VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Dalius Ratautas

LAKAZĖS IR GLIUKOZĖS DEHIDROGENAZĖS BIOELEKTROKATALITINĖS SISTEMOS SINTEZĖ IR TYRIMAS

THE SYNTHESIS AND RESEARCH OF LACCASE AND GLUCOSE DEHYDROGENASE BIOELECTROCATALYTIC SYSTEM

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Biotechnologijos studijų kryptis

Darbo vadovas: dr. Marius Dagys

Vilnius, 2015

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

_____
(Parašas)

_____
(Vardas, pavardė)

_____
(Data)

Dalius Ratautas

LAKAZĖS IR GLIUKOZĖS DEHIDROGENAZĖS BIOELEKTROKATALITINĖS SISTEMOS SINTEZĖ IR TYRIMAS

THE SYNTHESIS AND RESEARCH OF LACCASE AND GLUCOSE DEHYDROGENASE BIOELECTROCATALYTIC SYSTEM

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas	dr. Marius Dagys (Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas,pavardė)	(Parašas)	(Data)
Lietuvių kalbos konsultantas	dr. Vaida Buivydienė (Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas,pavardė)	(Parašas)	(Data)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas
_____
(Parašas)
_____
(Vardas, pavardė)
_____
(Data)

Biotechnologijos studijų kryptis
Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 621J76001

BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO

UŽDUOTIS
2014 06 01 Nr. .....

Vilnius

Studentui Daliui Ratautui
(Vardas, pavardė)

Baigiamojo darbo tema:

Lakazės ir gliukozės dehidrogenazės bioelektrokatalitinės sistemos sintezė ir tyrimas

patvirtinta 2014 m. lapkričio mėn. 03 d. dekano potvarkiu Nr.320 fm (BIfm-13).

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2015 birželio 1 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

Parinkti tinkamiausią matricą bifermentiniai sistemai, įvertinus LAC bei GDH elektrocheminius aktyvumus ant aukso nanodalelėmis (AuND) ir anglies nanovamzdeliams (CNT) modifikuotų elektrodų naudojant skirtingus imobilizavimo metodus, sudaryti LAC/GDH biokatalitinę sistemą ir įvertinti jos veikimo parametrus bei pasiūlyti modelį aprašantį šios sistemos biokonversinį procesą.

Baigiamojo darbo vadovas dr. Marius Dagys _____
(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas,pavardė) (Parašas)

Užduotį gavau

_____
(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
Pavadinimas Lakazės ir gliukozės dehidrogenazės bioelektrokatalitinės sistemos sintezė ir tyrimas
Autorius Dalius Ratautas
Vadovas dr. Marius Dagys

Kalba: lietuvių

Anotacija
Magistro darbe buvo susintetinta ir ištirta bioelektrokatalitinė sistema, sudaryta iš lakazės iš *Trichaptum abietinum* (LAC) ir gliukozės dehidrogenazės iš *Ewingiella americana* (GDH), kuri oksidavo gliukozę molekuliniu deguonimi. Iš pradžių buvo įvertinta LAC ir GDH vykdoma biokatalizė, pagrįsta tiesiogine elektronų pernaša. Nustatyta, kad abu fermentai vykdė katalizę ir ant aukso nanodalelėmis (AuND), ir anglies nanovamzdeliais (CNT) modifikuotų elektrodų. Parodyta, kad tiek LAC, tiek GDH ant CNT efektyviai vykdė katalizę prie pH 4,0 ant CNT modifikuoto grafito elektrodo, nenaudojant sukamojo disko elektrodo, tad nustatyta, kad CNT buvo tinkama matrica LAC/GDH bioelektrokatalitinei sistemai kurti. Tuomet buvo susintetinta LAC/GDH biokatalitinė sistema. Parodyta, kad ši sistema vartojo deguonį priklausomai nuo gliukozės koncentracijos, ir jos aktyvumo nuo pH priklausomybė buvo abiejų fermentų persidengianti dalis (sandauga). Tai parodo, kad sistema katalizavo deguonies redukciją oksiduodama gliukozę: t.y. egzistavo tiesioginė elektronų pernaša tarp LAC ir GDH. Taip pat pasiūlytas LAC/GDH sistemos biokonversinio proceso modelis, kuris gerai atitinka eksperimentinius rezultatus, esant stacionariomis sąlygomis. Modelis leidžia prognozuoti deguonies suvartojimo priklausomybę nuo gliukozės koncentracijos. Sukurta LAC/GDH biokatalitinė sistema gali atverti galimybes kurti biokatalitinius procesus, jungiant skirtingas oksidoreduktazes, ir geriau suprasti elektronų pernašos procesus.

Prasminiai žodžiai: Lakazė, gliukozės dehidrogenazė, elektronų pernaša, bioelektrokatalizė, anglies nanovamzdeliai, aukso nanodalelės

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

Title The Synthesis and Research of Laccase and Glucose Dehydrogenase Bioelectrocatalytic System

Author Dalius Ratautas

Academic supervisor dr. Marius Dagys

Thesis langue: lithuanian

Annotation

In this master thesis bioelectrocatalytic system which oxidized glucose with molecular oxygen using laccase from *Trichaptum abietinum* (LAC) and glucose dehydrogenase from *Ewingiella americana* (GDH) was synthesized. At first, biocatalysis based on direct electron transfer of LAC and GDH were evaluated. It was determined that both enzymes exhibited catalytic activities on gold nanoparticles (AuNP) and carbon nanotubes (CNT) modified electrodes. However, CNT was a better matrix for dual enzyme system since both LAC and GDH operated efficiently on this matrix at pH 4.0 and due to unnecessity to use rotating disk electrode. Afterwards bioelectrocatalytic system of LAC/GDH was synthesized. It was demonstrated that this system consumed oxygen depending on glucose concentration. The pH activity profile on this system was the overlapping part on the activity profiles on both enzymes (product). This data demonstrate that the system catalyzed oxidation of glucose by directly transferring electrons from GDH to LAC. The model of the bioconversion process of LAC/GDH at the stationary conditions was created. This model allows to predict theoretical oxygen consumption dependence on glucose concentration. Synthesized LAC/GDH biocatalytic system may create possibilities for creation of biocatalytic processes by wiring different oxidoreductases and for a better understanding of the processes of electron transfer.

Keywords: Laccase, glucose dehydrogenase, electron transfer, bioelectrocatalysis, carbon nanotubes, gold nanoparticles

Vilniaus Gedimino technikos universiteto egzaminų,
sesijų ir baigiamųjų darbų rengimo bei gynimo
organizavimo tvarkos aprašo 2011-2012 m. m.
1 priedas

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Dalius Ratautas, 20131434
(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)
Fundamentinių mokslų fakultetas
(Fakultetas)
Bioinžinerija, BIfm13
(Studijų programa, akademinė grupė)

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO) SĄŽININGUMO DEKLARACIJA

2015 m. gegužės 26 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Lakazės ir gliukozės dehidrogenazės bioelektrokatalitinės sistemos sintezė ir tyrimas“ patvirtintas 2014 m. lapkričio 3 d. dekano potvarkiu Nr. 320fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Mano darbo vadovas dr. Marius Dagys.

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą nėra. Jokių įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesumokėjęs (usi).

	Dalius Ratautas
(parašas)	(Vardas ir pavardė)

TURINYS

Paveikslų ir lentelių sąrašas 9

Santrumpos 11

Įvadas 12

1. Literatūros apžvalga 14

1.1 Lakazė 14

1.2 Membraninė gliukozės dehidrogenazė 15

1.3 Tiesioginė heterogeninė elektronų pernaša tarp fermento ir elektrodo paviršiaus 16

1.4 Aukso nanodalelės 19

1.5 Anglies nanovamzdeliai 20

1.6 Fermentų imobilizavimas, siekiant užtikrinti fermentų veikimą TEP 21

1.7 Šiuolaikiniai TEP principu pagrįsti bioanodai bei biokatodai 24

2. Metodai ir medžiagos 26

2.1 Įranga 26

2.2 Reagentai 26

2.3 Fermentai 27

2.4 Lakazės, gliukozės dehidrogenazės ir lakazės/gliukozės dehidrogenazės sistemos elektrodų ruošimo procedūra 28

2.5 Elektrodų analizės metodai 29

2.5.1 Ciklinė voltamperometrija 29

2.5.2 Chronoamperometrija 30

2.5.3 Sukamojo disko elektrodo voltamperometrija 30

2.5.4 Deguoninio Klarko elektrodo votlamperometrija 33

2.6 Difuzinio sluoksnio storis prie paviršiaus 33

3. Rezultatai ir jų aptarimas 34

3.1 Matricos parinkimas lakazės ir gliukozės dehidrogenazės biokatalitinei sistemai 34

3.1.1 Lakazės elektrocheminis aktyvumas ant aukso nanodalelėmis dengtų aukso elektrodų 34

3.1.2 Lakazės elektrocheminis aktyvumas ant anglies nanovamzdeliais dengtų grafito elektrodų 37

3.1.3 Gliukozės dehidrogenazės elektrocheminis aktyvumas ant AuND dengtų aukso elektrodų 39

3.1.4 Gliukozės dehidrogenazės elektrocheminis aktyvumas ant CNT dengtų grafito elektrodų 41

3.1.5 Lakazės ir gliukozės dehidrogenazės elektrodų parametrų įvertinimas pasirenkant sistemos matricą 42

3.1.6 Lakazės ir gliukozės dehidrogenazės elektrodų tariamų K_M ir j_{max} matavimai 43

3.2 Lakazės ir gliukozės dehidrogenazės biokatalitinė sistema anglies nanovamzdelių pagrindu 47

3.2.1 Lakazės ir gliukozės dehidrogenazės elektrocheminis aktyvumas ant anglies nanovamzdeliais modifikuoto grafito elektrodo 47

3.2.2 Lakazės ir gliukozės dehidrogenazės sistemos deguonies vartojimas priklausomai nuo gliukozės koncentracijos 48

3.2.3 Lakazės ir gliukozės dehidrogenazės sistemos aktyvumo priklausomybės nuo pH 49

3.3 Lakazės ir gliukozės dehidrogenazės sistemos biokonversinio proceso modeliavimas 51

3.4 Rezultatų aptarimas 53

Išvados 55

Literatūros sąrašas 56

Padėka 60

Priedai 61

Paveikslų ir lentelių sąrašas

Paveikslai

1. pav. LAC ir GDH bioelektrokatalitinė sistema veikianti TEP principu tarp abiejų fermentų 12

1.1 pav. Lakazių deguonies redukcijos katalitinio ciklo schema 14

1.2 pav. Neefektyvi lakazės adsorbcija ant elektrodo paviršiaus. 16

1.3 pav. TEP palanki fermento adsorbcija ant paviršiaus. Fermentas orientuotas T1 sritimi. 17

1.4 pav. Fermento adsorbcija ant CNT ir vykdoma TEP 18

1.5 pav. AuND sintezės reakcijos mechanizmo schema naudojant citratą 20

1.6 pav. Fermento orientuotas kovalentinis imobilizavimas. AuND paviršius padengiamas T1 centro ligandu 23

2.1 pav. Paviršinio sluoksnio nuolatinis atsinaujinimas 30

2.2 pav. Fermentinis procesas ant elektrodo paviršiaus. 30

3.1 pav. CV aukso elektrodo modifikuoto AuND ir dengto LAC nesant NaF (1) ir esant 6,3 mM NaF (2). 35

3.2 pav. CV aukso elektrodo su AuND ir dengto LAC modifikavus 4-ATF (2), 4-ATF ir 4-MBR (1), su 6,3 mM NaF (3).. 36

3.3 pav. CV aukso elektrodo modifikuoto AuND ir dengto LAC naudojant fiksuotą 0,55 V vs. SCE potencialią nesant NaF (1) ir esant 6,3 mM NaF (2) 37

3.4 pav. CV grafito elektrodo modifikuoto CNT DMF ir dengto LAC nesant NaF (1) ir esant 6,3 mM NaF (2). 38

3.5 pav. CV grafito elektrodo modifikuoto CNT vandenyje ir dengto LAC nesant NaF (1) ir esant 6,3 mM NaF (2)..... 39

3.6 pav. CV aukso elektrodo modifikuoto AuND ir dengto GDH be gliukozės (3) su 50 mM gliukozės buf. tirpalo pH 4,0 (2), su 50 mM gliukozės buf. tirpalo pH 7,0 (1). .. 40

3.7 pav. CV aukso elektrodo modifikuoto AuND ir 4-ATF bei 4-MBR ir dengto GDH be gliukozės (3) su 50 mM gliukozės buf. tirpalo pH 4,0 (2), su 50 mM gliukozės buf. tirpalo pH 7,0 (1)..... 41

3.8 pav. CV grafito elektrodo modifikuoto CNT ir dengto GDH be gliukozės (3) su 50 mM gliukozės buf. tirpalo pH 4,0 (2), su 50 mM gliukozės buf. tirpalo pH 7,0 (1)..... 42

3.9 pav. CV grafito elektrodo modifikuoto CNT ir dengto GDH be gliukozės (1), su 1 mM (2), 2 mM (3), 5 mM (4), 10 mM (5), 20 mM (6), 50 mM (7) gliukozės.. 44

3.10 pav. GDH tariamo reakcijos greičio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos, esant potencialui 0,4 V *vs*. SCE. Eksperimentiniams duomenimis pritaikytas M-M modelis..... 45

3.11 pav. CV aukso elektrodo modifikuoto AuND ir dengto LAC, kuomet deguonies koncentracija buvo 0,02 mM (2), 0,254 mM (3), 0,73 mM (4), 1,2 mM (5). Slopinimas 6,3 mM NaF (1)... 45

3.12 pav. LAC tariamo reakcijos greičio priklausomybė nuo deguonies koncentracijos. Eksperimentiniams duomenimis pritaikytas M-M modelis..... 46

3.13 pav. CV grafito elektrodo modifikuoto AuND ir dengto LAC ir GDH. Matavimai tirpale (3), su 6,3 mM NaF (2), su 6,3 mM NaF ir 50 mM gliukozės (1).. 47

3.14 pav. Deguonies koncentracijos kitimas priklausomai nuo tirpale esančios gliukozės (0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 mM) koncentracijos (1). Kontrolinis matavimas be LAC (2), be GDH (3)..... 49

3.15 pav. Grafito elektrodo dengto CNT ir LAC (1), GDH (2) bei LAC/GDH sistemos (3) santykinių aktyvumų priklausomybė nuo pH. Kreivės rodo modelio pritaikymą eksperimentiniams taškams 50

3.16 pav. LAC/GDH sistemos deguonies konversijos priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos 53

Lentelės

1 lentelė. Susintetinti LAC biokatodai bei GDH bioanodai ir jų parametrai.. 42

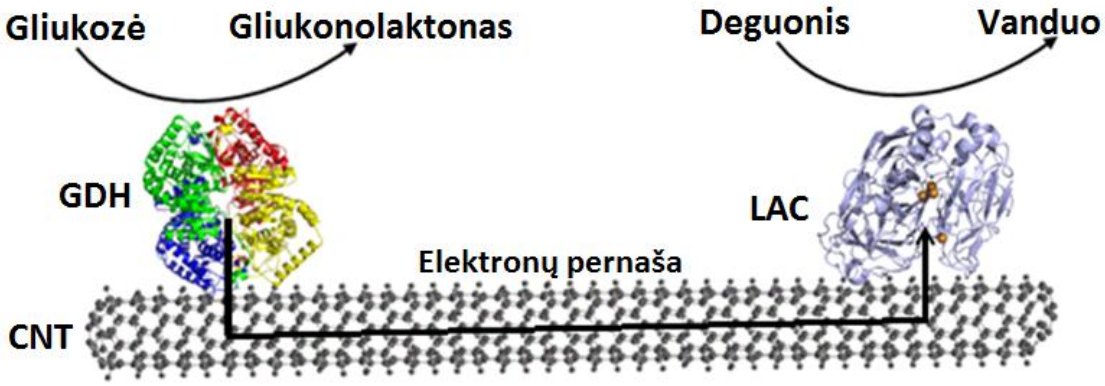
Santrumpos

4-ATF	4-aminotiofenolis
4-MBR	4-merkaptobenzoinė rūgštis
AuND	Aukso nanodalelė (s)
CA	Chronoamperometrija
CNT	Anglies nanovamzdeliai
CV	Ciklinė votlamperometrija / ciklinė votlamperograma
DMF	Dimetilformamidas
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbonimidas
GA	Gliutaraldehidas
GDH	Gliukozės dehidrogenazė iš *Ewingiella americana*
j_{max}	Maksimalus srovės tankis
K_M	Michaelio konstanta
LAC	Lakazė iš *Trichaptum abietinum*
LAC/GDH	Lakazės iš *Trichaptum abietinum* ir gliukozės dehidrogenazės iš *Ewingiella americana* sistema
m-GDH	Chinoninė membraninė gliukozės dehidrogenazė
M-M	Michealis-Menten
P3MT	Poli(3-metiltiofenas)
PEI	Polietileniminas
PQQ	Pirolochinolino chinonas
SCE	Standartinis kalomelio elektrodas (0,244 V *vs.* SVE)
SDE	Sukamojo disko elektrodas
s-GDH	Tirpi chinoninė gliukozės dehidrogenazė
SVE	Standartinis vandenilio elektrodas
TEP	Tiesioginė heterogeninė elektronų pernaša
TRIS	2-amino-2-hidroksimetilpropano-1,3-diolis

ĮVADAS

Bioelektrokatalitinė sistema – tai biologinės kilmės katalizatorių (fermentą) turinti sistema, kuri greitina elektrochemines reakcijas, ir tokiu būdu suteikia galimybę vykdyti biokonversinius ir bioanalitinius procesus (Ivnitski et al., 2014). Šiuo metu pagrindinės ir labiausiai kuriamos bei vystomos bioelektrokatalitinės sistemos yra biokuro elementai ir biojutikliai (Zhou, Dong, 2011). Biokuro elementų paskirtis yra generuoti elektros srovę oksiduojant (redukuojant) tam tikrus substratus. Šios sistemos yra patrauklios, nes tinkamai išvystytos gali suteikti galimybę kurti naujus implantuojamus įrenginius bei sistemas, efektyviai generuojančias elektros srovę iš įvairių šaltinių (pvz., biologinių skysčių, organinių junginių ar paprasčiausių atliekų). O biojutikliai – bioelektrokatalitinės sistemos, kurių paskirtis nustatyti tikslinio junginio koncentraciją tirpale.

Paprastai bioelektrokatalinę sistemą sudaro bioanodas ir biokatodas: ant elektrodo paviršiaus imobilizuotas fermentas, kuris katalizuoja redokso procesą, elektronus perduodamas arba priimdamas iš elektrodo. Šiuo metu didžiausias dėmesys yra skiriamas trečiosios kartos sistemoms, kurioms būdinga tarp fermento ir elektrodo vykstanti tiesioginė elektronų pernaša (TEP) (Bullen et al., 2006; Stoica et al., 2006; Zhang ir Li, 2004).



1 pav. GDH ir LAC bioelektrokatalitinė sistema veikianti TEP principu tarp abiejų fermentų

TEP atveria naujas galimybes kurti biokatalitines sistemas (žr. 1 pav.) tiesiogiai surišant arba suvielojant (angl. *wiring*) dominančius fermentus, kurie vykdytų biokonversinius procesus. Tokios bioelektrokatalitinės sistemos, kurioje būtų sujungiama dvi arba daugiau oksidoreduktazių pasižymi daug privalumų: palyginus su pavieniais fermentais turėtų pakeistą substratinį specifiškumą, suteiktų galimybę elektronų akceptoriumi naudoti

deguonį, suteiktų galimybę kurti biokonversines sistemas suvielojant (angl. *wiring*) įvairias oksidoreduktazes, dėl to būtų galima kurti naujus biokatalitinius procesus, tokią sistemą būtų galima naudoti kaip modelį, padedantį geriau suprasti gamtoje vykstančius elektronų pernašos procesus.

Šio magistro darbo metu buvo sintetinama ir tiriama TEP principu veikianti gliukozės dehidrogenazės ir lakazės biokatalatinė sistema, kuomet abu fermentai buvo sujungti per nanodarinį.

Tikslas: Sudaryti ir ištirti lakazės (LAC) ir gliukozės dehidrogenazės (GDH) bioelektrokatalitinę sistemą.

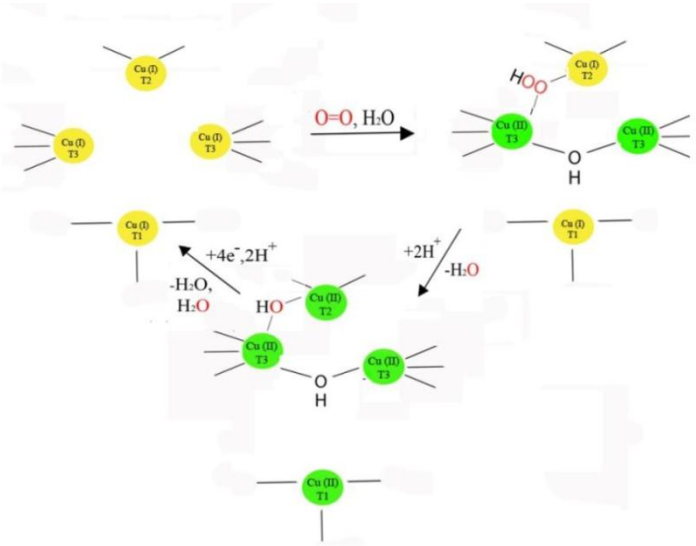
Uždaviniai:

1. Parinkti tinkamiausią matricą bifermentinei sistemai, įvertinus LAC bei GDH elektrocheminius aktyvumus ant aukso nanodalelėmis (AuND) ir anglies nanovamzdeliams (CNT) modifikuotų elektrodų, naudojant skirtingus imobilizavimo metodus;
2. Sudaryti LAC/GDH biokatalitinę sistemą ir įvertinti jos veikimo parametrus;
3. Pasiūlyti modelį, aprašantį šios sistemos biokonversinį procesą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Lakazė

Lakazė – vienas iš pirmųjų aprašytų fermentų (Yoshida, 1883), priklausantis oksidoreduktazėms. Lakazės yra randamos beveik visuose grybuose ir kai kuriuose augaluose (Baldrian, 2006). Grybinės lakazės yra ekstraląsteliniai fermentai, kurių viena iš geriausiai ištirtų funkcijų – minkštinti medieną, vykdant lignino degradaciją (Solomon et al., 1996), o augalų lakazių funkcijos, manoma, yra susijusios su lignino sinteze (Solomon et al., 1996). Visos lakazių funkcijos nėra žinomos. Grybinės lakazės yra monomeriniai, dimeriniai ar net tetrameriniai baltymai, kurių molekulinės masės vyrauja nuo 60 iki 110 kDa kiekvieno monomero atžvilgiu. Lakazės yra glikozilinti baltymai (angliavandenių masės dalis sudaro 10–50 % fermento masės), o tai, manoma, lemia pakankamai didelį lakazių aktyvumo stabilumą (Durán et al., 2002). Minimaliam katalitiniam fermento aktyvumui būtini du aktyvieji centrai: T1 aktyvusis centras, sudarytas iš vieno vario jono, ir T2/T3 vario centras,



1.1 pav. Lakazių deguonies redukcijos katalitinio ciklo schema[1]

sudarytas iš trijų vario jonų (žr. 1.1 pav.). Lakazės redukuoja molekulinį deguonį iki vandens keturių elektronų pernašos procesu, oksiduodamos įvairius substratus (Solomon et al., 1996). Bendra deguonies redukcijos schema, yra aprašoma lygtimi (Yaropolov et al., 1994):

$$2\ AH_2 + O_2 \rightarrow 2\ A + 2\ H_2O \qquad (1)$$

Kadangi lakazė substratą oksiduoja tik vienu elektronu, vadinasi reakcijos mechanizmas negali būti tiesioginis ir fermentas veikia kaupdamas elektronus savo

[1] Parengta pagal Solomon et al., 1996

aktyviajame centre. Pagal pasiūlytą veikimo mechanizmą (žr. 1.1 pav.) deguonies redukciją galima suskirstyti į tris etapus: 1) visiškai redukuoto fermento reakcija su deguonimi ir dalinė fermento oksidacija išsiskiriant vienai vandens molekulei; 2) iš dalies oksiduoto fermento visiška oksidacija išsiskiriant antrai vandens molekulei; 3) visiškai oksiduoto fermento redukcija prisijungiant 4 elektronus per T1 centrą (Solomon et al., 1996).

