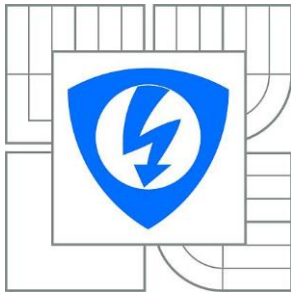




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH  
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

## ELEKTROCHEMICKÁ IMPEDANČNÍ ANALÝZA ENZYMOVÉ REAKCE

THE APPLICATION OF ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY FOR  
INVESTIGATION OF ENZYME KINETICS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

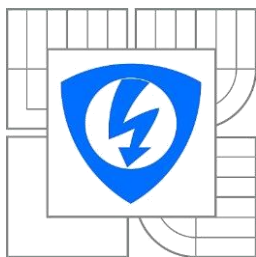
MICHAELA POSPÍŠILOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. ZDENKA FOHLEROVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ  
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky  
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

# Bakalářská práce

bakalářský studijní obor  
Biomedicínská technika a bioinformatika

**Studentka:** Michaela Pospíšilová

**ID:** 155598

**Ročník:** 3

**Akademický rok:** 2014/2015

**NÁZEV TÉMATU:**

## Elektrochemická impedanční analýza enzymové reakce

**POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:**

1) Proveďte literární rešerši na zvolené téma (enzymy, enzymová kinetika, enzymové biosenzory, impedanční měření kinetické reakce). 2) Prostudujte impedanční techniky z teoretického a praktického hlediska (impedanční spektroskopie, měření při fixní frekvenci, Faradaická a non-Faradaická impedance). 3) Navrhněte experiment a proveďte základní testovací měření. 4) Proveďte kompletní měření kineticky enzymové reakce s použitím modelové interakce mezi glukosaoxidásou a glukózou. 4) Vyhodťte naměřené výsledky (Michaelis-Mentenové).

**DOPORUČENÁ LITERATURA:**

- [1] S. SHRIKRISHNAN, et al. Electrochemical Impedance Analysis of Adsorption and Enzyme Kinetics of Calf Intestine Alkaline Phosphatase on SAM-Modified Gold Electrode. J. Phys. Chem. C, 116, 16030-16037, 2012
- [2] T. KOHMA, et al. Utilization of AC Impedance Measurements for Electrochemical Glucose Sensing Using Glucose Oxidase to Improve Detection Selectivity. Bull. Chem. Soc. Jpn. Vol. 80, No. 1, 158-165, 2007.

**Termín zadání:** 9.2.2015

**Termín odevzdání:** 29.5.2015

**Vedoucí práce:** Mgr. Zdenka Fohlerová, Ph.D.

**Konzultanti bakalářské práce:** Ing. Milan Jílek

**prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.**

*Předseda oborové rady*

**UPOZORNĚNÍ:**

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

## Abstrakt

Aplikace elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) pro studium redoxních enzymových reakcí byla již popsána. Impedanční měření jsou velmi citlivé na změny na rozhraní mezi elektrodou a roztokem způsobené např. adsorpcí nabitých částic. Z tohoto důvodu mohou být použity pro studium kinetiky adsorpce makromolekul, ale také umožňují studovat enzymovou kinetiku, jelikož působením enzymů na substráty se enzymy účastní modifikace a generování nabitých částic na povrchu elektrody.

V této práci zkoumáme potenciál elektrochemické impedanční techniky ke sledování kinetiky reakce na modelovém příkladu enzymu glukóza oxidázy a glukózy jako substrátu. Enzym je vystaven různým koncentracím substrátu a interakce se budou zaznamenávat v reálném čase. Očekávají se změny v impedanci při různých koncentracích substrátu. Tyto změny by měly následovat kinetiku Michaelis-Mentenové. Experimentální postup by měl být jednoduchý a měl by být prováděn v roztocích pufru bez požadavku na jakékoli dodatečné redoxní próby.

## Abstract

The application of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in theory and experiment for investigation of redox enzyme kinetics has been already described. The impedance studies are quite sensitive to the changes at the interface caused by adsorption of charged species and therefore can be used to study the kinetics of adsorption of macromolecules and also enables us to study enzyme kinetics since the action of the enzymes on their substrates involved modification and generation of charged species.

In this work, we explore the potential of electrochemical impedance technique to follow the kinetics of glucose oxidase–substrate reactions on the immobilized surface. The enzyme will be allowed to interact with different concentrations of its substrate and the resulting reaction will be recorded in real time. Changes in the imaginary component of the impedance at various substrate concentrations will be expected to follow Michaelis–Menten kinetics. The experimental procedure should be simple and can be carried out directly in buffer solutions most suited for the required interaction to take place, without the requirement of any additional redox probes.

## **Klíčová slova**

biosenzory, impedance, enzymy, kinetika enzymových reakcí, elektrochemická impedanční spektroskopie.

## **Keywords**

biosensors, impedance analysis, enzymes, kinetics of enzyme reaction, electrochemical impedance spectroscopy.

POSPÍŠILOVÁ, M. *Elektrochemická impedanční analýza enzymové reakce*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2015. 42s. Vedoucí semestrální práce Mgr. Zdenka Fohlerová, Ph.D..

# Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Elektrochemická impedanční analýza enzymové reakce jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č.140/1961 Sb.

V Brně dne 25. května 2015

.....  
podpis autora

# Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu bakalářské práce Mgr. Zdence Fohlerové, Ph.D. za odborné vedení a další cenné rady při zpracování bakalářské práce. Ráda bych také poděkovala Ing. Milanu Jílkovi za poskytnutí komůrky a elektrod s imobilizovaným enzymem pro účely měření. V neposlední řadě děkuji také rodině, která mi poskytla psychickou a finanční podporu během studia.

V Brně dne 25. května 2015

.....

podpis autora

# Obsah

Seznam obrázků.....	8
Seznam tabulek.....	10
1. Úvod.....	11
2. Teoretická část.....	12
2.1. Sacharidy.....	12
2.1.1. Glukóza.....	12
2.2. Biosenzory.....	13
2.2.1. Rozdělení biosenzorů.....	14
2.2.1.1. Impedimetrické biosenzory.....	15
2.2.1.2. Elektrochemická impedanční spektroskopie.....	16
2.2.2. Enzymové biosenzory.....	18
2.2.3. Imobilizace enzymu na povrch elektrod.....	19
2.3. Enzymy.....	19
2.3.1. Enzymová reakce.....	20
2.3.2. Rozdělení enzymů.....	20
2.3.3. Oxidoreduktázy.....	21
2.3.4. Oxidázy.....	21
2.3.4.1. Charakteristika glukóza oxidázy.....	22
3. Cíl práce.....	23
4. Experimentální část.....	24
4.1. Použité chemikálie.....	24
4.2. Použité přístroje.....	24
4.3. Měřicí aparatura.....	24
4.4. Imobilizace GOD a albuminu.....	27
4.5. Impedanční spektra glukózy.....	28
4.6. Kalibrační závislost glukózy při fixní frekvenci.....	28
5. Výsledky a diskuze.....	29
5.1. Impedanční spektra a kalibrační křivka pro glukózy.....	29
6. Závěr.....	40
Seznam použité literatury.....	41

## Seznam obrázků

Obrázek 1 - $\alpha$ -D-glukóza .....	13
Obrázek 2- Uspořádání složek biosenzoru .....	14
Obrázek 3 - Schéma impedance.....	17
Obrázek 4 - Nyquist diagram.....	17
Obrázek 5 -Kinetika podle Michaelis-Mentenové.....	18
Obrázek 6 - Vznik komplexu enzym-substrát .....	20
Obrázek 7 – Uvolnění produktu z komplexu enzym-substrát .....	20
Obrázek 8 - Impedanční analyzátor Aligent 4980A .....	25
Obrázek 9 - Měřicí aparatura s průtočnou celou umístěná ve Faradayově kleci .....	25
Obrázek 10 -Průtočná cela.....	26
Obrázek 11 - Tříelektrodový senzor s imobilizovanou GOD.....	26
Obrázek 12 - Ukázka metody zesílení biomolekul.....	27
Obrázek 13 - Schéma jednotlivých vrstev pracovní elektrody s imobilizovanou GOD. 27	
Obrázek 14 - Schéma jednotlivých vrstev pracovní elektrody s imobilizovaným albuminem .....	27
Obrázek 15 – Graf závislosti rezistence a kapacitance na koncentraci 0,5 mM glukózy a pufru .....	29
Obrázek 16 - Závislost celkové impedance $ Z $ na frekvenci pro 0,5 mM glukózu a pufr .....	30
Obrázek 17 - Graf závislosti celkové impedance $Z$ v čase 1h pro frekvenci 100 Hz.....	32
Obrázek 18 - Graf závislosti impedance na koncentraci pro enzym a albumin (f=100 Hz).....	34
Obrázek 19 - Graf závislosti kapacitance na koncentraci pro enzym a albumin (f=100 Hz).....	34
Obrázek 20 - Graf závislosti rezistance na koncentraci pro enzym a albumin (f=100 Hz) .....	35
Obrázek 21 - Závislost celkové impedance $Z$ v čase 1h pro frekvenci 2 MHz .....	36



Obrázek 22 - Graf závislosti impedance na koncentraci pro enzym a albumin ( $f=2$ MHz)	38
Obrázek 23 - Graf závislosti kapacitance na koncentraci pro enzym a albumin ( $f=2$ MHz)	39
Obrázek 24 - Graf závislosti rezistance na koncentraci pro enzym a albumin ( $f=2$ MHz)	39

## Seznam tabulek

Tabulka 1- Průměrné hodnoty impedance a směrodatné odchylky pro enzym GOD a $f=100$ Hz .....	33
Tabulka 2 - Průměrné hodnoty impedance a směrodatné odchylky pro albumin a $f=100$ Hz .....	33
Tabulka 3 - Průměrné hodnoty impedance a směrodatné odchylky pro enzym GOD a $f=2$ MHz.....	37
Tabulka 4 - Průměrné hodnoty impedance a směrodatné odchylky pro albumin a $f=2$ MHz.....	37

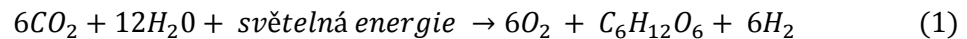
## 1. Úvod

Enzymatické stanovení glukózy v přítomnosti enzymu glukóza oxidázy má již dlouholetou tradici především v jejím stanovení pomocí amperometrických enzymových biosenzorů. Tyto biosenzory se vyznačují dobrou citlivostí a selektivitou, nicméně řada interferujících látek v reálných vzorcích může tyto parametry snižovat. Impedanční analýza je velmi citlivá metoda detekující změny kapacitance a rezistance v těsné blízkosti elektrody. Jako taková, může tedy sloužit jako alternativa k amperometrickým senzorům, přičemž je využito stanovení změn impedančních parametrů během enzymové přeměny glukózy na povrchu elektrody s imobilizovanou glukóza oxidázou. Potenciál této metody při studiu enzymové kinetiky je studován jak na základě impedanční spektroskopie, tak při fixní frekvenci. Očekává se, že změny v impedanci při různých koncentracích substrátu budou následovat kinetiku Michaelis-Mentenové. Výhodou zde zůstává, jako u většiny biosenzorů, rychlá detekce, jednoduchá konstrukce, dobrá citlivost, časová stálost a finanční nenáročnost.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Sacharidy

Sacharidy řadíme mezi nejrozšířenější organické sloučeniny vyskytující se v biosféře. Jsou to sloučeniny převážně rostlinného původu. Sacharidy vznikají primárně při fotosyntéze v zelených rostlinách z oxidu uhličitého a vody za přítomnosti světelná energie viditelného záření (rov. 1).



