

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**

**Nikola Sakač**

**NOVI POTENCIOMETRIJSKI  
AMILAZNI SENZOR**

**DISERTACIJA**

**ZAGREB, veljača 2011.**

UDK: 543.55 : 664.2 (043)

Znanstveno područje: prirodne znanosti

Znanstveno polje: kemija

Znanstvena grana: analitička kemija

Institucija: Odjel za kemiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Voditelj rada: dr.sc. Milan Sak-Bosnar, izv. prof.

Mentor: dr.sc. Milan Sak-Bosnar, izv. prof. (mentor 1),

dr.sc. Stjepan Milardović, izv. prof. (mentor 2)

Broj stranica: 107

Broj slika: 35

Broj tablica: 16

Broj literaturnih referenci: 122

Datum obrane: 04. veljače 2011.

Sastav povjerenstva za obranu:

dr. sc. Zorana Grabarić, red. prof. PBF-a, Zagreb (predsjednica povjerenstva)

dr. sc. Zoran Mandić, izv. prof. FKIT-a, Zagreb

dr. sc. Sandra Babić, izv. prof. FKIT-a, Zagreb

Rad je pohranjen u: knjižnici Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, Marulićev trg 20; Nacionalnoj i sveučilišnoj biblioteci u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb; Biblioteci Sveučilišta u Rijeci, Dolac 1; Biblioteci Sveučilišta u Splitu, Livanjska 5 i Biblioteci Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu održanoj dana 12. srpnja 2010.

## Sažetak

### Novi potenciometrijski amilazni senzor

Amilaze su važni biološki i industrijski enzimi koji kataliziraju hidrolizu škroba. Nehidrolizirani škrob, čija je količina obrnuto proporcionalna koncentraciji amilaze, stvara kompleks s trijodidom smanjujući pritom početnu koncentraciju trijodida.

Promjena koncentracije trijodidnog iona (koji postoji jedino uz suvišak jodidnih iona) izaziva promjenu vrijednosti omjera redoks-para trijodid/jodid, što prema Nernstovom izrazu uzrokuje promjenu redoks-potencijala redoks-senzora. Ta je promjena u direktnoj korelaciji s koncentracijom  $\alpha$ -amilaze.

U istraživanju je predložen teoretski model odziva platinskog redoks-senzora. Eksperimentalni podaci uspoređeni su s predloženim teoretskim modelom uz odabir i optimiranje parametara senzora i sastava analita.

Senzor je testiran na modelnim i realnim (industrijskim i biološkim) materijalima koji sadrže  $\alpha$ -amilazu. Rezultati su uspoređeni sa standardnom metodom.

**Ključne riječi:**  $\alpha$ -amilaza, potenciometrijski senzor, škrob, trijodid

## Summary

### A new potentiometric amylase sensor

Amylases are important biological and industrial enzymes, which catalyse the hydrolysis of starch. The nonhydrolysed starch, which amount is inversely proportional to the amylase concentration, forms a complex with triiodide reducing accordingly initial triiodide concentration.

The change of triiodide ion concentration (which exists only in excess of iodide ion) causes the change of the triiodide/iodide redox-couple ratio, which results with the changes of the electrode potential of a redox-sensor. These changes are directly correlated with  $\alpha$ -amylase concentration.

Theoretical model for sensor response has been proposed in these investigations. The experimental data were compared with proposed theoretical model in which the sensor response parameters and analyte properties were estimated and optimized.

The sensor was tested on the model and real (industrial and biological)  $\alpha$ -amylase containing materials. The results were compared with the standard methods as well.

**Key words:**  $\alpha$ -amylase, potentiometric sensor, starch, triiodide

Ovaj rad u cijelosti je izrađen na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Iskreno zahvaljujem svom mentoru dr. sc. Milanu Sak-Bosnaru, izv. prof. na dizajniranju istraživanja koja su rezultirala ovim radom, znanstvenom poučavanju, svestranoj pomoći i suradnji u svim fazama izrade disertacije. Također se zahvaljujem svom drugom mentoru dr. sc. Stjepanu Milardoviću, doc.

Zahvaljujem Mariji Horvat na pomoći oko eksperimentalne izrade rada i dr. sc. Dubravki Madunić-Čačić na pomoći oko standardne metode.

Veliko hvala mojim roditeljima, sestrama i prijateljima na podršci, razumijevanju i ustrajnosti.

*uvijek si se razlikovala  
po boji papira svojih pisama*

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. OPĆI DIO</b>	4
2.1. AMILAZE i $\alpha$ -AMILAZA	5
2.1.1. Distribucija $\alpha$ -amilaze	5
2.1.2. Podjela amilaza	6
2.1.3. Biokemijska svojstva $\alpha$ -amilaza	9
2.1.4. Primjena $\alpha$ -amilaze u industriji	10
2.1.5. Analiza u kliničkoj kemiji	11
2.2. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI $\alpha$ -AMILAZE	13
2.2.1. Optičke metode	13
2.2.1.1. Smanjenje intenziteta boje kompleksa trijodid-škrob, amiloklastični postupak	13
2.2.1.2. Porast reducirajućih šećera, saharogenski postupak ili metoda s dinitrosalicilnom kiselinom (DNSA)	15
2.2.1.3. Razgradnja supstrata s vezanom bojom	16
2.2.2. Elektroanalitičke metode	18
2.2.3. Referentne metode	20
2.2.4. Mikrofluidičke instrumentalne metode	22
2.2.4.1. Elektrokemijski senzori	22
2.2.4.2. Optički senzori	23
2.2.5. Ostale metode	25
2.2.6. Komercijalno dostupne metode za određivanje aktivnosti $\alpha$ -amilaze	26
2.2.7. Načini izražavanja aktivnosti $\alpha$ -amilaze	27
2.3. POTENCIOMETRIJSKI SENZORI	28
2.3.1. Potencimetrija	28
2.3.2. Redoks-senzori	30
2.3.3. (Bio)kemijski senzori	32
2.4. OTOPINA KALIJEVOG TRIJODIDA	38
2.5. KOMPLEKS ŠKROB-TRIJODID	40
2.5.1. Škrob	40



2.5.2. Stvaranje kompleksa škrob-trijodid	42
<b>3. METODIKA</b>	48
3.1. Potenciometrijska mjerenja	48
3.1.1. Instrumentacija i elektrodni sustav	48
3.1.2. Reagensi	49
3.1.3. Priprema otopina	50
3.1.4. Postupak	52
3.2. Spektrofotometrijska mjerenja	54
3.2.1. Instrumentacija	54
3.2.2. Reagensi	54
3.2.3. Priprava otopina	54
3.2.4. Postupak	56
3.3. Referentne metode	57
3.4. Programski alati za višeparametarsku analizu	58
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	61
3.1. Optimizacija sustava jodid/trijodid	61
3.1.1. Potenciometrijska mjerenja	62
3.1.1.1. Odgovor platinskog redoks-senzora na trijodidni ion	63
3.1.2. Spektrofotometrijska mjerenja	65
3.2. Priprema kompleksa škrob-trijodid i odabir koncentracije supstrata	67
3.2.1. Potenciometrijsko istraživanje nastajanja kompleksa škrob-trijodid	68
3.2.2. Direktno potenciometrijsko određivanje škroba	74
3.2.2.1. Mehanizam odgovora platinske redoks-elektrode u odnosu na škrob	74
3.2.2.2. Optimizacija upotrebom Solvera	76
3.2.2.3. Karakteristike odziva senzora u odnosu na škrob	77
3.2.2.4. Određivanje škroba upotrebom direktne potenciometrije	79
3.2.3. Spektrofotometrijsko istraživanje	82
3.2.4. Usporedba metode za određivanje škroba direktnom potenciometrijom i spektrofotometrijom	82
3.3. Direktno potenciometrijsko određivanje koncentracije $\alpha$ -amilaze	83

3.3.1. Mehanizam odziva platinskog redoks-senzora u odnosu na $\alpha$ -amilazu	83
3.3.2. Optimizacija analitičkog postupka za direktno potenciometrijsko određivanje koncentracije $\alpha$ -amilaze	85
3.3.3. Određivanje koncentracije/aktivnosti $\alpha$ -amilaze u čistim i industrijskim uzorcima	87
3.3.3.1. Optimizacija upotrebom Solvera	87
3.3.3.2. Čista $\alpha$ -amilaza	89
3.3.3.3. Industrijska $\alpha$ -amilaza	91
3.3.3.4. Usporedba rezultata određivanja $\alpha$ -amilaze dobivenih novim amilaznim redoks-senzorom sa spektrofotometrijskom metodom	95
<b>5. ZAKLJUČCI</b>	97
<b>6. LITERATURA</b>	98
<b>7. ŽIVOTOPIS</b>	106

# **1. UVOD**

## 1. UVOD

Alfa amilaza (EC 3.2.1.1) je enzim koji hidrolizira unutarnje  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze u škrobu, a produkti su glukoza, maltoza i dekstrin. Alfa amilaza nalazi se u biljkama, životinjama i mikroorganizmima. Široko se upotrebljava kod industrijske hidrolize škroba u šećere, u prehrambenoj industriji, pekarstvu, proizvodnji piva, sokova i drugih napitaka. Alfa amilaza ima značajnu ulogu kod industrije detergenata, kao enzim koji u kombinaciji s proteazama čisti zaprljanja. Biološki uzorci, kao što su serum, urin i slina također sadrže alfa amilazu. Visoka aktivnost amilaze u slini u korelaciji je sa stresom i pojavom karijesa.

Kao supstrat za alfa amilazu koristi se škrob. Škrob je jedan od glavnih polisaharida koje biljke koriste kao pričuvenu energije. Sastoji se od amiloze i amilopektina. Trijodidni ion ulazi u njihovu helikalnu strukturu i ispunjava šupljinu, što se manifestira pojavom modre boje kompleksa škrob-trijodid.

Amilolitičku aktivnost teško je odrediti, što se reflektira u raznolikosti analitičkih postupaka koji su poznati do sada. Postoje tri glavna tipa (redosljednom učestalosti citiranja): a) metode koje mjere porast reducirajuće snage (*reducing power*) mjerenjem reducirajućih šećera nastalih hidrolizom supstrata. Postupak se naziva saharogenska metoda, a koristi se metoda s dinitrosalicilnom kiselinom (DNSA) ili Nelson–Somogyi metoda<sup>1</sup>. b) mjerenjem obojenosti preostalog škroba formiranjem kompleksa škrob-trijodid u amiloklastičnoj metodi, koju je razvio Fuwa<sup>2</sup>. Metodom se mjeri smanjenje apsorbancije u otopini kompleksa škrob-trijodid c) upotrebljavaju se i kolorimetrijske metode gdje je boja<sup>3</sup> kovalentno vezana za škrob, a produkt je netopljivi materijal koji se odijeli.

Cilj je ovoga istraživanja razviti novu, brzu, jeftinu i pouzdanu senzorsku metodologiju za kvantificiranje amilaze u biološkim i industrijskim uzorcima upotrebom potenciometrijskih senzorskih principa. Uz neke modifikacije metodologije, postoji mogućnost potencijalne primjene za razvoj senzora za kvantifikaciju škroba i mogućnost utvrđivanja botaničkog podrijetla škroba.

Hipoteza ovog rada bazira se na činjenici da  $\alpha$ -amilaza hidrolizira škrob koji stvara kompleks s trijodidom, koji egzistira samo u velikom suvišku jodidnih iona. Promjena koncentracije

trijodida (proporcionalna je koncentraciji amilaze) izaziva promjenu vrijednosti omjera koncentracija redoks-para trijodid/jodid i uzrokuje promjenu redoks-potencijala redoks-senzora.

## **2. OPĆI DIO**

---

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. AMILAZE i $\alpha$ -AMILAZA

Amilaze su enzimi koji hidroliziraju molekule škroba, dajući pri tom niz produkata, kao što su dekstrini i niži polimeri sastavljeni od glukočnih jedinica<sup>4</sup>. Danas su ti enzimi od velike važnosti u biotehnologiji, a primjena im seže od prehrambene, tekstilne, papirne pa sve do industrije detergenata<sup>5</sup>, sokova i alkoholnih pića. Amilaze se mogu izolirati iz različitih izvora, uključujući biljke, životinje i mikroorganizme, no enzimi izolirani iz mikroorganizama najviše zadovoljavaju zahtjevima industrijske primjene. Danas je na tržištu prisutan velik broj amilaza iz mikroorganizama i skoro su u cijelosti zamijenile kemijsku hidrolizu škroba u industriji prerade škroba<sup>5</sup>.

Povijest amilaze počela je 1811. godine kad je Kirchhoff otkrio prvi enzim koji razgrađuje škrob, proučavanjem probavnih enzima i amilaze u sladu. Puno je kasnije Ohlsson<sup>6</sup>, 1930, predložio klasifikaciju enzima koji hidroliziraju slad na  $\alpha$ - i  $\beta$ -amilaze ovisno o anomernom tipu šećera koji je nastao hidrolizom. Povijest određivanja aktivnosti  $\alpha$ -amilaze i problemi oko njezine detekcije datiraju već od 1831., kada je Leuchs započeo proučavati hidrolizu škroba pomoću sline. Moderna povijest tog enzima započela je 1833. kada su francuski kemičari Anselme Payen i Jean-François Persoz uspjeli izolirati amilazu iz slada, te su je nazvali diastaza.

$\alpha$ -Amilaza (EC 3.2.1.1.) je enzim koji hidrolizira unutarnje  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze u škrobu. Osim kao enzim dobiven iz mikroorganizama,  $\alpha$ -amilaza široko je zastupljen sekrecijski enzim jer se nalazi u slini, gušterači, krvi i urinu.

#### 2.1.1. Distribucija $\alpha$ -amilaze

Amilaze su široko rasprostranjene u biljkama, životinjama i mikroorganizmima. Tijekom nekoliko prošlih desetljeća napravljena su značajna istraživanja vezana za produkciju ekstracelularne  $\alpha$ -amilaze koju proizvode mikroorganizmi<sup>7</sup>. Veliki kapaciteti i laka manipulacija mikroorganizmima do željenih karakteristika enzima, daju veliku prednost mikroorganizmima za proizvodnju amilaza koje imaju veliku primjenu u industriji.

$\alpha$ -amilaze su široko zastupljeni sekrecijski enzimi jer se nalaze u slini i gušterači čovjeka. Njihova prisutnost u krvi i urinu pokazatelj je nekih bolesti.

### 2.1.2. Podjela amilaza

**Tablica 1.** Amilolitički enzimi i njihov način djelovanja na škrob<sup>14</sup>

Ime enzima	Način djelovanja	Napadnute glikozidne veze	Glavni produkti
$\alpha$ -amilaza E.C. 3.2.1.1. <sup>8-10</sup>	Endo	$\alpha$ -D-(1-4)	Smjesa malto-oligosaharida s $\alpha$ -konfiguracijom
$\beta$ -amilaza E.C. 3.2.1.2. <sup>8-10</sup>	Egzo	$\alpha$ -D-(1-4)	$\beta$ -maltoza
$\alpha$ -amilaza E.C. 3.2.1.20. <sup>8-10</sup>	Egzo	$\alpha$ -D-(1-4)	$\alpha$ -glukoza
Glukoamilaza E.C. 3.2.1.3. <sup>8-10</sup>	Egzo	$\alpha$ -D-(1-4) i $\alpha$ -D-(1-6)	$\beta$ -glukoza
Izoamilaza E.C. 3.2.1.68. <sup>8-10</sup>	Endo	$\alpha$ -D-(1-6)	Linearni malto-oligosaharidi do 25 glukoznih jedinica bez bočnih ogranaka
Pululanaza E.C. 3.2.1.41. <sup>8-10</sup>	Endo	$\alpha$ -D-(1-6)	Razni linearni malto-oligosaharidi
Egzo-maltotetrao-hidrolaza E.C. 3.2.1.60. <sup>11,12</sup>	Egzo	$\alpha$ -D-(1-4)	Maltotetraoze
Egzo-maltoheksao-hidrolaza E.C. 3.2.1.98. <sup>12,13</sup>	Egzo	$\alpha$ -D-(1-4)	Maltoheksaoze

Enzimi koji imaju sposobnost hidrolize škroba nazivaju se amilolitički enzimi, a hidroliziraju  $\alpha$ -D-(1-) O-glikozidne veze i  $\alpha$ -D-(1-6) O-glikozidne veze. Amilolitički enzimi su podijeljeni prema svojoj aktivnosti prema škrobu u nekoliko podrazreda<sup>8,9</sup>. Razdioba je napravljena prema konfiguraciji anomernog ugljikovog atoma u produktu (Tablica 1).

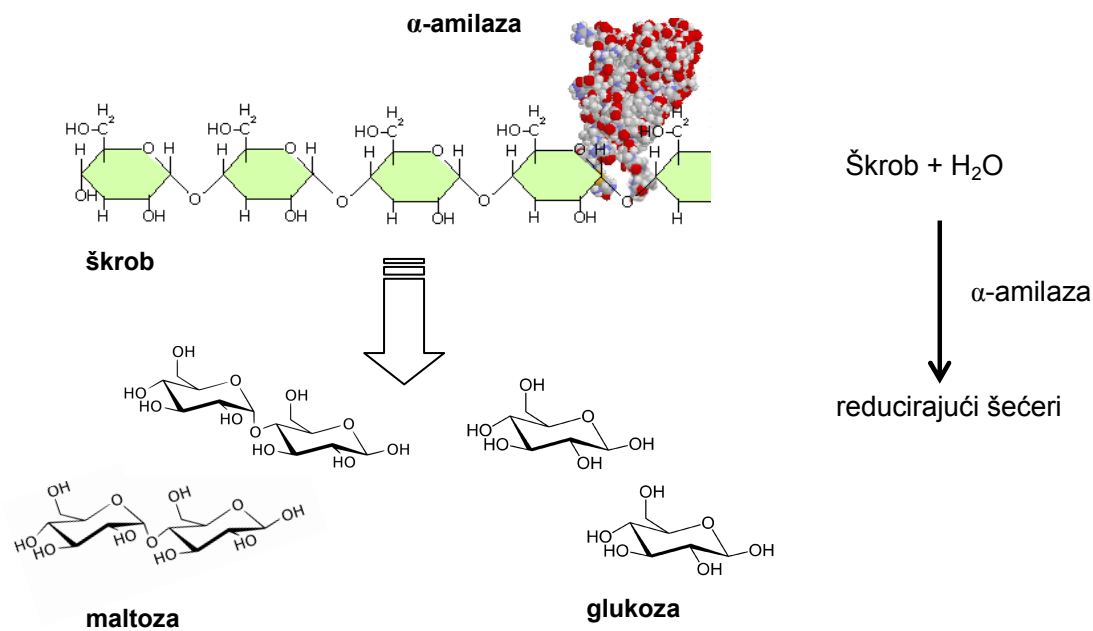
#### *$\alpha$ -amilaza*

$\alpha$ -amilaze su endo-enzimi koji slučajnim odabirom napadaju unutarnje  $\alpha$ -D-(1-) O-glikoidne veze u škrobu, osim onih koje su na kraju supstrata ili onih koje se nalaze u blizini točke grananja. Krajnji produkti su  $\alpha$ -ograničeni dekstrini ( $\alpha$ -limit dextrans), razgranati



saharidi koji se ne mogu više hidrolizirati, i malto-oligosaharidi s različitim stupnjem polimerizacije (DP), karakterističnim za pojedini enzim.

$\alpha$ -amilaze su kalcijevi metaloenzimi i ne mogu funkcionirati u odsutnosti kalcija. Nasumičnim djelovanjem uzduž škrobnog lanca,  $\alpha$ -amilaza kida duge ugljikohidratne lance u maltotriozu i maltozu iz amiloze, ili maltozu, glukozu i dekstrin iz amilopektina (Slika 1).



**Slika 1.** Biokatalitička razgradnja škroba



**Slika 2.** Ljudska  $\alpha$ -amilaza (iz gušterače). Kalcijev ion je vidljiv na dijagramu kao bijela kuglica, dok je kloridni ion zelen.

$\alpha$ -amilaza djeluje brže od  $\beta$ -amilaze jer može djelovati bilo gdje na škrobnom lancu. Kod životinja ona je glavni probavni enzim, a optimalni pH=6,7-7,0.

U ljudskoj fiziologiji postoje amilaze iz gušterače (Slika 2.) i sline (Slika 3.). To su također  $\alpha$ -amilaze.  $\alpha$ -amilaze se nalaze i kod biljaka (ječam), gljiva (rod *Ascomycetes* i *Basidiomycetes*).



**Slika 3.** Slika prikazuje amilaznu molekulu iz ljudske sline. Kalcijev ion je vidljiv na slici kao bijela kuglica, dok je kloridni ion zelen.

### ***$\beta$ -amilaza***

Druga vrsta amilaze je  $\beta$ -amilaza.  $\beta$ -amilazu sintetiziraju bakterije, gljive i biljke.  $\beta$ -amilaza djeluje na nereducirajući kraj škrobnog lanca i katalizira hidrolizu druge  $\alpha$ -1,4 glikozidne veze i odcjepljuje dvije glukoze jedinice (maltoza) odjednom. Prilikom zrenja voća  $\beta$ -amilaza razgrađuje škrob u šećer pa zrelo voće ima slatki okus. Obje amilaze prisutne su u sjemenkama;  $\beta$ -amilaza je prisutna prije klijanja, dok se  $\alpha$ -amilaze i proteaze pojavljuju kad je klijanje već počelo. Amilaza u žitu je ključna za proizvodnju slada. Mnogi mikroorganizmi proizvode amilazu za degradaciju ekstracelularnog šećera. Životinjska tkiva ne sadrže  $\beta$ -amilazu, iako može biti prisutna kod mikroorganizama u probavnom traktu.

### ***$\gamma$ -amilaza (glukoamilaza)***

Pored cijepanja zadnje  $\alpha$ -(1-4) glikozidne veze kod nereduciranog kraja amiloze i amilopektina, proizvedeći glukozu,  $\gamma$ -amilaza cijepa i  $\alpha$ -(1-6) glikozidne veze. Suprotno drugim oblicima amilaza,  $\gamma$ -amilaza je najaktivnija kod niskih pH, optimalno pri pH=3.

---

### 2.1.3. Biokemijska svojstva $\alpha$ -amilaza

#### *Specifični supstrat*

Općenito,  $\alpha$ -amilaze pokazuju najveću specifičnost prema škrobu, pa ga slijede amiloza, amilopektin, ciklodekstrin, glikogen i maltotrioza.

#### *Optimalni pH i stabilnost*

Optimalni pH za  $\alpha$ -amilaze varira od 2-12<sup>15</sup>.  $\alpha$ -amilaze iz većine bakterija i gljiva imaju optimalni pH od kiselog do neutralnog područja.

$\alpha$ -amilaze su općenito stabilne kroz široko područje pH=4-11, međutim nađene su i  $\alpha$ -amilaze koje imaju usko područje stabilnosti<sup>16</sup>.

#### *Temperaturni optimum i stabilnost*

Temperaturni optimum vezan za aktivnost  $\alpha$ -amilaze povezan je s rastom mikroorganizama. Mnogi faktori utječu na termostabilnost. Oni uključuju prisutnost kalcija, supstrata i drugih stabilizatora<sup>15</sup>.

#### *Inhibitori*

Mnogi metalni kationi, posebice ioni teških metala, reagensi sa sulfhidrilnim grupama, N-bromosukcinimidi, p-hidroksil merkuri benzojeva kiselina, BSA, EDTA i EGTA inhibiraju  $\alpha$ -amilazu.

#### *Kalcij i stabilnost $\alpha$ -amilaze*

$\alpha$ -amilaza je metaloenzim, koji sadrži najmanje jedan kalcijev ion<sup>17</sup>. Afinitet  $\text{Ca}^{2+}$  prema  $\alpha$ -amilazi puno je jači od drugih iona. Količina vezanog kalcija varira od jedan do deset. U prisustvu kalcija  $\alpha$ -amilaze su termostabilnije nego bez kalcija.

#### **2.1.4. Primjena $\alpha$ -amilaze u industriji**

Amilaze spadaju u najvažnije hidrolitičke enzime vezane za industriju baziranu na škrobu. Komercijalizacija amilaza započela je 1984. kao farmaceutski pripravak za liječenje probavnih tegoba. Danas amilaze nalaze primjenu za hidrolizu škroba u mnogim industrijskim procesima, kao što su prehrambena, tekstilna, papirna i industrija detergenata. Amilaze su u potpunosti zamijenile kemijsku hidrolizu u procesnoj industriji hidrolize škroba. Danas amilaze zauzimaju najveći dio svjetskog tržišta enzima<sup>18</sup>. Dostupno je nekoliko različitih pripravaka amilaza različitih proizvođača enzima za specifičnu primjenu u različitim industrijama. Opsežan izvještaj o komercijalnim primjenama  $\alpha$ -amilaze dali su Godfrey i West<sup>19</sup>.

##### ***Industrija proizvodnje kruha i peciva i kao dodatak protiv zgušnjavanja***

Amilaze se koriste u pekarstvu. Vrlo često koristi se amilaza iz plijesni, koja izaziva djelomičnu razgradnju škroba. Treba posebno istaknuti skraćivanje vremena pripravljanja tijesta za 30-50% pri upotrebi amilaza. Pekarski proizvodi ostaju duže svježi ako im se dodaju amilaze. Također se upotrebljava pri likvefakciji i saharifikaciji škroba.

##### ***Upotreba amilaza u proizvodnji piva, alkohola i vina***

Pri upotrebi enzima u pivovarskoj industriji proces proizvodnje piva se ubrzava, a konačni proizvod je bistriji i stabilniji.

Za ošećerenje škrobnih sirovina u proizvodnji alkohola svi moderni procesi koriste amilaze. Rezultat njihovog korištenja očituje se i u povećanju iskorištenja sirovine.

##### ***Industrija detergenata***

Enzimi su danas sastavni dio detergenata. Oni čine 25-30% u globalnoj potrošnji enzima<sup>20</sup>. Glavna je prednost primjene enzima ta što su uvjeti za pranje puno blaži i manje

agresivni. Prijašnji su detergentski za automatsko pranje suđa bili jako grubo i hrapavo pa su uzrokovali oštećenja na finom kineskom i drvenom posuđu. Ta činjenica natjerala je industriju detergenata da potraže neka nježnija i učinkovitija rješenja<sup>21</sup>.

Enzimi također dopuštaju snižavanje temperature što donosi značajne uštede u energiji te je ekološki puno prihvatljivije. Nadalje enzimi zamjenjuju kemikalije koje bi štetele okolišu, mogu se dobiti iz obnovljivih izvora, biološki su razgradivi i mogu biti pušteni u prirodu bez štetnih utjecaja na vodenu floru i faunu<sup>22</sup>.

$\alpha$ -amilaze koriste se u praškastim detergentima od 1975. Danas 90% svih tekućih detergenata sadrži  $\alpha$ -amilazu<sup>23</sup> i zahtjevi za  $\alpha$ -amilazom sve više rastu. Jedan od limitirajućih faktora za  $\alpha$ -amilazu u detergentima je osjetljivost enzima na kalcij, pa se stabilnost značajno narušava u okolini s niskim koncentracijama kalcija. Većina divljih tipova  $\alpha$ -amilaze osjetljiva je na oksidans koji se općenito nalaze u svim formulacijama detergenata. Stabilnost prema oksidansima postignuta je upotrebom kombinacija s proteazama. Znanstvenici iz dvaju vodećih dobavljača enzima, Novozymes i Genecore International, genetičkim su inženjerstvom uspjeli poboljšati stabilnost amilaza prilikom izbjeljivanja<sup>24</sup>. Poboljšanom stabilnosti prema oksidaciji poboljšani su uvjeti skladištenja i svojstva mutiranih enzima tijekom izbjeljivanja. Genecore International i Novozyme predstavili su svoje nove proizvode pod zaštićenim robnim imenima Purafect OxAm<sup>®</sup> i Duramyl<sup>®</sup>.

### 2.1.5. Analiza u kliničkoj kemiji

S otkrivanjem novih granica u biotehnologiji, opseg primjene amilaza proširio se na mnoga druga područja kao što su klinička, medicinska i analitičke kemija. U medicinskim i kliničkim područjima postoji nekoliko procesa koji uključuju primjenu amilaza. Opisana je primjena tekućeg stabilnog reagensa baziranog na  $\alpha$ -amilazi za upotrebu u Ciba Corning Express sistemu za kliničku kemiju<sup>25</sup>.

Razvijena je metoda za detekciju viših oligosaharida koja također upotrebljava amilazu<sup>26</sup>. Tvrdi se da je ta metoda učinkovitija od testa srebrovim nitratom. Za procesno praćenje  $\alpha$ -amilaze razvijeni su i biosenzori<sup>27</sup>.

---

$\alpha$ -amilaza se također nalazi u biološkim sustavima, kao što su gušterača, slina i urin, te njezino odsustvo ili visoka aktivnost može ukazivati na neke bolesti. Primjerice visoka koncentracija, odnosno aktivnost  $\alpha$ -amilaze u slini u korelaciji je sa stresom, zatim klinički akutni pankreatitis koji je karakteriziran akutnom abdominalnom boli i povećanom razinom enzima u krvi i/ili urinu. Studije ukazuju da je pankreasna  $\alpha$ -amilaza klinički osjetljiva i dijagnostički učinkovita za dijagnozu akutnog pankreatitisa.

### *Amilaza i stres*

Sredinom prošlog stoljeća, 1935., Salye i McKeown<sup>28</sup> definirali su stres kao odgovor čovjeka na vanjske stimulanse. Tijekom godina pokušavalo se na različite načine izmjeriti količinu stresa, npr. otkucaji srca, krvni tlak, razina hormona itd. Te metode ukazivale su na objektivne probleme prilikom mjerenja, tako da je točnost rezultata bila upitna. Bilo je teško skupiti uzorke neinvazivnim tehnikama u danom trenutku.

