

Stanovenie glukózy a laktózy v mlieku mikrobiálnym biosenzorom

JÁN TKÁČ - JURAJ ŠVITEL

SÚHRN. V práci sme študovali možnosti použitia mikrobiálneho biosenzora na stanovenie glukózy a bimikrobiálneho biosenzora na stanovenie laktózy v mlieku. Zistili sme, že táto metóda vykazuje dobrú zhodu s klasickou metódou stanovenia glukózy a laktózy. Je to metóda vhodná na rýchle stanovenie glukózy i laktózy v mlieku a mliečnych výrobkoch.

Obsah sacharidov v mlieku je jedným z akostných ukazovateľov tohto výrobku. Mlieko obsahuje približne 4 % laktózy. Okrem laktózy sa v mlieku nachádzajú produkty jej hydrolýzy (glukóza, galaktóza) a laktulóza - produkt izomeračnej reakcie vznikajúci tepelným opracovaním mlieka pri vysokej teplote (UHT). Stanovenie obsahu laktózy je zvlášť dôležitý parameter v delaktózovanom mlieku, ktoré je určené pre konzumentov trpiacich laktózovou intoleranciou.

Na stanovenie laktózy v mlieku sa využívajú jej fyzikálne a chemické vlastnosti. Laktóza ako opticky aktívna látka otáča rovinu polarizovaného svetla, dá sa teda stanoviť polarimetricky [1]. Ďalšie metódy sú založené na princípe stanovenia redukujúcich cukrov, laktózu je možné stanoviť kolorimetricky, titračne alebo gravimetricky [2]. Všetky tieto metódy stanovenia sú zdĺhavé, pretože vzorku mlieka treba upravovať (separácia bielkovín, vápnika, tuku).

Z modernejších metód stanovenia laktózy by sme mohli uviesť stanovenie metódou infračervenej spektroskopie (MIR, NIR) a chromatografické stanovenie (GLC, HPLC) [3]. Pri týchto metódach je vo väčšine prípadov potrebné vzorku upravovať. Veľmi spoľahlivé a často používané je spektrofotometrické enzýmové stanovenie. Komerčne dostupné súpravy na stanovenie laktózy obsahujú enzým β -galaktozidázu, ktorá štiepi laktózu na glukózu a galaktózu. β -Galaktóza je oxidovaná enzýmom β -galaktózadehydrogenázou na kyselinu galaktónovú v prítomnosti NAD. Redukované množstvo NAD sa stanoví spektrofotometricky [2].

Ing. Ján TKÁČ, Ing. Juraj ŠVITEL, CSc., Katedra biochemickej technológie, Chemicko-technologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Biosenzory sú moderné analytické nástroje, ktorých použitie sa začalo v literatúre objavovať iba v nedávnom období. Pomocou biosenzora sa dajú stanoviť aj niektoré potravinársky významné látky napr. etanol, glukóza, sacharóza, kyselina mliečna, laktóza a ďalšie [4]. Výhody použitia biosenzorov sú vysoká citlivosť, špecificita, malé nároky na predúpravu vzorky, časová nenáročnosť a cena analýzy. Nevýhody sú predovšetkým často nízka stabilita a nedostatočná reprodukovateľnosť prípravy biosenzora. V prípade mikrobiálnych biosenzorov je nevýhodou aj možnosť interferencie iných látok.

Biosenzor sa skladá z biologickej časti (enzým, enzýmové systémy, bunky, časti tkanív alebo pletív, orgány, membrány, receptory, protilátky, kofaktory) v tesnom kontakte s prevodníkom (elektrochemický, optický, piezoelektrický, kalorimetrický). Meranie koncentrácie analyzovanej látky sa takto prevádza na meranie inej veličiny, napr. zmeny pH, koncentrácie kyslíka, teploty, alebo emisie žiarenia [5]. Prvý biosenzor, vyvinutý pred tridsiatimi rokmi, bol skonštruovaný z kyslíkovej elektródy s imobilizovanou glukózaoxidázou [6]. Táto kombinácia biokatalyzátor-senzor je veľmi frekventovaná, hlavne preto, že sa technicky ľahko realizuje. Meracia časť polarografickej kyslíkovej elektródy je uzavretá semipermeabilnou membránou, cez ktorú difunduje kyslík. Na túto membránu sa umiestňuje enzým oxidáza alebo dehydrogenáza stanovovaného analytu. Pokles v odozve signálu elektródy na kyslík je preto úmerný koncentrácii analyzovanej látky.

