

AMPEROMETRICKÉ BIOSENSORY PRO NEVODNÁ PROSTŘEDÍ

LUBOR STANČÍK

Centrum biochemických metod, Lékařská fakulta Masarykovy university, Komenského nám. 2, 662 43 Brno

Došlo dne 2.X. 1996

Ve všech základních učebnicích biologie se dočteme, že voda je základní a nezbytnou látkou pro fungování všeho živého, že i naše tělo je z více než poloviny tvořeno vodou a u medúz je vody dokonce 95 %. Současné poznatky však ukazují, že bílkovinné katalyzátory živé hmoty - enzymy - jsou schopny plnit své funkce i v prostředích pro ně mnohem méně „přátelských“, jako jsou organická rozpouštědla a to i s vodou nemísitelná. Jisté esenciální množství vody je pro funkci enzymu nezbytné i v organické fázi, ale je až s podivem, jak malá množství vody stačí zajistit funkční schopnost enzymu, vždyť v některých případech připadá na molekulu enzymu jen několik molekul vody¹.

Chování enzymů V nevodných prostředích

Mluvíme-li o nevodných prostředích v souvislosti s enzymy, je třeba si nejprve vytýčit hranice tohoto termínu. Jedná se vždy o organické rozpouštědlo obsahující určité množství vody. Rozpětí je velmi široké, od kapalin s vodou nemísitelných a nasycených malým množstvím vody až po směsi, které obsahují vody pět až deset procent. Půjdeme-li do extrému, můžeme za enzymovou reakci v organicko-vodném prostředí považovat i alkoholové kvašení známé lidstvu už tisíce let.

Jak již bylo řečeno, vyžaduje enzym pro svoji funkci jisté množství vody vždy. Původně se uvažovalo, že je třeba tolik vody, aby na povrchu molekuly enzymu vytvořila monomolekulární vrstvu², což představuje přibližně pět set molekul vody na molekulu enzymu. Studium reakční kinetiky některých enzymů v různých organických rozpouštědlech však bylo zjištěno, že tento počet je někdy podstatně nižší. Např. molekule chymotrypsinu stačí v oktanu pro zachování funkčnosti méně než padesát molekul vody

a v jiných rozpouštědlech je to ještě méně. Obdobně se chová i subtilisin¹. Z toho je zřejmé, že voda nevytváří souvislou vrstvu, ale pouze jakési klastry kolem nabitých skupin bílkovinné molekuly. Jiné enzymy jako alkoholdehydrogenasa, tyrosinasa nebo alkoholoxidasa jsou katalyticky aktivní, je-li v rozpouštědle přítomno několik set molekul vody na molekulu enzymu, což ukazuje spíše na tvorbu monomolekulární vodné vrstvy³. Aktivita enzymu v organickém rozpouštědle je ovlivňována pouze vodou vázanou na molekulu enzymu nikoliv volnými molekulami vody v rozpouštědle⁴.

Při studiu enzymových reakcí v nevodných prostředích byla pozorována řada fenoménů, které umožnily pochopit chování bílkovinné molekuly v organické fázi a byly s výhodou využity rovněž pro enzymové analýzy v organických rozpouštědlech. Jedná se o změny tepelné stability, substrátové specifity, stereospecifity a životnosti enzymu.

Tepelná inaktivace (denaturace) enzymu vyžaduje značnou konformační mobilitu jeho molekuly, viděno v souvislostech s organickými rozpouštědly, vyžaduje volnou vodu. Celý tento proces může být tedy dehydratací velmi omezen. A skutečně bylo zjištěno, že např. chymotrypsin si zachovává aktivitu v bezvodém oktanu po několik hodin i při teplotě 100 °C, zatímco ve vodném prostředí je enzym během několika minut ireverzibilně inaktivován už při teplotě 60 °C (cit. ¹). Obdobný efekt byl pozorován také u subtilisinu⁵ a vepřové pankreatické lipasy⁶. Rovněž při běžné laboratorní teplotě je stabilita suspenzí enzymů v bezvodých rozpouštědlech velmi vysoká v porovnání s jejich vodnými roztoky¹.

