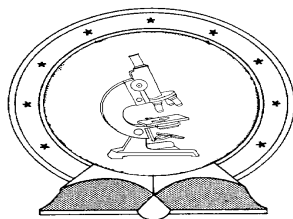


DE TTK



1949

BIOSZENZORFEJLESZTÉS L-ASZKORBINSAV ÉS AFLATOXIN M₁ MÉRÉSÉRE

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Szerző: Víg Attila

Témavezető: Dr. Gyémánt Gyöngyi
Egyetemi adjunktus

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi Doktori Tanács
Kémia Doktori Iskola
Debrecen, 2011

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem TTK Kémiai Doktori Iskola Környezeti és Műszeres Analitikai Kémia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem TTK Doktori (Ph.D.) fokozatának megszerzése céljából.

Debrecen, 2011.

Víg Attila

Tanúsítom, hogy Víg Attila doktorjelölt 2006-2011 között a fent megnevezett Doktori Iskola Környezeti és Műszeres Analitikai Kémia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a Jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2011.

Dr. Gyémánt Gyöngyi
Egyetemi adjunktus

BIOSZENZORFEJLESZTÉS L-ASZKORBINSAV ÉS AFLATOXIN M₁ MÉRÉSÉRE

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a Kémia tudományágban

Írta: Víg Attila okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem kémia doktori programja
(Környezeti és Műszeres Analitikai Kémia alprogramja) keretében

Témavezető: Dr. Gyémánt Gyöngyi
Egyetemi adjunktus

A Doktori Szigorlati Bizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.

A doktori szigorlat időpontja:

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.

A Bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja:

Tartalomjegyzék

I.	Bevezetés.....	- 8 -
II.	Irodalmi áttekintés.....	- 10 -
II.1	Bioszenzorokról általában.....	- 11 -
II.1.1	Biokatalitikus receptorok.....	- 12 -
II.1.2	Bioaffinitás alapú szenzorok.....	- 13 -
II.1.3	Hibridizációs szenzorok.....	- 13 -
II.2	Rögzítési módszerek.....	- 14 -
II.3	Jelátvivők.....	- 16 -
II.3.1	Elektrokémiai jelátvivők.....	- 16 -
II.3.2	Optikai jelátvivők.....	- 19 -
II.3.3	Termikus és akusztikus hullám alapú jelátvivők.....	- 21 -
II.4	Jövőbeli fejlesztési irányvonalak.....	- 22 -
III.	Saját eredmények.....	- 23 -
III.1	Az aszkorbinsav mérésére alkalmas bioszenzor fejlesztése.....	- 23 -
III.1.1	Bioszenzorral történő aszkorbinsav mérés előzményei.....	- 23 -
III.1.2	Célkitűzés.....	- 24 -
III.1.3	Enzim: Aszkorbát oxidáz.....	- 25 -
III.1.4	Mérőrendszer: FIA (Flow Injection Analysis) rendszer.....	- 26 -
III.1.5	Anyagok és módszerek.....	- 28 -
III.1.6	A készülék összeállítása.....	- 29 -
III.1.7	Elektród előkezelési protokoll.....	- 31 -
III.1.8	Enzimcella készítés.....	- 31 -
III.1.9	Előzetes vizsgálatok.....	- 33 -
III.1.10	Aszkorbinsav oldat stabilitásának vizsgálata.....	- 34 -
III.1.11	Rézionok hatása a regenerálódásra.....	- 35 -
III.1.12	Aszkorbinsav mérő bioszenzor optimalizálása.....	- 37 -
III.1.14	Reális minták vizsgálata.....	- 46 -
III.2	Aflatoxin M ₁ mérésére alkalmas bioszenzor fejlesztése.....	- 51 -
III.2.1	Irodalmi háttér.....	- 51 -
III.2.2	Célkitűzés.....	- 52 -
III.2.3	Elektrokémiai Impedancia Spektroszkópia.....	- 52 -

III.2.4	Aflatoxinok.....	- 56 -
III.2.5	Immunoszenzorok	- 59 -
III.2.6	Anyagok és módszerek.....	- 61 -
III.2.7	Jelerősítés koloidális arany és mágneses nanorészecskék alkalmazásával.....	- 63 -
III.2.8	Arany nanorészecskék mérése az elektród felszínén.....	- 66 -
III.2.9	Jelerősítés ezüstrrel hidrokinon felhasználásával.....	- 67 -
III.2.10	A kifejlesztett mérési módszer – Jelerősítés ezüst elektromos ülepítésével.....	- 71 -
IV.	Összefoglalás.....	- 78 -
V.	Summary.....	- 80 -
VI.	Irodalomjegyzék	- 82 -
VII.	Tudományos közlemények és publikációk.....	- 89 -

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Iglói Attilának és Kozák Imre Olivérnek az EgerFood Regionális Tudásközpontban végzett munka során nyújtott szakmai és emberi támogatást.

Köszönöm Antonio Radoi-nak és Xavier Munoz Berbel-nek a franciaországi Université de Perpignan volt poszt-doktorandusz hallgatóinak a szakmai és baráti támogatást, és a mindig segítőkész hozzáállást.

Köszönöm Dr. Adányi Nórának a Központi Élelmiszerkutató Intézet kutatójának az amperometriás fejlesztésben biztosított támogatását.

Köszönöm professzor Jean-Louis Marty-nak a Centre de Phytopharmacie, Université de Perpignan kutatóközpont vezetőjének a sikeres Állami Eötvös Ösztöndíj megvalósulását.

Köszönöm Dr. Kiss Attilának az EgerFood Regionális Tudásközpont menedzser igazgatójának a kutatási feltételek és lehetőségek biztosítását.

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Gyémánt Gyöngyinek a mindig támogató és iránymutató segítséget, mellyel valamennyi holtpontra sikeresen továbblendített.

Külön köszönöm feleségemnek Vigné Dr. Baji Ritának és családomnak a nyugodt, támogató családi légkört.

Hálával tartozom minden olyan munkatársnak, aki az EgerFood Regionális Tudásközpontnál ill. az Université de Perpignan-on eltöltött idő során valamilyen szinten hozzájárult a dolgozat létrejöttéhez

Köszönöm a munkám során nyújtott anyagi segítséget az EgerFood Regionális Tudásközpont 9/2005 pályázatának és a Magyar Állami Eötvös Ösztöndíjnak (2008).

Rövidítés jegyzék

AFB1	-Aflatoxin B1
AFM1	-Aflatoxin M1
AFG	-Aflatoxin G
AMPSO	- nátrium (3-[(1,1-dimetil-2-hidroxietyl) amino] 2-hidroxi-propánszulfon sav) só
BSA	-Bovine Serum Albumin - Marha szérum albumin
DPV	-Differential Pulse Voltametry
EIS	-Electro Impedance Spectroscopy - Elektro impedancia spektroszkópia
ELISA	-Enzyme Linked Immunosorbent Assay - Enzim csatolt immunkötődés vizsgálat
FIA	-Flow Injection Analysis - Átfolyó befecskendezéses elemzés
HRP	-Horse Radish Peroxidase –Fekete retek peroxidáz
IgG	-Imunoglobulin G
ISE	- Ion Sensitive Electrode - Ionérzékesen elektród
ISFET	- Ion Sensitive Field Effect Transistor - Ionérzékesen térvezérlésű tranzisztor
LOD	-Limit Of Detection - Kimutatási határ
LSV	-Linear Sweep Voltametry – Lineáris pásztázó voltametria
LWR	-Linear Working Range - Lineáris tartomány
OTA	-Ochratoxin A
PBS	- Phosphate Buffered Saline- fiziológiás alapú foszfát puffer
QCM	-Quartz Crystal Microbalance - Quartz kristály mikromérleg
SPR	-Surface Plasmon Resonance - Felületi plazmon rezonancia
TELISA	-Thermometric Enzyme Linked Immunosorbent Assay - Hőméréses enzim csatolt immunkötődés vizsgálat
TIR	-Total Internal Reflection - Teljes első visszaverődés

I. Bevezetés

A kémiai és biológiai folyamatok követése, megértése szempontjából az analitikai kémia fejlődésének kiemelt szerepe van. Ennek a fejlődésnek három irányvonala az automatizálás, miniatürizálás és egyszerűsítés, melyben fontos szerep jut a gyors, megbízható érzékelők (szenzorok) fejlesztésének. A szenzor egy olyan technológiai eszköz vagy biológiai alapú egység, ami detektálja/érezkeli a jelet vagy fizikai változást. A szenzorok fejlesztését az elmúlt században a szelektivitásnövelés motiválta, s ennek egyik legismertebb eredménye a pH mérésre használatos hidrogén szelektív üvegelektrod. A szenzorfejlesztés az analitikai kémián belül egy olyan dinamikusan fejlődő terület, melyet elsősorban a környezeti és egészségügyi előírások igényei irányítanak. A kémiai összetételt mérő kémiai szenzorok a kémiai információ (koncentráció, szerkezet) fizikai-kémiai jellé való átalakítását végzik. A kémiai szenzor két részegységből áll: egy molekuláris felismerést biztosító anyagot (például receptort) tartalmazó felismerő részből és egy fizikai-kémiai jelátvivő egységből. A felismerő egység funkciója kettős: szelektív kölcsönhatás révén a szenzor szelektivitásának biztosítása, és a kémiai paraméter (általában koncentráció) analitikailag mérhető, hasznos jellé való átalakítása, amelyre a jelátvivő egység reagál. Jellemző módon a kémiai felismerést végző elem és a jelátalakító egység egy analitikai eszközben található meg.

A bioszenzorok (biológiai szenzorok) a kémiai szenzorok alcsoportját alkotják, amelyeknél a felismerő anyag biológiai eredetű, és a szelektív felismerési lépés biológiai folyamatra épül, így lehet enzim-szubsztrát, antigén-antitest, receptor-agonista kölcsönhatás vagy nukleinsav hibridizáció. A különböző biológiai anyagok közül legáltalánosabban az enzimeket használják. A jelátvitel lehet elektrokémiai (amperometriás, potenciometriás), optikai vagy reakcióhő mérésén alapuló. Készítenek felületi plazmon-rezonancia detektáláson vagy tömegváltozás mérésén alapuló (kvarckristály mikromérleg alapú) és felületi akusztikus hullám detektáláson alapuló kémiai és bioszenzorokat is. Fontos megemlíteni, hogy a szenzorok működését megszabó folyamatok általában reverzibilisek, ami biztosítja a szenzorok ismételt felhasználhatóságát, folyamatos üzemmódú alkalmazását.

A 2006 óta az Eszterházy Károly Főiskola keretein belül indított egri Regionális Tudásközpont egyik kutatócsoportja az élelmiszeripari bioszenzor fejlesztésekre összpontosít, melyen belül főbb élelmiszer összetevők (antioxidánsok, biogén aminok) ellenőrzése a cél. A kutató laboratórium főként elektrokémiai módszereket (amperometria) alkalmaz munkájában. A kutatási tevékenységek során elengedhetetlen a hazai és nemzetközi csoportokkal (Lund-

Svédország, Perpignan- Franciaország) történő együttműködés. Egy ilyen együttműködés keretein belül sikerült a magyar állami Eötvös ösztöndíj segítségével, fél éves kutatómunkát végezni a dél-francia perpignan-i egyetemen, ahol jelentősebb immunoszenzor fejlesztések is folynak.

Jelen disszertáció az egri főiskolán végzett, L-aszorbinsav mérésére alkalmas bioszenzor fejlesztés és a francia kutatócsoportban végzett aflatoxin M₁ vizsgálatára alkalmas mérőmódszer kifejlesztésének eredményeit foglalja össze. Az első rész tehát L-aszorbinsav (antioxidás) mérésére alkalmas rendszer fejlesztését taglalja, mivel az antioxidánsok szerepe jelentős többek között az élelmiszertartósításban, minőség megőrzésben, s mennyiségük meghatározása fontos visszajelzés lehet a termék élettartamára vonatkozóan. A második rész az aflatoxin M₁ mérésére használható módszer elemzését tartalmazza, melyben egy olyan élelmiszer szennyezőt vettünk górcső alá, ami az emlősök tejében mutatható ki, s a táplálékkal elfogyasztott aflatoxin B₁ metabolikus változata. Mennyiségének meghatározása fontos a tej minőségének, emberi fogyaszthatóságának megállapításában.

II. Irodalmi áttekintés

Az ipari folyamatokban előállított termékek minőségbiztosítása egyre nagyobb gazdasági jelentőséggel bír a rohamosan fejlődő társadalmakban. Ezen belül az élelmiszer minőség és frissesség egyre inkább a figyelem középpontjába kerül mind a fogyasztók, mind az élelmiszeripar szempontjából, melyeknek ellenőrzésére időszakos kémiai és mikrobiológiai elemzéseknek vetik alá a termékeket. Az említett vizsgálatok olyan módszereket sorakoztatnak fel, mint kromatográfia, spektrofotometria, elektroforézis, titrálás, amelyek azonban nem teszik lehetővé az egyszerű, folyamatos elemzést. Többségük drága, lassú és amellet, hogy minta előkészítésük összetett lehet, jól képzett személyzetet is igényelnek. Az élelmiszeripar gyors és költséghatékony megoldásokat igényel a régi és újabb kritikus összetevők főként ellenőrző jellegű meghatározására. Az olcsó és folyamatos nyomon követés mellett a roncsolásmentes és gyors válaszidejű módszerek további előnyt élveznek. Az előbbieken felvázolt ipari rutin mérések teljesítésére kínál alternatív megoldást a bioszenzor fejlesztés [1]. A bioszenzorok a kémiai szenzorok közé tartoznak, melyekben egy biológiai alapú felismerő egység (enzim, antitest, receptor, mikroorganizmus) egy kémiai vagy fizikai jellegű jeltovábbítóval történő kombinációja nyújt az élelmiszer analízisben is használható mérőeszközt. A bioszenzor technológia egyedi tulajdonságai miatt valós mintákra alkalmazható eljárások lehetőségét ajánlja, s számos előnye (magasfokú szelektivitás és specifitás, megvalósíthatóság és tárolás relatív alacsony költsége, miniaturizálás lehetősége, automatizálhatóvá és hordozhatóvá tétel) alapanyag és minőségügyi laborok ellenőrző rendszereinek részévé teheti. A bioszenzor fejlesztések a legkülönbélebb felhasználási területekre koncentrálnak, mint pl.: klinikai, környezetvédelmi, mezőgazdasági, biotechnológiai [2,3]. Bioszenzorral alapozott fejlesztések ugyanakkor használhatóak lehetnek élelmiszertermékeknél is, főleg összetétel meghatározás, nyersanyag és késztermék szennyezettsége, ill. fermentációs folyamatok beépített (on-line) ellenőrzése terén. Az élelmiszeripar által gerjesztett nagy változatosságot mutató bioszenzor kutatások ennek ellenére még korlátozott alkalmazhatóságot mutatnak. Másrészt a valós minták mérésére alkalmas prototípusok teszteléseiben olyan kritikusnak mondható fázisok találhatók, mint a biokomponens rögzítése gyártás során és az elemzés mintaelőkészítése. A bioszenzorok megfelelő hőmérséklet és pH igénye a biológiai aktivitását biztosításáért szükséges, továbbá egyes esetekben a minta előkezelése is ajánlott bizonyos zavaró összetevők eltávolítására,

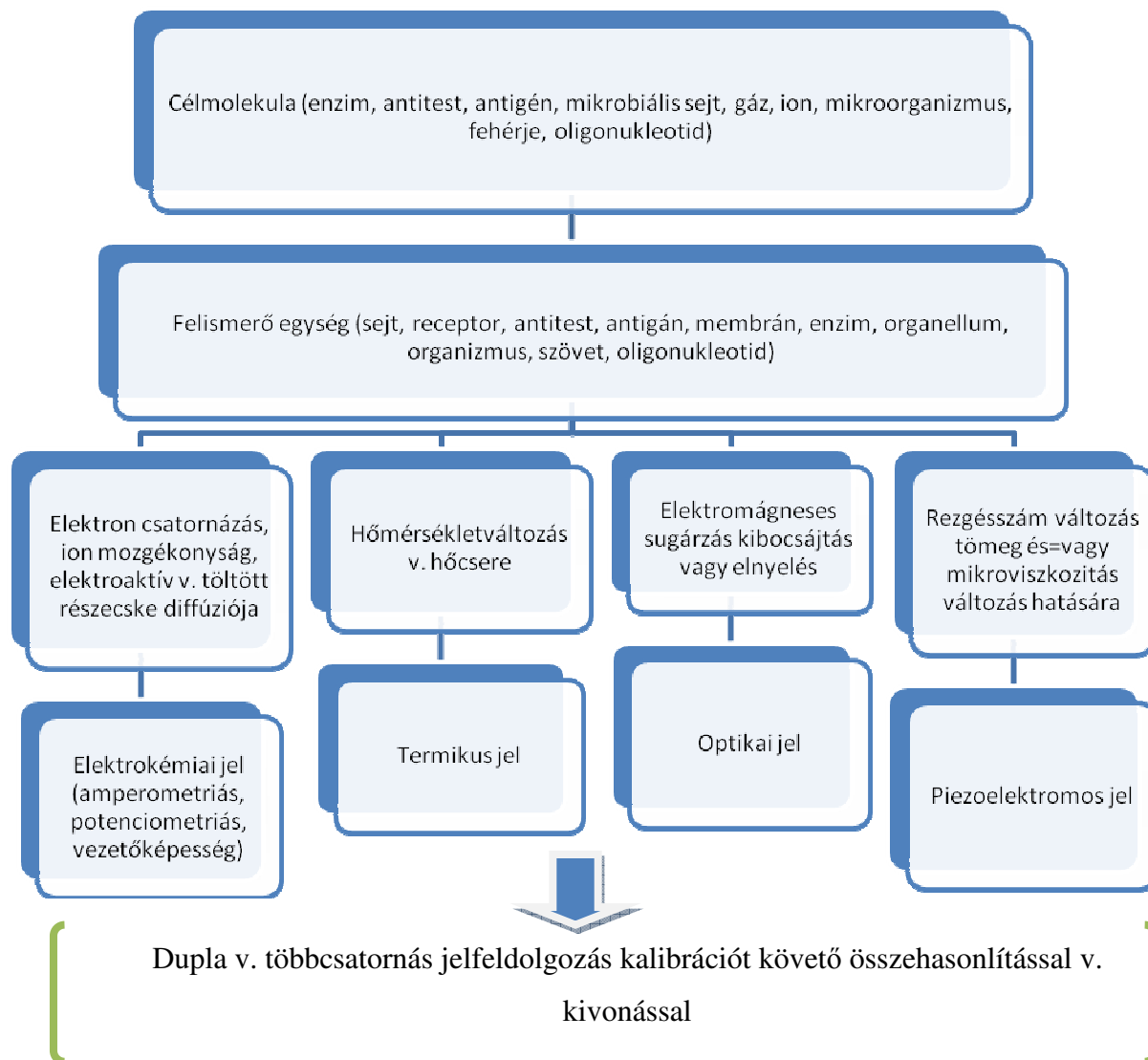
mint pl.: aszkorbinsav, tirozin stb., illetve semlegesítési, hígítási és extrakciós eljárások is szükségesek lehetnek az élelmiszer savassága vagy hidrofób tulajdonságai esetén. Az élelmiszerek esetén használt, elemzési időt csökkentő, feltáró módszerek többek között a savas vagy lúgos hidrolízis, mikrohullámos emésztés, szuperkritikus folyadék extrakció, párologtatás és szűrés.

Élelmiszeripari területen fontos bioszenzor alkalmazás a peszticidek, patogének, mikroorganizmusok és toxinok kimutatása. Ezen szennyezők kimutatására alkalmazott hagyományos módszerek fizikokémiai, biológiai és szerológiai tesztek foglalnak magukban, melyek legtöbbször hosszú mintaelőkészítést, elemzési időt igényel, nem megfelelő a szelektivitása és érzékenysége, s összességében az elemzés néha napokat vehet igénybe. Éppen ezért az immunoanalitikai módszerek jó alternatívát biztosítanak, mivel antitesteket nemcsak fehérjék felismerésére lehet kifejleszteni, hanem mikroorganizmusok felszíni antigénjeire és kis molekulatömegű összetevőkre is.

A bioszenzorok vagy immunoszenzorok csökkentik az analízis időt és költséget, s növelik a termék biztonságát. Ezek a módszerek felhasználhatóak továbbá beépített (on-line) rendszerű kontroll meghatározásra és mérésre olyan folyamatellenőrző minőségbiztosítási rendszerekben is mint a HACCP (Hazard analysis and critical control points- Kockázat elemzés és kritikus ellenőrzési pontok). Továbbá az enzim alapú bioszenzorok és immunoszenzorok mikroorganizmusok (*E. Coli*, *Salmonella*, *S. Aureus*), peszticidek, herbicidek órák ill. percek alatt történő meghatározását tették lehetővé [4,25].

II.1 Bioszenzorokról általában

Megegyezés alapján a bioszenzorok a felhasznált biológiai komponens típusa, a jelátvitel módja vagy ezek kombinációja alapján csoportosíthatók. A célmolekula kimutatására számos biológiai komponens és jelátvivő eljárás áll rendelkezésre (1. ábra), azonban a tényleges módszert a vizsgálandó minta és a mérési tartomány határozza meg. Mivel a biológiai felismerő egység különböző szelektivitási és specifikitási fokkal rendelkezhet, ezért ezt három csoportra osztják: biokatalitikus, bioaffinitás és hibridizációs receptor alapú.



1. ábra: A bioszenzorok általános működése és csoportosítása a generált jel alapján [1]

II.1.1 Biokatalitikus receptorok

A biokatalitikus felismerő egység enzim (mono vagy multi enzim), egész sejt (mikroorganizmus: baktérium, gomba, eukarióta sejt, élesztő), sejt organellum és növényi vagy állati szövet tartalmú rendszer lehet. Azok a bioszenzorok, amik mikroorganizmusokat, állati vagy növényi szövetet tartalmaznak, azzal az előnnyel bírnak, hogy kialakításukhoz nem szükséges a biokomponens bonyolult kivonási és tisztítási folyamata [5,6,7]. A mikrobiális szenzorok továbbá kevésbé érzékenyek a különböző egyéb összetevők inhibíciós hatására, sokkal jobban tűrik a pH és hőmérsékletváltozásokat, valamint általában hosszabb élettartammal is rendelkeznek. Ezek az eszközök az elektród és annak felszínén megkötött egész sejtek

kapcsolatán alapulnak, s könnyen regenerálhatók tápanyagokban dús oldatba mártással. Ugyanakkor az ilyen tulajdonságú szenzorok lassabb válaszidővel és alacsonyabb szelektivitással rendelkeznek az egyszerű enzimes megoldásokhoz képest, mivel egy élő sejtben számos metabolikus folyamat játszódik egyszerre. Ezek a szenzorok általában szerves összetevők beépülésén vagy metabolikus légzés aktivitás változásainak a nyomon követésén alapulnak. Néhány mikrobiális bioszenzort már eddig is alkalmaztak élelmiszer vizsgálatokban, de elsősorban Biológiai Oxigén Igény (BOI) meghatározásra.

A mikrobiális szenzorokban tapasztalható szelektivitás és lassú válaszidő okozta problémák az enzimes rendszerekben már kiküszöbölhetők, s ezért is lehetséges, hogy ez utóbbi jelenti a leggyakoribb érzékelő részt a bioszenzorokban. Az enzim szenzorok számos típusáról számoltak be potenciometriás, amperometriás, optoelektromos, kalorimetriás és piezoelektromos alapokon. Alapvetően minden enzimszenzor azon alapszik, hogy az enzimet megkötjük egy jelátvivő felszínén. A kereskedelmi forgalomban kapható enzimek közül az oxidázok a legnépszerűbbek [8], mivel nagy stabilitást mutatnak, és bizonyos esetekben nem igényelnek koenzimet vagy kofaktort.

II.1.2 Bioaffinitás alapú szenzorok

Az affinitáson alapuló bioszenzorok kemoreceptorok, antitestek lehetnek. Ezek a szenzorok szelektív kölcsönhatásba lépnek egy adott ligandummal, amivel termodinamikailag stabil komplexet képeznek. Az immunoszenzorok reális felhasználhatósága általános alkalmazhatóságukban rejlik, mivel bármilyen komponens kimutatható, ha kifejleszthető ellene specifikus antitest [9], s mindez úgy kivitelezhető, hogy specifitással, szelektivitással és magas érzékenységgel párosul. Bár a tapasztalható kapcsolódás nem képez elektrokémiai jelet, az antigén-antitest komplex mindenféle szenzorban felhasználható, mivel enzimmel, fluoreszcens komponenssel, elektrokémiaileg aktív szubsztráttal, radionukliddal vagy avidin-biotin kapcsolódással címkézhető az antigén vagy az antitest. A leggyakoribb immunoszenzor jelátvivők akusztikus és optikai rendszerek.

II.1.3 Hibridizációs szenzorok

Az olyan hibridizációs receptorok, mint a DNS és RNS szondák ígéretes alkalmazásoknak bizonyultak az élelmiszerekben található mikroorganizmusok kimutatására [10,11]. A szelektív vizsgálat biztosítéka a hibridizáción keresztül történő egyedi nukleinsav szekvencia

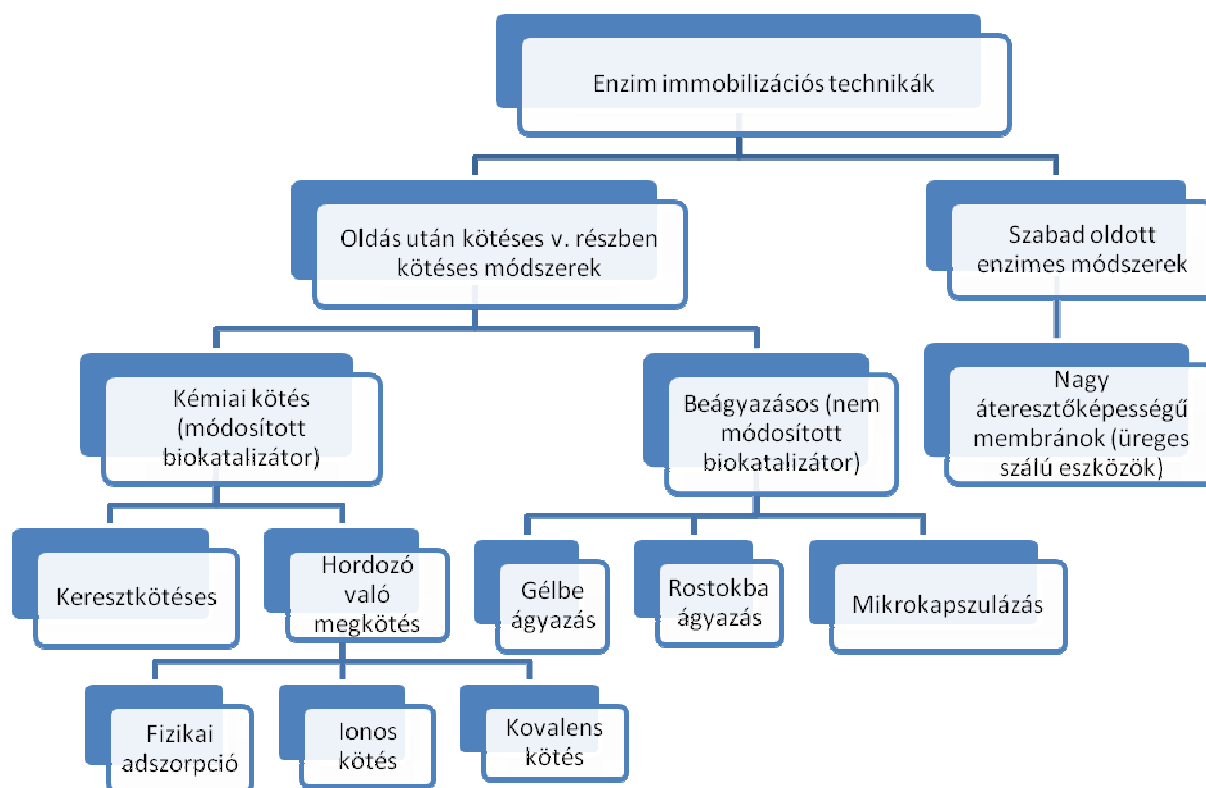
azonosítás. A bázispárosodási tulajdonság lehetővé teszi egyetlen DNS szálnak is, hogy „felismerje” a kiegészítő párját és duplexet alkosson. A DNS szenzorokban egy jól meghatározott bázissorrendű DNS szál alkotja a biológiai felismerő egységet, amit valamilyen módszerrel egy adott felülethez rögzítenek. A szondát egy ismeretlen DNS-t vagy RNS-t tartalmazó mintába juttatják, s ha a rögzített szál kombinálódik valamelyik ismeretlen örökítőanyag résszel, akkor lehetővé válik a meghatározás és azonosítás. A DNS alapú módszerek tűnnek az egyetlen módszernek, mellyel genetikai módosulások kimutathatók, ez a legérzékenyebb módszer mikroorganizmusok kimutatására is. Kereskedelmi forgalomban olyan élelmiszerekben található patogén baktériumok kimutatására alkalmas DNS szondák kaphatók, mint a *Salmonella*, a *Listeria*, az *E. Coli* és a *S. Aureus* [12,13].

II.2 Rögzítési módszerek

A biológiai alapú szenzor alapanyagok valamilyen szilárd felszínen történő rögzítése számos módon történhet [14]. Ezen rögzítési módszerek között szerepel az adszorpció, keresztkötés, kovalens kötés, valamilyen hordozóba zárás vagy kapszulázás, szilárd kötést segítő mátrix. A rögzítő mátrix szerepet játszhat csak és kizárólag a kötésben, de akár a jelátalakításban is (mediátor). Mindegy, hogy milyen rögzítési módszerről beszélünk, mivel minden esetben a cél a biológiai komponens lehető legmagasabb aktivitása, hosszú stabilitás ideje és a jelátviteli egységhez mért kis távolsága a rögzítés után. Meghatározó része a rögzítés hatékonyságának, hogy a vizsgálandó anyag tudjon ki- és bevándorolni a létrehozott rétegben. A megfelelő rögzítési módszer kiválasztása függ magától az alkalmazandó biológiai anyagtól, a jelátalakítás módjától, a célmolekula fizikai-kémiai tulajdonságaitól és a bioszenzor működési feltételeitől (2. ábra).

A leggyakrabban rögzítés céljából az adszorpció és a kovalens kötés módszerét alkalmazzák. A van der Waals erők vonzásán alapuló fizikai adszorpció a legegyszerűbb és legrégebben használt módszer. Ebben az esetben általában az enzimoldat, sejt szuszpenzió vagy szövet metszet úgy kerül a jelátalakító felszínére, hogy egy a célmolekulára féligáteresztő membrán lefedi. Ezen módszer esetén nem szükséges a biológiai komponens kémiai módosítása, lehetőség van a membrán mátrix regenerálására. Főként az egyszerűség a nagy előnye ennek a megoldásnak, illetve, hogy egyszerre akár többféle biológiai komponens is használható, azonban jelentős aktivitás csökkenés tapasztalható, ha pH, ionerősség és hőmérsékletváltozás lép fel mérés közben. A gélekbe, polimerekbe, pasztákba vagy tintákba történő bezárás

jelentősen növelheti a stabilitást, s hasonló teljesítményhez vezethet, mint a kovalens kapcsolás esetén.



2. ábra: Enzim megkötésekre alkalmazott módszerek összefoglalása [14]

Kovalens kötés során a biológiai komponens közvetlen a jelátalakító felszínéhez vagy a membrán mátrixához kapcsolható. Ezek a módszerek a fehérje terminális funkció csoportjainak (a katalitikus aktivitást nem befolyásoló) és a felszín szabad funkció csoportjainak reakcióin alapszanak. Enzimekben és fehérjékben ezek a lehetséges funkció csoportok az aminosav oldalláncokon találhatóak (pl.: a lizin ϵ -amino, az aszpartát és glutamát karboxil, a cisztein szulfhidrid és a tirozin fenil-hidroxi csoportja). A különböző aktív funkció csoportokat tartalmazó membránok nagy hatékonysággal képesek a biokomponensek megkötésére. Emellett arra is lehetőség van, hogy az enzimet például vízdoldható részecskékhez kötjük és két szelektíven átteresztő membrán közé zárjuk.

Enzimek vagy fehérjék esetén ugyancsak használnak bifunkció (homo vagy hetero funkció) reagenseket, mely során makroszkópikus részecskék és térhálós szerkezet keletkezik a kovalens kötések kialakulása során a hordozó felszínén. A leggyakrabban használt homofunkció vegyületek a glutáraldehid, karbodiimid, míg heterofunkciókból a trikloro triazin és a 3-metoxidifenil metán-4,4' diizocianát.

