

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2019**

**MARTINA VACKOVÁ**

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Umělé enzymy

Martina Vacková

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martina Vacková**  
Osobní číslo: **C15106**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Umělé enzymy**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

### 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 klasifikaci umělých enzymů podle struktury a fyzikálně chemických vlastností. Provedte rovněž jejich srovnání s klasickými enzymy.
2. U vybraných umělých enzymů se zaměřte na jejich využití při přípravě senzorů pro elektroanalýzu.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Jazyk zpracování bakalářské práce: ~~Angličtina~~

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

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: **20. února 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

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

Martina Vacková

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat vedoucímu práce Ing. Tomáši Mikyskovi, Ph. D. za cenné rady, věcné připomínky, trpělivost a vstřícnost při konzultacích a zpracování této práce.

## **Anotace**

Tato bakalářská práce je zaměřena na umělé enzymy. Umělé enzymy jsou v této práci rozděleny podle struktury do čtyř skupin. Každá skupina je popsána a doplněna příklady. Další části práce se zabývají biosenzory a možnostmi zakotvení enzymu nebo umělého enzymu na elektrodový povrch. Poslední část práce uvádí několik publikovaných senzorů na bázi umělých oxidáz a jejich výsledky při stanovení vybraných fenolických látek.

## **Klíčová slova**

Enzymy, umělé enzymy, tyrosináza, katechol oxidáza, biosenzor, modifikace povrchu elektrody, senzory na bázi umělé oxidázy.

## **Tittle**

Artificial enzymes

## **Annotation**

This bachelor thesis is focused on artificial enzymes. Artificial enzymes are divided into four groups according to the structure in this thesis. Each group is described and examples are given here. The next part of this thesis deals with biosensors and shows the possibility of electrode surface modification by an enzyme or artificial enzyme. There are several published sensors based on artificial oxidases in the final part of the thesis. In this part results in the determination of selected phenolic compounds by these sensors are also shown.

## **Keywords**

Enzymes, artificial enzymes, tyrosinase, catechol oxidase, biosensor, electrode surface modification, artificial oxidase-based sensors.

# Obsah

1	Enzymy .....	13
1.1	Vlastnosti.....	13
1.2	Názvosloví enzymů.....	13
1.3	Klasifikace enzymů.....	14
1.3.1	Oxidoreduktázy.....	14
1.3.2	Transferázy .....	14
1.3.3	Hydrolázy.....	15
1.3.4	Lyázy .....	15
1.3.5	Izomerázy.....	15
1.3.6	Ligázy .....	15
1.4	Struktura enzymu .....	16
1.4.1	Obecná struktura .....	16
1.4.2	Aktivní centra a další klíčové oblasti enzymu .....	16
1.5	Kinetika enzymových reakcí.....	17
2	Umělé enzymy .....	20
2.1	Umělé enzymy na bázi polymerů.....	20
2.1.1	Homogenní polymery s enzymovou aktivitou.....	20
2.1.2	Heterogenní polymery s enzymovou aktivitou.....	22
2.2	Umělé enzymy na bázi proteinů.....	24
2.2.1	Modifikace proteinů s enzymovou aktivitou .....	24
2.2.2	Modifikace proteinů bez enzymové aktivity .....	25
2.3	Umělé enzymy na bázi protilátek.....	28
2.4	Umělé metaloenzymy.....	30
2.4.1	Proteinové metaloenzymy.....	30
2.4.2	Kovové komplexy s aktivitou enzymu .....	31
2.4.3	Tyrosináza a komplexy s aktivitou tyrosinázy .....	32



3	Možnosti při konstrukci biosenzorů .....	35
4	Možnosti zakotvení enzymu/komplexu na elektrodový povrch .....	37
4.1	Mechanická imobilizace enzymu/komplexu.....	37
4.2	Zachycení enzymu/komplexu v gelu, polymeru nebo pastě .....	37
4.3	Zesítnění enzymu/komplexu .....	38
4.4	Kovalentní imobilizace enzymu/komplexu.....	38
4.5	Elektropolymerace .....	41
5	Senzory na bázi umělých enzymů pro elektroanalýzu.....	42
5.1	Stanovení katechinu .....	42
5.2	Stanovení rutinu .....	43
5.3	Stanovení dopaminu.....	44
	Závěr .....	46
6	Použitá literatura .....	47

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Princip označování enzymů kódem (vytvořeno, zdroj informací [1]) .....	14
Obrázek 2: Schéma jednosubstrátové enzymové reakce podle Michaelise a Mentenové (převzato, [3]) .....	17
Obrázek 3: Saturační křivka (vytvořeno, zdroj informací [3]) .....	18
Obrázek 4: Grafické metody pro stanovení $K_M$ a $V_{MAX}$ pomocí metody Lineweaver-Burk a Eadie-Hofstee (upraveno, [7]) .....	19
Obrázek 5: a) strukturní vzorec PEI; b) rozvětvená struktura PEI (převzato, [9]) .....	20
Obrázek 6: Schéma přípravy umělé proteázy (převzato, [9]) .....	21
Obrázek 7: Polymer PEI s připojenými laurylovými skupinami a komplexy Ni(II)TP (převzato, [9]) .....	22
Obrázek 8: PCPS modifikovaný katalytickou skupinou s kovovým iontem (převzato, [9]) .....	23
Obrázek 9: Co(III) cyklen vázaný na PCD (převzato, [9]) .....	23
Obrázek 10: Schéma chemické modifikace subtilisinu s thiolovou skupinou pomocí R-substituovaného methanthiosulfonátu (převzato; [17]) .....	24
Obrázek 11: Obecné schéma tvorby umělých enzymů na bázi proteinu s použitím OP a kovových iontů (převzato; [9]) .....	25
Obrázek 12: Struktura dutého proteinu (převzato; [19]) .....	26
Obrázek 13: Schéma reakce TP-PX činidla s proteinem obsahujícím thiolovou skupinu (převzato; [9]) .....	26
Obrázek 14: Porovnání protilátky modifikované chemicky (vlevo) a protilátky modifikované mutagenezí (vpravo) (převzato; [9]) .....	28
Obrázek 15: Struktura protilátky (upraveno, [25]) .....	29
Obrázek 16: Diels–Alderova reakce katalyzovaná protilátkou 1E9 (upraveno; [9]) .....	29
Obrázek 17: Schéma výpočetního designu pro tvorbu umělých enzymů (upraveno, [30]) .....	30
Obrázek 18: Vývoj nového enzymu pomocí řízené evoluce enzymu (upraveno, [23]) .....	31
Obrázek 19: Monooxygenace fenolu na orto-chinon pomocí oxy-tyrosinázy (upraveno, [32]) .....	32
Obrázek 20: Oxidace katecholu na orto-chinon pomocí oxy-tyrosinázy a met-tyrosinázy (upraveno, [32]) .....	33
Obrázek 21: Struktury ligandů uvedených v tabulce 2 (upraveno, [38]) .....	34
Obrázek 22: Obecné schéma biosenzoru (převzato, [45]) .....	35

Obrázek 23: Princip navázání enzymu/komplexu obsahujícího aminoskupinu na povrch s aminoskupinou pomocí glutaraldehydu (převzato, [44]) .....	39
Obrázek 24: Princip navázání enzymu/komplexu obsahujícího aminoskupinu na povrch s aromatickou aminoskupinou pomocí diazotace (převzato, [44]) .....	39
Obrázek 25: Princip navázání enzymu/komplexu obsahujícího aminoskupinu na povrch s karboxyskupinou (převzato, [44]) .....	40
Obrázek 26: Aktivace povrchu s hydroxyskupinou pomocí epichlorhydrinu (převzato, [44])	40
Obrázek 27: Princip navázání enzymu/komplexu s volnými cysteinovými zbytky na povrch s thiolovou skupinou (převzato, [44]) .....	40
Obrázek 28: Katechin (převzato, [53]) .....	42
Obrázek 29: Square wave voltamogramy pro různé koncentrace katechinu (převzato, [47])..	42
Obrázek 30: Rutin (převzato, [53]) .....	43
Obrázek 31: Square wave voltamogramy pro různé koncentrace rutinu (převzato, [53]) .....	44
Obrázek 32: Dopamin (převzato, [53]) .....	44
Obrázek 33: Square wave voltamogramy pro různé koncentrace dopaminu (převzato, [54]) .	45

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Kinetické parametry přírodních metaloenzymů pro oxidaci katecholu (převzato, [38]) .....	34
Tabulka 2: Kinetické parametry umělých metaloenzymů na bázi mědi s aktivitou katechol oxidázy (převzato, [38]) .....	34
Tabulka 3: Přehled enzymových biosenzorických stanovení (vytvořeno, zdroj dat [44]) .....	36

## Seznam zkratek a značek

ALBP	Adipocytární protein vázající mastné kyseliny
CMM	Chemicky modifikovaný mutant
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ee	Enantiosektivní přebytek
HPNPP	2-hydroxypropyl-p-nitrofosfát
IFABP	Intestinální protein vázající mastné kyseliny
K	Lysin
OP	1,10-fenantrolin
PAD	Poly(aminomethylstyren-co-divinylbenzen)
PCD	Poly(chlormethylstyren-co-divinylbenzen)
PCPS	Chlormethylovaný zesítěný polystyren
PEI	Polyethylenimin
PX	Pyridoxaminové činidlo
RNA	Ribonukleová kyselina
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SBL	Subtilisin izolovaný z <i>Bacillus lentus</i>
TP	Terpyridin
TrpR	Tryptofanový represor
Y	Tyrosin

## Úvod

Chemické reakce se v živých systémech málokdy obejdou bez přítomnosti katalyzátoru. Tyto katalyzátory jsou specifické bílkovinné makromolekuly s vysokou účinností, nazývané enzymy. Každá buňka obsahuje v průměru více než 3000 enzymů ovlivňující její reakce. Enzymy každého biologického druhu jsou odlišné (druhovú specifita), a tak se celkový počet těchto biokatalyzátorů odhaduje na miliardy. Své jméno získaly enzymy roku 1878 přetvořením řeckého výrazu "en zýme" znamenajícího "v kvasnicích". Studium enzymů a objevy v této oblasti vedly až ke vzniku samostatného oboru zvaného enzymologie. S objevením unikátních katalytických vlastností enzymů vznikla i lákavá myšlenka týkající se využití těchto vlastností v běžných procesech. Přírodní enzymy však mají nevýhody, které jejich využití ve velkém měřítku znemožňují. Mezi tyto nevýhody patří především složitá izolace, vysoké pořizovací náklady, snadná denaturace a složitá recyklace. I přes tyto nevýhody jsou přírodní enzymy v některých případech nezastupitelné, a tak se využívají například v biomedicíně, chemii životního prostředí a potravinářství [1].

Katalytické vlastnosti přírodních enzymů byly natolik zajímavé a výhodné, že vedly k vývoji a syntéze nových molekul. Tyto molekuly mají katalytické vlastnosti podobné přírodním enzymům, ale nejsou tak náchylné k podmínkám a jsou snadněji dostupné. Tato nová skupina molekul se nazývá umělé enzymy.

# 1 Enzymy

## 1.1 Vlastnosti

Ve srovnání s dnešními synteticky vyrobenými katalyzátory jsou přírodní enzymy v mnoha směrech katalyzátory dokonalejšími. Jejich výhody lze shrnout následovně:

- **Účinnost**

Jedna molekula enzymu je schopna přeměnit až  $5 \cdot 10^4$  molekul substrátu za sekundu. Rychlost reakcí katalyzovaných enzymem tedy o několik řádů převyšuje rychlost reakcí katalyzovaných syntetickými katalyzátory. Účinnost je ovšem závislá na okolních podmínkách.

- **Specifita**

Enzymy se podílí pouze na specifickém typu reakce se specifickým substrátem. Lze tedy říci, že mají účinkovou a substrátovou specifitu.

- **Mírné podmínky**

Optimální podmínky pro reakce s enzymy jsou v rozmezí teplot 20–40 °C, tlaku 100 kPa a pH v okolí neutrální oblasti. Lze ovšem najít i výjimky, například termofilní bakterie, jejichž enzymy odolávají i teplotám kolem 90 °C, pepsin, který má nejvyšší aktivitu při pH 2, nebo argináza, která vykazuje nejvyšší aktivitu při pH 10.

- **Regulovatelnost účinku**

- **Netoxičnost**

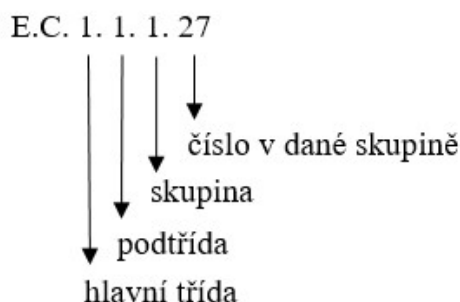
Nevýhody enzymů pro praktické využití již byly popsány v úvodu [1-3].

## 1.2 Názvosloví enzymů

Z počátku se enzymům vymýšlely triviální názvy, které obvykle končily koncovkou -in, tedy například pepsin a trypsin. Některé z těchto triviálních názvů se používají dodnes. Následoval systém pojmenování podle substrátu, který daný enzym přeměňuje, plus koncovka -áza, (např. amyláza, lipáza), nebo jako druhá varianta druh katalyzované reakce plus koncovka -áza (např. hydroláza, transamináza). S rostoucím počtem enzymů však bylo třeba vytvořit systematické názvosloví pro pojmenování enzymů, proto v roce 1961 Mezinárodní unie biochemie provedla částečnou úpravu triviálních názvů a vytvořila systémové rozdělení enzymů do šesti skupin, ze kterých vyplývá systematické názvosloví. Toto názvosloví udává v názvu enzymu substrát, společně s typem katalyzované reakce a koncovkou -áza. (např. alkoholdehydrogenáza) [1].

## 1.3 Klasifikace enzymů

Díky rozdělení enzymů do tříd, podtříd a skupin je možné enzymu přiřadit čtyřmístný kód v klasifikaci EC (Enzyme Commission). Na prvním místě tohoto kódu je číslo hlavní třídy, na druhém místě je číslo podtřídy, na třetím místě je číslo skupiny a na posledním čtvrtém místě je číslo enzymu v dané skupině (obrázek 1).



Obrázek 1: Princip označování enzymů kódem (vytvořeno, zdroj informací [1])

Podle typu katalyzované reakce lze enzymy rozdělit do šesti následujících skupin.

### 1.3.1 Oxidoreduktázy

Oxidoreduktázy jsou povahou složeny bílkoviny, které katalyzují intermolekulové oxidačně redukční reakce. Dělíme je podle způsobu, jak tyto intermolekulové oxidačně redukční reakce uskutečňují. Dehydrogenázy nebo transhydrogenázy realizují přesun atomů vodíku, transelektronázy realizují přesun elektronů a oxygenázy vestavují atom kyslíku do molekuly substrátu. Dále se dělí na podtřídy podle funkčních skupin, které jsou donory elektronů nebo vodíku. Zastoupením jsou oxidoreduktázy jednou z nejpočetnějších skupin enzymů. Příkladem reakce katalyzované oxidoreduktázou je vratná dehydrogenace laktátu na pyruvát pomocí laktátdehydrogenázy [1,2].

### 1.3.2 Transferázy

Transferázy jsou složeny bílkoviny podílející se na přenosu skupin methyl, amino, zbytek glukózy atd. v aktivované formě z jejich donoru na akceptor. Často přenášenou skupinou jsou také fosfáty. Enzymy realizující tento přenos se nazývají kinázy. Transferázy se rozdělují na podtřídy podle charakteru přenášených skupin. Příkladem reakce katalyzované transferázou je přenos aminoskupiny z aminokyseliny na oxokyselinu pomocí aminotransferázy [1,3].

