

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Optimalizace skladovacích podmínek pro tyrozinázové senzory

Aneta Hartmanová

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Aneta Hartmanová**
Osobní číslo: **C16177**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Optimalizace skladovacích podmínek pro tyrozinázové senzory**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Z dostupné literatury zpracujte rešerši obsahující základní charakterizaci tyrosinázových amperometrických sensorů. Detailně popište molekulovou strukturu, katalytické vlastnosti a významné inhibitory tyrosinázy (EC 1.14.18.1) izolované z houby *Agaricus bisporus*. Vše pokud možno doprovodte patřičnými ilustracemi. V poslední řadě by měla teoretická část obsahovat stručný přehled výše zmíněných biosenzorů zaměřený na jejich životnost.
2. V experimentální části se zaměřte především na výběr skladovacích podmínek vámi zhotoveného biologického zařízení. Životnost ověřte vždy každodenním opakováním měření standardního roztoku dopaminu. Na základě obdržených experimentálních výsledků navrhnete optimální podmínky skladování.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Tomáš Mikysek, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Milan Sýs, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

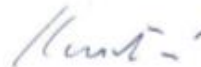
Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



Ing. Petr Kalenda, Ph.D.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji: Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne.....

.....
Podpis

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala mé rodině a blízkým za jejich srdečnou podporu, kterou mi po celou tu dobu poskytovali. Zvláštní poděkování patří také mému konzultantovi Ing. Milanu Sýsovi, Ph.D. za cenné rady a pomoc, jak s experimentální částí, tak se samotnou bakalářskou prací.

ANOTACE

Hlavní náplní této vědecké práce bylo studium vlivu skladovacích podmínek na životnost tyrozinázových biosenzorů. Pro experimentální měření byl jako analyt zvolen neurotransmitter dopamin. Enzym tyrozináza (EC 14.18.1) izolovaný z houby *Agaricus bisporus* byla pevně zakotvena na různé typy amperometrických transduktorů. Imobilizace se prováděla přímým začleněním do elektrodového materiálu, vmezeřením do struktury polymeru Nafionu[®], či kovalentní vazbou prostřednictvím zesíťovadla glutaraldehydu. Takto vzniklé biosenzory byly skladovány za různých podmínek a jejich analytické parametry se sledovaly amperometricky.

KLÍČOVÁ SLOVA

tyrozináza, biosenzory, amperometrie, imobilizační techniky, skladovací podmínky

TITLE

Optimalization of storage conditions for tyrosinase sensors

ANNOTATION

The main aim of this scientific work was study of storage conditions effect on tyrosinase biosensors service life. A neurotransmitter dopamine was chosen as the analyte for experimental measurements. An enzyme tyrosinase (EC 14.18.1) isolated from the mushroom *Agaricus bisporus* was firmly anchored to different types of amperometric transducers. Immobilizations were realized using incorporation into the electrode material, intercalation into the Nafion[®] polymer structure and/or covalent bonding via a glutaraldehyde crosslinker. Resulting biosensors were stored at different storing conditions and their analytical parameters were monitored amperometrically.

KEY WORDS

tyrosinase, biosensors, amperometry, immobilization techniques, storage conditions

Obsah

Seznam obrázků a tabulek.....	9
Seznam použitých zkratk 10	10
Úvod	11
TEORETICKÁ ČÁST	12
1. Základní charakteristika enzymu tyrozinázy.....	12
1.1. Molekulová struktura aktivního centra	12
1.2. Optimální podmínky pro katalytickou aktivitu.....	14
1.2.1. Teplota	14
1.2.2. Vliv pH prostředí.....	14
1.2.3. Iontová síla	14
1.2.4. Inhibitory.....	15
1.2.5. Aktivátory.....	16
1.2.6. Přítomnost kationtů kovů	16
1.3. Potencionální substráty.....	17
2. Konstrukce amperometrických tyrozinázových senzorů	17
2.1. Nekovalentní imobilizace.....	18
2.1.1. Přímé zakomponování do elektrodového materiálu	18
2.1.2. Přímá adsorpce na povrch elektrodového materiálu	19
2.1.3. Zakotvení enzymu pomocí polymeru	19
2.1.4. Zabudování enzymů do nanopórů vhodných nosičů	20
2.2. Kovalentní imobilizace	21
2.2.1. Karbodiimidová metoda	21
2.2.2. Glutaraldehydová metoda	22
3. Životnost tyrozinázových senzorů	23
3.1. Stabilita tyrozinázových senzorů	23
3.2. Vliv skladování na životnost tyrozinázových biosenzorů	23
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
4. Analýza s amperometrickým biosenzorem	24
4.1. Chemikálie.....	24
4.2. Přístrojové vybavení	24
4.3. Příprava tyrozinázového biosenzoru	24
4.4. Výsledky a diskuze.....	26

4.4.1. Charakterizace připravených biosenzorů.....	26
4.4.2. Vliv způsobu imobilizace na životnost tyrozinázových biosenzorů	29
4.4.3. Vliv skladování na životnost SPCE/Tyr-GTA/Nafion® senzoru	30
5. Závěr	32
Seznam použité literatury	33

Seznam obrázků a tabulek

Obr. 1. Molekulová struktura tyrozinázy	12
Obr. 2. Mechanismus oxidace fenolu katalyzovanou přítomností tyrozinázy.....	13
Obr. 3. Schéma reakcí imobilizace enzymů na nosičích s různými funkčními skupinami	22
Obr. 4. Jednotlivé kroky potřebné k přípravě SPCE/Tyr-GTA/Nafion [®] senzoru.....	25
Obr. 5. Jednotlivé kroky potřebné k přípravě AuE-AET-GTA-Tyr senzoru	26
Obr. 6. Cyklické voltamogramy	27-28
Obr. 7. Mechanismus reakce tyrozinázového senzoru.	28
Obr. 8. Amperogramy čerstvých biosenzorů	29
Obr. 9. Kalibrační křivky SPCE/Tyr-GTA/Nafion [®] senzoru po 1 týdnu skladování	31
Tab. 1. Srovnání biosenzorů elektrochemické tyrozinázy pro monitorování dopaminu	30

Seznam použitých zkratek

AET	2-aminoethanthiol hydrochlorid
Ag/AgCl	argentchloridová elektroda
AuE	zlatá disková elektroda
CMK-1/CMK-3	kopie matric mezoporézního oxidu křemičitého
CNTs	uhlíkaté nanotrubičky
CPE	uhlíková pastová elektroda
CuA, CuB	označení oxidačních iontů mědi
GCE	skleněná uhlíková elektroda
GTA	glutaraldehyd
KCl	chlorid draselný
K_M	Michaelisova konstanta
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
MIP	z angl. Molecularly Imprinted Polymers
OMC	mezoporézní uhlíky
PANI	polyanilin
PEDOT	poly (3,4-ethylendioxythiofen)
PPY	polypyrrol
PVA	polyvinylalkohol
SPCE	uhlíková tištěná elektroda
SWNTs	uhlíková nanotrubičky
TYR	tyrozináza
V_{max}	maximální rychlost

Úvod

Mnou zhotovená bakalářská práce je věnována studiu vlivu použitých imobilizačních technik a podmínek skladování na životnost tyrozinázových amperometrických biosenzorů. Doposud byl vyvinut bezpočet takovýchto biosenzorů pro různě významné klinické aplikace, ať už v monitorování neurotransmiterů, hormonů, léčiv atd. Nicméně je stále zapotřebí se cíleně věnovat výzkumu v této oblasti, protože stabilita těchto biosenzorů není natolik uspokojivá, aby byly zařazeny do rutinní praxe.

Tato bakalářská práce je rozdělena do dvou větších celků, a to na teoretickou a praktickou část. První část je zaměřena především na popis struktury enzymu tyrozináza (EC 14.18.1) izolovaný z houby *Agaricus bisporus*, tak aby imobilizace mohla být, co nejefektivnější. Dále jsou zde přehledně zmíněny nejčastější způsoby imobilizace, které se používaly v souvislosti s tímto enzymem. V poslední řadě jsou v teoretické části zahrnuty fyzikálně-chemické podmínky, které taktéž významně ovlivňují katalytickou aktivitu tyrozinázy, a tím i výsledné analytické parametry amperometrických biosenzorů.

V rámci praktické části byla připravena trojice biosenzorů lišící se způsobem imobilizace. Z této trojice byl vybrán biosenzor na bázi polymeru, z důvodu reprodukovatelné konstrukce, tak aby mohl být dále studován vliv skladovacích podmínek na jejich životnost. Dopamin jakožto důležitý neurotransmitter v lidském organismu spojovaný s Parkinsonovou a Alzheimerovou nemocí byl pro svůj klinický význam zvolen jako modelový analyt. Ze získaných dat se lze domnívat, že jak samotný způsob imobilizace, tak i skladovací podmínky mají významný vliv na životnost tyrozinázových biosenzorů, z čehož vyplývá, že by bylo dobré ve studiu dále pokračovat v rámci diplomové práce.

TEORETICKÁ ČÁST

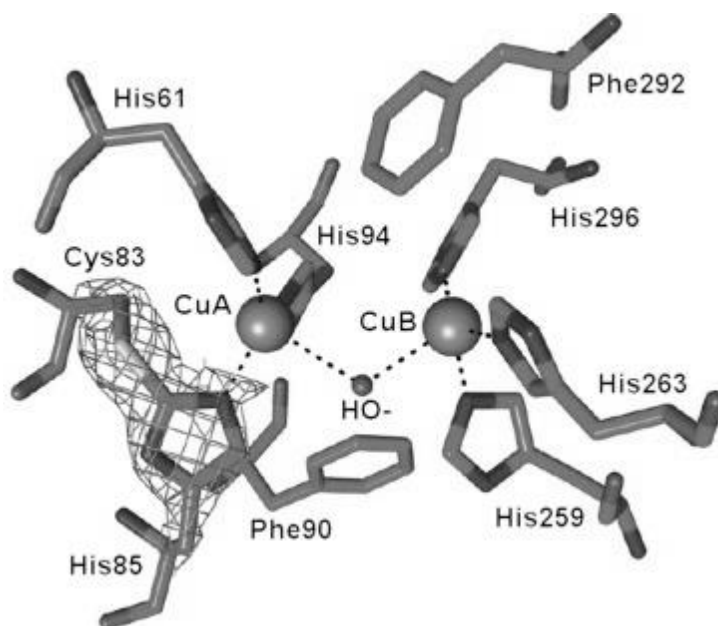
1. Základní charakteristika enzymu tyrozinázy

1.1. Molekulová struktura aktivního centra

Tyrozináza (EC 14.18.1) je enzym nacházející se v mnoha organismech, kde se zúčastňuje důležitých biochemických procesů, jako je tvorba melaninu a tím spojené hnědnutí pokožky a vlasů. Dále se podílí na hnědnutí ovoce a hub. Tento enzym patří i mezi základní metabolické vybavení mnoha mikroorganismů, včetně bakterií. Dále je nutné zmínit, že se u vyšších obratlovců (člověka) podílí na hojení ran či imunitní odpovědi [1].

Aktivní centrum tyrozinázy zodpovědné za její katalytickou aktivitu je složeno dvěma atomy mědi (CuA a CuB), přičemž každý atom dvoumocné mědi je vázán k šesti histidinovým zbytkům [2]. Takto složený kofaktor je obalen 4 podjednotky (proteiny), který obsahuje významné aminokyselinové zbytky jako asparagin, glutamin, valin a methionin [3] (viz. Obr.1.). Zmíněné atomy mědi jsou spojeny vazbou s kyslíkem, která hraje důležitou roli ve funkci tyrozinázy [4,5]. Celková struktura tyrozinázy může být rozdělena do tří domén: centrální doména, N-terminální doména a C-terminální doména. Centrální doména je složena z již zmíněných šesti histidinových zbytků a obsahuje oxidační ionty mědi CuA a CuB [6].

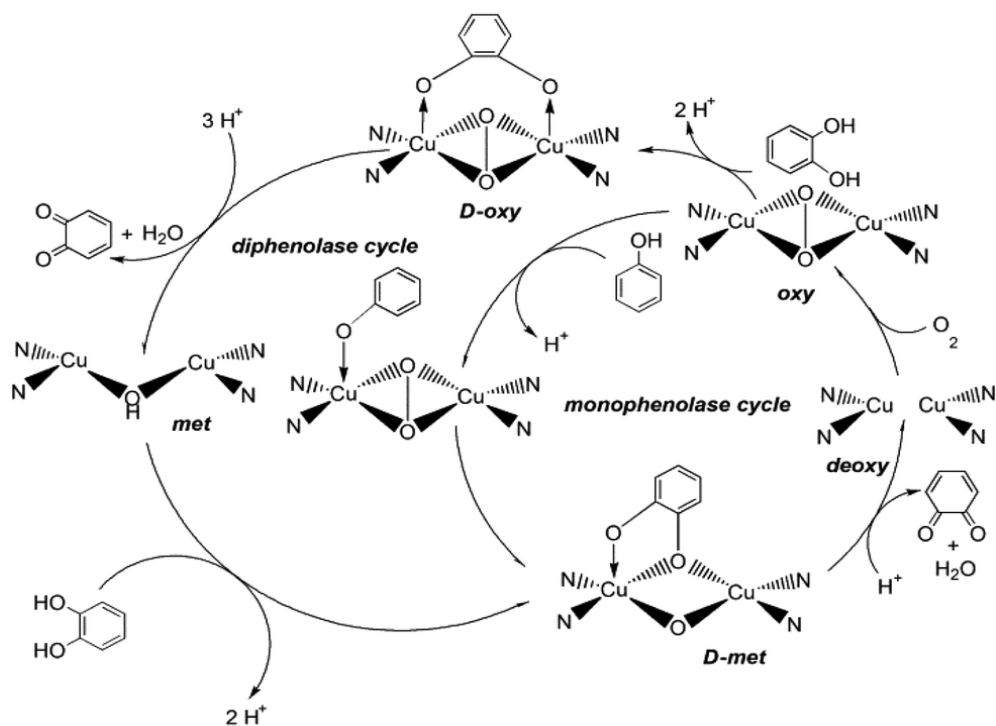
Enzym tyrozináza je složen ze dvou podjednotek H a dvou podjednotek L o různých molekulových hmotnostech, podjednotky H o molekulové hmotnosti 43 kDa a podjednotky L o 14 kDa. Dohromady enzym vyskytující se jako tetramerní protein složený z α -helixů, β -listů a smyček (H2L2) odpovídá molekulové hmotnosti 120 kDa [3,7]. Na stabilitě enzymu se podílejí hydrofobní interakce, vodíkové můstky a iontové vazby [3].



