

POROVNANIE ANALÝZ ZLOŽIEK VÍNA, PIVA A INÝCH NÁPOJOV BIOSENZORMI S REFERENČNÝMI ANALYTICKÝMI METÓDAMI

JÁN TKÁČ, JURAJ ŠVITEL, ERNEST ŠTURDÍK, Katedra biochemickej technológie, STU, Bratislava

Kľúčové slová: biosenzor, víno, pivo, nápoje, etanol, sacharidy, organické kyseliny, glycerol, fosfát, siričitany

1. ÚVOD

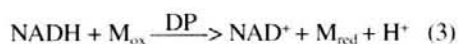
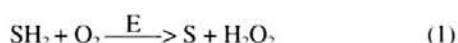
Vývoj biosenzorov od konštrukcie prvého biosenzora v roku 1962 Clarkom a Lyonsom [1] je prudko sa rozvíjajúca oblasť, čo možno dokumentovať aj tým, že od roku 1985 vychádza časopis *Biosensors and Bioelectronics*, ktorý sa venuje výhradne vývoju a aplikáciám biosenzorov. Dôvodom, prečo k prudkému rozvoju biosenzorov dochádza až v posledných 15 rokoch, 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), 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 zatiaľ bránia masovejším využitiam, sú: nízka stabilita biologickej časti (enzýmu), nie sú to štandardné metódy požadované normami, paleta analytov stanoviteľných biosenzorom je limitovaná komerčnou dostupnosťou enzýmov.

V potravinárskom priemysle si biosenzory nachádzajú svoje miesto pri hodnotení kvality potravín stanovením kontaminácií, čerstvosti výrobkov, šetrnosti spracovania i vhodného skladovania výrobkov. V oblasti biotechnológií biosenzory nájdu uplatnenie pri monitorovaní a kontrole procesu fermentácie a vďaka možnosti zasahovať a riadiť proces prakticky v reálnom čase.

2. PRINCÍP

Biosenzor pozostáva z dvoch častí: biologickej (najčastejšie enzým) a prevodníka (najčastejšie amperometrický detektor). Amperometrický prevodník je schopný detegovať zmeny, ktoré vznikajú pri interakcii enzýmu so stanovovanou látkou (SH_2) tak, že táto biointerakcia sa prevádza na zmenu prúdu. Veľkosť zmeny prúdu je potom úmerná koncentrácii stanovovanej látky.

Pri konštrukcii biosenzorov sa najčastejšie využívajú oxidázy, ktorých činnosť si môžeme priblížiť rovnicou (1) a dehydrogenázy, ktoré sú NAD-dependentné (NAD = nikotinamidadenindinukleotid), kde ako akceptor elektrónov vystupuje iná látka ako kyslík, zvaná mediátor (M). Redukovaný kofaktor sa regeneruje enzýmom diaforázou (DP) – rovnice (2) a (3).



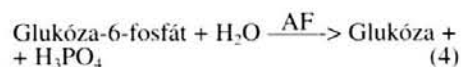
kde S je stanovovaná látka, E je príslušný enzým

Prvá reakcia sa dá biosenzorom monitorovať dvoma spôsobmi:

1. Kyslíkovou elektródou sa stanoví úbytok kyslíka, ktorý je úmerný koncentrácii stanovovanej látky
2. Amperometricky sa deteguje vznikajúci peroxid vodíka, prúd tečúci elektródou je úmerný koncentrácii stanovovanej látky.

Pri druhej reakcii sa redukovaný mediátor oxiduje na povrchu elektródy, čo vyvolá tok prúdu, ktorý je úmerný koncentrácii stanovovanej látky.

Najčastejšie stanovovanými látkami vo víne, pive a nápojoch sú etanol, cukry (glukóza, fruktóza, sacharóza), kyseliny (mliečna, jablčná, šťavelová), glycerol, siričitany a fosfát. Všetky tieto látky sa dajú stanoviť podľa rovníc (1) – (3), výnimkou je stanovenie sacharózy, keď je najprv potrebné tento disacharid rozštiepiť na glukózu a fruktózu a vznikajúca glukóza sa stanoví spôsobom popísaným v rovniciach (1) alebo (2) a (3). V prípade stanovenia fosfátov vo vzorkách sa využíva inhibičný efekt fosfátových iónov na priebeh reakcie, pri ktorej je glukóza-6-fosfát premieňaný na glukózu kyslou fosfatázou (AK), reakcia (4).



