

KONŠTRUKCIE AMPÉROMETRICKÝCH BIOSENZOROV PRE RÝCHLE A JEDNODUCHÉ STANOVENIE ETANOLU

MILAN VALACH a ERNEST ŠTURDÍK

Katedra biochemickej technológie, Fakulty chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
milan_valach@stuba.sk

Došlo 17.8.04, prepracované 6.3.05, prijaté 30.6.05.

Kľúčové slová: biosenzor, etanol, alkoholdehydrogenáza, alkoholoxidáza, ampérometrický prevodník, mediátor

Obsah

1. Úvod
2. Biologická časť
 - 2.1. Alkoholoxidáza
 - 2.2. Alkoholdehydrogenáza
 - 2.3. Mikroorganizmy
3. Elektrochemický prevod signálu
 - 3.1. Ampérometrický prevodník
 - 3.2. Mediátory
4. Sledovanie etanolu pomocou biosenzorov
5. Záver

1. Úvod

Kontinuálne, súbežné a selektívne monitorovanie obsahu etanolu v prítomnosti ostatných zložiek tvoriacich fermentačné prostredie je veľmi žiaduce najmä v priemyselnej oblasti. Zvyčajne využívané metódy založené na chromatografickom stanovení^{1,2} sú náročné nielen na čas analýz, ale aj na drahé technické vybavenie. V tejto súvislosti sa hľadajú lacnejšie alternatívy. Jednou z nich sa javí stanovovanie pomocou biosenzorov.

Biosenzory ako analytické detektory predstavujú príkladné spojenie interdisciplinárnych poznatkov biológie, biochémie, fyzikálnej a analytickej chémie. Spoločnou črtou princípu práce biosenzorov je interakcia biologického komponenta so stanovovaným substrátom, ktorá je zdrojom impulzu spracovateľného prevodníkom na elektronický signál úmerný koncentrácii stanovovaného analytu³. Výhody týchto zariadení sú rýchlosť, špecifickosť a mobilita stanovenia s minimálnou resp. žiadnou predúpravou analyzovaných vzoriek. Včasným zásahom do bioprocesu na základe získaných informácií možno vo veľkovýrobnej praxi predísť značným ekonomickým stra-

tám. Zhotovenie takéhoto senzora si vyžaduje selekciu optimálneho biologického komponenta, ktorý bude adekvátne komunikovať s vhodne zvoleným prevodníkom. Dôraz sa pritom kladie na reprodukovateľnosť procesu prípravy biosenzorov.

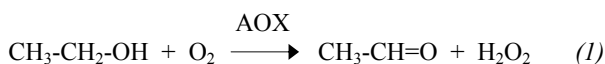
2. Biologická časť

Biologickou zložkou môže byť akýkoľvek upravovaný, alebo pôvodný materiál biologickej povahy, ktorý zahŕňa celé funkčné časti biologických štruktúr, ktoré prevádzajú svoju prirodzenú funkciu. Esenciálnou časťou senzorov je ich reakčná vrstva. Vytvorenie tejto vrstvy si vyžaduje imobilizáciu rozlišovacích elementov, teda biomolekúl nevyhnutných pre detekciu analytu⁴. Pri výbere kľúčového biologického systému vhodného pre monitorovanie etanolu pripadajú do úvahy čisté – purifikované enzýmy, z ktorých najpoužívanejšie sú alkoholoxidáza (AOX) a alkoholdehydrogenáza (ADH). Okrem čistých enzýmov boli tiež úspešne aplikované aj rôzne typy buniek, z ktorých vykazuje výborné vlastnosti hlavne *Gluconobacter oxydans*.

2.1. Alkoholoxidáza

Molekula AOX – EC 1.1.3.13 (zdroj *Pichia pastoris*) je oktamér veľkosti 675 kDa zložený z podjednotiek veľkých 80 kDa, pričom každá subjednotka obsahuje jednu molekulu kofaktora flavínadenínindukleotidu (FAD). AOX katalyzuje oxidáciu primárnych alkoholov na aldehydy. Kosubstrátom je kyslík, ktorý plní funkciu akceptora elektrónov. Enzým pracuje v rozsahu pH 6,5–8,3; pričom optimum je pri pH 7,5. Optimálna teplota je v okolí 37° C (cit.²³). Porovnanie afinity AOX k rôznym alkoholom je prehľadne uvedené v tabuľke I.

Stanovenie etanolu s využitím AOX je založené na reakcii (I). Keďže H₂O₂ je inhibítorom oxidácie etanolu, treba ho z prostredia odstraňovať, aby sa nehromadil. Na detekciu enzýmovej reakcie sa používa ampérometrický prevodník (kapitola 3.1.), pomocou ktorého sa sleduje množstvo vzniknutého peroxidu. Ten sa priamo elektrochemicky oxiduje pri vysokom polarizačnom potenciáli (650 mV vs. SCE), čo značne ovplyvňuje selektivitu stanovenia vzhľadom na interferenciu s inými redoxne aktívnymi látkami. Preto sa uplatňuje prídavok mediátorov elektrónového transportu (MET, kapitola 3.2), ktorých účinnok prehľadne opísal Gorton a spol.⁶



Nanjo a Guilbault v roku 1975 ako prví imobilizovali AOX na platinovú elektródu a ampérometricky sledovali

Tabuľka I
Porovnanie afinity alkoholoxidázy (zdroj *Pichia pastoris*)
k rôznym substrátom⁵

