

Enzymy

- bílkoviny velké 10 až 100 kDa (typicky), fungují jako biokatalyzátory
 - každá metabolická reakce má svůj enzym...
- jednoduché (polypeptidový řetězec)
- složené (**holoenzymy**) z **apoenzymu** (bílkovina) a **kofaktoru**
- **kofaktor** – ion kovu, nebo koenzym, nepeptidová složka
- **koenzym** – prosthetická skupina nebo kosubstrát



Specifita

- dvojí charakter:
 - z hlediska látek, se kterými enzym reaguje (nazývají se **substráty**)
 - z hlediska reakce, kterou enzym katalyzuje
- žádný ze substrátů přítom nereaguje postranními neproduktivními reakcemi
- vznikají pouze specifické produkty
- molekulární rozpoznávání na bázi strukturní komplementarity
- aktivní místo – část molekuly enzymu, kam se váže substrát a probíhá tam katalytická reakce
- vazebné místo a katalytické místo (aktivní centrum)



Třídy enzymů

1. oxidoreduktasy

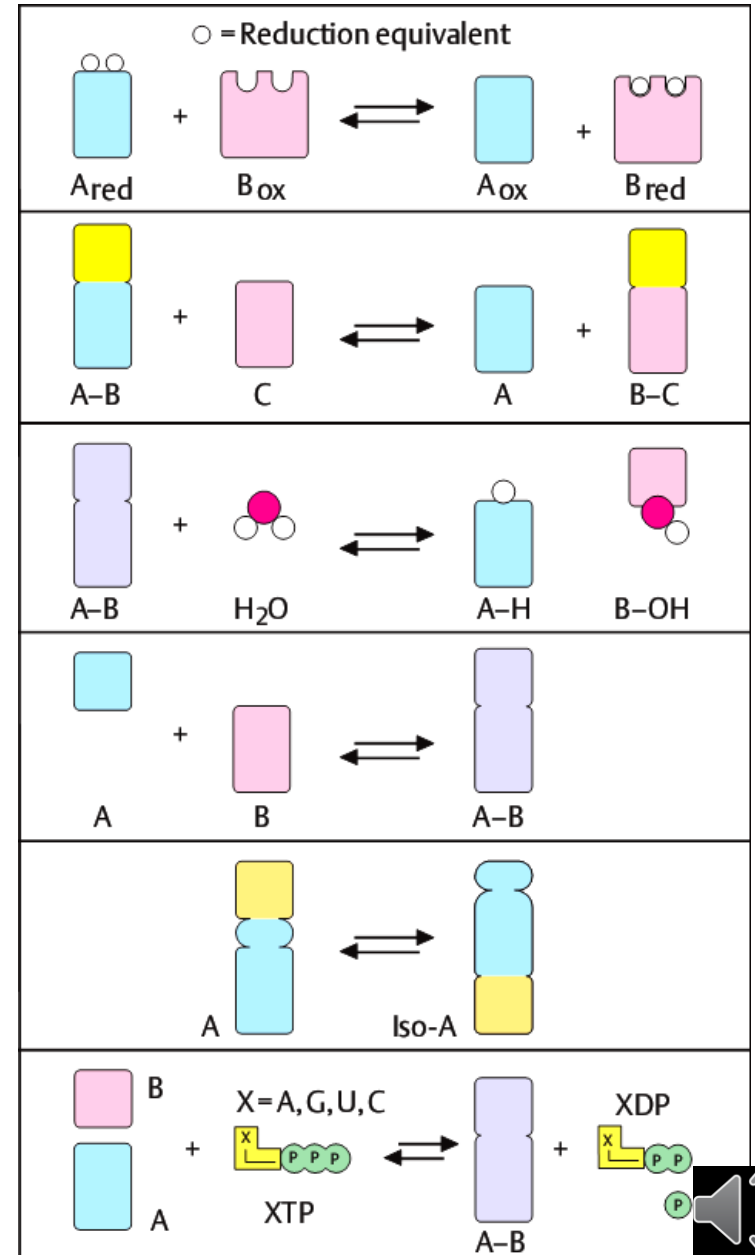
2. transferasy

3. hydrolasy

4. lyasy

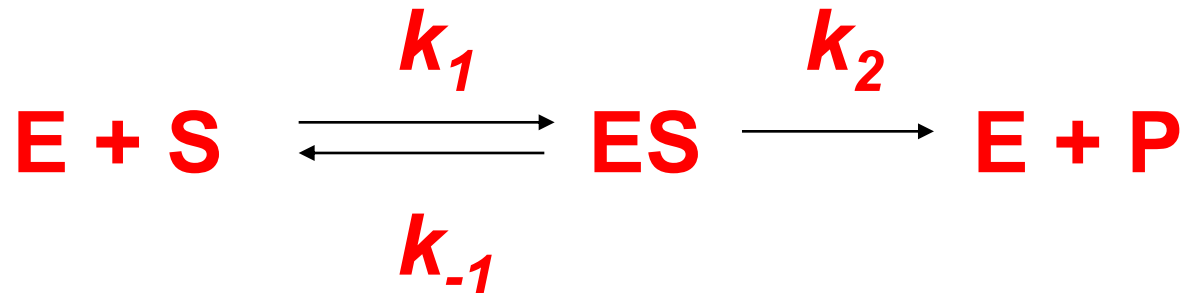
5. isomerasy

6. ligasy



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: $v = v_{max}[\text{S}]/(K_m + [\text{S}])$

■

saturační závislost – kalibrace je lineární
pokud platí $[\text{S}] \ll K_m$ pak $v = v_{max}/K_m[\text{S}]$



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**

(β -D-glukosa : O₂ 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 pyrolochinolinochinon); 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 insulínu
- dávkování však vyžaduje znalost aktuální hladiny glukosy, takže pacienti jsou nuceni několikrát denně sami měřit glykemii
- velmi dobré uplatnění biosensorů



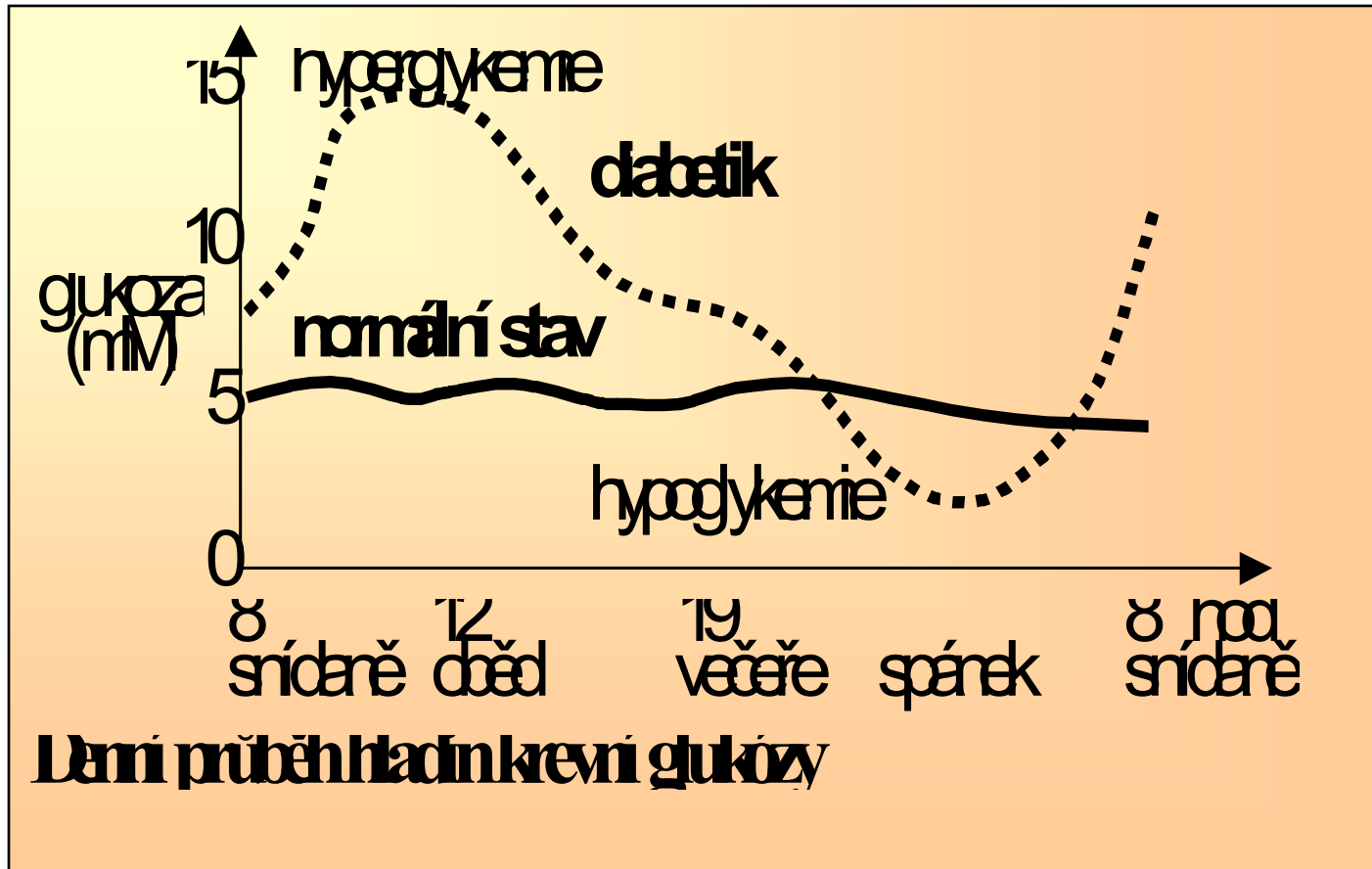
Diabetes mellitus („cukrovka“)

- klinicky definován jako chronické, endokrinní a metabolické onemocnění, vznikající v důsledku nedostatečného působení insulinu
- existují dva typy tohoto onemocnění:
 1. typ neboli inzulin-dependentní diabetes mellitus (**IDDM**, četnost 3 až 7 případů na tisíc osob) je charakterizován sníženou nebo prakticky chybící produkcí inzulinu, takže pacienti ho musí denně přijímat v injekčních dávkách
 2. typ je inzulin-independentní diabetes mellitus (**NIDDM**), pacienti na vlastní nebo injekčně podaný inzulin 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 insulínu, který umožní vstup glukosy dovnitř buněk a současně zabrání její tvorbě v játrech



Biosensory pro diabetiky

- první osobní glukometr na bázi výměnného elektrochemického biosensoru představila firma MediSense
- ExacTech - velikost psacího pera do kterého se zasunovaly měřící 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