Izlučivanje sline, odnosno količine  $\alpha$ -amilaze u slini regulirano je simpatičkim živčano-adrenomedularnim sustavom, koji je pod kontrolom norepinefrina, u žlijezdama slinovnicama. Problematično je mjerenje razine hormona, a mjerenje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze u slini je zapravo u direktnoj korelaciji sa stresom, gdje žlijezde slinovnice djeluju kao pojačalo niske razine norepinefrina. Mjerenjem aktivnosti  $\alpha$ -amilaze u slini zapravo se može kvantitativno odrediti stres i to unutar par minuta. Tu korelaciju dokazali su Yamaguchi<sup>29</sup> i suradnici, 2001, te su i razvili uređaj za sakupljanje sline i jednokratni senzor s automatiziranom metodom za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze u slini.

## 2.2. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI $\alpha$ -AMILAZE

Povijest određivanja aktivnosti  $\alpha$ -amilaze i problemi oko njezine detekcije datiraju već od 1831., kada je Leuchs započeo proučavati hidrolizu škroba pomoću sline. Do 1980. razvijeno je oko 200 metoda za određivanje aktivnosti, a baziraju se na devet različitih principa i na raznovrsnim supstratima.

$\alpha$ -amilaze određuju se biokatalitički, pri čemu se koristi topljivi škrob ili modificirani škrob kao supstrat.  $\alpha$ -amilaza (EC 3.2.1.1.) je enzim koji hidrolizira unutarnje  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze u škrobu, a produkti su glukoza, maltoza i dekstrin. Za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze nekoliko je dostupnih metoda<sup>30</sup>. One se baziraju na smanjenju intenziteta boje kompleksa trijodid-škrob, porastu koncentracije reducirajućih šećera, degradaciji supstrata koji ima kovalentno vezanu boju ili u smanjenju viskoznosti suspenzije škroba. Pregled nekih metoda za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaza prikazan je u Tablici 2.

### 2.2.1. Optičke metode

#### 2.2.1.1. Smanjenje intenziteta boje kompleksa trijodid-škrob, amiloklastični postupak

Škrob s trijodidom formira kompleks izrazito plave boje<sup>31</sup> i s progresivnom hidrolizom škroba ta se boja mijenja u crveno-smeđu. Na tom se svojstvu bazira nekoliko postupaka za kvantitativno određivanje amilaze. Ta metoda određuje dekstrinizirajuću aktivnost (*dextrinising activity*)  $\alpha$ -amilaze smanjenjem intenziteta plave boje<sup>32-34</sup>.

Wohlgemuth<sup>35</sup> je 1908. razvio metodu za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze koja se bazirala na nestanku plave boje kompleksa škroba i trijodida uslijed hidrolize škroba.

Smith i Roe su 1948. adaptirali prijašnju amiloklastičnu metodu za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze. Za to su upotrijebili reakciju škroba s trijodidom pri čemu su koristili kolorimetar koji je odstranio dotadašnja ograničenja pri kojima se završna točka određivala vizualno. Tvrdili su da ova metoda zahtijeva manje vremena od saharogenskih metoda, da je jednostavna i primjenjiva za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze u krvi i urinu. Isti autori su

---

1957.<sup>36</sup> objavili modifikaciju svoje metode, pri čemu su smanjili početne ukupne volumene reaktanata i dobili još bolje rezultate.

### ***Određivanje dekstrinizirajuće aktivnosti***

Za određivanje dekstrinizirajuće aktivnosti  $\alpha$ -amilaze koristi se škrob kao supstrat i nakon inhibiranja reakcije pomoću HCl, doda se otopina trijodida. Smanjenje apsorbancije na 620 nm prati se prema kontrolnom uzorku. Smanjenje apsorbancije za 1% ekvivalentno je jednoj jedinici enzima<sup>2</sup>.

Neki su autori<sup>37,38</sup> uspješno spojili originalne postupke za određivanje aktivnosti s analizom injektiranja u protok (FIA) što je opisano u poglavlju 2.2.4.

### ***Metoda po Sandstedt Kneen i Blishu (SKB)***

SKB metoda<sup>39</sup> najviše se primjenjuje za određivanje amilaza u pekarskoj industriji. Djelotvornost amilaza opisuje se SKB jedinicama. Ta se metoda uglavnom koristi za izražavanje amilolitičke (dijastatičke) djelotvornosti slada, a ne za samo izražavanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze<sup>40</sup>.

### ***Metoda iz Indijske farmakopeje/Japanske farmakopeje***

#### ***Indijska farmakopeja<sup>41</sup>***

Ova metoda, opisana u Indijskoj farmakopeji, upotrebljava se za izračunavanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze i definira se kao gram hidroliziranog škroba po dodanom volumenu enzima. Ovaj postupak uključuje inkubaciju pripremljenih, sistematski razrijeđenih otopina enzima, u puferiranom škrobu (pH=6) kao supstratu u periodu od jednog sata na 40°C. Otopini se doda otopina trijodida. Uzorak koji ne pokazuje plavo obojenje služi za



izračunavanje aktivnosti po gramu hidroliziranog škroba. Ta se metoda koristi za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze kod žitarica.

### *Japanska farmakopeja*<sup>42</sup>

Osušeni škrob dodaje se u otopinu natrijevog hidroksida pri čemu otopina poprima oblik paste. Pasta se otopi u odmjernoj tikvici u acetatnom puferu. Koncentracija škroba u otopini definirana je masom škroba po litri podijeljenoj s molekulskom masom monomernih jedinica (glukoze). Standardna otopina  $\alpha$ -amilaze pripravljena je otapanjem 10 mg biodiastaze 1000 u 500 ml 0.1 M acetatnog pufera (pH=5.0) koja sadrži 6 mM  $\text{CaCl}_2$  i 20 mM NaCl. Dodatak  $\text{CaCl}_2$  i NaCl otopini amilaze stabilizira enzimatsku aktivnost.

#### **2.2.1.2. Porast reducirajućih šećera, saharogenski postupak ili metoda s dinitrosalicilnom kiselinom (DNSA)**

Hidrolizom škroba nastaju šećeri sa reducirajućim krajevima. Njihova se količina može izmjeriti ovom metodom, koristeći neki oksidans.

Ovom se metodom određuje porast reducirajućih šećera kao rezultat amilolitičke aktivnosti na hidrolizu škroba<sup>43</sup>. Glavni je nedostatak ove metode spori nestanak boje i razaranje glukoze pomoću DNSA reagensa.

Sherman, Kendall i Clark<sup>44</sup> su 1910. razvili metodu, za to doba, velike preciznosti, kojom se određuje aktivnost diastaze na bazi saharogenskog postupka i reducirajuće moći. Metoda je prilagodljiva i pogodna za određivanje aktivnosti diastaze u krvnom serumu. Somogyi je 1938. prilagodio tu metodu tako da ju je vremenski skratio na 30 minuta. Metoda se bazira, kao i kod prethodnih autora, na određivanju reducirajućih šećera koji nastaju hidrolizom, s bakrovim spojem u jako kiselom mediju. Dotadašnje metode bazirane na ovom principu imale su nedostatak standardizacije važnih čimbenika kao što su koncentracija  $\text{H}^+$  iona i sadržaj elektrolita, koji izravno utječu na aktivnost diastaze. Čak se i javljao problem u najosnovnijim zahtjevima u uspostavljanju i interpretaciji odnosa između aktivnosti enzima i količine supstrata.

Myers<sup>45</sup> i suradnici 1944. predložili su upotrebu pikrinske kiseline umjesto bakrovih spojeva. Sljedeća prednost je boja koja je stabilna i lako se može mjeriti, a nastaje

---

formiranjem natrijevog pikrata. S tehničkog gledišta metoda je jednostavna i zahtjeva minimum reagenasa, tehničkog iskustva i vremena, a preciznija je od ostalih dotadašnjih metoda.

Teller<sup>46</sup> je 1950. prilagodio metodu za određivanje količine glukoze koju je razvio Nelson 1944. za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze. Nelsonova metoda nije bila pogodna za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze u biološkim uzorcima, no javila se potreba za korištenjem istih reagenasa u laboratorijima, prvenstveno zbog ekonomskih razloga i jednostavnosti. Modificirana metoda bazirala se na smanjenju koncentracije škroba gdje otopina postaje bistra, čime je nestala greška koja je nastajala uslijed nehidroliziranih ostataka škroba koji su izazivali zamućenje i nemogućnost točnog fotometrijskog određivanja.

Glavni je nedostatak ove metode spori nestanak boje i razaranje glukoze pomoću DNSA reagensa. Da bi se prevladala ova ograničenja, razvijena je nova metoda za određivanje reducirajućih šećera<sup>47</sup>. Upotrebljavaju se Rochelle-ove soli (kalijev natrijev tartarat) u koje je dodano 0,05 % natrijevog sulfata da se spriječi oksidacija reagensa. Od tada se modificirana metoda počela intenzivnije koristiti za mjerenje reducirajućih šećera i to bez daljnjih modifikacija u postupku. Za određivanje reducirajućih šećera koriste se i druge metode<sup>48</sup>.

### 2.2.1.3. Razgradnja supstrata s vezanom bojom

Nekoliko su godina različite grupe radile na razvoju nove metode za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze. Poznato je da  $\alpha$ -amilaza ima slabiji afinitet (nekoliko redova veličine) za supstrate manje molekulske mase. Ove metode su bazirane na upotrebi novih tipova supstrata. Primjerice, na škrob se kovalentno vežu plave boje kao što su Remazol brilliant Blue R<sup>49</sup> ili Cibacron Blue F3 G-A<sup>50</sup> kao alternativan supstrat. Sintezu ovih supstrata razvili su Rinderknecht i sur. 1967, a ona uključuje dva glavna koraka. Topljivi škrob se, pomoću boje, oboji u alkalnim uvjetima. Rezultat je boja kovalentno vezana za škrob. Obojeni škrob je zatim umrežen (*cross-linked*) dodatkom 1,4-butandiol diglicidetera. To daje netopljivu mrežu koja bubri u vodi. Enzimatska hidroliza takvog netopljivog derivata škroba daje topljive hidrolizirane ostatke škroba koji nose boju. Ta metoda je jednostavna i osjetljiva za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze, ali čak i minimalne količine glukoze mogu dovesti do

pogrešnih rezultata uslijed onečišćenja škroba dekstrinom<sup>50</sup>. Također je razvijena i brza i osjetljiva mikrometoda za detekciju  $\alpha$ -amilaze temeljena na boji vezanoj za škrob, a koja uspješno može detektirati niske koncentracije enzima, 0-50 ng<sup>51</sup>.

**Tablica 2.** Pregled metoda za određivanje amilolitičke aktivnosti

Metoda	Supstrat	Princip reakcije	Detekcija
<b>Saharogenska metoda</b>			
Fericijanid <sup>53,54</sup>	Prirodni ili topljivi škrob	Alkalni fericijanid(III) reduciran do ferocijanida(II)	Spektrofotometrijska
Nelson-Somogyi <sup>1,55</sup>	Prirodni ili topljivi škrob	Alkalni bakrov(II) ion reducira se do bakrovog(I) iona, boja pomoću arsenomolibdata	Spektrofotometrijska
DNS <sup>43</sup>	Prirodni ili topljivi škrob	Alkalna 3,5-dinitrosalicilna kiselina reducirana do 3-amino-5-nitrosalicilne kiseline	Spektrofotometrijska
CuSO <sub>4</sub> -Bikinolin <sup>56</sup>	Prirodni ili topljivi škrob	Alkalni bakrovi(II) ioni reduciraju se u bakrove(I) ione, boja s 4,4'-dikarboksi-2,2'-bikinolinom	Spektrofotometrijska
<b>Kromogene metode</b>			
Cerealpha <sup>TM 52,57</sup>	BPNG7 <sup>a</sup>	Endo-napad nakon hidrolize glukoamilaze/ $\alpha$ -glukozidaze na p-NP dio, oslobađa se p-NP	Spektrofotometrijska
Betamyl <sup>TM 58</sup>	PNPG5 <sup>b</sup>	Egzo-napad i hidroliza $\alpha$ -glukozidazom na p-NP dio, oslobađa se p-NP	Spektrofotometrijska
Škrob sa vezanom bojom <sup>59</sup>	AZCL-amiloza <sup>c</sup>	Oslobađanje plave boje prilikom hidrolize amiloze	Vizualno ili spektrofotometrijska
<b>Amiloklastične metode</b>			
Jodometrijska <sup>2,60</sup>	Škrob ili amiloza	Hidrolizom kompleksa amiloza-I <sub>3</sub> - (plavo) smanjuje se koncentracija kompleksa i plavo obojenje	Spektrofotometrijska
<b>Viskozimetrija</b>			
Viskozimetrija <sup>10</sup>	Visoka konc. škroba	Smanjenje viskoznosti otopine uslijed hidrolize	

<sup>a</sup> Blokirana p-nitrofenolmaltoheptaoza

<sup>b</sup> p-nitrofenolmaltopentaoza

<sup>c</sup> Azo-boja vezana za amilozu

Kao novi supstrati koriste se i nitrofenilni derivati maltosaharida. Metoda radi na principu mjerenja slobodnih p-nitrofenilnih grupa.

Također je opisana i upotreba nereducirajućeg p-nitrofenil maltoheptozida blokiranog na završetku (BPNG<sub>7</sub>)<sup>52</sup>. Blokirajuća grupa (4,6-O-benziliden) štiti supstrat od hidrolize egzo-djelujućih enzima, pa je stoga specifična za  $\alpha$ -amilazu. Metoda je jednostavna, pouzdana i brza, ali je skupa jer uključuje upotrebu sintetičkih supstrata i specifičnih enzima. Zbog toga je ova metoda ograničena samo na specifične testove, a ne za rutinsku analizu. Napravljena je

usporedba te metode s nekoliko priznatih metoda koji koriste škrob kao supstrat. Reakcija je praćena promjenom boje kompleksa škrob-trijodid<sup>52</sup>. Dobivena je odlična korelacija između svake od provedenih metoda, što dovodi do zaključka da metode daju točne i pouzdane podatke o aktivnosti  $\alpha$ -amilaze. Obje su metode dostupne komercijalno, međutim, nađeno je da  $\alpha$ -amilaze pokazuje manji afinitet prema supstratima manje molekulske mase<sup>49</sup>.

### 2.2.2. Elektroanalitičke metode

Elektrokemijska mjerenja imaju prednost pred ostalima jer su neovisna od utjecaja zamućenosti i obojenosti otopine<sup>62</sup>.

Elektroanalitičke metode za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze većinom se svode na određivanje produkata nastalih razgradnjom supstrata, odnosno škroba ili njegovih derivata do manjih polisaharida ili oligosaharida i glukoze. U osnovi to su zapravo glukozni senzori koji mjere koncentraciju nastale glukoze, koja je u korelaciji s aktivnosti  $\alpha$ -amilaze.

Drugu vrstu čine senzori koji kao supstrat koriste derivatizirani oligosaharid koji nakon amilolitičke hidrolize daje elektroaktivnu komponentu. Elektroda se podesi na potencijal pri kojem derivatizirani oligosaharid nije elektroaktivan, a produkt nastao elektroaktivan hidrolizom je elektroaktivan. Na taj se način može odrediti promjena struje zbog elektrokemijske aktivnosti elektroaktivne komponente i ona je u korelaciji s aktivnosti  $\alpha$ -amilaze<sup>62</sup>.

#### *Amperometrijske metode*

Barabino<sup>63</sup> i sur. su 1978. razvili su amperometrijski biosenzor za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze koji se sastoji od višeslojnog reaktora s imobiliziranim enzimima za glukozu, odnosno nastalog vodikovog peroksida. U slojevima se nalaze imobilizirane glukozna oksidaza, katalaza i glukoamilaza ili maltaza i glukozna oksidaza, a troelektrodni sustav je mjerio količinu nastalog peroksida.

Batchelor<sup>64</sup> i suradnici su 1988. razvili amperometrijsku metodu za određivanje aktivnosti amilaze. Sustav se bazira na enzimatskoj hidrolizi 4-aminofenil oligosaharida kao

---

supstrata, pomoću analita  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze. Produkt reakcije je 4-aminofenol, koji se može mjeriti elektrokemijski, pri potencijalu od +150 mV (prema SCE).

Zou<sup>65</sup> i suradnici su 2008. razvili jednokratnu bioprobnu baziran na ferocenu. Taj sustav koristi škrob kao supstrat i dva enzima, glukoza oksidazu i alfa-glukozidazu, imobilizirane na grafitnu *screen printed* radnu elektrodu.

Zheng<sup>66</sup> i suradnici su 2010., razvili novi jednokratni biosenzor za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze. Princip se bazira na obavijanju glukoza oksidaze i  $\alpha$ -glukozidaze u kompozitni film sol-gel/Nafion. Kao medijator u prijenosu elektrona koristio se 1,1-dimetil-3-(2-amino-1-hidroksietil) ferocen (DMAHFc) koji je bio imobiliziran pomoću Nafiona na *screen printed* elektrodu. Pod optimalnim uvjetima taj je senzor mogao detektirati amilaznu aktivnost u rasponu od of 15-980 IU L<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,9523$ ).

Mahosenaho<sup>67</sup> i suradnicu su 2010. konstruirali jednokratnu tri-enzimsku bioprobnu za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze. Metoda se bazira na količini maltoze koja se oslobodi hidrolizom maltopentoze u prisustvu  $\alpha$ -amilaze. Biosenzor je izrađen koimobilizacijom  $\alpha$ -glukozidaze, glukoza oksidaze i mutarotaze na *screen printed* elektrodi koja je modificirana s Prusko plavim. Mjeriti se može u samo jednoj kapi analita.

### ***Voltametrijske metode***

Gnedenko<sup>68</sup> i sur. su 1997. tvrdili da mogu upotrijebiti cikličku voltametriju na rotirajućoj disk elektrodi (CVA/RDE) za promatranje depolimerizacijskih enzimatskih reakcija u sustavu (ferocen)amilaze kao supstrata i  $\alpha$ -amilaze. Rast granične struje (*limiting current*) kroz vrijeme, u prisutnosti enzima, proporcionalan je količini enzima, odnosno njegovoj aktivnosti. Usporedili su rezultate dobivene ovom CVA/RDE metodom s 3,5-dinitrosalicilnom i Somogyi–Nelson-ovom metodom, pri čemu se ova metoda pokazala boljom, osobito pri malim koncentracijama enzima. Ovaj je postupak i puno jednostavniji.

### 2.2.3. Referentne metode

U ovom radu korištene su dvije referentne metode za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze. To su Konelab Arena 30 referentna metoda na autoanalizatoru i Fuwa metoda koja je detaljno opisana u poglavlju Metodika (3.3).

#### *Autoanalizator Konelab Arena 30*

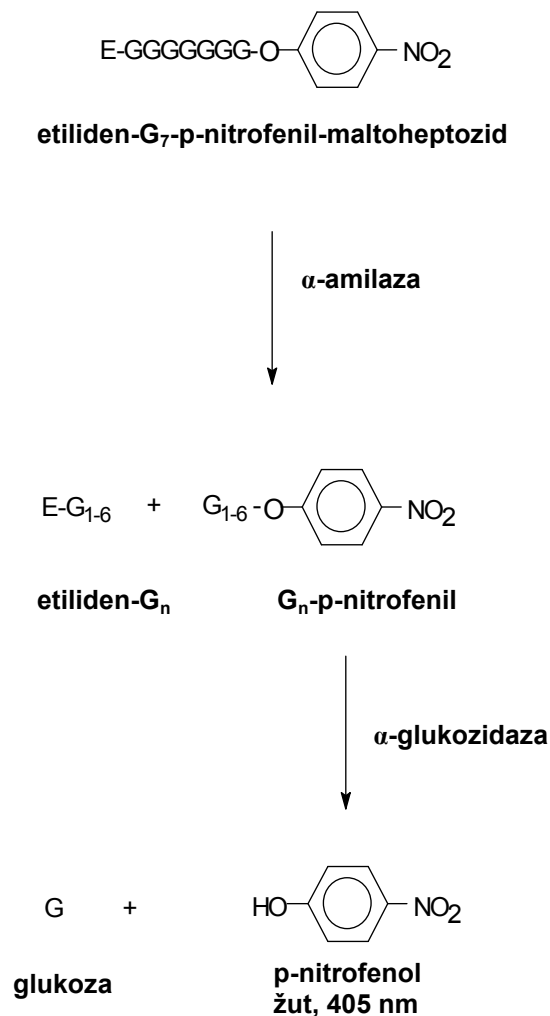
Kao referentna metoda koristi se metoda za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze na analizatoru (Thermo Clinical Labsystems, Konelab Corporation Espoo, Finland, Model Konelab Arena 30) koja koristi 4,6-etiliden-(G<sub>7</sub>)-1,4-nitrofenil-(G<sub>1</sub>)- $\alpha$ ,D-maltoheptozid (etiliden-G<sub>7</sub>PNP) kao supstrat za  $\alpha$ -amilazu. Produkt je žuto obojeni p-nitrofenol i određuje se spektrofotometrijski na 405 nm.

Nastanak p-nitrofenola može se promatrati uređajem Konelab 30. Slika 4. prikazuje tijek reakcije hidrolize etiliden-G<sub>7</sub>PNP-a do p-nitrofenola.

Aktivnost Duramyla mjeri se u KNU(D) (Kilo Novo  $\alpha$ -amylase Units (Duramyl)) prema standardu enzima deklarirane aktivnosti.

Reakcijski uvjeti su:

- pH = 7,15
- temperatura = 37°C
- valna duljina = 405 nm
- reakcijsko vrijeme = 5 min
- vrijeme mjerenja = 2 min



**Slika 4.** Tijek reakcije nastanka p-nitrofenola hidrolizom iz 4,6-etiliden-(G<sub>7</sub>)-1,4-nitrofenil-(G<sub>1</sub>)- $\alpha$ ,D-maltoheptozida (etiliden-G<sub>7</sub>PNP)

*Specifičnost, područje i granica detekcije*

Metoda je specifična za sve enzime koji mogu hidrolizirati etiliden-G<sub>7</sub>PNP. Kalcij stabilizira enzime. Radno područje je u rasponu od 0,015 – 0,045 KNU(D)/ml za konačnu otopinu. Granica detekcije je 0,3 KNU(D) za minimalnu pripremu 1,25 g uzorka u 25 mL.

#### 2.2.4. Mikrofluidičke instrumentalne metode

Analitički postupak s injektiranjem u protok prvi put su opisali Ružička i Hansen 1975. godine<sup>69</sup>. Na samom početku razvoja ove tehnike cilj je bio povećati brzinu određivanja i učinkovitost određivanja serijskom analizom uzoraka. S vremenom su se iskristalizirale i druge ništa manje značajne osobine ove tehnike. Zahvaljujući visokom stupnju automatizacije, moguće je otkloniti subjektivne pogreške analitičara, što utječe na točnost i preciznost određivanja.

Neki su autori<sup>37</sup> uspješno spojili originalne spektrofotometrijske i amperometrijske postupke za određivanje amilaze s analizom injektiranja u protok (FIA) i sekvencijalnom injekcijskom analizom (SIA). Upotreba senzora<sup>70</sup> u protočnim mikrofluidičnim sustavima povećava kvalitetu analitičkih informacija<sup>71</sup>.

##### 2.2.4.1. Elektrokemijski senzori

Jedan od novijih primjera je amilazni biosenzor kojeg su razvili Zajoncova<sup>72</sup> i suradnici, 2004. Radi se o novom biosenzoru ugrađenom u analitiku s injektiranjem u protok. Metoda se bazira na određivanju maltoze, koja nastaje kao produkt hidrolize škroba  $\alpha$ -amilazom. U protočnom sustavu maltozu je moguće mjeriti zahvaljujući upotrebi peroksidne elektrode s enzimskom membranom. Membrana sadrži imobiliziranu glukozu oksidazu,  $\alpha$ -glukozidazu i mutarotazu na celofanu.  $\alpha$ -glukozidaza hidrolizira maltozu do  $\alpha$ -D-glukoze, koju mutarotaza konvertira u  $\beta$ -D-glukozu.  $\beta$ -D-Glukozu određuje se pomoću glukozu oksidaze.

Još jedan biosenzor razvili su Yamaguchi<sup>73</sup> i suradnici, 2002. Standardni biosenzori priređeni su imobiliziranjem enzima na elektrodu (enzimsku elektrodu) i da se mjeri aktivnost ovisna o supstratu. Ovaj biosenzor zapravo koristi obrnuti princip, jer se mjeri aktivnost  $\alpha$ -amilaze koja nije imobilizirana. Kao supstrat koristi se maltopentaoza, a analiza injektiranjem u protok koristi se za neprestano doziranje maltopentaoze u sustav.  $\alpha$ -glukozidaza imobilizirana je na prednju membranu, jer ima nižu enzimatsku aktivnost, a glukozu oksidaza, s višom aktivnosti, imobilizirana je na radnu elektrodu, pa funkcionira kao amperometrijski biosenzor.  $\alpha$ -amilaza hidrolizira supstrat maltopentaozu. Produkti koji nastaju, maltoza i



maltotrioza dalje se hidroliziraju  $\alpha$ -glukozidazom do glukoze, koju glukoza oksidaza oksidira do peroksida koj se mjeri. Ovaj biosenzor razvijen je u svrhu mjerenja aktivnosti  $\alpha$ -amilaze u slini.

Pošto je taj sustav relativno velik i glomazan isti je autor sa suradnicima<sup>74</sup> 2005, konstruirao sličan minijaturizirani senzor na ravnom čipu (*flat-chip*). Radi se o mikroanalitičkom enzimskom senzoru koji radi po principu mikroelektromehaničkih sustava (Micro-Electro-Mechanical Systems, MEMS), a umjesto imobilizirane  $\alpha$ -glukozidaze koristi se maltoza fosforilaza, čime se povećava osjetljivost predložene metode.

Nikolelis<sup>75</sup> i sur. napravili su sustav s injektiranjem u protok za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze, koji uključuje glukozu kao krajnji produkt, te elektrokemijski detektor za kisik s amperometrijskim sustavom od tri elektrode. Ova metoda testirana je na realnim uzorcima kao što su krvni serum i urin. Granica detekcija metode je 0,357 U/ml.

Ohura<sup>71</sup> i sur. 1998. predložili su potenciometrijski sustav s injektiranjem u protok. Sustav je jako osjetljiv i bazira se na upotrebi redoks-reakcije heksacijanoferata(III) sa šećerima koji nastaju kao produkt enzimatske hidrolize škroba  $\alpha$ -amilazom. Heksacijanoferat(III) prelazi u heksacijanoferat(II). Upotrebljava se protočni tip redoks-elektrode. Granica detekcije je  $6,0 \times 10^{-5}$  U/ml.

#### 2.2.4.2. Optički senzori

Protočni se sistemi sastoje od injekcijskog ventila, peristaltičke pumpe, fotometra s protočnom ćelijom i filterom od 570 nm te čitača. Uzorci reagiraju sa škrobom u inkubacijskoj zavojnici prije nego se doda trijodid. Tada se očita apsorbancija na 570 nm. Ta metoda ima mnoge prednosti, uključujući veliku brzinu uzimanja uzoraka, brzi odgovor, prilagodljivost i jednostavnu instrumentaciju.

S obzirom na visoku važnost i zastupljenost određivanja  $\alpha$ -amilaze u dijagnostici i kvaliteti hrane, vrlo je važno da se njezina aktivnost odredi objektivno i visokoselektivno. Upotrebom analize s injektiranjem u protok (FIA), mogu se dobiti realni i točni podaci kontinuirano. Za *on-line* mjerenja<sup>76</sup> enzimatske aktivnosti u praćenju bioprocasa FIA mjerenja su vrlo važna. Recktenwald<sup>77</sup> i sur. predložili su 1985. spektrofotometrijsko *on-line* praćenje

---

enzima u procesima nakon biotehnoške obrade u reaktoru. Pregled upotrebe FIA sustava za određivanje enzima dali su Luque de Castro i Fernandez-Romero<sup>78</sup>.

O'Neil i Gochman<sup>79</sup> su 1970. opisali automatiziranu metodu baziranu na Somogyjevom saharogenskom postupku. Kao instrumentaciju su upotrebili uobičajni autoanalizator. U uzorak, odnosno inkubacijsku smjesu, stavlja se glukoza oksidaza i katalaza koji razlažu nastalu glukozu. Maltoza i ostali reducirajući oligosaharidi koji su nastali amilolitičkom aktivnošću i mogu se dijalizirati, mjere se pomoću reakcije bakra i neokuproina, koju je opisao Bitter<sup>80</sup>. Metoda ima prednosti jer može koristiti male količine škroba, nema interferencija s proteinima i puno je preciznija od do tada razvijenih automatiziranih jodometrijskih metoda, a i značajno je smanjeno vrijeme inkubacije – na 5 minuta.

Hansen<sup>37</sup> je 1984. uklopio spektrofotometrijsku tehniku, baziranu na razgradnji škroba pomoću  $\alpha$ -amilaze i mjerenju ostataka kompleksa škrob-trijodid, u FIA sustav.

Lendl<sup>81</sup> i suradnici (1997.) kombinirali su sustav analize s injektiranjem u protok s FTIR spektroskopijom kao detektorom za simultano određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze. Hidroliza škroba bila je praćena u srednjem IR području, mjerenjem IR-spektra prije i nakon hidrolize. Intenziteti u razlikama u spektru u direktnoj su vezi s aktivnosti enzima.

