

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie

PŘÍPRAVA A TESTOVÁNÍ TRÍENZYMOVÉHO
BIOSENZORU PRO STANOVENÍ LAKTÓZY

Bakalářská práce

Autor:

Petra Komenská

Vedoucí práce:

RNDr. Pavla Kučerová, Ph.D.

Studijní program:

B1407 Chemie

Studijní obor:

Aplikovaná chemie

Forma studia:

Prezenční

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Petra Komenská
Název práce	Příprava a testování tříenzymového biosenzoru pro stanovení laktózy
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	RNDr. Pavla Kučerová, Ph.D.
Rok obhajoby	2016
Abstrakt	<p>Cílem bakalářské práce bylo zkonstruovat citlivý amperometický biosenzor na stanovení laktózy. Laktóza, jako analyt, byla zvolena z důvodu neustále se zvyšujícího procenta lidí trpících laktózovou intolerancí. Za použití chronoamperometrie byl nalezen nejcitlivější biosenzor, který byl následně testován na vzorku mléka, tvarohu, jogurtu a sušeného mléka. Jako referenční metoda byla zvolena plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí.</p>
Klíčová slova	Biosenzor, laktóza, laktózová intolerance
Počet stran	43
Jazyk	Čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Petra Komenská
Title	Preparation and testing of three-enzyme biosensor for the determination of lactose
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Analytical Chemistry
Supervisor	RNDr. Pavla Kučerová, Ph.D.
The year of presentation	2016
Abstract	<p>The aim of the thesis was to construct a sensitive amperometric biosensor for the determination of lactose. Lactose, as analyte, was chosen because of the constantly increasing percent of people who suffers from lactose intolerance. The most sensitive biosensor was found using chronoamperometry and subsequently tested on a sample of milk, cheese, yoghurt and milk powder. Gas chromatography with mass spectrometry was chosen as a reference method.</p>
Keywords	Biosensor, lactose, lactose intolerance
Number of pages	43
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem práci zpracovala samostatně za pomoci citované literatury a použitých zdrojů pod vedením RNDr. Pavly Kučerové, Ph.D.

V Olomouci, květen 2016

.....

Podpis

Děkuji RNDr. Pavle Kučerové, Ph.D. za obrovskou trpělivost a pochopení. Také za cenné rady, připomínky a čas, který mi věnovala při vedení mé bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat konzultantům RNDr. Janě Skopalové, Ph.D a doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D za připomínky k této práci.

Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Ludmile Zajoncové, Ph.D. za poskytnutí speciálního celofánu na přípravu biosenzorů.

V neposlední řadě patří také poděkování katedře analytické chemie za možnost zpracovávat bakalářskou práci právě zde a také za financování celé práce.

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Teoretická část.....	8
2.1. Charakteristika biosenzorů.....	8
2.2. Historický vývoj biosenzorů.....	9
2.3. Enzymové biosenzory.....	10
2.4. Laktózové biosenzory.....	11
2.5. Biosenzory s nanočásticemi.....	13
2.6. Laktóza.....	16
2.6.1. Vlastnosti.....	17
2.6.2. Výskyt.....	18
2.6.3. Laktózová intolerance.....	20
2.6.4. Metody stanovení.....	21
3. Experimentální část.....	23
3.1. Chemikálie.....	23
3.2. Přístrojové vybavení.....	24
3.3. Pracovní postupy.....	24
3.3.1. Příprava biosenzorů.....	24
3.3.2. Příprava reálných vzorků.....	25
3.3.3. Chronoamperometrie.....	26
3.3.4. Referenční metoda GC-MS.....	26
4. Výsledky a diskuze.....	28
4.1. Vliv pH.....	28
4.2. Vliv předúpravy elektrody.....	29
4.3. Vliv použití polymeru.....	30
4.4. Vliv různých typů nanočástic.....	30
4.5. Kalibrační závislost laktózy.....	32
4.6. Stanovení laktózy v reálných vzorcích.....	33
4.6.1. Stanovení laktózy, glukózy a galaktózy referenční metodou GC-MS.....	34
5. Závěr.....	37
6. Summary.....	38
7. Seznam použitých zkratk.....	39
8. Literatura.....	40

1. Úvod

Biosenzory jsou přístroje analytické povahy, obsahující prvek biologického původu. Biosenzor je jeden z průlomových objevů za posledních 100 let. Pomocí nich si mohou pacienti s diabetem měřit hladinu glukózy v krvi. Pomocí DNA biosenzorů je možné provádět například testy otcovství. Své uplatnění si biosenzory našly i ve sféře životního prostředí, kde slouží k detekci různých polutantů ať už ve vodě, či v ovzduší.

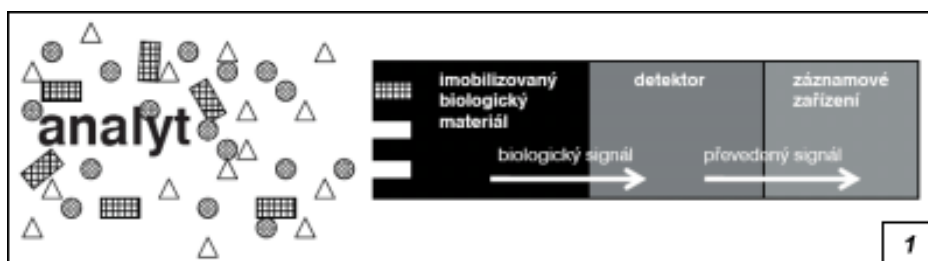
Laktóza je disacharid obsažen v mléce a mléčných produktech. V těle je laktóza hydrolyzována enzymem laktázou, která v tlustém střevě štěpí laktózu na stravitelné monosacharidy glukózu a galaktózu. Množství laktázy v lidském těle se snižuje s věkem. U dnešní populace se velmi často vyskytuje tzv. laktózová intolerance, kdy tělu chybí nebo častěji má nedostatek laktázy, což způsobuje zažívací obtíže. Je tedy důležité znát množství laktózy v mléčných produktech.

Cílem mé bakalářské práce je zkonstruovat enzymový amperometrický biosenzor pro citlivou detekci laktózy v různých typech reálných vzorků. Za použití chronoamperometrie je testován vliv předúpravy elektrody, pH prostředí, použití polymeru, želatiny nebo nanočástic na odezvu biosenzoru. Nejcitlivější biosenzor byl zvolen pro stanovení laktózy ve vzorku mléka, jogurtu, tvarohu a sušeného mléka.

2. Teoretická část

2.1. Charakteristika biosenzorů

Biosenzor je přístroj analytické povahy, který obsahuje prvek biologického původu. (Obecné schéma biosenzoru lze vidět na obr. 1.) Ten je buď přímo součástí, nebo je v přímém kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem. Biosenzor poskytuje průběžný elektrický signál, který je přímo úměrný koncentraci složek nebo pouze jednotlivých látek ve vzorku¹. Biosenzory jsou podle prvků, které snímají, rozděleny do dvou skupin. Katalytický a afinitní typ. Snímače katalytického typu zahrnují především enzymy, mikroorganismy, organely, buňky či tkáně, zatímco snímače afinitního typu zahrnují protilátky, receptory a nukleové kyseliny². Fyzikálně-chemické převodníky, poskytující signál k dalšímu zpracování, rozdělujeme do čtyř skupin³. *Elektrochemické* (potenciometrie, amperometrie, konduktometrie, voltametrie), *optické* (fotometrie, fluorimetrie, luminometrie, lineární optika), *kalorimetrické a piezoelektrické* a *akustické*. Existuje mnoho aplikací biosenzorů v praxi, přičemž jsou jistá kritéria, kterými se řídit při výběru vhodného biosenzoru. Těmi jsou například cena, stanovovaná látka, citlivost detekce, dostupnost biologického prvku ke zpracování, aj. Jeden z vůbec nejznámějších a nejpoužívanějších biosenzorů v praxi je přístroj na měření hladiny glukózy v krvi u pacientů s diabetem. Další průlomové použití biosenzorů je z oblasti životního prostředí. Jde o detekci pesticidů a polutantů znečišťující říční vodu jako jsou ionty těžkých kovů⁴, průzkum vzdušných bakterií, detekce a identifikace organofosfátu, detekce patogenů⁵. V neposlední řadě se jedná o použití biosenzorů pro stanovení zbytkových léků v potravinách, jako jsou antibiotika a růstové stimulanty, biotechnologii, medicínu, boj proti bioterorismu, zemědělské aplikace, aj⁶.



Obr. 1 - Schéma biosenzoru⁷

Biosenzory se také osvědčily v použití *in vivo*-zařízení. Zde mohou být sledovány biologické signály v reálném čase, jako je například uvolnění proteinů nebo protilátek v reakci na poškození tkáně, svalovou dystrofií, infarktu myokardu, záněty nebo infekce. Toto využití má nespornou výhodu v časně detekci stádia onemocnění a následné léčbě⁸.

Pro efektivní účely bio-snímání a diagnostiky při přesném snímání biologických signálů v buněčném prostředí byly vyvinuty biosenzory obsahující snímače nanoměřítka (nanovlákná či nanotrubičky). Tyto snímače mohou být použity pro měření pH nebo funkcionalizovány specifickými molekulami k identifikaci velmi malého množství biologických a chemických látek⁸. Biosenzory s různými mikro- a nanostrukturovanými povrchy byly úspěšně použity jak pro krátkodobé, tak i dlouhodobé *in vivo* studie⁹.

2.2. Historický vývoj biosenzorů

Z historického hlediska udělal největší zásah do senzorů Leland C. Clark Jr. Jeho cílem bylo změřit redukci kyslíku s platinovou elektrodou při stanovení okysličení krve. Jeho první biosenzor však selhal, vzhledem k tomu, že krevní složky byly absorbovány na povrch elektrody, čímž došlo ke zkreslení signálu. Tomuto problému předešel tak, že použil celofánový obal z krabičky cigaret¹⁰. Tak v roce 1956,¹¹ kdy předřadil elektrodovému systému membránu propustnou pro plyny, elektrody fyzikálně izoloval od měřeného prostředí a získal spolehlivý měřicí systém. Tímto objevem dal za vznik mnoha aplikacím a začátkům biosenzorů.

Clarkem připravená, již zmíněná, elektroda pro stanovení okysličení s polopropustnou membránou se zapsala do podvědomí pod názvem „Clarkova elektroda“. Tento senzor zůstává nadále klíčovým nástrojem v medicíně a monitorování životního prostředí. Pro kalibraci těchto senzorů přidal Clark do roztoku enzym glukózooxidázu. Clark následně vyvinul senzor zachycením koncentrované glukózooxidázy s jinou polopropustnou membránou v přední části elektrody. Elektroda pak mohla být použita pro více měření glukózy. Enzymová vrstva se tedy stala nedílnou součástí biosenzoru¹⁰.

Doposud nejúspěšnější biosenzor je založen na ferrocenu, který přenáší elektrony z oxidoreduktáz na elektrodu¹². Tím byl vyvinut levný osobní biosenzor pro měření hladiny glukózy v krvi u diabetiků.

Myšlenka vybudování imunosenzorů stanovujících protilátky za použití potenciometrických či piezoelektrických snímačů se stala reálnou v roce 1983, kdy Liedberg, Nylander, a Lundström popsali použití rezonance povrchových plasmonů pro monitorování afinity reakce v reálném čase. Takto připravený imunosenzor se komerčně vyrábí dodnes (The BIAcore, Pharmacia, Sweden). První optický biosenzor byl přímo spjat s průlomem v optice a komunikaci. První senzory na bázi optických vláken byly chemické biosenzory, ale integrace biologických molekul nabídla mnohem větší snímací specifitu a citlivost. Průlomové biosenzory z optických vláken byly konfigurovány tak, že vyšetřovací oblast byla na konci vlákna. První glukózový senzor byl vyvinut v roce 1982 Schultzem s kolegy, kteří měřili rovnováhu výměny mezi fluorescenčním konkanavalinem A vázaným na glukózu imobilizovanou mimo dráhu světla a též molekuly vázané na volné glukóze ve vzorku na konci vlákna. Tento režim byl upraven pro použití s protilátkami, ale byl omezen tím, že reakce vyžaduje značné množství času k dosažení rovnovážného stavu. Pro sledování enzymových reakcí byla úspěšnější odlišná konfigurace, kdy byl enzym zachycen do membrány nebo gelu na konci vlákna a terčičky s nízkou molekulovou hmotností společně s barevnými produkty substrátu difundovaly do oblasti obsazené enzymem pro generování signálu. Fluorescence v celých buňkách by mohla být měřena tímto způsobem¹⁰.