1.2. Membraninė gliukozės dehidrogenazė

Chinoninė membraninė gliukozės dehidrogenazė (m-GDH) – gram-neigiamoms bakterijoms būdingas ir pakankamai neseniai atrastas fermentas, kurio struktūra dar nėra nustatyta. m-GDH buvo painiojama su tose pačiose gram-neigiamose bakterijose esančia nuo PQQ priklausoma tirpia gliukozės dehidrogenaze (s-GDH), kol buvo įrodyta, kad tai du skirtingi fermentai turintys skirtingas struktūras (Matsushita et al., 1989).

Pagrindinė m-GDH funkcija – chinoninio kofaktoriaus redukcija (oksiduojant gliukozę ir kitus panašius substratus), kuris paskui yra naudojamas protonų gradientui kurti bakterijos kvėpavimo grandinėje. m-GDH katalizuojama reakcija gali būti aprašoma bendra lygtimi (Duine, 1999):

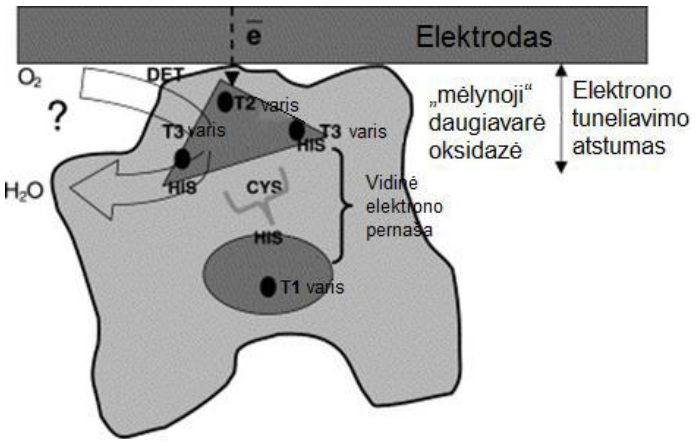
$$\text{D-gliukozė} + \text{kofaktorius}_{\text{oks}} \rightarrow \text{D-gliukono-δ-lactonas} + \text{kofaktorius}_{\text{red}} \qquad (2)$$

Nustatyta, kad m-GDH, gali turėti vieną arba daugiau subvienetų, tačiau katalitinį aktyvumą turintis subvienetas yra būdingas visoms m-GDH (Yamada et al., 2003). Jo molekulinė masė yra apie 90 kDa ir sudarytas iš dviejų domenų: membraninio ir periplazminio. Parodyta, kad kofaktorių turintis m-GDH subvieneto membraninis domenas yra sudarytas iš kelių hidrofobinių segmentų, esančių membranoje, o tarpmembraninis domenas turi chinoninį kofaktorių ir Mg^{2+} (arba Ca^{2+}) joną. Manoma, kad redukuotas chinoninis kofaktorius, susidaręs oksiduojant gliukozę, čia pat oksiduojasi perduodamas elektronus judriems membranoje esantiems elektronų pernašos mediatoriams (Yamada et al., 2003). Pasiūlytas m-GDH gliukozės oksidacijos mechanizmas, kuris paremtas hidrido pernaša. Manoma, kad neigiamai įkrauta asparto grupės liekana elgiasi kaip Luiso (angl. *Lewis*) bazė prisijungdama protoną iš gliukozės, tuomet vyksta hidrido pernaša susidarant D-gliukono-δ-laktonui. Per kelis kitus etapus susidaro redukuotas kofaktorius, kuris oksiduojasi

perduodamas elektronus mediatoriniam junginiui. Tuomet katalitinis gliukozės oksidacijos ciklas vėl kartojasi (Yamada et al., 2003).

1.3. Tiesioginė heterogeninė elektronų pernaša tarp fermento ir elektrodo paviršiaus

Elektronų pernaša gamtoje yra vienas iš svarbiausių gyvybinių procesų, dažniausiai susijęs su energijos perdavimu, pvz., ATP sintezė mitochondrijų kvėpavimo grandinėje (Hernandez, Newman, 2001). Tiesioginė heterogeninė elektronų pernaša (TEP) – procesas, kurio metu fermentas tiesiogiai mainosi elektronais su elektrodo paviršiumi. Šiuo metu vis geriau suprantama, kaip fermentai geba vykdyti TEP ir kas nulemia TEP efektyvumą. Vieni iš pirmųjų TEP tyrimų parodo, kad elektrono tuneliavimo atstumas yra vienas iš pagrindinių faktorių nulemiančių efektyvią arba neefektyvią TEP. Didėjant atstumui elektrono perdavimo greitis mažėja eksponentiškai (Kulys, Čėnas, 1988). Tad vienas iš svarbiausių faktorių nulemiančių TEP efektyvumą yra fermento redokso centro padėtis baltyminiame karkase, kadangi fermento veikimui TEP būdu, šis centras turi pakankamai suartėti su elektrodo paviršiumi (Shleev et al., 2005). Parodyta, kad TEP efektyviai gali vykti tik tuomet, jei elektrono tuneliavimo atstumas yra 0,4-1,2 nm (Moser et al., 2008).



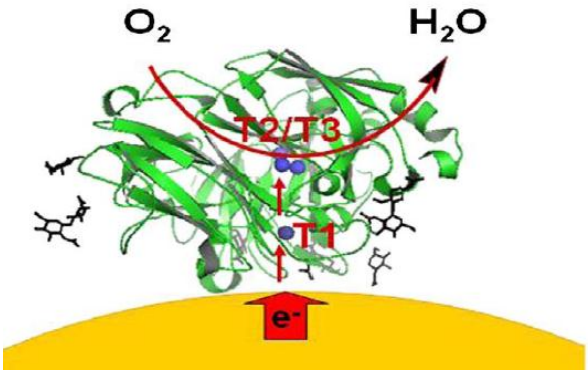
1.2 pav. Neefektyvi lakazės adsorbcija ant elektrodo paviršiaus[2].

Tiesioginė elektronų pernaša tarp fermento redokso centro ir elektrodo paviršiaus pirmą kartą aprašyta 1977, kai dvi nepriklausomos mokslininkų grupės nustatatė citochromo *c* elektrocheminį aktyvumą ant modifikuotų aukso elektrodų (Eddowes, Hill, 1977; Yeh, Kuwana, 1977). Netrukus pastebėta, kad lakazė iš *Trametes versicolor,* esant molekuliniam

[2] Parengta pagal Shleev et al., 2005

deguoniui, ant anglies elektrodų veikia TEP principu (Berezin et al., 1978). Tyrimo autoriai parodė, kad šia lakaze modifikuotas anglies elektrodas redukuoja molekulinį deguonį iki vandens, kuomet reakcijos tirpale nėra jokių elektronų donorinių junginių. Tai indikuoja TEP, nes elektronus, reikalingus molekulinio deguonies redukcijai, fermentas priima tiesiogiai iš elektrodo. Biokatalitinės elektros srovės išnykdavo pašalinus iš tirpalo deguonį. Taip pat parodyta, kad tai aukšto veikimo potencialo lakazė, kurios T1 centro redokso potencialas – 780 mV *vs.* SVE. Maždaug tuo pat metu taip pat buvo parodyta ir lakazės veikimas TEP ant anglies elektrodų esant potencialui, kurio reikšmė yra artima termodinaminiai deguonies redukcijos iki vandens potencialo reikšmei – 1,2 V (Tarasevich et al., 1979).

Remiantis bendru lakazių struktūriniu panašumu ir savybėmis, pasiūlyta, kaip vyksta tiesioginė elektronų pernaša tarp nemodifikuoto aukso elektrodo ir lakazės (žr. 1.2 pav.).

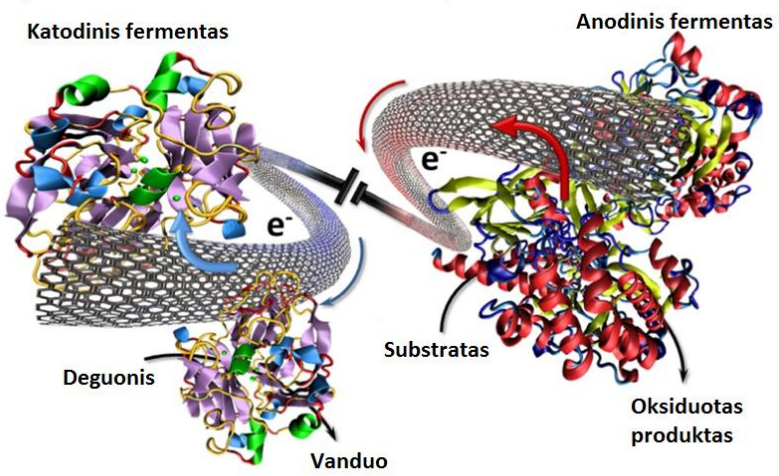


1.3 pav. TEP palanki fermento adsorbcija ant paviršiaus[3]. Fermentas orientuotas T1 sritimi.

Nustatyta, kad ant porėto paviršiaus lakazės dažniausiai adsorbuojasi T2/T3 centru (kuris katalizuoja deguonies redukciją), tuo metu T1 centras (kuris katalizuoja įvairių substratų oksidaciją) yra nutolęs nuo elektrodo paviršiaus. Kadangi lakazė tirpale substratus oksiduoja T1 centre ir elektronus perduoda iš T1 centro į T2/T3 (Solomon et al., 1996) dėl tokios adsorbcijos TEP nėra efektyvi: apsunkinamas deguonies patekimas ir vandens pašalinamas T2/T3 centre, taip pat vidinės elektrono pernašos kelias smarkiai pailgėja, nes elektronai perduodami per T2 vario centrą (Shleev et al., 2005). Efektyviai TEP pasiekti, lakazė turėtų adsorbuotis T1 centru į elektrodo paviršių, kadangi būtent per T1 centrą yra perduodami elektronai. Manoma, kad ant įvairių paviršių, (pvz., aukso nanodalelių, karboksi grupėmis aktyvuotų anglies nanovamzdelių, etc.) esant tinkamoms sąlygoms, fermentas gali adsorbuotis T1 sritimi (Dagys et al., 2010; Shleev et al., 2005) (žr. 1.3 pav.). Visgi, tai

[3] Parengta pagal Dagys et al. 2010

greičiausiai yra susiję su elektrodo paviršiaus plotu. Esant dideliam paviršiaus plotui, yra didesnė tikimybė, kad daugiau fermento adsorbuosis tinkamai ir bus stebima gana efektyvi TEP. Matomai dėl šios priežasties lakazės ant gryno aukso TEP vykdo neefektyviai, tuo metu ant AuND ir modifikuotų AuND gaunami molekulinio deguonies redukcijos srovės tankiai šiuo metu siekia iki 1,5 mA cm^{-2} (Gutiérrez-Sánchez et al., 2012). Ant anglies nanodarinių (pvz., CNT) manoma, kad fermentai taip pat turi būti orientuoti tinkamai: t.y. savo redokso centru kuo arčiau anglies nanostruktūros (Cosnier et al., 2014) (žr 1.4 pav.). Dažnai ant anglies nanodarinių gaunamos absoliučios srovės būna didesnės nei ant kitų paviršių, tačiau tai neparodo, kad fermentas adsorbuojasi palankiau. Paprastai anglies nanodariniai, tokie kaip CNT, pasižymi labai dideliu paviršiaus plotu, tad ir tinkamai adsorbavusio fermento kiekis bus didesnis nei netinkamai ir tai sąlygos didesnę stebimą biokatalitinę srovę.



1.4 pav. Fermento adsorbcija ant CNT ir vykdoma TEP[4].

Kaip ant įvairių paviršių adsorbuojasi gliukozės dehidrogenazė šiuo metu nėra žinoma, tačiau manoma, kad efektyviai TEP gliukozės dehidrogenazė taip pat turi adsorbuotis taip, kad jos struktūriniai elementai, lemiantys elektronų pernašą (hemai, aktyvūs centrai ir pan.), turi būti kuo arčiau elektrodo paviršiaus.

Lakazės katalizuojama reakcija ant elektrodo paviršiaus gali būti aprašoma:

$$O_2 + 4\ H^+ + 4e \rightarrow 2\ H_2O \qquad (3)$$

[4] Parengta pagal Cosnier et al., 2014

Gliukozės dehidrogenazės katalizuojama reakcija gali būti aprašoma:

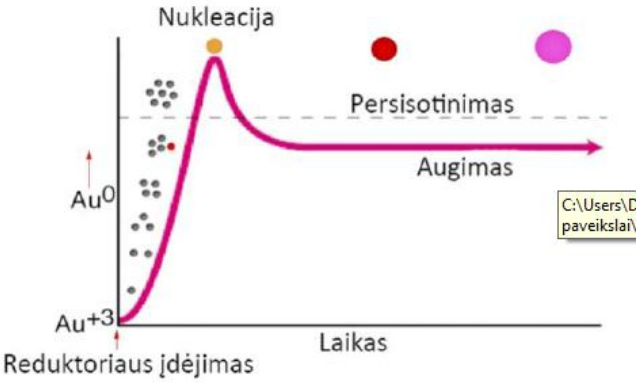
D-gliukozė → D-gliukono-δ-laktonas + 2 H^+ + 2 e (4)

Čia elektronų šaltinis (donoras) yra elektrodas. Taigi, kaip matome iš lygčių (3–4) stebima fermentinė reakcija tampa monosubstratine, nes antras tariamas substratas yra elektrodas.

1.4. Aukso nanodalelės

Aukso nanodalelės (AuND) dėl paprastos sintezės, aukšto inertiškumo ir pakankamai geros dydžio sintezės kontrolės yra vieni iš labiausiai studijuojamų metalo nanodarinių (Gao, Nie, 2004). Nors aiškaus modelio kaip baltymai adsorbuojasi ant AuND nėra sukurta, tačiau manoma, kad tam įtakos turi daugelis žinomų sąveikų: hidrofobinė, elektrostatinė ir kt. (Gao, Nie, 2004). Taip pat AuND pasižymi unikalia savybe sudaryti disulfidinius tiltelius (su cisteino šoninės grupės liekanomis). Baltymas ant AuND gali adsorbuotis ir vykstant dalinei ar visiškai (paprastai nepageidautina) denatūracijai – atsiranda hidrofobinė sąveika tarp hidrofobinės baltymo dalies (natyviai nesančios baltymo išorėje) ir AuND (Gao, Nie, 2004).

Egzistuoja keletas AuND sintezės metodų, kurie remiasi Au(III) redukcija iki Au(0). Patys naudingiausi AuND sintezės metodai yra turintys gerą atsikartojamumą, kuo tikslesnę sintetinamų AuND dydžio kontrolę ir lemiantys kuo taisyklingesnę AuND formą. Vienas ir labiausiai naudojamų AuND sintezės metodų yra aukso druskos redukcija citratu, kuris yra ne tik reduktorius, bet ir stabilizuojantis junginys užtikrinantis, kad AuND neagreguotų (McFarland et al., 2004).



1.5 pav. AuND sintezės reakcijos mechanizmas schema naudojant citratą[5].

Toks AuND sintezės metodas yra praktiškas tuo, kad AuND dydis yra funkcija nuo reduktoriaus koncentracijos, kuomet visi kiti parametrai yra pastovūs. Didesnė reduktoriaus koncentracija sąlygoja mažesnes AuND (McFarland et al., 2004). Paaiškinimui pasiūlytas reakcijos mechanizmas (žr. 1.5 pav.). Iš pradžių visas auksas yra Au(III) formoje. Reduktoriaus pridėjimas skatina Au(III) redukciją iki Au(0), kol tirpalas persisotina ir susidaro nukleacijos centrai, aplink kuriuos toliau limpa naujai susidarę Au(0) atomai. Didesnė reduktoriaus koncentracija lemia didesnį kiekį susiformavusių nukleacijos centrų – vadinasi bus susintetintos mažesnio dydžio AuND.

1.6. Anglies nanovamzdeliai

Anglies nanovamzdeliai (CNT) dėl labai gero laidumo elektros srovei, „draugiškumo“ biologiniams junginiams (angl. *biocompability*) ir nanolaidinių struktūrų (angl. *nanowires*) formavimo yra patraukli medžiaga fermentų imobilizavimui (Dai, 2002). Dėl specifinės geometrijos CNT pasižymi itin dideliu savituoju paviršiaus plotu – daugiau nei 1000 m^2 g^{-1} (Dai, 2002). Egzistuoja dviejų tipų CNT: vienasieniai (angl. *single-walled carbon nanotubes*) ir daugiasieniai (angl. *multi-walled carbon nanotubes*) (Dai, 2002). Daugiasieniai CNT nuo vienasienių skiriasi struktūra: daugiasieniai CNT sudaryti iš kelių atskirų nanovamzdelių, kurie yra vienas kito viduje. Paprastai vienasieniai CNT pasižymi didesniu paviršiaus ploto ir masės santykiu. CNT labai sunkiai tirpsta vandenyje, todėl dažnai įvedamos modifikacijos padidinančios CNT tirpumą. Viena iš dažniausiai naudojamų CNT modifikacijų yra

[5] Parengta pagal McFarland et al., 2004

karboksilinimas (Ajayan, Zhou, 2001). Tai modifikacija, kurios metu CNT yra aktyvinamos karboksi grupėmis. Tokios CNT pakankamai tirpsta vandenyje (apie 2 mg ml^{-1}).

Dėl didelio paviršiaus ploto ir gero laidumo CNT yra puiki matrica fermentų imobilizavimui bioelektrokatalitinėms sistemoms. Parodyta, kad ypač didelis anglies nanovamzdelių paviršiaus plotas užtikrina didelę paviršinę fermento koncentraciją (Minteer, 2010). Dėl šios priežasties, esant mažoms substrato koncentracijoms, biokatalitinę srovę ribojantis faktorius pakankamai dažnai būna ne fermento katalitinis pajėgumas, bet substrato difuzija į paviršių. Dėl to, CNT taip pat patrauklūs biojutiklių kūrime. Šiame darbe buvo naudoti vienasieniai CNT, kurie buvo aktyvuoti karboksi grupėmis.

1.5. Fermentų imobilizavimas, siekiant užtikrinti fermentų veikimą TEP

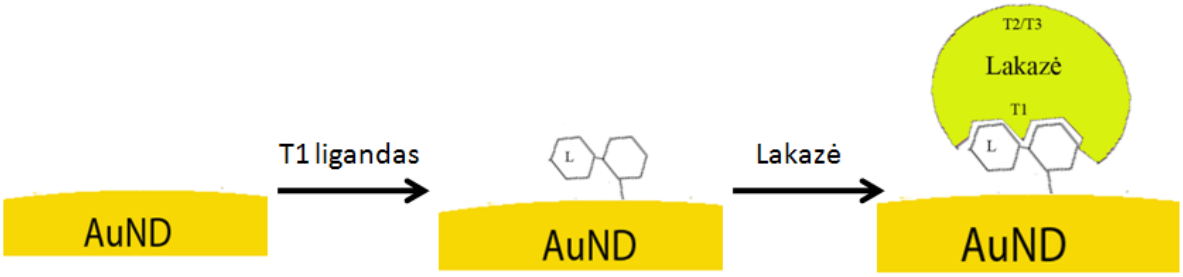
Fermentų imobilizavimas – labai plati sritis, kuri yra ne tik mokslo nagrinėjimo objektas, bet net ir meno (Cao, 2005). Norint fermentą tinkamai imobilizuoti egzistuoja labai daug faktorių, į kuriuos reikia atsižvelgti: fermento cheminė aplinka, funkcinės išorinės grupės ir jų skaičius, fermento izoelektrinis taškas, baltymo dydis, subvienetų skaičius, poliškumas ir kt. (Hanefeld et al., 2009). Siekiant fermentą imobilizuoti taip, kad jis veiktų TEP principu atsiranda dar vienas svarbus reikalavimas – fermento redokso centras ir elektrodas turi būti pakankamai arti, kad galėtų vykti TEP, o pats fermentas turi būti imobilizuotas taip, kad jo stabilumas būtų kuo didesnis. Kadangi fermento imobilizavimui įtaką daro labai daug faktorių, sunku numatyti, kaip fermentas imobilizuosis. Dėl to fermentai imobilizuojami išbandant daug metodikų tikintis, kad bus rastos tokios, kurios imobilizuos efektyviausiai. Fermentų imobilizavimo metodai skiriami į tris grupes: elektrostatinė adsorbcija, kovalentinis surišimas (angl. *cross-linking*) ir įterpimas (angl. *encapsulation*) (Minteer, 2010).

