

VILNIAUS UNIVERSITETAS

IEVA ŠAKINYTĖ

BEREAGENTINĖS FERMENTINĖS SISTEMOS ANGLINIŲ
STRUKTŪRŲ PAGRINDU

Daktaro disertacija,
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2017

Disertacija rengta 2012 – 2016 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos instituto Bioanalizės skyriuje.

Mokslinė vadovė :

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

Mokslinis konsultantas:

Prof. habil. dr. Jurgis Barkauskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03 P).

TURINYS

ŽYMĖJIMAI IR SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	8
1 LITERATŪROS APŽVALGA	12
1.1 Bereagentinės fermentinės sistemos	12
1.2 Amperometriniai fermentiniai biojutikliai	13
1.2.1 Amperometrinių fermentinių biojutiklių kartos	16
1.2.1.1 Elektronų pernaša trečios kartos biojutikliuose.....	19
1.2.2 Amperometrinių biojutiklių veikimas	21
1.3 Darbe naudoti fermentai.....	23
1.3.1 Nuo pirolo chinolinchinono priklausoma gliukozės dehidrogenazė iš <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> sp.: struktūra, savybės, panaudojimas	23
1.3.2 Ureazė iš <i>Canavalia ensiformis</i> : struktūra, savybės, taikymas.....	27
1.3.2.1 Karbamido nustatymo svarba hemodializės metu	30
1.3.3 D-Fruktozės dehidrogenazė iš <i>Gluconobacter industrius</i> : struktūra, savybės, taikymas.....	31
1.3.3.1 D-tagatozės nustatymo svarba	34
1.4 Anglinės medžiagos ir jų savybės	35
1.4.1 sp ² hibridizacijos anglinių medžiagų klasifikacija	37
1.4.2 Grafeno defektiškumas	39
1.4.2.1 Defektų įtaka grafeno elektrinėms savybėms.....	43
1.4.3 sp ² hibridizacijos anglinių medžiagų modifikacija	43
1.4.3.1 Oksidacijos metu susidariusios funkcinės grupės	44
1.4.3.2 Funkcinių grupių dalyvavimas EP	46
1.4.3.3 Grafito oksidas.....	47
1.4.3.4 Termiškai redukuotas grafito oksidas	49
1.4.4 sp ² hibridizacijos anglinių medžiagų amorfizacija.....	50
2 DARBO METODIKA	52
2.1 Naudotos medžiagos	52
2.2 Naudota aparatūra	53
2.3 sp ² hibridizacijos anglinių medžiagų sintezė	54

2.3.1 Grafito oksido ir grafeno oksido sintezė.....	54
2.3.2 Grafito oksidacijos produktų sintezės.....	55
2.3.3 Grafito ir grafeno oksido terminė redukcija.....	57
2.4 sp ² hibridizacijos anglinių medžiagų tyrimai.....	58
2.5 Biojutiklių konstravimas ir elektrocheminiai tyrimai.....	61
2.5.1 Fermentų imobilizavimas.....	64
3 DARBO REZULTATAI.....	66
3.1 sp ² hibridizacijos anglinių medžiagų charakterizavimas.....	66
3.1.1 GrO, GOP(1 – 5) ir TRGrO tyrimas.....	66
3.1.2 TRGO frakcijų tyrimas.....	76
3.2 Bereagentinės fermentinės sistemos anglinių medžiagų pagrindu.....	83
3.2.1 Bereagentinių sistemų su PQQ-GDH tyrimas.....	84
3.2.2 Bereagentinių sistemų su ureaze tyrimas.....	89
3.2.2.1 Sistemų su GOP ir TRGrO tyrimas.....	90
3.2.2.2 Sistemų su TRGO frakcijomis tyrimas.....	94
3.2.3 Bereagentinių sistemų su FDH ir TRGO frakcijomis tyrimas.....	101
3.2.3.3 FDH stabilizavimas.....	105
3.3 Bereagentinių sistemų taikymas realių mėginių analizei.....	109
3.3.1 TRGO2 ir ureazės biojutiklio taikymas karbamido nustatymui.....	109
3.3.2 TRGO1 ir FDH biojutiklio taikymas D-fruktozės ir D-tagatozės nustatymui.....	111
4 IŠVADOS.....	118
5 AUTORIAUS MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS.....	120
5.1 Straipsniai recenzuojamuose žurnaluose.....	120
5.5.1 Straipsniai doktorantūros tema.....	120
5.5.2 Kiti straipsniai.....	121
5.2 Tarptautinių ir nacionalinių mokslinių konferencijų pranešimų tezės ..	121
5.3 Dalyvavimas projektuose.....	124
6 PADĖKOS.....	125
7 NAUDOTOS LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	126

ŽYMĖJIMAI IR SANTRUMPOS

- A – elektrodo plotas;
- AJM – atominės jėgos mikroskopija;
- ATP – adenzin 5' trifosfatas;
- b – kalibracinės kreivės tiesinės dalies nuolinkio kampas;
- \vec{b} – Burgerso vektorius;
- BET – Brunauerio-Emeto-Telerio analizė;
- BSA – jaučio serumo albuminas (angl. Bovine serum albumin);
- CV – variacijos koeficientas;
- D – A_{1g} simetrijos Ramano sklaidos moda, kuri apibūdinanti šešianarių, aromatinių žiedų simetrinius virpesius;
- D' – Ramano sklaidos moda atsirandanti dėl „zigzago“ ar „kedės“ forma išsidėsčiusių anglies atomų grafeno briaunose;
- d_{002} – tarplokštuminis atstumas tarp (002) plokštumų;
- DNR – deoksiribonukleino rūgštis;
- d_{vid} – vidutinis anglinių medžiagų dalelių arba porų diametras;
- $[Enz]_{im}$ – pirminė imobilizuoto fermento koncentracija;
- E'_0 – formalusis elektrodo potencialas;
- E – potencialas;
- $E_{ox,im}$ – imobilizuoto fermento oksiduota forma;
- $E_{red,im}$ – imobilizuoto fermento redukuota forma;
- EP – elektronų pernaša;
- EPT – elektronų pernašos tarpininkas;
- F – faradėjaus konstanta;
- FAD – flavinadenindinukleotidas, oksiduota forma, $FADH_2$ – redukuota forma;
- FDH – D-Fruktozės dehidrogenazė išskirta iš *Gluconobacter industrius*
- FMN – flavinmononukleotidas, oksiduota forma;
- FMS – fenazino metasulfatas;
- G – E_{2g} simetrijos Ramano sklaidos moda apibūdinanti tarp sp^2 hibridizacijos anglies atomų esančių dvigubų ryšių simetrinius virpesius;
- GrO – grafito oksidas;
- GO – grafeno oksidas;
- GOP – grafito oksidacijos produktai, GOP1, GOP2, GOP3, GOP4 ir GOP5 – grafito oksidacijos produktai gauti skirtingomis sąlygomis oksiduojant grafitą, žiūrėti 2.3.2 syrių;
- GOx – gliukozės oksidazė;
- HD – hemodializė;
- h_{vid} – vidutinis anglinių medžiagų dalelių aukštis;
- I_{max}^{tar} – tariamasis maksimalus srovės stipris;
- I – biojutiklio generuojamos srovės stipris;

I_{max}^{tar} – tariamasis maksimalus srovės stipris;
 $I(G)$ – Ramano sklaidos spektruose matomos G smailės intensyvumas
 $I(D)$ – Ramano sklaidos spektruose matomos D smailės intensyvumas;
 $I(D)/I(G)$ – Ramano sklaidos spektruose matomų D ir G smailių intensyvumo santykis, apibūdinantis medžiagos defektiškumą;
 Im-FDH – imobilizuota FDH, Im-FDH1, Im-FDH2, Im-FDH3 ir Im-FDH4 yra skirtingi imobilizuoti FDH;
 j – srovės tankis;
 J_{max}^{tar} – tariamasis maksimalus srovės tankis;
 K – „kėdės“ forma išsidėstę anglies atomai grafeno briaunose;
 k_1, k_{-1} ir k_2 – fermentinės reakcijos greičio konstantos;
 k_{ET} – tiesioginės elektronų pernašos greičio konstanta;
 k_{fe} ir k_{be} – greičio konstantos apibūdinančios elektronų pernašą tarp fermento aktyvaus centro ir elektrodo paviršiaus;
 k_{in} – biojutiklio inaktyvacijos konstanta, k_{in}^1, k_{in}^2 – pirmoji ir antroji biojutiklio inaktyvacijos konstantos;
 K_M – Michaelio konstanta;
 K_M^{tar} – tariamoji Michaelio konstanta;
 k_s – reakcijos greičio konstanta nustatyta esant E'_0 ;
 LOD – nustatymo riba (angl. limit of detection);
 n – reakcijoje dalyvaujančių elektronų skaičius;
 $NAD(P)^+$ – nikotinamidadeninukleotidas (fosfatas), oksiduota forma, $NAD(P)H$ – redukuota forma;
 P – fermento produktas;
 PEI – polietileniminas;
 pK_a – rūgšties disociacijos konstantos dešimtainis logaritmas;
 pK_b – bazės disociacijos konstantos dešimtainis logaritmas;
 PQQ – pirolo chinolinchinonas, oksiduota forma, $PQQH_2$ – redukuota forma;
 PQQ-GDH – nuo pirolo chinolinchinono priklausoma gliukozės dehidrogenazė išskirta iš *Acinetobacter calcoaceticus*
 PVA – polivinilo alkoholis;
 r – tikrasis atstumas tarp elektronų donoro ir akceptorius;
 R – universalioji dujų konstanta;
 r_0 – minimalus (Van der Waalso atstumas) tarp elektronų donoro ir akceptorius;
 r_{xy} – koreliacijos koeficientas;
 S – fermento substratas;
 $[S]$ – substrato koncentracija ant biojutiklio paviršiaus;
 S_a – standartinis nuokrypis;
 S_{BET} – anglinių medžiagų savitasis paviršiaus plotas, nustatytas naudojant BET analizę;
 $S-E_{im}$ – imobilizuoto fermento-substrato kompleksas;
 SEM – skenuojanti elektroninė mikroskopija;

SW – Stone-Waleso defektas;
 T – absoliutinė temperatūra;
TAI – termofilinė L-arabinozės izomerazė išskirta iš *Geobacillus lithuanicus* 5;
TEP – tiesioginė elektronų pernaša;
TGA – termogravimetrinė analizė;
TKRO – tiesioginė karbamo rūgšties oksidacija;
TRGO – termiškai redukuotas grafito oksidas;
TRGO1, TRGO2, TRGO3 – termiškai redukuoto grafeno oksido pirmoji, antroji ir trečioji frakcijos;
TTF – tetratiofulvalenas;
 V – vakansija (taškinis defektas);
VAV – vienasieniai angliniai vamzdeliai;
XRD – Rentgeno spindulių difrakcinė analizė (angl. X-ray Diffraction Analysis);
 Z – „zigzago“ forma išsidėste anglies atomai grafeno briaunose;
 α – elektronų pernašos koeficientas;
 β – elektronų pernašos konstanta;
 ΔE – potencialų skirtumas tarp pradinio elektronų donoro ir galutinio akceptoriaus;
 ΔG^0 – laisvosios Gibso energijos pokytis (reakcijos energija arba varos jėga);
 λ – reorganizacijos energija;
 ρ_b – anglinių medžiagų piltinis tankis.

IVADAS

Dabartiniame technologijų amžiuje svarbią mokslinių tyrimų vietą užima heterogeninių fermentinių bioanalizinių ir biokonversinių sistemų kūrimas, kadangi jų pagalba galima greičiau, efektyviau bei pigiau gauti norimus produktus ar nustatyti rūpimas analites. Tokių sistemų kūrimas yra sudėtingas procesas, kadangi, ne visi fermentai ir kitos fazės medžiagos yra suderinamos tarpusavyje, fermentai dažnai pasižymi mažu stabilumu, o jų aktyvusis centras yra giliai baltymo globulėje, kas apsunkina jų regeneraciją [1, 2].

Oksidoreduktazių ar kitų fermentų, katalizuojančių elektrochemiškai aktyvių produktų susidarymą, imobilizacijai parinkus tinkamas kietos fazės medžiagas (elektroodus), yra ne tik prailginama jų gyvavimo trukmė bet ir palengvinama ar net užtikrinama šių fermentų regeneracija sistemoje nenaudojant papildomų tirpių, elektrochemiškai aktyvių medžiagų, o tai yra bereagentinių sistemų pagrindas [3]. Tokios bereagentinės elektrocheminės sistemos pasižymi dideliu atrankumu savo substratui, todėl yra labai perspektyvios kuriant amperometrinius biojutiklius. Amperometriniai biojutikliai, lyginant su kitais analitiniais metodais (pvz. potenciometriniais ar spekrofotometriniais), turi keletą pranašumų: pasižymi dideliu atrankumu, yra nesudėtingos konstrukcijos, pigūs, tinkami analizuoti neskaidrias terpes, o matavimai atliekami realiu laiku [3, 4]. Dėl šių savybių amperometriniai bereagentiniai biojutikliai yra patrauklūs kuriant naujus prietaisus, skirtus medicininei diagnostikai, aplinkosaugai ar pramoninių procesų kontrolei [5, 6].

Siekiant sukurti efektyviai veikiančius bereagentinius amperometrinius biojutiklius didelis dėmesys turi būti skiriamas elektrodinių medžiagų, ant kurių vyktų efektyvūs bioelektrokataliziniai procesai, paieškoms. Dėl tinkamų fizikinių ir elektrocheminių savybių, sp^2 hibridizacijos anglinės medžiagos yra patrauklios tokių sistemų kūrimui [7 – 9]. Šiuo metu viena plačiausiai tyrinėjamų sp^2 hibridizacijos anglinių medžiagų yra grafenas. Dėl didelio paviršiaus ploto (teorinis $2630 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), tinkamo elektrinio laidumo ($64 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$), plačių potencialo ribų, greitos elektronų pernašos grafenas laikomas idealia elektrodine medžiaga [10]. Be to, modifikavus grafeną deguoninėmis funkcinėmis grupėmis

gali būti padidinamas elektronų pernašos greitis [11] ar net realizuojama tiesioginė elektronų pernaša tarp fermento aktyvaus centro ir šios anglinės medžiagos paviršiaus [12]. Šiuo metu grafito oksidacija yra vienas iš plačiausiai naudojamų metodų siekiant gauti grafeno pagrindu sudarytas anglines medžiagas, kurių paviršiuje yra išsidėsčiusio deguoninės funkcinės grupės.

Šiame darbe buvo siekiama susintetinti, atrinkti ir ištirti sp^2 hibridizacijos anglines medžiagas tinkamas efektyviai veikiančių bereagentinių fermentinių sistemų kūrimui. Tam pasitelktos keturios skirtingos oksidacijos bei Hummers'o ir Offemano sintezės [13] metu gautų grafito ir grafeno oksidų terminės redukcijos metodikos. Gautos medžiagos charakterizuotos termogravimetrinės analizės, atominės jėgos mikroskopijos, Brunauerio-Emeto-Telerio, skenuojančios elektroninės mikroskopijos, Rentgeno spindulių difrakcinės, Ramano sklaidos spektrinės, titrimetrinės ir elementinės analizės metodais. Ištirtos sp^2 hibridizacijos anglinės medžiagos buvo tiriamos kaip elektrodinės medžiagos amperometriuose fermentiniuose biojutikliuose, kurių biologinę dalį sudarė tirpi nuo pirolo chinolinchinono priklausoma gliukozės dehidrogenazė išskirta iš *Acinetobacter calcoaceticus* sp., ureazė išskirta iš *Canavalia ensiformis* arba D-fruktozės dehidrogenazė išskirta iš *Gluconobacter industrius*. Geriausiai veikiantys biojutikliai buvo atrinkti tolimesniems tyrimams, kurių metu siekta juos pritaikyti realių mėginių analizei – karbamido nustatymui dializės skystyje hemodializės eigoje ir D-tagatozės nustatymui biokonversijos iš D-galaktozės sistemoje.

Darbo tikslas: susintetinti, atrinkti ir ištirti sp^2 hibridizacijos anglines medžiagas ir jų pagrindu sukurti bereagentines efektyviai veikiančias fermentines sistemas.

Uždaviniai:

1. Susintetinti grafito ir grafeno oksidus, skirtingus grafito oksidacijos produktus, termiškai redukuotą grafito oksidą. Sukurti optimizuotą metodą, leidžiantį susintetinti apibrėžtomis savybėmis pasižyminčias termiškai redukuoto grafeno oksido frakcijas;

2. Susintetintas anglines medžiagas charakterizuoti titrimetrijos, atominės jėgos mikroskopijos, Ramano sklaidos spektrinės, Brunauerio-Emeto-Telerio, termogravimetrijos, skenuojančios elektroninės mikroskopijos, Rentgeno spindulių difrakcinės ir elementinės analizės metodais;
3. Panaudoti susintetintas ir ištirtas anglines medžiagas bereagentinių sistemų kūrimui, kurių biologinę dalį sudaro nuo pirolo chinolinchinono priklausoma gliukozės dehidrogenazė išskirta iš *Acinetobacter calcoaceticus* sp., ureazė išskirta iš *Canavalia ensiformis* arba D-fruktozės dehidrogenazė išskirta iš *Gluconobacter industrius*. Nustatyti sukurtų sistemų pagrindinius kinetinius parametrus.
4. Įvertinus nustatytus kinetinius parametrus, atrinkti tinkamiausias anglines medžiagas bereagentinių D-gliukozės, karbamido ir D-fruktozės biojutiklių kūrimui ir nustatyti sukurtų biojutiklių charakteristikas;
5. Pritaikyti bereagentinius karbamido ir D-fruktozės biojutiklius realių mėginių analizei.

Mokslinis naujumas

1. Pirmą kartą parodyta, kad grafitą oksiduojant H_2O_2 , $K_3[Fe(CN)_6]$ šarminėje terpėje arba veikiant fermentu lakaze išskirta iš *Coriolopsis byrsina* gaunami GOP. Naudojant GOP, TRGrO ir PQQ-GDH vyko TEP. Nustatytos GOP ir TRGrO savybės nuo kurių priklauso TEP vyksmas ir efektyvumas.
2. Sukurta originali vertikalioji GO terminės redukcijos ir frakcionavimo sistema, leidžianti surinkti tris apibrėžtomis savybėmis pasižyminčias TRGO frakcijas, tinkamas didelio efektyvumo, prilygstančio mediatoriniams procesams, bereagentinių karbamido ir D-fruktozės biojutiklių kūrimui. Nustatytos TRGO frakcijų savybės nuo kurių priklauso efektyvus ir stabilus šių sistemų veikimas.
3. Parodyta, kad iš antrosios TRGO frakcijos ir ureazės pagamintu biojutikliu galima tiksliai ir tiesiogiai nustatyti karbamido koncentraciją dializės skystyje hemodializės metu, o biojutikliu pagamintu iš

pirmosios TRGO frakcijos ir FDH galima tiksliai ir tiesiogiai amperometriškai nustatyti D-Fruktozės koncentraciją ir D-tagatozės koncentraciją biokonversijos iš D-galaktozės reakcijos mišinyje.

1 LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Bereagentinės fermentinės sistemos

Fermentai yra biologinės kilmės katalizatoriai, nulemiantys, jiems būdingų, cheminių reakcijų greitį bei kryptį patys neįeidami į šių reakcijų metu susidarančių galutinių produktų sudėtį. Skirtingai nei cheminiai katalizatoriai, fermentai yra atrankūs ir katalizuoja tik jiems būdingas reakcijas, taip pat jie pasižymi dideliu aktyvumu ir veikia švelniomis sąlygomis – esant atmosferos slėgiui, neutraliam terpės pH bei žemai temperatūrai [14]. Dėl šių savybių fermentai iš biomolekulinių atpažinimų elementų (antikūnų, nukleorūgščių, ląstelių segmentų ir kt.) yra plačiausiai naudojami bioanalitinėse sistemose – biojutikliuose [15]. Pastarųjų kūrime yra naudojami visų šešių klasių fermentai: oksidoreduktazės, hidrolazės, transferazės, liazės, izomerazės bei ligazės [15]. Gamtoje aptinkama daugiau nei 3000 šioms klasėms priklausančių fermentų rūšių, iš kurių net 1060 yra oksidoreduktazės – fermentai katalizuojantys oksidacijos-redukcijos (redokso) reakcijas [16]. Dėl didelės oksidoreduktazių katalizuojamų reakcijų įvairovės, šie fermentai dažniausiai naudojami tiek naujų biojutiklių kūrime tiek jau sukurtuose komerciniuose biojutikliuose: apie 90 % pasaulinės biojutiklių rinkos sudaro biojutikliai skirti D-gliukozės nustatymui kraujyje. Šių biojutiklių konstrukcijoje naudojama gliukozės oksidazė arba gliukozės dehidrogenazė priklauso oksidoreduktazių klasei [1, 15].

Siekiant biojutikliuose panaudoti oksidoreduktazes susiduriama su keletą problemų: fermentai pasižymi trumpa gyvavimo trukme o jų aktyvus centras dažnu atveju yra giliai baltymo globulėje, dėl ko, vykstant redokso reakcijų katalizei, yra apsunkinama EP tarp fermento aktyvaus centro ir galutinio akceptorius ar pradinio donoro [1, 2]. Fermentų gyvavimo trukmė prailginama juos imobilizavus ant tam tikrų kietų paviršių/elektrodų, taip yra sukuriamos heterogeninės bioelektrokatalizinės sistemos. Imobilizuoti fermentai pasižymi didesniu atsparumu aplinkos pokyčiams ir yra tinkami daugkartiniam panaudojimui [2, 17, 18]. Tuo tarpu, EP tarp giliai esančio fermento aktyvaus centro ir galutinio akceptorius gali būti realizuojama naudojant papildomas medžiagas – EPT. Sintetiniai EPT yra brangūs, toksiški, didelės jų

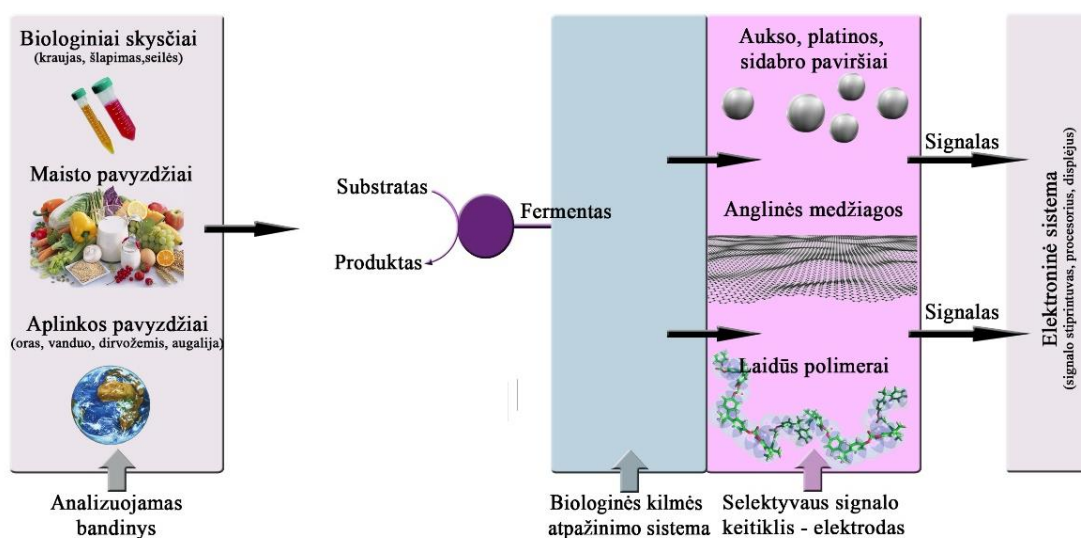
koncentracijos slopina fermentų veikimą, EPT gali išsieikvoti (išsiplauti) katalizės metu bei reaguoti su kitomis medžiagomis esančiomis terpėje [19 – 21]. Dėl šių priežasčių tirpių EPT panaudojimas *in vivo* ar *in vitro* matavimas dažnai yra komplikuoatas. Taip pat yra galimybė įvykdyti EP tarp aktyvaus centro ir elektrodo paviršiaus į reakcijos terpę nepridedant papildomų elektrochemiškai aktyvių medžiagų, o negrįžtamai imobilizuojant EPT ant elektrodų paviršiaus[22] arba naudojant netirpius EPT [23]. Tokios sistemos priskiriamos bereagentinėms bianalitinėms sistemoms [2], tačiau šios papildomos paruošimo stadijos (EPT sintezė ir imobilizavimas) didina kuriamų sistemų paruošimo laiko ir kaštų sąnaudas, kas pramoniniu požiūriu tampa neperspektyvu. Fermentų imobilizacijai parinkus tam tikros struktūros elektrodines medžiagas, tarp fermento aktyvaus centro ir elektrodo paviršiaus gali būti realizuojama TEP nenaudojant nei tirpių, nei netirpių EPT [3]. Tokios bereagentinės sistemos pasižymi dideliu atrankumu bei mažesniais paruošimo kaštais, todėl yra labai perspektyvios kuriant elektrocheminius biojutiklius bei kitus prietaisus skirtus medicininei diagnostikai ar pramoninių procesų kontrolei [5, 6].

Apibendrinant galima pasakyti, kad, siekiant sukurti pigias, bereagentines ir daugkartines fermentines bioanalizines sistemas, didelis dėmesys turi būti skiriamas elektrodinių medžiagų savo paviršiuje turinčių elektrochemiškai aktyvių funkcinių grupių paieškai ir tyrimui. Šiame darbe, oksidazių ir hidrolazių pagrindu buvo siekta sukurti bereagentines fermentines sistemas tinkamas amperometrinių biojutiklių kūrimui, o elektrodinių matricių formavimui panaudoti įvairiai modifikuotas sp^2 hibridizacijos anglines medžiagas.

1.2 Amperometriniai fermentiniai biojutikliai

Biojutiklis – tai bioanalitinė sistema, kurios pagalba galima gauti kokybinę ir kiekybinę informaciją apie rūpimą analitę. Biojutiklį sudaro dvi pagrindinės dalys: biologinės kilmės atpažinimo sistema (biomolekulė) ir selektyvaus signalo keitiklis. Biomolekulė atrankiai atpažįsta analitę, tuo metu selektyvaus signalo keitiklis fiksuoja sistemoje vykstančius pokyčius ir keičia į

išmatuojamus signalus [5]. Priklausomai nuo biologinio virsmo keitimo į matuojamą signalą mechanizmo, biojutikliai gali būti skirstomi į elektrocheminius, optinės-detekcijos, terminės-detekcijos, masės pokyčiams bei jonams jautrius biojutiklius. Dėl paprastos konstrukcijos ir lengvos gaunamų duomenų interpretacijos elektrocheminiai biojutikliai yra vieni iš labiausiai vystomų [3, 4]. Elektrocheminių fermentinių biojutiklių konstrukcija ir principinis veikimo mechanizmas pateikti 1.1 paveiksle.



1.1 pav. Elektrocheminio biojutiklio konstrukcija ir principinis veikimo mechanizmas [3, 4].

Iš aukščiau pateikto paveikslo matoma, kad elektrocheminiame fermentiniame biojutiklyje biologinės kilmės atpažinimo elementas – fermentas tiriamojoje terpėje atrankiai atpažįsta savo substratą ir katalizuoja jo vartimą produktui, o katalizė vyksta ant selektyvaus signalo keitiklio – elektrodo paviršiaus ar netoli jo. Vykstant šiam biologiniam atpažinimui, elektrodu yra fiksuojamas sistemos elektrinis pokytis, kuris perduodamas elektroninei sistemai tolesniam apdorojimui elektrinio signalo pavidalu. Priklausomai nuo sistemos parametrų pokyčio elektrocheminiai biojutikliai skirstomi į amperometrinius, konduktometrinius, potenciometrinius, impeimetrinius ir lauko efekto [3, 4].

Šiame darbe nagrinėsime amperometrinius biojutiklius. Jų veikimas paremtas sistemos anodinės arba katodinės srovės pokyčio matavimu vykstant

biologiniam atpažinimui. Šie biojutikliai yra labiausiai naudojami medicininių prietaisų konstrukcijoje, kadangi pasižymi dideliu atrankumu, turi ilgą tiesinę kalibracinės kreivės dalį, yra pigūs ir tinkami analizuoti neskaidrias terpes, o atliekama analizės procedūra yra paprasta ir greita [25, 26].

Norint sukurti efektyviai veikiančią amperometrinių biojutiklį reikia įgyvendinti šias sąlygas:

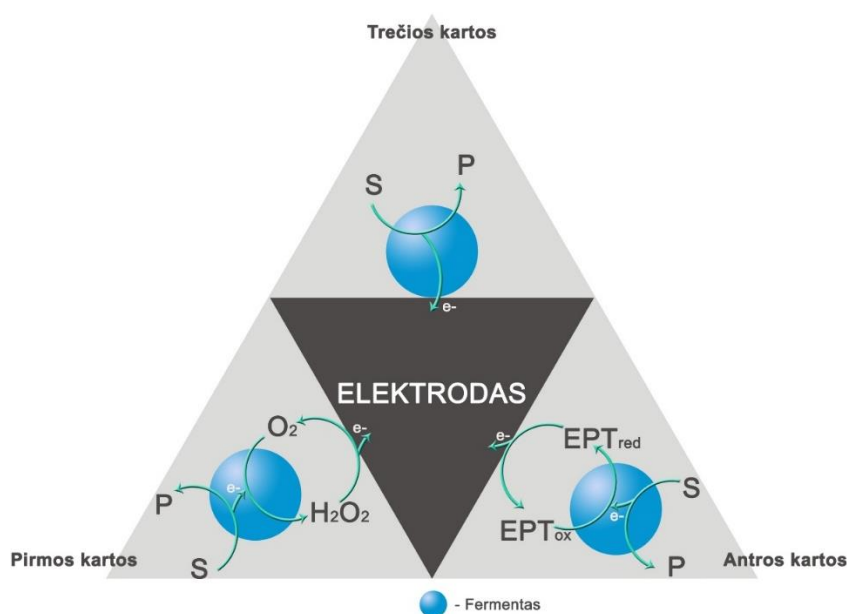
- fermentas turi pasižymėti dideliu atrankumu, būti stabilus eksploatuojant, o jo gavimas turi būti lengvai atkartojamas;
- elektrodinė medžiaga turi būti tinkamo laidumo, jos sintezė, apdorojimas bei elektrodingo paviršiaus ruošimas lengvai atkartojami;
- katalizuojama reakcija turi nebepriklausyti nuo tokių valdomų parametrų, kaip mėginio maišymo intensyvumas, temperatūra ar pH, kas leidžia analizuoti tik minimaliai apdorotus bandinius;
- fiksuojamas signalas turi būti griežtai apibrėžtas, tikslus, atkartojamas ir būti tiesinėje analitės koncentracijų srityje, analizuojant neapdorotus (neskiestus) bandinius;
- kuriant invazinius biojutiklius, skirtus klinikiams tyrimams, biojutiklis turi būti mažas, biologiškai suderinamas, nepasižymėti toksiniu ar antigeniniu efektu;
- matavimai turi būti atliekami greitai, o biojutiklis tinkamas matavimams realiu laiku;
- jei biojutiklis skirtas individualiam naudojimui, jis turi būti pigus, mažas, patogus nešiotis o jo naudojimas suprantamas nekvalifikuotiems vartotojams [3].

Amperometriniuose fermentiniuose biojutikliuose, kaip atpažinimo elementai dažniausiai naudojamos ozidoreduktazės [5]. Elektrodinėmis medžiagomis, šiuose biojutikliuose, gali būti įvairios modifikuotos ir nemodifikuotos anglinės nanomedžiagos (nanovamzdeliai, grafenas ir kt.), aukso, platinos, sidabro paviršiai bei laidūs polimerai [8, 25, 27]. Fermento ir elektrodingo paviršiaus suderinamumas nanometriniame lygmenyje yra esminis faktorius, nuo kurio priklauso amperometrinių biojutiklių efektyvus

veikimas, todėl naujų elektrodinių medžiagų paieška yra vis dar aktuali kuriant šiuolaikiškas bereagentines biojutiklines sistemas [3, 4].

1.2.1 Amperometrinių fermentinių biojutiklių kartos

Priklausomai nuo EP tarp fermento ir elektrodo paviršiaus mechanizmo, amperometriniai fermentiniai biojutikliai skirstomi į pirmos, antros ir trečios kartos biojutiklius [28]. 1.2 paveiksle pateiktos visos biojutiklių kartos ir joms būdinga EP. Paveiksle pateikta EP kryptis nusako, kad sistemoje vyksta substratų oksidacijos bioelektrokatalizė, redukcijos biokatalizės atveju EP vyksta priešinga kryptimi ir elektronai pernešami nuo elektrodo paviršiaus ant substrato molekulės.



1.2 pav. Elektronų pernaša nuo substrato ant elektrodo paviršiaus pirmos, antros ir trečios kartos biojutikliuose. *S* – substratas, *P* – produktas, *EPT*– elektronų pernašos tarpininkas.

Pirmos kartos biojutikliuose elektros srovę sukuria ne pats bioelektrokatalizinis procesas, bet elektros srovė generuojama oksiduojantis arba redukuojantis reakcijos produktams [18]. Dažniausiai tokių biojutiklių konstrukcijoje naudojamos oksidazės ir dehidrogenazės, kurių veikimui yra būtini kofermentai: NAD^+ , NADP^+ , NADH , NADPH , ATP , FAD , FADH ir kt. Norint užtikrinti efektyvų šių fermentų veikimą kofermentai turi būti

regeneruojami bioelektrokatalizės metu. Oksidazių atveju kofermentai yra regeneruojami terpėje esančiu ištirpusiu O_2 , kaip ir pavaizduota 1.2 paveiksle. O_2 yra antrasis šių fermentų substratas. Esant tokiai biojutiklio konstrukcijai matavimo metu gali būti fiksuojamas O_2 suvartojamas esant $-0,7\text{ V vs. Ag/AgCl}$ darbinio elektrodo potencialui (ant elektrodo paviršiaus O_2 redukuojasi, o duomenys lyginami su kontroliniu elektrodu, gauti katodinių srovių pokyčiai proporcingi substrato koncentracijai). Gali būti fiksuojamas ir H_2O_2 susidarymas esant $0,7\text{ V vs. Ag/AgCl}$ darbinio elektrodo potencialui (ant elektrodo paviršiaus H_2O_2 oksiduojasi, dėl ko gaunamas anodinės srovės pokytis proporcingas substrato koncentracijai) [18, 29]. Tokiu principu veikia komerciniai gliukozės biojutikliai, kuriuose naudojama GOx [30]. Šis fermentas katalizuoja gliukozės oksidaciją iki gliukono rūgšties, o tuo pačiu ir deguonies redukciją iki H_2O_2 . Pastarajam oksiduojantis iki deguonies, elektronai pernešami ant elektrodo paviršiaus [30]. Tokių biojutiklių didžiausias trūkumas yra tas, kad jų veikimas priklauso nuo O_2 koncentracijos, kurią sunku išlaikyti pastoviam lygyje. Dar daugiau, dėl mažo O_2 tirpumo mažėja biojutiklio kalibracinės kreivės tiesinė dalis, o tai yra didelis trūkumas analitinei sistemai [18].

Pirmos kartos biojutikliuose naudojant dehidrogenazes į sistemą papildomai pridedama jų kofaktorių (pvz. NAD^+). Oksidacijos reakcijų biokatalizės metu vyksta šių kofaktorių specifinė redukcija, o po to oksidacija ant elektrodo paviršiaus – generuojamas anodinės srovės dydis yra proporcingas substrato koncentracijai. Taip pat pirmos kartos amperometrinėse sistemose naudojamos hidrolazės ar fermentinės kaskados (sudaro daugiau nei vienas fermentas, kurie nuosekliai katalizuoja reakcijas), kurių katalizuojamų reakcijų metu gaunami elektrochemiškai aktyvūs produktai. Pagrindiniai šių biojutiklių trūkumai – reikalingas papildomas elektrodinio paviršiaus apdorojimas bei nespecifinių reakcijų vykimasis [18, 29].

Antros kartos biojutikliuose elektronus nuo fermento perneša ne O_2 , o papildomi EPT (1.2 pav.). EPT yra mažos molekulinės masės junginiai, kurie perneša elektronus tarp fermento redokso centro ir elektrodo paviršiaus. Antros kartos biojutikliai pranašesni už pirmos, kadangi jų veikimas nepriklauso nuo

terpėje ištirpusio O_2 , o EPT ant elektrodo paviršiaus regeneruojasi (oksiduojasi arba redukuojas) esant mažesniai darbinio elektrodo potencialui. Taip sumažinama pašalinių reakcijų vyksmo tikimybė, todėl biojutikliai tampa tikslesni. Geriausiai žinomi EPT yra ferocianidai, feroceni, metileno mėlis, fenazinas ir kt., Taip pat kaip EPT yra naudojami ir kiti neorganiniai kompleksiniai junginiai bei organinės molekulės savo struktūroje turinčios EP dalyvaujančias funkcinės grupes (pvz. deguonines funkcinės grupes turinčios organinės molekulės – chinonai). Sintetiniai EPT yra brangūs, toksiški, esant didelėms jų koncentracijoms slopinami fermentai, EPT gali išsieikvoti (išsiplauti) katalizės metu bei reaguoti su kitomis medžiagomis esančiomis terpėje. Dėl šių priežasčių tirpių EPT panaudojimas *in vivo* ar *in vitro* matavimas dažnai yra komplikuotas. Taip pat EPT naudojimas apsunkina analizę ir gali įvesti papildomų paklaidų, kadangi EPT gali ne tik dalyvauti EP tarp fermento ir elektrodo paviršiaus, bet ir reaguoti su kitomis terpėje esančiomis medžiagomis [18 – 21, 29]. Antros kartos biojutikliai, dėl EPT išsieikvojimo pasižymi mažesniu stabilumu nei pirmos kartos, todėl analizei naudojami rečiau [18].

Šiuo metu bene didžiausias dėmesys skiriamas trečios kartos biojutiklių paieškoms, todėl, kad jų veikimas pagrįstas TEP tarp fermento aktyvaus centro ir elektrodo paviršiaus (1.2 pav.). Šiuo atveju, analizės metu anodinės arba katodinės srovės pokytis atsiranda dėl tiesioginės fermento kofaktorių ar prostetinių grupių regeneracijos ant elektrodo paviršiaus. Trečios kartos biojutikliai yra pranašesni nei pirmos ar antros kartos, kadangi oksidacijos ar redukcijos reakcijų bioelektrokatalizė vyksta esant fermento redokso potencialui arba arti jo. Dėl šios priežasties tokio tipo biojutikliai pasižymi didesniu atrankumu, o pašalinių reakcijų tikimybė sumažėja [5, 31]. Be to, paprasta trečios kartos amperometrinių biojutiklių konstrukcija ir generuojamos srovės dydis leidžia juos miniatiūrizuoti [29], kas yra labai svarbu šiuolaikiniuose bioanaliziniuose prietaisuose.