Biosenzory na stanovenie disacharidov sú obvyčajne založené na glukózaoxidáze a príslušnej disacharidhydroláze, napr. invertáze alebo β -galaktózidáze [7-10]. Použitie celých buniek namiesto enzýmov je zaujímavou alternatívou. Mikrobiálne biosenzory majú niektoré výhody oproti enzýmovým biosenzorom: sú menej citlivé na inhibítory, odolnejšie voči suboptimálnemu pH a teplote, sú lacnejšie, pretože príslušný enzým nie je potrebné izolovať a purifikovať. V literatúre boli nedávno popísané biosenzory na špecifické stanovenie glukózy, fruktózy a sacharózy s použitím permeabilizovaných buniek *Zymomonas mobilis* [11]. Celé bunky *Acetobacter sp.* boli už použité na prípravu laktátového senzora [12]. Bunky *Gluconobacter sp.* boli použité na prípravu etanolového senzora [13]. Bunky *Gluconobacter* sú vhodné aj na prípravu glukózového biosenzora, pretože obsahujú enzým glukózadehydrogenázu, ktorý účinne oxiduje glukózu [14]. V spojení s príslušnou hydrolázou možno tieto bunky použiť aj na stanovenie disacharidov obsahujúcich glukózu.

Naším cieľom bolo pripraviť jednoduchý laktózový biosenzor, s minimálnymi nákladmi a overiť možnosť jeho použitia na analýzu laktózy v mlieku, príp. v mliečnych výrobkoch. Zvolili sme koncepciu bimikrobiálneho biosen-

zora na báze buniek *Gluconobacter oxydans*, ktoré majú glukóza-dehydrogenázovú aktivitu a z permeabilizovaných buniek *Kluyveromyces marxianus*, obsahujúcich β -galaktozidázu.

Permeabilizácia buniek *Kluyveromyces marxianus* uľahčuje transport laktózy do vnútra bunky a produktov hydrolýzy laktózy, glukózy a galaktózy, z bunky von. Oba tieto monosacharidy sa oxidujú bunkami *Gluconobacter oxydans* za spotreby kyslíka [15]. Spotreba kyslíka sa zaznamená meraním na kyslíkovej elektróde. Pokles koncentrácie kyslíka je úmerný prírastku koncentrácie laktózy.

Materiál a metódy

Kultivácia mikroorganizmov

V práci sa použili mikroorganizmy *Gluconobacter oxydans* CCM 1783 a *Kluyveromyces marxianus* CCY 51-1-6. Na uchovávanie mikroorganizmov sa použili agary doporučované v katalógu kultúr. Na kultiváciu *Gluconobacter oxydans* sa použilo kultivačné médium nasledovného zloženia: glycerol 5 g.l⁻¹, kvasničný autolyzát (Imuna, Šarišské Michaľany) 5 g.l⁻¹.

Na kultiváciu *Kluyveromyces marxianus* CCY 51-1-6 sa použilo kultivačné médium tohto zloženia: laktóza 10 g.l⁻¹, kvasničný autolyzát 10 g.l⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 5 g.l⁻¹, KH₂PO₄ 1 g.l⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,5 g.l⁻¹.

Bunky sa pripravili aeróbnou kultiváciou pri teplote 28 °C na rotačnej trepačke. Na kultiváciu sa použili 500 ml kultivačné banky naplnené 100 ml média. Kvapalné kultivačné médium sa očkovalo zo šikmého agaru. Po dosiahnutí stacionárnej fázy rastu (12-16 h) sa bunky odstredili, premyli fyziologickým roztokom, rozsuspendovali v malom objeme fyziologického roztoku a táto suspenzia sa použila pri príprave biosenzorov. Koncentrácia buniek sa stanovila sušením do konštantnej hmotnosti a vyjadrila v g.l⁻¹ suchej váhy. Bunky *K. marxianus* sa pred vlastnou prípravou biosenzora permeabilizovali 15 min pri laboratórnej teplote v 15 % roztoku zmesi chloroform-etanol (1:9) [16]. Potom sa bunky odstredili a premyli fyziologickým roztokom.

