



**VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS INSTITUTAS
NEORGANINĖS CHEMIJOS KATEDRA**

Gintarė Rimkutė

Chemija

Magistro baigiamasis darbas

**TERMIŠKAI REDUKUOTO GRAFENO OKSIDO TYRIMAS IR
PANAUDOJIMAS AMPEROMETRINIUOSE TREČIOS KARTOS
BIOJUTIKLIUOSE**

Darbo vadovė
vyr. mokslo darbuotoja dr. Julija Razumienė
Konsultantė
mokslo darbuotoja dr. Ieva Šakinytė

(leidimas ginti, data, parašas)

Darbo įteikimo data _____
Registracijos Nr. _____

Vilnius 2020

TURINYS

ŽYMĖJIMAI IR SANTRUMPOS	2
1. LITERATŪROS APŽVALGA	4
1.1 Biojutiškos sistemos	4
1.1.1 Fermentiniai atpažinimo elementai biojutiškuose	5
1.1.2 Amperometriniai fermentiniai biojutiškiai.....	5
1.1.3 Amperometrinių fermentinių biojutiškių kartos	6
1.2 Anglinės medžiagos biojutiškuose	8
1.3 Termiškai redukuotas grafeno oksidas	9
1.4 Darbe naudoti fermentai	10
1.4.1 Ureazė iš <i>Canavalia ensiformis</i>	10
1.4.2 Gliukozės dehidrogenazė iš <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> sp.	12
1.5 Angliavandeniniai	13
2. METODINĖ DALIS	15
2.1 Darbui naudotos medžiagos.....	15
2.2 Naudota aparatūra	15
2.3 Darbo metodika.....	15
2.3.1 Grafito oksido sintezė.....	15
2.3.2 Terminė grafito oksido redukcija	16
2.3.3 Anglinių medžiagų charakterizavimo tyrimai	17
2.3.4 Biojutiškių konstravimas ir jų elektrocheminiai tyrimai	18
2.3.5 Biojutiškių pritaikymas darbui realiose terpėse.....	20
3. Darbo rezultatai	22
3.1 Anglinių medžiagų sintezės įvertinimas	22
3.2 Anglinių medžiagų charakterizavimas.....	22
3.3 TRGO panaudojimas biojutiškuose	27
3.3.1 Sintezės atsikartojamumo tyrimas panaudojant ureazę	27
3.3.2 Biojutiškių su PQQ-GDH tyrimas	29
3.4 Biojutiškių veikimo realiose terpėse tyrimas	34
IŠVADOS.....	38
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	39
SANTRAUKA	43
SUMMARY	44

ŽYMĖJIMAI IR SANTRUMPOS

- ATP – adenzintrifosfatas;
b – kalibracinės kreivės tiesinės dalies nuolinio kampas;
BET – Brunauer-Emmett-Teller;
 d_{002} tarpplokštuminis atstumas tarp (002) plokštumų;
EP – elektronų pernaša;
EPT – elektronų pernašos tarpininkas;
FAD – flavinadenindinukleotidas;
GDH-TRGO – sukonstruotas trečios kartos biojutiklis, kurio biokomponentas PQQ-GDH;
GO – grafito oksidas;
j – srovės tankis;
 $j_{\text{fon.}}$ – biojutiklio generuojamos foninės srovės tankis;
 $j_{\text{max}}^{\text{tar}}$ – maksimalus srovės tankis, kurį gali generuoti bioelektrokatalizinė sistema;
 K_M^{tar} – tariamoji Michaelis konstanta;
LOD – žemiausia nustatymo riba (angl. *limit of detection*);
 NAD^+ – oksiduotas nikotinamidadenindinukleotidas;
NADH – redukuotas nikotinamidadenindinukleotidas;
p.a. – analitiškai grynas (angl. *pure analytical*);
PQQ – pirolo chinolinchinonas (angl. *pyrroloquinoline quinone*);
PQQ-GDH – nuo pirolo chinolinchinono priklausoma gliukozės dehidrogenazė išskirta iš *Acinetobacter calcoaceticus* sp.;
S – fermento substratas;
[S] – substrato koncentracija ant biojutiklio paviršiaus;
 S_a – standartinis nuokrypis;
 S_{BET} – anglinių medžiagų savitasis paviršiaus plotas, nustatytas naudojant BET analizę;
s. v. – santykiniai vienetai;
TEP – tiesioginė elektronų pernaša;
TGA – termogravimetrinė analizė;
TRGO – termiškai redukuotas grafito oksidas;
TRGO1, TRGO2, TRGO3 – pirmoji, antroji ir trečioji termiškai redukuoto grafito oksido frakcijos;
TRIS – tris-hidroksimetil-amino metanas;
ŪP – ūminis pankreatitas;
XRD – Rentgeno spindulių difrakcija (angl. *X-ray Diffraction*);
 ρ_b – piltinis tankis;
 σ – savitasis elektrinis laidumas.

IVADAS

Pasaulinė biojutiklių rinka kasmet stabiliai auga ir prognozuojama, kad iki 2024 metų ji pasieks 31,5 milijardo JAV dolerių. Šį augimą lemia tiek sparčiai didėjanti technologinė pažanga, tiek su ja susijęs greitėjantis gyvenimo tempas, dėl kurio kyla nebrangių, mobilių, nesudėtingai naudojamų analizinių prietaisų, kurie suteikia rezultatus realiu laiku, paklausa [1]. Šiomis dienomis tokie įrenginiai tampa ypač aktualūs, kai siekiama užkirsti kelią ekologiniam pavojui ar bioterorizmui, taip pat pramonės šakose, kur laiku nenustatytos klaidos gali sukelti didelius ekonominius nuostolius ir ypatingai medicinoje, kai ankstyva ir tiksli ligų prognozė gali ne tik palengvinti gydymo procesą, bet ir išgelbėti paciento gyvybę.

Šiuo metu daug dėmesio sulaukia elektrocheminiai trečios kartos biojutikliai, kurių veikimas pagrįstas tiesiogine elektronų pernaša tarp fermento aktyvaus centro ir elektrodo paviršiaus. Biojutikliuose, veikiančiuose šiuo principu, yra nenaudojamos papildomos medžiagos – elektronų pernašos tarpininkai, todėl sutrumpinamas elektronų pernašos kelias, taip užtikrinant didelį atsako greitį, didesnę selektyvumą ir mažesnę pašalinių reakcijų tikimybę. Tačiau sukurti efektyviai veikiančius trečios kartos biojutiklius nėra lengva. Tiesioginė elektronų pernaša priklauso nuo fermento prigimtis, orientacijos ant elektrodo paviršiaus, taip pat nuo elektrodo laidumo ir biosuderinamumo. Dėl šių priežasčių atsigręžiama į nanodarinius, o tarp jų ir į anglines nanomedžiagas, kurios pasižymi daugeliu unikalių savybių bei gali būti modifikuojamos įvairiomis funkcinėmis grupėmis, kurios taip pat užtikrina efektyvų ir ilgalaikį fermentų veikimą biojutikliuose [2].

Viena iš daugiausiai dėmesio sulaukusių anglinių medžiagų nuo pat savo atradimo yra grafenas. Tačiau nepaisant palankių jo fizikocheminių savybių, nedefektuotas grafenas yra sunkiai panaudojamas bioelektrokataliziniuose sistemose. Todėl biojutikliuose pradėtas taikyti modifikuotas grafenas, kuris pasižymi ne tik išskirtinėmis elektrinėmis savybėmis, bet taip pat turi įvairių defektų ir funkcinių grupių, kurios gali padėti įterpti biokomponentus, taip išlaikant jų stabilumą. Vienas iš patikimiausių modifikuoto grafeno gavimo būdų yra grafito oksido redukcija. Tokiu būdu gaunamas redukuotas grafeno oksidas jau gali būti pritaikytas kuriant trečios kartos biojutiklius, kurie nenaudoja jokių elektronų pernašos tarpininkų, o tai leidžia sukurti paprastesnės konstrukcijos ir pigesnes sistemas.

Darbo tikslas: susintetinti termiškai redukuoto grafeno oksido pavyzdžius, juos charakterizuoti ir pritaikyti amperometriniuose trečios kartos biojutikliuose.

Darbo uždaviniai:

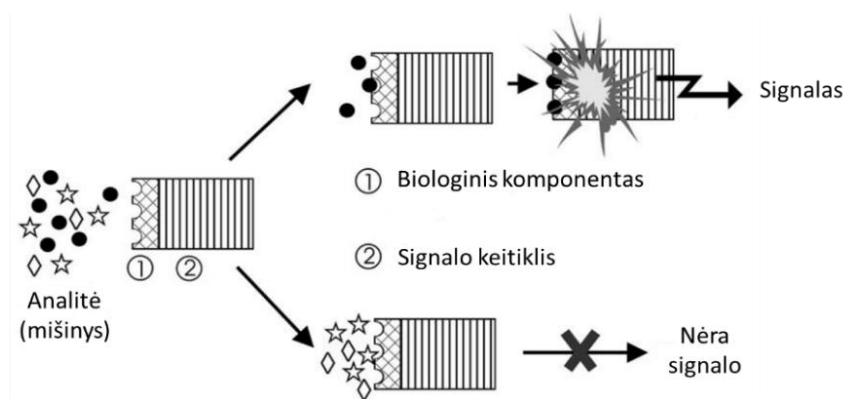
1. modifikuotu Hummers'o metodu susintetinti grafito oksidą ir atlikti jo terminę redukciją;
2. charakterizuoti gautus produktus nustatant jų elektrinį laidumą, naudojant termogravimetrinės, Rentgeno spindulių difrakcinės, Brunauer-Emmett-Teller ir Ramano sklaidos spektrinės analizės metodus;
3. pritaikyti susintetintas medžiagas biojutikliuose, kurių biologinę dalį sudaro ureazė išskirta iš *Canavalia ensiformis* ir įvertinti TRGO sintezės atsikartojamumą ;
4. pritaikyti susintetintas medžiagas amperometriniuose trečios kartos biojutikliuose, kurių biologinę dalį sudaro nuo pirolino chinolino priklausoma gliukozės dehidrogenazė išskirta iš *Acinetobacter calcoaceticus* sp. ir nustatyti pagrindines sukurtų biojutiklių charakteristikas bei optimalias veikimo sąlygas;
5. pritaikyti sukonstruotus biojutiklius darbui realioje terpėje.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Biojutiklinės sistemos

Biojutiklių istorija prasidėjo 1956 metais, kai amerikiečių biochemikas L. C. Clark, panaudodamas pusiau pralaidžią membraną, sukonstravo deguonies nustatymui kraujyje skirtą jutiklį. Norėdamas sukvalifikuoti savo prietaisą mokslininkas ant elektrodo paviršiaus imobilizavo fermentą gliukozės oksidazę. Ant taip paruošto elektrodo buvo pastebėtas bioelektrokatalizės reiškinys – elektrodo paviršiuje vykstančių reakcijų pagreitinimas naudojant fermentus (biologinius katalizatorius) [3]. Dėl šios priežasties, Clark'o elektrodas jau galėjo būti panaudotas daugkartiniams matavimams ir fermentinis sluoksnis tapo integruota jutiklio dalimi. Tokiu būdu buvo sukurtas pirmasis amperometrinis fermentinis elektrodas – biojutiklis, o praėjus šiek tiek daugiau nei dešimtmečiui jau buvo pagamintas ir sėkmingas komercinis gliukozės biojutiklis [4].

Biojutiklis apibrėžiamas kaip analizinis prietaisas, kuris biologinį signalą paverčia elektriniu atsaku [5]. Tokio įrenginio konstrukciją sudaro biokomponentas, kuriuo gali būti fermentai, ląstelės, aptamerai, nukleorūgštys, antikūnai ir kt., fizikinis signalo keitiklis, kuris gali generuoti elektrinį, optinį, šiluminį, koduktometrinių ir kt. signalus, elektroninė prietaiso dalis ir taip pat signalą atvaizduojantis ekranas [6]. Supaprastinta biojutiklio schema pavaizduota 1 pav.



1 pav. Standartinio biojutiklio veikimo supaprastinta schema [7].

Biologinė analizinio prietaiso dalis, kuri yra integruota arba imobilizuota nedideliu atstumu nuo fizikinio keitiklio, elgiasi kaip atpažinimo elementas ir lengvai aptinka konkrečią analitę mišinyje. Sąveikos metu sugeneruotas biocheminis impulsas fizikinio keitiklio pagalba verčiamas į atskirą arba nuolatinį signalą, kurio intensyvumas yra proporcingas analitės koncentracijai [8].

Elektroninė prietaiso dalis apdoroja perduodamą signalą ir paruošia jį atvaizdavimui. Tai sudėtinga elektroninė sistema, galinti atlikti signalo stiprinimą ir konvertavimą iš analoginės į skaitmeninę formą. Galiausiai apdorotas signalas kiekybiškai įvertinamas naudojant spausdintuvą arba tiesiog kompiuterio ekraną. Ekране matomas signalas gali būti skaitmeninis, grafinis, lentelių ar atvaizdo pavidalo, atsižvelgiant į galutinius naudotojo reikalavimus [6].

Taigi, šiais laikais nedideli, realiu laiku rezultatus suteikiantys biojutikliai turi didelį potencialą ir užima platų pritaikymo spektrą. Jie gali būti panaudojami maisto ir gėrimų pramonėje, aplinkosaugos srityje, kariuomenės reikmėms ir ypatingai medicinoje [9]. Tačiau komercinis pritaikymas dėl tam tikrų technologinių kliūčių ir apribojimų vis dar vyksta gana lėtai. Pavyzdžiui, yra svarbu užkirsti kelią biojutiklio užsiteršimui, kai biokomponentai yra imobilizuojami prie puslaidininkių medžiagų [10]. Taip pat dažniausiai naudojami biologiniai atpažinimo elementai yra

fermentai, kurie dažniausiai nepasižymi stabilumu, todėl vis dar aktuali išlieka naujų elektrodinių medžiagų, kurios užtikrintų biojutiklių stabilumą ir efektyvumą, paieška.

1.1.1 Fermentiniai atpažinimo elementai biojutikliuose

Biologinio atpažinimo elementų pasirinkimas yra esminis žingsnis biojutiklių kūrimo procese. Naudojamas biokomponentas turi sąveikauti tik su konkrečia, nustatoma analite ir nereaguoti į kitas medžiagas, esančias tiriamame mėginyje. Nuo tinkamo biologinio komponento priklauso ir biojutiklio efektyvumas bei specifiskumas [11].

Kaip atpažinimo elementai biojutikliuose naudojami įvairūs biologiniai dariniai, tokie kaip nukleorūgštys, antikūnai, ląstelės, audiniai ar fermentai [9]. Didelis biokomponentų pasirinkimas leidžia biojutiklius panaudoti įvairiose srityse. Pavyzdžiui, antikūnai atpažįsta tik jiems specifinius antigenus, todėl juos naudojantys imuniniai jutikliai gali būti sukonstruoti vėžinių ląstelių stebėjimui, bakterijų, virusų ir toksinų nustatymui organizme. Ląsteles naudojantys biojutikliai taip pat gali būti pritaikomi biomedicinoje ir aplinkosaugoje. Vis dėlto biojutikliuose seniausiai naudojami ir vis dar populiariausi atpažinimo elementai yra fermentai [12,13].

Fermentai – tai biologinės kilmės katalizatoriai, kurie yra atsakingi už tūkstančius medžiagų apykaitos procesų. Jie pasižymi dideliu kataliziniu aktyvumu – pagreitina reakcijas nuo 10^8 iki 10^{20} kartų. Taip pat dėl savo ypatingo aktyvaus centro išsidėstymo, šie biokatalizatoriai dažniausiai yra giminingi tik specifiniam substratui, todėl gali net ir sudėtingame mišinyje aptikti reikiamą analizę, užtikrindami tai, kad jutiklis galėtų nustatyti žymiai mažesnes analizės koncentracijas lyginant su kitais įprastiniais metodais [5,8]. Be to, priešingai nei laboratorijoje naudojamiems cheminių reakcijų katalizatoriams, fermentams nereikia išskirtinių ir sudėtingai įgyvendinamų sąlygų. Efektyviausiai fermentai veikia vandeniniuose tirpaluose, dažniausiai esant neutralioms pH vėrtėms, taip pat neaukštai temperatūrai (organizme randamiems fermentams optimali temperatūra – 37 °C) ir atmosferos slėgiui [14,15]. Fermentiniai biojutikliai gali būti kompaktiški, nebrangūs, paprastos konstrukcijos, todėl jais nesudėtinga naudotis. Visie šie privalumai nulemia platų fermentų panaudojimą biojutiklių kūrimo [13].

Tačiau paprastai fermentai nepasižymi dideliu stabilumu ir yra itin jautrūs aplinkos pokyčiams. Dažniausiai tai trumpiausiai gyvuojanti biojutiklio dalis, kuri nuosekliai prarasdama aktyvumą apsprendžia ir viso analizinio prietaiso veikimo trukmę [13]. Šių baltymų daugkartinis panaudojimas galimas tik tokiu atveju, jei jų aktyvumas yra išlaikomas keletą ciklų, todėl labai svarbu, kad biojutiklinė konstrukcija sugebėtų užtikrinti atpažinimo elementų stabilumą. Tam yra naudojamos fermentams specifinės ar giminingos elektrodinės medžiagos bei imobilizavimo technikos, kurios gali užtikrinti ne tik fermentų stabilumą, bet ir pagerinti jų aktyvumą, selektyvumą bei sumažinti inhibicijos procesą [16].

1.1.2 Amperometriniai fermentiniai biojutikliai

Biojutikliai gali būti skirstomi ne tik pagal naudojamą atpažinimo elementą, bet ir pagal fizikocheminio signalo perdavimo būdą. Pagal generuojamą atsaką analiziniai prietaisai dažniausiai klasifikuojami į optinius, šiluminius, pjezoelektrinius ir elektrocheminius [17]. Pastarieji pasižymi paprasta konstrukcija, mobilumu ir pakankamai prieinama kaina, todėl kelia didelį susidomėjimą tiek verslo, tiek mokslo bendruomenei. Pagal stebimus elektrinius parametrus šie biojutikliai taip pat skirstomi į konduktometrinius, kai nagrinėjamas elektrinio laidumo ar varžos pokytis, potenciometrinius, kurie išmatuoja elektrocheminės reakcijos oksidacijos arba redukcijos potencialo

pokytį ir amperomerinius biojutiklius, kurių pagalba nustatomas generuojamos elektros srovės stiprio pasikeitimas [12].

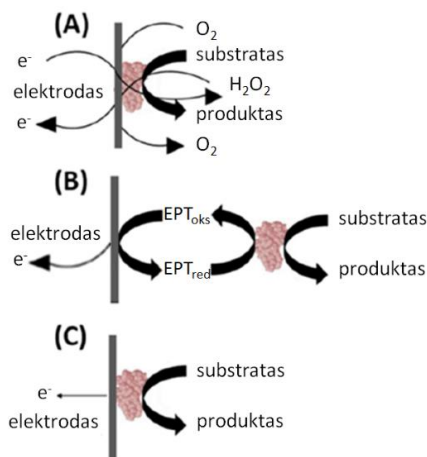
Amperometriniai fermentiniai biojutikliai šiuo metu yra vieni tarp labiausiai tyrinėjamų. Jie pasižymi tvirta konstrukcija, kuri gali būti nesunkiai miniatiūrizuojama, taip pat yra labai jautrūs – gali patikimai veikti analizuojant mažus nustatomų medžiagų tūrius ar sudėtingas analites, tokias kaip kraujas ar šlapimas, kuriose gausu pašalinių elektrochemiškai aktyvių medžiagų [14,15]. Šių biojutiklių veikimas pagrįstas anodinės arba katodinės elektros srovės stiprio pokyčio fiksavimu biologino atpažinimo metu palaikant tam tikrą potencialą [20]. Gautas srovės stipris yra proporcingas nustatomos medžiagos koncentracijai [13].

Elektrocheminėse sistemose amperometrinių biojutiklių veikimas realizuojamas naudojant trijų arba dviejų elektrodų elektrochemines celes. Įprasta trijų elektrodų celė konstruojama naudojant darbinį (biojutiklį), pagalbinį ir palyginamąjį elektrodus. Darbinio elektrodo paviršiuje vyksta pagrindinė elektrocheminė reakcija. Palyginamasis elektrodas, kurį dažniausiai sudaro sidabras, padengtas sidabro chloridu, turi pastovų pusiausvyrinį potencialą, kurio pagalba galima kontroliuoti kitų elektrodų potencialus elektrocheminėje celėje. Pagalbinis elektrodas, kurio paskirtis yra sudaryti uždara elektros grandinę, dažniausiai gaminamas iš platinos vielos [21]. Dviejų elektrodų (darbinio ir palyginamojo) sistema plačiausiai naudojama vienkartinio naudojimo biojutikliuose [13].

Tobulėjant technologijoms nuolatos ieškoma naujų elektrodinių medžiagų, kurios užtikrintų dar našesnę amperometrinių biojutiklių veikimą ir leistų sumažinti jų konstrukciją [22,13]. Dėl šios priežasties į amperometrius biojutiklius įkomponuojamos įvairios nanomedžiagos, neretai ir anglies nanodariniai, tokie kaip anglies nanovamzdeliai ar grafenas. Iš šių medžiagų pagaminti elektrodai gali būti lengvai sumažinami iki mikrometrų dydžio, yra atvejų, kai pasiekiamos net nanometrų dimensijos. Tačiau užtikrinti fermento ir elektrodinės medžiagos suderinamumą nanometriniame lygmenyje ne visada yra lengva. Nepaisant pasiekto nemažo progreso biojutiklių kūrimo srityje, vis dar ieškoma naujų, tinkamai modifikuotų elektrodinių medžiagų, kurios užtikrintų efektyvų ir ilgalaikį amperometrinių biojutiklių veikimą [2].