Zajímavým fenoménem je tzv. pH paměť enzymu a ligan-
dandem indukovaná paměť enzymu. Bylo zjištěno, že termorezistence enzymu závisí na pH roztoku, ze kterého byl mrazově vysublimován⁴. Stejně tak mrazová sublimace z roztoku obsahujícího kompetitivní inhibitor a jeho následné odstranění vede k enzymovému preparátu, který je v nevodném prostředí mnohonásobně aktivnější než enzym mrazově sublimovaný běžným způsobem⁵. Podstatou tohoto jevu je konformační rigidita enzymové molekuly v bezvodém rozpouštědle. Enzym si tedy zachovává konformační centrum formací danou optimálním pH nebo vazbou ligandu do jeho aktivního centra.

Substrátová specificita enzymů související s hydrofilností a hydrofobností substrátů je v organických rozpouštědlech také **pozměněna**⁷. U mnoha hydrolas jsou podstatou vazby substrátu **hydrofobní interakce**. Reaktivita substrátu roste s jeho hydrofobností. V organických rozpouštědlech však hydrofobní interakce prakticky neexistují a skutečně bylo experimentálně ověřeno na chymotrypsinu, subtilisinu a jaterní karboxylesterase, že hydrofobnost substrátu koreluje s jeho aktivitou v organickém rozpouštědle negativně⁸. Analogicky je tomu i s kompetitivními inhibitory¹.

Substrátová stereospecificita enzymů rovněž doznává jistých změn. Proteinasa subtilisin, která ve vodných roztocích štěpí pouze **peptidické** vazby **L-aminokyselin**, byla v organické fázi schopna reakce i s **D-aminokyselinovými zbytky**⁹. Experimentální data ukazují, že čím je vyšší hydrofobicitá rozpouštědla, tím je nižší stereospecificita enzymu¹⁰.

Chování enzymů v nevodných prostředích nastiňuje nové možnosti jejich využití, ať již při biochemické syntéze, kde umožňuje použití ve vodě nerozpustných reaktantů, nebo v oblasti biochemické analytiky, kde je rovněž pro možnost detekce ve vodě obtížně rozpustných analytů široké pole působnosti. Sem spadá také problematika enzymových elektrod, na které je tento přehled zaměřen.

Výběr rozpouštědel

Hlavním kritériem pro výběr rozpouštědla pro analýzy pomocí enzymové elektrody je, vedle minimálních denaturačních účinků na použitý enzym, jeho **hydrofobnost**¹¹. Čím méně se rozpouštědlo mísí s vodou, tím menší je jeho schopnost odnímat vodu z enzymové vrstvy biosensoru a tedy ji inaktivovat snížením množství vody pod esenciální minimum. Je nutno přihlídnout také k rozpustnosti analytů v daném rozpouštědle. Parametrem kvantitativně vyjadřujícím nemísitelnost rozpouštědla s vodou je tzv. index hydrofobicity **log P**. Jedná se o logaritmus rozdělovacího koeficientu testovaného rozpouštědla ve standardním dvoufázovém systému **oktanol-voda**¹¹.

Rozpouštědla s koeficientem hydrofobicity menším než **2** nejsou pro biosensorové systémy příliš vhodná právě z důvodu vymývání vody z enzymové vrstvy elektrody. Běžně se používají rozpouštědla s koeficientem **2–4**. Média s **log P** větším než **4** jsou pak naprosto **biokompatibilní**¹². Stručný přehled nejčastěji používaných organických rozpouštědel s jejich hodnotami koeficientu hydrofobicity je uveden v tabulce I.

