

SZAKDOLGOZAT

Papp Richárd Bence Szakdolgozat

Papp Richárd Bence

2021

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi kar
Élelmiszeripari Műveletek és Folyamattervezés Tanszék

Galakto-oligoszacharid gyártás során
képződő glükóz gyors meghatározása
vércukormérő használatával

Papp Richárd Bence

Budapest

2021

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1 Szénhidrátok	3
2.1.1 Glükóz.....	4
2.1.2 Galaktóz.....	4
2.1.3 Laktóz	5
2.1.4 Galakto-oligoszacharid (GOS)	5
2.1.4.1 GOS gyártástechnológia	6
2.2 A szacharidok analízisére használható módszerek	9
2.2.1 Kémiai vizsgálati módszerek	9
2.2.2 Egyéb vizsgálati módszerek	9
2.2.2.1 Tömegspektrometria	9
2.2.2.2 HPLC	11
2.3 A vércukorszintmérők működési elve	13
2.4 Vércukorszint mérőben használt enzimek	15
2.4.1 Glükóz-oxidáz.....	15
2.4.2 GDH-NAD.....	15
2.4.3 GDH-FAD (Glükóz-dehidrogenáz)	16
2.4.4 GDH-PQQ	16
3. A munka célja	17
4. Anyag és módszer	18
4.1 Kísérlethez használt anyagok	18
4.1.1 Glükóz.....	18
4.1.2 Laktóz	19
4.1.3 Galaktóz.....	19
4.1.4 Vivinal GOS Syrup.....	19
4.1.5 Tesztekhez használt vércukorszintmérő eszköz	21
4.2 Kísérletek leírása	22
5. Kísérletek eredménye, tapasztalatok	28
6. Összefoglalás	29
Irodalomjegyzék	31

1. Bevezetés

A természetben előforduló legtokéletesebb táplálék egy emlős újszülött számára az anyatej, de a csecsemők mesterséges táplálásáról már az ókorból is vannak feljegyzések. Főként tehén, és kecsketejjel pótolták az anyatejet. Az 1800-s évek második felében forgalomba hozták az első maláta alapú csecsemőtápszert. Hatása nem volt megfelelő, ezért az orvosok visszatértek az állati tejek ajánlásához. Az 1900-s évek elején úgy gondolták az anyatejes táplálás nem fontos, ám a csecsemő halandóság jóval magasabb volt a palackból táplált csecsemők esetében, mint az anyatejjel tápláltak között. Megfigyelések azt mutatták, hogy ez a különbség nemcsak higiéniai okokkal (cumisüvegekben elszaporodó baktériumok) függ össze, hanem a tej összetételével is. Körülbelül 1930-ban azonosították a gynolactose nevű emberi tej szénhidrátfrakcióját. Ez volt az emberi tej oligoszacharidjai (HMO) kutatásának kiindulópontja. (Kunz, C.; 2012) A HMO-k kutatása sok mindenre fényt derített. Többek között, hogy antimikrobiális szerek, amelyek megakadályozzák a kórokozók kötődését a csecsemő nyálkahártya felszínén és csökkentik a vírusos, bakteriális és protozoon parazitafertőzések kockázatát, receptoranalógokként gátolják a kórokozók adhézióját a hám felszínén és közvetlenül kölcsönhatásba lépnek az immunsejtekkel. (Boehm, G.; Stahl, B.; 2007) Az emberi tej oligoszacharidjai kulcsszerepet játszanak a bélflóra postnatalis fejlődésére. A háziállatok tejében kimutatott oligoszacharidok többségének vannak bizonyos szerkezeti jellemzői, amik hasonlóak az emberi tej oligoszacharidjaihoz. Az emberi tej összetettsége rendkívül bonyolult, emiatt az emberi tej oligoszacharidjaival megegyező szerkezetű oligoszacharidok még nem állnak rendelkezésre étrendi összetevőként, ebből kifolyólag alternatív prebiotikus összetevők forrásait kell használni az anyatej-helyettesítő tápszerek komponenseként. A 90% rövid láncú galakto-oligoszacharidokat és 10% hosszú láncú frukto-oligoszacharidokat tartalmazó prebiotikus keverékkel végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy ezzel a prebiotikus keverékkel jól stimulálható a bifidobaktériumok és a laktobacillusok növekedése, a széklet pH-ja csökkenthető, és a kórokozók jelenléte a szoptatott csecsemőkéhez hasonló szintre csökkenthető. (Boehm, G.; Stahl, B.; ed.; 2005)

Az Európai Bizottság (EB) a 2016/127 felhatalmazáson alapuló rendelete szabályozza az anyatej-helyettesítő és az anyatej-kiegészítő tápszerekre vonatkozó különös összetételi és tájékoztatási követelményeket. A rendeletben meghatározzák a felhasználható szénhidrát

fajtákat, azok minimum és/vagy maximum határértékeit. Ezek alapján az anyatej-helyettesítő és az anyatej-kiegészítő tápszerekben 100 ml-ként 60 – 70 kcal energia a megengedett. A szénhidrátok minimum mennyiségét 9 g/100 kcal-ban határozták meg, és 14 g/100 kcal-ban maximálták. Így 100 ml tápszerben 5,4 – 9,8 g szénhidrát lehet.

A laktóz esetében csak a minimum mennyiséget adták meg. Ez 4,5 g/100 kcal. 100 ml-ben legkevesebb 2,7 g laktóznak kell lennie. Az említett minimumok nem vonatkoznak az olyan anyatej-helyettesítő tápszerekre, amelyekben a szójafehérje-izolátumok az összes fehérjetartalom több mint 50 %-át képviselik, vagy amelyeken fel van tüntetve a „laktózmentes” kijelentés. Szacharózt és glükózt csak fehérjehidrolizátumokból gyártott anyatej-helyettesítő tápszerhez lehet hozzáadni. A hozzáadott szacharóz mennyisége nem haladhatja meg az összes szénhidrát-tartalom 20 %-át, és a hozzáadott glükóz mennyisége nem haladhatja meg a 2 g/100 kcal értéket (100 ml-ben maximum 1,4 g glükóz). Glükózszirup vagy szárított glükózszirup csak akkor adható a tehéntejfehérjéből vagy kecsketejfehérjéből gyártott anyatej-helyettesítő tápszerhez vagy a szójafehérje-izolátumokból (kizárólag vagy ezeknek tehéntejfehérjével, vagy kecsketejfehérjével készített keverékéből) gyártott anyatej-helyettesítő tápszerhez, ha dextróz-ekvivalense nem haladja meg a 32-t. (A dextróz-ekvivalens a keményítő teljes hidrolízisének eredménye, ami alapján minél nagyobb a dextróz-ekvivalens, annál több hidrolízist hajtanak végre, és ezért több az egyszerű cukrok aránya.) Ha ezekhez a termékekhez glükózszirupot vagy szárított glükózszirupot adnak, a glükózszirupból vagy szárított glükózszirupból származó glükóztartalom nem haladhatja meg a 0,84 g/100 kcal értéket. A glükóz mennyiségére a feljebb meghatározott maximumokat alkalmazni kell, ha a glükózszirupot vagy szárított glükózszirupot fehérjehidrolizátumokból gyártott anyatej-helyettesítő tápszerhez adják hozzá. Az előfőzött és/vagy zselatinált keményítőket maximálták 2 g/100 ml és az összes szénhidrát-tartalom 30 %-ában.

Az anyatej-helyettesítő tápszerhez frukto-oligoszacharidok és galakto-oligoszacharidok hozzáadhatók, ezek mennyisége nem haladhatja meg a 0,8 g/100 ml értéket egy 90 %-ban oligogalaktozil-laktózból és 10 %-ban nagy molekulásúlyú oligofruktozil-szacharózból álló keverék esetében. A csecsemő tápszerekben fontos alkotói a galakto-oligoszacharidok. Mivel a GOS gyártás folyamán nem csak tisztán GOS képződik, hanem szénhidrát keverék. Ezekben megtalálhatók azok a szénhidrátok, amiket a rendelet szabályoz. Ezért fontos, hogy gyorsan jussunk információhoz a GOS tartalmú szénhidrát keverék összetételéről.

2. Irodalmi áttekintés

Ebben a fejezetben kitérek a szénhidrátok fontosságára, röviden bemutatom a glükózt, laktózt, galaktózt és a galakto-oligoszacharidot, a GOS gyártás folyamatát és a gyártáshoz szükséges enzimet. Ezenkívül ismertetem a szénhidrátok analízisére használható módszereket, a vércukorszintmérő eszköz működési elvét, és az azokhoz használatos enzimeket.

2.1 Szénhidrátok

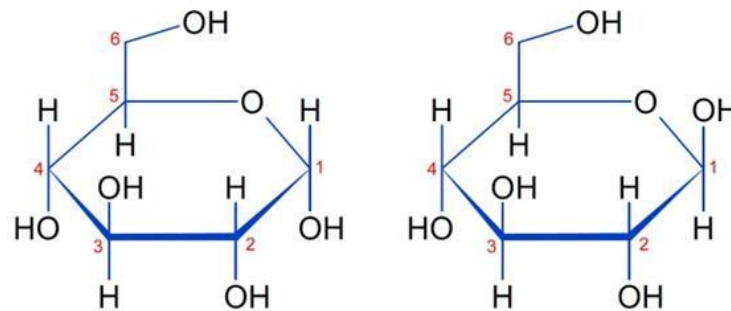
A természetben leggyakrabban előforduló szénvegyületek a szénhidrátok. A szénhidrátok a növények által termelt, a fotoszintézis során előállított szénből, hidrogénből, oxigénből álló vegyületek. A sejt anyagcseréjének legfontosabb energiaforrásai. A nagymolekulájú szénhidrátok, a poliszacharidok a leggyakoribb tartalék tápanyagok, például a növényi keményítő. A cellulóz sejtfal vázát is szénhidrátok alkotják. A szénhidrátok lehetnek egyszerű cukrok (monoszacharidok). Jellemzőjük, hogy vízben oldódó, édes ízű anyagok. A szénatomok száma szerint lehetnek három, öt vagy hat szénatomosak. Biológiai szempontból az öt (pentóz) és a hat (hexóz) szénatomos cukrok a legjelentősebbek. A pentóz a nukleinsavak alkotója, a hexóz a sejtek energiaforrása. Összegképlete: $C_6H_{12}O_6$. Ide tartozik a glükóz, a fruktóz, és a galaktóz. Az oxocsoportból keletkező hidroxilcsoportot glizidos hidroxilcsoportnak nevezzük (megkülönböztetve a többi, alkoholos hidroxilcsoporttól). A monoszacharidok jó redukáló vegyületek. Ezen a sajátosságon alapul a Fehling-féle cukorreakció is. Léteznek még összetett cukrok is (diszacharidok), amelyek két egyszerű cukor molekula egyesüléséből keletkeznek egy víz molekula kilépése közben. Összegképlete: $C_{12}H_{22}O_{11}$. Ide tartozik pl.: maltóz, laktóz. Valamint lehetnek poliszacharidok, amik nagyobb számú, akár több száz vagy ezer monoszacharidot tartalmazó molekulák, amelyekben a cukrok glikozidos kötással kapcsolódnak egymáshoz. A poliszacharidok közül csak néhány oldódik vízben ilyen például az inulin, de a legtöbb már nem oldódik vízben, nem cukorszerű. Ezek savas hidrolízissel egyszerű molekulákra bonthatók. Összegképletük: $(C_6H_{10}O_5)_n$. Az emészthetetlen szénhidrátokat ételmi rost forrásnak tekintjük. A Magyar Élelmiszerkönyv meghatározása alapján: az összes ételmi rost az emészthetetlen szénhidrátok és a lignin összege. A legfontosabb ételmi rost típusok:

- Nem-keményítő poliszacharidok – cellulózok, hemicellulózok, pektinek, hidrokolloidok (gumik, nyálkaanyagok, β -glukánok)

- Rezisztens oligoszacharidok – frukto-oligoszacharidok (FOS), galakto-oligoszacharidok (GOS), egyéb rezisztens oligoszacharidok
- Rezisztens keményítő – fizikailag bezárt keményítő, néhány típusú nyers keményítő granulátum, retrogrált amilóz, kémiaailag és/vagy fizikailag modifikált keményítők
- Diétás rost poliszacharidokkal természetesen egyesült lignin (Magyar Élelmiszerkönyv, 2008)

2.1.1 Glükóz

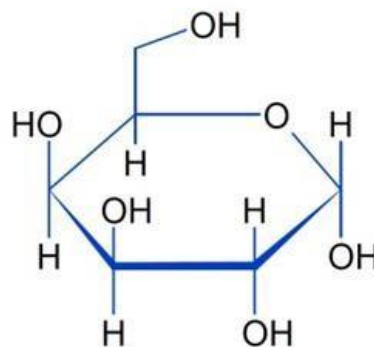
A glükóz köznapi neve szőlőcukor, mely egy hat szénatomból álló monoszacharid. Összegképlete: $C_6H_{12}O_6$. Ez a sejtek legfőbb energiaforrása, a fotoszintézis terméke.