Egyéb a jelátvivő felszínének átalakítására irányuló módszerek között szerepel például a biokatalitikus molekula szén kompozit mátrixba ágyazása. Az ilyenfajta módosított bioszenzorok többek között olyan jelentős előnyökkel rendelkeznek, mint a biokatalitikus vagy érzékelő rész szoros közelsége, esetleges kofaktorok, segédanyagok beágyazása, a felszín könnyű megújulása, alacsony költség és nagy stabilitás a biokatalitikus fehérjére nézve. Az előbbieken felsorolt tulajdonságokkal rendelkeznek a szén paszta elektródok, a nyomtatott elektródok és a meghatározott molekuláris szerkezetű szilárd rögzítő mátrixok.

Az elektrokémiai polimerizációval történő rögzítés is gyakran használatos szerves molekulák esetén, s számos előnye közzé tartozik a mikroléptékű kivitelezés, film vastagság befolyásolása, homogenitás és ismételhetség.

II.3 Jelátvivők

A biológiai komponens vizsgált szubsztrátra mutatott aktivitása figyelemmel kísérhető oxigénfogyasztás, hidrogén peroxid képződés, NADH koncentráció változás, fluoreszcencia, abszorpció, pH-, vezetőképesség-, hőmérséklet- vagy tömegváltozás követésével. Így a bioszenzorok a következő különböző osztályokba sorolhatók: potenciometriás (ionszelektív elektródok, ISE), ion érzékeny térvezérlésű tranzisztoros (ISFET), amperometriás, impedimetriás, kalorimetriás, optikai és piezoelektromos. Sok az élelmiszervizsgálatokban használt bioszenzor valamilyen oxidáz rendszerre alapoz, mintha egy aerob mikroorganizmust elektrokémiai jelátalakítóval kombinálnánk.

II.3.1 Elektrokémiai jelátvivők

Az elektrokémiai bioszenzor az IUPAC definíciója szerint az az önálló, integrált szerkezet, amely képes kvantitatív vagy fél-quantitatív analitikai információt szolgáltatni biológiai felismerő egység segítségével (biokémiai receptor), mely egység közvetlen és térbeli kapcsolatban van a jelátalakító egységgel. Az elektrokémiai jelátalakítóval kiépített bioszenzorok gazdaságosak és gyors válaszidejűek, s az automatizálási lehetőségük sorozatmérésre is alkalmassá teszi őket [14]. Az elektrokémiai bioszenzorok különböző osztályai a vezetőképesség, impedimetria, potenciometria és amperometria.

Vezetőképesség és impedimetria alapú jelátvivők

A vezetőképesség változásokat követő bioszenzorok a mikroorganizmusok által fogyasztott vagy termelt szubsztrátok/köztitermékek koncentrációit vizsgálják (pl: szénhidrát-tejsav átalakulás) az adott közegben, ami lényegben 2 elektród között bekövetkező kis vezetőképesség változás kimutatását jelenti. A töltéssel rendelkező molekulák mennyisége egyenes arányban van az organizmus növekedésének mértékével, egyszerűen számszerűsíthető. Számos biológiai membrán receptora figyelhető meg beültetett mikroelektródokkal ion vezetőképesség [15,16], kapacitás [17] vagy impedimetria [18] változásokon keresztül. A vezetőképesség bioszenzorokat nem szívesen használják a gyakorlatban, mivel általában nem specifikusak és nem megfelelő a jel/zaj arányuk.

Az impedancia alapelvét a Hivatalos Analitikai Kémikusok Egyesülete (AOAC) is elfogadta, s elsősorban minőségi megfigyelésre és élelmiszer patogének (baktériumok) specifikus meghatározására használják [19]. Ezek a bioszenzorok arra alapoznak, hogy a mikrobiális anyagcsere folyamatok vezetőképesség és kapacitásnövekedést is okoznak, s így az impedancia csökkenését idézik elő. Az impedanciát általában egy híd áramkörrel mérik, amiben gyakran egy referencia egység is található a nem specifikus változások mérésére és kivonására. A referencia egység ugyancsak figyeli a hőmérsékletváltozásokat, párolgást, oldott gázok mennyiségi változásait és a sejttállomány változásait inkubáció során. Kereskedelmi forgalomban is kaphatóak, mikroorganizmusok meghatározására alkalmas impedancia alapú technológiák.

Potenciometriás jelátvivők

A potenciometriás bioszenzorokban egy adott anyagra érzékeny membrán vagy érzékelő felszín ad a koncentrációval logaritmusos arányba hozható jelet referencia elektród jelenlétében [20,21]. A potenciometriás készülékek pH és ion koncentráció változásainak mérésére alkalmas. Lehetőség van jelerősítőként tranzisztor használatára, amit az ionszelektív elektródhoz (ISE) kapcsolnak, s ezért Ion Érzékeny Térvezérlésű Tranzisztornak (ISFET) hívnak [22]. Ezekben a bioszenzorokban a biológiailag aktív anyag (enzim, antitest) egy az ionszelektív elektród felszínét beburkoló membránon kerül megkötésre, s az enzimreakció vagy antigén-antitest komplexképződés során bekövetkező változásokat a jelátalakító regisztrálja. Jelenlegi kutatások az ionszelektív elektródok jobb detektálási határa és

szelektivitása felé mutatnak, hogy jobban megfeleljenek az ipari igényeknek (elektród rendszerek, újfajta ionofórok, új miniatürizálásra alkalmas elektródok).

Az ISFET nagy jelentősége a folyamatok mikroelektronikai kivitelezésében és a miniatürizálásban rejlik. Az enzim alapú potenciometriás szenzorok alkalmazási lehetőségei közül jelentős az ipari folyamat figyelés és a higiéniai-egészségügyi minőség ellenőrzés területe.

Amperometriás jelátvivők

Az amperometriás bioszenzorok azt az áramot mérik, amit az elektródon egy elektroaktív anyag képez egy adott potenciálon. Ez a mért áram egyenes arányban áll a kérdéses anyag oldatbeli koncentrációjával. Az amperometriás bioszenzorok gyorsak, hiszen nem kell várni a termodinamikus egyensúly beállításáig, s érzékenyebbek, pontosabbak, mint a potenciometriás képviselőik. Ugyanakkor azonban szelektivitás terén a rendszerben jelenlévő elektroaktív anyagok redox potenciálja a meghatározó, ami ahhoz vezet, hogy a mért áram több anyag együttes, különböző arányú jeléből tevődik össze. Az amperometriás bioszenzorok jelentik egyenlőre a legsikeresebb osztályt a bioszenzorok történetében (3. ábra).

Az első glükóz mérésére alkalmas amperometriás bioszenzor glükóz oxidáz és Clark oxigén elektród felhasználásával készült [23], s a rendszerben bekövetkező oxigén fogyását követte nyomon. A termék keletkezésének vagy a reakciópartner (oxigén) fogyásának figyelemmel kíséréseivel követhetjük a vizsgálandó anyag koncentrációjára. Ezek a bioszenzorok az úgy nevezett első generációsak.

A mediátorral módosított amperometriás bioszenzorok jelentik a bioszenzorok második generációját, hiszen itt a mediátor redox tulajdonságai segítik az elektron transzfert az enzim és az elektród felszíne között. Direkt elektrontranszfert tesznek lehetővé a direkt enzim-elektrod kapcsolatos vagy mediátormentes bioszenzorok, melyek a szenzorok harmadik generációját jelentik. Ez utóbbi esetben az elektron közvetlenül jut el az elektródtól az enzimig, s onnan a szubsztrát molekulához (vagy fordítva). Ebben a mechanizmusban az elektron egyfajta másodlagos szubsztrátként van jelen, s katalitikus áram képződését eredményezi. A szubsztrát átalakítása alapvetően egy katalitikus folyamat [24].

Az élelmiszerelemzések esetében a bioszenzorok többsége az amperometrián és valamilyen oxidáz kombinációján alapszik. Ezek a típusú szenzorok annak köszönhetik népszerűségüket, hogy az enzim általában jó aktivitást mutat, magas érzékenység érhető el velük, s könnyű a

reakció nyomon követése. Jelentős különbség ugyanakkor, hogy bár a hidrogén peroxid jelenlétét kimutató jelátalakítók érzékenyebbek az oxigén fogyását követőknél, az utóbbiak alkalmasabbak a biológiai eredetű anyagokon (sejtek, növényi- vagy állati szövetek) alapuló szenzorok esetében.

Más esetekben amperometriás bioszenzorokat is alkalmaznak a mikrobiális szennyeződések indirekt kimutatására, hiszen számos mikroorganizmus kimutatható amperometriásan, enzimkatalizált oxidáció, redukció vagy bioaffinitási reakcióban történő részvételük alapján. Ezekben a rendszerekben enzimsatolt amperometriás immunoszenzort alkalmaznak a baktérium kimutatására. Ilyen például mikor hővel előlt baktériumot (pl.: *S. Typhimurium*)



ágyazunk antitesttel borított mágneses részecske és enzimmel kapcsolt antitest közzé.

Továbbá élelmiszer szennyezőként növényvédő szerek is mérhetőek amperometriásan enziminhibíció keresztül [25].

3. ábra: A kereskedelmi forgalomban is kapható egyik glükóz oxidáz enzim alapú amperometriás vércukorszint mérő. Tesztcsíkokkal történik a mérés, a készülék tárolja és átalakítja a mért eredményeket.

II.3.2 Optikai jelátvivők

Az optikai szálak és lézerek fejlődésével ezek a típusú bioszenzorok nagy figyelmet kapnak, továbbá az analitikai spektrofotometrián belül is jelentős előrelépést jelentenek főleg a miniatürizálás terén.

Az optikai bioszenzorok azon alapulnak, hogy a biokatalitikus kölcsönhatás során UV-VIS abszorpció, bio/kemilumineszcencia, fluor/foszforeszcencia, visszaverődés, szóródás és refraktív indexben változás történik [26]. Az optikai szenzorokat kezdetben oxigénre, széndioxidra és pH-ra fejlesztették ki sav-bázis indikátorok felhasználásával, azonban mára fluoreszcens és lumineszcens optrodokká nőttek ki magukat. Az optrod nem más, mint az optikai szál egyik végén rögzített szelektív biokomponens és a szál másik végén található gerjesztő és érzékelő egység együttese. Az elnyelt vagy kibocsájtott fény intenzitás változása, ami a közegben jelátvivő szerepet játszó indikátor változásaihoz köthető, egyenes arányba hozható a vizsgálandó anyag mennyiségével. Bizonyos száloptikás szondák alapja a teljes belső visszaverődés (Total Internal Reflection- TIR) jelensége a fényvezetőben, ahol azokat a

gyengülő elektromágneses hullámokat használják, melyek az optikai határfelületen jelentkeznek, s információval szolgálnak a felszín refraktív index változásairól. A TIR szenzorok alapja, hogy az elektromágneses hullámokból csak egy bizonyos hullámhossz tartomány jut vissza az optikailag ritkább közegbe, ha a kapcsolódó közegből beeső fény a kritikus szögnél nagyobb szögben érkezik. Tehát a felszín refraktív indexében vagy abszorpciós képességében bekövetkező változás csökkenti a vezető fénytovábbító képességét. NAD(P)⁺/NAD(P)H rendszertől függő dehidrogenáz enzimek nyomonkövethetőek, mivel NAD(P)H erős elnyelő 340 nm-en (UV tartomány) míg fényt bocsájt ki 460 nm-en (kék tartomány). Ilyen rendszereket alkalmaztak már acetaldehid, alanin, malát, glükóz, glicerin, etanol és galaktóz vizsgálatára [27]. Biolumineszcens baktérium (*Vibrio fischeri* vagy *Vibrio harveyi*) vagy luminolszerű kemilumineszcenciás anyagok oxidoreduktázokkal történő kombinációjával direkt módon mérhető az ATP, NAD(P)H vagy a H₂O₂. Optikai lumineszcens bioszenzorokat alkalmaznak fermentációs folyamatok megfigyelésére (alkohol) és szénhidrátok meghatározására.

A TIR módszerhez hasonlóan a fényvezetőben bekövetkező belső visszaverődés az alapja a Felszíni Plazmon Rezonancia (SPR- Surface Plasmon Resonance) technikának is [28]. Ezek a készülékek a visszaverődést mérő detektort egy biokomponenssel (legtöbbször antitesttel) kombinálják. Az SPR fontos alkalmazása a jelzés nélküli immuno vizsgálatoknak. Egy optikai alapú SPR szenzort egy optikai rendszer, egy az előző rendszerhez kapcsolt jelátvivő és egy optoelektromos jelfeldolgozó alkot.

A módszer alapja olyan töltés sűrűség oszcilláció, ami két különböző előjelű dielektromos állandóval rendelkező közeg érintkezésénél jöhet létre, mint pl. fém és dielektrikum. Az SPR egy quantum elektro-optikai jelenség, melyben a fotonok energiája a fém elektronjainak adódik át. A folyamat eredménye a plazmon keletkezése, vagyis gerjesztett elektronok a fém felszínén. A keletkező plazmon intenzitását a fém anyagi minősége és a felszín környezete befolyásolja, ahol a plazmon mezőben bekövetkező kémiai tulajdonságok változása (pl. antitest-antigén kölcsönhatás) jól nyomon követhető. A változások vagy a beeső fény szögében, vagy az elnyelt fény hullámhossz változásában vagy az SPR jelben (rezonancia egységekben (RU) kifejezve) figyelhetőek meg, de leginkább a beeső fény szögének vizsgálata az elterjedt. Az SPR bioszenzorok abszorpciós tulajdonságait kovalensen kötött molekulák felhasználásával határozzák meg. Az SPR szenzorok jól használhatóak környezeti és élelmiszeripari minták vizsgálatára, mivel egyszerű használatukhoz (nem igényelnek jelölést a molekulák) a minta tisztítás nélküli mérése párosul. Az üvegprizma belső felszínén található vékony fémréteg (pl. arany) van kapcsolatban az érzékelő antitest réteggel, mely

közvetlen kapcsolatba kerül az antigénnel vagy a meghatározandó anyaggal. A refraktív indexben bekövetkező változások a beeső fény teljes abszorpciójához rendelhető szög eltolódásában követhetőek. Nagy előny, hogy az ilyen immunoszenzorok nem igényelnek inkubációs vagy elválasztási lépést.

II.3.3 Termikus és akusztikus hullám alapú jelátvitel

Bár az elektrokémiai és optikai bioszenzorok teszik ki a fejlesztések nagy részét, a termikus és akusztikus jelátvitel is teret nyer. Ugyan ezen alkalmazások szelektivitása nem kiemelkedő, de a miniaturizálásra és párhuzamos vizsgálatokra mutató lehetőségeik mindenképpen az előnyeik között sorolható.

Termikus jelátvitel

A termikus jelátvitelre alapozott bioszenzorok mikrokaloriméterhez hasonlóak [29], s az enzim vagy mikroorganizmus által katalizált kémiai reakció hőenergia változásait figyelik ($20-100 \text{ kJ mol}^{-1}$). Mivel adiabatikus rendszerről beszélünk, a mérés mindig magában foglal sugárzással, vezetéssel és konvekcióval kapcsolatos hővesztéséget is. Alapja legtöbbször termisztor, mely képes $0,0001-0,05 \text{ } ^\circ \text{C}$ tartományban változásokat rögzíteni, s 10^{-5} M koncentrációt meghatározni. Ilyen jellegű szenzorokkal képesek voltak már meghatározni aszkorbinsavat, glükózt, laktátot, galaktózt, etanolt, penicillin G-t, cefalosporint és oxálsavat. Antitesteket felhasználó alkalmazásokkal (TELISAs) mikrobiológiai szennyeződések is vizsgálhatóak.

Piezoelektromos jelátvitel

Ezeket a jelátvitelket jelentősebben az immunoszenzorok esetén alkalmazzák, ahol az antitestet vagy antigént a kvarckristály felszínéhez kötik [30,31,32]. A kristály folyadékban adott oszcillációja adott frekvenciájú, azonban tömegváltozással ez a rezgés változik. A nagy specifitású immunoreakciók során a kristályhoz kapcsolódó fehérjék okozta tömegváltozások nyomkövetése olyan komponensek mérését tette lehetővé, mint mikroorganizmusok, gázok, aromák, peszticidek, hormonok. Ezen a területen a fejlesztések fő csapásvonala a jelátvitel érzékenység és szelektivitás növelése.

II.4 Jövőbeli fejlesztési irányvonalak

Felhasználói szempontból a fejlesztéseket a valós és gyors válaszidejű, termelési folyamatokba épített megfigyelőrendszerek igénye határozza meg. A megfelelés ezen igényeknek olyan technikákon keresztül történhet, amelyek nem igényelnek különösebb elemzés előkészítést, és zavartalanul tudnak valós időben működni. Ilyen például a már említett SPR technika. Ugyancsak fontos a biológiai felismerő rész minél hatékonyabb elhelyezése a hordozó felületen, amiben az önszerveződő monorétegek (Self Assembled Monolayer- SAM, [33,75]) vagy a kétrétegű lipid membránok játszanak fontos szerepet. Ezeknél a módszereknél a biomolekulák olyan szervezett, megfelelően irányított rögzítése lehetséges a felszínen, amivel aktivitásuk, stabilitásuk, élettartamuk növelhető. Ugyanakkor a bioszenzorok stabilitás növelése mellett enzim nélküli bioszenzorok fejlesztésére is vannak törekvések, melyek során az elektród felszín biológiailag jelentős, enzim aktív helyetl módosítják. Ez a megoldás jobb elektronátvitelt biztosít az aktív hely és az elektród felszín között. A mikrobioszenzor technológiák fejlesztői ionszenzitív tervezérlésű tranzisztorok, mikro oxigén, hidrogén peroxid és szénzál elektródok segítségével olyan chip méretű szenzorokra koncentrálnak [34,86,88,90], melyek eldobhatóak és akár több komponens egyidejű meghatározására alkalmasak. A mikrotechnikával ugyancsak jól ötvözhető területnek tűnik a DNS szenzorok felhasználása, melyek patogén mikroorganizmusok kimutatására lehetnek megfelelőek az igényelt specifitás és érzékenység elérése után. A különböző szennyezők kimutatása is aktív kutatási terület, melyek azonban irreverzibilis receptor kötődésekre építenek. Így pl. az antigén-antitest reakciókkal magas fokú specifitás és alacsony kimutatási határok érhetőek el (10^{-11} - 10^{-9} M). Emellett mesterséges akrilamid nanorészecskék kialakításával is kísérleteznek, ahol a célmolekulát jelentő toxint vagy antigént használnak sablonnak, s így a célmolekula megkötésére alkalmas kötőhely állítható elő [35]. Másik irányzat a katalizálandó reakció mechanizmusának ismeretében mesterséges enzim előállítás módosított baktérium fehérjeexpresszióján keresztül [36].

Említést érdemel, hogy az orvosi jellegű fejlesztések is támaszkodnak a bioszenzorokra, melynek ékes bizonyítéka pl. a vércukorszint mérésre alkalmas glükóz szenzor. Ezen a területen a távoli jövő célkitűzése a folyamatos üzemű, akár a testbe integrálható szenzor kifejlesztése [37]. A jelenlegi piaci igények és az ehhez kapcsolódó fejlesztési vonalak összefoglalása már megtörtént biotechnológiai folyóiratokban [38].

A kutatási témák különbözősége miatt a konkrét fejezetekhez kapcsolódó irodalmi összefoglalók és célkitűzések a Saját eredményeken belül az egyes részegységek előtt találhatóak.

III. Saját eredmények

III.1 Az aszkorbinsav mérésére alkalmas bioszenzor fejlesztése

III.1.1 Bioszenzorral történő aszkorbinsav mérés előzményei

Aszkorbinsav meghatározására számos módszer található a szakirodalomban, a klasszikus analitikai eljárások közül elsősorban a titrimetriás meghatározást alkalmazzák, amely pontos, viszont időigényessége miatt sorozat elemzésekben nem használható [39]. A műszeres módszerek között a HPLC-s meghatározás terjedt el, amely akár rendkívül költséges is lehet [40]. Az aszkorbinsav mérésére eddig kifejlesztett HPLC-s módszereket már összefoglalták [41]. Fluorimetriás optikai alapú aszkorbinsav mérésre is volt már példa [42].

Az eddigi kutatások során többfajta elektrokémiai eljárást dolgoztak ki C-vitamin (aszkorbinsav) vizsgálatára, melyek közül néhány a titrimetriában alkalmazott 2,6-diklórfenol indofenolra alapoz [43,44]. Más esetben az aszkorbinsav redukáló sajátságát használták ki $\text{Fe(III)} \rightarrow \text{Fe(II)}$ reakción keresztül, melyből ezután Fe(II) -ferrozin kelát detektálása történt spektrometriásan [45]. Szulfonazonnal (III) módosított üveges szén elektróddal aszkorbinsav, dopamin és húgysav mérését már meg tudták valósítani [46].

Az antioxidánsok meghatározására kezdeményezett bioszenzor fejlesztések eredményeit már korábban összefoglalták [47]. C-vitamin tartalmú gyógyászati készítmények elemzésére próbálták meg alkalmazni a kalixarénnel módosított szénpaszta elektródot ciklikus voltametriával [48]. Ez direkt elektrokatalitikus módszernek tekinthető, Pb(II) ionok alkalmazásával sikerült az aszkorbinsav leválási potenciálját 5-600 mV-ról 200 mV-ra csökkenteni, azonban így sem sikerült reális minták esetében megfelelő specifitást elérniük. Ugyancsak szénpaszta elektróddal és peroxidáz enzim tartalmú cukkini extraktum felhasználásával végeztek aszkorbinsav meghatározást hidrokinon redukációján keresztül -140 mV-on [49].

Szintén direkt amperometriás meghatározást választottak angol kutatók gyümölcsök minőségének, érettségének vizsgálatára [50]. A fent említett zavaró anyagok kiküszöbölésére méretkizárásos membránt alkalmaztak a választott +350 mV potenciálon.

Aszkorbát oxidáz enzim rögzítésével török kutatóknak nagyfokú szubsztrátspecifitást sikerült elérniük gyümölcslevek és C-vitamin tabletták elemzésénél [51]. Az enzimet zselatin gélben rögzítették glutáraldehid alkalmazásával oxigén elektród felületén. A mérés során az enzimreakcióban elfogyasztott oxigén mennyiségét mérték, aminek során azonban számos zavaró hatással kell számolni (hőmérsékletfüggés, reális mintákban az oldott oxigén zavaró hatása, nagymértékű háttérzaj, rossz érzékenység).

Brazil kutatók potenciometriás detektálással dolgoztak ki enzimátikus módszert aszkorbinsav mérésére [22]. Szintén aszkorbinsav oxidázt használtak, amelyet etilénvinilacetát kopolimer membrán felszínéhez kötöttek. A mérést grafit elektróddal végezték, de a már említett hibákat nem sikerült kiküszöbölniük.

Ugyancsak brazil kutatók kötöttek uborka (*Cucumis sativus*) extraktumból származó aszkorbát oxidázt nylon hálózathoz, s oxigén szenzorral vizsgálták a szubsztrát hatására bekövetkező változásokat -600 mV-on [52].

Az eddigi leghatékonyabb módszer készítői SIRE (Sensors based on Injection of the Recognition Element) típusú szenzort alkalmaztak [53]. Ebben az esetben átfolyó rendszerben végzik a méréseket, az enzimet a mérendő oldathoz keverik, és együtt injektálják. A mérés során az aszkorbinsav enzim nélkül illetve enzimmel együtt mért amperometriás jelének különbségéből következtettek az aszkorbinsav mennyiségére. A módszer nagyon pontos, specifikus módszer, a háttér zavaró hatása sem jelentkezik. Hátrányának mondható a drágasága, mivel viszonylag sok enzim szükséges egy méréshez és a felhasznált enzim nem használható újra.

A nem átfolyó cellás módszerek hátránya az átfolyó rendszerű (FIA Flow Injection Analysis) bioszenzorokkal szemben, hogy sorozat elemzésekre nem használhatók, azaz az automatizálhatóságuk korlátozott [54].

Enzim nélküli szenzor kifejlesztésére is volt példa, ahol hisztidin-réz komplexet használtak az aszkorbinsav mérésére [55].

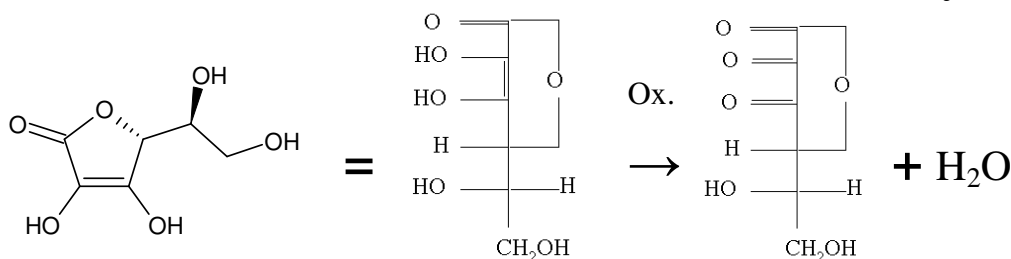
III.1.2 Célkitűzés

Mivel az antioxidánsok szerepe jelentős többek között az élelmiszertartósításban, minőség megőrzésben, s mennyiségük meghatározása fontos visszajelzés lehet a termék élettartamára

vonatkozóan, ezért a kutatási téma első részében a Központi Élelmiszerkutató Intézet bioszenzor fejlesztésén [63,64] alapuló L-askorbinsav (antioxidás) sorozat mérésére alkalmas rendszer kifejlesztését tűztük ki célul. A FIA rendszer mérési elve nagyban hasonló a SIRE típusú szenzorra [53], azonban a rögzített, preparált enzim illetve az elektród elkülönítése a rendszer nagyobb rugalmasságát teheti lehetővé (enzimcella egyszerű cseréje). Továbbá a rögzített, regenerálható enzim csökkenti a sorozat mérési költséget.

III.1.3 Enzim: Aszkorbát oxidáz

Az askorbát oxidáz egy 8 réz (II) iont tartalmazó oxidoreduktáz (E.C. 1.10.3.3). A 8 rézatomot spektroszkópiailag 3 osztályba sorolják attól függően, hogy milyen a kémiai környezetük: I, II és III típusú. Szilárd, kristályos formájában a benne található réz miatt kék színű. Az enzim egy oxigén molekula 4 elektronos redukcióját képes elvégezni, ezzel vizet előállítva, miközben az L-askorbinsavat [56] dehidro-askorbinsavvá alakítja (4. ábra).



4. ábra: Az askorbát oxidáz által katalizált oxidációs folyamat

Ez a reakció a *citokróm c* oxidáz enzim reakciójához nagyon hasonló. Csak magasabb rendű növényekben fordul elő, s általában a tökfélék közé tartozó *Cucurbita* fajokból végzik a preparálását különböző módszerekkel. Szerkezetét tekintve dimer, s molekulatömege közel 140000 Da (a 3D szalagmodellt az 5. ábra szemlélteti).. Az enzim növényekben betöltött *in vivo* szerepe még nem teljesen tisztázott. *In vitro* vizsgálatok alapján elmondható, hogy mivel a katecholokkal és a polifenolokkal is reakcióba lép, ezért szerepe lehet olyan biológiai folyamatokban, mint a gyümölcs érése.



Működésének inhibitorai, zavaró ionjai: F^- , CN^- , N_3^- , Zn^{2+} . Az askorbátra mint szubsztrátra megállapított enzim kinetikai állandók: $k_{cat}=8 \times 10^3 s^{-1}$ és $K_M=0,2 \text{ mM}$.

5. ábra: Az askorbát oxidáz röntgendiffrakcióval meghatározott szalagmodellje (PBD kód 1ASO) [57]

A mechanizmus során az I. típusú rézionnak egy elektront ad át az aszkorbát, s keletkezik az ú.n. szemidehidroaszkorbát, mely ezután spontán átalakuláson megy keresztül. Az ezután bekövetkező regenerálódási folyamat az I-III. típusú réz atomok közötti intramolekuláris elektrontranszfer és a kialakuló réz-oxigén komplex kialakulásán keresztül történik.

III.1.4 Mérőrendszer: FIA (Flow Injection Analysis) rendszer

Az első áramlásos befecskendezéses rendszert 1975-ben mutatták be (Ruzicka és Hansen), s a kémiai elemzés automatizált módszereiben alkalmazták. Egy meghatározott mennyiségű mintát injektálunk folyamatos, megszakítás nélküli folyadék áramba, s a mintazóna lamináris áramlással halad végig a csőrendszeren. Az eredeti dugószerű profil az előrehaladás során elmosódik komplex diffúziós és konvekciós folyamatok során, s elkeveredik a vivő közeggel. Ez kémiai reakció lejátszódását is lehetővé teszi, ha a vivő közeg valamilyen reagenst tartalmaz. Fotométerek, flouriméterek, pH vagy ionszelektív elektródok ill. amperometriás cellák építhetők be detektorként a kialakított átfolyó rendszerbe. Egy FIA rendszer részei tehát a perisztaltikus pumpa, ami a folyamatos folyadékáramot biztosítja, a minta injektor és a detektor. Egyéb a vizsgálatokat segítő elemek is bekerülhetnek a rendszerbe, mint keverő kamrák, katalitikus vagy affinitás oszlopok, gáz diffúziós vagy dialízis kamrák [58,59].

A meghatározott pumpálási sebességnek, az adott csőhossznak és átmérőnek köszönhetően pontos idővel írhatóak le a rendszerben lejátszódó folyamatok, azt is lehetővé téve, hogy kémiai reakciók kinetikai feltételek mellett fussanak az egyensúlyi folyamatok beállta nélkül, tehát a minta rendszerbe adagolása is gyorsabb lehet. A FIA rendszer jele egy meghatározott magassággal és szélességgel leírható csúcs, aminek az alakját a beadagolt minta mennyisége, a rendszerben történő elmosódás és a kémiai reakció gyorsasága határoz meg. Ha a rendszer feltételeket állandó szinten tartjuk, akkor akár a csúcsmagasság változásainak figyelemmel kísérése is elegendő a jel kiértékeléshez.

A FIA megoldás a folyamat megfigyelése, ellenőrzése és beépített mintázási lehetősége alapján nagyon ígéretes megoldás bioszenzor fejlesztésekben.

Injektorok

Korábban egyszerű fecskendőkkel juttatták a folyadékáramba a mintát, ezután következtek a manuális, majd automata injektor szelepek. Általában a bejuttatott mintamennyiség 15 µl-től 300 µl-ig terjed, ahol az alsó határt a csatlakozók fizikai közelítésének korlátja, míg a felső határt a feltekerhető csőhossz határozza meg. Akkor történik meg az injektálás, ha a mintát tartalmazó hurkot befördítjük a hordozó fő áramba, s így a vivő közeg bemossa a rendszerbe a mintahurok tartalmát. Ismételhető eredmények manuális injektorral csak megfelelő gyakorlat után érhetőek el, míg egy teljesen automatizált injektor rendszer esetén az ismételhetőség a pontos időzítéssel biztosított.

Reakció kamrák

A legkönnyebb módja, hogy kémiai, biokémiai reakciót egy FIA rendszerben hajtsunk végre, ha oldható formában hozzáadjuk a reagenst a vivő közeghez, vagy injektoron keresztül bejuttatjuk az áramba. Ez a jelentős reagens fogyasztás elkerülhető, ha a reakcióhoz szükséges reagenst egy az áramlásba bekötött reakció kamrában kötjük meg. Az enzimet, antitestet, egész sejtet szilárd hordozón vagy membránokon köthetjük meg a fizikai tulajdonságaik (méret, töltés, hidrofób domén) felhasználásával. A megkötés során az enzim veszít ugyan mozgékonyaságából, azonban aktivitását megőrzi, s regenerálódás után ismételt reakcióba vihető. Különböző feltételeknek kell teljesülniük, hogy a reakciókamra hordozó anyaga megfelelőnek bizonyuljon:

- megfelelő stabilitással kell tudnia megkötni az enzimet/fehérjét ionos vagy funkcionális csoportokon keresztül kovalens kötéssel
- megfelelő mechanikai sajátosságokkal kell rendelkeznie, hogy bírja az állandó folyadékáramlást
- sem a vizsgálandó anyag, sem a keletkező termék nem adszorbeálódhat az anyagon

Leggyakrabban a kovalens kötést használják, ami során sokszor ugyan jelentős aktivitás csökkenés figyelhető meg a több ponton történő kötés kialakulás miatt, de hosszú távú stabilitásuk jobb, s kevésbé hatnak rájuk a pH illetve hőmérsékletváltozások.

