



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Eimantas Ramonas

GLICEROLIO BIOJUTIKLIO KŪRIMAS IR TYRIMAS

CREATION AND CHARACTERIZATION OF GLYCEROL BIOSENSOR

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2018

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Jaunius Urbonavičius

(Vardas, pavardė)

(Data)

Eimantas Ramonas

GLICEROLIO BIOJUTIKLIO KŪRIMAS IR TYRIMAS
CREATION AND CHARACTERIZATION OF GLYCEROL BIOSENSOR

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas

prof. habil. dr. Juozas Kulys

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Konsultantas

lekt. Dalius Ratautas

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Lietuvių kalbos konsultantas

lekt. Regina Žukienė

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2018

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijos studijų kryptis

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

TVIRTINU

Katedros vedėjas

(Parašas)

Jaunius Urbonavičius

(Vardas, pavardė)

(Data)

**BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO
UŽDUOTIS**

..... Nr.

Vilnius

Studentui

Eimantas Ramonas

(Vardas, pavardė)

Baigiamojo darbo tema:

GLICEROLIO BIOJUTIKLIO KŪRIMAS IR TYRIMAS

Patvirtinta 2017 m. spalio mėn. 26 d. dekanų potvarkiu Nr. 443fm (BIfm – 16).

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2018 m. gegužės mėn. 25 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

Įvertinus alkoholio dehidrogenazės elektrocheminį aktyvumą ant įvairių grafito elektrodų sukurti glicerolio biojutiklį. Naudojant glicerolio biojutiklį parinkti optimalų darbinį potencialą ir pH reikšmę. Parinkus optimalias sąlygas nustatyti tiesinę glicerolio biojutiklio dalį, jautrį bei detekcijos limitą.

Baigiamojo darbo rengimo konsultantai:

lekt. Dalius Ratautas

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

Vadovas:

prof. habil. dr. Juozas Kulys

(Parašas)

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

Užduotį gavau:

Eimantas Ramonas

(Parašas)

(Vardas, pavardė)

(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk.
Data-.....-.....

Antrosios pakopos studijų **Bioinžinerijos** programos magistro baigiamasis darbas 4

Pavadinimas **Glicerolio biojutiklio kūrimas ir tyrimas**

Autorius **Eimantas Ramonas**

Vadovas **Juozas Kulys**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Glicerolis susidaro fermentacijos ir biodyzelino gamybos metu, jis taip pat naudojamas kaip maisto priedas bei yra aptinkamas žinduolių kraujyje. Norint kontroliuoti biotechnologinius procesus, įvertinti įvairių produktų kokybę bei anksčiau nustatyti galimus sveikatos sutrikimus reikia nustatyti glicerolio koncentraciją. Glicerolio koncentracijai įvertinti naudojami spektrofotometriniai ir chromatografiniai metodai, kuriems atlikti reikia daug laiko, brangios įrangos ir kvalifikuotų specialistų. Kaip alternatyva glicerolio kiekiui įvertinti minimi elektrocheminiai analizės metodai panaudojant glicerolio biojutiklius. Pastarieji pasižymi dideliu jautrumu, draugiškumu vartotojui ir yra ekonomiškai efektyvesni. Baigiamajame magistro darbe buvo sukurtas ir ištirtas glicerolio biojutiklis, kurio kūrimui panaudota alkoholio dehidrogenazė iš *Pseudomonas putida* HK5 kamieno. Iš pat pradžių sukurti keturių tipų fermentiniai elektrodai ir įvertinta fermento vykdoma biokatalizė. Remiantis biokatalizės efektyvumu parinkta tinkamiausia fermentinio elektrodo konfigūracija biojutikliui kurti: anglies nanovamzdeliais nanostruktūrizuoto grafito elektrodo paviršius modifikuotas tetratiafulvalenu ir imobilizuotas fermentas. Nustatyta, kad optimaliomis sąlygomis (50 mV vs SCE, pH 7,5, 25 °C) glicerolio biojutiklis pasižymėjo $106 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ jautrumu tiesinėje 0,0126 – 0,57 mM dalyje. Taip pat biojutiklis pasižymėjo 2 μM detekcijos limitu. Naudojant sukonstruotą biojutiklį nustatyta glicerolio koncentracija nežinomos koncentracijos glicerolio tirpale ir matuota glicerolio koncentracija kraujo plazmoje. Darbą sudaro aštuonios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, metodai ir medžiagos, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros šaltiniai, padėka ir priedai. Darbo apimtis 55 p. be priedų, 28 paveikslai, 3 lentelės ir 64 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: anglies nanovamzdeliai, alkoholio dehidrogenazė, glicerolio biojutiklis, glicerolis

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

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

Master Degree Studies **Bioengineering** study programme Master Graduation Thesis 4
Title **Creation and Characterization of Glycerol Biosensor**
Author **Eimantas Ramonas**
Academic supervisor **Juozas Kulys**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

Glycerol is byproduct of fermentation and biodiesel production processes. It is used as food additive and is known to be one of blood plasma compounds in its free state. In order to control various biotechnological processes and ensure proper health care determination of glycerol concentration is needed. Most commonly glycerol concentration is determined spectrophotometrically and chromatographically. These determination methods are time consuming, requires expensive apparatus and high qualification specialists. As the alternative electrochemical methods is proposed by utilizing glycerol biosensors. Glycerol biosensors are known to be more accurate, user friendly and more economically efficient. In this master thesis glycerol biosensor using alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas putida* HK5 stain was created and characterized. At first, four enzymatic electrodes were created and biocatalysis of enzyme was evaluated. Based on biocatalysis efficiency of enzymatic electrode glycerol biosensor was created by immobilization of alcohol dehydrogenase on to tetrathiafulvalene modified and carbon nanotubes nanostructured graphite's rod electrode. It was demonstrated that at the optimal conditions (50 mV vs SCE, pH 7,5, 25 °C) created glycerol biosensor exhibited $106 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ sensitivity in linear range from 0,0126 to 0,57 mM of glycerol. Created glycerol biosensor demonstrated 2 μM detection limit. Characterized glycerol biosensor was utilized for determination of glycerol in solution consisting of unknown glycerol concentration and in blood's plasma. Structure: introduction, literature review, materials and methods, results and discussion, conclusions, references, acknowledgment and appendices. Thesis consists of: 55 p. text without appendices, 28 pictures, 3 tables and 64 bibliographic entries. Appendixes included.

Keywords: carbon nanotubes, alcohol dehydrogenase, glycerol biosensor, glycerol

Vilniaus Gedimino technikos universiteto egzaminų,
sesijų ir baigiamųjų darbų rengimo bei gynimo
organizavimo tvarkos aprašo
2 priedas

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Bioinžinerija, BIfm-16

(Studijų programa, akademinė grupė)

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO)

SĄŽININGUMO DEKLARACIJA

2018 m. gegužės 25 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Glicerolio biojutiklio kūrimas ir tyrimas“ patvirtintas 2017 m. spalio mėn. 26 d. dekanų potvarkiu Nr. 443fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Prenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo mokslininkai ir specialistai: Dalius Ratautas. Mano darbo vadovas prof. habil. dr. Juozas Kulys.

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą (projektą) nėra. Jokių įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

(Parašas)

EIMANTAS RAMONAS

(Vardas ir pavardė)

Turinys

Paveikslų sąrašas	9
Santrumpos.....	11
Įvadas	13
1. Literatūros apžvalga	15
1.1. Amperometriniai biojutikliai	16
1.1.1. Pirmosios kartos biojutiklis.....	16
1.1.2. Antrosios kartos biojutiklis.....	17
1.1.3. Trečiosios kartos biojutiklis.....	18
1.2. Elektronų pernaša.....	20
1.2.1. Netiesioginė elektronų pernaša	20
1.2.2. Mediatoriai	22
1.2.3. Tiesioginė elektronų pernaša.....	23
1.3. Anglies nanovamzdeliai.....	24
1.4. Fermentų imobilizacija.....	25
1.5. Alkoholio dehidrogenazė.....	27
1.6. Glicerolio biojutikliai	30
2. Metodai ir medžiagos	33
2.1. Įranga.....	33
2.2. Reagentai	33
2.3. Fermentas.....	34
2.4. Elektrodų ruošimas elektrocheminiam fermento aktyvumui įvertinti.....	34
2.5. Glicerolio biojutiklio ruošimo procedūra	35
2.6. Elektrocheminės analizės metodai	35
2.6.1. Ciklinė voltamperometrija	35
2.6.2. Chronoamperometrija.....	36
2.7. Kinetinių parametrų matavimo homogeninėje terpėje metodas	37

3. Rezultatai ir jų aptarimas.....	38
3.1. Alkoholio dehidrogenazės K_M ir k_{cat} homogeninėje terpėje.....	38
3.2. Fermentinio elektrodo kompozicijos parinkimas glicerolio biojutikliui	38
3.2.1. Alkoholio dehidrogenazės elektrocheminis aktyvumas ant grafito elektrodo	39
3.2.2. Alkoholio dehidrogenazės elektrocheminis aktyvumas ant TTF modifikuoto grafito elektrodo	39
3.2.3. Alkoholio dehidrogenazės elektrocheminis aktyvumas ant CNT nanostruktūrizuoto grafito elektrodo.....	40
3.2.4. Alkoholio dehidrogenazės elektrocheminis aktyvumas ant CNT nanostruktūrizuoto ir TTF modifikuoto grafito elektrodo.....	41
3.3. Glicerolio biojutiklio parametrų įvertinimas	41
3.3.1. Kinetinių (I_{max} ir K_M) biojutiklio parametrų nustatymas	41
3.3.2. Glicerolio biojutiklio jautrio priklausomybė nuo potencialo	43
3.3.3. pH įtaka glicerolio biojutiklio aktyvumui.....	43
3.3.4. Glicerolio biojutiklio jautris ir detekcijos limitas.....	44
3.3.5. Biojutiklio stabilumas.....	46
3.4. Glicerolio biojutiklio panaudojimas.....	46
Išvados	49
Literatūros sąrašas	50
Padėka	55
Priedai	56

Paveikslų sąrašas

1.1 pav. „Yellow Spring“ kompanijos komercializuoto gliukozės biojutiklio, naudojamo kaip standartas, schema	16
1.2 pav. Scheminis antrosios kartos biojutiklių veikimas.....	18
1.3 pav. Trečiosios kartos laktozės biojutiklio veikimo principas	19
1.4 pav. Homogeninės mediatorinės elektronų pernašos schema	21
1.5 pav. Heterogeninė mediatorinė elektronų pernaša tarp GOx ir elektrodo.....	21
1.6 pav. TTF (a) ir TCNQ (b) struktūros pokyčiai redokso reakcijų metu	23
1.7 pav. Netiesioginės (a) ir tiesioginės (b) elektronų pernašos skirtumas.....	24
1.8 pav. Anglies nanovamzdeliai. a – grafeno lapas, b – vienasienis CNT, c – daugiasienis CNT	25
1.9 pav. Trimatė ADH IIG struktūra.....	27
1.10 pav. PQQ molekulės orientacija PQQ domene: (a) horizontaliai ir (b) vertikalčiai.....	28
1.11 pav. PQQ redukcijos mechanizmas vykstant substrato oksidacijai (a) ir vidinės elektronų pernašos kelias tarp PQQ ir hemo (b).....	29
1.12 pav. Multif fermentinio glicerolio biojutiklio veikimo principas	31
2.1 pav. (a) Darbinio elektrodo potencialo kitimas laike, atliekant CV analizę ir (b) srovės stiprio kitimas CV analizės metu.....	35
2.2 pav. (a) Darbinio elektrodo potencialo kitimas laike, atliekant CA analizę ir (b) srovės stiprio pokytis CA analizės metu pakeičiant sąlygas	36
3.1 pav. Pradinio ADH katalizuojamos reakcijos greičio priklausomybė nuo glicerolio koncentracijos. Duomenys glodinti taikant Michaelis-Menten modelį. Standartinė paklaida 2 %	38
3.2 pav. C/ADH elektrodo CV: buf. tirpalas be glicerolio ir su 50 mM glicerolio.....	39
3.3 pav. C/TTF/ADH elektrodo CV: buf. tirpalas be glicerolio ir su 50 mM glicerolio	40
3.4 pav. C/CNT/ADH elektrodo CV: buf. tirpalas be glicerolio ir su 50 mM glicerolio	40
3.5 pav. C/CNT/TTF/ADH elektrodo CV: buf. tirpalas be glicerolio ir su 50 mM glicerolio	41
3.6 pav. Glicerolio biojutiklio generuojamų srovų kitimas laike, didinant glicerolio koncentraciją	42
3.7 pav. Glicerolio biojutiklio generuojamų srovių pokyčio priklausomybė nuo glicerolio koncentracijos. Duomenys glodinti taikant Michaelis-Menten modelį.....	42
3.8 pav. Glicerolio biojutiklio jautrio priklausomybė nuo potencialo.....	43

3.9 pav. Glicerolio biojutiklio santykinio aktyvumo priklausomybė nuo pH. Duomenys glodinti taikant „varpo“ modelį.....	44
3.10 pav. Glicerolio biojutiklio srovės kitimas laike, didinant glicerolio koncentraciją.....	45
3.11 pav. Biojutiklio srovės pokyčio priklausomybė nuo glicerolio koncentracijos. Duomenys glodinti tiesės lygtimi.....	45
3.12 pav. Biojutiklio santykinio aktyvumo priklausomybė nuo laiko.....	46
3.13 pav. Biojutiklio generuojamos srovės kitimas laike nustatant glicerolio koncentraciją.....	47
3.14 pav. Glicerolio biojutiklio generuojamos srovės kitimas laike matuojant glicerolio koncentraciją kraujo plazmoje.....	48

Santrumpos

ADH	Alkoholio dehidrogenazė
ADP	Adenozin-5'-difosfatas
Ag/AgCl	Palyginamasis sidabro/sidabro chlorido elektrodas (0,21 V vs SHE)
ATP	Adenozin-5'-trifosfatas
C/ADH	Fermentinis grafito elektrodas su alkoholio dehidrogenaze
C/CNT/ADH	Anglies nanovamzdeliais nanostruktūrizuotas grafito elektrodas su alkoholio dehidrogenaze
C/CNT/TTF/ADH	Tetratiafulvalenu modifikuotas anglies nanovamzdeliais nanostruktūrizuotas grafito elektrodas su alkoholio dehidrogenaze
C/TTF/ADH	Tetratiafulvalenu modifikuotas grafito elektrodas su alkoholio dehidrogenaze
CA	Chronoamperometrija
CDH	Celobiozės dehidrogenazė
CNT	Anglies nanovamzdeliai
CRE	Kreatinazė
CRK	Kreatino kinazė
CV	Ciklinė voltamperometrija / ciklinė voltamperograma
FAD	Oksiduotos formos flavin adenino dinukleotidas
FADH ₂	Redukuotos formos flavin adenino dinukleotidas
Fer _{oks}	Oksiduotos formos fermentas
Fer _{red}	Redukuotos formos fermentas
GlyDH	Glicerolio dehidrogenazė
GlyK	Glicerolio kinazė
GOx	Gliukozės oksidazė
HRP	Peroksidazė
IUPAC	Tarptautinė grynosios ir taikomosios chemijos sąjunga
Med _{oks}	Oksiduotos formos redokso mediatorius
Med _{red}	Redukuotos formos redokso mediatorius
NAD ⁺	Oksiduotos formos nikotinamido adenino dinukleotidas

NAD-ADH	Nuo nikotinamido adenino dinukleotido priklausoma alkoholio dehidrogenazė
NADH	Redukuotos formos nikotinamido adenino dinukleotidas
P	Produktas
PQQ	Oksiduotos formos pirolochinolino chinonas
PQQ-ADH	Nuo pirolochinolino chinono priklausoma alkoholio dehidrogenazė
PQQ-GlyDH	Nuo pirolochinolino chinono priklausoma glicerolio dehidrogenazė
PQQH ₂	Redukuotos formos pirolochinolino chinonas
S	Substratas
SaOx	Sarkozino oksidazė
SCE	Sotusis kalomelio elektrodas (0,244 V vs SHE)
SHE	Standartinis vandenilio elektrodas
TCNQ	Tetracianochinodimetanas
TEP	Tiesioginė elektronų pernaša
TTF	Tetratiafulvalenas

Išvadas

Glicerolio biojutiklis – tai analitinis įrankis, kuris biokatalizinėmis redokso reakcijomis leidžia įvertinti glicerolio koncentraciją tikslinėje analizėje [1]. Glicerolis yra labai plačiai paplitęs junginys, kuris susidaro fermentacijos ir biodyzelino gamybos metu [2, 3]. Taip pat jis plačiai naudojamas maisto pramonėje kaip maisto priedas, farmacijoje [4]. Laisvo glicerolio aptinkama ir žinduolių kraujo plazmoje, kurioje pakitęs laisvo glicerolio kiekis gali būti siejamas su autonominėmis nervų sistemos ligomis, diabetu ir metabolizmo sutrikimais [5, 6]. Profesionaliaame sporte glicerolis gali būti naudojamas kaip draudžiamus preparatus maskuojantis junginys, todėl yra įtrauktas į draudžiamų junginių sąrašą kaip maskuojantis agentas [7].

Norint automatizuoti biotechnologinius procesus, greitai ir efektyviai nustatyti maisto kokybę ar užtikrinti geresnę sveikatos priežiūrą, reikia sukurti metodus, kurie leistų greitai ir tiksliai tam tikrais atvejais net realiu laiku nustatyti glicerolio koncentraciją. Deja, bet šiuo metu naudojami glicerolio koncentracijos nustatymo metodai reikalauja nemažai laiko, brangios įrangos ir aukštos kvalifikacijos specialistų. Glicerolio biojutiklis būtų vienas iš šių problemų sprendimo būdų.

Paskutiniuosius tris dešimtmečius ypač daug dėmesio skiriama glicerolio biojutiklių tyrimams. Sukurti biojutikliai daugiausia skirti glicerolio koncentracijos fermentacijos metu ir vyne nustatyti. Beveik visų biojutiklių bioreceptorių sudaro nuo NAD priklausoma glicerolio dehidrogenazė. Šių biojutiklių pritaikymas praktikoje ribotas, nes naudojamas kofermentas NAD yra brangus. Prieš metus buvo sukurtas patobulintas glicerolio biojutiklis panaudojant nuo NAD priklausomą glicerolio dehidrogenazę. Brangus kofermentas buvo kovalentiškai prijungtas prie elektrodo ir imobilizuotas fermentas. Biojutiklio veikimas pagrįstas tiesiogine elektronų pernaša, tačiau darbinis biojutiklio potencialas labai aukštas [8]. Dėl naudojamo brangaus kofermento ir aukšto darbinio potencialo šio biojutiklio pritaikymas praktikoje gan miglotas.

Kiek anksčiau buvo sukurtas multifermentinis glicerolio biojutiklis, kurio darbinis potencialas žemas, tačiau jo kūrimui panaudoti net penki skirtingi fermentai [1]. Naudojamų fermentų skaičius turi tiesioginę įtaką kainai, todėl jis sunkiai pritaikomas realiame gyvenime, nes yra ekonomiškai neefektyvus. Dėl šių problemų šio baigiamojo magistro darbo metu buvo sukurtas ir ištirtas žemo darbinio potencialo biojutiklis panaudojant vieną fermentą – alkoholio dehidrogenazę.

Darbo tikslas - sukurti glicerolio biojutiklį naudojant alkoholio dehidrogenazę ir įvertinti pagrindinius biojutiklio parametrus.

Darbo uždaviniai:

1. Parinkti tinkamą glicerolio biojutiklio kūrimo metodiką, atsižvelgiant į elektrocheminį alkoholio dehidrogenazės aktyvumą;
2. Įvertinti pagrindinius glicerolio biojutiklio parametrus;
3. Nustatyti glicerolio koncentraciją nežinomos koncentracijos glicerolio tirpale ir laisvo glicerolio koncentraciją kraujo plazmoje.

1. Literatūros apžvalga

Įvairioje literatūroje konceptualiai biojutikliai aprašomi skirtingai [9, 10, 11]. Tačiau remiantis šaltiniais galima pasakyti, kad apibrėžiant biojutiklio sąvoką būtina paminėti, jog jį sudaro biologinės kilmės elementas (bioreceptorius), kuris užtikrina selektyvumą, ir signalo perdavimo elementas (transduktorius), kuris leidžia atlikti kiekybinę ar pusiau kiekybinę analizę [12]. Tarptautinė grynosios ir taikomosios chemijos sąjunga biojutiklį apibrėžia kaip analitinį įrenginį, kuris specifinėmis biocheminėmis reakcijomis geba identifikuoti cheminius junginius ir nustatyti jų koncentraciją sugeneruodamas elektrinį, terminį ar optinį signalą [13].

Bioreceptorius yra atsakingas už biochemines reakcijas, kurių metu vyksta tikslinio junginio pokyčiai ir juos atlikti gali fermentai, bakterijos, eukariotinės ląstelės, nukleorūgštys, imuninės sistemos komponentai ar organelės [13]. Svarbu atkreipti dėmesį, kad bioreceptorius nėra tik biologinis elementas, jį gali sudaryti ir papildomos medžiagos ar junginiai. Biojutiklį sudarantis transduktorius yra atsakingas už bioreceptoriaus dalyje įvykusių fiziko cheminių pokyčių aptikimą, kuriuos sąlygoja vykstančios biocheminės reakcijos, ir jo pavertimą analizuojamu signalu [14].

Kuriant biojutiklius daugiausia naudojami dviejų tipų signalo transduktoriai: elektrocheminiai ir optiniai. Naudojant elektrocheminius signalo transduktorius yra gaunamas elektrinis signalas, o naudojant optinius gaunamas šviesinis signalas. Elektrocheminiai transduktoriai skirstomi į tris grupes: konduktimetrinius, potenciometrinius ir amperometrinius [15].

Pagrindiniai parametrai, kuriuos reikia įvertinti sukūrus biojutiklį, yra [16]:

1. Tiesinė dalis – tai parametras, apibrėžiantis jutiklio galimybę dirbti tam tikrame substrato koncentracijų intervale, kuriame didėjant substrato koncentracijai atsakas yra tiesinis. Kuo didesnis tiesiškumo intervalas, tuo biojutiklis geresnis;
2. Jautrumas arba jautris – tai elektrodo atsakas į tam tikrą substrato koncentraciją;
3. Specifiškumas – tai biojutiklio gebėjimas atrankiai oksiduoti ar redukuoti tikslinę analizę, o ne aplinkoje esančius kitus junginius, kurie gali sustiprinti foninį signalą. Dažniausiai specifiškumą nulemia fermentas, tačiau galimi ir kitų, elektrochemiškai aktyvių medžiagų redokso virsmai elektrodo paviršiuje;
4. Atsako laikas – tai laikas, kurio reikia, kad būtų sugeneruota 95 % atsako į analizę. Kuo trumpesnis atsako laikas, tuo jutiklis geresnis.

