

# Bioszenzorok

Készítette:  
Váradi Márton  
Ivanics Balázs

# Bevezetés

- A fermentációs folyamatok komplex rendszerek  
- hiába tudjuk „mit raktunk a tartályba”, a sejt egy összetett rendszer
- Egy tényező, vagy egy elem megváltozása is drasztikus következményekkel járhat
- „Végső cél” a biológiai folyamatok feltárása és a tényezők egymásra hatásának ismerete, fizikai – kémiai környezet megértése
  
- A fermentáció célja, amilyen megközelítésben mi is foglalkozunk vele legtöbbször – egy kitüntetett molekula termelése.

# Megfigyelés és szenzorok

## Általánosan megfigyelt tényezők:

- keverés
- hőmérséklet
- hab szint
- pH
- redoxpotenciál
- oldott oxigén és széndioxid
- optikai denzitás

## Újabban:

- Távozó gázanalízis
- Illékony anyagok gőztér-analízise

■ Ezek legtöbbje valójában közvetett információt szolgáltat a termék képződésről. Inkább a szükséges feltételek ellenőrzése az elérhető.

■ Mennyi van a termékből a tartályban?

■ Növekszik-e termék a mennyisége, vagy sem?

A fermentlé mátrixában in situ meghatározni egy komponens mennyiségét, igen nagy kihívás.

# Megfigyelés és vezérlés

- Szabályozást akkor lehet megvalósítani, ha van egy mért paraméter alapján visszacsatolás.
- A szabályozás megvalósításához:  
a mintavétel és az elemzés idejének – összemérhető időskálán kell lennie a biofolyamatunk idejével
- Ez az idő:
  - enzimes folyamatoknál – pár másodperc
  - bakteriális kultúráknál – pár perc
  - emlőssejteknél – 1-2 óra
- A késleltetési idő függ:
  - a mintavétel módjától
  - a mintakezeléstől (előkészítés)
  - az elemzés és az adatfeldolgozás idejétől

# Szenzorok illesztése a folyamathoz

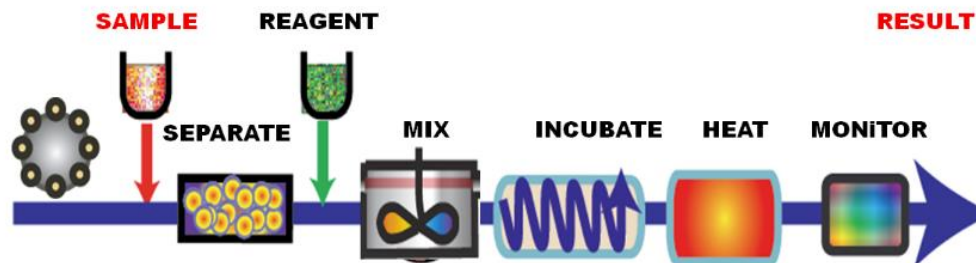
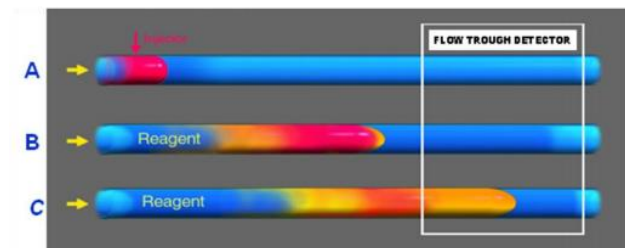
- Lehet in situ szonda, vagy offline (ez a cikk megközelítése)
- Az in situ szondák legnagyobb hátránya/kihívása a sterilizálhatóság  
- erre a javaslat: komplex mérnöki tervezés
- A legelterjedtebb offline rendszerek a tangenciális szűrők és a FIA
- Minden on-line monitorozó és irányító rendszernek tartalmaznia kell 3 elemet:
  - (1) szenzor
  - (2) a fermentlé és a szonda kapcsolatát megvalósító berendezés, ex situ és in situ is
  - (3) vezérlő rendszer, a szükséges algoritmussal

# FIA: Flow Injection Analysis

## Áramló oldatos elemzés

Egy folyamatosan áramló fluidumba (vivőanyag) injektáljuk a mintát, amely egy zónát alkotva halad a detektor felé. A minta diszpergálódik a folyadékban, illetve a többi csatornán hozzáadott reagensekkel reakcióba lép. A minta valamilyen tulajdonságát mérve következtetünk a koncentrációjára.