Značná pozornost je v posledních letech věnována biosenzorům v medicíně a nanotechnologiích. Zde je rostoucí zájem o jeho aplikaci v tkáňovém inženýrství, kde biosenzory v poslední době ukázaly obrovský potenciál stejně jako v regenerativní medicíně. Obě, ať už tkáňové inženýrství nebo regenerativní medicína mají obrovský potenciál v biomedicínském inženýrství pro obnovení ztracených funkcí nemocné nebo poškozené tkáně či orgánů^{13,14}.

2.3. Enzymové biosenzory

Bezpochyby lze považovat za „otce enzymatické analýzy“ Ottu Heinricha Warburga. V roce 1930 položil základní kámen pro vysoce citlivou detekci dehydrogenáz a jejich substráty jeho optickým testem pro detekci NADH/NADPH při vlnové délce 340 nm¹⁰. Nicméně za enzymový biosenzor vděčíme Leland C. Clarkovi, kdy v jednom z jeho pokusů byla glukózooxidáza zachycena na kyslíkaté Clarkově elektrodě s použitím dialyzační membrány. Pokles měřené koncentrace kyslíku byl přímo úměrný koncentraci glukózy¹⁰.

Enzymový elektrochemický biosenzor je založen na detekci elektrického signálu produkovaného galvanicky aktivním článkem ať již vzniklé, či spotřebované enzymatické reakce¹⁵. V enzymových biosenzorech je jako bioreceptor použit enzym. Často jsou jako enzymy použity proteiny typu oxidázy. Ty obvykle selektivně reagují s konkrétními analyty, spotřebovávají rozpuštěný kyslík a produkují peroxid vodíku. Právě ten je totiž snadno detegovatelný. Dále však existuje možnost nanést přímo na snímač biosenzoru enzym a zafixovat pomocí gelu. Výhody takto připraveného biosenzoru je především dostupnost enzymů o vysoké čistotě, vysoké schopnosti se vázat, použitelnost pro různé techniky transdukce a především schopnost detegovat širokou škálu analytů. Ovšem biosenzory připravené tímto způsobem mají také svá úskalí. Jejich aktivita je závislá na různých faktorech, jako je hodnota pH, iontová síla, chemická inhibice či teplota. Taktéž mají omezenou stabilitu^{2,16,17}.

Přestože jsou elektrochemické enzymové biosenzory tak populární především díky svým nízkým nákladům a poměrně rychlé době odezvy, bývá s enzymatickými reakcemi u elektrochemických biosenzorů často problém. Hlavním úkolem při vývoji těchto elektrochemických biosenzorů bylo překonání často neefektivního přenosu elektronů mezi enzymem a elektrodovým povrchem. K tomuto problému dochází proto, že redoxní aktivní místo je hluboko uvnitř enzymu a ten jej nemůže dobře, s ohledem na povrch elektrody, zaměřit pro rychlý a efektivní přenos elektronů¹⁸. Často také dochází k omezené funkci v reálných vzorcích vzhledem k zanášení elektrody nebo špatné selektivitě analytu ve složité matici vzorku. Dochází také ke snaze miniaturizace a biokompatibilitě (nejčastější vzorek matrice pro enzymové elektrody v klinické chemii je krev a jiné biologické tekutiny)¹⁵.

2.4. Laktóзовé biosenzory

Enzymy jsou běžně používány v biosenzorech vzhledem k jejich vysoké specifitě. Pro stanovení laktózy v mléčných produktech se používá enzym β -galaktozidáza. Tento enzym bývá získán z mikroorganismů (houby, bakterie nebo kvasinky), z rostlin, živočišných buněk nebo z rekombinačních zdrojů. β -galaktozidáza je široce používána v potravinářském průmyslu s cílem zlepšit rozpustnost, sladkost, chuť a stravitelnost mléčných výrobků¹⁹.

β -galaktozidáza z *E. coli* byla díky své univerzálnosti použita jako modelový enzym pro laktózový biosenzor, kdy byl enzym imobilizován na třírozměrnou křemičitou síť spojenou přímo s křemíkovým povrchem, která poskytuje mnohem větší plochu a 3,5x vyšší zachycení enzymu ve srovnání s enzymem napojeným přímo na povrchu. β -galaktozidáza imobilizovaná na třírozměrnou strukturu byla stabilní a udržela více než 80% počáteční aktivity po 10 dnech při 24 °C²⁰.

Pro stanovení glukózy, galaktózy a laktózy v mléce byla použit průtokový injekční amperometrický senzor spojen s mikro dialýzou (μ FIAS). Snímač je založen na enzymem katalyzované reakci v kombinaci s třemi tradičními analytickými technikami: vzorkovací mikro dialýzou, průtokovou injekční analýzou (FIA), a amperometrickou detekcí. Se snímačem multianalyte bylo možné detekovat glukózu a galaktózu sekvenčními nástřiky jejich odpovídajících enzymů: glukózo oxidázy a galaktózo oxidázy, zatímco laktóza byla stanovena injekcí směsi enzymů β -galaktozidázy a glukózo oxidázy. Snímač prokazoval linearitu mezi 0,05 a 10 mM pro glukózu, mezi 0,1 a 20 mM pro galaktózu a mezi 0,2 a 20 mM pro laktózu. Stanovení obsahu laktózy v mléce pomocí tohoto senzoru byl porovnán se standardní metodou s infračerveným spektrofotometrem²¹.

Byl studován vliv teploty na signál biosenzoru pro kvantitativní analýzu laktózy založené na stanovení spotřeby kyslíku v enzymatické reakci. Bylo pozorováno, že existuje nelineární vztah mezi elektrickou odezvou biosenzoru a koncentrací laktózy²².

Byl vyvinut amperometrický biosenzor na stanovení laktózy imobilizací laktázy a galaktózo oxidázy (GAO) v Langmuir-Blodgett (LB) filmu poly (3-hexyl thiofen) (P3HT) / kyselina stearová (SA) pro odhad laktózy v mléce a jeho produktech. Enzym imobilizovaný na LB filmu byl použit jako pracovní elektroda a referenční elektroda byla zvolena platinová. Enzym elektrody vykazuje linearitu v rozmezí 1-6 g / dl laktózy a mají životnost více než 120 dnů. Při opakovaném použití docházelo k 3 % ztrátě proudové odezvy. Enzymová elektroda byla charakterizována infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací (FTIR), skenovací elektronovou mikroskopií (SEM) a kinetickými parametry, jako je pH, teplota a stabilita pracovní elektrody. Senzor může být použit pro odhad laktózy / galaktózy v potravinách a biologických tekutinách²³.

Nový amperometrický biosenzor pro stanovení laktózy v syrovém mléce byl vyvinut prostřednictvím současné imobilizace β -galaktozidázy a galaktózo oxidázy na derivatizovanou polyethersulfonovou membránu. β -galaktozidáza katalyzuje hydrolýzu laktózy na galaktózu

a glukózu. Citlivost takto připravených biosenzorů byla $6,81 \text{ nA}\cdot\text{mol dm}^{-3}$ a reprodukovatelnost $0,72 \text{ nA}\cdot\text{mol dm}^{-3}$ a jejich stabilita byla 20 dnů²⁴.

Byl vyvinut hybridní biosenzor pro stanovení laktózy. *Saccharomyces cerevisiae* byla zachycena v agaru. Dva druhy laktázy byly adsorbována na diethylaminoethyl celulóze. Katalytické složky byly ohraničeny z jedné strany membránou propustnou pro CO_2 a z druhé strany dialyzační membránou. Laktáza hydrolyzuje laktózu, *Saccharomyces cerevisiae* fermentovanou glukózu a galaktózu za produkce CO_2 . Tento plyn byl měřen pomocí CO_2 elektrody. Výsledky byly aplikovány na analýzu laktózy ve vzorcích mléka. Validace byla provedena na mléčích několika značek a výsledky byly porovnávány se spektrofotometrickou metodou²⁵.

Další biosenzor na detekci laktózy byl připraven na elektrodové vrstvě s β -galaktozidázou a glukózooxidázou, imobilizované na želatině. Laktózové biosenzory byly vystaveny několikanásobnému použití pro zjištění opakovatelnosti a životnosti. Při stanovení byly použity roztoky standard laktózy a mléčných výrobků. Většina činnosti laktózových biosenzorů byla zachována i po desátém použití v období 30 dní²⁶.

Amperometrický biosenzor, citlivý na glukózu a laktózu byl vyvinut imobilizací glukózooxidázy (GOD), β -galaktozidázy, mutarotasy a ferrocenu na β -cyklodextrinovém polymeru. Ferrocen je obsažen v dutinách polymeru, zatímco glukózooxidáza, β -galaktozidáza a mutarotasa jsou zasíťované s polymerem β -cyklodextrinem. Stabilita enzymu byla značně zvýšena zasíťováním enzymů s polymerem²⁷.

Tříenzymový biosenzor pro stanovení koncentrace laktózy v syrovém mléce je založen na sériových reakcích β -galaktozidázy, glukózooxidázy, a křenové peroxidázy imobilizovaných na skelné uhlíkové elektrodě. Postupná enzymatická reakce zvýší selektivitu i citlivost čidla. Senzor však vyžaduje ředění syrového a přidání 5-aminosalicylové kyseliny. Koncentrace laktózy v mléce měřená takto připravenými snímači byla v dobré shodě s hodnotami naměřenými referenční metodou za použití infračervená spektrometrie²⁸.

2.5. Biosenzory s nanočásticemi

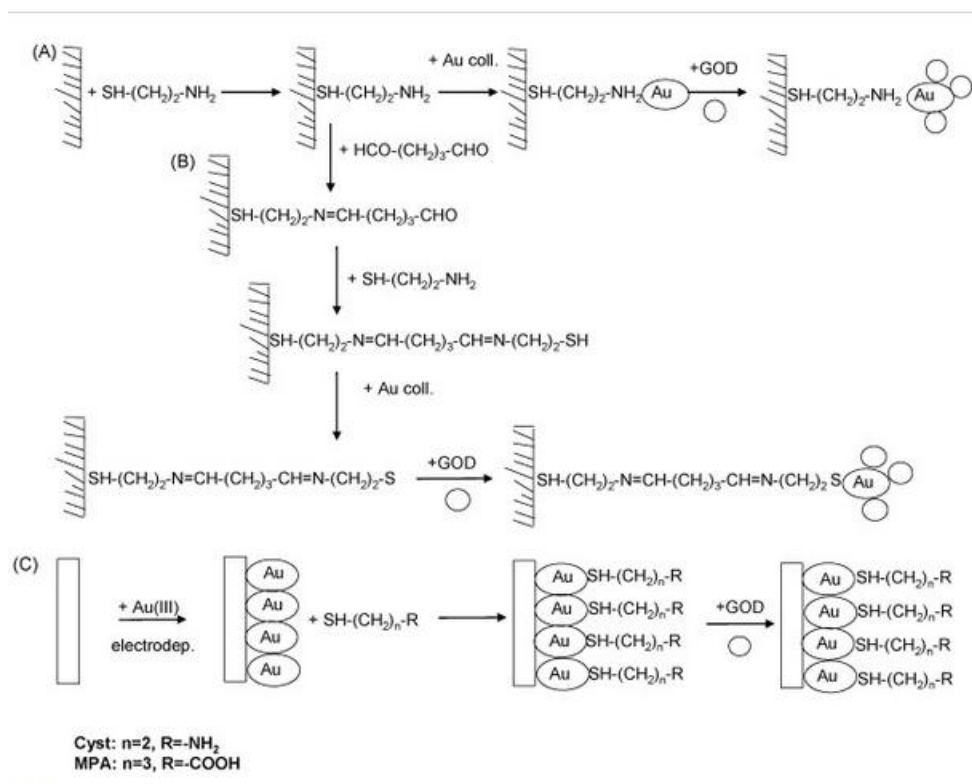
Pro všeobecné zlepšení detekce a tím i vyhodnocení výsledku se začaly používat biosenzory s nanočásticemi. Díky jedinečným vlastnostem nanomateriálů²⁹ se používají na výstavbu elektrochemických biosenzorů, které dosahují lepší analytické výkonnosti s ohledem na další konstrukce³⁰.

Grafen je jeden z nejnovějších nanomateriálů používaný v biosenzorech. Byl objeven v roce 2004³¹. Jeho atomy jsou uspořádány opakovaně hexagonálně a mají sp² hybridizaci a tvoří krystalovou mřížku, stejně jako je tomu u grafitu. Tento nanomateriál vypadá jako by byl vyroben z plochého drátěného pletiva. Mezi jeho fyzikální vlastnosti patří především biokompatibilita, rychlý transport elektronů, vysoká tepelná vodivost a vysoká mechanická pevnost³². Dalšími vlastnostmi je transparentnost, vysoká elasticita, šetrnost k životnímu prostředí, fakt, že se jedná o polovodičový materiál s nulovou šířkou zakázaného pásu a v neposlední řadě se jedná o nízkonákladový materiál³³. Grafen se v průběhu několika posledních let ukázal jako vhodná součást chemických a biologických sensorových aplikací a jeho použití se osvědčilo také v enzymatických biosenzorech^{32,34,35}. Grafen umožňuje snazší imobilizaci proteinů, než je tomu v případě použití uhlíkových nanotrubiček. Bylo zjištěno, že grafen má vysokou katalytickou aktivitu s peroxidem vodíku, kdy v účinně řízené elektrochemii vzniká s glukooxidázou vynikající materiál snímače pro glukózové biosenzory³⁵. K přenosu elektronů mezi grafenem a redoxní aktivní látkou dochází na okrajích grafenového listu nebo (někdy také současně) na defektech v bazální rovině³³. Díky vysoké povrchové vrstvě grafenu tedy získáváme velký počet elektroaktivních míst. Ultratenké vícevrstvé greenové nanodestičky byly také použity jako snímače v glukózových biosenzorech^{36,37}.