Sukurti efektyviai veikiančius trečios kartos biojutiklius yra gan sudėtinga. Iki 2013 metų buvo žinoma tik apie 40 fermentų, tarp kurių ir elektrodinių

paviršių buvo realizuota TEP [32]. Taip yra, nes TEP labai priklauso nuo fermento prigimties, fermento orientacijos ant elektrodo paviršiaus ir elektrodo paviršiaus charakteristikų (laidumo, biosuderinamumo ir gebėjimo dalyvauti EP) [1]. Yra žinoma, kad sp^2 hibridizacijos anglinės medžiagos (modifikuoti ir nemodifikuoti angliniai nanovamzdeliai, grafenas, nanodalelės) pasižymi, ypatingomis elektronų transporto savybėmis bei dideliu paviršiaus plotu, o funkcinės grupės ant jų paviršiaus gali palengvinti EP. Todėl naudojant šias medžiagas, elektrodiniams paviršiams ruošti, gali būti realizuota TEP tarp fermento aktyvaus centro ir elektrodo paviršiaus. Taip pat, TEP vyksmas labai priklauso ir nuo pačio biojutiklio architektūros. Tai patvirtina darbai, atlikti ant platinos ar stiklo anglies elektrodo paviršiaus vertikaliai, kovalentiškai prijungus modifikuotus anglinius nanovamzdelius, o prie jų kovalentiškai prijungiant GOx, suformuojami ampermetriniai – fermentiniai biojutikliai, kuriuose TEP gali vykti vien dėl jų unikalios architektūros [3, 4, 8]. Siekiant realizuoti TEP bei sukurti efektyviai veikiančią bereagentinę biojutiklį, reikia ieškoti tiek naujų elektrodinių paviršių, tiek jų bei fermentų modifikavimo elektrochemiškai aktyviomis funkcinėmis grupėmis galimybių [31].

1.2.1.1 Elektronų pernaša trečios kartos biojutikliuose

Trečios kartos biojutiklių veikimas yra neatsiejamas nuo EP procesų. Šiuose biojutikliuose yra naudojami fermentai, kurie savo aktyviajame centre turi vieną arba daugiau prostetinių grupių ar kofaktorių, kurie geba lengvai oksiduotis ir redukuotis. Vykstant fermentinei substrato oksidacijai, elektronai nuo substrato per fermento aktyviajame centre esančias prostetines grupes tokias kaip PQQ, FAD, hema, metalo jonus (vario, geležies, cinko ir kt.) arba kofermentus NAD, NADP, FMN ir kitus yra pernešami ant elektrodo paviršiaus, taip fermentas regeneruojasi, o sistemoje registruojamas anodinės srovės išaugimas [24, 31, 33].

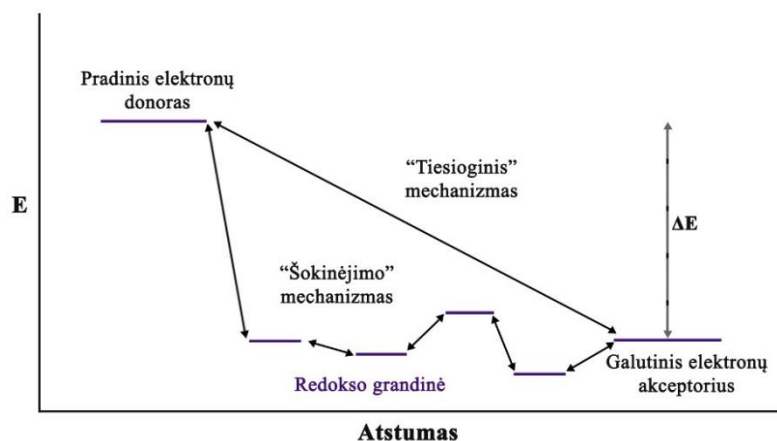
Pagal Markuso teoriją TEP greičio konstanta (k_{ET}) išreiškiama [34, 35]:

$$k_{ET} = 10^{13} \exp[-\beta(r - r_0)] \exp\left[\frac{-(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4\lambda RT}\right] \quad (1)$$

Šioje lygtyje, r_0 ir r yra minimalus (Van der Waalso atstumas) ir tikrasis atstumas tarp elektronų donoro ir akceptoriaus, β – tai elektronų pernašos konstanta, kuri priklauso nuo medžiagos prigimties, λ – reorganizacijos energija, ΔG^0 – laisvosios Gibso energijos pokytis (reakcijos energija arba varos jėga), R – universalioji dujų konstanta, T – absoliutinė temperatūra. Iš 1 lygties aišku, kad svarbiausi veiksniai nulemiantys TEP greitį yra:

- atstumas tarp elektrono donoro ir akceptoriaus ($r-r_0$);
- procese dalyvaujančių redokso grupių potencialų skirtumas (ΔG^0) ir jų orientacija;
- elektrochemiškai aktyvių centrų reorganizacinė energija (λ) [5, 24, 31, 36].

TEP greitis priklauso ir nuo fermento prigimties: atstumo tarp fermento aktyvaus centro ir fermento paviršiaus, fermento aktyvaus centro prieinamumo, aktyvųjų fermento centrą sudarančių kofaktorių ar prostetinių grupių skaičiaus ir prigimties [5]. Fermentai, kurių prostetinės grupės yra tvirtai pririštos prie baltyminės dalies, gali tiesiogiai perduoti elektronus elektrodo paviršiui [32]. Priklausomai nuo grupių skaičiaus ir kaip giliai jos yra baltymo globulėje, skiriasi EP būdai. Jei fermento aktyvus centras nėra giliai baltymo globulėje elektronai gali būti pernešami ant elektrodo paviršiaus tiesiogiai juos tuneliuojant, tačiau elektronai skirtingai nei atomai ar jonai gali būti tuneliuojami atstumu ne didesniu nei 14 Å. Daugeliu atveju, elektronai turi būti pernešami ilgesniu nei 15 Å. Tokie fermentai savo struktūroje turi turėti daugiau nei vieną prostetinę grupę ar kofaktorių, kurie geba dalyvauti redokso reakcijose. Elektronai yra pernešami nuo vienos grupės (kofektoriaus) ant kitos pirmajai regeneruojantis. Taip yra sukuriamos donoro-tiltelio-akceptoriaus sistemos. Pastarosios dar vadinamos biologiniais „laidais“ ar redokso grandinėmis. Atlikus teorinius elektronų pernašos DNR grandinėje skaičiavimus, buvo pasiūlyti du elektronų pernašos mechanizmai: „tiesioginis“ ir „šokinėjimo“ (1.3 pav.) [37, 38].



1.3 pav. Elektronų pernašos mechanizmai. E – potencialas, ΔE – potencialų skirtumas tarp pradinio elektronų donoro ir galutinio akceptoriaus [37, 38].

Tiesioginis“ mechanizmas – elektronai nuo donoro akceptoriumi perduodami tiesiogiai – tuneliuojant. Šis mechanizmas priklauso nuo grandinės valentinių orbitalių sanklodos ir energijos. Pagal „šokinėjimo“ mechanizmą elektronai pereina nuo vieno redokso centro ant kito, keisdami jų oksidacijos būseną, tol kol pasiekia galutinį elektronų akceptorium – elektrodą [37, 38].

TEP vyksmui didelę įtaką daro ir fermento aktyvaus centro orientacija elektrodo atžvilgiu. Esant nepalankiai fermento orientacijai, fermento aktyvų centrą gaubianti baltyminė dalis sudaro didelį energetinį barjerą, kas apsunkina TEP [32, 36]. Dėl šios priežasties fermento imobilizacijos metu būtina užtikrinti tinkamą fermento aktyvaus centro orientaciją elektrodo paviršiaus atžvilgiu. Yra žinoma, kad nuo greitos TEP priklauso efektyvus bereagentinių biojutiklių veikimas. Norint sukurti tokioms savybėmis pasižyminti biojutiklį reikia parinkti tiek tinkamą fermento imobilizacijos metodiką tiek elektrodinius paviršius, kurie gebėtų orientuoti fermentą ir dalyvauti EP.

1.2.2 Amperometrinių biojutiklių veikimas

Bereagentiniuose amperometriniuose biojutikliuose, kuriuose realizuota TEP, vykstantis biokatalizinis procesas, kuriame dalyvauja vienas substratas, gali būti aprašomas tokiomis schemomis [39]:



kur S – fermento substratas, P – gautas produktas, $E_{ox,im}$ – imobilizuoto fermento oksiduota forma, $E_{red,im}$ – imobilizuoto fermento redukuota forma, $S \cdot E_{im}$ – imobilizuoto fermento-substrato kompleksas, k_1 , k_{-1} ir k_2 – fermentinės reakcijos greičio konstantos, k_{fe} ir k_{be} – greičio konstantos apibūdinančios elektronų pernašą tarp fermento aktyvaus centro ir elektrodo paviršiaus. Iš pateiktų schemų matoma, kad vykstant oksidacijos reakcijų bioelektrokatalizei, pirma fermentas susijungia su substratu, sudarydamas fermento ir substrato kompleksą (vyksta EP nuo substrato molekulės ant fermento aktyvaus centro), kuris vėliau skyla į fermentą ir produktą (1 schema), o EP vyksta nuo fermento aktyvaus centro ant elektrodo paviršiaus (2 schema). Ribinė srovė 1 ir 2 schemose pateiktoms reakcijoms aprašoma 2 – 4 lygtimis [40, 39]:

$$I = \frac{I_{max}^{tar} [S]}{(1 + k_{be}/k_{fe})K_M^{tar} + (1 + k_2/k_{fe})[S]} \quad (2)$$

kur

$$I_{max}^{tar} = nFAk_2[Enz]_{im} \quad (3)$$

$$K_M^{tar} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (4)$$

Šiose lygtyse I – biojutiklio generuojamos srovės stipris, $[S]$ – substrato koncentracija ant biojutiklio paviršiaus, $[Enz]_{im}$ – pirminė imobilizuoto fermento koncentracija, n – reakcijoje dalyvaujančių elektronų skaičius, F – faradėjaus konstanta, A – elektrodo plotas, I_{max}^{tar} – tariamasis maksimalus srovės stipris ir K_M^{tar} – tariamoji Michaelio konstanta [40, 39].

k_{fe} ir k_{be} greičio konstantos yra elektrodo potencialo (E) funkcijos ir išreiškiamos Butlerio-Volmerio formulėmis [40]:

$$k_{fe} = k_s \exp[(1 - \alpha)(nF/RT)(E - E'_0)] \quad (5)$$

$$k_{be} = k_s \exp[-\alpha(nF/RT)(E - E'_0)] \quad (6)$$

kur E'_0 – formalusis elektrodo potencialas, k_s – greičio konstanta nustatyta esant E'_0 , α – elektronų pernašos koeficientas, R – universalioji dujų konstanta, T – absoliutinė temperatūra. Priimant, kad elektronų pernaša (elektrokinė reakcija 2 scheme) yra labai greita ir nelimituoja viso proceso, 2 lygtis supaprastėja [39, 40]:

$$I = \frac{I_{max}^{tar} [S]}{K_M^{tar} + [S]} \quad (7)$$

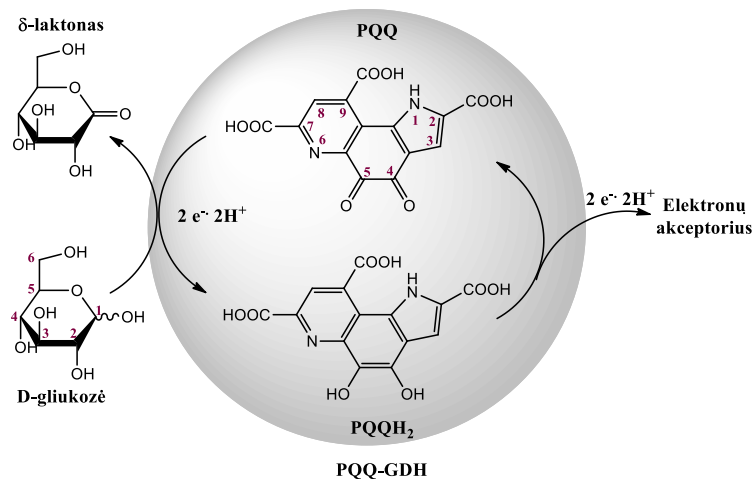
Tai elektrocheminiams matavimams adaptuota Michaelio-Menten hiperbolės lygtis, kurioje esantys I_{max}^{tar} ir K_M^{tar} yra pagrindiniai biojutiklių kinetiniai parametrai, kurie nustatomi iš sistemos generuojamo srovės stiprio priklausomybių nuo substrato koncentracijos – kalibracinių kreivių. K_M^{tar} yra substrato koncentracija, kuriai esant bioelektrokatalizinės sistemos generuojamas srovės stipris yra $I_{max}^{tar}/2$.

Aptartas bereagentinio biojutiklio, kuriame yra realizuota tiesioginė vieno substrato bioelektrokatalizė, yra pats nesudėtingiausias atvejis. Kitais atvejais, priklausomai nuo bioelektrokatalizinės sistemos sudėtingumo (substratų skaičiaus, EPT dalyvavimo, elektrodingo paviršiaus ir imobilizacijos būdo sudėtingumo ir kt.) aprašyti visas sistemoje vykstančias reakcijas yra gan sudėtinga. Dėl šių priežasčių kiekvienu atveju sistemos aprašomos skirtingai, taikant individualius matematinius modelius [41].

1.3 Darbe naudoti fermentai

1.3.1 Nuo pirolo chinolinchinono priklausoma gliukozės dehidrogenazė iš *Acinetobacter calcoaceticus* sp.: struktūra, savybės, panaudojimas

Darbe D-gliukozės biojutiklio kūrimui buvo pasirinktas oxidoreduktazių klasei priklausantis fermentas – nuo pirolo chinolinchinono priklausoma gliukozės dehidrogenazė (PQQ-GDH). Darbe buvo tirta vandenyje tirpi PQQ-GDH, E.C.1.1.5.2, išskirta iš *Acinetobacter calcoaceticus* sp. periplazmos. Šis fermentas katalizuoja D-gliukozės oksidacijos reakciją iki δ -laktono [42]. 1.4 paveiksle pavaizduota PQQ-GDH katalizuoja reakcija ir EP nuo D-gliukozės, per fermentą, ant galutinio elektronų akceptoriaus.



1.4 pav. EP nuo D-gliukozės molekulės ant galutinio akceptoriaus PQQ-GDH katalizuojamoje reakcijoje .

Kaip matoma PQQ-GDH prostetinė grupė – PQQ molekulė dalyvauja D-gliukozės oksidacijos procese, kurio metu per PQQ yra perdušami 2 elektronai nuo D-gliukozės ant galutinio akceptoriaus. Katalizės metu hidrofobinės sąveikos dėka D-gliukozė (β -D-gliukopiranozės formos) prijungiama prie PQQ molekulės, taip kad hidroksi grupė esanti prie C1 gliukozės atomo atsiduria tiesiai virš penkto PQQ anglies atomo, kur vyksta tolesnė D-gliukozės oksidacija, kurios metu yra perdušami $2 e^-$ ir $2 H^+$ [43].

PQQ-GDH sudaryta iš dviejų identiškų 50 kDa subvienetų. Kiekviename subviename yra trys kalcio jonai (Ca^{2+}) ir PQQ molekulė. Du Ca^{2+} yra subvieneto išorinėje dalyje ir dalyvauja subvienetų dimerizacijos procese – sudaro ryšius tarp subvienetų. Vienas Ca^{2+} yra subvieneto aktyviajame centre ir atsako už PQQ prijungimą prie apofermento [44 – 46]. Be PQQ molekulės ir Ca^{2+} PQQ-GDH aktyvų centrą sudaro dar 23 amino rūgštys, tarp kurių šoninių amino grupių ir PQQ molekulės karbonilinių grupių atsiranda elektrostatinė sąveika [45, 47]. PQQ-GDH aktyvusis centras yra giliai baltymo globulėje, kuriame, dėl hidrofobinės sąveikos ir vandenilinių ryšių tarp PQQ ir aminorūgščių šoninių grupių, yra stipriai pririšta PQQ molekulė [44]. Pagrindinės PQQ-GDH fizikinės savybės ir optimalios veikimo sąlygos pateiktos 1.1 lentelėje.

1.1 lentelė. *PQQ-GDH iš Acinetobacter calcoaceticus sp. fizikinės savybės ir optimalios veikimo sąlygos [48].*

Fizikinė savybė/veikimo sąlyga	
Michaelio konstanta	$4,8 \cdot 10^{-3}$ M (D-gliukozei)
Optimalus pH	7,0
Optimali temperatūra	37 °C
pH stabilumas	pH 3,5 – 8,5 (25 °C, 16 valandų)
Laikymo temperatūra	-20 °C
Temperatūrinis stabilumas	50 °C (pH 7,5, 30 minučių)
Stabilizatoriai	Ca ²⁺ , jaučio serumo albuminas
Inhibitoriai	Ag ⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺

Be 1.1 lentelėje paminėtų savybių PQQ-GDH pasižymi tuo, kad jos veikimui nėra būtinas deguonis t.y. deguonis nėra natūralus PQQ-GDH elektronų akceptorius [42]. Dėl šios savybės ir tvirtai aktyviajame centre pririšto PQQ, šis fermentas yra labai patrauklus tiek bereagentinių bioanalizės, tiek biokonversijos sistemų kūrimu.

PQQ-GDH, katalizuoja ne tik D-gliukozės oksidacijos reakciją, bet kai kurių sacharidų ir disacharidų oksidaciją [38]. 1.2 lentelėje pateiktas PQQ-GDH atrankumas sacharidams ir disacharidams.

1.2 lentelė. *PQQ-GDH iš Acinetobacter calcoaceticus sp. substratinis atrankumas [48].*

Substratas (50 mM)	Aktyvumas, %	Substratas (50 mM)	Aktyvumas, %
D-gliukozė	100	D-fruktozė	0,3
L-gliukozė	0,3	D-galaktozė	16,0
D-ksilozė	15,0	D-laktozė	68,9
2-deoksi-gliukozė	4,9	D-sorbitolis	0,2
L-sorbozė	0,5	Sacharozė	0,2
D-manozė	10,8	Maltozė	107,0

Iš pateiktų duomenų, matoma, kad PQQ-GDH, be D-gliukozės, pasižymi dideliu atrankumu maltozei, D-laktozei, galaktozei, D-ksilozei ir D-manozei. Mažą specifiškumą D-gliukozei lėmė tai, kad PQQ-GDH aktyviajame centre virš PQQ yra platus tirpalui prieinamas plyšys, kuriame nėra aminorūgščių liekanų, kurios gebėtų sąveikauti su gliukozės žiede trečiojoje, ketvirtojoje ir šeštojoje padėtyje esančiais deguonies atomais [49]. Nepaisant to PQQ-GDH yra naudojama komerciniuose amperometriniuose biojutikliuose skirtuose D-gliukozės kiekio nustatymui kraujyje [50]. Dėl giliai PQQ-GDH globulėje

esančio aktyvaus centro TEP tarp jo ir elektrodo paviršiaus yra sunkiai realizuojama, todėl biojutiklių konstrukcijoje dažniausiai naudojami EPT [51]. 1.3 lentelėje pateikta keletas sukurtų amperometrinių D-gliukozės biojutiklių, kuriuose naudojama PQQ-GDH.

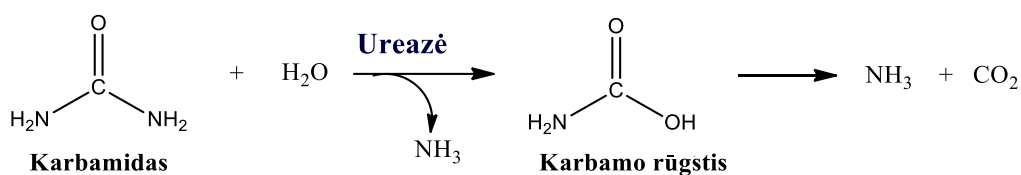
1.3 lentelė. *Amperometrinių D-gliukozės biojutiklių charakteristikos.*

Biojutiklio konstrukcija	EPT	Tiesinė dalis, mM	Jautris/ efektyvumas	E_{darb} , V vs Ag/AgCl	Stabilumas
PQQ-GDH imobilizuota glutaro aldehido garais ant grafitinio strypo [52]	4-ferocenil fenolis	-	$26 \mu A \cdot cm^{-2}$	0,4 V	1 savaitė
PQQ-GDH ir mediatorius imobilizuoti ant anglinio, spausmo montažo elektrodo [53]	4-(4-ferocenoferoniliminometil) fenolis	Iki 2,4	$77,5 \mu A \cdot cm^{-2}$	0,4 V	20 dienų
PQQ-GDH imobilizuota į hidrogelį sudarytą iš poli(1-vinylimidazolo) ir Os(4-4'-dimetilbipyridino) ₂ Cl ant grafitinio strypo [54]	Os(4-4'-dimetilbipyridinas) ₂ Cl	10 – 100	$5,9 \mu A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$	0,2 V	–
PQQ-GDH/ferocianidas/angliniai nanovamzdeliai [55]	Fe(CN) ₆ ³⁻	1 – 35	$2,15 mA \cdot cm^{-2}$	0,5 V	-23 % per 4 savaites
PQQ-GDH/cyt b562 ant grafito pastos elektrodo [56]	Citochromas b ₅₆₂	–	–	0,2 V	-40 % per 72 valandas
PQQ-GDH adsorbuota ant modifikuotos amorfinės anglies [12]	–	0,011 – 0,600	$6,8 \mu A \cdot cm^{-2}$	0,4	-91 % per 25 dienų

Be 1.3 lentelėje paminėtų EPT naudojami ir kiti EPT: FMS, benzochinonai, N-metilfenazinas, rutenio (II/III) kompleksai, laidūs polimerai (poliuretanas, poliakrilatas, polipirolas) ar aukso nanodalelės [51]. Iš 1 lentelės matyti, kad TEP buvo realizuota tik tuo atveju, kai elektrodo konstrukcijoje buvo naudojama elektrochemiškai aktyviomis grupėmis modifikuota amorfinė anglis [12]. Todėl darbo metu, įvairiais metodais modifikuojant anglines medžiagas buvo siekiama realizuoti TEP tarp PQQ-GDH aktyvaus centro ir elektrodo paviršiaus. Tokia beragentinė sistema būtų perspektyvi ne tik biojutiklių kūrimo, bet ir biokuro celių gamyboje.

1.3.2 Ureazė iš *Canavalia ensiformis*: struktūra, savybės, taikymas

Darbe bereagentinių karbamido biojutiklių kūrimui pasirinkta Ureazė iš *Canavalia ensiformis*. Tai hidrolazių klasei priklausantis fermentas, dar vadinamas amidohidrolaze (EC 3.5.1.5). Ureazė katalizuoja karbamido hidrolizės reakciją iki karbamo rūgšties ir amoniako. Susidariusi karbamo rūgštis yra nestabili ir spontaniškai skyla iki anglirūgštės ir antrosios amoniako molekulės [57, 58]. Šis dvipakopis procesas pavaizduotas 1.5 paveiksle.



1.5 pav. Ureazės katalizuojamos karbamido hidrolizės ir karbamo rūgšties skilimo reakcijos.

Ureazė dalyvauja natūraliame azoto apykaitos cikle, todėl yra plačiai aptinkama augaluose, bakterijose, grybuose, dumbliuose bei dirvožemyje. Ureazė pirmą kartą iškristalinta 1926 metais iš *Canavalia ensiformis*, tai buvo pirmasis iškristalintas fermentas enzimologijos istorijoje. Ureazės ketvirtinė struktūra priklauso nuo to iš kokio organizmo ji yra išskirta, nepaisant to, ureazėse išskirtose iš skirtingų organizmų yra aptinkama identiška trimerinė struktūra su 3 aktyviaisiais (katalitiniais) centrais. 1975 metais buvo identifikuota, kad ureazės aktyviajame centre yra du Ni²⁺ jonai, kurie sudaro koordinacinius ryšius su histidino ir asparto amino rūgščių šoninėmis grupėmis bei vandeniu. Nikelio jonai veikia kaip Lewis'o rūgštis – palengvina vandens skilimą ir inicijuoja hidroksilo anijono prisijungimą prie karbamido karbonilo grupės taip susidarant karbamo rūgščiai [59, 57].

Darbe, bereagentinių fermentinių biojutiklių kūrimui, buvo pasirinkta ureazė išskirta iš *Canavalia ensiformis*. Ši ureazė sudaryta iš 6 vienodų subvienetų (90 kDa), kurie yra susijungę į dvi viena prieš kitą išsidėsčiusias, identiškas trimerines struktūras, taip suformuojant heksamerą [58]. Pagrindinės ureazės iš *Canavalia ensiformis* fizikinės savybės ir optimalios veikimo sąlygos pateiktos 1.4 lentelėje.

1.4 lentelė. *Ureazės iš Canavalia ensiformis fizikinės savybės ir optimalios veikimo sąlygos [60].*

Fizikinė savybė/veikimo sąlyga	
Michaelio konstanta	$1,3 \cdot 10^{-3}$ M (TRIS buferiniame tirpale)
Optimalus pH	7,4
Izoelektrinis taškas	5,0 – 5,2
Optimali temperatūra	60 °C
Laikymo temperatūra	2 – 8 °C
Temperatūrinis stabilumas	45 °C (60 min)

Ureazės substratas karbamidas yra galutinis alifatinių azoto junginių metabolizmo organizme produktas. Su jo kiekiu padidėjimu ar sumažėjimu organizme yra susijusios įvairios inkstų ligos. Norint jų išvengti yra labai svarbu tiksliai ir realiu laiko momentu nustatyti karbamido kiekio pokyčius organizme. Dar daugiau, tikslus ir greitas karbamido kiekio nustatymas reikalingas žemės ūkio (pienininkystės) bei trąšų pramonėje [61, 62].

Ureazė, dėl gebėjimo atrankiai katalizuoti karbamido hidrolizės reakciją, yra plačiai naudojama karbamido kiekybinei ir kokybinei analizei. Šiuo metu plačiausiai karbamido detekcijai yra naudojami potenciometriniai biojutikliai [63, 64]. Jų veikimas paremtas ne tiesioginiu karbamido nustatymu, o ureazės katalizuojamos reakcijos metu susidariusių amonio jonų ar pH pokyčio matavimu. Tam pasitelkiami pH jautrūs, jonams selektyvūs, porėti NH_3 ir CO_2 elektrodai arba jonams jautrūs lauko efekto tranzistoriai. Tokio tipo biojutikliai turi keletą minusų: lėtas atsako laikas, nepastovi bazinė linija, nespecifinė jonų esančių tirpale/tiriamajame mėginyje įtaka registruojamam signalui. Dėl šių priežasčių gauti rezultatai dažnu atveju yra sunkiai interpretuojami bei priklauso nuo įvairių terpės parametrų, todėl karbamido analizė tampa komplikauta [65].

Yra sukurtų ir amperometrinių karbamido biojutiklių, kuriuose naudojama ureazė. Amperometriniai biojutikliai lyginant su potenciometriniais yra daug jautresni. 1.5 lentelėje yra pateikti, jau sukurti karbamido biojutikliai ir jų charakteristikos.

1.5 lentelė. Amperometrinių karbamido biojutiklių charakteristikos.

Biojutiklio konstrukcija	Registruojamas signalas	Tiesinė dalis, μM	Jautris, $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	E_{darb} , V
Ureazė Imobilizuota į nailono tinklelį, ant Pt elektrodo su imobilizuota glutamato dehidrogenaze [66]	NADPH oksidacija	10 – 300	–	0,4 vs Ag/AgCl
Adsorbuota ureazė ant grafito-Pt elektrodo [65]	pH pokytis, naudojant EPT	10 – 250	0,2	0 vs SCE
Ureazė adsorbuota ant TB/SAE*[67]	pH pokytis	200 – 800	0,98	-0,2 vs SCE
Ureazė imobilizuota į poli(vinilferoceno) matricą ant Pt elektrodo [61]	pH pokytis	1 – 250	–	0,7 vs Ag/AgCl
Ureazės-PANI ^{**} -nafiono-Pt elektrodas [68]	NH_4^+ susidarymas	30 – 300	$11,6 \pm 0,05$	-0,2 vs SCE
Ureazė imobilizuota ant PANI ^{**} -nafionas-Cu modifikuoto anglinio elektrodo [69]	NH_4^+ susidarymas	1 – 100	$112 \pm 3,36$	-0,35 vs Ag/AgCl
Ureazė imobilizuota ant stiklo anglies elektrodo [63]	Karbamo rūgšties elektrooksidacija	500 – 21000	–	(1,05 V vs. Ag/AgCl)

*TB/GCE – toluidinu padengtas stiklo anglies elektrodas

**PANI – polianilinas

Kaip matoma iš 1.5 lentelės, daugumos amperometrinių biojutiklių, kaip ir potenciometrinių biojutiklių atveju, veikimas paremtas ne tiesioginiu karbamido nustatymu, o netiesioginiu – susidariusių amonio jonų ar pH pokyčio matavimu, tam pasitelkiant amonio jonams jautresius elektrodus [69 – 71] ar net papildomus EPT [65]. Taip pat yra sukurtų amperometrinių biojutiklių, kurių veikimas pagrįstas tiesiogine fermentinės katalizės metu susidariusios karbamo rūgšties elektrooksidacija ant stiklo anglies elektrodo paviršiaus [63]. Tokio biojutiklio veikimui yra būtinas aukštas elektrodo potencialas (1,05 V vs. Ag/AgCl) [63]. Dėl didelio darbinio elektrodo potencialo ar netiesioginės karbamido nustatymo ant darbinio elektrodo paviršiaus padidėja pašalinių/nescifinių reakcijų vyksmo galimybė, kas gali iškraipyti eksperimentinius rezultatus. Dėl šios priežasties, doktorantūros darbo metu panaudojus naujas elektrodinės medžiagas, buvo siekiama sukurti amperometrinius karbamido biojutiklius, kurie leistų tiesiogiai nustatyti karbamido koncentraciją tiriamuosiuose bandiniuose esant žemam elektrodo potencialui, taip išvengiant pašalinių reakcijų galimybes.

1.3.2.1 Karbamido nustatymo svarba hemodializės metu

Inkstai, žmogaus organizme, atlieka svarbią funkciją – išvalo kraują nuo kenksmingų medžiagų, susidarančių vykstant medžiagų apykaitai, ir pašalina jas su šlapimu. Be šios svarbios funkcijos inkstai reguliuoja vandens ir druskų kiekį organizme, kraujo spaudimą, skatina eritrocitų gamybą, bei yra atsakingi už aktyviojo vitamino D gamybą. Sutrikus inkstų veiklai, jie nebepajėgia išvalyti kraujo nuo kenksmingų medžiagų, todėl šios kaupiasi kraujyje sukeldamos daugybę nepageidaujamų simptomų (pykinimą, bendrą silpnumą, galvos skausmą ir t.t.) [72]. Inkstų funkcijai nusilpus iki tam tikros ribos pacientams reikalinga pakaitinė inkstų terapija – dializė, kurios metu, naudojant specialius aparatus, organizmas yra išvalomas nuo kenksmingų medžiagų [72, 73]. Hemodializė (HD) yra viena dializės rūšių, kurios metu prie paciento yra prijungiamas aparatas (dializatorius) ir kraujo valymas vyksta ne kūne, o jo išorėje [72]. Dializatoriaus viduje kraujas teka per tūkstančius tuščiavidurių skaidulų ir yra atskirtas pusiau pralaidžia membrana nuo dializės tirpalo, kuris dializatoriumi teka priešinga kryptimi. Kraujo valymas hemodializės metu vyksta pagal difuzijos dėsnius, dėl kurių kenksmingos medžiagos iš kraujo pereina į dializės skystį [72]. Išvalytas kraujas pumpuojamas atgal į organizmą, o panaudotas dializės skystis šalinamas kaip atlieka. Standartinė hemodializė, ligoninėse ar dializės centruose atliekama 3 kartus per savaitę ir trunka 4 – 5 valandas [73]. Tai yra ilgas ir varginantis procesas.

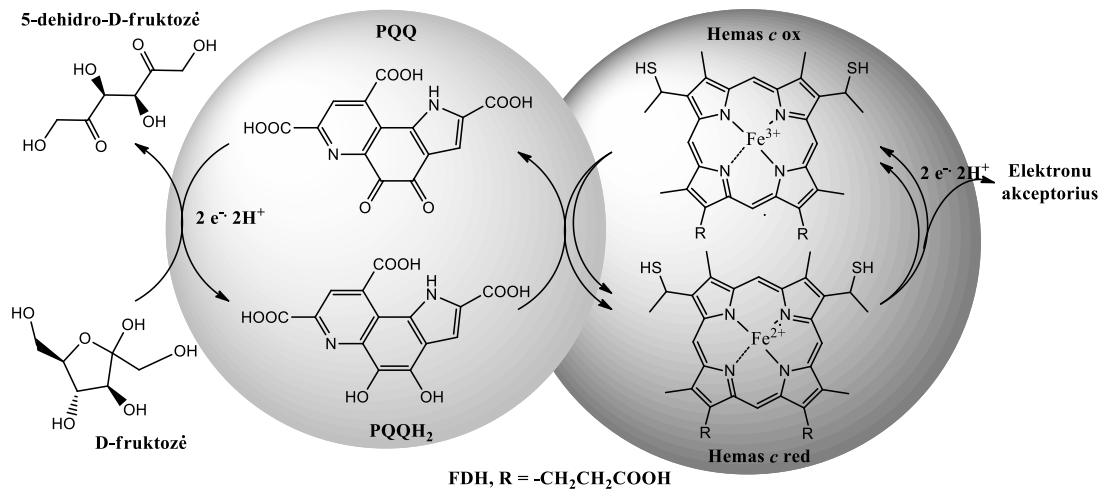
Karbamidas, kreatininas, natrio, kalio druskos ir fosfatai yra pagrindiniai medžiagų apykaitos produktai, kurių kiekis kraujyje padidėja sutrikus inkstų funkcijai [72]. Pagrindinis junginys, kuris turi būti pašalinamas iš organizmo, hemodializės metu yra karbamidas. Pagal karbamido pašalinimą iš organizmo hemodializės metu yra vertinamas ir dializės efektyvumas [74]. Esant nesutrikusiai inkstų funkcijai, karbamido kiekis kraujo serume svyruoja nuo 2,5 iki 6,7 mM, tuo tarpu jei sutrikus karbamido koncentracija pasiekia 30 – 80 mM, todėl pacientui turi būti atliekama dializės procedūra [75]. Tuo tarpu, karbamido kiekis dializine skystyje, dializės metu, gali svyruoti nuo 3 iki 16 mM [74].

Pagal Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro 2015 m. Rugpjūčio 14 d. įsakymą Nr. V-956 karbamido kiekis kraujo serume turi būti nustatytas vieną kartą per mėnesį, prieš ir po hemodializės [76]. Pažymėtina, kad tam pačiam pacientui karbamido kiekis kiekvienos HD procedūros pradžioje gali skirtis (priklauso nuo streso, mitybos, fizinio aktyvumo ir kt.), todėl ne visais atvejais būtina 4 valandų dializės trukmė. Šiuolaikinė aparatūra, matuojanti karbamido koncentraciją, yra stacionari, daugiaparametrinė, reikalaujanti apmokyto personalo ir paprastai komplektuojama specialiose laboratorijose [74], todėl norint nustatyti karbamido koncentraciją surinktus mėginius reikia siųsti į laboratoriją ir laukti atsakymų. Portatyvus, paprastas karbamido nustatymo metodas, gebantis tiksliai nustatyti karbamido kiekį kraujyje, serume ar dializiniame skystyje realiu laiku išspręstų šią problemą, todėl tokių metodų kūrimas yra vis dar aktualus. Manome, kad mūsų sukurtas karbamido biojutiklis galėtų pasižymėti aptartomis savybėmis. Jo pagalba būtų galima nustatyti karbamido koncentraciją dializės atlikimo vietoje (prieš kiekvieną seansą), kas leistų sutaupyti tyrimų kaštus, laiko sąnaudas ar net sutrumpinti HD laiką. Nustačius, kaip karbamido koncentracija kraujyje koreliuoja su jo koncentracija ištekančiame dializės skystyje, būtų galima kraujo tyrimą pakeisti dializės skysčio tyrimu, taip dar labiau tausojant paciento sveikatą.

1.3.3 D-Fruktozės dehidrogenazė iš *Gluconobacter industrius*: struktūra, savybės, taikymas

Darbe bereagentinių D-fruktozės biojutiklių kūrimui pasirinkta nuo PQQ priklausoma D-fruktozės dehidrogenazė (FDH) iš *Gluconobacter industrius* (EC 1.1.99.11). FDH yra kompleksinis baltymas sudarytas iš 3 subvienetų, kurio molekulinė masė yra 140 kDa. Pirmasis FDH subvienetas tai PQQ rišantis, katalizinis subvienetas (67 kDa), antrasis – hemą *c* turintis subvienetas (50,8 kDa) ir trečiasis – peptidinis subvienetas (19,7 kDa), šio subvieneto tiksli funkcija nėra žinoma, manoma, kad jis reikalingas fermento ketvirtinei struktūrai palaikyti [77]. FDH katalizuoja D-fruktozės oksidaciją iki 5-keto-D-

fruktozės. FDH katalizuoja reakcija ir EP nuo D-fruktozės molekulės, per fermentą, ant galutinio akceptoriaus pavaizduota 1.6 paveiksle.



1.6 pav. EP nuo D-fruktozės molekulės ant galutinio akceptoriaus FDH katalizuojamoje reakcijoje.

Iš 1.6 paveikslo matyti, kad vykstant D-fruktozės oksidacijos reakcijos katalizei 2 elektronai ir protonai pernešami nuo D-fruktozės ant PQQ molekulės po to, elektronus pernešus ant hemo *c* - PQQ molekulė reoksiduojasi. Galiausiai elektronai nuo hemo *c* (per du kartus) pernešami ant galutinio akceptoriaus ir FDH regeneruojasi.

Pagrindinės FDH fizikinės savybės ir optimalios veikimo sąlygos pateiktos 1.6 lentelėje.

1.6 lentelė. FDH fizikinės savybės ir optimalios veikimo sąlygos [78, 79].

Fizikinė savybė/veikimo sąlyga	
Michaelio konstanta	5·10 ⁻³ M
Optimalus pH	4,0
Optimali temperatūra	37 °C
pH stabilumas	pH 4,0 – 6,0 (25 °C, 16 valandų)
Laikymo temperatūra	-20 °C
Temperatūrinis stabilumas	< 40 °C (pH 4,5, 15 min)
Diametras	7 nm

FDH yra labai specifiška D-fruktozei. Dėl šios savybės fermentas yra naudojamas kokybinei ir kiekybinei šio angliavandens analizei. Verta paminėti, kad deguonis, kaip ir PQQ-GDH atveju, nėra natūralus FDH elektronų akceptorius [79], o tai yra didelis pranašumas, kuriant trečios kartos

amperometrinius biojutiklius. Šiuo metu yra sukurtas didelis kiekis antros kartos ir keletas trečios kartos D-fruktozės biojutiklių naudojant FDH. 1.7 lentelėje yra pateikti, jau sukurti antros ir trečios kartos D-fruktozės biojutikliai ir jų charakteristikos.