Glukóza reaguje s glukózooxidázou podľa rovnice (1) za spotreby kyslíka. Prítomný fosfát vo vzorke pôsobí inhibične a posúva rovnováhu (4) na ľavú stranu, čím sa uvoľní menej glukózy, čo sa prejaví vzrastom koncentrácie kyslíka a teda aj prúdu. Okrem amperometrických prevodníkov sa často využívajú aj potenciometrické (pH elektróda), optické a entalpické detektory. Potenciometrickými detektormi sa meria zmena potenciálu, alebo pH, optickými zmena absorbancie, emisie svetla, fluorescencie atď, entalpickými zmena entalpie počas reakcie.

Biosenzor musí byť skonštruovaný tak, aby biologická časť bola v čo možno najtesnejšom kontakte s prevodníkom. V prípade biosenzorov skonštruovaných na detekciu látok nachádzajúcich sa v nápojoch bol biologický materiál:

1. **adsorbovaný** priamo na elektródu, uhlíkovú čerň, sklovitý uhlík, filtračný papier,

membránový filter, tenký rez zemiaka, atď.
2. **uchytený v matrici** zo želatíny, hovädzieho sérového albumínu, kolagénu, polymetakrylátu, polypyrólu, polyvinylalkoholu, polyakrylamidu, v tele uhlíkovej pastovej elektródy, v tele organickej vodivej soli, screen-printing technológiou (zmes uhlíkoveho prášku, enzýmu v pufrí a ďalších látok vytlačená najčastejšie na PVC substrát), atď.

3. **kovalentne uchytený** na sklenené a uhlíkové častice, nylonové, polyamidové a modifikované celulózoové membrány, atď.

4. **mechanicky uchytený** medzi dve membrány, v tele mikrodialyzačnej membrány, atď

3. STANOVENIE ALKOHOLOV

Najčastejšie sa vyskytujúci alkoholmi v nápojoch sú etanol a glycerol. Etanol je najdôležitejším akostným ukazovateľom alkoholických nápojov, a preto je dôležité jeho monitorovanie. Glycerol je látkou, ktorá zjemňuje chuť nápojov, a preto jeho množstvo ovplyvňuje predovšetkým senzorké charakteristiky nápojov.

3.1 Etanol

Na prípravu etanolových biosenzorov boli použité enzýmy alkoholoxidáza a alkoholdehydrogenáza, ale aj intaktné bunky *Gluconobacter oxydans*, s vysokou aktivitou alkoholdehydrogenázy. Etanol sa oboma týmito enzýmami oxiduje na kyselinu octovú podľa rovníc (1) alebo (2) a (3), prúd tečúci elektródou je úmerný koncentrácii etanolu vo vzorke. Porovnanie stanovenia etanolu biosenzormi s referenčnými metódami je v tabuľke 1. Na konštrukciu etanolového biosenzora bol výlučne použitý amperometrický detektor. Stanovenie etanolu v reálnych vzorkách biosenzorom je len o niečo menej presnejšie (smerodajná odchýlka 1,8–6,7%) než použitými referenčnými metódami (smerodajná odchýlka 1,3–5,5%), pričom odchýlka pri štandardnej pyknometrickej (destilačnej) metóde je pod 1%. Odchýlka stanovenia biosenzormi je väčšinou spôsobená nešpecifitou enzýmu, ktorý, ako už sám názov napovedá, je schopný oxidovať viacero alkoholov (etanol, 1-propanol, 2-propanol, butanol) [6].