Obr. 1. Molekulová struktura tyrozinázy [8]

Termín tyrozináza je spjat se specifickým substrátem tyrosinem. Enzym katalyzuje oxidace monofenolů a *o*-difenolů na reaktivní *o*-chinony, za použití molekulového kyslíku [1,5,9]. Fyziologická úloha tyrozinázy představuje přeměnu tyrosinu na dopachinon, poněvadž je to klíčový enzym v prvním kroku biosyntézy melaninu [1]. Melanogeneze začíná hydroxylací tyrosinu na *o*-difenol (L-DOPA) a následnou oxidací na dopachinon. Obě tyto oxidační reakce jsou katalyzovány právě enzymem tyrozinázou [10,11].

Tvorby pigmentů při melanogenezi se účastní tři typy tyrozináz (oxy-, met- a deoxytyrozináza). Tyto enzymy obsahují různé typy struktur dvouatomárního aktivního místa. Okysličená forma tyrozinázy (oxy) je tvořena ze dvou atomů mědi (Cu^{II}) a vázána histidinovými zbytky, přičemž kyslík je vázán jako peroxid vodíku. Met-tyrozináza se podobá oxy formě, ale namísto peroxidu obsahuje hydroxidové ligandy. Deoxytyrozináza obsahuje atomy mědi v oxidačním stavu jedna (Cu^{I}) a koordinačně se podobá formě met, ale již bez hydroxidových můstků. Výše uvedené skutečnosti ovlivňují různou tyrozinázovou aktivitu. Pokud monofenol reaguje pouze ve formě kyslíku, může se dále oxidovat na *o*-chinon, což dále vede k vázání deoxyformy a deoxygenu. Regenerace oxytyrozinázy probíhá vazbou molekulárního kyslíku na deoxytyrozinázu. V případě, kdy máme k dispozici pouze *o*-difenol, formy oxy a met s ním reagují a oxidují ho na *o*-chinon [2] (viz. Obr. 2.).



Obr. 2. Mechanismus oxidace fenolu katalyzovanou přítomností tyrozinázy [11].

1.2. Optimální podmínky pro katalytickou aktivitu

Obecně má tyrozináza schopnost katalyzovat oxidaci fenolových substrátů, které mají hydroxylovou skupinu v *ortho* poloze [13]. Pro kinetiku těchto reakcí je tedy důležitá dostupnost hydroxylových skupin pro tyrozinázu. Enzymatickou reakci lze popsat pomocí Michaelisovy konstanty (K_M) jako koncentraci substrátu v polovině maximální míry dosažené systémem (V_{max}) [14]. Hodnoty K_M pro monofenolázovou aktivitu houbové tyrozinázy se pohybují obvykle v rozmezí od 0,1 do 2,0 mmol·l⁻¹. Aktivita difenolasy dosahuje hodnot nižších [15]. Katalytickou aktivitu ovlivňují různé faktory, jako například teplota a pH, které jsou dále diskutovány.

1.2.1. Teplota

Obvykle je houbová tyrozináza aktivní v poměrně širokém rozmezí teplot, a to od 30°C až do 65°C [16-18]. Například v roce 2008, L. B. Martina a kol. studovali vliv teploty na katalytickou aktivitu tyrozinázy a pro dosažení potřebných výsledků použili teplotu 30°C [19]. Nicméně zjištěné optimum pro katalytickou aktivitu je teplota 35°C. [16,18.]

1.2.2. Vliv pH prostředí

V literatuře se můžete dozvědět, že většina experimentů se uskutečňovala povětšinou v prostředí fosfátového pufru o koncentraci 0,1 až 0,01 mol·l⁻¹ o pH 6-8 [19,20]. Je možné použít více druhů pufrů, fosfát citrátu, fosforečnanový pufr, tris-HCl, glycin-NaOH [21] a borátový pufr [22]. Pro houbovou tyrozinázu je ideální pH 7 za použití fosfátového pufru, jenž byl použit i v mé praktické části [21].

1.2.3. Iontová síla

Aktivita enzymu se může částečně lišit podle druhu iontové kapaliny. Dle stanovených kinetických parametrů lze říci, že iontové kapaliny mohou mít na enzym vliv v podobě přímé interakce, čímž brání ve vazbě enzym-substrát z důvodu jejich vysoké hydrofilnosti a polarit. Iontové kapaliny mohou mít také vliv na pufrovací účinek a při vyšší teplotě schopnost navýšit katalytickou účinnost [23].

Nicméně si tyrozináza ponechává svoji katalytickou aktivitu i v organických rozpouštědlech, jako je například hexan či chloroform [24]. Aktivita enzymu se může lišit dle typu použitého iontového rozpouštědla a hlavní faktory, které tuto skutečnost ovlivňují, jsou hydrofobnost, polarita a viskozita [25]. Například hydrofilnější rozpouštědlo lépe přímo

interaguje s enzymem, protože lépe pronikne do vodného roztoku, tím obklopí molekuly enzymu a může způsobit snížení jeho aktivity [24]. Nevodná rozpouštědla ovlivňují aktivitu enzymu tím, že brání vázání substrátu na aktivní místo enzymu, což má za následek vyšší K_M a aktivační energii a tento výsledek je mnohem závažnější, než když použijeme jako reakční činidlo iontovou kapalinu [23].

1.2.4 Inhibitory

Obecně inhibitor enzymu je molekula či iont prvku, který se naváže na enzym a tím snižuje jeho aktivitu [2]. Typické příklady inhibitorů tyrozinázy jsou ionty těžkých kovů, kosmetické přípravky, potravinářské přídatné látky [2,26,27], pesticidy [28], protizánětlivé látky [29] a mnoho dalších farmaceutických výrobků. Inhibitory lze rozdělit do tří typů dle mechanismu inhibice: včetně kompetitivní, nekompetitivní a smíšeného typu [30]. Dále se dají rozdělit na základě původu, jmenovitě na přírodní a syntetické. Reverzibilní inhibice je způsobena nekovalentními interakcemi, jako jsou vodíkové vazby, hydrofobní interakce a iontové vazby a nevratná inhibice souvisí s chemickými reakcemi, kdy vznikají kovalentní vazby.

Z vědecké literatury, která je věnována inhibici tyrozinázy, nelze přímo určit, zda se opravdu jedná o skutečný inhibitor dle výše uvedené definice. Pojem inhibice se často totiž využívá ve vztahu k inhibici melanogeneze (tvorba melaninu) a jindy zas v přítomnosti substrátů tyrosinu a L-DOPA, přičemž je kladen důraz na reakci tvorby dopachinonu.

Co se experimentálního hlediska týče, můžeme za inhibitor považovat redukční činidla způsobující redukci vzniklých oxidačních produktů. Za tyto inhibitory lze považovat látky s redukčními vlastnostmi, jako je například kyselina askorbová a sloučeniny obsahující thiolovou skupinu.

Někdy jsou mylně za inhibitory označovány fenoly, které vykazují afinitu k enzymu a tím zabraňují tvorbě chinonů. Za inhibitory mohou být také považovány různé kyseliny a báze, které enzym denaturují. Za specifické inhibitory tyrozinázy jsou považovány látky, které mohou být katalyzovány tyrozinázou, ale zůstávají kovalentně vázány na enzym a tím ho nenávratně inaktivují. Mezi tyto látky patří difenoly obsahující hydroxy skupinu v *meta* poloze. Typickým příkladem je například resorcinol [2].

Kyselina kojová je jedna z nejvíce studovaných inhibitorů a je používána i jako srovnávací standard. Tato sloučenina se hojně využívá v potravinářství pro zpomalení enzymatického hnědnutí [30]. Kyselina kojová inhibuje enzym tak, že chelatuje měď v

aktivním místě enzymu [31]. Doposud největší skupinou inhibitorů tyrozinázy jsou polyfenolické sloučeniny, z nichž flavonoidy jsou nejvíce studované [32].

1.2.5 Aktivátory

Aktivátory lze definovat jako látky, které svojí přítomností zvyšují či udržují aktivitu daného enzymu. Tyto látky by mohly být použity právě při skladování mnou vyrobených biosenzorů, aby se prodloužila jejich životnost. Dále lze zmínit, že aktivátory tyrozinázy schopné stimulačního účinku na melanogenezi jsou doposud zkoumány pro úspěšnou léčbu hypopigmentačních onemocnění [33]. Tyrozináza bývá přítomna v latentní fázi, která je třeba nejprve aktivovat [34]. Tato aktivace probíhá pomalu a závisí na její povaze. Tato reakce by se dala popsat jako konformační změna proteinu, kdy se struktura změní, aby dosáhla své aktivní povahy. Je zajímavé, že u auronů je mimo inhibiční účinek pozorována i povaha aktivátoru, za který je pravděpodobně odpovědný alosterický efekt, záleží však na typu sloučeniny. Některé pentapeptidy byly také publikovány jako aktivátory pro houbovou tyrozinázu [35,36]. Již v poměrně nízkých koncentracích se projevuje aktivační účinek například i u ethyl- nebo propyl-xantátu [37]. Za zmínku stojí též využití metabolitu tryptofanu s *o*-aminofenolovou strukturou (3-hydroxykynurenin), jak v roli substrátu, tak i jako možnosti využití aktivátoru pro houbovou tyrozinázu [38].

1.2.6. Přítomnost kationtů kovů

Přítomnost kovů v roztoku enzymu může buď snížit či zvýšit jeho katalytické účinky, proto diskuzi o vlivu iontů kovů bylo nutné zařadit jako samostatnou kapitulu. Některé kovové ionty vyskytující se v biologických systémech, Fe^{2+} , Cu^{2+} a Mn^{2+} mají výrazný vliv na aktivitu tyrozinázy. U iontů Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} a Co^{2+} nebyl pozorován žádný vliv na kinetiku enzymu, zatímco Cu^{2+} a Mn^{2+} vykazují inhibiční účinek [39]. Univalentní kationty Li^+ , Na^+ a NH_4^+ nemají žádný výrazný vliv na tyrozinázovou aktivitu. Draselné ionty mohou mít mírný inhibiční účinek stejně jako ionty chloridové. Obecně jsou to slabé inhibitory, protože je jich zapotřebí ve velké koncentraci. Fluoridy, chloridy inhibují tyrosin-tyrosinásové a dopa-tyrosinázové reakce. Ionty rtuti, stříbra a zlata mohou mít schopnosti inaktivace enzymu, protože jsou schopny soutěžit o vazebné místo aktivního centra enzymu [40].

Ionty Fe^{2+} mají jedinečnou schopnost stimulovat aktivitu tyrozinázy. Konverze tyrosinu na L-DOPA je krok, který omezuje rychlost biosyntézy melaninu katalyzovanou tyrozinázou. Tato reakce se vyznačuje dobou prodlevy a její rozsah závisí hlavně na přítomnosti donoru vodíku, jako je přímo L-DOPA. Bylo zjištěno, že katalytické množství iontů Fe^{2+} má při

stimulaci aktivity enzymu tyrosinhydroxylázy stejný účinek jako L-DOPA, přičemž kinetika reakce závisí na koncentraci kovu a povaze pufovacího systému. Na aktivitu tyrozinázy vykazovaly malý účinek ionty Fe^{3+} , zatímco na kinetiku oxidace tyrosinu měly inhibiční účinek ionty Cu^{2+} a Mn^{2+} [39].

1.3. Potencionální substráty

Protože tyrozináza má různě koordinovanou molekulovou strukturu, lze za substráty označit alifatické sloučeniny, kde může enzym způsobit hydroxylační účinek [41]. Jelikož má tyrozináza také oxidázovou aktivitu, kde dochází ke katalýze oxidace *o*-difenolů na *o*-chinony, je tyrozináza řazena mezi vnitřní monooxygenázy. Neboť difenolový produkt může být pro enzym zdrojem dvou elektronů, které jsou třeba ve fenolové oxidaci, lze o něm hovořit jako o substrátu pro daný enzym [42].