Tabulka I

Přehled **nejpoužívanějších organických rozpouštědel** a jejich indexů hydrofobicity (**log P** – logaritmus rozdělovacího koeficientu testovaného rozpouštědla ve standardním dvoufázovém systému **oktanol-voda**)

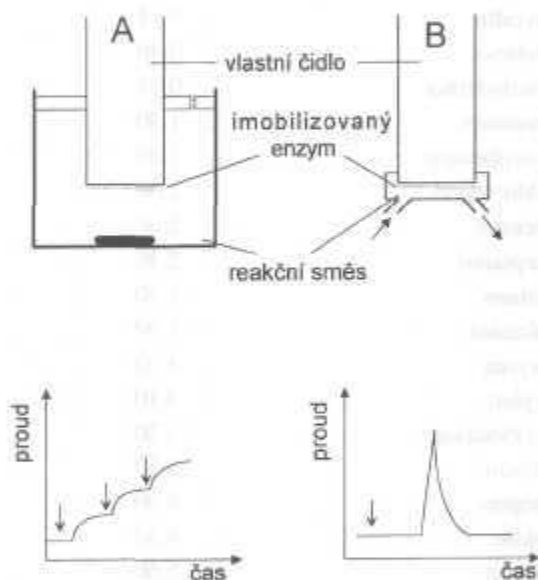
Rozpouštědlo	log P
dimethylsulfoxid	-1,30
N,N-dimethylformamid	-1,00
methanol	-0,76
acetonitril	-0,33
ethanol	-0,24
aceton	-0,23
propanol	0,28
tetrahydrofuran	0,49
ethylacetát	0,68
pyridin	0,71
butanol	0,80
diethylether	0,85
pentanol	1,30
nitrobenzen	1,80
chloroform	2,00
benzen	2,00
heptanol	2,40
toluen	2,50
oktanol	2,90
styren	3,00
xylén	3,10
cyklohexan	3,20
hexan	3,50
heptan	4,00
oktan	4,50
dekan	5,60
dioktylfthalát	9,60
dilaurylfthalát	13,70

Konstrukce biosensorů pro nevodná prostředí

Enzymové biosensory dosud používané v nevodných prostředích jsou vesměs sensory **amperometrickými**. Elektrody jsou polarizovány vložením vhodného konstantního potenciálu a signál sensoru, daný redukcí či oxidací detegované látky, se registruje jako proudová změna v systému. Jako referentní slouží elektrody **argentchloridová** nebo na-

sycená kalomelová. Pomocná elektroda je obvykle platinová nebo ocelová. Toto uspořádání ovšem vyžaduje vodivé reakční prostředí, proto jsou do reakčních směsí přidávány různé látky, převážně typu tetraalkylamoniových solí, které zvyšují jejich vodivost a umožňují tak průchod elektrických proudů. Existují také enzymové sensory na bázi Clarkova kyslíkového článku, které vodivost organického média nevyžadují. Elektrodová reakce zde probíhá ve vlastním článku s elektrolytem z chloridu draselného, který je od organické reakční fáze oddělen membránou propustnou pouze pro plyny¹².

Použití organických rozpouštědel klade také zvýšené nároky na materiály použité při konstrukci vlastní měřicí cely. Vedle skla jsou nejvhodnějšími teflon, polyethylen a polypropylen, případně jiné plasty, které vykazují dostatečnou rezistenci vůči použitému rozpouštědлу.



Obr. 1. Dva způsoby analýzy pomocí biosensoru v organické fázi: A - stacionární provedení, B - průtočný systém. Přidávky substrátu (analýzované látky) jsou v záznamu signálu označeny šipkami

Imobilizace enzymu

Příprava vlastních biosensorů má svá specifika plynoucí z vlastností prostředí, pro která jsou určeny. Nejčastěji používaným materiálem pro konstrukci pracovních elektrod je uhlík. Sensory bývají zhotovovány buď z uhlíkové fólie nebo častěji ze skelného uhlíku¹². Je-li použit

Clarkův článek, je pro tyto účely opatřen teflonovou nebo polyethylenovou plynově propustnou membránou¹³.

