



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Mintautė Jatkelienė

**IMOBILIZUOTOS ANT ĮVAIRIAI MODIFIKUOTŲ PAVIRŠIŲ PQQ
GLIUKOZĖS DEHIDROGENAZĖS SPECIFIŠKUMO TYRIMAS**

**SPECIFICITY STUDY OF PQQ GLUCOSE DEHYDROGENASE
IMMOBILIZED ON MODIFIED SURFACES**

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX018

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2022

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)
Jaunius Urbonavičius
(Vardas, pavardė)

Mintautė Jatkelienė

**IMOBILIZUOTOS ANT ĮVAIRIAI MODIFIKUOTŲ PAVIRŠIŲ PQQ
GLIUKOZĖS DEHIDROGENAZĖS SPECIFIŠKUMO TYRIMAS**

**SPECIFICITY STUDY OF PQQ GLUCOSE DEHYDROGENASE
IMMOBILIZED ON MODIFIED SURFACES**

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX018

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas

Marius Butkevičius

(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Lietuvių kalbos konsultantas

(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2022

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijos studijų kryptis

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX018

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Jaunius Urbonavičius

(Vardas, pavardė)

(Data)

**BAIGIAMOJO BAKALAURO (ARBA MAGISTRO) DARBO
UŽDUOTIS**

Studentui (ei) Mintautei Jatkelienei
(Vardas, pavardė)

Baigiamojo darbo tema: Imobilizuotos ant įvairiai modifikuotų paviršių PQQ gliukozės dehidrogenazės specifškumo tyrimas

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2022 m. birželio 1 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

Ištirti skirtingų paviršių įtaką imobilizuotam oksidoreduktazių klasės fermentui (nuo PQQ priklausomai gliukozės dehidrogenazei), nustatyti natyvos PQQ-GDH kinetinius parametrus (K_m , V_{max}) įvairiems substratams spektrofotometrinio metodu, atrinkti tinkamą paviršių PQQ-GDH imobilizavimui, nustatyti imobilizuotos PQQ-GDH kinetinius parametrus (K_m , V_{max}) įvairiems substratams elektrocheminiu metodu, palyginti natyvos ir imobilizuotos PQQ-GDH specifškumą įvairiems substratams.

Vadovas

(Parašas)

Marius Butkevičius

(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

Vilniaus Gedimino Technikos Universitetas

Fundamentinių mokslų fakultetas

Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN

ISSN

Egz. sk.

Data-....-....

Antrosios pakopos studijų **Nanobiotechnologijos** programos magistro baigiamasis darbas

Pavadinimas: **Imobilizuotos ant įvairiai modifikuotų paviršių PQQ gliukozės dehidrogenazės specifiškumo tyrimas**

Autorius: **Mintautė Jatkelienė**

Vadovas: **Marius Butkevičius**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Angliavandenių, kaip ir nukleino rūgščių ir aminorūgščių, gamtoje yra daug. Daugelyje natūralių produktų yra oligosacharidų, kurie yra gyvybiškai svarbūs jų biologinei veiklai. Kalbant apie struktūrinę įvairovę, angliavandeniai koduoja informaciją specifiniam molekuliniam atpažinimui ir yra baltymų lankstymąsi, stabilumą ir farmakokinetiką lemiantys veiksniai. Kokybinė ir kiekybinė skirtingų angliavandenių bioanalizė yra svarbi ne tik stebint cukrų kiekį kraujyje, bet ir tiriant maisto produktų ir gėrimų kokybę, vertinant fermentacijos procesus ir tiriant mikroorganizmus. Didelį populiarumą įgavo gliukozės, laktozės ir galaktozės biojutikliai. Yra ištyrinėta ir aprašyta nemažai elektrocheminių biojutiklių, veikiančių su gliukozės oksidoreduktazėmis.

Šiame darbe naudojamas fermentas PQQ gliukozės dehidrogenazė ir tiriamas jos specifiškumas tiek ant skirtingai modifikuotų paviršių, tiek su skirtingais substratų tirpalais ir skirtingomis aplinkos sąlygomis. Naudojant elektrocheminius ir spektrofotometrinius metodus ir pritaikius Michaelio-Menten modelį apskaičiuotos K_m ir V_{max} reikšmės. Šios reikšmės palygintos fermentą imobilizavus ir neimobilizavus. Nustatyta, kad tiriamo fermento kinetinėms savybėms įtakos turi tirpalo sąlygos – pH, tačiau pastebėtas mažas poveikis keičiant buferinio tirpalo joninę jėgą. Darbą sudaro 6 dalys: įvadas, literatūros apžvalga, eksperimento metodikos, tyrimo rezultatai, išvados, literatūros sąrašas. Darbo apimtis: 51 p. teksto be priedų, 21 paveikslas, 3 lentelės, 62 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: gliukozės dehidrogenazė, imobilizavimas, natyvus fermentas, fermento specifiškumas, savitvarkiai monosluoksniai, elektrodo paviršius

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of Fundamental Sciences
Department of Chemistry and Bioengineering

ISBN ISSN
Copies No.
Date-....-....

Master Degree Studies **Nanobiotechnology** study programme Master Graduation Thesis

Title: **Specificity study of PQQ glucose dehydrogenase immobilized on modified surfaces**

Author: **Mintautė Jatkeliënė**

Academic supervisor: **Marius Butkevičius**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

Carbohydrates, like nucleic acids and amino acids, are abundant in nature. Many natural products contain oligosaccharides that are vital to their biological activity. In terms of structural diversity, carbohydrates encode information for specific molecular recognition and are determinants of protein flexibility, stability, and pharmacokinetics. Qualitative and quantitative bio-analysis of different carbohydrates is important not only for monitoring blood sugar levels, but also for studying the quality of food and beverages, evaluating fermentation processes and research of microorganisms. Glucose, lactose, and galactose biosensors have become very popular. A number of electrochemical biosensors acting on glucose oxidoreductases have been investigated and described.

The enzyme PQQ glucose dehydrogenase is used in this work and its specificity is investigated both on differently modified surfaces and with different substrate solutions and different environmental conditions. K_m and V_{max} values were calculated using electrochemical and spectrophotometric methods and applying the Michael-Menten model. These values were compared after immobilization and non-immobilization of the enzyme. The kinetic properties of the test enzyme were found to be affected by the pH conditions of the solution, but a small effect on the ionic strength of the buffer solution was observed. Structure: introduction, literature review, experimental methods, research results, conclusions, references. Thesis consist of: 51 p. text without appendixes, 21 pictures, 3 tables, 62 bibliographical entries.

Keywords: glucose dehydrogenase, immobilization, native enzyme, enzyme specificity, self-assembled monolayers, electrode surface

Turinys

Įvadas	8
1. Literatūros apžvalga	10
1.1. Oksidoreduktazių klasės fermentai.....	10
1.1.1. Tirpi PQQ gliukozės dehidrogenazė.....	11
1.1.2. Tirpios PQQ gliukozės dehidrogenazės struktūra ir veikimo mechanizmas	12
1.1.3. Oksidoreduktazių imobilizavimas	13
1.1.4. Fermentų imobilizavimo būdai.....	13
1.2. Biojutikliai, jų veikimo principas ir tipai	16
1.3. Grafas	18
1.3.1. Grafeno oksidas	19
1.3.2. Grafeno sintezė	19
1.4. Savitvarkiai monosluoksniai	21
1.4.1. Struktūra.....	22
1.4.2. Tiolių formuojami SAM	23
1.5. Bioelektrocheminiai procesai	24
1.6. Nanodalelės ir jų charakteristika	25
1.6.1. Aukso nanodalelės	26
2. Metodai ir medžiagos	27
2.1. Tyrimo metu naudotos medžiagos.....	27
2.1.1. Tirpalai	27
2.2. Aparatūra.....	28
2.3. Spektrofotometrinis fermentinio aktyvumo nustatymas	28
2.4. Aukso nanodalelių sintezė ir charakterizavimas	29
2.5. Chronoamperometrija	30
2.6. Ciklinė voltamperometrija.....	30
2.7. Elektrodai ir jų paruošimas	31
2.8. Fermentų reakcijų kinetiniai skaičiavimai	31
3. Rezultatai ir jų aptarimas.....	33
3.1. Natyvos PQQ-GDH specifiskumas įvairiems substratams	33
3.1.1. Natyvos PQQ-GDH Michaelio-Menten modeliai	34
3.2. Imobilizuotos PQQ-GDH specifiskumas.....	36
3.2.1. Savitvarkių monosluoksnių imobilizavimas ant aukso elektrodo paviršiaus.....	36

3.2.2.	PQQ-GDH imobilizavimas ant grafito elektrodo paviršiaus	38
3.2.3.	Imobilizuotos PQQ-GDH Michaelio-Menten modeliai.....	42
3.2.4.	Natyvios ir imobilizuotos PQQ-GDH specifiškumo palyginimas	44
Išvados.....		46
Literatūros sąrašas.....		47

Išvadas

Biojutikliai gaminami sujungiant biologinę medžiagą (pvz. fermentus, antikūnus, nukleorūgštis) su tinkamu elektrocheminiu, terminiu, optiniu ar kitoku keitikliu, leidžiančiu greitai ir tiksliai aptikti įvairias medžiagas. Biotechnologai pradeda naudoti didžiulius biosensorių, galinčių aptikti žemą baltymų, hormonų, teršalų, dujų ir kitų molekulių kiekį, išteklius. Fermentiniai biojutikliai iki šiol buvo labiausiai išvystyta ir svarbiausia biojutiklių klasė, kuri rado svarbią pritaikymo sritį klinikinėje chemijoje. Pirmieji ir vis sėkmingesni biojutikliai buvo pagrįsti fermentų, kaip biologinio atpažinimo elemento, naudojimu, o tai yra tie, kurie naudojami diabetu sergančių asmenų gliukozės kiekiui kraujyje nustatyti, pagrįsti gliukozės oksidazės (GOx) imobilizavimu ant vienkartinųjų elektrocheminių juostelių. Buvo aprašyta daugiau amperometrinių sistemų, naudojant fermentus peroksidazę, laktato dehidrogenazę ir cholesterolio oksidazę atitinkamai peroksidų, laktatų ir cholesterolio analitėms nustatyti (Martínez et al., 2007).

Fermentų imobilizavimas yra vienas iš pagrindinių veiksnių kuriant efektyvius biojutiklius, pasižyminčius tinkamu veikimu, pavyzdžiui, geru veikimo ir laikymo stabilumu, dideliu jautrumu, dideliu selektyvumu, trumpu atsako laiku ir geru atsikartojamumu. Po imobilizacijos imobilizuotos biomolekulės turi išlaikyti savo struktūrą, funkciją, biologinį aktyvumą, išlikti tvirtai surištos su paviršiumi ir nesidesorbuotis naudojant biojutiklį. Be to, idealus biojutiklis turi būti stabilus ilgalaikiam naudojimui. Imobilizavimo metodo tipas turi įtakos fermentinių biosensorių aktyvumui ir stabilumui. Tokie veiksniai kaip matavimų tikslumas, jutiklio atkuriamumas ir veikimo trukmė labai priklauso nuo fermento stabilumo, o pats imobilizacijos procesas stipriai veikia biosensoriaus analitinės savybės (Sassolas et al., 2012).

Gliukozės biojutikliams ypač svarbus yra fermento substrato specifiškumas. Pacientų, kuriems atliekama peritoninė dializė ar kitoks gydymas, kraujyje gali būti didelis maltozės kiekis (Janssen et al., 1998). Gliukozės biojutikliai, kuriuose naudojamos plataus specifiškumo oksidoreduktazės, gali parodyti klaidingai padidėjusį gliukozės kiekį ir sukelti jatrogeninę hipoglikemiją. Maisto ir vaistų administracijos pranešime (Frias et al., 2010) apie visuomenės sveikatą buvo įspėta dėl galimų mirtinų klaidų iš PQQ-GDH pagrįstos jutimo technologijos. Svarbu suprasti pagrindines savybes ir naudojamų fermentų apribojimus ir jų katalizinio aktyvumo principus, kad būtų išvengta galimų pavojų. Svarstant galimą fermento tinkamumą konkrečiam biojutiklio pritaikymui turi būti atsižvelgta ne tik į pagrindinę fermento kategoriją arba sutartinį pavadinimą, bet taip pat reikia žinoti ir kitas

ypatybes, kurios gali turėti įtakos fermentinėms savybėms, pvz., jo paruošimui naudotas šeimininko kamienas, inžinerinės mutacijos, taip pat cheminės ar fermentinės modifikacijos. (Ferri et al., 2011).

Angliavandenių konversija ir nustatymas įvairiuose tirpaluose yra svarbus daugelyje sričių – pramonėje (pvz., bioetanolio gamyba iš lignoceliuliozės (Damayanti et al., 2021)), klinikiniuose tyrimuose (pvz., gliukozės, fruktozės kiekis kraujyje (Shi et al., 2021)), maisto pramonėje (pvz., saldiklių gamyba (Cervantes et al., 2020)). Didelė angliavandenių įvairovė šiose srityse paskatino sukurti daugelį angliavandenių koncentracijos matavimų analizės metodų, įskaitant chromatografiją (dujų (Zhang et al., 2009), plonasluoksne (Bischel et al., 1966), didelio efektyvumo skysčių (Chen et al., 2010)), kapiliarinę elektroforezę (An et al., 2015), kolorimetrinę ar infraraudonųjų spindulių spektroskopiją (Immanuel et al., 2018).

Chinoproteinų oksidoreduktazės (QPOs) geba katalizuoti įvairių struktūriškai skirtingų alkoholių, pirminių aminių ir angliavandenių oksidaciją. Tarp jų labiausiai paplitusios yra angliavandenių dehidrogenazės (gliukozės, laktato, maltozės dehidrogenazės) (Kulys et al., 2010). Nuo PQQ priklausoma gliukozės dehidrogenazė (PQQ-GDH) iš *Acinetobacter calcoaceticus* buvo panaudota kuriant bioelektrokatalitinę angliavandenių (monosacharidų ir disacharidų) detekcijos sistemą. PQQ-GDH skirstomos pagal jų lokalizaciją, t.y., tirpi (PQQ-sGDH) arba sujungta su membrana (PQQ-mGDH). PQQ-sGDH buvo pasirinktas dėl jo platesnio specifiškumo įvairiems cukrams. PQQ-sGDH geba oksiduoti įvairius monosacharidus, tokius kaip gliukozė, galaktozė, arabinozė, taip pat disacharidus, pvz., laktozę, celobiozę ir maltozę. Angliavandenių oksidacijos produktai yra atitinkami laktonai (Matsushita et al., 1988).

Tikslas: Ištirti skirtingų paviršių įtaką imobilizuotam oksidoreduktazių klasės fermentui (nuo PQQ priklausomai gliukozės dehidrogenazei).

Uždaviniai:

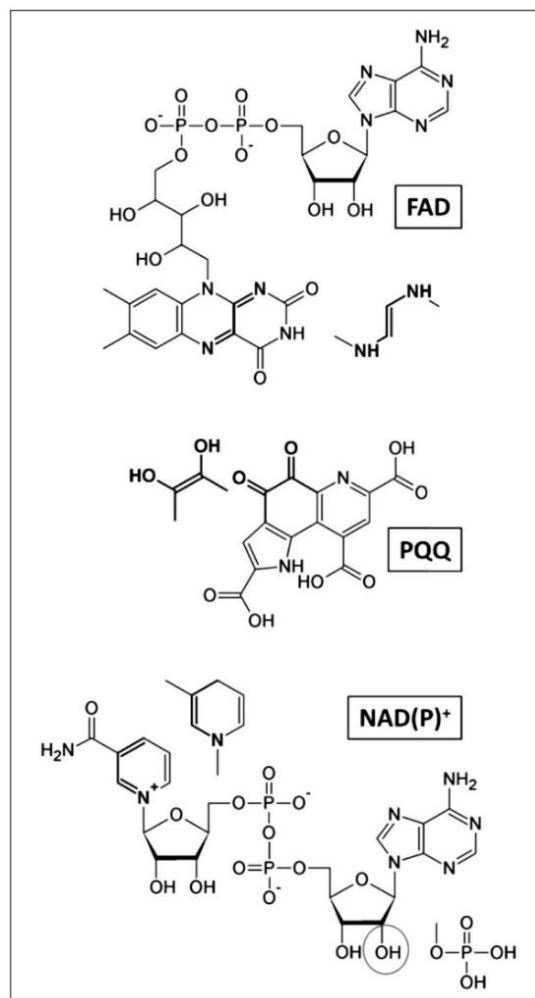
1. Nustatyti natyvos PQQ-GDH kinetinius parametrus (K_m , V_{max}) įvairiems substratams spektrofotometrinio metodu;
2. Atrinkti tinkamą paviršių PQQ-GDH imobilizavimui;
3. Nustatyti imobilizuotos PQQ-GDH kinetinius parametrus (K_m , V_{max}) įvairiems substratams elektrocheminiu metodu;
4. Palyginti natyvos ir imobilizuotos PQQ-GDH specifiškumą įvairiems substratams.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Oksidoreduktazių klasės fermentai

Oksidoreduktazės yra pagrindinė fermentų klasė, atsakinga už oksidacijos-redukcijos reakcijų katalizę, labai svarbią daugumoje bioenergetinių medžiagų apykaitos kelių, kurie tiria ląstelės ir organizmų energijos konversiją ir metabolizmą kaip visų gyvybės funkcijų pagrindą. Pagrindinis dėmesys skiriamas biofiziniams, biocheminiams, fiziologiniams ir ląstelių biologiniams procesams, kurie garantuoja ląstelės energetinį saugumą ir jos komponentų išsidėstymą pagal įvairius matabolinius ir fiziologinius poreikius. Universalus oksidoreduktazių buvimas bakterijų, archėjų ir eukariotų energijos gamybos keliuose rodo, kad šie baltymai atsirado anksčiau, biogenezės proceso metu, ir todėl yra būtini gyvybei (Chang & Baldi, 2013).

