

Enzymová elektroda pro stanovení laktosy

EVA VRBOVÁ—JITKA PECKOVÁ—MIROSLAV MAREK—PAVEL BŘEZINA

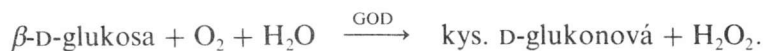
Souhrn. Enzymová elektroda pro stanovení laktosy byla připravena koimobilizací β -galaktosidasy, gluksooxidasy a katalasy na parciálně hydrolyzovanou nylonovou síťku kovalentní vazbou za přítomnosti cyklohexylisokyanidu a glutaraldehydu; nosič s navázanými enzymy byl fixován na povrchu kyslíkového čidla Clarkova typu.

Připravený biosenzor byl charakterizován specifickou aktivitou imobilizované β -galaktosidasy, oblastí lineární závislosti odezvy enzymové elektrody na koncentraci substrátu ($1\text{--}20\text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$), zdánlivou Michaelisovou konstantou ($K_{M(\text{app.})} = 9,99 \cdot 10^{-2}\text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a stabilitou v závislosti na čase a počtu provedených analýz; dále byl testován vliv pH a teploty reakční směsi na velikost odezvy.

Laktosová elektroda byla použita pro stanovení obsahu laktosy ve vybraných výrobcích mlékárenského průmyslu, získané hodnoty byly ověřeny pomocí fotometrické enzymové metody pro stanovení laktosy a D-galaktosy.

Kravske mléko obsahuje v průměru 4—5 % laktosy, u mléčných výrobků je tato hodnota nižší podle typu technologického zpracování. Rychlé a přesné stanovení obsahu laktosy v potravinářských výrobcích je důležité z řady důvodů, v poslední době však také s ohledem na vysoké procento jedinců, kteří jsou postiženi laktosovou intolerancí.

Vedle chemických [1] a fyzikálně-chemických způsobů [2] se pro stanovení laktosy čím dál více využívá enzymových postupů především na bázi β -galaktosidasy (β -gal). Nejčastěji je pro stanovení obsahu laktosy využíván systém enzymů β -galaktosidasy a gluksooxidasy (GOD):



Ing. Eva Vrbová, Doc. Ing. Miroslav Marek, CSc., Biotechnologické centrum VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6.

Ing. Jitka Pecková, katedra biochemie a mikrobiologie VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6.

Doc. Ing. Pavel Březina, CSc., katedra technologie mléka a tuků VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6.

U uvedených metod je však stanovení obsahu laktosy rušeno volnou D-glukosou, která musí být ze směsi odstraněna nebo musí být její obsah stanoven samostatným měřením.

Běžně používané fotometrické metody (založené na reakci peroxidu vodíku s leukoformou barviva katalyzované peroxidasou) jsou poměrně zdlouhavé, pracné na úpravu vzorku a náročné z hlediska spotřeby chemikálií. Z tohoto hlediska je výhodnější elektrochemická detekce spotřeby kyslíku [3] nebo tvorby peroxidu vodíku [4]. Metodu stanovení obsahu laktosy v mléce pomocí „sendvičové“ enzymové elektrody vypracovali Pilloton a kol. [5]. β -Galaktosidasa a glukosaoxidasa byly koimobilizovány na nylonové síťce nebo na imunoafinitní membráně, která byla přiložena na dialyzační acetátcelulosovou membránu H_2O_2 -citlivého senzoru a od reakční směsi oddělena ochrannou acetátcelusovou membránou.

Cílem naší práce byla příprava citlivé a stabilní enzymové elektrody na bázi imobilizované směsi enzymů β -galaktosidasy, glukosaoxidasy a katalasy ve spojení s amperometrickou detekcí kyslíku a využití připraveného biosenzoru v potravinářství pro stanovení laktosy ve vzorcích kultivačních médií a produktech mlékárenského průmyslu.

