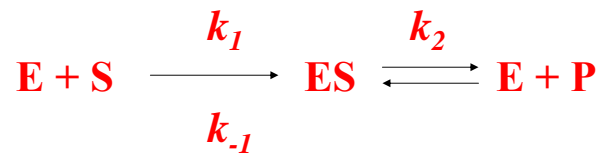


## Enzymové sensory

- enzymy – bílkoviny s aktivním místem, v němž je substrát přeměňován na produkt(y):



- Michaelisova konstanta  $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$
- rychlost přeměny substrátu:  $v = v_{max}[S]/(K_m + [S])$
- saturační závislost – kalibrace je lineární pouze pokud platí  $[S] \ll K_m$  pak  $v = v_{max}/K_m[S]$

## Měření koncentrace substrátu

Stanovovaná látka je imobilizovaným enzymem konvertována na produkty detekovatelné vhodným převodníkem  
Obvykle je možné pro daný analyt navrhnout více konfigurací biosensoru

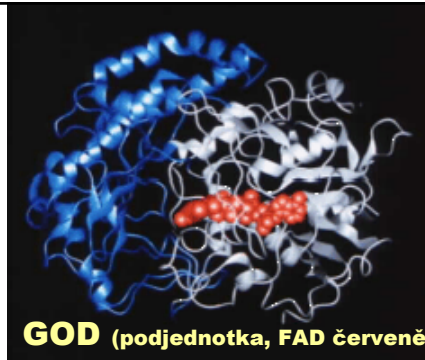
### Přehled:

- Sacharidy
- Alkoholy, fenoly
- Karboxylové kyseliny, aminokyseliny
- Dusíkaté sloučeniny

# Sacharidy

## glukosa

- důležité měření v klinické praxi (normální hladina v krvi 5 mM, v moči 1 mM) – potřebný rozsah 0.1 až 20 mM
- **glukosa oxidasa** ( $\beta$ -D-glukosa : O<sub>2</sub> 1-oxidoreduktasa, EC 1.1.3.4, GOD), je běžně dostupná z plísní *Aspergillus niger* nebo *Penicillium notatum*. GOD je dimer se dvěma FAD kovalentně vázanými na podjednotky, obsahuje asi 16% glykosylových zbytků, molekulová hmotnost je 160 kDa, specifická aktivita komerčních preparátů přesahuje 200 IU/mg a je velmi stabilní.
- PQQ-dependentní **glukosa dehydrogenasa** z bakterie *Acinetobacter calcoaceticus* (EC 1.1.99.17, PQQ značí koenzym pyrolochinolinchinon); snadno přenáší elektrony na mediátory (ferrocen), a má velmi vysoké číslo přeměny - poskytuje nejvyšší signál.



# Biosensory pro diabetiky

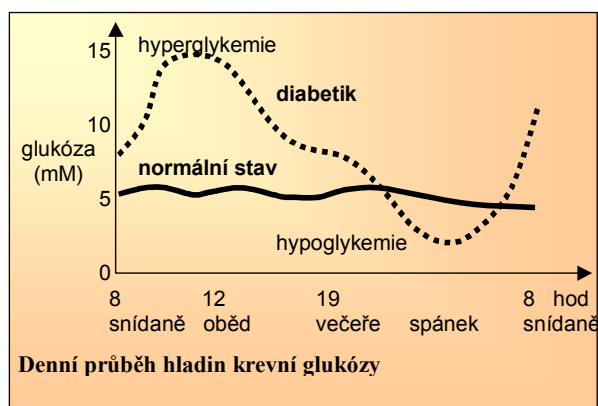
- v oblasti klinické biochemické analýzy zůstává stále středem zájmu měření hladiny glukosy u diabetiků
- **diabetes mellitus** (cukrovka) a s ním spojené komplikace tvoří v dnešní době velký sociální problém
- kromě běžných poruch souvisejících s diabetem, jako je hyperglykemie, metabolická acidóza a glykosurie, se u diabetiků vyskytují i další komplikace, které výrazně ovlivňují kvalitu života pacientů; regulace je však u diabetiků porušena a musí se docílit vnějším podáváním insulinu
- dávkování však vyžaduje znalost aktuální hladiny glukosy, takže pacienti jsou nuceni několikrát denně sami měřit glykemii
- **velmi dobré uplatnění biosensorů**

## Diabetes mellitus (cukrovka)

- klinicky definován jako chronické, endokrinní a metabolické onemocnění, vznikající v důsledku nedostatečného působení inzulínu
- existují dva typy tohoto onemocnění:
  1. typ neboli inzulín-dependentní diabetes mellitus (**IDDM**, četnost 3 až 7 případů na tisíc osob) je charakterizován sníženou nebo prakticky chybící produkcí inzulínu, takže pacienti ho musí denně přijímat v injekčních dávkách.
  2. typ je inzulín-independentní diabetes mellitus (**NIDDM**), pacienti na vlastní nebo injekčně podaný inzulín nereagují (rezistence).
- vznik a vývoj komplikací při tomto onemocnění je velmi těsně spjat s porušenou regulací hladiny krevní glukosy

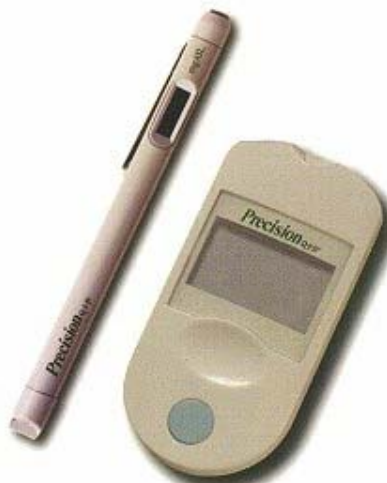
## Regulace hladiny glukosy

- za normálních okolností je koncentrace glukosy v krvi udržována mezi 4.4 a 6.6 mM pomocí zpětné vazby
- nárůst koncentrace glukosy po jídle stimuluje rychlé uvolnění inzulínu, který umožní vstup glukosy dovnitř buněk a současně zabrání její tvorbě v játrech



## Biosensory pro diabetiky

- první osobní glukometr na bázi výměnného elektrochemického biosensory představila firma MediSense
- ExacTech - velikost psacího pera do kterého se zasunovaly měřicí pásky na jedno použití
- Companion - formát karty
- MediSense nyní patří do skupiny Abbott Laboratories, současný její glukometr je distribuován pod názvem Precision QID
- proti předchozím verzím potřebuje nyní pro analýzu pouze 5 mikrolitrů krve, takže pacient je méně zatěžován.