1.ábra: Glükóz szerkezeti képlete α - és β - (gyűrűs) alakban (Internet 1.)

2.1.2 Galaktóz

Kevésbé vízdékony és édes ízű monoszacharid, mint a glükóz.

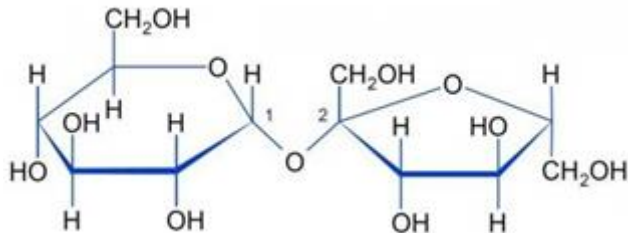


2.ábra: Galaktóz gyűrűs szerkezeti képlete (Internet 2.)

2.1.3 Laktóz

A laktóz, más néven tejcukor, a legtöbb emlős tejének elsődleges szénhidrátja. Egy galaktóz és egy glükóz molekulából áll. A két monoszacharid rész 1,4- kötéssel kapcsolódik össze. Vízben jól oldódó, redukáló hatású vegyület a glükóz rész szabad glikozidos hidroxidoscsoportja miatt. Erszényesek esetében ez, a tej csak kis részét jelenti. A laktóz általában szabadon, de kis mennyiségben laktóz-tartalmú oligoszacharidok formájában is előfordul. (Morrissey, 1985) Az emberiség több ezer éve hasznosítja az állati tejet; akár frissen fogyasztva, akár feldolgozott formában. A tej laktóztartalma állandónak mondható (4,8%). (Agrárágazat, 2018) Ipari célokra a tejipar melléktermékéből, a savóból nyerhető tejcukor, amit a gyógyszer-, és a tápszergyártók hasznosítanak.

Az emlősök a szoptatás ideje alatt termelnek a laktóz lebontásához szükséges laktáz enzimet, de ez az elválasztás után folyamatosan csökken, így alakul ki a laktózintolerancia, ezért egyre nagyobb figyelmet kap a tejtermék gyártók körében a laktózmentes termékek előállítására. A laktóz gyors és pontos meghatározása kritikus jelentőségű a laktózmentes termékek és a sajt-savó erjedés folyamatának ellenőrzésében.



3. ábra: Laktóz szerkezeti képlete (Internet 3.)

2.1.4 Galakto-oligoszacharid (GOS)

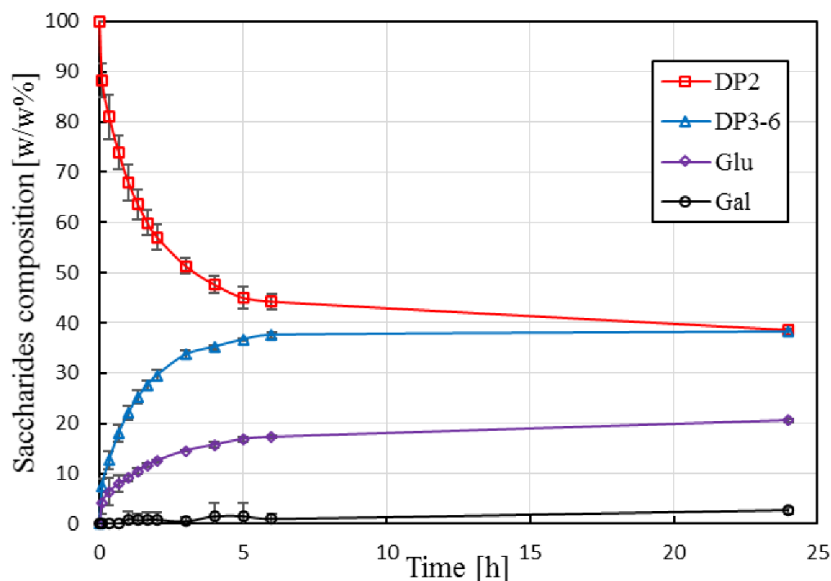
A galakto-oligoszacharidok kettő-tíz monoszacharidból álló glikozidos kötéssel kapcsolódó molekula. A GOS nem emészthető szénhidrát, az emberi emésztő enzimek nem tudják lebontani, így szinte sértetlenül jutnak el a béltraktusba, ahol táplálékul szolgálnak a bél mikroflórájának. Ezért a GOS prebiotikum, mert olyan nem emészthető élelmiszer-összetevő, ami jótékonyan hat a gazdaszervezetre azáltal, hogy a vastagbélben a baktériumok növekedését és/vagy aktivitását serkenti. A Vivinal GOS-t a tehéntej savófrakciójában lévő laktózból enzimes átalakítással készítik β -galaktozidázok felhasználásával. A β - galaktozidot a *Papiliotrema terrestris* nevű gombafajból állítják elő.

2.1.4.1 GOS gyártástechnológia

Oligoszacharidok monoszacharidokból kémiai szintézissel előállíthatók. A laktóz savas hidrolízisekor képződő oligoszacharidokat az 1950-s években is megfigyelték. Ez az eljárás azonban nem használható az oligoszacharidok gazdaságos előállításához, mert nem termékspecifikus és szélsőséges körülményeket igényel.

Gazdaságosabb módja az előállításának az enzimes katalízis. A glikoziltranszferázok vagy glikozid-hidrolázok olyan enzimek, amelyek felelősek a glikozilcsoportok donorcukorról akceptorba történő átviteléért (Ly és Withers 1999). A glikoziltranszferáznak speciális cukor nukleotidra van szüksége (nukleozid-foszfát vagy lipid-foszfát) a reakcióhoz. Ezért annak ellenére, hogy ez az eljárás elég hatékony, mégsem használják ipari előállításához, mert az enzimmészítmény drága és speciális szubsztrátra is szükség van. Általában szakaszos üzemben, kevert tartályreaktorokban (STR) állítják elő a GOS-t. Kiindulási anyaga a laktóz, amihez oldódás után hozzáadják az enzimet, majd az enzimreakció (glikozid-hidrolázok katalitikus aktivitásával történik) lezajlása után következő fázis az ion-cserélés, utána a melegítés és bepárlás következik. Végül szűrést követően kapják meg a galakto-oligoszacharidot. Legfőbb költségtenyező a biokatalizátor, ezért fontos, hogy a β -galaktozidázokat hosszú ideig tudják használni. Az STR alternatívája az ultrafiltrációval (UF) támogatott biokatalitikus reaktorok, más néven enzimátikus membránreaktorok (EMR). Ennél az eljárásnál egy szabad enzim végzi a GOS szintézist. Különbség az STR-rel szemben, hogy a kevert tartályreaktorhoz egy külső membránmodult szereltek. Így egyidőben megy végbe a folyamatos GOS szintézis és az enzim elválasztása, mert a membrán a reakcióterben tartja az enzimet, míg a szacharidokat átengedi. Az eljárás problémája a membrán eltömődése és az enzimaktivitás csökkenése. (Cao, T; Pázmándi, M; ed.; 2020)

A reakció laktózból indul, amit az enzim átalakít galakto-oligoszahariddá, és melléktermékben keletkezik felesleges glükóz. Ennek a glükóznak a mennyisége arányos a termelődött galakto-oligoszahariddal (4. ábra). A reakció kezdetén csak laktóz található a rendszerben. Az enzim hozzáadása utáni első öt órában folyamatosan emelkedő DP3-6 figyelhető meg. A hatodik órában közelíti meg a max. hozamot, ami kicsivel 40 w/w% alatt marad. A folyamat közben körülbelül 20 w/w% mennyiségben keletkezik glükóz és egészen kevés 2-3 w/w%-ban galaktóz. A folyamat végére nem reagáló laktóz marad. A reakció dinamikájára jellemző, hogy az első hat órában lezajlik a reakciók 95%-a. A további időben stabilizálódik a rendszer és szinte változatlan marad.



4.ábra: Szakaszos enzimatiszus átalakítás szénhidrátprofilja (Cao, T; Pázmándi, M; ed.; 2020)

DP2: Laktóz, DP3-6: Oligoszacharidok, Glu: Glükóz, Gal: Galaktóz

Glikozid-hidrolázok:

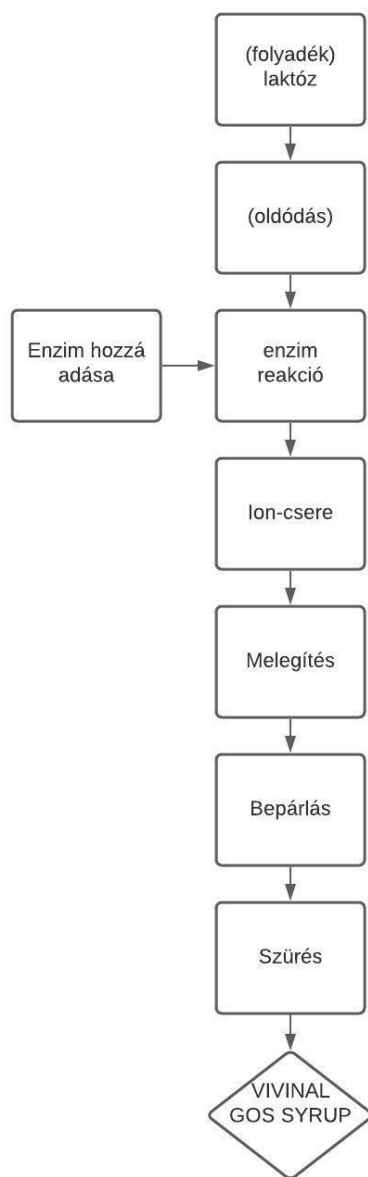
A β -galaktozidáz aktivitással bíró glikozid-hidrolázok előállításának forrásai különböző baktériumok (pl.: *Bifidobacterium bifidum*), ösbaktériumok (pl.: *Pyrococcus furiosus*), gombafélék (pl.: *Aspergillus niger*). Ezeknek a szervezeteknek megfelelő körülmények szükségesek, de még így is gazdaságosabban az enzim előállítás, mint a glikoziltranszferázok esetében, de általában kevésbé sztereo-szelektívek (Tzortzis, Vulevic 2009).

Ezen enzimek egy részét a gazdaszervezetekben expresszáltatják és tisztítják, például ioncserék, gélszűrés, hidroxipapatit és hidrofób kölcsönhatás-kromatográfiák használatával (Nakayama, Amachi 1999).

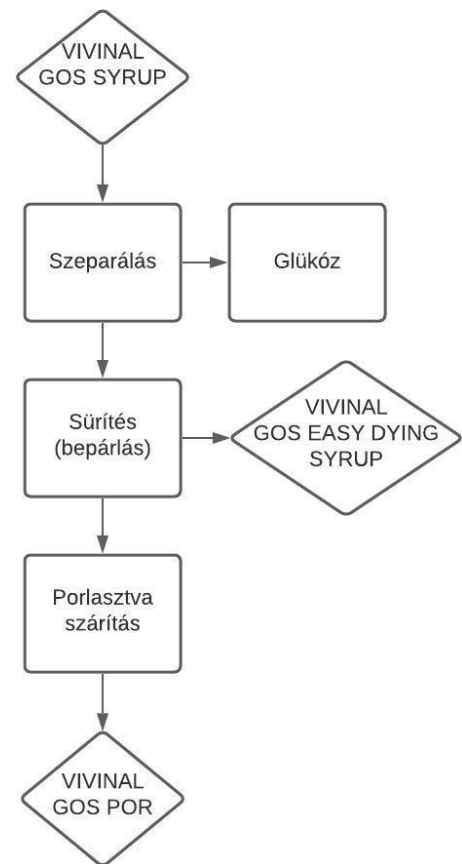
A GOS hozam maximalizálása elérhető, ha a glükóz-galaktóz arányt úgy határoztuk meg, hogy a különböző enzimek képesek-e kvantitatív módon transzgalaktozilezési reakciókat katalizálni (a laktóz vagy galaktóz akceptorokká) a teljes hidrolízissel szemben. Ennek az aránynak nagyobbnak kell lennie, mint 1, mert a laktóz hasítással előállított galaktóz egy része oligoszacharidokba kerül, míg az összes glükóz felszabadul.