### 1.3.3 Hydrolázy

Hydrolázy jsou ve většině případů jednoduché bílkoviny, které hydrolyticky štěpí vazby vzniklé kondenzací (např. vazby peptidové, glykosidové, esterové). Rozdělují se na podtřídy podle typu štěpených vazeb. Hydrolázy jsou skupinou nejdéle známých enzymů a mají často původní nesystematické názvy. Příkladem reakce katalyzované hydrolázou je štěpení polypeptidu pomocí proteázy [1,2,4].

### 1.3.4 Lyázy

Lyázy jsou složeny bílkoviny katalyzující nehydrolytické štěpení a vznik energeticky nenáročných vazeb C-C, C-O, C-N. Principem těchto reakcí je štěpení nebo vnesení malé molekuly, jako je voda, oxid uhličitý, amoniak a další, do substrátu bez pomoci dalšího reaktantu. Lyázy patří mezi málo početné skupiny enzymů. Triviálně je označujeme jako syntházy. Na podtřídy se rozdělují podle typu štěpených nebo synthetisovaných vazeb. Příkladem reakce katalyzované lyázou (pyruvátdekarboxylázou) je odštěpení  $\text{CO}_2$  z pyruvátu za vzniku acetaldehydu [1].

### 1.3.5 Izomerázy

Izomerázy jsou ve většině případů jednoduché bílkoviny katalyzující intramolekulární přesuny atomů a skupin, které vedou ke vzniku izomerů. Jejich zastoupení je oproti ostatním skupinám minimální. Rozdělují se na podtřídy podle typu izomerie. Příkladem reakce katalyzované izomerázou (triózafosfátizomerázou) je vytvoření rovnováhy mezi glycerinaldehyd-3-fosfátem a dihydroxyacetonfosfátem [1].

### 1.3.6 Ligázy

Ligázy jsou složeny bílkoviny katalyzující vznik energeticky náročných vazeb za současného rozkladu látky poskytující velké množství energie, např. ATP. Stejně jako izomerázy jsou málo početnou skupinou. Triviálně se pro ně používá označení synthetáza a rozdělují se podle typu vytvářených vazeb. Příkladem reakce katalyzované ligázou (pyruvátdekarboxylázou) je zabudování  $\text{CO}_2$  do pyruvátu za vzniku oxalacetátu [1].



## 1.4 Struktura enzymu

### 1.4.1 Obecná struktura

Enzym je jednoduchá nebo častěji složená bílkovina (60–70%), výjimku tvoří pouze RNA molekuly, které mohou být také vysoce aktivními enzymy.

Složený enzym se skládá ze dvou částí, a to bílkovinné a nebílkovinné. Bílkovinná část složeného enzymu má stejnou strukturu jako jiné typy bílkovin. Nízkomolekulová nebílkovinná část složeného enzymu se nazývá kofaktor. Kofaktor je oproti enzymovým bílkovinám stálý při zahřívání a v enzymu plní funkci přenašeče skupin jednotlivých atomů nebo elektronů. Pokud je v enzymu kofaktor vázán na bílkovinnou část pevně, je nazýván prostetická skupina, v případě, že je kofaktor vázán na bílkovinnou část volně a může se od ní oddělit, nazýváme jej koenzym. Kofaktory jsou látky různé chemické povahy obsahující obvykle heterocyklus. Tento heterocyklus slouží jako reaktivní nebo rozpoznávací část enzymu. Mnohé kofaktory mají blízký vztah k vitaminům rozpustným ve vodě a obsahují zbytek kyseliny fosforečné. Kofaktory se řadí do skupin podle funkcí, nikoli podle struktury.

Skupinu enzymů majících ve svých strukturách kovové ionty nazýváme metaloenzymy. Nejčastější kovové ionty vyskytující se v enzymech jsou  $Zn^{2+}$  (alkoholdehydrogenáza),  $Mg^{2+}$  (fosfatáza),  $Mn^{2+}$  (hexokianáza),  $Fe^{2+}$ ;  $Fe^{3+}$  (cytochromy),  $Cu^{2+}$  (tyrosináza),  $K^+$  (pyruvátkináza) a  $Na^+$  (ATPáza). Kovové ionty jsou v některých případech součástí aktivních center, mohou ale sloužit také jako můstky pro vazbu substrátu nebo jako prvek stabilizující strukturu enzymu [1,2,4,5].

### 1.4.2 Aktivní centra a další klíčové oblasti enzymu

Aktivní centrum (aktivní místo) je malá část enzymu, na které probíhá samotná enzymová reakce. Je to oblast odpovědná za vazbu substrátu a v případě složených bílkovin i kofaktoru. V tomto místě nalezneme přesně rozmístěné funkční skupiny, které jsou součástí postranních řetězců aminokyselinových zbytků na polypeptidovém řetězci. Díky specifickému svinutí polypeptidového řetězce se funkční skupiny dostanou do bezprostřední blízkosti. Mezi skupiny tvořící aktivní centrum enzymu patří katalyticky aktivní skupiny tvořící katalytické centrum, skupiny schopné vázat substrát tvořící vazebné centrum a skupiny podílející se na tvorbě vhodného prostředí, včetně tvorby vhodné prostorové struktury.

Enzymy povahy složených bílkovin mají kromě aktivního centra ještě druhou vazebnou oblast. Tato vazebná oblast, se nachází v blízkosti vazebného centra pro substrát a zajišťuje

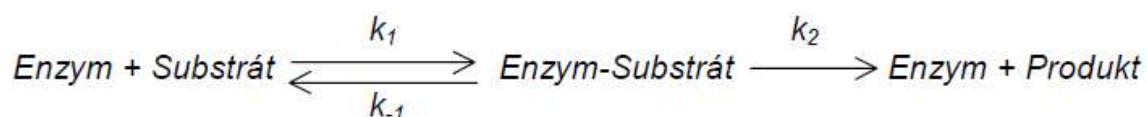
navázání koenzymu. Samotná enzymová reakce probíhá mezi vázaným substrátem a vázaným koenzymem, který se v tomto případě označuje jako kosubstrát.

Další důležité místo na molekule enzymu je stabilizační (aktivační) místo. Na toto místo se váží různé molekuly nebo ionty ovlivňující katalytickou funkci enzymu. Například ionty kovů se u některých enzymů podílí na stabilizaci struktury nebo její změně podmiňující nebo usnadňující aktivitu enzymu.

Posledním z míst ovlivňujících enzym je alosterické centrum u oligomerních enzymů vyskytujících se na důležitých místech metabolických drah. Na alosterické centrum se váže alosterický efektor, což je látka, která dokáže vyvolat malé konformační změny v molekule enzymu, a tím mění její aktivitu [1,2,5].

## 1.5 Kinetika enzymových reakcí

Nejjednodušší enzymové reakce přeměňují jeden substrát za vzniku jednoho produktu, takové reakce nazýváme jednosubstrátové. Zastoupení jednosubstrátových reakcí je stejně jako třísubstrátových, případně vícesubstrátových malé, nejčastější jsou dvousubstrátové reakce. Michaelis a Mentenová se zabývali kinetikou enzymových reakcí a navrhli mechanismus pro jednosubstrátové reakce, který vycházel z představy, že meziproduktem jednosubstrátové reakce je komplex enzym-substrát (obrázek 2) [1,3].

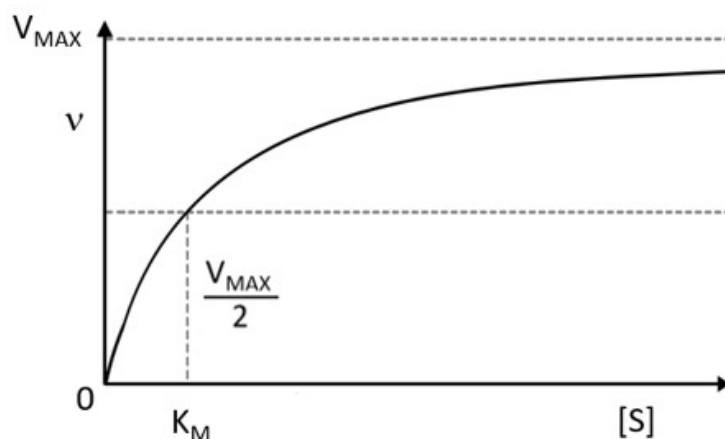


Obrázek 2: Schéma jednosubstrátové enzymové reakce podle Michaelise a Mentenové (převzato, [3])

Saturační křivka (obrázek 3) zobrazuje závislost rychlosti enzymově katalyzované reakce ( $v$ ) na koncentraci substrátu ( $[S]$ ). Z této křivky se dají odečíst parametry jako Michaelisova konstanta ( $K_M$ ) nebo mezní rychlost ( $V_{MAX}$ ), které nalezneme v odvozené rovnici Michaelise a Mentenové.

Rovnice Michaelise a Mentenové:

$$v = \frac{V_{MAX} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$



Obrázek 3: Saturační křivka (vytvořeno, zdroj informací [3])

Michaelisova konstanta je konstanta nezávislá na koncentraci enzymu, zato je závislá na prostředí (pH, teplota, přítomnost efektorů<sup>1</sup>), a proto je při jejím stanovování nutné udat také podmínky měření. Konstanta charakterizuje katalytické vlastnosti enzymu k příslušnému substrátu, čím je konstanta nižší, tím je afinita k substrátu vyšší. Obvyklé hodnoty  $K_M$  se pohybují v rozmezí  $10^{-1}$  až  $10^{-6}$  mol.dm<sup>-3</sup> [1].

Důležitost parametru mezní rychlosti  $V_{MAX}$  souvisí s jejím vztahem k rychlostní konstantě  $k_{cat}$ , která udává molekulovou/molární aktivitu enzymu. Při nasycení enzymu substrátem závisí rychlost reakce pouze na koncentraci enzymu:

$$v = V_{MAX} = k_{cat} \cdot [E_0]$$

Kromě určení parametrů  $K_M$  a  $V_{MAX}$  ze saturační křivky lze použít další metody pro stanovení těchto parametrů jako metodu Lineweaver-Burk a metodu Eadie-Hofstee [1,6].

V případě vztahu Lineweaver-Burk se jedná o přetransformovanou rovnici Michaelise a Mentenové do dvojnásobně recipročního lineárního tvaru:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{MAX}} + \frac{K_M}{V_{MAX}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

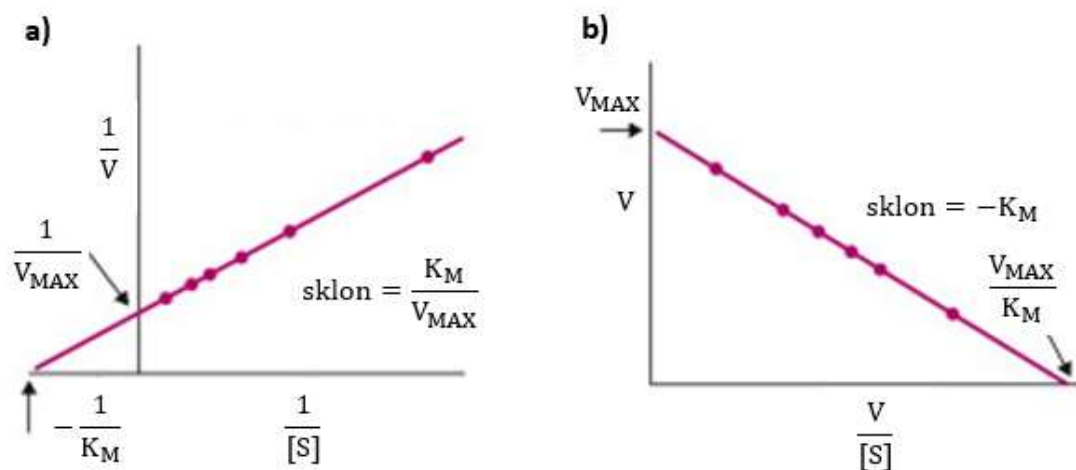
Grafické znázornění je na obrázku 4 a).

<sup>1</sup> Efektor nebo také modifikátor je látka pozitivně nebo negativně ovlivňující aktivitu enzymu. Pozitivní efekторы se nazývají aktivátory, negativní inhibitory [1].

V případě vztahu Eadie-Hofstee se opět jedná o lineární rovnici ve tvaru:

$$V = V_{\text{MAX}} - K_M \cdot \frac{V}{[S]}$$

Grafické znázornění je na obrázku 4 b).



Obrázek 4: Grafické metody pro stanovení  $K_M$  a  $V_{\text{MAX}}$  pomocí metody Lineweaver-Burk a Eadie-Hofstee (upraveno, [7])

Enzymovou reakci pro daný substrát tedy můžeme popsat hned několika parametry [1,6,8]:

- Michaelisova konstanta  $K_M$  v  $[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$  nebo  $[\text{M}]$ .
- Mezní rychlost  $V_{\text{MAX}}$   $[\text{M} \cdot \text{s}^{-1}]$ .
- Molekulová/molární aktivita enzymu (číslo přeměny)  $k_{\text{cat}}$  v  $[\text{s}^{-1}]$  vyjadřuje počet molekul/molů substrátu přeměněných molekulou/molem enzymu za sekundu.
- Katalytická efektivita enzymu  $k_{\text{cat}}/K_M$   $[\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}]$  je často udávaná hodnota pro porovnávání enzymů.

## 2 Umělé enzymy

Umělé enzymy jsou v této kapitole rozděleny do skupin podle struktury na:

- Umělé enzymy na bázi polymerů
- Umělé enzymy na bázi proteinů
- Umělé enzymy na bázi protilátek
- Umělé metaloenzymy

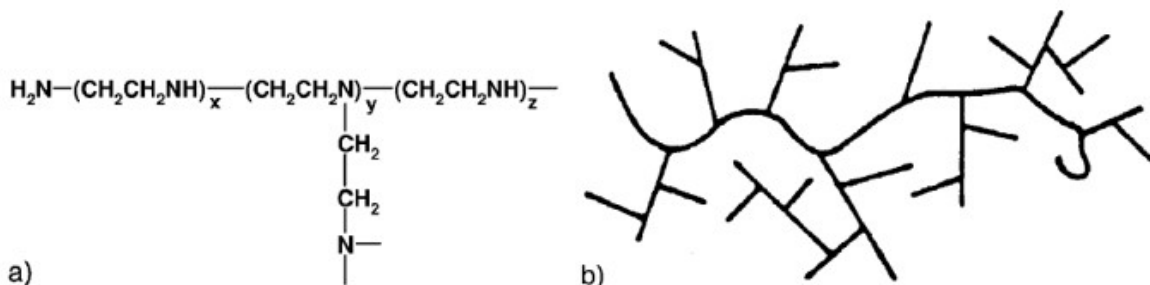
### 2.1 Umělé enzymy na bázi polymerů

Obecně je třeba při konstrukci enzymu postupovat ve dvou krocích. V prvním kroku je třeba najít vhodnou makromolekulu (polymer) a vytvořit na ní vazebná místa, v druhém kroku je třeba na makromolekulu zavést skupiny související se samotnou katalýzou [9].

Polymery s enzymovou aktivitou lze rozdělit do dvou skupin, a to na homogenní polymery a heterogenní polymery.

#### 2.1.1 Homogenní polymery s enzymovou aktivitou

Výchozím bodem pro výběr polymeru, který má v umělém enzymu funkci kostry, byl albumin. Albumin je neenzymatický protein se silnou afinitou k malým molekulám různé struktury. Během několika desetiletí bylo vyzkoušeno mnoho ve vodě rozpustných polymerů a nakonec byl nalezen polyethylenimin (PEI). Strukturální vzorec PEI je na obrázku 5 a) a rozvětvená struktura na obrázku 5 b). Přibližně 25 % dusíků ve struktuře PEI jsou primární aminy, což jsou skupiny vhodné pro připojení nepolárních skupin. Připravené deriváty PEI mají pozoruhodné vazebné vlastnosti, které dokonce předčí vazebné vlastnosti sérového albuminu [9,10].