## Biosensory pro diabetiky

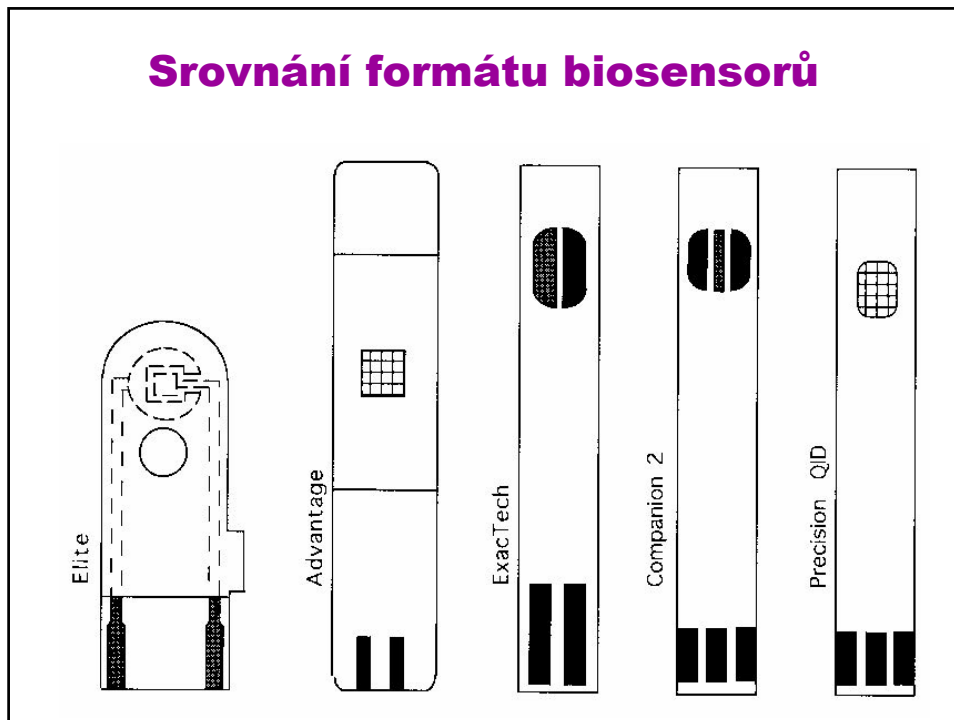
### elektrochemické sensory

- Elite (pro analýzu stačí 3 mikrolitry krve) vyrábí japonské firmy Matsushita a Kyoto Daiichi Kagaku, distribuje Bayer
- Accu-Chek Advantage (Boehringer Mannheim) na rozdíl od ostatních nevyužívá k výrobě biosensory sítotisk, ale originální vícevrstvou laminátovou technologii

### reflektometrické systémy

- Encore (Bayer),
- One Touch (existuje ve verzích Basic a Profile), vyrábí firma LifeScan patřící pod Johnson & Johnson)
- Accu-Chek (verze Instant a Easy, Boehringer).

## Srovnání formátu biosensorů



## Hlavní cíl do budoucna

- implantovatelný glukosový biosensor pro měření in vivo
- přímé řízení pumpy dávající kontinuálně insulin podle okamžité potřeby pacienta
- výsledky vývoje prováděného paralelně asi na desítku různých pracovišť v celém světě nadějně - po implantaci fungují biosensory až 100 dnů
- komerční systém dosud není k dispozici
- problémy jsou zejména se spolehlivostí a dostatečně dlouhou operační stabilitou.

## Monosacharidy

### galaktosa

- monosacharid, potenciálně toxická při poruchách odbourávání; hladina v séru normálně pod 0.25 mM
- **galaktosa oxidasa** (EC 1.1.3.9, kuproprotein), má afinitu k oběma anomerům

### fruktosa

- alternativní sladidlo v potravinářství
- **fruktosa dehydrogenasa** - membránově vázaná, přenos elektronů prostřednictvím cytochromů

### kyselina askorbová (vitamin C)

- v potravinách, ovoci, a mnoha vitaminových preparátech
- **askorbát oxidasa** (EC 1.10.3.3, kuproprotein)

## Disacharidy

### sacharosa

- disacharid, potravinářství, cukrovarnictví
- multienzymové stanovení: hydrolyzuje se **invertasou** (EC 3.2.1.26) na  $\alpha$  anomer glukosy a fruktosu, poté se pomocí **mutarotasy** (EC 5.1.3.3) urychluje ustavení rovnováhy mezi oběma anomery glukosy (spontánně tento proces probíhá pomalu) a nakonec se  $\beta$  anomer glukosy oxiduje **glukosa oxidasou**

### laktosa ( $\beta$ -D-galaktosyl-4-O-glukosa)

- mléčný cukr (0.3 až 0.6 mM v lidském a 0.25 až 0.28 mM v kravském mléku), analýza v potravinářství - určení sušeného mléka v produktech
- hydrolyza  **$\beta$ -galaktosidasou** (EC 3.2.1.23) poskytuje oba monosacharidy, pak se použije buď **galaktosa-** nebo **glukosa oxidasa**

### maltosa

- hydrolyza **maltasou** (EC 3.2.1.20), poté se měří vzniklá glukosa

## Polysacharidy

**škrob** (spojení glukosových molekul  $\alpha$ -1,4)

- funguje jako zásobní polysacharid, stanovení se provádí v obilí, rýži a bramborách
- nejprve hydrolyza **glukoamylasou** (= amyloglukosidasa, exo-1,4- $\alpha$ -glukosidasa, EC 3.2.1.3), navíc lze přidat i  **$\alpha$ -amylasu** (1,4-  $\alpha$ -D-glukan-glukanohydrolasa, EC 3.2.1.1), která produkuje maltosu a dextriny délky 4 až 12 glukózových jednotek); nakonec se použije glukosa oxidasa
- problémem je velikost molekuly škrobu, je vhodnější provést hydrolysu v enzymovém reaktoru než imobilizovat hydrolytické enzymy v biokatalytické vrstvě na povrchu převodníku

## Alkoholy

**ethanol**

- v alkoholických nápojích, v klinické praxi a kontrola řidičů
- **alkohol oxidasa** (EC 1.1.3.13, *Pichia pastoris*)

**cholesterol**

- klinické praxe, v potravinách (tuky)
- **cholesterol oxidasa** (EC 1.1.3.6, produkuje peroxid vodíku) účinkuje na volný cholesterol; pro stanovení formy vázané v esterech se přidá **cholesterol esterhydrolasa** (EC 3.1.1.13)

**cholin**

- při studiu nervové funkce (neuromediátor)
- **cholin oxidasa** (EC 1.1.3.17, z *Alcaligenes* sp.) produkuje betain a dvě molekuly peroxidu vodíku

## Fenoly

- stanovení fenolů má značný význam v průmyslových odpadních vodách a v některých potravinách (oleje)
- **tyrosinasa** (fenol oxidasa nebo polyfenol oxidasa, EC 1.14.18.1) je kuproprotein izolovaný z žampionů, nebo používaný přímo jako tkáňový řez houby
- působí na fenol, jednoduché substituované fenoly, katechol, chlorfenoly, oxidace jde přes katechol na *o*-chinon, který spontánně polymeruje (tmavnutí enzymových vrstev)
- dalším enzymem je **lakasa** (EC 1.10.3.2, izoluje se z houby *Polyporus versicolor*, kuproprotein) působí zejména na hydrochinon a *p*-difenoly
- některé kmeny *Pseudomonas* jsou schopné fenoly metabolizovat (mikrobiální sensory)

## Karboxylové kyseliny

### kyselina mléčná (L-laktát)

- v klinické medicíně (stanovení koncentrace v séru slouží pro rozlišení příčin acidózy, normální hladina je 2.7 mM)
- ve sportovní medicíně slouží jako ukazatel pro hodnocení trénovanosti (nárůst koncentrace nastává jako reakce na fyzickou zátěž)
- v potravinářském průmyslu vzniká při mléčném kvašení - jogurty, víno
- **L-laktát dehydrogenasa** (EC 1.1.1.27, u savců, ze svalů) má jako koenzym NAD<sup>+</sup>, pro analýzu biosensory se prakticky nepoužívá
- další dehydrogenasou laktátu je **cytochrom b<sub>2</sub>** (EC 1.1.2.3, izoluje se z kvasinek nebo se používají přímo kvasinky), jeho akceptorem je ferrikyanid a další mediátory
- nejběžnější je dnes **L-laktát oxidasa** (EC 1.1.3.2, LOD, z bakterie *Pediococcus*), flavoprotein produkující peroxid vodíku
- **L-laktát monooxygenasa** (EC 1.13.12.4) produkuje acetát a oxid uhličitý a používala se spíše dříve před objevením LOD.
- při mléčném kvašení může vznikat i D-forma laktátu, její stanovení se provádí pomocí **D-laktát dehydrogenasy** (NAD<sup>+</sup>dependentní).