1.1.3 Amperometrinių fermentinių biojutiklių kartos

Priklausomai nuo biojutiklinėje sistemoje vykstančio elektronų pernašos (EP) būdo tarp fermento ir elektrodo, amperometriniai biojutikliai gali būti suskirstyti į tris pagrindines klases, arba kartas [19], kurių supaprastintos schemos pateiktos 2 pav.



2 pav. Pirmos (a), antros (b) ir trečios (c) kartos biojutiklių schemos. Kaip pavyzdys naudojamas gliukozės biojutiklis [23].

Pirmos kartos biojutikliuose elektros srovė generuojama ne dėl bioelektrokatalizinio proceso, bet sukuriama oksiduojantis ar redukuojantis reakcijos produktams. Tam dažniausiai naudojami fermentai yra oksidazės ir dehidrogenazės, kurių tinkamam veikimui reikalingi tokie kofaktoriai, kaip oksiduotas nikotinamidadeninukleotidas (NAD^+), redukuotas nikotinamidadeninukleotidas (NADH), adozin trifosfatas (ATP), flavinadeninukleotidas (FAD) ir kt. Analizės metu šie kofaktoriai turi būti regeneruoti, kad fermentas galėtų katalizuoti tolimesnes reakcijas [19].

Dažniausiai pirmos kartos biojutikliuose imobilizuoti fermentai oksiduoja substratą, tuo pačiu metu vykstant specifinei kofaktoriaus redukcijai. Tada ištirpusio deguonies pagalba kofaktoriui yra regeneruojamas susidarant vandenilio peroksidui, kuris dėl aukšto darbinio elektrodo potencialo yra oksiduojamas ant elektrodo paviršiaus, taip susidarant elektriniam signalui [23]. Oksidazėmis paremti pirmos kartos biojutikliai gali fiksuoti vandenilio peroksidą, palaikant pastovų oksidacinį potencialą (0,7 V lyg. su Ag/AgCl) arba deguonies sunaudojimą, naudojant pastovų redukcinį potencialą (-0,7 V lyg. su Ag/AgCl) [19]. Pirmos kartos biojutikliuose panaudojant dehidrogenazes, į sistemą papildomai pridedama jų kofaktorių (pvz., NAD^+). Vykstant biokatalizei oksidacijos reakcijų metu šie kofaktoriai taip pat specifiskai redukuojasi, o po to oksiduojasi ant elektrodo paviršiaus. Tuo metu generuojamos anodinės srovės dydis yra proporcingas analitės koncentracijai [2]. Nors pirmos kartos biojutikliai yra jautrūs ir pasižymi dideliu atsako greičiu, jų generuojamos srovės stiprio priklausomybė nuo kintančios deguonies koncentracijos ir nespecifinių reakcijų vyksmo (dėl aukšto darbinio elektrodo potencialo) gali iškraipyti matavimų rezultatus arba sumažinti kalibracinės kreivės tiesinę dalį [23].

Antros kartos amperometriniai fermentiniai biojutikliai EP nuo fermento aktyvaus centro iki elektrodo naudoja sintetinius elektronų pernašos tarpininkus (EPT). Patys populiariausi EPT yra fericianidai ir ferocenai, taip pat metileno mėlis, tioninai, fenazinai ir kt. Šiuose biojutikliuose, vykstant substrato oksidacijos katalizei, oksiduotos formos EPT (2 pav. (b) dalyje pažymėtas EPT_{oks}) regeneruoja kofaktorių pats tuo pačiu metu redukuodamasis. Tada jau redukuotos formos EPT regeneruojasi ant elektrodo paviršiaus taip sukurdamas elektrinį signalą, proporcingą nustatomos medžiagos koncentracijai. Šiuose biojutikliuose naudojami EPT užtikrina tai, kad palyginus su pirmos kartos biojutikliais, būtų galima dirbti prie žemesnių darbinio elektrodo potencialo verčių. Tokiu būdu išvengiama tiek deguonies oksidacijos ar redukcijos reakcijų, tiek pašalinių elektrochemiškai aktyvių medžiagų įtakos. Nepaisant to, sintetiniai EPT katalizės metu gali išsiplauti, taip sumažindami biojutiklio stabilumą, todėl antros kartos biojutikliai nėra dažnai naudojami [15,18].

Daug dėmesio susilaukia trečios kartos biojutikliai, kurių veikimas pagrįstas tiesiogine elektronų pernaša (TEP) tarp elektrodo paviršiaus ir fermento aktyvaus centro. Šių biojutiklių atveju anodinės arba katodinės srovės pokytis fiksuojamas dėl tiesioginės fermento kofaktorių regeneracijos ant elektrodo paviršiaus. Norint užtikrinti TEP, fermentas imobilizuojamas tiesiai ant elektrodo paviršiaus arba į gretimą matricą, pavyzdžiui, laidžią polimerinę plėvelę [23]. Imobilizuojant fermentą arčiau signalo keitiklio, yra sutrumpinamas EP kelias, taip užtikrinant didesnę biojutiklio selektyvumą analizei, mažesnę pašalinių reakcijų tikimybę bei didesnę biojutiklio atsako greitį. Be to, papildomų medžiagų nenaudojimas sistemose leidžia supaprastinti ir sumažinti biojutiklių konstrukciją, kas aktualu šiuolaikinėms technologijoms [24]. Tačiau sukurti efektyvius trečios kartos biojutiklius nėra lengva. TEP įtaką daro fermento prigimtis, orientacija ant elektrodo paviršiaus, tokios elektrodo paviršiaus charakteristikos, kaip laidumas ar biosuderinamumas. Siekiant sukurti trečios kartos biojutiklius, nuolatos ieškoma naujų elektrodo paviršių, fermentų arba šių medžiagų modifikavimo galimybių, kurios padėtų užtikrinti efektyvų TEP procesą [25]. Dėl išvardintų priežasčių yra atsižengiama į anglines medžiagas, kurios pasižymi puikiais EP savybėmis bei gali

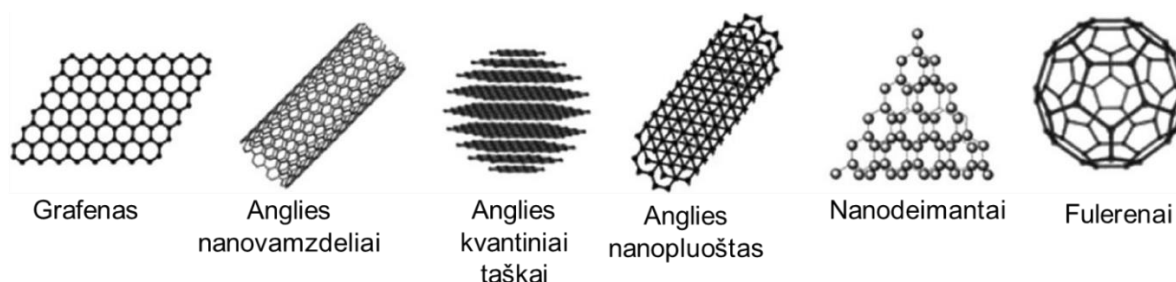
būti modifikuojamos įvairiomis funkcinėmis grupėmis, kurios užtikrintų efektyvų ir ilgalaikį fermentų veikimą [2].

1.2 Anglinės medžiagos biojutikliuose

Jau nuo senų laikų žmonės pripažino, kad anglis yra neatskiriama gamtos dalis ir svarbus energijos šaltinis. Dėl galimų skirtingų hibridizacijos formų (sp , sp^2 , sp^3), anglis pasižymi didele struktūra ir savybėmis besiskiriančių darinių įvairove [26]. Vykstant nuolatiniam technologijų progresui šiuo metu ypatingai didelio dėmesio susilaukia anglinių medžiagų tyrinėjimai nanometriniame lygmenyje [27].

Anglies nanodariniai pasižymi unikaliomis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis. Priklausomai nuo hibridizacijos ir modifikacijos, jiems būdingas aukštas šiluminis bei elektrinis laidumas, cheminis stabilumas, taip pat mechaninis patvarumas. Pavyzdžiui, anglies nanovamzdeliai yra maždaug penkis kartus atsparesni gniuždymui negu plienas. Šių anglinių medžiagų Jungo modulis yra didesnis nei 1 TPa [28]. Dėl tokių charakteristikų sp^2 hibridizacijos anglinės nanomedžiagos gali būti panaudojamos kondensatoriuose, baterijose, aukšto dažnio elektroniniuose prietaisuose, energijos kaupimo įrenginiuose, 3D spausdintuvuose ir kt. Taip pat sp^2 hibridizacijos anglies nanojunginiams būdingas išskirtinai didelis specifinis paviršiaus plotas (grafeno teorinis paviršiaus plotas siekia $2630 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) bei suderinamumas su biologiniais komponentais nulemia šių darinių pritaikymą cheminiuose bei biologiniuose jutikliuose [29,30].

Dėl visų šių unikalių savybių ir sąlyginai žemos kainos, sp^2 hibridizacijos angliniai dariniai istoriškai laikomi svarbia elektrodeine medžiaga elektrocheminėse analizinėse sistemose. Pavyzdžiui, pirolitinis grafito ir stiklinis anglies elektrodai yra iki šiol plačiai naudojami elektrodinės medžiagos. Tačiau šiuo metu sparčiai populiarėja naujai atrastų anglinių nanomedžiagų naudojimas bioelektrokatalizinėse sistemose. Biojutikliuose dažniausiai naudojami tokie anglies nanojunginiai, kaip anglies nanovamzdeliai, fulerenai, anglies kvantiniai taškai, deimanto nanodalelės, anglies nanopluoštai ir grafenas [27]. Minėtos anglies alotropinės atmainos pateiktos 3 pav.



3 pav. Biojutikliuose naudojamų anglinių nanomedžiagų struktūros [27].

Stebinantys savo savybėmis anglies nanojunginiai suteikia bioelektrokatalizinėms sistemoms dar daugiau pranašumų. Tokius junginius naudojantys biojutikliai veikia patikimiau, greičiau ir tiksliau, yra paprastesnės konstrukcijos, taip pat nereikalauja didelio analitės tūrio jos nustatymui [31]. Galiausiai dėl anglinių nanomedžiagų mechaninio lankstumo, jos gali būti potenciali struktūrinė medžiaga, padedanti sukurti nešiojamus biojutiklius, skirtus žmogaus kūno perduodamiems signalams fiksuoti [32].

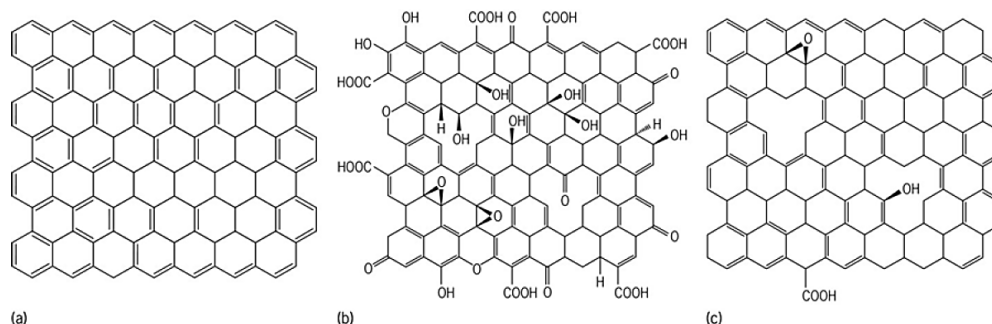
Tačiau biojutikliuose naudojamos nemonifikuotos ir nefunkcionalizuotos anglinės medžiagos dėl hidrofobinių savybių, gali agreguotis, kas neretai riboja jų komercinį pritaikymą analizinėse prietaisuose [29]. Norint užtikrinti šių medžiagų efektyvų panaudojimą biojutikliuose, yra svarbu

gauti tinkamai modifikuotus darinius, kurie išlaikytų ir savo unikalias savybes. Yra žinoma, kad ant deguoninėmis funkcinėmis grupėmis modifikuoto grafeno paviršiaus galima tiesiogiai imobilizuoti fermentus be jokių papildomų jungiamųjų reagentų [33]. Deguoninės funkcinės grupės taip pat dalyvauja ir EP procesuose. Tokios anglinės medžiagos palengvina fermentų imobilizavimo procesą, supaprastina biojutiklių kūrimo eigą bei užtikrina efektyvią EP.

1.3 Terminiškai redukuotas grafeno oksidas

Jau nuo XX a. pabaigos mokslininkai susidomėjo amperomerinių biojutiklių kūrimu panaudojant anglies pastos elektrodus [9]. Tačiau net ir dabar dėl savo ypatingų fizikinių charakteristikų (mechaninio patvarumo, didelio paviršiaus ploto, aukšto elektrinio laidumo ir kt.) ir palankių katalizinių savybių anglies dariniai išlieka tarp labiausiai naudojamų medžiagų analizinėse sistemose. Nemažai dėmesio sulaukia tokios anglinės medžiagos, kaip anglies nanovamzdeliai, nanopluoštai ir ypatingai grafenas [10,15].

Grafenas – tai vieno anglies atomo storio sp^2 hibridizacijos anglinė medžiaga (4 pav. a). Grafenui būdingas aukštas šiluminis laidumas ($5000 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), didelis specifinis paviršiaus plotas ($2630 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$), o dėl savo nenutrūkstamos π -konjuguotų ryšių sistemos, grafenas pasižymi ir dideliu elektronų mobilumu ($200\,000 \text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) bei aukštu elektriniu laidumu ($2000 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$) [30]. Dėl šių savybių grafenas patraukė mokslininkų dėmesį daugelyje sričių, tarp jų ir kuriant biojutiklius.



4 pav. Grafeno (a), grafito oksido (b) ir redukuoto grafeno oksido (c) struktūros [34].

Nedefektuotas – idealios struktūros grafenas, yra chemiškai inertiška medžiaga. Norint šį anglies darinį pritaikyti biojutikliuose, reikia naudoti specialiai modifikuotus grafeno darinius. Vienas patikimiausių defektuoto ir funkcionalizuoto grafeno gavimo būdų yra grafito oksido (GO) eksfoliacija ir redukcija. Tokiu būdu įprastas grafitas yra veikiamas stipriais oksidatoriais, tokiais kaip sieros rūgštis bei kalio permanganatas, gaunant GO, kuris turi panašią į grafitą sluoksninę struktūrą, tačiau ji tankiai padengta deguonies turinčiomis funkcinėmis grupėmis, kurios dalyvauja EP procesuose. Vieno grafito oksido sluoksnio struktūra pavaizduota 4 pav. (b) dalyje. Dėl didelio defektiškumo, suardytos π -konjuguotų ryšių sistemos ir nemažo funkcinė grupių kiekio, GO pasižymi ir didele elektrine varža. Tokia medžiaga nėra tinkama biojutiklių gamybai. Norint atkurti elektrinį laidumą ir sumažinti defektų kiekį, bet tuo pačiu metu išlaikyti ir tam tikrą deguoninių funkcinė grupių skaičių, GO gali būti redukuojamas cheminiu, terminiu arba elektrocheminiu metodais [35].

Terminė redukcija yra pats efektyviausias ir kenksmingų reagentų nenaudojantis metodas, kurio metu gaunamas elektrai laidus, didelio paviršiaus ploto terminiškai redukuotas grafeno oksidas (TRGO). GO kaitinant aukštoje temperatūroje ir inertinėje atmosferoje, nuo jo paviršiaus vandens garų, anglies monoksido bei anglies dioksido pavidalu atskyla dalis deguoninių funkcinė grupių.

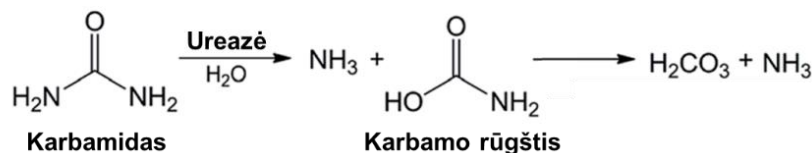
Prieš pasišalindamos, susidariusios dujos tarp GO sluoksnių sukuria aukšto slėgio aplinką. Atliekant redukciją 300 °C temperatūroje tarp GO lakštų susidaro 40 MPa slėgis, o 1000 °C temperatūroje slėgis gali pasiekti net 130 MPa [36]. Tai paskatina GO eksfoliaciją iki TRGO, kurio galima struktūra pavaizduoda 4 pav. (c) dalyje. Įvykus redukcijai, yra dalinai atstatoma π -konjuguotų ryšių sistema, taip struktūrai susigrąžinant elektrinį laidumą. Likęs nedidelis kiekis deguoninių funkcinių grupių, tokių kaip hidroksi, epoksi ir karboksi, gali palengvinti fermento imobilizaciją ir tinkamai jį orientuoti siekiant užtikrinti efektyvią ir greitą EP tarp fermento aktyvaus centro ir elektrodo. Tokiomis savybėmis pasižymintis TRGO gali būti perspektyvus kuriant bioelektrokatalizines sistemas. Tačiau, daugiapakopė anglinių medžiagų sintezė nėra lengvai atkartojamas procesas, todėl norint sintetinti biojutiklinėms sistemoms tinkamas anglines medžiagas, reikia ne tik pasirinkti tinkamą sintezės kelią, bet ir gebėti atkartoti šį procesą optimizuojant kiekvieną anglinių darinių sintezės stadiją.

1.4 Darbe naudoti fermentai

1.4.1 Ureazė iš *Canavalia ensiformis*

Darbe, trečios kartos biojutiklių kūrimui, vienas iš pasirinktų fermentų buvo ureazė. Tai hidrolazių klasei ir amidohidrolazių šeimai priklausantis biologinis katalizatorius (EC 3.5.1.5). Ureazė buvo pirmasis enzimologijos istorijoje iškristalintas fermentas, kurio pagalba užsitarnauta Nobelio premija nustatant baltyminę fermentų struktūrą [37].

Ureazė dalyvauja natūraliame azoto apykaitos cikle – katalizuoja azoto turinčio junginio karbamido hidrolizę iki amoniako ir karbamo rūgšties, kuri yra nestabili ir skyla iki dar vienos amoniako molekulės ir anglies rūgšties. Šios reakcijos lygtis pateikta 5 pav.



5 pav. Ureazės katalizuojama karbamido hidrolizės reakcija [37].

Šiame darbe buvo naudojama ureazė išskirta iš augalo *Canavalia ensiformis*. Ši ureazė sudaryta iš šešių identiškų 90 kDa subvienetų, susijungusių į dvi viena prieš kitą išsidėsčiusias trimerines stuktūras, kurios suformuoja heksamerą [38]. Prie ureazės aktyviojo centro, kuriame yra du nikelio jonai, išsidėsčiusios vandens molekulės vandenilinių ryšių pagalba sudaro tetraedrinę sankaupą, kuri užpildo aktyvųjį fermento centrą. Katalizės metu karbamidas pakeičia šias vandens molekules, o nikelio jonai palengvina vandens skilimą ir inicijuoja hidroksilo prisijungimą prie karbamido karbonilo grupės tuo metu susidarant karbamo rūgščiai [39].

Fermento substratas karbamidas yra galutinis organizmo azoto junginių metabolizmo produktas. Medžiagų apykaitos metu iš susidariusio amoniako ir anglies dioksido kepenyse pagamintas karbamidas keliauja į inkstus ir yra pašalinamas iš organizmo. Tačiau esant infekcijai, 20 – 30 % metabolito gali pasiekti žarnyną, kuriame esančios bakterijos ureazės pagalba skaido karbamidą ir naudoja jį kaip azoto šaltinį. Karbamido perteklius organizme taip pat gali reikšti širdies sutrikimus, inkstų negalavimus bei indikuoti dehidrataciją [37]. Karbamidas yra plačiai gaminamas ir komerciškai. Dėl didelio azoto kiekio ir greito jo skilimo į amoniaką dirvoje, karbamidas yra viena iš populiariausių azotinių trąšų. Organinis junginys gali būti naudojamas kaip atskira trąša arba kaip trąšų sudedamoji dalis [40]. Jis yra ir Lietuvoje gaminamų KAS-32 trąšų komponentas.

Dėl plataus karbamido naudojimo trąšų pramonėje ir jo vaidmens medicinoje, organinio junginio kiekiui nustatyti yra naudojama nemažai metodų. Tam tinka fluorimetrija, kalorimetrija, dujų chromatografija, fermentinė spektrofotometrija ir kt. Tačiau, visi šie metodai reikalauja brangiai kainuojančios įrangos, daug laiko mėginio paruošimui ir įgudusių specialistų tyrimų vykdymui. Dėl šios priežasties karbamido koncentraciją šiuo metu dažniau renkamasi nustatyti fermentinių potenciometrinių ir amperometrinių biojutiklių pagalba [41]. Keleto naujausiuose moksliniuose straipsniuose aprašytų karbamido amperometrinių biojutiklių, kuriuose naudota ureazė, savybės pateiktos 1 lentelėje.

1 lentelė. Amperometrinių karbamido biojutiklių su ureaze charakteristikos.