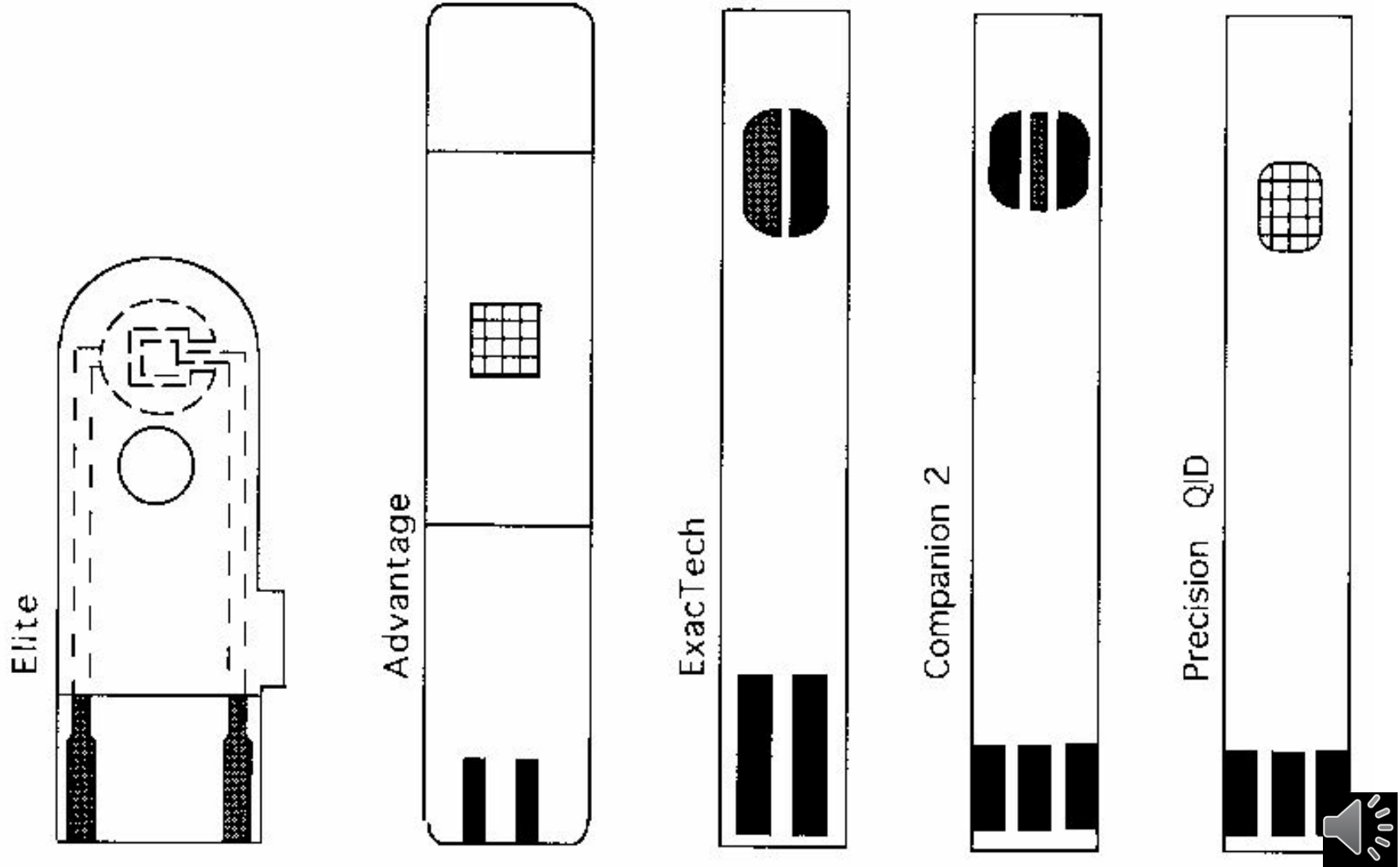
- Elite (pro analýzu stačí 3 mikrolitry krve) vyrábí japonské firmy Matsushita a Kyoto Daiichi Kagaku, distribuje Bayer
- Accu-Chek Advantage (Boehringer Mannheim) na rozdíl od ostatních nevyužívá k výrobě biosensorů sítotisk, ale originální vícevrstvou laminátovou technologii

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).



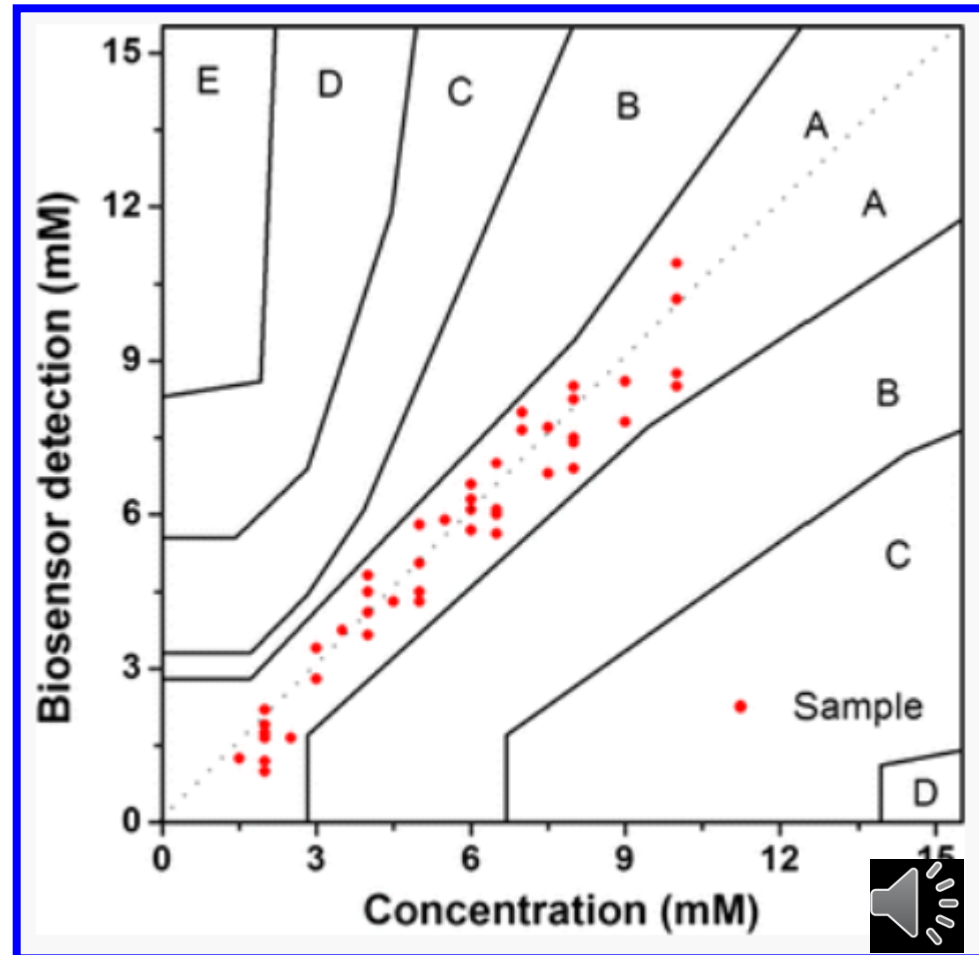
Srovnání formátu biosensorů



Testování glukometrů

- srovnání údajů z biosensoru se skutečnou koncentrací
- rozložení výsledků v hodnotící síti
 - Parkes error grid analysis (EGA), ISO 15197:2013, zavedl už Clark v 1987

- A v rámci 20% chyby
- B mimo 20%, ale nebude následkem nevhodná léčba
- C povede ke zbytečné léčbě
- D nebezpečné výsledky – selhání odhalení hyper- nebo hypoglykemie
- E zcela naopak - zaměnění se hyper- a hypoglykemie

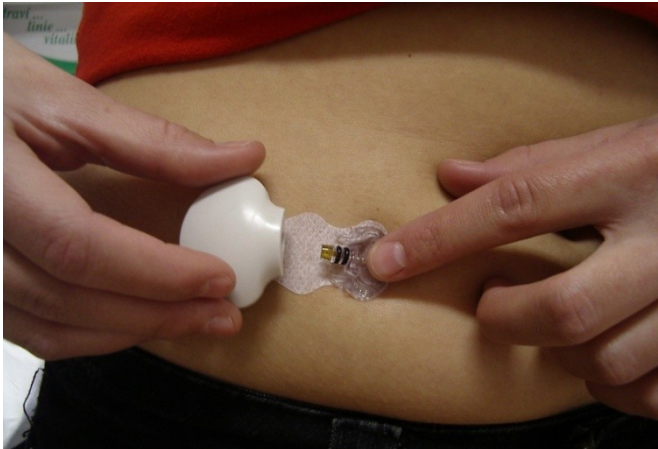


Hlavní cíl do budoucna

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



Současný stav



- “nastřelení“ sensoru
- připojení vysílací jednotky
- inzulinová pumpa

- kontinuální subkutánní infuze inzulinu
- kontinuální monitorování glykemie
- terapeutická edukace

- = předpoklady pro optimální substituci inzulinu u osob s DM1 a suplementaci inzulinu u osob s DM2



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 α 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 β anomer glukosy oxiduje **glukosa oxidasou**

laktosa (β -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
- hydrolýza **β -galaktosidasou** (EC 3.2.1.23) poskytuje oba monosacharidy, pak se použije buď **galaktosa-** nebo **glukosa oxidasa**

maltosa

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



Polysacharidy

škrob (spojení glukosových molekul α -1,4)

- funguje jako zásobní polysacharid, stanovení se provádí v obilí, rýži a bramborách
- nejprve hydrolýza **glukoamylasou** (= amyloglukosidasa, exo-1,4- α -glukosidasa, EC 3.2.1.3), navíc lze přidat i **α -amylasu** (1,4- α -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 acidóz, 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⁺, pro analýzu biosensory se prakticky nepoužívá
- další dehydrogenasou laktátu je **cytochrom b₂** (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⁺dependentní).



kyselina jablečná (malát)

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

kyselina šťavelová (oxalát)