### kyselina jablečná (malát)

- v ovoci a ve víně (hodnocení kvality), potřebný enzym je **malát dehydrogenasa** (NAD<sup>+</sup>, EC 1.1.1.37)

### kyselina šťavelová (oxalát)

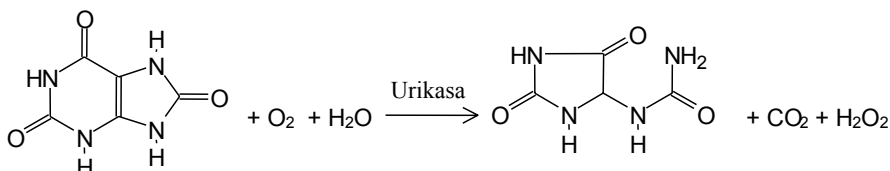
- v moči při hyperoxalurii; **oxalát oxidasa** (EC 1.2.3.4) katalyzuje reakci  $(\text{COOH})_2 + \text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$

### kyselina isocitronová

- produktem při fermentační výrobě kyseliny citronové, ke stanovení slouží **isocitrát dehydrogenasa** (EC 1.1.1.42, NADP<sup>+</sup>)

### kyselina močová (urát)

- v klinické praxi - hematologické poruchy (v séru 0.14 až 0.4 mM). Enzym **urikasa** (urát oxidasa, EC 1.7.3.3, obsahuje měď) ji oxiduje na allantoin:



### mastné kyseliny

- analyzují se v krvi, v potravinách indikují denaturaci tukových (olejových) složek
- stanovení je dvouenzymové: **acyl-CoA synthasa** v přítomnosti ATP a CoA převede mastnou kyselinu na příslušný acyl-CoA, na který účinkuje **acyl-CoA oxidasa** (EC 1.3.3.6, oxidací vzniká dvojná vazba a současně se produkuje peroxid vodíku)

.....

### kyselina siřičitá

- obsah se kontroluje ve víně
- její oxidace je možná pomocí **sulfit oxidasy** (EC 1.8.3.1) produkující H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## Aminokyseliny

- lze stanovit jako sumu (v potravinách) pomocí **oxidasy L-aminokyselin** (EC 1.4.3.2), obdobný enzym existuje také pro D-aminokyseliny (EC 1.4.3.3), může se uplatnit při oxidaci glycinu

### lyzin

- jako esenciální faktor přidáván do krmných směsí
- **lyzin-a-oxidasa** (EC 1.4.3.14, dekarboxylující, z *Trichoderma viridae*)
- **lyzin dekarboxylasa** (EC 4.1.1.18, z *E. coli*, *Bacterium cadaveris*) produkuje CO<sub>2</sub> a kadaverin, ten lze následně stanovit diaminoxidasou (z hrachu, EC 1.4.3.6)

### kyselina glutamová

- je součástí polévkových koření a sojové omáčky
- **glutamát oxidasa** (EC 1.4.3.11, flavoprotein) produkuje z glutamátu NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>, α-oxoglutarát a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- **glutamát dehydrogenasa** [L-glutamát:NAD(P)<sup>+</sup> oxidoreduktasa (deaminující), z jater] se uplatňovala zejména dříve před objevením oxidasy

## močovina Dusíkaté sloučeniny

- v krvi normální hladina 3.6 až 9 mM, indikátor funkce ledvin, **ureasa** (EC 3.5.1.5) je vůči močovině absolutně specifická

### kreatin, kreatinin

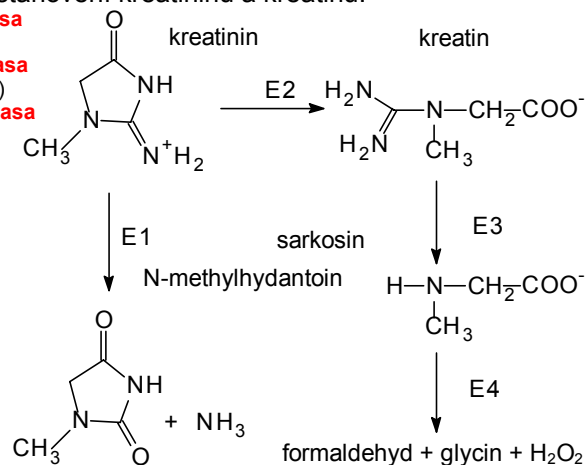
- enzymy potřebné pro stanovení kreatininu a kreatinu:

E1 **kreatinin iminohydrolasa**  
(EC 3.5.4.21)

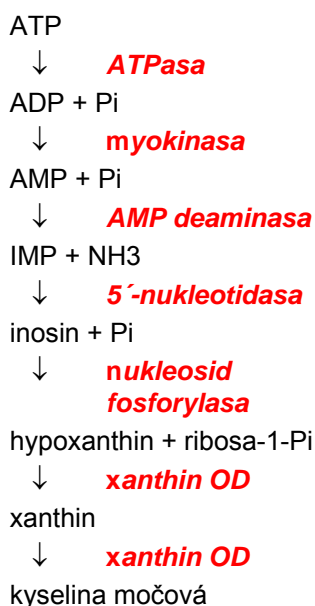
E2 **kreatinin amidohydrolasa**  
(kreatinasa, EC 3.5.2.10)

E3 **kreatin ami-dinohydrolasa**  
(EC 3.5.3.3)

E4 **sarkosin oxidasa**  
(EC 1.5.3.1)



## Purinové base (čerstvost rybího masa)



Při kažení masa probíhá enzymová autolýza tkáně a dochází k postupnému hydrolytickému rozkladu ATP, v konečné fázi se oxiduje až na kyselinu močovou. Tím nastávají změny kvality a chuti masa.

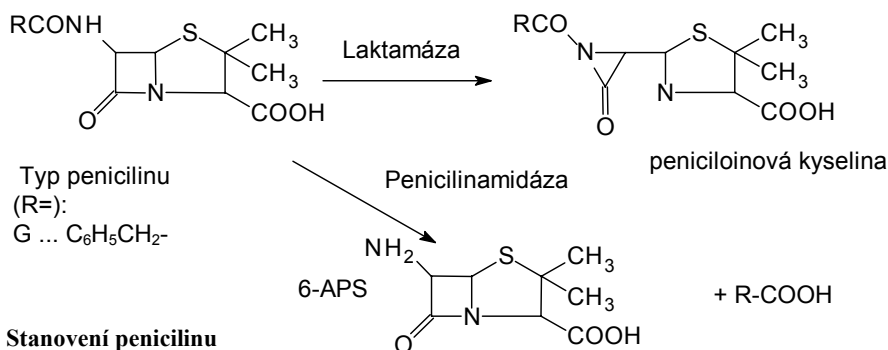
Pro postižení stupně tohoto procesu byl vyvinut čtyřkanálový biosensor:

- 1) xanthin oxidasa (XOD, EC 1.2.3.2)
- 2) XOD + nukleosid fosforylasa (NP, EC 2.4.2.1)
- 3) jako 2 + 5'-nukleotidasa (NT, EC 3.1.3.5)
- 4) jako 3 + AMP deaminasa (AD, EC 3.5.4.6)

Tak lze postupně určit hladiny všech metabolitů v tkáni, přitom se navíc dopočítá obsah ATP / ADP (jejich výchozí množství je obvykle víceméně konstantní a známé). Vypočítá se procentuální podíl xanthinu a hypoxanthinu k sumě všech metabolitů - tzv. faktor čerstvosti K. Podle jeho velikosti se pak rybí maso klasifikuje jako velmi čerstvé (K < 10%), čerstvé (K < 40%) a kazící se (K > 40%)