Oksidoreduktazės katalizuoja vienos cheminės rūšies (reduktoriaus arba elektronų donoro) oksidaciją kartu su kitos (oksidatoriaus arba elektronų akceptoriaus) redukcija $A^- + B \rightarrow A + B^-$ formoje ir sudaro beveik trečdalį visų fermentinių aktyvumų, užregistruotų Braunšveigo fermentų duomenų bazėje BRENDA. Oksidoreduktazės gali katalizuoti įvairių organinių substratų oksidaciją / redukciją, įskaitant alkoholius, aminus ir ketonus, ir neorganinius substratus, įskaitant mažus anijonus, pavyzdžiui sulfitus, ir metalus, pavyzdžiui gyvsidabrį (Sellés Vidal et al., 2018). Šiai fermentų klasei priklauso grupė fermentų, kurie veikia redukuojančiame gliukozės gale, pirmąją hidroksilo grupėje. Šios dvi grupės – gliukozės oksidazė (GOx) ir gliukozės dehidrogenazė (GDH), priklausomai nuo jų gebėjimo reaguoti su išoriniais elektronų akceptoriais. Gliukozės oksidazės apibrėžiamos kaip oksidoreduktazės, kurios geba panaudoti deguonį kaip išorinį elektronų akceptorį, išskirdamos vandenilio peroksidą. Gliukozės dehidrogenazės apibrėžiamos kaip oksidoreduktazės, kurios negali panaudoti deguonies kaip elektronų akceptoriaus, o vietoj to perkelia elektronus į įvairius natūralius ir dirbtinius elektronų akceptorius. Gliukozės dehidrogenazės toliau skirstomos pagal jų redokso kofaktorių, kurie yra esminis nebaltyminis komponentas, veikiantis kaip pirminis elektronų akceptorius (1.1 pav.). Įdomu tai, kad GOx geba panaudoti deguonį, taip pat įvairius kitus elektronų akceptorius, FAD turinčios GDHs negali panaudoti deguonies, nepaisant to, kad jie turi tą patį redokso kofaktorių ir turi reikšmingų struktūrinių panašumų su GOx (Ferri et al., 2011).

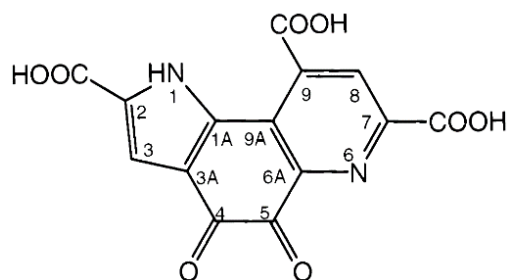


1.1 pav. GDHs naudojami kofaktoriai. FAD, PQQ ir NAD struktūros pavaizduotos oksiduotoje būsenoje. Redukuoti regionai yra paryškinti juodai, o šalia nupiešta redukuota regiono forma. Sritis, skirianti NAD (OH) ir NADP (PO_4H_2), apibrėžiama apskritimu (Ferri et al., 2011)

1.1.1. Tirpi PQQ gliukozės dehidrogenazė

Tirpi gliukozės dehidrogenazė yra klasikinis chinoproteinas, kuriam reikalingas kofaktorius pirolchinolino chinonas (PQQ), kad oksiduotų gliukozę į gliukonolaktoną. Pirolchinolino chinonas (1.2 pav.) yra daugumos chinoproteinų dehidrogenazių, kurios katalizuoja reakcijas gramneigiamų bakterijų periplazmoje, prostetinė grupė. Jis sintetinamas nepriklausomai nuo apofermento dehidrogenazės ir pernešamas į periplazmą, kur jis yra įtrauktas į fermento struktūrą, sudarydamas aktyvų holofermentą. Jis visada yra nekovalentiškai surištas su fermentu. Visuose chinoproteinuose, išskyrus turinčius PQQ, prostetinės grupės yra kovalentiškai prijungtos prie fermento, gaunamos

modifikuojant triptofano, tirozino arba lizino liekanas baltymo aminorūgščių pagrinde (Goodwin & Anthony, 1998).



1.2 pav. Picrolochinolino chinono (PQQ) cheminė struktūra. Nurodyta atomų nomenklatūra (Oubrie et al., 1999)

1.1.2. Tirpios PQQ gliukozės dehidrogenazės struktūra ir veikimo mechanizmas

PQQ pirmą kartą buvo išskirtas iš gliukozės ir metanolio dehidrogenazių (Anthony & Zatman, 1967). Jis lengvai išsiskyrė denatūruojant fermentus, buvo išgrynintas ir pasirodė esantis raudonas, labai polinis, rūgštus junginys su būdinga žalia fluorescencija. Vėliau jo struktūra buvo išaiškinta rentgeno kristalografija (Salisbury et al., 1979), o jo chemiją išsamiai aprašė Frankas ir Duine bei jų bendradarbiai (Duine et al., 1983). Jie parodė, kad pagrindinis PQQ struktūros bruožas yra *orto* chinonas chinolino žiedo C4 ir C5 padėtyse, kuris katalizės metu redukuojamas iki chinolio (Goodwin & Anthony, 1998). PQQ biosintezė patvirtinta tik prokariotiniuose mikroorganizmuose; tačiau daugelis biosintezės kelio detalių lieka nežinomos. Skirtingai nuo NAD ar FAD, PQQ biogenezė yra ribosominė, gaunama nuosekliai modifikuojant peptido pirmtaką po transliacijos. Dehidrogenazės, turinčios PQQ, yra plačiai paplitusios, tokios kaip GDH, alkoholio dehidrogenazė ir sorbitolio dehidrogenazė, visos jos turi beta sraigto struktūrą (Ferri et al., 2011).

PQQ-GDH neatspindi vieno fermento, o vietoj to nurodo bent dvi skirtingas GDH, turinčias PQQ kaip redokso kofaktorių: su membrana surištą PQQ-mGDH (senesnėje literatūroje GDH-A) ir vandenyje tirpų PQQ-sGDH (senesnėje literatūroje GDH-B). Buvo pranešta apie PQQ-mGDH iš įvairių gramneigiamų bakterijų, o jų substrato specifiškumas, stabilumas ir kitos savybės yra būdingos kamienui. Bakterijose PQQ-mGDH, kuris yra susietas su kvėpavimo grandine per ubiquinoną, fiziologinis vaidmuo yra galutinė gliukozės oksidacija. Apie PQQ-sGDH buvo pranešta tik iš gramneigiamos bakterijos *Acinetobacter calcoaceticus*, kur ji randama periplazminėje erdvėje. PQQ-sGDH nėra susietas su *A. calcoaceticus* kvėpavimo grandine, o jos fiziologinis vaidmuo išlieka neaiškus. PQQ-sGDH yra mažiau specifiška substratams nei PQQ-mGDH ir katalizuoja gliukozės,

alozės, 3-O-metilgliukozės, taip pat disacharidų laktozės, celobiozės ir maltozės oksidaciją. PQQ-sGDH yra homodimerinis fermentas, turintis po PQQ molekulę ir tris Ca^{2+} jonus, prijungtus prie kiekvieno subvieneto (Ferri et al., 2011).

Dėl savo nejautrumo deguoniui, gero katalizinio reaktyvumo ir, nepaisant prasto substrato selektyvumo, chinoproteino gliukozės dehidrogenazė atlieka svarbų vaidmenį tarp redokso fermentų, kurie gali būti naudojami analitiniais tikslais, pavyzdžiui, gliukozės detekcijai, fermentų pagrindu atliekamiems biojutiklių tyrimams (elektrocheminiuose imuno, DNR ir aptasensoriuose) ir biokuro elementų kūrimui. PQQ sGDH yra žinoma dėl savo mažo specifiškumo ir gali oksiduoti įvairius mono-, di- arba oligosacharidus, įskaitant maltozę (Durand et al., 2011).

1.1.3. Oksidoreduktazių imobilizavimas

Oksidoreduktazės imobilizavimas yra labai svarbus norint pagerinti elektrodų pakartotinį naudojimą ir stabilumą. Norint pasiekti efektyvią tiesioginę elektronų pernašą (TEP), svarbu atsižvelgti į išsamias fermento ir elektrodo paviršiaus charakteristikas, kad fermentai būtų tinkamai orientuoti, o tai sumažintų elektronų tunelinį atstumą. Veiksmingam fermentų imobilizavimui naudojamos įvairūs anglies arba metaliniai paviršiai (Vaz-Dominguez et al., 2008). Dažniausiai naudojama fizinė adsorbcija ir / arba kovalentinis sujungimas. Savitvarkiai monosluoksniai (SAM) buvo įvesti į bioelektrokatalizę, kad tarnautų kaip baltymų / fermentų tiltas imobilizavimui ant aukso ar kitų metalinių paviršių. SAM struktūras nulemia Au-S ryšys, metalinių paviršių paviršiaus struktūra, šoninės sąveikos, taip pat tirpiklis ir elektrolitai. Naudojant SAM išvengiama tiesioginio fermento ir kietų paviršių kontakto, imituojant mikroatplinką biologinėse membranose. SAM turi įvairias funkcines hidrofilines arba hidrofobines galines grupes, tokias kaip karboksilo, hidroksilo, amino ir alkilo grupės. TEP kinetiką taip pat galima valdyti sureguliuojant SAM molekulės grandinės ilgį, nes elektronų pernašos greitį stipriai kontroliuoja tunelinis atstumas. Baltymų inžinerija oksidoreduktazes tiesiogiai aprūpina tiolio liekanomis, kas veda prie valdomos orientacijos, tiesiogiai jungiantis prie baltymų tiolio arba formuojant tioeterio ryšį su nesočiuoju maleimidu (Murata et al., 2009; Tominaga et al., 2008).

1.1.4. Fermentų imobilizavimo būdai

Fermentų imobilizavimas yra svarbi funkcija kuriant fermentų pagrindu veikiančių biojutiklių biologinio atpažinimo dalį. Siekiant pagerinti biojutiklių analitines charakteristikas ir išplėsti analizių diapozoną keitiklio paviršius modifikuojamas įvairiomis medžiagomis. Modifikatorius gali būti

įterpiamas į paviršių (paviršiaus modifikacija) arba sumaišomas su elektrodų pastų komponentais (didmeninė modifikacija (angl. *bulk modification*). Aprašyta išsamių apžvalgų apie keletą fermentų imobilizavimo būdų: adsorbciją (angl. *adsorption*), kovalentinį prijungimą (angl. *covalence*), kryžminį ryšį (angl. *cross-linking*), įterpimą (angl. *encapsulation*) į polimero matricą ir afiniškumą (angl. *affinity*) (1.3 pav.). Kai kuriais atvejais fermentų imobilizacijos metodai yra pagrįsti kelių imobilizacijos metodų deriniu. Pavyzdžiui, fermentas gali būti iš anksto imobilizuotas ant granuliuotos adsorbcijos, afiniškumo arba kovalentiškumo būdu prieš tolesnį įterpimą akytame polimere (Sassolas et al., 2012).

Fermentus galima imobilizuoti trimatėje matricose (1.3 pav. A) tokiose kaip elektropolimerizuota plėvelė, amfifilinis tinklas, sudarytas iš polidimetilsiloksano, fotopolimeras, silikagelis, polisacharidas arba anglies pasta. Šią imobilizaciją lengva atlikti. Fermentai, mediatoriai ir priedai gali būti vienu metu nusodinami tame pačiame jutimo sluoksnyje. Paviršius modifikuojamas taip, kad imobilizacijos proceso metu būtų išsaugotas fermento aktyvumas. Biojutikliai, kurių pagrindą sudaro fiziškai įterpti fermentai, dažnai pasižymi padidintu veikimo ir saugojimo stabilumu. Tačiau apribojimai, tokie kaip biokomponentų išplovimas ir galimi difuzijos barjerai, gali apriboti sistemų veikimą.

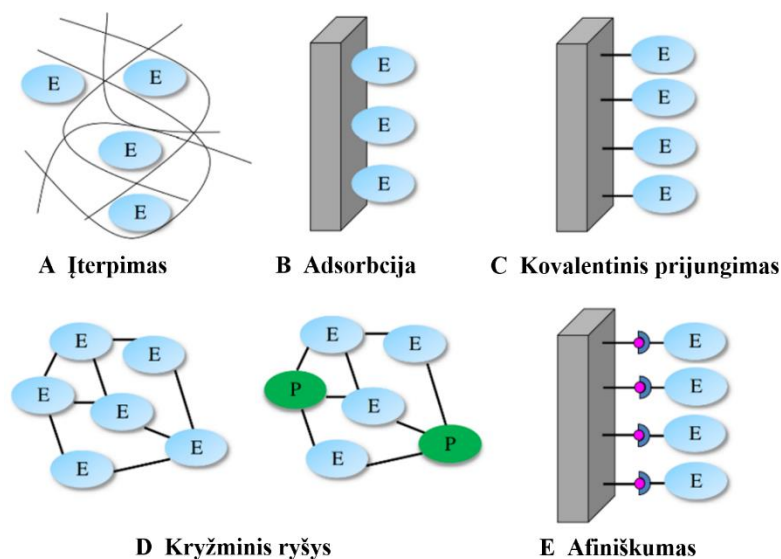
Fermentų adsorbcija ant kietų paviršių (1.3 pav. B) yra lengviausias fizinės imobilizacijos būdas. Fermentas ištirpinamas tirpale, o paviršius tam tikrą laiką kontaktuoja su fermento tirpalu. Tada neadsorbuotas fermentas pašalinamas plaunant buferiniu tirpalu. Adsorbcijos mechanizmai yra pagrįsti silpnomis jungtimis, tokiomis kaip Van der Valso jėgos ir elektrostatinė ir (arba) hidrofobinė sąveika. Šis metodas gali būti naudojamas be papildomo paviršiaus funkcionalizavimo ir paprastai nesunaikina fermentų aktyvumo ir yra plačiai naudojamas dėl proceso paprastumo ir mažos kainos. Tačiau šis imobilizacijos metodas turi ir trūkumų: fermentai yra silpnai prijungiami prie paviršiaus, o pagrindinė problema yra fermento desorbcija, atsirandanti dėl temperatūros, pH ir jonų stiprumo pokyčių.

Kovalentinis fermentų prijungimas prie polimerinių paviršių (1.3 pav. C) yra populiarus cheminės imobilizacijos metodas, naudojamas fermentiniams biojutikliams kurti. Biokatalizatoriai yra prijungiami prie paviršiaus per funkcines grupes, kurios yra juose ir kurios nėra būtinos jų kataliziniam aktyvumui. Fermentų prijungimas ant kieto paviršiaus paprastai atliekamas iš pradžių aktyvuojant paviršių, naudojant daugiafunkcinius reagentus (pvz., glutaraldehydą arba karbodiimidą), po to vyksta fermento sujungimas su aktyvuotu paviršiumi, tada pašalinamos perteklinės ir nesurištos

biomolekulės. Nešiklio paviršius gali būti neorganinė medžiaga (pvz., reguliuojamų porų stiklas), natūralus (pvz., celiuliozė) arba sintetinis polimeras (pvz., nailonas). Kovalentinis imobilizavimas gali būti atliekamas tiesiai ant keitiklio paviršiaus arba ant plonos membranos, pritvirtintos prie keitiklio. Šis metodas užtikrina tvirtą ir kryptingą fermento fiksavimą keitiklio paviršiuje. Tai reikšmingai padidina detekcijos jautrumą ir tikslumą bei leidžia regeneruoti paviršių, pavyzdžiui, keičiant „analitės-fermento“ komplekso stabilumą. Tai padidina biojutiklio galiojimo laiką (Kozitsina et al., 2018; Rodríguez-Delgado et al., 2015).

Fermentų imobilizavimas kryžminiu ryšiu (1.3 pav. D) su glutaraldehidu arba kitais bifunkciniais agentais, tokiais kaip glioksalis arba heksametilendiaminas, yra dar vienas gerai žinomas biojutiklių kūrimo būdas. Fermentai gali būti sujungti tarpusavyje arba esant funkciškai inertiškam baltymui, pavyzdžiui, jaučio serumo albuminui. Šis metodas populiarus dėl savo paprastumo ir stipraus cheminio jungimosi tarp biomolekulių. Pagrindinis trūkumas yra aktyvumo praradimo galimybė dėl aktyvaus fermento konformacijos iškraipymo ir aktyviojo fermento centro struktūros pakitimų kryžminio imobilizavimo metu.

Afiniškumo strategija (1.3 pav. E) yra sukurti (bio)afiniškus ryšius tarp aktyvuoto paviršiaus (pvz., su lektinu, avidinu, metalo chelatais) ir specifinės baltymų sekos grupės (pvz., angliavandenių liekanos, biotino, histidino). Šis metodas leidžia reguliuoti biomolekulės orientaciją, kad būtų išvengta fermentų deaktyvavimo ir (arba) aktyvios vietos blokavimo. Buvo aprašyti keli afiniškumo metodai, skirti imobilizuoti fermentus per streptavidino-biotino, lektino-angliavandenių bei metalo katijonų-chelatorių sąveikas. Fermento sekoje gali būti afiniškumo žymenų (pvz., cukraus dalis), tačiau kai kuriais atvejais afiniškumo žymę (pvz., biotiną) reikia prijungti prie baltymų sekos taikant genų inžinerijos metodus, pvz., nukreiptą mutagenezę, baltymų suliejimo technologiją ir po transkripcijos modifikaciją (Kozitsina et al., 2018; Sassolas et al., 2012).

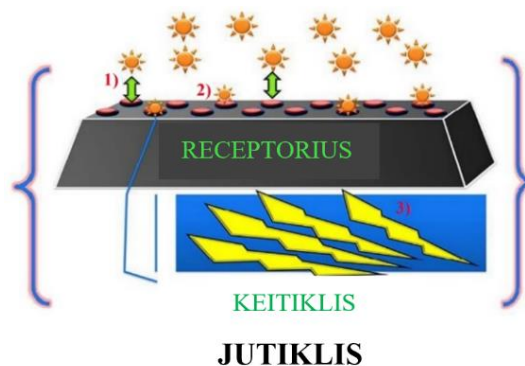


1.3 pav. Scheminis pagrindinių skirtingų fermentų imobilizavimo būdų vaizdavimas. E: fermentas, P: inertiškas baltymas (Sassolas et al., 2012)

1.2. Biojutikliai, jų veikimo principas ir tipai

Biojutikliai yra prietaisai, kurie fiksuoja biologinį signalą ir paverčia jį aptinkamu elektriniu signalu. Tai apima biologinių subjektų, tokių kaip DNR, RNR ir baltymų / fermentų, kombinaciją į elektrocheminį keitiklį, siekiant aptikti ir stebėti tam tikras biologines analites, pvz., antikūnų ir antigenų sąveiką. Buvo žinomi keli biosensorių tipai, kurie buvo sėkmingai naudojami aplinkosaugos, biomedicinos ir maisto pramonės srityse, siekiant aptikti ir pašalinti tam tikrus teršalus, negyvus ar gyvus objektus ore. Dabar dažniausiai naudojami amperometriniai, optiniai, paviršiaus plazmoninio rezonanso, fermentiniai, DNR, fagų ir bakteriniai jutikliai. Šie biojutikliai gali būti naudojami aptikti platų biologinių analizių spektrą ir parodė didesnę atsaką bei sėkmę medicinos laboratorijose, maisto bioanalizėje, mikrobų detekcijoje ir kt. Lengvai, tiksliai ir realiu laiku galima nustatyti gliukozės koncentraciją organizme, mikrobų invaziją į organizmą ir maistą, sunkiųjų metalų aptikimą dirvožemyje, vandenyje ir ore plintančių mikrobų, pesticidus vandenyje ir dirvožemyje bei įvairių kenksmingų cheminių medžiagų aptikimą, naudojant įvairių tipų biojutiklius su nedidelėmis modifikacijomis (Ali et al., 2017).