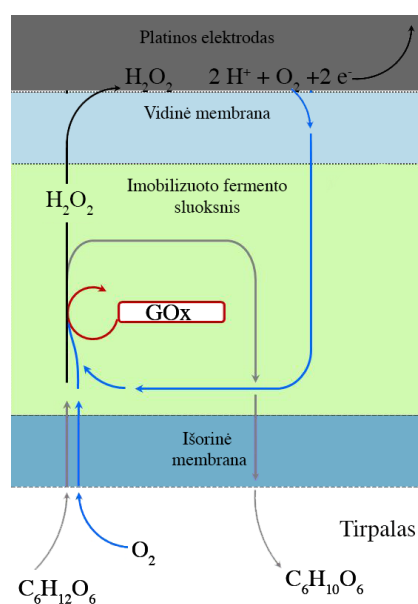
1.1. Amperometriniai biojutikliai

Biojutikliai, kurių bioreceptorių sudaro oksidoreduktazių klasės fermentai, katalizuojantys junginių oksidaciją ir/ar redukciją, signalo perdavimui dažniausiai naudojami amperometriniai transduktoriai (elektrodai) [17]. Amperometrinių biojutiklių prototipas pristatytas dar 1962 metais, kai L. Klarkas ir C. Lionsas (angl. *L. Clark and C. Lyons*) sukūrė amperometrinį gliukozės jutiklį, kurį pristačius prasidėjo įvairiausių biojutiklių kūrimas ir tobulinimai [17, 18].

Praėjus 56 metams po amperometrinio gliukozės jutiklio pristatymo galima įvertinti mokslo pasiekimus biojutiklių srityje ir išskirti tris jų kartas: pirmosios, antrosios ir trečiosios kartos jutikliai. Pirmosios kartos amperometrinių jutiklių veikimas pagrįstas deguonies arba vandenilio peroksido koncentracijos pokyčio įvertinimu, kurį leidžia nustatyti elektrocheminiai analizės metodai. Antrosios kartos amperometriniai jutikliai nėra priklausomi nuo deguonies ar kitų tirpale esančių medžiagų, nes jos yra pakeistos dirbtiniais elektronų donorais ar akceptoriais, kitaip dar žinomais kaip redokso mediatoriais, ir yra bioreceptoriaus sudedamoji dalis [19]. Biojutikliai, kurių veikimui nereikia nei deguonies, nei redokso mediatorių, yra priskiriami trečiajai amperometrinių biojutiklių kartai. Šios kartos biojutiklių veikimas pagrįstas tiesiogine elektronų pernaša tarp fermento ir transduktoriaus.

1.1.1. Pirmosios kartos biojutiklis

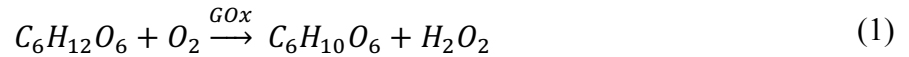
Pirmojo gliukozės biojutiklio bioreceptorių sudarė gliukozės oksidazė. Fermentas imobilizuotas įterpimo metodu elektrodo paviršiuje ir nuo tirpalo atskirtas pusiau pralaidžia membrana [18]. 1.1 paveiksle pateikta amperometrinio gliukozės biojutiklio schema.



1.1 pav. „Yellow Spring“ kompanijos komercializuoto gliukozės biojutiklio, naudojamo kaip standartas, schema ¹

¹ Parengta pagal [17]

GOx katalizuoja β -D-gliukozės oksidaciją iki β -D-gliukonolaktono, kurios metu vyksta fermento aktyviajame centre esančio kofermento FAD redukcija iki $FADH_2$. Tada seka redukuoto kofermento $FADH_2$ regeneracija molekulinio deguonimi susidarant oksiduotos formos kofermentui FAD ir vandenilio peroksido [20]. Galiausiai esant 0,6 V potencialui elektrodo paviršiuje vyksta vandenilio peroksido oksidacija sugeneruojant elektrinį signalą [21]. GOx katalizuojamą reakciją galima aprašyti reakcijos 1 lygtimi:



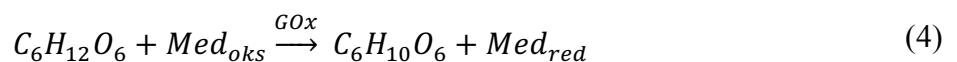
Kurią galima išskaidyti į dvi kitas lygtis:



Deja, bet pirmosios kartos jutikliai turi nemažai trūkumų. Kuriant šios kartos biojutiklius galima naudoti tik tuos fermentus, kurie katalizuodami tikslinio junginio oksidaciją ar redukciją iki produkto geba keisti deguonies ar vandenilio peroksido koncentraciją. Antras trūkumas yra tas, kad deguonies, kuris yra fermento kosubstratas, tirpumas vandeniniuose tirpaluose yra ribotas ir paprastai jo koncentracija siekia vos 0,253 mM, todėl priklausomai nuo reakciją katalizuojančio fermento katalizinių parametrų nukenčia svarbus biojutiklio parametras – tiesinė atsako į substratą dalis [17].

1.1.2. Antrosios kartos biojutiklis

Sprendžiant pirmosios kartos biojutiklių problemas, kurios susijusios su fermentų kosubstrato problema, buvo pradėti kurti antrosios kartos biojutikliai. Pagrindinis skirtumas tarp pirmosios ir antrosios kartos biojutiklių yra tas, kad kuriant biojutiklį papildomai yra naudojamas sintetinis redokso mediatorius, kurio užduotis - vykdyti elektronų mainus tarp fermento aktyviojo centro ir elektrodo [21]. Naudojant GOx galima sukonstruoti ir antrosios kartos biojutiklį ir aprašyti tomis pačiomis cheminių reakcijų lygtimis, tik skirtumas tas, kad redukuotos formos kofermentas regeneruojamas ne O_2 , o oksiduotos formos redokso mediatoriumi. Bendrai vykstanti reakcija aprašoma 4 lygtimi:



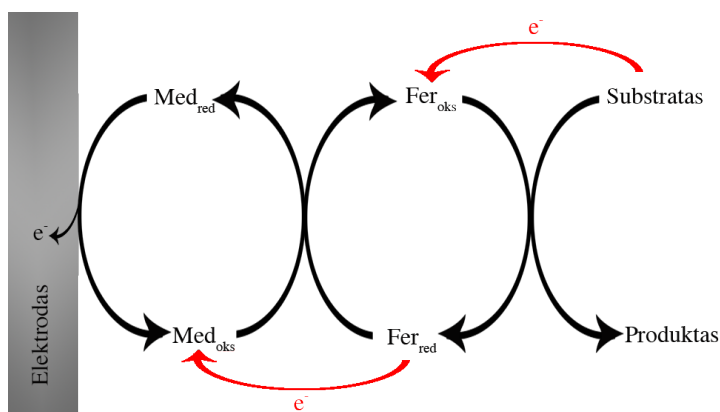
4 lygtis gali būti išskaidyta į dvi atskiras lygtis, kurios aprašo fermento aktyviajame centre vykstančias reakcijas:



Redukuotos formos mediatorius regeneruojamas jį oksiduojant elektrodo paviršiuje prie jam būdingo redokso potencialo. Mediatoriaus oksidacija gali būti aprašyta 7 lygtimi, kurios metu yra gaunamas signalas.



Antrosios kartos biojutikliai yra pranašesni už savo pirmtakus, nes: (i) signalas generuojamas esant žemesniam potencialui, (ii) signalo dydis nepriklauso nuo deguonies koncentracijos. Sintetinių redokso mediatorių panaudojimas suteikia galimybę biojutiklių kūrimui naudoti ne tik oksidazes, bet ir dehidrogenazes ar kitus oksidoreduktazių klasei priklausančius fermentus. Tačiau antrosios kartos biojutikliai nėra idealūs. Jų pagrindinė problema yra susijusi su mediatoriaus netekimu laike, dėl kurio nukenčia visi svarbiausi biojutiklio parametrai. Antros kartos biojutiklių veikimas schematiškai pavaizduotas 1.2 paveiksle [17].



1.2 pav. Scheminis antrosios kartos biojutiklių veikimas²

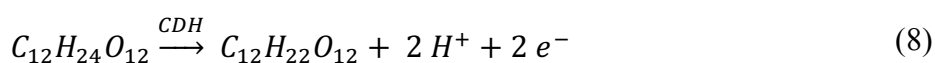
Iš 1.2 paveikslo matyti, kad oksiduotos formos fermentas katalizuoja substrato oksidaciją iki produkto susidarant redukuotos formos fermentui, kuris oksiduojamas panaudojant Med_{oks}, pastarajam prisijungiant elektronus. Galiausiai Med_{red} yra oksiduojamas prie tam tikro potencialo elektrodo paviršiuje, kuris gauna elektronus ir sugeneruojamas signalas.

1.1.3. Trečiosios kartos biojutiklis

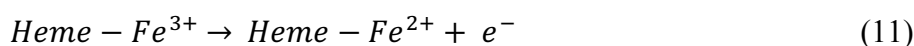
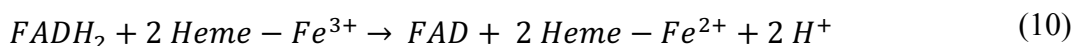
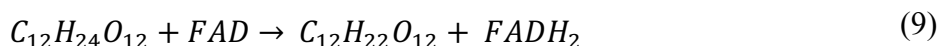
Trečiosios kartos biojutiklių vystymo priežastis labai panaši, kaip ir antrosios kartos – siekiama išspręsti kylančias problemas. Trečiosios kartos biojutikliuose siekiama atsisakyti mediatorių, realizuojant tiesioginę elektronų pernašą tarp fermento aktyviojo centro ir elektrodo. Taigi šios kartos biojutikliuose nebereikia fermento kosubstrato ar redokso mediatoriaus, nes užtikrinama TEP tarp fermento aktyviajame centre esančios prostetinės grupės (kofermento) ir elektrodo. Kaip biokatalizatorius, kuriant trečiosios kartos biojutiklius, galima naudoti oksidoreduktazių klasės fermentus, kurie katalizuoja oksidacijos ir redukcijos reakcijas. Pagrindinė problema su kuria susiduriama vystant šiuos biojutiklius yra ta, kad reikia užtikrinti

² Parengta pagal [17]

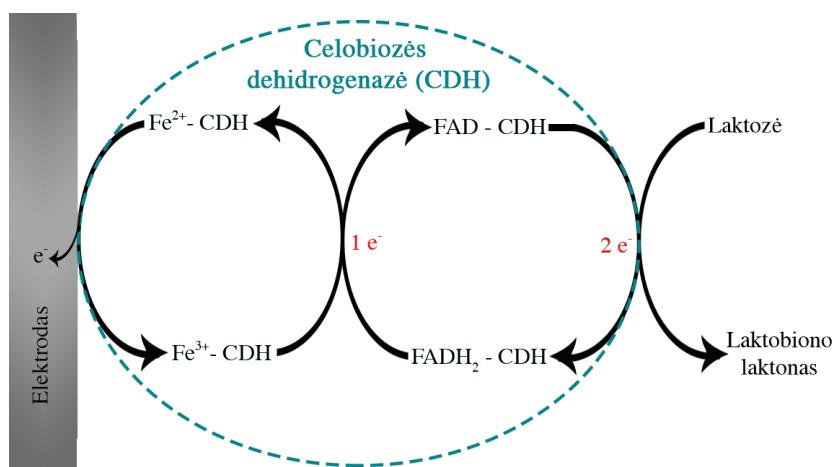
tinkamą fermento molekulių orientaciją užtikrinant efektyvią TEP. Deja, bet vien tinkamos orientacijos nepakanka, nes svarbi ir aktyviojo centro vieta baltymo molekulėje. Jeigu jis giliai baltymo globulėje, TEP pasiekti sudėtinga ar to padaryti išvis neįmanoma [19]. Žinoma, kad didėjant atstumui tarp elektrodo paviršiaus ir fermento aktyviojo centro elektronų pernašos efektyvumas mažėja eksponentiškai. 2006 metais buvo sukonstruotas trečios kartos laktozės biojutiklis, kurio veikimas buvo paremtas TEP tarp celobiozės dehidrogenazės ir aukso elektrodo. Fermentas katalizuoja laktozės oksidaciją vykstat fermento aktyviajame centre esančio FAD redukcijai iki FADH₂ (9 lygtis). FADH₂ per fermente esantį hemą palaipsniui oksiduojamas elektrodo paviršiuje, taip sugeneruojant elektrinį signalą (10 ir 11 lygtys) [22]. Visą vykstantį procesą galima aprašyti bendra reakcijos lygtimi:



8 lygtį galima išskaidyti į 3 atskiras lygtis:



9 – 11 lygtys schematiškai iliustruotos 1.3 paveiksle:



1.3 pav. Trečiosios kartos laktozės biojutiklio veikimo principas³

Iš 1.3 paveikslo matyti, kad fermento aktyviajame centre vykstant laktozės oksidacijai vyksta prostetinės grupės redukcija dviem elektronais. Tada fermente esantis hemo Fe³⁺ jonas palaipsniui oksiduoja FADH₂ pasikeičiant heme esančio geležies jono oksidaciniam laipsniui iš 3+ į 2+, kuris gautą elektroną atiduoda elektrodui prie tam tikro potencialo, nes vyksta Fe²⁺ oksidacija iki Fe³⁺. Pilnai FADH₂ oksidacijai reikia dviejų heme esančio geležies atomo redukcijos ir oksidacijos ciklų, kurių metu sugeneruojamas signalas [22].

³ Parengta pagal [22]

1.2. Elektronų pernaša

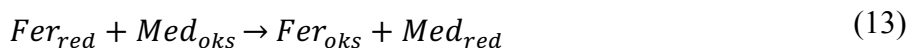
Procesai, kurių metu elektronai perduodami iš vieno junginio kitam, vadinami elektronų pernašos procesais. Elektronų pernašos procesai aprašomi redokso reakcijomis, nes kinta reakcijoje dalyvaujančių junginių oksidacijos laipsniai [23]. Daugelis gamtoje vykstančių procesų yra paremti elektronų pernaša: fotosintezė, kvėpavimas, oksidacinis fosforilinimas ir pan. [24]. Elektronų pernaša skirstoma į tris rūšis: heterogeninė, vidinė ir išorinė. Būtent heterogeninės elektronų pernašos principu yra pagrįstas biojutiklių veikimas, nes elektronų judėjimas vyksta tarp biokatalizatoriaus ir elektrodo. Heterogeninė elektronų pernaša smulkiau dar skirstoma į tiesioginę ir netiesioginę elektronų pernašą [19].

1.2.1. Netiesioginė elektronų pernaša

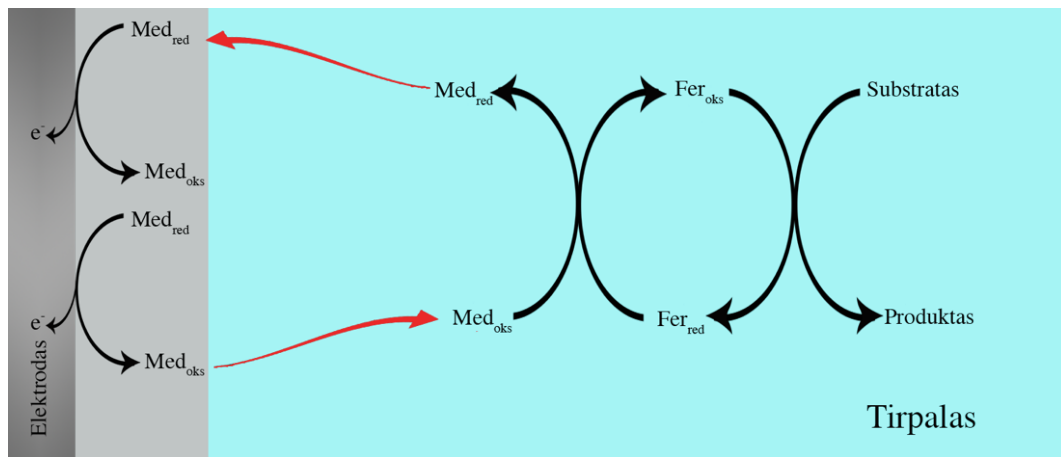
Netiesioginė elektronų pernaša kitaip dar vadinama mediatorine elektronų pernaša, nes elektronų judėjime tarp biokatalizatoriaus ir elektrodo dalyvauja mažos molekulinės masės junginys, vadinamas redokso mediatoriumi [25]. Skirtingi mediatoriai turi skirtingą molekulinę struktūrą, dėl kurios skiriasi savybėmis bei pasižymi skirtingu redokso potencialu. Elektronų pernašos metu tarp fermento molekulių ir elektrodo mediatoriai periodiškai keičia savo formas: iš oksiduotos į redukuotą, kuri vėl verčiama į oksiduotą ir ciklas tęsiasi. Galimas ir atvirkščias variantas - iš redukuotos į oksiduotą, tačiau principas išlieka tas pats [25].

Mediatoriai efektyviai konkuruoja su natūraliais fermento kosubstratais, pavyzdžiui molekuliniu deguonimi, užtikrindami efektyvų elektronų judėjimą tarp fermento ir elektrodo suteikdami galimybę stebėti srovės pokyčius prie žemesnio darbinio potencialo [26, 27]. Mediatorinė elektronų pernaša smulkiau skirstoma į homogeninę ir heterogeninę elektronų pernašą [25].

Homogeninė mediatorinė elektronų pernaša gali būti aprašoma 12 – 14 lygtimis:



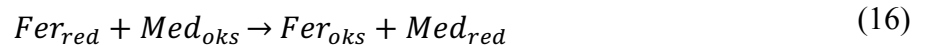
Iš pat pradžių Med_{red} oksiduojamas elektrodo paviršiuje prie jam būdingo redokso potencialo susidarant Med_{oks} . Tada Med_{oks} difunduoja nuo elektrodo paviršius į tirpalą, kuriame sąveikauja su Fer_{red} susidarant Med_{red} ir Fer_{oks} . Galiausiai Fer_{oks} katalizuoja substrato virtimą produktu susidarant Fer_{red} [25]. Šios reakcijos lygtis iliustruotos 1.4 paveiksle.



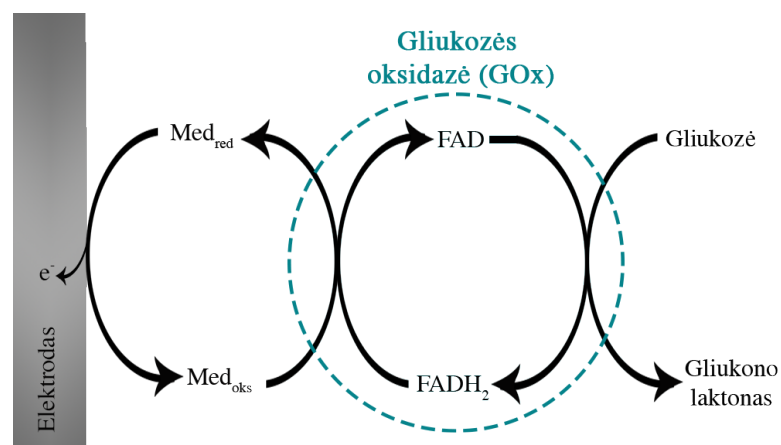
1.4 pav. Homogeninės mediatorinės elektronų pernašos schema⁴

Taikant mediatorinę elektronų pernašą reikia atsižvelgti į mediatoriaus gebamą pernešti elektronų skaičių, nes žinoma, kad flavo ir chinoniniai fermentai katalizuoja dviejų elektronų pernašą. Jeigu naudojamas flavo fermentas ir mediatorius gebantis atlikti vieno elektrono pernašą, tai pilnam kataliziniui ciklui atlikti reikės dviejų mediatoriaus molekulių [28, 29].

Kalbant apie heterogeninę mediuotą elektronų pernašą reikia paminėti, kad yra išskiriamos dvi šios pernašos tipo sistemos: pirma, kai mediatorius yra tirpalo sudėtyje, o antra, kai mediatorius yra įkomponuotas elektrodo paviršiuje [25]. Antruoju atveju neišvengiama mediatoriaus praradimo, nes ilgainiui mediatorius difunduoja į tirpalą [30]. Heterogeninė mediatorinė elektronų pernaša aprašoma 15 – 17 lygtimis [31].



Kur $Fer_{oks}S$ yra fermento-substrato kompleksas. Šios reakcijos lygtys puikiai atspindi elektronų pernašą tarp elektrodo paviršiaus ir GOx, kuri schematiškai atvaizduota 1.5 paveiksle.



1.5 pav. Heterogeninė mediatorinė elektronų pernaša tarp GOx ir elektrodo⁵

⁴ Parengta pagal [25]

⁵ Parengta pagal [27]

GOx katalizuoja gliukozės oksidaciją iki gliukonolaktono, kurios metu vyks fermento aktyviajame centre esančio FAD redukcija iki FADH₂. Kofermentas oksiduojamas mediatorinės elektronų pernašos principu, kurioje mediatoriaus vaidmenį gali atlikti molekulinis deguonis (natūralus kosubstratas) arba dirbtinis redokso mediatorius, pavyzdžiui ferocenas. Feroceno ir fericeno redokso poros atveju, pilnai FADH₂ oksidacijai sunaudojamos dvi feroceno molekulės, susidaro FAD ir dvi fericeno molekulės, kurios oksiduojamos elektrodo paviršiuje [27].

1.2.2. Mediatoriai

Mediatoriai - tai dirbtiniai elektronų pernašos dalyviai, kurie dalyvauja redokso reakcijose su biologiniais komponentais padidindami elektronų pernašos efektyvumą. Tai mažos molekulinės masės junginiai, kurie atlieka elektronų pernašą tarp fermento redokso centro ir elektrodo paviršiaus [17]. Pernašoje dalyvaujantys mediatoriai turi pasižymėti penkios būtinomis savybėmis:

- Greitai reaguoti su redukuotos formos fermentu;
- Pasižymėti grįžtama heterogenine kinetika;
- Žemas, nuo vandenilio jonų koncentracijos nepriklausomas, oksidacijos potencialas;
- Stabilus tiek oksiduotoje, tiek redukuotoje formoje;
- Redukuotos formos mediatorius neturėtų reaguoti su deguonimi.

Pagal savo kilmę mediatoriai skirstomi į tris grupes: neorganiniai, organiniai ir feroceno dariniai [17].

Neorganiniai mediatoriai

Fericianido jonas buvo vienas pirmųjų, kuris buvo panaudotas kaip mediatorius. Tai anijoninis mediatorius, kuris dalyvauja vieno elektrono pernašoje nedalyvaujant vandenilio protonui. Kadangi tai anijoninis mediatorius, tai elektrodo paviršiuje gali būti inkorporuojamas naudojant teigiamą krūvį turinčias medžiagas. Fericianidas puikiai tinka vienkartinio naudojimo biojutikliams kurti, nes mediatoriaus praradimas nėra problema, dėl trumpo ir vienkartinio biojutiklio naudojimo [32].

