

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRO
CHEMIJOS INSTITUTAS

VIKTOR MAŽEIKO

**POLIANILINO IR POLIPIROLO, AUKSO NANODALELIŲ
BEI ĮVAIRIŲ ELEKTRONŲ PERNAŠOS TARPININKŲ
TAIKYMAS GLIUKOZĖS BIOLOGINIUOSE
JUTIKLIUOSE**

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, chemija (03 P)

Vilnius, 2015 metai

Disertacija buvo ruošama 2010 – 2014 metais Vilniaus universitete, Chemijos fakultete, Analizinės ir aplinkos chemijos katedroje.

Mokslinė vadovė - doc. dr. Asta Kaušaitė–Minkštimienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03 P)

TURINYS

| | |
|--|-----------|
| SANTRUMPOS | 6 |
| 1. ĮVADAS | 8 |
| 2. LITERATŪROS APŽVALGA..... | 13 |
| 2.1 Biologiniai jutikliai..... | 13 |
| 2.2 Gliukozės biologiniai jutikliai | 15 |
| 2.3 Elektronų pernešimo tarpininkai | 17 |
| 2.4 Fenazino metosulfatas | 18 |
| 2.5 Kiti elektronų pernašos tarpininkai | 19 |
| 2.6 π - π konjuguoti polimerai | 20 |
| 2.7 Fermentinė KP sintezė..... | 22 |
| 2.8 KP taikymas biologiniuose jutikliuose..... | 22 |
| 2.9 Polianilinas | 23 |
| 2.10 Polipirolas..... | 26 |
| 2.11 Fermentai..... | 28 |
| 2.12 Michaelio–Menten kinetika..... | 31 |
| 2.13 Fermentų imobilizavimo elektrodo paviršiuje būdai | 32 |
| 2.14 Gliukozės oksidazė..... | 34 |
| 2.15 Aukso nanodalelių taikymas fermentiniuose biologiniuose jutikliuose..... | 35 |
| 3. DARBO METODAI | 38 |
| 3.1 Reagentai ir tirpalai | 38 |
| 3.2 Grafito elektrodo paruošimas | 39 |
| 3.3 Grafito elektrodo modifikavimas gliukozės oksidaze..... | 39 |
| 3.5 Grafito elektrodo modifikuoto gliukozės oksidaze padengimas polipirolo sluoksniu..... | 40 |
| 3.6 Aukso nanodalelių dalelių sintezė..... | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 3.7 Į polianilino sluoksnį įterptų gliukozės oksidazės bei gliukozės oksidazės ir aukso nanodalelių struktūrų sintezė | 41 |
| 3.8 Grafito elektrodų modifikuotų kompozitiniemis dalelėmis paruošimas | 41 |
| 3.9 Elektronų pernašos tarpininkais ir gliukozės oksidaze modifikuotų grafito elektrodų paruošimas..... | 42 |
| 3.10 Elektronų pernašos tarpininkų ir gliukozės oksidazės mišiniu modifikuotų grafito elektrodų paruošimas | 42 |
| 3.11 Elektrocheminių matavimų sąlygos | 42 |
| 3.12 Ciklinės amperometrijos matavimo sąlygos..... | 44 |
| 3.13 Sąlygos elektrodų stabilumo tyrimams | 44 |
| 3.14 Tyrimai atominių jėgų mikroskopu | 44 |
| 3.15 Tyrimai skenuojančiu elektronų mikroskopu..... | 45 |
| 3.16 Spektrofotometriniai tyrimai | 45 |
| 3.17 Tyrimai optiniu mikroskopu..... | 46 |
| 4. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS..... | 47 |
| 4.1 PANI sintezė tirpale | 47 |
| 4.2 Grafito elektrodų paviršiuje imobilizuotos GOx įterpimas į PANI sluoksnį | 50 |
| 4.3 Įterptos į PANI sluoksnį GOx kinetinių savybių tyrimai | 53 |
| 4.4 Elektrodų paviršiaus tyrimai SEM ir AJM..... | 58 |
| 4.5 PANI įtaka gliukozės biologinio jutiklio parametrams | 62 |
| 4.6 Polianilino įtaka terminiam gliukozės jutiklio stabilumui | 64 |
| 4.7 Biologinio jutiklio analizinio signalo pakartojamumo tyrimai | 68 |
| 4.8 Jutiklio jautris pašalinėms medžiagoms | 70 |
| 4.9 PPY ir PANI įtakos jutiklio charakteristikoms palyginimas..... | 72 |
| 4.10 AuND taikymas gliukozės biologiniame jutiklyje | 81 |
| 4.11 Elektronų pernašos tarpininkų tyrimas..... | 88 |
| IŠVADOS..... | 97 |
| PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA..... | 99 |

| | |
|--|------------|
| PRANEŠIMŲ MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE TEZĖS | 100 |
| NAUDOTA LITERATŪRA | 103 |

SANTRUMPOS

5,6-DAP – 5,6-diamino-1,10-fenantrolinas;

Ag/AgCl/Cl⁻ – sidabro chloridinis elektrodas;

AJM – atominių jėgų mikroskopas;

ATP – adenzin-5'-trifosfatas;

AuND – aukso nanodalelės;

A-PBS – acetatinis fosfatinis buferis;

BAM – biologiškai aktyvi medžiaga;

ELP – elektrai laidūs polimerai;

EPT – elektronų pernešimo tarpininkas;

FAD – flavino adenino dinukleotidas;

FMS – fenazino metosulfatas;

GA – gliutaro aldehidas;

GOx – gliukozės oksidazė;

(GOx)PANI – gliukozės oksidazė įterpta į polianilino sluoksnį;

(GOx/AuND)PANI – gliukozės oksidazė ir aukso nanodalelės įterptos į polianilino sluoksnį;

GR – modifikavimui paruoštas grafito elektrodas;

GR/(GOx)PANI – grafito elektrodas modifikuotas polianilino sluoksnyje įterptos gliukozės oksidazės dalelėmis;

GR/(GOx/AuND)PANI – grafito elektrodas modifikuotas polianilino sluoksnyje įterptomis aukso nanodalelių ir gliukozės oksidazės dalelėmis;

GR/GOx – gliukozės oksidaze modifikuotas grafito elektrodas;

GR/GOx/PANI – gliukozės oksidaze ir polianilino sluoksniu modifikuotas grafito elektrodas;

GR/GOx/PPY – gliukozės oksidaze ir pilipirolo sluoksniu modifikuotas grafito elektrodas;

GR/M/GOx – grafito elektrodas modifikuotas elektronų pernašos tarpininku ir gliukozės oksidaze;

GR/M-GO_x – grafito elektrodas modifikuotas elektronų pernašos tarpininko ir gliukozės oksidazės mišinio sluoksniu.

GTP – guanozin-5'-trifosfatas;

I_{max} – soties srovės stipris;

K_M – Michaelo konstanta;

Kontrolinis elektrodas 1 – gliukozės oksidaze modifikuotas grafito elektrodas tam tikram laikui pamerktas į buferinį tirpalą su gliukoze;

Kontrolinis elektrodas 2 – gliukozės oksidaze modifikuotas grafito elektrodas tam tikram laikui pamerktas į buferinį tirpalą su anilinu;

KP – π - π konjuguoti polimerai;

MB – metileno mėlis;

PANI – polianilinas;

PPY – polipirolas;

SAM – savitvarkis monosluoksnis;

SEM – skenuojantis elektroninis mikroskopas;

TB – toluidino mėlynasis;

TCNQ – tetracianochinondimetanas;

TEP – tiesioginė elektronų pernaša;

TTF – tetratiofulvalenas;

TTF-TCNQ – tetratiofulvaleno-tetracianochinondimetano kompleksas;

UTP – uridin-5'-trifosfatas;

1. ĮVADAS

Cukrinis diabetas (*Diabetes mellitus*) arba cukraligė – tai visuma metabolinių sutrikimų, kuriuos sukelia suprastėjęs organizmo gebėjimas sintetinti insuliną ir taip panaudoti organizme esančią gliukozę. Pasaulyje cukriniu diabetu serga apie 100 mln. žmonių ir jų skaičius vis didėja. Šiam sveikatos sutrikimui diagnozuoti ir gydyti reikalingas tikslus bei greitas gliukozės koncentracijos kraujyje nustatymo būdas. Biologiškai aktyvių analičių kiekio nustatymui sudėtingos matricos mėginiuose (kraujyje, kraujo serume, šlapime, kituose organizmo skysčiuose) puikiai tinka elektrocheminiai biologiniai jutikliai. Nuo 1962 metų, kai buvo sukonstruotas pirmasis gliukozės biologinis jutiklis [1], buvo atlikta gausybė mokslinių tyrimų, skirtų gliukozės nustatymui *in vitro* ir *in vivo* [2]. Šiuo metu biologiniai jutikliai dėl trumpos analizės trukmės, didelio atrankumo ir jautrio analizei [3], paprastos bei pigios analizės [4] plačiai naudojami maisto ir gėrimų pramonėje, gamtinių objektų analizėje bei medicinoje [5].

Dėl paprastos konstrukcijos amperometriniai biologiniai jutikliai yra bene plačiausiai naudojami. Konstruojant tiek amperometrinius, tiek ir kitus elektrocheminius biologinius jutiklius vienas iš svarbiausių etapų yra fermento imobilizavimas elektrodo paviršiuje. Pasiūlyta įvairių imobilizavimo būdų naudojant fizikinę adsorbciją, pagavą gelio matricoje, surišimą difunkciniais junginiais ar savitvarkius monosluoksnius [6]. Fermentinio elektrodo charakteristikos priklauso nuo biologiškai aktyvios medžiagos (BAM) imobilizavimo būdo bei imobilizavimo metu susidariusio BAM sluoksnio prigimties ir storio [7]. Tinkamai imobilizavus fermentą elektrodo paviršiuje sumažinama analizės kaina, nes tokius elektrodus galima naudoti pakartotinai, sudaroma galimybė reguliuoti katalizines fermento savybes. Kuriant naujas imobilizavimo metodikas siekiama pagerinti jutiklių jautrį, analizinio signalo pakartojamumą, praplėsti analizės nustatymo ribas bei pailginti jutiklio naudojimo laiką.

Konstruojant amperometrinius biologinius jutiklius daug privalumų ir naujų galimybių atveria π - π konjuguotų polimerų (KP) panaudojimas [8], nes šie polimerai yra tinkami įvairių fermentų imobilizavimui [9]. Vieni iš svarbiausių ir plačiausiai tyrinėjamų KP yra polianilinas (PANI) ir polipirolas (PPY). Šie polimerai suteikia stabilią ir porėtą matricą fermento imobilizavimui, palengvina elektronų pernašą nuo fermento aktyvaus centro iki elektrodo paviršiaus [10] bei pasižymi biosuderinamumu [11]. Fermento įterpimas į polimerinį sluoksnį apsaugo fermentą nuo išsiplovimo, tačiau dėl šio sluoksnio pralaidumo analizei katalizinėmis savybėmis pasižyminčių sričių prieinamumas išlieka [12]. Be to, dėl difuzinių apribojimų ženklus Michaelio konstantos (K_M) padidėjimas sąlygoja reikšmingą jutiklio analizinio signalo priklausomybės nuo analitės koncentracijos tiesinio intervalo padidėjimą [13]. KP tradiciškai sintetunami elektrocheminės arba cheminės oksidacinės sintezės būdais, tačiau abu šie būdai pasižymi tam tikrais trūkumais, todėl šiame darbe buvo pasirinktas fermentinės KP sintezės būdas.

Tinkamas elektrodo paviršiaus paruošimas ir biologiškai aktyvios medžiagos imobilizavimas yra labai svarbus žingsnis konstruojant biologinius jutiklius. Sparčiai augantis įvairių nanodarinių naudojimas, siekiant padidinti elektrodo paviršiaus plotą ir pagerinti elektrinį laidį, modifikuojant elektrodus skirtingo dydžio tauriųjų metalų nanodalelėmis arba anglies nanovamzdeliais, sąlygoja platesnį ir efektyvesnį biologinių jutiklinių panaudojimą aplinkosaugoje, maisto pramonėje bei klinikiniuose tyrimuose [14,15]. Šiame darbe pademonstruota skirtingo dydžio aukso nanodalelių (AuND) įtaka gliukozės oksidazės (GOx) katalizuojamai PANI sintezei bei gliukozės biologinio jutiklio analiziniams parametrams.

Pastaruoju metu, siekiant pagerinti minėtas gliukozės jutiklių charakteristikas bei sukurti bereagentinius jutiklius, papildomai naudojamos organinės ir neorganinės kilmės medžiagos užtikrinančios elektronų pernašą nuo fermento aktyviojo centro iki elektrodo paviršiaus – elektronų pernašos tarpininkai (EPT). Nepaisant didžiulio šia tema atliekamų tyrimų ir publikuojamų

darbų kiekio naudojant skirtingus EPT [16,17,18,19], nėra aiškus jų veikimo palyginimo bei konkrečiai analizinei sistemai daromos įtakos įvertinimo. Todėl šiame darbe buvo palyginti keletas plačiausiai naudojamų EPT, įvertinta jų įtaka gliukozės biologinio jutiklio analiziniam signalui bei iširtos pagrindinės analizinės charakteristikos panaudojant tinkamiausius EPT.

Darbo tikslas:

Pritaikyti π - π konjuguotus polimerus polianiliną ir polipirolą, aukso nanodaleles bei įvairius elektronų pernašos tarpininkus amperometriniuose gliukozės biologiniuose jutikliuose.

Darbo uždaviniai:

- Iširti polianilino ir polipirolo susidarymą bei padengti jų sluoksniu gliukozės oksidazę imobilizuotą grafito elektrodų paviršiuje;
- Iširti bei palyginti polianilino ir polipirolo sluoksnio įtaką amperometrinių gliukozės biologinių jutiklių analizinėms charakteristikoms;
- Susintetinti gliukozės oksidazės bei gliukozės oksidazės ir aukso nanodalelių įterptų į polianilino sluoksnį nanokompozitines struktūras ir iširti aukso nanodalelių įtaką polianilino susidarymo greičiui;
- Iširti bei palyginti nanokompozitinių struktūrų įtaką amperometrinių gliukozės biologinių jutiklių analizinėms charakteristikoms;
- Iširti skirtingų elektronų pernašos tarpininkų imobilizuotų grafito elektrodų paviršiuje įtaką amperometrinio gliukozės biologinio jutiklio analizinėms charakteristikoms.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

- Polipirolo ir polianilino sluoksnis suformuotas grafito elektrodų, modifikuotų gliukozės oksidaze, paviršiuje praplečia amperometrinio gliukozės biologinio jutiklio analizinio signalo tiesinės priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos intervalą, padidina stabilumą bei pagerina analizinio signalo pakartojamumą;
- Aukso nanodalelės ne tik padidina anilino fermentinės polimerizacijos reakcijos greitį, bet ir būdamos gliukozės oksidazės ir polianilino nanokompozitinių struktūrų sudėtyje, vykstant fermentinei gliukozės oksidacijai, užtikrina efektyvesnę elektronų pernašą nuo gliukozės oksidazės redoks centro flavino adenino dinukleotido iki elektrodo, ir tokiu būdu padidina biologiniu jutikliu registruojamą analizinį signalą;
- Elektronų pernašos tarpininkai tetratiofulvalenas, fenazino metosulfatas, 5,6-diamino-1,10-fenantrolinas, tetratiofulvaleno-tetracianochinondimetano kompleksas, metileno mėlis, toluidino mėlynasis ir kalio heksacianoferatas imobilizuoti grafito elektrodų paviršiuje įgalina efektyvią elektronų pernašą nuo gliukozės oksidazės redoks centro iki elektrodo paviršiaus. Efektyviausia elektronų pernaša pasižymi tetratiofulvalenas ir tetratiofulvaleno-tetracianochinondimetano kompleksas.

Mokslinis darbo naujumas:

- Pasiūlytas fermentinis π - π konjuguotų polimerų sintezės būdas pagrįstas gliukozės oksidazės katalizuojama gliukozės oksidacijos molekulinio deguonimi iki vandenilio peroksido ir gliukonolaktono, kuris spontaniškai hidrolizuojasi iki gliukono rūgšties, reakcija. Šiame darbe katalizinis gliukozės oksidazės aktyvumas buvo panaudotas pirolo ir anilino polimerizacijai. Parodyta, kad tirpale esant gliukozei ir ištirpusiam deguoniui

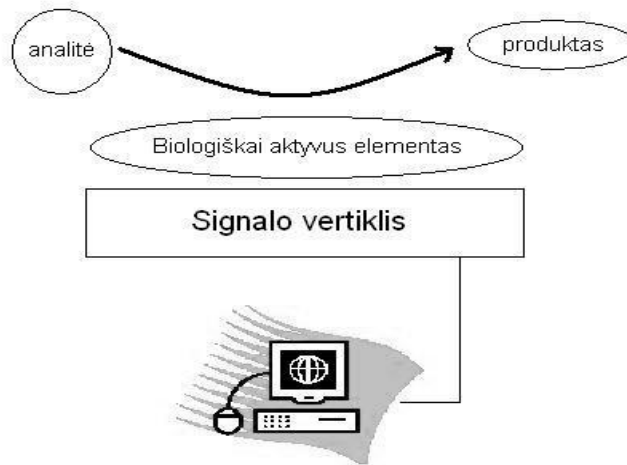
fermento katalizuojamos reakcijos metu susidaręs stiprus oksidatorius vandenilio peroksidas bei gliukono rūgštis sudaro sąlygas polimerizacijos reakcijai vyksmui;

- Pademonstruota galimybė polianilino ir polipirolo sluoksniu padengti gliukozės oksidaze modifikuotų grafito elektrodų paviršius ir susintetinti gliukozės oksidazės įterptos į polianilino sluoksnį bei gliukozės oksidazės ir aukso nanodalelių įterptų į polianilino sluoksnį nanokompozitines struktūras. Ištirta ir palyginta polimerinio sluoksnio bei nanokompozitinių struktūrų įtaką amperometrinių gliukozės biologinių jutiklių pagrindinėms analizinėms charakteristikoms;
- Parodyta, kad polimeriniu sluoksniu padengiant gliukozės oksidaze modifikuotų grafito elektrodų paviršius galima keisti imobilizuoto fermento kinetinius parametrus ir konstruoti biologinius jutiklius gebančius detektuoti gliukozės kiekį platesniame koncentracijų intervale;
- Pademonstruota, kad aukso nanodalelės ne tik padidina polianilino susidarymo greitį, bet ir būdamos gliukozės oksidazės ir polianilino nanokompozitinių struktūrų sudėtyje pasižymi elektronų pernašos tarpininkų savybėmis. Tai daro teigiamą įtaką elektronų pernašai nuo fermento redoks centro iki elektrodo paviršiaus ir pagerina biologinio jutiklio jautrį;
- Palygintas grafito elektrodų paviršiuje imobilizuotų elektronų pernašos tarpininkų tetratiofulvaleno, fenazino metosulfato, metileno mėlio, 5,6-diamino-1,10-fenantrolino, tetratiofulvaleno-tetracianochinondimetano komplekso, toluidino mėlynojo ir kalio heksacianoferato gebėjimas pernešti elektronus nuo gliukozės oksidazės redoks centro iki grafito elektrodo paviršiaus. Efektyviausia elektronų pernaša pasižymėjusių elektronų pernašos tarpininkų tetratiofulvaleno ir tetratiofulvaleno-tetracianochinondimetano komplekso pagrindu sukonstruoti ir ištirti bereagentiniai amperometriniai gliukozės jutikliai.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1 Biologiniai jutikliai

Biologinis jutiklis – tai daugiakomponentė sistema, sudaryta iš biologiškai aktyvaus elemento (BAM) atpažįstančio norimą analitę ir sąveikaujančio su ja, signalo vertiklio, kuris paverčia BAM sąveikos su analite signalą elektriniu signalu ir signalą registruojančio įrenginio (pav. 2.1).



Pav. 2.1 Principinė biologinio jutiklio schema.

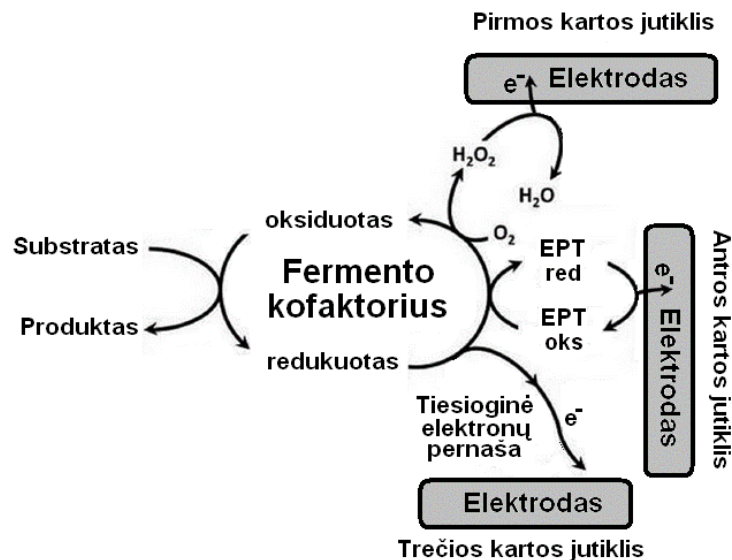
Pagal BAM sąveiką su analite skiriamos dvi pagrindinės biologinių jutiklių grupės [20]. Pirmoji grupė – kataliziniai biologiniai jutikliai. Šiai grupei priskiriami jutikliai, kurių biologiškai aktyvus elementas pasižymi katalizinėmis savybėmis. Šio tipo biologiniuose jutikliuose BAM naudojami fermentai, fermentų turinčios biologinės kilmės medžiagos arba išstisos ląstelių membranos, kurių paviršiuje yra katalizinėmis savybėmis pasižyminčių junginių. Antrajai jutiklių grupei priskiriami afiniškumo biologiniai jutikliai. Šios analizinės sistemos yra skirtos identifikuoti arba nustatyti analitės koncentraciją, panaudojant biologinės kilmės medžiagas, pasižyminčias afiniškumu nustatomi analitei. Šio tipo biologiniuose jutikliuose BAM naudojami antikūnai, viengrandės DNR fragmentai, RNR, receptoriai ir kitos afiniškumu pasižyminčios medžiagos.

Yra įvairių biologinių jutiklių signalo registravimo būdų. Pagal sistemos naudojimo ypatumus bei poreikius galima pasirinkti elektrocheminį ar elektromagnetinį signalo registravimo būdą. Galima naudoti kvarco kristalo osciliatorius, akustinių bangų įrenginius, paviršiaus plazmonų rezonanso analizatorius bei bendrosios paskirties elektrochemines sistemas [20]. Iš visų išvardintų signalo registravimo būdų, konstruojant biologinius jutiklius, dažniausiai taikomas elektrocheminis signalo registravimo būdas. Šio būdo, lyginant su kitais signalo registravimo būdais, privalumai yra maža analizės kaina, didelis jautris, patikimumas bei galimybė rinktis iš kelių detekcijos metodų (voltamperometrijos, potenciometrijos, kulonometrijos ar konduktometrijos).

Amperometriniai biologiniai jutikliai registruoja elektrocheminės sistemos srovės stiprį, atsiradantį dėl biocheminės ir elektrocheminės reakcijų, esant pastoviam indikatorinio elektrodo potencialui. Analizinio signalo registravimui dažniausiai naudojama trielektrodė elektrocheminė celė, kurią sudaro mažo paviršiaus ploto lengvai poliarizuojamas indikatorinis elektrodas ir didelio paviršiaus ploto nesipoliarizuojantys pagalbinis ir lyginamasis elektrodai. Lyginamuoju elektrodu dažniausiai naudojamas sidabro chloridinis ($\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$) arba kalomelio elektrodas. Indikatorinis ir pagalbinis elektrodai turi būti chemiškai inertiški. Jais dažniausiai naudojami Au, Pt, grafitas. Tokios analizinės sistemos veikimas labiausiai priklauso nuo indikatorinio elektrodo paviršiuje imobilizuotos BAM (pvz., fermento) savybių, bei naudojamos biocheminio signalo registravimo įrangos [21,22,23].

Pagal elektronų, nuo fermento aktyviojo centro elektrodui, perdavimo principą amperometriniai biologiniai jutikliai skirstomi į tris kartas. Pirmos kartos jutikliuose elektrochemiškai registruojami fermentinėje reakcijoje dalyvaujantys substratai arba susidarantys produktai. Antros kartos jutikliuose elektrochemiškai detektuojamas sintetinis elektronų akceptorius arba donoras – elektronų pernešimo tarpininkas (EPT). Trečios kartos jutikliuose elektronų pernaša nuo fermento aktyviojo centro iki elektrodo vyksta tiesiogiai. Visų trijų kartų jutiklių elektronų

pernašos schema pavaizduota pav. 2.2. Plačiai naudojami antrosios kartos jutikliai, bet trečiosios kartos yra patraukliausi, nes analizės metu nereikia papildomai pridėti EPT. Be trijų pagrindinių biologinių jutiklių kartų šiuo metu yra išskiriama ir ketvirtoji biologinių jutiklių karta, kuriuos konstruojant panaudojamos nanomedžiagos [24].



Pav. 2.2 Amperometrinių biologinių jutiklių kartos

Amperometriniai biologiniai jutikliai yra patikimi, pigūs ir jautrūs analitėms esančioms įvairiuose maisto produktų, gėrimų, klinikiniuose bei biologinės kilmės mėginiuose [25,26].

2.2 Gliukozės biologiniai jutikliai

Gliukozės biologiniai jutikliai užima svarbią vietą pasaulinėje rinkoje dėl diabeto paplitimo, kuris yra pasaulinės reikšmės sveikatos problema. Kiekvienam sergančiajam diabetu būtina pastoviai stebėti gliukozės koncentraciją kraujyje. Tai lėmė spartų gliukozės jutiklių tyrinėjimo bei konstravimo sferos augimą. Dauguma komerciškai prieinamų gliukozės jutiklių yra amperometriniai biologiniai jutikliai su indikatorinio elektrodo paviršiuje imobilizuotu fermentu, kuris reaguoja į substratą – gliukozę, esančią tiriamojoje terpėje. Nors yra kelios

fermentų rūšys skaidančios gliukozę kaip pagrindinį substratą [27], labiausiai biologinių jutiklių konstravimui tinkamos yra gliukozės oksidazės. Pagrindinis jų privalumas – pakankamai didelis stabilumas, todėl gliukozės jutikliai su imobilizuotomis GOx plačiai tyrinėjami iki šiol [28,29,30].

Rutininei gliukozės koncentracijos kraujyje analizei dažniausiai gaminami pirmos kartos fermentiniai gliukozės jutikliai, kurių veikimas pagrįstas GOx katalizuojamos gliukozės oksidacijos ištirpusiu deguonimi metu susidarančio H₂O₂ amperometriniu detekcija esant indikatorinio elektrodo potencialui > +600 mV (Ag/AgCl/Cl⁻ lyginamojo elektrodo atžvilgiu) [31,32] arba antros kartos, kuriuos konstruojant naudojami įvairūs EPT [33]. Jų naudojimas leidžia analizę atlikti esant žymiai mažesniai indikatorinio elektrodo potencialui. Indikatoriniais elektrodais dažniausiai naudojami grafito [34,35] arba tauriųjų metalų [36,37] elektrodai. GOx gali būti imobilizuota elektrodo paviršiuje arba uždengta kokia nors pusiau pralaidžia membrana, neišleidžia jos iš prielektrodinio sluoksnio. Šiuo metu tyrinėjamos įvairios membranos skirtos ne tik apsaugoti elektrodo paviršiuje imobilizuotą GOx [38,39], bet ir membranos, galinčios pagerinti jutiklio atrankumą sumažinant nepageidaujamų medžiagų (askorbo bei urino rūgščių), kurios kartu su gliukoze dalyvauja oksidacijos-redukcijos reakcijose ir tokiu būdu iškreipia analizinį signalą, pralaidumą pro apsauginę membraną [40].

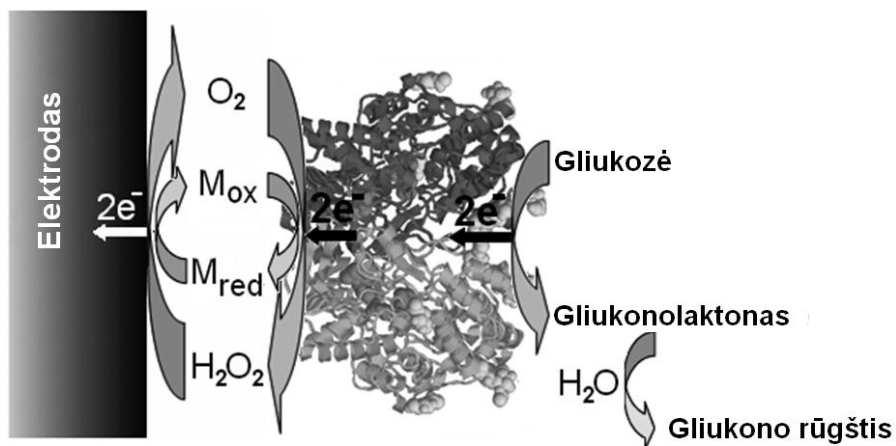
Bene perspektyviausi būtų bereagenčiai (antros kartos kai EPT imobilizuotas elektrodo paviršiuje) arba trečios kartos biologiniai jutikliai, nes jie galėtų būti naudojami keletą kartų be papildomo EPT pridėjimo prieš kiekvieną tyrimą, o trečios kartos biologinių jutiklių atveju elektronai būtų pernešami tiesiogiai nuo fermento aktyviojo centro elektrodai. Tačiau tiesioginėje elektronų pernašoje (TEP) nėra lengvai pasiekama, nes paprastai atstumas nuo fermento aktyvaus centro iki fermento globulės išorės yra per didelis, kad elektronai galėtų „pereiti“ nuo fermento aktyviojo centro iki elektrodo. Pavyzdžiui, gliukozės oksidazės molekulės diametras yra 8,6 nm, o didžiausi atstumai, kuriuos

elektronas įveikia esant 0,3 V indikatorinio elektrodo potencialui yra 0,8 – 1,7 nm. Todėl tokiems jutikliams konstruoti geriausiai tinka tokie fermentai, kurių kofaktorius arba kitos elektrochemiškai aktyvios grupės, galinčios dalyvauti TEP, yra pakankamai arti fermento globulės paviršiaus. Tokių fermentų nėra daug. TEP buvo pastebėta tarp Au elektrodo ir laukinių krienų peroksidazės, GOx ir chemiškai modifikuoto grafito elektrodo ir dar keleto fermentų ir elektrodų.

2.3 Elektronų pernešimo tarpininkai

Konstruojant biologinius jutiklius dažnai susiduriama su problema, kuomet neįmanoma išmatuoti nei substrato, nei reakcijos produkto koncentracijos. Tokiais atvejais naudojami EPT – įvairūs organinės arba neorganinės kilmės junginiai, galintys lengvai ir greitai oksidacijos-redukcijos reakcijos metu paimiti ir atiduoti elektronus. Todėl dažniausiai naudojamos mažos molekulinės masės molekulės, galinčios lengvai pasiekti fermento aktyvųjį centrą bei esant nedideliame elektrocheminiame potencialui virsti iš oksiduotos formos į redukuotą ir atvirkščiai. EPT dažnai naudojami kalio heksacianoferatas, fenazino metosulfatas, ferocenas, chinonai ir kiti.

Dalyvaujančių oksidacijos-redukcijos reakcijoje junginių koncentracijos pokyčiai prie elektrodo lengvai nustatomi amperometriškai arba potenciometriškai. Panaudojant EPT siekiama pagerinti ir pagreitinti elektronų pernašą nuo fermento aktyviojo centro iki elektrai laidaus elektrodo sluoksnio, pvz. aukso, platinos, grafito bei grafito pastos elektrodų paviršiaus [41] arba elektrai laidžių polimerų [42,43]. Tokia elektronų pernaša gali būti pavaizduota schema (pav. 2.3), kur substrato oksidacijos metu redukuotas fermento kofaktorius oksiduojamas EPT. Pastarajam atiduodant elektronus indikatoriniam elektrodui registruojamas elektrocheminio signalo pokytis.

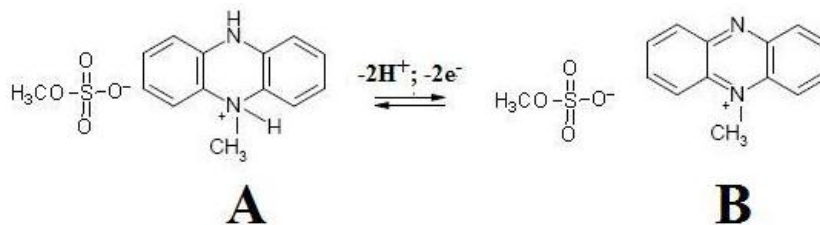


Pav. 2.3 EPT panaudojimo biologiniame jutiklyje schema.

EPT plačiai naudojami ir tais atvejais, kuomet galima nustatyti substrato arba reakcijos produktų koncentracijas. EPT panaudojimas tokiems atvejais leidžia pagreitinti elektronų pernašą bei sustiprinti analizinį signalą tuo pagerinant analizinės sistemos jautrį. Taip pat leidžia sumažinti indikatoriniam elektrodui suteikiamą potencialą ir tokiu būdu sumažinti kitų reakcijos terpėje esančių pašalinių medžiagų įtaką analiziniam signalui.

2.4 Fenazino metosulfatas

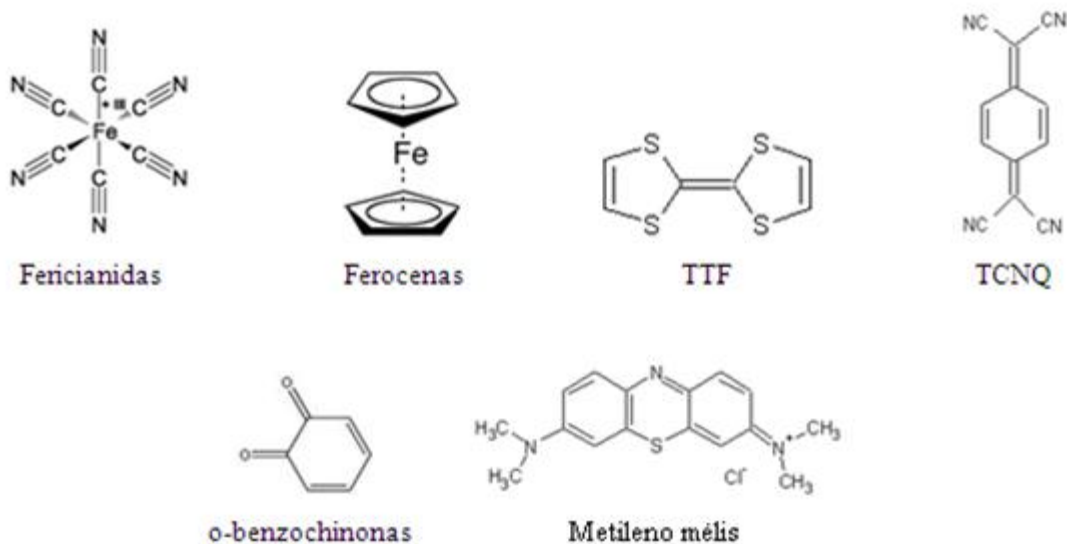
Vienas EPT pavyzdžių yra fenazino metosulfatas (FMS), kuris dažnai naudojamas atliekant fermentinių biologinių jutiklių tyrimus. Šis EPT atitinka visus pagrindinius reikalavimus keliamus EPT, nors ir yra jautrus šviesai. Oksiduota ir redukuota FMS formos pavaizduotos pav. 2.3. Fenazino metosulfatas dažniausiai naudojamas kaip tirpus EPT, bet taip pat gali būti įterptas į polimero sluoksnį [44] ar adsorbuotas elektrodo paviršiuje.



Pav. 2.4 Fenazino metosulfato redukuota (A) ir oksiduota (B) formos.

2.5 Kiti elektronų pernašos tarpininkai

Konstruojant biologinius gliukozės jutiklius plačiai naudojami ir kiti EPT. Visais atvejais tokiems EPT taikomi bendri reikalavimai: turi pasiekti fermento aktyvųjį centrą ir jį oksiduoti, paties EPT oksidacijos redukcijos reakcija turi būti greita, kuo mažiau nuo terpės pH priklausantis redokso potencialas, EPT turi būti stabilus visose redoks formose, nedalyvauti pašalinėse redokso reakcijose, pageidautinas kuo mažesnis toksiškumas[45,46]. Šiuos reikalavimus puikiai atitinka tokie EPT kaip fericianidas, ferocenas, tetratiofulvalenas (TTF), tetratiofulvaleno-tetracianochinondimetano kompleksas (TTF-TCNQ), chinono bei fenotiazino junginiai [47]. Šių junginių struktūra pateikta pav. 2.5.