Imobilizace enzymů na pracovní elektrodě je jednoduchá. Všechny dosavadní práce se shodují v tom, že prostá sorpce se jeví jako mnohem výhodnější než jakákoliv chemická imobilizace¹⁴. Roztok enzymu ve vhodném pufru je nasáknut buď přímo od povrchu pracovní elektrody (uhlíková fólie)¹⁵, nebo jejím napuštěna na ní fixovaná nylonová síťka¹⁶. Velmi elegantní možnost imobilizace nabízí použití katektů z polyester-sulfonových kyselin, které vyrábí firma Eastman Kodak a dodává pod označením Eastman AQ. Enzym se rozpustí v cca 2 % vodném roztoku ionomeru a vzniklá směs je nanesena na povrch elektrody zhotovené ze skelného uhlíku. Po zaschnutí se vytvoří pružný film, který dokonale fixuje enzym na povrchu elektrody¹⁷. Byly testovány i gely na bázi zesíťovaného polyvinylpyridinu a také vodivé polymery jako například polypyrrol¹⁸ nebo polythiofen¹⁹. Při použití Clarkova článku je enzym imobilizován prostým překrytím aplikovaného roztoku dialyzační membránou¹³. Někdy je využito adsorpce do vhodného materiálu - skelný papír²⁰, oxid hlinitý²¹.

Z důvodu zlepšení přenosu elektronů mezi enzymem a povrchem pracovní elektrody bývají někdy použity mediátory. Nejvýhodnější je takový, který je v reakčním médiu nerozpustný a není tedy z enzymové vrstvy biosensoru vymýván do reakční směsi¹⁵. Rozpustné mediátory se přidávají ve vhodné koncentraci přímo do reakční směsi²², což je ovšem ekonomicky méně výhodné zejména u drahých mediátorů.

Aplikace

Rozsah aplikací enzymových elektrod v nevodných prostředích je velmi široký a odvíjí se od možností, které s sebou přináší změny v chování enzymu dané příslušným rozpouštědlem a změn v rozpustnosti substrátů a inhibitorů v porovnání s roztoky vodnými. S výhodou jich bylo použito k analýzám materiálů, které se s vodou nemísí, jako jsou na příklad různé masti²³ a oleje²⁴. U rozpouštědel nemísitelných s vodou lze s výhodou využít také zakonzentrování analytu do organické fáze extrakcí z vodného roztoku nebo přímo použitím organického rozpouštědla k extrakci vzorku. Tímto způsobem lze monitorovat hladiny některých látek v odpadních vodách nebo v půdě¹⁶.

V drtivé většině se enzymové elektrody pracující v organických rozpouštědlech používají k detekci látek, které jsou substráty enzymů imobilizovaných na pracovní elek-

Tabulka II

Přehled biosensorů pro nevodná prostředí. Při použití tříelektrodových systémů byla vodivost prostředí zvýšena přidávkem tetralakylammoniové soli, s vodou nemísitelná rozpouštědla byla ve směs nasycena pufrem pro pH optimum daného enzymu. S vodou mísitelná rozpouštědla obsahovala od 2 do 20 % pufru (v/v)

