka vysoko energetickeho zdroja, úzky koncentračný rozsah
Piezoelektrický <sup>9</sup>	rýchla odozva, jednoduchý, stabilný signál výstupu	nízka citlivosť pri použití vodnej fázy, nešpecifické väzobné interferencie
Kalorimetrický <sup>10</sup>	univerzálnosť, nezávislosť od optických interferentov	drahý, ťažkopádny, požiadavka veľkého množstva enzýmu
FET-tranzistory <sup>11</sup>	nízka cena, stabilný výstup, požiadavka malého množstva biokatalyzátora, monitorovanie niekoľkých analytov naraz	závislý od teploty, výroba rozličných vrstiev pri ich konštrukcii ešte nie je dokonale zvládnutá

1 - transducer, 2 - advantages, 3 - disadvantages, 4 - amperometric, 5 - O<sub>2</sub> electrode, 6 - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection (electrode made from Au, Pt or carbon), 7 - potentiometric, 8 - optic, 9 - piezoelectric, 10 - calorimetric, 11 - FET transistors.

TABUĽKA 3. Základné charakteristiky biosenzorov.

TABLE 3. Basic biosensor characteristics.

Termín <sup>1</sup>	Význam <sup>2</sup>
citlivosť <sup>3</sup>	smernica krivky, vyjadrená ako výstup na jednotku koncentrácie
selektivita <sup>4</sup>	schopnosť zariadenia merať jeden chemický komponent v prítomnosti ďalších
dynamický rozsah <sup>5</sup>	rozsah koncentrácií, pri ktorých je citlivosť väčšia než nula
čas odozvy <sup>6</sup>	čas, za ktorý dosiahne výstupná veličina hodnotu 90 % ustálenej hodnoty
reprodukovateľnosť <sup>7</sup>	charakterizuje zhodu výsledkov nameraných dvomi rozličnými biosenzormi
detekčný limit <sup>8</sup>	hodnota koncentrácie stanovovanej látky zistená z výstupnej veličiny rovná dvojnásobku jej smerodajnej štandardnej odchýlky
životnosť <sup>9</sup>	využitelný čas biosenzora, vyjadrený ako skladovacia, alebo operačná stabilita
stabilita <sup>10</sup>	zmena citlivosti v čase

1 - term, 2 - meaning, 3 - sensitivity, 4 - selectivity, 5 - dynamic range, 6 - response time, 7 - reproducibility, 8 - detection limit, 9 - life time, 10 - stability.

– úbytok kyslíka amperometricky, keď sa kyslík na katóde kyslíkovej elektródy redukuje, t.j. prijme elektróny z elektród a elektródou tečie prúd. Počas enzýmovej reakcie dochádza k poklesu koncentrácie kyslíka vplyvom jeho spotreby pri oxidácii stanovovanej látky oxidázou a tento pokles je úmerný koncentrácii analytu.

Ďalším prístupom je použitie mediátora (M) namiesto kyslíka ako akceptoru elektrónov (rovnice 3 a 4). Mediátorom je nízkomolekulová látka, ktorá ľahko mení oxidačný stupeň, napríklad ferikyanid draselný, ferocén, atď.



V tomto prípade reoxidáciou mediátora na elektróde (rovnica 4) tečie prúd, ktorý je úmerný koncentrácii analytu (glukózy).

Okrem oxidáz, ktoré boli používané najmä na začiatku konštrukcie biosenzorov, sa používajú pri amperometrickej detekcii dehydrogenázy, ktoré sú NAD-dependentné a patria k najdôležitejšej skupine enzýmov používa-

ných pri konštrukcii biosenzorov najmä preto, že je ich známych vyše dvesto. Príkladom činnosti NAD-dependentnej dehydrogenázy je rovnica (5), kde bol použitý enzým alkoholdehydrogenáza (ADH).



NADH sa reoxiduje prostredníctvom enzýmu diaforázy (DP), čo je uvedené v rovniciach (6) a (7).



Redukovaný mediátor  $\text{M}_{\text{red}}$  sa následne reoxiduje na povrchu prevodníka (4) a prúd tečúci elektródou je priamo úmerný koncentrácii analytu (etanolu).

Vhodným materiálom na konštrukciu amperometrických prevodníkov sú zlato, platina a najmä uhlík (aj ako uhlíkový prášok, ktorý je zložkou uhlíkových pastových elektród). Tento typ detekcie môže viesť k pozitívnym chybám stanovenia, kvôli interferencii nízkomolekulových elektroaktívnych látok, ktoré podliehajú elektródovej reakcii. Na odstránenie tohto problému sa v praxi najčastejšie využíva päť prístupov:

- použitie membrán, ktoré na povrchu nesú náboj a pôsobia elektrostaticky odpudivo na rovnako nabitú látku [6],
- použitie vhodného mediátora, ktorý znižuje pracovný potenciál a tým aj interferujúce elektródové reakcie [7],
- koimobilizácia enzýmov, ktoré sú schopné tieto interferujúce látky odstrániť (kyselina askorbová - askorbát oxidáza, kyselina močová - urikáza [8], acetaminofén - tyrozináza [9]),
- použitie dvojelektrodového diferenciálneho systému, pričom na jednej elektróde je imobilizovaná aktívna a na druhej inaktívna biologická časť,
- preoxidácia vzorky peroxidázou a hydrogénperoxidom [10].

Prvou generáciou enzýmových senzorov boli zariadenia, s vysokým polarizačným napätím, pri ktorých interferovali mnohé látky. Táto ich nevýhoda bola najmarkantnejšia pri analýze takých komplexných vzoriek, akými je krv. V druhej generácii biosenzorov sa podarilo túto nevýhodu odstrániť použitím mediátora, ktorý pomohol znížiť pracovný potenciál a tým zabrániť interferenciám. Tretia generácia biosenzorov sa vyznačuje priamou komunikáciou medzi enzýmom a elektródou, ktorou je vlastne redoxný polymér. Výhodou tohto usporiadania sú extrémne nízke časy odozvy pohybujúce sa v oblasti niekoľkých sekúnd.