Elektrostatinė adsorbcija tai fermentų imobilizavimo metodų grupė, kuomet baltymas yra imobilizuojamas dėl susidarančių silpnų tarpmolekulinių (elektrostatinių) sąveikų. Patys svarbiausi faktoriai lemiantys sėkmingą fermento adsorbciją yra baltymo krūvis ir poliškumas bei paviršiaus (ant kurio baltymas imobilizuojamas) krūvis bei poliškumas. Paprastai fermentų adsorbcija pagrįstų metodų pagrindinis trūkumas – pakankamai greita fermentų desorbcija nuo paviršiaus (Minteer, 2010). Visgi šis imobilizavimo metodas yra vienas iš paprasčiausių. Ant paruošto CNT, AuND (ar kita

nanostruktūra) modifikuoto elektrodo dedamas tam tikras kiekis fermento, nenaudojant jokių rišiklių. Kai kurie fermentai, imobilizuoti tokiu būdu ant AuND ir CNT modifikuotų elektrodų, generuoja aukštą srovės tankį.

Kovalentinis surišimas – fermentų imobilizavimo būdas, kai baltymas kovalentiškai pririšamas prie norimo paviršiaus arba surišamas vienas su kitu naudojant specialiais junginiais dengtus paviršius, rišiklius arba funkcines grupes aktyvuojančias medžiagas. Paprastai kovalentinis fermento imobilizavimas sumažina fermentinį aktyvumą, tačiau padidina stabilumą (Minteer, 2010). Kovalentiniam fermentų imobilizavimui ant AuND paviršiaus, AuND yra paveikiamos junginiu, kuris gali sudaryti kovalentinį ryšį su auksu pvz.: 4-aminotiofenoliu, α-lipoine rūgštimi, 4-merkaptobenzoine rūgštimi ir pan. (Betancor et al., 2013). Tuomet AuND su kovalentiškai prijungtu junginiu paveikiamos fermento ir rišiklio mišiniu. Kaip rišiklis dažniausiai naudojamas gliutaraldehidas dėl savo savybės vandenyje spontaniškai reaguoti su pirminėmis amino grupėmis. Susidaro imidinis ryšys tarp fermento ir AuND paviršiaus (Minteer, 2010). Ant CNT modifikuotų elektrodų reikalinga CNT modifikacija (pvz., karboksilinimas). Tuomet fermentas kovalentiškai imobilizuojamas naudojant karboksi grupę aktyvinančios junginius (pvz., EDC) ir rišiklius.

Tiesioginiai elektronų pernašai pasiekti, ypač svarbus tinkamas fermento orientavimas ant elektrodo paviršiaus (lakazėms – T1 centras turi būti orientuotas į elektrodo paviršių). Lakazėms efektyviai imobilizuoti, pasiūlyta modifikuojamą paviršių padengti T1 centro ligandais. Dėl to fermentas turėtų adsorbuotis T1 centru orientuotu į paviršių ir TEP galėtų vykti efektyviai (žr. 1.6 pav.). Nustatyta, kad T1 centro ligandai yra junginiai turintys karboksi grupę (pvz., 4-MBR) (Martinez-Ortiz et al., 2011). Parodyta, kad naudojant šiuos junginius lakazės gali būti imobilizuojamos pakankamai efektyviai: generuojami srovių tankiai siekia iki 0,5 mA cm^{-2} (Betancor et al., 2013).



1.6 pav. Fermento orientuotas kovalentinis imobilizavimas[6]. Paviršius padengiamas T1 centro ligandu.

Įterpimas – fermentų imobilizavimo būdas, kuomet fermentas yra įterpiamas į polimerinį junginį. Naudojant įterpimo metodus vykdoma monomero arba mažos masės polimero polimerizacija aplink fermento molekulę (Minteer, 2010). Šios grupės metodai pasižymi tuo, kad sistema polimero sluoksnyje gali būti stabilizuojama, pvz., polietilenimino (PEI) sluoksnyje imobilizavus lakazę iš *Aspergillus oryzae* po 90 dienų buvo stebimas vos 20% aktyvumo sumažėjimas (Brondani et al., 2013). Pagrindinis imobilizavimo polimeriniame junginyje trūkumas yra sulėtinta substratų ir produktų difuzija link ir nuo fermento molekulės dėl aplinkui esančio polimero (Minteer, 2010). Todėl stebimas sistemos stabilumas yra greičiausiai susijęs su biokatalitiniais procesais, kurių greitį riboja difuzija, o ne pačio fermento stabilumu. Fermentinės katalizės greitis yra daug didesnis nei substrato srauto greitis. Net ir fermento aktyvumui krentant, pačios sistemos atsakas išlieka nepakitęs. Dėl šios priežasties fermentais modifikuoti elektrodai, naudojant įterpimą į polimerinį junginį, TEP principu generuoja gerokai mažesnius srovių tankius, nei kad imobilizuojant kovalentiškai ar elektrostatiškai, tačiau dėl stebimo stabilumo yra patrauklūs biojutikliams kurti. Parodyta, kad lakazė iš *Trametes versicolar* įterpta į poli(3-metiltiofeno) polimerinį sluoksnį veikia TEP principu ir generuoja srovių tankius iki 0,15 mA cm^{-2} – gerokai mažiau nei kad srovės pasiekiamos kitais metodais, tačiau pati sistema yra gerokai stabilesnė (Kuwahara et al., 2013).

[6] Parengta pagal Martinez-Ortiz et al., 2011

1.6. Šiuolaikiniai TEP principu pagrįsti bioanodai ir biokatodai

Keliami du svarbiausi kriterijai bioanodams ir biokatodams, skirtiems bioelektrokatalitinėms sistemoms kurti, kuriais remiantis įvertintinamas jų efektyvumas: generuojamos srovės tankis ir veikimo potencialas (Aurélien et al., 2011).

Biokatodai – elektrodai, kurie dengiami fermentu, katalizuojančiu tirpale esančių junginių redukciją, elektronus imant iš elektrodo. Šiuo metu didžiausias dėmesys kuriant biokatodus yra skiriamas fermentams, kurie katalizuoja deguonies redukciją iki vandens – lakazėms (Meredith, Minteer, 2012). Efektyviems biokatodams keliami du pagrindiniai reikalavimai: generuojamų srovių tankiai turi būti kuo didesni, veikimo potencialai turi būti kuo aukštesni (Aurélien et al., 2011). Pirmasis biokatodas, veikiantis TEP principu ant AuND modifikuoto elektrodo, pademonstruotas 2010 naudojant lakazę iš *Thrametes hirsuta* ir generavo apie 0,01 mA cm^{-2} srovės tankį bei pasižymėjo ~0,78 V *vs.* SHE pusbangio potencialu (Dagys et al., 2010). Nuo tada lakazėmis ir AuND modifikuoti biokatodai sparčiai tobulėjo: šiuo metu pažangūs biokatodai su ant AuND imobilizuotomis lakazėmis generuoja aukštas biokatalitines sroves. Vienas iš pažangiausių biokatodų sukurtas su lakaze iš *Thrametes hirsuta* generuoja iki 1,5 mA cm^{-2} srovės tankį O_2 prisotintame tirpale, tačiau jo pusbangio potencialas yra pakankamai žemas ~ 0,7 V *vs.* SVE (Gutiérrez-Sánchez et al., 2012). Biokatodai taip pat plačiai kuriami lakazes imobilizuojant ant anglies nanovamzdelių. Parodyta, kad biokatodas su lakaze iš *Trametes versicolor* ant modifikuotų CNT generavo aukštas biokatalitines sroves iki 1,85 mA cm^{-2} (Lalaoui et al., 2013). Taip pat pademonstruotas biokatodas su lakaze ant supresuotų CNT (Zebda et al., 2011). Buvo gauta biokatalitinė srovė, kurios dydis siekė apie 5,0 mA cm^{-2}. Taigi naudojant CNT gaunami net 5,0 mA cm^{-2} siekiantys srovės tankiai, tačiau tai neparodo, kad TEP vyksta efetyviai: nustatyta, kad elektrodo paviršiaus plotas yra labai smarkiai padidinamas ir adsorbuojasi labai daug fermento. Realus srovės tankis biokatodams, kurie kurti naudojant anglies nanodarinius siekia apie 2 μA cm^{-2}, jeigu srovė yra normuojama ne į formalų paviršiaus plotą, bet realų (Meredith ir Minteer, 2012).

Bioanodai – elektrodai, kurie dengiami fermentu, katalizuojančiu tirpale esančių junginių oksidaciją, elektronus duodant elektrodui. Bioanodams kurti naudojami įvairūs fermentai, tačiau šiuo metu daugiausiai dirbama su gliukozės oksidaze, PQQ gliukozės dehidrogenaze, fruktozės dehidrogenaze, ir celobiozės dehidrogenaze (Meredith, Minteer,

2012). Bioanodams keliami du pagrindiniai reikalavimai: generuojamų srovių tankiai turi būti kuo didesni, o veikimo potencialai turi būti kuo žemesni (Aurélien et al., 2011). Šiuo metu didelis dėmesys skiriamas PQQ gliukozės dehidrogenazei, kaip vienam iš perspektyviausių anodinių fermentų, dėl nejautrumo deguoniui ir aukšto aktyvumo (Flexer et al., 2011). Efektyviai TEP principu veikiančių bioanodų su PQQ gliukozės dehidrogenaze ir AuND šiuo metu nėra sukurta daug. Sukurti efektyviai TEP principu veikiantys bioanodai su PQQ gliukozės dehidrogenaze naudojant anglies nanovamzdelius. Jie generuoja iki 1 mA cm^{-2} srovių tankius (Meredith, Minteer, 2012). Šiuo metu vienas efektyviausių bioanodų su PQQ gliukozės dehidrogenaze ant anglies nanodarinių generuoja 0,93 mA cm^{-2} srovės tankį, esant 150 mM gliukozės, ir pasižymi apie 0,2 V *vs.* SVE pusbangio potencialu (Flexer et al., 2011).

2. METODAI IR MEDŽIAGOS

2.1. Įranga

Magistro darbe buvo naudojama įranga:

- GAMRY Reference 600^{TM} ir Series 750 potentiostatai iš GAMRY (JAV);
- Thermo evolution 300 spektrofotometras;
- RDE-2 sukamojo disko sistema iš BASi (JAV).

Taip pat naudota kita standartinė laboratorinė įranga: 10, 100, 200, 1000 ir 5000 μL reguliuojamojo tūrio pipetės (eppendorf ir Transferpette®), analitinės svarstyklės, kaitinimo plytelė, pH matuoklis, ultragarso vonelė, termostatas, centrifuga, įvairūs laboratoriniai indai, aukso, platinos elektrodai, palyginamasis kalomelio elektrodas ir kiti.

2.2 Reagentai

Naudoti reagentai buvo analitinio grynumo. Tyrimams naudotas dejonizuotas vanduo gautas naudojant Crystal E Ultrapure sistemą iš ADRONA SIA (18 MΩ·cm).

Reagentas	**Tiekėjas**
$HAuCl_4$ x $3H_2O$	Sigma-Aldrich
Citrinos rūgštis	Sigma-Aldrich
Azoto rūgštis	Merck
Natrio fluoridas	Sigma-Aldrich
Natrio chloridas	Roth
Dinatrio vandenilio fosfatas	Reachem
Natrio divandenilio fosfatas	Reachem
Natrio sulfatas	Reachem
Trinatrio citrato dihidratas	Sigma-Aldrich
Sieros rūgštis	Fluka
4-aminotiofenolis (4-ATF)	Sigma-Aldrich
4-merkaptobenzoinė rūgštis (4-MBR)	Sigma-Aldrich
Glutaraldehidas (GA)	Sigma-Aldrich
Etanolis (96%)	Vilniaus degtinė

Natrio šarmas	FasChem
Druskos rūgštis	Fluka
Metanolis	AppliChem
Argonas	Linde Gas
Deguonis	AGA
Gliukozė	Sigma
Anglies nanovamzdeliai (CNT)	Sigma
Laktozė	Sigma
Fruktozė	Sigma
Kalio heksacianoferatas (II)	Reachem

Buferiniai tirpalai buvo ruošti naudojant dejonizuotą vandenį. Pagrindinis darbe naudotas buferinis tirpalas buvo su 50 mM citrinos rūgšties ir 50 mM dinatrio vandenilio fosfatu, o jo pH buvo privestas prie reikiamo naudojant H_2SO_4 arba NaOH. Matavimams su gliukozės dehidrogenaze buvo naudoti 2,0 M gliukozės, 1,0 M laktozės ir 1,0 M fruktozės tirpalai, iš kurių buvo ruošiami praskiesti darbiniai tirpalai. Taip pat naudoti šie tirpalai: 250 mM NaF, 50 mM 4-aminotiofenolio, 50 mM 4-merkaptobenzoinės rūgšties, 0,5 M H_2SO_4, 50 mM KOH, 2% glutaraldehido, 250 mM $HAuCl_4$ x $3H_2O$, 1% citrato tirpalas ir kt.

2.3 Fermentai

Magistriniame darbe buvo dirbama naudojant 2 fermentus: 1 lakazę ir 1 gliukozės dehidrogenazę. Fermentai buvo gauti iš VU Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus. Naudoti fermentai yra naujai išskirti, nežinomos nei jų sekos, nei struktūros.

Tyrimams naudota lakazė iš *Trichaptum abietinum* (LAC), kuri buvo išgryninta iki homogeninio grynumo. Baltymas pasižymėjo specifiniu ~1100 U/mg aktyvumu. Baltymo koncentracija buvo išmatuota Lowry metodu, naudojant BSA kaip standartą, ir nustatyta ~ 19 mg/ml. Nustatyta, kad lakazė yra monomerinis baltymas, kurio molinė masė - 57 kDa, o fermento pI – 4,6. Homogeniškai išgrynintas koncentruotas baltymas laikomas 10 mM fosfatiniame buf. tirpale, kurio pH 7,0 esant -18°C. Praskiesti fermentų tirpalai buvo laikomi 4°C.

Gliukozės dehidrogenazė iš *Ewingiella americana* (GDH) buvo išgryninta iki homogeninio grynumo. Nustatyta, kad baltymas sudarytas iš 3 subvienetų, kurių molinės masės 90, 57 ir 17 kDa. Baltymo koncentracija pagrindiniame tirpale buvo 13 mg/ml. Fermentas buvo laikomas 10 mM 7,4 pH TRIS buferiniame tirpale, -18ºC. Praskiesti fermento tirpalai laikomi 4ºC.

2.4 Lakazės, gliukozės dehidrogenazės ir lakazės/gliukozės dehidrogenazės sistemos elektrodų ruošimo procedūra

Buvo ruošiami kelių tipų elektrodai: LAC, GDH ir LAC/GDH sistemos elektrodas bei šios sistemos deguoninis elektrodas.

LAC ir GDH elektrodai buvo ruošti pagal tą pačią procedūrą. LAC (GDH) buvo imobilizuota ant AuND modifikuoto aukso elektrodo. Paviršius buvo kruopščiai nuvalytas (mechaniškai ir elektrochemiškai) ir buvo uždėta 5 µL AuND tirpalo. Palaukus kol gerai išdžius, buvo atliktas elektrocheminis valymas ir kruopščiai nuplauta. Tuomet ant elektrodo paviršiaus buvo uždėta 5 µL LAC (GDH) tirpalo ir laikyta 2 val. po gaubtu (neleidžiant išdžiūti). Po to buvo atlikti elektrocheminiai matavimai. Jei LAC (GDH) buvo imobilizuota ant elektrodo modifikuoto monosluoksnį formuojančiais junginiais, AuND modifikuoto aukso elektrodo paviršius buvo kruopščiai nuvalytas (mechaniškai ir elektrochemiškai) ir buvo uždėta 5 µL AuND tirpalo. Palaukus kol gerai išdžius, buvo atliktas elektrocheminis valymas ir kruopščiai nuplauta. Tuomet elektrodas buvo įmerktas į 0,5 mM 4-ATF ir 0,5 mM 4-MBR tirpalą metanolyje (iš kurio naudojant argoną pašalintas deguonis) ir buvo laikoma 24 val. Po to elektrodas kruopščiai nuplautas ir ant jo paviršiaus uždėta 5 µL tirpalo, kuri sudarė 2,5 µL LAC (GDH) tirpalo ir 2,5 µL 2% GA tirpalo, ir laikytas 2 val. po gaubtu. Po to buvo atlikti elektrocheminiai matavimai.

LAC (GDH) buvo imobilizuota ant grafito elektrodo modifikuoto CNT. Buvo paruošti CNT tirpalai vandenyje ir DMF, kurių koncentracijos buvo ~2 mg/ml. CNT tirpinti naudojant ultragarsą. Tuomet grafito elektrodo paviršius buvo atnaujintas naudojant švitrinį popierių ir kruopščiai nuplautas. Po to uždėta 10 µL CNT tirpalo (arba vandenyje arba DMF) ir leista gerai išdžiūti. Po to uždėta 5 µL LAC (GDH), leista išdžiūti ir tuomet buvo atlikti matavimai.

LAC/GDH sistemos elektrodas buvo paruoštas naudojant grafito elektrodą. Grafito elektrodo paviršius buvo atnaujintas naudojant švitrinį popierių ir kruopščiai nuplautas. Po to

uždėtas mišinys, kurį sudarė 10 µL CNT tirpalo (vandenyje), 5 µL GDH ir µL LAC. Tuomet buvo leista išdžiūti ir atlikti elektrocheminiai matavimai.

LAC/GDH sistemos deguoninis elektrodas buvo ruoštas Klarko elektrodo pagrindu. Klarko elektrodas padengtas polietileno plėvele buvo kruopščiai nuplautas. Po to ant jo paviršiaus uždėtas mišinys, kurį sudarė 10 µL CNT tirpalo (vandenyje), 5 µL GDH ir µL LAC. Tuomet elektrodams buvo leista išdžiūti ir atlikti deguonies koncentracijos matavimai.

2.5 Elektrodų analizės metodai

2.5.1 Ciklinė volamperometrija

Ciklinė voltamperometrija (CV) – pagrindinis magistro darbo metu naudotas metodas. Tai elektrocheminis analizės metodas, pagrįstas tekančios per celę srovės stiprio matavimu priklausomai nuo keičiamo potencialo laike: t.y. darbinio elektrodo potencialas yra keičiamas laike (į teigiamą arba neigiamą puses) ir matuojama kokia srovė teka per celę. Naudojant CV visada atliekami du skleidimai – į teigiamas (arba neigiamas) potencialo reikšmes ir atgal į neigiamas (arba teigiamas). Skleidimas į teigiamas potencialo reikšmes sąlygoja tiriamų junginių oksidaciją, todėl vadinamas anodiniu skleidimu, o skleidimas į neigiamas – junginių redukciją ir vadinamas katodiniu skleidimu. Tuomet grafiškai yra vaizduojama srovės stiprio priklausomybė nuo veikiančio potencialo. Metodas yra naudingas tiriant įvairius redokso procesus, junginių koncentracijoms nustatyti, tirti elektronų perdavimo kinetiką, įvertinti difuzijos koeficiento reikšmę. Magistro darbo metu ciklinė voltamperometrija buvo naudota tirti fermentų elektrocheminį aktyvumą ant elektrodo paviršiaus: t.y. atliekant skleidimus stebima ar atsiranda srovė, kuri yra tiesiogiai priklausoma nuo fermento katalizuojamos reakcijos ant elektrodo paviršiaus. Jeigu ant elektrodo esantis fermentas yra elektrochemiškai aktyvus, t.y. prie tam tikro darbinio elektrodo potencialo katalizuoja substrato oksidaciją ir elektronus perduoda elektrodui, CV skleidimo metu bus registruojama srovė, atsirandanti dėl fermentinės katalizės. Iš CV srovės stiprio dydžio, formos, taip pat potencialo reikšmių, prie kurių prasideda katalizė, galima vertinti sukurtą sistemą.

Matavimai buvo atlikti 20 mL tūrio celėje kuomet aukso arba grafito elektrodas buvo naudojamas kaip darbinis, platinos kaip pagalbinis, o kalomelio (0,2444 V *vs.* SVE) kaip palyginamasis.

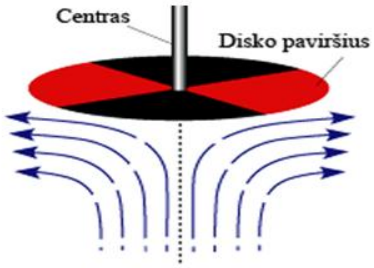
2.5.2 Chronoamperometrija

Chronoamperometrija (CA) – tai elektrocheminės analizės metodas, kurį naudojant yra laikomas pastovus potencialas ir matuojamas srovės kitimas laike. Šis metodas magistro darbe buvo naudojamas stacionariai srovei matuoti.

Matavimai buvo atlikti 20 mL tūrio celėje kuomet aukso arba grafito elektrodas buvo naudojamas kaip darbinis, platinos kaip pagalbinis, o kalomelio (0,2444 V *vs.* SVE) kaip palyginamasis.

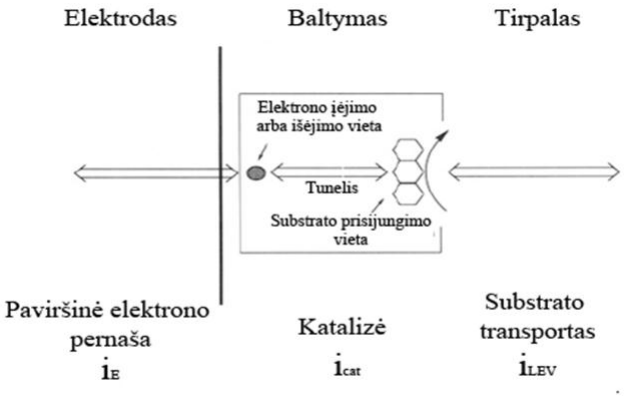
2.5.3 Sukamojo disko elektrodo voltamperometrija

Sukamojo disko elektrodas (SDE) – tai hidrodinaminis darbinis elektrodas, kuris yra naudojamas trijų arba dviejų elektrodų sistemoje.



2.1 pav. Paviršinio sluoksnio nuolatinis atsinaujinimas.

Šis elektrodas yra naudojamas tuomet, kai elektrocheminė reakcija ant paviršiaus vyksta labai sparčiai ir tiriamųjų junginių difuzija pradeda riboti elektrocheminės reakcijos greitį.



