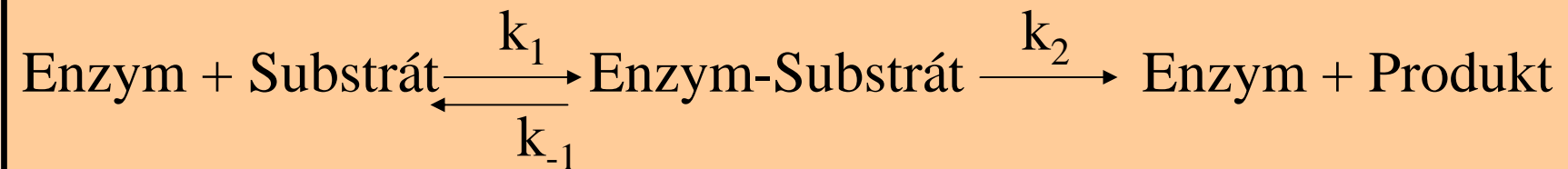


# ENZYMOVÉ BIOSENSORY

**BIOKATALYTICKÉ SENSORY** - rekogniční prvek je enzym = bílkovina, která biokatalyticky přemění určitý specifický substrát na produkt.  
V nejjednodušším případě lze popsat schématem:



**Rychlost vzniku produktu podle rovnice Michaelise-Mentenové:**

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$V_{\max}$  je maximální rychlost při saturaci substrátem:

$$K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$$

Pro enzymové sensory platí upravená rovnice Michaelise-Mentenové:

- Rychlost v ní vystupuje jako měřený signál
- Snaha udržet koncentraci substrátu mnohem nižší než je  $K_m$ , protože pak závisí odezva lineárně na koncentraci substrátu, pro  $[S] \ll K_m$  a  $[S]$  v jmenovateli zanedbat
- Při immobilizaci enzymů v biosensorech dochází obvykle ke změně  $K_m$ , takže se dá určit jen zdánlivá hodnota.

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

## Typ biorekogniční vrstvy

- ❑ purifikovaný enzym
- ❑ biologický materiál (buňky, tkáňové řezy)
- ❑ jeden enzym nebo dva i více, které spolu kooperují-katalyzují následné reakce nebo recyklační procesy

- ✓ stanovení substrátů
- ✓ stanovení inhibitorů
- ✓ stanovení aktivity enzymů

## Stanovení substrátů

**ANALYT**

substrát imobilizovaného enzymů

**PŘEVODNÍK**

elektroda nebo optický systém

## Příklady stanovení látek jako substrátů

- ✓ sacharidy
- ✓ alkoholy a fenoly
- ✓ kyseliny
- ✓ aminokyseliny
- ✓ dusíkaté látky
- ✓ purinové báze
- ✓ estery a amidy
- ✓ triglyceridy
- ✓ fosfolipidy
- ✓ penicilin

# GLUKOSA

Význam: v klinické biochemie  
v potravinářství

Hodnoty. normální: 5 mM, patologické: až 50 mM

Léčba: inzulin

## Požadavky na biosensor:

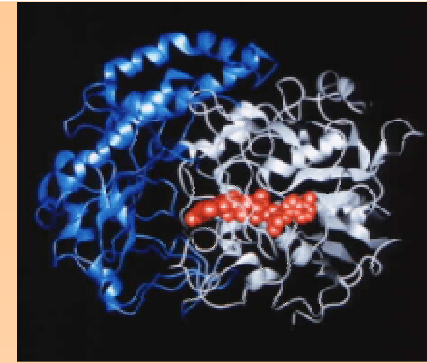
rozsah: do 20 mM, limit detekce 0,1 mM

koncentrace glukosy v krvi není stabilní, ale klesá  
za hodinu až o 10%

stabilizace pomocí NaF a detergentů



# GLUKOSA



## Biorekogniční vrstva

- **glukosaoxidas** EC 1.1.3.4. *Aspergillus niger*

*Penicillium notatum*

dimer se dvěma FAD kovalentně vázaný na podjednotky  
16% glykosylových zbytků

$M_r$  160 kDa

specifická aktivita 200 U/mg (i více, poměrně stabilní)

oxiduje pouze  $\beta$ -formu

- **glukosodehydrogenasa** EC 1.1.99.17, PQQ

*Acinetobacter calcoaceticus*

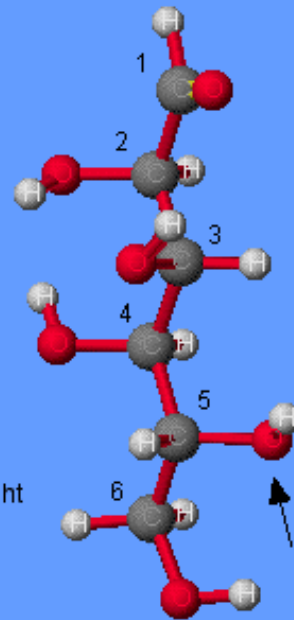
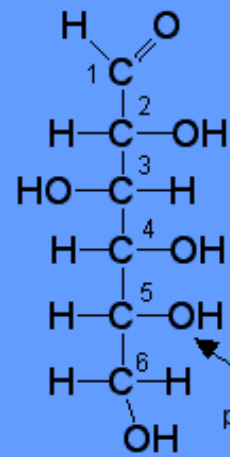
snadno přenáší elektrony na mediátory (ferrocen)

má vysoké číslo přeměny, poskytuje nejvyšší signál

- **pyranosaoxidas** = glukosa-2-oxidas

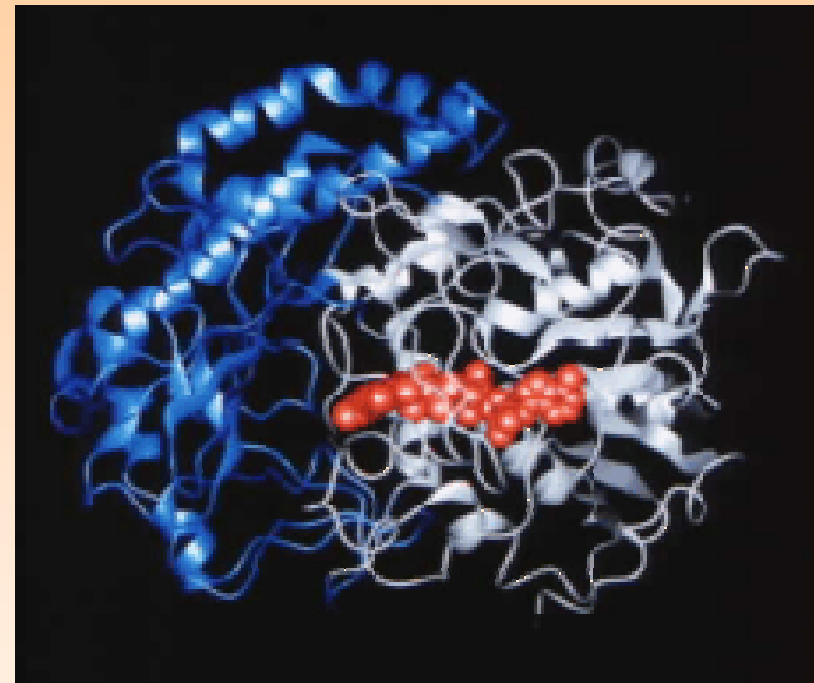
nevýhoda: reaguje s dalšími sacharidy

## D-Glucose

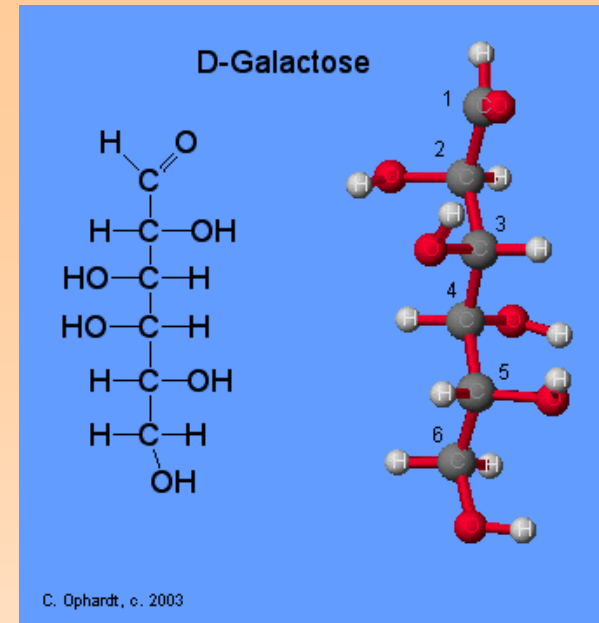


projects right  
for the D  
isomer

C. Ophardt, c. 2003



# GALAKTOSA



## □ klinické biochemii

Galaktosemie: chybí galaktosa-1-fosfáturidyltransferasa (enzym pro metabolismus galaktosy v dětském věku - -průjem, zástava růstu, mentální retardace)