### 3.2. Potenciometrický prevodník

Ďalšou skupinou sú potenciometrické prevodníky umožňujúce merať zmenu potenciálu vyvolanú koncentračným gradientom iónov, ktoré vznikajú činnosťou enzýmov imobilizovaných na povrchu elektród (rovnica 5). Prvým potenciometrickým biosenzorom bola enzýmová elektróda na detekciu močoviny skonštruovaná v roku 1969 Guilbaultom a Moltalvom [11]. Zmena potenciálu je úmerná logaritmu koncentrácie analytu. Používajú sa iónselektívne elektródy, najčastejšie pH-elektrody, ale v súčasnej dobe si rýchlo razia cestu vpred FET-tranzistory, v ktorých citlivou časťou je iónselektívna membrána v kombinácii s referenčnou elektródou. FET-tranzistor bol prvýkrát skonštruovaný v roku 1970 Bergveldom [12]. Nevýhodou je nízka citlivosť pri analýze vzoriek s vysokou tlmivou kapacitou. Príkladom reakcie, ktorá môže byť detegovaná potenciometricky, je reakcia popísaná rovnicou (5), pri ktorej sa detegujú uvoľnené protóny.

### 3.3. Entalpický prevodník

Entalpické biosenzory, nazývané aj termistory, poskytujú univerzálny detekčný princíp, pretože uvoľňovanie, alebo spotreba tepla je typická pre všetky biochemické deje. Prístroj je konštruovaný tak, že jedna vetva je referenčná a v druhej vetve je imobilizovaný biokatalyzátor, pričom sa zaznamenáva rozdiel teplôt (rádovo  $10^{-3}$  °C), ktorý je úmerný koncentrácii stanovovanej látky [13]. Prvý termistor bol vyvinutý v roku 1974 Mosbachom a Danielssonom [14]. Typickým substrátom je glukóza, ktorej oxidáciou glukózaoxidázou sa uvoľní entalpia  $80 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

### 3.4. Optický prevodník

Biosenzory s optickým prevodníkom fungujú tak, že biokatalyzátor produkuje alebo spotrebúva látku s optickými vlastnosťami a koncentrácia analytu sa určuje na základe merania vhodnej optickej veličiny, napríklad absorpcie, emisie svetla, fluorescencie, atď. Najčastejšie sa na konštrukciu používajú optické vlákna s detekciou hydrogénperoxidu vznikajúceho oxidáciou substrátu oxidázou (rovnica 1 a 2). V roku 1975 bol prvýkrát použitý indikátor imobilizovaný na konci optického vlákna na kontinuálne meranie v biologických kvapalinách [15]. Príkladom optickej detekcie je reakcia 8, pri ktorej sa monitoruje žiarenie uvoľnené oxidáciou luminolu hydrogénperoxidom (je produktom veľkého počtu reakcií katalyzovaných kyslík závislými oxidázami) [16].





### 3.5. Konduktometrický prevodník

Produkcia alebo spotreba iónov je charakteristická pre mnohé reakcie a preto konduktometrický princíp je aplikovateľný na monitorovanie mnohých reakcií. Nevýhodou tohto typu detekcie je jeho nízka špecificita, pretože k výslednej vodivosti prispievajú všetky prítomné ióny nachádzajúce sa vo vzorke. Najlepším príkladom je hydrolýza močoviny ureázou za uvoľnenia troch iónov (rovnica 9).



### 3.6. Piezoelektrický prevodník

Základným princípom detekcie je zmena v rezonančnej frekvencii piezoelektrického kryštálu, ktorá je priamo úmerná zmene hmotnosti kryštálu. Táto zmena je spôsobená interakciou analytu s biologickou časťou imobilizovanou na povrchu kryštálu. Prvý biosenzor s piezoelektrickou detekciou amoniaku a oxidov dusíka bol publikovaný v roku 1975 Karmarkarom a Guilbaultom [17]. Najčastejšie sa tento typ prevodníka využíva pri detekcii antigénov, ak je na povrchu kryštálu uchytená protilátka k tomuto antigénu.

## 4. Biologická časť

Biologická časť (enzýmy, bunky, protilátky, atď.) sa vyznačuje špecificitou interakcie so stanovovanou látkou. Citlivosť závisí od biologickej časti a od použitého prevodníka, ktorý musí čo najefektívnejšie detegovať interakciu biomolekula-analyt. Biologická časť a prevodník takto prepožičiavajú svoje vlastnosti biosenzoru. Týmto sa dosiahne oveľa vyššia špecificita v porovnaní s chemickými senzormi. Najtypickejším prípadom je interakcia antigén-protilátka, kedy sa dajú detegovať antigény v koncentráciách okolo  $10^{-12}$  –  $10^{-18}$  mol.l<sup>-1</sup>. Najčastejšie sa pri konštrukcii biosenzorov používajú enzýmy, protilátky a bunky [18].

### 4.1. Enzýmy

Enzýmy sú molekuly proteínovej povahy, ktoré zvyšujú reakčné rýchlosti biochemických reakcií.