Bezpočet klinicky významných fenolických látek, které mají volný uhlík v *ortho* poloze nebo mají katecholovou strukturu lze považovat za substráty, a tudíž za potencionální analyty tyrozinázových biosenzorů. Pomocí elektrochemických senzorů založených na tyrozináze lze stanovit hormony (př. estrogeny) [43], neurotransmitery (př. dopamin) [44], mikrobiální patogeny [45–47] a proteiny [48,49]. Také je lze aplikovat v různém odvětví medicíny, jako při diagnóze melanomu [50–52], Alzheimerovy choroby [53–55], stanovení aktivity enzymů [56,57] a léčiv [57–60]. Mezi tyto látky patří již zmíněný L-DOPA (aminokyselina využívaná jako léčivo Parkinsonovi nemoci), [61,62], epinefrin (neurotransmitter) [63], penicilin (antibiotikum) [58], serotonin (neurotransmitter). Také neurotransmitter dopamin lze stanovit, který je zkoumán v souvislosti s Parkinsonovou chorobou [64]. Právě dopamin byl v mé práci použit jako substrát i z důvodu jeho velikého klinického významu.

2. Konstrukce amperometrických tyrozinázových senzorů

Biosenzor lze definovat jako analytické zařízení, které kombinuje biologický materiál s fyzikálně-chemickým převodníkem, a je určený ke stanovení analytu. V našem případě je důležité zmínit schopnost biosenzoru využít katalytickou aktivitu tyrozinázy [65]. Elektrochemické biosenzory převádějí informaci rozpoznanou z biologického materiálu na elektrický signál s určitou citlivostí. Měřenou veličinou může v tomto případě být potenciál (potenciometrické), elektrický proud (amperometrické) či vodivost (konduktometrické biosenzory). Ve všech zmíněných případech, pokud se nejedná o nepřímé stanovení (analýza inhibitorů), je měřená veličina přímoúměrná koncentraci stanoveného analytu [66,67].

Převodníky (elektrody) mohou být tvořeny z ušlechtilých kovů, jejich slitin, grafitu nebo různých nanomateriálů [68], přičemž lze použít dvou nebo tříelektrodové zapojení [69].

Protože většina tyrozinázových biosenzorů využívá amperometrický typ převodníku, další způsoby elektrochemické detekce nejsou diskutovány. Amperometrické zařízení měří změny koncentrace analytu v difúzní vrstvě při procházejícím proudu pracovní elektrodou způsobené oxidací nebo redukcí produktů biochemické reakce a zároveň při konstantní hodnotě pracovního potenciálu. Vyžadované vlastnosti amperometrických biosenzorů jsou přesnost, rychlá doba odezvy a nízké detekční limity, přičemž je důležité brát na zřetel, že selektivita může být ovlivněna redox potenciálem interferujících elektroaktivních látek ve vzorcích. I přes tuto skutečnost jsou amperometrické biosenzory velmi často využívány v klinické diagnostice [70].

2.1. Nekovalentní imobilizace

Imobilizace je velice důležitý krok ve vývoji biosenzorů, protože pomáhá dosáhnout požadovaného kontaktu mezi biomateriálem a převodníkem a také stabilizovat biomateriál pro opětovné použití [71]. Při vývoji katalytických biosenzorů by měly být obecně zajištěny následující pracovní podmínky: úzký kontakt vybraného enzymu s transduktorem, selektivní permeabilita bio-membrány, mechanická stabilita (zabránění nežádoucí eluci enzymů) a dostatečná vodivost biovrstvy. Hlavním cílem tedy je hledání různých způsobů pro pevné zabudování bioreceptorů na povrchu elektrod. Odpovídající techniky pak mohou být rozděleny do dvou hlavních skupin: nekovalentní imobilizace enzymů a imobilizace kovalentní vazbou. Volba typu imobilizace může do jisté míry snížit katalytické účinky enzymu, protože způsob imobilizace ovlivňuje orientaci enzymu na povrchu elektrody, či zablokování aktivního místa. Patří sem několik parametrů, jako je celková katalytická aktivita, účinnost kinetiky využití katalyzátoru, deaktivace a regenerace [72]. První generace katalytických biosenzorů byly vyvinuty právě nekovalentní imobilizací enzymu na povrchu elektrody [73]. Různé typy nekovalentní imobilizace jsou diskutovány v následujících odstavcích.

2.1.1. Přímé zakomponování do elektrodového materiálu

Bezpočet přístupů pro zabudování tyrozinázy k těsnému kontaktu s elektrodou bylo vyvinuto. Tyto přístupy lze rozdělit do dvou velkých skupin, a to fyzikální nebo chemické zakotvení. První generace tyrozinázových biosenzorů byla konstruována přímým začleněním surové tkáně nebo extraktu do elektrodového materiálu. Většinou se jednalo o pletiva rostlin či plodů obsahujících enzym, která byla součástí uhlíkové pastové elektrody [74]. Využívaly se

tkáně z ovoce (*Persea americana* [75] a *Pyrus communis* [76]), zeleniny (*Ipomoea batatas* [77] a *Cucurbita pepo* var. *giromontiina* [78]) a houby (*Agaricus bisporus*) [79]. Tyto materiály byly využívány jako zdroje polyfenol oxidáz (tyrozinázy), dokud se nedocílilo možnosti izolace s jejich vysokou čistotou a aktivitou [80]. Toto nekovalentní začlenění může být umožněno smícháním tkáně nebo čistého enzymu s vodivým uhlíkovým práškem a lipofilním pojivem [81].

Jako příklad biosenzoru lze uvést tkáňově modifikovanou uhlíkovou pastovou elektrodu (CPE) [82]. Velikou výhodou zde je, že tento senzor může být obohacen o další prvky, hlavně redox mediátory, které mohou sloužit jako mediátory, a tak zvýšit selektivitu finálního biosenzoru [83]. V mé práci byl obdobně připraven amperometrický biosenzor a zkoumán vliv imobilizace na jeho životnost.

2.1.2. Přímá adsorpce na povrch elektrodového materiálu

Další způsob přípravy biosenzoru lze cestou přímé adsorpce na povrch elektrody, kde se nanáší na povrch elektrody potřebné roztoky a enzym se nechá imobilizovat [84]. Přímou adsorpci lze označit jako nejjednodušší způsob imobilizace enzymu na povrch elektrody [85]. Při této technice jsou využity fyzikální interakce mezi povrchem elektrody a enzymem. Konkrétně se jedná o slabé Van der Waalovy síly anebo vodíkové můstky [86]. Dále se mohou účastnit také hydrofobní interakce [73,87]. Je však důležité myslet na možnost nežádoucí eluce biologického materiálu z povrchu elektrody, kterou může mít za následek změna pH, iontové síly nebo teploty [88]. Jako elektrodové materiály se nejčastěji využívají různé typy uhlíku, které vykazují vysoké adsorpční vlastnosti [84].

2.1.3. Zakotvení enzymu pomocí polymeru

Příprava membrán pomocí vodivých polymerů je nejvyužívanější technikou imobilizace enzymů [89]. I přes pevné zachycení enzymu ve struktuře polymeru je umožněn pohyb substrátů a produktů reakce [90]. Na povrchu elektrody lze polymerní filmy vytvořit elektrochemickou depozicí [91] nebo přímou aplikací s odpařením použitých rozpouštědel [92,93]. V současné době se využívají elektrodové materiály na bázi polymerů a grafenu [94,95], uhlíkatých nanotrubic (CNTs) [96-98] nebo kovů [99,100]. V poslední době jsou vodivé polymery zkoumány a využívány pro výrobu různých biosenzorů. Obecně je enzym zabudován do polymeru, který pokrývá pracovní elektrodu nebo je součástí kompozitního materiálu, který můžeme chápat jako směsice daného enzymu, polymeru, nanočástic, zesíťovadel atd. [101-103]. Při použití vodivého polymeru dochází ke zvýšení specifického

povrchu biosenzoru, což vyústí ke zvýšení citlivosti [104]. Považuji za důležité zmínit, že pomocí polymeru lze zakotvit mnohonásobně vyšší obsah enzymu, než v ostatních případech, a tím zvýšit kromě citlivosti i životnost. Z tohoto důvodu byl konstruován jednoduchý tyrozinázový biosensor na bázi polymeru a studována jeho životnost.

Při přípravě tyrozinázových biosenzorů lze považovat za nejoblíbenější polymery polypyrrol (PPY) [105], polyanilin (PANI) [97], chitosan [106], Nafion [107,108], poly (3,4-ethylendioxythiofen) (PEDOT) [109], epoxy pryskyřice [110] a polyvinylalkohol (PVA) [111]. Tyto polymery mají tu vlastnost, že mohou fungovat jako snímače a zároveň imobilizační matrice pro zadržení enzymu, jak uvnitř, tak i přes polypyrrolový film. [112,113]. Zmíněný PPY lze tedy využít jako základ pro imobilizaci tyrozinázy s následovným zesíťením pomocí glutaraldehydu (GTA) [105]. Je nutné brát na zřetel, že výsledné kompozity mohou obsahovat malé množství vody, které může způsobit zhoršení mechanických vlastností membrány a vést až k uvolnění zachycených biomolekul [90].

Kromě toho mohou být polymery také použity pro přípravu biomimetických senzorů, které mohou zcela nahradit funkci enzymatických biosenzorů, a tak významně prodloužit jejich životnost [114]. V této oblasti umělých biosenzorů se nelze obejít bez znalostí supramolekulární chemie k napodobení vlastností biologických enzymů [115,116]. Syntetická vazebná místa, která napodobují aktivní místo enzymu tyrozinázy jsou součástí struktury molekulárně potíštěných polymerních membrán [117]. Této problematice se týká vývoj syntetického polymeru (MIP), protože se polymerní katalyzátory ukázaly jako významná oblast zájmu. [118,119]. MIP lze popsat jako polymer schopný reverzibilní vazby funkčních monomerů s templátovou molekulou (analyt) za vzniku výsledného „komplexu“ a začlenění do síťového polymeru kopolymerizací za současného nadbytku zesítujícího monomeru v přítomnosti inertního rozpouštědla a působením volných radikálů [120]. Syntetický otisk tyrozinázy lze získat metodou molekulárního otisku při termicky iniciované radikálové polymerizaci, kdy je výsledkem vytvoření dutin polymerní sítě [117].

2.1.4. Zabudování enzymů do nanopórů vhodných nosičů

Kromě CNTs [121], grafenu [122], a fullerenů [123] jsou často testovány mezoporézní uhlíky (OMC) jako složky nových biosenzorů. Mezi nejčastější OMC používající se pro přípravu matrice biosenzoru patří CMK-3 a CMK-1, což jsou kopie různých typů matric mezoporézního oxidu křemičitého [124,125]. Dobrá elektronická vodivost, vysoce definovaná velikost pórů, vysoký specifický povrch, velký objem pórů, a zvýšená mechanická stabilita, to jsou všechno vlastnosti, díky kterým se tyto materiály využívají v katalytické, adsorpční a

elektrochemické aplikaci při konstrukci chemických a biochemických senzorů [124]. Mezoporézní uhlíkové materiály mají široké využití v amperometrickém, voltameterickém a potenciometrickém stanovení [126]. Enzym může být zabudován do nanopórů nosičů pomocí nanovláken s následným zesítním, kdy je účinnost závislá hlavně na vzájemné interakci materiálu s enzymem a porézní struktuře nanomateriálu. [127-129]. Nanovláknna se v tomto případě vyrábějí za použití roztoku polymeru a tavení při vysokém napětí, kdy vznikne nabitě polymerní vlákno [130]. Tyrozináza může být imobilizována například na jednovrstevné uhlíkové nanotrubicí (SWNT) za použití polymerace PPY, kdy vznikne mnoho póru a trhlin pro dobrý přenos enzymu. Tento typ biosenzoru lze použít pro stanovení dopaminu [131]. Jako příklad lze také uvést zeolitově modifikovanou tyrozinázovou elektrodu, kdy se uhlíková elektroda modifikovaná mediátorem obsahující zeolitové nanočástice potáhne imobilizovanou tyrozinázou [132].

2.2. Kovalentní imobilizace

Metody chemické imobilizace zahrnují zejména připojení enzymu k matici kovalentními vazbami, zesítnění mezi enzymem a maticí a zesítnění enzymu multifunkčními činidly. Postupy kovalentní imobilizace jsou využívány zejména díky jejich jednoduchosti a silné chemické vazbě mezi materiálem a biomolekulou. Důležité je zmínit možnost ztráty aktivity v důsledku nežádoucí změny konformace enzymu během zesítnění [133].

Kovalentní vazbou lze zakotvit enzym přímo na povrch elektrody nebo na strukturu polymeru, který pokrývá elektrodu. Aby mohlo dojít ke kovalentnímu zakotvení, musí enzym na svém povrchu mít volné funkční skupiny, které by se mohly zúčastnit kovalentní reakce. Za tyto skupiny lze považovat $-SH_2$ cysteinu, $-NH_2$ lysinu a argininu, $-COOH$ kyselin glutamové a asparagové atd. [134-136]. Tyrozináza má především $-NH_2$ funkční skupiny [3]. Typy reakcí, které se mohou podílet na tvorbě kovalentní vazby, jako jsou diazotace [137], alkylace [138], tvorbou Schiffovy báze [139], vznik amidové vazby [140] a výměna thioldisulfidu [141] (viz. Obr. 3.).