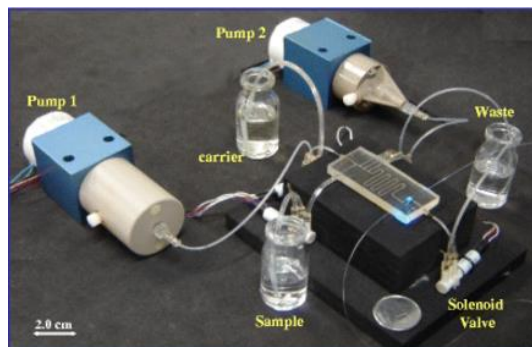
- jó automatizálhatóság
- egyszerű
- jó reprodukálhatóság
- iparban elterjedt



# FIA: Flow Injection Analysis

## Áramló oldatos elemzés

- A minta nem kerül vissza a bioreaktorba, alacsony a befertőződés, szennyezés valószínűsége
- Rövid mérési idő
- Alacsony mintamennyiségek elegendőek
- Sok komponens mérhető egyszerre – szenzorok sorozata
- Szükséges lehet hígítás, pH beállítás - megvalósítható
- Szenzorok szűkebb mérési tartománya biztosítható



25 – 125 mikro mol



# Bioszenzor definíciószerűen

Akkor mi is az a bioszenzor?

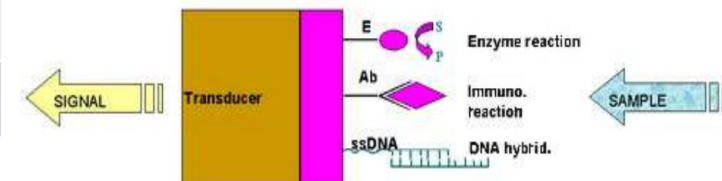
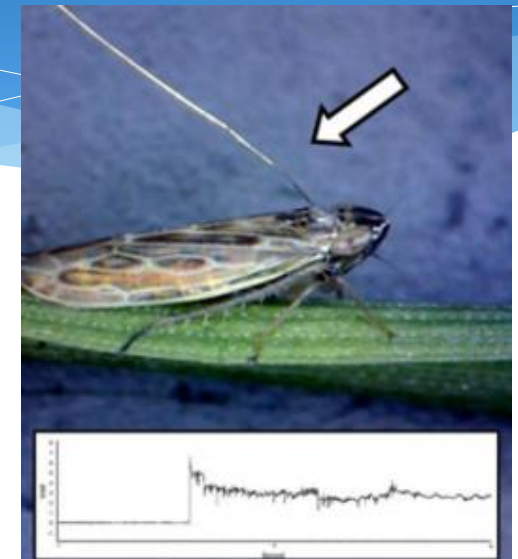
- A bioszenzorok a kémiai szenzorok egy alcsoportja, melyek biológiai alapú mechanizmusokat használnak fel az analit detektálására.
- IUPAC: A kémiai szenzorok miniatürizált energiaátalakítók (transzduktor), amelyek reverzibilisen és szelektíven reagálnak a kémiai komponensekre vagy ion hozamra és analitikai jelet adnak az analit koncentrációval arányosan.

A jel származhat: pH változás, gázfejlődés, fényemisszió, hőemisszió, tömegváltozás, stb. A transzduktor átalakítja a biológiai reakciót egy mérhető válaszba, legyen az akár áramerősség, feszültség, hőmérsékletváltozás, fényintenzitás változás stb. A jel tovább erősíthető, feldolgozható, vagy tárolható. Elviekben bármilyen receptor kombinálható bármilyen megfelelő transzduktorral, hogy produkáljon működő próbát/szondát.