Enzýmy sa kombinujú so všetkými druhmi prevodníkov, pričom najpodstatnejším dôvodom je vyššia špecifická aktivita v porovnaní s bunkami. Najčastejšou kombináciou sú enzýmy imobilizované spolu s amperometrickými a potenciometrickými prevodníkmi. Okrem stanovenia substrátov enzýmových reakcií boli vyvinuté aj biosenzory na báze inhibície enzýmov. V takom-

to prípade sa na základe poklesu odozvy biosenzora na substrát dá stanoviť koncentrácia inhibítora enzýmu. Enzymové elektródy sa konštruujú s ukotveným jedným enzýmom (stanovenie etanolu alkoholoxidázou), alebo dvomi (glukoamyláza spolu s glukózaoxidázou na stanovenie maltózy), alebo aj ako multienzymový komplex (tri a viac enzýmov, napríklad invertáza, glukózaoxidáza a mutarotáza na detekciu sacharózy). Z uvedeného je vidieť, že paleta stanoviteľných látok sa rozšíri, keď použijeme hydrolázy (invertáza, glukoamyláza, atď.), ktoré stanovovanú látku rozštiepia na jej zložky, z ktorých je aspoň jedna transformovateľná oxidoreduktázou (glukózaoxidázou) za tvorby aktívnych látok, ktoré sa dajú detegovať (hydrogénperoxid, kyslík). V niektorých prípadoch je nutné použiť izomerázy, ktoré analyzovanú látku prevedú na izomér transformovateľný enzýmom (izomerizácia  $\alpha$ -anoméru glukózy na  $\beta$ -anómér, ktorý je substrátom pre glukózaoxidázu).

#### 4.2. Bunky

Bunky v biochemickom ponímaní sú malé membránové štruktúry s vysokým obsahom biologických látok, ku ktorým patria proteíny (enzýmy), nukleové kyseliny, sacharidy, tuky, množstvo iónov, atď. Pri konštrukciách biosenzorov sa najčastejšie používajú jednobunkové mikroorganizmy, s ktorými sa dá jednoducho a reprodukovateľne pracovať. Okrem týchto jednobunkových organizmov sa využívajú aj pletivá, alebo tkanivá, najmä v prípadoch, keď obsahujú želané enzýmy v dostatočne veľkom množstve. Výhodou bunkových biosenzorov je ich nízka cena a najmä to, že enzým je v prirodzenom prostredí a je schopný väčšmi odolávať nepriaznivým vonkajším okolnostiam. Tak ako každá výhoda ide ruka v ruke s nevýhodou, tak je to aj v tomto prípade, nevýhodou je nízka koncentrácia enzýmu a dlhšie časy odoziev, čo sa dá odstrániť použitím permeabilizovaných buniek, alebo mediátorov, ktoré uľahčujú transport elektrónov smerom k elektróde. Ich nevýhodou je aj strata špecificity, čo sa môže na druhej strane v prípadoch stanovenia asimilovateľných sacharidov (*Brevibacterium lactofermentum*) [19], pri analýze toxických látok na základe inhibície respirácie (*Saccharomyces cerevisiae* v kombinácii s kyslíkovou elektródou) [20], i pri meraní biologickej spotreby kyslíka (*Trichosporum cutaneum*) [21] stať výhodou.

#### 4.3. Protilátky

Protilátky sú sérové proteíny, ktoré sú produkované dvoma druhmi buniek, B lymfocytmi a plazmovými bunkami, ako odpoveď na prítomnosť cudzorodých látok. Vo väčšine prípadov je protilátka schopná rozoznať iba jednu látku, ktorú nazývame antigénom. V prípade konštrukcie biosenzora na báze protilátok, analytom je teda antigén, alebo jeho časť zvaná haptén.

Interakciu charakterizujú dve vlastnosti:

- veľmi vysoká afinita,
- nízka aktivita so štruktúrnymi analógmi antigénu.

Protilátky sa nedajú získať chemickou syntézou, môžeme ich získať iba imunizáciou zvierat daným antigénom. Imunitnú odpoveď vyvolávajú látky s relatívnou molekulovou hmotnosťou vyššou ako 100000, pričom molekuly s relatívnou molekulovou hmotnosťou menšou ako 10000 vyvolávajú slabú, alebo žiadnu odpoveď. V takomto prípade sa dá stanovovaná látka konjugovať s väčšou nosičovou molekulou (hovädzí sérový albumín), pričom takýto konjugát je schopný vyvolať imunitnú odpoveď s produkciou protilátok.

Pri konštrukcii biosenzorov sa protilátka vhodnou imobilizačnou technikou umiestni do blízkosti prevodníka a po naviazaní analytu (antigénu) dochádza k zmene konformácie, alebo elektrického náboja biomolekúl. Tieto zmeny sa dajú detegovať priamo, v reálnom čase, alebo nepriamo, keď analyt súťaží o väzbové miesto s molekulou analytu, ktorá je nejakým spôsobom označená (enzýmom, alebo fluorescenčne). V tomto druhom prípade je meraný výsledok interakcie, nie priebeh.

## 5. Spôsoby imobilizácie

Na úspešnú konštrukciu biosenzora je nutné vybrať vhodnú kombináciu prevodníka a biologickej časti a umiestniť ich do tesnej blízkosti imobilizáciou. Poznáme niekoľko spôsobov ukotvenia:

1. Mechanické zachytenie biomolekúl membránami určitých polymérov (najčastejšie dialyzačných), tento spôsob je najjednoduchší a veľmi výhodný, pretože sa neznižuje aktivita biologickej časti.
2. Jednoduchá adsorpcia na také materiály, ako sú íl, hlina, sklo, iónovo-výmenné živice, ktorá je veľmi nenáročná, má však nevýhodu, že materiál sa z nich veľmi ľahko desorbuje. Je to vlastne imobilizácia na jedno stanovenie.
3. Kovalentné viazanie na aktivované povrchy skla, syntetických polymérov, celulózy, atď., pričom takto ukotvený materiál sa ešte môže ďalej pospájať bifunkčnými činidlami, z ktorých je najpoužívanější glutardialdehyd.
4. Zachytenie do matrice gélu je jednou z najpopulárnejších metód. V prípade použitia želatíny sa môže celý systém hneď zosieťovať, v prípade použitia látok na báze alginátov a pektátov sa tieto musia aktivovať, napríklad polyetylénimínom, ktorým sa vnesú aminoskupiny do matrice gélu a tento systém sa už môže sieťovať bifunkčnými činidlami (glutardi-

aldehyd). Póry gélu sú dostatočne veľké na to, aby molekuly analytu prechádzali a malé na to, aby dochádzalo k vyplavovaniu biologickej časti z matrice gélu.