je potenciálně toxická při poruchách odbourávání  
hladina v séru: pod 0,25 mM

## Biorekogniční vrstva:

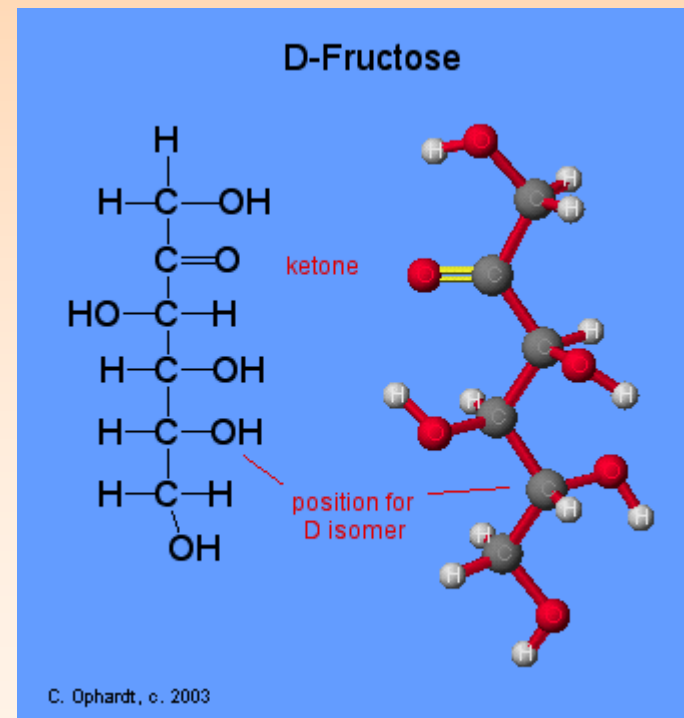
galaktosoxidas EC 1.1.3.9, kuproprotein  
má afinitu k oběma anomerům

# FRUKTOSA

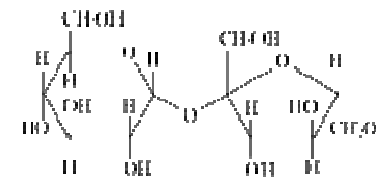
- potravinářský průmysl (alternativní sladidlo)
- klinická biochemie intolerance fruktosy způsobená chyběním aldolasy, štěpící v játrech fruktosa-1-fosfát. Hromadící se fruktosa vede k inhibici fosfoglukomutasy poruše přeměny glykogenu na glukosu, což se projeví hypoglykemií po zátěži fruktosou.  
Onemocnění poškození CNS, jater, porucha růstu, poškození ledvin  
Řešení: vynechání fruktosy a sacharosy ve stravě

## Biorekogniční vrstva

**fruktosodehydrogenasa** (mikrobiálního původu)  
membránově vázaný enzym přenášející  
elektrony na umělé akceptory  
např. ferricyanid



# SACHAROSA



**Význam:** potravinářství a cukrovarnictví  
(v cukrovce je obsah 15 až 25%)

## Biorekogniční vrstva:

je třeba imobilizovat několik enzymů:

**INVERTASA** (EC 3.2.1.26) hydrolýza

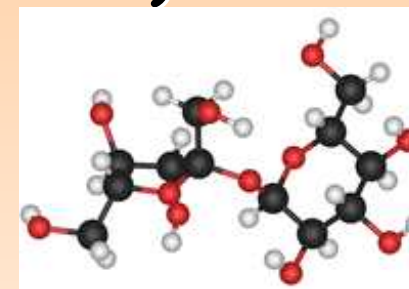
sacharosy na  $\alpha$ -glukosu a fruktosu

**MUTAROTASA** (EC 5.1.3.3) urychluje

ustavení rovnováhy mezi oběma anomery  
glukosy (spontálně - pomalu)

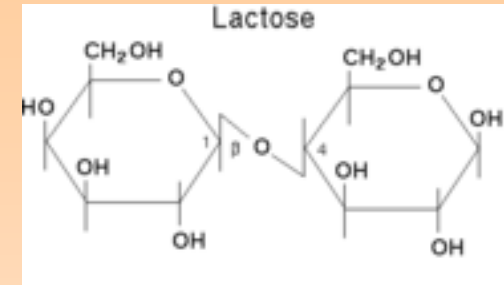
**GLUKOSAOXIDASA** (EC 1.1.3.4.)

oxiduje  $\beta$ -anomer glukosy za vzniku  $H_2O_2$



# LAKTOSA

= MLÉČNÝ CUKR  
( $\beta$ -D-galaktosyl-4-O-glukosa)



V lidském mléku: 0,3 až 0,6 mM

V kravském mléku: 0,25 až 0,28 mM

Analýza v potravinářství - určení obsahu sušeného mléka v produktech.

Biorekogniční vrstva:

$\beta$ -galaktosidasa (EC 3.2.1.23)

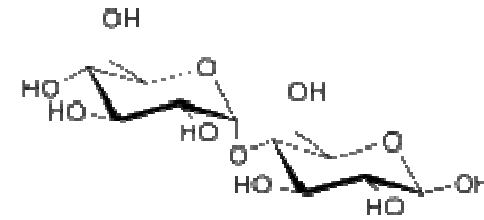
poskytuje oba monosacharidy

pak se použije jeden z následujících:

galaktosoxidasa (EC 1.1.3.9)

nebo glukosaoxidasa (EC 1.1.3.4)

# MALTOSA



**Význam:** klinické biochemii při stanovení aktivity  $\alpha$ -amylasy (onemocnění slinivky)

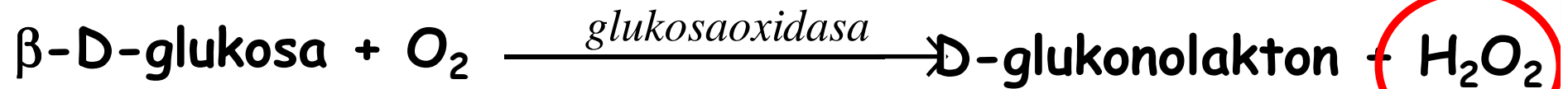
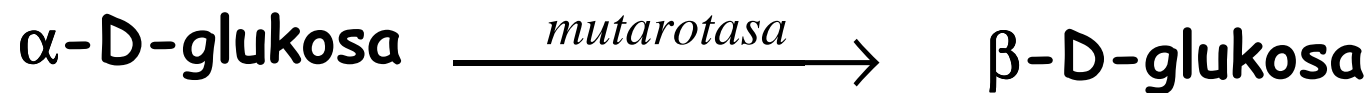
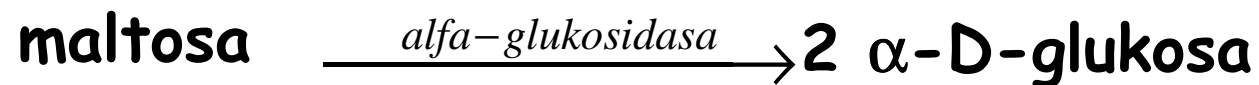
## Biorekogniční vrstva