Biojutiklio konstrukcija	E, V (lyg. su Ag/AgCl)	Tiesinė dalis, mM	Jautris/ efekyvumas	Stabilumas
Feroceno poliamidoamino dendrimerai prijungti prie anglies nanovamzdelių ant grafito elektrodo [42]	0,35	0,2–1,8	$1,085 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$	50 % per 16 dienų
Sulfoninto grafito ir polianilino nanokompozitu padengtas indžio titano oksido (ITO) elektrodas [43]	0,4	0,12–12,3	$0,85 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$	81 % per 15 dienų
Polidifenilamino, fosfovolframo rūgšties, grafito hibridiniais nanokompozitais padengtas ITO elektrodas [44]	0,25	0,001–0,013	$1,085 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$	–
Poliamidoamino dendrimerai prijungti prie daugiasluoksnių anglies nanovamzdelių ant Au elektrodo [45]	0,45	1–20	$6,6 \text{ nA}\cdot\text{mM}^{-1}$	83 % per 15 dienų
Laidus polimeras su feroceno EPT ant grafito elektrodo [46]	0,45	0,1–8,5	$0,54 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	90 % per 30 dienų

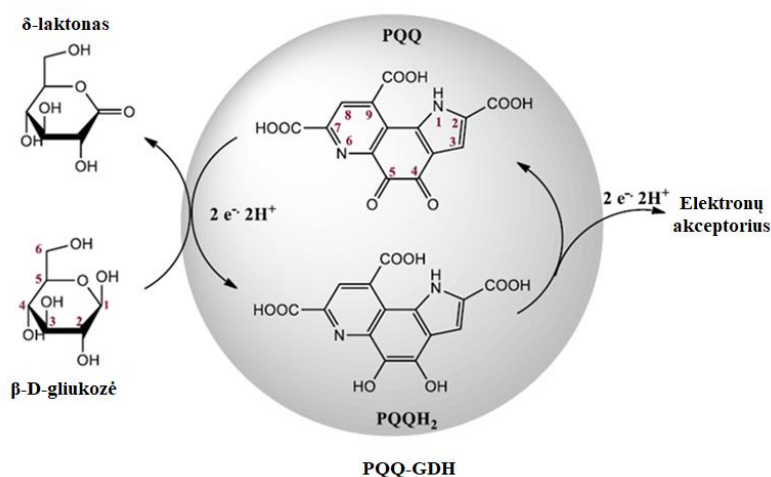
Iš aukščiau pateiktų duomenų matoma, kad yra sukurta nemažai amperometrinių karbamido nustatymui skirtų biojutiklių, kuriems būdinga gana ilga tiesinė kalibracinės kreivės dalis ir pakankamas stabilumas. Tačiau šių biojutiklių konstrukcijoje yra naudojami EPT bei įvairios sluoksniuotos struktūros, kas padaro biojutiklių gamybos technologiją daug brangesnę bei sunkiau atkartojamą. Šio darbo metu siekta sukurti paprastesnės konstrukcijos, bet tuo pačiu ir didelio jautrio karbamido biojutiklius, kaip elektrodinę medžiagą naudojant vien tik TRGO. EPT nenaudojimas leistų sukurti paprastesnes, pigesnes ir komerciškai patrauklesnes sistemas. Tokie karbamido biojutikliai galėtų būti paklausūs trąšų pramonėje, kur trąšų komponentų kiekis yra griežtai kontroliuojamas. Didelis biojutiklio jautris leistų atlikti analizę su labai mažomis paklaidomis, kas trąšų pramonei padėtų sutaupyti daug lėšų.

1.4.2 Gliukozės dehidrogenazė iš *Acinetobacter calcoaceticus* sp.

Baigiamajame darbe biojutiklių kūrimui taip pat pasirinktas fermentas nuo pirola chinolinchinono priklausoma gliukozės dehidrogenazė (PQQ-GDH). Buvo tiriama vandenyje tirpi PQQ-GDH (EC 1.1.5.2), išskirta iš bakterijos *Acinetobacter calcoaceticus* sp. periplazmos. Šis fermentas priklauso okidoreduktazių klasei ir turi gan platų specifiškumą įvairiems angliavandeniams, tačiau pagrindinė jo funkcija yra katalizuoti β -D-gliukozės oksidacijos reakciją iki gliukono- δ -laktono [47].

PQQ-GDH yra sudaryta iš dviejų vienodų 50 kDa molekulinės masės subvienetų. Kiekviename subviename yra viena PQQ molekulė ir trys kalcio jonai. Vienas kalcio jonas, esantis subvieneto aktyviajame centre, yra atsakingas už polinį kofermento PQQ prisijungimą prie apofermento. Kiti du kalcio jonai yra subvieneto išorėje ir yra atsakingi už baltymo dimerizaciją [48].

PQQ-GDH katalizuojamos β -D-gliukozės oksidacijos schema pateikta 6 pav. Substrato surišimo zona fermente yra santykinai platus ir tirpikliui prieinamas plyšys, išsidėstęs tiesiai virš PQQ molekulės. Katalizės metu ten patekusi β -D-gliukozė dėl hidrofobinės sąveikos yra prijungiama prie PQQ ir oksiduojama per kofermentą pernešant du elektronus iki galutinio akceptoriaus. Tuo pačiu metu pernešant du vandenilio atomus PQQ redukuojasi.



6 pav. PQQ-GDH katalizuojamos β -D-gliukozės oksidacijos reakcijos mechanizmas [2].

PQQ-GDH pasižymi aukštu kataliziniu efektyvumu, kuris yra daugiau nei 25 kartus didesnis už kitų gliukozės oksidaciją katalizuojančių fermentų, kas užtikrintų jos perspektyvų panaudojimą įvairiose sintezės ar analizės technologijose. Be to, dėl fermento pobūdžio, jo aktyvumui neturi įtakos deguonies koncentracijos kitimas terpėje, todėl PQQ-GDH panaudojant analizinėse sistemose būtų išvengiama deguonies įtakos analizės tikslumui. Taip pat PQQ yra tvirtai prisijungęs prie GDH, todėl technologiniuose procesuose nebereikėtų papildomo kofaktoriaus pridėjimo. Dėl šių savybių ir platesnio specifiškumo įvairiems angliavandeniams PQQ-GDH gali būti patraukli alternatyva gliukozės oksidazei atitinkamo poreikio technologijose, tarp jų ir biojutikliuose [47]. 2 lentelėje pateikiamos jau sukurtų, efektyviausių β -D-gliukozės amperometrinių biojutiklių, kuriuose naudojama PQQ-GDH, charakteristikos.

2 lentelė. Amperometrinių β -D-gliukozės biojutiklių su PQQ-GDH charakteristikos.

Biojutiklio konstrukcija	EPT	E, V (Ag/AgCl)	Tiesinė dalis, mM	Jautris/ efektyvumas	Stabilumas
Anglies nanovamzdeliai su kalio fericianidu ant anglies pastos elektrodo [49]	Kalio fericianidas	0,5	1–35	$31 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	87 % per 4 savaites
Chromo heksacianoferatas įkomponuotas į Pt elektrodą [50]	Chromo heksacianoferatas	0,4	Iki 20	$0,2 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	88 % per 272 dienas
Tiolio funkcinėmis grupėmis modifikuoti anglies nanovamzdeliai ant Au elektrodo [51]	–	0	0,001–0,04	$60 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$	–
Modifikuotos juodosios anglies elektrodas [52]	–	0,4	0,011–0,6	–	17 % per 25 dienas
Anglies kriogelio elektrodas [53]	–	0,2	4–8	$0,93 \text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$	–

2 lentelėje matyti, kad TEP tarp fermento ir elektrodo, kai nenaudojami sintetiniai EPT, gali būti pasiekta biojutiklio konstrukcijoje naudojant modifikuotus anglies junginius. Tokios elektrodinės medžiagos gali užtikrinti tinkamą fermento orientaciją ir taip palengvinti EP katalizės metu, kas taip pat nulemia ir didesnę tokių sistemų efektyvumą. Tačiau literatūroje pateiktuose pavyzdžiuose papildomas anglinių medžiagų modifikavimas reikalauja ne tik daugiau laiko, bet ir išteklių. Tuo tarpu atlikus terminę GO redukciją gaunamas TRGO yra dalinai pasidengęs funkcinėmis grupėmis, kurios geba dalyvauti EP reakcijose. Dėl šios priežasties darbe panaudojant TRGO buvo siekiama įgyvendinti TEP tarp PQQ-GDH aktyvaus centro ir elektrodo paviršiaus. Tokia bioelektrokatalizinė sistema gali būti aktuali ne tik didelio jautrio biojutiklių kūrimo, bet ir gaminant biokuro celes [2].

Kaip jau minėta, PQQ-GDH taip pat gali katalizuoti įvairių kitų sacharidų (β -D-ksilozės, β -D-manozės, β -D-galaktozės ir kt.) ir disacharidų (β -D-laktozės, β -D-maltozės ir kt.) oksidaciją [54]. Nors toks PQQ-GDH nespecificškumas kartais gali trukdyti β -D-gliukozės nustatymui realiuose mėginiuose, šis universalumas taip pat gali būti ir labai naudingas tikslinėms angliavandenių analizės ar konversijos technologijoms.

1.5 Angliavandeniai

Angliavandeniai sudaro gausiausią organinių junginių klasę ir yra randami visose augalų ir gyvūnų ląstelėse. Sacharidai, kurie dažniausiai suskaidomi iki gliukozės, yra tinkamiausias energijos šaltinis žmogaus organizmui. Jie taip pat veikia kaip atpažinimo komponentai, sudaro sudėtingesnius organinius junginius ir atlieka atraminių molekulių funkciją. Angliavandeniai taip pat turi platų komercinį pritaikymą ir yra naudojami tokiose srityse, kaip žemės ūkis, fermentacija, maisto, farmacijos, tekstilės, popieriaus bei naftos pramonė [55].

Vienas svarbiausių sacharidų yra gliukozė. Šis monosacharidas yra būtinas viso organizmo veiklai, ypač smegenų ir nervų sistemai. Ji gerina medžiagų apykaitą, suteikia energijos procesams, vykstantiems organizme, greitai pašalina atsiradusį nuovargį. Tačiau ypatingai svarbu yra stebėti

gliukozės kiekį organizme, kai sergama cukriniu diabetu ir šio monosacharido apykaita žmogaus kūne yra sutrikusi [55]. Kitas plačiai aptinkamas angliavandenis yra disacharidas laktozė. Tai viena pagrindinių pieno sudedamųjų dalių, kuri yra svarbus kitų įvairių pieno produktų kokybės rodiklis [56]. Dėl mažo laktazės fermento aktyvumo šiuo metu daugiau nei 60 % viso pasaulio populiacijos negali tinkamai suvirškinti laktozės [57], todėl sacharido reguliavimas maisto pramonėje yra labai svarbus. Vienas žinomesnių disacharidų taip pat yra maltozė – tarpinis glikogeno ir krakmolo virškinimo produktas, kuris parodo ir amilazės fermento aktyvumą organizme [58]. Maltozė naudojama ir maisto pramonėje. Jos kiekis melasoje daro įtaką galutinei produkcijai, ypač alaus ir giros, kokybei [56].

Dėl tokio plataus angliavandenių pasiskirstymo, egzistuoja daug įvairių sacharidų nustatymo metodų, tačiau jie taip pat turi ir nemažai trūkumų. Tokie metodai kaip chromatografija ar spektrofotometrija reikalauja kvalifikuotų darbuotojų, brangios, daug vietos užimančios įrangos, yra ilgai užtrunkantys ir sudėtingi. Kokybiniai cheminiai matavimai, refraktometrija, poliariometrija yra paprastesni ir greitesni metodai, bet mažiau tikslūs ir selektyvūs. Dėl šios priežasties biojutiklinės technologijos yra perspektyvus būdas išspręsti tradicinių sacharidų analizės metodų iššūkius, nes palyginti su pastaraisiais, biojutikliai pasižymi greita analize, pakankamai žema kaina, dideliu jautrumu ir selektyvumu [56].

Darbe naudotos PQQ-GDH platus substratinis atrankumas gali atverti dideles galimybes šio fermento pagrindu sukurtas fermentines biojutiklines sistemas plačiau taikyti pramoninėse technologijose, kur vykdoma įvairių sacharidų konversija. Tokie biojutikliai taip pat gali būti aktualūs ne tik maisto ar gėrimų, bet ir farmacijos pramonėje bei medicinoje. Šio darbo metu dėmesys atkreiptas į ūminį pankreatitą – skausmingą uždegiminę ligą, sukeliančią staigią kasos ląstelių žūtį, kurios metu agresyvūs kasos fermentai patekę į kraują pakenkia visam organizmui. Dėl pažeidimų virškinamajame trakte jaučiamas didžiulis skausmas. Panaudojant biojutiklius būtų galima prognozuoti ligos eigą dar ankstyvoje stadijoje, kas būtų labai svarbu siekiant užkirsti kelią ligos komplikacijoms [59].

2. METODINĖ DALIS

2.1 Darbui naudotos medžiagos

Grafitas, 99,5 % (Merck KGaA, Vokietija), grafito strypeliai, 3 mm × 150 mm, 99,995 % (Sigma-Aldrich, JAV), kalio permanganatas, KMnO_4 , $\geq 99,0$ % (Sigma-Aldrich, JAV), natrio nitratas, NaNO_3 , 99,0 % (Reachim, Rusija), sieros rūgštis, H_2SO_4 , ≥ 98 % (Eurochemicals, Lietuva), vandenilio peroksidas, H_2O_2 , 30 % (POCH, Lenkija), druskos rūgštis HCl , 36 – 38 % (Chempur, Lenkija), kalio persulfatas, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, $\geq 99,0$ % (Sigma-Aldrich, JAV), fosforo pentoksidas, P_2O_5 , 99 % (Carl Roth, Vokietija), argonas, Ar (ELME Messer Lit, Lietuva), kalio chloridas, KCl , $\geq 99,0$ % (Carl Roth, Vokietija), kalcio chloridas, CaCl_2 (Lachema, Čekija), kalio divandenilio fosfatas, KH_2PO_4 , $\geq 98,0$ % (Merck KGaA, Vokietija), ureazė iš *Canavalia ensiformis*, EC. 3.5.1.5, ≥ 50 U/mg (Sigma-Aldrich, JAV), vandenyje tirpi gliukozės dehidrogenazė iš *Acinetobacter calcoaceticus* sp., E.C.1.1.5.2, ≥ 500 U/mg (Creative BioMart, JAV), α -gliukozidazė iš *Saccharomyces cerevisiae*, E.C. 3.2.1.20, ≥ 10 U/mg (Sigma-Aldrich, Izraelis), tris-hidroksimetil-amino metanas, $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ (Sigma-Aldrich, Vokietija), D-gliukozė, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, p.a., ACS reagentas (Carl Roth, Vokietija), D-laktozės monohidratas, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$, ≥ 98 % (Carl Roth, Vokietija), D-maltozės monohidratas, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$, ≥ 97 % (Carl Roth Vokietija), D-ribozė, $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$, ≥ 98 % (Carl Roth, Vokietija), D-ksilozė, $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$, $\geq 98,5$ % (Carl Roth Vokietija), D-galaktozė, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, ≥ 98 % (Carl Roth, Vokietija), D-celobiozė, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, ≥ 98 % (Carl Roth, Vokietija), terileno plėvelė, storis 15 μm , porų diametras 0,4 μm (Joint Institute of Nuclear Research, Rusija).

2.2 Naudota aparatūra

Elektroninės svarstyklės, PCB 200-3B (KERN, Vokietija), magnetinė maišyklė, IKA MSH B (Vokietija), vakuuminis siurblys N86 KN. 18 (KNF LAB, Vokietija), pH-metras, inoLab pH 730, (Vokietija), dujų srauto reguliatorius, Omega FMA5400/5500 (Vokietija), vamzdinė kaitinimo krosnis, COYA 0,25.1.1/12 (Rusija), elektrinio laidumo matavimo prietaisas, Keithley 2601 SourceMeter (JAV), Rentgeno difraktometras Rigaku MiniFlex II (Japonija), termogravimetrinės analizės įranga, Pyris 1, Clarus 600 T MS (Perkin-Elmer, JAV), paviršiaus analizatorius, TriStar II 3020 (Micrometrics, JAV), Ramano spektrometras, Renishaw inVia (UK), elektrocheminė celė su darbinium, pagalbinium ir palyginamuoju elektrodais (VU GMC), potenciostatas, PARSTAT 2273 (Princeton Applied Research, JAV), mikropipetės, 0,5 – 10 μl , 20 – 200 μl , 500 – 5000 μl (Eppendorf research, JAV), termostatuojama celė (VEB MLW, Vokietija), gliukozės analizatorius, Eksan-G (Lietuva).

Gauti duomenys apdoroti OriginPro 2015 ir Microsoft Office Excel programomis.

2.3 Darbo metodika

2.3.1 Grafito oksido sintezė

Grafito oksido (GO) tarpinio produkto paruošimas. Sintezė buvo atlikta pagal literatūroje [60] aprašytą metodiką. Į 600 ml tūrio stiklinę supilami 24 ml konc. H_2SO_4 , 5 g P_2O_5 ir 5 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. Naudojant magnetinę maišyklę stiklinė su mišiniu šildoma iki 80 °C temperatūros. Tada į stiklinę lėtai suberiami 6 g grafito ir toliau esant tai pačiai temperatūrai mišinys šildomas 4,5 val. Praėjus nurodytam laikui, tirpalas atvėsinaamas iki kambario temperatūros ir skiedžiamas 1 l ditiliuoto

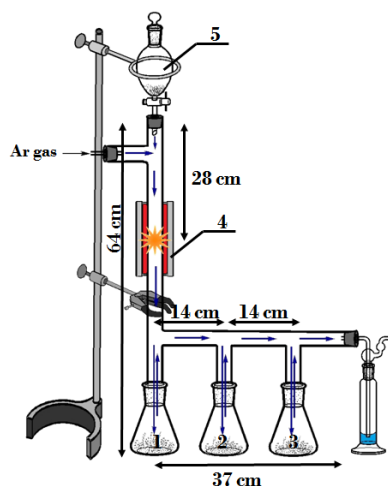
vandens bei paliekamas parai. Tokiu būdu gaunamas GO tarpinis produktas, kuris filtruojamas naudojant Biuchnerio piltuvą ir praplaunamas iki neutralios terpės distiliuotu vandeniu. Gautas produktas išdžiovinamas ore ir veikiamas Hummers' o metodu, originaliai aprašytu literatūroje [61].

GO sintezė (Hummers' o metodas). Į 600 ml turio stiklinę supilama 240 ml konc. H_2SO_4 . Naudojant magnetinę maišyklę ir ledo vonelę, rūgštis atšaldoma iki $3\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūros. Tada į stiklinę mažomis porcijomis suberiamas GO tarpinis produktas bei 3 g $NaNO_3$. Po 10 min nuolatos maišant į gautą mišinį atsargiai, kad temperatūra nepakiltų virš $20\text{ }^\circ\text{C}$, per 6 val. suberiama 30 g $KMnO_4$ ir mišinys paliekamas stovėti 3 paras. Praėjus nurodytam laikui, tirpalas pašildomas iki $35\text{ }^\circ\text{C}$ ir visą laiką maišant, į jį per 1 val. supilama 276 ml distiliuoto vandens. Mišinio temperatūra neturi pakilti virš $70\text{ }^\circ\text{C}$. Gauta suspensija dar 15 min pakaitinama $70\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje ir tada distiliuotu vandeniu praskiedžiama iki 840 ml. Galiausiai į tirpalą nestipriai maišant supilama 20 ml konc. H_2O_2 .

Gauta medžiaga filtruojama, naudojant Biuchnerio piltuvą, ir praplaunama 500 ml 10 % HCl tirpalu. Toliau gautos nuosėdos nuo sulfato jonų pertekliaus plaunamos dializės metodu. Tam atkerpama maždaug 43 cm ilgio celiuliozės hidrato žarna. Ji sudrėkinama distiliuotu vandeniu ir vienas jos galas tvirtai užrišamas storu medvilniniu siūlu. Kitas žarnos galas užmaunamas ant plastikinės talpos, kuri taip pat užtvirtinama medvilniniu siūlu. Į dializės žarnos vidų supilamas gautas GO ir visa tai metalinio laikiklio pagalba pritvirtinama prie stovo. Žarna pilnai pamerkiama į 3 l distiliuoto vandens pripildytą stiklinę. Vykstant difuzijai, SO_4^{2-} jonai juda iš dializės žarnos į stiklinę, kurioje esantis vanduo keičiamas kas parą, ir naudojant inoLab pH 730 pH-metrą stebimos vandens pH vertės. Po 14 praplovimų GO nufiltruojamas, išdžiovinamas ore ir kruopščiai sutrinamas agatinėje grūstuvėje. Viena dalis miltelių paliekama charakterizavimo tyrimams, o su kita dalimi atliekama terminė GO redukcija.

2.3.2 Terminė grafito oksido redukcija

Pagal 7 pav. pateiktą schemą, sukonstruojama GO terminės redukcijos ir frakcionavimo sistema. Tada sutrinti GO milteliai suberiami į dalijamąjį piltuvą (7 pav. 5), kuris sandariai uždaromas. Prieš redukciją atsukamas Ar dujų srautas ir 1 val. $60\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ greičiu dujos leidžiamos per sistemą, taip sukuriama inertinė atmosfera. Tada įjungiami vamzdinė kaitinimo krosnis (7 pav. 4) ir temperatūra tolygiai keliama iki $800\text{ }^\circ\text{C}$. Pasiekus šią temperatūrą, inertinių dujų srauto greitis padidinamas iki $100\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ir mažomis porcijomis GO milteliai iš dalijamojo piltuvo suberiami į vertikalų kvarcinį vamzdį. GO milteliai greitai redukuojasi ir susidaro termiškai redukuotas grafeno oksidas (TRGO). TRGO dalelės Ar dujų pagalba išnešamos iš kaitinamo vamzdžio ir surenkamos atskirose kolbose (7 pav. 1, 2, 3), priklausomai nuo dalelių formos, masės bei krūvio. Tokiu būdu gaunamos trys TRGO frakcijos: TRGO1, TRGO2 ir TRGO3.

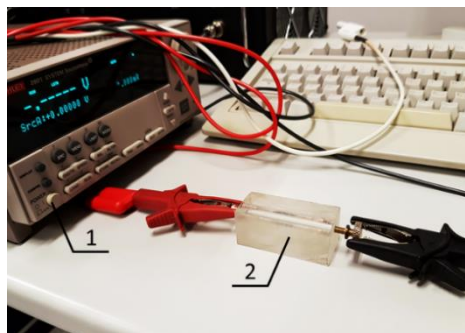


7 pav. GO terminės redukcijos ir eksfoliacijos sistema (1 – TRGO1 frakcijos surinkimo vieta, 2 – TRGO2 frakcijos surinkimo vieta, 3 – TRGO3 frakcijos surinkimo vieta, 4 – vamzdinė kaitinimo krosnis, 5 – dalijamasis piltuvas) [62].