5. Inkorporácia do vodivých polymérov, ktoré vznikajú elektrochemicky priamo na povrchu elektródy.
6. Ukotvenie biologického materiálu do tela uhlíkovej pastovej elektródy, alebo tuhej pastovej elektródy, ktorým dostávame biosenzory vyznačujúce sa vysokou stabilitou a možnosťou regenerácie povrchu biosenzora jednoduchým oterom.

## 6. Aplikácia biosenzorov v analýze potravín

Oblasť potravín a najmä nápojového priemyslu je pre konštruktérov biosenzorov veľmi dôležitá. Najčastejšími analytmi sú sacharidy (mono, di- až polysacharidy), etanol, organické kyseliny, aminokyseliny, anorganické látky a indikátory čerstvosti, prípadne skladovania potravín.

### 6.1. Sacharidy

Najčastejšie je konštruovaný glukózový biosenzor imobilizáciou glukóza-oxidázy, ktorá katalyzuje oxidáciu glukózy za spotreby kyslíka a produkcie hydrogénperoxidu (rovnice 1 a 2). Glukóza bola stanovená v pive [22], víne [23], nealkoholických nápojoch [24], mlieku [25], atď. Kombináciou glukóza-oxidázy s hydrolázou disacharidov (invertáza, glukoamyláza,  $\beta$ -galaktozidáza) a polysacharidov ( $\alpha$ - alebo  $\beta$ -amyláza) dostaneme biosenzory na ich analýzu. Takto môžeme analyzovať sacharózu v nealkoholických nápojoch [26], víne, mede, múke [27], maltózu v múke, mede, nealkoholických nápojoch a víne [27], laktózu najmä v mlieku [25], a laktulózu ako indikátor šetrnosti spracovania mlieka [28]. Z polysacharidov sa dá stanoviť škrob [29] a glykogén [30]. Okrem glukózy bola biosenzormi stanovená aj fruktóza v nealkoholických nápojoch [31], jablkách [32], citrónoch, pomarančoch, kiwi, jahodách i karfirole [33].

### 6.2. Alkoholy

Etanol ako najhlavnejší kvalitatívny ukazovateľ možno stanovovať predovšetkým v alkoholických nápojoch, akými sú víno [34], pivo [35], ale aj „tvrdý alkohol“ [36]. Okrem stanovenia etanolu boli pripravené glycerolové biosenzory s jeho stanovením v pive a víne [37].

### 6.3. Organické kyseliny

K organickým kyselinám, ktoré sú stanovované biosenzormi patria kyse-

lina mliečna, jablčná, šťavelová a ďalšie. Kyselina mliečna sa stanovuje vo vínach [38], mlieku a jogurtoch [39] a v celých rajčinách, rajčinovom džúze a kečupe [40], kyselina jablčná vo vínach [41] i muštach [38] a kyselina šťavelová v nealkoholických nápojoch [42].

#### 6.4. Ďalšie organické látky

Z ostatných organických látok sa dajú stanoviť biosenzormi aminokyselinami použitím ich oxidázy [43], alebo použitím selektívnejších enzýmov, akými sú glutamátdekarboxyláza [44], tryptofanánmonooxygenáza [45], aspartám v sladkostiach a liekoch [46], voľné mastné kyseliny v mlieku [47], cholesterol vo vajčiakach a oleji [48], ale aj vitamín C [33], pektín hybridným biosenzorom (rez šupky pomaranča s pektínesterázou) [49], triacylglyceroly [50], formaldehyd s detekciou protónov uvoľnených oxidáciou [51], fenoly [52] a pesticídy [53]. Veľmi zaujímavými aplikáciami sú stanovenia čerstvosti rýb s využitím poznatku, že mikrobiálnou kontamináciou mäsa dochádza k vzniku degradačných produktov aminokyselín, akými sú xantín a hypoxantín, ktoré boli stanovené použitím enzýmu xantínoxidázy [54], a čerstvosti bravčového mäsa na základe analýzy D-laktátu vznikajúceho v procese mikrobiálneho napadnutia mäsa [55] i detekcia mikrobiálnej kontaminácie baktériou *Staphylococcus aureus* na základe stanovenia proteínu A, ktorý produkuje, imunosenzorom [56].

#### 6.5. Anorganické látky

Najčastejšími anorganickými látkami stanovovanými v potravinách biosenzormi sú fosforečnany a siričitany. Siričitany boli stanovené enzýmovým biosenzorom v nealkoholických nápojoch [57] a mikrobiálnym biosenzorom (*Thiobacillus thiooxidans*) vo vínach [58]. Fosforečnany sa stanovujú na základe inhibície kyslej fosfatázy v prítomnosti fosforečnanových iónov, ktorá hydrolýzou uvoľní menšie množstvo glukózy z glukóza-6-fosfátu. Uvoľnená glukóza sa stanoví glukózaoxidázou (rovnice 1 a 2). Týmto princípom boli stanovené fosforečnany vo víne, sušenom mlieku a rajčinovom pretlaku [59]. Okrem týchto boli skonštruované biosenzory na analýzu fluoridov na rovnakom princípe, spomenutom pri fosfátovom senzore [60], a dusičnanov, ktoré využívajú činnosť denitrifikačných baktérií *Agrobacterium radiobacter* [61].