Enzym	Elektrodový systém	Imobilizace	Rozpouštědlo	Analyt	Analyt detegován jako ^a	Citace
tyrosinasa	Clarkův kyslíkový článek	překrytím dialyzační membránou	hexan	fenol <i>p</i> -chlorfenol <i>p</i> -bromfenol <i>p</i> -kresol fenol	s s s s s	13
tyrosinasa	Clarkův kyslíkový článek	překrytím dialyzační membránou	chloroform			15
tyrosinasa	grafitová fólie – SCE – Pt	adsorpce do nylonové sítky	chloroform	<i>p</i> -kresol	s	16
tyrosinasa	skelný uhlík – Ag/AgCl – Pt	polymer Eastman AQ	acetonitril	fenol	s	17
tyrosinasa	Clarkův kyslíkový článek	adsorpce do skelného papíru, překrytí dialyzační membránou	hexan	fenylthiomocovina N,N-difenylythiomocovina fenylethylthiomocovina benzylthiomocovina isopropylthiomocovina allylthiomocovina fenoly v bakteriálních mastech	i i i i i i s	20
tyrosinasa	skelný uhlík – Ag/AgCl – Pt	polymer Eastman AQ	acetonitril			23
tyrosinasa	skelný uhlík – Ag/AgCl – Pt	polymer Eastman AQ	acetonitril	thiomocovina diethylthiokarbamat kyselina benzoová 2-merkaptioethanol kyselina dichlorfenoxycetová dimethyltruf	i i i i i i	26
tyrosinasa	grafit – Ag/AgCl – Pt skelný uhlík – SCE – Pt	adsorpce polymer Eastman AQ	chloroform acetonitril aceton	fenoly v olivovém oleji fenol	s s	24 29
tyrosinasa	Clarkův kyslíkový článek	překrytím dialyzační membránou	tetrahydrofuran hexan chloroform	fenol <i>p</i> -chlorfenol	s s	30

Pokračování tabulky II

Enzym	Elektrodotový systém	Imobilizace	Rozpouštědlo	Analyt	Analyt delegován jako ^a	Citace
tyrosinasa	skelný uhlík – Ag/AgCl – Pt	karboxymethylhydroxyethyl celuloza zesíťená polyvinylalkoholem	chlorbenzen chloroform oktanol 1-butanol ethanol acetonitril 2-propanol dioxan chloroform chlorbenzen acetonitril	<i>o</i> -chlorfenol <i>p</i> -kresol <i>o</i> -kresol guajakol katechol fenol <i>p</i> -kresol	s s s s s s s	31
peroxidasa	grafitová fólie – SCE – Pt	šorpce		peroxid vodíku	s	15
peroxidasa	skelný uhlík – Ag/AgCl – Pt	polymer Eastman AQ	acetonitril	peroxid vodíku	s	17
peroxidasa	SnO ₂ sklo – Ag/Ag ⁺ – Pt	inkorporace do hydrofilního polythiofenu	acetonitril	2-butanon peroxid peroxid vodíku	s s	19
peroxidasa	skelný uhlík – Ag/AgCl – Pt	Pt polymer Eastman AQ	acetonitril	peroxydy v baktericidních mastech	s	23
peroxidasa	skelný uhlík v tenké vrstvě	polymer Eastman AQ	acetonitril	peroxydy v baktericidních olejích	s	32
peroxidasa	skelný uhlík – Ag/AgCl – Pt	polymer Eastman AQ	acetonitril	thiomočovina 2-merkaptioethanol	i i	26
peroxidasa	skelný uhlík – SCE – Pt	polymer Eastman AQ	acetonitril	hydroxyammoniumsulfát thiomočovina ethylthiomočovina	i i i	33
peroxidasa	skelný uhlík – Ag/AgCl – Pt	kovalentní	aceton acetonitril methanol acetonitril	lauroyl peroxid peroxid vodíku 2-butanon peroxid kumenhydroperoxid	s s s s	34

Pokračování tabulky II

Enzym	Elektrodový systém	Imobilizace	Rozpouštědlo	Analyt	Analyt detegován jako ^a	Citace
peroxidasa	Pt – SCE – Pt	polymer Eastman AQ	acetonitril	terbutylhydroperoxid ethylenthionochovina thionochovina merkaptoethanol peroxid vodíku	s i i i s	35 36
peroxidasa	grafit – Ag/AgCl – Pt	karboxymethylhydroxy-ethyl celulosu zesílená polyvinylalkoholem	chlorobenzen chloroform ethylendichlorid acetonitril aceton dioxan methanol cyklohexan ethanol tetrahydrofuran N,N-dimethylformamid chloroform acetonitril			
cholesteroloxidasa alkoholdehydrogenasa	Clarkův kyslíkový článek skelný uhlík – Ag/AgCl – Pt	adsorpce do Al ₂ O ₃ polymer Eastman AQ	ethanol 2-propanol 1-butanol acetonitril toluen hexan heptan nonan cyklohexan hexan toluen	cholesterol 2-propanol 2-butanol 4-methylkatechol katechol hydrochinon glukosa paraoxon	s s s s s s i	21 37 38 22 25
lakasa	skelný uhlík – Ag/AgCl – Pt	polymer Eastman AQ				
glukosaoxidasa cholinesterasa ^b	skelný uhlík – Ag/AgCl – Pt Pt kompozit – Ag/AgCl – Pt	zesílená glutaraldehydem zesílená glutaraldehydem				
cholinesterasa ^{b,c}	Pt – Ag/AgCl – Pt	fotopolymer PVASbQ		paraoxon aldicarb	i i	39