Materiál a metody

Imobilizace enzymů a příprava biosenzoru. Koimobilizace β -galaktosidasy, glukosaoxidasy a katalasy na nylonovou síťku. Nylonová síťka (UHELON 63, Řempe ČSFR) byla při 20 °C aktivována parciální hydrolýzou 25% kyselinou chlorovodíkovou. Okamžitě po její aplikaci byla síťka důkladně promyta destilovanou vodou. Po usušení bylo na parciálně hydrolyzovaný povrch naneseno 5 μ l roztoku β -galaktosidasy (β -D-galaktosid galaktohydrolasy E.C.3.2.1.23) připraveného rozpuštěním 20 mg lyofilizovaného preparátu (z *Curvularia inequalis*, 5,60 $\cdot 10^{-3}$ μ kat \cdot mg $^{-1}$ Fermentas, Vilnius, SSSR) v 100 μ l destilované vody, 5 μ l roztoku glukosaoxidasy (β -D-glukosa : O_2 -oxidoreduktasy, E.C.1.1.3.4) připraveného rozpuštěním 5 mg práškového preparátu (z *Aspergillus niger*, 4,16 μ kat \cdot mg $^{-1}$, Serva, SRN) ve 100 μ l destilované vody, 5 μ l suspenze katalasy (KAT, H_2O_2 : H_2O -oxidoreduktasy, E.C.1.1.1.6, 56,7 μ kat \cdot mg $^{-1}$ Reanal, MR), 5 μ l 5% roztoku glutaraldehydu (Koch-Light Laboratories, Velká Británie) a ev. 1 μ l cyklohexylisokyanidu (Fluka, Švýcarsko). Po promíchání enzymové směsi a následných 96 h při 4 °C byla síťka s navázanými enzymy promyta 0,1 mol \cdot dm $^{-3}$ draselno-fosfátovým pufrem, pH 5,5, obsahujícím ionty Mn^{2+} v koncentraci 10 $^{-4}$ mol \cdot dm $^{-3}$, který byl použit i pro její uchování při 4 °C. při přípravě enzymové elektrody byla síťka s imobilizovanými enzymy fixována na povrchu kyslíkového čidla Clarkova typu (Chemoprojekt, ČSFR).

Stanovení laktosy. Do temperované (30 °C) míchané reakční nádoby o objemu 1,5 ml se zasunutým biosenzorem bylo pipetováno 1,4 ml 0,1 mol . dm⁻³ draselno-fosfátového pufru, pH 5,5, s koncentrací Mn²⁺-iontů 10⁻⁴ mol . dm⁻³, syceného vzdušným kyslíkem. Reakce byla zahájena přidavkem 100 µl roztoku vzorku nebo laktosy příslušné koncentrace. Rychlost úbytku kyslíku z reakční směsi byla sledována nanoampérmetrem se stabilizovaným zdrojem stejnosměrného polarizačního napětí a členem pro derivaci signálu (Chemoprojekt, ČSFR). Prostý signál a jeho derivace byly registrovány pomocí zapisovače TZ 4200 (Laboratorní přístroje, ČSFR). Dále byl pro stanovení laktosy použit kombinovaný fotometrický set fy Boehringer [6].

Stanovení závislosti aktivity enzymové elektrody na pH reakčního prostředí a teplotě. Do reakční nádoby temperované na 20 až 50 °C, obsahující 1,4 ml 0,1 mol . dm⁻³ draselno-fosfátového pufru (s 10⁻⁴ mol . dm⁻³ Mn²⁺-ionty) o různých hodnotách pH (2,5 až 8,0), syceného vzdušným kyslíkem, bylo aplikováno 10 µl standardního roztoku laktosy. Směs byla promíchávána magnetickým míchadlem a při každé změně hodnoty pH nebo teploty byl systém ustalován 10 minut.

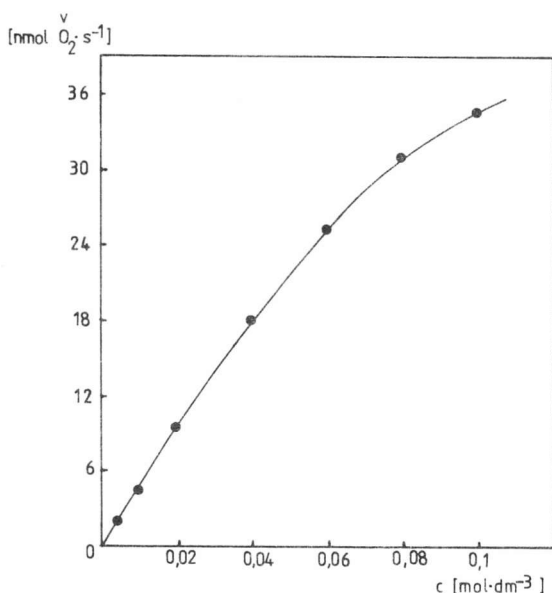
Stanovení D-glukosy. Do temperované (30 °C) míchané reakční nádoby o objemu 1,5 ml se zasunutou enzymovou elektrodou na stanovení D-glukosy [7] bylo pipetováno 1,4 ml 0,1 mol . dm⁻³ draselno-fosfátového pufru, pH 5,8, syceného vzdušným kyslíkem. Reakce byla zahájena přidavkem 100 µl roztoku vzorku nebo D-glukosy příslušné koncentrace. Před vlastním stanovením bylo třeba proměřit ze standardních roztoků kalibrační křivku.