Koloidní zlato je jedním z nejvíce studovaných nanomateriálů v souvislosti s biosenzory³⁸. Vyrábí se z malých oktaedrických jednotek nazývaných „primární jednotky“. Velikost a morfologie nanočástic lze měnit, v závislosti na způsobu zvolené syntézy³⁹. Zlaté nanočástice se obvykle uchovávají ve vodném roztoku. Kovové nanočástice jsou vhodné pro stavbu biosenzorů, vzhledem k jejich schopnosti zvyšovat množství imobilizovaných biomolekul začleněných do snímače⁴⁰. Nanočástice zlata umožňují snímání bez nutnosti přenosu elektronů mediátorů. Nanočástice zlata také představují užitečné rozhraní pro elektrolyzu redoxních procesů molekul, jako H₂O₂, O₂ nebo NADH (red. forma nikotinamidadenindinukleotidu). Podílí se na řadě významných biochemických reakcí⁴¹.

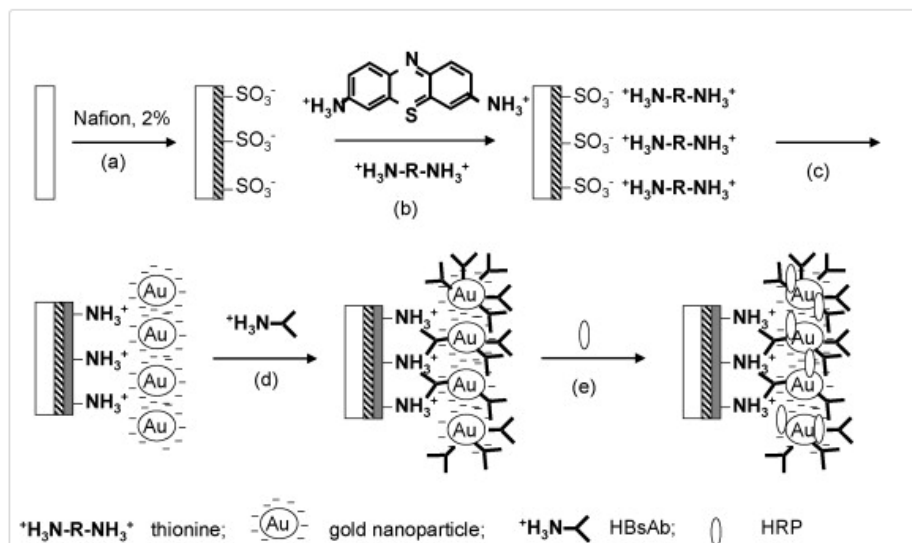
Modifikace povrchů elektrod pomocí samoskladných monovrstev (SAM) thiolů, poskytuje jednoduchý způsob navrhování materiálů na míru. Ty mohou být dále použity na imobilizaci funkčních míst nanočástic zlata a enzymů³¹. Při porovnávání výsledků různých GOx biosenzorů na základě několika SAM-modifikovaných elektrod se dospělo k závěru, že koloidní zlato vázané na merkaptní monovrstvě samoorganizující se na zlaté diskové

elektrodě vykazovaly vyšší selektivitu a životnost než ostatní GOx biosenzory⁴². Schéma pro různé strategie GOx biosenzorů můžeme vidět na obr. 2⁴².



Obr. 2 – Schéma strategie přípravy GOx biosenzorů

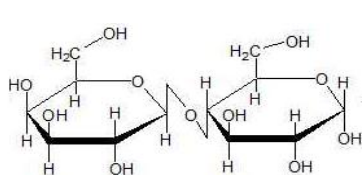
Biosenzory se používají také jako imunosenzory, kdy byly protilátky nanášeny na nanočástice zlata. Potenciometrické a amperometrické imunosenzory pro detekci HBsAg (povrchový antigen viru hepatitidy B) byly stanoveny elektrostatickou adsorpcí protilátky na nanočástice zlata / tris (2,2-bipyridyl) kobalt (III) vícevrstvé fólie⁴³. Také byly popsány nanočástice zlata na bázi bimolekulární metody imobilizace na Nafionu a želatině⁴⁴. Kroky znázorněné při přípravě imunosenzoru lze vidět na obr. 3⁴⁵.



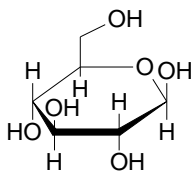
Obr. 3 - Příprava imunosenzoru

2.6. Laktóza

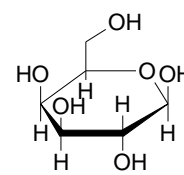
Laktóza (obr. 4), neboli mléčný cukr je disacharid tvořený glukózou (obr. 5) a galaktózou (obr. 6). Tyto dva monosacharidy jsou spojeny β -1-4-glykosidickou vazbou⁴⁶. Laktóza má sumární vzorec $C_{12}H_{22}O_{11}$, systematický název beta-D-galactopyranosyl-(1-4)-D-glukóza a je izomerem sacharózy. Laktóza je hydrolyzována na glukózu a galaktózu, izomerizována v alkalickém roztoku na laktulózu a katalyticky hydrogenuje na odpovídající vícesytný alkohol, laktitol⁴⁷.



Obr. 4 - Struktura laktózy⁴⁸



Obr. 5 - Struktura glukózy



Obr. 6- Struktura galaktózy

Laktóza je extrahována ze sladké nebo kyselé syrovátky. Název pochází z latinského názvu pro mléko *Lactis* a koncovky -ose používané pro cukry⁴⁹. První izolace laktózy byla provedena v roce 1633 italským lékařem Fabrizioem Bartolettim. V roce 1700 publikoval benátský lékárník Lodovico Testi brožuru certifikátů o síle mléčného cukru (*saccharum lactis*) zmírňující, mimo jiné nemoci, také příznaky artritidy. V roce 1715 pak byl Testiův

postup pro výrobu mléčného cukru publikován Antoniem Vallisnerim. Laktóza byla, jako cukr, identifikována Carlem Wilhelmem Scheelem v roce 1780. O 32 let později, tedy v roce 1812, došlo k velkému skoku v chápání laktózy zjištěním Heinricha Vogela, že glukóza, jakožto základní a nejpodstatnější cukr, je hydrolytickým produktem laktózy. Další produkt hydrolytického štěpení, tedy galaktóza, byl objasněn Louistem Pasteurem v roce 1856. Laktóza získala svou kompletní konfiguraci cukru v roce 1894, nicméně její název byl znám již od roku 1843⁵⁰.

Aplikace laktózy v potravinářském průmyslu se výrazně zvýšila od roku 1960. I přes tento fakt není laktóza přidávána do mnoha potravin, protože její rozpustnost je mnohem nižší než u jiných cukrů, běžně používaných v potravinářství. Avšak u přípravků pro kojence je tomu jinak. Zde musí být laktóza přidávána, aby produkt odpovídal, co možná nejpřesněji složení lidského mléka⁵⁰. Přebytek laktózy ze syrovátky, jakožto vedlejšího produktu mléčných operací, je potenciálním zdrojem alternativní energie⁵¹.

Další hlavní použití je ve farmaceutickém průmyslu. Laktóza se přidává do léků jako výplň díky jejím fyzikálním vlastnostem, jakými jsou především dobrá stlačitelnost a nízká cena. Z podobných důvodů bývá také použita k ředění heroínu⁵⁰.

2.6.1. Vlastnosti

Monohydrát α -laktózy je nejstabilnější formou laktózy. Zde se z laktózy získávají krystaly z vodných roztoků při teplotě do 93,5°C. Oproti tomu, jestliže se rozhodneme pro krystalizaci při teplotě nad 93,5°C vznikne nám bezvodá β -laktóza. Hygroskopického α -anhydridu dosáhneme vysušením ve vakuu při teplotě nad 100°C. Pakliže chceme docílit amorfni hygroskopické směsi α - a β -laktózy, musíme zvolit postup rychlého sušení roztoků laktózy nebo sušení mléka. Rozpustnost obou těchto anomerů je velmi odlišná. α -anomer má rozpustnost pouhých 7,5 g/100 g vody a jeho krystaly jsou tvrdé, mírně hygroskopické a pomalu rozpustné. Naopak krystaly β -anomeru jsou lépe rozpustné a nejsou hygroskopické a jejich rozpustnost je uvedena jako 48 g/100 g vody⁵².

Porovnáme-li laktózu s ostatními cukry, kupříkladu se sacharózou, zjistíme, že laktóza se pomaleji vstřebává v zažívacím traktu, zřejmě vlivem menší rozpustnosti ve vodě a také je méně sladká⁵³. Zvláštností je, že laktóza je méně sladká, než jednotlivé monosacharidy, ze kterých je složena. Toho se začíná využívat v mlékárenském průmyslu, kdy se enzymatickým

štěpením laktózy zvyšuje sladivost mléčných výrobků⁵². Laktóza poskytuje různé chemické reakce, nejdůležitější z nich včetně produktů jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1 - Nejpodstatnější chemické reakce laktózy a jejich výsledný produkt⁵³⁻⁵⁶.

Chemická reakce	Produkt
Epimerace	Laktulosa (bifidogenní faktor)
Redukce	Laktitol-4- <i>O</i> - β -D-galaktopyranosyl-D-sorbitol (cukerný alkohol, sladidlo)
Oxidace	Kyselina laktobionová – δ lakton kyseliny laktobionové
Maillardova reakce	Reakce neenzymového hnědnutí; interakce mezi karbonylovou skupinou laktózy a amino skupinou (přednostně lysin v bílkovinách) za tvorby glukosaminů (laktosamin), které podléhají dalším reakcím za tvorby konečných produktů melanoidinů
Fermentace	Kyselina mléčná, kyselina octová, diacetyl, acetoin atd.

Typickou vlastností optických izomerů je takzvaná mutarotace, kdy dochází k vratnému přesmyku mezi alfa a beta strukturou. K tomuto jevu dochází v závislosti na pH, teplotě, koncentraci a dalších faktorech. V mlékárenském průmyslu má tento jev nežádoucí účinky především proto, že jestliže by byly v produktu zastoupeny obě formy, mohlo by docházet k nechtěné krystalizaci a tvorbě písčité struktury⁵².

Laktóza má v mléčných produktech důležitý význam. Nejdůležitějšími jsou pak fyzikální vlastnosti, jakožto osmotický tlak, bod mrazu či bod varu. Dále mimo tyto fyzikální vlastnosti je také třeba vyzdvihnout podporu adsorpce vápníku, slouží jako zdroj energie, dodává mléku nasládnou chuť a především je laktóza podstatnou látkou při výrobě fermentovaných mléčných výrobků⁵².

2.6.2. Výskyt

Laktóza, jak již z názvu („mléčný cukr“) vyplývá, je obsažena v mateřském mléce savců v koncentraci okolo 0,3 mol/l a dalších mléčných produktech. Zde tvoří, podle druhu mléka či mléčného výrobku, různé procento. Pro představu přikládám tabulku 2 s vybranými mléčnými výrobky.

Tabulka 2 - Přehled obsahu laktózy v jednotlivých mléčných výrobcích⁵⁷

Mléčný výrobek	Laktóza [%]	
	Rozmezí [%]	Průměr [%]
Plnotučné mléko	1,05-7,3	4,8
Nízkotučné (odstředěné) mléko	3,4-7,05	5,2
Šlehačka	2,8-3,0	2,9
Zakysaná smetana	3,0-4,3	3,9
Podmáslí	3,6-5,0	4,3
Slazené kondenzované mléko	11,4-16,3	12,9
Zmrzlina	3,1-8,4	-
Máslo	0,8-1,0	-
Margarín	0,0-1,0	-
Sušené polotučné mléko	36-38,5	-
Sušené nízkotučné mléko	49-52,3	-
Syrovátka (sladký typ)	63-75	-
Camembert	0,0-1,8	-
Čedar (jemný)	0,0-2,1	-
Cottage	0,0-3,5	-
Eidam	0,0-1,4	-
Gouda	0,0-2,2	-
Mozzarella	0,0-3,1	-
Parmazán (strouhaný)	2,9-3,7	-
Ricotta	0,2-5,1	-
Romadúr	-	2,5

Laktóza však nemusí být vždy součástí pouze mléka, ale objevuje se také v sušenkách, pečivu slaném či sladkém, instantních směsích, bramborových chipsech, kukuřičných lupíncích, produktech na hubnutí, bonbonech, nealkoholických nápojích, pivu ležák. Laktóza je také často v malé míře součástí léků^{58,59}.