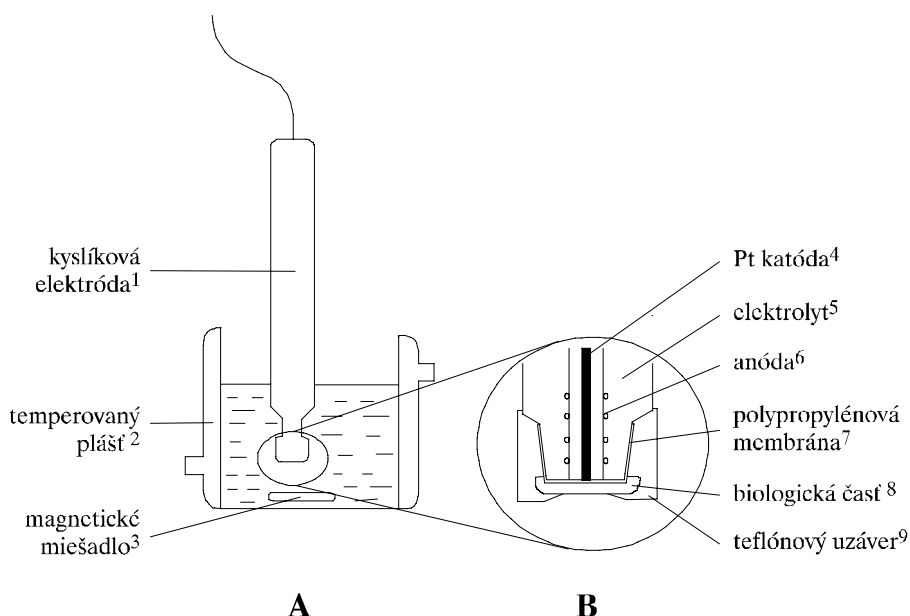
Príprava biosenzora

Bunky *G. oxydans* a *K. marxianus* rozsuspendované v zásobnom roztoku sa odstredili a rozsuspendovali v 10 % roztoku želatíny potravinárskej čistoty. K 100 μ l tejto suspenzie sa pridalo 50 μ l 5 % glutaraldehydu (Merck, Nemecko). Na suchú sklenenú podložku sa umiestnila viskózová tkanina hrúbky 0,15 mm so 125 vláknami na 1 cm. Na tkaninu sa naniesla rovno-

merná vrstva suspenzie. Množstvo nanesej suspenzie zodpovedalo 0,02 g želatíny na cm^{-2} . Takto pripravená membrána sa sietovala 24 hodín pri teplote 4 °C. Po zosieťovaní želatíny sa membrána opláchla vodou a opatrne odlepila zo sklenej podložky. Takto pripravená membrána sa skladovala v suchom stave pri teplote 4 °C. Pred vlastným meraním sa membránka ponorila do fyziologického roztoku na cca 30 minút a potom pripevnila hladkou stranou (odlepenou zo sklenej podložky) na katódu kyslíkovej elektródy. Membránka sa mechanicky fixovala teflónovým uzáverom.

Meranie biosenzorom

Na meranie sa použila kyslíková elektróda SOPS 533 (Chemoprojekt, Satalice) s polypropylénovou membránou hrúbky 30 μm , na ktorú sa umiestnila membrána s imobilizovanými bunkami. Na meranie signálu elektródy sa použil merací blok regulátora kyslíka z fermentora LF-2 (Vývojové dílny ČSAV, Praha). Meranie sa zaznamenávalo zapisovačom TZ 4620 (Laboratórní přístroje, Praha).



OBR. 1. Biosenzor.

FIG. 1. Biosensor.

A. Schéma experimentálneho usporiadania. B. Detail aktívnej časti biosenzora.

A. Experimental scheme. B. Detail of biosensoractive part. 1 - oxygen electrode, 2 - temperate basket, 3 - magnetic stirrer, 4 - Pt cathode, 5 - electrolyte, 6 - anode, 7 - polypropylene membrane, 8 - biological part, 9 - teflon closure.

Meranie prebiehalo v dvojplášťovej nádobke s magnetickým miešadlom, temperovanej na 30 °C. Schému experimentálneho zariadenia uvádzame na obr. 1. Pred meraním sa nádobka naplnila 20 ml 0,05 mol.l⁻¹ fosfátového tlmivého roztoku s hodnotou pH 6,4. Po vytemperovaní a nasýtení kyslíkom stlačeným vzduchom dáva biosenzor konštantný signál zodpovedajúci rozpustnosti kyslíka. Do nádobky sa pridal štandardný roztok stanovovanej látky (glukóza alebo laktóza) alebo meraná vzorka a po ustálení signálu (cca 5-7 minút) sa odčítal pokles signálu zodpovedajúci koncentrácii vzorky. Z takto nameraných hodnôt sa zostrojila analytická čiara. Priebeh signálu sa zaznamenával na zapisovači. Vzorky sa merali bez predúpravy, z čerstvo otvoreného malospotrebitelského balenia.