Sacharidy mají řadu významných funkcí v živých organismech. Jednou z nich je stavební funkce v těle rostlin, kdy jsou sacharidy součástí pojiva a buněčných stěn (např. celulóza). Energetická funkce zahrnuje velmi bohatý a rychlý zdroj energie pro organismy. Zásobní formy sacharidů tvoří škrob (u rostlin) a glykogen (u živočichů). [4]

Mezi nejjednodušší sacharidy patří monosacharidy. Mnoho těchto sloučenin je syntetizováno v procesu glukoneogeneze, jiné jsou produkty fotosyntézy. Metabolický rozklad monosacharidů poskytuje většinu energie potřebné pro průběh biochemických pochodů. Monosacharidy jsou také významnou složkou nukleových kyselin a důležitou součástí lipidů. [4]

Druhou skupinu sacharidů představují oligosacharidy, které se skládají ze dvou až deseti kovalentně vázaných monosacharidových jednotek, bývají často sloučeny s proteiny a lipidy, v nichž mají jak stavební, tak regulační funkci. [4]

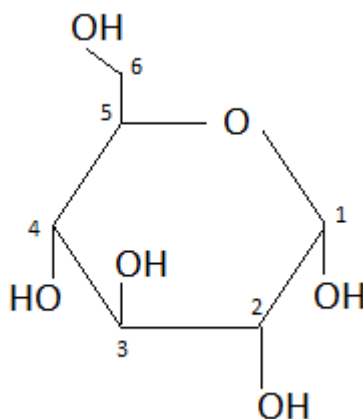
Třetí skupinou jsou polysacharidy tvořené více jak deseti kovalentně vázaných monosacharidových jednotek. Mezi polysacharidy řadíme např. celulózu, škrob a glykogen. Jejich strukturní role je nepostradatelná pro všechny organismy, zejména pak v rostlinách, kde celulóza tvoří základní stavební materiál. U živočichů je významný např. glykogen, který slouží jako zásobní zdroj energie. [4]

#### 2.1.1. Glukóza

Glukóza se řadí do skupiny aldohexós a je nejrozšířenějším a nejdůležitějším cukrem v přírodě. Je hlavním a rychlým zdrojem energie pro všechny buňky v lidském těle. Tvoří základní stavební jednotku celulózy, škrobu a glykogenu. Volně ji najdeme ve sladkém ovoci a nektaru květů. U glukózy rozeznáváme dvě formy, L- a D- forma

(L-glukóza, D-glukóza). Jinou formu tvoří tzv. anomery. Rozlišujeme  $\alpha$ - a  $\beta$ - anomery v závislosti na poloze OH skupiny konkrétně na prvním uhlíku v řetězci. [4] [5]

Glukóza má také obrovský význam v lékařství, jelikož její roztoky jsou běžnou součástí nitrožilních infuzí. Hypertonické roztoky glukózy se podávají při umělé výživě nebo v terapii některých závažných stavů (např. mozkový edém). Zvýšená hladina koncentrace glukózy v krvi může být také indikátorem nemoci diabetes mellitus (tzv. cukrovka, onemocnění projevující se únavou, častým močením a pocitem žízně. [4] [14] [15]

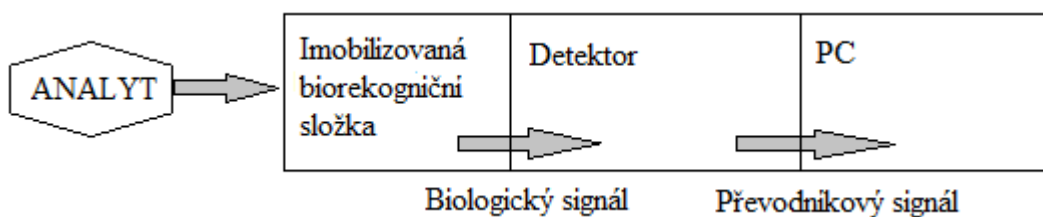


Obrázek 1 -  $\alpha$ -D-glukóza

## 2.2. Biosenzory

Biosenzor lze definovat jako „analytický přístroj obsahující citlivý prvek biologického původu, který je buď součástí nebo v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem. Poskytuje průběžný elektrický signál, který je přímo úměrný koncentraci jedné nebo několika chemických látek ve vzorku“. [12]

Jinými slovy je biosenzor zařízení, kde se spojuje část biorekogniční a převodníková. Biorekognice je umožněna díky bioelementu, který je imobilizován na povrch biosenzoru. Bioelementem mohou být buňky, enzymy, DNA sekvence, a jiné. Bioelement se nachází v těsném kontaktu s převodníkovou částí, která měřenou reakci či interakci převádí na signál lépe vyhodnotitelný (např. elektrický, optický). Díky biosenzorům jsou dnes zkoumány např. interakce protilátka-antigen, hybridizace DNA nebo enzymové stanovení substrátů. Jedním z prvotních a dodnes asi nejvíce prostudovaných biosenzorů je glukózový biosenzor, komerčně známý jako glukometr, který je využíván u diabetiků k měření koncentrace glukózy v krvi. [3] [9] [11]



Obrázek 2- Uspořádání složek biosenzoru

### 2.2.1. Rozdělení biosenzorů

Biosenzory lze rozdělit podle typu použité biorekogniční složky a převodníku na následující [11]:

1) Podle biorekogniční složky:

- biokatalytické (např. organely, enzym, buňka, organismus) – pracují na principu přeměny analytu v průběhu chemické reakce; analytem je substrát enzymové reakce
- bioafinitní (např. protilátka, nukleová kyselina) – analyt se specificky váže na vznikající afinitní komplex

2) Podle typu fyzikálně – chemického převodníku:

- **optické** – měří intenzitu emitovaného světla, absorpenci, reflektanci, a také změnu indexu lomu při biochemické reakci/interakci
- **piezoelektrické** – založené na piezoelektrickém jevu, tj. na změně frekvence vibrací piezoelektrického krystalu po navázání zkoumané látky
- **kalorimetrické** – měří změnu tepla v průběhu termických reakcí mezi analytem a imobilizovanou biomolekulou na senzoru
- **elektrochemické** – měří elektrický signál vznikající během působení mezi substrátem a biologicky aktivní složkou, řadí se zde biosenzory potenciometrické, amperometrické a voltametrické
- **impedimetrické** – využívají změnu impedančních parametrů nejčastěji při bioafinitních interakcích

Jak již bylo zmíněno, v předložené práci se budeme zabývat využitím impedimetrie při studiu kinetiky enzymové reakce. Níže tedy bude detailněji popsána impedanční technika.

### 2.2.1.1. Impedimetrické biosenzory

Impedance je fyzikální veličina vyjadřující elektrický odpor závislý na frekvenci. Tato veličina je vyjádřena komplexním číslem, v kterém je obsažena informace o závislosti dvou veličin, kapacitance a rezistence. Značí se písmenem  $Z$ , jednotkou je  $1 \Omega$  [ohm]. Impedanci lze zapsat v kartézském tvaru následujícími rovnicemi:

$$|Z| = Re + Im \quad (2)$$

$$Re = |Z| + \cos\phi \quad (3)$$

$$Im = |Z| + \sin\phi \quad (4)$$

$$|Z| = \sqrt{Re^2 + Im^2} \quad (5)$$

kde  $Z$  odpovídá celkové impedanci,  $Im$  značí imaginární složku impedance a  $Re$  reálnou složku impedance, úhel  $\phi$  (fázový úhel), který svírá impedance  $Z$  s reálnou osou ( $Re$ ). [19] [20]

U impedimetrických biosenzorů lze zachytit změny v impedanci ( $Z$ ) na základě biochemické reakce/interakce. Impedimetrické biosenzory jsou konstruované většinou jako tříelektrodové s biorekogniční složkou imobilizovanou na pracovní elektrodě. Na elektrody je přivedeno střídavé napětí s malou amplitudou. Nevyžadují referenční elektrodu, mohou se využít např. dvě pracovní elektrody. Mezi výhody patří dobrá slučitelnost s počítačovým rozhraním a elektrickými obvody, naopak nevýhodou oproti amperometrickým či potenciometrickým biosenzorům je nízká citlivost. Využívají se např. ke sledování růstu mikroorganismů či stanovení močoviny pomocí enzymu ureázy. [3] [9] [11] [13] [17]

### 2.2.1.2. Elektrochemická impedanční spektroskopie

Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS) je metoda, kdy se na pracovní elektrodu vkládá konstantní potenciál se střídavým napětím o určité amplitudě. Amplituda je převážně volena v rozsahu 5–10 mV a měřena je střídavá složka proudové odezvy. Metoda umožňuje při měření měnit frekvenci v čase. Měření probíhá od vyšších frekvencí po nižší, jelikož systémy jsou stabilně omezeny. Nižší frekvence se měří podstatně pomaleji. Při měření jsou použity frekvence, které se zpravidla pohybují od 0,1 mHz do 1 MHz. Využívá se tříelektrodevého zapojení. Volené frekvence se mohou vkládat dvěma způsoby. Vložení je buď postupné (single-sine technika) nebo skládáním více frekvencí (multi-sine technika, např. 6 nebo 10). Mezi nevýhody techniky multi-sine je poněkud nižší kvalita naměřených dat, ale zato je rychlá. Single-sine technika poskytuje vyšší kvalitu naměřených dat, ale není dostatečně rychlá. Abychom mohli jednotlivé frekvence separovat, je nutno využít Fourierovy transformace, která dokáže díky své rychlosti změřit i méně stabilní systémy. EIS v obou případech používá hlavně ke kvalitativnímu popisu elektrochemického chování systému. Může být kombinována i s jinými technikami. Mezi výhody lze uvést poskytování komplexního popisu elektrochemického chování daného zkoumaného systému, např. informace o kinetice či mechanismu elektrodevého děje. Pokud dojde k odchýlení potenciálu zkoumaného systému, neprojeví se to ve změně charakteristiky dějů probíhajícího na elektrodevému systému. Výsledek měření současně popisuje jak faradaické, tak i nefaradaické děje, proto je možné z EIS získat informace o mechanismu probíhajícího elektrochemického procesu. [18] [19]