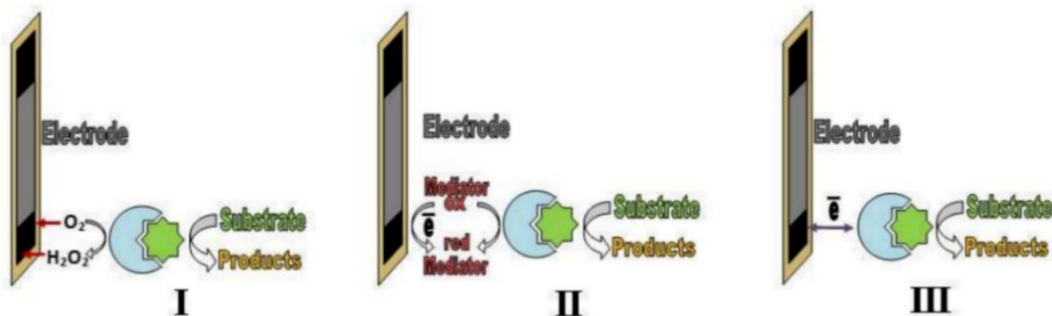
Biojutiklio schema yra pateikta 1.4 paveiksle. Jutiklis turi specifinę reaguojančią vietą, kuri gali reaguoti į tam tikros rūšies analitę terpėje. Analitė / dirgiklis sukelia cheminę sąveiką, kuri inicijuoja informacijos pavertimą elektriniu signalu. Tada elektrinis signalas perduodamas kitam įrenginiui, apdorojimo blokui, kuris toliau įvykdo aptikimo atsaką. Techniškai jutiklis susideda iš dviejų dalių, t.y. receptoriaus ir keitiklio. Receptorius priima fizinį / cheminį dirgiklį ir paverčia šią informaciją elektros energijos pavidalu, o keitiklis šią energiją paverčia vertingu analitiniu signalu, kurį galima toliau analizuoti ir pateikti elektronine forma.



1.4 pav. Schema, vaizduojanti įvairius jutikliuose vykstančius procesus. 1) analitė jungiasi prie receptorių 2) cheminė sąveika tarp analitės generuoja elektrinį signalą 3) Keitiklis perduoda elektrinį signalą į procesorių (Ali et al., 2017)

Signalų formavimo procesas fermentų biojutikliuose, apima vieną ar kelias substrato (analitės) katalizines transformacijas. Biojutikliai skirstomi į kelias kartas (1.5 pav.). Pirmosios kartos fermentų biojutikliuose (1.5 pav. I) katalizinės sąveikos produktas patenka į elektrocheminę signalo formavimo reakciją. Pirmosios kartos biojutikliuose sistemos naudoja deguonį kaip elektronų akceptorį, nustatydamos gliukozės koncentraciją pagal deguonies suvartojimą arba vandenilio peroksido išsiskyrimą. Antroje kartoje signalo formavimo procesas apima fermentinės reakcijos produkto sąveiką su mediatoriumi (1.5 pav. II), o analitinis signalas susidaro dėl elektronų mainų tarp tarpininko ir keitiklio. Antrosios kartos biojutikliuose fermentai perkelia elektronus į dirbtinius elektronų akceptorius (taip pat vadinamus elektronų tarpininkais arba redokso dažais) vietoj deguonies, kad būtų išvengta trukdžių iš kitų redokso rūšių. Sureagavę (redukuoti) dirbtiniai elektronų akceptoriai stebimi kolorimetriškai arba elektrochemiškai. Trečios kartos (1.5 pav. III) fermentų biojutikliuose analitinį signalą lemia tiesioginis elektronų perdavimas tarp keitiklio ir aktyvaus fermento centro. Trečiosios kartos biojutikliai naudoja tiesioginį elektronų perdavimą į elektrodą, taip pašalinant toksiškus dirbtinius elektronų tarpininkus ir išvengiant klaidų dėl deguonies koncentracijos pokyčių. Be trijų kartų, biosensorių sistemos toliau skirstomos į kategorijas pagal naudojamo fermento tipą, kurių

individualios savybės labai skiriasi pagal kelis skirtingus kriterijus: reakciją į substratus, elektronų akceptorių prieinamumą, nebaltyminio kofaktoriaus komponentą (pirminis elektronų akceptorius), baltymo struktūrą (nuo pirminės iki ketvirtinės), glikozilinimo buvimą ar nebuvimą, taip pat mikroorganizmo šeimnininką, skirtą natūraliai arba rekombinantinei fermento gamybai (Ferri et al., 2011; Kozitsina et al., 2018).



1.5 pav. Pirmos (I), antros (II) ir trečios (III) kartos fermentų biojutikliai (Kozitsina et al., 2018)

1.3. Grafenas

Dėl puikių mechaninių, elektrinių, šiluminių ir barjerinių savybių grafeno pagrindu pagaminti nanokompozitai pastarąjį dešimtmetį buvo aktyviai tyrinėjama sritis. Dėl paprastos sintezės „iš viršaus į apačią“ (angl. *top-down*) grafeno oksidas (GO) ir redukuotas grafeno oksidas (rGO) atvėrė naujas galimybes tirti dujų barjerą, membranos atskyrimą ir dirgiklio-atsako savybes nanokompozituose.

Grafenas yra atomiškai plonas, dvimatis (2D) sp^2 anglies atomų lakštas korio struktūroje. Įrodyta, kad jis turi daug pageidaujamų savybių, tokių kaip didelis mechaninis stiprumas, elektrinis laidumas, molekulinės barjerinės savybės. Dėl šių priežasčių daugybės mokslinių tyrimų tikslas buvo įtraukti grafeną į polimerus, kad būtų sukurti polimerų pagrindu pagaminti nanokompozitai. Tačiau neoksiduoto grafeno (angl. *pristine graphene*) naudojimas pasirodė sudėtingas dėl sudėtingos sintezės „iš apačios į viršų“, blogo tirpumo ir aglomeracijos tirpale dėl Van der Valso sąveikos. Kaip alternatyva, junginiai, savo struktūra panašūs į grafeną, gali būti sintetinami iš grafito ar kitų anglies šaltinių „iš viršaus į apačią“ metodu, bandant pasiekti daugelį neoksiduoto grafeno pranašumų, kartu prisotinant paviršių funkcionalizuotomis deguonies grupėmis. Dėl grafito oksidacijos protonizuotuose tirpikliuose susidaro grafito oksidas, kurį sudaro keli grafeno oksido (GO) sluoksniai (Smith et al., 2019).

1.3.1. Grafeno oksidas

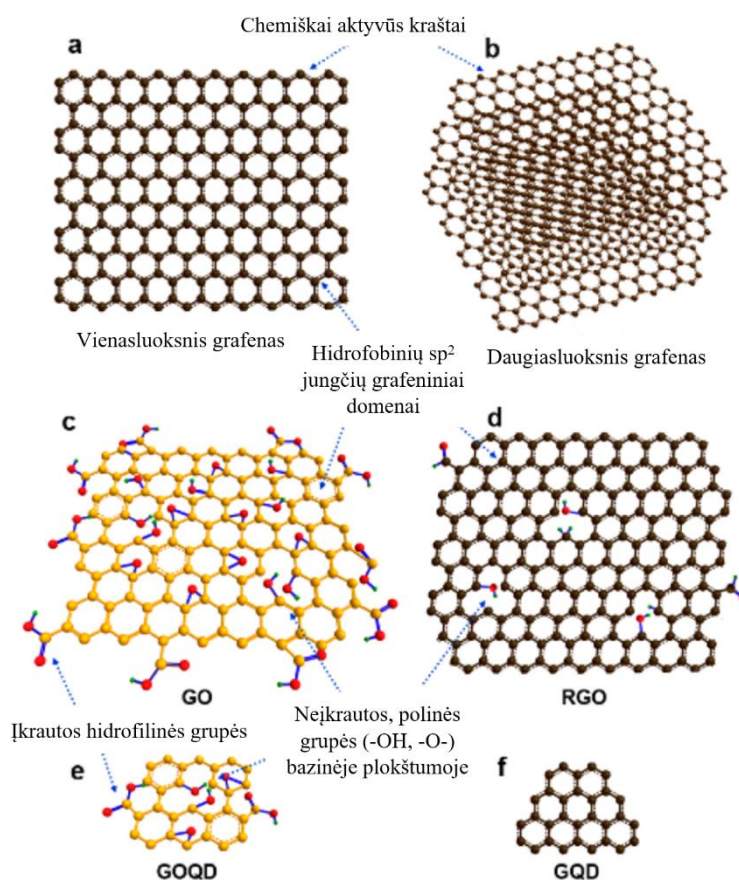
GO turi panašią šešiakampę anglies struktūrą kaip grafeno, bet jame taip pat yra hidroksilo (–OH), alkoksi (C–O–C), karbonilo (C=O), karboksirūgšties (–COOH) ir kitų funkcinių grupių, turinčių deguonį. Be sintezės paprastumo, šios deguonies prisotintos grupės yra atsakingos už daugybę pranašumų, lyginant su grafenu, įskaitant didesnę tirpumą ir paviršiaus funkcionalizavimo galimybę, o tai suteikė daug galimybių naudoti GO nanokompozitinėse medžiagose. Be to, GO gali būti apdorojamas daugeliu metodų, skirtų redukuoto grafeno oksido (rGO) sintezei, siekiant sumažinti deguonies grupių skaičių ir pasiekti savybes, artimesnes neoksiduoto grafeno savybėms. Neseniai atsirado kita grafeno darinių klasė, žinoma kaip grafeno kvantiniai taškai (GQDs), kurie iš esmės yra grafeno lakštai, kurių šoninis matmuo <100 nm.

Grafeno dariniai (GO, rGO, GQDs) pasirodė esantys veiksmingi užpildai polimerinėse nanokompozitinėse medžiagose dėl idealių medžiagų savybių ir dispersiškumo polimerinėse matricose, o tai lėmė didelį jų pritaikymą. Įrodyta, kad sandarus sp^2 anglies atomų sudėjimas yra beveik tobulas barjeras dujų molekulėms, o tai įrodo grafeno darinių naudojimą pakavimo medžiagose, korozijai atspariose medžiagose ir jautrių elektroninių prietaisų apsaugai. Dėl panašių priežasčių užpildo kiekio koregavimas nanokompozituose gali būti naudojamas tam tikro dydžio molekulių selektyvumui reguliuoti, kad būtų sukurtos aukščiausios membranų technologijos. Be to, unikalios hidrofilinės, šiluminės ir elektrinės GO savybėmis gali būti panaudotos medžiagose, kurios reaguoja į dirgiklius (Pei & Cheng, 2012).

1.3.2. Grafeno sintezė

GO sintezę galima suskirstyti į dvi pagrindines kategorijas: „iš apačios į viršų“ metodus, kai neoksiduotam grafenui sukurti naudojamos paprastos anglies molekulės, ir „iš viršaus į apačią“ metodus, kai grafeno darinių sluoksniai išgaunami iš anglies šaltinio, paprastai grafito. Įrodyta, kad sintezė „iš apačios į viršų“ (pvz., cheminis nusodinimas garais, epitaksinis augimas ant silicio karbido plokštelių ir kt.) užima daug laiko ir sukelia mastelio keitimo iššūkius.

Svarstant grafeno ir jo darinių sintezę, norima struktūra ir savybės labai priklauso nuo dydžio, formos ir funkcinių grupių, pritvirtintų prie medžiagos paviršiaus. Ideali struktūra yra vieno sluoksnio grafenas, susidedantis iš vieno atomo visiškai hibridizuotos sp^2 anglies struktūros su minimaliais defektais (1.6 pav. a). Tačiau dėl labai palankaus grafeno lakštų išdėstymo buvo sukurta daugiasluoksnė grafeno struktūra (1.6 pav. b). Kaip minėta pirmiau, šių struktūrų sintezė naudojant metodą „iš apačios į viršų“ pasirodė sudėtinga pramoniniam pritaikymui. Taigi, taikant metodą „iš viršaus į apačią“, lengviau sukurti labai oksiduotą grafeno formą, GO, su sp^2 ir sp^3 anglimi, kurioje yra daug deguonies grupių (1.6 pav. c), kurias galima pašalinti redukuojant (rGO) ir sp^3 anglies, kad susidarytų labiau į grafeną „panaši“ medžiaga su gerokai pagerintomis savybėmis (1.6 pav. d). Tada ir GO, ir rGO gali būti toliau apdorojami taikant metodą „iš viršaus į apačią“, kad būtų sukurti tiek GOQD, tiek rGQD (1.6 pav. e ir f) (Cheng et al., 2017).



1.6 pav. Grafeno ir jo darinių formos: (a) vieno sluoksnio grafenas, (b) daugiasluoksnis grafenas, (c) GO, (d) rGO, (e) GOQD, (f) rGQD (Cheng et al., 2017)

1.4. Savitvarkiai monosluoksniai

Savitvarkio monosluoksnių sritis atsirado 1946 m. kai Zisman'as paskelbė monomolekulinio sluoksnio paruošimą, adsorbuojant (savaime surenkant) paviršinio aktyvumo medžiagą ant švaraus metalo paviršiaus. Tais metais šie tyrimai nebuvo pripažinti ir paskelbtas leidinys nesulaukė daug dėmesio. Vėliau tolesni tyrimai buvo pradėti Kuhn'o laboratorijoje Göttingene. Pritaikant ilgametę patirtį, naudojant chlorosilano darinį stiklui hidrofobizuoti, sekė naujesnis atradimas, kai Nuzzo ir Allara parodė, kad alkantiolių savitvarkio monosluoksnius (SAM) ant aukso paviršiaus galima paruošti adsorbuojant di-n-alkilo disulfidus iš praskiestų tirpalų. Daugelis savitvarkio monosluoksnių po jų atradimo buvo plačiai tyrinėjami, o ypač alkantiolių monosluoksniai ant aukso paviršiaus (Ulman, 1996).

Savitvarkės monomolekulinės plėvelės, sudarytos iš gana didelių, ilgos grandinės pusiau lanksčių organinių molekulių sulaukė nemažo susidomėjimo fizikoje, chemijoje ir biologijoje dėl savo sugebėjimo kontroliuoti drėkinimą, sukibimą ir koroziją ant paviršių ir sąsajų. Šios plėvelės, vadinamos savitvarkiais monosluoksniais (SAM), kurios susidaro dvimatės amfifilinių molekulių agregacijos metu ant tinkamo pagrindo (Zharnikov & Grunze, 2001).

Savitvarkiai monosluoksniai plačiai taikomi modifikuojant metalų paviršius, siekiant jiems suteikti tam tikras savybes. SAM ypatingai patrauklūs dėl tokių priežasčių:

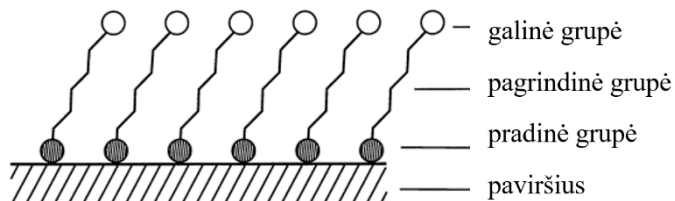
- 1) Nesudėtingas paruošimas;
- 2) Paviršiaus savybių suderinamumas keičiant molekulės struktūrą ir funkcijas;
- 3) Naudojami SAM statybiniai blokai daugelyje kompleksinių struktūrų, sujungiant pridėtinius sluoksnius ant paviršiaus (Schreiber, 2000).

SAM jau seniai pripažinti kaip esminiai „tiltai“ tarp redokso aktyvių fermentų ir kietų elektrodų paviršių, ant kurių fermentai patenka per tiesioginį elektronų perdavimą (TEP) – pavyzdžiui, fermentinio biokuro elementuose (EBFC) ir biosensoriuose. SAM turi daugybę galinių grupių, leidžiančių produktyviai fermentus adsorbuoti ir tikslius nustatymus palankioms orientacijoms ant elektrodo. Tunelinis atstumas, SAM grandinės ilgis bei kontaktuojančios galinės SAM grupės yra reikšmingiausi kontroliuojantys veiksniai atliekant TEP tipo bioelektrokatalizę. Pastaruoju metu buvo plačiai ištirtos SAM modifikuotos nanostruktūrinės elektrodo medžiagos, siekiant pagerinti ant

elektrocheminių paviršių imobilizuotų redokso aktyvių fermentų katalizinį aktyvumą ir stabilumą (Yan et al., 2020).

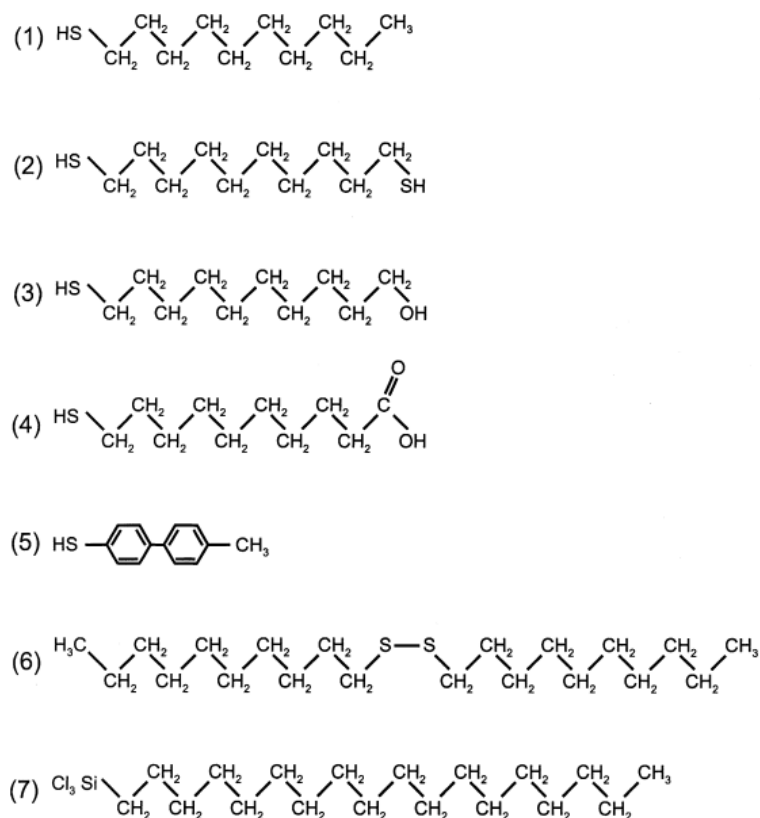
1.4.1. Struktūra

Savitvarkius monosluoksnius sudarančios molekulės pasižymi savita struktūra, kuri pavaizduota 1.7 paveiksle. Molekulės, iš kurių susiformuoja SAM, sudarytos iš paviršiui aktyvios funkcinės grupės (pradinė grupė), angliavandenilio grandinės (pagrindinė grupė) ir galinės grupės.