A felvitt enzim mennyiségét a választott reaktor típus határozza meg elsősorban, s mivel az enzim vizsgálandó anyaghoz való hozzáférése is meghatározó a hatékonyság szempontjából, ezért a töltött ágyas kamrák bizonyultak a legjobbaknak. Ennek a megoldásnak a mikrostruktúras továbbfejlesztését jelenti, mikor az enzim az átfolyó csatorna belső felszínén kerül megkötésre szilícium rétegeken.

Eloszlás

Az átfolyó rendszerbe beépített minden új elem megváltoztatja a minta áramlási profilját. Mivel a diffúzió időfüggő folyamat, az alacsony áramlási sebességek is növelik az eloszlási hatást, s a dugószerűen vivőáramba juttatott minta határán kialakuló koncentráció gradiens változásai idővel a minta áram közepének irányába hatnak. A FIA rendszerben bekövetkező eloszlást a diszperziós koefficienssel (D) írják le

$$D=c_0/c_{\max} \quad (1)$$

ahol c_0 a kezdeti, bejuttatott koncentráció, míg a c_{\max} pedig, ami ténylegesen elérte a detektort (1. egyenlet). Az áramlási viszonyok miatt a c_{\max} mindig kisebb, mint a kezdeti koncentráció, s D a hígulás mértékét írja le $D > 1$. A D meghatározásához egy adott oldott festék abszorpciójának (H_0) és ugyanezen festék injektált mintaként kapott abszorpciójának (H_{\max}) hányadosaként juthatunk. Tehát a minta eloszlás hatékonysága szempontjából a nagyobb térfogat, magasabb áramlási sebesség, rövidebb csőhosszak és kevesebb áramlásba épített elem a kedvezőbb. Az ismételhető mérések szempontjából elengedhetetlen az eloszlással kapcsolatba hozható tényezők állandón tartása.

A kutatómunka során az elsődleges cél az volt, hogy egy olyan mérési módszert fejlesszünk ki, amely alkalmas lehet más szubsztrátok elemzésére is a megfelelő oxidáz enzim használatával, enzim cella cseréjével, ill. lehetőség legyen a rendszer miniaturizálására. Mivel az enzimcella és mérőcella sorba van kötve, ezért a szubsztrát hosszabb időn át érintkezhet az enzimmal, így az enzimreakció teljesebb lehet, ami az érzékenység és kimutatási határ növekedését eredményezheti. A fejlesztés során az enzim reakció hatására bekövetkező aszkorbinsav jel csökkenést mértük, s az alkalmazott üveges szén elektróddal pozitív potenciálon történő mérések esetén alacsony alapvonal zajjal és regenerálódási idővel számolhattunk.

III.1.5 Anyagok és módszerek

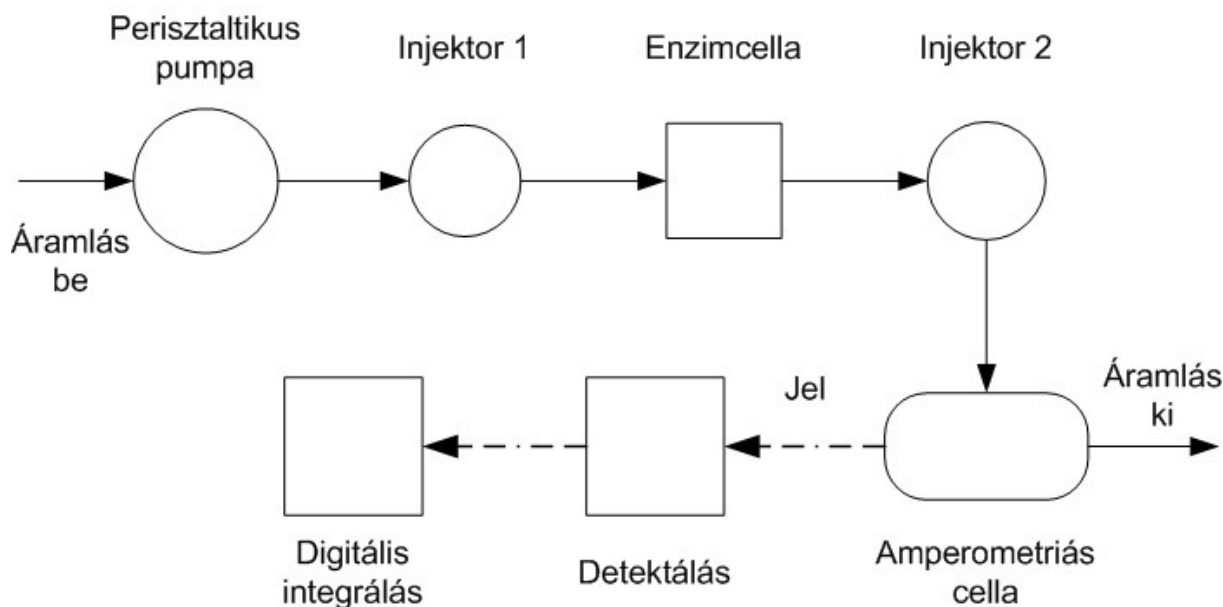
Anyagok

Aszkorbát oxidáz (330 U/mg, *Cucurbita sp.*, EC 1.10.3.3) és HPO_3 (Merck) került beszerzésre. Marha szérum albumint (BSA) és a glutárdialdehidet a Sigma-Aldrich szolgáltatta. A sertés vékonybél (természetes fehérje membrán) hazai forrásból származott. Az L-aszkorbinsav, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , CH_3COONa és CH_3COOH -at a Spektrum-3D Kft.

biztosította. Minden használt vegyszer analitikai tisztaságú volt, s az oldat készítéshez Milli-Q HPLC vizet használtunk.

Mérési eszközök

A vizsgálatokra alkalmazott átfolyós rendszerben aszkorbát oxidáz enzimen alapult az L-aszkorbinsav [56] kimutatás.



6. ábra: Az alkalmazott FIA rendszer sematikus ábrája

Az injektálásos, átfolyós vizsgálati rendszer (FIA) felépítése a következő volt (6. ábra): puffer tároló edény, perisztaltikus pumpa (Gilson Minipuls3), 2 manuális injektor (20 µl mintabemérő hurok, Rheodyne 7725i, Cotati, CA) és egy vékonyrétegű amperometriás cella (Model. 5040, ESA, USA) összekapcsolva egy elektrokémiai detektorral (Coulochem III, ESA, USA) s digitális jelfeldogozó egységgel (személyi számítógép), Assistant[®] vízfürdő, digitális kontakt-hőmérő. Az állandó munkapotenciált az amperometriás cellába beépített referenciaelektrod biztosította (esetünkben +400 mV az ESA által beépített Cd referencia elektróddal szemben).

III.1.6 A készülék összeállítása

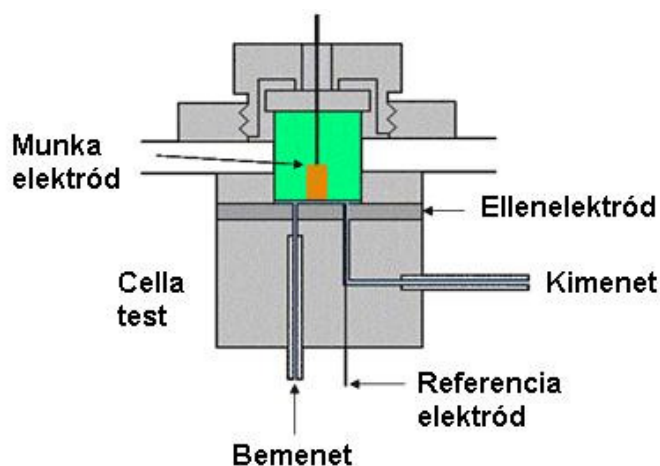
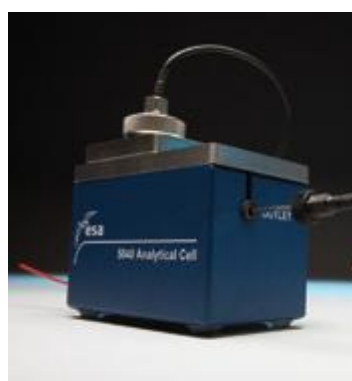
Az első készülék összeállítás (7. ábra) a Központi Élelmiszerkutató Intézetben kifejlesztett rendszerhez hasonló volt [63,64], s az első próbafutások alatt különböző mérést befolyásoló tényezőket derítettünk fel:

- a perisztaltikus pumpa esetén a pumpát ki kell nyitni minden leállításnál, és az aktuálisan használt csövet le kell venni a nyúlás/eldeformálódás elkerülésére és a hosszabb élettartam érdekében
- az injektorba történő befecskendezés után azonnali injektálásnak kell következnie a hiba csökkentésére
- a vékony HPLC csövek csatlakoztatásánál ügyelni kell a pontos illeszkedésre, mivel a csatlakozásoknál kialakuló átmérő növekedések az injektált minta detektált csúcsának elhúzóódását eredményezheti



7. ábra: Az első készülék összeállítás (balról: perisztaltikus pumpa, manuális injektor, enzimmegőrző (injektor mögött), amperometriás cella, amperometriás detektor, regiszter)

- az elektród időszakos tisztítására és kezelésére elektródtisztító eszközöket kell használni, mely megfelelő módszeréhez az irodalmi leírásokat vettük alapul



8. ábra: Az amperometriás mérőcella képe és metszeti ábrája

A munkaelektrod üveges szén (Glassy carbon), melyet szén alapú polimer kontrollált körülmények között történő pirolízisével (2000 °C) állítanak elő. Az ellenelektrod rozsdamentes acél. A mérőcellában található kadmium referencia elektrod nem igényel cserét, tisztítást vagy speciális töltő folyadékot, s széles pH tartományban ad stabil, pH kompenzált jelet (8. ábrán látható a mérőcella felépítése). Az elektrod előkezelését irodalmi leírások alapján dolgoztuk ki [60,61]. Oxidált üveges szénnel már történt korábban L-aszkorbinsav mérés [62].

III.1.7 Elektrod előkezelési protokoll

1. fázis: Az elektrodot az elektrodpolírozó kitt segítségével először közepesen durva műanyag membránon polírozzuk HPLC víz és 0,3 µm szemcseméretű Al₂O₃ szuszpenzió segítségével (15 perc), majd finom polírozzuk HPLC víz és 0,3 µm szemcseméretű Al₂O₃ szuszpenzió segítségével (10 perc). Ezután HPLC vízzel öblítjük, s 30 mp-ig ultrahangos mosóban mossuk az esetleges szuszpenzió nyomok eltávolítására (ne törölgessük, mert megkarcolódik!) Ha az elektrod felületén szemrevételezés után nem látható karcolás, egyenetlenség, folt, akkor továbbléphetünk a 2. fázisra ellenkező esetben az 1. fázist megismételjük.
2. fázis: A megmosott elektrodot kevés 0,1M HCl oldatba állítjuk 30 percre, majd ezután HPLC vízzel mossuk, s kb. 5 percre HPLC vízbe tesszük, hogy a savnyom maradékokat lemoszuk.
3. fázis: A savazott elektrodot a puffer oldattal mossuk a FIA rendszerben 400 mV-on 10 percig (0,55 ml/perc). Ezután az elektrodot 5 percig 1,75 V-on oxidáljuk, majd 30 mp-ig mossuk a cellát kikapcsolva, s végül 1,5 percig -1,00 V-on redukáljuk.
4. Az elektrodot hosszabb ideig mosassuk a pufferrel (2 óra) 400 mV-on, míg az alapvonal kellően alacsony értékre áll be (ez utóbbi segíthető minta injektálásával!). Ha az eljárás megfelelő sikerű, akkor az elektrod felülete egységes (folt nélküli), nedvesen szivárványos, szárazon kissé sárgás megjelenésű.

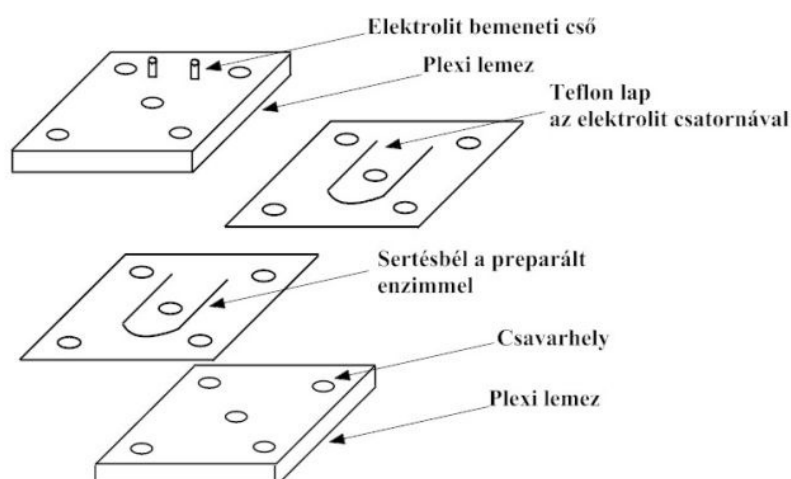
III.1.8 Enzimcella készítés

A pH optimum az enzim számára pH=5,5-7,0-ig terjed szabad formájában, ez a megkötődés hatására természetesen változhat, s 4,5 és 8,3 pH-n az enzim aktivitás már csak 50%-a az eredetinek.

Az előzőek figyelembe vétele fontos a cella készítésénél, ahol először a fagyasztott, sózott sertés vékonybelet kiolvasztjuk, s alaposan megmossuk a sótól. Ezután 3-4 db 15-20 cm-es darabot vágunk le belőle, melyeket a nyílásuknál az ujjunkra felhúva átvágunk, majd a kapott darabokat desztillált vízben tovább áztatjuk, hogy a konzerváló só maradéktalanul kioldódjon. Az előkészített cellát szétszereljük, s az alsó plexi részre alkoholos filctollal felrajzoljuk a teflonlap segítségével az elektrolit csatornát. Ezután kiválasztjuk a megfelelő nagyságú és minőségű béldarabot (ne legyenek rajta kinövések, hibák, fátyolos vagy kemény rész stb.), ráfeszítjük az előkészített plexi lapunkra és gumigyűrűvel rögzítjük az oldalt lelógó részeket (száradás közben összehúzódnak!). Szárítószekrényben vagy szobahőmérsékleten szárítjuk (túlszáritani nem szabad, mert töredezni kezd).

Eldöntjük, hogy mennyi egység (U) enzimet szeretnénk felvinni a membránunkra, s azt a mennyiséget feloldjuk 2,5-5 mg BSA-val (fehérje stabilizáló szerep, mennyisége az enzim mennyiségtől függ) az enzimre jellemző, optimális 150-200 μ l 66 mM, pH=5.6 foszfát pufferben (a BSA nehezen oldódik). Feloldódás után 50 μ l 2,5% glutáraldehidet adunk az oldathoz, majd gyorsan felvisszük az előzőleg felrajzolt elektrolit csatornának megfelelően a kifeszített vékonybél membránra. A cellát 12 órán keresztül szobahőn szárítjuk. A sertés vékonybél megfelelő száradása ahhoz kell, hogy a felvitt BSA+enzim+glutáraldehid oldat ne folyjék szét rajta.

Dugófúró készlettel kilyukasztjuk a membránt a csavarok helyén, s óvatosan összeszereljük a cellát (a csavarok meghúzásánál a kerékcserénél jól ismert átlós meghúzási sor a javasolt, mert így nem sérül a membránunk). Az enzimcella felépítése a 9. ábrán látható.



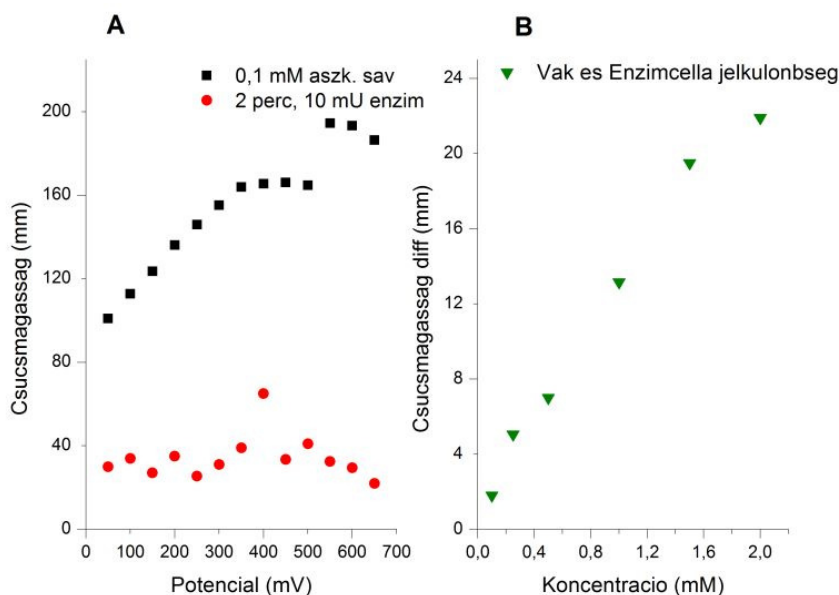
9. ábra: A plexi, teflon és sertésbél alapú cella [63,64]

Az első használat előtt a cella aktivitása növekedett a 66 mM-os, pH=5,6 foszfát puffer oldattal való egy éjszakás állás során. A rendszerbe kötés után célszerű volt továbbá nagyobb áramlási sebességgel az amperometriás cella előtt a hulladékgyűjtőbe mosatni az új

enzimcellákat, mivel az esetlegesen leváló fehérje részek eltömíthették az amperometriás cella bemeneti nyílását.

III.1.9 Előzetes vizsgálatok

A mérések során először az aszkorbinsav jel potenciálfüggését és az aszkorbinsav koncentrációban az enzimreakció hatására bekövetkező változást vettük alapul (10. ábra). 50 mM, pH=5,6 foszfát puffert használtunk, s minden mérési ponthoz 3 injektálás átlagát vettük. Az enzimmel injektált mérésekhez használt oldatot 1000 μ l 0,1 mM aszkorbinsav oldat és 1 μ l 10 U aktivitású enzimoldat szobahőn történő inkubálásával nyertem. A koncentráció függés vizsgálatánál nehézséget jelentett, hogy a vak cella, enzim cella (50 U aktivitású) csere nem volt könnyen kivitelezhető.



10. ábra: Az aszkorbinsav jel és enzimes aszkorbinsav jel potenciál (A) függése ill. vak és enzimcellával nyert eredmények különbsége (B) 0,5 ml/perc áramlás, 400 mV mellett. (A használt filctollas regiszter miatt a csúcsmagasságok mm-ben megadva.)

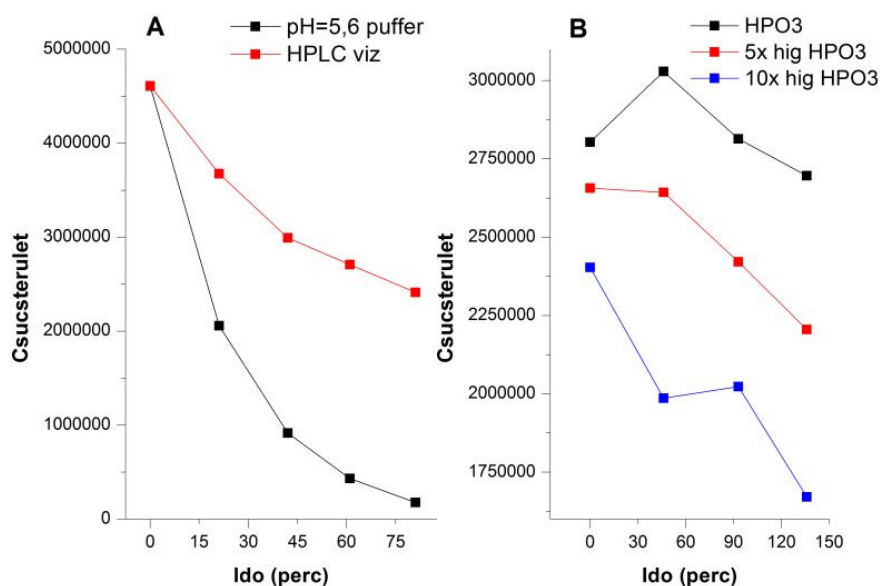
Az előzetes eredményekből látszott, hogy az adott aszkorbinsav koncentráció, viszonylag magasabb potenciálon (300 mV felett) ad nagyobb jelet, s az enzimreakció hatására bekövetkezett jelcsökkenés jól megfigyelhető. Továbbá a vak és enzim cellás mérésekből a jel különbség koncentráció függése jól kivehető, bár a linearitás nem volt egyértelmű. A jelek kiértékelésénél a csúcsmagasságokat vettük alapul milliméterben, majd később korrigáltuk az értékeket a félértékszélesség figyelembevételével.

III.1.10 Aszkorbinsav oldat stabilitásának vizsgálata

Az elkészített enzimműködés esetén nagy ingadozást tapasztaltam a mért jelekben, ezért vizsgáltam az aszkorbinsav törzsoldat stabilitását először amperometriásan, majd HPLC és UV-VIS fotometriás módszerrel. A mérések során tisztázódott, hogy a stabilizáló szerként az oldatokhoz adott $2 \text{ g}/100 \text{ cm}^3 \text{ HPO}_3$ nagyon eltolja a puffer pH-t (pl.: $0,5 \text{ g HPO}_3$ hozzáadása $25 \text{ cm}^3 \text{ pH}=5,6$ -os puffer oldathoz $\text{pH}=1,90$ eredményezett!), illetve az aszkorbinsav amperometriás jelének nagysága nagyban függ a pH-tól. Továbbá, ha a mérések során csak a törzsoldatban található HPO_3 , akkor a hígítási sor készítésénél a legkisebb koncentrációk esetén ($0,1 \text{ mM}$ és $0,25 \text{ mM}$) ez olyan mértékben hígul, hogy az oldatok stabilitása nagyon lecsökken. Ezért elkezdtem kisebb metafoszforsav koncentrációk vizsgálatát a későbbi minta előkészítés hatékonyságának javítására.

Aszkorbinsav bomlás mérése

Irodalmi leírásokban már korábban tanulmányozták az aszkorbinsav bomlását [65]. A mi esetünkben a bomlás megfigyelése először a vakcellával amperometriásan történt, de mivel a jelek instabilitása miatt az egyes párhuzamos injektálások nem voltak összehasonlíthatóak, ezért inkább HPLC-s és UV fotometriás módszereket alkalmaztam a további vizsgálatokhoz (11.ábra). Készülék: Shimadzu LC-10AD, Detektor: Shimadzu SPD-10A, Oszlop: Supelco Discovery C-18 ($5 \mu\text{m}$ töltet, $15 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$, eluens: $13,5 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$ 900 cm^3 víz + $1,8 \text{ g N}$ -cetil-N,N,N trimetil ammónium bromid $100 \text{ cm}^3 \text{ MeOH}$) [40].



11. ábra: Aszkorbinsav oldat stabilitás vizsgálata HPLC méréssel 66 mM foszfát pufferben, HPLC vízben ($0,75 \text{ mM}$ konc.) -A rész és (250 mM , 50 mM és 25 mM) metafoszforsavval ($0,4 \text{ mM}$ konc.) –B rész.

HPLC-s módszerrel vizsgáltam a 2 g/100 cm³ (250 mM), 0,4 g/100 cm³ (50 mM) és a 0,2 g/100 cm³ (25 mM) HPO₃ koncentráció, Millipore szűrt víz és csak foszfát puffer mellett az aszkorbinsav törzsoldat stabilitását. Az aszkorbinsav HPLC-s meghatározásánál a fenti standard módszert alkalmaztam.

Amint az a 11. ábrán látható, pufferben és Millipore szűrt vízben, szobahőn az aszkorbinsav bomlása viszonylag gyors (pufferben a 15 perc alatt közel felére csökken a mennyisége). Irodalmi koncentrációjú [40] metafoszforsav jelenlétében közel 90 percig stabil, míg 5x hígítású metafoszforsavval 60 percig megfelelő stabilitású az oldat.

Aszkorbinsav oldat stabilitás mérése

HPLC-s eredmények mellett ellenőrzésként UV-VIS fotometriát is használtam 265 nm hullámhosszon. Ebben a kísérletsorban az 50 mM metafoszforsav tartalmú, 66 mM foszfát pufferben készített, hűtőben tárolt aszkorbinsav oldat változásait figyeltem meg (1. táblázat).

1. táblázat: 50 mM koncentrációjú HPO₃ tartalmú, hűtőben tárolt aszkorbinsav oldat mért abszorbanciája 66 mM foszfát pufferben

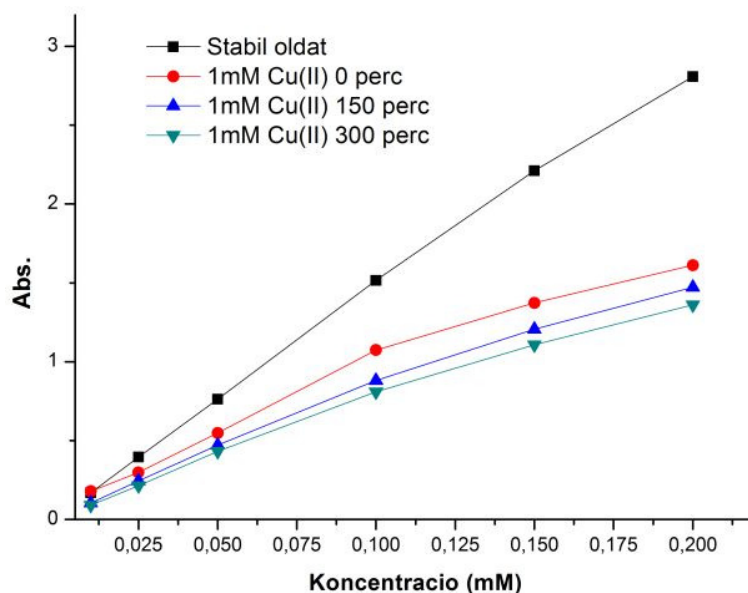
Konc/Idő	0 perc	60 perc	150 perc	1100 perc
0,02 mM	0,31	0,301	0,315	0,313
0,025 mM	0,394	0,376	0,396	0,399
0,05 mM	0,756	0,755	0,763	0,793
0,1 mM	1,505	1,508	1,515	1,59
0,15 mM	2,224	2,238	2,211	2,294
0,2 mM	2,851	2,841	2,808	2,839

A hűtőben tárolt, alap törzsoldatot csak a hígítások elvégzéséhez vettem ki szobahőmérsékletre. 0,4 g/100 cm³ HPO₃ tartalmú pH=8,2 66 mM foszfát pufferben (mért pH=6,7) oldottam a 88,1 mg (10 mM konc.) aszkorbinsavat, melynek mért pH-ja így 6,46-os volt. Ennek az oldatnak vizsgáltam a stabilitását 18,5 órán át 0,02 mM-0,2 mM hígítású kalibrációs sorozatméréssel. A kísérlet eredménye alapján kijelenthető, hogy az 50 mM koncentrációjú metafoszforsavval készített aszkorbinsav oldat legalább 18,5 órán keresztül stabil hűtőben tárolva.

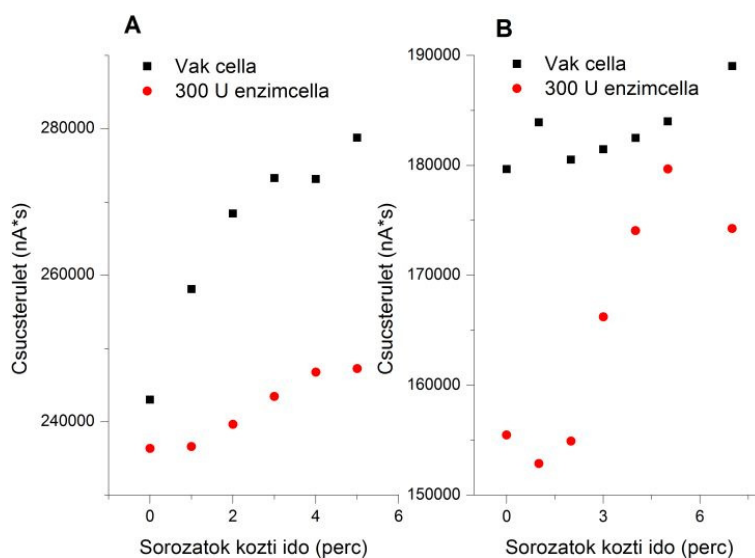
III.1.11 Rézionok hatása a regenerálódásra

Az aszkorbát oxidáz enzim egy 8 réz atomot tartalmazó oxido-reduktáz, ahol a Cu(II)→Cu(I) redoxireakció játszódik le. A Cu(II) ionokat tartalmazó oldat elvben segítheti az enzim gyorsabb regenerálódását és így a gyorsabb, hatékonyabb reakciót [66]. Azonban ezen ion jelenléte a HPO₃-al stabilizált aszkorbinsav oldatban gyorsítja az aszkorbinsav

bomlását is. A hűtőben tárolt 10 mM-os törzsoldat stabilitásának vizsgálatát 1 mM CuSO₄ koncentrációnál, fotometriásan 265 nm hullámhosszon. A kalibrációs sorozat 0,01-0,2 mM aszkorbinsav koncentráció tartományban került elkészítésre. A 12. ábrán jól megfigyelhető, hogy a metafoszforsavval stabilizált aszkorbinsav oldatban jelenlévő 1 mM Cu (II) ion már a hozzáadás pillanatában elősegítette a bomlást.



12. ábra: 50 mM koncentrációjú metafoszforsavval stabilizált aszkorbinsav törzsoldat (Stabil oldat) kalibrációs görbéje és a hozzáadott 1 mM koncentrációjú Cu (II) ionok hatása időben (UV-VIS fotometria, 265 nm)



13. ábra: Enzimcella és elektródregenerálódási vizsgálat 1 μM Cu (II) jelenléte nélkül (A) és jelenlétében (B). Minden mérési pontot 2 mM aszkorbinsav oldat háromszori injektálásával kaptuk.

Az enzimcella regenerálódás szempontjából 1 μM koncentrációjú Cu (II) ion jelenlétében vizsgáltam a kapott jelek változásait. Vak és enzimcella esetén figyeltem meg a jelek alakulását 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7 perccel az alapvonalra visszatérés után injektálva. Minden mérési pont 3 injektálás átlagából adódott 2 mM aszkorbinsav koncentrációval.

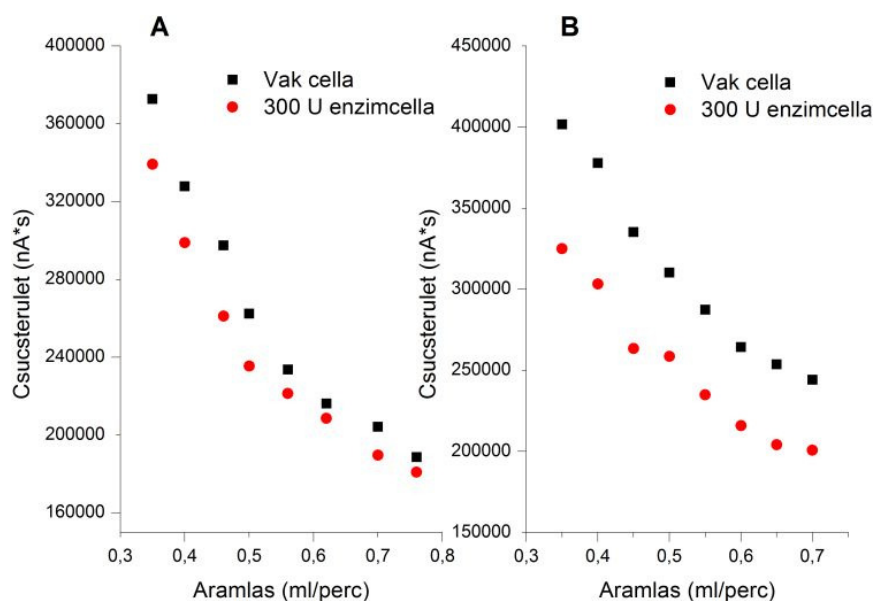
Az első kísérletben (13. ábra A) a használt puffer oldatban nem volt hozzáadott CuSO_4 , míg a második kísérlet során igen (13. ábra B). A regenerálódási idők az első esetben: vak- 160 mp, enzim- 150 mp, míg a második esetben: vak- 150 mp, enzim- 135 mp. Összességében megállapítható, hogy az oldathoz adott kis mennyiségű Cu (II) segítette a regenerálódási idő csökkentését, azonban hosszabb távon károsíthatja az enzimműködését.