Pav. 2.5 Dažnai naudojamų EPT struktūros.

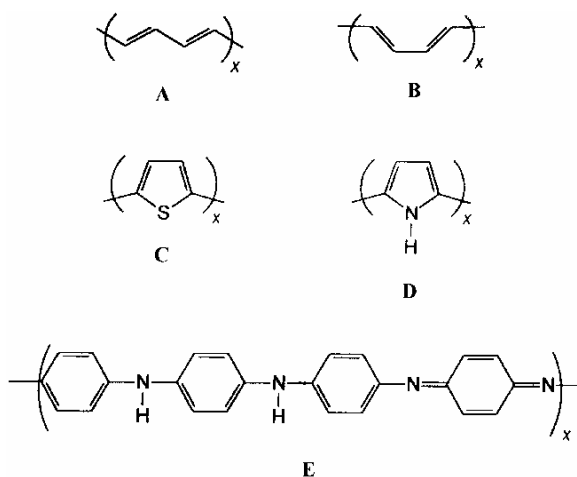
Kaip alternatyva geležies darinių EPT (fericianido, feroceno) gliukozės biologiniuose jutikliuose gali būti naudojamas TTF [48]. Šis EPT taip pat naudojamas askorbo rūgšties [49], pieno rūgštis [50], glutamino ir glutamo rūgščių [51] biologiniuose jutikliuose.

Plačiai aprašytas orto-benzchinino panaudojimas kuriant gliukozės jutiklius įterpiant jį į grafito pastos matricą [52]. Taip pat pakankamai plačiai aprašytas ir

toluidino mėlynojo [53] bei metileno mėlio [54] panaudojimas gliukozės jutikliuose. Nepaisant mokslinių pranešimų gausos, moksliniuose publikacijose nepavyko rasti aiškaus EPT veikimo palyginimo esant tai pačiai jutiklio konstrukcijai bei toms pačioms eksperimento sąlygoms.

2.6 π - π konjuguoti polimerai

π - π konjuguoti polimerai (KP) yra nauja organinių polimerų klasė savo struktūroje turinti konjuguotą π - π elektronų sistemą ir pasižyminti tiek metalų, tiek polimerų savybėmis. Kadangi dėl delokalizotos elektroninės sistemos π - π konjuguotoje grandinėje šie polimerai dažnai pasižymi laidumu, todėl dar yra vadinami elektra laidžiais polimerais (ELP). Kartais ELP elektriniu laidžiu nenusileidžia metalams, todėl tokie junginiai literatūroje praminti sintetiniais metalais [55]. Šių polimerų tyrimai prasidėjo prieš tris dešimtmečius, kuomet buvo pastebėtos unikalios šių polimerų savybės [56,57]. Neįtikėtinos poliacetileno savybės nulėmė pasaulinį susidomėjimą ir jau neužilgo buvo susintetinti ir kiti KP (polianilinas, polipirolas ir politiofenas). Šiuo metu KP naudojami įvairiose srityse, pavyzdžiui baterijų elektrodams [58], cheminiams [59] ir biologiniams jutikliams gaminti [60], įvairiuose biomedicininuose įrenginiuose [61], elektroninėje tekstilėje [62], dirbtiniams raumenims gaminti [63] bei kaip fermentų imobilizavimo matrica [64].



Pav. 2.6 Dažniausiai naudojami KP: A – trans poliacetilenas; B – cis poliacetilenas; C – politiofenas; D – polipirolas; E – polianilinas.

KP savybės priklauso nuo sąlygų, kuriose vykdoma polimerizacija, nuo sintezei naudojamų monomerų modifikavimo, nuo polimerinės grandinės ilgio, nuo medžiagų, kuriomis jie buvo legiruoti polimerizacijos metu [65]. KP grandinėje yra teigiamai įkrautų grupių, todėl elektrocheminės ir fizikinės savybės taip pat priklauso ir nuo priešjonių geometrijos, krūvio ir dydžio.

Pagrindiniai KP privalumai yra paprasta jų sintezė iš pigių monomerų bei naudojant įvairius sintezės būdus lengvai valdomos fizikinės, elektrocheminės ir optinės savybės. Dažniausiai naudojami KP sintezės būdai yra elektrocheminė ir cheminė oksidacinė polimerizacija. Nemažai atliekamų tyrimų yra sukonzentruoti ties elektrochemine KP polimerizacija [66,67], kuomet plona polimero plėvelė yra formuojama elektrodo paviršiuje iš vandeninių arba nevandeninių terpių vykstant anodinei monomero oksidacijai. Tokiais atvejais naudojamos įvairios elektrocheminės sintezės technikos: potenciostatinė, galvanostatinė, potenciodinaminė [68]. Šis polimerizacijos būdas turi daug privalumų, nes atliekant elektrocheminę sintezę įmanoma kontroliuoti susidariusio polimero masę, plėvelės storį bei sluoksnio morfologiją, tačiau šis būdas turi ir tam tikrų trūkumų. Pagrindinis trūkumas yra tas, kad elektrocheminės sintezės būdu yra sudėtinga pagaminti didelius polimero kiekius nes polimeras formuojasi tik elektrodo paviršiuje. Taip pat paminėtu būdu sintetinamas polimeras yra netirpus nei vandenyje, nei organiniuose tirpikliuose. Dėl išvardintų trūkumų, cheminė oksidacinė monomerų polimerizacija išlieka plačiausiai naudojamu CP sintezės būdu. Paprastas, greitas, nereikalaujantis sudėtingos įrangos cheminės sintezės metodas, kurio metu KP susidaro visame tirpalo tūryje yra kur kas tinkamesnis dideliems polimero kiekiams gaminti [69], o tai leidžia šiuos polimerus plačiai panaudoti jau aptartose mokslo ir technologijų srityse. Tačiau atliekant cheminę oksidacinę monomerų polimerizaciją dažniausiai naudojami stiprūs ir toksiški neorganinės kilmės reagentai, tokie kaip amonio persulfatas [70], vandenilio peroksidas [71], geležies (III) chloridas [72], vario (II) perchloratas [73], kalio

heksacianoferatas [74]. Todėl, šiuo požiūriu labai perspektyvus yra fermentinis KP sintezės būdas.

2.7 Fermentinė KP sintezė

Pastaruoju metu vis didesnį susidomėjimą kelia fermentų katalizuojamos organinės reakcijos, kurių metu *in vitro* inicijuojamas naujų naudingų medžiagų susidarymas [75]. Fermentų panaudojimas organinės sintezės metu suteikia keletą privalumų: (I) reakcija vyksta esant švelnioms sąlygoms (neriekalinga aukšta temperatūra, didelis slėgis bei labai mažas pH), o tai yra energetiškai naudinga; (II) reakcija vyksta atrankiai ir nesusidaro pašalinių produktų; (III) reakcijos metu nenaudojamos toksiškos medžiagos, tokiu būdu sintezė yra draugiška aplinkai ir atitinka vis griežtesnius ekologinius reikalavimus [76].

Fermentinė oksidacinė poliaromatinių junginių sintezė pagrįsta fermentine reakcija, kurios metu susidaro stiprus oksidatorius, dažniausiai vandenilio peroksidas. Susidaręs oksidatorius inicijuoja polimerizacijos reakciją, kurios metu susidaro pageidaujamas polimeras. Polimerizacijos reakcijoms inicijuoti dažniausiai naudojami oksireduktazių klasės fermentai, pavyzdžiui krienų peroksidazė, sojų peroksidazė, lakazė [77].

Krienų peroksidazė – dažniausiai naudojamas fermentas vandenyje tirpių KP sintezei. Fermentinės sintezės būdai naudojant krienų peroksidazę pasiūlyti tiek anilino [78], tiek ir pirolo [79] polimerizacijai. Abiem atvejais fermentinės sintezės metu susintetinti KP yra tirpūs vandenyje ir pasižymi geru elektriniu laidžiu.

Panašus fermentinės KP sintezės būdas buvo panaudotas ir šiame darbe, leidžiantis susintetintus polimerinius sluoksnius ar nanokompozitine struktūras naudoti gliukozės biologinio jutiklio konstrukcijoje.

2.8 KP taikymas biologiniuose jutikliuose

KP ypatingai tinka fermentų imobilizavimui elektrodo paviršiuje. Yra gana daug monomerų, kurie gali būti polimerizuojami elektrodo paviršiuje, o esant tam

tikroms sąlygoms gali sudaryti elektrai laidžius sluoksnius. Iš visų KP biologiniuose jutikliuose dažniausiai naudojamas polianilinas, polipirolas ir politiofenas.

Konstruojant fermentinius biologinius jutiklius KP gali būti panaudojami keletu būdų:

1) fermentai iš pradžių koku nors būdu imobilizuojami elektrodo paviršiuje, vėliau padengiami KP sluoksniu;

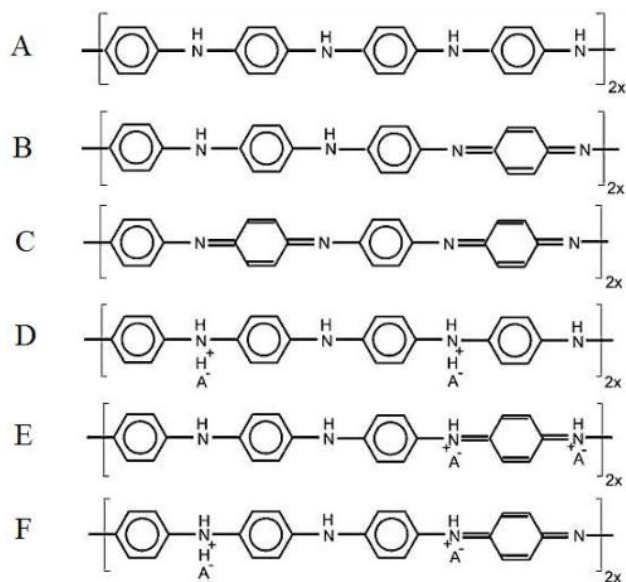
2) fermentai kartu su EPT imobilizuojami elektrodo paviršiuje elektrocheminės sintezės metu susidarančiame polimero tinkle;

3) fermentai imobilizuojami elektrodo paviršiuje elektrocheminės sintezės metu susidarančiame polimero tinkle. Šiuo atveju EPT nenaudojami. Tikėtina, kad dėl polimerui būdingo elektroninio laidžio elektronai bus pernešami nuo fermento aktyviojo centro prie elektrodo paviršiaus [80,81].

2.9 Polianilinas

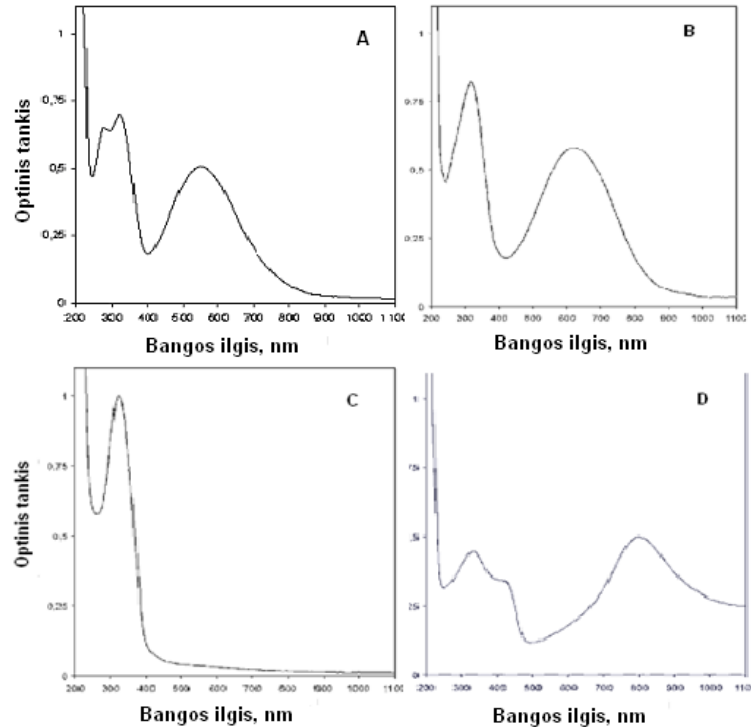
Polianilinas (PANI) – polimeras, pasižymintis elektrinėmis, elektrocheminėmis ir optinėmis savybėmis, taip pat cheminiu stabilumu ir sąlyginai dideliu elektriniu laidžiu [82,83]. PANI sintetinamas įvairiais elektrocheminiais arba cheminiais polimerizacijos metodais. PANI sintetinant elektrocheminės polimerizacijos būdu gaunamas mechaniškai patvarus, ilgos grandinės polimeras, tačiau mažai tirpus vandenyje. Naudojant cheminį sintezės būdą, polimero grandinė gaunama trumpesnė, polimero tirpumas vandenyje padidėja, tačiau suprastėja elektrinės PANI savybės.

PANI yra vienas iš plačiausiai įvairiose mokslo ir technologijų srityse naudojamų KP. Tam turi įtakos PANI formų gausa [84]: leukoemeraldinas, emeraldino bazė, emeraldino druska, pernigranilinas (pav. 2.7) bei tarpiniai šių formų dariniai, kurie esant tam tikroms sąlygoms taip pat yra stabilūs. PANI formų gausa kiekvienu atveju suteikia galimybę pasirinkti norimas PANI savybes.



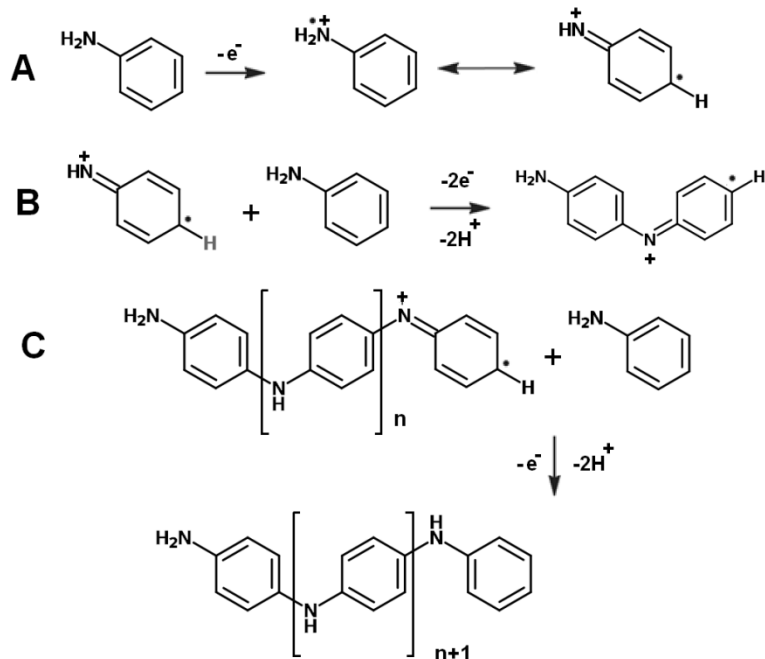
Pav. 2.7 PANI formos: A – leukoemeraldinas; B – emeraldinas; C – pernigranilinas; D, E ir F – leukoemeraldino, emeraldino ir pernigranilino protonizuotos formos.

Norint susintetinti dideliu laidžiu bei geromis mechaninėmis savybėmis pasižymintį polianiliną, daug dėmesio skiriama sintezės būdų ieškojimui. Nors mažiems PANI kiekiams sintetinti ir tirti yra naudojamas elektrocheminis sintezės būdas, tačiau cheminė oksidacinė PANI sintezė išlieka plačiausiai naudojama. Oksidacinį anilino polimerizacijos mechanizmą galime suskirstyti į tris stadijas: inicijavimą, grandinės augimą ir grandinės nutrūkimą.



Pav. 2.8 Cheminės sintezės metu susintetintų PANI formų UV/VIS absorbcijos spektrai: A – pernigranilinas, B – emeraldino bazė, C – leukoemeraldinas, D – emeraldino druska.

Plačiausiai priimtas anilino cheminės oksidacinės polimerizacijos mechanizmas pateiktas pav. 2.9. Inicijavimo stadijoje anilino monomeras oksiduojamas stipriu oksidatoriumi (pvz., vandenilio peroksidu [85] ar kitais oksidatoriais [86]) susidarant anilino katijonradikalui. Pasikeitus katijonradikalo konformacijai yra atakuojamas anilino monomeras. Vykstant oksidacijos ir deprotonizavimo reakcijoms susidaro dimerinis katijonradikalas ir prasideda grandinės augimo stadija. Dimerinis katijonradikalas reaguoja su monomerais ir vykstant pasikartojantiems oksidacijos, susijungimo ir deprotonizacijos procesams sudaro vandenyje tirpūs oligomerai, o reakcijai vykstant toliau galiausiai susidaro netirpus PANI [87].



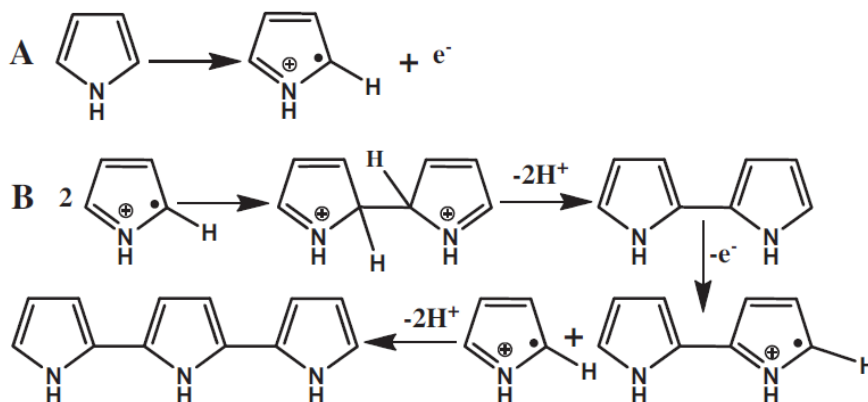
Pav. 2.9 Cheminės oksidacinės anilino polimerizacijos schema: A – iniciavimas, B – grandinės augimas, C – grandinės nutrūkimas.

2.10 Polipirolas

Polipirolas yra vienas intensyviausiai tyrimėjamų KP dėl paprastos sintezės, gero elektrinio laidžio [88], biosuderinamumo [89], gero atsparumo aplinkos poveikiui ir terminio stabilumo [90].

Pirola polimerizacijos procesas plačiai tirtas pastaraisiais dešimtmečiais. Šiais tyrimais nustatyta, kad cheminės oksidacinės pirola sintezės metu polimerizacijos iniciavimui panaudojus įvairius oksidatorius, pirola polimerizacija vyksta pagal pseudopolikondensacijos mechanizmą [91]. Nepaisant kelių publikuotų darbų, kuomet pirola sintezė buvo vykdoma organiniuose tirpikliuose, dažniausiai polimerizacija vykdoma vandeninėje terpėje esant mažoms pH vertėms [92]. Pagal plačiausiai priimtą pirola cheminės oksidacinės polimerizacijos mechanizmą, polimerizacija vyksta susijungiant dviem katijonradikalams [93]. Pagal šį mechanizmą, iniciavimo stadijos metu, vyksta pirola oksidacija susidarant chemiškai aktyvus monomero katijonradikalui (pav.

2.10 A). Susijungus dviem katijonradikalams ir vėlesnės deprotonizacijos metu susidaro bipirolų molekūlės. Grandinės augimo stadijoje bipirolų molekūlės vėl oksiduojamos ir susijungia su kitu oksiduotu segmentu (pav. 2.10 B). Pasikartojantys oksidacijos, susijungimo ir deprotonizacijos procesai sudaro vandenyje tirpius oligomereus, o reakcijai vykstant toliau, galiausiai susidaro netirpus PPY.

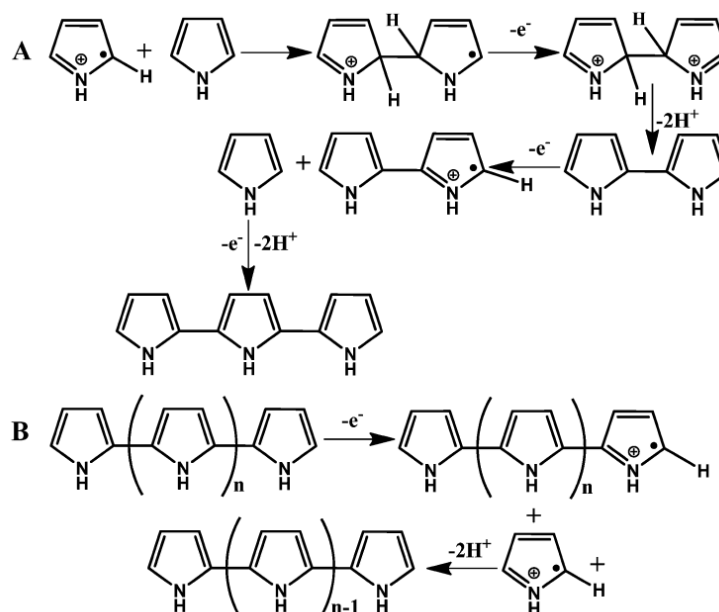


Pav. 2.10 Pirolo cheminės oksidacinės polimerizacijos iniciavimas (A), grandinės augimas bei dimerų ir trimerų susidarymas (B).

Pagal kitą pasiūlytą šios polimerizacijos reakcijos mechanizmą, grandinės augimo stadijoje katijonradikalas reaguoja su neutralia monomero molekule [94]. Tuomet įvyksta oksidacijos ir deprotonizacijos procesai ir susidaro bipirolų molekūlės, kuriuos tučtuoju oksiduojasi ir sudaro dimerinį katijonradikalą. Susidaręs darinys atakuoja sekančią neutralią pirolų molekūlę ir susidaro trimeras (pav. 2.11 A). Pasikartojant aprašytam procesui polimero grandinė auga ir galiausiai susidaro PPY.

Visiškai neseniai atlikti nauji tyrimai pateikė kinetinį pirolų cheminės oksidacinės polimerizacijos mechanizmą [95], pagal kurį kur kas labiau tikėtina kad polimerizacijos reakcija vyksta pagal schemą pav. 2.11, o ne pagal plačiausiai priimtą mechanizmą pateiktą pav. 2.10. Pagal pateiktus duomenis polimerizacijos greitis priklauso nuo monomero koncentracijos ir naudojamo oksidatoriaus

prigimties. Susidariusio polimero išeiga tuo geresnė, kuo didesnė oksidatoriaus koncentracija, o taip pat nuo pasirinkto oksidatoriaus priklauso susidariusio PPY laidis. Chemiškai sintetinto PPY laidis yra mažesnis nei PPY susintetinto elektrocheminės sintezės būdu ir paprastai yra apie 10 S cm^{-1} . Tam tikrais atvejais naudojamas oksidatorius gali legiruoti susidariusį PPY ir taip pat padidinti jo laidumą elektros srovei [96]. Susidariusio PPY savybės taip pat priklauso ir nuo paruošimo būdo [97], pasirinkto tirpiklio [98], polimerizacijos trukmės ir temperatūros [99].



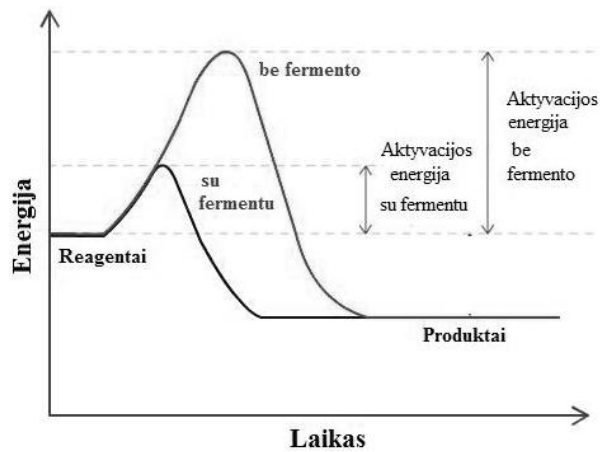
Pav. 2.11 Pirolo dimerų ir trimerų susidarymo mechanizmo schema (A) bei grandinės augimas ir PPY susidarymas (B).

2.11 Fermentai

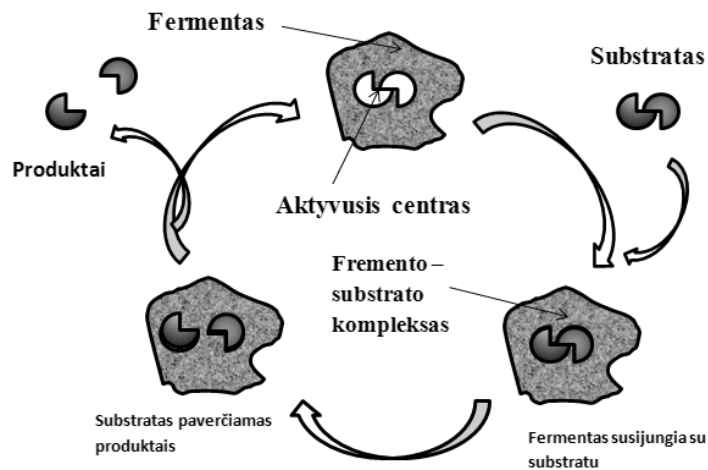
Tam, kad užtikrinti normalias gyvo organizmo funkcijas beveik visos organizme vykstančios cheminės reakcijos yra greitinamos biologinės kilmės katalizatoriais – fermentais. Fermentai chemines reakcijas priverčia vykti iki 10^9 kartų greičiau negu jos vyktų savaime (fermentas katalazė greitina vandenilio peroksido skilimą). Taigi, fermentai – tai biologiniai katalizatoriai, sumažinantys

reakcijos energetinį barjerą ir taip pagreitinantys organizme vykstančias chemines reakcijas [100].

Fermentas sąveikauja su substratu, paversdamas jį fermentinės reakcijos produktu. Fermentinė reakcija vyksta tik tam tikroje fermento dalyje – aktyviajame centre, kuris susidaro formuojantis tretinei baltymo struktūrai iš suartėjusių, skirtingose baltymo molekulės vietose esančių šoninių amino rūgščių. Aktyvus centras turi substrato prisijungimo ir katalizinę sritį. Dažniausiai tarp fermento aktyviojo centro ir substrato susidaro vandeniliniai arba kovalentiniai ryšiai, hidrofobinės, hidrofiliinės arba elektrostatinės sąveikos.



Pav. 2.12 Reakcijos kelias su fermentu ir be fermento.



Pav. 2.13 Principinė fermento veikimo schema.

Fermentai, kaip visi katalizatoriai, reakcijos metu nėra nei sunaudojami, nei pagaminami. Jie nekeičia termodinaminės reakcijos pusiausvyros, o tik sumažina termodinaminės pusiausvyros pasiekimo laiką, t.y. pagreitina reakciją. Fermentai, kaip ir nebiologiniai katalizatoriai, dažnai katalizuoja kelias reakcijas, tačiau yra ir labai atrankių fermentų, kurie greitina tik vieną reakciją. Fermentai, dėl savo baltyminės kilmės, yra jautrūs terpės pH ir temperatūros kitimui. Labai mažos arba labai didelės pH vertės bei aukšta temperatūra gali suardyti baltymo tretinę struktūrą ir taip panaikinti fermento katalitines savybes.

Kadangi fermentai yra baltyminės sandaros biologiniai katalizatoriai, jiems būdingos tiek bendrosios katalizatorių savybės, tiek tam tikros specifinės savybės. Savybės būdingos ir fermentams, ir cheminiams katalizatoriams:

- ✓ reakcijos metu nei sunaudojami, nei pagaminami;
- ✓ didina reakcijos greitį, bet nekeičia reakcijos pusiausvyros.

Savybės būdingos tik fermentams:

- greitina tik tam tikrą cheminę reakciją ir negamina šalutinių reakcijos produktų;
- jautrūs temperatūros ir terpės pH pokyčiams;
- atrankūs substratams – vieni fermentai atrankūs tik vienam substratui, o kiti fermentai gali katalizuoti keleto junginių virsmus;
- aktyvumas reguliuojamas – priklauso nuo tam tikrų junginių kiekio biologinėje aplinkoje.

Fermentai skirstomi į grupes pagal savo katalizuojamos reakcijos pobūdį:

1. oksireduktazės – katalizuoja oksidacijos-redukcijos reakcijas [101];
2. transferazės – katalizuoja funkcinių grupių pernešimą nuo vienos molekulės iki kitos [102];
3. hidrolazės – katalizuoja medžiagų jungčių skaidymą hidrolizės būdu dalyvaujant vandeniui [103];

4. liazės – katalizuoja nehidrolizinių funkcijų grupių (H₂O, amonio, CO₂) atskilimą susidarant dvigubai jungčiai arba grupių prisijungimą dvigubų jungčių vietoje [104];

5. izomerazės – katalizuoja izomerizacijos reakcijas [105];

6. ligazės – katalizuoja medžiagų sintezės reakcijas, o vykstant kondensacijos reakcijai naujoms jungtims sudaryti naudoja makroenergiųjų junginių Pavyzdžiui adenzin-5'-trifosfato (ATP), guanozin-5'-trifosfato (GTP) arba uridin-5'-trifosfato (UTP) energiją [106].

Tiriant fermentines reakcijas būtina prisiminti, kad fermentinės reakcijos greitis priklauso ne tik nuo substrato ir fermento koncentracijų, bet ir nuo terpės pH, slėgio, temperatūros bei papildomų medžiagų, galinčių slopinti arba greitinti fermentinę reakciją (slopiklių arba aktyviklių) koncentracijų. Fermentinių reakcijų aprašymui tinka Michaelis–Menten kinetika.

2.12 Michaelio–Menten kinetika

Labai dažnai fermentinės reakcijos kinetikai aprašyti yra taikomas supaprastintas matematinis modelis apytiksliai aprašantis daugelį fermentinių reakcijų matematinėmis lygtimis. Vienas iš tokių matematinių modelių yra Michaelis–Menten kinetika. Šis modelis aprašyti fermentinei reakcijai yra tinkamas tuomet, kai reakcijos metu nesusidaro papildomi tarpiniai junginiai bei nevyksta reakcijos slopinimas arba alosterija. Be to, aprašant fermentinės reakcijos kinetiką šiuo modeliu priimamos dvi pagrindinės prielaidos:

1) susidariusio tarpinio komplekso koncentracija reakcijos metu yra pastovi;

2) laisvo ir surišto į kompleksą fermento koncentracijų suma reakcijos metu yra pastovi.

Primojo laipsnio fermentinė reakcija aprašoma:



(1)

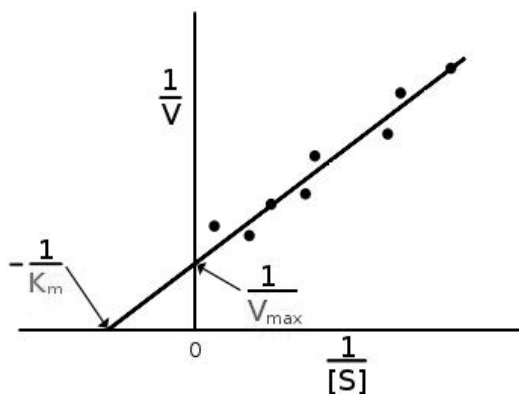
kur: E – fermentas; S – substratas; ES – fermento-substrato kompleksas; P – produktas;

k_1 , k_2 ir k_3 – reakcijos greičio konstantos.

Michaelis-Menten lygtis:

$$(2) \quad V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

kur: V – reakcijos greitis; V_{\max} – maksimalus reakcijos greitis; [S] – substrato koncentracija; K_M – Michaelio konstanta.



Pav. 2.14 Michaelio-Menten lygties konstantų nustatymas.

Tiriant fermentų aktyvumą patogiu naudotis Michaelio konstanta (K_M). Šios konstantos reikšmės įvairioms reakcijoms yra skirtingos ir parodo fermentų giminingumą substratams. Giminingumas – fermento geba prijungti substratą. K_M galima nustatyti dviem būdais: apskaičiuoti remiantis Michaelio-Menten lygtimi arba nustatyti grafiškai (pav. 2.14) [107].

2.13 Fermentų imobilizavimo elektrodo paviršiuje būdai

Biologinių katalizatorių išskyrimas neprarandant katalizinių jų savybių yra sudėtingas procesas, o paties išgryninto fermento kaina yra ganėtinai didelė. Norint sukurti daugkartinio panaudojimo analizinę sistemą, sumažinti analizės

kainą bei eliminuoti didelės molekulinės masės junginių difuzijos keliamus trukdžius, fermentus būtina išskirti iš reakcijos terpės. Tai pasiekama juos imobilizuojant elektrodo paviršiuje. Imobilizacijos metu siekiama išlaikyti visas fermentų katalizines bei atrankumo savybes ir kuo tvirčiau prijungti prie elektrodo paviršiaus. Fermentai elektrodo paviršiuje gali būti imobilizuoti fizikinės arba cheminės imobilizacijos būdais. Fizikiniams imobilizavimo būdams priskiriama adsorbicija, pagava gelio matricoje [38] bei įterpimas į cheminės arba elektrocheminės polimerizacijos būdu gautą polimero sluoksnį [43]. Cheminiai imobilizavimo būdai skirstomi į kovalentinį prijungimą prie elektrodo paviršiaus, susiuvimą kryžminiais kovalentiniais ryšiais, panaudojant daugiafunkcinius reagentus (glutaro aldehidą, karbodiimidą ir kt.) [108]. Be to, siekiant kuo stipriau prijungti fermentus prie paviršiaus, dažnai naudojama fizikinių bei cheminių būdų kombinacija.

Konstruojant elektrocheminius fermentinius jutiklius indikatoriniais elektrodais dažniausiai naudojami taurių metalų arba įvairios modifikacijos anglies elektrodai [34,35,36]. Imobilizuojant fermentus ant grafito paviršiaus paprastai taikoma paprastos fizikinės adsorbicijos ir cheminio imobilizavimo susiuvant su daugiafunkciniais reagentais kombinacija. Adsorbicijos metu fermentas lengvai pereina į poringos matricos (grafito) sluoksnį, dėl ko sutrumpėja elektronų pernešimo atstumas nuo fermento iki elektrodo. Imobilizuojant šiuo būdu fermento savybės išlaikomos, tačiau galima fermentų desorbicija nuo elektrodo paviršiaus, o dėl to blogėja analizinio signalo pakartojamumas. Tam, kad išvengti šių trūkumų, po fizikinės adsorbicijos taikomas cheminis imobilizavimo būdas. Norint fermentus imobilizuoti ant metalinių paviršių adsorbicijos nepakanka, kadangi biologinės medžiagos dažniausiai ne tik nėra adsorbuojamos metalo paviršiaus, bet dažnai denatūruojamos, dėl ko netenka savo aktyvumo. Tokiais atvejais norint tvirtai prijungti fermentą, taikomos imobilizavimo metodikos panaudojant savitvarkius monosluoksnius (SAM) [109] arba KP.

2.14 Gliukozės oksidazė

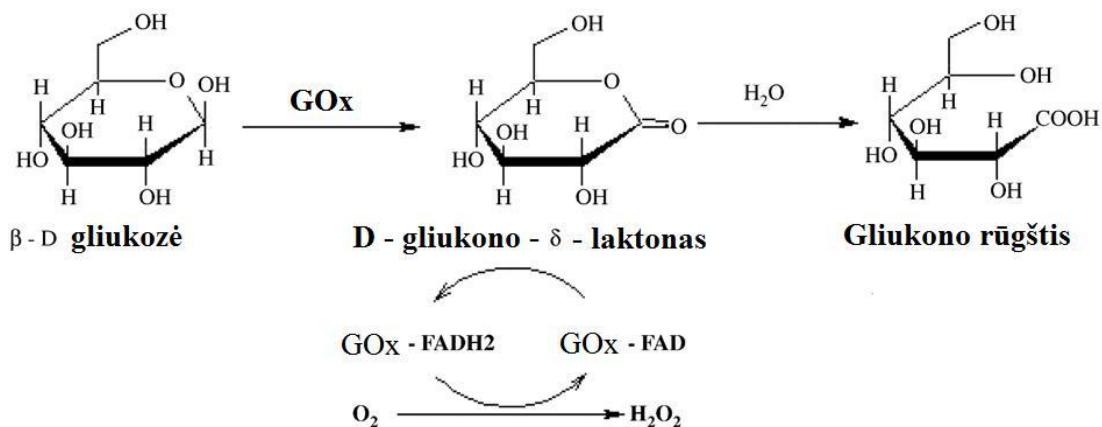
Gliukozės oksidazė (GOx) priklauso oksidoreduktazių grupės fermentams. Šis fermentas pirmą kartą buvo išskirtas 1928 metais iš *Aspergillus niger*. Ši GOx sudaryta iš dviejų polipeptidinių grandinių sudarytų iš 18 skirtingų amino rūgščių, o molekulinė masė apie 186 000 [27]. GOx taip pat išskiriama iš *Glaucum penicillium*, *Penicillium vitale* ir kitų rūšių pelėsinių grybelių. Nepriklausomai iš kokių pelėsinių grybelių GOx išskirta, visų jų molekulinė masė yra apie 160 000 – 180 000 Da, o izoelektrinis taškas prie pH = 4.2.