A GOS szintézis hozam növelhető: nagyon erősen koncentrált kiindulási laktóz-oldattal, a víz termodinamikai aktivitásának csökkentésével, ha eltávolítjuk a végterméket és/vagy inhibitorokat a reakcióközögből; és az enzim módosításával (Monsan és Paul 1995; Czermak és mások, 2004). A kísérleteimhez a FrieslandCampina által gyártott Vivinal GOS Syrupot használom. A FrieslandCampina vállalatról elmondható, hogy

1871-ben alakult holland tejtermelő gazdák helyi szövetségéeként. Mára a világ egyik legnagyobb tejipari vállalata. 38 országban vannak fióktelepei, többek között Magyarországon is. A cég termék palettája tejipari termékek széles választékából (tej, joghurt, sajt, tejszín, vajtermékek, stb.) áll, ezenkívül összetevőket, és félkész termékeket szállít csecsemőtápszer gyártók, a gyógyszer-, és az élelmiszeripar számára. A FrieslandCampina DOMO az elsők között vezette be az organikus GOS használatát az anyatej-helyettesítő tápszerekben. A Vivinal GOS Syrup gyártási folyamatának lépéseit a 5. ábra, a Vivinal GOS Syrupból előállítható egyéb termékek menetét a 6. ábra mutatja. (FrieslandCampina; 2017)



5.ábra: Vivinal GOS Syrup gyártási fázisai



6.ábra: Vivinal GOS Syrupból előállított termékek gyártási fázisai

2.2 A szacharidok analízisére használható módszerek

2.2.1 Kémiai vizsgálati módszerek

A cukrok kémiai tulajdonságáért az alkoholos hidroxil, az aldehid, és a ketocsoport felelős. Ezen csoportok reakciói alapján lehet meghatározni és kimutatni a cukrokat.

A cukor analitikájáról már az 1800-s évek közepétől vannak leírások. Elsőként Fehling írta le, hogy réz(II)-szulfáthoz (Fehling-I reagens) és natrium-hidroxidhoz (Fehling-II reagens) adva a cukoroldatot a cukor oxocsoportja a réz(II)ionokat redukálja, és először réz(I)-hidroxid, majd réz(I)-oxid csapadék keletkezik. A folyamat során az elemi réz kicsapódik a mintából, a cukortartalom pedig ennek mennyiségével lesz arányos. Ezzel a módszerrel csak a redukáló cukrokat lehet vizsgálni, a répacukrot (szacharóz) például nem. A poliszacharidokat először savas hidrolízissel (például sósavval) szét kell bontani monoszacharidokká, ezután lehet redukálni a képződött egyszerű cukrokat. Másik módszer az aldózok kimutatására az ezüstitűkőr próba. Ammóniás ezüst-nitrát oldathoz adjuk a cukoroldatot. Melegítés hatására a tökéletesen zsírmentes kémcső falára fémezüst csapódik ki, mert a reakció során a D-glükóz aldehidcsoportja reagál egy ezüst-aminnal.

2.2.2 Egyéb vizsgálati módszerek

A laktóz koncentráció mérésére számos módszer áll rendelkezésre. Az enzimátikus módszer annyit tesz, hogy enzimek segítségével katalizáljuk a folyamatokat, majd utána valamely súly, vagy fényelnyelésen alapuló technikával megállapítjuk a koncentrációt. A gravimetrikus módszerrel tulajdonképpen egyszerű súlyméréssel határozzuk meg a végeredményt. A kriozkopia az oldószer fagyáspontcsökkentése révén teszi lehetővé az oldott anyag molekulatömegének meghatározását. A kolorimetrikus pedig a fényelnyelési képességen alapszik, ezen belül a polarimetria elve az, hogy lineárisan polarizált fényt vezetünk át egy optikailag aktív közegen és mérjük a fény polarizációs síkjának elfordulási szögét. (Jeon, 1984; Amamcharla, 2011)

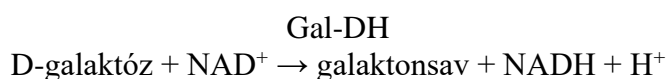
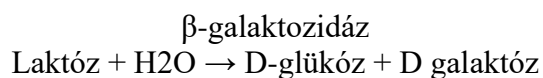
Ipari szinten leggyakrabban használt eszköz a nagy felbontóképességű tömegspektrometria (MS) és nagy teljesítményű folyadék-kromatográfia (HPLC).

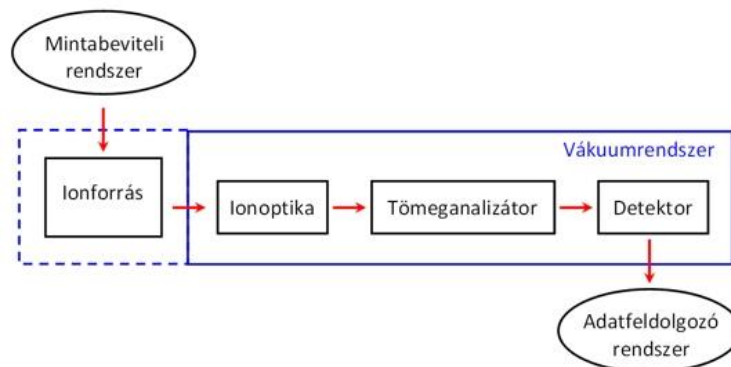
2.2.2.1 Tömegspektrometria

“A tömegspektrometria (Mass Spectrometry, MS) az egyik legáltalánosabban alkalmazott analitikai eljárás, amely alkalmas szerves és szervetlen komponensekből

képződött ionok tömeg/töltés (m/z) arányának nagyhatékonyságú meghatározására. (...)

A tömegspektrometria egy olyan analitikai módszer, mely segítségével atomok, molekulák, vagy molekulatöredékek tömegét tudjuk megmérni. A módszer alapja az, hogy a mintából előállított gázhalmazállapotú ionok fajlagos tömegük (tömeg/töltés, m/z) alapján elválaszthatók, miközben mennyiségük és fajlagos tömegük pontosan meghatározható. A tömegspektrometria kiemelkedő szerepét a módszer egyedülálló érzékenysége, kis mintaigénye, széles tömegtartománya, kiterjedtalkalmazási lehetősége biztosítja. A tömegspektrometria rendkívül kis anyagmennyiségű minták (subfemtomol) gyors, pontos, megbízható analizésére alkalmas, az elválasztás-technikában használatos módszerekkel (HPLC, UPLC, nanoLC, nanoUPLC, GC, 1D/2D PAGE) jól kombinálható készülékek.”^(Idézet 1) 2007-ben már Lynch és társai a folyékony tej laktóztartalmának meghatározására spektrofotometriás enzimatikus elemzést alkalmaztak. A módszer alapelve a laktóz d-glükózzá és d-galaktózzá történő hidrolízise galaktozidázzal, majd a -d-galaktóz oxidációja nikotinamid-adenin-dinukleotiddal (NAD) -galaktóz-dehidrogenáz jelenlétében. A reakciót aldóz-1-epimeráz hozzáadásával katalizálták, amely felgyorsította a -d-galaktóz -d-galaktózzá történő mutarotációját. A képződött redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) mennyiségét 340 nm-en mérték, mely arányos a jelen lévő laktóz mennyiségével. Ezzel az eljárással a teljesítmény jelentős javulását érték el azzal, hogy figyelembe vették a fény útjának hosszát és tömeg/térfogat helyett tömeg/tömeg-ben fejezték ki a koncentrációt. (Lynch, 2007) A tömegspektrométer semleges részecskékből (molekulákból, atomokból) ionokat állít elő, ezeket elektromágneses terek segítségével tömeg/töltés arányuk szerint elválasztja. Az ionforrásban a vizsgálandó molekulákból valamilyen gerjesztő energia (kinetikus, fény, elektromos, kémiai, stb.) segítségével ionokat hoz létre. Az ionoptika biztosítja, hogy az ionok lehetőleg azonos kinetikus energiával, egy nyalábban mozgatva bejussanak az analizátorba. A tömeganalizátor válogatja szét őket tömeg/töltés hányadosuk (m/z) alapján. Az elválasztott ionok intenzitását a detektor méri. Így alakul ki a tömegspektrum ami az ionáram intenzitás/fajlagos tömeg aránya (6. ábra).





7.ábra: Tömegspektrometria sematikus ábrája (Internet 6.)

2.2.2.2 HPLC

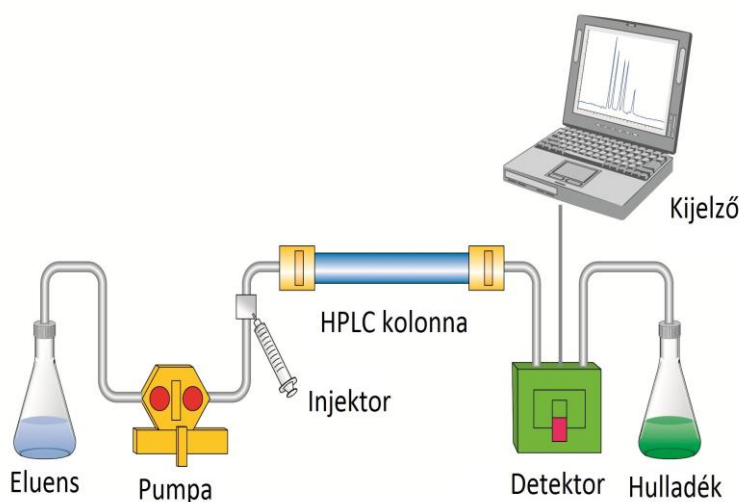
A szénhidrátok összetételének meghatározását laboratóriumi körülmények között a HPLC berendezés segítségével végzik. A HPLC előnyei közé tartozik, hogy a méréseket szobahőmérsékleten vagy annak közelében végezhetjük, így termikusan érzékeny anyagok is vizsgálhatók vele, megfelelő szerkezeti anyagok felhasználásával pedig biológiai eredetű minták is közvetlenül analizálhatók. Hátránya, hogy a HPLC készülék meglehetősen költséges. A készülék üzemeltetése jelentős anyagi terhet jelent. (Lázár I., 2009) Az analízis időigényes, de nagy pontosságú.

HPLC részei (6. ábra):

- **Eulens:** A mozgófázis (eluens) folyadék, mely az állófázist tartalmazó oszlopon áramlik keresztül. Az eluens áramlását nagynyomású pumparendszer biztosítja, így tömör (kicsi szemcseméretű, nagy fajlagos felületű), nagy ellenállású oszlopokon is biztosítható a megfelelő áramlási sebesség.
- **Pumpa:** Nagynyomású pumpa, ami biztosítja az eluens megfelelő áramlását.
- **Injektor:** A mintaadagoló (injektor) segítségével juttatható be a folyadék állapotú minta a folyamatosan áramló mozgófázisba. Használható manuális vagy automata injektáló.
- **HPLC Kolonna:** Az elválasztásért felelős analitikai oszlop. A kolonna méretét és annak töltetét a méréshez kell igazítani. Fontos tényező a töltet szemcsemérete, alakja, eloszlása, a töltet szerkezete, pórusmérete, kémiai-, mechanikai-, és hőstabilitása. A töltet szemcseméretétől függ az áramlási sebesség, az oszlopban kialakítható nyomásesés, és az elválasztás hatékonysága. A szemcseméret csökkentésével nő az elválasztás felbontóképessége. Leggyakrabban a szilikagél

és alumínium-oxid töltésű kolonnát használnak, és a szilikagélhez kémiaiilag kötött poláris csoportokat (pl.: ciano-, amino-, diol-, nitrocsoport, stb.) tartalmazó állófázisokat.