## Penicilin

- stanovován v průběhu fermentační výroby. Pro stanovení jsou vhodné dva enzymy, β-laktamasa (penicilinasa, EC 3.5.2.6) a penicilinamidasa (EC 3.5.1.11); oba se spojují s pH sensory



## Měření enzymových aktivit

- produkt reakce měřeného enzymu slouží jako substrát indikačního enzymu imobilizovaného v biokatalytické vrstvě
- oproti klasickým fotometrickým postupům u biosensorů často nevede k zákalu nebo zbarvení analyzovaného vzorku.
- Laktát dehydrogenasa se měří v klinické praxi (normálně v séru 63 až 155 IU/l u mužů, 62 až 131 IU/l u žen), nárůstá při hepatitidě nebo infarktu. Substrátem je laktát, sleduje se produkce pyruvátu pomocí senzoru s pyruvát oxidázou.
- $\alpha$ -Amylasy se měří v séru (normálně 60 až 150 U/l), nárůstá při akutní pankreatitidě. Stanovení je možné buď použitím maltopentaózy jako substrátu a biosenzoru s glukóza oxidázou, nebo může být substrátem škrob a pro detekci navíc slouží také glukooamyláza.
- Transaminasy indikují funkci jater a objevují se i při infarktu. ALT (normálně v séru 5 až 24 U/l), AST (5 až 20 U/l), při patologických stavech (hepatitida, alkoholismus) je možné pozorovat nárůst až 100 až 1000x. Pro ALT jsou substráty alanin a  $\alpha$ -oxoglutarát, detekuje se vznikající pyruvát nebo glutamát. Pro AST jsou substráty aspartát a  $\alpha$ -oxalacetát a měří se vzniklý glutamát.
- Arginasa je snadno stanovitelná pomocí močovinového biosenzoru (ureáza / amoniak), substrátem je arginin.

## Měření enzymových aktivit

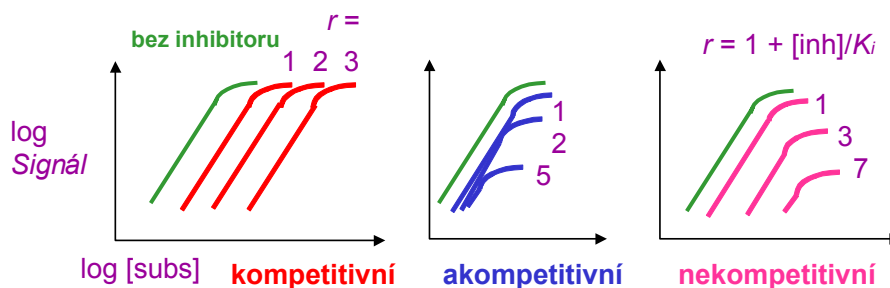
- aktivity stanovitelné pomocí glukózového biosenzoru (glukóza oxidáza / peroxid vodíku) zahrnují například následující enzymy (v závorce je uveden potřebný substrát):  
alkalická / kyselá fosfatáza,  $\beta$ -glukosidáza (glukóza-6-fosfát), glukooamyláza (maltóza), invertáza (sacharóza), trehaláza ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ -trehalóza).
- aktivity stanovitelné pomocí fenolového biosenzoru (tyrosináza / kyslík) zahrnují:  
alkalická / kyselá fosfatáza (fenylfosfát),  $\beta$ -galaktosidáza (fenyl- $\beta$ -D-galaktosid),  $\beta$ -glukosidáza (fenyl- $\beta$ -D-glukosid),  $\beta$ -glukuronidáza (fenyl- $\beta$ -D-glukuronid).

## Měření inhibice enzymů

- pro bioanalytické aplikace je možné využít reakce enzymů s inhibitory - ty snižují aktivitu imobilizovaného indikačního enzymu
- měření inhibitorů je obvykle velmi citlivé, jedna molekula analytu zablokuje jednu molekulu enzymu, který následně přestane konvertovat mnoho molekul substrátu
- určitá forma zesilovacího mechanismu
- klasifikace inhibicí:**  
 ireverzibilní (nevratné)  
 reverzibilní      kompetitivní      (parciální / plná)  
                              nekompetitivní  
                              akompetitivní  
                              směsné

## Určení typu inhibice

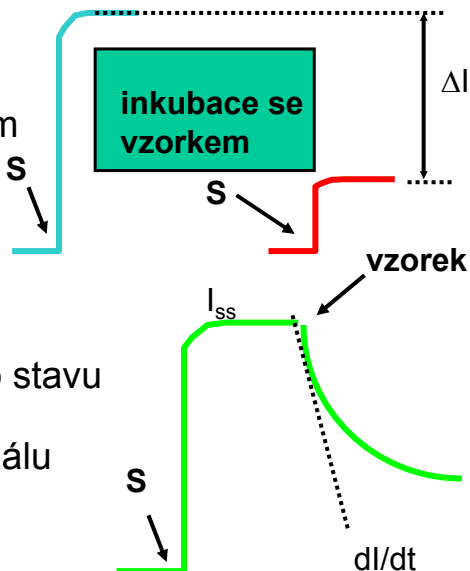
- kalibrační křivky pro substrát, vždy při určité konstantní koncentraci inhibitoru
- výnos v dvojnásobných logaritmických koordinátách - typické vzájemné polohy závislostí



## Měření inhibice enzymů

### Inkubační postup

1. výchozí signál
2. inkubace se vzorkem
3. promytí sensoru
4. zbytkový signál

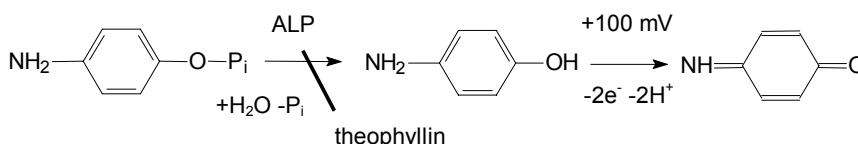
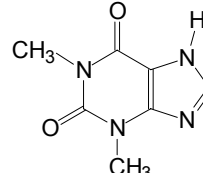


### Kontinuální měření

1. odezva na substrát,
2. ustavení ustáleného stavu
3. přidavek vzorku
4. měření poklesu signálu

## Inhibice alkalické fosfatasy

- **theophyllin** účinkuje jako stimulant centrální nervové soustavy, používá se v klinické praxi jako bronchodilatátor k respirační stimulaci
- terapeutickou hladinu v krvi (10 až 20 mg/l) je třeba sledovat, aby se zabránilo předávkování
- inhibice je při použití *p*-aminofenylfosfátu (PAPP) akompetitivní
- jako pufr lze použít tris nebo diethanolamin, mez detekce kolem 5  $\mu\text{M}$



- **anorganický fosfát  $P_i$**  je stanovován mimo jiné v životním prostředí - znečištění vodních toků (podporuje nadměrný růst řas a sinic)
- stanovení se provádí s glukosa-6-fosfátem jako substrátem, jeho hydrolyza ALP je inhibována volným fosfátem kompetitivně
- vnikající glukosa se může stanovit pomocí glukosa oxidasy imobilizované ve stejné vrstvě jako ALP; mez detekce je kolem 10  $\mu\text{M}$

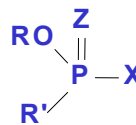
## Inhibice cholinesterasy

- enzym účinkuje v nervové soustavě při přenosu vzruchů

- organofosfáty**

pesticidy (insekticidy dichlorvos, actelic, ...)  
bojové otravné látky (sarin, soman, tabun, VX)

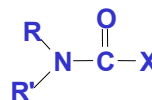
R alkyl, aryl; R' alkyloxy, aryloxy, subst. amin;  
X odcházející skupina - CN, F, p-nitrofenyl, fosfodiester;  
Z = O nebo S



- karbamáty**

pesticidy (carbofuran, carbaryl, aldicarb, ...)