#### Přeměny elektrochemického systému

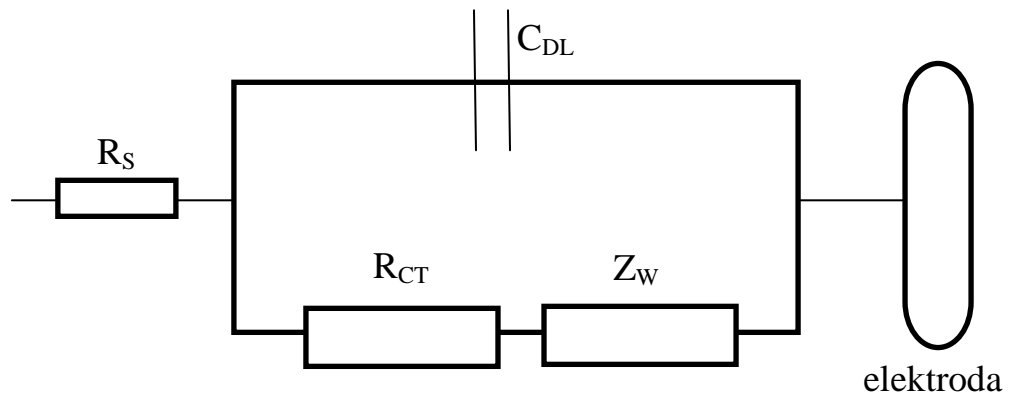
Metoda EIS je užitečnou metodou zkoumající chování daných systémů (biosenzorů, elektrod). Výsledkem chování těchto systémů jsou informace o elektrochemickém procesu. Výstupní hodnotou je celková impedance systému, která je vyjádřena jako součet reálné složky (Re) a imaginární složky (Im). Zajímavé děje lze pozorovat v elektrochemickém systému na rozhraní elektroda-elektrolyt. Tyto děje mohou být popsány náhradním obvodem, tzv. Randles obvodem. Rozhraní mezi dvěma systémy lze chápat jako kapacitor, který je nutno doplnit odporem, aby systémem mohl procházet proud. Randles obvod zahrnuje odpor roztoku  $R_s$ , Warburgovu impedanci  $Z_W$  (ta popisuje difúzi iontů elektrolytu k elektrodevému rozhraní, závisí na koncentraci roztoku), kapacitu dvouvrstvy  $C_{DL}$  a odporu přenosu náboje  $R_{CT}$ .



Kapacitu dvouvrstvy lze popsat rovnicí (rov. 6): [19] [20]

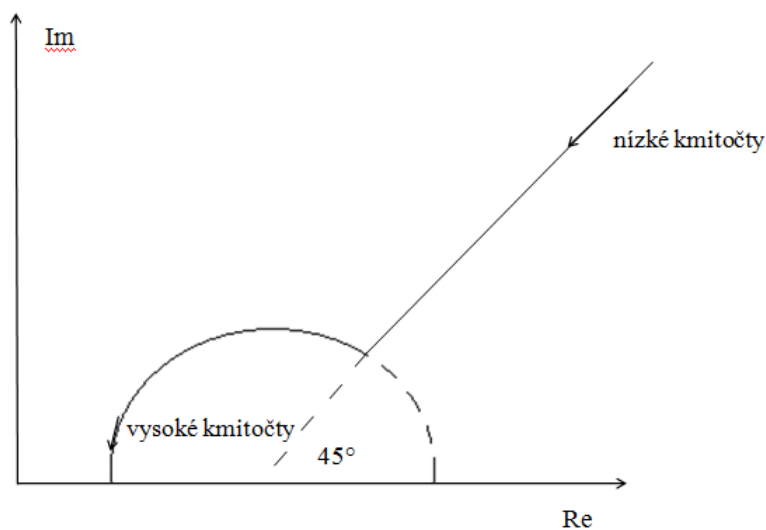
$$-Z_{im} = \frac{1}{C_{DL}} \quad (6)$$

kde  $Z_{im}$  odpovídá imaginární složce impedance,  $C_{DL}$  značí kapacitu dvouvrstvy. Z rovnice lze vyvodit, že při nižší kapacitě dvouvrstvy dochází k poklesu imaginární složky impedance.



Obrázek 3 - Schéma impedance

Charakteristickým vyjádřením impedančního spektra je tzv. Nyquist diagram (Obrázek 4). Tento diagram lze rozdělit na část skládající se z půlkružnice a část tvořící přímku. Půlkružnice je dána odporem přenosu náboje přes dvouvrstvy a lze ji sledovat při vysokých frekvencích. Přímková část definuje děje řízené difúzí a je charakteristická pro nízké frekvence. Každý bod Nyquistova diagramu je impedance na jedné frekvenci. Nyquist diagram může být reprezentován jako vektor o délce  $|Z|$ . Úhel mezi tímto vektorem a osou x je nazýván fázovým úhlem. [19] [20]



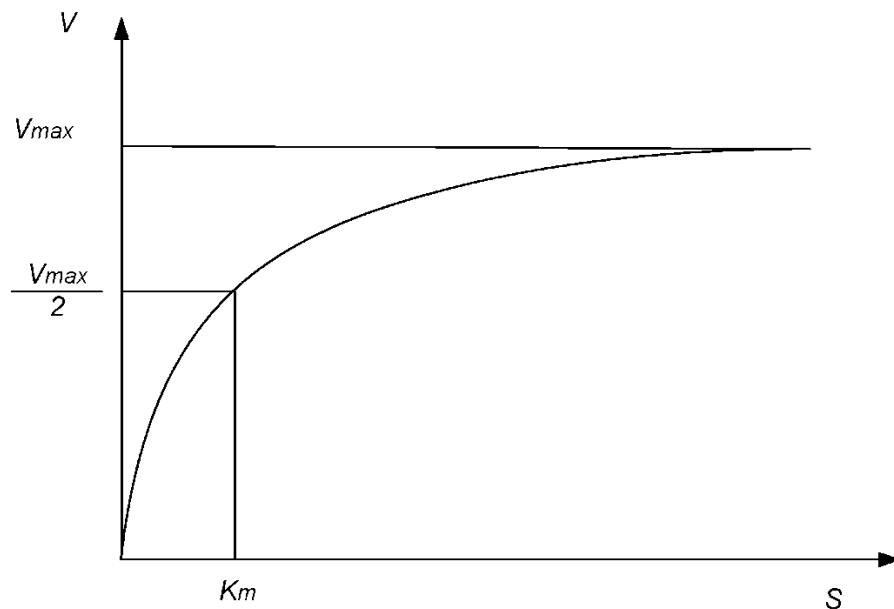
Obrázek 4 - Nyquist diagram

### 2.2.2. Enzymové biosenzory

Tyto biosenzory patří mezi biokatalycké využívající enzym jako biorekogniční složku. Enzym (E) dokáže katalyticky přeměnit substrát (S) na produkt (P) (rov. 7).



Mezi velké výhody můžeme řadit jednoduchost a s ní spojenou dobrou definovatelnost odpovědi. Enzymaticky katalyzované reakce jsou rychlé, obvykle velice selektivní a nejčastěji se řídí kinetikou podle Michaelis-Mentenové. Z ní vyplývá, že při dostatečném množství enzymu je rychlost reakce v určitém rozsahu přímo úměrná koncentraci analytu (Obrázek 5). Je možné tedy vytvořit kalibrační křivky a stanovit kvantitativně obsah analytu. [7] [11]



Obrázek 5 -Kinetika podle Michaelis-Mentenové

Rychlost reakce lze vyjádřit vztahem (rov. 8):

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

kde  $v$  značí rychlost vzniku produktu,  $V_{\max}$  je maximální rychlost, při které dochází k saturaci enzymu substrátem,  $K_M$  odpovídá Michaelisově konstantě, tedy koncentraci substrátu, při níž reakce probíhá právě poloviční rychlostí ( $\frac{V_{\max}}{2}$ ). [11]

Pokud dojde k imobilizaci enzymů v biosenzorech, změní se Michaelisova konstanta.

Enzymové biosenzory využívají buď jeden enzym anebo vyžadují k imobilizaci více enzymů, které katalyzují např. recyklační procesy či následné reakce. [7] [11] [16]

### 2.2.3. Imobilizace enzymu na povrch elektrod

Imobilizační technika umožňuje upevnit biologický materiál k ostatním částem senzoru, především tvořit pevnou vazbu s převodníkovou částí. Pokud sestavujeme funkční biosenzor, je důležité bezchybně zvládnout imobilizační proces biorekogniční složky. Imobilizace má vliv na funkci biosenzoru, převážně na reprodukovatelnost, stabilitu, citlivost a rychlost odezvy. Užití vhodné imobilizační metody závisí jak na bioelementu, tak na charakteru detekčního zařízení. [11]

Imobilizovat enzym lze různými metodami. Jednou z nich je kovalentní imobilizace, dále pomocí silanizace nebo SAM metody (spontánní vznik monovrstvy). Dále je možno využít nekovalentní imobilizace pomocí pouhé fyzikální adsorpce, zachycením enzymu v polymeru či gelu nebo tzv. cross-linkem pomocí bifunkčních činidel. [3] [10] [11]