^a s = substrát, i = inhibitor, ^b v organické fázi byla prováděna pouze inkubace, měření úbytku aktivity pak ve vodném prostředí, ^c bylo testováno 28 různých organických rozpouštědel

trodě. Bylo však publikováno také několik prací, které se zabývají stanovováním analytů, které jsou inhibitory použitých enzymů. V tomto případě je možno měření provádět dvojím způsobem. Buď vystavit předem enzym v biokatalytické vrstvě sensoru působení inhibitoru v organickém rozpouštědle a poté provést měření úbytku aktivity v prostředí vodném²⁵, nebo provést celý měřicí cyklus v nevodném prostředí²⁶. Přehled dosud zkonstruovaných a použitých sensorů je uveden v tabulce II.

Perspektivita biosensorů pro organickou fázi

Na závěr je možno říci, že enzymové biosensory pracující v nevodných rozpouštědlech jsou pro praxi perspektivní. Už například fakt, že enzymy si zachovávají svoji katalytickou aktivitu v prakticky dehydratovaném stavu, nastiňuje možnost jejich využití při konstrukci nových typů biosensorů, jakými jsou například piezoelektrické sensory pro analýzy v plynné fázi¹². Enzymové biosensory pro detekci toxických plynů, byly již popsány²⁷ a zvýšená rozpustnost některých plynů v organických rozpouštědlech může být využita ke zvýšení citlivosti těchto zařízení. Další možný vývoj je spojen s rozvojem technologií přípravy polymerů, které by umožnily selektivní akumulaci analytu na povrchu biosensoru a také nových technik přípravy vlastních sensorů²⁸. Zmiňme také proteinové inženýrství, které umožní přípravu enzymů „šitých na míru“ tak, aby si zachovaly vysokou aktivitu a stabilitu i při použití v ne zcela běžných fázích. Biosensorika v organických rozpouštědlech rozšiřuje pole působnosti biochemické analýty a s rozvojem nových technologií se jeví jako velmi perspektivní oblast výzkumu.

