

VILNIAUS UNIVERSITETAS

EDITA VOITECHOVIČ

**OKSIDOREDUKTAZIŲ VEIKIMO
BIOELEKTROCHEMINĖSE SISTEMOSE TYRIMAS IR
TAIKYMAS**

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

VILNIUS, 2013

Disertacija rengta 2008-2012 metais Vilniaus universiteto Biochemijos institute.

Mokslinė vadovė:

dr. Julija Razumienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P).

Pratarmė

Jūs laikote savo rankose mano rimčiausią mokslinį darbą, kurį paruošiau per pastaruosius penkis metus. Tačiau nesugebėčiau tai padaryti, jei ne daugelis žmonių, kurie buvo šalia, mane mokino, palaikė, grūdino ir įkvėpė.

Visų pirmą aš dėkoju savo šeimos nariams: tėvams Danutai ir Stanislovui, sesei Veronikai, senelėms Sofijai ir Bronislavai, bei besiilsinčiam amžinybėje seneliui Tadeušiui už tai, jog yra mano tvirtovė, kur galiu pasislėpti nuo pačių sunkiausių išgyvenimų ir pasisemti jėgų.

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei dr. Julijai Razumienei už suteiktą galimybę atlikti mokslinį darbą bei visapusišką pagalbą ruošiant disertaciją, geranoriškumą, kantrybę ir supratimą, o taip pat šauniam Bioanalizės skyriaus kolektyvui: Vidutei Gurevičienei, Jadvygai Matulevič, dr. Bogumilai Kurtinaitienei, Nijolei Baliuckienei ir Algimantui Jonuškai.

Dėkoju dr. Andrejui Bratovui, dr. Natalijai Abramovai ir dr. Andrejui Ipatovui už nuostabų laiką praleistą Barselonos Mikroelektronikos institute (IMB-CNM, CSIC), už tai, jog pristatė tarptautinio lygio mokslo tyrimų galimybes, jog padėjo tada ir padeda dabar.

Taip pat dėkoju žmonėms, kurie davė medžiagas tyrimams, už jų geranoriškumą ir pagalbą: dr. Algirdui Palaimai, dr. Reginai Jančienei, dr. Rolandui Meškiui, dr. Irinai Bachmatovai, dr. Liucijai Marcinkevičienei, dr. Daivai Tauraitei, Jonitai Stankevičiūtei, Virginijai Dzekevičienei, prof. habil. dr. Jurgiui Barkauskui, Ievai Šakinytei, dr. Dhanai Lakshmi, prof. Sergejui Piletskiui, Juozui Puzui ir Kazimierui Vitkauskui.

Gerbiameji prof. habil. dr. Valdas Laurinavičius ir dr. Virginija Bukelskienė, nuoširdžiai dėkoju Jums, jog rėmėte, kritikavote ir padėjote su dokumentų ruošimu.

Dėkoju Lietuvos mokslo tarybai bei Valstybiniam studijų fondui už suteiktą finansinę paramą, o taip pat Lietuvos jaunųjų mokslininkų sąjungai už visapusišką paramą ir galimybes realizuoti save ne tik moksle.

Mano nuostabūs draugai ir kolegos: Marija, Justai, Ieva M., Rima, Mariau, Tada, Mindaugai, Božena, Ana, Ekaterina J., Ilja, Audriau ir kt., dėkoju Jums už nepamirštamą akimirką, kurios „saldino“ rutininį darbą! Natalia, Olenka, Peka, Liosha, Olia, Vitalij, Mira, Rūta, Justina, Jolanta, Milda, Asta ir visi kiti – Jus esate nuostabūs! Dėkoju Jums už tai, jog esate šalia ir palaikote mane! Olegai, dėkoju Tau, jog kovoji už mane, myli ir rūpiniesi! Gerbiamas mano treneri, Viktorai Kante, dėkoju Jums, jog išmokėte kautis, nebijoti sunkumų ir priešų!

Pratarmę norėčiau pabaigti paprasta Rusų patarle, kurios esmė tinkama ne tik kasdieniniame gyvenime, bet ir moksle, bei kuri motyvuoja nenuleisti rankų, kai ką bedarytum, viskas nesiseka:

Всё что ни делается – всё к лучшему.

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

Straipsniai žurnaluose, įrašytuose į Mokslinės informacijos instituto (ISI Web of Science) sąrašą

Razumienė J, Gurevičienė V, Voitechovič E, Barkauskas J, Bukauskas V, Šetkus A. Fine structure and related properties of the assembleable carbon nanotubes based electrode for a new family of biosensors with chooseable selectivity. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2011;11:9003-11.

Straipsniai žurnaluose, įrašytuose į ISI Master Journal List sąrašą

Voitechovič E, Razumienė J, Šakinytė I, Barkauskas J. Investigation of bioelectrocatalytic systems with PQQ-dependent GDH and carbonaceous materials. Biologija, 2010;56:83-7.

Barkauskas J, Razumienė J, Šakinytė I, Voitechovič E. Use of carbon nanomaterials for amperometric biosensors. Lectures Notes of the ICB Seminar. Micro- and Nanosystems in Biochemical Diagnosis. Principles and application, 2010;28-39.

Razumiene J, Voitechovic E, Bachmatova I, Marcinkeviciene L, Meskys R, Laurinavicius V. Electrochemical and spectrophotometric investigations of electron-transfer pathways in biocatalysis by PQQ-ADH. Biologija. 2008;54:171-3.

Straipsniai kituose leidiniuose:

Voitechovič E, Šakinytė I, Barkauskas J, Razumienė J. Grafito oksidacijos produktai: tyrimas ir taikymas bioelektrokatalizinėse sistemose. 15-osios tarptautinės studentų ir jaunųjų mokslininkų konferencijos „Chemija ir cheminė technologija, 2010“ medžiaga (skaitmeninė laikmena); 2010 m. gegužės 7 d.; Vilnius, LT.

Voitechovič E, Razumienė J, Gurevičienė V, Bachmatova I, Marcinkevičienė L. Oksidoreduktazių panaudojimas alkoholių ir angliavandenių nustatymui. Mokslinės konferencijos „Organinė chemija“ pranešimų medžiaga. – Kaunas, 2009 m. - Kaunas: Technologija, 2009, p. 76-81. ISBN 978-9955-25-663-2.

STAŽUOTĖS IR PROJEKTAI

Stažutės užsienio mokslo centruose:

2011 01 07 – 2011 02 28: Ispanijos Valstybinio Mikroelektronikos centro Barselonos Mikroelektronikos institutas. Bioelektrocheminių sistemų su PQQ priklausomais fermentais tyrimas elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodais. Vadovas: dr. Andrey Bratov.

Dalyvavimas projektuose:

Lietuvos mokslo tarybos finansuojamuose projektuose: „BIOSA“ (PBT 04/2010), „2xBioKat“ (N-09/2008); COST programos veikloje CM0701 bei „Doktorantų stažutės į užsienio mokslo centrus“ (2011 m.).

TURINYS

SANTRUMPŲ IR SUTARTINIŲ ŽYMĖJIMŲ SĄRAŠAS	7
ĮVADAS	10
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	12
MOKSLINIS NAUJUMAS	13
GINAMIEJI TEIGINIAI	14
1 LITERATŪROS APŽVALGA	15
1.1 FERMENTŲ VEIKIMAS ELEKTROCHEMINĖSE SISTEMOSE	15
1.2 BIOAMPEROMETRINĖS SISTEMOS	17
1.2.1 Pirmos kartos amperometriniai biojutikliai	20
1.2.2 Antros kartos amperometriniai biojutikliai	21
1.2.3 Trečios kartos amperometriniai biojutikliai	25
1.3 IMPEDIMETRINĖS BIOELEKTROCHEMINĖS SISTEMOS	26
1.4 BIOELEKTROCHEMINIŲ SISTEMŲ PRITAIKYMAS	29
1.4.1 Angliavandenių nustatymas	31
1.4.2 Alkoholių nustatymas	32
1.4.3 CO nustatymas	33
1.5 BIOELEKTROCHEMINĖS SISTEMOS SU NUO PQQ PRIKLAUSOMOMIS DEHIDROGENAZĖMIS	34
1.5.1 Bioelektrocheminės sistemos su tADH	35
1.5.2 Bioelektrocheminės sistemos su mADH	38
1.5.3 Bioelektrocheminės sistemos su GDH	41
1.5.4 Bioelektrocheminės sistemos su FDH	45
1.6 ĮŽVALGOS IR AKTUALIJOS	48
2 MEDŽIAGOS IR METODAI	49
2.1 MEDŽIAGOS	49
2.2 TIRPALAI	53
2.3 APARATŪRA	54
2.4 METODAI	55
2.4.1 Elektrodo ir jų paruošimas	55
2.4.2 Elektrodo modifikavimas polianilino polimeru	57
2.4.3 Elektrodo modifikavimas chinoniniais mediatoriais	58
2.4.4 Elektrodo modifikavimas chemiškai modifikuota amorfine anglimi ir įvairiais grafito oksidacijos produktais	58
2.4.5 Bioelektrocheminių sistemų paruošimas	59
2.4.6 Fermentų aktyvumo nustatymas spektrofotometrinio metodu	60
2.4.7 Chronoamperometriniai tyrimai	61
2.4.8 Ciklinės voltamperometrijos tyrimai	63
2.4.9 Elektrocheminio impedanso spektroskopijos tyrimai	63
2.4.10 Atominės jėgos mikroskopijos tyrimai	63
2.4.11 Anglies monoksido sintezė	64
2.4.12 Natyvių bei adsorbuotų ant anglies pastos elektrodo fermentų slopinimas anglies monoksidu	64
2.4.13 Alkoholių koncentracijos nustatymas alkoholiniuose gėrimuose	65
2.4.14 Galaktozės biokonversija į tagatozę	66
2.5 DUOMENŲ ANALIZĖ	66
2.5.1 Fermentų pK _a nustatymas	66

2.5.2	<i>Fermentų slopinimo ekstrapoliacinių kreivių grafinis vaizdavimas</i>	67
2.5.3	<i>Inaktyvacijos konstantų skaičiavimas</i>	67
2.5.4	<i>Bioamperometrinių sistemų I_{max}^{app} ir K_M^{app} skaičiavimas</i>	67
2.5.5	<i>Fermentų katalizuojamų reakcijų aktyvacijos energijos nustatymas</i>	68
2.5.6	<i>Elektrocheminio impedanso spektroskopijos duomenų analizė</i>	68
2.5.7	<i>Ciklinių voltamperogramų analizė</i>	69
2.5.8	<i>AJM metodu gautų anglinių paviršių duomenų apdorojimas</i>	71
3	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	73
3.1	NUO PQQ PRIKLAUSOMŲ ALKOHOLDEHIDROGENAZIŲ SAVYBĖS	73
3.1.1	<i>pH įtaka nuo PQQ priklausomų alkoholio dehidrogenazių aktyvumui</i>	73
3.1.2	<i>Tirpios ir membraninės alkoholdehidrogenazių elektronų pernaša bioamperometrinėse sistemose</i>	77
3.1.2.1	<i>MADH ir tADH elektronų pernaša homogeninėje aplinkoje</i>	78
3.1.2.2	<i>MADH elektronų pernaša heterogeninėje aplinkoje</i>	80
3.1.3	<i>Nevandeninės terpės įtaka mADH ir tADH veikimui heterogeninėje aplinkoje</i>	82
3.2	IMPEDIMETRINĖS FERMENTINĖS SISTEMOS	84
3.2.1	<i>3D-IDEA elektrodų modifikavimas ir poliNDDEAEA savybės</i>	84
3.2.2	<i>TADH impedimetrinė sistema</i>	86
3.2.3	<i>MADH ir GDH impedimetrinės sistemos</i>	88
3.2.4	<i>Chronamperometriniai sistemų su tADH, mADH, GDH ir poliNDDEAEA tyrimai</i>	89
3.3	AMPEROMETRINĖS FERMENTINĖS SISTEMOS	90
3.3.1	<i>Sistemos su GDH</i>	91
3.3.1.1	<i>GDH veikimas ant anglies pastos elektrodų</i>	92
3.3.1.2	<i>GDH veikimas ant PVA modifikuotos ląsano plėvelės</i>	94
3.3.1.3	<i>GDH atrankumas substratams</i>	99
3.3.2	<i>Sistemos su tADH</i>	101
3.3.2.1	<i>TADH veikimas ant anglies pastos elektrodų</i>	102
3.3.2.2	<i>TADH veikimas ant PVA modifikuotos pusiau pralaidžios ląsano plėvelės</i>	103
3.3.2.3	<i>TADH veikimas ant grafito oksidacijos produktais modifikuotų anglies pastos elektrodų</i>	106
3.3.2.4	<i>Grafito oksidacijos produktų paviršiaus morfologijos charakteristikos</i>	108
3.3.2.5	<i>TADH atrankumas substratams</i>	110
3.3.3	<i>Sistemos su mADH</i>	111
3.3.3.1	<i>MADH atrankumas substratams</i>	113
3.3.4	<i>Sistemos su FDH</i>	114
3.3.4.1	<i>Naujų chinoninių mediatorių elektrocheminės savybės</i>	115
3.3.4.2	<i>Bioamperometrinių sistemų su FDH ir chinoniniais mediatoriais charakteristikos</i>	120
3.3.4.3	<i>FDH atrankumas substratams</i>	125
3.4	BIOELEKTROCHEMINIŲ SISTEMŲ PRITAIKYMAS	127
3.4.1	<i>Alkoholių amperometriniai biojutikliai</i>	127
3.4.2	<i>CO indikatorinė sistema</i>	128
3.4.3	<i>D(-)-tagatozės sintezės ir stebėjimo sistemos</i>	129
	IŠVADOS	132
	CITUOTI LITERATŪROS ŠALTINIAI	134

SANTRUMPŲ IR SUTARTINIŲ ŽYMĖJIMŲ SĄRAŠAS

Matematiniai žymėjimai:

A –	elektrodo plotas	pK_a –	rūgšties disociacijos konstantos dešimtainis logaritmas
C –	elektrinė talpa	R –	varža
CI –	elektrodo geometrinė elektrinė talpa	$R1$ –	polimero sluoksnio varža
CPE –	pastovios fazės elementas	$R2$ –	tirpalo sąlyčio ribos varža
$CPE1$ –	tirpalo sąlyčio ribos elektrinė talpa	R_d –	universalioji dujų konstanta
E –	darbinio elektrodo potencialas	S_{10} –	paviršiaus „dešimties taškų“ aukštis
E^0 –	standartinis redokso potencialas	S_a –	paviršiaus vidutinis šiurkštumas
E'_0 –	formalusis standartinis redokso potencialas	S_k –	paviršiaus ekscesas
E_F^0 –	standartinis fermento redokso potencialas	S_s –	paviršiaus šiurkštumo asimetrija
E_M^0 –	standartinis mediatoriaus redokso potencialas	T –	temperatūra
E_a –	aktyvacijos energija	v –	fermentinės reakcijos greitis
E_{pa} –	oksidacijos potencialas	v_0 –	pradinis fermentinės reakcijos greitis
E_{pc} –	redukcijos potencialas	v_{max} –	maksimalus fermentinės reakcijos greitis
f –	dažnis	v_p –	potencialo skleidimo greitis
F –	Faradėjaus konstanta	Z –	elektrocheminės celės impedansas
h –	Hill'o koeficientas	Z_{im} –	menamas impedanso komponentas
I –	srovės stipris	Z_{re} –	realus impedanso komponentas
I_{max}^{app} –	tariamasis fermentinės redokso reakcijos maksimalus srovės stipris	α –	krūvio pernašos koeficientas, vykstant redukcijos procesui
I_{pa} –	oksidacinės srovės smailės maksimumas	β –	krūvio pernašos koeficientas, vykstant oksidacijos procesui
I_{pc} –	redukcinės srovės smailės maksimumas	ε –	molinis sugerties koeficientas
j –	menamas skaičius	λ –	šviesos bangos ilgis
K –	suminė konstanta	θ –	fazės pokytis tarp potencialo ir srovės
k^0 –	standartinė elektronų pernašos greičio konstanta	Γ_R –	elektroaktyvios medžiagos kiekis
k_{in} –	inaktyvacijos konstanta		
K_M –	Michaelio konstanta		
K_M^{app} –	tariamoji Michaelio konstanta		
n –	elektronų skaičius		

Teksto sutrumpinimai:

1F – 2-(2-fluoro(fenil)amino)- cikloheksa-2,5-dien-1,4-dionas
1M – 2-(2-metoksi(fenil)amino)- cikloheksa-2,5-dien-1,4-dionas
2F – 2-(4-fluoro(fenil)amino)- cikloheksa-2,5-dien-1,4-dionas
2M – 2-(4-metoksi(fenil)amino)- cikloheksa-2,5-dien-1,4-dionas
AJM – atominės jėgos mikroskopas
ANV – anglies nanovamzdeliai
A_{ox} – oksiduotas elektronų akceptorius
AOx – alkoholio oksidazė
APE – anglies pastos elektrodas
A_{red} – redukuotas elektronų akceptorius
Arg – argininas
Asn – asparaginas
Asp – asparto rūgštis
ATF – adenzintrifosfatas
AuME – aukso mikroelektrodas
BBen – 2,5-bis[metil(fenil)amino]- cikloheksa-2,5-dien-1,4-dionas
Ben – 2-[metil(fenil)amino]- cikloheksa-2,5-dien-1,4-dionas
BOx – bilirubino oksidazė
BQ – *p*-benzochinonas
BSA – jaučio serumo albuminas
ChMA – chemiškai modifikuota amorfinė anglis
Cys – cisteinas, aminorūgštis
Cst – amorfinė anglis „Raven M“
CV – ciklinė voltamperograma
DCFIF – dichlorfenolindofenolis
dEP – dvielektroninis elektronų pernašos kelias
DNR – dezoksiribonukleino rūgštis
DSANV – daugiasieniai anglies nanovamzdeliai
EDTA – etilendiamintetraacetatas
EG – elektroninė ekvivalentinė grandinė
EIS – elektrocheminio impedanso spektroskopija
EP – elektronų pernaša
FAD – flavinadenindinukleotidas, oksiduota forma, FADH₂ – redukuota forma
FDH – nuo PQQ priklausoma membraninė fruktozės dehidrogenazė
FMS – fenazinmetosulfatas
GDH – nuo PQQ priklausoma periplaziminė gliukozės dehidrogenazė
GE – grafito strypo elektrodas
Glu – glutamo rūgštis
GO – grafito oksidas
GOx – gliukozės oksidazė
His – histidinas, aminorūgštis
HPR – krienų peroksidazė
IDEA – adresuojamojo kontakto elektrodų matricos, 3D-IDEA – erdviniai IDEA

IMB-CNM, CSIC – Barcelonos mikroelektronikos institutas, ispan. *Instituto de Microelectrónica de Barcelona – Centro Nacional de Microelectrónica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas*

IUPAC – angl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*

JS – joninis skystis

JS₁ – tetrakis-(2-hidroksietil)amonio trifluorometansulfonatas

JS₂ – 1-iso-butil-3-metilimidazolio dicianamidas

JS₃ – 1-iso-pentil-3-metilimidazolio dicianamidas

KF – kalio heksacianoferatas, K₃[Fe(CN)₆]

Lys – lizinas, aminorūgštis

mADH – nuo PQQ priklausoma III tipo membraninė alkoholio dehidrogenazė

MET – mediatorinė elektronų pernaša

MN – 2-(3-nitro(fenil)amino)-cikloheksa-2,5-dien-1,4-dionas

Mut33 – GDH mutantas, žr. 2.1 sk.

Mut35 – GDH mutantas, žr. 2.1 sk.

Mut42 – GDH mutantas, žr. 2.1 sk.

NAD(P)⁺ – nikotinamadenindinukleotidas (fosfatas), oksiduota forma, NAD(P)H – redukuota forma

NDDEAEA – N-(N',N'-dietilditiokarbamoiletilamidoetil)anilinas

OG-1P – grafito oksidacijos produktas, žr. 2.1 sk.

OG-1S – grafito oksidacijos produktas, žr. 2.1 sk.

OG-2P – grafito oksidacijos produktas, žr. 2.1 sk.

OG-2S – grafito oksidacijos produktas, žr. 2.1 sk.

PANI – polianilinas

poliNDDEAEA – poli(N-(N',N'-dietilditiokarbamoiletilamidoetil)anilinas

PQQ – pirolo chinolinchinonas

PVA – polivinilo alkoholis

SAM – savitvarkis monosluoksnis

Ser – serinas

tADH – nuo PQQ priklausoma IIG tipo periplazminė alkoholio dehidrogenazė

TAI – termofilinė arabinozės izomerazė

TEP – tiesioginė elektronų pernaša

Tris – tris-[hidroksimetil]-aminometanas

vEP – vienelektroninis elektronų pernašos kelias

ĮVADAS

Sparčiai besivystančiai pramonei medicinos, mikrobiologijos, maisto, aplinkosaugos srityse reikalingi platų spektrą analičių ir jų itin mažas koncentracijas matuojantys prietaisai bei efektyvias konversijas atliekantys reaktoriai. Tokių prietaisų selektyvumą ir efektyvumą užtikrintų biokatalizatorių panaudojimas. Biokatalizatorių vaidmenį dažniausiai atlieka fermentai. Tačiau, nepaisant fermentų unikalių savybių, jie yra brangūs ir trumpalaikiai. Todėl, neįsisavinus pigių imobilizacijos metodų, kurie užtikrintų jų daugkartinį ir ilgalaikį veikimą, fermentų panaudojimas nebus pakankamai efektyvus.

Iš kitos pusės, realios terpės, kuriose turėtų veikti sukurti prietaisai, dažniausiai yra neskaidrūs tirpalai, frakcionuoti, disperguoti, turintys įvairias kitas daugiakomponentes organines medžiagas. Todėl, kalbant apie analizei skirtus prietaisus, dominančios medžiagos kokybinis ir kiekybinis nustatymas yra labai komplikotas ir terpės prigimtis labai apsunkina jautrių spektrofotometrinių metodų panaudojimą. Elektrocheminių metodų taikymas sprendžia daugumą šių problemų, o atliekama analizė yra greita, kas ypač aktualu medicinoje ir žymiai pigesnė, lyginant su imunologiniais metodais. Todėl prietaisų kūrimas bioelektrocheminių sistemų pagrindu yra perspektyvus. Be to, bioelektrocheminėse sistemose ta pati medžiaga gali atlikti ir fermentų imobilizavimo matricos ir signalo vertiklio (šiuo atveju elektrodo) vaidmenį, kas iš dalies galėtų supaprastinti prietaisų konstravimo procedūras. Paminėtina ir tai, kad bioelektrochemines sistemas lengva miniatiūrizuoti, o jų pagrindu kurti mikrodydžio lustus, arba priešingai, didelio paviršiaus ploto reaktorius su imobilizuotais biokatalizatoriais, priklausomai nuo šiuolaikinės technologijos poreikio [1-2].

Bioelektrocheminių sistemų konstravimui dažniausiai naudojami fermentai yra oksidoreduktazės. Taikomojo aspektu buvo plačiai tirtos gliukozės (GOx) ir alkoholio (AOx) oksidazės, krienų peroksidazė (HRP), o taip pat įvairios lakazės, monooksigenazės, katalazės ir kt. Tačiau, nepaisant šių populiarių fermentų pritaikymo ir išsamių fundamentinių duomenų, yra ieškoma kitų

oksidoreduktazių, kurios būtų pranašesnės, stabilesnės, pasižymėtų didesniu substratiniu specifiškumu, o taip pat lengvai išskiriamos ir modifikuojamos. Vieni tokių fermentų yra chinobaltymai ir chinohemobaltymai. Jiems priskiriamos nuo pirolo chinolinchinono (PQQ) priklausančios dehidrogenazės. Tačiau apie juos dar nėra sukaupta pakankamai fundamentinių duomenų ir neištirtos pritaikymo galimybės. Be to, atrandami vis nauji chinobaltymai.

Šiame darbe buvo sukurtos ir ištirtos kelios naujos bioelektrocheminės sistemos nuo PQQ priklausomų dehidrogenazių pagrindu: membraninės alkoholio dehidrogenazės, išskirtos iš *Gluconobacter sp. 33* (mADH); periplazminės alkoholio dehidrogenazės, išskirtos iš *Pseudomonas putida* HK5 (tADH); periplazminės gliukozės dehidrogenazės, išskirtos iš *Acinetobacter calcoaceticus* (GDH) ir fruktozės dehidrogenazės, išskirtos iš *Gluconobacter industrius* išorinės membranos (FDH). Šie fermentai gali tiesiogiai reoksidotis ant kai kurių specialių elektrodų paviršių ir pasižymi plataus spektro substratiniu specifiškumu. Be to, jų katalizei nedaro įtakos aplinkoje esantis molekulinis deguonis. Todėl tokios fermentų savybės yra ypač naudingos kuriant jautrias bioelektrochemines sistemas veikiančias ne tik aerobinėmis, bet ir anaerobinėmis sąlygomis.

Siekiant sukurti elektrochemines sistemas, naudojančias biokatalizatorius ir veikiančias realioje terpėje, būtina optimizuoti fermentų veikimą šiose sistemose bei žinoti sistemų charakteristikas. Todėl fermento substrato atpažinimo mechanizmų išaiškinimas, medžiagos ir krūvių judėjimo sistemoje modeliavimas bei procesą limituojančių faktorių visumos ir dydžio įvertinimas yra viena iš aktualiausių šiuolaikinio mokslo sričių. Nes tik aiškiai apibrėžtas molekulės veikimas kitų molekulių apsuptyje sukuria sąlygas tikslingai manipuluoti tomis molekulėmis ir prognozuoti jų veikimą [3].

Todėl šiame darbe, kuriant bioelektrochemines sistemas, buvo atlikta paieška nuo PQQ priklausomų dehidrogenazių veikimui tinkamų elektrodinių paviršių ir imobilizavimo būdų, optimizuojamos fermentų veikimo sąlygos, įvertinta heterogeninės, homogeninės ir nevandeninės aplinkos įtaka fermentų veikimui ir ištirti elektronų pernašos (EP) keliai. Gauti rezultatai buvo

pritaikyti kuriant amperometrinius biojutiklius skirtus alkoholių, angliavandenių ir CO nustatymui. Taip pat buvo konstruojamas retojo cukraus D-(-)-tagatozės gavimo bioreaktorius naujai išskirtos termofilinės arabinozės izomerazės iš *Gluconobacter lituanicus* 5 (TAI) pagrindu ir pasiūlyti du būdai tagatozės koncentracijos pokyčiams matuoti.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Ištirti nuo pirolo chinolinchinono (PQQ) priklausomų oksidoreduktazių: membraninės alkoholio dehidrogenazės iš *Gluconobacter sp. 33* (mADH), periplazminės alkoholio dehidrogenazės iš *Pseudomonas putida* HK5 (tADH), periplazminės gliukozės dehidrogenazės iš *Acinetobacter calcoaceticus* (GDH) ir membraninės fruktozės dehidrogenazės iš *Gluconobacter industrius* (FDH) veikimą homogeninėje ir heterogeninėje aplinkose ir jų pagrindu sukurti naujas bioelektrokatalizines sistemas.

Darbo uždaviniai:

1. Ištirti nuo PQQ priklausomų alkoholdehidrogenazių savybes: aktyvumo priklausomybę nuo buferinio tirpalo pH, elektronų pernašos kelius heterogeninėse sistemose ir terpės su organiniais priedais įtaką šių dehidrogenazių veikimui heterogeninėje aplinkoje.

2. Ištirti tADH, mADH ir GDH veikimą impedimetrinėse bioelektrocheminėse sistemose su poli(N-(N',N'-dietilditiokarbamoiletilamidoetil)anilinu.

3. Sukurti ir charakterizuoti amperometrines fermentines sistemas užtikrinančias efektyvią bioelektrokatalizę: parenkant skirtingas anglines elektrodines medžiagas, chinoninius mediatorius, išbandant įvairius fermentų imobilizavimo būdus.

4. Pritaikyti sukurtas bioelektrochemines sistemas alkoholių, angliavandenių ir CO detekcijai.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Nuo PQQ priklausomų dehidrogenazių – tADH, mADH, GDH ir FDH savybės tokios, kaip platus specifiskumas angliavandeniams ir alkoholiams, gebėjimas veikti anaerobinėmis sąlygomis bei tiesiogiai reoksiduotis ant tam tikrų elektrodinių paviršių, yra perspektyvios, kuriant elektrocheminius biosintezės ir bioanalizės įrenginius. Tačiau šių fermentų savybės, kai biokatalizatoriai veikia heterogeninėje aplinkoje, nėra iki galo išaiškintos. Todėl šiame darbe buvo įvertinta heterogeninės aplinkos įtaka tADH, mADH, GDH ir FDH specifiskumui įvairiems fermentų substratams, ištirtos veikimo galimybės joniniuose skysčiuose, kurie gali būti panaudoti vandenyje netirpių organinių medžiagų tirpinimui, bei išaiškinti elektronų pernašos keliai bioamperometriniuose sistemose su šiais fermentais. Siekiant sukurti efektyviai ir stabiliai veikiančias sistemas, išbandyti nauji fermentų imobilizavimo būdai, naujos elektrodinės ir mediatorinės medžiagos, bei optimizuotas biokatalizatorių veikimas heterogeninėje aplinkoje. Bioamperometrinės sistemos su alkoholio dehidrogenazėmis gali būti taikomos alkoholių ir CO nustatymui. Bioamperometrinės sistemos FDH ir 2-(3-nitro(fenil)amino)-cikloheksa-2,5-dien-1,4-dionu pagrindu sukurtas biojutiklio prototipas, kuris gali būti panaudotas tagatozės nustatymui.

GINAMIEJI TEIGINIAI

- 1) Imobilizuotų nuo PQQ priklausomų dehidrogenazių specifiskumas substratams skiriasi nuo natyvių fermentų ir priklauso nuo heterogeninės aplinkos, kurioje jie veikia.
- 2) Heterogeninėje aplinkoje nuo PQQ priklausomų fermentų reoksidacija galima tiesiogiai pernešant elektronus nuo PQQ molekulės ant elektrodo paviršiaus, jei energetiškai palankesnė elektronų pernaša negalima.
- 3) Nuo PQQ priklausomų dehidrogenazių imobilizacija ant polivinilo alkoholiu modifikuotos pusiau pralaidžios lavsano plėvelės užtikrina efektyvų fermentų veikimą daugiau nei pusę metų.
- 4) Bioamperometrinė sistema su FDH ir 2-(3-nitro(fenil)amino)-cikloheksa-2,5-dien-1,4-dionu yra tinkama D-(-)-tagatozės nustatymui.

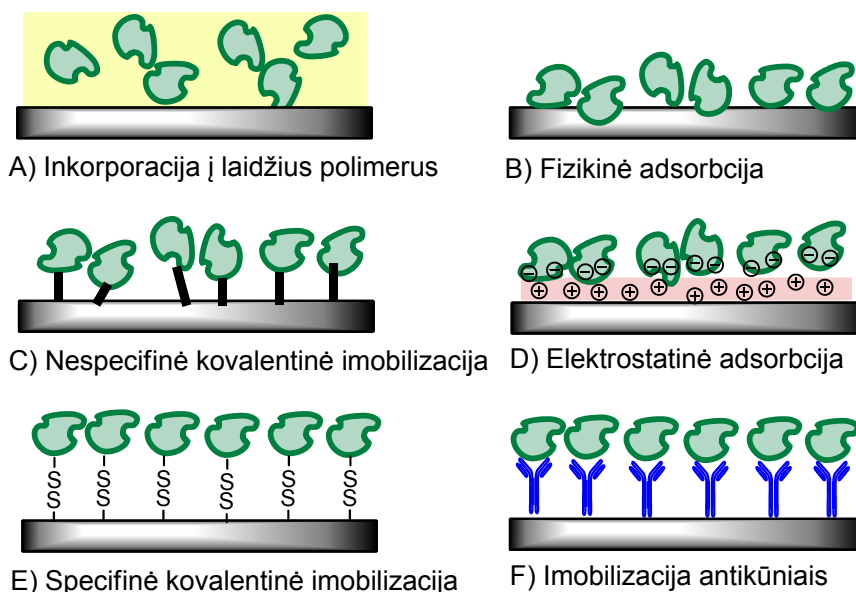
1 LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Fermentų veikimas elektrocheminėse sistemose

Platus fermentų taikymas elektrocheminėse sistemose prasidėjo nuo Clark ir Lyons darbų, kai jie, panaudoję GOx, sukonstravo ir aprašė gliukozės koncentraciją kraujyje matuojantį fermentinį elektrodą [4]. Terminą „*fermentinis elektrodas*“ pastaruoju metu vis dažniau pakeičia terminas „*bioelektrocheminė sistema*“.

Bioelektrocheminėje sistemoje fermentas gali veikti kaip natyvus (homogeninėje aplinkoje) arba kaip imobilizuotas, t.y. heterogeninėje aplinkoje. Jeigu fermentas veikia heterogeninėje aplinkoje, tai jam galios kiek kitokie dėsningumai nei jis dirbtų homogenėje aplinkoje. Kadangi fermentas yra baltyminės prigimties molekulė, jo aktyvumas gali mažėti priklausomai nuo aplinkoje atsirandančių slopiklių, dėl jų funkcinių grupių oksidacijos, kofermentų disociacijos ar dėl aplinkos mikroorganizmų veiklos, o taip pat ir veikiant temperatūros svyravimams, esant nepalankiam pH ir kt.[5]. Siekiant stabilizuoti baltymines molekules ir optimizuoti fermento veikimą, kuriamos įvairios fermentų imobilizavimo ant elektrodo paviršiaus metodikos. Pastaruoju metu jau yra žinoma nemažai imobilizavimo būdų. Juos galima suskirstyti į fizikinius bei cheminius, kurie savo ruožtu skirstomi į kelias grupes [6-8]:

- ◇ įterpimas į polielektrolitinius laidžius polimerus (1.1 pav., A);
- ◇ fizikinė adsorbicija (1.1 pav., B);
- ◇ nespecifinė kovalentinė imobilizacija (1.1 pav., C);
- ◇ elektrostatinė adsorbicija (1.1 pav., D);
- ◇ specifinė kovalentinė imobilizacija (1.1 pav., E);
- ◇ imobilizacija antikūnais (1.1 pav., F).



1.1 pav. Fermento imobilizacijos ir orientavimo ant elektrodo schemas. Žaliai pažymėtas fermentas, mėlynai - antikūnis, pilkai – elektrodas.

Imobilizuotų fermentų veikimas heterogeninėje aplinkoje priklauso nuo elektrodo paviršiaus savybių ir imobilizavimo būdo, kadangi galimi imobilizuotų fermentų tretinės ar/ir ketvirtinės struktūros pokyčiai. Tai gali pakeisti fermentų savybes, pvz., substratinį specifiškumą ar pH optimumą [5-6, 9]. Imobilizuotų fermentų bioelektrokatalizės efektyvumą dažniausiai nulemia keli faktoriai [10]:

- ◇ išorinių ir/arba vidinių difuzinių apsunkinimų buvimas;
- ◇ sterinių apsunkinimų atsiradimas reakcijose su makromolekuliniiais substratais;
- ◇ elektrostatinės, hidrofobinės ar kt. sąveikos efektai, susiję su substratų, slopiklių, H^+ jonų perskirstymų tarp vandeninio tirpalo ir elektrodinės matricos.

Todėl fermento vykdomos reakcijos kinetinės lygtys ir apskaičiuojami tariamieji kinetiniai parametrai nustatomi, įvertinant šių faktorių įtaką [5, 9].

Taip pat didelę reikšmę fermento veikimui ant elektrodo turi jo orientacija. Buvo parodyta, kad tarp fermento ir elektrodo tiesioginė elektronų pernaša (TEP) (žr. 1.2.3 sk.) gali vykti tik tuo atveju, jei jo aktyvusis centras yra ne toliau nei 15 Å nuo elektrodo paviršiaus [7, 11].

Elektronų pernašos (EP) dėsningumus biologinėms sistemoms aprašė Marcus. Pagal jo teoriją EP nuo vienos molekulės (ar jono) ant kitos yra viena labiausiai paplitusių elementariųjų reakcijų, kurios dažniausiai vyksta skystoje terpėje (pagrindinai vandeniniuose tirpaluose). Nustatyti svarbiausi veiksniai, darantys įtaką EP procesams yra [8, 11]:

- ◇ elektrovaros jėga, t. y. procese dalyvaujančių redokso grupių potencialų skirtumas;
- ◇ redokso grupių reorganizacinė energija;
- ◇ atstumas tarp procese dalyvaujančių redokso centrų.

Daugelyje biologinių sistemų EP nėra proceso limituojanti stadija net esant gana dideliems atstumams tarp redokso grupių. Tai įmanoma dėl to, kad tarp pirminio elektronų donoro ir galutinio akceptorius yra papildomų redokso grupių, pavyzdžiui, hemų, Fe-S klasterių ar įkrautų aminorūgščių šoninių radikalų bei mediatorių. Tokios sistemos vadinamos biologiniais „laidais“ ar redokso grandinėmis, tačiau EP mechanizmas jose daugeliu atveju lieka neaiškus [9, 12]. Kai fermentas veikia heterogeninėje sistemoje jo elgseną įtakos papildomi faktoriai, tokie kaip imobilizavimo matricos elektrostatinės savybės, erdvinė struktūra, hidrofobiškumas ir kt. Dėl šių faktorių įtakos fermento veikimo pokyčius būtina įvertinti susiejant su konkrečia heterogenine aplinka ir praktinio taikymo poreikiais [10]. Todėl šiame darbe buvo tiriamos įvairiomis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis pasižyminčios fermentų imobilizavimo matricos: cheminiais ir fizikiniais būdais modifikuotos anglinės medžiagos, chemiškai modifikuotas polianilino polimeras, o taip pat polivinilo alkoholis (PVA) ir auksas.

1.2 Bioamperometrinės sistemos

Bioamperometrinių sistemų veikimas yra paremtas elektrochemiškai aktyvaus junginio oksidacija arba redukcija ant darbinio elektrodo paviršiaus, esant pastoviam darbiniam elektrodo potencialui [6]. Termodinamiškai kontroliuojamai sistemai darbinio elektrodo potencialą (E) galima išreikšti,

panaudojus oksiduotoje ir redukuotoje formoje elektronų akceptorius koncentracijas (A_{ox} ir A_{red} atitinkamai), Nernsto lygtimi:

$$E = E^0 + \frac{2,3R_d T}{nF} \log \frac{A_{ox}}{A_{red}} \quad (1-1),$$

kur E^0 – standartinis virsmo redokso potencialas; R_d – universalioji dujų konstanta, T – temperatūra, n – elektronų skaičius EP reakcijoje, F – Faradėjaus konstanta.

Neigiamos E^0 reikšmės liudija apie redukcijos procesą, tuo tarpu, teigiamos nurodo oksidacijos procesą. Elektrodu tekanti srovė, atsirandanti oksiduotos/redukuotos būsenos pakitimo metu, vadinama *faradėjine srove*. Ši srovė tiesiogiai apibūdina redokso reakcijos greitį. Tačiau daugelio bioamperometrinių sistemų generuojama srovė – tai redokso procesų, kurie vyksta ant elektrodo paviršiaus, esant pastoviam E , faradėjinių ir nefaradėjinių srovių suma, kas padaro EP bei redokso procesų eiliškumą šiose sistemose sudėtingu [6].

Redokso procesus amperometrinėse sistemose galima santykinai suskirstyti į keletą stadijų. Lėčiausia stadija – tai redokso procesų greitį limituojanti stadija. Dažniausiai redokso reakcijų greitį limituojanti stadija yra elektroaktyvių dalelių masės transportas prie elektrodo paviršiaus, EP ant elektrodo bei produkto transportas nuo elektrodo paviršiaus atgal į tirpalą. Tačiau sudėtingos redokso reakcijos apjungia papildomus cheminius ir ant elektrodo paviršiaus vykstančius procesus, kurie vyksta ankščiau arba kartu su nagrinėjamu redokso procesu [6, 9]. Būtent kokia stadija limituos redokso procesą, galima apspręsti parenkant redokso porą, kurios oksidacijos ar redukcijos srovė bus matuojama, bei varijuojant eksperimento sąlygomis (elektrodo tipas, elektrodinė medžiaga, mediatoriaus naudojimas, E ir pan.). Kai reakcija kontroliuojama tik elektroaktyvių dalelių patekimo ant elektrodo paviršiaus greičiu (greita EP), laikoma, kad srovę limituoja masės transportas. Redokso reakcijos, vadinamos grįžtamomis tada, kai jų greitį apsprendžia termodinaminiai aspektai. Paprastai amperometrinėse ir bioamperometrinėse sistemose naudojamos masės transportu apspręsti redokso procesai, nes

termodinamiškai apsunkintų procesų naudojimas yra komplikuotas kuriant biojutiklius ir bioreaktorius [6].

Bioamperometrinėse sistemose fermentų katalizuojamų reakcijų aprašymas ir gautų voltamperogramų bei chronoamperogramų interpretavimas yra pakankamai komplikuotas, nes į kuriamą kinetinį modelį turi įeiti ne vien fermento katalizuojamos reakcijos kinetiniai aspektai, bet ir substratų, produktų, susidarančių tarpinių junginių, krūvių persiskirstymo, difuzijos, aplinkos įtakos ir kt. kinetiniai aspektai. Be to, dažnai sunkiai taikytini pusiausvyrinės kinetikos dėsniai. Tačiau, turint paprastas sistemas, fermentų kinetinės charakteristikos aprašomos naudojant klasikinį pusiausvyrinės kinetikos Michaelio ir Menten modelį [12]. Fermento katalizuojamos reakcijos greičio (v) priklausomybė nuo substrato koncentracijos ($[S]$) aprašoma Michaelio-Menten kinetine lygtimi:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (1-2),$$

kur v_{max} – maksimalus reakcijos greitis, o K_M – Michaelio konstanta, apibūdina tokią substrato koncentraciją, kuriai esant fermentinės reakcijos greitis yra $v_{max}/2$ [13].

Paprastose amperometrinėse sistemose ši lygtis transformuojama panaudojant matuojamą srovės stiprį (I):

$$I = \frac{I_{max}^{app}[S]}{K_M^{app} + [S]} \quad (1-3),$$

kur I_{max}^{app} – tariamas fermentinės redokso reakcijos maksimalus srovės stipris, K_M^{app} – tariamoji Michaelio konstanta, nusakanti tokią substrato koncentraciją, kuriai esant fermentinės sistemos generuojamas srovės stipris yra $I_{max}^{app}/2$ [12].

K_M^{app} visada yra didesnė nei K_M , nes paprastai srovės stipris apsprendžiamas substrato difuzija iki fermento aktyviojo centro ir vėlesne fermento reoksidacija ant elektrodo paviršiaus.

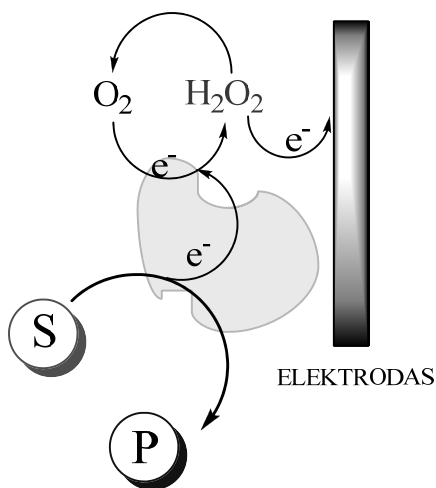
Kitais atvejais, priklausomai nuo bioamperometrinės sistemos sudėtingumo, redokso porų skaičiaus, elektrodinės medžiagos tipo ir pan., visas redokso proceso reakcijas, įskaitant fermentinę reakciją, fermento

reoksidaciją bei EP ant elektrodo paviršiaus yra aprašomos kiekvienu atveju skirtingai. Todėl fermentų veikimas skirtingose amperometrinėse sistemose yra specifinis ir aprašomas taikant individualų veikimo matematinį modelį.

Kuriant amperometrines fermentines sistemas, viena iš pagrindinių užduočių yra parinkti tinkamą fermento imobilizavimo metodiką bei užtikrinti efektyvią EP tarp substrato ir elektrodo [14]. Priklausomai nuo EP būdo tarp fermento aktyviojo centro ir elektrodo paviršiaus, amperometriniai biojutikliai santykinai suskirstyti į tris kartas [8]. Tokiu principu gali būti suskirstytos ir kitos bioelektrocheminės sistemos, kuriose vyksta elektronų mainai tarp bio-komponento ir elektrodo. Plačiau apie bioelektrocheminių sistemų pritaikymą biojutiklių kūrime ir pačius biojutiklius aptariama 1.4 skyriuje. Šio skyriaus poskyriuose aptariami EP būdai ir, priklausomai nuo jų, bioelektrocheminių sistemų konstravimo bei veikimo galimybės.

1.2.1 Pirmos kartos amperometriniai biojutikliai

Pirmosios kartos amperometrinuose biojutikliuose generuojama elektros srovė yra ne paties bioelektrokatalizinio proceso, bet atsiranda oksiduojantis ar redukuojantis reakcijos produktams (1.2 pav.) [6, 8]. Šios kartos biojutiklių gamyboje naudojamos įvairios oksidazės, kurios katalizuoja įvairių organinių

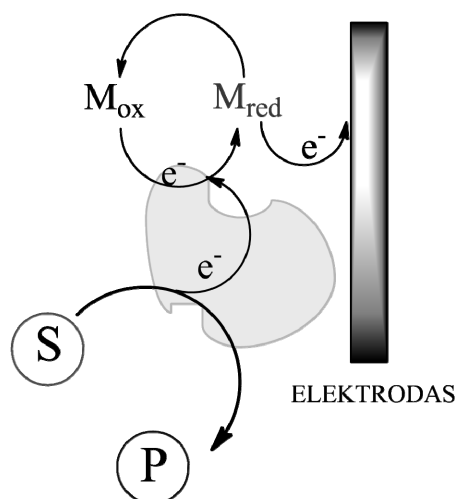


1.2 pav. Pirmos kartos bioelektrocheminės sistemos schema. S – substratas, P – produktas, pilkai pažymėtas – fermentas.

medžiagų oksidaciją. Tačiau redukuota oksidazė elektronus atiduoda natūraliam elektronų akceptoriumi – deguoniui, kuris katalizės metu verčiamas į vandenilio peroksida. Katalizės eigą galima stebėti amperometriškai, registruojant deguonies sunaudojimo arba vandenilio peroksido susidarymo greitį, todėl aplinkoje esantis deguonis yra esminis komponentas ir daro įtaką pirmosios kartos bioelektrocheminių sistemų atsakui [6, 8]. Šių biojutiklių trūkumas yra tas, kad katalizės reakcijos

metu susidaro vandenilio peroksidas, kurio dideli kiekiai gali ardyti fermentus. Taip pat vandenilio peroksido koncentracija gali būti registruojama tik esant gana teigiamam elektrodo potencialui, bet tada kartu su vandenilio peroksidu oksiduojami ir kiti metabolitai (šlapimo rūgštis, askorbo rūgštis, glutationas), kas iškreipia jutiklio atsaką [15]. Šių problemų iš dalies bandoma išvengti, įvedant papildomas membranas, kurios nepraleidžia trukdančių medžiagų [8]. Taip pat yra parodyta, jog panaudojant specialias elektrodines dangas su Prūsijos mėlynuoju, peroksidą galima nustatinėti esant neigiamesniems darbinio elektrodo potencialams [16-19].

1.2.2 Antros kartos amperometriniai biojutikliai



1.3 pav. Antros kartos biojutiklio schema oksidacijos procesui. M_{ox} – oksiduotas mediatorius, M_{red} – redukuotas, pilkai pažymėtas – fermentas.

Antros kartos amperometriniai biojutikliai yra fermentinės sistemos, kitaip dar vadinamos „mediatorinėmis sistemomis“, kuriose naudojami įvairūs mediatoriai [6, 20-21]. Kadangi fermentų aktyvusis centras paprastai būna giliai baltymo globulėje, o elektrono perkėlimui nuo aktyviojo centro ant elektrodo paviršiaus nepakanka vien aukšto potencialo, mediatorių panaudojimas šiose sistemose įgalina arba palengvina bioelektrokatalizės virsmus, sukuriant EP grandinę. Mediatoriai – tai redoks aktyvūs

mažos molekulinės masės junginiai, kurie perneša elektronus nuo fermento aktyviojo centro ant elektrodo paviršiaus (arba atvirkščiai), o taip pat mediatorius yra antrasis fermento substratas [6, 8-9] (1.3 pav.). Mediatoriaus standartinis oksidacijos-redukcijos potencialas (E_M^0) turi būti žymiai teigiamesnis arba neigiamesnis nei fermento aktyviojo centro potencialas (E_F^0), esant atitinkamai oksidacijos ($E_M^0 > E_F^0$) ir redukcijos ($E_M^0 < E_F^0$)

bioelektrokatalizei [22]. Praktiniu požiūriu idealus mediatorius turi pasižymėti sekančiomis savybėmis [9, 23]:

- ◇ gerai aprašoma grįžtama voltamperometrija bei didelė heterogeninė greičio konstanta,
- ◇ greita reakcija su oksidoreduktaze,
- ◇ stabiliomis oksiduota ir redukuota formomis,
- ◇ nuo pH nepriklausomu formaliuoju oksidacijos-redukcijos potencialu,
- ◇ mediatoriaus redukuota forma neturi reaguoti su deguonimi,
- ◇ neturi vykti autooksidacija,
- ◇ tirpūs mediatoriai turi pasižymėti labai geru tirpumu.

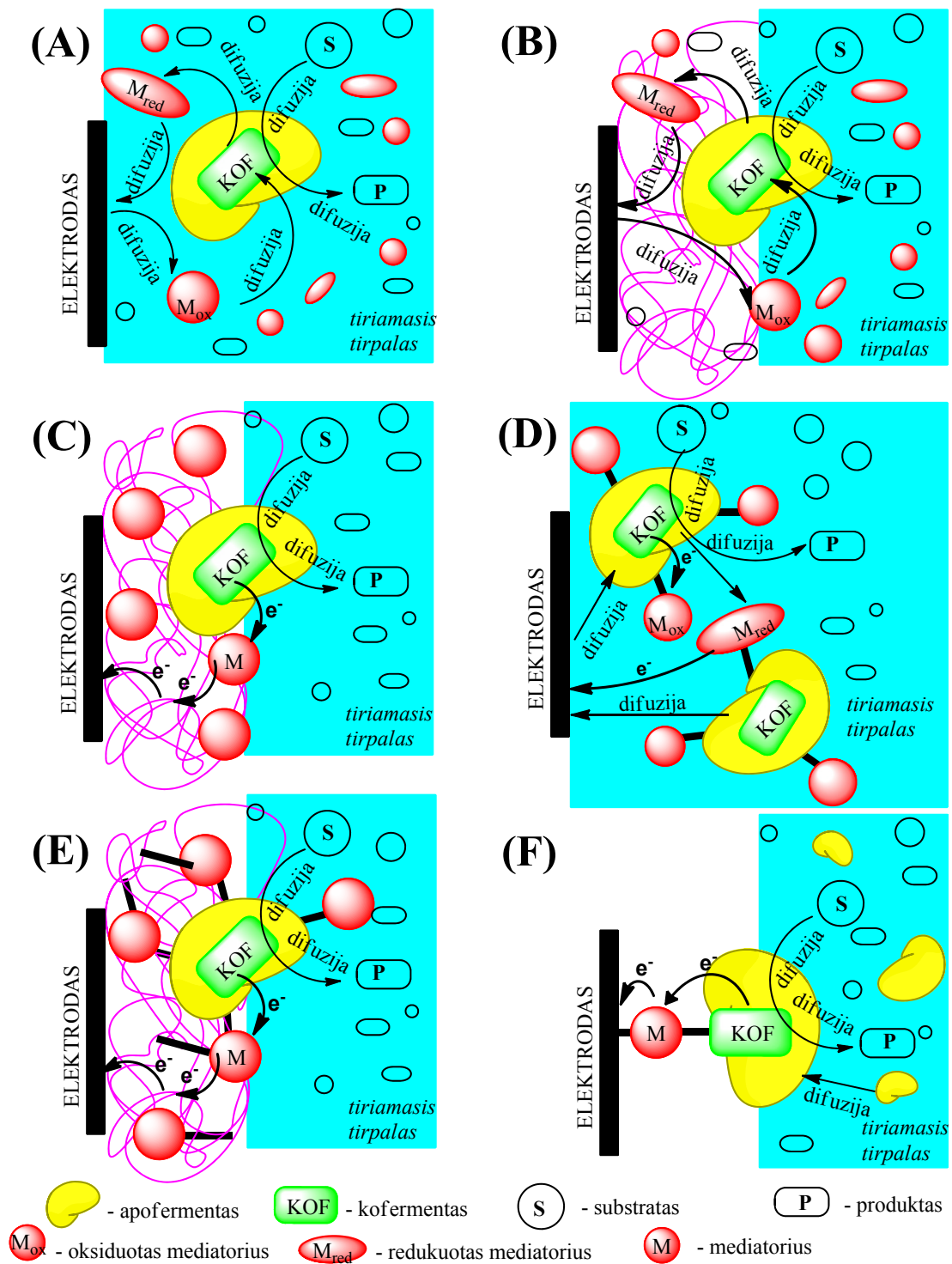
Mediatoriaus panaudojimas bioelektrocheminėse sistemose, lyginant su pirmos kartos amperometriniiais biojutikliais (žr. 1.2.1 sk.), turi eilę privalumų [23]:

- ◇ sistemų generuojamas atsakas yra mažiau priklausomas nuo ištirpusio oro deguonies koncentracijos,
- ◇ darbinį fermentinio elektrodo potencialą apsprendžia mediatoriaus oksidacijos (arba redukcijos) potencialas,
- ◇ panaudojant mediatorių su žemu oksidacijos potencialu sumažėja arba visiškai prarandama įtaka pašalinių oksidacijos-redukcijos reakcijų,
- ◇ jei mediatoriaus reoksidacija vyksta be protonų pernašos, sistemų generuojamas atsakas tampa santykinai nuo pH nepriklausomu,
- ◇ generuojamas atsakas paprastai yra didesnis lyginant su sistemomis, kur vyksta TEP (žr. 1.2.3 sk.).

Tačiau ne vien mediatoriaus savybės apsprendžia atsako efektyvumą, taip pat yra labai svarbi visos bioelektrocheminės sistemos architektūra [22]. Todėl individualiai sistemai labai svarbu parinkti individualų ir jai geriausiai tinkantį mediatorių. Šiuo metu yra žinoma daug fermentų reoksidaciją greitinančių medžiagų. Gerai žinomi yra įvairūs feroceno dariniai, chinonai, organinės druskos, organiniai dažai, tokie kaip Metileno mėlynasis, fenazinais, metilo

violetas ir kt., metalų biperidino kompleksai, neorganiniai redokso junginiai, pvz., kalio heksacianoferatas (KF), įvairūs rutenio bei osmio kompleksai ir kt. [9, 14, 23].