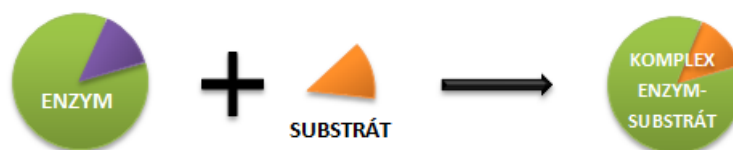
## 2.3. Enzymy

Enzymy jsou makromolekulární látky bílkovinné povahy. Jsou nedílnou součástí lidského těla a účastní se řady biochemických reakcí. Jsou označovány jako biokatalyzátory, látky snižující aktivační energii reakcí. Chemické reakce buď urychlují, nebo naopak zpomalují. V buňkách se nachází více jak 3000 enzymů, které jsou charakterizovány specifickou strukturou umožňující průběh reakcí. Ke svému účinku požadují především neutrální prostředí a optimální teplotu okolo 37°C. Hlavní funkcí enzymů v organismu je účast při trávení. Štěpí a rozkládají určité molekuly

(tuky, cukry, bílkoviny) na základní elementy. Tyto elementy využívají organismy jako zdroj energie, která je nezbytná pro růst organismu. [1] [2]

### 2.3.1. Enzymová reakce

Přeměněnám v různých enzymových reakcích podléhají látky, které se jmenují substráty (S). Tyto substráty se váží na enzymy (E) a navázáním vzniká tzv. komplex enzym-substrát. Substrát se váže na povrch enzymu, do místa zvaného aktivní centrum, kde probíhá samotná biochemická reakce. Aktivní centrum je tvořeno aminokyselinovými zbytky, které mají schopnost vázat reaktivní části molekuly substrátu. Po dokončení reakce je výsledná látka (produkt - P) uvolněna z aktivního místa. Snížení aktivační energie závisí také na neproteinové složce, která je nazývána jako kofaktor. Kofaktory jsou z velké části deriváty vitamínů. Můžeme je rozdělit do dvou skupin dle navázání. První skupinou jsou kofaktory vázané na strukturu enzymů pevně - prostetické skupiny (např.  $Mn^{2+}$ ), druhou tvoří kofaktory vázané volněji – koenzymy (např.  $NAD^+$ ). [4]



Obrázek 6 - Vznik komplexu enzym-substrát  
(Převzato z [www.e-chembook.eu](http://www.e-chembook.eu))



Obrázek 7 – Uvolnění produktu z komplexu enzym-substrát  
(Převzato z [www.e-chembook.eu](http://www.e-chembook.eu))

### 2.3.2. Rozdělení enzymů

Pojmenování a zařazení enzymů vychází z reakce, kterou katalyzují a z názvu substrátu. Názvosloví může být vědecké (systémové) a doporučené (pracovní). Každý enzym má

tak své jedinečné pojmenování. Enzymy se dělí do šesti tříd podle typu katalyzované reakce. [4]

1. Oxidoreduktázy - katalyzují oxidačně redukční reakce, např. laktátdehydrogenáza, glukóza oxidáza
2. Transferázy - skupina enzymů přenášející atomy z jednoho substrátu na druhý, např. alaninaminotransferáza
3. Hydrolázy - katalyzují hydrolytické štěpení substrátů, např. ureáza
4. Lyázy - enzymy katalyzující nehydrolytické odštěpení malé skupiny ze substrátu za tvorby vazby C-C, C-O, C-N, např. dekarboxylázy
5. Izomerázy - katalyzují intramolekulární přesuny vazeb v substrátu, např. epimerázy
6. Ligázy - katalyzují vznik vazby mezi dvěma substráty za hydrolýzy ATP

### 2.3.3. Oxidoreduktázy

Oxidoreduktázy jsou enzymy, které katalyzují oxidačně redukční reakce a platí u nich (rov. 9):



kde A značí oxidační činidlo a B je redukční činidlo. V živých systémech se oxidace látek uskutečňuje prostřednictvím odštěpení vodíku (dehydrogenací substrátu). Oxidoreduktázy jsou skupinou zahrnující dehydrogenázy a oxidázy. Mezi dehydrogenázy řadíme např. laktátdehydrogenázu, alkoholdehydrogenázu, glutamátdehydrogenázu. Oxidázám náleží např. kataláza nebo glukóza oxidáza. [4]

### 2.3.4. Oxidázy

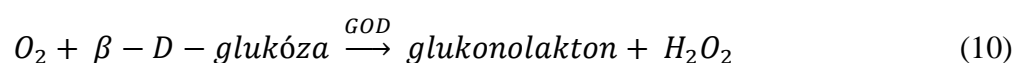
Biosenzorové systémy, které jsou založeny na oxidázách využívajících kyslík, který slouží jako akceptor elektronů za tvorby peroxidu vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nebo vody (H<sub>2</sub>O). [8]

Enzymové reakce mohou být sledovány amperometricky, tedy měřením spotřeby kyslíku (O<sub>2</sub>) nebo produkcí peroxidu vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) při pracovních potenciálech -650 mV (kyslík) a +650 mV (peroxid vodíku). [7] [8]

Jak již bylo zmíněno, jednou z oxidáz je glukóza oxidáza (GOD). Využívá se pro stanovení glukózy v klinické biochemii. Její kofaktor je flavinadeninukleotid, označován jako FAD. [4] [6]

#### 2.3.4.1. Charakteristika glukóza oxidázy

Objev glukóza oxidázy (GOD) je znám od roku 1928. GOD se objevila poprvé v plísních *Aspergillus niger* a *Penicillium glaucum*. Bylo zjištěno, že v plísních katalyzuje oxidaci glukózy za vzniku glukonolaktonu a peroxidu vodíku (rov. 5). [6]



GOD se skládá ze dvou polypeptidových řetězců, které jsou navzájem spojeny disulfidickými můstky. Na polypeptidické řetězce je vázán FAD. Molekulová hmotnost glukózy oxidázy je 186 000 g/mol a až 16% molekuly tvoří sacharidová složka. Z vlastností GOD je známa vysoká substrátová specifita vzhledem k  $\beta$ -D-formě glukózy. [6] [16]

### 3. Cíl práce

1. Provedení literární rešerše na zvolené téma (enzymy, enzymová kinetika, enzymové biosenzory, impedanční měření kinetické reakce).
2. Seznámení se s problematikou enzymových biosenzorů a porozumění impedančním technikám z teoretického a praktického hlediska (impedanční spektroskopie, měření při fixní frekvenci, Faradaická a non-Faradaická impedance).
3. Testování funkčnosti a kalibrace připraveného biosenzoru – měření kinetiky enzymové reakce s použitím modelové interakce mezi glukóza oxidázou a glukózou. Bude provedena impedanční spektroskopie, z níž bude vyhodnocena frekvence. Při této frekvenci bude sledována změna impedančních parametrů během enzymové reakce v reálném čase.
4. Vyhodnocení naměřených výsledků

## 4. Experimentální část

V této bakalářské práci jsem se seznámila a přiblížila si problematiku měření kinetiky enzymové reakce pomocí impedanční spektroskopie. Prakticky jsem si vyzkoušela laboratorní praxi, která je nezbytná pro zvládnutí praktické části měření. Seznámila jsem se s měřicí aparaturou a programem pro měření vytvořeným Ing. Zdeňkem Pytlíčkem.

### 4.1. Použité chemikálie

- fosfátový pufr (50mM, pH 7,4)
- 10mM glukóza (Sigma)
- glukóza oxidáza, 191 U/mg, (Sigma)

### 4.2. Použité přístroje

- tříelektrodivý senzor s imobilizovanou GOD (poskytnutý Ing. Milanem Jílkem)
- impedanční analyzátor Agilent 4980A, program na sběr dat vytvořený Ing. Zdeňkem Pytlíčkem
- průtočná cela (poskytnutá Ing. Jílkem)

### 4.3. Měřicí aparatura

Pro samotné měření bylo nutno sestavit vhodnou měřicí aparaturu, kde by bylo možné testovat enzymový biosenzor (Obrázek 9). Součástí byla průtočná cela, do které byl vložen biosenzor (Obrázek 10, Obrázek 11). Cela byla umístěna ve Faradayově kleci kvůli potlačení okolního rušení. Z průtočné cely byly vedeny dvě hadičky, z nichž jedna byla přívodem dané látky (pufru/glukózy) na biosenzor a druhá vývodem. Z impedančního analyzátoru Agilent 4980A (Obrázek 8) bylo na pracovní elektrodu s imobilizovanou GOD vkládáno napětí o amplitudě 10 mV, proud procházející systémem odpovídal hodnotě 1 $\mu$ A. Systém umožňoval měřit v rozmezí frekvencí od 20 Hz – 2 MHz. Data z měření byla sbírána pomocí vytvořeného programu a zobrazena na počítači.





Obrázek 8 - Impedanční analyzátor Aligent 4980A



Obrázek 9 - Měřící aparatura s průtočnou celou umístěná ve Faradayově kleci



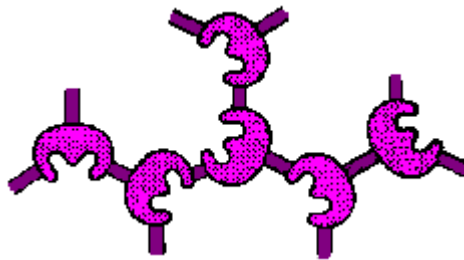
Obrázek 10 - Průtočná cela



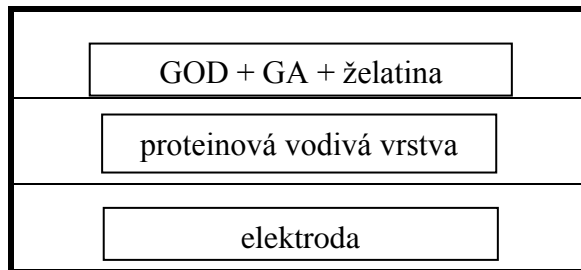
Obrázek 11 - Třielektrokový senzor s imobilizovanou GOD

#### 4.4. Imobilizace GOD a albuminu

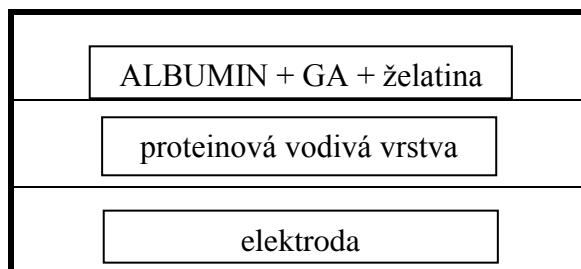
Pro správnou funkčnost biosenzoru je nezbytné zvládnout imobilizační proces. Pro účely měření byly dodány dva komerčně vyrobené biosenzory od firmy RNDr. Dagmar Jílková, s. r. o.. Biosenzor je tvořený ze dvou pracovních elektrod a jednou elektrodou referenční. Na první pracovní elektrodu byl imobilizován enzym GOD (Obrázek 13), na druhou pak albumin (Obrázek 14). Samotný imobilizační proces byl proveden za pomoci glutaraldehydu v želatině metodou cross-link, neboli zesítním (Obrázek 12). Zesítnění je ireverzibilní proces, který využívá nejčastěji glutaraldehyd jako síťovací činidlo díky jeho dostupnosti a finanční nenáročnosti.