2.2 pav. Fermentinis procesas ant elektrodo paviršiaus.[7]

[7] Parengta pagal Sucheta et al., 1993

Prie stacionaraus ir plokščio paviršiaus tirpale egzistuoja difuzinis sluoksnis, kuriame nevyksta turbulentinis judėjimas būdingas tirpalui ir šio sluoksnio storis nemaišomame tirpale siekia apie 0,3 mm. Diskui besisukant, dėl išcentrinės jėgos paviršinis difuzinio sluoksnis yra nustumiamas nuo elektrodo paviršiaus (žr. 2.1 pav.). Skysčio kiekis prie elektrodo paviršiaus, lyginant su darbiniu tirpalu, sumažėja (o taip pat ir slėgis) ir skystis iš apačios veržiasi link elektrodo paviršiaus. Susiformuoja naujas paviršinis sluoksnis, kuris dėl SDE sukimosi vėl yra nustumiamas. Tokiu būdu paviršinis tirpalo sluoksnis prie SDE paviršiaus labai sparčiai atsinaujina ir difuzinio sluoksnio storis sumažinamas net iki 30 kartų (nuo 0,3 mm iki ~0,01 mm) (Kamin, Wilson, 1980). Tirpalo srauto greitis į elektrodo paviršių iš apačios gali būti reguliuojamas keičiant SDE sukimosi greitį. Tokiu būdu elektrocheminiai procesai gali būti stebimi sumažinant difuzinį barjerą, ribojantį proceso greitį.

SDE voltamperometrija buvo naudota, nes ji padeda išvengti difuzinių procesų, darančių įtaką elektrocheminės reakcijos greičiui, kuomet substrato koncentracija yra labai maža. Tam paaiškinti pasiūlytas modelis (žr. 2.2 pav.): vykstantį elektrocheminį fermentinį procesą galima padalinti į tris atskirus etapus – paviršinę elektrono pernašą (tarp elektrodo paviršiaus ir fermento), katalizę ir substrato transportą į fermento aktyvųjį centrą (A. Sucheta et al., 1993). Stacionariomis sąlygomis visas procesas gali būti aprašomas lygtimi (A. Sucheta et al., 1993):

$$\frac{1}{i} = \frac{1}{i_{LEV}} + \frac{1}{i_E} + \frac{1}{i_{cat}} \qquad (5)$$

Lygtis parodo, kad bendras proceso greitis didžiąja dalimi priklauso nuo lėčiausios iš trijų stadijų: žinant, kad greitį ribojanti stadija yra daug kartų lėtesnė negu kiti du likę procesai, likusius du narius galime pašalinti iš lygties tardami, kad jų įtaka bendram proceso greičiui tokia maža, kad galima jos nevertinti. Pirmasis lygties narys i_{LEV} parodo, kad viena iš stadijų – substrato transportas link fermento aktyviojo centro. Naudojant SDE, šis procesas apibrėžiamas lygtimi (Koutecky ir Levich, 1958):

$$I_{LEV} = 0.62nFAD^{\frac{2}{3}}[C]\nu^{-\frac{1}{6}}\sqrt{\omega} \qquad (6)$$

Čia, n – perduotų elektronų skaičius, F – Faradėjaus konstanta, A – elektrodo plotas, D – difuzijos koeficientas, v – tirpalo klampumas, ω – SDE sukimosi greitis (rad s^{-1}). Lygtis (6)

parodo, kad substrato transporto greitis priklauso tik nuo SDE sukimosi greičio (kai kitos sąlygos nekinta) ir yra proporcingas jo kvadratiniai šakniai.

Antrasis narys i_E apibūdina elektrono perdavimą tarp elektrodo ir fermento. i_E yra nuo potencialo priklausomas parametras, kuris aprašomas lygtimi (A. Sucheta et al., 1993):

$$i_E = nFA\Gamma k_E \qquad (7)$$

Čia, n – perduotų elektronų skaičius, F – Faradėjaus konstanta, A– elektrodo plotas, Γ – adsorbuoto fermento kiekis ant elektrodo paviršiaus, o k_E - heterogeninė elektronų pernašos konstanta. Dažniausiai ši stadija yra katalizės greitį (ir tuo pačiu elektrocheminės srovės stiprį) limituojanti.

Trečiasis narys i_{cat} apibūdina paties fermento katalitines savybes. Kitus du parametrus mes galime optimizuoti (pvz., didinti SDE apsukų skaičių, bandyti efektyviau imobilizuoti fermentą), tačiau i_{cat} yra paties fermento charakteristika, kurią nulemia fermento struktūra. i_{cat} gali būti aprašomas elektrochemine Michaelis-Menten lygtimi (Xu et al., 2010):

$$i_{cat} = \frac{nFA\Gamma k_{cat}[S]}{K_M^{tar} + [S]} \qquad (8)$$

K_M^{tar} - fermento imobilizuoto ant elektrodo paviršiaus tariamoji Michaelio konstanta. $nFA\Gamma k_{cat}$ - tariamas maksimalus katalizės greitis. Abu šie parametrai nepriklauso nuo potencialo. Fermentas imobilizuotas efektyviai, jeigu elektrocheminės reakcijos greitį (ir tuo pačiu katalitinę srovę) riboja fermento katalitinės savybės i_{cat}, kurios yra apibūdinamos lygtimi (8). Esant efektyviam imobilizavimui elektrocheminės reakcijos greitis (biokatalitinė srovė) tampa beveik nebepriklausoma nuo potencialo. Jeigu stebima, kad srovė yra funkcija nuo potencialo, tai greičiausiai rodo, kad elektrocheminės reakcijos greitį riboja elektrono perdavimas tarp fermento ir elektrodo (i_E).

Elektrocheminiai matavimai su LAC ir AuND modifikuotais aukso elektrodais buvo atlikti naudojant SDE, kadangi deguonies koncentracija buferiniame tirpale yra maža (0,253 mM) (Koppenol, Butler, 1985) SDE padėjo išvengti katalitinės srovės ribojimo atsirandančio dėl to, kad fermentui trūksta substrato. SDE nebuvo naudotas kuomet LAC buvo imobilizuota ant CNT. Šių elektrodų paviršius nebuvo pakankamai stabilus, kad būtų galima naudoti SDE.

2.5.4 Deguoninio Klarko elektrodo votlamperometrija

Deguoninis Klarko elektrodas – tai elektrodas sudarytas iš platinos katodo ir sidabro vielos, dengtos AgCl, anodo. Taip pat elektrodo viduje esančio elektrolito su buferiniu tirpalu ir polietileno plėvelės, kuria uždengiamas platinos paviršius. Šis elektrodas yra skirtas matuoti deguonies koncentraciją tirpale (Clark et al., 1953). Platinos paviršiaus, esant -0,4 V *vs.* SCE potencialui, katalizuoja reakciją:

$$O_2 + 4\,e + 2\,H_2O \rightarrow 4\,OH^- \qquad (9)$$

Kadangi deguonis lengvai gali difunduoti per polietileno plėvelę, kuria yra dengiamas platinos katodas, elektrodo generuojama yra tiesiogiai proporcinga deguonies koncentracijai tirpale. Klarko elektrodas šiame darbe buvo naudotas siekiant įvertinti LAC/GDH sistemos deguonies suvartojimą. Laikyta, kad stabili šio elektrodo srovė maišomame tirpale, yra tiesiogiai proporcinga deguonies koncentracijai t.y. 0,253 mM (Koppenol ir Butler, 1985).

2.6 Difuzinio sluoksnio storis prie paviršiaus

Nurodoma, kad nemaišomame tirpale difuzinio sluoksnio storis siekia apie 0,3 mm (Baronas et al., 2004; Kamin, Wilson, 1980). Maišant tirpalą, kuomet buvo naudotas SDE, galima įvertinti koks yra difuzinio sluoksnio storio sumažėjimas priklausomai nuo SDE sukimosi greičio. Kuomet tirpalas buvo maišomas magnetine maišykle difuzinio sluoksnio sumažėjimą teoriškai įvertinti yra sudėtinga, todėl jis buvo matuotas naudojant 2,5 mM $K_4Fe(CN)_6$ tirpalą. Buvo atliekamas maišymas tokiomis pat sąlygomis kaip deguonies suvartojimo matavimų metu. Difuzinio sluoksnio storis įvertintas pagal formulę (Kulys, Baronas, 2006):

$$\delta = \frac{nFD\theta C}{i} \qquad (10)$$

Čia δ – difuzinio sluoksnio storis (cm), n – reakcijoje dalyvaujančių elektronų skaičius, F – Faradėjaus konstanta, D – difuzijos koeficientas ($cm^2\ s^{-1}$), θ – elektrodo plotas (cm^2), C – junginio koncentracija ($mol\ cm^{-3}$), i – stebima srovė (A).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Matricos parinkimas lakazės ir gliukozės dehidrogenazės biokatalitinei sistemai

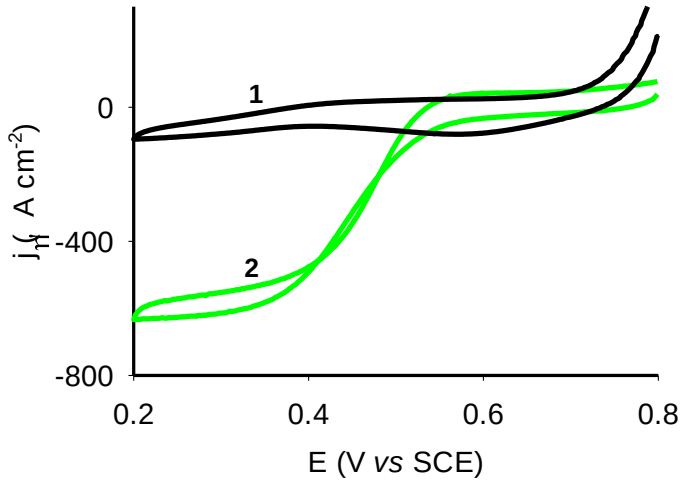
Norint sukurti LAC/GDH biokatalitinę sistemą pirmiausiausia buvo įvertinti abiejų fermentų elektrocheminiai aktyvumai ant aukso elektrodų, modifikuotų AuND, ir anglies elektrodų, modifikuotų CNT. Matricai parinkti iškelti šie kriterijai:

- pH suderinamumas. Įprastai lakazių pH optimumas siekia apie 4 (arba mažiau), kai gliukozės dehidrogenazių apie 7. Reikėjo parinkti tokią matricą, kad esant tokiam pačiam pH, tiek LAC tiek GDH vykdytų katalizę kuo aukštesniais aktyvumais;
- Generuojamų biokatalitinių srovių dydis. Pageidautina, kad matrica būtų tokia, ant kurios abu fermentai generuotų kuo aukštesnes biokatalitines sroves.

3.1.1 Lakazės elektrocheminis aktyvumas ant aukso nanodalelėmis dengtų aukso elektrodų

Buvo sukurti biokatodai AuND dengtų aukso elektrodų ir LAC pagrindu bei įvertintas jų elektrocheminis aktyvumas. LAC buvo imobilizuota trejomis pagrindinėmis metodikomis ant AuND modifikuoto elektrodo: elektrostatinė adsorbcija, kovalentiniu surišimu ir naudojant fiksuotą potencialą. Visi matavimai pateikiami šiame skyriuje buvo atlikti naudojant sukamojo disko elektrodą (1000 rpm) ir potencialą skleidžiant 5 mV s^{-1} greičiu.

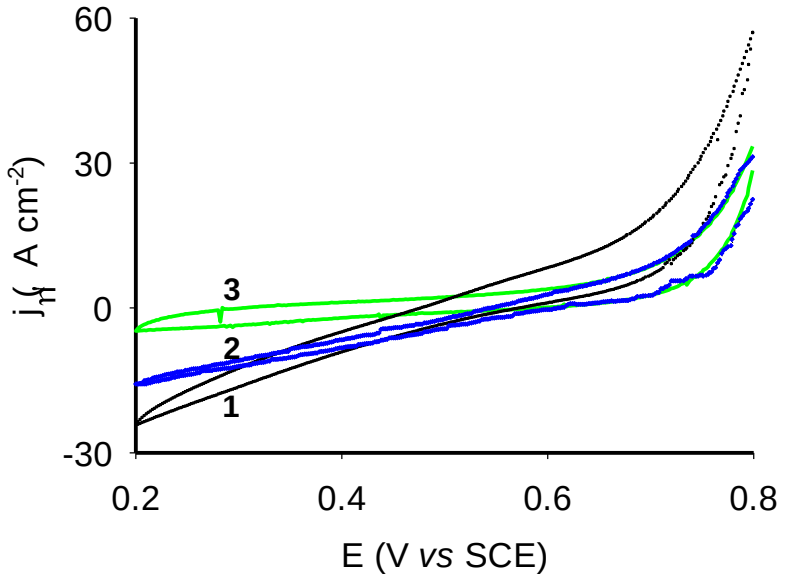
LAC ant AuND modifikuoto aukso elektrodo imobilizavus elektrostatiškai ir atlikus elektrocheminius matavimus (žr. 3.1 pav.), buvo nustatyta, kad buferiniame tirpale pH



3.1 pav. CV aukso elektrodo modifikuoto AuND ir dengto LAC nesant NaF (1) ir esant 6,3 mM NaF (2).

4,0 be mediatorinių junginių skleidžiant potencialą nuo 0,8 V iki 0,2 V *vs.* SCE katodinė srovė pradėjo didėti potencialui esant žemesniam nei 0,55 V *vs.* SCE. Potencialo reikšmei buvus žemesnei nei 0,4 V *vs.* SCE srovė tapo stabili ir beveik nekito. Nustatytas šio biokatodo pusbangio potencialas siekė 0,46 V *vs.* SCE. Vidutinė biokatalitinės srovės reikšmė 650 µA cm^{-2}. Atlikus matavimą su 6,3 mM NaF buvo stebimas biokatalitinės srovės sumažėjimas (maksimali srovė buvo apie 90 µA cm^{-2}). Biokatalitinė srovė buvo atsiradusi dėl LAC katalizuotos deguonies redukcijos iki vandens, esant žemesniam nei 0,55 V *vs.* SCE potencialui. Kadangi buferiniame tirpale nebuvo mediatorinių junginių, LAC katalizavo deguonies redukciją TEP principu, pernešdama elektronus tiesiogiai iš elektrodo. Tai, kad įdėjus NaF buvo stebimas biokatalitinės srovės sumažėjimas, indikavo, kad stebėtas procesas buvo fermentinis. Parodyta, kad NaF yra lakazės slopiklis (Johannes, Majcherczyk, 2000).

LAC ant monosluoksnį formuojančių junginių ir AuND modifikuoto elektrodo taip pat generavo biokatalines sroves (žr. 3.2 pav.). Buvo nustatyta, kad LAC imobilizuota ant AuND elektrodo, kuris modifikuotas monosluoksniu formuojančiu junginiu 4-ATF buferiniame tirpale pH 4,0 generavo katodinę srovę, kuri pradėjo didėti, kai potencialas buvo žemesnis nei 0,55 V *vs.* SCE. Biokatalitinė srovė pasiekė didžiausią reikšmę potencialo skleidimo pabaigoje (esant 0,2 V *vs.* SCE) ir buvo apie 16 µA cm^{-2}. LAC imobilizuota ant AuND elektrodo, kuris modifikuotas 4-ATF ir 4-MBR generavo katodinę srovę, kuri pradėjo didėti potencialui esant mažesniam nei 0,55 V *vs.* SCE. Maksimali generuojama biokatalitinė

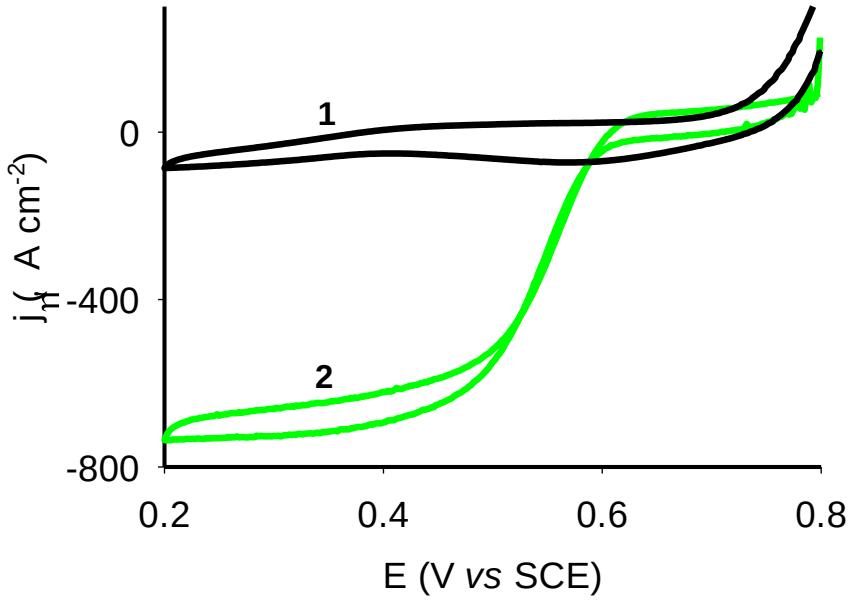


3.2 pav. CV aukso elektrodo su AuND ir dengto LAC modifikavus 4-ATF (2), 4-ATF ir 4-MBR (1) , su 6,3 mM NaF (3).

srovė taip pat buvo pasiekta potencialo skleidimo pabaigoje ir siekė apie 25 µA cm^{-2}. Įdėjus 6,3 mM NaF buvo stebimas katodinės srovės sumažėjimas iki vidutinės reikšmės apie 3 µA cm^{-2} potencialo intervale nuo 0,2 iki 0,55 V *vs.* SCE. Pusbangio potencialiai šiems biokatodams buvo nevertinami, kadangi biokatalitinė srovė buvo beveik tiesiogiai proporcinga veikiamam potencialiui. Kadangi mediatoriniai junginiai nebuvo naudoti, o NaF įdėjimas sumažino katodinę srovę, LAC katalizavo deguonies redukciją iki vandens TEP principu. Visgi, naudojant šią imobilizavimo metodiką buvo gauti žemo efektyvumo biokatodai, kurie generavo santykinai žemas biokatalitines sroves.

LAC taip pat buvo imobilizuota ant aukso elektrodo modifikuoto AuND, kuomet naudojamas fiksuotas potencialas: t.y. AuND elektrodas laikomas fermento tirpale, esant pastoviam potencialui. Buvo nustatyta, kad LAC imobilizavus fiksuotu 0,55 V *vs.* SCE potencialu ir atlikus potencialo skleidimą buvo generuojama katodinė srovė (žr. 3.3 pav.) buferiniame tirpale pH 4,0. Katodinė srovė pradėjo didėti potencialui esant žemesniam nei 0,6 V *vs.* SCE ir tapo beveik stabili potencialo intervale nuo 0,2 iki 0,4 V *vs.* SCE. Išmatuota vidutinė reikšmė siekė apie 720 µA cm^{-2}. Išmatuotas pusbangio potencialas buvo 0,54 V *vs.* SCE. Atlikus matavimą su 6,3 mM NaF nustatyta, kad katodinė srovė smarkiai sumažėjo iki apie 80 µA cm^{-2} potencialo intervale nuo 0,2 iki 0,6 V *vs.* SCE. Kadangi NaF nuslopino

katodinę srovę, o tirpale nebuvo mediatorinių junginių, vadinasi LAC vykdė biokatalizę TEP principu.



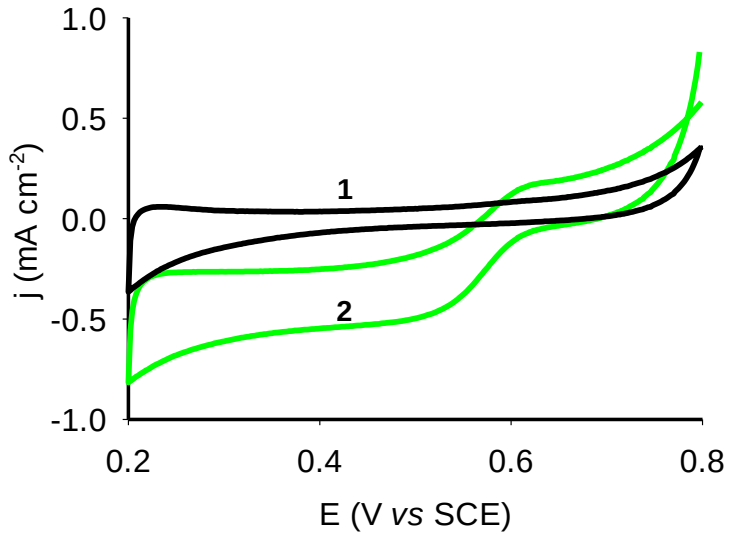
3.3 pav. CV aukso elektrodo modifikuoto AuND ir dengto LAC naudojant fiksuotą 0,55 V *vs.* SCE potencialią nesant NaF (1) ir esant 6,3 mM NaF (2).

Išbandžius tris LAC imobilizavimo metodus ant AuND modifikuoto aukso elektrodo nustatyta, kad kovalentinis surišimas ant monosluoksnius formuojančių junginių (4-ATF ir 4-MBR) nėra efektyvi metodika, nes generuojamos per mažos biokatalitinės srovės. Efektyviausias metodas buvo imobilizavimas naudojant fiksuotą potencialą, nes buvo generuojamos didžiausios biokatalitinės srovės bei naudojami praskiesti LAC tirpalai (dėl to toks biokatodas yra pigesnis).

3.1.2 Lakazės elektrocheminis aktyvumas ant anglies nanovamzdeliais dengtų grafito elektrodų

Buvo sukurti biokatodai CNT dengtų grafito elektrodų ir LAC pagrindu bei įvertintas jų elektrocheminis aktyvumas. LAC buvo imobilizuota fermentą adsorbuojant ant CNT,

kuriais buvo dengtas grafito elektrodas. Kadangi vandenyje CNT sunkiai tirpsta, siekiant padidinti jų koncentraciją tirpale CNT buvo tirpinami ne tik vandenyje, bet ir dimetilformamide. Visi matavimai pateikiami šiame skyriuje buvo atlikti skleidžiant potencialią 5 mV s^{-1} greičiu, naudojant buferinį tirpalą pH 4,0. Sukamoji disko elektrodas šiuo matavimuose nebuvo naudotas dėl CNT sąlyginai prasto sukibimo su elektrodo paviršiumi.