III.1.12 Aszkorbinsav mérő bioszenzor optimalizálása

Áramlási sebesség vizsgálatok (cellacsere, 1 injektor, 7. ábra)

Az enzímreakció szempontjából érdemes volt megnézni az ideális áramlási sebességet, hogy maximális jelcsökkenés legyen megfigyelhető.

Alacsonyabb áramlási sebességeknél megnövekszik a tartózkodási idő az enzimműködésben, s így növekszik a vak és enzim jel különbsége, azonban az elmosódó áramlás miatt a detektálási idő és elektródregenerálódás (visszatérés az alapvonalra) is megnőhet. A 14. ábrán néhány cellacserevel végzett mérés eredményeit foglaltuk össze.

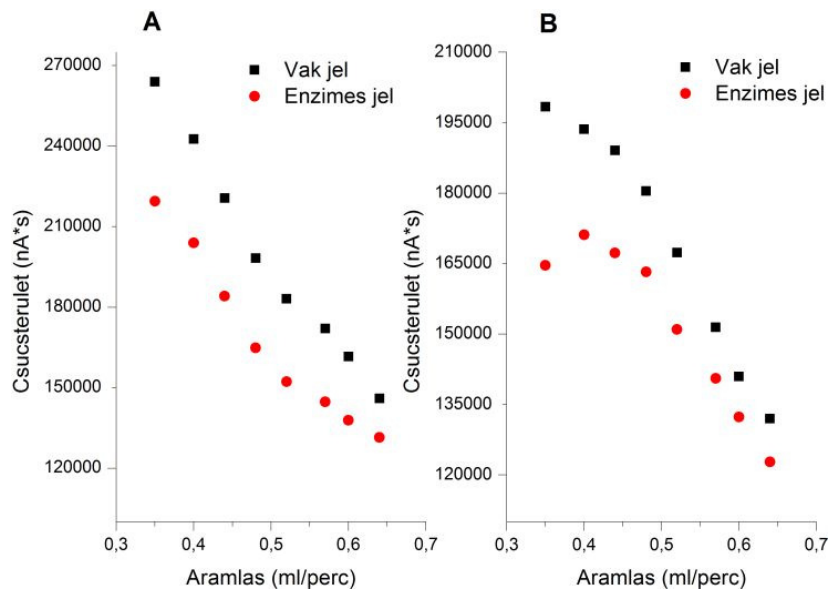


14. ábra: 2 egymást követő napon (A és B) megismételt áramlási sebesség függés vizsgálat 3 mM aszkorbinsav oldat használatával. Jól megfigyelhető, hogy az áramlási sebesség növelésével csökken az aszkorbinsav jel (vak cella, enzimcella), s reprodukálhatóság szempontjából számottevő különbség van egymást követő napok mérési eredményeiben.

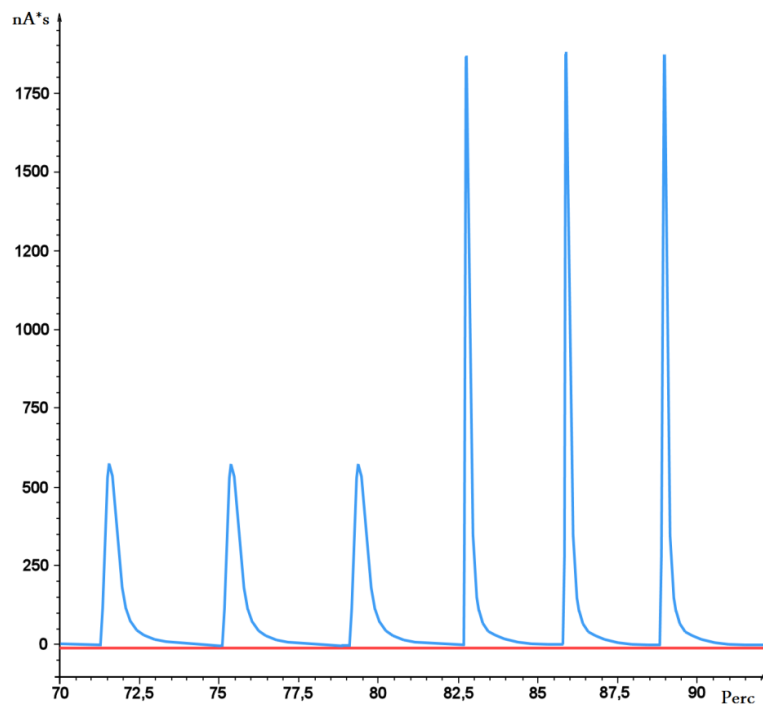
Áramlási sebesség vizsgálatok (enzimcella, 2 injektor, 6. ábra)

Ezután megvizsgáltuk a 2 injektoros összeállítással az áramlási sebesség függést (15. ábra), mivel az előző típusú mérésnél a cellák cseréje során áramlási sebesség változások is voltak. A 14. és 15. ábrán is jól megfigyelhető, hogy egymást követő napokon a munkaelektrodon

kapott jelek csúcsterületeiben is megfigyelhetők különbségek, ami elektródfelületi változásokkal magyarázhatók.



15. ábra: 400 mV potenciál, pH=5.5, 100 mM foszfát puffer, 300 U enzimcella, 3 mM aszkorbinsav paraméterek mellett áramlási sebesség függés vizsgálat 2 egymást követő napon (A és B). A kapott eredmények alapján az alacsonyabb áramlási sebesség a nagyobb arányú enzimes jelcsökkenés irányába hat.



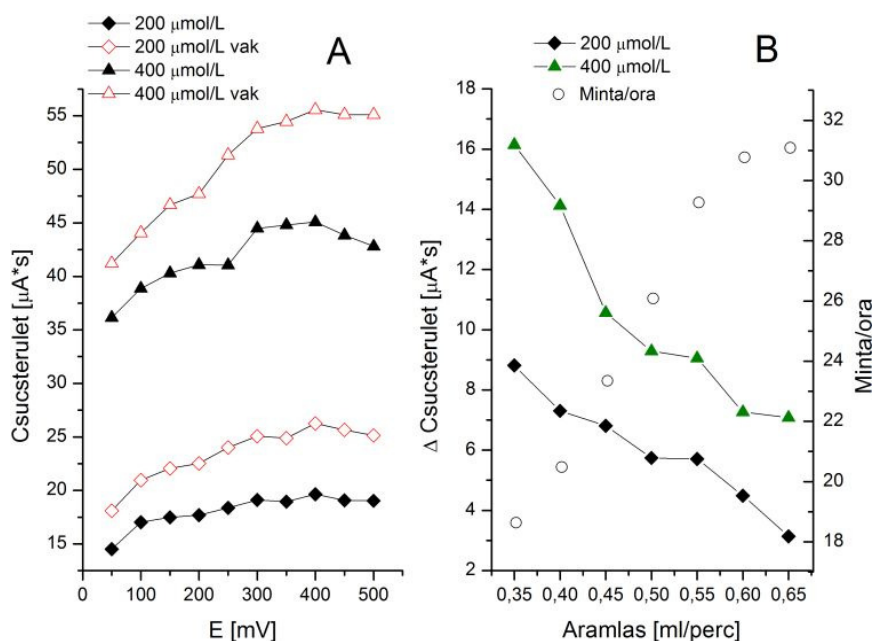
16. ábra: A 2 injektoros készülék összeállítással kapott csúcsok 100 μ M aszkorbinsav cella előtti és cella utáni injektálásával. A csúcsalakok nagy különbsége miatt a digitális jelfeldolgozás elengedhetetlen.

Ezen készülék összeállítás esetén azonban már csak digitális integrálás után lehetett értékelhető eredményeket kapni, hiszen a cella előtt és után injektálva más csúcsmagasságú és alakú jeleket kaptunk (16. ábra).

A méréseket 400 mV potenciál, pH=5.5, 100 mM foszfát puffer, 300 U enzimcella paraméterek mellett végeztem. Az aszkorbinsav törzsoldatból 3 mM hígítást készítettem a vizsgálathoz. Hasonló eredményekre jutottam, mint a cellacserés megoldásnál, hiszen jól megfigyelhető, hogy alacsonyabb áramlási sebességeknél nagyobb arányú a detektált és enzimes jel különbség is, mivel hosszabb időt tölt a minta az enzim és elektrokémiai cellában. Azonban összességében elmondható, hogy markánsabban kimutatható az áramlási sebesség-csúcsterület csökkenő tendenciájának összefüggése, ill. a cella csere folyamán megfigyelt áramlási sebesség és áramlási profilváltozásból eredő bizonytalanság is megszüntethető ezzel a mérési móddal.

Potenciálfüggés és regenerálódási idő

Annak meghatározására, hogy milyen potenciálon lehet a legnagyobb aszkorbinsav jelet ill. jelkülönbséget kapni, potenciál pásztázást végeztünk az 50-500 mV tartományban. A megfelelő potenciál kiválasztásánál fontos, hogy a lehetőségekhez mérten a legalacsonyabb oxidációs potenciált alkalmazzuk, hiszen magasabb feszültségnél az eloxidálódó, interferáló anyagok mennyisége is megnő a kapott jelben.



17. ábra: Potenciálfüggés vizsgálat (A) az 50-500 mV tartományban ill. elektrod regenerálódás (B) vizsgálat 200 μM és 400 μM aszkorbinsav koncentrációkkal. A növekvő oxidációs potenciálnál növekedett a kapott aszkorbinsav jel, enzimes jel mértéke is (A) ill. a megfelelő áramlási sebesség meghatározásánál a jelkülönbség nagyságán túl az elektrodjel alapvonalra visszatérése is fontos volt (B –Minta/óra).

A méréseket 200 μM és 400 μM koncentrációkkal végeztük, hogy a hasonló tendenciák jól nyomon követhetők legyenek. A mérés alapján 400 mV oxidációs potenciált választottuk,

hisz effölött nem növekszik számottevően az aszkorbinsav jel, s a vak és enzimes jel különbsége is itt legnagyobb (17. ábra A).

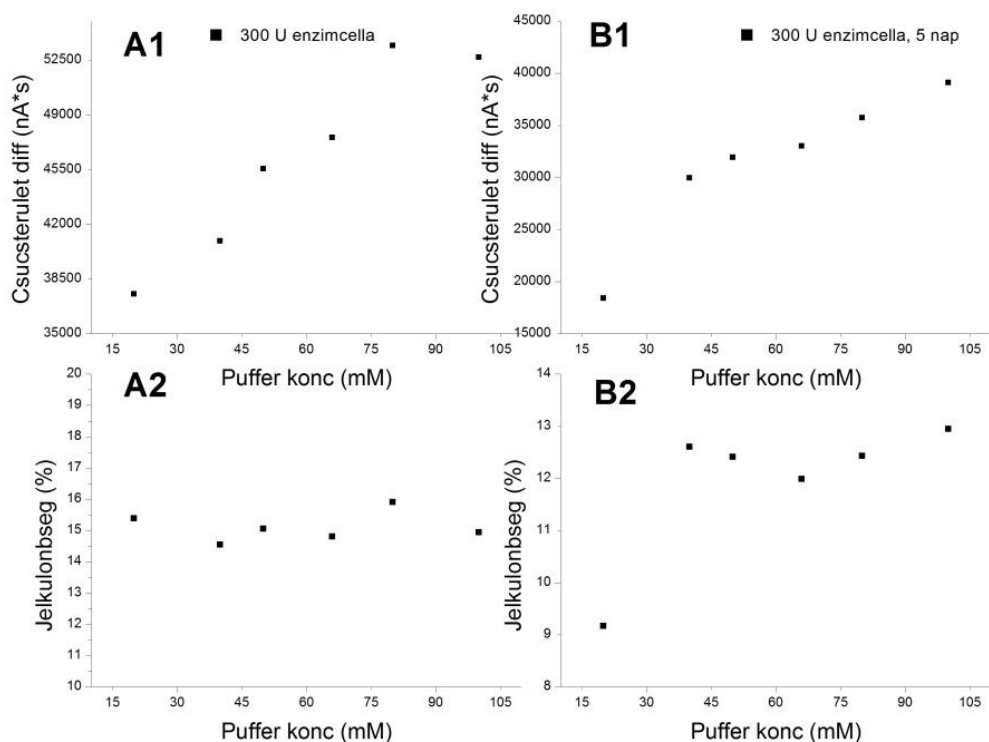
Az áramlási sebesség hatása mellett mértem az egyes injektálások közötti regenerálódási idő hosszát is (injektálástól az alapvonalig (0,080 μ A-es jelig) mért idő), mely a leghosszabbnak 0,35 ml/perc-nél 225-240 mp adódott, míg 0,65 ml/perc-nél a legrövidebbnek 130-145 mp (17. ábra B). Érdeemes megjegyezni, hogy a legnagyobb regenerációs idő csökkenés 0,35-0,55 ml/perc közötti szakaszon volt: 75 mp. A megfelelő regenerálódási idő kiválasztása meghatározó lehet nagyobb mintaszám esetén, hiszen sorozatmérések során fontos szempont a mérés gyors kivitelezése. Ezek és a korábbi áramlási sebesség vizsgálatok alapján 0.5 ml/perc áramlási sebességet választottuk a későbbi vizsgálatokhoz.

Ionerősség függés vizsgálata

Az ionerősség enzimes reakcióra és jelre gyakorolt hatásának vizsgálatát 20-100 mM foszfát puffer koncentráció tartományban végeztem, s bár a későbbiekben más anyagi minőségű puffereket is használtam, ezek esetében már nem végeztem ilyen jellegű vizsgálatot.

Az alkalmazott paraméterek a következők voltak: 400 mV potenciál, 300 U enzimcella, pH=5.6, szobahő, 0.5 ml/perc áramlási sebesség, 2 mM aszkorbinsav oldat minden puffer koncentrációnál. A két mérést 5 nap különbséggel végeztük el ugyanazzal az enzimcellával. Egyértelműen látszott, hogy nagyobb puffer koncentrációknál nagyobb a kapott jelkülönbség, ami elektrokémiai szempontból magyarázható a töltéshordozó ionok koncentrációjának növekedésével. Ez a jelnövekedés azonban nem jelentette azt, hogy az enzim aktivitás is nagyobb az egyes esetekben, mivel a teljes jelek százalékában arányos jelcsökkenésekről beszélünk (15% és 12,5%-os 18. ábra A és B). A 18. ábrán feltüntetett (A2 és B2) jelszázalékok a teljes aszkorbinsav jel továbbá a teljes aszkorbinsav jel és enzimes jel különbségének százalékos viszonyát mutatják.

Irodalmi leírások szerint további vezetősó (100 mM KCl) hozzáadása növelheti a jelintenzitást, azonban ezen puffer koncentrációknál már csak a párhuzamos injektálások eredményén javított valamelyest. A párhuzamos injektálások szórása vezetősó hozzáadása előtt RSD +/- 5% volt, ezért használatát nem tartottuk indokoltnak.



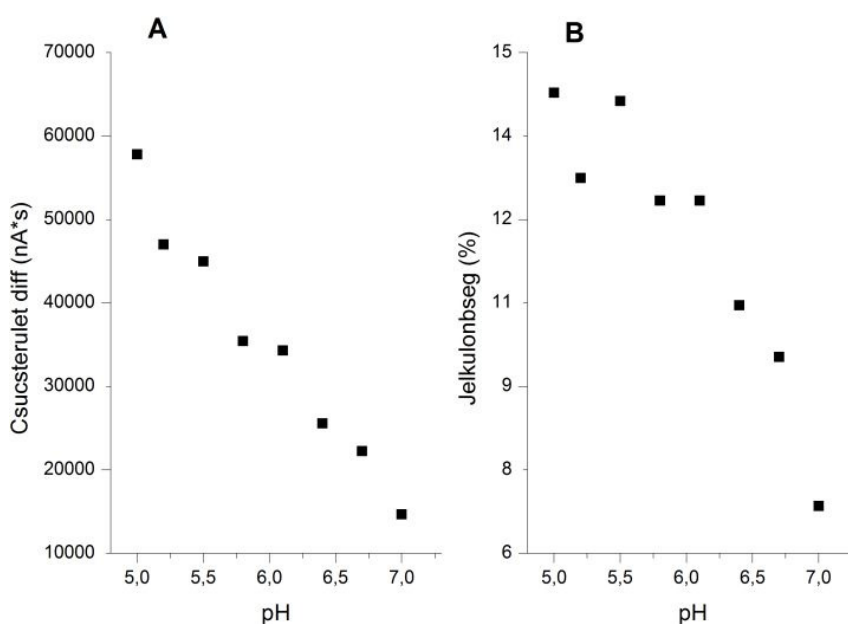
18. ábra: Ionerősség függés mérése új enzimcellával (A1) s 5 nappal később ismételve (B1) 20-100 mM foszfát puffer koncentráció tartományban. A jelkülönbségek növekedése mellett a teljes jelek százalékában közel azonos enzim aktivitás volt kimutatható. Paraméterek: 400 mV potenciál, 300 U enzimcella, pH=5.6, szobahő, 0.5 ml/perc áramlási sebesség, 2 mM aszkorbinsav

pH és hőmérsékletfüggés vizsgálatok

A pH függés vizsgálat tekintetében az volt a fontos, hogy az enzim pH optimuma eltolódott-e az immobilizáció során, s ha igen milyen mértékben. A natív enzimforma pH optimuma pH=5.5-7.0 (Sigma-Aldrich, Product Information).

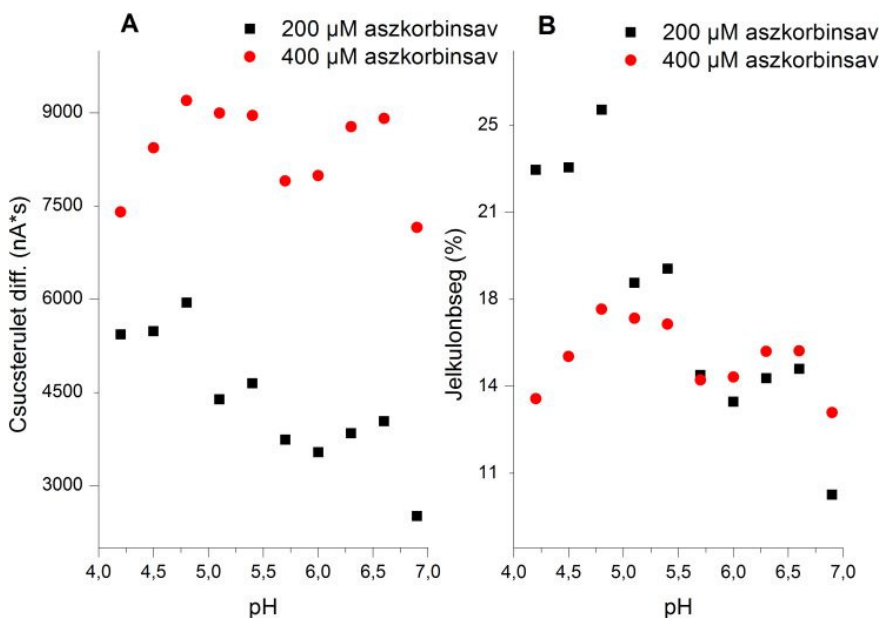
Az első mérések során foszfát pufferben ellenőriztük a pH=5.0-7.0 tartományt (19. ábra A), s megállapítottuk, hogy a jelkülönbségek egyértelműen növekszenek a savasabb tartományban (19. ábra B), s ez az enzim aktivitás növekedésével magyarázható, hiszen a jelkülönbségek százalékában ugyanez a tendencia figyelhető meg. 2 injektoros összeállításban az alkalmazott paraméterek a következők voltak: 400 mV potenciál, 100 mM foszfát puffer, szobahő, 20 µl mintahurok, 2 mM aszkorbinsav oldat.

Mivel a kapott eredmények alapján teljesen egyértelművé vált, hogy pH=5.0 alatt található az optimum az enzimreakció szempontjából, ezért a pH függés vizsgálatát a 2 injektoros összeállításban újra vizsgáltam, de ez alkalommal más puffer (Britton: 0.04 M H₃BO₃, 0.04 M CH₃COOH, 0.04 M H₃PO₄ 0.1 M NaOH-al beállítva) használatával (20. ábra).



19. ábra: Enzimcella aktivitás pH függésének vizsgálata a pH=5.0-7.0 tartományban. A pH csökkenésével (A) a jelkülönböveg százalékok növekedtek (B), ami az aktivitás növekedését jelezte. Paraméterek: 400 mV potenciál, 100 mM foszfát puffer, szobahő, 20 µl mintahurok, 2mM aszkorbinsav injektálva

A vizsgált pH tartomány pH=4.2-6.9, s a paraméterek 400 mV potenciál, 120 mM Britton puffer, szobahő, 20 µl mintahurok, 300 U enzimcella voltak. 200µM és 400µM aszkorbinsavat vizsgáltam, mivel ez már beleesett a későbbi kalibrációs tartományba.

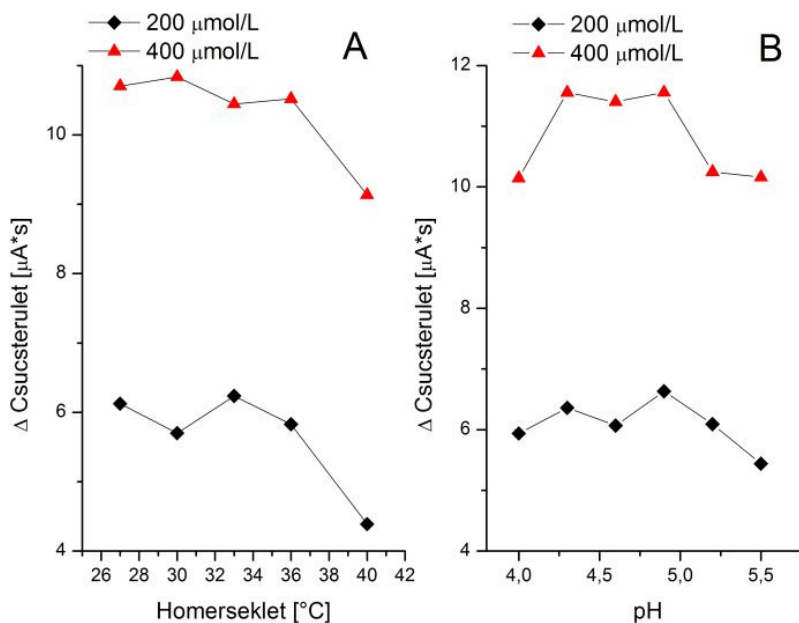


20. ábra: Enzimcella aktivitás pH függésének vizsgálata a pH=4,2-6,9 tartományban 200 és 400 µM koncentrációjú aszkorbinsavval. Paraméterek: 400 mV potenciál, 120 mM Britton puffer, szobahő, 20 µl mintahurok, 300 U enzimcella

Elég nagy szórást tapasztaltam a 200 μM aszkorbinsav jelkülönbség százalékainak savas tartományú pH=4.0-5.0 eredményeiben, ami az enzimcella nem megfelelő aktivitása és injektálási hibákból adódhatott. Azonban így is megállapítható, hogy közelítőleg pH=4.3 és 5.0 közé tehető a pH optimum. A mérések kiegészítéseként UV (265nm-es) detektálás is történt, de ezt a fajta detektálást nagyban zavarta a pH változása, s ezért az eredmények sajnos nem hordoztak kiértékelhető információkat.

Mivel az előzetes mérések alapján a valószínűsített optimális pH tartomány pH=4.3 és 5.0 közöttinek adódott, ezért ehhez a tartományhoz kerestem jó puffer kapacitású puffert, s így esett a választás az acetát pufferre (ecetsav $pK=4,7$). A későbbi reális mintákkal történő mérések során az alkalmazott 200 mM koncentrációban ennél a puffernél volt tapasztalható a legkisebb pH ingadozás. A kérdéses pH tartomány ellenőrző vizsgálata ezért már acetát pufferben készült (21 B ábra), ami alapján elmondható, hogy a pH optimum pH=4.3-5.0 közé tehető.

A reakcióteret jelentő enzimcella termosztálását fém tartószerkezet és vízfürdő segítségével oldottuk meg. A hőmérsékletfüggés vizsgálatánál nehézséget okozott az enzimcella (így a reakció tér) hőmérséklet mérése.



21. ábra: Hőmérsékletfüggés (A) mérése 400mV potenciál mellett, 0,55 ml/perc áramlásnál, 300 U enzimcella, pH=4.7, 200mM acetát puffer, 3 mM aszkorbinsav és pH függés (B) mérése 400mV potenciál mellett, 200 mM acetát puffer, 0,5 ml/perc áramlásnál, 300 U enzimcella

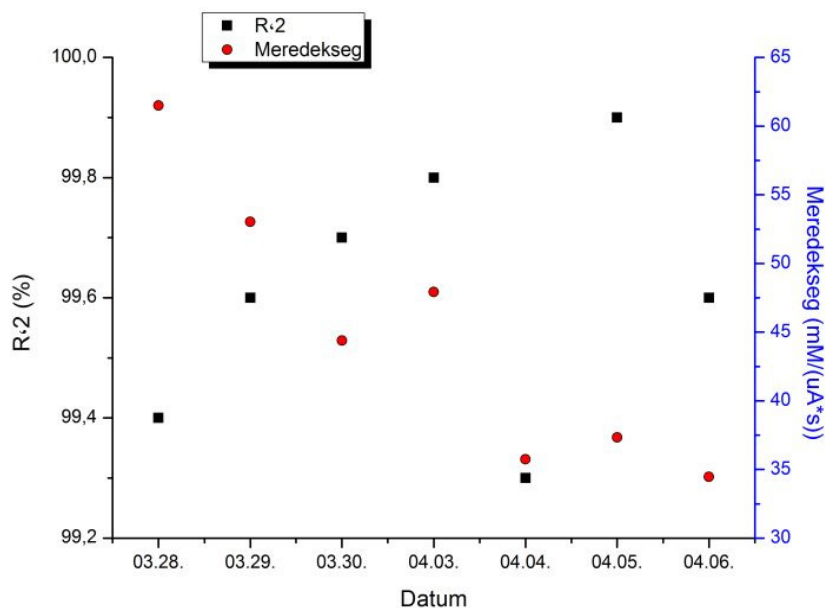
A plexi anyagú cella rossz hőátadása miatt a göztérbe helyezett hőmérő nem a valóságosnak (az enzimcellának) megfelelő hőmérsékletet mutatta, s ezért ezek a mérések nem voltak

megbízhatóak. Azonban a cella furatolása és a hőmérő furatba helyezése, valamint a cella alsó rész alumínium anyagra cserélése nagyban megkönnyítette a hőmérséklet mérést. A későbbiekben az alumínium alsó rész kontakt-hőmérős ellenőrző mérése tovább növelte a mérési stabilitást. Általánosságban elmondható, hogy a várható eredményekkel egybevágó végeredménnyel zárult a hőmérsékletfüggés mérése. A vizsgált 27-40 °C tartományban (21 A ábra) 36 °C-ig stabil aktivitás volt kimutatható, azonban felette már számottevő aktivitás csökkenés volt megfigyelhető.

Ezek a mérések 400 mV potenciál mellett, 0,5 ml/perc áramlásnál, 300 U enzimművelet, pH=4.7, 200 mM acetát puffer mellett folytak. A mérési eredmények alapján a későbbi mérések kivitelezésére a 33 °C-ot választottuk.

III.1.13 Enzimcella élettartama

A cella élettartam vizsgálatához egy adott enzimművelet egymást követő napokon kapott kalibrációs görbéinek meredeksége és a kalibrációs görbeilleszkedések megfigyelése szolgált információval (22. ábra).



22. ábra: A 250 U aktivitású enzimművelet kalibrációs görbéinek változásai (R²- illeszkedés, Meredekség-illesztett görbe meredeksége) a vizsgált időszakban

A kérdéses 250 U névleges aktivitású cellát 18 nappal a használat előtt készítettük, s felhasználásig szárazon, hűtőben tároltuk (4 °C). Felhasználás előtt a cella 2,5 órás acetát pufferes kondicionálása, majd még ugyanazon a napon (márc. 28) kalibrációs mérés történt. Az első használat után az egyes napok között a cellát hűtőben tároltuk pH=5.6, 66 mM foszfát

pufferen. Az adott 1 hetes vizsgálati periódusban a kalibrációkat követően a 2. táblázatban feltüntetett reális minták mérése történt meg.

2. táblázat: 250 U aktivitású enzimcellával vizsgált reális minták a megfigyelt 1 hetes időszakban

29. márc	30. márc	03.ápr	04. ápr	05. ápr	06. ápr
Móri ezerjő (bor)	Móri ezerjő (bor)	Móri ezerjő (bor)	Multivitamin tabletta	Multivitamin tabletta	Multivitamin ivólé

Amint az a 22. ábrán látható a görbe illeszkedés javult az idő előrehaladtával (kiv. 04.04., ami mérési hibából adódhat), ami az enzimfehérje hidratálódását jelzi. A 04.06. dátummal kapott eredmény, azaz a rosszabb kalibrációs illeszkedés eredménye, már viszont köthető az enzimreakció stabilitás csökkenéséhez. A kalibrációs görbe meredeksége mindeközben tendenciálisan csökkent, ami arra enged következtetni, hogy csökkent a cellaaktivitás. Külön érdekes, hogy a 03.30-04.03. időszakban a hosszabb foszfát pufferes állás kis mértékben segíteni látszott a cella regenerálódásban, hiszen kis mértékű növekedés volt tapasztalható a kalibrációs görbe meredekségében.

Mivel a görbemeredekség változásai a kiindulási jel nagyságától is függnnek, ezért megfigyeltük az enzim nélküli vak jelek változásait is (3. táblázat), amik csökkenő tendenciát mutattak, ami viszont mutatja az üvegeszén elektród reális mintákra és azokban található elektroaktív komponensekre való érzékenységét. Érdeemes megfigyelni a reális minták vizsgálatánál bekövetkező elektródfelszín változás hatását, hiszen a jel nagyságban bekövetkező jelentős csökkenések (9,5%, és 12,2%) a borminták injektálása után figyelhető meg, míg a multivitamin tablettára irányuló vizsgálatok során kisebb mértékű ez a változás.

3. táblázat: 100 μ M koncentrációjú aszkorbinsavra mért vak jelek nagysága és a jelcsökkenésből számolt enzimaktivitás alakulása (százalékban) a vizsgált időszakban.

	28.márc	29.márc	30.márc	03.ápr	04.ápr	05.ápr	06.ápr
0,1 mM vak jel (nA*s)	17530	17594	15888	15975	14019	14702	14449
Cella aktivitás (%)	39,93725	35,87587	32,47105	33,14554	29,38869	26,83308	28,51408

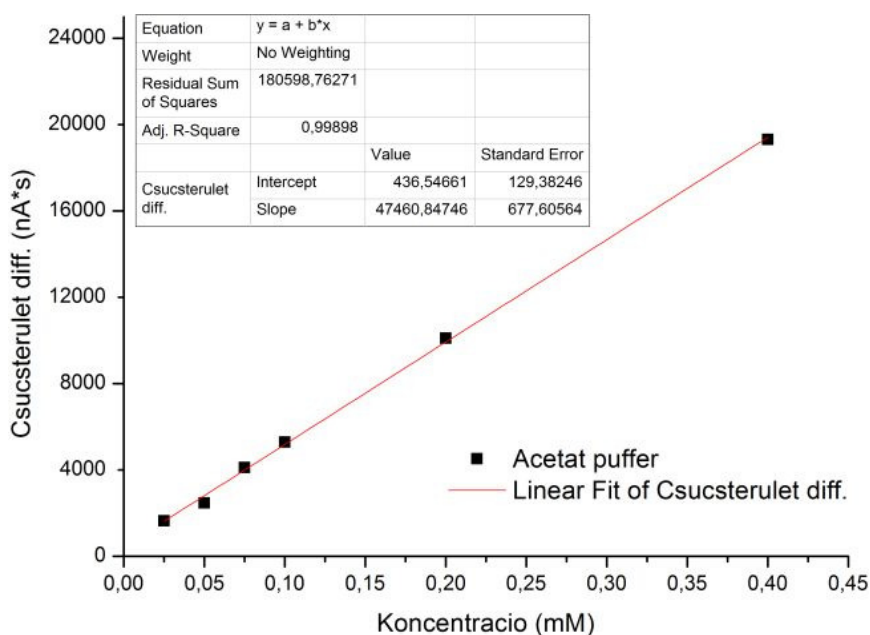
Továbbá a napi szintű aszkorbinsav jelekből számolt enzimaktivitás változások a 22. ábrán tapasztalt cellaaktivitás csökkenést mutatták.

III.1.14 Reális minták vizsgálata

A bioszenzor reális mintákon történő tesztelése során elsősorban folyadék halmazállapotú minták vizsgálatát végeztem, nevezetesen multivitamin pezsgőtabletta, bor (spiking technikával), és multivitaminos gyümölcslé.