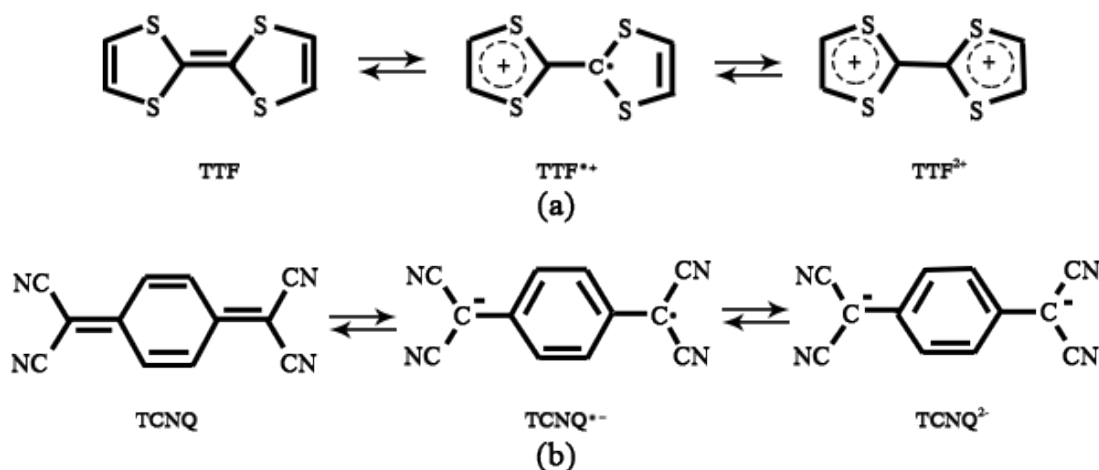
Metalų oksidai, tokie kaip Fe₂O₃, Fe₃O₄, MnO₂, SnO₂, taip pat gali būti naudojami kaip mediatoriai grafito pastoje (angl. *graphite paste*) ar elektrodų spausdinimo rašale (angl. *screen-printing ink*). Ypač geri rezultatai gaunami naudojant platinos šeimos metalų oksidus, pavyzdžiui IrO₂, užtikrinant žemą biojutiklio darbinį potencialą [33].

Organiniai mediatoriai

Žinoma nemažai organinės kilmės redokso junginių, kurie gali būti panaudojami kaip biojutiklių mediatoriai, pavyzdžiui benzochinonas ir jo dariniai ar dichinonai (Folio reagentas). Taip pat naudojami redokso dažai (angl. *redox dyes*), kurie dar naudojami redokso titravime.

Redokso dažams priskiriami įvairūs fenazino, fenoksiazino ar fenotioazino junginiai [17]. Kadangi tai chinoniai junginiai, redokso reakcijoje tarp mediatoriaus ir biologinio elemento dalyvauja hidridas, todėl tai nuo pH priklausoma reakcija. Nėgana to, naudojant tokius mediatorius stebima neigiama šviesos ir deguonies įtaka mediatoriui, kuri neigiamai veikia biojutiklio stabilumą [17]. Kitai organinių mediatorių grupei priklauso heteroatomus turintys nesotieji aromatiniai junginiai, kurių joninės ar radikalinės formos yra stabilizuojamos panaudojant π elektronų orbitales. Dėl gebėjimo paskirstyti krūvį molekulėje redokso reakcijų metu nedalyvauja vandenilio jonai, todėl reakcija nepriklausoma nuo pH [17].

Geriausiai žinomi šios grupės redokso mediatoriai yra tetracianochinodimetanas ir tetratiafulvalenas [34, 35]. TCNQ žinomas kaip elektronų akceptorius, o TTF elektronų donoras. Abu junginiai dalyvauja dviejų pakopų, vieno elektrono pernašoje. Pirmosios redokso reakcijos metu susidaro jono radikalas, o antrosios dijonas. Biojutikliuose su šiais mediatoriais naudojama tik pirmoji redokso reakcija, kurios metu mediatorius atiduoda arba prisijungia tik vieną elektroną [17].



1.6 pav. TTF (a) ir TCNQ (b) struktūros pokyčiai redokso reakcijų metu⁶

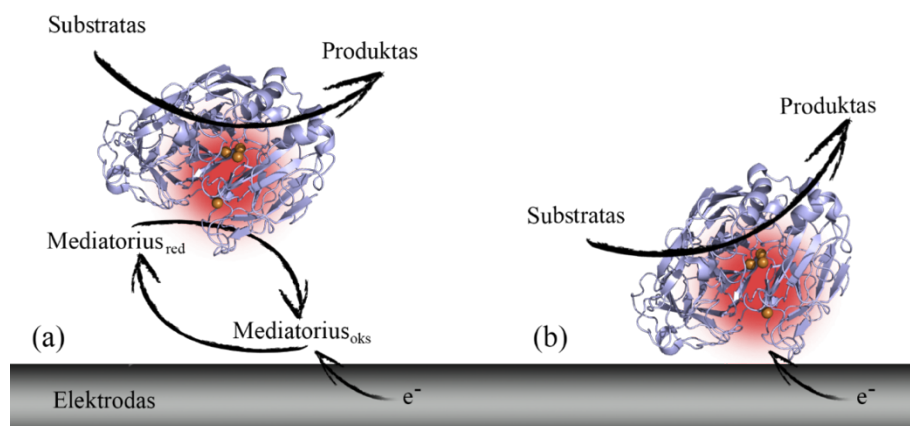
XX a. antroje pusėje pademonstruota, kad TTF yra puikus mediatorius, kuris užtikrina efektyvią elektronų pernašą tarp GOx ir grafito elektrodo. Taip pat 2008 metais pademonstruota, kad TTF modifikuoti anglies nanovamzdeliai geba efektyviai vykdyti elektronų pernašą tarp fermento aktyviojo centro ir elektrodo [36].

1.2.3. Tiesioginė elektronų pernaša

Elektronų pernaša, kurios metu elektronų mainai tarp fermento aktyviojo centro ir elektrodo vyksta tiesiogiai vadinama tiesiogine elektronų pernaša (1.7 pav. (b)) [37]. Priklausomai nuo fermento katalizuojamos reakcijos tipo elektronų donaru ar akceptoriumi tampa elektrodas, o ne

⁶ Parengta pagal [17]

redokso aktyvus junginys [38]. Tiesioginės elektronų pernašos fenomenas įrodytas dar 1977 metais, kai buvo pademonstruotas citochromo c elektrocheminis aktyvumas ant modifikuotų aukso elektrodų [39]. Iki pat šios dienos nėra iki galo išaiškintas visas TEP principas, tačiau aišku, kad elektronų pernašos efektyvumas eksponentiškai mažėja, didėjant elektronų tuneliavimo atstumui (0,4 – 1,2 nm), todėl labai svarbu užtikrinti tinkamą fermento orientavimą į paviršių [40, 41]. Šiuo metu TEP principu veikia daug įvairių fermentų: lakazės, askorbato oksidazė, superoksido dismutazė, peroksidazės, hidrogenazė bei įvairios dehidrogenazės [42]. Be išimties beveik visi TEP principu galintys veikti fermentai savo struktūroje turi metalo jonus [43].



1.7 pav. Netiesioginės (a) ir tiesioginės (b) elektronų pernašos skirtumas⁷

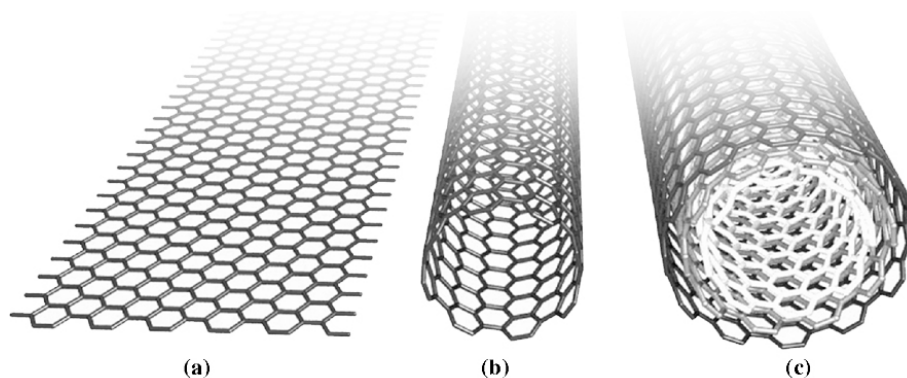
1.3. Anglies nanovamzdeliai

Anglies nanovamzdeliai – tai cilindrinės formos anglies nanostruktūra, kurioje anglies atomai tarpusavyje susijungę kovalentinėmis jungtimis [45]. Nuo 2000 metų CNT dėl savo struktūros ir savybių yra labai intensyviai tyrinėjama nano skalės struktūra. Elektrochemijoje anglies nanostruktūros naudojamos kaip matricos biojutiklių ir bioelektrodų kūrimui [46]. Dėl savo konjuguotos π elektronų sistemos (sp^2 hibridizacijos anglies atomai) CNT pasižymi labai geru laidumu elektros srovei, formuoja nanolaidines struktūras (angl. *nanowires*), yra „draugiški“ biologinės kilmės junginiais ir pasižymi labai dideliu paviršiaus plotu [46, 47]. Dėl šių visų savybių CNT naudojami kuriant įvairias elektrokatalizines sistemas (biojutiklius, biokuro elementus), nes panaudojant CNT padidinamas elektrodo paviršiaus plotas, kuris užtikrina didelę paviršinę fermento koncentraciją [48]. Pagal savo struktūrą CNT galima suskirstyti į dvi grupes: vienasienius (angl. *single-walled*) ir daugiasienius (angl. *multi-walled*) [45, 49]. Išilgai perkirpus tiek vienasienius, tiek daugiasienius nanovamzdelius gaunamas grafeno lapas (1.8 pav. (a)). Vienasienio CNT (1.8 pav. (b)) diametras gali būti nuo 1,4 nm [45]. Daugiasieniai CNT (1.8 pav. (c)) yra sudaryti iš dviejų ar daugiau vienas kitame esančių vienasienių CNT, tai yra kai vieną vienasienį CNT iš išorės gaubia antras CNT, o pastarąjį – trečiasis ir t.t. Tarpas tarp dviejų

⁷ Parengta pagal [44]

vienasienių vamzdelių daugiasieniame CNT paprastai yra apie 3,4 Å (0,34 nm), o daugiasienio nanovamzdelio skersmuo dažniausiai būna tarp 10 – 20 nm [47].

Dėl savo struktūros CNT labai sunkiai tirpsta vandenyje, tačiau įvairių modifikacijų pagalba galima padidinti jų tirpumą (karboksi, amino grupės) [50]. Įvestos modifikacijos ne tik gali padidinti tirpumą, bet ir puikiai gali pasitarnauti toliau modifikuojant CNT (sudaromos amidinės, esterinės jungtys), kurios nanomedžiagai suteikia naujų savybių [46, 51].



1.8 pav. Anglies nanovamzdeliai⁸. a – grafeno lapas, b – vienasienis CNT, c – daugiasienis CNT

1.4. Fermentų imobilizacija

Fermentų imobilizacija – tai atskira biotechnologijos mokslų sritis, kurioje pasitelkiant įvairių molekulių ar junginių chemines bei fizikines savybes bandoma surišti ar kitaip pririšti fermento molekules tarpusavyje ar prie įvairiausių paviršių. Imobilizacijos metu baltymo molekulė negali nei denatūruoti, nei prarasti savo katalizinio aktyvumo, todėl tai sudėtingas, nuo daug faktorių priklausomas procesas. Dėl šios priežasties netgi svarstoma, galbūt fermentų imobilizacija yra ne tik mokslo sritis, bet ir tam tikra meno rūšis [52]. Renkantis fermento imobilizacijos metodą reikia žinoti jo molekulinę masę, izoelektrinį tašką, fermento glubulėje esančias funkcines grupes, norimą fermento orientaciją ir daug kitų veiksnių, tam, kad užtikrinti efektyvią imobilizaciją [53]. Kadangi tai nuo daug faktorių priklausomas procesas, fermentų imobilizacijai nėra vieno ar kelių metodų, be to imobilizacija priklauso ne tik nuo baltymo molekulės, bet ir nuo paviršiaus prie kurio vykdomas pririšimas [52]. Žinoma nemažai skirtingų imobilizacijos metodų, tačiau juos visus galima suskirstyti į tris grupes: elektrostatinė adsorbcija, kovalentinis surišimas (angl. *cross-linking*) ir įterpimas (angl. *encapsulation*) [48].

Elektrostatinė adsorbcija

Vienas paprasčiausių fermentų imobilizacijos metodų yra elektrostatinė adsorbcija, kurią atliekant nereikia naudoti jokių papildomų medžiagų. Metodas pagrįstas silpna tarp molekuline sąveika tarp baltymo molekulės ir paviršiaus, kai susidaro vandeniliniai ryšiai bei sąveikos, kurias

⁸ Parengta pagal [50]

nulemia Van der Valso jėgos ir hidrofobiškumas [53]. Šis imobilizacijos metodas patrauklus tuo, kad nėra naudojamos papildomos medžiagos, kurios gali sąlygoti fermento denatūraciją, visišką inaktyvaciją ar dalinį katalizinio aktyvumo sumažėjimą. Be to imobilizacijai galima naudoti ne iki galo išgrynintą, neapdorotą (angl. *crude*) fermentinį tirpalą [52]. Tačiau elektrostatinės adsorbcijos metodu imobilizuoti fermentai greičiau desorbuojasi, lyginant su kitais imobilizacijos metodais, todėl norint ilgiau išlaikyti fermentą paviršiuje reikia apsunkinti baltymo molekulių difuziją į tirpalą sudarant įvairias plėveles [48].

Kovalentinis surišimas

Kovalentinio surišimo imobilizacijos metodai pagrįsti kovalentinių jungčių sudarymu tarp baltymo molekulės ir matricos, kurioje imobilizuojamas fermentas. Taikant šios rūšies metodus dažniausiai nukenčia fermento katalitinis pajėgumas, nes susidarę kovalentiniai ryšiai nėra būdingi natyviam fermentui. Nors ir nukenčia biokatalizatoriaus aktyvumas, tačiau kovalentinio surišimo metodais imobilizuoti fermentai pasižymi geresniu stabilumu [48]. Kovalentinis surišimas atliekamas, kai norima minimalizuoti baltymo desorbciją dirbant vandeninėse terpėse, kuriose dėl aplinkoje esančių medžiagų didėja baltymo desorbcijos ir denatūracijos tikimybė. Kovalentinės jungtys tarp baltymo ir matricos apsaugo fermento molekules nuo polipeptidinės grandinės išsilankstymo ir denatūracijos, nes jos sumažina terminę vibraciją ir konformacinį stabilumą [53].

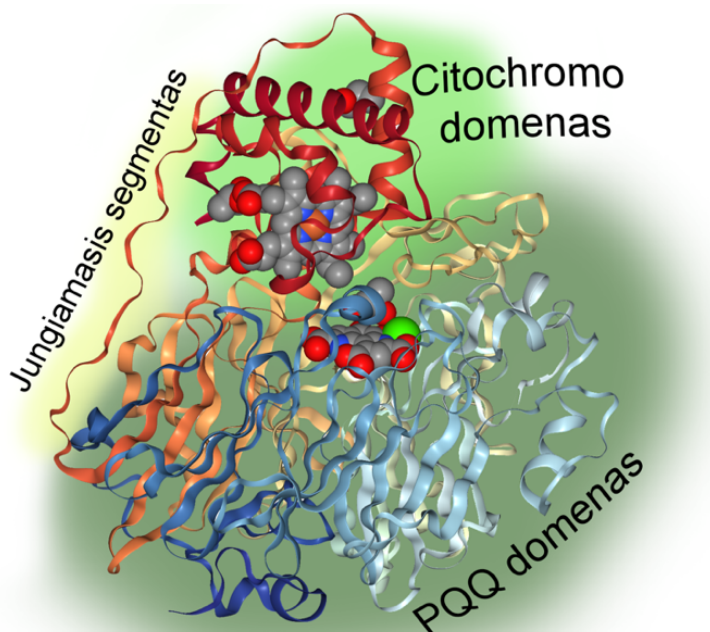
Įterpimas

Įterpimas – tai fermentų imobilizavimo metodas, kuris paremti fermento įterpimu į polimerą, kuris apsupa visą fermento molekulę ir apriboja jos judėjimo galimybes. Imobilizacija atliekama sumaišant fermentinį tirpalą su polimerą formuojančiais monomerais, kurie iš visų pusių apsuka fermento molekulę ir inicijuojama polimerizacija, kurios metu monomerai susijungia. Šios rūšies imobilizacijos metodai taikomi, kai siekiama išvengti neigiamos įtakos fermento struktūrai, nes nesusidaro kovalentiniai ryšiai tarp fermento ir matricos [48]. Žinoma nemažai įterpimo metodų, tačiau labai gerai ištyrinėti ir plačiausiai naudojami Sol-Gel metodai. Šių metodų metu fermentų imobilizacijai kaip monomerai dažniausiai naudojami silicio alkoholiatai (angl. *silicon alkoxide*), kuriems sudarius polimerą naujai susidariusi medžiaga pasižymi keramikai būdingomis savybėmis: atsparumas mechaniniam poveikiui ir temperatūriniais pokyčiams [54]. Šis imobilizacijos metodas taikomas ir konstruojant biojutiklius, kai siekiama sukonstruoti ypač stabilų biojutiklį, tačiau tokių jutiklių analizę apsunkina atsirandantys difuziniai apribojimai, į kuriuos būtina atsižvelgti [53]. Taigi bene didžiausias įterpimo metodų trūkumas yra tas, jog suformuotas polimeras apsunkina substrato difuziją link biokatalizatoriaus ir produkto pasišalinimą [48].

1.5. Alkoholio dehidrogenazė

Alkoholio dehidrogenazė – tai oksidoreduktazių klasės fermentas, kuris randamas daugelyje organizmų: nuo bakterijų iki žinduolių. Dažniausiai sutinkama fermento forma yra nuo NAD priklausoma ir aptinkama citoplazmoje [55]. Fermentas katalizuoja alkoholių oksidaciją vykstant NAD redukcijai [56]. Žinoma ir tokių ADH, kurios yra nepriklausomos nuo NAD, nes šių fermentų prostetinė grupė yra pirolo chinolinochinonas [57]. Nuo PQQ priklausomos ADH randamos tik kelių rūšių bakterijose, kuriuose fermentas lokalizuojamas periplazmoje ir dalyvauja aerobinių gram-neigiamų bakterijų kvėpavimo grandinėje. PQQ-ADH yra pirminė dehidrogenazė, kuri katalizuoja pirminę oksidaciją, kurios metu ląstelėje nesusidaro energetiškai naudingų junginių [58]. PQQ-ADH grupė sudaro didžiąją, visų nuo chinonų priklausomų baltymų šeimos dalį. Šią grupę sudaro 18 skirtingų fermentų, kurie suskirstyti į tris grupes: I, II ir III tipų ADH [59].

Auginant alkoholius skaidančias *Pseudomonas putida* HK5 bakterijas terpėje su 1-butanoliu ir 1,2-propandoliu galima išgryninti trijų tipų PQQ-ADH iš kurių dvi priklauso II ADH grupei. II ADH grupę sudaro du fermentai: ADH IIB ir ADH IIG [59]. Nors abu iš šių fermentų geba oksiduoti vidutinio grandinės ilgio pirminius alkoholius (1-butanolis), tačiau pastebima, kad ADH IIG geriau katalizuoja diolių ir glicerolio oksidaciją nei ADH IIB. 2005 metais atlikus ADH IIG rengenų spindulių kristalografijos tyrimus 2,2 Å rezoliucija gauta trimatė baltymo struktūra (1.9 pav.) [59].

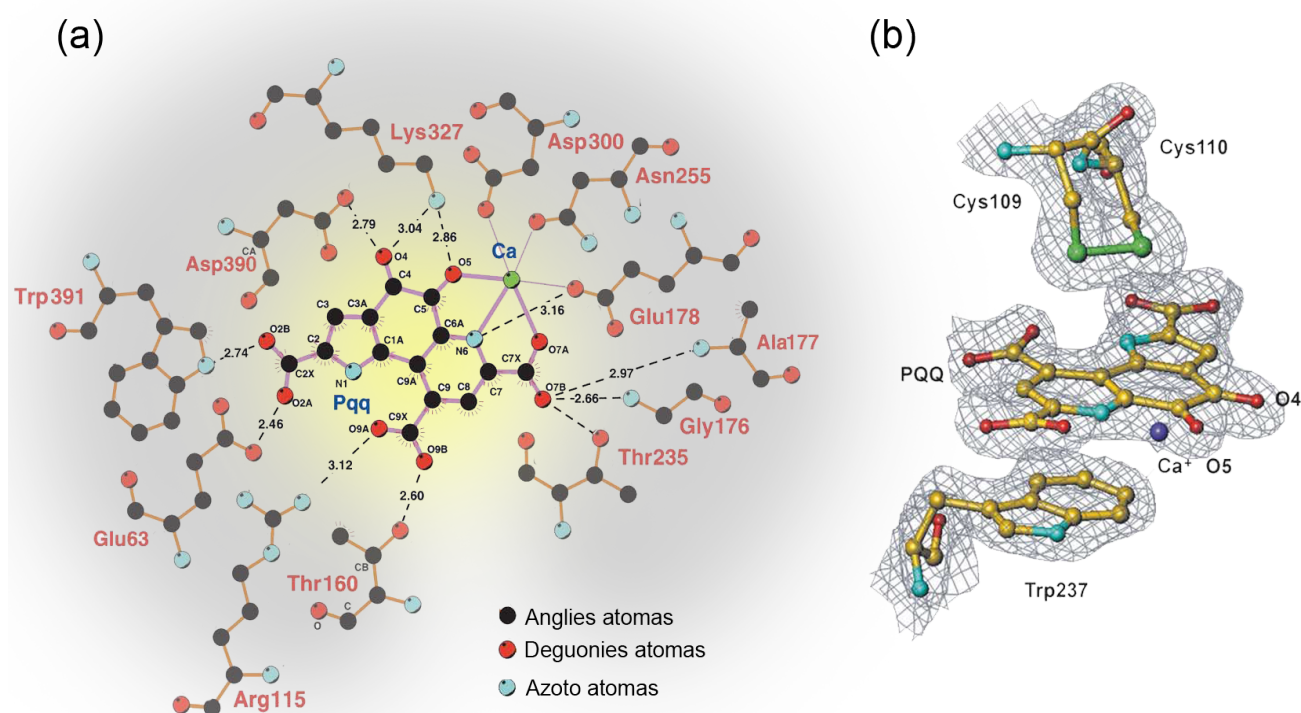


1.9 pav. Trimatė ADH IIG struktūra⁹

⁹ Parengta pagal [59]

Fermentas sudarytas iš dviejų domenų, kurie tarpusavyje sujungti 23, prolinu turtinga, aminorūgščių seka. Tai 76,6 kDa baltymas sudarytas iš 689 aminorūgščių, kur PQQ domeną sudaro 567 aminorūgštys (N galas), o c-tipo citochromo domeną 94 aminorūgštys (C galas) [59].