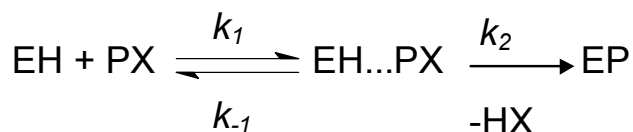
R, R' H, alkyl, aryl; X odcházející skupina - CN, F, p-nitrofenyl



- používané enzymy: **acetylcholinesterasa** (AChE, EC 3.1.1.7) a **butyrylcholinesterasa** (BChE, EC 3.1.1.8);  
AChE se získává nejčastěji z elektrického úhoře nebo z membrán erythrocytů, BChE zejména z koňského séra
- rekombinantní ChE - lepší inhibiční vlastnosti úpravou aktivního místa

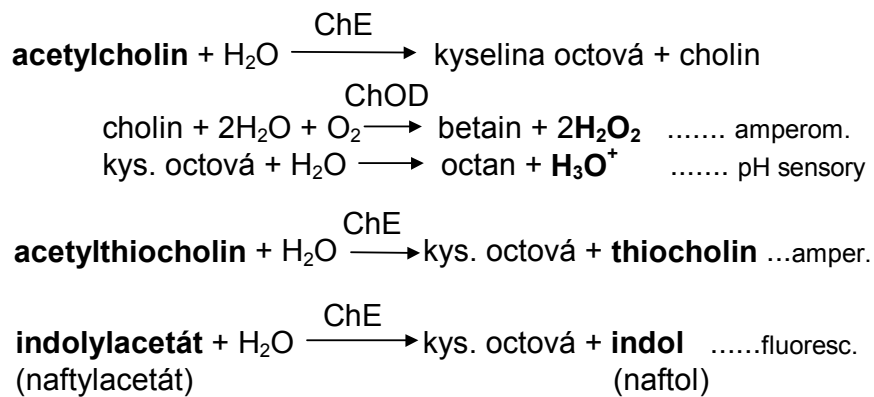
## Kinetika inhibice ChE

- volný enzym EH tvoří komplex s inhibitorem PX který rozpadem poskytuje fosforylovaný enzym EP (fosforyluje resp. karbamoyluje se hydroxyl serinového zbytku v aktivním místě cholinesterasy)
- oxofosforové sloučeniny jsou obecně mnohem silnější než analogické thiofosfáty, z těch vznikají oxidací (bromová voda, peroxid vodíku)



- první krok charakterizuje rovnovážná konstanta  $K_D = k_1/k_{-1}$ , druhý pak rychlostní konstanta  $k_2$ ; v praxi se však nejčastěji používá bimolekulární inhibiční konstanta  $k_i = k_2/K_D$
- Při inkubačním způsobu měření platí pro signál Y biosensorů:  
 $\Delta \ln Y = k_i [\text{PX}] t$ , odezva je tedy určována jednak koncentrací a jednak inhibičními účinky dané látky
- pokud není známý druh pesticidu před vlastní analýsou, lze stanovit parametr **anticholinesterasová toxicita**

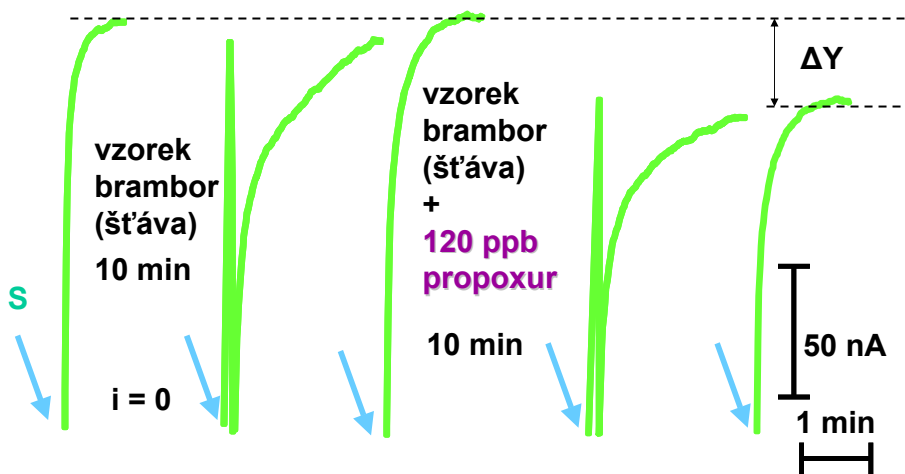
## Variabilita ChE biosensorů



Možnosti měření s cholinesterázovými sensory

## Příklad odezvy

- inhibice ChE biosensoru = rychlá charakterizace vzorků zelenin a ovoce na místě odběru, rozsáhlý předběžný screening
- podezřelé vzorky znovu analyzovány v laboratořích (GC, HPLC, MS, ...).





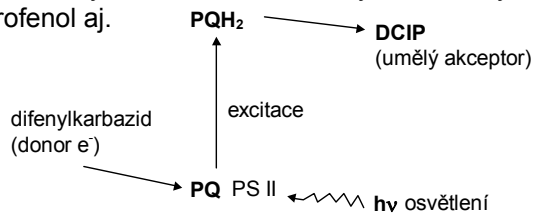
## BioNA Biochemical Nerve Agent Detector

- osobní detektor nervově paralytických látek ve vzduchu
- detekované látky: typ "G" and "V", limit detekce ve vzduchu: 1 ng/L
- rychlost odezvy: 30 s (15 s pro 10 ng/L)
- hmotnost: 500 g rozměry: 120 x 80 x 35 mm
- signalizace alarmu: vizuálně / akusticky



## Další inhibice

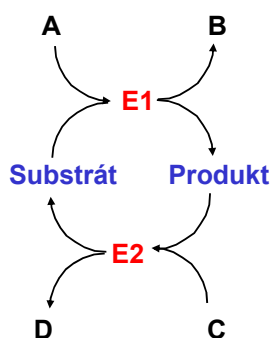
- **tyrosinasa** je použitelná pro celé spektrum různých inhibitorů: kyselina benzoová byla dříve používána jako konzervační činidlo, kyselina salicylová vzniká odbouráváním kyseliny acetylsalicylové (aspirin); celá řada substituovaných thiomocovin vzniká z glukosinolátů, způsobují nepříjemné chuťové vlastnosti pokrutin z produkce řepkového oleje
- **ureasa** je velmi citlivá na inhibici, kterou působí různé těžké kovy, konstrukčně může jít o potenciometrické enzymové elektrody
- **fotosystém** z thylakoidů chloroplastů špenátu nebo fotosyntetických mikroorganismů (*Rhodobacter*) se využívá k detekci řady látek používaných jako herbicidy v zemědělství: triaziny, karbamáty, fenylnocoviny, nitrofenol aj.