Obrázek 12 - Ukázka metody zesítnění biomolekul  
(Převzato z [www.rpi.edu](http://www.rpi.edu))



Obrázek 13 - Schéma jednotlivých vrstev pracovní elektrody s imobilizovanou GOD



Obrázek 14 - Schéma jednotlivých vrstev pracovní elektrody s imobilizovaným albuminem

## **4.5. Impedanční spektra glukózy**

Tato experimentální část je zaměřena na testování odezvy biosenzoru na glukózu v širokém rozsahu frekvencí. Cílem bylo zjistit optimální frekvence pro měření kalibrační křivky glukózy ve fixní frekvenci. Pro měření impedančních spekter byl biosenzor umístěn v průtočné cele, která byla součástí Faradayovy klece. K biosenzoru byl pomocí konektorů připojen impedanční analyzátor Agilent 4980A, který generoval napětí o amplitudě 10 mV. Impedanční spektra biosenzoru byly měřeny pro 0,5 mM koncentraci glukózy. Impedanční spektra byly měřeny i pro jiné koncentrace glukózy (1 mM, 2 mM) avšak nebylo dosaženo výrazných změn oproti 0,5 mM glukózy.

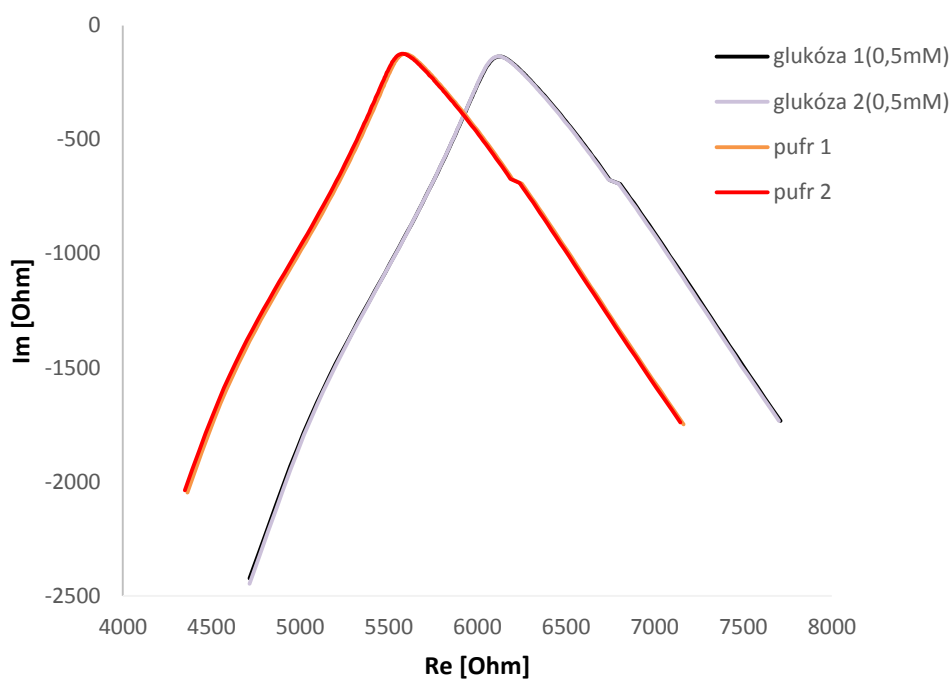
## **4.6. Kalibrační závislost glukózy při fixní frekvenci**

Na základě impedanční spektroskopie jsme zjistili, že ke změnám impedance dochází v celém spektru frekvencí od 20 Hz do 2 MHz. Z měřeného spektra byly vybrány dvě fixní frekvence, ze kterých byly sestrojeny kalibrační závislosti glukózy. Zaměřili jsme se na nízkofrekvenční a vysokofrekvenční složku. Jako nízkofrekvenční složka byla zvolena frekvence 100 Hz a vysokofrekvenční 2 MHz. Dodatečně byly měřeny také jiné frekvence (20 Hz, 250 Hz, 1000 Hz, 2500 Hz, 10000 Hz, 50000 Hz, 150000 Hz, 500000 Hz), u kterých ovšem nedocházelo k výraznějším změnám oproti zvoleným frekvencím. Pro zvolené fixní frekvence byly sestrojeny kalibrační závislosti pro šest vzrůstajících koncentrací glukózy (0,01 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM; 10 mM). Frekvence byly generovány v různých časových intervalech. Při měření s koncentrovanějším roztokem docházelo k většímu poklesu impedance, než u roztoků méně koncentrovaných. Hodnoty celkové impedance pro jednotlivé koncentrace byly vypočteny z rozdílů hodnot pufru a glukózy. Rozdíly byly dále zprůměrovány a výsledkem byly hodnoty odpovídající  $|Z|$ ,  $|\text{Re}|$ ,  $|\text{Im}|$ .

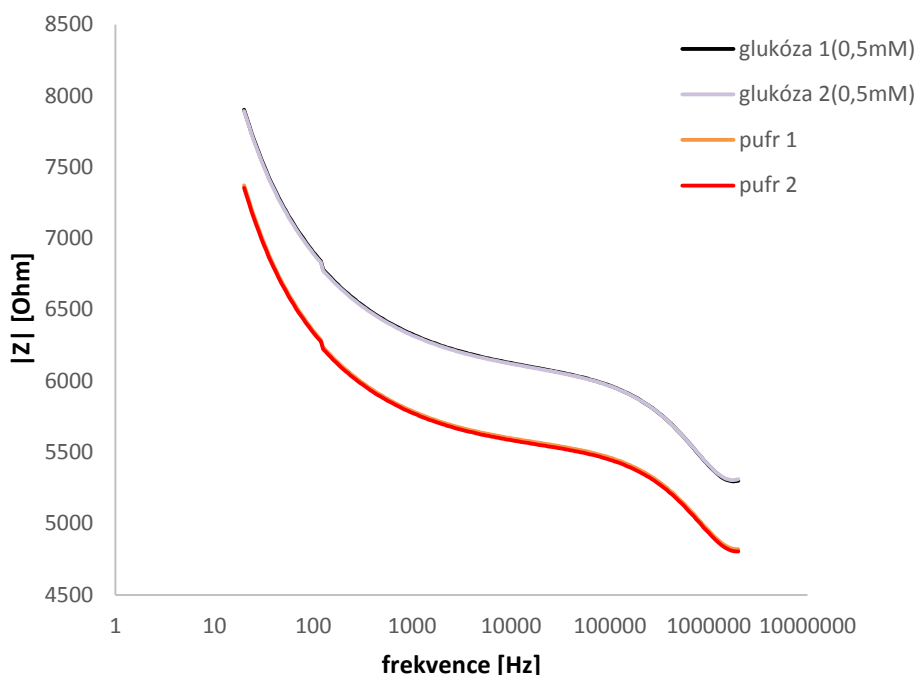
## 5. Výsledky a diskuze

### 5.1. Impedanční spektra a kalibrační křivka pro glukózy

V naměřených impedančních spektrech lze zaznamenat změny jak v reálné, tak imaginární složce (Obrázek 15). V závislosti na měřené frekvenci lze pozorovat také změnu impedance, kdy se zvyšující se frekvencí dochází k poklesu celkové impedance (Obrázek 16).



Obrázek 15 – Graf závislosti rezistence a kapacitance na koncentraci 0,5 mM glukózy a pufru



Obrázek 16 - Závislost celkové impedance  $|Z|$  na frekvenci pro 0,5 mM glukózu a pufr

Na Obr. 16 (Obrázek 16) můžeme vidět závislost frekvence na celkové impedanci  $|Z|$  pro pufr a 0,5 mM koncentraci glukózy. Můžeme vidět, že celková impedance se s rostoucí frekvencí snižuje, což odpovídá předpokladům.

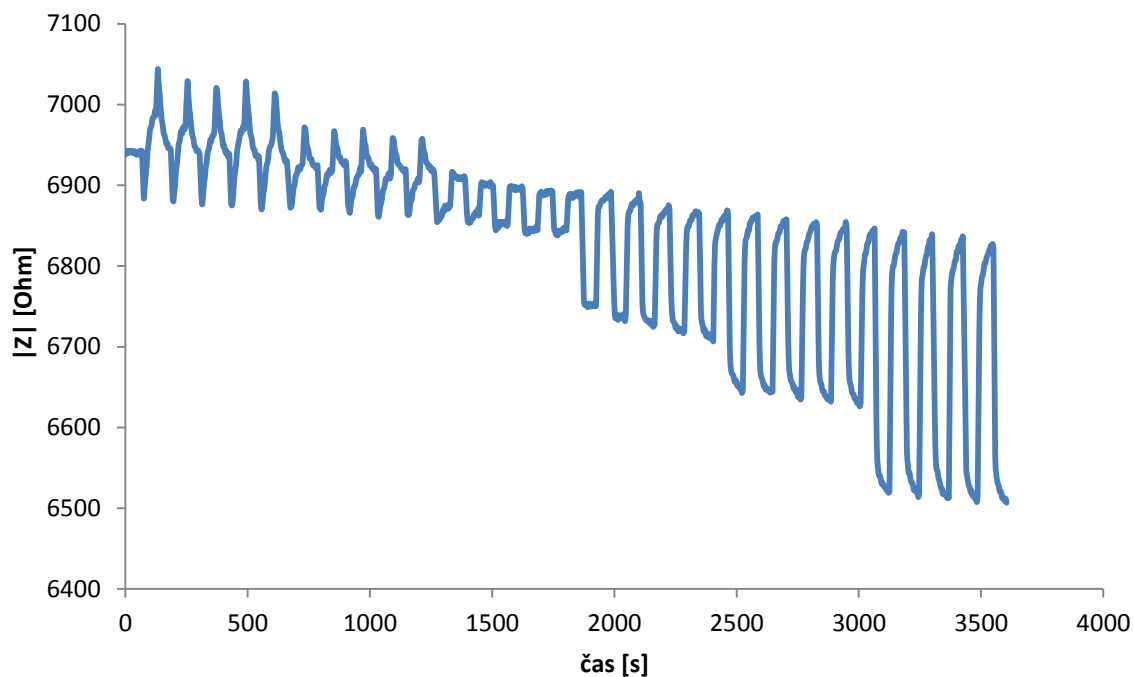
Z výsledků impedanční spektroskopie a zvolených fixních frekvencí byly sestrojeny kalibrační závislosti glukózy. Tyto závislosti jsou zaznamenány v grafech separovaně pro frekvenci 100 Hz a 2 MHz. Pro srovnání byla měřena odezva biosenzoru také pro protein albumin. Vrstva albuminu není sice enzymaticky aktivní, zato odezva GOD byla u frekvence 100 Hz srovnatelná s odezvou albuminu při průtoku glukózy.