#### 6.6. Analýza potravín biosenzormi v nevodnom prostredí

V poslednom čase sa čoraz viac začínajú používať biosenzory pracujúce v nevodných rozpúšťadlách bez obsahu vody, alebo so saturáciou organickej fázy vodou. Výhodou takejto konštrukcie je, že sa takýmto spôsobom môžu analyzovať nepolárne substráty a že nedochádza k mikrobiálnej kontami-

nácii, čím sa zvýši operačná stabilita biosenzorov [62]. Imobilizáciou chre-  
novej peroxidázy na uhlíkovú elektródu bol skonštruovaný biosenzor na ana-  
lýzu peroxidov v rastlinných olejoch a imobilizáciou tyrozinázy v karagena-  
novom géli biosenzor na stanovenie polyfenolov v olivovom oleji a ďalších  
tukoch, pracujúci v n-hexáne [63]. Okrem toho bol skonštruovaný biosenzor  
na stanovenie cholesterolu pracujúci v zmesi chloroform-hexán [64].

## 7. Budúcnosť biosenzorov

Ako už bolo spomínané, nevýhodami biosenzorov sú ich nestabilita, obmedzenosť konštrukcie dostupnými enzýmami, ako aj to, že analýza bio-  
senzormi nie je zatiaľ odporúčaná ako referenčná analytická metóda. V budúcnosti už pravdepodobne nedôjde k objavom enzýmov, ktoré by mohli zaznamenať revolúciu v rozvoji tejto vedecko-aplikačnej disciplíny. Rozvoj môže nastať zvýšením stability a reprodukovateľnosti ako prípravy, tak i merania, ktoré bude v konečnom dôsledku viesť k ich uznaniu ako refe-  
renčných metód. Nízka stabilita by sa dala odstrániť použitím vhodných metód imobilizácie, keďže už teraz sú známe postupy, ktorými sa dajú pri-  
praviť biosenzory stabilné aj niekoľko mesiacov, pričom jednoduchým ote-  
rom sa dá docieľiť takmer pôvodná citlivosť na stanovovanú látku. Použitie biosenzorov ako referenčných metód si v budúcnosti možno predstaviť hlav-  
ne pre ich rýchlosť, nenáročnosť a nízke náklady najmä, ak sa vyriešia pro-  
blémy s regeneráciou kofaktorov nutných pre priebeh niektorých enzýmo-  
vých reakcií (v prípade použitia dehydrogenáz je to NAD). Problém so sta-  
bilitou sa dá riešiť prijatím konceptu jednorázových biosenzorov, ktoré by  
boli skonštruované z veľmi lacných materiálov, prípadne by sa vyrábali  
vo veľkých množstvách a používali by sa na meranie počas jedného dňa, čo  
by zahŕňalo analýzu niekoľkých desiatok vzoriek. V prípade použitia mikro-  
biálnych biosenzorov by veľmi zaujímavé vlastnosti mohli vzniknúť použitím  
mutantných alebo ináč modifikovaných buniek. S rozvojom mikroelektroni-  
ky sa bude oblasť biosenzorov prudšie rozvíjať, hlavne po skúsenostiach  
s konštrukciou biočipov.

Na záver je osožné dodať, že i na našom pracovisku sa zaoberáme pro-  
blematikou vývoja a aplikácií biosenzorov. Vyvinuli sme biosenzory  
na detekciu glukózy - imobilizáciou *Gluconobacter oxydans*, sacharózy - ko-  
imobilizáciou buniek *Gluconobacter oxydans* a *Saccharomyces cerevisiae*,  
a laktózy - koimobilizáciou kvasiniek *Kluyveromyces marxianus*  
a *Gluconobacter oxydans*. Na imobilizáciu bola použitá želatína, ktorá bola  
spolu s bunkami zosieťovaná glutardialdehydom. Kvasinky *K. marxianus* boli

permeabilizované kvôli urýchleniu hydrolyzy laktózy [65]. Mikrobiálne senzory na stanovenie glukózy a laktózy boli použité v analýze týchto zložiek v mlieku [25]. Okrem sacharidových bol skonštruovaný aj biosenzor na stanovenie etanolu v pive, imobilizáciou baktérií *G. oxydans* do želatíny a použitím kyslíkovej elektródy na detekciu ubúdajúceho kyslíka, ktorý je substrátom pri oxidácii etanolu. Porovnanie medzi týmto stanovením a plynovou chromatografiou bolo vo veľmi dobrej zhode [35]. Pri konštrukcii biosenzorov sme použili aj iný princíp, ako amperometrický, a to entalpický (termistor). Na stanovenie kyseliny citrónovej boli použité bunky *Enterobacter aerogenes*, imobilizované do pektátového gélu [66]. V tabuľke 4 sú uvedené možné oblasti analýz biosenzormi, spolu s látkami, ktoré môžu byť nimi stanovené.

TABUĽKA 4. Využitie biosenzorov v analýze potravín.  
TABLE 4. Utilizing of biosensors in food analysis.