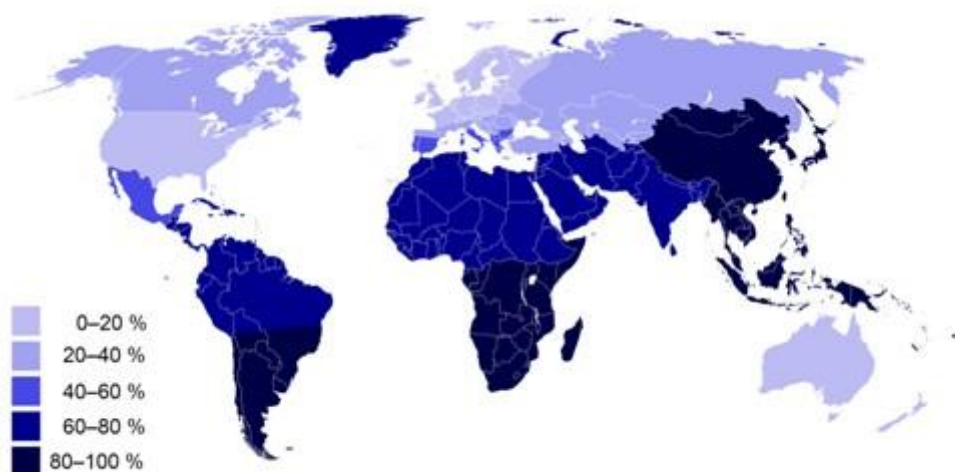
Laktózy je vyrobeno několik milionů tun ročně jako vedlejšího produktu mlékárenského průmyslu. Syrovátka je vyrobena až z 6,5% pevných látek, z nichž 4,8% je

právě laktóza. Ta bývá očištěná krystalizací⁶⁰. Průmyslově se laktóza vyrábí ze syrovátkového permeátu tak, že je syrovátka filtrovaná pro všechny hlavní proteiny. Proteinová frakce se pak využívá v kojenecké výživě či sportovní výživě, zatímco permeát je možné odpařit do 60-65% pevných látek a krystalizovat za chlazení⁶¹. Laktóza může být také vysrážena ze syrovátky použitím etanolu. Vzhledem k tomu, že je v etanolu nerozpustná, činí sraženina asi 65% výtěžek⁶².

2.6.3. Laktózová intolerance

Abychom mohli správně pochopit podstatu laktózové intolerance, musíme nejdříve vědět, jak to má správně fungovat, tedy *laktózovou toleranci*. Vlivem β -galaktozidázy dojde v kartáčkovém lemu lačnicku (*jejunum*) tenkého střeva k hydrolýze laktózy na glukózu a galaktózu. Oba tyto monosacharidy jsou spolu s vodou absorbovány do krevního oběhu. (Na^+ ionty obsažené ve střevní lumen výrazně ovlivňují transport glukózy a galaktózy do střevních buněk.) Glukóza následně slouží jako zdroj energie a galaktóza jako složka glykolipidů a glykoproteinů^{63,64}. Enzym laktáza se dostává procesem zrání z hlubších vrstev sliznice tenkého střeva na vrcholky enterocytů kartáčkového lemu. Ta je aktivována pankreatickým enzymem trypsinem na sliznici tenkého střeva. Pro hydrolýzu laktázy je podstatné pH, které musí být v rozmezí 6-8 a nízká koncentrace bakterií. Právě díky těmto podmínkám je místem působení laktázy *jejunum*, které oba požadavky splňuje^{58,65}. *Laktózová intolerance* je tedy nedostatek enzymu β -galaktozidázy, kdy laktóza není plně hydrolyzovaná a spolu s vodou přechází do tlustého střeva, kde je trávena střevními bakteriemi za vzniku CO_2 a H_2 ⁵⁸. Vznikem těchto plynů dochází k nadýmání.

Problém laktózové intolerance je celosvětový (obr. 7). Všichni suchozemští živočichové mají dramatický pokles laktázy během života, především hned po odstavení. Po celém světě ztrácejí lidé od raného dětství 90-95% laktázy s trvalým poklesem tohoto enzymu v průběhu celého života. V současné době se světem rozšířil nepřesný údaj, kdy je nedostatek laktázy považován za „normální“ či „přirozený“ stav a přetrvávání výrazné aktivity laktázy do dospělého života se v severských evropských populacích považuje za „abnormální“ mutaci⁶⁶. Procento lidí s laktózovou intolerancí se liší v závislosti na etniku. Například se tento problém týká 2% osob severní Evropy oproti téměř 100% dospělých Asiatů a amerických indiánů⁶⁷.



Obr. 7 - Četnost laktóзовé intolerance ve světě⁶⁷

Lidé s nedostatkem enzymu laktázy potvrdili, že potíže, spojené především s nadýmáním přichází v pozření 12 až 18 g laktózy. Tento fakt ovlivňuje několik faktorů. Mimo etnický původ je dalším ukazatelem také věk postiženého, kdy pacienti staršího věku jsou náchylnější⁶⁶. Symptomy postiženého jsou přímo spřaženy s osmotickým tlakem substrátu v tlustém střevě a vyskytují se asi dvě hodiny po požití laktózy⁶⁸.

Často bývá laktóзовá intolerance špatně označována za alergii na laktózu. Každá z těchto nemocí má jiný původ. Při laktóзовé intoleranci, jak již bylo řečeno, je to nedostatek enzymu β -galaktozidázy, naopak při alergii na laktózu jde o imunologickou reakci.

2.6.4. Metody stanovení

Metod stanovení laktózy ve vzorku je mnoho. Mezi jedny z nejznámějších patří *titrace za přítomnosti chloraminu T*. Během této titrace se stanovuje halogen, který je uvolněn při reakci cukrů s chloraminem T a jodidem draselným⁶⁹. Další z metod je *Metoda dle Luff Schoorla*. Zde se vzorek vyčeří Carrezovým činidlem, čímž odstraníme tuk a bílkovinu. Poté se ve filtrátu, na základě schopnosti laktózy redukovat za varu měďnaté soli z Luffova roztoku na oxid měďný, stanoví redukující cukry, tedy laktóza. Přebytek, který nezreaguje je stanoven jodometricky⁷⁰. Jestliže použijeme *biochemickou metodu*, musíme laktózu enzymaticky štěpit. Enzymy přidáme současně, ale působí postupně. β -galaktozidáza štěpí laktózu na glukózu a galaktózu, hexokináza a adenosintrifosfát fosforylují glukózu na glukózo-6-fosfát. Glukózo-

6-fosfátdehydrogenáza za přítomnosti nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfátu (NADP) katalyzuje oxidaci glukózo-6-fosfátu na 6-fosfoglukonát za převedení NADP na redukovanou formu NADPH. Konečný produkt, tedy NADPH, se stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm⁶⁸. Dále lze laktózu stanovit *infračervenou spektroskopií*,⁷¹ *chromatografií (HPLC i GC)*⁷¹. Při použití GC je samozřejmostí cukry zderivatizovat, jelikož samy o sobě nejsou příliš těkavé. Ze všech uvedených metod je nejčastější HPLC^{71,72}.

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie

Zásobní roztok laktózy o koncentraci $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním naváženého množství laktózy ($\geq 99,5 \%$, Sigma-Aldrich, USA) v roztoku základního elektrolytu (ZE) obsahujícího fosfátový pufr (PBS) o koncentraci $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ a MgCl_2 o koncentraci 1 mmol l^{-1} . Na přípravu fosfátového pufru byl použit hydrogenfosforečnan sodný (p.a., Chemapol, Praha) a jeho pH bylo upraveno na požadovanou hodnotu pomocí hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice). Pro zajištění optimální aktivity enzymu β -galaktozidázy⁷³ byl ve fosfátovém pufru rozpuštěn předem vysušený chlorid hořečnatý (p.a., Lach-Ner, Neratovice). Na předúpravu elektrody namočením v kyselině byla použita kyselina merkaptopropionová o koncentraci $0,04 \text{ mol l}^{-1}$ ($> 99 \%$, Sigma-Aldrich, USA). Na biosenzor se nanášely dvě vrstvy. První vrstva byla tvořena ferrocenem o koncentraci $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ (98% , Sigma-Aldrich, USA) rozpuštěného v metanolu (p.a., Penta, Praha). Druhá vrstva byla tvořena směsí křenové peroxidázy (HRP) o koncentraci $96,8 \text{ mg ml}^{-1}$ ($250\text{-}330 \text{ U mg}^{-1}$, Sigma-Aldrich, USA), β -galaktozidázy z *Escherichia coli* (β -GAL) o koncentraci $18,4 \text{ mg ml}^{-1}$ ($\geq 500 \text{ U mg}^{-1}$, Sigma-Aldrich, USA), glukózooxidázy z *Aspergillus niger* (GOD) o koncentraci 123 mg ml^{-1} ($100\text{-}250 \text{ U mg}^{-1}$, Sigma-Aldrich, USA), 10% (w/w) želatiny Agar-Agar (Natural, Jihlava, ČR) a polymeru polyethylenglykol diglicidyl etheru (PEGDE) o koncentraci $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$ ($M_n 500$, Sigma-Aldrich, USA).

Při hledání optimálních podmínek byly použity také nanočástice zlata (suspendovány v H_2O , $30 \times 6 \text{ nm}$, Aldrich, USA), stříbra (20 nm , $0,02 \text{ mg/ml}$, Aldrich, USA), grafen (Graphene supermarket, New York) a nanočástice SAMN ($0,1 \text{ g/ml}$ v destilované H_2O , připraveny 8. 3. 2015, maghemitové nanočástice byly poskytnuty od prof. Fabia Vianella, Univerzita v Padově)⁷⁴.

Pro stanovení laktózy v mléčných produktech pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC-MS) byly připraveny standardy galaktózy, glukózy a laktózy (vše Sigma-Aldrich, USA). Pro deproteinaci byl použit etanol denaturovaný 5% metanolem (Tereos TTD, lihovar Kojetín, Kojetín) s rozpuštěným salicilem jako vnitřním standardem ($\geq 99\%$ (GC), Sigma, USA). Vzorky byly derivatizovány hydroxylaminhydrochloridem (p.a., Lachema, Brno) v pyridinu (p.a., Penta, Chrudim),

hexamethyldisilazanem ($\geq 99\%$ reagent grade, Aldrich, USA) a kyselinou trifluoroctovou ($\geq 99\%$, Sigma Aldrich, USA).

Jako reálné vzorky bylo použito mléko (odstředěné mléko Basic, Albert, Praha), sušené mléko (odstředěné sušené mléko Lactino, PML Protein.Mléko.Laktóza, a.s., Nový Bydžov), bílý jogurt (Pilos bílý jogurt nízkotučný, Okręgowa Spółdzielnia Mleczarska w Łowiczu, Polsko) a tvaroh (odtučněný tvaroh Pilos, POLABSKÉ MLÉKÁRNY a.s., Poděbrady).

3.2. Přístrojové vybavení

Chronoamperometrické experimenty byly prováděny na přístroji Autolab se softwarem NOVA 1.10 (Metrohm Autolab B.V., Nizozemí). Rozpouštění a homogenizace roztoků byly podpořeny pomocí třepačky Reax Top (Heidolph Instruments, Německo). Pro úpravu pH fosfátového pufru byl použit pH metr InoLab pH 720 s kombinovanou skleněnou elektrodou SenTix 41 (vše WTW, Německo), který byl kalibrován na vodné kalibrační roztoky Duracal (Hamilton, Švýcarsko).

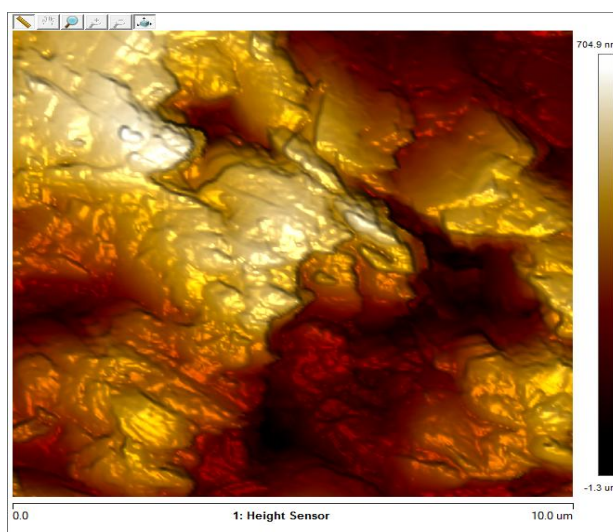
Jako referenční metoda byl použit plynový chromatograf s hmotnostní spektrometrií GC-MS systém Agilent 7890B & 7010 Triple Quad se softwarem Mass Hunter (vše Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Připravené vzorky, včetně standardů byly centrifugovány na centrifuze 5702 (Eppendorf, Německo).