3.2 Glycerol

Na konštrukciu glycerolového biosenzora bol imobilizovaný enzým glyceroldehydrogenáza, ktorý oxiduje glycerol na dihydroxyacetón, podľa rovníc (2) a (3) a elektróny pochádzajúce zo substrátu sú vedené cez mediátor na elektródu a prúd ňou tečúci je úmerný koncentrácii glycerolu vo vzorke. Glycerol bol detegovaný potencio-

Tab. 1 Porovnanie stanovenia etanolu biosenzorom a referenčnou analytickou metódou

Vzorka	Počet vzoriek (počet meraní každej vzorky)	Ref. metóda	Priemerná odchýlka medzi stanovením biosenzorom a ref. metódou v %	Detekčný limit mmol	Citácia
červené víno	7/3	SF	1,79	–	5
biele víno	7/3	SF	2,24	–	5
pivo	2/3	SF	2,57	–	4
biele víno	1/3	SF	<0,01	–	4
červené víno	1/3	SF	0,92	–	4
alk. nápoj	1/7	GC	3,66	–	6
pivo	–	GC	$r = 0,994^a$	–	3
pivo	4/1	SF	15,32 ^b	0,085	2
víno	3/1	SF	28,57 ^b	0,085	2
pivo	2/1	GC	0,75	–	7

a – korelačný koeficient medzi stanovením biosenzorom a referenčnou metódou, b – biosenzor bez použitia membrány, – nepublikovaný údaj, SF – spektrofotometria, GC – plynová chromatografia

Tab. 2 Porovnanie stanovenia glycerolu biosenzorom a referenčnou analytickou metódou

Vzorka	Počet vzoriek (počet meraní každej vzorky)	Ref. metóda	Priemerná odchýlka medzi stanovením biosenzorom a ref. metódou v %	Citácia
červené víno	2/5	SF	1,46	8
biele víno	4/5	SF	1,76	8
pivo	3/5	SF	1,52	8

SF – spektrofotometria

metricky cez protóny vznikajúce oxidáciou glycerolu, čo je zrejme z rovníc (2) a (3). V tomto prípade je signál (potenciál) úmerný logaritmu koncentrácie stanovovanej látky. Porovnanie analýz glycerolu biosenzorom a referenčnou analytickou metódou je uvedené v tabuľke 2.

genázovou aktivitou. V oboch týchto prípadoch sa glukóza oxiduje na kyselinu glukónovú odovzdaním elektrónov, ktoré spôsobia tok prúdu elektródou. Veľkosť prúdu je úmerná koncentrácii glukózy vo vzorke. Glukóza bola stanovená aj potenciometricky stanovením protónov vznikajúcich oxidáciou

Tab. 3 Porovnanie stanovenia glukózy biosenzorom a referenčnou analytickou metódou

Vzorka	Počet vzoriek (počet meraní každej vzorky)	Ref. metóda	Priemerná odchýlka medzi stanovením biosenzorom a ref. metódou v %	Detekčný limit mmol	Citácia
biele víno	3/3	SF	3,47	–	15
červené víno	2/3	SF	25,45 ^a	–	15
biele víno	3/2	SF	8,01 ^a	–	9
červené víno	2/2	SF	13,13 ^a	–	9
džus	28/3	SF	3,43	–	10
nealk. nápoje	7/3	SF	2,23	–	11
nealk. nápoje	4/7	SF	2,49	–	12
biele víno	1/1	SF	42,50	–	13
nealk. nápoje	2/1	SF	2,23	–	13
víno	5/1	SF	7,94	–	14
pivo	4/1	SF	12,50 ^a	0,005	2
víno	3/1	SF	23,04 ^a	0,005	2

a – meranie vzoriek (-y) zatažené veľkou chybou spôsobenou nízkym obsahom glukózy vo vzorke, SF – spektrofotometria

4. ANALÝZA CUKROV

Cukry sú prirodzenou súčasťou nápojov, v prípade nealkoholických sú dominantnou zložkou, a preto veľmi významne ovplyvňujú ich vlastnosti. Vyskytujú sa v podobe monosacharidov, disacharidov, oligosacharidov i polysacharidov, ale najdôležitejšími z hľadiska charakterizácie vzoriek sú glukóza, fruktóza a sacharóza.

4.1 Glukóza

V prípade glukózového biosenzora sa temer výlučne využíva enzým glukózaoxidáza a na konštrukciu mikrobiálnych biosenzorov bunky *Aspergillus niger*, s vysokým obsahom enzýmu glukózaoxidázy a *Gluconobacter oxydans* s vysokou glukózaohydro-

glukózy glukózaohydrogenázou a regeneráciou redukovaného NAD, čo je zrejme z rovníc (2) a (3). Glukóza je najčastejšie stanovovaným analytom. Porovnanie stanovenia glukózy v nápojoch biosenzorom a spektro-

fotometrickej metódy je uvedené v Tabuľke 3. Stanovenie glukózy v reálnych vzorkách biosenzorom je presnejšie (odchýlka 0,5–4,6 %) než štandardnými metódami (odchýlka 2,7–7,7 %). Tento rozdiel je spôsobený tým, že pri najčastejšie používanej referenčnej analytickej metóde – spektrofotometrii interferujú zložky vzoriek, prípadne sa mení koncentrácia analytov vplyvom úpravy vzorky.