Enzýmové stanovenie glukózy a laktózy

Na enzýmové stanovenie glukózy i laktózy sa použil komerčný test (Lachema, Brno). Vo vzorkách mlieka sa pred stanovením vyražali proteíny Carresovými roztokmi

Pri stanovení laktózy sa najprv prítomná laktóza hydrolyzovala β -galaktozidázou a až potom nasledovalo čírenie Carresovými roztokmi. Na hydrolyzu sa použil potravinársky preparát β -galaktozidázy (Novo-Nordisk, Dánsko). Do mlieka sa pridal prebytok enzýmu (0,5 ml) s deklarovanou aktivitou 300 U.ml⁻¹ a hydrolyza sa nechala prebiehať 100 minút pri laboratórnej teplote.

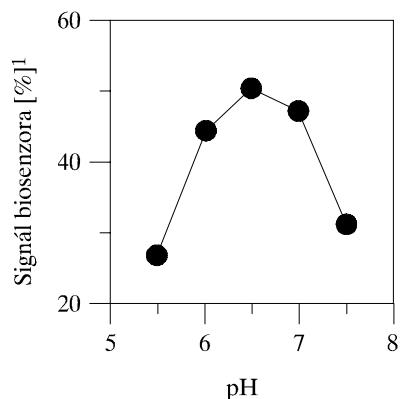
Výsledky a diskusia

Vplyv pH na odozvu biosenzora

Podľa našich praktických skúseností odozva biosenzorov nezávisí od typu použitého tlmivého roztoku, ale výrazne závisí od hodnoty pH, ako je to dokumentované na obr. 2. V ďalších meraniach používaných v tejto práci sa používal fosforečnanový tlmivý roztok s hodnotou pH 6,4. Rýchlosť odozvy závisí od množstva želatíny a citlivosť od množstva buniek použitých na prípravu membrány. Hodnoty použité v tejto práci (uvádzané v g.cm⁻²) sa našli empiricky tak, aby sa dosiahol vhodný kompromis medzi stabilitou, citlivosťou a rýchlosťou odozvy.

Kalibrácia, časová odozva a stabilita biosenzora

Bimikrobiálny laktózový biosenzor, obsahujúci bunky *G. oxydans* a *K. marxianus* reaguje na glukózu aj laktózu. Ak vzorka mlieka obsahuje voľnú glukózu, táto môže interferovať so stanovením laktózy. Koncentrácia

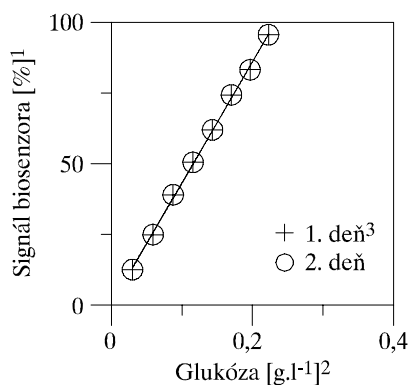


OBR. 2. Vplyv pH na odozvu biosenzora.
FIG. 2. The influence of pH on biosensor response.

1 - biosensor response.

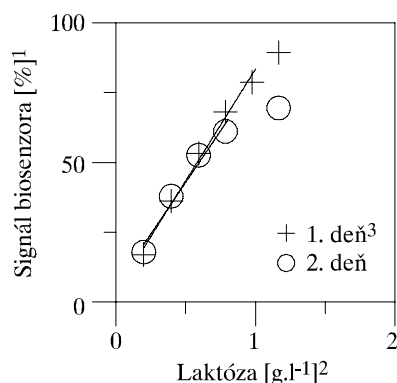
voľnej glukózy sa stanovila mikrobiálnym biosenzorom iba s bunkami *G. oxydans* (nereaguje na laktózu) a nameraná hodnota sa odčítala od obsahu laktózy. Analytickú čiaru na stanovenie glukózy uvádzame na obr. 3. Tento senzor je možné použiť na stanovenie voľnej glukózy v mlieku, mliečnych výrobkoch prípadne aj v iných potravinárskych výrobkoch, ktoré neobsahujú interferujúce látky. Možné interferujúce látky, ktoré sa môžu vyskytovať v potravinárskych výrobkoch sú etanol, glycerol, xylóza, sorbitol.