Panaudojant mediatorių ir fermentą, gali būti kuriamos įvairios bioelektrocheminės sistemos. Pačios paprasčiausios – kai fermentas ir mediatorius yra tirpūs ir yra tiriamajame tirpale (1.4 pav. A). Sudėtingesnės yra, kai fermentas imobilizuotas ant elektrodo paviršiaus arba į organinio ar neorganinio polimero matricą ir naudojamas tirpus mediatorius (1.4 pav. B). Tokių sistemų generuojamo atsako dydis labiausiai priklauso nuo aktyvaus imobilizuoto fermento kiekio ir mediatoriaus gebėjimo kontaktuoti su juo. Paminėtų sistemų didžiausias trūkumas tas, jog mediatoriai gali chemiškai veikti elektrodo paviršių ir mediatorių koncentracija labai priklauso nuo tiriamo tirpalo skiedimo. Be to, tokios sistemos sunkiai taikytinos *in vivo* tyrimuose. Todėl yra kuriamos bioelektrocheminės sistemos, kur ir fermentas, ir mediatorius imobilizuojami ant elektrodo (1.4 pav. C) [22]. Joms priskiriamos sistemos su imobilizuotais fermentais ant mediatoriais modifikuotų laidžių polimerų, zolių-gelių, įvairių anglinių medžiagų ir nanodarinių matricų. Kai fermentas turi silpnai surištą su apofermentu kofermentą, pvz., NAD(P)^+ , FAD, gali būti kuriamos sistemos, kuriose kofermentas imobilizuojamas kartu su mediatoriumi ant elektrodo paviršiaus, o apofermentas randamas tiriamajame tirpale (1.4 pav. F). Tokios sistemos kuriamos be dirbtinių mediatorių panaudojant ir imobilizuotus citochromus ar kitus biologinius fermentų elektronų akceptorius [22, 24]. Kitas mediatorinių sistemų variantas yra paties fermento cheminis modifikavimas mediatoriais. Šių sistemų galimi du variantai: kai tirpus modifikuotas fermentas yra tiriamajame tirpale (1.4 pav. D) arba kai modifikuotas fermentas įrištas į elektrodinę matricą (1.4 pav. E) [22]. Kai kurios paminėtos mediatorinės sistemos jau dabar taikomos pramonėje [9, 22]. Vienas didžiausių aprašytų sistemų trūkumų yra dalinė fermento denatūracija cheminio modifikavimo metu bei fermento inaktyvacija imobilizavimo metu.

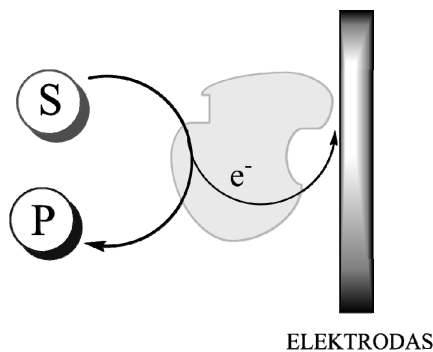


1.4 pav. Mediatorinių sistemų schemas. Detalų aprašymą žr. tekste.

Mediatorinių sistemų trūkumas tas, kad mediatoriaus reakcija su fermentu nėra labai specifiška, todėl visi kiti potencialūs oksiduoto mediatoriaus reduktoriai (arba redukuoto mediatoriaus oksidatoriai) turėtų būti pašalinti. Oksidazių atveju, mediatoriaus ir fermento reakcija turi būti pakankamai

greita, nes tik tokiu atveju mediatorius gali sėkmingai konkuruoti su natūraliu elektronų akceptoriumi – deguonimi [8, 23]. Daugumoje atvejų, mediatoriaus savybės neatitinka idealių reikalavimų, kadangi mediatoriai dažnai yra mažai stabilūs, jų oksidacijos-redukcijos potencialas priklauso nuo pH, taip pat dažnai yra toksiški. Tokiu būdu, naujų mediatorinių medžiagų paieška vis dar išlieka aktuali.

1.2.3 Trečios kartos amperometriniai biojutikliai



1.5 pav. Trečios kartos biojutiklio schema oksidacijos procesui. Pilkai pažymėtas – fermentas.

Trečios kartos biojutiklių pagrindas yra TEP tarp fermento aktyviojo centro ir elektrodo paviršiaus be papildomų elektronų pernešančių redoksoaktyvių molekulių dalyvavimo [9, 25]. Bioelektrocheminės sistemos, veikiančios TEP principu, schema pavaizduota 1.5-me paveiksle. Fermentas veikia kaip elektrokatalizatorius, palengvindamas elektronų perdavimą nuo substrato molekulės ant elektrodo [6, 8]. Bioelektrocheminės sistemos, veikiančios TEP principu, dažniausiai yra didesnio selektyvumo nei kitos, nes fermentas reaguoja tik su substratu ir oksidacijos-redukcijos reakcijos vyksta esant paties fermento redokso potencialui (arba arti jo), todėl sumažėja pašalinių reakcijų galimybė. Be to, kaip ir mediatorinių sistemų atveju, generuojamas atsakas yra mažiau priklausomas nuo ištirpusio deguonies koncentracijos ir tampa santykinai nuo pH nepriklausomu, jei fermento reoksidacija vyksta be protonų pernašos.

Tačiau fermentų, galinčių veikti pagal TEP mechanizmą yra nedaug ir ne visi elektrodiniai paviršiai yra tam tinkami [8, 26]. Dauguma šių fermentų turi daugiau nei vieną kofaktorių. Iki 2003 m. buvo žinoma tik apie dvidešimt baltymų, galinčių veikti TEP principu [8, 26-27]. Taip pat buvo pastebėta, kad šių fermentų sugebėjimas perduoti elektronus tiesiogiai elektrodo paviršiui susijęs su aktyviojo centro lokalizacija arti baltymo globulės išorės [9, 22].

Elektrociniai paviršiai, ant kurių registruojama TEP, paprastai yra aukso, sidabro, platinos arba įvairių anglinių medžiagų. Taip pat kai kurie laidūs organiniai polimerai yra tinkami TEP [9]. Siekiant palengvinti TEP tarp fermento aktyviojo centro ir elektrodo paviršiaus, daugelis chemiškai ir/arba mechaniškai modifikuoja elektrodinę medžiagą arba patį fermentą [9, 28]. Tačiau nebūtinai tinkamas TEP elektrodinis paviršius yra tinkamas ir fermento imobilizavimui. Efektyviai veikiančias trečios kartos bioelektrochemines sistemas garantuoja tik visuma sėkmingai išspręstų uždavinių, tokių kaip fermento imobilizavimas, jo orientavimas ant elektrodo, tinkamų elektrodinių paviršių parinkimas bei EP ištyrimas.

1.3 Impedimetrinės bioelektrocheminės sistemos

Bioelektrocheminės sistemos, registruojančios srovės arba potencialo pokyčius, gali turėti trūkumų, pvz., santykinai mažas registruojamos srovės tankis, atsakai dažnai turi daug trikdžių, palaipsnis fermento aktyvumo mažėjimas dėl elektrodo taikomo viršįtampio ir kt. Šias problemas bandoma spręsti, generuojant kuo didesnę atsaką, todėl bandomos įvairios elektrodinės medžiagos, parenkami įvairūs mediatoriai, modifikuojami fermentai ir kt. Tačiau galimas ir kito pokyčius registruojančio metodo parinkimas [29].

Amperometrinių ir potenciometrinių metodų alternatyva – elektrocheminio impedanso spektroskopija (EIS). Šis metodas yra labai informatyvus, pateikiantis informaciją apie fizikines ir chemines medžiagų savybes, nekenkiantis biologiniam atpažinimo elementui ir elektrodinei medžiagai, nereikalaujantis specifinių žymių. Paprastai naudojamas paviršių korozijos, energijos išgavimo reaktorių, padengimo polimerais, medžiagų adsorbcijos, savitvarkių monosluoksnių (SAM), EP kinetikos tyrimuose ir kt. [29-32].

Sukonstruotos elektrocheminės celės impedansas matuojamas tarp dviejų elektrodų, veikiant silpnam kintamos srovės sinusoidiniam signalui. Matuojamas atsakas – tai srovės ir fazės poslinkis tarp potencialo ir srovės sinusoidės funkcijos. Atliekant šiuos matavimus plačiame dažnių (f) diapazone išgaunamas impedanso (Z) spektras, kuris gali būti pavaizduotas Nyquist (Z_{im}

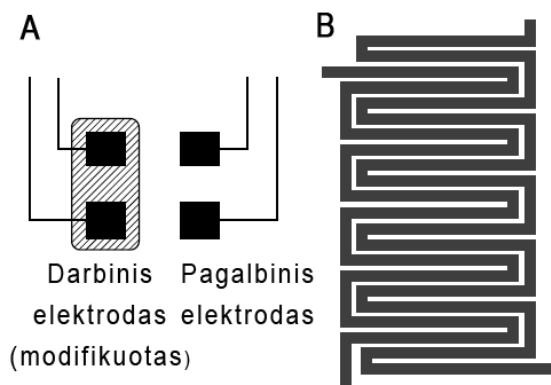
vs. Z_{re}) arba Bode ($|Z|$, θ vs. $\log f$) grafikuose. Impedansas (kompleksinė varža) – tai kompleksinis dydis, kuris gali būti pavaizduotas poline (1-4) arba Dekarto (1-5) forma:

$$Z = |Z| \cdot e^{j\theta} \quad (1-4)$$

$$Z = Z_{re} + jZ_{im} \quad (1-5)$$

Modulis $|Z|$ atvaizduoja taikyto potencialo amplitudės ir srovės amplitudės santykį, o θ – fazės pokytį tarp potencialo ir srovės, j – menamas skaičius. Z_{re} ir Z_{im} yra atitinkamai realus ir menamas impedanso komponentai [30, 32].

Priklausomai nuo fizikinių arba elektrocheminių procesų, kurie vyksta elektrodo/elektrolito sąlyčio riboje sudaroma elektroninė ekvivalentinė grandinė (EG), kuri reprezentuoja visą tiriamą elektrocheminę sistemą. Atskiri EG komponentai, tokie kaip varža (R), elektrinė talpa (C), pastovios fazės elementas (CPE) ir kt., nustatomi aproksimuojant impedanso spektrus pagal pasirinktos EG modelį [30]. Bioelektrocheminių sistemų EIS tyrimams konstruojamos celės sudarytos iš dviejų metalinių elektrodų: darbinio, kuris būna modifikuotas įvairiomis medžiagomis ir/ar bioatpažinimo elementu, bei palyginamojo/atraminio (1.6 pav., A). Siekiant optimizuoti santykį tarp tirpalo sąlyčio ribos ploto ir elektrodų atstumo, naudojamos miniatiūrizuotos, vingiuotos, adresuojamojo kontakto elektrodų matricos (IDEA, ang. interdigitated electrode array) (1.6 pav. B) [32]. IDEA savybės labai priklauso nuo jos geometrinės struktūros: elektrodų pločio, perskyros pločio tarp



1.6 pav. EIS tyrimams naudojamų elektrocheminių celių schemas. A – paprasta elektrocheminė sistema, B – IDEA [33].

elektrodo šukų, persidengimo tankumo tarp šukų ir bendro elektrodų ilgio [30]. Pirmi jutikliai, panaudojant IDEA, buvo aprašyti 1987 – 1990 metais. Įvairūs molekulinio atpažinimo elementai, tokie kaip receptoriai, fermentai, antikūnai, nukleino rūgštys, lektinai ir kt. gali būti nusodinti ant IDEA

paviršiaus. Bet koks IDEA paviršiaus modifikavimas paveiks matuojamą elektrinę talpą. Taip, vykstant sąveikai tarp molekulių, kurios pasekoje ant paviršiaus formuojasi konjugatai, kurie keičia C . Todėl daugelis išvystytų biologinių impedimetrinių sistemų yra elektrinės talpos biojutikliai, pvz. imunologiniai, DNR, bakterijų, ląstelių, receptorių ir pan. [30-31].

Kitu atveju, jei molekulinio atpažinimo elemento ir biomolekulės sąveikos pasekoje susidaro elektrochemiškai aktyvus junginys arba vyksta elektronų mainai tarp elektrodinės medžiagos ir biologinio atpažinimo elemento, gali būti nustatomi varžos arba laidumo pokyčiai [29-30]. Dažniausiai publikuotuose moksliniuose straipsniuose sutinkamos aprašytos impedimetrinės sistemos GOx ir ureazės pagrindu, nes šie fermentai pasižymi dideliu stabilumu ir jų katalizės metu susidaro elektrochemiškai aktyvūs junginiai, didinantys sistemos laidumą [30, 33]. Fermentinėmis impedimetrinėmis sistemomis taip pat galima nustatinėti nuodingas medžiagas, tokias kaip pesticidai, herbicidai, sunkiųjų metalų jonai ir cheminiai ginklai. Šios sistemos remiasi fermento slopinimu. Jomis netiesiogiai nustatomas fermento aktyvumas. Tai pasiekama stebint polimero (ar kitos medžiagos, kuria dengiamas IDEA jutiklis) degradavimą, esant fermentui tiriamajame tirpale [30, 34]. Kiti IDEA jutiklių ir impedimetrinių sistemų pritaikymo pavyzdžiai plačiai aprašyti keliuose leidiniuose [35-36].

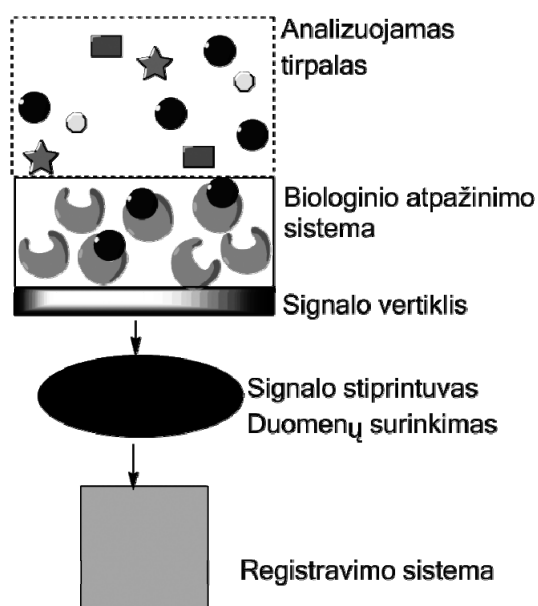
Impedimetrinių elektrocheminių sistemų panaudojimas analizėje turi daug privalumų, tačiau taip pat turi ir trūkumų. Vienas didžiausių trūkumų – matavimai turi būti atliekami mažo laidumo tirpaluose, kas ne visada yra įmanoma, o atliekant tyrimus su realiais bandiniais, gali įvykti nepageidaujama medžiagų adsorbcija ant elektrodo paviršiaus. Taip pat impedanso spektrus ne visada lengva interpretuoti, gaunami rezultatai labai priklauso nuo aprašytos EG modelio [30, 32]. Nepaisant to, gerai išdirbtos impedimetrinės sistemos yra žymiai jautresnės ir selektyvesnės nei kiti elektrocheminiai metodai. Todėl šiame darbe buvo bandyta sukurti impedimetrinę bioelektrocheminę sistemą IDEA elektrodinės matricos pagrindu.

1.4 Bioelektrocheminių sistemų pritaikymas

Gerai veikiančios bioelektrocheminės sistemos taikomos kuriant amperometrinius, potenciometrinius, impedimetrinius biojutiklius, o taip pat naudojamos elektrolizėje, biologiniuose kuro elementuose, imunoanalizėje, elektronų ir protonų pernašos tyrimuose ir kt. Kadangi šiame darbe bioelektrocheminės sistemos buvo kurtos siekiant pritaikyti jas alkoholių, angliavandenių ir CO biojutikliuose bei įvertinti jų potencialą bioelektrosintezei, šiame skyriuje yra aptarti tik tokių sistemų pagrindiniai reikalavimai ir pritaikymo aktualumas.

Biojutiklis – tai medžiagų koncentracijos pokyčius matuojantis įrenginys, kurio jutiklis yra biokomponentas (1.7 pav.). Biologinio atpažinimo sistema dažniausiai suteikia informaciją apie analitės koncentraciją, signalą generuojanti su tam tikru jautrumu cheminiu arba fizikiniu būdu. Biojutikliai yra įvairūs, gali turėti skirtingų signalo vertiklių tipų, pvz. elektrocheminius, optinius, pjezoelektrinius, terminius ir kt.

Šiandien pagal IUPAC, elektrocheminiais biojutikliais vadinami integruoti prietaisai, kurie gali suteikti kokybinę, kiekybinę ar pusiau kiekybinę informaciją apie analitę, naudojant biologinio atpažinimo elementą, kuris



1.7 pav. Biojutiklio schema.

tiesiogiai sąveikauja su elektrocheminiu verčiančiuoju elementu. Elektrocheminiu biojutikliu laisvai fiksuojama substrato koncentracija yra apie 10^{-5} – 10^{-6} M [6]. Kuriant bioelektrochemines sistemas, kurios galėtų būti pritaikytos biojutikliuose, būtina atsižvelgti į pagrindinius biojutiklių reikalavimus, tokius kaip: pakankamas jautrumas, atrankumas bei stabilumas. Jie turėtų būti nejautrūs trukdančioms ir

konkuruojančioms medžiagoms, generuojamo atsako stiprumo priklausomybės nuo analizės koncentracijos tiesinė dalis turi būti tinkama realių tirpalų matavimams, o taip pat pageidautinas greitas atsakas bei greita parengtis sekančiam matavimui. Biojutiklio gamybos procesas turi būti lengvai atkuriamas [8, 32].

Kita bioelektrocheminių sistemų pritaikymo sritis – bioelektrosintezė, kuri apibrėžiama kaip organinių medžiagų sintezės procesas dideliais kiekiais, kuomet viena iš elektrodinių reakcijų stadijų arba visas elektrodinis procesas katalizuojamas fermentu [9]. Per dvidešimt metų yra aprašyta nemažai bioelektrosintezės atvejų laboratorinėmis sąlygomis [37-40]. Susidomėjimas bioelektrosinteze kilo dėl svarios priežasties – elektrolizės ir fermento katalizės procesų kompozicija gali pasiūlyti unikalias ir neprilygstančias cheminei sintezei perspektyvas ypatingai grynų organinių medžiagų išgavimui, nes:

- ◇ sistemai taikomas elektrinis potencialas suteikia labai stiprią varomąją jėgą cheminiams pokyčiams ir gali pagreitinti EP net 10^8 kartų, kas, parinkus atitinkamas sąlygas, įgalina bet kokios organinės molekulės oksidaciją arba redukciją;

- ◇ bioelektrosintezėje naudojami mažiau toksiški ir mažesniais kiekiais cheminiai reagentai, sintezė paprastai vyksta neagresyviomis sąlygomis. Tokiais principais pagrįsta „neturinti nuotekų technologija“ ir „žalioji chemija“;

- ◇ sintezė gali vykti be aktyvių grupių blokavimo, stereoselektyviai įvedant arba šalinant funkcinės grupes, be to, bioelektrosintezė yra santykinai pigesnė technologija nei įprasta organinė sintezė [9].

Konstruojant bioelektrochemines sistemas, yra keletas faktorių, į kuriuos būtina atsižvelgti, norint vykdyti efektyvią bioelektrosintezę: fermentas turi būti išlaikomas ilgą laiką aktyvus, jo vykdoma reakcija turi būti kontroliuojama reaktantų masės pernaša; turi būti subalansuoti visi elektrocheminėje celėje vykstantys procesai; paprasta elektrocheminės celės gamybos technologija su ilgai nenusidėvinčiais komponentais; turi būti išgaunamas kuo didesnis srovės tankis, pvz., biojutiklių atveju pageidaujamas

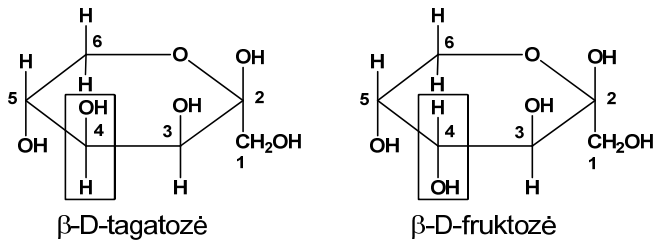
srovės tankis turi būti μAcm^{-2} eilės, o tuo tarpu sintezei turi būti nuo kelių iki kelių šimtų mAcm^{-2} ; patogi produkto izoliavimo technologija; didelė produkto išeiga be nepageidaujamų priemaišų.

Efektyvią bioelektrosintezę užtikrina ne vien fermento ir visos naudojamos bioelektrocheminės sistemos kinetinės charakteristikos, bet vieną svarbiausių vaidmenų atlieka pačios elektrocheminės celės konstrukcija, kuri turi užtikrinti: efektyvią reaktantų masės pernašą iki elektrodų, vienodą srovės ir potencialo paskirstymą ant elektrodinių paviršių ir mažą atstumą tarp elektrodų.

Nepaisant daugybės privalumų, bioelektrosintezė, kaip ir bioelektroanalizė dar neįgavo reikiamo masto dėl keleto sunkiai išsprendžiamų problemų, tokių kaip, fermento stabilumo užtikrinimas ir procesų aukšto efektyvumo išlaikymas. Taipogi, daugelis fermentų yra labai brangūs, jų išskiriami kiekiai iš mikroorganizmų yra maži, daugelis fermentų priklausomi nuo kofaktorių, kurių papildomai reikia pridėti, be to, fermentų katalizės efektyvumas ir selektyvumas labai priklauso nuo pH, temperatūros, tirpiklio, druskų ir kt. Šias problemas bandoma spręsti genetiškai modifikuojant fermentus, parenkant elektrodines medžiagas ir mediatorius, kuriant bereagentes sistemas, optimizuojant elektrocheminės celės konstrukcijas [9].

1.4.1 Angliavandenių nustatymas

Kokybinė ir kiekybinė įvairių angliavandenių analizė yra svarbi tiek stebint cukrų kiekį kraujyje, tiek vertinant maisto produktų ar gėrimų kokybę, kontroliuojant fermentacijos procesus ir tiriant mikroorganizmų veiklą [41]. Bene didžiausią populiarumą įgijo gliukozės, galaktozės, fruktozės biojutikliai. Yra sukurta ir aprašyta nemažai elektrocheminių biojutiklių veikiančių su gliukozės oksidoreduktazėmis [9], o taip pat ir imunologinių, fluorescenciją matuojančių, spektrofotometrinių metodų [41]. Tačiau pastaruoju metu susidomėjimo susilaukė ir mažesniais kiekiais gamtoje sutinkami cukrūs. Vienas tokių yra D-(-)-tagatozė.



1.8 pav. Tagatozės ir fruktozės molekulių struktūros.

D-(-)-tagatozė – tai mažais kiekiais gamtoje randama ketozė, kuri tik viena –OH grupės pozicija (prie 4-to anglies atomo) skiriasi nuo D-(+)-fruktozės

(1.8 pav.). Ši ketozė yra viena iš retųjų cukrų, kuri pastaraisiais metais tapo labai patrauklia maisto pramonėje. Visų pirma, dėl jos savybių ir poveikio žmogaus organizmui. Ji pasižymi mažu kaloringumu, antioksidaciniu ir citoprotektiniu poveikiu, o taip pat yra tinkama vartojimui cukriniu diabetu sergantiems žmonėms [42]. Todėl tagatozės sintezės technologijos ir nustatymas maisto gaminiuose bei žmogaus skysčiuose išlieka aktualūs.

Jau dabar yra pasiūlyta įvairių tagatozės sintezės būdų [43-45], tačiau tagatozės nustatymui yra aprašyta vos keletas metodikų [46-48]. Taip pat, iki šiol nėra aprašytas nei vienas tagatozės biojutiklis.

1.4.2 Alkoholių nustatymas

Kalbant apie alkoholių nustatymą, dažniausiai pasitaikanti yra etanolio detekciją. Jo nustatymas svarbus įvairiose srityse: medicinoje, alkoholinių gėrimų, maisto, popieriaus gaminimo pramonėje, vairuotojų, eismo dalyvių, darbuotojų, mokinių kontrolei ir kt. [49-51]. Šiuo metu yra sukurta įvairių metodų etanolio nustatymui, kurie remiasi chemine, chromatografine, spektrine analize. Tačiau tik nedaugelis jų yra patikimi, pati analizė dažnai komplikuoja, reikalaujanti papildomo mėginio gryninimo, brangios aparatūros ir žmogaus, mokančio teisingai atlikti analizę. Etanolio elektrocheminiai biojutikliai yra perspektyvūs, kadangi dalinai išsprendžia šias problemas. Daugelis jų yra sukurti nuo NAD^+ ir FAD priklausomų alkoholio oksidoreduktazių pagrindu. Tačiau efektyviai ir ilgai veikiančio, daugkartinio naudojimo etanolio biojutiklio sukūrimas vis dar išlieka aktualus [49, 51].

Tačiau, ne vien etanolio nustatymas yra svarbus. Pavyzdžiui, metanolis yra labai nuodingas žmogaus organizmui, geras organinis tirpiklis, pastaruoju metu vis dažniau naudojamas kuro elementuose [52], 1-propanolis – vienas

svarbiausių pramoninių alkoholių, naudojamų tapyboje ir kosmetikos priemonėse, laikomas geresniu biologiniu kuru nei etanolis [53], 2-propanolis ir 2-butanolis naudojami kaip energijos išgavimo šaltiniai [54], 1,2-propandiolis (arba jo optiniai izomerai) yra vienas dažniausiai naudojamų pradinių ir/ar tarpinių junginių vaistų, agrochemikalų, feromonų sintezės procesuose [55]. Taigi, tiek įvairių alkoholių nustatymas, tiek gryninimo ar sintezės procedūros yra aktualūs uždaviniai, padėtų spręsti gilus bioelektrokatalizinių procesų ištyrimas.

1.4.3 CO nustatymas

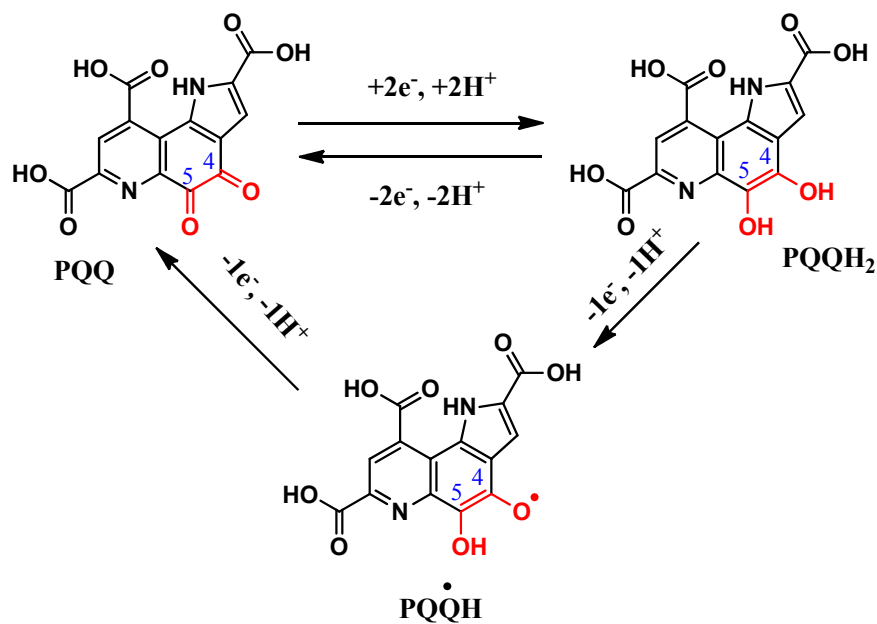
Anglies monoksidas – tai daugeliui organizmų nuodingos bekvapės dujos, kurios gali susidaryti anglinių medžiagų degimo metu, bakterijų veiklos dėka ir pan. Dėl šių dujų nuodingumo žmonių sveikatai kilo poreikis sekti jų koncentracijas aplinkoje [56]. Šiuo metu sukurta įvairių prietaisų CO nustatymui aplinkoje. Didžioji jų dalis yra dujų jutikliai lauko tranzistoriaus pagrindu, metalo oksido jutikliai, elektrocheminiai jutikliai ir dujų analizė infraraudonosios spektrometrijos metodu [57-59]. Daugelis jų yra komerciškai prieinami ir paprastai naudojami kartu su priešgaisrinėmis sistemomis, kurios montuojamos patalpose. Tačiau kai kurie jutikliai geba veikti tik esant labai aukštoms temperatūroms (virš 200 °C), taip pat yra jautrūs oro drėgmės pokyčiams ir neveikia vandenyje. Be to, yra svarbu ne vien nustatyti CO koncentraciją, bet ir greitai ir efektyviai sumažinti jo kiekį. Kaip yra žinoma, biokatalizatoriai veikia ne tik esant kambario temperatūrai, bet ir vandenyje, todėl jų panaudojimas CO nustatymui ir kiekio sumažinimui yra perspektyvi sritis. Tam naudojami CO oksiduojantys arba surišantys fermentai ir mikroorganizmai, kurių pagrindu konstruojami biojutikliai, biofiltrai ir biologiniai kuro elementai. Pažymėtina tai, kad biokatalizatoriai yra jautresni pavojingo žmogaus gyvybei CO kiekio nustatymui, todėl dažniausiai panaudojami pavojaus signalo įjungimo sistemose [60-61].

Tačiau biokatalizatorių panaudojimas ženkliai padidina prietaisų kainą, prietaisai dažnai yra vienkartiniai, bei jų gyvavimo trukmė yra trumpesnė nei

cheminių jutiklių. Todėl yra aktualu sukurti pigią, lengvai atkuriamą bei patikimą CO nustatymo sistemą naudojančią biokatalizatorius.

1.5 Bioelektrocheminės sistemos su nuo PQQ priklausomomis dehidrogenazėmis

Nuo PQQ (2,7,9-trikarboksi-1H-pirol(2,3-f)chinolin-4,5-diono arba pirol(2,3-f)chinolin-4,5-diono) priklausomos dehidrogenazės priklauso chinobaltymų ir chinohemobaltymų šeimai. PQQ struktūra buvo nustatyta 1979 m. [62-63]. PQQ (1.9 pav.) yra vienas iš kofaktorių, kurie dalyvauja oksidacijos-redukcijos reakcijose biologinėse sistemose, ir kuris, skirtingai nei NAD(P)^+ , nekovalentiškai, bet stipriai sujungtas su apofermentu. Šio kofaktoriaus redokso potencialas yra teigiamesnis (119 mV vs. NHE [64]) nei piridino nukleotido (-320 mV vs. NHE) ar flavino (-221 mV vs. NHE) [65], kas bakterijų kvėpavimo grandinėje lemia EP kelią ir elektronų akceptorius.



1.9 pav. Trys stabilios PQQ formos: oksiduota (PQQ), redukuota (PQQH₂) bei semichinoninė (PQQH[•]).

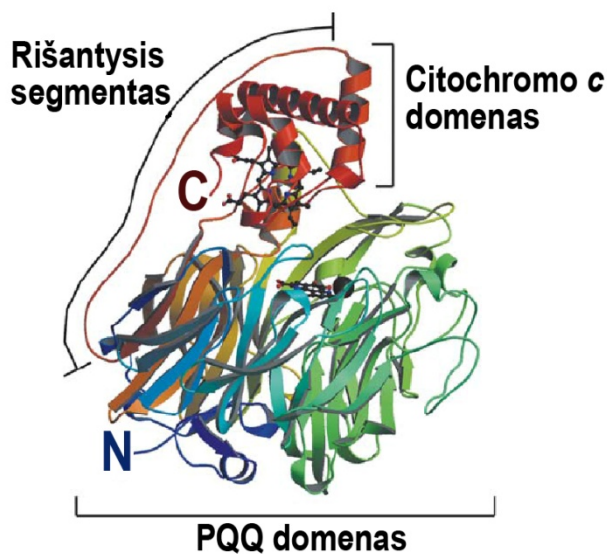
PQQ tyrimai parodė, kad jis greitai reaguoja su nukleofiliniais junginiais, tokiais kaip cianidai, hidrazinai, alkoholiai, aldehydai, ketonai ir pan., susidarant grįžtamiems kovalentiniams kompleksams. Dauguma nukleofilų formuoja kompleksus prisijungiant prie PQQ penkto anglies atomo (C5), tačiau galimas prisijungimas ir prie PQQ ketvirto anglies atomo (C4). PQQH₂

reoksidacija fiziologinėje aplinkoje yra lėtas procesas, taigi tai ir yra nuo PQQ priklausomų fermentų vykdomų katalizės reakcijų greitį limituojanti stadija. PQQ priklausomų dehidrogenazių veikimo mechanizmai ir PQQ reoksidacijos modeliai plačiai aprašyti [66-68] darbuose. Be PQQ yra žinoma daugiau chinoninių kofermentų: topachinonas, triptofantriptofilchinonas, lizintirozilchinonas ir cisteinotriptofilchinonas [65, 69] bei atrandama vis daugiau chino- ir chinohemofermentų. Šiuo metu jiems priskiriama apie 600 baltymų, iš kurių tik 51-iems nustatytos erdvinės struktūros (elektroninės duomenų bazės www.ncbi.nlm.nih.gov duomenimis). Tačiau ypač didelis susidomėjimas chinofermentais ir chinohemofermentais kilo, kai buvo išaiškinti pirmieji jų veikimo principai. Paaiškėjo, kad nuo PQQ priklausomi fermentai geba atiduoti elektronus įvairiems elektronų akceptoriams, ne tik fiziologiniams. Be to, buvo parodyta, kad kai kurie chinofermentai ir chinohemofermentai neatiduoda elektronų deguoniui, todėl jų veikimui nedaro įtakos nuolat kintančios deguonies koncentracijos aplinkoje.

Dėl šių savybių jie rado platų pritaikymą analizinėse sistemose, jų pagrindu kuriami įvairūs biojutikliai skirti angliavandenių ar alkoholių nustatymui kraujyje, maiste ar įvairiose biologinėse terpėse [70-71]. Pagal kompanijos „Thomson reuters“ (JAV) duomenų bazę „Web of knowledge“, publikuojamų straipsnių paminint chinofermentus ir/ar chinohemofermentus kasmet yra virš 600. Tolesniuose šio skyriaus poskyriuose bus aptariamoms sukurtos bioelektrocheminės sistemos chinofermentų ir chinohemofermentų pagrindu, didelį dėmesį skiriant natyvių fermentų savybėms, naudojamoms elektrodinėms medžiagoms ir kitoms bioelektrocheminių sistemų charakteristikoms.

1.5.1 Bioelektrocheminės sistemos su tADH

Šiame darbe buvo naudota periplazminė antrojo tipo alkoholio dehidrogenazė, E.C.1.1.9.1, IIG (tADH) išskirta iš *Pseudomonas putida* HK5 ląstelių [72-74], augintų terpėje su 1,2-propandioliu. TADH susideda iš 718 aminorūgščių. PQQ domeno homologiškumas kitiems chinobaltymams, ypač chinohemobaltymams, yra aukštas. TADH yra vieno subvieneto (~73,2 kDa)



1.10 pav. TADH erdvinė struktūra [71].

baltymas, kuris turi du domenų: N-terminalinį PQQ rišantį domeną (~62,4 kDa), kuris yra aštuonmenčio „β-propelerio“ formos, ir c-tipo citochromo c terminalinį domeną (~10,8 kDa). Abu domenai sujungti kartu per rišantįjį segmentą iš 23-ies aminorūgščių liekanų. Fermentas taip pat turi surišta Ca^{2+} joną (1.10 pav.). TADH

izoelektrinis taškas yra 5,0 [72, 74].

Kaip ir daugelio oksidoreduktazių, tADH katalizė gali būti aprašoma „ping-pong“ mechanizmu. TADH aktyviajame centre yra Ca^{2+} jonas, Asp ir Glu šoniniai radikalai. Manoma, kad katalizės reakcija vyksta hidridą pernešant nuo substrato ant PQQ C5 anglies atomo. Vėlesnė PQQH₂ reoksidacija vyksta lėtai, elektronai pernešami nuo chinolo ant hemo c, o protonai atpalaiduojami į aplinką analogiškai kaip tai vyksta kituose chinohemobaltymuose [72, 74]. Likęs redukuotas hemo c vėliau elektronus atiduoda fiziologiniam elektronų akceptoriumi. Fiziologinis elektronų akceptorius tADH kol kas nėra nustatytas, bet manoma, jog tai yra azurinas [72, 75]. Tyrinėjant tADH buvo nustatyta, kad šis fermentas specifiškas monohidroksiliams cikliniams angliavandeniliams, o monociklinių cis-diolių oksidacijos iš viso nekatalizuoja. Monocikliniams trans-dioliams fermento specifškumas yra nedidelis, be to jų oksidacijos greitis priklauso nuo enantiomerinės formos. Cikliniai dioliai, kurių hidroksigrupes skiria nors viena metileno grupė yra geri tADH substratai.

Naudojant 1,2-propandiolį kaip fermento substratą, parodyta, kad tADH stereospecifiška: *S*-propandiolį oksiduoja greitai ir K_M šiam substratui yra mažas (0,055 mM), tuo tarpu *R*-propandiolio oksidacija vyksta, palyginus, lėtai ir K_M yra didelis (3,32 mM).

TADH yra enantioselektyvi ir geba oksiduoti įvairius pirminius ir antrinius alkoholius. Šios fermento savybės yra labai patrauklios kuriant ne tik alkoholių biojutiklius, bet ir sistemas skirtas sintezei [76]. Aprašytų bioelektrocheminių sistemų tADH pagrindu nėra daug, nes natyvus fermentas, lyginant su plačiai naudojama AOX, nėra stabilus, o tinkamo imobilizavimo metodo, užtikrinančio ilgalaikį aktyvumą nėra sukurta. Be to, tADH nėra lengvai komerciškai prieinama.

Bioelektrocheminės sistemos su tADH buvo kuriamos ant anglinių ir aukso elektrodinių matricų, vykstant TEP arba EP greitinant dirbtiniais mediatoriais. Buvo parodyta, jog tADH geba atiduoti elektronus tiesiai nuo aktyviojo centro ant aukso ir įvairių anglinių paviršių: grafito, amorfinės anglies, chemiškai modifikuotos anglies [14, 77-78] (1.1 lentelė).

1.1 lentelė. Trečios kartos bioelektrocheminių sistemų su tADH ir skirtingomis elektrodinėmis medžiagomis kinetiniai parametrai.

Elektrodinė medžiaga:	I_{max}^{app} , $\mu A/cm^2$	K_M^{app} , mM	$k_{in} \times 10^{-3}$, min^{-1}	Pastabos
Grafitas	1,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	7,0 ± 3,0	Bioelektrokatalizės sąlygos: +300 mV, 50 mM acetatinis buferinis tirpalas, pH 6,0; su 10 mM CaCl ₂ [14].
Amorfinė anglis	2,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1	10,0 ± 4,0	Bioelektrokatalizės sąlygos: +400 mV, 50 mM acetatinis buferinis tirpalas, pH 6,0, su 10 mM CaCl ₂ [14].
Chemiškai modifikuota anglis	46 ± 2*	1,4 ± 0,03*	0,28 ± 0,08*	Bioelektrokatalizės sąlygos: +400 mV, 50 mM acetatinis buferinis tirpalas, pH 6,0; su 10 mM CaCl ₂ [77, 79].
Auksas	-	-	-	50 mM acetatinis buferinis tirpalas, pH 6,0; su 10 mM CaCl ₂ , vykdyti ciklinės voltamperometrijos tyrimai, TEP vyksta nuo +190 mV [14].

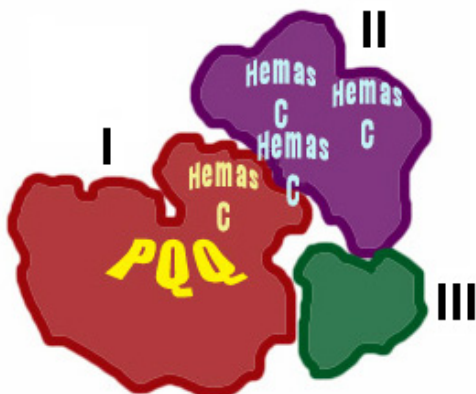
*Rezultatai gauti su geriausiai veikiančia sistema. Naudotas Ag/AgCl palyginamasis elektrodas.

Taip pat yra aprašytos bereagentinės mediatorinės bioamperometrinės sistemos, kuomet fermentas buvo imobilizuotas ant amorfinės anglies elektrodo, modifikuoto skirtingais rutenio arba osmio metaloorganiniais kompleksais [80] bei skirtingais feroceno dariniais [14].

Efektyviausios bioamperometrinės sistemos buvo gautos su rutenio kompleksais, kuomet I_{max}^{app} siekė iki $30 \mu\text{Acm}^{-2}$, o su feroceno dariniais I_{max}^{app} iki $12 \mu\text{Acm}^{-2}$, o K_M^{app} buvo apie 0,7 mM. Tačiau šios sistemos nebuvo stabilios, jų inaktyvacijos konstantos (k_{in}) siekė net apie $5 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ [14, 80]. Buvo kuriamos bioelektrocheminės sistemos ant amorfinės anglies elektrodo, modifikuotų rutenio metaloorganiniais kompleksais, kuomet tADH veikė natūralioje aplinkoje – intaktinėse *Pseudomonas putida* HK5 ląstelėse. Bakterinės bioelektrocheminės sistemos pasižymėjo didesniu stabilumu lyginant su išgryninto fermento bioelektrocheminėmis sistemomis, tačiau atsako dydis buvo net keliskart mažesnis [81].

Sėkmingai EP bioelektrocheminėse sistemose su tADH taip pat yra tinkami įvairūs vandenyje tirpūs mediatoriai, su kuriais buvo atlikti fermento tyrimai: KF [14], heterocikliniai pentacianoferato (III) kompleksai [75], fenazinmetosulfatas (FMS) [81].

1.5.2 Bioelektrocheminės sistemos su mADH



1.11 pav. MADH struktūros schema.

(1.11 pav.) [82]. Pirmas subvienetas yra panašus į tADH, jame lokalizuotas

Nuo PQQ priklausoma trečiojo tipo alkoholio dehidrogenazė, E.C. 1.1.5.5 (mADH), yra membraninis fermentinis kompleksas, sudarytas iš trijų subvienetų. Šiame darbe buvo tirta mADH išskirta iš *Gluconobacter sp. 33* kamieno. Erdvinė struktūra šio fermento kol kas nėra nustatyta, tačiau žinoma kad mADH yra sudaryta iš trijų subvienetų, kurių molekulinės masės atitinkamai lygios: 83 kDa; 52,1 kDa ir 16,6 kDa

vienas hemo c ir PQQ molekulė. Antrame subvienete yra trys hemo c. Šio subvieneto funkcija yra perduoti elektronus elektronų akceptoriumi (fiziologinis mADH elektronų akceptorius yra ubichinonas [65, 82]). Trečias subvienetas neturi papildomų prostetinių grupių arba kofaktorių ir reikalingas tam, kad baltymas įgautų fermentinį aktyvumą [65].

Buvo nustatyta, kad mADH yra specifiškiausia pirminiems nešakotiems alkoholiams, sudarytiems iš trijų ar keturių anglies atomų, o metanoliumi specifiškumas yra labai mažas. mADH K_M etanoliumi lygi 0,15 mM. Šio fermento pH optimumas, naudojant elektronų akceptoriumi KF ar 2,6-dichloroindofenolį (DCFIF), yra 5,2, o naudojant DCFIF ir FMS mišinį, stebimi du pH optimumai: 5,8 - 6,2, bei 8,7 - 8,9. Fermentas yra aktyviausias esant 43 °C temperatūrai. Kaip ir kitų nuo PQQ priklausomų alkoholio dehidrogenazių atveju, Ca^{2+} jonai padidina mADH aktyvumą, o Cu^{2+} , Hg^+ bei Ag^+ jonai veikia slopinančiai [82].

mADH katalizė gali būti aprašoma „ping-pong“ mechanizmu. Reoksidacija vyksta elektronus pernešant nuo hemo c, esančio I subvienete, paskiau, e^- perduodant hemams c, esantiems II subvienete, kurie vėliau atiduoda juos membranoje esančiam ubichinonui [83].

mADH yra įdomus dėl savo struktūros, kurioje be PQQ molekulės yra keturi hemo c. Fermentas pasižymi hidrofobiškumu ir gali tiesiogiai reoksiduotis ant tam tikrų elektrodinių matricių bei efektyviai oksiduoti etanolį anaerobinėje aplinkoje. Tokios savybės yra patrauklios ne tik kuriant biojutiklius, bet ir biologinius kuro elementus, naudojančius etanolį. Bioelektrocheminės sistemos su mADH, kuriose realizuota TEP, buvo konstruojamos ant:

◇ metalinių paviršių: aukso, sidabro, platinos ir nikelio [20, 84-86], o geriausi rezultatai pasiekti naudojant auksinę elektrodinę matricę: K_M^{app} etanoliumi siekė 1,5 mM, o I_{max}^{app} : $5,4 \mu A cm^{-2}$ [20];

◇ anglinių paviršių: stiklo anglies [20], grafito, amorfinės anglies, chemiškai modifikuotos anglies [70, 87], efektyviausios bioamperometrinės

sistemos buvo su chemiškai modifikuota anglimi ir generavo I_{max}^{app} apie 200 μAcm^{-2} , K_M^{app} etanolui siekė apie 1 mM, o k_{in} buvo $2,7 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ [87];

◇ polipirolo polimeru modifikuoto platinos elektrodo: šių sistemų K_M^{app} etanolui buvo 102 mM [84, 88];

◇ SAM iš skirtingų alkilsulfidų modifikuoto aukso elektrodo [84].

Siekiant išgauti didesnę bioelektrocheminės sistemos generuojamą atsaką, buvo kuriamos bereagentinės mediatorinės sistemos: osmio redokso polimerų [89] bei amorfinės anglies elektrodų, modifikuotų įvairiais feroceno dariniais [90] pagrindu. Taip pat buvo naudojami tirpūs mediatoriai: KF, sistemų tyrimuose, kuomet mADH buvo kovalentiškai imobilizuota ant celiuliozinės membranos [91]; FMS [92] ir DCFIF [90], sistemų tyrimuose, kuomet mADH buvo kovalentiškai imobilizuota ant polipirolo polimeru modifikuotos Pt. Šios antros kartos bioelektrocheminės sistemos generavo apie 1,5 – 2 kartų didesnę atsaką ir K_M^{app} etanolui buvo žymiai didesnis nei trečios kartos bioelektrocheminių sistemų. Tačiau mediatorinės sistemos nepasižymėjo dideliu stabilumu. Alkoholių koncentracijos nustatymui panaudota bioamperometrinė sistema su polipirolo polimeru pasižymėjo gebėjimu oksiduoti ne tik etanolį, bet ir metanolį, 1-propanolį, 1-butanolį ir iso-butanolį [92].

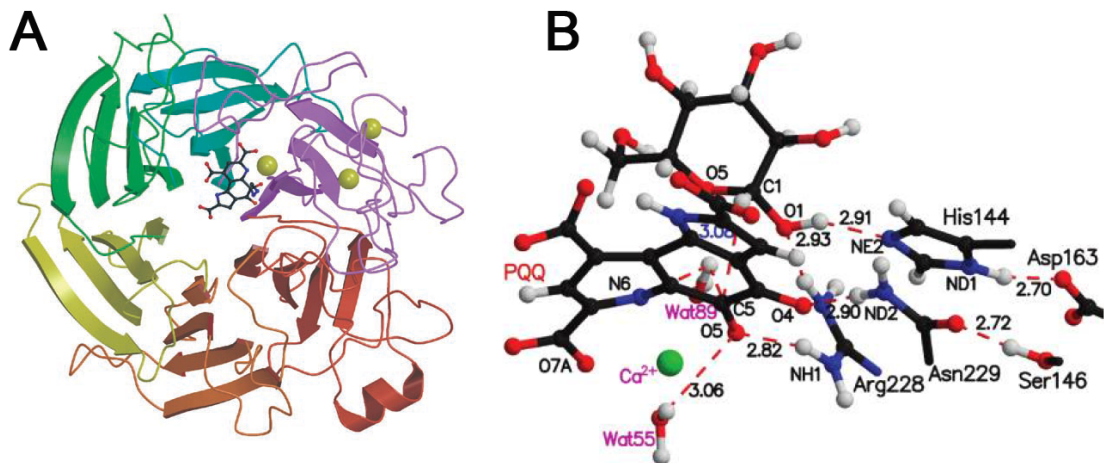
Efektyviausios ir ilgiausiai veikiančios sistemos su mADH buvo sukurtos ir pritaikytos etanolio-deguonies [93-94], etanolio [95] biologinio kuro elementuose.

Lyginant sukurtas sistemas su mADH, buvo pastebėta, jog vienas didžiausių trūkumų, konstruojant efektyviai ir ilgai veikiančias sistemas, yra mažas natyvaus fermento aktyvumas. 2011 metais išleistame straipsnyje mokslininkės Zulic ir Minter parodė, jog natyvaus fermento aktyvumą iki trijų kartų galima padidinti, pridėdant į bakterijų auginimo terpę fermento substrato – etanolio [96]. MADH aktyvumo padidėjimą mokslininkės paaiškino tuo, kad *Gluconobacter sp. 33* bakterijos, stengiantis išgyventi nepalankioje aplinkoje, didina mADH genų ekspresiją bei išvystė mADH didesnę specifinę aktyvumą ir

atsparumą didesnėms etanolio koncentracijoms, dėka galimų taškinių mutacijų mADH genų sekoje.

1.5.3 Bioelektrocheminės sistemos su GDH

Šiame darbe buvo tirta vandenyje tirpi nuo PQQ priklausoma gliukozės dehidrogenazė, E.C. 1.1.5.2, išskirta iš *Acinetobacter calcoaceticus* bakterijų periplazmos. 1964 m. Hauge su bendradarbiais išskirta GDH atrodė labai perspektyvi, kadangi pasižymėjo eile privalumų: fermento atsakui į substratą nedaro įtakos kintančios deguonies koncentracijos, fermento kofaktorius tvirtai surištas su apofermentu ir jo nereikia kaskart įvedinėti į analizinį tirpalą, be to, fermentas pasižymi labai dideliu specifiniu aktyvumu [97]. Dabar yra žinomi dar keli GDH privalumai: fermentas gali tiesiogiai reoksiduotis ant specifinių elektrodinių paviršių, yra pakankamai stabilus ir jam tinkami įvairūs dirbtiniai mediatoriai. Be to, daugelio mokslininkų manymų, GDH yra geriausia alternatyva GOx gliukozės biojutiklių kūrimo [98]. Todėl šiai dienai yra sukurta daug įvairių analizinių sistemų su GDH ir aktyviai tyrinėjami reakcijos bei EP mechanizmai.



1.12 pav. GDH monomero tretinė struktūra. **A** – fermento monomero juostinė diagrama. Kiekviena β -propelerio plokštė pavaizduota skirtinga spalva. Ca^{2+} pavaizduotas geltona sfera [68]. **B** – fermento aktyvusis centras su PQQ ir D-gliukozės molekulėmis. Punktyrinė linija vaizduoja molekulių atomų sąveikas, o skaičiumi atžymėtas atstumas tarp C1 atomo gliukozėje ir C5 atomo PQQH. Wat55 ir Wat89 – vandens molekulės [99].

GDH yra homodimerinis baltymas [100-101], kurį sudaro du identiški monomerai (kiekvienas po 50 kDa, 454-ių aminorūgščių polimeras). Vienas

dimeras jungia dvi PQQ molekules ir šešis Ca^{2+} jonus. Keturi Ca^{2+} jonai reikalingi monomero dimerizacijai, o kiti du dalyvauja katalizinėse procesuose [100]. Fermento aktyvųjų centrą sudaro 23 aminorūgštys, vienas Ca^{2+} jonas ir PQQ molekulė. PQQ molekulė yra giliai baltymo globulėje ir nekovalentiškai bet labai stipriai rišasi su apofermentu [99]. Fermento izoelektrinis taškas yra 9,5 [100-101]. GDH monomero erdvinėje struktūroje dominuoja β -propelerio struktūros. Šešios β -propelerio plokštės sudarytos iš keturių priešingos krypties paralelinių β -klosčių ir formuoja šešias β -propelerio pseudosimetrijos ašis [101] (1.12 pav. A). Ketvirtinės struktūros susidarymas yra būtinas fermento aktyvumui [68, 98, 101]. Yra nustatyta, jog dimerų kontakto aplinkoje yra 19-os aminorūgščių šoniniai radikalai, iš kurių net 8 nesudaro elektrostatinės, hidrofobinės ar vandenilio sąveikos. Todėl yra eilė publikuotų darbų, kur nuodugniai tyrinėjama bei stengiamasi sustiprinti sąveiką tarp GDH monomerų, kas leistų padidinti fermento stabilumą [98, 102-106].

GDH pasižymi substratiniu specifiskumu aldozėms: katalizuoja heksozių, pentozių, monosacharidų ir disacharidų oksidaciją iki laktonų. Šis fermentas labai efektyviai vykdo katalizės reakcijas, jo katalizinė konstanta (k_{cat}) D-gliukozei yra 1550 s^{-1} , o $K_M - 3,0 \text{ mM}$ [100]. Biokatalizė vyksta efektyviausiai TRIS/HCl buferiniame tirpale su elektronų akceptoriumi Viursterio mėlynuoju, esant pH 9,0, ir fosfatiniame buferiniame tirpale su elektronų akceptoriumi DCFIF, esant pH 6,0. Tačiau, fermento aktyvumą matuojant spektrofotometriškai su KF ir keičiant buferinio tirpalo prigimtį bei pH, nebuvo gauta atsako į gliukozę, todėl KF yra netinkamas GDH elektronų akceptorius [100]. Fiziologinis GDH elektronų akceptorius kol kas nėra nustatytas [99].

GDH vykdomą katalizę galima aprašyti „ping-pong“ mechanizmu. Nustatyta, jog esant didelėms substrato koncentracijoms, fermentas pasižymi neigiamu kooperatyvumu [100-101, 107-108], kuris gali būti paaiškintas skirtinga substrato molekulės prisijungimo prie vieno subvieneto fermento aktyviojo centro ir katalizės kinetika, priklausomai nuo to, ar yra redukuotas kitas GDH subvienetas [107]. Be to, Olsthoorn ir bendradarbiai nustatė, kad

GDH, nepaisant jos plataus substratinio specifiškumo, reaguoja tik su tam tikrais substratų enantiomerais ir anomerais. Fermentas katalizuoja tik β -D-gliukozės oksidaciją, o su α -D-gliukozės anomeru nesudaro net fermento-substrato komplekso. GDH specifiškai oksiduoja β -D-galaktozę, β -D-ksilozę, α -L-arabinozę ir visas kitas aldoses, kurios turi tokią pačią anomerinę C-atomo konfigūraciją, kaip β -D-gliukozės, bei fermento aktyvumas siekia 37% su α - ir 63% su β -D-piranoze [109].