GOx plačiai naudojama daugelyje mokslo bei pramonės sričių: kuriant biologinius kuro elementus [110], kaip maisto ir gėrimų papildas [111], mažai alkoholio turinčio vyno gamyboje [112], higienoje kaip anti-mikrobinis agentas [113], gliukono rūgšties gamyboje [114], tekstilės pramonėje [115] bei konstruojant gliukozės jutiklius [27].



Pav. 2.15 Bendra GOx topografija su pažymėtomis α spiralėmis bei antrinėmis struktūromis [116].

GOx iš *Aspergillus niger* ar *Penicillium vitale* yra nuo flavino adenino dinukleotido (FAD) priklausoma oksidazė, kuri katalizuoja β -D-gliukozės oksidaciją iki D-gliukono- δ -laktono molekulinio deguonimi [117].



Pav. 2.16 GOx katalizuojamos reakcijos schema.

Nauji GOx sintezės būdai išgaunant švarų fermentą panaudojant genų inžineriją yra aprašyti literatūroje [118, 119]. Pagrindinė problema gaminant švarų GOx preparatą yra išvengti pašalinių fermentų (celiulazės, katalazės ir amilazės) kurie taip pat yra gaminami *Aspergillus niger*. Šiam tikslui pasiekti naudojama genų inžinerija modifikuojant arba jau žinomus organizmus gaminančius GOx, arba pasitelkiant naujus ir juos modifikuojant [119].

2.15 Aukso nanodalelių taikymas fermentiniuose biologiniuose jutikliuose

Konstruojant fermentinius biologinius jutiklius ir nagrinėjant bioelektrochemines reakcijas yra būtinas teisingas elektronų pernešimo nuo fermento aktyviojo centro iki elektrodo paviršiaus mechanizmo supratimas. Pastaruoju metu dedamos didžiulės mokslininkų pastangos nagrinėjant tiesioginius elektrocheminius procesus, vykstančius tarp fermento ir elektrodo. Pastovaus ir pakankamo stiprio tiesioginio elektrinio signalo užtikrinimas yra vienas didžiausių iššūkių tiriant fermentinius elektrocheminius procesus [120,121]. Kadangi daugumos oksireduktazių redoks aktyvus centras yra giliai baltymo globulėje, fermentas negali būti oksiduojamas arba redukuojamas tiesiogiai ant elektrodo esant bent kokiam indikatorinio elektrodo potencialui.

Norint užtikrinti pastovų elektronų srautą nuo arba link elektrodo yra naudojami EPT.

Visiškai neseniai buvo pademonstruoti pirmieji darbai, kuomet TEP tarp fermento ir elektrodo buvo užtikrinama naudojant AuND be papildomo EPT sistemoje. Tinkamai modifikuoti AuND elektrodų paviršiai suteikia palankią mikroaplinką naudojamam fermentui ir sumažina baltyminio sluoksnio izoliacines savybes, užtikrindami TEP. Pirmieji TEP darbai buvo pademonstruoti tarp arklio širdies citochromo-c ir SnO₂ elektrodo modifikuoto 12 nm AuND [122]. Po šio tyrimo buvo publikuota daugybė mokslinių straipsnių, aprašančių TEP tarp fermento ir elektrodo panaudojant AuND. Konstruojant trečios kartos biologinius jutiklius fermento ir AuND konjugatai imobilizuojami elektrodo paviršiuje tinkamoje matricoje, kaip tai buvo padaryta su krienų peroksidaze [123]. Naudojant panašią jutiklio konstrukciją, TEP pastebėta tarp citochromo c ir silicio gelio matricos, modifikuotos AuND [124], hemoglobino ir koloidiniu auksu bei cistaminu modifikuoto aukso elektrodo [125]. Tinkamą fermento veikimui terpę taip pat suteikia iš grafito pastos bei AuND pagrindu pagaminti elektrodų paviršiai. TEP taip pat buvo stebėta tarp mioglobino ir koloidinio aukso bei grafito pastos mišinio [126], ksantino oksidazės ir grafito pastos sluoksnio, ant kurio elektrochemiškai buvo nusodintos AuND [127]. Dar vienas jutiklio konstrukcinis modelis, pritaikant AuND biologiniuose jutikliuose pasinaudojant elektrostatinėmis sąveikomis yra elektrocheminis daugiasluoksnis elektrodas [128,129]. Šiuo būdu pagamintų analizinių sistemų pavyzdžiais gali būti daugiasluoksnė membrana suformuota indikatorinio platinos elektrodo paviršiuje iš AuND ir GOx [130] arba daugiasluoksnė membrana suformuota aukso elektrodo paviršiuje iš GOx, AuND ir cistamino [131]. Apibendrinus mokslinius šaltinius galima teigti, kad įvairaus dydžio bei skirtingų modifikavimų AuND turi didžiulį potencialą kuriant biologinius jutiklius.

Gerai žinoma, kad kompozitiniai junginiai sudaryti iš įvairių polimerų legiruotų nanodalelėmis pasižymi labiau išreikštomis ir stipresnėmis elektrinėmis,

optinėmis ir magnetinėmis savybėmis, nei atskirai paimti polimerai arba nanodalelės. Publikuoti tyrimai šia tema parodė, kad kompozitiniai dariniai iš AuND ir tokių biopolimerų kaip chitozanas arba karboksimetilchitozanas tampa puikia matrica ilgalaikiam oksiredukcinėmis savybėmis pasižyminčių baltymų įterpimui [132]. Tokiu būdu į chitozано hidrogelį įterpiant GOx ir legiruojant AuND buvo sukurta palanki fermentui terpė ir pagamintas gliukozės jutiklis [133]. Taip pat naujos kartos H₂O₂ jutiklis buvo sukurtas panaudojant biosuderinamus karboksimetilchitozано ir AuND nanokompozitus įterpiant į juos krienų peroksidazę [134]. Grafeno ir aukso nanodalelių kompozitai taip pat gali būti naudojami gliukozės jutikliams gaminti [135] Pastarieji tyrimai parodė, kad sudėtingų kompozitinių junginių naudojimas biologiniuose jutikliuose yra aktuali ir sparčiai vystoma mokslo tema.

3. Darbo metodai

3.1 Reagentai ir tirpalai

GOx iš *Aspergillus niger*, specifinis aktyvumas 100 – 250 vienetų/mg (Sigma-Aldrich, Jungtinė Karalystė), D-(+)-gliukozė (AppliChem, Vokietija), glutaro aldehidas (GA) 25 %, askorbo rūgštis, urino rūgštis (SIGMA-Aldrich Chemie, Vokietija), TTF, TCNQ, FMS, 5,6-diamino-1,10-fenantrolinas (5,6-DAP), kalio heksacianoferatas ($K_4[Fe(CN)_6]$), metileno mėlis (MB), toluidino mėlynasis (TB), anilinas, pirolas (SIGMA-Aldrich Chemie, Vokietija).

Vandeninis 2 mol l⁻¹ D-(+)-gliukozės vandeninis tirpalas buvo ruošiamas ne mažiau kaip 24 valandas prieš naudojimą, kad nusistovėtų pusiausvyra tarp α - ir β gliukozės formų ir būtų išvengta gliukozės mutarotacijos.

Tirpalams gaminti buvo naudojamas distiliuotas vanduo, kurio $\kappa = 4 - 8 \mu S cm^{-1}$.

0,05 mol l⁻¹ A-PBS buferinis tirpalas su papildomai įdėtu 0,1 mol l⁻¹ KCl buvo ruošiamas naudojant $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ir CH_3COONa (druskos įsigytos iš SIGMA-Aldrich Chemie). Tinkama pH reikšmė buvo gaunama rūgštinant CH_3COOH arba šarminant $NaOH$.

40 mg ml⁻¹ koncentracijos GOx tirpalas buvo šviežiai ruošimas iš liofilizuoto fermento miltelių ištirpinant juos A-PBS buferiniame tirpale pH 6,0.

Anilinas ir pirolas buvo naudojami po papildomo išvalymo praleidžiant monomero tirpalą pro Al_2O_3 užpildytą kolonėlę, kad būtų pašalinti visi spalvoti komponentai.

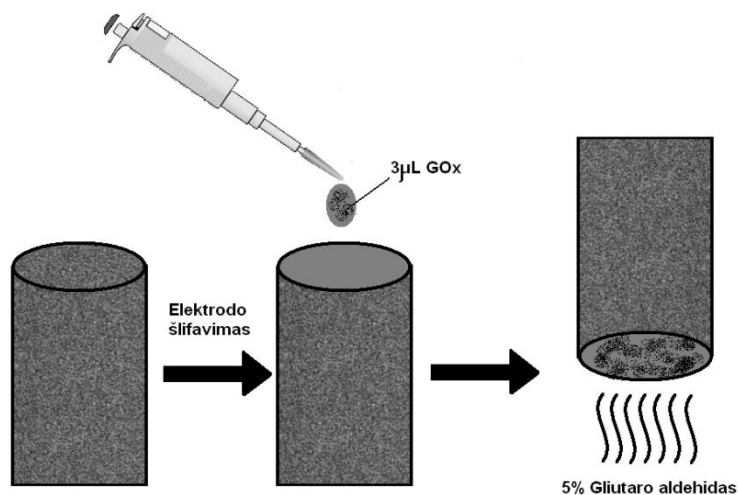
Tiksliems medžiagų kiekiams sverti buvo naudojamos analizinės svarstyklės KERN ABJ 120-4M (KERN & Sohn GmbH, JAV). Tikslī pH vertė tirpaluose buvo matuojama pH metru (Thermo Electron Corporation, JAV), tirpalams maišyti buvo naudojama magnetinė maišyklė (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Vokietija).

3.2 Grafito elektrodo paruošimas

3 mm skersmens, 150 mm ilgio, 99,999 % grynumo ir mažo tankio grafito strypeliai buvo įsigyti iš SIGMA-Aldrich, Inc (St. Louis, MO, JAV). Grafito elektrodo darbinis paviršius – 0,7 mm². Pirmiausiai buvo atkerpamas reikiamo ilgio grafito strypelis. Elektrodo plokštuma buvo šlifuojama stambiu, po to smulkiu švitriniu popieriumi iki blizgesio. Tada elektrodas buvo poliruojamas Al₂O₃ milteliais (dalelių diametras 0,1 μm), plaunamas etanoliu bei distiliuotu vandeniu ir džiovinami kambario temperatūroje. Paruošto grafito (GR) elektrodo šoninis paviršius izoliuojamas silikoniniu vamzdeliu, kad išvengtų sąlyčio su tirpalu.

3.3 Grafito elektrodo modifikavimas glikozės oksidaze

Ant paruošto grafito elektrodo paviršiaus buvo užlašinama 3 μl GOx tirpalo ir džiovinama iki tol, kol elektrodo paviršius visiškai nudžius. Tada elektrodas 24 valandas laikomas uždareme inde 2 cm aukštyje virš 5 % glutaro aldehido tirpalo 4 °C temperatūroje. Vėliau elektrodas 15 min. džiovinamas kambario temperatūroje. Prieš atliekant elektrocheminius matavimus GOx modifikuoti grafito elektrodai (GR/GOx) kruopščiai plaunami distiliuotu vandeniu siekiant pašalinti neimobilizuotą fermentą. Elektrodai tarp matavimų laikomi 4 °C temperatūroje uždareme inde virš buferinio A-PBS tirpalo.



Pav. 3.1 GR elektrodo paruošimas ir modifikavimas GOx.

3.4 Grafito elektrodo modifikuoto gliukozės oksidaze padengimas polianilino sluoksniu

Siekiant GR/GOx elektrodus padengti PANI sluoksniu (GR/GOx/PANI), paruošti GR/GOx elektrodai tam tikram laikui buvo įmerkiami į A-PBS buferinį tirpalą (pH = 6,0), turintį 20 mmol l⁻¹ gliukozės ir 200 mmol l⁻¹ anilino. Prieš atliekant elektrocheminius matavimus elektrodai buvo kruopščiai plaunami distiliuotu vandeniu.

3.5 Grafito elektrodo modifikuoto gliukozės oksidaze padengimas polipirolo sluoksniu

Siekiant GR/GOx elektrodus padengti PPY sluoksniu (GR/GOx/PPY), paruošti GR/GOx elektrodai tam tikram laikui buvo įmerkiami į A-PBS buferinį tirpalą (pH = 6,0), turintį 20 mmol l⁻¹ gliukozės ir 200 mmol l⁻¹ pirolo. Prieš atliekant elektrocheminius matavimus elektrodai buvo kruopščiai plaunami distiliuotu vandeniu.

3.6 Aukso nanodalelių dalelių sintezė

Atliekant AuND sintezę buvo naudojami du tirpalai. Pirmasis tirpalas buvo gaminamas 1 % tetrachloraukso rūgšties vandeninį tirpalą 80 kartų skiedžiant distiliuotu vandeniu. Antrajam tirpalui pagaminti buvo naudojama 4 ml 1 % tri-natrio citrato ir 16 ml distiliuoto vandens, pridedant 5,0, 0,5 arba 0,03 mL 1 % tanino rūgšties tirpalo, atitinkamai sintetinant 3,5, 6,0 arba 13,0 nm dydžio AuND. Pašildžius iki 65 °C abu tirpalai supilami į vieną indą, tirpalui įgavus raudoną spalvą ir pastoviai maišant tirpalo temperatūra pakeliama iki 95 °C. Toks pagamintas AuND tirpalas vėsinaamas kambario temperatūroje ir naudojamas tolimesniems tyrimams.

3.7 Į polianilino sluoksnį įterptų gliukozės oksidazės bei gliukozės oksidazės ir aukso nanodalelių struktūrų sintezė

Norint įterpti GOx į PANI sluoksnį ((GOx)PANI) arba GOx ir AuND į PANI sluoksnį ((GOx/AuND)PANI) ir nustatyti optimalias sintezės ir susidariusių darinių veikimo sąlygas, buvo paruošta serija įvairios pH vertės tirpalų (4,0; 4,5; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0) ir pritaikyta fermentinė PANI sintezė. (GOx)PANI dalelėms sintetinti polimerizacijos tirpalas buvo sudarytas iš 200 mmol l⁻¹ anilino, 1 mg ml⁻¹ GOx ir 20 mmol l⁻¹ gliukozės, tuo tarpu (GOx/AuND)PANI dalelėms sintetinti į polimerizacijos tirpalą papildomai buvo įdedama 7,5 mg ml⁻¹ skirtingo dydžio (3,5 nm; 6 nm; 13 nm) AuND. Polimerizacijos reakcija buvo vykdoma tamsoje, esant +4 °C. Po 24 valandų sintezė buvo nutraukiama susidariusius darinius centrifuguojant ir perkeltant iš sintezės tirpalo papildomam plovimui. Praplovus daleles antrą kartą ir pilnai pašalinus polimerizacijai reikalingų komponentų likučius, jos buvo pervestos į 100 μL A-PBS buferinio tirpalo.

3.8 Grafito elektrodų modifikuotų kompozitinių dalelių paruošimas

Paruošti (GOx)PANI ir (GOx/AuND)PANI dalelių koloidiniai tirpalai buvo naudojami tolimesnei indikatorinių elektrodų gamybai. Bendras 9 μL tūris pasirinktų dalelių tirpalo buvo trim etapais po 3 μL užlašintas ant paruošto GR elektrodo paviršiaus ir pilnai išdžiovinamas. Tada elektrodai 24 valandas laikomi uždarame inde 2 cm aukštyje virš 5% glutaro aldehido tirpalo 4 °C temperatūroje. Vėliau elektrodai 15 minučių džiovinami kambario temperatūroje, o prieš atliekant elektrocheminius matavimus (GOx)PANI arba (GOx/AuND)PANI dalelėmis modifikuoti GR elektrodai (atitinkamai (GR/(GOx)PANI) ir GR/(GOx/AuND)PANI) kruopščiai plaunami distiliuotu vandeniu, siekiant pašalinti blogai imobilizuotas daleles.

3.9 Elektronų pernašos tarpininkais ir gliukozės oksidaze modifikuotų grafito elektrodų paruošimas

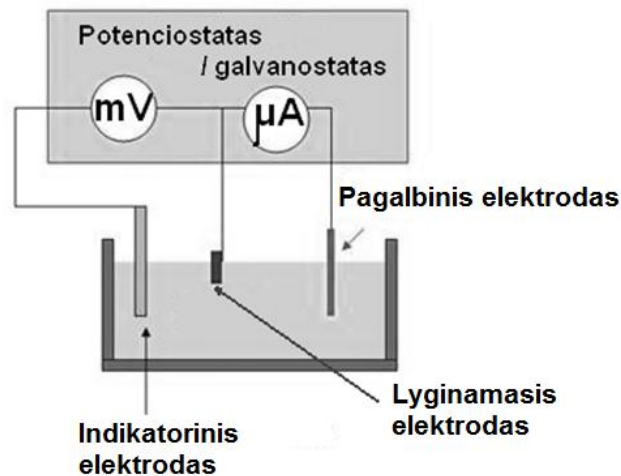
Konstruojant bereagenčius gliukozės jutiklius indikatoriniai elektrodai buvo gaminami ant paruošto GR elektrodo paviršiaus užlašinant ir tolygiai paskleidžiant 3 μ L pasirinktojo EPT tirpalo. Sulaukus visiško tirpiklio išgaravimo, 3 μ L GOx tirpalo buvo lašinami ant elektrodo paviršiaus. Tada elektrodas 24 valandas laikomas uždarame inde 2 cm aukštyje virš 5% glutaro aldehido tirpalo 4 $^{\circ}$ C temperatūroje. Elektrodas 15 minučių džiovinamas kambario temperatūroje. Prieš atliekant elektrocheminius matavimus EPT ir GOx modifikuoti GR elektrodai (GR/M/GOx) kruopščiai plaunami distiliuotu vandeniu siekiant pašalinti neimobilizuotą fermentą bei EPT.

3.10 Elektronų pernašos tarpininkų ir gliukozės oksidazės mišiniu modifikuotų grafito elektrodų paruošimas

Konstruojant bereagenčius gliukozės jutiklius kito tipo indikatoriniai elektrodai buvo gaminami ant paruošto GR elektrodo paviršiaus užlašinant ir tolygiai paskleidžiant pasirinktojo EPT ir GOx tirpalų mišinį. Sulaukus visiško tirpiklio išgaravimo nuo elektrodo paviršiaus, modifikuotas elektrodas buvo 24 valandas talpinamas uždarame inde 2 cm aukštyje virš 5% glutaro aldehido tirpalo 4 $^{\circ}$ C temperatūroje. Po to elektrodas 15 minučių džiovinamas kambario temperatūroje. Prieš atliekant elektrocheminius matavimus GOx ir EPT mišiniu modifikuoti GR elektrodai (GR/M-GOx) kruopščiai plaunami distiliuotu vandeniu siekiant pašalinti neimobilizuotą fermentą bei EPT.

3.11 Elektrocheminių matavimų sąlygos

Visi elektrocheminiai matavimai buvo atlikti kompiuterizuotu potenciostatu-galvanostatu PGSTAT 30, naudojant GPES3 V3 programinę įrangą (ECO-Chemie, Utrechtas, Nyderlandai). Matavimai buvo atliekami 5 cm^3 tūrio elektrocheminėje gardelėje A-PBS buferiniame tirpale su papildomai įdėtu 0,1 mol l^{-1} KCl (pH 6,0), naudojant trijų elektrodų sistemą ir esant 120 aps/min tirpalo maišymosi greičiui.



Pav. 3.2 Trielektrodės celės principinė schema.

Modifikuoti elektrodai buvo naudojami indikatoriniais elektrodais, Ag/AgCl/Cl⁻ elektrodas – lyginamuoju, 2 cm² paviršiaus ploto platinos elektrodas – pagalbinis. Analizinis signalas buvo registruojamas esant pastoviam +300 V potencialui (pagal Ag/AgCl/Cl⁻ 3 mol L⁻¹ elektroda). Registruojamas srovės stiprio kitimas laike tiesiogiai proporcingas fermento oksiduojamo substrato koncentracijai:

$$I = \frac{nFDc}{d}$$

(3)

kur: I – soties srovės stipris, n –elektronų skaičius, F – Faradėjaus skaičius, D – nustatomos medžiagos difuzijos koeficientas, c – nustatomos medžiagos koncentracija, d – difuzinio sluoksnio storis.

Tyrimo metu į elektrocheminę gardelę, užpildytą A-PBS buferiniu tirpalu su papildomai įdėtu 0,1 mol l⁻¹ KCl, turinčiu 10 mmol l⁻¹ FMS, buvo pridėdami skirtingi gliukozės (substrato) kiekiai ir laukiama kol nusistovės nuostovioji srovė (analizinis signalas). Tarp kiekvieno nepriklausomo tyrimo iš gardelės buvo pašalinamas substrato ir FMS turintis tirpalas, o elektrocheminė gardelė ir elektrodai plaunami buferiniu tirpalu. Prieš kiekvieną tyrimą buvo laukiama kol

nusistovės bazinė linija. Atlikus tyrimus brėžiamos srovės stiprio priklausomybės nuo substrato koncentracijos gradavimo kreivės.

3.12 Ciklinės amperometrijos matavimo sąlygos

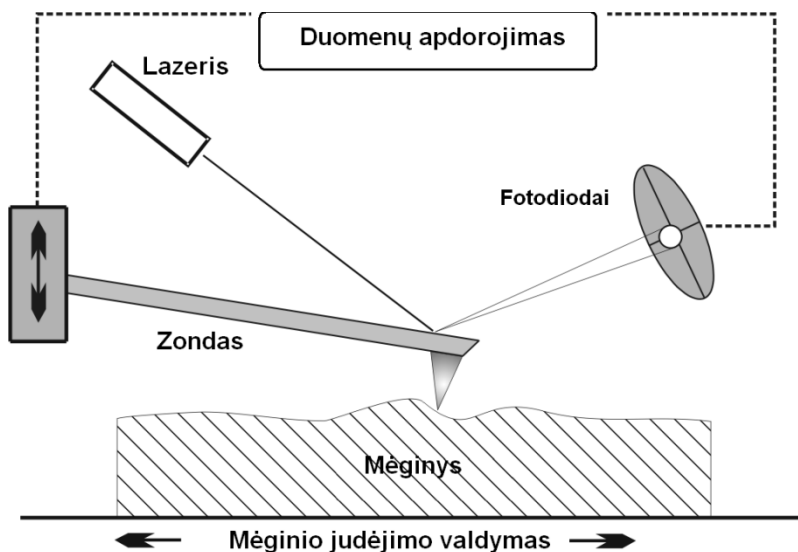
Indikatorinis elektrodas buvo paruoštas pagal pasirinktą metodiką, o matavimai atliekami elektrocheminėje celėje užpildytoje 5 mL A-PBS, pH 6,0, su papildomai įdėtu 0,1 mol l⁻¹ KCl, esant 20 mmol l⁻¹ gliukozės. Elektrodams buvo registruojamos ciklinės voltamperogramos. Registravimo metu indikatoriniam elektrodai suteiktas potencialas buvo iš pradžių tiesiškai keičiamas anodine, o po to katodine kryptimi (nuo -500 iki +1000 mV). Potencialo skleidimo greitis – 100 mV/s.

3.13 Sąlygos elektrodų stabilumo tyrimams

Atliekant stabilumo tyrimus modifikuoti elektrodai tarp matavimų buvo laikomi 4 °C temperatūroje uždarame inde virš A-PBS buferinio tirpalo (pH = 6,0). Modifikuotų elektrodų atsako į analitę tyrimai buvo atlikti A-PBS buferiniame tirpale (pH 6,0) turinčiame 0,1 mol l⁻¹ KCl, 20 mmol l⁻¹ gliukozės ir 10 mmol l⁻¹ FMS.

3.14 Tyrimai atominių jėgų mikroskopu

BIOSCOPE II Veeco Instruments Ltd (Santa Barbara, JAV) atominės jėgos mikroskopas (AJM) buvo naudojamas tirti nemodifikuotam elektrodai, GOx/GA ir GOx/PANI elektrodams pusiau kontaktiniu režimu. Visiems AJM vaizdams buvo pasirinkta 200 x 200 pikselių vaizdo raiška, o skenavimo greitis 10 μm/s. Eksperimentiniai duomenys buvo tvarkomi diNanoScope 7.30 ir 2.10 Gwyddion NT-MDT Nova programine įranga. Visiems matavimams buvo naudojami zondai skirti darbui pusiau kontaktiniu režimu.



Pav. 3.3 Principinė AJM veikimo schema.

Ruošiant pavyzdžius tyrimui elektrodų strypeliai buvo nupjaunami. Laikant nupjautą elektrodą pincetu, jie buvo mažinami švitrinu popieriumi iki 2 – 3 mm aukščio. Tokie nupjauti ir sumažinti elektrodai, naudojant dvipusę lipnią juostelę, buvo tvirtinami prie stikliuko mikroskopavimui. Taip paruošti pavyzdžiai toliau buvo tiriami AJM.

3.15 Tyrimai skenuojančiu elektronų mikroskopu

GR/GOx ir GR/GOx/PANI modifikuoti elektrodai buvo tirti JEOL JSM-7600F skenuojančiu elektroniniu mikroskopu (SEM). Prieš atliekant SEM tyrimus elektrodai buvo kruopščiai plaunami distiliuotu vandeniu ir džiovinami kambario temperatūroje. Elektrodai buvo nupjaunami ir laikant nupjautą elektrodą pincetu, šveičiami švitrinu popieriumi iki 2 – 3 mm aukščio. Tuomet mėginys grafito pastos pagalba pritvirtinamas ant specialaus aliuminio padėklo. Taip paruoštas mėginys tiriamas SEM.

3.16 Spektrofotometriniai tyrimai

Fermentinė polimerizacija buvo atlikta A-PBS buferiniuose tirpaluose, turinčiuose 1 mg/ml GOx, 15 mmol l⁻¹ gliukozės ir 200 mmol l⁻¹ monomero. Polimerų susidarymas buvo stebimas dviejų spindulių UV-VIS spektrometru

Lambda 25 (PerkinElmer, Šeltonas, JAV). Tyrimams naudojamos plastikinės UV-VIS mikro kiuvetės, optinio kelio ilgis 1 cm. Lyginamuoju tirpalu naudotas A-PBS buferinis tirpalas pH 6,0. Susidariusių oligomerų absorbcija buvo registruojama 200 – 800 nm bangos ilgių srityje.

3.17 Tyrimai optiniu mikroskopu

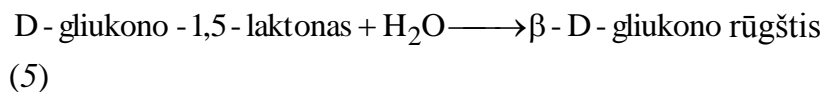
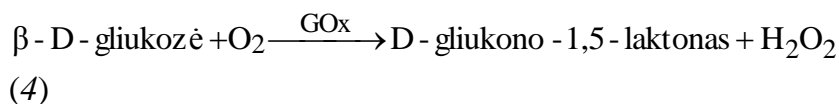
PANI bandinių atvaizdavimui buvo naudotas imersinis optinis mikroskopas LEICA DM LB “Leica MiGRosystemsWetzlar GmbH” (Heidelbergas, Vokietija) ir skaitmeninė kamera GC-X 3E “JVC” (Japonija). Ruošiant mėginius 20 μ l PANI tirpalo buvo tolygiai paskleidžiama ant stiklo plokštelių, džiovinama kambario temperatūroje, plaunama distiliuotu vandeniu ir vėl džiovinama.

4. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

4.1 PANI sintezė tirpale

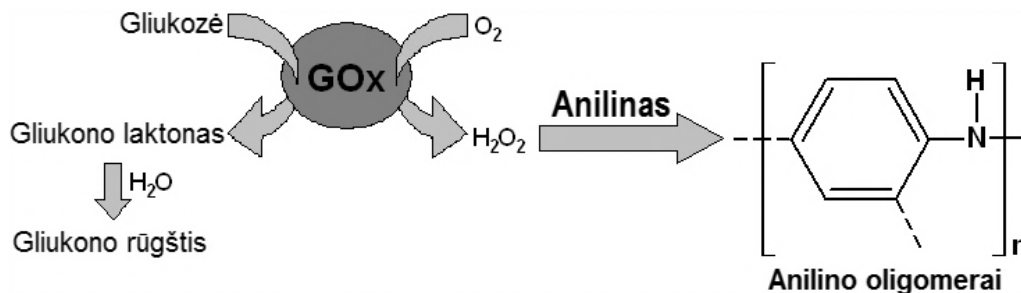
PANI – gerai žinomas KP pasižymintis dideliu elektrocheminiu ir terminiu stabilumu, įdomiomis elektrocheminėmis ir optinėmis savybėmis. Be to, dėl puikaus laidžio, šis polimeras gali būti naudojamas palengvinti elektronų pernašą nuo fermento aktyviojo centro link elektrodo paviršiaus [136]. PANI tradiciškai sintetinamas elektrocheminės arba cheminės oksidacinės sintezės būdu. Elektrocheminės sintezės metu gaunamas PANI sluoksnis elektrodo paviršiuje, cheminės oksidacinės sintezės metu – polimero dalelės visame tirpalo tūryje. Tiek elektrocheminei, tiek ir cheminei oksidacinės sintezei reikalingos didelės medžiagų koncentracijos, žema arba ekstremaliai žema terpės pH vertė, naudojami toksiški katalizatoriai bei stiprūs oksidatoriai [137]. Šie trūkumai priverčia ieškoti alternatyvių PANI sintezės būdų. Vienas iš jų būtų fermentinė PANI sintezė.

Šiame darbe katalizinis gliukozės oksidazės aktyvumas buvo panaudotas PANI polimerizacijai. GOx – tai nuo FAD priklausomas fermentas katalizuojantis β -D-gliukozės oksidaciją molekulinio O_2 iki H_2O_2 ir D-gliukono-1,5-laktono (4), kuris spontaniškai hidrolizuojasi iki β -D-gliukono rūgšties (5):

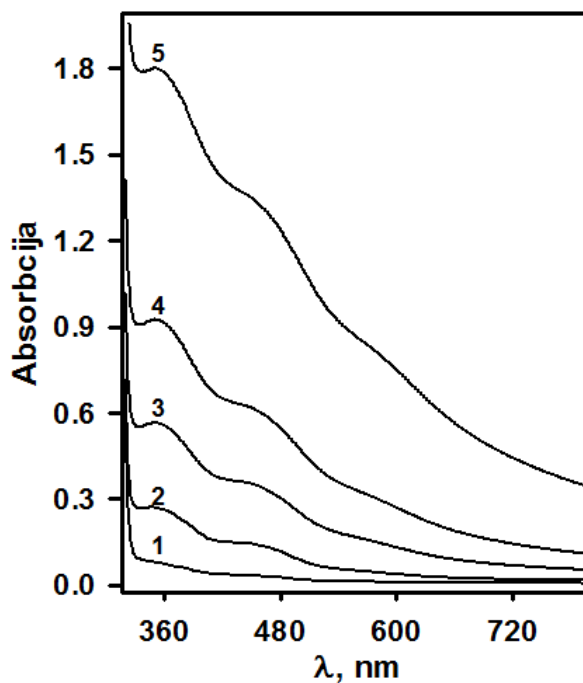


PANI sintezė buvo atlikta kambario temperatūroje, A-PBS buferiniame tirpale pH 6,0. Polimerizacijos tirpalas buvo sudarytas iš keturių pagrindinių komponentų: anilino – galinčio polimerizuotis monomero, GOx – vandenilio peroksidą gaminančio fermento, gliukozės – GOx redukuojančio substrato, ištirpusio deguonies – gliukozės oksidazę oksiduojančio substrato. Tirpale esant gliukozei ir ištirpusiam deguoniui GOx katalizuojamos reakcijos metu susidaręs stiprus oksidatorius, vandenilio peroksidas, sudaro sąlygas anilino polimerizacijos

reakcijai vykti, kurios metu susidaro polianilino oligomerai ir polimeras (pav. 4.1).



Pav. 4.1. Principinė anilino polimerizacijos schema.

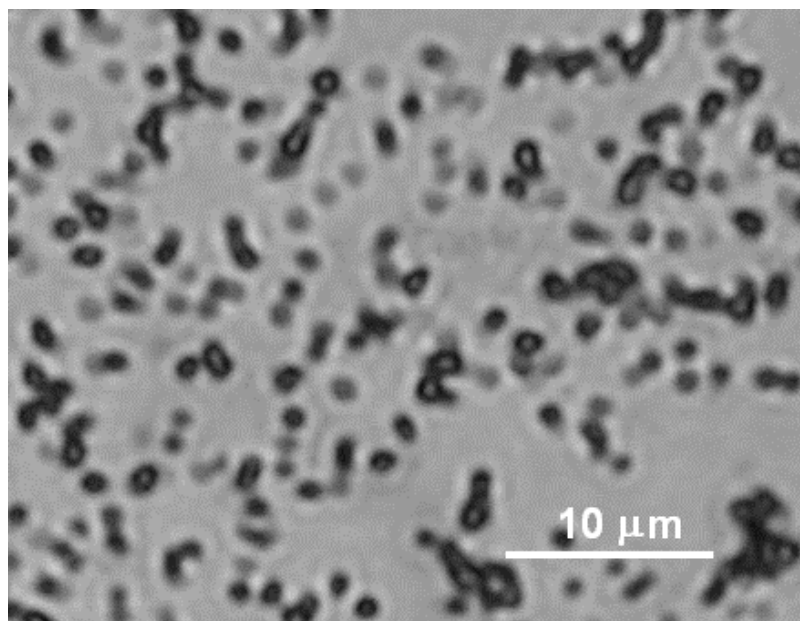


Pav. 4.2 PANI absorbcijos spektrų kitimas laike: 1 –polimerizacijos pradžia; 2 – po 23 valandų; 3 – po 47 valandų; 4 – po 75 valandų; 5 – po 99 valandų polimerizacijos. Polimerizacija vykdyta A-PBS buferiniame tirpale pH 6,0 esant 200 mmol l^{-1} anilino, 1 mg/ml GOx ir 20 mmol l^{-1} gliukozės.

Anilino polimerizacijos reakcija buvo vykdoma A-PBS buferiniame tirpale (pH = 6), turinčiame 200 mmol l^{-1} anilino, 1 mg/ml GOx ir 20 mmol l^{-1} gliukozės. Polimerizacijos reakcijos eiga laike buvo stebima spektrofotometriškai

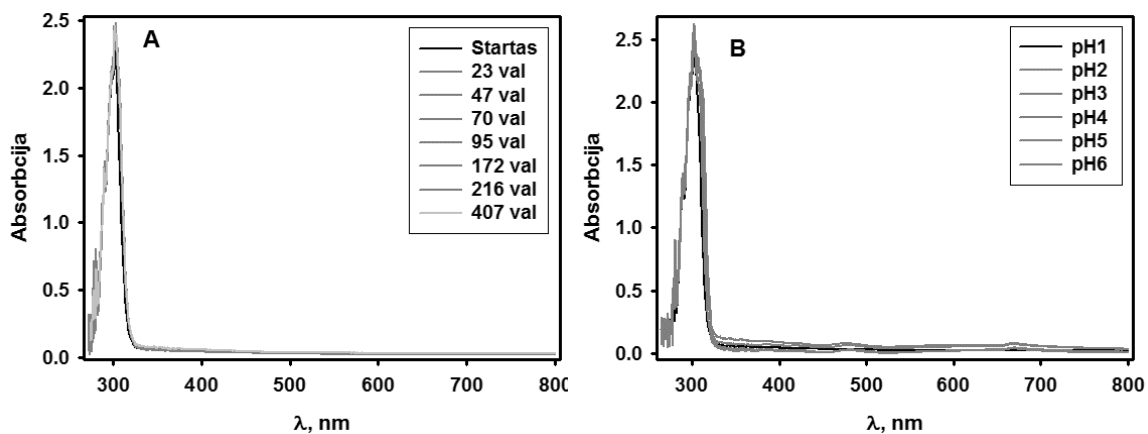
registruojant absorbciją 300 – 800 nm bangų ilgių intervale. Iš absorbcijos spektrų kitimo laike (pav. 4.2), galime spręsti, kad anilino polimerizacija vyksta, nes spektre fiksuojami PANI būdingi absorbcijos maksimumai ties 360 ir 450 nm. Absorbcijos maksimumas ties 360 nm rodo nedidelės molekulinės masės PANI oligomerų susidarymą [138]. Tuo tarpu absorbcijos maksimumas ties 450 nm gali būti susietas su šakotos struktūros PANI susidarymu [139,140].