**$\alpha$ -glukosidasa** (EC 3.2.1.20) z kvasinek  
hydrolýza na dvě  $\alpha$ -glukosy

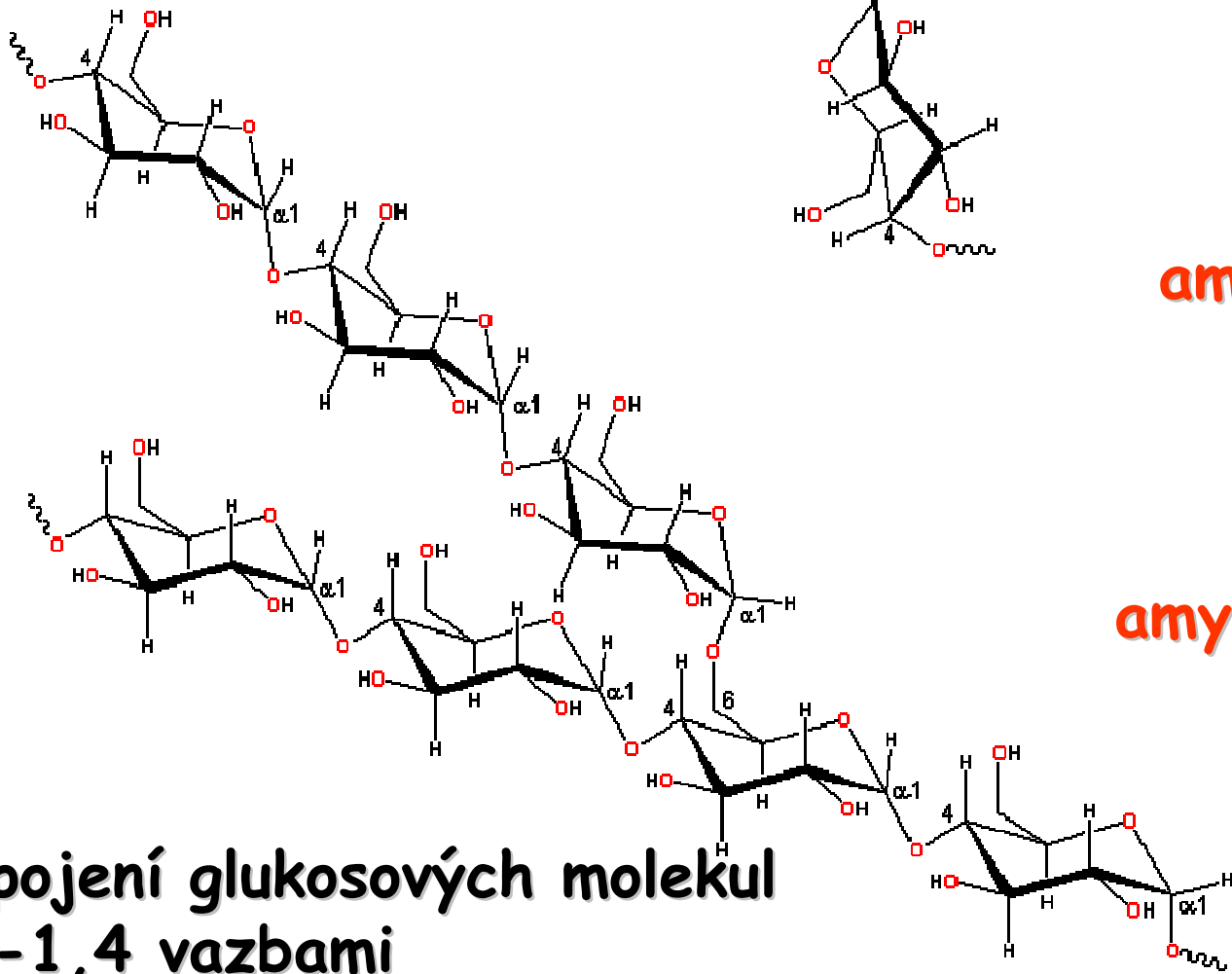
**mutarotasa** (EC 5.1.3.3) z vepřových ledvin  
přeměna  $\alpha$ -glukosy na  $\beta$ -glukosu

**glukosaoxidasa** (EC 1.1.3.4)  
oxidace glukosy na kyselinu glukonovou  
peroxid vodíku

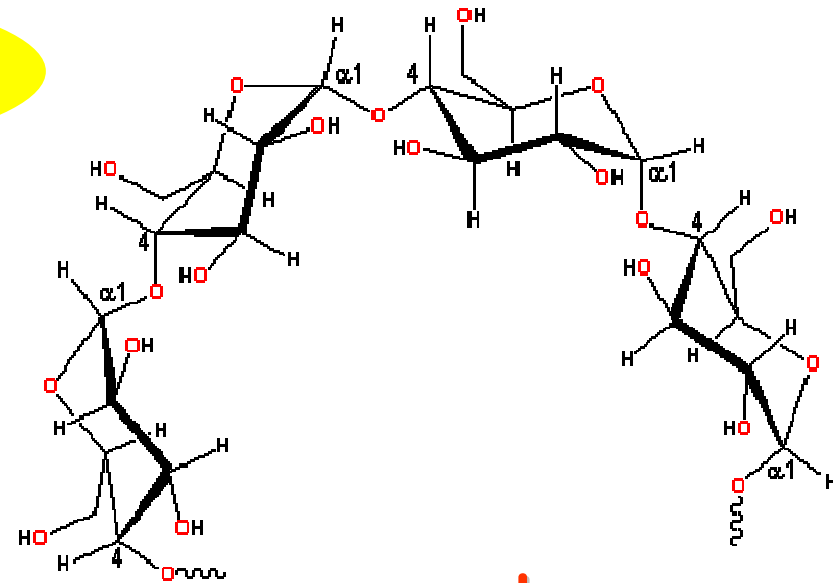




# ŠKROB



amylosa



amylopektin

spojení glukosových molekul  
α-1,4 vazbami

**Význam:** stanovení v obilí, rýži, bramborách

**Biorekogniční vrstva:**

nejprve je nutné provést hydrolýzu

**glukoamylasou** (EC 3.2.1.3) **exo-1,4- $\alpha$ -glukosidasa**,  
 **$\alpha$ -amylasu** (EC 3.2.1.1), která produkuje maltosu +  
dextriny (4 až 12 glukosových jednotek)

**$\alpha$ -glukosidasa** (EC 3.2.1.20), která přemění  
maltosu na dvě glukosy ( $\alpha$ )

**mutarotasa** (EC 5.1.3.3) katalyzuje přeměnu  
 $\alpha$ -glukosy na  $\beta$ -glukosu,

**glukosaoxidasa** (EC 1.1.3.4) oxiduje glukosu  
za vzniku peroxidu vodíku a kyseliny glukonové

**Problém:** velikost molekuly škrobu  
reaktoru

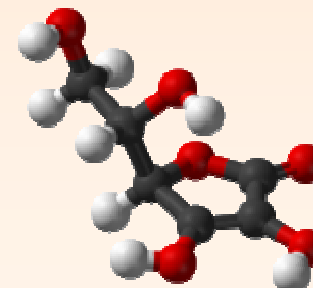
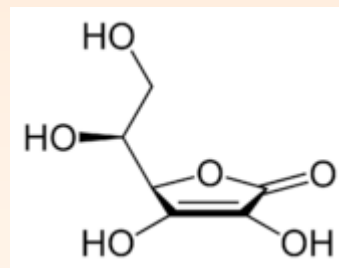
# VITAMÍN C