Tiriant GDH veikimą amperometrinėse sistemose, buvo naudojami įvairūs tirpūs mediatoriai: N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiaminas [97], DCFIF, FMS [110], 1-metoksifenazinasulfatas [111], įvairūs rutenio (II/III) organiniai kompleksai [112]; feroceno dariniai: feroceno monokarboksirūgštis [97], feroceno karboksirūgštis, ferocenmetanolis [113-115]; *p*-aminofenolis [114]. Durand ir bendradarbiai nustatė, jog GDH sistemose su tirpiaisiais feroceno dariniais pasižymi kooperatyvumu, t.y. bioelektrokatalizė vyksta žymiai aktyviau, kai abu GDH subvienetai sąveikauja su gliukozės molekulėmis. Tačiau GDH taip pat būdinga ir inhibicija substratu. Kai gliukozės koncentracija viršija 100 mM, bioelektrokatalizės efektyvumas pradeda ženkliai mažėti [116]. Kulys ir Bratkovskaja parodė, jog bioelektrocheminėse sistemose su GDH, naudojant kelis skirtingus mediatorius, stebimas mediatorių sinergetinis efektas. Neefektyvią GDH reoksidaciją ant grafito elektrodo su KF žymiai pagreitino fenoksazino, fenazino, fenotiazino ir feroceno dariniai [108].

Vienos pirmųjų bereagentinių sistemų su GDH ir mediatoriais buvo kuriamos ant anglinių elektrodų. Fermentas buvo imobilizuojamas fizikine adsorbcija ir imobilizacija su glutaro aldehidu ir jaučio serumo albuminu (BSA) ant grafito strypo modifikuoto su 1,1'-dimetilferocenu. K_M^{app} gliukozei svyravo nuo 1,5 iki 8,0 mM, o efektyviausios bioelektrokatalizės metu buvo generuojamas apie $54 \mu\text{Acm}^{-2}$ atsakas [97]. Stiklo anglies elektrodas buvo modifikuojamas laidžiu epoksiolimeru ir osmio organiniu kompleksu, ant kurio vėliau imobilizuota GDH bioelektrokatalizės metu generavo $1,8 \text{mAcm}^{-2}$ į 70 mM gliukozės. Tačiau ši sistema pusę savo aktyvumo prarado per 8

valandas [117]. Neseniai pasirodęs Wettstein straipsnis, kuriame aprašomas imobilizuotos GDH veikimas ant aukso elektrodų, modifikuotų su DNR ir citochromu c. Šios bioamperometrinės sistemos K_M^{app} gliukozei buvo 0,18 μM , o maksimalus srovės tankis 20 nAcm^{-2} , naudotas 2-(N-morfolino)etansulfoninės rūgšties buferinis tirpalas [118].

Bereagentės bioelektrocheminės sistemos su GDH, kuriose realizuota TEP, buvo konstruojamos taip pat ant anglinių elektrodų. Siekiant išgauti efektyvią TEP, buvo genetiškai modifikuojamas fermentas [119] arba modifikuojama elektrodinė medžiaga. TEP buvo gauta ant elektrodų, sukonstruotų iš chemiškai modifikuotos anglies [120], kriogeliu impregnuotos anglies [121] anglies nanovamzdelių (ANV) ir papildomai modifikuotų su įvairias polianilino polimerais (PANI) ANV-ių [122-123]. Kone efektyviausia TEP vyko sistemose, kuriose naudoti anglies elektrodai impregnuoti kriogeliu [121] (sistemos maksimalus srovės tankis: 1 mAcm^{-2}) ir daugiasieniai anglies nanovamzdeliai (DSANV), modifikuoti PANI [123] (sistemos maksimalus srovės tankis: 0,5 mAcm^{-2}), tačiau stabiliausiai sistemos veikė su chemiškai modifikuota anglimi, kurios generavo atsaką į gliukozę apie mėnesį [120]. Taip pat buvo pastebėta, jog TEP nevyksta nuo GDH aktyviojo centro ant metalinių paviršių. Tačiau kai nuo fermento atplėšiamas PQQ kofermentas ir imobilizuojamas ant aukso nanodalelių ir vėliau leidžiama GDH apofermentui susijungti su imobilizuotu kofermentu, vykstant bioelektrokatalizei, stebima efektyvi EP nuo PQQ ant aukso [124].

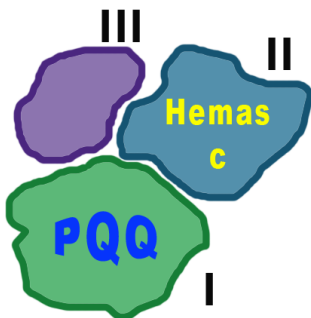
Literatūroje taip pat aprašyti keli gliukozės-deguonies biologiniai kuro elementai su GDH [123, 125]. Abiems atvejais anodas ir katodas buvo konstruojami, panaudojant DSANV. Ant katodo buvo stebima TEP nuo bilirubino oksidazės (BOx) ant elektrodo. Efektyviausias biologinis kuro elementas gautas kuomet GDH buvo kovalentiškai imobilizuota ant DSANV modifikuotų su PANI polimerais [123].

Prieš tai aptartos bioelektrocheminės sistemos buvo naudojamos tiesioginiam gliukozės koncentracijos nustatymui. Tačiau GDH sistemos gali būti panaudotos ir dirbtinių mediatorių koncentracijos nustatymui: tokių kaip

fenoliai ir katecholaminai [126-127], amperometriniuose DNR jutikliuose: GDH panaudojama kaip DNR hibridizacijos žymė, vietoj tipinės GOx [111]; imunosensoriuose, kaip avidino-biotino sąveikos žymė [128]; ATF jutikliuose panaudojama GDH ir heksokinazės sistema, iš kurios atsako į gliukozę mažėjimo buvo sprendžiama apie ATF koncentracijos pokyčius [113, 129].

Kaip galima matyti iš aptartų atvejų, bioelektrocheminės sistemos su GDH gali būti pritaikomos labai įvairiose srityse, todėl elektrodinių medžiagų, imobilizavimo būdų ir kitų veiksnių įtaka GDH veikimui turi būti nuodugniai ištirta.

1.5.4 Bioelektrocheminės sistemos su FDH



1.13 pav. FDH struktūros schema.

Fructozės dehidrogenazę (FDH), E. C. 1.1.99.11, kartu su kitais su membrana surištais fermentais 1966 m. išskyrė Yamada ir jo bendradarbiai iš *Gluconobacter cerinus*. Ameyama ir bendradarbiams 1981 m. pavyko išgryninti ir aprašyti šį fermentą iš kito *Gluconobacter industrius* kamieno. Šie mokslininkai nustatė, jog fermentas yra labai jautrus D-fruktozei, kurią oksiduoja iki 5-keto-D-fruktozės, ir visiškai nereaguoja su D-

gliukoze, D-manoze, D-fruktozės-6-fosfatu, D-fruktozės-1,6-difosfatu, 5-keto-D-fruktoze, D-gliukozės-6-fosfatu, D-gliukozės-1-fosfatu, D-gliukonatu, 2-keto-D-gliukonatu ir su 5-keto-D-gliukonatu. Be to, jo veikimui nedarė įtakos vandenyje ištirpęs deguonis, kaip ir kitų PQQ priklausomų fermentų [130]. Todėl FDH, kaip atpažinimo elementas tapo labai patraukti fruktozės biojutiklių kūrimui [130-132].

Nors šis fermentas žinomas seniai, tačiau jo struktūra ir veikimo mechanizmas nėra detalčiai ištirti. Yra žinoma, jog tai yra membraninis chinohemobaltymas, sudarytas iš trijų subvienetų: PQQ rišančio katalizinio subvieneto (67 kDa), citochromo c tipo subvieneto (51 kDa) ir 20 kDa peptido, kuris, manoma, reikalingas fermento ketvirtinei struktūrai susidaryti ir sąveikai su membrana [130, 132-133] (1.13 pav.). FDH natūralus elektronų akceptorius,

manoma, yra citochromas c ir/arba ubichinonas [133]. Tačiau FDH yra tinkami ir nefiziologiniai elektronų akceptoriai [130, 132]. Fermento veikimo optimumas yra esant pH 4,0 – 4,5 bei 25 °C temperatūrai (FDH aktyvumas smarkiai mažėja, jį laikant aukštesnėj nei 35 °C temperatūroje). Jo izoelektrinis taškas yra 5,0, o K_M fruktozei – 10 mM [130]. Fermento katalizuojama reakcija, kaip ir daugumos kitų oksidoreduktazių, galima aprašyti „ping-pong“ mechanizmu [132].

Įvertinant visas išvardintas FDH savybes ir labai didelį specifiškumą fruktozei, galima teigti, jog perspektyviausia jos pritaikymo sritis būtų bioelektrocheminės analizinės sistemos. Šiuo metu jau yra sukurta nemažai analizinių sistemų su FDH. Jos buvo kuriamos TEP pagrindu arba EP greitinant įvairiomis mediatorinėmis medžiagomis.

TEP tarp FDH aktyviojo centro ir elektrodo yra realizuota ant platinos ir aukso [134]. Siekiant išgauti optimalų fermento kiekio imobilizavimą ir orientaciją ant elektrodo, elektrodų paviršiai iš aukso buvo modifikuojami SAM-iais iš alkantiolių [133], o sidabro elektrodų paviršiai – sidabro nanodalelėmis [135]. Taip pat TEP tarp FDH vyko ant anglinių paviršių: anglies pastos [136], stiklo anglies [134], porinės anglies [137], Ketjen black suodžių [138], DSANV [139] bei polipirolu modifikuoto platinos elektrodo [140].

Efektyviausia TEP buvo gauta ant Ketjen black suodžių, kuomet maksimaliausias srovės tankis buvo pasiektas iki 10 mAcm⁻² [138]. Taip pat buvo nustatyta, jog optimaliausios TEP sąlygos, panašiai kaip ir natyvaus fermento yra: McIlvain buferinis tirpalas, pH 4,5; darbinis elektrodo potencialas +450 mV (vs. Ag/AgCl), jei naudojamos anglinės medžiagos [136-137, 139], ir nuo -100 iki +40 mV, 25 °C, jei naudojami metaliniai paviršiai [134-135].

Bereagentės sistemos su FDH buvo formuojamos, imobilizuojant ant elektrodų paviršiaus *p*-benzochinoną ir feroceną [141-142], ubichinoną 6 [143], tetratiafulvalenu ir tetracianochinodimetanu modifikuotą polipirolą [144], bei panaudojant komercinius spausdinto montažo ferocianido ir anglies

elektrodus [131] ar Meldola mėlynąjį [145]. Visos mediatorinės bereagentės sistemos, lyginant su sistemomis TEP pagrindu, pasižymėjo didesniu stabilumu ir generuojamu maksimaliu srovės tankiu. Ilgiausiai veikiančios bioelektrocheminės sistemos buvo gautos su *p*-benzochinonu, kuomet sistema generavo $15 \mu\text{Acm}^{-2}$ maksimalų srovės tankį ir atsakas buvo registruojamas ilgiau nei septynias savaites [141]. Efektyviausios sistemos buvo sukurtos ant aukso elektrodų modifikuotų su SAM iš alkiltolių ir fosfolipidų bei panaudojant ubichinoną 6, kaip mediatorių [143]. Sistemos jautrumas 1 mM fruktozei siekė net $20 \mu\text{Acm}^{-2}$. Tačiau sistemos praradavo aktyvumą dėl PQQ pasišalinimo iš FDH aktyviojo centro. Šią problemą mokslininkai išsprendė atstatydami bioelektrocheminės sistemos aktyvumą inkubuojant fermentą su PQQ.

Bioelektrocheminės sistemos su FDH tirtos ir su vandenyje tirpiaisiais mediatoriais: FMS ir KF [141, 146-148].

Visos minėtos bioelektrocheminės sistemos buvo taikomos fruktozės koncentracijos nustatymui. Daugelis autorių pažymėjo, jog sistemos nėra jautrios gliukozei, galaktozei, cukrozei, laktozei, maltozei, ksilozei ir arabinozei. Tačiau, esant anglies pastos ar platinos darbinio elektrodo potencialui +450 mV vs. Ag/AgCl potencialui, gautas atsakas į aspartatą [141, 148] bei foninė gliukozės oksidacijos srovė, esant +500 mV vs. Ag/AgCl potencialui, ant Au ir Pt elektrodų [134]. Nespecifinius atsakus į substratus dalinai išsprendė neigiamai įkrautuos pusiaupralaidžios membranos uždėjimas ant elektrodo paviršiaus, o taip pat SAM sluoksnis, dėl kurio atsitiktiniai metabolitai negalėjo patekti ant aukso paviršiaus. Kai kurios mediatorinės bioelektrocheminės sistemos su FDH buvo naudojamos bifermentinėse sistemose laktuliozės (su β -galaktozidaze) [149] ir gliukozės (su GOx) [150] nustatymui.

Be analizinių sistemų buvo sukurtas ir fruktozės-deguonies biologinis kuro elementas, kur bioanodas buvo formuojamas ant modifikuotu celiulioze ir joniniais skysčiais DSANV su imobilizuota FDH, o biokatodas – su imobilizuota BOx [151].

Nežiūrint to, kad šiuo metu jau yra sukurta gan įvairių efektyviai veikiančių analizinių sistemų naudojančių FDH, tačiau šis fermentas dar niekada nebuvo taikomas retojo cukraus tagatozės atpažinimui. Įvertinant tai, kad tagatozės nustatymui yra naudojami sudėtingi metodai tokie, kaip spektrofotometriniai [46] ir skysčių chromatografijos [47-48], bioelektokatalizinė tagatozės nustatymo sistema naudojanti FDH, yra labai perspektyvi.

1.6 Išvalgos ir aktualijos

Bioelektrocheminių sistemų konstrukcijų, matavimo metodų bei pritaikymo galimybės yra labai plačios. Šiame darbe tirtos oksidoreduktazės dėl savo unikalių savybių sėkmingai gali būti taikomos, kuriant tiek analizines ar sintezės sistemas, tiek biologinius kuro elementus. Efektyviausios ir ilgiausiai veikiančios bioelektrokatalizinės sistemos buvo gautos ant anglinių paviršių ir porėtą struktūrą turinčių laidžių polimerų. Tačiau kol kas išlieka nevisai aiškūs fermentų veikimo mechanizmai ir heterogeninės EP keliai įvairiose bioelektrocheminėse sistemose. Taip pat, nepaisant aukšto generuojamo atsako į substratus, sistemų veikimas nėra optimizuotas tiek, kad fermentas išliktų gyvybingas ištisus metus ar net ilgiau. Todėl fermentų imobilizavimo metodikos, optimalaus elektrodinio paviršiaus, mediatoriaus parinkimas bei pritaikymo galimybės lieka atviri klausimai.

2 MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos

Fermentai:

Membraninė ADH išskirta iš *Gluconobacter sp. 33*, E. C. 1.1.5.5, Vilniaus universiteto Biochemijos instituto (VU BchI) Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje (Lietuva), pagal literatūroje aprašytą metodiką [82]. Naudotas fermento 5 mM Tris buferinis tirpalas (pH 7,5), turintis 1 mM CaCl₂, 0,02 % Tritono-X-100 ir 0,5 % sacharozės, aktyvumas 200 U/ml.

Tirpi ADH išskirta iš *Pseudomonas putida* HK5 ląstelių, E. C. 1.1.9.1, VU BchI Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje (Lietuva), pagal literatūroje aprašytą metodiką [74]. Naudotas fermento 5 mM Tris buferinis tirpalas (pH 8,5), turintis 5 mM CaCl₂, aktyvumas 130 U/ml.

GDH išskirta iš *Acinetobacter calcoaceticus*, E. C. 1.1.5.2, VU BchI Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje (Lietuva), pagal literatūroje aprašytą metodiką [100]. Naudotas fermento 5 mM Tris buferinis tirpalas (pH 8,0), turintis 1 mM CaCl₂, aktyvumas 1800 U/ml.

GDH mutantai su pakeistu substratiniu specifiškumu: Mut33, Mut35 ir Mut42 sukonstruoti projektui „Bioelekrokatalizė sintezėje ir analizėje“ (Reg. Nr. N-08007) BchI Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje (Lietuva). Jų paieška ir gryninimas aprašyti 2008 m. projekto ataskaitoje. Naudoti fermentų tirpalai 5 mM Tris buferiniame tirpale (pH 8,0), turinčiame 1 mM CaCl₂.

FDH, išskirta iš *Gluconobacter industrius*, E. C. 1.1.99.11 („Sigma-Aldrich“, Vokietija). Naudotas fermento McIlvaino buferinis tirpalas (pH 4,6), aktyvumas 800 U/ml.

AOx išskirta iš *Pichia pastoris*, E.C. 1.1.3.13 („The Merck Group“, Vokietija). Naudotas liofilizuotas fermentas.

TAI išskirta iš *Geobacillus lituanicus* 5 VU BchI Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje (Lietuva). Fermentas išgrynintas giminingumo chromatografijos būdu, jo aktyvumas nustatytas cisteino-

karbazolo kolorimetriniu metodu, pagal D(-)-tagatozės susidarymo iš D-(+)-galaktozės greitį [152]. Naudotas fermento 50 mM K₂HPO₄ buferinis tirpalas (pH 7,5), turintis 1 mM MgCl₂, aktyvumas 28 U/ml.

Elektrodinės medžiagos:

Amorfinė anglis „Raven M“ (Cst) iš „Columbian Chemicals Co“ (JAV). Grafitas iš „Rings-dorff Werke GmbH“ (Vokietija).

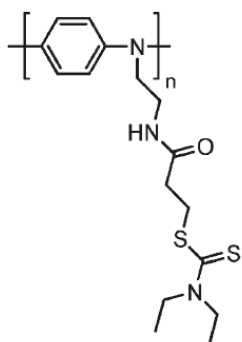
Chemiškai modifikuota amorfinė anglis (ChMA) susintetinta ir ištirta VU Chemijos fakulteto Bendrosios ir neorganinės chemijos katedroje (Lietuva) pagal literatūroje aprašytą metodiką [87].

Grafito oksidas (GO) buvo susintetintas pagal [153] aprašytą metodiką, o grafito oksidacijos produktai: OG-1P, OG-1S, OG-2P bei OG-2S susintetinti ir ištirti pagal [154] aprašytą metodiką VU Chemijos fakulteto Bendrosios ir neorganinės chemijos katedroje (Lietuva). OG-1S ir OG-2S buvo sintetinti iš papildomai sonifikacijos būdu smulkinto grafito.

2.1 lentelė. Anglinių medžiagų funkcinės grupės [87, 154].

<i>Anglinės medžiagos</i>	<i>Funkcinių grupių kiekis, mmol/g</i>						<i>Smulkiosios frakcijos kiekis, masės dalimis</i>	
	<i>Bendros rūgštinės</i>	<i>Hidroksi-</i>	<i>Karboksi-</i>	<i>Laktoninės</i>	<i>Fenolinės</i>	<i>Bendros bazinės</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
Cst	0,1	-*	-*	-*	0,1	0,592	-*	-*
ChMA	0,86	-*	0,000	0,000	0,86	0,74	0,693	0,133
GO	-*	3,433	0,278	1,511	-*	0,000	-*	-*
OG-1P	-*	0,000	0,000	0,000	-*	0,108	-*	-*
OG-1S	-*	0,000	0,000	0,000	-*	0,157	-*	-*
OG-2P	-*	0,000	0,000	0,000	-*	0,138	-*	-*
OG-2S	-*	0,000	0,000	0,000	-*	0,167	-*	-*

* nebuvo nustatyta



2.1 pav. PoliNDDEAEA struktūrinė formulė.

Poli - N - (N, N'- dietil ditiokarbamoil etil amidoetil) - anilinas (poliNDDEAEA) (2.1 pav.) gautas cheminės polimerizacijos būdu kaip aprašyta 2.2.5 sk. iš N - (N, N'- dietil ditiokarbamoil etil amidoetil) – anilino (NDDEAEA), kuris buvo susintetintas ir iširtas Kranfildo biotechnologijos centre (Kranfildo universitetas, Jungtinė Karalystės) pagal literatūroje aprašytą metodiką [155].

Elektronų akceptoriai ir mediatorinės medžiagos:

Vandenyje tirpūs mediatoriai: KF, FMS iš „Sigma Aldrich“ (Vokietija) ir DCFIF iš „Fluka Chemie GmbH“ (Vokietija).

Nauji chinoniniai mediatoriai susintetinti VU BchI Bioorganinių junginių chemijos skyriuje (Lietuva). Chinoninių mediatorių struktūrinės formulės, IUPAC pavadinimai ir pavadinimų santrumpos, naudotos šiame darbe, aprašyti 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Chinoninių mediatorių struktūrinės formulės.

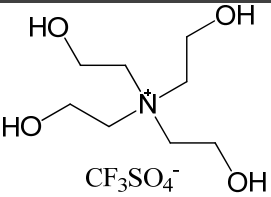
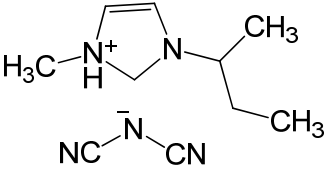
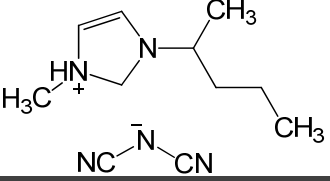
<i>Struktūrinė formulė</i>	<i>Pavadinimas</i>	<i>Sant-rumpa</i>	<i>Struktūrinė formulė</i>	<i>Pavadinimas</i>	<i>Sant-rumpa</i>
	2-(2-fluoro(fenil)amino)-R*	1F		2-(4-fluoro(fenil)amino)-R*	2F
	2-(2-metoksi(fenil)amino)-R*	1M		2-(4-metoksi(fenil)amino)-R*	2M
	2-(3-nitro(fenil)amino)-R*	MN		2,5-bis[metil(fenil)amino]-R*	BBen
	2-[metil(fenil)amino]-R*	Ben			

*R – cikloheksa-2,5-dien-1,4-dionas

Joniniai skysčiai:

Darbe tirti joniniai skysčiai (JS-iai) buvo susintetinti VU BchI Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje (Lietuva). JS-ių struktūrinės formulės, IUPAC pavadinimai ir jų žymėjimai, naudoti šiame darbe, aprašyti 2.3 lentelėje. Visi darbe naudoti JS-iai yra skysti esant kambario temperatūrai.

2.3 lentelė. Joninių skysčių struktūrinės formulės

<i>Struktūrinė formulė</i>	<i>Pavadinimas</i>	<i>Žymėjimas</i>
	Tetrakis-(2-hidroksietil) amonio trifluorometansulfonatas	JS ₁
	1-iso-butil-3-metilimidazolo dicianamidas	JS ₂
	1-iso-pentil-3-metilimidazolo dicianamidas	JS ₃

Kitos medžiagos:

Alkoholiai: 1,2-propandiolis („J. T. Baker“, Nyderlandai), etanolis („Riedel – de Haen“, Vokietija), 1,3-propandiolis („Merck“, Vokietija), metanolis, 2-propanolis, alilo alkoholis ir 3-metil-1-butanolis („Reachim-Pharm Ltd“, Rusija), 2-butanolis („Reanal“, Vengrija), 2-dekanolis („Fluka Chemie GmbH“, Vokietija), 1,3-diamino-2-propanolis, PVA („Fluka Chemie GmbH“, JAV).

Angliavandeniai: D-(+)-gliukozė, D-(+)-galaktozė, D-(-)-tagatozė, D-(-)-fruktozė („Merc“, Vokietija)

Kiti reagentai: natrio acetatas, CaCl₂ („Lachema“, Čekijos Respublika), acto rūgštis, NaOH („J. T. Baker“, Nyderlandai); Tris („Carl Roth GmbH + Co“, Vokietija), imidazolas („Fluka AG“, Šveicarija), KCl („Riedel – de Haen“, Vokietija), polivinildichloridas („Fluka Chemie GmbH“, Vokietija),

BSA, KCl, $K_4[Fe(CN)_6]$, HCl, acetonitrilas, N_2 , $(NH_4)_3S_2O_8$ („Sigma Aldrich“, Vokietija), Na_2HPO_4 , 0,1 M citrinos rūgštis, chloroformas, glutaro aldehidas, natrio azidas, skruzdžių rūgštis (85%), koncentruota sieros rūgštis (95%) („AppliChem“, Vokietija), švitrinis popierius, lavsano (polietileno tereftalato) plėvelė (storis 12 μ M, porų diametras 0,4 μ M) („Joint Institute of Nuclear Research“, Rusija); žėrutis („SPI Supplies Inc“, JAV); 1,5 ml ir 1 cm storio „semi-micro PMMA“ kiuvetės („Brand GmbH+Co KG“, Vokietija), dializės maišelis (iš celiuliozės, MWCO 12000, plotis 25 mm) („Sigma-Aldrich“, Vokietija).

2.2 Tirpalai

Buferiniai tirpalai:

Buferiniai tirpalai ruošti naudojant dejonizuotą vandenį. Tirpalų pH nustatymui naudotas pH-metras „pH/nV Meter Ultra Basis“ firmos „Denver instrument“ (JAV). Ruošiant buferinius tirpalus, norimas pH gautas, pridėdant reikiamą tūrį koncentruotų NaOH arba HCl tirpalų.

0,05 M acetatinis buferinis tirpalas, turintis 0,01 M $CaCl_2$ ir 0,01 M KCl, pH 4,0 – 6,2; 0,05 M imidazolo buferinis tirpalas, turintis 0,01 M $CaCl_2$ ir 0,01 M KCl, pH 6,2 – 7,0; 0,05 M Tris buferinis tirpalas, turintis 0,01 M $CaCl_2$ ir 0,01 M KCl, pH 7,0 – 11,0; 0,05 M fosfatinis (KH_2PO_4) buferinis tirpalas, turintis 0,01 M KCl ir 0,001 M $MgCl_2$, pH 7,0; 0,01 M fosfatinis (Na_2HPO_4) buferinis tirpalas, turintis 0,1 M KCl, pH 8,0 ir 7,5; McIlvaino buferinis tirpalas ruošiamas ir norimas pH pasiekiamas, kaip aprašyta literatūroje [156], skirtingomis proporcijoms sumaišant 0,2 M Na_2HPO_4 ir 0,1 M citrinos rūgšties vandeninius tirpalus, pH 2,2 – 8,0.

Fermentų substratų tirpalai:

Naudoti 10 ir 100 mM etanolio, 1,2-propandiolio, gliukozės, fruktozės, tagatozės ir galaktozės tirpalai buferiniame tirpale arba dejonizuotame vandenyje, 100 mM metanolio, 2-propanolio, 2-butanolio, 3-metil-1-butanolio, 2-dekanolio, alilo alkoholio, 1,3-diamino-2-propanolio ir 1,3-propandiolio tirpalai buferiniuose tirpaluose.

Vandenyje tirpių mediatorių ir elektronų akceptorių tirpalai:

Naudoti 100 mM KF buferiniuose tirpaluose; 5 mM DCFIF tirpalas dejonizuotame vandenyje ir buferiniuose tirpaluose, 10 mM FMS tirpalas buferiniuose tirpaluose.

Chinoninių mediatorių tirpalai:

Naudoti 10 mg/ml MN, Ben, BBen, 1M, 1F, 2M, 2F ir *p*-benzochinono tirpalai chloroforme.

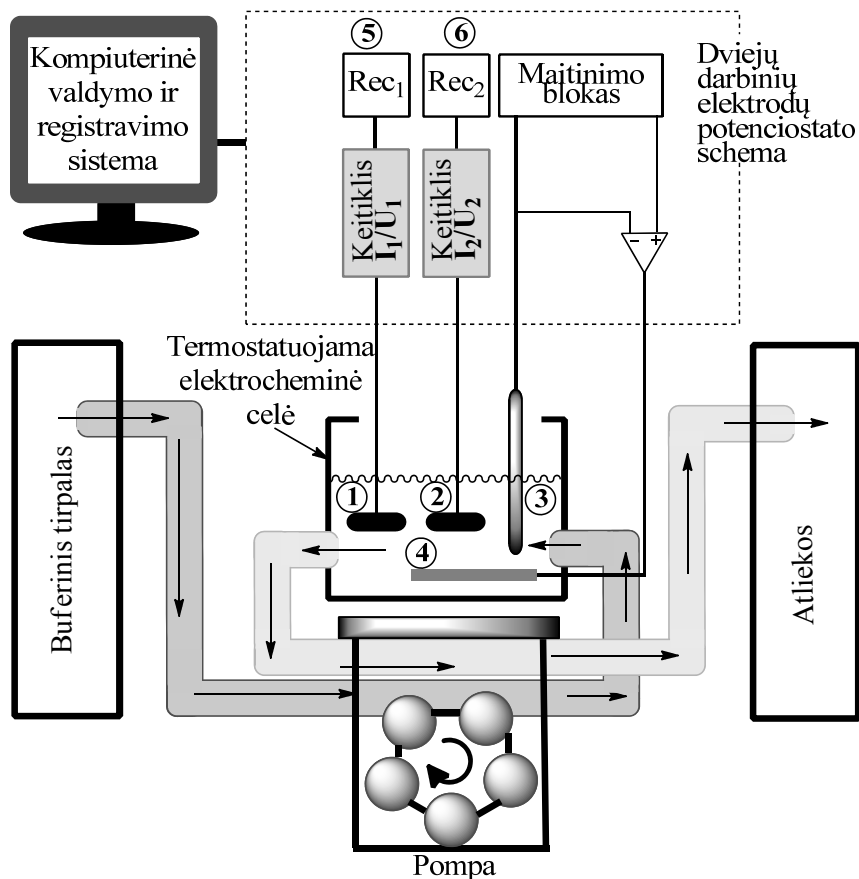
Kiti tirpalai:

Naudotas 3 M KCl vandeninis tirpalas, 0,5 M H₂SO₄ vandeninis tirpalas, 0,1 M NDDEAEA tirpalas acetonitrile, 0,0915 M (NH₄)₃S₂O₈ vandeninis tirpalas, 1 M HCl vandeninis tirpalas. JS₁, JS₂, JS₃ tirpalai: 25%, 37,5%, 50%, 62,5% ir 75% (masės dalimis) vandeniniai tirpalai.

2.3 Aparatūra

Elektrocheminės sistemos „PARSTAT 2273“ ir „PARSTAT 2263“ firmos „Princeton applied research“ (JAV); potencioštat, sujungtas su termostatuojama pratekama dviejų darbinių elektrodų elektrochemine celiu, valdomas kompiuteriu su adaptuota programine įranga (2.2 pav.), sukurtas VU BchI Bioanalizės skyriuje (Lietuva).

Spektrofotometras „UV 300, UV-Visible spectometr“ firmos „Termo Spectronic“ (JAV); atominės jėgos mikroskopas (AJM) „Agilent 5500 AJM/STM“ iš „Agilent Technologies Inc“ (JAV), analizatorius „Eksan A“ iš UAB „Analita“ (Lietuva); svarstyklės: „KERN EW 220-3NM“ firmos „KERN & Sohn“ (Vokietija); mikropipetės: „Transferpette“ („BrandTechScientific“, JAV) ir „Eppendorf“ (Vokietija), termostatas-maišyklė „RCT basic ETS-D5“ („IKA-Werke“ GmbH & Co. KG, Vokietija).



2.2 pav. Pratekamos dviejų darbinių elektrodų elektrocheminės celės principinė schema. Celės tūris 1,65 ml. 1 – pirmas darbinis elektrodas, 2 – antras darbinis elektrodas, 3 – palyginimo Ag/AgCl 3M KCl elektrodas, 4 – pagalbinis platinos elektrodas, 5 – 1-o darbinio elektrodo registruojamas signalas, 6 – 2-o darbinio elektrodo registruojamas signalas. Elektrocheminėje celėje palaikomas vienodas darbinių elektrodų potencialas. Per elektrocheminę celę tirpalo srautas teka tik praplaunant celę.

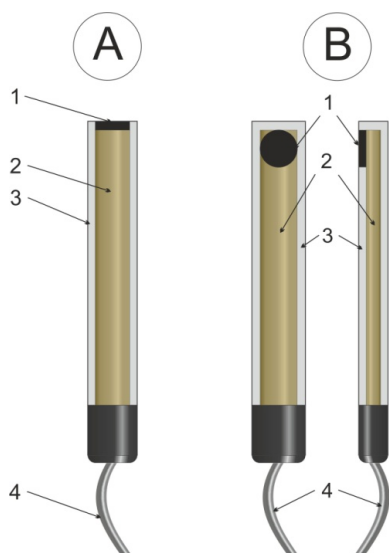
2.4 Metodai

2.4.1 Elektrodai ir jų paruošimas

Elektrocheminiams tyrimams atlikti buvo naudoti: pagalbinis – platinos elektrodas ir palyginimo – Ag/AgCl elektrodas iš „Princeton applied research“ (JAV), bei darbiniai elektrodai: anglies pastos, grafito, IDEA ir aukso mikroelektrodai (AuME-ai).

Anglies pastos elektrodai:

Darbe naudoti strypiniai ir plokštiniai anglies pastos elektrodai (APE-ai), pagaminti VU Biochemijos institute. Strypinio ir plokštinio elektrodų schemas pavaizduotos 2.3 paveiksle. Strypinių APE-ų pagrindas gaminamas iš metalinio strypo, jį įklijuojant į ištekintą cilindro formos nelaidų polimerą,



2.3 pav. Strypinio (A) ir plokštinio (B) APE-ų schemas. B – iš kairės – vaizdas iš viršaus; iš dešinės – iš šono. 1 – anglies pastos sluoksnis, 2 – metalinis strypas A atveju ir plokštelė B atveju, 3 – polimerinė izoliacinė danga, 4 – elektrodo kontakto su potenciostatu vieta.

paliekant 2,4 mm skersmens ir apie 1,5 mm gylio šulinėlį darbiniam elektrodo paviršiui suformuoti (2.3 pav. A). Plokštinių APE-ų pagrindas gaminamas iš metalinės plokštelės, ją įklijuojant į nelaidaus polimero izoliuojantį sluoksnį bei paliekant 2 mm skersmens ir apie 1 mm gylio šulinėlį darbiniam elektrodo paviršiui suformuoti (2.3 pav. B). Anglies pasta ruošama Cst sumaišius su rišančia ir plastifikuojančia medžiaga polivinildichloridu. Vėliau spausdinto montažo būdu anglies pasta dengiamas elektrodo pagrindas ir taip suformuojamas darbinio APE-o paviršius (2.3 pav. 1).

Grafito elektrodai:

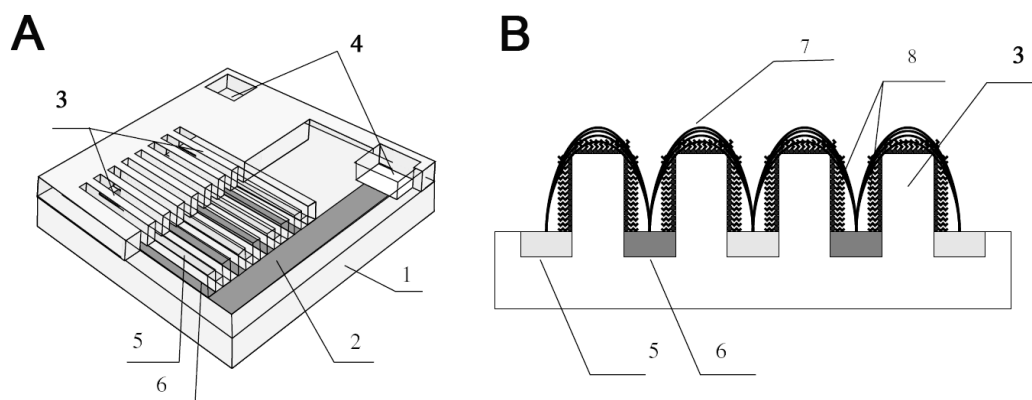
Grafito elektrodams (GE-ams) formuoti buvo naudotas grafito strypas RW001, Ø 3,05 mm, iš „Rings-dorff Werke GmbH“ (Vokietija). Ant grafito strypo buvo užmaunamas izoliacinės gumos cilindras. Taip paruoštą GE-ų paviršius buvo poliruojamas stambesniu švitrinium popieriumi, o po to smulkiu, kol įgydavo veidrodinį blizgesį.

Erdviniai IDEA elektrodai:

Erdviniai IDEA elektrodai (3D-IDEA) pagaminti Barselonos mikroelektronikos institute (IMB-CNM, CSIC) (Ispanija) kaip aprašyta [157-158].

3D-IDEA elektrodo schema pavaizduota 2.4 pav. A. Elektrodo kiekvienos iš dviejų srovę surenkančių plokščių „pirštai“ yra perskirti izoliaciniu barjeru. Atliekant impedimetrinius matavimus, didesnė tekančios srovės dalis teka ne per elektrodą supantį tirpalą, bet labai arti barjero paviršiaus (2.4 pav. B, 7). Šis

technologinis sprendimas padėjo ženkliai padidinti registruojamo atsako jautrumą, atliekant biomolekulių sąveikos tyrimus [158].



2.4 pav. 3D-IDEA elektrodo schema [157]. **A.** 3D-IDEA pagrindinės dalys: 1 – izoliacinis pagrindas iš Si/SiO₂, 2 – srovę surenkanti plokštė, 3 – 4 μm storio SiO₂ barjerai tarp “pirštų”, 4 – aliuminio kontaktai, 5, 6 – dviejų elektrodų “pirštai” iš TaSi. **B.** 3D-IDEA skerspjūvio schema: 7 – elektrinio lauko linijos, 8 – imobilizuotos biomolekulės.

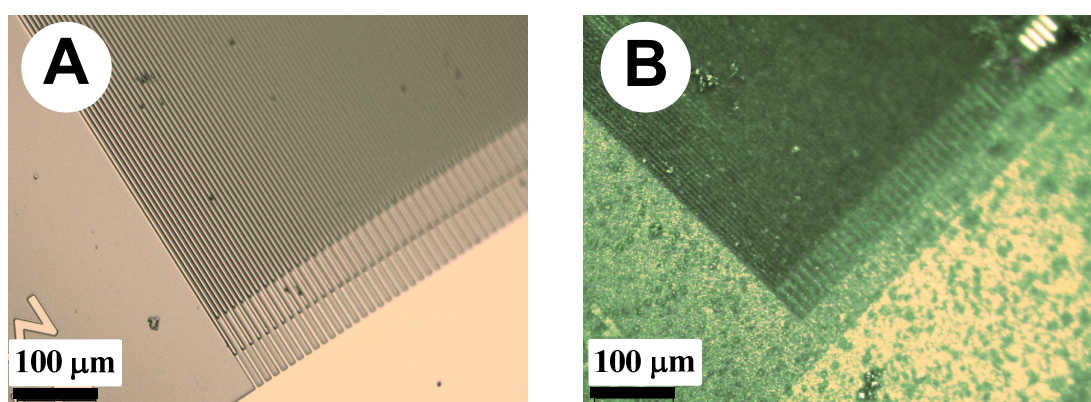
Aukso mikroelektrodai:

Aukso mikroelektrodai (darbinis paviršius 1,64 mm²) (AuME-ai) pagaminti, naudojant „lift-off“ techniką IMB-CNM, CSIC (Ispanija) formuojant 10 nm titano ir 100 nm aukso sluoksnius ant silicio oksidu (1 μm) dengto silikono pagrindo. Prieš eksperimentus AuME-ai buvo plaunami su dejonizuotu vandeniu ir sonifikuoti dejonizuotame vandenyje 10 min. Vėliau elektrodų paviršius buvo valomas elektrochemiškai ciklinės voltamperometrijos būdu, panaudojant elektrocheminę sistemą „PARSTAT 2273“ ir trielektrodinę elektrocheminę celę, kurią sudarė pagalbinis Pt elektrodas, palyginamasis Ag/AgCl ir darbinis – AuME-as. Valymas ciklinės voltamperometrijos būdu buvo atliekamas 0,5 M H₂SO₄ vandeniniame tirpale, skleidžiant potencialą nuo -0,2 V iki 1,7 V 10-20 kartų, 200 mVs⁻¹ greičiu iki kol voltamperogramoje bus gaunamos tipinės atsikartojančios aukso oksido smailės.

2.4.2 Elektrodo modifikavimas polianilino polimeru

3D-IDEA elektrodų ir AuME-ų modifikavimas poliNDDEAEA buvo vykdomas NDDEAEA oksidacinės polimerizacijos būdu, kaip aprašyta [155],

panaudojant $(\text{NH}_4)_3\text{S}_2\text{O}_8$. Polimerizacijos mišinys ruošiamas, sumaišant 250 μl 0,1 M NDDEAEA tirpalą acetonitrile su 207 μl 0,0915 M $(\text{NH}_4)_3\text{S}_2\text{O}_8$ vandeniniu tirpalu, 230 μl 1 M HCl vandeniniu tirpalu ir 680 μl dejonizuoto vandens. Elektrodai panardinami į polimerizacinį tirpalą, kad būtų apsemtas visas darbinis elektrodo paviršius ir laikomi tamsoje, esant kambario temperatūrai, 1,5 valandos. Pasibaigus polimerizacijai, ant elektrodo paviršiaus buvo matomas plonas žalios spalvos poliNDDEAEA sluoksnis (2.6 pav. B). PoliNDDEAEA padengti elektrodai nuplaunami dejonizuotu vandeniu ir džiovinami N_2 srove.



2.5 pav. 3D-IDEA elektrodo paviršiaus optinės mikroskopijos nuotraukos prieš (A) ir po modifikacijos su poliNDDEAEA (B).

2.4.3 Elektrodo modifikavimas chinoniniais mediatoriais

Eksperimentams paruošti GE-ai ir strypiniai APE-ai buvo modifikuojami chinoniniais mediatoriais fizikinės adsorbcijos būdu. 2 μl 10 mg/ml chinoninio mediatoriaus tirpalo chloroforme užlašinama ant GE-o ar APE-o darbinio paviršiaus. GE-as ar APE-as paliekamas sorbuotis, esant kambario temperatūrai iki kol išgaruos mediatoriaus tirpalo tirpiklis (~30 min). Taip paruošti elektrodai laikomi sausai, esant 4°C temperatūrai.

2.4.4 Elektrodo modifikavimas chemiškai modifikuota amorfine anglimi ir įvairiais grafito oksidacijos produktais

Ant paruošto APE-o paviršiaus užberiama apie 1 mg ChMA, GO, OG-1P, OG-1S, OG-2P arba OG-2S medžiagos ir įpresuojama į anglies pastą. Neįpresuotos anglinės dalelės pašalinamos stipria oro srove. Taip paruošti elektrodai laikomi sausai.

2.4.5 Bioelektrocheminių sistemų paruošimas

Bioelektrocheminės sistemos buvo ruošiamos penkiais skirtingais būdais. Kadangi darbe naudoti įvairūs fermentai, elektrodinės medžiagos, mediatoriai, įvedama konstruojamų bioelektrocheminių sistemų pavadinimų formulė:

Fermentas-(jei yra) mediatoriaus pavadinimas-elektrocinė medžiaga (2-1)

Pvz., APE-as su GO ir imobilizuota tADH, bus vadinamas: tADH-GO-Cst, o APE-as modifikuotas MN ir FDH: FDH-MN-Cst.

Pastaba: pavadinimuose nenurodomi tirpūs mediatoriai, apsauginė lavisano plėvelė, naudoto elektrodo tipas.

Fermentų imobilizacija fizikinės adsorbcijos būdu

Bioampermetrinės sistemos buvo ruošiamos, absorbuojant ant paruoštų darbinių elektrodų paviršių 2 μ l atitinkamo fermento – mADH, tADH, FDH, GDH ar jos mutantų tirpalo. Darbinis elektrodas paliekamas adsorbuotis fermentui 1 val., esant 4 °C temperatūrai. Prieš darbą modifikuotas fermentu elektrodas nuplaunamas dejonizuotu vandeniu, kad nusiplautų neadsorbuotas fermentas.

TADH kopolimerizacija su poliNDDEAEA

TADH kopolimerizacija su poliNDDEAEA buvo atliekama ant 3D-IDEA elektrodų. Polimerizacijos mišinys ruošiamas, sumaišant 250 μ l 0,1 M NDDEAEA tirpalą acetonitrile su 207 μ l 0,0915 M $(\text{NH}_4)_3\text{S}_2\text{O}_8$ vandeniniu tirpalu, 230 μ l 1 M HCl vandeniniu tirpalu ir 690 μ l 0,9 mM tADH buferiniu tirpalu. Elektrodai panardinami į polimerizacinį tirpalą, kad būtų apsemtas visas darbinis elektrodo paviršius ir laikomi tamsoje, esant kambario temperatūrai, 1,5 valandos. Fermentu ir poliNDDEAEA padengti elektrodai nuplaunami dejonizuotu vandeniu ir džiovinami N_2 srove.

Taip paruošta bioelektrocheminė sistema vadinama tADH+poliNDDEAEA.

Bioelektrocheminių sistemų su imobilizuotais fermentais ant PVA modifikuotos lavisano plėvelės paruošimas

2 μ l 0,5% PVA vandeninio tirpalo užlašinama ant lavisano plėvelės, stengiantis, kad užlašintas tirpalo tūris nepasiskirstytų po visą plėvelę, o liktų

apytiksliai \varnothing 2 mm apskritime. PVA sorbuotis ant lavsano plėvelės paliekamas apie parą, esant kambario temperatūrai. Vėliau ant PVA modifikuotos lavsano plėvelės tADH arba GDH imobilizuojami fizikinės adsorbcijos būdu. 2 μ l tiriamo fermento tirpalo užlašinama ant modifikuotos plėvelės ir paliekama sorbuotis fermentui, esant 4 °C temperatūrai nuo 1-os val. iki 1-os paros.

Bioelektrocheminė sistema paruošiama, fermentu ir PVA modifikuotą lavsano plėvelę prispaudžiant ir užfiksuojant ant strypinio APE-o, taip, kad fermentas atsidurtų tarp plėvelės ir elektrodo paviršiaus. Prieš darbą paruoštas darbinis elektrodas nuplaunamas dejonizuotu vandeniu.

Taip paruoštos sistemos vadinamos:

(PVA)-tADH-Cst ir (PVA)-GDH-Cst.

Bereagenčių bioelektrocheminių sistemų su chinoniniais mediatoriais paruošimas

Bereagentės bioelektrocheminės sistemos su chinoniniais mediatoriais ir FDH buvo ruošiamos fermentą imobilizuojant ant mediatoriais modifikuotų GE-ų ir strypinių APE-ų fizikinės adsorbcijos būdu. Prieš eksperimentus fermentu ir mediatoriais modifikuotų GE-us ar APE-us darbiniai paviršiai nuplaunami dejonizuotu vandeniu, kad nusiplautų neadsorbuotas fermentas, vėliau uždengiami apsaugine lavsano plėvele.

AOx kovalentinė imobilizacija

AOx, naudojant glutaro aldehidą, buvo kovalentiškai imobilizuota ant lavsano plėvelės membranos. Imobilizavimo mišinys ruoštas sumaišant 20 μ l albumino tirpalo (50 mg/ml BSA 0,01 M fosfatiniame buferiniame tirpale, pH 8,0) su 1,3 mg AOx, 0,5 mg natrio azido ir 5 μ l 5% glutaro aldehido vandeninio tirpalo. 5 μ l imobilizavimo tirpalo užlašinama ant lavsano plėvelės membranos ir paliekama 12 val., esant 4 °C. Prieš eksperimentus lavsano plėvelės membrana su imobilizuotu fermentu nuplaunama 0,01 M fosfatinu buferiniu tirpalu, pH 7,5.

2.4.6 Fermentų aktyvumo nustatymas spektrofotometriniu metodu

Fermento aktyvumo vienetas (U) – tai toks fermento kiekis, kuris katalizuoja 1 μ M substrato virtimą į produktą per 1 min [13]. Šiame darbe

fermento aktyvumas buvo nustatomas kaip pradinis fermento reakcijos greitis (v_0) bei vertinamas fermento aktyvumo vienetais 1-ame ml naudoto fermento tirpalo (Uml^{-1}).

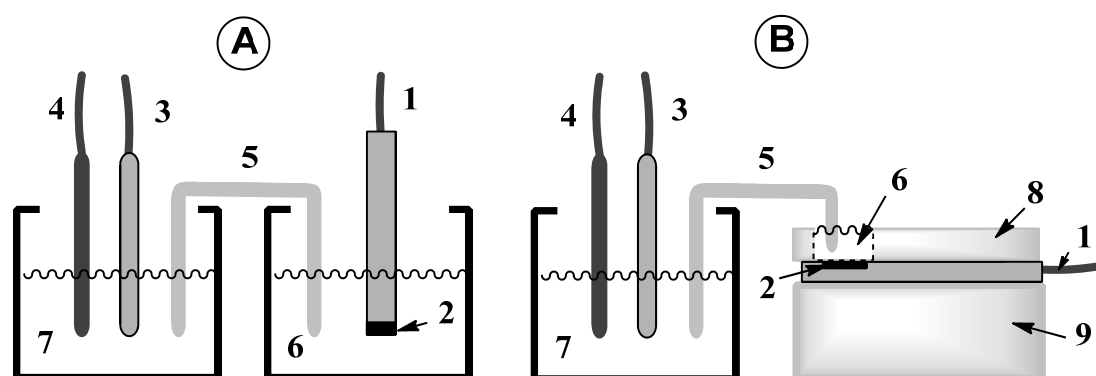
Tyrimai buvo atliekami „UV 300, UV-Visible spectometr“ spektrofotometru 1,5 ml ir 1 cm storio „semi-micro PMMA“ kiuvetėse, esant kambario temperatūrai bei bangos ilgiui 420 nm, kai naudotas KF (molinis sugerties koeficientas (ϵ_{420}) = $1000\text{ cm}^{-1}M^{-1}$), ir 600 nm, kai naudotas DCFIF (ϵ_{600} = $9300\text{ cm}^{-1}M^{-1}$). Reakcijos mišinį sudarė 958 μ l buferinio tirpalo, 20 μ l 100 mM KF, arba 20 μ l 5 mM DCFIF, ir 20 μ l 100 mM tiriamo fermento substrato tirpalo. v_0 nustatomas, pridėjus į tirpalą 2 μ l tiriamo fermento tirpalo, ir stebint optinio tankio mažėjimą fermento katalizės metu redukuojantis KF arba DCFIF [159].

2.4.7 Chronoamperometriniai tyrimai

Chronoamperometriniai tyrimai atlikti dviejų darbinių elektrodų trielektrodinėje elektrocheminėje celėje, kurią sudarė du darbiniai (APE-as, GE-as arba AuME-as), pagalbinis platinos bei palyginamasis Ag/AgCl/3M KCl elektrodai. Tyrimai buvo atliekami skirtingos formos ir konstrukcijos elektrocheminėse celėse: 1 ml tūrio celėje (2.6 pav. A), „vieno lašo“ celėje (2.6 pav. B), bei pratekamoje dviejų darbinių elektrodų celėje (žr. 2.3 sk., 2.2 pav.). Celės konstrukcija buvo parenkama priklausomai nuo naudoto darbinio elektrodo formos ir eksperimento sąlygų, iškeltų uždavinių, prie potenciostato (žr. 2.3 sk.) prijungiant du arba vieną darbinį elektrodą. Visos celės eksperimento metu buvo termostatuojamos.

Chronoamperometrinių tyrimų metu, esant pastoviam darbinio elektrodo potencialui, buvo matuotas darbinio elektrodo generuojamos srovės stiprio (I) kitimas laike, intensyviai maišamome buferiniame tirpale, į celę pridėjus fermento substrato. Bioelektrocheminių sistemų su GDH, GDH mutantais, mADH ir tADH chronoamperometriniai tyrimai atlikti 50 mM acetatiniame buferiniame tirpale, pH 6,0, o su FDH McIlvaino buferiniame tirpale, pH 5,0, esant +400 mV vs. Ag/AgCl, 20 °C. Atliekant bioelektrocheminių sistemų I priklausomybės nuo fermento substrato koncentracijos tyrimus, į celę buvo

pridedamas skirtingas fermento substrato buferinio tirpalo kiekis. O atliekant bioelektrocheminių sistemų stabilumo tyrimus, matuojamas atsakas (išreikštas I) tyrimų eigoje pridedant vienodą fermento substrato koncentraciją. Darbiniai elektrodai su imobilizuotomis tADH, mADH, GDH ir GDH mutantais tarp tyrimų laikyti 50 mM acetatiniame buferiniame tirpale, pH 6,0, o su imobilizuota FDH McIlvaino buferiniame tirpale, pH 5,0, esant 4 °C temperatūrai.



2.6 pav. Elektrocheminių celių konstrukcijos. **A** – 1 ml tūrio celė. **B** – „vieno lašo“ celė. 1 – darbinis elektrodas: strypinis arba plokštinis APE-as, GE-as ar AuME-as A atveju ir plokštinis APE-as B atveju, 2 – darbinio elektrodo paviršius, 3 – palyginimo Ag/AgCl/3M KCl elektrodas, 4 – pagalbinis Pt elektrodas, 5 – 3M KCl agar-agaro (tyrimus atliekant esant aukštomis temperatūroms) arba želatinos tiltelis (esant 20 °C temperatūrai), 6 – tiriamasis tirpalas: 1 ml A atveju ir 60 µl B atveju, 7 – 3M vandeninis KCl tirpalas, 8 – stipriai prie elektrodo paviršiaus prigludanti izoliacinė guma su Ø 3 mm skylė, formuojančia šulinėlį tiriamajam tirpalui (6), 9 – pagrindas elektrodai iš izoliacinės medžiagos.

Atliekant tyrimus su tirpiaisiais mediatoriais: KF, DCFIF ir FMS, tyrimai atlikti pridedant nustatytą naudojamo mediatoriaus kiekį: koncentracija celėje 2 mM, jei naudojamas KF ir 0,1 mM, jei naudojamas DCFIF, arba 0,2 mM, jei naudojamas FMS. Atsakas registruotas esant pastoviam darbinio elektrodo potencialui (+0,4 V) ir 20 °C, maišomame buferiniame tirpale.