4.2 Fruktóza

Pri príprave fruktózového biosenzora bol použitý enzým fruktózaohydrogenáza, ktorý oxiduje fruktózu na 5-keto-fruktózu, podľa rovníc (2) a (3) odovzdaním elektrónov elektróde cez mediátor. Zmena prúdu bola detegovaná amperometricky. Stanovenie fruktózy vo vzorkách nápojov je prehľadne spracované v tabuľke 4. Stanovenie fruktózy v reálnych vzorkách biosenzorom je presnejšie (odchýlka približne 0,8 %) než štandardnými metódami (odchýlka približne 3 %).

4.3 Sacharóza

Enzýmový sacharózový biosenzor pozostáva z troch enzýmov: invertázy, glukózaohydrogenázy a mutarotázy. V prvom kroku sa sacharóza hydrolyzuje na fruktózu a alfa-glukózu invertázou, ktorá sa v druhom kroku izomerizuje mutarotázou na beta-glukózu, ktorá je substrátom pre glukózaohydrogenázu. Oxidáciu glukózy sa elektróny prenášajú na elektródu podľa rovnice (1). Veľkosť prúdu, ktorý tečie elektródou, je úmerný koncentrácii sacharózy vo vzorke. Bol skonštruovaný aj hybridný glukózový biosenzor s bunkami *Zymomonas mobilis*, ktoré obsahujú enzým glukóza-fruktózaohydrogenázou, a invertázou s podobným princípom, ako v prípade enzýmového biosenzora. Potenciometricky bola detegovaná sacharóza cez protóny, ktoré vznikajú oxidáciou glukózy bunkami *Z. mobilis*. Porovnanie stanovenia sacharózy biosenzorom a referenčnou analytickou metódou je v tabuľke 5.

5. DETERMINÁCIA KYSELÍN

Nižšie organické kyseliny sú produktom mikrobiálnej fermentácie a aj súčasťou surovín, preto sa v nápojoch nachádzajú v nezanedbateľných množstvách a ovplyvňujú najmä chuťové vlastnosti nápojov, predovšetkým vín. V najväčšom množstve sa nachádzajú kyselina mliečna, jablčná a šťavelová.

5.1 Kyselina mliečna

Na stanovenie kyseliny mliečnej boli použité enzýmy D a L-laktátdehydrogenáza

Tab. 4 Porovnanie stanovenia fruktózy biosenzorom a referenčnou analytickou metódou

Vzorka	Počet vzoriek (počet meraní každej vzorky)	Ref. metóda	Priemerná odchýlka medzi stanovením biosenzorom a ref. metódou v %	Detekčný limit mmol	Citácia
víno	5/3	SF	4,50	–	15
víno	1/5	LC	2,54	0,001	18
nealk. nápoje	3/5	LC	0,35	0,001	18
nealk. nápoje	4/1	SF	1,63	–	19
džus	2/3	SF	1,40	–	16
džus	7/3	SF	4,79	–	17

SF – spektrofotometria, LC – kapalinová chromatografia

Tab. 5 Porovnanie stanovenia sacharózy biosenzorom a referenčnou analytickou metódou

Vzorka	Počet vzoriek (počet meraní každej vzorky)	Ref. metóda	Priemerná odchýlka medzi stanovením biosenzorom a ref. metódou v %	Detekčný limit mmol	Citácia
nealk. nápoj	4/7	SF	2,40	–	12
nealk. nápoj	5/1	SF	0,26	0,0002	21
nealk. nápoj	2/3	HPLC	2,65	–	22
nealk. nápoj	5/1	SF	4,76	–	20

SF – spektrofotometria, HPLC – vysokoučinná kapalinová chromatografia

Tab. 6 Porovnanie stanovenia laktátu biosenzorom a referenčnou analytickou metódou