Topografické snímky povrchu biosenzoru byly pořízeny na mikroskopu atomárních sil (AFM) Dimension Icon (Bruker Corporation, Billerica, USA).

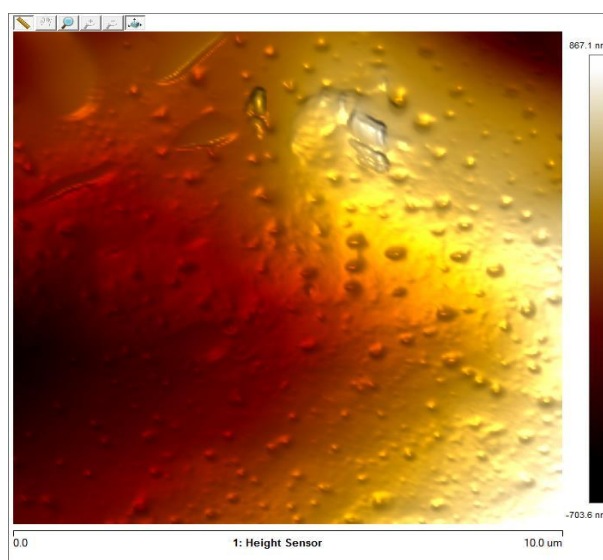
3.3. Pracovní postupy

3.3.1. Příprava biosenzorů

Biosenzor (uhlíková tyčinka), byl očištěn na smirkovém papíře a navlhčené buničině (obr. 8). Na takto připravené biosenzory bylo nejprve nanášeno 3 μl ferrocenu v methanolu a následně 3 μl směsi enzymů s polymerem a želatínou v poměru 4 μl HRP, 4 μl želatiny AGAR-AGAR, 8 μl β -GAL a 10 μl GOD (obr. 9). Následně byl na biosenzor pokladen speciální tenký celofán, který byl zafixován parafilmem. Biosenzory byly ponechány do následujícího dne v lednici.



Obr. 8 – Topografický snímek grafitu z AFM mikroskopu po čistícím kroku, tedy obroušení na smirkovém papíře a očištění na navlhčené buničině



Obr. 9 – Topografický snímek biosenzoru z AFM mikroskopu po čistícím kroku a nanesení vrstvy ferrocenu a směsi enzymů

3.3.2. Příprava reálných vzorků

Reálné vzorky pro chronoamperometrické stanovení byly připraveny přesným navážením mléka, jogurtu, tvarohu a sušeného mléka, které byly rozpuštěny ve vodě a ponechány v ultrazvukové lázni do vzniku homogenní směsi. Vzorky byly následně

naředěny fosfátovým pufrům o pH 7,5 tak, aby výsledná koncentrace měřeného roztoku byla v lineárním rozsahu koncentrací kalibrační závislosti.

3.3.3. Chronoamperometrie

Při chronoamperometrii se měří proud v závislosti na čase při konstantním potenciálu. Chronoamperometrie je velmi účinná metoda používaná převážně v kvantitativní analýze nukleárních reakcí. Toto technické použití vede k získání výchozích informací o jádře a růstovém mechanismu ve studovaném systému. Kromě toho může také stanovit množství nabití nutného na uložení do rozpouštědla (rozpuštění). Také může být tato metoda použita na stanovení rychlostní konstanty jádra a adsorpční izotermy⁷⁵.

Podobně jako všechny impulzní metody produkuje i chronoamperometrie vysoké nabíjecí proudy, které exponenciálně ubývají s časem, stejně jako ostatní RC okruhy. Nejčastěji se v chronoamperometrii pracuje v tříelektrodovém zapojení. Vzhledem k tomu, že je proud integrován přes poměrně dlouhé časové intervaly, poskytuje chronoamperometrie lepší poměr signálu k šumu ve srovnání s jinými amperometrickými metodami⁷⁶.

Při měření se pracovalo v tříelektrodovém zapojení, kdy pomocná elektroda byla platinová, pracovní elektroda byl samotný biosenzor a referenční elektrodu jsme zvolili argentchloridovou elektrodu. Do elektrochemické cely bylo převedeno 10 ml ZE potřebného na měření.

Chronoamperometrie byla měřena při potenciálu -50 mV s časem intervalu 50 ms. Následně byl, po ustálení rovnováhy (po 5 minutách), přidáván roztok laktózy či vzorku v rozmezí od 10 μ l do 100 μ l.

3.3.4. Referenční metoda GC-MS

Plynová chromatografie je typ chromatografie, kde je mobilní fází nosný plyn. Často se jedná o inertní plyn, jako je například helium, nebo o nereaktivní plyn, například dusík. Stacionární fáze je tvořena mikroskopickou vrstvou kapaliny nebo polymeru na inertní náplni uvnitř kolony. Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) je analytická metoda, která kombinuje vlastnosti plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie pro identifikaci různých látek v testovaném vzorku. GC je separační metoda, pomocí níž se dají

analyzovat těkavé a semi-těkavé sloučeniny s velkým rozlišením a MS může poskytnout podrobnější informace o struktuře látek⁷⁷.

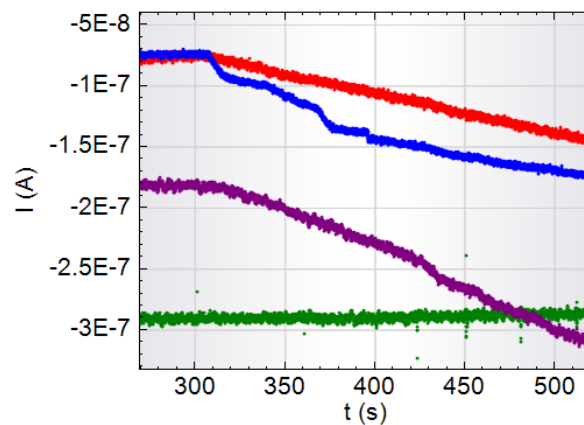
Do čisté centrifugační zkumavky bylo naváženo s analytickou přesností přibližně 0,5 g vzorku jogurtu, mléka a tvarohu, 50 mg vzorku sušeného mléka nebo 25 mg standardu galaktózy, glukózy, laktózy nebo jejich směsi, kdy všechny 3 standardy byly po 25 mg smíchány v 1 centrifugační zkumavce. Vzorek byl rozmíchán v 1,5 ml destilované vody a ponechán 5 minut v ultrazvukové lázni. Poté byl vzorek deproteinován přidavkem 4 ml etanolu (denaturovaného 5% metanolem) s rozpuštěným salicinem (2-(hydroxymethyl)phenyl- β -D-glukopyranosid) o koncentraci 2,5 mg ml⁻¹ jako vnitřním standardem. Vzorek byl promíchán, ponechán 10 minut v ultrazvukové lázni a centrifugován 6 minut při 4400 otáčkách min⁻¹. Z čirého supernatantu bylo odebráno 100 μ l do čisté šroubovací vialky a odpařeno mírným proudem dusíku při teplotě 50°C. K odparku bylo přidáno 500 μ l roztoku hydroxylaminhydrochloridu, vialka byla uzavřena a inkubována 30 minut při teplotě 75°C. Po následném ochlazení bylo přidáno 500 μ l hexamethyldisilazanu a 50 μ l kyseliny trifluoroctové. Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě 30 minut, poté byly centrifugovány, supernatant byl odebrán a naředěn 100x hexanem do krimplovaví vialky.

Připravený vzorek byl analyzován plynovou chromatografií s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC-MS) s těmito parametry: nastříkovaný objem 1 μ l; teplota nástříku 300°C; split 5 ml min⁻¹ (5:1); dvě kolony HP-5ms Ultra Intert (15 m x 250 μ m x 0,25 μ m), průtoky na 1. a 2. koloně: 1 ml min⁻¹ a 1,2 ml min⁻¹; teplotní program: 180°C - 2 min - 7°C min⁻¹ - 320°C - 2 min, post run: 320°C - 8 min; průtok N₂ (collision gas) 1,5 ml min⁻¹, průtok He (quench gas) 2,25 ml min⁻¹, EI 70 eV, SIM mode: 318,5 *m/z* do 14. min, 360,5 *m/z* od 14. min. Kvantifikace byla provedena metodou vnitřního standardu.

4. Výsledky a diskuze

4.1. Vliv pH

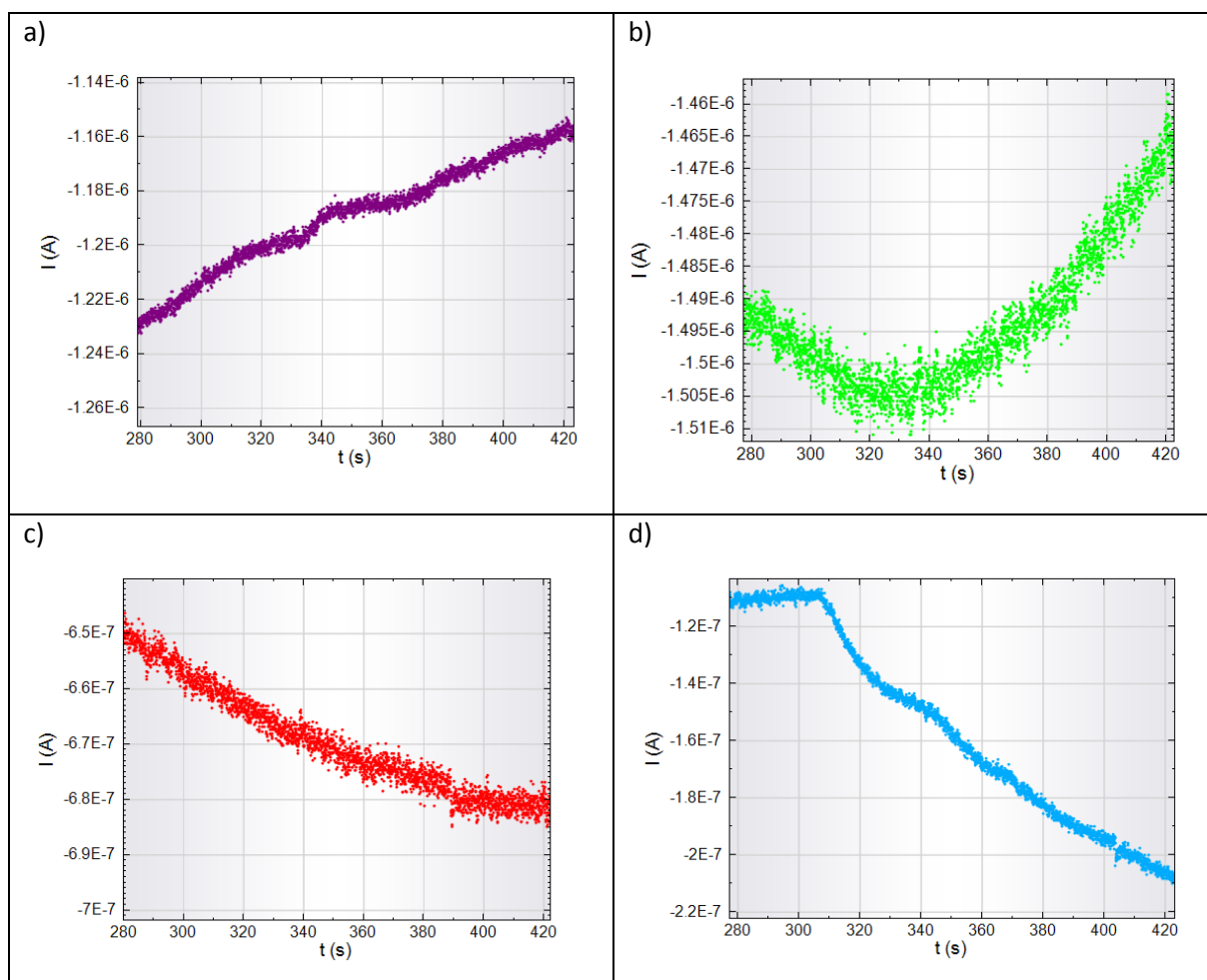
Biosenzory byly testovány při různých pH 6,0; 7,0; 7,5 a 8,0, protože každý použitý enzym vykazuje vyšší aktivitu v jiném pH. Aktivita křenové peroxidázy je nejvyšší v rozmezí pH 6,0-6,5, aktivita enzymu GOD je naopak nejvyšší v pH 7,0 a enzym β -GAL je nejaktivnější při pH 6,0. Tříenzymový biosenzor poskytoval nejlepší odezvu při pH 7,5. (Obr. 10).