Min<sup>82</sup> i suradnici predložili su tehniku sekvencijske injekcijske analize (SIA) za mjerenja amilazne aktivnosti. Detekcija se bazira na praćenju gubitka boje kompleksa škrob-trijodid.

Staden i Mulaudzi<sup>83</sup> su 2000. napravili spektrofotometrijski FIA sustav za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze. Detekcija se bazirala na reakciji maltoze i ostalih reducirajućih šećera s dinitrosalicilnom kiselinom, mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 540 nm.

Blanco<sup>84</sup> i sur. su 2000. razvili metodu za praćenje enzimatske hidrolize škroba pomoću NIR spektroskopije. Metoda je namijenjena za praćenje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze i glukoamilaze u industrijskom procesu enzimatske hidrolize škroba za upotrebu u prehrambenoj industriji. Spomenuta metoda koristi NIR spektroskopiju, te je uvedena i višekomponentna umjeravanje za simultano praćenje parametara tijekom hidrolize.

### 2.2.5. Ostale metode

#### ***Metode bazirane na mjerenju smanjenja viskoznosti otopine škroba***

Viskozimetrijska metoda bazira se na mjerenju smanjenja viskoznosti paste škroba uslijed hidrolize diastazom. Ovu metodu razvijali su Davison<sup>85</sup>, Elman i McCaughan<sup>86</sup>. Metoda je brza i jednostavna, međutim, netočna je i ima puno objektivnih pogrešaka.

#### ***Nefelometrijska metoda***

Nefelometrijska<sup>87</sup> metoda temelji se na smanjenju rasipanja svjetla (*light scattering*) supstrata amilopektina uslijed hidrolize. Za to je potreban poseban instrument, standardi i umjeravanje za svaku novu dozu supstrata.

#### ***Viskozimetrija, turbidimetrija i radiometrija***

Viskozimetrija, turbidimetrija i radiometrija<sup>88</sup> predstavljaju metode koje nemaju prevelikog značaja u laboratorijskim analizama. Ove se metode općenito upotrebljavaju u pekarskoj industriji da bi se poboljšala kvaliteta brašna, a ne odredila aktivnost  $\alpha$ -amilaze. Metode su bazirane na određivanju reoloških osobina tijesta. Metode koje spadaju u ovu skupinu su test opadajućih vrijednosti (*falling number test*) i Amiligraf ili Farinograf test. Metoda opadajućih brojeva (FN), međunarodno je standardizirana i prihvaćena za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze u žitaricama u pripravcima brašno-enzim pri 100 °C.

#### ***Metoda bazirana na promjeni mase supstrata***

Caldwell i Hildebrandt<sup>89</sup> su 1935. razvili metodu za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze. Metoda se bazira na direktnom određivanju ostataka škroba kvantitativnim taloženjem u etanolu, pri čemu talog ne sadrži dekstrin i maltozu. Razlika u masi prije i nakon hidrolize je proporcionalna aktivnosti  $\alpha$ -amilaze.

---

### ***Fluorescencijska metoda***<sup>90</sup>

Opisana je metoda koja se temelji na mjerenju smanjenja fluorescencije kompleksa oktaamiloze i 2-p-toluidinilnaftalen-6-sulfonata, koji nastaje uslijed enzimatske degradacije.

Za određivanje katalitičke aktivnosti  $\alpha$ -amilaze koriste se još i elektroforeza<sup>91</sup>, izoelektrično fokusiranje<sup>92</sup>, kromatografija<sup>93</sup> i imunološke metode<sup>94</sup>.

### **2.2.6. Komercijalno dostupne metode za određivanje aktivnosti $\alpha$ -amilaze**

Du Pont *aca*, Automatic Chlinical Analyser, metoda bazirana je na hidrolizi maltopentoze pomoću  $\alpha$ -amilaze i glukozidaze u glukozu, koja se heksokinazom prevodi u glukozu-6-fosfat. Hidrolizat prati redukciju  $\text{NAD}^+$  u NADH. Reakcija se prati spektrofotometrijski na 340 nm<sup>95</sup>.

Konelab metoda koristi se kao referentna metoda u radu i opisana je u odjeljku referentne metode (2.2.3.).

Phadebas<sup>®</sup> test, koristi kromogeni supstrat na bazi škroba. Nakon dodatka Phadebas tablete otopini amilaze i inkubacije, otopina se filtrira te se mjeri apsorbancija na 600 nm. Postoji i test traka kojom se dokazuje postojanje amilaze, odnosno sline na forenzičkim uzorcima što omogućuje DNA analizu (Phadebas Forensic Press test). Također je moguće i mjerenje aktivnosti amilaze u medu.

Ceralpha<sup>®</sup> metoda<sup>52</sup>, predložena 1987., koristi se za određivanje  $\alpha$ -amilaze u žitaricama i mikroorganizmima. Metoda se bazira na upotrebi definiranog supstrata, p-nitrofenol maltoheptazida blokiranog na kraju, u prisustvu dva egzo-enzima,  $\alpha$ -glukozidaze i amiloglukoamilaze. Blokirajuća grupa na nereducirajućem kraju oligosaharida sprečava hidrolizu oligosaharida egzo-enzimima. Kad se doda endo-enzim  $\alpha$ -amilaza, dolazi do hidrolize oligosaharida i oslobađa se p-nitrofenol koji se mjeri spektrofotometrijski.

QuantiChrom<sup>™</sup>  $\alpha$ -Amylase Assay Kit koristi kromogeni supstrat za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze iz krvi, urina, seruma, plazme i drugih bioloških uzoraka. Kromogeni

supstrat amiloza–azure prilikom hidrolize oslobađa plavu boju čiji se intenzitet (apsorbancija) mjeri na 591 nm i u direktnoj je korelaciji s aktivnosti  $\alpha$ -amilaze.

### 2.2.7. Načini izražavanja aktivnosti $\alpha$ -amilaze

**1 KNU** (Kilo Novo Unit) je količina enzima koji razgradi 4870 mg škroba u jednom satu pri standardnim uvjetima, pH=5,6, 37°C i koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$  0,3 mM.

**U (Units)** Jedan Unit (U) oslobodi 1,0 mg maltoze iz škroba u 3 minute pri pH=6,9 na 20°C.

**Katal (KAT)** spada u SI sustav za prikazivanje enzimatske aktivnosti. Katal se definira kao količina enzima koja je potrebna za obradu 1 mola supstrata u jednoj sekundi.  $1\text{U} = 16,67\text{kat}$

**FAU** – fungalne amilazne jedinice (fungal amylase units), 1 FAU količina enzima koji hidrolizira 5.26 g škroba na sat.  $1\text{FAU} = 249,85\text{SIGMA}$

**SIGMA** jedinice – jedna SIGMA jedinica oslobađa 1 mg maltoze iz škroba u 3 minute pri pH=6,9.  $1\text{FAU} = 249,85\text{SIGMA}$ .

**Broj dijastaze (DN)** iskazuje aktivnost dijastaze kao ml 1%-tne otopine škroba što je hidrolizirana enzimom u 1 g meda za jedan sat pri 40°C . Broj dijastaze odgovara broju na Goetheovoj ljestvici. Aktivnost dijastaze  $\text{DN} = \text{ml } 1\%-tne \text{ otopine škroba po g meda/h pri } 40^\circ\text{C}$  .

**Dekstrinizirajuća aktivnost (D.A.)** računa se po sljedećoj relaciji:

$$D.A. = \frac{\text{apsorbancija slijepe probe} - \text{apsorbancija uzorka}}{\text{apsorbancija slijepe probe}} \cdot 100 \quad (1)$$

Jedna jedinica enzimatske aktivnosti definira se kao količina enzima potrebna da izazove smanjenje intenziteta boje kompleksa trijodid–škrob, za 1 %.

**Ceralpha jedinica** – 1 jedinica je definirana kao količina enzima koja je potrebna da se oslobodi 1  $\mu\text{mol}$  p-nitrofenola u jednoj minuti.

---

## 2.3. POTENCIOMETRIJSKI SENZORI

### 2.3.1. Potencimetrija

Elektroanalitička metoda kojom se mjeri razlika potencijala između elektroda elektrokemijskog članka uz ravnotežne uvjete - napon članka mjeri se tako da kroz članak ne teče struja odnosno teče tako mala struja da ona ne utječe na mjerljivo stanje ravnoteže na elektrodama naziva se potencimetrija..

Potencimetrijska se mjerenja uvijek odvijaju u sustavu s dvije elektrode: mjerne elektrode, odnosno indikatorske elektrode i referentne elektrode. Obje elektrode tvore polučlanke. Kad se zajedno stave u neku otopinu daju razliku potencijala. Ovisno o konstrukciji samog polučlanka, nastali potencijal zapravo je zbroj nekoliko zasebnih potencijala. Pretvorbe vezane za određivanje potencijala uvijek se javljaju na kontaktima faza, npr. između otopine i površine elektrode.

*Referentne elektrode:* Idealna referentna elektroda ima potencijal koji je poznat, stalan i potpuno neovisan o sastavu otopine analita. Zbog praktičnosti standardna vodikova elektroda često se zamjenjuje mnogo pogodnijim sekundarnim referentnim elektrodama. Potencijali sekundarnih elektroda pomno su određeni u odnosu na standardnu vodikovu elektrodu kako bi se mogli prevesti u potencijal standardne vodikove elektrode.

Neki od primjera referentnih elektroda su kalomelova i srebro/srebrov klorid elektroda.

*Indikatorska elektroda:* Idealna elektroda daje brz i reproducibilan odziv na promjene koncentracije iona (ili skupine iona) analita. Iako ne postoji indikatorska elektroda koja je potpuno selektivna, na tržištu je dostupno nekoliko selektivnih elektroda. Postoje dvije vrste indikatorskih elektroda: metalne i membranske.

Metalne indikatorske elektrode uglavnom se razvrstavaju kao:

- a) elektrode prvog reda,
- b) elektrode drugog reda
- c) inertne redoks-elektrode.

### Mjerenje potencijala i koncentracija iona

Budući da je svaki ion okružen ionima suprotnog naboja, pojednostavljeno, on više nije tako efektivan kao slobodan ion (po Debye–Hückelovom zakonu). To djeluje na reaktivnost i iznos potencijala na mjernoj indikatorskoj elektrodi. Aktivitet mjerenog iona  $a_M$ , koji se nalazi i u Nernstovom izrazu, povezan je s molarnom koncentracijom  $c_M$  preko koeficijenta aktiviteta  $f_M$ :

$$a_M = c_M \cdot f_M \quad (2)$$

Za razrijeđene otopine s koncentracijom  $c_M < 0.001$  M koeficijent aktiviteta  $f_M$  teži prema 1 i aktivitet iona približno odgovara koncentraciji. Koeficijent  $f_M$  je funkcija ukupne količine aktiviteta elektrolita.

Matematički odnos između aktiviteta,  $a_M$ , iona mjerene otopine i izmjerenog potencijala između referentne i indikatorske elektrode, opisan je Nernstovim izrazom. To se odnosi samo na idealne slučajeve kad elektroda ima odziv samo na jednu vrstu iona. Potencijali  $E_2$  i  $E_3$  koji se pojavljuju kod redoks-elektroda u Nernstovom se izrazu pojavljuju kao  $E_0$ .

$$E = E_0 + \frac{2.303 \cdot RT}{zF} \log a_M \quad (3)$$

gdje je:

$E$  = izmjereni potencijal

$E_0$  = standardni elektrodni potencijal

$R$  = plinska konstanta,  $8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

$T$  = temperatura u K (kelvinima)

$z$  = je naboj iona

$F$  = Faradayeva konstanta =  $96500 \text{ C}$  (kulona)

Izraz ispred logaritma u Nernstovom izrazu naziva se nagib.

$$S = \frac{2.303 \cdot RT}{zF} \quad (4)$$

Pri standardnoj temperaturi ( $T = 298 \text{ K}$ ) i  $z = +1$  njegova je vrijednost  $0.059 \text{ V}$ . On u Nernstovom izrazu, kao faktor, predstavlja teoretski nagib elektrode. S odgovara točno promjeni potencijala uzrokovanoj porastom aktiviteta  $a_M$  za faktor deset. Nernstov je izraz

direktno ovisan o temperaturi. Zbog toga je jako bitno uzeti temperaturu u izračune prilikom mjerenja u direktnoj potenciometriji.

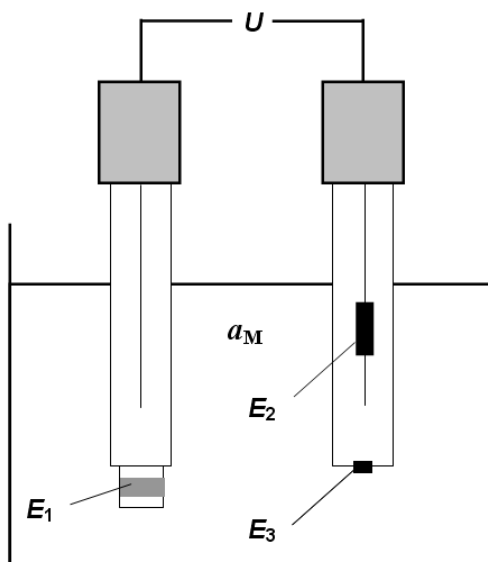
### ***Direktna potenciometrijska mjerenja***

Direktna potenciometrijska mjerenja su brz i pogodan način određivanja aktiviteta brojnih kationa i aniona. Primjenom te tehnike potrebno je izmjeriti samo potencijal indikatorske elektrode uronjene u (1) ispitivanu otopinu i (2) otopinu koja sadrži poznatu koncentraciju analita. Ako je odziv elektrode nespecifičan za analit, kao što se često događa, sastojke uzorka potrebno je prethodno odijeliti. Direktna potenciometrijska analiza može se lako prilagoditi za kontinuirano i automatsko bilježenje analitičkih podataka.

### **2.3.2. Redoks-senzori**

#### ***Inertne metalne elektrode za redoks-sustave***

Metali poput platine, zlata, paladija, ali i nemetal ugljik, pokazuju odziv na redoks-sustave s kojim su u dodiru (Slika 5).



**Slika 5.** Shema redoks-sustava. Metalna elektroda – mjerna indikatorska elektroda (lijevo)  $E_1$ =redoks-potencijal između otopine i metalne površine elektrode. Referentna elektroda – srebro/srebrov klorid (desno)  $E_2$ =Galvanski potencijal referentne elektrode,  $E_3$ =difuzijski potencijal,  $a_M$ =aktivitet mjenjenih iona u otopini.



### **Redoks-potencijal za metalne elektrode**

Na sličan način kao i Nernstov izraz može se prikazati jednadžba za potencijal ovisan o aktivitetu:

$$E = E_0 + \frac{2.303 \cdot RT}{zF} \log \frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}} \quad (5)$$

$E$  = izmjereni potencijal

$E_0$  = standardni elektrodni potencijal

$R$  = plinska konstanta,  $8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

$T$  = temperatura u K (kelvinima)

$z$  = je naboj iona

$F$  = Faradayeva konstanta =  $96500 \text{ C}$  (kulona)

$a_{\text{ox}}$  = aktivitet oksidirane vrste

$a_{\text{red}}$  = aktivitet reducirane vrste

Jednadžba (5) omogućuje izračunavanje potencijala redoks-para na indikatorskoj elektrodi. Većina redoks-reakcija uključuje protone, stoga izmjereni potencijal ovisi o pH vrijednosti. U slučaju da se reakcija sa protonima ne može isključiti, bitno je da se pH odredi ili podesi na određenu vrijednost.

Kod inertnih redoks-elektroda, površina elektrode je inertna na redoks-reakciju. Metalni ioni se ne otpuštaju s površine metala pa metalna površina elektrode koristi samo kao katalizator. Zlato i platina većinom su kemijski inertni pa se upotrebljavaju za mjerenje redoks-potencijala. Dakle, redoks-elektrodama nazivamo one metalne elektrode u kojima metal elektrode sam ne sudjeluje u redoks-reakciji, nego služi samo kao nosač elektrona drugog redoks-para. Njihov je standardni elektrodni potencijal jako pozitivan, uronjene u otopinu poprimaju potencijal koji ovisi samo o svojstvima redoks-sustava u otopini.

---

**Platinske elektrode u enzimatskim reakcijama koriste se na dva načina:**

1. za praćenje oksido-redukcijskih reakcija u otopinama, prateći promjene koje nastaju kao posljedica oksido-redukcijskih promjena u otopini uzrokovanih djelovanjem enzima,
2. platinske elektrode s membranom - konstrukcijom Pt elektrode s membranom dobiva se na selektivnosti elektrode.

**2.3.3. (Bio)kemijski senzori**

(Bio)kemijski senzori su uređaji za pretvorbu kemijske ili biološke veličine u električni signal. Područje primjene kemijskih senzora je raznoliko. Ciljani analiti mogu biti razni kationi ili anioni, zatim plinovi, otrovne organske pare, različiti metaboliti, proteini, mikroorganizmi, itd.

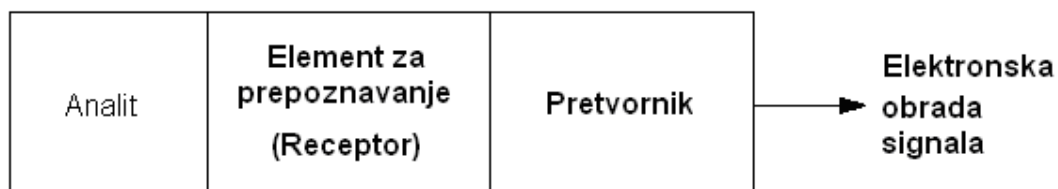
Razvoj i izrada kemijskih senzora trenutno je jedno od najaktivnijih područja analitičkih istraživanja. Elektrokemijski senzori predstavljaju važan podrazred kemijskih senzora, u kojima se elektrode koriste kao pretvornički elementi. Takvi uređaji drže vodeće mjesto među danas dostupnim sensorima, dosegli su komercijalnu upotrebu, i našli svoju važnu primjenu u industriji, poljoprivredi, kliničkoj analitici i analitici zaštite okoliša. Polje senzora je interdisciplinarno i buduće prednosti proizlaze iz povezanosti među različitim disciplinama.

Najrazvijenija grupa senzora su elektrokemijski senzori. S obzirom na elektrokemijsku veličinu koju mjere, dijele se na potenciometrijske (napon), amperometrijske (struja) i konduktometrijske (otpor) senzore. Zajednička karakteristika im je da koriste elektrode na kojima se odvijaju kemijske reakcije ili na njima dolazi do izmjene prijenosa naboja. Ime senzora koje se koristi u praksi često oblikuje veličina koja biva pretvorena u električni signal, i/ili princip konverzije. Tako se npr. kemijski senzori za detekciju plinova u zraku nazivaju plinski senzori, kemijski senzor za detekciju vlage skraćeno se naziva senzor vlage, amperometrijski senzor za određivanje šećera u krvi glukozni senzor, itd.

Kemijski senzori omogućavaju određivanje ciljanog analita u prisutnosti interferirajućih sastojaka. Imaju sposobnost više ili manje selektivnog prepoznavanja analita (Slika 6.). Za selektivno vezanje analita na senzor odgovoran je element za prepoznavanje,

tzv. receptor. Kao posljedica interakcije analita i receptora dolazi do promjene jednog ili više fizikalno-kemijskih parametara. Pretvornik ih prevodi u mjerljiv izlazni signal, koji se može pojačati, obrađivati i prikazivati u pogodnom obliku.

Dobre osobine kemijskog senzora postižu se ispravnim odabirom receptora i pretvornika. Karakteristike senzora određuje njegova selektivnost, osjetljivost, stabilnost i trajnost. Selektivnost pokazuje u kojoj mjeri senzor razlikuje analit od supstanci slične ili različite kemijske strukture i praktično je određena elementom za prepoznavanje (receptorom). Osjetljivost senzora je određena receptorom i pretvornikom i može se povećati, a time i sniziti granica detekcije, uvođenjem dodatnih stupnjeva pojačavanja signala.



**Slika 6.** Shema kemijskog senzora

Kod **potenciometrijskih senzora** pri interakciji analita i receptora dolazi do promjene elektrodnog potencijala receptora u funkciji koncentracije analita. Pretvornik pojačava izlazni naponski signal (pri nultoj struji), obrađuje ga i prikazuje u pogodnom obliku.

### ***Svojstva senzora***

*Točnost:* mjera odstupanja eksperimentalnih rezultata od očekivanih vrijednosti (slaganje između točne prihvaćene referentne i izmjerene vrijednosti), obično mora biti unutar  $\pm 5\%$ .

$$\text{pogreška(\%)} = \frac{\text{dobiveni rezultat} - \text{očekivani rezultat}}{\text{očekivani rezultat}} \cdot 100 \quad (6)$$

*Preciznost:* je stupanj podudaranja više nezavisnih ispitnih rezultata izvedenih iz istoga homogenog uzorka u propisanim uvjetima. Ukoliko nije prisutna sustavna pogreška, rasipanje rezultata posljedica je slučajne pogreške.

*Mjerno područje (radno):* područje unutar kojeg je promjena signala senzora u ovisnosti o promatranom svojstvu analita (koncentracija, topljivost, površinska napetost i sl.) linearna. Interval između minimalne i maksimalne vrijednosti (razine) analita unutar kojeg bi analit bio određen s određenom točnošću i preciznošću.

*Osjetljivost:* je svojstvo metode ili instrumenta da razlikuje uzorke različitih koncentracija analita uz definiranu razinu pouzdanosti odnosno mjera promjene vrijednosti izmjerenog signala senzora po jedinici promjene koncentracije analita.

$$\Delta n = \frac{\Delta S_A}{k} \Rightarrow \text{metoda uk. množine tvari} \quad (7)$$

$$\Delta c_A = \frac{\Delta S_A}{k} \Rightarrow \text{koncentracijska metoda} \quad (8)$$

$k$  – konstanta proporcionalnosti (nagib umjerenog pravca)

$\Delta S_A$  – najmanji mjerljivi inkrement signala

*Selektivnost:* Selektivnost je svojstvo metode da identificira ili kvantificira željeni analit ali se pri tome, za razliku od specifičnih reakcija, moraju ukloniti smetnje koje mogu utjecati na rezultat analize. Selektivnost je najvažnije svojstvo senzora, senzor je selektivan ukoliko je signal samo funkcija koncentracije analita prisutnog u uzorku. Selektivnost ponajviše ovisi o selektivnom elementu (element za prepoznavanje), iako i vrsta pretvornika može pridonijeti većoj selektivnosti senzora. Uz prisutnost interferencija iznos signala je :

$$S_{\text{uzorak}} = S_A + S_I = k_A n_A + k_I n_I \quad (9)$$

ili

$$S_{\text{uzorak}} = S_A + S_I = k_A c_A + k_I c_I \quad (10)$$

$S_{\text{uzorak}}$  – ukupni signal senzora ili metode kao rezultat svih prisutnih konstituenata uzorka

$k_A$  i  $k_I$  – osjetljivosti biosenzora na analit odnosno interferent

$n_A$ ,  $n_I$ ,  $c_A$  i  $c_I$  – množine tvari, odnosno koncentracije analita i interferenta

$$\text{Konstanta selektivnosti: } K_{A,I} = \frac{k_I}{k_A}, \quad (11)$$

gdje je  $K_{A,I} > +1$  slaba selektivnost  
 $K_{A,I} < -1$

ako u jednadžbu (9) odnosno (10) za  $k_I$  uvrstimo

$$k_I = K_{A,I} \cdot k_A \quad (12)$$

dobijemo

$$S_{uzorak} = k_A (n_A + K_{A,I} \cdot n_I) \quad (13)$$

$$S_{uzorak} = k_A (c_A + K_{A,I} \cdot c_I) \quad (14)$$

Koeficijent selektivnosti računa se iz konstanti  $k_I$  i  $k_A$  ili iz gornjih izraza.

*Granica detekcije*: statistička vrijednost kojom se opisuje najmanji iznos analita koji se može pouzdano mjeriti. Prema IUPAC-u (Slika 7) granica detekcije je najmanja koncentracija ili apsolutna količina analita koja je značajno veća od signala koji potječe od slijepe probe. Matematički gledano, signal analita pri granici detekcije može se izraziti:

$$(S_A)_{DL} = S_{reg} + z \sigma_{reg} \quad (15)$$

$(S_A)_{DL}$  – signal analita pri granici detekcije

$S_{reg}$  – signal dobiven mjerenjem slijepe probe

$\sigma_{reg}$  – standardno odstupanje dobiveno mjerenjem slijepe probe

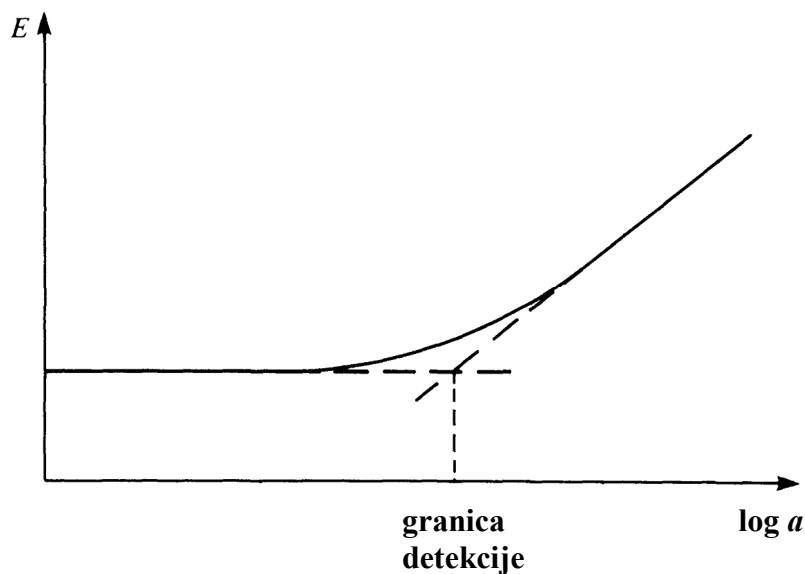
$z$  – faktor koji podrazumijeva željeni interval pouzdanosti (najčešće iznosi 3)

Koncentracija analita ili apsolutna množina tvari analita koja predstavlja granicu detekcije može se izračunati kao:

$$(c_A)_{DI} = \frac{(S_A)_{DL}}{k} \quad \text{ili} \quad (n_A)_{DI} = \frac{(S_A)_{DL}}{k} \quad (16)$$

$(c_A)_{DI}$  = koncentracija analita pri granici detekcije

$(n_A)_{DI}$  = apsolutna množina analita pri granici detekcije



**Slika 7.** Određivanje granice detekcije za ionsko selektivne elektrode po IUPAC-u.

*Vrijeme odziva:* kratko vrijeme odziva

$1\tau$  -vrijeme koje je potrebno da se postigne  $\frac{\sqrt{2}}{2}$  maksimalne vrijednosti koju će pokazati senzor u otopini određene koncentracije nekog analita.

$5\tau$ - vrijeme koje je potrebno da se postigne 95% maksimalne vrijednosti koju će pokazati senzor u otopini određene koncentracije nekog analita.

*Vrsta otopine (elektrolita) u kojoj se provodi mjerenje:* uvjeti kao što su pH, temperatura i ionska jakost utječu na rad samog senzora.

*Relaksacija senzora:* vrijeme koje mora proteći kako bi senzor bio spreman za novo mjerenje, ne smije biti duže od nekoliko minuta.

*Radni vijek (vrijeme trajanja):* obično je određen stabilnošću elementa za prepoznavanje. Za biološke materijale ovo vrijeme može biti vrlo kratko (nekoliko dana), ali je često nekoliko mjeseci ili duže.

---

### ***Elektroanaliza s potenciometrijskim sensorima***

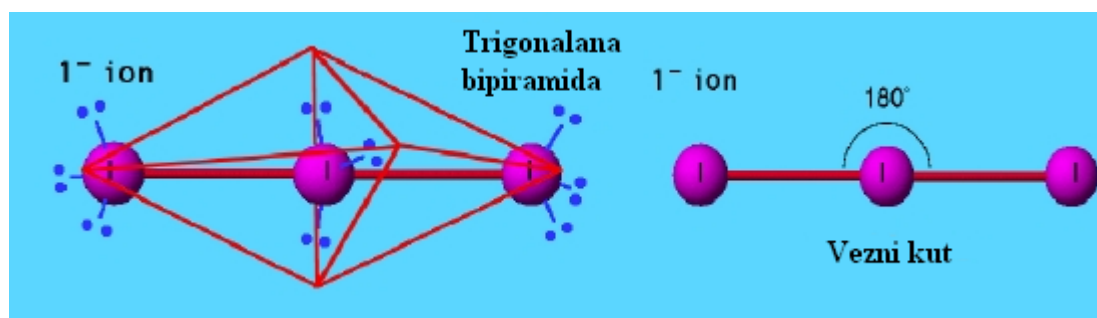
Zahvaljujući svojoj specifičnosti, osjetljivosti i rasponu mjerljivih koncentracija, potenciometrijski senzori, bazirani na ionskoj ili enzimatskoj selektivnosti, imaju širok spektar primjene u analitičkim određivanjima. Drugi potenciometrijski senzori koji koriste elektrode prvog reda ( $M^{n+}|M$ ), upotrebljavaju se u taložnim titracijama. Redoks-elektrode imaju smanjenu primjenu zbog nedostatka selektivnosti jer reagiraju na bilo koju oksidirajuću ili reducirajuću vrstu.