Výsledky a diskuse

Enzymová elektroda pro stanovení laktosy byla připravena koimobilizací β -galaktosidasy, glukosaoxidasy a katalasy kovalentní vazbou na aktivovanou nylonovou sítku. Cyklohexylisokyanid byl do reakční směsi přidáván za účelem vytvoření pevnější, a tedy stabilnější kovalentní vazby oproti „klasické“ imobilizaci enzymů pomocí samotného glutaraldehydu. Při použití cyklohexylisokyanidu sice docházelo k mírnému snížení aktivity imobilizovaného enzymového komplexu, ale z dřívějších našich prací [7] bylo možno analogicky usuzovat na podstatné zvýšení dlouhodobé stability enzymových systémů, a tedy i značné prodloučení životnosti biosenzoru. Vzájemný poměr enzymů byl volen tak, aby nejpomalejším, a tedy řídícím dějem celého procesu byla enzymová hydrolýza laktosy pomocí β -galaktosidasy. Při použití cyklohexylisokyanidu vykazoval koimobilizovaný komplex enzymů 75–80 % výchozí aktivity volných enzymů, zatímco při klasické koimobilizaci uvedeného enzymového komplexu (bez při-

tomnosti cyklohexylisokyanidu) tento podíl zachované enzymové aktivity činil v průměru 95 %.

Specifická aktivita enzymového komplexu imobilizovaného za přítomnosti cyklohexylisokyanidu byla $28,9 \cdot 10^{-3} \mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ β -galaktosidasy použité k imobilizaci, lineární závislost odezvy biosenzoru na koncentraci substrátu (obr. 1) se nacházela v oblasti $1 \cdot 10^{-3}$ — $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ laktosy v nástřiku vzorku, tj. $6,67 \cdot 10^{-5}$ — $1,33 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ laktosy v nádobce.

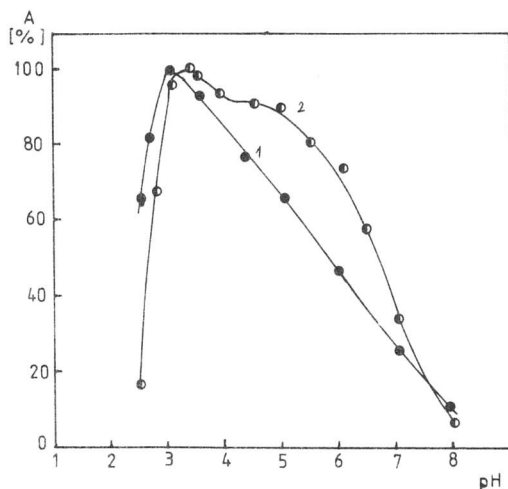


Obr. 1. Kalibrační křivka pro stanovení laktosy pomocí enzymové elektrody připravené koimobilizací β -galaktosidasy, glukosaoxidasy a katalasy na nylonovou sítku. v — rychlost úbytku kyslíku v reakční směsi, c — koncentrace laktosy v nástřiku směsi.

Fig. 1. Calibration curve for the determination of lactose using enzyme electrode prepared by co-immobilization of β -galactosidase, glucose oxidase and catalase on nylon net. v — rate of oxygen consumption in the reaction mixture, c — concentration of lactose in the injected mixture.

Z křivky závislosti aktivity imobilizovaného komplexu enzymů na pH reakčního prostředí bylo zjištěno pH optimum 3,4 (obr. 2). Ve srovnání s volnou směsí enzymů (pH optimum 3,0) došlo vlivem imobilizace k mírnému posunu do alkalické oblasti. Zjištěné údaje byly v dobré shodě s literárními údaji [8], kde je pro plísňovou β -galaktosidasu uváděno pH optimum v intervalu 2,5 až 4,5 jednotek pH. pH optimum námi používaného enzymu z *Curvularia inaequalis* [9, 10] leží v oblasti 3,4 až 4,3 pH. Pokud byl pufr v tomto intervalu pH používán pro stanovení, docházelo během 24 hodin k rychlé inaktivaci enzymové směsi a ztrátě stability biosenzoru. Proto byly analýzy vzorků prováděny při pH 5,5.

kdy citlivost biosenzoru byla postačující, a tato hodnota pH vyhovovala i z hlediska uchování dlouhodobé stability biosenzoru.