Bioelektrocheminių sistemų tADH-Cst ir mADH-ChMA-Cst ant plokštinių APE-ų: tyrimai atlikti nemišomuose joninių skysčių tirpaluose „vieno lašo“ celėje (2.6 pav.), esant pastoviam darbinio elektrodo potencialui (+0,4 V) ir 20 °C. TADH atsakas matuotas į 8 mM 1,2-propandiolio, mADH atsakas matuotas į 8 mM etanolio. Mediatorinės elektronų pernašos (MEP) atveju į terpę buvo pridedama 5 mM KF.

Bioelektrocheminių sistemų ant AuME-ų tyrimai atlikti 0,1 M acetatiname buferiniame tirpale, pH 6,0, turinčiame 0,01 M CaCl₂ ir KCl, esant +400 mV vs. Ag/AgCl, 25 °C. Atsakas matuotas į 1,2-propandiolį, sistemomis su tADH, į etanolį, sistemomis su mADH, ir į D-gliukozę, sistemomis su GDH.

Bereagenčių elektrocheminių sistemų su imobilizuotais chinoniniais mediatoriais ir FDH anodinės srovės išaugimas registruotas, pridėjus fermento substrato, maišamome McIlvaino buferiniame tirpale (pH 5,0) dviejų darbinių elektrodų celėje, esant pastoviam darbinio elektrodo potencialui (+0,4 V) ir 20 °C.

2.4.8 Ciklinės voltamperometrijos tyrimai

Ciklinės voltamperometrijos tyrimai buvo atliekami elektrochemine sistema „PARSTAT 2273“ trielektrodinėje elektrocheminėje 1ml celėje (2.6 pav.), kurią sudarė darbiniai: GE-as arba strypinis APE-as su imobilizuotu chinoniniu mediatoriumi, pagalbinis platinos bei palyginamasis Ag/AgCl/3M KCl elektrodai. Matavimai atlikti skirtingu greičiu skleidžiant potencialą, nemaišomame 0,5 M H₂SO₄ vandeniniame tirpale arba McIlvaino buferiniame tirpale, esant 20 °C.

2.4.9 Elektrocheminio impedanso spektroskopijos tyrimai

3D-IDEA elektrodų EIS tyrimai buvo atlikti 0,01 mM CaCl₂ vandeniniame tirpale (tūris 5 ml) elektrochemine sistema „PARSTAT 2263“ 100 Hz – 1000 kHz dažnio diapazone, taikant 25 mV sužadavimo potencialą vs. NHE bei esant 25 °C. 3D-IDEA elektrodų su imobilizuotais fermentais atsakas matuotas pridėdant skirtingą fermentų substratų kiekį. Tyrimams naudoti 100 mM 1,2-propandiolio, gliukozės ir etanolio tirpalai 0,01 mM CaCl₂ vandeniniame tirpale.

2.4.10 Atominės jėgos mikroskopijos tyrimai

Anglinių medžiagų: grafito, Cst, GO, OG-1P, OG-1S, OG-2P bei OG-2S paviršių morfologijos tyrimai atlikti skenuojančio zondo mikroskopu „Agilent 5500 AFM/STM“, panaudojant paviršiaus skenavimo standartinį akustinį AC režimą. Matavimai atlikti kontaktiniu režimu stačiakampio formos „FESP“

zondų (Veeco, JAV, silicio su 0,01 – 0,025 Ωcm stibio priemaišomis, dažnis $f_c = 60 - 100$ kHz, spyruoklės konstanta $1 - 5 \text{ Nm}^{-1}$, nominalus adatos galiuko spindulys 10 nm). Anglinių medžiagų pavyzdžiai AJM tyrimams ruošiami tipiniu mechaninės eksfoliacijos metodu ant naujai atplėšto žėručio paviršiaus [160].

PVA modifikuotos pusiau pralaidžios plėvelės su imobilizuota GDH paviršiaus analizė atlikta Fizinių ir technologijos mokslų centre Puslaidininkių fizikos institute skenuojančio zondo mikroskopu „3100/Nanoscope IVA“ (Veeco Instruments Inc., JAV), panaudojant paviršiaus skenavimo standartinį akustinį AC režimą.

Gauti duomenys ir vaizdai apdoroti su „Scanning Probe Image Processor 5.1.2“ kompiuterine programa (nemokama bandomoji versija iš <http://www.imagemet.com>, Image metrology, Danija).

2.4.11 Anglies monoksido sintezė

CO dujos sintetintos iš 85% skruzdžių rūgšties, katalizuojant koncentruotai sieros rūgščiai ((2-1)lygtis) pagal Q. Haas pasiūlytą metodiką [161].



Skruzdžių rūgštis lašinta į koncentruotą 95% sieros rūgštį, esant 80 °C. Oksidacijos metu išsiskyręs CO nuo priemaišų išvalytas dujas leidžiant per koncentruotos sieros rūgšties tirpalą, kalio šarmo granules ir distiliuotą vandenį esant kambario temperatūrai. Išgrynintos CO dujos vėliau buvo naudotos eksperimentams jas tam tikrą laiką praleidžiant per tiriamąjį tirpalą.

2.4.12 Natyvių bei adsorbuotų ant anglies pastos elektrodų fermentų slopinimas anglies monoksidu



2.7 pav. APE veikimui cigarečių dėmais skirtas indas.

Pagamintos CO dujos (žr. 2.4.11 sk.) buvo leidžiamos skirtingą laiko tarpą į 1,5 ml tūrio kiuvetę užpildytą 1 ml acetatinio buferinio tirpalo (pH 6,0), kurioje buvo 2 μl fermento tirpalo arba fermento, imobilizuoto ant plokštinio APE-o.

CO, išsiskiriančio degant cigaretėms, poveikio stebėjimas buvo atliekamas naudojant bioamperometrines sistemas ant plokštinių elektrodų inde, kurio nuotrauka parodyta 2.7 pav. Indas turi du išėjimus, iš kurių į vieną įstatoma cigaretė, o prie kito išėjimo pritvirtinama žarnelė, iš kurios gumine kriauše eksperimento metu patraukiami cigarečių dūmai. Biojutiklinė mADH_ChMA-Cst sistema buvo patalpinta indo viduje. Tam tikrais laiko tarpais, sudegus daliai cigaretės, biojutiklis buvo ištraukiamas ir pagal atsaką į etanolį, buvo įvertinamas biojutiklio aktyvumas.

2.4.13 Alkoholių koncentracijos nustatymas alkoholiniuose gėrimuose

Alkoholių koncentracija alkoholiniuose gėrimuose buvo nustatoma chronoamperometriškai, panaudojant mADH_ChMA-Cst, tADH_Cst bei imobilizuotą AOX ant lavsano plėvelės. Atlikus mADH-ChMA-Cst, tADH_Cst ir imobilizuotos AOX atsako kalibravimą pagal etanolį, rasta tiesinė priklausomybė nuo etanolio koncentracijos ir sistemų generuojamos I , kuri yra iki 0,3 mM mADH_ChMA-Cst ir tADH_Cst sistemoms, bei iki 1,5 sistemai su AOX. Todėl prieš atliekant analizę, alkoholinių gėrimų („Beauvillon“ vynas, pusiau sausas „J. P. Chenet“ vynas, trauktinė „Palanga“ ir likeris „Mariel“) pavyzdžiai praskiesti 1000 kartų 50 mM acetatiniu buferiniu tirpalu, pH 6,0, ir 0,01 M fosfatiniu buferiniu tirpalu, pH 7,5.

Analizė su mADH_ChMA-Cst ir tADH_Cst sistemomis atlikta maišomame 50 mM acetatiniame buferiniame tirpale, pH 6,0, 1 ml tūrio termostatuojamoje celėje „PARSTAT 2273“ potenciostatu. Matuotas atsakas į 25 μ l alkoholinių gėrimų tirpalus, pridedamus į 970 ml buferinio tirpalo.

Analizė su imobilizuota AOX atlikta maišomame 0,01 M fosfatiniame buferiniame tirpale, pH 7,5, esant pastoviam darbinio elektrodo potencialui (+0,6 V) ir 20 °C, panaudojant darbinį platinos elektrodą, palyginimo Ag/AgCl/3M KCl ir pagalbinį titano elektrodus analizatoriumi „Eksan A“. Matuotas atsakas į 50 μ l alkoholinių gėrimų tirpalus, pridedamus į 950 ml buferinio tirpalo. AOX katalizuoja pirminių alkoholių oksidaciją, vykstant deguonies redukcijai ir išsiskiriant vandenilio peroksidui, todėl buvo matuotas

vandenilio peroksido oksidacinės srovės išaugimas, kuris yra proporcingas fermento substrato koncentracijai.

2.4.14 Galaktozės biokonversija į tagatozę

Galaktozės konversija į tagatozę buvo katalizuojama TAI. TAI tirpalas (200 μ l) patalpintas į dializės maišelį ir sandariai užspaustas fiksatoriumiu. Taip paruoštas TAI patalpintas į indą, pripildytą 10 ml fosfatinio buferinio tirpalo (pH 7,0). Reakcija inicijuota į tirpalą pridėjus 10 mM galaktozės. Po to indas su reakcijos mišiniu buvo sandariai uždarytas. Biokonversija vykdyta esant 60 °C, intensyviai maišamome reakcijos mišinyje. Temperatūra palaikoma „RCT basic ETS-D5“ termostatu. Po skirtingų laiko tarpų galaktozės ir tagatozės koncentracijų analizei buvo paimama po 100 μ l reakcijos mišinio.

2.5 Duomenų analizė

Visi eksperimentai pakartoti mažiausiai po tris kartus, o grafikuose pateiktos jų vidutinės reikšmės. Duomenų apdorojimui ir rezultatų atvaizdavimui naudotos tokios programos: „OriginPro 8.0“ (bandomoji versija iš <http://www.originlab.com>, Origin-Lab Corporation, JAV), „Z-Plot/Z-View“ (Scribner Associates, JAV), „Scanning Probe Image Processor 5.1.2“ (bandomoji versija iš <http://www.imagemet.com>, Image metrology, Danija).

2.5.1 Fermentų pK_a nustatymas

Fermentų pK_a reikšmės buvo nustatytos pagal [162-163] pasiūlytą metodiką, panaudojant Michaelio ir Davidsohno modelį. Pagal šį modelį fermentas apibrėžiamas kaip dvibazė rūgštis ir, esant substrato įsotavimo sąlygomis, tik fermento-substrato komplekso jonizacija turi įtakos reakcijos greičiui [163]. Atlikus spektrofotometrinius fermentų aktyvumo tyrimus (žr. 2.4.6 sk.) esant skirtingoms buferinio tirpalo pH reikšmėms, iš gautų pradinių reakcijos greičių apskaičiuoti jų natūriniai logaritmai (ln). Abscisių ašyje atidėjus pH reikšmes, o ant ordinačių - $\ln(v_0)$, gauta $\ln(v_0)$ priklausomybė nuo buferinio tirpalo pH. Šios priklausomybės kreivės iškilimų lūžio taškų projekcija ant *x*-ašies atitinka fermento pK_a reikšmes, kurios gali nurodyti

fermento aktyviajame centre arba arti jo esančių aminorūgščių šoninių radikalų pK_a reikšmes. Duomenys apdoroti „OriginPro 8.0“ programa.

2.5.2 Fermentų slopinimo ekstrapoliacinių kreivių grafinis vaizdavimas

Duomenys gauti fermentus veikiant anglies monoksidu aproksimuoti pirmo laipsnio eksponentės lygtimi (2-3) ir kreivės atidėtos grafiniuose vaizduose, panaudojant „OriginPro 8.0“ programą.

$$y=y_0+\exp\left(\frac{-x}{t}\right) \quad (2-3)$$

2.5.3 Inaktyvacijos konstantų skaičiavimas

Fermentų ir fermentinių sistemų aktyvumo kitimas įvertintas nustatant inaktyvacijos konstantas (k_{in}). Apskaičiavus spektrofotometrinių ir elektrocheminių tyrimų metu gautų duomenų $\ln v_0$ ir $\ln I$ reikšmes, jos atidėtos grafiko y -ašyje, o x -ašyje atidėta natyvių arba adsorbuotų ant elektrodų fermentų veikimo CO dujomis arba aktyvumo kitimo trukmė, min. Gautos grafinės priklausomybės buvo aproksimuotos tiesės lygtimi, panaudojant „OriginPro 8.0“ programą:

$$y=kx+c \quad (2-4)$$

Šios tiesės nuolinkio kampo tangentas atitinka k_{in} reikšmę min^{-1} .

2.5.4 Bioamperometrinių sistemų I_{max}^{app} ir K_M^{app} skaičiavimas

Siekiant nustatyti bioelektrocheminių sistemų tariamąsias kinetines charakteristikas: I_{max}^{app} ir K_M^{app} eksperimento metu nustatytos I reikšmių priklausomybės nuo substrato koncentracijos buvo aproksimuotos pagal Hill funkcijos sigmoidės lygtį [164]:

$$I=I_{max}^{app} \frac{[S]_0^h}{((K_M^{app})^h + [S]_0^h)} \quad (2-5),$$

kur I – matuojamas fermentinės redokso reakcijos srovės stipris, I_{max}^{app} – tariamas maksimalus srovės stipris, K_M^{app} – tariamoji Michaelio konstanta, h – Hill'o koeficientas.

Kai $h = 1$, (2-5) lygtis virsta klasikine Michaelio ir Menten lygtimi bioamperometriniams sistemoms (žr. 1.2 sk., (1-5) lygtis). Hill'o koeficiento įvedimas optimizavo skaičiuojamų tariamųjų kinetinių konstantų reikšmes, ką

liudijo didesnis taikyto modelio koreliacijos koeficientas, lyginant su koreliacijos koeficientu, konstantas nustatant priėmus $h = 1$. Tačiau visų darbe tirtų bioelektrocheminių sistemų Hill'o koeficientas buvo artimas arba lygus vienetui. Kinetinių konstantų skaičiavimai atlikti „OriginPro 8.0“ programa.

2.5.5 Fermentų katalizuojamų reakcijų aktyvacijos energijos nustatymas

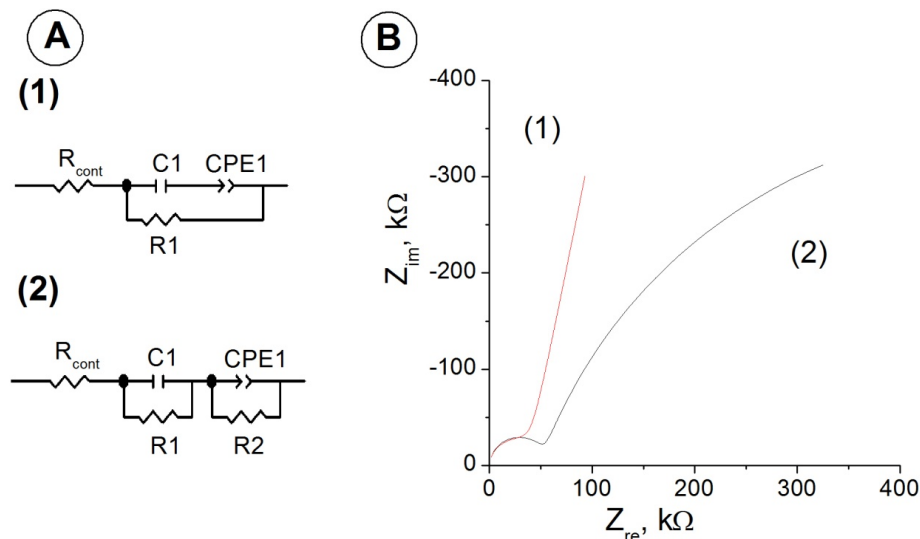
Bioamperometrinėse sistemose substratų oksidacijos aktyvacijos energijos apskaičiuotos naudojantis Arenijaus lygtimi elektrocheminėms sistemoms [165-166]:

$$\ln I = \ln K + \frac{E_a}{R_d T} \quad (2-6),$$

kur K – suminė konstanta, į kurią įeina Faradėjaus konstanta, dažnio faktorius ir kt., E_a – proceso aktyvacijos energija. Matuotos katalizinės srovės stiprio $\ln I$ priklausomybės nuo T^{-1} nuolinkio kampas yra $-E_a/R_d$, o y -ašies atkarpa, esant $x = 0$, yra $\ln K$.

2.5.6 Elektrocheminio impedanso spektroskopijos duomenų analizė

EIS tyrimų metu (žr. 2.4.9 sk.) gauti duomenys apdoroti „Z-Plot/Z-View“ kompiuterine programa. EIS spektrai aproksimuoti pagal du 3D-IDEA elektrodo EG-ių modelius (2.8 pav.).



2.8 pav. 3D-IDEA elektrodo EG-ių modeliai. **A** – EG-ių modeliai (1) ir (2). **B** – Nyquist grafikas, pateikiantis kiekvienos EG-ės EIS spektrus.

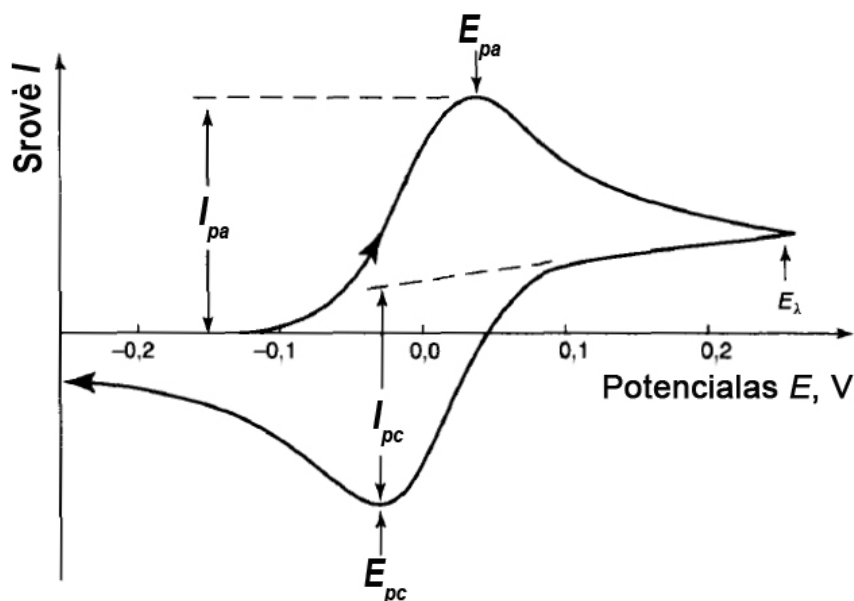
Parametras R_{cont} – elektrodų kontaktų varža, lygiagrečiai sujungta C1-R1 kombinacija atvaizduoja poliNDDEAEA varžą (R1) ir IDEA elektrodo geometrinę elektrinę talpą (C1). Tirpalo sąlyčio ribos elektrinę talpą ir varžą atvaizduoja atitinkamai CPE1 ir R2.

Pirmoji EG, pavaizduota 2.8 pav. A (1), naudota, kai Nyquist grafikuose buvo matomas tik vienas pusapskritimis aukštų dažnių srityje, o žemų dažnių srityje spektro dalis yra tiesinė. Kai EIS spektruose buvo stebimi du pusapskritimiai (2.8 pav. B (2)), naudotas (2) EG modelis (2.8 pav. A (2)).

Abiejų EG-ių modelių tinkamumą patvirtina mažas X^2 parametras ir dideli koreliacijos koeficientai, lyginant teoriškai gautų EIS spektrų kreives su gautomis eksperimento metu. Visų aproksimuotų spektrų X^2 parametras buvo mažesnis nei 0,0025.

2.5.7 Ciklinių voltamperogramų analizė

Ciklinių voltamperogramų (CV-ų) registravimo eigoje potencialas buvo skleidžiamas potencialo teigiamėjimo kryptimi, grįžtant – potencialo neigiamėjimo kryptimi. Gauta CV-a – ant darbinio elektrodo vykstančių redokso procesų faradėjinių ir nefaradėjinių srovių suma, iš kurių galima spręsti apie šių procesų grįžtamumą, krūvio pernašos dėsningumus, oksiduotis ir redukuotis gebančios medžiagos prigimtį, jos sudėtį, kiekį, darbinio elektrodo plotą ir kt. [167-168]. CV-ų matavimų metu gaunamos kreivės turi dvi skirtingo poliškumo srovės smailes (2.9 pav.).



2.9 pav. Tipinė grįžtamo proceso CV-a [167].

Skleidžiant potencialą teigiamiesnių potencialo reikšmių kryptimi, gaunama oksidacijos proceso anodinės srovės smailė (maksimumo reikšmė I_{pa}), o potencialo reikšmių neigiamėjimo kryptimi – redukcijos proceso katodinės srovės smailė (maksimumo reikšmė I_{pc}). Grįžtamiems elektrocheminiams procesams galima nustatyti formalųjį redokso potencialą (E'_0):

$$E'_0 = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (2-7),$$

kur E_{pa} – oksidacijos potencialas, E_{pc} – redukcijos potencialas. E'_0 reikšmė – tai medžiagos charakteristika, nepriklausanti nuo potencialo skleidimo greičio (v_p), bet priklausanti tik nuo medžiagos prigimties.

Visiškai grįžtamiems procesams galioja sekantys požymiai [167]:

1. $I_{pa} = I_{pc}$;
2. E_{pa} ir E_{pc} nepriklauso nuo v_p ;
3. I_p yra proporcinga $v_p^{1/2}$;
4. skirtumas tarp E_{pa} ir E_{pc} yra $59 \text{ mV}/n$, kur n – elektronų, dalyvaujančių redokso procese, skaičius.

Tačiau, jeigu gautos redokso procesų charakteristikos neatitinka grįžtamų procesų charakteristikų, jie gali būti kvazi-grįžtami arba negrįžtami [168]. Šiame darbe tirtų chinoninių mediatorių, kurie adsorbcijos būdu imobilizuoti ant GE-ų, CV-ų duomenys analizuoti, remiantis [169] pasiūlyta metodika. Adsorbuoto ant elektrodo redoksaktyvaus junginio redokso procesai pasižymi kvazi-grįžtamumu: esant mažiems v_p , redoksprocesas yra grįžtamas, o esant dideliems v_p – procesas yra negrįžtamas. Esant mažiems v_p , oksidacinės srovės smailės maksimumas, $I_{pa}(gr.)$, aprašomas:

$$I_{pa}(gr.) = n^2 F^2 A \Gamma_R v_p / 4 R_d T \quad (2-8),$$

kur n – elektronų, dalyvaujančių oksidacijoje, skaičius, A – elektrodo plotas (cm^2), Γ_R – elektroaktyvios medžiagos kiekis ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2}$).

O esant dideliems v_p , oksidacinės srovės smailės maksimumas, $I_{pa}(negr.)$, aprašomas:

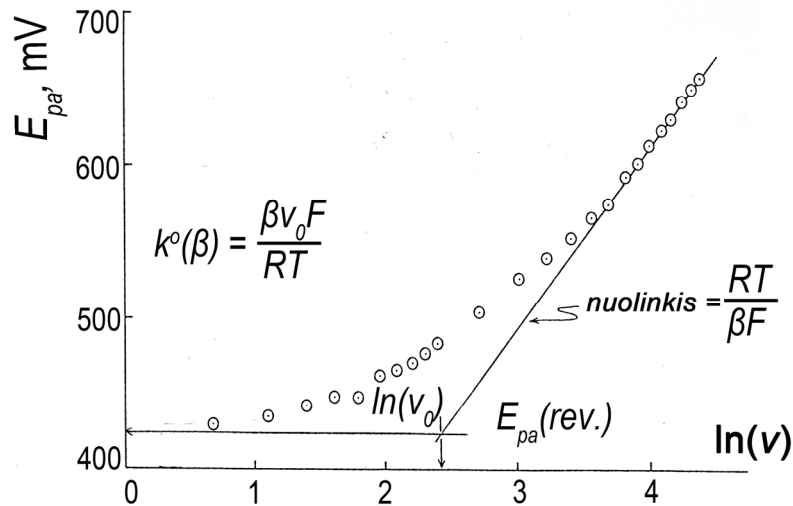
$$I_{pa}(negr.) = \beta n^2 F^2 A \Gamma_R v_p / e R_d T \quad (2-9),$$

kur $e = 2,718$. Analogiškai aprašomi ir redukcijos procesams smailių srovės maksimumų reikšmės. Kadangi negrįžtamos stadijos metu stebima E_{pa} ir E_{pc} priklausomybė nuo v_p , anodinio $E_{pa}(negr.)$ ir katodinio ($E_{pc}(negr.)$) procesų potencialai aprašomi sekančiomis lygtimis:

$$E_{pa}(negr.) = E_a^{0'} - \left(\frac{R_d T}{\beta n F}\right) \ln\left(\frac{R_d T k^0}{\beta n F v}\right) \quad (2-10),$$

$$E_{pc}(negr.) = E_c^{0'} + \left(\frac{R_d T}{\alpha n F}\right) \ln\left(\frac{R_d T k^0}{\alpha n F v}\right) \quad (2-11),$$

kur $E_a^{0'}$ ir $E_c^{0'}$ formalieji potencialai, stebimi pilnai grįžtamos stadijos metu, t.y. esant labai mažoms v_p reikšmėms, β – krūvio pernašos koeficientas vykstant oksidacijos procesui, α – krūvio pernašos koeficientas, vykstant redukcijos procesui, k^0 – standartinė EP heterogeninė greičio konstanta. Kai redokso procesų metu nevyksta reikšmingų sąveikų tarp molekulių ant elektrodo paviršiaus, tada $E_a^{0'} = E_c^{0'} = E_0'$. Parametrai β , α ir k^0 randami, analizuojant E_{pa} (arba E_{pc}) priklausomybę nuo $\ln(v_p)$, kaip parodyta 2.10 paveiksle.



2.10 pav. Anodinio piko potencialo priklausomybė nuo $\ln(v)$. Pavyzdys iš [169].

2.5.8 AJM metodu gautų anglinių paviršių duomenų apdorojimas

Pasinaudojant „Scanning Probe Image Processor 5.1.2“ kompiuterine programa bei remiantis ISO/DIS 25178-2 standartu, buvo nustatomi įprasti paviršių šiurkštumo parametrai: vidutinis šiurkštumas (S_a), šiurkštumo asimetrija (S_s), „dešimties taškų“ aukštis (S_{10}) ir intensyvumas (S_k).

S_a atspindi vidutinį skirtumą tarp paviršiaus minimumo ir maksimumo reikšmių. S_a nustatomas, pagal formulę:

$$S_a = \frac{1}{MK} \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{i=0}^{N-1} |z(x_k, y_i)| \quad (2-12),$$

kur z , x ir y – paviršiaus koordinatės, M ir N – analizuojamo ploto plotis ir aukštis.

S_{I0} atspindi vidutinę reikšmę tarp penkių aukščiausių ir penkių žemiausių paviršiaus taškų, nustatomas pagal formulę:

$$S_{I0} = \frac{\sum_{i=1}^5 |z_{pi}| + \sum_{i=1}^5 |z_{vi}|}{5} \quad (2-13),$$

kur z_{pi} ir z_{vi} atitinkamai paviršiaus i -to aukščiausio taško aukštis ir i -to žemiausio taško aukštis.

S_s atspindi paviršiaus šiurkštumų asimetriją, nustatomas pagal formulę:

$$S_s = \frac{1}{MKS_q^3} \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{i=0}^{N-1} [z(x_k, y_i)]^3 \quad (2-14),$$

$$\text{kur: } S_q = \sqrt{\frac{1}{MK} \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{i=0}^{N-1} [z(x_k, y_i)]^2} \quad (2-15).$$

Kai $S_s < 0$, paviršius yra nelygus su giliomis įdubomis, kai $S_s > 0$ – paviršius yra nelygus su išreikštais pikais („spygliuotas paviršius“), o kai $S_s = 0$ – paviršiaus nelygumai yra simetriniai.

S_k atspindi paviršiaus nelygumų intensyvumą ir nustatomas pagal formulę:

$$S_k = \frac{1}{MKS_q^4} \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{i=0}^{N-1} [z(x_k, y_i)]^4 \quad (2-16).$$

Kuo didesnė S_k reikšmė, tuo paviršiaus nelygumai labiau išreikšti ir „spygliuotesnės“ formos.

Šiurkštumo parametrą nustatyti buvo analizuojami 400 nm x400 nm ploto anglinių medžiagų paviršiai iš skirtingų pavyzdžio vietų. Analizuota 5 – 10 pavyzdžio vietų, rezultatuose pateiktos šiurkštumo parametrų vidutinės reikšmės.

3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Nuo PQQ priklausomų alkoholdehidrogenazių savybės

Darbe buvo tirtos nuo PQQ priklausomos alkoholdehidrogenazės taikomoju požiūriu naudingi fermentai, kadangi kai kurios jų charakteristikos, svarbios bioelektrocheminėse sistemose, iki šiol yra nepakankamai gerai žinomos. Kuriant bioelektrochemines sistemas, labai svarbu detaliam išsiaiškinti pH įtaką naudojamų fermentų veikimui, t.y. nustatyti jų pK_a (rūgšties disociacijos konstantos dešimtainio logaritmo) reikšmes. Natyvių fermentų pK_a žinojimas padeda prognozuoti, kokiomis sąlygomis ir ant kokių paviršių gali būti imobilizuojamas fermentas, bei kokio rūgštingumo aplinka negrįžtamai nuslopins fermentą [6]. Abu tirti fermentai savo aktyviuosiuose centruose turi po kelis kofaktorius: PQQ molekulę, vieną ar kelis hemus c. Todėl fermentų aktyvumo palaikymui bioelektrocheminėse sistemose labai svarbu efektyviai regeneruoti tiek PQQ molekulę, tiek hemus c. Tuo tikslu būtina žinoti kokie veiksniai nulemia EP kelius nuo redukuotų tADH ir mADH aktyviųjų centrų ant elektrodo paviršiaus.

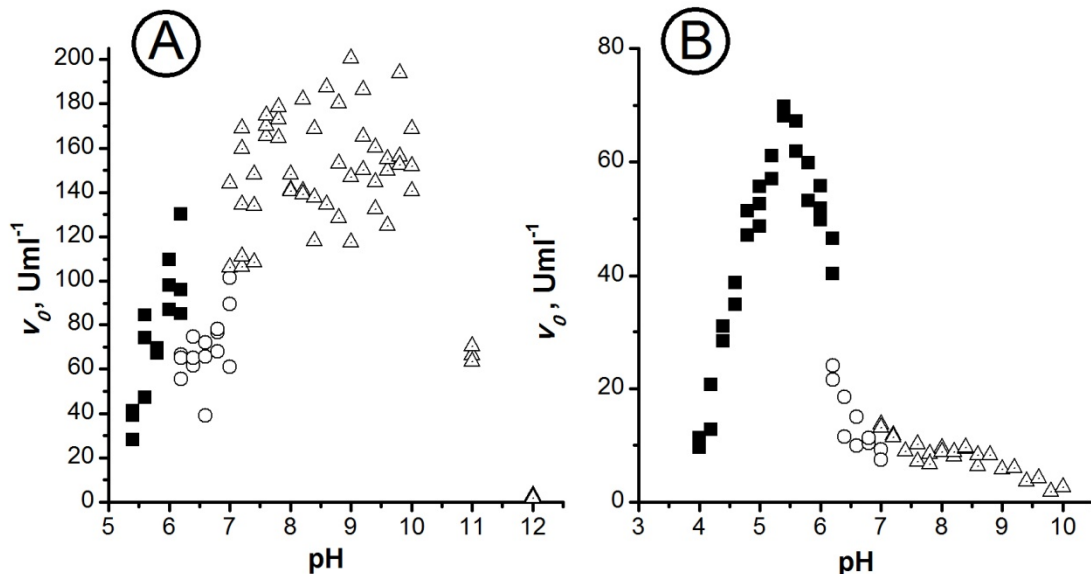
Šio darbo dalies tikslas – ištirti pH įtaką fermentų veikimui nustatant jų pK_a reikšmes, slopinimo priežastis ir kinetiką, galimybes veikti nevandeninėse terpėse, ant skirtingų elektrodinių paviršių bei nustatyti galimus elektronų pernašos kelius.

3.1.1 pH įtaka nuo PQQ priklausomų alkoholio dehidrogenazių aktyvumui

MADH pirmo subvieneto struktūra, kur lokalizuoti aktyviojo centro elementai: PQQ molekulė, kalcio jonas, hemas c, yra panaši į tADH struktūrą. Todėl galima tikėtis, jog pH įtaka abiem fermentams bus panaši. Tačiau, skirtingai nei tADH, mADH yra membraninis sudėtinis baltymas, turintis 3 subvienetus, todėl ne vien aktyviojo centro aminorūgščių protonizacija, bet ir kitų aminorūgščių, kurios dalyvauja subvienetų tarpusavio sąveikoje, protonizacija turėtų paveikti mADH aktyvumą. Iš literatūros yra žinoma, kad nuo pH priklauso tiek fermentų stabilumas, tiek v_{max} ir K_M [13, 162]. Žinant

fermento v_{max} , esant skirtingoms vandenilio jonų koncentracijoms, galima nustatyti fermento pK_a reikšmes [162-163].

Šiame darbe tirtų alkoholio dehidrogenazių pK_a reikšmės dar nebuvo nustatytos. Todėl spektrofotometrinio metodu buvo tirta mADH ir tADH v_0 (žr. 2.4.6 sk.), esant fermento substrato išotininimui, priklausomybė nuo buferinio tirpalo pH, panaudojant KF kaip elektronų akceptorių. Gauti duomenys pateikti 3.1 paveiksle. TADH atveju (3.1 pav. A), ši priklausomybė yra varpo formos, kas būdinga daugeliui fermentų [13], o jos aktyvumas didžiausias bazinėje aplinkoje ir pasiekia maksimalią reikšmę, esant buferinio tirpalo pH tarp 7 ir 9. Tuo tarpu, mADH aktyvumo priklausomybės nuo terpės pH kreivė turi du maksimumus: ryškų, esant pH 5,5 ir nežymų, esant pH 8,4 (3.1 pav. B).

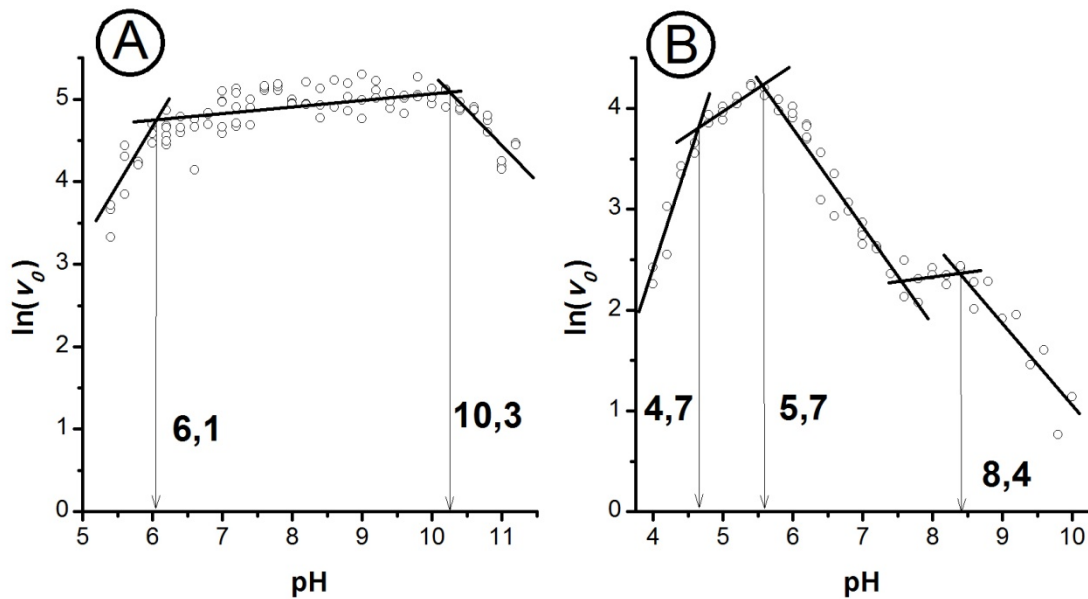


3.1 pav. Nuo PQQ priklausomų alkoholio dehidrogenazių pradinio greičio priklausomybė nuo buferinio tirpalo pH: tADH (A), mADH (B). Juodais kvadratais pažymėti matavimų rezultatai, gauti acetatiniuose, baltais apskritimais - imidazolo, o trikampiais - Tris buferiniuose tirpaluose. Matuotas atsakas į 2 mM fermento substrato (tADH atveju 1,2-propandiolio, mADH atveju - etanolio).

Skirtingai nei tADH, membraninis fermentas geriausiai veikia rūgštinėje aplinkoje. Be to, kaip matoma 3.1 paveiksle, abiejų fermentų atveju, matavimus atlikus imidazolo buferiniuose tirpaluose, fermentų aktyvumai yra mažesni, nei naudojant acetatinius ir Tris buferinius tirpalus. Taigi, didžiausias alkoholio dehidrogenazių aktyvumas yra naudojant acetatinį arba Tris buferinį tirpalą, ir esant pH 7 – 9, tADH atveju, bei esant pH 5,5, mADH atveju. Šie

duomenys patvirtino literatūroje paskelbtus rezultatus [82, 170]. Tačiau, tADH atveju, pH priklausomybė buvo tirta tik giminingam tADH fermentui, išskirtam iš *Comamonas testosteroni* bakterijų [171]. O Marcinkevičienė ir bendradarbiai stebėjo vieną pH optimumą, mADH aktyvumą nustatant su KF iki pH ~ 6,5, ir tik panaudojant DCFIF ir FMS mišinį, stebėjo du mADH pH aktyvumo optimumus [82]. Tačiau tiriant v_0 priklausomybę bei naudojant KF, esant didesnėms pH reikšmėms, buvo pastebėtas ir antrasis pH optimumas.

Siekiant nustatyti mADH ir tADH pK_a reikšmes, buvo apskaičiuoti spektrofotometriniu metodu gautų v_0 natūriniai logaritmai, įvertinus nuo buferinio tirpalo prigimties aktyvumo sumažėjimą bei padarius prielaidą, kad matuojamame pH intervale buferinio tirpalo įtaka v_0 yra vienoda. Gauta $\ln(v_0)$ priklausomybė nuo buferinio tirpalo pH pavaizduota 3.2 paveiksle.



3.2 pav. Nuo PQQ priklausomų alkoholio dehidrogenazių $\ln(v_0)$ priklausomybė nuo buferinio tirpalo pH: tADH (A), mADH (B). Tiesės gautos aproksimuojant duomenis tiesės lygtimi, visų tiesių koreliacijos koeficientas ne mažesnis nei 0,95.

TADH atveju gauta klasikinė v_0 priklausomybė nuo pH (3.1 pav. A), turinti du lūžio taškus, kurių projekcija ant abscisių ašies yra pH 6,1 ir 10,3 (3.2 pav. A), kas atitinka fermento pK_{a1} ir pK_{a2} reikšmes. TADH pK_{a1} ir pK_{a2} reikšmės yra panašios į histidino (His) (5,97) ir lizino (Lys) (10,28) [13] aminorūgščių šoninių radikalų pK_a . Iš to galima spėti, jog šios aminorūgštys randasi fermento aktyviajame centre arba arti jo ir jų protonizacija lemia tik

vieno produktyvaus fermento-substrato komplekso susidarymą. Tačiau, rentgenostruktūrinės analizės metodu ištirtame tADH aktyviajame centre tokios aminorūgštys nenustatytos [74]. Taip gali būti dėl to, kad baltymo molekulėje aminorūgščių funkcinių grupių pK_a gali kisti priklausomai nuo hidrofobinės ar hidrofiliinės apsuptyies. Pavyzdžiui, greta Lys esantis teigiamas radikalas gali sumažinti Lys $-NH_2$ grupės pK_a , o neigiamas krūvis jį padidinti. Šios aminogrupės pK_a baltyme gali skirtis 2 ir daugiau vienetų nuo jos reikšmės tirpale [13]. Be to, gautų fermento pK_a reikšmių skirtumas yra didesnis, nei 3,5, todėl jos pažymi tokią pH reikšmę, kuriai esant, fermento aktyvumas lygus pusei maksimalaus [163]. O optimali pH reikšmė randama iš: $(pK_{a1}+pK_{a2})/2$, kas lygu 8,2.

Analogiškai buvo nustatomos mADH pK_a reikšmės. Šio fermento gauta v_0 priklausomybė nuo buferinio tirpalo pH turi du maksimumus (3.1 pav. B), todėl priklausomybė $\ln(v_0)$ nuo pH turi daugiau nei du lūžio taškus (3.2 pav. B). Tokios priklausomybės paprastai gaunamos, kai daugiau nei viena fermento jonizacijos forma gali sudaryti produktyvų fermento-substrato kompleksą [163]. MADH atveju pK_{a1} ir pK_{a2} reikšmės atitinkamai yra: 4,7 ir 5,7. Iš to galima nuspėti glutamato (4,25) ir His (5,97) [13] šoninių radikalų protonizacijos svarbą katalizės procese. Be to, vykstanti fermento deprotonizacija nuo pK_{a2} reikšmės ženkliai mažina fermento aktyvumą, o H^+ jonai šiuo atveju atlieka fermento katalizės aktyvatoriaus vaidmenį. Nuo pK_{a2} vykstantis v_0 mažėjimas pasiekia soties sritį su lūžio tašku ties pH 8,4, kas atitinka antros fermento-substrato komplekso jonizuotos formos maksimalų pasiekiamą greitį ir kritinę pH reikšmę, nuo kurios fermentas negrįžtamai nuslopinamas [163]. Šie duomenys patvirtina literatūroje nurodomą informaciją, jog šarminėje aplinkoje mADH veikia nestabiliai ir jo aktyvumas neatsistato [82].

Abiejų fermentų atveju buvo nustatyta His protonizacijos svarba katalizei. Yra žinoma, jog deprotonizuotas His šoninis radikalas tinkamai orientuoja hemo centre esantį geležies joną, tam, kad jis galėtų būti geru elektronų akceptoriumi [172]. Todėl, be kitų priežasčių, tokių kaip substrato jonizacijos

laipsnis, PQQ sąveikos su baltymu stiprio kitimas ir His protonizacija gali sąlygoti greitą abiejų fermentų inaktyvaciją stipriai rūgštinėje aplinkoje, Todėl o, kuriant bioelektrochemines sistemas tADH ir mADH pagrindu, reikia atsižvelgti į tai, kad fermentų optimaliam veikimui geriausia aplinka bus neutrali arba silpnai rūgštinė. Tai patvirtina ir aprašytos tADH ir mADH bioamperometrinės sistemos, kurios efektyviausiai ir stabiliausiai veikė acetatiniame buferiniame tirpale esant pH ~ 6 [14, 87, 92].

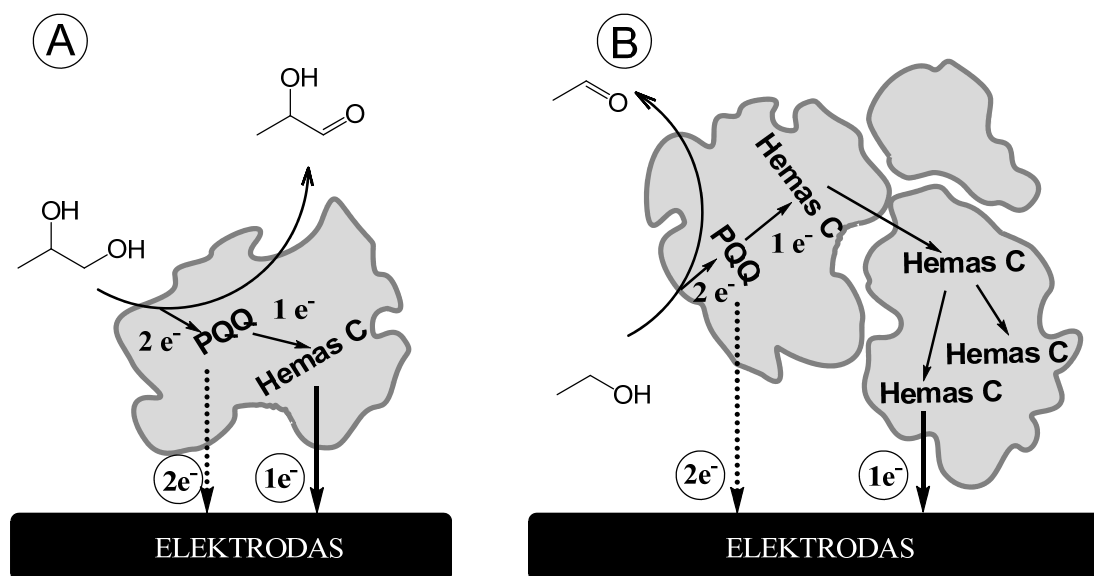
3.1.2 Tirpios ir membraninės alkoholdehidrogenazių elektronų pernaša bioamperometrinėse sistemose

Darbe tirtos nuo PQQ priklausomos alkoholio dehidrogenazės, turinčios kelis kofermentus, yra vienos iš nedaugelio fermentų, galinčių tiesiogiai perduoti elektronus tam tikroms elektrodinėms medžiagoms (žr. 1.5.1 ir 1.5.2 sk.), todėl šio proceso tyrimas ir optimizavimas yra labai svarbus. Remiantis ankščiau atliktais tyrimais [79, 87], buvo nustatyta, kad elektronų pernašos limituojanti stadija yra EP nuo fermento ant APE-o paviršiaus, tačiau kokiais keliais fermentai atiduoda elektronus APE-ui liko neaišku.

EP bioamperometrinėse sistemose, panašiai kaip kvėpavimo grandinėje, vyksta potencialo didėjimo kryptimi (žr. 1.1 sk.). Darbe naudotų fermentų EP bioelektrokatalizės proceso eigoje, manoma, vyksta pagal 3.3 pav. pateiktą schemą. MADH (3.3 pav. B): remiantis [65, 83, 133] darbais, ląstelėje redukuotas PQQ perduoda elektronus fermento pirmame subvienete lokalizuotam hemui, kuris toliau juos atiduoda hemams, esantiems antrame subvienete. Toliau, vienelektroniniu perdavimo (vEP) būdu per elektrono perdavimo grandinę, elektronas keliauja ant ubichinono. Manytina, kad fermentas adsorbuotas ant elektrodo paviršiaus, turėtų elgtis panašiai kaip ląstelėje, tačiau išlieka ir tiesioginė elektrono pernašos galimybė nuo PQQ molekulės, esančios pirmame subvienete, tiesiai ant elektrodo paviršiaus, kas ir buvo tirta šiame darbe.

Kadangi tADH (3.3 pav. A) yra baltymas, sudarytas iš vieno subvieneto, kuris turi vieną PQQ molekulę ir tik vieną hemą c, todėl, autorių tyrusių šį fermentą duomenimis, jo EP kelias ląstelėje yra paprastesnis: elektronas

pernešamas ant hemo c, o po to ant fiziologinio elektronų akceptorius [65, 74]. Šio fermento atveju taip pat buvo tirta galimybė dvielektroninės pernašos būdu (dEP) perduoti elektronus nuo redukuotos PQQ molekulės, tiesiai ant elektrodo paviršiaus.



3.3 pav. Galimi EP keliai bioamperometrinėse sistemose su tADH (A) ir mADH (B). Strėlytės parodo fermentų substratų virstimą į produktus ir EP kelius. Paryškintos juodos strėlytės parodo vienelektroninį pernašos kelią nuo hemo c ant APE-o, o punktyrinės – galimą dvielektroninį EP kelią nuo redukuotos PQQ molekulės.

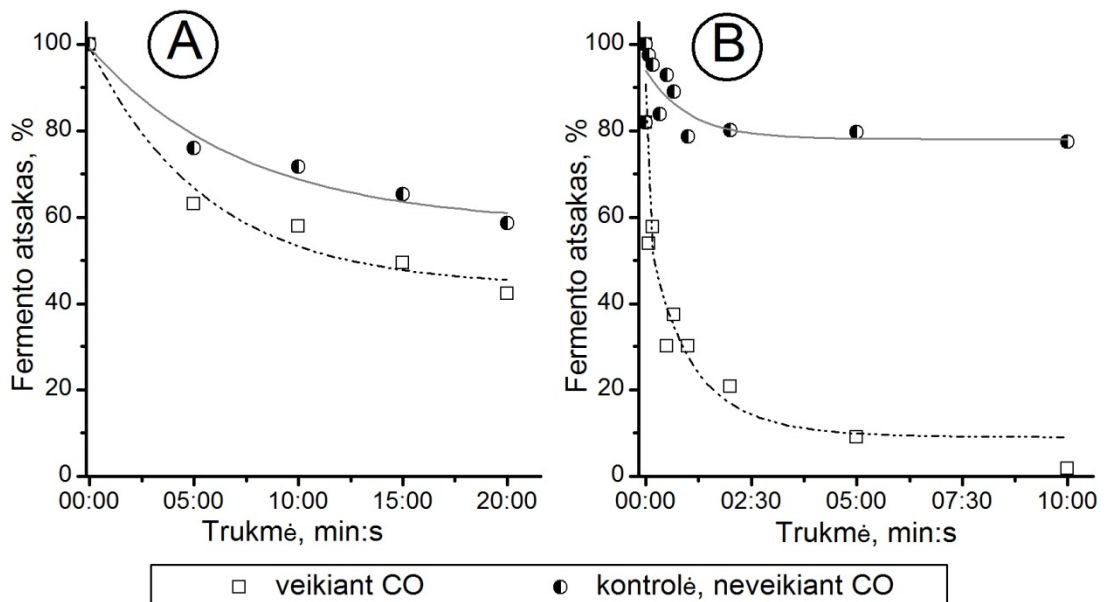
Siekiant išsiaiškinti koku keliu gali vykti EP nuo fermentų aktyviųjų centrų ant APE-o, anglies monoksidu buvo inaktyvuoti hemai, per kuriuos įmanomas vienelektroninis EP būdas, ir, panaudojant vienelektroninį arba dvielektroninį mediatorius, ištirti fermentų katalizuojamos reakcijos efektyvumai, paskaičiuojant inaktyvacijos konstantas (k_{in}) (žr. 2.5.3 sk.). Išvados apie galimą vienelektroninę arba dvielektroninę pernašą buvo daromos remiantis gautomis k_{in} reikšmėmis homogeninėje aplinkoje, kur EP apsprendžia tik panaudotas vienelektroninis ar dvielektroninis mediatorius, jas lyginant su k_{in} , nustatytomis, kai fermentai veikė heterogeninėse sistemose.

3.1.2.1 MADH ir tADH elektronų pernaša homogeninėje aplinkoje

Yra žinoma, kad CO sąveikauja su geležį rišančiais hemais, kurie yra daugelyje fermentų ir elektronų pernašos tarpininkų [173-174], o susidariusi kovalentinė jungtis yra labai stipri. Taip pat yra žinoma, kad gyvūnų ląstelėse

esantį citochromą *c* CO nuslopina negrižtamai ir tokiu būdu nutraukia kvėpavimo grandinės EP [13]. Toks vEP kelio slopinimo principas buvo pritaikytas tADH bei mADH. Šiai prielaidai patvirtinti buvo atlikti alkoholdehidrogenazių slopinimo CO tyrimai.

Tuo tikslu fermentai, esantys buferiniame tirpale, tam tikrą laiką buvo veikti CO dujomis ir jų aktyvumas palygintas su nepaveiktais CO dujomis kontroliniais bandiniais. Matuotas jų aktyvumas esant vienodai substrato koncentracijai (tADH atveju - 1,2-propandiolui, o mADH - etanolui) bei naudojant vienelektroninį mediatorių – KF, kuris gali paimti elektronus nuo redukuotų fermentų hemų *c*, bet negali dalyvauti dEP kelyje, pernešant iškart 2 elektronus (3.3 pav.). Iš literatūros yra žinoma, jog KF yra puikus redukuotų hemų *c* elektronų akceptorius [175-176], o nuo redukuotos PQQ molekulės elektronus paima blogai arba PQQH₂ išvis nereoksiduoja [100, 108]. Gauti rezultatai pateikti 3.4 paveiksle.

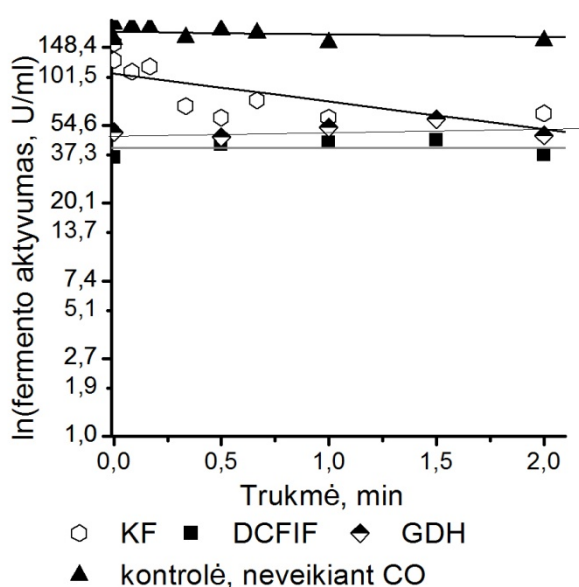


3.4 pav. TADH (A) ir mADH (B) kontroliniai bei slopinimo CO spektrofotometrinių matavimų duomenys. Matuotas atsakas į 1,2-propandiolį, tADH atveju, ir į etanolį, mADH atveju.

Kaip matome, tADH slopinimas CO (3.4 pav. A) ne toks efektyvus lyginant su nepaveiktu fermentu negu mADH atveju (3.4 pav. B). Dėl sąveikos su CO, mADH jau po 10 min visiškai praranda aktyvumą, kai tuo tarpu tADH net po 15 min, lyginant su kontroliniu bandymu nuslopinama labai mažai. Taip

gali būti dėl to, kad tADH turi tik vieną hemą ir jos jautrumas slopinimui CO yra sunkiai užfiksuojamas mūsų naudojamais metodais ir taip pat gali būti dėl to, jog tADH atveju KF gali reoksiduoti ir PQQH₂ molekulę. Todėl tolimesniems EP tyrimams buvo pasirinkta mADH.

MADH slopinimas CO taip pat buvo tirtas naudojant dvielektroninį mediatorių – DCFIF, kuris elektronus paima nuo PQQH₂. Tam, kad neliktų abejonių, kad mūsų tiriamas fermentas nuslopinamas dėl CO-hemų c sąveikos, o ne dėl nespecifinės CO-baltymas sąveikos ar kitų priežasčių, atlikti bandymai ir su GDH, iš viso neturinčia hemų c. Šis fermentas analogiškai kaip mADH, veiktas CO skirtingą laiko tarpą ir spektrofotometriškai matuotas jo aktyvumas, naudojant DCFIF.