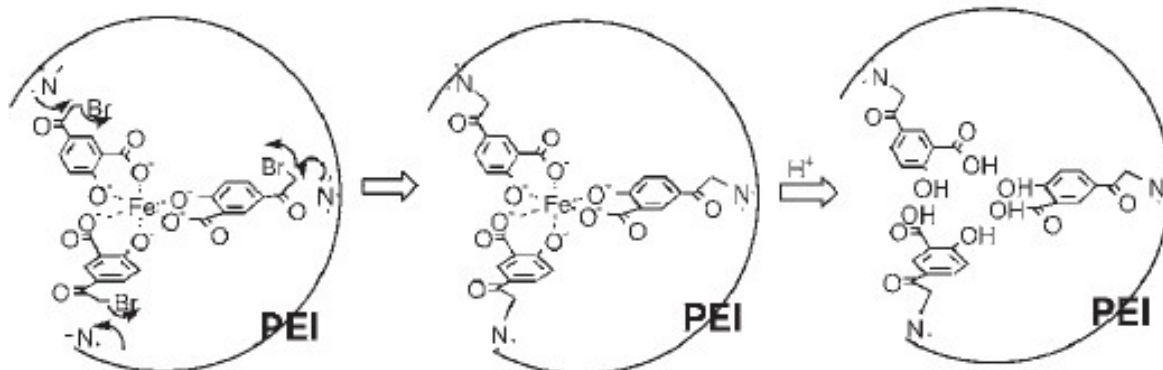


Obrázek 5: a) strukturální vzorec PEI; b) rozvětvená struktura PEI (převzato, [9])

Do struktury vybraného polymeru se zavádí katalytická skupina. Prvním způsobem je zavedení nukleofilu. Příkladem je imidazolová skupina, která se uplatňuje při hydrolýze

nitrofenolových esterů. Vytvořený polyethyleniminový polymer nesoucí 10 % dodecylových skupin a 15 % methylenimidazolových skupin hydrolyzuje nitrofenolové estery ( $k = 2700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Tento polymer má při reakci podstatně větší katalytickou účinnost než samotný imidazol ( $k = 10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ), ale menší ve srovnání s  $\alpha$ -chymotrypsinem ( $k = 10000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Další používané nukleofily jsou skupiny aktivní při přenosu acylové skupiny nitrofenolových esterů na nukleofil (hydroxamát, merkaptan, aldoxim, triazin). Dimethylaminopyridiny vázané na polymer fungují jako katalyzátory solvolýzy esterů.

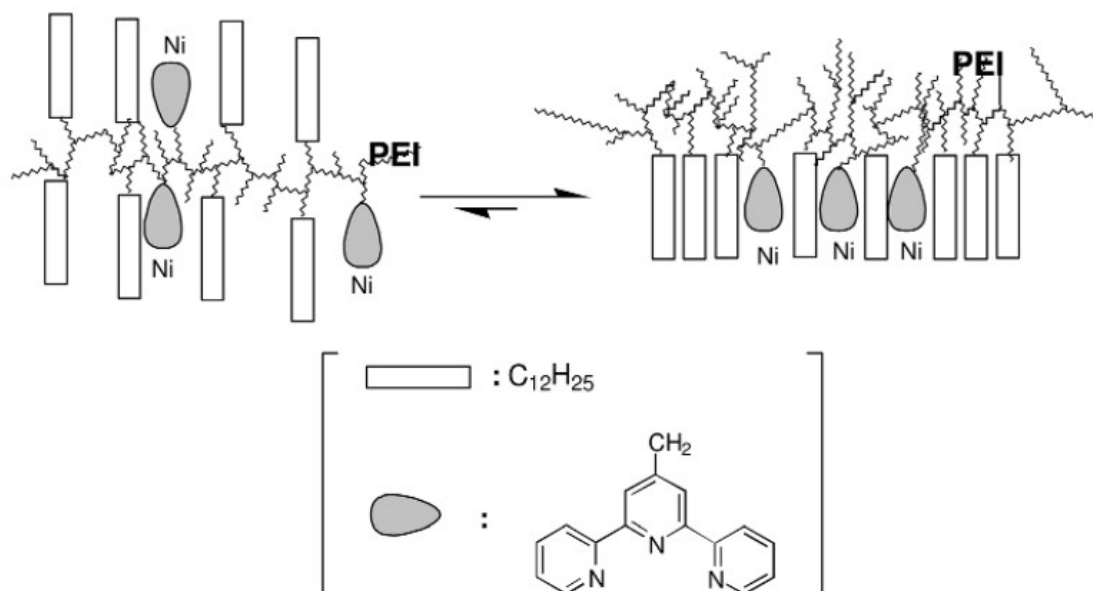
Další způsob přípravy polymerů s aktivitou enzymu je vytvoření aktivního místa s více katalytickými skupinami, které jsou v těsné blízkosti. Příkladem přírodních enzymů tímto typem aktivního centra jsou proteázy. První připravený polymer s aktivitou proteázy byl polyethylenimin se třemi salicylátovými zbytky v bezprostřední blízkosti. Schéma přípravy je na obrázku 6. Tři molekuly 4-bromacetylsalicylátu jsou navázány na iont  $\text{Fe(III)}$ , komplex je poté zesíťován pomocí reakce salicylátů a aminoskupin na PEI. Po odstranění  $\text{Fe(III)}$  iontu pomocí kyseliny získáme výsledný polyethylenimin se třemi salicylátovými zbytky v bezprostřední blízkosti. Proteolytická aktivita tohoto komplexu byla vyšší v porovnání s komplexem, na který byly salicyláty zavedeny náhodně [9,11,12].



Obrázek 6: Schéma přípravy umělé proteázy (převzato, [9])

Další polymery s aktivitou enzymu jsou PEI s adukty, které se samy sestavují do katalytických skupin. Kovové ionty se podílejí na katalytickém působení mnoha enzymů, například také při hydrolýze DNA a RNA. 2-hydroxypropyl-p-nitrofosfát (HPNPP) je látka používaná jako aktivovaný analog RNA. Transesterifikace HPNPP je katalyzována dvěma nebo více kovovými ionty působícími společně. Pro transesterifikaci HPNPP byly konstruovány jako katalyzátory komplexy kovů, katalyticky efektivnější se však ukázaly syntetické polymery získané náhodným připojením laurylových skupin a komplexů  $\text{Ni(II)}$  terpyridinu (TP) k PEI. Takový polymer je na obrázku 7 vlevo. Na pravé straně obrázku 7 je pak struktura, která se

samovolně tvoří ve vodě. Laurylové a Ni(II)TP zbytky v této struktuře tvoří hydrofobní shluky. Tyto shluky slouží jako aktivní místo, jehož katalytická aktivita je způsobena dvěma nebo více sousedícími kovovými ionty. Struktura aktivního místa závisí na obsahu laurylových a Ni(II)TP zbytků. Při transesterifikaci HPNPP se pravděpodobně využívá právě těchto aktivních míst s kovovými ionty [9].



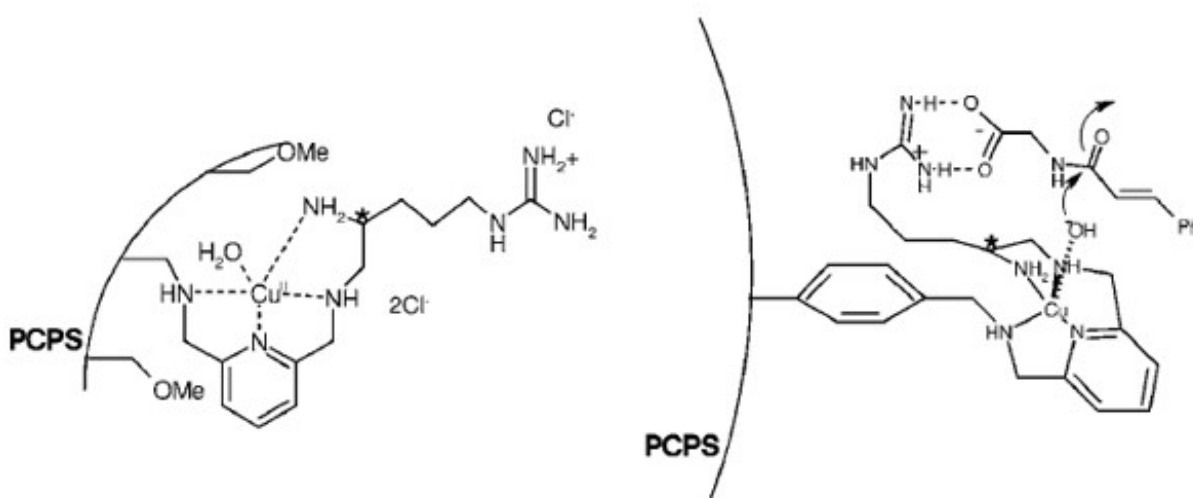
Obrázek 7: Polymer PEI s připojenými laurylovými skupinami a komplexy Ni(II)TP (převzato, [9])

### 2.1.2 Heterogenní polymery s enzymovou aktivitou

Jednou ze skupin heterogenních polymerů s enzymovou aktivitou jsou polymery s náhodně rozmístěnými katalytickými adukty. Pro tento druh katalyzátorů se používají rozvětvené nerozpustné polymery. Polymer s proteázovou aktivitou byl připraven například náhodným připojením imidazolu na poly(chlormethylstyren-co-divinylbenzen) (PCD). Nejlepší hydrolytickou aktivitu pro albumin při pH 7–9 měl katalyzátor s obsahem 22 molárních % imidazolu vázaného na PCD přes C2 uhlík. Při snížení počtu imidazolových skupin došlo ke zhoršení katalytické aktivity, což ukazuje, že aktivní místo polymeru je tvořeno dvěma nebo více imidazolovými skupinami. Další katalyzátor s proteázovou aktivitou byl vytvořen zavedením aldehydových skupin na silikagel. Tento katalyzátor vykazoval katalytickou aktivitu pro albumin a c-globulin. Proteolytickou aktivitu vykazoval i silikagel pokrytý různými organickými skupinami (karboxy, hydroxy, fenolické, imidazolové, merkaptó skupiny). Silikagel pokrytý histidiny a aldehydy poskytl nejlepší proteolytický účinek (poločas 50 min při pH 6–9 a 25,8 °C), kromě toho měl i širokou substrátovou specifitu (albumin, ovalbumin, hemoglobin, c-globulin) [9,13].

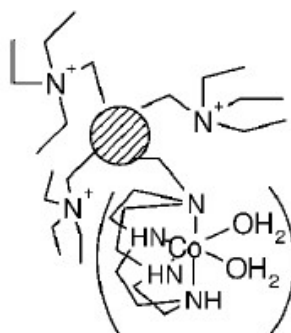
Podobně jako na homogenní polymery se i na heterogenní polymery zavádí katalytické skupiny, které jsou v těsné blízkosti. Jedním z takových polymerů je poly(aminomethylstyren-co-divinylbenzen) (PAD). Na tento polymer je možné stejným způsobem jako na PEI zavést 3 salicylové skupiny. Výsledný polymer hydrolyzuje albumin (při pH 3).

Částečně chlormethylovaný zesítěný polystyren (PCPS) modifikovaný katalytickou skupinou s kovovým iontem je na obrázku 8 vlevo. Princip fungování tohoto katalytického místa je na obrázku 8 vpravo. Díky struktuře katalytického místa tento polymerní katalyzátor na substrátu hydrolyzuje pouze amidové vazby, které sousedí s karboxylovou skupinou.



Obrázek 8: PCPS modifikovaný katalytickou skupinou s kovovým iontem (převzato, [9])

Další skupinou heterogenních katalytických polymerů jsou polymery s aktivitou nukleáz. Nejznámější syntetické katalyzátory pro hydrolyzu DNA jsou komplexy kovů. Jedním z nejúčinnějších komplexů s hydrolytickou aktivitou je Co(III) cyklen. Po připojení Co(III) cyklu k PCD (obrázek 9) se ukázalo, že je tento polymer 200 krát katalyticky účinnější při štěpení dvoušroubovicové DNA než samotný Co(III) cyklen [9,13].



Obrázek 9: Co(III) cyklen vázaný na PCD (převzato, [9])



## 2.2 Umělé enzymy na bázi proteinů

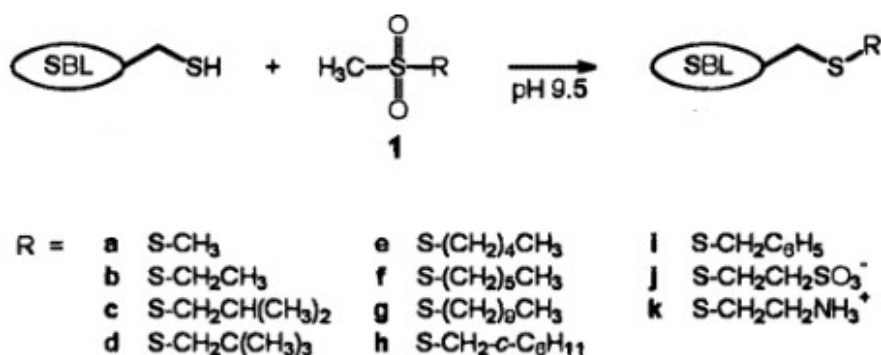
Polypeptidy jsou logickou volbou pro konstrukci umělých enzymů. Základem pro tvorbu umělého enzymu je buď protein s katalytickou aktivitou, nebo protein bez katalytické aktivity. Samotná příprava umělého enzymu spočívá v chemické modifikaci proteinu nebo v místně cílené mutagenезi proteinu spojené s chemickou modifikací [9,14].

### 2.2.1 Modifikace proteinů s enzymovou aktivitou

První chemicky modifikovaný protein vznikl už v roce 1985, kdy se Kaiserovi podařilo kovalentně navázat flavin na papain, a tak se změnila proteáza na nový enzym s aktivitou oxidoreduktázy. Modifikací enzymů pomocí různých činidel lze dosáhnout změny reaktivity, selektivity, tepelné stability a další odolnosti (např. pH). V některých případech má však tato změna vliv na aktivitu, například RNáza modifikovaná D-glukosaminem má vyšší tepelnou stabilitu, ale v porovnání s původní RNázou přišla o 80 % aktivity.

První polosyntetické enzymy schopné katalýzy tvorby vazby C-C vznikly také modifikací enzymu. Základem enzymu je papain, jehož cysteinová skupina byla modifikována analogem thiazolia. Thiazolopapainy jsou umělé enzymy katalyzující dekarboxylaci kyseliny pyrohroznové a také tvorbu vazby C-C na 6-oxoheptanal.

Místně cílená mutagenезe spojená s chemickou modifikací je druhou metodou, kterou lze upravit enzym. Zavedení funkční skupiny do molekuly proteinu místně cílenou mutagenезí je velice výhodný způsob, jak získat dobře modifikovatelný enzym. Příkladem je mutagenезe a chemická modifikace subtilisinu izolovaného z *Bacillus lentus* (SBL). Místně cílenou mutagenезí se dosáhne produkce SBL s cysteinovým zbytkem v aktivním místě. Thiolová skupina cysteinu reaguje s různě substituovaným methanthiosulfonátem za vzniku CMM (chemicky modifikovaného mutantu) s navázanou -R skupinou (obrázek 10) [15,16].