Obr. 10 - Záznam chronoamperogramu tříenzymového biosenzoru pro šest přidavků laktózy o objemu 10-20 μ l a koncentraci $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ v pH 6,0 (zelená), pH 7,0 (fialová), pH 7,5 (modrá) a pH 8,0 (červená)

4.2. Vliv předúpravy elektrody

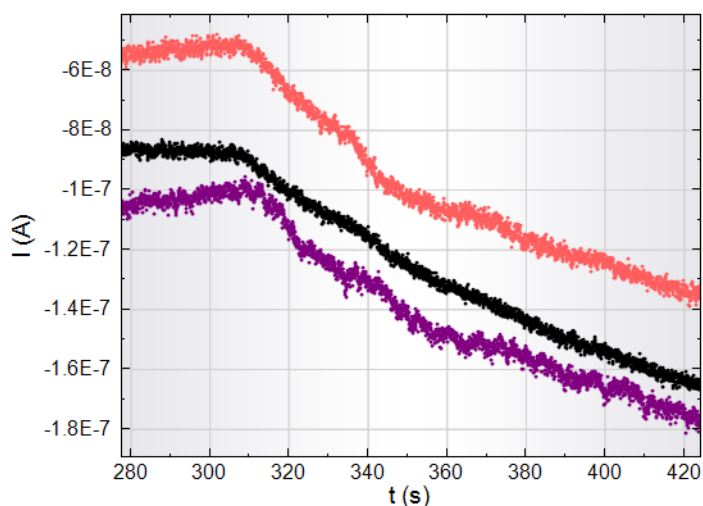
Grafitová tyčinka byla vždy před nanesením vrstev obroušena na smirkovém papíře a následně očištěna na navlhčené buničině. Po čisticím kroku jsme zkoušeli předupravit elektrochemickým čištěním v 1 % NaCl (Obr. 11a), biosenzor nevykazoval odezvu na laktózu. Také jsme zkoušeli předúpravu máčením elektrody přes noc v kyselině merkaptopropionové podle lit.⁷³ (Obr. 11b), nicméně odezva biosenzoru nebyla pozorována. Tento způsob předúpravy je spíše vhodný pro zlatou elektrodu⁷³. Zkusili jsme i předúpravu skloubením obou možností (Obr. 11c). Z výše uvedených však ani jedno nevykazovalo lepší nebo alespoň stejné odezvy jako tomu bylo u elektrod upravených pouze čisticím krokem (Obr. 11d).



Obr. 11 - Porovnání chronoamperogramu biosenzoru s předúpravou pomocí El.-Chem. čištění (a), namočením v MPA kyselině (b), El.-Chem. čištěním a namočením v MPA kyselině (c) a biosenzoru bez předúpravy (d)

4.3. Vliv použití polymeru

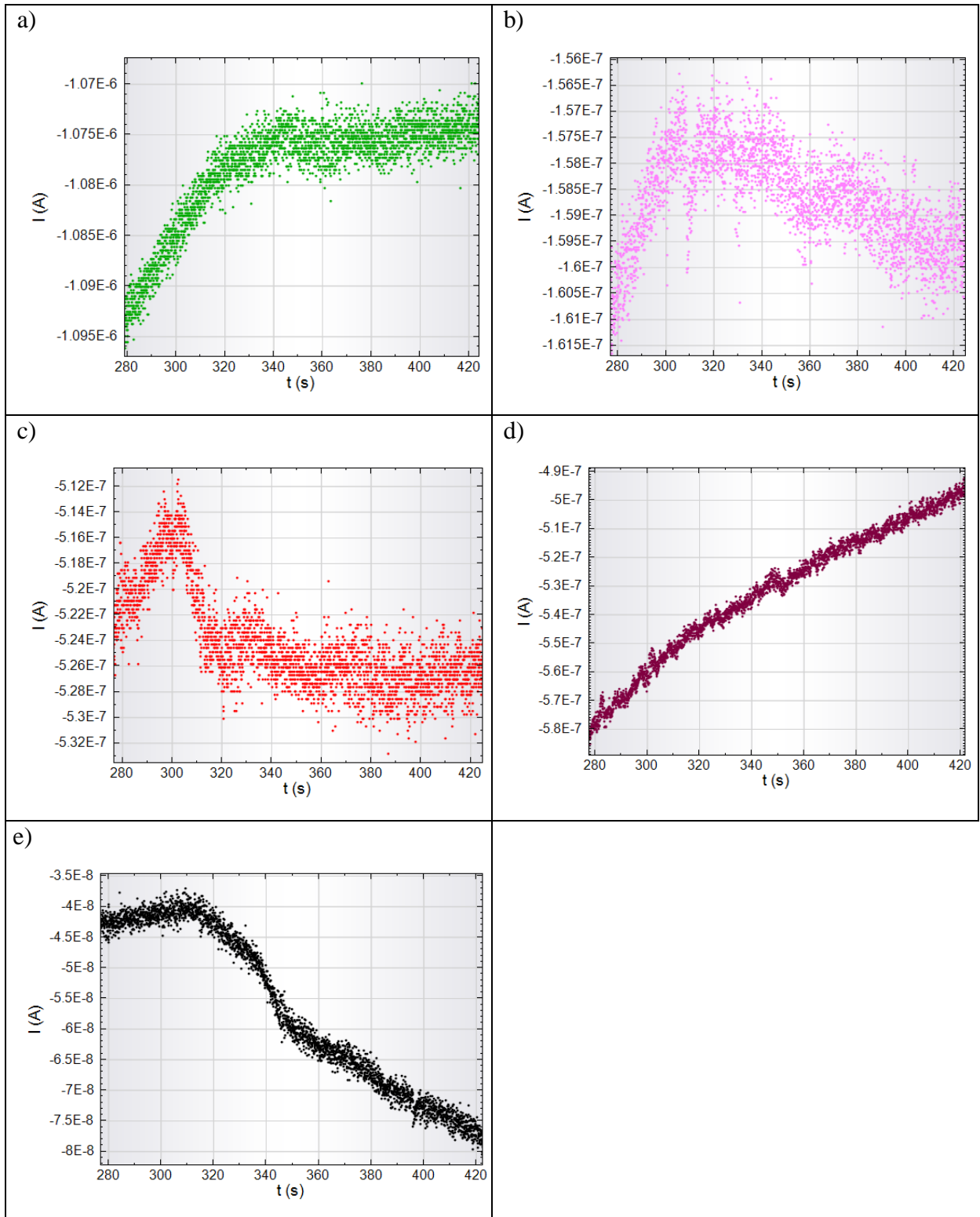
Do enzymové směsi biosenzoru jsme pro stabilizaci vrstvy a zesíťování přimíchali polymer PEGDE a želatinu. Pozitivní efekt těchto složek byl také pozorován zlepšením odezvy biosenzoru (Obr. 12).



Obr. 12 - Porovnání chronoamperogramu biosenzoru s polymerem (fialová), s želatinou (černá) a polymerem i želatinou (červená)

4.4. Vliv různých typů nanočástic

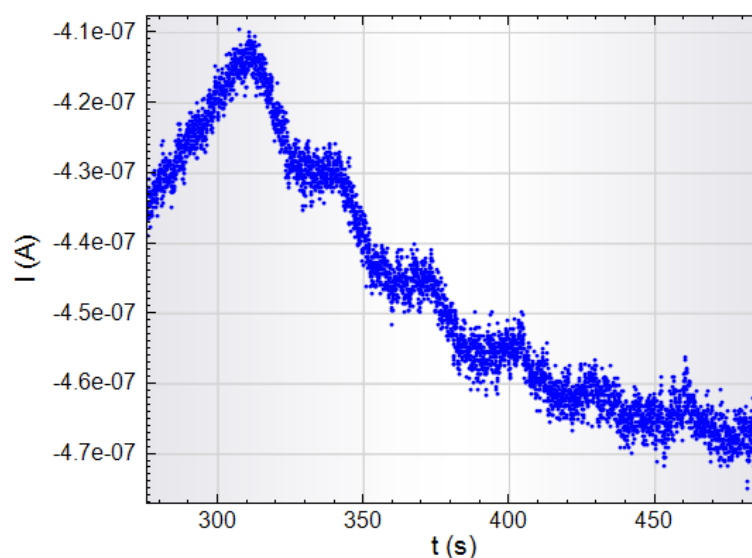
Dále bylo testováno, zda přimíchání nanočástic do enzymové směsi biosenzoru bude mít vliv na odezvu biosenzoru v roztoku laktózy. Pro tyto experimenty byly použity nanočástice zlata (Obr. 13a), stříbra (Obr. 13b), grafen (Obr. 13c) a nanočástice SAMN (Obr. 13d). Nejlepší chronoamperometrický záznam a odezva však byly pozorovány s biosenzorem bez přimíchaných nanočástic (Obr. 13e).



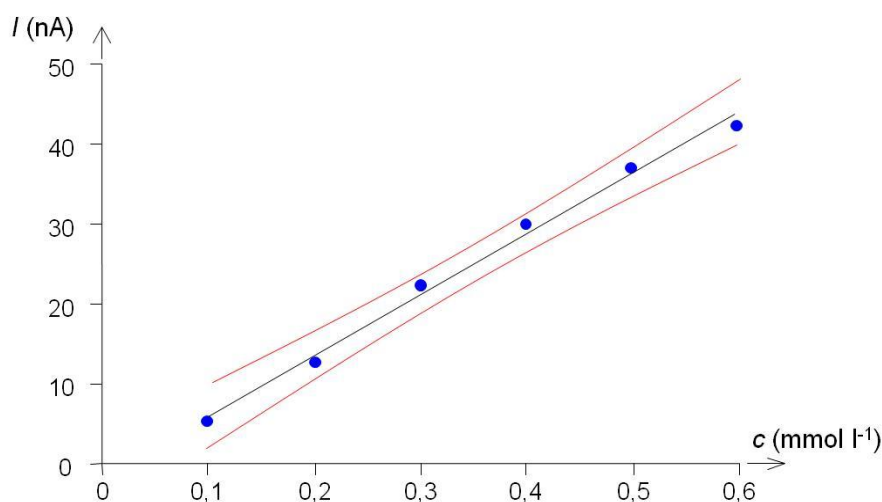
Obr. 13 - Porovnání chronoamperogramu biosenzoru s nanočásticemi zlata (a), stříbra (b), grafenem (c), nanočásticemi SAMN (d) a bez nanočástic (e)

4.5. Kalibrační závislost laktózy

S patnácti biosenzory, které vykazovaly nejlepší odezvu (čištění bez další předúpravy, s polymerem i želatinou a bez nanočástic), byly v prostředí PBS pufru o pH 7,5 naměřeny kalibrační závislosti laktózy (Obr. 14), ze kterých byla vytvořena průměrná kalibrační závislost (Obr. 15). Ta byla lineární v rozsahu koncentrací $1 \cdot 10^{-4}$ až $6 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ - se směrnici a směrodatnou odchylkou $(-1,72 \cdot 10^{-9} \pm 1,26 \cdot 10^{-9}) \text{ A l mol}^{-1}$, úsekem kalibrační přímky a směrodatnou odchylkou $(7,65 \cdot 10^{-5} \pm 0,33 \cdot 10^{-5}) \text{ A}$ a koeficientem determinace 0,9964. Odhad meze detekce byl $1,08 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a meze stanovitelnosti $1,52 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$.



Obr. 14 - Chronoamperometrické měření jednoho z biosenzoru použitých na stanovení kalibrační závislosti



Obr. 15 - Průměrná kalibrační závislost laktózy z patnácti biosenzorů

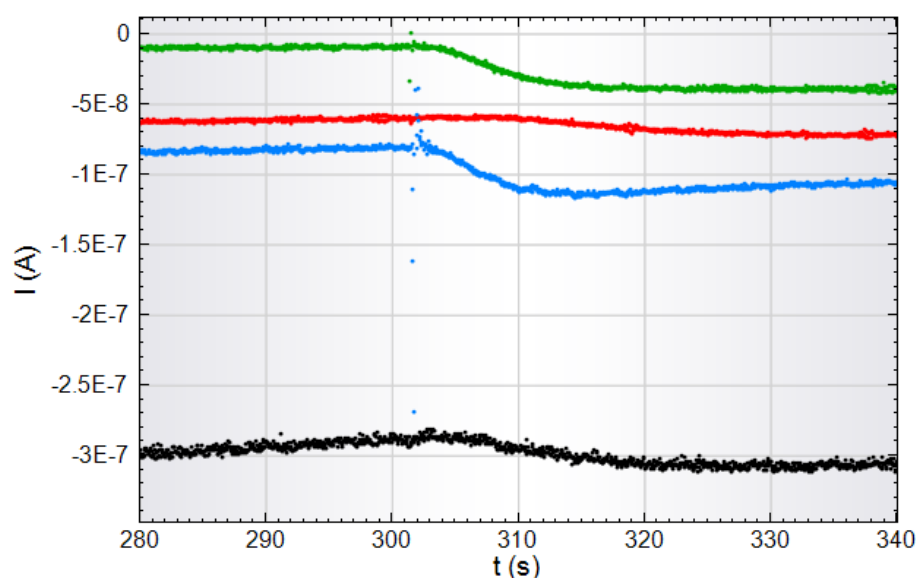
4.6. Stanovení laktózy v reálných vzorcích

Připravené biosenzory byly použity pro amperometrické stanovení laktózy v reálných vzorcích tvarohu, jogurtu, mléka a sušeného mléka. Do elektrochemické cely se k 10 ml ZE přidávalo vždy 100 μ l roztoku reálného vzorku. Pro každý reálný vzorek bylo připraveno pět biosenzorů (pro mléko sedm). U tvarohu a jogurtu všechny připravené biosenzory vykazovaly dobrou odezvu, u mléka a sušeného mléka tři biosenzory poskytovaly analyticky vyhodnotitelný signál (Obr. 16).