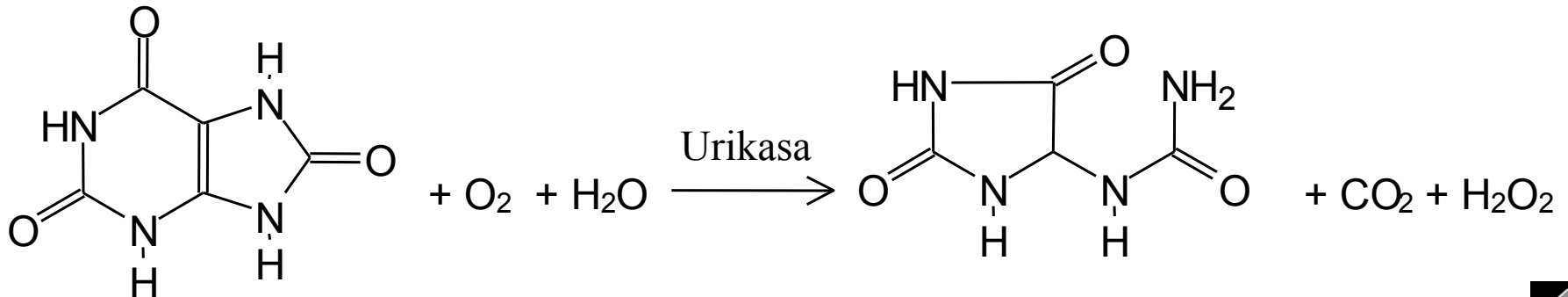
- v moči při hyperoxalurii; **oxalát oxidasa** (EC 1.2.3.4) katalyzuje reakci
 $(\text{COOH})_2 + \text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$

kyselina isocitronová

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

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_2O_2



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 CO₂ 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 NH₃, CO₂, α-oxoglutarát a H₂O₂
- **glutamát dehydrogenasa** [L-glutamát:NAD(P)⁺ oxidoreduktasa (deaminující), z jater] se uplatňovala zejména dříve před objevením oxidasy



Dusíkaté sloučeniny

močovina

- 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**

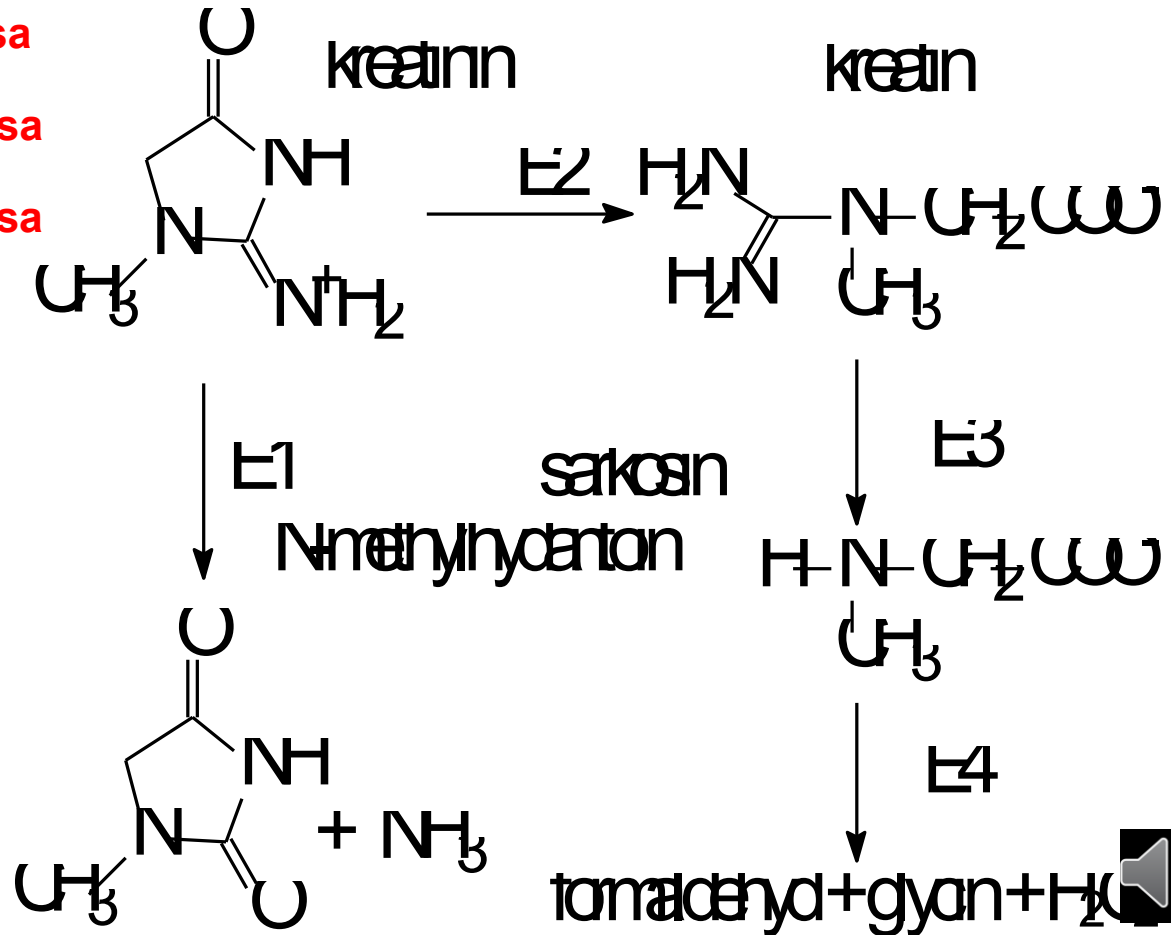
(kreatinasa, EC 3.5.2.10)

E3 **kreatin amidinohydrolasa**

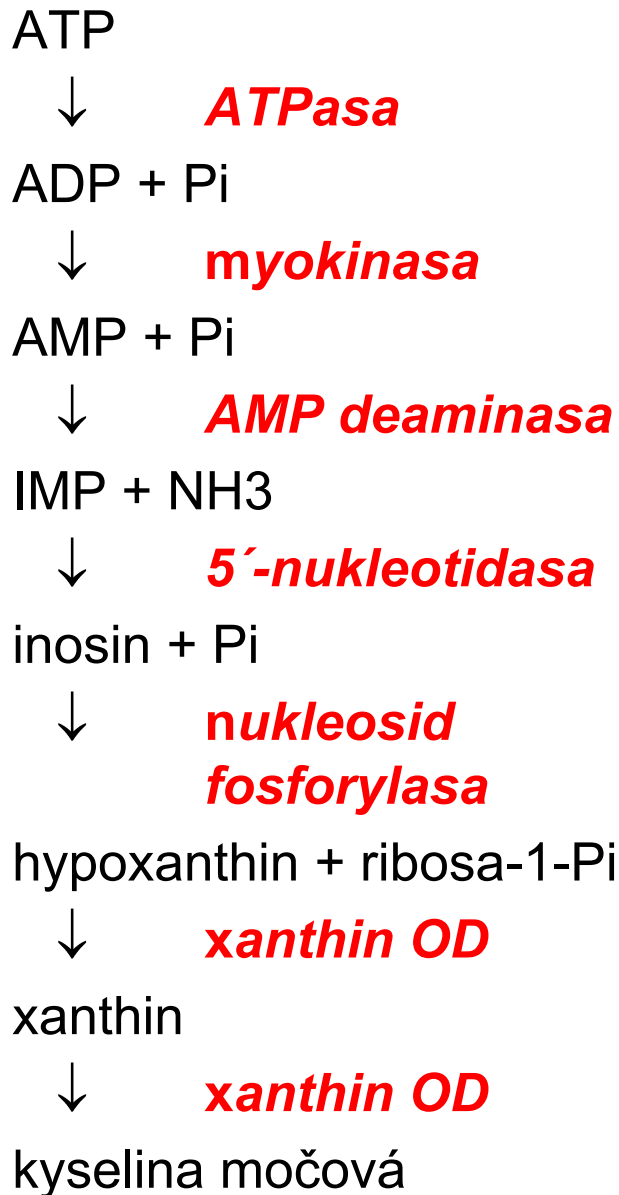
(EC 3.5.3.3)

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:

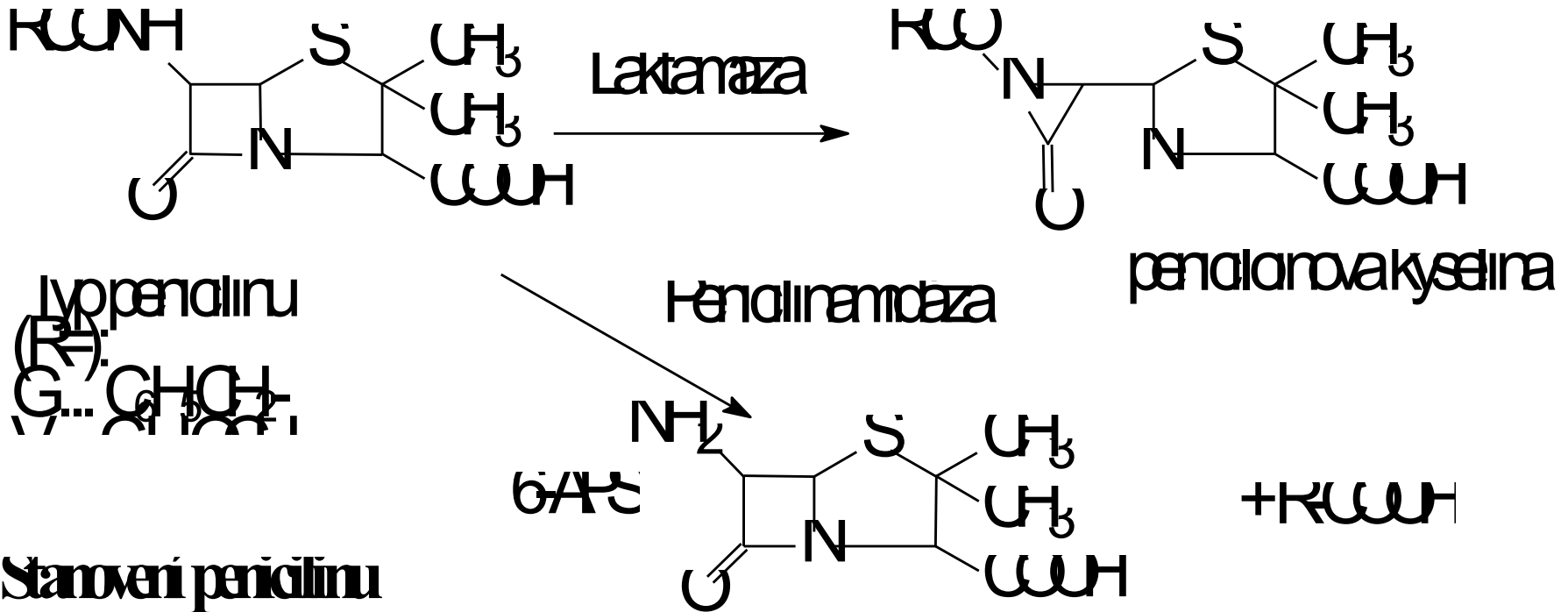
- 1) xanthin oxidasa (XOD, EC 1.2.3.2)
- 2) XOD + nukleosid fosforylasa (NP, EC 2.4.2.1)
- 3) jako 2 + 5'-nukleotidasa (NT, EC 3.1.3.5)
- 4) jako 3 + AMP deaminasa (AD, EC 3.5.4.6)

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 -laktamáza (penicilínáza, EC 3.5.2.6) a penicilínamidáza (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 nevádí zákal 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 sensoru s pyruvát oxidázou.
- α -Amylasy se měří v séru (normálně 60 až 150 U/l), narůstá při akutní pankreatitidě. Stanovení je možné buď použitím maltopentaózy jako substrátu a biosensoru s glukóza oxidázou, nebo může být substrátem škrob a pro detekci navíc slouží také glukoamyláza.
- Transaminasy indikují funkci jater a objevují se i při infarkt. 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 oxoglutarát, detekuje se vznikající pyruvát nebo glutamát. Pro AST jsou substráty aspartát a oxalacetát a měří se vzniklý glutamát.
- Arginasa je snadno stanovitelná pomocí močovinového biosensoru (ureáza / amoni-ak), substrátem je arginin.