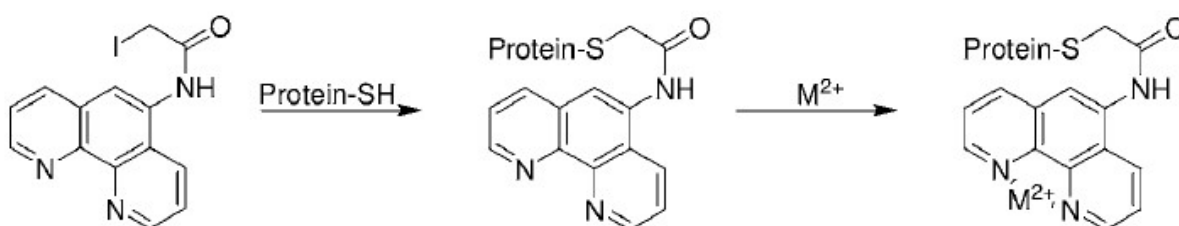
Obrázek 10: Schéma chemické modifikace subtilisinu s thiolovou skupinou pomocí R-substituovaného methanthiosulfonátu (převzato; [17])

Tento přístup byl použit také pro glukozylázu. Místně cílenou mutagenezí se na enzym zavedl cystein, který byl poté oxidován na cystein-sulfinovou kyselinu.  $k_{cat}/K_M$  vzrostl po modifikaci pro hydrolyzu maltózy 1,8 krát [15].

## 2.2.2 Modifikace proteinů bez enzymové aktivity

### Umělé nukleázy založené na DNA vazebných proteinech

Stejně jako u modifikace katalyticky aktivních proteinů se při mutagenezí zavede na určené místo v proteinové struktuře thiolová skupina, která je následně chemicky modifikována. Takovým příkladem je příprava umělé nukleázy, pro kterou byl jako výchozí protein použit *Escherichia coli* tryptofanový represor (TrpR), což je protein, který se specificky váže na DNA. Na tomto represoru se lysinová aminoskupina mutagenezí změnila na cysteinovou skupinu. Thiolová skupina cysteinu pak reagovala s 5-(jodoacetamido)-1,10-fenatrolinem. 1,10-fenatrolin (OP) měďnatý komplex je komplex štěpící fosfodiesterovou vazbu nukleových kyselin. Vzniklý TrpR-OP byl koordinován Cu(II) ionty za vzniku komplexu TrpR-OP-Cu(II), což je enzym, který se specificky váže na DNA a má aktivitu nukleázy. Schéma syntézy tohoto enzymu je obecně znázorněno na obrázku 11.

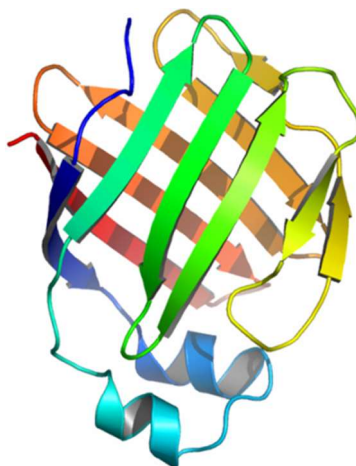


Obrázek 11: Obecné schéma tvorby umělých enzymů na bázi proteinu s použitím OP a kovových iontů (převzato; [9])

Pro tvorbu umělých nukleáz výše zmíněným způsobem je možné využít i další specificky se vázající proteiny jako katabolický aktivační protein nebo *Escherichia coli* Fis protein. Tímto způsobem připravené nukleázy využívají k efektivnímu štěpení hydrolytický kov, který je díky vazbě protein-DNA v blízkosti řetězce DNA. Kromě OP váže kovový iont dobře také činidlo EDTA. Konjugáty Fe-EDTA proteinu jsou kromě štěpení DNA a RNA schopny štěpit i peptidovou vazbu [9,16,18].

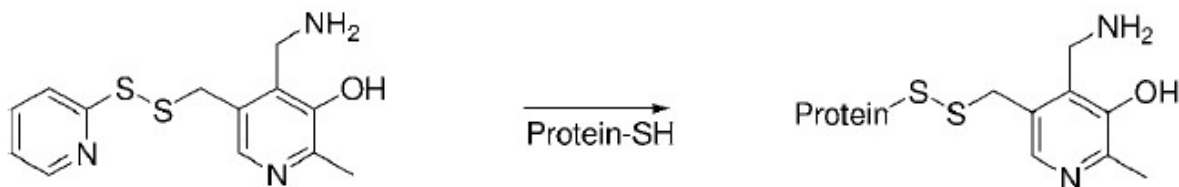
## Umělé enzymy na bázi dutých proteinů vázajících lipidy

Kostru těchto umělých enzymů tvoří duté proteiny vázající lipidy, které se typicky nacházejí v eukaryotických buňkách. Struktura takového proteinu je na obrázku 12. Dutina proteinu slouží v umělém enzymu jako vazebné místo pro ligand.



Obrázek 12: Struktura dutého proteinu (převzato; [19])

Pro přípravu umělého enzymu využívajícího dutiny v proteinu byl využit ALBP (adipocytární protein vázající mastné kyseliny), který má ve své struktuře cysteinový zbytek. Tento protein byl modifikován TP-PX (pyridoxaminové činidlo) činidlem, které obsahuje aktivovaný disulfid (obrázek 13).



Obrázek 13: Schéma reakce TP-PX činidla s proteinem obsahujícím thiolovou skupinu (převzato; [9])

Vzniklý ALBP-PX reduktivně aminoval různé  $\alpha$ -keto kyseliny na aminokyseliny s 0-94 % ee. Proteinová dutina v tomto případě slouží jako selektivní část enzymu, jelikož oproti volnému pyridoxaminu nedošlo k výraznému zvýšení rychlosti. Pro srovnání byly na různé polohy IFABP (intestinální protein vázající mastné kyseliny) mutagenézí zavedeny cysteinové zbytky, které poté reagovaly s činidlem TP-PX. IFABP-PX měly ve srovnání s ALBP-PX rozdílné rychlosti, opačnou enantioselektivitu nebo jinou selektivitu. Z těchto experimentů je jasné, že poloha kofaktoru hraje klíčovou roli pro vlastnosti enzymů. K proteinům ALBP a IFABP modifikovaným TP-PX činidlem byly přidány také kovové ionty Zn(II), Cu(II), Ni(II), Al(III). Přítomnost kovových iontů se pozitivně nebo negativně projevila

na rychlosti reakce a také vedla ke snížení enantioselektivity. Dále bylo vytvořeno pyridoxalové činidlo modifikované lysinovým zbytkem (PX-K). Lysinový zbytek umožňuje v reakčním cyklu tvorbu Schiffovy báze a slouží jako obecná kyselina nebo zásada. Vzniklý IFABP-PX-K vykazoval v porovnání s holým pyridoxalfosfátem 4200 krát vyšší katalytickou účinnost.

Proteiny s dutinou byly použity také pro syntézu hydrolytických enzymů. Příkladem je ALBP modifikovaný OP a koordinovaný Cu(II). ALBP-OP-Cu(II) hydrolyzoval za mírných podmínek neaktivované estery aminokyselin. Rychlost hydrolyzy se zvýšila na 32 až 280 násobek v porovnání s hydrolyzou ve vodném pufovaném roztoku, avšak v porovnání s neenzymovým komplexem Cu(II)bipyridinu byla  $k_{cat}$  nižší [9,16,20-22].

### **Umělé enzymy na bázi myoglobinu**

Myoglobin je protein, na který se nekovalentně váže hem. Toto vazebné místo bylo použito pro modifikaci jinými ligandovými systémy, například komplexy Mn(III) a Cr(III) salofenů. Cr(III) salofen nekovalentně vázaný na apo-myoglobin vykazoval šestinásobně vyšší sulfoxidační aktivitu v porovnání s volným Cr(III) salofenem. Na apo-myoglobin byl také mutagenézí zaveden cysteinový zbytek, který následně reagoval s Mn(III) salenem za vzniku kovalentní vazby. Výsledný enzym měl nízkou sulfoxidační aktivitu díky ukotvení salenu v jednom místě, a tedy možné existenci ligandu ve více konformacích. Po ukotvení salenu na dvou místech došlo ke zvýšení rychlosti sulfoxidace thioanisolu a zvýšení enantioselektivity z původních 13 na 51 % ee [9].

Výše uvedené příklady ukazují, že většina činidel pro modifikaci proteinů využívá thiolové skupiny přítomné v cysteinu. Existuje také alternativní přístup, kterým lze nahradit chemickou modifikaci. Tento přístup spočívá v částečné proteolýze nebo chemickém štěpení proteinu, v němž vzniknou fragmenty. Vybraný fragment je nahrazen modifikovaným fragmentem a poté je protein znovu sestaven (rekonstituován).

Obecně tyto umělé enzymy nedosahují účinnosti přírodních enzymů, avšak u některých došlo k obdivuhodnému zvýšení rychlosti reakce. Spousta z výše zmíněných přístupů by se neobešla bez počítačového modelování. Počítačové modelování je nepostradatelným pomocníkem při tvorbě nových enzymů i při interpretaci výsledků [9,16,23].

## 2.3 Umělé enzymy na bázi protilátek

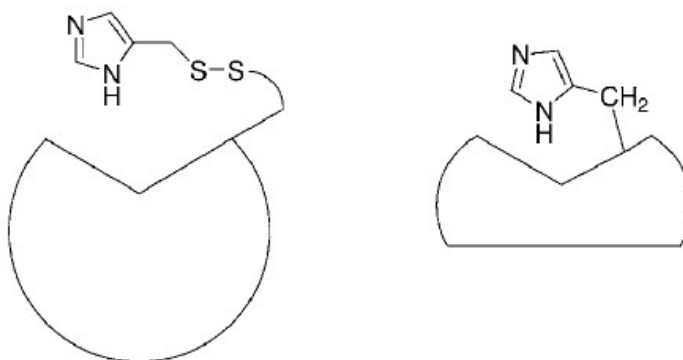
Imunitní systém savců má jedinečnou schopnost tvořit vysoce afinitní receptorové molekuly nazývané protilátky. Těto vlastnosti se využívá také pro tvorbu umělých enzymů. Protilátka je v organismu vytvořena na základě haptenu, tedy malé molekuly, která je po navázání na nosič schopna vyvolat tvorbu protilátek. V této části jsou uvedeny umělé enzymy vytvořené modifikací protilátky a také umělé enzymy jako protilátky vytvořené na základě analogu přechodného stavu dané reakce [24].

### Umělé enzymy vytvořené modifikací protilátek

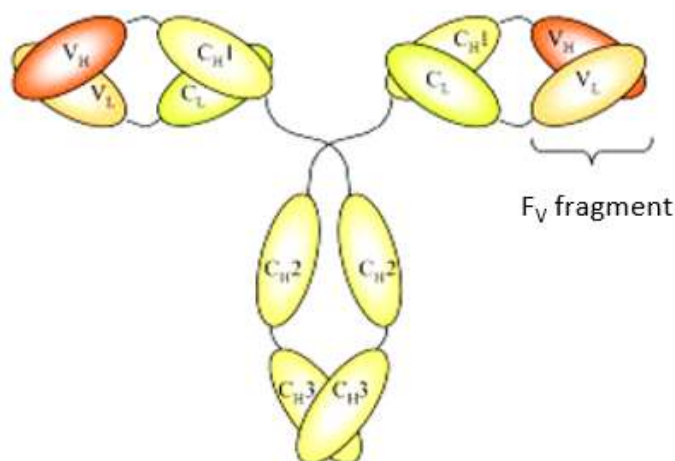
Umělý enzym je možné stejně jako u proteinů vytvořit chemickou modifikací protilátky, případně kombinací mutagenese a chemické modifikace protilátky.

Protilátka MOPC 315 váže specificky substituované 2,4-dinitrofenoly s asociační konstantou  $5 \cdot 10^4$  až  $1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Chemická modifikace protilátky (obrázek 14 vlevo) spočívala v zavedení imidazolu prostřednictvím navázání histidinové skupiny na aktivní místo protilátky disulfidickým můstkem. Vzniklý umělý enzym vykazoval hydrolytickou aktivitu pro estery kumarinu, která byla  $10^3$  krát vyšší než u volného 4-methylimidazolu.

Imidazolová skupina byla do fragmentu MOPC 315 zavedena také mutagenézí (obrázek 14 vpravo). V *Escherichia coli* byl vyprodukován  $V_L$  řetězec, ve kterém byl tyrosinový zbytek (Y34) zaměněn mutagenézí na histidin. Umělý enzym (Fv fragment protilátky – obrázek 15) byl zkonstruován rekonstitucí  $V_H$  řetězce protilátky a  $V_L$  řetězce z *Escherichia coli*. Tento mutant katalyzoval hydrolýzu 7-hydroxykumarin esterů 5-(2,4-dinitrofenyl)aminopentanové kyseliny 90000 krát rychleji než 4-methylimidazol. U protilátky vytvořené mutagenézí došlo k šestnáctinásobnému zvýšení rychlosti reakcí v porovnání s chemicky modifikovanou protilátkou [9,16].



Obrázek 14: Porovnání protilátky modifikované chemicky (vlevo) a protilátky modifikované mutagenézí (vpravo) (převzato; [9])

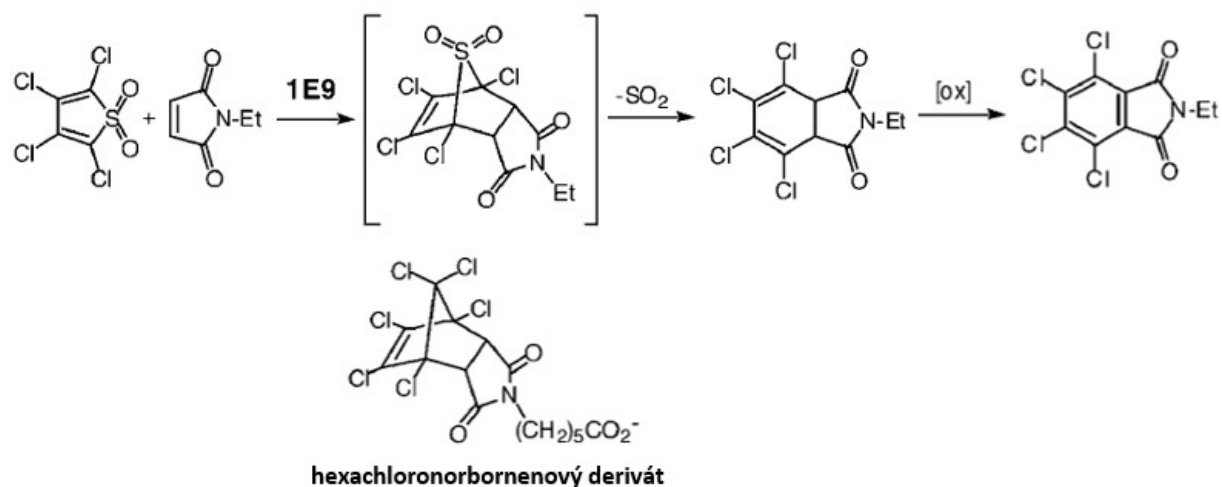


Obrázek 15: Struktura protilátky (upraveno, [25])

### Protilátky vytvořené na základě analogu přechodného stavu dané reakce

Možnost vytvoření katalytické protilátky na základě komplementarity s přechodným stavem předpokládal už v roce 1969 W. P. Jencks. U tohoto typu umělých enzymů je hapten analog přechodného stavu dané reakce. Katalytický účinek spočívá ve zrychlení reakce tím, že se protilátka snaží, aby se navázané substráty podobaly přechodnému stavu. Příkladem takové reakce je Diels-Alderova cykloadice (obrázek 16), kde reaguje tetrachlorothiophendioxid s N-ethylmaleimidem. Přechodný stav reakce je uveden na obrázku v hranaté závorce. Tato reakce je katalyzována protilátkou 1E9 vytvořenou na základě analogu přechodného stavu, hexachloronorborenovým derivátů.