PQQ domeną sudarančios aminorūgštys formuoja beta klostes, kurios sudaro super-statinės struktūrą (angl. *super-barrel*). PQQ molekulė PQQ domeno atžvilgiu koordinuojamas super-statinės struktūros paviršiuje netoli citochromo domeno. Pati PQQ molekulė, kaip ir daugelyje nuo PQQ priklausomų fermentų, koordinuojama kartu su kalcio jonu, sudarant ryšius per penktąjį PQQ deguonies (O5), šeštąjį azoto (N6) ir septintąjį deguonies (O7A) atomus (1.10 pav. (a)) [59]. Aktyviajame centre PQQ-Ca kompleksas toje pačioje plokštumoje su baltymu įsitvirtina sudarydamas dešimt vandenilinių ar metalo koordinacinių ryšių su polipeptidinę grandinę sudarančių aminorūgščių šoninėmis grandinėmis (Glu63, Arg115, Thr160, Glu178, Thr235, Asn255, Asp300, Lys327, Asp390 ir Trp391) bei du ryšius su polipeptidinėje grandinėje esančiomis amido grupėmis (Gly176, Ala177) (1.10 pav. (a)). Iš apačios kofermentą Van der Valso jėgų pagalba „prilaiko“ Trp237, o iš viršaus disulfitinis tiltelis, kurį sudaro Cys109 ir Cys110 (1.10 pav. (b)) [59].

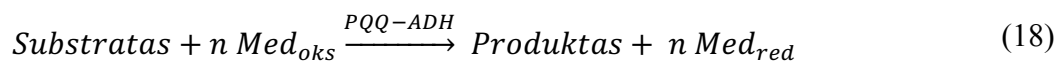


1.10 pav. PQQ molekulės orientacija PQQ domene: (a) horizontaliai ir (b) vertikaliai¹⁰

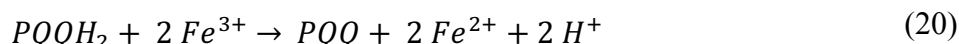
Citochromo c domenas turi c-tipo hema, kuris tioeterinėmis jungtimis, per dvi savo vinilo grupes, surištas su Cys606 ir Cys609 esančiais sieros atomais. Heme esantis geležies jonas sudaro koordinacinius ryšius su His610 šoninėje grandinėje esančiu azotu ir Met647 sieros atomu [59].

¹⁰ Parengta pagal [59]

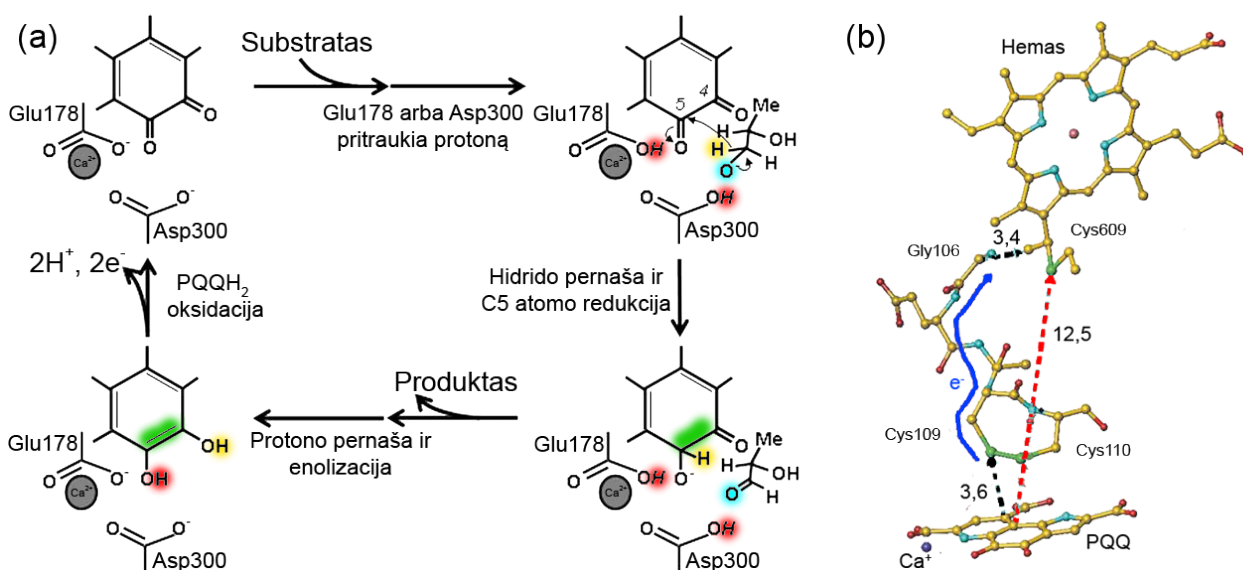
Žinant, kad fermentas sudarytas iš dviejų, PQQ ir citochromo, domenų galima parašyti bendrą reakcijos lygtį, kuri aprašo fermento katalizuojamą reakciją:



Kur Med_{oks} ir Med_{red} atitinkamai yra oksiduotos ir redukuotos formų elektronų akceptoriai. Tai labai bendra reakcijos lygtis, nes fermento katalizinis ciklas susideda iš trijų, vienas nuo kito priklausomų procesų: substrato oksidacijos ir PQQ redukcijos, vidinės elektronų pernašos tarp PQQH_2 ir heme esančio geležies jono bei hemo oksidacijos elektronų akceptoriumi. Bendrą reakcijos lygtį galima aprašyti 19 - 21 lygtimis.



Substrato oksidacijos metu PQQ domene vyksta kofermento PQQ redukcija. 1.11 paveikslo (a) dalyje pateiktas scheminis, labiausiai tikėtinas substrato oksidacijos mechanizmas, kuris paremtas hidrido pernaša (pateikta dalis PQQ molekulės). Šioje reakcijoje be kofermento ir substrato dar dalyvauja kalcio jonas bei asparto ir glutamo rūgščių šoninėse grandinėse esančios karboksi grupės [59].



1.11 pav. PQQ redukcijos mechanizmas vykstant substrato oksidacijai (a) ir vidinės elektronų pernašos kelias tarp PQQ ir hemo (b)¹¹

Kaip matyti iš 1.11 paveikslo (a) pirmajame žingsnyje PQQ yra oksiduotoje formoje, o Glu178 ir Asp300 karboksi grupės deprotonizuotos. Į aktyvųjį centrą patekusi substrato molekulėi įvyksta karboksi rūgšties protonizacija ir hidrido pernaša nuo substrato molekulės prie penktojo PQQ anglies atomo (C5) susidarant $\text{PQQH}^\bullet$. Tada susidaręs produktas pasišalina ir vyksta $\text{PQQH}^\bullet$

¹¹ Parengta pagal [59]

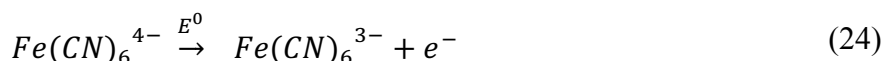
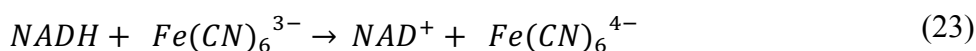
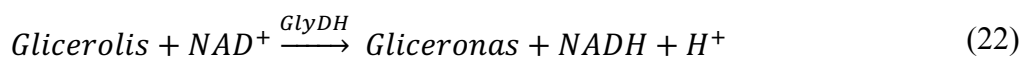
stabilizacija iki PQQH₂, kurios metu protonas nuo C5 „peršoka“ ant šalia esančio deguonies atomo, o deguonies atomas ties C5 perima protoną nuo Asp300 arba Glu178. Stabilizacijos metu susidaro dvigubas ryšys tarp C5 ir C4 atomų. PQQH₂ oksiduojamas vidinės elektronų pernašos pagalba tarp PQQ ir citochromo domenų [59].

Tikslus vidinės pernašos mechanizmas nėra žinomas, tik pasiūlyti du galimi elektronų keliai, kurie pateikti 1.11 paveikslo (b) dalyje. Pirmasis, galbūt mažiau tikėtinas vidinės elektronų pernašos kelias yra pažymėtas raudona punktyrine linija. Manoma, kad elektronas iš PQQ peršoka tiesiai į hemą per Cys609 esantį sieros atomą, atlikdamas 12,5 Å šuolį. Antras, labiau tikėtinas kelias prasideda juoda punktyrine linija, kai elektronai iš PQQ atlieka 3,6 Å šuolį į Cys109 esantį sieros atomą, tada per 4 aminorūgščių peptidą nukeliauja į Gly106 (mėlyna kreivė) ir atlikęs 3,4 Å šuolį patenka į hemą [59].

1.6. Glicerolio biojutikliai

Glicerolio biojutiklis – tai analitinis įrankis, biokatalizinių redokso reakcijų pagalba leidžiantis įvertinti glicerolio kiekį tikslinėje analitėje. Įprastiniai glicerolio nustatymo metodai reikalauja nemažai laiko, aukštos kvalifikacijos specialistų ir brangios įrangos, todėl pradėti kurti glicerolio biojutikliai, leidžiantys greitai nustatyti glicerolio koncentraciją.

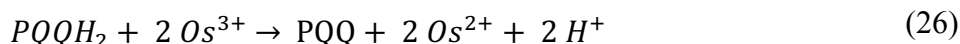
2001 metais sukonstruotas glicerolio biojutiklis, imobilizuojant nuo NAD priklausomą glicerolio dehidrogenazę panaudojant polianiliną, kofermentą NAD ir redokso mediatorių fericianidą ant aliuminio elektrodo [60]. Glicerolio koncentracijos analitėje nustatymas aprašomas 22 - 24 reakcijos lygtimis:



Kaip matyti iš 22 lygties GlyDH katalizuoja glicerolio oksidaciją iki glicerono vykstant NAD⁺ redukcijai iki NADH, kuris oksiduojamas redokso mediatoriumi (fericianidu) susidarant oksiduotam NAD⁺ ir ferocianidui (23 lygtis). Galiausiai ferocianidas oksiduojamas elektrodo paviršiuje prie 0,35 V vs SHE potencialo (24 lygtis). Tai antrosios kartos glicerolio biojutiklis, kurio atsako laikas 60 – 80 s, tiesinė dalis 0,005 – 2 mM bei detekcijos limitas 0,001 mM [60]. Tačiau šio biojutiklio pritaikymas ribotas, nes glicerolio oksidacija GlyDH yra grįžtama reakcija, be to fermentas katalizuoja ir į glicerolį panašių junginių oksidaciją [61].

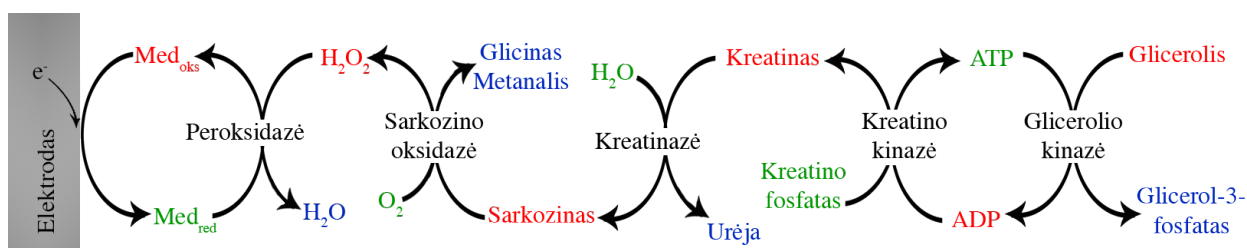
Po poros metų Švedijos ir Lietuvos mokslininkai sukonstravo biojutiklių sistemą, skirtą nustatyti gliukozės, etanolio ir glicerolio koncentracijas vyne. Glicerolio biojutiklis sukurtas naudojant ne nuo NAD priklausomą GlyDH, bet nuo PQQ priklausomą GlyDH. Grafito elektrodo

paviršiuje panaudojant kovalentinio surišimo agentą suformuotas hidrogelis iš PQQ-GlyDH ir redokso polimero. Šio biojutiklio veikimo principą aprašo 25 - 27 reakcijų lygtys [62].



Iš reakcijos lygčių matyti, kad PQQ-GlyDH katalizuojant glicerolio vartimą gliceronu vyksta fermento aktyviajame centre esančio kofermento PQQ redukcija susidarant PQQH₂ (25 lygtis), kuris oksiduojamas dviem Os³⁺ jonais susidarant PQQ ir Os²⁺ (26 lygtis). Galiausiai divalenčiai osmio jonai oksiduojami prie 0,2 V vs Ag/AgCl potencialo (27 lygtis). Šis biojutiklis priskiriamas trečiosios kartos biojutikliams, kurio detekcijos limitas 0,001 mM ir tiesinė dalis nuo 0,001 iki 0,2 mM [62].

Dar po trijų metų sukonstruoti keli multifermentiniai glicerolio biojutikliai, kurių pagalba buvo nustatinėjama glicerolio koncentracija vyno fermentacijos metu [63]. Iš kurių vienas buvo tobulinamas ir pritaikytas glicerolio koncentracijos vyne nustatymui [1]. Biojutiklio kūrimui buvo panaudoti penkti fermentai: glicerolio ir kreatino kinazės, kreatinazė, sarkozino oksidazė ir peroksidazė. Biojutiklio veikimas schematiškai pateiktas 1.12 paveiksle.



1.12 pav. Multifermentinio glicerolio biojutiklio veikimo principas¹²

GlyK katalizuoja glicerolio fosforilinimą panaudojant ATP, susidaro ADP, kuri panaudojama defosforilinant kreatino fosfatą iki kreatino, reakciją katalizuojant CRK. Tada CRE hidrolizuoja kreatiną susidarant karbamidui ir sarkozinui. SaOx katalizuoja sarkozino skilimą į formaldehidą ir gliciną, sugeneruodama vandenilio peroksidą, kuris HRP pagalba naudojamas redukuotos formos mediatoriui oksiduoti. Galiausiai sugeneruojamas signalas, kai oksiduotos formos mediatorius redukuojamas elektrodo paviršiuje prie -0,05 V vs Ag/AgCl potencialo. Šio biojutiklio detekcijos limitas 0,002 mM, tiesinė dalis nuo 0,005 iki 0,64 mM, bet atsako laikas 70 sekundžių [1].

Šiai dienai žinomi glicerolio biojutikliai pateikti 1.1 lentelėje gali būti tobulinami panaudojant kitus fermentus, leidžiančius nenaudoti brangaus kofermento NAD, praplečiant

¹² Parengta pagal [1]

tiesinę biojutiklio atsako dalį, didinant jautrumą bei mažinant darbinį potencialą, nes esant žemesniam darbiniam potencialui mažinama pašalinių redokso reakcijų tikimybė.

1.1 lentelė. Žinomų glicerolio biojutiklių charakteristikos

Elektrodas	Fermentas	Kofermentas	Detekcijos limitas, mM	Tiesinė dalis, mM	Jautris, $\mu\text{A}/\text{mM}$	E, V vs SCE	Literatūros šaltinis
Aluminio	GlyDH	NAD^+	0,001	0,005 - 2	0,16	0,40	[60]
Grafito	GlyDH	PQQ	0,001	0,001 – 0,2	231,42	0,20	[62]
Platinos	GlyOx	FAD	0,05	0,05 – 25,6	-	0,30	[61]
Aukso	GlyK CRK CRE SaOx HRP	ATP ADP - FAD Hemas	0,002	0,005 – 0,64	0,8	-0,05	[1]
Grafito	GlyDH	NAD^+	0,003	0,01 – 0,1	-	0,05	[63]
Aukso	GlyDH	NAD^+	0,16	1 – 25	0,025	1,30	[8]

2. Metodai ir medžiagos

2.1. Įranga

Baigiamajame magistro darbe naudota įranga:

- Analitinė potenciostato sistema iš „Bioanalizės sistemos“, Lietuva. Jos parametrai: analoginis - skaitmeninis 24 bitų keitiklis, SPI protokolo, sigma – delta tipo su programuojamu įėjimo stiprinimo koeficientu ir skaitmeniniu filtru nuo 2,5 iki 30 kHz. Skaitmeninis – analoginis 16 bitų keitiklis, SPI protokolo su 35 kHz glodinimo filtru. Maksimali pagalbinio elektrodo srovė – 22 mA, darbinio elektrodo potencialo kontrolės ribos nuo -1,46 iki 1,46 V.
- „Thermo evolution 300“ UV ir regimosios šviesos spektrofotometras.

Darbui atlikti naudota ir kita, standartinė laboratorinė įranga: analitinės svarstyklės, pH matuoklis, ultragarso vonelė, „Eppendorf®“ ir „Transferpette®“ reguliuojamo tūrio pipetės (2,5, 10, 100, 200, 1000 ir 5000 µl), „Lauda Eco Silver“ termostatas, laboratoriniai indai (cheminės stiklinės, matavimo cilindras ir kolba, plokščiadugnė kolba ir kt.), grafito elektrodas, palyginamasis Kalomelio elektrodas, pagalbinis platinos elektrodas.

2.2. Reagentai

Visos baigiamajame darbe naudotos medžiagos yra analitinio grynumo ir papildomai gryninamos. Dejonizuotas vanduo gautas naudojant Crystal E Ultrapure sistemą iš ADRONA SIA. Naudojant gautą vandenį buvo gaminami baigiamajame darbe naudojami vandeniniai tirpalai: darbinis buferinis tirpalas (50 mM TRIS, 50 mM acetato, 1 mM CaCl₂, pH – 7,5), 1 M glicerolio tirpalas, iš kurio buvo gaunami skiesti darbiniai tirpalai ir kt. TTF tirpalas gaminamas medžiagą tirpinant acetonitrile. Nafion tirpalas buvo gaunamas skiedžiant 5 % tirpalą vandenyje. Žemiau pateiktoje lentelėje išvardinti reagentai, kurie buvo naudoti atliekant baigiamąjį darbą.

2.1. lentelė. Darbe naudoti reagentai bei tiekėjas.

Reagentas	Tiekėjas
CNT	Sigma-Aldrich
Druskos rūgštis	Carl Roth
Kalio fericianidas	Reachem
Nafion	Sigma-Aldrich
Acetonitrilas	Lab Scan

Acto rūgštis	Riedel de Haen
Kalcio chloridas	Carl Roth
Glicerolis	Sigma-Aldrich
TRIS	Serva
Natrio šarmas	FasChem
TTF	Sigma-Aldrich

2.3. Fermentas

Baigiamajame magistro darbe dirbta naudojant alkoholio dehidrogenazę. Fermentas gautas iš VU Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus. Tyrimams naudota alkoholio dehidrogenazė buvo išgryninta iki homogeninio grynumo iš *Pseudomonas putida* HK5 kamieno. Atlikta SDS-PAGE analizė patvirtino fermento homogeniškumą, nes formavo vieną juostelę. Baltymas sudarys iš dviejų, 23 aminorūgštimis, tarpusavyje sujungtų domenų. Baltymo molinė masės – 76,6 kDa. Lowry metodu nustatyta baltyminio tirpalo koncentracija buvo 20 mg/ml, kaip standartą naudojant jaučio serumo albuminą. Fermentas pasižymėjo 500 U/mg specifiniu aktyvumu. Fermentas buvo laikomas 10 mM TRIS buferiniame tirpale, kurio pH 7,4, esant -18°C temperatūrai.

2.4. Elektrodo ruošimas elektrocheminiam fermento aktyvumui įvertinti

Buvo paruošti keturių tipų fermentiniai elektrodai: C/ADH, C/CNT/ADH, C/TTF/ADH ir C/CNT/TTF/ADH.

Ruošiant elektrodus, grafito elektrodai buvo mechaniškai nuvalyti švitrinio popieriumi ir nuplauti dejonizuotu vandeniu. C/ADH elektrodo atveju fermentas imobilizuojamas užlašinant 2 µl fermento tirpalo ir leidžiama išdžiūti. C/TTF/ADH elektrodo atveju švaraus grafito elektrodo paviršius buvo modifikuojamas užlašinama 10 µl 0,2 % TTF tirpalo. Išgaravus acetonitrilui ant elektrodo su TTF užlašinami 2 µl fermento tirpalo ir leidžiama išdžiūti. C/CNT/ADH ir C/CNT/TTF/ADH elektrodai ruošiami kaip C/ADH ir C/TTF/ADH atitinkamai, tik prieš fermento imobilizaciją ar TTF užlašinimą, elektrodo paviršius nanostruktūrizuojamas užlašinant 10 µl 2 mg/ml CNT suspensijos vandenyje ir leidžiant išdžiūti. Visų keturių tipų fermentiniai elektrodai baigiami ruošti užlašinant 10 µl 1 % Nafion tirpalo ir leidžiama išdžiūti.

Naudojant paruoštus fermentinius elektrodus buvo atliekama ciklinės voltamperometrijos analizė.

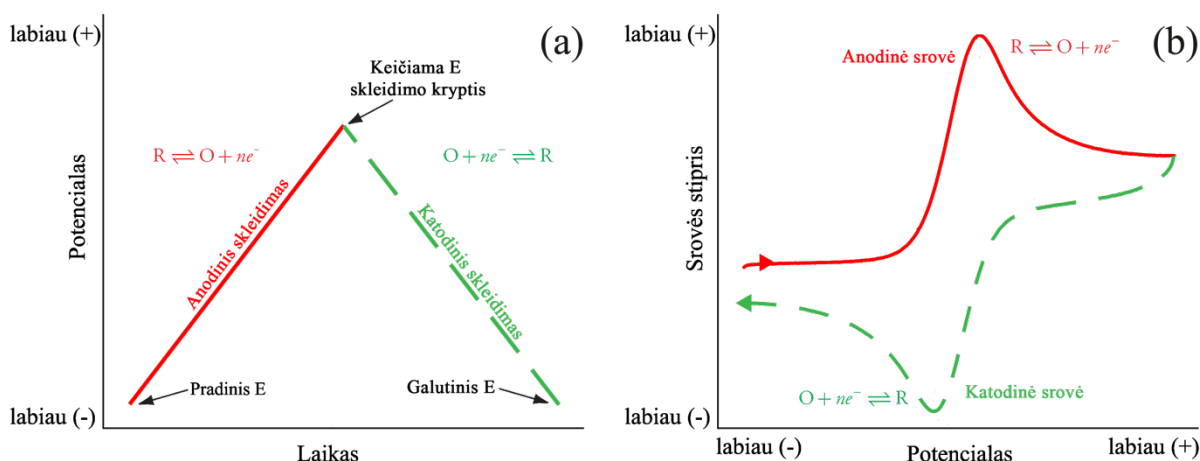
2.5. Glicerolio biojutiklio ruošimo procedūra

Baigiamojo darbo metu sukurtas glicerolio biojutiklis buvo paruoštas remiantis tokia pat metodika. Mechanškai nuvalyto grafito elektrodo paviršius nanostruktūrizuojamas jo paviršiuje išdžiovinat 10 μ l 2 mg/ml CNT suspensijos vandenyje. Tada užlašinama 20 μ l 0,2 % TTF tirpalo ir išgaravus tirpikliui imobilizuojamas fermentas (5 μ l fermento tirpalo). Po imobilizacijos elektrodo paviršiuje su CNT, TTF ir ADH yra formuojama Nafion membrana užlašinant ir leidžiant išdžiūti 10 μ l 1 % Nafion tirpalo.