Měření enzymových aktivit

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



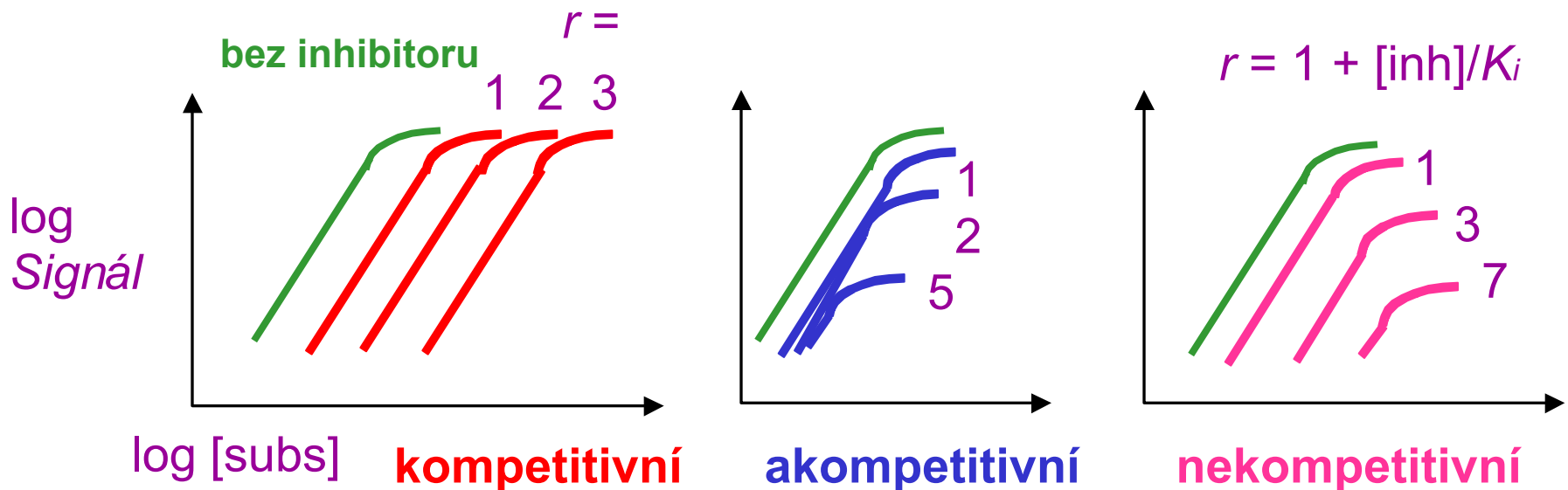
Měření inhibice enzymů

- 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

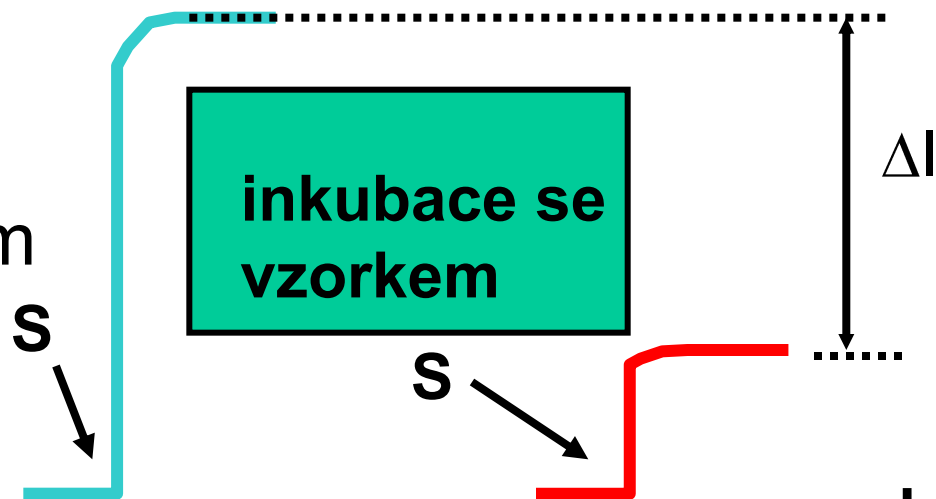
- kalibrační křivky pro substrát, vždy při určité konstantní koncentraci inhibitoru
- výnos v dvojnásobných logaritmických koordinátách - typické vzájemné polohy závislostí



Měření inhibice enzymů

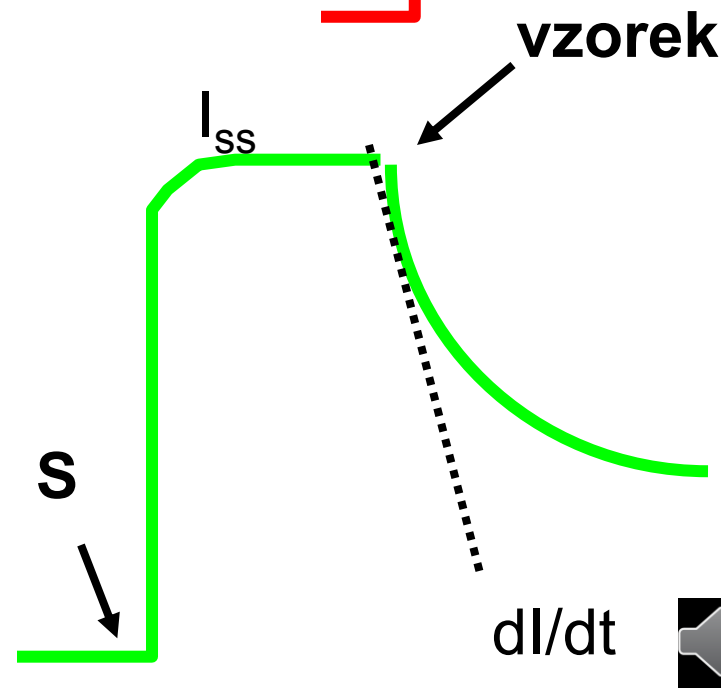
■ Inkubační postup

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



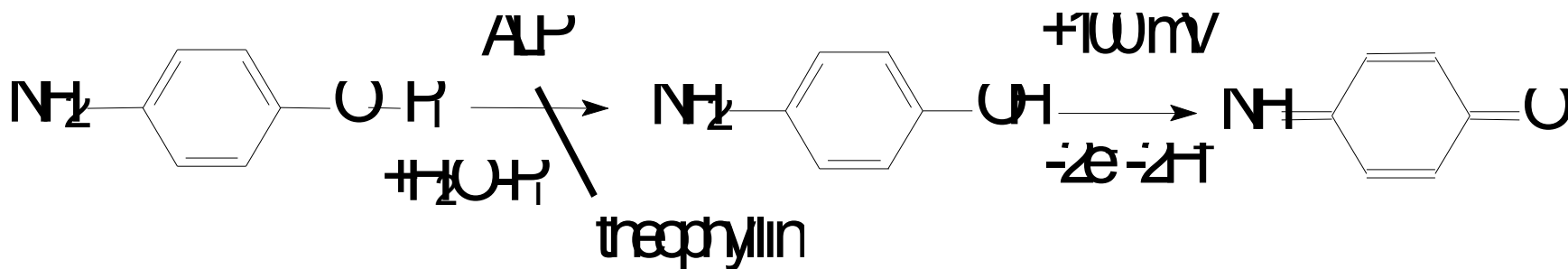
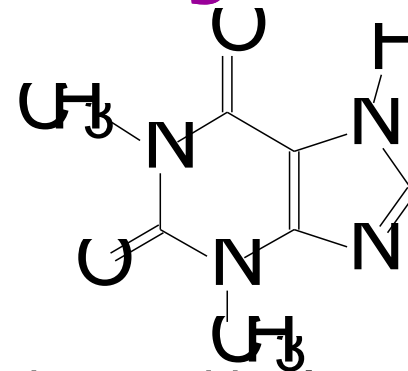
■ Kontinuální měření

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



Inhibice alkalické fosfatasy

- **theophyllin** účinkuje jako stimulátor 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 μM



- **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 hydrolýza 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 μM



Inhibice cholinesterasy

- enzym účinkuje v nervové soustavě při přenosu vzruchů

- organofosfáty

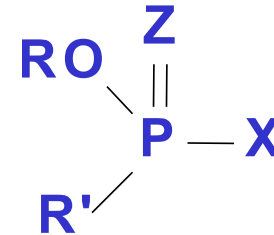
pesticidy (insekticidy dichlorvos, actelic, ...)

bojové otravné látky (sarin, soman, tabun, VX)

R alkyl, aryl; R' alkyloxy, aryloxy, subst. amin;

X odcházející skupina - CN, F, *p*-nitrofenyl, fosfodiester;

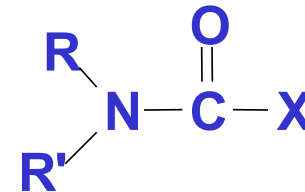
Z = O nebo S



- 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);

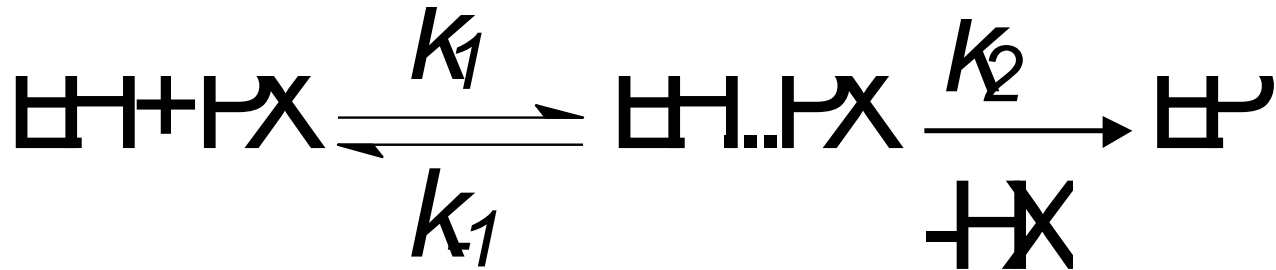
AChE se získává nejčastěji z elektrického úhoře nebo z membrán erythrocytů, BChE zejména z koňského séra