Tímto způsobem byly vytvořeny umělé enzymy pro katalýzu reakcí, které žádné přírodní enzymy katalyzovat nedokážou. Protilátkové enzymy jsou doposud nejúspěšnějšími katalyzátory napodobujícími enzymy [9,23,26].



Obrázek 16: Diels–Alderova reakce katalyzovaná protilátkou 1E9 (upraveno; [9])

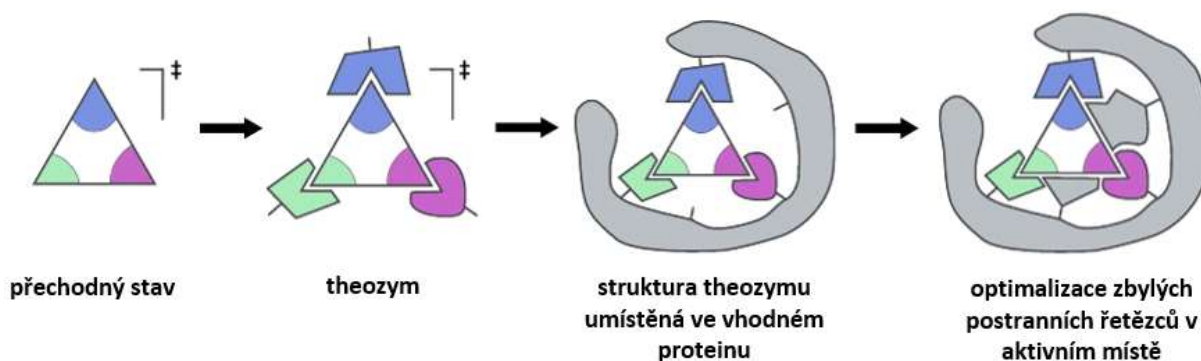
## 2.4 Umělé metaloenzymy

Další skupinou umělých enzymů jsou metaloenzymy, tedy enzymy, jejichž struktura obsahuje kov. Několik příkladů umělých enzymů, které mají ve své struktuře kov, již bylo zmíněno v předchozích kapitolách. Tato část se zaměřuje na strategie pro tvorbu proteinových metaloenzymů a také na kovové komplexy s aktivitou enzymu.

### 2.4.1 Proteinové metaloenzymy

#### Výpočetní design

Jednou z metod používaných pro tvorbu umělých enzymů i umělých metaloenzymů je výpočetní design. Proces tvorby takového umělého enzymu zahrnuje několik kroků (obrázek 17). Prvním krokem je konstrukce theozymu (teoretického enzymu), který je tvořen na základě přechodného stavu dané reakce metodami kvantové chemie. Theozym tvoří několik katalytických skupin ve správné geometrii, které se mohou nekovalentně vázat přechodný stav. Dalším krokem je vyhledání správného proteinu (pomocí databáze), do jehož aktivního centra je možné theozym umístit. Následně jsou mutacemi upraveny další části aktivního centra tak, aby zlepšilo navázání přechodného stavu. Takovýchto návrhů se tvoří velké množství, pro samotný experiment jsou ale vybrány jen ty s nejlepšími teoretickými parametry. Tato metoda umožňuje tvořit úplně nové enzymy na základě znalosti reakce. Enzymy připravené touto metodou mají obvykle malou katalytickou aktivitu, lze je však dále upravit například metodou řízené evoluce [27-30].



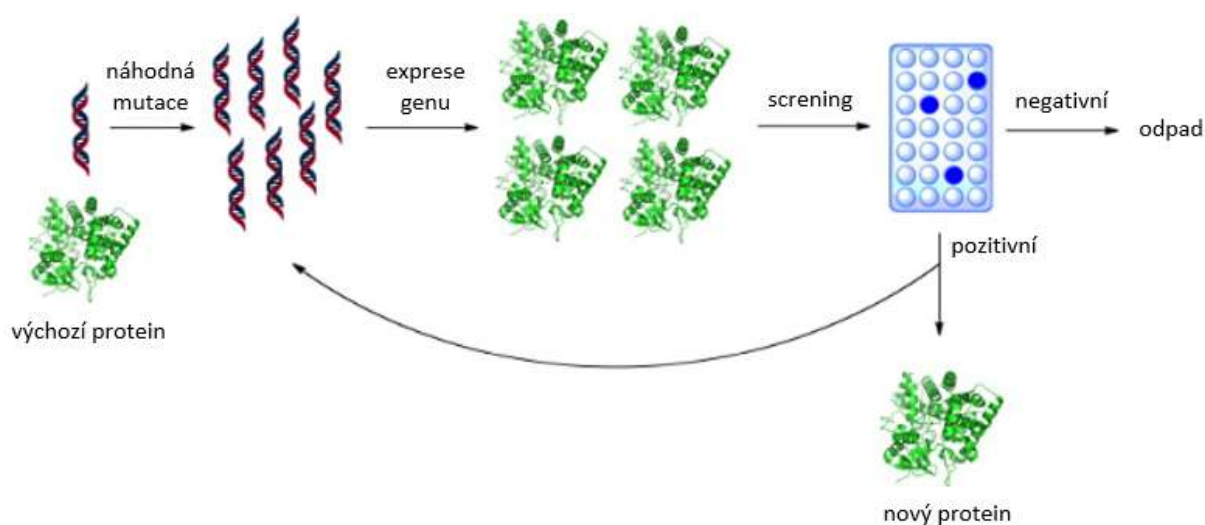
Obrázek 17: Schéma výpočetního designu pro tvorbu umělých enzymů (upraveno, [30])

#### Metoda řízené evoluce

Metoda řízené evoluce může využít jako výchozí bod jakoukoliv reakci, pro kterou má protein měřitelnou aktivitu. Kromě parametrů (aktivita, stabilita, selektivita) pro hlavní katalyzované reakce lze tedy upravit také parametry i pro vedlejší katalyzované reakce, které

mají obvykle nízkou aktivitu, rychlost a jiný substrát než hlavní reakce. Vytvoří se tak nový enzym specializovaný na původně vedlejší reakci.

Proces řízené evoluce je znázorněn na obrázku 18. Gen z rodičovského enzymu je podroben náhodné mutaci, čímž se vytvoří knihovna genů. Expresí mutantních genů se získají proteiny, které jsou podrobeny screeningu na požadovanou vlastnost. Pokud protein požadovanou vlastnost nemá, je vyřazen. V případě, že protein požadovanou vlastnost má, je buď poslán do dalšího cyklu, aby se vlastnosti ještě upravily, nebo už je dovyvinut [23,27].



Obrázek 18: Vývoj nového enzymu pomocí řízené evoluce enzymu (upraveno, [23])

Příkladem využití této metody je úprava cytochromu P450<sub>BM3</sub>. Tento cytochrom katalyzuje hydroxylaci dlouhých řetězců mastných kyselin. Krátké řetězce tento metaloenzym nerozpoznává. Řízenou evolucí byla nejprve zvýšena aktivita enzymu a následně byla několika cykly upravována substrátová specifita do té doby, než bylo dosaženo délky rozpoznávaného řetězce ethan, propan [23].

#### 2.4.2 Kovové komplexy s aktivitou enzymu

Dalším druhem metaloenzymů jsou komplexní sloučeniny. Tyto komplexy napodobují aktivní místa enzymů. Komplexy se skládají ze dvou částí, a to z jádra a ligandu/ligandů. Jádro tvoří nejčastěji ionty přechodných kovů nebo lanthanoidů. Komplex může obsahovat jedno, dvě, tři nebo čtyři jádra. Druhá část, tedy ligand/ligandy, jsou organické nebo anorganické molekuly, které koordinují jádro, případně jádra. Díky velké rozmanitosti ligandů je možné vytvořit širokou škálu komplexů s požadovanými vlastnostmi. Ligandy mění vlastnosti komplexů, jako je rychlost reakce, selektivita a stabilita v různých roztocích (rozdílné pH, teplota a polarita) a další. Nejznámější ligandy jsou makrocyclické, bipyridinové,



monodentátové a polydentátové. Ačkoli se ligandy liší ve struktuře, několik pravidel musí vždy dodržet, a to je vzdálenost jádra včetně příslušných úhlů, geometrické struktury a tvary, koordinační číslo a poloha kolem iontu, případně iontů. Vlastnosti komplexu však záleží také na kovovém iontu, při syntéze komplexů se shodnými ligandy a odlišnými kovovými ionty měly tyto komplexy vzájemně odlišné charakteristiky.

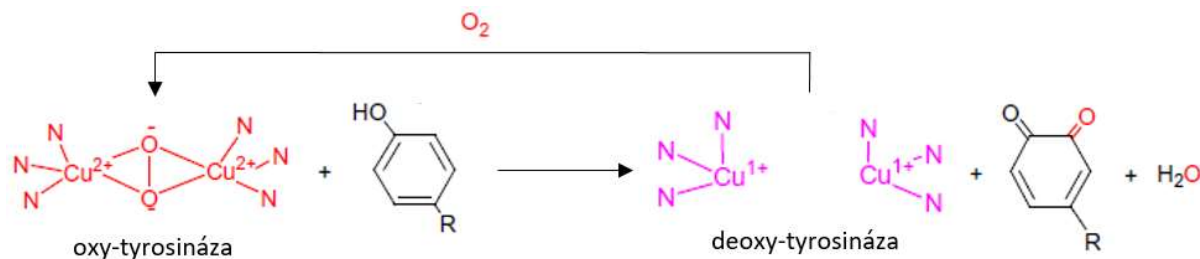
Ze všech kovových iontů vzbudila pro syntézu komplexů s aktivitou enzymů největší zájem měď, a to díky své vyšší aktivitě v porovnání s ostatními ionty, nízké ceně, dobré dostupnosti, koordinačnímu stavu a aktivitě v mírných podmínkách. Zájem byl podpořen také jejím poměrně častým výskytem v přírodních enzimech [31].

### 2.4.3 Tyrosináza a komplexy s aktivitou tyrosinázy

Tyrosináza stejně jako katecholáza a hemocyanyiny patří do skupiny enzymů s aktivním místem typu 3 obsahujícím dva atomy Cu, přičemž je každý atom Cu obklopen třemi histidinovými zbytky. Charakteristickým rysem těchto aktivních míst je schopnost vázat O<sub>2</sub>.

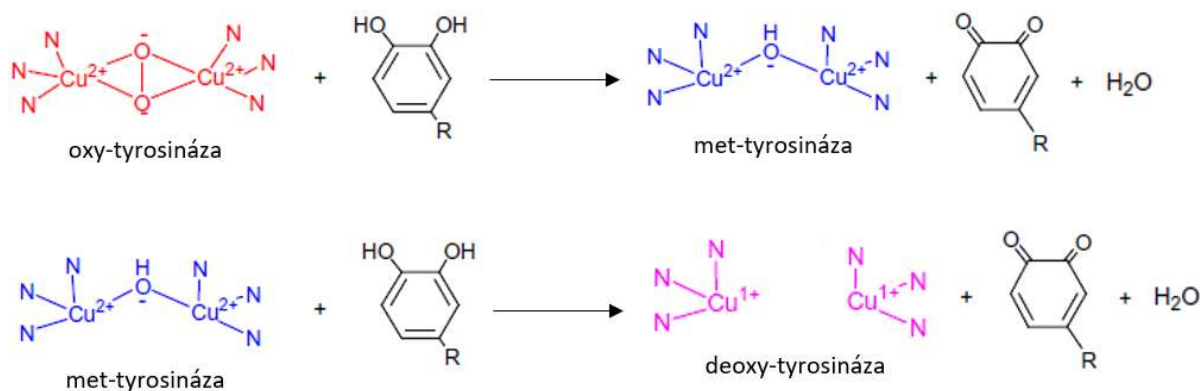
Tyrosináza existuje ve čtyřech oxidačních stavech aktivního centra: met-tyrosináza, deoxy-tyrosináza, oxy-tyrosináza a deact-tyrosináza. V přírodě se běžně vyskytuje met forma enzymu. Deact-forma je inaktivní forma enzymu vznikající zpracováním katecholu nikoli oxidací, ale monooxygenací. V tomto zpracování dochází k nevratné redukci jedné z mědí na Cu(0) a následně jejímu difundování z aktivního centra.

Tyrosináza katalyzuje jedním mechanismem monooxygenaci fenolu na orto-chinon (aktivita monooxygenázy) a druhým mechanismem oxidaci katecholu na orto-chinon (aktivita katecholoxidázy). Primární funkcí tyrosinázy je monooxygenace fenolu. Do této reakce vstupuje fenol, který reaguje s oxy-tyrosinázou za vzniku orto-chinonu a deoxy-tyrosinázy (obrázek 19). Vzniklá deoxy-tyrosináza se oxiduje O<sub>2</sub> za vzniku oxy-tyrosinázy, a tak tato reakce může probíhat do vyčerpání fenolu nebo O<sub>2</sub> [32].



Obrázek 19: Monooxygenace fenolu na orto-chinon pomocí oxy-tyrosinázy (upraveno, [32])

Druhý mechanismus probíhá ve dvou krocích (obrázek 20). První krok je oxidace katecholu oxy-tyrosinázou za vzniku orto-chinonu a met-tyrosinázy. Vzniklá met-tyrosináza je v druhém kroku schopná oxidovat další molekulu katecholu na orto-chinon. Deoxy-tyrosináza vznikající v druhém kroku je regenerována O<sub>2</sub> stejně jako u monooxygenace fenolů [32].



Obrázek 20: Oxidace katecholu na orto-chinon pomocí oxy-tyrosinázy a met-tyrosinázy (upraveno, [32])

V přírodě se tyrosináza vyskytuje v mnoha procesech. U obratlovců se tento enzym podílí na tvorbě melaninu, který způsobuje pigmentaci. Nedostatek nebo úplná absence tyrosinázy vedou k albinismu. Rostliny využívají oxidace katecholů jako obranných mechanismů proti hmyzu případně jako ochranu před patogeny v poraněných tkáních. Pro člověka je tyrosináza atraktivní pro její schopnost aktivace O<sub>2</sub> a zajímavé je i její využití pro detekci katecholaminů (DOPA, adrenalin, noradrenalin) u neurologických poruch [31,33-36].

Syntéza a studium komplexů napodobujících aktivitu tyrosinázy a katecholázy je předmětem výzkumu spoustu let. Literatura [31] udává několik klíčových faktorů, které ovlivňují aktivitu syntetických komplexů napodobujících aktivitu tyrosinázy a katecholázy. První z nich je počet jader, nejlepší aktivitu ze zkoumaných mono-, di-, tri- a tetranukleárních komplexů vykazují dinukleární komplexy. Dalším důležitým parametrem je vzdálenost Cu jader, ta by měla být v rozmezí 2,90–2,99 Å, kratší nebo delší vzdálenost aktivitu snižuje. Třetím faktorem je hydrofobnost prostředí, to je zajištěno vhodným typem ligandů vázaných na kovové jádro. Dalším faktorem je geometrie aktivního místa, které musí být dobře dostupné pro substrát. Poslední faktor je povaha rozpouštědla, aktivita stejného komplexu se může lišit v různých druzích rozpouštědla [31].