Substrát	Rýchlosť reakcie v porovnaní s metanolom ^a [%]
Etanol	82
Propan-1-ol	43
Propan-2-ol	2
Butan-1-ol	20
2-Methylpropan-1-ol	1,2

^a Rýchlosť reakcie s metanolom predstavuje 100 %

úbytok spotrebovaného kyslíka⁷. Odvtedy už vývoj pokročil natoľko, že dnes senzor na báze AOX + kyslíková elektróda je bežne komerčne dostupný a dá sa objednať cez internet za 700 USD (cit.⁸). Úspešne bola tiež otestovaná príprava bienzýmového senzora, v ktorom biologickú časť tvorí AOX + peroxidáza^{9–11}. Pri použití bienzýmového usporiadania v uhlíkovej pastovej elektróde so stabilizátorom polyetylénimínom možno polarizačný potenciál znížiť až na –50 mV vs. Ag/AgCl (cit.¹²).

Najväčšou aplikačnou nevýhodou AOX je jej nízka stabilita. Preto Gibson a spol. zvyšovali životnosť senzorov pomocou prídavku stabilizátorov laktitolu a DEAE-dextránu¹³. Liu a Wang riešili problém tepelnej stability AOX imobilizáciou enzýmov do hydrofóbných polotuhých matric¹⁴. Iný spôsob práce s citlivými enzýmami predstavuje zhotovenie mini-kolóniek s obsahom vysokého množstva enzýmu (akýsi rezervoár) a ich inkorporáciu do prietokových FIA systémov¹⁵. Kvôli zvýšeniu špecificity online sledovania komplexného fermentačného média sa v takomto usporiadaní zvykne tiež zaradiť chromatografická predseparačná kolónka¹⁶. Mitsubishi a spol. dokonca pripravili senzor pracujúci na báze AOX-elektrody schopný merať koncentráciu etanolu v plynnej fáze, pričom skonštruovali unikátnu plyn-kvapalinovú celu s využitím princípu difúzie cez špeciálne poly(tetrafluoroetylénové) membrány¹⁷.

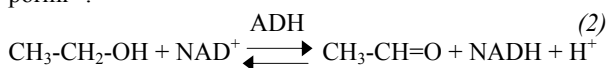
2.2. Alkoholdehydrogenáza

Dehydrogenázy predstavujú najväčšiu skupinu redoxných enzýmov. V súčasnosti je známych asi 300 druhov. Veľké množstvo týchto enzýmov predstavuje širokú výberovú paletu pre mnoho analytov monitorovateľných pomocou biosenzorov napr. alkohol^{18,19}, glukóza^{20,21}, kyselina glutámová²², atď.

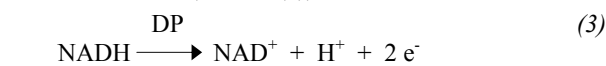
NAD-dependantná ADH – EC 1.1.1.1 (zdroj *Saccharomyces cerevisiae*) obsahuje pevne naviazané štyri atómy zinku na jednu molekulu veľkosti 141 kDa zloženú zo štyroch podjednotiek po 35 kDa. Optimálne pH pre oxidáciu etanolu je 8,6–9,0; nad pH 9,0 enzým rýchlo stráca stabilitu. Pre redukciu acetaldehydu je optimálne pH okolo 7,0. Izoelektrický bod sa nachádza pri pH 5,4. Reakcia so

sekundárnymi a rozvetvenými alkoholmi je veľmi obmedzená²³. ADH reaguje prakticky len s primárnymi alkoholmi, reakčná rýchlosť rapídne klesá s veľkosťou molekuly, pričom enzým je špecifickejší ako AOX (cit.²⁴).

Hlavný problém pri použití dehydrogenázového systému je potreba prítomnosti molekuly nebielkovinovej povahy – kofaktora nikotínamidnukleotidu (NAD) (reakcia (2)), čím sa celý senzor značne komplikuje hlavne z hľadiska jeho prípravy. Keďže koenzým možno od bielkovinovej molekuly enzýmu jednoducho oddeliť dialýzou, je potrebné zabrániť jeho vymývaniu do okolia. Tomuto javu sa predchádza prípravou koenzýmu so zvýšenou molekulovou hmotnosťou, ťažšie vyplaviteľného z pripravenej enzýmovej elektródy (NAD-dextrán). Tiež sa môže využiť umelá väzba koenzýmu na molekulu enzýmu t.j. vytvorenie „umelej prostejickej skupiny“²⁵. Otestované bolo aj použitie membrán so špecificky pripravenými pôrmí²⁶.



Pri využití NAD-ADH senzorov na stanovenie etanolu treba uvažovať aj o vratnosti enzymatickej reakcie (2), keďže rovnováha je posunutá skôr v smere tvorby etanolu ako jeho spotreby²⁷. Významné posunutie rovnováhy tejto reakcie želaným smerom však docielime odčerpaním jedného z produktov. Vzhľadom na ampérometrickú detekciu prebiehajúceho procesu sa využije reoxidácia NADH na povrchu enzýmovej elektródy, ktorá sa uskutoční buď len pomocou MET (cit.²⁸) alebo tiež v kombinácii s ďalším enzýmom diaforázou – DP (cit.²⁹) (reakcia (3)); resp. NADH-oxidázou (reakcia (4)).