# Bioszenzor részei

Biológiai elem	Energiaátalakító
teljes organizmus	potenciometriás
szövet	amperimetriás
organellum	konduktometriás
membrán	impedanciametriás
enzim	optikai
receptor	kalorimetriás
antitest	akusztikai
genetikai anyag	mechanikai
organikus molekula	



# Enzimek

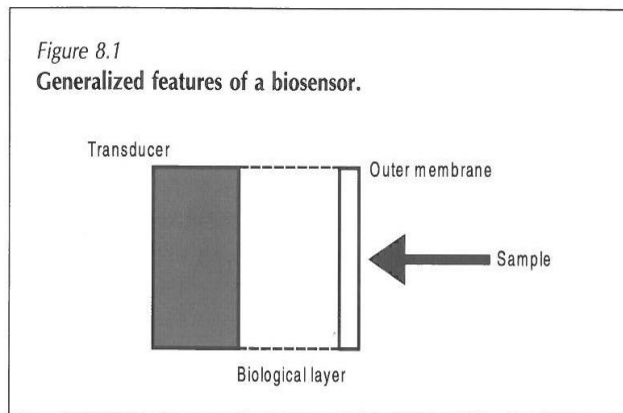
## Miért enzimek?

- szelektívek, egy bizonyos kémiai reakció, egy bizonyos szubsztrát...
- enyhe körülmények között, szobahőmérsékleten
- Nyers anyagokon is lehet kvantitatív próbákat végezni, mintaelőkészítés nélkül, vagy kevés mintaelőkészítéssel
  - ez pontosan az elején emlegetett komplex rendszerekben, mátrixokban történő szelektív detektálás igényére felel
- Két fontos dolgot figyelembe kell venni:
  - működési stabilitás
  - hosszú távú használhatóság
- Ezek az immobilizálási eljárás függvényei



# Enzimek

- Egy bioszenzor alkalmazhatóságát az enzim-elktród konfiguráció határozza meg.
- Enzimelektród: egy valamilyen típusú elektród és egy vékony (10-200 mikrométer) immobilizált enzimréteg kombinációja.
- Az enzimes reakció körülményei mérhetőek a termékképződés és reagens fogyás vizsgálatával. -  
> Nem feltétlen az enzim „jelét” kell mérnünk, vagy nem feltétlenül egyféle enzim jelét.



# Immobilizálás típusai

- Fizikai módszerek:
  - Gélbezárás
  - Adszorpció a transzduktor felületére
- Kémiai módszerek:
  - kovalens kötés a transzduktor felületére
    - (1) bifunkciós vegyülettel (cianur-klorid)
    - (2) keresztkötés multifunkciós vegyület használatával (glutáraldehid)
    - (3) immobilizáció elektrokémiai úton létrehozott polimerfilmen
- Elvárható előnyök, illetve célok
  - a) biológiai komponensek szélesebb tartományban működjenek, mint oldatban
  - b) nagyobb stabilitás elérése
  - c) jól meghatározott diffúziós réteg létrehozása az elektród felületén

# Gélbezárás

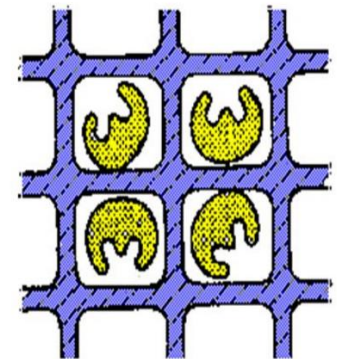
- Többféle mátrixot is alkalmaznak
  - Alginát –  $\text{Ca}^{2+}$  ionok egyes láncával keresztkapcsolva
  - Poliakrilamid

Előnye, hogy bármilyen enzimmal alkalmazhatjuk.

BIM előadások keretében sokkal több módszerről volt szó...