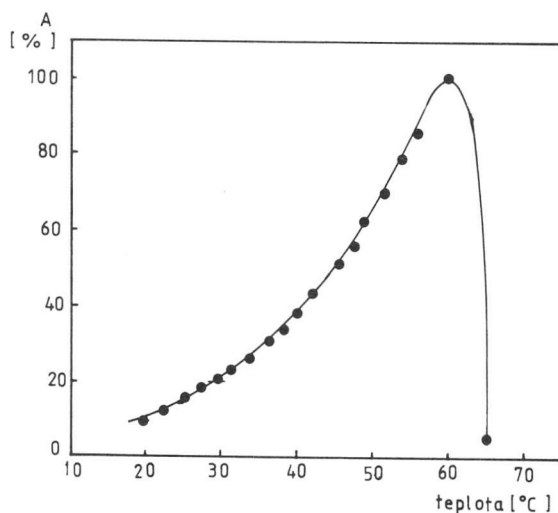
Obr. 2. Vliv pH reakčního prostředí na 1 — aktivitu volné β -galaktosidasy, 2 — aktivitu imobilizovaného enzymového komplexu β -galaktosidasy, glukosaoxidasy a katalasy.

Fig. 2. Influence of pH of reaction mixture on 1 — the activity of free β -galactosidase, 2 — the activity of immobilized enzyme complex (β -galactosidase, glucose oxidase and catalase).

Při měření závislosti aktivity enzymového komplexu na teplotě byla zjištěna maximální rychlost úbytku kyslíku z reakční směsi při 60 °C, po překročení této teploty nastal prudký pokles aktivity enzymového komplexu (obr. 3). Teplotní optimum volného enzymu z *Curvularia inaequalis* bylo uváděno v intervalu 30 až 55 °C [9, 10]. Vzhledem k zajištění dostatečné stability a citlivosti biosenzoru byla pro měření zvolena teplota 30 °C.

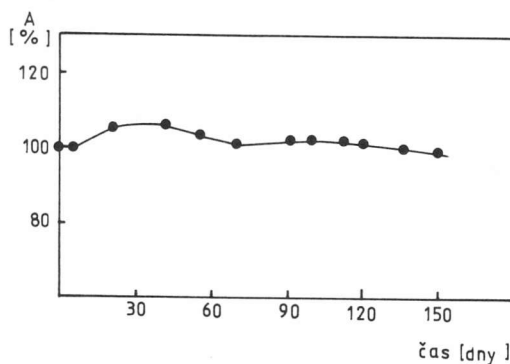
Gaussovou-Newtonovou iterační metodou byla na základě hodnot získaných z kalibrační křivky (obr. 1) zjištěna zdánlivá Michaelisova konstanta $K_{M(\text{app.})} = 9,99 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Při ověřování stability biosenzoru (připraveného koimobilizací enzymů s cyklohexylisokyanidem) bylo provedeno s jedinou enzymovou elektrodou asi 500 analýz včetně stanovení laktosy ve vybraných vzorcích potravinářského průmyslu. Přes noc byla enzymová elektroda uchovávána v pufru při 4 °C. Při testování byla hodnota směrnice lineární části kalibrační křivky vyjádřena bezprostředně po imobilizaci jako 100 %, analogicky byly získány další hodnoty vyjadřující stabilitu biosenzoru. Během intervalu 5 měsíců nebylo pozorováno žádné podstatné snížení aktivity koimobilizovaného systému enzymů (obr. 4).



Obr. 3. Teplotní závislost aktivity enzymového komplexu β -galaktosidasy, glukosaoxidasy a katalasy imobilizovaného na nylonové síťce.

Fig. 3. Temperature dependence of activity of enzyme complex β -galactosidase, glucose oxidase and catalase immobilized on nylon net. (Temperature.)



Obr. 4. Stabilita enzymového komplexu β -galaktosidasy, glukosaoxidasy a katalasy imobilizovaného na nylonové síťce v závislosti na čase.

Fig. 4. Stability of enzyme complex (β -galactosidase, glucose oxidase and catalase immobilized on nylon net) in dependence on time. (Time [days].)

