

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Jakub Mavrev

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Enzymové biosenzory
Bakalářská práce

2023

Jakub Mavrev

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Enzyme Biosensors
Bachelor Thesis

2023

Jakub Mavrev

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jakub Mavrev**
Osobní číslo: **C20242**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Enzymové biosenzory**
Téma práce anglicky: **Enzyme Biosensors**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracovat teoretickou rešerši týkající se konstrukce a použití enzymových biosenzorů
2. V úvodu krátce popsat historii vývoje biosenzorů
3. Další kapitoly věnovat konstrukci enzymových biosenzorů, použitým materiálům a možnostem imobilizace enzymů
4. V závěru práce zmínit výhody a nevýhody použití enzymových biosenzorů

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Enzymové biosenzory jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2023

Jakub Mavrev

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěl velmi poděkovat Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D., vedoucí mé bakalářské práce, za odborné vedení, za její klidný, vstřícný a laskavý přístup, za poskytnutí jejích drahocenných rad a zkušeností, a především za čas, který mi věnovala během psaní mé bakalářské práce. Velké poděkování směřuje i k mé rodině a k mým přátelům, protože právě oni mě podporovali a motivovali během studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce má za cíl seznámit čtenáře se základní analytickou podstatou enzymových biosenzorů. Diskutují se zde počátky takového senzoru, materiály na jeho konstrukci, jejich skladba a imobilizační postupy. Důraz je dále kladen na přínosné a nepřínosné analytické vlastnosti enzymového biosenzoru, které jsou porovnány s vlastnostmi jiných biorekogničních složek. Popsáno je i jeho potenciální využití v klinické, industriální, potravinářské, environmentální a vojenské praxi.

KLÍČOVÁ SLOVA

biosenzor, enzym, převodník, katalýza, inhibice, imobilizace

TITLE

Enzyme Biosensors

ANNOTATION

This bachelor's thesis is designed to assist the reader in acquiring the basics of the analytical focus of enzyme biosensors. The timeline of enzyme biosensor design, materials for its construction, fabrication procedures, and immobilization techniques are also taken into account. Particular emphasis is placed on the analytical characteristics of enzyme biosensors in terms of comparison with other bioreceptors. Target applications in the biomedical field, industrial field, food and beverage industry, environment monitoring, and warfare agents' assay are also presented.

KEYWORDS

biosensor, enzyme, transducer, catalysis, inhibition, immobilization

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ADH	alkoholdehydrogenáza
AChE	acetylcholinesteráza
ALP	alkalická fosfatáza (alkaline phosphatase)
BChE	butyrylcholinesteráza
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (ethylenediaminetetraacetic acid)
FAD	flavinadenindinukleotid
G6PD	glukóza-6-fosfátdehydrogenáza
GOD	glukózaoxidáza
H	těžký řetězec (heavy chain)
HK	hexokináza
HRP	avidin-peroxidáza (horseradish peroxidase)
ChOx	cholinoxidáza
L	lehký řetězec (light chain)
LAC	laktáza (lactase)
LDH	laktátdehydrogenáza
LOD	laktátoxidáza
NAD	nikotinaminadenindinukleotid
NADP	nikotinaminadenindinukleotidfosfát
ODNs	oligosonda (oligonucleotide probes)
OP	organofosfáty (organophosphate)
PNA	peptidová nukleová kyselina (peptide nucleic acid)
POD	peroxidáza
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
SAMs	self-assembled monolayers
SKE	saturovaná kalomelová elektroda
SPR	povrchová plasmonová resonance (surface plasmon resonance)
TMB-4	1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-propandibromid
TRZ	tyrozináza
TTF-TCNQ	tetrathiafulvalen-tetrakyanochinodimetan
URE	ureáza

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1.1	– Schéma oxidačně-redoxních reakcí na Clarkově kyslíkové sondě ...	16
Obrázek 1.2	– Generace biosenzorů a jejich mechanismus	21
Obrázek 1.3	– Sestava biosenzoru včetně komponent	21
Obrázek 1.4	– Dělení biologických receptorů	22
Obrázek 1.5	– Dělení převodníků.....	27
Obrázek 2.1	– Saturační křivky	33
Obrázek 2.2	– Záznam inhibice bienzymu AChE-ChOx inhibitorem OP	34
Obrázek 2.3	– Chemická amplifikace signálu v laktátovém senzoru.....	36
Obrázek 2.4	– Typická sestava enzymatického biosenzoru	37
Obrázek 2.5	– Metody imobilizace	42

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1.1 – Přehled nejčastěji používaných mediátorů (pH 7 aq., 25 °C)	19
Tabulka 1.2 – Souhrn vlastností biologických receptorů	26
Tabulka 2.1 – Porovnání různých vazebných mechanismů inhibice a jejich efektu na kinetické parametry	33

OBSAH

ÚVOD	14
1 BIOSENZOR	15
1.1 Historický model.....	15
1.1.1 Clarkova kyslíková sonda.....	15
1.1.2 Biosenzory první generace.....	17
1.1.3 Biosenzory druhé generace.....	18
1.1.4 Biosenzory třetí generace.....	20
1.2 Konstrukce biosenzoru	21
1.3 Klasifikace podle biologického receptoru	22
1.3.1 Enzymy	23
1.3.2 Protilátky.....	23
1.3.3 Nukleové kyseliny	24
1.3.4 Buněčné struktury	25
1.4 Klasifikace podle typu převodníku	27
1.4.1 Elektrochemické převodníky	27
1.4.2 Optické převodníky.....	28
1.4.3 Gravimetrické převodníky	28
1.4.4 Kalorimetrické převodníky	29
2 ENZYMATICKÉ BIOSENZORY	30
2.1 Průběh enzymatické reakce	30
2.1.1 Katalytické měření.....	31
2.1.2 Inhibiční měření.....	32
2.1.3 Měření multienzymovou kaskádou.....	35
2.2 Základní konfigurace enzymatického biosenzoru	36
2.3 Permselectivní membrány	37
2.4 Imobilizační techniky	38

2.4.1	Adsorpce na pevný povrch	38
2.4.2	Kovalentní vazba	39
2.4.3	Iontová vazba.....	39
2.4.4	Chelatace.....	40
2.4.5	Sulfidická vazba.....	40
2.4.6	Afinitní vazba	40
2.4.7	Zesíťování.....	40
2.4.8	Zachycení.....	41
2.4.9	Enkapsulace	41
3	VYUŽITÍ ENZYMATICKÝCH SENZORŮ	43
3.1	Aplikace v medicíně	43
3.1.1	Stanovení glukózy.....	43
3.1.2	Stanovení cholesterolu.....	44
3.1.3	Stanovení močoviny	44
3.1.4	Stanovení laktátu.....	44
3.1.5	Stanovení tumorových markerů.....	44
3.2	Aplikace v životním prostředí.....	45
3.2.1	Stanovení těžkých kovů	45
3.2.2	Stanovení organofosfátů	45
3.2.3	Stanovení sloučenin fenolů.....	46
3.2.4	Stanovení léčiv.....	46
3.3	Aplikace v potravinářství.....	46
3.3.1	Detekce mikroorganismů.....	46
3.3.2	Kontrola kvality balených produktů	47
3.3.3	Fermentační procesy	47
3.3.4	Kontrola kvality masa a ryb.....	47
3.3.5	Stanovení volných radikálů a antioxidantů.....	47

3.4	Aplikace v biologické a chemické ochraně	48
ZÁVĚR	49
ZDROJE	50

ÚVOD

Vylepšit a zvýšit kvalitu života je jedním z nejdůležitějších cílů vědecké sféry. S kvalitou života je totiž spojena kvalita a bezpečnost našeho životního prostředí, zajištění nezávadnosti potravinových produktů nebo včasný záchyt, screening a prevence různých onemocnění. Ve všech těchto sférách je vyžadované nepřetržité monitorování klíčových parametrů, a přesně v tomto kontextu operuje biosenzor.

Biosenzor je zařízení, které kombinuje biologický materiál s vhodnou platformou, která je schopna detekovat sledovaný analyt, ať už nízkomolekulární nebo vysokomolekulární podstaty, bez nutnosti přidávat k roztoku analytu reagentie. Principiálně je složen z převodního zařízení integrovaného s rekogniční složkou biologického charakteru, která specificky interaguje s analytem, čímž na povrchu převodníku zapříčiňuje fyzikálně-chemické změny. V tomto provedení je zaznamenaný specifický reakční mechanismus analytu převeden na signál, který je lépe vyhodnotitelný. O zaznamenání signálů se v největším měřítku starají enzymy imobilizované na povrch převodníku, který je schopný tyto signály transformovat na signály elektrochemické, elektrické, optické, gravimetrické nebo akustické.

Enzymatické biosenzory umožňují průběh vysoce specifické interakce mezi substrátem a enzymem a vysokou citlivost při stanovení rychlosti přeměny substrátu na produkt. Detekují tak analyt determinováním koncentrace volných protonů, produkce nebo spotřeby plynů (CO_2 , O_2 , NH_3), světelné emise, absorpance, refrakce nebo tepelného zabarvení při konzumpci substrátu.

Enzymatické senzory zaznamenaly největší rozvoj po sestavení prvních glukózových biosenzorů, které v dnešní době stále ovládají 85 % světového trhu biosenzorů. Cílem této bakalářské práce je představit koncept prvních generací enzymových biosenzorů, prozkoumat podstatu enzymatických detekcí a převést je do aplikovatelné míry.

1 BIOSENZOR

Za biosenzor je považováno integrované detekční zařízení, které využívá specifických biochemických reakcí zprostředkovaných například izolovanými enzymy, imunokomplexy, nukleovými kyselinami, tkáněmi, organelami nebo celými buňkami pro poskytnutí selektivní kvantitativní nebo semi-kvantitativní analytické informace. Biosenzor má za úkol poskytovat rychlou, přesnou a spolehlivou informaci analyzované složky v reálném čase. [1]

1.1 Historický model

O konceptu biosenzoru se začalo uvažovat kolem roku 1906, kdy bylo provedeno praktické zjištění, že koncentrace rozpuštěné kyseliny ve vodném roztoku vykazuje ekvivalentní elektrický potenciál generovaný na skleněné membráně ponořené do roztoku. O čtyři roky později toto zjištění rozvedl dál Søren Peder Lauritz Sørensen se zavedením termínu pH roztoků, což zanedlouho vedlo k sestavení prvního senzoru schopného měřit na tomto principu. [2, 3]

S nápadem imobilizovat enzym na nosič přišli vědečtí pracovníci J. M. Nelson a E. G. Griffin, kteří se v roce 1916 jako první nevědomky podíleli na položení základů pro termín biosenzor. Stalo se tak po jejich zdařilém pokusu fyzikálně adsorbovat enzym invertázu na aktivní uhlí, jež po imobilizaci vykazovala stejnou katalytickou aktivitu jako invertáza v nativní formě. [4]

Rozvoj enzymatických analýz nastal po necelých dvaceti letech úkony Otta Warburga, který svou optickou detekcí NADH/NADPH při 334 nm vydláždil cestu k mimořádně citlivým stanovením dehydrogenáz a jejích substrátů. Warburgův model optických enzymatických testů se posléze komerčně zpřístupnil, až se stal esenciálním krokem pro většinu biochemických analýz, které se hojně, respektive s jistými modifikacemi, využívají dodnes. [5]

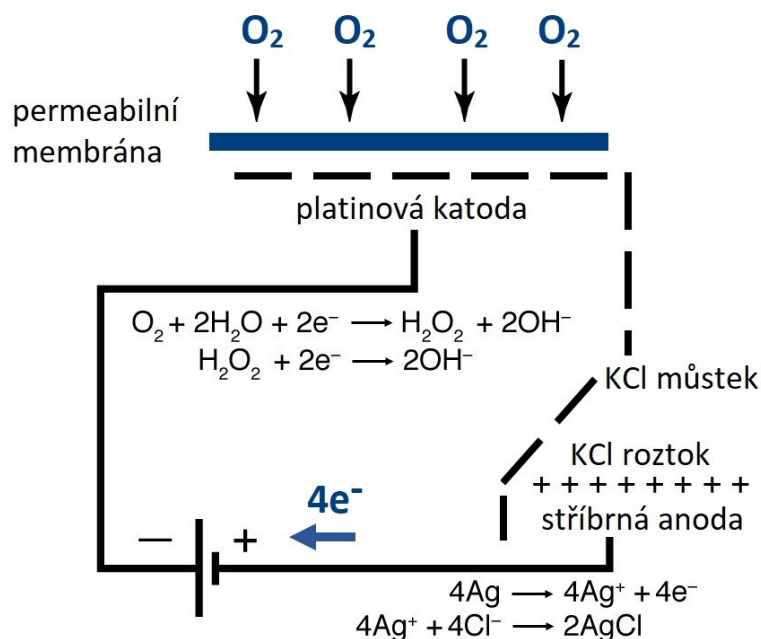
1.1.1 Clarkova kyslíková sonda

Průkopníkem své doby se stal profesor Leland C. Clark, Jr., který v roce 1956 navázal na výše zmíněné objevy a navrhl konstrukci kyslíkové elektrody mající za cíl stanovit zastoupení kyslíku v krvi. Jeho senzor se skládal z polarizovatelné měrné platinové katody vodivě spojené s nepolarizovatelnou referentní stříbrnou elektrodou,

takto obě ponořené do elektrolytu s rozpuštěným KCl. Dvouelektrodový článek operuje na amperometrickém uspořádání. Na platinovou katodu je přiváděno rozkladné napětí pro kyslík v rozmezích -600 mV až -800 mV vs. Ag a na jejím pracovním povrchu dochází k postupné redukci kyslíku podle následujících rovnic zobrazujících děj na katodě:



Tento jev s výsledným tokem čtyř elektronů, jak zobrazuje schéma na obrázku 1.1, vyvolá průchod elektrického proudu v obvodu s referentní anodou s konstantním potenciálem, na níž jsou generovány potřebné elektrony, jak znázorňuje rovnice 1.3, jimiž konečným příjemcem je kyslík. Protékající proud je přímo úměrný množství analytu. [6]



Obrázek 1.1 – Schéma oxidačně-redoxních reakcí na Clarkově kyslíkové sondě, převzato a upraveno z [7]

Jeho první pokus se neseťkal s úspěchem, když po vložení napětí na polarizovatelnou elektrodu ji složky krve výrazně zanesly a výsledný signál analytu zkreslily. Pro oddělení krevních komponent elektrodu obalil celofánem z cigaretového balení. Celofán sám o sobě není propustný pro vysokomolekulární látky, nýbrž přes něj difundují pouze plyny, čímž se kyslík stal pro měření ve vzorku krve dosažitelným.