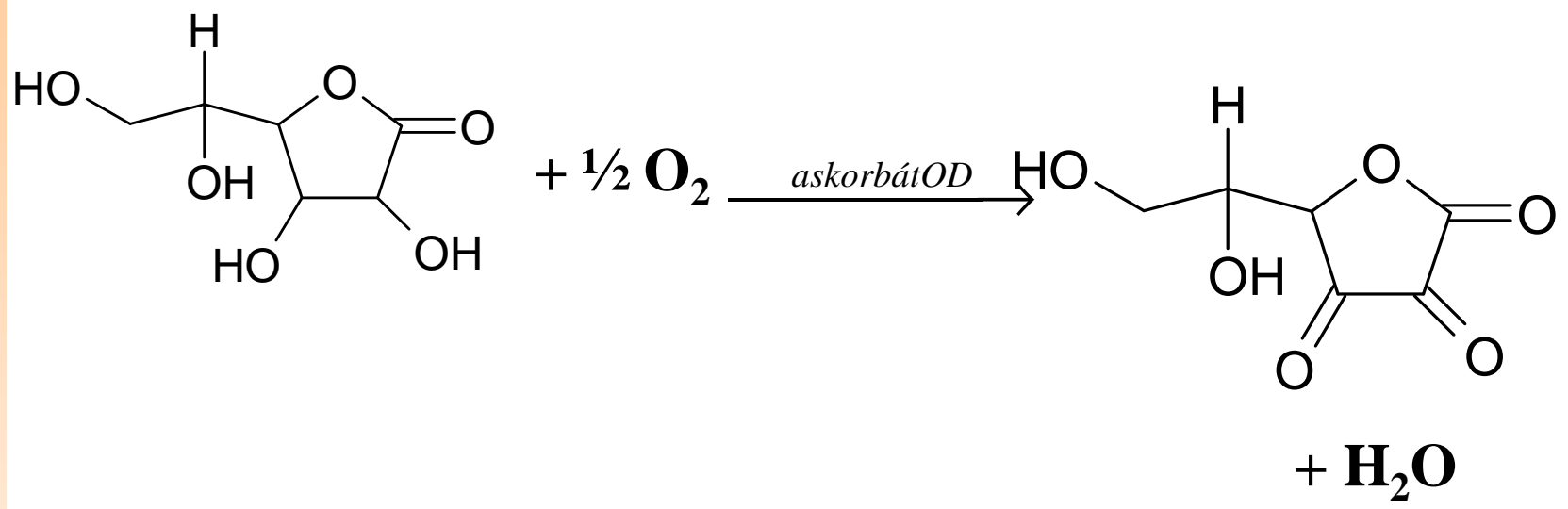
kyselina askorbová

Význam: stanovení v potravinách, ovoci, v preparátech

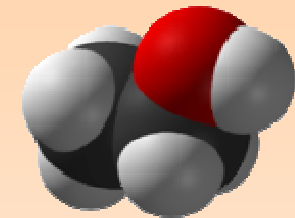
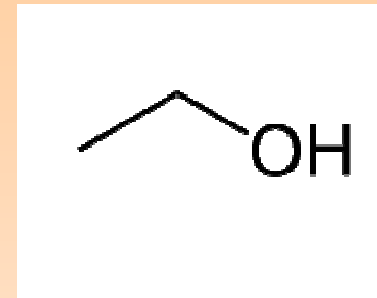
Biorekogniční vrstva:

askorbát oxidasa (EC 1.10.3.3) kuproprotein  
oxiduje vitamín C na dehydroaskorbovou  
kyselinu, vzniká však jen voda, lze tedy  
použít pouze kyslíkovou elektrodu  
větší citlivosti lze dosáhnout zpětnou  
chemickou redukcí vznikající dehydroaskorbové  
kyseliny např. cysteinem





# ETHANOL



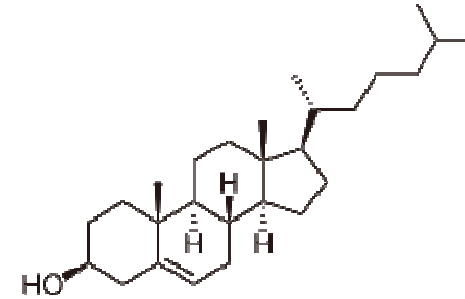
**Význam:** v alkoholických nápojích  
klinická praxe, při kontrole řidičů  
vhodné použití biosensorů, jsou snadno přenosné  
pokusy měřit vydechovaný vzduch- nadějně

### Biorekogniční vrstva

**alkoholoxidas** (EC 1.1.3.13) mikrobiální

(*Pichia pastoris*) spec. aktivita bývá 40 U/mg

# CHOLESTEROL



**Význam:** klinická praxe (ukládá se ve stěnách cév)  
při kardiovaskulárních chorobách nejčastější  
příčina morbidity obyvatelstva (1/2 všech úmrtí)  
3,5 až 5,2 mM (6,5 = 2, 7,4=4)  
potravinářství

## Biorekogniční vrstva:

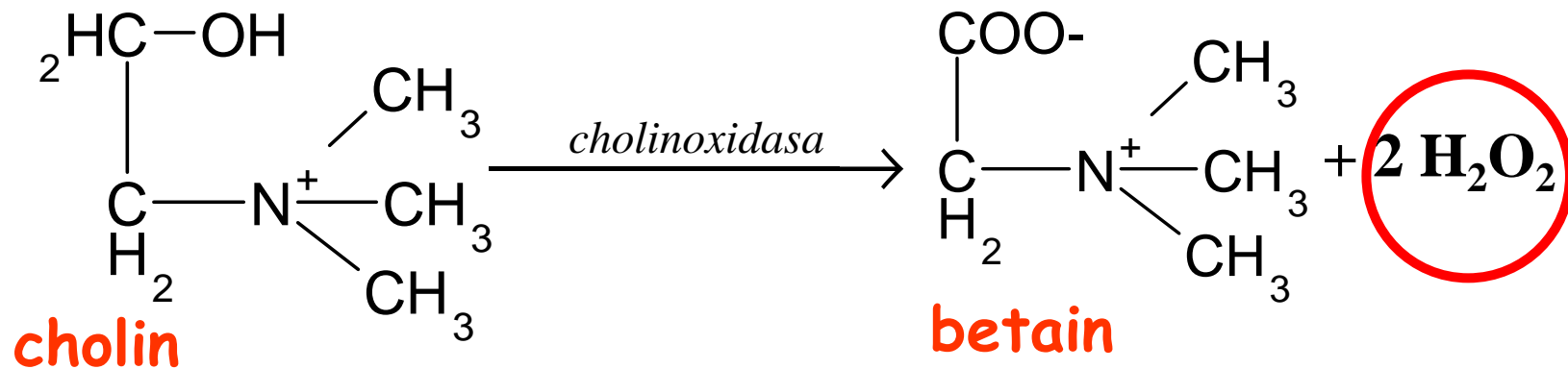
**Cholesteroloxidas** (EC 1.1.3.6) produkce peroxidu vodíku,  
cholesterol volný, pokud je třeba stanovit

formu

vázanou v esterech, přidává se navíc  
cholesterolesterhydrolasa (EC 3.1.1.13),  
pak je vhodné pracovat v prostředí detergentu  
(Triton X-100, deoxycholát) nebo v organickém  
rozpuštědle.

# CHOLIN

**Význam:** často se měří při studiu nervové funkce  
**Enzym:** **Cholinidasa (EC 1.1.3.17)**  
*Alcaligenes sp.*  
produkuje betain a 2 molekuly peroxidu vodíku





# FENOLY

**Význam:** stanovení v průmyslových odpadních vodách  
v některých potravinách (oleje)  
průmyslové produkty

**Enzymy:** tyrosinasa (EC 1.14.18.1) fenoloxidas a nebo polyfenoloxidas a, kuproprotein izolovaný ze žampionů, je možné použít přímo tkáňový řez.

Působí na fenol, jednoduché substituované fenoly, katechol, chlorfenoly.