- rekombinantní ChE - lepší inhibiční vlastnosti úpravou aktivního místa



Kinetika inhibice ChE

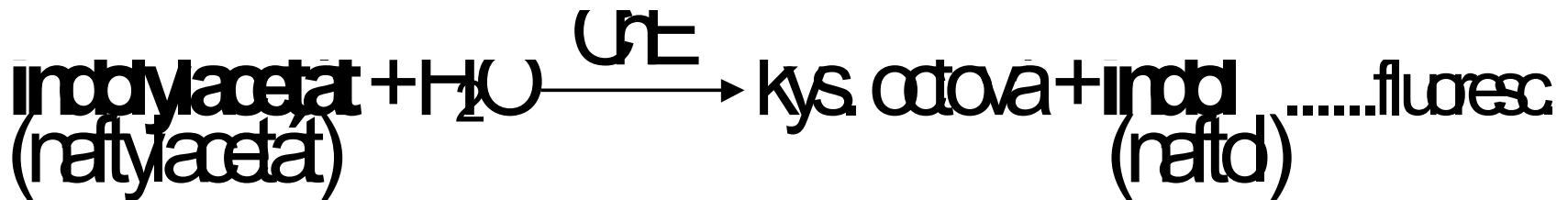
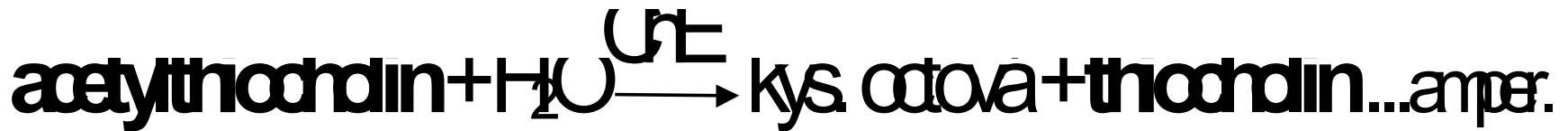
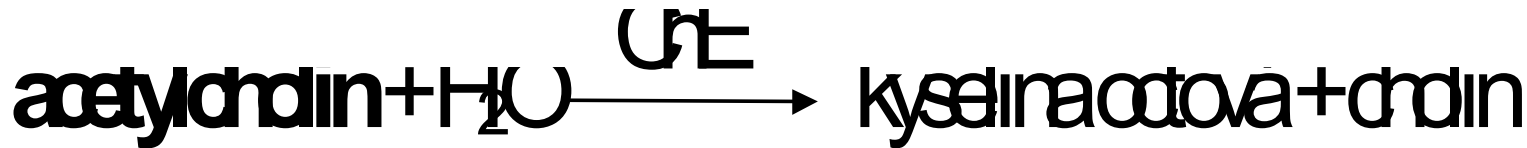
- volný enzym EH tvoří komplex s inhibitorem PX který rozpadem poskytuje fosforylovaný enzym EP (fosforyluje resp. karbamoyluje se hydroxyl serinového zbytku v aktivním místě cholinesterasy)
- oxofosforové sloučeniny jsou obecně mnohem silnější než analogické thiofosfáty, z těch vznikají oxidací (bromová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

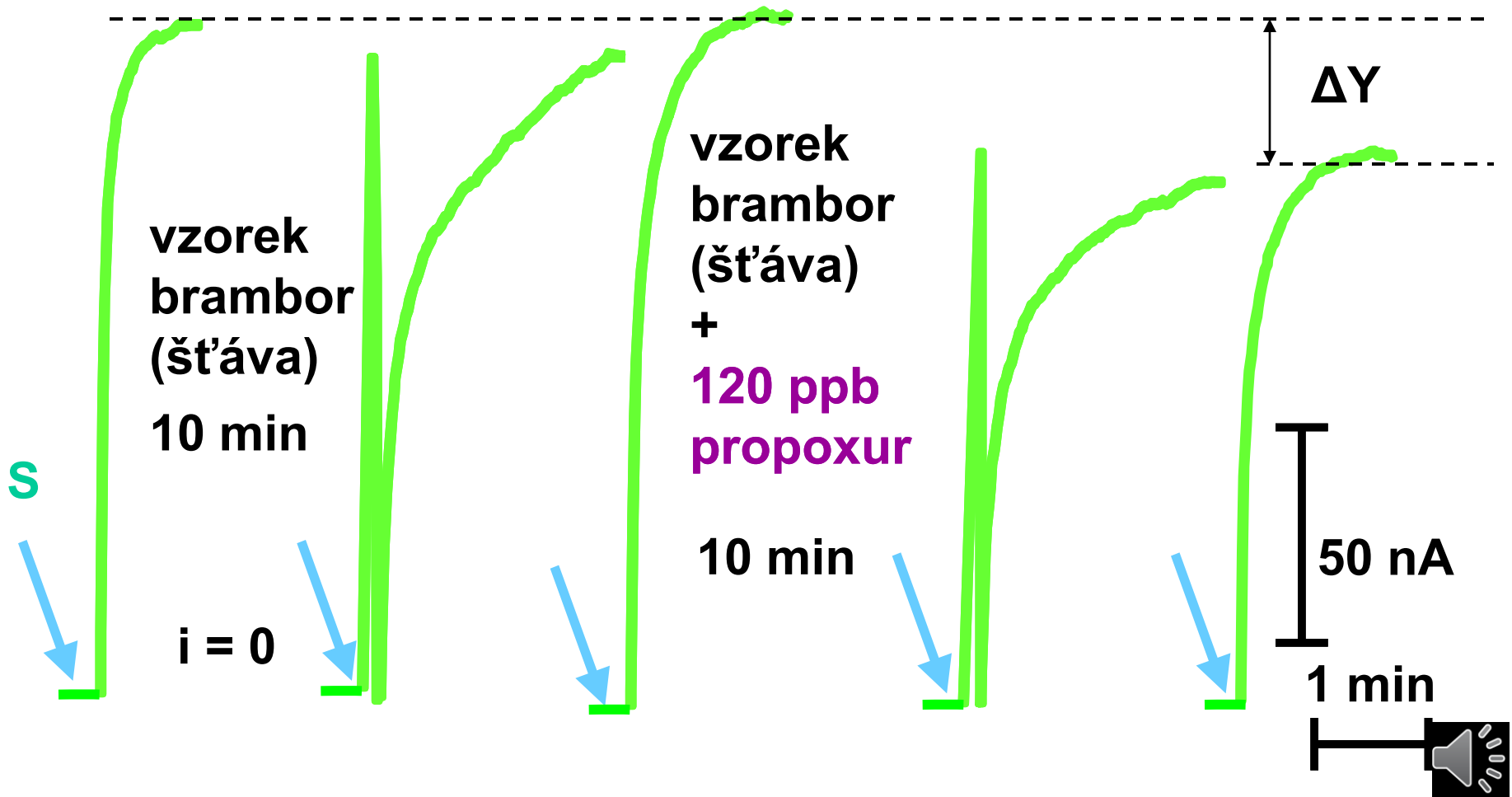


Možnosti měření s cholinesterázovými sensory



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

kontrolní jednotka

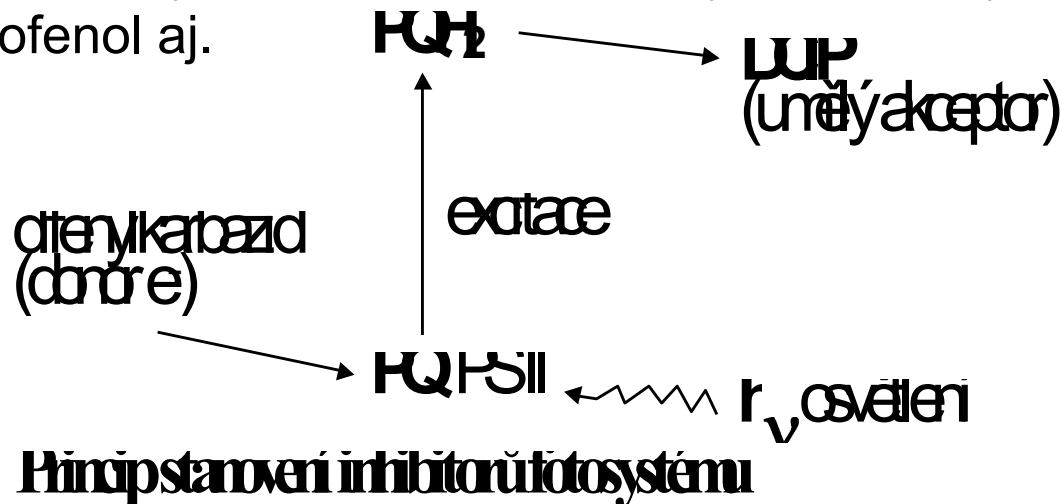


měřicí blok

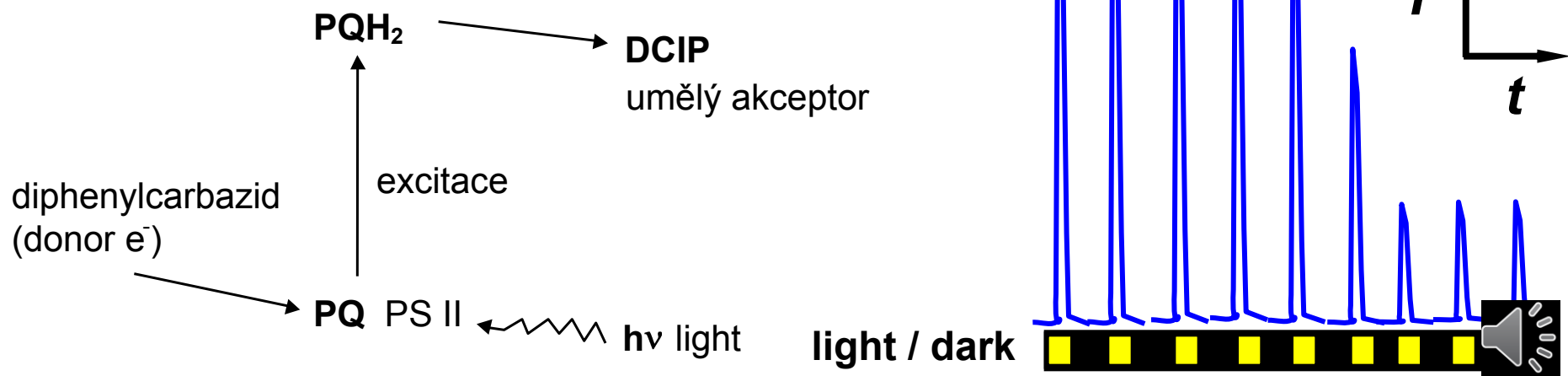


Další inhibice

- **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, fenylmočoviny, nitrofenol aj.