Pro kalibraci senzoru přidal Clark k roztoku enzym glukózaoxidázu (GOD). V pozdějším designu se obě elektrody oddělily od měřeného média a přenesly se za polopropustnou membránu vyrobenou z teflonu. [8, 9]

1.1.2 Biosenzory první generace

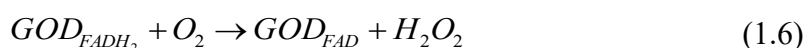
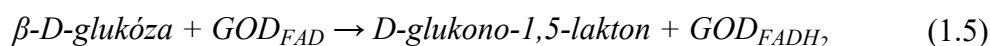
Detekční schémata prvních biosenzorů byla navržena tak, aby přímo zaznamenávaly buď přírůstek produktu enzymatické reakce, úbytek substrátu enzymem katalyzované oxidačně-redukční reakce, nebo změny mediátoru, který se účastní enzymatické reakce. Ve všech třech případech je důležité, aby monitorovaná látka byla dostatečně elektrochemicky aktivní. [10]

Po vzoru kyslíkové sondy, první generace biosenzorů využívala GOD jako první biorekogniční složku. Clark společně s Lyonsem použili první design, aby posunuli vývoj senzoru tak, že zkoncentrovanou GOD imobilizovali mezi polopropustnou membránu platinové elektrody a dialyzační membránu. Senzor mohl být tímto způsobem využit k opakovaným měřením glukózy. Principem stanovení glukózy je oxidace β -D-glukózy na D-glukono-1,5-lakton. Reakci katalyzuje oxidovaná forma enzymu GOD, který je zpětně reoxidován redukcí kyslíku rozpuštěného ve vzorku na H_2O_2 . Kyslík pro svou redukcí akceptuje z monosacharidového skeletu glukózy elektrony generované oxidací aldehydické skupiny. Množství úbytku kyslíku nebo přírůstku H_2O_2 je úměrné koncentraci glukózy. Reakci znázorňuje následná souhrnná rovnice:



Clark následně interpretoval svůj senzor pod termínem *enzymová elektroda*. Správnější termín *biosenzor* definovala později Názvoslovná komise Mezinárodní společnosti pro čistou a užitou chemii (IUPAC). [9, 11, 12]

S Clarkovým patentem pracovala firma Yellow Spring Instrument Company, která v roce 1973 uvedla na trh první glukometr Model 23006 YSI schopný měřit glukózu ve vzorcích plné krve do objemu 25 μ l. Senzor již nepracoval na principu měření úbytku kyslíku, nýbrž přírůstku H_2O_2 generovaného na argentochloridové anodě při vloženém konstantním napětí +600 mV vs. Ag/AgCl na pracovní platinovou elektrodu. Enzymová biokatalýza se nyní spoléhala na flavinadenindinukleotidový kofaktor (FAD), který měl za úkol regenerovat enzym GOD podle následujících reakcí:



Model 23006 YSI musel být brzy stažen z trhu kvůli interferencím, které se vyřešily insercí další permeabilní membrány a společnost ohlásila vylepšený model 23A YSI, jenž se s velkou oblibou využíval v klinické praxi. [9, 13]

1.1.3 Biosenzory druhé generace


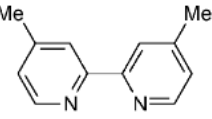
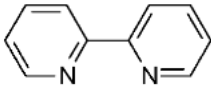
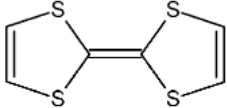
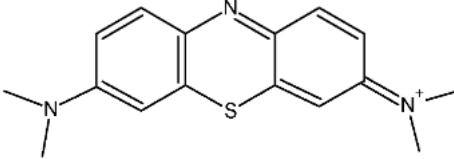
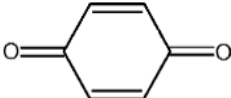
Další vylepšení a řešení chyb biosenzorů první generace přineslo zakomponování umělých oxidačně-redukčních mediátorů nebiogenního charakteru, které coby akceptory přenášejí elektrony mezi redoxním centrem enzymu a povrchem měrné elektrody. Limitujícím faktorem amperometrického měření glukózy je právě přenos elektronů mezi aktivním centrem GOD a povrchem elektrody. To zatěžuje objemná bariéra FAD, která překáží přímému přenosu elektronů z aktivního centra na konvenční elektrodu, což kompenzuje mediátor podle následujícího schéma, kde M_{OX} a M_{RED} vystupují jako oxidovaná a redukováná forma mediátoru:



M_{RED} se reoxiduje na elektrodě, čímž udává příslušný signál úměrný koncentraci glukózy, zatímco se regeneruje oxidovaná forma mediátoru. Klíčovou komponentou této reakce je, aby redoxní potenciál mediátoru byl v souladu s redoxním potenciálem kofaktoru, a tedy kompatibilní k příslušné enzymatické reakci. Rozdíl potenciálů by neměl být vyšší než $\Delta E \sim 50$ mV. Z hlediska kinetického průběhu enzymatické reakce je nutné volit takový mediátor, který splňuje Michaelisovu konstantu (K_M) pro příslušný enzym a který má vyšší afinitu k přijetí elektronu než rozpuštěný kyslík ve vzorku. Mediátor by měl být specifický k příslušné biorekogniční složce, musí se jednat o reverzibilní elektrochemicky aktivní látku, která je ve svých oxidačních stavech stabilní a nereaguje s elektrodou, s analytem ani s biorekogniční složkou. Zároveň nesmí být toxický ke vnějšímu prostředí a měl by být cenově dostupný. Příkladem takovýchto mediátorů jsou deriváty ferrocenu, hexakynoželezitany, tetrathiafulvalen-tetrakyanochinodimetan (TTF-TCNQ), komplexy ruthenia a osmia nebo organická barviva (1,4-benzochinon, methylenová modř). Tabulka 1.1 předkládá nejčastěji používané jednoelektronové nebo dvouelektronové mediátory s jejich formálním potenciálem vzhledem k referenční saturované kalomelové elektrodě (SKE) a K_M

pro oxidaci GOD_{RED}. Výhodou použití mediátoru je volba nižšího potenciálu, během něhož neinterferují elektroaktivní látky přítomné ve vzorku. Naopak v opakovaných analýzách mediátorové systémy vykazují rychlou konzumpci, a proto nejsou vhodné pro rutinní použití. Z hlediska potenciální toxicity a nízké biokompatibility se tyto systémy navíc vyloučily z vyšetření *in vivo*. [13–15]

Tabulka 1.1 – Přehled nejčastěji používaných mediátorů (pH 7 aq., 25 °C) [16]

Mediátor	Redoxní potenciál mV vs. SKE	K _M oxidace GOD M ⁻¹ s ⁻¹ /ref.
Jednoelektronový		
Ferrocen	210	5 · 10 ⁵ [17]
		
[Os(Me ₂ bpy) ₂ Cl ₂]	150	1,2 · 10 ⁵ [18]
	Me ₂ bpy = 	
[Ru(bpy) ₂ Cl ₂]	300	1,8 · 10 ⁵ [18]
	bpy = 	
Dvouelektronový		
Tetrathiafulvalen	150	1,28 · 10 ⁷ [19]
		
Methylenová modř	30	1,86 · 10 ⁴ [19]
		
1,4-benzochinon	275	1,97 · 10 ⁵ [20]
		

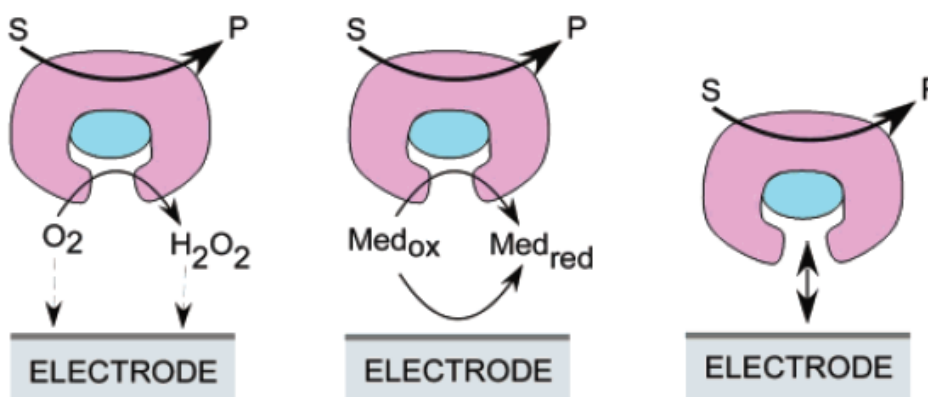
1.1.4 Biosenzory třetí generace

Po eliminaci soustavy s mediátorem a po vyzdvižení možnosti využívat nízké redoxní potenciály blízké redoxním potenciálům enzymů se začalo pracovat s modelem, který by zajistil přenos elektronů z aktivního centra enzymu přímo na elektrodu bez žádného prostředníka. Absence mediátorů vede k vyšší selektivitě a k možnosti zmenšovat biosenzor. Novým krokem v architektuře senzoru se rázem stává imobilizace enzymu na povrch elektrody, díky čemuž elektron musí urazit jen velmi krátkou vzdálenost do svého cíle. [12, 13]

Proteiny mají schopnost spontánně se adsorbovat na povrch různých elektrodových materiálů. Interakce jsou převážně zprostředkovány vodíkovými vazbami, elektrostatickými silami, van der Waalsovými silami nebo hydrofobní vazbou. Kvůli nim je nutné počítat s možným dodatkovým příspěvkem k výslednému proudovému signálu. Nevýhodou je, že většina proteinů má tendenci po adsorpci denaturovat a ztratit tak svou katalytickou a elektroaktivní aktivitu, a proto je nutné udržovat vhodné pH prostředí, teplotu, iontové prostředí a vybrat elektrodu zhotovenou z vhodného materiálu. Prvním imobilizovaným proteinem, který sice denaturoval, ale chvíli vykazoval elektrochemické chování, byl cytochrom c na měděné elektrodě. Na jeho udržení v reverzibilním stavu a zabránění denaturace se podílely monovrstvy z oxidu india a cínu nebo 4,4'-bipyridinu kotvené na zlaté elektrodě, později označované SAMs (self-assembled monolayers). SAMs se na povrchu elektrody rychle organizují a vzhledem k opačnému náboji i ochotněji vrství enzym. Uvažovalo se i nad modelem využívajícím krystalickou vrstvu z TTF-TCNQ, přes jehož krystalickou mřížku by docházelo k výměně elektronů, jenže film TTF-TCNQ má v tomto uspořádání tendenci korodovat a produkovat interferující složky. [13, 21–24]

Překážku v tomto uspořádání představuje malá rychlost přenosu elektronů mezi aktivním centrem a elektrodou, a to navzdory jejich blízkému kontaktu. Přenos je často i zcela znemožněn, pokud je aktivní centrum nebo kofaktor zahalen proteinovým obalem. Tento problém obchází multikofaktorové enzymy, které dlouhý přenos rozdělí na dílčí cesty, jak je tomu například u cytochromů v dýchacím řetězci. V potaz musí být vzato, že ne všechny enzymy mohou být imobilizovány v produktivní vzdálenosti elektrody. Snaha přivést enzym blíže k povrchu elektrody a vyvolat přenos elektronů se stala předmětem miniaturizace senzoru do podoby nanobiosenzoru. Obrázek 1.2 shrnuje

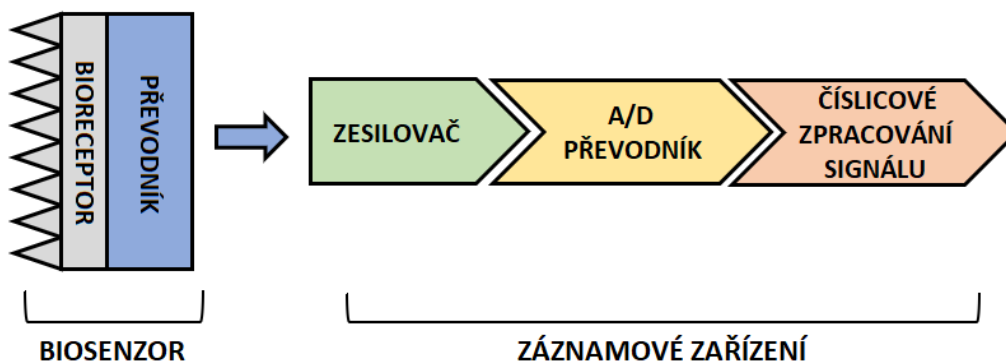
různé generace amperometrických biosenzorů na glukózu podle toho, jak se odlišují v mechanismu přenosu elektronů mezi biorekogniční složkou a elektrodou. [12, 25]



Obrázek 1.2 – Generace biosenzorů a jejich mechanismus [13]

1.2 Konstrukce biosenzoru

Biosenzor se skládá ze tří základních částí, jak zobrazuje obrázek 1.3. Obecně se jedná o biologicky aktivní rekogniční složku, fyzikálně-chemický detektor nebo převodník a o záznamové zařízení vyhodnocující sesbíraný signál. [26]



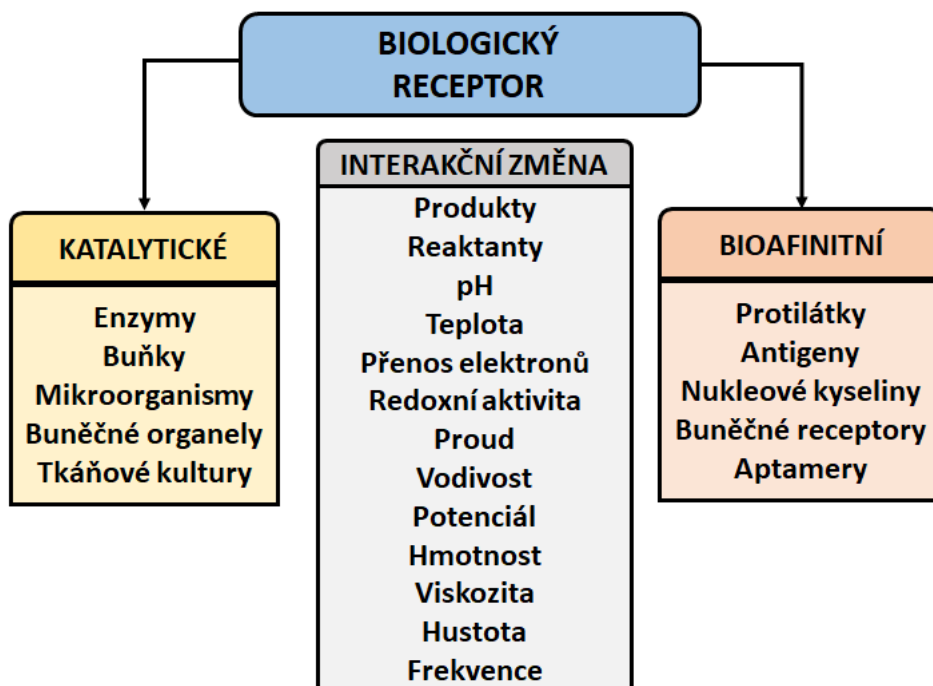
Obrázek 1.3 – Sestava biosenzoru včetně komponent, převzato a upraveno z [27]