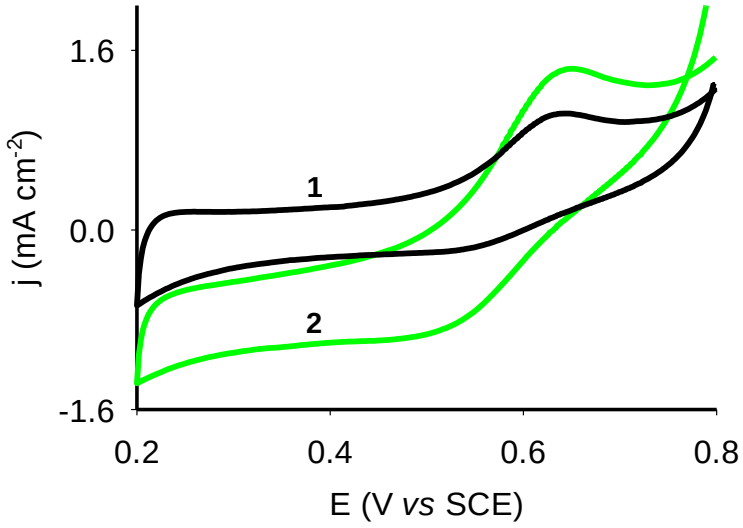


3.4 pav. CV grafito elektrodo modifikuoto CNT DMF ir dengto LAC nesant NaF (1) ir esant 6,3 mM NaF (2).

Nustatyta, kad biokatodas sukurtas ištirpinus CNT DMF ir po adsorbavus LAC generuoja katodinė srovę potencialui esant žemesniam nei 0,6 V *vs*. SCE. Katodinė srovė esant potencialui žemesniam nei 0,5 V *vs.* SCE beveik nekinta ir jos vidutinė reikšmė yra apie 0,56 mA cm^{-2} (žr. 3.4 pav.). 6,3 NaF pridėjimas smarkiai sumažino biokatalinę srovę. Nustatytas šio biokatodo pusbangio potencialas siekė apie 0,58 V *vs.* SCE. Kadangi NaF smarkiai sumažino katodinę srovę, o tirpale nebuvo mediatorinių junginių, akivaizdu, kad biokatalitinė srovė yra generuojama dėl LAC katalizuojamos deguonies redukcijos iki vandens, kuomet fermentas veikia TEP principu.

Imobilizavus LAC ant grafito elektrodo modifikuoto CNT, kurie buvo ištirpinti vandenyje, taip pat nustatytas elektrocheminis aktyvumas (žr. 3.5 pav.). Parodyta, kad nesant NaF biokatodas generavo elektros srovę, kuri ėmė didėti potencialui esant žemesniam nei 0,65 V *vs.* SCE. Biokatalitinė srovė srovė tapo beveik nekintanti, kuomet potencialas buvo žemesnis nei 0,5 V *vs.* SCE ir jos vidutinė reikšmė buvo apie 1 mA cm^{-2}. Nustatytas pusbangio potencialas siekė 0,58 V *vs.* SCE. Įdėjus 6,3 mM NaF buvo stebimas biokatalitinės

srovės sumažėjimas iki -0,25 mA cm^{-2}, kas parodo, kad LAC yra slopinama NaF. Vadinasi stebima srovė yra susijusi su deguonies redukcija iki vandens.



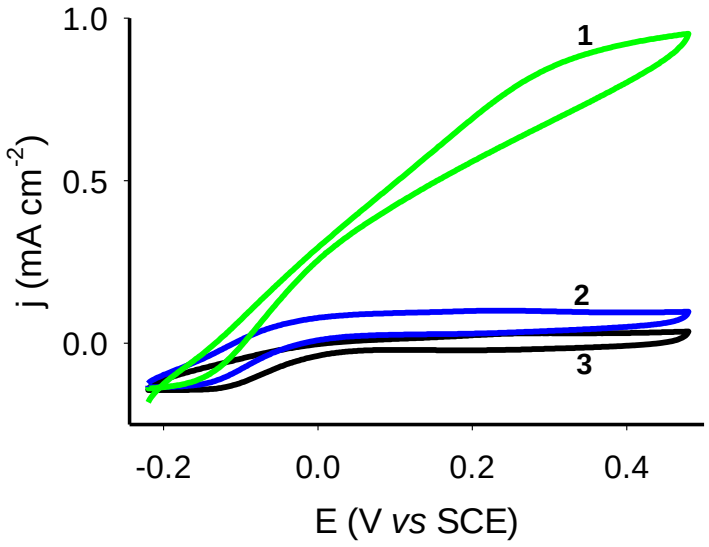
3.5 pav. CV grafito elektrodo modifikuoto CNT vandenyje ir dengto LAC nesant NaF (1) ir esant 6,3 mM NaF (2).

3.1.3 Gliukozės dehidrogenazės elektrocheminis aktyvumas ant AuND dengtų aukso elektrodų

Buvo sukurti bioanodai AuND dengtų aukso elektrodų ir GDH pagrindu bei įvertintas jų elektrocheminis aktyvumas. GDH buvo imobilizuota dvejomis pagrindinėmis metodikomis ant AuND modifikuoto elektrodo: elektrostatinė adsorbcija ir kovalentiniu surišimu. Visi matavimai pateikiami šiame skyriuje buvo atlikti skleidžiant potencialą 5 mV s^{-1} greičiu. Matavimai buvo atlikti su gliukoze naudojant buferinius tirpalus, kurių pH buvo 4,0 ir 7,0.

Buvo sukurtas bioanodas su GDH imobilizuota ant aukso elektrodo dengto AuND elektrostatiškai. Nesant gliukozės visame potencialo skleidimo intervale nebuvo stebimas joks žymesnis elektrocheminis procesas (žr. 3.6 pav.) Įdėjus 50 mM gliukozės buferiniame tirpale pH 4,0 buvo stebima biokatalitinė srovė, kuri ėmė didėti, kuomet potencialas buvo didesnis nei -0,04 V *vs.* SCE. Anodinė srovė tapo beveik stabili, kuomet potencialas buvo didesnis nei 0,08 V *vs.* SCE, ir jos vidutinė reikšmė buvo 0,17 mA cm^{-2}. Nustatytas

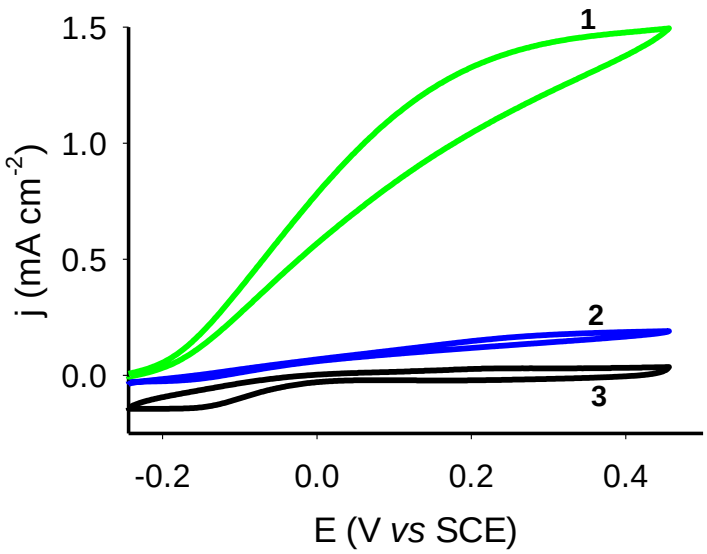
pusbangio potencialas, esant tokiam buf. tirpalo pH, siekė apie 0 V *vs.* SCE. Taip pat buvo atliktas



3.6 pav. CV aukso elektrodo modifikuoto AuND ir dengto GDH be gliukozės (3) su 50 mM gliukozės buf. tirpalo pH 4,0 (2), su 50 mM gliukozės buf. tirpalo pH 7,0 (1).

matavimas esant 50 mM gliukozės, kuomet buf. tirpalo pH buvo padidintas nuo 4,0 iki 7,0. Buvo stebima anodinė srovė, kuri pradėjo didėti potencialui esant didesniam nei -0,04 V *vs.* SCE. Biokatalitinės srovės didėjimas buvo beveik proporcingas veikiamam potencialui ir maksimalią reikšmę pasiekė skleidimo pabaigoje (apie 0,95 mA cm^{-2}). Pusbangio potencialas nebuvo vertintas, nes srovės didėjimas buvo priklausomas nuo potencialo. Kadangi anodinė srovė atsirado dėl gliukozės pridėjimo į tirpalą ir tirpale nebuvo mediatorinių junginių, akivaizdu, kad srovė yra susijusi su GDH katalizuojama gliukozės oksidacija, kuomet fermentas TEP principu perduoda elektronus elektrodui. Taip pat nustatyta, kad GDH daug efektyviau veikia ant AuND modifikuoto aukso elektrodo, kuomet naudojamas buf. tirpalas pH 7,0.

Buvo sukurtas bioanodas su GDH ant aukso elektrodo dengto AuND, kurios buvo modifikuotos monosluoksnį formuojančiais junginiais: 4-aminotiofeniu ir 4-merkaptobenzoine rūgštimi. Nesant tirpale gliukozės nestebimas jos žymus biokatalitinis procesas (žr. 3.7 pav.). Kuomet į tirpalą, kurio pH 4,0, buvo įdėta 50 mM gliukozės buvo stebima anodinė srovė, kuri ėmė didėti potencialui esant didesniam nei -0,1 V *vs.* SCE. Srovės didėjimas buvo beveik proporcingas veikiamam potencialui ir srovė pasiekė didžiausią reikšmę potencialo skleidimo pabaigoje apie 0,19 mA cm^{-2}. Kuomet buf. tirpalo

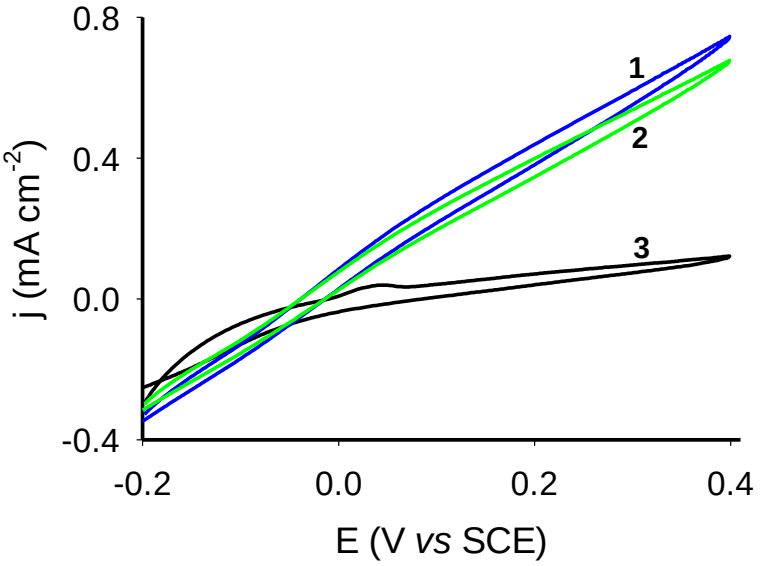


3.7 pav. CV aukso elektrodo modifikuoto AuND ir 4-ATF bei 4-MBR ir dengto GDH be gliukozės (3) su 50 mM gliukozės buf. tirpalo pH 4,0 (2), su 50 mM gliukozės buf. tirpalo pH 7,0 (1).

pH buvo 7,0 anodas generavo daug didesnes sroves. Anodinė srovė pradėjo didėti nuo -0,2 V *vs.* SCE ir, esant potencialiui didesniam nei 0,2 V vs. SCE tapo beveik nekintanti. Vidutinė reikšmė siekė 1,45 mA cm^{-2}. Nustatytas pusbangio potencialas siekė apie 0 V *vs.* SCE. Tai, kad nebuvo naudoti mediatoriniai junginiai ir biokatalitinė srovė atsirasdavo, tik kai tirpale buvo gliukozės indikuoja, kad stebima srovė buvo generuojama dėl GDH katalizuojamos gliukozės oksidacijos ir TEP tarp fermento ir elektrodo.

3.1.4 Gliukozės dehidrogenazės elektrocheminis aktyvumas ant CNT dengtų grafito elektrodų

Buvo sukurtas GDH bioanodas ant grafito elektrodo modifikuoto CNT. Atliktas elektrocheminis matavimas parodė, kad nesant gliukozės nestebimas joks žymus elektrocheminis procesas (žr. 3.8 pav.). Įdėjus 50 mM gliukozės, esant buf. tirpalo pH 4,0, stebima atsirandanti anodinė srovė, kurios dydis yra beveik tiesiogiai proporcingas veikiančiam potencialui. Anodinė srovė pradeda didėti potencialui esant didesniam nei -0,05 V *vs.* SCE. Maksimalus srovės dydis pasiekiamas potencialo skleidimo pabaigoje ir siekia apie 0,66 mA cm^{-2}. Atlikus matavimą buferiniame tirpale pH 7,0 stebima panaši ciklinė voltamperograma. Anodinė srovė pradeda didėti potencialiui esant didesniam nei -0,05 V *vs.* SCE. Srovės dydis taip pat beveik tiesiogiai priklauso nuo veikiančio potencialo, o maksimali reikšmė siekia 0,74 mA cm^{-2}.



3.8 pav. CV grafito elektrodo modifikuoto CNT ir dengto GDH be gliukozės (3) su 50 mM gliukozės buf. tirpalo pH 4,0 (2), su 50 mM gliukozės buf. tirpalo pH 7,0 (1).

3.1.5 Lakazės ir gliukozės dehidrogenazės elektrodų parametrų įvertinimas pasirenkant sistemos matricą

Sukurti biokatodai LAC pagrindu ir bioanodai GDH pagrindu pateikti lentelėje (žr. 1 lentelę) su pagrindinėmis charakteristikomis. Parametrai pateikti kuomet deguonies koncentracija tirpale yra 0,254 mM, o gliukozės 50 mM.

1 lentelė. Susintetinti LAC biokatodai bei GDH bioanodai ir jų parametrai

Fermentas	**Matrica**	**Imobilizavimo būdas**	**pH**	**SDE sukimosi greitis (rpm)**	**Generuojama maksimali srovė (mA cm^{-2})**
LAC	AuND	Fizinė adsorbcija	4,0	1000	0,65
		Kovalentinė adsorbcija			0,025
		Adsorbcija potencialu (0,55 V *vs.* SCE)			0,72
	CNT (tirpinti	Adsorbcija		Nenaudotas	0,56

LAC	DMF)		4,0	Nenaudotas	
	CNT (tirpinti vandenyje)	Fizinė adsorbcija			1,0
GDH	AuND	Fizinė adsorbcija	4,0	Nenaudotas	0,17
			7,0		0,95
		Kovalentinė adsorbcija	4,0		0,19
			7,0		1,45
	CNT (tirpinti vandenyje)	Fizinė adsorbcija	4,0		0,66
			7,0		0,74

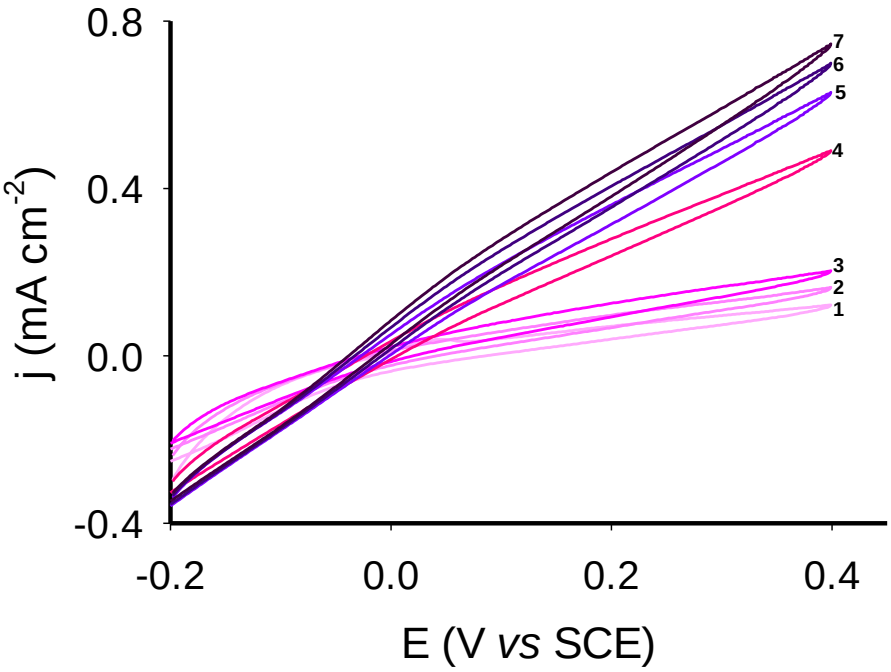
Įvertinus visų sukurtų biokatodų ir anodų parametrus pasirinkta LAC ir GDH sistemą kurti CNT, tirpintų vandenyje, pagrindu dėl šių priežasčių:

- abu fermentai ant šios matricos pakankamai efektyviai veikia esant buferinio tirpalo pH 4,0;
- abu elektrodai generuoja pakankamai aukštas biokatalitines sroves;
- nereikalingas sukamojo disko elektrodas (jo naudojimas komplikuotų tolesnius tyrimus);
- pakankamai paprastas ir greitas tokios sistemos paruošimas.

3.1.6 Lakazės ir gliukozės dehidrogenazės elektrodų tariamų K_M ir j_{max} matavimai

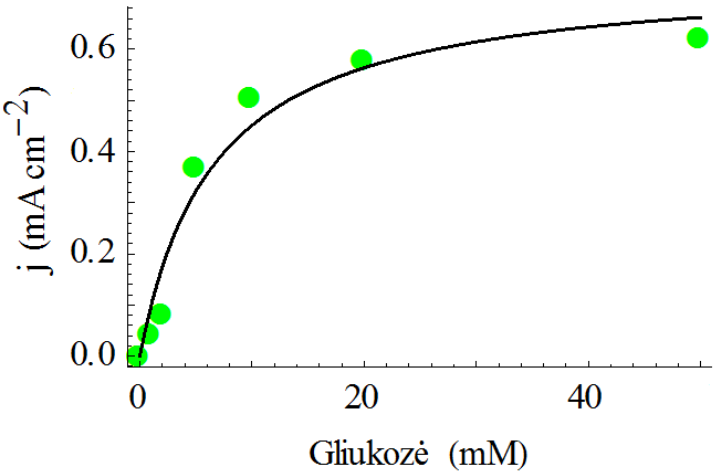
Tam, kad būtų galima vertinti LAC ir GDH sistemos parametrus ir modeliuoti sistemos atsaką reikėjo nustatyti tariamus K_M ir j_{max}. Tariamųjų konstantų matavimai buvo atlikti naudojant buferinį tirpalą pH 4,0.

Gliukozės dehidrogenazei tariami K_M ir j_{max} buvo nustatyti atliekant CV, esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms. Buvo sukurtas bioanodas su GDH ant pasirinktos



3.9 pav. CV grafito elektrodo modifikuoto CNT ir dengto GDH be gliukozės (1), su 1 mM (2), 2 mM (3), 5 mM (4), 10 mM (5), 20 mM (6), 50 mM (7) gliukozės.

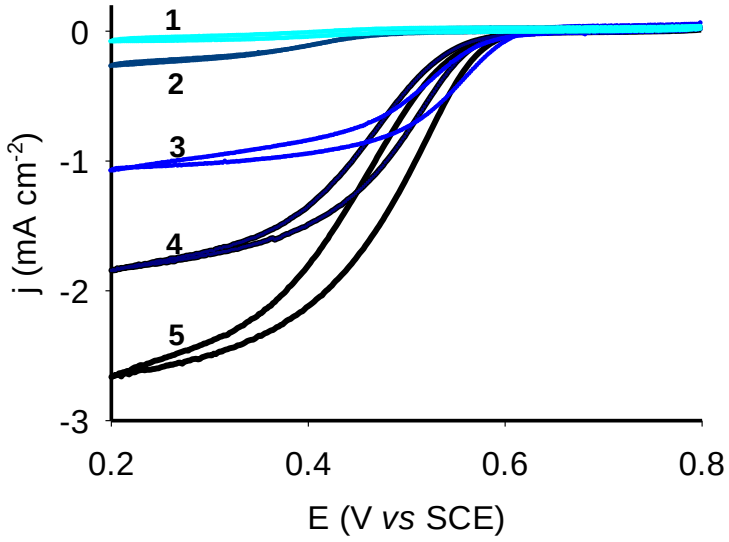
matricos (CNT tirpinti vandenyje) ir atlikti matavimai esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms. Nesant gliukozės nestebimas joks žymus elektrocheminis procesas (žr. 3.9 pav.). Pridėjus gliukozės (1 – 50 mM) stebimas biokatalitinės anodinės srovės didėjimas susijęs su GDH katalizuojama gliukozės oksidacija. Srovės priklausomybei nuo gliukozės koncentracijos naudotas Michaelis-Menten modelis ir atliktas modelio pritaikymas eksperimentiniams duomenims (angl. *fitting*). Nustatyta, kad tariamos K_M reikšmė nuo potencialo nepriklauso ir siekia šio tipo elektrodams 6,8 ± 0,4 mM gliukozės. Tariama j_{max} buvo priklausoma nuo veikiančio potencialo. Nuspręsta naudoti j_{max} reikšmę, kuri pasiekiama esant potencialui 0,4 V *vs*. SCE, darant prielaidą, kad LAC



3.10 pav. GDH tariamo reakcijos greičio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos, esant potencialui 0,4 V *vs.* SCE. Eksperimentiniams duomenimis pritaikytas M-M modelis.

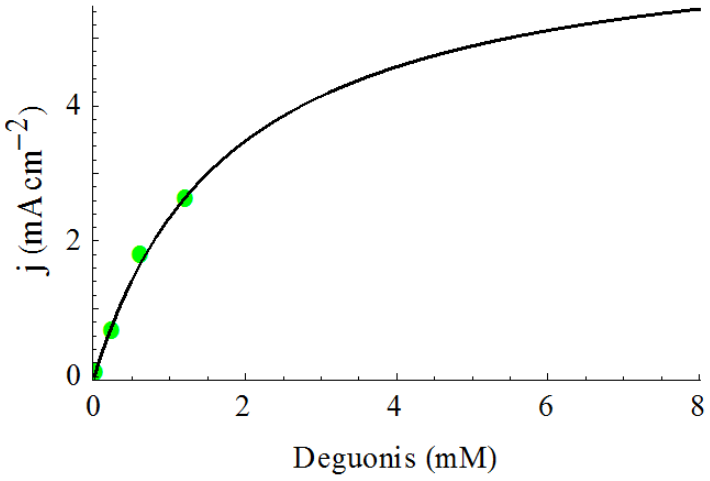
generuojamas potencialas yra pakankamai aukštas. Nustatyta j_{max} reikšmė yra 0,74±0,08 mA cm^{-2}, o tai yra 2,7 nmol cm^{-2} s^{-1} gliukozės.