Atliekant tolimesnę fermentinę PANI sintezę tirpale pastebėta, kad po tam tikro laiko, priklausomai nuo terpės pH, absorbcijos intensyvumas pradeda mažėti. Tai galima paaiškinti tuo, kad susidarantios polianilino dalelės sukimba, tampa netirpiomis ir išsėda ant kiuvetės dugno. Dėl šios priežasties stebime absorbcijos pokyčio sumažėjimą. Nustatyta, kad po 240 valandų polimerizacijos susidariusios polianilino dalelės yra 1 – 3 μm dydžio (pav. 4.3).



Pav. 4.3 Fermentinės sintezės būdu PANI dalelių nuosėdos užfiksuotos optiniu mikroskopu. Polimerizacija vykdyta A-PBS buferiniame tirpale pH 6,0 esant 200 mmol l^{-1} anilino, 1 mg/ml GOx ir 20 mmol l^{-1} gliukozės 240 valandų.

Siekiant patvirtinti ar polianilinas nesusidaro savaime buvo atliktas kontrolinis savaiminės anilino polimerizacijos tirpale tyrimas. Savaiminis polianilino susidarymas buvo stebimas spektrofotometriškai. Iš literatūros šaltinių žinome, kad polianilinui būdingi absorbcijos maksimumai yra 350 – 450 nm ir 750 – 850 nm bangos ilgių srityse. Todėl siekiant nustatyti ar vyksta savaiminė polianilino polimerizacija buvo registruojamas skirtingo pH (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0; 12,0) 0,05 mol l⁻¹ A-PBS tirpalų turinčių 200 mmol l⁻¹ anilino, absorbcijos spektrų kitimas laike. Išanalizavus gautus duomenis nustatyta, kad savaiminė anilino polimerizacija nevyksta, nes laikui bėgant nei vieno pH tirpale neatsirado polianilinui būdingų adsorbcijos maksimumų (pav. 4.4).



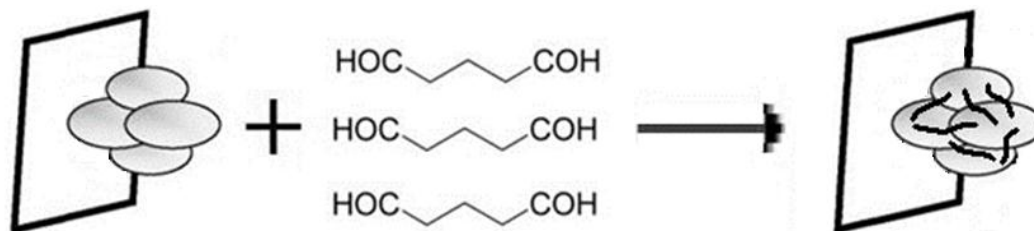
Pav. 4.4 Anilino absorbcijos spektrai: A – kitimas laike (pH = 6,0); B – įvairių pH reikšmių po 407 valandų. Polimerizacija vykdyta A-PBS buferiniame tirpale esant 200 mmol l⁻¹ anilino.

4.2. Grafito elektrodų paviršiuje imobilizuotos GOx įterpimas į PANI sluoksnį

Iš atliktų tyrimų su KP žinoma, kad jie ne tik suteikia stabilią ir porėtą matricą fermentų imobilizavimui, bet taip pat gali palengvinti elektronų pernašą nuo fermento aktyviojo centro link elektrodo paviršiaus. Fermento įterpimas į

polimerinį sluoksnį apsaugo fermentą nuo išsiplovimo, tačiau dėl sluoksnio pralaidumo analizei katalizinėmis savybėmis pasižyminčių sričių prieinamumas išlieka. Be to, po fermento imobilizavimo į KP sluoksnį, dėl difuzinių apribojimų ženkliai padidėjusi Michaelio konstanta (K_M) sąlygoja reikšmingą jutiklio analizinio signalo priklausomybės nuo analitės koncentracijos tiesinio intervalo padidėjimą, o tai leidžia analizuoti didesnes analitės koncentracijas [141]. Todėl pradinis šio darbo uždavinys buvo grafitinių elektrodų paviršiuje imobilizuotą GOx įterpti į PANI sluoksnį.

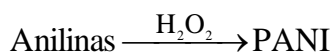
Šio darbo metu GOx buvo imobilizuota ant grafito elektrodo paviršiaus užlašinant tam tikrą GOx tirpalo kiekį, nudžiovinant ir fermentą surišant skersiniais-išilginiais ryšiais su difunkciniu reagentu glutaro aldehidu (GA) (pav. 4.5). Toks GOx imobilizavimas būdas buvo pasirinktas todėl, kad tai yra bene dažniausiai naudojama oksidazių imobilizavimo procedūra [142]. Be to, šis imobilizavimo būdas įgalina tvirtai sujungti fermentą su pasirinktu paviršiumi, stabilizuoja fermento erdvinę struktūrą, išvengiama fermento denatūracijos.



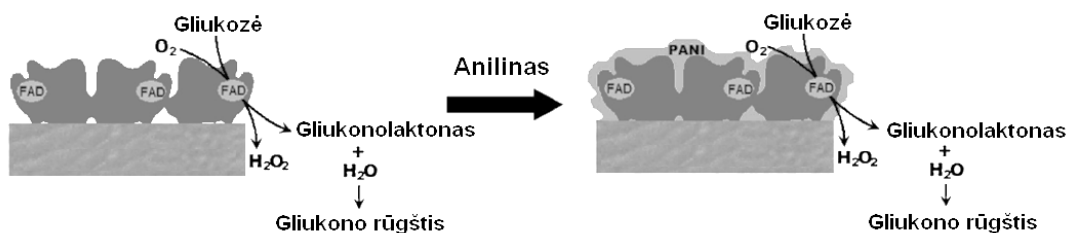
Pav. 4.5 GOx imobilizavimas elektrodo paviršiuje surišant skersiniais-išilginiais ryšiais glutaro aldehidu.

Katalizinis GOx, imobilizuotos grafito elektrodo paviršiuje surišant skersiniais-išilginiais ryšiais su glutaro aldehidu (GR/GOx), aktyvumas buvo panaudotas anilino polimerizacijai. Kaip jau minėta GOx katalizuoja β -D-gliukozės oksidaciją molekulinio O_2 iki H_2O_2 ir D-gliukono-1,5-laktono (4), kuris spontaniškai hidrolizuojasi iki β -D-gliukono rūgšties (5). Kadangi anilino pKa yra 4,63, o GOx pI yra 4,2, tai esant pH mažesniems nei 4,63 anilinas turės teigiamą

krūvį, o GOx, esant pH didesniai nei 4,2, turės neigiamą krūvį. Dėl elektrostatinės sąveikos teigiamai įkrautas anilino monomeras bus traukiamas prie neigiamai įkrauto glikoproteino GOx. Tirpale esant gliukozės ir ištirpusio O₂, dėl elektrodo paviršiuje imobilizuotos GOx katalizuojamos reakcijos, susidarys H₂O₂ ir gliukono laktonas. Dėl gliukono laktono hidrolizės metu susidariusios gliukono rūgšties terpės, greta imobilizuoto fermento, pH sumažės. Lokaliai sumažėjusi terpės pH (4,3 – 4,5) ir didelė oksidatoriaus (H₂O₂) koncentracija sudaro optimalias sąlygas anilino polimerizacijai (6) ir padidina tikimybę, kad GOx bus įterpiama į susidarantį PANI sluoksnį (GR/GOx/PANI) (pav. 4.6). Taigi, mūsų pasiūlytas GOx įterpimo į PANI sluoksnį metodas iš dalies buvo pagrįstas elektrostatine sąveika tarp teigiamai įkrauto anilino monomero ir neigiamai įkrautos imobilizuotos GOx. Tai sumažina šakotos polimero struktūros susidarymą ir skatina linijinės PANI grandinės augimą [143].



(6)



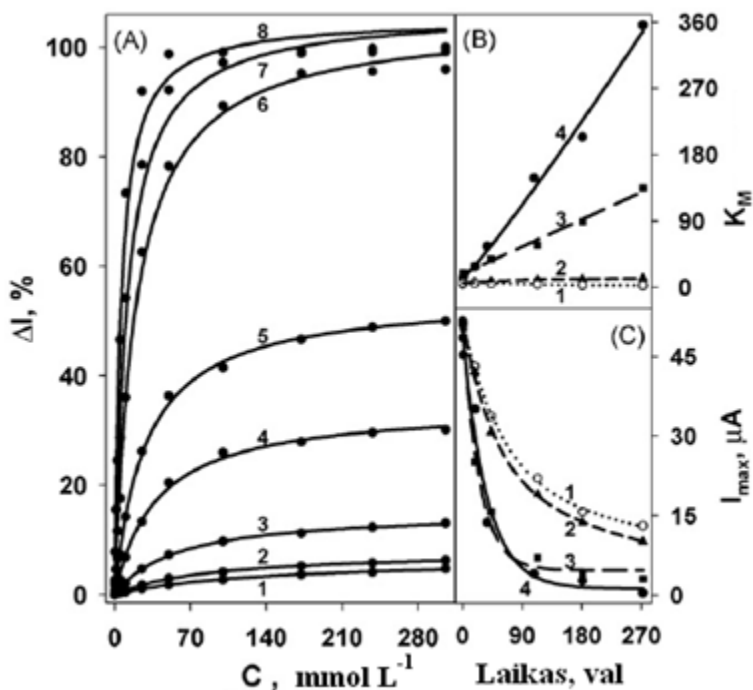
Pav. 4.6 Grafito elektrodo paviršiuje imobilizuotos GOx įterpimas į PANI sluoksnį.

Imobilizuota GOx įterpiama į PANI sluoksnį tik tuo atveju, kai elektrodas su imobilizuotu fermentu tam tikram laikui panardinamas į buferinį tirpalą, kuriame yra ir gliukozės ir anilino. Siekiant patvirtinti GOx įterpimą į susidarantį PANI sluoksnį buvo atlikti kontrolinių elektrodų tyrimai. Kontrolinis elektrodas 1 buvo gautas GR/GOx elektrodą tam tikram laikui pamerkiant į buferinį tirpalą,

kuriame yra gliukozės, bet nėra anilino, o kontrolinis elektrodas 2 – įmerkiant į tirpalą, kuriame yra anilino, bet nėra gliukozės. Pagrindinis anilino polimerizacijos proceso elektrodo paviršiuje įrodymas buvo K_M didėjimas ir soties srovės (I_{max}) mažėjimas. Kinetinės GOx savybės buvo tiriamos kambario temperatūroje esant skirtingoms gliukozės koncentracijoms (0,05 – 305 mmol l⁻¹). Šių tyrimų rezultatai pateikti 4.3. skyriuje.

4.3. Įterptos į PANI sluoksnį GOx kinetinių savybių tyrimai

GR/GOx ir GR/GOx/PANI elektrodai buvo paruošti pagal metodiką aprašyta 3.3 – 3.4, o amperometriniai šių elektrodų tyrimai buvo atliekami pagal metodiką aprašyta 3.10 skyriuje. Amperometrinio biologinio jutiklio konstrukcija buvo pasirinkta todėl, kad mūsų nuomone ji buvo tinkamiausia tokios rūšies tyrimams, nes reikalingi tik labai maži medžiagų kiekiai, tas pats elektrodas gali būti panaudotas keletui matavimų, elektrodų modifikavimas gali būti atliktas lengvai atkartojamomis sąlygomis, neimobilizuota ir/arba neįterpta į PANI matricą GOx gali būti lengvai nuplauta nuo indikatorinio elektrodo paviršiaus.



Pav. 4.7 (A) Kalibravimo kreivės GR/GOx (8) ir GR/GOx/PANI elektrodui po 0,17 val. (7), 1,17 val. (6), 18 val. (5), 43 val. (4), 113 val. (3), 181 val. (2) ir 272 val. (1) polimerizacijos trukmės 4°C temperatūroje. K_M **(B)** ir I_{max} **(C)** priklausomybė nuo inkubacijos trukmės kontroliniame tirpale 1 esant 4°C (1), kontroliniame tirpale 2 esant 4°C (2) ir polimerizacijos tirpale esant 4°C (3) ir 18°C (4). Elektrocheminiai matavimai atlikti A-PBS buferiniame tirpale pH 6,0 esant 10 mmol l⁻¹ FMS. Indikatorinio elektrodo potencialas +300 mV Ag/AgCl/Cl⁻ 3 mol l⁻¹ atžvilgiu.

Skirtingai modifikuoti elektrodai buvo tiriami trielektrodinėje elektrocheminėje gardelėje, A-PBS buferiniame tirpale (pH = 6,0) su papildomai įdėtu 0,1 mol l⁻¹ KCl ir 10 mmol l⁻¹ FMS. Modifikuotą elektrodą įjungus kaip indikatorinį ir didinant gliukozės koncentraciją nuo 0,05 mmol l⁻¹ iki 305 mmol l⁻¹ buvo registruojamas srovės stiprio kitimas laike esant pastoviam +300 V potencialui (pagal Ag/AgCl/Cl⁻ 3 mol l⁻¹ elektrodą). Elektrocheminių tyrimų duomenys pateikti pav. 4.7 ir 4.1 lentelėje.

4.1 lentelė. Kinetiniai GR/GOx ir GR/GOx/PANI elektrodų (polimerizacija vykdyta 4°C temperatūroje) parametrai, apskaičiuoti aproksimavus elektrocheminių tyrimų rezultatus.

| Polimerizacijos trukmė, val. | K_M , mmol l ⁻¹ | I_{max} , μA | R |
|------------------------------|------------------------------|----------------|--------|
| 0 | 5,75 ± 0,58 | 51,72 ± 1,81 | 0,996 |
| 0,17 | 11,28 ± 1,25 | 51,53 ± 1,23 | 0,9958 |
| 1,17 | 19,38 ± 1,54 | 50,32 ± 2,49 | 0,998 |
| 18 | 28,30 ± 1,48 | 25,11 ± 0,97 | 0,9992 |
| 43 | 38,62 ± 2,82 | 15,69 ± 0,63 | 0,9986 |
| 113 | 57,05 ± 2,14 | 7,03 ± 0,11 | 0,9996 |
| 181 | 89,34 ± 3,07 | 3,72 ± 0,04 | 0,9997 |
| 272 | 134,91 ± 11,84 | 3,06 ± 0,01 | 0,9986 |

Amperometrinio signalo priklausomybės nuo substrato (gliukozės) koncentracijos tirpale buvo aprašytos dviejų kintamųjų hiperbolinėmis lygtimis,

kurios suderinamos su Michaelio-Menten kinetika. Kinetiniai parametrai I_{\max} (atitinka V_{\max}) ir K_M atitinka hiperbolinės funkcijos $y = ax/(b + x)$ parametrus a ir b . Kaip jau minėta, pagrindinis anilino polimerizacijos proceso elektrodo paviršiuje įrodymas buvo K_M didėjimas ir I_{\max} mažėjimas. Tyrimų duomenys pateikti pav. 4.7 ir 4.1 lentelėje iliustruoja, jog GR/GOx ir GR/GOx/PANI modifikuotiems elektrodams būdingos stipriai besiskiriančios K_M vertės. Kaip matyti iš 4.1 lentelėje pateiktų duomenų GR/GOx elektrodai K_M ir I_{\max} vertės yra 5,75 mmol l⁻¹ ir 51,72 μA atitinkamai. Tuo tarpu GR/GOx/PANI elektrodai K_M vertė padidėja iki 134,9 mmol l⁻¹ jei polimerizacija vykdoma 4°C temperatūroje (pav. 4.7 B, 3 kreivė) ir iki 356,00 mmol l⁻¹ jei polimerizacija vykdoma 18°C temperatūroje (Pav. 4.7 B, 4 kreivė). Priešingas rezultatas buvo gautas I_{\max} vertėms. Tyrimo rezultatai pateikti 4.5 C paveiksle rodo, kad I_{\max} vertė sumažėja nuo 51,72 μA (GR/GOx elektrodai) iki 3,06 μA, jei polimerizacija vykdoma 4°C temperatūroje, arba 0,42 μA, jei polimerizacija vykdoma 18°C temperatūroje. Taigi, palyginus kinetinius parametrus, gautus GR/GOx ir GR/GOx/PANI elektrodams, matyti, kad GR/GOx/PANI elektrodams I_{\max} vertės sumažėja 16,69 ir 121,59 karto, tuo tarpu K_M vertė padidėja atitinkamai 23,5 ir 61,9 karto (polimerizacijos trukmė 272 val.). Toks ženklus K_M padidėjimas ir I_{\max} sumažėjimas rodo, kad GR/GOx/PANI elektrodams difuziniai apribojimai turi reikšmingą įtaką ir galima teigti, kad ši konstrukcija veikia difuzinio limitavimo būdu. Tuo tarpu, elektrodas, modifikuotas GR/GOx veikia fermento kinetinio limitavimo būdu, nes šiuo atveju difuziniai apribojimai yra minimalūs. K_M padidėjimas daugiau nei 10 kartų [144,141] gali būti įrodymu, kad grafito elektrodo paviršiuje imobilizuota GOx buvo įterpta į susidarantį PANI sluoksnį. Be to, dėl difuzinių apribojimų padidėjusi K_M sąlygoja reikšmingą GR/GOx/PANI analitinės sistemos tiesinio analizinio signalo priklausomybės nuo analitės koncentracijos intervalo padidėjimą, lyginant su GR/GOx. Toks ženklus analitės koncentracijos nustatymo intervalo praplėtimas yra ypatingai aktualus gliukozės koncentracijos nustatymui maisto produktų ir gėrimų mėginiuose. Kita vertus,

difuzinių apsunkinimų padidėjimas sąlygoja maksimalios srovės, generuojamos GR/GOx/PANI elektrodo, sumažėjimą, kadangi yra ribojama tiek substrato difuzija, tiek ir elektronų pernešimo tarpininko – FMS difuzija. Šie faktai patvirtina teorinius teiginius, kad po fermento įterpimo į polimerinį sluoksnį, fermentiniu aktyvumu pasižyminčio sluoksnio storis dėl difuzinių apsunkinimų analizei ir reakcijos produktams į/iš šio sluoksnio yra 200 – 400 nm [145].

Tyrimų duomenys pateikti pav. 4.7 A rodo, kad polimerizacija vykdoma ilgą laiko tarpą – virš 270 val. Polimerizacijos reakcijai naudojama gliukozė ir anilinas, taip pat kaip ir susidarantis vandenilio peroksidas bei gliukono rūgštis, teoriškai taip pat gali įtakoti modifikuotų elektrodų paviršiuje esančios GOx kinetiniams parametrus. Priežastys gali būti: (i) galima pradinių medžiagų (gliukozės ir anilino) bei susidarančių fermentinės reakcijos produktų (vandenilio peroksido ir gliukono rūgšties) reakcija su GOx paviršiumi bei aktyviuoju centru; (ii) elektrodo paviršiaus užsiteršimas ir elektrocheminė inaktyvacija; ir (iii) fermento pašalinimas nuo elektrodo paviršiaus. Siekiant ištirti šių poveikių įtaką GOx kinetiniams parametrus buvo reikalingi kontroliniai elektrodai. Kaip jau minėta, ruošiant kontrolinį elektrodą 1 GR/GOx elektrodas tam tikram laikui buvo pamerkiamas į buferinį tirpalą, kuriame yra gliukozės, bet nėra anilino – būtino polimerizacijai komponento. Tuo tarpu kontrolinis elektrodas 2 buvo gautas GR/GOx elektrodą įmerkiant į tirpalą, kuriame yra anilino, bet nėra gliukozės, kuri yra būtina vandenilio peroksido – anilino polimerizacijos iniciatoriaus – susidarymui. Tyrimų duomenys pateikti pav. 4.7 B ir C kreivėse 1 ir 2, taip pat 4.2 lentelėje.

4.2 lentelė. Kinetiniai kontrolinių elektrodų parametrai, apskaičiuoti aproksimavus elektrocheminių tyrimų rezultatus.

| Inkubavimo trukmė, val. | Kontrolinis elektrodas 1 | | Kontrolinis elektrodas 2 | |
|-------------------------|------------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|
| | K_M , mmol l ⁻¹ | I_{max} , μA | K_M , mmol l ⁻¹ | I_{max} , μA |
| 0 | 5,80 ± 0,14 | 51,81 ± 1,35 | 5,78 ± 0,21 | 51,68 ± 1,04 |
| 18 | 5,63 ± 0,17 | 43,11 ± 1,12 | 7,09 ± 0,23 | 42,11 ± 0,99 |
| 43 | 5,47 ± 0,19 | 33,69 ± 0,93 | 8,56 ± 0,39 | 30,69 ± 0,83 |
| 113 | 4,19 ± 0,14 | 22,03 ± 0,29 | 10,39 ± 0,54 | 19,03 ± 1,12 |
| 181 | 2,94 ± 0,09 | 15,72 ± 0,33 | 11,26 ± 0,49 | 13,72 ± 0,64 |
| 272 | 2,64 ± 0,07 | 13,06 ± 0,61 | 12,09 ± 0,53 | 10,06 ± 0,43 |

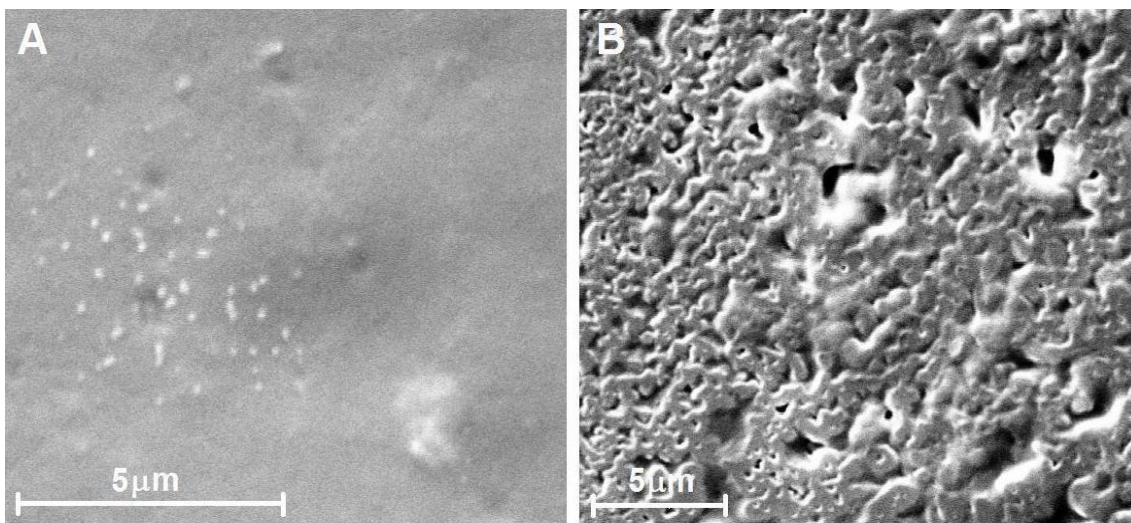
Kontrolinio elektrodo 2 inkubavimas kontroliniame tirpale 2, kuriame buvo vien tik anilinas, sukėlė kontrolinio elektrodo 2 K_M reikšmės didėjimą (pav. 4.7 B 2 kreivė, 2 lentelė), tačiau šis padidėjimas po 272 val. inkubacijos periodo buvo 11 kartų mažesnis lyginant su GR/GOx/PANI elektrodu gautu GR/GOx elektrodą inkubuojant polimerizacijos tirpale turinčiame ir gliukozės, ir anilino 4°C temperatūroje (Pav. 4.7 B 3 kreivė, 4.1 lentelė) ir beveik 30 kartų mažesnis lyginant su GR/GOx/PANI elektrodu gautu vykdant polimerizaciją 18°C temperatūroje (pav. 4.7 B 4 kreivė). Tuo tarpu kontrolinio elektrodo 2 I_{max} sumažėjimas buvo 3,29 kartus mažesnis (pav. 4.7 C 2 kreivė, 4.2 lentelė) lyginant su GR/GOx/PANI elektrodu gautu vykdant polimerizaciją 4°C temperatūroje (pav. 4.7 C 3 kreivė, 4.1 lentelė).

Inkubuojant kontrolinį elektrodą 1 kontroliniame tirpale 1, kuriame buvo vien tik gliukozė ir nebuvo anilino, apskaičiuota K_M reikšmė po 272 val. inkubacijos trukmės buvo 2 kartus mažesnė (pav. 4.7 B 1 kreivė, 2 lentelė) palyginus su K_M reikšme apskaičiuota kontroliniam elektrodui 2 (pav. 4.7 B 2 kreivė, 2 lentelė) ir net 51 kartą mažesnė lyginant su GR/GOx/PANI elektrodu gautu vykdant polimerizaciją 4°C temperatūroje (pav. 4.7 C 3 kreivė, 1 lentelė). Priešingai rezultatams gautiems kontroliniam elektrodui 2 ir GR/GOx/PANI elektrodams, kontrolinio elektrodo 1 K_M reikšmė ilgėjant inkubacijos trukmei mažėjo ir po 272 val. inkubacijos trukmės K_M reikšmė sumažėjo 2,2 karto. Tai galima paaiškinti lėta elektrodo paviršiuje imobilizuotos GOx sluoksnio

degradacija, kuris ilgėjant inkubacijos trukmei tampa vis plonesnis dėl dalies fermentinio sluoksnio išsiplovimo, o difuzija pro jį tampa vis greitesnė. Panašūs rezultatai buvo gauti inkubuojant GOx modifikuotus elektrodus gryname buferiniame tirpale (duomenys nepateikti). Po 272 val. inkubacijos trukmės kontroliniam elektrodui 1 apskaičiuota K_M reikšmė buvo $2,64 \pm 0,07 \text{ mmol l}^{-1}$ (pav. 4.7 B 1 kreivė, 2 lentelė). Ši K_M reikšmė yra artima natyvos GOx K_M reikšmei. Tai reiškia, kad elektrodo paviršiuje imobilizuotos GOx sluoksnis tampa toks plonas, kad jutiklis pradeda veikti kinetinio limitavimo režimu užuot veikęs difuzinio limitavimo režimu.

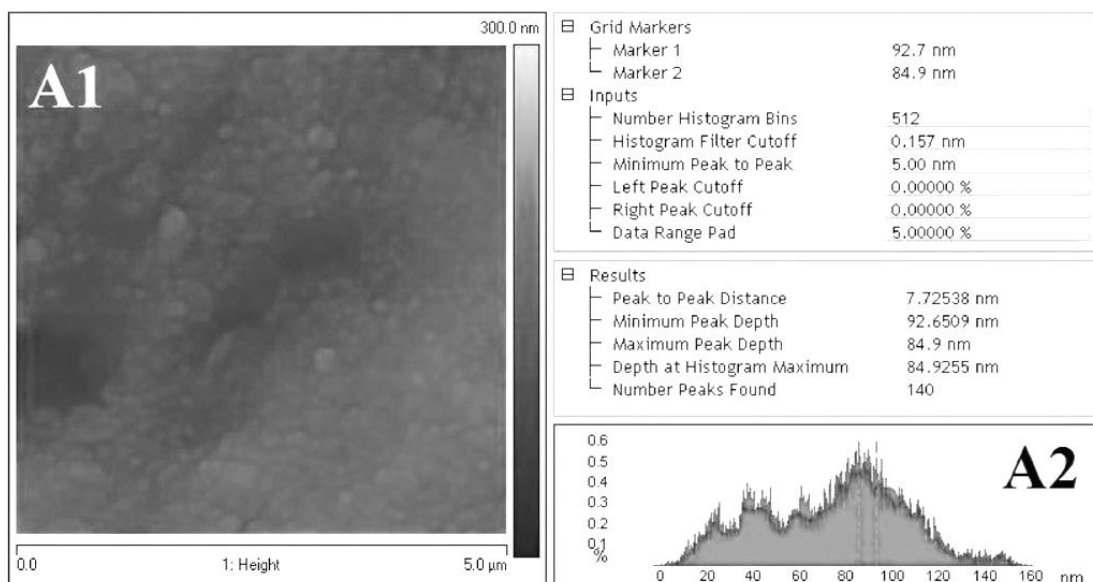
4.4. Elektrodo paviršiaus tyrimai SEM ir AJM

GR/GOx ir GR/GOx/PANI elektrodo paviršiaus SEM vaizdai pateikti pav. 4.8 A demonstruoja, kad prieš GR/GOx elektrodo paviršiuje susidarant PANI, elektrodo paviršius atrodo blyškus dėl nelaidaus GOx sluoksnio išbarstančio elektronus. Po PANI sluoksnio susidarymo elektrodo paviršiaus morfologija žymiai pasikeitė (pav. 4.8 B). Skirtinga elektronų sklaida 4.8 A ir B paveiksle iliustruoja, kad GR/GOx/PANI elektrodo paviršius yra žymiai laidesnis lyginant su GR/GOx elektrodu. GR/GOx/PANI elektrodo paviršiaus morfologija (pav. 4.8 B) aiškiai rodo, kad GR/GOx elektrodo paviršiuje susidarė naujos polimerinės struktūros. Be to, buvo nustatyta, kad susidariusio PANI sluoksnio storis, po 113 val. polimerizacijos trukmės, buvo apie $1 \mu\text{m}$.

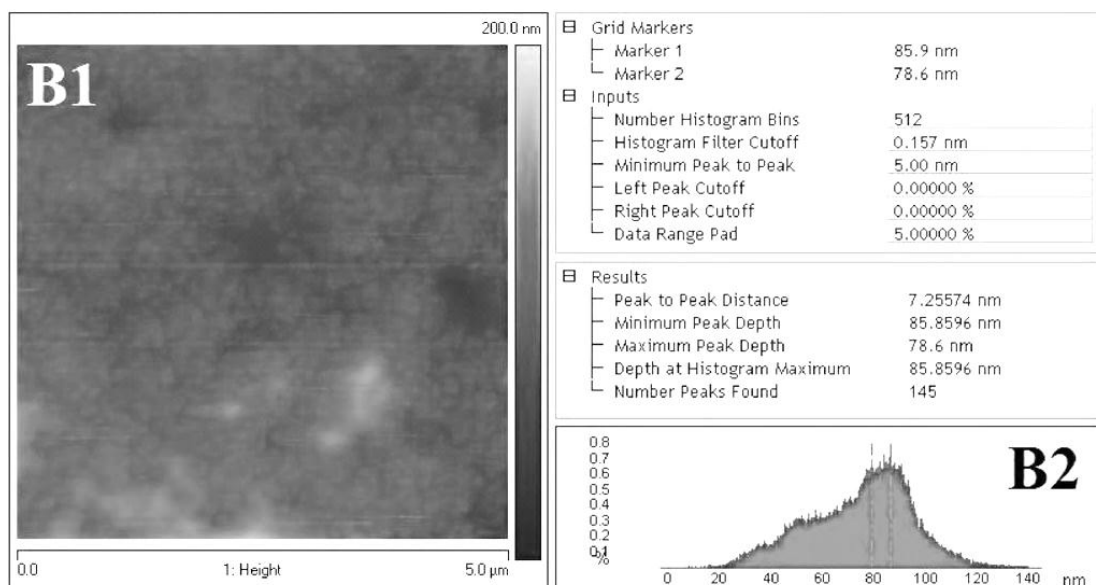


Pav. 4.8 Elektrodo paviršiaus SEM vaizdai: A – GR/GOx elektrodo paviršius; B – GR/GOx/PANI elektrodo paviršius.

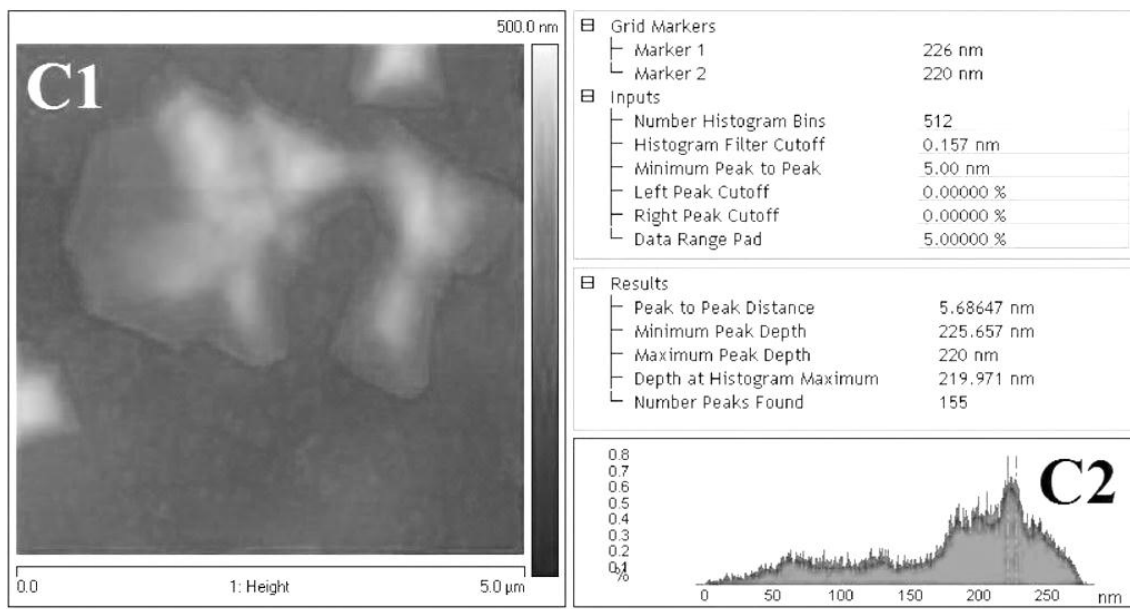
Tiriant elektrodo paviršius AJM buvo pasirinktas pusiau kontaktinis (virpančio zondo) režimas, leidžiantis nepažeidžiant tyrimo objekto gauti artimą kontaktiniam režimui skiriamąją gebą, bei turintis fazinio vaizdinimo galimybę. AJM tyrimams buvo pasirinkti trys elektrodo paviršiai: nušveisto ir paruošto GOx imobilizavimui (pav. 4.9), GR/GOx (pav. 4.10) ir GR/GOx/PANI (pav. 4.11). Iš paruošto GOx imobilizavimui grafito elektrodo paviršiaus dvimačio vaizdo pateikto pav. 4.9 A1 matyti, kad jo paviršius yra šiurkštus, o iš aukščio pasiskirstymo histogramos galima teigti, kad yra daug įvairaus dydžio dalelių (nuo 2 iki 160 nm). GR/GOx grafito elektrodo paviršiaus dvimatis vaizdas pateiktas pav. 4.10 B1, iš kurio matyti, kad imobilizuoto fermentinio sluoksnio paviršius yra tolygus. Gautas skenavimo metu trimatis vaizdas leidžia spręsti ne tik apie paviršiaus morfologiją, bet ir apie jo paviršiuje esančių struktūrų dydį bei dydžio pasiskirstymą, kurie gali būti apskaičiuojami, pasinaudojus histogramos funkcija. Nagrinėtoje sistemoje aptinkamos įvairaus dydžio, t.y. nuo 2 iki 140 nm struktūros, tačiau dominuojančios yra 85 nm dydžio struktūros.



Pav. 4.9 GR elektrodo paviršiaus dvimatis vaizdas (A1) ir aukščių pasiskirstymo histograma (A2).



Pav. 4.10 GR/GOx elektrodo paviršiaus dvimatis (B1) vaizdas ir aukščių pasiskirstymo histograma (B2).

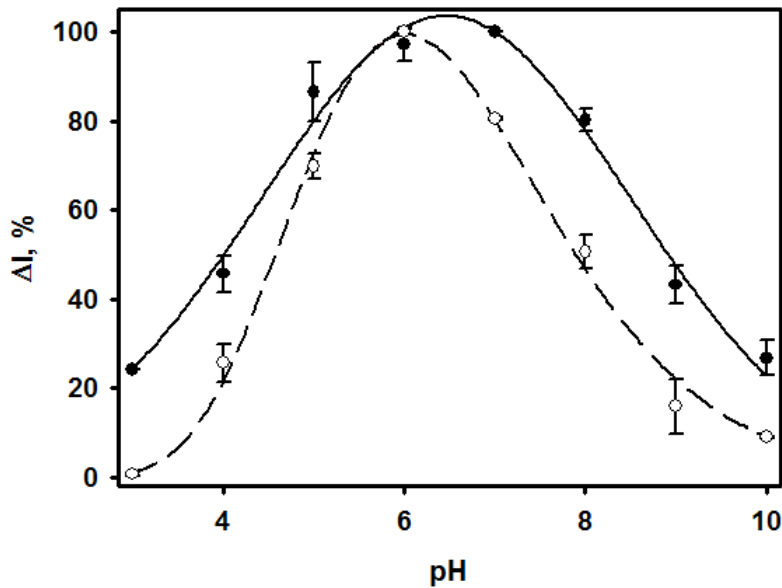


Pav. 4.11 GR/GOx/PANI elektrodo dvimatis vaizdas (C1) ir aukščių pasiskirstymo histograma (C2). Polimerizacijos trukmė 24 valandos.