Měřený analyt interaguje s biorekogniční složkou za účelem vyvolání signálu, pakliže je detekovaná látka přítomna v blízkosti této aktivní vrstvy senzoru. Takto zaznamenaný signál nesoucí informaci o specifickém reakčním mechanismu analyzované složky je nedokonale měřitelný, a proto musí být převeden na lépe vyhodnotitelný, kvantifikovatelný elektrický signál. O tento převod se zpravidla stará kompatibilní převodník signálu. Výstupem se stává informace v elektrické podobě, respektive ve formě proudu, napětí nebo elektrického odporu. Signál je v poslední fázi zpracování

vhodně zesílen na analogové napětí a transformován na číslicová data zobrazená na zobrazovacím zařízení. [28]

1.3 Klasifikace podle biologického receptoru

Biologický receptor vystupuje v zařízení jako aktivní sensorový prvek biologického charakteru zodpovědný za detekci přítomnosti stanovované látky, případně její koncentrace. Po specifickém rozpoznání sledovaného analytu bioreceptorem dochází k interakci, která musí mít za následek spuštění řady chemických změn. Tak se děje například na úrovni exotermní reakce, změn pH nebo hmoty, redoxně-oxidační aktivity, přenosu elektronů, přírůstku nebo úbytku produktu a reaktantu. Rozsáhlejší výčet těchto dějů spojený s rekogničními složkami je dále rozepsán na obrázku 1.4. [2]



Obrázek 1.4 – Dělení biologických receptorů

Biologický receptor by měl vykazovat vysokou stabilitu, specifitu a afinitu k analyzované složce. Rovněž by měl splňovat podmínku imobilizace na fyzikálně-chemický převodník. Imobilizované komponenty mohou být kategorizovány na katalytické a nekatalytické receptory. Pro správnou volbu vhodné biorekogniční složky je klíčové zvolit účinnou metodu jejího zpracování. Mezi tyto operace se nejčastěji řadí separace, purifikace nebo viabilita prvku. [16]

Receptory katalytické skupiny, jak už název napovídá, zvyšují pravděpodobnost průběhu chemické reakce. Vlivem účasti na reakci podmiňují přenos fyzikální veličiny, jakou je například proud, potenciál, fluorescence nebo absorbance, na elektrochemické či optické převodníky, které jsou v obvodu s touto skupinou receptorů zapojeny nejčastěji. Ze své jednoduché podstaty aplikace byly zařazeny do praxe jako první a využívají se v senzorech pro kontinuální monitorování látek o koncentracích v řádu milimolů až mikromolů. Mezi takové receptory spadají enzymy, buňky, buněčné organely, mikroorganismy a tkáňové komponenty. [29]

V poslední dekádě vzrostl zájem o nekatalytické receptory. Tyto bioafinitní ligandy zahrnující protilátky, antigeny, nukleové kyseliny nebo buněčné receptory se využívají pro senzory operující na základě selektivního navázání receptoru na ligand. Měřený signál má potom možnost doputovat na zapojený převodník právě díky interakci receptor-ligandu. S tím souvisí i zakomponování hmotnostních nebo magnetických typů převodníků. Navíc umožňují měřit velmi nízké koncentrace, řádově v mikromolech až pikomolech, což je uplatnitelné převážně pro analýzu hormonů, toxinů nebo léčiv. Přehled výhod a limitujících faktorů biorekogničních elementů sumarizuje tabulka 1.2 na straně 26. [29, 30]

1.3.1 Enzymy

Enzymy se řadí mezi nejčastěji používané biorekogniční složky vzhledem ke své vysoké senzitivitě, dostupnosti, jednoduché konstrukci a nízké ceně. Ve své podstatě překládají substrát na korespondující množství produktu, který může být senzitivně detekován optickým převodníkem po označení substrátu chromogenní značkou. Namísto optických vlastností se lze spolehnout na katalýzu oxidačně-redukčních reakcí, kdy výměnu elektronů mezi komponentami reakce zachytává elektrochemický převodník. Výhodou je i použití multienzymového systému. Při použití enzymu je nutné kompenzovat nedostatky v podobě slabé teplotní stability, udržení stálé enzymatické aktivity po imobilizaci nebo interference matrice endogenních substancí. Problematika enzymatických biosenzorů bude dále rozvedena v její samostatné kapitole. [30, 31]

1.3.2 Protilátky

Protilátky jsou struktury proteinového charakteru imunoglobulinů sestaveného ze dvou polypeptidických těžkých H (heavy) a lehkých L (light) řetězců spojených

pantovými oblastmi disulfidických můstků. Podle typu H řetězce se kategorizují do tříd IgG, IgM, IgA, IgE a IgD. Každá z jejich variabilních oblastí má tendenci vázat antigen za vzniku imunokomplexu antigen-protilátka. Imunokomplex není schopný sám o sobě generovat měřitelný signál, a proto bývá označen enzymem, fluorescenční značkou, radionuklidem, elektrochemickou látkou nebo komplexem avidinu a biotinu, které jsou s to komunikovat s optickým nebo elektrochemickým převodníkem. Senzory se zakotvenou protilátkou nebo pracující na principu vzniku imunokomplexu se nazývají imunosenzory. K měření využívají zakomponování monoklonální, polyklonální protilátky nebo jejich rekombinací. Polyklonální protilátky jsou secernovány jako heterogenní směs produktů více klonů plazmatických buněk, naopak monoklonální protilátky jsou identické kopie imunoglobulinů hybridomových buněk odvozených od jedné linie plazmatických buněk, nejčastěji myších. Analýza imunosenzorem je vysoce komplexní a časově náročná. Navzdory nízké ceně a vysoké specifitě měření zatěžují opakované kroky purifikace, separace a promývání. [32, 33]

1.3.3 Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny, konkrétně deoxyribonukleová kyselina (DNA), složená ze dvou antiparalelních komplementárních polynukleotidových řetězců, kde tmelem mezi purinovými a pyrimidinovými bázemi jsou vodíkové vazby, mohou být rovněž integrovány na převodníku. Buď jsou zakotvené jednotlivě, nebo jako oligosonda sestavená z desetičlenných nukleotidových sekvencí (ODNs). Senzitivita a selektivita principálně staví na silné afinitě párování bází mezi komplementárními řetězci, kdy mezi adeninem a thyminem vznikají dva vodíkové můstky a mezi guaninem a cytosinem vznikají tři vodíkové můstky. Zdrojem měřeného signálu ODNs genosondy bývá nejčastěji proces hybridizace mezi cílenou sekvencí nukleotidů a k ní komplementární sondou, kdy se formuje DNA duplex. Hybridizační sondy jsou podobně jako antigeny označeny fluorescenční značkou, radionuklidem nebo elektrochemicky aktivní látkou. Použití nukleových kyselin, mezi něž kromě DNA spadají i ribonukleové kyseliny (RNA), umělé jednovláknové aptamery nebo peptidové nukleové kyseliny (PNA), tak otevírá koncept nanosenzorů a jejich zakomponování do praxe. Tu však zatěžuje vysoká cena senzorů, časová komplexnost a nutnost značení. [34]

1.3.4 Buněčné struktury

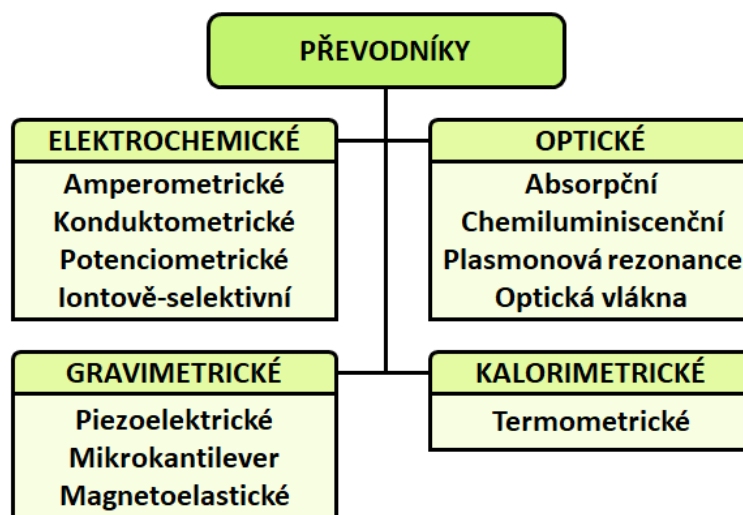
Buněčné bioreceptory, především mikrobiálního charakteru (bakterie, plísně, kvasinky, řasy a tkáňové kultury), jsou po immobilizaci na elektrodu schopné detekovat organické sloučeniny nimi produkované nebo asimilované organismu vlastní po interakci mezi buňkou a stimulem. Mikrobiální buňky jsou pro detekování mnohem výhodnější z hlediska snadnější aklimatizace k laboratorním podmínkám, snadnějšího zacházení a vyšší stability, než je tomu u živočišných nebo rostlinných buněk. Principem takového měření je stanovit spotřebu kyslíku nebo produkci CO₂ mikroorganismem, případně změny redoxního potenciálu a pH, kdy jsou tyto změny úměrné sledovanému analytu, který vůči metabolickým a respiračním procesům buňky může vycházet jako substrát nebo inhibitor. Vedle toho mohou být pro levnější alternativu enzymatických stanovení užity extrahované enzymy z intracelulárního nebo periplasmatického prostoru buňky. Vyšší selektivity může být dosaženo použitím pouze buněčných receptorů pracujících na vzniku komplexu analyt-ligand. Biosenzory buněčného typu mají široké uplatnění především v potravinářství a monitorování životního prostředí. Velkým plusem je jejich stabilita vůči změnám pH a teploty nebo obsah širokého spektra enzymů. Na druhou stranu jsou takové analýzy často časově náročné a zatížené nevýhodnou selektivitou, biokompatibilitou a životností, která je však delší než u enzymatických senzorů. [30, 35]

Tabulka 1.2 – Souhrn vlastností biologických receptorů [36]

Biologický receptor	Výhody	Limitace
Enzymy	<p>Vysoká katalytická aktivita a stabilita</p> <p>Schopnost katalyzovat nebo inhibovat reakce</p> <p>Silná vazebná kapacita</p> <p>Jednoduchá konstrukce</p> <p>Přímá vizualizace</p>	<p>Analýza vyžaduje více kroků</p> <p>Nízká stabilita v nepříznivých podmínkách – pH, teplota</p> <p>Interference s matricí nebo endogenními enzymy</p>
Protilátky	<p>Variabilita v detekci celé bakteriální buňky nebo jejích toxinů</p> <p>Specifické bimolekulární interakce antigen-protilátka</p> <p>Neinvazivní přímá detekce</p>	<p>Nelze rozeznat bakteriální buňky živé a mrtvé</p> <p>Náročné na výrobu jednak cenově, jednak časově</p> <p>Nutnost separačních, purifikačních a promývacích mezikroků</p> <p>Imunogenicita</p> <p>Problém docílit konzistence mezi šaržemi</p>
DNA	<p>Rozpoznání a detekce sekvencí nebo tvaru je závislá na párování bází</p> <p>Rychleji regenerované a připravené k analýze</p> <p>Vysoká životnost a stabilita</p>	<p>Náročné na výrobu jednak cenově, jednak časově</p> <p>Tvorba agregátů znemožňujících purifikaci a charakterizaci</p> <p>Nízká rozpustnost ve vodných roztocích</p> <p>Nestabilní za vysokých teplot a pH; zatěžující vývoj <i>in situ</i> přenosných senzorů</p> <p>Falešně pozitivní výsledky při interakci s velkými molekulami</p>
Buněčné struktury	<p>Vysoká stabilita</p> <p>Nízká cena na produkci</p> <p>Bez nutnosti mezikroku purifikace, promývání, separace</p> <p>Široké spektrum enzymů</p>	<p>Doba použitelnosti</p> <p>Specifické podmínky pro analýzu</p> <p>Interference různých biochemických cest vedou k falešně pozitivním výsledkům</p> <p>Dlouhý reakční čas</p>

1.4 Klasifikace podle typu převodníku

Převodník představuje druhou důležitou komponentu senzorického zařízení. Obecně se jedná o kompozitní zařízení sestavené z několika funkčních částí, jejichž význam spočívá v úzké spolupráci s biologickým receptorem. Na jeho aktivní vrstvě musí po interakci s analytem dojít k reverzibilní nebo ireverzibilní obměně složení vrstvy, což se projeví změnou náboje, vodivosti, teploty nebo zbarvení, a tyto dynamické děje fyzikálně-chemického charakteru se převodníkem převedou na snadněji měřitelný a kvantifikovatelný signál elektrochemického, optického, piezoelektrického nebo kalorimetrického profilu. Podle něho se následně klasifikují do kategorií (viz obrázek 1.5). Pro správnou volbu převodníku je nutné započítat řadu proměnlivých faktorů, kterými jsou například specifita ke sledovanému analytu, koeficient selektivity, koncentrační rozsah, detekční limit, citlivost, reakční čas, časová konstanta nebo aplikovatelnost pro praktická měření. [37, 38]



Obrázek 1.5 – Dělení převodníků

1.4.1 Elektrochemické převodníky

Elektrochemické převodníky, kde je elektroda převodním elementem, monitorují oxidačně-redukční reakci mezi imobilizovanou molekulou a sledovaným analytem mající na svědomí produkci nebo konzumpci iontů nebo elektronů, což ovlivňuje měřitelné elektrické vlastnosti roztoku, které mohou být korelovány buď ke koncentraci elektroaktivní látky, nebo k jejímu přírůstku či úbytku. Podle měřeného parametru se takové převodníky dělí na amperometrické (elektrický proud), konduktometrické (změna vodivosti), potenciometrické a iontově-selektivní (změna potenciálu). [39]

1.4.2 Optické převodníky

U optických převodníků je převedený signál, který je měřen po interakci analytu na povrchu biosenzoru, ve formě elektromagnetického záření určité energie. V příslušné odezvě se skrývají změny vyvolané na úrovni molekulárních struktur. Jsou konstruovány ze světelného zdroje a z optických pomocných komponent k vymezení konkrétní části spektra o specifické vlnové délce, respektive jejich úzkém oboru, směřujících paprsek nejkratší cestou na modulátor, modifikovanou detekční hlavici s fotodetekčním zařízením. [40]

Vedle spektroskopických technik, které se zde nejvýrazněji uplatňují, mezi něž řadíme metody absorpční, chemiluminiscenční, refrakční, disperzní nebo Ramanovu spektroskopii, našla velké využití i optická povrchová plasmonová resonance (SPR), u níž se detekují změny indexu lomu paprsku odraženého od tenkých kovových vrstev. Detekční jednotky mohou pracovat i na principu zakomponování optických vláken mívajících souhrnné označení optroda, v němž se snoubí slova optický a elektroda. [41]