Taip pat buvo vertinamas LAC tariamas K_M deguoniui. Literatūroje galima rasti informacijos apie tai, kokie yra lakazių K_M kosubstratams, pvz., ABTS, ferocianidui, pirokatecholiui ir etc. (Yaropolov et al., 1994), tačiau nėra duomenų koks yra lakazės K_M deguoniui, nes tą sunku išmatuoti (dėl prasto deguonies tirpumo vandenyje).



3.11 pav. CV aukso elektrodo modifikuoto AuND ir dengto LAC, kuomet deguonies koncentracija buvo 0,02 mM (2), 0,254 mM (3), 0,73 mM (4), 1,2 mM (5). Slopinimas 6,3 mM NaF (1).

Tariamas K_M LAC buvo matuotas naudojant aukso elektrodą dengtą AuND, nes išmatuoti LAC tariamą K_M ant grafito elektrodo dengto pasirinkta matrica (CNT) yra technologiškai labai sudėtinga, nes tokiems matavimams reikia naudoti SDE. Matavimai buvo atlikti naudojant du buferinius tirpalus pH 4,0, kurių vienas buvo prisotintas deguonies, kitas prisotintas argono ir buvo naudojamas SDE (1000 rpm). Atlikti matavimai oru prisotintame tirpale ($[O_2]$=0,254 mM), deguonies prisotintame tirpale ($[O_2]$=1,2 mM), argono prisotintame tirpale ($[O_2]$=0,025 mM), ir oro bei argono prisotintų tirpalų mišinyje, kurių santykis buvo 1:1, o deguonies koncentracija siekė 0,61 mM.



3.12 pav. LAC tariamo reakcijos greičio priklausomybė nuo deguonies koncentracijos. Eksperimentiniams duomenimis pritaikytas M-M modelis.

Bioelektrokatalitinės srovės priklausomybei nuo deguonies koncentracijos buvo naudotas Michaelis-Menten modelis ir atliktas pritaikymas eksperimentiniams duomenims (angl. *fitting*) (žr. 3.12 pav.). Nustatyta, kad LAC tariama K_M deguoniui yra 1,8 mM. Visgi ši reikšmė nėra pakankamai patikima, nes net ir maksimali deguonies koncentracija (1,21 mM) dar buvo per maža, kad būtų stebimas pakankamas Michaelio kreivės lenkimasis. Patikimai galima įvertinti tik tai, kad LAC tariama K_M deguoniui yra tikrai ne mažesnė nei 1,8 mM. Tariamas j_{max} buvo nevertintas dėl galimų labai didelių paklaidų, kurios kiltų dėl jau įvardintos priežasties.

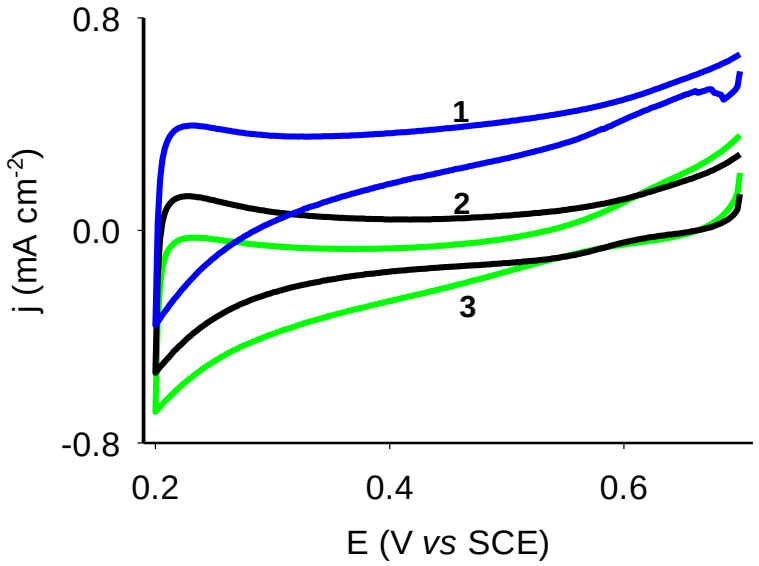
3.2 Lakazės ir gliukozės dehidrogenazės biokatalitinė sistema anglies nanovamzdelių pagrindu

Nustačius, kad CNT yra tinkamiausia nanostruktūra, kurią galima naudoti kaip matricą LAC/GDH biokatalitinei sistemai, sudaryta LAC/GDH biokatalitinė sistema. Sistemos analizė buvo atlikta atliekant šiuos tyrimus:

- įvertintas abiejų fermentų elektrocheminis aktyvumas ant to paties, CNT dengto, grafito elektrodo;
- nustatytas ir įvertintas deguonies suvartojimas priklausomai nuo gliukozės koncentracijos;
- ištirtas LAC/GDH sistemos aktyvumas nuo pH.

3.2.1 Lakazės ir gliukozės dehidrogenazės elektrocheminis aktyvumas ant anglies nanovamzdeliais modifikuoto grafito elektrodo

Pasirinkus matricą ir įvertinus LAC ir GDH veikimą ant atskirų grafito elektrodų, reikėjo įvertinti ar šie fermentai abu kartu yra aktyvūs adsorbuoti ant to paties elektrodo.



3.13 pav.. CV grafito elektrodo modifikuoto AuND ir dengto LAC ir GDH. Matavimai tirpale (3), su 6,3 mM NaF (2), su 6,3 mM NaF ir 50 mM gliukozės (1).

Sukūrus LAC/GDH sistemą atlikti elektrocheminiai matavimai (žr. 3.13 pav.) parodė, kad buferiniame tirpale pH 4,0 stebima katodinė srovė, kuri pradeda didėti potencialui esant žemesniam nei 0,54 V *vs.* SCE ir pasiekia maksimalią reikšmę, kuri siekia 0,67 mA cm^{-2}, prie 0,2 V *vs.* SCE. 6,3 mM NaF pridėjimas sumažina katodinę srovę potencialo intervale nuo 0,54 iki 0,2 V *vs.* SCE. Esant 0,2 V *vs.* SCE potencialui srovės dydis siekia 0,5 mA cm^{-2}. Įdėjus 50 mM gliukozės (kartu yra ir 6,3 mM NaF) stebimas anodinės srovės padidėjimas visame potencialo skleidimo intervale. Vidutinė reikšmė siekia apie 0,5 mA cm^{-2}.

Kadangi tirpale nebuvo mediatorinių junginių akivaizdu, kad biokatalinės srovės buvo susijusios su LAC katalizuota deguonies redukcija arba GDH gliukozės oksidacija. Tirpale nesant NaF ir gliukozės katodinė srovė buvo kilusi dėl LAC katalizuojamos deguonies redukcijos iki vandens. NaF pridėjimas sumažino LAC aktyvumą ir dėl to stebimą katodinę srovę. Gliukozės pridėjimas (kartu yra ir NaF) padidino anodinę srovę, kuri atsirado dėl GDH katalizuojamos gliukozės oksidacijos ir LAC slopinimo NaF.

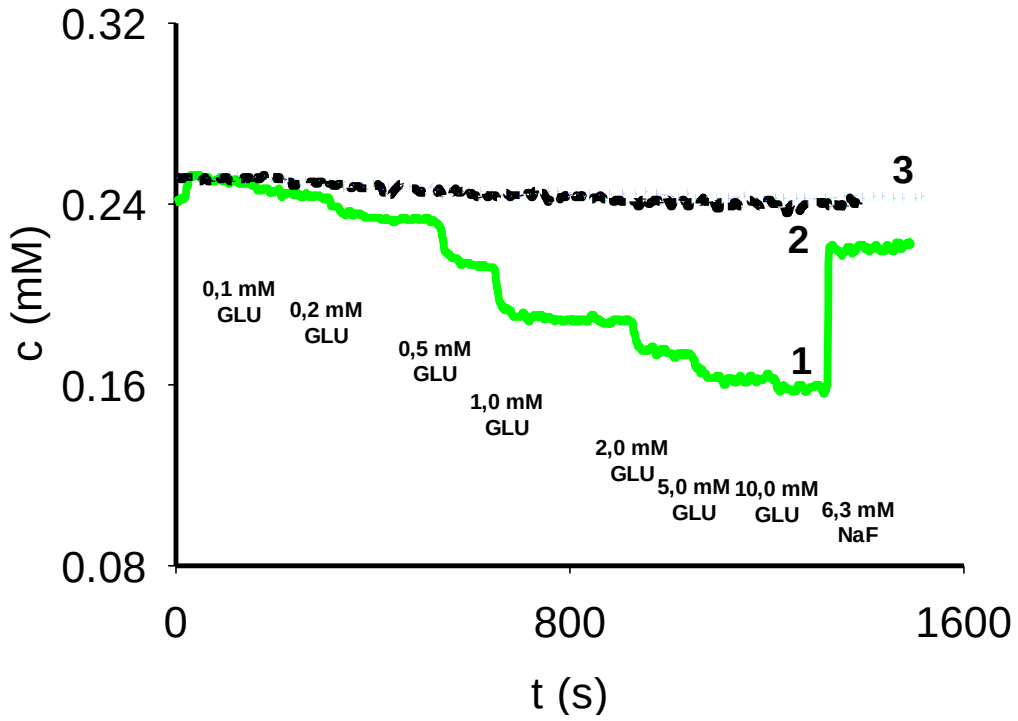
3.2.2 Lakazės ir gliukozės dehidrogenazės sistemos deguonies vartojimas priklausomai nuo gliukozės koncentracijos

Buvo išmatuotas deguonies koncentracijos pokytis prie deguoninio Klarko elektrodo paviršiaus, ant kurio buvo imobilizuota CNT matrica su LAC/GDH biokatalitine sistema. Buferinis tirpalas pH 4,0 buvo maišomas magnetiniu maišikliu ir maišymo metu nusistovėjusi ramybės srovė, kurią rodė Klarko elektrodas, buvo prilyginta deguonies koncentracijai tirpale, esant normaliomis sąlygomis, t.y. $[O_2]$=0,254 mM (Koppenol and Butler 1985).

Kuomet tirpale nebuvo gliukozės deguonies koncentracijos pokyčio nebuvo (žr. 3.14 pav.). Laipsniškas gliukozės pridėjimas nuo 0,1 mM iki 10 mM sąlygojo laipsnišką deguonies koncentracijos mažėjimą prie elektrodo paviršiaus nuo 0,253 mM iki 0,16 mM. Kuomet į tirpalą buvo įdėta 6,3 mM NaF buvo stebimas staigus deguonies koncentracijos padidėjimas (netoli pradinės vertės) nuo 0,16 mM iki 0,22 mM. Tikriausiai deguonies koncentracija nebuvo visiška atstatyta iki normalios, nes LAC nebuvo visiškai užslopinta. Kontrolinių matavimų metu, kuomet nebuvo kažkurio iš fermentų (LAC arba GDH), o gliukozės koncentracija buvo keičiama taip pat (nuo 0,1 mM iki 10,0 mM) nebuvo fiksuotas deguonies koncentracijos pokytis.

Šie duomenys rodo, kad deguonies koncentracijos sumažėjimas prie paviršiaus buvo susijęs su LAC/GDH biokatalitinės sistemos vykdoma bioelektrochemine kataline. GDH

katalizavo gliukozės oksidaciją ir perdavė elektronus per matricą (CNT) LAC, kuri redukavo deguonį iki vandens. Tokiu būdu, buvo fiksuotas laipsniškas deguonies koncentracijos sumažėjimas, kuris priklausė nuo tirpale esančios gliukozės koncentracijos.



3.14 pav. Deguonies koncentracijos kitimas priklausomai nuo tirpale esančios gliukozės (0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 mM) koncentracijos (1). Kontrolinis matavimas be LAC (2), be GDH (3).

NaF fluorido pridėjimas atstatė deguonies koncentraciją iki artimos pradinei. Tai parodo, kad deguonies sumažėjimas tikrai priklausė nuo LAC katalizuojamo proceso.

3.2.3 Lakazės ir gliukozės dehidrogenazės sistemos aktyvumo priklausomybės nuo pH

Buvo atlikti LAC/GDH sistemos bei LAC ir GDH elektrodų santykinių aktyvumų ($A_{LAC/GDH}$, A_{LAC}, A_{GDH} atitinkamai) matavimai priklausomai nuo buferinių tirpalų pH. Matavimų eksperimentiniams duomenis pritaikytas „varpo“ modelis (Ivanec-Goranina, Kulys, 2008). GDH buvo laikyta, kad fermento aktyviajame centre yra dvi katalizei būtinos funkcinės grupės, kurių protonizacija arba deprotonizacija lemia tris fermento formas visame pH intervale. Taip pat egzistuoja dvi pK, nusakančios šių grupių protonizaciją (deprotonizaciją) priklausomai nuo pH. Šis modelis taikytas paprastumo dėlei, nes pakankamai gerai atitinka eksperimentinius rezultatus. Iš tikro, kadangi GDH struktūra nėra

žinoma, tiksliai negalima pasakyti kiek grupių yra aktyviajame centre, kurios protonizuojasi ar deprotonizuojasi ir daro įtaką fermento katalitiniam aktyvumui.

LAC laikyta, kad yra tik viena funkcinė grupė, kurios protonizacija ar deprotonizacija turi įtaką fermento kataliniam aktyvumui. Tokiu atveju LAC egzistuoja dvi fermento formos visame pH intervale ir viena pK. Nors LAC prie mažų pH stebimas aktyvumo mažėjimas, tačiau jis greičiausiai yra susijęs su fermento denatūracija ir jo struktūriniais pokyčiais (esant itin rūgščiai terpei) nei kad aktyviajame centre esančios grupės protonizacija.

LAC/GDH sistemos aktyvumo priklausomybė nuo pH turėtų būti atskirų fermentų LAC ir GDH persidengianti dalis, todėl sistemos aktyvumas nuo pH buvo aprašytas kaip abiejų fermentų aktyvumų sandauga t.y. $A_{LAC} \times A_{GDH}$.

LAC santykinis aktyvumas (A_{LAC}) buvo aprašytas:

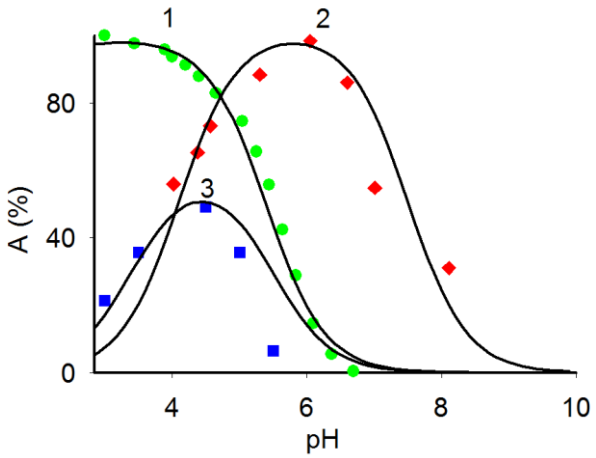
$$A_{LAC} = \frac{1}{1+10^{pH-pK}} \quad (11)$$

GDH santykinis aktyvumas (A_{GDH}) buvo aprašytas:

$$A_{GDH} = \frac{1}{1+10^{pK_1-pH}+10^{pH-pK_2}} \quad (12)$$

LAC/GDH santykinis aktyvumas ($A_{LAC/GDH}$) buvo aprašytas:

$$A_{LAc/GDH} = \frac{1}{1+10^{pH-pK}\,(1+10^{pK_1-pH}+10^{pH-pK_2})} \quad (13)$$



3.15 pav. Grafito elektrodo dengto CNT ir LAC (1), GDH (2) bei LAC/GDH sistemos (3) santykinių aktyvumų priklausomybė nuo pH. Kreivės rodo modelio pritaikymą eksperimentiniams taškams.

Atlikus LAC ir GDH aktyvumų eksperimentinių taškų pritaikymą aprašytais modeliais nustatyta LAC pK = 5,3 ± 0,1 ir GDH pK_1 = 4,1 ± 0,1 ir pK_2 = 7,5 ± 0,1. Tuomet naudojant šias reikšmes, pagal aprašytą modelį, sudaryta LAC/GDH sistemos santykinio aktyvumo kreivė priklausomai nuo pH (žr. 3.15 pav.). LAC/GDH sistemos santykinio aktyvumo nuo pH kreivė pagal modelį gerai sutampa su eksperimentiniais matavimais. Tai parodo, kad sistemos pH profilis sudarytas iš atskirų fermentų pH profilių. Tai yra dar vienas įrodymas, kad gliukozės oksidacija deguonimi buvo stebima dėl LAC/GDH sistemos vykdomos biokatalizės, kuomet elektronai buvo tiesiogiai perduodami iš GDH į LAC per CNT.

3.3 Lakazės ir gliukozės dehidrogenazės sistemos biokonversinio proceso modeliavimas

Sukūrus LAC/GDH biokatalitinę sistemą ir įvertinus šios sistemos vykdomą gliukozės oksidaciją deguonimi ir aktyvumo priklausomybę nuo pH, sudarytas modelis, kuris aprašo teorinę deguonies konversijos priklausomybę nuo gliukozės koncentracijos.

GDH katalizuojama reakcija aprašoma:

2 β-D-Gliukozė → 2 δ-gliukonolaktonas + 4 e^- + 2 H+ (14)

LAC katalizuojama reakcija aprašoma:

O_2 + 4 e^- + 4 H^+ → H_2O (15)

LAC/GDH sistemoje abu fermentai yra sujungti per CNT matricą, t.y. elektronai perduodami per nanovamzdelį. Bendras proceso greitis (V) gali būti aprašomas:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{LAC}} + \frac{1}{V_{GDH}} \rightarrow V = \frac{V_{LAC} V_{GDH}}{V_{LAC} + V_{GDH}} \quad (16)$$

Čia V – bendras proceso greitis, V_{LAC} ir V_{GDH} – LAC ir GDH katalizuojamų reakcijų greičiai.

$$V_{GDH} = \frac{V_{max}\, C_{gp}}{K_M + C_{gp}} \quad (17)$$

$$V_{LAC} = k_s C_{dp} \quad (18)$$

Čia V_{max} – tariamas GDH maksimalus katalizės greitis, K_M – tariama GDH Michaelis konstanta, k_s – tariama LAC pirmo laipsnio konstanta (galima daryti tokią prielaidą, nes parodėme, kad LAC K_M bent 8 kartus didesnis nei deguonies koncentracija tirpale), C_{gp} – gliukozės koncentracija prie LAC/GDH sistemos elektrodo paviršiaus, C_{dp} – deguonies koncentracija prie LAC/GDH sistemos elektrodo paviršiaus.

Deguonies (J_d) ir gliukozės (J_g) srautų greičiai į stacionarų paviršių aprašomi:

$$J_d = \frac{D_d}{\delta}\,(C_{dt} - C_{dp}) \tag{19}$$

$$J_g = \frac{D_g}{\delta}\,(C_{gt} - C_{gp}) \tag{20}$$

Čia D_d ir D_g – atitinkamai deguonies ir gliukozės difuzijos koeficientai, δ – difuzinio sluoksnio storis, C_{dt} ir C_{gt} – atitinkamai deguonies ir gliukozės koncentracijos tirpale.

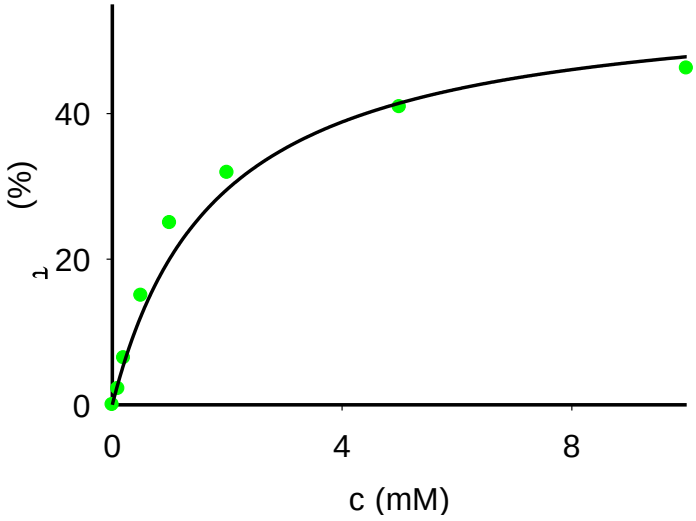
Esant stacionariomis sąlygomis procesas aprašomas:

$$J_d = J_g = V \tag{21}$$

Iš to seka lygčių sistema:

$$\begin{cases} \frac{D_d}{\delta}\,(C_{dt} - C_{dp}) = \frac{\frac{V_{max}\,C_{gp}}{K_M + C_{gp}}\,k_s C_{dp}}{\frac{V_{max}\,C_{gp}}{K_M + C_{gp}} + k_s C_{dp}} \\ \frac{D_g}{\delta}\,(C_{gt} - C_{gp}) = \frac{\frac{V_{max}\,C_{gp}}{K_M + C_{gp}}\,k_s C_{dp}}{\frac{V_{max}\,C_{gp}}{K_M + C_{gp}} + k_s C_{dp}} \\ \frac{D_d}{\delta}\,(C_{dt} - C_{dp}) = \frac{D_g}{\delta}\,(C_{gt} - C_{gp}) \end{cases} \tag{22}$$

Ši lygčių sistema, ją išsprendus, leidžia įvertinti kokia turėtų būti teorinė deguonies koncentracija prie deguoninio Klarko elektrodo paviršiaus, dengto LAC/GDH sistema, kuomet kiti parametrai yra žinomi. Skaičiavimams naudoti šie parametrai: V_{max}=0.92 nmol cm^{-2} s^{-1} (apskaičiuotas iš GDH ant CNT elektrodo maksimalios srovės 0.74 mA cm^{-2}, esant 0.4 V), K_M=6.8 mM, C_{dt}=2.54·10^{-4} M, δ=0,012 cm, D_d=2.42·10^{-5} cm^2 s^{-1} (Haynes ir Lide, 2011), D_g=6.7·10^{-6} cm^2 s^{-1} (Haynes ir Lide, 2011).



