**Kataláz alapú bioszenzorok**

**Ki készítette, miért mikor?**

**Rövid téma ismertetés: Mi a bioszenzor? Hogyan működnek?**

A kataláz enzim a hidrogén-peroxid és más hidroperoxid származékok bomlását katalizálja oxiginné és hidrogénné. Az enzim szerves oldószerekben is megőrzi aktivitását, ezáltal szerves fázisú bioszenzorokban is alkalmazható. A monofunkciós kataláz enzimek többsége stabil, merev szerkezetűek, ennek köszönhetően ellenáll a proteolízisnek és a fehérje unfolding mechanizmusának.

A katalázok alkalmazhatóságát bioszenzorként elsőnek Wang és munkatársai bizonyították (ref). Kísérleteikben az enzimeket amepprometriás üvegszerű szén transzduktoron immobilizálták és az így létrehozott szenzort használták szerves fázisú biomonitoringra.

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

Campanella által kifejlesztett kataláz alapú OPEE-t (rövídítés feloldása) gyógyászati- és kozmetikai-alapanyagok és termékek hidrogén-peroxid tartalmának meghatározására alkalmazták (ref). 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.

 Salimi az enzimek voltammetrikus és elektrokatalikus tulajdonságait vizsgálta (ref). 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.

 Hyun és munkatársai polivinil-alkohol membránban rögzítve vizsgálták a kataláz enzim stabilitását és arra a következtetésre jutottak, hogy az enzim aktivitása és stabilitása nőtt szerves oldószerekben. Az enzim aktivitása függött a PEG móltömegétől.

 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 (ref).

 Ezt a hatást Khmelnitsky és munkatársai ugyancsak bemutatták (ref). A PEG molekulák erősen hidratált láncai vízburokkal veszik körül az enzimmolekulákat, így megőrizve aktivitásukat.

 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.

Glükóz-oxidázok (GOX):

A glükóz-oxidázok redox enzimek, igen specifikusak a β-D glükózra, sem az α-D glükózt, sem másmilyen hexózt nem bontanak. Számos felhasználásuk ismert, bioszenzorként nagy jelentőségük van, főleg a textil- és élelmiszeriparban.

A glükóz-oxidázt általában hagyományos fermentációs technológiával állítják elő, fő termelő mikroorganizmusok az *Aspergillus niger* és a *Penicillium amagasakeinse,*de ezek mellett még érdemes megemlíteni az *A. fumaricus*, *P. funiculosum* és *P. piceum* fajokat, de a legnagyobb aktivitással az előbb felsorolt mikrobák által enzimek rendelkeznek. A gyártás során képződő glükonátot (az enzim terméke) többek között mosószerek gyártására, az élelmiszeriparban stabilizálószerként használják, de kalcium-glükonát formában alkalmas a hypocalcemia kezelésére is. A GOX mellett nagy mennyiségben termelődik kataláz is (a képződő hidrogén-peroxidtól védi a sejteket). Ez szintén eladható termék, de mint a képződött GOX szennyezője is fontos.

Élelmiszeripari alkalmazások például:

1. Élelmiszerek tartósítása - H2O2 képzéssel, vagy O2 elvonással (ez utóbbi esetben GOX-t és katalázt is adnak a rendszerbe)
2. Élelmiszerek glükóz tatalmának csökkentése, eltávolítása
3. Alacsony alkoholtartalmú borok készítése (a must glükóz tartalmának csökkentése); borok sav.alkohol egyensúlyának javítása (glükonsav képzés); borok tartósítása (O2 eltávolítása)
4. A tészta állagának javítása a sütőiparban (a képződő H2O2 keresztkötéseket hoz létre a glutén molekulák között).

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

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

A GOX bioszenzorok 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 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 meghatározására 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 koimmobilizálása glutáraldehiddel protein membránon

2. Laktóz: β-galaktozidáz, GAO és GOx immobilizálása triacetát-cellulózmembránon

3. Szacharóz és teljes D-glükóz: Invertáz, mutarotáz, GOx

4. Keményítő: Amilogkükozidáz és GOx Pt elektródra rögzítve, α-amiláz oldatban

5. Glükozinolátok: Mirozináz és GOx DO elektródon

**A galaktóz oxidáz enzimek (GAO)**

Galaktóz oxidáz: A galaktóz-oxidáz a széles specificitású enzimek közé tartozik. A D-galaktóz mellett a primer alkoholok, illetve a mono-, oligo- és poliszacharidok oxidációját katalizálja. A primer alkohol csoport aldehiddé alakul, miközbe H2O2 keletkezik. Inkább sztereospecifikus enzim, nem szubsztrátja például a glükóz, L-galaktóz és a szekunder, tercier alkoholok sem.

Hagyományos gyártása során az enzimet különböző gombafajták termelik: *Fusarium dendroides, Pichia pastoris* vagy *Aspergillus oryaze.* Az aktív enzim egy Cu2+/Cu+ iont tartalmaz, aminek fontos szerepe van a katalízisben. Ezen felül a szénforrás befolyásolja még az enzim képződését.

A hagyományos gyártás mellett a heterológ expresszión alapuló előállítást is használják.

A galaktóz oxidáz enzim alapú bioszenzorok alkalmasak a galaktóz, a galaktóz-tartalmú szacharidok, a galaktóz-tartalmú glikoproteidek és glikoszfingolipidek, illetve a hidroxi-aceton meghatározására.