Oblasť <sup>1</sup>	Analyty <sup>2</sup>
Mliekárstvo <sup>3</sup>	laktóza, laktulóza, glukóza, kyselina mliečna, mastné kyseliny, močovina, fosforečnany
Liehoviny <sup>4</sup>	etanol, sacharóza, glukóza, glycerol
Vína <sup>5</sup>	etanol, glycerol, glukóza, fruktóza, sacharóza, maltóza, kyselina mliečna, kyselina jablčná, kyselina šťavelová, polyfenoly, siričitany, fosforečnany, dusičnany
Pivá <sup>6</sup>	etanol, glycerol, glukóza
Nealkoholické nápoje <sup>7</sup>	glukóza, sacharóza, fruktóza, maltóza, pektín, kyselina citrónová, vitamíny, aspartám, fosforečnany, siričitany, dusičnany, reziduá pesticídov
Mäsiarstvo <sup>8</sup>	(hypo)xantín, kyselina mliečna, dusičnany
Tuky a oleje <sup>9</sup>	cholesterol, lecitín, mastné kyseliny, hydrogénperoxid, polyfenoly
Cukrovinky, med <sup>10</sup>	sacharóza, maltóza, glukóza, fruktóza, aspartám
Ovocie a zelenina <sup>11</sup>	fruktóza, vitamín C, organické kyseliny, dusičnany, fosforečnany, reziduá pesticídov
Múka a pekárenské výrobky <sup>12</sup>	škrob, maltóza, sacharóza, lecitín, fosfolipidy

1 - area, 2 - analyts, 3 - dairy industry, 4 - spirits, 5 - wines, 6 - beers, 7 - soft drinks, 8 - meat industry, 9 - fats and oils, 10 - sweets, honey, 11 - fruits and vegetables, 12 - flour and bakery products.



## Literatúra

1. TURNER, A. P. F. - KARUBE, I. - WILSON, G. S.: Biosensors: Fundamentals and Applications. Oxford, Oxford University Press 1987. 770 s.
2. CLARK, L. C. - LYONS, C.: Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of New York Academy of Science*, 102, 1962, s. 29-45.
3. CLARK, L. C.: Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *Transitions in American Society of Artificial Internal Organs*, 2, 1956, s. 41-48.
4. Pat. US 3 539 455. CLARK, L. C.: Membrane polarographic electrode system and method with electrochemical compensation. November 1970.
5. GRIFFITHS, D. - HALL, G.: Biosensors - what real progress is being made? *Trends in Biotechnology*, 11, 1993, s. 122-130.
6. MANOWITZ, P. - STOECKER, P. W. - YACYNICH, M.: Galactose biosensors using composite polymers to prevent interferences. *Biosensors and Bioelectronics*, 10, 1995, s. 359-370.
7. OHARA, T. J. - RAJAGOPALAN, R. - HELLER, A.: „Wired“ enzyme electrodes for amperometric determination of glucose or lactate in the presence of interfering substances. *Analytical Chemistry*, 66, 1994, s. 2451-2457.
8. WANG, J. - NASER, N. - OZSOZ, M.: Plant tissue-based amperometric electrode for eliminating ascorbic acid interferences. *Analytica Chimica Acta*, 234, 1990, s. 315-320.
9. WANG, J. - NASER, N. - WOLLENBERGER, U.: Use of tyrosinase for enzymatic elimination of acetaminophen interference in amperometric sensing. *Analytica Chimica Acta*, 281, 1993, s. 19-24.
10. MAIDAN, R. - HELLER, A.: Elimination of electrooxidable interferent-produced currents in amperometric biosensors. *Analytical Chemistry*, 64, 1992, s. 2889-2896.
11. GUILBAULT, G. - MONTALVO, J.: Urea specific enzyme electrode. *Journal of American Chemical Society*, 91, 1969, s. 2164-2165.
12. BERGVELD, P.: Development of an ion-selective solid-state device for neurophysiological measurement. *IEEE Transactions in Biomedical Engineering*, 17, 1970, s. 70-71.
13. SETHI, S. R.: Transducer aspects of biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 9, 1994, s. 243-264.
14. MOSBACH, K. - DANIELSSON, B.: An enzyme thermistor. *Biochimica and Biophysica Acta*, 364, 1974, s. 140-145.
15. LUEBBERS, D. W. - OPITZ, N.: The pCO<sub>2</sub>-pO<sub>2</sub>-optode. New probe for measurement of partial pressure of oxygen in fluids and gases. *Zeitschrift für Naturforschung*, 30, 1975, s. 532-533.
16. CHUDOBOVÁ, I. - VRBOVÁ, E.: Základní principy optických vláknových biosenzorů a jejich aplikace při stanovení glukosy. *Chemické Listy*, 90, 1996, s. 295-306.
17. KARMARKAR, K. H. - GUILBAULT, G. G.: The determination of ammonia and nitrogen dioxide at the parts per billion level with coated piezoelectric crystal detectors. *Analytica Chimica Acta*, 75, 1975, s. 111-115.
18. BYFIELD, M. P. - ABUKNESHA, R. A.: Biochemical aspects of biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 9, 1994, s. 373-400.
19. HIKUMA, M. - OBANA, H. - YASUDA, T. - KARUBE, I. - SUZUKI, S.: Amperometric determination of total assimilable sugars in fermentation broth with use of immobilized whole cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 2, 1980, s. 234-239.
20. IKEBUKURO, K. - MIYATA, A. - CHO, S. J. - NOMURA, Y. - CHANG, S. M. - YAMAUCHI, Y. - HASEBE, Y. - UCHIYAMA, S. - KARUBE, I.: Microbial cyanide sensor for monitoring river water. *Journal of Biotechnology*, 48, 1996, s. 73-80.
21. MARTY, J. L. - OLIVE, D. - ASANO, Y.: Measurement of BOD: Correlation between 5-day