Z regresní rovnice kalibrační závislosti byl vypočítán obsah laktózy v jednotlivých reálných vzorcích (Tabulka 3).

Tabulka 3 - Obsah laktózy v reálném vzorku m včetně směrodatných odchylek s vypočítané z kalibrační závislosti a obsah laktózy deklarovaný výrobcem produktu m_d

Vzorek	m (g/100 g)	s (g/100 g)	m_d (g/100 g)
Mléko	4,94	1,50	5
Sušené mléko	56,00	8,00	53,2
Jogurt	10,42	3,67	5,2
Tvaroh	5,67	0,85	4,0



Obr. 16 - Chronoamperogramy reálného vzorku mléka (černá), tvarohu (červená), jogurtu (modrá) a sušeného mléka (zelená)

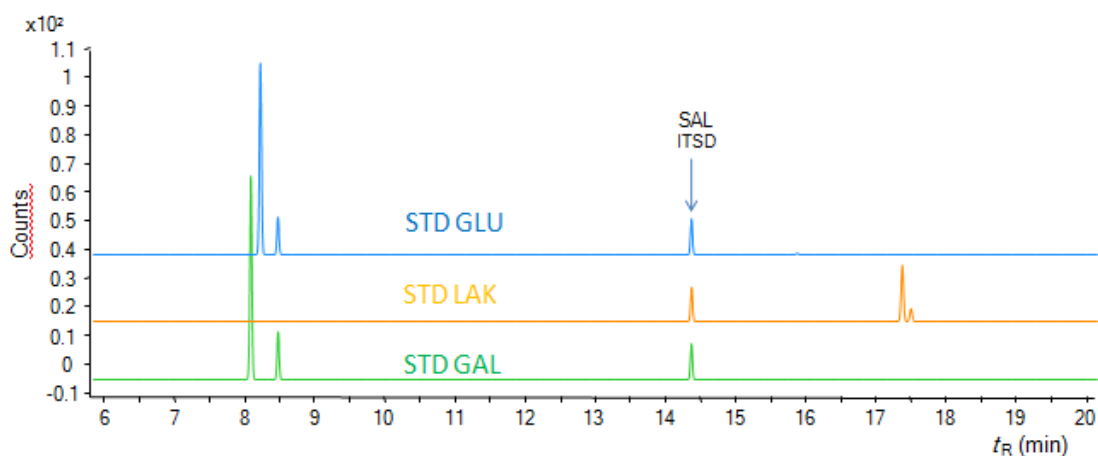
4.6.1. Stanovení laktózy, glukózy a galaktózy referenční metodou GC-MS

Pro srovnání výsledků stanovení laktózy v reálných vzorcích byla zvolena referenční metoda plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC-MS). Byly změřeny standardy laktózy, glukózy a galaktózy (Obr. 17) a jejich směs (Obr. 18) a následně byly změřeny předupravené reálné vzorky tvarohu, jogurtu, mléka a sušeného mléka (Obr. 19).

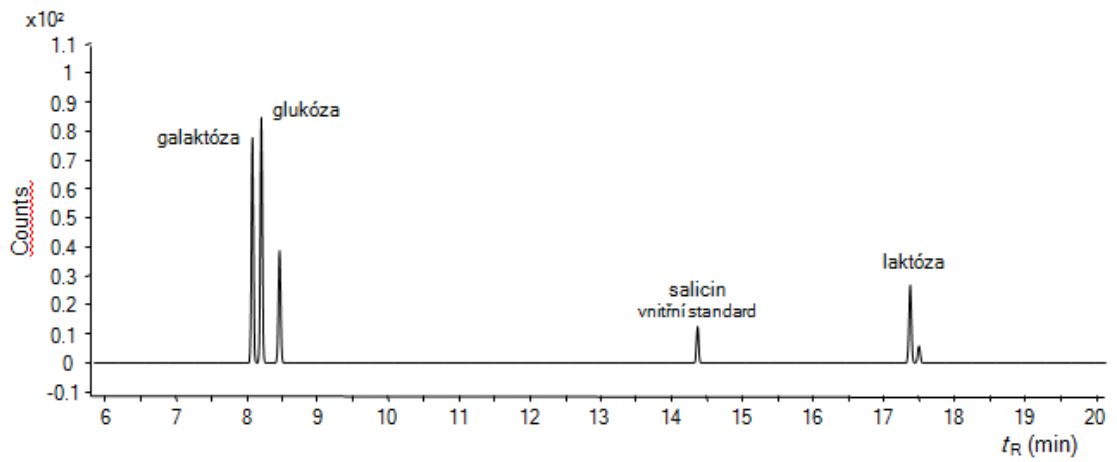
Pro kvantitativní stanovení byl použit salicin jako vnitřní standard. Výpočet odezvových faktorů f a kvantifikace (Tabulka 4) byla provedena podle rovnice (1), kde A_x a A_S odpovídá plochám píků stanovované látky a vnitřního standardu a m_x a m_S jsou hmotnosti stanovované látky a standardu.

$$f = \frac{m_x A_S}{m_S A_x} \quad (1)$$

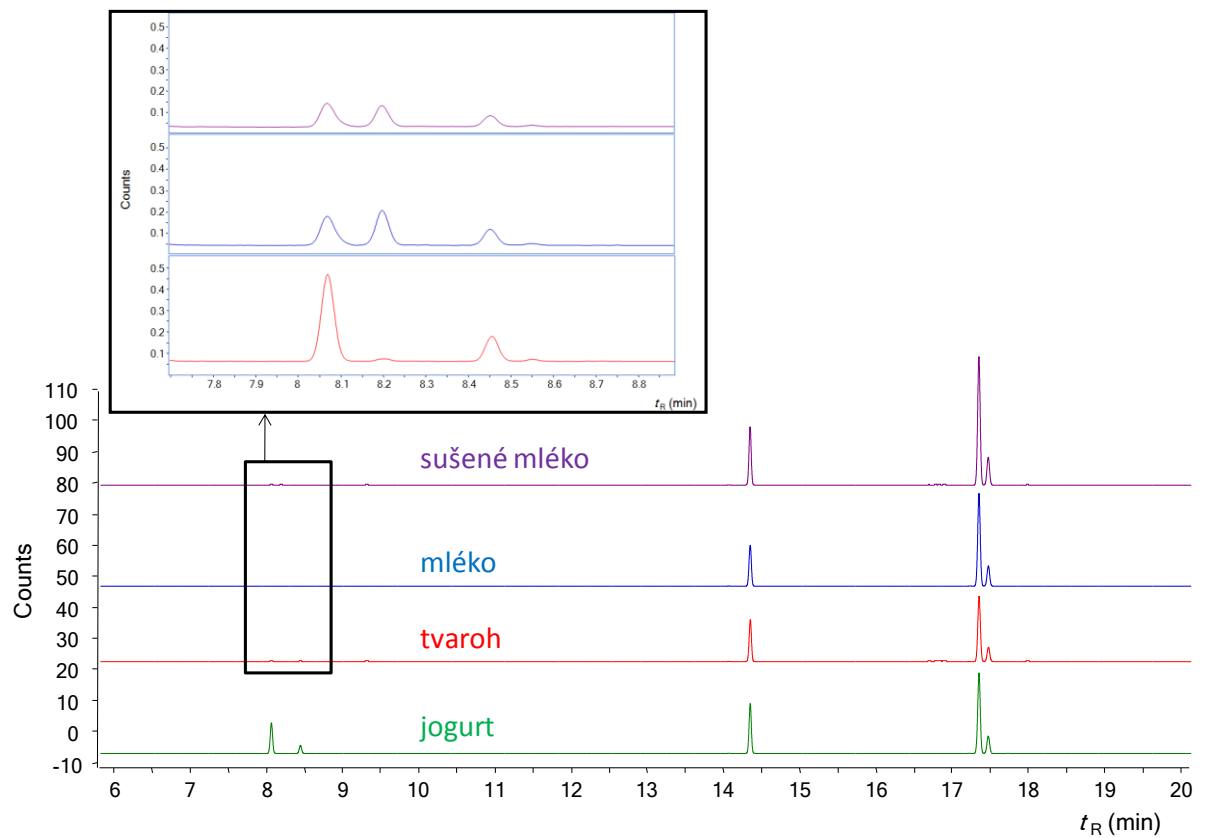
V jogurtu, jako u jediného reálného vzorku, bylo amperometricky stanoveno dvojnásobně vyšší množství laktózy, což mohlo být ovlivněno vyšším množstvím galaktózy ($0,52 \pm 0,01$) g na 100 g jogurtu. U ostatních reálných vzorků bylo stanoveno deseti až stonásobně nižší obsah galaktózy než u jogurtu (Tabulka 4). Při výrobě jogurtu fermentací dochází k rozkladu laktózy na glukózu a galaktózu. Jogurtové bakterie však většinu glukózy spotřebují, proto vidíme jen zvýšený obsah galaktózy.



Obr. 17 – Chromatogramy jednotlivých standardů sacharidů včetně interního standardu



Obr. 18 – Chromatogram směsi standardů sacharidů



Obr. 19 – Chromatogramy jednotlivých reálných vzorků, včetně zvětšené oblasti píků galaktózy

Tabulka 4 Obsah laktózy, glukózy a galaktózy v reálných vzorcích stanoveny referenční metodou GC/MS ze tří měření, kde m je obsah sacharidů v reálném vzorku, s je směrodatná odchylka, f je odezvoový faktor.

Sacharid	f	Tvaroh		Jogurt		Mléko		Sušené mléko	
		m (g/100g)	s (g/100g)	m (g/100g)	s (g/100g)	m (g/100g)	s (g/100g)	m (g/100g)	s (g/100g)
LAK	0,450	3,9363	0,0450	3,8638	0,0723	5,4644	0,0596	56,4014	2,1558
GLU	0,170	0,0004	0,0001	0,0008	0,0002	0,0059	0,0001	0,0363	0,0007
GAL	0,155	0,0110	0,0002	0,5178	0,0140	0,0061	0,0001	0,0494	0,0010

5. Závěr

Byl zkonstruován amperometrický enzymový biosenzor pro stanovení laktózy. Jeho odezva byla sledována v závislosti na pH, přičemž nejlepší výsledky byly zaznamenány při pH 7,5. Nejvhodnější předúpravou elektrody se ukázalo být pouze obroušení na jemném smirkovém papíře a očištění na navlhčené buničině. Lepší výsledky dával biosenzor po přidání želatiny AGAR-AGAR a polymeru polyethylenglykoldiglycidyl etheru do enzymové směsi bez použití nanočástic.

Se sadou 15-ti biosenzorů byly naměřeny kalibrační závislosti. Průměrná kalibrační závislost vykazovala linearitu v rozsahu koncentrací $1 \cdot 10^{-4}$ až $6 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ se směrnicí a směrodatnou odchylkou $(7,65 \cdot 10^{-5} \pm 0,33 \cdot 10^{-5}) \text{ A l mol}^{-1}$, úsekem kalibrační přímky a směrodatnou odchylkou $(7,65 \cdot 10^{-5} \pm 0,33 \cdot 10^{-5}) \text{ A}$ a koeficientem determinace 0,9964. Odhad meze detekce byl stanoven na $1,08 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a meze stanovitelnosti $1,52 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$.

S připravenými biosenzory byl stanoven obsah laktózy v reálných vzorcích mléka (5,0 g/100 g), jogurtu (10,4 g/100 g), tvarohu (5,67 g/100 g) a sušeného mléka (53,2 g/100 g). Jako referenční metoda byla zvolena plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí a pro kontrolu sloužily údaje uvedeny na obalu produktu. Hodnoty stanovené amperometricky, pomocí GC-MS a údaje uvedené na obalu výrobku byly v souladu, kromě vzorku jogurtu, u kterého bylo chronoamperometricky stanoveno dvojnásobné množství laktózy. Zvýšený obsah galaktózy v jogurtu pravděpodobně ovlivnil odezvu biosenzoru.