Oxidace jde přes katechol na o-chinon, který spontánně polymeruje (tmavne)

lakasa (EC 1.10.3.2) izoluje se z houby *Polyporus versicolor*, kuproprotein, působí hlavně na hydrochinon a *p*-difenoly.

## Karboxylové kyseliny a aminokyseliny

Kyselina mléčná (L-laktát)

kyselina jablečná

kyselina oxaloctová

kyselina močová

kyselina isocitronová

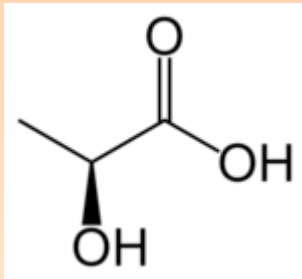
aminokyseliny: lysin, kyselina glutamová

mastné kyseliny

kyselina siřičitá

# KYSELINA MLÉČNÁ = L-LAKTÁT

## Význam:



- v klinické medicíně (koncentrace v séru pro rozlišení acidóz) norma: 2,7 mM
- ve sportovní medicíně ukazatel trénovanosti (nárůst koncentrace nastává jako reakce na zátěž)
- v potravinářském průmyslu - mléčné kvašení ( v jogurtech a vínu).

## Enzymy:

- laktát oxidasa (EC 1.1.3.2)** LOD z bakterie *Pediococcus*, flavoprotein produkující  $H_2O_2$
- cytochrom  $b_2$  (EC 1.1.2.3)** dehydrogenasa izoluje se z kvasinek, akceptorem je ferrikyanid a další mediátory
- laktátmonooxygenasa (EC 1.13.12.4)** produkce acetát+ $CO_2$ , používala se před LOD

Při mléčném kvašení může vznikat i  
D-forma laktátu

Stanovení se provádí pomocí **D-laktátdehydrogenasy**  
(**NAD<sup>+</sup>-dependetní**)

**Laktátdehydrogenasa (EC 1.1.1.27)** ze svalů savců  
má jako koenzym **NAD<sup>+</sup>**, pro analýzu biosensory  
se prakticky nepoužívá.

# KYSELINA JABLEČNÁ

**Význam:** stanovení v ovoci, ve víně (hodnocení kvality)

**Enzym:** malátdehydrogenasa ( $\text{NAD}^+$ , EC 1.1.1.37)  
*Bacillus subtilis*



# KYSELINA OXALOCTOVÁ

**Význam:** klinická biochemie, v moči při hyperoxalurii  
zvýšené vylučování kyseliny šťavelové v moči  
(dědičné poruchy, nadbytek vitamínu C,  
nedostatek vápníku)

Kyselina šťavelová v moči vzniká z

10% z potravy

30% přeměnou kyseliny askorbové

60% endogenní vzniklá při metabolismu  
aminokyselin

**Enzymy:** oxalát oxidasa (EC 1.2.3.4)

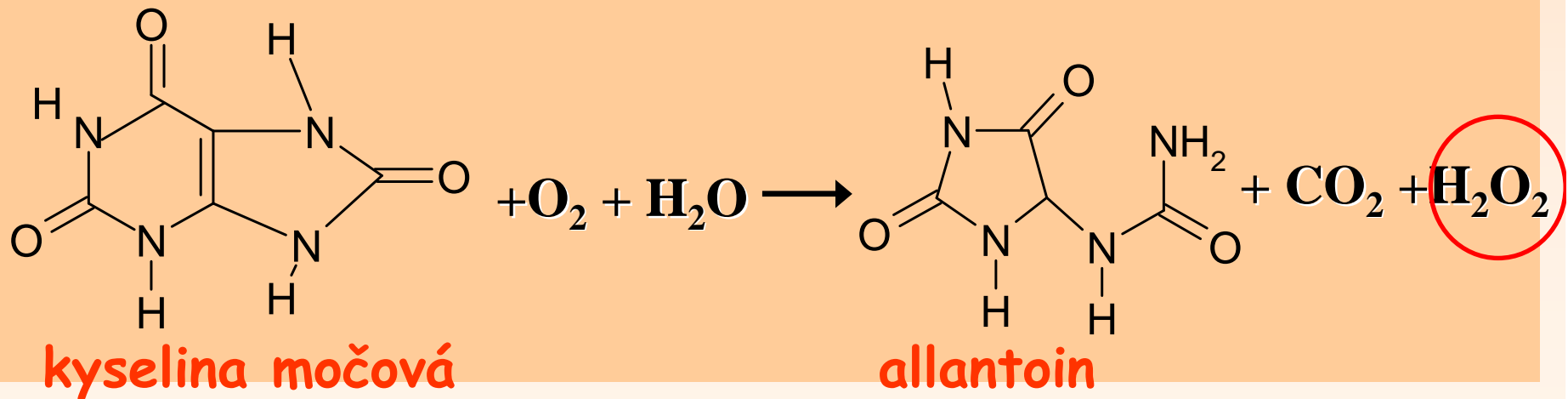
katalyzuje reakci:



# KYSELINA MOČOVÁ

**Význam:** klinická biochemie, hematologické poruchy, dna (kyselina močová se ukládá v kloubech) v séru 0,14 až 0,4 mM

**Enzym:** urikasa (EC 1.7.3.3) urát oxidasa, obsahuje Cu oxiduje kyselinu močovou na allantoin a peroxid vodíku



# KYSELINA ISOCITRONOVÁ

Vzniká jako vedlejší produkt při fermentační výrobě kyseliny citronové.

Enzym: isocitrátdehydrogenasa (EC 1.1.1.42)  
(NADP<sup>+</sup>)



# AMINOKYSELINY

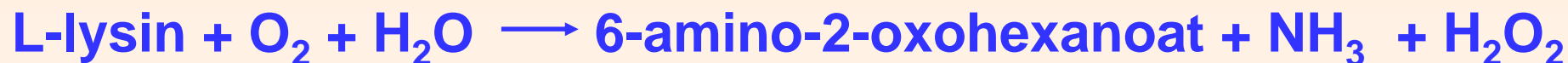
**Význam:** je možné stanovit jako sumu v potravinách

**Enzym:** oxidasa L-aminokyselin (EC 1.4.3.2)  
pro L-aminokyseliny  
oxidasa D-aminokyselin (EC 1.4.3.3)  
pro D-aminokyseliny

# LYSIN

**Význam:** esenciální, je přidáván do krmných směsí  
**Enzymy:** lysin- $\alpha$ -oxidasa (EC 1.4.3.14), dekarboxylující  
z *Trichoderma viridae*  
lysindekarboxylasa (EC 4.1.1.18)  
z *Escherichia coli*, *Bacterium cadaveris*  
produkuje CO<sub>2</sub> a kadaverin, který lze stanovit  
pomocí diaminoxidasy (EC 1.4.3.6) z hrachu

lysin- $\alpha$ -oxidasa



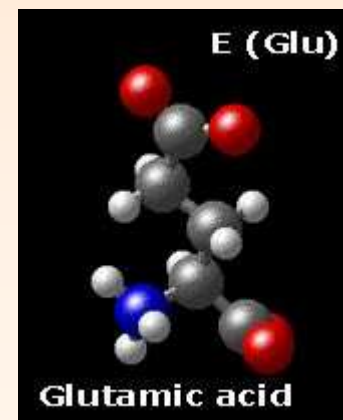
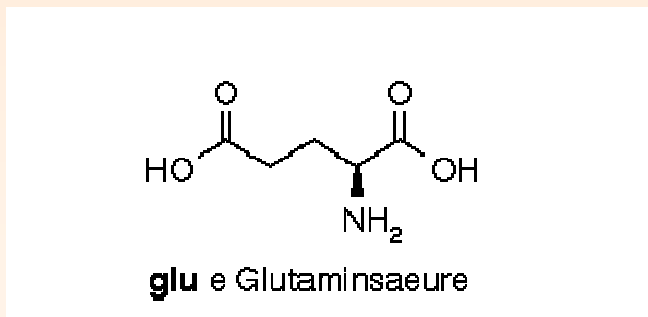
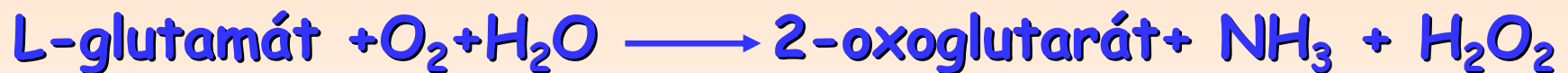
lysindekarboxylasa

# KYSELINA GLUTAMOVÁ

**Význam:** je součástí polévkových koření, sojové omáčky.

**Enzymy:** **glutamát oxidasa (EC 1.4.3.11)** flavoprotein  
produkuje z glutamátu  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\alpha$ -oxoglutarát  
a peroxid vodíku.