Z obr. 3. je vidieť, že citlivosť biosenzora na glukózu (smernica závislosti signálu biosenzora od koncentrácie glukózy) je na druhý deň rovnaká ako v prvý deň. Odozva bola lineárna v celom meranom rozsahu až po koncentráciu $0,22 \text{ g.l}^{-1}$ a nezmenila sa ani na druhý deň merania. Časová odozva biosenzora po prídavku glukózy bola asi 3 minúty.



OBR. 3. Analytická čiaru glukózového biosenzora. Na prípravu bola použitá koncentrácia buniek *G. oxydans* $0,83 \text{ mg.cm}^{-2}$.
FIG. 3. Calibration curve of glucose biosensor. It was prepared with cell concentration *G. oxydans* $0,83 \text{ mg.cm}^{-2}$.

1 - biosensor response, 2 - glucose, 3 - day.



OBR. 4. Kalibrácia laktózového biosenzora. Biosenzor bol pripravený s bunkami *G. oxydans* 0,75 mg.cm⁻² a *K. marxianus* 5,3 mg.cm⁻².

FIG. 4. Calibration of lactose biosensor. The biosensor was prepared with cells of *G. oxydans* 0,75 mg.cm⁻² a *K. marxianus* 5,3 mg.cm⁻².

1 - biosensor response, 2 - lactose, 3 - day.

Kalibráciu laktózového senzora dokumentuje obr. 4. Pred meraním vzoriek sa senzor nakalibroval na glukózu aj laktózu. Z obr. 4. je vidieť, že citlivosť laktózového biosenzora (smernica závislosti signálu biosenzora od koncentrácie laktózy) je približne rovnaká na druhý deň merania v porovnaní s hodnotou nameranou v prvý deň. V prvý deň merania má laktózový biosenzor oblasť linearity až po hodnotu 1,2 g.l⁻¹, avšak na druhý deň laktózový biosenzor reaguje lineárne len po hodnotu 0,8 g.l⁻¹. Tento pokles linearity laktózového biosenzora je spôsobený zmenami aktivity buniek *K. marxianus*, pretože bunky *G. oxydans*, použité na prípravu glukózového senzora nevykazujú zmenu vitality v prvých dvoch dňoch. Pokles vitality buniek *K. marxianus* bude spôsobený pravdepodobne permeabilizáciou buniek. Časová odozva laktózového biosenzora je asi 8 minút po prídavku laktózy. Rozdiel v časoch odozvy na glukózový a laktózový biosenzor je spôsobený prítomnosťou ďalších difúzných bariér v prípade laktózového biosenzora. Po 3 dňoch klesá citlivosť na laktózu na 50 % pôvodnej hodnoty pri uchovávaní biosenzora pri 4 °C. V prípade glukózového senzora (obr. 3.) je stabilita lepšia. Stabilitu, ktorá sa považuje za hlavný nedostatok biosenzorov, je možné zlepšiť optimalizáciou postupu imobilizácie, optimalizáciou podmienok merania atď. Vzhľadom k nízkej cene potrebných materiálov (želatína, bunky) považujeme za efektívnejší spôsob pripraviť pred meraním novú membránu, ktorá sa použije iba na niekoľko desiatok meraní.

Analýza vzoriek mlieka

Použitie biosenzora sme overili meraním laktózy a glukózy v dvoch vzorkách mlieka a namerané hodnoty sú v tabulkách 1. a 2.

Z tabuľky 1. je vidieť, že metóda stanovenia laktózy biosenzorom je vhodnou metódou, najmä, ak sa hodnota nameraná biosenzorom koriguje o hod-

TABULKA 1. Stanovenie laktózy v mlieku.
TABLE 1. Results of lactose determination in milk.

mlieko ¹	c laktózy [g.l ⁻¹] ^{2 a}	c laktózy [g.l ⁻¹] ^b	c laktózy [g.l ⁻¹] ^c
vzorka ³ 1	45,8	46,0	46,6
		47,8	48,4
vzorka 2	44,8	44,8	45,4
		46,2	46,8

a - obsah laktózy stanovený fotometricky po hydrolýze laktózy, b - obsah laktózy stanovený biosenzorom po odčítaní interferencie spôsobenej glukózou, c - obsah laktózy stanovený s interferenciou glukózy.

1 - milk, 2 - c of lactose [g.l⁻¹], 3 - sample, a - content of lactose determined by a spectrophotometric assay after hydrolysis of lactose, b - content of lactose determined by biosensor as the result of a postdifferential measurement, c - content of lactose corresponding to the total response of the biosensor (including interference of glucose).