2.6. Elektrocheminės analizės metodai

2.6.1. Ciklinė voltamperometrija

Ciklinė voltamperometrija – tai elektrocheminės analizės metodas, kurio metu matuojamas srovės stipris tirpale, kai tiesiškai keičiamas darbinio elektrodo potencialas laike. Kitaip tariant, keičiamas darbinio elektrodo potencialas (iš neigiamų reikšmių į teigiamas arba atvirkščiai) laike (2.1 pav. (a)) ir fiksuojamas per matavimo celę tekančios elektros srovės stipris.



2.1 pav. (a) Darbinio elektrodo potencialo kitimas laike, atliekant CV analizę ir (b) srovės stiprio kitimas CV analizės metu

Matavimo metu atliekami du potencialo skleidimai – anodinis ir katodinis. Anodinio skleidimo metu darbinio elektrodo potencialas didinamas iš labiau neigiamų reikšmių į labiau teigiamas ir skleidimo metu vyksta tiriamo junginio oksidacija, kurios metu elektronai perduodami elektrodui (didėja srovės stipris, anodinis procesas) (2.1 pav. (b)). Katodinis skleidimas yra priešingas anodiniam skleidimui, nes darbinio elektrodo potencialas yra tiesiškai keičiamas iš labiau teigiamų į labiau neigiamas reikšmes. Katodinio skleidimo metu vyksta tiriamo junginio redukcija, kurios metu tiriamasis junginys prisijungia elektronus nuo elektrodo paviršiaus (srovės stipris mažėja, katodinis procesas) (2.1 pav. (b)). Grafikas vaizduojantis srovės stiprio priklausomybę nuo potencialo yra vadinamas cikline voltamperograma. Naudojant šį metodą

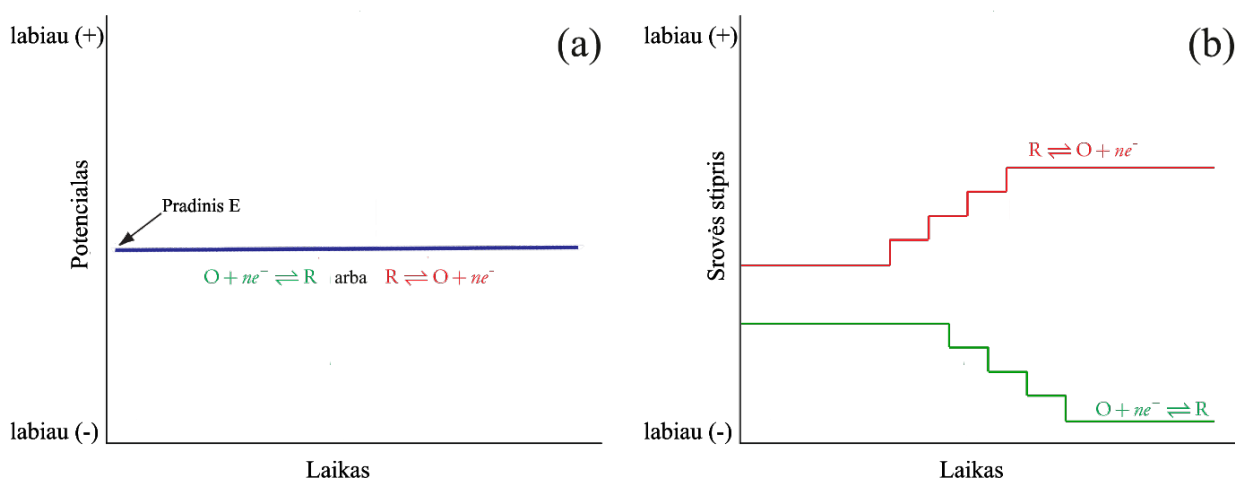
galima tyrinėti redokso reakcijas, nustatyti produkto stabilumą, tirti elektronų pernašos kinetiką bei nustatyti nežinomą junginio koncentraciją analitėje.

Baigiamojo darbo metu šis metodas taikytas siekiant nustatyti fermento elektrocheminį aktyvumą keturių skirtingų konfigūracijų fermentiniuose elektroduose. Atliekant matavimus stebima ar atsiranda srovė, kuri susijusi su elektrodo paviršiuje imobilizuoto fermento kataliziniu aktyvumu. Imobilizuotas fermentas yra tiesiogiai arba netiesiogiai elektrochemiškai aktyvus, kai prie tam tikro darbinio elektrodo potencialo stebimas anodinės srovės padidėjimas. Ant elektrodo paviršiaus esantis fermentas yra elektrochemiškai aktyvus, jeigu atlikus CV skleidimą bus užregistruota srovė, kuri atsiranda dėl fermento vykdomos katalizės. Iš gautų CV rezultatų galima vertinti fermentinio elektrodo tinkamumą atsižvelgiant į srovės stiprio dydį, ciklinės voltamperogramos formą bei potencialo reikšmes, prie kurių prasideda žymūs srovės stiprio pokyčiai.

Matavimai atliki prie 25 °C temperatūros trijų elektrodų sistemoje, kurią sudarė darbinis elektrodas, palyginamasis sotusis kalomelio elektrodas (0,2444 V vs SHE) ir pagalbinis platinos elektrodas. Matavimų celės tūris – 20 ml.

2.6.2. Chronoamperometrija

Chronoamperometrija – elektrocheminės analizės metodas, kurio metu matuojamas srovės stiprio kitimas laike, kai viso matavimo metu potencialas nekinta (2.2 pav. (a)). Atliekant CA matavimą stebimas srovės stiprio pokytis, kai nusistovėjus ramybės srovei pakeičiama tirpalo sudėtis (pvz. pridedama substrato) (2.2 pav. (b)). Tokį srovės pokytį nulemia aplinkos pasikeitimas, kurioje fermentas geriau arba prasčiau vykdo substrato katalizę: t.y pakinta elektronų mainai tarp elektrodo ir fermento, kurie dalyvauja substrato konversijoje.



2.2 pav. (a) Darbinio elektrodo potencialo kitimas laike, atliekant CA analizę ir (b) srovės stiprio pokytis CA analizės metu pakeičiant sąlygas

Jeigu fermentas katalizuoja substrato konversiją ir vyksta elektronų pernaša tarp fermento ir elektrodo, tai turėtų būti stebimas srovės stiprio pokytis. Keičiant eksperimento sąlygas gali būti

stebimas skirtingas srovės pokytis, kuris gali būti pritaikytas nustatant daug skirtingų parametrų: fermento aktyvumą skirtingos pH reikšmės tirpaluose, elektronų pernašos efektyvumo priklausomybę nuo potencialo, imobilizuoto fermento kinetinius parametrus ir kt.

Baigiamojo darbo metu šis metodas buvo taikytas charakterizuojant sukurtą glicerolio biojutiklį: jautrį, optimalų pH, tiesinę dalį, detekcijos limitą.

Matavimai atlikti trijų elektrodų 20 ml tūrio gardelėje prie 25 °C temperatūros. Gardelėje buvo panardintas darbinis elektrodas, palyginamasis SCE ir pagalbinis platinos elektrodas.

2.7. Kinetinių parametrų matavimo homogeninėje terpėje metodas

Kinetiniai ADH parametrai (K_M ir k_{cat}) buvo nustatyti naudojant kalio fericianidą kaip elektronus priimančią ADH substratą. ADH katalizavo glicerolio oksidaciją, kurios metu vyko fericianido redukcija iki ferocianido ir buvo stebimas matuojamojo tirpalo absorbcijos pokytis ties 420 nm bangos ilgiu. Redukuoto fericianido kiekis yra tiesiogiai proporcingas oksiduoto glicerolio kiekiui. Keičiant substrato (glicerolio) koncentraciją gauta pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo substrato koncentracijos. Ši priklausomybė leido apskaičiuoti K_M , v_{max} ir k_{cat} . Matavimams naudotas tirpalas buvo sudarytas iš 1 mM kalio fericianido, glicerolio, fermentinio tirpalo ir darbinio buferinio tirpalo. Kiekvieno iš dėtų komponentų kiekiai pateikti žemiau esančioje 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. K_M ir k_{cat} nustatymui naudotų mišinių sudėtis

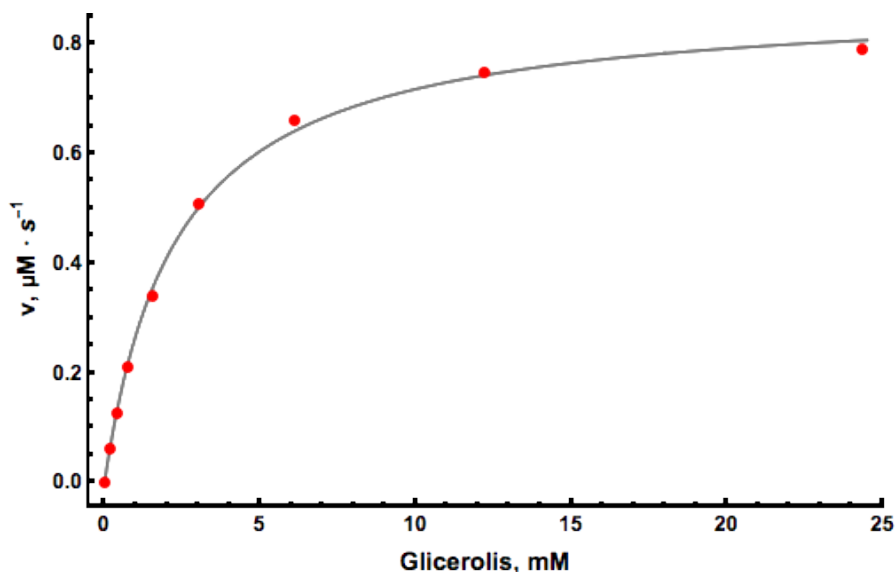
Glicerolis, mM	Matavimo tirpalo sudėtis			
	Darbinis buf. t. (pH – 7,5)	11 mM $K_3[Fe(CN)_6]$	10,55 μ M ADH	100 μ l glicerolio
0				0 mM
0,19				1,05 mM
0,38				2,09 mM
0,76				4,19 mM
1,5	790 μ l	100 μ l	10 μ l	8,38 mM
3				16,76 mM
6				33,5 mM
12				67 mM
24				134 mM

K_M ir v_{max} reikšmės apskaičiuotos iš pradinio reakcijos greičio priklausomybės nuo substrato koncentracijos pritaikant Michaelis-Menten modelį. Katalizinė konstanta (k_{cat}) apskaičiuota maksimalų reakcijos greitį (μ M/s) padalinus iš fermento koncentracijos (μ M).

3. Rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Alkoholio dehidrogenazės K_M ir k_{cat} homogeninėje terpėje

Atlikti spektrofotometriniai matavimai ties 420 nm bangos ilgiu stebint sugerties kitimą laike. Tirpaluose su gliceroliu ir fericianidu pridėjus ADH buvo stebimas sugerties sumažėjimas, kurį sąlygojo fericianido redukcija susidarant ferocianidui. Keičiant glicerolio koncentraciją matavimo tirpale buvo gautos sugerties kitimo laike kreivės. Iš kiekvienos kreivės tiesinės dalies buvo apskaičiuojamas pradinis reakcijos greitis (v). Gaunama pradinio reakcijos greičio priklausomybė nuo glicerolio koncentracijos (3.1 pav.).



3.1 pav. Pradinio ADH katalizuojamos reakcijos greičio priklausomybė nuo glicerolio koncentracijos.

Duomenys glodinti taikant Michaelis-Menten modelį. Standartinė paklaida 2 %

Eksperimentiniams duomenims pritaikius Michaelis-Menten modelį apskaičiuota, kad alkoholio dehidrogenazės K_M gliceroliui ir maksimalus reakcijos greitis (v_{max}) homogeninėje terpėje atitinkamai yra $2,30 \pm 0,05$ mM ir $0,88 \pm 0,02 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$. Žinant reakciją katalizuojančio fermento koncentraciją (192 nM) buvo apskaičiuota fermento katalizinė konstanta (k_{cat}), kuri lygi $4,59 \pm 0,09 \text{ s}^{-1}$.

3.2. Fermentinio elektrodo kompozicijos parinkimas glicerolio biojutikliui

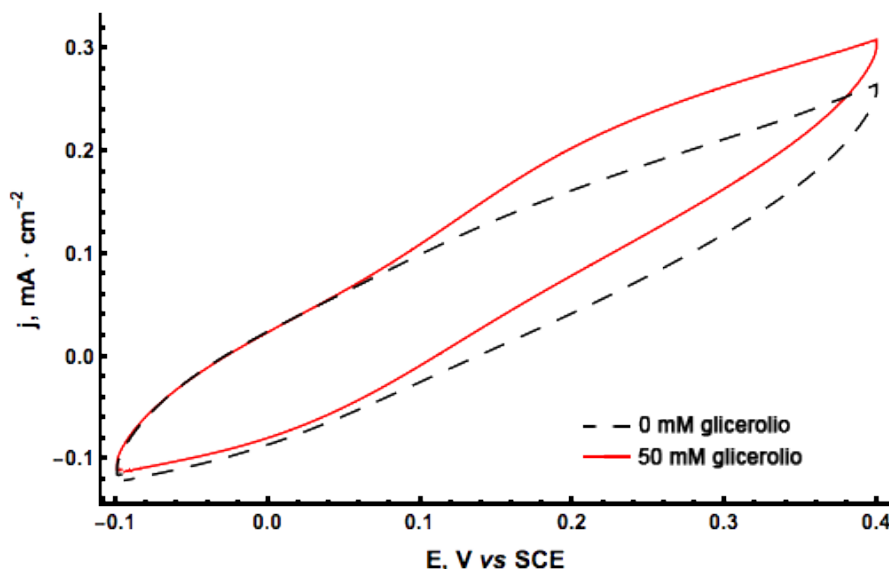
Norint sukurti gerą glicerolio biojutiklį visų pirma reikėjo įvertinti fermento elektrocheminį aktyvumą naudojant grafito ir CNT nanostruktūrizuoto paviršiaus grafito elektrodus. Tinkamu glicerolio biojutikliu pripažįstamas fermentinis elektrodas jeigu:

- Generuoja aukštas elektrokatalizines sroves, kurių pridėjimas susijęs su fermentiniu procesu;
- Elektrokatalizinės srovės pradamos generuoti prie kuo žemesnio potencialo;

- Elektrodo ruošimo procedūra yra paprasta, nereikalaujanti daug laiko bei yra lengvai atkartojama.

3.2.1. Alkoholio dehidrogenazės elektrocheminis aktyvumas ant grafito elektrodo

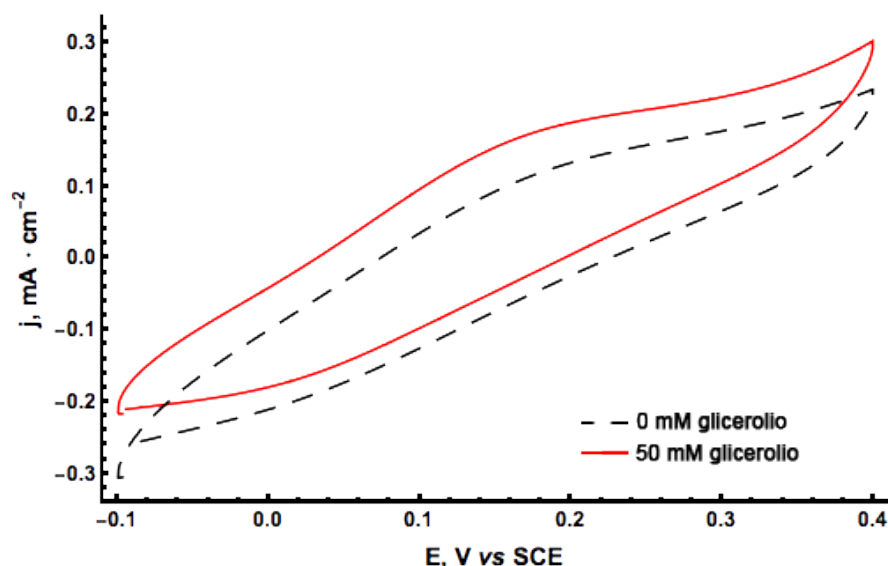
Fermentinis elektrodas su imobilizuota ADH (C/ADH) naudotas fermento elektrocheminio aktyvumo nustatymui. Darbiniame buferiniame tirpale, esant $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ potencialo skleidimo greičiui, potencialo intervale nuo $-0,1$ iki $0,4 \text{ V vs SCE}$ buvo atlikta CV analizė. Pademonstruota, kad buferiniame tirpale be ADH oksiduojamo substrato elektrodas generuoja tolygiai kintančią srovę visame potencialo skleidimo intervale, kuri ties $0,4 \text{ V vs SCE}$ potencialu pasiekia maksimalią $0,264 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ srovę (3.2 pav.). Į tirpalą pridėjus 50 mM glicerolio fermentinis ADH elektrodas ties $0,08 \text{ V vs SCE}$ potencialu pradėjo generuoti didėjančią anodinę srovę, kuri pasiekia maksimumą ties $0,4 \text{ V vs SCE}$ potencialu ir buvo lygi $0,312 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$. Toks, $0,048 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ srovės padidėjimas stebimas dėl ADH substrato (glicerolio) oksidacijos.



3.2 pav. C/ADH elektrodo CV: buf. tirpalas be glicerolio ir su 50 mM glicerolio

3.2.2. Alkoholio dehidrogenazės elektrocheminis aktyvumas ant TTF modifikuoto grafito elektrodo

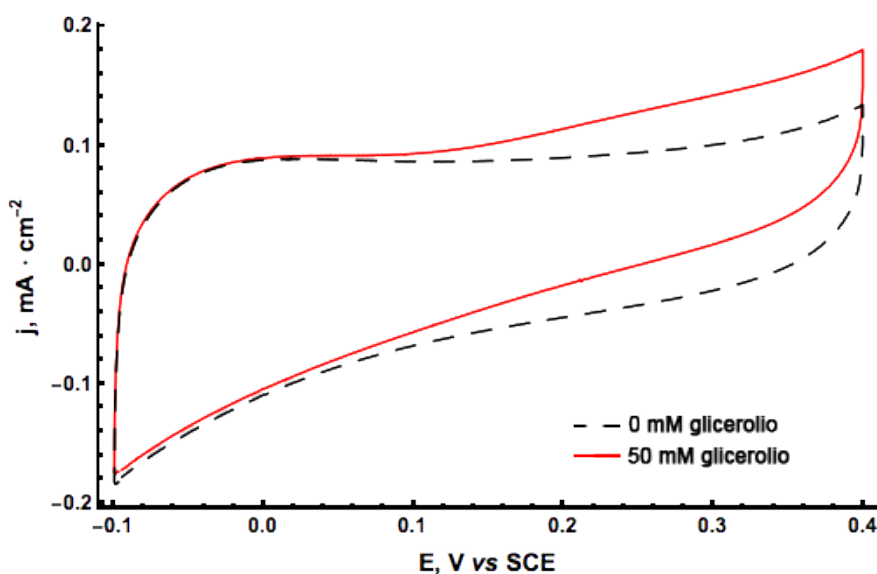
Fermentis C/TTF/ADH elektrodas naudotas elektrocheminio aktyvumo nustatymui. Atlikta CV analizė darbiniame buferiniame tirpale potencialą skleidžiant nuo $-0,1$ iki $0,4 \text{ V vs SCE}$ ir atgal $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ greičiu. Pademonstruota, kad kai tirpalo sudėtyje nėra fermento substrato elektrodas generuoja sroves nuo $-0,3$ iki $0,16 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ potencialo režiuose nuo $-0,1$ iki $0,3 \text{ V vs SCE}$ (3.3 pav.). Tirpalo sudėtyje esant 50 mM glicerolio fermentinis elektrodas generuoja sroves nuo $-0,2$ iki $0,24 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$, kai potencialas keičiamas nuo $-0,1$ iki $0,3 \text{ V vs SCE}$. Palyginus CV matoma, kad kreivės labai panašios ir nėra pastebimo anodinės srovės padidėjimo, kuris būtų siejamas su ADH katalizuojama glicerolio oksidacija.



3.3 pav. C/TTF/ADH elektrodo CV: buf. tirpalas be glicerolio ir su 50 mM glicerolio

3.2.3. Alkoholio dehidrogenazės elektrocheminis aktyvumas ant CNT nanostruktūrizuoto grafito elektrodo

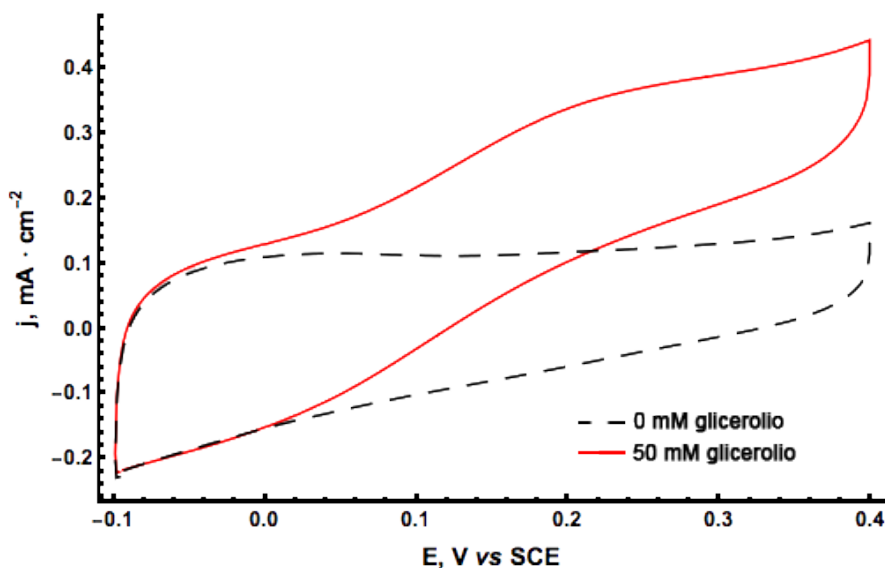
Fermentinis C/CNT/ADH elektrodas buvo analizuotas CV analizės metodu potencialą skleidžiant $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ greičiu nuo -0,1 iki 0,4 V vs SCE. Parodyta, kad kai terpėje nėra glicerolio elektrodas generuoja beveik nekintančią anodinę srovę nuo 0 iki 0,3 V vs SCE potencialo ir ties 0,4 V vs SCE potencialu pasiekia maksimalią $0,13 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ srovę (3.4 pav.). Tirpale su 50 mM glicerolio elektrodas generavo nekintančią srovę nuo 0 iki 0,08 V vs SCE potencialo. Nuo 0,08 V vs SCE potencialo elektrodas generavo didėjančią anodinę srovę ir ties 0,4 V vs SCE potencialu pasiekė maksimalią $0,18 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ srovę. Toks $0,05 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ anodinės srovės padidėjimas stebimas, nes ADH katalizavo glicerolio oksidaciją.