Upotrebom FIA (analiza injektiranjem u protok)<sup>96</sup> sustava s potenciometrijskim sensorima, njihova primjena postaje sve šira i nije ograničena s obzirom na broj uzoraka. Analize postaju sve kraće. U protočnim sustavima mikroprocesori mogu kontrolirati korake eksperimenta i analizu podataka. Također omogućuju i povremenu kalibraciju. Minijaturizacija je općenito omogućila porast upotrebe senzora u analizi prehrambenih proizvoda, biološkoj i kliničkoj analizi.

## 2.4. OTOPINA KALIJEVOG TRIJODIDA

Jod spada u grupu halogenih elemenata, čvrsta je supstanca, tamnosive boje i metalnoga sjaja. Pri zagrijavanju jod sublimira, pri čemu nastaju ljubičaste pare karakterističnog mirisa koje se pri hlađenju odmah kristaliziraju. Jod je kao i svi halogeni elementi veoma reaktivan.

U vodi se jod slabo otapa (0.3350 g I<sub>2</sub> u 1.00 L vode pri 25 °C). Vodena otopina joda je žuto-smeđe boje (dipolne molekule vode polariziraju molekule joda). Topljivost joda u vodi se povećava u prisutnosti jodidnog iona I<sup>-</sup> zbog nastajanja trijodidnog iona I<sub>3</sub><sup>-</sup>, što se primjećuje po promjeni boje iz smeđe u tamnocrvenu. Otopine napravljene otapanjem joda u koncentriranoj otopini jodida zapravo bi trebalo zvati otopine trijodida. Međutim, u praksi se one zovu otopine joda, a naziv se odnosi na njihovo stehiometrijsko ponašanje. Trijodid je poznat i u čvrstom stanju npr. NH<sub>4</sub>I<sub>3</sub><sup>97</sup>.



Slika 8. Struktura trijodidnog iona.

Trijodidni ion ima linearnu strukturu, što ne možemo objasniti po pravilu okteta (Slika 8). Njegova struktura tumači se veličinom jodova atoma i malenim energetska razlikama između p- i d- orbitala O-ljuske, tako jod može u zadnjem energetska nivou imati više valentnih elektrona. To se objašnjava *sp*<sup>3</sup>*d* hibridizacijom centralnog atoma joda, pri čemu njega okružuju tri nepodijeljena elektronska para u ekvatorijalnoj ravnini trigonske bipiramide, a ostali atomi nalaze se na aksijalnim položajima.

Boja joda može se opaziti u otopini koja sadrži oko  $5 \times 10^{-6}$  M I<sub>2</sub>, a to je koncentracija koja odgovara dodatku 0.0500 M otopine (manje od jedne kapi) u 100 mL. Ako je otopina analita bezbojna jod može poslužiti kao sam svoj indikator, no mnogo češće se kao indikator koristi škrob.



---

U vodenom mediju događa se reakcija disproporcioniranja.  $I_2$  disproporcionira, što prikazuje sljedeća ravnotežna reakcija:



Disproporcioniranje se odvija u dva koraka:



Reakcija je zavisna pH, pa  $[H^+]$  utječe na brzinu reakcije. Reakcija je potaknuta u bazičnoj otopini.

---

## 2.5. KOMPLEKS ŠKROB-TRIJODID

### 2.5.1. Škrob

Škrob je ugljikohidrat, polisaharid, izgrađen od ugljika, vodika i kisika u omjeru 6:10:5, opće formule  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Nastaje kao produkt asimilacije u lišću zelenih biljaka te se nagomilava u sjemenkama, plodovima, korijenu i gomoljima biljaka u obliku škrobnih granula koje se koriste kao rezervna hrana tijekom mirovanja, klijanja i rasta biljke. Škrob je fini bijeli prah, neutralan, bez mirisa, okusa po brašnu, netopljiv u hladnoj vodi<sup>98</sup>. Osnovne sirovine iz kojih se u industrijskim razmjerima proizvodi škrob su: kukuruz, krumpir, tapioka, pšenica i riža.

Škrob se u prirodi javlja u obliku granula (zrnaca)<sup>99</sup>. Granula se sastoji od dva polisaharida, amiloze i amilopektina, koji čine 98-99 % suhe tvari<sup>100</sup>. Oba polisaharida su izgrađena od  $\alpha$ -D-glukoze. Amiloza je linearni polisaharid gdje su molekule  $\alpha$ -D-glukoze povezane  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 vezama, dok je amilopektin razgranata molekula u kojoj su molekule osim  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4, povezane i  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 vezama. Oblik i veličina granule te udio amiloze i amilopektina su karakteristični za botaničko porijeklo škroba.

S obzirom na udio amiloze i amilopektina škrobove dijelimo na:

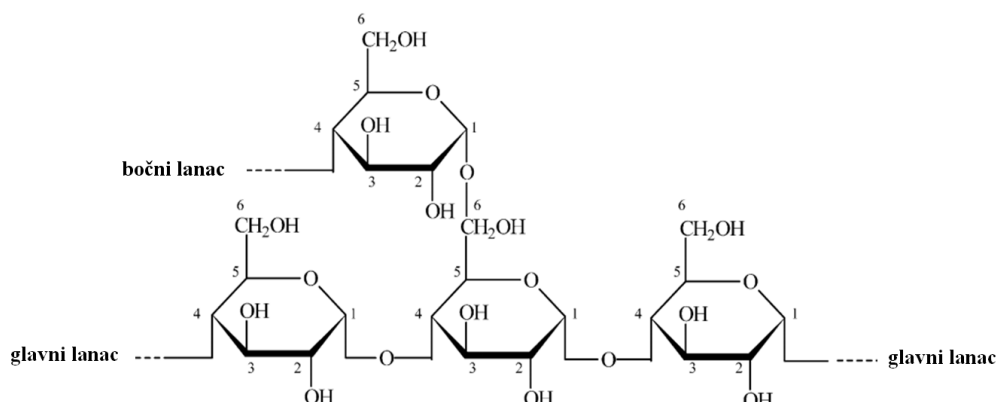
- voštane škrobove (sadrže manje od 15 % amiloze);
- normalne škrobove (sadrže 20-35 % amiloze);
- visoko-amilozne škrobove (sadrže preko 40 % amiloze).

Osim amiloze i amilopektina granula škroba može sadržavati različite proteine, minerale i lipide.

#### *Amilopektin*

Amilopektin je razgranati polimer izgrađen od  $\alpha$ -D-glukoze te jedna od najvećih molekula u prirodi sa molekulskom masom  $10^7$  -  $10^9$ . Molekule glukoze u amilopektinu su povezane  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 glikozidnim vezama u strukturu ravnog lanca te  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 vezama na mjestima

grananja. Sastoji se od nekoliko stotina lanaca gdje svaki lanac ima oko 20 – 25 jedinica  $\alpha$ -D-glukoze<sup>101</sup>.

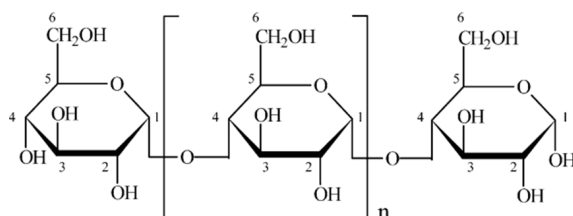


**Slika 9.** Struktura amilopektina

Amilopektin zbog svoje razgranate strukture ne može formirati stabilne komplekse sa jodom, odnosno zbog kratkih bočnih lanaca veže samo manju količina joda (<0,6 %). Amilopektin-jod kompleks ima crveno-smeđu boju ( $\lambda_{\max} \approx 530-540$  nm). Što su bočni lanci amilopektina duži to se  $\lambda_{\max}$  navedenog kompleksa povećava.

### **Amiloza**

Amiloza je gotovo nerazgranata molekula izgrađena kao i amilopektin od jedinica  $\alpha$ -D-glukoze međusobno povezanih  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 glikozidnim vezama. Međutim, molekula amiloze sadrži 9 - 20 bočnih lanaca stupnja polimerizacije između 4 i 100, vezanih na glavni lanac  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 glikozidnim vezama. Stupanj grananja amiloze ovisi o molekularnoj masi i raste sa povećanjem molekulske mase.



**Slika 10.** Struktura amiloze

Molekule amiloze imaju hidrofobnu (lipofilnu) unutrašnjost što im omogućava formiranje kompleksa sa jodom (slika 11). Jod (kao  $I_3^-$ ) stvara komplekse sa amilozom i

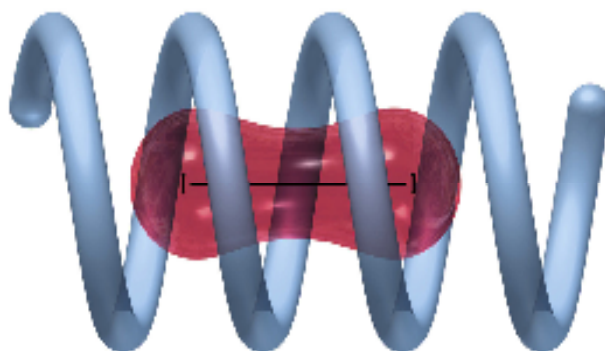
amilopektinom. Amiloza-jod kompleks ima plavu boju što se koristi za određivanje škroba i određivanje količine amiloze u škrobu<sup>102</sup>.

### 2.5.2. Stvaranje kompleksa škrob-trijodid

Reakciju između joda i škroba otkrili su rane 1841. godine Colin i Claubry<sup>103</sup>. Mnogi su se istraživači bavili reakcijom trijodida sa škrobom, pri čemu nastaje škrob-trijodidni kompleks. Unatoč brojnim istraživanjima koja su pokušala objasniti prirodu kromatofora koja apsorbira na 620 nm i daje kompleks škrob-jod, odnosno karakteristično „jodno plavo“ (*iodine`s blue*) duboko plavo obojenje<sup>104</sup>, do danas još uvijek postoje mnoge kontroverze koje se pokušavaju objasniti na različite načine.

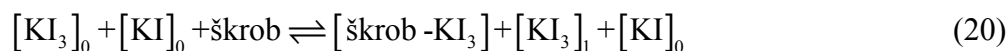
Analiza amiloze X-zrakama pokazuje da su lanci škroba u obliku heliksa spiralno spleteni, tako da unutar njih ima dovoljno mjesta da se smjesti molekula trijodida, pri čemu nastaje kompleks amiloza-trijodid odgovoran za plavu boju kompleksa škrob-trijodid (boja ovisi o vrsti i prirodi škroba<sup>105</sup>).

Amilopektin s jodom stvara crveno obojenje, ali ta reakcija nije dovoljno reverzibilna, te je zbog toga nepoželjna. Stoga topljivi škrob koji se upotrebljava kao indikator sadrži uglavnom amilozu iz koje je odstranjen amilopektin.



**Slika 11.** Prikaz spiralne strukture kompleksa škrob-trijodid.

Jednadžba (20) prikazuje kemijsku reakciju i stvaranje kompleksa škrob-trijodid nakon dodatka škroba u otopinu kalijevog trijodida:



$[\text{KI}_3]_0$  = početna koncentracija kalijevog trijodida

$[\text{KI}]_0$  = početna koncentracija kalijevog jodida

$[\text{škrob-KI}_3]$  = koncentracija kompleksa škrob-trijodid

$[\text{KI}_3]_1$  = koncentracija nevezanog kalijevog trijodida

### ***Struktura i mehanizam vezanja***

Sam škrob se sastoji od razgranatog amilopektina i nerazgranate, linearne amiloze koja je povezana samo  $\alpha(1-4)$  glikozidnim vezama. Samo amiloza stvara plavi kompleks sa jodom, pa je stoga taj kompleks najtočnije nazvati amiloza-jod kompleks.

Godine 1947. Swanson<sup>106</sup> je u četvrtom dijelu svojih *Studija o strukturi polisaharida* dao osobno viđenje, uz eksperimentalne rezultate, o dotadašnjem odnosu između strukture polisaharida i boje koja nastaje dodatkom otopine joda (trijodida). Dokazao je da boja kompleksa ovisi o duljini nerazgranatog polisaharida. Smjesa dvaju različitih polisaharida pokazuje da svaka dodana komponenta dodatno doprinosi jačem efektu konačne boje. Rezultati su također ukazivali na to da lanci dugački od 4-6 glukozičnih jedinica ne stvaraju komplekse sa jodom (trijodidom), odnosno ne pojavljuje se obojenje. Lanci dugački od 8-12 jedinica daju crvenkasto obojenje, a oni od 30-35 jedinica plavo.

Hanes (1937) je predložio izgled kompleksa škrob-jod. Po njemu se kompleks škrob-jod sastoji od linearnog niza atoma joda koji ispunjavaju šupljinu zavojite strukture molekule polisaharida. Tu tezu je kasnije, 1943, analizom difrakcije X-zraka, potvrdio Rundle sa suradnicima. Dokazano je da ta struktura postoji ne samo u kristalnom stanju, već i u otopini<sup>104</sup>.

Usprkos mnogim istraživanjima i rezultatima, do 1960. postoji velika nesigurnost oko samog mehanizma i stehiometrije formiranja kompleksa trijodid-škrob. Većina literaturnih podataka o kompleksu škrob-jod bazira se na vodenim otopinama, gdje većina istraživača

---

smatra da je za stvaranje kompleksa u otopini potreban jodidni ion. On je zapravo začetnik kompleksiranja između joda i amiloze, odnosno škroba<sup>107</sup>.

Hiromi<sup>108</sup> et al. (1970) uvodi termin „amiloza-trijodid kompleks“ koji predstavlja polijodidni lanac sastavljen od trijodidnih iona u spiralnoj strukturi amiloze.

Dobar pregled dotadašnjih istraživanja dali su Banks i Greenwood (1975)<sup>104</sup>. Na temelju istraživanja koja su do tada provedena, a upućivala su na spiralnu strukturu amiloze u molekuli škroba, i na temelju potenciometrijskih titracija amiloze s jodom, došlo se do pretpostavke da unutar heliksa amiloze dolazi do kolinearnog slaganja joda i jodida.

Iako su istraživači<sup>109</sup> relativno nedavno, 1999. godine, postavili sumnju u jodid kao najvažnijem začetniku reakcije stvaranja kompleksa, za to postoje mnogi dokazi. U vodenim otopinama koncentracija jodidnog iona je važan faktor koji određuje koliko se joda veže sa škrobom, te je velik dio količine vezanog joda jodidni ion. Taj se sustav zove kompleks škrob-trijodid.

Mukherjee i Bhattacharyya<sup>110</sup> (1946.) su koristili NaCl da bi izolirali kompleks joda i amiloze iz vodene otopine koja je sadržavala različite koncentracije jodida. Ako koncentracija KI varira od 0,046 do 1,21 M, omjeri između  $I^- / I_2$  raste od 0,41 do 0,470. Niža vrijednost je odgovarala količini od 15 atoma joda po negativnom naboju, a viša je bila bliska omjeru za trijodidni ion.

Potenciometrijska mjerenja koja su izveli Knutson, Cluskey, and Dintzis<sup>111</sup> (1982.) pokazala su da kad se 100 mg amiloze iz pšenice tretira s velikim suviškom otopine  $I_2$  u KI, oko 30 mg ukupnog joda (molekulski jod i jodid zajedno) se veže za škrobni supstrat. Njihova istraživanja upućivala su da je pri 0,2 M KI omjer atoma joda po negativnom naboju 3.3, vrijednosti koja je jako blizu vrsti  $I_3^-$ .

U kompleksu škroba, amiloza tvori helikalnu strukturu s razmakom od 8,0 Å s vanjskim dijametrom od 13.0 Å, 5,0 Å širokom centralnom šupljnom i 6 glukoznih jedinica po okretu. Sama šupljina pruža dovoljno prostora za smještanje atoma joda. Oni se linearno poredaju u polijodidni lanac s prosječnim razmakom od 3,1 Å između  $I-I$ , karakterističnom

udaljenošću koja je uočljiva i kod drugih jodnih kompleksa koji su intenzivno obojeni zbog prisutnosti polijodidnih lanaca. Kasnije su provedena detaljnija istraživanja sa X-zrakama i modelnim izračunima koja ukazuju da je heliks koji formira amiloza-jod kompleks, a naziva se V-amiloza (V-Verkleisterung), vjerojatno lijevog smjera te je stabiliziran međuglukoznim vodikovim vezama<sup>112</sup>. Točna forma smještaja i izgleda tih polijodida istraživana je Raman spektroskopijom<sup>113</sup> i kružnim dikroizmom<sup>114</sup>, Mössbauerovom spektroskopijom<sup>115</sup>, kalorimetrijom i ostalim fizikalnim metodama<sup>116</sup> i teorijama. Dobiveni podatci<sup>117</sup> interpretirani su kao linearni lanac jednako udaljenih atoma joda ( $I_2$ ) i velikih asocijata trijodida ( $I_3^-$ ), pentajodida ( $I_5^-$ ) i viših jodida ili smjesa tih specija prema modelnoj ravnoteži uz pretpostavku o sunazočnosti  $I_3^-$  i  $I_5^-$  substrukture u kompleksu amiloza-jod, a čiji odnos ovisi o eksperimentalnim uvjetima.

### ***Udio vezanog trijodida***

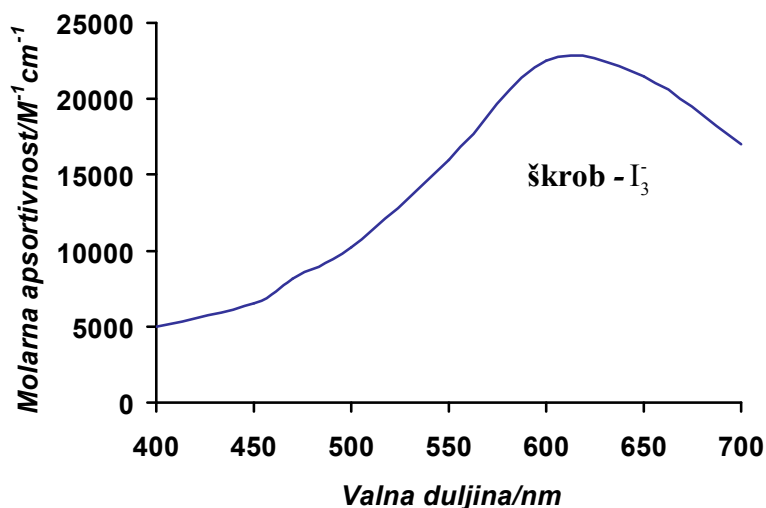
Istraživači su kroz povijest pokušali izračunati udio vezanog joda u kompleksu amiloza-jod. Rezultati variraju od 26 – 33,7 %<sup>118</sup>. Nema objavljenih izračunavanja za maksimalni udio joda u kompleksu, baziranom na duljini linearnog trijodidnog iona,  $I_3^-$ . Može se zaključiti da je takav ion najdominantnija vrsta koja se veže u amiloza-jod kompleks formiran u vodenom mediju uz visoku koncentraciju jodidnog iona,  $I^-$ . Zbroj duljina dvije kovalentne veze u  $I_3^-$  je 5,92 Å<sup>119</sup>. Ako se pretpostavi da je van der Waalsov radijus za svaki od terminalnih atoma u  $I_3^-$  2,15 Å<sup>120</sup>, onda bi duljina trijodidnog iona bila 10,22 Å, a prosječni međuatomski razmak 3,41 Å. Ako se uzme dodatna pretpostavka da negativni naboji u linearnom lancu atoma joda nemaju važan efekt na raspoloživ prostor unutar helikalne strukture amiloze, tad bi maksimalno izračunati maseni udio joda bio oko 30,7 % (w), vrijednost koja nije puno različitija od vrijednosti izračunate na bazi kompleksa koji sadrži samo nenabijene atome joda.

### ***Škrob kao indikator za jod***

Škrob koji s trijodidnim ionom stvara plavi kompleks specifičan je indikator za redoks-reakcije u kojima je jod oksidans ili reducens. No, otopina škroba koja sadrži malu količinu trijodidnog ili jodidnog iona može djelovati i kao pravi redoks-indikator. U

prisutnosti suviška oksidirajućeg reagensa koncentracijski omjer joda i jodida je visok, što otopini daje plavu boju. U suvišku reducirajućeg reagensa prevladava jodidni ion, te nema plave boje. Zbog toga indikatorski sustav mijenja boju tijekom titracije mnogih reducirajućih reagenasa s različitim oksidirajućim reagensima od bezbojnog u plavo. Ta promjena boje je prilično neovisna o kemijskom sastavu reaktanata, a ovisi samo o potencijalu sustava u točki ekvivalencije.<sup>105</sup>

Škrob je vrlo osjetljiv indikator; u idealnim uvjetima on pokazuje prisutnost joda i u koncentracijama manjim od  $2 \times 10^{-7}$  M. Svojstva škroba kao indikatora mogu zavisiti o sastavu otopine analita. Zapaženo je da neophodno mora biti prisutan jodid; ako je njegova koncentracija premala ( $< 4 \times 10^{-4}$  M) smanjuje se intenzitet modre boje. Velika količina joda u otopini smeta promjeni boje, jer nastaje stanovita razgradnja škroba, a razgradni obojeni produkti nemaju reverzibilna svojstva.



**Slika 12.** Molarna apsorbivnost kompleksa škrob-trijodid u ovisnosti o valnoj duljini.

Organski spojevi koji sadrže jod, sumpor i brom apsorbiraju u UV-VIS području jer ti elementi imaju slabo vezane nepodijeljene elektrone koji se lakše pobuđuju od podijeljenih elektrona u zasićenim vezama.

Kompleks škrob-trijodid spada u komplekse s prijenosom naboja što je osobito važno za kvantitativne svrhe, jer dovodi do vrlo visokih vrijednosti molarnih apsorbivnosti ( $\epsilon_{\max} > 10.000$ ), što omogućuje veliku osjetljivost pri određivanju ovog kompleksa spektrofotometrijskim metodama (Slika 12).



### **3. METODIKA**

---

### 3. METODIKA

#### 3.1. POTENCIOMETRIJSKA MJERENJA

##### 3.1.1. Instrumentacija i elektrodni sustav

Za izvođenje potenciometrijskih mjerenja odziva redoks-sustava korišteni su *Metrohm 780 pH metar*, magnetska mješalica *728 Stirrer*, *Metrohm 765 Dosimat* jedinica za doziranje preciznosti 0.001 mL (svi od proizvođača Metrohm, Švicarska), poseban program razvijen za potrebe mjerenja *Metrohm1\_2*, platinska redoks-elektroda *IJ64* (Ionode, Australija). Kao referentna elektroda korištena je srebro/srebrov(I) klorid referentna elektroda (Metrohm, Švicarska).

Za inkubaciju  $\alpha$ -amilaze korišten je termostat (PolyScience Thermostat, SAD). Za direktna potenciometrijska mjerenja upotrebljavali su se 4-kanalno pH/mV pojačalo *eDAQ 168 Quad Amp pH/mV*, *eDAQ e-corder 821* 8-kanalni uređaj za akviziciju (obradu) podataka (svi od proizvođača eDAQ, Australija), *IJ64* platinska redoks-elektroda (Ionode, Australija) i srebro/srebrov(I) klorid referentna elektroda (Metrohm, Švicarska).

---

### 3.1.2. Reagensi

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

- $\alpha$ -amilaza (EC 3.2.1.1) iz mikroorganizma *Aspergillus oryzae* (Fluka, Švicarska), aktivnost 36 U/mg
- granulirana industrijska  $\alpha$ -amilaza Duramyl 120 T (Novozymes A/S, Danska), aktivnost 120 KNU/g
- enzimski kogranulat  $\alpha$ -amilaze i proteaze Everlase/Duramyl 8.0 T/60 T (Novozymes A/S, Danska), aktivnost 66 KNU/g
- topljivi škrob,  $(C_6H_{10}O_5)_n$  p.a. (Kemika, Hrvatska)
- kalijev jodid, KI p.a. (Sigma-Aldrich, SAD)
- jod,  $I_2$  p.a. (Kemika, Hrvatska)
- natrijev acetat trihidrat,  $CH_3COONa \times 3H_2O$  p.a. (J. T. Baker, Nizozemska)
- ledena octena kiselina,  $CH_3COOH$  (Panreac, Španjolska)
- natrijev klorid, NaCl p.a. (Sigma-Aldrich, SAD)
- kalcijev klorid,  $CaCl_2$  p.a. (Kemika, Hrvatska)
- deionizirana voda

### 3.1.3. Priprema otopina

#### *Priprema otopine škroba*

Početna koncentracija škroba bila je 5 g/L. Otopina je pripremljena dodavanjem 0,5 g suhog škroba otopini acetatnog pufera, 0,1 M, pH=6,0, u odmjernu tikvicu od 100 mL. Nakon zagrijavanja i intenzivnog mješanja otopine, 10 minuta na 80°C, otopina se ohladi na sobnu temperaturu, tikvica se nadopuni deioniziranom vodom do 100 ml, te je spremna za daljnju uporabu. Na isti su način pripremljene otopine škroba koncentracija 2 i 3 g/L.

Svaki dan priprema se svježa otopina škroba, zbog retrogradacije škroba s vremenom i razvoja mikroorganizama u otopini.

#### *Priprema standardne otopine $\alpha$ -amilaze*

Standardna otopina  $\alpha$ -amilaze 10 mg/L pripremljena je u odmjernoj tikvici od 500 mL otapanjem 5 mg  $\alpha$ -amilaze (Fluka, Švicarska, 0.36 U/mL) u acetatnom puferu, 0,1M, pH=6,0, u kojem je otopljeno i 6 mM CaCl<sub>2</sub> i 20 mM NaCl. Dodatak CaCl<sub>2</sub> i NaCl otopini amilaze stabilizira enzim. Ovako pripremljenu otopinu  $\alpha$ -amilaze treba držati u hladnjaku. Zbog samorazlaganja dolazi do smanjenja aktivnosti amilaze, pa ju je najbolje upotrijebiti unutar 3 dana od pripreme (aktivnost joj se smanjuje oko 3 % unutar 3 dana)<sup>71</sup>.

#### *Priprema otopina industrijske $\alpha$ -amilaze*

##### *Priprema otopine granulirane industrijske $\alpha$ -amilaze Duramyl 120 T*

Otopina se priprema na isti način kao i standardna otopina  $\alpha$ -amilaze uz prilagođenu odvagu uzorka  $\alpha$ -amilaze. Koncentracija granulirane industrijske  $\alpha$ -amilaze Duramyl 120 T je 100 mg/L.

---

*Priprema otopine enzimskog kogradulata  $\alpha$ -amilaze i proteaze Everlase/Duramyl 8,0 T/60 T*

Otopina se priprema na isti način kao i standardna otopina  $\alpha$ -amilaze uz prilagođenu odvagu uzorka  $\alpha$ -amilaze. Koncentracija enzimskog kogradulata  $\alpha$ -amilaze i proteaze Everlase/Duramyl 8,0 T/60 T je 200 mg/L.

***Priprema otopine za kondicioniranje (CS)***

Otopina za kondicioniranje pripremljena je na isti način kao i standardna otopina  $\alpha$ -amilaze, samo bez dodatka  $\alpha$ -amilaze.

***Priprema inhibicijske otopine trijodida s octenom kiselinom (ATIS)***

Otopina kalijevog trijodida pripremljena je otapanjem krutog joda ( $c=100 \mu\text{M}$ ) u malom volumenu otopine kalijevog jodida, ( $c=0.05 \text{ M}$ ). Ledena octena kiselina dodana je otopini te se tikvica nadopuni deioniziranom vodom do konačne koncentracije kiseline 1M. Pripremljena otopina trijodida s octenom kiselinom koristi se za inhibiciju aktivnosti  $\alpha$ -amilaze i reakciju trijodida s nehidroliziranim škrobom.

### 3.1.4. Postupak

#### *Optimizacija otopine kalijevog trijodida*

Otopina kalijevog jodida pripravljena je s ultračistom deioniziranom vodom i sadrži konstantnu koncentraciju joda (5 mM) i promjenjivu koncentraciju kalijevog jodida (0,02, 0,05, 0,1 i 0,5M). Prethodno navedene otopine kalijevog jodida, pripravljene su svaka zasebno.

Odziv platinske redoks-elektrode mjereno je preciznim i točnim inkrementalnim dodavanjem otopine trijodida u 20 mL otopine kalijevog jodida koji je imao ekvivalentnu koncentraciju jodida. Na taj je način, pri konstantnoj koncentraciji jodida, bilo moguće mjeriti odziv platinskog redoks-senzora samo na čistom trijodidu. Tijekom dodavanja i mjerenja trijodida otopina je kontinuirano miješana.

#### *Odabir i optimizacija kompleksa trijodid-škrob*

Mjeren je odziv platinskog redoks-senzora dodatkom škroba otopini trijodida. Određeni inkrementi otopine škroba promjenjivih koncentracija (2, 3 i 5 g/L) dodaju se jedinicom za doziranje (Metrohm 765 Dosimat), u intervalima od 60 s, u čašicu s 8 mL otopine kalijevog trijodida pri različitim koncentracijama trijodida i konstantnoj koncentraciji jodida (0,05 M). Otopina se tijekom doziranja i mjerenja neprestano miješa.

#### *Optimizacija analitičkog postupka za određivanje aktivnosti $\alpha$ -amilaze*

##### *Optimizacija pH*

U nekoliko kiviteta stave se otopine škroba u rasponu pH=4-8, te se vrši inkubacija  $\alpha$ -amilazom (10 mg/L) na konstantnoj temperaturi od 40°C. Nakon inhibiranja amilaze u otopini dodatkom otopine ATIS, izmjeri se potencijal otopine.