1.7 pav. Savitvarkio monosluoksniu struktūros schema (Schreiber, 2000)

Pradinė grupė yra gimininga paviršiui ir sąveikauja su juo. Sąveika gali būti fizinė arba cheminė. Tiolių atveju susidaro metalo ir sieros ryšys, kuris stabilizuoja paviršiaus atomus ir keičia elektrines savybes. Svarbu tai, kad metalo ir sieros ryšį sudaro ne tik tioliai, bet ir disulfidai, sulfidai, ditioliai ir kt. Pagrindinė grupė – tai angliavandenilio grandinė, kurios ilgis gali būti nuo kelių iki keliolikos anglies atomų. Dėl angliavandenilinės grandinės veikiančių sąveikų ši grupė lemia monosluoksniu savitvarką, taip pat veikia kaip fizinis barjeras tarp paviršiaus ir funkcinės grupės arba terpės komponentų. Priklausomai nuo angliavandenilinių grandinių ilgio ir sudėties, galima keisti optines savybes ir elektrinį laidumą. Galinė, funkcinė grupė, sąveikauja su aplinka ir lemia SAM funkcines savybes. Keičiant funkcinę grupę galima keisti savitvarkio monosluoksniu paskirtį ir paviršiui suteikti norimas savybes. Funkcinės grupės gali būti tokios: CH_3 , CF_3 , Cl , Br , CN , OH , NH_2 , SO_3H , COOH , taip pat įvairaus tipo aromatiniai žiedai (Jin et al., 1999; Schreiber, 2000). SAM formavimui naudojamos kelios sistemos. Apibūdinamasis bruožas yra chemisorbuojančios molekulės ir substrato grupės „pora“ (o likusią molekulės dalį galima beveik laisvai pasirinkti), ši „chemisorbcijos pora“ naudojama klasifikuojant konkrečią sistemą. Tikriausiai populiariausia SAM sistema yra tioliniai junginiai ant aukso (111). Kitas populiarus pavyzdys yra organinio silicio (angl. *organosilicon*) monosluoksniai ant hidroksilintų paviršių. Kai kurie dažniausiai naudojami SAM junginiai pavaizduoti 1.8 pav.



1.8 pav. Keletas dažniausiai naudojamų SAM junginių pavyzdžių (1) n-alkantiolis: $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{n-1}-\text{CH}_3$; (2) α,ω -alkanditolis: $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{SH}$; (3) ω -merkaptalkanolis: $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$; (4) ω -merkaptalkano karboksirūgštis: $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{n-1}-\text{COOH}$ (5) 4-metil-4' -merkaptobifenilas (MMB): $\text{HS}-(\text{C}_6\text{H}_4)_2-\text{CH}_3$; (6) 1,1' -dialkil-disulfidas: $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{n-1}-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_{n-1}-\text{CH}_3$; 7) alkiltrichlorsilanas: $\text{Cl}_3\text{Si}-(\text{CH}_2)_{n-1}-\text{CH}_3$ (paveikslėlyje pavaizduotas oktadeciltrichlorsilanas (OTS): $\text{Cl}_3\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$ (Schreiber, 2000)

1.4.2. Tiolių formuojami SAM

Savitvarkiai monosluoksniai (SAM) yra plačiai tiriami ant įvairių metalų, tokių kaip auksas ir sidabras. Stabilų monosluoksnį galima sukurti mirkant substratą tirpale, kuriame yra molekulės su tiolio grupe. Tiolio molekulių savaiminis susidarymas ant metalinių paviršių atsiranda dėl cheminio ryšio tarp substrato atomų ir alkantiolių sieros atomų ir hidrofobinės sąveikos tarp alkilo grandinių (Uosaki, 2009). Alkantiolio molekulės sukuria nanometrinį monosluoksnį. SAM privalumai, tokie kaip geros izoliacinės savybės, didelis tvarkingumas, išskirtinis stabilumas, fizinių ir cheminių savybių suderinamumas ir papildomos savybės sukėlė platų pritaikymą jutiklių, katalizės, saulės elementų, elektro-analitinių prietaisų srityse (Price et al., 2006).

Labiausiai ištirtas SAM tipas yra alkantioliai ant aukso (Ganesh & Muthurasu, 2012). Galinė molekulių grupė, sukurianti SAM, suteikia didelę įvairovę specialiųjų funkcijų. SAM funkcionalumas labai priklauso nuo SAM tvarkos ir tankio defekto. Elektroninės SAM savybės labai priklauso nuo molekulinės orientacijos, adsorbcijos sąlygų ir tarpmolekulinės sąveikos (Uosaki, 2009). Susidarymo proceso ir tiolio SAM tyrimas atliekamas skirtingais metodais, pvz. infraraudonųjų spindulių spektroskopija (IR), kvarco kristalų mikrosvarstyklėmis (QCM) ir skenuojančia tuneline mikroskopija (STM). Tioliai išsidėsto juostinėje struktūroje, kai tiolio molekulės turi mažą paviršiaus padengimą. STM matavimas atskleidė tam tikrą SAM defektą, pvz. trūkumą duobių ir eilučių (angl. *missing pits and rows*) Sumi ir kt. (Sumi et al., 2003) nustatė, kad duobių tankis labai priklauso nuo tirpiklio ir temperatūros. Schneider ir kt. (Schneider & Buttry, 1993) tyrė alkantiolio adsorbcijos kinetiką naudojant specifinį elektrolito tirpiklį. Jų darbas parodė, kad adsorbcijos kinetika labai priklauso nuo tirpiklio. Dong Ho Kim ir kt. (Kim et al., 2001) ištyrė oktaedekantiolio monosluoksnių, turinčių skirtingus tirpiklius ir koncentracijas, adsorbcijos proceso tendencijas, naudojant QCM. Kang ir kiti (Kang & Noh, 2013) tyrė elektrocheminį funkcionavimą ir ciklinių SAM paviršių struktūrą Au paviršiuje cikline voltamperija (CV) ir STM. Jie pastebėjo, kad esminis parametras yra sąveika tarp substrato nustatant struktūrinę SAM tvarką ar netvarką Au paviršiuje.

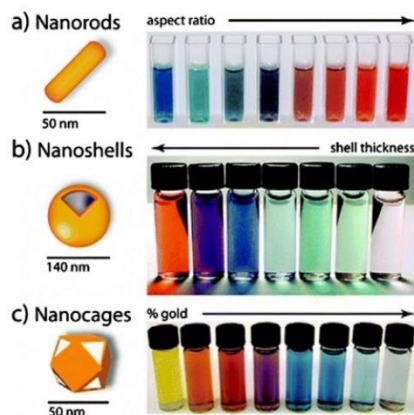
1.5. Bioelektrocheminiai procesai

Elektronų pernašos (EP) reakcijos tarp elektrodo paviršiaus ir oksidoreduktazės aktyviojo centro yra viena iš svarbiausių bioelektrokatalizės temų (Hitaishi et al., 2018; Tang et al., 2020). Sistema, kai oksidoreduktazės, kurios yra imobilizuotos ant elektrodo paviršiaus ir katalizuoja substrato oksidaciją (pvz., gliukozės dehidrogenazė, fruktozės dehidrogenazė) yra vadinama bioanodu, o sistema, kuri vykdo redukcijos reakciją (pvz., lakazės katalizuojama molekulinio deguonies redukcija iki vandens) – biokatodu. Sujungus tarpusavyje biokatodą su bioanodu yra gaunamas fermentinis biokuro elementas (EBFC), kuris generuoja bioenergiją (Schulz et al., 2016). Bioelektrocheminiai EP procesai skirstomi į tiesioginius EP (TEP) ir mediatorinius EP (MEP). MEP tipo sistemoje naudojami tarpiniai redokso aktyvūs junginiai, kurie perneša elektronus tarp elektrodo paviršiaus ir oksidoreduktazės aktyviojo centro, ypač jei fermento aktyvusis centras (-ai) yra pasislėpęs giliai baltymų struktūroje. TEP tipo sistemose oksidoreduktazės gali tiesiogiai kontaktuoti su elektrodo paviršiumi, jei redokso kofaktoriai / centrai yra arti elektrodo paviršiaus (paprastai mažiau nei 2 nm). Taigi TEP yra paprastesnis mechanizmas, pašalinantis redokso tarpininkų poreikį (Xiao et al., 2019).

Srovės tankį ir fermentų apkrovą galima skatinti naudojant nanostruktūrines medžiagas (Bollella, 2020). Tarp jų, metalinės nanomedžiagos, pasižyminčios puikiu elektroniniu laidumu ir dideliu paviršiaus plotu, turėdamos potencialą pagerinti redoksinių fermentų katalizinį atsaką ir stabilumą. Nanoporinis auksas, paruoštas iš nelegiruojančių Au lydinių arba elektrodepozicijos, turintis trimatę porėtą struktūrą ir santykinai vienodą porų dydį yra ypač tinkamas fermentų imobilizavimui per TEP. Be to, aukso nanodalelės (AuNPs), turinčios sferinę nanostruktūrą ir didelį paviršiaus plotą, buvo plačiai ištirtos bioelektrokatalizės metu. SAM ir nanostruktūrinio aukso derinys suteikia naujų galimybių bioelektrochemijoje ir yra plačiai tyrinėjamas (Siepenkoetter et al., 2017).

1.6. Nanodalelės ir jų charakteristika

Nanodalelės (NPs) yra mažos medžiagos, kurių dydis svyruoja nuo 1 iki 100 nm. Jos gali būti skirstomos į skirtingas klases pagal jų savybes, formas ar dydžius. Skirtingos grupės apima fulerenus, metalines NPs, keramikines NPs ir polimerines NPs. NPs turi unikalių fizinių ir cheminių savybių dėl didelio paviršiaus ploto ir mažo dydžio. Jų optinės savybės priklauso nuo dydžio, kuris suteikia skirtingas spalvas dėl absorbcijos matomoje spektrinėje srityje. Jų reaktyvumas, kietumas ir kitos savybės taip pat priklauso nuo jų unikalaus dydžio, formos ir struktūros. Dėl šių savybių jos yra pritaikomos įvairioms komercinėms ir buitinėms reikmėms, įskaitant katalizę, vaizdinimą, medicinos pritaikymus, energiją pagrįstus tyrimus ir aplinkosaugos pritaikymus. Buvo išsiaiškinta, kad NDs dydis gali turėti įtakos fizikinėms ir cheminėms medžiagos savybėms, pvz. optinėms savybėms. 20 nm aukso (Au), platinos (Pt), sidabro (Ag) ir paladžio (Pd) NPs turi būdingą vyno raudonumo spalvą, atitinkamai gelsvai pilką, juodą ir tamsiai juodą spalvas. 1.9 pav. parodytas šios iliustracijos pavyzdys, kuriame pavaizduotos skirtingų dydžių Au NPs. Šios NPs pasižymėjo būdingomis spalvomis ir savybėmis, kurios priklauso nuo dydžio ir formos. Kaip pavaizduota 1.9 pav. tirpalo spalva keičiasi dėl kraštinių santykio, nanoapvalkalo storio ir procentinės aukso koncentracijos. NPs nėra paprastos molekulės, todėl susideda iš trijų sluoksnių, t.y. (a) paviršinio sluoksnio, kuris gali būti funkcionalizuotas įvairiomis mažomis molekulėmis, metalo jonais, aktyviosiomis paviršiaus medžiagomis ir polimerais, (b) apvalkalo sluoksnio, kuris chemiškai skiriasi nuo šerdies visais aspektais, ir (c) šerdies, kuri iš esmės yra centrinė NPs dalis ir paprastai nurodo pačias NPs (Khan et al., 2019).



1.9 pav. Au NDs spalvų priklausomybė nuo dydžio ir formos (Khan et al., 2019)

Nanodalelių dydį galima kontroliuoti keičiant sintezės sąlygas tokias kaip temperatūra, pH, medžiagų koncentracijas, tirpalo joninę jėgą, naudojamus medžiagas. Susintetintas nanodaleles reikia valyti, padengti įvairiais sluoksniais, užtikrinančiais jų stabilumą bei tirpumą vandeninėje terpėje, prikabinti biologiškai aktyvias molekules.

Magnetinės nanodalelės gali būti dengiamos neorganinių molekulių (aukso, grafito silanų) sluoksniais. Tokios nanodaleles sudarytos iš magnetinės šerdies ir neorganinio dangalo. Šios dangos ne tik padidina magnetinių nanodalelių stabilumą pačiame pH intervale, bet ir pasitarnauja toliau modifikuojant nanodalelių paviršių (prie aukso jungiant molekules per tiolines (SH) grupes), kuris būtinas norint užtikrinti nanodalelių stabilumą, tirpumą, bei biosuderinamumą (Karabanovas, 2016).

1.6.1. Aukso nanodalelės

Aukso nanodalelės (AuND) yra plačiai naudojamos dėl savo išskirtinių savybių: inertiškumo, biologinio suderinamumo ir ypač dėl mažo toksiškumo. Ypač (AuND) vaidina svarbų vaidmenį kuriant biojutiklius dėl didelio specifinio ploto, gero laidumo, katalizinių savybių ir mažų matmenų. Jos gali būti gaminamas dideliu mastu redukuojant Au^{+1} arba Au^{+3} iki Au^0 , pridedant redukuojančio agento. Didesnė redukuojančio agento koncentracija lemia tai, kad bus susintetintos mažesnio dydžio AuND. AuND yra labai mažos, palyginti su šviesos bangos ilgiais, sugeria šviesą mėlynai žalioje spektro dalyje (~ 450 nm) ir atspindi raudoną šviesą (~ 700 nm), kas lemia sodrią raudoną spalvą (rubino aukso). Nanodalelių konfigūracija apima tokias, kuriose yra pagrindinės organinės molekulės (pvz., liposomos, DNR, riebalų rūgštys, virusai ir micelės), neorganinės molekulės (pvz., geležies oksido, aukso ir anglies nanovamzdeliai) arba hibridai, kuriuose yra du ar daugiau šių elementų. AuND taip pat geba sudaryti disulfidinius tiltelius (su cisteino aminorūgšties šoninės grupės

liekanomis). Tarp AuND ir prijungtų biologiškai aktyvių molekulių vyksta įvairios žinomos sąveikos jėgos: hidrofobinė, elektrostatinė, Van der Valso ir kt. (Hammami et al., 2021).

2. Metodai ir medžiagos

2.1. Tyrimo metu naudotos medžiagos

Fermentai:

Gliukozės dehidrogenazė (GDH) išskirta iš *Acinetobacter calcoaceticus* (500 U/mg) ir ištirpinta 50 mM TRIS buferiniame tirpale su 100 mM KCl ir 5 mM CaCl₂ (pH 7,2).

Reagentai:

Angliavandeniai: D-(+)-gliukozė, D-(+)-galaktozė, D-(+)-maltozė, D-(+)-laktozė, D-(-)-ribozė, D-(+)-ksilozė, D-(+)-celobiozė, D-(-)-arabinozė („Sigma Aldrich“, Vokietija).

Kalcio chloridas („Lachema“, Čekijos Respublika), natrio hidroksidas, kalio hidroksidas („J. T. Baker“, Nyderlandai), Tris („Carl Roth GmbH + Co“, Vokietija), kalio chloridas („Riedel – de Haen“, Vokietija), vandenilio chloridas („Sigma Aldrich“, Vokietija), 2,6-dichlorfenolio-indofenolis („Merck“, Vokietija), fenazino metosulfatas („Ferak“, Vokietija), 4-merkaptobenzoinė rūgštis („Sigma Aldrich“, Vokietija), 4-aminotiofenolis („Sigma Aldrich“, Vokietija), 6-merkaptio-1-heksanolis („Sigma Aldrich“, Vokietija), koncentruota sieros rūgštis (95%) („AppliChem“, Vokietija), Etanolis (96%) („Sigma-Aldrich“, Vokietija), Aukso (III) chlorido trihidratas („Sigma Aldrich“, Vokietija), natrio citrato dihidratas („Sigma Aldrich“, Vokietija).

Grafeno oksidas, modifikuotas malachito žaliuoju, gautas iš VU Chemijos ir geomokslų fakulteto, susintetintas dr. Justinos Gaidukevič.

2.1.1. Tirpalai

Buferiniams tirpalams ruošti naudotas dejonizuotas vanduo. Nustatyti tirpalų pH naudotas pH-metras „EC-31 pH“ („PHOENIX Instrument“, JAV). Ruošiant buferinius tirpalus, norimas pH gaunamas, pridėdant reikiamą tūrį koncentruotų NaOH arba HCl tirpalų.

Buferiniai tirpalai:

50 mM Tris buferinis tirpalas, turintis 5 mM CaCl_2 ir 100 mM KCl, pH 7,2; 50 mM fosfatinis buferinis tirpalas, skirtingų pH (6,2; 6,7; 7,2; 7,7; 8,2) su 100 mM KCl ir skirtingos fosfato jonų koncentracijos buferinis tirpalas (20, 30, 50, 100 mM), turintis 100 mM KCl, pH 7,2.

Kiti tirpalai:

1 mM 4-merkaptobenzoinė rūgštis, 1 mM 4-aminotiofenolis, 1 mM 6-merkaptio-1-heksanolis, 100 mM gliukozė, 100 mM galaktozė, 100 mM maltozė, 100 mM laktozė, 100 mM ribozė, 100 mM ksilozė, 100 mM celobiozė, 100 mM arabinozė.

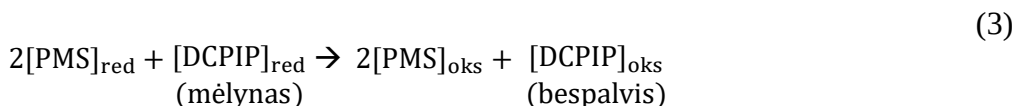
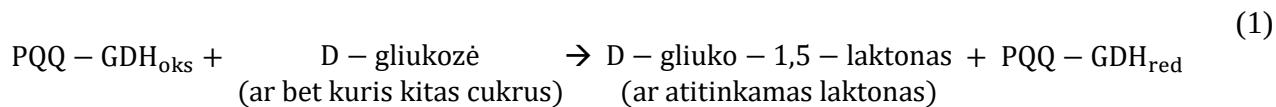
Naudoti redokso dažų 35 μM 2,6-dichlorfenolio-indofenolio (DCPIP) ir 60 μM fenazino metosulfato (PMS) tirpalai dejonizuotame vandenyje.

2.2. Aparatūra

Spektrofotometras „The Evolution™ 300 UV-Visible“ („Thermo Electron Corporation“, JAV); svarstyklės „KERN ABJ-NM/ABS-N“ („KERN & Sohn“, Vokietija); mikropipetės, „Eppendorf“ (Vokietija), termostatas-maišyklė „RCT basic ETS-D5“ („IKA-Werke“ GmbH & Co. KG, Vokietija), ultragarsinis disintegratorius (VCX 130PB, SONYCS Vibra cell, JAV); purtyklė, centrifūga „Eppendorf Centrifuge 5418“ („Sigma Aldrich“, Vokietija).