Bylo provedeno několik měření odezvy biosenzoru na glukózu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při hodinovém měření, které probíhalo v průtoku. Průtočnou celou se nejprve nechal protékat pufr a následně byl střídán glukózou. Střídání probíhalo po minutě. Během hodinového měření protéklo systémem všech šest různých koncentrací glukózy. Rychlost průtoku byla nastavena na hodnotu 3 ml/min. Pro otestování i jiných rychlostí se tento průtok snížil o 1/3, avšak snížením rychlosti průtoku nebyly výsledky adekvátní. Bylo zkoumáno, jak se liší impedance v závislosti na koncentraci glukózy a frekvenci. Záznam z daného měření pro GOD můžete vidět na Obr. 17 (Obrázek 17) pro frekvenci 100 Hz a Obr. 21 (Obrázek 21) pro frekvenci 2 MHz.

U těchto dvou frekvencí lze zaznamenat rozdíly zejména v imaginární části impedance. U frekvence 2 MHz jsou hodnoty imaginární složky pro všechny koncentrace podstatně vyšší. Vyšší hodnoty mohou být následkem změn fázových úhlů, díky kterým se systém chová více kapacitativně.

Ve srovnání s impedanční studií S. Shikrshnan [7] můžeme konstatovat, že jsme dosáhli obdobných výsledků. Změny impedance byly zaznamenány v celém spektru frekvencí. Na základě našich výsledků lze říci, že se zvyšující koncentrací glukózy docházelo k poklesu imaginární složky impedance. Pokles v imaginární složce impedance během enzymatické reakce se sledoval v reálném čase při fixních frekvencích.

Z hlediska chování biosenzoru během enzymatické reakce lze předpokládat, že s rostoucí koncentrací glukózy docházelo k poklesu odporu  $R$  systému a také k poklesu imaginární složky impedance. Tyto změny mohly nastat v důsledku enzymatické reakce a tvorby nabitých částic, popř. možné detekce změny konformace proteinu či vytváření komplexu E-S.



Obrázek 17 - Graf závislosti celkové impedance  $Z$  v čase 1h pro frekvenci 100 Hz

Graf na Obr. 17 (Obrázek 17) je záznamem hodinového měření odezvy biosenzoru na přítomnost glukózy v různých koncentracích ve frekvenci 100 Hz. Z grafu je zřejmé, že dochází k poklesu impedance ve všech koncentracích glukózy.



Nadcházející část zahrnuje tabulky průměrných hodnot celkové impedance, reálné a imaginární složky v závislosti na koncentraci glukózy z jednotlivých detekcí (Tabulka 1, Tabulka 2). Hodnoty zahrnují také směrodatné odchylky a jsou spočítány pro enzym i albumin ve fixní frekvenci 100 Hz. Z naměřených hodnot pro frekvenci 100 Hz je zřejmé, že hodnoty impedance pro enzym a albumin se zvlášť neliší, tudíž odezva při průtoku glukózy byla srovnatelná. Z vypočítaných hodnot byly sestrojeny kalibrační křivky glukózy.

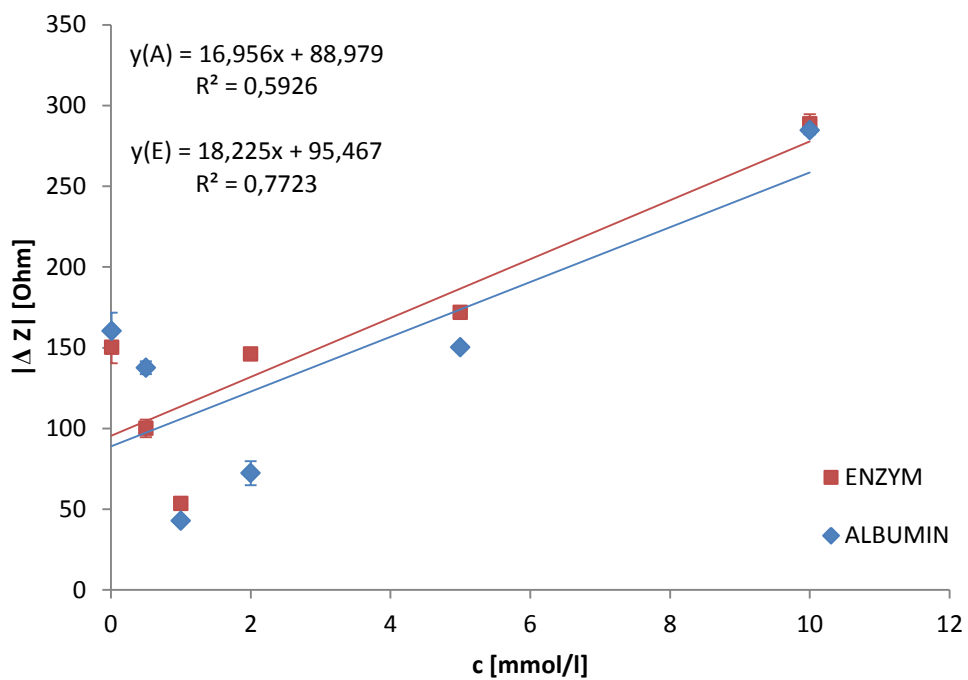
Tabulka 1- Průměrné hodnoty impedance a směrodatné odchylky pro enzym GOD  
a  $f=100$  Hz

c [mmol/l]	Z  [Ohm]	Re  [Ohm]	Im  [Ohm]
<b>0,01</b>	150,30±9,83	150,46±10,9	5,18±4,57
<b>0,5</b>	100,09±5,46	100,04±5,62	5,17±1,72
<b>1</b>	53,49±3,81	53,39±3,87	3,60±3,65
<b>2</b>	145,98±3,35	145,66±3,43	10,27±2,53
<b>5</b>	171,79±2,55	171,90±2,30	6,95±5,95
<b>10</b>	288,49±6,12	288,70±5,87	11,58±4,54

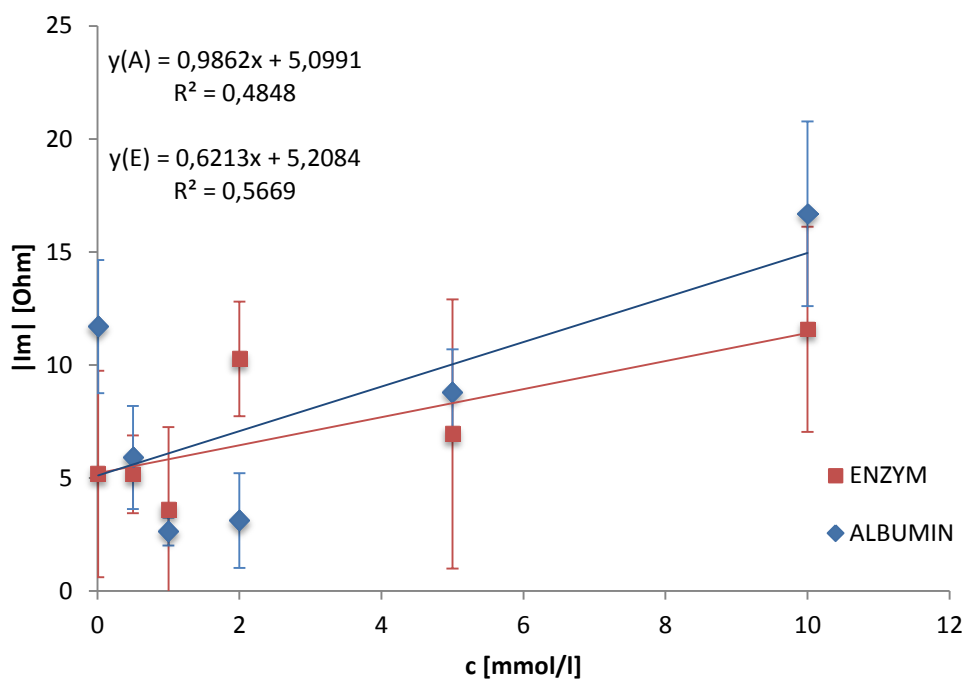
Tabulka 2 - Průměrné hodnoty impedance a směrodatné odchylky pro albumin  
a  $f=100$  Hz

c [mmol/l]	Z  [Ohm]	Re  [Ohm]	Im  [Ohm]
<b>0,01</b>	160,23±11,42	159,87±11,76	11,70±2,95
<b>0,5</b>	137,59±4,00	137,70±3,92	5,91±2,28
<b>1</b>	42,71±1,41	42,67±1,38	2,63±0,62
<b>2</b>	72,30±7,34	72,36±7,50	3,12±2,09
<b>5</b>	150,23±0,95	150,12±0,96	8,80±1,90
<b>10</b>	284,66±2,45	284,46±2,28	16,69±4,09