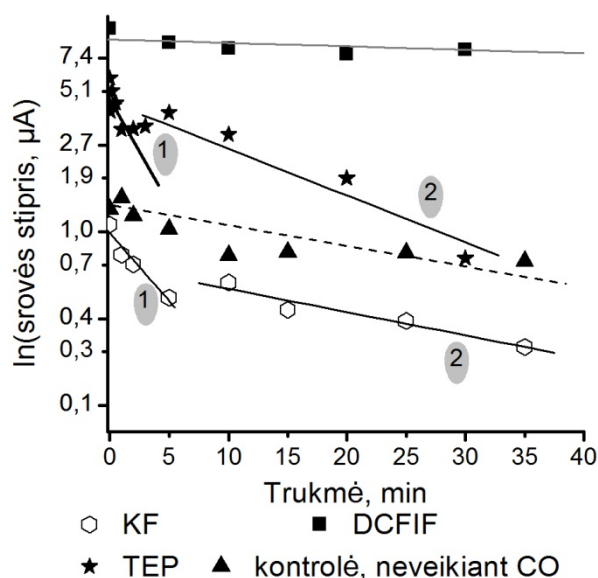
3.5 pav. CO įtaka mADH ir GDH veikimui. Eksperimentiniai duomenys aproksimuoti tiesės lygtimi. Gautos priklausomybės pavaizduotos grafike. Matuotas atsakas į etanolį, mADH atveju, ir į D-gliukozę, GDH atveju.

3.1.2.2 MADH elektronų pernaša heterogeninėje aplinkoje

CO įtaka veikiančios heterogeninėje sistemoje mADH inaktyvacijai buvo tirta stebint TEP ir mediatorinę elektronų pernašą (MEP), naudojant

Gauti matavimų duomenys pateikti 3.5 paveiksle. Kaip matoma, anglies monoksidas GDH aktyvumo kitimo neveikė, nes fermentas neturi hemų c, kuriuos galėtų inaktyvuoti CO. Tačiau, naudojant dvielektroninį mediatorių – DCFIF, mADH taip pat stipriai neprarado aktyvumo, kaip tai buvo slopinimo CO atveju, naudojant vienelektroninį mediatorių – KF. Tai rodo, kad net ir užkirtus vEP kelią per hemus c, fermentas išlieka aktyvus dėl galimybės pernešti elektronus dEP būdu (3.3 pav. B).

viennelektroninį mediatorių – KF ir dvielektroninį – DCFIF. Gauti rezultatai pateikti 3.6 paveiksle. Kaip matome 3.6 pav., esant TEP ir naudojant KF, CO slopina bioamperometrinės sistemos aktyvumą (greitos stadijos (1) k_{in} atitinkamai yra $0,442 \text{ min}^{-1}$ ir $0,155 \text{ min}^{-1}$), tuo tarpu su DCFIF, fermentinės sistemos aktyvumas praktiškai išlieka toks pats kaip ir kontrolinio bandymo (t.y. neveikiant CO) (k_{in} $0,024 \text{ min}^{-1}$ ir $0,004 \text{ min}^{-1}$). Be to, mADH slopinimo CO procesas, esant TEP ir MEP su vienelektroniniu mediatoriumi, vyksta keliomis stadijomis: greitesne (3.6 pav., 1 tiesė) ir lėtesne (3.6 pav., 2 tiesė). Pagal k_{in} reikšmes, kurios vEP ir dEP atvejams skiriasi per eilę, gautos skirtingos inaktyvacijos kinetikos apibūdina du skirtingus procesus: greitesnį – vEP kelio CO slopinimą, o lėtesnį – dEP kelio slopinimą.



3.6 pav. CO įtaka mADH, veikiančiai heterogeninėje aplinkoje. Naudota mADH-ChMA-Cst bioamperometrinė sistema ant plokštinio APE-o, matuotas atsakas į 2 mM etanolio.

Iš eksperimentinių slopinimo CO duomenų (3.5 ir 3.6 pav.) paskaičiuotos inaktyvacijos konstantos, kai mADH veikė homogeninėje ir heterogeninėje aplinkose, yra pateiktos 3.1 lentelėje.

Kaip matome iš 3.1 lentelės, k_{in} , nustatyta natyviame fermentui su dvielektroniniu mediatoriumi per eilę skiriasi nuo k_{in} , paskaičiuotų iš duomenų su vienelektroniniu mediatoriumi. Tai rodo, kad pagal slopinimo kinetiką, kurią atspindi k_{in} , galima aiškiai išskirti vEP ir dEP kelius. Kadangi, k_{in}

reikšmės paskaičiuotos iš greitesnių inaktyvacijos stadijų, kai mADH veikia heterogeninėje aplinkoje sutampa su k_{in} vEP keliu homogeninėje aplinkoje, galima daryti išvadą, kad užslopinus vienelektroninį EP būdą, lieka dvielektroninis EP būdas, kurį atspindi lėtesnės inaktyvacijos procesas. Panašios k_{in} reikšmės, dalyvaujant dvielektroniniam mediatoriui, mADH tiek homogeninėje ($0,027 \text{ min}^{-1}$) tiek heterogeninėje aplinkoje ($0,024 \text{ min}^{-1}$) nurodo, kad abiem atvejais gali būti pernešami 2 elektronai. Vadinas, yra dEP kelio galimybė ir ji pasireiškia, kai biokatalizėje su mADH dalyvauja dvielektroninis mediatorius arba vyksta TEP, kai blokuojamas energetiškai palankesnis vEP kelias.

3.1 lentelė. mADH, veikiančios homogeninėje ir heterogeninėje aplinkoje, k_{in} reikšmės.

<i>Aplinka:</i>	<i>homogeninė</i>	<i>heterogeninė</i>
vEP kelio k_{in}, min^{-1}	0,344 (naudojant KF)	0,442 (TEP greitos inaktyvacijos stadijos) 0,155 (greitos inaktyvacijos stadijos, naudojant KF)
dEP kelio k_{in}, min^{-1}	0,027 (naudojant DCFIF)	0,053 (TEP lėtos inaktyvacijos stadijos) 0,026 (lėtos inaktyvacijos stadijos, naudojant KF) 0,024 (naudojant DCFIF)
Neveikiant CO k_{in}, min^{-1}	0,002	0,004

3.1.3 Nevandeninės terpės įtaka mADH ir tADH veikimui heterogeninėje aplinkoje

Siekiant ištirti bioelektrocheminių sistemų veikimo nevandeninėse terpėse galimybes, tirta naujai susintetintų joninių skysčių įtaka mADH ir tADH, veikiančių heterogeninėje aplinkoje, aktyvumui. Organiniai tirpikliai ir jų vandeniniai mišiniai dažnai naudojami šiuolaikinėse technologijose, tačiau tokiose terpėse paprastai vyksta biokatalizatorių denatūracija. Siekiant stabilizuoti fermento molekulę genetiškai arba chemiškai modifikuojami fermentai, įrišami į organines ir neorganines matricas, inkapsuluojami į lipidų mices, stengiantis priversti juos dirbti bevandenėse terpėse [177-178].

Šiame darbe buvo tirtos nevandeninės terpės – joniniai skysčiai, kurie apibūdinami kaip medžiagos, sudarytos iš organinių druskų teigiamai ir neigiamai įkrautų jonų, kurių lydymosi temperatūra mažesnė nei 100 °C. Jos gali būti naudojamos kaip tirpikliai daugeliui organinių medžiagų, kurios netirpsta arba blogai tirpsta vandenyje. Be to, JS-iai pasižymi geru laidumu, dideliu klampumu, terminiu stabilumu, todėl yra žymiai pranašesnės elektrochemijoje nei organiniai tirpikliai ir panaudojamos įvairių medžiagų elektronusodiniame, elektropolimerizacijoje, elektrokatalizėje, elektrocheminiuose biojutikliuose, elektrocheminiuose kondensatoriuose, kuro elementuose, ličio jonų baterijose, saulės elementuose ir kt. [179]. Taipogi buvo parodyta, kad lipazių, chimotripsino ir krienų peroksidazės aktyvumas bei stabilumas didėjo, terpėje esant JS-iams [180]. Todėl šiame darbe buvo tirta JS-ių įtaka nuo PQQ priklausomų alkoholdehidrogenazių veikimui heterogeninėje aplinkoje. Tuo tikslu fermentai buvo imobilizuoti ant APE-ų fizikinės adsorbcijos būdu ir sukurtų bioamperometrinių sistemų atsakai į substratus matuoti skirtingo skiedimo JS-ių vandeniniuose tirpaluose, taip pat grynuose JS-iuose ir lyginama su veikimu acetatiniame buferiniame tirpale, pH 6,0, kuriame fermentų aktyvumas yra optimalus, vykstant TEP arba MEP. Grynuose JS-iuose alkoholdehidrogenazių atsakas į substratus nesiekė 1%, lyginant su atsaku buferiniame tirpale. Tai liudija, jog darbe naudotų JS-ių aplinka, nėra palanki fermentų bioelektrokatalizei. Tai gali būti paaiškinta substrato ir mediatoriaus molekulių difuzijos apsunkinimu, dėl labai klampių JS-ių tirpalų. Tačiau 50% JS₂ ir JS₃ tirpaluose fermentai dar buvo aktyvūs, vykstant MEP (3.2 lentelė).

3.2 lentelė. JS-ių įtaka tADH ir mADH aktyvumui heterogeninėje aplinkoje.

<i>Terpė:</i>	<i>50 mM acetatinis buf. tirp.</i>		<i>50% JS₁</i>		<i>50% JS₂</i>		<i>50% JS₃</i>	
<i>e⁻ pernašos būdas:</i>	<i>TEP</i>	<i>MEP</i>	<i>TEP</i>	<i>MEP</i>	<i>TEP</i>	<i>MEP</i>	<i>TEP</i>	<i>MEP</i>
tADH	290 ± 45 nA	630 ± 30 nA	-	-	-	130 ± 15 nA	-	210 ± 25 nA
mADH	76 ± 8 nA	1,95 ± 0,13 μA	-	-	-	7 ± 4 nA	-	2 ± 0,8 nA

tADH, lyginant su mADH, JS-iuose veikė geriau, kas gali būti sąlygota aktyvios fermento struktūros išlaikymu. Kadangi tADH yra nesudėtinės struktūros ir jo aktyvumui palaikyti būtinas tik taisyklingos tretinės struktūros išlaikymas, tuo tarpu kai mADH aktyvumas prarandamas, jei pažeidžiama ketvirtinė struktūra (žr. 1.5.1 ir 1.5.2 sk.). Iš 3.2 lentelės matoma, jog tADH gali išlaikyti iki pusės savo aktyvumo terpėje esant 50% JS-ių. Šio fermento veikimas taip pat buvo tirtas organiniuose tirpikliuose: dimetilsulfoksido, acetonitrile, dimetilformamide ir 1,4-dioksane [76], kuriuose tADH daugiau nei pusę savo aktyvumo jau prarasdavo terpėje esant 5% organinio tirpiklio. Todėl JS-ių panaudojimas galėtų atverti platesnes tADH panaudojimo galimybes nevandeninėse terpėse.

3.2 Impedimetrinės fermentinės sistemos

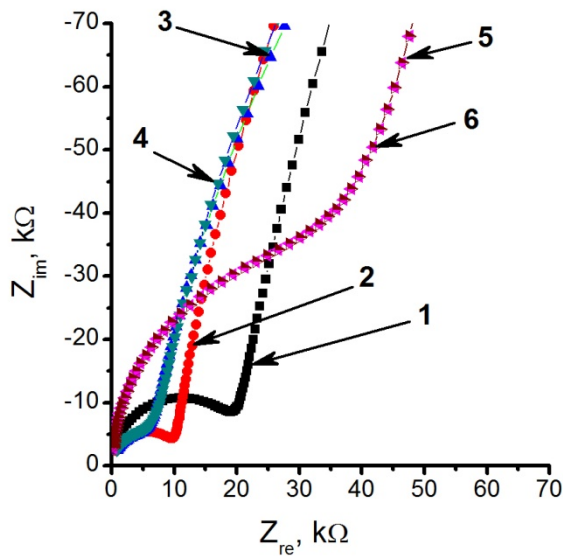
Panaudojant EIS metodus, šiame darbe buvo tirta nauja elektrodinė medžiaga – poli-N-(N',N'-ditiokarbamoiletilamidoetil)anilinas (poliNDDEAEA) ir jos sąveika su PQQ priklausomais fermentais: tADH, mADH ir GDH. PoliNDDEAEA yra vienas iš anilino polimerų, kurie plačiai naudojami įvairiuose optiniuose ir elektroniniuose prietaisuose [181-182]. Šiame darbe tirtas naujas poliNDDEAEA unikalus tuo, jog jo monomeras sudarytas iš dviejų dalių: anilino ir ditiokarbamato, kas suteikia galimybę vykdyti ne vien įprastą polianilino polimerizaciją, bet ir tikslingą paviršiaus modifikaciją, konstruojant reikiamus erdvinis darinius, neprarandant tipinių polianilino fizikinių savybių [155].

Šiame darbe buvo atlikti poliNDDEAEA sąveikos su tADH, mADH ir GDH tyrimai, siekiant sukurti naujo tipo biojutiklius 3D-IDEA elektrodų pagrindu.

3.2.1 3D-IDEA elektrodų modifikavimas ir poliNDDEAEA savybės

3D-IDEA elektrodai dengti poliNDDEAEA, vykdant monomero NDDEAEA cheminę polimerizaciją (žr. 2.4.2 sk.). Dengtų polimeru elektrodų impedanso spektrai užrašyti skirtingos koncentracijos CaCl_2 vandeniniuose

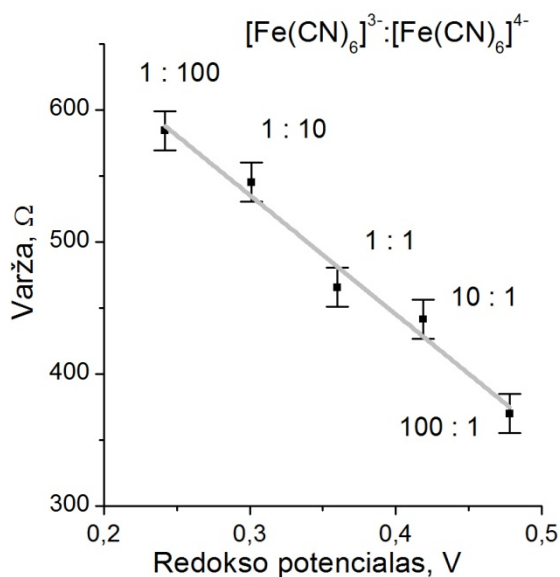
tirpaluose (žr. 2.4.9 sk.). Kaip matoma 3.7 pav., nedengtų 3D-IDEA spektrai skirtingų laidumo tirpaluose yra skirtingi (1 ir 2 kreivės), tuo tarpu padengus elektrodus laidžiu polimeru, skirtumai tarp gaunamų spektrų praktiškai nepastebimi (3 ir 4 kreivės). Šie rezultatai liudija, jog nmodifikuotų polimeru 3D-IDEA elektrodų jautrumas tirpalo laidumui yra žymiai didesnis, nei dengtų



3.7 pav. Modifikuoto poliNDDEAEA ir fermentu 3D-IDEA elektrodo impedanso spektrų Nyquist grafikai skirtingo laidumo CaCl_2 tirpaluose. 1 ir 2 kreivės vaizduoja nmodifikuoto elektrodo, 3 ir 4 – modifikuoto poliNDDEAEA, 5 ir 6 – modifikuoto poliNDDEAEA ir adsorbuotos tADH spektrus. 1, 3 ir 5 spektrai užrašyti 10^{-5} M CaCl_2 tirpale ($4,62 \mu\text{S/cm}$). 2,4 ir 6 spektrai užrašyti $5 \cdot 10^{-5}$ M CaCl_2 tirpale ($16,8 \mu\text{S/cm}$).

polimeru. Kadangi storas didelio laidumo polimero sluoksnis, dengiantis visą elektrodo paviršių, trukdo skverbtis generuojamam elektriniam laukui į tirpalą, ir stebima varža yra didžiaja dalimi polimero varža. Fermento adsorbcija ant poliNDDEAEA modifikuoto elektrodo taip pat reikšmingai įtakoja impedanso spektrus (5 ir 6 kreivės). Šiuo atveju varža tampa kelis kartus didesnė nei vien polimero varža, tačiau, kaip ir poliNDDEAEA atveju be adsorbuoto fermento, skirtumas tarp stebimų varžos pokyčių skirtingo laidumo tirpaluose nestebimas.

Yra žinoma, jog laidūs polianilino polimerai gali didinti tipinių redoksporių elektrokatalizės efektyvumą, pvz. chinono/hidrochinono, $\text{Fe}^{2+/3+}$, o taip pat ir kai kurių biojunginių, tokių kaip kofermentai ir citochromai [183-184]. Šiame darbe tirti fermentai aktyviuosiuose centruose turi PQQ molekulę bei hemus c, todėl buvo tikėtasi, jog poliNDDEAEA palengvins šių fermentų reoksidaciją. Tačiau, taip pat žinoma, jog polianilino polimerai yra jautrūs tirpalo redokspotencialo pokyčiams, kurie gali būti pasiekti naudojant skirtingo



3.8 pav. Modifikuoto poliNDDEAEA 3D-IDEA elektrodo varžos priklausomybė nuo tirpalo redokspotencialo. Pilka tiesė – taškų tiesinė aproksimacija ($r^2=0,9734$).

santykio oksiduotos ir redukuotos formos junginių, pvz. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, tirpalus. Kas, tiriant imobilizuotų ant poliNDDEAEA nuo PQQ priklausomų alkoholio dehidrogenazių veikimą, taip pat naudinga, nes KF yra joms tinkamas elektronų akceptorius. Abi fermentų biokatalizės galimybės buvo patikrintos.

Siekiant išsiaiškinti ar ir poliNDDEAEA pasižymi tirpalo redokspotencialo jautrumu, modifikuotų šiuo polimeru 3D-

IDEA elektrodo impedanso spektrai užrašyti skirtingo santykio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ vandeniniuose tirpaluose. Jutiklio varža (R1) nustatyta iš impedanso spektrų aproksimavimo pagal pirmos EG modelį (2.8 pav. A (1)), o tirpalo redokspotencialas apskaičiuotas pagal Nernsto lygtį:

$$E = E_0 + \frac{RT}{Fn} \ln \frac{([\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-})}{([\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-})} \quad (3-1),$$

kur $E_0 = 0,36 \text{ V}$ – standartinis $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ poros redokspotencialas vandeniniame tirpale.

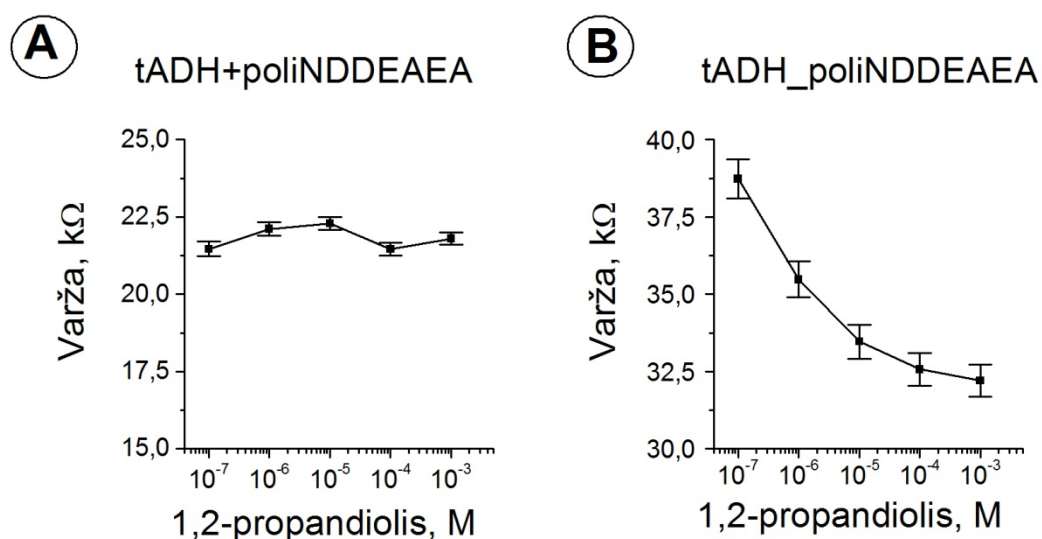
Kaip matoma 3.8 pav., polimero varža tiesiogiai mažėja didėjant tirpalo redokspotencialui, kas liudija, jog poliNDDEAEA yra jautrus tirpalo elektriniams pokyčiams.

3.2.2 TADH impedimetrinė sistema

Siekiant išsiaiškinti, ar poliNDDEAEA darys įtaką nuo PQQ priklausomų fermentų bioelektrokatalizei, tirta bioelektrocheminė sistema su tADH. Bioelektrocheminė sistema su tADH ir poliNDDEAEA modifikuotu 3D-IDEA elektrodo konstruota išbandant kelis fermento imobilizavimo metodus: paviršinę fizikinę adsorbciją ir kopolimerizaciją su NDDEAEA. Gautos dvi

bioelektrocheminės sistemos: tADH_poliNDDEAEA ir tADH+poliNDDEAEA. Abiejų sistemų atsakas pridėjus tADH substrato – 1,2-propandiolio matuotas tirpale esant fermento elektronų akceptoriui – KF. TADH_poliNDDEAEA sistemos registruota varža mažėjo didinant 1,2-propandiolio koncentraciją, panašiai kaip prieš tai atliktame eksperimente (žr. 3.8 pav.), o tADH+poliNDDEAEA sistemoje varžos pokyčiai nebuvo užregistruoti. Šie rezultatai parodė, jog tADH adsorbicija ant poliNDDEAEA nenuslopino fermento. Todėl sekančių eksperimentų metu bandyta išsiaiškinti, ar tADH ir poliNDDEAEA sąveikos pasekoje fermentas galės reoksiduotis ant elektrodo paviršiaus ir vykdyti katalizės reakcijas.

Sistemų tADH_poliNDDEAEA ir tADH+poliNDDEAEA atsakas į 1,2-propandiolį matuotas tirpale nesant KF. Rezultatai pateikti 3.9 pav. Kaip matoma, varžos mažėjimas didinant substrato koncentraciją stebimas tik sistemoje su adsorbuotu fermentu, o su kopolimerizuota tADH atsako nebuvo, kaip ir eksperimentuose su KF. Taip pat, atsako nebuvo gauta į 1,2-propandiolį, atlikus kontrolinį eksperimentą su poliNDDEAEA dengtu 3D-IDEA elektrodu be fermento (rezultatai nepavaizduoti). Šie rezultatai parodė, kad kopolimerizacijos metu buvo prarastas tADH aktyvumas.

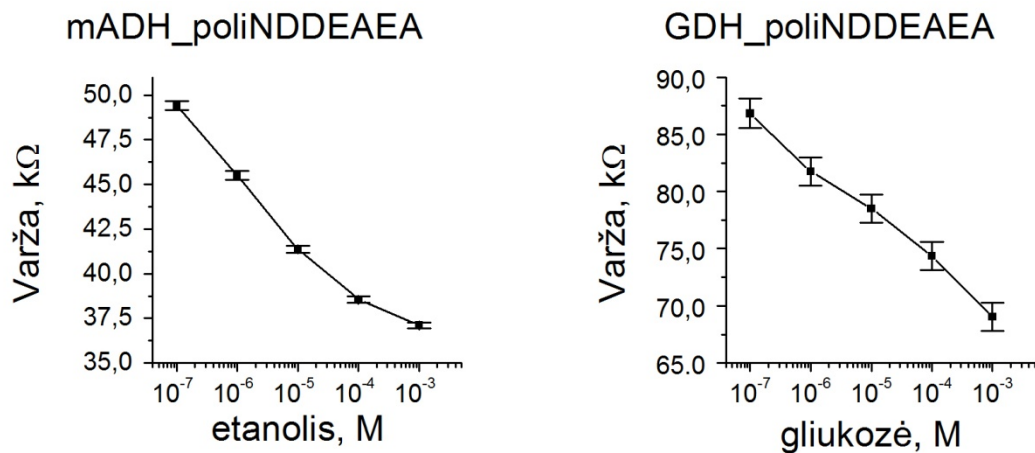


3.9 pav. Elektrodo su poliNDDEAEA ir imobilizuota tADH atsakas į 1,2-propandiolį. **A** – elektrodo su kopolimerizuota **B** – elektrodo su adsorbuota tADH.

Nors šio fermento aktyvumas išlieka iki 35%, laikant jį 1 val. 25% acetonitrilo vandeniniame tirpale [76], tačiau NDDEAEA polimerizacijos mišinyje be organinio tirpiklio yra ir HCl, o polimerizacijos metu vyksta deguonies išsiskyrimas. Visi šie veiksniai galėjo lemti negrįžtamą fermento globulės denatūraciją. Todėl tolesniuose tyrimuose šis fermento imobilizavimo būdas naudotas nebuvo.

3.2.3 MADH ir GDH impedimetrinės sistemos

Siekiant išsiaiškinti ar mADH bei GDH taip pat gali reoksiduotis ant poliNDDEAEA vykstant katalizės reakcijoms, abu fermentai, analogiškai kaip ir tADH, buvo adsorbuoti ant poliNDDEAEA dengtų 3D-IDEA elektrodų, sukuriant dvi bioelektrochemines sistemas: mADH_poliNDDEAEA ir GDH_poliNDDEAEA. Šių sistemų impedanso spektrai buvo užrašyti, pridėdant skirtingą fermentų substratų koncentraciją: mADH atveju – etanolio, GDH atveju – D-(+)-gliukozės. Rezultatai pateikti 3.10 pav.



3.10 pav. Sistemų mADH_poliNDDEAEA (kairėje) ir GDH_poliNDDEAEA (dešinėje) atsakas į fermentų substratus.

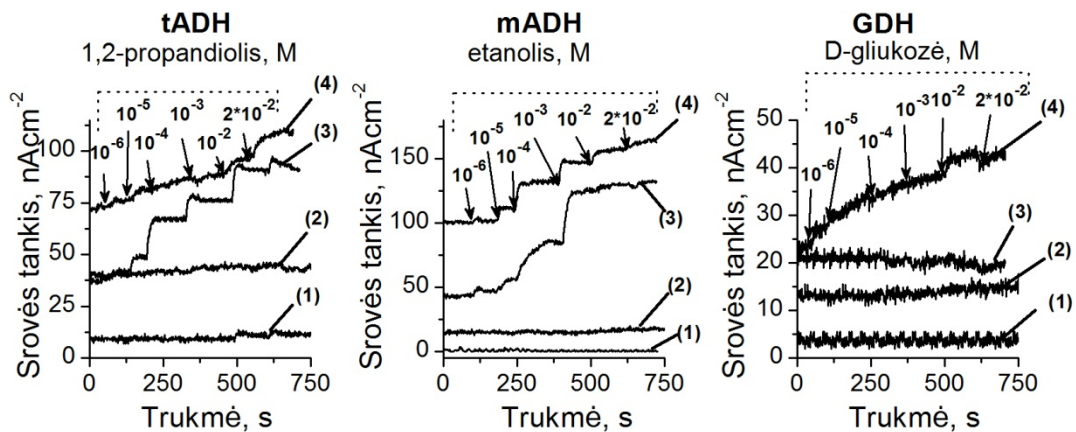
Kaip matoma 3.10 pav., abiejų fermentų atveju stebimas varžos mažėjimas, didėjant fermentų substratų koncentracijai tiriamajame tirpale. Tai liudija, jog, kaip ir tADH, abu fermentai sąveikos su poliNDDEAEA pasekoje išlieka aktyvūs ir reoksiduojasi ant šio polimero. Vykstant fermentų reoksidacijai, poliNDDEAEA grandinės dalinai redukuojamos. Tai veikia

polimero elektrinį laidumą ir impedanso spektruose stebimas varžos mažėjimas.

Siekiant patvirtinti, jog tADH, mADH ir GDH gali reoksiduotis ant poliNDDEAEA be papildomų EP mediatorinių medžiagų, atlikti chronoamperometriniai tyrimai su fermentais, imobilizuotais ant aukso mikroelektrodų, modifikuotų poliNDDEAEA polimeru.

3.2.4 Chronamperometriniai sistemų su tADH, mADH, GDH ir poliNDDEAEA tyrimai

AuME-ai buvo modifikuoti poliNDDEAEA, kaip ir 3D-IDEA elektrodai, vykdant cheminę monomero polimerizaciją. Bioamperometrinės sistemos ruošiamos tADH, mADH ir GDH imobilizuojant ant modifikuotų polimeru elektrodų fizikinės adsorbcijos būdu. Gautų sistemų atsakas matuotas pridėjus fermentų substratus (3.11 pav.). Kontroliniai eksperimentai taip pat atlikti su švariais, modifikuotais tik polimeru ir adsorbuotu fermentu AuME-ais.



3.11 pav. AuME-ai su poliNDDEAEA ir nuo PQQ priklausomais fermentais chronoamperometriniai tyrimai. 1 – nemodifikuoto švaraus AuME-o, 2 – AuME-o modifikuoto su poliNDDEAEA, 3 – AuME-o su adsorbuotu fermentu, 4 – AuME-o modifikuoto su poliNDDEAEA ir adsorbuotu fermentu chronoamperogramos. Skaičiais grafikuose nurodyta molinė substrato koncentracija.

Modifikuotų poliNDDEAEA AuME-ų foninė srovė yra didesnė, nei švaraus elektrodo (3.11 pav. 2, 3 ir 4 kreivės), dėl esančių elektrodo paviršiuje fermentų ir/ar polimero elektroaktyvių funkcinių grupių. Reikšmingų srovės pokyčių nėra gauta į etanolio, 1,2-propandiolio ir gliukozės pridėjimą, kai sistemoje nėra imobilizuotų fermentų (3.11 pav. 1 ir 2 kreivės). Tuo tarpu

elektrodus modifikavus fermentais, stebėtas nuoseklus katalizinės srovės didėjimas (4 kreivė). Tačiau adsorbuotos ant AuME-ų tADH ir mADH generavo atsaką į substrato pridėjimą ir be poliNDDEAEA (3.11 pav. 3 kreivė). Faktas, jog nuo PQQ priklausomos alkoholdehidrogenazės gali tiesiogiai perduoti elektronus įvairiems metaliniams paviršiams, tame tarpe ir auksui jau yra aprašytas literatūroje [20, 85]. GDH adsorbuota ant AuME-o negalėjo katalizuoti gliukozės oksidacijos nesant poliNDDEAEA. Tai parodo, jog GDH tiesioginei reoksidacijai būtinas polianilino polimeras.

Chronoamperometriniu metodu gauti duomenys patvirtino EIS tyrimų rezultatus. Tyrimai su GDH, kuri savo aktyviajame centre turi tik PQQ molekulę ir neturi kitų kofermentų, kurie galėtų dalyvauti elektronų mainuose, parodė jog e^- pernaša nuo tirtų nuo PQQ priklausomų fermentų ant poliNDDEAEA vyksta per PQQ molekulę. Tačiau tADH ir mADH atveju negalima atmesti hemų c dalyvavimo elektronų pernašoje, kadangi tai yra energetiškai palankesnis EP kelias šiose fermentuose.

EIS tyrimų metu 3D-IDEA elektrodai buvo pirmą kartą panaudoti oksidoreduktazių reoksidacijos tyrimuose ir nustatyta TEP galimybė tarp naujo polianilino polimero ir nuo PQQ priklausomų fermentų. Taip pat EIS tyrimų metu gauti rezultatai patvirtinti chronoamperometriniu metodu, kuris gali būti naudojamas kaip paprastas įrankis įvertinti polimerinių medžiagų tinkamumą kuriant impedimetrinius biojutiklius. Tačiau, gautos naujos bioelektrocheminės sistemos ant poliNDDEAEA su nuo PQQ priklausomais fermentais nepasižymėjo dideliu efektyvumu, lyginant su sistemomis, kurios veikė ant anglinių medžiagų elektrodų. Todėl tinkamų efektyviai bioelektrokatalizei elektrodinių paviršių ir fermentų imobilizavimo būdų paieškos buvo tęsiamos toliau.

3.3 Amperometrinės fermentinės sistemos

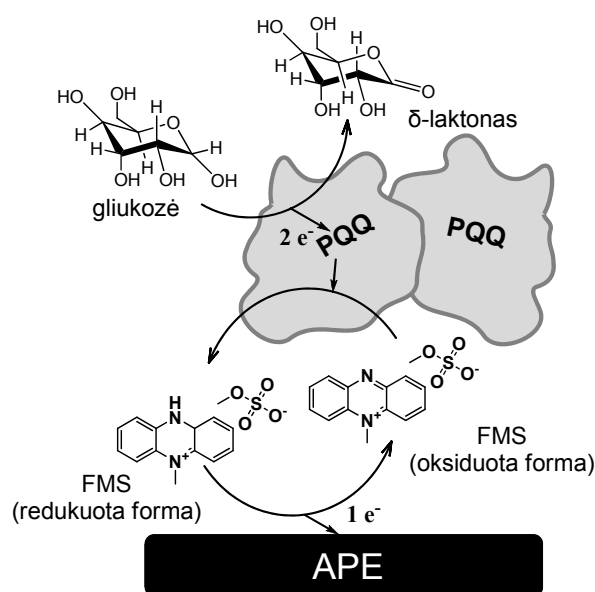
Amperometrijos metodai plačiai taikomi kuriant įvairias bioelektrochemines sistemas ne vien bioelektrokatalizinių procesų ištyrimui, bet ir yra amperometrinių jutiklių ir biojutiklių, biologinių kuro elementų ir

(bio)elektrosintezės pagrindas (žr. 1.4 sk.). Todėl, šiame darbe, panaudojant chronoamperometrijos ir ciklinės voltamperometrijos metodus, buvo tirtos mediatorinės ir bereagentės sistemos nuo PQQ priklausomų dehidrogenazių pagrindu.

Siekiant optimizuoti fermentų veikimo sąlygas ir sukurti efektyviai veikiančias sistemas, panaudotos įvairios elektrodinės medžiagos ir mediatoriai. Kadangi iš literatūros yra žinoma, jog nuo PQQ priklausomi fermentai pasižymi labai efektyviomis katalizinėmis savybėmis (žr. 1.5 sk.), tačiau nėra pakankamai stabilūs, šiame darbe siekta parinkti tokias fermento imobilizavimo ir veikimo sąlygas ant elektrodų, kurios užtikrintų ne vien efektyvią bioelektrokatalizę, bet ir gerą stabilumą.

3.3.1 Sistemos su GDH

GDH yra tirpus fermentas, kurio globulės paviršiuje daugiausia išsidėstę hidrofilingi aminorūgščių šoniniai radikalai. Todėl tikėtina, jog stabiliausiai fermentas veiks hidrofilingomis savybėmis pasižyminčioje matricoje. Hidrofilingomis savybėmis pasižymintis polivinilo alkoholis vienas žinomiausių polimerų, kuris naudojamas baltymų imobilizavimui ant įvairių paviršių [185]. Baltymai, kurių tarpe buvo ir GDH, dažniausiai imobilizuojami



3.12 pav. GDH bioelektrokatalizės su FMS schema.

kopolimerizacijos su PVA monomeru būdu. Tačiau tokia GDH imobilizavimo metodika neužtikrina stabilumo ir optimalaus fermento veikimo [186]. Siekiant patobulinti GDH imobilizavimo ant PVA metodikas ir ištirti, kaip keičiasi GDH substratinis specifiškumas, priklausomai nuo heterogeninės aplinkos, šiame darbe bioampermetrinės sistemos

kurtos, fermentą imobilizuojant fizikinės adsorbcijos būdu ant PVA modifikuotos pusiau pralaidžios plėvelės. Imobilizavimo metodo efektyvumo palyginimui, taip pat analizuota sistema su imobilizuota GDH, tiesiog adsorbuojant fermentą ant APE-o. Elektronų pernašos greitinimui tarp fermento aktyviojo centro ir elektrodo paviršiaus panaudotas tirpus mediatorius: FMS. Bioelektrokatalizės schema pavaizduota 3.12 pav.

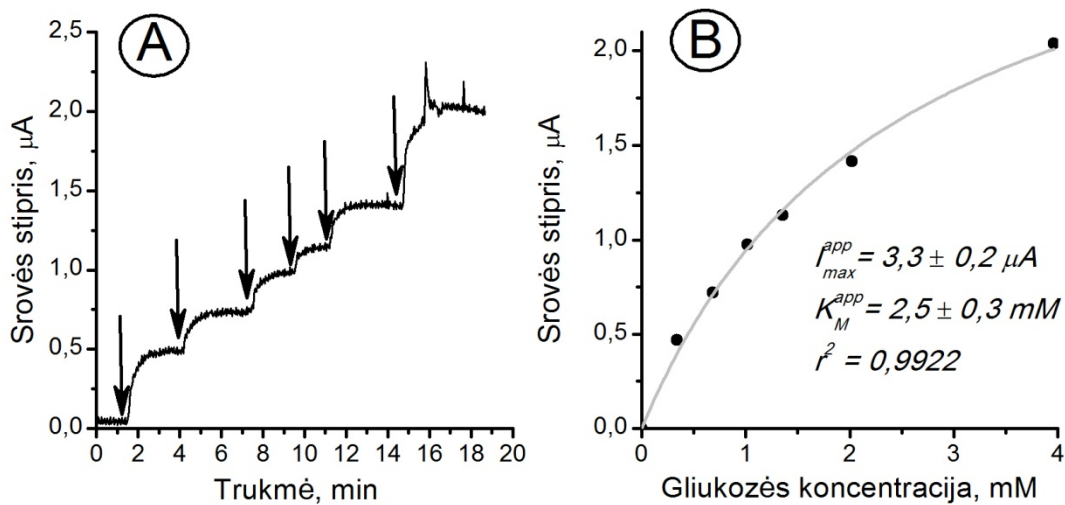
3.3.1.1 GDH veikimas ant anglies pastos elektrodo

Siekiant įvertinti galimus imobilizavimo būdus, pirmiausia GDH buvo imobilizuota ant APE-o tiesiog fizikinės adsorbcijos būdu. Sistema šiame darbe pažymėta GDH_Cst. GDH_Cst tirta, esant optimalioms GDH veikimo sąlygoms ant APE-o, kurios buvo nustatytos ankstesniuose darbuose [120, 128].

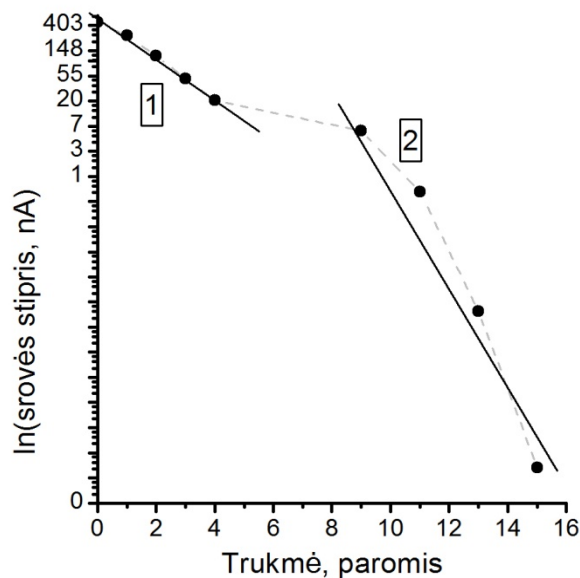
Chronoamperometrijos metodu tirtas GDH_Cst sistemos atsakas į fermento substrato – D-(+)-gliukozės pridėjimą, esant pastoviai FMS koncentracijai tiriamajame tirpale. Rezultatai pateikti 3.13 pav. A, o sistemos atsako dydžio priklausomybė nuo substrato koncentracijos ir apskaičiuoti tariamieji kinetiniai parametrai: I_{max}^{app} ir K_M^{app} pateikti 3.13 pav. B. Šios bioamperometrinės sistemos atsakas į gliukozę vidutiniškai buvo gaunamas per 1-2 min, kaip matyti 3.13 pav. A, o tiesinė priklausomybė nuo substrato koncentracijos – iki 1 mM. Gautas $3,3 \mu\text{Acm}^{-2}\text{mM}^{-1}$ GDH_Cst jautrumas. Tariamieji kinetiniai parametrai buvo nustatomi priimant, jog fermento bioelektrokatalizė vyksta pagal pseudo-pirmo laipsnio kinetinę lygtį, o generuojamo atsako dydžio priklausomybė aprašoma Michaelio-Mentent pusiausvyrinės kinetikos lygtimi. Nustatytas I_{max}^{app} buvo $3,3 \mu\text{A}$ (maksimalus tariamas srovės tankis $11,5 \mu\text{Acm}^{-2}$), o $K_M^{app} = 2,5 \text{ mM}$.

Taip pat buvo tirtas GDH_Cst stabilumas. Kaip matoma 3.14 pav., bioamperometrinė sistema prarado daugiau nei pusę savo aktyvumo mažiau nei per dvi dienas, tačiau atsaką į pridedamą fermento substratą generavo apie dvi savaites. GDH_Cst stabilumo kreivėje matomos kelios inaktyvacijos stadijos: [1], kuomet sistema prarado daugiau nei pusę savo aktyvumo ir [2], kuomet

sistema visiškai prarado savo aktyvumą. Pirmos inaktyvacijos stadijos metu galėjo vykti neefektyviai surišto fermento desorbcija nuo APE-o paviršiaus. Vėliau sistema stabiliai veikė 5 dienas, generuodama apie 40% savo pradinio aktyvumo. Antra inaktyvacijos stadija gali būti susieta su fermento aktyvumo mažėjimu, dėl jo optimalios ketvirtinės ir/arba tretinės struktūros praradimo. Buvo nustatytos abiejų inaktyvacijos stadijų k_{in} : pirmos – $(2,1 \pm 0,5) \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, o antros – $(5,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$.



3.13 pav. Bioamperometrinės sistemos su imobilizuota ant APE-o GDH generuojamo atsako priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos. **A** – chronoamperograma, strėlytėmis nurodytas gliukozės pridėjimas, **B** – oksidacinės srovės dydžio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos. Bioamperometrinės sistemos konstravimui naudotas strypinis elektrodas.



3.14 pav. Bioamperometrinės sistemos su imobilizuota GDH ant APE-o stabilumas. Matuotas atsakas į 3 mM gliukozės.

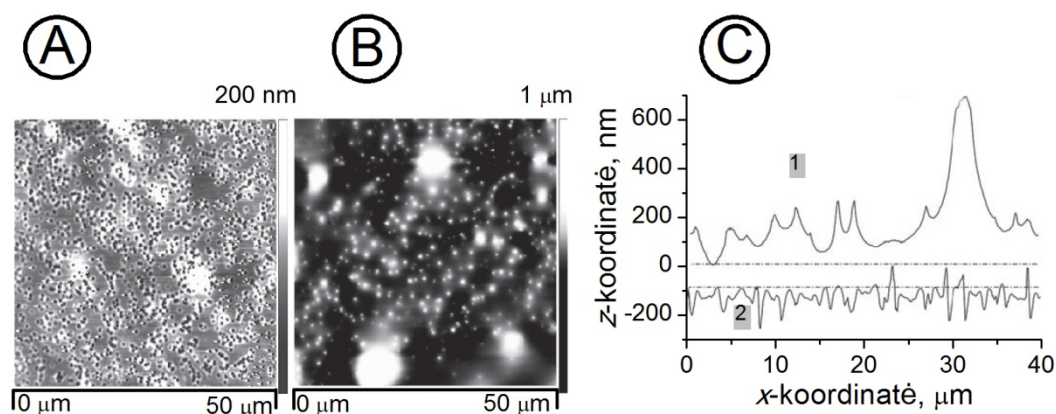
Mediatorinė GDH_Cst sistema veikė efektyviau ir stabiliau nei anksčiau aprašytos bereagentės sistemos su GDH [120] bei atsakas buvo greitesnis, nei aprašytų sistemų su kopolimerizuota dehidrogenaze [186]. Tačiau sistema veikė tik dvi savaites.

3.3.1.2 GDH veikimas ant PVA modifikuotos lavsano plėvelės

Siekiant parinkti matricą GDH optimaliausiam veikimui, bioamperometrinių sistemų buvo sukonstruotos GDH imobilizuojant ant PVA modifikuotos pusiau pralaidžios lavsano plėvelės. Kadangi bioamperometrinių sistemų charakteristikos priklauso ne tik nuo fermento ir elektrodinės medžiagos prigimties, bet ir nuo sukonstruotos bioaktyvios plėvelės struktūros – storio, sudedamųjų dalių santykio ir pasiskirstymo, buvo atlikti visų sudedamųjų dalių, tame tarpe ir PVA modifikuotos lavsano plėvelės AFM tyrimai.

Lavsano plėvelė yra porėtos struktūros, porų diametras vidutiniškai yra 400 nm, o fermento diametras – apie 6-10 nm, todėl tikėtina, jog adsorbuojantis fermento molekulės užpildo plėvelės poras ar net prasiskverbia į kitą plėvelės pusę. Siekiant išsiaiškinti kaip fermento molekulės pasiskirsto ant PVA modifikuotos lavsano plėvelės, atlikti AFM tyrimai. Tipiniai plėvelės paviršiaus topografijos vaizdai su imobilizuota GDH pavaizduoti 3.15 pav. Analizuojant plėvelės paviršių iš fermento imobilizavimo pusės (3.15 pav. A), pastebėta, jog GDH formuoja ganėtinai storą bioaktyvųjų sluoksnį (iki 1 μm storio), pro kurį praktiškai nesimato plėvelės paviršiaus. Tuo tarpu, iš kitos plėvelės pusės GDH molekulių topografijos vaizduose pastebėta nebuvo (3.15 pav. B). Skirtumus tarp abiejų plėvelės pusių galima atvaizduoti reljefinėmis linijomis (3.15 pav. C). Kaip matoma 3.15 pav. C, plėvelės paviršiaus iš fermento imobilizavimo pusės reljefinė linija neatitinka reljefinės linijos iš kitos pusės ir ji yra aukštesnė. Iš to seka, jog plėvelės fermentinė pusė pasižymi didesniu šiurkštumu. Taip pat galima pastebėti, kad priešingos pusės reljefinės linijos smailės viršija tariamą plėvelės paviršiaus lygmenį (3.15 pav.

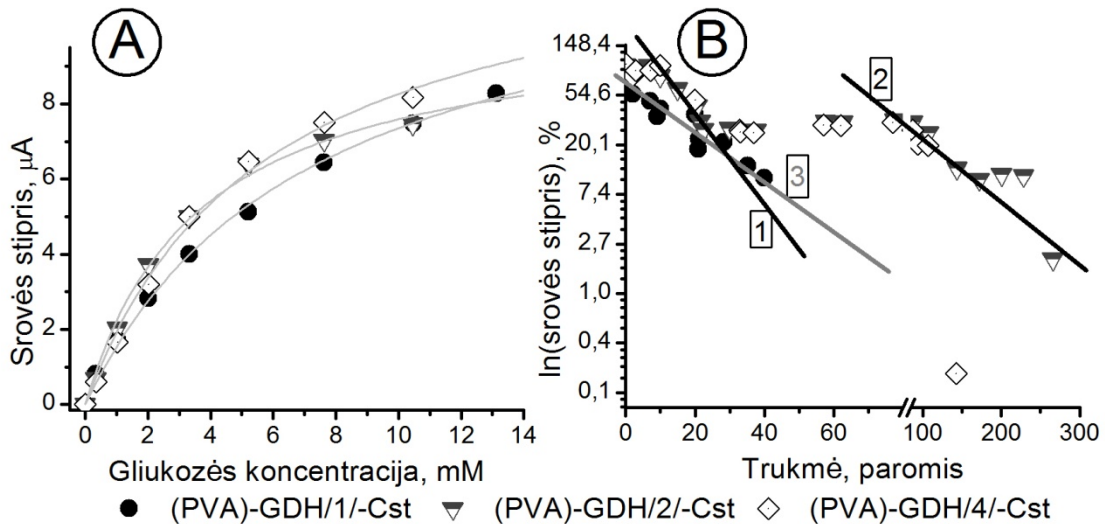
C (2)). Šias smailes sunku asocijuoti su fermento aglomeratais, kurie galėtų susiformuoti plėvelės poruose. Šios smailes greičiausiai atitinka daleles, kurias formuoja švarus pusiau pralaidžios plėvelės paviršius. Tačiau šiai prielaidai patvirtinti reikalingi papildomi tyrimai. Apibendrinant AFM tyrimų rezultatus, galima teigti, jog GDH formuoja storą ir gerai prigundantį prie plėvelės viršaus bioaktyvųjį sluoksnį, fermento adsorbcijos metu GDH molekulės neprasiskverbia pro plėvelę. Plėvelės poros išlieka pralaidžios ir pro jas gali judėti mažos molekulinės masės junginiai.



3.15 pav. PVA modifikuotos lavsano plėvelės paviršiaus topografijos vaizdas iš GDH imobilizavimo pusės (A) ir iš pusės be fermento (B). PVA modifikuotos lavsano plėvelės su adsorbuota GDH paviršiaus reljefas iš fermento imobilizavimo pusės (1) ir iš pusės be fermento (2) (C). Punktyrinės linijos vaizduoja tariamą plėvelės paviršiaus lygmenį. Fermento adsorbcija vykdyta 4 val.

Siekiant optimizuoti fermento kiekį, imobilizuotą ant plėvelės paviršiaus bioamperimetriniams tyrimams GDH imobilizacija buvo atliekama skirtingą laiko tarpą: 1, 2 ir 4 val. Gautos trys bioampermetrinės sistemos: (PVA)-GDH/1/-Cst, (PVA)-GDH/2/-Cst ir (PVA)-GDH/4/-Cst. Analogiškai kaip ir 3.3.1.1 sk. aprašyta GDH_Cst, sukurtos sistemos tirtos chronoampermetrinio metodu, esant optimalioms GDH veikimo sąlygoms ant APE-o. Bioampermetrinų sistemų atsako priklausomybės nuo substrato koncentracijos pateiktos 3.16 pav. A, o šių sistemų stabilumo matavimai 3.16 pav. B. Kaip matoma 3.16 pav., visos sukurtos sistemos generavo iki 9-ių kartų didesnę atsaką, pridėjus gliukozės ir veikė stabiliau, nei GDH_Cst sistema (žr. 3.3.1.1 sk.). (PVA)-GDH/2/-Cst ir (PVA)-GDH/4/-Cst sistemų stabilumo kreivėse stebimos dvi inaktyvacijos stadijos (3.16 pav. B, 1 ir 2). Abi sistemos

veikė stabiliai apie savaitę, generuodamos 100% savo pradinio atsako pridėjus gliukozės, po kurios prasidėjo apie 14 dienų trunkanti pirma inaktyvacijos stadija. Vėliau abi sistemos veikė stabiliai ilgiau nei du mėnesius, išlaikydamos apie pusę savo pradinio aktyvumo.



3.16 pav. Bioamperometrinės sistemos su imobilizuota GDH ant PVA modifikuotos lavsano plėvelės: oksidacinės srovės dydžio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos (A); stabilumas (B), numeruotos tiesės pažymi sistemų inaktyvacijos stadijas. Bioamperometrinės sistemos konstravimui naudotas strypinis APE-as. Stabilumo tyrimuose matuotas atsakas į 3 mM gliukozės.

Pirma inaktyvacijos stadija gali būti susieta su neefektyviai surišto fermento desorbcija ir/arba fermento molekulių reorganizacija plėvelės paviršiuje. Antra, lėtesnės inaktyvacijos stadija, prasidėjusi po trijų mėnesių sistemų veikimo, gali būti susieta su lėtu fermento denatūravimu. O (PVA)-GDH/1/-Cst sistemos aktyvumas mažėjo tolygiai, todėl stebėta viena inaktyvacijos stadija (3.16 pav. B, 3). (PVA)-GDH/1/-Cst savo aktyvumą galėjo prarasti dėl neefektyvios fermento sąveikos su PVA, lyginant su sistemomis, kurių imobilizacija vyko ilgiau.

Apskaičiuoti tariamieji kinetiniai parametrai ir sistemų charakteristikos susumuotos 3.3 lentelėje. Kaip matoma 3.3 lentelėje, nustatytos sistemų K_M^{app} reikšmės yra didesnės nei natyvaus fermento K_M (žr. 1.5.3 sk.), kaip ir daugelio sistemų su imobilizuotais fermentais. Tai liudija, jog bioelektrokatalizės procesas apribojamas substrato molekulių difuzija iš tirpalo į fermento aktyvųjį centrą, kadangi yra žinoma, jog GDH reakcija su FMS ir

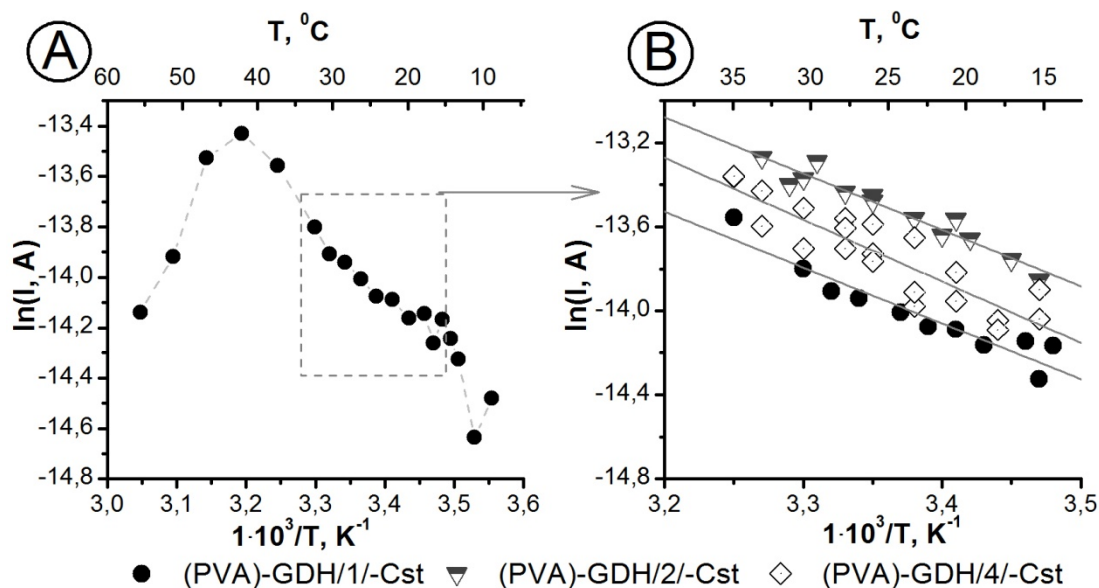
FMS reoksidacija ant elektrodo paviršiaus yra greiti procesai. Tą patį patvirtina ir nuo padidinto GDH imobilizavimo laiko pailgėjęs nuo 4 iki 5,5 min atsako laikas. Tai rodo, jog ant plėvelės paviršiaus susiformuoja storesnis fermento sluoksnis. Tačiau, visų trijų sistemų jautrumas ir atsako dydžio priklausomybės nuo substrato koncentracijos tiesinė dalis išlieka panašios. Apskaičiuotos inaktyvacijos konstantos ($0,9 \cdot 10^{-5}$ ir $1,3 \cdot 10^{-5}$, min^{-1}) yra per eilę mažesnės, nei GDH_Cst sistemos ($5,9 \cdot 10^{-4}$, min^{-1}).