---

### *Optimizacija temperature i vremena inkubacije*

U kivete se stavi otopina škroba konstantne vrijednosti pH=6. Otopina se inkubira dodatkom  $\alpha$ -amilaze (10mg/L), a inkubacija se vrši u vremenskim intervalima od 5 minuta nakon kojih se dodaje inhibicijska ATIS otopina. Istovremeno se varira i temperatura inkubacijskih uvjeta i to na 35, 40 i 45°C.

### *Mjerenje koncentracije/aktivnosti $\alpha$ -amilaze*

Hidroliza škroba odvijala se u kivetama koje su bile uronjene u termostatiranu kupelj. Pufirirane otopine  $\alpha$ -amilaze različitih koncentracija dodavane su u otopinu škroba, a inkubacija je obavljana pri različitim vrijednostima temperature, pH i vremena. Volumen reakcijske smjese održavan je konstantnim, što se postiglo dodatkom otopine CS (otopina za kondicioniranje). Nakon inkubacije reakcija je prekinuta dodatkom 5 mL ATIS otopine. Hlađenjem smjese na sobnu temperaturu, pomoću hladne vodene kupelji s vodovodnom vodom, izmjeren je redoks-potencijal otopina koristeći pri tom prethodno opisani platinski redoks-senzor.

## 3.2. Spektrofotometrijska mjerenja

### 3.2.1. Instrumentacija

Za snimanje spektara u UV-VIS području korišteni su Avantes AvaSpec-2048-2 (Avantes, Nizozemska), spektrometar s optičkim vlaknima i Shimadzu 1800 UV-VIS spektrofotometar (Shimadzu, Japan) u spektralnom području od 190 do 900 nm. Svi spektri snimljeni su uz upotrebu kvarcnih kiveta širine 1 cm. Programi *AVASoft* software (Avantes) i *UV probe* software (Shimadzu) koristili su se za prikupljanje i obradu podataka.

### 3.2.2. Reagensi

U radu su korištene iste kemikalije kao i za potenciometrijska mjerenja (poglavlje 3.1.2.)

### 3.2.3. Priprava otopina

#### *Priprava otopine kalijevog trijodida*

##### *Priprava osnovne otopine kalijevog jodida-trijodida sastava*

U tikvicu od 100 mL dodano je 0,4980 g kalijevog jodida i otopljeno u malo deionizirane vode. U tako dobivenu otopinu dodano je 0,0761 g I<sub>2</sub>. Kristale joda treba otopiti u malom volumenu koncentrirane otopine kalijeva jodida uz snažno miješanje, pri čemu treba paziti da se koncentrirana otopina ne razrjeđuje prije nego li se otopi i zadnji trag krutog joda (inače će se koncentracija joda u otopini s vremenom povećavati). Kad se sav jod otopi, tikvicu nadopuniti destiliranom vodom do oznake. Priređene otopine trijodida ( $c(\text{KI}) = 3 \times 10^{-2}$  M,  $c(\text{I}_2) = 3 \times 10^{-3}$  M) nisu osobito stabilne zbog hlapljivosti joda, osim toga jod polako reagira s organskim tvarima, te se boce s otopinom trijodida nikad ne zatvaraju gumenim ili plutenim čepovima. Oksidacija na zraku također uzrokuje promjene koncentracije otopine, a ubrzavaju je prisutnost kiseline, toplina i svjetlo.



---

***Priprava otopine kalijevog jodida***

U volumetrijsku tikvicu od 250 mL kvantitativno se prenese 20,5120 g kalijevog jodida i otopi u malom volumenu destilirane vode. Tikvicu potom nadopuniti destiliranom vodom do oznake ( $c(\text{KI}) = 0,5 \text{ M}$ ).

***Priprava otopine škroba***

Otopina škroba (2 g/L) priprema se na prethodno opisani način.

***Priprava otopine alfa-amilaze***

Otopina  $\alpha$ -amilaze (pH=6, 2 mg/L) priprema se na prethodno opisani način. 1.00 mg enzima otopljen je u 500 mL acetatnog pufera.

***Priprava otopine za kondicioniranje***

Otopina za kondicioniranje (pH=6) pripremljena je na isti način kao i standarda otopina  $\alpha$ -amilaze, samo bez dodatka  $\alpha$ -amilaze.

### 3.2.4. Postupak

#### *Spektrofotometrijska istraživanja nastajanja kalijevog trijodida*

U volumetrijsku tikvicu od 25 mL pipetirano je 10,00 mL radne otopine jodida-trijodida ( $c(\text{KI}) = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $c(\text{I}_2) = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) te alikvoti (0,50 do 10,00 mL) standardne otopine kalijevog jodida ( $c = 0,5000 \text{ M}$ ). Sadržaj tikvice dopunjen je destiliranom vodom do oznake i potom snimljen spektar dobivene otopine.

Za snimanje spektara (apsorbancija) je korišten spektrometar s optičkim vlaknima AVANTES (AvaSpec-2048-2).

#### *Spektroskopska studija nastajanja kompleksa škrob-trijodid*

U odmjernu tikvicu od 25 mL pipetirano je 10,00 mL radne otopine jodida-trijodida, 8,00 mL standardne otopine kalijevog jodida ( $c = 0,5000 \text{ M}$ ) i alikvoti (0,20 do 1,60 mL) otopine škroba. Sadržaj tikvice dopunjen je destiliranom vodom do oznake i potom snimljen spektar dobivene otopine.

Za snimanje spektara (apsorbancija) je korišten spektrometar s optičkim vlaknima AVANTES (AvaSpec-2048-2).

#### *Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije alfa-amilaze*

U sve kivete je dodano 2,50 mL otopine škroba (2 g/L) i inkubirano u termostatu na temperaturi od 45°C. Kada je otopina u termostatu dostigla željenu temperaturu dodani su u kivete različiti volumeni otopine alfa-amilaze (3.3.5.), osim u prvu kivetu, u koju je umjesto otopine amilaze dodano 2,50 mL otopine za kondicioniranje (3.3.6.). Nakon toga kivete su termostatirane 10 minuta na 45°C. Reakcija je zaustavljena dodatkom 5 mL 1 M octene kiseline. Otopine iz kiveta su kvantitativno prenesene u Erlenmayerove tikvice od 50 mL, dodano 5,00 mL otopine kalijevog jodida-trijodida i tikvice su potom dopunjene destiliranom vodom do oznake. snimljeni su spektri nastalih škrob-trijodid kompleksa.

---

### 3.3. Referentne metode

#### *Autoanalizator Konelab Arena 30*

Kao referentna metoda korištena je metoda za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze na analizatoru (Thermo Clinical Labsystems, Konelab Corporation Espoo, Finland, Model Konelab Arena 30) koja koristi 4,6-etiliden-(G<sub>7</sub>)-1,4-nitrofenil-(G<sub>1</sub>)- $\alpha$ ,D-maltoheptozid (etiliden-G<sub>7</sub>PNP) kao supstrat za  $\alpha$ -amilazu. Hidrolizom supstrata, etiliden-G<sub>7</sub>PNP-a, oslobađa se boja čiji se intenzitet mjeri na 420 nm (2.2.3.).

#### *Određivanje dekstrinizirajuće aktivnosti Fuwa metodom*

Amilolitička aktivnost  $\alpha$ -amilaze određuje se Fuwa metodom<sup>2</sup>. Ukupni volumen od 1 mL reakcijske smjese sadrži 0,5 mL otopine topljivog škroba (1%, pripremljen u 0,2 M citrat-fosfatnom puferu, pH=6) s pripadajućom određenom količinom razrijeđenog enzima. Inkubacija traje 10 minuta pri temperaturi od 60°C. Reakcija se zaustavi dodatkom 1 M HCl. U tu se otopinu doda 0,1 mL otopine trijodida (0,3% joda u 3% kalijevom jodidu). Razvija se plavo obojenje a tikvica se nadopuni do 25 ml. Mjeri se apsorbancija uzorka na 600 nm. Slijepa proba priprema se dodavanjem vode umjesto enzima.

---

### 3.4. Programski alati za višeparametarsku analizu<sup>121</sup>

#### *Solver*

Solver je optimizacijski modelni sustav inkorporiran u MS Excel programski paket za Windowse. Može se upotrijebiti za rješavanje cijelog niza linearnih i nelinearnih problemskih zadataka.

Aktivira se odabirom *Add ins...* postavke u izborniku *Tools*. Upotrebljava se za usporedbu niza podataka predviđenih modelom s eksperimentalnim podacima, varirajući vrijednosti zavisnih varijabli. Nakon te operacije računa se suma kvadrata rezidua (SSR) između dva niza varirajući vrijednosti parametara. Izračunavanje se bazira na algoritmu koji smanjuje grešku (SSR) između dva seta podataka na minimalnu moguću vrijednost u usporedbi sa zadanom vrijednosti (obično je to 0).

#### *Goal seek*

Newton–Raphsonova metoda se obično koristi pri rješavanju problema koji uključuje jednu varijablu, a implementiran je u *Excel* kao alat *Goal Seek*. Metoda zahtjeva da se funkcija  $F(x)$  formulira kao eksplicitni matematički izraz unutar varijable  $x$ . Ako hoćemo znati za koju vrijednost  $x$  funkcija  $F(x)$  ima određenu vrijednost,  $A$ . Newton–Raphsonova metoda traži vrijednost  $x$  za koju je  $F(x)$  jednaka  $A$ . Obično se izabere  $A=0$ , u tom se slučaju odgovarajuća vrijednost  $x$  zove korijen funkcije  $F(x)$ .

*Excel* sadrži naredbe za provođenje Newton-Raphsonovih aproksimacija: to je *Goal Seek* naredba u *Tools* izborniku. *Goal Seek* varira vrijednosti odabrane ćelije (promjenjive ćelije) da bi dobio vrijednost druge ćelije (*Target cell*) i tako došao do željene vrijednosti.

#### *SolvStat* makro

*SolvStat* makro je naredba koja provodi regresijsku statističku analizu za *Solver*. Ovaj makro izračunava standardnu devijaciju koeficijenata, koeficijent korelacije i standardnu grešku  $SE(y)$ ; i može se primijeniti za linearnu i nelinearnu regresiju. Makro *SolvStat*

izračunava  $SS_{\text{rezidue}}$ ,  $SS_{\text{regresije}}$  i  $SE(y)$  iz poznatih i izračunatih  $y$  vrijednosti (izračunatih *Solverom*).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 3.1. Optimizacija sustava jodid/trijodid

Kalijev trijodid pripremljen je otapanjem joda u kalijevom jodidu prema sljedećoj jednadžbi:



Taj sustav može se opisati odgovarajućom konstantom ravnoteže:

$$K = \frac{a_{\text{I}_3^-}}{a_{\text{I}_2} a_{\text{I}^-}} \cong \frac{c_{\text{I}_3^-}}{c_{\text{I}_2} c_{\text{I}^-}} \quad (22).$$

Niska vrijednost konstante formiranja ( $K_f=710$ ) upućuje na to da je za održavanje konstantne vrijednosti koncentracije trijodida potreban kalijev jodid u velikom suvišku.

Jednadžba (22) može se proširiti na jednadžbu (23):

$$K = \frac{c_{\text{I}_3^-}}{(c_{(\text{I}_2)_0} - c_{\text{I}_3^-})(c_{(\text{I}^-)_0} - c_{\text{I}_3^-})} \quad (23),$$

gdje donji indeks 0 označava početnu (inicijalnu) koncentraciju joda i jodida nakon konačnog razrjeđenja i prije postizanja ravnoteže.

Koncentracija trijodida,  $c_{\text{I}_3^-}$ , u ravnoteži može se izračunati rješavanjem kvadratne jednadžbe

(24):

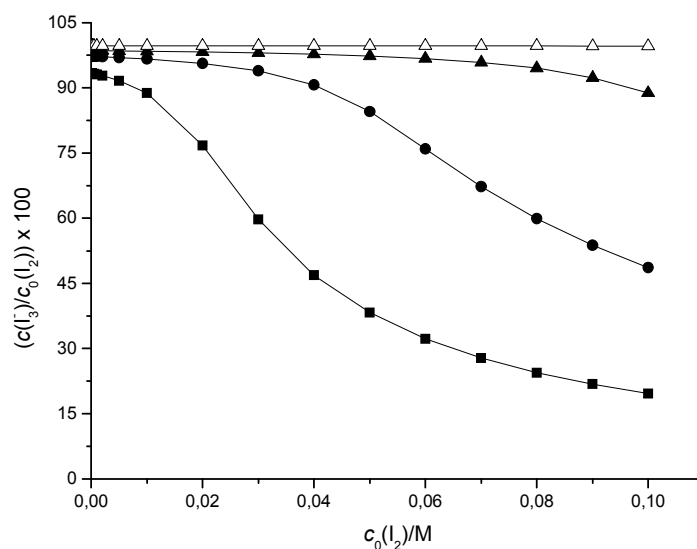
$$\left(c_{\text{I}_3^-}\right)_{1,2} = \frac{\left[ K \left( c_{(\text{I}^-)_0} + c_{(\text{I}_2)_0} \right) + 1 \right] \pm \sqrt{\left[ K \left( c_{(\text{I}^-)_0} + c_{(\text{I}_2)_0} \right) + 1 \right]^2 - 4K^2 c_{(\text{I}^-)_0} c_{(\text{I}_2)_0}}}{2K} \quad (24).$$

Realno rješenje jednadžbe (24) je:

$$c_{\text{I}_3^-} = \frac{\left[ K \left( c_{(\text{I}^-)_0} + c_{(\text{I}_2)_0} \right) + 1 \right] - \sqrt{\left[ K \left( c_{(\text{I}^-)_0} + c_{(\text{I}_2)_0} \right) + 1 \right]^2 - 4K^2 c_{(\text{I}^-)_0} c_{(\text{I}_2)_0}}}{2K} \quad (25).$$

### 3.1.1. Potenciometrijska mjerenja

Da bi se provjerio utjecaj koncentracije jodida na konverziju joda u trijodid (jedn. (21)) bilo je potrebno izračunati postotak nastalog trijodida u odnosu na dodani jodid. Postotak se računao prema jednadžbi (25) pri četiri koncentracijska nivoa jodida: 0,02; 0,05; 0,1 i 0,5 M. Rezultati su prikazani na Slici 13.



**Slika 13.** Utjecaj koncentracije jodida na konverziju joda u trijodid pri četiri različite koncentracije jodida: 0,02 (■); 0,05 (●); 0,1 (▲) i 0,5 M (△).

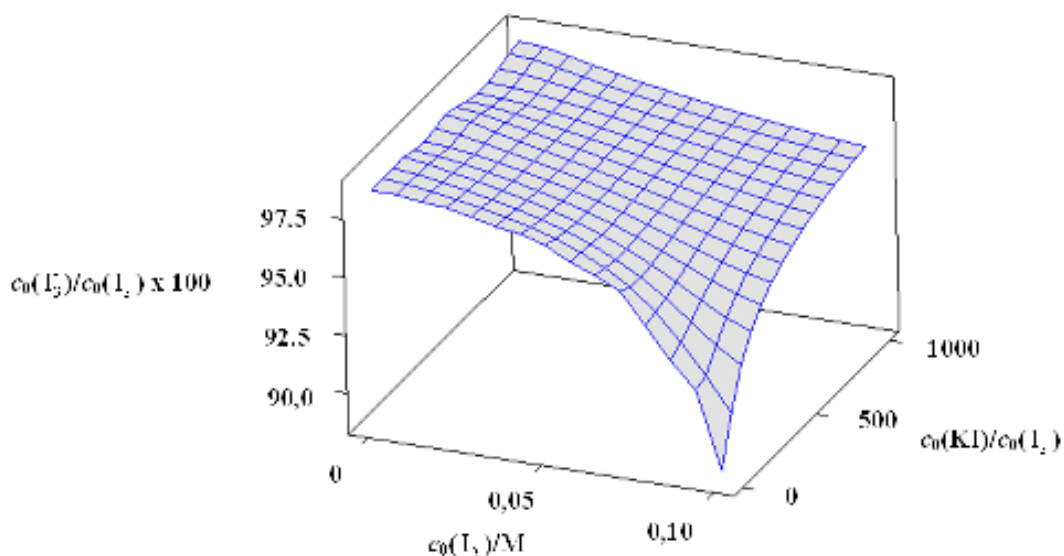
Iz Slike 13 mogu se izvući sljedeći zaključci:

- S porastom koncentracije jodida povećava se konverzija joda u trijodid,
- Za niže koncentracije joda ( $c_{0I_2} < 1$  mM) konverzija joda u trijodid je gotovo potpuna, čak i pri nižim koncentracijama jodida,
- Pri visokim koncentracijama jodida ( $c_{I_2} > 0,1$  M), njegova koncentracija neznatno se mijenja i može se smatrati konstantnom.

Slika 14. prikazuje površinski 3D graf konverzije joda u trijodid, izraženu kao postotak formiranog trijodida u odnosu na uzeti jod, kao funkciju početnog odnosa jodid/jod i koncentracije joda. Maksimum konverzije vidi se kod otopina nižih koncentracije joda ( $< 1$



mM) i koncentriranijih otopina jodida ( $c_{I^-} > 0,1 \text{ M}$ ) pri vrijednosti početnog odnosa jodid/jod  $> 100$ .



**Slika 14.** Stupanj konverzije joda u trijodid kao funkcija vrijednosti početnog odnosa jodid/jod i koncentracije joda.

### 3.1.1.1. Odgovor platinskog redoks-senzora na trijodidni ion

Za mjerenje odziva redoks-senzora na trijodidni ion korištena je sljedeća jednadžba:

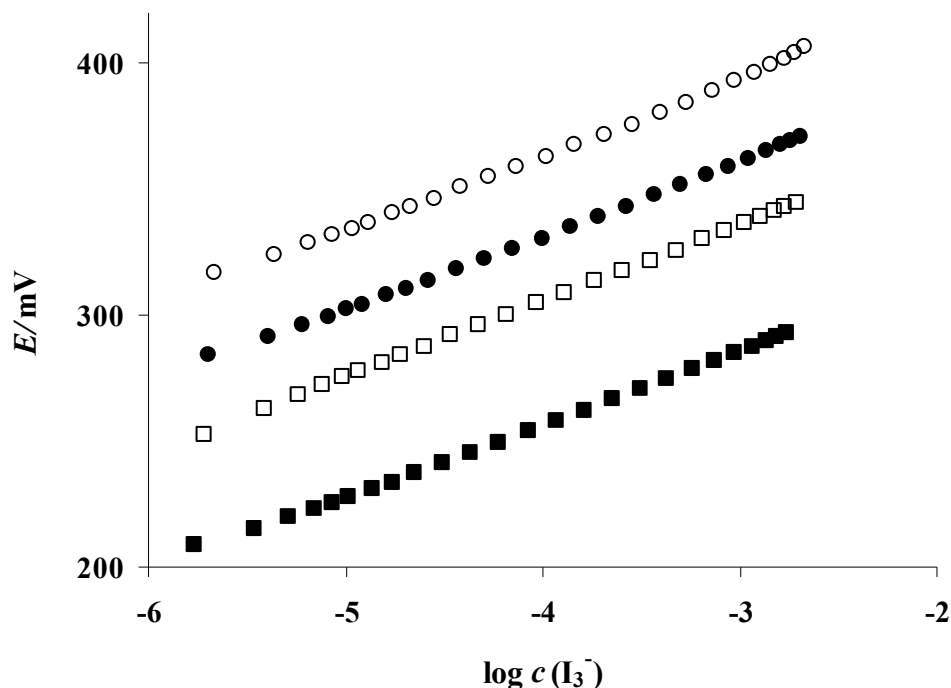


a odgovarajući se redoks-potencijal može opisati Nernstovom jednadžbom:

$$E = E^\circ + \frac{RT}{2F} \ln \frac{c_{I_3}}{c_{I^-}^3} = E^\circ + S \log \frac{c_{I_3}}{c_{I^-}^3} \quad (27),$$

gdje je  $S = 0,0296 \text{ V}$ .

Na Slici 15. prikazane su karakteristike odziva platinskog redoks-senzora prema trijodidnom ionu pri različitim konstantnim koncentracijama jodida ( $c_{I^-} = 0,02 - 0,5 \text{ M}$ ), dok je odgovarajuća (pripadajuća) statistika prikazana u Tablici 3.



**Slika 15.** Karakteristike odziva platinskog redoks-senzora na trijodidni ion pri četiri konstantna koncentracijska nivoa jodida [ $c_T = 0,02 \text{ M}$  ( $\circ$ );  $c_T = 0,05 \text{ M}$  ( $\bullet$ );  $c_T = 0,1 \text{ M}$  ( $\square$ );  $c_T = 0,5 \text{ M}$  ( $\blacksquare$ )].

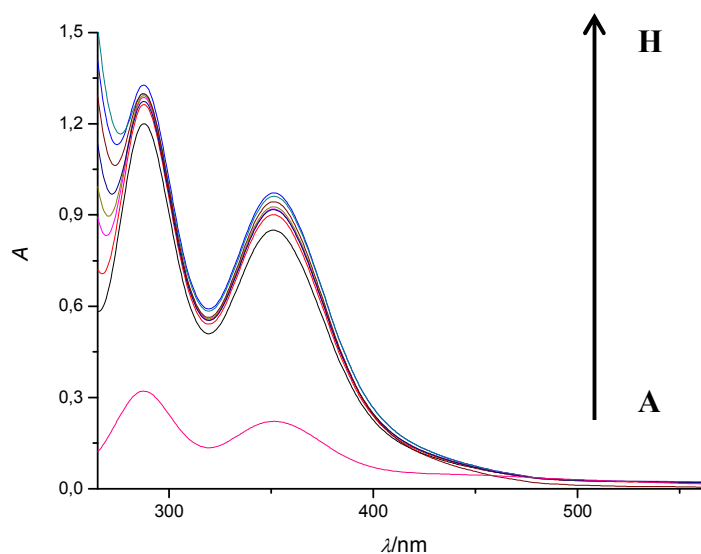
**Tablica 3.** Statistika odziva platinskog redoks-senzora na trijodidni ion pri različitim koncentracijama jodida  $\pm$  granice pouzdanosti ( $p = 0,95$ )

Parametri	$c_{kl}/M$			
	0,02	0,05	0,1	0,5
Nagib (mV/dekada aktivnosti)	$29,7 \pm 0,4$	$29,5 \pm 0,3$	$30,1 \pm 0,1$	$29,1 \pm 0,2$
Koeficijent korelacije ( $R^2$ )	0,9993	0,9995	0,9999	0,9997
Izraz za konstantni potencijal ( <i>Const</i> )	$481,8 \pm 1,7$	$449,3 \pm 1,0$	$426,1 \pm 0,3$	$372,7 \pm 0,9$
Linearno koncentracijsko Područje $c_{I_3^-}/M$	$7,5 \times 10^{-6} - 1,7 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-6} - 2,5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-6} - 2,5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-6} - 2,5 \times 10^{-3}$

Na osnovi prikazanih rezultata iz Slike 15 i Tablice 3 može se zaključiti da senzor ima Nernstovski odziv i visoku korelaciju  $E - \log(c_{I_3^-})$  pri svim ispitivanim koncentracijama jodidnog iona. Za određivanje amilaze koncentracije trijodidnog iona bile su uvijek unutar linearnog odziva senzora.

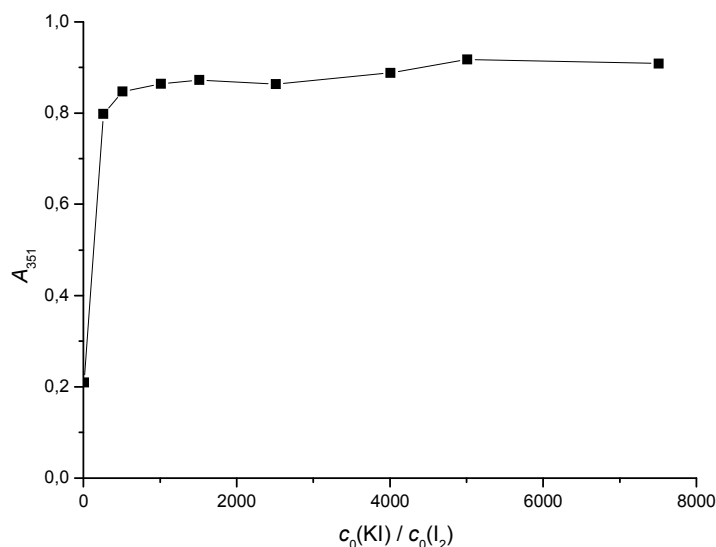
### 3.1.2. Spektrofotometrijska mjerenja

Stvaranje kompleksa trijodidnog iona praćeno je spektrofotometrijski. Snimljeni su UV-VIS spektri otopina fiksne koncentracije joda ( $c_{I_2} = 0.1 \text{ mM}$ ) i varijabilne koncentracije kalijevog jodida (Slika 16). Apsorpcijski spektar otopine kalijevog trijodida karakteriziraju dva apsorpcijska maksimuma, na 288 i 351 nm. Za izračune vezane uz optimizaciju sastava otopine trijodida koristio se apsorpcijski maksimum na 351 nm ( $\epsilon_{351\text{nm}} = 30.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).



**Slika 16.** UV-VIS spektri otopine sustava jodid-trijodid pri konstantnoj koncentraciji joda ( $c_{I_2} = 0,1 \text{ mM}$ ) i varijabilnoj koncentraciji jodida. Slova u legendi predstavljaju omjer  $c_{I^-}/c_{I_2}$ , gdje su A-10, B-260, C-510, D-1010, E-1510, F-2510, G-5010 i H-7510.

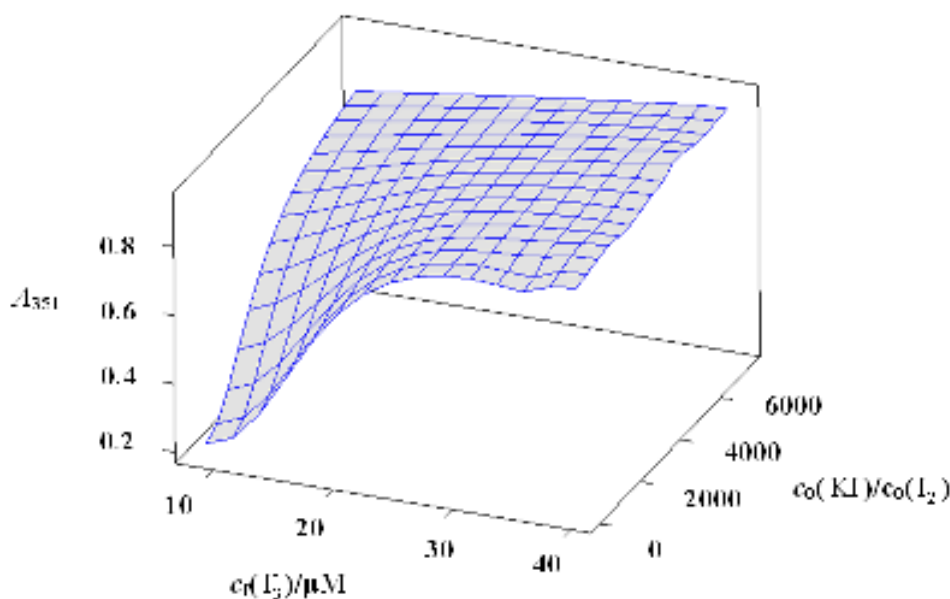
Iz Slike 16. vidljivo je da koncentracija trijodida raste s porastom koncentracije jodida. Vrijednosti apsorbancija za ispitivane otopine, mjerene na 351 nm, pokazuju trend približavanja konstantnoj vrijednosti s porastom vrijednosti odnosa jodid/jod pri fiksnoj koncentraciji joda (Slika 17.)



**Slika 17.** Ovisnost vrijednosti apsorbancija otopine trijodida, mjerene na 351 nm, kao funkcija vrijednosti odnosa jodid/jod pri fiksnoj koncentraciji joda ( $c_{\text{I}_2} = 0,1 \text{ mM}$ ).

Slika 18. prikazuje 3D površinski graf konverzije joda u trijodid, izražene kao vrijednost apsorbancije mjerene na 351 nm u funkciji slobodnog trijodida i vrijednosti početnog odnosa jodid/jod.

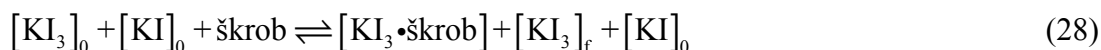
Vrijednosti apsorbancija ispitivanih otopina, mjenjenih na 351 nm, rastu i ispoljavaju tendenciju približavanja konstantnoj vrijednosti s porastom omjera koncentracija jodida i joda i pri rastućoj koncentraciji trijodida.



**Slika 18.** Promjena vrijednosti apsorbancije, mjerena na 351 nm, kao funkcija slobodnog trijodida i vrijednosti početnog odnosa jodid/jod.

### 3.2. Priprema kompleksa škrob-trijodid i odabir koncentracije supstrata

Škrob s trijodidnim ionom stvara modri kompleks. Boja ovisi o prirodi škroba. Formiranje kompleksa škrob-trijodid može se opisati sljedećom jednačinom:



$[\text{KI}_3]_0$  i  $[\text{KI}]_0$  = početna koncentracije trijodida i jodida, i

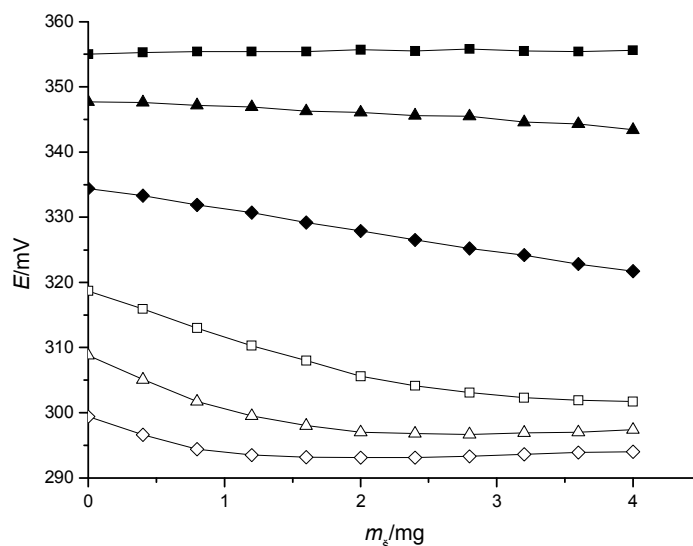
$[\text{KI}_3]_f$  = koncentracija slobodnog, (nevezanog) trijodida.