- BOD and commercial BOD biosensor values. *Environmental Technology*, 18, 1997, s. 333-337.
22. MAYER, M. - RUZICKA, J.: Flow injection based renewable electrochemical sensor system. *Analytical Chemistry*, 68, 1996, s. 3808-3814.
  23. ŠVORC, J. - MIERTUŠ, S. - KATRLÍK, J. - STREĎANSKÝ, M.: Composite transducers for amperometric biosensors. The glucose sensor. *Analytical Chemistry*, 69, 1997, s. 2086-2090.
  24. CENTONZE, D. - ZAMBONIN, G. C. - PALMISANO, F.: Determination of glucose in nonalcoholic beverages by biosensors coupled with microdialysis fiber samplers. *Journal of AOAC International*, 80, 1997, s. 829-833.
  25. TKÁČ, J. - ŠVITEL, J.: Stanovenie glukózy a laktózy v mlieku mikrobiálnym biosenzorom. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 36, 1997, s. 113-121.
  26. KOGURE, M. - MORI, H. - ARIKI, H. - KOJIMA, CH. - YAMAMOTO, H.: Determination of sucrose using sucrose phosphorylase in a flow-injection system. *Analytica Chimica Acta*, 337, 1997, s. 107-111.
  27. TZOUWARA-KARAYANNI, S. - CROUCH, S. R.: Enzymatic determination of glucose, sucrose and maltose in food samples by flow injection analysis. *Food Chemistry*, 35, 1990, s. 109-116.
  28. MAYER, M. - GENRICH, M. - KÜNNECKE, W. - BILITEWSKI, U.: Automated determination of lactulose in milk using an enzyme reactor and flow injection analysis with integrated dialysis. *Analytica Chimica Acta*, 324, 1996, s. 37-45.
  29. MENZEL, C. - LERCH, T. - SCHEPER, T. - SCHÜGERL, K.: Development of biosensors based on an electrolyte isolator semiconductor (EIS)-capacitor structure and their application for process monitoring. Part I. Development of the biosensors and their characterisation. *Analytica Chimica Acta*, 317, 1995, s. 259-264.
  30. EMNÉUS, J. - GORTON, L.: Comparison between different inorganic supports for the immobilisation of amyloglucosidase and  $\alpha$ -amylase to be used in enzyme reactors in flow-injection system. Part II. Hydrolysis of glycogen. *Analytica Chimica Acta*, 276, 1993, s. 319-328.
  31. KIBA, N. - INOUE, Y. - FURUSAWA, M.: Flow-injection system for the fluorimetric determination of fructose with an immobilised mannitol dehydrogenase reactor. *Analytica Chimica Acta*, 243, 1991, s. 183-186.
  32. IKEDA, T. - MATSUSHITA, F. - SENDA, M.: Amperometric fructose sensor based on direct bioelectrocatalysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 6, 1991, s. 299-304.
  33. MATSUMOTO, K. - BAEZA, J. J. - MOTTOLA, H. A.: Simultaneous kinetic based determination of fructose and ascorbate with rotating bioreactor and amperometric detection: Application to the analysis of food samples. *Analytical Chemistry*, 65, 1993, s. 1658-1661.
  34. KATRLÍK, J. - ŠVORC, J. - STREĎANSKÝ, M. - MIERTUŠ, S.: Composite alcohol biosensors based on solid binding matrix. *Biosensors and Bioelectronics*, 13, 1998, s. 181-191.
  35. ŠVITEL, J. - ČURILLA, O.: Stanovenie etanolu v pive biosenzorom. *Kvasný průmysl*, 42, 1996, s. 241-245.
  36. SPRULES, S. D. - HARTLEY, I. C. - WEDGE, R. - HART, J. P. - PITTSO, R.: A disposable reagentless screen-printed amperometric biosensor for the measurement of alcohol in beverages. *Analytica Chimica Acta*, 329, 1996, s. 215-221.
  37. PRODROMIDIS, M. I. - STALIKAS, C. D. - TZOUWARA-KARAYANNI, S. M. - KARAYANNIS, M. I.: Determination of glycerol in alcoholic beverages using packed bed reactor with immobilised glycerol dehydrogenase and and amperometric flow-injection system. *Talanta*, 43, 1996, s. 27-33.
  38. PALLESCHI, G. - VOLPE, G. - COMPAGNONE, D. - NOTTE, E. - ESTI, M.: Bioelectrochemical

