A galaktóz oxidáz (GAO) enzimek használata a bioszenzorokban

Galaktóz oxidáz:

 A galaktóz oxidáz széles körűen a primer alkoholok és az egyes poliszacharidok oxidációját katalizálja. Nem szubsztrát, inkább sztereospecifikus enzim (pl.: nem oxidálja a D‑glükózt vagy az L-galaktózt). Különböző gombafajták termelik, például: *Fusarium dendroides, Pichia pastoris* vagy *Aspergillus oryaze.*

Bioszenzorok:

A galaktóz oxidáz enzimeket hasznosító bioszenzorok galaktóz vagy hidroxiaceton meghatározására szolgálnak a kölünböző biofermentációs folyamatokban, illetve a különböző élelmiszerek laktóz tartalmának mérésére szolgálnak. Kifejlesztettek olyan elektródokat, amelyek a galaktóz és a galaktóz tartalmú diszacharidok meghatározására használnak. Ezekben a galaktóz oxidáz enzim egy zselatin rétegben van immobilizálva, amely két dialízis membrán között helyezkedik el, ami pedig az elektródhoz rögzítetten helyezkedik el a rendszerben. Egy másik fajtája a galaktóz koncentráció mérésére szolgáló bioszenzornak amperometriás alapelven működik, legtöbbször a tejben és vérszérumban végzik el a mérést. Egy Langmuir-Blodgett (LB) filmen immobilizálják az enzimet, amelyet egy indium ón-oxid (ITO) borítású üvegre rétegeznek.

További kutatások során megállapították, hogy a *F. dendroidesből* nyert GAO szubsztrát specifitása jelentős mértékben megváltozik L-hisztidin jelenlétében. A kutatás eredményeként ki tudtak fejleszteni egy olyan rendszert, amely közvetlenül a hisztidin koncentrációjának mérésére alkalmas.

A galaktóz oxidáz katalitikus aktivitásának mérését különböző szabad gyökök meghatározására is használják, ugyanis ezek jelenléte gátolja az enzim működést (pl.: szuperoxid és nitrogén oxid gyökök). Ebben az esetben olyan bioszenzorokra van szükség, amelyekben a GAO-t a gélszerű κ‑karragén membránba zárják, amely egy amperometriás oxigén elektróddal párosítanak.

Koleszterin-oxidáz (ChOx) alapú bioszenzorok

Koleszterin-oxidáz:

 A koleszterin oxidázok bifunkciós flavoenzimek, amelyek egyszerre két folyamatot katalizálnak. az első, a koleszterin koleszt-5-én-3-onná való oxidálása, a második pedig a termék izomerizációja koleszt-4-én-3-onná. A ChOx egy szteroid specifikus enzim.

Termelő baktériumai: *Rhodococcus, Streptomyces, Nocardia, Brevibacterium, Proactinomyces, Pseudomonas, Cellulomonas* stb.

Bioszenzorok:

A biológiai minták szabad és teljes koleszterin tartalmát ChOx bioszenzorokkal és bioenzimeket (koleszterin oxidázt, ChOx, és koleszterin észterázt, ChEt) tartalmazó immobilizált sejtekkel történik. Sokfajta ChOx alapú bioszenzort fejlesztettek ki. Léteznek olyanok, amelyekben a ChOx és a ChEt vagy kollagén membránhoz, vagy pedig polimer mátrixhoz van kötve. Az elektrokémiai redox folyamatok az enzimkötött filmen mennek végbe, amelyet vagy platinum lapra, vagy ITO (indium ón-oxid) borított üveglapra rétegeznek.

A direkt amperometriás módszer szerint az enzim polisztirénszulfonáttal nanovastagságú filmet alkotva a HRP-hez (torma proxidázhoz) kötve egy arany tartalmú elektródon kovalens módon rögzítenek. Az elektrokémiai polimerizáció során a ChOx és a ChEt polipirrol filmmel van közre fogva a platina elektródon.

Az élelmiszerek koleszterin meghatározására egy amperometriás kompozit bioszenszort hoztak létre. Ebben az esetben a ChOx, a HRP és kálium ferrocianid együttesen mediátorként elegyedik a grafit teflon mátrixban.