Diaforáza alebo tiež lipoamiddehydrogenáza (zdroj *Clostridium kluyveri*) predstavuje enzým s NADH oxidačnou aktivitou (reakcia (3)). Enzým tvorí jedna molekula veľkosti 24 kDa. Optimálne pH pre enzým je 8,5. Ako stabilizátory pôsobia NADH, nikotínamidnukleotidfosfát (NADPH), či flavínmononukleotid (FMN)²³. Redoxne aktívne centrá enzýmu sú obalené proteínovou štruktúrou, ktorá vytvára priestorovú bariéru spomaľujúcu transport elektrónov. Často sa pritom z praktických dôvodov využívajú umelé akceptory elektrónov ako kosubstráty. Diaforáza vykazuje tiež nízky stupeň substrátovej špecificity vzhľadom na akceptor elektrónov čiže možno využiť širokú paletu MET (kosubstráty). Najčastejšie používané MET v kombinácii s diaforázou sú ferrikyanid³⁰ a analógy ferocénu. Metylviologén sa v kombinácii s diaforázou používa na regeneráciu NADH pri biosyntézach, nie však pri konštrukcii biosenzorov (potrebný vysoký pracovný potenciál)³¹.

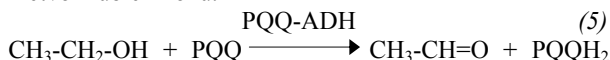
V prípade využitia NADH-oxidázy na enzymatickú reoxidáciu NADH (reakcia (4)), sa na elektróde potom deteguje vzniknutý H₂O₂.

2.3. Mikroorganizmy

Použitie mikrobiálnych buniek na prípravu biosenzorov je perspektívne nielen z cenového hľadiska, ale aj z dôvodu relatívne vyššej stability senzora (v porovnaní s využitím čistých enzýmov), keďže potrebné enzýmy sa nachádzajú v prirodzenom prostredí bunky, kde sú viac chránené proti inaktivácii. Kmeň *Gluconobacter oxydans* bol už úspešne použitý na prípravu viacerých biosenzorov^{32,33} kvôli jeho schopnosti rýchlej a neúplnej oxidácie substrátov^{34,35}, pretože jeho dehydrogenázový systém je viazaný v periplazmatickom priestore, t.j. oxidačný proces nie je limitovaný transportnými javmi cytoplazmatickej membrány.

Viacero gramnegatívnych aeróbných baktérií obsahuje periplazmatické enzýmy, ktoré katalyzujú oxidáciu alkoholov a cukrov nezávisle od prítomnosti pyridínových nukleotidov a obsahujú nekovalentne viazaný pyrolchínolínchinón (PQQ) ako svoj redoxný kofaktor³⁶. Tieto chinoproteíny zvyčajne uskutočňujú pingpongový mechanizmus prenosu elektrónov, pri ktorom sa prenáša pár elektrónov zo substrátu na PQQ, pričom vzniká redukovaný intermediát kofaktoru (rovnica (5)). Potom nasleduje reoxidácia PQQH₂ prostredníctvom poskytnutia redukčných ekvivalentov reťazovou reakciou na terminálnu oxidázu v cytoplazmatickej membráne. Tieto oxidázy sa vyskytujú buď ako voľné, alebo membránovo asociované formy. V prípade voľných foriem sa prísun elektrónov uskutočňuje prostredníctvom malých elektrónov transportujúcich proteínov ako sú cytochrómy, zatiaľ čo transport elektrónov

k membránovo viazaným formám sa uskutočňuje prostredníctvom ubiquinónu.



Membránovo viazaná PQQ-dependentná ADH oxiduje etanol nevratne a zároveň nie je schopná oxidovať metanol³⁷, čo je jej veľkou výhodou v porovnaní s AOX a tiež NAD-ADH. Ďalšou výhodou použitia PQQ-dehydrogenáz z hľadiska jednoduchosti konštrukcie senzora je, že kofaktor majú priamo viazaný vo svojom katalytickom centre, t.j. je súčasťou enzýmu.

Nevýhodou mikrobiálnych senzorov je vo všeobecnosti ich nižšia selektivita, pretože použité bunky obsahujú viaceré enzýmy, ktoré poskytujú reakcie s rôznymi zložkami prítomnými v komplexných vzorkách. Z tohto dôvodu boli vyvinuté viaceré metódy zvyšujúce selektivitu týchto senzorov, ktoré sú založené na aktivácii potrebných transportných resp. metabolických mechanizmov, inhibícií nežiaducich transportov a dráh³⁸. Ďalej boli opísané aj pokusy s použitím permeabilizovaných buniek³⁹ a v neposlednom rade majú tiež patričný vplyv aj pH podmienky pri meraní. Veľmi perspektívne sa javí tiež použitie permiselektívnych membrán s definovanými vlastnosťami⁴⁰. Dokonca pri použití acetátcelulózovej membrány v kombinácii s kmeňom *G. oxydans* bolo dosiahnuté potlačenie interferencie glukózy a glycerolu pri stanovení etanolu až na úroveň šumu merania^{41,42}. Sľubným sa zdá byť postup na vytvorenie biosenzora pre detekciu etanolu založeného na schopnosti metylotrofných kvasiniek rastú-