Jodidni ion mora biti prisutan u velikom suvišku (koncentracija jodida treba biti više od 500 puta veća od početne koncentracije trijodida) i njegova koncentracija može se smatrati konstantnom. Zbog toga se jednačina (28) može pojednostaviti:



### 3.2.1. Potencimetrijsko istraživanje nastajanja kompleksa škrob-trijodid

Da bi se odredila osjetljivost predložene metode, bilo je potrebno istražiti odziv platinskog redoks-senzora pri različitim koncentracijama trijodidnog iona i otopina škroba (koji se koristi kao supstrat), simulirajući na taj način promjene koje nastaju biokatalitičkom razgradnjom škroba. Za otopinu odgovarajuće koncentracije škroba izračunata je masa dodanog škroba. Razlikujemo područje niskih masa škroba (koncentracija dodavanog škroba 2 g/L), srednjih masa škroba (koncentracija dodavanog škroba 3 g/L) i visokih (koncentracija dodavanog škroba 5 g/L).

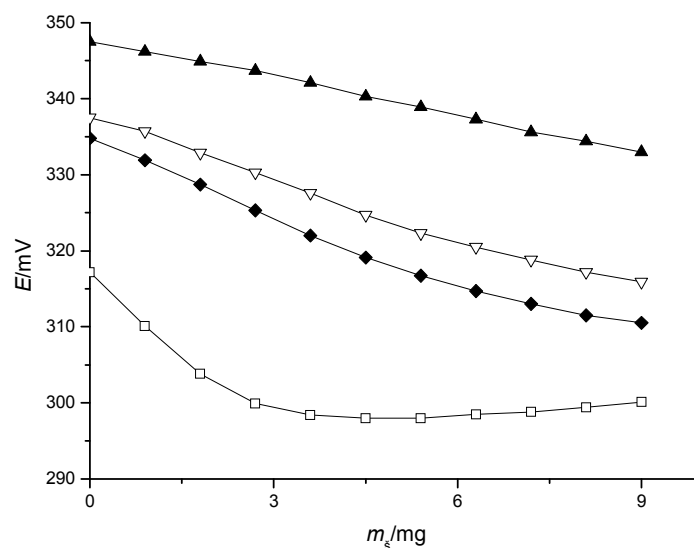


**Slika 19.** Odziv platinskog redoks-senzora na škrob u području malih masa škroba (0 - 4 mg), pri različitim koncentracijama trijodida ( $5 \times 10^{-4} M$  (■),  $2,5 \times 10^{-4} M$  (▲),  $1 \times 10^{-4} M$  (◆),  $2,5 \times 10^{-5} M$  (□),  $1 \times 10^{-5} M$  (△),  $2,5 \times 10^{-6} M$  (◇)) i konstantnoj koncentraciji jodidnih iona  $c_{I^-} = 0,05 M$ .

Slika 19. prikazuje odziv platinskog redoks-senzora na škrob u području malih masa škroba (0 - 4 mg) pri različitim koncentracijama trijodida i konstantnoj koncentraciji jodidnih iona  $c_{I^-} = 0,05 M$ . Odziv senzora bio je linearan u cijelom području ispitivanih količina škroba (0 - 4 mg), pri početnoj koncentraciji trijodida  $(c_{I_3})_0 = 0,1 mM$ . Najveća osjetljivost (6,55 mV/mg škroba) bila je pri upotrebi početne koncentracije trijodida  $(c_{I_3})_0 = 0,025 mM$  u

rasponu od 0 - 2 mg škroba, tj. 8,50 mV/mg škroba, upotrebom početne koncentracije trijodida  $(c_{I_3})_0 = 0,01$  mM, u rasponu od 0 - 0,8 mg škroba.

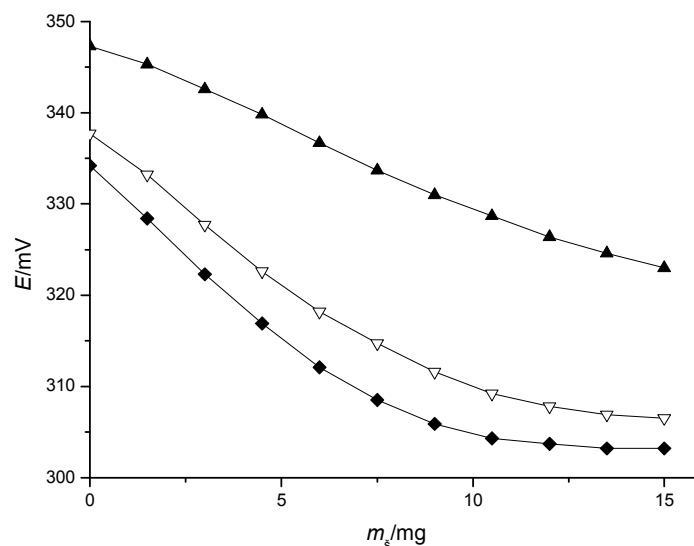
Slika 20. prikazuje odziv platinskog redoks-senzora na škrob za područje srednjih masa škroba od 0 - 9 mg, pri različitim koncentracijama trijodida i konstantnoj koncentraciji jodidnih iona  $c_{I^-} = 0,05$  M. Odziv senzora bio je linearan u cijelom području ispitivanih količina škroba (0 - 9 mg), pri početnim koncentracijama trijodida  $(c_{I_3})_0 = 0,25$  mM. Najveća osjetljivost (3,35 mV/mg škroba) bila je pri upotrebi početne koncentracije trijodida  $(c_{I_3})_0 = 0,1$  mM, u rasponu od 0 - 5,4 mg škroba, tj. 7,44 mV/mg škroba upotrebom početne koncentracije trijodida  $(c_{I_3})_0 = 0,025$  mM, u rasponu od 0 - 1,8 mg škroba.



**Slika 20.** Odziv platinskog redoks-senzora na škrob za područje srednjih masa škroba od 0 - 9 mg, pri različitim koncentracijama trijodida ( $2,5 \times 10^{-4}$  M (▲),  $1,25 \times 10^{-4}$  M (▽),  $1 \times 10^{-4}$  M (◆),  $2,5 \times 10^{-5}$  M (□)), i konstantnoj koncentraciji jodidnih iona  $C_{I^-} = 0,05$  M.

Slika 21. prikazuje odziv platinskog redoks-senzora na škrob u području većih masa škroba (0 - 15 mg) pri različitim koncentracijama trijodida i konstantnoj koncentraciji jodidnih iona  $c_{I^-} = 0,05$  M. Odziv senzora bio je linearan u cijelom području ispitivanih količina škroba (0 -

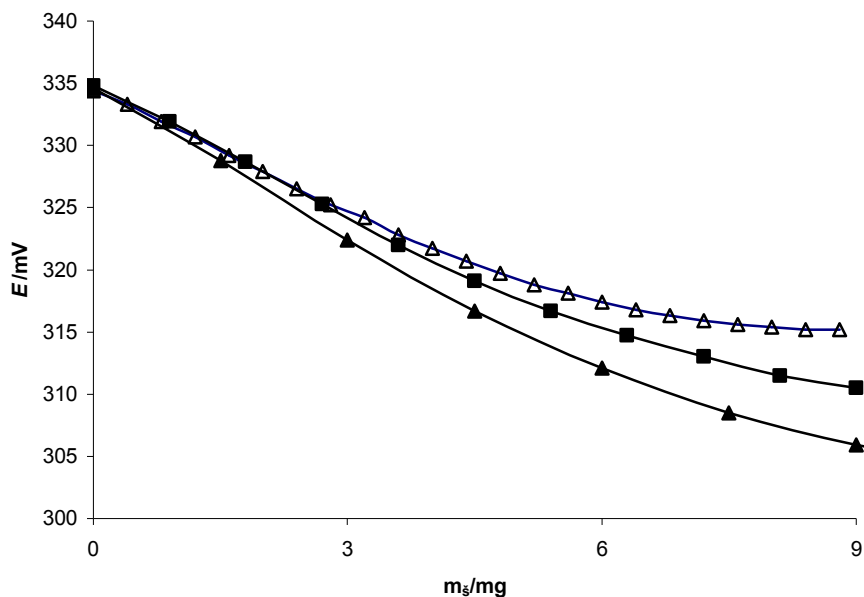
15 mg) pri početnim koncentracijama trijodida  $(c_{I_3})_0 = 0,25$  mM. Najveća osjetljivost (3,68 mV/mg škroba) bila je pri upotrebi početne koncentracije trijodida  $(c_{I_3})_0 = 0,1$  mM, u rasponu od 0 – 6,0 mg škroba.



**Slika 21.** Odziv platinskog redoks-senzora na škrob u području većih masa škroba (0 - 15 mg), pri različitim koncentracijama trijodida ( $2,5 \times 10^{-4}$  M ( $\blacktriangle$ ),  $1,25 \times 10^{-4}$  M ( $\nabla$ ),  $1 \times 10^{-4}$  M ( $\blacklozenge$ )), i konstantnoj koncentraciji jodidnih iona  $c_{I^-} = 0,05$  M.

Usporedba odziva platinskog redoks-senzora u otopinama škroba različitih koncentracija (2 - 5 g/L), pri početnoj koncentraciji trijodida  $(c_{I_3})_0 = 0,1$  mM i konstantnoj koncentraciji jodidnog iona  $c_{I^-} = 0,05$  M prikazana je na Slici 22.





**Slika 22.** Odziv platinskog redoks-senzora prema otopinama škroba različitih koncentracija (2 ( $\Delta$ ), 3 ( $\blacksquare$ ) i 5 g/L ( $\blacktriangle$ )), pri početnoj koncentraciji trijodida  $(c_{I_3})_0 = 0,1$  mM i konstantnoj koncentraciji jodidnog iona  $c_I = 0,05$  M.

Iz Slike 22 može se zaključiti da su relativne promjene potencijala najveće pri korištenju otopine škroba koncentracije 5 g/L. Objašnjenje leži u činjenici da za dodatak jednake količine škroba treba dodati veći volumen otopine škroba manje koncentracije, čime se ukupni volumen mjerne otopine povećava. Posljedica toga je smanjenje molarne koncentracije trijodida, što prema jednadžbi (27) rezultira i smanjenjem potencijala platinskog redoks-senzora uronjenog u mjerni sustav. Stoga su pri daljnjim ispitivanjima korištene otopine škroba većih koncentracija (3 i 5 g/L).

U Tablici 4. naveden je pregled rezultata karakteristika odziva platinskog redoks-senzora prema otopinama škroba različitih koncentracija, pri fiksnoj koncentraciji jodidnog iona  $c_I = 0,05$  M.

**Tablica 4.** Pregled rezultata karakteristika odziva platinskog redoks-senzora prema otopinama škroba različitih koncentracija (2, 3 i 5 g/L), pri konstantnoj koncentraciji jodida  $c_{I^-} = 0,05$  M.

$c(I_3^-)_0 / \mu\text{M}$	$E(m_s=0)/\text{mV}$	$S/(\text{mV}/\text{dekada})$	$Const$	$\Delta E - \text{linearno}$ područje $\Delta E=f(m_s)/\text{mV}$	$m_s(\text{linearno}$ područje) mg	Osjetljivost/ (mV/mg)	$k$	$\log k$
2,5	299,4	26,35	446,80	5	0,8	6,25	7,943E-06	-5,100
10	308,4	57,23	594,40	6,8	0,8	8,50	2,005E-05	-4,698
25	318,7	59,65	592,73	13,1	2	6,55	3,197E-05	-4,495
100	334,4	60,95	578,20	12,7	4	3,18	4,662E-05	-4,331
25	317,2	115,62	849,06	13,4	1,8	7,44	1,957E-05	-4,708
100	334,8	80,01	654,64	18,1	5,4	3,35	4,157E-05	-4,381
125	337,5	61,06	576,10	15,2	5,4	2,81	5,946E-05	-4,226
250	347,5	40,64	493,95	14,5	9	1,61	9,094E-05	-4,041
100	334,2	169,73	1012,80	22,1	6	3,68	1,993E-05	-4,701
125	337,3	120,28	806,49	20,3	6	3,38	3,723E-05	-4,429
250	347,3	52,02	534,72	16,6	9	1,84	9,369E-05	-4,028

Relativna osjetljivost definira se kao omjer promjene elektromotorne sile  $E_{emf}$  u području linearnog odgovora i promjene odgovarajuće koncentracije škroba. S obzirom da je u ispitivanim otopinama ionska jakost bila jako visoka, odziv platinske redoks-elektrode bio je izrazito stabilan i visoko ponovljiv. Iz Tablice 5 vidljivo je da se osjetljivost povećava sa smanjenjem koncentracije škroba, ali područje linearnog odziva postaje uže. Iz toga se može zaključiti da se niže koncentracije/aktivnosti amilaze mogu točnije i preciznije odrediti upotrebom niže koncentracije škroba/supstrata, što (koji) uzrokuje veću relativnu promjenu elektromotorne sile,  $emf$ .

**Tablica 5.** Relativna osjetljivost platinskog redoks-senzora prema škrobu, pri različitim koncentracijama trijodida i škroba te konstantnoj koncentraciji jodida ( $c_{I_3^-} = 0,05$  M).

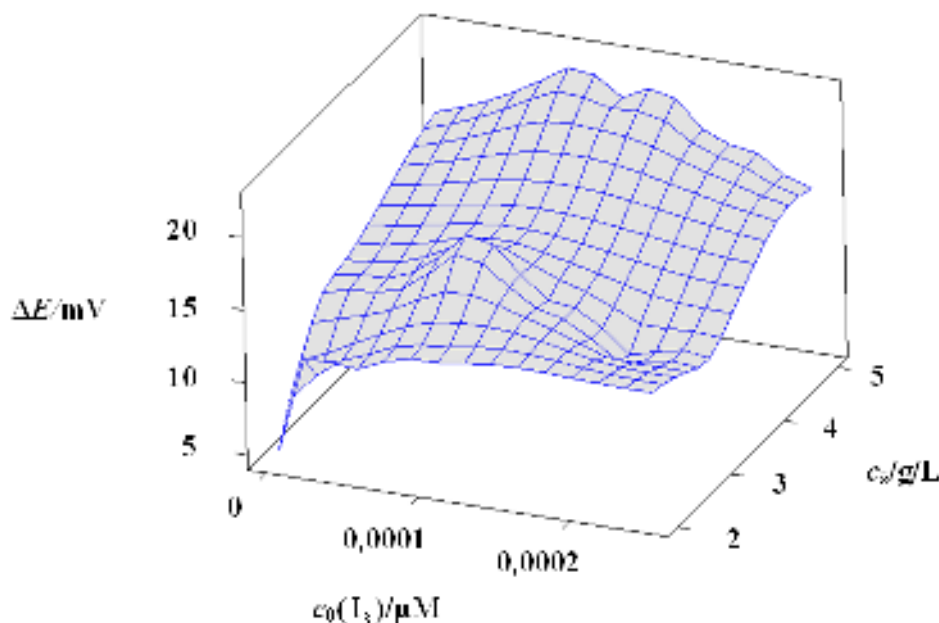
$(c_{I_3^-})_0 / \mu\text{M}$	$c_s / (\text{mg/L})$	$\Delta E$ (linearno područje)/mV	$m_s$ (linearno područje)/mg	Relativna osjetljivost/ (mV/mg)
25	2	13,1	2	6,55
100	2	12,7	4	3,18
25	3	13,4	1,8	7,44
125	3	15,2	5,4	2,81
100	5	22,1	6	3,68
250	5	16,6	9	1,84

**Tablica 6.** Parametri senzora i analita dobiveni modeliranjem potenciometrijskih podataka nakon optimizacije Solverom zajedno s odgovarajućom regresijskom statistikom dobivenom SolvStatom.

Nagib* / (mV/dekada)	Const* /mV	Log(k)*	R <sup>2</sup>	SE(y)
28,47 ± 1,25	425,1 ± 5,2	3,283 ± 0,051	0,9984	0,405

\* vrijednost ± standardno odstupanje

Na Slici 23 je površinski 3D graf, koji prikazuje relativnu promjenu redoks-potencijala platinskog senzora u funkciji koncentracija trijodida i škroba. Najveća promjena potencijala bila je kod koncentracije trijodida  $100 \mu\text{M}$  i otopine škroba (supstrata) koncentracije  $5 \text{ g/L}$ .



**Slika 23.** Relativna promjena redoks-potencijala platinskog redoks-senzora kao funkcija početne koncentracije trijodidnog iona i škroba.

### 3.2.2. Direktno potenciometrijsko određivanje škroba

#### 3.2.2.1. Mehanizam odgovora platinske redoks-elektrode u odnosu na škrob

Transformacijom jednadžbe (27)  $E = E^{\circ} + \frac{RT}{2F} \ln \frac{c_{\text{I}_3^-}}{c_{\text{I}^-}^3} = E^{\circ} + S \log \frac{c_{\text{I}_3^-}}{c_{\text{I}^-}^3}$  dolazi se do sljedećeg

$$\text{izraza } E = \text{Const} + S \log c_{\text{I}_3^-} \quad (30),$$

$$\text{gdje je } \text{Const} = E^{\circ} - S \log c_{\text{I}^-}^3 = E^{\circ} - S3 \log c_{\text{I}^-} \quad (31).$$

Jodid je prisutan u velikom suvišku i može se smatrati konstantnim.

Jednadžba (32) opisuje ravnotežne koncentracije trijodidnih iona nakon dodatka određene količine otopine škroba otopini jodida i trijodida, konstantne koncentracije trijodida i konstantnog suviška jodida.

$$\left(c_{I_3^-}\right)_f = \left(c_{I_3^-}\right)_0 - \left(c_{I_3^-}\right)_b \quad (32),$$

gdje je

$$\left(c_{I_3^-}\right)_f = \text{koncentracija slobodnog trijodida}$$

$$\left(c_{I_3^-}\right)_0 = \text{početna koncentracija trijodida, i}$$

$$\left(c_{I_3^-}\right)_b = \text{koncentracija trijodida vezanog za škrob.}$$

Koncentracija vezanog trijodida proporcionalna je koncentraciji (masi) škroba  $m_s$ :

$$\left(c_{I_3^-}\right)_b = k \times m_s \quad (33),$$

gdje je  $k$  = faktor proporcionalnosti,

$m_s$  = masa škroba

Supstitucijom jednadžbe (33) u jednadžbu (32) dobije se sljedeći izraz:

$$\left(c_{I_3^-}\right)_f = \left(c_{I_3^-}\right)_0 - k \times m_s \quad (34).$$

Iz jednadžbe (34) može se izračunati  $m_s$ :

$$m_s = \frac{\left(c_{I_3^-}\right)_0 - \left(c_{I_3^-}\right)_f}{k} \quad (35).$$

Jednadžba (35) omogućava određivanje koncentracije (mase) škroba u nepoznatom uzorku škroba. Određivanje se može izvesti mjerenjem odziva platinskog redoks-senzora (kalibracija) u seriji otopina škroba različitih koncentracija.

### 3.2.2.2. Optimizacija upotrebom *Solvera*

Optimizacija *Solverom* išla je u sljedećim koracima:

a) Generiran je radni list (Slika 24.) koji sadrži podatke, s nezavisnom varijablom  $E$  (redoks-potencijal u mV) i zavisnom varijablom  $m_S$  (koncentracija/količina škroba u mg) koje se trebaju podesiti.

b) Dodana je kolona (H) koja sadrži  $E_{calc}$ , koji se izračuna iz izraza 30, a opisuje odziv platinskog redoks-senzora i uključuje odgovarajući broj parametara koji se variraju: nagib senzora  $S$ , izraz za konstantni potencijal (*constant potential term*)  $Const$  i faktor proporcionalnosti  $k$ .

Umjesto vrlo male vrijednosti veličine  $k$  (red veličine  $10^{-4}$ ) koristi se  $\log k$ . Variranjem različitih setova početnih uvjeta omogućava se da *Solver* nađe globalni minimum.

c) Dodana je kolona (J) u kojoj se računa kvadrat razlika  $sr$  (*residuals*),  $E - E_{calc}$ , za svaki podatak.

d) Izračuna se suma kvadrata razlika  $ssr$  (*residuals*) (*Target Cell*)

e) *Solver* izračunava minimalnu sumu kvadrata razlika  $ssr$  (*Target Cell*) variranjem odabranih parametara iz jednadžbe 30 (*Changing Cell*). Za varijable nisu primijenjena nikakva ograničenja.

N34								
	A	B	E	F	G	H	I	J
3	$V_s / \text{mL}$	$m_s$ uzeto / mg	$E / \text{mV}$	$C(I) / M$	$C(I)_f$	$E_{calc}$	res	sr
4	0	0	337.5	0.0500	1.250E-04	337.8	-0.269233453	0.072486652
5	0.3	0.9	335.7	0.0482	1.140E-04	335.3	0.365618858	0.133677149
6	0.6	1.8	332.9	0.0465	1.038E-04	332.8	0.050720667	0.002572586
7	0.9	2.7	330.3	0.0449	9.432E-05	330.3	-0.001047875	1.09804E-06
8	1.2	3.6	327.6	0.0435	8.543E-05	327.7	-0.07496572	0.005619859
9	1.5	4.5	324.7	0.0421	7.710E-05	325.0	-0.253853695	0.064441698
10	1.8	5.4	322.3	0.0408	6.928E-05	322.1	0.182761086	0.033401615
11								
12							ssr	0.312
13								
14	Varijable		Solver Statistika					
15	S	61.06		S	Const	log(k)		
16	Const	576.10		61.06	576.10	-4.2258		
17	k	5.946E-05		Stand. dev.	14.5673	57.015	0.1293	
18	log(k)	-4.2258		Corr. coeff. R <sup>2</sup>	0.9984			
19				SE(y)	0.2794			

**Slika 24.** Rezultati potenciometrijskih mjerenja (dio) i parametri modela za direktno potenciometrijsko određivanje škroba dobiveni primjenom programa *Solver* (Excel).

f) Makro *SolvStat* daje regresijsku statistiku za *Solver* izračunavajući standardnu devijaciju parametara, koeficijent korelacije i standardnu pogrešku vrijednosti procijenjenog elektrodnog potencijala  $SE(y)$ .

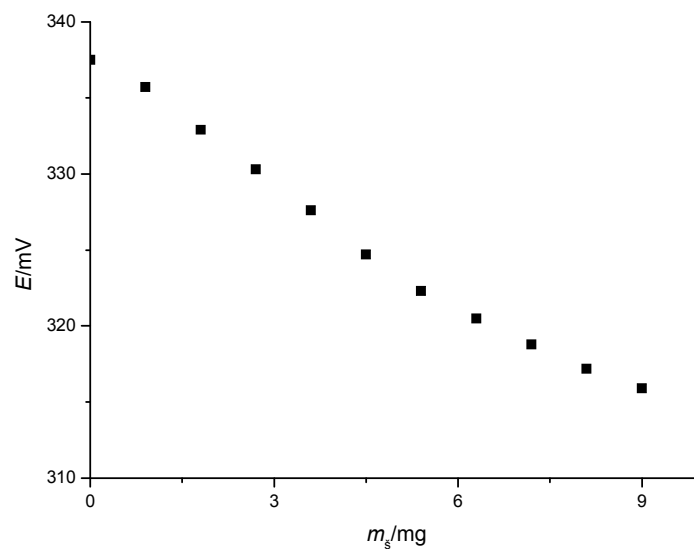
g) Izabrani podaci se nalaze u linearnom dijelu odziva platinskog redoks--senzora korišteni su za izračunavanje slobodnog trijodida  $(C_{I_3})_f$ , koncentracije/mase škroba koja se nalazi u otopini u promatranoj točki elektrodnog potencijala, a potom i % iskorištenja. U tu svrhu korišten je program *Goal seek (Excel)*. Posebno je provedena odgovarajuća statistika izračunatih iskorištenja. Rezultati izračunavanja (dio) prikazani su na Slici 25.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
24	$V_0$ / mL	$m_s$ uzeto / mg	$E$ / mV	$m_s$ nađeno / mg	Iskorištenje / %	$C(I) / M$	$C(I_3)_f$	$E_{calc}$	res	sr
25	0.6	1.8	332.9	1.755	97.486	4.762E-02	1.041E-04	332.93	-0.02907	8.450E-04
26	0.9	2.7	330.3	2.686	99.486	4.444E-02	9.441E-05	330.33	-0.02709	7.339E-04
27	1.2	3.6	327.6	3.627	100.737	4.348E-02	8.526E-05	327.62	-0.02167	4.697E-04
28	1.5	4.5	324.7	4.608	102.398	4.211E-02	7.642E-05	324.72	-0.02051	4.207E-04
29	1.8	5.4	322.3	5.311	98.347	4.082E-02	6.982E-05	322.32	-0.02382	5.672E-04
30										
31										
32	Statistika iskorištenja									
33		Model								
34	Srednja vrijednost =	99.691								
35	STDEV =	1.945								
36	CV(%) =	1.951								
37										

**Slika 25.** Rezultati (dio) izračunavanja slobodnog trijodida  $(C_{I_3})_f$ , koncentracije/mase škroba koja se nalazi u otopini u promatranoj točki elektrodnog potencijala, a potom i % iskorištenja, dobiveni primjenom programa *Goal seek (Excel)*.

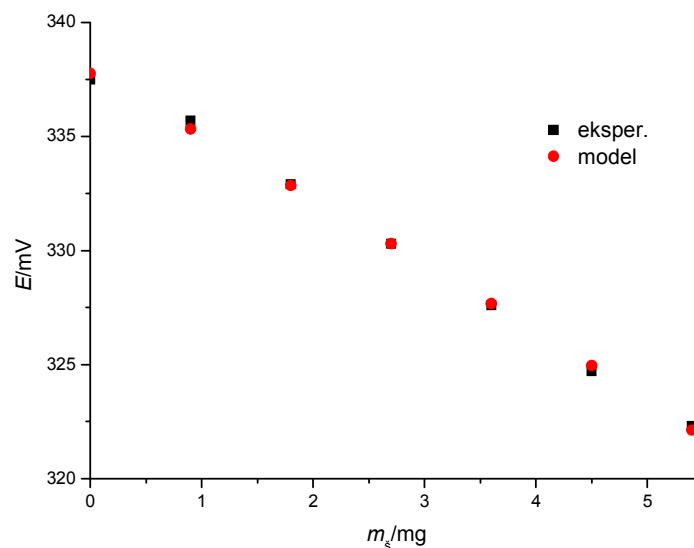
### 3.2.2.3. Karakteristike odziva senzora u odnosu na škrob

Iz slike 26 vidljivo je da se redoks-potencijal linearno smanjuje s porastom koncentracije škroba. To se može objasniti kontinuiranim vezanjem slobodnog trijodida na škrob, što rezultira smanjenjem redoks-potencijala prema jednadžbi (30). Pri višim koncentracijama škroba veže se skoro sav trijodid, a preostali trijodid odgovara njegovoj ravnotežnoj koncentraciji prema jednadžbi (29). Daljnje postupno smanjenje koncentracije trijodida posljedica je efekta razrjeđenja



**Slika 26.** Karakteristike odziva platinskog redoks-senzora u odnosu na škrob ( $c_0(I_3^-) = 0,125$  mM,  $c_0(I^-) = 0,05$  M).

Stoga se koncentracija škroba treba računati u području linearnog odziva platinskog redoks-senzora. Slika 27 prikazuje graf linearnog odziva platinskog redoks-senzora.



**Slika 27.** Linearni dio odziva platinskog redoks-senzora u odnosu na škrob ( $c_0(I_3^-) = 0,125$  mM,  $c_0(I^-) = 0,05$  M).



Procjene parametara modela i senzora dobivene optimizacijom pomoću Solvera prikazane su u tablici 7.

**Tablica 7.** Parametri senzora i modela za kompleks trijodid-škrob dobiveni iz njihovih potenciometrijskih podataka nakon optimizacijskog postupka upotrebom *Solvera*.

Parametar	Vrijednost
$S$	26,3
$Const.$	446,8
$\log(k)$	-5,148
$R^2$	0,9984
$SE(y)$	0,28

Potvrđena je visoka korelacija ( $R^2 = 0,9984$ ) između škroba, koncentracije trijodida i odziva platinskog redoks-senzora (Tablica 7).

#### 3.2.2.4. Određivanje škroba upotrebom direktne potenciometrije

Rezultati određivanja sadržaja škroba u tri područja koncentracija primjenomom direktne potenciometrije (3.1.4.) navedeni su u Tablicama (8-10)

**Tablica 8.** Rezultati određivanja sadržaja škroba u području nižih masa škroba (0-2 mg) primjenom direktne potenciometrije ( $c_0(I_3^-) = 0,025 \text{ mM}$ ,  $c_0(I^-) = 0,05 \text{ M}$ ).