Kalibráció

A foszfát pufferes vizsgálatoknál a mintahígítások során elég nagy pH (3-5 tized) eltolódást tapasztaltam, ami a HPO_3 hatására bekövetkező pufferkapacitás csökkenéssel magyarázható. Ezen jelenséget kiküszöbölendő új, jobb puffer kapacitású oldatot kerestem. Kipróbálásra került Na_2HPO_4 -citrát puffer, és K-acetát- CH_3COOH melyek közül az acetát puffer jónak bizonyult. A stabilabb pH érték biztosítása érdekében a méréseket az ecetsav pK értéke körüli pH-n végeztem pH=4.7-nél. Az acetát pufferes kalibráció eredménye a 23. ábrán látható.



23. ábra: Kalibráció felvétele a 25-400 μM aszkorbinsav koncentráció tartományban. Paraméterek: 400 mV potenciál, pH=4.7, 100 mM acetát puffer, 100 mM KCl, 300 U enzimmeghő, áramlás 0,5 ml/perc, 33°C hőmérséklet

A mérések során 400 mV, pH=4.7, 100 mM acetát puffer, 100 mM KCl, 300 U enzimmeghő, áramlás 0,5 ml/perc paraméterek mellett végeztem. A hígításokat 10 mM aszkorbinsav törzsoldatból végeztem (25-400 μM tartomány).

Amint látható ebben a pufferes közegben elég jó illeszkedésű kalibrációt sikerült megvalósítani (hozzá kell azonban tenni, hogy foszfát pufferes kalibráció során nagyobb arányú jeleket kaptam, s ez a hiba szempontjából előnyösebb). Minden nap új kalibrációt készítettem el, mivel az elektród jele néha egymást követő napokon is számottevően változott.

Bor minták

A bor komplex mátrixát (etil-alkohol, glükóz, almasav, borkősav, csersav, polifenolok, glicerin, természetes színyanyagok) tekintve ideális tesztelésre, s bizonyos bor készítési eljárásoknál adnak is aszkorbinsavat a borokhoz, forrásban lévő musthoz az un. oxidatív sokk megakadályozására (~60-100 μM koncentráció). Mivel az általam vizsgált borokban nem volt ténylegesen kimutatható az aszkorbinsav, ezért hozzáadott anyag visszamérését próbáltam.

1. mérés

1. minta: 1 cm^3 Móri Ezerjő (2005) + 4 cm^3 acetát puffer (minta pH=4.53)

2. minta: 1 cm^3 Móri Ezerjő (2005) + 1 cm^3 400 μM aszk. s. old. + 3 cm^3 acetát puffer (minta pH=4.53, 80 μM hígítási koncentráció)

A vak mintára mért aszkorbinsav tartalom 17 μM -nak míg a 2. mintára kapott eredmény 97 μM -nak adódott.

2. mérés

1. minta: 1 cm^3 Móri Ezerjő (2005) + 4 cm^3 acetát puffer

2. minta: 1 cm^3 Móri Ezerjő (2005) + 1 cm^3 200 μM aszkorbinsav + 3 cm^3 acetát puffer

3. minta: 1 cm^3 Móri Ezerjő (2005) + 1 cm^3 400 μM aszkorbinsav + 3 cm^3 acetát puffer

4. minta: 1 cm^3 Móri Ezerjő (2005) + 1,5 cm^3 400 μM aszkorbinsav + 2,5 cm^3 acetát puffer

A visszamért mennyiségek rendre: 1. 9 μM , 2. 53 μM , 3. 73,5 μM , 4. 116 μM

3. mérés

1. minta: 1 cm^3 Móri Ezerjő (2005) + 4 cm^3 acetát puffer

2. minta: 1 cm^3 Móri Ezerjő (2005) + 1 cm^3 200 μM aszkorbinsav + 3 cm^3 acetát puffer

3. minta: 1 cm^3 Móri Ezerjő (2005) + 1 cm^3 400 μM aszkorbinsav + 3 cm^3 acetát puffer

4. minta: 1 cm^3 Móri Ezerjő (2005) + 1,5 cm^3 400 μM aszkorbinsav + 2,5 cm^3 acetát puffer

A visszamért mennyiségek rendre: 1. N.A., 2. 15,5 μM , 3. 57,2 μM , 4. 81,1 μM

A mérések összesített eredményei a 4. táblázatban láthatók. Mivel a mérések során tapasztalt hiba okaként az esetleges zavaró anyagok oxidációja emelhető ki, ezért a következő méréseket 200 mV-os potenciálon kíséreltem meg, hogy tapasztalható-e javulás.

4. táblázat: A Móri ezerjő fehérbor méréseinek eredményeit összefoglaló táblázat (az 1/5 v/v hígított borra és a standard addícióval aszkorbinsav törzsoldatból bemért mennyiségekre kapott eredmények)

Móri ezerjő	Bor, mért (μM)	Számított (μM)	40 μM st. add	Számított (μM)	80 μM st. add	Számított (μM)	120 μM st. add	Elvárt (μM)
1. mérés	17	0		40	97	80		120
2. mérés	9	0	53	40	73,5	80	116	120
3. mérés	NA	0	15,5	40	57,2	80	81,1	120

4. mérés

1. minta: 1 cm³ Verpeléti Hárslevelű (2004) + 4 cm³ acetát puffer

2. minta: 1cm³ Verpeléti Hárslevelű (2004) + 1 cm³ 200 μM aszkorbinsav + 3cm³ acetát puffer

3. minta: 1cm³ Verpeléti Hárslevelű (2004) + 1 cm³ 400 μM aszkorbinsav + 3cm³ acetát puffer

A visszamért mennyiségek rendre: 1. 7,25 μM , 2. 42,7 μM , 3. 89,4 μM , 4. N.A.

5. mérés

1. minta: 1 cm³ Verpeléti Hárslevelű (2004) + 4 cm³ acetát puffer

2. minta: 1 cm³ Verpeléti Hárslevelű (2004) + 1 cm³ 200 μM aszkorbinsav + 3cm³ acetát puffer

3. minta: 1 cm³ Verpeléti Hárslevelű (2004) + 1 cm³ 400 μM aszkorbinsav + 3cm³ acetát puffer

4. minta: 1 cm³ Verpeléti Hárslevelű (2004) + 1,5 cm³ 400 μM aszkorbinsav + 2,5cm³ acetát puffer

A visszamért mennyiségek rendre: 1. 24 μM , 2. 64,7 μM , 3. 132,9 μM , 4. 155,2 μM

A mérés pontosságán a 200 mV-on történő mérés sem segített (a mérések eredményeit a 5. táblázat összegzi), ezért vak cellás ellenőrző méréseket végeztem az injektálás hibájának

kiszűrésére. Ezen mérések alapján megállapítást nyert, hogy az alacsonyabb koncentrációknál nagyobb mértékű a hiba, ami viszont valószínűleg az integrálás hibájával magyarázható.

5. táblázat: A Verpeléti hárslevelű fehérbor méréseinek eredményeit összefoglaló táblázat (az 1/5 v/v hígított borra és a standard addícióval aszkorbinsav törzsoldatból bemért mennyiségekre kapott eredmények)

Verpeléti	Bor, mért (μM)	Számított (μM)	40 μM st. add	Számított (μM)	80 μM st. add	Számított (μM)	120 μM st. add	Számított (μM)
4. mérés	7,25	0	42,7	40	89,4	80	NA	120
5. mérés	24	0	64,7	40	132,9	80	155,2	120

Multivitamin pezsgőtabletta mérése

Az acetátos kalibrációval multivitamin pezsgőtablettát is vizsgáltam, s ez alapján a következő eredményre jutottam kalibráció után (összesített eredmények a 6. táblázatban).

1. mérés

1 tablettát (60 mg aszkorbinsav/4,1162 g tablettá) 100 cm³ HPLC vízben oldottam fel (3,406 mM aszkorbinsav), 250 μl oldatot hígítottam 4750 μl acetát pufferrel (~170 μM konc.).

Kalibráció alapján visszamért mennyiség 179,3 μM, ami a teljes mennyiségre visszszámolva 63,1 mg aszkorbinsav.

2. mérés

1 tablettát (60 mg aszk. s./3,8473g tablettá) 100 cm³ HPLC vízben oldottam fel (3,406 mM aszkorbinsav), ezt hígítottam acetát pufferrel 10x, 20x és 40x-ére (~340μM,~170μM, ~85μM konc.).

A kalibráció alapján visszamért mennyiségek 97μM (68,3mg), 172μM (59,2mg) és 328μM (57,8mg).

6. táblázat: A multivitamin tablettá méréseinek eredményeit összefoglaló táblázat (a 60 mg aszkorbinsav tartalmú tablettá, különböző mértékű hígításaira kapott eredmények)

Multivitamin tablettá	40x híg (μM)	Számított (μM)	20x híg (μM)	Számított (μM)	10x híg (μM)	Számított (μM)
1. mérés			179,3	170		
2. mérés	97	85	172	170	328	340

Multivitamin ivólé vizsgálata

Kalibráció után Cappy Ice Fruit multivitamin rostos ivólé vizsgálatát végeztem (9 mg aszkorbinsav/100 cm³ ivólé, ~511 µM koncentráció) a multivitamin tabletta vizsgálatánál leírt módon. Hígítások 2x (~255 µM), 5x (~102 µM), 10x (~51 µM). Visszamért mennyiségek: 2x- N.A., 5x- 355 µM, 10x- 258 µM.

Amint az eredményekből látható a minta mátrixában található festék és egyéb oxidálható zavaró anyagok nagyon befolyásolták a kapott jelek nagyságát, illetve a meghatározás kivitelezhetőségét, mivel tartósabban megváltoztatják a munkaelektrod felületét. Esetleges szűrés után akár jobban használható a módszer, bár a legkézenfekvőbb a zavaró hatást okozó komponensek kiszűrése lenne, melyhez azonban az egyes komponensek zavaró hatását külön-külön és kombinációban vizsgálni kellene.

Összegzés

A kifejlesztett két injektoros és egy cellás bioszenzor az optimális működési paraméterek meghatározása után megfelelő kalibrációra alkalmas volt 25-400 µM tartományban.

Reális minták vizsgálata során fehérbor, multivitamin pezsgőtabletta és multivitamin ivólé elemzését végeztük. A multivitamin tabletta esetén hígítástól függően ~3,5-14% eltéréssel lehetett az aszkorbinsav koncentrációt meghatározni. A másik két mátrix eredményei alapján a fehérborban és multivitamin ivólében található könnyen oxidálható komponensek zavaró hatásúak az aszkorbinsav meghatározás szempontjából. Valószínűleg a minták polifenol tartalma (flavonok, fenolsavak, antocianinok, tanninok) jelent a munkaelektrodon lejátszódó oxidáció szempontjából nehézséget, ami a munkaelektrod felszínén kialakított inkább kis molekulákra pl. aszkorbinsav áteresztő membrán felhasználásával akár kiküszöbölhető lehet.

III.2 Aflatoxin M₁ mérésére alkalmas bioszenzor fejlesztése

III.2.1 Irodalmi háttér

Az aflatoxinok vizsgálatát általában vékonyrétegkromatográfia (TLC) [67], folyadékkromatográfia (LC) [67], nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) [68] és hagyományosabb immunoelemzéses (mint az enzim csatolt immunokapcsolásos elemzés – ELISA) módszerekkel végzik [69,70]. Mivel azonban ezek a módszerek érzékenység és detektálási határ tekintetében korlátozottak [71], ezért az újabb, hatékonyabb főként immunoelemzés alapú módszerek fejlesztése folyamatos [72,73]. Az újabban megjelent élelmiszerminőségi és élelmiszerbiztonsági szabályozások igényelik az új típusú, megbízható elemzési módszereket.

Az elektrokémiai impedancia spektroszkópia (EIS) a vezető és félvezető felszínnek változásait roncsolásmentesen vizsgálja, ezért jól használható a biomolekuláris kölcsönhatások dinamikájának követésére [18]. Mivel, mikor az antitest reakcióba lép az antigénnel, megváltoznak az elektród-oldat határfelület elektromos tulajdonságai, ezért az EIS [74-76] megfelelő az adszorpciós és töltés átviteli folyamatok megfigyelésére olyan technikák mellett, mint a Felszíni Plazmon Rezonancia (SPR) [77] és Kvarc Kristály Mikromérleg (QCM) [78]. Impedimetriás mérések jelerősítésére gyakran használnak vezető tulajdonságú anyagot, így arany nanorészecske tartalmú önrendeződő monoréteget már alkalmaztak, hogy növeljék egy impedimetriás szenzor érzékenységét [79]. Aflatoxin B₁ kimutatására ugyancsak kifejlesztettek EIS alapú módszert, mely a felszínen elektropolimerizált vezető tulajdonságú polimer töltésátviteli ellenállás változásain alapult (R_{ct}) [80]. Más esetben arany nanorészecske alapú üreges „labdát” módosítottak anti-AFB₁ antitestekkel, hogy QCM technikával AFB₁-et mérjének [81]. Ülepítési reakción keresztül jó érzékenységű lúgos foszfáttal jelzett SPR alapú immunoszenzort fejlesztettek egérből izolált IgG felhasználásával [82]. Más irodalmi leírás alapján aflatoxin B₁-marha szérum albumin konjugátum (AFB₁-BSA) kötése történt dextrán gélben és a kompetíciós reakció követését SPR technikával végezték [83].

III.2.2 Célkitűzés

Az aflatoxin M₁ olyan élelmiszerszennyező, ami az emlősök tejében mutatható ki, s a táplálékkal elfogyasztott aflatoxin B₁ metabolikus változata. Mennyiségének meghatározása fontos a tej minőségének, emberi fogyaszthatóságának megállapításában. A kutatómunka második részében az aflatoxin M₁ kimutatására és mérésére használható egyszerű kivitelű módszer kifejlesztése volt a cél. További cél volt, hogy a fejlesztést olyan kis méretű, eldobható kivitelben valósítsuk meg, mely impedancia alapú és a szükséges érzékenységet valamilyen jelerősítő módszerrel érjük el.

III.2.3 Elektrokémiai Impedancia Spektroszkópia

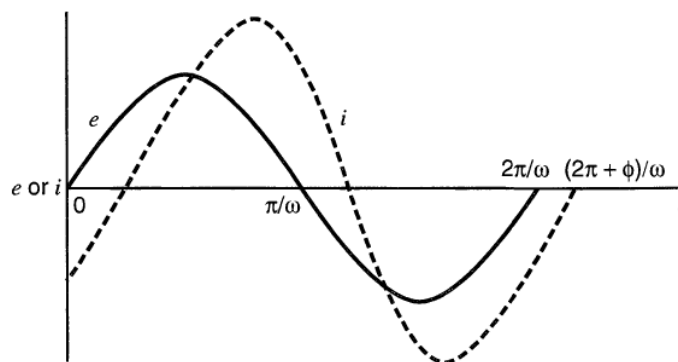
Az EIS nagyon hatékony módszer a vezető tulajdonságú anyagok és felületek tanulmányozásában [91-94]. Az elektrokémiai technikák a felületi jelenségeket vizsgálják a feszültség és az áram kapcsolatán keresztül. Ebben az esetben gerjesztő áramot vagy feszültséget irányítunk a munkaelektrodra, s az erre adott válaszreakciókat vizsgáljuk, ami számos információval szolgál a rendszer kinetikai, termodinamikai és mechanikai sajátosságairól. A leggyakoribb elektrokémiai technikákkal szemben, melyek közvetlen áramon alapszanak, mint pl. a kronoamperometria vagy a voltametria, az EIS egy kis amplitúdójú szinuszos hullám potenciál szuperpozícionálását jelenti egy állandó polarizációs potenciálra (2. egyenlet).

$$E(t) = E_{\text{polarizáció}} + \Delta E(\omega t) \quad (2)$$

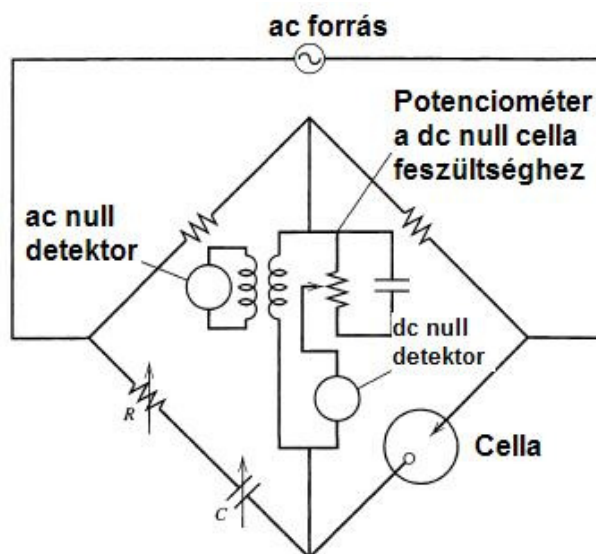
Ahol $E_{\text{polarizáció}}$ a munkaelektrod referenciával szemben mért alappotenciálja, ΔE a szinuszos hullám amplitúdója és ω a radiálban megadott jelfrekvencia. A kis amplitúdójú (ΔE) gerjesztő potenciál ($E(t)$) egy fix feszültség ($E_{\text{polarizáció}}$) körül oszcillál adott frekvenciával ($\omega=2\pi f$), s erre a vizsgált rendszer válaszzel reagál. Ha a rendszer lineáris (azaz kis amplitúdójú a gerjesztő potenciál), akkor a válasz egy ugyanolyan szinuszos áram, de a feszültségtől különböző amplitúdóval és frekvenciával. Nem lineáris esetben azonban a válasz sokkal összetettebb, nem szinuszos természetű, bár továbbra is periodikus. Vizsgálati szempontból a szinuszos természetű válaszzel modellezhető le, melyet a következő képlet ír le (3. egyenlet).

$$i = I \sin(\omega t + \varphi) \quad (3)$$

ahol i az áramerősség, I az amplitúdó és $\omega t + \varphi$ φ -vel eltolódott frekvencia.



24. ábra: A kis amplitúdójú gerjesztő potenciál és az arra adott válaszjel összefüggése



25. ábra: Az impedancia mérésekhez szükséges gerjesztő jel generáló híd áramkör

A mérés során a gerjesztő potenciálra adott jel (24.-25. ábra) az elektródfelületi viszonyok függvénye, azaz egy teljesen „tisztá” ellenállás esetében nem lesz fázis eltolódás a gerjesztő potenciáljel és áramerősség között, míg egy teljesen „tisztá” kapacitás esetén a fázis eltolódás $\pi/2$ (90°). Természetesen reális mérési esetben e két faktor keveredéséről van szó ($E(t) = E_{pol} + \Delta E \sin(\omega t)$, $I(t) = \Delta I \sin(\omega t + \Phi)$). Egy egyszerű rendszerrel kapcsolatban is megjegyezhető, hogy minden frekvencia esetén a válaszjel hordoz kapacitív ill. ellenállással kapcsolatos információkat, csak a súlyozottságuk más a jelben.

Az általános Ohm törvény úgy írja le az impedanciát ($Z(\omega)$ Ω -ban), mint az alkalmazott szinuszos potenciál és a kapott áramerősség hányadosát (4-6. egyenlet).

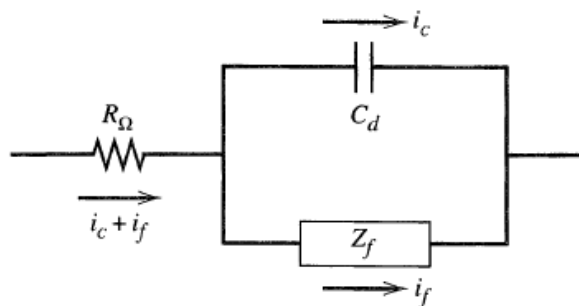
$$Z(\omega) = \frac{e}{i} = \frac{E}{I} \frac{\sin \omega t}{\sin(\omega t + \Phi)} = Z \frac{\sin \omega t}{\sin(\omega t + \Phi)} \quad (4)$$

$$e^{j\Phi} = \cos \Phi + j \sin \Phi \quad (5)$$

$$Z(\omega) = \frac{E e^{j\omega t}}{I e^{j(\omega t - \Phi)}} = Z e^{j\Phi} = Z(\cos\Phi + j\sin\Phi) = Z_{re}(\omega) - jZ_{im}(\omega) \quad (6)$$

Kizárólag ellenállást tartalmazó áramkörben a $Z_{re(\omega)}$ (valós) komponens található meg inkább, kizárólag kapacitás jellegű áramkör esetén a $Z_{im(\omega)}$ (imaginárius) a domináló. Az impedanciát a $Z_{im(\omega)}$ és a $Z_{re(\omega)}$ ordináta és abszcissza tengelyen történő ábrázolással vektorként is meg szokták jeleníteni. További ábrázolás mód a két érték által meghatározott vektor értékének és a hozzátartozó frekvenciának a logaritmikus megjelenítése (27. ábra).

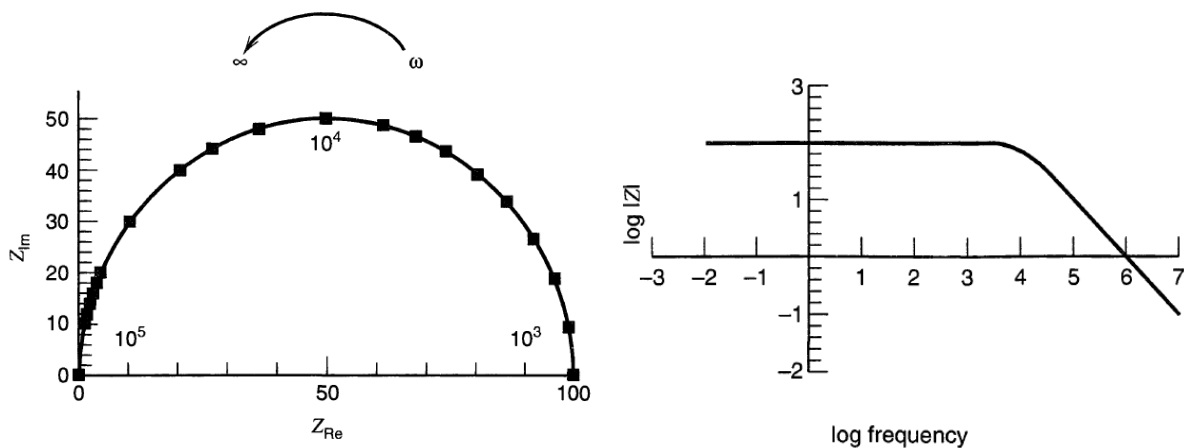
A legáltalánosabban használt modell áramkör az úgynevezett Randles féle, mely egyszerű elemekkel ír le az impedimetria számára egy elektrokémiai cellát. A benne található részek az



oldat ellenállásával (R_Ω), az elektromos kettősréteg kapacitásával (C_d) és a Faraday folyamatokat leíró általános impedancia (Z_f) elemmel azonosíthatók (26. ábra).

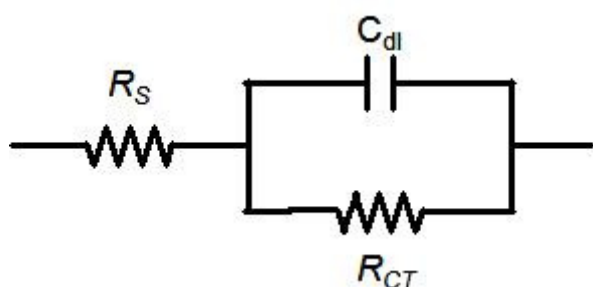
26. ábra: Az impedimetriában gyakran használt elektrokémiai cellát leíró Randles áramkör modellje, R_Ω -oldat ellenállás, C_d -elektromos kettősréteg kapacitása, Z_f -általános impedancia [95]

Az általános impedancia elem (Z_f) tovább bontható egy töltés átviteli ellenállás (R_{ct}) és egy úgynevezett Warburg impedancia elemre (Z_w), amit kapacitás jellegű tömegáramlási ellenállásként azonosítanak. Az utóbbi elemek a frekvencia változással ugyancsak jelentősen változnak, így az impedimetriás mérések feladata ezen elemek frekvencia függésének meghatározása, s ezáltal kémiai információ szolgáltatása.



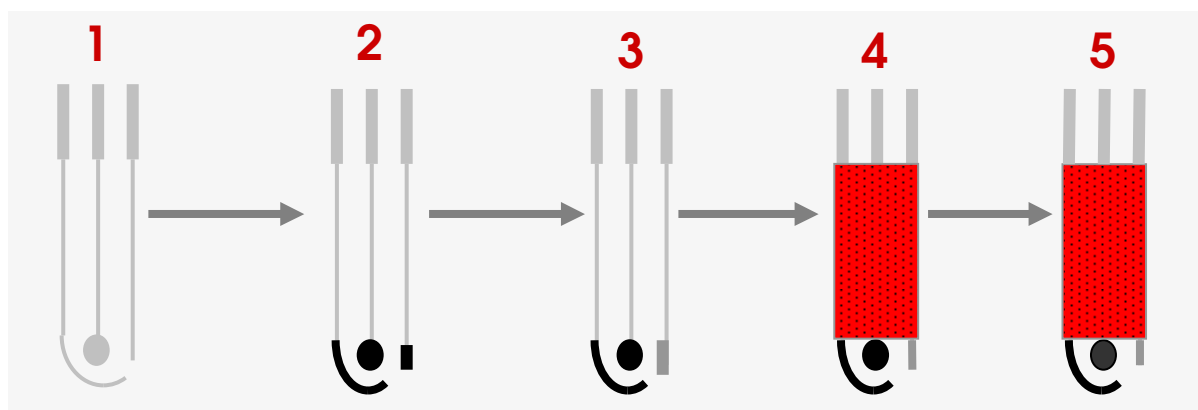
27. ábra: Az imaginárius és valós impedancia (Nyquist) ábrázolása ill. az impedancia modulus és frekvencia logaritmusának (Bode) ábrázolása egy egyszerű kapacitás és ellenállás tartalmú áramkörre (2 párhuzamos RC típusú elemre modellezve $R=100\Omega$, $C=1\mu F$).

Egy egyszerű rendszer esetén nagyon magas és alacsony frekvenciákon inkább az ellenállás (oldat és felületi töltésátviteli) a meghatározó a jelben. A mérés optimalizálása és kiértékelése szempontjából azonban lényeges annak ismerete, hogy milyen közeget befolyásoló részelemekre bontható a vizsgálandó rendszer, azaz milyen egyenértékű áramkörrel írható le. Esetünkben az oldat ellenállással (R_s) párhuzamosan kötve egy kapacitás (C_{dl} – az elektród felszínen kialakuló elektromos kettős réteg töltéséből) és egy ellenállás (R_{ct} – az elektródon végbemenő oxidációs redukciós folyamatok elektron-átmeneti folyamataival szembeni ellenállás) modellezi legjobban a rendszerünket (28. ábra).



28. ábra: A mért rendszer modellezésére és a mért adatok kiértékelésére szolgáló egyenértékű áramkör

Az impedanciás mérések kivitelezése a már korábban kifejlesztésre került, s a laborban készített nyomtatott elektródokkal történt (29. ábra). Az elektród elkészítésének módszerét a francia kutatócsoport korábbi kutatómunkáiban írta le [84,85].



29. ábra: A kis méretű (cm lépték) nyomtatott elektródok készítési fázisai. (munka és ellenelektrod grafit, referencia Ag-AgCl). A kész elem kör alakú munkaelektrod részén (5. fázis) játszódott le a kötődési és elektroülepítési reakció.

Az elkészítési fázisok sorban a következők: 1. Ezüst tartalmú vezető réteg, 2. Az elektródok alapját képező grafit réteg, 3. Ag/AgCl referencia elektród kialakítása, 4. Szigetelő fedőréteg, 5. Munkaelektrod módosítása

III.2.4 Aflatoxinok

Az aflatoxinokkal kapcsolatos probléma először 1960-ban került az élelmiszerbiztonság középpontjába, amikor Angliában a nagy baromfitelepeken százezer számra pusztultak el a fiatal szárnyasok. A kór „pulyka 'X'betegség”-ként vált ismerté. 1961-ben Sargeant és mtsai kimutatták, hogy a betegséget a takarmányba kevert penészes földimogyoró, pontosabban a rajta lévő *Aspergillus flavus* által termelt rákkeltő anyag okozta. Ezt az anyagot aflatoxinnak nevezték el.

A mikotoxinok (AFM₁, AFB₁, AFG, OTA, etc.) általában mezőgazdasági terményekben [96] és takarmányokban [97,98] találhatóak. Az aflatoxin M1 (AFM1) az aflatoxin B1 (AFB1) hidroxilált metabolitja és megtalálható olyan tejet adó állatok tejében vagy tejtermékében, amik *Aspergillus flavus* vagy *Aspergillus parasiticus* fajjal fertőzött takarmányt ettek [99]. Az aflatoxinok potenciális máj karcinogének és DNS-károsító anyagok. 1987-ben az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 1. Osztályú karcinogénnek minősítette, s a legfrissebb élelmiszer minőségi szabályozásoknak is tárgya volt [100], az Európai Közösség az aflatoxin M1 megengedett koncentrációját tejben és tejtermékekben 0.050 ppb (µg/kg)-ban [101] határozta meg felnőttekre és 0.025 ppb (µg/kg)-ban gyerekekre és csecsemőkre [102]. Az aflatoxinok mérésére irányuló kutatások és eredményeik összefoglalását megtalálhatjuk az irodalmi leírásokban [103,104].

Aflatoxinok előfordulása

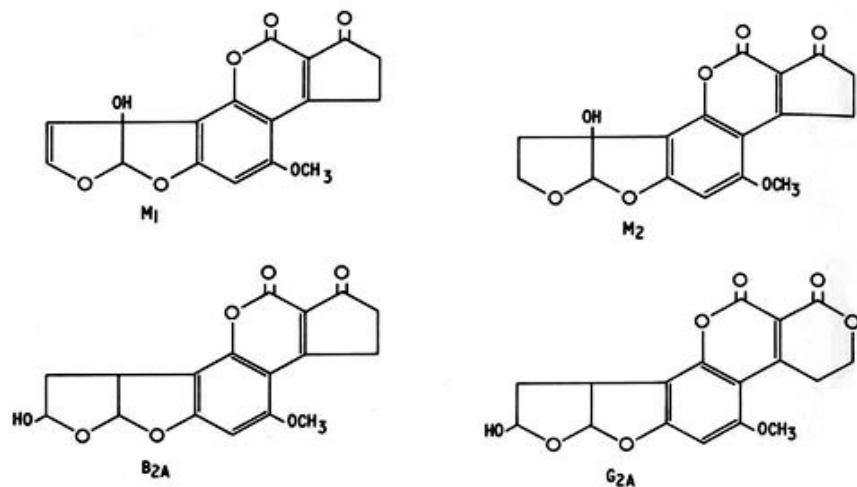
Az aflatoxinok az aspergillus penészgombák (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* és *Aspergillus parasiticus*) által termelt másodlagos metabolitok. Leggyakrabban különböző gabonákban (búza, rizs, köles, zab stb), fűszerekben (paprika, bors, chili), olajosmagvakban (földimogyoró, mandula, pisztácia, szója, napraforgó mag) található meg. A legfontosabb aflatoxin termelő penészgomba az *A. flavus*. Az egész világon elterjedt, talajban, bomló növényi részekben, raktározott magokon fordul elő. Elsősorban a trópusi, szubtrópusi éghajlaton jellemző, de esősebb meleg nyarakon a mérsékelt égövben is problémát okoz.