Tabuľka II

Prehľad niektorých publikovaných etanolových senzorov so základnými parametrami

Biologická zložka	Charakteristika	Citlivosť [μA mmol ⁻¹ dm ⁻³]	Čas odzvy [s]	Detekčný limit [μmol dm ⁻³]	Lit.
AOX	detekcia H ₂ O ₂	0,89	–	0,3	55
NAD-ADH	NADH-oxidáza, ferrikyanid	2,00	20	0,3	56
NAD-ADH	poly(<i>o</i> -fenyldiamín)	1,50	20	0,02	57
NAD-ADH	NADH-oxidáza, detekcia H ₂ O ₂	–	10	0,05	58
NAD-ADH	ferrikyanid	1,30	16	2	59
NAD-ADH	NAD, Meldolova modrá	2,33	0,6	8,0	64
PQQ-ADH (zdroj <i>Gluconobacter oxydans</i>)	priamy transport elektrónov	0,48	3	–	63
PQQ-ADH (zdroj <i>Acetobacter aceti</i>)	2-metyl-5,6-dimetoxybenzochinón	7,00	40	–	62
PQQ-ADH (zdroj <i>Gluconobacter oxydans</i>)	ferrikyanid	3,40	60	–	40
<i>Gluconobacter oxydans</i>	ferrikyanid	3,5	13	0,85	41
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	O ₂ elektróda	–	300	6,0	60
<i>Gluconobacter oxydans</i> (membrána)	ferrikyanid	3,70	300	50	61
<i>Hansenula polymorpha</i>	O ₂ elektróda	0,50	50	100	39

cich na etanole vylučovať protóny do média. Týmto spôsobom boli vytvorené biosenzory s buniek *Hansenula polymorpha* a *Pichia methanolica*. Etanol a metanol bolo pritom možné stanoviť v rozmedzí koncentrácií 0,5 až 100 mmol dm⁻³ (cit.⁴³).

V tabuľke II je uvedený prehľad niektorých doteraz pripravených a publikovaných senzorov pre sledovanie etanolu spolu so základnými charakteristikami.

3. Elektrochemický prevod signálu

Po selektívnom rozoznaní analytu biologickým komponentom dochádza k prevodu vzniknutej biologicko-chemickej odpovede na elektronický signál. Na tento účel sa používajú fyzikálno-chemické prevodníky. Dôležité je pritom, aby bol biologický komponent v čo najdokonalejšom fyzickom kontakte s prevodníkom, čím sa znižuje nebezpečenstvo rozptylu prenášanej informácie.

3.1. Ampérometrický prevodník

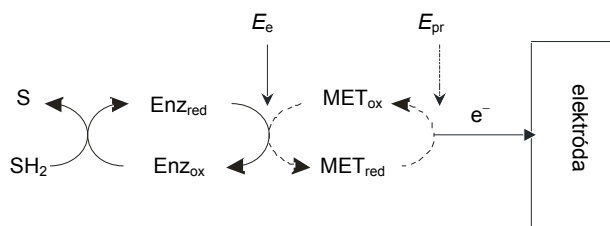
Najfrekvencovanejším prevodníkom v spojení s monitorovaním oxidačno-redukčných procesov je ampérometrický prevodník. Na tento prevodník (pracovná elektróda) je vkladán určitý polarizačný potenciál (vzťahujúci sa voči referenčnej elektróde), veľkosť prúdu tečúceho medzi elektródami je pritom lineárnou funkciou koncentrácie analytu.

Bioreceptor pri oxidácii substrátu odovzdáva elektróny pracovnej elektróde (nielen priamo ale aj prostredníctvom iných molekúl, ktorými môžu byť kosubstrát, kofaktor alebo MET, pozri obr. 1), na ktorej povrchu dochádza k elektrochemickej regenerácii celej transportnej kaskády a tým sa redoxný kolobeh uzavrie. Základným predpokladom tohto tvrdenia je skutočnosť, že elektródová reakcia prebieha oveľa rýchlejšie ako transport analytu k elektróde. Rýchlosť určujúcim stupňom je potom transport elektroaktívnej látky k elektróde, pričom rýchlosť tohto transportu sa s rastúcou hrúbkou difúznej vrstvy spomaľuje podľa druhého Fickovho zákona.

Ak počas merania zabezpečíme konštantnú hrúbku difúznej vrstvy (pomocou dokonalého miešania) budeme zaznamenávať limitný difúzny prúd i_d (rovnica (6), v ktorej c – koncentrácia analytu v stanovovanom roztoku, c_0 – koncentrácia analytu na povrchu pracovnej elektródy, d – hrúbka difúznej vrstvy).

$$(i_d)_t = nFAD \frac{(c - c_0)}{\delta} \quad (6)$$

Práve táto metóda detekcie umožňuje za optimálnych podmienok sledovať koncentrácie analytov 10⁻⁸ až 10⁻⁹ mol dm⁻³ a dynamický rozsah stanovenia môže dosahovať až tri poriadky⁴⁴. Vhodným materiálom na konštrukciu ampérometrických prevodníkov sú zlato, platina a najmä uhlík (aj ako uhlíkový prášok, ktorý je zložkou kompozitných elektród⁴⁵).