2.2.1. Karbodiimidová metoda

Karbodiimidy jsou nenasycené sloučeniny s allenovou strukturou. Od jejich první syntézy z thimočoviny začly být široce využívány v organické syntéze a biotechnologiích. Karbodiimidy adičně reagují s vodou, alkoholy, aminy, fenoly a karboxylovými kyselinami, využívají se také při syntéze peptidů [142], modifikaci polysacharidů [143] a proteinů [144] ve vodných systémech. Karbodiimidy jsou velmi účinné v zesíťování proteinů, díky schopnosti je

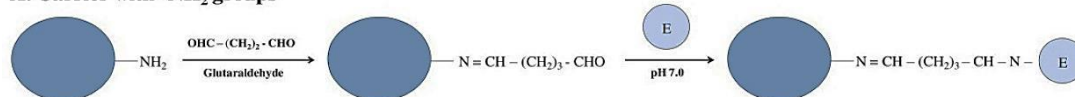
vzájemně propojovat bez zavedení dalších skupin [145]. Při použití karbodiimidu dochází k reakci karboxylové skupiny v nosiči a aminoskupinou enzymu [136]. Je zde důležité dbát na podmínky, zejména pH reakčního systému a koncentraci karbodiimidu [146].

2.2.2. Glutaraldehydová metoda

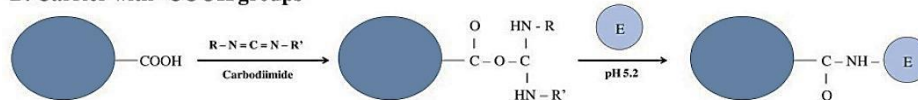
GTA je organická látka kapalné povahy hojně využívána k zesíťování. Imobilizace kovalentní vazbou přes glutaraldehyd k nosičům nerozpustných ve vodě je jednou z nejjednodušších a nejšetrnějších metod [90]. GTA lze použít jako zesíťovací činidlo pro imobilizaci enzymů, protože reakce může probíhat ve vodném pufové roztoku za blízkých fyziologických podmínek pH, teploty a iontové síly. Jeden ze způsobů je vytvoření trojrozměrné sítě v důsledku intermolekulárního zesíťování či navázání na nerozpustný nosič.

GTA může s proteiny reagovat mechanismem aldolové kondenzace nebo adice. Díky různým vlastnostem a charakteristik každého enzymu je třeba dbát na poměr enzym:glutaraldehyd, aby se enzym nevymýval a byla zde zachována katalytická aktivita [147]. V případě tyrozinázy je třeba, aby glutaraldehyd poskytoval dostatek aldehydových skupin na povrchu nosiče, které jsou schopny vazby aminoskupin tyrozinázy [148]. V mé práci byla zvolena právě tato metoda zesíťování z důvodu jejích dobrých vlastností ve vztahu k proteinům a enzymům a také širokého využití. Doba reakce při použití krystalků proteinů a zavedení glutaraldehydu ve formě krystalizačních kapiček se pohybuje od 30 do 60 minut [149].

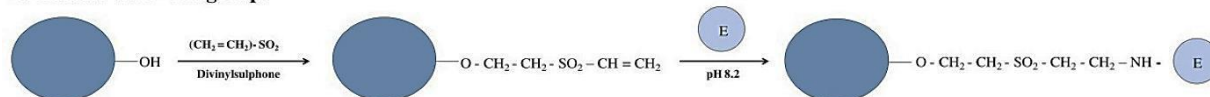
A. Carrier with -NH₂ groups



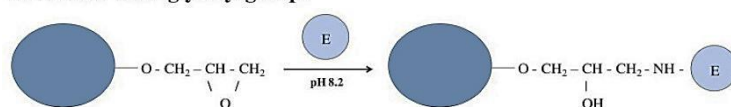
B. Carrier with -COOH groups



C. Carrier with -OH groups



D. Carrier with -glycidyl groups



Obř. 3. Schéma reakcí imobilizace enzymů na nosičích s různými funkčními skupinami aktivovaný (A) glutaraldehydem, (B) karbodiimidem, (C) divinylsulfonem nebo (D) bez aktivátoru, (E) enzym [150].

3. Životnost tyrozinázových senzorů

3.1. Stabilita tyrozinázových senzorů

Stabilita tyrozinázových biosenzorů je stále velice diskutované téma. Díky dobré selektivitě a širokému spektru detekce různých klinicky významných látek by mohly tyto biosenzory najít široké uplatnění v klinické diagnostice onemocnění, zejména melanomu kůže a Parkinsonovy choroby [151]. Bohužel ale není stabilita těchto biosenzorů prozatím natolik uspokojivá, aby byly zavedeny do rutinní praxe. Při pravidelném používání nebývá stabilita většinou delší jak jeden měsíc. Zde uvedu několik konkrétních příkladů z publikovaných prací pro lepší představu o stabilitě tyrozinázových biosenzorů. V roce 2005, Z. Liu a kol. imobilizovali tyrozinázu na magnetických nanočásticích za použití uhlíkové pastové elektrody. Ve výsledcích uvádějí stabilitu 92% po 10 dnech a její pokles na 85% po 20 dnech. Po 1 měsíci klesla původní odezva na 70%, přičemž měření bylo prováděno každé 3 až 4 dny [152]. V roce 2000, B. Wang a kol. imobilizovali enzym pomocí silica sol-gelu a po 110 dnech si biosenzor uchoval stabilitu na 96% a 73% po 3 týdnech při přerušovaném používání [153]. V publikaci z roku 2003 od S. Liu a kol. si Tyr-Au-CPE si po 20 dnech při pouhém skladování při 4 °C uchovává 20% své aktuální odezvy a Tyr-CPE za stejných podmínek 72% [154]. Jako poslední příklad uvedu elektrochemicky předem upravený a modifikovaný aktivovaný uhlík/tyrosináza/Nafion® GCE biosenzor, který si zachoval 80.9% své počáteční aktivity po 15 dnech, v publikaci od S. F. Rahman [42].

3.2. Vliv skladování na životnost tyrozinázových biosenzorů

Ve většině případů se tyrozinázové biosenzory skladovali za sucha v lednici při 4°C nebo ve fosfátovém pufru o pH 7,0 [152-156]. Lze předpokládat, že vyvojáři těchto senzorů jen opakovali podmínky z předchozích prací, aniž by samotní prováděli nějakou optimalizaci skladování. Z tohoto důvodu studium vlivu skladování na životnost biosenzoru bylo taktéž součástí mé praktické práce.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. Analýza s amperometrickým biosenzorem

4.1. Chemikálie

Chemikálie jako 98% dopamin hydrochlorid, 25% glutaraldehyd (GTA), 5% Nafion[®] v 55% ethanolu, $\geq 97\%$ lyofilizovaný prášek tyrozinázy z houby *Agaricus biosporus* (EC 1.14.18.1), a 98% 2-aminoethanethiol hydrochlorid (AET) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Deionizovaná voda s vodivostí nižší než $11 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ byla připravena za použití purifikačního systému Milli-Q od firmy Merck Millipore (Darmstadt, Německo). Dále fosfátové soli potřebné pro přípravu $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku fosfátového pufrového (PB) byly získány od firmy Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Česká republika).

4.2. Přístrojové vybavení

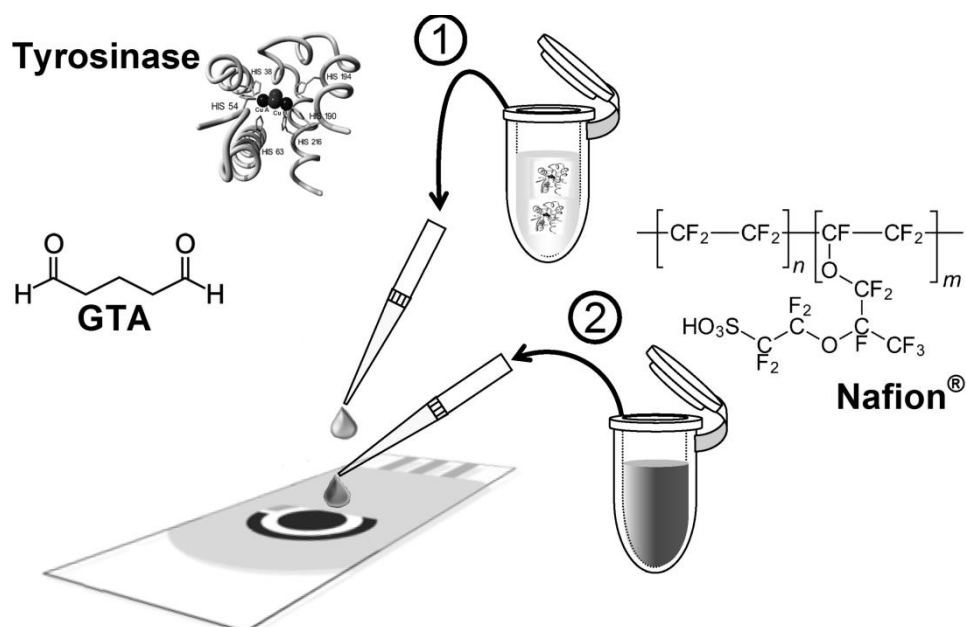
Veškerá amperometrická měření byla prováděna v typické tříelektrodové uspořádání skládající se z jednoho typu tyrozinázového biosenzoru (pracovní), Ag/AgCl/3,0 mol/l KCl (referenční) a platinový drát (pomocné) elektrody. Pístový elektrodový držák o průměru 3 mm vyrobený z teflonu pocházel z elektroanalytického pracoviště Univerzity Pardubice. Komerční tištěná elektroda (typ C-110) o průměru pracovní plochy 4 mm a zlatá disková elektroda (AuE) o průměru 2 mm byly zakoupeny od společnosti Metrohm (Praha, Česká republika). Tyto elektrody byly připojeny k potenciostatu/galvanostatu AUTOLAB PGSTAT101 společnosti Metrohm (Praha, Česká republika), který byl provozován prostřednictvím softwaru MetroAm NOVA 1.11.

4.3. Příprava tyrozinázového biosenzoru

V rámci praktické části byly testovány tři různé způsoby imobilizace. Běžná uhlíková pastová elektroda modifikovaná 5% (w/w) enzymem tyrozinázy (CPE/Tyr) zde zastává typ nekovalentní imobilizace, kdy byla použita metoda přímého začlenění do elektrodového materiálu. V tomto případě bylo použito 0,4 g grafitového prášku (velikost částic $> 2 \mu\text{m}$) od firmy Graphite Týn, spol. s. r. o. (Týn nad Vltavou, Česká republika), 0,1 g parafinového oleje od firmy Merck (Darmstadt, Německo) a 25 mg tyrozinázy. Homogenizace se prováděla v keramickém hmoždíři po dobu 20 minut. Výsledná pasta byla vtačena do dutiny (průměr 3 mm) elektrodového držáku vyrobeného z teflonu. Povrch elektrody byl po každé analýze obnoven vytlačněním malého množství a následujícím vyleštěním pomocí suchého papíru.

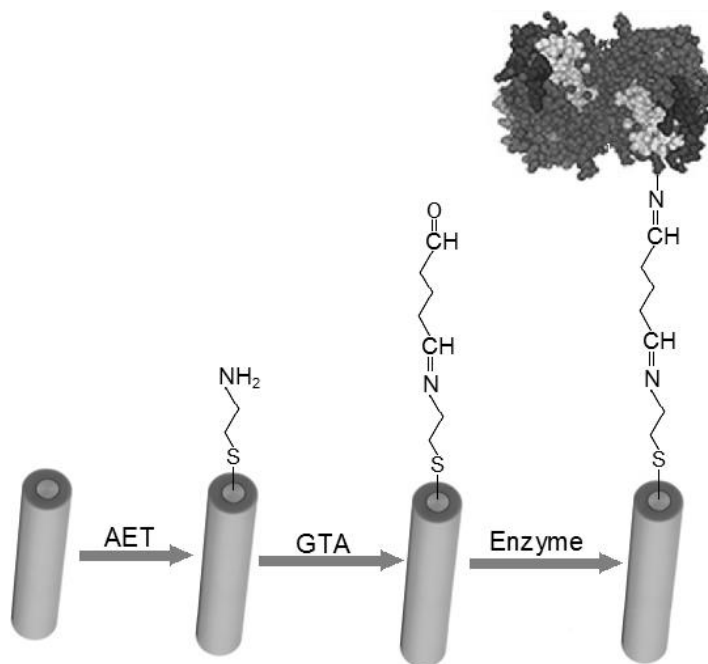
Jako druhý typ imobilizace byl vybrán vodivý polymer Nafion[®], do něhož struktury byl začleněn enzym. Na povrch komerční uhlíkové tištěné elektrody (SPCE) se nanoslo 5 μl roztoku

tyrozinázy ($2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ v PB) a po jeho úplném zaschnutí při laboratorních podmínkách. Pak byly jednotlivé molekuly enzymu zesítěny přidáním $3 \mu\text{l}$ 1% GTA a po 20 minutách byly vzniklé agregáty převrstveny $15 \mu\text{l}$ 1% Nafionu[®] (neutralizovaný 8% roztokem amoniaku na pH 7.0) a ponechán vyschnout při laboratorních podmínkách (viz Obr. 4).



Obr. 4. Jednotlivé kroky potřebné k přípravě SPCE/Tyr-GTA/Nafion[®] senzoru.

Jako poslední typ imobilizace byla použita kovalentní vazba za použití zesít'ovadla GTA. AuE byla ponořena na několik hodin do $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku AET při teplotě 5°C . Vzniklá modifikovaná AuE byla promyta deionizovanou vodou a sušena při laboratorních podmínkách. Poté byl biosenzor připraven postupným pipetováním $3 \mu\text{l}$ GTA, $10 \mu\text{l}$ tyrozinázy a zesítěním $3 \mu\text{l}$ glutaraldehydu (viz. Obr. 5). Po každém přidavku se daná sloučenina na elektrodě nechala zaschnout při laboratorní teplotě. Čerstvě připravené tyrozinázové biosenzory byly skladovány v suchu při chladničkové teplotě 5°C .