1.7 lentelė. *Amperometrinių D-fruktozės biojutiklių charakteristikos.*

Biojutiklio konstrukcija	EPT	Tiesinė dalis, mM	Jautris, $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	E_{darb} , V	Stabilumas
FDH ir mediatorius inkorporuoti į anglies pastą [80]	$\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$	0,2 – 20	15,0	0,1 vs Ag/AgCl	1 savaitė
FDH imobilizuota į polipirolu sluoksnį ant Pt elektrodo [81]	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	0,1 – 0,8	1,542	0,23 vs SCE	7 dienos
FDH imobilizuota ant Au elektrodo sudarant į membraną panašų sluoksnį [83]	Koenzimas Q_6	0,01 – 0,5	15,0	0,5 vs Ag/AgCl	-10 % per dieną
FDH ir mediatorius imobilizuotas ant 3-merkaptopropano rūgštimi modifikuoto Au elektrodo [83]	TTF	0,01 – 1	29,1	0,2 vs Ag/AgCl	33 dienos
FDH imobilizuota ant elektrodo pagaminto iš grafito-epoksi-tetracianochinodimetano kompozito [84]	TTF	0,01 – 0,3	7,1	0,15 vs Ag/AgCl	4 mėnesiai
FDH inkorporuota į anglies pastą [85]	–	0,5 – 10	$3,174 \text{ nA}\cdot\text{mM}^{-1}$	0,4 vs Ag/AgCl	10 h
FDH adsorbuota ant Ketjen'o juodosios anglis [86]	–	–	10 mA cm^{-2}	–	–

Kaip matoma iš aukščiau pateiktos lentelės antros kartos biojutikliuose yra naudojami EPT, tokie, kaip kalio heksacianoferatas (III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), TTF, osmio kompleksiniai junginiai ($\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$) ir kt. Tokio tipo D-fruktozės biojutiklių jautris svyruoja nuo 0,8 iki $29,1 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ [84, 87 – 92]. Tuo tarpu, trečios kartos/bereagentinių D-fruktozės biojutiklių, kuriuose nuo FDH aktyvaus centro ant elektrodo paviršiaus vyko TEP yra aprašyti vos keli atvejai [86, 93]. TEP vyksmui būtina sąlyga – teisinga FDH orientacija ant elektrodo paviršiaus t.y. šis fermentas į elektrodo paviršių turi orientuotis hemą *c* turinčiu subvienetu [94]. Šiame darbe buvo siekiama sukurti trečios kartos D-fruktozės biojutiklius, naudojant naujas anglines medžiagas, kurių paviršiuje yra išsidėsčiusios deguonies funkcinės grupės, dalyvaujančios tiek fermentų orientavimo, tiek ir elektronų pernašos procesuose.

Nesudėtingų, lengvai pritaikomų individualiems poreikiams biojutiklinių sistemų, registruojančių D-fruktozės koncentraciją kūrimas išlieka aktualus, kadangi pastaruoju metu, D-fruktozės kiekio nustatymas maisto produktuose bei gėrimuose tampa vis svarbesnis, kadangi dėl skirtingo D-fruktozės metabolizmo žmogaus organizme, lyginant su D-gliukoze, šio angliavandens perteklius organizme skatina riebalų kaupimąsi kepenyse ir kitose organuose bei audiniuose, ko pasekoje atsiranda kepenų sutrikimai, tokie kaip hepatitas ir kepenų cirozė [95]. Dar daugiau, didelis D-fruktozės kiekio suvartojamas (74 g per dieną) gali būti ir metabolinio sindromo, inkstų ligų, nutukimo, įvairias širdies ligų, atsparumo insulinui ir 2 tipo diabeto ar net vėžinių susirgimų, priežastis [96 – 100]. Taigi paprastas ir greitas šios analizės nustatymas maisto produktuose bei gėrimuose yra labai aktualus. Įprastai D-fruktozės nustatymui naudojama chromatografijos, spektrofotometrijos, elektroforezės bei titravimo metodikos [92, 101]. Dauguma šių metodų yra brangūs, sudėtingi ir reikalauja pradinio mėginio apdorojimo procedūrų bei gerai apmokyto personalo, kas didina analizės laiko ir kaštų sąnaudas [102]. Dėl šių priežasčių naujų, greitų ir paprastų D-fruktozės nustatymo metodų kūrimas yra vis dar aktualus.

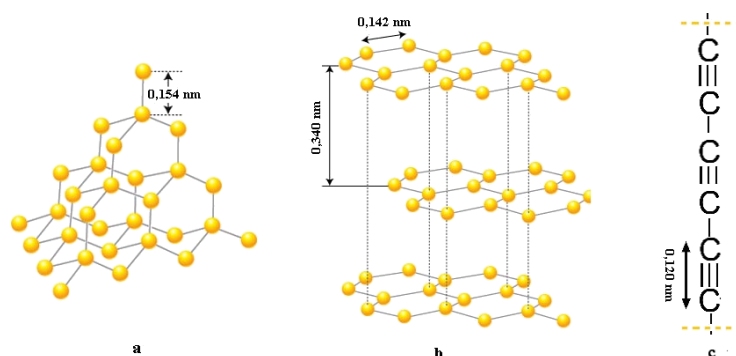
1.3.3.1 D-tagatozės nustatymo svarba

Panaudoti FDH D-tagatozės nustatymui būtų labai perspektyvu, kadangi D-tagatozė yra natūralus, mažai kaloringas saldiklis, kuris savo tekstūra labai panašus į sacharozę ir turi 92 % jos saldumo, tačiau D-tagatozės kaloringumas yra žymiai mažesnis ($7,3 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$) ir atitinka 38 % šio cukraus kaloringumo [103 – 105]. D-tagatozė 2001 Jungtinių Tautų maisto ir žemės ūkio organizacijos/Pasaulio sveikatos organizacijos pripažinta saugiu naudoti produktu. Šis cukrus pasižymi teigiamu poveikiu sveikatai: skatina svorio praradimą, daro minimalią įtaką cukraus ir insulino kiekiui kraujyje, pasižymi antioksidacinėmis ir prebiotinėmis savybėmis, mažina 2 tipo diabeto sukeltus simptomus [103, 106, 108]. Dėl šių savybių D-tagatozė gali būti naudojama maisto, gėrimų bei vaistų gamyboje, burnos priežiūros priemonių ir kosmetikos pramonėje [105, 107]. Deja, D-tagatozė yra retasis cukrus ir mažais kiekiais

randama *Sterculia setigera* dervoje, tam tikruose vaisiuose, bei termiškai apdorotuose produktuose tokiuose kaip sterilizuotas karvės pienas ar pieno milteliai, karštoje kakavoje, jogurtuose, sūriuose ir kituose pieno produktuose. Šiuose produktuose D-tagatozės kiekis yra mažas, o jos išgavimas brangus [105, 108]. Pramoniniu būdu D-tagatozė gali būti gaunama dviem būdais: cheminiu, naudojant kalcio katalizatorius [109], bei biocheminiu naudojant fermentą L-arabinozės izomerazę, kuri katalizuoja D-galaktozės (pieno pramonės pašalinis produktas) konversiją į D-tagatozę [110 – 112]. Nors FDH yra labai selektyvus D-fruktozei, darbo metu buvo norima patikrinti ar šis imobilizuotas fermentas katalizuoja ir retojo cukraus D-tagatozės oksidacijos reakciją.

1.4 Anglinės medžiagos ir jų savybės

Anglinėmis medžiagomis vadiname tokias medžiagas, kurių pagrindinė sudedamoji dalis yra elementinė anglis. Šiam elementui būdinga labai didelė cheminių junginių įvairovė; tai lemia anglies atomų gebėjimas jungtis tarpusavyje sudarant įvairios sudėties monomerinius, polimerinius ar kristalinius junginius. Šiuose junginiuose gali susidaryti sp^3 , sp^2 ar sp hibridizacijos anglies atomai bei atitinkamai viengubieji (C-C), dvigubieji (C=C) ir trigubieji (C≡C) ryšiai tarp jų. Iš tokios hibridizacijos anglies atomų sudarytos deimanto, grafito ir karbino struktūros pavaizduotos 1.7 paveiksle. Tai vienos iš seniausiai žinomų medžiagų, kurių cheminių ir fizikinių savybių skirtumas padėjo pagrindą anglies chemijos vystymuisi [113].



1.7 pav. Anglinių medžiagų struktūros: a – deimanto, b – grafito, c – karbino [114].

Tipiškos sp^2 hibridizacijos medžiagos yra fulerenai, anglinės nanodalelės (mažesni nei 10 nm nanokristalai sudaryti iš amorfinės anglies ar kristalinių klasterių), angliniai nanovamzdeliai, grafenas ir grafitas. sp^3 hibridizacijos anglinės medžiagos – deimantas ir jam giminingos struktūros (deimantiškosios dangos, nanodeimantai), o sp^1 – karbinas [115].

Anglinėms medžiagoms būdingos savybės:

- anglinės medžiagos yra lengvos, kadangi jas sudarantis pagrindinis elementas anglis yra mažos molekulinės masės [113];
- priklausomai nuo medžiagos struktūros ir anglis-anglis ryšio tipo anglinės medžiagos gali būti laidžios elektros srovei ar pasižymėti puslaidininkėmis, izoliacinėmis savybėmis (grafenas, angliniai nanovamzdeliai – puslaidininkiai, deimantas – izoliatorius). Daugumos sp^2 hibridizacijos anglinių medžiagų elektrinis laidumas yra anizotropinis – priklausantis nuo matavimo krypties pvz. elektrinis grafito laidumas anglies atomų šešiakampių plokštumoje yra $37 \cdot 10^6 \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$, o statmena šiai plokštumai kryptimi – $17 \cdot 10^1 \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$ [113];
- sp^2 hibridizacijos medžiagose šiluminis laidumas, kaip ir elektrinis priklauso nuo matavimo krypties pvz. išilgai VAV ašiai kryptimi yra gerai praleidžiama šiluma, o statmena ašiai kryptimi šiluma nepraleidžiama – izoliuojama. Tuo tarpu deimantas yra vienas geriausių šilumos laidininkų [113];
- Angliniai nanovamzdeliai ir grafenas yra vienos atspariausių gniuždymui ar tempimui medžiagų – VAV ir grafeno Young'o modulis apie 1 TPa, deimanto – 0,1 TPa [113];
- VAV ir deimantas yra kiečiausios žinomos medžiagos [113];
- anglinėms nanodalelėms, nanodeimantams bei kai kuriems anglinių nanovamzdelių ir grafeno dariniams yra būdingos fluorescencinės savybės (apšviestos medžiagos sugeria krintančius spindulius ir skleidžia didesnio bangos ilgio šviesą). Nemodifikuotų anglinių nanovamzdelių optinės savybės panašios į absoliučiai juodo kūno savybes, kadangi yra

stebima didelė šių medžiagų šviesos absorbcija (0,99 – 0,98 a. v.) plačiame bangos ilgių intervale [113, 115];

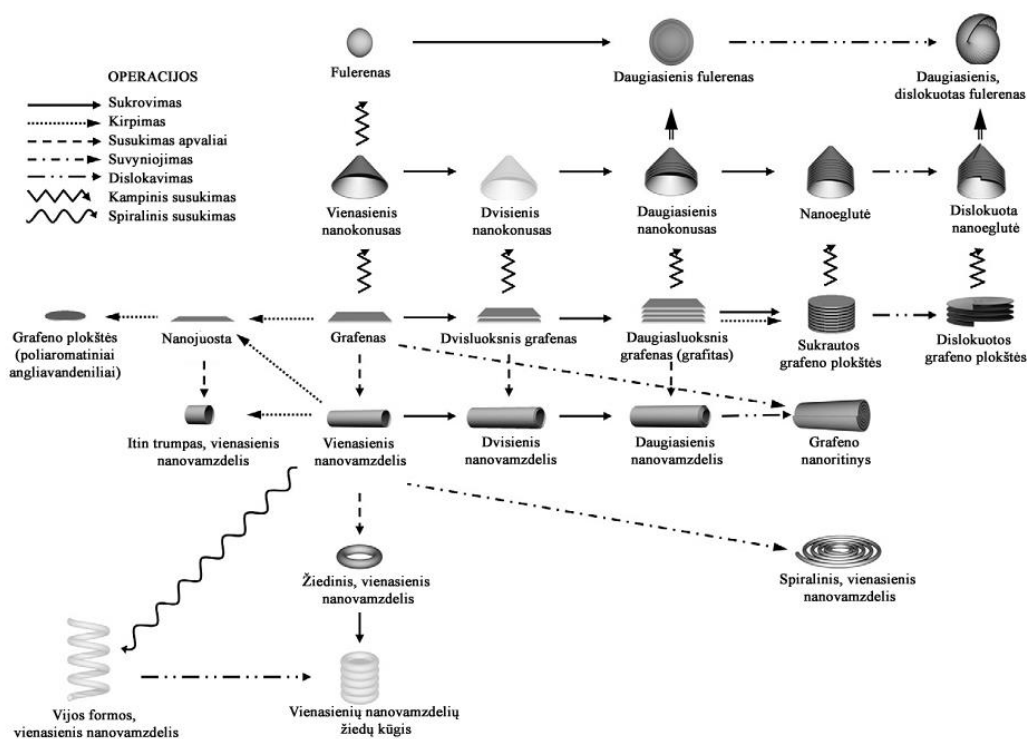
- Anglinės medžiagos – chemiškai stabilios;
- sp^2 hibridizacijos anglinės medžiagos yra gan lengvai modifikuojamos – nekovalentiškai arba kovalentiškai prijungiant tam tikrus junginius ar įvedant funkcines grupes. Tai labai keičia jų tirpumą, laidumą, hidrofobiškumą ir kitas fizikines bei chemines savybes [113, 116];
- grafitas ir deimantas yra netoksiškos medžiagos, o daugumos anglinių nanomedžiagų toksiškumas dar nėra ištirtas. Modifikuojant anglines medžiagas funkcinėmis grupėmis – toksiškumas didėja. Yra žinoma, kad anglies nanovamzdeliai gali sukelti ligas, panašias į tas, kuriomis suseraga asbesto plaušelių prisikvėpavę žmonės (plaučiuose sukelia uždegimą, formuoja randus gali būti net vėžio priežastis) [115, 117].

Sp^2 hibridizacijos anglinės medžiagos, dėl didelio paviršiaus ploto, tinkamo elektrinio laidumo, plačių potencialo ribų, greitos elektronų pernašos, biosuderinamumo ir lengvos modifikacijos funkcinėmis grupėmis ar biologinės kilmės medžiagomis yra labai perspektyvios kuriant biokuro elementus, elektrocheminius jutiklius ar biojutiklius [8 – 10, 118, 119].

1.4.1 sp^2 hibridizacijos anglinių medžiagų klasifikacija

Prieš kelis dešimtmečius atrastos dvi unikaliomis savybėmis pasižyminčios anglinės nanoformos – fullerėnai ir nanovamzdeliai sukėlė didelį susidomėjimą anglinėmis medžiagomis bei spartų nanotechnologijų vystymąsi. Tai paskatino naujų nanoformų, sudarytų iš sp^2 hibridizacijos anglies atomų, atradimą. Tokioms formoms, šiuo metu, priskiriami angliniai nanokonusai, bambukiniai ir spiraliniai nanovamzdeliai, kūginės formos struktūros, bei dar daug kitų nanodarinių [113, 120]. Esant tokiai didelei anglinių medžiagų įvairovei, atsiranda jų sisteminimo ir nomenklatūros problemos. Vien tik anglinių nanovamzdelių nomenklatūrai yra paskirta nemažai mokslinių publikacijų [121]. Pastarieji gali būti skirstomi į vienasienius ir daugiasienius, o papildomai pagal skersmenį ir susukto grafeno sluoksnio chiralumą (pvz.

„zigzago“ ar „kėdės“ struktūros) [122]. Taigi, vien tik anglinių nanovamzdelių asortimentas yra labai platus. Dar didesnė nomenklatūros problema atsiranda tuomet, kai nagrinėjame visus šiuo metu žinomus anglinius nanodarinius. Iki šiol suklasifikuoti šias anglines medžiagas buvo bandoma pagal jų sintezės sąlygas, fizikines savybes tokias kaip tankis, paviršiaus plotas ar net pagal tekstūrą. Šiuo metu plėtojamos klasifikacijos paremtos anglinių medžiagų morfologiniais, geometriniais skirtumais ir kaip vienos formos išvedamos iš kitų. Viena tokių pateikta 1.8 paveiksle.



1.8 pav. Iš grafeno sluoksnio gaunamos sp^2 hibridizacijos nanoformos [120].

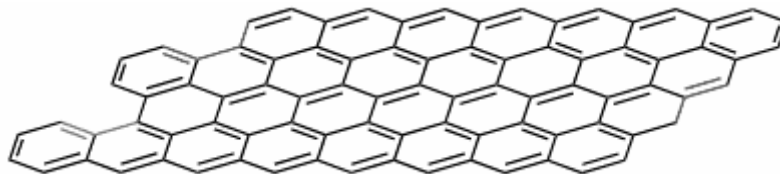
Iš 1.8 paveikslo matyti, kad visos nanoformos gaunamos atitinkamai sukraunant, iškerpant, susukant apvaliai, kampu ar spirale, suvyniojant ar net įvedant dislokacijas į grafeną ar kitus gautus nanodarinius. Pateikta sp^2 hibridizacijos anglinių nanodarinių klasifikacijos schema sudaryta naudojant medžiagų morfologinius skirtumus. Bandymų susintetinti kai kuriuos egzotinius šios medžiagų klasės atstovus iki šiol nėra daug [115]. Nors ši klasifikacija ir nėra be trūkumų, tačiau gana išsamiai atskleidžia visą egzistuojančią šių perspektyvių ir intensyviai tyrinėjamų medžiagų klasės įvairovę.

Šios klasifikacijos „kertinis akmuo“ grafenas – vienas grafito sluoksnis (žiūrėti 1.7 b paveikslą). Pastarasis yra dvimatė, vieno anglies atomo storio, plokščia struktūra [123]. Grafene sp^2 hibridizacijos anglies atomai glaudžiai susijungę į heksagoninį tinklą ir sudaro šešianarių, aromatinių žiedų sistemą. Iš 1.7 b paveikslo matoma kad grafene anglis-anglis ryšio ilgis siekia 0,142 nm [114]. Šiame darbe buvo tirtos anglinės medžiagos, kurios apima centrinę šios klasifikacijos dalį – nuo grafeno iki grafito.

1.4.2 Grafeno defektiškumas

Tobula kristalinė struktūra – tobulas kristalas hipotetiškai gali egzistuoti tik absoliutaus nulio temperatūroje. Realiose temperatūrose jau vien dėl atomų šiluminio judėjimo turime neidealias – defektiškas kristalines struktūras [124]. Be to baigtiniai kristalo matmenys padaro jį nebe idealiu – defektišku. Ne išimtis ir grafenas bei iš jo gaunamos struktūros. Pastarųjų cheminės, mechaninės, optinės, terminės bei elektroninės savybės priklauso nuo defektų koncentracijos ir prigimties [125, 126]. Todėl norint suprasti anglinių medžiagų struktūrą ir savybes būtina suprasti ir susidariusių defektų prigimtį bei daromą įtaką joms.

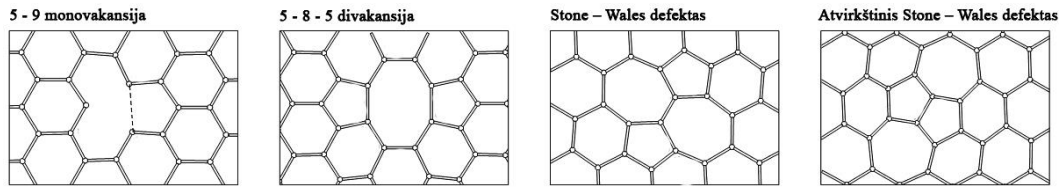
Šiame skyrelyje nagrinėsime grafeno lakšte egzistuojančius nuosavuosius (vidinius) defektus. Grafenas yra dvimatė kristalinė medžiaga [125]. Jo idealizuota struktūra pateikta 1.9 paveiksle. Grafenas nėra labai reaktingas, priklausomai nuo struktūrinių defektų koncentracijos ir grafeno lakšto dydžio cheminis aktyvumas gali kisti. Yra žinoma, kad grafeno sluoksnio briaunose esantys anglies atomai yra reaktingesni už plokštuminis, kadangi juose suardyta π konjuguota ryšių sistema ir yra sp^3 hibridizacijos anglies atomų [123, 127].



1.9 pav. *Idealizuota grafeno lakšto struktūra [123].*

Realioje grafeno struktūroje egzistuoja taškiniai ir linijiniai nuosavieji defektai. Taškiniai – 0D defektai, tai įvairios vakansijos ir įterptiniai atomai.

Vakansijos grafeno lakšte susidaro pasišalinus arba netaisyklingai tarpusavyje susijungus anglies atomams. Taip susidaro vakansijos, divakansijos, SW ir atvirkštiniai SW defektai grafeno sluoksnyje (1.10 pav.) [125, 126].



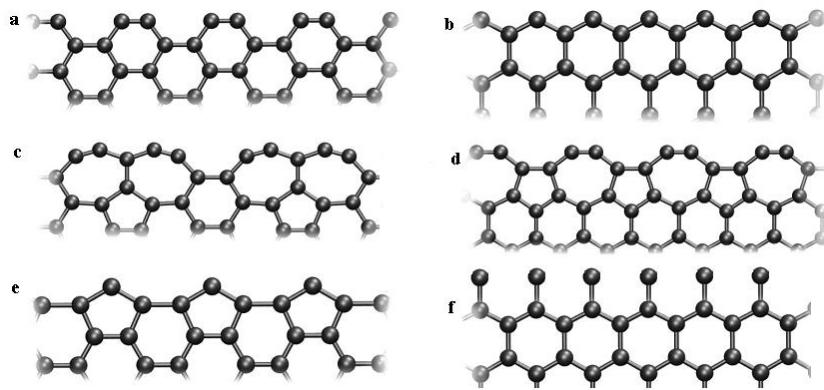
1.10 pav. Taškinių defektų struktūros [126].

Kaip matoma iš 1.10 paveikslo monovakansijos susidaro pasišalinus vienam anglies atomui iš kristalinės grafeno struktūros. Dėl to persitvarko trys anglis-anglis ryšiai atitinkamai susidarant penkiakampiui ir devyniakampiui angliniam žiedui – $V_1(5-9)$ taškinis defektas. Dviguba vakansija susidaro pasišalinus dviem anglies atomams iš grafeno struktūros arba sąveikaujant dviem $V_1(5-9)$ defektams. Taip gali susidaryti 1.10 paveiksle pavaizduota dviguba vakansija susidedanti iš dviejų penkiakampių ir vieno aštuonkampio anglinio žiedo – $V_2(5-8-5)$ taškinis defektas. Tai paprasčiausia struktūra galinti susidaryti praradus du anglies atomus, be jos gali susidaryti ir $V_2(555-777)$ ir $V_2(5555-6-7777)$ taškiniai defektai. SW ir atvirkštinis SW defektai yra paprasčiausi taškiniai defektai, kadangi jie susidaro ne taisyklingai susijungus anglies atomams, o nepraradus jų. Jiems susidarant nekinta grafeno struktūrą sudarančių atomų ar tarp jų esančių ryšių skaičius. Kaip matoma iš 1.10 paveikslo SW ir atvirkštinis SW defektai sudaryti iš dviejų penkiakampių ir dviejų septynkampių anglinių žiedų – SW(55-77) defektai [125, 126].

Kiti taškiniai defektai – anglies įtarpos atomai ant grafeno plokštumos nerandami, šie defektai egzistuoja tik trimačiuose kristaluose. Taip yra, kadangi susidarant tokiam atomui, ant grafeno plokštumos, turi pasikeisti grafeno plokštumoje esančių atomų hibridizacija iš sp^2 į sp^3 ir susidaryti du nauji kovalentiniai ryšiai su įterptiniu atomu. Tai yra energetiškai nenaudingas procesas. Be to, susidaręs atomas ant 2D grafeno plokštumos pradeda kurti trečiąją dimensiją [125].

dislokacijų vietose mažiakampės grūdelių ribos. Esant didelei (1,0) dislokacijų koncentracijai gali susidaryti didelio kampo grūdelių ribos, kaip pavaizduota 1.11 paveiksle f ir g variantuose. Tokiu atveju turėsime didelius grafeno plokštumos iškreipimus, o tai daro didelę įtaką elektroninėms grafeno savybėms [125, 126, 128, 129].

Kaip minėta anksčiau, grafeno lakštas yra baigtinio dydžio. Jo briaunose esantys anglies atomai gali būti laisvi arba prisijungę vandenilio atomą ar kitą funkcinę grupę. Galimas anglies atomų išsidėstymas grafeno briaunose pateiktas 1.12 paveiksle.



1.12 pav. Anglies atomų išsidėstymas grafeno briaunose. a – „kėdės“ formos, b – „zigzago“ formos, c – K(6-77), d – Z(5-7), e – K(5-6) ir f - Kleino struktūros grafeno briaunos [130].

Aišku, kad anglies atomai briaunose gali išsidėstyti „kėdės“ arba „zigzago“ forma (1.12 pav. a ir b) – tai tvarkingiausi ir mažiausi grafeno defektiškumą įtakojantys išsidėstymai. Taip pat gali susidaryti ir briaunos, kuriose yra lokalizuota po vieną anglies atomą, prie kiekvieno šešiakampio anglinio žiedo – Kleino struktūra (1.12 pav. f). „Kėdės“ formos briaunos gali rekonstruotis susidarant dviem septyniakampiams ir vienam penkiakampiui angliniui žiedui, tokia rekonstrukcija vyksta taip pat, kaip susidarant SW taškiniam defektams – gaunamas K(6-77) išsidėstymas (1.12 pav. c). Analogišku keliu rekonstruojasi ir „zigzago“ formos briaunos susidarant Z(5-7) anglinių žiedų išsidėstymui (1.12 pav. d). Tuo tarpu, K(5-6) briaunų susidarymas vyksta pašalinus vieną anglies atomą (jam difundavus į kitas grafeno defektiškas dalis) iš „kėdės“ formos briaunų (1.12 pav. e) [125, 126, 128]. Egzistuoja ir tarpiniai anglies atomų

išsidėstymai grafeno briaunose, kas didina jo defektiškumą ir netvarką struktūroje [125, 126].

1.4.2.1 Defektų įtaka grafeno elektrinėms savybėms

Defektų prigimtis ir skaičius labai įtakoja chemines, mechanines bei elektrines grafeno savybes [123, 125]. Anglinių medžiagų elektrinės savybės – laidumas bei greitas elektronų transportas yra vienos svarbiausių savybių norint jas pritaikyti elektrocheminių jutiklių ir biojutiklių gamyboje [8, 10]. Grafeno sluoksnyje, už elektrines savybes yra atsakinga π -konjuguotų ryšių sistema ir p_z molekulinės orbitalės. Defektų vietose ir aplink juos šios orbitalės yra pakitusios. Taip yra, kadangi, šiose vietose, tarp anglies atomų yra pakitę ryšių ilgiai, kas lemia s ir p orbitalių hibridizaciją. Dėl defektų susidarę nelygumai taip pat lemia šių orbitalių hibridizaciją. Funkcinės grupės ant grafeno plokštumos suardo π -konjuguotų ryšių sistemą, kuo labiau suardoma ši sistema tuo labiau pakinta p_z orbitalės, tuo elektrinis laidumas tampa mažesnis. Visi defektai sukelia elektroninių bangų sklaidą bei pakeičia elektronų keliavimo trajektoriją. Pašalinus defektus bei atkūrus π -konjuguotų ryšių sistemą atkuriamos ir anglinių medžiagų elektrinės savybės [123, 125].

1.4.3 sp^2 hibridizacijos anglinių medžiagų modifikacija

sp^2 hibridizacijos anglinės medžiagos modifikuojamos kovalentiškai arba nekovalentiškai prijungiant tam tikrus junginius ar funkcines grupes [131]. Kovalentiškai funkcinės grupės ar junginiai prijungiami, cheminių reakcijų metu, susidarant kovalentiniam ryšiui tarp anglinės medžiagos anglies atomų ir funkcinės grupės. Tuo tarpu junginiai turintys hidrofobines ar aromatinės dalis, adsorbuojasi ant anglinių medžiagų paviršiaus (nekovalentinis prijungimas). Šiuo būdu organiniais ir biologiniais junginiais (fermentais, ląstelėmis, antikūnais, nukleorūgštimis ir kt.) modifikuojamos sp^2 hibridizacijos anglinės medžiagos. Modifikacija labai keičia anglinių medžiagų fizikines bei chemines savybes tokias, kaip hidrofobiškumą, tirpumą, laidumą, toksiškumą bei cheminį reaktyvumą. Kaip žinoma, grafenas, angliniai nanovamzdėliai ir fulerenai yra

netirpios ar mažai tirpios vandenyje medžiagos, tačiau jas modifikavus hidrofilinėmis funkcinėmis grupėmis jų tirpumas didėja. Pavyzdžiui, priklausomai nuo funkcinų grupių kiekio angliniai nanovamzdeliai modifikuoti amino grupių turinčiomis karboksirūgštimis, dendritiniai fulereno dariniai bei grafeno oksidas yra tirpūs ar dalinai tirpūs vandenyje. Grafenas yra laidus elektrai, o grafeno oksidas (oksiduotas grafenas) – mažai laidus, kadangi suardyta jo π -konjuguotų ryšių sistema. Yra žinoma, kad anglinių medžiagų modifikacijos metu, didėjant funkcinų grupių kiekiui didėja ir šių medžiagų toksiškumas, kas yra labai nepageidautinas norint modifikuotas anglines medžiagas taikyti medicinos tikslams [116, 118, 132, 133].

Anglinių medžiagų oksidacija – vienas seniausiai žinomų modifikacijos metodų. Jau 1850 metais Oksfordo universitete anglų chemikas Benjaminas C. Brodie, grafitą veikdamas stipriai oksiduojančiu mišiniu (KClO_3 ir HNO_3) pirmą kartą susintetino GrO [134]. 1957 metais Hummers'as ir Offemanas pasiūlė saugesnį, greitesnį, bei daug efektyvesnį GrO sintezės metodą, naudojant H_2SO_4 , NaNO_3 ir KMnO_4 mišinį [135]. Šis metodas sulaukė didelio susidomėjimo, kadangi tai vienas pirmųjų žingsnių sintetinant ypač gryną, bedefektį grafeną ir kitas anglines nanoformas [123]. Be to, žinant kad oksidacijos metu susidariusios deguoninės funkcinės grupės geba dalyvauti EP [11] ir net nulemia TEP tarp fermento ir elektrodingo paviršiaus [12], šiame darbe, grafito oksidacija buvo pasirinkta, kaip modifikacijos metodas, siekiant gauti tinkamomis savybėmis pasižyminčias elektrodines medžiagas bereagentiniams biojutikliams.

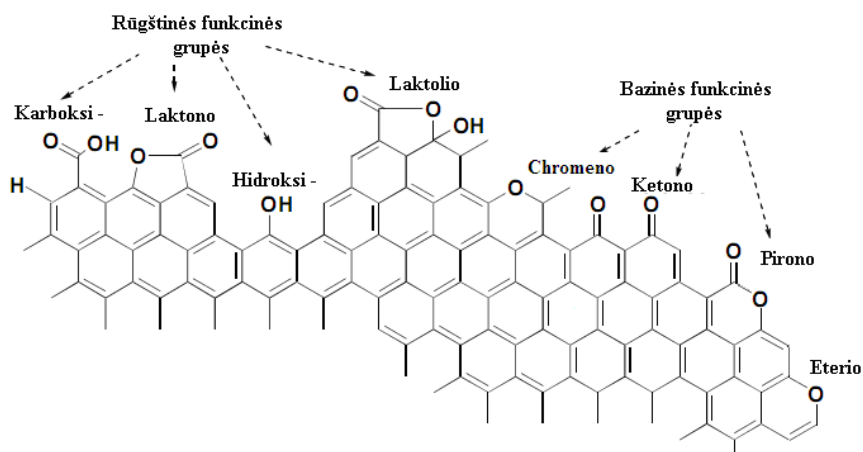
1.4.3.1 Oksidacijos metu susidariusios funkcinės grupės

Oksiduojant grafitą, grafeno briaunose ir plokštuminėje dalyje, kovalentiškai prijungiamos įvairios deguonies turinčios funkcinės grupės. Pastarųjų prigimtis ir kiekis labai priklauso nuo modifikacijos metodo bei gautų produktų apdorojimo būdo. Įvairių sintezių metu susidarę produktai, dėl skirtingo deguonies bei vandenilio kiekio savo paviršiuje, skiriasi spalva,

dispersiškumu, elektriniu laidumu, paviršiaus hidrofiliškumu bei kitomis anglinėms medžiagoms būdingomis savybėmis [136].

Oksiduojant anglines medžiagas, paviršiuje pradžioje susidaro hidroksigrupės ir nedideli kitų, deguonies turinčių grupių kiekiai. Vykstant tolesnei paviršiaus oksidacijai, susidaro chinono, karboksi ir laktono grupės. Atsiranda paviršiniai defektai. Dėl didesnio grafeno briaunų ir defektinių vietų reaktingumo, lyginant su plokštumine dalimi, šiose vietose aptinkama didesnė funkcinė grupių koncentracija [125].

Oksidacijos metu anglinių medžiagų paviršiuje gali susidaryti rūgštinės, bazinės ir neutralios (įvairūs alifatiniai segmentai) funkcinės grupės. Pagrindinės grupės, susidarančios anglinių medžiagų paviršiuje, pateiktos 1.13 paveiksle. Anglinės medžiagos su šiomis funkcinėmis grupėmis naudojamos įvairiuose jutikliuose, energijos kaupimo ir konversijos sistemose, katalizatoriuose bei absorbentuose [137, 138].



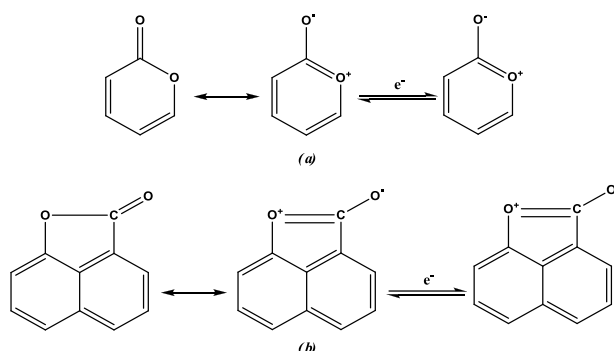
1.13 pav. Anglinių medžiagų paviršinės funkcinės grupės, turinčios deguonies ir vandenilio atomus [137].

Grafeno plokštumos labai stipriai veikia funkcinė grupių savybes. Pavyzdžiui, hidroksigrupės, prisijungusios prie aromatinių žiedų, įeina į tokius organinių junginių, kaip fenoliai ir hidrochinonai sudėtį, bet taip pat tokių grupių segmentai nustatyti ir anglinių medžiagų paviršiuje. Organinėms molekulėms yra būdingas diskretinis poliškumas, funkcinė grupių pK_a reikšmės yra griežtai apibrėžtos, o anglinių medžiagų poliškumas gali tolygiai kisti ir priklausyti nuo

aplinkos. Tai viena iš priežasčių, kuri paaiškina anglinių medžiagų nevienalytiškumą [137].

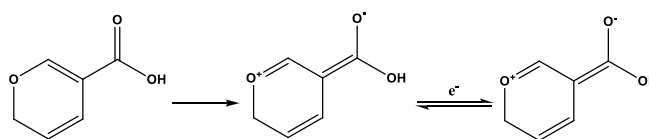
1.4.3.2 Funkcinių grupių dalyvavimas EP

Yra žinoma, kad kai kurios, deguonies turinčios funkcinės grupės gali dalyvauti elektronų pernašos procesuose. Anglinių medžiagų paviršiuje esančių pirono ir laktono funkcinių grupių dalyvavimas EP atvaizduotas 1.14 paveiksle [139, 140].



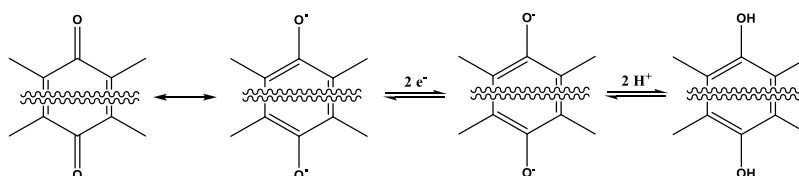
1.14 pav. Elektronų pernašos procesai pironuose (a) ir laktonuose (b).

Nedisocijavę laktonai dalyvauja vieno elektrono pernašos procese, esant $\text{pH} < 7$. Bazių tirpaluose laktono žiedai suyra [139] ir gali susiformuoti karboksigrupės. Pastarosios sąveikaudamos su kitomis funkcinėmis grupėmis, taip pat dalyvauja vieno elektrono pernašos procesuose, kas parodyta 1.15 paveiksle.



1.15 pav. Elektronų pernaša karboksigrupėse.

Anglinių medžiagų paviršiuje aptinkamos chinoninės funkcinės grupės lengvai redukuojasi į hidrochinonus, kurie gali oksiduotis iki chinonų taip pernešant du protonus ir du elektronus. Chinonų ir hidrochinonų redokso reakcijos pavaizduotos 1.16 paveiksle.



1.16 pav. *Chinonų ir hidrochinonų oksidacija ir redukcija.*

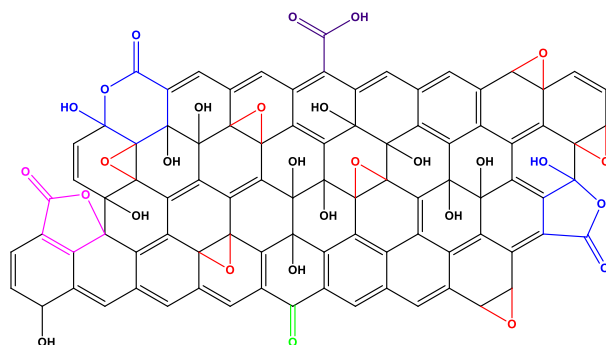
Elektronų pernaša ant anglinių medžiagų paviršiaus yra labai svarbi tiriant procesus, vykstančius amperometriniuose biojutikliuose. Šiose sistemose anglinių elektrodų paviršiuje esančios funkcinės grupės ne vien tik sąveikauja (orientuoja) fermentus, bet ir padeda jiems regeneruotis [25] kas, greičiausiai, ir apsprendžia TEP nuo biomolekulės ant elektrodinės medžiagos paviršiaus. Šis TEP faktas fermentinėse sistemose su grafito oksidacijos produktais yra labai svarbus ir žinomas tik keliuose dešimtyse atvejų [25, 141].

1.4.3.3 Grafito oksidas

Kaip minėta 2.4 skyriuje GrO yra gaunamas grafitą veikiant stipriai oksiduojančiu mišiniu. Šios oksidacijos metu gaunamas junginys sudarytas iš įvairiais santykiais pasiskirsčiusių anglies, deguonies ir vandenilio atomų [142]. GrO savitasis elektrinis laidumas siekia $4,08 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$, ir yra gerokai mažesnis už grafito ($27 \cdot 10^6 \text{ S m}^{-1}$) matuojant lygiagrečiai grafeno plokštumai. Taip yra dėl oksidacijos metu π -konjuguotų ryšių sistemos suardymo grafeno sluoksniuose [123]. GrO pasižymi hidrofilinėmis savybėmis, todėl jis lengvai disperguojamas vandenyje, kur grafeno lakštų dydis gali siekti apie 1 μm , o storis apie 1 nm. Dėl susidarančių didelių micelių, GrO tirpumas vandenyje ir kitose tirpikliuose yra sąlyginis [123].

Maksimaliai oksidavus grafitą gaunami geltonos spalvos GrO milteliai, kur anglies ir deguonies santykis yra tarp 2,1 : 1 ir 2,9 : 1. Tokį anglies ir deguonies santykį turintys grafito oksidacijos produktai išlaiko sluoksniuotą struktūrą, kurios pagrindą sudaro grafeno oksido sluoksniai [142]. GrO tarp sluoksnių dydis kinta nuo 6 iki 12 Å priklausomai nuo hidratacijos laipsnio, nes vandens molekulės įsiterpia arba pasiskirsto tuščiose tarp sluoksnių vietose taip praplėsdamos juos [143]. Nepaisant to, kad GrO pirmą kartą susintetintas daugiau nei prieš šimtą metų, jo struktūra dar iki šiol yra galutinai nesuprasta. Egzistuoja daugybė GrO struktūros modelių, keletas jų-Hofmano, Rueso, Scholzo-Boehmo, Lerfo-Klinowsko ir Dekany modeliai. Iki šiol nė vienas iš šių modelių neaprašo tikslios GrO struktūros [144, 145]. 1.17 paveiksle pateiktas

GrO monosluoksniu – grafeno oksido struktūros modelis, parengtas naujausių tyrimų duomenimis.



1.17 pav. Grafeno oksido struktūros modelis.