3.4 pav. C/CNT/ADH elektrodo CV: buf. tirpalas be glicerolio ir su 50 mM glicerolio

3.2.4. Alkoholio dehidrogenazės elektrocheminis aktyvumas ant CNT nanostruktūrizuoto ir TTF modifikuoto grafito elektrodo

Fermentinis C/CNT/TTF/ADH elektrodas taip pat analizuotas CV metodu potencialą skleidžiant $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ greičiu nuo $-0,1$ iki $0,4 \text{ V vs SCE}$. Pademonstruota, kad darbiname buferiniame tirpale elektrodas nuo $-0,04$ iki $0,4 \text{ V vs SCE}$ generuoja beveik nekintančią srovę ir ties $0,4 \text{ V vs SCE}$ potencialu pasiekia maksimalią reikšmę, lygią $0,16 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ (3.5 pav.). Pridėjus 50 mM glicerolio fermentinis elektrodas nuo 0 V vs SCE potencialo pradeda generuoti anodinę srovę, kuri staigiai didėja iki $0,2 \text{ V vs SCE}$ potencialo, o tada pamažu didėja ir pasiekia maksimalią $0,44 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ srovę ties $0,4 \text{ V vs SCE}$ potencialu. $0,28 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ anodinės srovės padidėjimas susijęs su fermentiniu procesu, kurio metu ADH katalizuoja glicerolio oksidaciją vyko TTF redukcija. Redukuotos formos TTF oksiduojamas nanostruktūrizuoto elektrodo paviršiuje.



3.5 pav. C/CNT/TTF/ADH elektrodo CV: buf. tirpalas be glicerolio ir su 50 mM glicerolio

3.3. Glicerolio biojutiklio parametrų įvertinimas

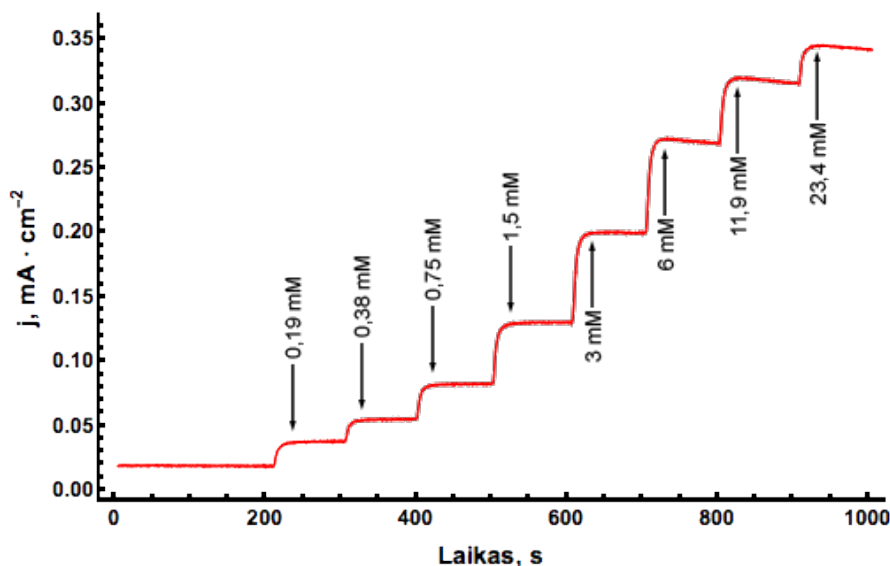
Išanalizavus visus keturis fermentinius elektrodus glicerolio biojutiklis kuriamas C/CNT/TTF/ADH elektrodo pagrindu, nes tokios elektrodas atitiko keliamus kriterijus biojutikliui kurti:

- Generuoja aukštas elektrokatalizines sroves ($0,44 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ ties $0,4 \text{ V vs SCE}$ potencialu), kurių didėjimas prasideda ties 0 V vs SCE potencialu;
- Pakankamai paprasta ir greita elektrodo ruošimo metodika.

3.3.1. Kinetinių (I_{max} ir K_M) biojutiklio parametrų nustatymas

Sukurtas glicerolio biojutiklis analizuotas CA metodu esant fiksuotam 50 mV vs SCE potencialui. Pademonstruota, kad darbiname buferiniame tirpale be glicerolio biojutiklis

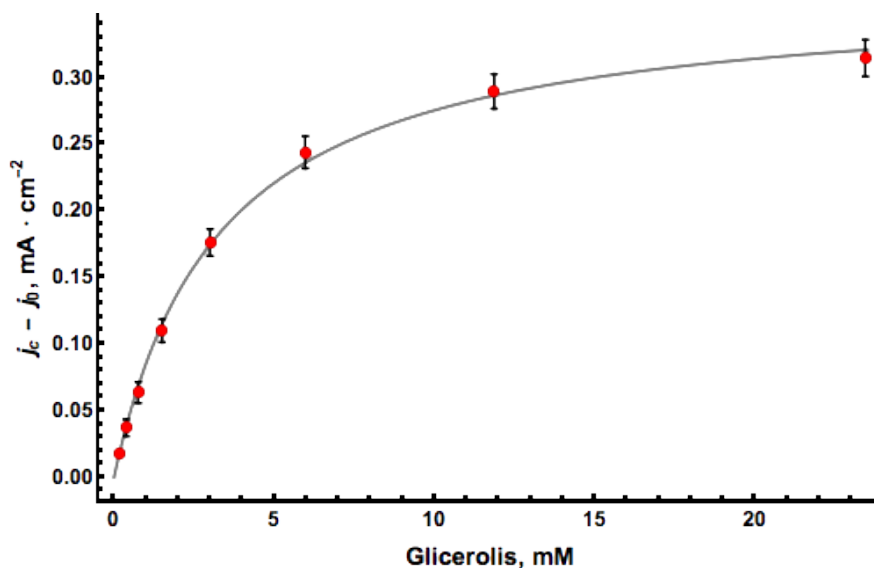
generuoja nekintančią, $0,02 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$, srovę (3.6 pav.). Laipsniškai keičiant glicerolio koncentraciją nuo 0 iki 23,4 mM stebimas srovės didėjimas. Atlikus pirmą, 0,19 mM, glicerolio pridėjimą stebimas srovės padidėjimas nuo 0,02 iki $0,04 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$. Esant didžiausiai, 23,4 mM, glicerolio koncentracijai biojutiklis generavo $0,34 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ srovę. Eksperimentas atliekamas mažiausiai tris kartus, kad būtų galima apskaičiuoti paklaidas.



3.6 pav. Glicerolio biojutiklio generuojamų srovų kitimas laike, didinant glicerolio koncentraciją

Gauti eksperimentiniai duomenys rodo, kad srovės pokytis priklauso nuo glicerolio koncentracijos, nes ADH oksiduoja glicerolį redukuodama redokso mediatorių, kuris oksiduojamas nanostruktūrizuoto elektrodo paviršiuje.

Iš gautų eksperimentinių duomenų gaunama glicerolio biojutiklio generuojamų srovių priklausomybė nuo glicerolio koncentracijos (3.7 pav.). Gauti duomenys glodinti Michaelis-Menten modeliu ir nustatyta, kad biojutiklį sudarančios ADH K_M gliceroliui yra $3,3 \pm 0,2 \text{ mM}$ ir gali sugeneruoti maksimalią, $0,37 \pm 0,01 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ srovę.

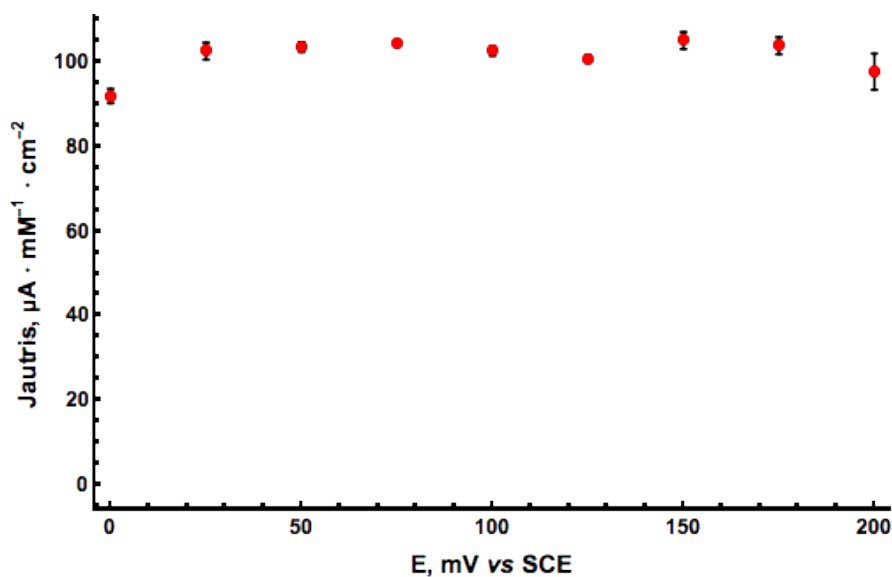


3.7 pav. Glicerolio biojutiklio generuojamų srovių pokyčio priklausomybė nuo glicerolio koncentracijos.

Duomenys glodinti taikant Michaelis-Menten modelį

3.3.2. Glicerolio biojutiklio jautrio priklausomybė nuo potencialo

Žinant biojutiklį sudarančio fermento K_M galima daryti prielaidą, kad tiesinė glicerolio biojutiklio atsako į glicerolį dalis yra iki 1 mM, nes žinoma, jog dalyje, kurioje substrato koncentracija yra daug mažesnė už fermento K_M ($[S] \ll K_M$) atsakas yra tiesiogiai proporcingas. Todėl naudojant biojutiklį atlikta CA analizė keičiant glicerolio koncentraciją nuo 0 iki 0,4 mM, prie skirtingo potencialo. Prie kiekvieno iš potencialų atlikta bent po tris matavimus tiesiškai keičiant glicerolio koncentraciją nuo 0 iki 0,4 mM, tam, kad būtų galima įvertinti paklaidas. Iš eksperimentinių duomenų apskaičiuotas biojutiklio jautris prie skirtingo potencialo ir gauta biojutiklio jautrio priklausomybė nuo potencialo (3.8 pav.).

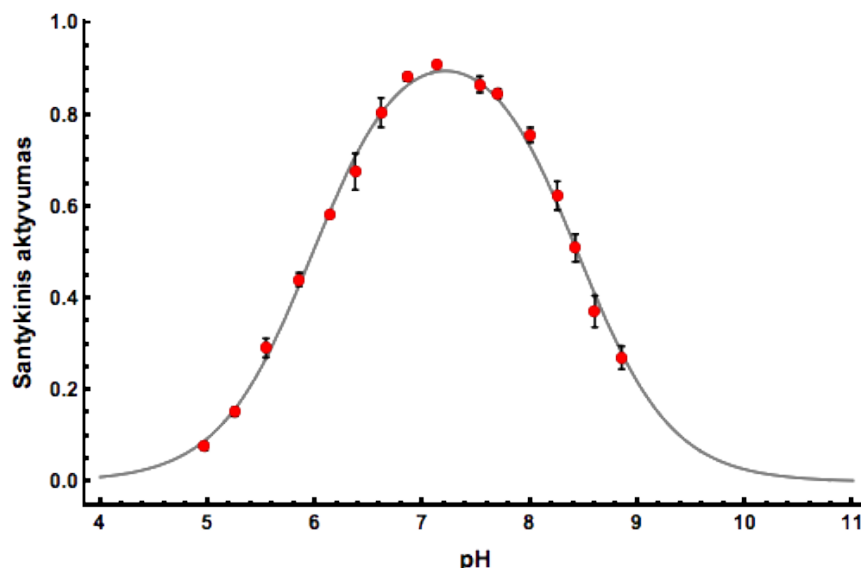


3.8 pav. Glicerolio biojutiklio jautrio priklausomybė nuo potencialo

Iš grafiko matyti, kad mažiausias jautris yra ties 0 ir 200 mV vs SCE potencialu ir atitinkamai lygus 92 ± 2 ir $98 \pm 4 \mu A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$. Keičiant darbinį potencialą nuo 25 iki 175 mV vs SCE jautris svyruoja apie $103 \pm 2 \mu A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$. Remiantis rezultatais buvo pasirinktas 50 mV vs SCE darbinis potencialas, nes jis pakankamai žemas, leidžiantis sumažinti nepageidaujamų redokso reakcijų tikimybę, bei ties šio potencialu biojutiklio jautris didelis – $104 \pm 1 \mu A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$.

3.3.3. pH įtaka glicerolio biojutiklio aktyvumui

Glicerolio biojutikliui atlikta CA analizė skirtingos pH reikšmės buferiniuose tirpaluose tiesiškai keičiant glicerolio koncentraciją nuo 0 iki 0,4 mM prie fiksuoto 50 mV vs SCE potencialo. Kiekvienos pH reikšmės buferiniame tirpale atlikta po tris matavimus, kad būtų galima įvertinti paklaidas. Iš eksperimentinių duomenų gauta biojutiklio santykinio aktyvumo priklausomybė nuo pH (3.9 pav.).

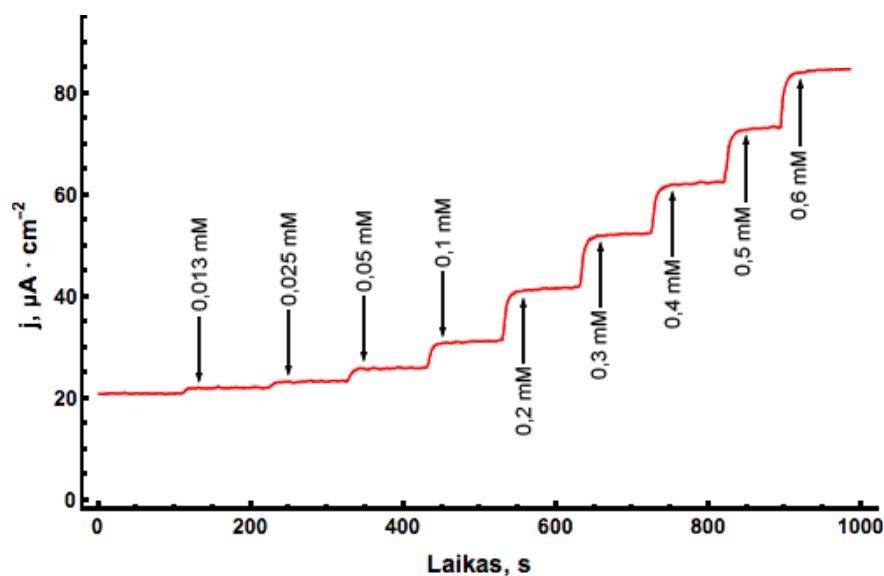


3.9 pav. Glicerolio biojutiklio santykinio aktyvumo priklausomybė nuo pH. Duomenys glodinti taikant „varpo“ modelį

Gautieji duomenys glodinti taikant „varpo“ modelį. Laikyta, kad ADH katalizei reikalingos dvi fermento aktyviajame centre esančios funkcinės grupės, kurių protonizacija ar deprotonizacija nulemia trijų formų ADH, visame pH intervale: protonizuotą, dalinai protonizuotą ir deprotonizuotą. Taip pat laikoma, kad tik dalinai protonizuota fermento forma yra kataliziškai aktyvi. Pritaikius „varpo“ modelį nustatyta, kad pirmosios funkcinės grupės $pK_{a1} = 5,86 \pm 0,02$, o antrosios $pK_{a2} = 8,55 \pm 0,02$. Iš eksperimentiškai gautų taškų matyti, kad pH intervale nuo 6,6 iki 7,7 biojutiklis išlaiko didesnę nei 80 % aktyvumą, todėl sukurtas biojutiklis puikiai tinka glicerolio koncentracijos nustatymui fiziologinėmis sąlygomis.

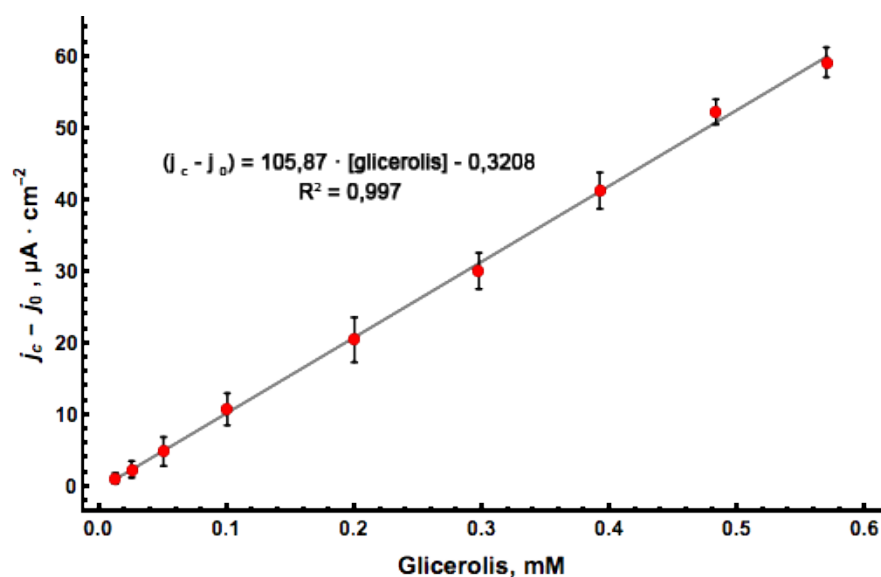
3.3.4. Glicerolio biojutiklio jautris ir detekcijos limitas

Naudojant sukurtą glicerolio biojutiklį buvo atlikta CA analizė prie fiksuoto 50 mV *vs* SCE potencialo darbiniam buferiniame tirpale esant 25°C temperatūrai. Matavimų metu nusistovėjus nulinei ramybės srovei didinama glicerolio koncentracija ir stebimas srovės pokytis. Vėl nusistovėjus ramybės srovei glicerolio koncentracija didinama, taip gaunant srovės kitimą laike (3.10 pav.). Srovės padidėjimas susijęs su ADH katalizuojama glicerolio oksidacija, kurios metu vyko TTF redukcija. Redukuotos formos TTF oksiduojamas elektrodo paviršiuje prie 50 mV *vs* SCE potencialo. Būtent TTF oksidacijos elektrodo paviršiuje metu sugeneruojamas stebimas srovės padidėjimas, nes elektronai perduodami elektrodui.



3.10 pav. Glicerolio biojutiklio srovės kitimas laike, didinant glicerolio koncentraciją

Iš eksperimentinių srovės kitimo laike duomenų buvo gauta srovės pokyčio priklausomybė nuo glicerolio koncentracijos. (3.11 pav.).

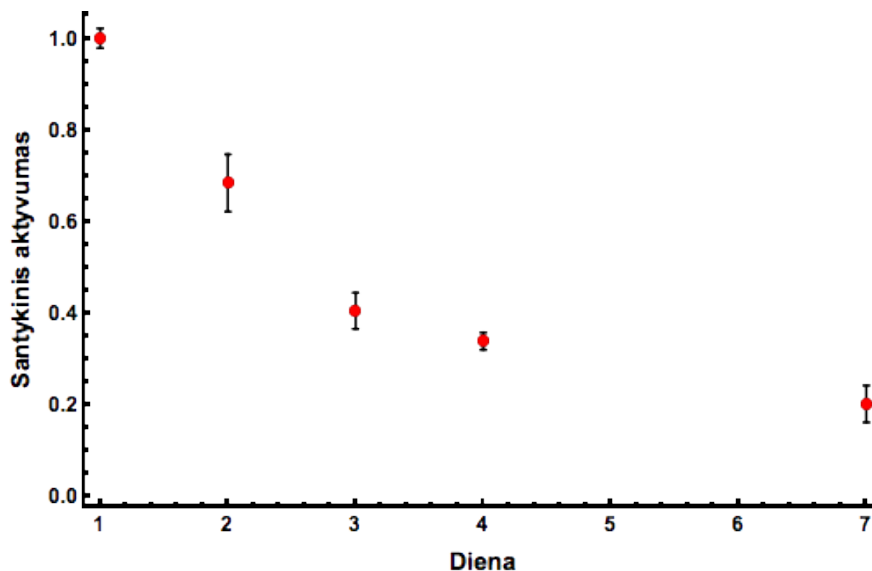


3.11 pav. Biojutiklio srovės pokyčio priklausomybė nuo glicerolio koncentracijos. Duomenys glodinti tiesės lygtimi

Gautieji eksperimentiniai taškai glodinti taikant tiesinį modelį. Tiesės lygties krypties koeficientas yra sukurto biojutiklio jautris – $106 \pm 1 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. Iš 3.11 paveikslo matyti, kad biojutiklio tiesinė atsako į glicerolį dalis yra iki 0,57 mM. Atvejais, kai gaunamas atsakas yra tiesiogiai proporcingas substrato koncentracijai ir aprašomas tiesės lygtimi galima apskaičiuoti detekcijos limitą, kuris yra lygus trimis nulinės srovės standartiniams nuokrypiams, padalintiems iš biojutiklio jautrio [64]. Remiantis šiuo metodu glicerolio biojutiklio detekcijos limitas yra 2 μM .

3.3.5. Biojutiklio stabilumas

Sukurtas biojutiklis analizuotas CA metodu prie 50 mV vs SCE potencialo tiesiškai keičiant glicerolio koncentraciją nuo 0 iki 0,4 mM. Analizė atliekama savaite, kai tarp matavimų biojutiklis laikomas darbiname buferiniame tirpale esant 4 °C temperatūrai. Matavimai atliekami bent po tris kartus, kad būtų galima įvertinti paklaidas. Iš eksperimentinių duomenų gaunama glicerolio biojutiklio santykinio aktyvumo priklausomybė nuo laiko (3.12 pav.).

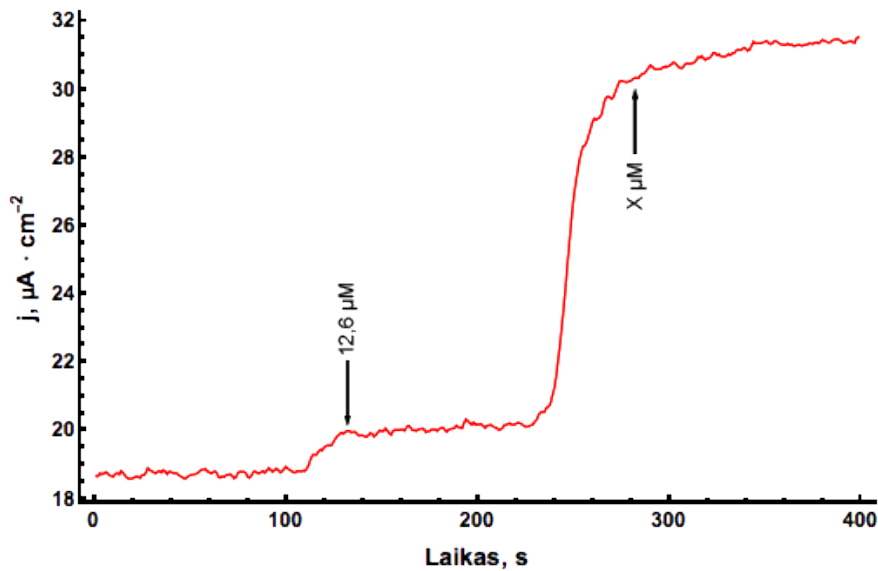


3.12 pav. Biojutiklio santykinio aktyvumo priklausomybė nuo laiko

Iš grafiko matyti, kad per pirmas tris dienas po biojutiklio sukonstravimo santykinis aktyvumas mažėja tiesiškai ir trečiąją dieną išlaiko 41 ± 4 % pradinio aktyvumo. Tačiau sekančiomis dienomis stebimas mažesnis santykinio aktyvumo kritimas ir septintąją dieną glicerolio biojutiklis pasižymi 20 ± 4 % pradinio aktyvumo.