Siekiant įvertinti sintezės atsikartojamumą, šio darbo metu gauta TRGO2 frakcija taip pat buvo palyginta su aukščiau aprašytu būdu kitų prieš tai atliktų dvejų sintezių metu gautomis antrosiomis TRGO frakcijomis.

2.3.3 Anglinių medžiagų charakterizavimo tyrimai

Elektrinio laidumo nustatymas. Pirmiausiai buvo nustatomos grafito, GO ir TRGO mėginių elektrinio laidumo priklausomybės nuo piltinio tankio. Šiam tikslui paimamas 33,80 mm ilgio ir 2,86 mm diametro stiklinis vamzdelis. Vamzdelis pasveriamas, į jį suberiama tiriamoji medžiaga ir visa tai vėl pasveriamas. Tada vamzdelis su milteliais patalpinamas į 73,50 mm ilgio ir 20,40 mm pločio stiklinę celę, kurios ilgis vėl išmatuojamas. Celė prijungiama prie gnybtų, pasirenkama 15 V įtampa GO, 0,5 V įtampa grafito bei TRGO mėginiams ir Keithley 2601 Source Meter prietaisu nustatomas miltelių varžos kitimas vis labiau juos suspaudžiant. Elektrinio laidumo nustatymo įranga pavaizduota 8 pav.



8 pav. Laidumo nustatymo aparatūra. 1 – varžos matavimo prietaisas Keithley 2601 Source Meter, 2 – stiklinė celė.

Žinant miltelių masę, varžą bei vamzdelio parametrus, pagal 1 ir 2 formules apskaičiuojamas anglinių medžiagų elektrinis laidumas [63].

$$R = \rho \cdot \frac{L}{S} \quad (1)$$

kur R – elektrinė varža, ρ – savitoji elektrinė varža, L – laidininko ilgis, S – laidininko plotas.

$$\sigma = \frac{1}{\rho} \quad (2)$$

kur σ – savitasis elektrinis laidumas, ρ – savitoji elektrinė varža.

Termogravimetrinė analizė. Termogravimetrinė analizė (TGA) buvo pasirinkta norint įvertinti deguonies turinčių funkcinių grupių kiekį gautose anglinėse medžiagose. Tyrimams naudota Pyris 1, Clarus 600 T MS, Perkin-Elmer aparatūra. Analizės metu maždaug 10 mg masės mėginiai buvo kaitinami 25 – 500 °C temperatūrų intervale, temperatūrai kylant 10 °C·min⁻¹ greičiu, esant 20 ml·min⁻¹ azoto srautui.

Rentgeno spindulių difrakcinė analizė. Siekiant įvertinti darbo metu gautų GO, TRGO mėginių bei grafito struktūras, buvo atlikta Rentgeno spindulių difrakcinė (XRD) analizė. Analizės metu buvo tiriama nedidelė dalis miltelių, suspaustų ant silicio monokristalo dėkliuko centro. Tyrimams buvo naudojamas Rigaku MiniFlex II difraktometras su Cu K_α spinduliuote ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$). Mėginių difraktogramos užrašytos 2 θ kampų intervale 5 – 50°. Rentgeno spindulių detektorius judėjo pastoviu 0,010° žingsniu, impulsų kaupimo trukmė – 1,0 s. Tarpplotštuminiai atstumai buvo apskaičiuoti naudojant Bragg'o dėsnį:

$$2d \cdot \sin \theta = n\lambda \quad (3)$$

kur n – teigiamas sveikasis skaičius, λ – Rengteno spindulių bangos ilgis, d – tarpplotštuminis atstumas, θ – difragavusios bangos kampas. Kristalitų dydis buvo apskaičiuotas naudojantis Sherrer'io lygtimi:

$$D = \frac{0,89 \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad (4)$$

kur λ – Rengteno spindulių bangos ilgis, β – smailės pusplotis, θ – difragavusios bangos kampas.

Brunauer-Emmett-Teller analizė. Brunauer-Emmett-Teller (BET) analizė atlikta norint palyginti grafito, GO ir TRGO mėginių paviršiaus plotą ir porų diametrą. Naudojant Micrometrics TriStar II 3020 analizatorių, tirti milteliniai maždaug 100 mg medžiagų bandiniai, kurių adsorbcijos ir desorbcijos izotermos išmatuotos esant -196 °C temperatūrai. Prieš matavimų atlikimą, mėginiai buvo 2 val. laikomi azoto atmosferoje 100 °C temperatūroje.

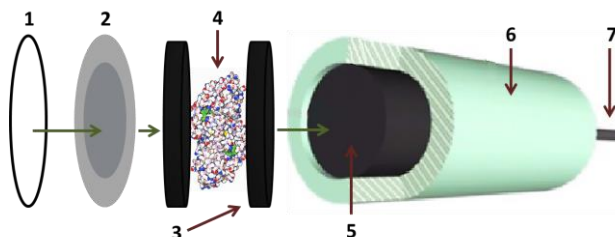
Ramano sklaidos spektrinė analizė. Ramano sklaidos spektroskopija pasirinkta siekiant nustatyti susintetintų medžiagų oksidavimosi, redukavimosi laipsnį ir jų defektiškumą. Suspaustų anglinių medžiagų miltelinių mėginių Ramano spektroskopija buvo atlikta naudojant 532 nm He-Ne lazerio sužadinajamą spinduliuotę, kurios galia 1 mW. Lazeris buvo nukreiptas į maždaug 2 μm skersmens plotą, esant 100 s kaupimo laikui ir 20 kartų didinimui. Analizė atlikta naudojant Renishaw inVia Ramano spektrometrą.

2.3.4 Biojutiklių konstravimas ir jų elektrocheminiai tyrimai

Siekiant įvertinti TRGO sintezių atsikartojamumą, pirmiausiai buvo norima palyginti karbamido biojutiklio, naudojančio šio darbo metu susintetintą TRGO2 frakciją, veikimą su kitų dviejų biojutiklių, kuriuose naudojamos tokiomis pačiomis sąlygomis prieš tai atliktų sintezių metu

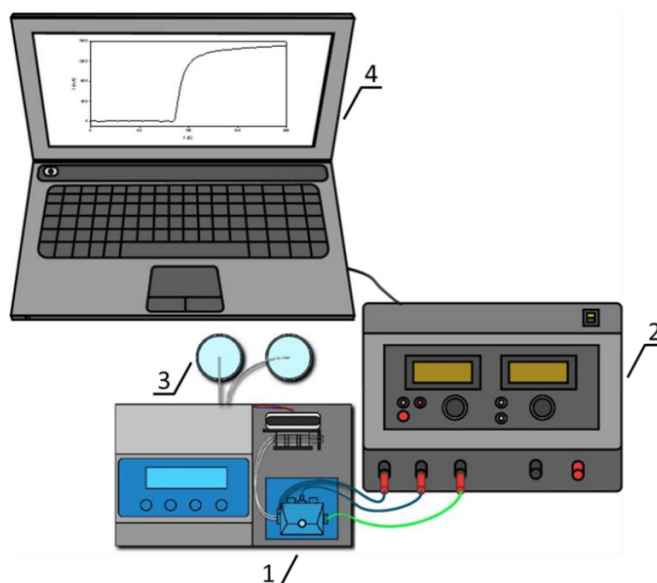
gautos TRGO2 frakcijos. Taip pat buvo norima išanalizuoti ir palyginti biojutiklių, kuriuose naudojamos šio darbo metu susintetintos trys TRGO frakcijos (TRGO1, TRGO2, TRGO3) ir PQQ-GDH, veikimą.

Tuo tikslu iš TRGO frakcijų buvo gaminamos membranos su imobilizuotu PQQ-GDH / ureazės sluoksniu. Prie guminio žiedo priklijuojama 15 μm storio pusiau pralaidi terileno plėvelė. Vidinėje guminio žiedo pusėje paskirstomas TRGO frakcijos su imobilizuotu fermentu sluoksnis. Gautos anglinės fermentinės membranos mechaniniu būdu pritvirtinamos prie 3 mm diametro grafito strypelio, įmontuoto į organinio stiklo korpusą. Sukonstruotų biojutiklių schema pavaizduota 9 pav.



9 pav. Supaprastinta biojutiklio schema. 1 – guminis žiedas, 2 – pusiau pralaidi membrana, 3 – TRGO, 4 – fermentas, 5 – grafito strypelis, 6 – biojutiklio korpusas, 7 – kontaktinis laidas.

Sukonstruoti biojutikliai prijungiami prie elektrocheminės sistemos, pavaizduotos 10 pav., ir naudojami, kaip darbiniai elektrodai. Elektrocheminę sistemą sudaro trielektrodinė elektrocheminė celė, potenciostatas, generuojamo signalo praplovimo ir registravimo sistemos. 1 ml tūrio trijų elektrodų elektrocheminė celė buvo sudaryta iš pagalbinio (Ti), palyginamojo (Ag/AgCl) ir darbinio (sukonstruotas biojutiklis) elektrodų. Elektrocheminiai tyrimai atlikti kambario temperatūroje esant pastoviam 0,2 V darbinio elektrodo potencialui, naudojant 0,02 M fosfatinį buferinį tirpalą, turintį 0,1 M KCl (pH = 7,2) ureazės atveju ir esant pastoviam 0,4 V darbinio elektrodo potencialui, naudojant 0,05 M tris-hidroksimetil-amino metano (TRIS) buferinį tirpalą, turintį 0,1 M KCl ir 0,005 M CaCl₂ (pH = 7) PQQ-GDH atveju.



10 pav. Elektrocheminė sistema. 1 – elektrocheminė celė, 2 – potenciostatas, 3 – praplovimo sistema, 4 – signalo registravimo sistema.

Buvo registruojami biojutiklių su ureaze atsakai į 1 M karbamido tirpalą, paruoštą fosfatiname buferiniame tirpale, bei biojutiklių su PQQ-GDH atsakai į 100 mM β-D-gliukozės, β-D-ribozės, β-D-ksilozės, β-D-galaktozės, β-D-celobiozės, β-D-maltozės bei β-D-laktozės tirpalus, paruoštus TRIS buferiniame tirpale.

Taip pat buvo nustatomos biojutiklių su PQQ-GDH generuojamos srovės tankio priklausomybės nuo buferinio tirpalo koncentracijos, pH, ir naudojamo darbinio elektrodo potencialo esant 0,2 mM bei 0,4 mM sacharidų koncentracijoms. Biojutiklių atsakas nustatomas iš biojutiklio generuojamos srovės tankio vertės atėmus foninės srovės reikšmę. Tarp matavimų biojutikliai laikomi buferiniame tirpale, kambario temperatūroje.

Duomenų analizei naudota elektrocheminiams matavimams adaptuota Michaelis-Menten hiperbolės lygtis [2]:

$$j = \frac{j_{\max}^{\text{tar}}[S]}{K_M^{\text{tar}} + [S]} \quad (5)$$

kur j – bioelektrokatalizės metu generuojamos srovės tankis (srovės stipris į ploto vienetą), $[S]$ – substrato koncentracija, j_{\max}^{tar} – maksimalus srovės tankis, kurį gali generuoti bioelektrokatalizinė sistema, K_M^{tar} – sistemos tariamoji Michaelis konstanta (substrato koncentracija, kuriai esant bioelektrokatalizinės sistemos generuojamas srovės tankis yra lygus $j_{\max}^{\text{tar}}/2$). K_M^{tar} reikšmė taip pat nurodo substrato koncentraciją, iki kurios galioja tiesinė biojutiklio atsako nuo koncentracijos priklausomybė [62].

Biojutiklių žemiausia nustatymo riba (LOD) buvo apskaičiuota iš jų kalibracinių kreivių tiesinių dalių pagal 6 formulę [64]:

$$\text{LOD} = \frac{3S_a}{b} \quad (6)$$

kur S_a – tris kartus išmatuotų biojutiklio generuojamų signalų į tą pačią substrato koncentraciją, esančią tiesinėje kalibracinės kreivės dalyje, standartinis nuokrypis, b – kalibracinės kreivės tiesinės dalies nuolinio kampas (jautris).

Gauti duomenys apdoroti OriginPro 2015 ir Microsoft Office Excel programomis.

2.3.5 Biojutiklių pritaikymas darbui realiose terpėse

Siekant sukonstruotus biojutiklius ateityje pritaikyti medicinoje, darbo metu PQQ-GDH ir TRGO pagrindu sukonstruotas trečios kartos biojutiklis (GDH-TRGO), buvo panaudojamas β-D-maltozės kiekio įvertinimui ūminiu pankreatitu (ŪP) sergančių pacientų šlapime.

Visų pirma, vandeninėje terpėje sukuriama modelinė sistema: paruošiamas 2 ml, 10 mM β-D-maltozės tirpalas TRIS buferiniame tirpale, turinčiame 0,1 M KCl ir 0,005 M CaCl₂ (pH = 7). Šis tirpalas patalpinamas į termostatuojamą (37 °C) celę su nenutrūkstamu maišymu (1000 rpm). Į tirpalą pridėdama 12 μg α-gliukozidazės, kuri katalizuoja β-D-maltozės 1→4 glikozidinio ryšio tarp gliukozės molekulių hidrolizę, taip susidarant dvejoms gliukozės molekulėms (β-D-gliukozei ir α-D-gliukozei) [65]. Po α-gliukozidazės pridėjimo į tirpalą, tam tikrais laiko tarpais imamas reakcijos mišinys, kuris analizuojamas naudojant sukonstruotą GDH-TRGO biojutiklį (esant 0,4 V darbinio elektrodo potencialui) ir patvirtintą gliukozės analizatorių Eksan-G. Šių prietaisų pagalba nustatomi susidariusios β-D-gliukozės ir likusios β-D-maltozės kiekiai bei šių dviejų sacharidų generuojamas bendras biojutiklio signalas. Taip pat GDH-TRGO biojutikliu nustatytos β-D-gliukozės ir β-D-

maltozės kalibracinės kreivės vandeniniuose tirpaluose bei biojutiklio atsakai į 0,5 mM β -D-gliukozės tirpalą, į 0,5 mM β -D-maltozės tirpalą ir į 0,5 mM β -D-gliukozės bei 0,5 mM β -D-maltozės mišinį.

Siekiant patikrinti biojutiklio veikimą realiose terpėse, buvo tirtas ŪP sergančio ir sveiko žmogaus šlapimas. Į šlapimo mėginius buvo pridedama α -gliukozidazės ir tokiomis pačiomis sąlygomis kaip modelinėje sistemoje atliekamas tolimesnis eksperimentas. Tam tikrais laiko tarpais buvo imamas reakcijos mišinys, kuris toliau analizuojamas GDH-TRGO ir aprobuotu metodu.

3. DARBO REZULTATAI

3.1 Anglinių medžiagų sintezės įvertinimas

Taikant modifikuotą Hummers' o aprašytą metodiką, buvo susintetintas GO. Tačiau prieš atliekant terminę GO redukciją, buvo svarbu gautą medžiagą tinkamai atplauti nuo sulfato jonų pertekliaus. Verta paminėti, kad plovimas skatina ir dalinę GO sluoksnių eksfoliaciją. Atplovimo laipsnis įvertintas keturiolikos dienų eigoje keičiant distiliuotą GO praplovimo vandenį ir stebint jo pH vertes. Distiliuoto vandens pH priklausomybė nuo praplovimo kartų pateikta 3 lentelėje.

3 lentelė. GO praplovimo distiliuoto vandens pH priklausomybė nuo plovimo skaičiaus.

GO plovimo dienos	1	2	3	4	5	6	7
pH	2,437	3,287	4,032	4,195	4,248	4,452	4,486

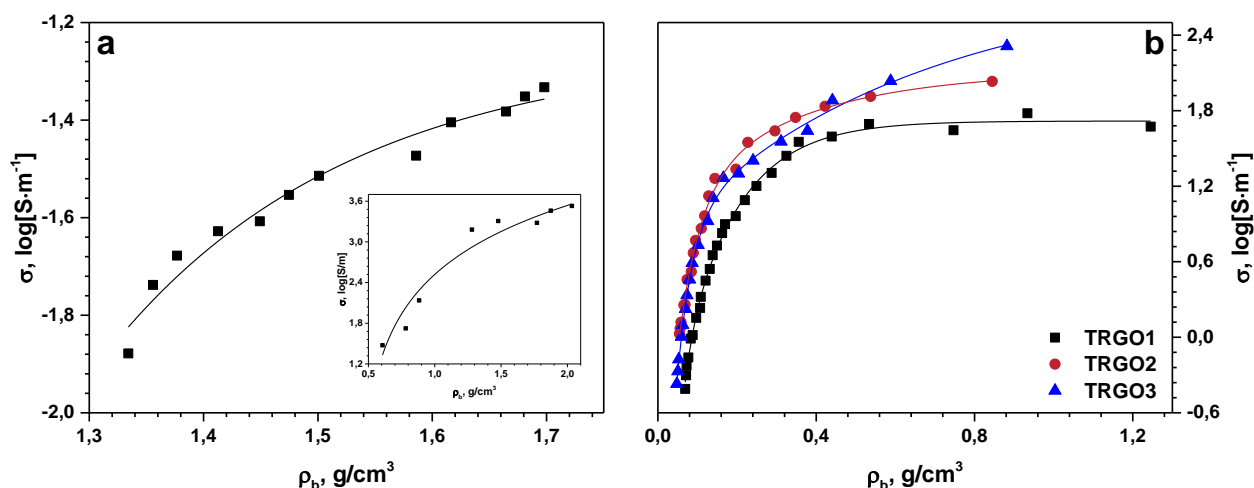
GO plovimo dienos	8	9	10	11	12	13	14
pH	4,503	4,508	4,585	4,723	4,766	4,776	5,067

Kaip matoma 3 lentelėje, po keturiolikos praplovimų pavyko pasiekti įprastam distiliuotam vandeniui artimą pH vertę ir tinkamai atplauti GO nuo sulfato jonų pertekliaus. Kadangi anglines medžiagas siekta pritaikyti amperometrinių biojutiklių konstravimui, atplauto GO milteliai toliau buvo termiškai redukuojami, taip dalinai atstatant elektrinį laidumą.

GO redukcijos metu naudojant terminės redukcijos ir frakcionavimo įrangą, buvo gautos trys TRGO frakcijos: TRGO1, TRGO2, TRGO3. Gautų medžiagų išeigos atitinkamai buvo – 23,37 %, 2,54 %, 1,56 %. Didelė dalis medžiagos masės yra prarandama, nes redukcijos metu nuo GO struktūros paviršiaus bei kraštų vandens garų, anglies monoksido bei anglies dioksido dujų pavidalu atskyla deguoninės funkcinės grupės. Dalinai pašalinus deguonies turinčias funkcinės grupes, susidariusias grafito oksidacijos metu, TRGO medžiagos jau gali būti panaudotos elektrocheminių biojutiklių konstravimui. Tačiau norint palyginti anglinių medžiagų įtaką fermentiniuose biojutikliuose, yra svarbu gautas struktūras charakterizuoti. Dėl šios priežasties, pirmiausiai buvo atlikti gautų anglinių medžiagų savybes leidžiantys įvertinti metodai.

3.2 Anglinių medžiagų charakterizavimas

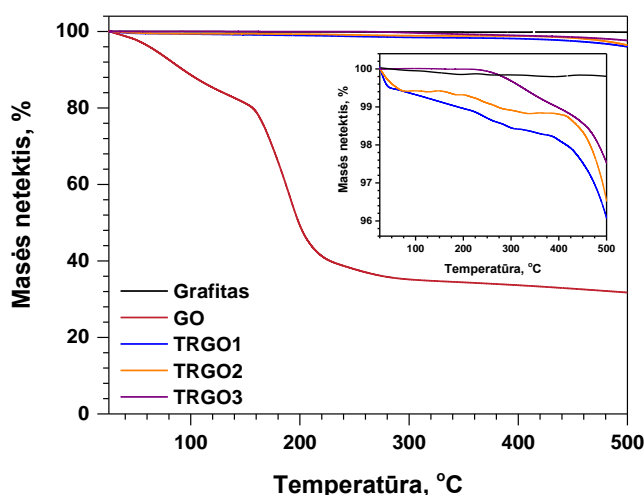
Elektrinio laidumo įvertinimas. Elektrinis laidumas kuriant bioelektrokatalizines sistemas yra viena iš pagrindinių savybių, nulemiančių sėkmingą šių sistemų veikimą. Siekiant įvertinti šią svarbią charakteristiką buvo tiriamos gautų anglinių medžiagų elektrinio laidumo priklausomybės nuo piltinio tankio. Gautos kreivės pateiktos 11 pav.



11 pav. GO (įtarpe pateikta grafito elektrinio laidumo priklausomybė nuo piltinio tankio logaritminėje skalėje) (a) ir TRGO frakcijų (b) elektrinio laidumo priklausomybės nuo piltinio tankio logaritminėje skalėje.

11 pav. matoma, kad atlikus grafito oksidaciją, jo elektrinis laidumas smarkiai sumažėjo – nuo 3,53 S·m⁻¹ iki -1,33 S·m⁻¹ (logaritminėje skalėje) esant didžiausiam miltelių suspaudimui. GO laidumas mažas, nes oksidacijos metu grafito struktūra pasidengia deguoninėmis funkcinėmis grupėmis, dėl kurių yra suardoma π -konjuguotų ryšių sistema ir elektronai nebegali toliau laisvai judėti [35]. Po redukcijos stebimas elektrinio laidumo padidėjimas. Tarp TRGO frakcijų didžiausiu – 2,31 S·m⁻¹ (logaritminėje skalėje), elektriniu laidumu pasižymėjo TRGO3 medžiaga. Po terminės redukcijos padidėjęs elektrinis laidumas įrodo, kad kaitinimo metu buvo dalinai atstatyta π -konjuguotų ryšių sistema ir susigrąžintas elektronų mobilumas.