Grafeno oksido sluoksnyje egzistuoja dviejų tipų sritys – aromatinė ir alifatinė. Aromatinėje srityje yra susitelkusi neoksiduotų benzeno žiedų sistema. Alifatinėje srityje – lokalizuoti šešianariai alifatiniai cikliniai žiedai. Šių dviejų sričių santykis ir dydžiai priklauso nuo medžiagos oksidavimo laipsnio. Aromatinės srities konjuguota π ryšių sistema ir alifatinėje dalyje esantys dvigubieji ryšiai bei epoksigrupės palaiko plokščią, grafenui būdingą-struktūrą. Prie anglies atomo prisijungusi hidroksigrupė dėl jai būdingos tetraedrinės konfigūracijos sukelia nedidelius plokščios struktūros iškraipymus, o šio proceso padarinys – nelygumų atsiradimas grafeno oksido sluoksnyje. Dėl didelio reakingumo, pavienių dvigubų ryšių (C=C) koncentracija GO sluoksnyje yra labai maža [134].

Grafeno briaunose esantys anglies atomai yra aktyvesni už plokštuminius anglies atomus, todėl briaunose randama įvairesnių funkcinių grupių. Briaunose gali susidaryti karboksi-, hidroksi-, epoksi-, karbonilgrupės, γ - ir δ - laktonai, esteriai, chinonai ir ketonai. Jei karboksi- ir tretinio alkoholio grupė yra greta tai šios grupės gali sureaguoti ir sudaryti esterius, taip pat karboksi grupės gali dalyvauti laktonų susidarymo procesuose ant GrO sluoksniu paviršiaus [142, 134].

Plokštuminėje GrO lakšto dalyje daugiausia aptinkama, viena nuo kitos nutolusių, hidroksi – ir epoksigrupių. Šių funkcinių grupių daugiausia aptinkama grafeno oksido sluoksnyje. Funkcinių grupių pasiskirstymas prie kiekvieno

anglinio žiedo nėra identišką, kadangi aromatinė bei alifatinė sritys GrO lakšte taip pat pasiskirsto atsitiktinai [142, 134].

Hidroksi – ir epoksigrupės įtakoja GrO struktūrą, kadangi jos sudaro vandenilinius ryšius su vandens molekulėmis lygiagrečiuose grafeno sluoksniuose. Taip H₂O molekulės yra „surakinamos“ ir „įkalinamos“ GrO tarp sluoksniuose [142]. Be vandenilinių ryšių grafeno oksido sluoksnius tarpusavyje palaiko ir silpnosios Van der Waalso sąveikos jėgos. Tačiau, dėl padidėjusio tarplokštuminio atstumo (nuo 3,4 Å grafite iki > 6 Å GrO) šios jėgos tarp grafeno oksido lakštų yra daug silpnesnės, nei grafito atveju tarp grafeno lakštų [146].

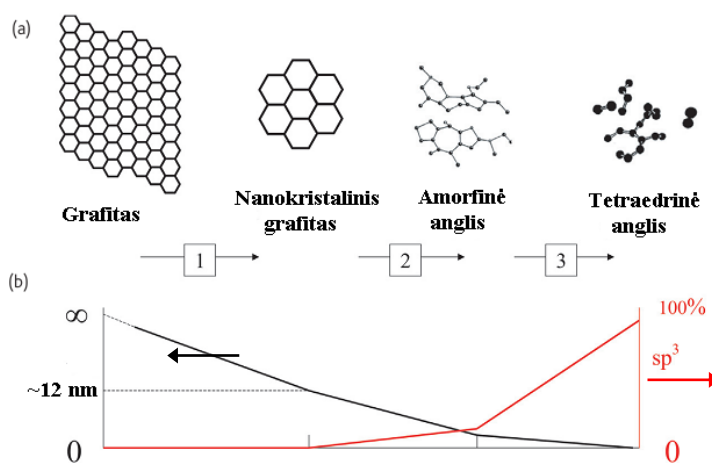
1.4.3.4 Terminiškai redukuotas grafito oksidas

GrO, dėl didelio funkcinių grupių kiekio ir tuo pačiu suardytos π -konjuguotų ryšių sistemos, pasižymi didele elektrine varža (yra izoliatorius) ir dideliu hidrofiliškumu (beveik tirpus vandenyje) [142, 147]. Dėl šių savybių GrO panaudojimas amperometrinių bereagentinių biojutiklių kūrime yra ribotas. Elektrinis laidumas gali būti atstatytas, atstačius π -konjuguotų ryšių sistemą – pašalinus deguonines funkcines grupes nuo grafeno oksido paviršiaus. Šios grupės gali būti pašalinamos redukuojant GrO, taip susidarant redukuotam grafito/grafeno oksidui, kurio laidumas yra nuo 4 iki 6 eilių didesnis nei GrO [147]. GrO gali būti redukuojamas cheminės, elektrocheminės ir terminės redukcijos būdais [142]. Terminė GrO redukcija yra pats paprasčiausias ir efektyviausias π -konjuguotų ryšių sistemą atstatantis redukcijos metodas [147]. Terminės GrO redukcijos metu GrO yra laikomas aukštoje temperatūroje (~1000 °C), inertinėje aplinkoje, kurioje nuo GrO paviršiaus CO ir CO₂ pavidalu, atsiskyla deguoninės funkcinės grupės. Susidaręs didelis CO ir CO₂ slėgis (apie 130 MPa) tarp GrO lakštų padeda jiems atsiskirti – mažėja GrO kristalitai [148]. Siekiant gauti aukštos kokybės terminiškai redukuotą grafito oksidą, GrO redukcija turi vykti „terminio šoko“ sąlygomis, kurioms esant pasiekiamas greitas dujų išsiskyrimas ir efektyvus grafeno oksido lakštų atsiskyrimas [148]. Lyginant su GrO, TRGrO pasižymi daug didesniu paviršiaus plotu, geresniu laidumu, bei

mažesniu hidrofiliškumu, o jo paviršiuje yra išsidėstęs nedidelis kiekis deguoninių funkcinų grupių [142, 149]. Šios savybės, padaro TRGO, labai patrauklų amperometrinių bereagentinių sistemų kūrimui.

1.4.4 sp^2 hibridizacijos anglinių medžiagų amorfizacija

Grafito oksidacijos bei GrO redukcijos metu yra ardamos silpnosios Van der Waalso sąveikos jėgos tarp grafeno (grafeno oksido) sluoksnių [150]. Toks procesas vadinamas amorfizacija, t.y. šio proceso metu ne tik smulkėja grafito (grafito oksido) kristalitai, bet ir padidėja grafeno (grafeno oksido) lakštų defektiškumas – atsiranda sp^3 hibridizacijos anglies atomų [151]. Grafito amorfizacijos trajektorija pateikta 1.18 paveiksle.



1.18 pav. Grafito amorfizacijos trajektorija. a – susidariusių anglinių medžiagų struktūra, b – anglinių medžiagų dydžio (dešinėje) ir sp^3 hibridizacijos anglies atomų skaičiaus kitimas (kairėje)[151].

Grafito amorfizacijos procesą galime suskirstyti į tris etapus: 1 – nanokristalinio grafito susidarymas iš grafito, 2 – amorfinės anglies susidarymo iš nanokristalinio grafito ir 3 – tetraedrinės anglies susidarymas. Visos amorfizacijos metu susidariusios medžiagos skiriasi sp^2 ir sp^3 hibridizacijos anglies atomų santykiu t. y. vykstant šiam procesui mažėja sp^2 ir daugėja sp^3 hibridizacijos anglies atomų. Amorfizacijos procesas ir susidariusių anglinių medžiagų dydžio kitimas pateiktas 1.18 paveiksle. Nanokristaliniu grafitu vadiname darinius, kurių diametras vidutiniškai siekia 12 nm, šiame junginyje

dominuoja sp^2 hibridizacijos anglies atomai. Amorfinė anglis – anglinė medžiaga, kurioje įvairiais santykiniais pasiskirstę sp^2 ir sp^3 hibridizacijos anglies atomai. Nuo skirtingos hibridizacijos anglies atomų santykio priklauso ir amorfinės anglies savybės. Tetraedrinėje amorfinėje anglyje dominuoja sp^3 hibridizacijos anglies atomai, dėl ko ši medžiaga kartais vadinama deimanto tipo [151].

Grafitą, vandeninėje terpėje, veikiant ultragarsu (sonifikuojant) yra stebimas į amorfizaciją panašus efektas: smulkėja grafito kristalitai ir didėja grafenų lakštų defektiškumas. Nuo ultragarso intensyvumo ir veikimo laiko priklauso, kokio dydžio ir defektiškumo gausime anglinius darinius. Ilgai ir intensyviai sonifikuojant grafitą galime gauti net organines molekules [152].

2 DARBO METODIKA

2.1 Naudotos medžiagos

Fermentai: tirpi gliukozės dehidrogenazė iš *Acinetobacter calcoaceticus* L.M.D 79. 41 (E.C.1.1.5.2) išskirta naudojant A. J. A. Olsthoorn ir J. J Duine metodą [153] (VU GMC BchI Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyrius); ureazė išskirta iš *Canavalia ensiformis* EC. 3.5.1.5 (Sigma, JAV); D-fruktozės dehidrogenazė išskirta iš *gluconobacter industrius*, EC. 1.1.99.11 (Sigma, JAV); lakazė išskirta iš *Coriopsis byrsina* EC. 1.10.3.2 pagal literatūroje [154] pateiktą protokolą (VU GMC BchI Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyrius); termofilinė L-arabinozės izomerazė išskirta iš *Geobacillus lithuanicus* 52 (VU GMC BchI Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyrius).

Reagentai ir priemonės: Grafitas, dalelių dydis $\geq 50 \mu\text{m}$, 99,5 % (Merck KGaA, Vokietija); grafito strypeliai, 3 mm diametro, 99,995 % (Sigma, JAV); amorfinė anglis Raven M (Columbian Chemicals Co, JAV); vandenilio peroksidas, H_2O_2 , 30 % (Sigma-Aldrich, Vokietija); kalio permanganatas, KMnO_4 , $\geq 99,0$ % (Sigma-Aldrich, JAV); natrio nitratas, NaNO_3 , 99 % (Merck KGaA, Vokietija); kalio heksacianoferatas (III), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (PEAXИM, Rusija); kalio hidroksidas, KOH (Chempur, Lenkija); sieros rūgštis, H_2SO_4 , 95,0 – 98,0 % (Sigma-Aldrich, Vokietija); druskos rūgštis, HCl , 36,5 – 38,0 % (Sigma, Vokietija); polivinilo alkoholis (PVA) (Sigma-Aldrich, JAV), polietileniminas (PEI) (Sigma-Aldrich, JAV); jaučio serumo albuminas (BSA angl. Bovine serum albumin), V frakcija (Merck KGaA, Vokietija); tritonas X-100 (Sigma-Aldrich, JAV); glutaro aldehidas, 25 % (Merck KGaA, Vokietija); kalio persulfatas, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, $\geq 99,0$ % (Sigma-Aldrich, Vokietija); fosforo pentoksidas, P_2O_5 , 99 % (Sigma-Aldrich, Indija); natrio hidroksidas, NaOH , gr. (Penta, Čekija); natrio karbonatas, Na_2CO_3 , gr. (Reaxim, Rusija); natrio hidrokarbonatas, NaHCO_3 , gr. an. (Sigma-Aldrich, Vokietija); azotas, N_2 (Elme Messer, Lietuva); argonas, Ar (Elme Messer, Lietuva); D-tagatozė (AppliChem, Vokietija); D-galaktozė, $\geq 98,0$ % (Merck KGaA, Vokietija); D-

gliukozė, $\geq 99,5$ % (Sigma, Prancūzija); D-fruktozė, $\geq 98,0$ % (Fluka, Izraelis); karbamidas, $\geq 99,0$ % (Sigma-Aldrich, Vokietija); kalio chloridas, KCl, $\geq 99,0$ % (Sigma-Aldrich, Ispanija); natrio acetatas, CH₃COONa (Merck KGaA, vokietija); kalio dihidrofosfatas, KH₂PO₄, $\geq 98,0$ % (Sigma, Japonija); natrio hidrofosfatas, Na₂HPO₄, $\geq 99,0$ % (Sigma-Aldrich, Vokietija); citrinos rūgštis (Carl Roth, Vokietija); kalcio chloridas, CaCl₂ (Lachema, Čekija); pusiau pralaidi terileno plėvelė, storis 12 μm, porų diametras 0,4 μm (Joint Institute of Nuclear Research, Rusija), SEM laidai, lipni dvipusė anglinė juostelė, 8 mm pločio (Science Services, Vokietija).

Tirpalai: 0,05 M acetatinis buferinis tirpalas turintis 10 mM CaCl₂ ir 10 mM KCl, pH 6; 0,02 M fosfatinis buferinis tirpalas turintis 10 mM KCl, pH 7,2; kalio fosfatinis (K-fosfatinis) buferinis tirpalas, pH 7,5; McIlvaino buferinis tirpalas, pH 4,5 [155]; 10 mM ir 100 mM D-gliukozės tirpalai paruošti acetatiniame buferiniame tirpale; 1 M karbamido tirpalas paruoštas fosfatiname buferiniame tirpale; 1 M D-fruktozės, D-tagatozės ir D-galaktozės tirpalai paruošti McIlvaino ir K-fosfatiniuose buferiniuose tirpaluose; 3 M KCl, 0,1 ir 0,01 M NaOH, 0,1 ir 0,01 M Na₂CO₃, 0,1 ir 0,01 M NaHCO₃, 0,1 M ir 0,01 M HCl vandeniniai tirpalai paruošti distiliuotame H₂O.

2.2 Naudota aparatūra

Elektroninės svarstyklės, PCB 200 – 3 (BERN & Sohn GmbH, Vokietija); magnetinė maišyklė, HI 300N (HANA instruments, Vokietija); ultragarsinis disintegratorius, (VCX 130PB, SONYCS Vibra cell, JAV); purtyklė, KS 130 (IKA, Vokietija); Boehmo titravimo įranga (surinkta VU ChGf Anglinių medžiagų laboratorijoje); GrO ir GO terminės redukcijos įranga (surinkta VU ChGf Anglinių medžiagų laboratorijoje); vamzdinė kaitinimo krosnis COYΛ 0,25.1.1/12 (Rusija); programuojamas temperatūros reguliatorius Omron E5CK-T (Japonija); dujų srauto reguliavimo įranga Omega FMA5400/FMA 5500 (Vokietija); potenciostatas, PARSTAT 2273 (Princeton Applied Research, JAV); pH-metras, modes 220 (Denver instruments, JAV); Atominės jėgos mikroskopas, D3100/Nanoscope IVa (Veeco Instruments Inc., JAV);

mikropipetės, 0,5 – 10 μl , 20 – 200 μl , 500 – 5000 μl (Eppendorf research, JAV); elektrocheminė celė su palyginamuoju, pagalbinu ir darbinu elektrodais (pagaminta VU GMC BchI mechaninėse dirbtuvėse); konfokalinis Ramano spektrometras/mikroskopas su 600 įbrėž./mm difrakcine gardele ir skystu N_2 šaldomu CCD detektorium, LabRam HR800 (Horiba JobinYvon, JAV); termogravimetrinės analizės įranga, Pyris 1, Clarus 600 T MS (Perkin-Elmer, JAV); BET analizatorius, TriStar II 3020 (Micrometrics, JAV); SEM SU70 (Hitachi, JAV); organinių medžiagų elementinės sudėties analizatorius Flash 2000, CHNS/O serija (Thermo Scientific, JAV); piltinio tankio matavimo įranga (surinkta VU ChGf Anglinių medžiagų laboratorijoje); Rentgeno spindulių difraktometras D8 Advance su $\text{Cu K}\alpha$ spinduliuotės šaltiniu ($K_{\alpha 1} = 1.54056\text{\AA}$) (Bruker AXS, JAV).

Duomenys apdoroti OriginPro 8.0, Microsoft Office Excel ir Scanning Probe Image Processor 5.1.2 (free trial version from <http://www.imagemet.com>, Image metrology, DK) programomis.

2.3 sp^2 hibridizacijos anglinių medžiagų sintezė

2.3.1 Grafito oksido ir grafeno oksido sintezė

Grafito oksido sintezė. Grafito oksido sintezė buvo atliekama pagal [13] literatūroje aprašytą Hummers'o ir Offemano metodiką. Maišant bei šaldant ledu į kūginę kolbą supilama 115 ml koncentruotos H_2SO_4 . Į ją lėtai (mažomis porcijomis) pridedama 2,5 g NaNO_3 ir 5 g grafito. Į paruoštą mišinį lėtai beriama 15 g KMnO_4 . Proceso metu buvo stebima, kad temperatūra neviršytų $20\text{ }^\circ\text{C}$. Vėliau reakcijos mišinys pakaitinamas iki $35\text{ }^\circ\text{C}$ ir tokioje temperatūroje išlaikomas 30 min, po to lėtai praskiedžiamas 230 ml distiliuoto H_2O ir į gautą suspensiją pilamas 30 % H_2O_2 , kol bendras reakcijos mišinio tūris pasiekia 700 ml. Atlikus visas operacijas susidaręs grafito oksidas filtruojamas per vakuuminį filtrą ir praplaunamas iki neutralios terpės distiliuotu vandeniu. Gautas produktas iš pradžių džiovinamas ore, o po to vakuume. Toliau šios oksidacijos metu gautą produktą žymėsime **GrO**.

Grafeno oksido sintezė. Siekiant gauti grafeno oksidą savo paviršiuje turintį didelį kiekį deguonies funkcinių grupių, sintezė buvo atliekama pagal metodiką aprašytą [156]. Pagal šią metodiką pirma buvo paruošiamas tarpinis grafeno oksido produktas: į 600 mL kūginę kolbą supilama 24 mL konc. H_2SO_4 , po to lėtai beriama 5 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ir 5 g P_2O_5 . Vandens vonioje, stiklinė su mišiniu pakaitinama iki 80 °C temperatūros. Pasiekus šią temperatūrą lėtai suberiama 6 g grafito miltelių. Paruoštas mišinys 4,5 valandas laikomas 80 °C temperatūroje. Po to atvėsinamas iki kambario temperatūros ir skiedžiamas 1,0 L distiliuoto H_2O , bei paliekamas parai. Atlikus visas operacijas, susidaręs tarpinis produktas nufiltruojamas ir plaunamas iki neutralios terpės distiliuotu H_2O bei džiovinamas ore. Paruoštas produktas toliau oksiduojamas pagal Hummers'o metodika: į 600 mL kūginę stiklinę įpilama 240 mL koncentruotos H_2SO_4 , kuri, maišant ledo vonioje, atšaldoma iki 3 °C. Į atšaldytą H_2SO_4 , mažomis porcijomis suberiami 3 g NaNO_3 ir išdžiovinto tarpinio produkto. Po 10 min, į paruoštą mišinį lėtai suberiama 30 g KMnO_4 . Viso proceso metu temperatūra neturi viršyti 20 °C. Po to stiklinė su mišiniu paliekama 3 paras stovėti kambario temperatūroje. Praėjus nurodytam laikui reakcijos mišinys pakaitinamas iki 35 °C. Pasiekus šią temperatūrą per 30 min mišinys praskiedžiamas 276 mL distiliuoto H_2O . Stebima, kad temperatūra neviršytų 70 °C. Vėliau karšta suspensija laikoma 15 min 70 °C temperatūroje. Atlikus visus veiksmus suspensija skiedžiama distiliuotu H_2O , kad bendras reakcijos mišinio tūris padidėtų iki 840 mL, po to, maišant lėtai, supilama 20 mL, 30 % H_2O_2 . Gautos, karštos nuosėdos nufiltruojamos ir praplaunamos 600 mL, 10 % HCl . Vėliau nuosėdos plaunamos centrifuguojant (centrifugavimo greitis 4500 rpm) iki neneutralios terpės. Toliau šios oksidacijos metu gautą produktą žymėsime **GO**.

2.3.2 Grafito oksidacijos produktų sintezės

Sintezė šarminėje vandenilio peroksido terpėje. Ši sintezė buvo atliekama, norint gauti didesnę deguoninių funkcinių grupių asortimentą grafeno plokštumoje. Sintezei buvo naudojama skirtingo dydžio grafito dalelės.

Pirmuoju atveju maišant ir šaldant paruošiama 50 ml sotaus KOH tirpalo vandenilio peroksido (20 g KOH + 25 ml H₂O₂). KOH į H₂O₂ beriamas lėtai. Paruošus tirpalą, toliau šaldant bei maišant ledo vonelėje, atsargiai į tirpalą suberiami 5 g grafito miltelių. Viso proceso metu temperatūra turi neviršyti 5 °C. Sudėjus grafitą reakcijos mišinys paliekamas dviems savaitėms 0 °C temperatūroje, po to nuosėdos nufiltruojamos ir plaunamas distiliuotu vandeniu iki neutralios terpės. Gautas produktas džiovinamas ore. Toliau šios oksidacijos metu gautą produktą žymėsime **GOP1**.

Antruoju atveju pirma buvo paruošiama grafito suspencija vandenyje: į 25 ml H₂O suberiama 5 g grafito miltelių, gauta suspencija veikiama ultragarsu (sonifikuojama) 10 valandų. Paruoštas mišinys lėtai supilamas į 100 ml sotaus KOH tirpalą vandenilio peroksido. Toliau sintezė atliekama taip, kaip nurodyta pirmajame variante. Toliau šios oksidacijos metu gautą produktą žymėsime **GOP2**.

Sintezė, oksidatoriumi naudojant kalio heksacianoferatą (III) (K₃[Fe(CN)₆]). K₃[Fe(CN)₆] yra žinomas, kaip geras oksidatorius, ypač efektyviai veikiantis šarminėje terpėje [157]. K₃[Fe(CN)₆] pagalba buvo oksiduojama skirtingo dydžio grafito dalelės.

Pirmuoju atveju maišant ir šaldant ledo vonelėje buvo paruošiama 50 ml sotaus KOH tirpalo vandenyje (20 g KOH + 25 ml H₂O). Į paruoštą KOH tirpalą atsargiai suberiama 5 g grafito. Reakcijos mišinys ledo vonelėje atšaldomas iki 0 °C temperatūros ir į jį lėtai suberiama 15 g K₃[Fe(CN)₆]. Viso proceso metu temperatūra turi neviršyti 5 °C. Po atliktų veiksmų, reakcijos mišinys paliekamas trimis savaitėms, minusinėje temperatūroje. Po to nuosėdos nufiltruojamos ir plaunamos distiliuotu H₂O iki neutralios terpės. Gautas produktas džiovinamas ore. Toliau šios oksidacijos metu gautą produktą žymėsime **GOP3**.

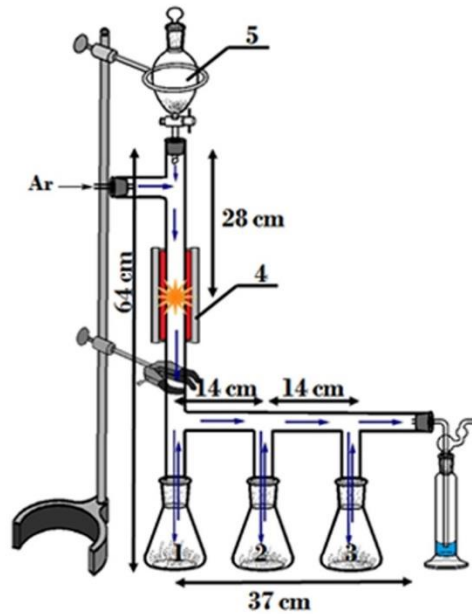
Antruoju atveju pirma buvo paruošiama grafito suspencija vandenyje: į 25 ml H₂O suberiama 5 g grafito miltelių, gauta suspencija sonifikuojama 10 valandų. Į paruoštą suspensiją pridedama 20 g KOH. Toliau sintezė vykdoma, kaip nurodyta pirmuoju atveju. Toliau šios oksidacijos metu gautą produktą žymėsime **GOP4**.

Fermentinė oksidacija, oksidatoriumi naudojant fermentą lakazę išskirtą iš *Coriolopsis byrsina*. Lakazė išskirta iš *Coriolopsis byrsina* aktyviajame centre, turi keturis vario atomus ir katalizuoja aromatinių ir nearomatinių junginių oksidacijos reakciją, naudojant molekulinę deguonį [158]. Darbo metu, 14 mg grafito buvo sumaišyta su 10 μ l lakazės ($14370 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) ir 10 μ l fosfatinio buferinio tirpalo pH 4,2. Gautas mišinys laikytas 24 valandas $15 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje. Po to nuosėdos nufiltruojamos ir plaunamos iki neutralios terpės. Išplautos nuosėdos kaitinamos 5 min $50 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje. Šios oksidacijos metu gautą produktą žymėsime **GOP5**.

2.3.3 Grafito ir grafeno oksido terminė redukcija

GrO terminė redukcija. Terminė redukcija yra vienas iš metodų naudojamas atstatyti, oksidacijos metu, suardytų π -konjuguotų ryšių sistemą. Siekiant termiškai redukuoti grafito oksidą, 5 g GrO 1 valandą buvo laikomi argono (Ar) sraute ($60 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) horizontaliai pritvirtinto kvarcinio vamzdžio centre. Po to 1 valandos GrO buvo kaitinamas (redukuojamas) $800 - 900 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje, esant $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ Ar srautui. Praėjus nustatytam laikui redukuotas GrO atvėsintas iki kambario temperatūros esant pastoviam $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ Ar srautui. Šio proceso metu gautą termiškai redukuotą grafito oksidą toliau žymėsime **TRGrO**.

GO terminė redukcija. Siekiant įgyvendinti „terminio šoko“ sąlygas VU ChGf Anglinių medžiagų laboratorijoje (kartu su prof. HP dr. Jurgiu Barkausku ir dokt. Justina Gaidukevič) buvo sukonstruota vertikalioji terminė grafeno oksido redukcijos ir frakcionavimo sistema. Ši sistema leido surinkti tris skirtingomis savybėmis pasižyminčias termiškai redukuoto GO frakcijas: **TRGO1, TRGO2** ir **TRGO3**. Sukonstruotos aparatūros schema pateikta 2.1 paveiksle.



2.1 pav. Grafeno oksido terminės redukcijos ir frakcionavimo sistema (1 – vieta kur surenkama TRGO1 frakcija, 2 – vieta kur surenkama TRGO2 frakcija, 3 – vieta kur surenkama TRGO3 frakcija, 4 – kaitinimo zona, 5 – dalinamasis piltuvas su GO).

Darbo metu, naudojant 2.1 paveiksle pateiktą sistemą, į atskirą dalinamąjį piltuvą (2.1 pav. 5) buvo dedami sausi, agatiniame grūstuve susmulkinti GO milteliai (1,0 g). Prieš redukciją per sistemą 1 valandą buvo leidžiamas $60 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ Ar dujų srautas, taip sukuriant bedeguoninę atmosferą. Po to vamzdine krosnimi (2.1 pav. 4) buvo kaitinama centrinė kvarcinio vamzdžio dalis, kol joje nusistovėjo $800 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūra. Taip paruošus sistemą pradedamas redukcijos procesas: Ar dujų srautas padidinamas iki $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ir susmulkinti GO milteliai mažomis porcijomis ($\sim 0,05 \text{ g}$) dozuojami į vertikalų kvarcinį vamzdį. Greitai į kaitinimo zoną patekusios GO dalelės redukuojasi – susidaro termiškai redukuoto grafeno oksido dalelės. Pastarosios, Ar srauto pagalba, išnešamos iš kaitinimo zonos ir priklausomai nuo jų masės, krūvio bei formos surenkamos atskirose sistemos vietose (2.1 pav. 1, 2, 3). Šio proceso metu gautas frakcijų masių santykis (TRGO1 : TRGO2 : TRGO3) – $0,428 : 0,019 : 0,004$.

2.4 sp^2 hibridizacijos anglinių medžiagų tyrimai

TGA analizė. Ši analizė pasirinkta siekiant įvertinti deguoninių funkcinių grupių kiekį susintetintose anglinėse medžiagose. Analizės metu buvo tiriami 10

mg anglinių medžiagų milteliniai bandiniai esant $25 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ azoto srautui. Tyrimai atlikti $25 - 500 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūrų intervale, temperatūrai kintant $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ greičiu.

Ramano sklaidos spektrinė analizė. Ši analizė pasirinkta siekiant įvertinti susintetintų anglinių medžiagų oksidavimosi/redukavimosi laipsnį bei defektiškumą. Analizės metu buvo tiriami suspausti, milteliniai anglinių medžiagų pavyzdžiai. Ramano sklaidos spektrai buvo gauti naudojant 633 nm 1 mW galios He-Ne lazerio sužadinamąją spinduliuotę, nukreipiant į analizuojamą paviršių. Lazerio spindulys buvo sukoncentruotas $\sim 2 \text{ }\mu\text{m}$ skersmens plote, kaupimo laikas – 100 s . Bandymų rezultatai užrašyti naudojant atgalinės sklaidos geometriją su konfokaliu mikroskopu Labram HR800, Horiba Yvon Jobin.

BET analizė. Ši analizė pasirinkta siekiant įvertinti susintetintų anglinių medžiagų paviršiaus plotą, bei porų diametrą. Analizės metu buvo tiriami anglinių medžiagų milteliniai bandiniai. Jų N_2 adsorbcijos ir desorbcijos izotermos buvo išmatuotos $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje su BET analizatoriumi TriStar II 3020 Micrometrics. Prieš atliekant adsorbcijos matavimus bandiniai buvo 2 valandas laikomi N_2 atmosferoje $100 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje.

Funkcinių grupių titravimas. Ši analizė pasirinkta siekiant nustatyti deguoninių funkcinių grupių kiekį ir asortimentą ant GOP ir GrO paviršiaus. Boehmo titravimo metodu buvo kiekybiškai ir kokybiškai įvertintos anglinių medžiagų paviršiuje išsidėsčiusios rūgštinės prigimties funkcinės grupės. Pagal tradicinę Boehmo titravimo schemą anglinių medžiagų bandiniai 24 valandas veikiami purtant su keturiais skirtingo baziškumo tirpalais: vandeniniais NaHCO_3 , Na_2CO_3 , NaOH . Atitinkamos bazių pK_a – $6,37$; $10,25$; $15,74$; $20,58$ [159]. Po 24 valandų, bandiniai filtruojami, filtratai titruojami HCl tirpalu. Žinant, kad NaOH sureaguoja su hidroksi-, laktono ir karboksi-grupėmis, Na_2CO_3 reaguoja su hidroksi- ir laktono funkcinėmis grupėmis, o NaHCO_3 reaguoja tik su karboksi grupėmis, galima įvertinti šių funkcinių grupių kiekį. Anglinių medžiagų bazinės funkcinės grupės nustatytos anglinių medžiagų pavyzdžius veikiant rūgštiniais tirpalais [140]. Bandiniai 24 valandas purtomis su

HCl tirpalu, po to filtruojami, filtratai titruojami baziniu NaOH tirpalu. Taip nustatoma pirono grupių ($-1 < pK_b < 2$), pirilo jonų ($3 < pK_b < 6$) bei karboanijonai ($pK_b = 16 - 23$) suma.

Darbo metu, norint nustatyti rūgštines grupes, kiekvienam bandymui buvo naudojami trys užsukami indeliai, kuriuose buvo atsverta po 0,05 g kiekvienos anglinės medžiagos. GrO bandiniai buvo 24 valandas purtomi su 10 ml 0,1 M NaOH, 0,1 M Na_2CO_3 ir 0,1 M $NaHCO_3$ tirpalais. Tuo tarpu, grafito ir GOP bandiniai buvo 24 valandas veikiami purtant su 10 ml 0,01 M NaOH, Na_2CO_3 ir $NaHCO_3$ tirpalais. Po 24 valandų veikimo bandiniai nufiltruoti naudojant filtro popierių. Iš kiekvieno gauto filtrato buvo imami trys mėginiai po 2 ml ir atitinkamai titruojami 0,1 M ir 0,01 M HCl tirpalais. NaOH, Na_2CO_3 filtratų titravimui buvo naudojamas metilo oranžinis indikatorius (60 μ l), o titruojant $NaHCO_3$ filtratą naudojamas fenolftaleino indikatorius (60 μ l). Nustatant bazines grupes visų medžiagų bandiniai buvo 24 valandas veikiami purtant su 10 ml 0,01 M HCl tirpalu. Po 24 valandų filtruojami ir titruojami 0,01 M NaOH tirpalu, indikatorium naudojant fenolftaleiną (60 μ l).

AJM analizė. Ši analizė pasirinkta siekiant įvertinti GrO, GOP, TRGrO bei grafito paviršiaus morfologiją ir nustatyti šias medžiagas sudarančių dalelių matmenis. Analizės metu iš anglinių medžiagų buvo ruošiamos vandeninės suspensijos: į 120 μ l distiliuoto H_2O buvo berama apie 0,5 mg anglinių medžiagų ir gerai išmaišoma. 10 μ l gautos suspensijos buvo lašinama ant silicio plokštelės ir 10 minučių džiovinta 110 $^{\circ}C$ temperatūros krosnyje, po to pavyzdžiai atvėsinti iki 30 $^{\circ}C$ ventiliuojamoje krosnyje. Siekiant sumažinti drėgmės kiekį bandinio paviršiuje prieš kiekvieną matavimą bandiniai 20 min. buvo papildomai padžiovinti 50 $^{\circ}C$ temperatūroje. Visuose pavyzdžiuose buvo nuskenuoti 3 atsitiktiniai 10 μ m x 10 μ m plotai, ir atlikta nusodintos medžiagos matmenų AJM analizė – įvertinti nusėdusių dalelių diametrai bei aukščiai.

SEM analizė. Siekiant įvertinti TRGO frakcijų, GO ir grafito paviršiaus morfologiją buvo atlikta SEM analizė. Išvardintų anglinių medžiagų milteliai buvo mechaniškai prispausti prie lipnaus anglinio pagrindo. Taip paruoštų pavyzdžių SEM nuotraukos darytos naudojant skenuojantį elektroninį

mikroskopą Hitachi SU-70 esant 5,0 kV greitėjimo įtampai ir 25000 – 100000 kartų didinimui. Grafeno oksido SEM nuotraukos buvo darytos naudojant 0,8 kV stabdymo įtampą.

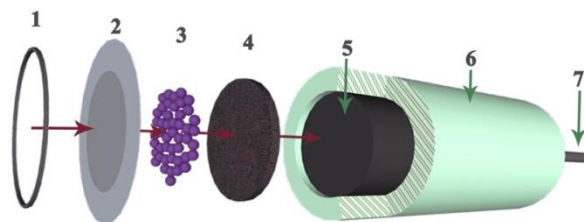
Piltinio tankio matavimai. Ši analizė pasirinkta siekiant įvertinti TRGO frakcijų, GO ir grafito struktūrą. Piltinis tankis buvo nustatytas atliekant miltelinių bandinių tūrio ir svorio matavimus, kaip aprašyta [160] literatūroje, buvo įvertintas, koks medžiagos kiekis telpa į 1 cm³ tūrio indą.

Elementinė analizė. Šios analizės metu buvo siekta nustatyti deguonies kiekį TRGO frakcijose, GO ir grafito. Analizės metu buvo tirti anglinių medžiagų milteliai (20 mg) su organinių medžiagų elementinės sudėties analizatoriumi FLASH 2000. Milteliniuose mėginiuose deguonies kiekis buvo nustatomas atliekant mėginio pirolizę 1060 °C temperatūroje, elementinės anglies prisotintame reaktoriuje. Susidariusios CO₂, CO, H₂O ir kitos deguonies turinčios dujos, homogenizuotos ir helio pagalba perneštos į dujų chromatografinę kolonėlę su šiluminio laidumo detektoriumi. Kolonėlėje, dujos atskirtos ir atlikta jų kiekybinė ir kokybinė analizė bei įvertintas deguonies kiekis mėginyje (masės %).

XRD analizė. Ši analizė pasirinkta siekiant įvertinti TRGO frakcijų, GO ir grafito struktūrą. Šios analizės metu buvo tiriami suspausti anglinių medžiagų milteliniai. Rentgeno difrakciniams tyrimams naudotas difraktometras Bruker D8 Advance su Cu K_α spinduliuotės šaltiniu (K_{α1} = 1.54056Å). Tyrimo parametrai: įtampa – 40 keV, srovės stipris – 40 mA, kampo žingsnis – 0,040° ir fiksacijos laikas – 1 sek.

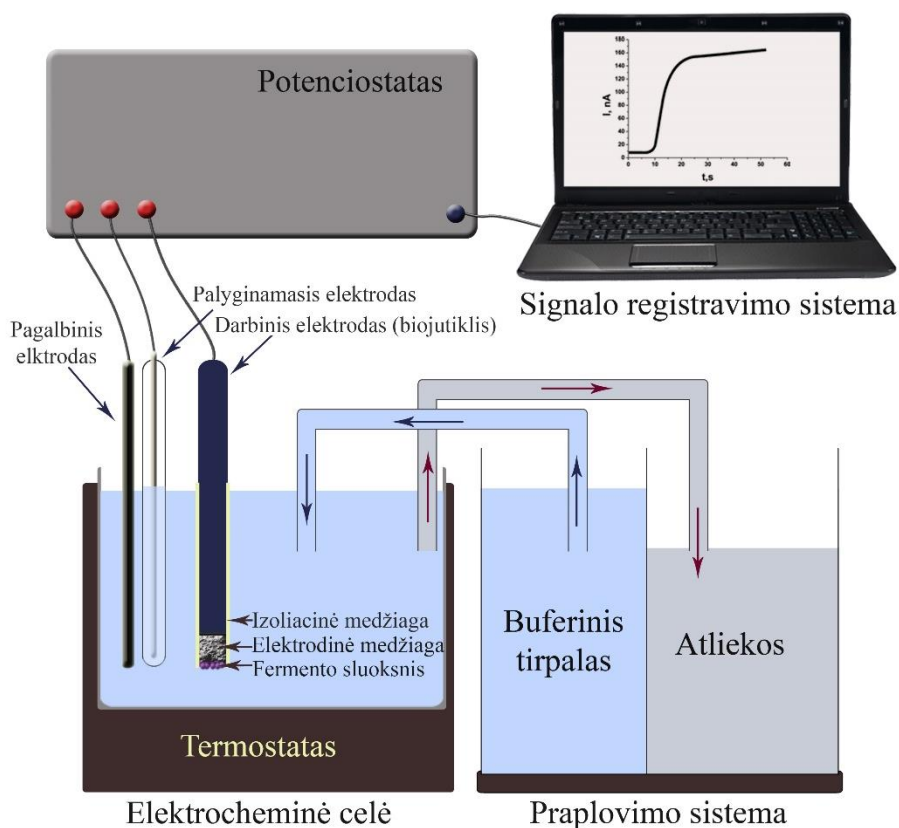
2.5 Biojutiklių konstravimas ir elektrocheminiai tyrimai

Šiame darbe susintetintos ir iširtos anglinės medžiagos (žr. 2.3 skyrių), iš kurių, o taip pat ir iš grafito buvo paruošti strypiniai elektrodai. Anglinių medžiagų elektrodai buvo panaudoti biojutiklių konstravime (biojutiklio schema pateikta 2.2 paveiksle).



2.2 pav. Biojutiklio principinė schema. 1 – guminis žiedas, 2 – apsauginė membrana, 3 – fermento sluoksnis, 4 – tiriamą anglinę medžiagą, 5 – elektrodo kontaktinę medžiagą, 6 – korpusą, 7 – kontaktinį laidą.