Obr. 1. Princíp pôsobenia mediátora pri enzymatickej oxidácii substrátu s ampérometrickou detekciou; E_e predstavuje pracovný potenciál vkladávaný na elektródu pri priamej komunikácii enzýmu s elektródou, avšak pri použití mediátora elektrónového transportu – MET sa zefektívni prenos elektrónov t.j. hodnota pracovného potenciálu sa znižuje na E_{pr}

3.2. Mediátory

Efektívna komunikácia medzi biologickým komponentom a prevodníkom tvorí základ odozvy ampérometrických biosenzorov. MET predstavuje redoxne aktívnu látku urýchľujúcu heterogénny transport elektrónov z aktívneho centra enzýmu na povrch elektródy, pretože priamu komunikáciu biologického komponenta a prevodníka často znemožňujú a spomaľujú stericke bariéry. Látka použitá ako MET by mala spĺňať nasledovné kritériá: mala by rýchlo reagovať s enzýmom, heterogénna kinetika elektrónového transportu by mala byť reverzibilná, ďalej potenciál potrebný na regeneráciu mediátora by mal byť čo najnižší a nezávislý od pH. Redukovaná aj oxidovaná forma mediátora by mala byť stabilná, pričom redukovaná forma mediátora by nemala reagovať s kyslíkom. Keďže sa pracuje v spojení s biologickým systémom, tak by použitá látka nemala byť toxická⁴⁴.

Princíp pôsobenia MET možno opísať nasledovne: Vkladávaný pracovný potenciál E_{pr} predstavuje hnaciu silu elektródovej reakcie, preto reakcia medzi mediátorom a elektródou musí prebiehať rýchlejšie ako reakcia medzi enzýmom a mediátorom aby nedochádzalo k hromadeniu produktov enzymovej reakcie ale k ich odčerpávaniu (pozri obr. 1), čím sa dosiahne posunutie termodynamickej rovnováhy. Z toho vyplýva, že pri použití MET nie je potrebné pracovať pri takom vysokom polarizačnom potenciáli (E_{pr}) ako pri priamej komunikácii enzýmu s povrchom elektródy (E_e), t.j. $E_{pr} < E_e$. Znížením hodnoty pracovného potenciálu sa aj výrazne znižuje interferenčný vplyv iných redoxne aktívnych látok prítomných vo vzorke.

Najjednoduchším mediátorom anorganického pôvodu je ferrikyanid draselný K₃[Fe(CN)₆]. Mediátorom na báze ferrikyanidu je Berlínska modrá Fe^{III}₄[Fe^{II}(CN)₆]₃, ktorá umožňuje stanovenie peroxidu vodíka. Táto je elektrochemicky redukovaná na K₄Fe^{II}₄[Fe^{II}(CN)₆]₃, ktorá je pri nízkych potenciáloch (-50 mV vs. Ag/AgCl) schopná katalyzovať redukciiu peroxidu vodíka tak ako to robia peroxidázy, preto sa jej tiež hovorí „umelá peroxidáza“^{46,47}. Ďalej sú v praxi často používané jednoduchšie organické mole-

kuly napr. 2,6-dichlórfenolindofenol, ferocény, chinóny, koordinačné zlúčeniny prechodných prvkov, tiež farbivá a špecifické polyméry.

4. Sledovanie etanolu pomocou biosenzorov

Nielen použitie biologického komponenta, ale hlavne celá architektúra konštrukcie biosenzora, rozhoduje o jeho úžitkových vlastnostiach. Problém stability odozvy biosenzorov postavených na báze NAD-ADH spôsobený vyplavovaním kofaktora NAD zo senzora do prostredia riešili Švorc a Katrlík imobilizáciou enzýmov s kofaktorom a uhlíkovým práškom (elektricky vodivý komponent) do tuhých matric (pri laboratórnej teplote) s nízkym bodom topenia a rôznym stupňom hydrofobicity⁴⁸. V prípade poklesu odozvy sa deaktivovaný povrch senzora dal pritom jednoducho obnoviť zbrúsením opotrebovanej vrstvičky a meranie mohlo pokračovať. Tento koncept sa stal základom komerčne vyrábaného analyzátora na vzorky vína²⁹. Santos a spol. zas pripravili senzor na báze NAD-ADH kovalentným zosietením enzýmu, NAD a hovädzieho sérového albumínu pomocou glutaraldehydu na uhlíkovom prášku. Modifikovaný uhlík bol potom zmiešaný s upraveným silikagélom, na ktorom bola naadsorbovaná Meldola blue⁴⁹ (funkcia MET), a minerálnym olejom. Pomocou tejto uhlíkovej pastovej elektródy bolo možné pracovať pri polarizačnom potenciáli 0 mV vs. SCE, čím boli maximálne odstránené prípadné interferencie iných elektroaktívnych látok prítomných v reálnych vzorkách. Takýto senzor sa vyznačoval excellentnou operačnou aj skladovacou stabilitou a extrémne krátkou dobou odozvy (0,6 s) ďaleko prekonávajúcou všetky doteraz používané metodiky stanovenia⁶⁴.

Iný spôsob prípravy predstavuje zabudovanie PQQ-ADH do filmov na báze polypyrol-osmiového polyméru (funkcia MET), kde sa podarilo dosiahnuť neobvykle rozšírenie lineárneho rozsahu dosahujúceho koncentráciu etanolu 100 mmol dm⁻³, kým senzory s PQQ-ADH adsorbovanou na grafitových elektródach alebo senzory využívajúce voľne difundujúce redoxné mediátory dosahovali lineárny rozsah len okolo pár mmol dm⁻³. Biosenzor postavený na tejto báze autori zabudovali do prietokového sekvenčného analyzátora umožňujúceho plne automatické a reprodukovateľné riedenia vzoriek a štandardov. Celý monitorovací systém bol potom veľmi prakticky prepojený na fermentor pomocou kombinácie uzavretej slučky so vstavaným „cross-flow“ filtračným zariadením a jednoduchej odbublinkovávacej komory (odstraňovanie CO₂ vzniknutého počas fermentácie). Životaschopnosť tohto zariadenia bola otestovaná pri on-line monitorovaní vinného kvasenia vo vinárskych závodoch v maďarskej tokajskej oblasti (celkový objem fermentora 45 hl)⁵⁰.