$m_s$ (uzeto)/mg	$E$ /mV	$m_s$ (nađeno)/mg	Iskorištenje/%
0,4	315,3	0,408	101,971
0,8	312,6	0,837	104,671
1,2	309,6	1,308	109,032
1,6	307,1	1,654	103,350
2	305	1,913	95,644

**Tablica 9.** Rezultati određivanja sadržaja škroba u području srednjih masa škroba (0-4 mg) primjenom direktne potenciometrije ( $c_0(I_3^-) = 0,1 \text{ mM}$ ,  $c_0(I^-) = 0,05 \text{ M}$ ).

$m_s(\text{uzeto})/\text{mg}$	$E/\text{mV}$	$m_s(\text{nađeno})/\text{mg}$	Iskorištenje/%
0,8	331,4	0,790	98,690
1,6	329	1,538	96,113
2,4	326,3	2,452	102,150
3,2	324	3,128	97,755
4	321,4	3,946	98,638

**Tablica 10.** Rezultati određivanja sadržaja škroba u području viših masa škroba (0-9 mg) primjenom direktne potenciometrije ( $c_0(I_3^-) = 0,25 \text{ mM}$ ,  $c_0(I^-) = 0,05 \text{ M}$ ).

$m_s(\text{uzeto})/\text{mg}$	$E/\text{mV}$	$m_s(\text{nađeno})/\text{mg}$	Iskorištenje/%
3	342,6	2,864	95,473
4,5	339,8	4,473	99,395
6	336,7	6,165	102,745
7,5	333,7	7,648	101,978
9	331	8,827	98,076

Rezultati određivanja sadržaja škroba, prikazani kao statistika iskorištenja, dati su u Tablici 11.

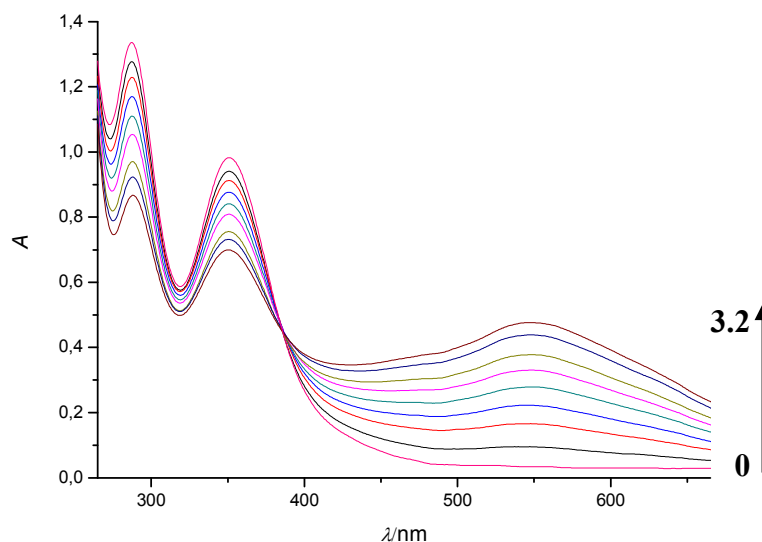
**Tablica 11.** Statistika iskorištenja direktnog potenciometrijskog određivanja škroba u tri različita područja mase škroba, izračunata na temelju 5 različitih mjerenja u svakom području.

Parametri	Područje određivanja (mg škroba)		
	0 - 2	0 - 4	0 - 9
Srednja vrijednost (%)	102,93	98,67	99,53
Stand. odstupanje	4,86	2,21	2,95
CV (%)	4,72	2,24	2,97

Za srednje i velike mase škroba greška određivanja manja je od 2%, što je zadovoljavajuće za direktno potenciometrijsko određivanje. Samo za niže mase škroba (manje od 2 mg škroba) greška je veća (2,93%), što je prihvatljivo za to koncentracijsko područje.

### 3.2.3. Spektrofotometrijsko istraživanje

Formiranje kompleksa trijodid-škrob, bazirano na jednadžbi (28) studirano je i spektrofotometrijski. Slika 28. prikazuje UV-VIS apsorpcijski spektar kompleksa trijodid-škrob pri različitim koncentracijama škroba.



**Slika 28.** UV-VIS apsorpcijski spektar kompleksa trijodid-škrob pri različitim koncentracijama škroba. Brojevi u legendi predstavljaju koncentracije škroba u mg/25 mL.

Apsorpcijski spektar kompleksa trijodid-škrob karakteriziraju tri apsorpcijska maksimuma. Dva od njih se odnose na trijodidni ion (na 288 i 351 nm), dok se treći (na 550 nm) odnosi na kompleks trijodid-škrob. Taj se maksimum može iskoristiti za spektroskopsko određivanje škroba. S porastom koncentracije škroba, apsorpcijski maksimum na 550 nm raste. Razlog je formiranje kompleksa trijodid-škrob. U isto vrijeme apsorpcijski maksimumi na 288 i 351 nm padaju, zbog smanjenja koncentracije trijodida koji se veže sa škrobom.

### 3.2.4. Usporedba metode za određivanje škroba direktnom potenciometrijom i spektrofotometrijom

Rezultati dobiveni upotrebom predloženog senzora uspoređeni su s rezultatima dobivenim odgovarajućom spektrofotometrijskom metodom<sup>122</sup> i prikazani su u tablici 12. Evaluacija rezultata primjenom Studentovog t-testa pokazala je da nema statistički značajne

razlike u srednjim vrijednostima dobivenim dvjema metodama za interval pouzdanosti od 95%. Slaganje rezultata dobivenim dvjema metodama je zadovoljavajuće za rutinsko određivanje škroba.

**Tablica 12.** Usporedba rezultata dobivenih spektrofotometrijom i direktnom potenciometrijskom metodom s redoks-senzorom.

Uzorak	Nađeno škroba (mg) *	
	Spektrofotometrijska metoda	Redoks-senzor
A	0,378 ± 0,011	0,393 ± 0,015
B	1,27 ± 0,03	1,29 ± 0,04
C	2,82 ± 0,07	2,79 ± 0,08
D	4,37 ± 0,09	4,42 ± 0,08
E	7,54 ± 0,10	7,63 ± 0,11
F	8,80 ± 0,13	8,85 ± 0,13

\* Srednja vrijednost za 5 određivanja  $\pm \sigma_{N-1}$

### 3.3. Direktno potenciometrijsko određivanje koncentracije $\alpha$ -amilaze

#### 3.3.1. Mehanizam odziva platinskog redoks-senzora u odnosu na $\alpha$ -amilazu

$\alpha$ -amilaza katalizira hidrolizu škroba. Nehidrolizirani škrob, čija je koncentracija obrnuto proporcionalna koncentraciji  $\alpha$ -amilaze, stvara kompleks s trijodidom (jednadžba 28), smanjujući pri tom početnu koncentraciju trijodida.

Promjena koncentracije trijodida (koji postoji samo uz veliki suvišak jodidnog iona) uzrokuje promjenu odnosa koncentracija redoks-para trijodid/jodid, što prema jednadžbi (27) uzrokuje promjenu elektrodnog potencijala platinskog redoks-senzora. Te su promjene u direktnoj korelaciji s koncentracijom  $\alpha$ -amilaze.

Jodidni ion prisutan je u velikom suvišku, njegova je koncentracija više od 500 puta veća od početne koncentracije trijodida i može se smatrati konstantnom.

U početku, prije dodatka amilaze i pri konstantnoj koncentraciji škroba, elektrodni potencijal platinskog redoks-senzora može se opisati sljedećim izrazom:

$$E = Const + S \log(c_{I_3})_0 \quad (36)$$

gdje je

$E$  = elektrodni potencijal (mV),

$S$  = nagib senzora (mV/dekada aktivnosti), i

$(c_{I_3})_0$  = početna koncentracija trijodida (mol/L).

Nakon dodatka  $\alpha$ -amilaze koncentracije  $c_A$ , dobije se sljedeći izraz:

$$E = Const + S \log(c_{I_3})_f \quad (37),$$

gdje je

$$(c_{I_3})_f = (c_{I_3})_0 + (c_{I_3})_1 \quad (38).$$

Nakon uvrštavanja jednadžbe (38) u (37), dobije se sljedeći izraz:

$$E = Const + S \log \left[ (c_{I_3})_0 + (c_{I_3})_1 \right] \quad (39),$$

gdje je

$(c_{I_3})_1$  = porast koncentracije trijodida (mol/L).

Porast koncentracije trijodida proporcionalan je aktivnosti (koncentraciji)  $\alpha$ -amilaze:

$$(c_{I_3})_1 = k \times m_A \quad (40),$$

gdje je

$k$  = faktor proporcionalnosti

$m_A$  = koncentracije  $\alpha$ -amilaze ( $\mu\text{g}$ )

Uvrštavanjem jednadžbe (40) u (38), dobije se:

$$(c_{I_3})_f = (c_{I_3})_0 + k \times m_A \quad (41).$$

Nakon uvrštavanja jednadžbe 40 u 39, dobije se sljedeći izraz:

$$E = Const + S \log \left[ (c_{I_3})_0 + k \times m_A \right] \quad (42).$$

Iz jednadžbe (41) može se izračunati koncentracija  $\alpha$ -amilaze:

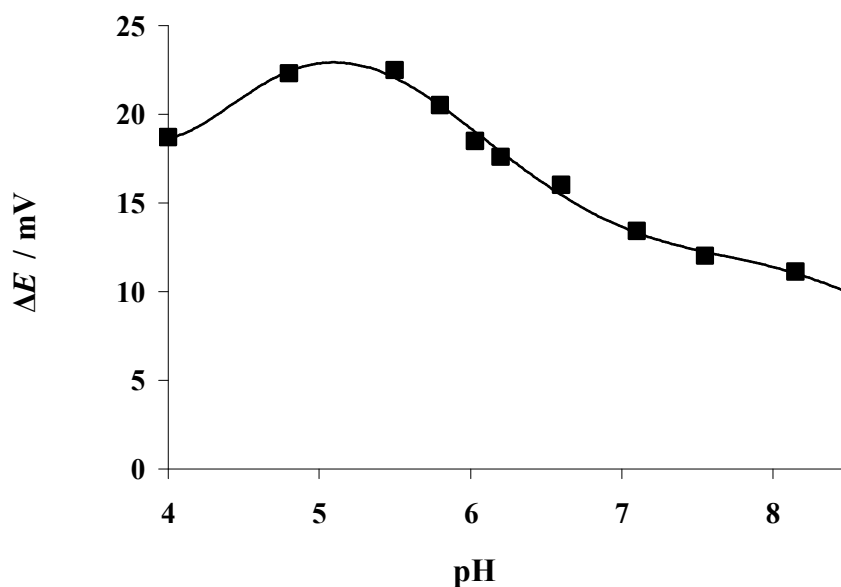
$$m_A = \frac{(c_{I_3})_f - (c_{I_3})_0}{k} \quad (43).$$

### 3.3.2. Optimizacija analitičkog postupka za direktno potenciometrijsko određivanje koncentracije $\alpha$ -amilaze

Aktivnost  $\alpha$ -amilaze ovisna je o temperaturi, pH i prisustvu metalnih iona. Ispitana je kinetika hidrolize škroba  $\alpha$ -amilazom u cilju definiranja optimalnih uvjeta analitičkog postupka.

#### *Utjecaj pH*

Ispitan je utjecaj pH na brzinu hidrolize škroba u području vrijednosti 4-8. Nađeno je da je maksimum hidrolize bio pri pH 5,5. Taj pH uzet je kao optimalni u daljnjim istraživanjima (Slika 29).



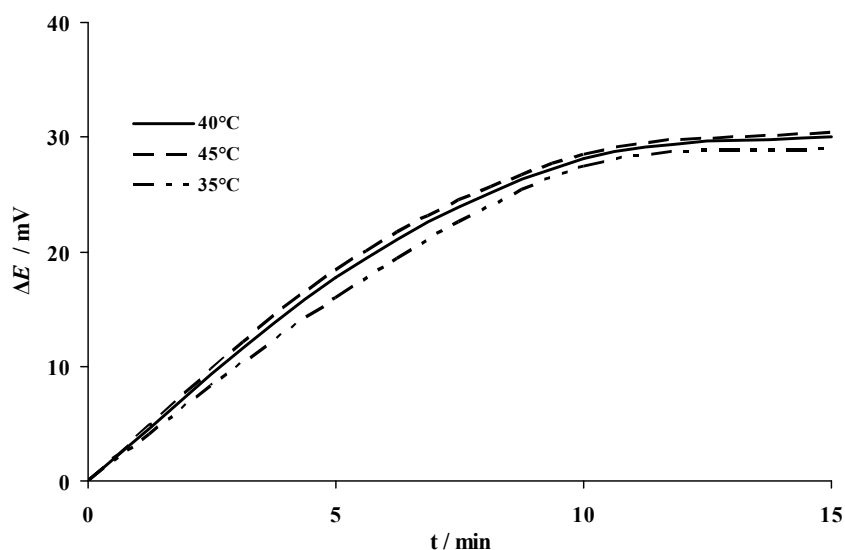
**Slika 29.** Odziv platinskog redoks-senzora na  $\alpha$ -amilazu pri različitim pH-vrijednostima (koncentracija  $\alpha$ -amilaze je 10  $\mu$ g (aktivnosti 0,36 U/mg), temperatura 40 °C, vrijeme inkubacije 10 minuta, koncentracija škroba 5 mg/mL).

### Utjecaj temperature i odabir vremena inkubacije

Da bi se smanjili troškovi analize, potrebno je odabrati odgovarajuću temperaturu i vrijeme hidrolize.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti najnižu temperaturu hidrolize i najkraće vrijeme inkubacije pri kojima bi se dobili još uvijek analitički upotrebljivi podaci. Rezultati hidrolize škroba pri konstantnim koncentracijama škroba (5 mg/ml) i  $\alpha$ -amilaze (10  $\mu$ g) dani su na Slici 30. Može se vidjeti da je  $\alpha$ -amilaza skoro u potpunosti hidrolizirala škrob pri temperaturi od 40°C i vremenu od 10 minuta. Ti su parametri korišteni u nastavku istraživanja.

Povećanje vremena i temperature hidrolize neznatno utječe na veličinu promjene odziva senzora (Slika 30).



**Slika 30.** Utjecaj temperature i vremena hidrolize na odziv platinskog redoks-senzora prema  $\alpha$ -amilazi (koncentracija  $\alpha$ -amilaze je 10  $\mu$ g (aktivnosti 0.36 U/mg), koncentracija škroba 5 mg/mL).



### 3.3.3. Određivanje koncentracije/aktivnosti $\alpha$ -amilaze u čistim i industrijskim uzorcima

#### 3.3.3.1. Optimizacija upotrebom *Solvera*

Optimizacija *Solverom* išla je u sljedećim koracima:

a) Generiran je radni list (Slika 31) koji sadrži podatke s nezavisnom varijablom  $E$  (redoks-potencijal u mV) i zavisnom varijablom  $m_A$  (koncentracija/količina amilaze u mg) koje se trebaju podesiti.

b) Dodana je kolona (G) koja sadrži  $E_{calc}$ , koji se izračuna iz jednadžbe (37), a opisuje odziv platinskog redoks-senzora i uključuje odgovarajući broj parametara koji se variraju: nagib senzora  $S$ , izraz za konstantni potencijal (constant potential term)  $Const$  i faktor proporcionalnosti  $k$ .

Umjesto vrlo male vrijednosti veličine  $k$  (red veličine  $10^{-4}$ ) koristi se  $\log k$ . Variranjem različitih setova početnih uvjeta omogućava se da *Solver* nađe globalni minimum.

c) Dodana je kolona (I) u kojoj se računa kvadrat razlika  $sr$  (*residuals*),  $E - E_{calc}$ , za svaki podatak.

d) Izračuna se suma kvadrata razlika  $ssr$  (*residuals*) (*Target Cell*)

e) *Solver* izračunava minimalnu sumu kvadrata razlika  $ssr$  (*Target Cell*) variranjem odabranih parametara iz jednadžbe (37) (*Changing Cell*). Za varijable nisu primijenjena nikakva ograničenja.

f) Makro *SolvStat* daje regresijsku statistiku za *Solver* izračunavajući standardnu devijaciju parametara, koeficijent korelacije i standardnu grešku vrijednosti procijenjenog elektrodnog potencijala  $SE(y)$  (Slika 32).

A	B	C	D	E	F	G	H	I
127								
128	$V_a$ / mL	$m_{uzeto}$ / mg	$E$ / mV	$C(I) / M$	$C(I)_f$	$E_{cat}$	res	sr
129	0.00	0.00	311.4	0.029411765	1.000E-04	311.21	0.18932	3.584E-02
130	0.15	1.50	318.8	0.029411765	1.920E-04	319.27	-0.47305	2.238E-01
131	0.30	3.00	324.1	0.029411765	2.839E-04	324.11	-0.01213	1.473E-04
132	0.45	4.50	327.2	0.029411765	3.759E-04	327.58	-0.38101	1.452E-01
133	0.60	6.00	330.5	0.029411765	4.678E-04	330.29	0.21319	4.545E-02
134	0.75	7.50	333	0.029411765	5.598E-04	332.51	0.49454	2.446E-01
135	0.90	9.00	334.8	0.029411765	6.518E-04	334.39	0.41412	1.715E-01
136	1.05	10.50	336.4	0.029411765	7.437E-04	336.02	0.38230	1.462E-01
137	1.20	12.00	337.4	0.029411765	8.357E-04	337.46	-0.05903	3.485E-03
138	1.35	13.50	338.4	0.029411765	9.276E-04	338.75	-0.34974	1.223E-01
139	1.50	15.00	339.5	0.029411765	1.020E-03	339.92	-0.41835	1.750E-01
140								
141								
142							ssr	1.31
143								
144	Varijable			Solver Statistika				
145	S	28.47		S	Const	log(k)		
146	Const	425.08		28.47	425.08	-3.283		
147	k	5.211E-04		Stand. dev.	1.25	5.16	0.051	
148	log(k)	-3.2831		Corr. coeff. R <sup>2</sup>	0.9984			
149				SE(y)	0.405			
150								
151								

**Slika 31.** Rezultati potenciometrijskih mjerenja (dio) i parametri modela za direktno potenciometrijsko određivanje koncentracije  $\alpha$ -amilaze dobiveni primjenom programa *Solver* (Excel).

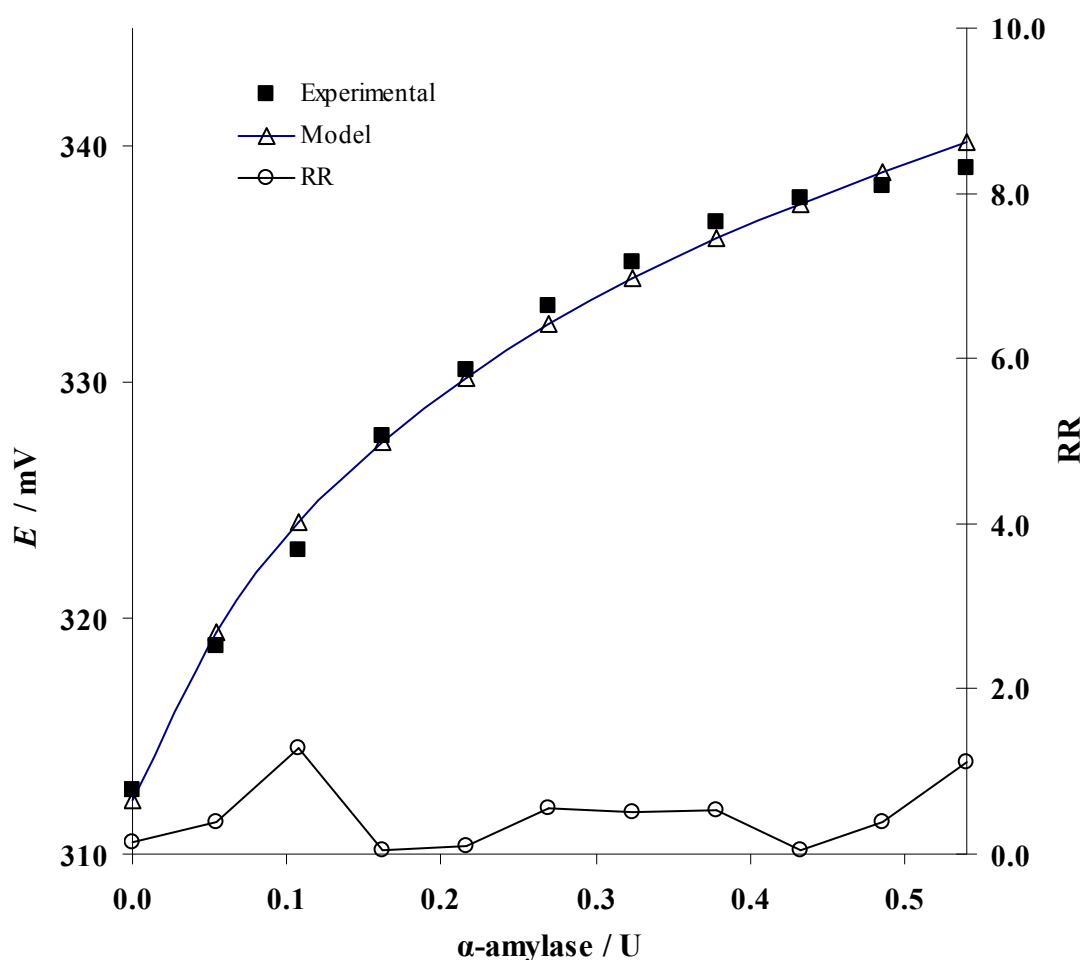
g) Izabrani podaci koji se nalaze u linearnom dijelu odziva platinskog redoks-senzora korišteni su za izračunavanje slobodnog trijodida ( $C_{I_3}$ )<sub>f</sub>, koncentracije/mase  $\alpha$ -amilaze koja se nalazi u otopini u promatranoj točki elektrodnog potencijala, a potom i % iskorištenja. U tu svrhu korišten je program *Goal seek* (Excel). Posebno je provedena odgovarajuća statistika izračunatih iskorištenja. Rezultati izračunavanja (dio) prikazani su na Slici 32.

J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
129									
130	$m_{uzeto}$ / mg	$E$ / mV	$m_{nađeno}$ / mg	Iskorištenje / %	$C(I) / M$	$C(I)_f$	$E_{cat}$	res	sr
131	4.50	327.2	4.301	95.58	0.02941176	3.637E-04	327.17	0.02632	6.929E-04
132	6.00	330.5	6.120	102.00	0.02941176	4.752E-04	330.48	0.02029	4.117E-04
133	7.50	333	7.895	105.26	0.02941176	5.840E-04	333.03	-0.02886	8.330E-04
134	9.00	334.8	9.386	104.28	0.02941176	6.754E-04	334.83	-0.02637	6.952E-04
135	10.50	336.4	10.908	103.89	0.02941176	7.687E-04	336.43	-0.02690	7.234E-04
136									
137									
138	Statistika iskorištenja								
139		Model							
140	Srednja vrijednost =	102.20							
141	STDEV =	3.89							
142	CV(%) =	3.80							

**Slika 32.** Rezultati (dio) izračunavanja slobodnog trijodida ( $C_{I_3}$ )<sub>f</sub>, koncentracije/mase  $\alpha$ -amilaze koja se nalazi u otopini u promatranoj točki elektrodnog potencijala, a potom i % iskorištenja primjenom programa *Goal seek* (Excel).

### 3.3.3.2. Čista $\alpha$ -amilaza

Eksperimentalni podaci (Slika 33.) uspoređeni su s odgovarajućim teoretskim modelom u kojem su, upotrebom *Solvera*, optimizirane karakteristike senzora i analita (nagib senzora  $S$ , izraz za konstantni potencijal  $Const$ , koeficijent proporcionalnosti  $k$ ). *Solver* koristi metodu najmanjih kvadrata da bi teoretsku krivulju prilagodio eksperimentalnim podacima i izračunao vrijednosti varijabli koje maksimalno smanjuju sumu razlika kvadrata između teoretske i eksperimentalne krivulje.



**Slika 33.** Usporedba eksperimentalnih (■) i modelnih ( $\Delta$ ) karakteristika odziva platinskog amilaznog redoks-senzora na  $\alpha$ -amilazu ( $c_0(I_3^-) = 0,1$  mM,  $c_0(I^-) = 0,05$  M, koncentracija škroba 5 mg/mL). Na sekundarnoj Y-osi prikazane se vrijednosti kvadrata rezidua RR( $\circ$ ).

Vrijednosti tih parametara i odgovarajuća regresijska statistika dobiveni su upotrebom makroa *SolvStat* (*Excel*) i prikazani u Tablici 13.

**Tablica 13.** Vrijednosti parametara senzora i analita dobivenih optimizacijom pomoću *Solvera* i odgovarajuće regresijske statistike upotrebom makroa *SolvStat*

Nagib* / (mV/dekada)	Const* / mV	Log(k)*	R <sup>2</sup>	SE(y)
28,47 ± 1,25	425,1 ± 5,2	3,283 ± 0,051	0,9984	0,405

\* vrijednost ± standardno odstupanje

Teoretski model se zadovoljavajuće slaže s eksperimentalnim vrijednostima za ispitivanu koncentraciju  $\alpha$ -amilaze. Vrijednosti nagiba dobivenih modeliranjem u skladu su s teoretskom Nernstovom vrijednosti prema jednadžbi (27).

Rezultati određivanja  $\alpha$ -amilaze za 0-0.54 U (0-15  $\mu$ g)  $\alpha$ -amilaze primjenom metode standardnog dodatka dati su u Tablici 14. Granica detekcija iznosila je 1.944 mU  $\alpha$ -amilaze.

**Table 14.** Rezultati i statistika direktnog potencimetrijskog određivanja aktivnosti  $\alpha$ -amilaze

$m_A$ (uzeto)/ $\mu$ g	Aktivnost $\alpha$ -amilaze/U		Iskorištenje**/%	Stand. odst.	Interval pouzdanosti
	Očekivano*	Nađeno**			
4,50	0,162	0,163	100,6	0,006	± 0,004
6,00	0,216	0,224	103,8	0,004	± 0,003
9,00	0,324	0,339	104,8	0,010	± 0,009
12,00	0,432	0,445	103,0	0,010	± 0,007
13,50	0,486	0,488	100,5	0,009	± 0,007

\* bazirano na deklariranoj enzimatskoj aktivnosti 36 U/mg

\*\* srednja vrijednost za 5 mjerenja

### 3.3.3.3. Industrijska $\alpha$ -amilaza

Senzor je testiran i na dva uzorka granulirane industrijske  $\alpha$ -amilaze Duramyl (Novozymes A/S, Danska): *Duramyl 120 T* i enzimski kogranulat  $\alpha$ -amilaze i proteaze *Everlase/Duramyl 8.0 T/60 T*. Duramyl standard dobiven je iz referentnog laboratorija proizvođača - Novozymes A/S, Danska.

Ekperimentalni i modelni odzivi platinskog amilaznog senzora na različite koncentracije spomenuta dva uzorka enzima prikazani su na Slikama 34. i 35. Rezultati dobiveni upotrebom platinskog amilaznog senzora uspoređeni su s rezultatima potpuno automatiziranog analizatora (Thermo Clinical Labsystems, Konelab Corporation Espoo, Finland, Model Konelab Arena 30) prikazani su u Tablici 15.

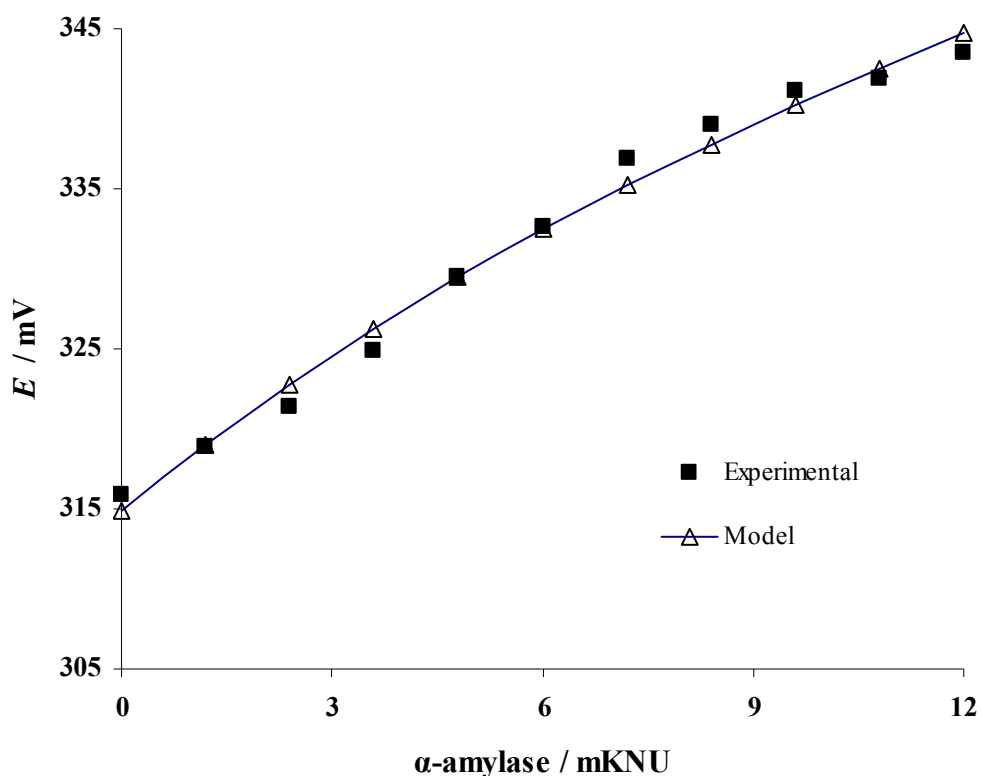
**Tablica 15.** Rezultati dobiveni za aktivnost  $\alpha$ -amilaze u granuliranom komercijalnom uzorku za praškaste detergente ( $\alpha$ -amilaza *Duramyl 120 T* i kogrulat amilaze i proteaze: *Everlase/Duramyl 8.0 T/6.0 T*) dobiveni direktnim potenciometrijskim određivanjem i upotrebom *Konelab Arena* autoanalizatora.