3.3 lentelė. Bioamperometrinių sistemų su imobilizuota GDH ant PVA modifikuotos lavisano plėvelės charakteristikos.

<i>Sistema:</i>	<i>(PVA)-GDH- /1/-Cst</i>	<i>(PVA)-GDH- /2/-Cst</i>	<i>(PVA)-GDH- /4/-Cst</i>
<i>Tariamasis maksimalus srovės tankis, μAcm^{-2}</i>	45 ± 5	37 ± 1	46 ± 2
<i>K_M^{app}, mM</i>	7,2 ± 0,6	3,6 ± 0,4	5,7 ± 0,8
<i>Jautrumas, $\mu\text{Acm}^{-2}\text{mM}^{-1}$</i>	4,1	4,35	4,5
<i>Atsako laikas, min</i>	4,2 ± 0,6	5,0 ± 2,1	5,3 ± 1,9
<i>Tiesinė dalis, mM</i>	0,001 - 3	0,001 – 4,5	0,001 – 4,5
<i>50% atsako sumažėjimas, paromis</i>	4,6	17	20
<i>Sistemos veikimo trukmė, paromis</i>	50	265	149
<i>$k_{in} \cdot 10^{-5}$, min^{-1}</i>			
1	-	5,2 ± 0,6	3,9 ± 0,3
2	-	0,9 ± 0,1	1,3 ± 0,7
3	3,7 ± 0,3	-	-

Sistemų su imobilizuota GDH ant PVA modifikuotos pusiau pralaidžios plėvelės pasiektas stabilumas leidžia jas taikyti bioelektrokatalizinių sistemų kūrimui. Todėl svarbu įvertinti šių sistemų veikimą ne tik standartizuotomis laboratorinėmis sąlygomis, bet ir nustatyti kambario temperatūros svyravimų įtaka sistemų aktyvumui. Temperatūros įtaka nuo 10 iki 60 °C tirta (PVA)-GDH/1/-Cst sistemai (3.17 pav. A), o nuo 15 iki 35 °C – visoms trimis sukonstruotoms sistemoms (3.17 pav. B). Kaip matoma 3.17 pav. A, sistemos aktyvumas didėja, didėjant temperatūrai, iki 43 °C, o didesnėje temperatūroje

sistema inaktyvuojasi, tačiau jos aktyvumas atsistato po kelių dienų laikymo acetatiniame buferiniame tirpale, esant 4°C.



3.17 pav. Temperatūros įtaka bioamperometrinių sistemų su imobilizuota GDH ant PVA modifikuotos lavisano plėvelės aktyvumui. (PVA)-GDH/1/-Cst oksidacinės srovės dydžio priklausomybės nuo temperatūros Arenijaus priklausomybė (A); (PVA)-GDH/1/-Cst, (PVA)-GDH/2/-Cst ir (PVA)-GDH/4/-Cst oksidacinės srovės dydžio priklausomybės nuo kambario temperatūros Arenijaus priklausomybė (B). Matuotas atsakas į 3 mM gliukozės.

Temperatūrinės priklausomybės duomenys sutapo su D'Costa ir bendradarbių gautais rezultatais [97], tačiau jų sukurtos sistemos su GDH po veikimo aukštose temperatūrose denatūravosi negrįžtamai. (PVA)-GDH/1/-Cst, (PVA)-GDH/2/-Cst ir (PVA)-GDH/4/-Cst sistemų veikimas, esant kambario temperatūrai, buvo panašus: 15 – 35 °C temperatūrų ruože, sistemų atsakas į 3 mM gliukozės, didėjo apytiksliai 2,4% per 1-ą laipsnį. 3.17 pav. B pavaizduotoje Arenijaus priklausomybėje matoma, jog ji yra tiesinė su vienu nuolinkio kampu, kas reiškia, jog (PVA)-GDH/1/-Cst, (PVA)-GDH/2/-Cst ir (PVA)-GDH/4/-Cst bioelektrokatalizės proceso aktyvacijos energijos yra vienodos ir lygios 26 ± 2 kJ/mol. Panašaus dydžio aktyvacijos energijos yra gautos ir kitoms bioamperometrinėms sistemoms su nuo NAD^+ ir FAD priklausomomis dehidrogenazėmis [9].

Gauti rezultatai su GDH imobilizuota ant PVA parodė, jog šis fermentas sudaro stiprias nekovalentines sąveikas su PVA paviršiumi, neprarandant savo

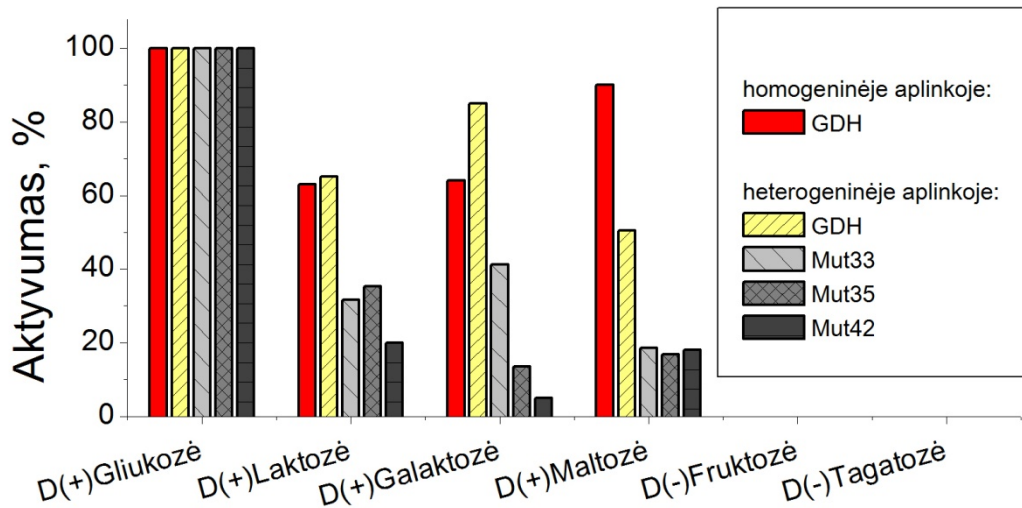
aktyvumo. Be to, hidrofilinė PVA aplinka užtikrina optimalų GDH veikimą. (PVA)-GDH/2/-Cst sistema veikė, išlaikydama iki 20% savo pradinio aktyvumo, ilgiau nei 9-is mėnesius, o šių sistemų charakteristikos yra vienos geriausių kol kas publikuotų. Todėl šiame darbe sukurtos bioamperometrinės sistemos su GDH turi dideles pritaikymo perspektyvas tiek biojutiklių, tiek bioreaktorių kūrimo ir bioelektrosintezėje.

3.3.1.3 GDH atrankumas substratams

Natūralios GDH atrankumas substratams homogeninėje aplinkoje jau buvo tirtas ir nustatyta, kad fermentas pasižymi plačiu specifiskumu aldozėms, kas būtų naudinga ir perspektyvu kuriant angliavandenių biojutiklius ir biologinius kuro elementus (žr. 1.5.3 sk.). Yra publikacijų, kuriose aprašyti bandymai genetiškai modifikuoti GDH aktyvųjų centrą, siekiant taip pakeisti jo atrankumą įvairiems angliavandeniams [102, 187]. Šiame darbe taip pat buvo tirti GDH mutantai, siekiant išsiaiškinti jų substratinio specifiskumo priklausomybę nuo fermento veikimo aplinkos. Laukinio tipo GDH ir jos mutantų Mut33, Mut35 bei Mut42 atrankumas substratams tirtas, kuomet fermentai veikė heterogeninėje aplinkoje: imobilizuoti ant PVA modifikuotos lavošono plėvelės, panaudojant strypinį APE-ą ir vykstant MEP su FMS. Palygintas visų fermentų atrankumas D-(+)-gliukozei, D-(+)-maltozei, D-(+)-galaktozei, D-(+)-laktozei, D-(-)-fruktozei bei D-(-)-tagatozei. Rezultatai pateikti 3.18 paveiksle. Fermentų atsakai pateikti procentais priiman, kad atsakas į D-(+)-gliukozę yra 100%.

Kaip matoma iš 3.18 pav., laukinio tipo GDH atrankumas substratams homogeninėje ir heterogeninėje aplinkose yra panašus. Šis fermentas efektyviausiai katalizuoja gliukozės oksidaciją. Atsako dydis sumažėja tik per pusę į maltozę, fermentui veikiant heterogeninėje aplinkoje, o homogeninėje aplinkoje į pasirinktus angliavandenius atsako dydis gali sumažėti tik ~30%. Tuo tarpu, bioamperometrinės sistemos su GDH mutantais generavo mažiau nei 50% gliukozės atsako į kitus cukrus. Beveik vienodas atsakas, siekiantis iki 40%, sistemų su Mut33, Mut35 ir Mut42 buvo į disacharidus: laktozę ir

maltozę. Tuo tarpu bioamperometrinė sistema su Mut33 generavo didesnę nei 40% atsaką į galaktozę, kai sistemų su Mut35 ir Mut42 jis nesiekė 20%. Taip pat, bioamperometrinės sistemos su GDH ir jos mutantais buvo nejautrios ketozėms: fruktozei ir tagatozei.



3.18 pav. Gliukozės dehidrogenazių substratiniai specifiskumai fermentams veikiant heterogeninėje ir homogeninėje aplinkoje. Homogeninėje aplinkoje GDH jautrumas substratams iš [100, 109]. Bioamperometrinių sistemų konstravimui naudotas strypinis APE-as. Atsakas matuotas į 3 mM substrato GDH atveju ir į 12 mM Mut33, Mut35 ir Mut42 atveju.

Siekiant įvertinti bioamperometrinių sistemų atrankumą substratams, apskaičiuotos tariamos Michaelio konstantos, kurios atspindi fermento giminingumą substratui, ir įvertinti sistemų angliavandenių katalizės efektyvumai, kurie nustatomi iš I_{max}^{app}/K_M^{app} santykio [188]. Kaip matoma 3.4 lentelėje, visos bioamperometrinės sistemos su GDH mutantais pasižymėjo didesnėmis K_M^{app} reikšmėmis ir žymiai mažesniu efektyvumu. Taipogi visų sistemų didžiausios K_M^{app} buvo galaktozei, o mažiausios – gliukozei. Laukinio tipo GDH K_M^{app} atsako reikšmės-gliukozei ir galaktozei skyrėsi apie du kartus, tuo tarpu, GDH mutantų – daugiau nei keturis kartus. Be to, laukinio tipo GDH heterogeninėje aplinkoje maltozės, galaktozės ir laktozės oksidacijos efektyvumas buvo panašus ir skyrėsi nuo gliukozės oksidacijos efektyvumo daugiau nei du kartus. GDH mutantų oksidacijos efektyvumo skirtumas tarp gliukozės ir kitų sacharidų buvo per eilę didesnis. Mažiausiai tinkamas substratas visoms sistemoms buvo galaktozė, išimtį sudarė tik (PVA)-Mut33-

Cst sistema, kurios katalizės efektyvumas galaktozei buvo didesnis nei disacharidams.

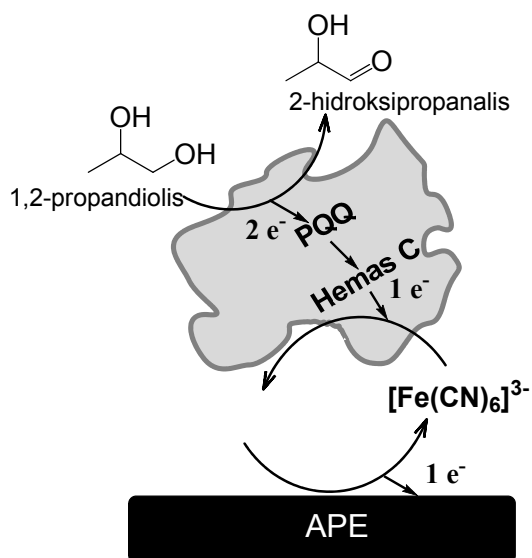
3.4 lentelė. Bioamperometrinių sistemų su GDH ir jos mutantais apskaičiuoti kinetiniai parametrai: K_M^{app} (mM) ir I_{max}^{app}/K_M^{app} ($\mu\text{A}/\text{mM}$) monosacharidams ir disacharidams.

Sistema:	(PVA)-GDH-Cst		(PVA)-Mut33-Cst		(PVA)-Mut35-Cst		(PVA)-Mut42-Cst	
Kinetiniai parametrai:	K_M^{app}	$\frac{I_{max}^{app}}{K_M^{app}}$	K_M^{app}	$\frac{I_{max}^{app}}{K_M^{app}}$	K_M^{app}	$\frac{I_{max}^{app}}{K_M^{app}}$	K_M^{app}	$\frac{I_{max}^{app}}{K_M^{app}}$
Atsakas į:								
gliukozę	4,8±0,2	1,1	19±2	$8,3 \cdot 10^{-2}$	43±3	$3,2 \cdot 10^{-2}$	52±7	$5,7 \cdot 10^{-3}$
maltozę	9±0,3	0,5	67±5	$2,2 \cdot 10^{-3}$	85±9	$1,3 \cdot 10^{-3}$	66±4	$6,5 \cdot 10^{-4}$
galaktozę	10±0,4	0,4	96±13	$7,9 \cdot 10^{-3}$	194±21	$9,8 \cdot 10^{-4}$	197±45	$2,7 \cdot 10^{-4}$
laktozę	8,1±0,6	0,6	89±14	$5,1 \cdot 10^{-3}$	108±23	$2,4 \cdot 10^{-3}$	117±27	$5,8 \cdot 10^{-4}$

Padidėjusios mutantinių fermentų K_M^{app} reikšmės nurodo, jog disacharidų ir galaktozės oksidacija visiems heterogeninėje aplinkoje veikiančiams fermentams yra energetiškai apsunkintas procesas, dėl apsunkinto substrato patekimo į aktyvų centrą ir tuo pačiu apsunkinto fermento-substrato komplekso susidarymo. Tuo tarpu laukinio tipo GDH perkėlimas iš homogeninės aplinkos į heterogeninę, praktiškai neįtakojo fermento atrankumo. Taipogi, iš gautų rezultatų seka, jog sistemos su GDH mutantais pasižymėjo mažesniu efektyvumu, bet jas galima naudoti didelės koncentracijos angliavandenių tirpaluose. Ši savybė yra naudinga kuriant biologinius kuro elementus arba bioelektrosintezės sistemas. Taip pat, bioamperometrinių sistemų su GDH mutantais generuojamo atsako tiesinė priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos siekė iki 50 mM, kas yra naudinga kuriant bioamperometrines analizines sistemas, skirtas neskiestų terpių analizei.

3.3.2 Sistemos su tADH

Bioamperometrinių sistemų su tADH yra sukurta nedaug (žr. 1.5.1 sk.), nors ši dehidrogenazė pasižymi enantioselektyvumu ir geba oksiduoti įvairius pirminius ir antrinius alkoholius, o tokios savybės yra labai patrauklios kuriant



3.19 pav. TADH bioelektrokatalizės su KF schema.

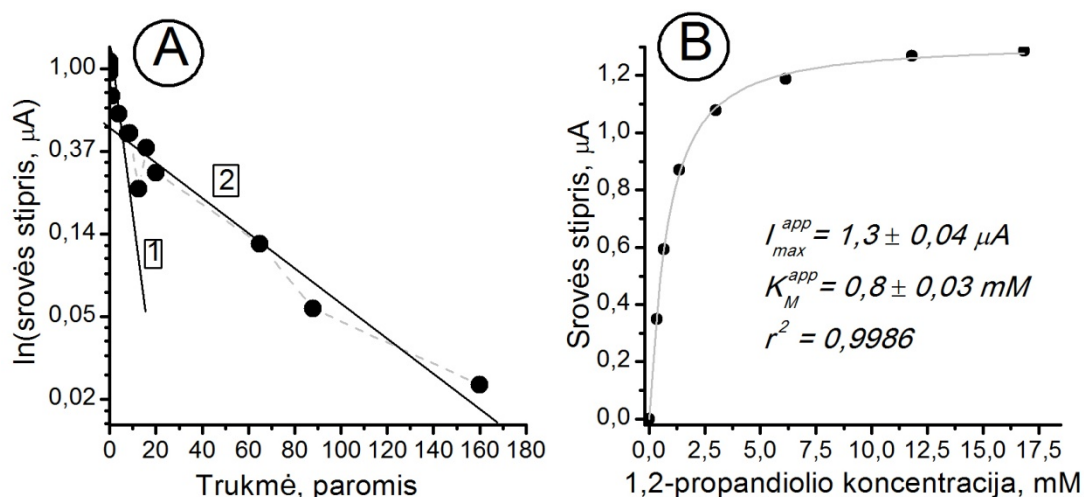
ne tik alkoholių biojutiklius, bet ir sistemas skirtas sintezei [76]. Nežiūrint efektyvios bioelektrokatalizės, aprašytos sistemos su tADH veikė neilgai, jų k_{in} buvo didesnės nei 10^{-3} min^{-1} . Kadangi tADH, kaip ir GDH, yra tirpus fermentas, kurio globulės paviršiuje daugiausia išsidėstę hidrofiliniai aminorūgščių šoniniai radikalai, tikėtina, jog stabiliausiai fermentas veiks taipogi hidrofilinėmis savybėmis pasižyminčioje imobilizavimo matricoje. Todėl tADH buvo taip pat, kaip ir GDH, imobilizuojama ant hidrofilinėmis savybėmis pasižyminčios PVA modifikuotos pusiau pralaidžios lavisano plėvelės. Imobilizavimo metodo efektyvumas buvo lyginamas su fizikine adsorbcija ant APE-o. Siekiant užtikrinti efektyvią bioelektrokatalizę buvo panaudotas tirpus mediatorius: KF. Bioelektrokatalizės su tADH schema pavaizduota 3.19 pav.

3.3.2.1 TADH veikimas ant anglies pastos elektrodų

Siekiant įvertinti galimus imobilizavimo būdus, pirmiausia tADH buvo imobilizuota ant APE-o tiesiog fizikinės adsorbcijos būdu. Gauta sistema šiame darbe žymima tADH_Cst. TADH_Cst tirta chronoamperometrijos metodu, esant optimalioms tADH veikimo sąlygoms ant APE-ų, kurios buvo nustatytos ankstesniuose darbuose [14, 79] ir esant pastoviai KF koncentracijai tiriamajame tirpale. Rezultatai pateikti 3.20 pav.

Sukurtos bioamperometrinės sistemos atsakas pridėjus substrato buvo gaunamas per 7 min, o tiesinė priklausomybė nuo substrato koncentracijos – iki 1 mM. TADH_Cst jautrumas 1,2-propandioliiui buvo apie $2,2 \mu\text{Acm}^{-2}\text{mM}^{-1}$. Kaip matoma 3.20 pav. A, sistema generavo atsaką į 1,2-propandiolį ilgiau nei 5-is mėnesius. Kaip ir GDH_Cst atveju, tADH_Cst inaktyvacija vyko keliomis

stadijomis: greita (3.20 pav. [1] tiesė), kuri gali būti susieta su neefektyviai surišto su APE-o paviršiumi fermento desorbcija, ir lėta (3.20 pav. [2] tiesė), kurios metu galėjo vykti fermento globulės negrįžtama denatūracija ir/arba kofaktoriaus išsiplovimas iš aktyviojo centro. Buvo nustatyti TADH_Cst kinetiniai parametrai: I_{max}^{app} ir K_M^{app} (3.20 pav. B), o visos pagrindinės tADH_Cst charakteristikos susumuotos 3.5 lentelėje (žr. 3.3.2.2 sk.).



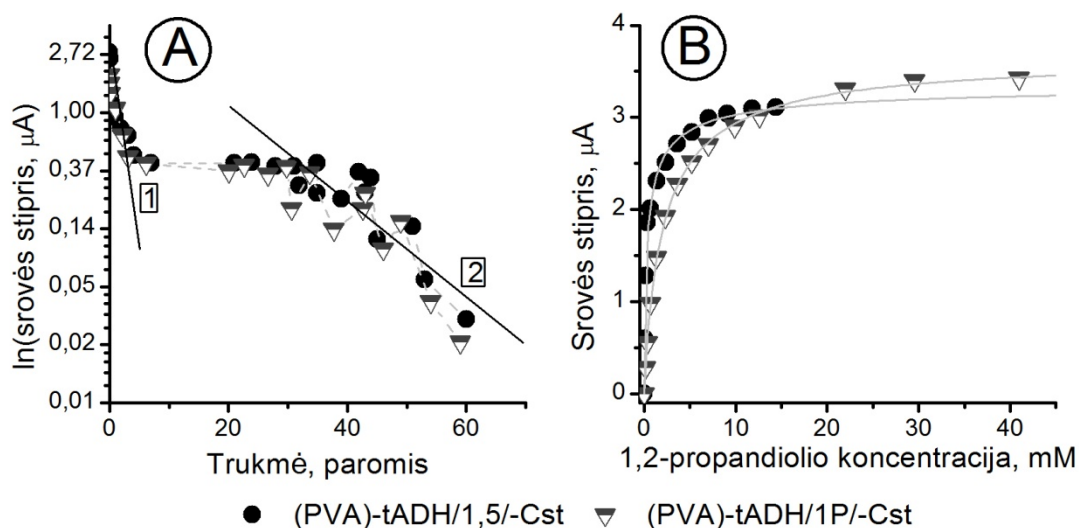
3.20 pav. Bioamperometrinės sistemos su imobilizuota tADH ant APE-o stabilumas (A), numeruotos tiesės pažymi sistemų inaktyvacijos stadijas, ir oksidacinės srovės dydžio priklausomybė nuo 1,2-propandiolio koncentracijos (B), pilka spalva atvaizduota kreivė, aproksimuota pagal Michaelio ir Menten hiperbolės lygtį, ir nustatyti kinetiniai parametrai. Bioamperometrinės sistemos konstravimui naudotas strypinis elektrodas, stabilumo tyrimuose matuotas atsakas į 1,25 mM 1,2-propandiolio.

Mediatorinė tADH_Cst veikė panašiai kaip anksčiau aprašytos bereagentinės sistemos su tADH ant grafitizuotų suodžių elektrodų [79] ir žymiai stabiliau nei mediatorinės bereagentinės sistemos su feroceno dariniais [14]. Tačiau tADH_Cst atsakas į 1,2-propandiolį yra ganėtinai ilgas – apie 7 min.

3.3.2.2 TADH veikimas ant PVA modifikuotos pusiau pralaidžios lavisano plėvelės

Siekiant optimizuoti tADH veikimą, bioamperometrinės sistemos ruoštos, tADH imobilizuojant ant PVA modifikuotos pusiau pralaidžios lavisano plėvelės (žr. 2.4.5 sk.). Fermento imobilizacija atlikta skirtingą laiko tarpą: 1,5

val. ir 1-ą parą. Gautos dvi bioamperometrinės sistemos: (PVA)-tADH/1,5/-Cst ir (PVA)-tADH/1P/-Cst. Analogiškai kaip ir 3.3.2.1 sk. aprašyta tADH_Cst, sukurtos sistemos tirtos chronoamperometriniumi metodu, esant optimalioms tADH veikimo sąlygoms ant APE-ų. Bioamperometrinių sistemų stabilumo matavimai pateikti 3.21 pav. A, o sistemų atsako priklausomybė nuo substrato koncentracijos 3.21 pav. B.



3.21 pav. Bioamperometrinės sistemos su imobilizuota tADH ant PVA modifikuotos lavisano plėvelės stabilumas, numeruotos tiesės pažymi sistemų dvi inaktyvacijos stadijas (A); oksidacinės srovės dydžio priklausomybė nuo 1,2-propandiolio koncentracijos (B), pilka spalva atvaizduota kreivė aproksimuota pagal Hill'o funkcijos hiperbolės lygtį ir nustatyti kinetiniai parametrai. Bioamperometrinių sistemų konstravimui naudoti strypiniai elektrodai, stabilumo tyrimuose matuotas atsakas į 1,25 mM 1,2-propandiolio.

Sukurtų bioamperometrinių sistemų atsakas į 1,2-propandiolį buvo greitesnis nei tADH_Cst atveju ir vidutiniškai buvo gaunamas per 1 min. Kaip pateikta 3.21 pav. A, abi sistemos generavo atsaką į substratą apie du mėnesius, o daugiau nei pusę savo aktyvumo prarasdavo mažiau nei per vieną dieną. Atlikus (PVA)-tADH/1,5/-Cst ir (PVA)-tADH/1P/-Cst generuojamo atsako dydžio priklausomybės nuo 1,2-propandiolio koncentracijos tyrimus, nustatyti tariamieji kinetiniai parametrai I_{max}^{app} ir K_M^{app} . Pagrindinės (PVA)-tADH/1,5/-Cst ir (PVA)-tADH/1P/-Cst charakteristikos nurodytos 3.5 lentelėje.

Kaip matoma 3.5 lentelėje, mediatorinės (PVA)-tADH/1,5/-Cst ir (PVA)-tADH/1P/-Cst sistemos generavo apie tris kartus didesnę atsaką ir žymiai

greičiau, nei tADH_Cst. Tačiau jų veikimas buvo mažiau stabilus. Kaip matoma 3.21 pav. A, (PVA)-tADH/1,5/-Cst ir (PVA)-tADH/1P/-Cst taip pat pasižymėjo keliomis inaktyvacijos stadijomis: 3.21 pav. A [1] tiesė – greita, kurios metu, manoma, vyksta neefektyviai surišto fermento desorbcija ir 3.21 pav. A [2] tiesė – lėta, kuri gali būti susieta su fermento globulės denatūracija ir/arba kofaktoriaus išsiplovimu iš tADH aktyviojo centro.

3.5 lentelė. Bioamperometrinių sistemų su imobilizuota tADH ant APE-ų ir PVA modifikuotos lavsano plėvelės charakteristikos.

Sistema:	tADH_Cst	(PVA)-tADH/1,5/- Cst	(PVA)-tADH/1P/- Cst
<i>Tariamaks maksimalus srovės tankis, μAcm^{-2}</i>	$4,6 \pm 0,5$	$12 \pm 0,2$	$13 \pm 0,7$
K_M^{app} , mM	$0,80 \pm 0,03$	$0,4 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$
<i>Jautrumas, $\mu\text{Acm}^{-2}\text{mM}^{-1}$</i>	2,2	18,1	5,1
<i>Atsako laikas, min</i>	$7,4 \pm 1,2$	$1 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,3$
<i>Tiesinė dalis, mM</i>	0,001 – 1,0	0,001 – 0,3	0,001 – 0,7
<i>50% atsako sumažėjimas, paromis</i>	4,7	0,1	1,3
<i>Sistemos veikimo trukmė, paromis</i>	160	60	60
$k_{in} \cdot 10^{-5}$, min^{-1}			
1	28 ± 2	40 ± 6	29 ± 2
2	$1,5 \pm 0,5$	7 ± 1	$7,3 \pm 1,0$

Paskaičiuotos greitos stadijos inaktyvacijos konstantų reikšmės visoms sistemoms yra panašios, todėl galima spėti, jog neefektyviai surištos tADH sąveika su Cst ir PVA yra panašaus stiprumo. Tuo tarpu lėtos stadijos k_{in} reikšmės buvo daugiau nei 4 kartus didesnės sistemose su tADH imobilizuotos ant PVA, iš ko galima daryti išvadą, jog Cst aplinka yra palankesnė fermento veikimui. Tačiau, (PVA)-tADH/1,5/-Cst ir (PVA)-tADH/1P/-Cst sistemos nuo ~10 dienos iki ~30 dienos veikė stabiliai (3.21 pav. A), o tADH_Cst sistema tolygiai prarasdavo savo aktyvumą (3.20 pav. A). Taip gali būti dėl to, jog tADH sąveika su PVA stabilizavo efektyviai surišto fermento tretinę struktūrą,

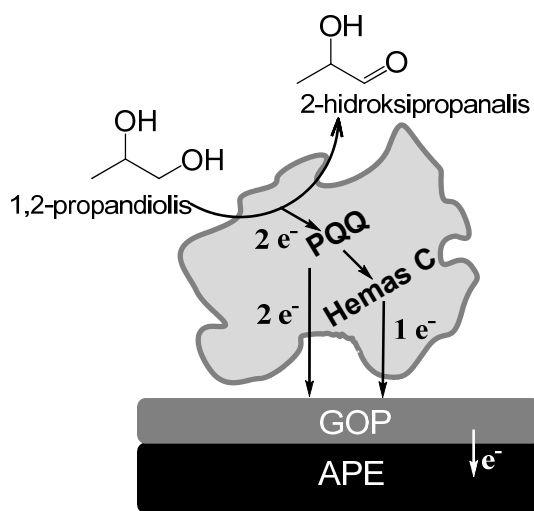
kol tADH pradėjo vykty aktyviojo centro pokyčiai, mažinantys sistemų aktyvumą.

Apskaičiuotos K_M^{app} reikšmės 1,2-propandioliui visoms sistemoms yra didesnės nei natyvaus fermento, kas taip pat nurodo substrato molekulės difuzijos apsunkinimus iš tirpalo į fermento aktyvų centrą. TADH_Cst ir (PVA)-tADH/1,5/-Cst sistemų K_M^{app} gautos panašios reikšmės, kaip ir sistemoms su feroceno dariniais [14]. Nustatyta K_M^{app} reikšmė (PVA)-tADH/1P/-Cst yra per eilę didesnė. Manytina, jog vieną parą imobilizuojantis fermentui, susidaręs jo sluoksnis buvo žymiai didesnis nei kitų sistemų atveju. Tačiau (PVA)-tADH/1P/-Cst ir (PVA)-tADH/1,5/-Cst aktyvumai buvo panašūs, iš ko galima daryti išvadą, jog abiejų sistemų atveju veikė apytiksliai vienodas aktyvaus tADH kiekis.

Atlikti eksperimentai su mediatorinėmis tADH sistemomis parodė, jog fermento veikimas yra stabilesnis ir efektyvesnis ant Cst elektrodingos matricos. Tačiau dėl efektyvios tADH sąveikos su PVA paviršiumi buvo stabilizuojama fermento molekulės globulė, todėl gerai surištas fermentas veikė neprarasdamas savo aktyvumo apie savaitę. PVA nekovalentinėje sąveikoje su tADH dalyvavo hidrofilinės –OH grupės, o Cst atveju, hidrofobinis amorfinės anglies paviršius. Siekiant išgauti tinkamą optimaliam fermento veikimui elektrodingą matricą, bioamperometrines sistemas su tADH buvo ruoštos ant įvairiais būdais oksiduoto grafito elektrodų, kurių paviršius pasižymėjo tiek hidrofobinėmis anglies savybėmis, tiek hidrofilinėmis deguonį turinčių funkcinių grupių savybėmis.

3.3.2.3 TADH veikimas ant grafito oksidacijos produktais modifikuotų anglies pastos elektrodų

Pastaraisiais metais dėl savo fizikinių ir cheminių savybių didelio mokslininkų susidomėjimo sulaukė grafenas ir jo įvairios modifikacijos [189-190]. Bioamperimetrinėms sistemoms tokio tipo elektrodinga medžiaga taip pat galėtų būti labai perspektyvi. Nors pats grafenas nėra chemiškai aktyvi medžiaga, tačiau jo aktyvumą ir savybes galima keisti įvedant struktūrinius



3.22 pav. TADH bioelektrokatalizės ant GOP modifikuotų APE-ų schema.

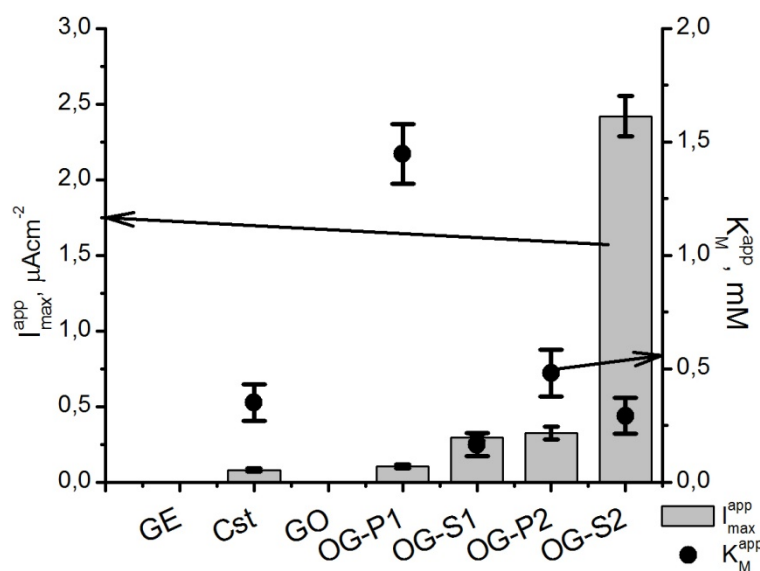
defektus ar funkcines grupes. Vienas iš galimų anglinių medžiagų modifikavimo būdų yra grafito oksidacija.

Šiame darbe buvo kuriamos bioamperometrinės sistemos iš naujų anglinių medžiagų – grafito oksidacijos produktų (GOP): GO, OG-1P, OG-1S, OG-2P, OG-2S, kurie gauti įvairiais būdais oksiduojant ir mechaniškai paruošiant grafitą. Tokiu

būdu buvo norima išgauti optimalios struktūros ir cheminės sudėties elektrodinę matricą, kuri užtikrintų efektyvų fermentų veikimą.

Darbe buvo sukurtos ir tirtos sekančios bioamperometrinės sistemos: tADH_GO-Cst, tADH_OG-1P-Cst, tADH_OG-1S-Cst, tADH_OG-2P-Cst ir tADH_OG-2S-Cst, tADH tiesiog adsorbuojant ant GOP modifikuotų strypinių APE-ų. Ankstesnių tyrimų metu buvo parodyta, jog tADH gali tiesiogiai reoksiduotis ant chemiškai modifikuotų anglinių paviršių [77, 79], todėl bioamperometrinės sistemos su GOP buvo tirtos nenaudojant papildomų mediatorių, tikėtasi, jog ir šios elektrokinės medžiagos yra tinkamos TEP. TADH bioelektrokatalizės schema pavaizduota 3.22 pav. Gauti kinetiniai parametrai buvo palyginti su sistemomis, kuriose fermentas veikė ant nemodifikuotų GE-o ir APE-o (atitinkamai bioamperometrinės sistemos tADH_GE ir tADH_Cst). Rezultatai pateikti 3.23 pav. Iš 3.23 paveiksle pateiktų duomenų matoma, jog I_{max}^{app} sistemose skirtingų GOP pagrindu kito nuo 0 (GO atveju) iki $2,5 \mu\text{Acm}^{-2}$ (OG-S2 atveju). Visų penkių sistemų 95% atsako, pridėjus fermento substrato, vystėsi per 1 min, kas yra žymiai greičiau, nei tADH_Cst su tirpiu mediatoriumi. Kaip matoma 3.23 paveiksle, visų sistemų I_{max}^{app} ir K_M^{app} reikšmės yra skirtingos. Iš to galima padaryti išvadą, jog šių procesų limituojanti stadija yra ne 1,2-propandiolio oksidacija fermentu, o EP nuo redukuoto fermento aktyviojo centro ant GOP paviršiaus. Tačiau šiai

prielaidai patvirtinti reikalingi papildomi tyrimai. Sistema, sukurta nemodifikuotos anglies pagrindu (tADH_Cst) be tirpaus mediatoriaus veikė labai neefektyviai, o jos I_{max}^{app} buvo daugiau nei 20 kartų mažesnis, nei su KF (žr. 3.3.2.1 sk.). Tuo tarpu sistemos su GOP, kuriose vyko TEP, veikė žymiai efektyviau.



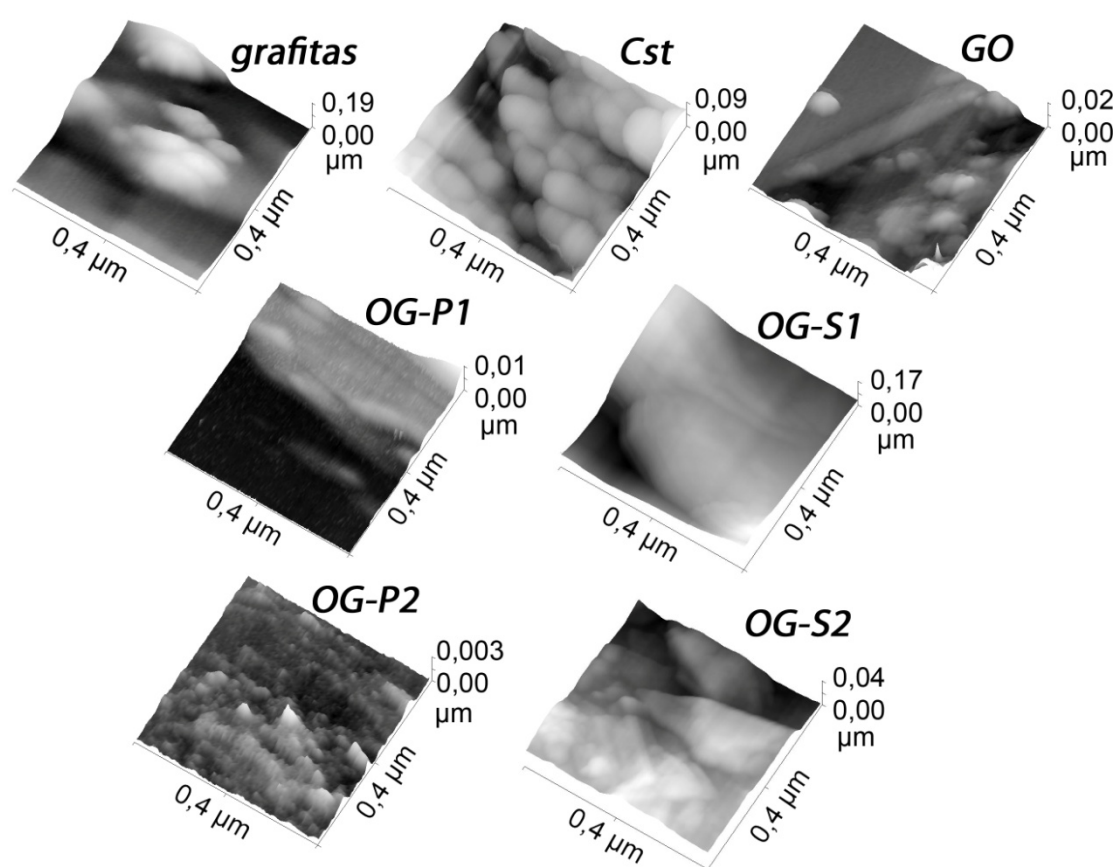
3.23 pav. Bereagentinių bioamperometrinių sistemų su tADH ir GOP, grafitu bei Cst kinetinės charakteristikos. Bioamperometrinių sistemų konstravimui ir modifikavimui GOP naudoti strypiniai APE-ai ir GE-ai.

Ankstesnių tyrimų metu buvo parodyta, jog užtikrinti efektyviai TEP nuo tADH aktyviojo centro ant chemiškai modifikuotų amorfinės anglies medžiagų yra svarbios bazinės funkcinės grupės [79]. Šiame darbe tirti OG-S1 ir OG-S2 taip pat pasižymėjo didesniu bazinių grupių kiekiu (žr. 2.1 sk., 2.1 lentelė) nei kiti GOP, nors kitokių funkcinių grupių jose ir nebuvo aptikta. Be to, OG-S1 ir OG-S2 buvo susintetinti iš papildomai susmulkintos grafito žaliavos. Todėl tikėtina, jog šios anglinės medžiagos formuoja elektrodo paviršiaus struktūrą, kuri paveikia fermento molekulės tinkamą orientaciją.

3.3.2.4 Grafito oksidacijos produktų paviršiaus morfologijos charakteristikos

Siekiant įvertinti GOP paviršiaus morfologijos įtaką tADH bioelektrokatalizės efektyvumui, tirtų anglinių medžiagų paviršiai buvo

charakterizuoti atominės jėgos mikroskopijos metodu. Gauti grafito, Cst, GO, OG-1P, OG-1S, OG-2P ir OG-2S topografiniai vaizdai pateikti 3.24 pav. Kaip matoma 3.24 paveiksle, visos tirtos anglinės medžiagos formuoja skirtingos morfologijos paviršius. Siekiant charakterizuoti šiuos paviršius, atlikta AJM vaizdų amplitudės parametrų analizė. Analizuoti tipiniai šiurkštumo parametrai: vidutinis šiurkštumas (S_a), šiurkštumo asimetrija (S_s), „dešimties taškų“ aukštis (S_{10}) ir intensyvumas (S_k) (žr. 2.5.8 sk.). Duomenys pateikti 3.6 lentelėje.



3.24 pav. Anglinių medžiagų topografiniai vaizdai. Skenavimo laukas 400 nm x 400 nm.

Pats žėrutis pasižymi atomiškai lygiu paviršiumi, todėl nedaro įtakos tirtų anglinių paviršių šiurkštumui. Visų kitų anglinių medžiagų šiurkštumo parametrai skyrėsi ir didžiausiu S_a pasižymėjo Cst ir OG-1S. S_k , kuris atspindi paviršiaus nelygumų „aštrumą“, buvo didžiausias GO. Mažiausiomis S_{10} reikšmėmis pasižymėjo grafitas ir OG-2S. S_s , atspindinčio šiurkštumą asimetriją, reikšmės nurodė, jog visų tirtų anglinių medžiagų paviršiuje stebimi

„kalnėliai“. Išimtį sudarė tik Cst, kurios paviršius buvo duobėtas. Labiausiai „kalnėliai“ išreikšti OG-1P ir OG-2P paviršiuose. Iš gautų duomenų galima daryti išvadą, jog OG-S1 ir OG-2S, ant kurių tADH bioelektrokatalizė vyko efektyviausiai ir stebimos K_M^{app} buvo mažiausios, formuoja tolygų paviršių iš smulkių oksiduoto grafito dalelių. O GO, OG-1P ir OG-2P, ant kurių bioelektrokatalizė vyko neefektyviai, formuoja netolygų paviršių iš stambių dalelių. Taip pat iš 3.6 lentelėje pateiktų duomenų galima pastebėti, jog kone didžiausią įtaką tADH veikimui daro S_a ir S_k , nors matematiškai apibrėžtos priklausomybės tarp jų reikšmių bei apskaičiuotų tariamųjų kinetinių bioamperometrinių sistemų parametrų nebuvo gauta.

3.6 lentelė. Anglinių medžiagų ir žėručio šiurkštumo parametrai. Pateikti parametrų vidurkiniai dydžiai, kurių paklaida neviršija 10% nuo nustatytos reikšmės.

	<i>Grafitas</i>	<i>Cst</i>	<i>GO</i>	<i>OG-1P</i>	<i>OG-1S</i>	<i>OG-2P</i>	<i>OG-2S</i>
S_a, nm	3	20	3	4	25	4	12
S_k, nm	10	7	153	47	4	55	3
S_s, nm	0,6	-2	3,1	10,9	0,3	29,1	1,1
S_{10}, nm	70	361	225	228	175	423	74

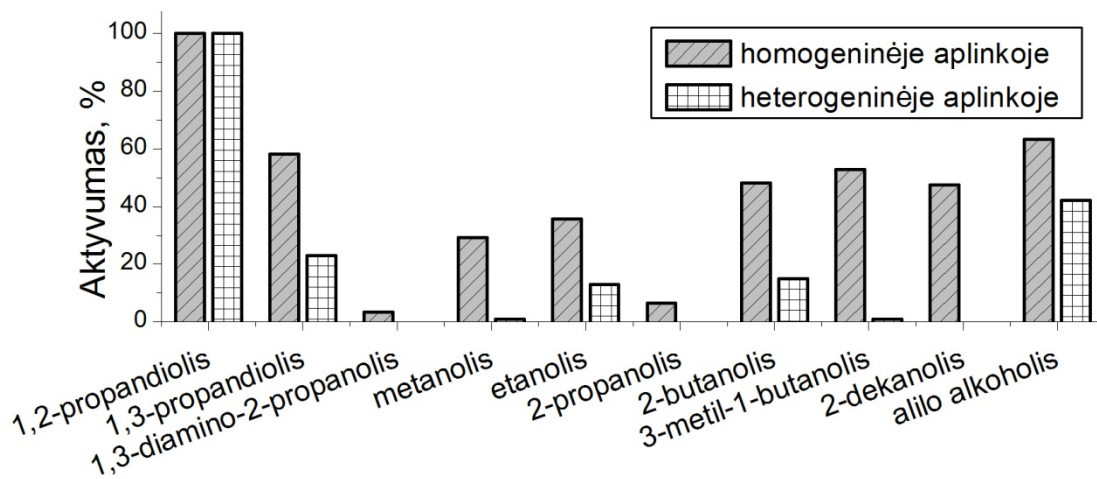
Apibendrinant šiame darbe tirtų bioamperometrinių sistemų su tADH ir GOP rezultatus, galima daryti išvadą, jog siekiant sukurti efektyviai veikiančią bereagentę sistemą, kurioje vyktų TEP, svarbu ne tik tinkamai chemiškai modifikuoti anglines medžiagas, bet ir suformuoti optimalią elektrodinės matricos morfologiją. Be to, tADH veikimui ir, greičiausiai, tinkamam orientavimui ant elektrodo paviršiaus daro įtaką bazinėmis savybėmis pasižyminčios deguoninės grupės, nes, nepaisant grafito ir OG-2S šiurkštumo parametrų panašumo, bioelektrokatalizė su tADH ant grafito nevyko, o ant OG-2S vyko efektyviausiai.

3.3.2.5 TADH atrankumas substratams

Kuriant bioelektrochemines sistemas, skirtas analizei, sintezei ir kt., svarbu žinoti jų atrankumą ir jautrumą įvairiems substratams, kadangi tik taip galima įvertinti sukurtos sistemos pritaikymo galimybes. TADH atrankumas įvairiems alkoholiams buvo vertinamas kuomet natyvus fermentas veikė tirpale

(homogeninėje aplinkoje) ir, kai fermentas buvo imobilizuotas į APE-ą (heterogeninėje aplinkoje). 3.25 paveiksle pateikti rezultatai išreikšti procentais priimanč, kad atsakas į 1,2-propandiolį yra 100%.

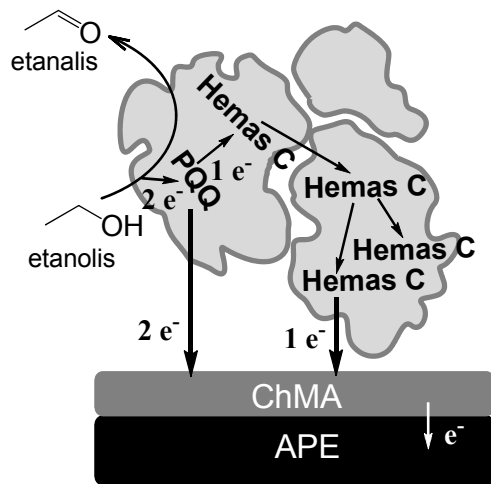
Kaip matome 3.25 pav., heterogeninėje aplinkoje veikianti tADH katalizuoja ne visų tirtų alkoholių oksidaciją. Tuo tarpu, kai tADH veikė homogeninėje aplinkoje, atsakas buvo gautas į visus tirtus alkoholius. Heterogeninėje aplinkoje tADH geriausiai oksiduoja alilo alkoholį ir 1,2-propandiolį, tačiau katalizės reakcijos nevykdo esant terpėje 2-propanoliui, 2-dekanoliui ir 1,3-diamino-2-propanoliui. Taip pat atsako į 1,3-propandiolį, 2-butanolį, 3-metil-1-butanolį ir etanolį intensyviau homogeninėje ir heterogeninėje aplinkose skyrėsi daugiau nei du kartus. Tai gali būti paaiškinta fermento konformacijos pokyčiais heterogeninėje aplinkoje ir skirtingu alkoholių judrumu. Iš gautų rezultatų taip pat galima padaryti išvadą, jog bioampermetrinės sistemos su tADH oksiduoja mažiau alkoholių, todėl yra atrankesnės, lyginant su natyvaus fermento veikimu homogeninėje aplinkoje.



3.25 pav. TADH substratiniai specifiškumai homogeninėje ir heterogeninėje aplinkose. Atsakas matuotas į 2 mM substrato, naudota tADH-Cst bioelektrocheminė sistema ant strypinio APE-o.

3.3.3 Sistemos su mADH

MADH yra membraninis fermentas, efektyviai oksiduojantis pirminius alkoholius net ir anaerobinėje aplinkoje. Yra parodyta, kad fermentas gali



3.26 pav. mADH bioelektrokatalizės schema.

tiesiogiai reoksiduotis ant kai kurių elektrodinių paviršių [20, 70]. Šios savybės yra patrauklios biojutiklių, biologinių kuro elementų įrenginių kūrimui ir pritaikymui bioelektrosintezėje (žr. 1.5.2 sk.).

3.1.2 skyriuje buvo parodyta, jog mADH gali reoksiduotis ant APE-o, elektronus pernešant nuo hemo c ir nuo PQQ molekulės, jei EP kelias nuo hemų c yra nepalankus. Kadangi mADH

molekulės paviršius pasižymi hidrofobinėmis savybėmis, tikėtina, jog hidrofiliiniai paviršiai jos veikimui nebus tinkami. Siekiant sukurti optimalų APE-o, buvo pasirinkta modifikuoti elektrodo paviršių chemiškai modifikuota anglimi (ChMA) (žr. 2.1 sk.). Ant šio paviršiaus mADH buvo imobilizuota fizikinės adsorbcijos būdu ir gautoji sistema pažymėta mADH_ChMA-Cst. Bioelektrokatalizės schema pateikta 3.26 pav., o nustatytos pagrindinės charakteristikos aprašytos 3.7 lentelėje. Palyginimui, taip pat tirta mADH_Cst sistema ant nemodifikuoto APE-o paviršiaus.

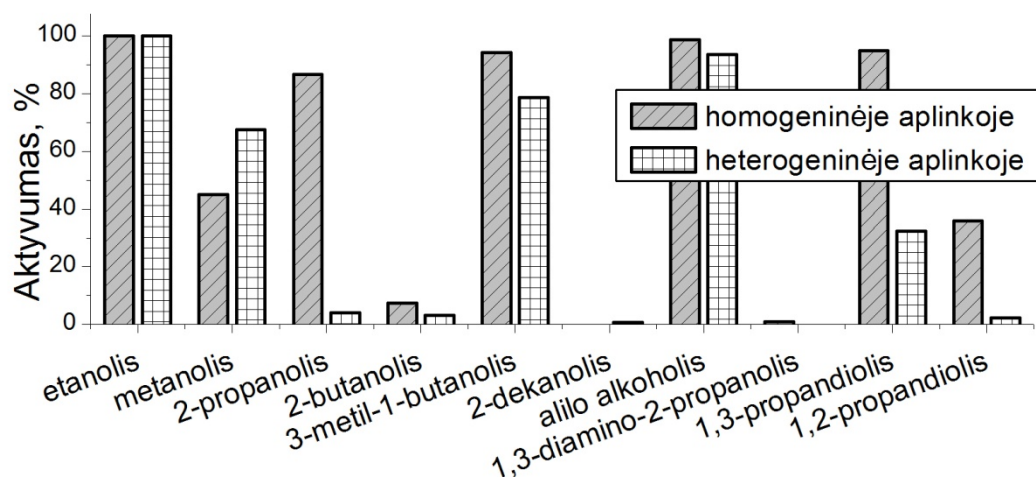
3.7 lentelė. Bioamperometrinių sistemų su mADH charakteristikos. Fermento substratu tyrimuose naudotas etanolis. Bioamperometrinės sistemos konstravimui naudotas plokštinis elektrodas.

<i>Sistema:</i>	<i>mADH_ChMA-Cst</i>	<i>mADH_Cst</i>
<i>Tiriamas maksimalus srovės tankis, μAcm^{-2}</i>	$3,3 \pm 0,1$	$0,20 \pm 0,01$
<i>K_M^{app}, mM</i>	$0,48 \pm 0,03$	$0,070 \pm 0,001$
<i>Jautrumas, $\mu\text{Acm}^{-2}\text{mM}^{-1}$</i>	3,9	0,8
<i>Atsako laikas, min</i>	$1,6 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,7$
<i>Tiesinė dalis, mM</i>	0,001 – 0,3	0,001 – 0,1
<i>$k_{in} \cdot 10^{-5}$, min⁻¹</i>	11 ± 2	60 ± 9

Kaip matoma 3.7 lentelėje, mADH_ChMA-Cst generavo iki 20 kartų didesnę atsaką į etanolį ir veikė stabiliau nei mADH_Cst. Abi sistemos generavo atsaką greičiau nei per 2 min, tačiau pasižymėjo trumpa tiesine dalimi, siekiančia iki 0,3 mM etanolio. Gautos bereagentės sistemos su mADH ir ChMA bei Cst, kuriose fermentas tiesiogiai reoksidavosi ant elektrodo paviršiaus, pasižymėjo geresniu stabilumu ir efektyvumu, nei bereagentės sistemos su polipirolo modifikuotais elektrodais [88] bei bereagentės mediatorinės sistemos su feroceno dariniais [14, 90]. Tačiau Treu ir bendradarbių panaudota amonio bromidu modifikuota „Nafion“ membrana mADH imobilizavimui užtikrino žymiai efektyvesnę ir stabilesnę veikimą [93].

3.3.3.1 MADH atrankumas substratams

Siekiant išsiaiškinti substratinio specifiškumo priklausomybę nuo aplinkos, kurioje fermentas veikia, buvo tirtas mADH atrankumas įvairiems alkoholiams, kuomet natyvus fermentas veikė tirpale (homogeninėje aplinkoje) ir, kai fermentas buvo imobilizuotas į ChMA modifikuotą APE-ą (heterogeninėje aplinkoje). 3.27 paveiksle pateikti rezultatai išreikšti procentais priimanč, kad atsakas į etanolį yra 100%.