Princip stanovení inhibitorů fotosystému

## Biochemické zesilovací systémy

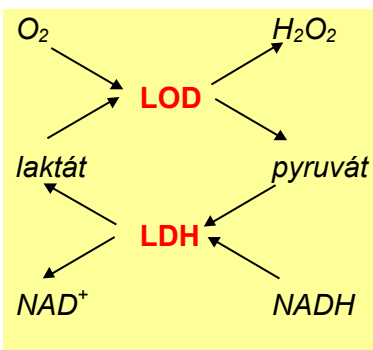
- u obvyklých reakcí poskytuje jedna molekula analytu jednu „jednotku“ měřeného signálu; cílem zesílení (amplifikace) je získat z 1 jednotky analytu (např. 1 molekula)  $G$  jednotek signálu (např.  $G$  elektronů) a dosáhnout tak podstatného zvýšení citlivosti stanovení parametr  $G$  pak vystupuje jako **zesilovací** (amplifikační) **faktor**



- molekula analytu nastartuje jednu nebo i několik cyklicky probíhajících reakcí, přitom neustále přechází mezi dvěma formami (Substrát, Produkt), které jsou přeměňovány dvěma **komplementárními enzymy** E1 a E2 (nejjednodušší možnost je kombinace substrát oxidasa a substrát dehydrogenasa)
- reakčního cyklu se dále účastní pomocné látky A a C a vystupují z něj látky B a D; v nepřítomnosti A nebo C recyklace neprobíhá, jejich přidavek tedy vlastně recyklaci „**zapíná**“

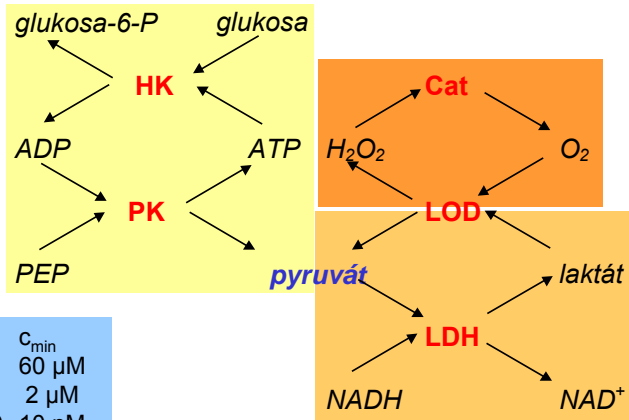
$$G \approx \frac{K_1 K_2}{K_1 + K_2} \frac{L^2}{D}$$

- amplifikační faktor**  $G$  lze určit pomocí závislosti na parametrech enzymů  $K_i = V_{max,i}/K_{M,i}$ , tloušťce biovrstvy  $L$  a difúzním koeficientu recyklované látky uvnitř vrstvy  $D$



- klasickým použitím zesilovacího systému v biosensorech je vysoce citlivé stanovení laktátu **laktát oxidasou** a **laktát dehydrogenasou** immobilizovanými v jediné biokatalytické vrstvě
- pro systém LOD / LDH bylo dosaženo  $G$  převyšující 4000, mez detekce pro laktát (nebo pyruvát) činila 1 nM
- laktátový systém může být využit také pro citlivou detekci enzymů produkujících pyruvát, např. alanin aminotransferázy

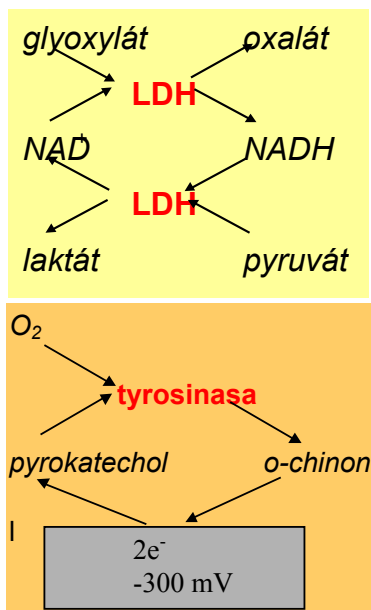
## Vícenásobná recyklace



Enzym	G	C <sub>min</sub>
HK	1	60 μM
+PEP PK	30	2 μM
+NADH LOD/LDH	1700	10 nM

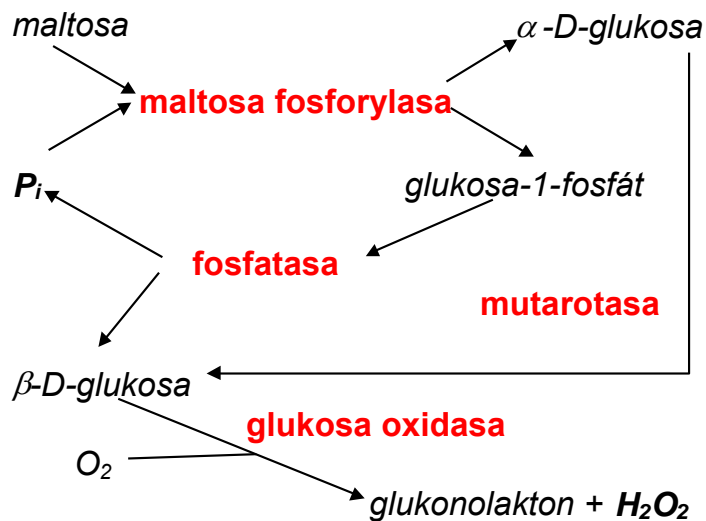
- několikanásobný recyklační systém pro citlivou detekci ATP / ADP byl sestaven z enzymů HK hexokinasa, PK pyruvát kinasa, LOD, LDH a Cat, katalasa
- cykly byly propojeny pomocí pyruvátu, postupným "zapínáním" jednotlivých cyklů byly zlepšovány parametry stanovení

## Další recyklace



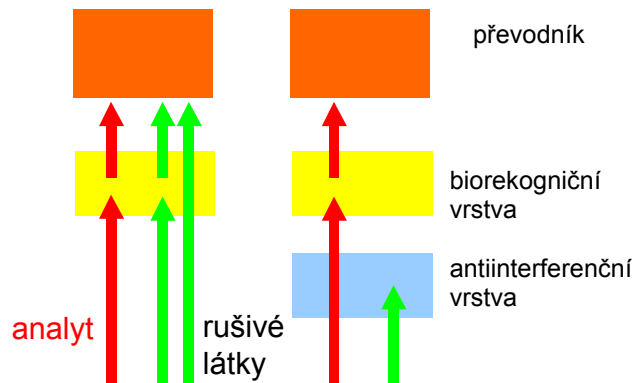
- zajímavý jednoenzymový recyklační systém využívající různé aktivity jediného enzymu (laktát dehydrogenasa) pro obě větve cyklu
- další kombinace jsou např.: glutamát oxidasa / dehydrogenasa (glutamát ev. amoniak); alkohol oxidasa / dehydrogenasa (alkohol); glutamát oxidasa / alanin aminotransferasa (α-oxoglutarát, glutamát); lakasa / cyto-chrom b2 (benzochinon); laktát monooxygenasa / malát dehydrogenasa (malát, oxaloacetát, AST)
- chemická recyklace byla na poli biosensorů použita ke zcitlivění detekce kyseliny askorbové pomocí kyslíkové elektrody s askorbát oxidasou, zpětná redukce kyseliny dehydroaskorbové probíhala v přítomnosti cysteinu
- jako příklad elektrochemické recyklace lze uvést tyrosinázový biosensor. Postup se používá pro stanovení feno-lu, který po oxidaci tyrosinásou poskytne recyklující pyrokatechol. Obdobné schéma je využitelné pro lakázu a recyklující pár hydrochinon / benzochinon

## Recyklace fosfátu



## Eliminace interferencí

- při analýze reálných vzorků se přítomné interferující složky konvertují (váží) vedle vlastního analytu a ruší stanovení na různých funkčních stupních biosensoru
- eliminací by se veškeré interferující látky měly odstranit nebo převést na nerušící produkty - tohoto efektu se dosáhne předřazením eliminačního systému vlastnímu biosensoru

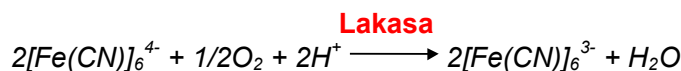
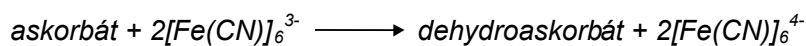


## Příklady

- **amoniak** je často detekovaným produktem enzymových reakcí, ale současně může být přítomen volný ve vzorku (sérum, moč), lze ho odstranit pomocí *glutamát dehydrogenasy*:



- **kyselina askorbová** může rušit v séru, pokud je konečnou fází amperometrická oxidace peroxidu vodíku, může být eliminována předřazením biomembrány s *askorbát oxidasou* (neprodukuje peroxid vodíku) jinou možností je použití ferrikyanidu ve spojení s *lakasou* (bez lakasy by vadil vzniklý ferrokyanid) další možností je předřadit vhodnou antiinterferenční vrstvu přímo vlastnímu převodníku - pro askorbát přichází do úvahy použít negativně nabitou membránu, např. velmi hustou acetylcelulosu lze provést elektrooxidaci askorbátu před příchodem do biokatalytické vrstvy:



- **glukosa** ve volném stavu bude vadit u řady víceenzymových systémů pro stanovení složitějších cukrů pro její odstranění lze použít antiinterferenční vrstvu obsahující glukosa oxidasu a katalasu (rozkládá vznikající peroxid vodíku), tento postup funguje do asi 2 mM koncentrace pokud nemá být ovlivněna hladina kyslíku v okolí biosensoru, je možné spotřebovat glukosu fosforylací ATP pomocí hexokinasy:



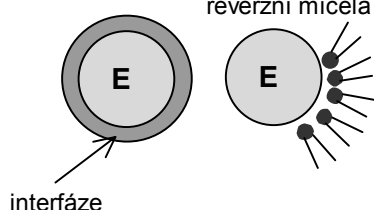
- **kyslík** je možné z okolí biosensoru odstranit jeho spotřebou při oxidaci glukosy glukosa oxidasou.

## Bioanalytická stanovení v organické fázi

### Výhody bioreakcí v organické fázi:

- zvýšená rozpustnost nepolárních substrátů (analýzy tuků či olejů)
- změněné reakční rovnováhy (místo hydrolýzy často probíhá syntéza)
- zvýšená termální stabilita (fixovaná struktura biomakromolekul)
- zjednodušená imobilizace prostou adsorpcí
- neprobíhají rušivé reakce s účastí vody
- nenastává bakteriální kontaminace

organická fáze



- pro činnost enzymů v organické fázi je potřeba jisté minimální množství vody (1 až 5 %) - hydratační obal bílkoviny
- obvykle nelze používat rozpouštědla volně mísitelná s vodou, která hydratační obal kompletně odstraní
- nepolární rozpouštědla je vhodné nasytit předem vodou
- na povrchu bílkoviny existuje přechodová oblast - interfáze, někdy je pro její tvorbu vhodné přidat hexanol nebo detergent CTAB, cetyl trimethylamonium bromid).

## Polarita rozpouštědel

	log <i>P</i>
dimethylsulfoxid	-1.3
dioxan	-1.1
dimethylformamid	-1.0
methanol	-0.76
ethanol	-0.24
acetone	-0.23
tetrahydrofuran	0.49
butanol	0.80
ether	0.85
cyklohexanol	1.5
chloroform	2.0
benzen	2.0
toluen	2.5
pentan	3.0
hexan	3.4
dekan	5.6
hexadekan	8.8

Pro posouzení polarity rozpouštědel se používá **partiční koeficient *P***, což je vlastně rozdělovací poměr daného rozpouštědla mezi oktanol a vodu:

$$P = \frac{[\text{rozp}]_{\text{oktanol}}}{[\text{rozp}]_{\text{voda}}}$$

nižší hodnota znamená méně polární rozpouštědlo

Podle velikosti log *P* lze přibližně vymežit tři skupiny rozpouštědel:

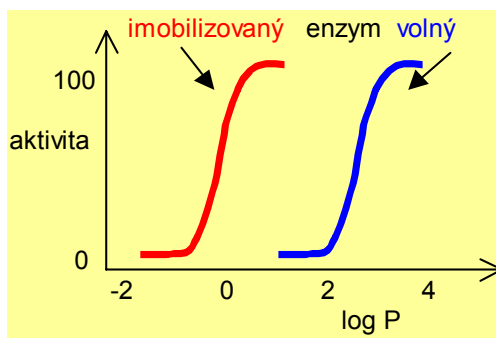
**log *P* < 2** nejsou vhodná, narušují vodný obal biomokuly; někdy jsou použitelná ve směsi s vodou

**2 < log *P* < 4** účinek rozpouštědla na aktivitu enzymu je třeba vyzkoušet

**log *P* > 4** obecně jsou použitelná, vodný obal enzymu není narušen

## Aktivita v organické fázi

- průběh aktivity enzymu v závislosti na polaritě rozpouštědla má charakteristický esovitý tvar
- imobilizovaný enzym obvykle lépe snáší i méně polární rozpouštědla; mimo polaritu rozpouštědla je samozřejmě nutné zvážit také jeho dostupnost, těkavost, cenu a případně toxicitu
- někdy je výhodné použít místo čistého rozpouštědla mikroemulze tvořené směsí rozpouštědla (1 až 10 %), vody a vhodného detergentu (0.05 až 0.5 %).



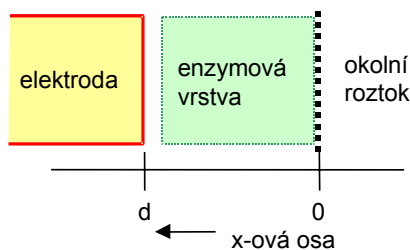
## Příklady stanovení

- aplikace se zaměřují na ve vodě nerozpustné analyty nebo vzorky
- nejvíce biosensorů je založeno na použití tyrosinasy - je vhodná pro stanovení fenolů v oleji nebo v organických extraktech z vody, na základě inhibice jde stanovit substituované thiomocoviny (vznikají z glukosinolátů, které znehodnocují krmné směsi s řepkou).
- podobně lakasa je vhodná pro *p*-difenoly
- peroxidáza mimo detekce peroxidu vodíku slouží také pro detekci organických hydroperoxidů, které vznikají v tucích při jejich rozkladu
- cholesterol v másle a margarínech lze v organické fázi výhodně stanovit cholesterol oxidasou
- acetylcholinesterasy slouží pro detekci pesticidů (organofosfáty, karbamáty) po extrakci z vodné fáze
- v poslední době se objevují i pokusy provádět v organické fázi některá imunochemická stanovení nízkomolekulárních toxických látek

## Modely biokatalytických sensorů

- pro popis a optimalizaci dílčích procesů tvořících odezvu biosensoru (látkový transport, enzymová reakce, elektrodová reakce)
- amperometrické biosensory jsou nejčastějším objektem modelování, uplatňuje se zde několik východisek:
  - **enzymová reakce** (1, 2, více) převádí analyt stechiometricky na snadno měřitelnou látku; uvažuje se **lineární** reakce (reakční rychlost je přímo úměrná koncentraci), nelineární reakce vedou k numerickému řešení
  - modelování lze provádět buď **stacionárně** pro předpokládaný ustálený stav (očekává se nezávislost nalezeného řešení na čase)
  - nebo **dynamicky**, kdy model obsahuje časovou proměnnou, takže lze nalézt řešení v žádaném časovém okamžiku
  - pro nalezení řešení je velmi důležitý popis situace v **přechodových oblastech**, což jsou rozhraní povrch elektrody / biokatalytická vrstva / okolní roztok

## Modelovaný systém



- existuje jistý počet navazujících vrstev, což je nejčastěji soubor několika membrán (enzymová, dialyzační pro kontrolu transportu, mechanická ochrana, ...) na povrchu elektrody