A koleszterin észterek konverzióját potenciometriás módszerrel lehet nyomon követni wolfram elektród és ferricianid/ferrocianid átalakulás monitorozásával.

Egy másik tanulmány során ChOx segítségével kifejlesztettek egy szerves fázisú enzim elektródot (OPEE), amely segítségével meghatározgató a koleszterin koncentráció a kolroform/hexán elegyben.

További bioszenzorok: az enzim membránt fotoszenzitív polimer és ultra vékony dialízis membrán segítségével készítették el, amelyet áramlási rendszerbe helyeztek, egy Clark-típusú oxigén elektródra rögzítetten.

A FIA (flow injection analysis) módszert a reaktorok esetében az enzimek szilika ágyra való rögzítésével vizsgálták.

Az optikai koleszterin bioszenzorok is léteznek, melyeket ugyancsak koleszterin-oxidáz immobilizálásával készülnek, amelyet oktadecil szilika részekkel a polivinil és karboximetil kompolimerek hidrogél mátrix hálójában rögzítenek.

Glükóz-oxidázok:

A glükóz-oxidázok redox enzimek, számos felhasználásuk ismert. napjainkban az ipari jelentőségük egyre növekszik, ez megmutatkozik a GOx alapú bioszenzorok használatában, valamint a textilipari és élelmiszeripari jelentőségükben.

Maga az enzim flavoprotein, ami az jelenti, hogy alegységenként egy FAD (Flavin-adenin-dinukleotid) molekulát tartalmaz, ami nem kovalensen köt hozzá.

*Az Aspergillus niger, Penicillium amagasakiense a* fő termelő mikroorganizmusai, ezek mellett *P. purpurogenum, P. variabile, P. chrysogenum* and *A. fumaricus, P. notatum, P. funiculosum,* és *P. piceum,* is termeli, viszont a legnagyobb aktivitással ez előbbi mikroorganizmusok által termelt enzimek rendelkeznek.

Felépítésük: Homodimer glikoproteinek, 160 kDA, alegységenként 1 FAD. Az alegységek disszociációja denaturációs körülmények közt lehetséges, ekkor a FAD molekula is ledisszociál a léncról.

*A. niger*: 10-16% mannóz típusú cukor, N- és O-glikolizációval kapcsolódva.

A két mikroorganizmus (*Aspergillus niger, Penicillium amagasakiense )* által termelt enzim aminosav-szekvenciája 81%-ban egyezik, oxidációs kinetikában is hasonlóak.

A Gox szenzorok a diabétesz kezelése és a vércukorszint monitorozása miatt nagy egészségügyi jelentőséggel bírnak.

Reakciómechanizmusuk a következő: Az enzim a β-D-glükózt oxidálja δ–glükonolaktonná és H2O2-dá.

A reakció egy Ping-Pong Bi-Bi mehanizmuson keresztül megy végbe, melynek van egy reduktív és egy oxidatív félreakciója. A reduktív reakció alatt a szubsztráton keresztül redukálja a FAD-ot FADH2-vé. A β-D-glükóz mellett más cukrok is szubsztrátjai az enzimnek, de ezzel mutatja a legnagyobb aktivitást.

Az oxidatív reakció alatt O2-vel regenerálódik a FADH2 FAD-dá, majd H2O2 keletkezik. Fontos megjegyezni, hogy O2 helyett más elektronakceptorok is részt vehetnek a reakcióban, pl: fém-komplexek, ferrocén származékok.

GOx bioszenzorok:

A GOx bioszenzorok alkalmazása az átlag enzimes bioszenzorokhoz képet sokkal olcsóbb, mégis hatalmas jelentőséggel bírnak, legfőképp a gyógyászat terén. Számos felépítésben megtalálhatók, melyekről elmondható, hogy mind az enzimek immobilizálásával alakíthatók ki. Az immobilizálás általában szénfilm elektródokon történik, glutáraldehid és borjú-szérum használatával, az elektródokhoz pedig amperometriás detektort csatlakoztatnak.

Emellett van számos detektálási lehetőség és felépítés is pl: optikai szenzorok, fluoreszcin.