- Detektor: A detektor általában egy átfolyó cellával rendelkezik, és a rajta átáramló, oszlopról eluálódó komponens koncentrációját jelzi. A detektorok érzékenységét az optikai fényút hossza és a detektorcella belső térfogata határozza meg. A leggyakrabban használt detektorok az ultraibolya/látható (UV/VIS) spektrofotométerek, ezen kívül alkalmaznak fluoreszcencia mérésen alapuló, elektrokémiai, fényszórás elvén működő detektorokat, tömegspektrométereket és törésmutatóindex (RI) detektorokat. Ez a detektor az ún. tömegérzékeny detektorok közé tartozik, automatikusan méri az átfolyó oldat törésmutatóját, amely pedig arányos az oldószerben oldott anyag mennyiségével. Az RI detektor erősen hőmérséklet függő. (Lázár I., 2009)



8.ábra: HPLC sematikus rajza (Internet 7.)

A tejben lévő laktóz koncentráció gyors és könnyű meghatározására West és Llorente 1981-ben kidolgozott egy nagy teljesítményű folyadékkromatográfiai (HPLC) módszert. A mintákat 0,5% perklórsavval hígították, majd lecentrifugálták és a felülúszó alikvot részét acetonitrillel keverték össze. A laktózt végül 10 mikron szemcseméretű szilikagél oszlopon vizes acetonitrillel leválasztották. (West, 1981)

Jeon és társai egy igen gyors, 15 perces kromatográfiás elválasztást és egy 15 perces mintaelőkészítést vázoltak fel munkájukban, melyben a mintákat többek között vízfürdőbe teszik és leszűrik. (Jeon, 1984)

Az ultra-nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás UHPLC nagymértékben kompatibilis a tömegspektrométerrel, egy 2020-ban végzett tanulmányban a Vivinal GOS analitikai elemzését végezték ilyen (UHPLC–PGC–MS) szerkezettel. Redukált (és a nem redukáló) GOS DP3 izomereket vizsgáltak. Egy tömegspektrométerhez (MS) kapcsolt Accela UHPLC rendszerrel elemezték a mintákat, amiben 3 µm részecskeméretű, különböző hosszúságú oszlopokat használtak. Mozgófázisként ULC-MS vizet + 0,1% (v/v) hangyasavat, és ACN + 0,1% (v/v) hangyasavat alkalmaztak. Az áramlási sebesség 300 µl/perc volt. Ez az összetett eszköz nagy pontossággal elemezte ki a Vivinal GOS-t. Egyetlen mérés alkalmával több, mint száz különböző struktúrát különített el, ebből huszonhárom redukáló és tizenöt nem redukáló DP3 izomert. (Logtenberg, M; Donners, K; ed.; 2020)

2.3 A vércukorszintmérők működési elve

A cukorbetegséghez hasonló tünetekről már a Krisztus előtti 5. században is készültek feljegyzések. Csak a 19.-20. századra derült fény arra, hogy igazából endokrin eredetű megbetegedésről van szó. (Eknoyan G., Nagy J. 2005) Szövődményei igen súlyosak lehetnek. Az erek meszesedése a retina és a vesék károsodását okozhatja, továbbá gyakori a végtagi trombózis. Napjainkban népbetegségnek számít az 1-es és 2-es típusú cukorbetegség. A cukorbetegek vércukorszintje folyamatos napi megfigyelést igényel a szövődmények megelőzésének érdekében. Ezt pedig a mai kompakt és egyszerűen használható vércukorszintmérő eszközök segítségével naponta többször is elvégezhetik önmaguk.

A mai vércukorszintmérők már 5 másodperc alatt és kevesebb, mint 1 µl vérből képesek megállapítani az ember vércukorszintjét. A munka nagy részét pedig az egyszerűhasználatos tesztsíkok végzik. Enzimeket, koenzimeket, mediátorokat és indikátorokat tartalmaznak szárazréteg formában. A mérési sebességet, specifikusságot, pontosságot és precizitást a kialakításuk és kémiájuk adja. (Hönes, 2008)

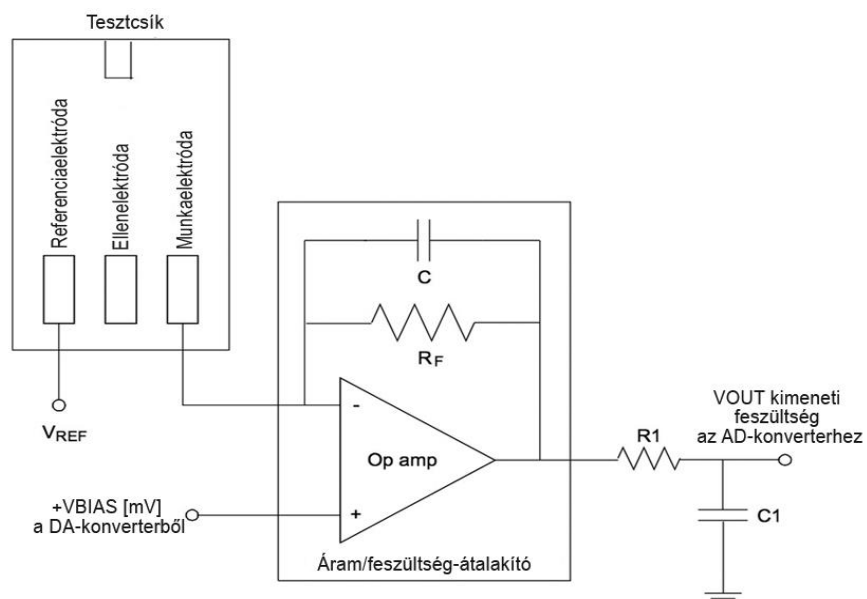
A ma használatos vércukorszintmérők pedig a laktóz mellett, akár keményítő vagy glikogén vizsgálatra is használhatók. Alapelve az, hogy első lépésként az összetett cukrot tartalmazó mintát például enzimek segítségével glükózra és egyéb cukrokra bontjuk,

majd a vércukorszintmérővel megmérjük a glükóz koncentrációt. A kapott értékből pedig vissza tudunk következtetni az oldat di-, és poliszacharid mennyiségére.

A vér cukor tartalmát többféleképpen lehet meghatározni. A refraktometria elvén működő mérők a vér törésmutatóját figyelik. Egy csepp vért megvilágítva és a visszavert fényt detektálva határozza meg a cukor koncentrációt. A polarizált vagy infravörös fény egy áttetsző anyag és a vér határfelületét világítja meg. Ahogy a vér glükóz koncentrációja megváltozik, megváltozik annak refrakciós indexe, valamint a visszatükröződő fény intenzitása. A differenciális erősítő pedig javítja az érzékenységet azáltal, hogy összehasonlítja a vérből visszavert fény intenzitását a visszaverődés előtti sugár intenzitásával.

Napjainkban 1 μl vér is elegendő egy sokkal pontosabb méréshez. A legtöbb vércukorszintmérő pedig elektrokémiai elven működik, ahol van egy reagenssel átitatott tesztcsik. Létezik kolorimetrikus és amperometrikus mérő is. A kolorimetrikus a tesztcsik reagens rétegének színintenzitását méri. Az amperometrikus mérés esetén a tesztcsik egy kapillárisba szívja fel a vért, mely többnyire glükóz-oxidázt tartalmaz (7.ábra). Az enzimes reakció következtében elektronok szabadulnak fel, melyek elektródákkal detektálhatóak. (Magyar Elektronika, 2015)

A glükóz mérést több tényező is befolyásolja, mivel az enzimreakció sebessége függ a környezeti hőmérséklettől, páratartalomtól, vagy akár a tengerszint feletti magasságtól.



9.ábra: Amperometrikus tesztcsik működési elve (Internet 8.)

2.4 Vércukorszint mérőben használt enzimek

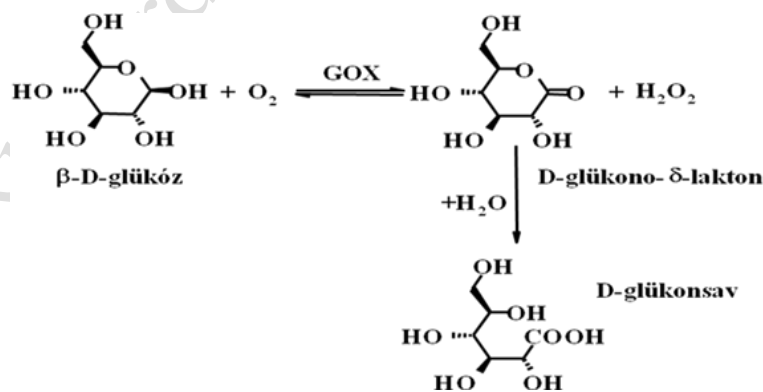
Az enzimek azok az anyagok, amik a reakciókban végbemenő folyamatok sebességét képesek felgyorsítani anélkül, hogy a reakció végtermékévé váljanak katalizátoroknak hívjuk, a folyamatot pedig katalízisnek. Ezt a jelenséget Jöns Jacob Berzelius írta le 1836-ben.

A katalizátor nem befolyásolja a kiindulási anyag és a végtermék közötti egyensúlyt, csak a reakciósebességet, amíg beáll az egyensúly.

A biológiai folyamatokban résztvevő katalizátorokat enzimeknek hívjuk. Bizonyos molekulák gátolják az enzim működését, ezek az inhibitorok. Más molekulák viszont szükségesek az enzim folyamatokhoz. A kofaktorok kis molekulájú anyagok, amik kiegészítik az enzimfehérjét (pl. FAD), ezek a molekulák nehezen választhatók le az enzimről. A koenzimek lazábban kötődnek az enzimhez (pl. NAD), egyszerű kémiai műveletekkel leválaszthatók. (Náray-Szabó G., 2006)

2.4.1 Glükóz-oxidáz

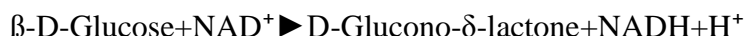
A glükóz-oxidáz olyan flavoprotein, ami katalizálja a glükóz első hidroxil csoportjának oxidációját, melynek elektron akceptora egy oxigén molekula. Eredménye D-glucono-delta-lactone és hidrogén-peroxid. A glükóz-oxidázt *Aspergillus niger* gombából állítják elő. A glükóz-oxidáz igen specifikus a β -D-glükózra.

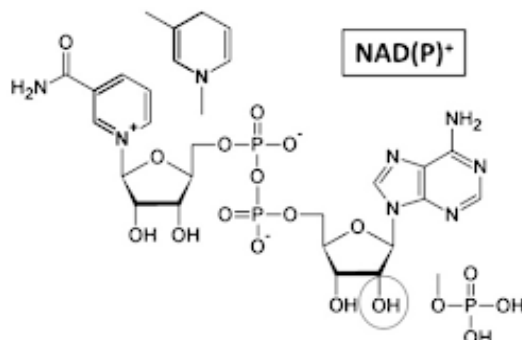


10.ábra: glükóz-oxidáz által katalizált reakció (Internet 9.)

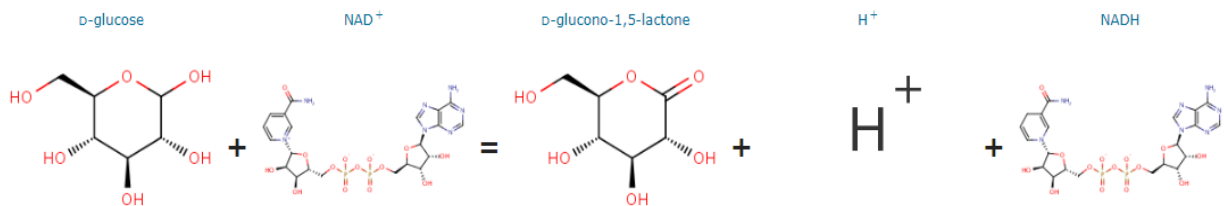
2.4.2 GDH-NAD

A GDH-NAD homotetramer szerkezetű, négy azonos alegységből épül fel. Koenzime a NAD nincs hozzá kötve. Inhibitora az ezüst ion (Ag^+), a higany (Hg^{2+}), és a jódacetát. A laktózza a relatív aktivitása 1.5, izoelektromos pontja pH 4,5.





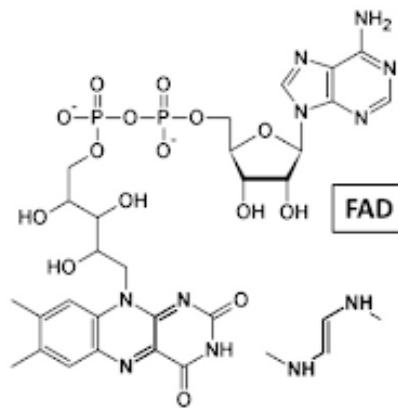
11.ábra: NAD szerkezeti képe (Internet 10.)