Keďže etanol vykazuje fyziologický účinok na ľudský organizmus približne od koncentrácie 10 mmol dm⁻³ v krvi a letálne účinky sa prejavujú pri koncentrácií asi 10 krát vyššej⁵¹, pochopiteľne boli vyvíjané aj senzory aplikovateľné na medicínske účely.

Tak komplexná matrica ako je krv obsahuje veľké množstvo zložiek, ktoré by mohli skresľovať stanovenie etanolu pomocou ampérometrických biosenzorov. Preto bola do pokusného prietokového monitorovacieho systému zaradená chromatografická kolóna deliaca jednotlivé zložky. Biežymový senzor využívajúci kombináciu AOX a peroxidázy zabudovaných do uhlíkovej pastovej elektródy bol v tejto zostave zaradený tesne za kolónu a plnil funkciu detektora. Kvôli zlepšeniu stability odozvy bola na aktívny povrch senzora aplikovaná membrána pomocou elektropolymerizácie *o*-fenyléndiamínu. Tento systém bol overovaný na sledovanie obsahu metanolu a etanolu v krvnej plazme a moči. Celá analýza pritom trvala menej ako päť minút, no zmenou rozmerov kolóny sa dá doba analýzy znížiť aj na dve minúty⁹.

Zaujímavým usporiadaním vyživajúcim „screen-printing“ technológiu Park a spol. pripravili biosenzor schopný merať koncentráciu etanolu v plynnej fáze⁵². Pretože v mnohých krajinách sa považuje za akceptovateľnú hranicu pre riadenie vozidiel koncentrácia 0,5 ‰ etanolu v krvi, čo predstavuje 130 ppm etanolu v ľudskom dychu⁵³, bol pripravený senzor vďaka svojmu dynamickému rozsahu 20–800 ppm využiteľný aj na tieto účely. Podstatou senzora bolo meranie rozdielu signálov z dvoch pracovných uhlíkových pastových elektród, pričom v jednej bola primiešaná NAD-ADH spolu s kofaktorom NAD a v druhej bol enzým nahradený hovädzím sérovým albumínom. Obe aktívne vrstvičky pracovných elektród boli spolu aj vrstvičkou referenčnej elektródy nanesené na polyesterovej fólii hrúbky 0,25 mm a pokryté vrstvičkou hydroxyetylcelulózovej membrány. Kvôli absencii MET v pracovných elektródach bolo nutné, aby meranie prebiehalo pri vysokom polarizačnom potenciáli (470 mV vs. Ag/AgCl), čo však vôbec neprekážalo, lebo prípadné interferencie boli odčítavané práve pomocou druhej pracovnej elektródy. Samotné meranie mohlo začať až po jednoduchom ovlhčení povrchu elektród ponorením do tlmivého roztoku s prídavkom KCl na dobu päť sekúnd.

Dlhodobá stabilita imobilizovaného biokomponenta má mnoho spoločného aj so stabilitou konformácie imobilizačnej matrice alebo s jej denaturáciou počas prevádzky a skladovania, hoci vplyv môžu mať aj iné slabšie interakcie. Z tohto dôvodu je zaujímavou výzvou nájsť pri vytváraní imobilizačnej matrice vhodné aditíva, ktoré by obmedzili proces zmenšovania pórov. Jedným s takýchto aditív je napríklad (hydroxyetyl)(karboxymetyl)celulózový polymér používaný pri vytváraní hybridného organicko-anorganického silikátového gélu⁵⁴.

5. Záver

Príkladné spojenie špecifického biologického člena selektívne rozoznávajúceho hľadaný analyt (etanol) vo vzorke s jednoduchým spôsobom ampérometrickej detekcie prebiehajúceho oxidoredukčného deja a v neposlednom rade jednoduchá obsluha predurčuje biosenzory k masovému využitiu v širokom meradle. Špecifická sa-

motného merania reálnych vzoriek je závislá hlavne od použitej biologickej časti, ale tiež na ňu môže podstatne vplývať aj postup prípravy senzora (imobilizácia biologického materiálu) a samozrejme podmienky merania. Pri ampérometrickom spôsobe detekcie hrá podstatnú úlohu polarizačný potenciál vkladajú na pracovnú elektródu, ktorý je zodpovedný za nešpecifické interakcie s mnohými elektrochemicky aktívnymi látkami prítomnými vo vzorkách. Preto sa vyvíja snaha znižovať E_{pr} na čo možno najnižšiu možnú hodnotu (použitie MET), resp. sa tiež uplatnili aj rôzne kompenzačné spôsoby merania založené na vyhodnocovaní rozdielu signálov z viacerých pracovných elektród. Z hľadiska automatizácie merania a vytvárania ucelených monitorovacích systémov použiteľných pre analýzu veľkých kvánt vzoriek popri prípade on-line sledovania fermentačných procesov predstavuje zabudovanie biosenzorov do prietokových analyzátorov výhodnú alternatívu často niekoľkonásobne prekonávajúcu klasické analytické metódy. Doposiaľ sa podarilo vyvinúť niektoré súpravy s obdivuhodnými úžitkovými vlastnosťami: krátky čas odozvy (rádovo niekoľko sekúnd až minút), mobilita stanovenia (príprava vreckových aparátov napájaných na batérie), široká variabilita zariadenia (vymeniteľné nástavce pre rôzne analyty). Všeobecne však možno povedať, že najväčšou prekážkou súčasných biosenzorov je stabilita ich odozvy, preto mnoho autorov rieši tento problém prípravou extrémne lacných jednorázových senzorov vyrábaných „screen-printed“ technológiou.