Lehetséges rendszerek:

* „Tűszenzor” in vivo monitorozáshoz, implantátum, closed loop system kiépítése: vércukorszint szabályzó rendszer
* FIA (Flow injection analysis): on-line, valós idejű mérés
* Mikrodialízis : Flow.trough mikrocella, eldobható szenzorok
* Monolayer enzim elektródok: Kovalens vagy elektrosztatikus kötéssel vezető polimerfilmmel bevont elektródokra kötött enzimek
* Mikrodializáló szondához közvetlenül csatlakoztatott mikro-detektor: A mikrodialízis technika egy szerv extracelluláris terében végbemenő biokémiai változások folyamatos, in vivo monitorozására alkalmas módszer.

Multienzim GOx bioszenzorok:

* Különböző mono- di- és poliszacharidok gyors és olcsó meghatározása alkalmas módszerek. Lényegük, hogy többféle, akár egymástól függetlenül, akár szinergikusan működő enzimeket közösen immobilizálunk, például kovalens rögzítéssel, gélmátrikxba zárással stb..
* Több ipari példát ismerünk:
* 1. Maltóz: amiloglükozidáz és GOx Ko-immobilizálása glutáraldehiddel protein membránon
2. Laktóz: β-galaktozidáz, GAO és GOx immobilizálása triacetát-cellulózmembránon
3. Szukróz és teljes D-glükóz: Invertáz, mutarotáz, GOx
(Mutarotázzal α-glükóz β-glükóz)
4. Keményítő: Amilogkükozidáz és GOx Pt elektródra rögzítve, α-amiláz oldatban
5. Glükozinolátok: Mirozináz és GOx DO elektródon

Kataláz alapú bioszenzorok

 A kataláz enzimek, pontosabban hidrogén-peroxidázok a hidrogén-peroxidok bomlását katalizálják hidrogénné és oxigénné. A legtöbb monofunkciós kataláz enzim igen stabil és ellenállnak a proteolízisnek, köszönhetően a nagyon merev szerkezetüknek, ami ezen felül a fehérje unfolding mechanizmusnak is ellenáll. Megfelelő szerves oldószerben tárolva pedig sokáig megőrzik aktivitásukat.

 Elsőként egy Wang nevű kutató bizonyította a katalázok alkalmazhatóságát bioszenzorként. Ezt úgy érte el, hogy az enzimeket amepprometriás üvegszerű szén transzduktoron immobilizálta és az így létrehozott szenzort használta szerves fázisú biomonitoringra.

 Horozova egy szerves fázisú enzim elektródot készített, amelyet úgy kivitelezett, hogy az enzimeket egy polimer filmbe „zárta” egy spektrografikus grafit elektródon.

 Salimi az enzimek voltammetrikus és elektrokatalikus tulajdonságait vizsgálta. az enzimeket egy multi-falú nanocsőre rögzítette. Egy grafit elektródon pedig kollagén filmet képeztek, amely megfelelő mikrokörnyezetet biztosított a hemoglobinoknak és katalázoknak ahhoz, hogy elektront szállítsanak az elektródra.

 Campanella szintén egy OPEE technológiát fejlesztett ki, amelyben az enzimeket egy κ-karragén gélben immobilizálta és több oldatban is demonstrálta a használatukat (toluol, klórbenzol, etil-acetát). Egy kevert reaktorban kísérletezett és az extra szűz olívaolajak avasodási folyamatainál vizsgálta a hidrogén-peroxid mennyiségét.

 Joo munkásságához tartozik, hogy az enzimek stabilitását növelte az által, hogy az enzimeket PEG-gel keverte. A stabilitás azonban nagyban függött a PEG molekulatömegétől és koncentrációjától.

 A későbbiekben kidolgoztak egy gyors analitikai módszert a különböző vajak és margarinok víztartalmának indirekt módon történő nyomon követésére. Ezt úgy érték el, hogy az enzimeket glutáraldehiden immobilizálták és vékony rétegben egy természetes alapú fehérje membránra vitték fel és ezt egy ún. stopped-flow injection analyser rendszerre kötötték, amely az áramerősséget mérte.