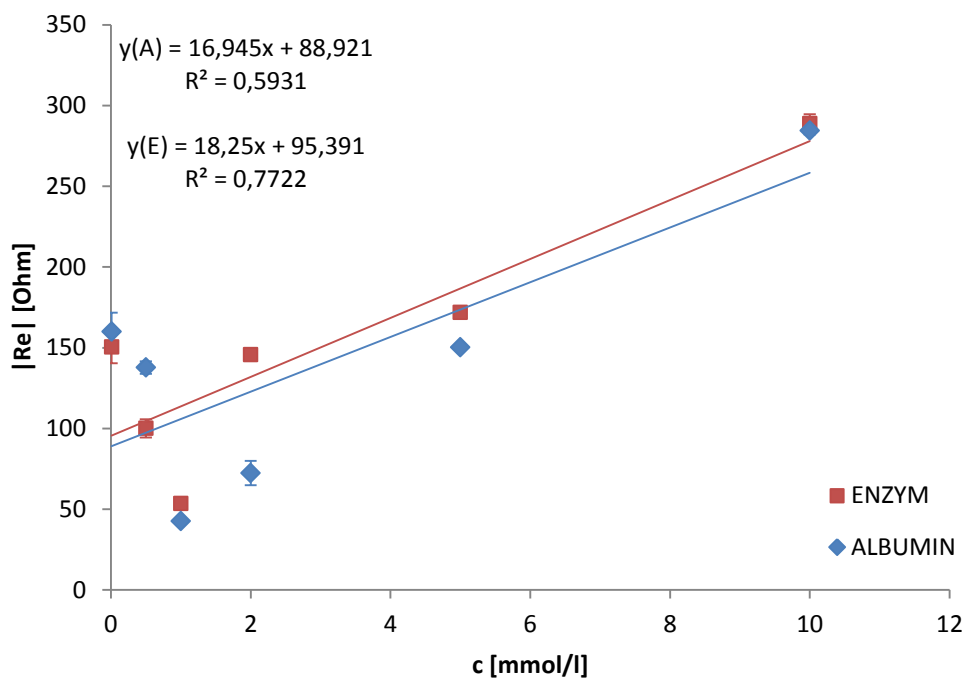
Na základě impedančních měření jsou v níže uvedených grafech vykresleny kalibrační závislosti glukózy pro enzym a albumin ve frekvenci 100 Hz. Z grafu na Obr. 18 (Obrázek 18) je patrné, že rozdíl změny impedance  $|\Delta Z|$  se zvyšující se koncentrací glukózy narůstá. Změny jsou také zaznamenány jak v imaginární (Obrázek 19), tak reálné části impedance (Obrázek 20). Nárůst změny impedance může být vysvětlen enzymovou reakcí, kdy dochází k přeměně substrátu (glukózy) na produkt.



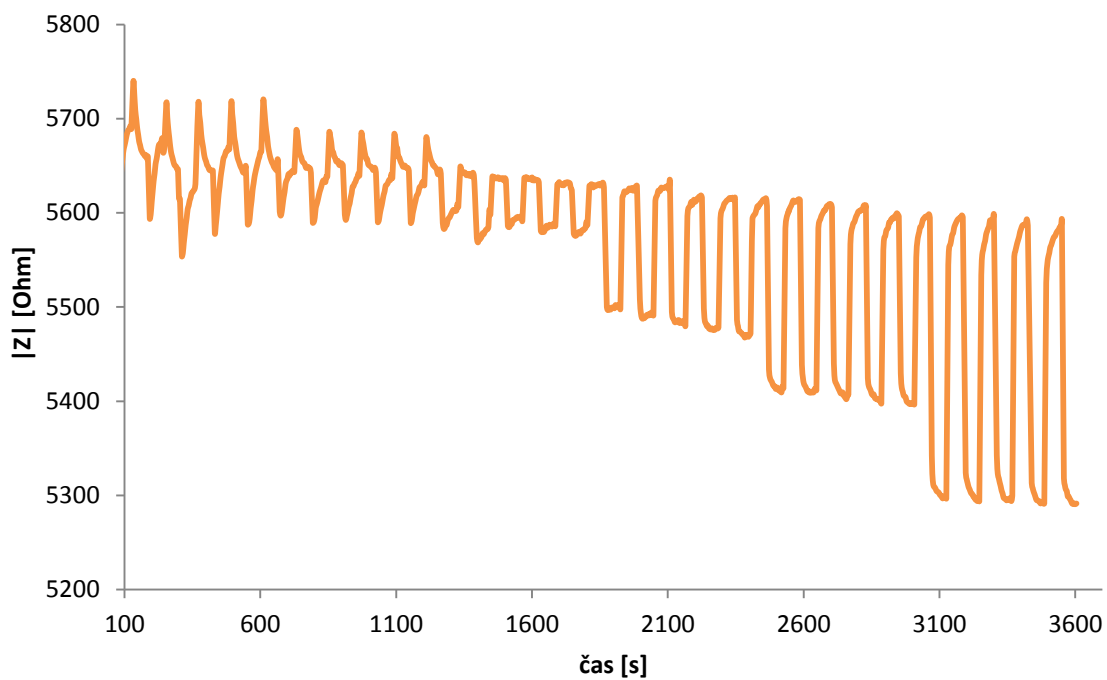
Obrázek 18 - Graf závislosti impedance na koncentraci pro enzym a albumin (f=100 Hz)



Obrázek 19 - Graf závislosti kapacitance na koncentraci pro enzym a albumin (f=100 Hz)



Obrázek 20 - Graf závislosti rezistance na koncentraci pro enzym a albumin ( $f=100$  Hz)



Obrázek 21 - Závislost celkové impedance  $Z$  v čase 1h pro frekvenci 2 MHz

Graf na Obr. 21 (Obrázek 21) je záznamem hodinového měření odezvy biosenzoru na přítomnost glukózy v různých koncentracích ve druhé fixní frekvenci 2 MHz. Z grafu je zřejmé, že dochází k poklesu impedance ve všech koncentracích stejně jak při frekvenci 100 Hz.

Další část zahrnuje opět tabulky průměrných hodnot celkové impedance, reálné a imaginární složky v závislosti na koncentraci glukózy z jednotlivých detekcí (Tabulka 3, Tabulka 4.). Hodnoty zahrnují také směrodatné odchylky a jsou spočítány pro enzym i albumin ve fixní frekvenci 2 MHz. Pro frekvenci 2 MHz je značný rozdíl v hodnotách celkové impedance pro enzym a albumin oproti měření při frekvenci 100 Hz. Při tomto měření bylo dosaženo toho, že odezva při průtoku glukózy nebyla srovnatelná pro albumin i enzym. Lze tedy předpokládat, že při této frekvenci bylo měření citlivější.

Tabulka 4 nezahrnuje výsledky pro 1 mM koncentraci glukózy, jelikož odezva pro albumin v této koncentraci nebyla vyhodnotitelná. Ze zaznamenaných hodnot byly také sestaveny kalibrační křivky glukózy.

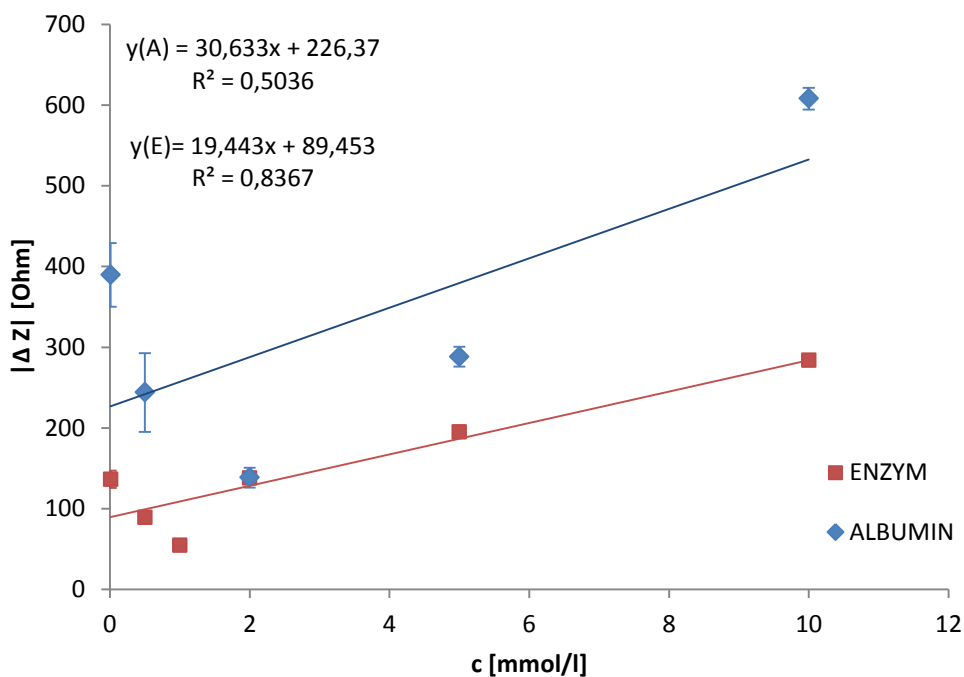
Tabulka 3 - Průměrné hodnoty impedance a směrodatné odchylky pro enzym GOD  
a f=2 MHz

c [mmol/l]	Z  [Ohm]	Re  [Ohm]	Im  [Ohm]
<b>0,01</b>	136,39±10,79	93,92±11,80	112,78±5,96
<b>0,5</b>	89,12±3,52	60,17±2,95	75,98±2,30
<b>1</b>	54,56±6,77	39,87±9,12	40,99±3,97
<b>2</b>	137,97±5,29	92,40±4,10	119,98±5,18
<b>5</b>	194,78±5,53	131,08±4,25	168,97±5,21
<b>10</b>	283,79±5,30	192,42±4,47	244,95±3,44

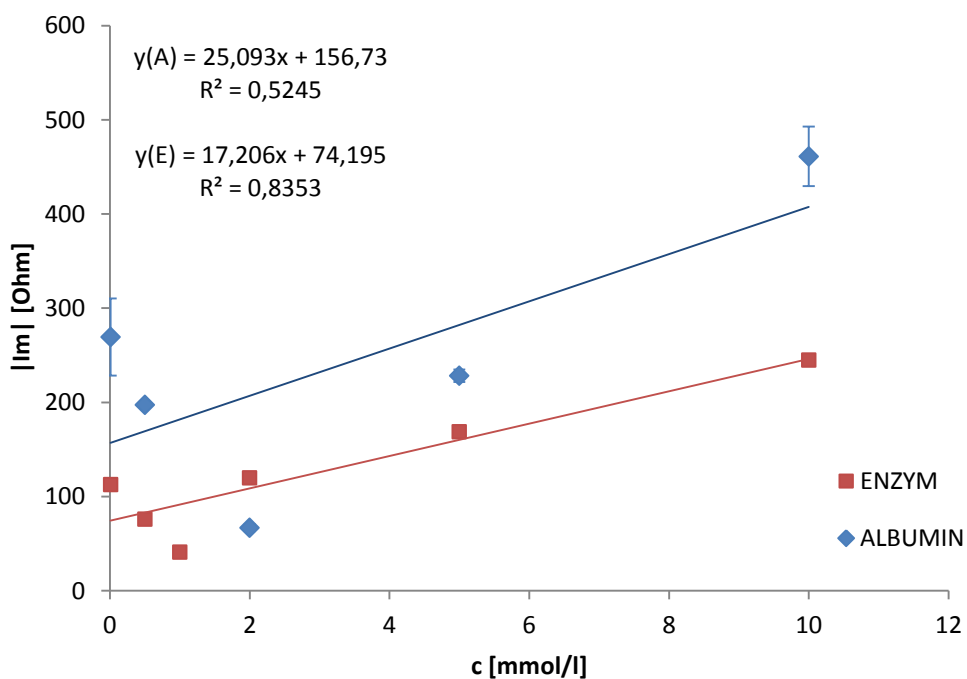
Tabulka 4 - Průměrné hodnoty impedance a směrodatné odchylky pro albumin  
a f=2 MHz

c [mmol/l]	Z  [Ohm]	Re  [Ohm]	Im  [Ohm]
<b>0,01</b>	389,70±39,37	310,70±26,76	269,38±40,81
<b>0,5</b>	243,93±48,90	179,08±35,06	197,33±5,28
<b>2</b>	138,48±12,34	121,76±12,30	66,97±3,77
<b>5</b>	288,23±12,34	215,75±12,25	228,23±6,75
<b>10</b>	607,92±13,48	465,65±4,18	461,12±31,56