Aflatoxin típusai

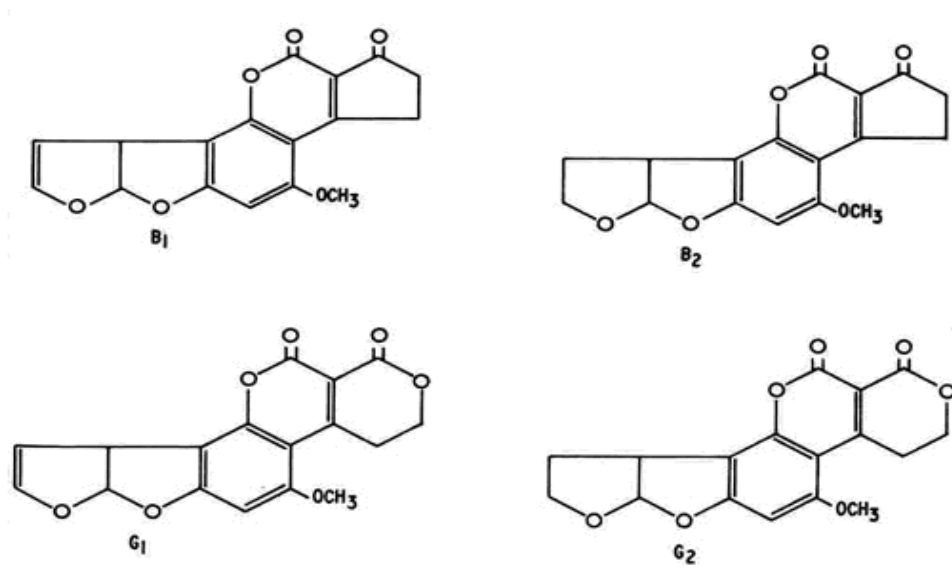
A kutatások során 18 különböző aflatoxin típust különítettek el. Ezek közül a legfontosabbak az aflatoxin B1 (AflB1, CAS No: 1162-65-8); aflatoxin B2 (AflB2, CAS No: 7220-81-7); aflatoxin G1 (AflG1, CAS No: 1165-39-5); aflatoxin G2 (AflG2, CAS No: 7241-98-7). Az *A. flavus*ból és *A. parasiticus*ból izoláltak kisebb mennyiségben termelődő M1 és M2, B2A, G2A típusú aflatoxint. Az aflatoxin M1 és M2 az aflatoxin B1 és B2 metabolitja, ami főként olyan állatok tejéből mutatható ki, amelyek aflatoxinnal szennyezett takarmányt kaptak.

Aflatoxinok szerkezete

Az aflatoxinok difurán-kumarin származékok, amelyek kémiai szerkezetük alapján két nagy csoportba sorolhatók. Az aflatoxin B1, B2, B2A, M1, M2 a difurokumarociklopentenon csoportba tartoznak, míg az aflatoxin G1, G2, G2A a difurokumarolakton csoportba sorolhatók (30. és 31. ábra).



30. ábra: Aflatoxin M1, M2, B2A, G2A szerkezete



31. ábra: Aflatoxin B1, B2, G1, G2 szerkezete

Az aflatoxinok metanolban, acetonban, kloroformban kiválóan, vízben jól oldódnak. Az aflatoxin B1 és B2 ultraibolya fényvel megvilágítva kéken fluoreszkál, míg az aflatoxin G1 és G2 zölden. Nem egyformán mérgező hatásúak. Leginkább mérgező közülük a B1, majd a G1, a B2 és végül a G2 következnek. Az állatoknak e toxin iránti érzékenysége is más és más fokú. A kacsra és a pulyka halálos adagja 0,02 mg, vagyis 1 mg ötven állatnak az elpusztításához elegendő. Az emlősállatok közül a sertés a legérzékenyebb, a szarvasmarha, a ló és a juh már jobban ellenáll e mérregnek.

Aflatoxin kémiai tulajdonságai

7. táblázat: A fontosabb aflatoxinok néhány tulajdonsága

Aflatoxin	Összegképlet	Molekulasúly	Olvadáspont
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293
B _{2A}	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	240
G _{2A}	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	346	190

Az aflatoxinok hőstabil vegyületek, 160 °C hőmérsékletet egy órán át, változás nélkül elbírnak (viszonylag magas olvadáspont – 7. táblázat), és csak 300 °C fölött károsodnak szembetűnően. Ilyen magas hőmérsékleten valószínűleg a lakton gyűrű felnyílik és dekarboxileződik.

Lúgos oldatokban a lakton hidrolizálódik, de ez a folyamat reverzibilis. Magas hőmérsékleten, ha a lakton gyűrű felnyílt a reakció tovább mehet és az aromás gyűrűről egy metoxi csoport válik le.

Az aflatoxin B1 és G1 szervesen sav jelenlétében, B2A és G2A-vá alakul (molekulasúly növekedés – 7. táblázat).

Oxidatív anyagokkal (pl: hidrogén peroxid, ózon, kálium-permanganát) az aflatoxin szintén reakcióba lép, amelynek egyik bizonyítéka, hogy a molekula ultraibolya fény alatt kevésbé fluoreszkál. A pontos folyamat és a reakció során keletkezett termékek még nem ismertek.

III.2.5 Immunoszenzorok

Az antitestek (immunoglobulinok, Ig) többfunkciós kötő fehérjék, amiket a gerincesek immunrendszere termel, s fontos szerepük van a szervezet védelmi mechanizmusában. Specifikusan képesek felismerni baktériumokat, toxinokat, s gyakorlatilag bármilyen ligandummal szemben kifejleszthetők. Az olyan anyagok, melyek szervezetbe jutva antitest termelést indukálnak, az antigének. Általában ezek makromolekulák: fehérjék, oligoszacharidok. Az antigén azon része, mely az antitesthez képes kötődni az ún. epitóp, amiből több különböző is található egy antigéneken belül. Ezen részekhez történő specifikus kötődés során alakul ki az antitest-antigén komplex.

Az antitestek molekula felismerő képességével az immunoszenzorok nagymértékű szelektivitása érhető el, bár nem mellőzhető, hogy affinitási állandók különbségei jelentősen befolyásolhatják a szelektivitást.

Az immunoszenzorok két nagy csoportra bonthatók: jelzett és nem jelzett szenzorok [59,105]. A nem jelzett immunoszenzorokat úgy tervezték, hogy az antigén-antitest immunokomplex kialakulása közvetlenül meghatározható legyen fizikai változások követésével, míg a jelzett módszerek esetén egy könnyen detektálható jelzőanyagot (jelerősítő) is alkalmaznak. Az első esetben az antigén vagy antitest szilárd mátrixba ágyazása adja az érzékelő felszínt, s a szilárd hordozó karakterisztikájában bekövetkező változások

követhetők (leggyakrabban elektród, membrán vagy piezoelektromos anyag). Az oldatban található, meghatározandó antigén vagy antitest felszínhez kapcsolódásának hatására megváltozik az elektród potenciál, transzmembrán potenciál, belső piezofrekvencia vagy optikai tulajdonság. A módszer nagyfokú szelektivitása a beágyazó mátrix nem-specifikus adszorpciójával párosul. A szelektivitas és érzékenység növelése érdekében különböző jelző (nem radioaktív izotóp alapú) anyagokat/molekulákat használnak (8. táblázat). Ha enzimet használnak jelerősítésre, akkor az antigénhez vagy antitesthez kötik kovalensen a fehérjét pl. kataláz enzimet, melyet aztán oxigén elektróddal kötnek össze.

8. táblázat: Nem-izotópos immunoszenzor jelző molekulák (FITC- fluoreszcein izotiocianát, DTPA-In - dietilén triamin pentaacetsav-In komplex)

Jelző molekula		Meghatározás
Enzim	Kataláz, Glükóz oxidáz	O ₂ amperometriás
	Peroxidáz, Luciferáz	Lumineszcens
	Ureáz	Fenol potenciometriás
Katalizátor	Hemin	Lumineszcens
Fluorofór	FITC	Floureszcens
Elektroaktív komponens	Ferrocén	Amperometriás
	DTPA-In	Elektrokémiai lumineszcens
	Pirén	Elektrokémiai lumineszcens
	Luminol	Elektrokémiai lumineszcens
Liposzóma	Ionos jelző	Potenciometriás

III.2.6 Anyagok és módszerek

Anyagok

Minden felhasznált reagens analitikai tisztaságú volt, s nem igényelt további tisztítást. Marha szérum albumin (BSA), BSA-aflatoxin M₁ konjugátum (BSA-AFM₁), 20 nm kolloidális arany oldat, AMPSO- nátrium (3-[(1,1-dimetil-2-hidroxietyl) amino] 2-hidroxi-propánszulfon sav) só, KCl, NaCl, Tween 20[®], Na₂HPO₄, KH₂PO₄ a Sigma-Aldrichtól kerültek beszerzésre. AgNO₃ só a Flukától és a NH₄NO₃ Prolabotól származott. Az egérben kifejlesztett anti-aflatoxin M₁ antitestet francia forrásból szereztük be. Minden itt nem említett reagens a Sigmatól volt, s minden oldat desztillált víz felhasználásával készült.

Kolloidális arany antitest konjugátum készítése

Az antitest-kolloidális arany konjugált az irodalmi leírásoknak megfelelően készült [84]. 25 µl 15 mM koncentrációjú pH=7.4 PBS (phosphate buffered saline) oldatban készített 0.9 mg/ml koncentrációjú anti-aflatoxin M₁ antitest oldatot, 100 µl 20 mM pH=9.0 AMPSO puffert, 1 ml 20 nm kolloidális arany oldatot és 10 µl 0.1 M NaOH oldatot kevertünk össze. 30 perces inkubációt követően szobahőmérsékleten 100 µl, AMPSO pufferben készített 1 m/v % BSA oldatot adtunk az elegyhez és 6000 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk (Eppendorf[®] Minispin centrifuga) 30 percig 4 °C-on. Centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk, s 1 ml AMPSO pufferben készített 0,1 % w/v BSA oldatot adtunk a kivált anyaghoz, és megismételtük a centrifugálást. A felülúszó újbóli eltávolítása után a visszamaradt anyagot 100 µl 15 mM pH=7.4 PBS oldatban oldottuk fel s 4°C-on tároltuk felhasználásig.

Immunoszenzor elkészítése

Az elektród előkezelést 10 ciklus ciklikus voltametriával végeztük a -0,5 V és 1,1 V közti tartományban, 0,1 V/mp pásztázással, 0,01 V potenciál lépésközzel 0,5 M H₂SO₄-ban. A maradék sav eltávolítására desztillált vizes mosást alkalmaztunk.

20 µl 15 mM pH=7.4 PBS-ben készített 15 mg/L koncentrációjú BSA-AFM₁ konjugátumot egész éjszakás hűtőben (4°C-on) állással adszorbeáltattunk a nyomtatott elektródok munkaelektrod részén vízgőzzel telített környezetben. A felszín blokkolási lépést 1% 15 mM pH=7.4 PBS-ben készített BSA oldattal végeztük 1 órán keresztül szobahőn. A blokkolási

lépés után vagy kötési lépés vagy kompetíció következett. A kötési lépés során 20x – 10000x hígítású arany konjugátum (vak elektródok kötése 20x hígítású arannyal nem jelzett antitestekkel történt) reakciója ment végbe az elektród felszínén szobahőn, 1 órán keresztül. Kompetíció során szabad AFM₁ (15-2500 ng/L koncentrációban) és 1/500 v/v hígítású arannyal jelzett antitestek reakciója játszódott le az elektród felszínén 1 órán keresztül szobahőmérsékleten.

Minden egyes lépés között mosási lépés következett 15 mM PBS + 0.5% v/v Tween 20 oldat segítségével s kétszer 15 mM pH=7.4 PBS oldattal, hogy a felületaktív anyag maradékokat eltávolítsuk.

Standard tej oldat készítése

10 g teljes tejport (BD 282 európai referencia anyag -nulla szintű AFM₁) oldottunk fel 100 ml 15 mM PBS + 0.5% v/v Tween 20 oldatban, amit előzetesen a kezelési protokollnak megfelelően 50 °C-ra melegítettünk. Az oldatot 10 percig centrifugáltuk 6000 rpm fordulatszámom (Eppendorf® Minispin centrifuga) 4 °C-on. A zsíros réteget eltávolítottuk, s a felülúszót tovább hígítottuk (1/1 v/v arányban) 15 mM PBS + 0.5% v/v Tween 20 oldattal. Ez az oldat szolgálta a mátrix hatás vizsgálatának alapját. Visszanyerési vizsgálatához a centrifugálási lépés előtt adott mennyiségű AFM₁ (25, 50, 100 ng/L) antigént adtunk az oldathoz.

Impedimetriás mérések és lineáris pásztázó voltametria (LSV)

Impedimetriás és LSV mérések előtt desztillált vizes öblítést alkalmaztunk az elektród felszínén az esetleges maradék klorid eltávolítására, s minden mérést 0.1 M-os NH₄NO₃ oldatban végeztünk, hogy elkerüljük az ezüst kiválását. Az elektródokat szobahőmérsékleten 0.1 M-os NH₄NO₃ oldattal hagytuk állni a mérések kivitelezéséig és az ezüst elektroülepítése előtt.

Az előkészített elektródok felszínéről történő NH₄NO₃ oldat eltávolítás után 150 µl 0.1 M-os NH₄NO₃-ban készített 1 mM-os AgNO₃ hozzáadására került sor. Az ezüstréteg elektroülepítése -110 mV-on történt 45 mp-ig kronoamperometriásan. Ezután a fenmaradó oldat eltávolítását követően desztillált vizes mosás következett. A kronoamperometriás, impedimetriás és lineáris pásztázó voltametria méréseket AUTOLAB PGSTAT12 potenciosztáttal végeztük. Az impedanciás mérések kivitelezése 0.1 M-os NH₄NO₃ oldatban

történt -20 mV-on 10 mV amplitúdóval 1 kHz-től 0.1 Hz-ig 30 pontos elemzéssel (adatfeldolgozás Zview szoftverrel történt), míg a lineáris pásztázó voltametriát ugyancsak az előzőekben használt 0.1 M-os NH₄NO₃ oldattal -100 mV- 700 mV tartományban 0.05 V/s szkennelés arány és 0.00442 V potenciállépés paraméterek mellett végeztük.

Kalibráció és kiértékelés

A kalibrációs görbéket standard AFM₁ (0–2500 ng/L) oldatok felhasználásával kaptuk, s elkészítésükhöz 15 mM, pH=7.4, PBS + 0.5% v/v Tween 20[®] oldatot használtunk. A kalibrációs görbék illesztése „4 paraméteres, nem lineáris, logisztikai kalibrációs” egyenlettel történt [106]. A 4 logisztikai paraméter funkció közötti összefüggést a 7. egyenlet írja le:

$$f(x) = \frac{1-a}{1 + \left[\frac{x}{c}\right]^b} + d \quad (7)$$

ahol a és d aszimptotikus maximum és minimum értékek; c az inflexiós pont értéke (IC₅₀) és b a meredekség.

A detektálási határ (LOD) és a lineáris tartomány (LWR) az irodalmi leírások alapján került kiszámításra [107].

III.2.7 Jelerősítés kolloidális arany és mágneses nanorészecskék alkalmazásával

A mágneses nanorészecskéket és a kolloidális aranyat már külön-külön [108-112] máskor is alkalmazták immunoreakciók detektálásánál, azonban a kettő kombinációjához kapcsolható impedimetriás mérésről nem esett említés. A kolloidális arany vezető tulajdonságait úgy használhatjuk ki, hogy megváltoztatni képes az elektródfelbűn kapacitás és ellenállás viszonyait. A mágneses részecskék ebben az esetben csak az aranyból származó jel növelésére szolgálnak, hiszen a részecskék segítségével a hozzájuk kötődött kolloidális arany koncentráltan kinyerhető, s az elektród felszűn gyűjthető.

Mágneses részecskék elkészítése:

Ademtech G05030 300 nm IgG egér antitestekkel preparált mágneses részecskéket (névleges felszűn ≤10 m²/g) módosítottunk nyűlból származó aflatoxin M₁ antitestekkel.

Első mosási lépésként 1400 µl 15 mM pH=7.4 PBS, 0,05% Tween 20 oldatba 13 µl gyártó által szolgáltatott mágneses részecske oldatot adtunk. Homogenizálás után 10 percig mágneses részecske gyűjtő dokkolóra tettük (Lifeseq 1.5 s). A különvált oldat leszívása után 1397,75 µl 15 mM pH=7.4 PBS, 0,05% Tween 20 és 2,25 µl 0,9 mg/ml aflatoxin M₁ antitest oldatot adtunk a visszamaradó mágneses részecskékhez. Homogenizálás után 20 percig szobahőn inkubáltuk az oldatot. Homogenizálás után 10 percig ismét mágneses részecske gyűjtő dokkolóra tettük, s a puffer oldat eltávolítása után 1400 µl 15 mM pH=7.4 PBS, 0,05% Tween 20 oldatban homogenizáltuk a preparátumot.

Kolloidális arany részecskék elkészítése:

Az 5 nm-es kolloidális arany oldat anti-HRP (**H**orse **R**adish **P**eroxidase) antitestekkel került módosításra. 1000 µl kolloidális arany oldathoz 100 µl 20 mM pH=9.0 AMPSO és 30 µl 0,9 mg/ml anti-HRP oldatot adtunk, s szobahőn inkubáltuk 30 percig. Ezen lépés során a kolloidális arany részecskék és az antitest fehérjében található tiol csoportok kötése történik meg. Ezután a preparált arany 2 lépcsőben Marha Szérum Albuminnal (**B**ovine **S**erum **A**lbumin-**B**SA) került centrifugálásra (a *IV.1.2* pontban leírtak alapján), mellyel az esetleges arany felszínen szabadon maradt kötőhelyeket borítjuk be semleges fehérjével.

Kötés és kompetíció:

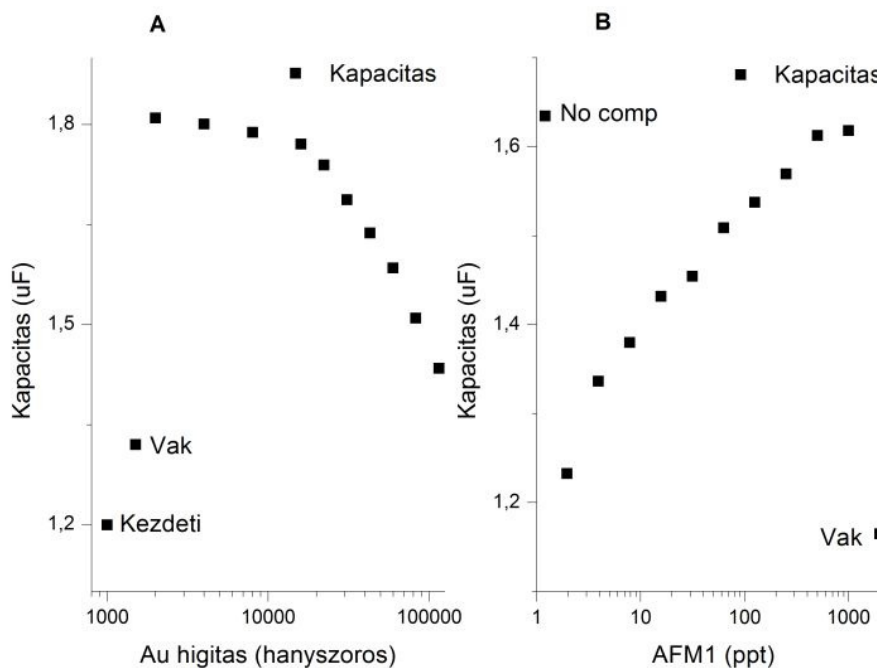
Kötési vizsgálatokhoz aflatoxin ELISA kit AFM₁-HRP konjugátumát használtuk 1/80 v/v hígításban. Az előzetesen elkészített mágneses részecskék ELISA tálcán szétosztott oldataihoz 1/10 v/v arányban adtunk az elkészített AFM₁-HRP konjugátum hígításból (kivéve vak oldat), s szobahőn 20 percig inkubáltuk. A mágneses részecskék összegyűjtése és az oldat eltávolítása után a preparátumot az előre 15 mM pH=7.4 PBS, 0,05% Tween 20 felhasználásával elkészített Au kolloid oldat hígítási sor hozzáadásával szobahőn 60 percig inkubáltunk. A méréshez használt elektród előkezelését PBS pufferben 10 ciklus, 0-1,1V tartományú ciklikus voltametriával végeztük. A mágneses részecskéket az elektródra felvitel után a munkaelektrod alá helyezett mágnessel (Ademmag 96-20106) 2 percig gyűjtöttük. Az impedancia méréseket 50 mérési pont gyűjtésével 1 Hz-10 kHz tartományban 10 mV-on végeztük. Mérések között az elektród desztillált vizes mosása történt.

A kompetíció HRP-vel jelzett és nem jelzett AFM₁ toxin között ment végbe az előkészített mágneses részecskék felszínén 1-1000 ppt koncentráció tartományban. A HRP-vel jelzett toxin 1/800 v/v hígítású volt minden esetben, s az inkubációs idő szobahőn 60 perc. A

következő jelerősítési lépéshez a kötési vizsgálatok alapján kiválasztott Au kolloid hígítási koncentráció 1/60000 v/v volt, mellyel 20 perc inkubációt végeztünk szobahőn. Vak mérésekhez az arany kolloid hígításának megfelelő aranymentes anti-HRP antitest oldat készült. A mérés előtt a mágneses részecskék 2 percig mágnesekkel kerültek összegyűjtésre az elektród felszínén (Ademmag 96-20106). Mérések között az elektród desztillált vizes mosása történt. Az eredeti elképzelésben az arannyal jelerősített mágneses részecskék más impedimetriás jelet adnak azokkal szemben, ahol a jelölésmentes toxin van túlsúlyban.

Eredmények

A mágneses részecskék kolloidális arannyal történő módosítása az első mérések után, 2000-115000 hígítású relatív koncentrációban vizsgálva megfelelőnek tűnt. A 32 A ábrán jól látható, hogy az alacsonyabb kolloidális arany koncentrációk esetén alacsonyabbak voltak a mért kapacitás értékek is. A görbe a koncentráció növekedésével (1/10000 v/v alatt) telítésbe megy át.



32. ábra: 300 nm-es mágneses nanorészecskékkel és 5 nm-es kolloidális arany felhasználásával kapott impedimetriás mérési eredmények. Az A ábrán látható a kolloidális arany-anti HRP konjugátum mágneses részecskékhez kötődésének mérési eredménye 1/2000-1/115000 v/v koncentrációknál (Kezdeti- alap elektród mért kapacitása, Vak- aranymentes anti HRP kötődése után). A B ábrán a kiválasztott kolloidális arany koncentráció mellett elvégzett kompetíció eredménye a 2,5-1000 ppt AFM₁ tartományban.

A nyomtatott elektród kezdeti és vak mérési eredménye is számottevően alacsonyabb volt a legalacsonyabb koncentrációjú aranykolloid mért értékénél. Az eredmény alapján a 1/60000 v/v aranykolloid hígítást választottuk a kompetíciós mérések kivitelezéséhez, mivel a görbe ezen szakaszán a kiválasztott aranykolloid koncentráció mellett kivitelezett kompetíció

eredményei 2,5-1000 ppt AFM₁ koncentráció tartományba a várttól eltérő tendenciát mutattak (32. ábra B). Az arany kötési eredmények alapján a szabad AFM₁ koncentráció növekedésével a kapott jelnek csökkennie kellene, hiszen kevesebb AFM₁-HRP konjugátum kötődésével kolloidális aranyból is kevesebb megkötésére kerül sor a mágneses részecskéken.

A felszínen lejátszódó folyamatok ellenőrzésére a következő impedancia méréseket végeztük el egyenként 3-3 elektródon: (a.) mágneses részecskék, (b.) AFM₁ antitesttel módosított mágneses részecskék, (c.) AFM₁ antitesttel módosított mágneses részecskék és AFM₁-HRP konjugát és (d.) AFM₁ antitesttel módosított mágneses részecskék, AFM₁-HRP konjugát és módosított kolloidális arany.

Ezekben a mérésekben tisztázódott, hogy a mágneses részecskék nem távolíthatóak el maradéktalanul az elektródfelületről két mérés között, s a kapott tendenciák (32. ábra) annak köszönhetőek, hogy a mérések egymás követő öblítés után, de ugyanazon az elektródon kerültek kivitelezésre. Az aranykolloid kötődés vizsgálatát megismételve cserélt elektródos mérés esetén nem volt kimutatható összefüggés az eredmények között. Minden lehetséges jelhez hozzájáruló faktor kombinációjának vizsgálatára sor került (mágneses részecskék, antitestekkel módosított mágneses részecskék, arany nanorészecskék, antitesttel módosított arany részecskék, antitestek), azonban számottevő jelnövekedés az arany koncentrációjának függvényében nem volt megfigyelhető.

A mérések során megerősítést nyert viszont, hogy a cserélt elektródok használata esetén fontos az elektródok megfelelő előkezelése az összehasonlíthatóság érdekében. A későbbiekben minden elektródot 10 ciklusban, 0-1,5 V-ig kondicionáltunk ciklikus voltametriaiban (10 mV lépések, 0,1 V/s lépés gyorsaság).

III.2.8 Arany nanorészecskék mérése az elektród felszínén

Az arany nanorészecskék jó vezetőképességükből kifolyólag megváltoztatják a felszín töltésátvitellel kapcsolatban tanúsított ellenállását. Ezen elméletre alapozva igyekeztünk módszerünkkel az aranyat, s a jel koncentráció függését kimutatni [113-113].

Elkészítés:

A 5 nm kolloidális arany anti-HRP konjugátum ugyanolyan módszerrel készült, ahogy az a *III.2.7/Kolloidális arany részecskék elkészítése* részben leírásra került. A mérésekhez

előkezelt elektródokat használtunk, s oldatban illetve felszínen adszorbeálva vizsgáltuk az arany konjugátum és anti-HRP jeleit.

Különböző koncentrációjú 5 nm kolloidális arany-antitest konjugátum és anti-HRP oldat adszorbeálása a munkaelektrodokon 12 óra alatt 4 °C-on, hűtőben történt.

Eredmények

Az elkészített elektródokkal legelőször a kolloidális arany-antitest konjugátum vizsgálatára került sor Differenciál Pulzus Voltametriával (DPV) -0.2-1.1 V tartományban, impedanciával 1 Hz-10 kHz tartományban 0 V potenciálon a oldatban vagy a felszínen található kolloidális arany kimutatására. Ezután egy kronocoulometriás oxidáló lépés következett 140 mp-ig, 1.4 V potenciálon az arany ülepitésére/oxidálására, amit egy újabb impedancia mérés és egy DPV mérés követett, annak megállapítására, hogy ilyen oxidáló módszerrel sikerül-e az arany részecskéket a felszínen kötni/kimutatni. Mivel nem volt számottevő változás a felszínről kapott jelekben, ezért az oldatok esetén az egész folyamatot megismételtük 10 perc várakozás után (mely alatt az arany természetesen is kiülepedhet/adszorbeálódhat az elektródfelszínen), de ez utóbbi esetben sem volt megfigyelhető jel változás.

A vizsgálatok utolsó részében 0-1.4 V potenciál tartományban (0; 0,5; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4) impedancia mérések kerültek kivitelezésre. 1 V-nál ugyan megfigyelhető volt különbség a vak és kolloidális arany konjugátumos elektródok között, de ezt a későbbi mérések nem igazolták.

III.2.9 Jelerősítés ezüsttel hidrokinon felhasználásával

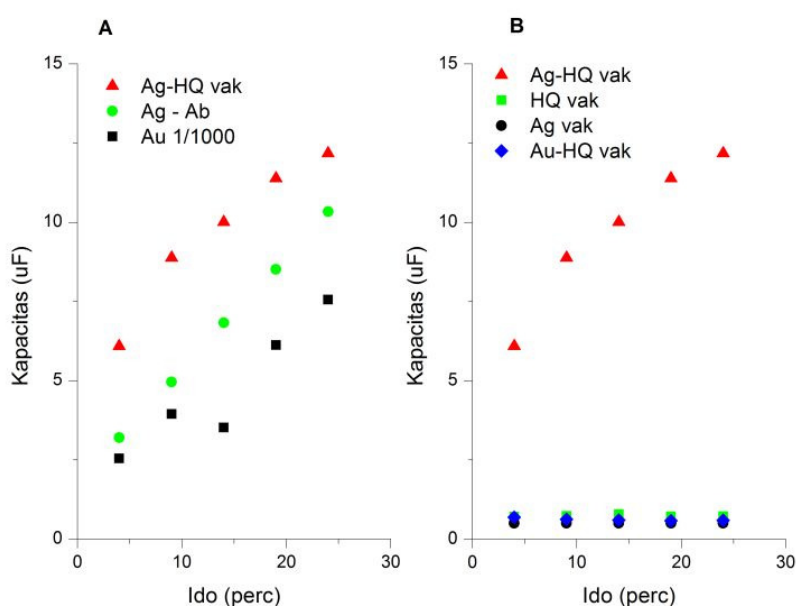
Ahogy arról említést tettek korábbi tudományos munkák [86-90], az ezüst jól alkalmazható az arany jobb detektálására, mivel ez utóbbi katalizálja az ezüst redukálódását és kiülepedési reakcióját. A hidrokinon, mint könnyen oxidálódó ágens, spontán reakcióban is redukálja a +1 oxidációs számú ezüstöt, azonban kolloidális arany jelenlétében ez a reakció gyorsabb, mivel az ezüst az arany részecskéken, mint gócpontokon könnyebben redukálódik.

Az első kísérlet sorban (33. A ábra) a vizsgálatokat 4 mg/ml koncentrációjú 100 mM pH=7.2 foszfát pufferben készített hidrokinnon, 10 mM AgNO₃ oldat és 1/1000 v/v 5 nm Au kolloid felhasználásával végeztük.

Később (33. ábra) 100 mM pH=7.2 foszfát pufferben készített 40 mg/ml hidrokinnon és 255 mg/ml citromsav elegyítése történt 3:1 arányban, s ennek az elegynek az elektródon történő 1/10 v/v hígítása volt a különböző koncentrációjú AgNO₃ oldatok redukálásának alapja. A redukáló oldatot felhasználásig alufóliával védve hűtőben tároltuk 4 °C-on.

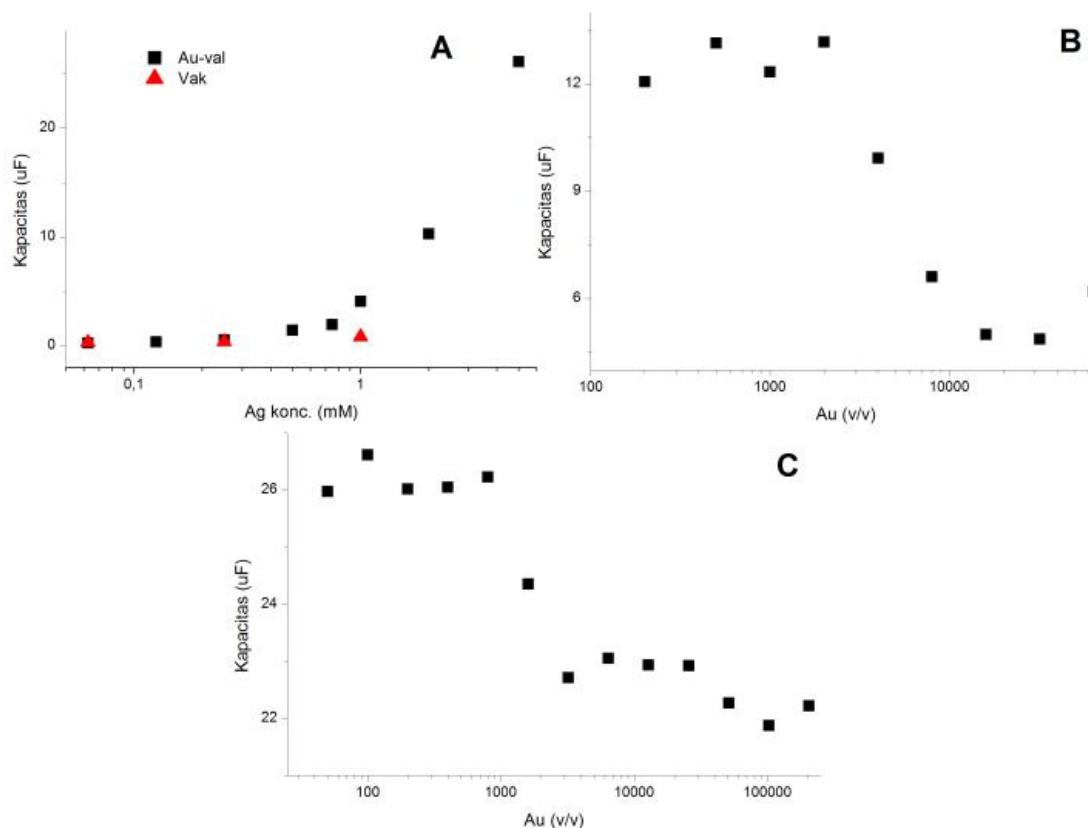
Eredmények

A vizsgálatokban először az arany jelenlétében történő ezüst kiválás került górcső alá, mely során (a) ezüst és hidrokinnon, (b) ezüst, hidrokinnon és antitestek valamint (c) ezüst, hidrokinnon és arany antitest konjugát jelenlétében figyeltük a változásokat (33. A ábra).