12.ábra: GDH-NAD által katalizált reakció (Internet 11.)

2.4.3 GDH-FAD (Glükóz-dehidrogenáz)

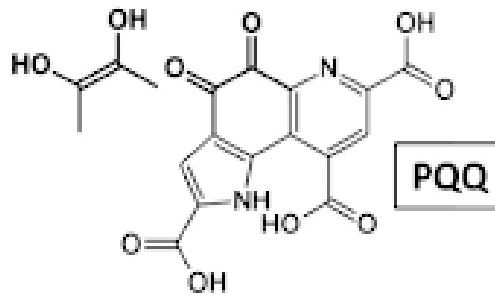
A glükóz-dehidrogenáz esetében a glükóz-oxidázzal ellentétben nem zavarja a mérést a vérben lévő oxigén. Maltózra és galaktózra nem érzékeny.



13.ábra: FAD szerkezeti képe (Internet 12.)

2.4.4 GDH-PQQ

A GDH-PQQ nem glükóz specifikus, maltózt, galaktózt, xilózt, laktózt is oxidál, így ezt használva a laktóz megemelné a mért eredményeket.



14.ábra: PQQ szerkezeti képe (Internet 13.)

Elsőként Amamcharla és Metzger álltak elő 2011-ben azzal az ötlettel, hogy használjunk vércukorszintmérőket. Mennyire gyors és praktikus? Alapelvük az volt, hogy β -galaktozidázos hidrolízissel lebontják a laktózt, majd a keletkezett glükózt mérik a műszerrel. Javaslatuk által lehetségessé vált a tejtermékek gyors, rutinszerű és olcsó vizsgálata. (Amamcharla, 2011)

Az Auri (Agricultural Utilization Research Institute) cég 2013 júliusi publikációjában írt le egy vércukorszint mérővel végezhető gyors laktóz meghatározási módszert. A módszer lényege, hogy a laktóz felbontásra kerül (β)-galaktozidázzal, glükózra és galaktózra. Ezután a glükóz koncentrációt mérik olyan vércukorszint mérővel, ahol a tesztcsík enzime GDH-NAD vagy GO vagy glükóz hexokináz, mert ezek specifikusak a glükózra, de a galaktóz jelenléte nem emeli meg a kapott értéket. (Metzger, L., 2013)

3. A munka célja

A glükóz koncentráció gyors és olcsó meghatározása köztes és végtermékekben. Hipotézisünk szerint a kereskedelmi forgalomban kapható vércukorszintmérő eszköz alkalmas a nem vérből származó glükóz kimutatására. Az eszköz használatát nem befolyásolja, ha a vizsgált termékben glükózon kívül más szacharid is jelen van. Ha a feltételezésünket mérésekkel alá tudjuk támasztani az kiegészítheti az iparban jelenleg használatos drága, időigényes, nagyteljesítményű folyadék-kromatográfiás eljárást. A vércukorszintmérő mérési elve, hogy amikor a vérmintát felviszik a tesztcsíkra, a vérben lévő β -OHB reakcióba lép a tesztcsíkon lévő vegyi anyaggal, ami kis mértékű elektromos áramot indukál. A készülék ezt az áramot méri, és az eredményt megjeleníti a kijelzőn. Az áram nagysága a vérmintában lévő glükóz mennyiségétől függ. Ezen elv alapján feltételezhetjük, hogy más oldatban található glükóz is reagál a tesztcsíkon lévő

enzimekkel és pontos értéket adhat. A GOS gyártás folyamán nem tisztán GOS keletkezik, hanem egy többféle szénhidrátot tartalmazó keverék. A gyártás közben a termelődött glükóz időben arányos a termelődött GOS-sal. Így kiszámolhatóvá válik a folyamat közben keletkező GOS. Mérésekkel megpróbálom igazolni, hogy egy-, és többkomponensű, illetve összetett oldatnál a vércukorszintmérő eszköz alkalmas a glükóz kimutatására.

Ehhez először egykomponensű glükóz oldatot fogok készíteni, hogy igazolni tudjam a glükóz mérhetőségét vércukorszintmérővel, majd készítek egykomponensű oldatot laktózból és galaktózból. Elméletem szerint ezeket nem fogja kimutatni a vércukorszintmérő, és ezért nem befolyásolják majd a további méréseknél a glükóz kimutatását. Ezen kívül többkomponensű oldatokat is készítek glükóz-laktóz, glükóz-galaktóz összetételű oldatok formájában, hogy egyértelműen látható legyen, hogy a laktóz és a galaktóz jelenléte nem zavarja a glükóz koncentráció mérését. Terveim szerint összetett oldatból is kimutatható lesz a glükóz, ezért Vivinal GOS Syrupból készítek mérési mintát. Vivinal GOS Syruphoz adok majd glükózt, aminek növelem a koncentrációját, és figyelem, hogy a vércukorszintmérő arányosan növekedő glükóz értéket mutat-e. Ha igen, akkor a Vivinal GOS Syrupban lévő egyéb összetevők nem befolyásolják a glükóz mérhetőségét. A várható eredmény számításához anyagmennyiségből koncentráció átváltást végezek.

4. Anyag és módszer

Ebben a fejezetben bemutatom a kísérletekhez használt anyagokat, azok fizikai tulajdonságait, a vércukorszintmérő eszköz jellemzőit, paramétereit, és az elvégzett kísérleteket.

4.1 Kísérlethez használt anyagok

4.1.1 Glükóz

Reanal által forgalmazott D(+)-Glükóz-monohidrát fizikai tulajdonságai :

megjelenés	fehértől a majdnem fehérig kristályos por
víz (KF)	7,0-9,5%

specifikus rotáció (c=10;H ₂ O,vízmentes anyagra)	+52,5°~+53,3°
oldékonyság	tiszta, színtelen
nehéz fémek (mint Pb)	max 0,00005 %
szulfátos hamu	≤0,1%
olvadás pont	146 °C

4.1.2 Laktóz

Acros organics által gyártott alfa-D-Laktóz monohidrát 99,5+%,2-4% béta-izomer. Olvadás pontja 219°C

4.1.3 Galaktóz

Carl Roth GmbH által gyártott D(+)-galaktóz fizikai tulajdonságai :

megjelenés	fehértől a majdnem fehérig por
vizsgálat (HPLC)	≥98.0 %
víz (KF)	≤0,5 %
specifikus rotáció (c=10 H ₂ O+NH ₄ OHban)	+80° ±2,0°
oldékonyság (10% H ₂ Oban)	átlátszó, színtelen
nehéz fémek (mint Pb)	≤0,002 %
szulfátos hamu	≤0,1%
olvadás pont	165-172°C

4.1.4 Vivinal GOS Syrup

A Vivinal GOS Syrup fizikai jellemzői:

- Megjelenése: Sárgás a nyersanyag szerves jellege miatt.
- Oldhatósága: Vízben teljesen oldódik, de kiválóan oldódik tejben és más tejtermékekben. Nem befolyásolja az ital viszkozitását.
- Íze: Semleges, vagy enyhén édes.
- Hőstabilitása: Nagyon stabil magas hőmérsékleten. Nem befolyásolja az oligoszacharidok tartalmát és összetételét sem a pasztörizálás, sem a sterilizálás még alacsony pH értéken sem.

4.táblázat: Vivinal GOS Syrup szárazanyag beltartalmi értékei

Szárazanyag tartalom	75%
Galakto-oligoszacharid	59%
Nitrogén	max.0,032%
Szulfátos hamu	max.0,3%
Vízmentes laktóz	21%
Vízmentes glükóz	19%
Galaktóz	1%
Nitrit	max.2 ppm
pH	3,2
Viszkozitás (25°C)	1000-5000cPs

5.táblázat: Vivinal GOS Syrup szénhidrát tartalma 100 grammban

Összes szénhidrát	75,2 g
Galakto-oligoszacharidok	44,3 g
Laktóz	15,8 g
Glükóz	14,3 g
Galaktóz	0,8 g

6. táblázat: Vivinal GOS Syrup oligoszacharid DP összetétele

polimerizáció foka (DP)	tömegszázalékuk a teljes oligoszacharid mennyiségben (%)
DP2 (nem laktóz)	31
DP3	38
DP4	18
DP5	8

DP6-vagy magasabb DP	5
összesen	100

4.1.5 Tesztekhez használt vércukorszintmérő eszköz

Az Abbott Diabetes Care Ltd. által gyártott FreeStyle Optium nevű készüléket használtam a kísérlet során, melynek jellemzőit a következő táblázatban foglaltam össze:

7.táblázat: FreeStyle Optium vércukormérő főbb jellemzői

Enzim	GDH-NAD
Vizsgálati módszer	Amperometrikus elektrokémia
Működési tartomány hőmérséklete	10 - 50°C
Kimutatási határ glükóz esetén	1,1 és 27,8 mmol/l (20–500 mg/dl)
Kimutatási határ β -keton esetén	0,0–8,0 mmol/l
Vizsgálati idő	5 sec
Mintamennyiség	6 μ l

A FreeStyle Optium vércukorszintmérő eszközhöz használt tesztsíkban GDH-NAD függő glükóz-dehidrogenáz van, és szabad sav formában NAD+.

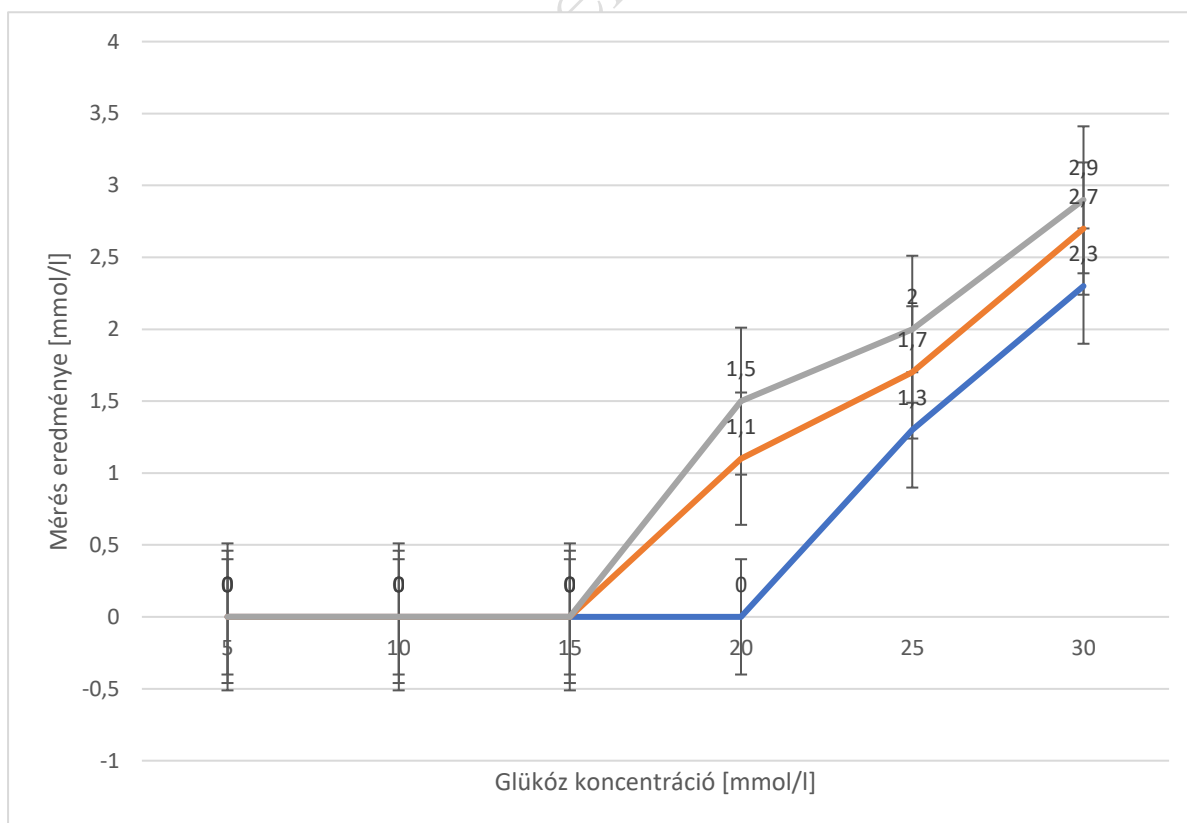
A műszer 1,1 és 27,8 mmol/l között méri a glükózt. A műszer mérésének pontosságát befolyásolja, hogy a tesztsík eredetileg 15-65%-os tartományba eső haematokritszinthez van beállítva. Ebben a tartományban a hibahatár 0,56 mmol/l (10mg/dl) vagy 10%-on belül van. FreeStyle Optium mérőknél a haematokrit tartomány 30-60%. A 30-55% tartományon kívül eső haematokritérték esetén a haematokrit változásából eredő hibahatár 0,56 mmol/l (10mg/dl) vagy 10% feletti lehet. A haematokrit érték a vér sejtjes alkotóinak arányát mutatja a teljes vértérfogathoz képest.