2.3. Spektrofotometrinis fermentinio aktyvumo nustatymas

Absorbcijos spektrai buvo gauti naudojant kompiuteriu valdomą „Nicolet evolution 300“ („Thermo electron Corporation“, JAV) UV-Vis spektrofotometrą. Natyvos PQQ-GDH aktyvumas nustatomas spektrofotometriškai 2 ml kvarcinėje kiuvetėje 25 °C temperatūroje naudojant 50 mM Tris buferinį tirpalą su 100 mM KCl ir 5 mM CaCl_2 (pH 7,2). Įvairūs cukrūs buvo naudojami kaip elektronų donorai gliukozės dehidrogenazės aktyvumui nustatyti ir 5-metilfenazinio metilsulfato (PMS) ir 2,6-dichlorfenolio indofenolio (DCPIP) mišinys kaip elektronų akceptorius, kur DCPIP yra galutinis elektronų akceptorius ir jo redukcijos reakcija buvo matuojamas prie 600 nm (reakcijos schema pateikta žemiau). Reakcijos mišinio tirpalą sudarė 50 mM TRIS (pH 7,2), 35 μM DCPIP, 60 μM PMS, skirtingos (1-12 mM) cukrų koncentracijos ir atitinkamas kiekis natyvaus fermento.



Spektrofotometrinių matavimų metu fiksuojama optinio tankio kitimas laike, bet panaudojus Beer–Lambert dėsnį (4), kur A yra optinis tankis, c – koncentracija, d – optinis kelias, ε – molinės ekstincijos koeficientas, optinio tankio kitimą laike galima perskaičiuoti į koncentracijos kitimą laike. Substrato koncentracijos kitimo laike grafikui išvedama liestinė, einanti per koordinatų pradžios tašką. Pradinis reakcijos greitis nustatomas iš tiesės posvyrio kampo ir išreiškiamas substrato koncentracijos pokyčiu per laiko vienetą.

$$A = \varepsilon cd \quad (4)$$

Vėliau elektrodai buvo pamerkiami į 1 mM 4-merkaptobenzoinės rūgšties, 1 mM 4-aminotiofenolio ir 1 mM 6-merkaptio-1-heksanolio tirpalus 1 valandai, mėgintuvėlius su įmerktais elektrodais sandariai užsukus plėvele. Nuplovus elektrodus dejonizuotu vandeniu ant jų paviršiaus buvo uždėta po 5 µL paruošto tirpalo, kurį sudarė 2 µl gliukozės dehidrogenazės fermentas ir 0,05 M 3 µl kalio fosfatinis buferinis tirpalas, tuomet 1 val. inkubuojama po gaubtu (neleidžiant išdžiūti) +4 °C temperatūroje. Po to buvo atlikti elektrocheminiai matavimai.

2.4. Aukso nanodalelių sintezė ir charakterizavimas

Auksinės nanodalelės (AuNP) buvo susintetintos naudojant $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ir trinitratą pagal Turkevich sintezę (Kimling et al., 2006). Kolba plaunama „aqua regia“ tirpalu (1 HNO_3 : 3 HCl). Rūgščių mišiniu pripildoma bent $\frac{3}{4}$ kolbos, padedama ant maišyklės ir maišant paliekama apie 10 min. Tuomet „aqua regia“ išpilamas atgal į saugojimo indą, kolbą kruopščiai išplaunama dejonizuotu vandeniu (skalaujama bent 10 kartų). Į švarią kolbą pripilama 50 ml dejonizuoto vandens. Maišant vanduo užkaitinamas. Užvirus pridedama 4,7 ml 1 % natrio citrato tirpalo. Vėl palaukiama užvirimo. Pridedama 1 μM 40 μL HAuCl_4 tirpalo. 15 min. virinama maišant, tada maišyklė išjungžiama ir 15 min virinama be maišymo. Kolba nuimama nuo kaitinimo lentelės ir leidžiama atvėsti tol, kol

kolbą įmanoma laikyti rankoje. Po to paruoštas tirpalas išpilstomas į 2 ml eppendorf mėgintuvėlius ir centrifuguojama 30 min 7000 rpm greičiu. Nanodalelių dydis ir koncentracija buvo nustatyta pagal metodiką aprašytą W. Haiss straipsnyje (Haiss et al., 2007). Nustatyta, kad AuND dydis 14 nM, o koncentracija 0,24 μ M.

2.5. Chronoamperometrija

Chronoamperometrija yra viena iš paprasčiausių ir dažniausiai naudojamų voltamperinių metodų. Tai yra nuo laiko priklausanti technika, kai darbiniam elektrodui pritaikomas pastovus potencialas ir registruojama srovės pokytis laike (Martins et al., 2003). Chronoamperometriniai matavimai buvo naudoti su imobilizuota PQQ-GDH.

Matavimai buvo atliekami 1 ml tūrio elektrocheminėje celėje, prie 25 °C temperatūros, pastoviai maišant. Matavimams naudota 3 elektrodų schema – Ag/AgCl palyginamasis elektrodas, titano plokštele, kaip pagalbinis elektrodas ir modifikuotas anglinis arba auksinis elektrodas. Matavimai atlikti 50 mM Tris buferiniame tirpale su 100 mM KCl ir 5 mM CaCl_2 , kai pridedama atitinkama cukraus koncentracija ir fiksuojamas srovės pokytis. Matavimai atlikti prie 0,4 V vs. Ag/AgCl.

2.6. Ciklinė voltamperometrija

Ciklinė voltamperometrija (CV), tai elektrocheminis analizės metodas, pagrįstas tekančios per celę srovės stiprio matavimu priklausomai nuo keičiamo potencialo. Atliekant CV matavimų metu darbinio elektrodo potencialas kinta laike tiesiškai – pradžioje didinamas, kol pasiekiamas nustatyta potencialo reikšmė, o tada tiesiškai mažinamas, kol pasiekiamas pradinė potencialo reikšmė (galimas ir atvirkščias potencialo keitimo variantas).

Šio darbo metu CV matavimams naudota 20 mL elektrocheminė celė, matavimai atlikti esant 25 °C temperatūrai. CV matavimai naudoti elektrodų valymui. Prieš eksperimentus auksiniai darbiniai elektrodai buvo poliruojami aliuminio oksido suspensija (0.3 μ m dalelėmis), plaunami dejonizuotu vandeniu ir sonifikuoti dejonizuotame vandenyje 8 min, po to dar kartą gerai nuskalaujami dejonizuotu vandeniu. Vėliau elektrodų paviršius buvo valomas elektrochemiškai ciklinės voltamperometrijos būdu, panaudojant elektrocheminę sistemą „PARSTAT 2273“ ir trijų elektrodų sistemą – pagalbinis Pt elektrodas, (BASI, JAV), palyginamasis Ag/AgCl (PalmSens,

Vokietija) ir darbinis auksinis elektrodas (PalmSens, Vokietija). Elektrocheminis valymas buvo atliekamas 0,05 M KOH tirpale, skleidžiant potencialą nuo 0,0 V iki -2,4 V 30 kartų, 300 mVs⁻¹ greičiu. Valymas ciklinės voltamperometrijos būdu buvo atliekamas 0,5 M H₂SO₄ vandeniniame tirpale, skleidžiant potencialą nuo -0,2 V iki 1,75 V 30 kartų, 300 mVs⁻¹ greičiu iki kol voltamperogramoje bus gaunamos atsikartojančios aukso oksido smailės. Po to ant elektrodų paviršiaus buvo uždėta 2 µl paruošto AuND tirpalo, palaukus kol gerai išdžius (15-20 min.) buvo atliktas ciklinės voltamperometrijos valymas ir elektrodai kruopščiai nuplauti dejonizuotu vandeniu.

2.7. Elektrodai ir jų paruošimas

Auksiniai elektrodai padengti AuND modifikuojami tioliniu monosluoksniu juos pamerkiant į 1 mM tiolių (1 mM 4-merkaptobenzoinė rūgštis, 1 mM 4-aminotiofenolis, 1 mM 6-merkaptio-1-heksanolis) etanolinį tirpalą ir paliekant per naktį kambario temperatūroje. Po to elektrodas kruopščiai nuplaunamas ir ant paviršiaus uždedama 5 µl PQQ-GDH tirpalo, uždengiamas stikliniu gaubtu ir laikomas 3 h 4 °C temperatūroje, neleidžiant elektrodai išdžiūti. Po 3 h elektrodas nuplaunamas dejonizuotu vandeniu ir atliekami chronoamperometriniai matavimai.

Elektrodai su modifikuotu grefeno oksidu buvo ruošiami – sumaišant 10 µl modifikuoto grafeno oksido (10 mg/ml) su 2 µl BSA (1 % tirpalas), 2 µl glutaraldehido (2.5 % tirpalas), 5 µl PQQ-GDH tirpalo. Visas mišinys dedamas ant grafitinio elektrodo ir išdžiovinamas. Prieš elektrocheminius matavimus ant elektrodo dedama dializinė membrana ir užtvirtinama guminiu žiedeliu (membrana dedama, nes grafeno oksidas nesilaiko ant elektrodo paviršiaus).

2.8. Fermentų reakcijų kinetiniai skaičiavimai

Fermentinės reakcijos metu susidaro pusiausvyra tarp laisvojo fermento (E), fermento-substrato (ES) ir fermento-produkto (EP) kompleksų. Reakcijos produktų susidarymo schema, suyrant ES kompleksui (5).

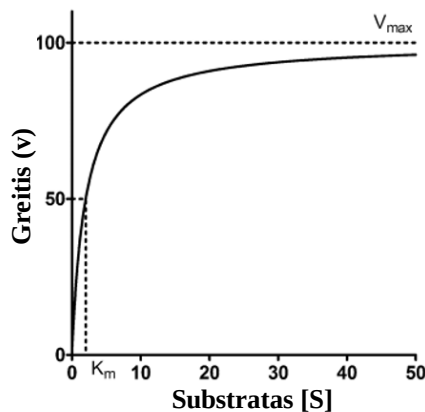


Pirma grįžtamoji šios reakcijos stadija yra pakankamai greita, todėl ją galima aprašyti pusiausvyros konstanta $K_s = [E][S]/[ES]$, čia [ES] – tarpinio fermento-substrato komplekso koncentracija. Antroji reakcijos stadija $ES \xrightarrow{k_{+2}} E + P$ yra paprasta pirmojo laipsnio reakcija, kurios greičio konstanta yra k_{+2} .

Nuostoviosios būsenos sąlygomis fermento-substrato komplekso koncentracija nekinta, reakcijos greitis lygus:

$$v = V_{\max}[S]/(K_m+[S]) \quad (6)$$

Lygtis yra vadinama Michaelio-Menten lygtimi. Lygtyje K_m vadinama Michaelio konstanta, kuri lygi $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$, o $V_{\max}$ yra maksimalus reakcijos greitis, kuris lygus $k_{+2}[E]_0$. Michaelio-Menten lygtimi galima aprašyti daugumos fermentinių reakcijų mechanizmą, tačiau tuomet konstantų K_m ir $V_{\max}$ matematinės išraiškos yra sudėtingesnės. $V_{\max}$ nėra pagrindinė konstanta, nes jos skaitinė vertė priklauso nuo fermento koncentracijos. Jeigu fermento koncentracija žinoma, tuomet k_{+2} greičio konstanta yra lygi reakcijos katalizinei greičio konstantai $(k_{\text{kat}}) \cdot k_{\text{kat}} = V_{\max}/[E]_0$. Michaelio-Menten lygtis nusako pradinio fermentinės reakcijos greičio priklausomybę nuo substrato koncentracijos (2.1 pav.) (Markuckas, 2008).



2.1 pav. Michaelio-Menten kinetikos pavyzdys. Pradinio greičio (v) priklausomybė nuo substrato koncentracijos [S] (Seibert & Tracy, 2014)

Pradinio fermentinės reakcijos greičio priklausomybė nuo substrato koncentracijos aprašoma lygiašonės hiperbolės lygtimi. Lygiašonės hiperbolės asimptotės yra $[S] = -K_m$ ir $v = V_{\max}$. Kai fermentinėje reakcijoje substrato koncentracija yra maža, tuomet pradinis reakcijos greitis yra tiesiog proporcingas substrato koncentracijai ir $v \approx V_{\max}[S]/K_m$. Tokia fermentinė reakcija yra pirmojo laipsnio ir $V_{\max}/K_m$ yra šios reakcijos greičio konstanta. Kai $[S] = K_m$, tuomet $v = 0,5 \cdot V_{\max}$. Didinant substrato koncentraciją, v skaitinė vertė artėja prie $V_{\max}$ ir reakcija tampa nulinio laipsnio. Tuomet fermento molekulės yra įsotintos substratu. Iš tiesų v artėja prie $V_{\max}$ labai lėtai. $V_{\max}$ galima apskaičiuoti matuojant reakcijos greitį, esant mažoms substrato koncentracijoms (Markuckas, 2008).

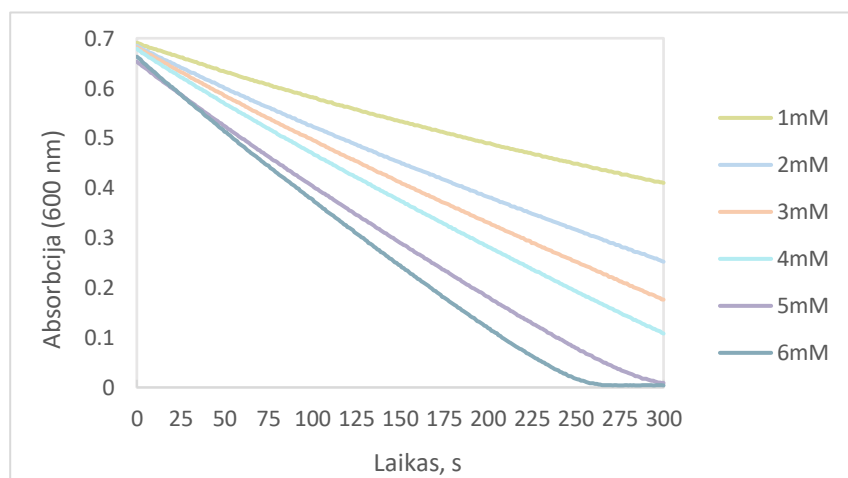
Naudojant spektrofotometrinių matavimų duomenys buvo naudota standartinė Michaelio-Menten lygtis (6), o elektrocheminiams matavimams buvo adaptuota lygtis (Ivanauskas et al., 2008):

$$I = I_{\max}[S]/(K_m+[S]) \quad (7)$$

3. Rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Natyvos PQQ-GDH specifiskumas įvairiems substratams

Iš pradžių buvo bandama charakterizuoti neimobilizuotą fermentą, o vėlesniuose tyrimų etapuose lyginti specifiskumo pokyčius fermentą imobilizavus. Gliukozės dehidrogenazės K_m ir $V_{\max}$ buvo nustatyti atliekant spektrofotometrinius matavimus, esant skirtingoms substratų koncentracijoms (1 – 12 mM) ir 600 nm bangos ilgiui, detalūs vykstantys procesai aprašyti metodinėje dalyje (2.3. skyriuje). Konstantų matavimai buvo atlikti naudojant 50 mM TRIS buferinį tirpalą su 100 mM KCl ir 5 mM CaCl_2 (pH 7,2). Į buferinį tirpalą pridėjus cukrų stebimas absorbcijos sumažėjimas susijęs su gliukozės dehidrogenazės katalizuojamos reakcijos redukcija (3.1 pav.).



3.1 pav. GDH katalizuojama reakcijos redukcija spektrofotometriniai matavimai esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms. 50 mM TRIS buferinis tirpalas su 100 mM KCl ir 5 mM CaCl_2 , pH 7,2, $t = 25^\circ\text{C}$

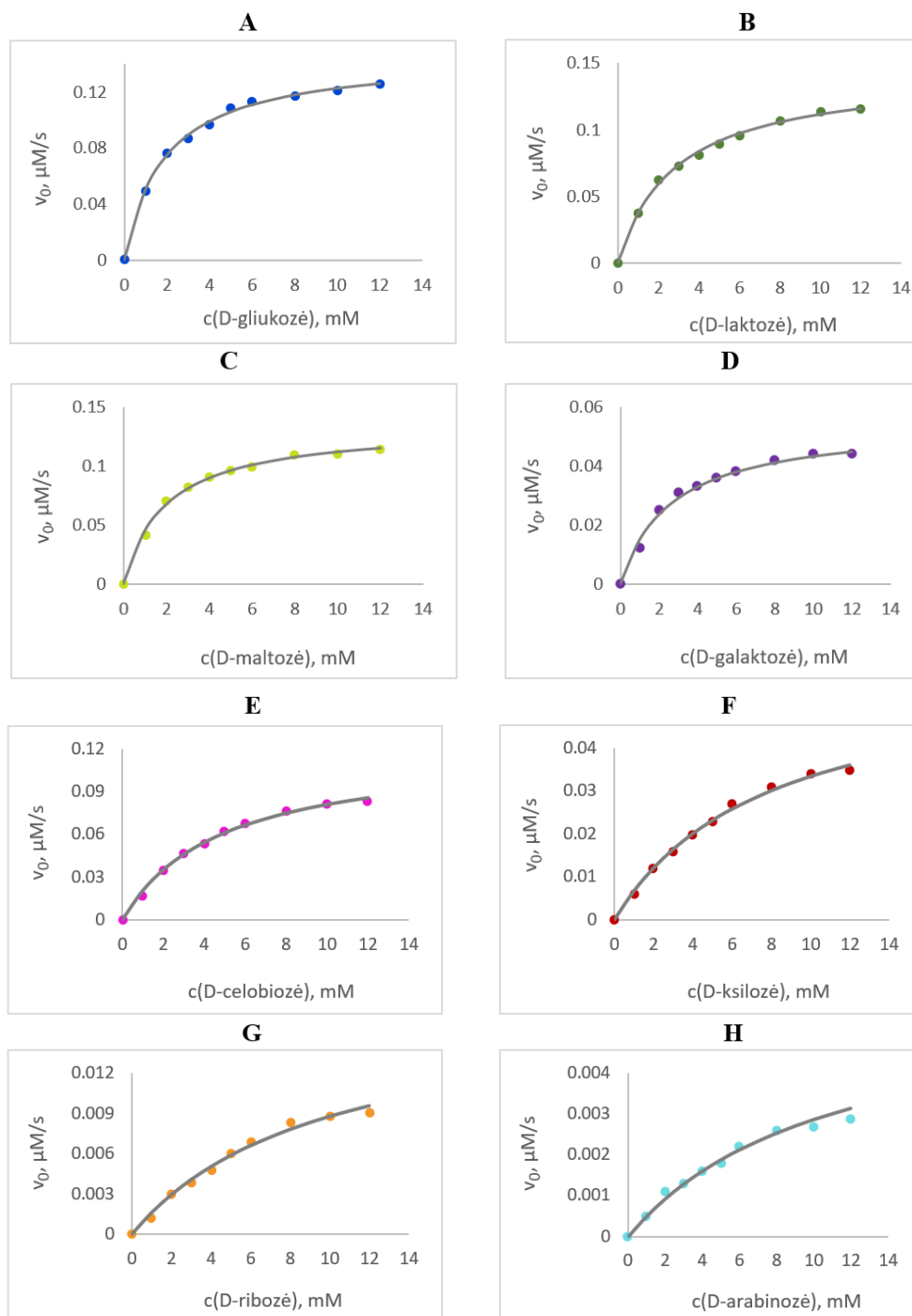
3.1.1. Natyvos PQQ-GDH Michaelio-Menten modeliai

Tirta PQQ-GDH katalizuojama įvairių substratų oksidacija. Pirmiausia buvo tirta substratų koncentracijų įtaka pradiniam reakcijų greičiams katalizuojamose reakcijose. Gautos reakcijos greičių tiesinės priklausomybės nuo tirtų junginių koncentracijų.