3.4. Glicerolio biojutiklio panaudojimas

Sudarius kalibracinę glicerolio biojutiklio tiesę ir žinant biojutiklio jautrį bei detekcijos limitą buvo pagamintas glicerolio tirpalas, kurio koncentracija buvo pažymėta kaip nežinoma. Naudojant sukurtą glicerolio biojutiklį buvo nustatinėjama glicerolio koncentracija „nežinomos“ glicerolio koncentracijos tirpale. Atlikti trys CA matavimai darbiname buferiniame tirpale prie 50 mV vs SCE potencialo esant 25 °C temperatūrai. Matavimo metu, nusistovėjus nuliniai ramybės srovei pridedama žinomos koncentracijos glicerolio tirpalo, kad galutinė glicerolio koncentracija darbiname buferiniame tirpale būtų 12,6 μM. Nusistovėjus ramybės srovei pridedama „nežinomos“ koncentracijos glicerolio tirpalo ir stebimas antras srovės padidėjimas (3.13 pav.).



3.13 pav. Biojutiklio generuojamos srovės kitimas laike nustatant glicerolio koncentraciją

Glicerolio koncentracija „nežinomos“ koncentracijos glicerolio tirpale apskaičiuojama pagal 28 formulę:

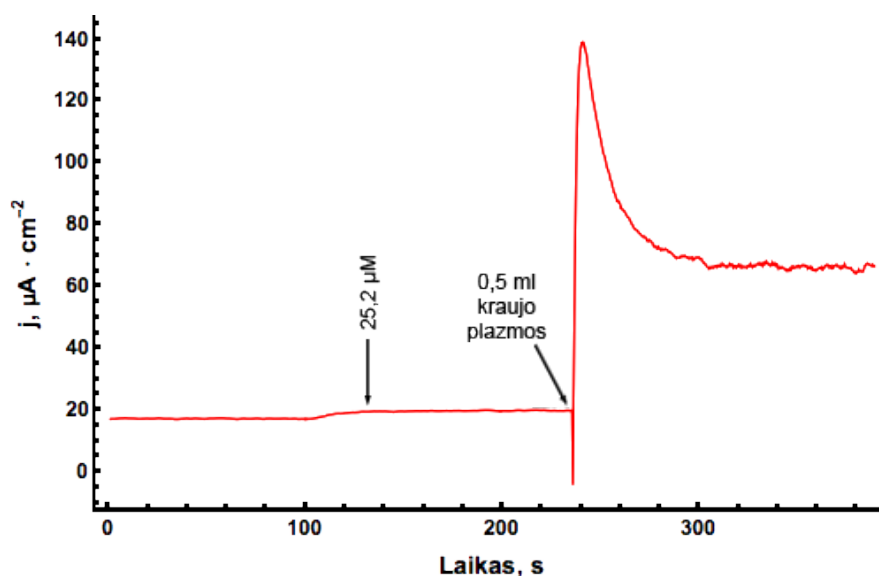
$$c_{gly} = \frac{j_X - j_{12,6 \mu M} - b}{a} \cdot \frac{V_{pr} + V_X + V_{12,6 \mu M}}{V_X} \cdot \frac{j_{12,6 \mu M_{kalib}} - j_{0_{kalib}}}{j_{12,6 \mu M} - j_0} \quad (28)$$

Kur j_0 , j_X ir $j_{12,6 \mu M}$ yra srovės tankis darbiniam buferiniame tirpale, pridėjus „nežinomos“ koncentracijos ir $12,6 \mu M$ glicerolio. a ir b – jautris ir kalibracinės tiesės koeficientas, V_{pr} , V_X ir $V_{12,6 \mu M}$ – darbinio buferinio tirpalo, „nežinomos“ glicerolio koncentracijos tirpalo ir žinomos koncentracijos glicerolio tirpalo tūriai, atitinkamai. $j_{0_{kalib}}$ ir $j_{12,6 \mu M_{kalib}}$ yra nulinis ir pridėjus $12,6 \mu M$ glicerolio generuotos srovės tankis kalibracijos metu.

Remiantis 28 formule ir žinant, kad matavimai atliekami 20 ml darbiniam buferiniame tirpale bei pridedama po 0,05 ml glicerolio tirpalų apskaičiuota, kad „nežinomos“ glicerolio koncentracijos tirpale jo koncentracija yra $38 \pm 3 \text{ mM}$. Gaminant šį tirpalą buvo siekiama pagaminti 40 mM glicerolio tirpalą, todėl galima pasakyti, kad naudojant sukurtą glicerolio biojutiklį paklaidų ribose galima nustatyti glicerolio koncentraciją tirpale.

Naudojant sukurtą glicerolio biojutiklį buvo bandoma nustatyti glicerolio koncentraciją kraujo plazmoje. CA analizės metu nusistovėjus ramybės srovei ($17,2 \mu A \cdot cm^{-2}$) į 2,5 ml darbinio buferinio tirpalo buvo pridėta $25,2 \mu M$ glicerolio ir stebėtas srovės padidėjimas. Nusistovėjus nekintančiai srovei ($19,8 \mu A \cdot cm^{-2}$) praėjus 240 s nuo matavimo pradžios buvo pridėta 0,5 ml kraujo plazmos. Stebėtas staigus srovės šuolis, kuris nusistovėjo pasiekus $65,9 \mu A \cdot cm^{-2}$ reikšmę (3.14 pav.). Staigus srovės padidėjimas ($138,9 \mu A \cdot cm^{-2}$) iki nusistovėjusios ramybės srovės tikėtina susijęs su kraujo plazmos komponentų oksidacija elektrodo paviršiuje. Tokiomis pat sąlygomis atliktas kitas eksperimentas, tik jame buvo naudotas biojutiklis su neaktyviu fermentu.

Pridėjus kraujo plazmos buvo gauta $25,9 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ foninė srovė, kuri susijusi su kraujo plazmoje esančių junginių oksidacija.



3.14 pav. Glicerolio biojutiklio generuojamos srovės kitimas laike matuojant glicerolio koncentraciją kraujo plazmoje

Įvertinus foninę kraujo plazmos srovę ir pritaikius 28 lygtį apskaičiuota, kad glicerolio koncentracija kraujyje yra apie 1,1 mM. Literatūroje nurodoma, kad suaugusio žmogaus kraujo plazmoje laisvo glicerolio koncentracija svyruoja nuo 0,05 iki 0,6 mM, todėl galima daryti prielaidą, kad galbūt biojutiklį sudaranti ADH katalizavo ne tik glicerolio, bet ir kitų kraujo plazmos komponentų oksidaciją [6].

Išvados

1. Atlikus fermentinių C/ADH, C/TTF/ADH, C/CNT/ADH ir C/CNT/TTF/ADH elektrodų CV palyginamuosius tyrimus nustatyta, kad C/CNT/TTF/ADH elektrodas generuoja didžiausią srovę ($0,44 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ prie 0,4 V) esant 50 mM glicerolio koncentracijai, todėl glicerolio biojutiklis kuriamas šio elektrodo pagrindu.
2. Naudojant glicerolio biojutiklį buvo nustatyta, kad biojutiklio prie 50 mV potencialo, darbiname buferiniame tirpale pH 7,5 esant 25 °C temperatūrai tiesinėje 0,0126 – 0,57 mM dalyje jautrumas yra $106 \pm 1 \text{ } \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. Sukurtas glicerolio biojutiklis pasižymėjo 2 μM detekcijos limitu. Taip pat pademonstruota, kad pH intervale nuo 6,6 iki 7,7 biojutiklis išlaiko didesnę nei 80 % aktyvumą, o po savaitės biojutiklis išlaiko $20 \pm 4 \%$ pradinio aktyvumo.
3. Naudojant glicerolio biojutiklį nustatyta, kad nežinomos koncentracijos glicerolio tirpale glicerolio koncentracija yra $38 \pm 3 \text{ mM}$. Taip pat nustatyta, kad kraujo plazmoje laisvo glicerolio koncentracija yra 1,1 mM, kuri viršija literatūroje nurodomą viršutinę 0,6 mM koncentracijos ribą.

Literatūros sąrašas

- [1] Monošik, R.; Ukropcova, D.; Stredansky, M.; Šturdik, E. Multienzymatic Amperometric Biosensor Based on Gold and Nanocomposite Planar Electrodes For Glycerol Determination in Wine, *Analytical Biochemistry*, 421 (1), p. 256–261, 2012.
- [2] Li, T.; Chen, X.; Chen, J.; Wu, Q.; Chen, G. Q. Open and Continuous Fermentation: Products, Conditions and Bioprocess Economy, *Biotechnology Journal*, 9 (12), p. 1503–1511, 2014.
- [3] Gerpen, J. V. Biodiesel Processing and Production, *Fuel Processing Technology*, 86 (10), p. 1097–1107, 2005.
- [4] Davidson, P. M.; Branen, A. L.; Thorngate, J.; Salminen, S. *Food Additives*, CRC Press, 2001.
- [5] Tao, R. C.; Kelley, R. E.; Yoshimura, N. N.; Benjamin, F. Glycerol: Its Metabolism and Use as an Intravenous Energy Source, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 7 (5), p. 479–488, 1983.
- [6] Davis, S. N.; Shavers, C.; Mosqueda-Garcia, R.; Costa, F. Effects of Differing Antecedent Hypoglycemia on Subsequent Counterregulation in Normal Humans, *Diabetes*, 46 (8), p. 1328–1335, 1997.
- [7] Okano, M.; Nishitani, Y.; Dohi, M.; Kageyama, S. Effects of Intravenous Infusion of Glycerol on Blood Parameters and Urinary Glycerol Concentrations, *Forensic Science International*, 262, p. 121–127, 2016.
- [8] Mahadevan, A.; Fernando, S. An Improved Glycerol Biosensor with an Au-FeS-NAD-Glycerol-Dehydrogenase Anode, *Biosensors and Bioelectronics*, 92, p. 417–424, 2017.
- [9] Buerk, D. G. *Biosensors: Theory and Applications*, Technomic Pub. Co, 1993.
- [10] Perumal, V.; Hashim, U. Advances in Biosensors: Principle, Architecture and Applications, *Journal of Applied Biomedicine*, 12 (1), p. 1–15, 2014.
- [11] Kirsch, J.; Siltanen, C.; Zhou, Q.; Revzin, A.; Simonian, A. Biosensor Technology: Recent Advances in Threat Agent Detection and Medicine, *Chemical Society Reviews*, 42 (22), p. 8733, 2013.
- [12] Rackus, D. G.; Shamsi, M. H.; Wheeler, A. R. Electrochemistry, Biosensors and Microfluidics: a Convergence of Fields, *Chemical Society Reviews*, 44 (15), p. 5320–5340, 2015.
- [13] Rasooly, A.; Herold, K. E. *Biosensors and Biodetection*, Humana Press, 2009.
- [14] Ahmed, M. U.; Zourob, M.; Tamiya, E. *Food Biosensors*: Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2016.
- [15] Karunakaran, C.; Bhargava, K.; Benjamin, R. *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, 2015.

- [16] Thevenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: Recommended Definitions and Classification, *Pure and Applied Chemistry*, 71 (12), p. 2333–2348, 1999.
- [17] Banica, F. G. *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, 2012.
- [18] Clark, L. C.; Lyons, C. Electrode System for Continuous Monitorind in Cardiovascular Surgery, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102 (1), p. 29–45, 1962.
- [19] Habermüller, K.; Mosbach, M.; Schuhmann, W. Electron-Transfer Mechanisms in Amperometric Biosensors, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366 (6-7), p. 560–568, 2000.
- [20] Ronkainen, N. J.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R. Electrochemical Biosensors, *Chemical Society Reviews*, 39 (5), p. 1747–1763, 2010.
- [21] Putzbach, W.; Ronkainen, N. Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review, *Sensors*, 13 (4), p. 4811–4840, 2013.
- [22] Stoica, L.; Ludwig, R.; Haltrich, D.; Gorton, L. Third-Generation Biosensor for Lactose Based on Newly Discovered Cellobiose Dehydrogenase, *Analytical Chemistry*, 78 (2), p. 393–398, 2006.
- [23] Marcus, R. A. Electron Transfer Reactions in Chemistry: Theory and Experiment (Nobel Lecture)“, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 32 (8), p. 1111–1121, 1993.
- [24] Hernandez, M. E.; Newman, D. K. Extracellular Electron Transfer, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58 (11), p. 1562–1571, 2001.
- [25] Chaubey, A.; Malhotra, B. D. Mediated Biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 17 (6-7), p. 441–456, 2002.
- [26] Kulys, J. J.; Samalius, A. S.; Švirnickas, G. J. S. Electron Exchange between the Enzyme Active Center and Organic Metal, *FEBS Letters*, 114 (1), p. 7–10, 1980.
- [27] Cass, A. E.; Davis, G.; Francis, G. D.; Hill, H. A. O.; Aston, W. J.; Higgins, I. J.; Plotkin, E. V.; Scott, L. D.; Turner, A. P. Ferrocene-Mediated Enzyme Electrode for Amperometric Determination of Glucose“, *Analytical Chemistry*, 56 (4), p. 667–671, 1984.
- [28] Davis, G. Electrochemical Techniques for the Development of Amperometric Biosensors, *Biosensors*, 1 (2), p. 161–178, 1985.
- [29] Nicholson, R. S.; Shain, I. Theory of Stationary Electrode Polarography for a Chemical Reaction Coupled between Two Charge Transfers, *Analytical Chemistry*, 37 (2), p. 178–190, 1965.

- [30] Schuhmann, W.; Lammert, R.; Uhe, B.; Schmidt, H. L. Polypyrrole, a New Possibility for Covalent Binding of Oxidoreductases to Electrode Surfaces as a Base for Stable Biosensors, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1 (1-6), p. 537–541, 1990.
- [31] Li, Q. S.; Ye, B. C.; Liu, B. X.; Zhong, J. J. Improvement of the Performance of H₂O₂ Oxidation at Low Working Potential by Incorporating TTF-TCNQ into a Platinum Wire Electrode for glucose Determination, *Biosensors and Bioelectronics*, 14 (3), p. 327–334, 1999.
- [32] Li, G.; Xu, H.; Huang, W.; Wang, Y.; Wu, Y.; Parajuli, R. A Pyrrole Quinoline Quinone Glucose Dehydrogenase Biosensor Based on Screen-Printed Carbon Paste Electrodes Modified by Carbon Nanotubes, *Measurement Science and Technology*, 19 (6), p. 065203, 2008.
- [33] Kotzian, P.; Brazdilova, P.; Kalcher, K.; Handlir, K.; Vytras, K. Oxides of Platinum Metal Group as Potential Catalysts in Carbonaceous Amperometric Biosensors Based on Oxidases, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 124 (2), p. 297–302, 2007.
- [34] Lima Filho, J. L.; Pandey, P. C.; Weetall, H. H. An Amperometric Flow Injection Analysis Enzyme Sensor for Sucrose Using a Tetracyanoquinodimethane Modified Graphite Paste Electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 11 (8), p. 719–723, 1996.
- [35] Qian, J.; Liu, Y.; Liu, H.; Yu, T.; Deng, J. Immobilization of Horseradish Peroxidase with a Regenerated Silk Fibroin Membrane and Its Application to a Tetrathiafulvalene-Mediating H₂O₂ Sensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 12 (12), p. 1213–1218, 1997.
- [36] Kowalewska, B.; Kulesza, P. J. Application of Tetrathiafulvalene-Modified Carbon Nanotubes to Preparation of Integrated Mediating System for Bioelectrocatalytic Oxidation of Glucose, *Electroanalysis*, 21 (3-5), p. 351–359, 2009.
- [37] Frew, J. E.; Hill, H. A. O. Direct and Indirect Electron Transfer Between Electrodes and Redox Proteins, *European Journal of Biochemistry*, 172 (2), p. 261–269, 1988.
- [38] Scheller, F. W.; Schubert, F.; Fedrowitz, J. *Frontiers in Biosensorics I: Fundamental Aspects*, Birkhäuser, 2013.
- [39] Eddowes, M. J.; Hill, H. A. O. Novel Method for the Investigation of the Electrochemistry of Metalloproteins: Cytochrome c, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 21, p. 771–771, 1977.
- [40] Shleev, S.; Tkac, J.; Christenson, A.; Ruzgas, T.; Yaropolov, A. I.; Whittaker, J. W.; Gorton, L. Direct Electron Transfer between Copper-Containing Proteins and Electrodes, *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (12), p. 2517–2554, 2005.

- [41] Moser, C. C.; Chobot, S. E.; Page, C. C.; Dutton, P. L. Distance Metrics for Heme Protein Electron Tunneling, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777 (7-8), p. 1032–1037, 2008.
- [42] Zhang, W.; Li, G. Third-Generation Biosensors Based on the Direct Electron Transfer of Proteins, *Analytical Sciences*, 20 (4), p. 603–609, 2004.
- [43] Gorton, L.; Lindgren, A.; Larsson, T.; Munteanu, F. D.; Ruzgas, T.; Gazaryan, I. Direct Electron Transfer between Heme-Containing Enzymes and Electrodes as Basis for Third Generation Biosensors, *Analytica Chimica Acta*, 400 (1-3), p. 91–108, 1999.
- [44] Ghindilis, A. L.; Atanasov, P.; Wilkins, E. Enzyme-catalyzed Direct Electron Transfer: Fundamentals and Analytical Applications, *Electroanalysis*, 9 (9), p. 661–674, 1997.
- [45] Iijima, S. Helical Microtubules of Graphitic Carbon, *Nature*, 354 (6348), p. 56–58, 1991.
- [46] Pujado, M. P. *Carbon Nanotubes as Platforms for Biosensors with Electrochemical and Electronic Transduction*, Springer Science & Business Media, 2012.
- [47] Dai, H. Carbon Nanotubes: Opportunities and Challenges, *Surface Science*, 500 (1-3), p. 218–241, 2002.
- [48] Minteer, S. D. *Enzyme Stabilization and Immobilization*, Humana Press, 2011.
- [49] Iijima, S.; Ichihashi, T. Single-Shell Carbon Nanotubes of 1-nm Diameter, *Nature*, 363 (6430), p. 603–605, 1993.
- [50] Ajayan, P. M.; Zhou, O. Z. *Applications of Carbon Nanotubes*, Springer, 2001.
- [51] Hirsch, A. Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes, *Angewandte Chemie International Edition*, 41 (11), p. 1853, 2002.
- [52] Cao, L. Immobilised Enzymes: Science or Art?, *Current Opinion in Chemical Biology*, 9 (2), p. 217–226, 2005.
- [53] Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E. Understanding Enzyme Immobilisation, *Chemical Society Reviews*, 38 (2), p. 453–468, 2009.
- [54] Hench, L. L.; West, J. K. The Sol-Gel Process, *Chemical Reviews*, 90 (1), p. 33–72, 1990.
- [55] Matsushita, K.; Toyama, H.; Adachi, O. Respiratory Chains and Bioenergetics of Acetic Acid Bacteria, *Advances in Microbial Physiology*, 36, p. 247–301, 1994.
- [56] Kosjek, B.; Stampfer, W.; Pogorevc, M.; Goessler, W.; Faber, K.; Kroutil, W. Purification and Characterization of a Chemotolerant Alcohol Dehydrogenase Applicable to Coupled Redox Reactions, *Biotechnology and Bioengineering*, 86 (1) p. 55–62, 2004.
- [57] Matsushita, K.; Toyama, H.; Yamada, M.; Adachi, O. Quinoproteins: Structure, Function, and Biotechnological Applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58 (1), p. 13–22, 2002.

- [58] Toyama, H.; Mathews, F. S.; Adachi, O.; Matsushita, K. Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenases: Structure, Function, and Physiology, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 428 (1), p. 10–21, 2004.
- [59] Toyama, H.; Chen, Z. W.; Fukumoto, M.; Adachi, O.; Matsushita, K.; Mathews, F. S. Molecular Cloning and Structural Analysis of Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase ADH-IIG from *Pseudomonas putida* HK5, *Journal of Molecular Biology*, 352 (1), p. 91–104, 2005.
- [60] Eftekhari, A. Glycerol Biosensor Based on Glycerol Dehydrogenase Incorporated into Polyaniline Modified Aluminum Electrode Using Hexacyanoferrate as Mediator, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 80 (3), p. 283–289, 2001.
- [61] Goriushkina, T. B.; Shkotova, L. V.; Gayda, G. Z.; Klepach, H. M.; Gonchar, M. V.; Soldatkin, A. P.; Dzyadevych, S. V. Amperometric Biosensor Based on Glycerol Oxidase for Glycerol Determination“, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 144 (2), p. 361–367, 2010.
- [62] Niculescu, M.; Mieliauskiene, R.; Laurinavicius, V.; Csoregi, E. Simultaneous Detection of Ethanol, Glucose and Glycerol in Wines Using Pyrroloquinoline Quinone-Dependent Dehydrogenases Based Biosensors, *Food Chemistry*, 82 (3), p. 481–489, 2003.
- [63] Katrlík, J.; Mastihubá, V.; Vostiar, I.; Šefcovicová, J.; Štefuca, V.; Gemeiner, P. Amperometric Biosensors Based on Two Different Enzyme Systems and Their Use for Glycerol Determination in Samples from Biotechnological Fermentation Process, *Analytica Chimica Acta*, 566 (1), p. 11–18, 2006.
- [64] Shrivastava, A.; Gupta, V. B. Methods for the Determination of Limit of Detection and Limit of Quantitation of the Analytical Methods, *Chronicles of Young Scientists*, 2 (1), p. 21–25, 2011.

Padėka

Dėkoju savo darbo vadovui prof. habil. dr. Juozui Kuliui už darbo tikslo ir metodikos suformulavimą bei vertingus patarimus. Ačiū VGTU lektoriui Daliui Ratautui už praktinius patarimus ir pagalbą. Taip pat dėkoju VU Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriui, vadovaujamam dr. Rolando Meškio, už tyrimams suteiktus fermentus.

Priedai

Magistratūros studijų metu atliekant baigiamąjį magistro darbą buvo ne tik kuriamas ir tiriamas glicerolio biojutiklis, tačiau buvo atliekas angliavandenių oksidacijos molekulinio deguonimi tyrimas, kuris publikuotas *ChemCatChem* žurnale (pirma kvartilė, IF – 4,803). Priede pateiktas išspausdintas straipsnis.