TABULKA 2. Stanovenie glukózy v mlieku.
TABLE 2. Results of glucose determination in milk.

mlieko ¹	c glukózy [g.l ⁻¹] ^{2 a}	c glukózy [g.l ⁻¹] ^b
vzorka ³ 1	0,06	0,07
		0,25
vzorka 2	0,03	0,06
		0,21

a - obsah glukózy stanovený fotometricky, b - obsah glukózy stanovený biosenzorom.

1 - milk, 2 - c of glucose [g.l⁻¹], 3 - sample, a - content of glucose determined by a spectrophotometric assay, b - content of glucose determined by biosensor.

notu interferencie na glukózu, nachádzajúcu sa v mlieku. Z tabuľky 2. je vidieť, že množstvo glukózy stanovené biosenzorom sa líši od hodnoty glukózy stanovenej fotometricky. Je to pravdepodobne spôsobené tým, že okrem glukózy sa v mlieku nachádzajú aj iné oxidovateľné látky.

Literatúra

1. ČVAK, Z.: Chemické a fyzikálně chemické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků. Praha, VÚPP-SPI 1992. s. 221.
2. KLEYN, D. H.: Determination of lactose by an enzymatic method. J. Dairy Sci., 68, 1985, č. 10, s. 2791-2798.
3. WEST, L. G.: High performance liquid chromatographic determination of lactose in milk. J. Assoc. anal. Chem., 64, 1981, č. 4, s. 805-807.
4. SEVERS, A. H.: Biosensors for food analysis. Trends Fd Sci. Technol., 58, 1994, č. 7, s. 230-232.
5. BYFIELD, M. P.: Review. Biochemical aspects of biosensors. Biosens. Bioelectron., 9, 1994, č. 4-5, s. 373-400.
6. CLARK, L. C.: Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Ann. N. Y. Acad. Sci., 102, 1962, č. 1, s. 29-45.
7. FILIPIAK, M.: Enzymatic membranes for determination of some disaccharides by means of oxygen electrode. Biosens. Bioelectron., 11, 1996, č. 4, s. 355-364.
8. KRYSŤEVA, M.: Multienzyme membranes for biosensors. J. chem. Technol. Biotechnol., 54, 1992, č. 1, s. 13-18.
9. ALBERY, W. J.: Amperometric enzyme electrodes. Part VI. Enzyme electrodes for sucrose and lactose. J. Electroanal. Chem., 325, 1992, s. 83-93.
10. WATANABE, E.: Development of biosensors for the simultaneous determination of sucrose and glucose, lactose and glucose, and starch and glucose. Biotechnol. Bioengng, 38, 1991, s. 99-103.
11. PARK, J. K.: Flow injection analysis of glucose, fructose, and sucrose using a biosensor constructed with permeabilised *Zimomonas mobilis* and invertase. Biotechnol. Progr., 11, 1995, č. 1, s. 58-63.
12. LUONG, J. H. T.: The development of an amperometric microbial biosensor using *Acetobacter pasteurianus* for lactic acid. J. Biotechnol., 10, 1989, s. 241-252.
13. ŠVITEL, J.: Stanovenie etanolu v pive biosenzorom. Kvasný Prům., 42, 1996, č. 7-8, s. 241.
14. RESHETILOV, A. N.: Evaluation of a *Gluconobacter oxydans* whole cell biosensor for amperometric detection of xylose. Biosens. Bioelectron., 12, 1997, č. 3, s. 241-242.
15. SMOLANDER, M.: Large-scale applicable purification and characterization of a membrane-bound PQQ-dependent aldose dehydrogenase. J. Biotechnol., 29, 1993, s. 287-297.
16. CHAMPLUVIER, B.: Preparation and properties of β -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces sp.* Enzyme Microb. Technol., 10, 1988, č. 10, s. 611-617.

Do redakcie došlo 13.6.1997.

Determination of glucose and lactose in milk by a microbial biosensor

TKÁČ, J. - ŠVITEL, J.: Bull. potrav. Výsk., 36, 1997, p. 113-121.

SUMMARY. The possibility of utilization of a microbial biosensor for glucose determination and a bimicrobial biosensor for lactose determination in milk was studied. Good correspondence of the biosensor method with the classic method of glucose and lactose determination was observed. The method presented is suitable for rapid determination of glucose and lactose in milk and in dairy products without sample pretreatment.