TGA įvertinimas. Susintetintos anglinės medžiagos – tiek GO, tiek TRGO frakcijos turi deguoninių funkcinę grupių, kurios dalyvauja EP reakcijose. Deguoninių funkcinę grupių kiekio nustatymui ir GO redukavimosi laipsnio įvertinimui buvo pasitelktas TGA metodas. Gautos anglinių medžiagų TGA kreivės pavaizduotos 12 pav.



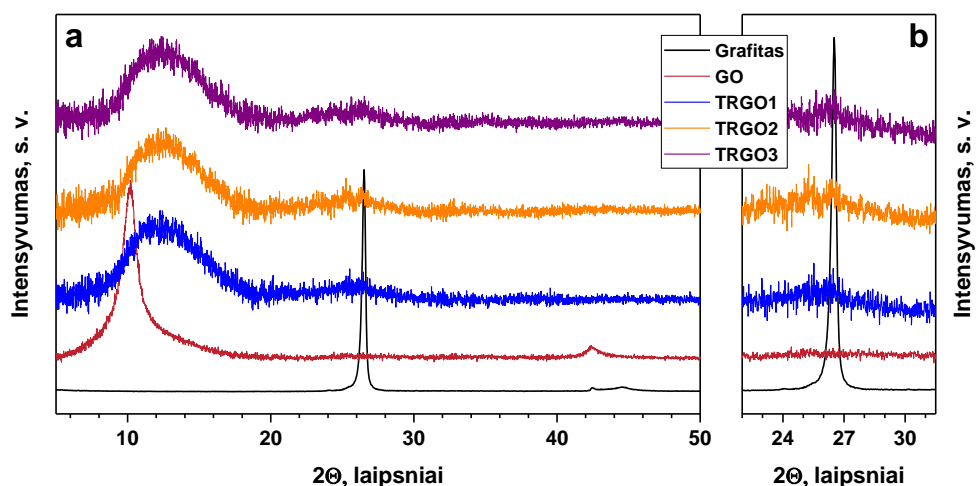
12 pav. Grafito, GO ir TRGO frakcijų TGA kreivės. Intarpe pateiktos grafito ir TRGO frakcijų kreivės 25 – 500 °C temperatūrų intervale.

12 pav. matyti, kad analizuotų anglinių medžiagų TGA kreivės skiriasi. Viso kaitinimo metu grafitas praranda tik labai nedidelę masės dalį (maždaug 0,2 %), kurios netektis siejama su ant

paviršiaus adsorbuotų nešvarumų pašalinimu analizės metu. Kitų anglinių medžiagų – GO ir TRGO frakcijų, TGA kreives galima suskirstyti į du intervalus – nuo 25 °C iki 160 °C ir nuo 160 °C iki 500 °C. Masės netektis iki 160 °C yra siejama su adsorbuotos drėgmės ir nedideliu hidroksi ir karboksigrupių kiekio pašalinimu nuo struktūrų [36]. Šiame intervale didžiausia masės netektimi (22 %) pasižymi GO, o TRGO frakcijos praranda tik iki 1 % savo masės. 160 – 500 °C intervale stebimas didesnis susintetintų anglinių medžiagų masės sumažėjimas, kuris atsiranda dėl labilių funkcinių grupių, tokių kaip karboksi, epoksi, laktono pašalinimo [62]. Šiame intervale GO netenka dar 46 % savo masės, tuo tarpu TRGO1 – 3,1 %, TRGO2 – 2,8 %, TRGO3 – 2,3 %. Lyginant su kitomis anglinėmis medžiagomis, visoje TRGO3 TGA kreivėje yra stebima mažiausia masės netektis, kuri įrodo kad ši frakcija pasižymi mažiausiu funkcinė grupių kiekiu ir yra labiausiai redukuota.

Iš skirtingų GO ir TRGO frakcijų masės pokyčių TGA kreivėse galima daryti išvadą, kad terminė GO redukcija pavyko ir didžioji dalis funkcinių grupių pašalinoma redukcijos metu. Taip pat analizė leidžia patvirtinti, kad GO terminė redukcijai yra reikalinga kritinė temperatūra, kuri yra atsakinga už staigų masės sumažėjimą (matomas GO masės mažėjimas iki maždaug 220 °C) ir greitą funkcinių grupių pašalinimą nuo struktūros. Pasiekus šią temperatūrą, greita masės netektis nebestebima – pašalinama tik didelę reikalingą energiją turinčios funkcinės grupės [36].

XRD analizės įvertinimas. Siekiant įvertinti anglinių medžiagų kristalinę struktūrą, buvo atlikta XRD analizė. Grafito, GO ir TRGO frakcijų difraktogramos pateiktos 13 pav.

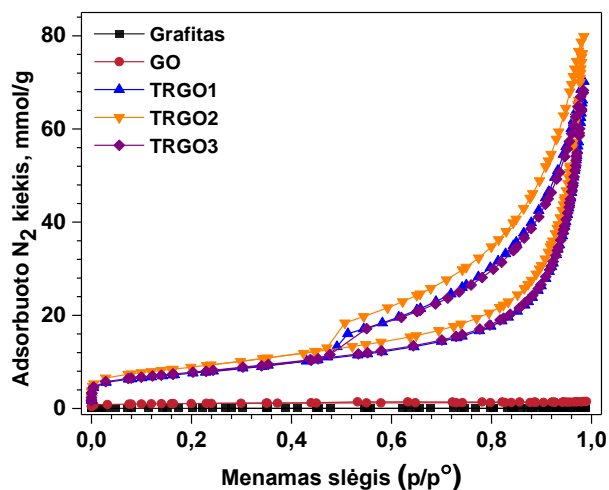


13 pav. Grafito, GO ir TRGO difraktogramos 5 – 50° intervale (a) bei 22 – 32° intervale (b).

Palyginus gautą grafito difraktogramą su PDF (ICDD) 00-056-0159 kortele, matyti, kad grafitui būdinga ryški smailė ties $2\theta = 26,51^\circ$ apibūdina heksagoninės grafito kristalinės gardelės (002) plokštumą. Pasinaudojant šios smailės padėtimi ir jos puspločiu, pagal Bragg'o ir Scherrer'io lygtis, apskaičiuotas grafito tarpplokštuminis atstumas d_{002} yra 0,336 nm, o kristalitų dydis – 29,78 nm. GO difraktogramoje matomos dvi smailės ties $2\theta = 10,16^\circ$ ir $2\theta = 42,47^\circ$. Apskaičiuotas atstumas tarp GO sluoksnių yra 0,871 nm, o kristalitų dydis lygus 5,95 nm. Oksidacijos metu grafito struktūra pasidengia deguoninėmis funkcinėmis grupėmis, kurios ir nulemia didesnę GO tarpplokštuminį atstumą [66]. Nagrinėjant TRGO difraktogramas galima matyti išplitusias smailes, kas parodo, kad frakcijoms būdinga labiau amorfinė struktūra, tačiau ties $2\theta = 24,66^\circ$ TRGO1 atveju, $2\theta = 25,30^\circ$ TRGO2 atveju ir $2\theta = 25,26^\circ$ TRGO3 atveju esančios mažo intensyvumo smailės parodo, kad redukcijos metu grafitinė struktūra buvo nežymiai atstatyta [66]. Intensyviausių TRGO frakcijų smaيليų (TRGO1 $2\theta = 12,58^\circ$, TRGO2 $2\theta = 12,68^\circ$, TRGO3 $2\theta = 12,69^\circ$) padėtys nesutampa nei su grafito nei su GO smailėmis ir yra pasislinkusios į didesnių kampų sritis, kas parodo susidariusias

tarpinės struktūras tarp šių medžiagų. Apskaičiuoti tarplokštiniai atstumai yra 0,703 nm TRGO1 atveju, 0,698 TRGO2 atveju ir 0,697 TRGO3 atveju.

BET analizės įvertinimas. Kita labai svarbi elektrodinių medžiagų charakteristika yra jų specifinis paviršiaus plotas. Gautų anglinių medžiagų specifiniam paviršiaus plotui (S_{BET}) bei vidutiniam porų diametruui (d_{vid}) nustatyti buvo pasitelkta BET analizė. Grafito, GO ir TRGO frakcijų azoto adsorbcijos-desorbcijos izotermos pateiktos 14 pav. Analizės metu gauti duomenys pateikti 4 lentelėje.



14 pav. Grafito, GO ir TRGO frakcijų azoto adsorbcijos-desorbcijos izotermos.

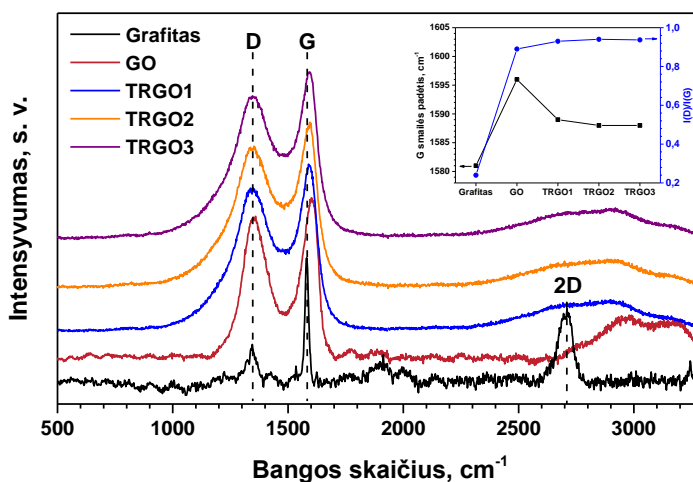
4 lentelė. BET metodu nustatytos susintetintų anglinių medžiagų charakteristikos.

Mėginys	$S_{BET}, m^2 \cdot g^{-1}$	d_{vid}, nm
Grafitas	12,4±0,2	10,6
GO	83,6±1,2	4,2
TRGO1	604,6±0,3	14,3
TRGO2	708,0±0,3	13,9
TRGO3	617,5±0,2	13,5

14 pav. matyti, kad visos izotermos yra H3 histerizės kilpos tipo, kuris būdingas plokščios formos dalelėms ar plyšio tipo poras turinčioms medžiagoms [67]. Lyginant 4 lentelėje pateiktus duomenis matyti, kad GO S_{BET} yra maždaug 7 kartus didesnis, o d_{vid} maždaug 2,5 karto mažesnis negu grafito. Yra žinoma, kad oksidacijos metu mažėja grafito kristalitiniai, ką patvirtina ir XRD analizės duomenys. Tai nulemia didesnę GO paviršiaus plotą bei mažesnę vidutinį porų diametrą. Verta paminėti, kad mažesnės poros susiformuoja ir dėl didelio kiekio funkcinų grupių tarpusavio sąveikos. Tuo pačiu metu susidaro ir struktūriniai defektai, kurie nulemia didesnę GO specifinį paviršiaus plotą [62]. Po terminės GO redukcijos anglinių medžiagų plotas išauga nuo 7 iki 8,5 kartų (TRGO1 ir TRGO2 atitinkamai). Tai siejama su tuo, kad redukcijos metu anglies monoksido ir anglies dioksido dujų pavidalu pašalinant deguoninėms funkcinėms grupėms vyko GO sluoksnių eksfoliacija bei defektų susidarymas juose. Didžiausiu paviršiaus plotu – 708,0±0,3 $m^2 \cdot g^{-1}$ pasižymėjo TRGO2 frakcija. Manoma, kad TRGO2, lyginant su kitomis frakcijomis, yra sudaryta iš labiausiai defektuotų dalelių, kas ir nulėmė didžiausią S_{BET} .

Ramano analizės įvertinimas. Pastebėjus, kad anglinės medžiagos gali būti defektuotos, tolimesnei jų struktūros analizei buvo pasitelkta Ramano sklaidos spektrinė analizė. Defektiškumas

įvertintas nustatant Ramano sklaidos spektruose matomų D ir G smailių intensyvumų santykį ($I(D)/I(G)$) [68]. 15 pav. matomi grafito, GO ir TRGO Ramano sklaidos spektrai.



15 pav. Grafito, GO ir TRGO mėginių Ramano sklaidos spektrai. Intarpe pateiktos anglinių medžiagų G smailės pozicijos ir $I(D)/I(G)$ santykiai.

15 pav. matoma, kad dėl struktūros panašumų, GO ir TRGO medžiagų Ramano sklaidos spektrai yra beveik identiški. Grafito spektre dominuoja trys smailės. Didžiausio intensyvumo G smailė yra išsidėsčiusi ties 1581 cm^{-1} , D smailė yra ties 1343 cm^{-1} ir D smailės virštonis – 2D, yra ties 2703 cm^{-1} . G smailė charakterizuoja dvigubųjų ryšių, esančių tarp sp^2 hibridizacijos anglies atomų, simetrinius virpesius. D smailė atspindi aromatinių žiedų simetrinius virpesius, kurie galimi tik tada kai anglinės struktūros turi defektų [69]. Lyginant grafito Ramano sklaidos spektrą su GO spektru, matoma, kad GO G smailė yra pasislinkusi link didesnių bangos skaičių srities per maždaug 15 cm^{-1} . Šis poslinkis atsiranda dėl GO plokštumoje oksidacijos metu pavienių dvigubųjų ryšių, sukeliančių didesnę G smailės dažnį, susidarymo [70]. GO D smailė taip pat pasižymi didesniu intensyvumu nei grafito smailė, kas parodo, kad oksidacijos metu susidariusi medžiaga pasižymi didesniu defektų kiekiu. Palyginus TRGO frakcijų G smailių padėtį su GO G smaile, matyti, kad visų TRGO frakcijų smailės yra pasilinkusios į mažesnių bangos skaičių sritį. TRGO1 G smailė pasislinkusi maždaug 7 cm^{-1} , TRGO2 – 8 cm^{-1} , TRGO3 – 8 cm^{-1} . Visų frakcijų G smailės poslinkis link mažesnių bangų skaičių reiškia, kad terminės redukcijos metu buvo dalinai atstatyta π -konjuguotų ryšių sistema [70]. TRGO2 ir TRGO3 frakcijoms būdingi didžiausi poslinkiai parodo, kad šios frakcijos yra labiausiai redukuotos. Palyginus analizuotų anglinių medžiagų $I(D)/I(G)$ santykį, matyti, kad GO yra maždaug 4 kartus defektiškesnis nei grafitas, o TRGO frakcijos pasižymėjo dar didesniu defektų kiekiu nei jų pirmtakai. TRGO1, TRGO2 ir TRGO3 $I(D)/I(G)$ santykiai atitinkamai buvo 0,930, 0,940, 0,937. Nors visų frakcijų $I(D)/I(G)$ santykiai skiriasi nežymiai, tačiau defektiškiausia buvo TRGO2 frakcija.. Manoma, kad tai ir nulėmė didžiausią šios medžiagos specifinį paviršiaus plotą (S_{BET}). Ramano spektrinės analizės metu gauti duomenys papildė elektrinio laidumo, TGA ir XRD analizių metu gautus rezultatus, kurie parodė, kad GO redukcijos metu daugiausiai funkcinų grupių prarado, t. y. labiausiai redukuota buvo TRGO3 frakcija. Atlikus anglinių medžiagų charakterizavimą, visos susintetintos medžiagos buvo pritaikytos amperometrinių fermentinių biojutiklių konstravimui.

3.3 TRGO panaudojimas biojutikliuose

Siekiant susintetintas anglines medžiagas pritaikyti biojutiklių konstravime ir norint išsiaiškinti, kokios jų savybės nulemia efektyviausią biojutiklių veikimą, gautos medžiagas charakterizuotos 5 metodais. Išsami anglinių medžiagų ir grafito savybių analizė pateikta 3.2 skyriuje, o apibendrinti tyrimo duomenys pateikti 5 lentelėje.

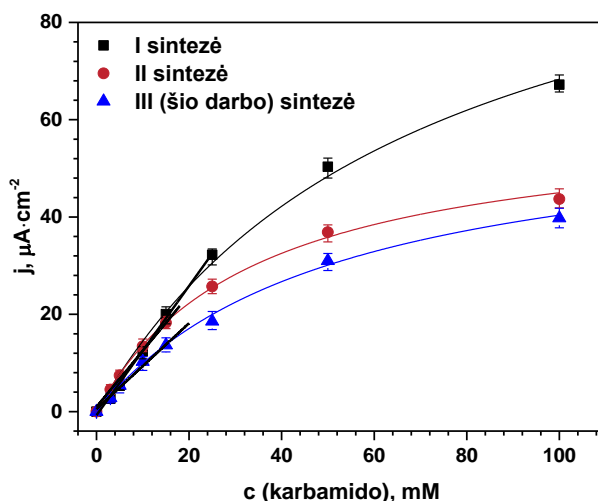
5 lentelė. Pagrindinės darbo metu nustatytos grafito, GO ir TRGO charakteristikos.

Mėginys	σ , $\log[S \cdot m^{-1}]$	Masės netektis, %	d, nm	S_{BET} , $m^2 \cdot g^{-1}$	I(D)/I(G)
Grafitas	3,53	0,2	0,336	12,4±0,2	0,243
GO	-1,33	68	0,871	83,6±1,2	0,891
TRGO1	1,67	3,9	0,703	604,6±0,3	0,930
TRGO2	2,03	3,4	0,698	708,0±0,3	0,940
TRGO3	2,31	2,4	0,697	617,5±0,2	0,937

Pritaikius anglines medžiagas biojutikliuose su ureazė iš *Canavalia ensiformis* ir PQQ-GDH iš *Acinetobacter calcoaceticus* sp., nustatyta, kad TEP vyko naudojant tik TRGO frakcijas, o su grafitu bei GO nevyko arba vyko labai neefektyviai (grafito ir ureazės biojutiklis). Iš 5 lentelės duomenų matyti, kad grafitas pasižymėjo aukščiausiu elektriniu laidumu ($3,53 S \cdot m^{-1}$ logaritminėje skalėje), mažiausiu tarpplotuminiu atstumu bei defektiškumu, tačiau jo paviršiau plotas ($12,4 \pm 0,2 m^2 \cdot g^{-1}$) buvo maždaug 50 kartų mažesnis už TRGO frakcijų S_{BET} . Be to, grafito struktūrai nebūdingos deguoninės funkcinės grupės, kurios gali užtikrinti efektyvią EP. Tuo tarpu, GO S_{BET} buvo didesnis už grafito ir šiai angliniai medžiagai buvo būdingas didžiausias funkcinių grupių kiekis bei didžiausias tarpplotuminis atstumas. Nepaisant to, grafito oksidacijos metu buvo suardyta jo π -konjunguotų ryšių sistema, todėl GO pasižymėjo ypatingai mažu elektriniu laidumu ($-1,33 S \cdot m^{-1}$ logaritminėje skalėje). Šios ribinės anglinių medžiagų savybės ir galėjo nulemti jų netinkamumą trečios kartos biojutikliams. TRGO frakcijos pasižymėjo tarpinėmis savybėmis ir didžiausiu paviršiaus plotu bei didžiausiu defektiškumu, kas ir leido įgyvendinti TEP biojutikliuose. Išsami TRGO biojutiklių analizė pateikta žemiau esančiuose 3.3.1 ir 3.3.2 skyriuose.

3.3.1 Sintezės atsikartojamumo tyrimas panaudojant ureazę

Norint sukonstruoti biojutiklius ateityje pritaikyti komerciniam panaudojimui, yra svarbu gebėti atkartoti TRGO sintezę, kurios metu gautų anglinių medžiagų pagrindu sukurti biojutikliai veiktų efektyviai. Siekiant įvertinti TRGO frakcijų sintezės atsikartojamumą buvo palygintas biojutiklių su skirtingu metu, bet tokiomis pačiomis sąlygomis susintetintomis TRGO2 frakcijomis ir ureaze veikimas. Pasirinkta TRGO2 frakcija, kadangi iš ankstesnių darbų žinoma, kad efektyviausiai ir stabiliausiai biojutikliai su ureaze veikia būtent su TRGO2 frakcija, o šių biojutiklių veikimui didžiausią įtaką daro TRGO S_{BET} , elektrinis laidumas ir funkcinių grupių kiekis [2]. Sukonstruotų biojutiklių, su skirtingu metu gautomis TRGO2 frakcijomis, generuojamos srovės tankio priklausomybės nuo karbamido koncentracijos pateiktos 16 pav.



16 pav. Biojutiklių su TRGO2 frakcijomis, gautomis trijų sintezių metu, generuojamos srovės tankio priklausomybės nuo karbamido koncentracijos.

16 pav. matoma, kad nors sintezės ir buvo atliktos naudojant tokias pat sąlygas, gautos kreivės skiriasi. Manoma, kad sintezių didžiausiems skirtumams įtaką darė žmogiškasis faktorius, toks kaip nevienodas GO miltelių sutrinimo laipsnis ar subėrimo į redukcijos zoną greitis. Dėl šių priežasčių, ateityje bus bandoma šias sintezės stadijas dar labiau kontroliuoti ir automatizuoti. Nepaisant to, naudojant visas tris medžiagas pavyko realizuoti efektyvią TEP tarp fermento ureazės bei elektrodo paviršiaus ir tiesinėje kalibracinės kreivės dalyje jautrumai išliko labai panašūs. Tai parodo, kad sintezės buvo dalinai atkartotos, o nevienodas GO miltelių sutrinimas ar subėrimo į redukcijos zoną greitis nėra labai reikšmingas faktorius efektyviam biojutiklių veikimui.

Iš 16 pav. pateiktų kreivių buvo nustatytos pagrindinės biojutiklių charakteristikos: kalibracinės kreivės tiesinė dalis, jautris, K_M^{tar} , $j_{\text{max}}^{\text{tar}}$ bei LOD reikšmės. Gauti duomenys pateikti 6 lentelėje.