Tabulka 1 uvádí kinetické parametry přírodních enzymů s aktivitou katechol oxidázy, a to konkrétně pro katechol oxidázu izolovanou z byliny karabince evropského (*Lycopus*

*europaeus*), katechol oxidázu izolovanou ze sladkých brambor (*Ipomoea batatas*) a tyrosinázu izolovanou z hub [37,38].

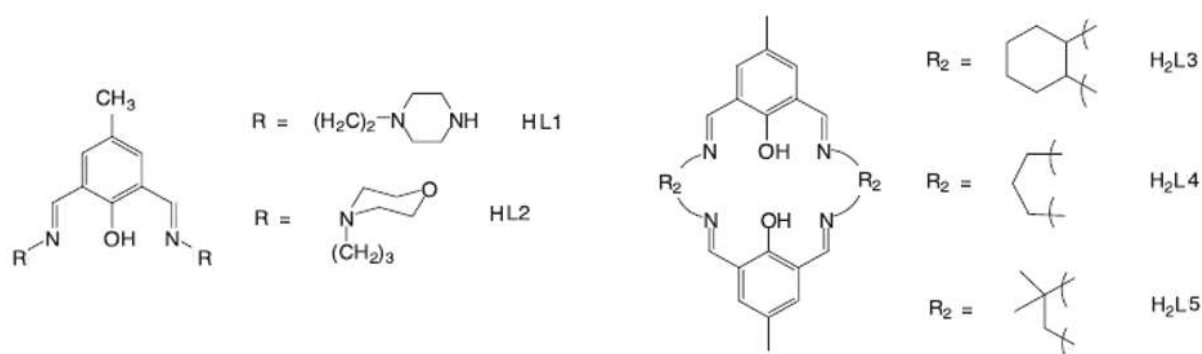
Tabulka 1: Kinetické parametry přírodních metaloenzymů pro oxidaci katecholu (převzato, [38])

Vzorec	Substrát	$k_{cat}$ [ $h^{-1}$ ]	$K_M$ [M]	$k_{cat}/K_M$ [ $mM^{-1}.s^{-1}$ ]	Zdroj
Katechol oxidáza ( <i>Lycopus europaeus</i> )	Katechol	$5,7.10^5$	$5,0.10^{-3}$	31,67	[39]
Katechol oxidáza ( <i>Ipomoea batatas</i> )	Katechol	$8,25.10^6$	$2,5.10^{-3}$	916,67	[40]
Tyrosináza (houby)	Katechol	$3,15.10^6$	$0,16.10^{-3}$	5463,13	[41]

V literatuře [38] je uvedeno celkem 127 komplexů mědi s aktivitou katechol oxidázy. Do tabulky 2 bylo vybráno 6 dinukleárních komplexů s aktivitou katechol oxidázy, které měly nejvyšší molární aktivitu. Přesto tyto komplexy nedosahují kinetických parametrů přírodních enzymů uvedených v tabulce 1.

Tabulka 2: Kinetické parametry umělých metaloenzymů na bázi mědi s aktivitou katechol oxidázy (převzato, [38])

Vzorec	Rozpouštědlo	$k_{cat}$ [ $h^{-1}$ ]	$K_M$ [M]	$k_{cat}/K_M$ [ $mM^{-1}.s^{-1}$ ]	Zdroj
$[Cu_2(H_2L1)(OH)(H_2O)(NO_3)]^{3+}$	Methanol	$3,24.10^4$	$2,3.10^{-3}$	3,91	[42]
$[Cu_2(L_2)(N_3)_3]$	Methanol	$2,88.10^4$	$0,7.10^{-3}$	11,42	[42]
$[Cu_2(L_3)(N_3)_2 \cdot 2H_2O]$	Acetonitril	$2,16.10^4$	$3,7.10^{-3}$	1,62	[43]
$[Cu_2(L_4)(N_3)_2 \cdot 2H_2O]$	Acetonitril	$2,16.10^4$	$9,7.10^{-3}$	0,62	[42]
$[Cu_2(L_5)(N_3)_2 \cdot 2H_2O]$	Acetonitril	$1,8.10^4$	$3,4.10^{-3}$	1,47	[42]
$[Cu_2(L_3)(N_3)_2 \cdot 2H_2O]$	Methanol	$1,8.10^4$	$2,3.10^{-3}$	2,17	[42]



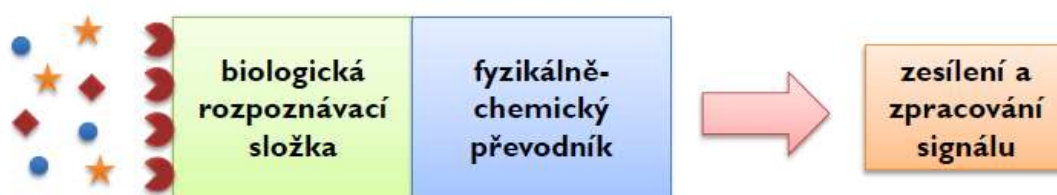
Obrázek 21: Struktury ligandů uvedených v tabulce 2 (upraveno, [38])

### 3 Možnosti při konstrukci biosenzorů

Definice popisuje biosenzor následovně:

*„Biosenzor je analytický přístroj obsahující citlivý prvek biologického původu, který je buď součástí, nebo v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem. Poskytuje průběžný elektronický signál, který je přímo úměrný koncentraci jedné nebo několika (skupiny) chemických látek ve vzorku“ [44]*

Obecné schéma biosenzoru znázorňuje obrázek 22.



Obrázek 22: Obecné schéma biosenzoru (převzato, [45])

Biologická rozpoznávací složka biosenzoru může být biokatalytická nebo bioafinitní. Biokatalytické složky přeměňují sledovanou složku enzymovou reakcí a patří mezi ně enzymy, buňky, tkáně, organely a organismy. Bioafinitní složky tvoří se sledovanou látkou komplex a patří mezi ně lektin, protilátky, nukleové kyseliny a receptory.

Fyzikálně-chemické převodníky poskytují signál vhodný pro další zpracování. Tyto převodníky lze rozdělit do čtyř skupin [44]:

- Elektrochemické – potenciometrie, amperometrie, konduktometrie a voltametrie
- Optické – fotometrie, fluorimetrie, luminometrie a nelineární optika
- Piezoelektrické a akustické
- Kalorimetrické

#### Enzymové biosenzory

U enzymových biosenzorů je analytem obvykle substrát pro enzymovou reakci. Rozpoznávací část může tvořit jeden enzym, více kooperujících enzymů, případně buňky nebo tkáňové řezy, které mají enzymovou aktivitu. Nejčastěji používaným fyzikálně chemickým převodníkem je elektrodový, nebo optický systém. Tabulka 3 uvádí přehled používaných enzymových biosenzorických stanovení [44].

Tabulka 3: Přehled enzymových biosenzorických stanovení (vytvořeno, zdroj dat [44])

Skupina stanovovaných látek	Stanovovaná látka	Místo využití stanovení	Používaný enzym / skupina enzymů (zdroj enzymu)
Sacharidy	Glukóza	Klinická praxe, potravinářství	Glukóza oxidáza ( <i>Aspergillus niger</i> / <i>Penicillium notatum</i> )
			Glukóza dehydrogenáza ( <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> )
			Pyranóza oxidáza
	Galaktóza	Klinická praxe	Galaktóza oxidáza
	Fruktóza	Potravinářství	Fruktóza dehydrogenáza
	Sacharóza	Potravinářství	Invertáza + mutarotáza + glukóza oxidáza
	Laktóza	Potravinářství	$\beta$ -galaktosidáza + glukóza oxidáza
Maltóza	Potravinářství	Maltáza	
Sacharidy	Škrob	Potravinářství	Glukoamyláza někdy společně s $\alpha$ -amylázou + glukóza oxidáza
	Vitaminy	Kyselina askorbová	Potravinářství, vitaminové preparáty
Alkoholy a fenoly	Ethanol	Alkoholické nápoje, klinická praxe	Alkohol oxidáza ( <i>Pichia pastoris</i> )
	Cholesterol	Klinická praxe, potravinářství	Cholesterol oxidáza
	Esterově vázaný cholesterol	Klinická praxe, potravinářství	Cholesterol oxidáza + cholesterol esterhydroláza
	Cholin	Medicína	Cholin oxidáza ( <i>Alcaligenes</i> sp)
	Fenoly	Životní prostředí, potravinářství	Tyrosináza (žampiony / tkáňový řez) / lakáza ( <i>Polyporus versicolor</i> )
Karboxylové kyseliny a aminokyseliny	Kyselina mléčná (L-laktát)	Klinická praxe, sportovní medicína, potravinářství	Cytochrom b <sub>2</sub> (z kvasinek / přímo kvasinky) / laktát oxidáza ( <i>Pediococcus</i> )
	Kyselina mléčná (D-laktát)		D-laktát dehydrogenáza
	Kyselina jablečná	Potravinářství	Malát dehydrogenáza
	Kyselina oxaloctová	Klinická praxe	Oxalát oxidáza
	Kyselina močová	Klinická praxe	Urikáza
	$\Sigma$ L-aminokyselin	Potravinářství	Oxidáza L-aminokyselin
	Lysin	Krmiva	Lysin dekarboxyláza ( <i>Escherichia coli</i> / <i>Bacterium cadaveris</i> ) + diaminoxidáza (hrách)
	Kyselina glutamová	Potravinářství	Glutamát oxidáza
	Mastné kyseliny (palmitová, olejová)	Klinická praxe, potravinářství	Acyl-CoA syntáza + Acyl-CoA oxidáza
	Kyselina siřičitá	Potravinářství	Sulfit oxidáza
Dusíkaté sloučeniny	Močovina	Klinická praxe	Ureáza
	Polyaminy	Klinická praxe, potravinářství	Diaminoxidáza
	Purinové báze	Potravinářství	Xanthin oxidáza + nukleosid fosforyláza + nukleotidáza + AMP deamináza
Estery a amidy	Acetylcholin	Klinická praxe	Acetylcholinesteráza (krvinky / elektrický úhoř) + cholin oxidáza
	Fosfolipidy	Klinická praxe	Fosfolipáza D + cholin oxidáza
	Triglyceridy	Klinická praxe	Lipáza + glycerol dehydrogenáza / lipáza + glycerol kináza + glycerolfosfát oxidáza
	Penicilin	Fermentační výroba	$\beta$ -laktamáza / penicilinamidáza

## **4 Možnosti zakotvení enzymu/komplexu na elektrodový povrch**

V této kapitole je uveden přehled možných způsobů zakotvení enzymu nebo komplexu s enzymovou aktivitou na elektrodový povrch. Konstrukce biosenzoru a volba imobilizační techniky závisí jak na druhu imobilizovaného enzymu/komplexu, tak na druhu analyzovaného vzorku. Imobilizační matrice může sloužit čistě jako podpora nebo se může podílet na přenosu signálu. Způsob imobilizace enzymu/komplexu ovlivňuje vlastnosti senzoru, jako výkonnost, životnost, lineární rozsah, selektivita nebo doba odezvy [22,46].

### **4.1 Mechanická imobilizace enzymu/komplexu**

Mechanické zachycení enzymu/komplexu zahrnuje jednoduché metody využívané při vývoji biosenzorů. Jedna metoda spočívá v nanesení roztoku enzymu/komplexu na elektrodový povrch a následné překrytí vrstvy dialyzační membránou. Dialyzační membrána nanesenou komponentu mechanicky zadržuje u převodníku a zároveň je propustná pro analyt. Druhá metoda zachytává enzym/komplex pomocí adsorpce a používá se u grafitových povrchů. Jedná se o reverzibilní proces závislý na podmínkách (pH, iontová síla, teplota) [44].

### **4.2 Zachycení enzymu/komplexu v gelu, polymeru nebo pastě**

Polymerové povrchy s imobilizovanou komponentou enzymu/komplexu se připravují z polymeračních směsí různého složení, do kterých je tato komponenta přidána. Polymerace se iniciuje pomocí záření nebo chemického činidla. Polymery používané jako základ membrány jsou polyakrylamid, polyvinylalkohol, poly(2-hydroxyethylmethakrylát) a polyuretan.

Další polymer využívaný pro imobilizaci je Nafion. Nafion se dodává rozpuštěný ve směsi alkoholů s vodou. Membrána se připravuje kápnutím směsi Nafionu a enzymu/komplexu na povrch elektrody a následným zaschnutím směsi. Mimo selektivní schopnost má Nafion také schopnost kumulovat kationty a odpuzovat anionty, čehož se využívá pro zvýšení citlivosti amperometrických měření.

Povrchy, jejichž základem je želatina, se připravují smísením roztoku želatiny o teplotě 40–50 °C s enzymem/komplexem a následným nalitím směsi na vhodný povrch. Ztuhlá želatinová membrána (12 hod při 4 °C) se pak přiloží na převodník a překryje dialyzační membránou.

Další materiál, se kterým se kombinují enzym/komplex, je chitin nebo chitosan. Výhody těchto materiálů jsou biokompatibilita, biologická rozložitelnost, fyziologická inertnost, vysoká afinita k proteinům, schopnost tvorby gelu a množství skupin vhodných pro přímou imobilizaci

komponenty. Zejména díky biokompatibilitě a biologické rozložitelnosti se zájem o chitosan zvyšuje a lze jej díky nim označit za ekologický polymer [22,44,46].

Komponentu enzym/komplex je možné imobilizovat i do uhlíkové pasty. Příprava takové pastové elektrody je poměrně jednoduchá. Z grafitového prášku, nujolu a biomolekuly se připraví pasta, která se natlačí do dutiny, a připojí se k ní kontakt například z Ag, nebo Cu drátu [47,48].

### **4.3 Zesítnění enzymu/komplexu**

Membránu lze vytvořit také zesítněním enzymů nejčastěji pomocí glutaraldehydu. Reakce spočívá v interakci mezi aldehydovou skupinou a aminoskupinou enzymu/komplexu. Produktem této reakce je Schiffova báze, která se může zredukovat na aminovou vazbu. Pro reakci se volí různý poměr enzymu/komplexu a aldehydu, který ovlivňuje průchodnost membrány. Někdy se do směsi přidává také bílkovina s velkým počtem volných aminoskupin (albumin), což zvyšuje stabilitu membrány. Nezreagovaný aldehyd se může zneutralizovat glycinem nebo ethanolaminem. Zesítnění může u některých typů proteinových biokatalyzátorů vést ke zvýšení jejich stability, stability v organických rozpouštědlech nebo úpravě termální stability [15,44].

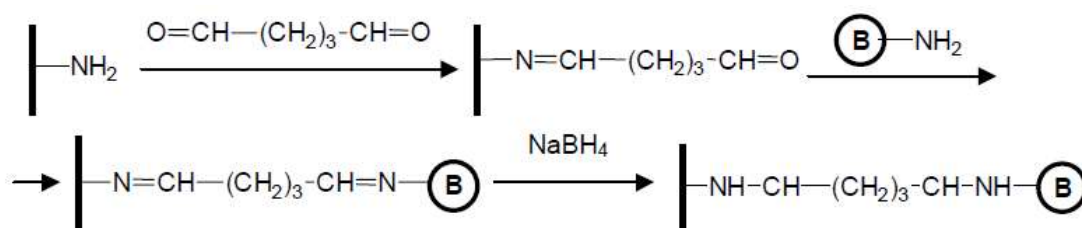
### **4.4 Kovalentní imobilizace enzymu/komplexu**

Pro tento druh imobilizace je třeba používané málo reaktivní povrchy elektrod (sklo, křemík, různé modifikace uhlíku, ušlechtilé kovy Au, Ag, Pt) nejprve upravit. K tomu se využívá například silanizace, tvorba monovrstev nebo aktivace polymerních materiálů. Těmito metodami se na povrch elektrody zavedou reaktivní skupiny jako aminoskupina, karboxyskupina, hydroxyskupina, thiolová skupina, případně další reaktivní skupina, na které je následně možné kovalentně vázat enzym/komplex [44].