6. Summary

The amperometric enzyme biosensor for the determination of lactose was constructed. Its response was observed, depending on the pH. The best results were observed at pH 7.5. The most appropriate pretreatment of the electrode turned out to be grinding on fine sandpaper and cleaning on moistened pulponly. The biosensor provided even better results after adding gelatin agar-agar and the polymer polyethylenglykoldiglycidyl ether to the enzyme mixture without using nanoparticles.

The calibration curves were measured with a set of 15 biosensors. The average calibration dependence showed linearity in the concentration range $1 \cdot 10^{-4}$ to $6 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ with the slope and standard deviation $(7.65 \cdot 10^{-5} \pm 0.33 \cdot 10^{-5}) \text{ A L mol}^{-1}$, a section of the calibration line and standard deviation $(7.65 \cdot 10^{-5} \pm 0.33 \cdot 10^{-5}) \text{ A}$ and with the coefficient of determination 0.9964. Estimation of the limit of detection was set on $1.08 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ and the limit of quantification on $1.52 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Using prepared biosensors the content of lactose was determined in real samples of milk (5.0 g / 100 g), yogurt (10.4 g / 100 g), cheese (5.67 g / 100 g) and powdered milk (53.2 g / 100 g). The gas chromatography with mass spectrometric detection was used as a reference method and for control we used data indicated on the packaging of the product. The values which were set amperometrically using GC-MS and information on the packaging of the product were consistent except for the yogurt sample. Twofold higher amount of lactose has been determined chronoamperometrically in yogurt. Increased content of galactose in yogurt probably influenced the response of the biosensor.

7. Seznam použitých zkratk

AFM	Mikroskopie atomárních sil
β -GAL	β -galaktozidáza
DNA	Deoxiribonukleová kyselina
El.-Chem.	Elektro-chemické
GC	Plynová chromatografie
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickým detektorem
GOD	Glukózooxidáza
GOx	Glukózooxidáza
HBsAg	Povrchový antigen viru hepatitidy B
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HRP	Křenová peroxidáza
MPA	Merkaptopropionová kyselina
MS	Hmotnostní spektrometr
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	Redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	Redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
p.a.	<i>per analysis</i> (čistota chemikálie - pro analýzu)
PBS	Fosfátový pufr
PEGDE	Polyethylenglykol diglycidyl eter
RC okruhy	Obvod složený z odporů (rezistorů) a kondenzátorů
SAM	Z angl. Self Assembled Monolayer (samoskladná monovrstva)
SAMN	Maghemitové nanočástice
w/w	Hmotnostní procentualita
ZE	Základní elektrolyt

8. Literatura

1. Rechnitz G. A. *Electroanalysis* **3**, 73-76 (1991)
2. Hasan A., Nurunnabi M.D., Morshed M., Paul A., Polini A., Kuila T., Hariri M.A., Lee Y.K. a Jaffa A.A. *BioMed Res. Int.* **2014**, 1-18 (2014)
3. Petr Skládal, *Biosensory, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta*, Brno, 2002; <http://orion.chemi.muni.cz/pskl/vyuka/Biosensory.pdf>
4. Saharudin H., Ashim K. R., *Medical Engineering and Physic*, **28**, 978-981 (2006)
5. Pohanka M., Skladal P., Kroca M., *Def. Sci. J.* **57**(3), 185-193 (2007)
6. Tomasulo M., Yildiz I., Kaanumalle S.L., and Raymo F.M., *Langmuir* **22**, 10284-10290 (2006)
7. http://automa.cz/index.php?id_document=31055; citováno 22. 3. 2016
8. Giepmans B. N. G., Adams S. R., Ellisman M. H., and Tsien R. Y., *Science* **312**, 217-224 (2006)
9. Yeh H., Ho Y., and Wang T., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **1**, 115–121 (2005)
10. Renneberg R., Pfeiffer D., Lisdat F., Wilson G., Wollenberger U., Ligler F., Turner A.P.F., *Adv Biochem Engin/Biotechnol* **109**, 1–18 (2008)
11. Clark L. C. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **2**, 41-48 (1956)
12. Cass A. E. G., Francis D. G., Hill H. A. O., Aston W. J., Higgins I.J., Plotkin E. V., Scott L. D. L., Turner A. P. F., *Anal. Chem* **56**, 667-671 (1984)
13. Annabi N., Hasan A., Memic A., et al., *Acta Biomaterialia* **10**, 11–25 (2014)
14. Hasan A., Ragaert K., Swieszkowski W., et al., *Journal of Biomechanics* **47**, 1949-1963 (2013)
15. Ronkainen N.J., Halsall H.B., Heineman W.R., *Chem. Soc. Rev* **39**, 1747–1763 (2010)
16. Cosnier S., *Biosensors and Bioelectronics* **14**, 443–456 (1999)
17. Tien H. T., Wurster S. H., and Ottova A. L., *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **42**, 77–94 (1997)
18. Marcus R.A., Sutin N., *Biochim. Biophys. Acta* **811**, 265–322 (1985)
19. Husain Q., *Crit. Rev. Biotechnol.* **30**, 41-62 (2010)
20. Betancor L., Luckarift H. R., Seo J. H., Brand O., Spain J. C., *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 261-267 (2008)
21. Rajendran V., Irudayaraj J., *J. Dairy Sci.* **85**, 1357-1361 (2002)

22. Ferreira L. S., Souza Jr M. B., Trierweiler J. O., Hitzmann B., Folly R. O. M., *Braz. J. Chem. Eng.* **20**, 7-13 (2003)
23. Sharma S. K., Singhal R., Malhotra B. D., Sehgal N., Kumar A., *Biosens. Bioelectron.* **20**, 651-657 (2004)
24. Lourenco R. J. M., Serralheiro M. L. M., Rebelo M. J. F., *Portugaliae Electrochimica Acta* **21**, 171-177 (2003)
25. Amarita F., Fernandez C. R., Alkorta F., *Anal. Chim. Acta* **349**, 153-158 (1997)
26. Loolua E., Sungurb S., Yildizb Y., *J. Macromol. Sci.* **43**, 525-533 (2006)
27. Liu H., Li H., Ying T., Sun K., Qin Y., Qi D., *Anal. Chim. Acta* **20**, 137-144 (1998)
28. Eshkenazi I., Maltz E., Zion B., Rishpon J., *J. Dairy Sci.* **83**, 1939-1945 (2000)
29. Katz E., Willner I., Wang J., *Electroanalysis* **16**, 19-44 (2004)
30. Pingarrón J. M., Yáñez-Sedeño P., González-Cortés A., *Electrochimica Acta* **19**, 5848-5866 (2008)
31. Novoselov K.S., Geim A.K., Morozov S.V., Jiang D., Zhang Y., Dubonos S.V., Grigorieva I.V., Firsov A.A., *Science* **306**, 666-669 (2004)
32. Kuila T., Bose S., Khanra P., Mishra A.K., Kim N.H., Lee J.H., *Biosens. Bioelectron* **26**, 4637-4648 (2011)
33. Pumera M., *Mater. Today* **14**, 308-315 (2011)
34. Ratinac K.R., Yang W., Gooding J.J., Thordarson P., Braet F., *Electroanalysis* **23**, 803-826 (2011)
35. Shao Y., Wang J., Wu H., Liu J., Aksay I.A., Lin Y., *Electroanalysis* **22**, 1027-1036 (2010)
36. Lu J., Drzal L.T., Worden R.M., Lee I., *Chem. Mater* **19**, 6240-6246 (2007)
37. Lu Q., Dong X., Li L.J., Hu X., *Talanta* **82**, 1344-1348 (2010)
38. Jain K.K., *Med. Device Technol* **14**, 10-15 (2003)
39. Lia Y., Schluesenerb H.J., Xua S., *Gold Bull* **43**, 29-41 (2010)
40. Putzbach W., Ronkainen N.J., *Sensors* **13**, 4811-4840 (2013)
41. Gooding J. J., Hibbert D. B., *Trac-Trend Anal. Chem.* **18**, 525-533 (1999)
42. Mena M.L., Yáñez-Sedeño P., Pingarrón J. M., *Anal. Biochem* **336**, 20-27 (2005)
43. Trang D., Yuan T. R., Chai Y., Fu Y., Dai J., Liu Y., Zhong X., *Biosens. Bioelectron* **21**, 539-548 (2005)

44. Tang D., Yuan R., Chai Y. Q., Zhong X., Liu Y., Dai J., Zhang L. Y., *Anal. Biochem.* **333**, 345-350 (2004)
45. Zhuo Y., Yuan R., Chai Y., Zhang Y., Wang N., Li X., Zhu Q., Wang N., *Anal. Chim. Acta* **548**, 205-210 (2005)
46. https://cs.wikipedia.org/wiki/Lakt%C3%B3za#cite_note-1 ; citováno 10.12.2015
47. Linko P, "Lactose and Lactitol", in Birch, G.G. & Parker, K.J, *Natural Sweeteners*, London & New Jersey: Applied Science Publishers, pp. 109–132, (1982)
48. <http://chemia-cukry.prv.pl/dwucukry.html> ; citováno 10.12.2015
49. Berthelot M.: *Chimie organique fondée sur la synthese*, Mallet-Bachelier, France 1860
50. <https://en.wikipedia.org/wiki/Lactose>, citováno 5. 3. 2016
51. <http://www.rd.usda.gov/files/RR214.pdf>, citováno 5. 3. 2016
52. <http://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/Navratilova-skripta-web.pdf>, citováno 5. 3. 2016
53. Mašek L., *Potraviný a nápoje v kostce*, Ratio, 2000
54. Fox P.F., McSweeney, P.L.H.: *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Blackie Academic & Professional, London 1998
55. Muir D.D., *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 1525-1529 (2003)
56. Gajdůšek S., Klíčník V., *Mlékařství*, VŠZ Brno, Brno 1993
57. http://www.stevecarper.com/li/list_of_lactose_percentages.htm ; citováno 17.12.2015
58. Lomer M. C. E., Parkers G. C., Sanderson J.D., *Alliment Pharmacol Ther* **27**, 93-103 (2008)
59. Matthews S. B., et al. *Postgrad Med J* **81**, 167-173 (2005)
60. Ranken, M. D. Kill, R. C.: *Food industries manual*, Springer 1997
61. Wong S.Y., Hartel R.W., *J Food Sci* **79**, 257-272 (2014)
62. Minard, R. *Introduction to Organic Laboratory Techniques: A Microscale Approach*. Pavia, Lampman, Kriz & Engel, Saunders. 1990
63. Ganong W. F.: *Přehled lékařské fyziologie*, HoH Vyšehradská, Jinočany 1999
64. Holeček M.: *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*, Grada, Praha 2006
65. Campbell A. K., Waud J. P., Matthews S. B., *Sci Prog* **88**, 157-202 (2005)
66. Lloyd ML, Olsen WA. Disacharid malabsorpce. In: Haubrich WS, Schaffner F, Berk JE, EDS, Bockus HL. *Bockus gastroenterologie*. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 1995

67. <http://slideplayer.cz/slide/4876160/> ; citováno 3.1.2016
68. Saltzman J.R., Russell R.M., Golner B., Barakat S., Dallal G.E., Goldin B.R., *Am J Clin Nutr* **69**, 140-146 (1999)
69. Cvak Z., Peterková L., Černá E.: *Chemické a fyzikálně-chemické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků*, VÚPP, Středisko potravinářských informací, Praha 1992
70. Doležálek J., Hladík J., Březina P.: *Příručka pro cvičení z chemie a technologie mléka*, SNTL Praha 1980
71. Lei Y., Zhou Q., Zhang Y.-l., Chen J.-b., Sun S.-q., Noda I., *Comp. Theor. Chem.* **974**, 1-3 (2010)
72. Xinmin W., Ruili Z., Zhihua L., Yuanhong W., Tingfu J., *Journal of Food Composition and Analysis* **21**, 255-258 (2008)
73. Conzuelo F., Gamella M., Campuzano S., Ruiz M.A., Reviejo A.J. a Pingarrón J.M., *J. Agric. Food Chem.* **58**, 7141-7148 (2010)
74. Venerando R., Miotto G., Magro M., Dallan M., Baratella D., Bonaiuto E., Zboril R., Vianello F., *J Phys Chem C 117* **39**, 20320–20331 (2013)
75. http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISSderivate/000000003216/03_chapter3.pdf?hosts= ; citováno 29. 3. 2016
76. Zoski C. G.: *Handbook of Electrochemistry*, New Mexico, USA 2006
77. Hussain S. Z., Maqbool K., *J. Anal. Bioanal. Tech.* **13**, 116-126 (2014)