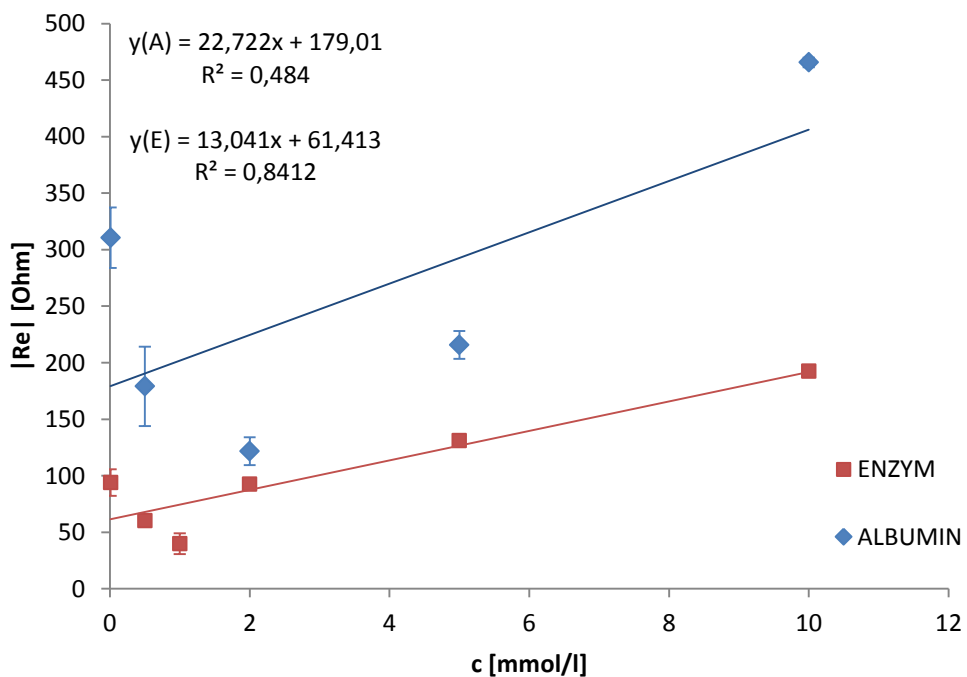
V níže uvedených grafech jsou vykresleny kalibrační závislosti glukózy pro enzym a albumin ve frekvenci 2 MHz. Ve všech uvedených kalibračních křivkách se rozdíl změny impedance  $|\Delta Z|$  se zvyšující se koncentrací glukózy narůstá. U albuminu jsou však rozdíly impedance zhruba dvojnásobné. Značný rozdíl impedance v kalibračních závislostech pro enzym a albumin lze vysvětlit citlivějším měřením a chováním vrstvy albuminu. Při vysokých frekvencích se neočekává srovnatelné odezvy jako u enzymu.



Obrázek 22 - Graf závislosti impedance na koncentraci pro enzym a albumin ( $f=2$  MHz)



Obrázek 23 - Graf závislosti kapacitance na koncentraci pro enzym a albumin ( $f=2$  MHz)



Obrázek 24 - Graf závislosti rezistance na koncentraci pro enzym a albumin ( $f=2$  MHz)

## 6. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo testování funkčnosti a kalibrace připraveného biosenzoru, měření kinetiky enzymové reakce s použitím interakce mezi glukóza oxidázou a glukózou.

V teoretické části jsem provedla literární rešerši na téma enzymy, enzymová kinetika, biosenzory a zaměřila jsem se na princip elektrochemické impedanční spektroskopie, který byl využit v experimentální části.

Pro zpracování této bakalářské práce bylo využito biosenzoru s imobilizovaným enzymem GOD a albuminem. Hlavní úkolem bylo provést impedanční měření na tomto biosenzoru a zkoumat jeho odezvu pro různé koncentrace glukózy. Impedančním měření bylo provedeno pro šest koncentrací glukózy ve fixních frekvencích 100 Hz a 2 MHz. Pro zvolené frekvence byla sledována změna impedančních parametrů během enzymové reakce v reálném čase. S postupně přibývajícím koncentrací glukózy docházelo ke zvyšování změn impedance. Je pravděpodobné, že linearita kalibrační závislosti by rostla i pro koncentrace vyšší než 10 mM glukóza. Pro bližší zkoumání enzymové kinetiky by bylo vhodné vyzkoušet měření také ve vyšších koncentracích, a tak stanovit jak horní, tak i dolní limit detekce biosenzoru. U nízkých koncentrací glukózy (do 1 mM) lze usoudit, že měření probíhalo mimo limit detekce, jelikož hodnoty impedančních parametrů nevykazovaly lineární závislost. Také by bylo vhodné zaměřit se na rychlost průtoku substrátu, optimalizovat ji a přispět tím k dosažení lepších výsledků impedančního měření. Aby bylo možné ověřit reprodukovatelnost měření enzymového biosenzoru, muselo by být provedeno stejné měření s jiným senzorem. Z důvodů časové náročnosti však nebyl prostor pro měření a porovnání naměřených hodnot.

Výsledky bakalářské práce z části přispěly ke zkoumání enzymové kinetiky a tuto práci je možné do budoucna rozšířit a získat tak nové poznatky v měření kinetiky enzymových reakcí.



## Seznam použité literatury

- [1] DASTYCH, a kol. *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2008, 232 s. ISBN 978-802-1045-729.
- [2] VODRÁŽKA, a kol. *Enzymologie*. 2. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1991, 245 s. ISBN 80-708-0124-7.
- [3] TRÖGL, J. Odbornecasopisy.cz [online]. Mikrobiologický ústav AV ČR (Praha) : 2006 [cit. 2014-11-27]. Biosenzory. Dostupné z: [http://www.odbornecasopisy.cz/index.php?id\\_document=31055](http://www.odbornecasopisy.cz/index.php?id_document=31055)
- [4] DOSTÁL, a kol. *Biochemie: pro posluchače bakalářských oborů*. Brno: Masarykova univerzita, 2009, 158 s. ISBN 978-80-210-5020-4.
- [5] CHROMÝ, V. *Analytické metody v klinické chemii*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 215 s. ISBN 80-210-2363-5.
- [6] HECHT, HJ, a kol. *Crystal structure of glucose oxidase from Aspergillus niger refined at 2.3 Å resolution* [online]. Journal of molecular biology, 1993 [cit. 2014-11-15]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8421298>
- [7] SHRIKRISHNAN, a kol. *Electrochemical Impedance Analysis of Adsorption and Enzyme Kinetics of Calf Intestine Alkaline Phosphatase on SAM-Modified Gold Electrode*. In: *The Journal of Physical Chemistry C* [online]. 2012-08-02, s. 16030-16037 [cit. 2014-12-05]. ISSN 1932-7447. DOI: 10.1021/jp3027463. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp3027463>
- [8] ZERAVIK, J. a kol. *State of the Art in the Field of Electronic and Bioelectronic Tongues â Towards the Analysis of Wines*. 2009. ISBN 10.1002/elan.200900285.
- [9] HUBÁLEK, J. a kol. *Chemosenzory a biosenzory*. Brno.

- [10] REKHA, K. a kol. Studies on the immobilisation of acetylcholine esterase enzyme for biosensor applications. FOOD AND AGRICULTURAL IMMUNOLOGY. Prosinec 2008, roč. 19, č. 4, s. 273-281. ISSN 0954-0105. DOI: 10.1080/09540100802380846.  
Dostupné z: <http://www.citeulike.org/article/3805141>
- [11] SKLÁDAL, P. *Biosenzory*. Brno (Česká republika) : [s.n.], 2002. 149 s
- [12] RECHNITZ G. A. *Electroanalysis* 3, 73 (1991)
- [13] HUSÁK, M. *Biosenzory* [online]. [cit. 2014-11-16]. Dostupné z: <http://www.micro.feld.cvut.cz/home/X34SES/prednasky/10%20Biosenzory.pdf>
- [14] KODÍČEK, M. a kol. *Biofyzikální chemie*. 2. přepr. a rozš. vyd. Praha: Academia, 2000, 337 s. ISBN 80-200-0791-1.
- [15] KOTAČKOVÁ, L. Glukóza. *Toplekar* [online]. [cit. 2014-12-05]. Dostupné z: <http://www.toplekar.cz/laboratorni-hodnoty/glukoza.html>
- [16] NOVÁK, J. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-675-3.
- [17] POHANKA M, SKLÁDAL P. Electrochemical biosensors – principles and applications, J. Appl. Biomed., 2008, roč. 6, č. 2, s. 57-64.
- [18] TATARKOVIČ, M. a kol. *Elektroimpedanční spektroskopie a její využití v chemické analýze* [online]. [cit. 2015-05-21]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012\\_11\\_1067-1074.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_11_1067-1074.pdf)
- [19] Gamry instruments. *Basics of Electrochemical Impedance Spectroscopy* [online]. [cit. 2015-05-21]. Dostupné z: <http://www.gamry.com/application-notes/basics-of-electrochemical-impedance-spectroscopy/>
- [20] Metroohm. *Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS)* [online]. [cit. 2015-05-21]. Dostupné z: [http://www.mep.net.au/wp-content/uploads/2014/01/TRL34\\_Autolab\\_Application\\_Note\\_EIS011.pdf](http://www.mep.net.au/wp-content/uploads/2014/01/TRL34_Autolab_Application_Note_EIS011.pdf)