1.4.3 Gravimetrické převodníky

U piezoelektrických (hmotnostních) biosenzorů dochází k adsorpci sledovaného analytu na povrch piezoelektrické komponenty, obecně nesymetrických krystalů křemene, turmalínu, lithného niobátu nebo tantalátu potažených na zlaté elektrodě. Tyto krystaly vykazují vlastní vibrační frekvence. Po vložení krystalu do elektrického obvodu se specifickým kmitočtem se mohou jednotlivé frekvence oscilací porovnávat. S rostoucí hmotností analytu sorbovaného na povrch krystalu se frekvence výsledné rezonance krystalu mění, vlivem čehož tato změna může být měřena elektricky a z ní je konečně determinována aditivní hmotnost krystalu, jak pozitivní, tak negativní, úměrná sledovanému analytu. [42]

Na podobném principu pracuje další hmotnostní senzor, na němž se sledují změny v ohybu nebo vibrační frekvenci nosníku, tzv. kantilever. Specifické molekulární interakce na povrchu nosníků jsou převáděny na mechanickou odpověď, díky čemuž mohou být takto zaznamenány parametry, jako je průtok, viskozita nebo hustota. [42, 43]

1.4.4 Kalorimetrické převodníky

Kalorimetrické biosenzory jsou sestavené z imobilizovaných biorekogničních složek na povrchu teplotního senzoru. Jakmile se sledovaný analyt dostane do kontaktu s biologickým receptorem, výsledná teplotní změna chemické reakce je úměrná koncentraci analytu. V principu takto přijaté nebo odevzdané teplo znázorněné rozdílem teplot (ΔT) je úměrné molární entalpii (ΔH_r), celkovému počtu vznikajících molekul (n_p) danou reakcí a nepřímo úměrné tepelné kapacitě reakce (C_p), jak znázorňuje rovnice uvedená níže:

$$\Delta T = -\frac{n_p \cdot \Delta H_r}{C_p} \quad (1.9)$$

Symbols

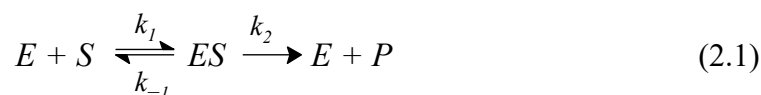
ΔT	K	změna teploty
n_p	mol	počet molekul produktu
ΔH_r	$J \cdot mol^{-1}$	změna entalpie při chemické reakci
C_p	$J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$	molární tepelná kapacita za konstantního tlaku

Teplota soustavy se zjišťuje na termistoru, nejčastěji enzymového typu spojeného s průtokovou vstřikovací analýzou. Takové senzory není potřeba opakovaně kalibrovat, což se řadí k jejich světlým stránkám. [44]

2 ENZYMATICKÉ BIOSENZORY

2.1 Průběh enzymatické reakce

Chemické reakce odehrávající se za různorodých podmínek v živých systémech by se bez enzymů prakticky nemohly uskutečnit. Tyto makromolekulární proteinové komponenty disponují schopností katalyzovat a zkracovat čas docílení chemického děje, aniž by ovlivnily jeho konečný stav a samy by se při tom musely podvolit některé z chemických přeměn, či dokonce musely být spotřebovány. Katalytická vlastnost je selektivní vůči určitým typům substrátů a reakcí, které enzym katalyzuje. Aby substrát mohl být náležitě přeměněn a detekován senzorem, pro jeho molekulu je primární překonat vysokou bariéru aktivační energie, k níž náleží příslušný tranzitní stav, který je následně spojen s tepelným zabarvením reakce. Enzym zpřístupňuje průběh reakce tak, že hodnotu aktivační energie rozkládá do několika dílčích tranzitních kroků odehrávajících se na nižších energetických hladinách, aby zároveň celková změna Gibbsovy energie zůstala stejná. Substrát se proto z počátku specificky váže do komplexu ES v aktivním centru enzymu a v dalším přechodu ve spřažení s kofaktorem je přeměněn na komplex EP enzymu s produktem, který se po rozpadu komplexu uvolňuje, a aktivní centrum enzymu se vrací do svého původního stavu. Tato sekvence se opakuje s další molekulou substrátu, dokud jsou sledovaný analyt a kofaktor přítomny v měřeném roztoku. V případě výskytu více než jednoho reaktantu může enzym specifickým navázáním tyto reaktanty zastavit tak, aby byla stimulována pouze žádoucí reakce. Pro potřeby průběhu reakce aktivní centrum enzymu přijímá a vyměňuje elektrony nebo vodíkové ionty z vnějšího prostředí, což se následně stává předmětem zájmu převodníku, který tento děj kvantifikuje na odečitatelný signál. Pro celý proces je charakteristická reverzibilita jednotlivých kroků, kdy u poslední tranzice (viz rovnice 2.1) je možné pro zjednodušení zanedbat zpětný krok, který se neuplatňuje při konverzi produktu do 5 %. [45, 46]



Symbols

E	enzym
S	substrát
ES	komplex enzym-substrát
P	produkt
k_1	rychlostní konstanta vzniku komplexu ES
k_{-1}	rychlostní konstanta rozpadu komplexu ES
k_2	rychlostní konstanta přeměny komplexu ES na produkt

Vedle katalytických vlastností enzymů sehrává významnou roli při měření tímto typem biosenzoru jeho inhibice. Interakce molekul enzymu a sledovaného analytu totiž může nabýt dvou různých podob, čemuž se přizpůsobuje celá taktika analýzy. Buď je analyt metabolizován enzymem a jeho kvantitativní parametr je zjištěn z měření katalytické transformace imobilizovaného enzymu, nebo analyt enzymatickou aktivitu utlumuje. V takovém případě se musí zakomponovat specifický postup, kterým se detekuje úbytek tvorby enzymatického produktu, jenž je úzce spjatý s koncentrací analytu. [47]

2.1.1 Katalytické měření

Imobilizované enzymy zajišťují vhodné podmínky pro to, aby proběhla požadovaná reakce, která se zviditelní vybranou transdukční strategií na převodníku. Pokud se setká substrát s enzymem, pokouší se navázat do aktivního centra enzymu v těsné blízkosti svých molekul, což má pozitivní účinek na vyšší výtěžnost reakce a zároveň se zbytečně neztrácí entropie formace tranzitního stavu. Navázáním substrátu se uplatňuje uvolnění vazebné energie, která je motorem k indukovanému přizpůsobení enzymu. Enzym rovněž zastřešuje, aby se reagující skupiny substrátu k sobě přibližovaly svými orbitaly ve správné orientaci. Pokud by tímto způsobem nebylo tranzitního stavu dosaženo a nebyl by dostatečně stabilizován, z velké pravděpodobnosti by k enzymatické přeměně nedošlo. [48, 49]

Enzym kombinuje několik katalytických procesů najednou. Například může docházet k dočasnému donorování protonu nebo naopak k jeho přijetí, což je charakteristické pro imidazolovou skupinu aminokyseliny His. Ta odjímá proton, aby mohlo vyústit štěpení vazby v substrátu, a následně se schová jako kyselina, která tento přebytečný proton poskytne odcházející skupině. K dosažení optimálního tranzitního stavu stabilizováním reakčního meziprojektu může dojít na základě elektrostatických interakcí. Parciální pozitivní náboj na uhlíku může být stabilizován interakcí s aniontem karboxylátu; obdobně negativně nabitý oxoaniont se stabilizuje iontem kovu, který vystupuje jako elektrofil. Součástí aktivního centra enzymu často bývá nukleofilní molekula, která napomáhá rychleji formovat intermediát, jenž se posoupně rozpadá. Touto vlastností disponují kofaktory thiamindifosfát nebo pyridoxalfosfát, které z reakčního centra intermediátu odtahují elektrony. [49]

2.1.2 Inhibiční měření

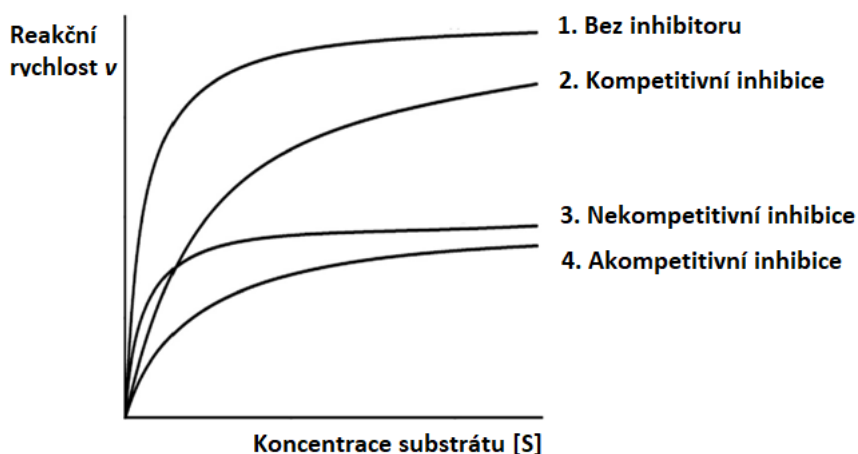
Vedle přímého měření lze nepřímě stanovit koncentraci analytu skrze specifickou interakci, kdy jsou inhibovány biokatalytické vlastnosti imobilizovaného enzymu. Děje se tak prostřednictvím látek, které nevystupují jako substrát, nýbrž se vážou na enzym nebo enzym-substrátový komplex a interferují s enzymatickou reakcí. Pozitivním faktorem nepřímého měření je vysoká citlivost na velmi nízké koncentrace inhibičních látek, což navyšuje senzitivitu biosenzoru. [50]

Pro kvantitativní určení parametrů je nutné rozeznat typ inhibice, kterou inhibitor podněcuje. Inhibice enzymu může být buď reverzibilní, kdy lze vazbu inhibitoru zvrátit snížením jeho koncentrace, nebo ireverzibilní, kdy kovalentní vazba inhibitoru vede k trvalému zastavení enzymatické reakce. Rozdílem mezi ireverzibilní inhibicí a ireverzibilní enzymovou inaktivací jsou drastické podmínky nevhodně zvoleného pH nebo teploty, které způsobují destrukci celé proteinové skupiny. Inhibitor se může navázat na enzym třemi různými způsoby, které jsou popsány v tabulce 2.1. Typ inhibice lze zjistit ze sestavení kalibračních křivek průběhu enzymatické reakce po inkubaci s inhibitorem. Průběhy jednotlivých křivek podle typů inhibice jsou zobrazeny na obrázku 2.1. [50, 51]

Tabulka 2.1 – Porovnání různých vazebných mechanismů inhibice a jejich efektu na kinetické parametry

Typ inhibice	Způsob navázání	Kinetické parametry
Kompetitivní	Inhibitor se kompetitivně váže na aktivní vazebné místo, neboť je strukturně podobný substrátu. Účinek lze odstranit zvýšením koncentrace substrátu.	V_m se nemění, K_M se zvyšuje
Nekompetitivní	Inhibitor má své vlastní vazebné místo a váže se na samotný enzym nebo komplex ES.	V_m se snižuje, K_M se nemění
Akompetitivní	Inhibitor se váže na vlastní vazebné místo po změně konformace vznikem komplexu ES.	V_m se snižuje, K_M se snižuje

Poznámka: V_m odpovídá maximální rychlosti (nasyčení) enzymatické reakce; K_M odpovídá koncentraci substrátu, kdy reakce dosahuje poloviční saturace enzymu.

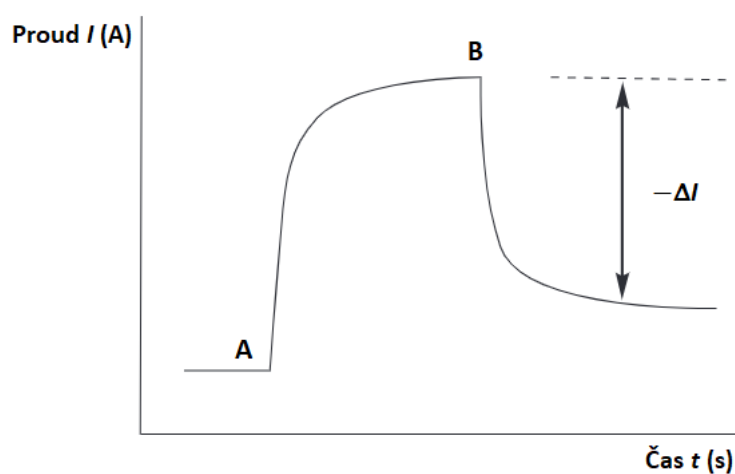


Obrázek 2.1 – Saturační křivky, převzato a upraveno z [50]

Při reverzibilní i ireverzibilní inhibici se enzymy regenerují, aby z praktického hlediska mohly být opakovaně používány k analýzám. Výsledný signál biosenzoru se následně může s každým měřením měnit, až úplně utlumit z toho důvodu, že po každém kroku inhibice-regenerace se část enzymatické aktivity ztrácí. Čím déle inhibitor působí na enzym, který není reaktivován, u enzymu postupně dochází k jeho stárnutí. Tento jev je přímo katalyzován enzymem samotným, až po určité době zůstává regenerace enzymu bez odpovědi. Zatímco je regenerace enzymů inhibovaných reverzibilně snazší, ne-li však stoprocentní, komplexnější přístup obnovy enzymatické funkce vyžadují enzymy zcela utlumené svým inhibitorem ireverzibilně. Regenerace se provádí pomocí oximů, EDTA nebo sloučenin thiolů.

1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-propandibromid (TMB-4) se kupříkladu používá na reaktivaci ireverzibilně inhibované acetylcholinsterázy (AChE). Musí se regenerovat do 10 minut po inhibici pro docílení maximální reaktivity bez poškození vrstvy imobilizovaného enzymu. Ani zde není regenerace pomocí TMB-4 stoprocentně účinná. Po 11 krocích klesá enzymatická aktivita AChE na 60 %. [52]

Odezva biosenzoru se určuje posouzením odchylky v enzymové aktivitě předtím, než je enzym vystaven inhibitoru, a potom, kdy dochází k inhibici, viz obrázek 2.2, na němž je znázorněn typický model stanovení koncentrace organofosfátů (OP), které inhibují AChE spřaženou s cholinoxidázou (ChOx). [53]



Obrázek 2.2 – Záznam inhibice bienzymu AChE-ChOx inhibitorem OP, převzato a upraveno z [53]

Poznámka: (A) Přídavek substrátu, (B) přídavek inhibitoru.