Z o z n a m s y m b o l o v

ADH	alkoholdehydrogenáza
Ag/AgCl	argentochloridová elektróda
AOX	alkoholoxidáza
DP	diaforáza
E^0	štandardný redoxný potenciál
E_e	potenciál aplikovaný pri priamej komunikácii enzýmu s povrchom elektródy
E_{pr}	pracovný potenciál
Enz	enzým
MET	mediátor elektrónového transportu
NAD/NADH	nikotínamidnukleotid oxidovaná/ redukovaná forma
ox	oxidovaná forma
PQQ	pyrolochinolínchinón
red	redukovaná forma
SCE	nasýtená kalomelová elektróda

LITERATÚRA

- Calbreath D. F.: *Clinical Chemistry: A Fundamental Text-Book*. WB Saunders Company, Philadelphia 1992.
- Kitagawa Y., Kitabatake K., Suda M., Muramatsu H., Ataka T., Mori A., Tamiya E., Karube I.: *Anal. Chem.* **63**, 2391 (1991).
- Mulchandani A., Bassi A. S.: *Crit. Rev. Biotechnol.* **15**, 105 (1995).
- Sharma S. K., Sehgaland N., Kumar A.: *Curr. Appl. Physics* **3**, 307 (2003).
- Coudere R., Baratti J.: *Agric. Biol. Chem.* **44**, 2279 (1980).
- Gorton L., Csöregi E., Domínguez E., Emnéus J., Jönsson-Pettersson G., Marko-Varga G., Persson B.: *Anal. Chim. Acta* **250**, 203 (1991).
- Nanjo M., Guilbault G. G.: *Anal. Chim. Acta* **75**, 169 (1975).
- http://intel.ucc.ie/sensors/universal/P_alcohol.htm, vyhľadané 9. januára 2004.
- Lidén H., Vijayakumar A. R., Gorton L., Marko-Varga G.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 1111 (1998).
- Kulys J. J., Schmid R. D.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* **24**, 305 (1990).
- Gorton L., Jönsson-Pettersson G., Csöregi E., Johansson K., Dominguez E., Marko-Varga G.: *Analyst* **117**, 1235 (1992).
- Vijayakumara A. R., Csöregi E., Heller A., Gorton L.: *Anal. Chim. Acta* **327**, 223 (1996).
- Gibson T. D., Hulbert J. N., Parkar S. M., Woodward J. R., Higgins I. J.: *Biosens. Bioelectron.* **7**, 701 (1992).
- Liu J., Wang J.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**, 177 (1999).
- Burfeind J., Weigel B., Kretzmer G., Schügerl K., Huwig A., Giffhorn F.: *Anal. Chim. Acta* **322**, 131 (1996).
- Lidén H., Buttler T., Jeppsson H., Marko-Varga G., Volc J., Gorton L.: *Chromatographia* **47**, 501 (1998).
- Mitsubayashi K., Yokoyama K., Takeuchi T., Karube I.: *Anal. Chem.* **66**, 297 (1994).
- Razumiene J., Meškys R., Gurevičiene V., Laurinavičius V., Reshetova M. D., Ryabov A. D.: *Electrochem. Commun.* **2**, 307 (2000).
- Várady M., Adányi N.: *Analyst* **119**, 1843 (1994).
- Polasek M., Gorton L., Appelqvist R., Marko-Varga G., Johansson G.: *Anal. Chim. Acta* **246**, 283 (1991).
- Yokohama K., Nakajima K., Uchiyama S., Suzuki S., Suzuki M., Takauchi T., Karube I.: *Electroanalysis* **4**, 859 (1992).
- Wang A.-J., Arnold, M. A.: *Anal. Chim. Acta* **64**, 1051 (1992).
- Worthington Enzyme Manual: Enzymes and Related Biochemicals*. Worthington Biochemical Corporation, Lakewood 1993.
- Barman T. E.: *Enzyme Handbook*, diel 1. Springer-Verlag, New York 1969.
- Eguchi T., Ikuza T., Kagotani T., Lee J. L., Urabe I., Okada H.: *Eur. J. Biochem.* **155**, 415 (1986).
- Miyamoto S., Murakami T., Saito A., Kimura J.: *Biosens. Bioelectron.* **6**, 563 (1991).
- Boujtita M., Chapleau M., El Murr N.: *Anal. Chim. Acta* **319**, 91 (1996).
- Wu Q., Maskus M., Pariente F., Tobalina F., Fernández V. M., Lorenzo E., Abruna H. D.: *Anal. Chem.*