4.2 Kísérletek leírása

A mérésekhez a következő eszközöket használtam: 2 db 200 ml-s tiszta pohár, 500 ml es mérőlombik, FreeStyle Optium vércukorszint mérő, FreeStyle Optium tesztsíkok, tölcsér, desztillált vizes palack, “Orma model bc” típusú táramérleg.

A mérések előkészületeként a vizsgálandó anyagot üvegedényben kimértem, majd betöltöttem az 500 ml-s mérőlombikba. Ezután a lombikot a rajta lévő jelig feltöltöttem desztillált vízzel. Az anyag teljes oldódásáig finoman, körkörösén mozgattam a lombikot. A teljes oldódás után pipettával mintát vettem ki, és a vércukorszint mérőbe helyezett tesztsíkra cseppentettem egy csepp oldatot.

Először egykomponensű glükóz oldatot készítettem, hogy igazoljam, hogy a vércukorszintmérő eszköz alkalmas a nem vérből származó glükóz kimutatására. Ehhez különböző töménységű oldatokat állítottam elő. Az oldatok töménységét a készülék mérési tartományához igazítottam, ez 1,1-27,8 mmol/l között van. Ezzel az volt a célom, hogy lássam, hogy lineárisan növekszik-e a kapott eredmény. A mérést egy 5 mmol/l (0,45 g) koncentrációjú oldattal kezdtem, és 30 mmol/l (2,7 g) töménységig növeltem. A mérések között mindig új glükóz oldatot készítettem. A kapott eredményeket diagramban ábrázolom (15.ábra).

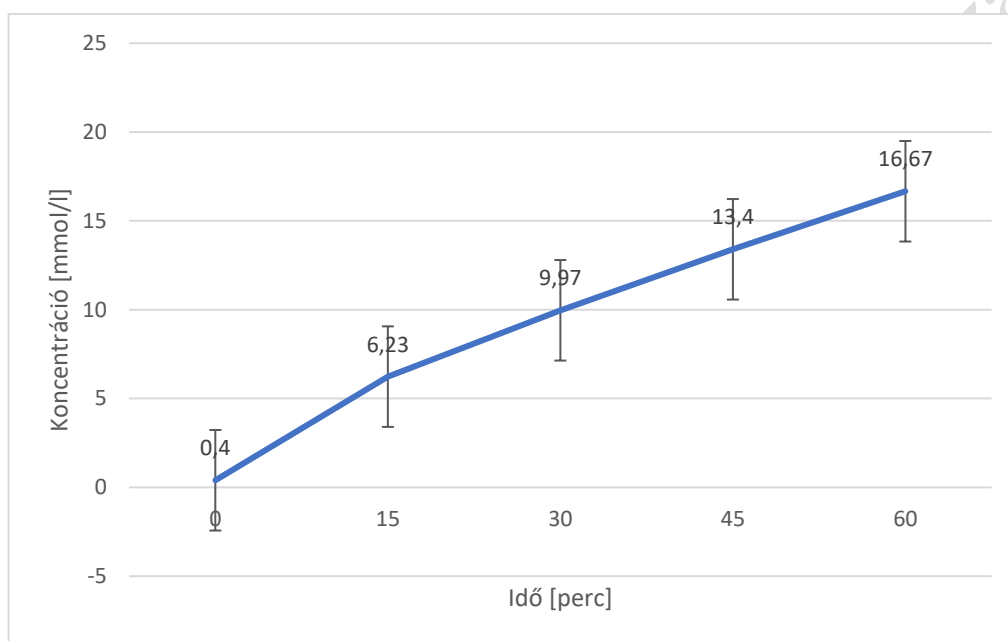


15.ábra: Növekvő koncentrációjú glükóz oldat mérési eredményei

15 mmol/l koncentrációig a vércukorszintmérő eszköz kijelzőjén „LO” és „E-3” hibaüzenet jelent meg, amit akkor mutat a készülék, ha a vércukorszint túl alacsony ahhoz, hogy a rendszer meghatározza. Nagyobb koncentrációnál adott eredmény az eszköz, tehát képes volt a glükóz kimutatására.

Ezután készítettem egy közepesen tömény (17,32 mmol/l – 1,56 g) egykomponensű glükóz oldatot, hogy megnézzem egy óras időtartam alatt változik-e a mérési eredmény.

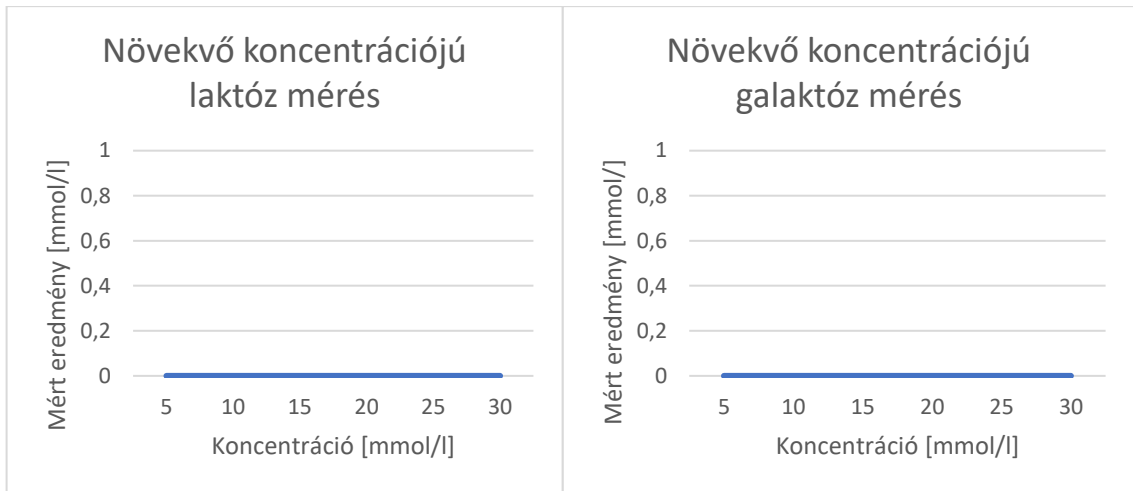
A teljes oldódás után a nulladik percben háromszor mértem, majd negyedóránként mértem megint hármat. A 16. ábrán a mérések átlaga látható.



16. ábra: Azonos koncentrációjú glükóz oldat mérési átlageredményei

Az eszköz folyamatosan emelkedő eredményeket mutatott, és egy óra elteltével közelítette meg a bemért koncentrációt.

Készítettem egykomponensű laktóz és galaktóz oldatokat azért, hogy megnézzem, hogy a vércukorszintmérő eszköz képes-e ezek kimutatására. Ha az eszköz reagál a laktózza vagy a galaktózza, akkor az gondot okoz, mert glükózos oldatban nem fog pontos eredményt mutatni az eszköz. A mérésekhez egy 5 mmol/l koncentrációjú oldatot készítettem külön laktózzal (0,86 g) és külön galaktózzal (0,45 g), majd mindkét anyagnak külön-külön 30 mmol/l töménységig növeltem a koncentrációját. A mérések között mindig új laktóz és galaktóz oldatot készítettem. A laktóz eredményét a 17.ábrán, a galaktóz eredményét a 18. ábrán mutatom.

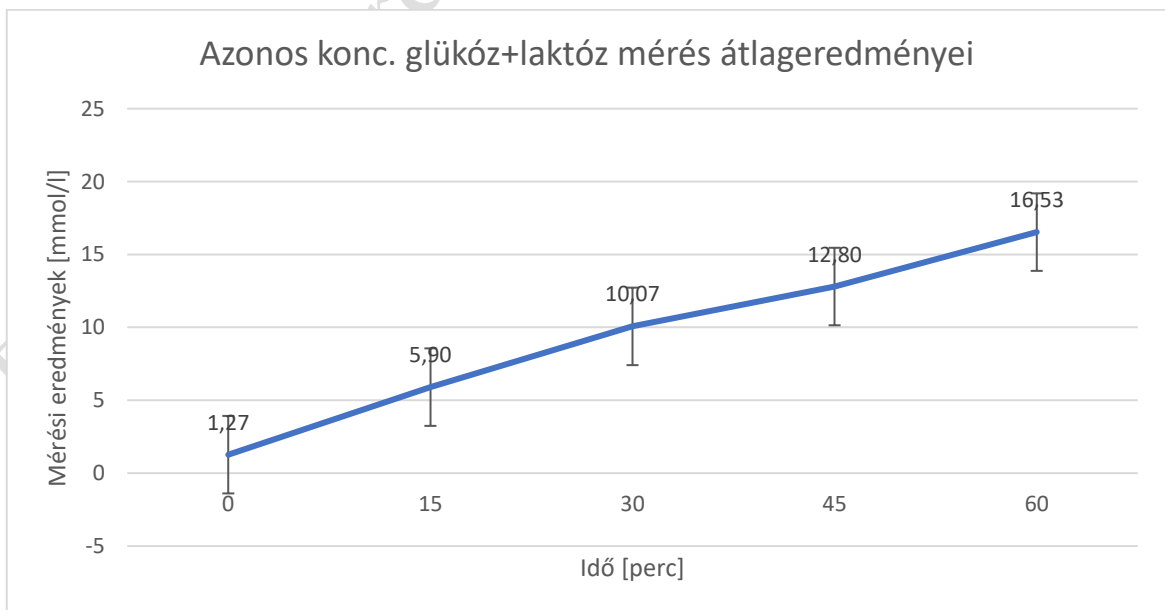


17. ábra: Növekvő koncentrációjú laktóz mérés

18. ábra: Növekvő koncentrációjú galaktóz mérés

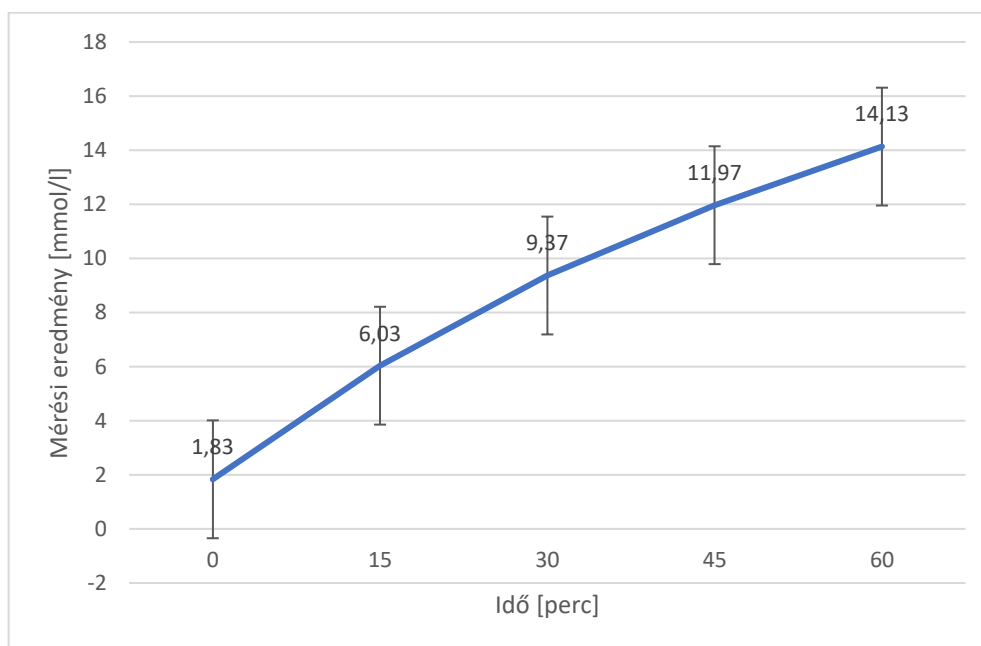
Az eszköz nem mutatta ki sem a laktózt, sem a galaktózt, mert minden koncentrációnál az eszköz kijelzőén „E-3” hibaüzenet jelent meg (az ábrákon az „E-3” = 0), amit akkor mutat a mérőeszköz, ha a vércukorszint túl alacsony ahhoz, hogy a rendszer meghatározza.

Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy többkomponensű oldatokban sem befolyásolja a glükóz eredményeket a laktóz vagy a galaktóz. Ezért elkezdtem többkomponensű oldatokat készíteni. Először glükóz-laktóz oldatot csináltam. 15,2 mmol/l (1,37 g) glükózt és 14,96 mmol/l (2,56 g) laktózt mértem ki és kevertem össze. Egy órán keresztül, negyedóránként háromszori ismétléssel néztem a glükózsintet. A mérési eredményeket a 19. ábrán mutatom. A diagramon a mérések átlaga látható.



19. ábra: Azonos konc. glükóz+laktóz mérés átlageredményei

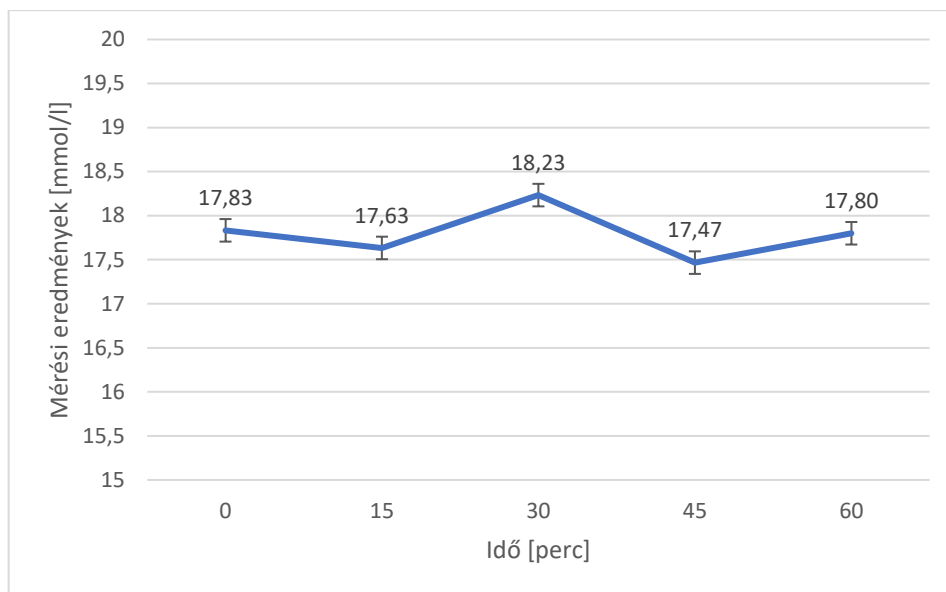
Az eszköz folyamatosan emelkedő eredményeket mutatott, és egy óra elteltével közelítette meg a bemért koncentrációt. A laktóz jelenléte viszont nem befolyásolta a glükóz koncentráció mérését. Galaktóz-glükóz oldatot is készítettem, azért, hogy biztosan kizárhassam, hogy a galaktóz befolyásolná a glükóz mérés eredményét. Kimértem 14,99 mmol/l (1,35 g) glükózt és hozzáadtam 14,99 mmol/l (1,35 g) galaktózt. Ebben az esetben is egy órán keresztül, negyedóránként háromszor mértem a glükózsztintet. A mért eredmények a 20. áran láthatóak.



20.ábra: Azonos konc. glükóz+galaktóz mérés átlageredményei

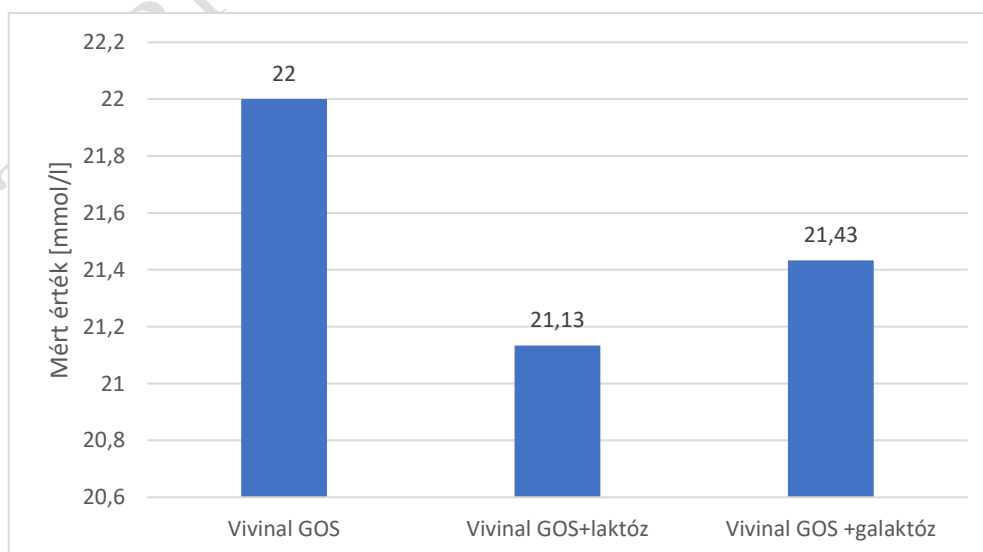
Az eszköz itt is folyamatosan emelkedő eredményeket mutatott, és a hatvanadik percnél közelítette meg a bemért koncentrációt. A galaktóz jelenléte ugyanúgy nem befolyásolta a glükóz koncentráció mérését, mint a laktóz.

Végül GOS tartalmú keveréket mértem, azért, hogy lássam, hogy ebből is kimutatható-e a glükóz. 10,57 mmol/l (6,66 g) glükóz tartalmú Vivinal GOS Syrupot mértem ki. A Vivinal GOS Syrup összetett keverék, a gyártó által meghatározott glükóz tartalomból számoltam a kimért mennyiség értékét. Egy órás időperiódusban mértem, hogy lássam növekszik-e a mért glükóz koncentráció. Az eredményeket a 21. ábrában mutatom.



21. ábra: Azonos konc. Vivinal GOS Syrup mérés átlageredményei

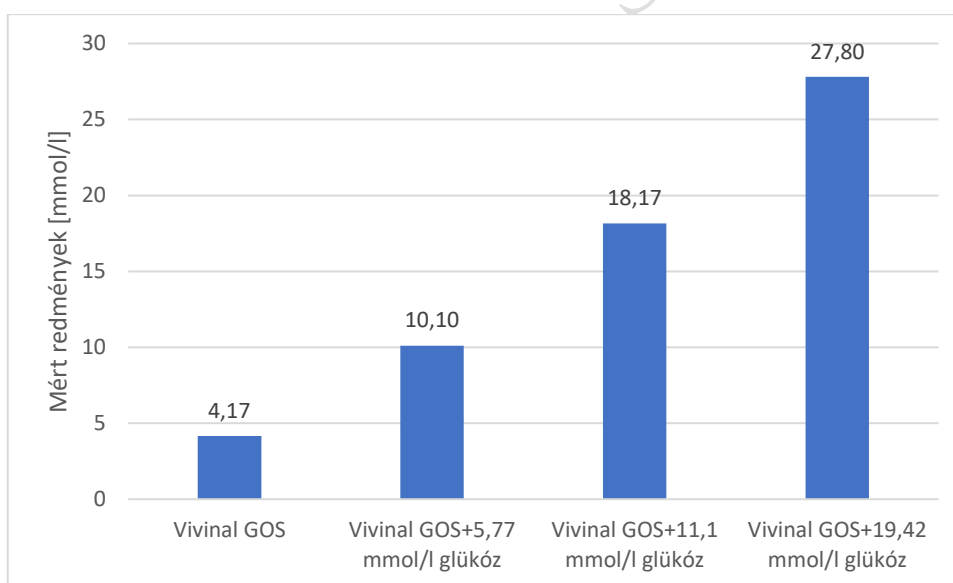
A Vivinal GOS esetében rögtön az oldódás utáni méréseknél magasabb eredményt kaptam, mint a kimért glükóz mennyiségéből várható lett volna, és konstans magasabb maradt az érték az egy órás mérési időszak alatt. Kiugró értékeket nem produkált a mérő. Készítettem egyéb GOS tartalmú oldatokat is, hogy lássam a laktóz és a galaktóz itt sem befolyásolja a mérési eredményeket. Kevertem egy Vivinal GOS-laktóz, majd egy Vivinal GOS-galaktóz oldatot. Csináltam egy 12,62 mmol/l (7,95 g) glükóz tartalmú Vivinal GOS alapoldatot. Három mérést végeztem az alapoldaton, majd ketté osztottam. Az egyik feléhez hozzáadtam 20,45 mmol/l (3,5 g) laktózt, a másik feléhez pedig 19,65 mmol/l (1,77 g) galaktózt. Ezután a laktózos és galaktózos oldatból is három-három mérést végeztem. Az eredmények átlaga a 22. ábrán láthatók.



22. ábra: Vivinal GOS+laktóz+galaktóz mérés átlageredményei

Az alapoldathoz képest sem a laktóz, sem a galaktóz nem emelte meg az eredményeket, így az elmondható, hogy ezek az anyagok nem befolyásolják a vércukorszintmérő eszköz esetében a glükóz mérhetőségét. Arra nem találtam magyarázatot, hogy az eszköz a kimért koncentrációnál jóval magasabb értékeket mutatott.

Ezután készítettem Vivinal GOS oldatot, amihez glükózt adagoltam, azért, hogy lássam, hogy az összetett oldatban a mért eredmények lineárisan lekövetik-e a koncentráció növekedést. Az alapoldathoz kimértem 3,21 mmol/l (2,02 g) glükóz tartalmú Vivinal GOS-t, háromszor lemértem az eszközzel a glükóz koncentrációját. Ezt követően hozzáadtam 5,77 mmol/l (0,52 g) glükózt, így egy 8,97 mmol/l (2,54 g) töménységű oldatot kaptam, és ezzel végeztem három mérést. Ehhez hozzáadtam még 5,33 mmol/l (0,48 g) cukrot. Így már 11,1 mmol/l (1 g) plusz cukor volt az oldatban. A teljes oldat töménysége 14,31 mmol/l lett. Ezzel is végeztem három mérést. Ezután beletettem még 5,11 mmol/l (0,46 g) glükózt. Ezzel 19,42 mmol/l (1,46 g) koncentrációjú oldat keletkezett. Újabb három mérést csináltam. A mérések átlageredménye a 23. ábrán látható.



23. ábra: Vivinal GOS+növekvő koncentrációjú glükózos keverék mérési átlageredményei

Az eszköz az egyre nagyobb koncentrációjú oldatokban egyenesen növekvő glükózt mutatott, de a legtöményebb oldatnál elérte a kalibrációja maximumát.

5. Kísérletek eredménye, tapasztalatok

Az egykomponensű oldatoknál a glükóz oldat estében a vércukorszintmérő eszköz mérhető eredményt adott. Az növekvő koncentrációjú oldatnál a kezdeti koncentrációnál nem mutatott még eredményt. Az eszköz kijelzőjén az „LO” és „E-3” hibaüzenet jelent meg, amit akkor mutat a készülék, ha a vércukorszint túl alacsony ahhoz, hogy a rendszer meghatározza. 15 mmol/l és annál magasabb koncentrációjú oldatnál jelent meg először mérhető érték, de nem a várt eredményt mutatta a gép, viszont az eszköz kimutatta a cukor jelenlétét. Egykomponensű, azonos töménységű glükóz oldatnál az eszköz mérte a glükózt. Egy óra elteltével közelítette meg a bemért glükóz koncentrációt. Az egykomponensű laktóz és galaktóz mérések esetében az eszköz nem mutatott mérhető eredményt, minden mérésnél „E-3” hibaüzenet jelent meg, amit akkor mutat a készülék, ha a vércukorszint túl alacsony ahhoz, hogy a rendszer meghatározza.

A glükózhoz adott laktózból és galaktózból többkomponensű oldatokat készítettem. Ezen oldatoknál minden esetben mérhető volt a glükóz, a hozzáadott többi cukor nem befolyásolta a méréseket.