Elektrodai buvo formuojami užpildant plastikinio vamzdelio su kontaktiniais išėjimais tuščiąją dalį presuota angline pasta, prie kurios mechaniškai prispaudžiamas sluoksnis tiriamos anglinės medžiagos. Tokiu būdu pagaminami strypiniai, angliniai elektrodai. Vėliau ant pagamintų elektrodų paviršiaus arba ant apsauginės plėvelės įvairiais metodais buvo imobilizuojami fermentai (PQQ-GDH, ureazė ar FDH). Sukurti biojutikliai buvo prijungiami prie elektrocheminės sistemos (schema 2.3 pav.) ir naudojami, kaip darbiniai elektrodai.



2.3 pav. Elektrocheminių matavimų sistema.

Elektrocheminę sistemą, pateiktą 2.3. paveiksle, sudaro termostatuojama elektrocheminė celė, potenciostatas, signalo registravimo ir praplovimo sistemos. Elektrocheminiai tyrimai buvo atliekami 1 ml trielektrodinėje elektrocheminėje celėje, kurią sudarė pagalbinis (platinos) ir palyginamasis (Ag/AgCl) elektrodai bei biojutiklis. Matavimai atlikti 20 °C temperatūroje esant pastoviam 0,4 V darbinio elektrodo potencialui, naudojant 0,05 M acetatinį buferinį tirpalą, pH 6, (PQQ-GDH atveju), esant pastoviam esant 0,2 V darbinio elektrodo potencialui, naudojant 0,02 M fosfatinį buferinį tirpalą, kurio, pH 7,2 (ureazės atveju) ir esant pastoviam 0,4 V darbinio elektrodo potencialui, naudojant McIlvaine (pH 4,5) arba K-fosfatinį (pH 7,5) buferinį tirpalą (FDH atveju). Atitinkamoms sistemoms šios sąlygos laikomos standartinėmis.

Siekiant nustatyti biojutiklių su PQQ-GDH veikimo efektyvumą ir jautrio kitimą laike tiesioginės chronoamperometrijos metodu buvo registruojami anodiniai atsakai į 10 mM ir 100 mM gliukozės tirpalų kiekius. Tuo tarpu, matuojant anodinius atsakus į 1 M karbamido ir 1 M D-fruktozės tirpalų kiekius elektrocheminėje celėje, buvo nustatyti analogiški parametrai biojutikliams su ureaze ir FDH. Matavimų metu gauti duomenys apdoroti „OriginPro 8.0“ programa.

Darbo metu, duomenų analizei buvo naudojama tiek elektrocheminiams matavimams adaptuota Michaelio-Menten hiperbolės lygtis (7), tiek analogiška lygtis, kurioje srovės stipris buvo pakeistas bioelektrokatalizės metu generuojamu srovės tankiu (srovės stipris į ploto vienetą):

$$j = \frac{j_{max}^{tar} [S]}{K_M^{tar} + [S]} \quad (8)$$

Iš biojutiklių generuojamų srovės stiprių arba tankių priklausomybių nuo substratų koncentracijų, naudojantis 7 arba 8 lygtimis, buvo paskaičiuoti pagrindiniai biojutiklių kinetiniai parametrai: j_{max}^{tar} ir K_M^{tar} . j_{max}^{tar} parodo maksimalių srovės tankį, kurį gali generuoti bioelektrokatalizinė sistema ir nusako sistemos efektyvumą. K_M^{tar} tai fermentinės sistemos (biojutiklio) charakteristika, kuri parodo imobilizuoto sistemoje fermento giminingumą substratui [161], kai sistemos K_M^{tar} , yra daug didesnės nei nustatytos natyviai

fermentui, tai rodo, kad tarp aktyvavaus fermentinio sluoksnio ir terpės, kurioje yra substratas susidaro difuziniai apribojimai [162]. Taip pat K_M^{tar} reikšmė nurodo substrato koncentraciją iki kurios galioja tiesinė biojutiklio atsako nuo koncentracijos priklausomybė [163].

LOD sukurtais biojutikliais buvo apskaičiuota iš jų kalibracinių kreivių tiesinių dalių pagal 10 formulę, kaip aprašyta [164] literatūroje: 3 kartus išmatuoti biojutiklio generuojami signalai į tą pačią substrato koncentraciją esančią tiesinėje kalibracinės kreivės dalyje, paskaičiuotas šių signalų standartinis nuokrypis (S_a), kuris vėliau padaugintas iš 3 ir padalintas iš kalibracinės kreivės tiesinės dalies nuolinkio kampo (b) – biojutiklio jautrio.

$$LOD = 3S_a/b \quad (10)$$

Biojutiklių inaktyvacijos konstantos buvo apskaičiuotos iš grafikų kuriuose y-ašyje atidėta $\ln I$ (natūrinis anodinės srovės logaritmas), o x-ašyje biojutiklio gyvavimo trukmė valandomis. Gautos priklausomybės, naudojantis „OriginPro 8.0” programine įranga, aprašytos tiesės lygtimi. Gautos tiesės nuolinkio kampo tangentas yra lygus biojutiklio k_{in} reikšmei h^{-1} .

2.5.1 Fermentų imobilizavimas

Siekiant išsiaiškinti susintetintų anglinių medžiagų tinkamumą bereagentinių sistemų kūrimui, ant skirtingų anglinių elektrodų fermentai buvo imobilizuojami vienodai, tačiau kiekvieno fermento atveju naudojant skirtingas metodikas:

D-gliukozės biojutiklio kūrimo atveju, **PQQ-GDH** buvo imobilizuojama ant pusiau pralaidžios terileno plėvelės: 2 μ l, 0,1 % PVA užlašinta ant pusiau pralaidžios terileno plėvelės (2 mm diametro žymės), terilenas su PVA 1 valandą džiovintas kambario temperatūroje, po to ant PVA sluoksnio adsorbuota 2 μ l PQQ-GDH tirpalo ($18000 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) paruošto 0,005 M TRIS-HCl buferiniame tirpale (pH 8,5), membrana su adsorbuota PQQ-GDH 1 valandą džiovinta kambario temperatūroje. Praėjus nurodytam laikui, membranos su imobilizuotu fermentu buvo mechaniškai prispaudžiamos prie pagamintų anglinių elektrodų

paviršiaus, jas užtvirtinant guminiais žiedais (2.2 pav. 1). Tokiu būdu buvo paruošti biojutikliai su GOP, GrO, TRGrO ir grafitu.

Karbamido biojutiklio kūrimo atveju, **ureazė** buvo imobilizuojama ant pusiau pralaidžios terileno plėvelės: 2 μ l, 0,1 % PVA užlašinta ant pusiau pralaidžios terileno plėvelės (2 mm diametro žymės), terilenas su PVA 1 valandą džiovinamas kambario temperatūroje, tuo pačiu metu 2 mg ureazės ($80 \text{ kU} \cdot \text{g}^{-1}$) ir 2 mg BSA ištirpinta 30 μ l 0,02 M fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 7,2) su 5 μ l, 5% glutaro aldehidu, po to paruoštas mišinys po 2 μ l išdozuotas ant pusiau pralaidžios terileno plėvelės apdorotos PVA. Taip paruoštos membranos džiovintos 10 °C temperatūroje 1 valandą, po to buvo sukarpomos norimu dydžiu ir mechaniškai prispaudžiamos prie pagamintų anglinių elektrodų paviršiaus, jas užtvirtinant guminiais žiedais. Tokiu būdu buvo paruošti biojutikliai su GOP, GrO, GO, TRGrO ir TRGO frakcijomis bei grafitu.

D-fruktozės bereagentinių biojutiklių kūrimo atveju, **FDH** buvo imobilizuojamas fizikinės adsorbcijos būdu. Pirma ant paruošto anglinio elektrodo 30 min, 10 °C temperatūroje buvo adsorbuojama 2 μ l, 0,5 % triton X-100 vandeninio tirpalo. Vėliau 30 min, 10 °C temperatūroje adsorbuojama 2 μ l FDH tirpalo ($1471 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) paruošto McIlvaino buferiniame tirpale (pH 4,5). Ant taip paruoštų elektrodų su fermentiniu sluoksniu paviršiaus buvo mechaniškai prispaudžiamos pusiau pralaidžios terileno plėvelės, kurios užtvirtintos guminiu žiedu. Tokiu būdu buvo paruošti biojutikliai su GO, TRGO frakcijomis ir grafitu.

3 DARBO REZULTATAI

3.1 sp² hibridizacijos anglinių medžiagų charakterizavimas

Siekiant išsiaiškinti kurie anglinių medžiagų parametrai nulemia sėkmingą TEP fermentinėse heterogeninėse sistemose buvo atlikti išsamūs jų tyrimai. Paprastai vieno metodo neužtenka norint detalai charakterizuoti GrO, GO ir kitų susintetintų anglinių medžiagų struktūrą, tad siekiant gauti tikslesnę informaciją reikia naudoti ir derinti skirtingus analizės metodus.

3.1.1 GrO, GOP(1 – 5) ir TRGrO tyrimas

Susintetinti grafito oksidacijos produktai ir grafito oksidas pirmiausia buvo išanalizuoti paviršinių grupių titravimo metodais [165], kurių pagalba galima nustatyti susidariusių deguoninių funkcinių grupių kiekį ir prigimtį ant GrO ir GOP paviršiaus. Atlikus analizę buvo apskaičiuota deguoninių rūgštinių grupių (hidroksi-, karboksi- ir laktoninių grupių) bei bazinių grupių kiekis, gauti rezultatai pateikti 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Paviršinių funkcinių grupių titrimetrinės analizės rezultatai.

Anglinė medžiaga	Rūgštinės grupės; mmol·g ⁻¹			Bazinės grupės; mmol·g ⁻¹
	Hidroksi-grupės	Karboksi-grupės	Laktoninės grupės	
GrO	3,433	1,511	0,278	0,000
GOP1	0,000	0,000	0,000	0,108
GOP2	0,000	0,000	0,000	0,157
GOP3	0,000	0,000	0,000	0,138
GOP4	0,000	0,000	0,000	0,167
GOP5	-	-	-	-
TRGrO	-	-	-	-
Grafitas	0,000	0,000	0,000	0,000

Iš gautų duomenų matoma, kad rūgštinių grupių rasta tik ant Hummerso ir Offeman'o sintezės metu gauto GrO paviršiaus. Ant jo paviršiaus nustatytas didžiausias kiekis hidroksi grupių – 3,433 mmol·g⁻¹, o mažiausias laktoninių grupių – 0,278 mmol·g⁻¹, karboksi grupių nustatyta 1,511 mmol·g⁻¹. Bazinės prigimties funkcinių grupių GrO paviršiuje rasta nebuvo.

Boehmo titravimo metodu įmanoma nustatyti tik rūgščių – bazių pusiausvyroje dalyvaujančias funkcines grupes. Iš literatūros duomenų žinoma

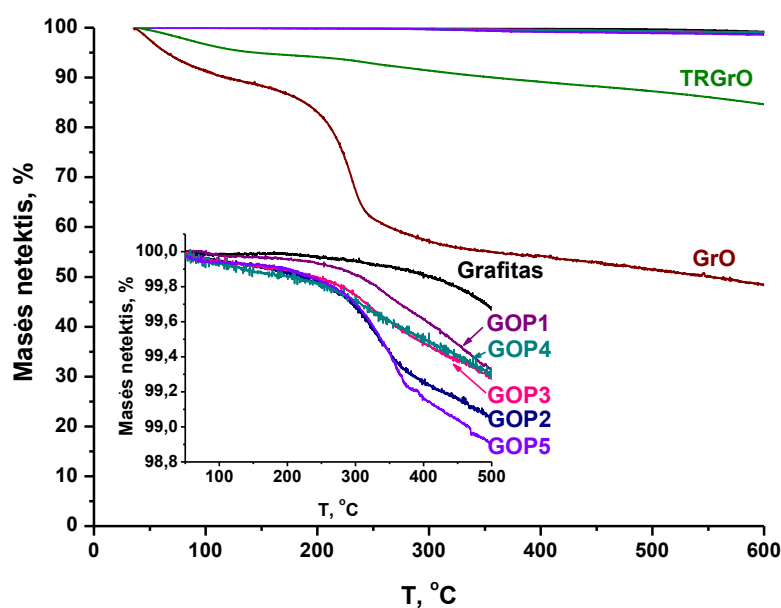
[142], kad anglies – deguonies santykis GrO siekia 2,7 : 1, o mūsų nustatytose visose funkcinėse grupėse (karboksi-, laktono ir hidroksi-) – 141,6 : 1. Iš to galime daryti išvadą, kad didesnioji deguonies dalis esanti GrO nedalyvauja rūgščių – bazių pusiausvyroje. Tai galėtų būti epoksi funkcinės grupės, kurios turėtų sudaryti didžiausią deguonies dalį esančią GrO medžiagoje.

Skirtingo dydžio grafito daleles (gamyklinio dydžio ($\geq 50 \mu\text{m}$ diametro) ir po 10 valandų veikimo ultragarsu – sonifikacijos) oksiduojant šarminėje vandenilio peroksido terpėje gauti du produktai: GOP1 ir GOP2. Šių medžiagų paviršiuje nustatyti nedideli kiekiai bazinės prigimties funkcinių grupių. Ant GOP1 rasta $0,108 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ grupių, o ant GOP2 – $0,157 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$. Skirtingo dydžio grafito daleles oksiduojant kalio heksacianoferatu (III) šarminėje terpėje taip pat gauti du produktai: GOP3 ir GOP4. Ant šių medžiagų paviršiaus nustatyti nedideli kiekiai bazinės prigimties deguoninių grupių: ant GOP3 aptikta $0,138 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ grupių, o ant GOP4 – $0,167 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ grupių. Taip pat buvo atlikta ir žaliavinio grafito pavyzdžio titrimetrinė analizė (Boehmo titravimas ir bazinių funkcinių grupių nustatymas). Žaliavinio grafito paviršiuje neaptikta nei rūgštinės nei bazinės prigimties funkcinių grupių.

Iš gautų duomenų matoma, kad prieš oksidaciją grafitą veikiant ultragarsu ant jo paviršiaus susidaro daugiau funkcinių grupių. Taip yra dėl to, kad, sonifikacijos metu vyksta grafito amorfizacija – mažėja jo kristalantai ir didėja defektiškumas [151], ko pasekoje susidaro didesnis skaičius grafeno briaunose ir defektų vietuose išsidėsčiusių anglies atomų, kurie pasižymi didesniu aktyvumu nei plokštuminius anglies atomus [142]. Dėl šios priežasties briaunuose ir defektų vietose esantys anglies atomai lengviau oksiduojasi.

Titravimo metu nustatytų rūgštinių funkcinių grupių skirstymas į karboksi-, laktono ir hidroksi- yra sąlyginis, kadangi pati Boehmo titravimo schema neleidžia detaliau analizuoti šių funkcinių grupių prigimties. Deja, alternatyvių ir patikimesnių už mūsų naudotus analizės metodus, skirtus anginėms medžiagoms, neegzistuoja. Norint gauti tikslesnę informaciją apie GO ir kitų grafito oksidacijos produktų struktūrą, reikia naudoti ir derinti daug darbo reikalaujančius šių medžiagų modifikavimo ir analizės metodus.

Deguninių funkcinių grupių buvimas ant susintetintų anglinių medžiagų paviršiaus įrodytas ir TGA metodo pagalba. Atliekant šią analizę tiriamoji medžiaga yra kaitinama keliant temperatūrą pastoviu greičiu inertinėje atmosferoje ir tuo pačiu metu matuojama jos masė. Jeigu medžiaga yra termiškai nestabili, ji esant tam tikrai temperatūrai skyla, sudarydama dujinius produktus. Taip gaunama medžiagos masės kitimo priklausomybė nuo kaitinimo temperatūros [166]. Šis metodas buvo pritaikytas darbo metu susintetintų GOP, GrO ir TRGrO tyrimui. Gautos anglinių medžiagų TGA kreivės pateiktos 3.1 paveiksle.



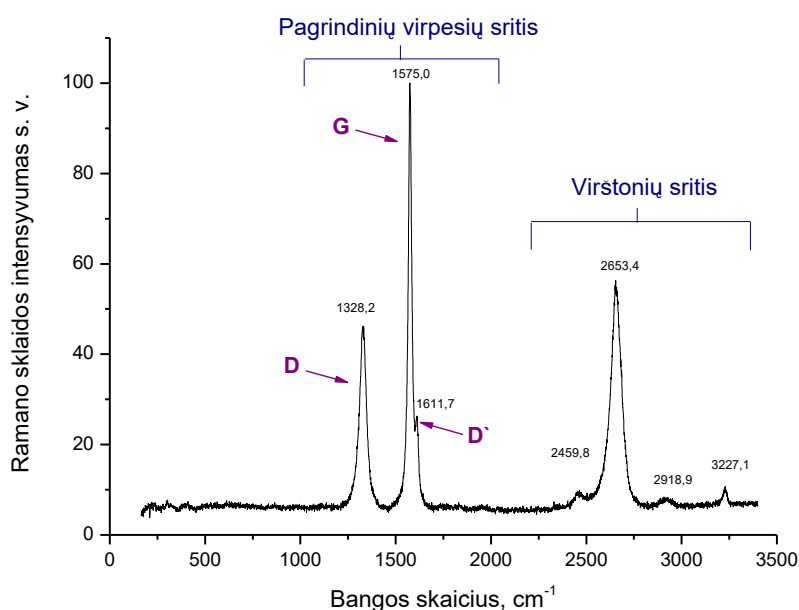
3.1 pav. Grafito, GrO, GOP1, GOP2, GOP3, GOP4, GOP5 ir TRGrO TGA kreivės. Intarpe pateikta grafito ir GOP TGA kreivės 25 – 500 °C temperatūrų intervale.

Iš aukščiau pateiktų duomenų matyti, kad anglinių medžiagų TGA kreivės yra skirtingos. Grafito masė, visame temperatūrų intervale, kinta tolygiai – nestebima staigių masės kitimo šuolių. Tolygus grafito masės mažėjimas siejamas su adsorbuotų nešvarumų pašalinimu. Tuo tarpu GOP ir GrO TGA kreivėse yra stebimi staigūs masės šuoliai, dėl kurių visas šių anglinių medžiagų TGA kreives galime suskirstyti į du intervalus: nuo 25 °C iki 150 °C ir nuo 150 °C iki 400 °C. Pirmame intervale matomas anglinių medžiagų masės sumažėjimas siejamas su drėgmės – adsorbuoto ar interkaliuoto vandens

pasišalinimu [166]. Akivaizdu, kad didžiausia šiame intervale masės netektis (net 12 %) būdinga GrO, o TRGrO netenka tik apie 5 % savo masės. Tuo tarpu grafito, GOP1, GOP2, GOP3, GOP4 bei GOP5 grafito oksidacijos produktų masė šiame intervale beveik nekinta. Antrajame intervale (150 °C iki 400 °C) matomas anglinių medžiagų masės sumažėjimas siejamas su labilių karboksi-, laktono ir anhidrido grupių atskilimu nuo anglinių medžiagų paviršiaus. Šios grupės atsikyla CO₂ ar CO pavidalais [138, 166]. Iš 2.9 paveikslo pateiktų duomenų matoma, kad šiame intervale visų susintetintų grafito oksidacijos produktų TGA kreivėse yra stebimas gan ryškus masės šuolis: GrO masė sumažėja 34 %, TRGrO – 6 %, GOP1, GOP2, GOP3, GOP4 bei GOP5 atvejais stebimas apie 1 % sumažėjimas. Šie duomenys patvirtina deguoninių funkcinų grupių buvimą ant GrO, TRGrO ir GOP paviršių.

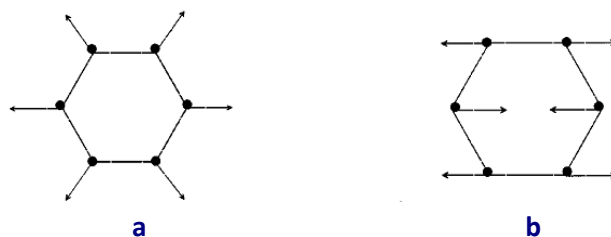
Susintetintų GrO, TRGrO ir GOP tyrimui pritaikyta ir Ramano sklaidos spektrinės analizė. Šio metodo pagalba buvo bandoma išsiaiškinti bei įsigilinti į susintetintų grafito oksidacijos produktų struktūrą bei susidariusių dalelių defektiškumą.

Susintetinti GrO, GOP ir TRGrO kaip ir jų pirmtakas grafitas, turi sluoksniuotą struktūrą, kurioje periodiškai išsidėsčiusius grafeno ar oksiduotus grafeno sluoksnius tarpusavyje palaiko silpnosios Van der Waalso sąveikos jėgos [167, 168]. Dėl struktūros panašumo šių anglinių medžiagų Ramano sklaidos spektrai yra beveik identiški – visuose yra matomos grafitui būdingos D, G ir D' smailės. 3.2 paveikslėlyje pavaizduotas grafito Ramano sklaidos spektras.



3.2 pav. Grafito Ramano sklaidos spektras.

Grafito Ramano sklaidos spektras yra suskirstytas į dvi dalis: pagrindinių virpesių ir virštonių sritis. Pagrindinių virpesių srityje matomos smailės ties 1328, 1575 ir 1612 cm^{-1} yra pagrindinės Ramano sklaidos modos, jos atitinkamai vadinamos D, G ir D'. D ir D' modos atspindi grafeno plokštumos defektiškumą, kadangi idealaus grafeno atveju D modos virpesiai yra negalimi [169, 150]. D moda yra A_{1g} simetrijos ir charakterizuoja šešianarių, aromatinių žiedų simetrinius virpesius (3.3 pav. a.), kurie galimi tik tuo atveju kai grafeno lakštai yra defektiški t.y. grafeno lakšto plokštumoje yra struktūrinių defektų, paviršinių funkcinių grupių ar alifatinių sričių, o jo briaunose anglies atomai išsidėstę „zigzago“, „kėdės“ ar kitomis formomis. Didėjant defektų skaičiui didėja šios smailės intensyvumas. Tuo tarpu D' smailė atsiranda tik dėl „zigzago“ ar „kėdės“ forma išsidėsčiusių anglies atomų grafeno briaunose [169].

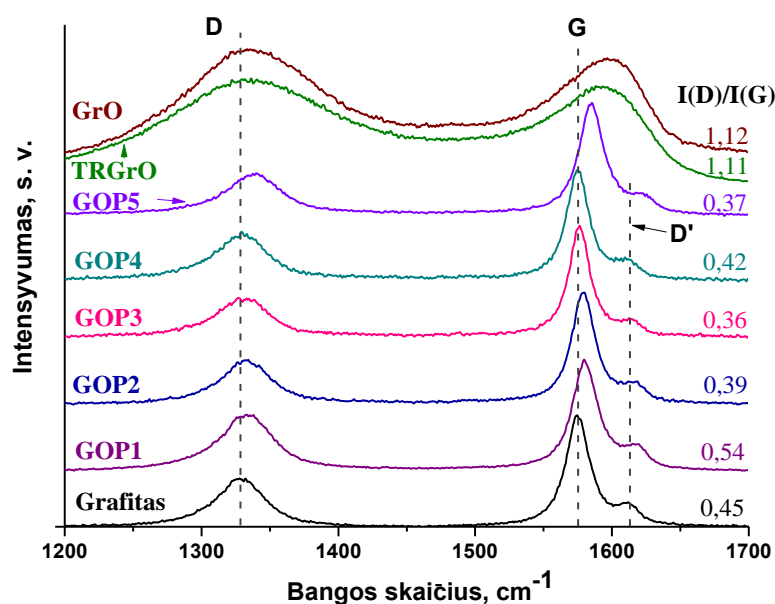


3.3 pav. D modos (a) ir G modos (b) charakterizuojami virpesiai [150]

G moda yra E_{2g} simetrijos ir charakterizuoja tarp sp^2 hibridizacijos anglies atomų esančių dvigubų ryšių simetrinius virpesius (3.3 pav. b). G modos charakterizuojami dvigubieji ryšiai gali būti išsidėstę ne tik konjuguotoje grafeno plokštumoje bet ir alifatinėse jo srityse ar net lakšto briaunose esančiuose grandininiuose segmentuose [150, 170]. D ir G smailių intensyvumo santykis ($I(D)/I(G)$) naudojamas defektiškumo lygio grafeno sluoksnyje įvertinimui.

Virštonių srityje matomos smailės ties 2653,4 ir 3227,1 cm^{-1} priskiriamos D ir D' virštoniams. Smailė ties 2918,8 cm^{-1} yra D ir G kombinacinė moda, o ties 2459,8 cm^{-1} esanti smailė atsiranda dėl dvigubo Ramano sklaidos rezonanso [168, 171]. Akivaizdu, kad pagrindinėje Ramano sklaidos srityje esančios smailės yra didesnio intensyvumo nei smailės virštonių srityje, todėl tolimesnėje analizėje nagrinėsime tik pagrindinių virpesių sritį t. y. spektro dalį nuo 1000 iki 2000 cm^{-1} . Kaip jau minėta anksčiau, grafito oksidacijos metu grafeno lakšto plokštumoje bei briaunose išsidėsto įvairios deguoninės funkcinės grupės, o grafeno briaunose aptinkamas didesnis funkcinų grupių tankis lyginant su plokštumine jo dalimi, bei vyksta grafito amorfizacija. Anglinių medžiagų amorfizacija labai įtakoja Ramano sklaidos spektruose esančių D, G ir D' smailių padėtį ir intensyvumą [150, 170].

Grafito, GrO, TRGrO, GOP1, GOP2, GOP3, GOP4 ir GOP5 Ramano sklaidos spektrai 1200 – 1700 cm^{-1} bangų intervale bei D ir G smailių $I(D)/I(G)$ pateiktas 3.4 paveiksle.



3.4 pav. Grafito, GrO, GOP1, GOP2, GOP3, GOP4, GOP5 ir TRGrO Ramano sklaidos spektrai.

Iš 3.4 paveiksle pateiktų duomenų matoma, kad GrO ir TRGrO Ramano sklaidos spektrai labai skiriasi nuo grafito ir GOP – juose stebimas tik išplitusios D ir G smailės. Tuo tarpu, visi GOP spektrai yra beveik identiški – juose stebimos aiškios G, D ir D' smailės. Grafito Ramano sklaidos spektre yra matoma didelio intensyvumo G smailė ties 1575 cm^{-1} ir D smailė ties 1328 cm^{-1} bei mažo intensyvumo D' smailė ties 1612 cm^{-1} . Tuo tarpu, GOP G, D ir D' smailės yra pasislinkusios į didesnių bangų sritį (mėlynasis poslinkis) lyginant su grafitu. Mėlynojo poslinkio atsiradimą gali lemti keletas priežasčių: pirma, D' smailė gali dalinai jungtis su G smaile, antra, smulkėjant grafito kristalitams (iki grafeno lakšto), G smailė slenkasi į didesnių bangų skaičių sritį nuo 1581 iki 1585 cm^{-1} , trečia, pavienių dvigubųjų ryšių susidarymas (grafito oksidacijos metu), kurie padidina G smailės dažnį. Pastaroji priežastis daugiausia įtakoja mėlynąjį poslinkį [150, 170]. 3.4 paveiksle matyti, kad didžiausiais G mėlynasis poslinkis yra stebimas GrO atveju ($20,6\text{ cm}^{-1}$) ir manome, kad taip yra dėl didžiausio funkcinų grupių kiekio susidarymo ant šios medžiagos paviršiaus grafitą veikiant stipriu oksiduojančių mišiniu (KMnO_4 , NaNO_3 , H_2SO_4). Susidaręs didelis funkcinų grupių kiekis suardo π -konjūguotą ryšių sistemą

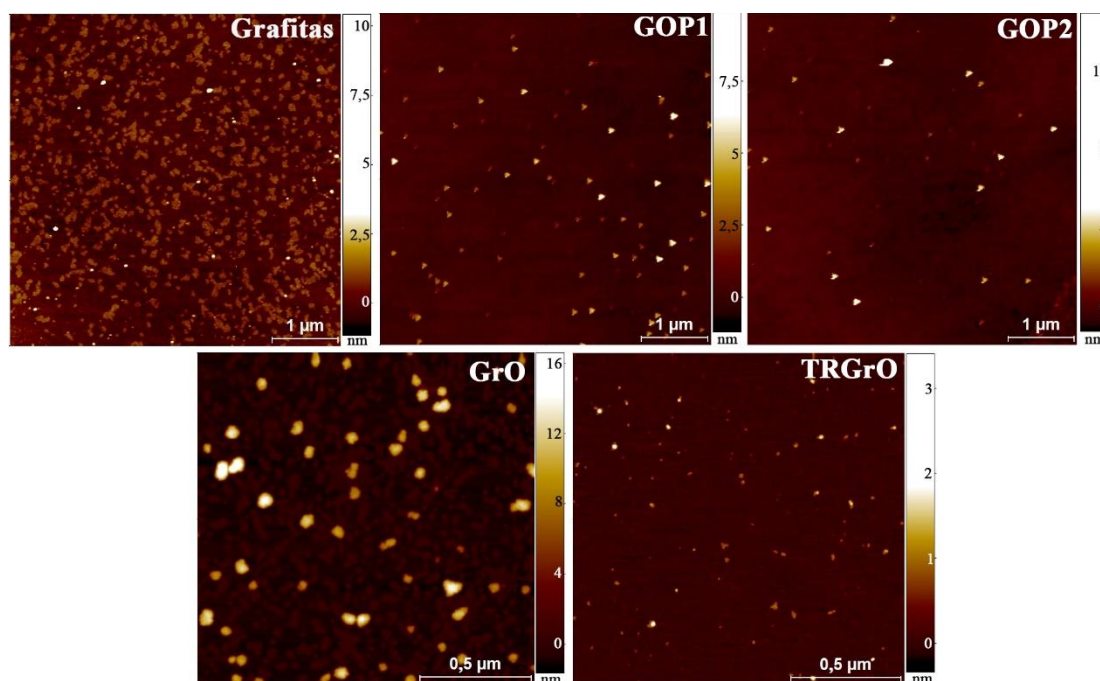
grafeno sluoksnyje, ko pasekoje atsiranda didelis pavienių dvigubųjų ryšių skaičius. Tuo tarpu grafitą veikiant silpnesniais oksidatoriais tokiais kaip H_2O_2 arba $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (GOP1, GOP2, GOP3 ir GOP4 produktai) grafeno paviršiuje susidaro tik nedidelis deguoninių funkcinių grupių ir pavienių dvigubųjų ryšių skaičius. Dėl šios priežasties G smailės mėlynasis poslinkis GOP1, GOP2, GOP3 ir GOP4 spektruose yra nežymus: GOP1 ir GOP2 atveju $\sim 5 \text{ cm}^{-1}$, o GOP3 ir GOP4 atveju $\sim 1 \text{ cm}^{-1}$. H_2O_2 pasižymi stipresnėmis oksidacinėmis savybėmis šarminėje terpėje ($E_{\text{red-ox}} = 0,878 \text{ V}$ [172]) nei $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($E_{\text{red-ox}} = 0,486 \text{ V}$ [173]). Dėl šios priežasties H_2O_2 gali oksiduoti ne tik reaktingesnius grafeno briaunose išsidėsčiusius anglies atomus, bet ir plokštuminius, taip atsiranda pavienių dvigubųjų ryšių, kurie lemia G smailės didesnę mėlynąją poslinkį. Tuo tarpu dėl silpnesnių $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ oksidacinių savybių, sintezės metu, yra oksiduojami tik reaktingesni grafeno briaunose esantys anglies atomai. Fermentiškai oksiduoto grafito atveju stebimas 10 cm^{-1} G smailės mėlynasis poslinkis. Šį poslinkį gana sunku paaiškinti, kadangi galutinai nesuprastas šios fermentinės oksidacijos mechanizmas. Tačiau galima iškelti hipotezę, kad fermentui „patogiau“, išsidėstyti ir katalizuoti oksidacijos reakciją ant grafito kristalitų plokštuminės dalies (grafeno plokštumos), nei ant kristalitų briaunų, tai lemtų pavienių dvigubųjų ryšių atsiradimą ir didelį G smailės poslinkį į trumpesnių bangų sritį.

Lyginant TRGrO ir GrO G smailių bangos skaičių matoma, kad TRGrO G smailė yra per $9,6 \text{ cm}^{-1}$ pasislinkus į mažesnių bangos skaičių sritį lyginant su GrO G smaile. Tai rodo, kad horizontaliosios terminės GrO redukcijos metu buvo dalinai atkurta π -konjūguota ryšių sistema grafeno sluoksnyje [170].

Terminės redukcijos metu, pašalinant deguoninėms funkcinėms grupėms nuo GrO paviršiaus, grafeno paviršiuje susiformuoja vakansijos ir kiti topologiniai defektai. Dar daugiau, terminės redukcijos, kaip ir stiprios oksidacijos, metu vyksta grafeno amorfizacija: mažėja grafito kristalitai, bei grafeno sluoksnyje atsiranda sp^3 hibridizacijos anglies atomų [142]. Dėl šios priežasties didėja grafeno defektiškumas, o tuo pačiu Ramano sklaidos spektruose stebimas D smailės intensyvumo bei $I(D)/I(G)$ didėjimas [150, 169].

Kaip matoma 3.4 paveiksle, GrO ir TRGrO I(D)/I(G) santykis – 1,12 ir 1,11. TRGrO I(D)/I(G) yra nežymiai mažesnis už GrO I(D)/I(G), tačiau abu šie santykiai yra daugiau nei du kartus didesni nei jų pirmtako grafito (I(D)/I(G) = 0,45) ar kitų GOP (I(D)/I(G) nuo 0,36 iki 0,54). Tai parodo, kad GrO ir TRGrO yra defektiškiausios iš visų anglinių medžiagų ir, kad grafitą oksiduojuant stipriu oksidaciniu mišiniu (KMnO₄, NaNO₃, H₂SO₄) vyko stiprus grafito amorfizacijos procesas, vėliau jį termiškai redukuojant dalis defektų, susidariusių oksidacijos metu, buvo pašalinta.

Darbo metu taip pat buvo norima įvertinti ir susintetintų anglinių medžiagų paviršiaus morfologiją, dalelių dydį bei paviršiaus plotą. Šiuo tikslu susintetintos anglinės medžiagos išanalizuotos AJM ir BET metodais. Prieš AJM analizę iš susintetintų anglinių medžiagų buvo ruošiamos vandeninės suspensijos, kuriomis buvo padengiamos silicio plokštelės. Būdingiausi gautų anglinių medžiagų 2D paviršiaus topologijos duomenys pateikti 3.5 paveiksle. Taip pat visuose anglinių medžiagų pavyzdžiuose nuskenavus 3 atsitiktinius 10 μm x 10 μm plotus buvo įvertinti nusėdusių dalelių diametrai bei aukščiai (3.2 lentelė).



3.5 pav. 2D grafito, GOP1, GOP2, GrO ir TRGrO AJM nuotraukos.

3.2 lentelė. *AJM ir BET metodu nustatytos susintetintų anglinių medžiagų charakteristikos: vidutinis dalelių diametras, aukštis ir savitasis paviršiaus plotas.*

Produktas	d_{vid} , nm	h_{vid} , nm	S_{BET} , $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$
GrO	26	0,95	$59,9 \pm 0,6$
	52	8	
GOP1	48	2,6	$8,1 \pm 0,03$
GOP2	53	3,4	$8,7 \pm 0,03$
GOP3	62	5,5	$8,2 \pm 0,04$
GOP4	50	3,5	$10,1 \pm 0,06$
GOP5	56	1,8	$7,6 \pm 0,06$
TRGrO	11	0,5	$235,8 \pm 1,1$
Grafitas	76	1,3	$13,1 \pm 0,04$

Iš gautų duomenų matoma, kad GrO, GOP ir TRGrO yra nanometrines eilės dalelės: d_{vid} nuo 11 iki 62 nm, o h_{vid} nuo 0,5 iki 5,5 nm, TRGrO sudaro mažiausios dalelės, o GOP3 – didžiausios. Taip pat matoma, kad visų sintezių metu mažėjo grafito kristalitų diametras t. y. visos po sintezės gautos dalelės yra mažesnio diametro nei jų pirmtako grafito. Tuo tarpu dalelių h_{vid} GOP1, GOP2, GOP3, GOP4, GOP5 ir GrO atvejais yra didesnis nei jų pirmtako grafito. Manome, kad taip yra dėl deguoninių funkcinių grupių sąveikos pavyzdžių ruošimo (džiūvimo) metu ant silicio padėklų, ko pasekoja formuojasi aukšti dariniai.

Analizuojant GrO AJM duomenis, matyti, kad šią anglinę medžiagą sudaro dviejų skirtingų dydžių dalelės: apie 1 nm aukščio ir 26 nm diametro smulkios dalelės ir 8 nm aukščio bei 52 nm diametro didelės dalelės. Gautas smulkių dalelių aukštis yra būdingas grafeno oksido lakštams [174]. Išmatuotas TRGrO dalelių d_{vid} – 11 nm, o dalelių h_{vid} – 0,5 nm. TRGrO h_{vid} yra artimas išmatuotam grafeno monosluoksniui (0,39 nm) [175].

Žinant, kad savitasis anglinių medžiagų paviršiaus plotas yra viena iš svarbiausių charakteristikų, siekiant jas pritaikyti efektyvių bioelektrokatalizinių sistemų kūrimui [8, 176], buvo norima tai įvertinti. Tam pasitelkta BET analizė. Gautų medžiagų S_{BET} buvo nustatytas iš N_2 adsorbcijos-desorbcijos izotermų. Gauti duomenys pateikti 3.2 lentelėje. Apdorojus duomenis, nustatyta, kad visoms susintetintų anglinių medžiagų N_2 adsorbcijos-desorbcijos izotermoms būdinga H3 tipo histerizės kilpa. Tokios formos izotermos būdingos

medžiagoms, sudarytoms iš plokščių formų dalelių [177, 178]. Šie duomenys patvirtina ir AJM analizės metu gautus duomenis (3.2 lentelė), kad susintetintoms anglinėms dalelėms yra būdinga plokščia forma: dalelių d_{vid} yra nuo 26 iki 76 nm, o dalelių h_{vid} nuo 0,5 iki 5,5 nm.

Susintetintų GOP1, GOP2, GOP3, GOP4 ir GOP5 produktų S_{BET} yra mažesnis nei jų pirmtako grafito. Manome taip yra dėl deguoninių funkcinių grupių, išsidėsčiusių anglinių medžiagų kristalitų briaunose, sąveikos oksidacijos metu, taip susidarant kompaktiškomis, mažesnio ploto struktūroms. Kai anglinių medžiagų sintezei yra naudojamas sonifikuotas grafitas, GOP2 ir GOP4 atvejais, nustatyti S_{BET} plotai yra didesni nei analogiškose sintezės metodikose naudojant ne sonifikuotą grafito žaliavą (GOP1 ir GOP3 atvejais). To buvo galima tikėtis, kadangi pasak Guittonneau ir kt. [152], sonifikacijos metu vyksta grafito amorfizacija, kas įtakoja grafito kristalitų mažėjimą. Iš 2 lentelėje pateiktų duomenų matoma, kad TRGrO sintezės metu – termiškai redukuojant GrO, paviršiaus plotas išauga daugiau nei 4 kartų: TRGrO S_{BET} yra $235,8 \pm 1,1 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, o GrO – $59,9 \pm 0,6 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, todėl TRGrO pasižymi didžiausia S_{BET} iš visų anglinių medžiagų.