V prvním kroku se stanovuje aktivita imobilizovaného enzymu před expozicí inhibitoru (A_0). V druhém kroku se do reakční směsi zavádí substrát s inhibitorem a měří se aktivita imobilizovaného senzoru po expozici inhibitoru (A_i). Výsledkem se stává pokles signálu, který je přímo úměrný koncentraci inhibitoru. Koncentrace inhibitoru je vyčíslena měřením procenta inhibice (viz rovnice 2.2) před inkubací a po inkubaci s inhibitorem. [50]

$$I(\%) = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \cdot 100 \quad (2.2)$$

Symboly

- $I(\%)$ procento inhibice
- A_0 aktivita enzymu před expozicí inhibitoru
- A_i aktivita enzymu po expozici inhibitoru

2.1.3 Měření multienzymovou kaskádou

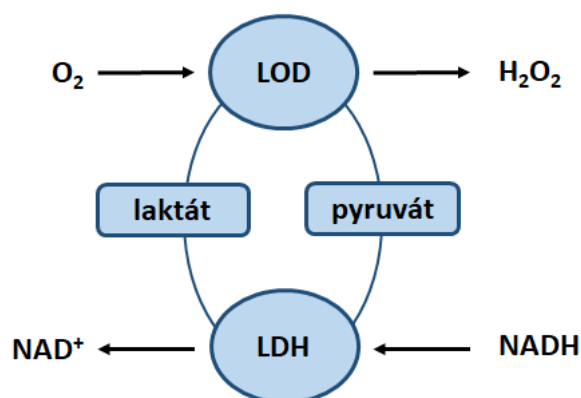
Pokud na výstupu příslušné enzymové reakce není dobře detekovatelná látka, do reakce se zakomponuje druhý indikátorový enzym, který poskytuje kvantitativní údaj o sledovaném analytu. Práce s více enzymy vykazuje mnohem lepší výsledky a širší uplatnění pro praktické analýzy. [54]

Multienzymový senzor je nejčastěji sestaven tak, aby pracoval v elektrochemickém uspořádání, tedy na základě potenciometrické nebo amperometrické detekce. V takovém případě musí být poslední substrát konvertován na látku, která může podléhat oxidačně-redukční přeměně oxidoreduktázami. Na konverzi analytu se tak mohou podílet jiné typy enzymů, jako jsou transferázy, hydrolázy, izomerázy nebo lyázy. Kaskády těchto redoxních a neredoxních párů vede ke generování elektroaktivního H_2O_2 , který je schopný vyvolat elektrochemický signál. [54, 55]

První bi-enzymový systém sestavený z imobilizované hexokinázy (HK) a glukóza-6-fosfátdehydrogenázy (G6PD), kovalentně vázaných k polymerní matrix byl navržen v roce 1970 Klausem Mosbachem a kol. Ten později přišel s tří-enzymovým systémem, v němž HK a G6PD doplnila zasiťovaná β -galaktosidáza. V porovnání se systémem, který obsahoval stejné enzymy, ale nezesíťované do kaskády, vykazuje multienzymový senzor lepší kinetické chování. [56, 57]

Přídavný enzym může být navíc zahrnut, aby kompenzoval případné interference. Příkladem je biosenzor ke stanovení sacharózy, který je sestavený z invertázy hydrolyzující sacharózu na D-fruktózu a směs anomerů α -D-glukózy a β -D-glukózy. α -D-glukóza je převedena mutarotázou na druhý anomer, který je konečně přeměněn GOD a amperometricky detekován za vyvolání průchodu elektrického proudu. Interferovat zde může endogenní glukóza z biologických vzorků nebo vzorků potravin. Tu zachytává aditivní vrstva GOD umístěná před invertázou. [58]

Vyšší selektivity a zesílení výsledného signálu jsou schopny systémy se zacyklovanými enzymy. Na této konfiguraci je sestaven senzor pro detekci kyseliny mléčné, jak je patrné na schématu v obrázku 2.3. V přítomnosti kyslíku se molekula laktátu oxiduje flavoproteinem laktát oxidázou (LOD) na pyruvát a H_2O_2 . Pyruvát je však zpětně přeměněn laktátdehydrogenázou (LDH) na laktát, po čemž se cyklus opakuje a výsledný zesílený signál je závislý na spotřebě kyslíku, nebo generování H_2O_2 . [59]

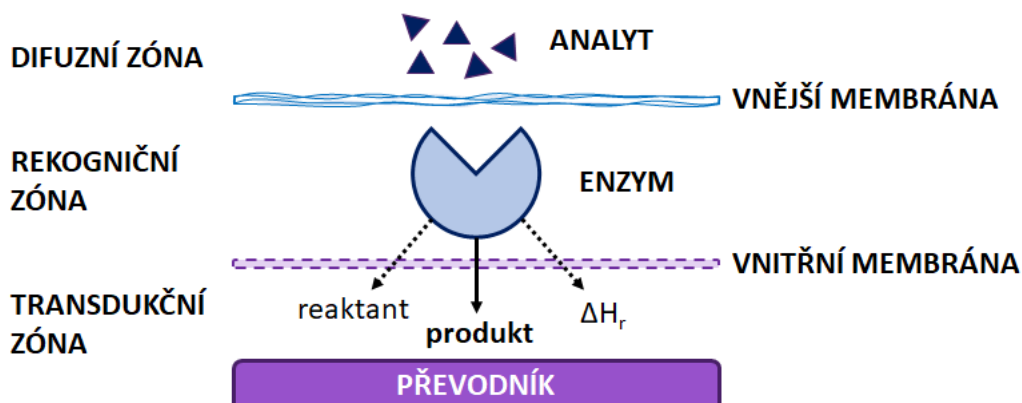


Obrázek 2.3 – Chemická amplifikace signálu v laktátovém senzoru, převzato z [59]

2.2 Základní konfigurace enzymatického biosenzoru

Sestava biosenzoru s enzymatickou detekcí (viz obrázek 2.4) je založena na specifické interakci určované apoenzymem. Ten se indukovaným způsobem přizpůsobí tvaru molekuly analytu v případě, že je komplementární vůči aktivnímu centru enzymu. Čím je specifita vyšší, tím nižší koncentrace analytu umí biosenzor zaznamenat. Pro detekci jde o jednu z klíčových výhod, neboť odpadá krok separační úpravy, protože enzym přemění pouze sobě specifický analyt ze směsi. [60, 61]

Aby enzym mohl splňovat své poslání, musí být vhodnou metodou imobilizován na povrch používaného převodníku kvůli formaci rekogniční vrstvy. Do ní difundují z analyzovaného roztoku reaktanty, kdy většinová část z nich podléhá coby substrát enzymatické reakci. Mezi enzymem a převodníkem pak konečně dochází k monitorování průběhu reakce tak, že je zaznamenán buď přírůstek produktu, nebo nadbytečné množství reaktantů, které se enzymaticky nespoteřeovalo. Z fyzikálního hlediska lze z velikosti uvolněné energie při enzymatické přeměně odečíst rychlostní konstanty přeměny, až samotnou koncentraci substrátu. Difuzi žádoucích částic mezi vrstvami moderují semipermeabilní membrány, které jsou inkorporované na rozhraních před a za rekogniční vrstvou. Vhodnou volbou vnější polopropustné vrstvy se předchází interferencím způsobených inhibitory. [59, 62]



Obrázek 2.4 – Typická sestava enzymatického biosenzoru, převzato a upraveno z [59]

2.3 Permselectivní membrány

Permselectivní membrány lze rozdělit do skupin podle způsobu, jak zabraňují průniku nežádoucích částic. Acetátová vlákna z derivátů celulózy, polypyrrol nebo polyanilin rozhodují o difuzi částic na základě jejich velikosti a skupina membrán tvořených Nafion™, polyvinylpyridinem a polyethersulfonem filtrují průnik částicím podle toho, jaký nesou celkový náboj. Polymerní vrstvy se na povrch biosenzoru deponují metodami drop-casting, spin-coating, dip-coating nebo elektrochemickou polymerací. Jejich stabilita je závislá na teplotě vnějšího prostředí nebo vlhkosti. Pro zvýšení adekvátní protekce eliminací interferenčních komponent se polymerní membrány kombinují nejčastěji v následujícím uspořádání:

- vnitřní vrstva m-fenylendiaminu – enzym – vnější vrstva polyuretanu,
- vnitřní vrstva Nafion™, polyfenylendiaminu – enzym – vnější vrstva polyuretanu,
- vnitřní vrstva chitosanu, chitinu – enzym – vnější vrstva polyuretanu.

Polyuretanové membrány se z praktických důvodů často volí pro vnější vrstvu u implantabilních senzorů vzhledem ke schopnosti rozšiřovat detekční rozsah měření a redukovat závislost na kyslíku u senzorů oxidačně založených. [62, 63]

Filmy zprostředkované elektropolymerizací z pyrrolu, fenolu, fenylendiaminu nebo substituovaných naftalenů se jako permeabilní membrány používaly od dob enzymatických biosenzorů první generace založených na modelu oxidačního měření glukózy. Obdobné designy se využívají pro měření kyseliny askorbové, kyseliny močové, laktátu nebo N-(4-hydroxyfenyl)acetamidu v séru. [64, 65]

NafionTM, polymer kyseliny perfluorsulfonové, využívá elektrostatických interakcí pro odpuzování záporně nabitých aniontů, aby membránou prošel pouze peroxid vodíku nebo jiné molekuly, nikoliv například kyselina askorbová nebo močová. [66]

Chitosan a chitin jsou přírodní, lineární amidosacharidové polymery obsažené v ulitách měkkýšů a korýšů. Chitin je složen z N-acetyl-D-glukosaminových jednotek, zatímco chitosan je získán deaminací chitinu. Vzhledem k tomu, že se jedná o látky nízké ceny a biologicky odbouratelné, jsou často spřaženy s enzymy kvůli přítomnosti aminových a hydroxylových skupin. Zajišťují hydrofobní prostředí a snadno se vážou na elektronegativní komponenty, čímž usnadňují imobilizaci enzymu na převodník. [67]

2.4 Imobilizační techniky

Za imobilizací se skrývá proces, pomocí něhož je enzym převeden na nerozpustnou stacionární formu, která je fyzikálně nebo chemicky spojena s pevným materiálem převodníku tak, aby enzym zůstal katalyticky aktivní. Imobilizace následně umožňuje vícenásobné použití enzymů pro měření nebo jejich zapojení do kontinuálních procesů. Další výhodou je jednodušší oddělení produktů od reakční směsi, zastavení reakce odejmutím enzymu z reakčního roztoku nebo zabránění proteinové kontaminaci z produktů. V porovnání s volným a imobilizovaným enzymem vykazuje imobilizovaný enzym vyšší stabilitu vůči změnám pH a teploty prostředí, na něž je enzym citlivý. V takovém případě je hodnota K_M u volného enzymu až 1,25krát snížena. Imobilizovaný enzym navíc vykazuje zvýšenou odolnost proti denaturačním činidlům či proteolytickému štěpení. Jednotlivé techniky imobilizace jsou schematicky shrnuty v obrázku 2.5 na straně 42. [68, 69]

2.4.1 Adsorpce na pevný povrch

Adsorpce se řadí mezi první použitou techniku vůbec, při níž je enzym přímo adsorbován na pevný povrch převodníku nebo na pevný nosič. Imobilizaci zprostředkovávají slabé elektrostatické interakce mezi sorbentem a enzymem, zejména vodíkové můstky, van der Waalsovy síly, kohezní síly, adhezní síly nebo hydrofobní interakce. Vzhledem ke slabým interakcím může v případě vyššího množství substrátu a vyšší iontové síle média docházet k samovolné desorpci, což limituje dlouhodobé používání. Adsorbovat lze až 1 g enzymu na gram nosiče. Nejčastějšími využívanými

matricemi k adsorpci jsou aktivní uhlí, porézní sklo, oxid hlinitý, silikagel nebo fosforečnany. [70]

2.4.2 Kovalentní vazba

Kovalentní vazba mezi enzymem a nerozpustným nosičem vzniká na podkladě jejich funkčních skupin. Na vzniku kovalentní vazby z funkčních skupin enzymů se nejvíce účastní:

- α , ϵ nebo 3-aminoskupina,
- α karboxylová skupina,
- β nebo γ karboxylová skupina Asp, Glu,
- thiolová skupina Cys,
- hydroxylová skupina Ser, Thr,
- fenolová skupina Tyr,
- imidazolová skupina His.

Pro vznik kovalentní vazby s výše zmíněnými funkčními skupinami enzymu se nabízí jako nosiče celulóza a její deriváty, polyakrylamid, želatina, kolagen, silikáty, oxidy kovů, nanotrubičky nebo polymerní nanočástice. Mezi podmiňující interakce pro vznik kovalentní vazby se řadí diazotační reakce, peptidová vazba, alkylace či síťovací polyfunkční činidla (glutaraldehyd). Imobilizovat lze už 0,02 g enzymu na gram nosiče. Ačkoliv je kovalentní vazba v porovnání s adsorpcí stabilnější, celkový proces má drastičtější průběh, vlivem čehož může dojít k částečné ztrátě aktivity enzymu. [32, 69]

2.4.3 Iontová vazba

Polysacharidy a syntetické polymery disponují výměnnou kapacitou iontového měniče. Mezi vyměněným místem a enzymem se následně mohou vytvořit iontové vazby, které neovlivňují změnu aktivity enzymu. Jelikož je vazba na ionex interakcí elektrostatického charakteru, tak v roztoku o vysoké iontové síle v kombinaci s nevhodným pH dochází k oslabení vazebných sil, a to má za následek únik enzymu z nosiče. [71]

2.4.4 Chelatace

Polárně nabitě aminoskupiny se mohou vázat s ionty kovů pomocí koordinačně kovalentní vazby za vzniku chelátu. Kov je úměrně inkorporován k povrchu nosiče a k němu je slabou vazbou vázán ligand, který se následně vymění s enzymem. Vzhledem k tomu, že se jedná o reverzibilní vazbu, enzym lze vytěsnit ligandem s vyšší afinitou ke kovovému iontu. Přestože nedochází ke změně v aktivním centru enzymu a enzym nemá tolik sníženou dobu skladování, použití takového senzoru je omezeno kvůli reagenčním potenciálně ohrožujícím zdravotí. [71]

2.4.5 Sulfidická vazba

Vazba enzymu na matrix přes sulfidický můstek je zařazena mezi reverzibilní vazby. Sulfidický můstek se nejčastěji formuje mezi nosičem a volnou thiolovou skupinou, kterou disponuje například Cys. Jedinou nevýhodou je vysoká citlivost sulfidického můstku na změny pH. Vhodnou matricí pro zprostředkování jsou silikáty aktivované jodoacetátem nebo maleimidem. [72]

2.4.6 Afinitní vazba

Pro imobilizaci lze využít jednoduché, zato vysoko afinitní interakce na podkladě komplexu antigen-protilátka. Imunosorbentový nosič je speciálně syntetizován proti specifickému typu enzymu. Na svém povrchu proto obsahuje protilátky mířené proti povrchovým epitopům enzymu. [71]