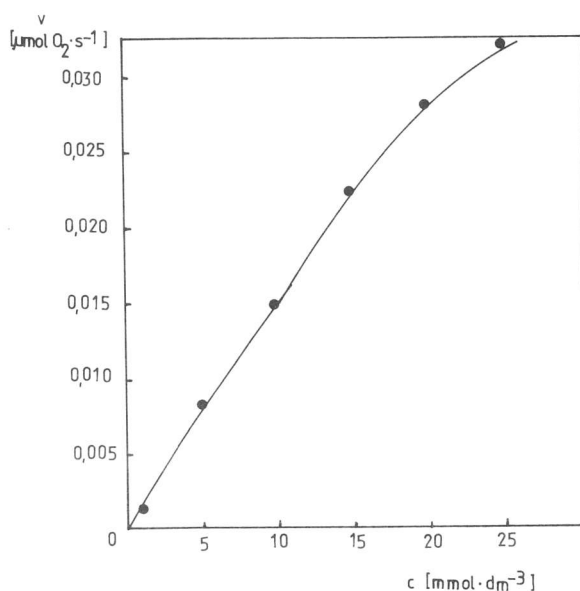
Pomocí enzymové elektrody připravené uvedeným způsobem byl stanoven obsah laktosy v některých výrobcích mlékárenského průmyslu (tab. 1). Výsledky uvedené v tabulce 1 představují průměr z pěti stanovení. Analýza je rušena přítomností volné D-glukosy, jejíž množství ve vzorcích bylo zjištěno z kalibrační křivky (obr. 5) pro enzymovou elektrodu na stanovení D-glukosy [7] a poté

Tabulka 1. Stanovení glukosy, laktosy a galaktosy ve vzorcích mlékárenského průmyslu ($\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$)

Table 1. Determination of glucose, lactose and galactose in the samples of dairy industry products ($\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$)

Analyzovaný vzorek ¹	Glukosa ² (enzymová elektroda)	Laktosa ³		Galaktosa ⁴
		(enzymová elektroda) ⁵	(set fy Boehringer) ⁶	(set by Boehringer) ⁶
pasterované mléko ⁷	0,1	41,1	39,2	1,4
zahuštěné mléko neslazené Tatra Grand ⁸	0,5	104,4	104,5	2,8
Biokys ⁹	0,7	37,0	41,0	13,4
Jovo koktejl ¹⁰	13,5	22,2	24,2	14,6
bílý jogurt ¹¹	0,8	43,0	48,7	18,3

1 — Sample analyzed, 2 — Glucose (enzyme electrode), 3 — Lactose, 4 — Galactose, 5 — Enzyme electrode, 6 — Set by fa Boehringer, 7 — Pasteurized milk, 8 — Condensed sugarless milk „Tatra Grand“, 9 — Biokys (soured milk beverage), 10 — Jovo (milk-shake), 11 — White yoghurt.



Obr. 5. Kalibrační křivka pro stanovení D-glukosy (imobilizace glukosaoxidasy a katalasy na nylonové síťce). v — rychlost úbytku kyslíku v reakční směsi, c — koncentrace glukosy v nástřiku směsi.

Fig. 5. Calibration curve for the determination of D-glucose (glucose oxidase and catalase immobilized on nylon net). v — rate of oxygen consumption in the reaction mixture, c — concentration of glucose in the injected mixture.

odečteno od celkového množství laktosy a D-glukosy stanoveného biosenzorem s imobilizovaným komplexem β -galaktosidasy, glukosa oxidasy a katalasy.

Výsledky analýz byly ověřeny pomocí kombinovaného enzymového setu na stanovení laktosy a D-galaktosy fy Boehringer (SRN) (založeného na katalytickém účinku β -galaktosidasy, hexokinasy a glukosa-6-fosfát-dehydrogenasy). Obsah laktosy ve vzorcích odpovídal jejímu množství zjištěnému pomocí námi připraveného biosenzoru. Rozdíly při stanovení téhož vzorku oběma metodami jsou asi $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ (tj. $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) laktosy. U vzorků bílého jogurtu a biokysu byla chyba stanovení vyšší, což bylo zřejmě spojeno s obtížnou přípravou vzorků pro měření, ale i v těchto případech lze biosenzor použít pro velmi rychlé orientační stanovení laktosy.