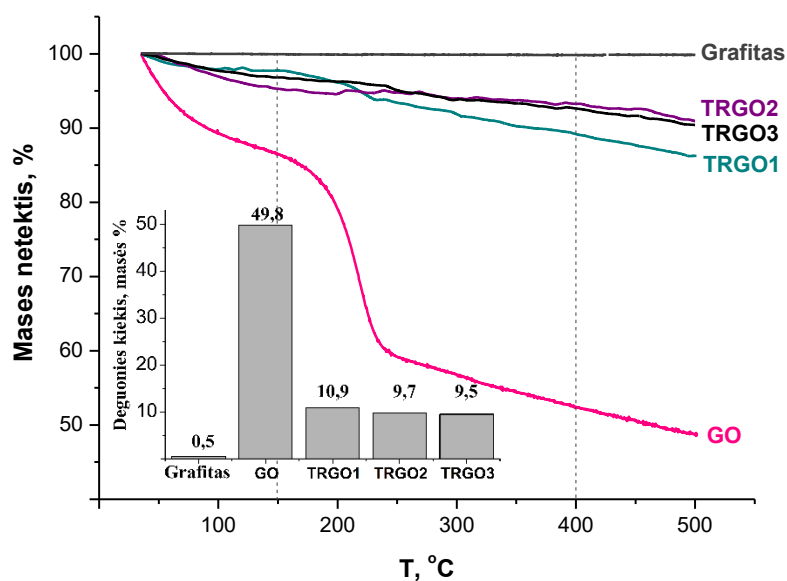
3.1.2 TRGO frakcijų tyrimas

Naudojant GOP ir TRGrO bei du skirtingus fermentus (PQQ-GDH ir ureazę) buvo sukurti bereagentiniai fermentiniai biojutikliai. Nustatyta, kad šios fermentinės bereagentinės sistemos efektyviausiai veikė tada, kai naudojome elektrodus pagamintus iš TRGrO (žr. 3.2.1 ir 3.2.2.1 sk.). Dėl šios priežasties tolesnių darbų metu buvo siekiama optimizuoti grafito oksido sintezės bei jo terminės redukcijos procesą. Tuo tikslu buvo sukonstruota vertikalioji terminė GO ir frakcionavimo sistema, kuri leido greitai redukuoti GO ir surinkti tris skirtingomis savybėmis pasižyminčias TRGO frakcijas (TRGO1, TRGO2 ir TRGO3), bei, kas svarbiausia, dalinai atkartoti antrosios ir trečiosios frakcijos gavimą. Žinant, kad TRGO savybės (savitasis paviršiaus plotas ir funkcinių grupių kiekis ir kt.) labai priklauso nuo jo pirmtako, mes siekėme susintetinti grafeno oksidą, kuris turėtų didelį deguoninių funkcinių grupių kiekį. Tuo tikslu

GO sintezė buvo atliekama pagal [156] metodiką. Šios sintezės metu gautame produkte anglies ir deguonies santykis turėtų siekti 4 : 3,1 [179].

Siekiant išsiaiškinti gautų anglinių medžiagų (GO ir TRGO1, TRGO2 ir TRGO3) savybes jos išanalizuotos naudojant SEM, XRD, TGA, BET, Ramano sklaidos spektrinės ir elementinės analizės metodus.

Žinant, kad GO ir TRGO frakcijų paviršiuje yra deguoninių funkcinų grupių, pirma buvo norima tai įvertinti. Tam pasitelkti termogravimetrinės bei elementinės analizės metodai (žr. 2.4 skyrių). Gauti duomenys pateikti 3.6 pav.

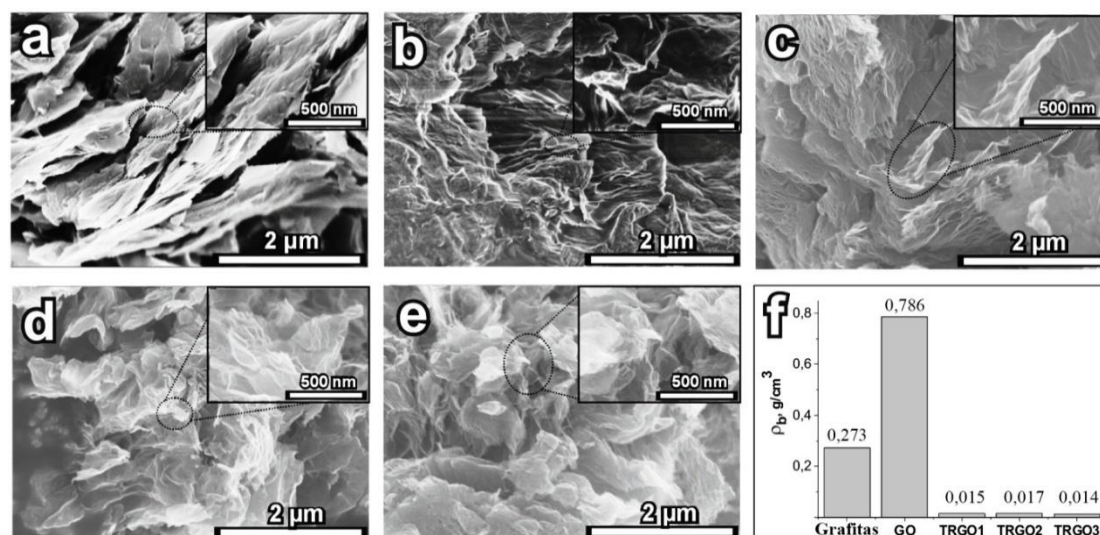


3.6 pav. Grafito, GO ir TRGO frakcijų TGA kreivės. Intarpe pateikti elementinės analizės duomenys.

Iš gautų duomenų matoma, kad grafitui (3.6 pav.) masės netektis nestebima. GO ir TRGO frakcijų TGA kreives galime suskirstyti į du intervalus: nuo 35 °C iki 150 °C, nuo 150 °C iki 400 °C. Pirmame intervale matomas anglinių medžiagų masės sumažėjimas siejamas su drėgmės – adsorbuoto ar interkaliuoto vandens pasišalinimu [166]. Akivaizdu, kad šiame intervale didžiausia masės netektis (net 13 %) būdinga GO, tuo tarpu TRGO netenka tik iki 5 % savo masės. Antrajame intervale (150 °C iki 400 °C) matomas anglinių medžiagų masės sumažėjimas siejamas su labilių karboksi-, laktono ir anhidrido grupių atskilimu CO₂ ar CO pavidalais nuo anglinių medžiagų paviršiaus [138]. Šiame intervale

didžiausiai masės netektis būdinga GO (34 %) ir TRGO1 (8 %). Šių dviejų medžiagų didžiausias masės netekties greitis pasiekiamas esant 275 °C temperatūrai, tai parodo vienodų procesų vyksmą. TRGO2 ir TRGO3 atveju stebimas pastovus, nežymus masės mažėjimas visos analizės metu. Tai rodo, kad šios frakcijos turi mažesnę funkcinių grupių kiekį savo paviršiuje, lyginant su GO ir TRGO1. Šiuos duomenis papildė ir elementinė medžiagų analizė (3.6 pav. interpas), kurios metu nustatyta, kad TRGO1 frakcijoje yra 10,9 %, TRGO2 – 9,7 %, o TRGO3 – 9,5 % deguonies. Aišku, kad deguoninių funkcinių grupių kiekis mažėja didėjant dalelių nukeliautam atstumui nuo vertikaliosios terminės redukcijos ir frakcionavimo sistemos kaitinimo zonos, t. y. toliau keliauja labiau redukuotos dalelės. Išanalizavus šiuos duomenis galime teigti, kad TRGO3 yra labiausiai redukuota frakcija.

Nustačius deguoninių funkcinių grupių kiekį GO ir TRGO frakcijose, buvo norima įvertinti ir šių anglinių medžiagų struktūrą. Tuo tikslus buvo nustatytas gautų anglinių medžiagų piltninis tankis ir atlikta jų SEM analizė. Gauti rezultatai pateikti 3.7 paveiksle.

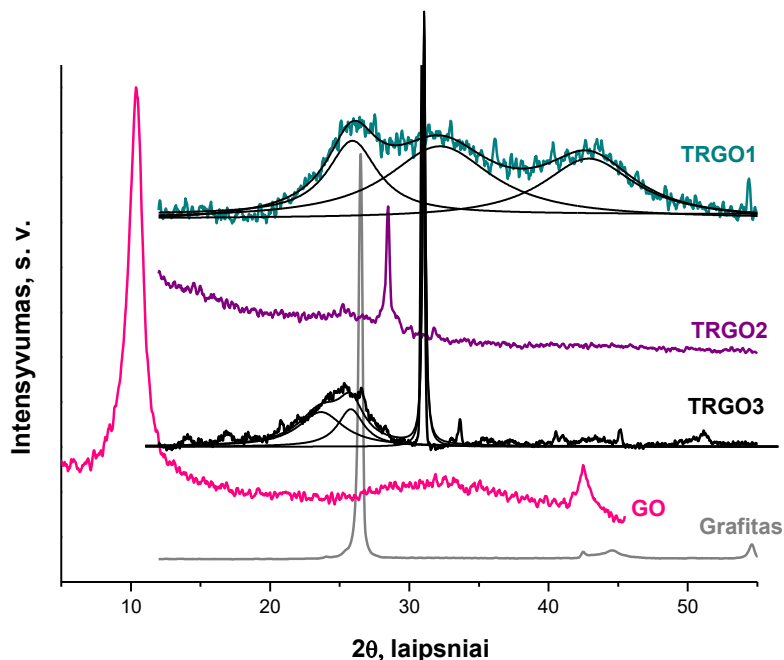


3.7 pav. Grafito (a), GO (b) ir TRGO (c – TRGO1, b – TRGO2, e – TRGO3) SEM nuotraukos ir šių medžiagų piltninio tankio reikšmės (f).

Iš gautų anglinių medžiagų SEM nuotraukų matoma, kad TRGO frakcijų ir jų pirmtakų (grafito ir GO) morfologija skiriasi: grafitas pasižymi sluoksniuota kristaline struktūra, tuo tarpu GO pasižymi mažesniu kristališkumu nei grafitas

ir yra sudaryta iš kompaktiškai supakuotų grafeno oksido lakštų, tuo tarpu TRGO frakcijos sudarytos iš ne taip kompaktiškai supakuotų, atsitiktinai orientuotų ir defektuotų grafeno lakštų. Iš medžiagų piltninio tankio ρ_b duomenų (3.7 pav. f) matyti, kad didžiausias ρ_b būdingas GO ir grafitui, o TRGO frakcijų ρ_b yra mažas. Mažas TRGO frakcijų piltninis tankis parodo, kad šių medžiagų dalelės yra defektuotos ir atsitiktinai orientuotos erdvėje, tai patvirtina SEM duomenis.

Darbo metu buvo norima įvertinti ir susintetintų anglinių medžiagų kristalinę struktūrą. Tam buvo pasitelkta XRD analizė. Gautos medžiagų rentgenogramos pateiktos 3.8 paveiksle.

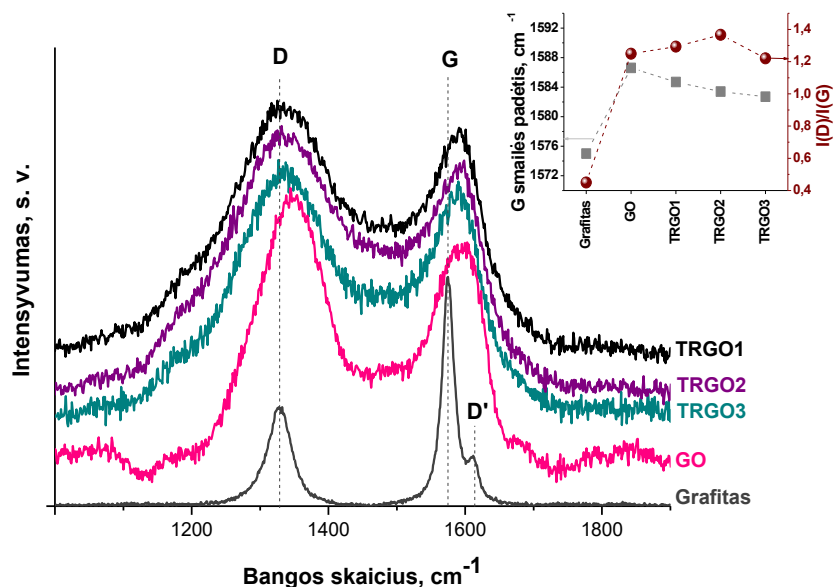


3.8 pav. Grafito, GO ir TRGO frakcijų XRD duomenys papildyti gludinimo kreivėmis.

Grafito rentgenogramoje matoma aiški smailė, kai $2\theta = 26,54^\circ$, ši smailė apibūdina grafito heksagoninės kristalinės gardelės (002) plokštumą, taip pat matomos trys mažesnio intensyvumo smailės: $2\theta = 42,36^\circ$, apibūdinanti (100) plokštumą; $2\theta = 44,56^\circ$, apibūdinanti (101) plokštumą ir $2\theta = 55,66^\circ$, apibūdinanti (004) plokštumą. Iš grafito rentgenogramos, panaudojant Bragg'ų ir Scherrerio lygtis ir (002) plokštumą apibūdinančios smailės padėtimi bei puspločiu, buvo apskaičiuotas tarpplokštuminis atstumas d_{002} (0,34 nm) ir

kristalitų dydis (31,9 nm). GO rentgenogramoje matomos dvi pagrindinės smailės, kai $2\theta = 10,35^\circ$ ir $2\theta = 42,57^\circ$. Pagal šiuos duomenis apskaičiuotas atstumas tarp GO sluoksnių – 0,86 nm, o kristalitų dydis 7,2 nm. Nagrinėjant TRGO frakcijų rentgenogramas pastebėta, kad TRGO2 ir TRGO3 frakcijoms būdinga tam tikros tvarkos struktūra (stebimos smailės aiškiai išreikštos, neišplitusios), tuo tarpu TRGO1 frakcijai būdinga tam tikra amorfinė struktūra – smailės išplitusios ir persiklojusios viena su kita. TRGO1 rentgenogramoje matomos trys viena su kita persiklojusios smailės. Jos sutampa su grafito (002), (100) ir GO (101) ($2\theta = 32,23^\circ$) kristalografines plokštumas apibūdinančiomis smailėmis. Todėl galime teigti, kad TRGO1 frakcijos struktūra yra tarpinė tarp grafito ir GO. TRGO2 ir TRGO3 rentgenogramose esančios smailių, nusakančių šių medžiagų kristalinę struktūrą (TRGO2 $2\theta = 28,49^\circ$ ir TRGO3 $2\theta = 30,95^\circ$), padėtys nesutampa nei su grafito nei su GO, jos pasislinkusios į didesnių kampų sritį. Pagal jas paskaičiuoti tarplokštuminiai atstumai – 0,31 nm TRGO2 atveju ir 0,29 nm TRGO3 atveju.

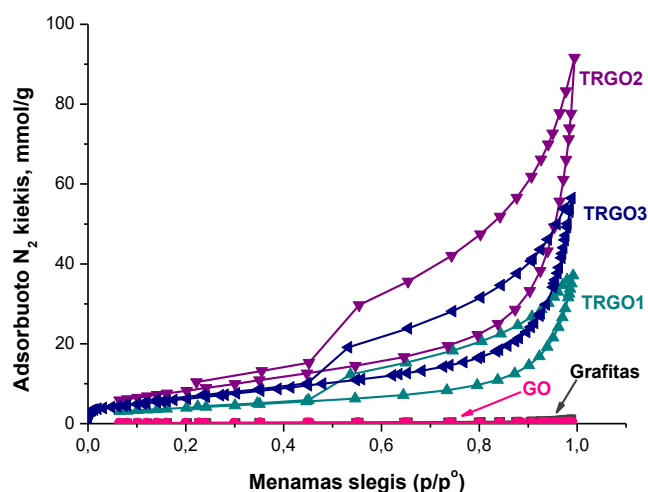
Pastebėjus, kad gautos medžiagos yra defektiškos, buvo norima tai įvertinti. Tam pasitelkta Ramano sklaidos spektrinė analizė. Defektiškumas buvo vertinamas lyginant Ramano sklaidos spektruose matomų D ir G smailių $I(D)/I(G)$. Žemiau pateikti grafito, GO ir TRGO frakcijų Ramano sklaidos spektrai $1000\text{ cm}^{-1} - 1900\text{ cm}^{-1}$ srityje.



3.9 pav. Grafito, GO ir TRGO frakcijų Ramano sklaidos spektrai. Intarpe pateikta G smailės pozicijos ir $I(D)/I(G)$ santykio priklausomybė nuo anglinės medžiagos.

Iš 3.9 paveikslo matoma, kad grafito Ramano sklaidos spektre yra išsidėsčiusios trys smailės: didelio intensyvumo G smailę ties 1575 cm^{-1} , D smailę ties 1328 cm^{-1} ir mažo intensyvumo smailę D' ties 1612 cm^{-1} . Lyginant GO ir grafito Ramano sklaidos spektrus, matyti, kad GO G smailė beveik per 12 cm^{-1} pasislinkusi į didesnių bangos skaičių sritį, o D smailės intensyvumas išauga. Taip yra dėl to, kad stiprios oksidacijos metu grafeno plokštumoje susiformuoja pavienių dvigubųjų ryšių, kurie padidina G smailės dažnį [150]. Lyginant TRGO frakcijų G smailės padėtį su GO G smaile (3.9 pav. intarpas) yra matomas, kad einant nuo GO link TRGO3 G smailė slenkasi į mažesnių bangos skaičių sritį. Didžiausias poslinkis yra būdingas TRGO3, tai reiškia, kad šios frakcijos dalelės yra labiausiai redukuotos, tai patvirtina ir TGA bei elementinės analizės duomenys. G smailės poslinkis į mažesnių bangų sritį parodo, kad terminės redukcijos metu buvo dalinai atkurta π -konjūguotų ryšių sistema nuo kurios priklauso anglinių medžiagų laidumas [142]. Lyginant gautų anglinių medžiagų $I(D)/I(G)$ santykį matoma, kad frakcijos yra defektiškesnės, nei jų pirmtakai (grafitas ir GO), o didžiausiu defektiškumu pasižymi TRGO2 ($I(D)/I(G) = 1,4$).

Žinant, kad specifinis anglinių medžiagų paviršiaus plotas yra viena iš svarbiausių charakteristikų, siekiant jas pritaikyti efektyvių bioelektrokatalizinių sistemų kūrimui [8, 176], buvo norima tai įvertinti. Tam pasitelkta BET analizė. Gautų medžiagų S_{BET} ir vidutinis porų d_{vid} buvo nustatytas iš N_2 adsorbcijos-desorbcijos izotermų (3.10 pav.), gauti duomenys pateikti 3.3 lentelėje.



3.10 pav. Grafito, GO ir TRGO frakcijų N_2 adsorbcijos – desorbcijos izotermos.

3.3 lentelė. Grafito, GO ir TRGO frakcijų BET charakteristikos: savitasis paviršiaus plotas ir vidutinis porų diametras.

	$S_{\text{BET}}, \text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	Porų $d_{\text{vid}}, \text{Å}$
Grafitas	$12,8 \pm 0,1$	$107,9 \pm 14,0$
GO	$11,1 \pm 0,2$	$42,3 \pm 5,5$
TRGO1	$316,8 \pm 1,1$	$142,3 \pm 18,5$
TRGO2	$689,5 \pm 11,3$	$148,8 \pm 19,3$
TRGO3	$503,0 \pm 15,7$	$146,3 \pm 19,0$

Iš gautų duomenų matoma kad visoms N_2 adsorbcijos-desorbcijos izotermoms būdinga H3 tipo histerizės kilpa, kas būdinga medžiagoms, sudarytoms iš plokščių formų dalelių [177, 178]. Iš lentelėje pateiktų duomenų aišku, kad einant nuo GO iki TRGO2 S_{BET} ir porų d_{vid} didėja. Išanalizavus šiuos duomenis nustatyta, kad termiškai redukuojant GO, jo paviršiaus plotas išauga nuo 30 iki 60 kartų, o porų d_{vid} daugiau nei 3 kartus. Didžiausiu paviršiaus plotu pasižymi TRGO2 ($689,5 \pm 11,3 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), tačiau šis plotas yra daug mažesnis už idealaus grafeno lakšto (teoriškai paskaičiuotas $2630 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) [180]. Tuo tarpu TRGO3 S_{BET} ir porų d_{vid} yra mažesnis nei TRGO2. Tai galėjo lemti mažesnis

šios frakcijos defektiškumas lyginant su TRGO2. Sugretinus duomenis iš 10 paveikslo ir 3.3 lentelės matyti, kad S_{BET} ir vidutinio porų diametro kitimas yra toks pat, kaip ir $I(\text{D})/I(\text{G})$ (defektiškumo) kitimas. Dėl šios priežasties galime daryti išvadą, kad frakcijų S_{BET} yra tiesiogiai proporcingas defektų skaičiui ir atvirkščiai.

Kaip minėta anksčiau, oksidacijos metu mažėja grafito kristalantai ir didėja grafeno lakštų defektiškumas. Tačiau iš 3.3 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad GO S_{BET} ir porų d_{vid} yra mažesni nei grafito. Taip yra, kadangi GO struktūra yra „kompaktiškesnė“ nei grafito (3.7 pav. a ir b) ir matavimo metu N_2 negali patekti tarp GO plokštumų [181].

Palyginus GrO ir GO charakteristikas, matyti, kad šios medžiagos turi vienodą deguoninių funkcinę grupių kiekį (34 % masės netekties 150 – 400 °C), GrO deguoninės funkcinės grupės išsidėsčiusios daugiau plokštuminėje lakšto dalyje nei GO atveju, ką parodo didesnis Ramano sklaidos spektruose matomas G smailės poslinkis į didesnių bangų skaičių sritį: per 20,6 cm^{-1} GrO atveju ir per 12 cm^{-1} GO atveju. Nepaisant to, GO yra būdingas didesnis defektiškumas ($I(\text{D})/I(\text{G}) = 1,25$) ir mažesnis savitasis paviršiaus plotas ($S_{\text{BET}} = 11,1 \pm 0,2 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) nei GrO – $I(\text{D})/I(\text{G}) = 1,1$, o $S_{\text{BET}} = 59,9 \pm 0,6 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), todėl galime teigti, kad GO sudarytas iš mažesnių dalelių, kurių paviršiuje išsidėsčiusios deguoninės funkcinės grupės stipriai sąveikauja, taip sudarydamos tankią GO struktūrą. Dėl šios priežasties terminės redukcijos metu susidaro didesnis slėgis tarp grafeno lakštų, dėl kurio pasireiškia stipresnis amorfizacijos efektas ir gaunami redukcijos produktai pasižymi didesniu paviršiaus plotu (TRGO frakcijų S_{BET} nuo $316,8 \pm 1,1$ iki $689,5 \pm 11,3 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) nei redukuojant ne tokias kompaktiškas struktūras – iš GrO gauto TRGrO $S_{\text{BET}} = 235,8 \pm 1,1 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.

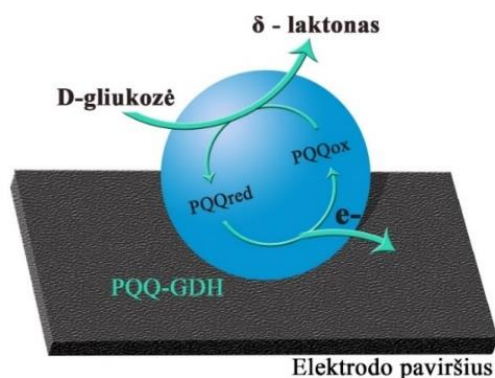
3.2 Bereagentinės fermentinės sistemos anglinių medžiagų pagrindu

Kaip jau buvo rašyta 1.2 skyriuje, šiuo metu didžiausias dėmesys skiriamas trečios kartos biojutiklių paieškoms, kurių pagrindas yra TEP tarp fermento aktyvaus centro ir elektrodo paviršiaus, todėl šiame darbe didžiausias dėmesys buvo skirtas kryptingai elektrodinių medžiagų sintezei, ant kurių vyktų TEP.

Tuo tikslu buvo susintetintos ir nuodugniai ištirtos 11 anglinių medžiagų: GrO, GO, GOP(1 – 5), TRGrO, TRGO1, TRGO2 ir TRGO3. Siekiant išsiaiškinti šių medžiagų tinkamumą bereagentinių sistemų kūrimui, iš jų buvo sukonstruoti amperometriniai biojutikliai, kaip aptašyta 2.5 ir 2.5.1 skyriuose, kurių biologinę dalį sudarė fermentai nuo pirolino chinolinchinono priklausoma gliukozės dehidrogenazė išskirta iš *Acinetobacter calcoaceticus* sp., ureazė išskirta iš *Canavalia ensiformis* ir D-fruktozės dehidrogenazė išskirta iš *gluconobacter industrius*.

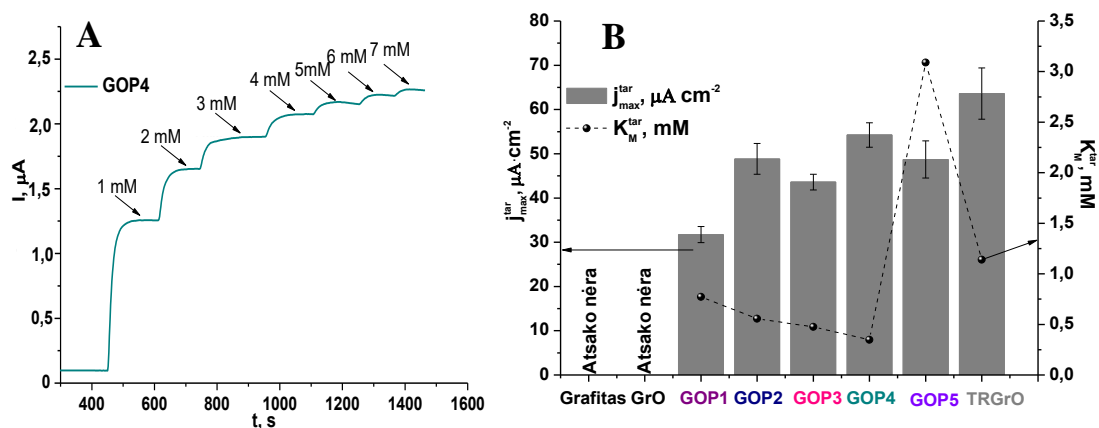
3.2.1 Bereagentinių sistemų su PQQ-GDH tyrimas

Siekiant išsiaiškinti ar TEP gali sėkmingai vykti heterogeninėse sistemose su naujomis medžiagomis – GrO, GOP bei TRGrO, jų pagrindu buvo sukonstruoti angliniai elektrodai (2.5 skyrius) ir ištirtas jų veikimas. Kontrolinio elektrodo konstrukcijai buvo panaudotas šių anglinių medžiagų pirmtakas – grafitas. Ant paruoštų elektrodų paviršiaus, buvo dedamos fermentinės membranos su imobilizuota PQQ-GDH (2.5.1 skyrius). Šis fermentas katalizuoja D-gliukozės oksidacijos reakciją iki δ -laktono [49]. Apie sukurtų sistemų veikimo efektyvumą buvo sprendžiama iš generuojamos anodinės srovės stiprio į sistemą pridėjus skirtingus kiekius D-gliukozės. Kuomet sistemose buvo naudoti elektrodai, pagaminti iš grafito bei GrO, jokių srovės stiprio išaugimų pridėjus D-gliukozės nepastebėta, kas rodo, jog TEP nevyksta. Tuo tarpu heterogeninėse sistemose su elektrodais, pagamintais iš GOP1, GOP2, GOP3, GOP4, GOP5 ir TRGrO, į elektrocheminę celę pridėjus D-gliukozės buvo registruojamas anodinės srovės stiprio augimas parodantis, jog nuo fermento aktyviojo centro ant anglinio elektrodo paviršiaus vyko TEP. Manoma, kad šiose sistemose elektronų pernaša vyksta pagal sekantį mechanizmą: D-gliukozės oksidacijos eigoje 2 elektronai pernešami nuo D-gliukozės molekulės ant PQQ-GDH kofaktoriaus PQQ, kuris reoksiduojasi elektronams patenkant ant elektrodo paviršiaus. Šis mechanizmas pateiktas 3.11 paveiksle.



3.11 pav. TEP tarp PQQ-GDH ir elektrodo paviršiaus, $E = 0,4 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

Sukurtiems bereagentiniams biojutikliams, buvo nustatytos generuojamos srovės stiprio priklausomybės nuo D-gliukozės koncentracijos (GOP4 amperograma pateikta 3.12 pav. A). Dėl skirtingų geometrinių elektrodų plotų srovės stipris buvo perskaičiuotas į srovės tankį. Iš gautų priklausomybių, naudojantis elektrocheminiams matavimams adaptuota Michaelio-Menten hiperbolės lygtimi (8), buvo paskaičiuoti pagrindiniai kinetiniai parametrai – j_{max}^{tar} ir K_M^{tar} . Sistemų kinetinių parametru reikšmės pateiktos 3.12 B paveiksle.



3.12 pav. Bioelektrokatalizinių sistemų su PQQ-GDH kinetinių parametru priklausomybės nuo elektrodinės medžiagos (A) ir GOP4 amperograma (B) išmatuota standartinėmis sąlygomis.

Iš gautų rezultatų matoma, kad efektyviausiai TEP vyko kuomet sistemose buvo naudojami elektrodai, pagaminti iš GOP2, GOP4 ir TRGrO, tai rodo didžiausios j_{max}^{tar} reikšmės ($48,8 \pm 3,5 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, $54,3 \pm 2,8 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ir $63,6 \pm 5,8 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ atitinkamai). Tuo tarpu mažiausiu TEP efektyvumu pasižymėjo biojutiklis, kuriame, kaip elektrodinė medžiaga naudotas GOP1 ($j_{max}^{tar} = 31,7 \pm$

1,8 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$). Lyginant sukurtų sistemų j_{max}^{tar} reikšmes su naudotų elektrodinių medžiagų charakteristikomis, buvo siekiama atsakyti į du svarbiausius klausimus: kokios elektrodinių medžiagų savybės įtakoja TEP atsiradimą ir nuo kokių savybių priklauso TEP efektyvumas?

Iš TGA duomenų nustatyta (3.1 pav.), kad ant GOP ir TRGrO paviršiaus yra nedidelis kiekis deguoninių funkcinų grupių – masės netektis 150 °C – 400 °C intervale yra nuo 1 iki 6 %. Didžiausiu deguoninių funkcinų grupių kiekiu pasižymi GrO – masės netektis 150 °C – 400 °C intervale yra 34 %. Tuo tarpu iš Boehmo titravimo duomenų (3.1 lentelė) matoma, kad ant GrO paviršiaus yra išsidėstęs didelis kiekis rūgštinės prigimties, o ant GOP1, GOP2, GOP3 ir GOP4 paviršiaus – bazinės prigimties funkcinės grupės. Didėjant šių grupių kiekiui didėja ir biojutiklių, kuriuose naudotos šios anglinės medžiagos, j_{max}^{tar} reikšmės. Iš šių duomenų galime daryti išvadą, kad TEP vyksmui tarp PQQ-GDH ir anglinio elektrodo paviršiaus yra būtinas optimalus deguoninių funkcinų grupių kiekis, nes esant per dideliu funkcinų grupių skaičiui (GO_1 atveju) ar iš vis jų neesant (grafito atveju), TEP nebevyksta. Deguoninės funkcinės grupės, geba dalyvauti elektronų pernašos reakcijose [38], todėl ant elektrodo paviršiaus tarnauja, kaip papildomi redokso centrai, ko pasekoje yra sukuriama donoro-tiltelio-akceptorius sistema, kuri leidžia greitai ir efektyviai regeneruotis fermentui. Dar daugiau, deguoninės funkcinės grupės gali dalyvauti ir fermento tinkamo orientavimo ant elektrodo paviršiaus procese, ko pasekoje pasiekama optimali fermento aktyviojo centro orientacija elektrodo paviršiaus atžvilgiu.

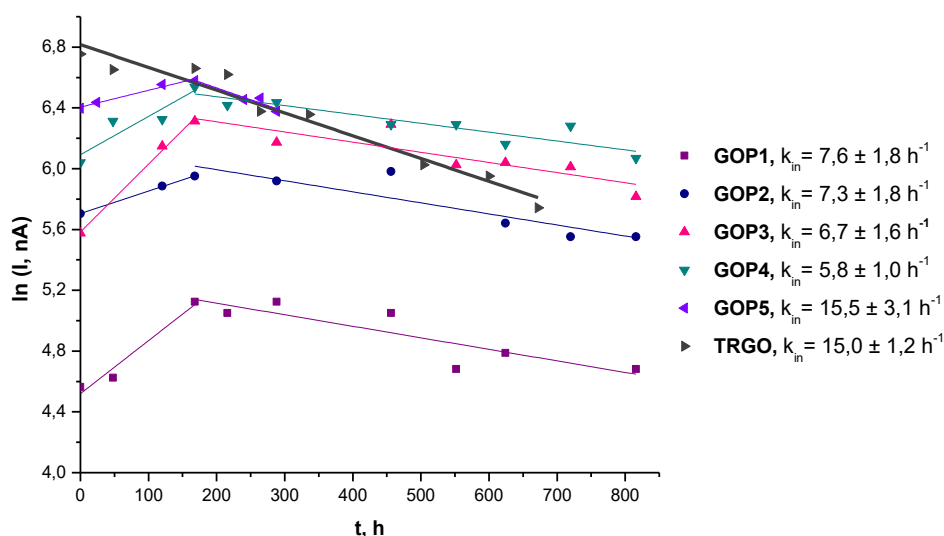
Iš BET analizės duomenų (3.2 lentelė) nustatyta, kad TRGrO pasižymi didžiausiu paviršiaus plotu ($235,8 \pm 1,1 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$), kas galėtų lemti ir didžiausią biojutiklio su šia angline medžiaga efektyvumą, tačiau GrO nustatytas paviršiaus plotas ($59,9 \pm 0,6 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$) lyginant su kitais GOP ($7,6 \pm 0,06 - 10,1 \pm 0,06 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$) yra beveik 6 kartus didesnis, tačiau TEP tarp šios anglinės medžiagos ir PQQ-GDH nevyksta. Dar daugiau, biojutiklių su elektrodais pagamintais iš GOP j_{max}^{tar} varijuoja nuo $31,7 \pm 1,8$ iki $54,3 \pm 2,8 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ir šios reikšmės yra artimos j_{max}^{tar} reikšmei ($63,6 \pm 5,8 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) biojutikliui su TRGrO nežiūrint, kad šių medžiagų paviršiaus plotas yra 20 – 30 kartų mažesnis nei TRGrO. Tai rodo, jog medžiagų

paviršiaus plotas nėra pagrindinis faktorius nulemiantis biojutiklių efektyvumą. Iš AJM duomenų (3.2 lentelė) nustatyta, kad TRGrO sudarytas iš mažiausių dalelių (dalelių d_{vid} 11 nm, o dalelių h_{vid} – 0,5 nm). Šios anglinės medžiagos dalelių d_{vid} yra beveik 5 kartus mažesnis nei kitų GOP, o aukštis daugiau nei du kartus mažesnis. Dėl mažiausių dalelių, ant TRGrO elektrodo glaudžiai prispaudus PQQ-GDH membraną, tarp fermento ir šio elektrodo paviršiaus atsiranda minimaliausias atstumas, o tai užtikrina efektyvę TEP.

Analizuojant K_M^{tar} reikšmes nustatyta, kad GOP1, GOP2, GOP3 ir GOP4 atvejais sistemų K_M^{tar} reikšmės ($0,77 \pm 0,02$ mM, $0,56 \pm 0,07$ mM, $0,46 \pm 0,03$ mM, $0,35 \pm 0,02$ mM atitinkamai) beveik sutampa ar yra net mažesnės už PQQ-GDH K_M reikšmę išmatuotą tirpale (0,5 mM [141]). Manome, kad ant šių anglinių medžiagų paviršiaus pakinta PQQ-GDH aktyvaus centro konformacija dėl ko šis fermentas tampa reaktingesnis t.y. pasiekiami maksimalūs reakcijos greičiai esant mažesnėms substrato koncentracijoms. Taip pat buvo pastebėta, kad sintezei naudojant sonifikuotą grafito žaliavą (GOP2 ir GOP4 atvejai), gauti oksidacijos produktai pasižymi didesniu giminingumu PQQ-GDH (mažesnės K_M^{tar} reikšmės) nei oksiduojant nepaveiktą grafito žaliavą (GOP1 ir GOP3 atvejai). Nustatyta, kad GOP2 ir GOP4 paviršiuje yra didesnis bazinės prigimties funkcinių grupių kiekis bei turi didesnę paviršiaus plotą nei GOP1 ir GOP3 medžiagos. Šios charakteristikos galėjo lemti ir mažesnes K_M^{tar} reikšmes. Žinant kad GOP5 turi panašų funkcinių grupių kiekį, S_{BET} , kaip kiti GOP, o nustatyta sistemos K_M^{tar} reikšmė yra daug didesnė ($3,09 \pm 0,69$ mM), galime teigti kad sistemų K_M^{tar} reikšmės priklauso ir nuo kitų anglinių medžiagų parametrų. Iš Ramano sklaidos spektrų (3.4 pav.) nustatyta, kad GOP1, GOP2, GOP3 ir GOP4 π -konjuguotų ryšių sistema yra suardyta nežymiai, tuo tarpu GOP5 atveju yra gan stipriai suardyta π -konjuguotų ryšių sistema. Dėl šios priežasties, gali būti apsunkinta elektronų pernaša tiek nuo fermento aktyvaus centro, tiek pačiame grafeno lakšte, kas gali apspręsti biojutiklių K_M^{tar} padidėjimą. Tuo tarpu, TRGrO pasižymi labiausiai suardyta π -konjuguotų ryšių sistema, o nustatyta sistemos K_M^{tar} reikšmė – $1,14 \pm 0,17$ mM. TRGrO turi didžiausią paviršiaus plotą ir funkcinių grupių kiekį lyginant su GOP. Šiuo atveju didelis funkcinių grupių

kiekis, gebantis dalyvauti elektronų pernašos reakcijose, kompensuoja suardytos π -konjuguotų ryšių sistemos daromą neigiamą įtaką elektronų pernašai tarp fermento ir elektrodo paviršiaus. Šie rezultatai dar kartą patvirtina, kad biojutiklių su PQQ-GDH efektyvus bei greitas veikimas labiausiai priklauso nuo deguoninių funkcinių grupių kiekio ant elektrodo paviršiaus, tačiau reikia nepamiršti, kad didėjant jų skaičiui, didėja medžiagų defektiškumas, bei paviršiaus hidrofiliškumas, o esant per dideliame jų kiekiui medžiaga tampa netinkama biojutiklių kūrimui, kaip GrO atveju. Hidrofiliškumas gali būti lemiamas faktorius įtakojančias fermentų stabilumą.

Siekiant išsiaiškinti, kaip kinta sukurtų biojutiklių jautris laike daugiau nei 800 valandų buvo matuojami sukurtų biojutiklių atsakai į 5 mM D-gliukozės. Logaritminis jautrio kitimas laike pateiktas 3.13 paveiksle.



3.13 pav. Logaritminis biojutiklių gautų naudojant skirtingas elektrodines medžiagas ir PQQ-GDH jautrio kitimas laike išmatuotas standartinėmis sąlygomis.