2.4.7 Zesít'ování

Metoda zesít'ování nebo kopolymerace se odlišuje od ostatních tím, že k ireverzibilní imobilizaci není zapotřebí nerozpustný nosič. Enzym není kovalentně vázán k matrici, ale je přítomen v reakční směsi ve formě zesít'ovaných krystalů nebo agregátů. Dle toho se rozlišují dvě strategie – imobilizace zesít'ovaných agregátů (cross linking enzyme aggregates) a imobilizace zesít'ovaných krystalů (cross linking enzyme crystals). Princip stojí na propojení molekul enzymů kovalentními vazbami do formy nerozpustných retikulí, které mohou být nasměrovány na podkladový materiál nebo povrch senzoru. Zesít'ování se nejčastěji provádí glutaraldehydem, dextranem,

deriváty isokyanatanů, N,N-polyethylenem, N,N'-ethylenem, bis-maleimidem, benzidinem nebo diazoniovými solemi. [32, 69–71]

Podnětem imobilizace pro enzym je přítomnost fenolové skupiny na Tyr, thiolové skupiny na Cys, imidazolové skupiny na His, α aminoskupiny nebo 3-aminoskupiny na Lys. Například aminoskupina reaguje s aldehydickou skupinou glutaraldehydu za vzniku iminu, který lze stabilizovat například redukcí NaBH_4 na amin. Pokud nelze zesíťovat enzym, enzym se kompletuje s inertní bílkovinou vynikající velkým počtem aminoskupin, jako je například albumin. Tvorbou retikula však dochází ke změnám v konformaci enzymu, což se odráží na jeho snížené aktivitě, a proto je potřeba zesíťovat větší množství enzymů než u jiných technik. [69]

2.4.8 Zachycení

Enzym se zachycuje do přídatné matrice nebo polymerních vláken na povrchu senzoru či podkladu, a jimi mohou procházet jak substrát, tak produkty. Princip je založen na tom, že enzym je makromolekulárně větší než produkt či substrát, a vzhledem ke své velikosti tak může být zastaven ve vhodně širokém póru, jímž následně difundují pouze selektované částice. Šířka póru je tedy rozhodující vlastností. Čím menší je jeho velikost, tím méně enzymu lze touto metodou zachytit. Mezi nejpoužívanější polymery tvořící síť spadají alginát, kolagen, želatina, agaróza, karagenan, polyakrylamidový gel, polyuretanová pěna a acetátová vlákna. [69, 71]

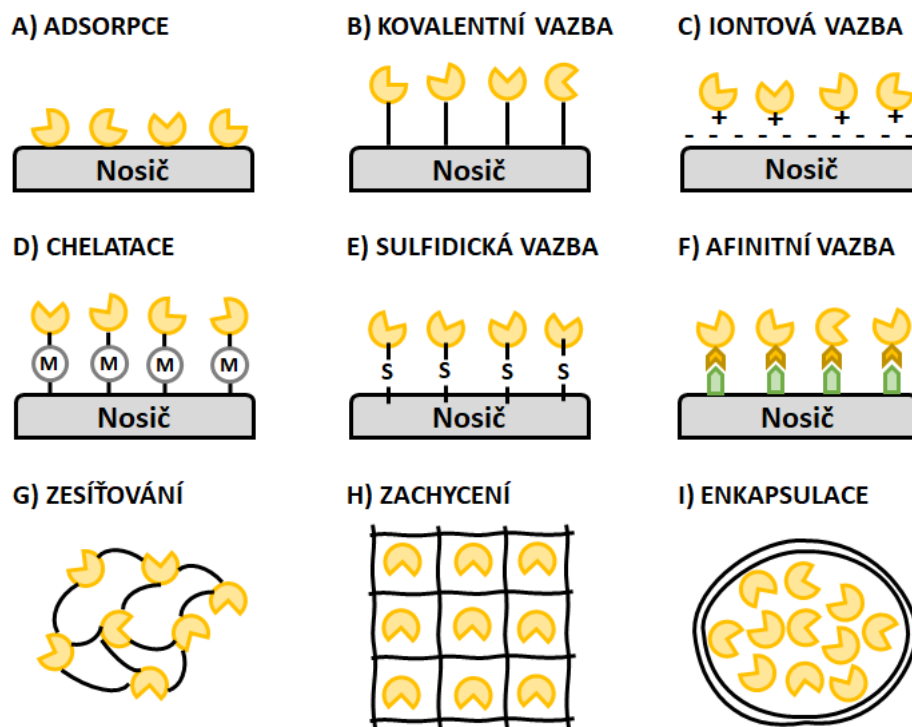
2.4.9 Enkapsulace

Speciálním typem zachycení je metoda enkapsulace, v níž je enzym imobilizován jeho uvězněním ve sférické semi-permeabilní membráně podobné kapsuli. U enkapsulace se opět uplatňuje jednoduchý velikostní princip. Makromolekulární enzym není schopný difundovat skrze membránu. Tuto možnost mají opět pouze malé molekuly substrátů a produktů, které selektivně opouští pouzdro. [32]

Zapouzdření je složeno ze dvou posloupných kroků. Makromolekulární enzym musí samovolně zformovat ve vodném prostředí útvary podobné kapičkám. Ty vytřídí dispergovaný monomer v rozpouštědle nemísitelném s vodou. Po smíchání obou médií hydrofobní monomery polymerují na rozhraní, konečně kolem kapičky enzymu, čímž se vytváří pouzdro. Vrstvy pouzder mohou být jednoduché nebo dvojité a formovány jsou

z alginátu, chitosanu, poly-L-lysinu, polyvinylacetátu, želatiny, dextrinu, celulózy nebo z jednotek H_3BO_3 . [71]

Na podobném principu je založena metoda imobilizace vysoušením, v němž se polymerací na rozhraní utváří mikrokapsule, která je postupně vysušována. Takto imobilizovány byly katalázy, lipázy a jiné enzymy zapouzdřením do ethylcelulózy nebo do polyethylenových vláken. [73]



Obrázek 2.5 – Metody imobilizace, převzato z [71]

3 VYUŽITÍ ENZYMATICKÝCH SENZORŮ

Senzory založené na enzymové detekci nachází praktická využití v různých oblastech průmyslu, potravinářství, zdravotnictví, zemědělství, životního prostředí nebo také vojenství, v případě detekce nebezpečných chemických či biologických agens. [74]

Pro analýzu vzorku v těchto sektorech je při použití enzymatického senzoru esenciální jeho nízká cena, spolehlivý, validní, přesný výsledek, který lze zjistit v krátkém časovém a prostorovém intervalu. Vzorky mohou být měřeny separátně od místa výskytu, kdy se sledovaný analyt metodou *off-line* vkládá do analytické soustavy s enzymem. *In vivo* senzory jsou ve své rozdílné podstatě implantované a kontinuálně detekují změny koncentrace sledovaného analytu v extracelulární tekutině. Méně invazivní model, který lze použít i nad rámec preklinických studií prováděných u laboratorních zvířat, vykazují *on-line* senzory, jež jsou integrované s odběrovým zařízením a implantované v těle nebo v biologickém materiálu. [75]

3.1 Aplikace v medicíně

3.1.1 Stanovení glukózy

Úkolem glukózového senzoru je monitorování koncentrace glukózy v krvi, zvláště u osob trpících hyperglykemií způsobenou absolutním či relativním nedostatkem inzulínu. Bez striktní kontroly glukózových hladin se u takového pacienta mohou rozvinout vážné zdravotní komplikace v podobě metabolického rozvratu, mikroangiopatií, neuropatií, rozvoji aterosklerózy nebo selhání životně důležitých orgánů. Hladina glukózy v krvi se u zdravých osob pohybuje ve fyziologickém rozmezí 4,9–6,9 mM, zato u diabetiků převyšuje hodnotu 40 mM. [76–78]

Senzor na glukózu operuje v amperometrickém či fotometrickém uspořádání za katalýzy enzymem GOD. Glukóza je následně kvantifikována množstvím vznikajícího peroxidu vodíku, nebo ubývajícím kyslíkem potřebným pro zoxidování glukózy. V dnešní době si hladinu glukózy dokáže změřit i lajk za použití osobních glukometrů, které nabyly kapesních podob, a to buď invazivně lancetou z kapky krve, nebo neinvazivně nositelným zařízením. [78, 79]

3.1.2 Stanovení cholesterolu

Vysoké hladiny celkového cholesterolu mohou poukazovat na rozvoj kardiovaskulárních onemocnění, které jsou spojené například s infarktem myokardu, anginou pectoris, cévní mozkovou příhodou, ischemií dolních končetin nebo hypertenzí. Tyto degenerativní změny jsou způsobeny ukládáním nadbytečného cholesterolu na vnitřní straně cév, které takto ztrácí svou elasticitu a zužují se. [80]

Biosenzor na cholesterol pracuje na stejném principu jako glukózový. Oxidaci cholesterolu zde katalyzuje cholesteroloxidáza a kvantifikuje se množství vznikajícího peroxidu vodíku, nebo úbytku kyslíku. Biosenzor operuje nejen na amperometrické bázi, ale i na fluorescenční, luminiscenční a SPR. [81]

3.1.3 Stanovení močoviny

Močovina je hepatálním produktem odbourávání amoniaku, který vzniká z metabolismu amoniaku a proteinů. Zvýšené koncentrace se podílejí na vzniku uremické neuropatie, gastrointestinálního krvácení nebo vedou k selhání ledvin. Snížené hodnoty mají za následek kachexii, nefritický syndrom či selhání jater. Pro stanovení močoviny se používá enzym ureáza (URE), která katalyzuje její hydrolýzu na NH_4^+ a HCO_3^- ionty, které způsobují změny pH roztoku měřené jiným typem převodníku. [82]

3.1.4 Stanovení laktátu

Určení koncentrace laktátu je klíčovým parametrem pro záchyt laktátové acidózy, která může vést k selhání levé komory srdeční, jater, ledvin nebo také způsobuje nástup diabetu či septického stavu. Stanovení podmiňuje spolupráce bi-enzymatické katalýzy LOD a LDH ve spřažení s kvantovými tečkami a diamantovými nanočásticemi. [83]

3.1.5 Stanovení tumorových markerů

Tumormarkery jsou molekuly proteinového charakteru, které slouží jako laboratorní ukazatelé výskytu zhoubného novotvaru. Obvykle se jedná o orientační stanovení, které varuje před rozvojem nádorového onemocnění nebo podle něhož se určuje primární lokalizace malignity nebo posuzuje odezva léčby. Koncentrace markeru závisí na stadiu nádoru, gradingu jeho buněk a stupně prokrvení. Mezi tumormarkery se například řadí enzymy alkalická fosfatáza (ALP; tumory pohybového aparátu), kyselá

fosfatáza (tumory prostaty), butyrylcholinesteráza (BChE; hepatální tumory), neuronspecifická enoláza (mozkové tumory, malobuněčný karcinom plic), thymidinkináza (hematologické malignity), prostatický specifický antigen (tumory prostaty) nebo antigen skvamózních buněk (tumory plic, cervixu, hlavy, krku). [84]

3.2 Aplikace v životním prostředí

3.2.1 Stanovení těžkých kovů

Kovové ionty jsou nedílnou součástí kofaktorů, jež jsou nezbytné pro přenos elektronů, atomů nebo molekul, aby mohlo dojít ke katalýze, a tím i k aktivaci enzymu. Naopak může docházet k inhibici enzymu, a to v místech, kde ionty těžkých kovů interagují s thiolovými nebo methylthiolovými funkčními skupinami aminokyselin. Některé enzymy jsou proto vysoce efektivní u identifikačních analýz těžkých kovů, které spočívají v aktivaci, nebo inhibici specifického enzymu. [85, 86]

Pomocí nitrátoreduktázy lze stanovit Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} . Konjugovaným systémem URE a glutamátdehydrogenázy se stanovuje Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} . Cr^{3+} se v odpadních vodách stanovuje inhibicí tyrozinázy (TRZ). Avidin-peroxidázou (HRP) lze analyzovat Pd^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Hg_2^{2+} . ALP vyhovuje pro stanovení Cd^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Bi^{3+} . GOD je možné použít pro analýzu Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} . URE lze navíc stanovit Sr^{2+} a mnoho dalších kovů. [85]

3.2.2 Stanovení organofosfátů

OP (pesticidy, insekticidy, herbicidy) silně zatěžují životní prostředí, ekosystém a lidské zdraví coby největší znečišťovatelé pozemní vody, atmosféry a půdy. Mezi nejpoužívanější OP v zemědělství spadají atrazin, kaptán, parathion, methylparathion, malathion, diazinon, chlorpyrifos, fenitrothion, dichlorvos a fosmet. Stanovení spočívá opět v inhibici specifického enzymu s tím rozdílem, že jde o časově náročnější a komplexnější měření, kde je zapotřebí enzymatické kaskády. Pro tato stanovení vyhovují enzymy AChE, BChE, GOD, ChOx, cholinesteráza, organofosfáthydroláza či fosfotriesteráza. [85, 87]

3.2.3 Stanovení sloučenin fenolů

Zdrojem fenolových sloučenin, které se dostávají do životního prostředí převážně z odpadních vod, jsou továrny zpracovávající plasty, polymery, pesticidy, detergenty, dezinfekční prostředky a barviva. I v minimálních koncentracích bývají často genotoxické, mutagenní, inhibují cesty fotosyntézy, respirační řetězec nebo enzymatické kaskády. TRZ lze stanovit chlorfenol; laktázou (LAC) pyrokatechol, guajakol a jeho deriváty; xantinoxidázou bisfenol A. [85, 87]

3.2.4 Stanovení léčiv

Léčiva a jejich metabolity se ve značném množství dostávají do komunálních odpadních vod, v nichž jsou detekovatelné do nanogramů na litr. Mezi nejčastěji objevující se farmaka patří nesteroidní antirevmatika a nesteroidní protizánětlivé léky, antihypertenziva, antipsychotika a antibiotika. Stanovit je lze s pomocí peroxidázy (POD; levetiracetam), LAC (methyldopa), TRZ (sulfonamidy) nebo HRP (paracetamol). [85]

3.3 Aplikace v potravinářství

3.3.1 Detekce mikroorganismů

Patogenní mikroorganismy nemusí vždy pozměnit organoleptické vlastnosti potravin, zato u konzumentů mohou být činitelem rozvoje závažných zdravotních potíží. Potravinové produkty se proto preventivně ověřují na záchyt *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* a *Salmonella spp.* [88]

Například přítomnost *E. coli* značící fekální znečištění je možné určit ze změn pH nebo konduktivity způsobené alkalizací, neboť bakterie produkcí URE uvolňují amoniak. Tyto změny jsou následně kvantifikovány hydrolázami asociovanými s potenciometrickými, konduktometrickými nebo optickými převodníky. [89]

Další možností je navázání enzymu kovalentní vazbou na specifickou protilátku proti antigenům daného mikroorganismu. Konjugát HRP nebo alkalické fosfatázy pak následně metabolizuje substrát s chromogenem na barevný produkt. Intenzita zabarvení konečně koreluje s koncentrací přítomného bakteriálního antigenu. [88]