Hátrányok:

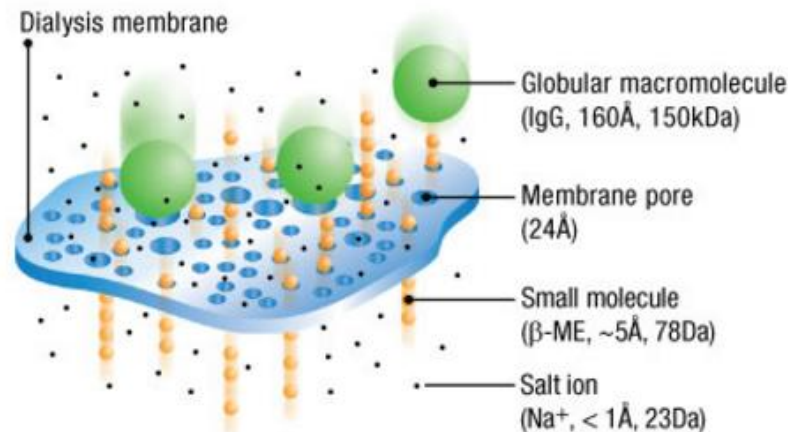
- Nagy diffúziós akadály – késleltetési időt növeli
- Folyamatos veszteség az enzimaktivitásból
- Polimer dagadása vagy zsugorodása a közeg ionerősségétől függ



entrapped in a matrix

# Dialízis membrán

- „A legegyszerűbb módja” az enzim beszorításának, ha a fehérjét az elektród felületén tarjuk egy vékony szemipermeábilis réteg mögött.
  - Ilyen lehet egy dialíziscső.
- Itt egy vékony enzimpaszta, mely megfelelő térfogatú pufferben (1-2 mm<sup>3</sup>) el van oszlatva az elektród felületén.
- Egy 20-25 mikrométer vastagságú dialízis membrán fedi, amelynek kb. a 10000 Daltonos molekulákat tartja vissza.

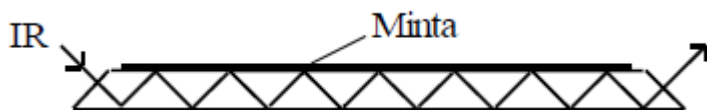


# Adszorpció

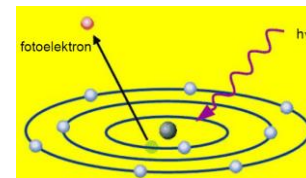
- Nagyon nagy előnye, hogy nem igényel más reagenst, csak minimális tisztítást
- Viszont csak kevés és gyenge kölcsönhatások jönnek létre.
  - Van der Waals erők, dipol – dipol, hidrogénkötés
  - Ezek reverzibilis kölcsönhatások, az egyensúly megváltozhat (pH, ionerősség...)
- Változatban összetételű oldatban ez a folyamat reverz és anyagtranszport kontrollált
- Az adszorpció mértéke arányos a diffúzióval
- A fehérje adszorpciója az elektródon gyakran eredményezheti a kicsapódását
- Egyszerűnek és széleskörűnek tűnik, de a hosszú távú stabilitás nem megoldható
  - csak egyszerhasználatos szenzorok készíthetőek ilyen technikával

# Kovalens rögzítés általánosan

- Irreverzibilis folyamat – legstabilabb
- A fehérje egy olyan nukleofil aminosavával kell végrehajtani, amely nem része a biológiai funkciójának (karbonsav-, hidroxil-, tiol-, imidazol- és fenolcsoport)
- Kétlépéses folyamat:
  - (1) Aktiválni kell az elektród felületét
  - (2) Enzim kötése az aktivált felületre
- XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) és ATR-FTIR módszerekkel követhető a felületre kötés sikeressége, illetve a felületaktiválás sikeressége (információs mélység 5 – 10 atomi réteg)
- A felület kapacitásának mérésével is nyomon követhetőek ezek a lépések
- A tankönyv további ajánlása a sikeres rögzítés tesztelésére, hogy próbáljuk ki