33. ábra: Ezüst jelének vizsgálata hidrokinnonos redukálás során. Az A ábrán látható az ezüst-hidrokinnon (Ag-HQ), ezüst-antitest-hidrokinnon (Ag-Ab) és ezüst-arany konjugát-hidrokinnon (Au 1/1000) oldatok időbeli változásai. A B ábrán látható az egyes oldat komponensek külön-külön mért eredményei (hidrokinnon-HQ vak, ezüst-Ag vak és arany konjugát + hidrokinnon -Au-HQ vak) az ezüst-hidrokinnon oldat jelével összevetve.

Az eredményeket az egyes komponensek vak méréseivel is összehasonlítottuk (33. B ábra). Az impedimetriás mérést 1 Hz-10 kHz tartományban 1.0 V-on végeztük. Az eredmények alapján kijelenthető, hogy az egyes oldat komponensek külön-külön nem adnak jelet impedanciában, s az aranyat tartalmazó oldat kisebb mért kapacitással jellemezhető, mint az ugyanolyan koncentrációjú antitestet tartalmazó illetve nem tartalmazó ezüst oldat.



34. ábra: A redukálódó különböző ezüst koncentrációk (0,0625-5 mM) impedimetriás jelének vizsgálata 1/2000 v/v 5 nm Au kolloid és 3 mg/ml hidrokinon jelenlétében 15 perc reakcióidő után -200 mV-on (A). A kiválasztott 1,2 mM AgNO₃ koncentrációval elvégzett oldott 5 nm Au konjugát v/v koncentrációk jelei 15 perc után (B) - 200 mV-on. Az előző kísérlet ismétlése különböző elektródon adszorbeált 5 nm Au konjugát v/v koncentrációkkal -200 mV-on (C).

Az ezüst koncentráció változások elektród felszínén való kimutatásához 0,0625-5 mM AgNO₃ redukálódását vizsgáltunk 1/2000 v/v 5 nm Au és 3 mg/ml hidrokinon (27 mM) koncentráció mellett (15 perc reakció az elektródon 150 µl öszoldatban: 105 µl NaNO₃ + 15 µl hidrokinon redukáló oldat + 15 µl 1/200 v/v Au oldat + 15 µl Ag oldat) -200 mV-on (redukáló potenciál), 1 Hz- 10 kHz tartományban impedanciával (34 A ábra). Az eredmény alapján megállapítható volt, hogy a nagyobb redukálódott ezüst koncentráció magasabb mért kapacitás értékeket eredményez arany jelenlétében, mint a vak méréseknél. A későbbi vizsgálatok kivitelezéséhez az 1,2 mM AgNO₃ koncentrációt választottuk.

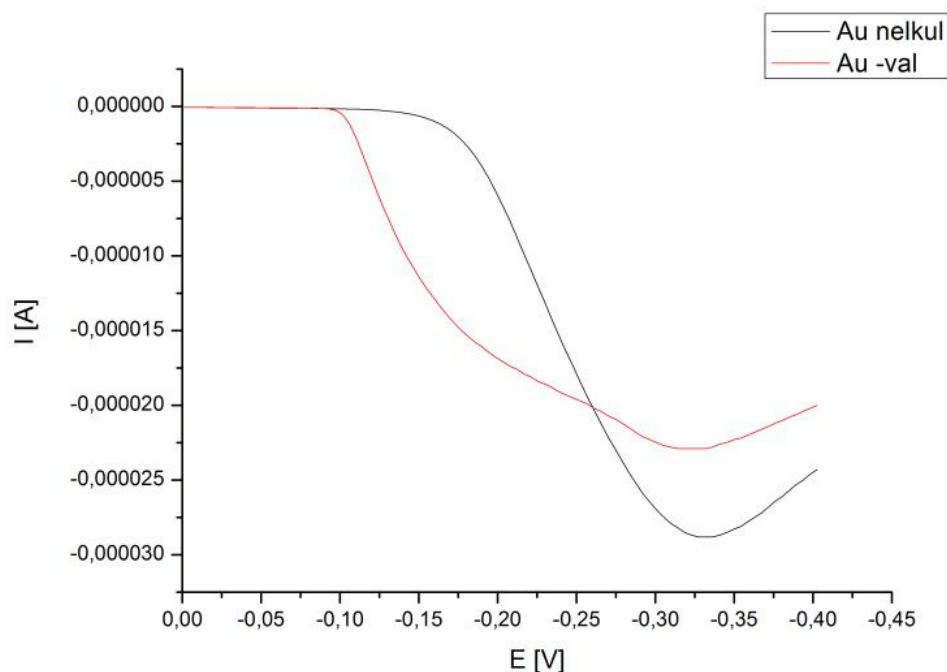
Az előző kísérletben említett paraméterek mellett különböző koncentrációjú kolloidális arany konjugátum hatása mind oldatban (34 B ábra), mind elektródon adszorbeálva kipróbálásra került (34 C ábra), s jelentős hatást mutatott az ezüst redukálódására és ülepedésére vonatkozóan. Az előbb ismertetett vizsgálatok során ugyanakkor egy a mérést

zavaró kloridion (fehér AgCl csapadék képződése) szennyező forrás is kiszűrésre került, ami után az oldatokat 100 mM NaNO₃-ban készítettük.

Általánosságban az arany koncentráció hatása kimutatható volt az ezüst ülepedésére és egy arany kötődésre vonatkozó görbét ugyancsak fel lehetett venni, azonban a módszer reprodukálhatósága nem volt megfelelő további vizsgálatokhoz, mivel a reakció oldat eltávolításánál esetenként valószínűleg nem ellenőrzött mennyiségű, kiülepedett ezüst is eltávolításra került.

III.2.10 A kifejlesztett mérési módszer – Jelerősítés ezüst elektromos ülepítésével

Az előző részben (III.2.9 rész) ismertetett katalizáló hatás ellenőrzését végeztük elektromos ülepítéssel. Ennek a módszernek az előnye, hogy ilyen módon az ezüst jobban kötődik az elektródfelszínen, s így azt onnan desztillált vizes mosással, tisztítással nem lehet eltávolítani.



35. ábra: Elektródon adszorbeált arany antitest konjugátum és antitest jelenlétében mért amperometriás jelek az ezüst elektromos ülepítése közben a 0-(-400) mV tartományban.

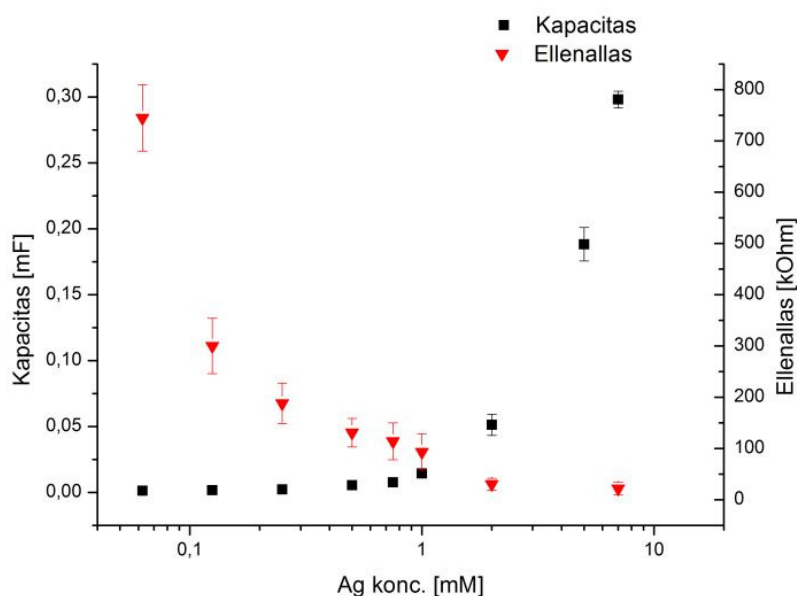
Az első kísérletek során megállapításra került, hogy az ezüst elektromos ülepítését ugyancsak katalizálja az arany jelenléte, ezért jól használható az elektród felszínen adszorbeált arany jelerősítésére, hiszen a relatív arany konjugátum koncentrációk ezüst ülepedésre gyakorolt hatása mind a felszíni töltés átviteli ellenállásban (R_{ct}) és a lineáris pásztázó voltametria (LSV) jól kimutathatóak voltak. A 35. ábrán megfigyelhető, hogy az ezüst oldatból történő redukálódása kevésbé negatív potenciálon (-130 mV alatt) indul meg arany-antitest konjugátum elektródfelszínen történt adszorpciójánál, mint a csak antitestet tartalmazó oldat adszorpciója esetén.

Az ezüst ülepítése kronoamperometriával történt, s ezután impedancia és lineáris pásztázó voltametria (LSV) következett. Az ülepítési potenciál, ülepítési idő és az impedancia mérési potenciálja került optimalizálásra.

Ha külön nincs kiemelve, akkor az arany konjugátum az elektród felszínén volt adszorbeálva.

Ezüst mérhetősége impedanciában [115]

Különböző koncentrációjú (0.0625, 0.125, 0.250, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0, 5.0 és 7.0 mM) ezüstnitrát oldatokat ülepítettünk elektromosan külön elektródokra, s figyeltük a rendszerben bekövetkező kapacitás és ellenállás változásokat. Ahogy az a 36. ábrán látható a kapacitás exponenciálisan növekedett a koncentrációval, míg a töltés átviteli ellenállás ugyanígy csökkent. Ez a jelenség érthető is, ha figyelembe vesszük, hogy az ezüstnek ugyanúgy, ahogy az aranyak is, vezető tulajdonságai vannak.

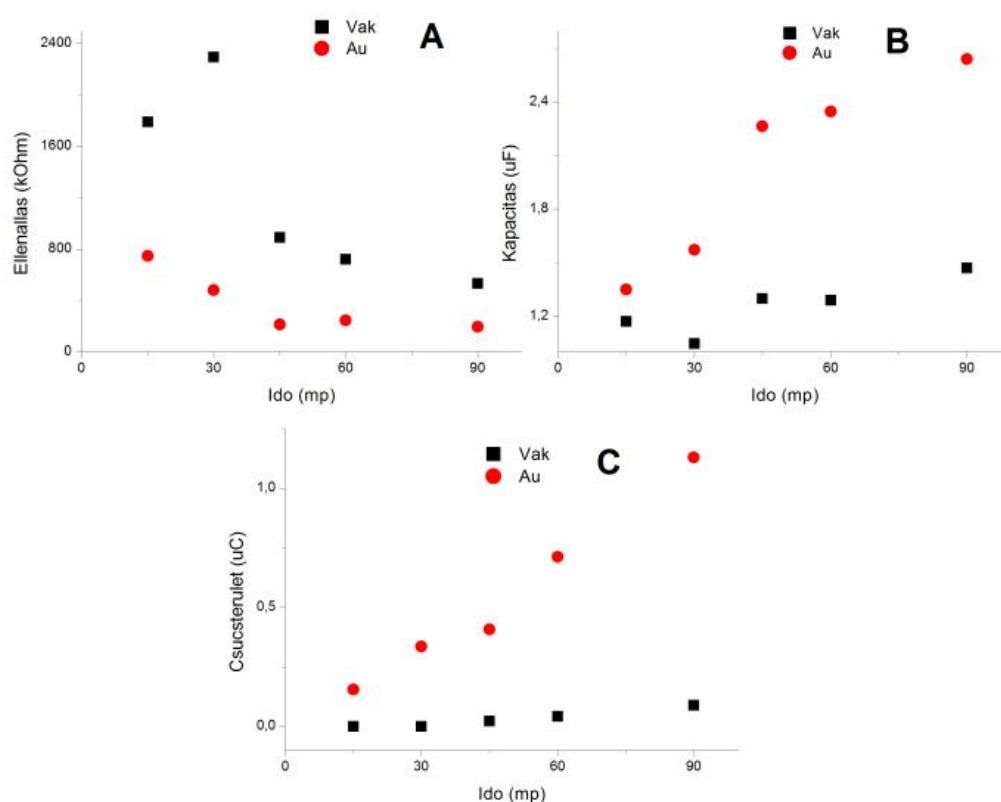


36. ábra: Az ezüst elektromos ülepítésének hatására bekövetkező impedanciában mért kapacitás és ellenállás változások a felszínén.

Elektroülepítési idő

Előzetesen előkezelt elektródokon 20-20 μ l 1/250 v/v Au konjugát és antitest oldatot adszorbeáltunk 1 éjszakán keresztül hűtőben, 4 °C-on tárolva. Amint az a 37 ábrán is megfigyelhető, az ülepítési idő tekintetében viszonylag nagy különbségek vannak az aranyat tartalmazó s nem tartalmazó elektródok között -130 mV-on végzett kronoamperometriával, s az eredmények alapján a 45 másodperc tűnik megfelelő ülepítési időnek. Az elektromos ülepítés során a fémes ezüst egységesen befedi a munkaelektrod felszínét 45 másodpercnél hosszabb idő alatt, ami jól megfigyelhető azon, hogy bár a felszíni ellenállás nem változik

számottevően 45 másodperc feletti időtartamnál, azonban a mért kapacitás és pásztázó voltametria eredménye alapján az ezüst mennyisége tovább növekedett.

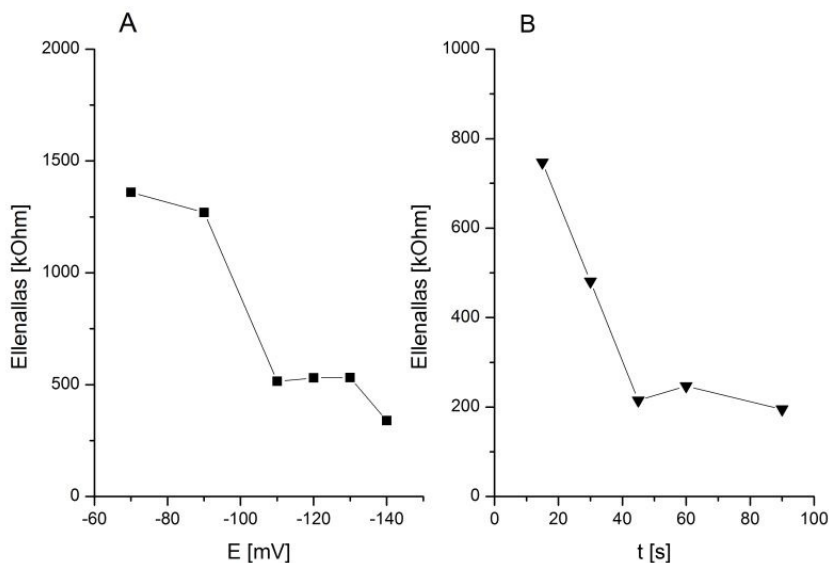


37. ábra: 1 mM ezüst nitrát oldat különböző időtartamú elektroülepítése 1/250 v/v Au és Antitest oldatokkal adszorbeált elektródokkal -130 mV-on. A ábra a töltés átviteli ellenállás változása, B ábra a felszíni kapacitás változása illetve C ábra a pásztázó voltametriaival mért csúcsterületek.

Mivel a mérések ismétlése során a töltésátviteli ellenállás megfigyelése egyértelműbb összefüggéseket mutatott, ezért a későbbi vizsgálatokban inkább ezen mérések eredményeire támaszkodtunk, s a kapacitás mérések eredményeit inkább ellenőrző jelleggel alkalmaztuk.

Ülepítési potenciál

Előzetes vizsgálatban (35. ábra) az arany jelenlétének ezüst elektromos ülepítésre gyakorolt katalizáló hatását már elemeztük, s úgy találtuk, hogy az aranyat is tartalmazó elektródfelületen az ezüst redukálódása -130 mV-nál egyértelműen megindul, míg a vak elektród esetében ez csak -150 mV-nál kezdődik el. Előzetesen előkezelt elektródokon 20-20 μ l 1/250 v/v Au konjugát és antitest oldatot adszorbeáltunk 1 éjszakán keresztül hűtőben, 4 °C-on tárolva. Az elektromos ülepítést meghatározott ideig (45 mp) végeztük különböző potenciálokon (-70, -90, -110, -120, -130, -140 mV) 1 mM ezüst nitrát koncentráció mellett.



38. ábra: Az elektromos ülepítési potenciál és idő összefoglaló impedimetriás eredményei 1/250 v/v adszorbeált aranyat tartalmazó elektródokkal

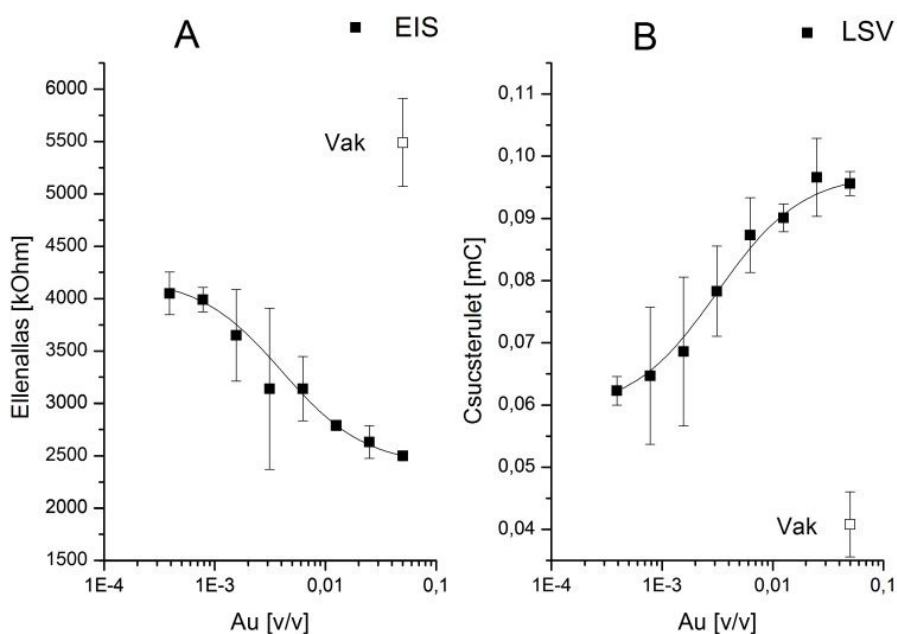
Optimális potenciálként a -110 mV-ot választottuk mivel e potenciál felett már nem változik számottevően a töltésátviteli ellenállás (38 A ábra), azonban az ennél alacsonyabb potenciálnál az aranyat tartalmazó és aranyat nem tartalmazó elektródok jele közti különbség csökken. A mérés ellenőrzésére lineáris pásztázó voltametriát alkalmaztunk, mely jó egyezést mutatott eredményeinkkel.

A megfelelő ülepítési potenciál és idő alkalmazásával egységes redukált ezüst réteg alakítható ki az elektród felszínén, mely a töltésátviteli ellenállás viszonylagos stabilitásában mutatkozik (38 ábra A és B).

Arany konjugátum kötés vizsgálata

Előzetesen az elektródok felszínén adott koncentrációjú BSA-AFM₁ konjugátum adszorpciójára került sor. Majd a kötési reakció alatt 20-10000 hígított arany konjugátum oldattal történt az elektródok 1 órás inkubációja szobahőn. A kötési reakció lejátszódása után, amíg az elektród mérése meg nem történt, 100 µl 100 mM NH₄NO₃ oldat elektródra cseppentése védte meg a munkaelektrodot, így az adszorbeált fehérjét a kiszáradástól. Amint az az eredményekből is látszik (39. ábra) a felszínhez kötődő arany konjugátum csökkenése az töltésátviteli ellenállás növekedését idézi elő az elektromos ülepítés után az

impedanciában, hiszen adott idő alatt kisebb mennyiségű ezüst redukálódása megy végbe (39 B ábra LSV eredmények).

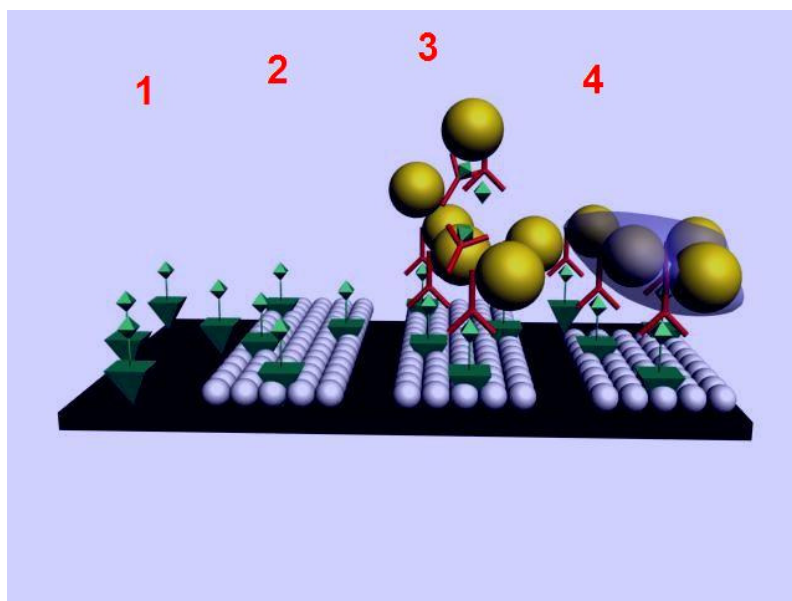


39. ábra: Az elektródokra kapott jelek impedanciában (A) és lineáris pásztázó voltametériában (B) 1/20-1/10000 v/v koncentrációjú arany konjugátummal történő inkubáció után.

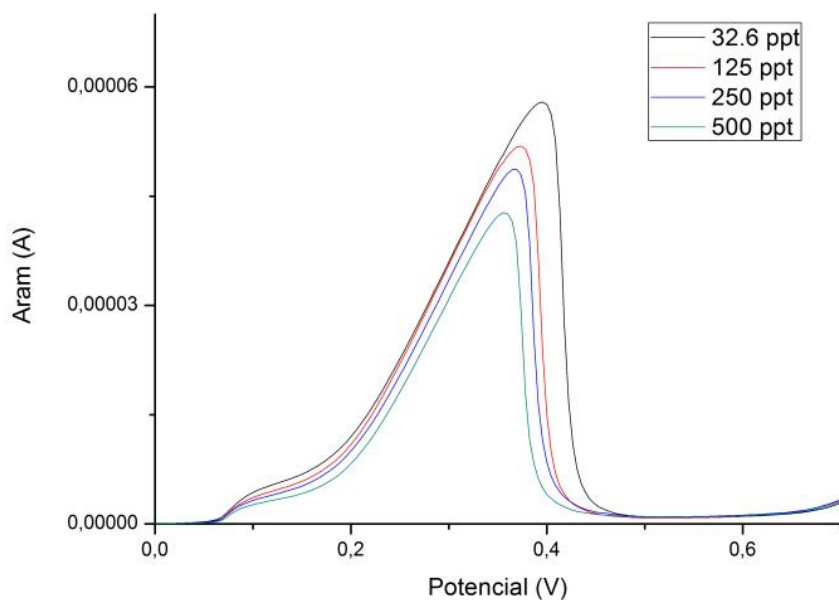
A kötési vizsgálat eredménye alapján az 1/500 v/v Au konjugát hígítás került kiválasztásra a kompetíciós vizsgálatokhoz.

Kompetíció, mátrixhatás, visszanyerés

A kompetíció vizsgálatok esetén is BSA-AFM₁ adszorpciójára került sor az elektródokon, majd adott koncentrációjú (1:500 v/v) arany konjugátum jelenlétében játszódott le a kompetíció a szabad toxin és a felszínhez kötött között 5-2000 ng/L koncentráció tartományban. Az elektródok elkészítési fázisait és a kompetíció után lejátszódó ezüstöt redukáló elektromos ülepítést foglalja össze a 40. ábra. Az antigének felszínen történő megkötését egy blokkolási lépés követte marha szérum albuminnal, majd a kompetíciós reakció lejátszódása után, a felszínen található kolloidális arany koncentrációjának függvényében redukált ezüstréteg kialakítására került sor. A kompetíció és elektroülepítés lejátszódása után pásztázó voltametériával felszínen kivált ezüst mennyisége jól párhuzamba állítható a kompetíció szabad toxinjának koncentrációival (41. ábra), hiszen magasabb szabad toxin koncentrációnál a felszínen kimutatható ezüst mennyisége csökken.



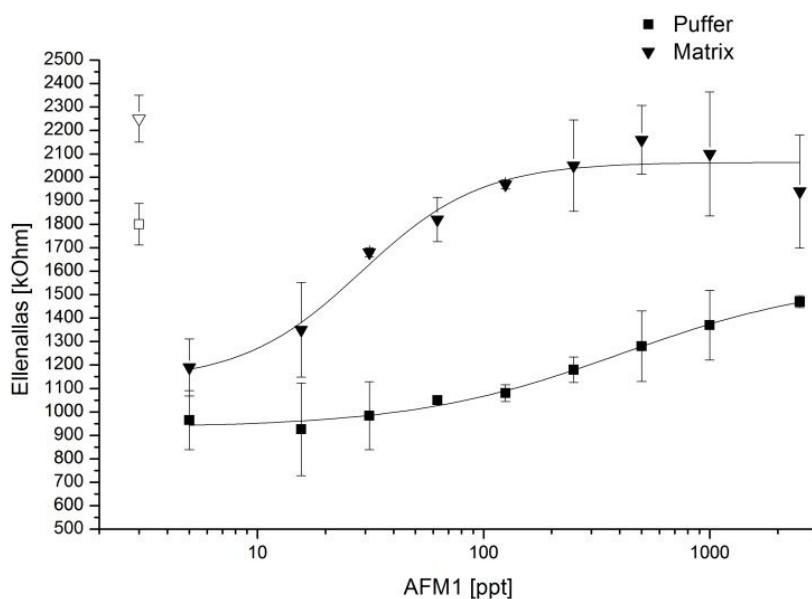
40. ábra: A kompetíció után felszínen megkötött kolloidális arany elektrokatalitikus hatása az ezüst ülepítésére. 1- antigének kötése, 2- elektródfelszín blokkolása BSA-val, 3- arannyal jelzett antitest- aflatoxin kompetíció, 4- Ezüst katalitikus ülepítése



41. ábra: Szabad AFM₁ és elektródon adszorbeált AFM₁ kompetíció utáni ezüst elektroülepítésének pásztázó voltametriás eredményei különböző (32.6, 125, 250, 500 ppt) szabad toxin koncentrációknál.

Amint az megfigyelhető a kompetíciós reakció hasonló görbét adott, mint a kötés esetén tapasztalt. Ahogy az oldatban levő szabad aflatoxin mennyisége növekszik, kevesebb arany tud a felszínhez kötődni, s csökken az ezüst mennyisége a felszínen, míg a töltés átviteli

ellenállás növekszik (42. ábra). A kalibráció lineáris szakaszának a 15-1000 ng/L tartomány adódott pufferben, s a detektálási határ 10 ng/L, relatív standard deviáció 20%.



42. ábra: Pufferben és 1/2 v/v tejben (mátrix) kivitelezett AFM₁ kompetíciós reakció eredménye az 5-2000 ppt tartományban.

Standard tej oldatot mátrixként felhasználva [116] ugyancsak végrehajtottuk a kompetíciót, s ekkor az ellenállás jelek növekedését és a lineáris voltametria jelek csökkenését tapasztaltuk (42. ábra) a mátrix hatása miatt. A tejben elvégzett kalibráció alapján a lineáris tartomány 25-125 ng/L-re szűkült, a detektálási határ (LOD) 15 ng/L. 25, 50 és 100 ng/L-es standard addíciós visszanyerési százalécai sorrendben 112%, 122%, 115%. Visszanyerési átlag $116\% \pm 6\%$ -nak adódott.

Összegzés

A végzett fejlesztő munka az aflatoxin M₁ tejben történő kimutatására és mennyiségi meghatározására irányult, melynek során immunoreakción alapuló rendszert vizsgáltunk. A kis kimutatási mennyiségre (25 ng/L és 50 ng/L) tekintettel kolloidális arany és redukált ezüst segítségével történt jelerősítés. Az arany mennyiségétől függő, elektród felszínén kialakított ezüstréteg impedimetriás mérése szolgáltatta az analitikai információt. Tej mátrixban sikeresen kalibrálás történt a kialakított rendszerrel, melynek lineáris tartománya 25-125 ng/L volt. Standard addíciós visszanyerési átlag 25, 50 és 100 ng/L koncentrációkra $116\% \pm 6\%$.

IV. Összefoglalás

Az értekezés két fő részre osztható, melyekben egy amperometriás enzim alapú és egy impedimetriás immunfehérje alapú szenzor fejlesztés leírása került összefoglalásra.

Az amperometriás bioszenzor esetén az aszkorbát oxidáz enzimet természetes fehérje membránon kötöttük meg a Teflon és Plexi alapanyagú enzim cellában. A cella egy FIA rendszerű amperometriás detektorhoz lett csatlakoztatva. A rendszerben két minta injektor (20 μ l mintabemérő hurok) volt egy az enzimcella előtt és egy utána. Az optimalizálás során több paramétert vizsgáltunk, s az enzim reakció és a készülék összeállítás szempontjából optimális paramétereknek a következőket találtuk: 400 mV potenciál, 0.5 ml/perc áramlási sebesség, pH=4.5-4.8, 200 mmol/L puffer koncentráció, hőmérséklet 36 °C vagy kisebb. A célvegyület mérésére és kalibrációra az enzimcella előtt és az enzimcella után injektált jelek különbségét alkalmaztuk, s a kiértékeléshez digitális jelfeldolgozást használtunk. 200 mmol/L koncentrációjú acetát pufferben kivitelezett kalibráció jó lineáris illeszkedést mutatott a 25-400 μ mol/L tartományban, s a kimutatási határ 5 μ mol/L, RSD 5%-nak adódott.

Különböző aszkorbinsav tartalom kimérésére került sor multivitamin pezsgőtabletta, multivitamin ivólé és bor minták esetén. A 60 mg aszkorbinsav tartalmú multivitamin pezsgőtablettánál az eredmények kielégítőnek mondhatók (visszamérés hatékonysága 96%, 101%, 115% 10, 20 és 40-szeres hígítások esetén), míg bor és multivitamin ivólé esetében visszanyerésnél csak az elvárt eredmények arányai voltak kimutathatóak az összetettebb mátrix hatás következményeként.

Az impedimetriás immunoszenzor esetén arannyal jelölt anti-aflatoxin M₁ antitestek és ezüst elektroülepítésének együttes alkalmazására került sor az aflatoxin M₁ detektálására. Az indirekt típusú kompetíciós ELISA eljárást nyomtatott elektródok felszínén valósítottuk meg. Az ezüst kronoamperometriás elektroülepítése állandó potenciálon, meghatározott ideig történt a jel erősítése érdekében. A számított töltésátviteli ellenállás (R_{ct}) jó egyezést mutatott az AFM₁ koncentrációjával. A leírásra került AFM₁ immunoszenzor lineáris tartománya 15 és 1000 ng/L közzé tehető 15 ng/L-nek megfelelő kimutatási határral (RSD= 20%). Az impedimetriás eredmények a kontroll lineáris pásztázó voltametria eredményeivel jó egyezést mutattak.

A tejben történő mátrix hatás tanulmányozása során töltésátviteli ellenállás növekedés volt megfigyelhető valószínűleg az arannyal jelölt AFM₁ antitesteken adszorbeálódó fehérje komponenseknek köszönhetően. Tej mátrixban a lineáris tartomány egy nagyságrenddel

kisebnek adódott (25–125 ng/L) mint pufferban, és a kimutatási határ 25 ng/L-nek felelt meg. A visszamérés hatékonysága átlaga a spike-olt minták eredményeinek kiértékelése után $116\pm 6\%$ volt.

Kísérleteink során be akartuk mutatni, hogy az ezüst irányított elektroülepítése megfelelőbb lehet, mint ezüst redukáló oldatoka használata, mert az utóbbiak reprodukálhatóságát jobban befolyásolja az idő, hőmérséklet ingadozás és fény kitettség. A töltés átviteli ellenállásban bekövetkező változások a felszínen közvetlenül megfigyelhetők impedancia spektroszkópiával. Az ilyen típusú EIS alapú felszín vizsgálatnak meg van az az előnye, hogy elhagyható a redox párok használata a folyamatban, de az így kapott jel érzékenyebb lehet a helyi környezeti tényezőkre, a felszíni és az adszorbeált antitestek által létrehozott réteg hibái nehezen észlelhetők. Konkrétan az immunoszenzor készítése során kialakuló munkaelektrod felszínén és BSA-AFM₁ konjugát megkötődésekor kialakuló különbségek és/vagy a BSA különböző fokú megkötődése befolyásolhatja az EIS jelet, s így a jel reprodukálhatósága nehezen befolyásolható. Ugyanakkor ez a típusú impedimetriás immunoszenzor elég érzékeny volt, hogy ppt tartományban kimutassa az AFM₁ toxint, azonban a tejben található fehérjék befolyásolták, azaz megemelték a kapott töltésátviteli ellenállásból származó jelet.