Vzorka	Počet vzoriek (počet meraní každej vzorky)	Ref. metóda	Priemerná odchýlka medzi stanovením biosenzorom a ref. metódou v %	Detekčný limit mmol	Citácia
červené víno	4/3	SF	3,70	0,01	12
biele víno	1/3	SF	2,42	0,01	21
víno	14/3	HPLC	9,64	–	22
vzorka	4/1	SF	2,28	–	20
nealk. nápoj	5/5	SF	2,84	0,025	24
nealk. nápoj	5/1	SF	2,21	0,0001	25
nealk. nápoj	2/3	SF	5,07	–	26
nealk. nápoj ^a	2/3	SF	1,69	–	23

a – stanovenie D-laktátu, SF – spektrofotometria, HPLC – vysokoučinná kapalinová chromatografia

a L-laktát oxidáza, ktoré kyselinu mliečnu oxidujú na kyselinu pyrohroznú a prenos elektrónov zo substrátu je analogický ako v predchádzajúcich prípadoch. Na detekciu žiarenia emitovaného oxidáciou luminolu vznikajúcim peroxidom vodíka bol použitý optický prevodník. Porovnanie analýz kyseliny mliečnej biosenzorom a referenčnou analytickou metódou je uvedené v tabuľke 6. Stanovenie laktátu v reálnych vzorkách biosenzorom je presnejšie (odchýlka 2,3–3,4%) než štandardnými metódami (odchýlka približne 4,7%).

5.2 Kyselina jablčná

Na konštrukciu malátového biosenzora bol použitý enzým L-malátdehydrogenáza a bunky *Pseudomonas putida*. Obe biologické komponenty oxidujú kyselinu jablčnú na kyselinu oxáloctovú, pričom uvoľnené elektróny sú detegované amperometricky. Porovnanie analýz kyseliny jablčnej biosenzorom a referenčnou analytickou metódou je

uvedené v tabuľke 7. Veľká odchýlka medzi stanovením biosenzorom a referenčnou analytickou metódou vo vzorkách červených vín (42,9%), je spôsobená nízkou koncentráciou kyseliny jablčnej vo vzorkách (okolo 0,1 g/l).

5.3 Kyselina šťavelová

Na konštrukciu biosenzora na stanovenie kyseliny šťavelovej bol použitý enzým oxalát oxidáza, ktorá oxiduje kyselinu šťavelovú na oxid uhličitý, za spotreby kyslíka, ktorá je detegovaná kyslíkovou elektródou. Tento biosenzor pracoval iba s 3 % relatívnu štandardnou odchýlkou. Pri analýze vzoriek nealkoholických nápojov bola ako referenčná metóda použitá spektrofotometrická metóda. Priemerná odchýlka medzi oboma metódami bola 30,95% [29].

6. STANOVENIE OSTATNÝCH ZLOŽIEK

Okrem už spomínaných zložiek sa v nápojoch vyskytujú aj iné látky, ktoré ovplyv-

ňujú ich charakter, ďalej sa budeme zaoberať anorganickými látkami, ako sú siričitany a fosfáty. Maximálna prípustná koncentrácia siričitanov vo vínach je určená príslušnou normou, takže je potrebné rýchlo určiť ich koncentráciu vo vínach.

6.1 Siričitany

Siričitanový biosenzor bol pripravený imobilizáciou sulfitoxidázy, alebo buniek *Thiobacillus thiooxidans*, ktoré tento enzým obsahujú. Základným princípom je oxidácia siričitanov na sírany, za súčasného uvoľnenia peroxidu vodíka, ktorý bol detegovaný amperometricky. V kyslom prostredí vzniká zo síranov kyselina sírová, ktorá je silnejšia ako kyselina siričitá, čo sa prejaví poklesom pH, ktoré bolo monitorované potenciometricky. Vhodnosť použitia siričitanového biosenzora bola overená porovnaním stanovenia biosenzorom a referenčnou analytickou metódou. Výsledok je v tabuľke 8.