Iš gautų duomenų matoma, kad pirmąsias 168 matavimo valandas biojutiklių su GOP1, GOP2, GOP3, GOP4 ir GOP5 jautriai į 0,5 mM D-gliukozės auga. Per šį laikotarpį fermentinė membrana brinksta, o joje esanti PQQ-GDH molekulė orientuojasi anglinių medžiagų paviršiaus atžvilgiu tol kol įgyja tinkamiausią TEP orientaciją. Vėliau biojutiklių logaritminis jautris D-gliukozei mažėjo tolygiai. Tuo tarpu biojutiklio su TRGrO elektrodine medžiaga

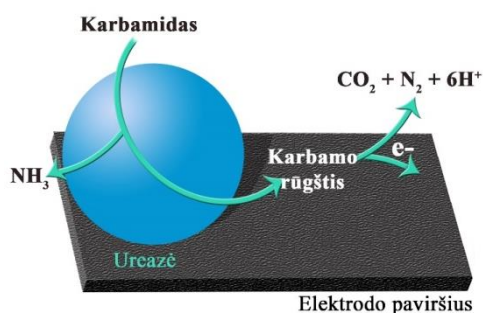
logaritminis jautris mažėjo tolygiai nuo pirmos matavimo valandos. Iš 3.13 paveiksle pateiktų tiesinių priklausomybių nuolinkio kampo nustatytos biojutiklių su susintetintomis anglinėmis medžiagomis inaktyvacijos konstantos (k_{in}): GOP1 $k_{in} = 7,6 \pm 1,8 \text{ h}^{-1}$, GOP2 $k_{in} = 7,3 \pm 1,8 \text{ h}^{-1}$, GOP3 $k_{in} = 6,7 \pm 1,6 \text{ h}^{-1}$, GOP4 $k_{in} = 5,8 \pm 1,0 \text{ h}^{-1}$, GOP5 $k_{in} = 15,5 \pm 3,1 \text{ h}^{-1}$ ir TRGrO $k_{in} = 15,0 \pm 1,2 \text{ h}^{-1}$. Nustatytų k_{in} reikšmės biojutikliams su GOP1, GOP2, GOP3, GOP4 yra tos pačios eilės, kas rodo vienodą inaktyvacijos pobūdį. Per eilę didesnės inaktyvacijos konstantos nustatytos sistemoms su GOP5 ir TRGrO ($15,5 \pm 3,1 \text{ h}^{-1}$ ir $15,0 \pm 1,2 \text{ h}^{-1}$). Iš TGA ir Boehmo titravimo duomenų (3.1 pav. ir 3.1 lentelė) nustatyta, kad GOP1, GOP2, GOP3 ir GOP4 turi panašų funkcinių grupių kiekį, o GOP5 ir TRGrO turi didžiausią funkcinių grupių kiekį savo paviršiuje lyginant su kitais GOP. Dėl šios priežasties, manome kad didžiausia įtaką biojutiklių su imobilizuota PQQ-GDH inaktyvacijai daro deguoninių funkcinių grupių ant anglinių medžiagų paviršiaus eikvojimasis. Lyginant TGA rezultatus pastebėta, kad GOP5 paviršiuje yra šiek tiek didesnis funkcinių grupių kiekis nei kitų GOP paviršiuje ir žymiai mažesnis nei ant TRGrO, kai tuo tarpu biojutiklio su šia angline medžiaga k_{in} yra didžiausia. Dėl šios priežasties, galime teigti kad sistemų k_{in} reikšmės lemia kitos anglinių medžiagų savybės. Iš Ramano sklaidos rezultatų (3.4 pav.) nustatyta kad GOP1, GOP2, GOP3 ir GOP4 π -konjuguotų ryšių sistema yra suardyta nežymiai, tuo tarpu GOP5 ir TRGrO atveju π -konjuguotų ryšių sistema yra gan stipriai suardyta. Suardyta π -konjuguotų ryšių sistema įtakoja anglinių medžiagų struktūros pakitimus t.y. grafeno lakštai nebetenka plokščios jam būdingos geometrijos – atsiranda nelygumai [123, 125]. Manome, kad su tokiu paviršiumi fermento molekulė sąveikauja stipriau ir sudaro pernelyg didelį kiekį ryšių. Dėl šios priežasties fermento tretinė struktūra deformuojama ir fermentas praranda savo aktyvumą, ko pasekoje biojutiklis inaktyvuojasi.

3.2.2 Bereagentinių sistemų su ureaze tyrimas

Darbe buvo atlikti heterogeninių sistemų su ureaze tyrimai, kurių galutinis tikslas išsiaiškinti ar susintetintos ir iširtos anglinės medžiagos yra tinkamos

bereagentinių karbamido biojutiklių kūrimui. Tuo tikslu iš visų 11 susintetintų medžiagų ir grafito buvo paruošti elektrodai (2.5 skyrius) ant kurių buvo dedamos fermentinės membranos su imobilizuota ureaze (2.5.1 skyrius).

Darbo metu, apie sukurtų bereagentinių karbamido biojutiklių veikimo efektyvumą buvo sprendžiama iš generuojamos anodinės srovės stiprio išaugimo į sistemą pridėjus karbamido. Ankstesni tyrimai, atlikti VU GMC BchI Bioanalizės skyriuje[182] parodė, kad esant 0,2 V darbinio elektrodo potencialui ir į elektrocheminę celę pridėjus karbamido, ureazė katalizuoja karbamido hidrolizės reakciją iki karbamo rūgšties, kuri tiesiogiai oksiduojasi ant anglinio elektrodo paviršiaus – vyksta tiesioginė karbamo rūgšties oksidacija (TKRO). Šios elektrooksidacijos metu gali susidaryti hidrazinas, kuris toliau oksiduojasi. Galimas TKRO oksidacijos mechanizmas ant anglinio elektrodo paviršiaus pateiktas 3.15 paveiksle.

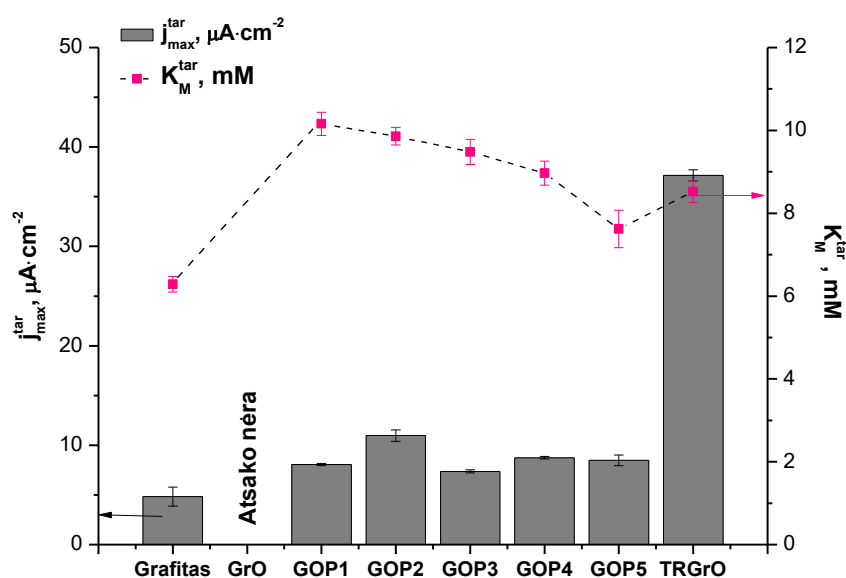


3.15 pav. *Karbamido hidrolizė ir susidariusios karbamido rūgšties oksidacija ant elektrodo paviršiaus, pagaminto iš grafito oksidacijos produkto, $E = 0,2\text{ V}$ vs. Ag/AgCl .*

3.2.2.1 Sistemų su GOP ir TRGrO tyrimas

Pirmiausia buvo tiriami biojutikliai, kurių elektrodinę dalį sudarė GrO, GOP, TRGrO ir grafitas. Kuomet elektrocheminėje celėje buvo naudoti elektrodai pagaminti iš GrO – anodinės srovės augimas pridėjus karbamido nebuvo fiksuojamas, kas rodo, jog TKRO nevyksta, o ši elektrodinė medžiaga, kaip ir PQQ-GDH atveju yra netinkama fermentinių bereagentinių sistemų kūrimui. Tuo tarpu sistemose su elektrodais, pagamintais iš grafito, GOP1, GOP2, GOP3, GOP4, GOP5 ir TRGrO, į elektrocheminę celę pridėjus

karbamido buvo registruojami anodinės srovės stiprio išaugimai, kas rodo, jog TKRO įvyko. Šiems biojutikliams, buvo nustatytos srovės stiprio priklausomybės nuo karbamido koncentracijos. Dėl skirtingų geometrinių elektrodų plotų srovės stipriai buvo perskaičiuoti į srovės tankius. Iš gautų priklausomybių naudojantis elektrocheminiams matavimams adaptuota Michaelio-Menten hiperbolės lygtimi, buvo paskaičiuoti biojutiklių su grafito, GOP1, GOP2, GOP3, GOP4, GOP5 ir TRGrO elektrodinėmis medžiagomis j_{max}^{tar} ir K_M^{tar} reikšmės. Gauti duomenys pateikti 3.16 paveiksle.



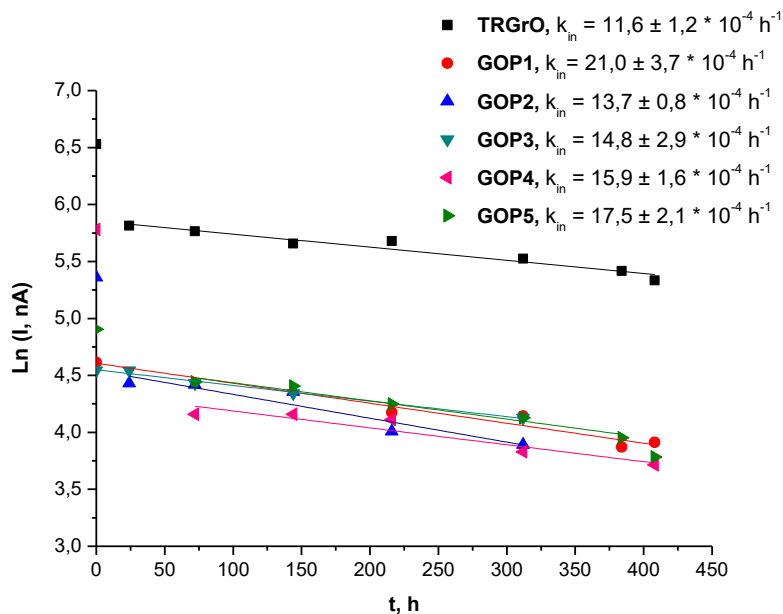
3.16 pav. Biojutiklių su imobilizuota ureaze kinetinių parametru priklausomybės nuo elektrodinės medžiagos išmatuotos standartinėmis sąlygomis.

Iš aukščiau pateikto paveikslo matoma, kad efektyviausiai TKRO vyko kuomet biojutiklinėse sistemose buvo naudojami elektrodai, pagaminti iš TRGrO ($j_{max}^{tar} = 37,1 \pm 0,6 \mu A \cdot cm^{-2}$). Ši anglinė medžiaga, lyginant su GOP pasižymi didžiausiu paviršiaus plotu ($235,8 \pm 1,1 m^2 \cdot g^{-1}$), yra sudarytas iš mažiausių dalelių (dalelių d_{vid} 11 nm, o dalelių h_{vid} – 0,5 nm) (3.2 lentelė) ir turi didžiausia funkcinių grupių kiekį savo paviršiuje (3.1 pav.). TKRO procesas vyko ir ant grafito paviršiaus ($j_{max}^{tar} = 4,8 \pm 1,0 \mu A \cdot cm^{-2}$), tačiau tokios sistemos efektyvumas beveik 8 kartus mažesnis nei sistemos su TRGrO. TKRO vyksmas

ant grafito paviršiaus rodo, kad, šiai elektrocheminiai reakcijai vykti nėra reikalingos deguoninės funkcinės grupės ant elektrodo paviršiaus. Nepaisant to, biojutiklių su GOP1, GOP2, GOP3, GOP4 bei GOP5 nustatytos j_{max}^{tar} reikšmės ($8,1 \pm 0,1$, $11,0 \pm 0,6$, $7,4 \pm 0,2$, $8,7 \pm 0,1$ ir $8,5 \pm 0,5 \mu A \cdot cm^{-2}$ atitinkamai) yra didesnės nei grafito naudojimo atveju. BET analizė parodė (3.2 lentelė), kad GOP paviršiaus plotai yra nuo $7,6 \pm 0,06 - 10,1 \pm 0,06 m^2 \cdot g^{-1}$, ir yra mažesni nei grafito ($13,1 \pm 0,04 m^2 \cdot g^{-1}$). Šie rezultatai rodo, kad anglinių medžiagų paviršiaus plotas yra ne vienintelis faktorius lemiantis TKRO efektyvumą. Lyginant anglinių medžiagų dalelių geometriją matyti, kad GOP atvejais dalelių d_{vid} yra mažesnis už grafito, o dalelių h_{vid} – didesnis (3.2 lentelė), taip pat visi GOP yra defektiškesni nei grafitas (3.4 pav.) ir savo paviršiuje turi bazinės prigimties deguoninių funkcinių grupių (3.1 lentelė ir 3.1 pav.). Sulyginus visas nustatytas anglinių medžiagų charakteristikų reikšmes su sistemų j_{max}^{tar} reikšmėmis nebuvo rasta aiškių sąsajų, todėl manome, kad TKRO ant susintetintų anglinių medžiagų paviršiaus efektyvumą apsprendžia ne viena konkreti anglinės medžiagos savybė, o savybių visuma.

Sistemoms su grafitu, GOP1, GOP2, GOP3, GOP4, GOP5 ir TRGrO nustatytos K_M^{tar} reikšmės – $6,3 \pm 0,2 mM$, $10,2 \pm 0,3 mM$, $9,9 \pm 0,2 mM$, $9,5 \pm 0,3 mM$, $9,0 \pm 0,3 mM$, $7,6 \pm 0,5 mM$ ir $8,5 \pm 0,3 mM$. Visos biojutiklių K_M^{tar} yra didesnės už natyvos ureazės K_M reikšmę išmatuotą tirpale ($1,8 mM$ [183]). Tai rodo, kad visais atvejais atsiranda difuzinis barjeras tarp aktyvaus fermentinio sluoksnio ir tiriamojo tirpalo [184]. Pastebėta, kad, kaip ir PQQ-GDH atveju sinthezei naudojant sonifikuotą grafito žaliavą (GOP2 ir GOP4 atvejais), gauti oksidacijos produktai pasižymi didesniu giminingumu ureazei (mažesnės K_M^{tar} reikšmės) nei oksiduojant nepaveiktą grafito žaliavą (GOP1 ir GOP3 atvejais). Sulyginus visas nustatytas aptartų anglinių medžiagų charakteristikas su biojutiklių K_M^{tar} reikšmėmis, kaip ir j_{max}^{tar} atveju, nerasta vienareikšmiškų sąsajų, todėl manome, kad ir šią biojutiklio charakteristiką apsprendžia ne viena konkreti elektrodinės medžiagos savybė, o savybių visuma.

Toliau, darbo metu, buvo siekta išsiaiškinti sukurtų sistemų jautrio kitimą laike. Tuo tikslu buvo matuojami biojutiklių generuojami anodinės srovės atsakai į 2,9 mM karbamido daugiau nei 400 valandų. Gauti rezultatai logaritminėje skalėje pateikti 3.17 paveiksle.



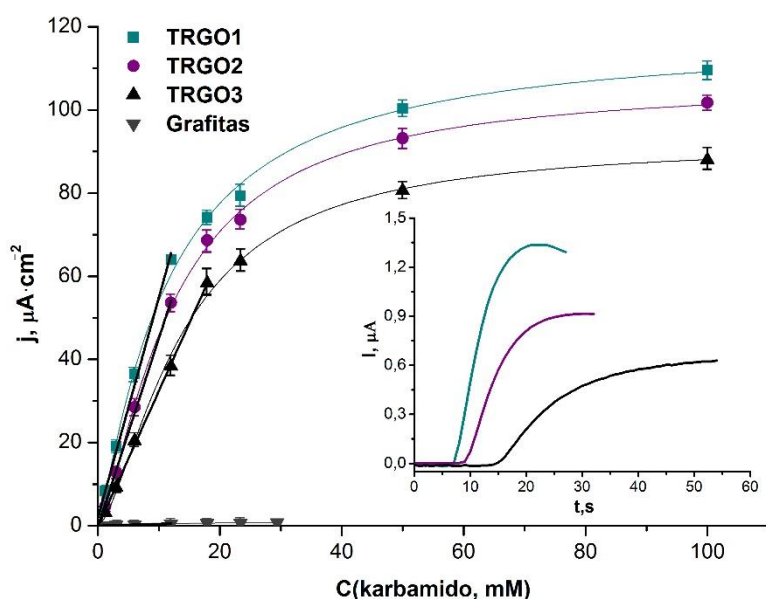
3.17 Pav. Logaritminis biojutiklių su imobilizuota ureaze jautrio kitimas laike išmatuotas standartinėmis sąlygomis. Atsakai į 2,9 mM karbamido.

Iš gautų duomenų matoma, kad biojutiklių su TRGrO, GOP2, GOP4 ir GOP5 atvejais yra stebimas greitas jautrio kitimas lyginant pradinę ir 24 matavimo valandas. Šis greitas jautrio kitimas siejamas su ureazės desorbicija nuo elektrodo paviršiaus. Nuo 24 matavimo valandos biojutiklių su TRGO, GOP2, GOP4 ir GOP5, o biojutiklių su GOP1 ir GOP3 nuo pirmos matavimo valandos, logaritminis jautris mažėjo tolygiai. Šis jautrio mažėjimas siejamas su ureazės inaktyvacija. Iš gautų tiesinių priklausomybių nuolinkio kampo buvo nustatytos biojutiklių su skirtingomis elektrodinėmis medžiagomis inaktyvacijos konstantos: TRGrO $k_{in} = 11,6 \pm 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$, GOP1 $k_{in} = 21,0 \pm 3,7 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$, GOP2 $k_{in} = 13,7 \pm 0,8 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$, GOP3 $k_{in} = 14,8 \pm 2,9 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$, GOP4 $k_{in} = 15,9 \pm 1,6 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$, GOP5 $k_{in} = 17,5 \pm 2,1 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$. Iš gautų duomenų matoma, kad mažiausia inaktyvacijos konstantos yra būdinga biojutikliui su TRGrO, o didžiausia biojutikliui su GOP1 elektrodine medžiaga. TRGrO savo

paviršiuje turi didžiausią deguoninių funkcinių grupių kiekį, tuo tarpu GOP1 mažiausia (3.1 pav. ir 3.1 lentelė). Yra žinoma, kad ureazė hidrofobinėje aplinkoje greičiau denatūruoja (inaktyvuojasi) nei hidrofiliinėje [185]. Tai patvirtina ir mūsų gauti rezultatai – didesnis funkcinių grupių kiekis TRGrO paviršių padaro hidrofiliškesnį nei GOP1 atveju, todėl biojutiklis su šia angline medžiaga pasižymi didesniu stabilumu. Nepaisant to, lyginant kitus GOP matyti, kad k_{in} einant nuo GOP1 link GOP4 nemažėja tolygiai, kai tuo tarpu funkcinių grupių kiekis ant šių anglinių medžiagų paviršiaus didėja tolygiai (3.1 lentelė). Šis rezultatas parodė, kad funkcinių grupių kiekis yra ne vienintelis faktorius įtakojantis biojutiklių su ureaze stabilumą.

3.2.2.2 Sistemų su TRGO frakcijomis tyrimas

Išanalizavus bereagentinių sistemų su GOP ir TRGrO bei dviem skirtingais fermentais (PQQ-GDH ir ureaze) matyti, kad biojutikliai efektyviausiai veikė tada, kai naudojome elektrodus pagamintus iš TRGO (žr. 3.2.1 ir 3.2.2.1 sk.). Dėl šios priežasties tolesnių darbų metu buvo optimizuotas grafito oksido sintezės bei jo terminės redukcijos procesas - sukurta nauja vertikaloji GO redukcijos ir frakcionavimo sistema, kuri leido surinkti tris skirtingomis savybėmis pasižyminčias TRGO frakcijas: TRGO1, TRGO2 ir TRGO3. Nuodugni šių frakcijų analizė pateikta 3.1.2 skyriuje. Iš ištirtų frakcijų buvo sukonstruoti karbamido biojutikliai, kaip aprašyta 2.5 ir 2.5.1 skyriuose. Kaip kontrolinė elektrodinė medžiaga, eksperimentų metu, buvo naudojamas grafito strypas, ant kurio buvo mechaniškai prispausta fermentinė membrana su imobilizuota ureaze. Visose sukurtose sistemose TKRO vyko, tačiau naudojant grafito elektrodinę medžiagą proceso jautris buvo bene 100 kartų mažesnis. Sukurtų amperometrinių biojutiklių su skirtingomis TRGO frakcijomis generuojamos srovės tankio priklausomybės nuo karbamido koncentracijos pateiktos 3.18 paveiksle.



3.18 pav. Biojutiklių su skirtingomis TRGO frakcijomis ir grafito strypu, generuojamos srovės tankio priklausomybės nuo karbamido koncentracijos bei biojutiklių su TRGO frakcijomis atsakai į 3,0 mM karbamido (intarpas) išmatuoti standartinėmis sąlygomis.

Iš gautų srovės tankio priklausomybių nuo karbamido koncentracijos buvo nustatytos pagrindinės biojutiklių charakteristikos: jautris, tiesinė dalis, K_M^{tar} ir j_{max}^{tar} reikšmės, bei LOD. Gauti duomenys pateikti 3.4 lentelėje.

3.4 lentelė. Biojutiklių su TRGO frakcijomis ir ureaze charakteristikos.

Elektrodinė medžiaga	Tiesinė dalis, mM	Jautris, $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	R^2	K_M^{tar} , mM	j_{max}^{tar} , $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$	LOD, mM
Grafitas	1,9 – 12,0	$0,04 \pm 0,002$	0,9899	$10,1 \pm 0,5$	$0,89 \pm 0,02$	1,9
GO	Atsako nėra					
TRGO1	0,26 – 12,0	$5,4 \pm 0,1$	0,9907	$11,4 \pm 0,8$	$117,6 \pm 3,5$	0,26
TRGO2	0,15 – 12,0	$4,5 \pm 0,1$	0,9976	$12,3 \pm 0,5$	$106,8 \pm 1,91$	0,15
TRGO3	0,15 – 17,9	$3,3 \pm 0,1$	0,9900	$13,8 \pm 0,8$	$92,3 \pm 2,7$	0,15

Iš gautų duomenų nustatyta, kad efektyviausiai TKRO vyko ant TRGO1 paviršiaus. Šios sistemos $j_{max}^{tar} = 117,6 \pm 3,5 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. Ant TRGO2 ir TRGO3 paviršiaus TKRO vyko ne taip efektyviai – TRGO2 atveju $j_{max}^{tar} = 106,8 \pm 1,9 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, o TRGO3 atveju $j_{max}^{tar} = 92,3 \pm 2,7 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. Nepaisant to, visų

biojutiklių efektyvumas beveik tris kartus didesnis nei biojutiklių su TRGrO, dešimt kartų didesnis nei biojutiklių su GOP ir daugiau nei šimta kartų didesnis nei kontrolinio biojutiklio. Manome, kad tokį efektyvumo padidėjimą galėjo lemti didesnis šių medžiagų paviršiaus plotas ir funkcinių grupių kiekis nei TRGrO ar GOP. Tačiau, lyginant TRGO1 ir TRGO2 matyti, kad padidėjus paviršiaus plotui daugiau nei du kartus, biojutiklių j_{max}^{tar} ne padidėja, o priešingai – sumažėja. Pastebėta, kad mažėjant deguoninių funkcinių grupių kiekiui (einant nuo TRGO1 link TRGO3 3.6 pav.), mažėja ir biojutiklių j_{max}^{tar} reikšmės. TRGO1 S_{BET} yra pusantro karto mažesnis nei TRGO3 ir daugiau nei dvigubai mažesnis nei TRGO2 (3.3 lentelė), tačiau šioje frakcijoje aptinkama 1,4 % ir 1,2 % daugiau deguonies nei TRGO3 ir TRGO2 atvejais (3.6 pav. intarpas). Vadinas, deguoninių funkcinių grupių kiekis ant TRGO frakcijų paviršiaus daro didesnę įtaką TKRO efektyvumui nei šių anglinių medžiagų savitasis paviršiaus plotas. Lyginant kitas TRGO frakcijų charakteristikas, tokias, kaip porų diametras, defektiškumas ar morfologija, su atitinkamų biojutiklių j_{max}^{tar} reikšmėmis nepastebėta aiškių tendencijų, todėl manome, kad anglinių medžiagų deguoninių funkcinių grupių kiekis yra pagrindinis faktorius lemiantis efektyvią TKRO.

Darbo metu taip pat nustatytos kalibracinių kreivių tiesinės dalys iš kurių nuolinkio kampo, paskaičiuotas biojutiklių jautris (3.4 lentelė). Lyginant sistemų su TRGO frakcijomis jautrius matyti, kad didžiausiu jautriu karbamidui pasižymi sistema su TRGO1 frakcija ($5,4 \pm 0,1 \mu A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$), o mažiausiu jautriu sistemos su TRGO3 ($3,3 \pm 0,1 \mu A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$). Nustatyti biojutiklių jautriai ir j_{max}^{tar} yra vienas kitą papildančios charakteristikos, kurios priklauso nuo tų pačių anglinių medžiagų savybių. Biojutiklių su TRGO frakcijomis jautriai yra per eilę didesnis nei jau sukurtų ir pH pokytį fiksuojančių biojutiklių [65, 67] ir tos pačios eilės [68] arba per eilę mažesnis [69] nei sukurtų biojutiklių matuojančių NH_4^+ susidarymą.

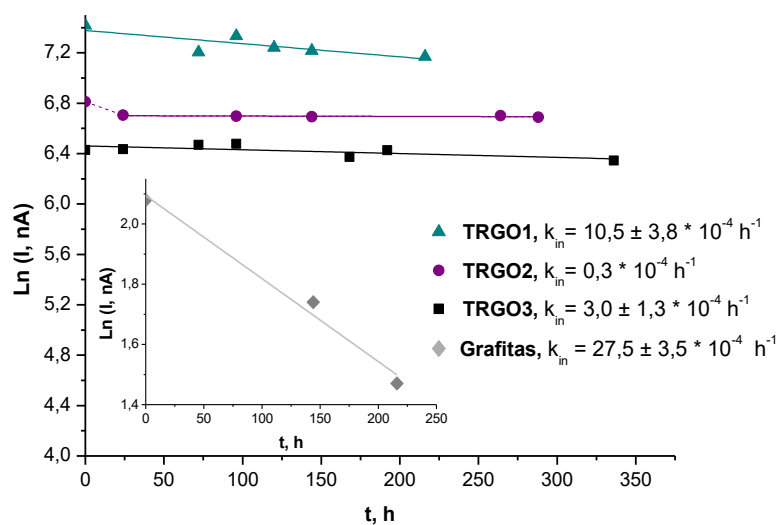
Analizuojant sukurtų biojutiklių su skirtingomis TRGO frakcijomis generuojamos srovės tankio priklausomybę nuo karbamido koncentracijos pastebėta, kad naudojant skirtingas TRGO frakcijas, sistemų atsakų greitis į tą pačią karbamido koncentraciją skiriasi (3.18 pav. intarpas): 90 % signalo

išsivysto per 9,5 s, 11,4 s, 23,2 s ir 56,0 s nuo karbamido pridėjimo į elektrocheminę celę, biojutiklio konstrukcijoje, atitinkamai naudojant TRGO1, TRGO2, TRGO3 ir grafito elektrodines medžiagas. Lyginant frakcijas, didžiausias bioelektrokatalizės greitis yra stebimas sistemoje su TRGO1, o mažiausias – naudojant TRGO3. Manome, kad didžiausia įtaką bioelektrokatalizinio proceso greičiui daro skirtingas deguoninių funkcinių grupių, gebančių dalyvauti elektronų pernašos reakcijose, kiekis ant anglinių medžiagų paviršiaus. Mažėjant deguoninių funkcinių grupių kiekiui (3.6 pav.) lėtėja biojutiklio elektrocheminis atsakas į karbamidą, o jų nesant ant elektrodo paviršiaus (grafito atveju) biojutiklio atsakas išsivysto lėčiausiai. Taip pat manome, kad atsakų greičiams galėjo turėti įtakos ir elektrodinių medžiagų struktūra. Iš XRD (3.8 pav.) duomenų nustatyta, kad TRGO1 yra būdinga amorfinė struktūra, TRGO2 ir TRGO3 frakcijoms būdingos tam tikros tvarkos (kristalinės) struktūros, o grafitas yra kristalinė medžiaga, kuriai būdinga heksagoninė kristalinė gardelė. Daugumos anglinių, kristalinių medžiagų laidumas yra anizotropinis [113], kai amorfinės anglies laidumas yra izotropinis – vienodas visomis matavimo kryptimis [186]. Šis struktūrų skirtumas galėjo įtakoti EP greitį nuo karbamo rūgšties per elektrodinę medžiagą iki galutinio akceptoriaus.

Nustatytos biojutiklių su skirtingomis TRGO frakcijomis K_M^{tar} reikšmės (3.4 lentelė) yra daug didesnės už natyvios ureazės K_M reikšmę išmatuotą tirpale (1,8 mM [183]). Tai rodo, kad visais atvejais atsiranda difuzinis barjeras tarp aktyvaus fermentinio sluoksnio ir tiriamojo tirpalo [184]. Taip pat nustatytos biojutiklių K_M^{tar} reikšmės naudojant TRGO frakcijas yra didesnės nei, kaip elektrodinę medžiagą naudojant TRGO ir GOP (3.4 lentelė ir 3.9 A pav.). Manome, kad didesnis frakcijų defektiškumas (3.5 B pav.) ir S_{BET} (3.3 lentelė) lyginant su GOP ir TRGO (3.1 B pav. ir 3.2 lentelė) lėmė didesnio difuzinio sluoksnio susidarymą ir tuo pačiu K_M^{tar} . Sulyginus biojutiklių K_M^{tar} reikšmes su jų atsakų į 3 mM karbamido laikais matyti, kad didėjant K_M^{tar} atsakai lėtėja. Taip yra kadangi biojutiklių atsakų greitis taip pat priklauso nuo difuzinio sluoksnio – didėjant difuzinam sluoksnio storiui ilgėja biojutiklių atsakų laikas [187].

Biojutikliams, kuriuose buvo realizuota TKRO, apskaičiuotos LOD bei kalibracinės kreivės tiesinės dalys (3.4 lentelė). Iš gautų duomenų matoma, kad mažiausia karbamido koncentracija, kuri gali būti nustatyta naudojant sukurtus biojutiklius, kuriuose naudotas grafitas yra 1,9 mM, TRGO1 – 0,26 mM, o TRGO2 ir TRGO3 – 0,15 mM. Grafito atveju didelę LOD lėmė, mažas šios sistemos jautris. Tuo tarpu didelę aptikimo ribą TRGO1 atveju nulėmė ne toks geras anodinių signalų į 3 mM karbamido atsikartojamumas nei TRGO2 ir TRGO3 atvejais. Iš 3.18 paveikslo intarpo matyti, kad biojutiklio su TRGO1 anodinis atsakas įvedus 3 mM karbamido vystosi labai greitai: nuo karbamido įvedimo per 14 sekundžių pasiekiami stacionari anodinės srovės reikšmė, kuri laikosi 4 s, o po to pradeda mažėti. Manome, kad šis mažėjimas atsiranda dėl pH pokyčių prielektrodiniame sluoksnyje, ko pasekoje, keičiasi deguoninių funkcinių grupių ant TRGO1 paviršiaus jonizuota būseną. pH pokytis atsiranda dėl fermentinės hidrolizės metu susidariusių NH_3 molekulių, kurios geba protonizuotis susidarant NH_4^+ , dėl ko pH prielektrodiniame sluoksnyje didėja. Tuo tarpu karbamido rūgšties elektrooksidacijos metu susidarę H^+ jonai mažina pH prielektrodiniame sluoksnyje. Iš 3.15 paveiksle pateiktos schemos matyti, kad susidariusių NH_4^+ ir H^+ santykis yra 1 : 6, todėl galime teigti, kad anodinės srovės mažėjimas atsiranda dėl pH mažėjimo prielektrodinime sluoksnyje ir deguoninių funkcinių grupių protonizacijos. Biojutiklių su TRGO2 ir TRGO3 frakcijomis atsakai lėtesni (3.18 pav. intarpas), o pasiekta stacionari anodinės srovės mažėjimas nėra toks ryškus, kaip TRGO1 atveju. Tai nulėmė mažesnis funkcinių grupių kiekis ant šių frakcijų paviršiaus (3.6 pav.).

Toliau buvo nustatytas biojutiklių jautrio kitimas laike. Gautos srovės stiprio į 3,0 mM karbamido logaritmo priklausomybės nuo biojutiklių tyrimo trukmės pateiktos 3.19 paveiksle.



3.19 pav. Logaritminis biojutiklių su TRGO1, TRGO2, TRGO3, grafitu (intarpas) ir imobilizuota ureaze jautrio į 3,0 mM karbamido kitimas laike išmatuotas standartinėmis sąlygomis.

Iš gautų tiesinių priklausomybių nuolinkio kampo buvo nustatytos biojutiklių su skirtingomis elektrodinėmis medžiagomis inaktyvacijos konstantos: TRGO1 $k_{in} = 10,5 \pm 3,7 \cdot 10^{-4} h^{-1}$, TRGO2 $k_{in} = 0,3 \cdot 10^{-4} h^{-1}$, TRGO3 $k_{in} = 3,03 \cdot 10^{-4} h^{-1}$, grafitui $k_{in} = 27,5 \pm 3,5 \cdot 10^{-4} h^{-1}$. Iš gautų duomenų matyti, kad biojutiklio su TRGO2 atveju yra stebimas greitas jautrio kitimas lyginant pirmąją ir 24 matavimo valandas, kuris atsiranda dėl ureazės desorbcijos nuo elektrodo paviršiaus. Nepaisant to nuo 24 matavimo valandos šis biojutiklis inaktyvavosi lėčiausiai, tai rodo gauta mažiausia inaktyvacijos konstanta. Iš visų biojutiklių greičiausiai inaktyvavosi, biojutiklis, kuriame naudotas grafitas. Ši medžiaga savo paviršiuje neturi deguoninių funkcinių grupių ir yra hidrofobinė, todėl ant šio paviršiaus ureazė inaktyvuojasi greičiausiai. Lyginant frakcijas, greičiausiai inaktyvuojasi biojutiklis, kuriame naudojamas TRGO1, o biojutikliai su TRGO3 ir TRGO2 inaktyvavosi panašiu greičiu. TRGO frakcijų elementinė ir TGA analizė (3.6 pav.) parodė, kad TRGO1 savo paviršiuje turi didžiausią funkcinių grupių kiekį, todėl yra hidrofiliškiausia, lyginant su kitomis frakcijomis. Nors yra žinoma, kad imobilizuota ureazė ant hidrofobinių paviršių

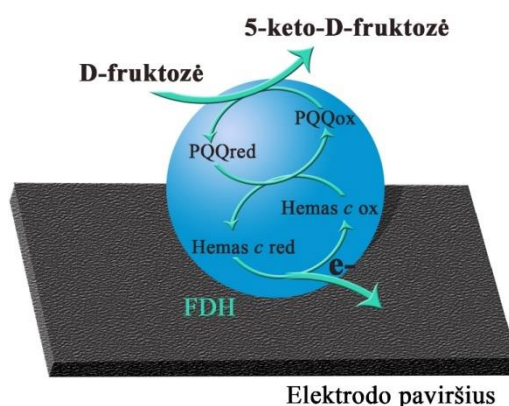
greičiau denatūroja (inaktyvuojasi) nei ant hidrofiliųjų [185], tačiau gauti biojutiklių stabilumo duomenys rodo priešingą rezultatą: biojutiklis su labiausiai hidrofiline elektrodine medžiaga inaktyvuojasi per eilę greičiau (TRGO1 atvejis) nei biojutikliai, kuriuose naudojamos hidrofobiškesnės elektrodinės medžiagos (TRGO2 ir TRGO3). Tai rodo, kad biojutikliai inaktyvuojasi ne vien dėl ureazės denatūracijos, bet, galimai, ir dėl susintetintų anglinių medžiagų paviršiaus kitimo. Ankstesni eksperimentai parodė (3.18 pav.), kad efektyvi tiesioginė karbamo rūgšties oksidacija, priklauso nuo funkcinių grupių kiekio ant elektrodo paviršiaus. Iš literatūros duomenų žinoma [182], kad TKRO metu prielektrodiniame sluoksnyje susidaro hidrazinas, kuris yra vienas geriausių oksiduotų anglinių medžiagų reduktorių [142]. TKRO metu išsiskyręs hidrazinas gali ne tik oksiduotis, bet ir negrįžtamai redukuoti deguonines funkcines grupes esančias ant anglinio elektrodo paviršiaus, ko pasekoje biojutiklio jautris mažėja. TRGO1 atveju, elektrodo paviršiuje yra didžiausias deguoninių funkcinių grupių kiekis, todėl hidrazino susidarymas ir tolesnė deguoninių funkcinių grupių redukciją daro didžiausią įtaką biojutiklio inaktyvacijai. Apibendrinant galima sakyti, kad TRGO1 atveju biojutiklio su imobilizuota ureaze inaktyvacijai didžiausią įtaką daro funkcinių grupių ant elektrodo paviršiaus netektis, o TRGO3 atveju – ureazės denatūracija dėl hidrofobinės aplinkos.

Iš gautų duomenų matyti, kad TRGO2 frakcija yra tinkamiausia bereagentinių, daugkartinių karbamido biojutiklių kūrimui: biojutiklių su TRGO2 jautris ir efektyvumas yra artimas biojutikliams su TRGO1 frakcija, biojutiklis su šia angline medžiaga pasižymi mažesne LOD reikšme, o stabilumas yra net dviem eilėms didesnis nei TRGO1 atveju. Dėl šių priežasčių TRGO2 buvo pasirinktas tolimesniems tyrimams, kurių metu buvo siekta skurtą biojutiklį pritaikyti karbamido kiekio įvertinimui hemodializės metu ištekančiame dializiniame skystyje.

3.2.3 Bereagentinių sistemų su FDH ir TRGO frakcijomis tyrimas

TRGO frakcionavimo metodas leidžia ženkliai pagerinti anglinių medžiagų sintezės atkartojamumą, tad žvelgiant iš praktinio taikymo perspektyvos, TRGO frakcijos buvo pasirinktos ir D-fruktozės biojutiklių kūrimui.

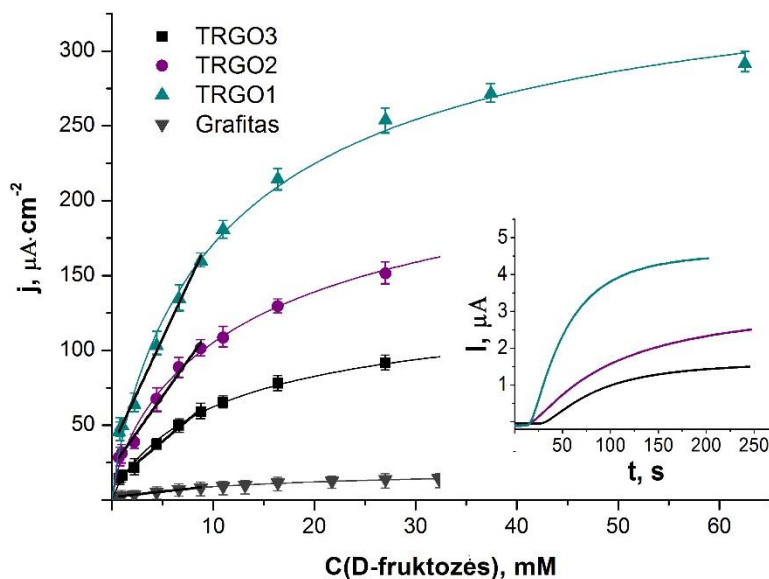
Bereagentinių D-fruktozės biojutiklių kūrimo metu iš susintetintų ir ištirtų TRGO frakcijų buvo paruošti darbiniai elektrodai, ant kurių fizikinės adsorbcijos būdu buvo imobilizuojama FDH. Ji katalizuoja D-fruktozės oksidaciją iki 5-keto-D-fruktozės [77]. Apie sukurtų biojutiklių veikimo efektyvumą buvo sprendžiama iš generuojamo srovės stiprio, į elektrocheminę celę pridėjus D-fruktozės. Kontrolinėse sistemose, kuriose elektrodinė medžiaga buvo GO TEP nevyko. Tuo tarpu, biojutikliuose, kaip elektrodinę medžiagą naudojant TRGO1, TRGO2, TRGO3 ir grafitą TEP nuo fermento aktyvaus centro ant elektrodo paviršiaus vyko. Manome, kad sukurtuose biojutikliuose TEP vyksta-pagal schemą pateiktą 3.20 paveiksle.