Obr. 5. Jednotlivé kroky potřebné k přípravě AuE-AET-GTA-Tyr senzoru.

Jako podpurný elektrolyt se pro každé elektrochemické měření v důsledku optimální biokatalytické aktivity tyrozinázy použil $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PB o pH 7,0. Pro charakterizaci vyvinutého biosenzoru byla provedena cyklická voltametrie $500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dopaminu za následujících podmínek: potenciálový rozsah od $-0,4 \text{ V}$ do $+0,8 \text{ V}$, potenciálový krok $2,5 \text{ mV}$ a rychlost skenování $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Amperometrická měření v dávkovacím uspořádání se uskutečňovala v běžné skleněné nádobce od International Chemistry Co., LTD. (Matsudo-shi, Japonsko). Potenciál amperometrické detekce nebyl optimalizován a veškerá měření se prováděla při $-0,2 \text{ V}$ vs $\text{Ag}/\text{AgCl}/3,0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a rychlosti míchání 400 min^{-1} . Jinak je jakákoliv změna pracovních podmínek popsána v legendách u odpovídajících obrázků.

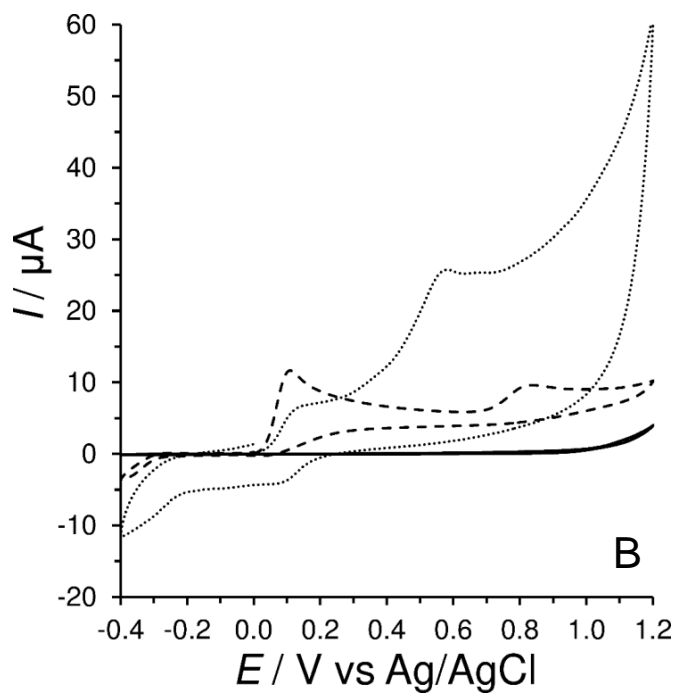
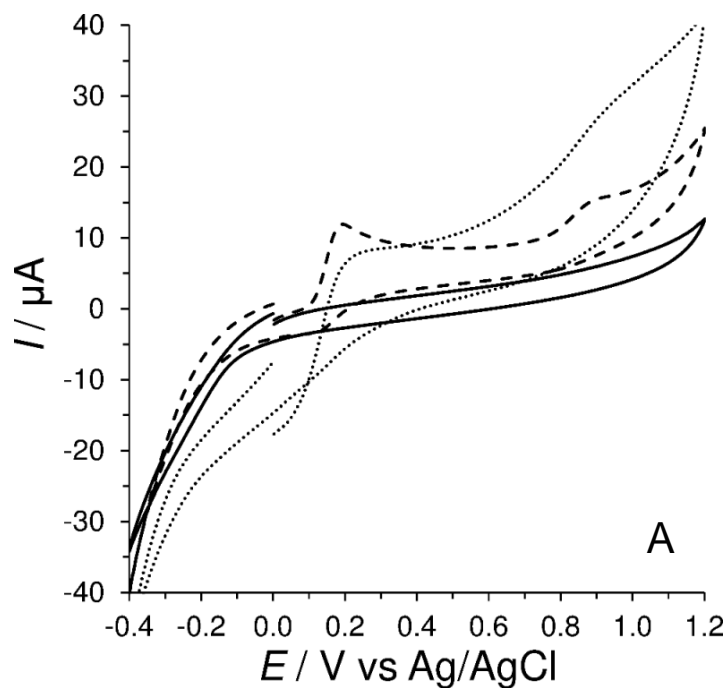
Vliv skladovacích podmínek na životnost mnou vybraného biosenzoru (SPCE/Tyr-GTA/Nafion[®]) se sledovala po týdnu skladování v lednici při 5°C za sucha, v lednici při 5°C v roztoku (10 ml PB a $100 \text{ }\mu\text{l}$ dopaminu), v mrazáku při -18°C a volně za sucha při laboratorní teplotě.

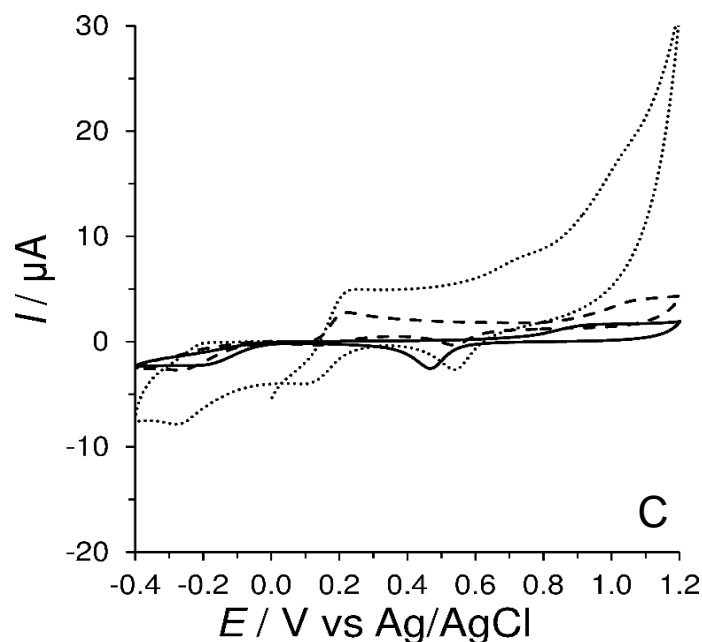
4.4. Výsledky a diskuze

4.4.1. Charakterizace připravených biosenzorů

Každý tyrozinázový biosenzor byl nejprve charakterizován cyklickou voltametrií pro potenciálový rozsah od $-0,4$ do $+1,2 \text{ V}$ při rychlosti skenu $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Pro sledování katalytické aktivity použitého enzymu bylo zapotřebí provádět tato měření při takto nízké rychlosti

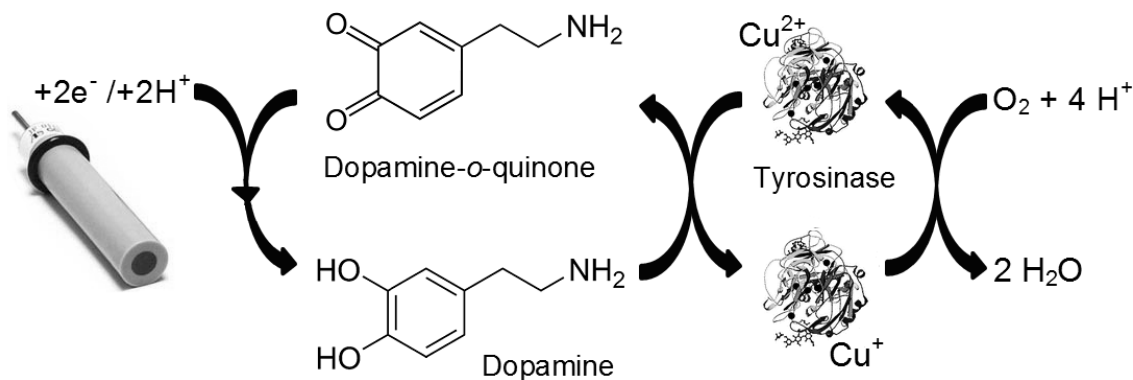
skenování. Cyklická voltametrie byla prováděna v prostředí $0.1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru z důvodu optimální bioaktivity enzymu [19,20]. Samotná voltametrická měření se prováděla následovně: cyklická voltametrie fosfátového pufru na zvoleném transduktoru (i), cyklická voltametrie $500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dopaminu taktéž na samotném trasduktoru (ii) a cyklická voltametrie $500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dopaminu na laboratorně připraveném biosenzoru obsahující výše studovaný transduktor (iii). Obdržené cyklické voltamogramy jsou uvedeny na Obr. 6.





Obr. 6. Cyklické voltamogramy $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PB o pH 7,0 (plná čára), $500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dopaminu (čárkovaná čára) a $500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dopaminu s tyrozinázou (tečkovaná čára) obdržené na CPE/Tyr (A), SPCE/Tyr-GTA/Nafion[®] (B) a AuE-AET-GTA-Tyr senzoru (C); pro potenciálový rozsah od -0,4 do +1,2 V při rychlosti skenování $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ a potenciálového kroku 2,5 V.

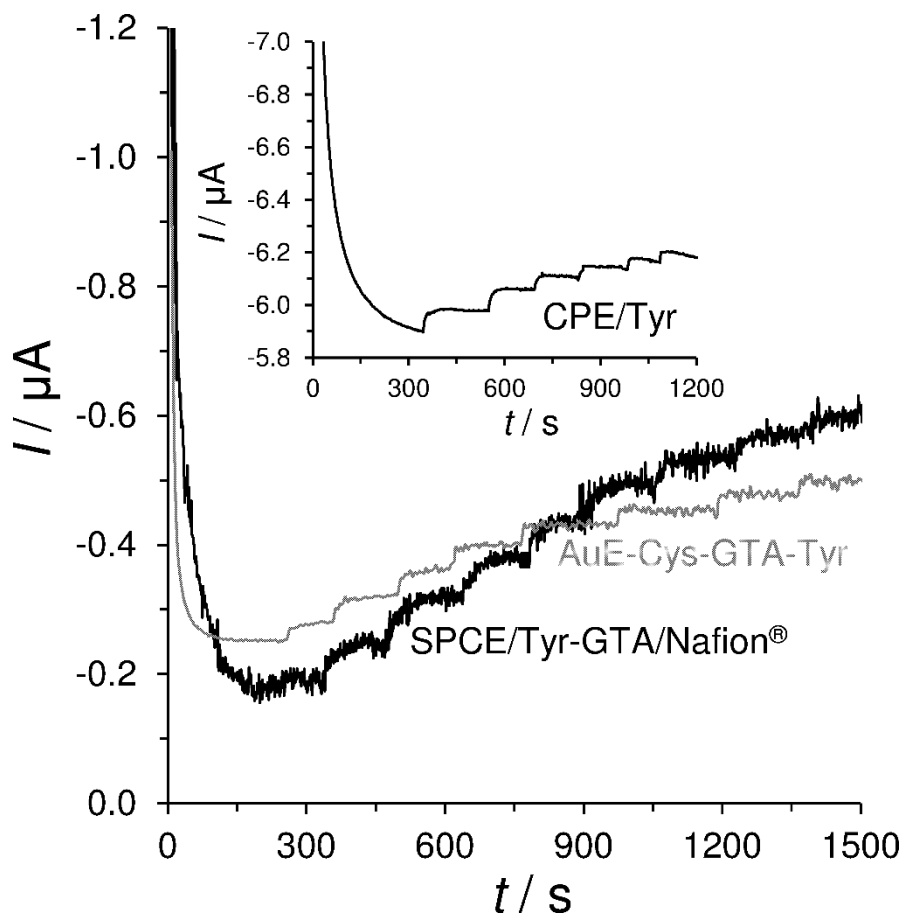
Z průběhu cyklických voltamogramů se lze domnívat, že za účasti enzymu pozorujeme pokles oxidačního píku dopaminu při +0,2 V, jelikož je oxidován rozpuštěným kyslíkem. Tato chemická reakce je právě katalyzována přítomným enzymem. Naopak se objevuje výrazný redukční pík při +0,1 V, který na čistých elektrodách není nijak vyvinut. Uvedené hodnoty potenciálu se lišili minimálně v závislosti na typu použitého transduktoru. Děje se tak z důvodu redukce vzniklého *o*-chinonu zpět na dopamin (Obr. 7).



Obr. 7. Mechanismus reakce tyrozinázového senzoru.

4.4.2. Vliv způsobu imobilizace na životnost tyrozinázových biosenzorů

Z předchozích měření vyplývá, že všechny tři typy tyrozinázových biosenzorů by mohly být použity pro následující amperometrická měření v sádkovém uspořádání. Zde je nutné konstatovat, že potenciál detekce nebyl optimalizován a veškerá měření se prováděla při konstantním potenciálu $-0,2$ V [131,157,158]. Lze předpokládat, že hodnota detekčního potenciálu není optimální, nicméně pro studium životnosti postačující. Na Obr. 8 jsou uvedeny obdržené amperogramy pro čerstvě připravené tyrozinázové biosenzory.



Obr. 8. Amperogramy (sádkové uspořádání) čerstvých biosenzorů pro několik přídavek $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dopaminu v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PB (pH 7,0) při pracovním potenciálu $-0,2$ V a rychlosti míchání 400 min^{-1} .