### předpoklady:

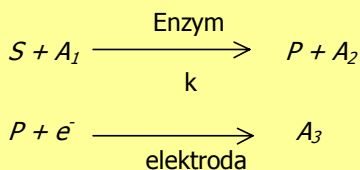
- dobře míchaný okolní roztok
- zanedbatelná spotřeba okolního analytu v důsledku činnosti biosensoru
- zachování hmoty při přechodu mezi vrstvami
- nulový tok neaktivních částic na povrchu elektrody,
- elektroaktivní látka je na povrchu elektrody úplně spotřebována ( $c=0$ )

### symbolika:

- S, P, A, B (...) značí koncentrace substrátu, produktu a dalších pomocných látek, v okolním roztoku jsou koncentrace  $S^o$ ,  $P^o$ ,  $A^o$  atd.
- rozměr (vzdálenost) je x, počátek = rozhraní enzymové vrstvy a okolního roztoku.
- čas je t, modelování začíná v čase 0
- pro jednotlivé látky jsou difúzní koeficienty  $D_S$ ,  $D_P$ , atd
- rychlostní konstanta enzymové reakce je k (lineární reakce,  $k = V_{max}/KM$ )
- koncentrace v daném místě a čase jsou  $S(x,t)$ , derivace podle času jsou  $S_t(x,t)$ , podle x pak  $S_x(x,t)$  a  $S_{xx}(x,t)$



### Příklad řešení



- nejjednodušší amperometrický biosensor (1 vrstva, 1 enzym, lineární reakce) je uvedeno pro ilustraci. Předpokládejme konverzi substrátu (analytu) enzymem a následnou elektrochemickou detekci produktu ( $A_3$  značí pomocné látky):

Rovnice a podmínky pro stacionární řešení substrátu a produktu:

$$\begin{array}{ll}
 0 = D_S S_{xx} - kS & 0 = D_P P_{xx} + kS \\
 S(0) = S^o & S_x(d) = 0 \\
 P(0) = 0 & P(d) = 0
 \end{array}$$

Vyřešení diferenciálních rovnic pak poskytuje rovnice pro koncentrace obou látek uvnitř biovrstvy po ustavení ustáleného stavu:

$$\begin{array}{l}
 S(x) = S^o \frac{\cosh[Q(d-x)]}{\cosh(Qd)} \quad \text{kde } Q = \sqrt{\frac{k}{D_S}} \\
 P(x) = S^o \left\{ \frac{x}{d} \left( \frac{1}{\cosh(Qd)} - 1 \right) + 1 + \frac{\cosh[Q(d-x)]}{\cosh(Qd)} \right\} \frac{D_S}{D_P}
 \end{array}$$

- proud v ustáleném vztahu  $I_{SS}$  je vlastně dán tokem produktu P na povrchu elektrody  $P_x(d)$ :

$$I_{SS} = nFAD_P P_x(d)$$

$n$  značí počet elektronů,  $F$  je Faradayova konstanta,  $A$  plocha elektrody. výsledky teroretického modelu je možné porovnat s experimentálně stanoveným proudem biosensoru

- pro tento jednoduchý příklad existuje řešení i pro **dynamický** model:

$$\begin{array}{l}
 S_t = D_S S_{xx} - kS \\
 S(0,t) = S^o \quad S_x(d,t) = 0 \quad S(x,0) = 0
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 P_t = D_P P_{xx} + kS \\
 P(0,t) = 0 \quad P(d,t) = 0 \quad P(x,0) = 0
 \end{array}$$

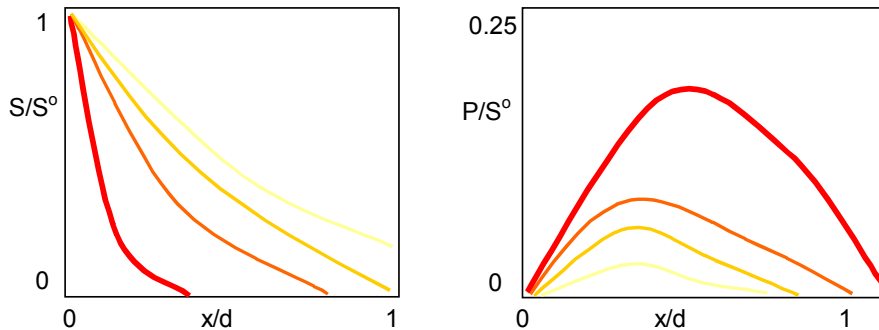
- časový průběhu koncentrace substrátu:

$$S(x,t) = S^o \left\{ 1 - \frac{4}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \left[ \cos\left(\frac{2n+1}{2} \pi \frac{d-x}{d}\right) \right] \left[ \frac{k+u \exp[-(u+k)t]}{u+k} \right] \right\} \quad u = D_S \frac{(2n+1)^2 \pi^2}{4d^2}$$

- časový průběh proudu  $I_{SS}$  je úměrný toku produktu na povrchu elektrody  $P_x(d,t)$ :

$$I(t) = nFAD_P P_x(d,t)$$

## Grafické znázornění



### Koncentrační profily v enzymové vrstvě

- na základě dynamického řešení je možné zkonstruovat koncentrační profily substrátu a produktu uvnitř biovrstvy na povrchu elektrody
- na obrázku jsou použity pro názornost bezrozměrné souřadnice
- vyvinutý model umožňuje studovat vliv změny parametrů (tloušťka biovrstvy, aktivita enzymu, průchodnost vrstvy) na odezvu biosensoru

## Mezní případy řešení

- rovnici pro signál v ustáleném stavu lze dále zjednodušit:
- zavádí se Thieleho modul  $\Phi$ , pak lze podle velikosti tohoto modulu určit dvě limitní oblasti činnosti biosensoru, pro něž se dají odvodit rovnice pro  $I_{ss}$ 

$$\Phi = Qd = \sqrt{\frac{kd^2}{D_s}} = d \sqrt{\frac{V_{\max}}{K_M D_s}}$$
- pro velmi malé  $\Phi$  ( $\Phi \rightarrow 0$ ) je odezva biosensoru určována pouze rychlostí enzymové reakce, existuje **kinetická kontrola** pro přibližné řešení se  $\cosh \Phi$  nahradí aritmetickou řadou (Taylorův rozvoj, ze které se použije pouze první člen,  $\cosh \Phi = 1 + \Phi^2 + \dots$ ):
$$I_{ss} \approx nFAS^{\circ}kd/2$$
- naopak pro velmi velká  $\Phi$  ( $\Phi \rightarrow \infty$ ) převládne vliv transportních procesů uvnitř biovrstvy, nastává **difúzní kontrola** pro zjednodušení se použije:
$$\lim_{\Phi \rightarrow \infty} \frac{1}{\cosh \Phi} = 0$$

což konečně vede ke zjednodušenému výrazu:

$$I_{ss} \approx nFAD_s S^{\circ}/d$$
- oba výrazy platí poměrně dobře pro reálné odezvy biosensory

## Limitace odezvy enzymového sensoru

- Pokud je analyt současně **substrátem** pro enzym imobilizovaný v biosensoru, je výhodné pracovat za podmínek **difúzní kontroly**: na odezvu nemá výrazný vliv rychlost enzymové reakce, takže případný postupný úbytek enzymové aktivity v biovrstvě enzymu se na velikosti signálu nemusí prakticky vůbec projevit. Biosensor obvykle vykazuje konstantní citlivost, která pak náhle klesne (enzymová aktivita se vyčerpá). Difúzní kontrola nastává u biovrstev s vysokou koncentrací enzymu, jinak ji lze dosáhnout předřazením málo propustné difúzní bariéry (kontrolní membrána).
- **Kinetická kontrola** - druhý limitní typ – je výhodný zase pokud analyt funguje jako **inhibitor** imobilizovaného enzymu. Pak se i malé poklesy aktivity v důsledku inhibice ihned projeví poklesem signálu biosensoru.