Na podobné bázi pracují bakteriofágy pro detekci kontaminace potravin, kdy se geny kódující luciferázu asociují do genomu bakteriofága. Bakteriofág infikuje

hostitelskou bakteriální buňku a dříve nebioluminiscenční mikroorganismus je detekován chemiluminiscenčně. [90]

3.3.2 Kontrola kvality balených produktů

Špatně zabalený potravinový výrobek, jeho vystavení teplotám vyšším, než dovolují kritéria, nebo přítomnost škodlivých hladin kyslíku v atmosféře potravinářských plynů mohou podporovat růst patogenních mikroorganismů, až vývoj těkavých plynů při fermentaci. Pro detekci vznikajícího ethanolu se používá chromogen a imobilizovaná alkoholdehydrogenáza (ADH) katalyzující přeměnu ethanolu na acetaldehyd a H_2O_2 , který slouží jako substrát pro POD. Kvantifikována je změna intenzity zbarvení chromogenu. [91]

3.3.3 Fermentační procesy

Koncentrace ethanolu se vedle balených výrobků kontroluje u fermentačních procesů při výrobě alkoholických nápojů, mléčných výrobků, fermentovaných uzenin, organických kyselin, droždí, zeleniny, sýrů nebo těsta. Například stanovení ethanolu v alkoholických výrobcích je založeno na elektrochemické detekci při oxidaci ethanolu pomocí ADH s NAD^+ . Pro udržení maximální účinnosti fermentačních procesů se kromě ethanolu detekují i glukózové, lysinové, laktátové nebo glutamátové biochemické parametry. [89]

3.3.4 Kontrola kvality masa a ryb

Kontrola čerstvosti a kvality masa se zjišťuje měřením glukózového gradientu, který odpovídá aktivitě mikrobů na povrchu masa. Takový glukózový senzor je sestaven atypicky se zapřaženým nožem pro vsazení do masa. Podobně se amperometrickým senzorem s LOD stanovují koncentrace laktátu. [91]

U masa ryb při mikrobiální degradaci dochází k hromadění histaminu, který neovlivňuje morfologii masa ani se neodráží v zápachu. Na jeho detekci se kupříkladu využívá biosenzoru s enzymem diaminooxidázou. [92]

3.3.5 Stanovení volných radikálů a antioxidantů

Antioxidanty jsou klíčovou složkou při zpracování, distribuci a konečné přípravě potravinových produktů. Zabraňují oxidaci a vzniku volných radikálů, které nepříznivě

ovlivňují vlastnosti potravin. Do potravinových výrobků se proto přidávají různé typy antioxidantů. Množství volných radikálů nebo antioxidantů se stanovuje enzymaticky nejčastěji v amperometrickém uspořádání: superoxid (cytochrom c, superoxid-dismutáza, galaktózaoxidáza), oxid dusnatý (HRP), glutathion (HRP, TRZ, glutathionperoxidáza, glutathionreduktáza), kyselina močová (urikáza, urát oxidáza, HRP), kyselina askorbová (POD, askorbát oxidáza). [93]

3.4 Aplikace v biologické a chemické ochraně

Zbraně hromadného ničení sestavené pro armádní nebo teroristické účely mají za následek fatální škody na životech, ekonomii a životním prostředí. V primárním zájmu ochrany před biologickými a chemickými agens stojí jejich snadná, rychlá a okamžitá detekce. Zatímco uměle vyrobená chemická agens (výbušniny, nervové plyny, jedy, pesticidy) mají rychlý nástup účinku, biologická agens (bakterie, viry, toxiny, houby) po uplynutí inkubační doby představují mnohem závažnější riziko infekce s vysokou smrtností populace. [94]

Detekce biohazardních agens závisí na jejich interakci s organickou maticí. Tu mohou napodobit magnetické mikro až nanočástice přírodního původu. Na magnetické bázi operující elektrochemický převodník se následně kombinuje s enzymovým biosenzorem, na němž je kvantifikována enzymatická aktivita, která je v přítomnosti bojové látky buď spuštěna, nebo utlumena enzymatickým inhibítoem. [74]

Inhibici využívají i enzymové fluorescenční biosenzory, jimiž je možné detekovat například nervová agens. Princip je založen na aktivitě AChE, která za normálních okolností hydrolyzuje acetylcholin, při čemž se doprovodně uvolňuje jeden proton. Snížení pH registruje pH-senzitivní fluorescenční značka (fluorescein isothiokyanát), jejíž intenzita se s postupnou acidifikací snižuje. [95]

Zatímco na biologická agens se často používají imunosenzory, kde enzym vystupuje jako značka, u botulotoxinu A a E lze využít jeho enzymatické aktivity u SPR instrumentace, kdy štěpí imobilizovaný fluorogenní peptid obsahující prekurzor SNAP25. [94]

ZÁVĚR

V posledních letech se biosensing pomocí enzymu prokázal být přínosným pro kvalitativní a kvantitativní analýzu v medicíně, zemědělství, potravinářství nebo ochraně životního prostředí. Jednak svou vysokou citlivostí, stabilitou, rychlou odpovědí, nízkou cenou, možností miniaturizace a jednak vzhledem k nízkému limitu detekce, lineární odpovědi, jednoduché konstrukci a možností miniaturizace je s to se vyrovnat, či dokonce předčít běžné analytické metody. Před analýzou je totiž možné obejít se bez předseparačního kroku a výsledek z enzymatického biosenzoru dokáže zprostředkovat informace o analytu přímo v reálném čase. Už z těchto důvodů mají enzymatické biosenzory široký zárah v každodenním životě, ať se jedná o domácí monitoring diabetu nebo přenosné analyzátořy, které dokáže obsluhovat i laik.

Velkou nevýhodou se stává snížená selektivita a odpověď pro *in vivo* systémy z důvodu přítomnosti rušivých agens, které nabíhají k odstranění interference matrice. Práci enzymů zatěžují nevhodně zvolené teplotní a pH parametry, které pro měření musí vytvářet co nejvhodnější podmínky. Při vývoji a konstrukci musí být vyřešen problém se ztrátou enzymové aktivity, k níž může docházet při interakcích na imobilizovaném převodníku, a problém s krátkou životností enzymu, k níž se pojí jeho opakované používání.

Pro adresované problémy může být řešením enzymové inženýrství, jehož cílem je zvýšit stabilitu enzymu a minimalizovat endogenní interference, což již částečně kompenzují biosenzory třetí generace zaštiťující monitoring bez nutnosti použití reagentů, sekundárních značek nebo kroků k zamezení interferencí.

Zbylá omezení mohou pokrýt nadále přetrvávající výzkumy a vývoje objevující nové technologie, postupy, materiály a metody pro komercializaci nových kompatibilních biosenzorů, které mohou najít širší uplatnění ve sférách komerčních testových kitů, analýz na mikrofluidním čipu nebo v technologii biočipu.

ZDROJE

- [1] NAGEL, B., H. DELLWEG a L. M. GIERASCH. Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992). *Pure and Applied Chemistry*. 1992, **64**(1), 143-168. ISSN 1365-3075. Dostupné z: doi:10.1351/pac199264010143.
- [2] ESTRELA, P., N. BHALLA, P. JOLLY, N. FORMISANO a P. ESTRELA. Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*. 2016, **60**(1), 1-8. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20150001.
- [3] HUGHES, W. S. The potential difference between glass and electrolytes in contact with the glass. *Journal of the American Chemical Society*. 1922, **44**(12), 2860-2867. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja01433a021.
- [4] NELSON, J. M. a E. G. GRIFFIN. Adsorption of invertase. *Journal of the American Chemical Society*. 1916, **38**(5), 1109-1115. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja02262a018.
- [5] OTTO, A. M. *Warburg effect(s)—a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism*. 2016, **4**(1). ISSN 2049-3002. Dostupné z: doi:10.1186/s40170-016-0145-9.
- [6] AFLORI, M., I. NEACȘU a V. MELNIG. Analysis methods of oxygen consumption in biological systems. *Scientific Annals of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*. 2006.
- [7] Redox reactions of the oxygen electrode (Clark-type). In: *BioWiki* [online]. Toronto, 2014 [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: http://biologywiki.apps01.yorku.ca/images/6/69/Oxygen_electrochemistry.png.
- [8] CLARK, L. C. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *Transactions of the American Society for Artificial Internal Organs*. 1956, **2**, 41-48.
- [9] RENNEBERG, R., D. PFEIFFER, F. LISDAT, G. WILSON, U. WOLLENBERGER, F. LIGLER a Anthony P. F. TURNER. Frieder Scheller and the short history of biosensors. In: *Biosensing for the 21st Century*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008, s. 1-18. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. ISBN 978-3-540-75200-4. Dostupné z: doi:10.1007/10_2007_086.
- [10] BORGMANN, S., A. SCHULTE, S. NEUGEBAUER a W. SCHUHMANN, R.C. ALKIRE, D. M. KOLB, J. LIPKOWSKI. Amperometric biosensors. In: *Advances in Electrochemical Science and Engineering*. 1st. Wiley, 2011, s. 1-83, 411 s. ISBN 978-3-527-32885-7. Dostupné z: doi:10.1002/9783527644117.ch1.

- [11] CLARK, L. C. a C. LYONS. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1962, **102**(1), 29-45. ISSN 00778923. Dostupné z: doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.
- [12] LEE, H., Y. J. HONG, S. BAIK, T. HYEON a D. KIM. Enzyme-based glucose sensor: From invasive to wearable device. *Advanced Healthcare Materials*. 2018, **7**(8). ISSN 2192-2640. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201701150.
- [13] WANG, J. Electrochemical glucose biosensors. *Chemical Reviews*. 2008, **108**(2), 814-825. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr068123a.
- [14] BARTLETT, P. N., P. TEBBUTT a R. G. WHITAKER. Kinetic aspects of the use of modified electrodes and mediators in bioelectrochemistry. *Progress in Reaction Kinetics*. Pergamon Press, 1991, **16**(2), 55-155.
- [15] CASS, A. E. G., G. DAVIS, G. D. FRANCIS et al. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Analytical Chemistry*. 1984, **56**(4), 667-671. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00268a018.
- [16] CASTILLO, J., S. GÁSPÁR, S. LETH et al. Biosensors for life quality. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2004, **102**(2), 179-194. ISSN 09254005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2004.04.084.
- [17] RYABOV, A. D., A. AMON, R. K. GORBATOVA, E. S. RYABOVA a B. B. GNEDENKO. Mechanism of a “jumping off” ferricenium in glucose oxidase-d-glucose-ferrocene micellar electrochemical systems. *The Journal of Physical Chemistry*. 1995, **99**(38), 14072–14077. Dostupné z: doi:10.1021/j100038a044.
- [18] RYABOV, A. D., Y. N. FIRSOVA, A. Y. ERSHOV a I. A. DEMENTIEV. Spectrophotometric kinetic study and analytical implications of the glucose oxidase-catalyzed reduction of [MIII(LL)2Cl2] complexes by d-glucose (M=Os and Ru, LL=2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline type ligands). *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 1999, **4**(2), 175-182. ISSN 0949-8257. Dostupné z: doi:10.1007/s007750050302.
- [19] KULYS, J., T. BUCH-RASMUSSEN, K. BECHGAARD, V. RAZUMAS, J. KAZLAUSKAITE, J. MARCINKEVICIENE, J. B. CHRISTENSEN a H. E. HANSEN. Study of the new electron transfer mediators in glucose oxidase catalysis. *Journal of Molecular Catalysis*. 1994, **91**(3), 407-420. ISSN 03045102. Dostupné z: doi:10.1016/0304-5102(94)00042-5.
- [20] KULYS, J. J. a N. K. ČÉNAS. Oxidation of glucose oxidase from *Penicillium vitale* by one- and two-electron acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1983, **744**(1), 57-63. ISSN 01674838. Dostupné z: doi:10.1016/0167-4838(83)90340-0.
- [21] BETSO, S. R., M. H. KLAPPER a L. B. ANDERSON. Electrochemical studies of heme proteins. Coulometric, polarographic, and combined spectroelectrochemical methods for reduction of the heme prosthetic group in cytochrome c. *Journal of the*

- American Chemical Society*. 1972, **94**(23), 8197-8204. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja00778a042.
- [22] YEH, P. a T. KUWANA. Reversible electrode reaction of cytochrome c. *Chemistry Letters*. 1977, **6**(10), 1145-1148. ISSN 0366-7022. Dostupné z: doi:10.1246/cl.1977.1145.
- [23] EDDOWES, S. R., H. A. O. KLAPPER a K. ANDERSON. 327 - The electrochemistry of cytochrome c. investigation of the mechanism of the 4,4'-bipyridyl surface modified gold electrode. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 1980, **7**(3), 527-537. ISSN 03024598. Dostupné z: doi:10.1016/0302-4598(80)80012-2.
- [24] FINKLEA, H. O. Self-assembled monolayers on electrodes. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. New York: Wiley, 2000, s. 10090–10115.
- [25] KATZ, E. a I. WILLNER. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications. *Angewandte Chemie International Edition*. 2004, **43**(45), 6042-6108. ISSN 1433-7851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200400651.
- [26] MALHOTRA, S., A. VERMA, N. TYAGI a V. KUMAR. Biosensors: Principle, types and applications. *International Journal of Advance Research and Innovative Ideas in Education*. 2017, **3**(2), 3639-3644.
- [27] SABR, A. K. Biosensors. *American Journal of Biomedical Engineering*. 2016, **6**(6), 170-179. Dostupné z: doi:10.5923/j.ajbe.20160606.03.
- [28] MULCHANDANI, A., K. R. ROGERS, ed. *Enzyme and microbial biosensors: techniques and protocols*. Totowa: Humana Press, 1998. Methods in biotechnology, vol. 6. ISBN 0-89603-410-0. Dostupné z: doi:10.1385/0-89603-410-0:3.
- [29] TURNER, A. P. F. Biosensors-sense and sensitivity. *Science*. 2000, **290**(5495), 1315-1317. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.290.5495.1315.
- [30] WANG, X., X. LU a J. CHEN. Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 2014, **2**, 25-32. ISSN 22141588. Dostupné z: doi:10.1016/j.teac.2014.04.001.
- [31] YANG, H. Enzyme-based ultrasensitive electrochemical biosensors. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2012, **16**(3-4), 422-428. ISSN 13675931. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2012.03.015.
- [32] MALHOTRA, B. D. a M. A. ALI. Nanomaterials in biosensors. *Nanomaterials for Biosensors*. Elsevier, 2018, 1-74. ISBN 9780323449236. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-44923-6.00001-7.