Modifikace povrchu elektrody polymerem s reaktivní skupinou je další možností přípravy elektrody pro kovalentní navázání enzymu/komplexu nahrazující složitější a zdlouhavější postupy zahrnující nejprve přípravu povrchu elektrody a následně zavádění reaktivních skupin. Polymer, kterým můžeme tyto postupy nahradit, je například polymaleimidostyren. Polymaleidostyren se připravuje polymerací N-4-vinylfenylmaleimidu iniciovanou roztokem tetrahydrofuranu. Maleimidová skupina na polymeru je schopná reagovat s thiolovou skupinou nebo aminoskupinou na enzymu/komplexu [22,49].

## Aminoskupina

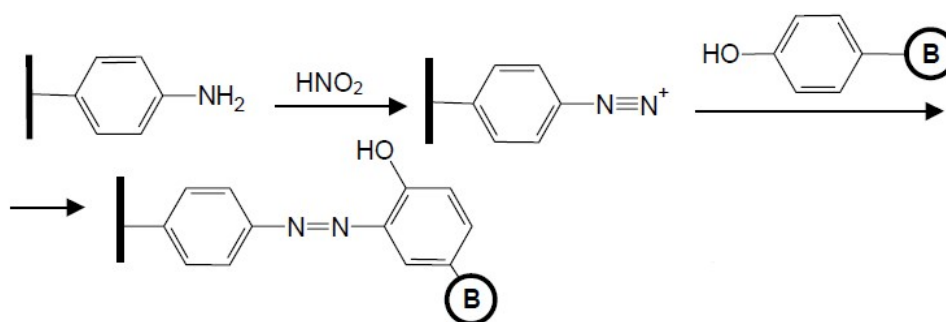
Povrch s navázanou aminoskupinou je nejpoužívanější. Na aminoskupinu můžeme navázat enzym/komplex hned několika způsoby. Prvním způsobem je reakce, v níž reaguje vhodné činidlo s aminoskupinou na upraveném povrchu a po přidání enzymu/komplexu také s aminoskupinou vázanou v této molekule (obrázek 23). V některých případech se ještě provádí redukce Schiffových bází borohydridem za vzniku stabilnějších vazeb. Činidla používaná pro tento druh imobilizace jsou glutaraldehyd, chloranil, dianhydridu kyseliny benzentetrakarboxylové a trans-stilben-(4,4'-diisothiokyanátu)-2,2'-disulfonové kyseliny.



Obrázek 23: Princip navázání enzymu/komplexu obsahujícího aminoskupinu na povrch s aminoskupinou pomocí glutaraldehydu (převzato, [44])

Dalším způsobem navázání je reakce aminoskupiny s thiofosgenem za vzniku isothiokyanátu. Isothiokyanát pak reaguje s aminoskupinou na biomolekule za vzniku substituované thiomocoviny.

Další metodu lze využít, pokud je aminoskupina vázaná na aromát. V tomto případě lze provést diazotaci a po ní navázat na diazoniovou sůl tyrosinový zbytek na enzymu/komplexu (obrázek 24) [44].

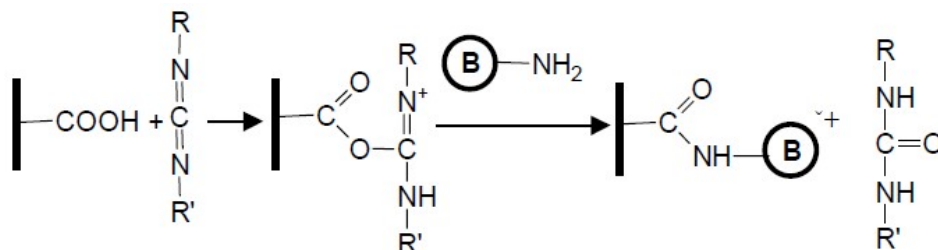


Obrázek 24: Princip navázání enzymu/komplexu obsahujícího aminoskupinu na povrch s aromatickou aminoskupinou pomocí diazotace (převzato, [44])



## Karboxyskupina

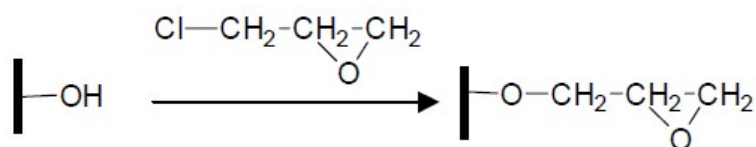
Karboxyskupina je druhou nejpoužívanější skupinou. Způsob navázání spočívá nejprve v aktivaci karboxyskupiny karboimidem a následně její reakcí s aminoskupinou na enzymu/komplexu (obrázek 25). Šetrnějším způsobem je aktivace pomocí směsi karboimidu a N-hydroxysukcinimidu [44].



Obrázek 25: Princip navázání enzymu/komplexu obsahujícího aminoskupinu na povrch s karboxyskupinou (převzato, [44])

## Hydroxyskupina

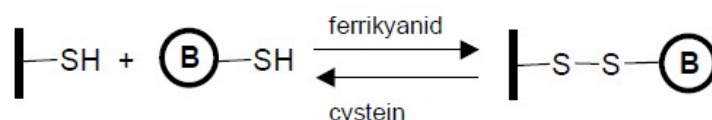
Hydroxyskupina často pochází ze sacharidové vrstvy, kterou je povrch elektrody modifikován. Způsob navázání spočívá nejprve v aktivaci hydroxyskupiny pomocí epichlorhydrinu (obrázek 26) a následné adici amino nebo hydroxyskupiny enzymu/komplexu [44].



Obrázek 26: Aktivace povrchu s hydroxyskupinou pomocí epichlorhydrinu (převzato, [44])

## Thiolová skupina

Thiolová skupina umožňuje vratnou imobilizaci enzymu/komplexu. Navázání spočívá v reakci thiolové skupiny s volnými cysteinovými zbytky enzymu/komplexu (obrázek 27) [44].



Obrázek 27: Princip navázání enzymu/komplexu s volnými cysteinovými zbytky na povrch s thiolovou skupinou (převzato, [44])

## 4.5 Elektropolymerace

Tento druh imobilizace spočívá v elektrochemické oxidaci monomerů, při níž se monomer převádí na reaktivní formu a tato reaktivní forma pak samovolně vytváří polymer na povrchu elektrody. Velikost prošlého náboje určuje tloušťku polymerové vrstvy na povrchu elektrody, což znamená, že se jedná o kontrolovatelný proces, a tím pádem i dobře opakovatelný způsob imobilizace. Enzym/komplex, který chceme do vrstvy imobilizovat, je v roztoku společně s monomery a při polymeraci se zachytává do vznikajícího filmu. Zachycení biomolekul v polymeru je poměrně volné a časem dochází k jejich vyplavení. Z tohoto důvodu se vrstvy využívají spíše jako výchozí úprava povrchu elektrod pro další chemické reakce. Nejvíce se u biosenzorů používají polymery z pyrolu a anilinu, méně používané jsou polymery z thiofenu, methylpyrolu a fenolu.

Elektropolymerovat lze i deriváty biomolekul, ty se připraví například připojením pyrolu na postranní řetězec enzymu/komplexu. Takto připravený derivát už se dá elektropolymerovat a výsledkem je elektroda pokrytá polymerem, jehož součástí je enzym/komplex.

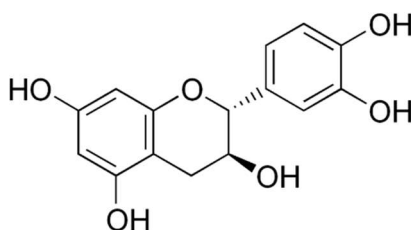
Elektrody používané pro elektropolymerace jsou běžné elektrody z materiálů jako Au, Pt, skelný uhlík. Místo si mezi nimi však našly i elektrody z metalizovaných plastů (pozlacený Mylar), elektrody z uhlíkové plsti, elektrody ze zesíteného skelného uhlíku, tištěné elektrody nebo naprašované elektrody [22,44,50-52].

## 5 Senzory na bázi umělých enzymů pro elektroanalýzu

Následující část je zaměřena na příklady stanovení fenolických látek pomocí senzorů s umělými metaloenzymy.

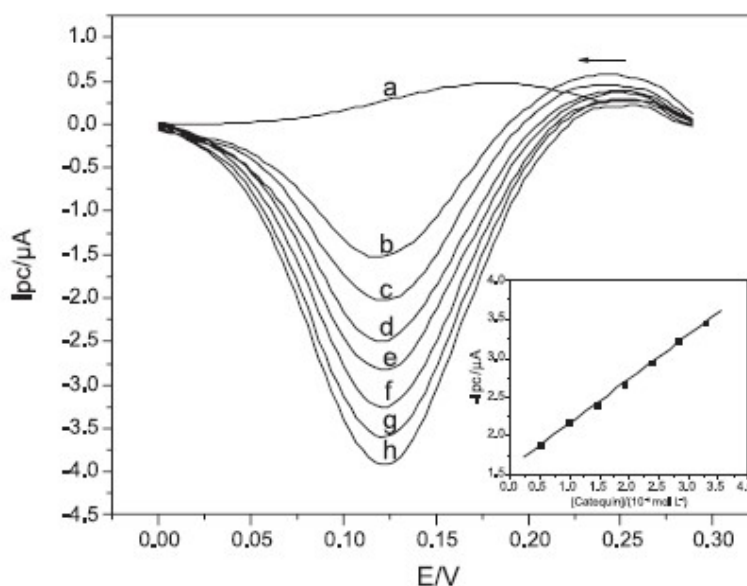
### 5.1 Stanovení katechinu

Literatura [47] popisuje vývoj a výsledky senzoru pro stanovení katechinu (obrázek 28) v čaji. Tento senzor je uhlíková pastová elektroda, v níž je začleněn dinukleární komplex mědi s aktivitou katechol oxidázy  $[\text{Cu}_2(\text{HL})(\mu\text{-CH}_3\text{COO})](\text{ClO}_4)$ . Ligand  $\text{H}_3\text{L}$  je  $N,N$ -[bis-(2-pyridylmethyl)]- $N',N'$ -[(2-hydroxybenzyl)(2-hydroxy-3,5-di-*terc*-butylbenzyl)]-1,3-propandi-amin-2-ol.



Obrázek 28: Katechin (převzato, [53])

Autoři v článku [47] naměřili a publikovali pro senzor následující data. Square wave voltamogramy získané měřením roztoků o různých koncentracích katechinu jsou na obrázku 29. Konstruovaný senzor má lineární rozsah měření od  $4,95 \cdot 10^{-6}$  M do  $3,27 \cdot 10^{-5}$  M katechinu, dále detekční limit  $2,8 \cdot 10^{-7}$  M katechinu a kvantifikační limit na  $3,5 \cdot 10^{-7}$  M katechinu.



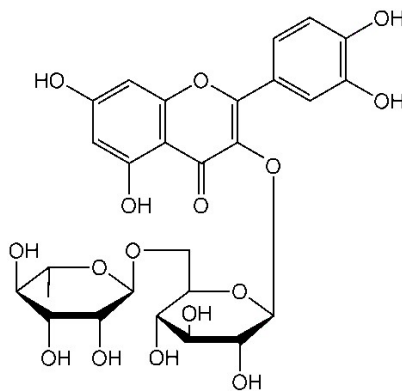
Obrázek 29: Square wave voltamogramy pro různé koncentrace katechinu (převzato, [47])

Další z popsaných parametrů je selektivita. Selektivita biosenzoru byla zkoumána pomocí přísadků různých látek (kofein, epikatechin, epigalokatechin, epikatechin galát, kyselina gallová, guajakol, kyselina fulová, kyselina p-kumarová, kyselina vanilová, sacharóza, glukóza, fruktóza, kyselina benzoová, kyselina citronová, kyselina vinná, kyselina fumarová). Žádná z těchto látek nerušila stanovení, a proto lze senzor považovat za selektivní.

Výsledky měření pomocí zkonstruovaného biosenzoru byly s výsledky získanými kapilární elektroforézou v 95% shodě. Při měření standardních roztoků získali autoři výsledky v rozmezí 93,8 % až 106,9 %. Popsaný senzor měl při 12 po sobě jdoucích měřeních roztoku katechinu RSD 3,4 %. Tři nezávisle připravené senzory mají při měření RSD 4,2 %. Senzor po 800 stanoveních provedených v rozmezí 270 dnů nevykazuje žádné změny v odezvě [47].

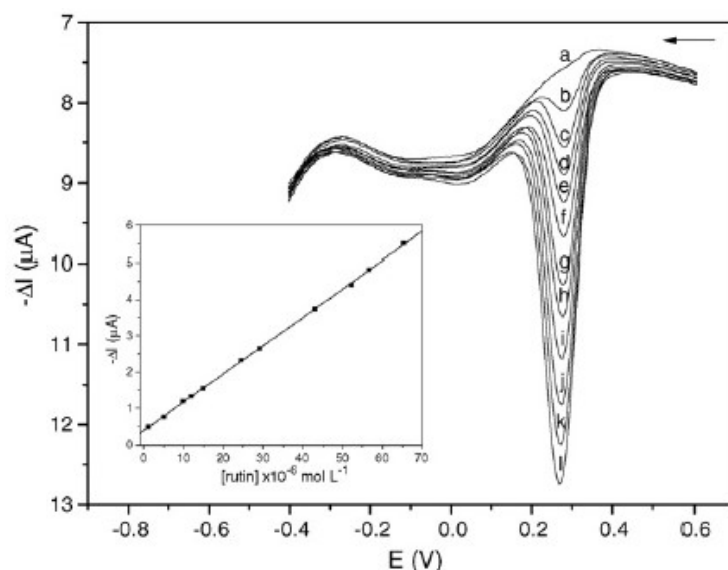
## 5.2 Stanovení rutinu

Literatura [53] popisuje vývoj a výsledky senzoru pro stanovení rutinu (obrázek 30) ve farmaceutických vzorcích. Tento senzor je uhlíková pastová elektroda, v níž je začleněn dinukleární komplex manganu s aktivitou peroxidázy  $[\text{Mn}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{II}}(\text{Ldtb})(\mu\text{-OAc})_2]\text{BPh}_4$ . Ligand  $\text{H}_2\text{Ldtb}$  je 2-[*N,N*-bis(2-pyridylmethyl)-aminomethyl]-6-[*N*-(3,5-di-*tert*-butyl-2-oxidobenzyl)-*N*-(2-pyridylamino)aminomethyl]-4-methylfenol.



Obrázek 30: Rutin (převzato, [53])

Autoři v článku [53] naměřili a získali pro senzor následující data. Square wave voltamogramy získané měřením roztoků o různých koncentracích rutinu jsou na obrázku 31. Konstruovaný senzor má lineární rozsah měření od  $9,99 \cdot 10^{-7}$  M do  $6,54 \cdot 10^{-5}$  M rutinu a detekční limit na  $1,75 \cdot 10^{-7}$  M rutinu.



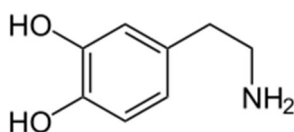
Obrázek 31: Square wave voltamogramy pro různé koncentrace rutinu (převzato, [53])

Autoři dále porovnávají výsledky měření pomocí zkonstruovaného biosenzoru s oficiální metodou pro stanovení rutinu (95% shoda). Výsledky při měření standardních roztoků byly v rozmezí 96,6 % až 103,2 %. Popsaný senzor má při šesti po sobě jdoucích měřeních roztoku rutinu RSD 1,85 %. Tři nezávisle připravené biosenzory mají při měření stejného roztoku RSD 2,08 %. Senzor po 750 stanoveních provedených v rozmezí 200 dnů nevykazuje žádné změny v odezvě.