LITERATURA

1. Zaks A., Klibanov A. M.: *J. Biol. Chem.* 263, 3194 (1988).
2. Rupley J. A., Gratton E., Careri G.: *Trends Biochem. Sci.* 8, 18(1983).
3. Zaks A., Klibanov A. M.: *J. Biol. Chem.* 263, 8017 (1988).
4. Zaks A., Klibanov A. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3192 (1985).
5. Russel A. J., Klibanov A. M.: *J. Biol. Chem.* 263, 11624(1988).
6. Zaks A., Klibanov A. M.: *Science* 224, 1249 (1984).
7. Dordick J. S.: *Enzyme Microb. Technol.* 11, 194 (1989).
8. Zaks A., Klibanov A. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 108, 2767 (1986).
9. Margolin A. L., Tai D-F., Klibanov A. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 109, 7885 (1987).
10. Sakurai T., Margolin A. L., Russell A. J., Klibanov A. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 110, 7236 (1988).
11. Laane C, Boeren S., Vos K., Veeger C: *Biotechnol. Bioeng.* 28, 417 (1987).
12. Saini S., Hall G. F., Downs M. E. A., Turner A. P. F.: *Anal. Chim. Acta* 249, 1 (1991).
13. Campanella L., Sammartino M. P., Tomassetti M.: *Sens. Actuators B.* 7, 383 (1992).
14. Campanella L., Tomassetti M., Sammartino M. P.: *Sens. Actuators* 16, 235 (1989).
15. Schubert F., Saini S., Turner A. P. F., Scheller F.: *Sens. Actuators B.* 7, 408 (1992).
16. Hall G. F., Best D. J., Turner A. P. F.: *Anal. Chim. Acta* 213, 113 (1988).
17. Wang J., Lin Y., Chen. Q.: *Electroanalysis* 5, 23 (1993).
18. Dicks J. M., Hattori S., Karube I., Turner A. P. F., Yokozawa T.: *Ann. Biol. Clin.* 47, 607 (1989).
19. Tatsuma T., Ariyama K., Oyama N.: *Anal. Chim. Acta* 318, 297 (1996).
20. Stančík L., Macholán L., Scheller F.: *Electroanalysis* 7, 649 (1995).
21. Hall G. F., Turner A. P. F., ve sborníku: *First World Conference on Biosensors*, str. 331. Elsevier Seminars, Oxford 1990.
22. Iwuoha E. I., Smyth M. R.: *Analyst* 119, 265 (1994).
23. Wang J., Lin Y., Chen L.: *Analyst* 118, 277 (1993).
24. Wang J., Reviejo A. J., Mannino S.: *Anal. Lett.* 25(8), 1399 (1992).
25. Skládal P., Krejčí J.: *Coll. Czech. Chem. Commun.* 61, 985 (1996).
26. Wang J., Dempsey E., Eremenko A.: *Anal. Chim. Acta* 279, 203 (1993).
27. Barzana E., Klibanov A. M., Karel M.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 15, 25 (1987).
28. Wang J., Chen Q. A.: *Anal. Lett.* 28, 1131 (1995).
29. Iwuoha E. I., Adeyoju O., Dempsey E., Smyth M. R., Liu J., Wang J.: *Biosens. Bioelectron.* 10, 661 (1995).
30. Campanella L., Fortuney A., Sammartino M. P., Tomassetti M.: *Talanta* 41, 1397 (1994).
31. Deng Q., Dong S.: *Anal. Chem.* 67, 1357 (1995).
32. Mannino S., Cosio M. S., Wang J.: *Anal. Lett.* 27(2),

- 299 (1994). L. Stančík (*Centre of Biochemical Methods, Medical Faculty, Masaryk University, Brno*): **Amperometric Biosensors for Non-Aqueous Media**
33. Adeyolu O., Iwuoha E. I., Smyth M. R.: *Anal. Chim. Acta* **305**, 57 (1995).
 34. Wang C. L., Mulchandani A.: *Anal. Chem.* **67**, 1109 (1995).
 35. Adeyolu O., Iwuoha E. I., Smyth M. R.: *Talanta* **41**, 1603 (1994).
 36. Dong S., Guo Y.: *Anal. Chem.* **66**, 3895 (1994).
 37. Wang J., Naser N., Lopez D.: *Biosens. Bioelectron.* **9**, 225 (1994).
 38. Wang J., Lin Y., Eremenko A., Ghindilis A., Kurochkin I.: *Anal. Lett.* **26**(2), 197 (1993).
 39. Mionetto N., Marty J-L., Karube I.: *Biosens. Bioelectron.* **9**, 463 (1994).

Application of biosensors in non-aqueous media extends their role in biochemical analysis to analytes which cannot be detected by biosensors in water solutions. The behaviour of an enzyme in an organic solvent and the changes expressed in differences of stability, substrate specificity, and sensitivity to inhibitors are discussed. Various methods of biosensor preparation, viz. the use of different electrode systems and ways of enzyme immobilization, are evaluated. A survey of so far designed and used biosensors for non-aqueous media is presented in a table.