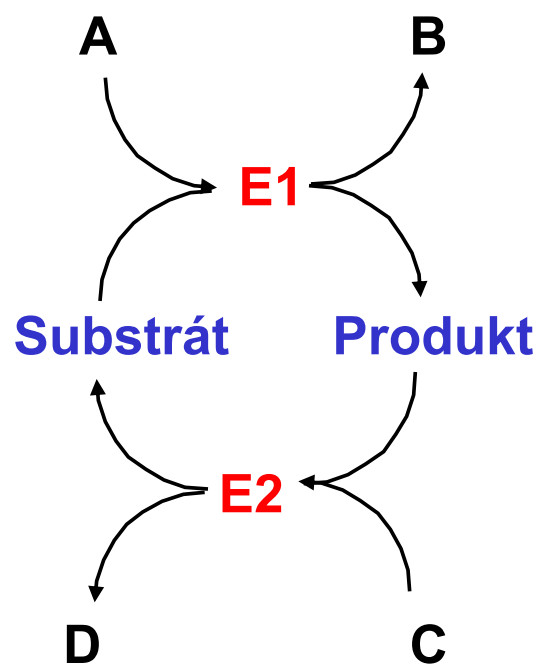


fotosystém z thylakoidů chloroplastů špenátu nebo fotosyntetických mikroorganismů (*Rhodobacter*) se využívá k detekci řady látek používaných jako herbicidy v zemědělství: triaziny, karbamáty, fenylmočoviny, nitrofenol aj



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

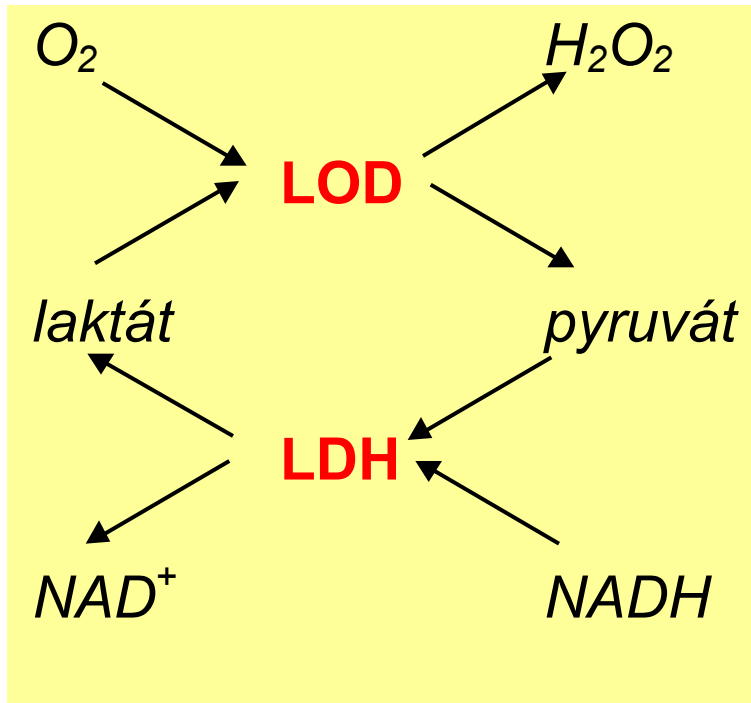


- molekula analytu nastartuje jednu nebo i několik cyklicky probíhajících reakcí, přitom neustále přechází mezi dvěma formami (Substrát, Produkt), které jsou přeměňovány dvěma komplementárními enzymy E1 a E2 (nejjednodušší možnost je kombinace substrát oxidasa a substrát dehydrogenasa)
- reakčního cyklu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



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

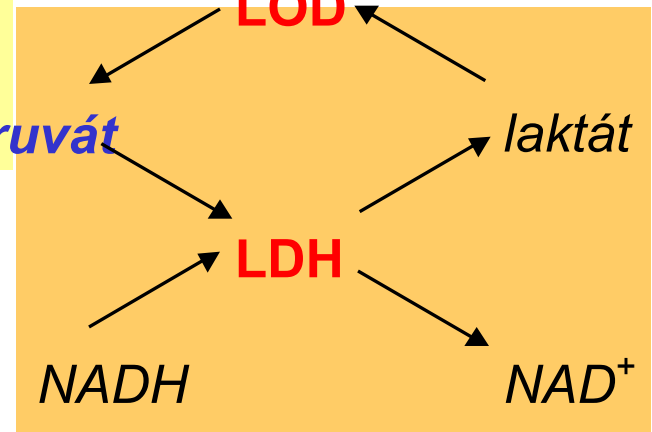
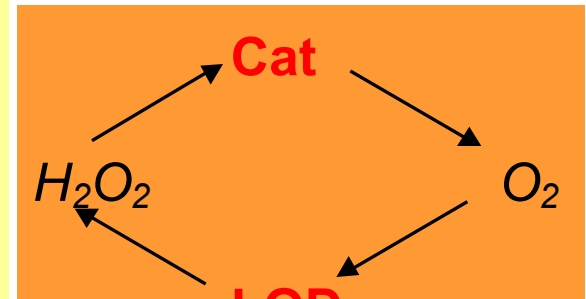
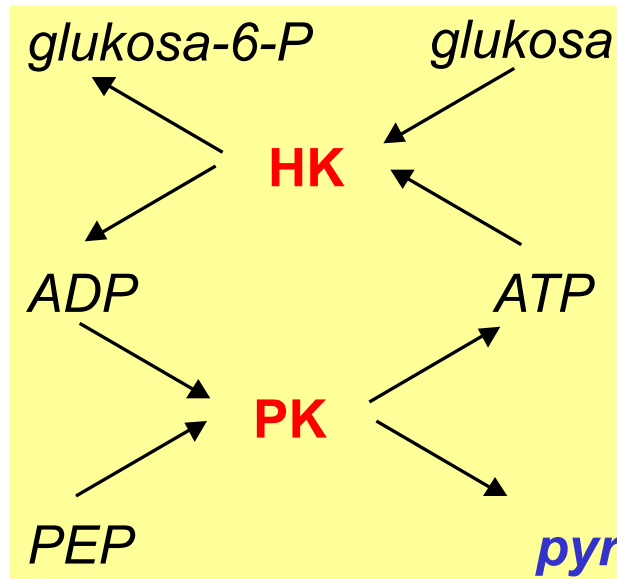
- **amplifikační faktor** G lze určit pomocí závislosti na parametrech enzymů $K_i = V_{max,i} / K_{M,i}$, tloušťce biovrstvy L a difúzním koeficientu recyklované látky uvnitř vrstvy D



- klasickým použitím zesilovacího systému v biosensorech je vysoce citlivé stanovení laktátu *laktát oxidasou* a *laktát dehydrogenasou* imobilizovanými 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

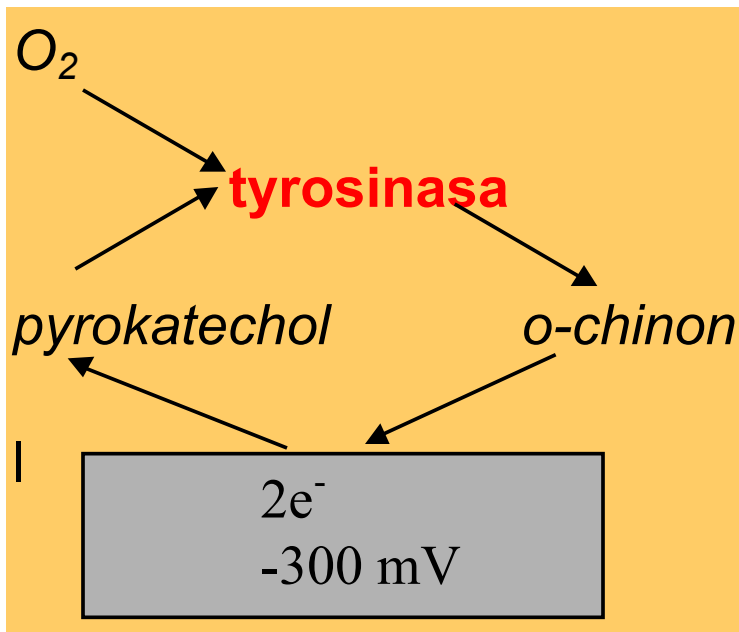
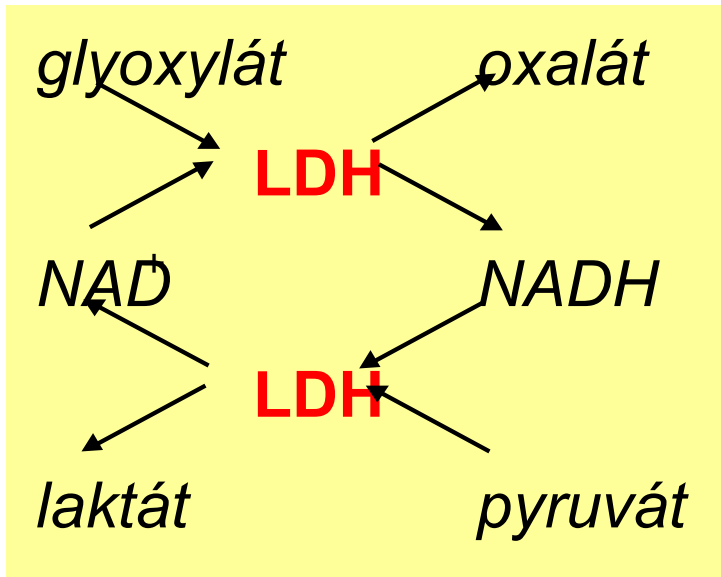


| Enzym | G | C _{min} |
|---------------|------|------------------|
| HK | 1 | 60 μM |
| +PEP PK | 30 | 2 μM |
| +NADH LOD/LDH | 1700 | 10 nM |