U amperogramu obdrženého na CPE/Tyr senzoru pozorujeme větší proudové pozadí z důvodu poklesu vodivosti kompozitního materiálu (enzymem modifikovaná elektroda), jelikož enzym lze považovat za elektrický izolant (protein). V případě SPCE/Tyr-GTA/Nafion® byl pozorován větší šum než u biosenzoru s kovalentně vázaným enzymem. Pozorovaný nárůst šumu si vysvětlují přítomností polymeru, který přirozeně brání průchodu *o*-chinonu k povrchu transduktoru. Bezpochyby nejlepší stability signálu bylo dosaženo za použití AuE-AET-GTA-

Tyr. Avšak pro studium vlivu skladovacích podmínek byl vybrán SPCE/Tyr-GTA/Nafion[®] pro jeho jednoduchost a reprodukovatelnost přípravy. Porovnání vlivu imobilizace na životnost tyrozinázových biosenzorů je přehledně uvedeno v Tab. 1. Bohužel musím konstatovat, že u žádných ze zmíněných biosenzorů nebyla životnost delší než dva týdny.

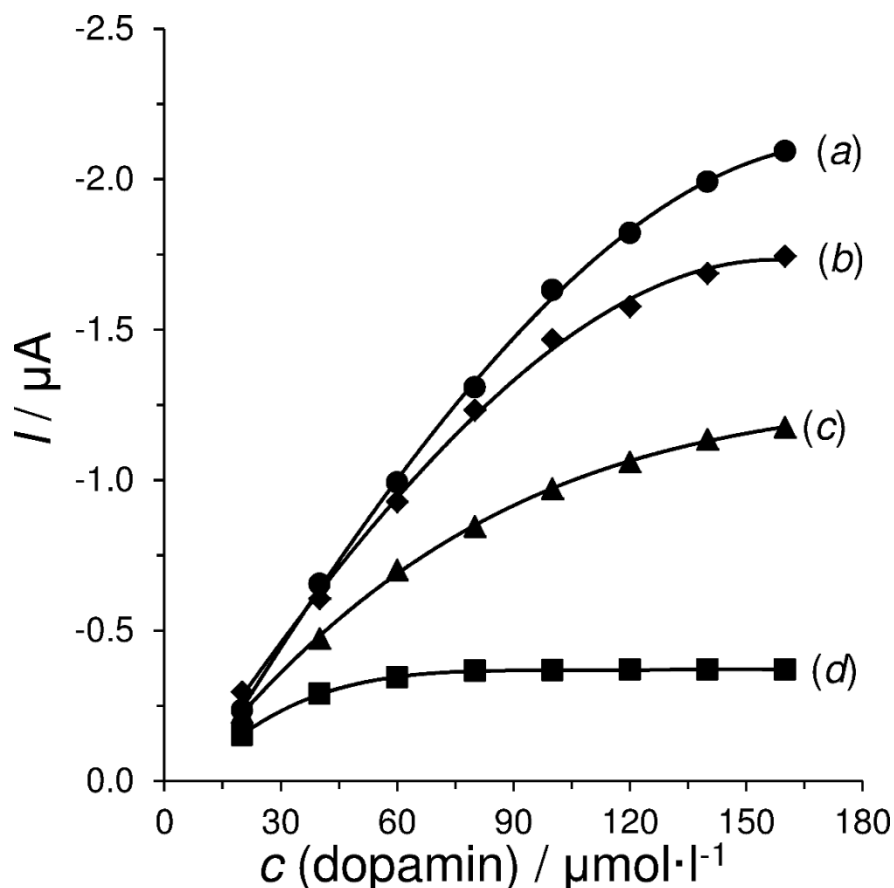
Tab. 1. Srovnání biosenzorů elektrochemické tyrozinázy pro monitorování dopaminu.

Biosensor	Skladování	Stabilita	Reference
<i>Začlenění tyrozinázy do materiálu elektrody (kompozity)</i>			
CPE/Tyr	v lednici za sucha při 5°C	27.4% po 2 týdnech	Tato práce
<i>Imobilizace tyrozinázy pomocí polymeru</i>			
GCE/AC/Tyr/Nafion [®]	v lednici za sucha při 4°C	80.9% po 15 dnech	[44]
AuE/PEDOT-Tyr	v PB o pH 7.5 při 4°C	35.0% po 5 dnech	[109]
GCE/Tyr-SWCNTs-Ppy	—	—	[131]
GCE/RGO/β-CD/Tyr/PEI	—	—	[157]
CF-Chit/Tyr/CeO ₂ /TiO ₂	v PB o pH 6.5 při 4°C	75.0% po 2 týdnech	[158]
GCE/Fe ₃ O ₄ -Chit-Tyr	v lednici za sucha při 4°C	95.0% po 1 týdnu	[159]
SPCE/Tyr-GTA/Nafion [®]	v lednici za sucha při 5°C	79.5% po 8 dnech	Tato práce
<i>Imobilizace tyrozinázy kovalentní vazbou</i>			
AuE/CoP-Tyr	PB v lednici za sucha 4°C	50.0% po 9 dnech	[160]
AuE-AET-GTA-Tyr	V lednici z sucha při 5°C	61.3% po 1 týdnu	Tato práce

Aktivní uhlí (AC); 2-aminoethanthiol (AET); β-cyklohextrin (β – CD); uhlíkové vlákno (CF); kobaltový (II) - porfyrinový film (CoP); glutaraldehyd (GTA); chitosan (Chit) poly (3,4-ethylendioxythiofen) (PEDOT); polyethylenimin (PEI); polypyrrol (Ppy); redukovaný oxid grafenu (RGO); jednotěnné uhlíkové nanotrubicce (SWNT); tyozináza (Tyr).

4.4.3. Vliv skladování na životnost SPCE/Tyr-GTA/Nafion[®] senzoru

Testováním způsobu imobilizace na stabilitu byl vybrán SPCE/Tyr-GTA/Nafion[®] senzor pro další testování, a to vlivu skladovacích podmínek na životnost, kdy byly zvoleny již zmíněné podmínky, v lednici při 5°C za sucha, v lednici při 5°C v roztoku (10 ml PB s přítomností 100 μmol·l⁻¹ dopaminu), v mrazáku při -18°C a volně za sucha při laboratorní teplotě 25°C. Po týdnu skladování byly naměřeny kalibrační křivky (Obr. 9).



Obr. 9. Kalibrační křivky dopaminu obdržené na čerstvém SPCE/Tyr-GTA/Nafion® senzoru (a) skladovaného po dobu jednoho týdne v mrazáku při -18°C (b), v lednici při 5°C (c), a volně při laboratorní teplotě (d). Experimenty byly naměřeny v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PB o pH 7,0, při potenciálu detekce $-0,2 \text{ V}$ a rychlosti míchání 400 min^{-1} .

Biosenzor skladovaný v mrazáku při teplotě -18°C vykazoval nejlepší stabilitu a nejvíce se blížil k čerstvě připravenému. Pomocí směrnice získaných z lineárních regresí přímek se určila citlivost $0,0172$ pro čerstvý sensor, $0,0157$ sensor skladovaný v mrazáku, $0,0119$ v lednici a $0,0068 \mu\text{A}\cdot\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ při laboratorních podmínkách. V rutinní analýze by to znamenalo, že před každou analýzou vzorku, by musela předcházet kalibrace biosenzoru. Prodloužení životnosti tyrozinázových biosenzorů by bylo možné zajistit přípravou biomimetických senzorů pomocí polymerů, které mohou zcela nahradit funkci enzymatických biosenzorů [114]. Konkrétně použití syntetického polymeru (MIP) [118,119]. Také použitím průtokových biosenzorů, kde enzymatická reakce probíhá v reaktoru, protože aktivita těchto reaktorů bývá konstantní nejméně jeden měsíc [161]

5. Závěr

Ze získaných výsledků lze konstatovat, že jak způsob imobilizace, tak i skladovací podmínky mají významný vliv na stabilitu tyrozinázových biosenzorů. Rozhodně by bylo správné ve studiu dále pokračovat pro získání jejich lepší životnosti, tak aby mohly najít uplatnění v klinické praxi. Dopamin se ukázal jako vhodný analyt, který vykazuje výraznou odezvu reakce pro správné odečtení hodnot.

Řešením neuspokojivé životnosti tyrozinázových senzorů by mohlo být vyvinutí biomimetických senzorů s použitím MIP. Důležité je zmínit také využití reaktorů, kde se na nosič naváže velké množství enzymu a reakce probíhá přímo v reaktoru. Pomocí těchto metodik výroby biosenzorů by bylo možné dosáhnout lepší životnosti, než mnou testovanými technikami.

Seznam použité literatury

- [1] SÁNCHEZ F., et. al., Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1995, **1247**(1), 1-11. ISSN 01674838.
- [2] CHANG T., An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009, **10**(6), 2440-2475. ISSN 1422-0067.
- [3] ISMAYA W., et. al., Crystal Structure of Agaricus bisporus Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone. *Biochemistry*. 2011, **50**(24), 5477-5486. ISSN 0006-2960.
- [4] MATOBA Y., et. al., Crystallographic Evidence That the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase Is Flexible during Catalysis. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, **281**(13), 8981-8990. ISSN 0021-9258.
- [5] WILCOX D., et. al., Substrate analog binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase. *Journal of the American Chemical Society*. 1985, **107**(13), 4015-4027. ISSN 0002-7863.
- [6] VAN G., et. al., Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*. 1997, **45**(7), 1309-1323. ISSN 00319422
- [7] WICHERS H. J., et. al., Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNAs from Agaricus bisporus. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003, **61**(4), 336-341. ISSN 0175-7598.
- [8] RAMSDEN C. and RILEY P.A., Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2014, **22**(8), 2388-2395. ISSN 09680896.
- [9] GARCIA-BORRÓN J. C. and SOLANO F., Molecular Anatomy of Tyrosinase and its Related Proteins: Beyond the Histidine-Bound Metal Catalytic Center. *Pigment Cell Research*. 2002, **15**(3), 162-173. ISSN 0893-5785.
- [10] HALABAN R., et. al., Abnormal Acidification of Melanoma Cells Induces Tyrosinase Retention in the Early Secretory Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, **277**(17), 14821-14828. ISSN 0021-9258.
- [11] SÁNCHEZ-FERRER Á., et. al., Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1995, **1247**(1), 1-11. ISSN 01674838.

- [12] ARTÉS F., et. al., Revisión: El pardeamiento enzimático en frutas y hortalizas mínimamente procesadas Review. *Food Science and Technology International*. 2016, **4**(6), 377-389. ISSN 1082-0132.
- [13] SOLEM E., et. al., Tyrosinase versus Catechol Oxidase: One Asparagine Makes the Difference. *Angewandte Chemie International Edition*. 2016, **55**(8), 2884-2888. ISSN 14337851.
- [14] JOHNSON K. and GOODY S. R., The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry*. 2011, **50**(39), 8264-8269. ISSN 0006-2960.
- [15] ESPÍN J., et. al., Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *European Journal of Biochemistry*. 2000, **267**(5), 1270-1279. ISSN 00142956.
- [16] ZAIDI K., et. al., Comparative evaluation of purified and characterized tyrosinases from two edible mushrooms, *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* and their clinical potential. *Bioscience Biotechnology Research Communications*. 2015, **8**(2), 161-170. ISSN: 0974-6455
- [17] SELINHEIMO E., et. al., Production and characterization of a secreted, C-terminally processed tyrosinase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *FEBS Journal*. 2006, **273**(18), 4322-4335. ISSN 1742-464X.
- [18] KENNEY J. A., Jr., Melanin pigmentation. *Journal of the National Medical Association*, 1961, **53**(5), 447–455, ISSN: 0027-9684
- [19] MARTIN L. B., et. al. Assessing the catalytic activity of three different sources of tyrosinase: A study of the oxidation of mono- and difluorinated monophenols. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008, **43**(3), 297-301. ISSN 01410229.
- [20] AKYILMAZ E., et. al., Do copper ions activate tyrosinase enzyme? A biosensor model for the solution. *Bioelectrochemistry*. 2010, **78**(2), 155-160. ISSN 15675394.
- [21] ZAIDI K. U., et. al., Purification and Characterization of Melanogenic Enzyme Tyrosinase from Button Mushroom. *Enzyme Research*. 2014, **2014**, 1-6. ISSN 2090-0406.
- [22] MAKINO N., et. al., The oxidatoin state of copper in resting tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 11974, **249**(19), 6062-6066. ISSN 1083-351X.
- [23] YANG Z., et. al., Tyrosinase activity in ionic liquids. *Biotechnology Letters*. 2007, **30**(1), 153-158. ISSN 0141-5492.
- [24] YANG Z., et. al. Partition coefficients of substrates and products and solvent selection for biocatalysis under nearly anhydrous conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. 1994, **43**(5), 365-370. ISSN 0006-3592.