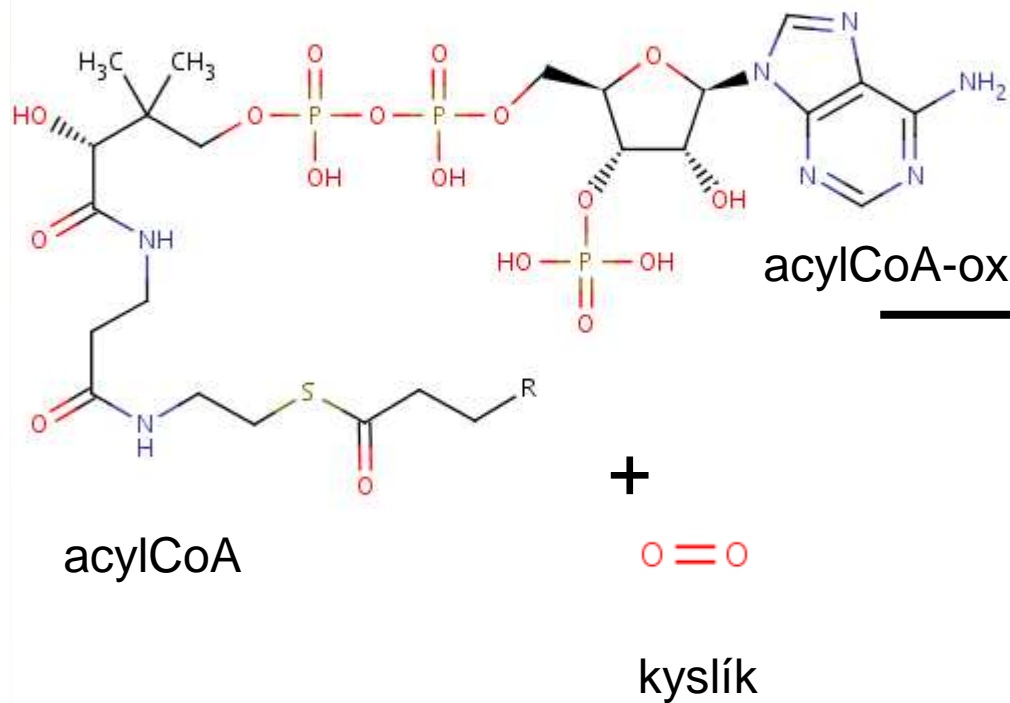
**glutamát dehydrogenasa (L-glutamát: NAD(P)<sup>+</sup>  
oxidoreduktasa (deaminující) z jater)**  
měla uplatnění dřív před objevem oxidasy.



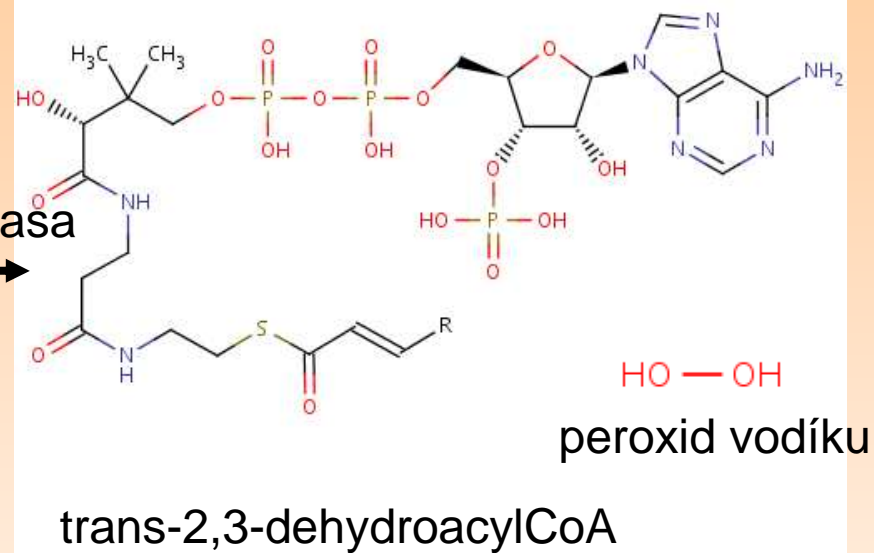
# MASTNÉ KYSELINY

**Význam:** kyselina olejová a palmitová se analyzují v krvi, v potravinách indikují denaturaci tukových (olejových) složek

**Enzymy:** **acyl-CoA-syntasa** 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



acylCoA-oxidasa



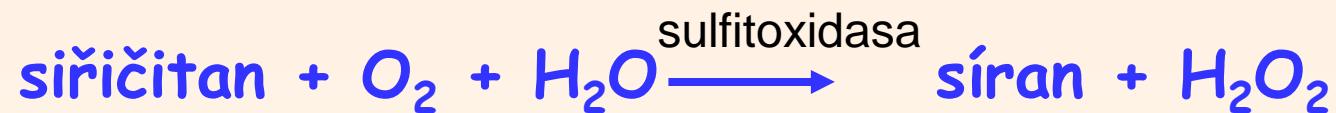
acylCoA-oxidasa



# KYSELINA SIŘIČITÁ

**Význam:** obsah se stanovuje ve víně  
**Enzym:** sulfitoxidasa (EC 1.8.3.1) oxidací vzniká peroxid vodíku

Některé další anorganické kyseliny lze stanovit na principu detekce inhibitorů (viz dále).



## Dusíkaté sloučeniny

močovina

aminy a polyaminy

kreatin a kreatinin

purinové base

# MOČOVINA

- Význam:** -klinická biochemie  
indikátor funkce ledvin norma: 3,6 až 9 mM  
-zemědělství: stanovení krmné dávky  
na základě znalosti koncentrace močoviny  
v kravském mléku
- Enzym:** ureasa (EC 3.5.1.5) absolutně specifická  
katalyzuje:



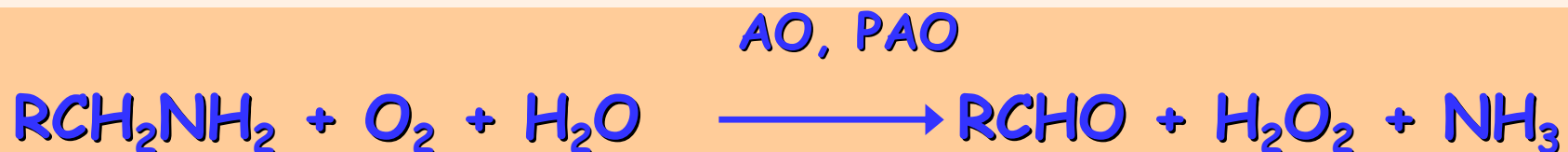
potenciometrie  
konduktometrie



# AMINY A POLYAMINY

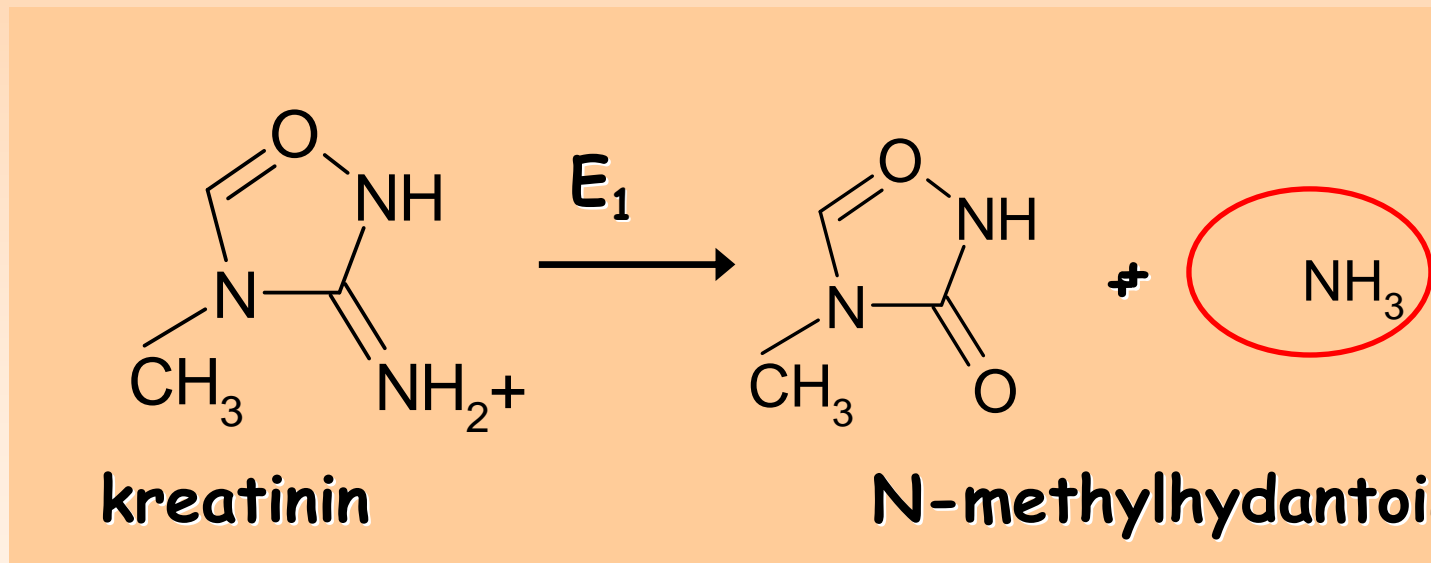
**Význam:** kadaverin a putrescin = diaminy, které vznikají působením mikroorganismů na potraviny bílkovinného složení (sýry, maso, ovoce, sojová omáčka, pivo, víno), indikátor čerstvosti potravin  
klinická biochemie - histamin (alergická reakce)  
polyaminy (spermin a spermidin) indikátory některých karcinomů

**Enzymy:** aminoxidasa (EC 1.4.3.6), AO  
polyaminy (EC 1.5.3.11), PAO  
katalyzují:



# KREATIN A KREATININ

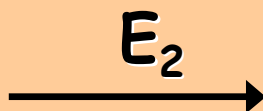
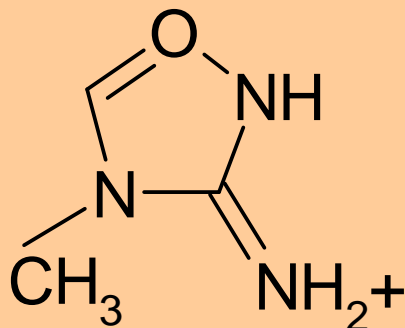
**Význam:** klinická biochemie, posouzení funkce ledvin



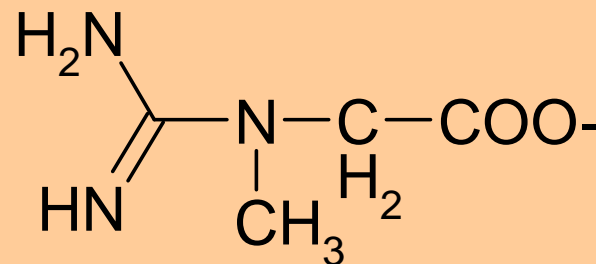
**E<sub>1</sub> kreatininiminohydrolasa (EC 3.5.4.21)**

potenciometrie

kreatinin

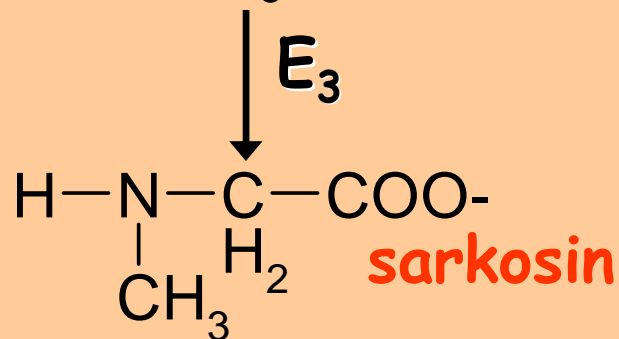


kreatin



$E_2 =$  kreatininamidohydrolasa  
(EC 3.5.2.10)

$E_3 =$  kreatinamidinohydrolasa  
(EC 3.5.3.3)



$E_4$

Formaldehyd, glycin +  $H_2O_2$

$E_4 =$  sarkosinoxidasa  
(EC 1.5.3.1)

peroxidová elektroda

# PURINOVÉ BÁZE

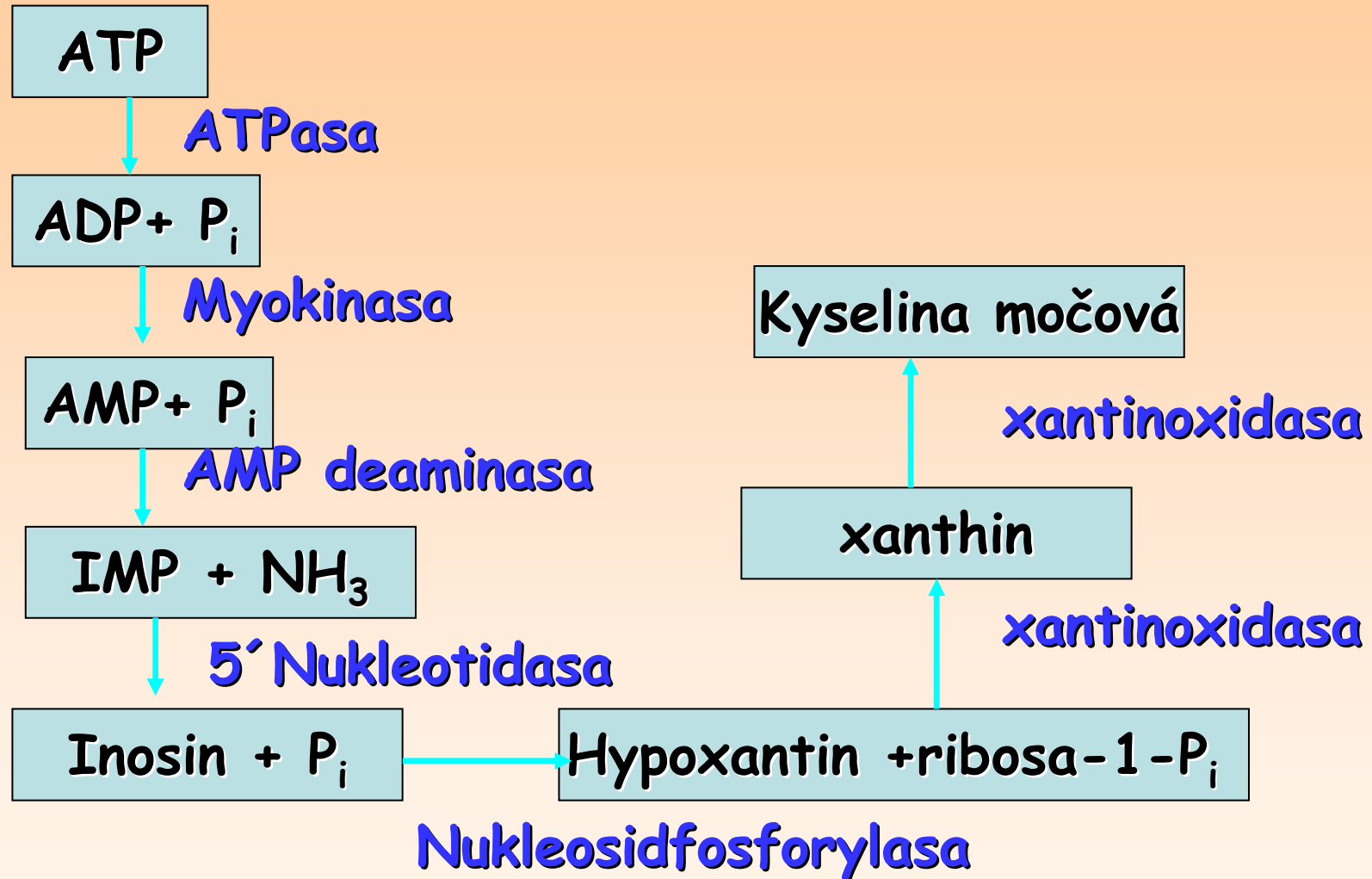
**Význam:** slouží v Japonsku jako indikátor čerstvosti rybího masa. Při kažení masa probíhá hydrolytický rozklad ATP, nakonec se oxiduje až na kyselinu močovou.