Padengto PANI sluoksniu GR/GOx elektrodo paviršiaus dvimatis vaizdas bei aukščių pasiskirstymo histogramos pavaizduotos pav. 4.11. Iš paveikslo aiškiai matyti paviršiaus struktūros pokytis lyginant su GR ir GR/GOx elektrodais. Po GR/GOx elektrodo padengimo PANI sluoksniu, elektrodo paviršius tapo šiurkštesnis, o vyraujančių struktūrų dydis pakito nuo 80 – 85 nm iki 220 – 225 nm. Taigi, iš pateiktų aukščio pasiskirstymo histogramų yra aiškiai matomas elektrodo paviršiaus morfologijos pokytis tiek po jo padengimo GOx sluoksniu (pav. 4.9 A2 ir pav. 4.10 B2), tiek ir po padengimo PANI sluoksniu (pav. 4.10 B2 ir pav. 4.11 C2). Be to, paveiksluose patekti AJM vaizdai, taip pat kai ir aukščio pasiskirstymo histogramos, rodo paviršiaus šiurkštumo padidėjimą. Tai patvirtina pav. 4.8 pateiktus SEM vaizdus. Taigi, tiek atlikti AJM, tiek ir SEM paviršių tyrimai patvirtina GR/GOx elektrodo paviršiuje PANI sluoksniu susidarymą.

4.5. PANI įtaka gliukozės biologinio jutiklio parametrams

Tinkamai pasirinkta polimerizacijos tirpalo pH vertė leidžia efektyviai įterpti fermentą į susidarantį polimero sluoksnį ir apsaugoti fermentą nuo galimo aktyvumo praradimo [146]. Be to, biologinio jutiklio analizinis signalas taip pat priklauso ir nuo pH vertės elektrocheminėje gardelėje. Tėpės pH įtaka kataliziniam fermento aktyvumui buvo ištirta indikatoriniu elektrodu naudojant GR/GOx arba GR/GOx/PANI elektrodus. Tyrimai atlikti A-PBS buferiniuose tirpaluose su papildomai įdėtu $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ KCl, esant 10 mmol l^{-1} FMS ir 20 mmol l^{-1} gliukozės. Buferinių tirpalų pH reikšmės buvo nuo 3,0 iki 10,0 pH. Tyrimo duomenys pateikti pav. 4.12.



Pav. 4.12 GR/GOx (brūkšninė linija) ir GR/GOx/PANI (vientisa linija) elektrodų analizinio signalo pokyčio procentais priklausomybė nuo tirpalo pH. Matavimai atlikti A-PBS buferiniame tirpale, kambario temperatūroje, tirpale esant 10 mmol l^{-1} FMS ir 20 mmol l^{-1} gliukozės. Indikatorinio elektrodo potencialas $+300 \text{ mV Ag/AgCl/Cl}^{-1}$ 3 mol l^{-1} atžvilgiu.

Ištirus GR/GOx ir GR/GOx/PANI elektrodų analizinio signalo priklausomybę nuo terpės pH nustatyta, kad GR/GOx elektrodų atveju didžiausias

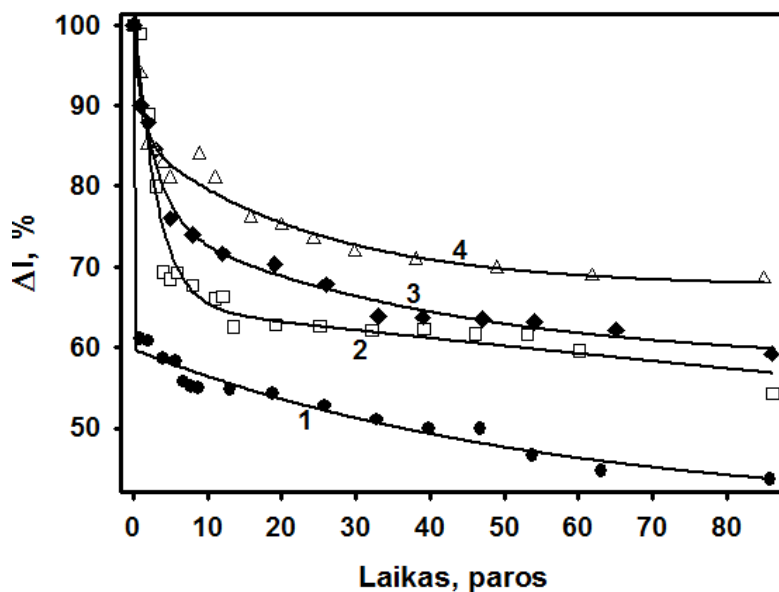
analizinis signalas į substratą (gliukozę) registruojamas tuomet, kai terpės pH yra 6,0. Šie duomenis sutampa su pH reikšme nustatyta natyviai GOx [147]. Esant šiam pH GOx pasižymi maksimaliu katalizinės reakcijos greičiu ir didžiausiu stabilumu. Apibendrinant tyrimo duomenis buvo pastebėta, kad esant pH mažesniai nei 4,0 ir didesniai nei 8,0 katalizinis imobilizuotos GOx aktyvumas staigiai mažėja. Pavyzdžiui, esant pH 10,0 išlieka tik tai apie 10 % pradinio GOx aktyvumo. Mažame pH GOx yra inhibuojama anijonų [148]. Esant pH 3,0, netgi 0,1 mol l⁻¹ KCl fermento aktyvumą inhibuoja visiškai [149].

GR/GOx/PANI elektrodams optimalus pH buvo detektuotas 6,5. Gauti rezultatai rodo, kad GOx įterpimo į susidarantį PANI sluoksnį procedūra išlaiko natyvias GOx charakteristikas. GR/GOx/PANI elektrodams GOx aktyvumo pH profilis tampa platesnis ir pasislenka per 0,5 pH vienetų į didesnių pH sritį lyginant su GR/GOx elektrodais. Šį poslinkį įtakoja PANI matrica.

Vienas iš svarbiausių biologinių jutiklių charakteristikų yra jų analizinio signalo (srovės stiprio) stabilumas laike. GR/GOx ir GR/GOx/PANI elektrodų (polimerizacijos trukmė 24, 48 ir 72 valandos) atsakas į gliukozę buvo tiriamas matuojant imobilizuotos GOx aktyvumą 86 dienų laikotarpyje. Tarp matavimų elektrodai buvo saugomi 4°C temperatūroje, uždarame inde, virš lašo A-PBS buferinio tirpalo pH 6,0.

Tyrimo rezultatai iliustruoja, kad GR/GOx elektrodo atsakas į gliukozę jau po pirmojo matavimo staigiai nukrenta žemiau 65 % pradinės savo vertės (pav.4.13 kreivė 1). Šis staigus GR/GOx elektrodo analizinio signalo sumažėjimas gali būti paaiškinamas imobilizuoto fermento disociacija nuo elektrodo paviršiaus. Tačiau po šio staigaus kritimo buvo stebimas žymiai lėtesnis elektrodo analizinio signalo mažėjimas ir buvo nustatyta, kad po 86 dienų GR/GOx elektrodas išsaugo apie 44 % pradinio savo aktyvumo. GR/GOx/PANI elektrodų generuojamos srovės stiprio sumažėjimas po pirmo matavimo buvo žymiai mažesnis nei GR/GOx elektrodo (pav. 4.13 2, 3 ir 4 kreivės). Be to, GR/GOx/PANI elektrodų analizinio signalo mažėjimas priklausė nuo polimerizacijos trukmės ir mažėjo

ilgėjant polimerizacijos trukmei. Tai gali būti paaiškinta tuo, kad imobilizuoto fermento disociacijos nuo elektrodo paviršiaus galimybė mažėjo dėl GOx įterpimo į PANI sluoksnį. Tyrimų rezultatai pateikti pav. 4.13 rodo, kad po 86 dienų GR/GOx/PANI elektrodai priklausomai nuo 22, 48 ir 69 valandų polimerizacijos trukmės išsaugo 54,31, 59,2 ir 68,5 % savo pradinio aktyvumo. Taigi, galima teigti, kad ilgėjant polimerizacijos trukmei GR/GOx/PANI elektrodų stabilumas didėja. GR/GOx elektrodo nestabilumas lyginant su GR/GOx/PANI elektrodu gali būti paaiškinamas fermentinio sluoksnio išbrinkimu ir fermento disociacija nuo elektrodo paviršiaus.



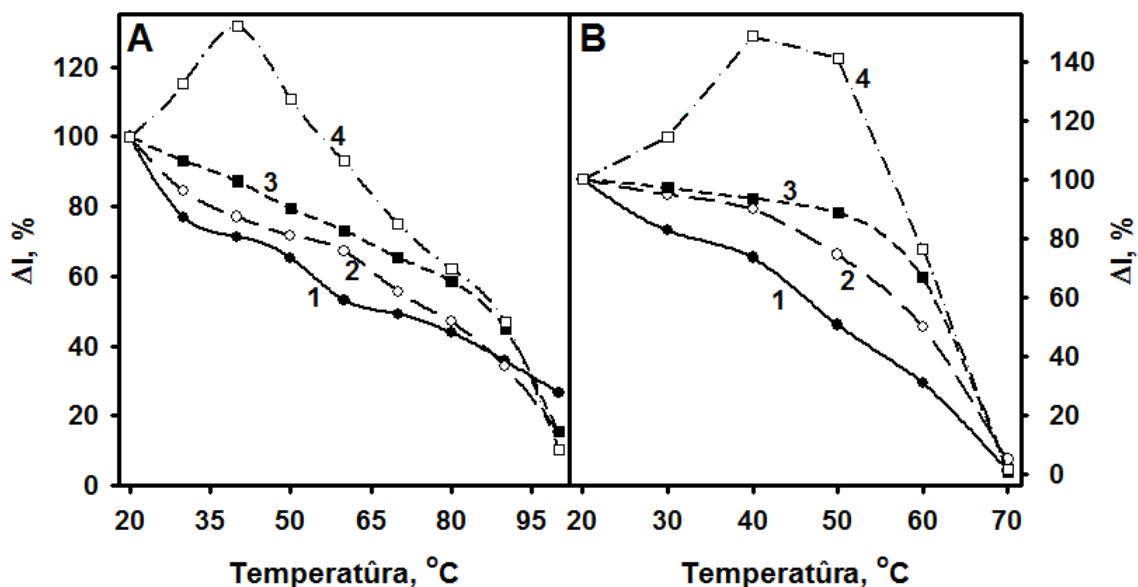
Pav. 4.13 Elektrocheminio signalo priklausomybė nuo laiko: GR/GOx elektrodas (1), GR/GOx/PANI elektrodas (polimerizacijos trukmė: 22 (2), 48 (3) ir 69 val. (4)). Analizinio signalo matavimai buvo atlikti esant +300 mV indikatorinio elektrodo potencialui Ag/AgCl/Cl⁻ 3 mol l⁻¹ atžvilgiu, A-PBS buferiniame tirpale esant pH 6,0 ir 20 mmol l⁻¹ gliukozės.

4.6. Polianilino įtaka terminiam gliukozės jutiklio stabilumui

Kaip ir visos biologinės kilmės struktūros, fermentai yra jautrūs aplinkos temperatūrai ir veikia geriausiai esant tam tikrai optimaliai temperatūrai [150].

Dauguma fermentų denatūruoja esant temperatūrų intervalui nuo 40 °C iki 70 °C ir visiškai praranda savo katalizines savybes. Kai kurie atlikti darbai rodo, kad GOx gali išlaikyti savo katalizinį aktyvumą esant netgi 65 °C optimalioje veikimui pH srityje [151]. GOx terminis denatūravimas yra sukiamas destabilizuojant jonines ir hidrofobines sąveikas bei nutraukiant vandenilinius ryšius. Šie veiksniai sukelia konformacinius pakitimus tretinėje baltymo struktūroje ir deaktyvuoja fermentą [152].

Šio tyrimo metu buvo tiriamas GR/GOx ir GR/GOx/PANI (polimerizacijos trukmė 24, 48 ir 72 valandos) elektrodų terminis stabilumas. Minėtų elektrodų tyrimai buvo atliekami A-PBS buferiniame tirpale (pH 6,0) turinčiame 0,1 mol l⁻¹ KCl ir 10 mmol l⁻¹ FMS. Modifikuotas grafito elektrodas buvo įjungiamas į grandinę kaip indikatorinis elektrodas ir registruojamas srovės kitimas laike esant +300 mV potencialui (Ag/AgCl/Cl⁻ 3 mol l⁻¹ lyginamojo elektrodo atžvilgiu). Atliekant matavimus gliukozės buvo pridedama tiek, kad jos koncentracija elektrocheminėje gardelėje būtų 20 mmol l⁻¹. Elektrodų analizinis signalas į gliukozę buvo tiriamas po kiekvieno temperatūrinio poveikio. Kiekvienas matavimas buvo kartojamas po tris kartus.



Pav. 4.14 Temperatūros poveikis GR/GOx (kreivė 1) ir GR/GOx/PANI elektrodams polimerizacijos tirpale laikytiems 24, 48 ir 72 valandas (kreivė 2, 3 ir 4). A dalyje pateiktos priklausomybės termostatuojant elektrodus 5 minutes inkubatoriuje oro atmosferoje, B dalyje elektrodai buvo 5 minutes termostatuojami buferiniame tirpale. Analizinio signalo matavimai atlikti A-PBS buferiniame tirpale, kambario temperatūroje, tirpale esant 10 mmol l^{-1} FMS ir 20 mmol l^{-1} gliukozės. Indikatorinio elektrodo potencialas $+300 \text{ mV Ag/AgCl/Cl}^{-1} 3 \text{ mol l}^{-1}$ atžvilgiu.

Terminio stabilumo tyrimai buvo atliekami dvejopai. Vienu atveju terminis stabilumas buvo tiriamas modifikuotus elektrodus inkubuojant po 5 minutes termostate A-PBS buferiniame tirpale pH 6,0, esant tam tikroms fiksuotoms termostato temperatūroms (20, 30, 40, 50, 60 ir 70°C). Šio tyrimo rezultatai pateikti pav. 4.14 B. Antruoju atveju elektrodai buvo laikomi po 10 minučių taip pat termostate tačiau ne tirpale, bet ore, esant tam tikroms fiksuotoms termostato temperatūroms (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ir 100°C). Šio tyrimo rezultatai pateikti pav. 4.12 A.

Pav. 4.14 B iliustruoja ryškius GR/GOx ir GR/GOx/PANI elektrodų terminio stabilumo skirtumus. Kaip matyti iš paveikslo, GR/GOx/PANI elektrodų terminis stabilumas yra žymiai geresnis lyginant su GR/GOx elektrodu. Kaip matyti iš paveikslo, GR/GOx elektrodo generuojamos srovės stipris didėjant temperatūrai staigiai mažėja. Tuo tarpu 24 ir 48 valandas modifikuotų GR/GOx/PANI elektrodų (pav. 4.14 B kreivės 2 ir 3) analizinis signalas iki tam tikros temperatūros taip pat mažėja, tačiau labai nežymiai. Didžiausi skirtumai tarp GR/GOx ir GR/GOx/PANI elektrodų analizinio signalo sumažėjimo buvo stebimi elektrodus inkubavus tirpale 50°C temperatūroje. Dėl temperatūros poveikio GR/GOx elektrodo analizinis signalas sumažėjo apie 50 % lyginant su pradinio signalo verte. Tuo tarpu GR/GOx/PANI elektrodų analizinis signalas sumažėjo tik apie 25 ir 10 % (atitinkamai 24 ir 48 valandų polimerizacijos

trukmei) lyginant su pradinio signalo verte. Visiškai skirtingi rezultatai gauti ilgiausiai, 72 valandas modifikuotiems elektrodams (pav. 4.14 kreivė 4). Šių elektrodų atveju keliant temperatūrą amperometrinis signalas nuosekliai stiprėja ir pasiekia maksimalią vertę esant 40 °C, o keliant temperatūrą toliau, nuosekliai mažėja. Tai galima paaiškinti tuo, kad keliant temperatūrą polianilino elektrinis laidis didėja. Panašūs rezultatai buvo gauti π - π konjuguotam polimerui – polipirolui [153]. GR/GOx elektrodo nestabilumas lyginant su GR/GOx/PANI elektrodu gali būti paaiškinamas fermentinio sluoksnio išbrinkimu ir fermento disociacija nuo elektrodo paviršiaus. Tačiau elektrodus inkubavus 70°C temperatūroje tiek GR/GOx, tiek ir GR/GOx/PANI elektrodų analizinis signalas sumažėja praktiškai iki nulio. Tai galima paaiškinti imobilizuotos GOx terminine inaktyvacija.

GR/GOx ir GR/GOx/PANI elektrodų terminis stabilumas, laikant juos tam tikroje temperatūroje oriniame termostate (pav. 4.14 A), buvo mažesnis lyginant su tuo atveju, kai elektrodai buvo inkubuojami tam tikroje temperatūroje tirpale. Atliekant tyrimus oriniame termostate buvo visiškai pašalintas fermento disociacijos nuo elektrodo paviršiaus faktorius, todėl elektrodo aktyvumo praradimas buvo sukeltas tik dėl fermento struktūros pokyčių dėl temperatūros poveikio. Kaip matyti iš pav. 4.14 A, GR/GOx/PANI elektrodų terminis stabilumas iki 80 °C buvo geresnis lyginant su GR/GOx elektrodu. Be to, GR/GOx/PANI elektrodų terminis stabilumas didėjo didėjant polimerinio sluoksnio storiui. Tiktai pakėlus temperatūrą iki 100 °C GR/GOx elektrodas tampa stabilesnis nei GR/GOx/PANI elektrodai. Atlikti terminio stabilumo tyrimai rodo, kad GOx įterpimas į PANI matricą stabilizuoja fermentą, o amperometrinio signalo praradimas esant didesnei nei 40 °C temperatūrai gali būti paaiškinamas fermento denatūravimu ir polimerinės matricos irimu [154].

4.7 Biologinio jutiklio analizinio signalo pakartojamumo tyrimai

Kita labai svarbi biologinių jutiklių charakteristika yra jų analizinio signalo (srovės stiprio) pakartojamumas. Todėl šiame darbo etape buvo įvertintas GR/GOx ir GR/GOx/PANI elektrodų analizinio signalo pakartojamumas. Tam buvo pakartotinai penkis kartus registruojamos srovės stiprio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos tam pačiam elektrodui ir penkiems skirtingiems vienodai paruoštiems elektrodams. Modifikuotų indikatorinių elektrodų tyrimai buvo atliekami A-PBS buferiniame tirpale (pH 6,0) turinčiame 0,1 mol l⁻¹ KCl ir 10 mmol l⁻¹ FMS.

Atsikartojamumo tyrimams buvo naudoti šie modifikuoti elektrodai:

- GR/GOx;
- GR/GOx/PANI, polimerizacijos trukmė 24 valandos;
- GR/GOx/PANI, polimerizacijos trukmė 48 valandos;
- GR/GOx/PANI, polimerizacijos trukmė 72 valandos.

Matavimų paklaidas gali įtakoti fermento dozavimo netikslumas, fermento aktyvumo praradimas ruošiant elektrodus ir nevienodas fermento pasiskirstymas elektrodo paviršiuje. Atliekant elektrodų analizinio signalo pakartojamumas tyrimus buvo išlaikyti visi tokiems tyrimams keliami reikalavimai: tyrimus atliko tas pats žmogus, tyrimai buvo atliekami ta pačią dieną, tyrimams atlikti buvo naudojama ta pati įranga ir tos pačios medžiagos, naudojamas tas pats metodas. Gauti duomenys apdoroti statistiškai ir pateikti 4.3 lentelėje. pakartojamumas buvo vertinamas kaip duomenų išsibarstymas ir išreikštas skaitine verte.

4.3 lentelė. GR/GO_x ir GR/GO_x/PANI elektrodų pakartojamumo tyrimo duomenys.

| Modifikuoti elektrodai | Vidutinis santykinis standartinis nuokrypis, % (tiriant tą patį elektrodą) | Vidutinis santykinis standartinis nuokrypis, % (tiriant 5 vienodai modifikuotus elektrodus) |
|---|---|--|
| GR/GO _x | 11,47 | 14,13 |
| GR/GO _x /PANI (polimerizacijos trukmė 24 val.) | 6,89 | 12,13 |
| GR/GO _x /PANI (polimerizacijos trukmė 48 val.) | 5,14 | 10,19 |
| GR/GO _x /PANI (polimerizacijos trukmė 72 val.) | 4,38 | 9,96 |

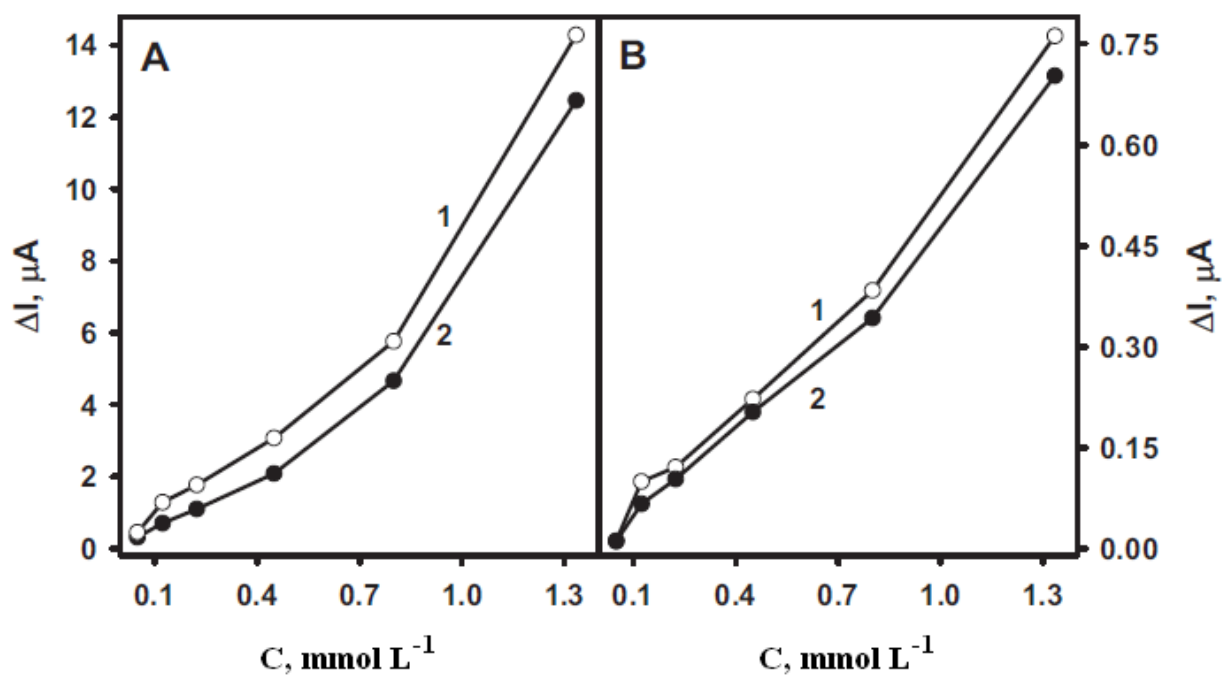
Iš tyrimo rezultatų pateiktų 4.3 lentelėje matyti, kad tiriant srovės stiprio priklausomybę nuo gliukozės koncentracijos tam pačiam elektrodui GR/GO_x/PANI elektrodai pasižymi žymiai geresniu pakartojamumu lyginant su GR/GO_x elektrodais. Be to, matyti, kad kuo ilgesnė polimerizacijos trukmė, o taigi ir storesnis susidaręs PANI sluoksnis elektrodo paviršiuje, tuo duomenų išsibarstymas mažesnis. Analogiški rezultatai buvo gauti ir tuomet, kai buvo tiriama srovės stiprio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos penkiems vienodai modifikuotiems elektrodams. Tačiau šiuo atveju duomenų išsibarstymas buvo didesnis lyginant su tuo atveju, kai srovės stiprio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos registruojama tam pačiam elektrodui. Taigi, tyrimo rezultatai iliustruoja, kad GO_x, imobilizuotos grafito elektrodo paviršiuje, įterpimas į PANI sluoksnį pagerina šios analizinės sistemos pakartojamumą.

4.8. Jutiklio jautris pašalinėms medžiagoms

Analizuojant biologinius mėginius, tokius kaip kraujas ar šlapimas, o taip pat ir maisto produktų bei gėrimų mėginius, juose dažnai pasitaiko įvairių medžiagų trukdančių gliukozės nustatymui. Iš šių medžiagų bene didžiausiu trukdančiu poveikiu, tiriant gliukozės koncentraciją GOx modifikuotais elektrodais, pasižymi askorbo ir urino rūgštys. Pavyzdžiui, normali urino rūgšties koncentracija kraujo serume yra 110 – 410 $\mu\text{mol l}^{-1}$ moterims ir 140 – 500 $\mu\text{mol l}^{-1}$ vyrams. Normali askorbo rūgšties koncentracija kraujo serume yra 5,7 – 143,1 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Todėl šio tyrimo tikslas buvo palyginti šių rūgščių įtaką GR/GOx ir GR/GOx/PANI elektrodams, nes buvo tikimasi, kad grafito elektrodo paviršiuje imobilizuotos GOx įterpimas į PANI sluoksnį sumažins šių medžiagų trukdantį poveikį. Tyrimui buvo paruošti GR/GOx ir GR/GOx/PANI (polimerizacijos trukmė 24 val.) elektrodai. Modifikuotų elektrodų tyrimai buvo atliekami A-PBS buferiniame tirpale (pH 6,0) turinčiame 0,1 mol l^{-1} KCl ir 10 mmol l^{-1} FMS. Modifikuotą elektrodą įjungus į grandinę kaip indikatorinį ir didinant analitės koncentraciją elektrocheminėje gardelėje registruojamas srovės stiprio kitimas laike esant pastoviam +300 V indikatorinio elektrodo potencialui (pagal Ag/AgCl/Cl⁻ 3 mol l^{-1} elektroda). Tyrimų duomenys pateikti pav. 4.15.

Šiam tyrimui askorbo ir urino rūgščių koncentracijų ribos buvo pasirinktos nuo 0,05 iki 1,33 mmol l^{-1} , nes būtent toks šių medžiagų kiekis yra labiausiai tikėtinas realiuose mėginiuose. Pav. 4.15 pateiktos amperometrinio signalo priklausomybės nuo askorbo ir urino rūgščių pasirinktame koncentracijų intervale. Tirpale esant 1,33 mmol l^{-1} askorbo rūgšties, GR/GOx elektrodo signalas buvo 14,29 μA (pav. 4.15 A kreivė 1). Esant tai pačiai urino rūgšties koncentracijai, registruotas signalas buvo 0,76 μA (pav. 4.15 B kreivė 1). Modifikavus elektrodą PANI sluoksniu, amperometrinis signalas askorbo rūgščiai sumažėjo iki 12,47 μA (pav. 4.15 A kreivė 2), o urino rūgščiai iki 0,70 μA (pav. 4.15 B kreivė 2). Iš šių eksperimentinių duomenų galima spręsti, kad PANI sluoksnis elektrodo paviršiuje sulėtina askorbo ir urino rūgščių difuziją atitinkamai 12,47 ir 7,89 %, ir veikia

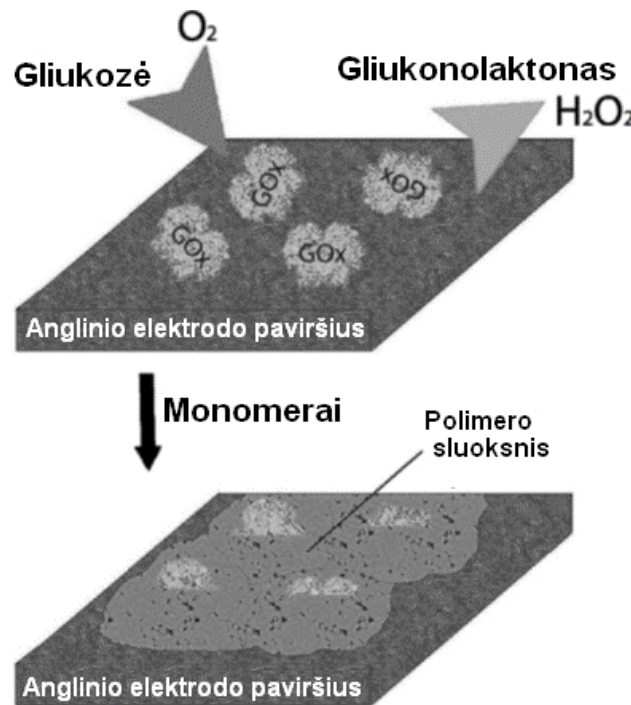
kaip barjeras apribodamas kai kurių elektroaktyvių junginių difuziją. Esant labiausiai tikėtinoms fiziologinėms sąlygom, kuomet gliukozės koncentracija kraujyje yra 3,8 – 5,5 mmol l⁻¹, o askorbo ir urino rūgščių koncentracija atitinkamai yra 0,1 ir 0,5 mmol l⁻¹, askorbo ir urino rūgščių signalai atitinkamai buvo 0,57 μA (pav. 4.15 A kreivė 2) ir 0,22 μA (pav. 4.15 B kreivė 2). Tiriamajame mėginyje esant 5,0 mmol l⁻¹ gliukozės, analizinis signalas yra 7,32 μA. Trukdants poveikis askorbo ir urino rūgščių tokiu atveju atitinkamai sudaro 7,8 ir 3,0 %. Toks jutiklio jautris pašalinėms medžiagoms yra mažesnis lyginant su kitais gliukozės jutikliais [154].



Pav. 4.15 Srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo askorbo (A) ir urino rūgščių (B) GR/GOx (1) ir GR/GOx/PANI (2) indikatoriniams elektrodams. Matavimai atlikti kambario temperatūroje buferiniame tirpale pH 6,0 esant 10 mmol l⁻¹ FMS. Indikatorinio elektrodo potencialas +300 mV Ag/AgCl/Cl⁻ 3 mol l⁻¹ atžvilgiu.

4.9 PPY ir PANI įtakos jutiklio charakteristikoms palyginimas

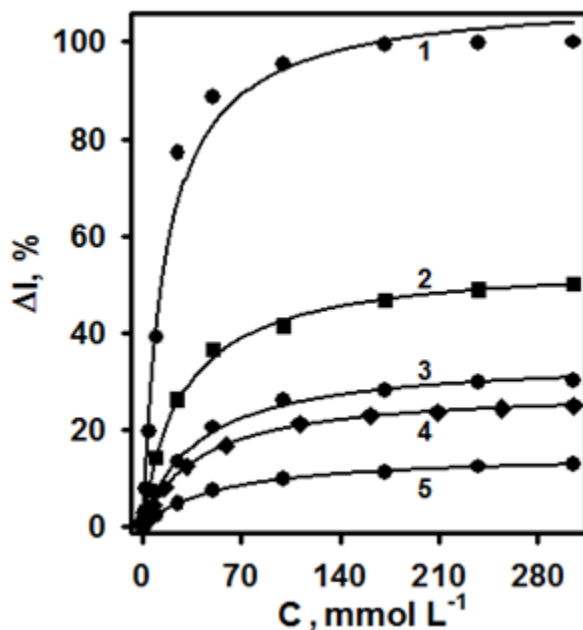
Norint tarpusavyje palyginti PANI ir PPY panaudojimo galimybes amperometriniuose gliukozės jutikliuose, buvo pasirinktas fermentinis šių polimerų sintezės būdas. Indikatorinių elektrodų paruošimas vyko taip, kaip aprašyta metodinės dalies 3.2 – 3.3 skyriuose, tačiau polimerizacijos tirpalui buvo naudojami skirtingi monomerai. GOx įterpimas į polimero sluoksnį vyko pagal schemą pateiktą pav. 4.16.



Pav. 4.16 Principinė GOx įterpimo į polimero sluoksnį indikatorinio elektrodo paviršiuje schema.

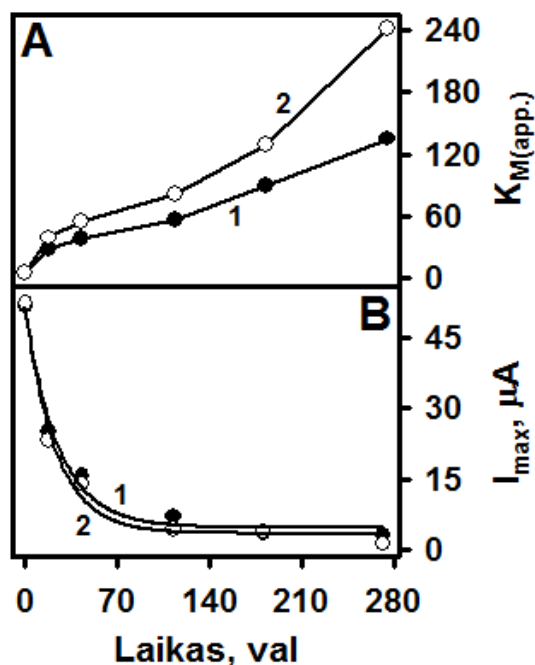
Kaip ir atliekant ankstesnius tyrimus, pagrindinis GOx padengimo polimero sluoksniu įrodymas buvo ryškus Michaelio konstantos K_M padidėjimas bei maksimalios generuojamos srovės I_{max} sumažėjimas. Šių tyrimų metu buvo iširtos ir tarpusavyje palygintos kinetinės GOx, imobilizuotos grafito elektrodo paviršiuje (GR/GOx) bei padengtos PANI (GR/GOx/PANI) ir PPY (GR/GOx/PPY) sluoksniu, savybės. Minėtų modifikuotų elektrodų analiziniai

signalai buvo tiriami amperometriškai, kambario temperatūroje, tirpale esant nuo 0,5 iki 300,0 mmol l⁻¹ gliukozės. Vis didinant gliukozės koncentraciją tiriamame tirpale ir registruojant skirtingų sistemų analizinio signalo kalibravimo kreives visais atvejais buvo stebima hiperbolinė amperometrinio signalo priklausomybė nuo analitės koncentracijos (pav. 4.17). Atlikus tolimesnius skaičiavimus buvo pastebėta, kad GR/GOx, GR/GOx/PANI ir GR/GOx/PPY indikatoriniai elektrodai pasižymi reikšmingai skirtingomis K_M reikšmėmis (pav. 4.18 B). Taip pat buvo pastebėta, kad K_M reikšmė priklauso nuo elektrodo modifikavimo laikant polimerizacijos tirpale trukmės.



Pav. 4.17 Skirtingai modifikuotų elektrodų kalibravimo kreivės: 1 – GR/GOx elektrodo prieš modifikavimą polimerais; 2 ir 3 – GR/GOx/PANI elektrodo atitinkamai laikyto polimerizacijos tirpale sudaryto iš 200 mmol l⁻¹ anilino ir 20 mmol l⁻¹ gliukozės 18 ir 23 valandas; 4 ir 5 – GR/GOx/PPY elektrodo atitinkamai laikyto polimerizacijos tirpale sudaryto iš 200 mmol l⁻¹ pirolo ir 20 mmol l⁻¹ gliukozės 18 ir 23 valandas.

Tolimesniais tyrimais buvo parodyta, kad K_M reikšmė nuo pradinės 5,75 mmol l⁻¹ reikšmės apskaičiuotos GR/GOx elektrodai gali būti atitinkamai padidinta net 23,5 ir 42,1 kartus iki 134,90 ir 241,96 mmol l⁻¹, atitinkamai GR/GOx/PANI (pav. 4.18 A kreivė 1) ir GR/GOx/PPY (pav. 4.18 A kreivė 2) elektrodams (polimerizacijos trukmė 272 valandos). Visiškai priešingas efektas buvo stebimas apskaičiuojant I_{max} reikšmes ir kaip parodyta pav. 4.18 B dalyje, gali sumažėti nuo 52 μ A, kuomet elektrodas buvo nemodifikuotas polimeriniu sluoksniu, iki 3,06 ir 1,34 μ A atitinkamai GR/GOx/PANI ir GR/GOx/PPY elektrodams (polimerizacijos trukmė 272 valandos), o tai sudaro žymų 16,9 ir 38,9 kartų sumažėjimą. Tokie GOx katalizinių parametru pasikeitimai visiškai atitinka fermentų padengtų pusiau pralaidžia membrana aktyvumo modelį [155].