- [25] YANG Z. and PAN W., Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology*. 2005, **37**(1), 19-28. ISSN 01410229.
- [26] KOCHANA J., et. al., Tyrosinase biosensor for benzoic acid inhibition-based determination with the use of a flow-batch monosegmented sequential injection system. *Talanta*. 2012, **96**, 147-152. ISSN 00399140.
- [27] BURDOCK G. A., et. al., Evaluation of Health Aspects of Kojic Acid in Food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2001, **33**(1), 80-101. ISSN 02732300.
- [28] TANIMOTO D. A., et. al., Amperometric biosensing of carbamate and organophosphate pesticides utilizing screen-printed tyrosinase-modified electrodes. *Analytica Chimica Acta*. 2007, **596**(2), 210-221. ISSN 00032670.
- [29] MITCHELL J. A., et. al., Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993, **90**(24), 11693-11697. ISSN 0027-8424.
- [30] CHEN J. S., et. al., Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1991, **39**(11), 1897-1901. ISSN 0021-8561.
- [31] CABANES J., et. al., Kojic Acid, a Cosmetic Skin Whitening Agent, is a Slow-binding Inhibitor of Catecholase Activity of Tyrosinase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1994, **46**(12), 982-985. ISSN 00223573.
- [32] HARBORNE J. B. and WILLIAMS C. A., Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000, **55**(6), 481-504. ISSN 00319422.
- [33] GUAN S., et. al., A potent tyrosinase activator from Radix Polygoni multiflori and its melanogenesis stimulatory effect in B16 melanoma cells. *Phytotherapy Research*. 2008, **22**(5), 660-663. ISSN 0951418X.
- [34] SEO S., et. al., Mushroom Tyrosinase: Recent Prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, **51**(10), 2837-2853. ISSN 1520-5118
- [35] UBEID A., HANTASH B., Novel Pentapeptide Activators of Mammalian and Mushroom Tyrosinase. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2014, **14**(12), 1463-1468. ISSN 15680266.
- [36] UBEID A. and HANTASH B., Minireview: Peptide Analogs and Short Sequence Oligopeptides as Modulators of Skin Pigmentation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2014, **14**(12), 1418-1424. ISSN 15680266.
- [37] SABOURY A. A. and ALIJANIANZADEH M., Ethyl Xanthate and Propyl Xanthate as Activators and Inhibitors of Mushroom Tyrosinase in Different

- Concentrations. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 2008, **55**(4), 937-942. ISSN 00094536.
- [38] SANJUST E., et. al., 3-Hydroxykynurenine as a substrate/activator for mushroom tyrosinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2003, **412**(2), 272-278. ISSN 00039861.
- [39] PALUMBO A., et. al., Effect of metal ions on the kinetics of tyrosine oxidation catalysed by tyrosinase. *Biochemical Journal*. 1985, **228**(3), 647-651. ISSN 0264-6021.
- [40] LERNER A. B. Mammalian tyrosinase: Effect of ions on enzyme action. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1952, **36**(2), 473-481. ISSN 00039861.
- [41] ROLFF M. and TUCZEK F., How Do Copper Enzymes Hydroxylate Aliphatic Substrates? Recent Insights from the Chemistry of Model Systems. *Angewandte Chemie International Edition*. 2008, **47**(13), 2344-2347. ISSN 14337851.
- [42] HOLM R. H., et. al., Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chemical Reviews*. 1996, **96**(7), 2239-2314. ISSN 0009-2665.
- [43] ANDREESCU S., and O. A. SADIK., Correlation of Analyte Structures with Biosensor Responses Using the Detection of Phenolic Estrogens as a Model. *Analytical Chemistry*. 2004, **76**(3), 552-560. ISSN 0003-2700.
- [44] RAHMAN S. F., et. al., Selective determination of dopamine with an amperometric biosensor using electrochemically pretreated and activated carbon/tyrosinase/Nafion®-modified glassy carbon electrode. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2016, **21**(5), 627-633. ISSN 1226-8372.
- [45] ESCAMILLA-GÓMEZ V. S., et. al., Immunosensor for the determination of *Staphylococcus aureus* using a tyrosinase–mercaptpropionic acid modified electrode as an amperometric transducer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008, **391**(3), 837-845. ISSN 1618-2642.
- [46] HASEBE Y., et. al., Highly sensitive electrochemical determination of *Escherichia coli* density using tyrosinase-based chemically amplified biosensor. *Analytica Chimica Acta*. 1997, **357**(1-2), 51-54. ISSN 00032670.
- [47] CHE Y., et. al., Detection of *Campylobacter jejuni* in poultry samples using an enzyme-linked immunoassay coupled with an enzyme electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2001, **16**(9-12), 791-797. ISSN 09565663.
- [48] CAMPANELLA L., et. al., Determination of Lactoferrin and Immunoglobulin G in Animal Milks by New Immunosensors. *Sensors*. 2009, **9**(3), 2202-2221. ISSN 1424-8220.

- [49] CHUANG M., et. al., An electrochemical tyrosinase-immobilized biosensor for albumin-toward a potential total protein measurement. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2006, **114**(1), 357-363. ISSN 09254005.
- [50] MOSSBERG M., et. al., A Direct Electrochemical Detection Method of Melanoma Based on Melanoma Biomarker. *Electroanalysis*. 2014, **26**(8), 1671-1675. ISSN 10400397.
- [51] MOUSA S., Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2010, **2011** (4). ISSN 1177-8903.
- [52] TOTHILL I. E., Biosensors for cancer markers diagnosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2009, **20**(1), 55-62. ISSN 10849521.
- [53] MANN D.M., YATES, P.O. Neurotransmitter deficits in Alzheimer's disease and in other dementing disorders. *Hum. Neurobiol*. 1986, **5**(3), 147-158. ISSN 0721-9075
- [54] GELDENHUYS W. J., et. al., Role of Serotonin in Alzheimer's Disease. *CNS Drugs*. 2011, **25**(9), 765-781 ISSN 1172-7047.
- [55] GODRIDGE H., et. al., Alzheimer-like neurotransmitter deficits in adult Down's syndrome brain tissue. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1987, **50**(6), 775-778. ISSN 0022-3050.
- [56] SIGOLAEVA L. V., et. al., Bioelectrochemical Analysis of Neuropathy Target Esterase Activity in Blood. *Analytical Biochemistry*. 2001, **290**(1), 1-9. ISSN 00032697.
- [57] LOPEZ M. S., et. al., Electrochemical detection of transketolase activity using a tyrosinase biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010, **26**(1), 139-143. ISSN 09565663.
- [58] TORRIERO A. A.J., et. al., Penicillamine determination using a tyrosinase micro-rotating biosensor. *Analytica Chimica Acta*. 2006, **580**(2), 136-142. ISSN 00032670.
- [59] VALERO E., et. al., Quantification of acetaminophen by oxidation with tyrosinase in the presence of Besthorn's hydrazone. *Analytical Biochemistry*. 2003, **318**(2), 187-195. ISSN 00032697.
- [60] CAMPANELLA L., et. al., Salicylic acid determination in cow urine and drugs using a bienzymatic sensor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, **42**(1), 94-99. ISSN 07317085.
- [61] MASUDA T., et. al., Screening for Tyrosinase Inhibitors among Extracts of Seashore Plants and Identification of Potent Inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014, **69**(1), 197-201. ISSN 0916-8451.

- [62] GELB D. J., et. al., Diagnostic Criteria for Parkinson Disease. *Archives of Neurology*. 1999, **56**(1). ISSN 0003-9942.
- [63] APETREI C. and APETREI M.I., Biosensor based on tyrosinase immobilized on a single-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode for detection of epinephrine. *International Journal of Nanomedicine*, 2013, **8**, 4391–4398. ISSN 1178-2013.
- [64] APETREI C., et. al., Amperometric tyrosinase based biosensor for serotonin detection. *Romanian Biotechnological Letters*. 2013, 18(3), 8253-8262. ISSN 2248-3942
- [65] LOWE C., An introduction to the concepts and technology of biosensors. *Biosensors*. **1**(1), 3-16. ISSN 0265928X.
- [66] THÉVENOT D. R., et. al., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification1International Union of Pure and Applied Chemistry. *Biosensors and Bioelectronics*. 2001, **16**(1-2), 121-131. ISSN 09565663.
- [67] PRIVETT B., et. al., Electrochemical Sensors. *Analytical Chemistry*. 2010, **82**(12), 4723-4741. ISSN 0003-2700.
- [68] HOLZINGER M., et. al., Nanomaterials for biosensing applications: a review. *Frontiers in Chemistry*. 2014, **2**. ISSN 2296-2646.
- [69] JAKEWAY S. C., et. al., Miniaturized total analysis systems for biological analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 2000, **366**(6-7), 525-539. ISSN 0937-0633.
- [70] SÝS M. and VYTRĚS K., Tyrosinase Electrochemical Biosensors Monitoring Medicinally Significant Substances. *Current Medicinal Chemistry*. 2018, **25**(33), 3988-4006. ISSN 09298673.
- [71] D'SOUZA S.F. Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2001, **16**(6), 337-353. ISSN 09565663.
- [72] DURÁN N., et. al., Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002, **31**(7), 907-931. ISSN 01410229.
- [73] FENG W., JI P., Enzymes immobilized on carbon nanotubes. *Biotechnology Advances*. 2011, **29**(6), 889-895. ISSN 07349750.
- [74] SKLÁDAL P., Mushroom tyrosinase-modified carbon paste electrode as an amperometric biosensor for phenols. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1991, **56**(7), 1427-1433. ISSN 0010-0765.

- [75] FATIBELLO-FILHO, O. Chronoamperometric determination of paracetamol using an avocado tissue (*Persea americana*) biosensor. *Talanta*. **55**(4), 685-692. ISSN 00399140.
- [76] FORZANI E.S., et. al., Amperometric determination of dopamine on vegetal-tissue enzymatic electrodes. Analysis of interferents and enzymatic selectivity. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1997, 435(1-2), 77-84. ISSN 15726657.
- [77] CRUZ VIEIRA, I. Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. *Talanta*. **52**(4), 681-689. ISSN 00399140.
- [78] LUPETTI K. O., et. al., A zucchini-peroxidase biosensor applied to dopamine determination. *Il Farmaco*. 2005, **60**(2), 179-183. ISSN 0014827X.
- [79] TOPÇU S., et. al., Evaluation of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects. *Biosensors and Bioelectronics*. 2004, **20**(3), 592-597. ISSN 09565663.
- [80] HEINIS C., et. al., Two General Methods for the Isolation of Enzyme Activities by Colony Filter Screening. *Chemistry & Biology*. 2002, **9**(3), 383-390. ISSN 10745521.
- [81] GORTON, L. Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells. *Electroanalysis*. 1995, **7**(1), 23-45. ISSN 1040-0397.
- [82] ŠVANCARA I., et. al., Carbon paste electrodes in the new millennium. *Open Chemistry*. 2009, **7**(4). ISSN 2391-5420.
- [83] VIEIRA I. da C., et. al., Zucchini crude extract-palladium-modified carbon paste electrode for the determination of hydroquinone in photographic developers. *Analytica Chimica Acta*. 1999, **398**(2-3), 145-151. ISSN 00032670.
- [84] DEMPSEY E., et. al., Development of a biosensor for endocrine disrupting compounds based on tyrosinase entrapped within a poly(thionine) film. *Biosensors and Bioelectronics*. 2004, **20**(2), 367-377. ISSN 09565663.
- [85] GAO Y. and KYRATZIS I., Covalent Immobilization of Proteins on Carbon Nanotubes Using the Cross-Linker 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide a Critical Assessment. *Bioconjugate Chemistry*. 2008, **19**(10), 1945-1950. ISSN 1043-1802.
- [86] ALBAREDA-SIRVENT M., et. al., Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2000, **69**(1-2), 153-163. ISSN 09254005.

- [87] SÝS M., et. al., Improvement of enzyme carbon paste-based biosensor using carbon nanotubes for determination of water-soluble analogue of vitamin E. *Chemical Papers*. 2015, **69**(1). . ISSN 1336-9075.
- [88] MELLO L. D. and KUBOTA L. T., Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*. 2002, **77**(2), 237-256. ISSN 03088146.
- [89] SHELDON R., A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 2007, **349**(8-9), 1289-1307. ISSN 16154150.
- [90] WEETALL H. H., Immobilized enzymes. Analytical applications. *Analytical Chemistry*. 2008, **46**(7), 602A-615a. ISSN 0003-2700.
- [91] BECK F., Electrodeposition of polymer coatings. *Electrochimica Acta*. 1988, **33**(7), 839-850. ISSN 00134686.
- [92] NISTOR C., et. al., Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds. *Analytica Chimica Acta*. 1999, **387**(3), 309-326. ISSN 00032670.
- [93] SÝS M., et. al., Amperometric tyrosinase carbon paste-based biosensor in food analysis. *Chemické Listy* [online]. 2014, **108**, 179–182. ISSN 1213-7103
- [94] DENG M., et. al., Electrochemical deposition of polypyrrole/graphene oxide composite on microelectrodes towards tuning the electrochemical properties of neural probes. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2011, **158**(1), 176-184. ISSN 09254005.
- [95] CHEN K., et. al., A Graphene-Based Electrochemical Sensor for Rapid Determination of Phenols in Water. *Sensors*. 2013, **13**(5), 6204-6216. ISSN 1424-8220.
- [96] SPITALSKY Z., et. al., Carbon nanotube–polymer composites: Chemistry, processing, mechanical and electrical properties. *Progress in Polymer Science*. 2010, **35**(3), 357-401. ISSN 00796700.
- [97] WANG B., et. al., A sandwich-type phenolic biosensor based on tyrosinase embedding into single-wall carbon nanotubes and polyaniline nanocomposites. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2013, **186**, 417-422. ISSN 09254005.
- [98] HAN G., et. al., Electrodeposition of polypyrrole/multiwalled carbon nanotube composite films. *Thin Solid Films*. 2005, **474**(1-2), 64-69. ISSN 00406090.
- [99] YANG L., et. al., A novel tyrosinase biosensor based on chitosan-carbon-coated nickel nanocomposite film. *Bioelectrochemistry*. 2012, **84**, 44-48. ISSN 15675394.