3.16 pav. LAC/GDH sistemos deguonies konversijos priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos.

Pateiktas modelis rodo teorinę deguonies konversiją, kuri išreikšta kaip $\tau = \frac{C_{dt}-C_{dp}}{C_{dt}} \times 100\%$ ir palyginta su eksperimentiniais duomenimis (žr. 3.16 pav.). Buvo gautas geras teorinio modelio atitikimas eksperimentiniams duomenims, kuomet laikyta, kad LAC aktyvumas yra toks pats kaip ir GDH. Ši prielaida paremta analizuojant GDH, LAC ir LAC/GDH sistemos pH profilius. LAC/GDH sistemos santykinis aktyvumas gerai atitinka atskirų fermentų santykinių aktyvumų profilių sandaugą. Tai rodo, kad abiejų fermentų aktyvumai LAC/GDH sistemoje yra panašūs. Taip pat nustatyta, kad maksimali konversija tokiai sistemai apie 50 %.

3.4 Rezultatų aptarimas

Buvo nustatyta, kad LAC ir GDH veikia TEP principu ant aukso elektrodų modifikuotų AuND ir grafito elektrodų modifikuotų CNT. Kadangi tirpaluose nebuvo mediatorinių junginių, biokatalitinės srovės atsirasdavo, kuomet tirpale buvo fermentų substratų, ir sumažėdavo, jei fermentai buvo slopinami. Tai rodo, kad biokatalitinė srovė atsirasdavo dėl fermentų katalizuotos substrato oksidacijos (redukcijos) tiesiogiai perduodant elektronus elektrodui. Nustatyta, kad CNT yra geresnė matrica biokatalitiniai LAC/GDH sistemai, nes ant CNT modifikuotų elektrodų LAC generuoja žymiai aukštesnes biokatalitines sroves nei ant aukso modifikuotų AuND nenaudojant sukamojo disko elektrodo. Taip pat parodyta, kad ant CNT GDH pakankamai efektyviai veikia esant pH 4,0 t.y. tokiam pH, kuriame LAC yra pati aktyviausia. Susintetinus LAC/GDH sistemą pavyko parodyti, kad ši sistema vartoja deguonį priklausomai nuo gliukozės koncentracijos tirpale, o

NaF pridėjimas nulemia deguonies koncentracijos atstatymą (artimą pradinei koncentracijai). Taip pat buvo parodyta, kad sistemos aktyvumo nuo pH profilis gerai atitinka teorinį modelį. LAC/GDH bioelektrokatalitinė sistemos aktyvumo priklausomybė nuo pH buvo aprašyta kaip atskirų fermentų aktyvumų nuo pH persidengianti dalis (sandauga). Tai rodo, kad LAC/GDH sistema veikia tiesioginės elektronų pernašos būdu: t.y. GDH oksiduoja gliukozę ir perduoda elektronus per CNT LAC, kuri redukuoja deguonį iki vandens. Be to, buvo sukurtas sistemos biokonversinio proceso modelis, esant stacionariomis sąlygomis, kuris gerai atitinka eksperimentinius rezultatus. Šis modelis leidžia prognozuoti sistemos vykdomą deguonies konversiją priklausomai nuo gliukozės koncentracijos. Ši sukurta sistema gali būti naudinga kuriant biotechnologinius procesus, kurių metu „surišamos“ skirtingos oksidoreduktazės, ir taip pat tiriant elektronų pernašos procesus.

IŠVADOS

1. Įvertinus LAC ir GDH vykdomą, tiesiogine elektronų pernaša pagrįstą biokatalizę, nustatyta, kad abu fermentai veikia ir ant AuND ir CNT modifikuotų elektrodų. Nustatyta, kad LAC efektyviai veikia ant AuND, kuomet yra imobilizuojama potencialu (j = 0,72 mA cm^{-2}) ar adsorbuojama (j = 0,65 mA cm^{-2}). Ant CNT LAC taip pat veikia efektyviai (j = 1,55 mA cm^{-2}). GDH taip pat efektyviai veikia ant AuND (j = 1,5 mA cm^{-2}) ir CNT (j = 0,72 mA cm^{-2}) elektrodų. Visgi GDH ant CNT efektyviai veikia ir prie pH 4,0, o LAC ant CNT generuoja didesnes sroves nei ant AuND nenaudojant sukamojo disko elektrodo. Nustatyta, kad CNT yra geresnė matrica LAC/GDH biokatalitinei sistemai kurti.

2. Susintetinta LAC/GDH biokatalitinė sistema. Parodyta, kad LAC/GDH sistema vartoja deguonį priklausomai nuo gliukozės koncentracijos, o sistemos aktyvumo nuo pH priklausomybė yra abiejų fermentų persidengianti dalis (sandauga). Tai parodo, kad sistema katalizuoja deguonies redukciją oksiduodama gliukozę: t.y. egzistuoja tiesioginė elektronų pernaša tarp LAC ir GDH. Ši modelinė sistema gali atverti galimybes kurti biokatalitinius procesus jungiant skirtingas oksidoreduktazes.

3. Pasiūlytas LAC/GDH sistemos biokonversinio proceso modelis, kuris gerai atitinka eksperimentinius rezultatus esant stacionariomis sąlygomis. Modelis leidžia įvertinti deguonies suvartojimo priklausomybę nuo gliukozės koncentracijos. Modelio atitikimas eksperimentiniams rezultatams suteikia galimybę prognozuoti šios sistemos (ir galimai ateityje sukurtų) biokonversinio proceso greitį ir efektyvumą.

LITERATŪRA

1. Ajayan, P.M., Zhou, O.Z., 2001. Applications of carbon nanotubes. Carbon nanotubes, 391-425. Springer.
2. Aurélien, H., Karine, S., Sophie, T., Boniface, K., 2011. Performances of Enzymatic Glucose/O2 Biofuel Cells. Biofuel's Engineering Process Technology, 467-492.
3. Baldrian, P., 2006. Fungal laccases – occurrence and properties. FEMS Microbiology Reviews 30(2), 215-242.
4. Baronas, R., Ivanauskas, F., Kulys, J., 2004. The Effect of Diffusion Limitations on the Response of Amperometric Biosensors with Substrate Cyclic Conversion. Journal of Mathematical Chemistry 35(3), 199-213.
5. Berezin, I., Bogdanovskaia, V., Varfolomeev, S., Tarasevich, M., Iaropolov, A., 1978. Bioelectrocatalysis-Equilibrium Oxygen Potential in Presence of Laccase. Doklady Akademii Nauk SSSR 240(3), 615-618.
6. Betancor, L., Johnson, G.R., Luckarift, H.R., 2013. Stabilized Laccases as Heterogeneous Bioelectrocatalysts. ChemCatChem 5(1), 46-60.
7. Brondani, D., de Souza, B., S. Souza, B., Neves, A., C. Vieira, I., 2013. PEI-coated gold nanoparticles decorated with laccase: A new platform for direct electrochemistry of enzymes and biosensingapplications. Biosensors and Bioelectronics 42(0), 242-247.
8. Bullen, R.A., Arnot, T.C., Lakeman, J.B., Walsh, F.C., 2006. Biofuel cells and their development. Biosensors and Bioelectronics 21(11), 2015-2045.
9. Cao, L., 2005. Immobilised enzymes: science or art? Current Opinion in Chemical Biology 9(2), 217-226.
10. Clark, L.C., Wolf, R., Granger, D., Taylor, Z., 1953. Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography.
11. Cosnier, S., Holzinger, M., Le Goff, A., 2014. Recent advances in Carbon Nanotube based Enzymatic Fuel Cells. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 2.
12. Dagys, M., Haberska, K., Shleev, S., Arnebrant, T., Kulys, J., Ruzgas, T., 2010. Laccase–gold nanoparticle assisted bioelectrocatalytic reduction of oxygen. Electrochemistry Communications 12(7), 933-935.
13. Dai, H., 2002. Carbon nanotubes: synthesis, integration, and properties. Accounts of Chemical Research 35(12), 1035-1044.

14. Duine, J.A., 1999. The PQQ story. Journal of Bioscience and Bioengineering 88(3), 231-236.
15. Durán, N., Rosa, M.A., D'Annibale, A., Gianfreda, L., 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. Enzyme and Microbial Technology 31(7), 907-931.
16. Eddowes, M.J., Hill, H.A.O., 1977. Novel method for the investigation of the electrochemistry of metalloproteins: cytochrome c. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications(21), 771b-772.
17. Flexer, V., Durand, F., Tsujimura, S., Mano, N., 2011. Efficient direct electron transfer of PQQ-glucose dehydrogenase on carbon cryogel electrodes at neutral pH. Analytical Chemistry 83(14), 5721-5727.
18. Gao, X., Nie, S., 2004. Quantum Dot-Encoded Mesoporous Beads with High Brightness and Uniformity: Rapid Readout Using Flow Cytometry. Analytical Chemistry 76(8), 2406-2410.
19. Gutiérrez-Sánchez, C., Pita, M., Vaz-Domínguez, C., Shleev, S., De Lacey, A.L., 2012. Gold Nanoparticles as Electronic Bridges for Laccase-Based Biocathodes. Journal of the American Chemical Society 134(41), 17212-17220.
20. Haynes, W.M., Lide, D.R., 2011. CRC handbook of chemistry and physics : a ready-reference book of chemical and physical data. CRC Press, Boca Raton, Fla.
21. Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E., 2009. Understanding enzyme immobilisation. Chemical Society Reviews 38(2), 453-468.
22. Hernandez, M.E., Newman, D.K., 2001. Extracellular electron transfer. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 58(11), 1562-1571.
23. Ivanec-Goranina, R., Kulys, J., 2008. Kinetic study of peroxidase-catalyzed oxidation of 1-hydroxypyrene. Development of a nanomolar hydrogen peroxide detection system. cent.eur.j.biol. 3(3), 224-232.
24. Ivnitski, D.M., Atanassov, P., Luckarift, H.R., 2014. Direct Bioelectrocatalysis: Oxygen Reduction for Biological Fuel Cells. Enzymatic Fuel Cells, 12-32. John Wiley & Sons, Inc.
25. Yamada, M., Elias, M.D., Matsushita, K., Migita, C.T., Adachi, O., 2003. Escherichia coli PQQ-containing quinoprotein glucose dehydrogenase: its structure comparison with other quinoproteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 1647(1–2), 185-192.

26. Yaropolov, A.I., Skorobogat'ko, O.V., Vartanov, S.S., Varfolomeyev, S.D., 1994. Laccase. Appl Biochem Biotechnol 49(3), 257-280.
27. Yeh, P., Kuwana, T., 1977. Reversible electrode reaction of cytochrome c. Chemistry Letters(10), 1145-1148.
28. Yoshida, H., 1883. Chemistry of lacquer (urushi). J Chem Soc 43, 472-486.
29. Johannes, C., Majcherczyk, A., 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. Journal of Biotechnology 78(2), 193-199.
30. Kamin, R.A., Wilson, G.S., 1980. Rotating ring-disk enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized enzyme layer. Analytical Chemistry 52(8), 1198-1205.
31. Koppenol, W.H., Butler, J., 1985. Energetics of interconversion reactions of oxyradicals. Advances in Free Radical Biology & Medicine 1(1), 91-131.
32. Koutecky, J., Levich, V., 1958. The use of a rotating disk electrode in the studies of electrochemical kinetics and electrolytic processes. Zh. Fiz. Khim 32, 1565-1575.
33. Kulys, J., Baronas, R., 2006. Modelling of amperometric biosensors in the case of substrate inhibition. Sensors 6(11), 1513-1522.
34. Kulys, J., Čėnas, N., 1988. Fermentinis elektrono pernešimas. Mokslas 172.
35. Kuwahara, T., Asano, T., Kondo, M., Shimomura, M., 2013. Bioelectrocatalytic O2 reduction with a laccase-bearing poly(3-methylthiophene) film based on direct electron transfer from the polymer to laccase. Bioelectrochemistry 91(0), 28-31.
36. Lalaoui, N., Elouarzaki, K., Le Goff, A., Holzinger, M., Cosnier, S., 2013. Efficient direct oxygen reduction by laccases attached and oriented on pyrene-functionalized polypyrrole/carbon nanotube electrodes. Chemical Communications 49(81), 9281-9283.
37. Martinez-Ortiz, J., Flores, R., Vazquez-Duhalt, R., 2011. Molecular design of laccase cathode for direct electron transfer in a biofuel cell. Biosensors and Bioelectronics 26(5), 2626-2631.
38. Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O., Ameyama, M., 1989. Quinoprotein D-glucose dehydrogenase of the Acinetobacter calcoaceticus respiratory chain: membrane-bound and soluble forms are different molecular species. Biochemistry 28(15), 6276-6280.
39. McFarland, A.D., Haynes, C.L., Mirkin, C.A., Van Duyne, R.P., Godwin, H.A., 2004. Color My Nanoworld. Journal of Chemical Education 81(4), 544.

40. Meredith, M.T., Minteer, S.D., 2012. Biofuel cells: enhanced enzymatic bioelectrocatalysis. Annual Review of Analytical Chemistry 5, 157-179.
41. Minteer, S.D., 2010. Enzyme stabilization and immobilization. Methods and Protocols.
42. Moser, C.C., Chobot, S.E., Page, C.C., Dutton, P.L., 2008. Distance metrics for heme protein electron tunneling. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1777(7–8), 1032-1037.
43. Shleev, S., Jarosz-Wilkolazka, A., Khalunina, A., Morozova, O., Yaropolov, A., Ruzgas, T., Gorton, L., 2005a. Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. Bioelectrochemistry 67(1), 115-124.
44. Shleev, S., Tkac, J., Christenson, A., Ruzgas, T., Yaropolov, A.I., Whittaker, J.W., Gorton, L., 2005b. Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. Biosensors and Bioelectronics 20(12), 2517-2554.
45. Solomon, E.I., Sundaram, U.M., Machonkin, T.E., 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. Chemical reviews 96(7), 2563-2606.
46. Stoica, L., Ludwig, R., Haltrich, D., Gorton, L., 2006. Third-Generation Biosensor for Lactose Based on Newly Discovered Cellobiose Dehydrogenase. Analytical Chemistry 78(2), 393-398.
47. Tarasevich, M.R., Yaropolov, A.I., Bogdanovskaya, V.A., Varfolomeev, S.D., 1979. 293 - Electrocatalysis of a cathodic oxygen reduction by laccase. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 6(3), 393-403.
48. Xu, H., Dai, H., Chen, G., 2010. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin protein entrapped in graphene and chitosan composite film. Talanta 81(1–2), 334-338.
49. Zebda, A., Gondran, C., Le Goff, A., Holzinger, M., Cinquin, P., Cosnier, S., 2011. Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes. Nature communications 2, 370.
50. Zhang, W., Li, G., 2004. Third-Generation Biosensors Based on the Direct Electron Transfer of Proteins. Analytical Sciences 20(4), 603-609.
51. Zhou, M., Dong, S., 2011. Bioelectrochemical Interface Engineering: Toward the Fabrication of Electrochemical Biosensors, Biofuel Cells, and Self-Powered Logic Biosensors. Accounts of Chemical Research 44(11), 1232-1243.

PADĖKA

Dėkoju savo darbo vadovui dr. Mariui Dagiui už pagalbą ir vertingus patarimus. Taip pat dėkoju VU Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriui, vadovaujamam dr. Rolando Meškio, už suteiktus fermentus. Taip pat dėkoju Vilniaus universiteto Biochemijos institutui ir Vilniaus Gedimino technikos universiteto Fundamentinių mokslų fakultetui bei jo vadovui prof. habil. dr. Juozui Kuliui už suteiktą infrastruktūrą ir priemones magistro darbui daryti bei visokeriopą pagalbą ir patarimus.

PRIEDAI

Šio magistro darbo pagrindu paruoštas ir pateiktas straipsnis į žurnalą *Electrochimica Acta.* Priede pateikiamas straipsnio rankraštis.

Mediatorless electron transfer in glucose dehydrogenase/laccase system adsorbed on carbon nanotubes

D. Ratautas[a,*], L. Marcinkeviciene[b], R.Meskys[b] , J.Kulys[a]

[a]Vilnius Gediminas Technical University, Sauletekio av.11, Vilnius 10223, Lithuania

[b]Department of Molecular Microbiology and Biotechnology, Institute of Biochemistry, Vilnius University, Mokslininku 12, Vilnius 08662, Lithuania

Abstract

A mediatorless electron transfer in the chain of glucose dehydrogenase (GDH) and laccase (LAC) which catalysed oxidation glucose by molecular oxygen was studied. To demonstrate mediatorless processes the GDH from *Ewingiella americana* was adsorbed on single-walled carbon nanotubes (SWCNT). The effective mediatorless oxidation of glucose proceeded at 0.2–0.4 V *vs.* SCE. The electrode was the most active at pH 6.1 and generated 0.8 mA cm^{-2} biocatalytic current in the presence of 50 mM of glucose. The pH dependence showed bell-shape with pK_a 4.1 and 7.5. LAC from *Trichaptum abietinum* adsorbed on SWCNT exhibited mediatorless oxygen reduction at electrode potential less than 0.65 V. Electrode was the most active at pH 3.0–4.0 and generated 1.1 mA cm^{-2} biocatalytical current in the presence of 0.254 mM of oxygen. Apparent pK_a were 1.0 and 5.4. The electrodes prepared by simultaneous adsorption of GDH and LAC on SWCNT exhibited glucose oxidation at potential higher than 0.25 V.

The oxygen consumption in the chain was demonstrated using Clark type oxygen electrode. The dependence of oxygen consumption on glucose and lactose concentrations as

well as activity on pH were measured. A model of pH dependence as well as mediatorless consecutive glucose oxidation with oxygen catalysed by LAC/GDH system is presented. This work creates the possibilities for the synthesis of artificial multi enzyme systems by wiring oxidoreductases with SWCNT and better understanding of natural electron transfer networks and chains.

Keywords: glucose dehydrogenase; laccase; carbon nanotube; electron transfer.

*Corresponding author: Dalius Ratautas, Tel:+37052744839, Fax: +37052744844.
E-mail: Dalius.Ratautas@vgtu.lt

1. Introduction

Electron transfer is essential for production of energy and metabolites. In living cells electrons are transferred in complex membrane systems like mitochondria or chloroplast [1]. The electrons in these systems are transported directly or by using mediators, i.e. hems, PQQ, NAD, etc., that directly are oxidized-reduced by oxidoreductases in the electron transfer chain. Mediatorless or direct electron transfer (DET), however, requires special structure of active centers of oxidoreductases and strong spatial orientation of their centers in the chain. It has been shown that direct electron transfer distance should be from 0.4 nm to 1.4 nm to ensure sufficient transfer rate [2].

In recent years, DET between enzyme and nanomaterial modified electrodes has been achieved for certain oxidoreductases allowing the production of the third generation biosensors and high effective biofuel cells and thus converting chemical energy into

electricity [3, 4]. Efficient DET has been demonstrated using carbon or SWCNT modified electrodes and, PQQ glucose dehydrogenase [5, 6], laccase [7], and bilirubin oxidase [8], etc. Moreover it has been shown DET is possible between the gold nanoparticles modified electrode and laccase [9], hemoglobin [10], cytochrome *c* [11], glucose oxidase [12], bilirubin oxidase, fructose dehydrogenase [13], etc.

In this work we demonstrate a direct electron transfer via SWCNT between two oxidoreductases – laccase and glucose dehydrogenase in a way that both enzymes catalyze their specific reaction without an addition of the electron acceptor for GDH and the electron donors for laccase and thus utilizing mediatorless electron transfer in glucose dehydrogenase/laccase system.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

SWCNT functionalized with carboxylic acid residues, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ and graphite rods (d=0.3 cm) were obtained from Sigma. H_2SO_4, NaOH and NaF were purchased from Merck. Trisodium citrate-2-hydrate was purchased from Riedel-de Haën. All chemicals were of analytical grade. Buffers and all other solutions were prepared using deionized water (18 MΩ·cm) purified with a Crystal E Ultrapure system from ADRONA SIA. Measurements were performed at 25±0.1°C maintained using Thermo Haake thermostat.

A novel GDH was purified from *Ewingiella americana*. Cells were grown aerobically at 30 °C for 18 h in flasks with 200 ml of media consisted of g/l: yeast extract – 5.0, triptone – 10.0, glucose – 0.5, $MgSO_4$ – 0.1. Cells were harvested at early stationary phase, washed with 5 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, re-suspended in the T buffer (5 mM Tris-HCl buffer, pH

7.5, containing 2 % sacharose, 1 mM Ca^{2+} and 1 mM PMSF) and disrupted by ultrasonic disintegration. The membranes fraction was collected by centrifugation (60,000 *g*, 2 h), suspended in the T buffer with 1 % of Triton X-100 (protein concentration ~8–10 mg/ml). After centrifugation (12,000 *g*, 1 h), the soluble fraction was applied to a DEAE Toyopearl 650M column (16×300 mm, Toyo Soda, Japan) equilibrated with the T buffer containing 0.02 % Triton X-100. The proteins were eluted by the linear gradient of 0 to 0.5 M NaCl in the same buffer. Fractions containing the GDH were collected, supplemented with 0.25 M NaCl and applied to a 20 ml PHE FF column (GE Healthcare, Sweden) equilibrated with the T buffer containing 0.25 M NaCl and 0.02 % Triton X-100. The GDH was eluted by the linear gradient of 0.25 NaCl and 0.02 % Triton X-100 to 0 M NaCl and 1 % Triton X-100. Active fractions were applied to the Source 15Q column (5×250 mm) equilibrated with the T buffer containing 0.02 % Triton X-100 and the GDH was eluted by the linear gradient of 0 to 0.5 M of NaCl in the same buffer. The enzyme was concentrated, dialyzed against the T buffer and stored at –20 °C. The specific activity of the purified GDH was 34±4 U/mg of protein and was measured at pH 6.5 as described in [14]. The solution of GDH (c=13 mg ml^{-1}, 5 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 2 % sacharose, 1 mM Ca^{2+}) was stored at –20 °C. Diluted solutions of GDH were kept at 4 °C.

LAC from *Trichaptum abietinum* was purified as described in [15]. A solution of LAC (c=3.5 mg ml^{-1}, 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0) was stored at –20 °C. Activity of LAC was determined by measuring the oxidation of ABTS to $ABTS^{+}$ (5 mM ABTS in 0.01 M phosphate buffer pH 4.0) at 420 nm (ε_{420} = 36000 M^{-1} cm^{-1}). The k_{cat} of LAC was 390 s^{-1}. Diluted LAC solutions were kept at 4 °C.