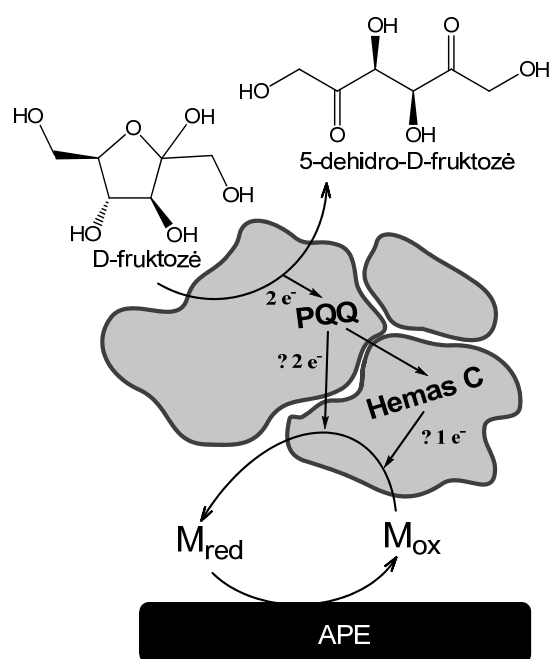
3.27 pav. MADH substratiniai specifiškumai homogeninėje ir heterogeninėje aplinkose. Atsakas matuotas į 2 mM substrato, naudota mADH-ChMA-Cst bioelektrocheminė sistema ant strypinio APE-o.

Kaip matome 3.27 paveiksle, mADH skirtingu greičiu vykdo tų pačių alkoholių katalizės reakcijas, esant homogeninėje ir heterogeninėje aplinkose.

Kaip ir aprašoma literatūroje (žr. 1.5.2 sk.), mADH labiau atranki pirminiems alkoholiams. MADH bioelektrokatalizė efektyviausiai vyksta su etanoliu, alilo alkoholiu, 3-metil-1-butanoliu ir metanoliu. Tačiau šis procesas nevyksta arba vyksta neefektyviai terpėje esant antriniams alkoholiams bei 1,3-diamino-2-propanoliui ir 1,2-propandoliui. Taipogi atsakas į tuos pačius alkoholius gali kisti daugiau nei du kartus homogeninėje ir heterogeninėje aplinkose, kaip ir 2-propanolio, 1,3-propandiolio bei 1,2-propandiolio atveju. Substratinis specifiškumas gali pasikeisti dėl to, kad pakinta adsorbuoto ant APE-o fermento konformacija ir deformuojasi aktyvusis centras. Tai gali būti ir dėl alkoholių molekulių prigimties, sąlygojančios jų skirtingą judrumą.

Iš gautų rezultatų galima padaryti išvadą, jog bioamperometrinės sistemos su mADH yra atrankesnės, lyginant su natyvaus fermento veikimu homogeninėje aplinkoje.

3.3.4 Sistemos su FDH



3.28 pav. FDH bioelektrokatalizės su chinoniniais mediatoriais schema.

Nuo PQQ priklausoma fruktozės dehidrogenazė, pasižyminti unikaliu atrankumu fruktozei ir dažniausiai naudojama fruktozės biojutiklių kūrimo. Iš literatūros duomenų žinoma, jog sėkmingiausios analizinės bioamperometrinės sistemos su FDH buvo sukurtos anglinių elektrodinių matricių pagrindu ir naudojant mediatorių, *p*-benzochinoną (BQ) (žr. 1.5.4 sk.). Tačiau šių sistemų trūkumas buvo mediatoriaus desorbicija nuo anglinio elektrodo paviršiaus į tirpalą, dėl ko sistemos greitai prarasdavo stabilumą [141].

Todėl šiame darbe buvo siekiama sukonstruoti naujus *p*-benzochinono darinius, kurie pasižymėtų tiek mažesniu

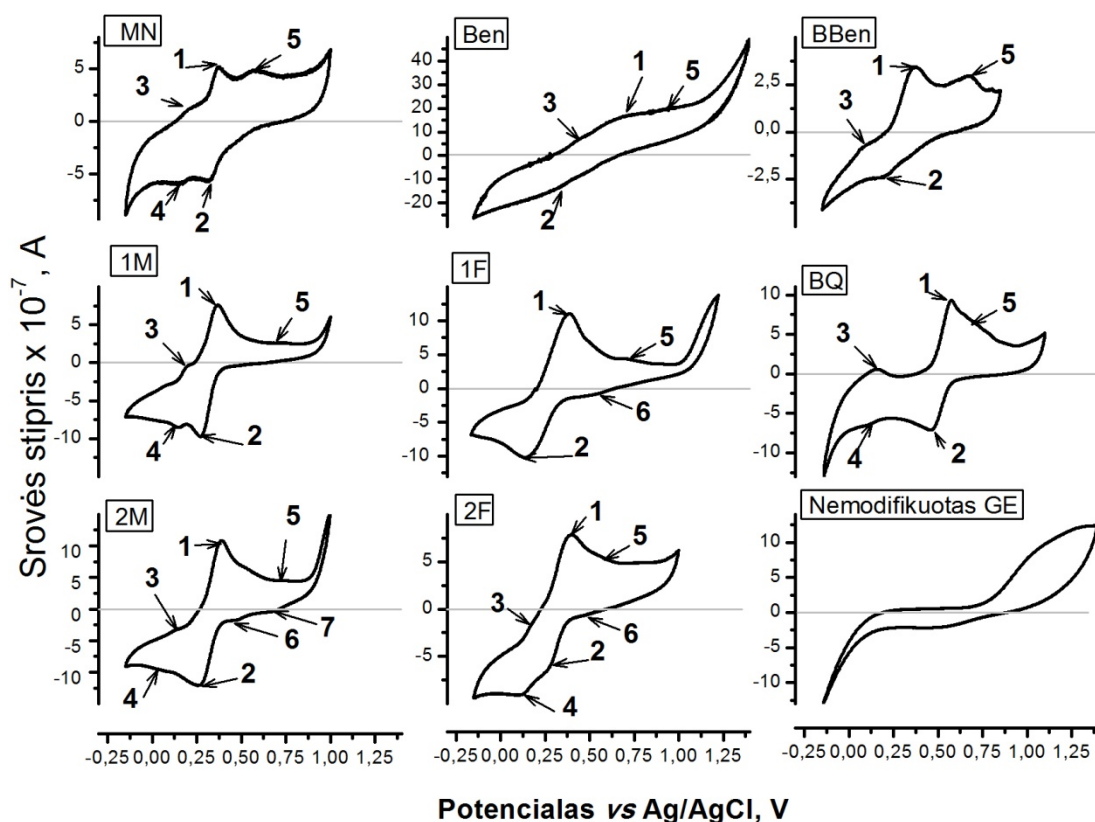
tirpumu vandenyje, dėl ko galėtų ilgiau išlikti ant elektrodo paviršiaus, tiek užtikrinti efektyvią EP nuo fermento aktyviojo centro ant elektrodo paviršiaus. Šiame darbe buvo tirti nauji BQ dariniai, turintys įvairius anilino pakaitus (žr. 2.1 sk.). Jų cheminės ir fizikinės savybės kol kas nėra iki galo iširtos, tačiau žinoma, jog jie yra mažiau tirpūs vandenyje nei BQ. FDH bioelektrokatalizės schema pavaizduota 3.28 pav.

3.3.4.1 Naujų chinoninių mediatorių elektrocheminės savybės

Siekiant įvertinti naujai susintetintų mediatorių elektrochemines savybes bei efektyvumą reoksiduojant FDH aktyvųjį centrą, buvo atlikti tiek pačių mediatorių, tiek jų pagrindu sukurtų bioelektrokatalizinių sistemų tyrimai.

Nauji chinoniniai mediatoriai, adsorbuoti ant GE-ų (žr. 2.4.3 sk.), buvo tirti ciklinės voltamperometrijos metodu. Siekiant įvertinti pakaitų įtaką BQ darinių elektrocheminėms ir mediatorinėms savybėms, palyginimui buvo tirtas ir adsorbuotas ant GE-o *p*-benzochinonas. Dažniausiai BQ ir jo darinių elektrocheminės savybės tiriamos aprotoninėje ir anaerobinėje aplinkoje, nes tokiu atveju vyksta grįžtami elektronų pernašos redokso elektrocheminiai procesai, stebint dvi oksidacines ir dvi redukcines smailes [191]. Tačiau, priklausomai nuo aplinkos poliškumo, chinono struktūros bei vidumolekulinių vandenilinių ryšių, chinonų voltamperogramose galima stebėti tik vieną redokso procesą (vieną oksidacinę ir vieną redukcinę smaile) [191-193]. Šiame darbe chinoninių medžiagų elektrocheminės savybės tirtos H₂SO₄ vandeniniame tirpale. *P*-benzochinono ir kitų BQ darinių CV-os pateiktos 3.29 paveiksle. Kadangi nemonifikuoto GE-o CV-oje nematomi žymūs oksidaciniai arba redukciniai procesai, mediatorių ciklinės voltamperometrijos tyrimams nedaro įtakos nespecifiniai procesai, vykstantys ant GE-o paviršiaus. Vykstant adsorbuoto BQ oksidacijai, CV-oje matomos trys oksidacinės smailės (3.29 pav. 1, 3 ir 5), o BQ redukcijai dvi redukcinės smailės (3.29 pav. 2 ir 4). 1-oji (0,57 V) ir 2-oji (0,46 V) smailės apibūdina intensyvius kvazigrįžtamus procesus (kurie tekste nurodyti kaip 1 ir 2 procesas), o 3-ioji (0,13 V) ir 4-oji

(0,09 V) smailės pažymi neintensyviai vykstančius kvazigrįžtamus redokso procesus (kurie tekste nurodyti kaip 3 ir 4 procesai), esant neigiamesniems elektrodo potencialams nei 1 ir 2 proceso. 5-oji nežymi oksidacinė smailė, elektrodo potencialui esant prie 0,731 V, apibūdina negrįžtamą oksidacinį procesą. Visos aptartos BQ būdingos smailės yra matomos ir vykstant MN, 1M, 2M bei 2F redokso reakcijoms. Tačiau jų 1-2 procesai pasislenka į neigiamesnių potencialų sritį. 1F, 2F ir 2M atveju atsiranda papildomos 6-oji ir 7-oji redukcines smailės. Vykstant 1F oksidacijai ir redukcijai ant GE-o, nevyksta 3-4 redokso procesai. Ben ir BBen atveju stebimos trys oksidacinės smailės ir tik viena nežymi redukcinė smailė, kas liudija, jog šių mediatorių redokso procesai yra negrįžtami.



3.29 pav. Chinoninių mediatorių ciklinės voltamperogramos. Kiekvienoje ciklinėje voltamperogramoje skaičiais pažymėtos oksidacinės ir redukcines smailės. Potencialas skleistas 10 mV/s greičiu, tyrimai atlikti 0,5 M H₂SO₄ vandeniniame tirpale.

Visų mediatorių CV-ose stebimų smailių potencialai pateikti 3.8 lentelėje. Yra žinoma, jog rūgštinėse vandeninėse sistemose, ištirpinto BQ CV-oje

stebimos viena oksidacinė ir viena redukcinė smailės. Šie redokso procesai vyksta pagal elektrocheminių reakcijų ECE mechanizmą [193-194]. Visų tirtų chinoninių medžiagų CV-ose stebimas 1-2 redokso procesas yra grįžtamas. Jis charakterizuotas oksidacinio ir redukcinio potencialų skirtumu (ΔE_{1-2}) ir formalioju redokso potencialu (E'_0) (žr. 3.8 lentelę). Kaip matoma 3.8 lentelėje, visų tirtų chinoninių mediatorių E'_0 yra panašūs, išskyrus BQ, Ben ir BBen. Tai liudija, jog BQ modifikavimas anilininiais pakaitais, pasižyminčiais stipriu indukcinio efektu, mažina elektronų atplėšimo nuo chinono deguonies atomų aktyvacijos energiją.

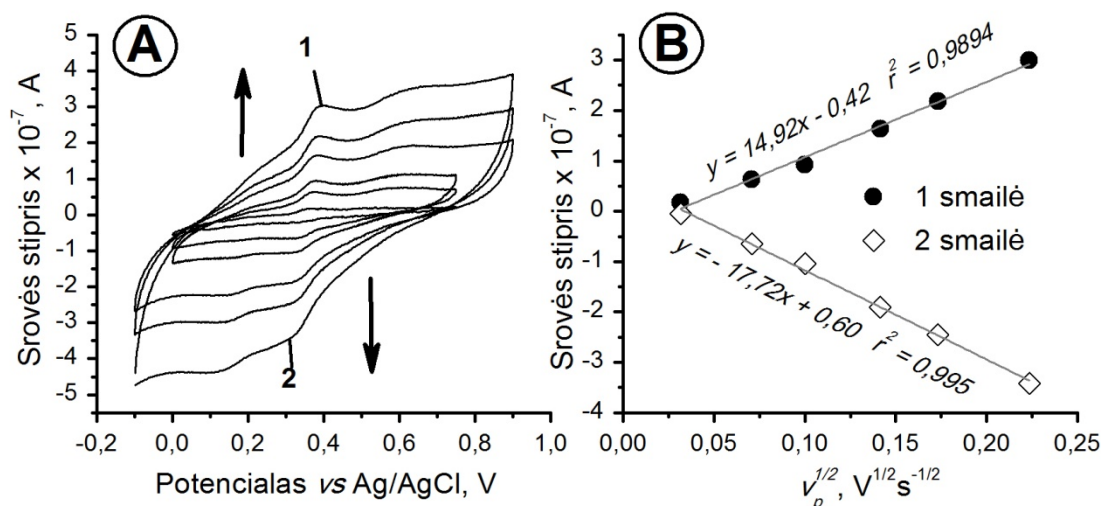
3.8 lentelė. Chinoninių medžiagų redokso smailių potencialų reikšmės (vs. Ag/AgCl) ir pagrindinės charakteristikos, nustatytos iš ciklinių voltamperogramų.

	<i>Oksidacijos potencialai, V</i>			<i>Redukcijos potencialai, V</i>				$\Delta E_{1-2}, V$	E'_0, V
	E_{pa1}	E_{pa3}	E_{pa5}	E_{pc2}	E_{pc4}	E_{pc6}	E_{pc7}		
BQ	0,57	0,13	0,73	0,46	0,09			0,11	0,522
MN	0,36	0,17	0,59	0,32	0,14			0,05	0,338
1M	0,37	0,19	0,69	0,27	0,13			0,1	0,319
2M	0,38	0,13	0,71	0,26	0,06	0,46	0,69	0,12	0,324
1F	0,46		0,85	0,18		0,63		0,28	0,323
2F	0,39	0,18	0,61	0,26	0,09	0,48		0,14	0,324
Ben	0,58	0,42	0,97	0,28				0,3	0,429
BBen	0,35	0,07	0,69	0,19				0,16	0,271

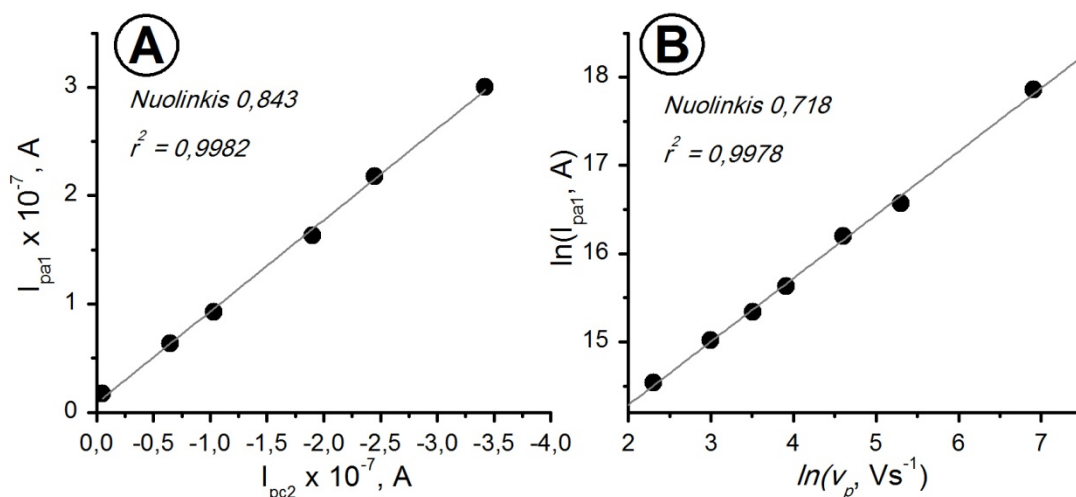
Mažesniu indukcinio efektu pasižymintis nemodifikuotas anilino pakaitas Ben molekulėje, mažiau veikia chinono deguonies atomus. Todėl tik kai prie *p*-benzochinono prijungti du anilininiai pakaitai BBen molekulėje stebimas E'_0 sumažėjimas. Be to, vykstančių redokso procesų greitis yra didesnis MN ir 1M. Tai atspindi mažesnis potencialų skirtumas tarp anodinės ir katodinės smailės. Kaip matoma 3.8 lentelėje, lėčiausi redokso procesai yra Ben ir 1F atveju. Be to, kaip bus parodyta tolimesniuose bioamperometrinių sistemų su FDH tyrimuose (žr. 3.3.4.2 sk.), sistemos su MN efektyviau nei kiti mediatoriai reoksiduoja fermento aktyvųjį centrą. Todėl MN redokso savybės buvo tirtos nuodugniau.

MN adsorbuoto ant GE-o CV-os užrašytos potencialą skleidžiant skirtingu greičiu. Rezultatai pateikti 3.30 pav. Kaip matoma, didėjant potencialo skleidimo greičiui (v) (3.30 pav. A), oksidacijos ir redukcijos procesai vyksta

intensyviau, todėl oksidacinių ir redukcinių smailių aukštis didėja. Didinant potencialo skleidimo greitį iki 50 mVs⁻¹, 1-os oksidacinės ir 2-os redukcinės smailės padėtys nekinta x-ašies atžvilgiu, kas rodo, jog vykstantys redokso procesai yra grįžtami. Tai patvirtina ir tiesinė smailių srovės stiprio priklausomybė nuo kvadratinės potencialo skleidimo greičio šaknies (3.30 pav. B).



3.30 pav. MN adsorbuoto ant GE-o ciklinės voltamperogramos užregistruotos skirtingais potencialo skleidimo greičiais (A). Skaičiais pažymėtos oksidacinė ir redukcinė smailės, o strėlytėmis oksidacijos ir redukcijos procesų srovės kitimas, didėjant skleidimo greičiui. MN oksidacinės (1) ir redukcinės (2) smailių aukščio priklausomybė nuo potencialo skleidimo greičio kvadratinės šaknies (B).



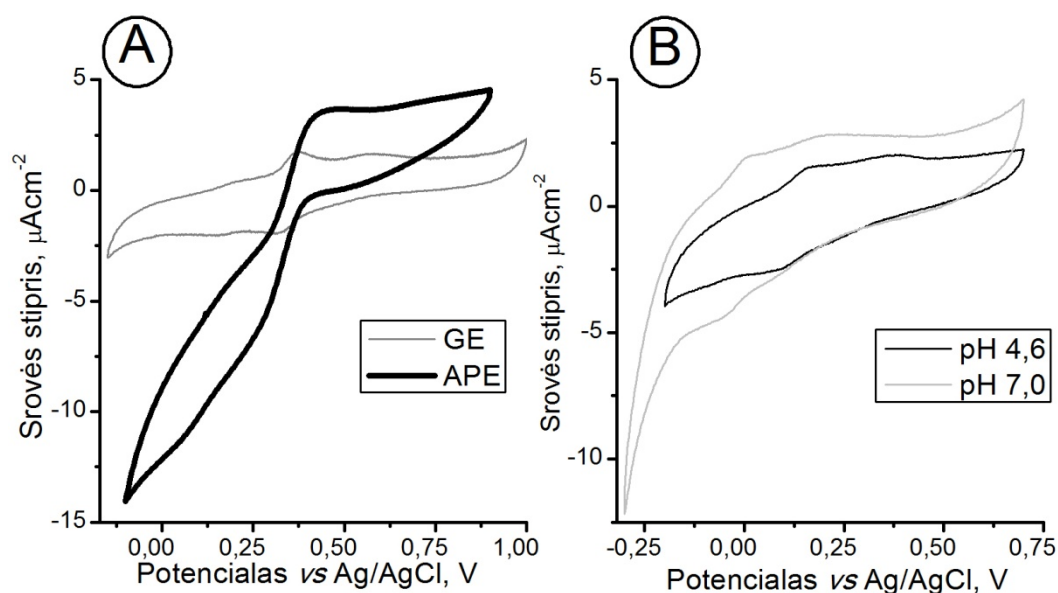
3.31 pav. Koreliacija tarp MN oksidacinės smailės 1 ir redukcinės smailės 2 srovės stiprių (A). MN oksidacinės smailės 1 dydžio logaritmo priklausomybė nuo potencialo skleidimo greičio logaritmo (B).

Siekiant išsiaiškinti, ar MN 1-2 redokso procesai yra pilnai grįžtami, buvo tirta koreliacija tarp 1-os oksidacinės smailės srovės stiprio (I_{pa1}) ir 2-os

redukcinės smailės srovės stiprio (I_{pc2}) (3.31 pav. A). Kaip matoma, koreliacija yra tiesinė, ir nors tiesės nuolinkio kampo tangentas labai artimas, tačiau nėra lygus 1-ai. I_{pa} vs. I_{pc} tiesės nuolinkio kampo tangentas lygus vienetui, kai redokso reakcija yra pilnai grįžtama ir $I_{pa} = I_{pc}$. MN oksidacijos virsmų greitį limituojanti stadija yra adsorbuotos medžiagos elektronų pernaša ant elektrodo paviršiaus, ką patvirtina tiesinė $\ln(I_{pa1})$ priklausomybė nuo $\ln(v_p)$, o tiesės nuolinkio kampo tangentas yra didesnis nei 0,5 (3.31 pav. B) [167].

Siekiant išsiaiškinti MN redokso 1-2 procesų EP efektyvumą, buvo nustatomas oksidacijos proceso EP greitis. EP greitį atspindi standartinė EP greičio konstanta k^0 , kuri buvo apskaičiuota remiantis Sharp pasiūlyta metodika [169] (žr. 2.5.7 sk.). Nustatyta k^0 yra lygi $0,78 \text{ s}^{-1}$, kurios reikšmė patvirtina, jog MN analizuoti redokso procesai yra kvazigrįžtami [195].

Siekiant išsiaiškinti elektrodinės medžiagos, ant kurios veiks mediatorius, įtaką, MN CV-os buvo užrašytos ant APE-o ir GE-o. Iš CV-ų, pavaizduotų 3.32 pav. A, paaiškėjo, jog MN redokso procesai yra kvazigrįžtami ir intensyvesni ant APE-o nei ant GE-o.

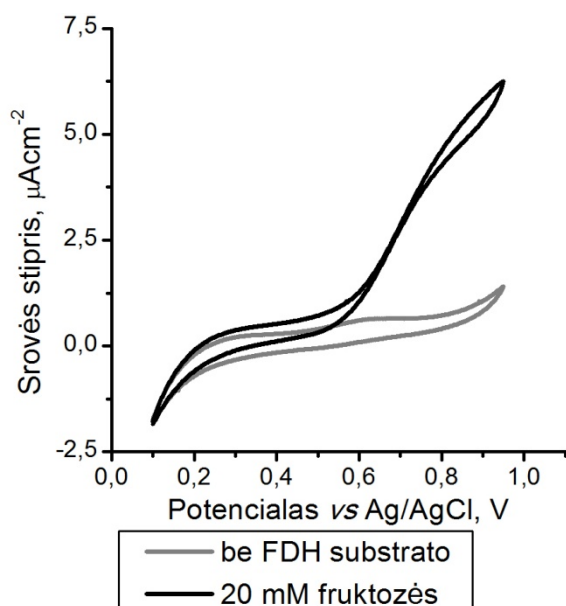


3.32 pav. MN adsorbuoto ant GE-o ir APE-o ciklinės voltamperogramos 0,5 M H_2SO_4 vandeniame tirpale (A). MN adsorbuoto ant GE-o ciklinės voltamperogramos McIlvaino buferiniame tirpale, esant skirtingiems pH (B). Potencialas skleistas 10 mV/s greičiu.

Taip pat MN redokso procesams daro įtaką terpės pH. Kaip matyti 3.32 B paveiksle, MN CV-ose, užrašytose McIlvaino buferiniame tirpale, esant skirtingiems pH, redokso procesai vyksta esant neigiamesniems potencialams (E_{pal} yra 0,16 V, esant pH 4,6 ir 0,01 V, esant pH 7,0), nei 0,5 M H₂SO₄ vandeniniame tirpale (E_{pal} yra 0,36 V). Tačiau procesai išlieka kvazigrįžtami.

3.3.4.2 Bioamperometrinių sistemų su FDH ir chinoniniais mediatoriais charakteristikos

Nustačius naujų chinoninių medžiagų elektrochemines savybes, tolesniuose tyrimuose buvo tirtos bioamperometrinės sistemos su naujomis chinoninėmis medžiagomis, siekiant įvertinti jų, kaip mediatorių panaudojimo galimybes sistemose su FDH. Bioamperometrinės sistemos su FDH ir chinoniniais mediatoriais sukonstruotos fermentą imobilizuojant ant modifikuoto chinonine medžiaga APE-o paviršiaus fizikinės adsorbcijos būdu. Gautos sistemos: FDH_MN-Cst, FDH_Ben-Cst, FDH_BBen-Cst, FDH_1M-Cst, FDH_2M-Cst, FDH_1F-Cst ir FDH_2F-Cst. CV-a užrašyta bioelektrokatalizinei sistemai su MN, parodo, jog į sistemą pridėjus substrato

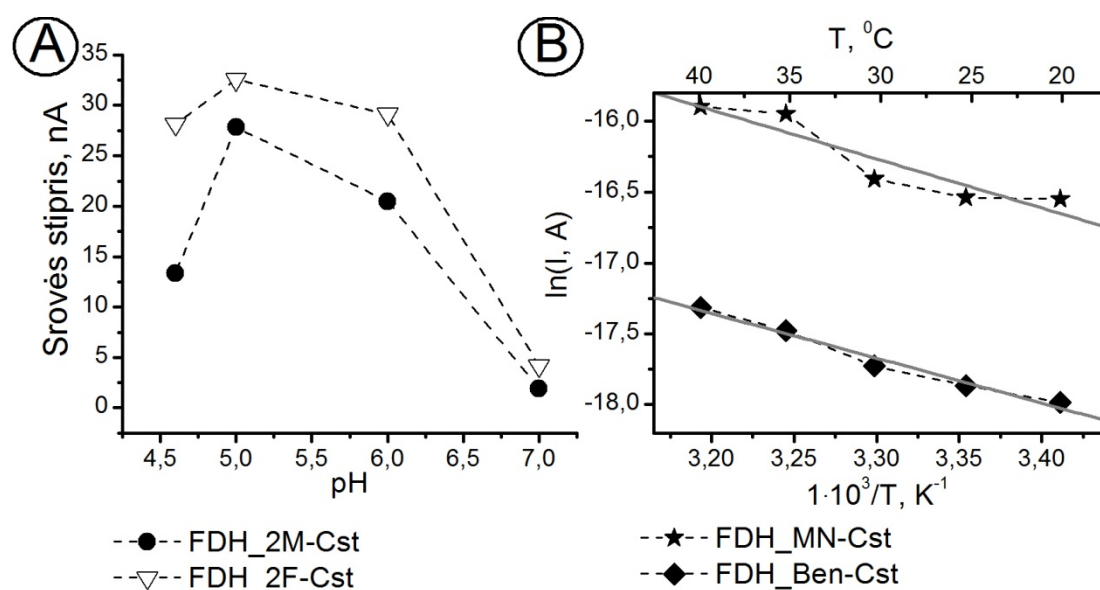


3.33 pav. FDH_MN-Cst ciklinės voltamperogramos. McIlvaino buferinis tirpalas, pH 4,6; potencialas skleistas 10 mV/s greičiu.

prasideda žymus anodinės srovės išaugimas mediatoriaus oksidacinio potencialo srityje (apie 0,25 V) (3.33 pav.), kas patvirtina mediatoriaus dalyvavimą bioelektrokatalizėje.

Siekiant parinkti optimalias FDH veikimo sąlygas ant chinoniniais mediatoriais modifikuotų APE-ų, tirtos sukurtų bioamperometrinių sistemų generuojamo atsako dydžio priklausomybės nuo buferinio tirpalo pH ir temperatūros.

Temperatūros ir pH įtaka visoms sistemoms buvo panaši. 3.34 pav. pavaizduotos gautos kelių sistemų aktyvumo priklausomybės nuo pH ir temperatūros. Visų sistemų bioelektrokatalizė vyko efektyviausiai, esant pH 5,0 ir 40 °C. Tačiau, mažėjant H⁺ jonų koncentracijai, bioamperometrines sistemas veikė labai nestabiliai, o esant pH 8,0, sistemos inaktyvavosi negrįžtamai. Tiriant temperatūros įtaką sistemų aktyvumui, paaiškėjo, jog didinant temperatūrą nuo 25 °C, sistemos taip pat veikia labai nestabiliai. Po bandymų, esant 40 °C, sistemų aktyvumas sumažėja maždaug iki 5% ir nebeatsistato. Temperatūrinės bioamperometrinių sistemų su FDH ir chinoniniais mediatoriais aktyvumo Arenijaus priklausomybės yra tiesinės (3.34 pav. B), o jų nuolinkis yra vienodas visoms sistemoms. Apskaičiuota bioelektrokatalizės procesų aktyvacijos energija lygi 28 ± 2 kJ/mol. Tai patvirtina išvadą, jog FDH yra jautri aplinkos pokyčiams ir bioamperometrinių sistemų efektyvumui didžiausią įtaką daro fermento prigimtis. Panašūs rezultatai gauti ir kituose darbuose [130-131, 146].

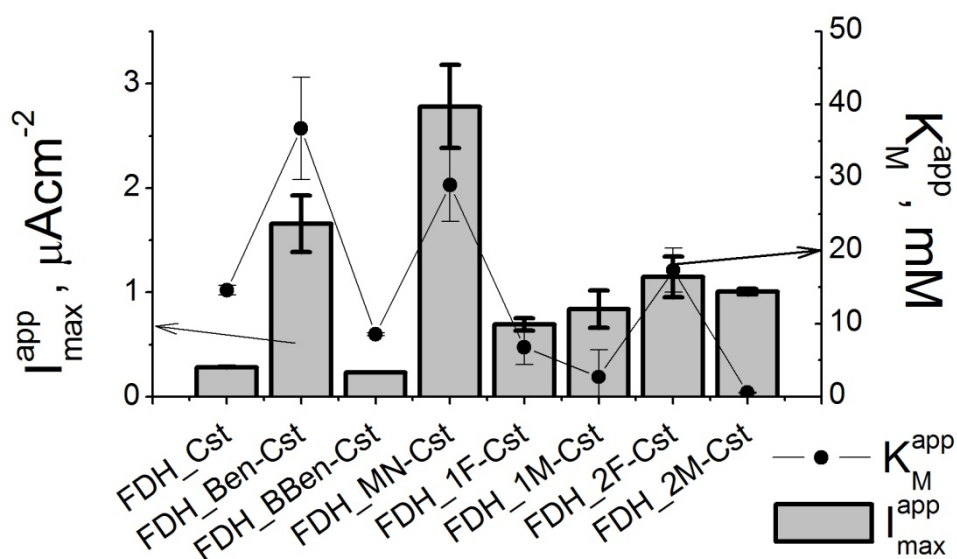


3.34 pav. Buferinio tirpalo pH (A) ir temperatūros (B) įtaka bioamperometrinių sistemų su FDH ir chinoniniais mediatoriais aktyvumui. Bioamperometrinių sistemų konstravimui naudoti strypiniai elektrodai, atsakas matuotas į 10 mM D-fruktozės.

Siekiant įvertinti sukurtų bioamperometrinių sistemų efektyvumą ir stabilumą atlikti chronamperometriniai tyrimai ir paskaičiuoti sistemų

kinetiniai parametrai: I_{max}^{app} ir K_M^{app} bei k_{in} . Rezultatai pateikti 3.35 ir 3.36 paveiksluose bei susumuoti 3.9 lentelėje.

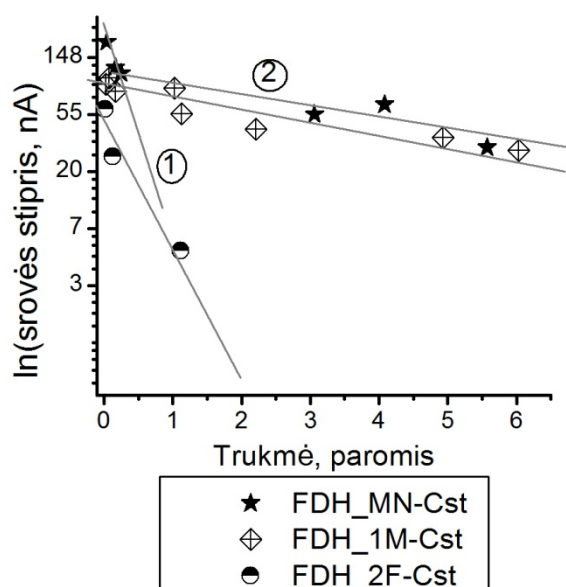
Kadangi FDH gali perduoti elektronus anglinėms medžiagoms ir tiesiogiai, t.y. be mediatorių, tirta bioamperometrinė sistema su FDH ant APE-o (FDH_Cst). Mediatorinių sistemų efektyvumas lygintas su FDH_Cst. Kaip matoma 3.35 pav., mediatoriaus panaudojimas mažiausiai 3 kartus padidino generuojamo atsako dydį lyginant su sistema, kurioje FDH veikė ant APE-o be chinoninės medžiagos. Išimtį sudarė tik sistema su BBen. Manoma, dėl šio mediatoriaus molekulos dydžio, jis negalėjo patekti arti FDH aktyviojo centro. Efektyviausiai FDH bioelektrokatalizė vyko sistemose su MN ir Ben. Mediatorių, kurių fluor- ir metoksi- pakaitai buvo anilino pakaito *para*-padėtyje (žr. 2.1 sk.), efektyviau reoksidavo FDH aktyvųjį centrą, nei tie mediatoriai, kurių tie patys pakaitai buvo *orto*-padėtyje.



3.35 pav. Bioamperometrinių sistemų su FDH ir chinoniniais mediatoriais kinetiniai parametrai.

Atlikus sistemų stabilumo matavimus, pastebėta, jog sistemos su *orto*-padėtyje esančiomis grupėmis pasižymi didesniu stabilumu, nei *para*-padėtyje, ką parodo mažesnės inaktyvacijos konstantos (3.9 lentelė). 3.36 paveiksle pavaizduotas kelių skirtingų bioamperometrinių sistemų atsako dydžio kitimas laike. Didžiausią atsaką į fruktozę generavusios FDH_MN-Cst ir FDH_Ben-Cst veikė stabiliausiai. Abi sistemos generavo atsaką į substrato pridėjimą apie

mėnesį. Tačiau jų inaktyvacija, skirtingai nei kitų sistemų, vyko keliomis stadijomis: greita, kurios metu, greičiausiai, vyko neadsorbuoto fermento desorbcija, ir lėta. 3.36 paveiksle ir 3.9 lentelėje greita stadija pažymėta (1), o lėta – (2). Visų kitų sistemų inaktyvaciją galima buvo aprašyti pirmo laipsnio eksponentės lygtimi. FDH_Cst, FDH_BBen-Cst, FDH_1M-Cst ir FDH_1F-Cst k_{in} reikšmės yra panašios. Iš to galima daryti išvadą, jog šiose sistemose FDH sąveika su elektrodiniu paviršiumi yra panaši ir inaktyvacija vyksta dėl fermento aktyvumo netekimo. Modifikuoti Ben ir MN APE-ai stabilizavo fermento molekulę geriau, nei kiti mediatoriai ir nmodifikuotas APE-as. O APE-ai su 2F ir 2M sąveika su FDH buvo neefektyvi, dėl to, sistemos veikė trumpiausiai (trumpiau nei savaitę).



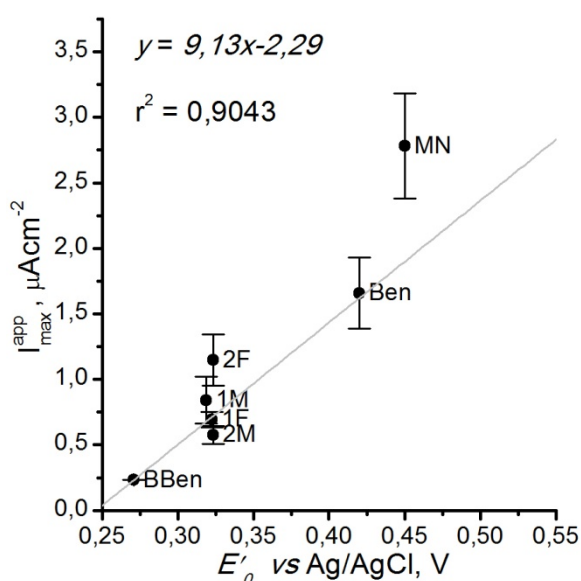
3.36 pav. Bioamperometrinių sistemų su FDH ir chinoniniais mediatoriais stabilumas. Duomenys aproksimuoti tiesės lygtimi. Visų tiesių $r^2 > 0,95$. Atsakas matuotas į 10 mM D-fruktozės.

Nustatytos bioamperometrinių sistemų K_M^{app} reikšmės fruktozei buvo didesnės nei 10 mM (tai yra natyvios FDH K_M , žr. 1.5.4 sk.) sistemose su Ben, MN, 2F ir be mediatoriaus, kas rodo, jog šiose sistemose greitį limituojanti stadija yra substrato difuzija iki fermento aktyviojo centro (3.35 pav.). Kitų sistemų K_M^{app} reikšmės yra mažesnės nei natyvaus fermento, kas gali reikšti, jog šių sistemų kataliziniams procesams didžiausią įtaką turi kinetiniai reiškiniai, pvz., e^- pernaša nuo redukuoto fermento aktyviojo centro ant BBen,

1M, 1F ir 2F. Iš gautų rezultatų galima daryti išvadą, jog FDH efektyviausiai reoksiduoja MN, o blogiausiai fluoro pakaitą turintys mediatoriai. Pagrindinės tirtų bioamperometrinių sistemų charakteristikos: jautrumas, substrato koncentracijos priklausomybė nuo atsako dydžio tiesinė dalis ir k_{in} pateiktos 3.9 lentelėje.

3.9 lentelė. Bioamperometrinių sistemų su FDH ir chinoniniais mediatoriais charakteristikos.

<i>Sistema:</i>	<i>Jautrumas,</i> $\mu\text{Acm}^{-2}\text{mM}^{-1}$	$k_{in} \cdot 10^{-5},$ min^{-1}	<i>Tiesinė dalis,</i> mM
<i>FDH_Cst</i>	0,003	12 ± 1	0,001-5
<i>FDH_MN-Cst</i>	0,1	(1) 190 ± 50 (2) $2,2 \pm 0,8$	0,001-10
<i>FDH_Ben-Cst</i>	0,05	(1) 270 ± 80 (2) $5,1 \pm 0,7$	0,001-5
<i>FDH_BBen-Cst</i>	0,01	$8,7 \pm 1,2$	0,001-15
<i>FDH_1M-Cst</i>	0,4	12 ± 2	0,001-0,25
<i>FDH_2M-Cst</i>	0,4	39 ± 5	0,001-0,01
<i>FDH_1F-Cst</i>	0,01	11 ± 2	0,001-0,5
<i>FDH_2F-Cst</i>	0,01	81 ± 15	0,001-0,1



3.37 pav. Bioamperometrinių sistemų su chinoniniais mediatoriais I_{max}^{app} priklausomybė nuo chinonų E'_0 .

Visos sistemos su FDH atsaką į D-fruktozę generavo greičiau nei per 2 min. Siekiant išsiaiškinti, kokią įtaką FDH reoksidacijai turi chinoninių mediatorių elektrocheminės charakteristikos, analizuota bioamperometrinių sistemų tariamo maksimalaus srovės stiprio priklausomybė nuo benzochinono darinių redokso potencialo. Kaip matoma 3.37

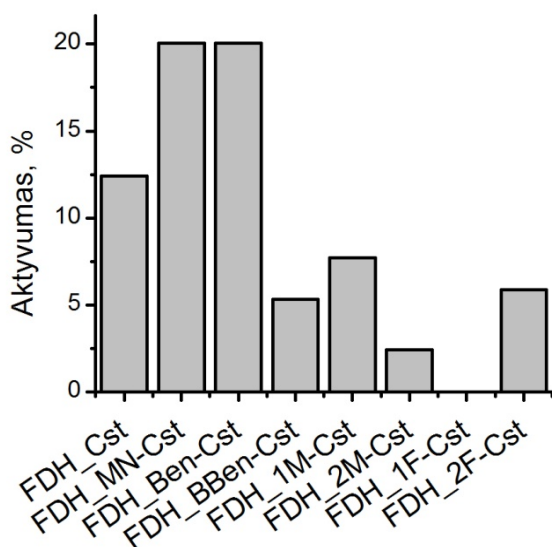
pav., I_{max}^{app} vs. E'_0 yra tiesinė. Iš to seka, jog, tirtų chinoninių medžiagų elektronų akceptorinės savybės didėja, didėjant jų E'_0 . Chinoniniai mediatoriai, kurių anilino pakaituose buvo didesniu neigiamu indukcinio efektu pasižyminčios grupės, pasižymėjo ir didesniu redokso potencialu. Atlikti tyrimai su naujais chinoniniais mediatoriais parodė, jog MN gali būti taikomas kuriant efektyvias bereagentes bioamperometrines sistemas su FDH.

3.3.4.3 FDH atrankumas substratams

Yra žinoma, jog nuo PQQ priklausoma fruktozės dehidrogenazė pasižymi unikaliu specifiškumu fruktozei, todėl naudojama įvairiose analizinėse sistemose, skirtose D(-)-fruktozės nustatymui (žr. 1.5.4 sk.) [131, 137]. Taipogi yra nustatyta, jog FDH generuojamo atsako į D(-)-fruktozę nedaro įtakos papildomas pridėjimas D(+)-gliukozės, D(+)-manozės, D(+)-fruktozės-6-fosfato, D(+)-fruktozės-1,6-difosfato, 5-keto-D(+)-fruktozės, D(+)-gliukozės-6-fosfato, D(+)-gliukozės-1-fosfato, D(+)-gliukonato, 2-keto-D(+)-gliukonato ir 5-keto-D(+)-gliukonato [130]. Tačiau FDH specifiškumas kitoms ketozėms tirtas nebuvo. Šio darbo naujumas buvo tas, jog nustatytas FDH aktyvumas ir tagatozei.

Siekiant išsiaiškinti ar tagatozės oksidacija gali būti katalizuojama FDH bei optimizuoti šio fermento veikimo sąlygas, buvo tirtas FDH katalizuojamos fruktozės ir tagatozės oksidacijos efektyvumas skirtingose heterogeninėse aplinkose: kuomet FDH buvo adsorbuota ant APE-o ir stebėta TEP nuo fermento aktyviojo centro ant elektrodo paviršiaus, bei kuomet FDH buvo adsorbuota ant naujai susintetintais chinoniniais mediatoriais (žr. 3.3.4 sk.) modifikuotų APE-ų ir stebėta MEP. Rezultatai pateikti 3.38 paveiksle, kur pavaizduotas sukurtų bioamperometrinių sistemų su FDH generuojamo atsako dydis į 0,5 mM tagatozės, priimant, jog atsakas į 0,5 mM fruktozės yra 100%.

Kaip matoma iš 3.38 paveikslo, visos bioamperometrinės sistemos su FDH generavo skirtingo intensyvumo atsaką į tagatozę, kuris, lyginant su atsaku į fruktozę, nebuvo didesnis nei 20%. Tai gali būti sąlygota tuo, jog tagatozės oksidacijos katalizė FDH yra energetiškai apsunkintas procesas. Atsako į



3.38 pav. FDH substratinis specifiškumas D(-)-tagatozei heterogeninėje aplinkoje su naujais chinoniniais mediatoriais. Atsakas matuotas į 0,5 mM substrato.

tagatozę negeneravo FDH-1F-Cst sistema, o atsakai sistemų su BBen, 1M, 2M ir 2F buvo mažesni nei 10%. Efektyviausiai tagatozę oksidavo FDH-MN-Cst ir FDH-Ben-Cst. Nevienodas FDH aktyvumas tagatozei skirtingose heterogeninėse aplinkose gali būti sąlygotas skirtinga fermento molekulės sąveika su elektrodiniu paviršiumi, kas lemia fermento aktyviojo centro struktūros pokyčius. FDH adsorbcijos

pasekoje ant skirtingomis elektrostatinėmis ir hidrofobinėmis savybėmis pasižyminčių paviršių, skirtingai vyko nekovalentinių jungčių tarp fermento ir elektrodo paviršiaus susidarymas.

Taip, APE-ai, modifikuoti mediatoriais, kurių struktūroje yra *ortho*- ir *para*- padėtyse esančios $-OCH_3$ ir $-F$ grupės, mažino FDH specifiškumą tagatozei, lyginant su bioamperometriniu sistema, kur fermentas veikė heterogeninėje aplinkoje be chinoninių medžiagų, o mediatorių struktūroje esantis nmodifikuotas benzeno pakaitas ir *meta*- padėtyje $-NO_2$ grupė – didino.

Gauti rezultatai parodė, jog heterogeninėje aplinkoje su MN veikianti FDH gali būti pritaikyta tagatozės nustatymui, jei tiriamoje terpėje nebus geresnio fermento substrato – fruktozės. FDH-MN-Cst sistema taip pat buvo pritaikyta, kuriant tagatozės biokonversijos iš galaktozės reaktorių. FDH-MN-Cst bioelektrokatalizės veikimo principu rėmėsi tagatozės nustatymo sistema (žr. 3.4.3 sk.).

3.4 Bioelektrocheminių sistemų pritaikymas

Ankstesniuose skyriuose aprašytos ir efektyviai veikusios sistemos su nuo PQQ priklausomomis dehidrogenazėmis buvo išbandytos, nustatant alkoholių ir angliavandenių koncentracijas realiose terpėse: alkoholiniuose gėrimuose bei biokonversijos mišinyje. Be to, šiame darbe tirta mADH inhibicija CO leido padaryti prielaidą, kad galima sukurti šiuo principu veikiančią indikatorinę sistemą anglies monoksido nustatymui.

3.4.1 Alkoholių amperometriniai biojutikliai

Darbo metu atlikti tyrimai su mADH ir tADH panaudoti kuriant amperometrinius biojutiklius, skirtus alkoholių nustatymui gėrimuose. Alkoholių nustatymas įvairiose pramonės šakose, medicinoje, aplinkoje yra aktualus jau daugelį dešimtmečių, nes siekiama sukurti pigius, labai selektyvius, paprasta ir greita analize pasižyminčius biojutiklius [196].

Šiame darbe tirtos sistemos mADH_ChMA-Cst ir tADH_Cst buvo įvertintos, nustatant alkoholio koncentracijas gėrimuose. Kontroliniams tyrimams buvo naudota nuo FAD priklausoma alkoholio oksidazė (AOx). Šis fermentas labai selektyvus metanoliiui, o atsakas etanoliiui yra apie 80% lyginant su atsaku į metanolį [197]. Prieš atliekant alkoholinių gėrimų tyrimus, buvo atlikta kontrolė, ar gaunamas atsakas, kai sistemoje nėra fermento. Bifermentiniai jutikliai atsako į gėrimus neparodė. Buvo tirti atsitiktinai pasirinkti alkoholiniai gėrimai. Tyrimų rezultatai pateikti 3.10 lentelėje.

3.10 lentelė. Alkoholių koncentracijos įvertinimas alkoholiniuose gėrimuose skirtingomis bioamperometrinėmis sistemomis.

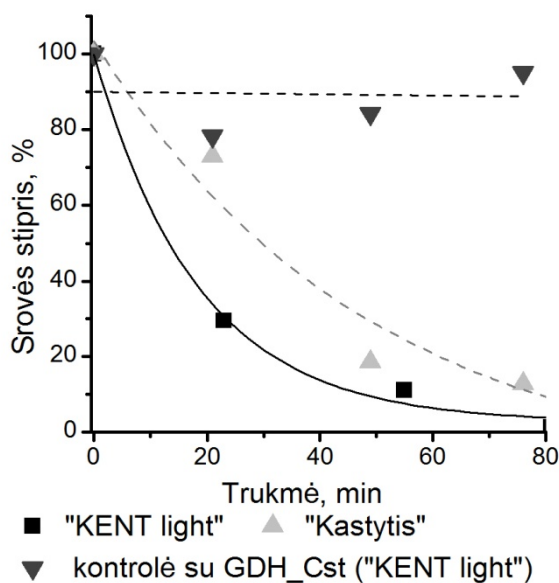
<i>Alkoholinio gėrimo pavadinimas, alkoholio kiekis</i>	<i>Nustatyta alkoholių koncentracija, M</i>			
	<i>Apskaičiuota</i>	<i>AOx</i>	<i>mADH</i>	<i>tADH</i>
<i>„Beauvillon“ pusiau saldus baltas vynas, 11%</i>	1,94	1,85	2,3	2,66
<i>„J. P. Chenet“ pusiau sausas baltas vynas, 11,5%</i>	2,02	1,97	1,97	2,14
<i>Trauktinė „Palanga“, 40%</i>	7,04	7,07	8,19	8,57
<i>Likeris „Mariel“, 40%</i>	7,04	7,07	8,53	8,28

Kaip matoma šioje lentelėje, bioamperometrini sistema su AOx nustatyta etanolio koncentracija atitinka nurodytą alkoholinių gėrimų etiketėse. Tačiau nuo PQQ priklausomomis alkoholio dehidrogenazėmis nustatytos alkoholių koncentracijos yra didesnės. Tai leidžia daryti prielaidą, kad tiriamuose gėrimuose be etanolio yra ir kitų alkoholių, kuriuos gali oksiduoti šie chinohemobaltymai. Tačiau metanolio tarp jų nėra.

Gauti rezultatai rodo, kad bioampermetrinės sistemos su nuo PQQ priklausomomis alkoholio dehidrogenazėmis yra tinkamos realių terpių tyrimams.

3.4.2 CO indikatorinė sistema

Šiame darbe mADH inhibicijos principas buvo pritaikytas kuriant CO indikatorinę sistemą. CO kiekis buvo vertinamas cigarečių dūmuose. Siekiant įsitikinti, ar cigarečių dūmuose esantis CO nenuslopina kitus hemo neturinčius fermentus, taip pat dūmais buvo veikiamos ir ampermetrinės sistemos su GDH. Indikatorinės sistemos jautrumo priklausomybė nuo veikimo cigarečių dūmais laiko pateikta 3.39 pav. Tyrimai atlikti su „KENT Light“ ir „Kastytis“ cigaretėmis. Kaip matoma, mADH_ChMA-Cst sistemos slopinamos abiejų rūšių cigarečių dūmais, o GDH_Cst sistemos veikimui nedaro įtakos degimo metu išsiskiriančios dujos.



3.39 pav. Bioamperometrinių sistemų slopinimas cigarečių dūmais.

Tai kad cigarečių „Kastytis“ dūmai slopino šią bioamperometrines sistemą mažiau nei „KENT Light“ rodo, jog cigarečių „Kastytis“ degimo metu išsiskiria mažiau CO. Tačiau CO išsiskyrimas degant cigaretėms gali priklausyti ne vien nuo jų rūšies, bet ir nuo degimo ypatumų, pvz. nuo deguonies patekimo iki rūkymo vietos, degimo efektyvumo ir pan.

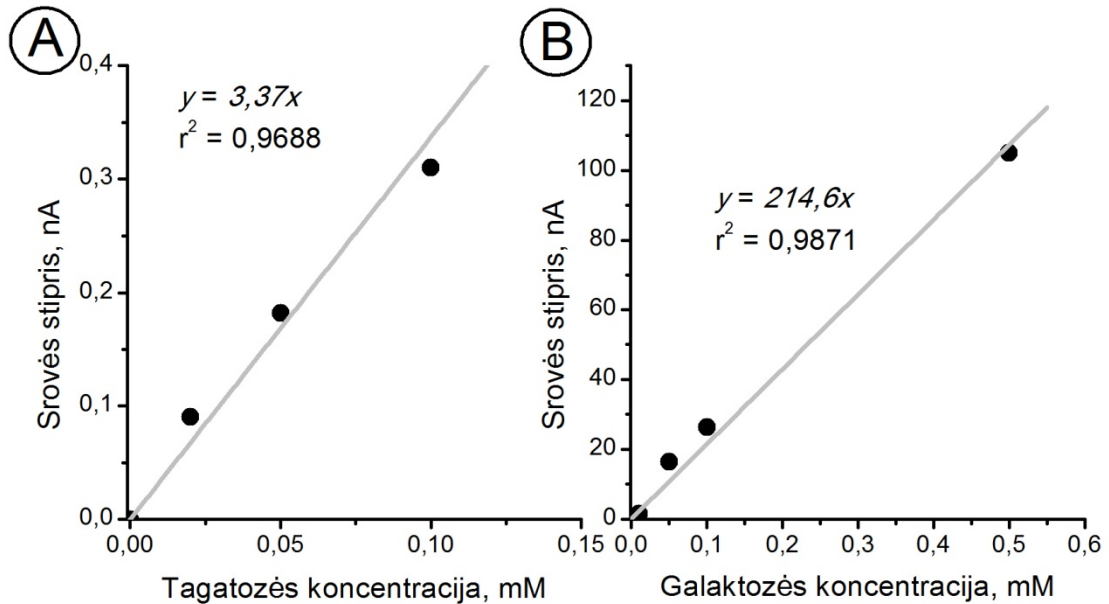
Šiais tyrimais buvo parodyta, kad mADH slopinimo principas gali būti taikomas kuriant CO bioindikatorinę sistemą.