6.2 Fosfát

Biosenzor bol pripravený imobilizáciou enzýmu glukózo oxidázy na tenký rez zemiaka, ktorý je zdrojom enzýmu kyslej fosfatázy. Tento enzým hydrolyzuje glukóza-6-fosfát za vzniku glukózy, ktorá je substrátom pre glukózo oxidázu. Kyslíkovou elektródou sa stanovil úbytok kyslíka potrebného na oxidáciu glukózy. V prípade, že vzorka obsahovala fosfát, rovnováha hydrolyzy glukóza-6-fosfátu sa posunula naľavo, čo sa prejavilo nižšou koncentráciou glukózy a teda vyššou koncentráciou kyslíka. Biosenzor pracoval s presnosťou 1,7%. Vzorka červeného vína bola stanovená biosenzorom aj referenčnou spektrofotometrickou metódou a odchýlka medzi nimi bola 3,53% [33].

6.3 Ďalšie analyty

Okrem už spomínaných analytov by sa vo vzorkách nápojov dali stanoviť mnohé iné látky, ako maltóza, oligosacharidy, vitamín C, aminokyseliny, reziduá pesticídov, dusičnany, fluoridy, vápnik, draslík a mnohé ďalšie.

7. ZÁVER

Stanovenie alkoholov (etanol, glycerol), sacharidov (glukóza, fruktóza, sacharóza), organických kyselín (mliečna, jablčná, šťavelová) a anorganických látok (siričitany, fosfát) bolo v mnohých prípadoch presnejšie ako stanovenie referenčnou analytickou metódou, pričom odchýlka medzi oboma metódami sa najčastejšie pohybovala v rozsahu od 2% do 6%. Pričom analýza biosenzorom sa vyznačuje väčšou rýchlosťou (čas odozvy zvyčajne do 3 minút) a takmer žiadnou predúpravou vzorky. Na stabilitu pozitívne vplyva imobilizácia enzýmu do uhlíkovej pastovej elektródy a koimobilizácia spolu s hovädzím sérovým albumínom, kedy si biosenzory zachovávajú takmer pôvodnú aktivitu niekoľko mesiacov. Veľmi stabilnými sú mikrobiálne biosenzory (*Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pseudomonas putida*, *Thiobacillus thiooxidans*), ktoré si uchovávajú 100% aktivitu až tri mesiace, skladovaním pri 4 °C.

Tab. 7 Porovnanie stanovenia malátu biosenzorom a referenčnou analytickou metódou

Vzorka	Počet vzoriek (počet meraní každej vzorky)	Ref. metóda	Priemerná odchýlka medzi stanovením biosenzorom a ref. metódou v %	Detekčný limit mmol	Citácia
červené víno	4/3	HPLC	42,86	0,01	15
biele víno	1/3	HPLC	12,90	0,01	15
mušt	4/1	SF	2,95	0,0005	28
mušt	4/1	SF	4,89	0,1 ^a	27

a – hodnota v g/l, SF – spektrofotometria, HPLC – vysokoučinná kapalinová chromatografia

Tab. 8 Porovnanie stanovenia sulfitu biosenzorom a referenčnou analytickou metódou

Vzorka	Počet vzoriek (počet meraní každej vzorky)	Ref. metóda	Priemerná odchýlka medzi stanovením biosenzorom a ref. metódou v %	Detekčný limit mg/l	Citácia
biele víno	3/1	Monier-Williams	1,58	1	31
červené víno	3/1	metóda	1,17	1	31
růžové víno	3/1	metóda	2,07	1	31
červené víno	1/1	modifikovaná Rankinova	14,87	5	32
biele víno	1/1	metóda	3,94	5	32
nealk. nápoje	1/1	SF	0,98 ^a	–	30

a – hodnota v g/l, SF – spektrofotometria

Na našom pracovisku sa pár rokov venuje problematike prípravy a využitia biosenzorov. Okrem už spomínaného biosenzora na stanovenie etanolu vo vzorkách piva [7], boli skonštruované mikrobiálne biosenzory na stanovenie glukózy, sacharózy a laktózy [34], kyseliny citrónovej [35], ale aj na analýzu glukózy a laktózy vo vzorkách mlieka [36]. V súčasnosti sa rieši problematika využitia biosenzora pri monitorovaní fermentácie lignocelulózových hydrolyzátov. V budúcnosti plánujeme konštrukciu selektívnych mikrobiálnych biosenzorov na stanovenie etanolu a glycerolu vo vzorkách nápojov.