A galakto-oligoszacharid mérésnél a FrieslandCampina által gyártott Vivinal GOS Syrupot használtam. A GOS mérésénél is különböző keverékeket csináltam. Készítettem tisztán Vivinal GOS oldatot, és laktózzal és galaktózzal kever Vivinal GOS-t. Ezeknél a mérésnél az eszköz kijelezte a glükóz szintet, de mindegyik mérésnél magasabb eredményt adott a vártnál. Kevertem Vivinal GOS-glükózos oldatot, ahol a glükóz koncentrációját egyre növeltem. A mérések eredménye, hogy a koncentrációval megegyező mértékben növekedett a készülék által mutatott glükóz érték.

Tapasztalatom szerint a vércukorszintmérő eszköz egy-, és többkomponensű oldatok esetében a glükózt kimutatta, a laktózt és a galaktózt nem mérte. Összetett szénhidrát keverékekben is alkalmas volt a glükóz koncentráció mérésére, és ezekben az oldatokban sem zavarta az eredményeket a laktóz és a galaktóz.

6. Összefoglalás

A csecsemőtápszerek egyik összetevője a galakto-oligoszacharid, melyről a kutatások során kiderült, hogy nagyon fontos élettani hatása van a fejlődésben lévő szervezetre. Az anyatej oligoszacharidjai elengedhetetlenek az újszülöttkori bélfóra fejlődéséhez. Az anyatej oligoszacharid összetétele annyira bonyolult, hogy még nem tudnak az anyatej-helyettesítő tápszerekhez ezzel megegyező oligoszacharidokat gyártani. Galakto-oligoszacharid előállítás bonyolult, időigényes feladat, amit laktózból állítanak elő enzimes reakcióval. Az előállítás során ipari mérőeszkővel (HPLC) ellenőrzik a termék összetételét, ami szintén időigényes eljárás. A HPLC mérések lassú, drága, de precíz eredményt adnak a gyártás közben keletkező GOS mennyiségéről és minőségéről.

Hipotézisünk, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható vércukorszintmérővel kimutatható a glükóz egyéb szacharidokkal összetett oldatból. Az eljárás kipróbálását indokolja, hogy ezzel a módszerrel gyorsan, olcsón lehetne meghatározni a glükóz koncentrációt a GOS gyártás folyamatában, kiegészítve a precíz HPLC méréseket.

A vércukorszint mérő eszköz glükóz-dehidrogenáz enzim segítségével a glükóz koncentrációval arányos mennyiségű elektront szabadít fel, melyek elektródákkal mérhetőek, ezért kísérleteimhez különböző cukoroldatokat készítettem. Először egykomponensű oldatokat csináltam, hogy bevizsgáljam, hogy az eszköz alkalmas a nem vérből származó cukor mérésére. Végeztem méréseket tisztán glükóz oldattal, laktóz és a galaktóz oldatokkal. A glükóznál mérhető adatokat kaptam, míg a laktóz és a galaktóz esetében az eszköz nem adott értékelhető adatot. Többkomponensű oldatokat is készítettem, hogy lássam a laktóz és a galaktóz valóban nem befolyásolja az eredményeket. Glükózhoz laktózt és galaktózt adtam. Mindkét esetben megfigyelhető volt, hogy a laktóz és a galaktóz jelenléte nem befolyásoló tényező a glükóz koncentráció mérésénél. GOS tartalmú szénhidrát keveréket is mértem. A méréshez Vivinal GOS Syrupot használtam. Először megmértem csak a Vivinal GOS-t. Aztán végeztem mérést a Vivinal GOS-sal, úgy, hogy laktózt és galaktózt adtam hozzá, végül csináltam egy Vivinal GOS glükózos keveréket is. Az eredményekről elmondható, hogy a vércukorszintmérő eszköz mindegyik esetben kimutatta a glükóz jelenlétét. A GOS-hoz adott laktóz és galaktóz nem befolyásolta a mérési eredményeket.

Méréseim során előre kiszámolt és kimért cukor mennyiséggel dolgoztam. Ezért pontosan meg tudtam határozni, hogy egy oldatnak mennyi a glükóz tartalma. A mérőeszközöm csak a glükózra reagált, a többi cukrot nem mutatta ki. Ez azért jó, mert

összetett cukros oldatokból is csak a glükózt mutatja ki. A méréseim során felmerülő leggyakrabban tapasztalt hiba, hogy bár tudtam, hogy mennyi az oldatok glükóz tartalma, ezeket az értékeket nem kaptam meg. Idővel megközelítette, volt, hogy meg is haladta az előre kiszámolt értéket. A vércukorszintmérő eszköz használata egyszerű volt, az eredmények gyorsan megjelentek a kijelzőn, az eszköz alkalmas volt a kísérletek elvégzésére.

Az eddigi tapasztalatok alapján konklúzióként elmondható, hogy a vércukorszintmérő nem vérből származó cukor detektálására alkalmas, de pontos koncentráció meghatározására nem tökéletes. Az eszköz mérési tartománya behatárolja a mérhető koncentráció mennyiségét. Ezért töményebb oldatokat hígításosor használatával lehet mérhetővé tenni.

Irodalomjegyzék

1. Kunz C. (2012): Historical aspects of human milk oligosaccharides. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 3(3), 430S–9S. DOI: <https://doi.org/10.3945/an.111.001776>
2. Boehm, G., Stahl, B. (2007): Oligosaccharides from milk. *The Journal of nutrition*, 137(3 Suppl 2), 847S–9S. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.847S>
3. Boehm, G., Stahl, B., Jelinek, J., Knol, J., Miniello, V., Moro, G. E. (2005): Prebiotic carbohydrates in human milk and formulas. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992). Supplement*, 94(449), 18–21. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2005.tb02149.x>
4. EU (2016): A 609/2013/EU európai parlamenti és tanácsi rendeletnek az anyatej-helyettesítő és az anyatej-kiegészítő tápszerekre vonatkozó különös összetételi és tájékoztatói követelmények, valamint a csecsemők és kisgyermekek táplálásával kapcsolatos információkra vonatkozó követelmények tekintetében való kiegészítéséről
https://eur-lex.europa.eu/legal-content/hu/TXT/?uri=CELEX%3A32016R0127#ntr4-L_2016025HU.01000101-E0004
5. Bodor, A., Dévényi, L., Harmat, V., Hegyi, Gy., Horváth, I., Iván B., Keszei, E., Mika, L., Náray-Szabó, G., Szabó, D., Szepes, L. (2006): Kémia. 3. 3.2: 514-516
6. MAGYAR ÉLELMISZERKÖNYV 3-2-2008/1 számú irányelv (2008): Élelmiszerek összes élelmi rosttartalmának a meghatározása enzimes-gravimetriás módszerrel. https://elelmiszerlanc.kormany.hu/download/1/94/b1000/3-2-2008_1.pdf
7. Morrissey P.A. (1985): Lactose: Chemical and Physicochemical Properties. *Developments in Dairy Chemistry*. 3:1-34. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-009-4950-8_1
8. Kalmár, N. (2018): Fókuszban a tej és a tejtermékek minőségének javítása. *Agraragazat.hu* <https://agraragazat.hu/hir/fokuszb-an-a-tej-es-tejtermek-minosegenek-javitasa/> (Megtekintés dátuma: 2021.04.01)
9. Ly, H. D., Withers, S. G. (1999): Mutagenesis of glycosidases. *Annual review of biochemistry*, 68, 487–522. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.487>

10. Duarte P.M. Torres, Maria do Pilar F. Gonçalves, José A. Teixeira, Lúcia R. Rodrigues (2010): Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9(5): 438-454 DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x>
11. Cao, T.; Pázmándi, M.; Galambos, I.; Kovács, Z. (2020): Continuous Production of Galacto-Oligosaccharides by an Enzyme Membrane Reactor Utilizing Free Enzymes. *Membranes*, 10(9):203.
DOI: <https://doi.org/10.3390/membranes10090203>
12. Idézet 1. BME (2018): Az elválasztástechnika korszerű módszerei <https://www.studocu.com/hu/document/budapesti-muszaki-es-gazdasagtudomanyi-egyetem/az-elvalasztastechnika-korszeru-modszerei/practical/a-toemegspektrometria/3692321/view>
13. Lázár I. (2009): Nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC) [inorg.unideb.hu](http://inorg.unideb.hu/download/kurzusok/public/7/hplc%20gyakorlat.pdf)
<http://inorg.unideb.hu/download/kurzusok/public/7/hplc%20gyakorlat.pdf>
(Megtekintés dátuma: 2021.04.02)
14. Eknoyan, G., Nagy, J. (2005): A history of diabetes mellitus or how a disease of the kidneys evolved into a kidney disease 12(2): 223-229. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2005.01.002>
15. Hönes, J., Müller, P., SurrIDGE, N. (2008): The technology behind glucose meters: Test strips. *Diabetes Technology and Therapeutics*. 10(1). 10-26. DOI: <http://doi.org/10.1089/dia.2008.0005>
16. Amamcharla, J.K., Metzger L. E. (2011): Development of a rapid method for the measurement of lactose in milk using a blood glucose biosensor. *Journal of Dairy Science*. 94 (10): 4800-4809. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4416>
17. West, L. G., Llorente, M. A. (1981). High performance liquid chromatographic determination of lactose in milk. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 64(4), 805–807.
18. Jeon, I. J., Galitzer, S. J., Hennessy, K. J. (1984): Rapid determination of lactose and its hydrolyzates in whey and whey permeate by high performance liquid chromatography. *Journal of Dairy Science*. 67 (4): 884-887. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81382-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81382-X)
19. Lynch, J. M., Barbano, D. M., & Fleming, J. R. (2007): Determination of the lactose content of fluid milk by spectrophotometric enzymatic analysis using weight

- additions and path length adjustment: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 90(1), 196–216.
20. Metzger L. (2013): Rapid measurement of the lactose content of cheese whey and process cheese using a commercially available blood glucose meter https://www.auri.org/wp-content/uploads/2014/01/AIC2010003.milk_meter.pdf
21. Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. (1995): Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401–1412. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
22. FrieslandCampina (2017): Vivinal® GOS Syrup <https://acnfp.food.gov.uk/sites/default/files/gos.pdf> <https://www.frieslandcampinaingredients.com/segment/medical-nutrition/ingredients/vivinal-gos-syrup-2/> (Megtekintési dátum: 2022.04.14)
23. Madelon J. Logtenberg, Kristel MH Donners, Jolien CM Vink, Sander S. van Leeuwen, Pieter de Waard, Paul de Vos és Henk A. Schols (2020): *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68 (29): 7800-7808
DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02684>

Kép források:

- Internet 1. Glükóz szerkezeti képlete α - és β - (gyűrűs) alakban: https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011-0073_sejtbiologia/ch02s02.html
- Internet 2. Galaktóz szerkezeti képlete: https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011-0073_sejtbiologia/ch02s02.html
- Internet 3. Laktóz szerkezeti képlete: https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011-0073_sejtbiologia/ch02s02.html
- Internet 4. Szakaszos enzimatisz átalakítás szénhidrátprofilja: <https://www.mdpi.com/2077-0375/10/9/203#cite>
- Internet 5. Enzimmembránreaktor permeátumának szacharid összetétele: <https://www.mdpi.com/2077-0375/10/9/203#cite>
- Internet 6. Tömegspektrometria sematikus ábrája: <http://tamop412a.ttk.pte.hu/files/kemia7/www/ch09s02.html>

- Internet 7. HPLC sematikus rajza:
<https://sites.google.com/site/folyadekkromatografiacvf0s/hplc-reszei>
- Internet 8. Amperometrikus tesztsík működési elve: <https://www.magyar-elektronika.hu/34-tartalom/tartalom/1326-vercukormer-tervezese>
- Internet 9. Glükóz-oxidáz által katalizált reakció:
https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Proteinbiotech_hu_book/ch14.html
- Internet 10. NAD szerkezeti képe:
<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/193229681100500507>
- Internet 11. GDH-NAD által katalizált reakció
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q6L047>
- Internet 12. FAD szerkezeti képe:
<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/193229681100500507>
- Internet 13. PQQ szerkezeti képe:
<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/193229681100500507>
- galaktóz specifikáció
<https://www.carlroth.com/com/en/monosaccharides/d%28%2B%29-galactose/p/4987.1>