3.4.3 D-(-)-tagatozės sintezės ir stebėjimo sistemos

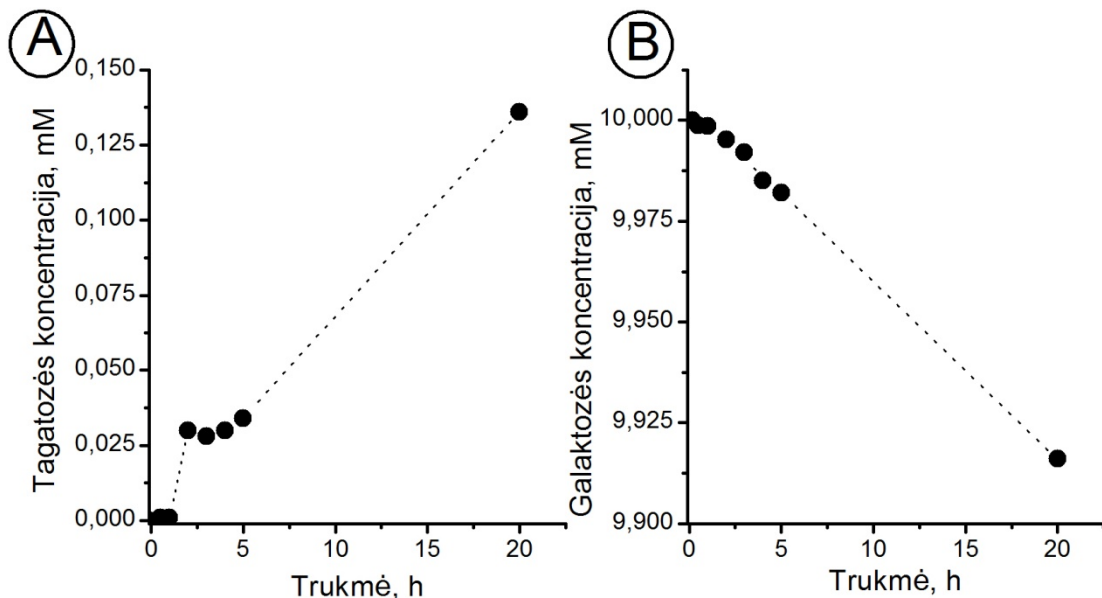
Šiame darbe buvo parodyta, jog bioamperometrinės sistemos su naujais chinoniniais mediatoriais ir FDH gali oksiduoti ne vien D-fruktozę, bet ir D-tagatozę, kuri yra viena iš retųjų cukrų, pasižyminčiu teigiamu poveikiu žmogaus organizmui, dėl ko tapo labai patrauklia maisto pramonėje (žr. 3.3.4.3 sk.). Tačiau kol kas nėra sukurta efektyvios tagatozės sintezės sistemos ir jos nustatymui skirtas biojutiklis. Todėl šiame darbe efektyviausiai veikianti sistema su FDH ir MN buvo pritaikyta D-(-)-tagatozės nustatymui naujai sukurtame bioreaktoriuje. Biokonversija buvo vykdoma optimaliomis TAI veikimo sąlygomis (2.4.14 sk). Reakcijos mišinio pavyzdžiai analizei buvo paimami tam tikrais laiko tarpais, o analizė buvo atliekama trimis alternatyviais metodais: elektrochemiškai su FDH_MN-Cst, nustatant tagatozės koncentraciją, elektrochemiškai su (PVA)-GDH-MN-Cst, nustatant tagatozės koncentraciją pagal galaktozės koncentracijos sumažėjimą ir spektrofotometriškai nustatant tagatozės koncentraciją. Spektrofotometrinė analizė atlikta VU BchI Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje.

Prieš atliekant bandymus su realiais pavyzdžiais, abi bioamperometrinės sistemos buvo sukalibruotos. Taip pat nustatyta, jog (PVA)-GDH-MN-Cst sistema neatsako į tagatozę, o FDH_MN-Cst neatsako į galaktozę. Paveiksle pavaizduotos sistemų (PVA)-GDH-MN-Cst ir FDH_MN-Cst generuojamo atsako priklausomybės nuo substrato koncentracijos tiesinės dalys (3.40 pav.). 3.41 pav. pateiktas bioreaktoriuje su FDH_MN-Cst nustatytas tagatozės

koncentracijos, o su (PVA)-GDH-MN-Cst – galaktozės koncentracijos kitimas laike. Kaip matoma šiame paveiksle, tagatozės koncentracija didėjo, o galaktozės mažėjo.



3.40 pav. FDH_MN-Cst (A) ir (PVA)-GDH-MN-Cst (B) kalibravimo grafikų tiesinės dalys.

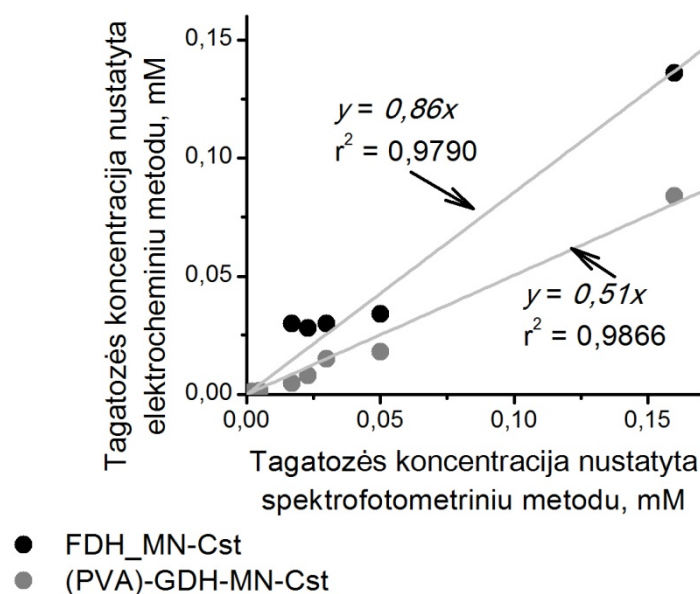


3.41 pav. Tagatozės koncentracijos kitimas bioreaktoriuje, nustatytas FDH_MN-Cst (A) ir galaktozės koncentracijos kitimas, nustatytas (PVA)-GDH-MN-Cst (B).

Kaip matoma 3.42 pav., elektrocheminiu metodu, panaudojant tiek FDH, tiek GDH bioamperometrines sistemas, nustatytos tagatozės koncentracijos gerai koreliavo su spektrofotometrinio metodo rezultatais.

Tačiau, (PVA)-GDH-MN-Cst nustatytos tagatozės koncentracijos buvo beveik perpus mažesnės nei šio angliavandenio koncentracijos nustatytos spektrofotometriniu metodu. FDH_MN-Cst nustatytos tagatozės koncentracijos gerai koreliavo su duomenimis, gautais, spektrofotometriniu metodu. Tai reiškia, jog tiesioginis tagatozės nustatymas elektrocheminiu metodu yra pranašesnis už netiesioginį – pagal galaktozės mažėjimą.

Gauti rezultatai parodė, jog bioamperometrinės sistemos FDH_MN-Cst ir (PVA)-GDH-MN-Cst pagrindu gali būti naudojamos tagatozės stebėjimo, o TAI – tagatozės biosintezės sistemose.



3.42 pav. Elektrocheminiu metodu gautų rezultatų palyginimas su spektrofotometrinio metodo rezultatais.

IŠVADOS

1. Nustatytos nuo pirolo chinolinchinono (PQQ) priklausomų periplazminės alkoholio dehidrogenazės, išskirtos iš *Pseudomonas putida* HK5 (tADH) ir membraninės alkoholio dehidrogenazės, išskirtos iš *Gluconobacter sp. 33* (mADH) pK_{a1} ir pK_{a2} reikšmės vandeniniuose tirpaluose: tADH yra 6,1 ir 10,3; mADH – 4,7 ir 5,7. Bioelektrocheminės sistemos su PQQ priklausomomis alkoholio dehidrogenazėmis gali veikti 50% 1-iso-pentil-3-metilimidazolo dicianamido vandeniniame tirpale, išlaikant iki 50% fermento aktyvumo.
2. Ištyrus tADH ir mADH elektronų pernašos (EP) kelius homogeninėje ir heterogeninėje sistemose, nustatyta, jog heterogeninėse sistemose yra įmanomas tiesioginis EP kelias nuo redukuotos PQQ molekulės elektronų akceptoriams.
3. Ištyrus impedimetrinės fermentinės sistemos su nauju poli(N-(N',N'-dietilditiokarbamoiletilamidoetil)anilinu (poliNDDEAEA) ir tADH, mADH bei periplazmine gliukozės dehidrogenaze, išskirta iš *Acinetobacter calcoaceticus* (GDH) ant erdvinių adresuojamojo kontakto elektrodų matricos, nustatyta tiesioginė elektronų pernaša nuo šių fermentų aktyviųjų centrų ant poliNDDEAEA, ir ji patvirtinta chronoamperometrijos metodu.
4. Sukurtas efektyvus GDH imobilizavimo būdas ant polivinilalkoholiu modifikuotos pusiau pralaidžios plėvelės, užtikrinantis fermento stabilų veikimą iki 9-ių mėnesių. Grafito oksidacijos produkto ir tADH pagrindu sukurta bioamperimetrinė sistema veikė tiesioginės elektronų pernašos principu ir pasižymėjo iki $1 \mu\text{Acm}^{-2}\text{mM}^{-1}$ jautrumu. Ištyrus naujų chinoninių mediatorių, sukurtų *p*-benzochinono ir aromatinių aminių pagrindu, veikimą bioamperimetrinėse sistemose su fruktozės dehidrogenaze, išskirta iš *Gluconobacter industrius* išorinės membranos

(FDH), nustatytas efektyviausias mediatorius – 2-(3-nitro(fenil)amino)-cikloheksa-2,5-dien-1,4-dionas (MN) (sistemos jautrumas $0,08 \mu\text{Acm}^{-2}\text{mM}^{-1}$). Tirtų naujų chinoninių mediatorių elektrono akceptorinės savybės didėja didėjant jų formaliems redokso potencialams.

5. Parodyta, jog efektyviausiai veikiančios bioamperometrinės sistemos su PQQ priklausomais fermentais gali būti naudojamos alkoholių, angliavandenių ir CO nustatymui. Pirmą kartą parodyta, kad bioamperometrinė sistema FDH ir MN pagrindu, gali būti panaudota tagatozės nustatymui (nustatymo ribos 0,001-0,1 mM).

Cituoti literatūros šaltiniai

- [1] P. Arora, A. Sindhu, N. Dilbaghi, A. Chaudhury, Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens, *Biosensors & Bioelectronics*, 28 (2011) 1-12.
- [2] K.E. Mach, P.K. Wong, J.C. Liao, Biosensor diagnosis of urinary tract infections: a path to better treatment?, *Trends in Pharmacological Sciences*, 32 (2011) 330-336.
- [3] V. Laurinavicius, J. Razumiene, B. Kurtinaitiene, I. Lapenaite, I. Bachmatova, L. Marcinkeviciene, R. Meskys, A. Ramanavicius, Bioelectrochemical application of some PQQ-dependent enzymes, *Bioelectrochemistry*, 55 (2002) 29-32.
- [4] L.C. Clark, C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102 (1962) 29-45.
- [5] J. Kulys, *Analiticeskie sistemy na osnove immobilizirovannyh fermentov*, Mokslas, Vilnius, 1981.
- [6] J. Wang, *Analytical electrochemistry*, 3rd ed., John Wiley & Sons, Hoboken, 2006.
- [7] L. Gorton, A. Lindgren, T. Larsson, F.D. Munteanu, T. Ruzgas, I. Gazaryan, Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors, *Analytica Chimica Acta*, 400 (1999) 91-108.
- [8] R.S. Freire, C.A. Pessoa, L.D. Mello, L.T. Kubota, Direct electron transfer: An approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14 (2003) 230-243.
- [9] P. Bartlett, *Bioelectrochemistry. Fundamentals, experimental techniques and applications*, in, John Wiley & Sons, Chichester, 2008.
- [10] I.V. Berezin, K. Martinenka, *Vvedenie v prikladnuju enzimologiju*, in, Izdatelstvo Moskovskogo universiteta, Moskva, 1982.
- [11] R.A. Marcus, Electron-transfer reactions in chemistry: theory and experiment, *Reviews of Modern Physics*, 65 (1993) 599-610.
- [12] L.J.C. Jeuken, A.K. Jones, S.K. Chapman, G. Cecchini, F.A. Armstrong, Electron-transfer mechanisms through biological redox chains in multicenter enzymes, *Journal of the American Chemical Society*, 124 (2002) 5702-5713.
- [13] D. Nelson, M. Cox, *Lehninger. Principles of Biochemistry*, 5th ed., W. H. Freeman, New York, 2009.
- [14] A. Vilkanauskyte, *Nuo PQQ priklausomų alkoholio ir gliukozės dehidrogenazių veikimas biosensorinėse sistemose*. Doctoral thesis. Institute of Biochemistry, Vilnius university, Vilnius, 2004.
- [15] A.A. Karyakin, Prussian Blue and its analogues: electrochemistry and analytical applications, *Electroanalysis*, 13 (2001) 813-819.
- [16] A.A. Karyakin, E.A. Kuritsyna, E.E. Karyakina, V.L. Sukhanov, Diffusion controlled analytical performances of hydrogen peroxide sensors: Towards the sensor with the largest dynamic range, *Electrochimica Acta*, 54 (2009) 5048-5052.
- [17] A.V. Mokrushina, M. Heim, E.E. Karyakina, A. Kuhn, A.A. Karyakin, Enhanced hydrogen peroxide sensing based on Prussian Blue modified macroporous microelectrodes, *Electrochemistry Communications*, 29 (2013) 78-80.
- [18] O.G. Voronin, A. Hartmann, C. Steinbach, A.A. Karyakin, A.R. Khokhlov, C. Kranz, Prussian Blue-modified ultramicroelectrodes for mapping hydrogen peroxide in scanning electrochemical microscopy (SECM), *Electrochemistry Communications*, 23 (2012) 102-105.

- [19] E.V. Zolotukhina, M.A. Vorotyntsev, I.S. Bezverkhyi, A.V. Borisova, A.A. Karyakin, Y.A. Zolotov, Composite materials based on Prussian Blue nanoparticles and polypyrrole for design of a highly stable sensor for hydrogen peroxide, *Doklady Physical Chemistry*, 444 (2012) 75-78.
- [20] T. Ikeda, D. Kobayashi, F. Matsushita, T. Sagara, K. Niki, Bioelectrocatalysis at electrodes coated with alcohol-dehydrogenase, a quinohemoprotein with heme-c serving as a built-in mediator, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 361 (1993) 221-228.
- [21] M. Niculescu, R. Mieliauskiene, V. Laurinavicius, E. Csoregi, Simultaneous detection of ethanol, glucose and glycerol in wines using pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases based biosensors, *Food Chemistry*, 82 (2003) 481-489.
- [22] E. Katz, A.N. Shipway, I. Willner, Mediated Electron-transfer between Redox-enzymes and Electrode Supports, in: G.S. Wilson (Ed.) *Bioelectrochemistry*, Wiley VCH, Weinheim, 2002, pp. 559-605.
- [23] A. Chaubey, B.D. Malhotra, Mediated biosensors, *Biosensors & Bioelectronics*, 17 (2002) 441-456.
- [24] M. Zayats, B. Willner, I. Willner, Design of amperometric biosensors and biofuel cells by the reconstitution of electrically contacted enzyme electrodes, *Electroanalysis*, 20 (2008) 583-601.
- [25] S.D. Minter, P. Atanassov, H.R. Luckarift, G.R. Johnson, New materials for biological fuel cells, *Materials Today*, 15 (2012) 166-173.
- [26] S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A.I. Yaropolov, J.W. Whittaker, L. Gorton, Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes, *Biosensors & Bioelectronics*, 20 (2005) 2517-2554.
- [27] A.L. Ghindilis, P. Atanasov, E. Wilkins, Enzyme-catalyzed direct electron transfer: fundamentals and analytical applications, *Electroanalysis*, 9 (1997) 661-674.
- [28] W.J. Zhang, G.X. Li, Third-generation biosensors based on the direct electron transfer of proteins, *Analytical Sciences*, 20 (2004) 603-609.
- [29] R.K. Shervedani, A.H. Mehrjardi, N. Zamiri, A novel method for glucose determination based on electrochemical impedance spectroscopy using glucose oxidase self-assembled biosensor, *Bioelectrochemistry*, 69 (2006) 201-208.
- [30] A. Bratov, N. Abramova, Chemical sensors and biosensors based on impedimetric interdigitated electrode array transducers, in: R.V. Harrison (Ed.) *Chemical Sensors: Properties, Performance and Applications*, Nova Science Publishers, New York, 2010, pp. 91-115
- [31] B. Lindholm-Sethson, J. Nystrom, M. Malmsten, L. Ringstad, A. Nelson, P. Geladi, Electrochemical impedance spectroscopy in label-free biosensor applications: multivariate data analysis for an objective interpretation, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398 (2010) 2341-2349.
- [32] W. Schuhmann, E.M. Bonse, Biosensors, in: P.R. Unwin (Ed.) *Instrumentation and Electroanalytical Chemistry*, Wiley VCH, Weinheim, 2002, pp. 350-392.
- [33] R.E. Ionescu, C. Fillit, N. Jaffrezic-Renault, S. Cosnier, Urease-gelatin interdigitated microelectrodes for the conductometric determination of protease activity, *Biosensors & Bioelectronics*, 24 (2008) 489-492.
- [34] A.G.E. Saum, R.H. Cumming, F.J. Rowell, Use of substrate coated electrodes and AC impedance spectroscopy for the detection of enzyme activity, *Biosensors & Bioelectronics*, 13 (1998) 511-518.
- [35] R.V. Harrison, *Chemical Sensors: Properties, Performance and Applications*, in: Nova Science Publishers, New York, 2010.

- [36] M.E. Orazem, B. Tribollet, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2008.
- [37] R. Jayabalan, M. Sathishkumar, E.S. Jeong, S.P. Mun, S.E. Yun, Immobilization of flavin adenine dinucleotide (FAD) onto carbon cloth and its application as working electrode in an electroenzymatic bioreactor, *Bioresource Technology*, 123 (2012) 686-689.
- [38] K. Min, D.H. Park, Y.J. Yoo, Electroenzymatic synthesis of L-DOPA, *Journal of Biotechnology*, 146 (2010) 40-44.
- [39] T. Shono, *Electroorganic chemistry as a tool in organic synthesis*, 1 ed., Springer, New York, 1984.
- [40] E. Steckhan, Electroenzymatic synthesis, in: E. Steckhan (Ed.) *Electrochemistry V*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, 1994, pp. 83-111.
- [41] J.S. Ha, J. Gam, S.L. Choi, K.H. Oh, H.S. Ro, J.J. Song, C.S. Shin, S.G. Lee, Quantitative analyses of individual sugars in mixture using FRET-based biosensors, *Biotechnology Progress*, 28 (2012) 1376-1383.
- [42] G.V. Levin, Tagatose, the new GRAS sweetener and health product, *Journal of Medicinal Food*, 5 (2002) 23-36.
- [43] N. Salonen, K. Salonen, M. Leisola, A. Nyssölä, D-tagatose production in the presence of borate by resting *Lactococcus lactis* cells harboring *Bifidobacterium longum* l-arabinose isomerase, *Bioprocess Biosyst Eng*, 36 (2013) 489-497.
- [44] H.J. Kim, S.A. Ryu, P. Kim, D.K. Oh, A feasible enzymatic process for D-tagatose production by an immobilized thermostable L-arabinose isomerase in a packed-bed bioreactor, *Biotechnology Progress*, 19 (2003) 400-404.
- [45] M. Wanarska, J. Kur, A method for the production of D-tagatose using a recombinant *Pichia pastoris* strain secreting beta-D-galactosidase from *Arthrobacter chlorophenicus* and a recombinant L-arabinose isomerase from *Arthrobacter* sp 22c, *Microbial Cell Factories*, 11 (2012).
- [46] Z. Dische, E. Borenfreund, A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses, *Journal of Biological Chemistry*, 192 (1951) 583-587.
- [47] C.M. Dobbs, L.N. Bell, Storage stability of tagatose in buffer solutions of various compositions, *Food Research International*, 43 (2010) 382-386.
- [48] K.J. Luecke, L.N. Bell, Thermal stability of tagatose in solution, *Journal of Food Science*, 75 (2010) C346-C351.
- [49] M. Das, P. Goswami, Direct electrochemistry of alcohol oxidase using multiwalled carbon nanotube as electroactive matrix for biosensor application, *Bioelectrochemistry*, 89 (2013) 19-25.
- [50] Y. Littner, C.F. Bearer, Detection of alcohol consumption during pregnancy—Current and future biomarkers, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31 (2007) 261-269.
- [51] A.M. Azevedo, D.M.F. Prazeres, J.M.S. Cabral, L.P. Fonseca, Ethanol biosensors based on alcohol oxidase, *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (2005) 235-247.
- [52] D.S. Park, M.S. Won, R.N. Goyal, Y.B. Shim, The electrochemical sensor for methanol detection using silicon epoxy coated platinum nanoparticles, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 174 (2012) 45-50.
- [53] Y. Jun Choi, J. Hwan Park, T. Yong Kim, S. Yup Lee, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1-propanol, *Metabolic Engineering*, 14 (2012) 477-486.

- [54] B. Habibi, E. Dadashpour, Electrooxidation of 2-propanol and 2-butanol on the Pt–Ni alloy nanoparticles in acidic media, *Electrochimica Acta*, 88 (2013) 157-164.
- [55] T. Kometani, H. Toide, Y. Daikaiji, M. Goto, Practical production of (S)-1,2-propanediol and its derivative through baker's yeast-mediated reduction, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91 (2001) 525-527.
- [56] J.A. Guzman, Carbon monoxide poisoning, *Critical Care Clinics*, 28 (2012) 537-548.
- [57] V. Aroutiounian, Metal oxide hydrogen, oxygen, and carbon monoxide sensors for hydrogen setups and cells, *International Journal of Hydrogen Energy*, 32 (2007) 1145-1158.
- [58] A. Salehi, A. Nikfarjam, Room temperature carbon monoxide sensor using ITO/n-GaAs Schottky contact, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 101 (2004) 394-400.
- [59] D. Gutmacher, C. Foelml, W. Vollenweider, U. Hofer, J. Wöllenstein, Comparison of gas sensor technologies for fire gas detection, *Procedia Engineering*, 25 (2011) 1121-1124.
- [60] J. Colby, E. Williams, A.P.F. Turner, Applications of CO-utilizing microorganisms, *Trends in Biotechnology*, 3 (1985) 12-17.
- [61] U. Bohrn, E. Stütz, M. Fleischer, M. Schöning, P. Wagner, Real-time detection of CO by eukaryotic cells, *Procedia Engineering*, 5 (2010) 17-20.
- [62] V. Davidson, Principles and applications of quinoproteins, in, CRC Press, 1992, pp. 472.
- [63] S.A. Salisbury, H.S. Forrest, W.B.T. Cruse, O. Kennard, A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenases, *Nature*, 280 (1979) 843-844.
- [64] E. Katz, D.D. Schlereth, H.L. Schmidt, Electrochemical study of pyrroloquinoline quinone covalently immobilized as a monolayer onto a cystamine-modified gold electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 367 (1994) 59-70.
- [65] K. Matsushita, H. Toyama, M. Yamada, O. Adachi, Quinoproteins: structure, functions and biotechnological applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58 (2002) 13-22.
- [66] C. Anthony, P. Williams, The structure and mechanism of methanol dehydrogenase, *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1647 (2003) 18-23.
- [67] V.L. Davidson, Electron transfer in quinoproteins, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 428 (2004) 32-40.
- [68] A. Oubrie, Structure and mechanism of soluble glucose dehydrogenase and other PQQ-dependent enzymes, *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1647 (2003) 143-151.
- [69] K. Kano, T. Ikeda, Bioelectrocatalysis, powerful means of connecting electrochemistry to biochemistry and biotechnology, *Electrochemistry*, 71 (2003) 86-99.
- [70] J. Razumiene, M. Niculescu, A. Ramanavicius, V. Laurinavicius, E. Csoregi, Direct bioelectrocatalysis at carbon electrodes modified with quinoxinoprotein alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter sp.* 33, *Electroanalysis*, 14 (2002) 43-49.
- [71] M.M. Rhemrev-Boom, Design and development of a miniaturised flow-through measuring device for the in vivo monitoring of glucose and lactate, in: Faculty of Medical Sciences, University of Groningen, Groningen, 2003, pp. 177.
- [72] Z.W. Chen, K. Matsushita, T. Yamashita, T.A. Fujii, H. Toyama, O. Adachi, H.D. Bellamy, F.S. Mathews, Structure at 1.9 angstrom resolution of a

- quinohemoprotein alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas putida* HK5, Structure, 10 (2002) 837-849.
- [73] W. Promden, A.S. Vangnai, H. Toyama, K. Matsushita, P. Pongsawasdi, Analysis of the promoter activities of the genes encoding three quinoprotein alcohol dehydrogenases in *Pseudomonas putida* HK5, Microbiology-Sgm, 155 (2009) 594-603.
- [74] H. Toyama, Z.W. Chen, M. Fukumoto, O. Adachi, K. Matsushita, F.S. Mathews, Molecular cloning and structural analysis of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase ADH-IIG from *Pseudomonas putida* HK5, Journal of Molecular Biology, 352 (2005) 91-104.
- [75] L. Tetianec, M. Dagys, J. Kulys, A. Ziemys, R. Meskys, Study of the reactivity of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase with heterocycle-pentacyanoferrate(III) complexes and the electron transfer path calculations, Central European Journal of Biology, 2 (2007) 502-517.
- [76] L. Marcinkeviciene, J. Stankeviciute, I. Bachmatova, R. Vidziunaite, A. Chaleckaja, R. Meskys, Biocatalytic properties of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase IIG from *Pseudomonas putida* HK5, Chemija, 23 (2012) 223-232.
- [77] 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.
- [78] E. Voitechovič, J. Razumienė, J. Barkauskas, Elektronų pernašos tyrimai sistemose : nuo pirolochinolinchinono priklausomos alkoholio dehidrogenazės ir grafitizuotų suodžių elektrodai, in: Tarptautinė studentų mokslinė konferencija "Chemija ir cheminė technologija 2007", Vilniaus universitetas, Vilnius, 2007, pp. 191-195.
- [79] E. Voitechovič, Elektronų pernašos tyrimai sistemose: nuo PQQ priklausomi fermentai ADH ir grafitizuotų suodžių elektrodai. Bachelor thesis. Faculty of Chemistry, Vilnius university, Vilnius, 2006, pp. 39.
- [80] R. Le Lagadec, L. Alexandrova, H. Estevez, M. Pfeffer, V. Laurinavičius, J. Razumienė, A.D. Ryabov, Bis-ruthena(III)cycles $[\text{Ru}(\text{C}^{\text{I}}\text{N})_2(\text{N}^{\text{I}}\text{N})]\text{PF}_6$ as low-potential mediators for PQQ alcohol dehydrogenase ($\text{C}^{\text{I}}\text{N} = 2\text{-phenylpyridinato}$ or $4\text{-}(2\text{-tolyl})\text{pyridinato}$, $\text{N}^{\text{I}}\text{N} = \text{bpy}$ or phen), European Journal of Inorganic Chemistry, 2006 (2006) 2735-2738.
- [81] M. Rozgaitė, *Pseudomonas putida* HK5 ir *Sinorhizobium sp.* L-1 bakterijų elektrocheminiai tyrimai ir taikymas biosensorių kūrime, in: Faculty of Chemistry, Vilnius university, Vilnius, 2007. Master thesis.
- [82] L. Marcinkevičienė, I. Bachmatova, R. Semėnaitė, R. Rudomanskis, G. Bražėnas, R. Meškienė, R. Meškys, Purification and characterization of alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter sp.* 33, Biologija, 2 (1999) 24-33.
- [83] H. Toyama, F.S. Mathews, O. Adachi, K. Matsushita, Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology, Archives of Biochemistry and Biophysics, 428 (2004) 10-21.
- [84] W. Schuhmann, H. Zimmermann, K. Habermuller, V. Laurinavičius, Electron-transfer pathways between redox enzymes and electrode surfaces: reagentless biosensors based on thiol-monolayer-bound and polypyrrole-entrapped enzymes, Faraday Discussions, 116 (2000) 245-255.
- [85] A. Šetkus, A. Galdikas, V. Laurinavičius, R. Meškys, A. Mironas, J. Razumienė, Electric charge transport in the symmetric metal-enzyme junctions affected by biochemical interaction, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 249 (2004) 141-143.

- [86] A. Šetkus, J. Razumienė, A. Galdikas, V. Laurinavičius, R. Meškys, A. Mironas, Electrically induced gas sensitive state of enzyme–metal contact in ADH-dry-layer based planar structure, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 95 (2003) 344-351.
- [87] J. Razumiene, J. Barkauskas, V. Kubilius, R. Meskys, V. Laurinavicius, Modified graphitized carbon black as transducing material for reagentless H₂O₂ and enzyme sensors, *Talanta*, 67 (2005) 783-790.
- [88] A. Ramanavicius, K. Habermüller, E. Csöregi, V. Laurinavicius, W. Schuhmann, Polypyrrole-entrapped quinohemoprotein alcohol dehydrogenase. Evidence for direct electron transfer via conducting-polymer chains, *Analytical Chemistry*, 71 (1999) 3581-3586.
- [89] T. Erichsen, M. Niculesco, D. Kisel, E. Csöregi, W. Schuhmann, Biosensoren auf der Basis von Redoxhydrogel-integrierter Quinohemoprotein Alkoholdehydrogenase für die on-line-Detektion von Ethanol in Wein, in, *Universitätsbibliothek Tübingen, Tübingen*, 2001.
- [90] V. Laurinavicius, J. Razumiene, A. Ramanavicius, A.D. Ryabov, Wiring of PQQ–dehydrogenases, *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (2004) 1217-1222.
- [91] Y. Kitagawa, K. Kitabatake, Amperometric detection of alcohol in beer using a flow cell and immobilized alcohol dehydrogenase, *Analytical Chemistry*, 63 (1991) 2391-2393.
- [92] A. Ramanavicius, K. Habermüller, J. Razumiene, R. Meskys, L. Marcinkeviciene, I. Bachmatova, E. Csoregi, V. Laurinavicius, W. Schuhmann, An oxygen-independent ethanol sensor based on quinohemoprotein alcohol dehydrogenase covalently bound to a functionalized polypyrrole film, in: V. Razumas, B. Lindman, T. Nylander (Eds.) *Surface and Colloid Science*, 2001, pp. 143-148.
- [93] B.L. Treu, S.D. Minter, Improving the lifetime, simplicity, and power of an ethanol biofuel cell by employing ammonium treated nafion membranes to immobilize PQQ-dependent alcohol dehydrogenase, *Polymeric Materials: Science & Engineering*, 92 (2005) 2.
- [94] B.L. Treu, R. Arechederra, S.D. Minter, Bioelectrocatalysis of ethanol via PQQ-dependent dehydrogenases utilizing carbon nanomaterial supports, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9 (2009) 2374-2380.
- [95] A. Ramanavicius, A. Kausaite, A. Ramanaviciene, Enzymatic biofuel cell based on anode and cathode powered by ethanol, *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (2008) 761-766.
- [96] Z. Zulic, S.D. Minter, Induced evolution of PQQ-dependent alcohol dehydrogenase activity in *Gluconobacter sp.33* for use in enzymatic biofuel cells, *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 5 (2011) 63-69.
- [97] E.J. D'Costa, I.J. Higgins, A.P.F. Turner, Quinoprotein glucose dehydrogenase and its application in an amperometric glucose sensor, *Biosensors*, 2 (1986) 71-87.
- [98] S. Tanaka, S. Igarashi, S. Ferri, K. Sode, Increasing stability of water-soluble PQQ glucose dehydrogenase by increasing hydrophobic interaction at dimeric interface, *BMC Biochemistry*, 6 (2005) 1.
- [99] S.Y. Reddy, T.C. Bruice, Mechanism of glucose oxidation by quinoprotein soluble glucose dehydrogenase: Insights from molecular dynamics studies, *Journal of the American Chemical Society*, 126 (2004) 2431-2438.
- [100] P. Dokter, J. Frank, J.A. Duine, Purification and characterization of quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* L.M.D. 79.41, *Biochem. J.*, 239 (1986) 163-167.

- [101] A. Oubrie, H.J. Rozeboom, K.H. Kalk, J.A. Duine, B.W. Dijkstra, The 1.7 angstrom crystal structure of the apo form of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* reveals a novel internal conserved sequence repeat, *Journal of Molecular Biology*, 289 (1999) 319-333.
- [102] S. Igarashi, T. Ohtera, H. Yoshida, A.B. Witarto, K. Sode, Construction and characterization of mutant water-soluble PQQ glucose dehydrogenases with altered K_m values - Site-directed mutagenesis studies on the putative active site, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264 (1999) 820-824.
- [103] S. Igarashi, K. Sode, Stabilization of quaternary structure of water-soluble quinoprotein glucose dehydrogenase, *Molecular Biotechnology*, 24 (2003) 97-103.
- [104] K. Sode, T. Ohtera, M. Shirahane, A.B. Witarto, S. Igarashi, H. Yoshida, Increasing the thermal stability of the water-soluble pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase by single amino acid replacement, *Enzyme and Microbial Technology*, 26 (2000) 491-496.
- [105] K. Sode, M. Shirahane, H. Yoshida, Construction and characterization of a linked-dimeric pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase, *Biotechnology Letters*, 21 (1999) 707-710.
- [106] Y. Takahashi, S. Igarashi, Y. Nakazawa, W. Tsugawa, K. Sode, Construction and characterization of glucose enzyme sensor employing engineered water soluble PQQ glucose dehydrogenase with improved thermal stability, *Electrochemistry*, 68 (2000) 907-911.
- [107] A.J.J. Olsthoorn, T. Otsuki, J.A. Duine, Negative cooperativity in the steady-state kinetics of sugar oxidation by soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*, *European Journal of Biochemistry*, 255 (1998) 255-261.
- [108] J. Kulys, I. Bratkovskaja, Glucose Dehydrogenase Based Bioelectrode Utilizing a Synergistic Scheme of Substrate Conversion, *Electroanalysis*, 24 (2012) 273-277.
- [109] A.J.J. Olsthoorn, J.A. Duine, On the mechanism and specificity of soluble, quinoprotein glucose dehydrogenase in the oxidation of aldose sugars, *Biochemistry*, 37 (1998) 13854-13861.
- [110] W.H. Mullen, S.J. Churchouse, P.M. Vadgama, Enzyme electrode for glucose based on the quinoprotein glucose dehydrogenase, *Analyst*, 110 (1985) 925-928.
- [111] K. Ikebukuro, Y. Kohiki, K. Sode, Amperometric DNA sensor using the pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase-avidin conjugate, *Biosensors and Bioelectronics*, 17 (2002) 1075-1080.
- [112] E.V. Ivanova, A.Y. Ershov, V. Laurinavicius, R. Meskus, A.D. Ryabov, Comparative kinetic study of D-glucose oxidation by ruthenium(III) compounds catalyzed by FAD-dependent glucose oxidase and PQQ-dependent glucose dehydrogenase, *Biochemistry (Mosc)*, 68 (2003) 8.
- [113] C. Weber, E. Gauda, B. Mizaikoff, C. Kranz, Developmental aspects of amperometric ATP biosensors based on entrapped enzymes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395 (2009) 1729-1735.
- [114] C. Zhao, G. Wittstock, Scanning electrochemical microscopy of quinoprotein glucose dehydrogenase, *Analytical Chemistry*, 76 (2004) 3145-3154.
- [115] C. Zhao, G. Wittstock, Scanning electrochemical microscopy for detection of biosensor and biochip surfaces with immobilized pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent glucose dehydrogenase as enzyme label, *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (2005) 1277-1284.
- [116] F. Durand, B. Limoges, N. Mano, F. Mavre, R. Miranda-Castro, J.M. Saveant, Effect of substrate inhibition and cooperativity on the electrochemical responses of

- glucose dehydrogenase. Kinetic characterization of wild and mutant types, *Journal of the American Chemical Society*, 133 (2011) 12801-12809.
- [117] L. Ye, M. Haemmerle, A.J.J. Olsthoorn, W. Schuhmann, H.L. Schmidt, J.A. Duine, A. Heller, High current density "wired" quinoprotein glucose dehydrogenase electrode, *Analytical Chemistry*, 65 (1993) 238-241.
- [118] C. Wettstein, H. Möhwald, F. Lisdat, Coupling of pyrroloquinoline quinone dependent glucose dehydrogenase to (cytochrome c/DNA)-multilayer systems on electrodes, *Bioelectrochemistry*, 88 (2012) 97-102.
- [119] J. Okuda, K. Sode, PQQ glucose dehydrogenase with novel electron transfer ability, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314 (2004) 793-797.
- [120] J. Razumiene, A. Vilkanauskyte, V. Gureviciene, J. Barkauskas, R. Meskys, V. Laurinavicius, Direct electron transfer between PQQ dependent glucose dehydrogenases and carbon electrodes: An approach for electrochemical biosensors, *Electrochimica Acta*, 51 (2006) 5150-5156.
- [121] V. Flexer, F. Durand, S. Tsujimura, N. Mano, Efficient direct electron transfer of PQQ-glucose dehydrogenase on carbon cryogel electrodes at neutral pH, *Analytical Chemistry*, 83 (2011) 5721-5727.
- [122] G. Göbel, I.W. Schubart, V. Scherbahn, F. Lisdat, Direct electron transfer of PQQ-glucose dehydrogenase at modified carbon nanotubes electrodes, *Electrochemistry Communications*, 13 (2011) 1240-1243.
- [123] I.W. Schubart, G. Göbel, F. Lisdat, A pyrroloquinolinequinone-dependent glucose dehydrogenase (PQQ-GDH)-electrode with direct electron transfer based on polyaniline modified carbon nanotubes for biofuel cell application, *Electrochimica Acta*, 82 (2012) 224-232.
- [124] M. Zayats, E. Katz, R. Baron, I. Willner, Reconstitution of apo-glucose dehydrogenase on pyrroloquinoline quinone-functionalized Au nanoparticles yields an electrically contacted biocatalyst, *Journal of the American Chemical Society*, 127 (2005) 12400-12406.
- [125] C. Tanne, G. Göbel, F. Lisdat, Development of a (PQQ)-GDH-anode based on MWCNT-modified gold and its application in a glucose/O₂-biofuel cell, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2010) 530-535.
- [126] A. Rose, F.W. Scheller, U. Wollenberger, D. Pfeiffer, Quinoprotein glucose dehydrogenase modified thick-film electrodes for the amperometric detection of phenolic compounds in flow injection analysis, *Fresenius J Anal Chem*, 369 (2001) 145-152.
- [127] U. Wollenberger, B. Neumann, Quinoprotein glucose dehydrogenase modified carbon paste electrode for the detection of phenolic compounds, *Electroanalysis*, 9 (1997) 366-371.
- [128] J. Razumiene, A. Vilkanauskyte, V. Gureviciene, I. Bachmatova, L. Marcinkeviciene, V. Laurinavicius, R. Meskys, PQQ-dependent glucose dehydrogenase as potential enzymatic label in amperometric avidin-biotin systems, *Electroanalysis*, 19 (2007) 280-285.
- [129] C. Weber, E. Gauda, E. Hecht, B. Mizaikoff, C. Kranz, Amperometric microbiosensors based on PQQ-dependent glucose dehydrogenase towards the development of an ATP biosensor for in vitro analysis, in: O. Dössel, W. Schlegel (Eds.) *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering*, September 7 - 12, 2009, Munich, Germany, Springer Berlin Heidelberg, 2010, pp. 351-354.
- [130] M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita, O. Adachi, D-fructose dehydrogenase of *Gluconobacter industrius*: purification, characterization, and

- application to enzymatic microdetermination of D-fructose, *Journal of Bacteriology*, 145 (1981) 814-823.
- [131] J. Biscay, E. Costa Rama, M.B. González García, A. Julio Reviejo, J.M. Pingarrón Carrazón, A.C. García, Amperometric fructose sensor based on ferrocyanide modified screen-printed carbon electrode, *Talanta*, 88 (2012) 432-438.
- [132] J. Marcinkeviciene, G. Johansson, Kinetic-studies of the active-sites functioning in the quinoxaline protein fructose dehydrogenase, *Febs Letters*, 318 (1993) 23-26.
- [133] E. Ferapontova, L. Gorton, Direct electrochemistry of heme multifactor-containing enzymes on alkanethiol-modified gold electrodes, *Bioelectrochemistry*, 66 (2005) 55-63.
- [134] G.F. Khan, H. Shinohara, Y. Ikariyama, M. Aizawa, Electrochemical behaviour of monolayer quinoprotein adsorbed on the electrode surface, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 315 (1991) 263-273.
- [135] K. Murata, M. Suzuki, N. Nakamura, H. Ohno, Direct evidence of electron flow via the heme c group for the direct electron transfer reaction of fructose dehydrogenase using a silver nanoparticle-modified electrode, *Electrochemistry Communications*, 11 (2009) 1623-1626.
- [136] T. Ikeda, F. Matsushita, M. Senda, Amperometric fructose sensor based on direct bioelectrocatalysis, *Biosensors and Bioelectronics*, 6 (1991) 299-304.
- [137] S. Tsujimura, A. Nishina, Y. Kamitaka, K. Kano, Coulometric D-fructose biosensor based on direct electron transfer using D-fructose dehydrogenase, *Analytical Chemistry*, 81 (2009) 9383-9387.
- [138] Y. Kamitaka, S. Tsujimura, K. Kano, High current density bioelectrolysis of fructose at fructose dehydrogenase-adsorbed and Ketjen Black-modified electrodes without a mediator, *Chemistry Letters*, 36 (2007) 218-219.
- [139] M. Tominaga, S. Nomura, I. Taniguchi, D-fructose detection based on the direct heterogeneous electron transfer reaction of fructose dehydrogenase adsorbed onto multi-walled carbon nanotubes synthesized on platinum electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (2009) 1184-1188.
- [140] G.F. Khan, E. Kobatake, H. Shinohara, Y. Ikariyama, M. Aizawa, Molecular interface for an activity controlled enzyme electrode and its application for the determination of fructose, *Analytical Chemistry*, 64 (1992) 1254-1258.
- [141] T. Ikeda, F. Matsushita, M. Senda, D-fructose dehydrogenase-modified carbon paste electrode containing *p*-benzoquinone as a mediated amperometric fructose sensor *Agricultural and Biological Chemistry*, 54 (1990) 2919-2924.
- [142] J. Tkáč, I. Voštiar, P. Gemeiner, E. Šturdík, Stabilization of ferrocene leakage by physical retention in a cellulose acetate membrane. The fructose biosensor, *Bioelectrochemistry*, 55 (2002) 149-151.
- [143] K.T. Kinnear, H.G. Monbouquette, An amperometric fructose biosensor based on fructose dehydrogenase immobilized in a membrane mimetic layer on gold, *Analytical Chemistry*, 69 (1997) 1771-1775.
- [144] A. Begum, E. Kobatake, T. Suzawa, Y. Ikariyama, M. Aizawa, New electrocatalytic biomolecular interface for fabricating a fructose dehydrogenase-based sensing system, *Analytica Chimica Acta*, 280 (1993) 31-36.
- [145] C.A.B. Garcia, G. de Oliveira Neto, L.T. Kubota, L.A. Grandin, A new amperometric biosensor for fructose using a carbon paste electrode modified with silica gel coated with Meldola's Blue and fructose 5-dehydrogenase, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 418 (1996) 147-151.

- [146] K. Damar, D. Odaci Demirkol, Modified gold surfaces by poly(amidoamine) dendrimers and fructose dehydrogenase for mediated fructose sensing, *Talanta*, 87 (2011) 67-73.
- [147] S. Kadow, E. Betiku, U. Rinas, U. Bilitewski, Development of a rapid, quantitative glucosyltransferase assay based on a screen-printed fructose enzyme electrode and application to optimization studies on gtfD expression in recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnology and Bioengineering*, 91 (2005) 154-161.
- [148] K. Matsumoto, J.J. Baeza Baeza, H.A. Mottola, Simultaneous kinetic-based determination of fructose and ascorbate with a rotating bioreactor and amperometric detection: application to the analysis of food samples, *Analytical Chemistry*, 65 (1993) 1658-1661.
- [149] Y. Sekine, E.A.H. Hall, A lactulose sensor based on coupled enzyme reactions with a ring electrode fabricated from tetrathiafulvalen-tetracyanoquinodimethane, *Biosensors and Bioelectronics*, 13 (1998) 995-1005.
- [150] S. Campuzano, Ó.A. Loaiza, M.a. Pedrero, F.J.M. de Villena, J.M. Pingarrón, An integrated bienzyme glucose oxidase-fructose dehydrogenase-tetrathiafulvalene-3-mercaptopropionic acid-gold electrode for the simultaneous determination of glucose and fructose, *Bioelectrochemistry*, 63 (2004) 199-206.
- [151] X. Wu, F. Zhao, J.R. Varcoe, A.E. Thumser, C. Avignone-Rossa, R.C.T. Slade, A one-compartment fructose/air biological fuel cell based on direct electron transfer, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2009) 326-331.
- [152] E.C. Bigham, C.E. Gragg, W.R. Hall, J.E. Kelsey, W.R. Mallory, D.C. Richardson, C. Benedict, P.H. Ray, Inhibition of arabinose 5-phosphate isomerase. An approach to the inhibition of bacterial lipopolysaccharide biosynthesis, *Journal of Medicinal Chemistry*, 27 (1984) 717-726.
- [153] W.S. Hummers, R.E. Offeman, Preparation of graphitic oxide, *Journal of the American Chemical Society*, 80 (1958) 1339-1339.
- [154] J. Barkauskas, J. Razumienė, I. Šakinytė, E. Voitechovič, Use of carbon nanomaterials for amperometric biosensors, in: *Micro- and nanosystems in biochemical diagnosis. Principles and applications: 108th ICB seminar*, Polska Akademia Nauk, Warsaw (Poland), 2010, pp. 28-39.
- [155] P.K. Ivanova-Mitseva, V. Fragkou, D. Lakshmi, M.J. Whitcombe, F. Davis, A. Guerreiro, J.A. Crayston, D.K. Ivanova, P.A. Mitsev, E.V. Piletska, S.A. Piletsky, Conjugated Polymers with Pendant Iniferter Units: Versatile Materials for Grafting, *Macromolecules*, 44 (2011) 1856-1865.
- [156] R.E. Wrolstad, T.E. Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker, D.M. Smith, P. Sporns, Common buffers and stock solutions, in: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [157] A. Bratov, N. Abramova, J. Ramón-Azcón, A. Merlos, F. Sánchez-Baeza, M.-P. Marco, C. Domínguez, Characterisation of the interdigitated electrode array with tantalum silicide electrodes separated by insulating barriers, *Electrochemistry Communications*, 10 (2008) 1621-1624.
- [158] A. Bratov, J. Ramon-Azcon, N. Abramova, A. Merlos, J. Adrian, F. Sanchez-Baeza, M.P. Marco, C. Dominguez, Three-dimensional interdigitated electrode array as a transducer for label-free biosensors, *Biosensors & Bioelectronics*, 24 (2008) 729-735.
- [159] L. Bagdonienė, V. Bendikienė, J. Kadziauskas, D. Labeikytė, A. Markuckas, V. Sabaliauskienė, S. Sasnauskienė, V. Šeputienė, *Biochemijos laboratoriniai darbai*, Vilniaus universiteto leidykla, Vilnius, 2006.

- [160] K.S. Novoselov, D. Jiang, F. Schedin, T.J. Booth, V.V. Khotkevich, S.V. Morozov, A.K. Geim, Two-dimensional atomic crystals, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (2005) 10451-10453.
- [161] Q. Haas, Kovalente Kohlenstoffverbindungen, in: G. Brauer (Ed.) *Handbuch der Präparativen anorganischen Chemie*, J. F. Enke Verlag, Stuttgart, 1960, pp. 574.
- [162] A. Markuckas, Fermentinės katalizės pagrindai, *Technologija*, Kaunas, 2008.
- [163] K.F. Tipton, A.G. McDonald, H.B.F. Dixon, Effects of pH on enzymes, in: D.L. Purich (Ed.) *Contemporary enzyme kinetics and mechanism*, Academic Press, Elsevier, Oxford, 2009, pp. 124-178.
- [164] T. Coleman, E.F. Spellman, A. Rostami-Hodjegan, M.S. Lennard, G.T. Tucker, The 1'-hydroxylation of rac-bufuralol by rat brain microsomes, *Drug Metabolism and Disposition*, 28 (2000) 1094-1099.
- [165] M. Stiene, U. Bilitewski, Electrochemical characterization of screen-printed carbonaceous electrodes for the determination of peroxidase activity in novel screen-printed flow-through modules, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372 (2002) 240-247.
- [166] D. Li, Y.P. Wen, H.H. He, J.K. Xu, M. Liu, R.R. Yue, Polypyrrole-multiwalled carbon nanotubes composites as immobilizing matrices of ascorbate oxidase for the facile fabrication of an amperometric vitamin C biosensor, *J. Appl. Polym. Sci.*, 126 (2012) 882-893.
- [167] P. Monk, *Fundamentals of Electroanalytical Chemistry*, John Wiley & Sons, 2007.
- [168] B. Speiser, Linear sweep and cyclic voltammetry, in: P.R. Unwin (Ed.) *Instrumentation and Electroanalytical Chemistry*, Wiley VCH, Weinheim, 2002, pp. 81-104.
- [169] M. Sharp, M. Petersson, K. Edström, Preliminary determinations of electron transfer kinetics involving ferrocene covalently attached to a platinum surface, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 95 (1979) 123-130.
- [170] B.W. Groen, M.A. van Kleef, J.A. Duine, Quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase apoenzyme from *Pseudomonas testosteroni*, *Biochemical Journal*, 234 (1986) 611-615.
- [171] E.C.A. Stigter, J.P. van der Lugt, W.A.C. Somers, Enantioselective oxidation of secondary alcohols by quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2 (1997) 291-297.
- [172] J. Kyte, *Mechanism in protein chemistry*, 1st ed., Garland Science, New York, 1995.
- [173] M. Blomberg, Redox reactions of NO and O₂ in iron enzymes : a density functional theory study, in, *Stockholms Universitet*, Stockholm, 2006.
- [174] D.G. Penney, *Carbon Monoxide*, 1 ed., CRC-Press, 1996.
- [175] J. Frebortova, K. Matsushita, H. Arata, O. Adachi, Intramolecular electron transport in quinoprotein alcohol dehydrogenase of *Acetobacter methanolicus*: a redox-titration study, *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1363 (1998) 24-34.
- [176] S.A. Moiseeva, G.B. Postnikova, V.S. Sivozhelezov, The catalytic effect of ferricyanide on the rate of electron transfer between myoglobin and cytochrome c, *Biofizika*, 46 (2001) 415-422.
- [177] G. Carrea, S. Riva, Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents, *Angewandte Chemie International Edition*, 39 (2000) 2226-2254.

- [178] A.M. Klibanov, Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature*, 409 (2001) 241-246.
- [179] M.J.A. Shiddiky, A.A.J. Torriero, Application of ionic liquids in electrochemical sensing systems, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011) 1775-1787.
- [180] D. Das, A. Dasgupta, P.K. Das, Improved activity of horseradish peroxidase (HRP) in 'specifically designed' ionic liquid, *Tetrahedron Letters*, 48 (2007) 5635-5639.
- [181] S. Ameen, M.S. Akhtar, M. Husain, Polyaniline and its nanocomposites: synthesis, processing, electrical properties and applications, *Science of Advanced Materials*, 2 (2010) 441-462.
- [182] P. Novak, K. Muller, K.S.V. Santhanam, O. Haas, Electrochemically active polymers for rechargeable batteries, *Chemical Reviews*, 97 (1997) 207-281.
- [183] A. Malinauskas, R. Holze, An in situ spectroelectrochemical study of redox reactions at polyaniline-modified ITO electrodes, *Electrochimica Acta*, 43 (1998) 2563-2575.
- [184] Z. Mandic, L. Duic, Polyaniline as an electrocatalytic material, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 403 (1996) 133-141.
- [185] M. Li, Y.T. Li, D.W. Li, Y.T. Long, Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays - a review, *Analytica Chimica Acta*, 734 (2012) 31-44.
- [186] A. Eremenko, A. Makower, W. Jin, P. Rüger, F. Scheller, Biosensor based on an enzyme modified electrode for highly-sensitive measurement of polyphenols, *Biosensors and Bioelectronics*, 10 (1995) 717-722.
- [187] S. Igarashi, T. Hirokawa, K. Sode, Engineering PQQ glucose dehydrogenase with improved substrate specificity: site-directed mutagenesis studies on the active center of PQQ glucose dehydrogenase, *Biomolecular Engineering*, 21 (2004) 81-89.
- [188] B.V. Plapp, Site-Directed Mutagenesis: A Tool for Studying Enzyme Catalysis, in: D.L. Purich (Ed.) *Contemporary enzyme kinetics and mechanism*, Academic Press, Elsevier, Oxford, 2009, pp. 199-226.
- [189] T. Kuila, S. Bose, P. Khanra, A.K. Mishra, N.H. Kim, J.H. Lee, Recent advances in graphene-based biosensors, *Biosensors & Bioelectronics*, 26 (2011) 4637-4648.
- [190] V. Singh, D. Joung, L. Zhai, S. Das, S.I. Khondaker, S. Seal, Graphene based materials: Past, present and future, *Progress in Materials Science*, 56 (2011) 1178-1271.
- [191] M. Aguilar-Martinez, N.A. Macias-Ruvalcaba, J.A. Bautista-Martinez, M. Gomez, F.J. Gonzalez, I. Gonzalez, Review: hydrogen bond and protonation as modifying factors of the quinone reactivity, *Current Organic Chemistry*, 8 (2004) 1721-1738.
- [192] A.E. Baum, H. Park, D. Wang, S.V. Lindeman, A.T. Fiedler, Structural, spectroscopic, and electrochemical properties of nonheme Fe(II)-hydroquinonate complexes: synthetic models of hydroquinone dioxygenases, *Dalton Transactions*, 41 (2012) 12244-12253.
- [193] P.D. Astudillo, J. Tiburcio, F.J. González, The role of acids and bases on the electrochemical oxidation of hydroquinone: hydrogen bonding interactions in acetonitrile, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 604 (2007) 57-64.
- [194] R.C.M. Jakobs, L.J.J. Janssen, E. Barendrecht, Hydroquinone oxidation and *p*-benzoquinone reduction at polypyrrole and poly-N-methylpyrrole electrodes, *Electrochimica Acta*, 30 (1985) 1313-1321.

- [195] D.K. Gosser, A Survey of Electrochemical Mechanisms in: Cyclic voltammetry simulation and analysis of reaction mechanisms, VCH Publisher, New York, 1993, pp. 71 - 105.
- [196] J.J. Huang, W.S. Hwang, Y.C. Weng, T.C. Chou, Determination of alcohols using a Ni–Pt alloy amperometric sensor, *Thin Solid Films*, 516 (2008) 5210-5216.
- [197] G. Dienys, S. Jarmalavicius, S. Budriene, D. Citavicius, J. Sereikaite, Alcohol oxidase from the yeast *Pichia pastoris* - a potential catalyst for organic synthesis, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21 (2003) 47-49.