Pradiniai reakcijų greičiai (v_0) buvo apskaičiuoti atlikus spektrofotometrinius matavimus vertinant sugerties pokytį laike pagal absorbcijos kreives, kurios panaudojant molinės ekstinkcijos koeficientą ($19,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Jahn et al., 2020) perskaičiuotos į koncentracijos pokytį laike, pritaikant tiesinius kinetinių kreivių segmentus tiesinei lygčiai. Tiesinio priartėjimo nuolydis buvo laikomas pradiniu reakcijos greičiu. Spektrofotometrinio signalo priklausomybė nuo substrato koncentracijos tirpale aprašyta dviejų kintamųjų hiperboline lygtimi, kuri suderinama su Michaelio-Menten kinetika (3.2 pav. A-H). Apskaičiavus pradinių reakcijos greičių priklausomybę nuo substratų koncentracijų ir pasinaudojus Michaelis-Menten lygtimi nustatomos $V_{\max}$ ir K_m reikšmės.

Absorbcijos priklausomybei nuo skirtingų substratų koncentracijos naudotas Michaelio-Menten modelis. Michaelio-Menten lygtis nusako pradinio fermentinės reakcijos greičio priklausomybę nuo substrato koncentracijos. Kai fermentinėje reakcijoje substrato koncentracija yra maža, tuomet pradinis reakcijos greitis yra tiesiog proporcingas substrato koncentracijai. Didinant substrato koncentraciją, v skaitinė vertė artėja prie $V_{\max}$. Tuomet fermento molekulės tampa įsotintos substratu.

Fermentinė gliukozės dehidrogenazės reakcija greičiausiai vyko tirpale esant gliukozės, laktozės ir maltozės substratams (pradinis reakcijos greitis apie $0,12 \text{ }\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$, kai naudota 12 mM substrato (3.2 pav. A-C), tuo tarpu reakcijos su ribozės ir arabinozės substratais vyko lėčiau, atitinkamai $0,009 \text{ }\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ ir $0,003 \text{ }\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ (3.2 pav. G-H).



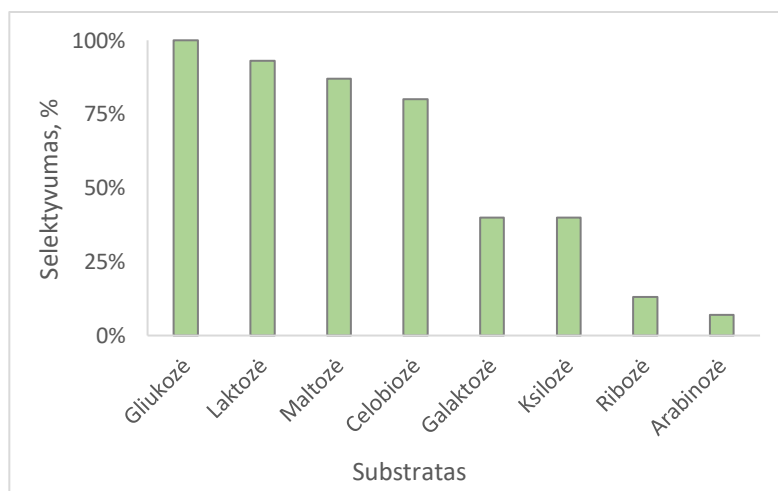
3.2 pav. Natyvio PQQ-GDH katalizuojamos reakcijos kinetinės kreivės įvairiems substratams. **A** – D-gliukozė, **B** – D-laktozė, **C** – D-maltozė, **D** – D-galaktozė, **E** – D-celobiozė, **F** – D-ksilozė, **G** – D-ribozė, **H** – D-arabinozė. Spalvoti taškai – eksperimentiniai duomenys, pilka linija – M-M matematinis modelis. 50 mM Tris buferinis tirpalas su 100 mM KCl ir 5 mM CaCl_2 , pH 7,2, $t = 25^\circ\text{C}$

Didžiausia K_m reikšmė pastebėta veikiant arabinozės substratui (10,98 mM), mažiausia – gliukozės substratui (1,91 mM). Didžiausias maksimalus reakcijos greitis (V_{max}) įvertintas esant gliukozės substratui ($0,15 \mu M \cdot s^{-1}$), mažiausias – arabinozės substratui ($0,01 \mu M \cdot s^{-1}$). Galima daryti išvadą, kad gliukozės substratas pats tinkamiausias tiriamam fermentui dėl jų giminingumo ir suderinamumo. 1 lentelėje pateikiami duomenys, kurie gauti suglodinusi gautus eksperimentinius duomenis pagal Michaelio-Menten lygtį.

1 lentelė. Fermentinių reakcijų greičiai fermentui esant natyvioje būsenoje

	Celbiozė	Maltozė	Gliukozė	Laktozė	Galaktozė	Ksilozė	Ribozė	Arabinozė
$V_{max}, \mu M \cdot s^{-1}$	0.12	0.13	0.15	0.14	0.06	0.06	0.02	0.01
K_m, mM	4.86	1.99	1.91	2.84	2.66	7.94	9.82	10.98

Naudojant 10 mM cukrų tirpalus apskaičiuotas fermento specifiškumas, kai reakcijos greitis su D-gliukoze yra prilyginamas 100% (3.3 pav.). Įvertinus procentines išraiškas didžiausiu fermentiniu specifiškumu be gliukozės pasižymėjo laktozė (93 %) ir maltozė (87 %), tuo tarpu mažiausiu – ribozė (13 %) ir arabinozė (7 %).



3.3 pav. Natyvios PQQ-GDH specifiškumas įvairiems substratams

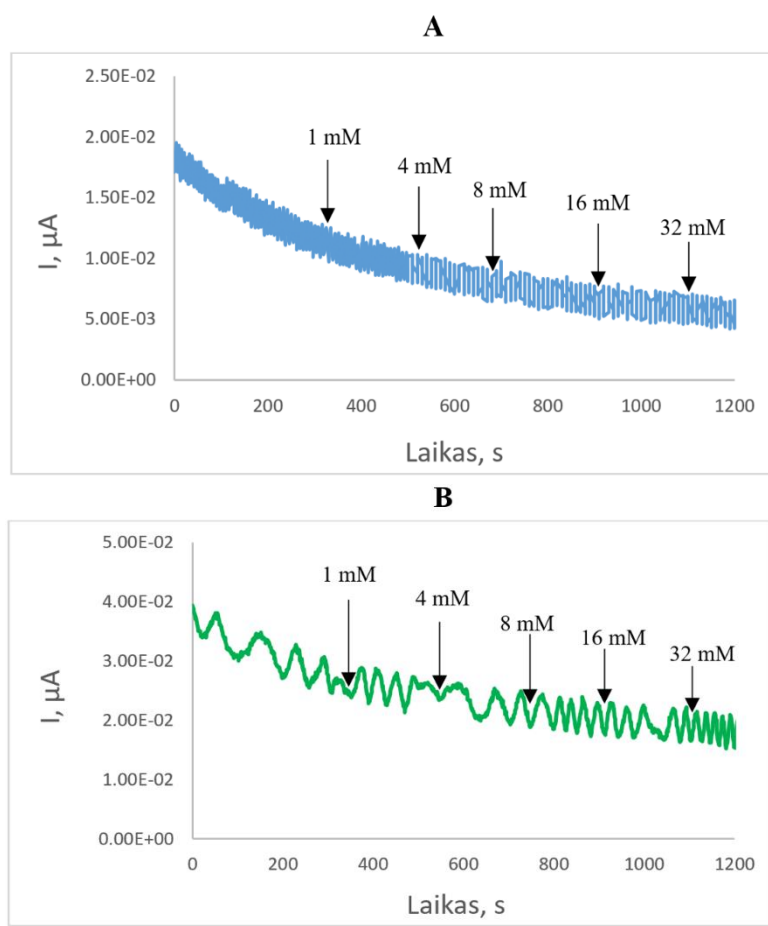
3.2. Imobilizuotos PQQ-GDH specifiškumas

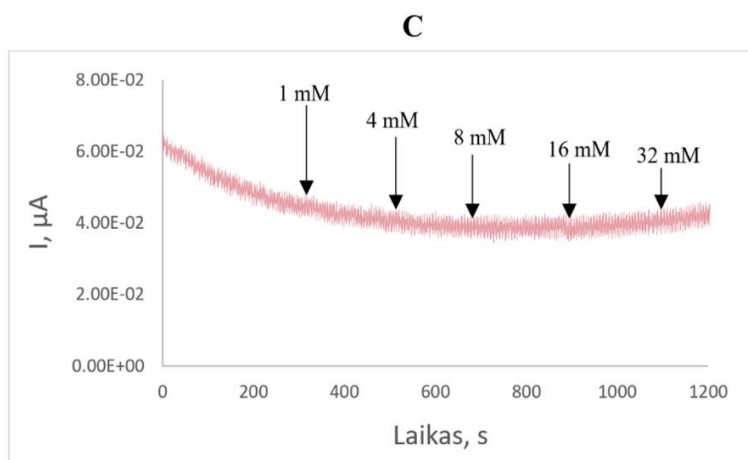
3.2.1. Savitvarkių monosluoksnių imobilizavimas ant aukso elektrodo paviršiaus

Norint įvertinti skirtingų paviršių įtaką PQQ-GDH specifiškumui buvo pasirinkta 4 skirtingi paviršiai: aukso nanodalelės modifikuotos tioliniais monosluoksniams (4-merkaptobenzoinė rūgštis, 1 mM 4-aminotiofenoliu, 1 mM 6-merkaptio-1-heksanolis) ir organiniais dažais (Malachito žaliuoju) modifikuotas grafeno oksidas. Atliekant tyrimus su AuND paviršiais aukso elektrodai

paruošiami juos valant mechaniškai aliuminio hidroksidu ir 8 min ultragarsinant. Aukso elektrodai valomi po 30 ciklų elektrochemiškai 50 mM KOH tirpale nuo 0 V iki -2,4 V, o vėliau 0,5 M H₂SO₄ tirpale nuo -0,2 V iki 1,75 V (potencialo skleidimo greitis 0,3 V/s). Po to elektrodai buvo padengti aukso nanodalelėmis, išdžiovinami ir valomi 30 ciklų elektrochemiškai 0,5 M H₂SO₄ tirpale nuo -0,2 V iki 1,75 V. Vėliau elektrodai buvo pamerkiami į skirtingų savitvarkių monosluoksnių tirpalus ir padengiami PQQ-GDH fermento ir buferinio tirpalo mišiniu, po to atliekami elektrocheminiai matavimai, kas 5 min į elektrocheminę celę pridedant skirtingas cukrų koncentracijas (nuo 1 mM iki 32 mM). Matavimai buvo atliekami apie 30 min, gautas elektrocheminės srovės pokytis nuo -0,1 iki -0,8 μA.

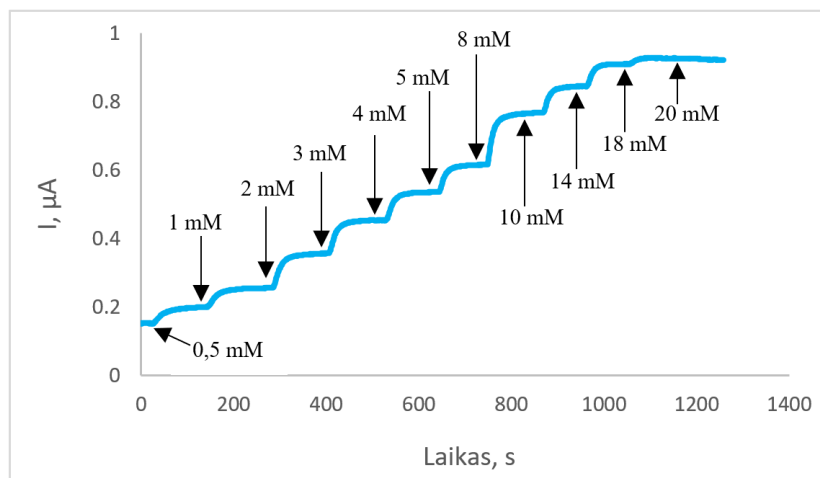
Iš chronoamperometrinių matavimų matoma, kad PQQ-GDH nekatalizuoja bereagentės bioelektrocheminės reakcijos (3.4 pav. A-C). Įvertinus gautas elektrochemines kreives galima teigti, kad didėjančios substratų koncentracijos nedarė jokio reikšmingo poveikio srovės kitimui, todėl galima daryti išvadą, kad modifikuoti aukso elektrodai nėra tinkami bereagentei biokatalitinei sitemai sukurti.





3.4 pav. Skirtingai modifikuoti aukso elektrodo paviršiai. **A** Srovės pokytis aukso elektrodo su nanodalelėmis padengus 4-aminotiofenoliu ir pridėjus skirtingas cukrų koncentracijas. **B** Srovės pokytis aukso elektrodo su nanodalelėmis padengus 4-merkaptobenzoine rūgštimi ir pridėjus skirtingas cukrų koncentracijas. **C** Srovės pokytis aukso elektrodo su nanodalelėmis padengus 6-merkaptopropil-1-heksanoliu ir pridėjus skirtingas cukrų koncentracijas

Norint įsitikinti, kad fermentas imobilizuotas ant paviršiaus buvo atliktas papildomas matavimas, kai į matavimo mišinį papildomai pridėtas mediatorius – hidroksimetilferocenas. 3.5 pav. matoma, kad fermentas yra imobilizuotas ant elektrodo paviršiaus, nes tirpale esant laisvo mediatoriaus yra stebima D-gliukozės oksidacija.



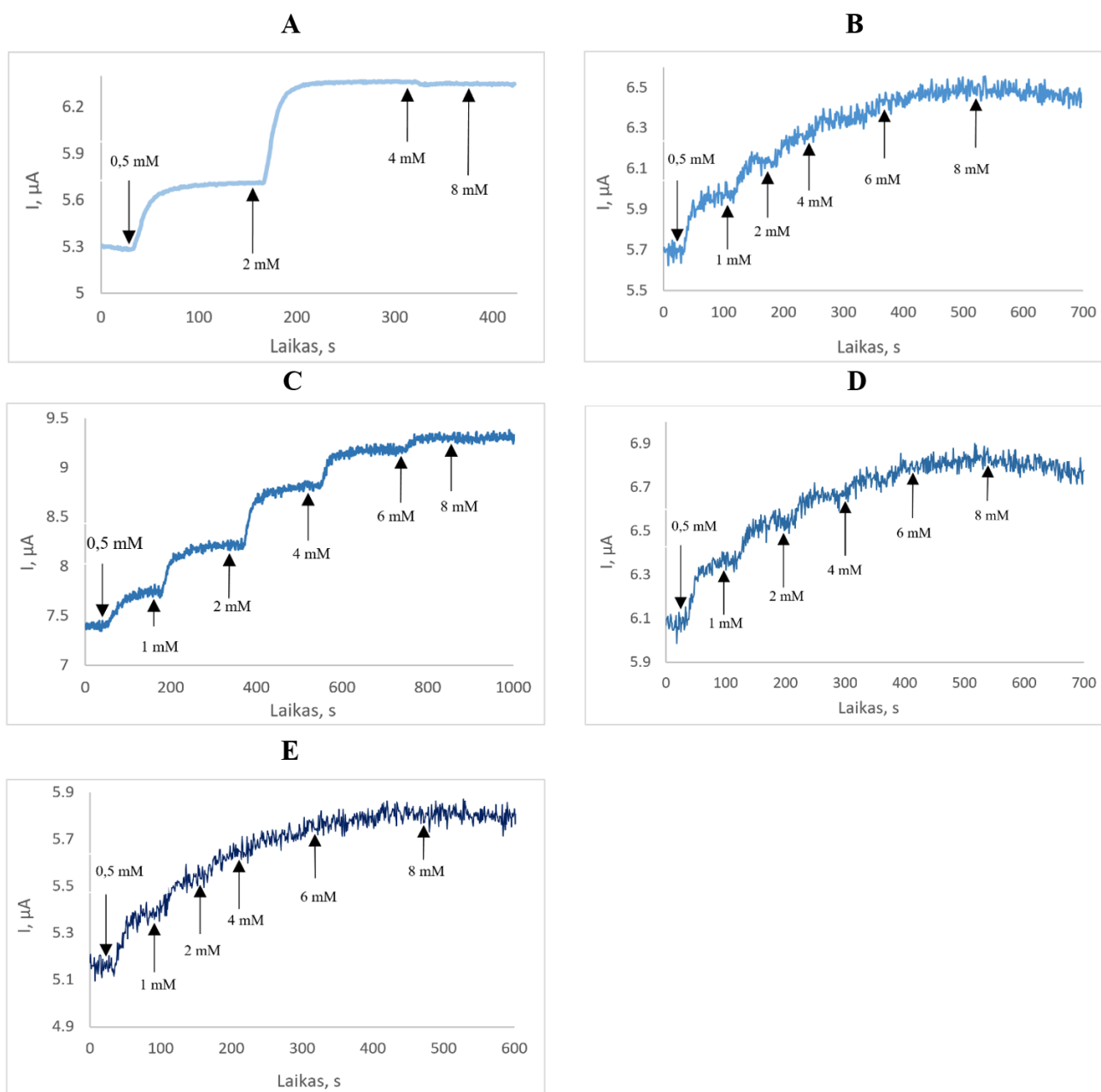
3.5 pav. Mediatoriaus – hidroksimetilferoceno indukuojama D-gliukozės oksidacija

3.2.2. PQQ-GDH imobilizavimas ant grafito elektrodo paviršiaus

Chronoamperometriniai matavimai buvo atliekami naudojant grafito elektrodą, padengtą membrana su imobilizuotu fermentu PQQ-GDH. Srovės stipris buvo tiriamas esant skirtingoms PQQ-GDH substrato – gliukozės koncentracijoms, nuo 0,5 mM iki 8 mM, kol srovės potencialas dėl tirpalo įsotinimo nusistovėdavo, esant fiksuotam elektrodo potencialui (3.6 pav. A-E). Buvo atlikti matavimai

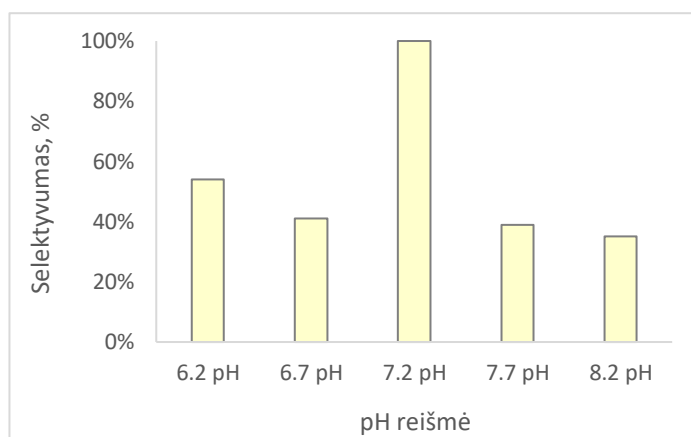
prie fiksuoto 400 mV vs Ag/AgCl potencialo buferiniame tirpale esant 25°C temperatūrai. Matavimų metu nusistovėjus nuliniai ramybės srovei didinama substrato koncentracija ir stebimas srovės pokytis. Vėl nusistovėjus ramybės srovei substrato koncentracija didinama, taip gaunant srovės kitimą laike. Srovės padidėjimas susijęs su PQQ-GDH katalizuojama gliukozės oksidacija. Būtent oksidacijos elektrodo paviršiuje metu stebimas srovės padidėjimas, nes elektronai perduodami elektrodui, tuomet fermento molekulės tampa įsotintos substratu.