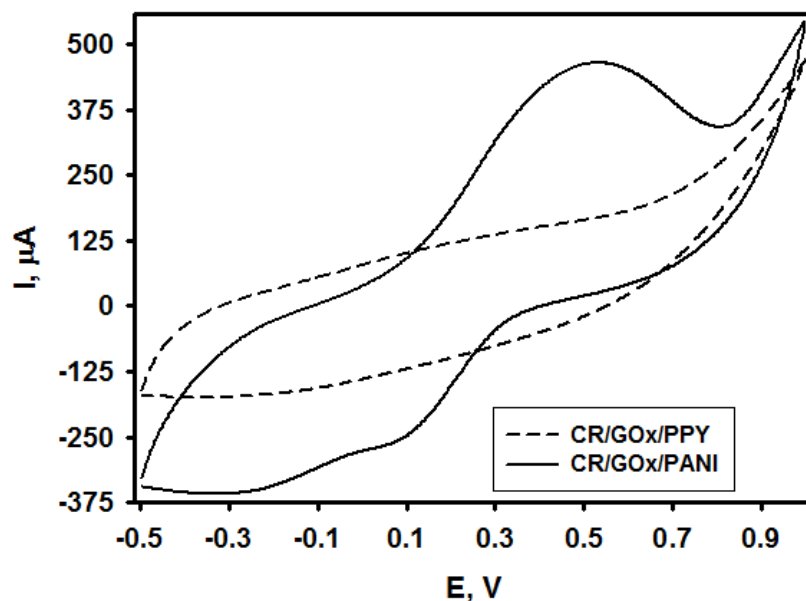


Pav. 4.18 Apskaičiuotų K_M (A) ir I_{max} (B) verčių priklausomybė nuo elektrodo modifikavimo laiko anilino (kreivė 1) ir pirola (kreivė 2) polimerizacijos tirpale.

Apibendrinus gautus rezultatus galima teigti, kad GR/GOx elektrodo veikimas lyginant su GR/GOx/PANI ir GR/GOx/PPY elektrodais yra pagrįstas

skirtingais principais. Kadangi padengus GOx polimero sluoksniu yra apsunkinama tiek analizės tiek ir EPT difuzija, galime teigti, kad GR/GOx/PANI ir GR/GOx/PPY elektrodai veikia difuzinio limitavimo būdu, tuo tarpu GR/GOx elektrodas veikia fermento kinetinio limitavimo būdu, nes šiuo atveju difuziniai apribojimai yra minimalūs. Nors buvo stebimas stiprus I_{max} sumažėjimas, sukeltas ribotos gliukozės ir FMS difuzijos link fermento aktyviojo centro, tačiau daugiau nei 10 kartų padidėjusi K_M reikšmė buvo tiek susidariusio polimero sluoksnio, tiek ir gerokai praplėsto tiesinio analizinio signalo priklausomybės nuo analizės intervalo įrodymas. Be to, toks susidaręs polimero sluoksnis apsaugo GOx nuo desorbcijos nuo indikatorinio elektrodo paviršiaus.

Iš duomenų pateiktų pav. 4.18 A dalyje matyti, kad po 272 valandų modifikavimo GR/GOx/PPY elektrodo K_M reikšmė buvo beveik dvigubai didesnė nei GR/GOx/PANI elektrodo po tokios pat modifikavimo trukmės. Toks kinetinių parametrų skirtumas galėjo susidaryti dėl skirtingų PANI ir PPY polimerizacijos greičio, dėl kurio elektrodo paviršiuje susidaro skirtingo storio ir/arba tankio polimero plėvelė. Šie faktai patvirtina teorinius teiginius, kad po fermento įterpimo į polimerinį sluoksnį, fermentiniu aktyvumu pasižyminčio sluoksnio storis dėl difuzinių apsunkinimų analizei, elektronų pernašos tarpininkui ir reakcijos produktams į/iš šio sluoksnio yra 200 – 400 nm [145]. Atliekant tolimesnius tyrimus buvo įsitikinta spartesniu PPY susidarymu esant toms pačioms fermentinės sintezės sąlygoms.

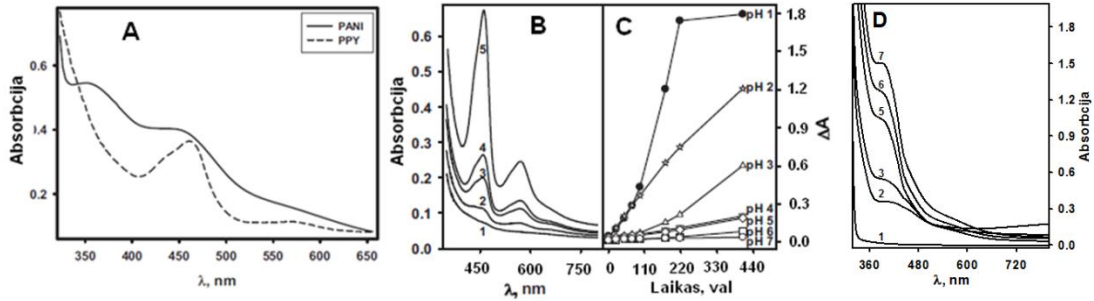


Pav. 4.19 GR/GOx/PANI ir GR/GOx/PPY modifikuotų elektrodų ciklinės voltamperogramos A-PBS buferiniame tirpale esant 20 mmol l^{-1} gliukozės. Potencialo skleidimo greitis 100 mV/s .

Siekiant patvirtinti elektoraktyvią sintetintų polimerų prigimtį buvo registruotos GR/GOx/PANI ir GR/GOx/PPY elektrodų ciklinės voltamperogramos, kurios pateiktos pav. 4.19. Pastarieji matavimai buvo atlikti esant kambario temperatūrai, A-PBS buferiniame tirpale esant 20 mmol l^{-1} gliukozės koncentracijai, keičiant indikatoriniam elektrodai suteiktą potencialą nuo -500 iki $+1000 \text{ mV}$ Ag/AgCl/Cl⁻ 3 mol L^{-1} lyginamojo elektrodo atžvilgiu. Užregistruotoje GR/GOx/PANI ciklinėje voltamperogramoje aiškiai matomas anodinis maksimumas ties $+530 \text{ mV}$. Šis anodinis maksimumas gali būti priskiriamas šakotajai PANI struktūrai. Jis yra nežymiai pasislinkęs į mažesnių potencialų sritį lyginant su PANI kuris buvo sintetintas naudojant krienu peroksidazę [156]. Tuo tarpu, GR/GOx/PPY elektrodo ciklinėje voltamperogramoje nebuvo stebima jokių ryškių oksidacijos-redukcijos maksimumų ir tai gali būti paaiškinama, tuo kad susidaręs PPY sluoksnis pasižymi silpnomis elektrocheminėmis savybėmis ir prastu elektriniu laidžiu jo

peroksidavimo stipriu oksidatoriumi vandenilio peroksidu susidarančiu polimerizacijos reakcijos metu.

Pav. 4.20 A pateiktuose polimerizacijos tirpalų UV–Vis absorbcijos spektruose matyti PPY ir PANI susidarymas po 48 valandų polimerizacijos. Pagrindinis susidariusio PPY požymis yra absorbcijos maksimumo ties 460 nm bangos ilgio atsiradimas ir didėjimas, kuris yra būdingas susidariusiems PPY oligomerams [157]. Dviejų absorbcijos maksimumų ties 360 ir 445 nm atsiradimas ir didėjimas buvo priskirtas atitinkamai linijinės [158] ir šakotos [159] struktūros PANI formos susidarymui.



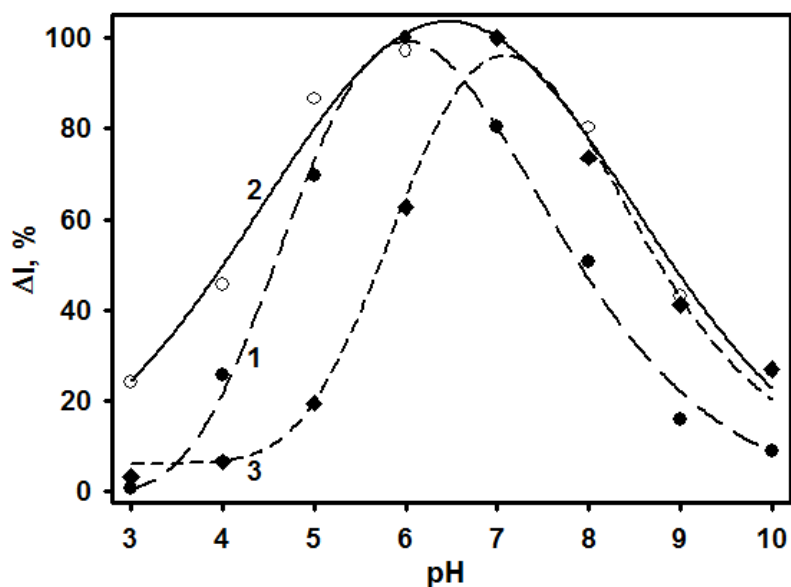
Pav. 4.20: A – fermentinė sintezė (A-PBS buferinis tirpalas pH 6,0, 1 mg/ml GOx, 20 mmol l⁻¹ gliukozės, 200 mmol l⁻¹ monomero, polimerizacijos trukmė – 48 val); B – cheminė oksidacinė polipirolo sintezė (A-PBS buferinis tirpalas pH 3,0, 200 mmol l⁻¹ pirolo, 300 mmol l⁻¹ H₂O₂, polimerizacijos trukmė – 23 (1), 96 (2), 173 (3), 217 (4), 408 (5) val.; C – absorbcijos skirtumo ($\lambda = 460$ nm) priklausomybės nuo cheminės oksidacinės pirolo polimerizacijos laiko esant skirtingiems tirpalo pH; D – cheminė oksidacinė anilino sintezė (A-PBS buferinis tirpalas pH 7,0, 200 mmol l⁻¹ anilino, 20 mmol l⁻¹ H₂O₂, polimerizacijos trukmė – 0 (1), 23 (2), 47 (3), 75 (4), 143 (5), 240 (6), 365 (7)).

Siekiant palyginti cheminės oksidacinės bei fermentinės sintezės būdu susidarančius polimerus ir patvirtinti GOx įterpimą į polimerinį sluoksnį, buvo atlikti anilino ir pirolo polimerizacijos spektrofotometriniai tyrimai. Tyrimų

duomenys patvirtina, kad fermentinės sintezės būdu susintetintų PPY ir PANI absorbcijos spektrai yra identiški absorbcijos spektrams užregistruotiems PPY ir PANI susintetintiems cheminės oksidacinės sintezės būdu oksidatoriumi naudojant H_2O_2 . Pagrindinis sintezės būdų skirtumas – optimalus sintezės pH intervalas. Atliekant cheminę polimerų sintezę, kuo rūgštesnė terpė, tuo greičiau vyksta polimerizacijos procesas ir tuo daugiau polimero susidaro (pav. 4.20 C). Šarminėje terpėje polimerizacija nevyksta. Tuo tarpu atliekant fermentinę sintezę polimerizacija geriausiai vyksta tame pH intervale, kuriame fermentas yra aktyviausias. Sintezė vyksta ir šarminėje terpėje.

Atliekant tolimesnius tyrimus buvo palygintas GR/GOx, GR/GOx/PANI ir GR/GOx/PPY elektrodų veikimas esant skirtingoms analizuojamojo tirpalo pH vertėms. Pasirinktas A-PBS buferinio tirpalo pH intervalas nuo 3,0 iki 10,0. Tyrimų metu į juos buvo papildomai įpilama 10 mmol l^{-1} FMS ir 20 mmol l^{-1} gliukozės. Matavimai atlikti kambario temperatūroje. Apibendrinus matavimo rezultatus pateiktus pav. 4.21 galima teigti, kad visais atvejais buvo stebima varpo formos analitinio signalo priklausomybė nuo analizuojamojo tirpalo pH. GR/GOx elektrodai optimali pH sritis buvo stebima ties 6,0 pH (pav. 4.21 kreivė 1). Šis pH sutampa su natyvos GOx pH optimumu [160]. Kaip ir nurodoma literatūros šaltiniuose, esant ekstremalioms pH vertėms GOx katalizinis aktyvumas stipriai sumažėja, o pasiekus pH 10,0 išlieka tik apie 10 % pradinio fermento aktyvumo. GR/GOx/PANI elektrodai nustatyta maksimali veikimo sritis yra ties pH 6,5 (pav. 4.21 kreivė 2), o GR/GOx/PPY elektrodai – ties 7,0 (pav. 4.21 kreivė 3). Toks nežymus GR/GOx/PANI ir GR/GOx/PPY elektrodams veikimui optimalaus terpės pH pasislinkimas lyginant su GR/GOx elektrodo veikimui optimaliu pH rodo, kad abiem atvejais padengus elektrodo paviršiuje imobilizuotą fermentą polimero sluoksniu buvo išlaikytos GOx katalizinės savybės. Modifikavus indikatorinius elektrodus polimero sluoksniu, abiem atvejais optimali veikimo sritis tapo platesnė ir kaip minėta nežymiai pasislinko bazinių reikšmių kryptimi dėl fermento ir polimerinės matricos sąveikos. Net ir menkiausi fermento

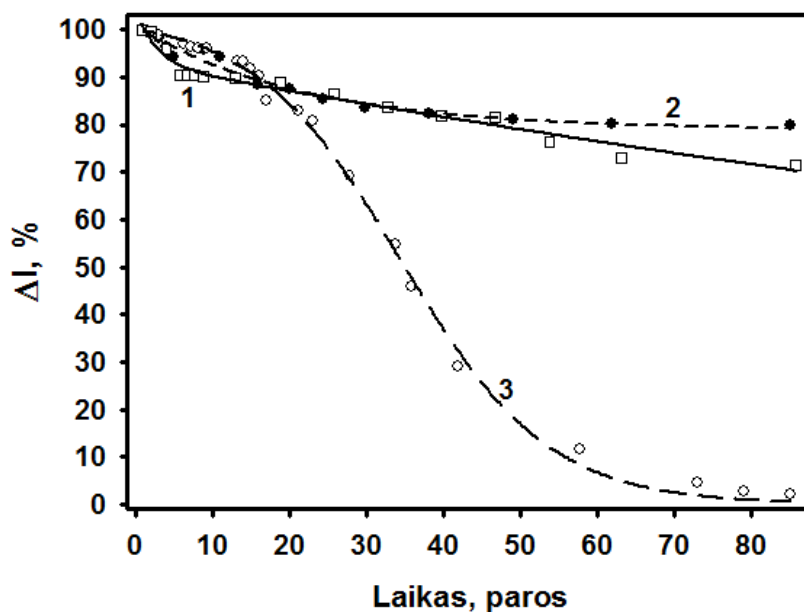
polipeptidinės struktūros konformaciniai pokyčiai gali įtakoti jo denatūraciją ir biokatalizinių savybių praradimą. Tokie pakitimai gali būti sukelti dėl temperatūros poveikio, ekstremalios analizuojamojo tirpalo pH vertės ar netinkamos sudėties bei fermento laikymo sąlygų.



Pav. 4.21 Amperometrinių signalo priklausomybė nuo terpės pH GR/GOx (kreivė 1), GR/GOx/PANI (kreivė 2) ir GR/GOx/PPY (kreivė 3) elektrodams. Matavimai atlikti A-PBS buferiniame tirpale esant 10 mmol l^{-1} FMS ir 20 mmol l^{-1} gliukozės, esant aplinkos temperatūrai. Indikatorinio elektrodo potencialas $+300 \text{ mV Ag/AgCl/Cl}^{-1} 3 \text{ mol L}^{-1}$ atžvilgiu.

Siekiant tarpusavyje palyginti GR/GOx, GR/GOx/PANI ir GR/GOx/PPY elektrodų analizes charakteristikas buvo atliktas ir amperometrinių signalo stabilumo laike tyrimai. Sistemos stabilumui didžiausią įtaką daro naudojamų medžiagų prigimtis, elektrodo paviršiuje susidariusio polimerinio sluoksnio morfologija ir tinkamas fermento imobilizavimas [161]. Šio tyrimo metu 86 parų laikotarpyje buvo registruojamas minėtų elektrodų analizinis signalas. Visi matavimai buvo atlikti A-PBS buferiniame tirpale pH 6,0, esant 20 mmol l^{-1}

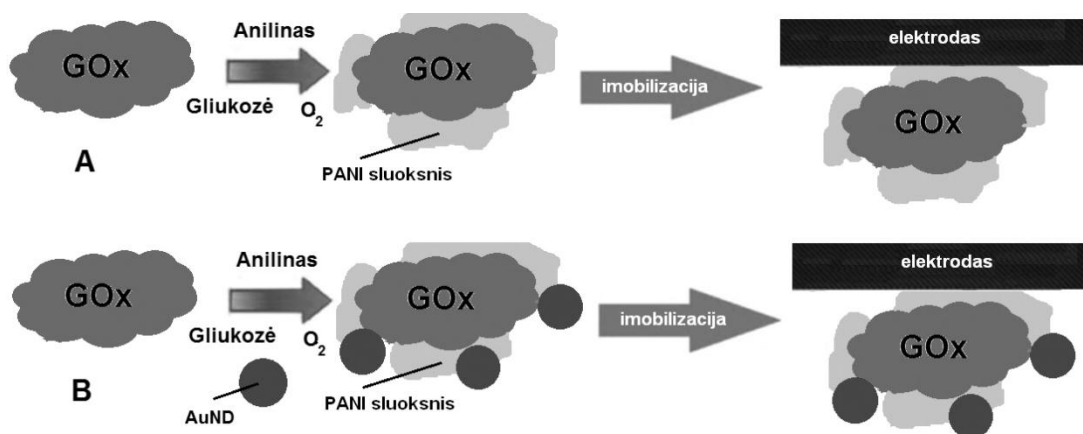
gliukozės ir 10 mmol l^{-1} FMS. Tarp matavimų modifikuoti indikatoriniai elektrodai buvo laikomi $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, uždarame inde, virš A-PBS pH 6,0 buferinio tirpalo lašo. Pav. 4.22 pateikti šio tyrimo rezultatai rodo, kad GR/GOx elektrodai (pav. 4.22 kreivė 1) didžiausias signalo sumažėjimas yra stebimas atlikus pirmuosius matavimus. Tačiau po jų, elektrodo analizinis signalas išlieka pakankamai stabilus ir po 86 parų išsaugo apie 76 % savo pradinės vertės. Tiek GR/GOx/PANI, tiek ir GR/GOx/PPY elektrodams nebuvo stebimas toks žymus pradinio signalo praradimas po pirmųjų matavimų ir tai gali būti paaiškinama geresniu fermento imobilizavimu elektrodo paviršiuje padengiant jį polimerine membrana ir taip apsaugant fermentą jo desorbcijos. Pirmąsias 22 paras geresnis stabilumas buvo stebimas GR/GOx/PPY elektrodai lyginant su GR/GOx ir GR/GOx/PANI. Tačiau po šio laikotarpio amperometrinis signalas pradėjo sparčiai mažėti (pav. 4.22 kreivė 3) ir po 86 parų buvo registruojama tik apie 2 % pradinio analizinio signalo. GR/GOx/PANI elektrodo signalo stabilumas po 86 parų išliko didžiausias lyginant su kitais elektrodais ir sudarė apie 80 % nuo pradinės vertės (pav. 4.22 kreivė 2).



Pav. 4.22 Elektrocheminio signalo priklausomybė nuo laiko: GR/GOx (1), GR/GOx/PANI (2) ir GR/GOx/PPY (3) elektrodui . Analizinio signalo matavimai atlikti A-PBS buferiniame tirpale pH 6,0 esant 20 mmol l⁻¹ gliukozės ir 10 mmol l⁻¹ FMS. Indikatorinio elektrodo potencialas +300 mV Ag/AgCl/Cl⁻ 3 mol L⁻¹ atžvilgiu.

4.10 AuND taikymas gliukozės biologiniame jutiklyje

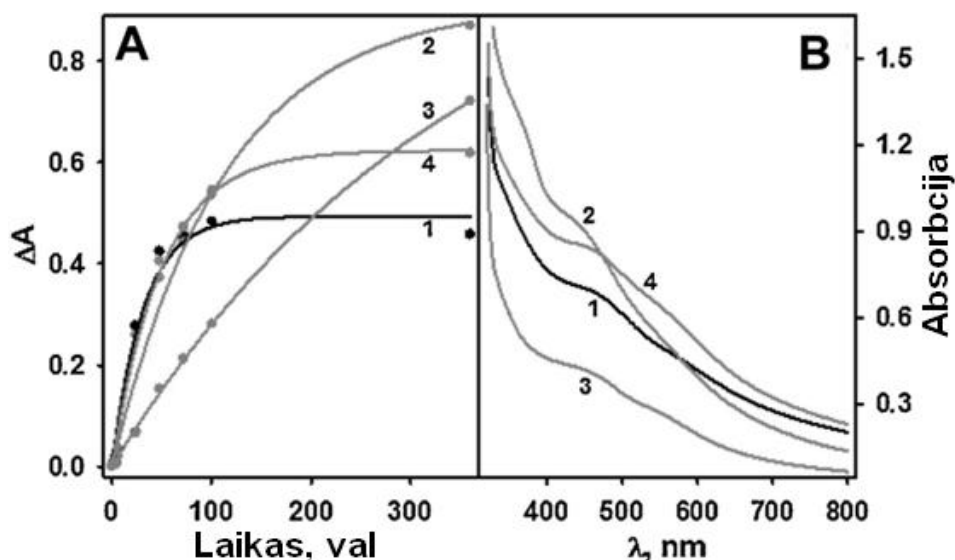
Norint įvertinti AuND įtaką gliukozės biologinio jutiklio parametrams, fermentinės sintezės būdu buvo susintetintos dviejų tipų nanokompozitinės struktūros: GOx įterptos į PANI sluoksnį ((GOx)PANI) bei GOx ir AuND įterptų į PANI sluoksnį ((GOx/AuND)PANI). Anilino polimerizacijos metu GOx buvo įterpta arba dalinai padengta polianilino sluoksniu, o polimerizacijos schema pateikta pav. 4.22 A.



Pav. 4.22 GR/(GOx)PANI (A) ir GR/(GOx/AuND)PANI (B) dalelių susidarymo ir imobilizavimo elektrodo paviršiuje schema.

Atliekant (GOx/AuND)PANI dalelių sintezę į polimerizacijos tirpalą papildomai buvo įdedama skirtingo dydžio (3,5, 6,0 ir 13,0 nm) aukso nanodalelių. Visais atvejais tirpale esant aukso nanodalelėms buvo stebimas greitesnis polianilino susidarymas, o taigi ir didesnis susidariusių dalelių kiekis po 300 valandų polimerizacijos (pav. 4.23 A). Norint tiksliau įvertinti polianilino

susidarymą, fermentinės polimerizacijos reakcijos vyksmas buvo stebimas spektrofotometriškai. Paveiksle 4.22 A pateikiami polimerizacijos tirpalų absorbcijos maksimumų kitimas laike, o pav. 4.23 B tiriamų polimerizacijos tirpalų absorbcijos spektrai po 116 valandų polimerizacijos. Buvo stebėti du absorbcijos maksimumai ties $\lambda_1 = 360$ nm ir $\lambda_2 = 450$ nm. Absorbcijos maksimumas ties 360 nm yra priskiriamas mažos molekulinės masės polianilino oligomerų susidarymui [162], tuo tarpu sugerties maksimumas ties 450 nm priskiriamas šakotos polianilino struktūros susidarymui [163,164].

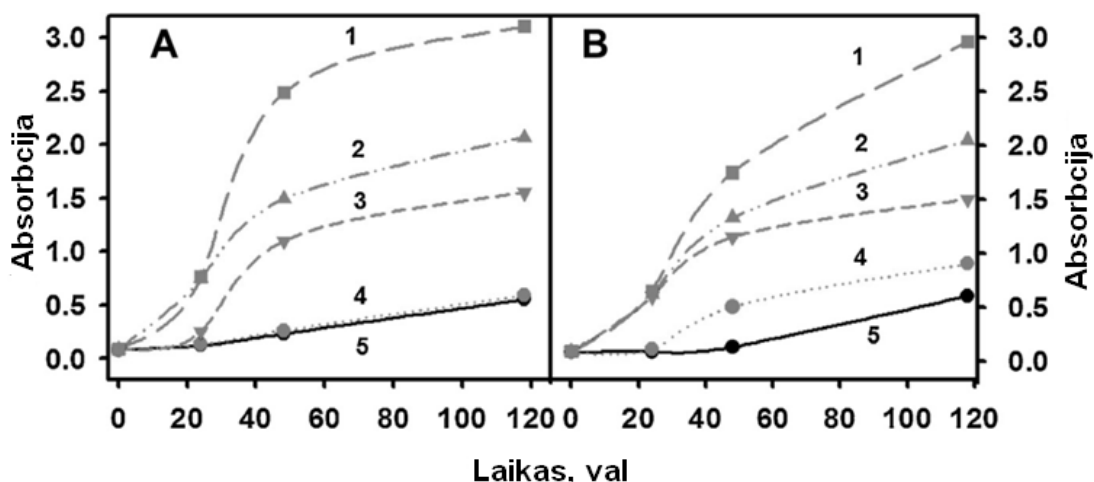


Pav. 4.23 (A) Susidariusiu PANI dalelių absorbcijos ($\lambda = 450$ nm) skirtumo priklausomybė nuo polimerizacijos laiko, tirpale esant 1 mg/ml GOx, 20 mmol l⁻¹ gliukozės ir 200 mmol l⁻¹ anilino bei AuND: 1 – be AuND; esant 2 –3,5; 3 – 6,0; 4 –13,0 nm. (B) UV/Vis sugerties spektrai po 116 valandų polimerizacijos: 1 – be AuND; 2 –3,5; 3 –6,0; 4 –13,0 nm AuND.

Eksperimentiniai duomenys rodo, kad aukso nanodalelių buvimas tirpale visais atvejais padidina polianilino susidarymo greitį. Geriausi rezultatai buvo gauti naudojant 3,5 nm dydžio aukso nanodaleles (pav. 4.23 A), kurios ir buvo pasirinktos tolimesniems tyrimams.

Siekiant įvertinti pH įtaka polimerinių dalelių formavimuisi, buvo paruoštos dvi A-PBS buferinių tirpalų serijos pH nuo 4,0 iki 7,0. Pirmoje tirpalų serijoje buvo vykdoma fermentinė polianilino sintezė, o antroje – fermentinė polianilino sintezė papildomai į polimerizacijos tirpalus pridedant 3,5 nm aukso nanodalelių.

Vykstanti polimerizacijos reakcija buvo stebima spektrofotometriškai resistruojant šviesos sugerties spektrus 300 – 800 nm srityje. Absorbcijos dydžio kitimas laike ties $\lambda = 450$ nm pavaizduotas pav. 4.24. Tyrimo rezultatai rodo, kad nepriklausomai nuo aukso nanodalelių buvimo tirpale, polimerizacijos reakcija vyksta greičiau esant rūgštinei terpei, o geriausi rezultatai buvo gauti esant polimerizacijos tirpalo pH 4,0.



Pav. 4.24 PANI dalelių absorbcijos maksimumo ($\lambda = 450$ nm) kitimas laike nenaudojant AuND (A) ir polimerizacijos tirpale esant $7,5 \text{ mg ml}^{-1}$ 3,5 nm AuND (B). Polimerizacijos reakcijos vykdytos A-PBS buferiniuose tirpaluose (1 – 4,0; 2 – 5,0; 3 – 6,0; 4 – 7,0; 5 – 8,0 esant 1 mg/ml GOx, 20 mmol l^{-1} gliukozės ir 200 mmol l^{-1} anilino).

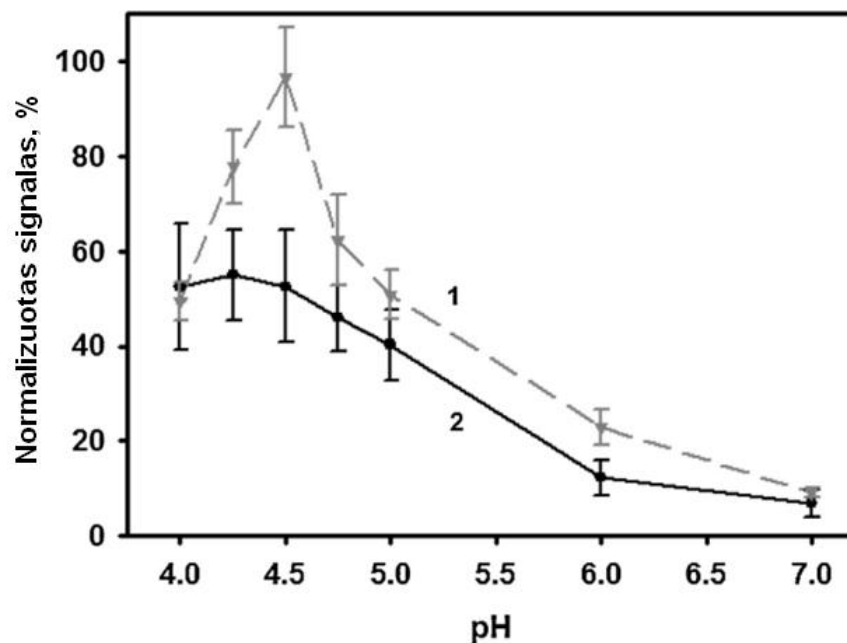
Siekiant įvertinti susintetintų (GOx)PANI ir (GOx/AuND)PANI nanokompozitinių struktūrų kinetines savybes, buvo pasirinktas amperometrinio

biologinio jutiklio modelis, kurio biologiškai aktyvų elementą sudarė minėti nanokompozitai. Amperometrinio biologinio jutiklio schema buvo pasirinkta dėl kelių svarbių priežasčių: elektrodais modifikuotais (GOx)PANI ir (GOx/AuND)PANI nanokompozitais gali būti atlikti keli matavimai, tyrimams atlikti reikalingi labai maži susintetintų nanokompozitų kiekiai, galima lengvai modifikuoti elektrodus, eksperimentų sąlygos yra lengvai atkartojamos.

Siekiant atkartoti eksperimento sąlygas, indikatoriniai grafito elektrodai buvo paruošiami taip, kaip aprašyta 3.2 skyriuje ir modifikuoti skirtingo pH polimerizacijos tirpaluose susintetintais, pagal 3.8 skyriuje pateiktas instrukcijas, (GOx)PANI ir (GOx/AuND)PANI nanokompozitais. Elektrocheminiai matavimai buvo atlikti taip, kaip aprašyta 3.10 skyriuje. Susintetinti (GOx)PANI ir (GOx/AuND)PANI nanokompozitai išlaikė savo katalizines savybes ir buvo tinkami naudoti. Elektrocheminių matavimų duomenys pateikti pav. 4.25 rodo, kad analizinės sistemos atsakas naudojant (GOx)PANI nanokompozitus susintetintus 4,0 – 4,5 pH polimerizacijos tirpaluose buvo geriausias. Tuo tarpu (GOx/AuND)PANI nanokompozitai sintetinti polimerizacijos tirpale pH 4,5 pasižymėjo geriausiomis katalitinėmis savybėmis. Terpės pH įtaka tokių nanokompozitų susidarymo efektyvumui gali būti paaiškinama tuo, kad polianilino pK_a vertė yra 4,63, o GOx pI vertė yra 4,2. Tokiu atveju, kuomet polimerizacijos tirpalo pH yra mažesnis negu 4,63 bet didesnis negu 4,2 anilino monomeras turės teigiamą krūvį, o GOx – neigiamą. Tokiu būdu, kai polimerizacijos tirpalo pH 4,5, dėl elektrostatinės teigiamai įkrautų monomerų ir neigiamai įkrauto fermento sąveikos, PANI susidarymas vyksta fermento ir tirpalo sąlyčio riboje.

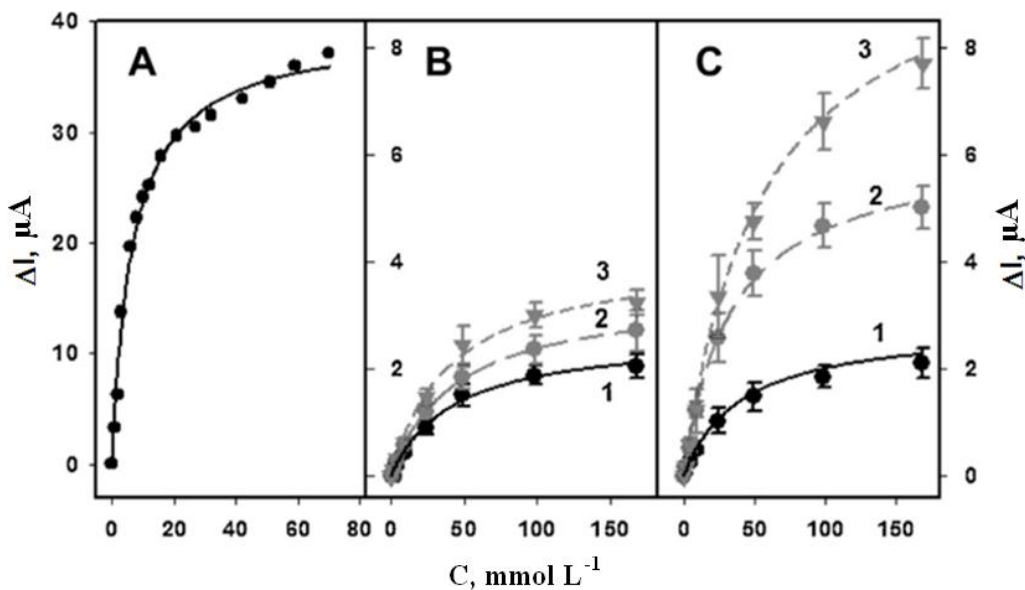
Panašių tyrimų duomenys rodo, kad aukso nanodalelių naudojimas konstruojant amperometrinius biologinius jutiklius pagerina analizinio signalo jautrį naudojant tiek elektrodo paviršiuje imobilizuotą fermentą, tiek ir papildomai padengiant fermentą PPY [165].

Pasiūlytas (GOx)PANI ir (GOx/AuND)PANI nanokompozitų sintezės būdas iš dalies pagrįstas elektrostatische sąveika leido įterpti GOx molekules į PANI sluoksnį ir atskirti susidariusias daleles nuo polimerizacijos tirpalo centrifuguojant. Aukso nanodalelių buvimas tirpale ne tik pagreitina sintezės procesą, bet ir pagerina analizinės sistemos jautrį analizei. Elektrodo modifikuotų (GOx)PANI ir (GOx/AuND)PANI dalelėmis (atitinkamai GR/(GOx)PANI ir GR/(GOx/AuND)PANI) sintetintomis 4,5 pH polimerizacijos tirpaluose tyrimų rezultatai pateikti pav. 4.25. Iš eksperimentinių duomenų matyti, kad į sintezės tirpalą pridėjus aukso nanodalelių analizinis signalas yra dvigubai didesnis. Šis reiškinys gali būti paaiškinamas tuo, kad AuND ne padidina GOx aktyvumą bei teigiamai veikia PANI susidarymą, bet ir turi elektronų pernešimo tarpininkų savybių kas įtakoja elektronų pernašai nuo fermento aktyviojo centro iki elektrodo paviršiaus ir patvirtina ankstesnius atliktus tyrimus kuomet aukso dariniai pasižymėjo elektronų pernašos tarpininkų savybėmis [166]. Taigi, aukso nanodarinių buvimas indikatorinio elektrodo paviršiuje padidina elektroaktyvaus elektrodo paviršiaus plotą ir patvirtina ankstesnių tyrimų rezultatus, kuomet ne tik aukso nanodalalės [24], bet ir anglies nanovamzdeliai [167] ar kiti nanodariniai [168,169] biokatalizines sistemose pasižymėjo elektronų pernašos savybėmis.



Pav. 4.25 Amperometrinio signalo priklausomybė nuo polimerizacijos tirpalo pH: 1 – GR/(GOx/AuND)PANI, 2 – GR/(GOx)PANI elektrodas. Matavimai atlikti A-PBS buferiniame tirpale esant 10 mmol l^{-1} FMS ir 20 mmol l^{-1} gliukozės, kambario temperatūroje. Indikatorinio elektrodo potencialas $+300 \text{ mV Ag/AgCl/Cl}^- 3 \text{ mol l}^{-1}$ atžvilgiu.

GR/(GOx)PANI ir GR/(GOx/AuND)PANI elektrodų amperometrinio signalo priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos buvo aprašomos dviejų kintamųjų hiperbolinėmis lygtimis ir atitiko Michaelis–Menten matematinį modelį $0,1\text{--}150 \text{ mmol l}^{-1}$ gliukozės koncentracijų ribose. Tyrimų rezultatai pateikti pav. 4.26 B ir C.