Wiring Gold Nanoparticles and Redox Enzymes: A Self-Sufficient Nanocatalyst for the Direct Oxidation of Carbohydrates with Molecular Oxygen

Dalius Ratautas,^{*,[a, b]} Eimantas Ramonas,^[a] Liucija Marcinkevičienė,^[b] Rolandas Meškys,^[b] and Juozas Kulys^[a, b]

The development of artificial nanocatalysts, especially those incorporating the highly active biocatalysts (enzymes) present in nature, is a rapidly developing field in nanocatalysis and nanomaterials science. Dehydrogenases are exceptionally attractive, as they catalyze the oxidation of various cheap/common substrates to more expensive and desired products. However, their use in sustainable catalysis and/or their incorporation in advanced nanomaterials with catalytic functions are limited owing to one immense problem that can be formulated as a question: how can the electrons received from the oxidized substrate be removed? Here, a solution to this problem is demonstrated: we designed a unique nanomaterial composed of two redox enzymes (nonspecific glucose dehydrogenase and oxygen-reducing laccase) and gold nanoparticles. Both enzymes were wired through the gold nanoparticles (10 nm) and direct electrochemical “communication” was achieved, allowing electron transfer from the redox center of glucose dehydrogenase to a copper center of laccase. As a result, self-sufficient nanocatalysts were synthesized and shown to oxidize various carbohydrates directly with molecular oxygen.

The recent development of nanoscience has presented opportunities to construct artificial nanocatalysts—nanoscale objects usually incorporating various chemical and biological materials—to enhance or create processes not possible in bulk solutions.^[1] Various nanocatalysts prepared from metallic nanoparticles, carbon nanotubes, and polymers together with proteins as well as inorganic frameworks have been reported for catalytic reactions.^[1,2] Some of the most attractive nanocatalysts have been created with enzymes—natural and very effective biocatalysts present in nature.^[3] The synthesis of nanocatalysts by using glucose oxidase,^[4,5] laccase,^[6] urease,^[7] and lipase^[8] has been demonstrated. Nanocatalysts containing multiple enzymes have also been developed.^[4,9,10] Moreover, redox en-

zymes (e.g., glucose and alcohol dehydrogenases) are very attractive for the construction of nanocatalysts, as some of them catalyze the oxidation of abundant and inexpensive substrates (e.g., glucose, lactose, and glycerol) to more expensive and desired products (e.g., gluconic acid, lactobionic acid, and glyceric acid).^[11,12] However, dehydrogenases have a big flaw: it is difficult to remove the electrons received from the oxidized substrate.^[13] Usually expensive and/or toxic mediators as well as complex chemical pathways are used to restore the enzyme to the oxidized state,^[13] that is, an electrode system, electron-accepting enzyme, and mediator may be required.^[14] Opportunely, it has been demonstrated that some redox enzymes can operate through direct electron transfer (DET),^[15] and this phenomenon has been utilized in designing mediatorless biocathodes and bioanodes for biofuel cells and biosensors.^[16,17] Various enzymes such as laccase,^[18,19] cellobiose,^[20] fructose,^[21] glucose,^[22] alcohol and aldehyde^[23,24] dehydrogenases, and hydrogenase^[25] have been demonstrated to operate through DET. A very effective DET was reported between heme-containing dehydrogenases and nanostructures owing to fast electron exchange between the heme of the enzyme and the nanostructure.^[22,26] Utilizing the phenomenon of DET, Vincent et al. made the first dual-enzymatic microsystem by directly wiring a hydrogenase with a nitrate/fumarate reductase on conducting graphite particles.^[27] Larazus et al. demonstrated the wiring of two enzymes on conducting graphite platelets for the water-gas-shift reaction.^[28] Later, we managed to wire two oxidoreductases on aggregated carbon nanotubes.^[29] However, the creation of this type of system utilizing attractive oxygen-reducing enzymes (e.g., laccases) with dehydrogenases to create a nanocatalyst for the direct oxidation of various substrates with molecular oxygen has never been achieved thus far. In this paper, we report the construction of a stable and highly active self-sufficient nanocatalyst composed of glucose dehydrogenase and laccase “wired” through gold nanoparticles (Figure 1). The gold nanoparticles act as carriers for the enzyme molecules as well as wires for the flow of electrons from the active center of glucose dehydrogenase to the copper center of laccase, resulting in a nanocatalyst capable of oxidizing various carbohydrates directly with molecular oxygen.

Thus, to create a self-sufficient nanocatalyst based on glucose dehydrogenase and laccase [Nanocatalyst(s)], we used the DET-capable laccase from *Didymocrea sp. J6* (LAC) and the glucose dehydrogenase from *Ewingella americana* (GDH) capable of oxidizing multiple sugars [e.g., glucose, turnover

[a] D. Ratautas, E. Ramonas, Prof. J. Kulys
Faculty of Fundamental Sciences
Vilnius Gediminas Technical University
Saulėtekio al. 11, LT-10223, Vilnius (Lithuania)
E-mail: Dalius.Ratautas@vgtu.lt

[b] D. Ratautas, Dr. L. Marcinkevičienė, Prof. R. Meškys, Prof. J. Kulys
Institute of Biochemistry
Life Sciences Center, Vilnius University
Saulėtekio al. 7, LT-10257, Vilnius (Lithuania)

Supporting Information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/cctc.201701738>.

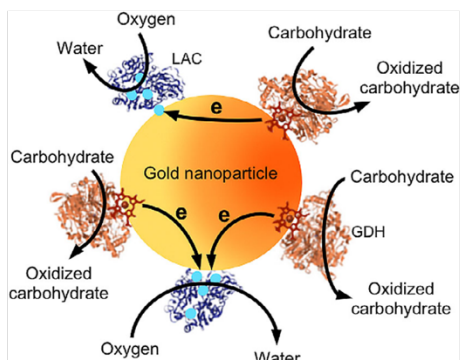


Figure 1. Schematic representation of a self-sufficient glucose dehydrogenase (GDH)/laccase (LAC)/gold nanoparticle-based nanocatalyst.

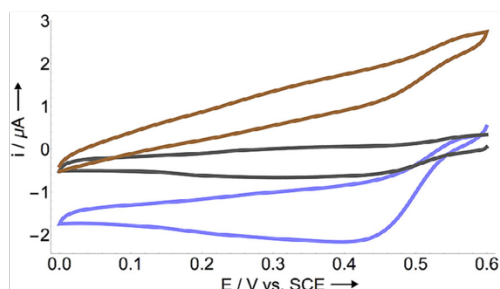


Figure 2. Cyclic voltammetry curves of the Nanocatalysts immobilized on a nanostructured gold electrode. The CV curves show the cathodic current in aerobic medium (blue), current in the anaerobic medium (black), and anodic current in the presence of 20 mM lactose (brown). Working buffer solution: pH 5.5, potential scan rate: -5 mV s^{-1} .

number ($k_{\text{cat}} = (10.7 \pm 1) \text{ s}^{-1}$; lactose, $k_{\text{cat}} = (8.4 \pm 1) \text{ s}^{-1}$). We immobilized both enzymes on gold nanoparticles (AuNPs) with a diameter of 10 nm expecting that the enzymes would directly transfer/receive electrons to/from the AuNPs and act as stabilizing agents to prevent aggregation of the AuNPs in buffer solution. At first, the synthesized Nanocatalysts were immobilized on the surface of the nanostructured gold electrode, and cyclic voltammetry (CV) analysis was performed to evaluate whether both enzymes could directly exchange electrons through the AuNPs with the electrode and demonstrate biocatalysis on the basis of DET (Figure 2). CV was performed in air-saturated buffer solution (pH 5.5); the cathodic current started to increase at 0.5 V [vs. saturated calomel electrode (SCE)] and reached a maximum value of approximately $2 \mu\text{A}$ at 0.3–0.4 V. Upon bubbling pure argon through the medium, a significant decrease in the current was observed (Figure 2). Finally, the CV curve was registered in the presence of 20 mM lactose. An increase in the anodic current was observed starting at 0 V with a maximum value of approximately $3 \mu\text{A}$ at 0.6 V. Control measurements were performed by using AuNPs with one or both enzymes replaced by bovine serum albumin (BSA) (see Figures S1–S3 in the Supporting Information), and these experiments demonstrated that replacement of either GDH or LAC with BSA resulted in the absence of either the anodic or cathodic current, whereas replacement of both enzymes with BSA resulted in the absence of both processes. These measurements proved that both enzymes comprising the Nanocatalyst

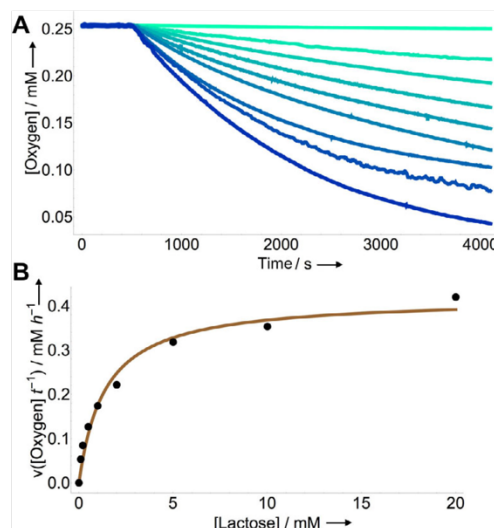
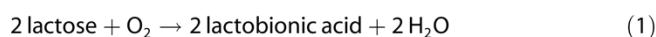


Figure 3. a) Decrease in the oxygen concentration in an isolated cell catalyzed by 12.5 nM Nanocatalysts with lactose (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 mM). b) Dependence of the initial oxygen-consumption rate [mmol h^{-1}] by the Nanocatalysts on the concentration of lactose. Curve corresponds to approximation of the experimental data by using the model [Eq. (2)]. Relative standard error of experimental data approximation is 5%.

were electrochemically active. The cathodic current was generated as a result of LAC-catalyzed oxygen reduction, whereas the anodic current was caused by oxidation of lactose by GDH.

To demonstrate that the Nanocatalysts could directly oxidize lactose and other carbohydrates with molecular oxygen, we measured the consumption of oxygen in a cell isolated from the atmosphere (Figure 3a and Figure S4). In the presence of the Nanocatalysts and a carbohydrate, a decrease in the concentration of oxygen was observed, demonstrating direct oxidation of sugar. Lactose was chosen as the most attractive carbohydrate owing to the high-value product and was used for further experiments and determination of the biocatalytic parameters of the Nanocatalysts. It was demonstrated that an increase in the lactose concentration resulted in an increase in oxygen consumption (Figure 3). No oxygen consumption was detected in the absence of lactose. A gradual increase in the lactose concentration (0.1–2 mM) resulted in a nearly linear increase in the oxygen-consumption rate. The highest oxygen-consumption rate was observed once the concentration of lactose reached 10 mM or higher. To ensure that the observed reactions were catalyzed by the Nanocatalysts, we performed control experiments by utilizing free enzymes and AuNPs with one of the enzymes replaced with BSA (Figure S5). The control measurements demonstrated no oxygen consumption in the presence of 10 mM lactose, thus supporting the evidence for a functioning Nanocatalysts.

The Nanocatalysts-catalyzed process can be described as follows [Eq. (1)]:



The kinetics of the coupled process involving the LAC- and GDH-catalyzed reactions could be approximated by Michaelis–

Menten equations for the individual reactions, and at stationary conditions the biocatalytic process rate (V) was derived (see the rate equation in the Supporting Information) [Eq. (2)]:

$$V = \frac{V_G V_L [\text{Lc}][\text{Ox}]}{V_G (K_{\text{ML}} + [\text{Ox}])[\text{Lc}] + V_L (K_{\text{MG}} + [\text{Lc}])[\text{Ox}]} \quad (2)$$

in which $[\text{Lc}]$ and $[\text{Ox}]$ are the concentrations of lactose and oxygen, K_{ML} and K_{MG} are the apparent Michaelis constants of LAC and GDH in homogeneous solution at pH 5.5, and V_L and V_G are the apparent maximum rates of LAC and GDH on the AuNP surface (mm of oxygen and mm of lactose per hour, respectively). The dependence of the initial reaction rate of the Nanocatalysts on the concentration of lactose was fitted to Equation (2), and V_L and V_G were estimated as (5.5 ± 0.1) and (1.8 ± 0.1) mm h⁻¹, respectively. The rate model in Equation (2) showed very good agreement with the experimental results (Figure 3b) and allowed evaluation of the efficiency of LAC and GDH operation. From the modeled values of V_L and V_G and the amount of adsorbed enzyme on the AuNPs, apparent turnover number (k_{cat}) values of (38 ± 3) s⁻¹ for LAC and (6.7 ± 1) s⁻¹ for GDH (expressed as electrons per second) were calculated. The determined k_{cat} values demonstrate the high activity of GDH, as the k_{cat} value on the surface of the AuNPs was only slightly lower than the k_{cat} value for free GDH $[(8.4 \pm 1) \text{ s}^{-1}]$, thus demonstrating fast electron transfer. However, the efficiency of LAC was drastically reduced, and k_{cat} was significantly lower than that for free LAC $[(655 \pm 20) \text{ s}^{-1}]$, demonstrating either slow electron transfer or inactivity of the majority of the LAC molecules during the biocatalytic process. Nevertheless, the k_{cat} value for LAC was high enough to ensure effective operation of the Nanocatalyst. On average, ten molecules of GDH and 17 molecules of LAC are adsorbed on the AuNPs to form a single Nanocatalyst, thus giving an apparent maximum catalytic rate of $(74 \pm 9) \text{ s}^{-1}$ for the whole Nanocatalyst (expressed as electrons per second).

Spectrophotometric analysis revealed the average diameter of the bulk AuNPs to be $(9.6 \pm 0.3) \text{ nm}$ with absorbance of plasmon resonance (λ_{spr}) at 519 nm (Figure S6). The diameter of the Nanocatalyst was found to be approximately $(13.1 \pm 0.5) \text{ nm}$, and λ_{spr} was shifted to longer wavelengths ($\lambda_{\text{spr}} = 528 \text{ nm}$). Additional measurements by using AuNPs conjugated with LAC, GDH, and BSA demonstrated shifts to $\lambda_{\text{spr}} = 528, 536$, and 538 nm , respectively (Figure S6). The increase in λ_{spr} after adsorption of the enzymes indicates the formation of protein corona, as demonstrated earlier.^[30] We did not observe a second λ_{spr} band at longer wavelengths ($> 600 \text{ nm}$) typical for aggregates of two or three gold nanoparticles;^[31] thus, it is suggested that protein adsorption does not cause enzyme-induced particle aggregation. To evaluate the morphology of the Nanocatalyst, we performed atomic force microscopy (AFM) measurements (Figure 4). AuNPs as well as the Nanocatalyst were immobilized on polylysine-modified mica. The measurements revealed spherical AuNPs with an average diameter of 9.8 nm (Figure 4a). The AFM images demonstrate that the morphology of the Nanocatalyst is different from that of the bulk AuNPs (Figure 4b). The particles are slightly larger (aver-

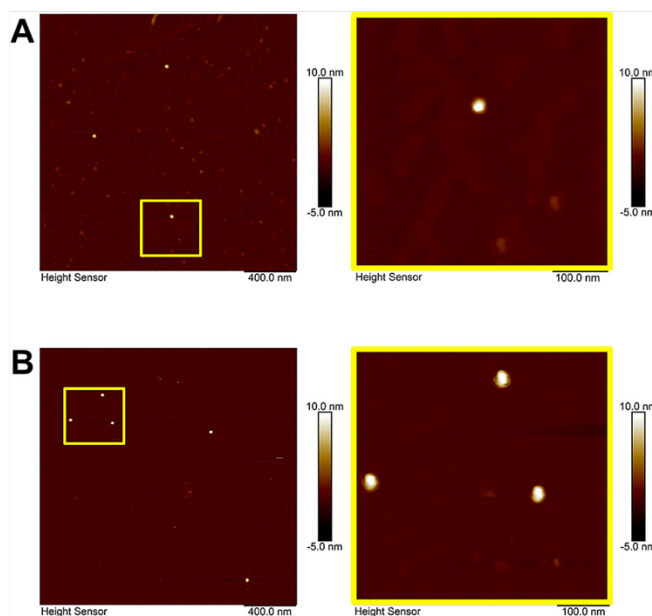


Figure 4. AFM images of a) AuNPs and b) the Nanocatalysts.

age diameter of 12.0 nm) and do not have such a well-ordered spherical shape. Most likely, the decrease in the size of the nanocatalyst (relative to that of obtained from spectrophotometric measurements) is a result of the sample-preparation procedures. “Dry” samples were used for the AFM measurements, and this resulted in a decrease in the size of the protein corona. However, it is evident that the size and shape of the particles are altered by the adsorbed enzymes. Moreover, the AFM images demonstrate that the Nanocatalysts are composed of single particles and also confirm that in the presence of the enzymes the particles do not aggregate; this is also confirmed by transmission electron microscopy images (Figure S7).

To sum up, we successfully created nanocatalysts composed of gold nanoparticles, glucose dehydrogenase, and laccase that were shown to act in concert and oxidized various carbohydrates directly with molecular oxygen. From a fundamental viewpoint, this study demonstrated the possibility to wire oxidoreductases with gold nanoparticles to allow electron flow from one active center to another. From a practical point of view, it offered solutions for long-lasting problems related to the difficulties of utilizing redox enzymes in biocatalytic processes as a result of the necessity to use and regenerate expensive and/or toxic mediators; furthermore, this study demonstrated the possible application of a catalyst with the capacity to effect direct electron transfer of redox enzymes at the nanoscale level. Although in similar cases it has been demonstrated that bulk gold nanoparticles can oxidize carbohydrates (e.g. glucose) with molecular oxygen,^[32] a fast contamination of the metallic surface and subsequent deactivation of the catalyst make those systems difficult to use in realistic conditions. Thus, this research may significantly advance the development of new nanomaterials that combine redox enzymes with conducting nanostructures. Many more redox enzymes could also be “wired” by using a similar approach, and thus, novel nano-

catalysts may be developed that are capable of catalyzing other processes not possible in bulk solutions. It may even be possible to create nanocatalysts incorporating multiple redox enzymes that may catalyze parallel or consecutive reactions at once, transferring electrons directly to the oxygen-reducing enzyme. However, the creation of such a system is a difficult yet very interesting and important task for the future.

Acknowledgements

D.R. acknowledges support of the Research Council of Lithuania (project No. DOK-17030). R.M. acknowledges support of the Research Council of Lithuania (project No. MIP-042/2012). We thank Dr. Eugenijus Šimoliūnas for assistance in sample preparation for TEM measurements and Martynas Skapas for conducting the measurements.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: carbohydrates • enzymes • gold • nanocatalysts • nanoparticles

- [1] D. M. Vriezema, M. Comellas Aragonès, J. A. A. W. Elemans, J. J. L. M. Cornelissen, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1445–1490.
- [2] S. H. Petrosko, R. Johnson, H. White, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 7443–7445.
- [3] A. Küchler, M. Yoshimoto, S. Luginbühl, F. Mavelli, P. Walde, *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *11*, 409–420.
- [4] X. Lian, Y.-P. Chen, T.-F. Liu, H.-C. Zhou, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 6969–6973.
- [5] Y. Huang, Y. Lin, X. Ran, J. Ren, X. Qu, *Nanoscale* **2014**, *6*, 11328–11335.
- [6] I. Gitsov, J. Hamzik, J. Ryan, A. Simonyan, J. P. Nakas, S. Omori, A. Krastanov, T. Cohen, S. W. Tanenbaum, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 804–811.
- [7] D. Shchukin, G. Sukhorukov, R. Price, Y. Lvov, *Small* **2005**, *1*, 510–513.
- [8] H. Gröger, O. May, H. Hüsken, S. Georgeon, K. Drauz, K. Landfester, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1645–1648; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1676–1679.
- [9] G. Delaître, I. C. Reynhout, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12600–12603.
- [10] S. F. M. van Dongen, M. Nallani, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, J. C. M. van Hest, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1107–1114.
- [11] M. Hall, A. S. Bommaris, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4088–4110.
- [12] D. Monti, G. Ottolina, G. Carrea, S. Riva, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4111–4140.
- [13] W. Liu, P. Wang, *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 369–384.
- [14] V. Reipa, M. P. Mayhew, V. L. Vilker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 13554–13558.
- [15] A. L. Ghindilis, P. Atanasov, E. Wilkins, *Electroanalysis* **1997**, *9*, 661–674.
- [16] M. J. Moehlenbrock, S. D. Minter, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1188.
- [17] M. Falk, Z. Blum, S. Shleev, *Electrochim. Acta* **2012**, *82*, 191–202.
- [18] I. V. Berezin, V. A. Bogdanovskaya, S. D. Varfolomeev, M. R. Tarasevich, A. I. Yaropolov, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1978**, *240*, 615.
- [19] M. Dagys, A. Laurynėnas, D. Ratautas, J. Kulys, R. Vidžiūnaitė, M. Talaikis, G. Niaura, L. Marcinkevičienė, R. Meškys, S. Shleev, *Energy Environ. Sci.* **2017**, *10*, 498–502.
- [20] F. Tasca, L. Gorton, W. Harreither, D. Haltrich, R. Ludwig, G. Nöll, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 9956–9961.
- [21] Y. Kamitaka, S. Tsujimura, K. Kano, *Chem. Lett.* **2007**, *36*, 218–219.
- [22] D. Ratautas, A. Laurynėnas, M. Dagys, L. Marcinkevičienė, R. Meškys, J. Kulys, *Electrochim. Acta* **2016**, *199*, 254–260.
- [23] S. Aquino Neto, E. L. Suda, S. Xu, M. T. Meredith, A. R. De Andrade, S. D. Minter, *Electrochim. Acta* **2013**, *87*, 323–329.
- [24] D. Ratautas, L. Tetianec, L. Marcinkevičienė, R. Meškys, J. Kulys, *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *98*, 215–221.
- [25] K. A. Vincent, A. Parkin, F. A. Armstrong, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4366–4413.
- [26] K. Murata, M. Suzuki, K. Kajiya, N. Nakamura, H. Ohno, *Electrochem. Commun.* **2009**, *11*, 668–671.
- [27] K. A. Vincent, L. Xiang, C. F. Blanford, N. A. Belsey, J. H. Weiner, F. A. Armstrong, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 761–762.
- [28] O. Lazarus, T. W. Woolerton, A. Parkin, M. J. Lukey, E. Reisner, J. Seravalli, E. Pierce, S. W. Ragsdale, F. Sargent, F. A. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14154–14155.
- [29] D. Ratautas, L. Marcinkevičienė, R. Meškys, J. Kulys, *Electrochim. Acta* **2015**, *174*, 940–944.
- [30] E. L. L. Yeo, A. J. S. Chua, K. Parthasarathy, H. Y. Yeo, M. L. Ng, J. C. Y. Kah, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 14982–14993.
- [31] G. Chen, Y. Wang, L. H. Tan, M. Yang, L. S. Tan, Y. Chen, H. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4218–4219.
- [32] W. Luo, C. Zhu, S. Su, D. Li, Y. He, Q. Huang, C. Fan, *ACS Nano* **2010**, *4*, 7451–7458.

Manuscript received: October 31, 2017

Revised manuscript received: November 20, 2017

Accepted manuscript online: November 23, 2017

Version of record online: ■■■ 0000