Nastávají změny kvality a chuti masa.

**Enzymy:** Byl vyvinut čtyřkanálový biosensor:

- 1) Xantinoxidasa (EC 1.2.3.2) (XOD)
- 2) XOD + Nukleosidfosforylasa (EC 2.4.2.1)
- 3) jako 2 + 5' Nukleotidasa (EC 3.1.3.5)
- 4) jako 3 + AMP deaminasa (EC 3.5.4.6)

# PRINCIP BIOSENSORU



Postupně se určí hladiny všech metabolitů v tkáni.  
Navíc se dopočítá obsah ATP/ADP  
(výchozí množství je konstantní a známé).  
Vypočítá se procentuální podíl xanthinu a hypoxanthinu  
k sumě všech metabolitů - tzv. **faktor čerstvosti K**  
Podle velikosti se pak maso klasifikuje jako:

**Velmi čerstvé**

**Čerstvé**

**Kazící se**

K je menší jak 10%

K je menší jak 40%

K je větší jak 40%

## Estery a amidy

Acetylcholin

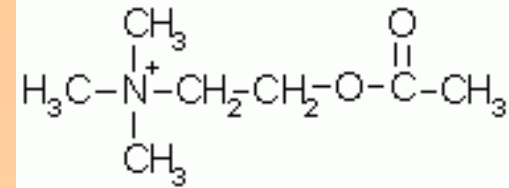
Fosfolipidy

Triglyceridy

Glycerol

Penicilin

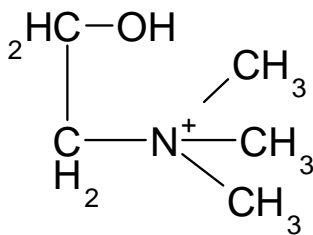
# ACETYLCHOLIN



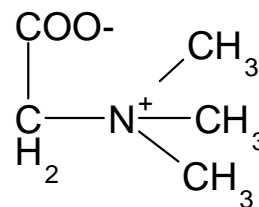
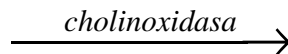
kation acetylcholinu

**Význam:** slouží jako mediátor přenosu vzruchů v nervové soustavě

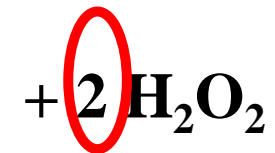
**Enzymy:** **acetylcholinesterasa (EC 3.1.1.7)**  
z krvinek nebo elektrického úhoře AChE  
štěpí na kyselinu octovou a cholin  
(lze spojit s pH senzorem)  
**cholinoxidasa (EC 1.1.3.17 ChOD)**  
stanovení cholinu, produkuje 2 molekuly  $\text{H}_2\text{O}_2$   
Arthrobacter globiformis



cholin



betain





# FOSFOLIPIDY

**Význam:** v krevní plazmě 2,5 až 3 mM,  
hlavně fosfatidylcholin

**Enzym:** po hydrolýze fosfolipasou (EC 3.1.4.4)  
vzniklý cholin se stanoví pomocí ChOD  
cholinoxidasa (EC 1.1.3.17 )

# TRIGLYCERIDY

**Význam:** klinická biochemie: vyskytují se v séru:  
normálně: 0,35 až 1,7 mM,  
vyšší hodnoty: hyperlipidemie

**Enzymy:** lipasa (EC 3.1.1.3) hydrolýza triglyceridů  
na mastné kyseliny a glycerol, který  
lze stanovit:

1) glyceroldehydrogenasa (EC 1.1.1.6),  
oxidací se produkuje NADH

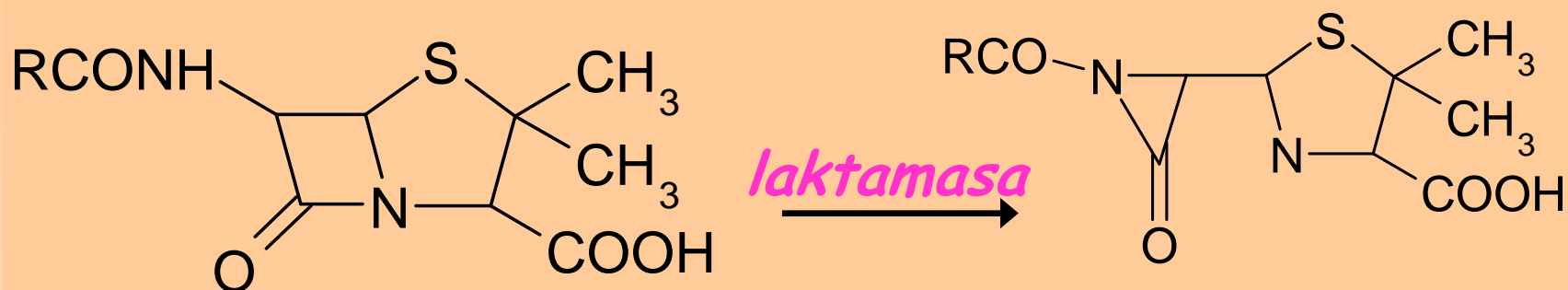
2) glycerol se převede pomocí  
glycerolkinasy (EC 2.7.1.30)  
na glycerolfosfát, který se katalyticky  
přeměňuje pomocí glycerolfosfát oxidasy

# PENICILIN

**Význam:** je biosensory stanovován během fermentační výroby.

**Enzymy:** dva enzymy:  
 $\beta$ -laktamasa (Penicilinas) (EC 3.5.2.6)  
penicilinamidasa (EC 3.5.1.11)  
oba se spojují s pH sensory

## Stanovení penicilinu



penicilin

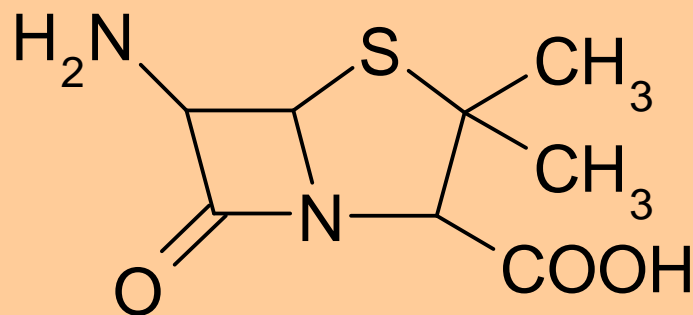
Peniciloinová  
kyselina

Typ penicilinu:

(R=):

G...C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>-

V...CHOCH-



6-APS

+ R-COOH