8. LITERATÚRA

- [1] CLARK, L. C. Z, LYONS, C.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **102**, 1962, s. 29.
- [2] MAYER, M., RUZICKA, J.: Anal. Chem. **68**, 1996, s. 3808.
- [3] KITAGAWA, Y., et al.: Anal. Chem. **63**, 1991, s. 2391.
- [4] BOUJTITA, M., CHAPLEAU, M., MURR, N.: Anal. Chim. Acta **319**, 1996, s. 91.
- [5] KATRÍK, J., et al.: Biosens. Bioelectron. **13**, 1998, s. 181.
- [6] SPRULES, S.D., et al.: Anal. Chim. Acta **329**, 1996, s. 215.
- [7] ŠVITEL, J., ČURILLA, O.: Kvasný Prum. **42**, 1996, s. 241.
- [8] PRODRONIDIS, M. I., et al.: Talanta **43**, 1996, s. 27.
- [9] ŠVORC, J., et al.: Anal. Chem. **69**, 1997, s. 2086.
- [10] VÁRADI, M., ADÁNYI, N., SZABÓ, E. E.: Acta Aliment. **24**, 1995, s. 365.
- [11] CENTONZE, D., ZAMBONIN, G.C., PALMISANO, F.: J. AOAC Int. **80**, 1997, s. 829.
- [12] CHEN, R.L.C., MATSUMOTO, K.: Biosci. Biotech. Biochem. **59**, 1995, s. 813.
- [13] BLUM, L.C.: Enzyme Microb. Technol. **15**, 1993, s. 407.
- [14] DREMEL, B. A. A., SCHAFFAR, B. P. H., SCHMID, R. D.: Anal. Chim. Acta **225**, 1989, s. 293.
- [15] KATRÍK, J.: *Dizertačná práca*, ČHTF STU, Bratislava, 1997.
- [16] IKEDA, T., MATSUSHITA, F., SENDA, M.: Biosens. Bioelectron. **6**, 1991, s. 299.
- [17] XIE, X., KUANG, S. S., GUIBAULT, G. G.: Biosens. Bioelectron. **6**, 1991, s. 49.
- [18] KIBA, N., INOUE, Y., FURUSAWA, M.: Anal. Chim. Acta **243**, 1991, s. 183.
- [19] MATSUMOTO, K., et al.: Anal. Chem. **58**, 1986, s. 2732.
- [20] XU, Y., GUIBAULT, G. G.: Anal. Chem. **61**, 1989, s. 782.
- [21] KOGURE M., et al.: Anal. Chim. Acta **337**, 1997, s. 107.
- [22] PARK, J.-K., RO, H.-S., KIM, H.-S.: Biotechnol. Bioeng. **38**, 1991, s. 217.
- [23] MONTAGNÉ, M., MARTY, J.-L.: Anal. Chim. Acta **315**, 1995, s. 297.
- [24] MAZZEI, F., et al.: Food Chem. **55**, 1996, s. 413.
- [25] MIZUTANI, F., YABUKI, S., HIRATA, Y.: Anal. Chim. Acta **314**, 1995, s. 233.
- [26] KIM, N., HAGINOYA, R., KARUBE, I.: J. Food Sci. **61**, 1996, s. 286.
- [27] PALLESCHI, G. et al.: Talanta **41**, 1994, s. 917.
- [28] MESSIA, M. C., et al.: Anal. Chem. **68**, 1996, s. 360.
- [29] ASSOLANT-VINET, C. H., BARDELLETTI, G., COULET, P. R.: Anal. Lett. **20**, 1987, s. 513.
- [30] SMITH, V. J.: Anal. Chem. **59**, 1987, s. 2256.
- [31] KAWAMURA, Y.: J. AOAC Int. **77**, 1994, s. 1052.
- [32] NAKAMURA, K.: Biosci. Biotech. Biochem. **57**, 1993, s. 379.
- [33] CAMPANELLA, L., et al.: Food Chem. **44**, 1992, s. 291.
- [34] ŠVITEL, J., ČURILLA, O., TKÁČ, J.: Biotechnol. Appl. Biochem. **27**, 1998, s. 153.
- [35] ŠVITEL, J., et al.: Biotechnol. Techniques **11**, 1997, s. 917.
- [36] TKÁČ, J., ŠVITEL, J.: Bull. Potr. Výsk. **36**, 1997, s. 113.