Buvo tirta kokią poveikį vykstančiam procesui ir srovės pokyčiui turi skirtingi darbinio buferinio tirpalo pH. Buvo naudoti nuo 6,2 iki 8,2 pH buferiniai tirpalai. Greičiausias vykstančios reakcijos procesas ir tirpalo įsotinimas pastebėtas prie 6,2 pH buferinio tirpalo, maksimalus srovės stiprio pokytis apie 1,05 μA (3.6 pav. A). Didžiausias srovės pokytis sukuriamas 7,2 pH buferiniame tirpale ir siekia apie 1,95 μA (3.6 pav. C). Taigi galima daryti išvadą, kad imobilizuotam fermentui optimaliausias būtent 7,2 pH buferinis tirpalas.



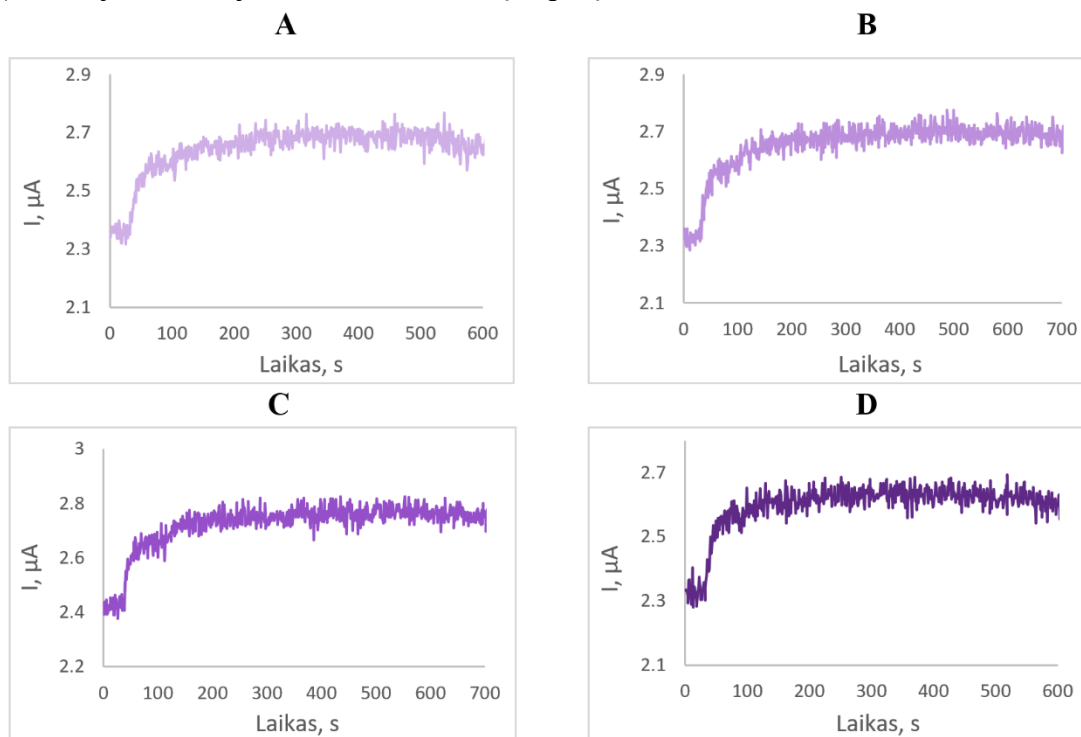
3.6 pav. Imobilizuota PQQ-GDH skirtinguose pH. **A** Imobilizuota PQQ-GDH 6.2 pH kalio fosfatiniame buferyje. **B** Imobilizuota PQQ-GDH 6.7 pH kalio fosfatiniame buferyje. **C** Imobilizuota PQQ-GDH 7.2 pH kalio fosfatiniame buferyje. **D** Imobilizuota PQQ-GDH 7.7 pH kalio fosfatiniame buferyje. **E** Imobilizuota PQQ-GDH 8.2 pH kalio fosfatiniame buferyje. 50 mM fosfatinis buferinis tirpalas su 100 mM KCl, pH 7,2, $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Apskaičiuotos optimaliausios pH reikšmės procentinės išraiškos, kai didžiausios vertės srovės potencialas yra prilyginamas 100% (3.7 pav.). Imobilizuotai ant anglies elektrodo paviršiaus PQQ gliukozės dehidrogenazei nustatytas optimaliausias pH – 7,2, mažiausiai tinkama pH vertė – 8,2.



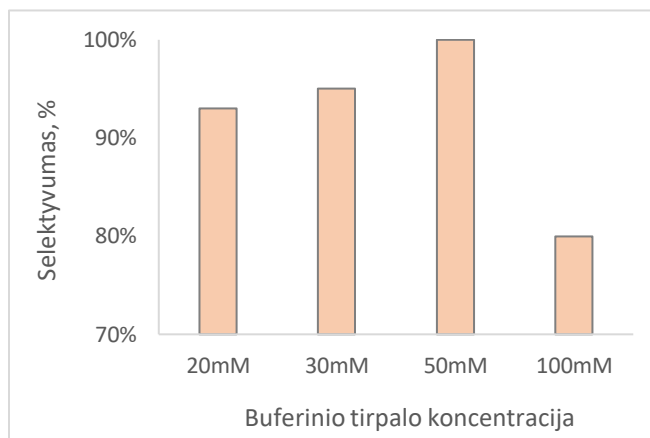
3.7 pav. Optimaliausios pH vertės procentinė išraiška

Buvo tirta kokį poveikį vykstančiam procesui ir srovės pokyčiui turi skirtingos darbinio buferinio tirpalo koncentracijos. Buvo naudoti nuo 20 mM iki 100 mM koncentracijų buferiniai tirpalai. Pastebėta, kad nežymiai skirtingos buferinių tirpalų koncentracijos neturi beveik jokio pastebimo pokyčio vykstančių reakcijų srovės stipriui (3.8 pav. A-D). Vis tik nežymiai didesnis srovės pokytis ($0,41 \mu\text{A}$) nustatytas naudojant 50 mM buferinį tirpalą. Minimaliai mažesnis srovės pokytis ($0,33 \mu\text{A}$) nustatytas naudojant 100 mM buferinį tirpalą.



3.8 pav. Imobilizuota PQQ-GDH skirtingų koncentracijų buferiniuose tirpaluose. **A** 20 mM KFB buferinis tirpalas. **B** 30 mM KFB buferinis tirpalas. **C** 50 mM KFB buferinis tirpalas. **D** 100 mM KFB buferinis tirpalas. Skirtingos fosfato jonų koncentracijos buferinis tirpalas, turintis 100 mM KCl, pH 7,2, $t = 25^\circ\text{C}$

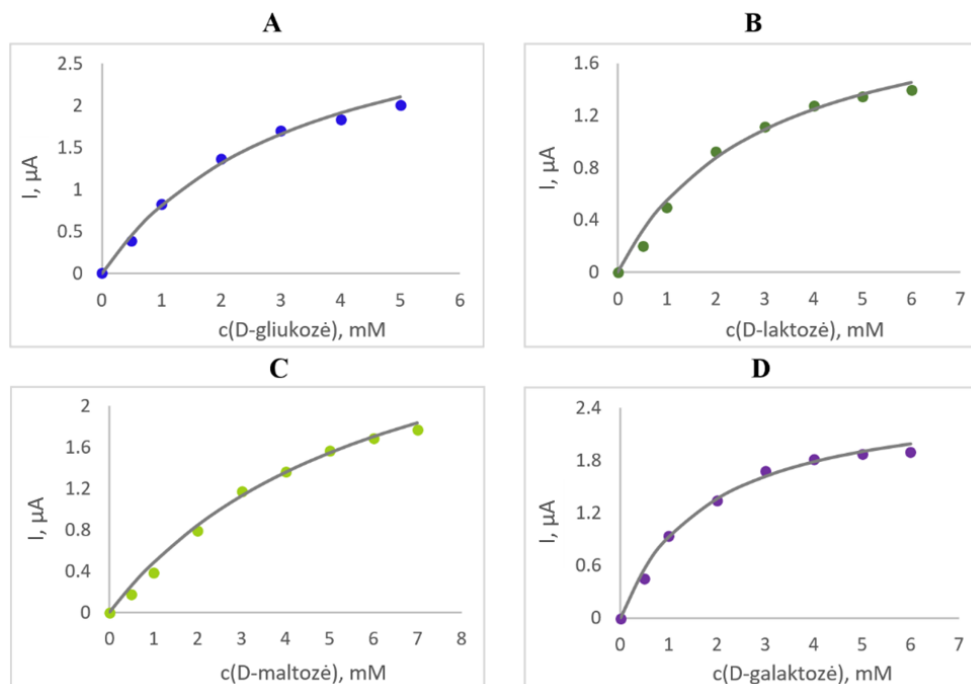
Apskaičiuotos optimaliausios buferinio tirpalo koncentracijos procentinės išraiškos, kai didžiausios vertės srovės potencialas yra prilyginamas 100% (3.9 pav.). Imobilizuotai ant anglies elektrodo paviršiaus PQQ-GDH nustatyta optimaliausia buferinio tirpalo koncentracija – 50 mM, mažiausiai tinkama koncentracija – 100 mM.

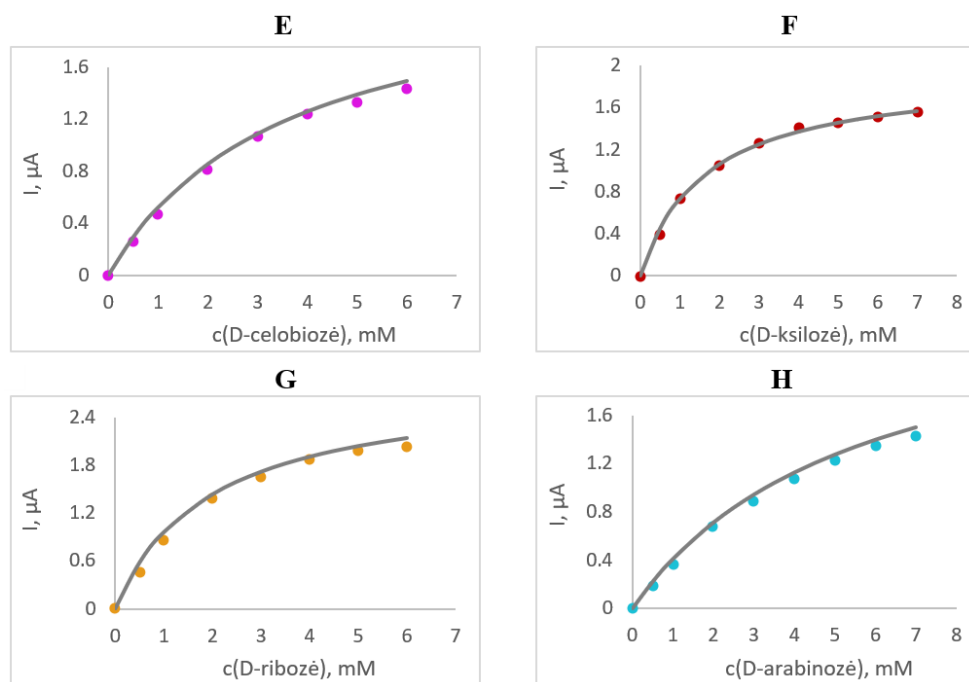


3.9 pav. Optimaliausios buferinio tirpalo koncentracijos procentinė išraiška

3.2.3. Imobilizuotos PQQ-GDH Michaelio-Menten modeliai

Imobilizavus PQQ-GDH didžiausia fermentinės reakcijos srovė ($I_{\max}$), kai naudojama 5 mM substrato, pasiekta tirpale esant gliukozės ir ribozės substratams ($I_{\max}$ apie 2 μA (3.10 pav. A ir G), tuo tarpu reakcijos su laktozės, celiobiozės ir arabinozės substratais vyko prasčiausiai ($I_{\max}$ apie 1,4 μA (3.10 pav. C, E ir H).





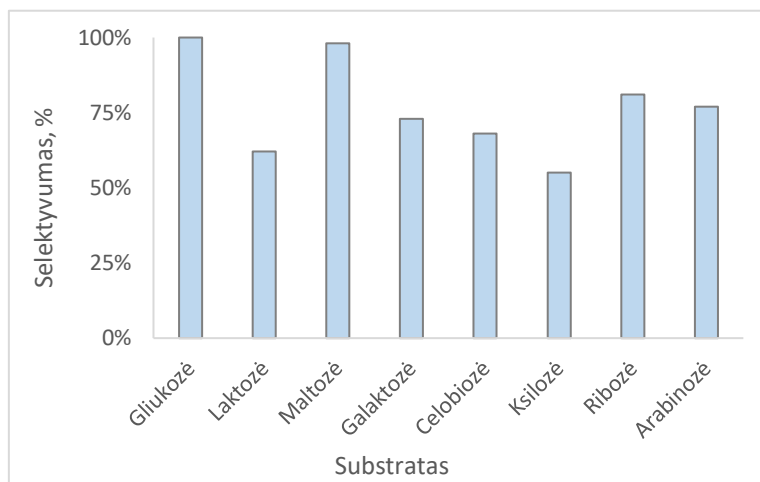
3.10 pav. Imobilizuotos PQQ-GDH katalizuojamos reakcijos kinetinės kreivės įvairiems substratams. **A** – D-gliukozė, **B** – D-laktozė, **C** – D-maltozė, **D** – D-galaktozė, **E** – D-celobiozė, **F** – D-ksilozė, **G** – D-ribozė, **H** – D-arabinozė. Spalvoti taškai – eksperimentiniai duomenys, pilka linija – M-M matematinis modelis. 50 mM Tris buferinis tirpalas su 100 mM KCl ir 5 mM CaCl₂, t = 25 °C, pH 7,2

Atlikus elektrocheminių matavimų skaičiavimus su programine įranga „Wolfram Mathematica 11.2“ gautos kinetinių parametrų reikšmės surašytos į žemiau pavaizduotą 2 lentelę. Maksimalūs reakcijų greičiai apskaičiuoti gerokai aukštesni nei taikant spektrofotometrinį Michaelio-Menten modelį. Didžiausia K_m reikšmė pastebėta veikiant maltozės substratui (6,25 mM), mažiausia – ksilozės substratui (1,65 mM). Didžiausias srovė (I_{max}) nustatyta esant gliukozės substratui (3,51 μA), mažiausia – ksilozės substratui (1,94 μA).

2 lentelė. Fermentinių reakcijų greičiai fermentą imobilizavus.

	Celobiozė	Maltozė	Gliukozė	Laktozė	Galaktozė	Ksilozė	Ribozė	Arabinozė
I_{max} , μA	2.39	3.47	3.51	2.17	2.58	1.94	2.84	2.71
K_m , mM	3.57	6.25	3.34	2.97	1.78	1.65	1.96	5.57

Naudojant 10 mM cukrų tirpalus apskaičiuotas fermento specifiskumas, kai maksimali srovė su D-gliukoze yra prilyginama 100% (3.11 pav.). Įvertinus procentines išraiškas didžiausiu fermentiniu specifiskumu be gliukozės pasižymėjo maltozė (98 %), tuo tarpu mažiausiu – ksilozė (55 %) ir laktozė (62 %).



3.11 pav. Imobilizuotos PQQ-GDH specifiskumas įvairiems substratams

3.2.4. Natyvos ir imobilizuotos PQQ-GDH specifiskumo palyginimas

Gauti eksperimentiniai PQQ-GDH specifiskumo duomenys palyginti su literatūroje rastais duomenimis (3 lentelė) (Laurinavicius et al., 2004; Matsushita et al., 1988; Razumiene et al., 2006). Didžiausias gautų rezultatų panašumas su esančiais literatūroje pastebėtas su natyviu fermentu, o mažiausias rezultatų atitikimas – su imobilizuotu fermentu. Literatūroje kaip tinkamiausi substratai natyviam fermentui aprašomi maltozė ir laktozė (atitinkamai 92 % ir 81 %), mažiausiai tinkami – ksilozė ir ribozė (atitinkamai 15 % ir 8 %). Imobilizuotam fermentui kaip tinkamiausias substratas aprašyta ksilozė (81 %), mažiausiai tinkami – laktozė ir celobiozė (atitinkamai 1 % ir 0 %).

Pagal eksperimentinius duomenis tinkamiausi substratai natyviam fermentui – laktozė ir maltozė (atitinkamai 93 % ir 87 %), mažiausiai tinkami – ribozė ir arabinozė (atitinkamai 13 % ir 7 %). Įvertinus rezultatus fermentą imobilizavus, gautas tinkamiausias substratas – maltozė (98 %), mažiausiai tinkamas – ksilozė (55 %).