U tohoto senzoru byla provedena studie na citlivost pro další fenolické látky. Nejvyšší citlivost má biosenzor na rutin, dále pak citlivost klesá v pořadí kyselina kávová, katechin, dopamin, kyselina chlorogenová, katechol, hydrochinon a adrenalin [53].

### 5.3 Stanovení dopaminu

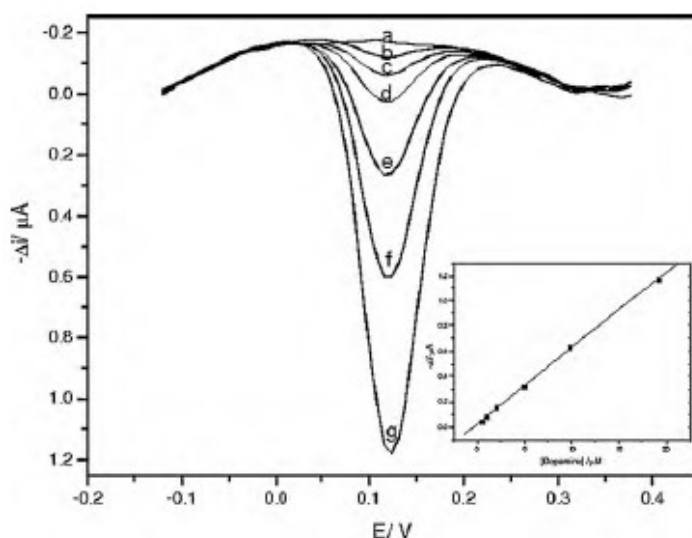
Literatura [54] popisuje vývoj a výsledky senzoru pro stanovení dopaminu (obrázek 32) ve farmaceutických vzorcích. Tento senzor je zlatá elektroda modifikovaná dinukleárním komplexem mědi s aktivitou katechol oxidázy  $[\text{Cu}^{\text{II}}_2(\text{Ldtb})(\mu\text{-OCH}_3)](\text{BPh})_4$  a potažená chitosanovým filmem. Ligand Ldtb je  $\{2\text{-}[N,N\text{-bis}(2\text{-pyridylmethyl})\text{aminomethyl}]\text{-6-[}N',N'\text{-}(3,5\text{-di-}i\text{terc}\text{-butylbenzyl-2-hydroxy})(2\text{-pyridylmethyl})\text{aminomethyl}]\text{-4-methylfenol}$ .



Obrázek 32: Dopamin (převzato, [53])

Autoři v článku [54] naměřili a získali pro senzor následující data. Square wave voltamogramy získané měřením roztoků o různých koncentracích dopaminu jsou na obrázku 33. Při optimálních podmínkách byla křivka lineární při koncentraci dopaminu v rozmezí od  $4,99 \cdot 10^{-7}$  M do  $1,92 \cdot 10^{-5}$  M dopaminu. Detekční limit byl stanoven na  $3,57 \cdot 10^{-7}$  M dopaminu a kvantifikační limit na  $1,07 \cdot 10^{-6}$  M dopaminu.

Při měření vzorků s různě vysokým obsahem kyseliny askorbové a kyseliny močové bylo zjištěno, že díky chitosanové vrstvě tyto interferující látky nezasahují do stanovení dopaminu.



Obrázek 33: Square wave voltamogramy pro různé koncentrace dopaminu (převzato, [54])

Výsledky měření vzorků senzorem byly také porovnány s oficiální metodou pro stanovení dopaminu a prokázaly 95% shodu s přijatelnou chybovostí. Při měření standardních roztoků byly výsledky v rozmezí 95,2 % až 102,6 %. Popsaný senzor má po osmi po sobě jdoucích měřeních roztoku dopaminu RSD 3,7 %, avšak po 70 stanoveních vykazuje velkou ztrátu aktivity. Pět nezávisle připravených biosenzorů má při měření stejného roztoku dopaminu RSD 4,2 % [54].

## Závěr

Cílem této práce bylo provést klasifikaci umělých enzymů, porovnat tyto enzymy s přírodními enzymy a zaměřit se na využití vybraných umělých enzymů v senzorech pro elektroanalýzu.

Umělé enzymy jsou na rozdíl od přírodních enzymů tvořeny poměrně pestrou škálou struktur. Využívají pro zachycení katalytických skupin nejen proteiny, ale také polymery, protilátky a další vysokomolekulární látky. Umělými enzymy mohou být též komplexní sloučeniny, které strukturou napodobují aktivní centrum přírodního enzymu, jako například komplexní metaloenzymy. Tato práce rozděluje umělé enzymy do čtyř skupin právě podle struktury. V jednotlivých skupinách jsou uvedeny příklady konkrétních enzymů a také přístupů používaných k jejich tvorbě. V kapitole umělé metaloenzymy je pozornost zaměřena také na porovnání vybraných komplexů mědi, které mají aktivitu katechol oxidázy s přírodními enzymy, které mají aktivitu katechol oxidázy. Kinetickými parametry vybrané komplexy mědi zdaleka nedosahují hodnot přírodních enzymů. Vybrané metalokomplexy však nejsou výjimkou, obecně lze o umělých enzimech říci, že jejich aktivity nedosahují aktivit přírodních enzymů.

Poslední část práce byla věnována využití vybraných umělých enzymů pro konstrukci senzorů. V této části jsou uvedeny tři publikované senzory na bázi umělých oxidáz, které byly vytvořeny za účelem stanovení vybraných fenolických látek. Publikované výsledky těchto senzorů svědčí o tom, že by je bylo možné využít i v praxi. Možnou nevýhodou, která se projevila u jednoho z popsanych senzorů, je ztráta aktivity po větším počtu měření.

Umělé enzymy jsou zajímavou dynamicky rozvíjející se oblastí. Neustále se zvyšuje počet nových umělých enzymů, které jsou tvořeny od jednoduchých způsobů, jakými je modifikace přírodních enzymů, až po vytváření zcela nových molekul založených na jiné struktuře. Díky spojení některých metod jako například výpočetní design s metodou řízené evoluce mohou vznikat umělé enzymy katalyzující reakce, které žádný přírodní enzym katalyzovat nedokáže. Umělé enzymy se jeví jako oblast s velkým potenciálem.

## 6 Použitá literatura

1. VODRÁŽKA, Z.; RAUCH, P.; KÁŠ, J. *Enzymologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Vys. šk. chemicko-technol, 1991.
2. VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996.
3. KLOUDA, P. *Základy biochemie*. 2., přeprac. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2005.
4. SOFROVÁ, D. *Biochemie: základní kurz*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 1999.
5. ZEHNÁLEK, J. *Biochemie*. Dotisk. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2000.
6. BUGG, T. *An introduction to enzyme and coenzyme chemistry*. 1st. USA: Blackwell Science, 1997.
7. BHAGAVAN, N.V.; HA, CH. Enzymes and Enzyme Regulation. *Essentials of Medical Biochemistry*. Elsevier, 2011, p. 47-58.
8. EISENTHAL, R.; DANSON, M.; HOUGH D. Catalytic efficiency and  $k_{cat}/K_M$ : a useful comparator?. *Trends in Biotechnology*. 2007, 25(6), p. 247-249.
9. BRESLOW, R. *Artificial enzymes*. 1st. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.
10. KLOTZ, I.; ROYER, G.; SLONIEWSKY, A. Macromolecule-small molecule interactions. Strong binding and cooperativity in a model synthetic polymer. *Biochemistry*. 2002, 8(12), p. 4752-4756.
11. SUH, J.; HAH, S. Organic Artificial Proteinase with Active Site Comprising Three Salicylate Residues. *Journal of the American Chemical Society*. 1998, 120(39), p. 10088-10093.
12. SUH, J. Synthetic Artificial Peptidases and Nucleases Using Macromolecular Catalytic Systems. *Accounts of Chemical Research*. 2003, 36(7), p. 562-570.
13. HETTICH, R.; SCHNEIDER, H. J. Cobalt(III) Polyamine Complexes as Catalysts for the Hydrolysis of Phosphate Esters and of DNA. A Measurable 10 Million-Fold Rate Increase 1. *Journal of the American Chemical Society*. 1997, 119(24), p. 5638-5647.



14. MATSUO, T.; HIROTA, S. Artificial enzymes with protein scaffolds: Structural design and modification. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2014, 22(20), p. 5638-5656.
15. DESANTIS, G.; JONES, J. Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Current Opinion in Biotechnology*. 1999, 10(4), p. 324-330.
16. QI, D.; et al. Generation of New Enzymes via Covalent Modification of Existing Proteins. *Chemical Reviews*. 2001, 101(10), p. 3081-3112.
17. BERGLUND, P.; et al. Chemical Modification of Cysteine Mutants of Subtilisin Bacillus lentus Can Create Better Catalysts Than the Wild-Type Enzyme. *Journal of the American Chemical Society*. 1997, 119(22), p. 5265-5266.
18. CHEN, C.; et al. Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper. New conjugates with low molecular weight targeting ligands. *Bioconjugate Chemistry*. 2002, 4(1), p. 69-77.
19. Human fatty acid binding protein 1, liver. *Structural Genomics Consortium* [online]. 2005 [cit. 2019-06-23] Dostupné z: <https://www.thesgc.org/structures/2f73>
20. LOUIS, B.; et al. Cu(II) bipyridine and phenantroline complexes: Tailor-made catalysts for the selective oxidation of tetralin. *Applied Catalysis A: General*. 2009, 360(2), p. 218-225.
21. LAU, E.; et al. The role of I-FABP as a biomarker of intestinal barrier dysfunction driven by gut microbiota changes in obesity. *Nutrition & Metabolism*. 2016, 13(1).
22. WANG, X.; UCHIYAM, S. Polymers for Biosensors Construction. *State of the Art in Biosensors - General Aspects*. InTech, 2013, p. 67-86.
23. HEINISCH, T.; WARD, T. Design strategies for the creation of artificial metalloenzymes. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2010, 14(2), p. 184-199.
24. Hapten. *Encyclopædia Britannica* [online]. 2018 [cit. 2019-06-27]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/hapten>
25. JOOSTEN, V.; et al. The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. *Microbial Cell Factories*. 2003, 2(1).

26. JENCKS, W. *Catalysis in chemistry and enzymology*. New York: McGraw-Hill, 1969.
27. VAISSIER WELBORN, V.; HEAD-GORDON, T. Computational Design of Synthetic Enzymes. *Chemical Reviews*. 2018, 119(11), p. 6613-6630.
28. TANTILLO, D.; JIANGANG, C.; HOUK, K. Theozymes and compuzymes: theoretical models for biological catalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*. 1998, 2(6), p. 743-750.
29. ŚWIDEREK, K.; et al. Computational strategies for the design of new enzymatic functions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2015, 582, p. 68-79.
30. KRIES, H.; BLOMBERG, R.; HILVERT, H. De novo enzymes by computational design. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2013, 17(2), p. 221-228.
31. SILAVI, R.; DIVSALAR, A.; SABOURY, A. A short review on the structure–function relationship of artificial catecholase/tyrosinase and nuclease activities of Cu-complexes. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2012, 30(6), p. 752-772.
32. RAMSDEN, C.; RILEY, P. Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorg. Med. Chem.* 2014, 22(8), p. 2388-2395.
33. SONG, Y.; et al. Functional validation of the albinism-associated tyrosinase T373K SNP by CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair (HDR) in rabbits. *EBioMedicine*. 2018, 36, p. 517-525.
34. KOVAL, I.; et al. Catecholase activity of a  $\mu$ -hydroxodicopper(II) macrocyclic complex. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2005, 10(7).
35. KUPÁN, Á.; et al. Molecular structure and catechol oxidase activity of a new copper(I) complex with sterically crowded monodentate N-donor ligand. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2009, 103(3), p. 389-395.
36. ALVES, W.; et al. Comparative kinetic studies on tyrosinase-like catalytic activity of dinuclear imidazole-containing copper(II) complexes. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2003, 198(1-2), p. 63-75.

37. LYCOPUS EUROPAEUS L. – karbinec evropský / karbinec európsky. *BOTANY.CZ* [online]. 2007 [cit. 2019-07-04]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/lycopus-europaeus/>
38. DEY, S.; MUKHERJEE, A. Catechol oxidase and phenoxazinone synthase: Biomimetic functional models and mechanistic studies. *Coordination Chemistry Reviews*. 2016, 310, p. 80-115.
39. ROMPEL, A.; et al. Substrate specificity of catechol oxidase from *Lycopus europaeus* and characterization of the bioproducts of enzymic caffeic acid oxidation 1. *FEBS Letters*. 1999, 445(1), p. 103-110.
40. EICKEN, C.; et al. Biochemical and spectroscopic characterization of catechol oxidase from sweet potatoes ( *Ipomoea batatas* ) containing a type-3 dicopper center 1. *FEBS Letters*. 1998, 436(2), p. 293-299.
41. MUÑOZ-MUÑOZ, J; et al. Catalytic oxidation of o-aminophenols and aromatic amines by mushroom tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2011, 1814(12), p. 1974-1983.
42. BANU, K.; et al. Catechol Oxidase Activity of a Series of New Dinuclear Copper(II) Complexes with 3,5-DTBC and TCC as Substrates: Syntheses, X-ray Crystal Structures, Spectroscopic Characterization of the Adducts and Kinetic Studies. *Inorganic Chemistry*. 2008, 47(16), p. 7083-7093.
43. BANU, K.; et al. Catechol oxidase activity of dinuclear copper(II) complexes of Robson type macrocyclic ligands: Syntheses, X-ray crystal structure, spectroscopic characterization of the adducts and kinetic studies. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2009, 310(1-2), p. 34-41.
44. SKLÁDAL, P. *Biosenzory*. Brno: Masarykova univerzita, 2002.
45. METELKA, R. *Elektrochemické biosenzory*. prezentováno v: [předmět Elektroanalytická chemie; Univerzita Pardubice; duben 2018, Pardubice].
46. MELLO, L.; KUBOTA, L. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*. 2002, 77(2), p. 237-256.

47. FERNANDES, S.; et al. Determination of catechin in green tea using a catechol oxidase biomimetic sensor. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2008, 19(6), p. 1215-1223.
48. CAO, X.; et al. Electrochemical methods for simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid using cetylpyridine bromide/chitosan composite film-modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2008, 129(2), p. 941.
49. Sulfhydryl-reactive Crosslinker Chemistry. Thermo Fisher Scientific [online]. 2013 [cit. 2019-06-13]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/sulfhydryl-reactive-crosslinker-chemistry.html#2>
50. YON-HIN, B.F.Y.; LOWE, C.R. An investigation of 3-functionalized pyrrole-modified glucose oxidase for the covalent electropolymerization of enzyme films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1994, 374(1-2), p. 167-172.
51. UMANA, M.; WALLER, J. Protein-modified electrodes. The glucose oxidase/polypyrrole system. *Analytical Chemistry*. 2002, 58(14), p. 2979-2983.
52. WALLACE, G.G.; SMYTH, M.; ZHAO, H. Conducting electroactive polymer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1999, 18(4), p. 245-251.
53. FRANZOI, A.; et al. Biomimetic sensor based on Mn<sup>III</sup>Mn<sup>II</sup> complex as manganese peroxidase mimetic for determination of rutin. *Talanta*. 2009, 78(1), p. 221-226.
54. FERNANDES, S.; et al. Development of a biomimetic chitosan film-coated gold electrode for determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid. *Electrochimica Acta*. 2010, 55(23), p. 7152-7157.