2.2 Methods

Two types of electrodes were prepared. The electrodes of the first type were based on graphite rods. Cylindrical side of graphite rod was wrapped by adhesive film and disk side was polished using emery paper. The polished surface was thoroughly rinsed with deionized water. 10 µL of SWCNT solution containing 2 µL of GDH or 2 µL of LAC or 2 µL of GDH and 2 µL of LAC solution was placed on the disk side of the electrode and left to dry at room temperature. The prepared electrodes were named GDH/SWCNT, LAC/SWCNT and GDH-LAC/SWCNT, respectively. The SWCNT solution was prepared by dissolving 2 mg of SWCNT in 1 ml of buffer solution under 8 hours of ultra-sonication.

The second type of electrodes were based on Clark type sensitive to oxygen electrode. 10 µL of SWCNT solution containing 2 µL of GDH and 2 µL of LAC solution was dropped on polyethylene membrane of the oxygen electrode and dried during 1–2 h at room temperature. These types of electrodes were named GDH-LAC/oxygen.

The diameter of the platinum cathode of a homemade oxygen electrode was 3 mm, and the electrode operated at –0.6 V *vs.* Ag/AgCl in 0.1 M KCl and 0.05 M citrate-phosphate buffer pH 4.0.

2.3 Measurements

Electrochemical measurements of the first type electrodes were carried out using three electrode system. Platinum plate (4×4 mm) was used as a counter electrode, saturated calomel electrode (SCE, 0.244 V *vs.* SHE) as a reference electrode. Measurements were carried out using Gamry Reference 600^{TM} potentiostat using cyclic voltammetry (CV) at the scan rate of 5 mV s^{-1} in the 20 mL cell containing 50 mM citrate-phosphate buffer solution.

Oxygen consumption measurements of GDH-LAC/oxygen were carried out in 40 ml of 50 mM citrate-phosphate buffer solution mixed by Teflon disk stirrer (Radiometer, Denmark) at fixed geometrical location to the electrode surface. The concentration of oxygen in air aerated buffer solution was 0.254 mM [16]. The thickness of stagnant layer was measured using 1.6 mm gold electrode (BASi) and 2.5 mM potassium hexacyanoferrate (II) at 0.4 V at the same conditions of solution mixing as in oxygen consumption measurements.

The activity of GDH/SWCNT was measured at pH 4.0–8.1, LAC/SWCNT at pH 2.4–6.7 and GDH-LAC/SWCNT at pH 3.0–5.5, respectively.

3. Results and discussion

3.1 Electrochemical activity of GDH/SWCNT, LAC/SWCNT and GDH-LAC/SWCNT electrodes

The CV of GDH/SWCNT electrode at pH 4.0 did not show any significant electrochemical process in range from -0.2 to 0.4 V *vs.* SCE (Fig.1A). The addition of 50 mM of glucose caused the increase of the anodic current at potential higher than 0 V. The catalytic current increase reached maximum value of 0.65 mA cm^{-2} at 0.4 V (Fig.1A). CV at different concentration of glucose (1–50 mM) were recorded (data not shown). The observed currents at 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 V were fitted to Michaelis-Menten model and apparent constants of K_M were determined 7.0±0.3, 6.7±0.2, 6.6±0.1 and 6.6±0.1 mM of glucose, respectively. Since apparent K_M value depends on applied potential mean K_M value of 6.8 mM was used for modelling. An apparent maximum rate of biocatalysis was calculated as I_{max} and was 0.74±0.08 mA cm^{-2} at 0.4 V.

The CV of LAC/SWCNT electrode at pH 4.0 showed the cathodic current, which increased at 0.65 V and became almost constant at the potential lower than 0.55 V with average value of 1.1 mA cm^{-2} (Fig. 1B). Addition of 6.3 mM NaF resulted in a significant decrease of the current due to the laccase inhibition by fluoride anion [17].

The CV of GDH-LAC/SWCNT electrode at pH 4.0 showed cathodic current (Fig. 1C) at less than 0.54 V. The maximum value of the cathodic current was 0.67 mA cm^{-2} at 0.2 V. The addition of 6.3 mM of NaF caused the decrease of the cathodic current to 0.5 mA cm^{-2} at 0.2 V. The addition of 50 mM of glucose and 6.3 mM of NaF resulted in an increase of the anodic current at the potential higher than 0.32 V with an average current of 0.45 mA cm^{-2}. The generation of the cathodic current was caused by LAC catalysed oxygen reduction. Inhibition of LAC by NaF decreased the activity of LAC and consequently the cathodic current. In the presence of glucose GDH catalysed oxidation of the glucose and the anodic current was generated since the LAC activity was inhibited by NaF.

3.2 The dependence of oxygen consumption by the GDH-LAC/oxygen electrode on glucose concentration

The oxygen consumption of GDH-LAC/oxygen electrode was analysed using Clark type electrode with the Teflon membrane isolating the internal electrolyte from the electrolyte in the cell. Therefore oxygen concentration on the membrane containing the immobilized GDH and LAC on SWCNT was measured.

The presence of 0.1–10.0 mM of glucose at pH 4.0 resulted in a decline of oxygen concentration from 0.254 to 0.16 mM (Fig. 2A). After addition of 6.3 mM NaF oxygen concentration was restored to within the initial range (0.22 mM). The full restoration, possibly, has not been achieved due to an incomplete inhibition of LAC. In control

experiments in the absence of LAC or GDH the decrease of oxygen concentration has not been observed. Besides, the addition of 0.1–10.0 mM of fructose (data not shown) did not result in oxygen consumption by the GDH-LAC/oxygen electrode also. However addition of 0.1–10.0 mM lactose (Fig. 2B) resulted in gradual decrease of oxygen concentration from 0.254 to 0.1 mM since GDH is not glucose-specific enzyme. As expected, the addition of 6.3 mM of NaF resulted in increase of oxygen concentration due to the inhibition of LAC. These results demonstrate that oxygen concentration decrease at the GDH-LAC/oxygen electrode surface was caused by the GDH-catalysed glucose (or lactose) oxidation followed by the transfer of electrons via SWCNT to LAC, which finally reduced oxygen to water. Moreover, the ability of GDH-LAC/oxygen to oxidize lactose (higher activity than glucose) demonstrates possible practical application of this system for the production of lactobionic acid or removal of unwanted lactose from products such as milk.

3.3 The dependence of activity of bioelectrocatalytic systems on pH

GDH/SWCNT, LAC/SWCNT and GDH-LAC/oxygen electrodes demonstrated bell-shape pH dependences with the maximum activities at different pH (Fig. 3A). The highest activity of GDH/SWCNT electrode was at pH 6.1. The biocatalytic current at this pH was 0.8 mA cm^{-2} in the presence of 50 mM of glucose. LAC/SWCNT electrode was the most active at pH 3.0–4.0.

The data of the dependence of activity of electrodes on pH were fitted using a two proton transfer model with three protonated forms of enzymes in the entire pH range [18]. The acid dissociation constants for LAC was named pK_1 and pK_2, whereas for GDH pK_1^* and pK_2^*, respectively. The relative activities of LAC (A) and GDH (A^*) were expressed:

$$A=1/(1+10^{pK_1-pH}+10^{pH-pK_2}) \quad (1)$$

$$A^{*}=1/(1+10^{pK_1^{*}-pH}+10^{pH-pK_2^{*}}) \quad (2)$$

The calculated pK_a values were pK_1=1.0±0.4, pK_2= 5.4±0.1 and pK_1^{*}=4.1±0.1, pK_2^{*}= 7.5±0.1, for LAC and GDH, respectively.

The GDH-LAC/oxygen electrode showed maximal activity at pH 4.2 (Fig. 3A). The pH dependence was analysed following a consecutive substrates conversion scheme as described below.

3.4. Modelling of substrates conversion in dual biocatalytical system

The conversion of substrates in a dual biocatalytical system adsorbed on SWCNT can be described as:

GDH catalysed process:

$$2\ \beta\text{-D-Glucose} \rightarrow 2\ \delta\text{-glucolactone} + 4\ e + 4\ H+ \quad (3)$$

LAC catalysed process:

$$O_2 + 4\ e + 4\ H^{+} \rightarrow 2\ H_2O \quad (4)$$

The electrons are transferred through SWCNT. The steady state rate (V) of substrates conversion is equal:

$$V=v_1 \cdot v_2/(v_1+v_2) \quad (5)$$

where v_1 is GDH and v_2 is LAC reaction rate.

These rates are expressed:

$$v_1=v_m \cdot c_{12}/(K_M+c_{12}) \quad (6)$$

$$v_2=k_s \cdot c_{22} \quad (7)$$

where v_m – a maximal rate of GDH, K_M – an apparent Michaelis-Menten constant, k_s – an apparent heterogeneous laccase constant (calculated in homogeneous solution K_M of LAC for oxygen is higher than oxygen concentration in the solution [19]), c_{12} and c_{22} – glucose and oxygen concentrations on electrode surface.

Glucose and oxygen flux through stagnant (Nernst) layer is equal:

$$J_1=D_1/\delta \cdot (c_{11}-c_{12}) \quad (8)$$

$$J_2=D_2/\delta \cdot (c_{21}-c_{22}) \quad (9)$$

where D_1 and D_2 –diffusion coefficient of glucose and oxygen in stagnant layer, δ – thickness of stagnant layer, c_{11} and c_{21}- glucose and oxygen concentration in bulk solution, respectively.

At steady state condition the glucose and oxygen fluxes are the same and both are equal to V. Therefore the solution of equations (5–9) permits to calculate oxygen concentration on electrode surface as a function of glucose bulk concentration, GDH and LAC activity and other parameters. For calculations following values of parameters were used: v_m=0.92 nmol cm^{-2} s^{-1} calculated that is 4 times less in comparison to GDH/SWCNT

electrode I_{max} (0.74 mA cm^{-2} at 0.4 V), K_M=6.8 mM, $c_{21}=2.54\cdot10^{-4}$ M [16], $D_1=6.7\cdot10^{-6}$ cm^2 s^{-1} [20] and $D_2=2.42\cdot10^{-5}$ cm^2 s^{-1} [20], δ=0.012 cm. The experimentally determined and modelled oxygen consumption calculated as $\tau=(c_{21}-c_{22})/c_{21}$,% (Fig. 3B).

The action of the mediatorless bienzyme system confirmed the pH dependence of the GDH-LAC/oxygen electrode. The pH dependence of activity of this electrode was a function of pH activity of both enzymes (eq. 1, 2). The rate of consecutive process (eq. 5) was used for calculations. The calculations fitted experimentally determined activity of GDH-LAC/oxygen electrode (Fig. 3).

Conclusions

It has been demonstrated that the adsorption of two oxidoreductases on SWCNT allowed an effective electron flow from one to another catalytic centre via a successive mediatorless electron transfer between enzymes and SWCNT during enzymatic glucose or lactose oxidation by oxygen. This phenomenon is a good model for natural electron transfer chains and can be applied for creation of biocatalytical conversion processes replacing native enzyme electron acceptors with oxygen.

Acknowledgements

This work was supported by the Research Council of Lithuania the grant MIP-63/2010.

References

[1] M.E. Hernandez, D.K. Newman, Extracellular electron transfer, CMLS, Cell. Mol. Life Sci., 58 (2001) 1562-1571.

[2] C.C. Moser, S.E. Chobot, C.C. Page, P.L. Dutton, Distance metrics for heme protein electron tunneling, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1777 (2008) 1032-1037.

[3] L. Gorton, A. Lindgren, T. Larsson, F.D. Munteanu, T. Ruzgas, I. Gazaryan, Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors, Analytica Chimica Acta, 400 (1999) 91-108.

[4] S.D. Minteer, B.Y. Liaw, M.J. Cooney, Enzyme-based biofuel cells, Current Opinion in Biotechnology, 18 (2007) 228-234.

[5] D. Ivnitski, P. Atanassov, C. Apblett, Direct bioelectrocatalysis of PQQ-dependent glucose dehydrogenase, Electroanalysis, 19 (2007) 1562-1568.

[6] J. Razumiene, A. Vilkanauskyte, V. Gureviciene, J. Barkauskas, R. Meskys, V. Laurinavicius, Direct electron transfer between PQQ dependent glucose dehydrogenases and carbon electrodes: An approach for electrochemical biosensors, Electrochimica Acta, 51 (2006) 5150-5156.

[7] C. Gutiérrez-Sánchez, W. Jia, Y. Beyl, M. Pita, W. Schuhmann, A.L. De Lacey, L. Stoica, Enhanced direct electron transfer between laccase and hierarchical carbon microfibers/carbon nanotubes composite electrodes. Comparison of three enzyme immobilization methods, Electrochimica Acta, 82 (2012) 218-223.

[8] J. Lim, N. Cirigliano, J. Wang, B. Dunn, Direct electron transfer in nanostructured sol-gel electrodes containing bilirubin oxidase, Physical Chemistry Chemical Physics, 9 (2007) 1809-1814.

[9] M. Dagys, K. Haberska, S. Shleev, T. Arnebrant, J. Kulys, T. Ruzgas, Laccase–gold nanoparticle assisted bioelectrocatalytic reduction of oxygen, Electrochemistry Communications, 12 (2010) 933-935.

[10] H.-Y. Gu, A.-M. Yu, H.-Y. Chen, Direct electron transfer and characterization of hemoglobin immobilized on a Au colloid–cysteamine-modified gold electrode, Journal of Electroanalytical Chemistry, 516 (2001) 119-126.

[11] L. Wang, E. Wang, Direct electron transfer between cytochrome c and a gold nanoparticles modified electrode, Electrochemistry Communications, 6 (2004) 49-54.

[12] S. Zhao, K. Zhang, Y. Bai, W. Yang, C. Sun, Glucose oxidase/colloidal gold nanoparticles immobilized in Nafion film on glassy carbon electrode: Direct electron transfer and electrocatalysis, Bioelectrochemistry, 69 (2006) 158-163.

[13] K. Murata, K. Kajiya, N. Nakamura, H. Ohno, Direct electrochemistry of bilirubin oxidase on three-dimensional gold nanoparticle electrodes and its application in a biofuel cell, Energy & Environmental Science, 2 (2009) 1280-1285.

[14] L. Marcinkevičienė, J. Vaitekūnas, I. Bachmatova, J. Stankevičiūtė, R. Meškys, Biocatalytic process for synthesis of oxidized xylooligosacharides from xylan, CHEMIJA, 25 (2014) 56-61.

[15] L. Tetianec, A. Chaleckaja, R. Vidziunaite, J. Kulys, I. Bachmatova, L. Marcinkeviciene, R. Meskys, Development of a laccase/syringaldazine system for NAD(P)H oxidation, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 101 (2014) 28-34.

[16] W.H. Koppenol, J. Butler, Energetics of interconversion reactions of oxyradicals, Advances in Free Radical Biology & Medicine, 1 (1985) 91-131.

[17] C. Johannes, A. Majcherczyk, Laccase activity tests and laccase inhibitors, Journal of Biotechnology, 78 (2000) 193-199.

[18] R. Ivanec-Goranina, J. Kulys, Kinetic study of peroxidase-catalyzed oxidation of 1-hydroxypyrene. Development of a nanomolar hydrogen peroxide detection system, cent.eur.j.biol., 3 (2008) 224-232.

[19] L. Tetianec, J. Kulys, Kinetics of N-substituted phenothiazines and N-substituted phenoxazines oxidation catalyzed by fungal laccases, cent.eur.j.biol., 4 (2009) 62-67.

[20] W.M. Haynes, D.R. Lide, CRC handbook of chemistry and physics : a ready-reference book of chemical and physical data, CRC Press, Boca Raton, Fla., 2011.

Legends to figures

Figure 1. A: CV of the GDH/SWCNT in the presence (1) and absence (2) of 50 mM of glucose. **B**: CV of LAC/SWCNT with (1) and without (2) of 6.3 mM of NaF. **C**: CV of the GDH-LAC/SWCNT in solution (1), with 6.3 mM NaF (2) and with 6.3 mM NaF and 50 mM glucose (3). pH of solutions was 4.0.

Figure 2. **A:** The change of GDH-LAC/oxygen response (oxygen concentration) following the addition of 0.1, 0.2. 0.5, 1, 2, 5 and 10 mM of glucose (1). An arrow indicates the time of the addition of 6.3 mM NaF. Control experiments without LAC (2) and without GDH (3). **B:** The change of GDH-LAC/oxygen response (oxygen concentration) following the addition of 0.1, 0.2. 0.5, 1, 2, 5 and 10 mM of lactose. An arrow indicates the time of the addition of 6.3 mM NaF. pH of solutions was 4.0

Figure 3. A: The dependence of relative activity of LAC/SWCNT (1), GDH/SWCNT (2) and GDH-LAC/oxygen (3) electrodes on pH. Solid curves show data fitting by the models. **B**: The dependence of oxygen consumption by the GDH-LAC/oxygen electrode on glucose concentration. Solid curve shows data fitting by the model.

Figure 1

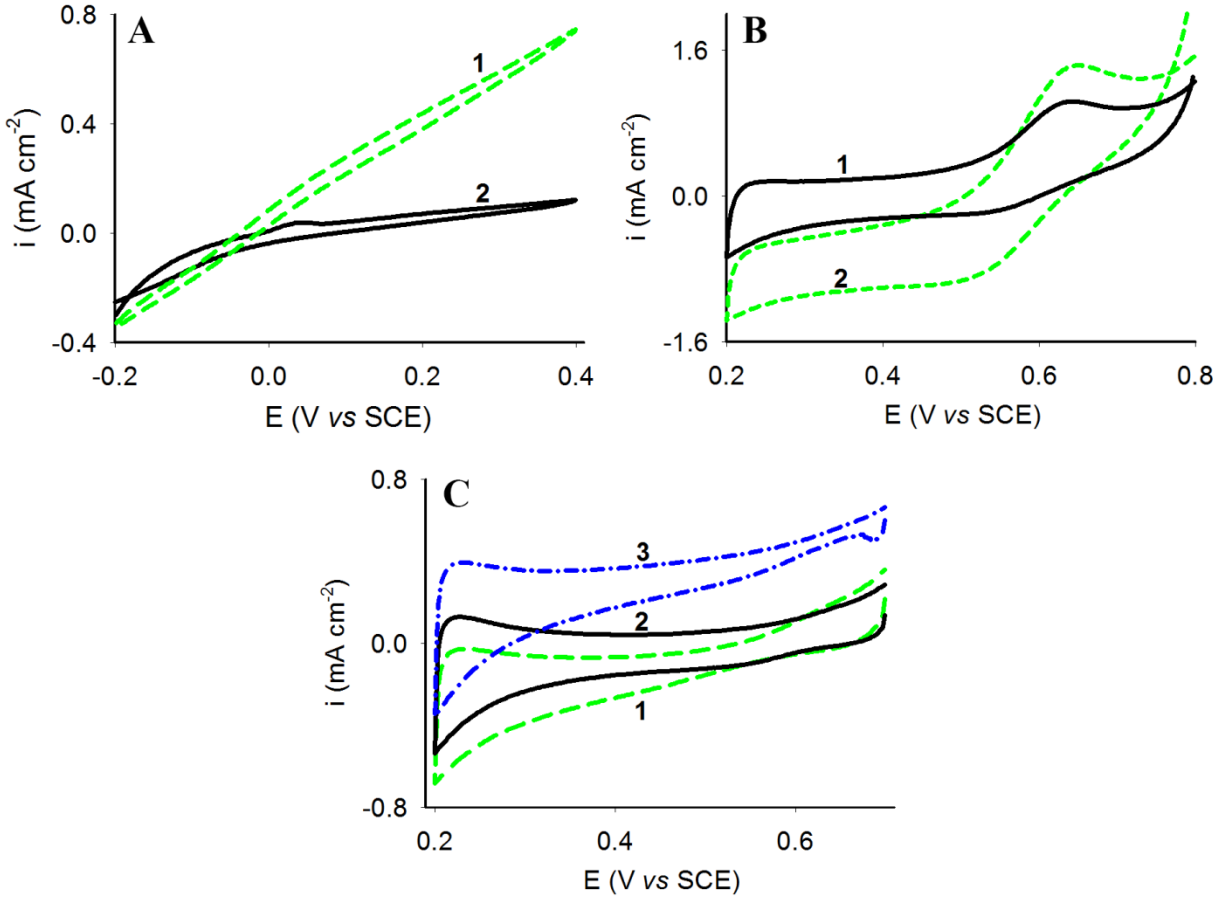


Figure 2

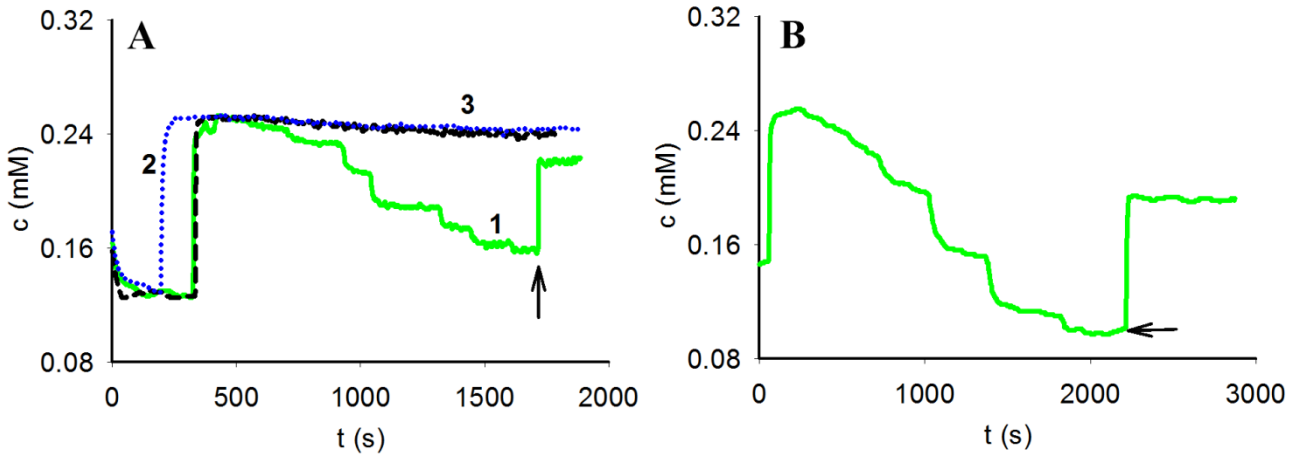


Figure 3