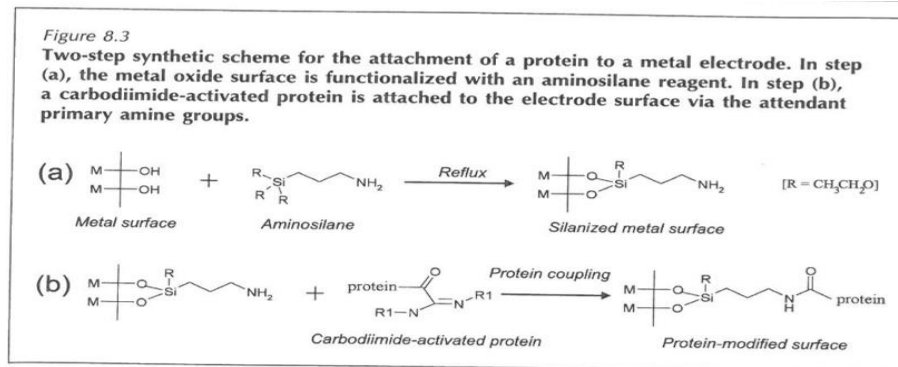
Belső reflexió ATR:  
Attenuated Total Reflection





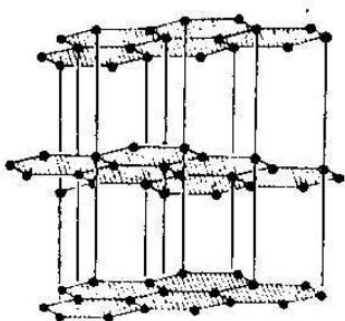
# Kovalens – rögzítés fémelektródra

- A fémfelületeket aktiválni, a vékony felületi oxidréteget „le kell cserélni”
- A silica felületek analógiájára M-OH felületeket vízmentes körülmények között szililezőszerrel stabil –MOSi- kötéseket hozhatunk létre
- Az enzim hozzáadásához az organoszilán reagens hordozzon primer aminocsoportot vagy karbonsavat pl: propil-aminoszilán  $[(\text{CH}_3\text{CHO}_2)_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]$  így képes kialakítani a fehérjével kötést, aminocsoporton keresztül



# Kovalens – rögzítés szénelektrodra

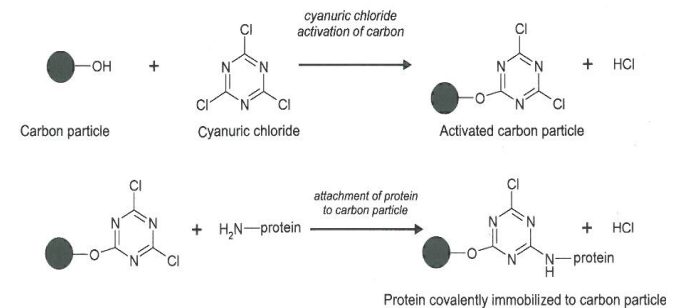
- Népszerű anyaga az elektródoknak
- Grafit hatalmas lemezekből áll, melyeknek szélei reakcióképesek
- Hasadások létrehozása, az így keletkezett „szélek” hasznosak, funkciós csoportok
- A síkok széle poláros -> vizes reakciók - vagy -OH csoportok számának növelése
- Rádiófrekvenciás O<sub>2</sub> plazmától eljutottak az 1 M-es salétromsavig
- -OH + cianur-klorid => szerves oldószerben és vizes oldatban is stabil
- Torma peroxidáz, glükóz oxidáz, stb...



graphite  
layer structure

Figure 8.4

Synthetic scheme showing the usage of cyanuric chloride in the covalent attachment of a protein to the surface of a carbon particle.



# Kérdések

Emailen 2016.05.26.:

1. Bioszenzor definíciója.
2. FIA jelentése és 5 előnyös tulajdonságának felsorolása.
3. Mi az a vezető polimer?
4. A Clark-féle oxigén mérés elvi alapja.
5. Mi az a mediátor?