Pav. 4.26 Srovės stiprio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos tiriamajame tirpale, elektrodo paviršiuje esant skirtingam dalelių kiekiui: (A) kontrolinio GR/GOx elektrodo (K_M $6,7 \pm 1,1$ mmol l⁻¹); (B) elektrodų modifikuotų (GOx)PANI dalelėmis: 1 – 40 mg/cm², 2 – 120 mg/cm², 3 – 360 mg/cm² (K_M 1, 2 ir 3 atitinkamai 42,2, 43,7 ir 40,7 mmol l⁻¹); (C) elektrodų modifikuotų (GOx/AuND)PANI dalelėmis: 1 – 40 mg/cm², 2 – 120 mg/cm², 3 – 360 mg/cm² (K_M 1, 2 ir 3 atitinkamai 36,6, 33,5 ir 35,1 mmol l⁻¹).

Iš pav. 4.26 pateiktų duomenų buvo apskaičiuotos Michaelio konstantos GR/GOx, GR/(GOx)PANI ir GR/(GOx/AuND)PANI elektrodams ir atitinkamai sudarė $6,7 \pm 1,1$, $42,2 \pm 1,7$ ir $35,1 \pm 1,6$ mmol l⁻¹. Katalizinių savybių išsaugojimas ir žymus Michaelio konstantos padidėjimas yra sėkmingo fermento įterpimo į polimerinį sluoksnį požymiai. Kelis kartus didesnė GR/(GOx)PANI (pav. 4.26 B) ir GR/(GOx/AuND)PANI (pav. 4.26 C) elektrodų K_M lyginant su kontroliniu tik GOx modifikuotu elektrodu visiškai patvirtina ankstesnius atliktus tyrimus, kuomet elektrodo paviršiuje esantis fermento sluoksnis buvo padengtas PPY sluoksniu [23].

Šių tyrimų metu buvo parodyta, kad susintetinti (GOx)PANI ir (GOx/AuND)PANI nanokompozitai yra tinkami konstruojant amperometrinį biologinį jutiklį. Taip pat pastebėta, kad aukso nanodalelių panaudojimas stipriai pagerina amperometrinio biologinio jutiklio jautrį.

4.11 Elektronų pernašos tarpininkų tyrimas

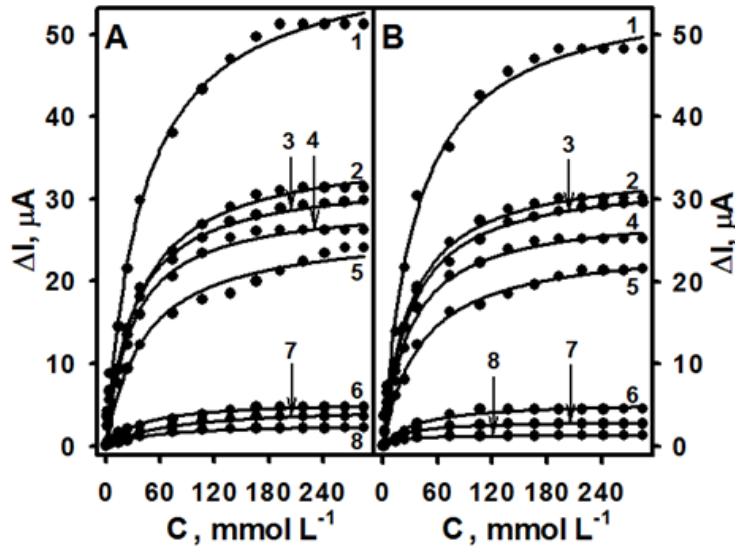
Tiesioginė elektronų pernaša nuo GOx aktyvaus centro iki elektrodo paviršiaus yra apsunkinta dėl to, kad fermento redoks centras FAD yra giliai fermentinėje globulėje. Baltymo sluoksnis kaip geras izoliatorius ekranuoja redoks centrą ir apsunkina elektronų perdavimą iš šių centro elektrodui. Todėl elektronų pernaša nuo FAD iki elektrodo paviršiaus yra limituojantis faktorius amperometrinių gliukozės biologinių jutiklių veikimui. Todėl konstruojant amperometrinius gliukozės biologinius jutiklius ir norint užtikrinti bei pagerinti elektronų srautą nuo redoks centro iki naudojamo elektrodo paviršiaus būtina naudoti elektronų pernašos tarpininkus.

Principinė EPT veikimo schema parodyta pav. 2.3, kuomet fermentas oksiduodamas gliukozę išskiria elektronus, kuriuos prisijungia pasirinkto EPT oksiduota forma. Tokiu būdu EPT yra redukuojamas, o vėliau reoksiduojamas prie elektrodo paviršiaus atiduodamas jam elektronus. Vykstant šiam procesui generuojamas elektros srovės signalas proporcingas gliukozės koncentracijai tirpale.

Atliekant tyrimus buvo pasirinkti plačiai naudojami EPT (TTF, TTF-TCNQ, FMS, 5,6-DAP, $K_4[Fe(CN)_6]$, MB ir TB). Šių tyrimų metu buvo siekiama tarpusavyje palyginti jų elektronų pernašos efektyvumą bei palyginti jų įtaką gliukozės biologinio jutiklio analiziniam signalui. Pasirinkti EPT buvo adsorbuoti grafito elektrodo paviršiuje, o vėliau atliktas cheminis fermento imobilizavimas surišant skersiniais ryšiais GA kaip aprašyta metodinėje dalyje. EPT imobilizavimas elektrodo paviršiuje yra naudingas, nes įgalina efektyvią elektronų

pernašą ir supaprastina atliekamus matavimus papildomai nededant reagentų į tiriamąjį tirpalą prieš kiekvieną matavimą.

Indikatoriniai elektrodai buvo paruošti dviem būdais. Vienu būdu, ant paruošto GR elektrodo paviršiaus buvo užlašinamas pasirinkto EPT tirpalas, o vėliau, išgaravus tirpikliui, GOx tirpalas. Išgaravus tirpikliui fermentas surišamas GA (GR/M/GOx). Antru būdu, ant paruošto GR elektrodo paviršiaus buvo užlašinamas pasirinkto EPT ir GOx tirpalų mišinys. Tirpikliui išgaravus fermentas surišamas GA (GR/M-GOx). GR/M/GOx ir GR/M-GOx analiziniai signalai buvo matuojami amperometriškai A-PBS buferiniame tirpale pH 6,0 kambario temperatūrai, analitės koncentracijos diapazone nuo 0,6 iki 290 mmol l⁻¹.



Pav. 4.27 Gliukozės kalibracinės kreivės užregistruotos A-PBS buferiniame tirpale, pH 6,0, GR/M/GOx (A) ir GR/M-GOx (B) elektrodu. M yra: TTF (1), TTF-TCNQ (2), FMS (3), 5,6-DAP (4), K₄[Fe(CN)₆] (5), MB (6) ir TB (7). Indikatorinio elektrodo potencialas Ag/AgCl/Cl⁻ 3 mol L⁻¹ atžvilgiu: TTF, TTF-TCNQ, 5,6-DAP ir K₄[Fe(CN)₆] yra +300 mV, FMS – +200 mV, MB – +50 mV, TB – 0 mV.

Kaip ir prieš tai atliktuose matavimose buvo stebima hiperbolinė amperometrinio signalo priklausomybė nuo analitės koncentracijos tirpale atitinkanti Michaelis–Menten kinetinę lygtį. Eksperimentiniai duomenys pateikti

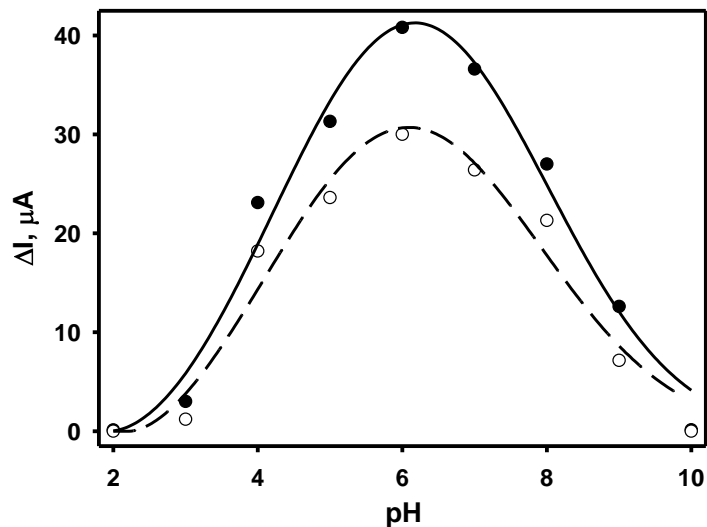
pav. 4.27 ir lentelėje 4.4, parodė kad kinetiniai parametrai skiriasi ne tik nuo naudojamo EPT prigimties bet ir nuo elektrodų paruošimo būdo. Naudojant tuos pačius EPT bet skirtingu būdu paruošiant indikatorinį elektrodą K_M ir I_{max} vertės skirėsi nežymiai, išskyrus MB ir TB. Skirtingų tyrimų metu GOx iš *Aspergillus niger* nustatyta K_M vertė svyruoja nuo 33 [170] iki 110 mmol l⁻¹ [171] esant pH 5,6. Atlikus skaičiavimus didžiausia K_M vertė ($72,9 \pm 8,2$ mmol l⁻¹) buvo nustatyta GR/MB/GOx elektrodai, tuo tarpu mažiausia ($13,9 \pm 1,8$ mmol l⁻¹) GR/TB-GOx elektrodai. Visiškai priešingas efektas buvo pastebėtas I_{max} vertėms. Rezultatai pateikti lentelėje 4.4 rodo, kad didžiausia I_{max} vertė buvo apakaičiuota EPM naudojant TTF ($59,9 \pm 1,0$ ir $55,9 \pm 0,9$ μA, atitinkamai GR/TTF/GOx ir GR/TTF-GOx elektrodams), tuo tarpu mažiausios vertės buvo nustatytos TB ($2,7 \pm 0,1$ ir $1,4 \pm 0,0$ μA, atitinkamai GR/TB/GOx ir GR/TB-GOx elektrodams). Antras pagal dydį amperometrinis signalas buvo registruotas EPM naudojant TTF-TCNQ ($36,3 \pm 0,8$ ir $34,3 \pm 0,4$ μA, atitinkamai GR/TTF-TCNQ/GOx ir GR/TTF-TCNQ-GOx elektrodams).

Lentelė 4.4 Apskaičiuotos K_M ir I_{max} vertės.

| EPT | GR/M/GOx | | GR/M-GOx | |
|---------------------------------------|------------------------------|----------------|------------------------------|----------------|
| | K_M , mmol l ⁻¹ | I_{max} , μA | K_M , mmol l ⁻¹ | I_{max} , μA |
| TTF | 39,8±2,6 | 59,9±1,0 | 35,9±2,3 | 55,9±0,9 |
| TTF-TCNQ | 36,7±3,2 | 36,3±0,8 | 30,1±1,7 | 34,3±0,4 |
| FMS | 29,4±3,2 | 29,7±0,7 | 30,3±2,0 | 28,7±0,4 |
| 5,6-DAP | 43,0±6,6 | 26,5±1,0 | 41,7±3,3 | 24,8±0,5 |
| K ₄ [Fe(CN) ₆] | 39,9±4,6 | 5,5±0,2 | 37,9±5,7 | 5,4±0,2 |
| MB | 72,9±8,2 | 4,8±0,2 | 24,2±2,3 | 3,1±0,1 |
| TB | 55,3±7,2 | 2,7±0,1 | 13,9±1,8 | 1,4±0,0 |

Didelė K_M vertė analizinei sistemai suteikia plačią analizinio signalo priklausomybės nuo analitės koncentracijos tiesinę atkarpą ir leidžia tirti platesnį koncentracijų spektrą, kas ypač svarbu nustatant gliukozės koncentraciją maisto bei gėrimų mėginiuose. Kita vertus, analizinio signalo stipris yra svarbus

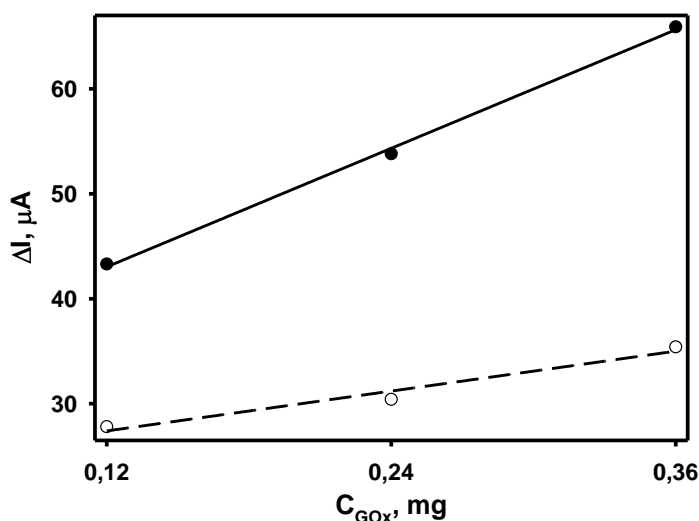
kiekvienos analizinės sistemos dydis, kuris tiesiogiai daro įtaką analizės tikslumui bei jautriui. Tai įvertinus, tolimesniems tyrimams buvo pasirinkti GR/TTF/GOx ir GR/TTF-TCNQ/GOx elektrodai, nors didžiausia K_M vertė buvo nustatyta GR/MB/GOx elektrodai. Pasirinkti elektrodai turi tiek pakankamai didelę K_M vertę, tiek stiprų anodinės srovės atsaką į analitės koncentraciją.



Pav. 4.28 Amperometrinio signalo priklausomybės nuo terpės pH GR/TTF/GOx (ištisa linija) ir GR/TTF-TCNQ/GOx (brūkšninė linija) elektrodams. Matavimai buvo atlikti pastovaus pH A-PBS buferiniame tirpale esant 100 mmol l^{-1} gliukozės. Indikatorinio elektrodo potencialas $+300 \text{ mV Ag/AgCl/Cl}^{-} 3 \text{ mol l}^{-1}$ atžvilgiu.

Tokie esminiai analizinės sistemos faktoriai kaip terpės pH, nuo kurios priklauso amino rūgščių jonizacija aktyviajame fermento centre arba analizinės sistemos naudojimo laikas, nuo kurių priklauso fermento biokatalizinio aktyvumo mažėjimas, buvo ištirti papildomai. GR/TTF/GOx ir GR/TTF-TCNQ/GOx elektrodams pirmiausia buvo parinkta tinkamiausia analizuojamojo tirpalo pH vertė, nes šis dydis dažnai apriboja bioanalizinių sistemų naudojimo galimybes dėl imobilizuoto biologiškai aktyvaus elemento negalėjimo tinkamai reaguoti į analitės buvimą tirpale. Analizinio signalo priklausomybei nuo terpės pH ištirti

buvo pasirinktos skirtingos A-PBS buferinio tirpalo pH vertės nuo 2,0 iki 10,0 ir pastovi analizės koncentracija mėginyje. Tyrimų rezultatai pateikti pav. 4.28. Skirtingai modifikuotų elektrodų analizinio signalo priklausomybės nuo terpės pH turėjo varpo formos kreives, o didesnis negu 50 % analizinis signalas buvo registruojamas pH srityje nuo 4,0 iki 8,0. Tuo tarpu didžiausias analizinis signalas buvo stebimas esant pH 6,0. Tyrimų rezultatai visiškai sutampa su natyvios GOx išskirtos iš *Aspergillus Niger* optimalaus aktyvumo pH verte [172]. pH srityje mažiau nei 4,0 ir daugiau nei 10,0 elektrodų analizinis signalas drastiškai mažėjo ir esant pH 10,0 fermento aktyvumas tesiekė 0 % pradinio aktyvumo. Mažo pH tirpaluose GOx yra inhibuojama tirpale esančių anijonų [148,149].



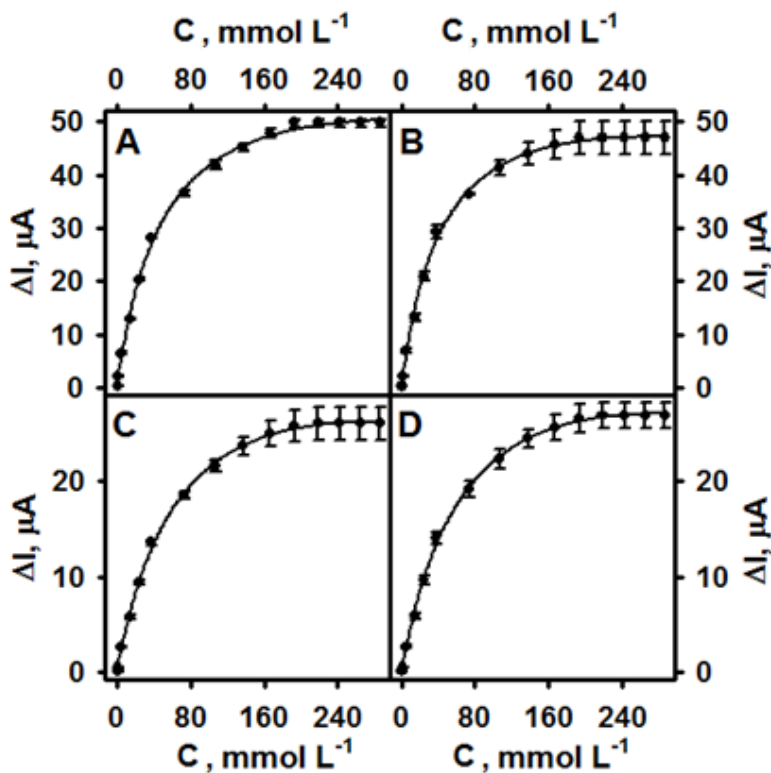
Pav. 4.29 Amperometrinio signalo priklausomybė nuo imobilizuotos GOx kiekio GR/TTF/GOx (ištisinė linija) ir GR/TTF-TCNQ/GOx (brūkšninė linija) elektrodų paviršiuje. Matavimai buvo atlikti A-PBS buferiniame tirpale pH 6,0 esant 100 mmol l^{-1} gliukozės. Indikatorinio elektrodo potencialas $+300 \text{ mV Ag/AgCl/Cl}^-$ 3 mol l^{-1} atžvilgiu.

Fermento kiekis amperometrinio biologinio jutiklio paviršiuje taip pat turi įtakos analizinio signalo dydžiui, todėl buvo atlikti papildomi GR/TTF/GOx ir GR/TTF-TCNQ/GOx elektrodų tyrimai. Šiems tyrimams elektrodo paviršiuje

buvo imobilizuotas skirtingas GOx kiekis. Šių elektrodų analizinis signalas buvo matuojamas A-PBS buferiniame tirpale pH 6,0, esant 100 mmol l^{-1} gliukozės, išlaikant pastovias visas kitas eksperimento sąlygas. Tyrimų duomenys pateikti pav. 4.29 rodo tendenciją, kad kuo didesnis fermento kiekis imobilizuojamas elektrodo paviršiuje, tuo didesnis analizinis signalas registruojamas. Didžiausias registruotas 65,9 ir 35,4 μA atsakas į analizę GR/TTF/GOx ir GR/TTF-TCNQ/GOx elektrodams atitinkamai buvo registruotas elektrodui su didžiausiu elektrodo paviršiuje imobilizuoto fermento kiekiu (0,36 mg). Tuo tarpu mažiausias 43,3 ir 27,8 μA atsakas į analizę buvo registruotas atitinkamai GR/TTF/GOx ir GR/TTF-TCNQ/GOx elektrodams, kurių paviršiuje buvo imobilizuotas mažiausias fermento kiekis (0,12 mg). Taigi, eksperimentiniai duomenys rodo, kad naudojant tris kartus didesnę imobilizuotos GOx kiekį atitinkamai registruojami 1,52 ir 1,28 karto stipresni analiziniai signalai GR/TTF/GOx ir GR/TTF-TCNQ/GOx elektrodams atitinkamai.

GR/TTF/GOx ir GR/TTF-TCNQ/GOx elektrodų analizinių signalų pakartojamumas taip pat buvo įvertintas. Šiam tikslui buvo pasirinkti du skirtingi būdai. Pirmuoju būdu buvo įvertintas vieno elektrodo analizinio signalo pakartojamumas atliekant pasikartojančius matavimus tuo pačiu elektrodu. Antrajam signalo pakartojamumo įvertinimo būdui buvo tiriamos trijų vienodu būdu paruoštų elektrodų analizinių signalų priklausomybės nuo analizės koncentracijos. Atliekant signalo pakartojamumo tyrimus buvo išlaikomos vienodos eksperimento sąlygos, visais atvejais buvo palaikoma pastovi A-PBS buferinio tirpalo pH 6,0 vertė ir pastovi aplinkos temperatūra. Atliktų matavimų rezultatai pateikti pav. 4.30, kuriame nurodytos matavimų paklaidos atitinka trijų matavimų standartinio nuokrypio reikšmes. Gliukozės koncentracijos didinimas nuo 0,6 iki $38,0 \text{ mmol l}^{-1}$ tiriamajame tirpale turėjo įtakos GR/TTF/GOx ir GR/TTF-TCNQ/GOx elektrodų analizinio signalo proporcingam didėjimui. Šiame koncentracijų intervale buvo stebima tiesinė analizinio signalo nuo analizės koncentracijos priklausomybė. Amperometrinio jutiklio signalas didinant

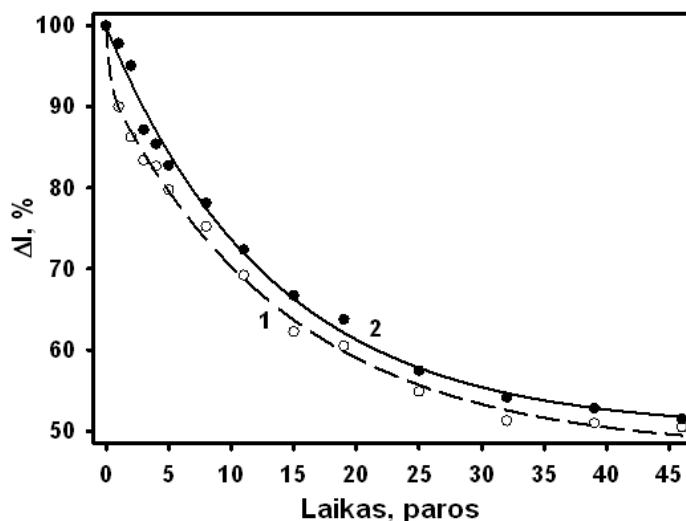
gliukozės koncentraciją didėjo iki $195,0 \text{ mmol l}^{-1}$ ribos, po kurios analizės koncentracijos didinimas tiriamajame tirpale analizinio signalo nebekeitė.



Pav. 4.30 Amperometrinio signalo priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos: A – vieno GR/TTF/GOx elektrodo; B – trims GR/TTF/GOx elektrodams; C – vienam GR/TTF-TCNQ/GOx elektrodui; D – trims GR/TTF-TCNQ/GOx elektrodams. Matavimai buvo atlikti A-PBS buferiniame tirpale pH 6,0 esant 100 mmol l^{-1} gliukozės. Indikatorinio elektrodo potencialas $+300 \text{ mV Ag/AgCl/Cl}^{-1} 3 \text{ mol L}^{-1}$ atžvilgiu.

Pav. 4.30 pateikti duomenys rodo, kad tiek GR/TTF/GOx, tiek ir GR/TTF-TCNQ/GOx elektrodų analizinio signalo pakartojamumas yra pakankamas. Abiem atvejais, tiek matuojant vieno to paties elektrodo, tiek matuojant trijų paruoštų elektrodų analizinių signalų pakartojamumą buvo stebima panaši analizinio signalo nuo gliukozės koncentracijos priklausomybė. Vidutinio suaugusiojo žmogaus gliukozės koncentracija kapiliariniame kraujyje yra $3,3 - 5,5 \text{ mmol l}^{-1}$,

veniniame kraujyje 4,1 – 5,9 mmol l⁻¹, o kraujo serume nuo 4,25 iki 6,4 mmol l⁻¹. Apskaičiuotas standartinis nuokrypis elektrodų signalų pakartojamumą tiriant pirmuoju būdu GR/TTF/GOx ir GR/TTF-TCNQ/GOx elektrodams ir esant analizuojamame tirpale gliukozės koncentracijai 4,37 mmol l⁻¹, atitinkamai sudarė 0,24 ir 0,08, o santykinis standartinis nuokrypis atitinkamai buvo 3,68 ir 2,92 %. Standartinis nuokrypis tiriant trijų pagamintų elektrodų amperometrinius signalus buvo didesnis. GR/TTF/GOx ir GR/TTF-TCNQ/GOx elektrodams gliukozės koncentracijai esant 4,37 mmol l⁻¹, atitinkamai buvo apskaičiuotas 0,40 ir 0,15. Santykinis standartinis nuokrypis atitinkamai buvo 5,81 ir 5,73 %. Atskirai ruoštų elektrodų nežymus analizinio signalo išsibarstymas galėjo būti sukeltas dėl šiek tiek skirtingo imobilizuoto fermento ir EPT kiekio elektrodo paviršiuje, GOx katalizinio aktyvumo praradimo elektrodo ruošimo metu arba dėl netolygaus fermento ir EPT pasiskirstymo elektrodo paviršiuje.



Pav. 4.31 Amperometrinio signalo priklausomybė nuo elektrodo naudojimo laiko: 1 – GR/TTF/GOx elektrodas, 2 – GR/TTF-TCNQ/GOx elektrodas. Matavimai buvo atlikti A-PBS buferiniame tirpale pH 6,0 esant 100 mmol l⁻¹ gliukozės. Indikatorinio elektrodo potencialas +300 mV Ag/AgCl/Cl⁻ 3 mol L⁻¹ atžvilgiu.

Atliekant amperometrinių signalo stabilumo tyrimą GR/TTF/GOx ir GR/TTF-TCNQ/GOx elektrodų generuojamas srovės stipris buvo tiriamas 46 dienas. Visi tyrimai buvo atlikti A-PBS buferiniame tirpale pH 6,0, esant 100 mmol l⁻¹ gliukozės. Matavimai atlikti kambario temperatūroje. Tyrimo metu kiekvienam elektrodai buvo atlikta 14 matavimų, tarp kurių elektrodai buvo laikomi 4°C temperatūroje virš buferinio tirpalo lašo. Kaip matyti pav. 4.31, abu elektrodai po 46 dienų matavimų išlaikė didesnę negu 50 % analizinio signalo dydį.

GR/TTF-TCNQ/GOx elektrodo (pav. 4.31 kreivė 1) stabilumas buvo šiek tiek geresnis nei GR/TTF/GOx elektrodo (pav. 4.31 kreivė 2), bet žymaus skirtumo nepastebėta. Ilgalaikis šių elektrodų stabilumo praradimas paaiškinamas fermento bei EPT desorbicija nuo elektrodo paviršiaus bei GOx katalizinių savybių praradimu.

Atliktais tyrimais buvo tarpusavyje palygintas TTF, TTF-TCNQ, FMS, MB, 5,6-DAP, K₄[Fe(CN)₆] ir TB veikimas vienoje ir toje pačioje analizinėje sistemoje. Visi pasirinkti EPT veikė pasirinktoje sistemoje ir pernešė elektronus nuo GOx redoks centro iki grafito elektrodo paviršiaus, bet stipriausi analiziniai signalai buvo užfiksuoti naudojant TTF ir TTF-TCNQ.

IŠVADOS

- Fermentinės ir cheminės oksidacinės, oksidatoriumi naudojant vandenilio peroksida, sintezės būdais susintetintų polipirolo ir polianilino absorbcijos spektrai yra identiški. Pagrindinis skirtumas – sintezei tinkamas polimerizacijos tirpalo pH. Cheminės sintezės atveju kuo rūgštesnė terpė, tuo greičiau vyksta polimerizacijos reakcija. Šarminėje terpėje polimerizacija nevyksta. Fermentinė sintezė geriausiai vyksta tame pH intervale, kuriame fermentas yra aktyviausias. Be to, sintezė vyksta ir šarminėje terpėje. Aukso nanodalelių būvimas polimerizacijos tirpale padidina polianilino susidarymo greitį. Didžiausią įtaką turi 3,5 nm dydžio aukso nanodalelės;
- Polimerinis sluoksnis suformuotas grafito elektrodų, modifikuotų gliukozės oksidaze, paviršiuje praplečia amperometrinių gliukozės biologinio jutiklio analizinio signalo tiesinės priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos intervalą, padidina stabilumą bei pagerina analizinio signalo pakartojamumą. Elektrodas modifikuotas polipirolo sluoksniu pasižymi mažesniu stabilumu lyginant su elektrodu modifikuotu polianilino sluoksniu;
- Aukso nanodalelės būdamos gliukozės oksidazės ir polianilino nanokompozitinių struktūrų sudėtyje užtikrina efektyvesnę elektronų pernašą nuo gliukozės oksidazės redoks centro iki elektrodo. Geriausiomis katalizinėmis savybėmis pasižymi nanokompozitinės struktūros sintetintos 4,5 pH polimerizacijos tirpale. Šios struktūros biologiniu jutikliu registruojamą analizinį signalą padidina du kartus;
- Elektronų pernašos tarpininkai tetratiofulvalenas, fenazino metosulfatas, 5,6-diamino-1,10-fenantrolinas, tetratiofulvaleno-tetracianochinondimetano kompleksas, metileno mėlis, toluidino mėlynasis ir kalio heksacianoferatas imobilizuoti grafito elektrodų paviršiuje pasižymi efektyvia elektronų pernaša. Kinetiniai gliukozės oksidazės parametrai priklauso ne tik nuo imobilizuoto elektronų pernašos tarpininko prigimties, bet ir nuo elektrodų paruošimo būdo. Efektyviausia elektronų pernaša pasižymi tetratiofulvalenas ir

tetratiofulvaleno-tetracianochinondimetano kompleksas. Elektrodai modifikuoti šiais elektronų pernašos tarpininkais pasižymi geromis analizinėmis charakteristikomis.

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

Doktorantūros metu gauti tyrimų rezultatai buvo publikuoti tarptautiniuose žurnaluose:

1. A. Kausaite – Minkstimiene, **V. Mazeiko**, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius. Enzymatically synthesized polyaniline layer for extension of linear detection region of amperometric glucose biosensor, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2010) 790–797
2. A. Kausaite – Minkstimiene, **V. Mazeiko**, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius. Evaluation of amperometric glucose biosensors based on glucose oxidase encapsulated within enzymatically synthesized polyaniline and polypyrrole, *Sensors and Actuators B* 158 (2011) 278– 285 B
3. **V. Mazeiko**, A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene, Z. Balevicius, A. Ramanavicius, Gold nanoparticle and conducting polymer – polyaniline – based nanocomposites for glucose biosensor design, *Sensors and Actuators B* 189 (2013) 187 - 193
4. A. Kausaite - Minkstimiene, **V. Mazeiko**, A. Ramanaviciene, Y. Oztekin, A. O. Solak, A. Ramanavicius. Evaluation of some redox mediators in the design of reagentless amperometric glucose biosensor, *Electroanalysis* 26 – 7 (2014) 1528–1535
5. A. Kausaite-Minkstimiene, **V. Mazeiko**, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Evaluation of chemical synthesis of polypyrrole particles, *Colloids and Surfaces A* (2015)

PRANEŠIMŲ MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE TEZĖS

Rezultatai pristatyti tarptautinėse mokslinėse konferencijose:

1. **V. Mazeiko**, A Kausaite – Minkstimiene. Enzyme/Polymeric and Enzyme/Gold/Polymeric nanoparticles for amperometric glucose biosensor design. The 13-th International Conference-School Advanced Materials and Technologies, August 27-31, 2011, Palanga, Lithuania.
2. **V. Mazeiko**, A Kausaite – Minkstimiene. Amperometric Glucose Biosensor based on Glucose Oxidase encapsulated within Enzymatically Synthesized Conducting Polymers. 5-th International Conference The Vital Nature Sign, May 19-21, 2011, Kaunas, Lithuania.
3. A. Ramanavicius, A. Kausaite – Minkstimiene, **V. Mazeiko**, V. Ratautaite, A. Vaitkuvienė, Y. Oztekin, A. Ramanaviciene. Novel synthesis of conducting polymers. PITCON 2011. CD-ROM abstracts 1480 – 11P, March 13 – 18, 2011, Atlanta, USA
4. A. Ramanavicius, A. Kausaite – Minkstimiene, **V. Mazeiko**, J. Voronovic, A. Ramanaviciene, Y. Oztekin. Some analytical applications of electrochemically generated polymers and conducting polymers. PITCON 2012. CD-ROM abstracts 2070 – 1, March 11 – 15, Florida, USA
5. **V. Mazeiko**, A Kausaite – Minkstimiene. Investigation of redox mediators for reagentless amperometric glucose biosensors. 14-th International Conference-School Advanced Materials and Technologies, August 27-31, 2012, Palanga, Lithuania.
6. **V. Mazeiko**, A Kausaite – Minkstimiene. Polyaniline synthesis and application in bioanalytical systems. 15-th International Conference-School Advanced Materials and Technologies, August 27-31, 2013, Palanga, Lithuania.

CURRICULUM VITAE

Vardas Viktor

Pavardė Mažeiko

Gimimo data 1985.11.07

Studijos

2004 – 2008 Vilniaus Universitetas, Chemijos Fakultetas, Aplinkos ir analizinės chemijos katedra. Įgytas chemijos bakalauro mokslinis laipsnis.

2008 – 2010 Vilniaus Universitetas, Chemijos Fakultetas, Aplinkos ir analizinės chemijos katedra. Įgytas chemijos magistro mokslinis laipsnis.

2010 – 2015 Vilniaus Universitetas, Chemijos Fakultetas, Aplinkos ir analizinės chemijos katedra. Doktorantūros studijos.

Doktorantūros metu taip pat buvo dalyvauta intensyvioje Erasmus programoje: European chemists for energy, materials and environment, Camerino 31 July - 11 August 2013 Italy

Projektinė veikla

Lietuvos Mokslo Tarybos finansuojamas pagal Lietuvos–Baltarusijos dvišalio bendradarbiavimo mokslo ir technologijų srityje programa projektas „Patobulinti gliukozės biologiniai jutikliai su imobilizuotomis biokompozitinėmis nanomedžiagomis“. Projekto trukmė 2013 – 2014 m. Projekto vadovas prof. habil. dr. A. Ramanavičius.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo mokslinei vadovei doc. dr. Astai Kaušaitėi–Minkštimienei už suteiktas žinias, visokeriopą paramą ir pagalbą ruošiant disertacinį darbą bei atliekant eksperimentus studijų doktorantūroje metu.

Dėkoju doc. dr. Almirai Ramanavičienei ir prof. habil. dr. Arūnui Ramanavičiui už mokslines konsultacijas, diskusijas ir pagalbą tiek atliekant eksperimentus tiek ir publikuojant rezultatus.

Dėkoju dr. Linai Mikoliūnaitei už pagalbą atliekant eksperimentus su atominių jėgų mikroskopu bei patarimus interpretuojant gautus duomenis.

Dėkoju dr. Jaroslavui Voronovič už pagalbą sintetinant koloidinio aukso junginius.

Nuoširdžiai dėkoju visiems Vilniaus Universiteto Chemijos fakulteto Analizinės ir aplinkos chemijos katedros Nanotechnologijų ir medžiagotyros centro „NanoTechnas“ kolegoms už visokeriopą pagalbą, kantrybę, supratingumą ir darbinę atmosferą.

Dalis tyrimų buvo atliekama dalyvaujant Lietuvos Mokslo Tarybos finansuojamame pagal Lietuvos–Baltarusijos dvišalio bendradarbiavimo mokslo ir technologijų srityje programa projekte „Patobulinti gliukozės biologiniai jutikliai su imobilizuotomis biokompozitinėmis nanomedžiagomis“ su Baltarusijos Mikrobiologijos institutu. Dėkoju kolegoms iš Baltarusijos už mokslines diskusijas bei pagalbą atliekant tyrimus ir interpretuojant duomenis.

Taip pat, esu dėkingas Lietuvos Mokslo Tarybai už finansinę paramą.

Nuoširdžiai dėkoju žmonai ir dukrai, mamai, visiems artimiesiems už paramą ir didžiulę kantrybę.