Analýza laktosy enzymovou elektrodou byla podstatně rychlejší (doba odezvy 5 s, doba ustálení do následující analýzy do 4 min) a nevyžadovala zvláštní úpravu vzorků před vlastním stanovením ve srovnání se zdlouhavou analýzou setem fy Boehringer a pracnou přípravu vzorků, která byla nezbytná pro možnost fotometrické detekce enzymové reakce. (Pro stanovení obsahu laktosy lze také použít volného enzymu β -galaktosidasy v kombinaci s biosenzorem na stanovení D-glukosy, jako už bylo dříve vyzkoušeno [11].)

Literatura

1. DAVÍDEK, J.—HRDLÍČKA, J.—POKORNÝ, J.—SEIFERT, J.—VELÍŠEK, J., Laboratorní příručka analýzy potravin. Praha, SNTL 1981, 238 s.
2. DAVÍDEK, J.—HRDLÍČKA, J.—POKORNÝ, J.—SEIFERT, J.—VELÍŠEK, J., Laboratorní příručka analýzy potravin. Praha, SNTL 1981, 252 s.
3. MASCINI, M.—IANNELLO, M.—PALLESCHI, G., Anal. Chim. Acta, 146, 1983, s. 135.
4. BERTRAND, C.—COULET, P. R.—GAUTHERON, C., Anal. Chim. Acta, 126, 1981, s. 23.
5. PILLOTON, R.—MASCINI, M.—CASELLA, I. G.—FESTA, M.—BOTTARI, E., Anal. Lett., 20, 1987, s. 1803.
6. Methods of Biochemical Analysis and Food Analysis. Mannheim, Boehringer 1986, 70 s.
7. VRBOVÁ, E.—MAREK, M., Anal. Chim. Acta, 239, 1990, s. 263.
8. COUGHLIN, R. V.—CHARLES, M., In: Immobilized Enzymes for Food Processing W. Pitcher (Ed.). Florida, CRS Press 1980, s. 153.
9. ABDULINA, I. N.—SAFONOVA, I. I.—KULIKOVA, A. K.—TIKHOMIROVA, A. S., Piščevoj Technol., 3, 1979, s. 131.
10. VASILISINA, V. S.—KHRUMTSOV, A. G.—CHEBOTRAREVA, N. G.—KUZNETSOV, V. S.—TIKHOMIROVA, A. S., Moločnaja Promyšlennost', II, 1979, s. 19.
11. VRBOVÁ, E.—MAREK, M.—BŘEZINA, P., Sbor. ÚVTIZ, Potravinářské vědy, 8, 1990, s. 161.

Do redakcie došlo 6. 8. 1990

Ферментный электрод для определения лактозы

Резюме

Ферментный электрод для определения лактозы был подготовлен коимобилизацией бета-галактосидазы, глюкозооксидазы и каталазы на частично гидролизованной наилоновой сетке ковалентной связью в присутствии циклогексизоцианида и глutarальдегида; носитель со связанными ферментами был фиксирован на поверхности кислородного детектора типа Кларка.

Подготовленный биосенсор был охарактеризован специфической активностью иммобилизованной бета-галактосидазы, областью линейной зависимости реакции ферментного электрода на концентрацию субстрата ($1-20 \text{ ммол} \cdot \text{дм}^{-3}$), минимой константой Михаэлиса ($K_{M(\text{app.})} = 9,99 \cdot 10^{-2} \text{ мол} \cdot \text{дм}^{-3}$) и стабильностью в зависимости от времени и количества сделанных анализов, далее было проверено влияние pH и температуры реакционной смеси на величину реакции.

Лактозный электрод был использован для определения доли лактозы в избранных изделиях молочной промышленности. Полученные данные были проверены с помощью фотометрического ферментного метода для определения лактозы и D-галактозы.

Enzyme electrode for the lactose determination

Summary

Enzyme electrode for the lactose determination has been prepared by co-immobilization of β -galactosidase, glucosidase and catalase on the partially hydrolyzed nylon net using the covalent bond at the presence of both cyclohexyl isocyanide and glutaraldehyde. A carrier with bound enzymes has been fixed on a surface of the Clark type oxygen sensor.

That biosensor has been characterized by specific activity of immobilized β -galactosidase, as well as by linear dependence of the enzyme electrode response on the substrate concentration ($1-20 \text{ mmol dm}^{-3}$), and by apparent Michaelis' constant ($K_{M(\text{app.})} = 9,99 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) and by the stability in dependence on both the time and the number of analyses. Moreover, pH influence and the influence of the reaction mixture temperature on the response intensity was studied.

The lactose electrode was used for the determination of the lactose content in some dairy products. These values have been verified by means of photometric enzyme method which is used for the determination of lactose and D-galactose, as well.