- [33] CONROY, P. J., S. HEARTY, P. LEONARD a R. J. O'KENNEDY. *Antibody production, design and use for biosensor-based applications*. 2009, **20**(1), 10-26. ISSN 10849521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcd.2009.01.010.
- [34] PALECEK, E., F. SCHELLER a Wang J., ed. *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2006. ISBN 9780444521507.
- [35] MAHENDRAN, G., T. SAVITHA, A. Y.Z. KHALIFA, A. SHARMA a A. SANKARANARAYANAN. Evaluation of environment by microbial sensors. *Bioprospecting of Microbial Diversity*. Elsevier, 2022, 407-424. ISBN 9780323909587. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-90958-7.00010-8.
- [36] HABIMANA, J., J. JI a X. SUN. Minireview: Trends in optical-based biosensors for point-of-care bacterial pathogen detection for food safety and clinical diagnostics. *Analytical Letters*. 2018, **51**(18), 2933-2966. ISSN 0003-2719. Dostupné z: doi:10.1080/00032719.2018.1458104.
- [37] THÉVENOT, D. R., K. TOTH, R. A. DURST a G. S. WILSON. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. International Union of Pure and Applied Chemistry. *Biosensors and Bioelectronics*. 2001, **16**(1-2), 121-131. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/S0956-5663(01)00115-4.
- [38] SETHI, R. S. Transducer aspects of biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 1994, **9**(3), 243-264. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/0956-5663(94)80127-4.
- [39] THÉVENOT, D. R., K. TOTH, R. A. DURST a G. S. WILSON. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Analytical Letters*. 2007, **34**(5), 635-659. ISSN 0003-2719. Dostupné z: doi:10.1081/AL-100103209.
- [40] BăNICĂ, F.-G. Optical sensors – fundamentals. In: *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*. 1st. Wiley, 2012, s. 404-434. ISBN 978-047-0710-661. Dostupné z: doi:10.1002/9781118354162.ch18.
- [41] ESTRELA, P., P. DAMBORSKÝ, J. ŠVITEL a J. KATRLÍK. Optical biosensors. *Essays in Biochemistry*. 2016, **60**(1), 91-100. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20150010.
- [42] POHANKA, M. Overview of piezoelectric biosensors, immunosensors and DNA sensors and their applications. *Materials*. 2018, **11**(3). ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma11030448.
- [43] ZIA, R., A. TAJ, S. YOUNIS et al. Application of nanosensors for pesticide detection. *Nanosensors for Smart Agriculture*. Elsevier, 2022, 259-302. ISBN 9780128245545. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-824554-5.00006-9.

- [44] NARESH, V. a N. LEE. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. *Sensors*. 2021, **21**(4). ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s21041109.
- [45] HECKMANN, C. M. a F. PARADISI. Looking back: A short history of the discovery of enzymes and how they became powerful chemical tools. *ChemCatChem*. 2020, **12**(24), 6082-6102. ISSN 1867-3880. Dostupné z: doi:10.1002/cctc.202001107.
- [46] ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*. 2015, **59**, 1-41. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/bse0590001.
- [47] JUSTINO, C. I. L., A. C. FREITAS, R. PEREIRA, A. C. DUARTE a T. A. P. ROCHA SANTOS. Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015, **68**, 2-17. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2015.03.006.
- [48] COOPER, G. *The Cell: A Molecular Approach*. 2. vyd. Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates Inc, 2000. ISBN 0-87893-106-6.
- [49] PALMER, T. a P. L. BONNER. The chemical nature of enzyme catalysis. *Enzymes*. Elsevier, 2011, 189-221. ISBN 9781904275275. Dostupné z: doi:10.1533/9780857099921.2.189.
- [50] BACHAN UPADHYAY, L. S. a N. VERMA. Enzyme inhibition based biosensors: A review. *Analytical Letters*. 2013, **46**(2), 225-241. ISSN 0003-2719. Dostupné z: doi:10.1080/00032719.2012.713069.
- [51] LI, J., H. CHANG, N. ZHANG, Y. HE, D. ZHANG, B. LIU a Y. FANG. Recent advances in enzyme inhibition based-electrochemical biosensors for pharmaceutical and environmental analysis. *Talanta*. 2023, **253**. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2022.124092.
- [52] AMINE, A., H. MOHAMMADI, I. BOURAIS a G. PALLESCHI. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006, **21**(8), 1405-1423. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2005.07.012.
- [53] ANZAI, J. Biosensors for the detection of OP nerve agents. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Elsevier, 2015, 925-934. ISBN 9780128001592. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800159-2.00062-2.
- [54] HAN, Y. D., Y. H. JANG a H. C. YOON. Cascadic multienzyme reaction-based electrochemical biosensors. *Biosensors Based on Aptamers and Enzymes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014, 221-251. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. ISBN 978-3-642-54142-1. Dostupné z: doi:10.1007/10_2013_228.

- [55] BAGAL-KESTWAL, D. R., M. H. PAN a B. CHIANG. Electrically nanowired-enzymes for probe modification and sensor fabrication. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018, **121**, 223-235. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2018.09.018.
- [56] MOSBACH, K., B. MATTIASSON, E. HEMMER, D. HOLME, A. LAMVIK, E. SUNDE a N. A. SØRENSEN. Matrix-bound enzymes. Part II: Studies on a matrix-bound two-enzyme-system. *Acta Chemica Scandinavica*. 1970, **24**, 2093-2100. ISSN 0904-213X. Dostupné z: doi:10.3891/acta.chem.scand.24-2093.
- [57] MATTIASSON, B. a K. MOSBACH. Studies on a matrix-bound three-enzyme system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*. 1971, **235**(1), 253-257. ISSN 00052744. Dostupné z: doi:10.1016/0005-2744(71)90054-4.
- [58] KUCHERENKO, I. S., O. O. SOLDATKIN, S. V. DZYADEVYCH a A. P. SOLDATKIN. Electrochemical biosensors based on multienzyme systems: Main groups, advantages and limitations – A review. *Analytica Chimica Acta*. 2020, **1111**, 114-131. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2020.03.034.
- [59] BĂNICĂ, F.-G. Enzymes and enzymatic sensors. In: *Chemical Sensors and Biosensors*. 1st. Wiley, 2012, s. 28-49. ISBN 978-047-0710-661. Dostupné z: doi:10.1002/9781118354162.ch3.
- [60] PERUMAL, V. a U. HASHIM. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of Applied Biomedicine*. 2014, **12**(1), 1-15. ISSN 1214021X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jab.2013.02.001.
- [61] WANG, T., X. FAN, R. LI, J. XU a J. LIU. Multi-enzyme-synergetic ultrathin protein nanosheets display high efficient and switch on/off antibacterial activities. *Chemical Engineering Journal*. 2021, **416**. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2021.129082.
- [62] KULKARNI, T. a G. SLAUGHTER. Application of semipermeable membranes in glucose biosensing. *Membranes*. 2016, **6**(4). ISSN 2077-0375. Dostupné z: doi:10.3390/membranes6040055.
- [63] WANG, B., L. FENG, B. KOO a H. G. MONBOUQUETTE. A complete electroenzymatic choline microprobe based on nanostructured platinum microelectrodes and an IrO_x on-probe reference electrode. *Electroanalysis*. 2018, **31**(7), 1249-1253. ISSN 1040-0397. Dostupné z: doi:10.1002/elan.201900039.
- [64] PARK, J., J. R. SEMPIONATTO, J. KIM, Y. JEONG, J. GU, J. WANG a I. PARK. Microscale biosensor array based on flexible polymeric platform toward lab-on-a-needle: Real-time multiparameter biomedical assays on curved needle surfaces. *ACS Sensors*. 2020, **5**(5), 1363-1373. ISSN 2379-3694. Dostupné z: doi:10.1021/acssensors.0c00078.
- [65] GANESANA, M., E. TRIKANTZOPOULOS, Y. MANIAR, S. T. LEE a B. J. VENTON. Development of a novel micro biosensor for in vivo monitoring of

- glutamate release in the brain. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019, **130**, 103-109. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2019.01.049.
- [66] OLEJNIK, A., J. KARCZEWSKI, A. DOŁĘGA, K. SIUZDAK a K. GROCHOWSKA. Novel approach to interference analysis of glucose sensing materials coated with Nafion. *Bioelectrochemistry*. 2020, **135**. ISSN 15675394. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioelechem.2020.107575.
- [67] KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004, **35**(2-3), 126-139. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/j.enzmictec.2003.12.013.
- [68] CALIFANO, V. a A. COSTANTINI. Enzyme immobilization and biocatalysis. *Catalysts*. 2021, **11**(7). ISSN 2073-4344. Dostupné z: doi:10.3390/catal11070823.
- [69] KHAN, M. R. Immobilized enzymes: A comprehensive review. *Bulletin of the National Research Centre*. 2021, **45**(1). ISSN 2522-8307. Dostupné z: doi:10.1186/s42269-021-00649-0.
- [70] JESIONOWSKI, T., J. ZDARTA a B. KRAJEWSKA. Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption*. 2014, **20**(5-6), 801-821. ISSN 0929-5607. Dostupné z: doi:10.1007/s10450-014-9623-y.
- [71] KRISHNAMOORTHY, S., A. BANERJEE a A. ROYCHOUDHURY. Immobilized enzyme technology: Potentiality and prospects. *Journal of Enzymology and Metabolism*. 2015, **1**(1). ISSN 2455-4774.
- [72] GÓRECKA, E. a M. JASTRZĘBSKA. Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnology and Food Science*. 2011, **75**(1), 65-86. ISSN 2084-0136.
- [73] HOSSEINI, S. H., S. A. HOSSEINI, N. ZOHREH, M. YAGHOUBI a A. POURJAVADI. Covalent immobilization of cellulase using magnetic poly(ionic liquid) support: Improvement of the enzyme activity and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018, **66**(4), 789-798. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.7b03922.
- [74] KAUR, J., S. CHOUDHARY, R. CHAUDHARI, R. D. JAYANT a A. JOSHI. Enzyme-based biosensors. In: *Bioelectronics and Medical Devices*. 1st. Amsterdam: Elsevier, 2019, s. 211-240. ISBN 9780081024201. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-102420-1.00013-3.
- [75] ROCCHITTA, G., A. SPANU, S. BABUDIERI et al. Enzyme biosensors for biomedical applications: Strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids. *Sensors*. 2016, **16**(6). ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s16060780.

- [76] MARTÍN-TIMÓN, I. Type 2 diabetes and cardiovascular disease: Have all risk factors the same strength?. *World Journal of Diabetes*. 2014, **5**(4), 444-70. ISSN 1948-9358. Dostupné z: doi:10.4239/wjd.v5.i4.444.
- [77] SI, P., Y. HUANG, T. WANG a J. MA. Nanomaterials for electrochemical non-enzymatic glucose biosensors. *RSC Advances*. 2013, **3**(11), 3487–3502. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/c2ra22360k.
- [78] BRUEN, D., C. DELANEY, L. FLOREA a D. DIAMOND. Glucose sensing for diabetes monitoring: Recent developments. *Sensors*. 2017, **17**(8). ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s17081866.
- [79] KORNECKI, J. F., D. CARBALLARES, P. W. TARDIOLI, R. C. RODRIGUES, Á. BERENQUER-MURCIA, A. R. ALCÁNTARA a R. FERNANDEZ-LAFUENTE. Enzyme production of d-gluconic acid and glucose oxidase: Successful tales of cascade reactions. *Catalysis Science & Technology*. 2020, **10**(17), 5740-5771. ISSN 2044-4753. Dostupné z: doi:10.1039/D0CY00819B.
- [80] LATA, K., V. DHULL a V. HOODA. Fabrication and optimization of ChE/ChO/HRP-AuNPs/c-MWCNTs based silver electrode for determining total cholesterol in serum. *Biochemistry Research International*. 2016, **2016**, 1-11. ISSN 2090-2247. Dostupné z: doi:10.1155/2016/1545206.
- [81] ZHANG, W. a G. LI. Third-Generation biosensors based on the direct electron transfer of proteins. *Analytical Sciences*. 2004, **20**(4), 603-609. ISSN 0910-6340. Dostupné z: doi:10.2116/analsci.20.603.
- [82] SINGH, S., M. SHARMA a G. SINGH. Recent advancements in urea biosensors for biomedical applications. *IET Nanobiotechnology*. 2021, **15**(4), 358-379. ISSN 1751-8741. Dostupné z: doi:10.1049/nbt2.12050.
- [83] RATHEE, K., V. DHULL, R. DHULL a S. SINGH. Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2016, **5**, 35-54. ISSN 24055808. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrep.2015.11.010.
- [84] YANG, G., Z. XIAO, C. TANG, Y. DENG, H. HUANG a Z. HE. Recent advances in biosensor for detection of lung cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019, **141**. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2019.111416.
- [85] SARKAR, A., K. D. SARKAR, V. AMRUTHA a K. DUTTA. An overview of enzyme-based biosensors for environmental monitoring. *Tools, Techniques and Protocols for Monitoring Environmental Contaminants*. Elsevier, 2019, 307-329. ISBN 9780128146798. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814679-8.00015-7.

- [86] MENG, Y., W. LI, X. PAN a G. M. GADD. Applications of nanozymes in the environment. *Environmental Science: Nano*. 2020, **7**(5), 1305-1318. ISSN 2051-8153. Dostupné z: doi:10.1039/C9EN01089K.
- [87] GAVRILAŞ, S., C. Ş. URSACHI, S. PERŢA-CRIŞAN a F.-D. MUNTEANU. Recent trends in biosensors for environmental quality monitoring. *Sensors*. 2022, **22**(4). ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s22041513.
- [88] YASMIN, J., M. R. AHMED a B.-K. CHO. Biosensors and their applications in food safety: A Review. *Journal of Biosystems Engineering*. 2016, **41**(3), 240-254. ISSN 1738-1266. Dostupné z: doi:10.5307/JBE.2016.41.3.240.
- [89] MEHROTRA, P. Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2016, **6**(2), 153-159. ISSN 22124268. Dostupné z: doi:10.1016/j.jobcr.2015.12.002.
- [90] ALHADRAMI, H. A. Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2017, **65**(3), 497-508. ISSN 0885-4513. Dostupné z: doi:10.1002/bab.1621.
- [91] MESHARAM, B. D., A. K. AGRAWAL, S. ADIL, S. RANVIR a K. K. SANDE. Biosensor and its application in food and dairy industry: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2018, **7**(2), 3305-3324. ISSN 23197692. Dostupné z: doi:10.20546/ijemas.2018.702.397.
- [92] AL-WAILI, N., K. SALOM, A. AL-GHAMDI a M. J. ANSARI. Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: Human health hazards. *The Scientific World Journal*. 2012, **2012**, 1-9. ISSN 1537-744X. Dostupné z: doi:10.1100/2012/930849.
- [93] MELLO, L. a L. KUBOTA. Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. *Talanta*. 2007, **72**(2), 335-348. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2006.11.041.
- [94] POHANKA, M. Current trends in the biosensors for biological warfare agents assay. *Materials*. 2019, **12**(14). ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma12142303.
- [95] BURNWORTH, M., S. J. ROWAN a Ch. WEDER. Fluorescent sensors for the detection of chemical warfare agents. *Chemistry - A European Journal*. 2007, **13**(28), 7828-7836. ISSN 09476539. Dostupné z: doi:10.1002/chem.200700720.