- [100] KHEIRI F., et. al., Acetone extracted propolis as a novel membrane and its application in phenol biosensors: the case of catechol. *Journal of Solid State Electrochemistry*. 2011, **15**(11-12), 2593-2599. ISSN 1432-8488.
- [101] APETREI C., et. al., Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized phosphate-doped polypyrrole film as an immobilization support. Application for detection of phenolic compounds. *Electrochimica Acta*. 2011, **56**(24), 8919-8925. ISSN 00134686.
- [102] APETREI C., Novel method based on polypyrrole-modified sensors and emulsions for the evaluation of bitterness in extra virgin olive oils. *Food Research International*. 2012, **48**(2), 673-680. ISSN 09639969.
- [103] RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, M.L., et. al., Evaluation of the polyphenolic content of extra virgin olive oils using an array of voltammetric sensors. *Electrochimica Acta*. 2008, **53**(20), 5867-5872. ISSN 00134686.
- [104] PÉREZ-LÓPEZ B. and MERKOÇI A., Carbon nanotubes and graphene in analytical sciences. *Microchimica Acta*. 2012, **179**(1-2), 1-16. ISSN 0026-3672.
- [105] PÉREZ-LÓPEZ B. and MERKOÇI A., Amperometric biosensor based on polypyrrole and tyrosinase for the detection of tyramine in food samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2013, **178**, 40-46. ISSN 09254005.
- [106] WANG S., et. al., Amperometric tyrosinase biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles–chitosan nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*. 2008, **23**(12), 1781-1787. ISSN 09565663.
- [107] SÝS M., et. al., Amperometric enzyme carbon paste-based biosensor for quantification of hydroquinone and polyphenolic antioxidant capacity. *International Journal of Electrochemical Science*. 2013, **8**(7),9030-9040. ISSN 1452-3981
- [108] TSAI Y. and CHIU CH., Amperometric biosensors based on multiwalled carbon nanotube-Nafion-tyrosinase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2007, **125**(1), 10-16. ISSN 09254005.
- [109] LUPU S., et. al., Development of Amperometric Biosensors Based on Nanostructured Tyrosinase-Conducting Polymer Composite Electrodes. *Sensors*. 2013, **13**(5), 6759-6774. ISSN 1424-8220.
- [110] WANG J., et. al., Amperometric biosensor for phenols based on a tyrosinase–graphite–epoxy biocomposite. *The Analyst*. 1994, **119**(3), 455-458. ISSN 0003-2654.

- [111] RODRIGUEZ-SEVILLA E., et. al., A Novel Tyrosinase Base Biosensor for the Quantification of Antioxidant Capacity: Evaluation on Infusions of Medicinal Plants. *ECS Transactions*. 2014, **64**(1), 49-57. ISSN 1938-6737.
- [112] RAJESH W., et. al., Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized PTS-doped polypyrrole film as an entrapment support. *Reactive and Functional Polymers*. 2004, **59**(2), 163-169. ISSN 13815148.
- [113] ELKAOUTIT M., et. al., Bio-functionalization of electro-synthesized polypyrrole surface by heme enzyme using a mixture of Nafion and glutaraldehyde as synergetic immobilization matrix: Conformational characterization and electrocatalytic studies. *Applied Surface Science*. 2011, **257**(24), 10926-10935. ISSN 01694332.
- [114] ALGIERI C., et. al., Bio-Mimetic Sensors Based on Molecularly Imprinted Membranes. *Sensors*. 2014, **14**(8), 13863-13912. ISSN 1424-8220.
- [115] ANDERSON S., et. al., Expanding roles for templates in synthesis. *Accounts of Chemical Research*. 2002, **26**(9), 469-475. ISSN 0001-4842.
- [116] LEHN J. M., Supramolecular Chemistry—Scope and Perspectives Molecules, Supramolecules, and Molecular Devices(Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1988, **27**(1), 89-112. ISSN 0570-0833.
- [117] SERGEYEVA T.A., et.al., Catalytic molecularly imprinted polymer membranes: Development of the biomimetic sensor for phenols detection. *Analytica Chimica Acta*. 2010, **659**(1-2), 274-279. ISSN 00032670.
- [118] HAUPT K., Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. *The Analyst*. **126**(6), 747-756. ISSN 00032654.
- [119] WULFF G., Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates-A Way towards Artificial Antibodies. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1995, **34**(17), 1812-1832. ISSN 0570-0833.
- [120] STEVENSON J. D. and THOMAS N. R., Catalytic antibodies and other biomimetic catalysts. *Natural Product Reports*. **17**(6), 535-577. ISSN 02650568.
- [121] YUE Y., et. al., A mesoporous carbon nanofiber-modified pyrolytic graphite electrode used for the simultaneous determination of dopamine, uric acid, and ascorbic acid. *Carbon*. 2012, **50**(1), 107-114. ISSN 00086223.
- [122] BATHINAPATLA A., et. al., An ultrasensitive performance enhanced novel cytochrome c biosensor for the detection of rebaudioside A. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016, **77**, 116-123. ISSN 09565663.

- [123] YE C., et. al., Sensing glucose based on its affinity for concanavalin A on a glassy carbon electrode modified with a C60 fullerene nanocomposite. *Microchimica Acta*. 2015, **182**(13-14), 2215-2221. ISSN 0026-3672.
- [124] WALCARIUS A., Electrocatalysis, sensors and biosensors in analytical chemistry based on ordered mesoporous and macroporous carbon-modified electrodes. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2012, **38**, 79-97. ISSN 01659936.
- [125] JARCZEWSKI S., et. al., Oxidative Dehydrogenation of Ethylbenzene Over Poly(furfuryl alcohol)-Derived CMK-1 Carbon Replica. *Catalysis Letters*. 2016, **146**(7), 1231-1241. ISSN 1011-372X.
- [126] GUO Z., et. al., Mesoporous carbon-polyaniline electrode: Characterization and application to determination of copper and lead by anodic stripping voltammetry. *Materials Chemistry and Physics*. 2011, **128**(1-2), 238-242. ISSN 02540584.
- [127] WANG X., et. al., Electrostatic Assembly of Conjugated Polymer Thin Layers on Electrospun Nanofibrous Membranes for Biosensors. *Nano Letters*. 2004, **4**(2), 331-334. ISSN 1530-6984.
- [128] WANG Z., et. al., Nanofibrous Membranes Containing Carbon Nanotubes: Electrospun for Redox Enzyme Immobilization. *Macromolecular Rapid Communications*. 2006, **27**(7), 516-521. ISSN 1022-1336.
- [129] STOILOVA O., et. al., Electrospun Polyacrylonitrile Nanofibrous Membranes Tailored for Acetylcholinesterase Immobilization. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2010, **25**(1), 40-57. ISSN 0883-9115.
- [130] YU D., et. al., Electrospun nanofiber-based drug delivery systems. *Health*. 2009, **01**(02), 67-75. ISSN 1949-4998.
- [131] MIN K. and YOO Y. J., Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode. *Talanta*. 2009, **80**(2), 1007-1011. ISSN 00399140.
- [132] KOTTE H., et. al., Methylphenazonium-Modified Enzyme Sensor Based on Polymer Thick Films for Subnanomolar Detection of Phenols. *Analytical Chemistry*. 2002, **67**(1), 65-70. ISSN 0003-2700
- [133] KUSWANDI B., et. al., Optical fibre biosensors based on immobilised enzymes. *The Analyst*. **126**(8), 1469-1491. ISSN 0003-2654.
- [134] STARODUB N.F., et. al., Usage of organosilanes for integration of enzymes and immunocomponents with electrochemical and optical transducers. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 1995, **24**(1-3), 173-176. ISSN 0925-4005.

- [135] BRÜNING C. and GROBE J., Aldehyde-functionalized ethoxysilanes as new enzyme immobilization reagents. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1995, (22), 2323-2324. ISSN 0022-4936.
- [136] SZALAPATA K., et. al., Novel Application of porous and cellular materials for covalent immobilization of pepsin. *Brazilian Journal of Chemical Engineering.* 2016, **33**(2), 251-260. ISSN 0104-6632.
- [137] WOYCHIK J.H. and WONDOLOWSKI M. V., Covalent bonding of fungal β -galactosidase to glass. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology.* 1972, **289**(2), 347-351. ISSN 000-52744.
- [138] ROYER G., et. al., Immobilization of enzymes on aldehydic matrices by reductive alkylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1975, **64**(2), 478-484. ISSN 000-6291X.
- [139] RAO S., et. al., Oriented immobilization of proteins. *Mikrochimica Acta.* 1998, **128**(3-4), 127-143. ISSN 0026-3672.
- [140] MONTALBETTI C.A.G.N. and FALQUE V., Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron.* 2005, **61**(46), 10827-10852. ISSN 00404020.
- [141] GULLA K.C., et. al., Enhancement of stability of immobilized glucose oxidase by modification of free thiols generated by reducing disulfide bonds and using additives. *Biosensors and Bioelectronics.* 2004, **19**(6), 621-625. ISSN 09565663.
- [142] SHEEHAN J. C., et. al., The Use of Water-Soluble and Basic Carbodiimides in Peptide Synthesis. *The Journal of Organic Chemistry.* 1956, **21**(4), 439-441. ISSN 0022-3263.
- [143] DANISHEFSKY I. and SISKOVIC E., Conversion of carboxyl groups of mucopolysaccharides into amides of amino acid esters. *Carbohydrate Research.* 1971, **16**(1), 199-205. ISSN 00086215.
- [144] HOARE D. G. and KOSHLAND D.E. Jr., A Method for the Quantitative Modification and Estimation of Carboxylic Acid Groups in Proteins. *The Journal of Biological Chemistry.* 1967, **242**, 2447-2453. ISSN 1083-351X.
- [145] ZEEMAN R., et. al., Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen. *Biomaterials.* 1999, **20**(10), 921-931. ISSN 01429612.
- [146] NAKAJIMA N. and IKADA Y., Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. *Bioconjugate Chemistry.* 2002, **6**(1), 123-130. ISSN 1043-1802.

- [147] MIGNEAULT I., et al., Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*. 2004, **37**(5), 790-802. ISSN 0736-6205.
- [148] DINÇER A., et. al., Immobilization of tyrosinase on chitosan–clay composite beads. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2012, **50**(3), 815-820. ISSN 01418130.
- [149] LUSTY C. J. A., gentle vapor-diffusion technique for cross-linking of protein crystals for cryocrystallography. *Journal of Applied Crystallography*. 1999, **32**(1), 106-112. ISSN 0021-8898.
- [150] SZAŁAPATA K., et. al., Novel applications of porous and cellular materials for covalent immobilization of pepsin. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2016, **33**(2), 251-260. ISSN 0104-6632.
- [151] BARON R., et. al., Dopamine-, l-DOPA-, Adrenaline-, and Noradrenaline-Induced Growth of Au Nanoparticles: Assays for the Detection of Neurotransmitters and of Tyrosinase Activity. *Analytical Chemistry*. 2005, **77**(6), 1566-1571. ISSN 0003-2700.
- [152] LIU Z., et. al., A phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to modified core-shell magnetic nanoparticles supported at a carbon paste electrode. *Analytica Chimica Acta*. 2005, **533**(1), 3-9. ISSN 00032670.
- [153] WANG B., et. al., Silica sol–gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2000, **15**(7-8), 397-402. ISSN 09565663.
- [154] LIU S., et. al., Renewable phenol biosensor based on a tyrosinase-colloidal gold modified carbon paste electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2003, **540**, 61-67. ISSN 15726657.
- [155] TEMBE S., et. al., Electrochemical biosensor for catechol using agarose–guar gum entrapped tyrosinase. *Journal of Biotechnology*. 2007, **128**(1), 80-85. ISSN 01681656.
- [156] ORTEGA F., et. al., Amperometric biosensor for the determination of phenolic compounds using a tyrosinase graphite electrode in a flow injection system. *Journal of Biotechnology*. 1993, **31**(3), 289-300. ISSN 01681656.
- [157] FRITEA L., et. al., Novel Reduced Graphene Oxide/ β -Cyclodextrin/Tyrosinase Biosensor for Dopamine Detection. *International. Journal. Electrochemical Science* [online]. (2015), 10, 7292 – 7302. ISSN 1452-3981

- [158] NJAGI J., et. al., Amperometric Detection of Dopamine in Vivo with an Enzyme Based Carbon Fiber Microbiosensor. *Analytical Chemistry*. 2010, **82**(3), 989-996. ISSN 0003-2700.
- [159] WANG Y., et. al., Detection of Dopamine Based on Tyrosinase-Fe₃O₄ Nanoparticles-chitosan Nanocomposite Biosensor. *American Journal of Biomedical Sciences*. 2010, 209-216. ISSN 19379080.
- [160] FLORESCU M., et. al., Tyrosinase-Based Biosensors for Selective Dopamine Detection. *Sensors*. 2017, **17**(6). 1424-8220. ISSN 1424-8220.
- [161] JOSYPČUK O., et. al., Electrochemical Biosensors Based on Enzymatic Reactor of Silver Solid Amalgam Powder for Measurements in Flow Systems. *Electroanalysis*. 2014, **26**(8), 1729-1738. ISSN 10400397.