V. Summary

This thesis can be separated into two main parts, which contain the description of an amperometric enzyme based and an impedimetric immune based sensor development.

In amperometric biosensor the ascorbate oxidase enzyme was immobilized on a natural protein membrane in the Teflon and Plexiglass enzyme cell. The cell was connected to a FIA system with an amperometric detector. In the system two sample injectors with 20 μl loop were used one before and one after the enzyme cell. During optimization several parameters were examined. For measuring analyte concentrations and for calibration procedure subtraction of the signal peak area given in the presence of enzyme from the signal peak area given in the absence of enzyme was applied. The evaluation was made by digital integration. The optimal parameters are the followings: 400 mV applied potential, 0.5 ml/min flow rate, pH=4.5-4.8, 200 mmol/L buffer concentration, optimal temperature under 40 °C for this enzyme reaction in the used system. Calibration made in 200 mmol/L acetate buffer provided a good linear working range from 25-400 $\mu\text{mol/L}$, limit of detection 5 $\mu\text{mol/L}$, RSD=5%.

Multivitamin tablets and wines with different ascorbic acid contents were measured for test measurements. With multivitamin tablet of 60 mg ascorbic acid content the results were satisfactory (recovery 96%, 101%, 115% for 10, 20 and 40 times dilutions respectively), while with wine and multivitamin juice samples using spiking method only the rates of expected results could be calculated due to more complex matrix effect.

In case of impedimetric immunosensor gold-labelling of anti aflatoxin M₁ antibodies combined with the electrodeposition of silver onto colloidal gold was used for the detection of aflatoxin M₁. The indirect like competitive ELISA procedure was performed on screen-printed electrodes (SPEs). Silver was chronoamperometrically electrodeposited at a fixed applied potential and for a determined period of time to amplify the signal. The calculated charge transfer resistance (R_{ct}) was found to correlate well with the concentration of AFM₁. The linear working range of the described AFM₁ immunosensor ranged between 15 and 1000 ng/L with a limit of detection (LoD) equal to 15 ng/L (R.S.D. = 20%) Impedimetric results were confronted with linear sweep voltametry (LSV) and corresponded well to this technique. By investigating the matrix effect in milk we observed an increase of charge transfer resistance possibly attributed to the presence of the proteic compounds adsorbed on the gold-labelled AFM₁ antibody. In milk matrix the linear working range was one order of magnitude

less (25–125 ng/L) than in buffer, and the limit of detection corresponded to 25 ng/L. The recovery percentage of spiked samples was evaluated and the mean of recovery was $116\pm 6\%$. We also wanted to demonstrate that the controlled electrochemical deposition of silver is more attractive than the use of silver enhancing solutions, because these are more prone to be influenced by the time and temperature variations, and also by light exposure. Changes in charge transfer resistance can be detected and interpreted directly from impedance spectroscopy observations at the interface. This type of interface interrogation by EIS has the advantage to eliminate the use of redox species during the process, but in the same time the signal obtained is very sensible to local environmental conditions and because a redox probe is not used, small defects in the layer/layers of adsorbed immunoreagents are not easily detectable. Concretely, during the construction of the immunosensor, differences of electrode's working area surface and BSA-AFM₁ conjugate and/or BSA different rates of adsorption could influence the EIS signal and, as a result, the reproducibility of the signal can be hardly influenced. Nonetheless, this type of impedimetric immunosensor was sensitive enough to detect the AFM₁ in the ppt range, but was also influenced by the presence of milk proteins which generated an increase of charge transfer resistance.

VI. Irodalomjegyzék

1. Lucilene Dornelles Mello, Lauro Tatsuo Kubota: Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries, *Food Chemistry* 77 (2002) 237–256
2. I.E. Tothill: Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector, *Comp. and Electron. in Agricult* 30 (2001) 205-218
3. J. Wang: Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review, *J. Pharmaceutical Biomed. Anal.* 19 (1999) 47-53
4. J. Fitzpatrick, L. Fanning, S. Hearty, P. Leonard, B.M. Manning, J.Q. Quinn, R. O’Kennedy: Applications and recent developments in the use of antibodies for analysis, *Anal. Letters* 33 (2000) 2536-2609
5. Erol Akyilmaz, Ali Erdogan, Ramazan Öztürk, Ihsan Yasa: Sensitive determination of l-lysine with a new amperometric microbial biosensor based on *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 2055
6. Kristina Tag, Klaus Riedel, Hans-Jürgen Bauer, Gerold Hanke, Keith H.R. Baronian, Gotthard Kunze: Amperometric detection of Cu²⁺ by yeast biosensors using flow injection analysis (FIA), *Sensors and Actuators B* 122 (2007) 403
7. Erol Akyilmaz, İhsan Yasa, Erhan Dinçkaya: Whole cell immobilized amperometric biosensor based on *Saccharomyces cerevisiae* for selective determination of vitamin B1 (thiamine), *Analytical Biochemistry*, 354 (2006) 78
8. Mihaela Badea, Antonella Curulli, Giuseppe Palleschi: Oxidase enzyme immobilisation through electropolymerised films to assemble biosensors for batch and flow injection analysis, *Biosensors and Bioelectronics* 18 (2003) 689
9. Bertold Hock: Antibodies for immunosensors, *Anal. Chim. Acta* 347 (1997) 177-186
10. Daniela De Venuto, Bruno Ricco: Design and characterization of novel read-out systems for a capacitive DNA sensor, *Microelectronics Journal* 37 (2006) 1610
11. H. Berney, J. West, E. Haefele, J. Alderman, W. Lane, J.K. Collins: A DNA diagnostic biosensor: development, characterisation and performance, *Sensors and Actuators B*, 68 (2000) 100
12. E. Boer, R.R. Beumer: Methodology for detection and typing of food borne microorganisms, *Int. J. Food Microbiol.* 50 (1999) 119-130
13. M.J. Wolcott: DNA based rapid methods for the detection of foodborne pathogens, *J. Food Prot.* 54 (1991) 387-401
14. S. Zhang, G. Wright, Y. Yang: Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction, *Biosens. Bioel.* 15 (2000) 273-282
15. Mouna Hnaïen, Walid Mohamed Hassen, Adnane Abdelghani, Stéphane Cotte, Didier Leonard, Francois Bessueille, Nicole Jaffrezic-Renault: A conductometric biosensor for the estimation of the number of cleaving sites in peptides and proteins, *Electrochem. Comm.* 11 (2009) 165-168
16. J. Castillo, S. Gáspár, S. Leth, M. Niculescu, A. Mortari, I. Bontidean, V. Soukharev, S.A. Dorneanu, A.D. Ryabov, E. Csöregi: Biosensors for life quality Design, development and applications, *Sensors and Actuators B* 102 (2004) 179
17. Christine Berggren, Bjarni Bjarnason, and Gillis Johansson: Capacitive Biosensors, *Electroanalysis*, 13 (2001) 173
18. Bobby Pejčić, Roland De Marco: Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization, *Electrochimica Acta* 51 (2006) 6217
19. Liju Yang, Rashid Bashir: Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria, *Biotechnology Advances* 26 (2008) 135

20. Julio Cesar B. Fernandes, Lauro Tatsuo Kubota, Graciliano de Oliveira Neto: Potentiometric biosensor for L-ascorbic acid based on ascorbate oxidase of natural source immobilized on ethylene±vinylacetate membrane *Analytica Chimica Acta*, 385 (1999) 3-12
21. Emine Karakus, Sule Pekyardimeci, Esma Kilic: Potentiometric biosensor based on PVC membrane containing palmitic acid for determination of creatine, *Process Biochem* 41 (2006) 1371-1377
22. Viatcheslav Volotovskaya, Namsoo Kimb: Ascorbic acid determination with an ion-sensitive field effect transistor-based peroxidase biosensor *Analytica Chimica Acta* 359 (1998) 143-148
23. S. J. Updike, G. P. Hicks: Enzyme electrode, *Nature* (1967) 214 (5092) 986
24. Katsunobu Yamamoto, Haisheng Zeng, Yi Shen, Md Mahiuddin Ahmed, Takeshi Kato: Evaluation of an amperometric glucose biosensor based on a tuhenium complex mediator of low redox potential, *Talanta* 66 (2005) 1175-1180
25. C. La Rosa, F. Pariente, L. Hernandez, E. Lorenzo: Amperometric flow-through biosensor for determination of pesticides, *Anal. Chim. Acta* 308 (1995) 129-136
26. Vanesa Sanz, Susana de Marcos, Javier Galban: A reagentless optical biosensor based on the intrinsic absorption properties of peroxidase, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 956
27. Xu-Dong Wang, Ting-Yao Zhou, Xi Chen, Kwok-Yin Wong, Xiao-Ru Wang: An optical biosensor for the rapid determination of glucose in human serum, *Sens Actuat B* 129 (2008) 866-873
28. Stephen J. Daly, Gary J. Keating, Paul P. Dillon, Bernadette M. Manning, Richard O'Kennedy, Heather A. Lee, and Michael R. A. Morgan: Development of Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassay for Aflatoxin B1, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000) 5097
29. Sunil G. Bhand, Srimathi Soundararajan, Ioana Surugiu-Wammark, Jaqueline Simona Milea, Estera Szwajcer Dey, Maria Yakovleva, Bengt Danielsson: Fructose selective calorimetric biosensor in flow injection analysis, *Anal. Chim. Acta* 668 (2010) 13-18
30. Henrik Anderson, Mats Jonsson, Lars Vestling, Ulf Lindberg, Teodor Aastrup: Quartz crystal microbalance sensor design I. Experimental study of sensor response and performance, *Sensors and Actuators B* 123 (2007) 27
31. T. Yakhno, A. Sanin, A. Pelyushenko, V. Kazakov, O. Shaposhnikova, A. Chernov, V. Yakhno, C. Vacca, F. Falcione, B. Johnson: Uncoated quartz resonator as a universal biosensor, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 2127
32. Joao M. Encarnacao, Peter Stallinga, Guilherme N.M. Ferreira: Influence of electrolytes in the QCM response: Discrimination and quantification of the interference to correct microgravimetric data, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 1351
33. Warakorn Limbut, Proespichaya Kanatharana, Bo Mattiasson, Punnee Asawatreratanakul, Panote Thavarungkul: A comparative study of capacitive immunosensors based on self-assembled monolayers formed from thiourea, thioctic acid, and 3-mercaptopropionic acid, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2006) 233
34. Yan Liu, Zonghui Qin, Xingfa Wu, Hong Jiang: Immune-biosensor for aflatoxin B1 based bio-electrocatalytic reaction on micro-comb electrode, *Biochemical Engineering Journal* 32 (2006) 211
35. Long Chen, Yoshihito Honso, Shu Seki, Donglin Jiang: Light-Harvesting Conjugated Microporous Polymers: Rapid and Highly Efficient Flow of Light

- Energy with a Porous Polyphenylene Framework as Antenna, *Journal of Am. Chem Soc.*, 2010, vol 132, issue 19, p 6742
36. Justin B. Siegel, Alexandre Zanghellini, Helena M. Lovick, Gert Kiss, Abigail R. Lambert, Jennifer L. St.Clair, Jasmine L. Gallaher, Donald Hilvert, Michael H. Gelb, Barry L. Stoddard, Kendall N. Houk, Forrest E. Michael, David Baker: Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular diels-alder reaction, *Science*, vol.329 (2010) p. 309, DOI: 10.1126/science.1190239
 37. Ting Chen, Keith A. Friedman, Ian Lei, Adam Heller: In situ assembled mass-transport controlling micromembranes and their application in implanted amperometric glucose sensors, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3757-3763
 38. John H.T. Luong, Keith B. Male, Jeremy D. Glennon: Biosensor technology: Technology push versus market pull, *Biotech. Advances* 26 (2008) 492-500
 39. 45.1.14 AOAC Official Method 967.21 Ascorbic Acid in Vitamin Preparations and Juices 2,6-Dichloroindophenol Titrimetric Method (First Action **1967**, Final Action **1968**)
 40. European Standard: Foodstuffs-Determination of vitamin C by HPLC Ref.No.: EN14130:2003 E
 41. L.Nováková, P. Solich, D. Solicjová: HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids, *Trends in Analytical Chemistry* 27 (2008) 942-958
 42. X. Wu, Y. Diao, C. Sun, J. Yang, Y. Wang, S. Sun: Fluorometric determination of ascorbic acid with o-phenyldiamine, *Talanta* 589 (2003) 95-99
 43. A.B. Florou, M.I.Prodromidis, S.M.Tzouwara-Karayanni, M.I. Karayannis: Fabrication and voltametric study of lanthanum 2,6-dichlorophenolindophenol chemically modified screen printed electrodes. Application for determination of ascorbic acid, *Anal. Chim. Acta* 423 (2000) 107-114
 44. A.B. Florou, M.I.Prodromidis, S.M.Tzouwara-Karayanni, M.I. Karayannis: Flow electrochemical determination of ascorbic acid in real samples using a glassy carbon electrode modified with a cellulose acetate film bearing 2,6-dichlorophenolindophenol, *Anal. Chim. Acta* 409 (2000) 113-121
 45. P.O.Barrales, M.L.Fernandez de Cordova, A.M. Diaz: Indirect determination of ascorbic acid by solid-phase spectrophotometry, *Anal. Chim. Acta* 360 (1998) 143-152
 46. A.A.Ensafi, M. Taei, T. Khayamian, A. Arabzadeh: highly selective determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid by differential pulse voltametry using poly(sulfonazo III) modified glassy carbon electrode, *Sens. Act. B* 147 (2010) 213-221)
 47. L.D. Mello and L.T. Kubota: Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation, *Talanta* 72 (2007) 335
 48. Vijaykumar S. Ijeri, Manuel Algarra, Ana Martins: Electrocatalytic Determination of Vitamin C Using Calixarene Modified Carbon Paste Electrodes, *Electroanalysis* 16 (2004) 2082
 49. Orlando Fatibello-Filho and Iolanda da C. Vieira L-Ascorbic Acid Determination in Pharmaceutical Formulations Using a Biosensor Based on Carbon Paste Modified with Crude Extract of Zucchini (*Cucurbita pepo*) *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 11, No. 4, 412-418, 2000
 50. Shobha Jawaheer, S. F. White, S. D. D. V. Rughooputh, David C. Cullen: Development of a common biosensor format for an enzyme based biosensor array to monitor fruit quality, *Biosensors and Bioelectronics* **2003**, 18, 1429-1437

51. Erol Akyilmaz, Erhan Dinckaya: A new enzyme electrode based on ascorbate oxidase immobilized in gelatin for specific determination of L-ascorbic acid, *Talanta* **1999**, 50, 87-93
52. I. N. Tomita, A. Manzoli, F. L. Fertonani and H. Yamanaka* Amperometric biosensor for ascorbic acid *Ecl. Quím., São Paulo*, 30(2): 37-43, 2005
53. K. Kriz, M. Anderlund, D. Kriz: Real-time detection of L-ascorbic acid and hydrogen peroxide in crude food samples employing a reversed sequential differential measuring technique of the SIRE-technology based biosensor, *Biosensors and Bioelectronics* 16 (2001) 363-369
54. Germán A. Messina, Angel A.J. Torriero, Irma E. De Vito, Julio Raba: Continuous-flow/stopped-flow system for determination of ascorbic acid using an enzymatic rotating bioreactor *Talanta* 64 (2004) 1009–1017
55. Yasushi Hasebe, Tatsushi Akiyama, Toshimitsu Yagisawa, Shunichi Uchiyama Enzyme-less amperometric biosensor for L-ascorbate using poly-L-histidine-copper complex as an alternative biocatalyst, *Talanta* 47 (1998) 1139–1147
56. C.A.B. Clemetson: Vitamin C, CRC Press, Boca Raton, FL, 1989
57. A. Messerschmidt, R. Ladenstein, R. Huber: Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1,9Å resolution, *J. Mol. Biol.* (1992) 179-205
58. Ruth Freitag: *Biosensors in Analytical Biotechnology*, 1996, R.G. Landes Company and Academic Press
59. Ursula Bilitewski, Antony Turner: *Biosensors for environmental monitoring*, 2000, Taylor & Francis
60. Royce C. Enstrom, Vernon A. Strasser: Characterization of electrochemically Pretreated Glassy Carbon Electrodes *Anal. Chem.* 1984, 56, 136-141
61. Christie D. Allred and Richard L. McCreery: Adsorption of Catechols on Fractured Glassy Carbon Electrode Surfaces *Analytical Chemistry* 64 (1992) 444
62. Jeromerajan Premkumar, Soo Beng Khoo: Electrocatalytic oxidations of biological molecules (ascorbic acid and uric acids) at highly oxidized electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 576 (2005) 105
63. N. Adányi, M. Tóth Markus, E.E. Szabó, M. Váradi, M.P. Sammartino, M. Tomassetti, L. Campanella: *Analytica Chimica Acta* 501 (2004) 219-225
64. E.E. Szabó, N. Adányi, M. Váradi: *Biosensors & Bioelectronics* 11 (1996) 1051-1058
65. E. Bellocco, D. Barreca, G. Lagana, U. Leuzzi, F. Migliardo, R. La Torre, G. Galli, A. Galtieri, L. Minutoli, F. Squadrito: Neutron scattering and HPLC study on L-ascorbic acid and its degradation, *Chemical Physics* 345 (2008) p. 191
66. Erol Akyilmaz, Emine Yorganci, Engin Asav: Do copper ions activate tyrosinase enzyme? A biosensor model for the solution, *Bioelectrochem.* 78 (2010) 155-160
67. *Official Methods of Analysis- Food composition; Additives; Natural contaminants*, vol. 2 K. Helrich, Association of Official Analytical Chemists Inc., USA, 1990, p. 1201
68. S. Dragacci, F. Grosso, J. Gilbert, Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk: collaborative study, *Journal of AOAC International*, 84 (2001) 437–443.
69. E.K. Kim, D.H. Shon, D. Ryu, J.W. Park, H.J. Hwang, Y.B. Kim, Occurrence of aflatoxin M1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC, *Food Additives and Contaminants*, 17 (2000) 59–64.
70. Nurhan Unusan: Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey, *Food and Chemical Toxicology* 44 (2006) 1897,

71. P. Rosi, A. Borsari, G. Lasi, S. Lodi, A. Galanti, A. Fava, S. Girotti, E. Ferri, Aflatoxin M1 in milk: Reliability of the immunoenzymatic assay, *International Dairy Journal* 17 (2007) 429–435.
72. F. Ricci, G. Volpe, L. Micheli, G. Palleschi, A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis, *Analytica Chimica Acta* 605 (2007) 111-129.
73. B. Gaag, S. Spath, H. Dietrich, E. Stigter, G. Boonzaaijer, T. Osenbruggen, K. Koopal, Biosensors and multiple mycotoxin analysis, *Food Control* 14 (2003) 251–254.
74. Z. Zou, J. Kai, M. J. Rust, J. Han, C. H. Ahn: Functionalized nanointerdigitated electrode arrays on polymer with integrated microfluidics for direct bio-affinity sensing using impedimetric measurement, *Sens. Actuat. A* 136 (2007) 518-526
75. S. Hleli, C. Martelet, A. Abdelghani, N. Burais, N. Jaffrezic-Renault: Atrazine analysis using an impedimetric immunosensor based on mixed biotinylated self-assembled monolayer *Sens. Actuat. B* 113 (2006) 711-717
76. K. S. Ma, H. Zhou, J. Zoval, M. Madou: DNA hybridization detection by label free versus impedance amplifying label with impedance spectroscopy *Sens Actuat. B* 114 (2006) 58-64
77. T. Kawaguchi, D. R. Shankaran, S. J. Kim, K. Matsumoto, K. Toko, N. Miura, Surface plasmon resonance immunosensor using Au nanoparticle for detection of TNT, *Sensors and Actuators B, Chem.* 133 (2008) 467–472.
78. T. Yakhno, A. Sanin, A. Pelyushenko, V. Kazakov, O. Shaposhnikova, A. Chernov, V. Yakhno, C. Vacca, F. Falcione, B. Johnson: Uncoated quartz resonator as a universal biosensor, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 2127–2131.
79. M. Wang, L. Wang, G. Wang, X. Ji, Y. Bai, T. Li, S. Gong, J. Li: Application of impedance spectroscopy for monitoring colloid Au-enhanced antibody immobilization and antibody–antigen reactions, *Biosensors and Bioelectronics* 19 (2004) 575–582.
80. J. H. O. Owino, A. Ignaszak, A. Al-Ahmed, P. G. L. Baker, H. Alemu, J. C. Ngila, E. I. Iwuoha: Modelling of the impedimetric responses of an aflatoxin B1 immunosensor prepared on an electrosynthetic polyaniline platform, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1069–1074.
81. J. Y. Liao: Construction of nanogold hollow balls with dendritic surface as immobilized affinity support for protein adsorption, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 57 (2007) 75-80.
82. H. Tang, Q. Wang, Q. Xie, Y. Zhang, L. Tan, S. Yao: Enzymatically biocatalytic precipitates amplified antibody–antigen interaction for super low level immunoassay: An investigation combined surface plasmon resonance with electrochemistry, *Biosensors and Bioelectronics* 23 (2007) 668–674.
83. S. J. Daly, G. J. Keating, P. P. Dillon, B. M. Manning, R. O’Kennedy, H. A. Lee, M. R. A. Morgan: Development of Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassay for Aflatoxin B1 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2000) 5097-5104.
84. Silvana Andreescu, Lise Barthelmebs, Jean-Louis Marty: Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides, *Analytica Chimica Acta* 464 (2002) 171
85. Thierry Montesinos, Sandra Pérez-Munguia, F. Valdez, Jean-Louis Marty: Disposable cholinesterase biosensor for the detection of pesticides in water-miscible organic solvent, *Analytica Chimica Acta* 431 (2001) 231

86. Ru-Qiang Liang, Cui-Yan Tan, Kang-Cheng Ruan: Colorimetric detection of protein microarrays based on nanogold probe coupled with silver enhancement, *Journal of Immunological methods* 285 (2004) 157
87. Zhao-Peng Chen, Zhao-Feng Peng, Yan Luo, Bo Qu, Jian-Hui Jiang, Xiao-Bing Zhang, Guo-Li Shen, Ru-Qin Yu: Successively amplified electrochemical immunoassay based on biocatalytic deposition of silver nanoparticles and silver enhancement, *Biosensors and Bioelectronics* 23 (2007) 485
88. Lionel Marcon, Didier Stiévenard, Oleg Melnyk: Electrical detection of human immunoglobulins G from human serum using a microbiosensor, *Biosensors and Bioelectronics* 23 (2007) 81
89. Xia Chu, Xin Fu, Ke Chen, Guo-Li Shen, Ru-Qin Yu: An electrochemical stripping metalloimmunoassay based on silver-enhanced gold nanoparticle label, *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005) 1805
90. I. Alexandre, S. Hamels, S. Dufour, J. Collet, N. Zammateo, F. De Longueville, J.-L. Gala, and J. Remacle: Colorimetric Silver Detection of DNA Microarrays, *Analytical Biochemistry* 295 (2001) 1
91. Allen J Bard, Larry R. Faulkner: *Electrochemical methods –Fundamentals and applications*, 2001, John Wiley & Sons
92. Xavier Munoz-Berbel: *Microsystems based on microbial biosensing*, 2008
93. Jian Guo Guan, Yu-Quing Miao and Qing-Jie Zhang: Impedimetric Biosensors, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 97 (2004) 219
94. Digby D. Macdonald, Elzbieta Sikora and George Engelhardt: Characterizing electrochemical systems in the frequency domain, *Electro Chimica Acta* 43 (1998) 87
95. Jean-Baptiste Jorcin, Mark E. Orazem, Nadine Pébere, Bernard Tribollet: CPE analysis by local electrochemical impedance spectroscopy, *Electrochi. Acta* 51 (2006) 1473-1479
96. P.J. Cotty, R.J. Garcia, Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination, *Int. J. Food Microbiol.* 119 (2007) 109–115.
97. J.F. Gremmels, Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review, *Food Addit. Contam.* 25 (2008) 172–180
98. H.E. Mee, H.R. Park, S.J. Hu, K.S. Kwon, H. Lee, M.S. Ha, K.M. Kim, E.J. Ko, S.D. Ha, H.S. Chun, D.H. Chung, D.H. Bae, Monitoring of aflatoxin B1 in livestock feeds using ELISA and HPLC, *J. Microbiol. Biotechnol.* 16 (2006) 643–646
99. J.L. Richard: Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—an overview, *Int. J. Food Microbiol.* 119 (2007) 3–10
100. H.P. Egmond, R.C. Schothorst, M.A. Jonker, Regulations relating to mycotoxins in food, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 147–157
101. European Commission Regulation, No. 466/2001/EC of 8 March 2001, Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs, O.J.E.C., L077 (2001) 1–13
102. European Commission Regulation, No. 683/2004/EC of 13 April 2004, Amending Regulation (EC) No. 466/2001 as Regards Aflatoxins and Ochratoxin A in Foods for Infants and Young Children, O.J.E.C., L106 (2004) 3–5.
103. Gordon S. Shepard: Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty first century, *Anal Bioanal Chem* 395 (2009) 1215-1224
104. Robert Köppen, Matthias Koch, David Siegel, Stefan Merkel, Ronald Maul, Irene Nehls: Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations, *Appl. Microbiol. Biotechnology* 86 (2010) 1595-1612

105. Loic J. Blum, Pierre R Coulet: Biosensor principles and applications, 1991, Marcel Dekker
106. M.J. Warwick, L.Brian (Ed.): Immunoassay: A practical guide, Taylor& Francis Ltd. London, UK 1996 pp 150-170
107. B. Prieto-Simon, M. Campas, J.-L. Marty, T. Noguier: Novel highly performing immunosensor-based strategy for ochratoxin A detection in wine samples, Biosens. Bioelectron. 23 (2008) 995-1002
108. Hideo Gotoh, Yukiko Matsumoto: Cell-surface streptavidin fusion protein for rapid selection of transfected mammalian cells, 5-Gene 389 (2007) 146-153
109. A.Radoi, M.Targa, B.Prieto-Simon, J. L. Marty:Enzymes-linked immunosorbent assay ELISA based on superparamagnetic nanoparticles for aflatoxin M1 detection, Talanta 77 (2008) 138-143
110. Aiping Fan, Choiwan Lau, Jianhong Lu: Magnetic Bead-Based Chemiluminescent Metal Immunoassay with a Colloidal Gold Label, Anal Chem, 77 (2005) 3238-3242
111. Bo-Wen Lu, Wen-Chang Chen: A disposable glucose biosensor based on drop-coating of screen-printed carbon electrodes with magnetic nanoparticles, Journal of Magnetism and Magnetic material 304 (2006) e400
112. Horia Chiria,Dumitru-Daniel Herea, Sorin Corodeanu: Microwire array for giant magneto-impedance detection of magnetic particles for biosensor prototype, Journal of Magnetism and Magnetic material 311 (2007) 425
113. A. Bonanni, M.J. Esplandiu, M. del Valle: Signal amplification for impedimetric genosensing using gold-streptavidin nanoparticles, Electro Chimica Acta 53 (2008) 4022
114. Huan Chen, Jian-Hui Jiang, Yong Huang, Ting Deng, Ji-Shan Li, Guo-Li Shen, Ru-Qin Yu: An electrochemical impedance immunosensor with signal amplification based on Au-colloid labeled antibody complex, Sensors and Actuators B 117 (2006) 211
115. Yingzi Fu, Ruo Yuan*, Lan Xu, Yaqin Chai, Yan Liu, Dianping Tang, Ying Zhang: Electrochemical impedance behavior of DNA biosensor based on colloidal Ag and bilayer two-dimensional sol-gel as matrices, Journal of Biochemical and Biophysical methods 62 (2005) 163
116. Charlie O. Parker, Ibtisam E. Tohill: Development of an Electrochemical Immunosensor for Aflatoxin M1 in Milk with Focus on Matrix Interference, Biosensors Bioelectronics 24 (2009) 2452

VII. Tudományos közlemények és publikációk

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

1. **Víg Attila**, Iglói Attila, Adányi Nóra, Bóka Beáta, Csutorás Csaba, Kiss Attila:
Élelmiszer minták mérésére alkalmas aszkorbinsav bioszenzor fejlesztése FIA (flow injection analysis) rendszerben, Developing of ascorbic acid biosensor in FIA (flow injection analysis) system suitable for food samples, **Erdélyi Műszaki Szemle (2007) 39-40. p. 88**
2. **Attila Víg**, Attila Iglói, Nóra Adányi, Gyöngyi Gyémánt, Csaba Csutorás, Attila Kiss:
Measuring antioxidants in food with biosensor techniques, microCAD 2008 **International Scientific Conference Papers, Miskolc (2008), pp. 63-68**
3. **Attila Vig**, Antonio Radoi, Xavier Munoz-Berbel, Gyongyi Gyemant, Jean Louis Marty: Impedimetric aflatoxin M₁ immunosensor based on colloidal gold and silver electrodeposition, **Sens. Act. B 134 (2009) p. 214-220 Impact: 3.083**
4. **Attila Vig**, Xavier Munoz-Berbel, Antonio Radoi, Montserrat Cortina-Puig, Jean Louis Marty: Characterization of the gold catalysed deposition of silver on graphite screen printed electrodes and their application to the development of impedimetric immunosensors, **Talanta 80 (2009), issue 2, p. 942-946 Impact: 3.29**
5. **Attila Vig**, Attila Igloi, Nora Adanyi, Gyongyi Gyemant, Csaba Csutoras, Attila Kiss:
Development and characterization of a FIA system for selective assay of L-ascorbic acid in food samples, **Bioprocess Biosyst. Eng., (published online 2010), DOI: 10.1007/s00449-010-0418-6 Impact: 1.823**

Össz impakt faktor: 8,196

Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia előadások és poszterek:

1. VÍG Attila, IGLÓI Attila, ADÁNYI Nóra, BÓKA Beáta, CSUTORÁS Csaba, KISS Attila *Aszkorbát oxidáz alapú aszkorbinsav bioszenzor fejlesztése FIA (flow injection analysis) rendszerben* **XXII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Csíkszereda, Erdély, 2006 október (poszter)**
2. VÍG Attila, IGLÓI Attila, ADÁNYI Nóra, CSUTORÁS Csaba, KISS Attila *L-Aszkorbinsav mérésére alkalmas aszkorbát oxidáz bioszenzor fejlesztése FIA (flow injection analysis) rendszerben* **Centenárium Vegyészkonferencia, Sopron, 2007 május (poszter)**
3. Iglói Attila, Víg Attila, Adányiné Kisbocskói Nóra, Csutorás Csaba, Kiss Attila *Glassy carbon elektród előkezelési eljárásainak kidolgozása szulfid bioszenzor kifejlesztésére* **Centenárium Vegyészkonferencia, Sopron, 2007 május (poszter)**
4. A. VÍG, A. IGLOI, N. ADANYI, Gy. GYÉMÁNT, Cs. CSUTORÁS, A. KISS *Development of Ascorbate Oxidase Based Biosensor for Measuring Food Samples* **Relatenz 2007, Nemzetközi Enzimtechnológiai Konferencia, University of Matanzas, Matanzas, Kuba, 2007 június (poszter)**
5. Attila Igloi, Attila Vig, Nora Adanyi, Csaba Csutoras, Attila Kiss *Development of a sulfite oxidase based amperometric biosensor used in FIA system for the determination of sulfite* **Euroanalysis XIV, Antwerpen, Belgium, 2007 szeptember (poszter)**
6. VÍG Attila, IGLÓI Attila, ADÁNYINÉ Kisbocskói Nóra, CSUTORÁS Csaba, KISS Attila *FIA rendszerű aszkorbát oxidáz bioszenzor fejlesztése L-aszkorbinsav meghatározására* **Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia, Eger, 2007 október (poszter)**
7. Víg Attila, Iglói Attila, Adányi , Gyémánt , Csutorás Csaba, Kiss Attila *Új analitikai eljárás fejlesztése élelmiszer antioxidánsok vizsgálatára- Development of new analytical procedure for investigation of food antioxidants* **„Lippay János – Ormos Imre - Vas Károly Tudományos Ülésszak”, Corvinus Egyetem, Budapest, 2007. november (poszter)**

8. Víg Attila, Iglói Attila, Csutorás Csaba, Kiss Attila, Szováti Katalin *C-vitamin sorozatmérésére alkalmas új analitikai mérő-műszer kifejlesztése XVI. Élelmiszer Minőségellenőrzési Tudományos Konferencia, Tihany, 2008. április (poszter)*

9. Attila Vig, Xavier Munoz-Berbel, Antonio Radoi, Jean-Louis Marty *Impedimetric detection of aflatoxin M₁ with biomolecular interaction using colloidal gold XII Trobada Transfronterera Andorra 2008, 2008 szeptember (előadás)*