6 lentelė. Biojutiklių su TRGO frakcijomis ir ureaze charakteristikos.

Sintezė	Tiesinė dalis, mM	Jautris, $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	K_M^{tar} , mM	$j_{\text{max}}^{\text{tar}}$, $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$	LOD, mM
I	0,27–25	$1,3\pm 0,03$	$70,3\pm 10,1$	$116,4\pm 9,2$	0,27
II	0,72–18	$1,2\pm 0,05$	$34,3\pm 1,9$	$60,4\pm 1,7$	0,72
III	0,50–20	$0,9\pm 0,04$	$51,8\pm 4,1$	$61,3\pm 2,7$	0,50

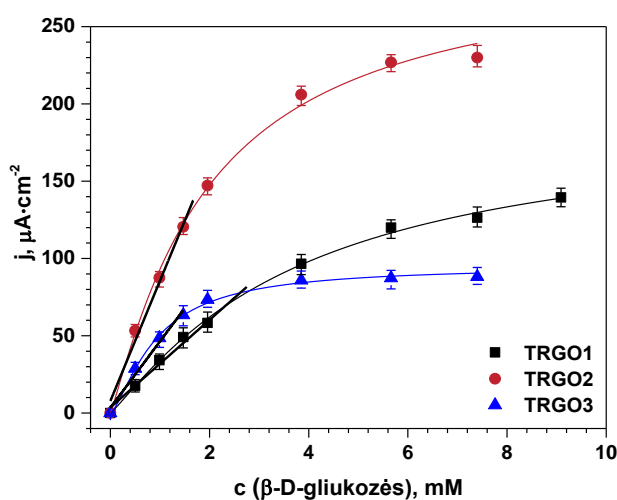
Iš 6 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad apskaičiuoti biojutiklių jautriai svyravo nuo $0,9\pm 0,04 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ iki $1,3\pm 0,03 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, o nustatytos biojutiklių K_M^{tar} vertės kito nuo $34,3\pm 1,9 \text{ mM}$ iki $70,3\pm 10,1 \text{ mM}$. Didžiausiu jautriu pasižymėjo biojutiklis, kuriame panaudota I sintezės metu gauta TRGO2 frakcija. Iš prieš tai atliktų tyrimų žinoma, kad šiai medžiagai būdingas didžiausias elektrinis laidumas ($2,64 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$ logaritminėje skalėje), lyginant su kitomis TRGO2 frakcijomis. Svarbu paminėti, kad visų sukonstruotų biojutiklių jautriai yra panašūs arba didesni už naujausių, literatūroje aprašytų, karbamido biojutiklių jautrius (1 lentelė). Tai parodo didelį TRGO2 frakcijos potencialą kuriant paprastos konstrukcijos trečios kartos biojutiklius.

Nors tokiomis pačiomis sąlygomis gautas anglines medžiagas naudojančių biojutiklių veikimas nėra identiškas, visi biojutikliai yra jautrūs karbamidui ir pasižymi ne tik dideliu jautriu bet ir ilga tiesine kalibracinės kreivės dalimi, didėmis K_M^{tar} vertėmis bei žemomis LOD reikšmėmis. Šios savybės leidžia sukonstruoti biojutiklius lengvai pritaikyti realių mėginių analizei plačiame

koncentracijų intervale. Prieš kiekvieną analizės atlikimą naudojami biojutikliai yra kalibruojami, todėl galima teigti, kad biojutiklių savybių skirtumai nėra reikšmingi karbamido koncentracijos nustatymui ir visos trys sintezės yra pavykusios. Toliau buvo tiriami biojutikliai, kuriuose panaudotos tik šio baigiamojo darbo metu susintetintos trys TRGO frakcijos.

3.3.2 Biojutiklių su PQQ-GDH tyrimas

Kaip minėta anksčiau (3.3 skyriuje), panaudojus anglines medžiagas biojutikliuose su PQQ-GDH TEP buvo realizuota naudojant tik TRGO frakcijas, o su grafitu bei GO nevyko. Apie sukurtų amperometrinių fermentinių biojutiklių su TRGO frakcijomis ir PQQ-GDH veikimo efektyvumą buvo sprendžiama iš generuojamų elektros srovės tankio priklausomybių nuo β -D-gliukozės koncentracijos. Priklausomybės pateiktos 17 pav.



17 pav. Biojutiklių su TRGO1, TRGO2, TRGO3 generuojamos srovės tankio priklausomybės nuo β -D-gliukozės koncentracijos.

Iš 17 pav. matomų srovės tankio priklausomybių nuo β -D-gliukozės koncentracijos buvo nustatytos šios biojutiklių charakteristikos: kalibracinės kreivės tiesinė dalis, jautris, K_M^{tar} , $j_{\text{max}}^{\text{tar}}$ bei LOD. Gauti duomenys pateikti 7 lentelėje.

7 lentelė. Biojutiklių su TRGO frakcijomis ir PQQ-GDH charakteristikos.

Elektrodinė medžiaga	Tiesinė dalis, mM	Jautris, $\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$	K_M^{tar} , mM	$j_{\text{max}}^{\text{tar}}$, $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$	LOD, μM
TRGO1	0,0044–2,8	28,4±1,5	3,8±0,4	191,7±10,3	4,4
TRGO2	0,0011–1,7	77,7±3,8	2,0±0,3	293,6±21,7	1,1
TRGO3	0,0049–1,5	42,9±4,3	0,9±0,1	95,1±2,7	4,9

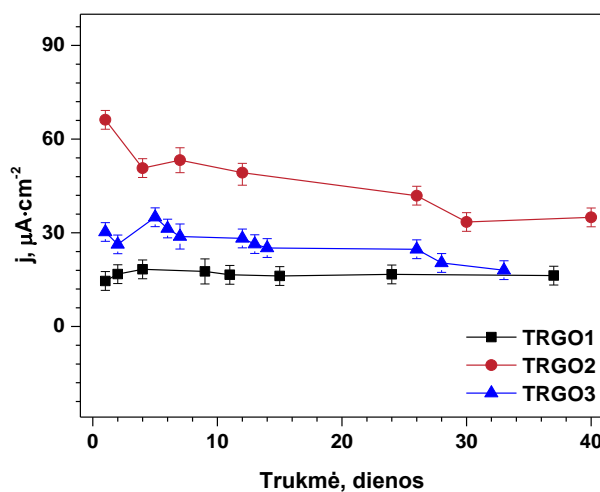
Iš aukščiau pateiktų duomenų matyti, kad sukonstruotuose biojutikliuose naudojant visas tris TRGO frakcijas, vyko labai efektyvi TEP tarp fermento aktyvaus centro ir elektrodinės medžiagos. Visos šių biojutiklių jautrių vertės yra daug didesnės nei jau PQQ-GDH pagrindu sukurtų biojutiklių, kurių konstrukcijoje naudojami EPT, jautriai (2 lentelė). Efektyviausiai veikė biojutiklis su TRGO2 frakcija. Šio biojutiklio jautris siekė $77,7 \pm 3,8 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ir buvo maždaug 2,7 karto didesnis už biojutiklio su TRGO1 ir 1,8 karto didesnis už biojutiklio su TRGO3 jautrius. Šis biojutiklis taip pat

pasivymėjo didžiausiu $j_{\max}^{\text{tar}} - 293,6 \pm 21,7 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$. Manome, kad tokios TRGO2 frakcijai būdingas savybės, kaip didžiausias S_{BET} , defektiškumas, optimalus funkcinių grupių kiekis bei tinkamas elektrinis laidumas (5 lentelė), ir nulėmė didžiausią šio biojutiklio efektyvumą.

Biojutikliams su PQQ-GDH ir TRGO frakcijomis apskaičiuotos ir β -D-gliukozės LOD reikšmės (7 lentelė). Iš gautų duomenų matyti, kad mažiausia β -D-gliukozės koncentracija, kuri gali būti nustatoma naudojant biojutiklį su TRGO2 frakcija yra $1,1 \mu\text{M}$. Tokią mažą LOD vertę nulėmė didelis šio biojutiklio jautris lyginant su kitais biojutikliais, kuriose naudotos TRGO1 bei TRGO3 frakcijos.

Taip pat iš gautų priklausomybių nustatytos visos K_M^{tar} vertės yra didesnės už PQQ-GDH fermentui tirpale būdingą K_M , kuri lygi $0,5 \text{ mM}$ [71]. Tai parodo, kad tarp fermentinio sluoksnio ir tiriamojo tirpalo atsiranda difuzinis barjeras [72]. Žemiausia K_M^{tar} vertė ($0,9 \pm 0,1 \text{ mM}$) nustatyta biojutikliui su TRGO3 frakcija, todėl galima teigti, kad ši frakcija pasižymi didžiausiu giminingu imobilizuotam fermentui. Tuo tarpu didžiausia K_M^{tar} vertė ($3,8 \pm 0,4 \text{ mM}$) būdinga biojutikliui su TRGO1 frakcija. K_M^{tar} vertės ir tuo pačiu kalibracinių kreivių tiesinės dalys koreliuoja su anglinių medžiagų struktūrose esančiu deguoninių funkcinių grupių kiekiu, todėl galima manyti, kad didesnis elektrochemiškai aktyvių deguoninių funkcinių grupių kiekis iki tam tikros ribos nulemia ilgesnę biojutiklio atsako tiesinę priklausomybę nuo substrato koncentracijos.

Nustačius pagrindines biojutiklių charakteristikas, buvo tiriamas jų stabilumas. 37 dienas (TRGO1), 40 dienų (TRGO2) ir 33 dienas (TRGO3) buvo stebėtas biojutiklių atsako į $0,5 \text{ mM}$ β -D-gliukozės tirpalą kitimas laike. Gautos priklausomybės pateikiamos 18 pav.



18 pav. Biojutiklių su TRGO1, TRGO2 ir TRGO3 stabilumas. Stebėtas biojutiklių generuojamos srovės tankis esant $0,5 \text{ mM}$ β -D-gliukozės koncentracijai.

18 pav. matoma, kad biojutikliams su TRGO2 ir TRGO3 frakcijomis yra būdingas staigus jautrumo sumažėjimas pirmomis matavimo dienomis. Šis sumažėjimas atsiranda dėl silpnai imobilizuoto fermento išsiplovimo. Biojutikliui su TRGO1 frakcija staigus signalo kritimas nėra būdingas. Ši anglinė medžiaga turi didžiausią kiekį deguoninių funkcinių grupių, kurios galėjo padėti geriau imobilizuoti fermentą, dėl ko jis ir neišsiplovė tarp matavimo atlikimų. Matoma, kad vėliau visiems biojutikliams yra būdingas nežymus signalo išaugimas. Šis išaugimas galėjo atsirasti dėl anglinių medžiagų, esančių fermentinėje membranoje, brinkimo, kuris paskatina šių medžiagų paviršiaus ploto padidėjimą, kas ir nulemia didesnę šių biojutiklio atsaką į β -D-gliukozę. Taip pat iš gautų priklausomybių matyti, kad 37 dienų eigoje biojutiklio su TRGO1 efektyvumas beveik nekito.

Tuo tarpu, biojutiklio su TRGO2 veikime po 40 dienų stebimas maždaug 47 % atsako sumažėjimas, o biojutiklio su TRGO3 efektyvumas per visą stebėjimo laiką sumažėjo maždaug 40 %. Manome, kad didžiausią įtaką jautrio sumažėjimui, turėjo PQQ-GDH išsiplovimas pirmomis matavimo dienomis, terminė fermento inaktyvacija bei TRGO paviršinių grupių išsieikvojimas tarp matavimų.

Žinant, kad biojutiklio kalibracinės kreivės tiesinė dalis yra viena svarbiausių analitinių savybių, darbo metu buvo norima įvertinti ir jos kitimą laike. Tiesinės dalis gerai atspindi biojutiklių K_M^{tar} vertės, kurių reikšmių kitimas laike buvo nustatytas biojutikliams su TRGO1, TRGO2 ir TRGO3 frakcijomis. Gauti duomenys patikti 8 lentelėje.

8 lentelė. Biojutiklių su TRGO frakcijomis K_M^{tar} kitimas laike.

TRGO1		TRGO2		TRGO3	
Trukmė, dienos	K_M^{tar} , mM	Trukmė, dienos	K_M^{tar} , mM	Trukmė, dienos	K_M^{tar} , mM
1	9,3±1,9	1	0,8±0,03	1	1,7±0,1
4	4,6±0,7	4	1,6±0,2	5	1,4±0,1
9	3,8±0,4	7	2,0±0,3	7	0,9±0,1
11	2,9±0,5	12	1,3±0,2	13	0,7±0,06
15	3,7±0,6	26	1,1±0,1	14	0,9±0,08
24	4,0±0,6	30	1,0±0,1	26	0,8±0,06

Iš aukščiau pateiktų duomenų matyti, kad lyginant veikimo pradžioje biojutiklių su TRGO1 ir TRGO3 nustatytas K_M^{tar} vertes su stebėjimo pabaigoje nustatytomis K_M^{tar} reikšmėmis, konstantos sumažėjo apie 2,3 karto TRGO1 atveju ir apie 2,2 karto TRGO3 atveju. Tai reiškia, kad trumpėjo biojutiklių generuojamos srovės tankio tiesinė priklausomybė nuo substrato. Biojutiklio su TRGO2 atveju matoma, kad K_M^{tar} reikšmės išaugo dvigubai iki 4 matavimo dienos, o tolesniame 26 dienų laikotarpyje išliko gana pastovios. Didelį išaugimą galėjo nulemti silpnai imobilizuoto ar net visai nepiriesto fermento išsiplovimas iš membranos. Likęs, stipriai surištas fermentas su angline medžiaga membranoje nulėmė, kad biojutiklio tiesinė priklausomybė nuo substrato koncentracijos beveik nekito tolesnio stebėjimo laikotarpiu. Apibendrinus rezultatus matyti, kad net ir po mėnesio laiko, visų biojutiklių K_M^{tar} vertės nenukrito žemiau natyvaus PQQ-GDH fermento K_M reikšmės (5 mM) [71]. Tai parodo, kad fermentas buvo tinkamai imobilizuotas panaudojant visas TRGO frakcijas ir išlaikė savo efektyvumą visą stebėjimo laikotarpį.

PQQ-GDH nėra visiškai specifinė β -D-gliukozei. Šis fermentas gali katalizuoti ir įvairių kitų sacharidų ir disacharidų oksidaciją [54]. Dėl šios priežasties, baigiamojo darbo metu buvo siekiama išanalizuoti biojutiklių su TRGO frakcijomis ir imobilizuota PQQ-GDH substratinį atrankumą. Tuo tikslu, nustatytos biojutiklių generuojamos srovės tankio priklausomybės nuo monosacharidų β -D-gliukozės, β -D-ribozės, β -D-ksilozės, β -D-galaktozės ir disacharidų β -D-celobiozės, β -D-maltozės bei D-laktozės. Lygintas biojutiklių jautris β -D-gliukozės atžvilgiu (atsakas į β -D-gliukozę prilygintas 100 %) ir iš srovės tankio priklausomybių nuo substratų koncentracijos nustatytos K_M^{tar} vertės. Gauti duomenys pateikti 9 lentelėje.

9 lentelė. Biojutiklių su TRGO selektyvumas sacharidams β -D-gliukozės atžvilgiu ir jų K_M^{tar} vertės.

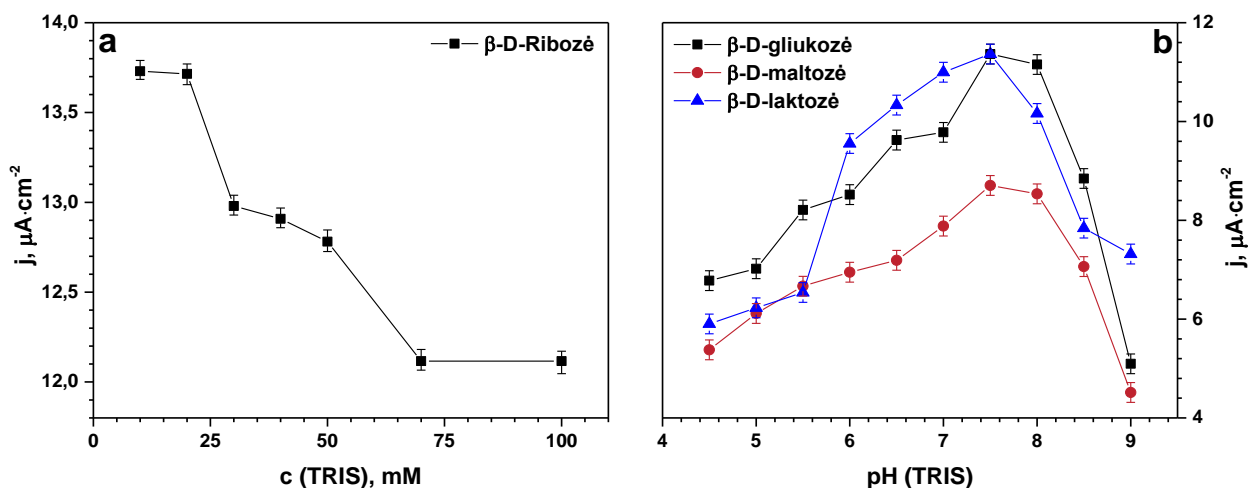
Substratas	TRGO1		TRGO2		TRGO3	
	Santykinis jautris, %	K_M^{tar} , mM	Santykinis jautris, %	K_M^{tar} , mM	Santykinis jautris, %	K_M^{tar} , mM
β -D-gliukozė	100	3,8±0,4	100	2,0±0,3	100	0,9±0,1
β -D-ribozė	130,6	5,1±0,9	129,9	2,2±0,2	96,7	0,8±0,03
β -D-ksilozė	114,6	8,2±1,0	104,8	2,8±0,3	107,5	1,0±0,05
β -D-galaktozė	119,2	4,4±0,4	116,0	1,5±0,1	96,6	0,8±0,05
β -D-celobiozė	65,6	5,2±0,7	74,1	2,2±0,3	61,3	1,3±0,1
β -D-maltozė	69,2	6,6±1,2	71,8	4,2±0,5	74,4	1,6±0,1
β -D-laktozė	72,3	7,6±1,6	80,5	3,1±0,3	75,6	1,4±0,1

Iš gautų duomenų matyti, kad nors PQQ-GDH fermentas plačiai naudojamas β -D-gliukozės analizės sistemose, sukurti biojutikliai buvo jautriausi monosacharidams β -D-ribozei ir β -D-ksilozei. Biojutiklio su TRGO1 bei TRGO2 frakcijomis jautrumas β -D-ribozei buvo maždaug 30 % didesnis nei β -D-gliukozei. Didžiausias biojutiklio su TRGO3 frakcija jautris β -D-ksilozei buvo maždaug 8 % didesnis negu β -D-gliukozei. Šie monosacharidai yra pentozės, mažesni už natūralų substratą β -D-gliukozę, todėl lengviau patenka į PQQ-GDH aktyvų centrą, kas ir nulemia didesnę biojutiklių jautrį šių substratų atžvilgiu. Sukurtų biojutiklių jautris disacharidams buvo daug mažesnis. Mažiausiu jautrumu biojutikliai su TRGO1 ir TRGO3 pasižymėjo β -D-celobiozei (65,6 % ir 61,3 %). Biojutiklis su TRGO2 mažiausiai efektyviai veikė, kai substratas buvo β -D-maltozė (71,8 %).

Iš apskaičiuotų K_M^{tar} matyti, kad biojutiklis su TRGO1 frakcija pasižymėjo didžiausiomis K_M^{tar} vertėmis. Ilgiausia tiesinė priklausomybė užfiksuota analizuojant substratą β -D-ksilozę ($K_M^{\text{tar}} = 8,2 \pm 1,0$ mM). Kitų biojutiklių ilgiausia tiesinė priklausomybė stebėta naudojant β -D-maltozė. Nustatyta K_M^{tar} su TRGO2 – $4,2 \pm 0,5$ mM, su TRGO3 – $1,6 \pm 0,1$ mM.

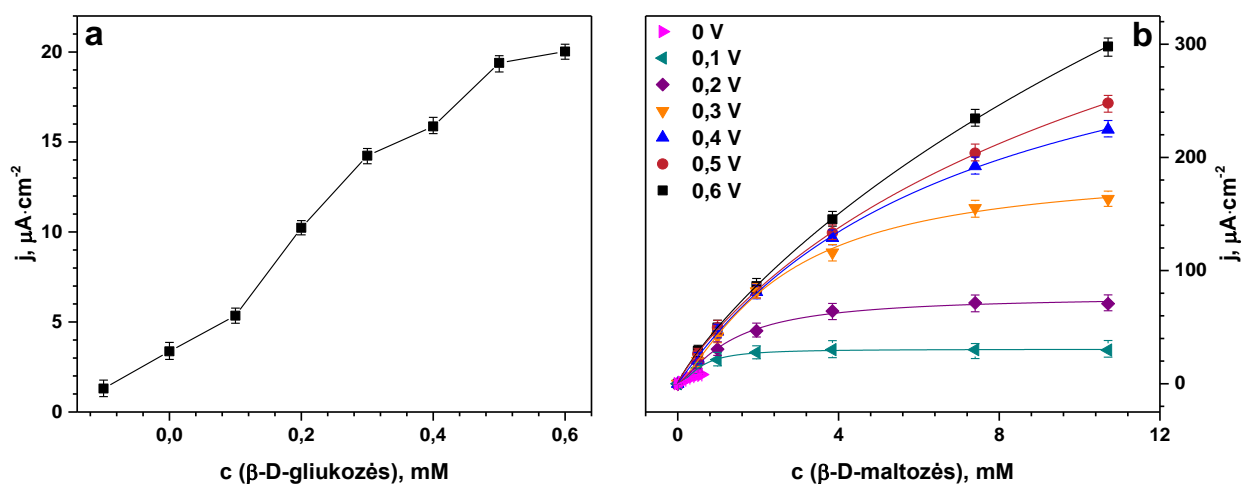
Platus PQQ-GDH substratinis atrankumas gali atverti dideles galimybes šio fermento pagrindu sukurtas fermentines biojutiklines sistemas plačiau taikyti pramoninėse technologijose, kur vykdoma įvairių sacharidų konversija ar gaminamos biokuro celės. Tokie biojutikliai taip pat gali būti aktualūs ne tik maisto ar gėrimų, bet ir farmacijos pramonėje bei medicinoje.