- 68, 3688 (1996).
29. Katrlík J., Švorc J., Stredánský M., Miertuš S.: *Biosens. Bioelectron.* 13, 181 (1998).
 30. Gros P., Durlat H., Comtat M.: *Electrochim. Acta* 46, 643 (2000).
 31. Kamen I. V., Sobolov S. B., Leonida M. D., Fry A. J.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5, 681 (1995).
 32. Tkáč J., Gemeiner P., Švitel J., Benikovsky T., Šturdík E., Vala V., Petruš L., Hrabárová E.: *Anal. Chim. Acta* 420, 1 (2000).
 33. Tkáč J., Švitel J., Novák R., Šturdík E.: *Anal. Lett.* 33, 2441 (2000).
 34. Gupta A., Singh V. K., Qazi G. N., Kumar A.: *J. Mol. Microb. Biotechnol.* 3, 445 (2001).
 35. Matsushita K., Toyama H., Yamada M., Adachi O.: *Appl. Microb. Biotechnol.* 58, 13 (2002).
 36. Matsushita K., Adachi O., v knihe: *Principles and Applications of Quinoproteins*, (Davidson V.L., ed.). Marcel Decker, New York 1993.
 37. Jongejan A., Machado S. S., Jongejan J. A.: *J. Mol. Catal., B: Enzym.* 8, 121 (2000).
 38. Riedel K.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 25, 19 (1991).
 39. Gonchar M. V., Maidan M. M., Moroz O. M., Woodward J. R., Sibirny A. A.: *Biosens. Bioelectron.* 13, 945 (1998).
 40. Hikuma M., Takeda M., Matsuoka H., Karube I.: *Anal. Chim. Acta* 306, 209 (1995).
 41. Tkáč J., Voštiar I., Gorton L., Gemeiner P., Šturdík E.: *Biosens. Bioelectron.* 18, 1125 (2003).
 42. Guži R.: *Diplomová práca*. FCHPT STU, Bratislava 2003.
 43. Korpan Y., Soldatkin A., Starodub N., El'skaya A.: *Anal. Chim. Acta* 271, 203 (1993).
 44. Turner A. P. F., Karube I., Wilson G. S.: *Biosensors, Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, Oxford 1987.
 45. Gründig B., Wittstock G., Rüdel U., Strehly B.: *J. Electroanal. Chem.* 395, 143 (1995).
 46. Karyakin A. A.: *Electroanalysis* 13, 813 (2001).
 47. Karyakin A. A., Karyakina E. E., Gorton L.: *Anal. Chem.* 72, 1720 (2000).
 48. Švorc J., Miertuš S., Katrlík J., Stredánský M.: *Anal. Chem.* 69, 2086 (1997).
 49. Santos A. S., Gorton L., Kubota L. T.: *Electroanalysis* 14, 805 (2002).
 50. Niculescu M., Erichsen T., Sukharev V., Kerenyi Z., Csöregi E., Schuhmann W.: *Anal. Chim. Acta* 463, 39 (2002).
 51. Rang H. P., Dale M. M., v knihe: *Pharmacology*. Churchill Livingstone, Edinburgh 1987.
 52. Park J.-K., Yee H.-J., Lee K. S., Lee W.-Y., Shin M.-C., Kim T.-H., Kim S.-R.: *Anal. Chim. Acta* 390, 83 (1999).
 53. Jones A.W.: *Clin. Chim. Acta* 146, 175 (1985).
 54. Xiao W. J., Choi M. M. F.: *Anal. Chim. Acta* 514, 219 (2004).
 55. Rüger P., Bilitewski U., Schmid R. D.: *Sens. Actuators, B* 4, 67 (1991).
 56. Leca B., Marty J. L.: *Anal. Chim. Acta* 340, 143 (1997).
 57. Lobo Castañón M. J., Miranda Ordieres A. J., Tuñón Blanco P.: *Biosens. Bioelectron.* 12, 511 (1997).
 58. Mizutani F., Sato Y., Hirata Y., Sawaguchi T., Yabuki S.: *Sens. Actuators, B* 65, 46 (2000).
 59. Kubiak W. W., Wang J.: *Anal. Chim. Acta* 221, 43 (1989).
 60. Rotariu L., Bala C.: *Anal. Lett.* 36, 2459 (2003).
 61. Kitagawa Y., Kitabatake K., Kubo I., Tamiya E., Karube I.: *Anal. Chim. Acta* 218, 61 (1989).
 62. Biran I., Rissin D. M., Ron E. Z., Walt D. R.: *Anal. Biochem.* 315, 106 (2003).
 63. Ikeda T., Kobayashi D., Matsushita F., Sagara T., Niki K.: *J. Electroanal. Chem.* 361, 221 (1993).
 64. Santos A. S., Freire R. S., Kubota L. T.: *J. Electroanal. Chem.* 547, 135 (2003).

M. Valach and E. Šturdík (*Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovak Republic*): **Constructions of Amperometric Biosensors for Rapid and Simple Monitoring of Ethanol**

The review is focused on construction of biosensors for monitoring of ethanol. The use of various biological components (considering their specificity), methods of preparation and practical properties of biosensors are discussed. Principles of the amperometric transducer, which is most frequently employed in detection of redox processes, are summarized. The operation mechanism of electron transfer mediators used to improve application properties of biosensors is also explained. Finally, some examples of ethanol biosensors designed for biotechnological and medical purposes are presented.