- 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



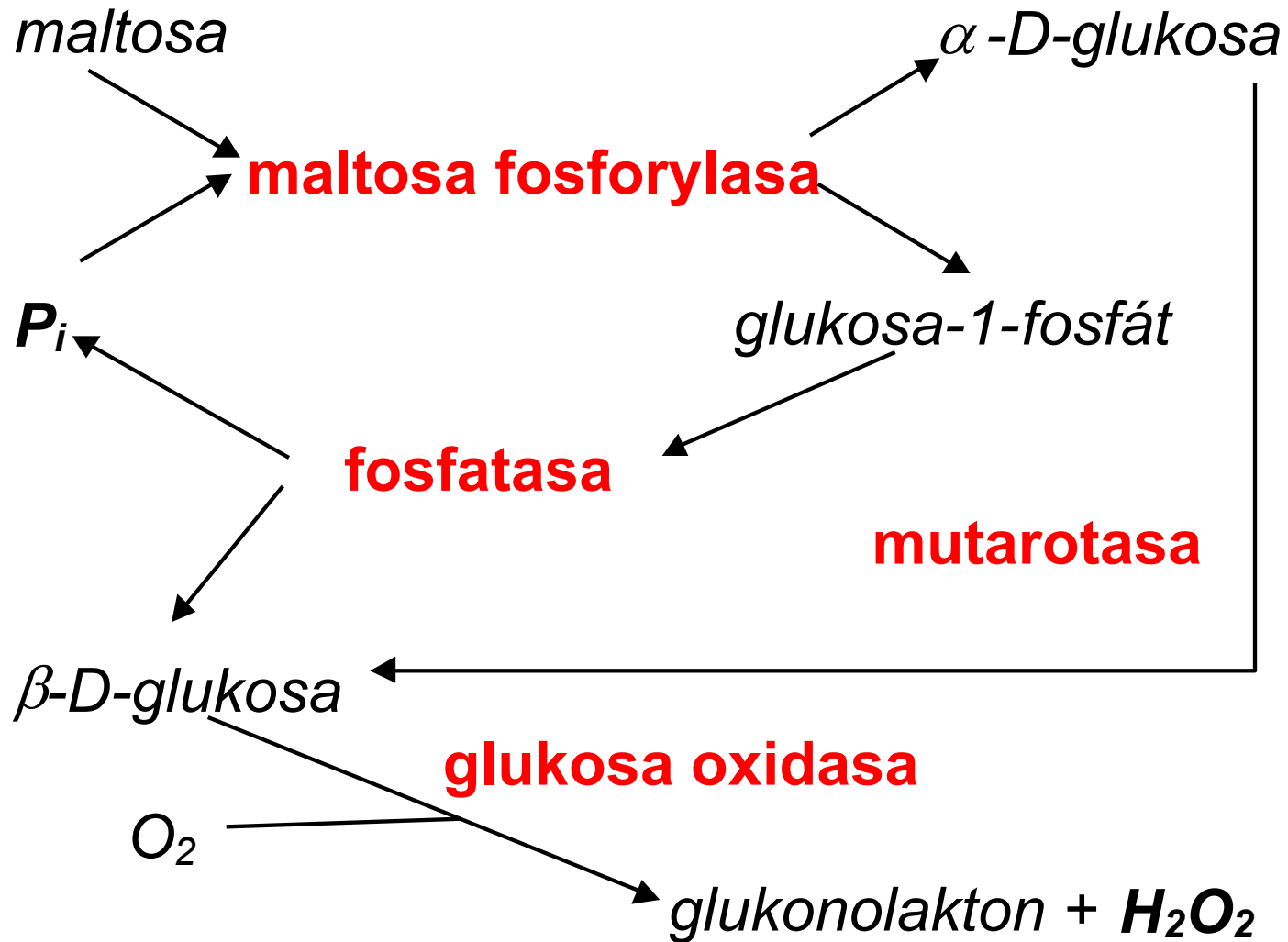
Další recyklace



- 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 (a-oxoglutarát, glutamát); lakasa / cytochrom 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 fenolu, který po oxidaci tyrosinásou poskytl recykluje pyrokatechol. Obdobné schéma je využitelné pro lakázu a recykluje pár hydrochinon / benzochinon

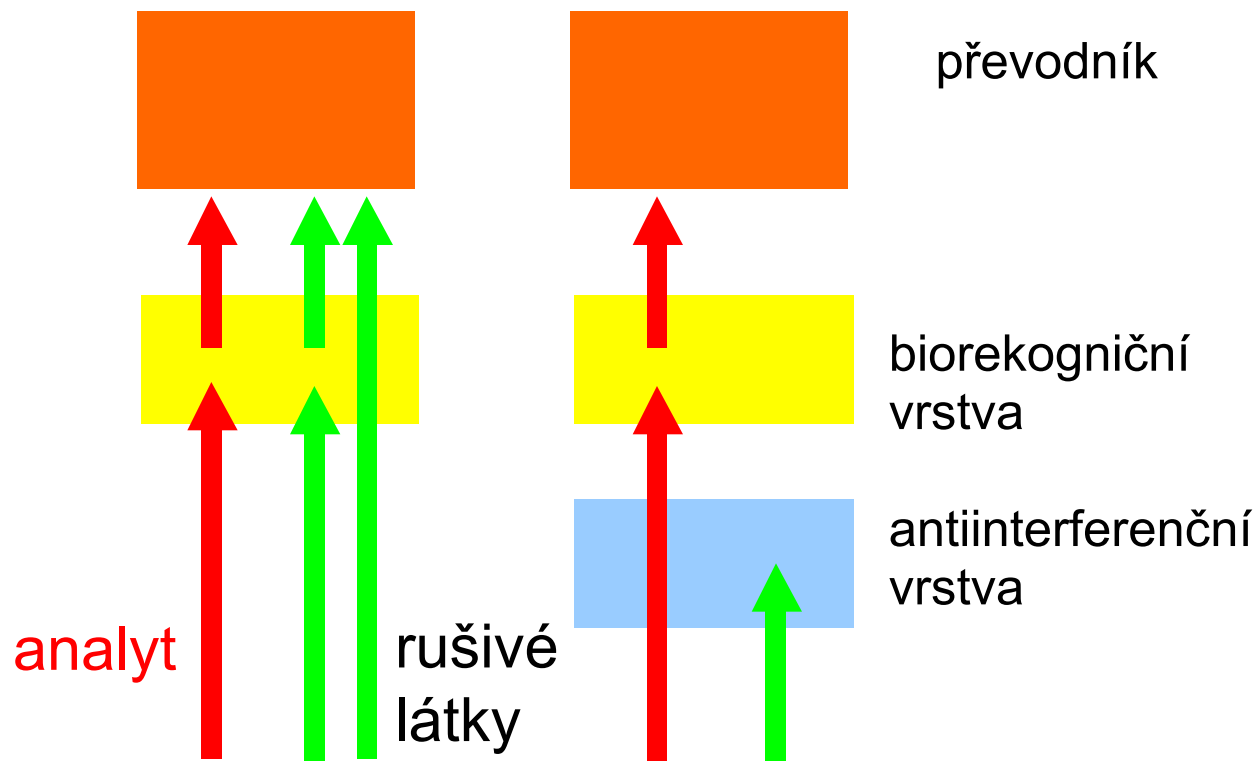


Recyklace fosfátu



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

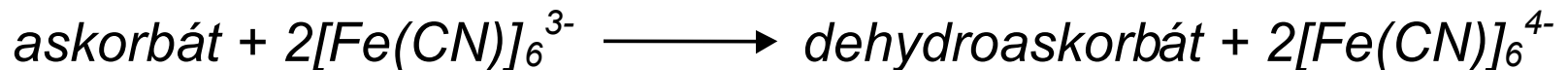


Příklady

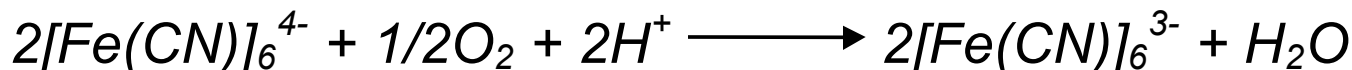
- amoniak je často detekovaným produktem enzymových reakcí, ale současně může být přítomen volný ve vzorku (sérum, moč), lze ho odstranit pomocí *glutamát dehydrogenasy*:



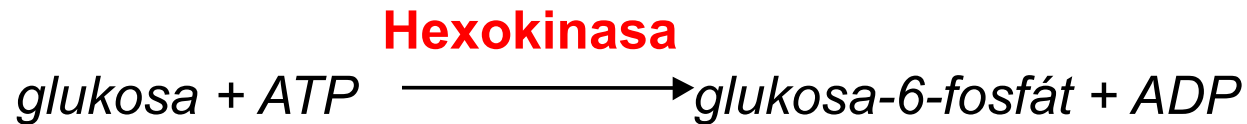
- kyselina askorbová může rušit v séru, pokud je konečnou fází amperometrická oxidace peroxidu vodíku, může být eliminována předřazením biomembrány s *askorbát oxidasou* (neprodukuje peroxid vodíku)
jinou možností je použití ferrikyanidu ve spojení s *lakasou* (bez lakasy by vadił vzniklý ferrokyanid)
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:



Lakasa



- **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.

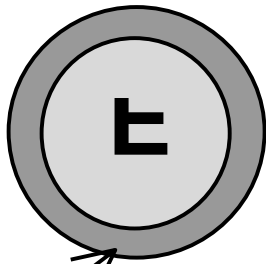


Bioanalytická stanovení v organické fázi

Výhody bioreakcí v organické fázi:

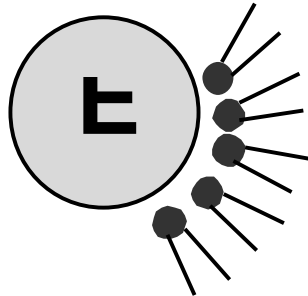
- zvýšená rozpustnost nepolárních substrátů (analýzy tuků či olejů)
- změněné reakční rovnováhy (místo hydrolýzy často probíhá syntéza)
- zvýšená termální stabilita (fixovaná struktura biomakromolekul)
- zjednodušená imobilizace prostou adsorpcí
- neprobíhají rušivé reakce s účastí vody
- nenastává bakteriální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

organokataze



interfáze

reverzní micela



- 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 P |
|------------------|---------|
| dimethylsulfoxid | -1.3 |
| dioxan | -1.1 |
| dimethylformamid | -1.0 |
| methanol | -0.76 |
| ethanol | -0.24 |
| aceton | -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:

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

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

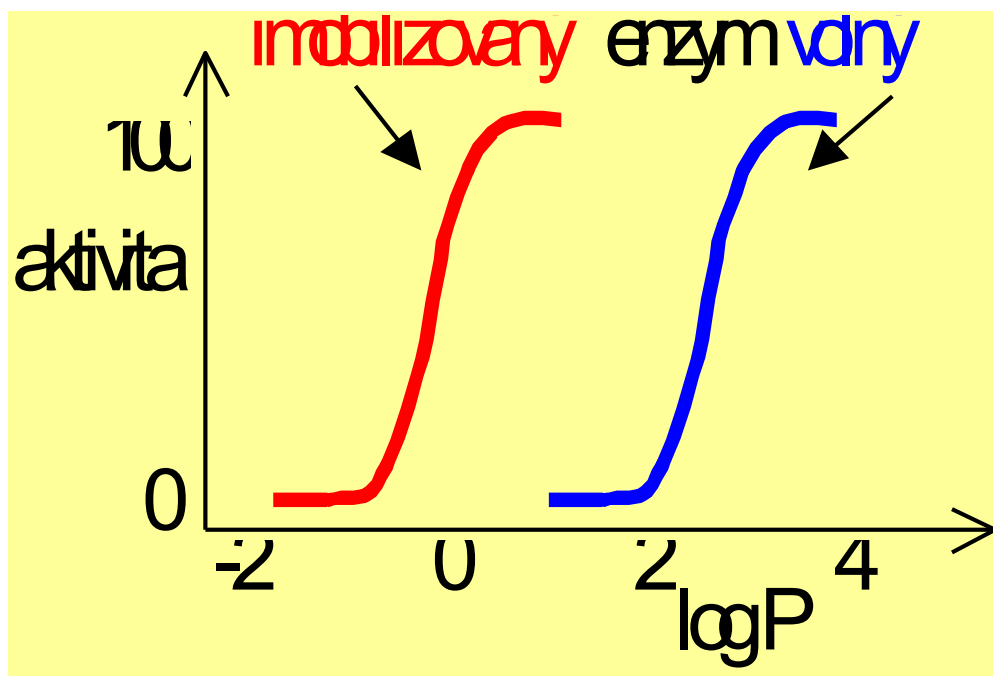
log $P > 4$

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

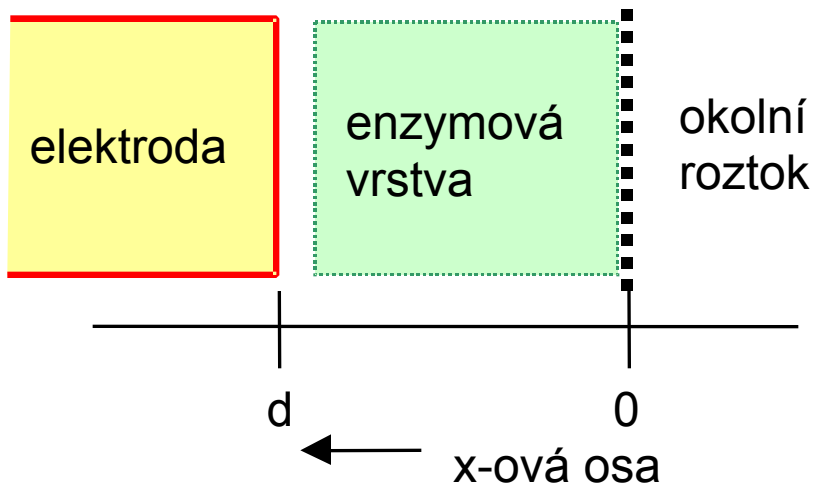


Modely biokatalytických sensorů

- **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:

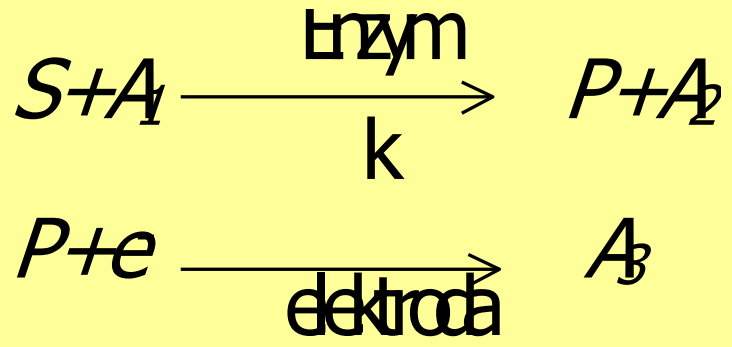
- dobře míchaný okolní roztok
- zanedbatelná spotřeba okolního analytu v důsledku činnosti biosensoru
- zachování hmoty při přechodu mezi vrstvami
- nulový tok neaktivních částic na povrchu elektrody,
- elektroaktivní látka je na povrchu elektrody úplně spotřebována ($c=0$)

symbolika:

- S, P, A, B (...) značí koncentrace substrátu, produktu a dalších pomocných látek, v okolním roztoku jsou koncentrace S^0 , P^0 , A^0 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 $S_t(x)$, 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_i značí pomocné látky):

Rovnice a podmínky pro stacionární řešení substrátu a produktu:

$$0 = D_S S_{xx} - kS$$

$$0 = D_P P_{xx} + kS$$

$$S(0) = S^0 \quad S_x(d) = 0$$

$$P(0) = 0 \quad P(d) = 0$$

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

$$S(x) = \frac{\cosh(\zeta(d-x))}{\cosh(\zeta d)}$$

$$kde \zeta = \sqrt{\frac{k}{D_S}}$$

$$P(x) = \left[\left(\frac{1}{\cosh(\zeta d) - 1} \right) \left(1 - \frac{\cosh(\zeta(d-x))}{\cosh(\zeta d)} \right) \right]$$



- 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:

$$S_t = D_S S_{xx} - kS$$

$$S(0,t) = S^0 \quad S_x(d,t) = 0 \quad S(x,0) = 0$$

$$P_t = D_P P_{xx} + kS$$

$$P(0,t) = 0 \quad P(d,t) = 0 \quad P(x,0) = 0$$

- časový průběhu koncentrace substrátu:

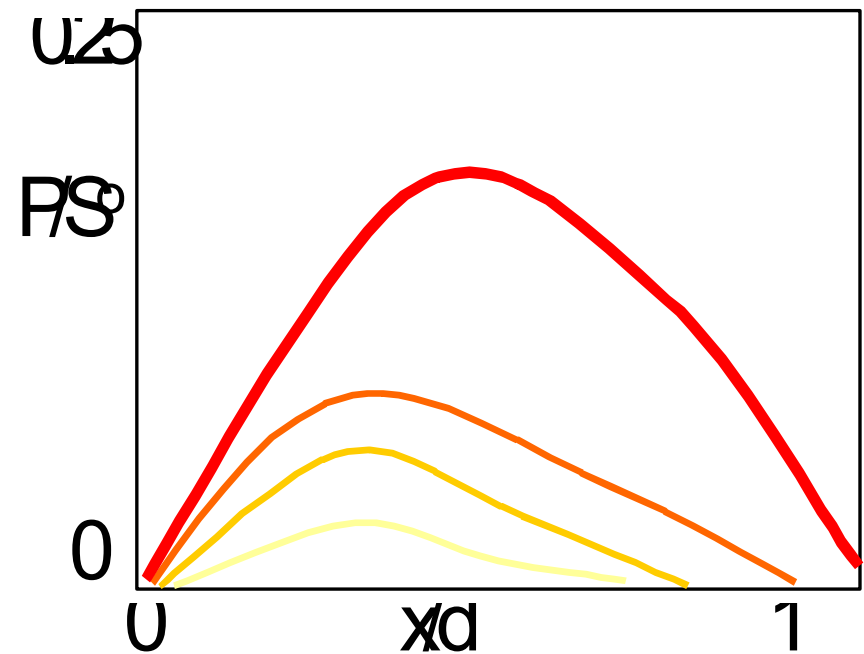
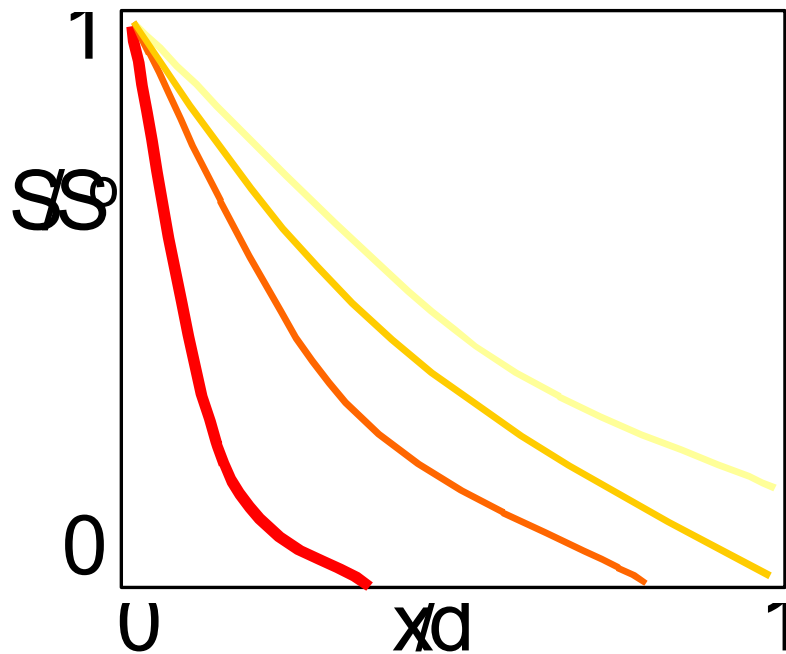
$$S(x,t) = \left[\frac{S^0}{u_+} \left(1 - \frac{x}{d} \right) + \frac{S^0}{u_+} \sum_{n=1}^{\infty} \cos\left(\frac{n\pi x}{d}\right) \exp\left(-\left(\frac{n\pi}{d}\right)^2 D_S t\right) \right] \exp\left(-kt\right)$$

- 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 Φ , pak lze podle velikosti tohoto modulu určit dvě limitní oblasti činnosti biosensoru, pro něž se dají odvodit rovnice pro I_{SS}

$$\Phi = \frac{\sqrt{k_d a}}{D_s} = \sqrt{\frac{V_{\max}}{K_M D_s}}$$

- pro velmi malé Φ ($\Phi \rightarrow 0$) 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, $\cosh \Phi = 1 + \Phi^2 + \dots$:

$$I_{SS} \approx nFAS^0 k_d / 2$$

- naopak pro velmi velká Φ ($\Phi \rightarrow \infty$) převládne vliv transportních procesů uvnitř biovrstvy, nastává **difúzní kontrola** pro zjednodušení se použije:

$$\lim_{\Phi \rightarrow \infty} \frac{1}{\cosh \Phi} \approx 2e^{-\Phi}$$

což konečně vede ke zjednodušenému výrazu:

$$I_{SS} \approx nFAD_s S^0 / d$$

- oba výrazy platí poměrně dobře pro reálné odezvy biosensorů



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.



Následky pro reálné systémy

- analyt je substrát ... difúzní kontrola je preferována
 - odezva významně nezávisí na množství enzymu v biovrstvě
 - postupný pokles aktivity dlouho neovlivňuje citlivost
 - jak dosáhnout – hodně velké množství enzymu, vytvoření difúzní bariéry (kontrolní membrána)
- analyt je inhibitor ... je nutná kinetická kontrola
 - i velmi malé úbytky aktivity ($\sim V_{\max}$) enzymu v biovrstvě důsledkem inhibice se okamžitě projeví poklesem signálu