Felhasználása az élelmiszeriparban például:

* a laktóz-tartalom kimutatása.

Gyógyszeripari felhasználása:

* a dihidroxi-aceton kimutatása
* a galaktóz vérből való kimutatása
* rákdiagnosztikában a galaktóz-tartalmú glikoproteidek és diszacharidok kimutatása.

A galaktózoxidáz által katalizált oxidációs mechanizmus nem teljesen ismert folyamat.

Whittaker azonosított az enzimben egy nem fémtartalmú, aminosavakat tartalmazó gyököt (ref). Szerinte ez katalizálja a Cu2+/Cu+ átalakulást.

Schumacher társaival beszámolt galaktóz, laktóz, melibióz, raffinóz, keményítő és dihidroxi-aceton méréséről a galaktóz bioszenzort alkalmazva. Ők a két féligáteresztő membrán közé zárt galaktózoxidázt platina elektródon rögzítették, és a mérés során a dihidroxi-acetonra kapták a legnagyobb látszólagos aktivitás értéket (ref).

Lundbäck és Olsson rögzített enzimmel töltött oszlop segítségével tudták elemezni a dihidroxi-aceton mérés lehetőségét. Vizsgálták a galaktóz, raffinóz és dihidroxi-aceton szubsztrát hatására kapott amperometriás jel nagyságát.

Azokban az elektródokban, melyeket galaktóz és galaktóz-tartalmú diszacharidok meghatározására használnak, a galaktóz oxidáz enzim egy zselatin rétegben van rögzítve. Ez két dialízis membrán között helyezkedik el, ami pedig az elektródhoz van rögzítve.

Egy másik fajta amperometriás alapelven működik, a leggyakrabban tejben és vérszérumban végzik el a mérést. Langmuir-Blodgett filmen rögzítik az enzimet, és egy indium ón-oxid borítású üvegre rétegezik.

Szabad gyökök jelenléte gátolja az enzim működését, így a galaktóz oxidáz katalitikus aktivitásának mérésének módszerét használják szabad gyök meghatározására is. Ebben az esetben olyan bioszenzorokra van szükség, amelyekben a galaktóz oxidázt a gélszerű κ‑karragén membránba zárják, amely egy amperometriás oxigén elektróddal párosítanak.

**Koleszterin-oxidázok (ChOx) alapú bioszenzorok**

A koleszterin-oxidázok FAD tartalmú, bifunkcionális, szteorid specifikus enzimek, amelyek a koleszterin lebontás első két lépését katalizálják oxigén felhasználásával. Az első folyamat során a 3β-hidroxil csoportot oxidálják egy ketocsoportra, tehát a koleszterin koleszt-5-én-3-onná oxidálódik. A második folyamatban pedig a termék izomerizációja történik koleszt-4-én-3-onná, melléktermékként H2O2 keletkezik. Így lehetővé teszi a sejtekben lévő koleszterin kimutatását.

Az oxidoreduktáz enzimek családjába tartozik. Nagy tömegű előállításuk különböző baktériumokkal történik, mint a *Streptomyces*, *Nocardia* ill. *Pseudomonas*. A baktériumok által előállított koleszterin-oxidázok olyan enzimek, amelyekben a szubsztrátkötő domén nyolcszálú vegyes béta-redőből és hat alfa-hélixből áll.

Minden emberi és állati sejt tartalmaz koleszterin molekulát. Biológiai mintákban lévő teljes és szabad koleszterin tartalom mérése immobilizált sejtekkel történik. Ezek az immobilizált sejtek ChOx bioszenzorokat és bioenzimeket tartalmaznak. Több ilyen ChOx alapú bioszenzort készítettek. A vezetőpolimerek alkalmazása bioszenzorokként egy újkeletű dolog, ám igen hasznos, mivel ezek mind immobilizáló mátrixként, mind redox rendszerekként felhasználhatóak az elektromos töltés szállítására. A vezető polimer alapú enzim elektródokat nagy működési stabilitás és gyors hatás kifejtés jellemzi. Az enzimek katalitikus központja általában egy fehérjemolekula mélyén helyezkedik el, ezért az elektródokon egy redox-aktív réteg létrehozása elősegíti az aktív hely és az elektród közötti elektronátvitelt.

Az immobilizálás során a negatív töltésű enzim és a pozitív töltésű vezető polimer között elektrosztatikus kötés alakul ki, amely meggátolja az enzim szivárgását. Ez az immobilizálás több módon történhet, mint az adszorpció, kovalens kötés és kapszulába zárás. Az alábbiak közül az enzimek kovalens kötéssel való megkötése egy erősebb kötést eredményez, így ellenállóbb lesz a környezeti hatásokkal szemben, mint a pH változások. A koleszterin-oxidáz kovalens módon való immobilizálásához glutáraldehid használható. A különböző vezető polimerek közül polianilin (PANI) felhasználása előtérbe került a közelmúltban, a vezetőképességét egyedi mechanizmus jellemzi és emelett ellenáll a környezeti hatásoknak. A polianilin alkalmazásának előnye a bioszenzorok fejlesztése szempontjából abban rejlik, hogy az enzimbefogadó mátrixként használható és a fizikai-kémiai transzduktor tulajdonságaival párosítva, a biokémiai jelet elektromos jellé alakítja át, ez a jel erősödését és az elektród hibájának kiküszöbölését teszi lehetővé.