Galiausiai buvo išanalizuotos sukonstruotų trečios kartos biojutiklių, kurių biologinę dalį sudaro PQQ-GDH, veikimui reikalingos optimalios sąlygos. Pirmiausiai buvo stebėtos biojutiklių generuojamos srovės tankio priklausomybės nuo buferinio tirpalo koncentracijos ir jo pH. Gauti duomenys pateikti 19 pav.



19 pav. Biojutiklio su TRGO2 srovės tankio atsakų į 0,2 mM β -D-ribozės tirpalą priklausomybė nuo TRIS buferinio tirpalo talpos (a) ir biojutiklio su TRGO1 srovės tankio atsakų į 0,2 mM β -D-gliukozės, β -D-maltozės ir β -D-laktozės tirpalus priklausomybės nuo TRIS buferinio tirpalo pH (b).

19 pav. (a) matomą priklausomybę galima suskirstyti į tris dalis. Esant 10 – 20 mM, 30 – 50 mM ir 70 – 100 mM buferinio tirpalo koncentracijoms, generuojamos srovės tankis kinta nežymiai, tačiau apibendrinant visą kreivę galima teigti, kad biojutiklio efektyvumas didėja mažėjant buferinio tirpalo talpai. 19 pav. (b) dalyje matyti, kad kai biojutiklinėje sistemoje vyksta sacharidų oksidacijos bioelektrokatalizė, didžiausios biojutiklio srovės tankio vertės, nepriklausomai nuo substrato, gaunamos, kai buferinio tirpalo pH yra 7,5. Nustatyta pH vertė yra artima pateikiamai literatūroje, kur teigiama, kad PQQ-GDH fermento veikimui tinkamiausia pH vertė esant 25°C yra 7,0 [54]. Toliau buvo analizuojama naudojamo darbinio elektrodo potencialo įtaka biojutiklių efektyvumui. Gautos priklausomybės pateiktos 20 pav.



20 pav. Biojutiklio su TRGO2 srovės tankio atsakų į 0,4 mM β -D-gliukozę priklausomybė nuo darbinio elektrodo potencialo (a) ir biojutiklio su TRGO3 srovės tankio priklausomybės nuo β -D-maltozės koncentracijos esant skirtingam darbinio elektrodo potencialui (b).

20 pav. (a) matyti, kad didėjant darbinio elektrodo potencialo vertei, generuojamos srovės tankis taip pat didėja. Remiantis 20 pav. (b) dalyje matomomis priklausomybėmis buvo nustatytas

sistemos jautris, K_M^{tar} vertės, $j_{\text{max}}^{\text{tar}}$ bei generuojamos foninės srovės tankis ($j_{\text{fon.}}$). Gauti duomenys pateikti 10 lentelėje.

10 lentelė. Biojutiklio su TRGO3 ir PQQ-GDH savybės esant skirtingam darbiniam potencialui.

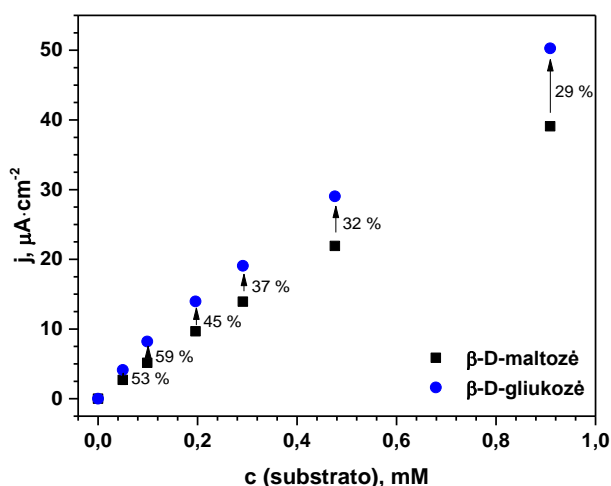
E, V	Jautris, $\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$	K_M^{tar} , mM	$j_{\text{max}}^{\text{tar}}$, $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$	$j_{\text{fon.}}$, $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$
0	–	0,3±0,02	10,2±0,5	-8,5
0,1	21,9±3,6	0,6±0,03	30,5±0,5	1,7
0,2	31,5±3,3	1,3±0,1	77,4±3,1	3,0
0,3	43,2±3,9	2,6±0,2	190,8±8,5	4,1
0,4	45,3±2,0	7,2±0,9	375,3±21,9	5,1
0,5	48,3±3,4	15,3±2,3	588,1±42,9	27,1
0,6	50,1±2,4	37,0±5,0	1162,6±89,7	64,0

Iš gautų duomenų nustatyta, kad didžiausiu jautriu ($50,1 \pm 2,4 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$), K_M^{tar} verte ($37,0 \pm 5,0 \text{ mM}$) bei $j_{\text{max}}^{\text{tar}}$ ($1162,6 \pm 89,7 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$) biojutiklis pasižymėjo, kai darbinio elektrodo potencialas buvo 0,6 V. Tačiau esant aukštam potencialui, egzistuoja didesnė pašalinių reakcijų tikimybė ir didesnė foninė srovė. Kaip matyti iš lentelės duomenų, esant 0,6 V foninės srovės tankis yra maždaug 38 kartus didesnis nei esant 0,1 V darbinio potencialo vertei. Visa tai gali trukdyti nustatyti mažas analičių koncentracijas. Dėl šių priežasčių, tyrimams tinkamiausias yra 0,2 V–0,3 V darbinio elektrodo potencialas, kuriam esant biojutiklio jautris yra pakankamas, foninė srovė nėra didelė, o pašalinių reakcijų tikimybė minimali.

3.4 Biojutiklių veikimo realiose terpėse tyrimas

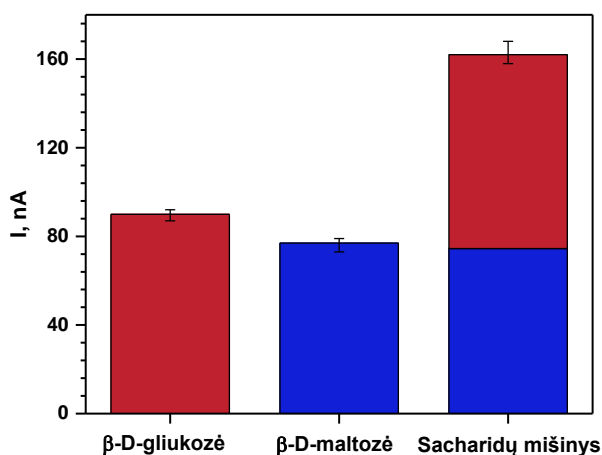
Nustačius trečios kartos biojutiklio su PQQ-GDH jautrumą β -D-maltozei, jo veikimo galimybė buvo išbandyta naudojant kontrolinį ir ŪP sergančio paciento šlapimo mėginius. Šis biologinis skystis pasirinktas dėl to, kad tai galutinis ir greitai atsinaujinantis organizmo produktas, kurio komponentų net minimalūs pakitimai gali parodyti organizmo fiziologinę būseną. Yra žinoma, kad sergančių ŪP žmonių organizme padidėja fermento α -amilazės kiekis. Šis fermentas išskiriamas kasoje ir seilių liaukose bei katalizuoja krakmolo hidrolizę iki tokių sacharidų, kaip gliukozė, maltozė ir dekstrinai. Sveiko žmogaus šlapime maltozės nėra arba jos kiekis turėtų būti minimalus, todėl padidėjusi šio sacharido koncentracija seilėse, kraujo serume ar šlapime gali indikuoti sunkią ŪP eigą dar ankstyvoje stadijoje [17,18]. Nors yra sukurta nemažai metodų, kurie nustato α -amilazės kiekio pokyčius, tačiau šie metodai tik parodo, kad didelė kasos audinių dalis jau yra suirusi, todėl netinka ŪP ligos prognostikai. Dėl šios priežasties jautrus metodas, kuris leistų nustatyti minimalius α -amilazės kiekio pokyčius dar ankstyvoje stadijoje, būtų labai aktualus, o dėl savo neinvaziškumo šlapimo tyrimai taip pat yra labai perspektyvūs.

Sukurtas GDH-TRGO biojutiklis buvo pritaikytas β -D-maltozės kiekio įvertinimui ŪP sergančių pacientų šlapime, taip norint patikrinti hipotezę dėl šio sacharido koncentracijos padidėjimo. Pirmiausiai GDH-TRGO biojutikliu buvo nustatytos β -D-gliukozės ir β -D-maltozės kalibracinės kreivės vandeniniuose tirpaluose. Gautos priklausomybės pateiktos 21 pav.



21 pav. GDH-TRGO biojutiklio generuojamos srovės tankio priklausomybės nuo β-D-gliukozės ir β-D-maltozės koncentracijų.

21 pav. matoma, kad tiesinėje β-D-gliukozės kalibracinės kreivės dalyje biojutiklio generuojamos srovės tankio vertės yra didesnės lyginant su tomis pačiomis β-D-maltozės koncentracijomis. Priklausomai nuo substrato koncentracijos, biojutiklio signalas į β-D-gliukozę yra maždaug nuo 30 % iki 60 % didesnis. Didėjant koncentracijai atsakas į β-D-gliukozę mažėja lyginant su ta pačia β-D-maltozės koncentracija, nes sukurto biojutiklio K_M^{tar} , kaip buvo minėta anksčiau, β-D-gliukozei yra mažesnė lyginant su K_M^{tar} verte nustatyta β-D-maltozei. Skirtingi GDH-TRGO biojutiklio signalų dydžiai skirtingiems substratams rodo, kad suminis šių sacharidų biojutiklio signalas bus sudarytas iš dviejų netolygių komponentų. 22 pav. iš GDH-TRGO biojutikliu nustatytą generuojamos srovės stiprio verčių matyti, kad suminį biojutiklio signalą sudaro signalų į tam tikras sacharidų koncentracijas suma, t. y. skirtinguose tirpaluose esančių sacharidų generuojamų srovės stiprių suma yra lygi tam pačiam tirpale esančių ir tos pačios koncentracijos abiejų sacharidų generuojamam srovės stipriui.



22 pav. GDH-TRGO biojutiklio generuojamos srovės stiprio vertės esant 0,5 mM β-D-gliukozės, 0,5 mM β-D-maltozės ir šių sacharidų mišiniui.

Tada β-D-maltozės tirpalas po α-gliukozidazės pridėjimo tam tikrais laiko tarpais išanalizuotas naudojant sukonstruotą GDH-TRGO biojutiklį ir aprobuotą metodą, kurių pagalba ir remiantis

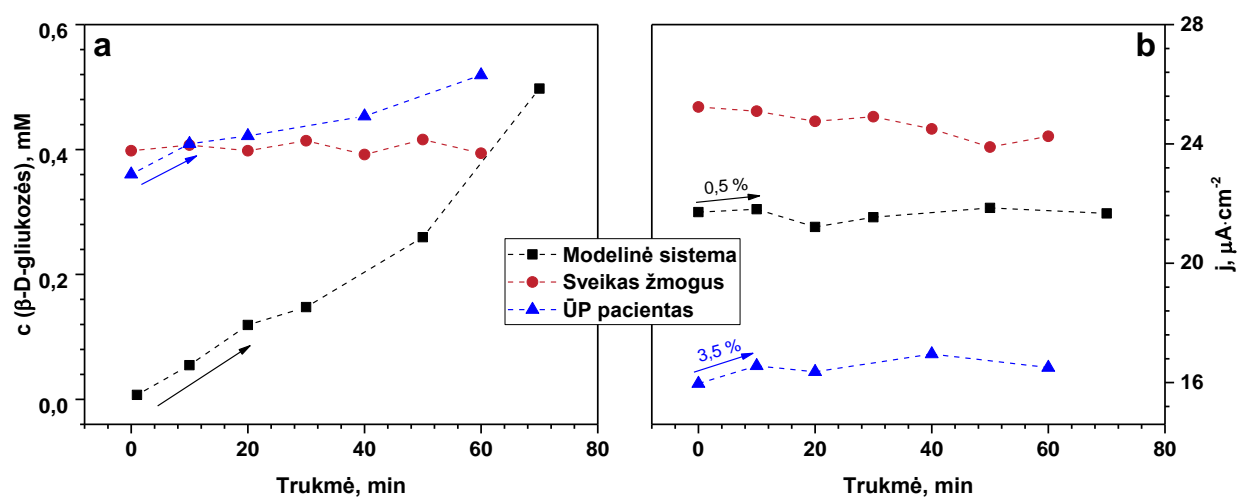
gautomis kalibracinėmis kreivėmis, nustatytos β -D-gliukozės ir β -D-maltozės koncentracijos bei šių substratų bendras generuojamas biojutiklio signalas. Gauti duomenys pateikti 11 lentelėje.

11 lentelė. α -gliukozidazės katalizuojamos reakcijos mišinio tyrimo duomenys.

Trukmė, min	I, nA	c (β -D-gliukozės), mM	c (β -D-maltozės), mM
0	1534	0	9,90
1	1513	0,007	9,75
10	1541	0,06	9,87
20	1499	0,12	9,52
30	1522	0,15	9,63
50	1544	0,26	9,62
70	1531	0,50	9,22

Iš 11 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad α -gliukozidazės katalizuojamos β -D-maltozės hidrolizės reakcijos mišinyje β -D-gliukozės koncentracija didėja iki 0,5 mM, o β -D-maltozės koncentracija svyruoja nuo 9,90 mM iki 9,22 mM. Manoma, kad β -D-maltozės koncentracijų svyravimai hidrolizės metu galėjo atsirasti dėl β -D-maltozės mutarotacijos ir α -gliukozidazės terminės inaktyvacijos reakcijos mišinyje. Nepaisant to, β -D-maltozės koncentracija bendrai sumažėja 0,68 mM, kas per daug nenukrypsta nuo susidariusio β -D-gliukozės kiekio.

Toliau, buvo tiriami ir ŪP sergančio bei sveiko žmogaus šlapimo mėginiai. Po α -gliukozidazės pridėjimo į šlapimą, tam tikrais laiko tarpais buvo nustatoma β -D-gliukozės koncentracija ir bendras GDH-TRGO biojutiklio generuojamas signalas į šlapime esančius sacharidus. Šie ir modelinės sistemos duomenys pateikti 23 pav.



23 pav. β -D-gliukozės koncentracijos (a) ir GDH-TRGO biojutiklio generuojamo srovės tankio (b) kitimas modelinėje sistemoje, sveiko ir ŪP sergančio paciento šlapimo mėginiuose naudojant α -gliukozidazę.

23 pav. (a) matyti, kad β -D-gliukozės koncentracijos kitimo dinamika modelinėje sistemoje yra panaši į ŪP sergančio paciento: pirmomis reakcijos minutėmis (iki 20 min modelinėje sistemoje ir iki 10 min ŪP sergančio paciento šlapime) matomas staigus koncentracijos didėjimas, o vėliau lėtesnis eksponentinis augimas. Sveiko žmogaus šlapimo mėginyje β -D-gliukozės koncentracija beveik nekinta viso stebėjimo metu. β -D-gliukozės koncentracijos augimo dinamikos ŪP sergančio

paciento šlapime panašumas į modelinę sistemą, gali rodyti, kad mėginyje yra β -D-maltozės. Toks įrodymas yra labai svarbus siekiant šią analizę pritaikyti ŪP diagnostikai. 23 pav. (b) dalyje matyti, kad GDH-TRGO biojutiklio generuojamo signalo dinamikoje ŪP sergančio paciento šlapime ir modelinėje sistemoje pirmosiomis minutėmis taip pat matomas anodinės srovės išaugimas, kuris gali atsirasti dėl greito β -D-gliukozės susidarymo katalizuojamos reakcijos pradžioje. Kadangi GDH-TRGO biojutiklis yra jautresnis β -D-gliukozei, šio sacharido generuojama srovė yra didesnė nei srovės sumažėjimas, kuris atsirado dėl atitinkamo β -D-maltozės suvartojimo hidrolizės metu. Dėl šios priežasties iki 10 minučių matomas biojutiklio bendro signalo augimas. Po to, tiek modelinėje sistemoje, tiek ŪP sergančio paciento šlapime susidaro tam tikra pusiausvyra tarp sacharidų.

Nustatius, kad sukurtas GDH-TRGO biojutiklis gali būti pritaikytas β -D-maltozės įvertinimui ŪP sergančio paciento šlapime, buvo optimizuotos jo veikimo sąlygos: pašalinių medžiagų įtakos minimalizavimui tiriamas 10 kartų skiestas šlapimas, naudojant 0,1 V (lyg. su Ag/AgCl) darbinio elektrodo potencialą ir matuojant tik 10 s anodinį biojutiklio signalą. Esant tokioms sąlygoms, šlapime esančios trukdančios medžiagos tokios, kaip šlapimo ir askorbo rūgštis, nedaro įtakos GDH-TRGO biojutiklio signalui ir nustatytos β -D-gliukozės koncentracijos visiškai sutampa su aprobuotu metodu nustatytomis koncentracijomis.

Atlikti eksperimentai rodo, kad įgyvendinus nuoseklius tyrimus ir optimizavimo darbus, GDH-TRGO biojutiklį būtų galima pritaikyti ankstyvoje, neinvazinėje ŪP prognostikoje. Lyginant su kitais, jau sukurtais metodais, kurių metu matuojamas α -amilazės aktyvumas, toks biojutiklis turėtų didelį pranašumą, kadangi jo pagalba būtų galima tiesiogiai nustatyti β -D-maltozės koncentraciją be papildomų šlapimo apdorojimo (sacharidų hidrolizės) stadijų.

IŠVADOS

1. Modifikuotu Hummers'o metodu susintetintas grafito oksidas (GO), iš kurio terminės redukcijos ir frakcionavimo metu gautos trys termiškai redukuoto grafeno oksido frakcijos (TRGO1, TRGO2 ir TRGO3). Frakcijų išeigos atitinkamai buvo 23,37 %, 2,54 %, 1,56 %.

2. Charakterizavus anglines medžiagas nustatyta, kad redukcija buvo atlikta sėkmingai: TRGO struktūros dalinai susigražino savo elektrinį laidumą, kuris nuo 3000 iki 7000 kartų didesnis už GO laidumą, prarado didžiąją dalį deguoninių funkcinių grupių (termogravimetrinės analizės metu stebima tik 3,9 %, 3,4 % ir 2,3 % TRGO frakcijų masės netektis, kai GO praranda 68 % savo masės) bei jų tarpploštuminiai atstumai sumažėjo nuo 0,871 nm, lyginant su GO, iki 0,703 nm, 0,698 nm bei 0,697 nm. Didžiausias elektrinis laidumas ($2,31 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$ logaritminėje skalėje) mažiausias tarpploštuminis atstumas (0,697 nm) ir mažiausias deguoninių funkcinių grupių kiekis atskleidė, kad labiausiai redukuota buvo TRGO3. Didžiausiu paviršiaus plotu ($708,0\pm 0,3 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$), kurį nulėmė didžiausias defektiškumas, pasižymėjo TRGO2.

3. Pritaikius susintetintas medžiagas biojutikliuose su nuo pirola chinolinchinono priklausoma gliukozės dehidrogenaze iš *Acinetobacter calcoaceticus* sp, nustatyta, kad tiesioginė elektronų pernaša buvo pasiekta tik su TRGO frakcijomis. Efektyviausiai veikė biojutiklis su TRGO2. Jo jautris siekė $77,7\pm 3,8 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. Ši medžiaga pasižymėjo didžiausiu paviršiaus plotu ($708,0\pm 0,3 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$), didžiausiu defektiškumu, tinkamu elektriniu laidumu bei optimaliu deguoninių funkcinių grupių kiekiu, kas ir nulėmė aukštą biojutiklio jautrį. Taip pat nustatyta, kad visi biojutikliai dėl mažesnio molekulių dydžio buvo labiau atrankūs monosacharidams nei disacharidams, o sistemų veikimui reikalingos optimalios sąlygos buvo 7,5 buferinio tirpalo pH vertė, 0,2–0,3 V darbinio potencialo vertės ir 10 mM buferinio tirpalo talpa.

4. Pritaikius anglines medžiagas biojutikliuose, kurių biologinę dalį sudarė ureazė iš *Canavalia ensiformis* išsiaiškinta, kad efektyvi tiesioginė elektronų pernaša taip pat realizuota tik panaudojus TRGO frakcijas. Nustatyta, kad biojutiklių su skirtingomis TRGO2 frakcijomis jautriai svyravo nuo $0,9\pm 0,04 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ iki $1,3\pm 0,03 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. Nors tokiomis pačiomis sąlygomis sintetintas TRGO2 frakcijas naudojančių biojutiklių jautris nėra identiškas, tačiau jis yra tinkamas ir kartu su ilga tiesine kalibracinės kreivės dalimi (iki 25 mM) leidžia sukonstruoti biojutiklius sėkmingai naudoti karbamido koncentracijos nustatymui.

5. Nustatyta, kad sukonstruotas trečios kartos biojutiklis yra tinkamas neinvaziniam β -D-gliukozės bei β -D-maltozės nustatymui ūminiu pankreatitu sergančių pacientų šlapime, kai šlapimo mėginiai yra 10 kartų skiesti, o darbinio elektrodo potencialas yra 0,1 V.