NAUDOTA LITERATŪRA

- [1] L. C. Clark, C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Annals of the New York Academy of Sciences*, (1962) 102, 29-45
- [2] E. H. Yoo, S. Y. Lee, Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice, *Sensors*, (2010) 10, 4558-4576
- [3] F. Wang, S. Hu, Electrochemical sensors based on metal and semiconductor nanoparticles, *MiGRochimica Acta*, (2009) 165, 1–22
- [4] E. Bakker, Y. Qin, Electrochemical sensors, *Analytical Chemistry*, (2006) 78, 3965
- [5] B. Cai, L. Huang, H. Zhang, Z. Sun, Z. Zhang, G. Zhang, Gold nanoparticles-decorated graphene field-effect transistor biosensor for femtomolar MicroRNA detection, *Biosensors and Bioelectronics*, (2015) 74, 329–334
- [6] S. Kaimori, T. Kitamura, M. Ichino, T. Hosoya, F. Kurusu, T. Ishikawa, H. Nakamura, M. Gotoh, I. Karube, Structural development of a minimally invasive sensor chip for blood glucose monitoring, *Analytica Chimica Acta*, (2006) 573–574, 104–109
- [7] R. K. Mendes, R. F. Carvalhal, L. T. Kubota, Effects of different self-assembled monolayers on enzyme immobilization procedures in peroxidase-based biosensor development, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (2008) 612, 164 – 172
- [8] A. Rahman, P. Kumar, D. Park, Y. Shim, Electrochemical Sensors Based on Organic Conjugated Polymers, *Sensors*, (2008) 8, 118–141
- [9] F. Davis, S. P. J. Higson, *Biomedical Polymers*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, p. 236. (2007)
- [10] P.D. Gaikwad, D. J. Shirale, P.A. Savale, K. Datta, P. Ghosh, A. J. Pathan, G. Rabbani, M. D. Shirsat, Development of PANI-PVS-GOD electrode by

potentiometric method for determination of glucose, *International Journal of Electrochemical Science*, (2007) 2, 488–497

[11] A. Ramanaviciene, A. Kausaite, S. Tautkus, A. Ramanavicius, Biocompatibility of polypyrrole particles: an in-vivo study in mice, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, (2007) 59, 311–315

[12] M. M. Barsan, M. David, M. Florescu, L. Ţugulea, C. Bretta, A new self-assembled layer-by-layer glucose biosensor based on chitosan biopolymer entrapped enzyme with nitrogen doped grapheme, *Bioelectrochemistry*, (2014) 99, 46–52

[13] R. Baronas, F. Ivanauskas, J. Kulys, The influence of the enzyme membrane thickness on the response of amperometric biosensors, *Sensors*, (2003) 3, 248–262

[14] L. Rassaeia, F. Markenb, M. Sillanpaac, M. Amirid, C. M. Cirtiu, M. Sillanpaa, Nanoparticles in electrochemical sensors for environmental monitoring, *Trends in Analytical Chemistry*, (2011) 30, 1704–1715

[15] J. Li, M. Stachowski, Z. Zhang, Application of responsive polymers in implantable medical devices and biosensors, *Switchable and Responsive Surfaces and Materials for Biomedical Applications*, (2015) 259–298

[16] J. D. Qiu, W. M. Zhou, J. Guo, R. Wang, R. P. Liang, Amperometric sensor based on ferrocene-modified multiwalled carbon nanotube nanocomposites as electron mediator for the determination of glucose, *Analytical Biochemistry*, (2009) 385, 264–269

[17] B. Ballarin, M. C. Cassani, R. Mazzoni, E. Scavetta, D. Tonelli, Enzyme electrodes based on sono-gel containing ferrocenyl compounds, *Biosensors and Bioelectronics*, (2007) 22, 1317–1322

[18] J. Razumiene, E. Cirbaite, V. Razumas, V. Laurinavicius, New mediators for biosensors based on PQQ-dependent alcohol dehydrogenases, *Sensors and Actuators B*, (2015) 207, 1019–1025

-
- [19] W. Z. Jia, K. Wang, X. H. Xia, Elimination of electrochemical interferences in glucose biosensors, *Trends in Analytical Chemistry*, (2010) 29, 316-318
- [20] A. Ramanavičius, Elektrai laidūs polimerai elektrocheminiuose biologiniuose jutikliuose, Vilnius (2005)
- [21] A. Chaubey, B. D. Malhotra, Mediated biosensors, *Biosensors and bioelectronics*, (2002) 17, 441–456
- [22] G. G. Guilbault, Analytical uses of immobilized enzymes, *Mercal Dekkar*, (1984) 77–160
- [23] G. Wolfgang, P. Heiduschka, Interface analysis in biosensor design, *Biosensors and bioelectronics*, (1995) 10, 853–883
- [24] V. Scognamiglio, Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years, *Biosensors and Bioelectronics*, (2013) 47, 12–25
- [25] M. Stoytcheva, R. Zlatev, V. Gochev, Z. Velkova, G. Montero, M. T. Beleno, Amperometric biosensors precision improvement. Application to phenolic pollutants determination, *Electrochimica Acta*, (2014) 147, 25–30
- [26] U. G. Hughes, R. M. Pemberton, P. R. Fielden, J. P. Hart, Development of a novel reagentless, screen-printed amperometric biosensor based on glutamate dehydrogenase and NAD⁺, integrated with multi-walled carbon nanotubes for the determination of glutamate in food and clinical applications, *Sensors and Actuators B*, (2015) 216, 614–621
- [27] R. Wilson, A. F Turner, Glucose oxidase: an ideal enzyme, *Biosensors and bioelectronics*, (1992) 7, 165–85
- [28] M. Khan, S. Park, Glucose biosensor based on GOx/HRP bienzyme at liquid–crystal/aqueous interface, *Journal of Colloid and Interface Science*, (2015) 457, 281–288
- [29] S. R. Balakrishnan, U. Hashim, G. R. Letchumanan, M. Kashif, A. R. Ruslinda, W. W. Liu, P. Veerasadan, R. H. Prasad, K. L. Foo, P. Poopalan, Development of highly sensitive polysilicon nanogap with APTES/GOx based

lab-on-chip biosensor to determine low levels of salivary glucose, *Sensors and Actuators A*, (2014) 220, 101–111

[30] N. Q. Dung, D. Patil, T. Duong, H. Jung, D. Kim, S. Yoon, An amperometric glucose biosensor based on a GOx-entrapped TiO₂–SWCNT composite, *Sensors and Actuators B*, (2012) 166–167, 103–109

[31] A. A. Karyakin, E. E. Karyakina, L. Gorton, Prussian-blue-based amperometric biosensors in flow-injection analysis, *Talanta*. (1996) 43, 1597–1606

[32] Z. Liu, H. Liu, M. Zhang, J. L. Kong, J. Q. Deng, Al₂O₃ sol-gel derived amperometric biosensor for glucose, *Analytica Chimica Acta*, (1999) 392, 135–141

[33] G. Ramsay, Commercial biosensors, *Wiley*, New York (1998)

[34] Q. Gao, Y. Guo, W. Zhang, H. Qi, C. Zhang, An amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer GOx-SWCNT conjugate/redox polymer multilayer on a screen-printed carbon electrode, *Sensors and Actuators B*, (2011) 153, 219–225

[35] M. Florescu, C. M. A. Brett, Development and evaluation of electrochemical glucose enzyme biosensors based on carbon film electrodes, *Talanta*, (2005) 65, 306–312

[36] X. Chu, X. Zhu, Y. Dong, T. Chen, M. Ye, W. Sun, An amperometric glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on the platinum electrode modified with NiO doped ZnO nanorods, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (2012) 676, 20–26

[37] J. R. Anush, H. Kimb, A. T. Fleming, S. J. Das, K. H. Yu, B. C. Kim, C. J. Raj, Simple fabrication of ZnO/Pt/chitosan electrode for enzymatic glucose biosensor, *Sensors and Actuators B*, (2014) 202, 827–833

[38] H. L. Chen, L. Zhao, X. Chen, Z. X. Zhuang, X. R. Wang, Development of an amperometric glucose biosensor based on the immobilization of glucose

oxidase in an ormosil-PVA matrix onto Prussian Blue modified electrode, *Science in China Series B: Chemistry*, (2009) 52-8, 1128–1135

[39] B. Sungur, New Glucose Biosensor Based on Glucose Oxidase-immobilized Gelatin Film Coated Electrodes, *Journal of Biomaterials Applications*, (2004) 18, 265–277

[40] L. M. Sanchez-Paniagua, D. Mecerreyes, E. Lopez-Cabarcos, B. Lopez-Ruiz, Amperometric glucose biosensor based on polymerized ionic liquid miGRoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, (2006) 21, 2320–2328

[41] M. Dervisevic, E. Cevik, M. Senel, Development of glucose biosensor based on reconstitution of glucose oxidase onto polymeric redox mediator coated pencil graphite electrodes, *Enzyme and Microbial Technology*, (2015) 68, 69–76

[42] M. M. Rahman, X. Li, J. Kim, B. O. Lim, A. J. Saleh Ahammad, J. Lee, A cholesterol biosensor based on a bi-enzyme immobilized on conducting poly(thionine) film, *Sensors and Actuators B*, (2014) 202, 536–542

[43] M. Ammam, J. Fransaer, Micro-biofuel cell powered by glucose/O₂ based on electro-deposition of enzyme, conducting polymer and redox mediators: Preparation, characterization and performance in human serum, *Biosensors and Bioelectronics*, (2010) 25, 1474–1480

[44] H. Liu, T. Ying, K. Sun, H. Li, D. Qi, Reagentless amperometric biosensors highly sensitive to hydrogen peroxide, glucose and lactose based on N-methyl phenazine methosulfate incorporated in a Nafion film as an electron transfer mediator between horseradish peroxidase and an electrode, *Analytica Chimica Acta*, (1997) 344, 187-199

[45] A. Chaubey, B. D. Malhotra, Mediated biosensors, *Biosensors & Bioelectronics*, (2002) 17, 441 – 456

[46] A. K. Sarma, P. Vatsyayan, Recent advances in material science for developing enzyme electrodes, *Biosensors and Bioelectronics*, (2009) 24, 2313-2322

-
- [47] J. Wang, Electrochemical glucose biosensors, *American Chemical Society*, (2008), 814 – 825
- [48] G. Sanchez-Obrero, M. Cano, J. L. Avil, M. Mayen, M. L. Mena, J. M. Pingarron, R. Rodríguez-Amaro, A gold nanoparticle-modified PVC/TTF-TCNQ composite amperometric biosensor for glucose determination, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (2009) 634, 59–63
- [49] A. S. N. Murthy, Tetrathiafulvalene as a mediator for the electrocatalytic oxidation of L-ascorbic acid, *Biosensors & Bioelectronics*, (1996) 11, 191-193
- [50] G. Palleschi, A. P. F. Turner. Amperometric tetrathiafulvalene-mediated lactate electrode using lactate oxidase absorbed on carbon foil, *Analytica Chimica Acta*, (1990) 234, 459-463
- [51] A. Mulchandani, A. Bassi, Determination of glutamine and glutamic acid in mammalian cell cultures using tetrathiafulvalene modified enzyme electrodes, *Biosensors & Bioelectronics*, (1996) 11, 271-280
- [52] J. Kulys, The carbon paste electrode enGRusted with a miGRoreactor as glucose biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, (1999) 14, 473–479
- [53] X. Bai, G. Chen, K. K. Shiu, Electrochemical biosensor based on reduced graphene oxide modified electrode with Prussian blue and poly(toluidine blue O) coating, *Electrochimica Acta*, (2013) 89, 454–460
- [54] X. Zhang, L. Shen, M. Wang, G. Siqin, Z. Tong, R. Xu, D. Zhang, J. Ma, L. Liu, A novel glucose biosensor constructed by glucose oxidase immobilized with methylene blue intercalated layered lanthanum niobic acid nanocomposite, *Materials Letters*, (2014) 135, 39–42
- [55] M. Ak, M. S. Ak, L. Toppare, Electrochemical properties of a new star-shaped pyrrole monomer and its electrochromic applications, *MaGRomolecular Chemistry and Physics*, (2006) 207, 1351–1358
- [56] H. Shirakawa, E. J. Louis, A. G. MacDiarmid, C. K. Chiang, A. J. Heeger, Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of

polyacetylene, (CH)_x, *Journal of the Chemical Society Chemical Communications*, (1977) 474, 578–580

[57] C. K. Chiang, Y. W. Park, A. J. Heeger, H. Shirakawa, E. J. Louis, A. G. MacDiarmid, Electrical conductivity in doped polyacetylene, *Physical Review Letters*, (1977) 39, 1098–1101

[58] J.H. Kim, A.K. Sharma, Y.S. Lee, Synthesis of polypyrrole and carbon nanofiber composite for the electrode of electrochemical capacitors, *Materials Letters*, (2006) 60, 1697–1701

[59] S. Radhakrishnan, S. Paul, Conducting polypyrrole modified with ferrocene for applications in carbon monoxide sensors, *Sensors and Actuators B*, (2007) 125, 60–65

[60] K. GRowley, M. R. Smyth, A. J. Killard, A. Morrin, Printing polyaniline for sensor applications, *Chemical Papers*, (2013) 67, 771–780.

[61] D. D. Ateh, H. A. Navsaria, P. Vadgama, Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues, *Journal of The Royal Society Interface*, (2006) 3, 741–752

[62] E. Hakansson, A. Kaynak, T. Lin, S. Nahavandi, T. Jones, E. Hu, Characterization of conducting polymer coated synthetic fabrics for heat generation, *Synthetic Metals*, (2004) 144, 21–28

[63] S. C. Luo, Conducting polymers as biointerfaces and biomaterials: a perspective for a special issue of polymer reviews, *Polymer Reviews*, (2013) 53, 303–310

[64] A. Sassolas, L. J. Blum, B. D. Leca-Bouvier, Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnology Advances*, (2012) 30, 489–511

[65] G. Couture, A. Alaaeddine, F. Boschet, B. Ameduri, Polymeric materials as anion-exchange membranes for alkaline fuel cells, *Progress in Polymer Science*, (2011) 36, 1521–1557

-
- [66] S. Cosnier, M. Holzinger, Electrosynthesized polymers for biosensing, *Chemical Society Reviews*, (2011) 40, 2146–2156
- [67] K. Tsunashima, T. Matsubayashi, Y. Ono, M. Matsumiya, Electropolymerization of pyrrole in a bis(fluorosulfonyl)amide-based ionic liquid, *ECS Electrochemistry Letters*, (2014) 3, G1–G4
- [68] M. Raicopol, C. Andronescu, R. Atasiei, A. Hanganu, A. M Manea, I. Rau, F. Kajzar, L. Pilan, Synthesis of conducting azopolymers by electrochemical grafting of a diazonium salt at polypyrrole electrodes, *Synthetic Metals*, (2015) 206, 84–91
- [69] C. Saravanan, R. C. Shekhar, S. Palaniappan, Synthesis of polypyrrole using benzoyl peroxide as a novel oxidizing agent, *MaGRomolecular Chemistry and Physics*, (2006) 207, 342–348
- [70] M. Taunk, A. Kapil, S. Chand, Chemical synthesis and lowtemperature electrical transport in polypyrrole doped with sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate, *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, (2011) 22, 136–142
- [71] K. Leonavicius, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Polymerization model for hydrogen peroxide initiated synthesis of polypyrrole nanoparticles, *Langmuir*, (2011) 27, 10970–10976
- [72] J. A. Pomposo, E. Ochoteco, C. Pozo, P. M. Carrasco, H. J. Grande, F. J. Rodriguez, Conductivity enhancement in raw polypyrrole and polypyrrole nanoparticle dispersions, *Polymers for Advanced Technologies*, (2006) 17, 26–29
- [73] M. M. Castillo-Ortega, M. B. Inoue, M. Inoue, Chemical synthesis of highly conducting polypyrrole by the use of copper(II) perchlorate as an oxidant, *Synthetic Metals*, (1989) 28, 65–70
- [74] M. S. Rather, K. Majid, R. K. Wanchoo, M. L. Singla, Nanocomposite of Polyaniline with the photoadduct of potassium hexacyanoferrate and pyridine

ligand: Structural, electrical, mechanical and thermal study, *Synthetic Metals*, (2013) 179, 60–66

[75] G. Shumakovich, V. Kurova, I. Vasileva, D. Pankratov, G. Otrokhov, O. Morozova, A. Yaropolov, Laccase-mediated synthesis of conducting polyaniline, *Journal of Molecular Catalysis B*, (2012) 77, 105–110

[76] V. Krikstolaityte, J. Kuliesius, A. Ramanaviciene, L. Mikoliunaite, A. Kausaite-Minkstimiene, Y. Oztekin, A. Ramanavicius, Enzymatic polymerization of polythiophene by immobilized glucose oxidase, *Polymer*, (2014) 55, 1613–1620

[77] S. Kobayashis, Enzymatic Polymerization: A New Method of Polymer Synthesis, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, (2000) 37, 16

[78] R. Nagarajan, S. Tripathy, J. Kumar, F. F. Bruno, L. Samuelson, An enzymatically synthesized conducting molecular complex of polyaniline and poly(vinyl phosphoric acid), *Macromolecules*, (2000) 33, 9542

[79] M. R. Nabid, A. A. Entezami, A novel method for synthesis of water-soluble polypyrrole with horseradish peroxidase enzyme, *Journal of Applied Polymer Science*, (2004) 94, 254–258

[80] N. Bartlett, J. M. Cooper, A review of the immobilization of enzymes in electropolymerized films, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (1993) 362, 1–12

[81] M. V. Deshpande, D. Amalnerkar, Biosensors prepared from electrochemically – synthesised conducting polymers, *Progress in Polymer Science*, (1993) 18, 623–649

[82] A. G. MacDiarmid, L. S. Yang, W. S. Huang, B. D. Humphrey, Polyaniline: Electrochemistry and application to rechargeable batteries, *Synthetic Metals*, (1987) 18, 393–398

[83] A. G. MacDiarmid, J. A. Epstein, The concept of secondary doping as applied to polyaniline, *Synthetic Metals*, (1994) 65, 103–116

-
- [84] G. Inzelt, *Conducting Polymers: A New Era in Electrochemistry*, Springer, p. 15 – 16 (2008)
- [85] P. Surwade , S. R. Agnihotra , V. Dua , N. Manohar , S. Jain , S. Ammu, K. Sanjeev, Manohar Catalyst-Free Synthesis of Oligoanilines and Polyaniline Nanofibers Using H₂O₂, *Journal of the American Chemical Society*, (2009) 131, 12528–12529
- [86] I. Yu, A. Sapurina, M. A. Shishov, Oxidative Polymerization of Aniline: Molecular Synthesis of Polyaniline and the Formation of Supramolecular Structures, *New Polymers for Special Applications*, (2012) 9
- [87] W. J. Feast, J. Tsibouklis, K. L. Pouwer, L. Groenendaal, E. W. Meijer, Synthesis, processing and material properties of conjugated polymers, *Polymer*, (1996) 37, 5017-5047
- [88] S. Machida, S. Miyata, A. Techagumpuch, Chemical synthesis of highly electrically conductive polypyrrole, *Synthetic Metals*, (1989) 31, 311–318
- [89] A. Vaitkuvienė, V. Kasetas, J. Voronovic, G. Ramanauskaite, G. Biziuleviciene, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Evaluation of cytotoxicity of polypyrrole nanoparticles synthesized by oxidative polymerization, *Journal of Hazardous Materials*, (2013) 167, 250–251
- [90] R. Ansari, Polypyrrole conducting electroactive polymers: synthesis stability studies, *European Journal of Chemistry*, (2006) 186–201
- [91] K. Leonavicius, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Polymerization model for hydrogen peroxide initiated synthesis of polypyrrole nanoparticles, *Langmuir*, (2011) 27, 10970–10976
- [92] C. D. Pina, E. Falletta, M. Rossi, Conductive materials by metal catalyzed polymerization, *Catalysis Today*, (2011) 160, 11–27
- [93] V. Bocchi, L. Chierici, G. P. Gardini, R. Mondelli, On pyrrole oxidation with hydroge peroxide, *Tetrahedron*, (1970) 26, 4073-4032

-
- [94] A. F. Diaz, J. Bargon, Handbook of Conducting Polymers, *Marcel Dekker*, New York, (1986)
- [95] T. A. Skotheim, J. R. Reynolds, Hand Book of Conducting Polymers, GRC Press, (2006)
- [96] G. Torres-Gomez, P. Gomez-Romero, Conducting organic polymers with electroactive dopants. Synthesis and electrochemical properties of hexacyanoferrate-doped polypyrrole, *Synthetic Metals*, (1998) 98, 95–102
- [97] H. C. Kang, K. E. Geckeler, Enhanced electrical conductivity of polypyrrole prepared by chemical oxidative polymerization: effect of the preparation technique and polymer additive, *Polymer*, (2000) 41, 6931–6934
- [98] N. H. A. Rahman, T. I. T. Kudin, A. M. M. Ali, M. Z. A. Yahya, Synthesis and characteristics of conducting polymer-based polypyrrole in different solvents, *Materials Science and Engineering: A*, (2012) 2, 190–195
- [99] A. Kassim, Z. B. Basar, H. N. M. E. Mahmud, Effects of preparation temperature on the conductivity of polypyrrole conducting polymer, *Journal of Chemical Sciences Indian Academy of Sciences*, (2002) 114, 155–162
- [100] A. Radzicka, R. Wolfenden, A proficient enzyme, *Science*, (1995) 267, 90 - 93
- [101] K. Parikka, E. Master, M. Tenkanen, Oxidation with galactose oxidase: Multifunctional enzymatic catalysis, *Journal of Molecular Catalysis B*, (2015) 120, 47–59
- [102] M. Guven, S. Unal, D. Erhan, N. Ozdemir, S. Baris, T. Celkan, M. Bostanci, Bahadir Batar, Role of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 gene polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia susceptibility in a Turkish population, *Meta Gene*, (2015) 5, 115–119
- [103] J. Xu, C. Morisseau, B. D. Hammock, Expression and characterization of an epoxide hydrolase from *Anopheles gambiae* with high activity on epoxy fatty acids, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*,

(2014) 54, 42–52

[104] S. S. Sawant, B. K. Salunke, B. S. Kim, A rapid, sensitive, simple plate assay for detection of microbial alginate lyase activity, *Enzyme and Microbial Technology*, (2015) 77, 8–13

[105] J. M. Coughlin, R. Kundu, J. C. Cooper, Z. T. Ball, Inhibiting prolyl isomerase activity by hybrid organic–inorganic molecules containing rhodium(II) fragments, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (2014) 24, 5203 – 5206

[106] A. Gailiūnienė, *Biochemija, Kaunas*, p. 115–128 (1999)

[107] A. Praškevičius, L. Ivanovienė, N. Stasiūnienė, J. Burneckienė, H. Rodovičius, L. Lukoševičius, D. Kondratas, *Biochemija, Kaunas*, p. 122–132 (2003)

[108] D. Agyei, B. K. Shanbhag, L. He, Enzyme engineering (immobilization) for food applications, Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality, *Technology and Nutrition*, (2015) 213–235

[109] R. K. Mendes, R. F. Carvalhal, L. T. Kubota, Effects of different self-assembled monolayers on enzyme immobilization procedures in peroxidase-based biosensor development, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (2008) 612, 164–172

[110] L. Sun, Y. Ma, P. Zhang, L. Chao, T. Huang, Q. Xie, C. Chen, S. Yao, An amperometric enzyme electrode and its biofuel cell based on a glucose oxidase-poly(3-anilineboronic acid)-Pd nanoparticles bionanocomposite for glucose biosensing, *Talanta*, (2015) 138, 100–107

[111] I. A. Rasiah, K. H. Sutton, F. L. Low, M. H. Lin, J. A. Gerrard, GROSslinking of wheat dough proteins by glucose oxidase and the resulting effects on bread and GROissants, *Food Chemistry*, (2005) 89, 325–332

[112] G. J. Pickering, D. A. Heatherbell, M. F. Barnes, Optimising glucose conversion in the production of reduced alcohol wine using glucose oxidase, *Food Research International*, (1998) 31, 685–692

-
- [113] J. Afseth, G. Rolla, Clinical experiments with a toothpaste containing amyloglucosidase and glucose oxidase, *Caries Research*, (1983) 17–5, 472–475
- [114] J. Klein, M. Rosenberg, J. Markos, O. Dolgos, M. Krosiak, L. Kristofikova, Biotransformation of glucose to gluconic acid by *Aspergillus niger* – study of mass transfer in an airlift bioreactor, *Biochemical Engineering Journal*, (2002) 3568, 1–9
- [115] T. Tzanov, A. Silgia, G. M. Gubitz, A. Cavaco-Paulo, Hydrogen peroxide generation with immobilized glucose oxidase for textile bleaching, *Journal of Biotechnology*, (2002) 93, 87–94
- [116] H. J. Hecht, D. Schomburg, The 3D structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Implications for the use of glucose oxidase as a biosensor enzyme, *Biosensors Bioelectronics*, (1993) 8, 197–203
- [117] I. Morkvenaite-Vilkonciene, P. Genys, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Scanning electrochemical impedance microscopy for investigation of glucose oxidase catalyzed reaction, *Colloids and Surfaces B*, (2015) 126, 598–602
- [118] M. Blazic, G. Kovacevic, O. Prodanovic, R. Ostafe, M. Gavrovic-Jankulovic, R. Fischer, R. Prodanovic, Yeast surface display for the expression, purification and characterization of wild-type and B11 mutant glucose oxidases, *Protein Expression and Purification*, (2013) 89, 175–180
- [119] J. H. Ko, M. S. Hahm, H. A. Kang, S. W. Nam, B. H. Chung, SeGRetry expression and purification of *Aspergillus niger* glucose oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in PMR1 gene, *Protein Expression and Purification*, (2002) 25, 488–493
- [120] M. L. Mena, P. Yanez-Sedeno, J. M. A. Pingarron, Comparison of different strategies for the construction of amperometric enzyme biosensors using gold nanoparticle-modified electrodes, *Analytical Biochemistry*, (2005) 336, 20–27

-
- [121] Y. Okawa, N. Yokoyama, Y. Sakai, F. Shiba, Direct electron transfer biosensor for hydrogen peroxide carrying nanocomplex composed of horseradish peroxidase and Au-nanoparticle – Characterization and application to bienzyme systems, *Analytical Chemistry Research*, (2015) 5, 1–8
- [122] K. R. Brown, A. P. Fox, M. J. Natan, Morphology-Dependent Electrochemistry of Cytochrome c at Au Colloid-Modified SnO₂ Electrodes, *Journal of the American Chemical Society*, (1996) 118, 1154-1157
- [123] C. Yu, L. Wang, W. Li, C. Zhu, N. Bao, H. Gu, Detection of cellular H₂O₂ in living cells based on horseradish peroxidase at the interface of Au nanoparticles decorated graphene oxide, *Sensors and Actuators B*, (2015) 211, 17–24
- [124] L. Wang, E. Wang, Direct electron transfer between cytochrome c and a gold nanoparticles modified electrode, *Electrochemistry Communications*, (2004) 6, 49-54
- [125] 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*, (2001) 516, 119- 126
- [126] J. L. Tang, S. F. Cheng, W. T. Hsu, T. Y. Chiang, L. K. Chau, Fiber-optic biochemical sensing with a colloidal gold-modified long period fiber grating, *Sensors and Actuators B: Chemical*, (2006) 119, 105-109
- [127] L. Agui, J. Manso, P. Yanez-Sedeno, J. M. Pingarron, Amperometric biosensor for hypoxanthine based on immobilized xanthine oxidase on nanoGRystal gold-carbon paste electrodes, *Sensors and Actuators B: Chemical*, (2006) 113, 272-280
- [128] C. Sun, X. Chen, Q. Han, M. Zhou, C. Mao, Q. Zhu, J. Shen, Fabrication of glucose biosensor for whole blood based on Au/hyperbranched polyester nanoparticles multilayers by antibiofouling and self-assembly technique, *Analytica Chimica Acta*, (2013) 776, 17–23

-
- [129] S. Chen, Amperometric Hydrogen Peroxide Biosensor Based on the Immobilization of Horseradish Peroxidase (HRP) on the Layer-by-Layer Assembly Films of Gold Colloidal Nanoparticles and Toluidine Blue, *Electroanalysis*, (2006) 18, 471-477
- [130] T. Hoshi, N. Sagae, K. Daikuhara, K. Takahara, J. Anzai, Multilayer membranes via layer-by-layer deposition of glucose oxidase and Au nanoparticles on a Pt electrode for glucose sensing, *Materials Science and Engineering: C*, (2007) 27, 890-894
- [131] W. Yang, J. Wang, S. Zhao, Y. Sun, C. Sun, Multilayered construction of glucose oxidase and gold nanoparticles on Au electrodes based on layer-by-layer covalent attachment, *Electrochemistry Communications*, (2006) 8, 665-672
- [132] G. F. Payne, S. R. Raghavan, Chitosan: a soft interconnect for hierarchical assembly of nano-scale components, *Soft Matter*, (2007) 3, 521-527
- [133] X. L. Luo, J. J. Xu, Y. Du, H. Y. Chen, A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition, *Analytical Biochemistry*, (2004) 334, 284- 289
- [134] Q. Xu, C. Mao, N. N. Liu, J. J. Zhu, J. Sheng, Direct electrochemistry of horseradish peroxidase based on biocompatible carboxymethyl chitosan-gold nanoparticle nanocomposite, *Biosensors and Bioelectronics*, (2006) 22, 768-773
- [135] X. Feng, H. Cheng, Y. Pan, H. Zheng, Development of glucose biosensors based on nanostructured graphene-conducting polyaniline composite, *Biosensors and Bioelectronics*, (2015) 70, 411-417
- [136] I. Michira, R. Akinyeye, V. Somerset, M. J. Klink, M. Sekota, A. Al-Ahmed, P. G. L. Baker, E. Iwuoha, Synthesis, characterisation of novel polyaniline nanomaterials and application in amperometric biosensors, *MaGRomolecular Symposia*, (2007) 255, 57-69
- [137] S. Cosnier, Biosensors based on electropolymerized films: new trends, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2003) 377, 507-520

-
- [138] N. V. Blinova, I. Sapurina, J. Klimovic, J. Stejskal, The chemical and colloidal stability of polyaniline dispersions, *Polymer Degradation and Stability*, (2005) 88, 428–34
- [139] Z. M. Tahir, E. C. Alocilja, D. L. Grooms, Polyaniline synthesis and its biosensor application, *Biosensors and Bioelectronics*, (2005) 20, 1690 – 1695
- [140] L. A. Samuelson, A. Anagnostopoulos, K. S. Alva, J. Kumar, S. K. Tripathy, Biologically derived conducting and water soluble polyaniline, *MaGRomolecules*, (1998) 31, 4376–4378
- [141] A. Ramanavicius, A. Kausaite, A. Ramanaviciene, Self-encapsulation of oxidases as a basic approach to tune the upper detection limit of amperometric biosensors, *The Analyst*, (2008) 133, 1083–1089
- [142] A. Ramanavicius, V. Laurinavicius, A. Bimbiris, R. Meskys, R. Rudomanskis, Immobilization and investigation of sarcosine oxidase and GReatine amidinohydrolase, *Biologija*, (1997) 1, 77–80
- [143] A. Kausaite, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Polyaniline synthesis catalysed by glucose oxidase, *Polymer*, (2009) 50, 1846–1851
- [144] A. Ramanavicius, A. Kausaite, A. Ramanaviciene, Biofuel cell based on direct bioelectrocatalysis, *Sensors and Actuators B*, (2005) 111–112, 532–539
- [145] E. J. Oh, K. S. Jang, A. G. MacDiarmid, High molecular weight soluble polypyrrole, *Synthetic Metals*, (2002) 125, 272–297
- [146] S. Fabiano, C. Tran-Minch, B. Piro, L. A Dang, M. C. Pharm, O. Vittori, Poly 3,4- ethylenedioxythiophene as an entrapment support for amperometric enzyme sensor, *Materials Science and Engineering: C*, (2002) 21, 61–67
- [147] A. Kozhukharova, N. Kirova, Y. Popova, K. Batsalova, Properties of gliucose oxidase immobilized in gel of polyvinylalcohol, *Biotechnology and Bioengineering*, (1988) 32, 245–248
- [148] M. J. Rogers, K. J. Brandt, Multiple Inhibition Analysis of *A. niger* Glucose Oxidase by D-Glucal and Halide Ions, *Biochemistry*, (1971) 10, 4636–4641

-
- [149] M. K. Weibel, H. J. Bright, Insolubilized enzymes. Kinetic behaviour of glucose oxidase bound to porous glass particles, *The Journal of Biological Chemistry*, (1971) 246, 2734–2744
- [150] S.B. Bankar, M.V. Bule, R.S. Singhal, L. Ananthanarayan, Glucose oxidase – an overview, *Biotechnology Advances*, (2009) 27, 489–501
- [151] J. Kulys, B. Kurtinaitene, Stabilization of modified glucose oxidase from *Penicillium vitale* incorporated into the polymeric chains of gels, *Biokhimiia*, (1978) 43, 453–459.
- [152] H. Tsuge, O. Natsuakai, K. Ohashi, Purification, properties and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*, *Journal of Biochemistry*, (1975) 78, 835–843
- [153] P. S. Abthagir, R. Saraswathi, Thermal stability of polypyrrole prepared from a ternary eutectic melt, *Materials Chemistry and Physics*, (2005) 92, 21–26
- [154] S. Sungur, E. Emregul, G. Gunendi, Y. Numanoglu, New glucose biosensor based on glucose oxidase-immobilized gelatin film coated electrodes, *Journal of Biomaterials Applications*, (2004) 18, 265–277
- [155] R. Baronas, F. Ivanauskas, J. Kulys, The influence of the enzyme membrane thickness on the response of amperometric biosensors, *Sensors*, (2003) 3, 248–262
- [156] V. Rumbau, J. A. Pomposo, J. A. Alduncin, H. Grande, D. Mecerreyes, E. Ochoteco, A new bifunctional template for the enzymatic synthesis of conducting polyaniline, *Enzyme and Microbial Technology*, (2007) 40, 1412–1421
- [157] M. Can, H. Ozaslan, O. Isildak, N.O. Pekmez, A. Yildiz, Investigation of catalytic effects of the proton and Lewis acids on oligomerization and chemical polymerization of pyrrole, *Polymer*, (2004) 45, 7011–7016.
- [158] R. GRuz-Silva, J. Romero-Garcia, J. L. Angulo-Sanchez, A. Ledezma-Perez, E. Arias-Marin, I. Moggio, E. Flores-Loyola, Template-free enzymatic synthesis of electrically conducting polyaniline using soybean peroxidase, *European Polymer Journal*, (2005) 41, 1129–1135.

-
- [159] C.H. Lim, Y. J. Yoo, Synthesis of ortho-directed polyaniline using horseradish peroxidase, *Process Biochemistry*, (2000) 36, 233–241
- [160] A. Kozhukharova, N. Kirova, Y. Popova, K. Batsalova, K. Kunchev, Properties of glucose oxidase immobilized in gel of polyvinylalcohol, *Biotechnology and Bioengineering*, (1988) 32, 245–248
- [161] C. Dhand, G. Sumana, M. Datta, B.D. Malhotra, Electrophoretically deposited nano-structured polyaniline film for glucose sensing, *Thin Solid Films*, (2010) 519, 1145–1150
- [162] N.V. Blinova, I. Sapurina, J. Klimovic, J. Stejskal, The chemical and colloidal stability of polyaniline dispersions, *Polymer Degradation and Stability*, (2005) 88, 428–434
- [163] Z. M. Tahir, E. C. Alocilja, D. L. Grooms, Immobilization of peroxidase on magnetite modified polyaniline, *Biosensors and Bioelectronics*, (2005) 20, 1690–1695
- [164] L. A. Samuelson, A. Anagnostopoulos, K. S. Alva, J. Kumar, S. K. Tripathy, Biologically derived conducting and water soluble polyaniline, *Macromolecules*, (1998) 31, 4376–4378
- [165] N. German, A. Ramanaviciene, J. Voronovic, A. Ramanavicius, Glucose biosensor based on graphite electrodes modified with glucose oxidase and colloidal gold nanoparticles, *Mikrochimica Acta*, (2010) 168, 221–229
- [166] A. Ramanaviciene, G. Nastajute, V. Snitka, A. Kausaite, N. German, D. Barauskas-Memenas, A. Ramanavicius, Spectrophotometric evaluation of gold nanoparticles as red-ox mediator for glucose oxidase, *Sensors and Actuators B: Chemical*, (2009) 137, 483–489
- [167] G. Qiang, G. Yanyan, Z. Wenyan, Q. Honglan, Z. Chengxiao, An amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer GOx-SWCNT conjugate/redox polymer multilayer on a sGreen-printed carbon electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical*, (2011) 153, 219–225

-
- [168] S. D. Minteer, P. Atanassov, H. R. Luckarift, G.R. Johnson, New materials for biological fuel cells, *Materials Today*, (2012) 15, 166–173
- [169] Z. Jianmei, Z. Yihua, C. Cheng, Y. Xiaoling, L. Chunzhong, Carbon nanotubescoated with platinum nanoparticles as anode of biofuel cell, *Particuology*, (2012) 10, 450–455.
- [170] B. E. P. Swoboda, V. Massey, Purification and Properties of the Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*, *The Journal of Biological Chemistry*, (1965) 240, 2209-2215
- [171] Q. H. Gibson, B. E. P. Swoboda, V. Massey, Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase, *The Journal of Biological Chemistry*, (1964) 239, 3927-3934
- [172] A. Heller, B. Feldman, Electrochemical Glucose Sensors and Their Applications in Diabetes Management, *Chemical Reviews*, (2008) 108, 2482-2505