Aktivnost $\alpha$ -amilaze/mKNU							
Duramyl 120 T				Everlase/Duramyl 8.0 T/60 T			
$m_A(\text{uzeto})/\mu\text{g}$	Očekivano *	Autoanalizator metoda	Direktna potenciometrija **	$m_A(\text{uzeto})/\mu\text{g}$	Očekivano ***	Autoanalizator metoda	Direktna potenciometrija *
20	2,40	2,35	2,27	40	2,64	2,56	2,48
30	3,60	3,64	3,60	60	3,96	3,90	3,85
40	4,80	4,80	4,80	80	5,28	5,38	5,40
50	6,00	6,00	5,99	100	6,60	6,61	6,78
60	7,20	7,20	7,45	120	7,92	7,92	7,98

\* Izračunato na temelju podataka iz laboratorija *Novozymes* (Bagsværd, Danmark); aktivnost  $\alpha$ -amilaze je 120 KNU/g

\*\* Srednja vrijednost za 5 mjerenja

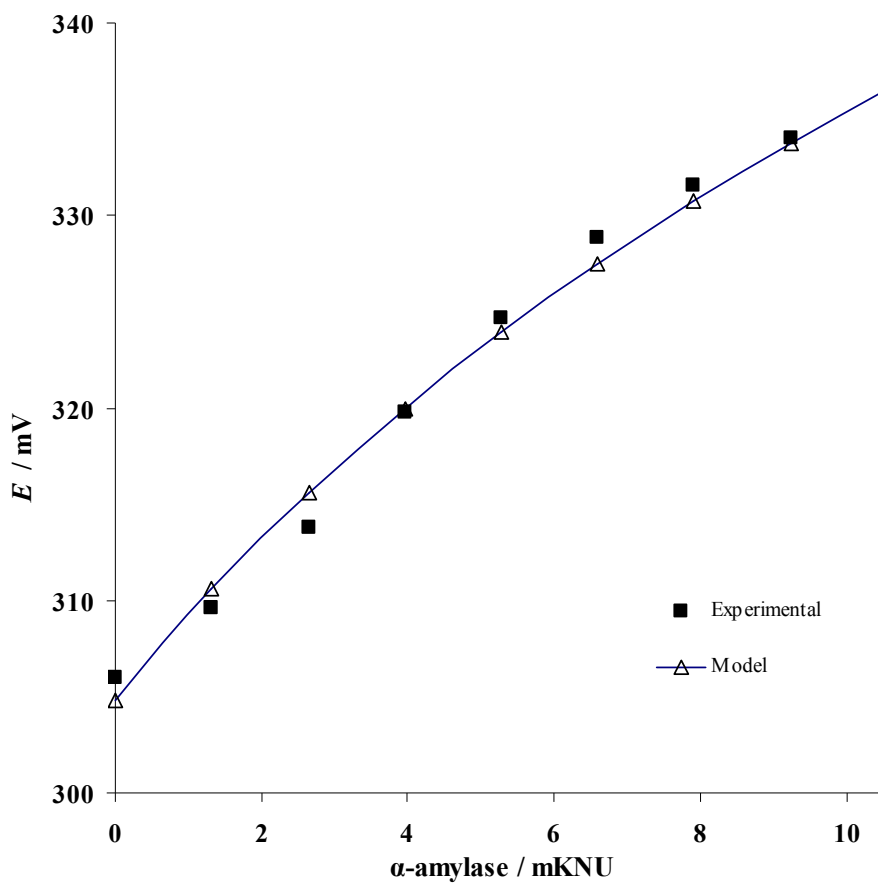
\*\*\* Izračunato na temelju podataka iz laboratorija *Novozymes* (Bagsværd, Danmark); aktivnost  $\alpha$ -amilaze je 66 KNU/g



**Slika 34.** Usporedba eksperimentalnih (■) i modelnih (Δ) karakteristika odziva platinskog amilaznog redoks-senzora na  $\alpha$ -amilazu *Duramyl 120 T* ( $c_0(I_3^-) = 0,1$  mM,  $c_0(I^-) = 0,05$  M, koncentracija škroba 5 mg/mL).

Metoda s analizatorom temelji se na cijepanju 4,6-etiliden-(G7)-1,4-nitrofenil-(G1)- $\alpha$ ,D- maltoheptaosida  $\alpha$ -amilazom i hidrolizom produkata degradacije u p-nitrofenol pomoću  $\alpha$ -glukozidaze, rezultirajući oslobađanjem kromofora. Mjerenja se izvode na valnoj duljini od 420 nm.

Granica detekcije platinskog amilaznog senzora nađena za *Duramyl 120 T* iznosila je 0,030 mKNU u rasponu od 0-9,6 mKNU (0-80  $\mu$ g) i 0,032 mKNU za industrijski enzimski kogradulat  $\alpha$ -amilaze i proteaze *Everlase/Duramyl 8.0 T/60 T* u rasponu od 0-9,24 mKNU (0-140  $\mu$ g).



**Slika 35.** Usporedba eksperimentalnih (■) i modelnih (Δ) karakteristika odziva platinskog amilaznog redoks-senzora na industrijski enzimski kogranulat  $\alpha$ -amilaze i proteaze *Everlase/Duramyl 8.0 T/60 T* ( $c_0(\text{I}_3^-) = 0,1 \text{ mM}$ ,  $c_0(\text{I}^-) = 0,05 \text{ M}$ , koncentracija škroba  $5 \text{ mg/mL}$ ).

Odzivi novog senzora su vrlo stabilni i ponovljivi zbog visoke ionske jakosti redoks-pufera i otopine ispitivanih uzoraka, što je omogućilo određivanje  $\alpha$ -amilaze sa zadovoljavajućom preciznosti i točnosti.



### 3.3.3.4. Usporedba rezultata određivanja $\alpha$ -amilaze dobivenih novim amilaznim redoks-senzorom sa spektrofotometrijskom metodom

Rezultati dobiveni upotrebom novog senzora uspoređeni su sa spektrofotometrijskom Fuwa<sup>2</sup> metodom prikazani su u Tablici 16.

Evaluacija rezultata primjenom Studentovog t-testa pokazala je da nema značajne razlike u srednjim vrijednostima dobivenim dvjema metodama za interval pouzdanosti od 95%. Manja preciznost rezultata dobivenih s obje metode za industrijske  $\alpha$ -amilaze *Duramyl 120 T* i *Everlase/Duramyl 8.0 T/60 T* može se pripisati onečišćenjima i kompleksnosti proizvoda (*Everlase/Duramyl 8.0 T/60 T*).

**Tablica 16.** Usporedba rezultata dobivenih Fuwa spektrofotometrijskom metodom i novim redoks-senzorom

Uzorak	Aktivnost $\alpha$ -amilaze*	
	Fuwa metoda	Redoks-senzor
$\alpha$ -Amilaza (Fluka)	0,157 ± 0,007	0,150 ± 0,006
(U)	0,296 ± 0,004	0,292 ± 0,003
Duramyl 120 T	2,48 ± 0,12	2,32 ± 0,11
(KNU)	4,91 ± 0,08	4,80 ± 0,07
Everlase/Duramyl 8.0 T/60 T	4,20 ± 0,16	3,99 ± 0,14
(KNU)	4,99 ± 0,12	4,88 ± 0,10

\* Srednja vrijednost za 5 mjerenja ±  $\sigma_{N-1}$

## **5. ZAKLJUČCI**

---

## 5. ZAKLJUČCI

U radu je opisana upotreba platinskoga redoks-senzora kao novog, brzog, pouzdanog i jeftinog senzora za direktno potenciometrijsko određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze. Mehanizam i djelovanje senzora baziraju se na mjerenju oslobođenog trijodida iz kompleksa trijodid-škrob nakon biokatalitičke razgradnje škroba  $\alpha$ -amilazom.

Optimizirani su sastav i stabilnost otopine kalijeveg trijodida. Potenciometrijski je karakteriziran kompleks trijodid-škrob pri promjenjivim koncentracijama škroba i trijodida. Predložen je mehanizam odziva platinskog redoks-senzora na  $\alpha$ -amilazu. Istraženi su reakcijski parametri (vrijeme reakcije, temperature, sastav pufera) za biokatalitičku razgradnju škroba  $\alpha$ -amilazom. Izvršena je njihova optimizacija što je rezultiralo značajnim smanjenjem vremena i troškova analize.

Eksperimentalni podaci uspoređeni su s odgovarajućim teorijskim modelom. Upotrebom Solvera, koji koristi metodu najmanjih kvadrata optimizirane su karakteristike senzora i analita (nagib senzora  $S$ , izraz za konstantni potencijal  $Const$ , factor proporcionalnosti  $k$ ).

Testiran je odziv senzora na čistu  $\alpha$ -amilazu (EC 3.2.1.1, Fluka, Švicarska), industrijski granulat  $\alpha$ -amilaze *Duramyl 120 T* i industrijski kogranulat proteaze i  $\alpha$ -amilaze *Everlase/Duramyl 8.0 T/60 T*. Pronađena granica detekcije je 1.944 mU za  $\alpha$ -amilazu za područje od 0-0.54 U (0-15  $\mu$ g), 0.030 mKNU za *Duramyl 120 T* za područje od 0-9.6 mKNU (0-80  $\mu$ g) i 0.032 mKNU za *Everlase/Duramyl 8.0 T/60 T* za područje od 0-9.24 mKNU (0-140  $\mu$ g).

Rezultati dobiveni upotrebom direktne potenciometrije s platinskim redoks-senzorom pokazali su zadovoljavajuću točnost i preciznost te dobro slaganje sa standardnom metodom i metodom na autoanalizatoru.

Predloženi senzor zahtijeva jednostavnu i jeftinu instrumentaciju, te je pogodan za minijaturizaciju i upotrebu, kao detektor, u mikrofluidičkim sustavima.

## **6. LITERATURA**

---

## 6. LITERATURA

1. N.J. Nelson: *Biol. Chem.* **153** (1944) 375–380
2. H. Fuwa: *J. Biochem.* **41** (1954) 583–603
3. A.Y. Foo, R.Bais: *Clin. Chim. Acta* **272** (1998) 137–147
4. W.W. Windish, N.S. Mhatre. *Microbial amylases*. In: Wayne Wu (Ed.). *Advances in applied microbiology*, Vol. 7, Academic Press, New York, 1965, str. 273-304
5. A. Pandey, P. Nigam, C.R. Soccol, V.T. Soccol, D. Singh, R. Mohan: *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31** (2000) 135-52
6. Z. Ohlsson: *Physiol. Chem.* **189** (1930) 17
7. B.K. Lonsane, M.V. Ramesh. *Production of bacterial thermostable  $\alpha$ -amylase by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis*. In: *Advances in applied microbiology*, Vol. 35, California Academic Press, San Diego, 1990, str. 1-56
8. W.M. Fogarty, C.T. Kelly, *Starch-degrading enzymes of microbial origin*, in M.J. Bull (Ed.): *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 15, Elsevier Scientific, Amsterdam, 1979, str. 87–150.
9. W.M. Fogarty, *Microbial amylases*, in W.M. Fogarty (Ed.): *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Applied Science, London, 1983, str. 1–92.
10. J.F. Robyt: *Enzymes in the hydrolysis and synthesis of starch*, in: R.L. Whistler, J.N. Bemiller, E.F. Paschall (Ed): *Starch: Chemistry and Technology*, second ed., Academic, San Diego, 1984, str. 87–123
11. J.F. Robyt, R.J. Ackerman, *Arch. Biochem. Biophys.* **145** (1971) 105–114.
12. T. Nakakuki, K. Azuma, K. Kainuma, *Carbohydr. Res.* **128** (1984) 297–310.
13. N. Monma, T. Nakakuki, K. Kainuma, *Agric. Biol. Chem.* **47** (1983) 1769–1774.
14. L. Duedahl-Olesen, L.H. Pedersen, K.L. Larsen: *Carbohydr. Res.* **329** (2000) 109–119
15. M. Vihinen, P. Mantsala: *Biochem. Mol. Biol.* **24** (1989) 329-418
16. M.J. Coronado, C. Vargas, J. Hofemeister, A. Ventosa, J.J. Nieto: *FEMS Microbiol. Lett.* **183** (2000) 67-71
17. B.L. Vallee, E.A. Stein, W.M. Summerwell, E.M. Fischer: *J Biol. Chem.* **231** (1959) 2901-5
18. W. Aehle, O. Misset: *Enzymes for industrial applications*, in: H.J. Rehm, G. Reed (Ed.): *Biotechnology*, 2nd ed.: Wiley-VCH, Germany, 1999, str. 189-216

19. T. Godfrey, S. West in: T. Godfrey, S. West (Ed.): *Industrial enzymology*, 2nd ed., Stockton Press, New York, 1996. str. 91, 105-31, 192, 339-56, 361-71
20. S. Mitidieri, A.H.S. Martinelli, A. Schrenk, M.H. Vainstein: *Bioresource Technol.* **97** (2006) 1217–1224
21. J.H. van Ee, W.C. van Rijswijk, M. Bollier: *Chim. Oggi.* **10** (1992) 21-4
22. V. Bravo Rodriguez, E. Jurado Alameda, J.F. Martinez Gallegos, A. Reyes Requena, A.I. Garcia Lopez: *Biochem. Eng. J* **27** (2006) 299–304
23. B. Kottwitz, H. Upadek, G. Carrer: *Chim. Oggi.* **12** (1994) 21-4
24. Svendsen A, Bisgaard-Frantzen H. PCT patent publication. WO 94/0, 1994.
25. S. Becks, C. Bielawski, D. Henton, R. Padala, K. Burrows, R. Slaby: *Clin. Chem.* **41** (1995) 186
26. N.Y. Giri, A.R. Mohan, L.V. Rao, C.P. Rao: *Curr. Sci.* **59** (1990) 1339-40
27. C. Menzel, T. Lerch, K. Schneider, R. Weidemann, C. Tollnick, G. Kretzmer, T. Scheper, K. Schugert: *Process Biochem.* **33** (1998) 175-80
28. H. Selye, T. McKeown: *Proc. Roy. Soc. B* **119** (1935) 1–31
29. M. Yamaguchi, T. Kanemori, M. Kanemaru, N. Takai, Y. Mizuno, H. Yoshida: *Biosens. Bioelectron.* **20** (2004) 491–497
30. F.G. Priest: *Bacteriol. Rev.* **41** (1977) 711-53.
31. J. Hollo, J. Szeitli: *The reaction of starch with iodine* In: J.A. Rodley (Ed.) *Starch and its derivatives*, 4th ed., Chapman & Hall, 1968, str. 203-46
32. E.J. van Loon, M.R. Likins, A.J. Seger: *Am. J. Clin. Pathol.* **22** (1952) 1134–1136
33. B.W. Smith, J.H. Roe: *J. Biol. Chem.* **179** (1949) 53–59
34. H.V. Street, J.R. Close: *Clin. Chim. Acta* **1** (1956) 256–268
35. P. Wohlgemuth: *Biochem. Z.* **9** (1908)
36. B.W. Smith, J.H. Roe: *J. Biol. Chem.* **227** (1957), 357–362
37. P.W. Hansen: *Anal. Chim. Acta* **158** (1984) 375-7.
38. M. Carlsen, J. Marcher, J. Nielsen: *Biotechnol. Tech.* **8** (1994) 479-82
39. R.M. Sandstedt, E. Kneen, M.J. Blish: *Cereal Chem.* **16** (1939) 712-23
40. K. Kulp: *Enzymes as dough improvers* In: B.S. Kamel, C.E. Stauffer (Ed.) *Advances in baking technology*, Blackie Academic and Professional, VCH Publishers, New York, 1993, str. 152-78
41. *Indian Standard. Colorimetric determination of alpha-amylase activity in cereals and cereal products.* IS 10524. Indian Standards Institution, 1982, New Delhi.

- 
42. *The Japanese Pharmacopoeia 13th Technical Information*, Yakugyo Jiho, 1966, str. 102
43. P. Bernfeld: *Methods Enzymol.* **1** (1955) 149-58
44. H.C. Sherman, E.C. Kendall, E.D. Clark: *J. Am. Chem. Soc.* **32** (1910) 1073
45. V.C. Myers, A.H. Free, E.E. Rosinski: *J. Biol. Chem.* **154** (1944) 39-49
46. J.D. Teller: *J. Biol. Chem.* **185** (1950) 701-704
47. G.L. Miller: *Anal. Chem.* **31** (1959) 426-8
48. R.S. Mishra, R. Maheshwari: *J. Biosci.* **21** (1996) 653-72
49. M. Ceska, E. Hultman, B.G.A. Ingelman: *Experientia* **25** (1969) 555-6. M.R. Dhawale, J.J. Wilson, G.G. Khachatourians, W.M. Ingledew: *Appl. Environ. Microbiol.* **44** (1982) 747-50
50. M.R. Dhawale, J.J. Wilson, G.G. Khachatourians, W.M. Ingledew: *Appl. Environ. Microbiol.* **44** (1982) 747-50
51. D.W.S. Wong, S.B. Batt, G.H. Robertson: *J. Agric. Food Chem. ACS* (2000) **48** 4540
52. H. Sheehan, B.V. McCleary: *Biotechnol. Tech.* **2** (1988) 289-92
53. J.F. Robyt, R.J. Ackerman, J.G. Keng: *Anal. Biochem.* **45** (1972) 517-524
54. S. Hizukuri, Y. Takeda, M. Yasuda, A. Susuki: *Carbohydr. Res.* **94** (1981) 205-213
55. M.J. Somogyi: *Biol. Chem.* **195** (1952) 19-23
56. M. Sinner, J. Puls: *J. Chromatogr.* **156** (1978) 197-204
57. B.V. McCleary, H. Sheehan: *J. Cereal Sci.* **6** (1987) 237-251
58. B.M. Brena, C. Pazos, L. Franco-Fraguas, F. Batista-Viera: *J. Chromatogr. B* **684** (1996) 217-237
59. K. Okuda, K-I. Naka, N. Shimojo: *Clinical assay of  $\alpha$ -amylase activity in body fluids, in: The Amylase Research, Society of Japan (Ed.): Handbook of Amylases and Related Enzymes, Their Sources, Isolation Methods, Properties and Applications*, Pergamon, Oxford, 1988, str. 178-185
60. M. John, J. Schmidt, H. Kneifel: *Carbohydr. Res.* **119** (1983) 254-257
61. H. Tatsumi, H. Katano, T. Ikeda: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71** (4) (2007) 946-950
62. M. J. Batchelor (Reading, GB3), S.C. Williams (Abingdon, GB3), M.J. Green (Buckinghamshire, GB3) US Patent 4912041, 1990.
63. R.C. Barabino, D.N. Gray, M.H. Keyes: *Clin. Chem.* **24** (1978) 1393-1398
64. M.J. Batchelor, S.C. Williams, M.J. Green: *J. Electroanal. Chem.* **246** (2) (1988) 307-311

- 
65. C. Zou, M. Zhou, G. Xie, P. Luo et al.: *Chin. J. Anal. Chem.* **36** (9) (2008) 1217–1220
66. J. Zheng, G. Xie, C. Chen: *Bioinformatics and Biomedical Engineering* **4** (2010) 1-5
67. M. Mahosenaho, C. Felice, L. Micheli, A.M. Sesay, G. Palleschi, V. Virtanen:  
*Microchimica Acta* **170** (3-4) (2010) 243-249
68. B.B. Gnedenko, A.M. Galkin, A.D. Ryabov: *Electroanalysis* **9** (8) (1997) 592–595
69. K. Kosswig, H. Stache (Eds.): *Die Tenside*, Carl Hanser Verlag München, Wien,  
1993, str. 1-114
70. J. Emnéus, L. Gorton: *Anal. Chim. Acta* **234** (1990) 97
71. H. Ohura, T. Imato, Y. Asano, S. Yamasaki: *Talanta* **45** (1998) 565
72. L. Zajoncová, M. Jilek, V. Beranova, Pavel Peč: *Biosens. Bioelectron.* **20** (2004) 240–  
245
73. M. Yamaguchi, M. Kanemaru, T. Kanemori, Y. Mizuno: *Biosens. Bioelectron.* **18**  
(2003) 835-840
74. M. Yamaguchi, M. Deguchi, J. Wakasugi: *Biomed. Microdevices* **7** (4) (2005) 295–  
300
75. D.P. Nikolelis, H.A. Mottola: *Anal. Chem.* **50** (1978) 1665
76. L. Olsson, U. Schulze, J. Nielsen: *Trends Anal. Chem.* **17** (1998) 88
77. Recktenwald, K.H. Kroner, M.R. Kula: *Enzyme Microb. Technol.* **7** (1985) 607
78. M.D. Luque de Castro, J.M. Fernandez-Romero: *GBF Monographs* **14** (1991) 123
79. W.R. O'Neil, N. Gochman: *Clin Chem.* **16** (12) (1970) 985-989
80. D.L. Bittner, J. Manning: *Automated neocuproine glucose method: Critical factors  
and normal values*, in: N.B. Scova (Ed.) *Automation in Analytical Chemistry  
Technicon Symposia* 1966, Mediad, White Plains, New York, 1967, str. 33
81. R. Schindler, B. Lendl, R. Kellner: *Anal. Chim. Acta* **366** (1998) 35-43
82. R.W. Min, M. Carlsen, J. Nielsen, J. Villadsen: *Biotech. Tech.* **9** (1995) 763
83. J.F. van Staden, L.V. Mulaudzi: *Anal. Chim. Acta* **421** (2000) 19–25
84. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspocho, R. Gonzalez Bano: *Analyst* **125** (2000)  
749–752
85. W.C. Davison: *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **37** (1925) 281
86. R. Elman, J.M. McCaughan: *Arch. Int. Med.* **40** (1927) 58
87. M. Ohnishi, K. Hiromi, *General considerations for conditions and methods of  
amylase assay*, in *The Amylase Research Society of Japan* (Ed.), *Handbook of*



- Amylases and Related Enzymes, Their Sources, Isolation Methods, Properties and Applications*, Pergamon, Oxford, 1988, str. 10–12.
88. M. Boehm-Truitt, E. Harrison, R.O. Wolf, A.L. Notkins: *Anal. Biochem.* **85** (1978) 476-479
89. M.L. Caldwell, F.C. Hildebrand: *J. Biol. Chem.* **111** (1935) 411
90. H. Kondo, H. Nakatani, K. Hiromi: *Agric. Biol. Chem.* **41** (1977) 631-634
91. T. Watanabe, A. Yamamoto, S. Nagai, S. Terabe, *Electrophoresis* **19** (1998) 2331-2336
92. T. Takeuchi, T. Matsushima, T. Sugimura, *Clin. Chim. Acta* **60** (1975) 207-212
93. V.G. Battershell, R.J. Henry, *J. Cereal Sci.* **12** (1990) 73-79
94. E. Svens, K. Kapyaho, P. Tanner, T.H. Weber, *Clin. Chem.* **35** (1989) 662-667
95. P.G. James, R.B. Passey, J.B. Fuller, M.L. Giles: *Clin. Chem.* **23** (3) (1977) 546-550
96. J. Ruzicka and E. H. Hansen: *Flow injection analysis*, 2nd edn, Wiley, New York, 1988.
97. I. Filipović, S. Lipanović, *Opća i anorganska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1995.
98. G.M.A. van Beynum, J. A. Roles: *Starch Conversion Technology*, Marcel Dekker, INC., New York and Basel 1985
99. R. Parker, S.G. Ring: *J. Cereal Sci.* **34** (2001) 1-17
100. R.F. Tester, J.K. Karkalas, X. Qi: *J. Cereal Sci.* **39** (2004) 151- 165
101. E.K. Chamberlain, M.A. Rao: Rheological: *Carbohydr. Polym.* **40** (1999) 251-260
102. A. Buleon, P. Colonna, V. Planchot, S. Ball: *Int. J. Biolog. Macromolec.* **23** (1998) 85-112
103. J.J. Colin, H.G. de Claubry: *Ann. Chim.* **90** (1814) 87
104. W. Banks, C.T. Greenwood: *Starch and its Components*, Edinburgh Univ. Press, Edinburg, 1975, str. 67.
105. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
106. M.A. Swanson: *J. Biol. Chem.* **172** (1947) 825-837
107. J.A. Thoma, D. French: *J. Am. Chem. Soc.* **82** (1960) 4144–4147
108. K. Hiromi, T. Shibaoka, S. Ono: *J. Biochem.* **68** (1970) 205-21
109. V.T. Calabrese, A. Khan: *Journal of Polymer Science: Part A* **37** (1999) 2711–2717
110. S. Mukherjee, S. Bhattacharyya: *J Ind. Chem. Soc.* **23** (4) (1946) 59–560
111. C.A. Kuntson, J.E. Cluskey, F.R. Dintzis: *Carbohydr. Res.* **101** (1982) 117–128

- 
112. W. Saenger: *Naturwissenschaften* **71** (1) (1984) 31-3
  113. R.C. Teitelbaum, S.L. Ruby; T.J. Marks: *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 3322–3328
  114. M. Minick, K. Fotta, A. Khan: *Biopolymers* **31** (1991) 57–63
  115. T. Konishi, W. Tanaka, T. Kawai, T. Fujikawa: *J. Synchrotron Rad.* **8** (2001) 737–739
  116. P. Tomasik, C.H. Schilling: *Carbohydr. Chem. Biochem.* **53** (1998) 263–343
  117. O. Nimz, K. Geßler, I. Uson, S. Laettig, H. Welfle, G.M. Sheldrick, W. Saenger: *Carbohydr. Res.* **338** (2003) 977–986
  118. J.A. Rendleman: *Carbohydr. Polym.* **51** (2003) 191-202
  119. J. Kleinberg, W.J. Argersinger, E. Griswold: *Inorganic chemistry*, Boston: D.C. Heath and Co, Boston, 1960, str. 466–467
  120. T. Moeller: *Inorganic chemistry*, Wiley, New York, 1963, str. 14
  121. E.J. Billo: *Excel for Chemists*, Wiley, New York, 2001
  122. P.C. Williams, F.D. Kuzina, I. Hlynka: *Cereal Chem.* **47** (1970) 411–421

## **7. ŽIVOTOPIS**

---

## 7. ŽIVOTOPIS

Nikola Sakač, rođen je 05. svibnja 1983. godine u Čakovcu gdje je 2001. maturirao na Gimnaziji Čakovec. Iste godine upisuje Pedagoški fakultet (kasnije se iz njega odvajaju Odjeli, kao samostalne jedinice Sveučilišta) Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, smjer biologija i kemija. U toku studija dobitnik je nekoliko nagrada, a najznačajnija je Rektorova nagrada, 2005. Iste godine odlazi na stručno usavršavanje u Berlin na institut *Deutsche Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke* u trajanju od 9 tjedana. Diplomirao je na Odjelu za biologiju i Odjelu za kemiju u travanju 2006. s ocjenom izvrstan. Iste se godine zapošljava kao asistent na Odjelu za kemiju, Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku. 2007. upisuje doktorski studij, smjer Inženjerska kemija, na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.

Suradnik je na projektu Ministarstva znanosti Republike Hrvatske - *Kemijski senzori za primjenu u biomedicini, hrani i zaštiti okoliša* (291-0580000-0169), projektu mađarsko-hrvatske bilateralne suradnje, Sveučilište u Pečuhu (2007-2011), i projektu Nacionalne zaklade za znanost, visoko školstvo i tehnološki razvoj RH i Saponije, kemijske, prehrambene i farmaceutske industrije d.d., Osijek - *Razvoj prijenosnog analizatora za određivanje anionskih tenzida u otpadnim vodama* (2010 - 2012).

Sudionik je nekoliko ljetnih škola, od kojih se ističu *Advanced Study Course on Optical Chemical Sensors* škole u organizaciji nekoliko vodećih europskih Sveučilišta. Do sada je kao koautor objavio 4 znanstvena rada koje citira Current Contents. Aktivno je sudjelovao na 7 međunarodnih i domaćih skupova, prezentacijama na posterima i usmenim izlaganjem.

---

**Popis objavljenih znanstvenih radova:**

1. **N. Sakač**, M. Sak-Bosnar, M. Horvat, D. Madunić-Čačić, A. Szechenyi, B. Kovacs: *A new potentiometric sensor for the determination of  $\alpha$ -amylase activity*, *Talanta*, **83 (5)** (2011) 1606-12.

I.F. = 3,290

2. M. Sak-Bosnar, D. Madunić-Čačić, **N. Sakač**, M. Samardžić, Ž. Kurtanjek: *Estimation and optimization of potentiometric sensor response parameters from surfactant titration data using Microsoft Excel Solver and Mathematica*, *Sensor Lett.*, **9** (2011) xxx.

I.F. = 1,587

3. M. Sak-Bosnar, D. Madunić-Čačić, **N. Sakač**, O. Galović, M. Samardžić, Z. Grabarić: *Potentiometric sensor for polyethoxylated nonionic surfactant determination*, *Electrochim. Acta*, **55** (2009) 528-534.

I.F. = 3,325

4. D. Madunić-Čačić, M. Sak-Bosnar, O. Galović, **N. Sakač**, R. Matešić-Puač: *Determination of cationic surfactants in pharmaceutical disinfectants using a new sensitive potentiometric sensor*, *Talanta* **76** (2008) 259-264.

I.F. = 3,290