LITERATŪROS ŠARAŠAS

1. N.H. Maniya, D.N. Srivastava, Fabrication of porous silicon based label-free optical biosensor for heat shock protein 70 detection, *Mater. Sci. Semicond. Process.* 115 (2020) 105126. <https://doi.org/10.1016/j.mssp.2020.105126>.
2. I. Šakinytė, Bereagentinės fermentinės sistemos anglinių struktūrų pagrindu. Daktaro disertacija: fiziniai mokslai, biochemija (04 P). Vilniaus universitetas. Vilnius. 2017.
3. A. Ruff, F. Conzuelo, W. Schuhmann, Bioelectrocatalysis as the basis for the design of enzyme-based biofuel cells and semi-artificial biophotoelectrodes, *Nat. Catal.* (2019). <https://doi.org/10.1038/s41929-019-0381-9>.
4. R. Renneberg, D. Pfeiffer, F. Lisdat, G. Wilson, U. Wollenberger, F. Ligler, A.P.F. Turner, Frieder scheller and the short history of biosensors, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 109 (2007) 1–18. https://doi.org/10.1007/10_2007_086.
5. P. Mehrotra, Biosensors and their applications - A review, *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 6 (2016) 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>.
6. N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, P. Estrela, Introduction to biosensors, *Essays Biochem.* 60 (2016) 1–8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>.
7. M. Keusgen, Biosensors: New approaches in drug discovery, *Naturwissenschaften.* 89 (2002) 433–444. <https://doi.org/10.1007/s00114-002-0358-3>.
8. A.M. Gonçalves, A.Q. Pedro, F.M. Santos, L.M. Martins, C.J. Maia, J.A. Queiroz, L.A. Passarinha, Trends in protein-based biosensor assemblies for drug screening and pharmaceutical kinetic studies, *Molecules.* 19 (2014) 12461–12485. <https://doi.org/10.3390/molecules190812461>.
9. S.P. Mohanty, E. Koucias, Biosensors: A tutorial review, *IEEE Potentials.* 25 (2006) 35–40. <https://doi.org/10.1109/MP.2006.1649009>.
10. B. Gupta, A. Shrivastav, S. Usha, Optical Sensors for Biomedical Diagnostics and Environmental Monitoring, 2017. <https://doi.org/10.1201/9781315156033>.
11. P.J. Conroy, S. Hearty, P. Leonard, R.J. O’Kennedy, Antibody production, design and use for biosensor-based applications, *Semin. Cell Dev. Biol.* 20 (2009) 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2009.01.010>.
12. R. Monošík, M. Stred’anský, E. Šturdík, Biosensors - classification, characterization and new trends, *Acta Chim. Slovaca.* 5 (2012) 109–120. <https://doi.org/10.2478/v10188-012-0017-z>.
13. N.J. Ronkainen, H.B. Halsall, W.R. Heineman, Electrochemical biosensors, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1747–1763. <https://doi.org/10.1039/b714449k>.
14. Proteins. <https://www.bbc.co.uk/bitesize/guides/zcr74qt/revision/4> (žiūrėta 2020 m. balandžio 15 d.).
15. G.E. Schulz, R.H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer New York, 2013.
16. C. Garcia-Galan, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, R.C. Rodrigues, Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance, *Adv. Synth. Catal.* 353 (2011) 2885–2904. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>.
17. D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification, *Anal. Lett.* 34 (2001) 635–659. <https://doi.org/10.1081/AL-100103209>.
18. C.L.S. Chagas, R.C. Moreira, L.P. Bressan, D.P. de Jesus, J.A.F. da Silva, W.K.T. Coltro, Instrumental Platforms for Capillary and Microchip Electromigration Separation Techniques, *Capill. Electromigr. Sep. Methods.* (2018) 269–292. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809375-7.00011-3>.
19. G. Rocchitta, A. Spanu, S. Babudieri, G. Latte, G. Madeddu, G. Galleri, S. Nuvoli, P. Bagella, M.I. Demartis, V. Fiore, R. Manetti, P.A. Serra, Enzyme biosensors for biomedical applications: Strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids, *Sensors (Switzerland).* 16 (2016). <https://doi.org/10.3390/s16060780>.
20. R. Baronas, Nonlinear effects of diffusion limitations on the response and sensitivity of amperometric biosensors, *Electrochim. Acta.* 240 (2017) 399–407.

<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.04.075>.

21. N. Elgrishi, K.J. Rountree, B.D. McCarthy, E.S. Rountree, T.T. Eisenhart, J.L. Dempsey, A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry, *J. Chem. Educ.* 95 (2018) 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>.

22. C.C. Liu, Electrochemical based biosensors, *Biosensors.* 2 (2012) 269–272. <https://doi.org/10.3390/bios2030269>.

23. W. Putzbach, N.J. Ronkainen, Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review, *Sensors (Switzerland)*. 13 (2013) 4811–4840. <https://doi.org/10.3390/s130404811>.

24. S. V Dzyadevych, V.N. Arkhypova, A.P. Soldatkin, A. V El, C. Martelet, N. Jaffrezic-renault, Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future Biocapteurs enzymatiques à transduction ampérométrique: passé, présent, futur, 29 (2008) 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.rbmret.2007.11.007>.

25. Y. Wu, S. Hu, Biosensors based on direct electron transfer in redox proteins Review Biosensors based on direct electron transfer in redox proteins, (2017). <https://doi.org/10.1007/s00604-007-0749-4>.

26. J. Xu, L. Wang, Carbon Nanomaterials, Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815053-5.00001-5>.

27. Z. Wang, Z. Dai, Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors: An overview, *Nanoscale.* 7 (2015) 6420–6431. <https://doi.org/10.1039/c5nr00585j>.

28. M.M. Shokrieh, R. Rafiee, Prediction of Young's modulus of graphene sheets and carbon nanotubes using nanoscale continuum mechanics approach, *Mater. Des.* 31 (2010) 790–795. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2009.07.058>.

29. U. Kamran, Y.J. Heo, J.W. Lee, S.J. Park, Functionalized carbon materials for electronic devices: A review, *Micromachines.* 10 (2019). <https://doi.org/10.3390/mi10040234>.

30. X. Li, J. Yu, S. Wageh, A.A. Al-Ghamdi, J. Xie, Graphene in Photocatalysis: A Review, *Small.* 12 (2016) 6640–6696. <https://doi.org/10.1002/sml.201600382>.

31. R. Sandulescu, M. Tertis, C. Cristea, E. Bodoki, New Materials for the Construction of Electrochemical Biosensors, *Biosens. - Micro Nanoscale Appl.* (2015) 1–36. <https://doi.org/10.5772/60510>.

32. E. Heydari-Bafroei, A.A. Ensafi, Typically used carbon-based nanomaterials in the fabrication of biosensors, Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816491-4.00004-8>.

33. J. Zhang, J. Zhang, F. Zhang, H. Yang, X. Huang, H. Liu, S. Guo, Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization, *Langmuir.* 26 (2010) 6083–6085. <https://doi.org/10.1021/la904014z>.

34. C.S. Griggs, V.F. Medina, Graphene and graphene oxide membranes for water treatment, *McGraw Hill Encycl. Sci. Technol.* (2016) 1–10. <https://doi.org/10.1036/1097-8542.YB150695>.

35. S. Pei, H.M. Cheng, The reduction of graphene oxide, *Carbon N. Y.* 50 (2012) 3210–3228. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.11.010>.

36. I. Sengupta, S. Chakraborty, M. Talukdar, S.K. Pal, S. Chakraborty, Thermal reduction of graphene oxide: How temperature influences purity, *J. Mater. Res.* 33 (2018) 4113–4122. <https://doi.org/10.1557/jmr.2018.338>.

37. L.J. Rajakovich, E.P. Balskus, Metabolic functions of the human gut microbiota: The role of metalloenzymes, *Nat. Prod. Rep.* 36 (2019) 593–625. <https://doi.org/10.1039/c8np00074c>.

38. C. Follmer, Insights into the role and structure of plant ureases, *Phytochemistry.* 69 (2008) 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.034>.

39. B. Krajewska, Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 59 (2009) 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.01.003>.

40. Urea, (2019). <https://www.britannica.com/science/urea> (žiūrėta 2020 m. balandžio 10 d.).

41. S. Jakhar, C.S. Pundir, Preparation, characterization and application of urease

- nanoparticles for construction of an improved potentiometric urea biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 100 (2018) 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.09.005>.
42. E. Dervisevic, M. Dervisevic, J.N. Nyangwebah, M. Şenel, Development of novel amperometric urea biosensor based on Fc-PAMAM and MWCNT bio-nanocomposite film, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.02.122>.
 43. G. Das, H.H. Yoon, Amperometric urea biosensors based on sulfonated graphene/polyaniline nanocomposite, *Int. J. Nanomedicine.* 10 (2015) 55–66. <https://doi.org/10.2147/IJN.S88315>.
 44. E. Muthusankar, V.K. Ponnusamy, D. Ragupathy, Electrochemically sandwiched poly(diphenylamine)/phosphotungstic acid/graphene nanohybrid as highly sensitive and selective urea biosensor, *Synth. Met.* 254 (2019) 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2019.06.012>.
 45. M. Dervisevic, E. Dervisevic, M. Şenel, Design of amperometric urea biosensor based on self-assembled monolayer of cystamine/PAMAM-grafted MWCNT/Urease, *Sensors Actuators, B Chem.* 254 (2018) 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.06.161>.
 46. M. Dervisevic, E. Dervisevic, M. Senel, E. Cevik, H.B. Yildiz, P. Camurlu, Construction of ferrocene modified conducting polymer based amperometric urea biosensor, *Enzyme Microb. Technol.* 102 (2017) 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.04.002>.
 47. S. Ferri, K. Kojima, K. Sode, Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: A bird's eye view of glucose sensing enzymes, *J. Diabetes Sci. Technol.* 5 (2011) 1068–1076. <https://doi.org/10.1177/193229681100500507>.
 - 48] J. Okuda, K. Sode, PQQ glucose dehydrogenase with novel electron transfer ability, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314 (2004) 793–797. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.167>.
 - [49. G. Li, H. Xu, W. Huang, Y. Wang, Y. Wu, R. Parajuli, A pyrrole quinoline quinone glucose dehydrogenase biosensor based on screen-printed carbon paste electrodes modified by carbon nanotubes, *Meas. Sci. Technol.* 19 (2008). <https://doi.org/10.1088/0957-0233/19/6/065203>.
 50. T.F. Tseng, Y.L. Yang, Y.J. Lin, S.L. Lou, Effects of electric potential treatment of a chromium hexacyanoferrate modified biosensor based on PQQ-dependent glucose dehydrogenase, *Sensors.* 10 (2010) 6347–6360. <https://doi.org/10.3390/s100706347>.
 - 51 G. Fusco, G. Göbel, R. Zanoni, E. Kornejew, G. Favero, F. Mazzei, F. Lisdat, Polymer-supported electron transfer of PQQ-dependent glucose dehydrogenase at carbon nanotubes modified by electropolymerized polythiophene copolymers, *Electrochim. Acta.* 248 (2017) 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.07.105>.
 52. J. Razumiene, A. Vilkanauskyte, V. Gureviciene, J. Barkauskas, R. Meskys, V. Laurinavicius, Direct electron transfer between PQQ dependent glucose dehydrogenases and carbon electrodes: An approach for electrochemical biosensors, *Electrochim. Acta.* 51 (2006) 5150–5156. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2006.03.058>.
 53. V. Flexer, F. Durand, S. Tsujimura, N. Mano, Efficient direct electron transfer of PQQ-glucose dehydrogenase on carbon cryogel electrodes at neutral pH, *Anal. Chem.* 83 (2011) 5721–5727. <https://doi.org/10.1021/ac200981r>.
 54. GLUCOSE DEHYDROGENASE (PQQ-dependent) from Microorganism. <http://www.toyobousa.com/enzyme-GLD-321.html> (žiūrėta 2020 m. gegužės 6 d.).
 55. L. R. Engelking, *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*, Academic Press, 2014. <https://books.google.lt/books?id=hX--AQAAQBAJ>.
 56. O.O. Soldatkin, V.M. Peshkova, O.Y. Saiapina, I.S. Kucherenko, O.Y. Dudchenko, V.G. Melnyk, O.D. Vasylenko, L.M. Semenycheva, A.P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych, Development of conductometric biosensor array for simultaneous determination of maltose, lactose, sucrose and glucose, *Talanta.* 115 (2013) 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.065>.
 57. S.J. Oak, R. Jha, The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59 (2019) 1675–1683. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1425977>.
 58. L.R. Engelking, *Carbohydrate Structure, Textb. Vet. Physiol. Chem.* (2015) 118–123. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-391909-0.50018-9>.
 59. J.G. D'Haese, G.O. Ceyhan, I.E. Demir, E. Tieftrunk, H. Friess, Treatment options in

painful chronic pancreatitis: A systematic review, *Hpb.* 16 (2014) 512–521. <https://doi.org/10.1111/hpb.12173>.

60. X. Yan, J. Chen, J. Yang, Q. Xue, P. Miele, Fabrication of free-standing, electrochemically active, and biocompatible graphene oxide-polyaniline and graphene-polyaniline hybrid papers, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2 (2010) 2521–2529. <https://doi.org/10.1021/am100293r>.

61. W.S. Hummers, R.E. Offeman, Preparation of Graphitic Oxide, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 1339. <https://doi.org/10.1021/ja01539a017>.

62. I. Šakinyte, J. Barkauskas, J. Gaidukevič, J. Razumiene, Thermally reduced graphene oxide: The study and use for reagentless amperometric d-fructose biosensors, *Talanta.* 144 (2015) 1096–1103. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.07.072>.

63. Electrical Conductivity: mho, siemens. https://www.electronicsnotes.com/articles/basic_concepts/resistance/electrical-conductivity-conductance.php (žiūrėta 2020 m. gegužės 4 d.).

64. A. Shrivastava, V. Gupta, Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, *Chronicles Young Sci.* 2 (2011) 21. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>.

65. α -Glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g5003?lang=en®ion=LT> (žiūrėta 2020 m. gegužės 6 d.).

66. G. Pavoski, T. Maraschin, F.D.C. Fim, N.M. Balzaretto, G.B. Galland, C.S. Moura, N.R.D.S. Basso, Few layer reduced graphene oxide: Evaluation of the best experimental conditions for easy production, *Mater. Res.* 20 (2017) 53–61. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2015-0528>.

67. M. Thommes, Physical adsorption characterization of nanoporous materials, *Chemie-Ingenieur-Technik.* 82 (2010) 1059–1073. <https://doi.org/10.1002/cite.201000064>.

68. M.S. Dresselhaus, A. Jorio, A.G. Souza Filho, R. Saito, Defect characterization in graphene and carbon nanotubes using Raman spectroscopy, *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 368 (2010) 5355–5377. <https://doi.org/10.1098/rsta.2010.0213>.

69. A.C. Ferrari, Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron-phonon coupling, doping and nonadiabatic effects, *Solid State Commun.* 143 (2007) 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.ssc.2007.03.052>.

70. K.N. Kudin, B. Ozbas, H.C. Schniepp, R.K. Prud'homme, I.A. Aksay, R. Car, Raman spectra of graphite oxide and functionalized graphene sheets, *Nano Lett.* 8 (2008) 36–41. <https://doi.org/10.1021/nl071822y>.

71. V. Laurinavicius, J. Razumiene, A. Ramanavicius, A.D. Ryabov, Wiring of PQQ-dehydrogenases, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2004) 1217–1222. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.05.012>.

72. F. Ivanauskas, I. Kaunietis, V. Laurinavičius, J. Razumienė, R. Šimkus, Apparent Michaelis constant of the enzyme modified porous electrode, *J. Math. Chem.* 43 (2008) 1516–1526. <https://doi.org/10.1007/s10910-007-9237-7>.

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

GINTARĖ RIMKUTĖ

Terminiškai redukuoto grafeno oksido tyrimas ir panaudojimas amperometriniuose trečios kartos biojutikliuose

Šiuo metu daug dėmesio sulaukia trečios kartos biojutikliai, kurių veikimas pagrįstas tiesiogine elektronų pernaša (TEP) tarp fermento aktyvaus centro ir elektrodo paviršiaus. Tačiau sukurti efektyviai veikiančius trečios kartos biojutiklius nėra lengva. Dėl to atsižengiama į anglines medžiagas, kurios pasižymi daugeliu unikalių savybių ir gali būti modifikuojamos įvairiomis funkcinėmis grupėmis.

Šio darbo tikslas – susintetinti terminiškai redukuoto grafeno oksido (TRGO) pavyzdžius, juos charakterizuoti ir pritaikyti amperometriniuose trečios kartos biojutikliuose. Modifikuotu Hummers'o metodu buvo susintetintas grafito oksidas (GO), kuris toliau terminiškai redukuotas gaunant tris TRGO frakcijas (TRGO1, TRGO2, TRGO3). Ištyrus anglines medžiagas, nustatyta, kad atlikus redukciją, struktūros dalinai susigrąžino elektrinį laidumą, prarado didžiąją dalį deguoninių funkcinių grupių ir jų tarpplotšūminiai atstumai sumažėjo. Didžiausias elektrinis laidumas ($2,31 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$ logaritminėje skalėje), mažiausias deguoninių funkcinių grupių kiekis ir mažiausias tarpplotšūminis atstumas ($0,697 \text{ nm}$) atskleidė, kad labiausiai redukuota buvo TRGO3.

Anglinės medžiagos – grafitas, GO ir TRGO frakcijos, buvo pritaikytos biojutikliuose, kurių biologinę dalį sudarė ureazė bei nuo pirolo chinolinchinono priklausoma gliukozės dehidrogenazė (PQQ-GDH). TEP buvo realizuota tik su TRGO frakcijomis. Tarp biojutiklių, kurie naudojo PQQ-GDH ir TRGO frakcijas, efektyviausiai veikė biojutiklis su TRGO2. Jo jautris siekė $77,7\pm 3,8 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. TRGO2 pasižymėjo didžiausiu paviršiaus plotu ($708,0\pm 0,3 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$), didžiausiu defektiškumu bei optimaliu deguoninių funkcinių grupių kiekiu, kas nulėmė didžiausią biojutiklio jautrumą. Visi biojutikliai dėl mažesnio molekulių dydžio buvo labiau atrankūs monosacharidams nei disacharidams, o nustatytos sistemų veikimui reikalingos optimalios sąlygos buvo 7,5 buferinio tirpalo pH vertė, 0,2–0,3 V darbinio potencialo vertės ir 10 mM buferinio tirpalo talpa. Palyginus biojutiklių su ureaze veikimą, nustatyta, kad biojutiklių su skirtingomis TRGO2 frakcijomis jautriai svyravo nuo $0,9\pm 0,04 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ iki $1,3\pm 0,03 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. Tokiomis pačiomis sąlygomis sintetintas TRGO2 frakcijas naudojančių biojutiklių jautris nėra identiškas, tačiau jis yra tinkamas ir kartu su ilga tiesine kalibracinės kreivės dalimi (iki 25 mM) leidžia sukonstruoti biojutiklius sėkmingai naudoti karbamido koncentracijos nustatymui.

Siekiant sukonstruoti biojutiklius ateityje pritaikyti medicinoje, trečios kartos GDH-TRGO biojutiklis buvo panaudotas sacharidų nustatymui realiose terpėse. Nustatyta, kad sukonstruotas GDH-TRGO biojutiklis yra tinkamas neinvaziniam β -D-gliukozės bei β -D-maltozės nustatymui, kai šlapimo mėginiai yra 10 kartų skiesti, o naudojamas darbinio elektrodo potencialas yra 0,1 V.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

GINTARĖ RIMKUTĖ

Investigation of thermally reduced graphene oxide and its application in amperometric third generation biosensors

Nowadays third-generation biosensors, which use direct electron transfer (DET) between the active site of enzyme and electrode surface, are receiving a lot of attention. However, it is not effortless to develop effectively operating third-generation biosensors. As a result, carbon materials are used, which have many unique properties and can be modified with various functional groups.

The purpose of this work was to synthesize samples of thermally reduced graphene oxide (TRGO), characterise and apply them in amperometric third-generation biosensors. Using modified Hummers' method graphite oxide (GO) was synthesized and thermally reduced thus obtaining three TRGO fractions (TRGO1, TRGO2, TRGO3). Investigation of materials revealed that after reduction, the structures partially regained electrical conductivity, lost most of their oxygen-containing functional groups and their interplanar spacings decreased. The highest electrical conductivity ($2.31 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$ on a logarithmic scale), lowest amount of oxygen-containing functional groups and smallest interplanar distance (0.697 nm) revealed that TRGO3 was the most reduced.

Carbon materials – graphite, GO and TRGO, were applied in biosensors, whose biological part consisted of urease and pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase (PQQ-GDH). DET was implemented only using TRGO. Among the biosensors with PQQ-GDH and TRGO fractions, the biosensor using TRGO2 was the most effective with sensitivity $77.7\pm 3.8 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. TRGO2 had the largest surface area ($708.0\pm 0.3 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$), the highest number of defects and optimal amount of functional groups, which determined the highest sensitivity of this biosensor. All biosensors were more selective for monosaccharides due to their smaller molecular size and the optimal conditions required for the bioanalytical systems to operate effectively were 7.5 buffer solution pH, 0.2–0.3 V working electrode potential values and 10 mM buffer solution capacity. Comparing the performance of biosensors with urease, it has been found out that the sensitivity of biosensors with different TRGO2 fractions varied from $0.9\pm 0.04 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ to $1.3\pm 0.03 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. The sensitivity of biosensors using synthesized TRGO2 fractions under the same conditions is not identical, but it is sufficient and, together with the long linear part of the calibration curve (up to 25 mM), allows the constructed biosensors to be successfully used for determination of urea concentration.

A third-generation GDH-TRGO biosensor was used to detect saccharides in real samples for future medical applications. The engineered GDH-TRGO biosensor was found to be suitable for the non-invasive detection of β -D-glucose and β -D-maltose when urine samples are diluted 10-fold while the working electrode potential is 0.1 V.