3 lentelė. Natyvios ir imobilizuotos PQQ-GDH specifškumo palyginimas su literatūros duomenimis

		Celobiozė	Maltozė	Gliukozė	Laktozė	Galaktozė	Ksilozė	Ribozė	Arabinozė
Eksperimentiniai duomenys	Natyvi	80%	87%	100%	93%	40%	40%	13%	7%
	Imobilizuota	68%	98%	100%	62%	73%	55%	81%	77%
Literatūros duomenys	Natyvi	69 ³² , 68 ⁴¹ %	93 ³⁶ , 86 ³² , 98 ⁴¹ %	100% ^{32,36,41}	72 ³⁶ , 72 ³² , 98 ⁴¹ %	30 ³⁶ , 38 ³² , 97 ⁴¹ %	15% ³⁶	8% ³⁶	37 ³² , 90 ⁴¹ %
	Imobilizuota	0 ³² , 0 ⁴¹ %	12 ³⁶ , 1 ³² , 1 ⁴¹ %	100% ^{32,36,41}	4 ³⁶ , 0 ³² , 0 ⁴¹ %	79 ³⁶ , 76 ³² , 8 ⁴¹ %	81% ³⁶	46% ³⁶	28 ³² , 5 ⁴¹ %

³² (Laurinavicius et al., 2004)

³⁶ (Matsushita et al., 1988)

⁴¹ (Razumiene et al., 2006)

Išvados

1. Ištyrus natyvią PQQ-GDH spektrofotometriniu metodu didžiausia K_m reikšmė pastebėta veikiant arabinozės substratui (10,98 mM), mažiausia – gliukozės substratui (1,91 mM). Didžiausias maksimalus reakcijos greitis (V_{max}) įvertintas esant gliukozės substratui ($0,15 \mu M \cdot s^{-1}$), mažiausias – arabinozės substratui ($0,01 \mu M \cdot s^{-1}$). Remiantis gautais rezultatais galima teigti, kad specifiskiausias substratas tiriamam fermentui – laktozė (93 %), tuo tarpu mažiausiai specifiskas – arabinozės substratas (7 %).
2. Nustatytas tinkamiausias paviršius PQQ-GDH imobilizavimui – grafito elektrodo paviršius. Iš chronoamperometrinių matavimų nustatyta, kad imobilizuota PQQ-GDH nekatalizuoja bereagentės bioelektrocheminės reakcijos, todėl aukso elektrodai pasirodė esantys netinkami bereagentei biokatalitinei sistemai sukurti.
3. Atlikus imobilizuotos PQQ-GDH elektrocheminių matavimų skaičiavimus didžiausia K_m reikšmė pastebėta veikiant laktozės substratui (6,25 mM), mažiausia – ksilozės substratui (1,65 mM). Didžiausias maksimalus reakcijos greitis (V_{max}) įvertintas esant gliukozės substratui ($3,51 \mu A$), mažiausias – ksilozės substratui ($1,94 \mu A$). Remiantis elektrocheminiais skaičiavimais specifiskiausias substratas tiriamam fermentui – maltozė (98 %), mažiausiai specifiskiausias – ksilozės substratas (55 %).
4. Imobilizuotos PQQ-GDH maksimalūs reakcijų greičiai gauti apie 23 kartus didesni lyginant su neimobilizuotu fermentu. K_m reikšmės fermentui esant natyvioje būsenoje gautos apie 1,8 karto didesnės. Apibendrinant tyrimų rezultatus natyviame fermentui tinkamiausias laktozės, o imobilizuotam – maltozės substratas.

Literatūros sąrašas

1. Ali, J., Najeeb, J., Asim Ali, M., Farhan Aslam, M., & Raza, A. (2017). Biosensors: Their Fundamentals, Designs, Types and Most Recent Impactful Applications: A Review. *Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 08(01), 1–9. <https://doi.org/10.4172/2155-6210.1000235>
2. An, D., Chen, Z., Zheng, J., Chen, S., Wang, L., Huang, Z., & Weng, L. (2015). Determination of biogenic amines in oysters by capillary electrophoresis coupled with electrochemiluminescence. *Food Chemistry*, 168, 1. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.019>
3. Anthony, C., & Zatman, L. J. (1967). The microbial oxidation of methanol. The prosthetic group of the alcohol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. M27: a new oxidoreductase prosthetic group. *The Biochemical Journal*, 104(3), 960–969. <https://doi.org/10.1042/bj1040960>
4. Bischel, M. D., Austin, J. H., Kemeny, M. D., Hubble, C. M., & Lear, R. K. (1966). Separation and identification of acid polysaccharides by thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 21(C), 40. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)91258-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)91258-0)
5. Bollella, P. (2020). Porous gold: A new frontier for enzyme-based electrodes. In *Nanomaterials* (p. 772). <https://doi.org/10.3390/nano10040722>
6. Cervantes, F. V., Neifar, S., Merdzo, Z., Viña-Gonzalez, J., Fernandez-Arrojo, L., Ballesteros, A. O., Fernandez-Lobato, M., Bejar, S., & Plou, F. J. (2020). A three-step process for the bioconversion of whey permeate into a glucose D-free tagatose syrup. *Catalysts*, 10(6), 1–2. <https://doi.org/10.3390/catal10060647>
7. Chang, I., & Baldi, P. (2013). A unifying kinetic framework for modeling oxidoreductase-catalyzed reactions. *Bioinformatics*, 29(10), 1299–1307. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt140>
8. Chen, D., Tao, Y., Liu, Z., Liu, Z., Huang, L., Wang, Y., Pan, Y., Peng, D., Dai, M., & Yuan, Z. (2010). Development of a high-performance liquid chromatography method to monitor the residues of benzimidazoles in bovine milk. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(28), 2928. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.08.029>
9. Cheng, C., Li, S., Thomas, A., Kotov, N. A., & Haag, R. (2017). Functional Graphene Nanomaterials Based Architectures: Biointeractions, Fabrications, and Emerging Biological Applications. In *Chemical Reviews* (Vol. 117, Issue 3, pp. 1826–1914). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00520>
10. Damayanti, D., Supriyadi, D., Amelia, D., Saputri, D. R., Devi, Y. L. L., Auriyani, W. A., & Wu, H. S. (2021). Conversion of lignocellulose for bioethanol production, applied in bio-polyethylene terephthalate. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 17, p. 1). <https://doi.org/10.3390/polym13172886>
11. Duine, J. A., Frank, J. J., & Jongejan, J. A. (1983). Detection and determination of pyrroloquinoline quinone, the coenzyme of quinoproteins. *Analytical Biochemistry*, 133(1), 239–243. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90249-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90249-X)
12. Durand, F., Limoges, B., Mano, N., Mavré, F., Miranda-Castro, R., & Savéant, J. M. (2011). Effect of substrate inhibition and cooperativity on the electrochemical responses of glucose dehydrogenase. Kinetic characterization of wild and mutant types. *Journal of the American Chemical Society*, 133(32), 12801–12809. <https://doi.org/10.1021/ja204637d>
13. Ferri, S., Kojima, K., & Sode, K. (2011). Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: A bird's eye view of glucose sensing enzymes. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 5(5), 1068–1072. <https://doi.org/10.1177/193229681100500507>

14. Frias, J. P., Lim, C. G., Ellison, J. M., & Montandon, C. M. (2010). Review of adverse events associated with false glucose readings measured by GDH-PQQ-based glucose test strips in the presence of interfering sugars. *Diabetes Care*, 33(4), 728–729. <https://doi.org/10.2337/dc09-1822>
15. Ganesh, V., & Muthurasu, A. (2012). Strategies for an enzyme immobilization on electrodes: Structural and electrochemical characterizations. *Journal of Physics: Conference Series*, 241–245. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/358/1/012003>
16. Goodwin, P. M., & Anthony, C. (1998). The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. In *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 40, pp. 3–19). [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60129-0](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60129-0)
17. Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., & Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Analytical Chemistry*, 79(11), 4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>
18. Hammami, I., Alabdallah, N. M., Jomaa, A. Al, & Kamoun, M. (2021). Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications. In *Journal of King Saud University - Science* (Vol. 33, Issue 7, pp. 1–4). <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101560>
19. Hitaishi, V. P., Clement, R., Bourassin, N., Baaden, M., de Poulpique, A., Sacquin-Mora, S., Ciaccafava, A., & Lojou, E. (2018). Controlling redox enzyme orientation at planar electrodes. In *Catalysts* (p. 192). <https://doi.org/10.3390/catal8050192>
20. Immanuel, S., Elakkiya, V., Alagappan, M., & Selvakumar, R. (2018). Development of colorimetric cholesterol detection kit using TPU nanofibre/cellulose acetate membrane. *IET Nanobiotechnology*, 12(5), 557. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2017.0246>
21. Ivanauskas, F., Kaunietis, I., Laurinavičius, V., Razumienė, J., & Šimkus, R. (2008). Apparent Michaelis constant of the enzyme modified porous electrode. *Journal of Mathematical Chemistry*, 43(4), 1517. <https://doi.org/10.1007/s10910-007-9237-7>
22. Jahn, B., Jonasson, N. S. W., Hu, H., Singer, H., Pol, A., Good, N. M., den Camp, H. J. M. O., Martinez-Gomez, N. C., & Daumann, L. J. (2020). Understanding the chemistry of the artificial electron acceptors PES, PMS, DCPIP and Wurster's Blue in methanol dehydrogenase assays. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 25(2), 4. <https://doi.org/10.1007/s00775-020-01752-9>
23. Janssen, W., Harff, G., Caers, M., & Schellekens, A. (1998). Positive interference of icodextrin metabolites in some enzymatic glucose methods [4]. In *Clinical Chemistry* (Vol. 44, Issue 11, pp. 2379–2380). <https://doi.org/10.1093/clinchem/44.11.2379>
24. Jin, Q., Rodriguez, J. A., Li, C. Z., Darici, Y., & Tao, N. J. (1999). Self-assembly of aromatic thiols on Au(111). *Surface Science*, 101–111. [https://doi.org/10.1016/S0039-6028\(99\)00195-8](https://doi.org/10.1016/S0039-6028(99)00195-8)
25. Kang, H., & Noh, J. (2013). Influence of thiol molecular backbone structure on the formation and reductive desorption of self-assembled aromatic and alicyclic thiol monolayers on Au(111) surface. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 34(5), 1383–1387. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2013.34.5.1383>
26. Karabanovas, V. (2016). *Nanomedžiagos*. 36–104.
27. Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. In *Arabian Journal of Chemistry* (Vol. 12, Issue 7, pp. 1–4). <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
28. Kim, D. H., Noh, J., Hara, M., & Lee, H. (2001). An adsorption process study on the self-assembled monolayer formation of octadecanethiol chemisorbed on gold surface. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 22(3), 276–280.
29. Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., & Plech, A. (2006). Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(32),

- 15700–15707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>
30. Kozitsina, A. N., Svalova, T. S., Malysheva, N. N., Okhokhonin, A. V., Vidrevich, M. B., & Brainina, K. Z. (2018). Sensors based on bio and biomimetic receptors in medical diagnostic, environment, and food analysis. In *Biosensors* (Vol. 8, Issue 2, pp. 1–6). <https://doi.org/10.3390/bios8020035>
 31. Kulys, J., Tetianec, L., & Bratkovskaja, I. (2010). Pyrroloquinoline quinone-dependent carbohydrate dehydrogenase: Activity enhancement and the role of artificial electron acceptors. *Biotechnology Journal*, 5(8), 822–823. <https://doi.org/10.1002/biot.201000119>
 32. Laurinavicius, V., Razumiene, J., Ramanavicius, A., & Ryabov, A. D. (2004). Wiring of PQQ-dehydrogenases. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(6), 1220. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.05.012>
 33. Markuckas, A. (2008). *Fermentinės katalizės pagrindai*. 66–78.
 34. Martínez, M., Hilding-Ohlsson, A., Viale, A. A., & Cortón, E. (2007). Membrane entrapped *Saccharomyces cerevisiae* in a biosensor-like device as a generic rapid method to study cellular metabolism. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(3), 455–459. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.11.001>
 35. Martins, M. C. L., Fonseca, C., Barbosa, M. A., & Ratner, B. D. (2003). Albumin adsorption on alkanethiols self-assembled monolayers on gold electrodes studied by chronopotentiometry. *Biomaterials*, 24(21), 3697–3706. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00244-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00244-8)
 36. Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O., & Ameyama, M. (1988). Quinoprotein D-glucose dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus* LMD 79.41: the membrane-bound enzyme is distinct from the soluble enzyme. *FEMS Microbiology Letters*, 55(1), 53–56. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb02797.x>
 37. Murata, K., Suzuki, M., Kajiya, K., Nakamura, N., & Ohno, H. (2009). High performance bioanode based on direct electron transfer of fructose dehydrogenase at gold nanoparticle-modified electrodes. *Electrochemistry Communications*, 11, 668–671. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.01.011>
 38. Oubrie, A., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Olsthoorn, A. J. J., Duine, J. A., & Dijkstra, B. W. (1999). Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase. *EMBO Journal*, 18(19), 5187–5194. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.19.5187>
 39. Pei, S., & Cheng, H. M. (2012). The reduction of graphene oxide. *Carbon*, 50(9), 3210–3228. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.11.010>
 40. Price, W. J., Leigh, S. A., Hsu, S. M., Patten, T. E., & Liu, G. Y. (2006). Measuring the size dependence of young's modulus using force modulation atomic force microscopy. *Journal of Physical Chemistry A*, 110, 1382–1388. <https://doi.org/10.1021/jp0544540>
 41. Razumiene, J., Vilkanauskyte, A., Gureviciene, V., Barkauskas, J., Meskys, R., & Laurinavicius, V. (2006). Direct electron transfer between PQQ dependent glucose dehydrogenases and carbon electrodes: An approach for electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta*, 51(24), 5154. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2006.03.058>
 42. Rodríguez-Delgado, M. M., Alemán-Nava, G. S., Rodríguez-Delgado, J. M., Dieck-Assad, G., Martínez-Chapa, S. O., Barceló, D., & Parra, R. (2015). Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 74, pp. 21–26). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.008>
 43. Salisbury, S. A., Forrest, H. S., Cruse, W. B. T., & Kennard, O. (1979). A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenases [13]. In *Nature* (Vol. 280, Issue 5725, pp. 843–844). <https://doi.org/10.1038/280843a0>
 44. Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. In *Biotechnology Advances* (Vol. 30, Issue 3, pp. 489–505).

- <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>
45. Schneider, T. W., & Buttry, D. A. (1993). Electrochemical Quartz Crystal Microbalance Studies of Adsorption and Desorption of Self-Assembled Monolayers of Alkyl Thiols on Gold. *Journal of the American Chemical Society*, 115(26), 12391–12393. <https://doi.org/10.1021/ja00079a021>
 46. Schreiber, F. (2000). Structure and growth of self-assembling monolayers. *Progress in Surface Science*, 65, 151–256. [https://doi.org/10.1016/S0079-6816\(00\)00024-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6816(00)00024-1)
 47. Schulz, C., Kittl, R., Ludwig, R., & Gorton, L. (2016). Direct Electron Transfer from the FAD Cofactor of Cellobiose Dehydrogenase to Electrodes. *ACS Catalysis*, 6, 555–563. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b01854>
 48. Seibert, E., & Tracy, T. S. (2014). Fundamentals of enzyme kinetics. *Methods in Molecular Biology*, 1113. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-758-7_2
 49. Sellés Vidal, L., Kelly, C. L., Mordaka, P. M., & Heap, J. T. (2018). Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1866, Issue 2, pp. 327–347). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.11.005>
 50. Shi, Y. N., Liu, Y. J., Xie, Z., & Zhang, W. J. (2021). Fructose and metabolic diseases: Too much to be good. In *Chinese Medical Journal* (Vol. 134, Issue 11, pp. 1276–1277). <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001545>
 51. Siepenkoetter, T., Salaj-Kosla, U., & Magner, E. (2017). The Immobilization of Fructose Dehydrogenase on Nanoporous Gold Electrodes for the Detection of Fructose. *ChemElectroChem*, 4, 905–907. <https://doi.org/10.1002/celc.201600842>
 52. Smith, A. T., LaChance, A. M., Zeng, S., Liu, B., & Sun, L. (2019). Synthesis, properties, and applications of graphene oxide/reduced graphene oxide and their nanocomposites. *Nano Materials Science*, 1(1), 31–47. <https://doi.org/10.1016/j.nanoms.2019.02.004>
 53. Sumi, T., Wano, H., & Uosaki, K. (2003). Electrochemical oxidative adsorption and reductive desorption of a self-assembled monolayer of decanethiol on the Au(1 1 1) surface in KOH+ethanol solution. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 550, 321–325. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(03\)00141-4](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(03)00141-4)
 54. Tang, J., Yan, X., Engelbrekt, C., Ulstrup, J., Magner, E., Xiao, X., & Zhang, J. (2020). Development of graphene-based enzymatic biofuel cells: A minireview. In *Bioelectrochemistry* (p. 107537). <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107537>
 55. Tominaga, M., Ohtani, M., & Taniguchi, I. (2008). Gold single-crystal electrode surface modified with self-assembled monolayers for electron tunneling with bilirubin oxidase. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10, 6928–6929. <https://doi.org/10.1039/b809737b>
 56. Ulman, A. (1996). Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chemical Reviews*, 96, 1533. <https://doi.org/10.1021/cr9502357>
 57. Uosaki, K. (2009). Electrochemical oxidative formation of ordered monolayers of thiol molecules on Au(111) surface. *Chemical Record*, 199–203. <https://doi.org/10.1002/tcr.200900002>
 58. Vaz-Dominguez, C., Campuzano, S., Rüdiger, O., Pita, M., Gorbacheva, M., Shleev, S., Fernandez, V. M., & De Lacey, A. L. (2008). Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O₂ to H₂O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 531–535. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.05.002>
 59. Xiao, X., Xia, H. Q., Wu, R., Bai, L., Yan, L., Magner, E., Cosnier, S., Lojou, E., Zhu, Z., & Liu, A. (2019). Tackling the Challenges of Enzymatic (Bio)Fuel Cells. In *Chemical Reviews* (pp. 9509–9511). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00115>
 60. Yan, X., Tang, J., Tanner, D., Ulstrup, J., & Xiao, X. (2020). Direct electrochemical enzyme electron transfer on electrodes modified by self-assembled molecular monolayers. In *Catalysts*

- (p. 1458). <https://doi.org/10.3390/catal10121458>
61. Zhang, W., Sun, Y., Wu, C., Xing, J., & Li, J. (2009). Polymer-functionalized single-walled carbon nanotubes as a novel sol-gel solid-phase micro-extraction coated fiber for determination of poly-brominated diphenyl ethers in water samples with gas chromatography-electron capture detection. *Analytical Chemistry*, 81(8), 2912. <https://doi.org/10.1021/ac802123s>
 62. Zharnikov, M., & Grunze, M. (2001). Spectroscopic characterization of thiol-derived self-assembling monolayers. *Journal of Physics Condensed Matter*, 11333–11334. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/13/49/314>