- determination of lactic and malic acid in wine. *Talanta*, 41, 1994, s. 917-923.
39. COLLIER, W. A. - JANSSEN, D. - HART, A. L.: Measurement of soluble L-lactate in dairy products using screen-printed sensors in batch mode. *Biosensors and Bioelectronics*, 11, 1996, s. 1041-1049.
40. MAZZEI, F. - AZZONI, A. - CAVALIERI, B. - BOTRÉ, F. - BOTRÉ C.: A multi-enzyme bio-electrode for the rapid determination of total lactate concentration in tomatoes, tomato juice and tomato paste. *Food Chemistry*, 55, 1996, s. 413-418.
41. KATRLÍK, J.: Mediátorové kompozitné bioelektródy a ich využitie v analýze potravín. [Dizertačná práca.] Bratislava 1997. 120 s. – Slovenská technická univerzita. Chemicko-technologická fakulta.
42. ASSOLANT-VINET, C. H. - BARDELETTI, G. - COULET, P. R.: A novel enzyme membrane enzyme electrode for oxalate determination in foodstuffs. *Analytical Letters*, 20, 1987, s. 513-516.
43. COOPER, J. C. - HÄMMERLE, M. - SCHUHMANN, W. - SCHMIDT, H.-L.: Selectivity of conducting polymer electrodes and their application in flow injection analysis of amino acids. *Biosensors and Bioelectronics*, 8, 1993, s. 65-74.
44. KURIYAMA, S. - RECHNITZ, A.: Plant tissue-based bioactive membrane electrode for glutamate. *Analytica Chimica Acta*, 131, 1981, s. 91-96.
45. SIMONIAN, A. L. - RAININA, E. I. - WILD, J. - FITZPATRICK, P. F.: A biosensor for L-tryptophan determination based on recombinant *Pseudomonas savastanoi* tryptophan-2-mono oxygenase. *Analytical Letters*, 28, 1995, s. 1751-1761.
46. CAMPANELLA, L. - ATURKI, Z. - SAMMARTINO, M. P. - TOMASSETTI, M.: Aspartate determination using a new enzyme sensor. *Journal of Pharmacy and Biomedical Analysis*, 13, 1995, s. 439-447.
47. SCHMIDT, A. - STANDFUSS-GABISCH, C. - BILITEWSKI, U.: Microbial biosensor for free fatty acids using an oxygen electrode based on thick film technology. *Biosensors and Bioelectronics*, 11, 1996, s. 1139-1145.
48. MASCINI, M. - TOMASSETTI, M. - IANELLO, M.: Determination of free and total cholesterol in human bile samples using an enzyme electrode. *Clinica Chimica Acta*, 132, 1983, s. 7-15.
49. HORIE, H. - RECHNITZ, G. A.: Hybrid tissue/enzyme biosensor for pectin. *Analytica Chimica Acta*, 306, 1995, s. 123-127.
50. LAURINAVICIUS, V. - KURTINAITIENE, B. - GUREVICIENE, V. - BOGUSLAVSKY, L. - GENG, L. - SKOTHEIM, T.: Amperometric glyceride sensor. *Analytica Chimica Acta*, 330, 1996, s. 159-166.
51. KORPAN, Y. I. - DOLDATKIN, A. P. - GONCHAR, V. - SIBIRNY, A. A. - GIBSON, T. D. - ELŠKAYA, A. V.: A novel enzyme biosensor specific for formaldehyde based on pH sensitive field effect transistors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 68, 1997, s. 209-213.
52. CAMPANELLA, L. - SAMMARTINO, P. - TOMASSETTI, M.: New enzyme sensor for phenol determination in non-aqueous and aqueous medium. *Sensors and Actuators*, B7, 1992, s. 383-388.
53. KRÄMER, P. M.: Biosensors for measuring pesticide residues in the environment: Past, present and future. *Journal of AOAC International*, 79, 1996, s. 1245-1254.
54. WATANABE, E. - ANDO, K. - KARUBE, I. - MATSUAKA, H. - SUZUKI, S.: Determination of hypoxanthine in fish meat with an enzyme sensor. *Journal of Food Science*, 48, 1983, s. 496-500.
55. SHU, H.-CH. - HAKANSON, H. - MATTIASSEN, B.: D-lactic acid in pork as a freshness indicator monitored by immobilized D-lactate dehydrogenase using sequential injection

- analysis. *Analytica Chimica Acta*, 283, 1993, s. 727-737.
56. CHANG, Y. H. - CHANG, T. CH. - KAO, E.-F. - CHOU, CH.: Detection of protein A produced by *Staphylococcus aureus* with a fiber-optic-based biosensor. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60, 1996, s. 1571-1574.
  57. SMITH, V. J.: Determination of sulfite using a sulfite oxidase enzyme electrode. *Analytical Chemistry*, 59, 1987, s. 2256-2259.
  58. KAWAMURA, Y. - KUBO, N. - ARATA, H. - ITO, Y. - TAMURA, M. - YAMAMOTO, K: A microbial sensor for determination of sulfite in wines. *Journal of AOAC International*, 77, 1994, s. 1052-1056.
  59. CAMPANELLA, L. - CORDATORE, M. - MAZZEI, F. - TOMASSETTI, M. - VOLPE, G.: Phosphate determination in foodstuffs using plant tissue electrode. *Food Chemistry*, 44, 1992, s. 291-297.
  60. SCHUBERT, F. - RENNEBERG, R. - SCHELLER, F.W. - KIRSTEIN, L.: Plant tissue hybrid electrode for determination of phosphate and fluoride. *Analytical Chemistry*, 56, 1984, s. 1677-1682.
  61. LARSEN, L. H. - KJAER, T. - REVSBECH, N. P.: A microscale  $\text{NO}_3^-$  biosensor for environmental applications. *Analytical Chemistry*, 69, 1997, s. 3527-3531.
  62. SAINI, S. - HALL, G. F. - DOWNS, M. E. A. - TURNER, A. P. F.: Organic phase enzyme electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 249, 1991, s. 1-15.
  63. CAMPANELLA, L. - TOMASSETTI, M.: Biosensors for food analysis. *Food Technology and Biotechnology*, 34, 1996, s. 131-141.
  64. HALL, G. F. - TURNER, A. P. F.: An organic phase enzyme electrode for cholesterol. *Analytical Letters*, 24, 1991, s. 1375-1388.
  65. ŠVITEL, J. - ČURILLA, O. - TKÁČ, J.: Microbial cell-based biosensors for sensing glucose, sucrose or lactose. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 27, 1998, s. 153-158.
  66. ŠVITEL, J. - VOŠTIAR, I. - GEMEINER, P. - DANIELSSON, B.: Determination of citrate by FIA using immobilized *Enterobacter aerogenes* cells and enzyme thermistor/flow microcalorimeter detection. *Biotechnology Techniques*, 11, 1997, s. 917-919.

Do redakcie došlo 17.7.1998.

### Biosensors and their applications in food analysis

TKÁČ, J. - ŠTURDÍK, E. - ŠVITEL, J.: *Bull. potrav. Výsk.*, 37, 1998, p. 89-107.

**SUMMARY.** The review contains brief characteristic of biosensors with description of main advantages and disadvantages. The operation of transducers (amperometric, potentiometric, enthalpic, optic, conductometric and piezoelectric), used biomolecules (enzymes, cells and antibodies) and immobilization techniques are described in details. Possibilities of biosensor application in analysis of sugars, alcohols, organic acids, others organic compounds, inorganic compounds, as well as application of biosensors in organic phase are presented. Possibilities of biosensor development in future are shown in conclusion of this review.

**KEYWORDS:** biosensor, food analysis, organic phase, transducer, biological part