3.20 pav. TEP tarp FDH ir anglinių medžiagų paviršiaus, $E = 0,4V$ vs. $Ag/AgCl$.

Į elektrocheminę celę pridėjus D-fruktozės, ji yra prijungiama prie FDH katalizinio subvieneto, kuriame yra PQQ molekulė – susidaro substrato-fermento kompleksas ir šioje FDH molekulės vietoje įvyksta D-fruktozės oksidacija iki 5-keto-D-fruktozės. Oksidacijos metu, $2 e^-$ transportuojami nuo D-fruktozės ant PQQ molekulės nuo kurios yra pernešami ant hemo *c*, o po to tiesiogiai ant elektrodo paviršiaus, taip regeneruojantis FDH.

Biojutiklių, kuriuose buvo realizuota TEP, generuojamų srovės tankių priklausomybės nuo D-fruktozės koncentracijos ir jų atsakai į 2,2 mM D-fruktozės pateikti 3.21 paveiksle.



3.21 pav. Biojutiklių, su skirtingomis elektrodinėmis medžiagomis, generuojamos srovės tankio priklausomybės nuo D-fruktozės koncentracijos bei sistemų atsakai į 2,2 mM D-fruktozės (intarpas) išmatuoti standartinėmis sąlygomis.

Iš gautų srovės tankio priklausomybių nuo D-fruktozės koncentracijos buvo nustatytos pagrindinės biojutiklių charakteristikos: jautris, tiesinė dalis, K_M^{tar} ir J_{max}^{tar} reikšmės bei LOD. Gauti duomenys pateikti 3.5 lentelėje.

3.5 lentelė. Biojutiklių su FDH ir TRGO frakcijomis charakteristikos.

Elektrocinė medžiaga	Tiesinė dalis, mM	Jautris, $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	R^2	K_M^{tar} , mM	J_{max}^{tar} , $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$	LOD, mM
Grafitas	0,7 – 8,8	$0,7 \pm 0,02$	0,9952	$15,1 \pm 1,0$	$21,5 \pm 0,6$	0,7
GO Atsako nėra						
TRGO1	0,7 – 8,8	$14,5 \pm 0,5$	0,9947	$9,5 \pm 0,4$	$335,2 \pm 6,1$	0,7
TRGO2	0,7 – 8,8	$9,5 \pm 0,5$	0,9937	$12,9 \pm 2,1$	$236,9 \pm 14,4$	0,7
TRGO3	0,6 – 8,8	$5,7 \pm 0,2$	0,9949	$10,1 \pm 0,2$	$125,4 \pm 1,2$	0,6

Iš gautų duomenų matoma, kad efektyviausiai veikė sistema, kurioje naudota TRGO1 frakcija. Šios sistemos J_{max}^{tar} siekė net $335,2 \pm 6,1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Mažiausiu efektyvumu pasižymėjo biojutiklis kuriame, kaip elektrodinė medžiaga buvo naudotas grafitas – $j_{max}^{tar} = 21,5 \pm 0,6 \mu A \cdot cm^{-2}$. Lyginant sistemų su TRGO frakcijomis jautrius matyti, kad didžiausiu jautriu D-fruktozei pasižymi sistema su TRGO1 frakcija ($14,5 \pm 0,5 \mu A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$), o mažiausiu jautrius sistema su TRGO3 ($5,7 \pm 0,2 \mu A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$). Sistemos su TRGO3 jautris beveik tris kartus mažesnis, nei sistemos, kurioje naudota TRGO1 frakcija. Verta paminėti, kad šiose sukurtose bereagentinėse sistemose su TRGO frakcijomis pasiektos didelės jautrio D-fruktozei vertės yra tokios pat eilės, kaip ir sistemų, kurių veikimui yra reikalingi papildomi EPT [101, 83]. Taip pat, dėl pasiektų didelių srovės tankių (iki $335 \mu A \cdot cm^{-2}$), sukurtos sistemos būtų tinkamos ne tik analitiniams tikslams, bet ir biokuro elementų kūrimui. Reiktų pažymėti, kad sistemoje su grafitu taipogi vyko TEP, tačiau šios sistemos jautris buvo pats mažiausias ($0,7 \pm 0,02 \mu A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$) – daugiau nei 10 kartų mažesnis, nei sistemų, kuriose naudotos TRGO frakcijos. Manome, kad sistemos su TRGO1, didžiausią efektyvumą sąlygojo optimali FDH orientacija ant TRGO1 paviršiaus, nes tai yra vienas iš svarbiausių veiksnių, lemiantis efektyvią EP nuo FDH ant elektrodo paviršiaus. Yra parodyta, kad TEP nuo FDH ant elektrodo paviršiaus vyksta tik tuo atveju, kai šis fermentas ant elektrodo paviršiaus oreantuoja hemas *c* domenu [94]. Hemas *c* pasižymi stipriomis hidrofobinėmis savybėmis ir geba stipriai adsorbuotis ant hidrofobinio elektrodo paviršiaus, kas lemia tinkamą FDH orientaciją [188].

TGA ir elementinės analizės duomenys parodė, kad TRGO1 turi didžiausią deguoninių funkcinių grupių kiekį lyginant su TRGO2 ir TRGO3. Galime teigti, kad ši frakcija pasižymi didžiausiu hidrofiliškumu, todėl biojutiklio konstravimo metu, TRGO frakcijas apdorojant nejonine paviršiaus aktyviaja medžiaga triton X-100, didžiausias skaičius tritono X-100 hidrofiliinių polietileno oksido grupių orientuojasi link TRGO1 paviršiaus, ko pasekoje hidrofobinės fenilo grupės orientuojasi į priešingą pusę. Ant taip apdoroto TRGO1 paviršiaus adsorbuojant FDH, fermentas orientuojasi hemo *c* domenu link apdoroto TRGO1 paviršiaus. Šio proceso metu FDH tinkamai orientuojama, kas įtakoja efektyvų bioelektrokatalizinį virsmą. Biojutiklių su PQQ-GDH ir GOP tyrimai parodė,

kad deguoninės funkcinės grupės esančios ant anglinių medžiagų paviršiaus geba dalyvauti elektronų pernašos reakcijose. Dėl šios priežasties galime teigti, kad didelis kiekis deguoninių funkcinių grupių, esančių ant TRGO1 paviršiaus pagerino TEP. Taip pat verta paminėti, kad sistema su TRGO1 frakcija pasižymėjo didžiausiu TEP efektyvumu, nors šios medžiagos paviršiaus plotas S_{BET} (3.3 lentelė) lyginant su kitomis frakcijomis buvo mažiausias. Tai parodė, kad šiuo atveju anglinių medžiagų paviršiaus plotas nėra kertinis veiksnys lemiantis efektyvią TEP.

Biojutikliams, kuriuose buvo realizuota TEP, apskaičiuota D-fruktozės LOD reikšmė (3.5 lentelė) bei tiesinė kalibracinės kreivės dalis. Iš gautų duomenų matyti, kad mažiausia D-fruktozės koncentracija, kuri gali būti nustatoma naudojant sukurtus biojutiklius su TRGO frakcijomis yra 0,7 mM, o šių biojutiklių, kalibracinės kreivės tiesinė dalis yra nuo 0,7 iki 8,8 mM. Tuo tarpu biojutiklio su grafito elektrodine medžiaga jautris yra daug mažesnis, kas apriboja šios sistemos taikymą analiziniais tikslams.

Analizuojant sukurtų amperometrinių biojutiklių, su skirtingomis elektrodinėmis medžiagomis, generuojamos srovės tankio priklausomybes nuo D-fruktozės koncentracijos buvo pastebėta, kad naudojant skirtingas TRGO frakcijas, sistemų atsakų greitis į tą pačią D-fruktozės koncentraciją skiriasi (3.21 pav. intarpas): 90 % signalo išsivysto per 100 s, 174 s ir 137 s nuo D-fruktozės pridėjimo į elektrocheminę celę, biojutiklio konstrukcijoje, atitinkamai naudojant TRGO1, TRGO2 ir TRGO3 elektrodines medžiagas. Didžiausias bioelektrokatalizės greitis yra stebimas sistemoje su TRGO1, o mažiausias – naudojant TRGO2. Manome, kad šiuos bioelektrokatalizinio proceso greičio skirtumus nulėmė skirtingos anglinių medžiagų paviršiaus charakteristikos. Tai patvirtina ir nustatytos sukurtų biojutiklių su skirtingomis TRGO frakcijomis ir grafitu K_M^{tar} reikšmės (3.5 lentelė). Pastarosios reikšmės yra žymiai didesnės nei natyvios FDH K_M vertė nustatyta tirpale (5 mM [78]). Tai parodo, kad visais atvejais yra stebimas difuzinis barjeras tarp tiriamojo tirpalo ir aktyvaus fermentinio sluoksnio [184]. Biojutiklio, kuriame naudota TRGO2 frakcija, atsakai į D-fruktozę buvo lėčiau, o nustatyta K_M^{tar} reikšmė ($12,9 \pm 2,1$ mM) –

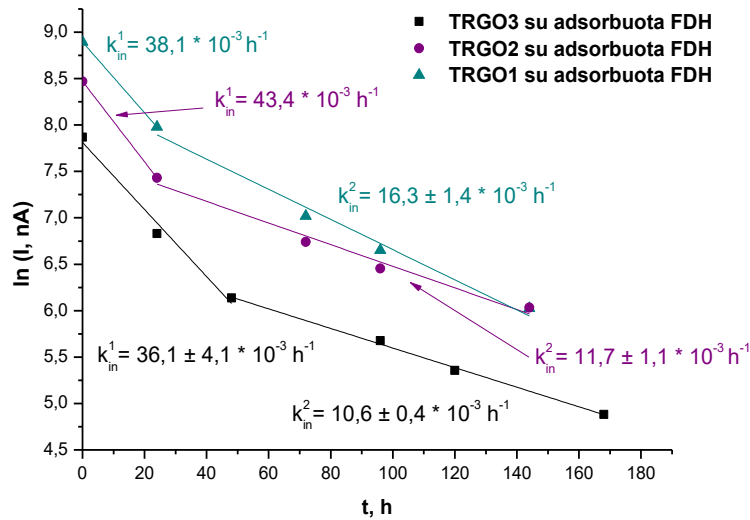
didžiausia, lyginant su biojutikliais, kuriuose naudotos TRGO1, TRGO3 frakcijos. Iš BET (3.3 lentelė) ir Ramano sklaidos spektrinės (3.9 pav.) analizių nustatyta, kad ši anglinė medžiaga pasižymi didžiausiu S_{BET} , porų d_{vid} bei defektiškumu lyginant su kitomis frakcijomis. Manome, kad tokios charakteristikos lėmė, tai, jog imobilizuojant FDH, ji adsorbavosi giliai medžiagos porose, kas bioelektrokatalizės metu apsunkino D-fruktozės ir 5-keto-D-fruktozės difuzija link/nuo adsorbuotos FDH. Dar daugiau, didelis defektų skaičius TRGO2 frakcijoje apsunkina elektronų transportą grafeno sluoksnyje – ilgėja elektronų kelias, ko pasekoje bendras proceso greitis mažėja. TRGO1 atveju stebimas didžiausias bioelektrokatalizės greitis ir efektyvumas, o nustatyta biojutiklio su šia angline medžiaga K_M^{tar} reikšmė – mažiausia ($9,5 \pm 0,4$ mM). Ši frakcija iš visų, pasižymi mažiausiu plotu S_{BET} , porų d_{vid} ir defektiškumu (3.3 lentelė ir 3.9 pav.). Dėl šių tinkamų TRGO1 charakteristikų bioelektrokatalizės metu D-fruktozės ir 5-keto-D-fruktozės difuzija link/nuo adsorbuotos FDH nėra taip apsunkinta, kaip TRGO2 atveju. Mažas defektų skaičius TRGO1 struktūroje neapsunkina elektronų transporto grafeno sluoksnyje, o didelis deguoninių funkcinų grupių kiekis ant TRGO1 paviršiaus, dalyvauja EP reakcijose nuo FDH aktyvaus centro link elektrodo paviršiaus. Šių procesų dėka yra stebimas greitas ir efektyvus bioelektrokatalizės reiškinys.

Biojutikliui, kuriame naudota grafito elektrodinė medžiaga, nustatyta K_M^{tar} reikšmė – $15,1 \pm 1,0$ mM. Ši reikšmė yra didesnė už nustatytas visiems biojutikliams su TRGO frakcijomis. Grafito ploto S_{BET} , porų d_{vid} , defektiškumas lyginant su TRGO frakcijomis yra labai mažas (3.3 lentelė). Tačiau ant šios anglinės medžiagos paviršiaus nėra deguoninių funkcinų grupių (3.6 pav.), kurios dalyvauja tiek orientuojant FDH, tiek elektronų pernašos reakcijose. Tai dar kartą parodo, kad deguoninės funkcinės grupės daro didžiausią įtaką sistemų su FDH efektyviam ir greitam veikimui.

3.2.3.3 FDH stabilizavimas

Biojutikliai su adsorbuota FDH ant TRGO frakcijų paviršiaus yra labai efektyvūs, tačiau, tokios konstrukcijos biojutikliai yra nestabilūs ir per 5 dienas

nuo matavimų pradžios praranda daugiau nei 90 % savo efektyvumo. Sukurtų biojutiklių jautrio logaritminėje skalėje kitimas laike pateiktas 3.22 paveiksle.



3.22 pav. Logaritminis biojutiklių, pagamintų naudojant skirtingas TRGO frakcijas su adsorbuota FDH jautrio D-fruktozei kitimas laike išmatuotas standartinėmis sąlygomis. Atsakas į 4,4 mM D-fruktozės.

Iš gautų duomenų matoma, kad visų sistemų jautrio kitimas laike aprašomas dviem procesais: pirmasis greitas (k_{in}^1 nuo $36,1 \pm 4,1 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ iki $43,4 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$), siejamas su fermento desorbcija nuo elektrodo paviršiaus, antrasis procesas lėtesnis (k_{in}^2 nuo $10,6 \pm 0,4 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ iki $16,3 \pm 1,4 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) siejamas su FDH inaktyvacija. Iš gautų duomenų, taip pat matoma, kad tiek pirmas, tiek antras procesas lėčiausiai vyksta sistemose kuriose, elektrodine medžiaga naudojamas TRGO3. Tačiau, kaip minėta anksčiau, tokios konstrukcijos biojutikliai per 5 dienas praranda daugiau nei 90 % savo jautrio, taip yra dėl pačio fermento temperatūrinės inaktyvacijos, kadangi FDH išlieka stabili tik esan $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūrai. [78]. Dėl šios priežasties, toliau, darbo metu, įvairiais būdais imobilizuojant FDH buvo bandoma sistemas stabilizuoti.

FDH imobilizacijai buvo pasirinkta TRGO1 frakcija, kadangi, jos pagrindu sukurti biojutikliai pasižymi didžiausiu jautriu D-fruktozei. Ruošiant biojutiklius TRGO1 buvo apdorojamas 2 μl , 0,5 % triton X-100 tirpalu. Ant taip paruošto

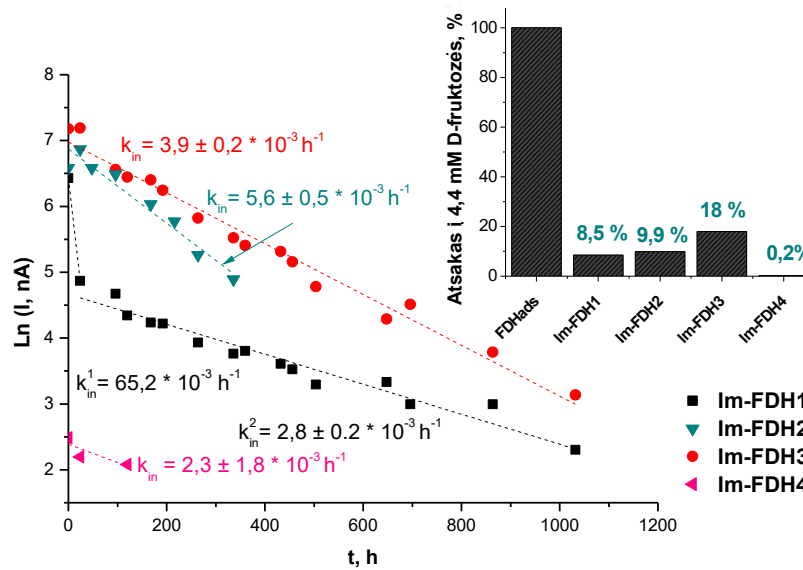
elektrodo paviršiaus įvairiais būdais buvo imobilizuojama FDH. Atrinktos geriausios 4 FDH imobilizavimo metodikos pateiktos 3.6 lentelėje.

3.6 lentelė. *FDH imobilizacijos metodikos.*

Nr.	Imobilizacijos metodika	Žymėjimas
1	Į 10 µl FDH tirpalą (1471 U·ml ⁻¹) suberiama 1 mg liofilizuoto BSA. 2 µl gauto FDH/BSA tirpalo užlašinama ant triton X-100 apdoroto TRGO1 paviršiaus. Taip paruoštas elektrodas laikomas 30 min. 25 % glutaro aldehido garuose.	Im-FDH1
2	10 µl FDH tirpalas (1471 U·ml ⁻¹) sumaišomas su 10 µl 2 % PEI tirpalo. 2 µl gauto FDH/PEI tirpalo užlašinama ant triton X-100 apdoroto TRGO1 paviršiaus. Taip paruoštas elektrodas 30 min. laikomas 25 % glutaro aldehido garuose.	Im-FDH2
3	2 µl gauto FDH tirpalo (1471 U·ml ⁻¹) užlašinama ant triton X-100 apdoroto TRGO1 paviršiaus. Taip paruoštas elektrodas 30 min. laikomas 25 % glutaro aldehido garuose.	Im-FDH3
4	2 µl FDH imobilizuotos ant polimerinio poliuretano nešiklio suspensijos (imobilizacija atlikta VU ChGf Polimerų katetroje) užlašinama ant triton X-100 apdoroto TRGO1 paviršiaus.	Im-FDH4

Iš 3.6 lentelėje pateiktų metodikų matoma, kad siekiant stabilizuoti FDH ji buvo veikama glutaro aldehidu (Im-FDH1, Im-FDH2 ir Im-FDH3). Šis reagentas reaguoja su FDH amino rūgščių liekanų šoninėmis amino funkcinėmis grupėmis, ko pasekoje FDH molekulės surišamos tarpusavyje. Siekiama padidinti amino funkcinų grupių kiekį, imobilizacijos metu, į FDH tirpalą buvo papildomai dedama BSA (Im-FDH1) arba PEI (Im-FDH2), kurių amino funkcinės grupės reaguodamos su glutaro aldehidu aplink FDH molekulės sudaro trimatį tinklą [189]. Taip pat VU ChGf Polimerų katetroje buvo atlikta ir tiesioginė FDH imobilizacija ant poliuretano nešiklio paviršiaus.

TRGO1 pagrindu sukurtų D-fruktozės biojutiklių su skirtingai imobilizuota FDH jautrio kitimas laike logaritminėje skalėje pateiktas 3.23 paveiksle.



3.23 pav. Logaritminis biojutiklių su skirtingai imobilizuota FDH (3.6 lentelė) jautrio kitimas laike išmatuotas standartinėmis sąlygomis. Intarpe pateiktas biojutiklių pirmos dienos jautris. Atsakai į 4,4 mM D-fruktozės.

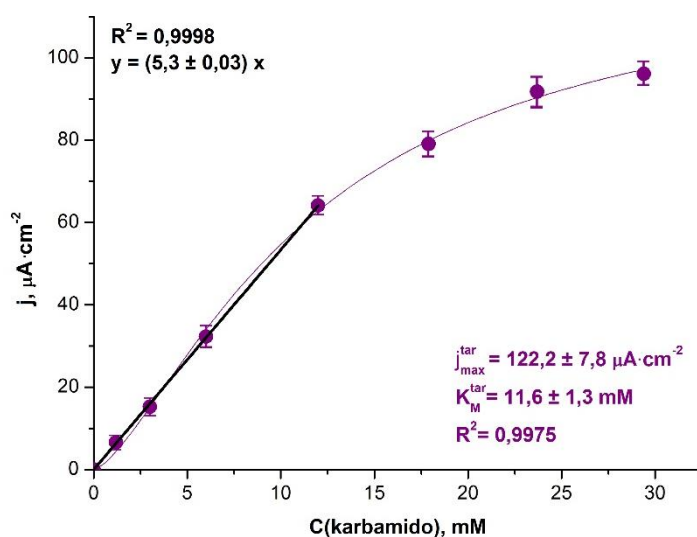
Iš aukščiau pateiktų duomenų matoma, kad visais atvejais imobilizuojant FDH ant TRGO1 paviršiaus, biojutiklių stabilumas išauga nuo 3 iki 7 kartų (k_{in} nuo $5,6 \pm 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ iki $2,3 \pm 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$), lyginant su biojutikliu, kuriame FDH tiesiogiai adsorbuota ant TRGO1 frakcijos paviršiaus ($k_{in}^2 = 16,3 \pm 1,4 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$). Tai reiškia, kad 4 aukščiau išvardyti FDH imobilizacijos būdai yra tinkami sistemų stabilizavimui. Lyginant su 3.22 paveiksle pateiktais duomenimis, imobilizavus FDH nestebima pirmoji, greitesnė jautrio mažėjimo laike stadija (išskyrus Im-FDH1 atvejį), todėl galime teigti, kad biojutiklių su imobilizuota FDH jautris mažėja tik dėl pačios FDH inaktyvacijos. Mažiausia k_{in} reikšmė ($2,3 \pm 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) būdinga sistemai, kurioje naudojamas Im-FDH4 imobilizacijos būdas. Nepaisant to, visais FDH imobilizacijos atvejais FDH jautris D-fruktozei sumažėja daugiau nei 80 % (2.34 pav. intarpas) lyginant su tiesiogiai adsorbuota FDH ant TRGO1 paviršiaus. Iš 2.34 paveiksle (intarpo) pateiktų duomenų matyti, kad, nors biojutiklis su Im-FDH4 veikė stabiliausiai, tačiau šios sistemos likutinis jautris lyginant su adsorbuota FDH yra tik 0,2 %. Didžiausiu likutiniu jautriu pasižymėjo biojutiklis, kuriame buvo naudojamas Im-FDH3 būdas (18 %). Be to, šio biojutiklio jautris, per 5 dienas nuo matavimų pradžios sumažėjo

apie 20 %. Tai yra gan neblogas rezultatas, kadangi lyginant su kitų autorių darbais pateiktais [101, 190] šaltiniuose, D-fruktozės biojutikliai išlieka stabilūs 30 – 60 dienų tik juos laikant -20 °C temperatūroje. Tuo tarpu darbe pagaminti biojutikliai, buvo laikomi +4 °C temperatūroje, bei jais buvo atliekama vidutiniškai 15 matavimų per dieną. Dėl šios priežasties galime teigti, kad sukurtas biojutiklis su TRGO1 ir Im-FDH3 pasižymi gana geru stabilumu. Šios konstrukcijos biojutiklis buvo pasirinktas tolesniems darbams, kurių metu buvo siekta sukurtą biojutiklį pritaikyti D-fruktozės ir D-tagatozės kiekių nustatymui realiuose mėginiuose.

3.3 Bereagentinių sistemų taikymas realių mėginių analizei

3.3.1 TRGO2 ir ureazės biojutiklio taikymas karbamido nustatymui

Darbo metu, karbamido kiekio nustatymui dializiniame skystyje, buvo pagamintas naujas biojutiklis iš TRGO2 ir ureazės, kaip aprašyta 2.5 ir 2.5.1 skyriuose. Sukurtam biojutikliui, buvo nustatyta karbamido kalibracinė kreivė. Gauti duomenys pateikti 3.24 paveiksle.



3.24 Pav. Amperometrinio biojutiklio pagaminto iš TRGO2 ir imobilizuotos ureazės, generuojamo srovės tankio priklausomybė nuo karbamido koncentracijos išmatuota standartinėmis sąlygomis.

Iš biojutiklio generuojamos anodinės srovės tankio priklausomybės nuo karbamido koncentracijos buvo nustatyta $j_{max}^{tar} = 122,2 \pm 7,8 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, $K_M^{tar} =$

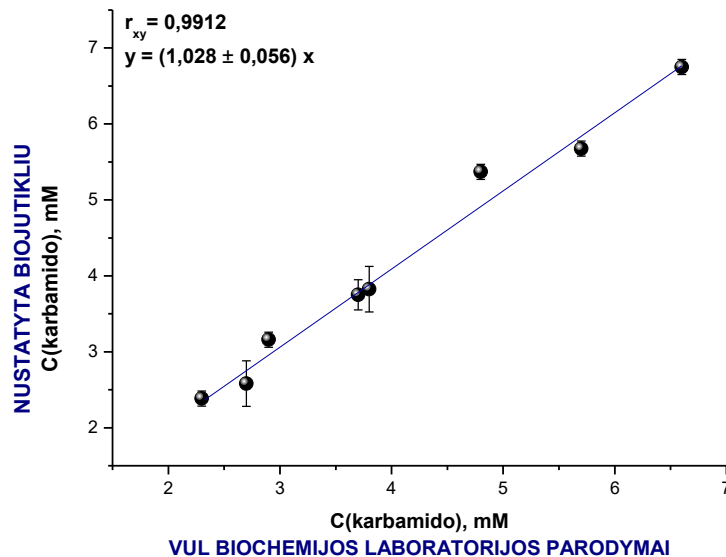
11,6 ± 1,3 mM, jautris – 5,3 ± 0,03 μA·mM⁻¹·cm⁻² ir tiesinė dalis iki 12,0 mM. Gauti biojutiklio parametrai, išskyrus tiesinę dalį, yra nežymiai didesni nei pateikta 3.4 lentelėje, kas parodo, jog dalinai pavyko atkartoti biojutiklio gamybos procesą.

Sukurtu biojutikliu buvo tiriami aštuoni, skirtingų pacientų, dializato pavyzdžiai gauti iš VUL Santariškių klinikų Dializių skyriaus. Amperometriškai karbamido koncentracija buvo nustatoma, iš kalibracinės kreivės tiesinės dalies: į elektrocheminę celę pridėjus tiriamojo dializato mėginio (20 μl), pagal biojutiklio generuojamą srovės stiprį iš kalibracinės kreivės tiesinės dalies (3.24 pav.) buvo nustatoma karbamido koncentracija mM. Biojutikliu nustatyti karbamido kiekiai buvo lyginami su kiekiais gautais VUL Santariškių klinikų biochemijos laboratorijoje analizatoriumi ARCHITECT plus ic8200 (Abbott). Duomenys pateikti 3.7 lentelėje.

3.7 lentelė. *Amperometriškai ir VUL Santariškių klinikų biochemijos laboratorijoje nustatytos karbamido koncentracijos dializinio skysčio mėginiuose.*

C(karbamido) dializiniame skystyje, mM		
Nr.	Nustatyta biojutikliu	Nustatyta VUL Santariškių klinikų biochemijos laboratorijoje
1	5,4 ± 0,1	4,8
2	3,8 ± 0,3	3,8
3	3,2 ± 0,1	2,9
4	2,6 ± 0,3	2,7
5	6,8 ± 0,1	6,6
6	5,7 ± 0,1	5,7
7	3,8 ± 0,2	3,7
8	2,4 ± 0,1	2,3

Siekiant palyginti kaip koreliuoja gauti rezultatai, buvo atidėta priklausomybė tarp karbamido kiekio nustatyto dializiniame skystyje biojutikliu ir VUL Santariškių klinikų biochemijos laboratorijoje (3.25 pav.).



3.25 pav. Koreliacija tarp karbamido koncentracijų nustatytų amperometriniu biojutikliu ir VUL Santariškių klinikų biochemijos laboratorijoje dializinio skysčio mėginiuose.

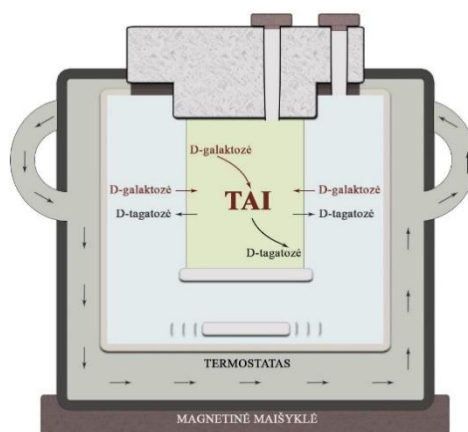
3.25 paveikslo matyti, kad priklausomybė tarp dviem metodais gautų duomenų yra tiesinė. Šiai priklausomybei nustatytas koreliacijos koeficientas ($r_{xy} = 0,9912$) parodė gerą sutapimą rezultatų gautų biojutikliu ir VUL biochemijos laboratorijoje. Tiesinės priklausomybės nuolinkio kampas (1,028) parodė, kad biojutiklio nustatytos karbamido koncentracijos nereikšmingai didesnės už nustatytas VUL biochemijos laboratorijoje. Gauti duomenys patvirtina, kad biojutiklis su ureaze ir TRGO2 gali būti pritaikytas karbamido nustatymui dializiniame skystyje ištekančiame HD metu.

3.3.2 TRGO1 ir FDH biojutiklio taikymas D-fruktozės ir D-tagatozės nustatymui

Stabilizuotu biojutikliu su TRGO1 frakcija ir pagal metodiką Im-FDH3 imobilizuotu fermentu pirmiausia buvo norima įvertinti D-fruktozės kiekį šviežiuose ir termiškai apdorotose obuolių ir apelsinų sultyse. Tuo tikslu į 0,9 ml elektrocheminę celę buvo pridedama po 5 μ l neskiestų sulčių. Iš generuojamos anodinės srovės stiprio išaugimo į elektrocheminę celę įvedus atitinkamų sulčių, pagal biojutiklio kalibracinės kreivės tiesinę dalį, buvo nustatoma D-fruktozės koncentracija mM, kuri vėliau buvo perskaiciuota į kiekį

(g) esantį 100 ml sulčių. Kiekvienas matavimas atliktas po tris kartus, o skaičiavimams imtos vidutinės jų reikšmės. Gauti duomenys parodė, kad 100 ml šviežiuose ir termiškai apdorotose obuolių sultyse atitinkamai yra $16,3 \pm 0,4$ g ir $8,6 \pm 0,3$ g D-fruktozės, o 100 ml šviežiuose ir apdorotuose apelsinų sultyse atitinkamai yra $13,7 \pm 0,2$ g ir $12,4 \pm 0,2$ g D-fruktozės. Nustatytos reikšmės buvo mažesnės už pateiktas angliavandenių kiekių reikšmes ant gaminių pakuočių, kas yra normalu, kadangi šiuose gaminiuose yra ir kitų cukrų pvz. D-gliukozės.

Nors FDH yra labai selektyvus D-fruktozei, darbo metu buvo norima patikrinti ar šis imobilizuotas fermentas katalizuoja ir retojo cukraus D-tagatozės oksidacijos reakciją. Panaudoti FDH D-tagatozės nustatymui būtų labai perspektyvu. Darbo metu, kartu su Dr. Jonita Stankevičiute ir Dr. Rolandu Meškiu (VU GMC BchI Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyrius) siekėme sukurti D-galaktozės konversijos į D-tagatozės biosintezės bei detekcijos sistemą, nes cheminė D-tagatozės sintezė yra ekonomiškai neefektyvi ir neperspektyvi. Tuo tikslu buvo sukurtas D-galaktozės konversijos reaktorius, kuris pateiktas 3.26 paveiksle.

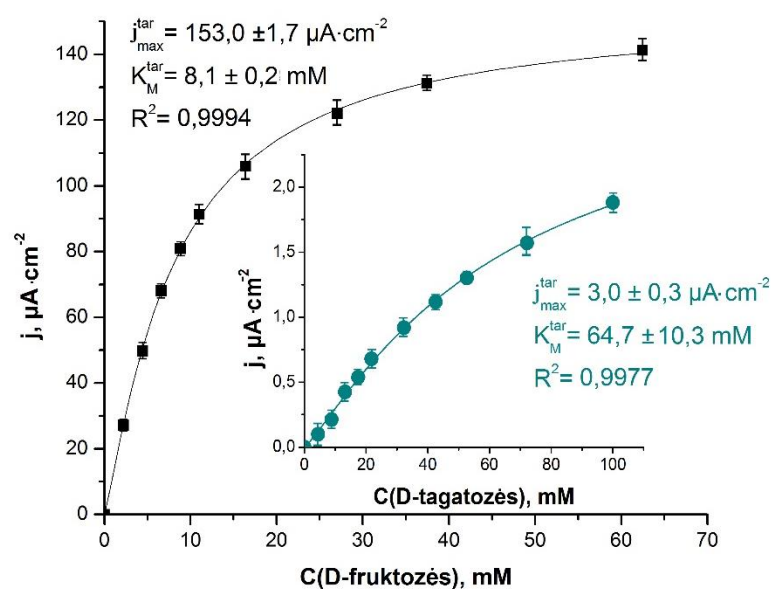


3.26 pav. *D-tagatozės biosintezės reaktorius. 1 – TAI įvedimo vieta, 2 – reakcijos mišinio paėmimo vieta.*

Kaip matyti, reaktoriaus centre dializiniame maišelyje, buvo patalpinta rekombinantinė L-arabinozės izomerazė (TAI) iš *Geobacillus lithuanicus* 5 (gauta iš VU BchI Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus),

kuri katalizuoja D-galaktozės izomeracijos reakciją į D-tagatozę. Naudojant pradinį 444,4 mM D-galaktozės tirpalą, konversija buvo vykdoma 50 valandų, 50 C temperatūroje. Reakcijos mišinio pavyzdžiai buvo paimami kas 10 valandų ir juose amperometriškai – naudojantis optimizuotu FDH biojutikliu buvo nustatomos D-tagatozės koncentracijos. D-tagatozės koncentracijos tikslumas buvo įvertintas ir spektrofotometrinio metodu (3.8 lentelė).

D-tagatozės amperometriniam nustatymui pasirinkta FDH, kadangi D-tagatozė, kaip ir D-fruktozė yra ketoheksozė. Šie du cukrai skiriasi tik hidroksi grupės padėtimi prie 4 anglies atomo [106, 191]. Dėl šių priežasčių, FDH galėtų katalizuoti D-tagatozės oksidacijos reakciją iki 5-keto-D-tagatozės. Tai patikrinti, buvo pasirinktas biojutiklis kuriame kaip elektrodinė medžiaga naudojama TRGO1 frakcija su Im-FDH3 metodu imobilizuota FDH. Tik šiuo atveju žinant, kad šios imobilizacijos metu prarandama daugiau nei 80 % FDH aktyvumo ir, spėjant, kad FDH ne taip efektyviai katalizuos D-tagatozės oksidacijos reakciją, ant elektrodo paviršiaus buvo dedamas didesnis kiekis FDH: vietoj 2 μl , 1471 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$, imobilizacijai naudota 2 μl , 10000 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ FDH tirpalas. Sukurtam biojutikliui, buvo nustatytos D-fruktozės ir D-tagatozės, kalibracinės kreivės (3.27 pav.).



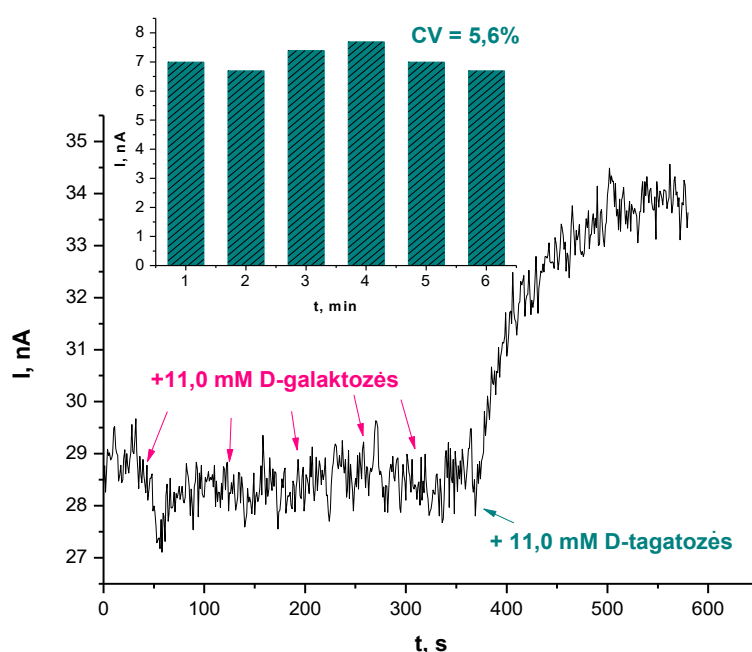
3.27 pav. Biojutiklio pagaminto iš TRGO1 ir Im-FDH3 būdu imobilizuotos FDH generuojamo srovės stiprio priklausomybės nuo D-fruktozės ir D-tagatozės (intarpas) koncentracijos išmatuotos standartinėmis sąlygomis.

Iš pateiktų duomenų matoma, kad imobilizuota FDH ant TRGO1 paviršiaus geba tiesiogiai katalizuoti D-tagatozės oksidacijos reakciją, tačiau šis procesas, lyginant su D-fruktozės katalize, yra ne toks efektyvus. Substratu naudojant D-fruktozę yra pasiekiamas $j_{max}^{tar} = 153,0 \pm 1,7 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$, kai tuo tarpu naudojant D-tagatozę yra pasiekiamas $j_{max}^{tar} = 4,0 \pm 0,3 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$. Taip pat, darbo metu buvo norima palyginti biojutiklio atsakus į 4,4 mM D-tagatozės ir D-fruktozės, kadangi ši substratų koncentracija yra abiejų kalibracinių kreivių tiesinėje dalyje. Išanalizavus duomenis buvo nustatyta, kad biojutiklio atsakas į 4,4 mM D-tagatozės sudaro tik $0,33 \pm 0,08 \%$ atsako į 4,4 mM D-fruktozę (100 %). Lyginant biojutiklio K_M^{tar} reikšmes (D-fruktozei $K_M^{tar} = 8,1 \pm 0,2 \text{ mM}$, o D-tagatozei $K_M^{tar} = 65,0 \pm 10,3 \text{ mM}$) matyti, kad K_M^{tar} D-tagatozei yra beveik aštuonis kartus didesnė nei D-fruktozei, tai rodo, kad imobilizuotos FDH aktyviajame centre D-tagatozė yra prijungiamą labai silpnai, lyginant su natūraliu FDH substratu D-fruktoze. K_M^{tar} reikšmės tiek D-tagatozei, tiek D-fruktozei yra didesnės už natyvios FDH K_M vertę nustatytą tirpale (5 mM [78]). Tai rodo, kad susidaro difuzinis barjeras tarp aktyvaus fermentinio sluoksnio ir tiriamojo tirpalo [184], kas, kaip jau išsiaiškinome, priklauso nuo elektrodinės medžiagos prigimties.

Tolesnių darbų metu buvo siekiama pritaikyti sukurtą biojutiklį, D-tagatozės nustatymui D-galaktozės biokonversijos mišinyje. Žinant, kad biokonversija turi vykti K-fosfatiniame buferiniame tirpale, kurio pH 7,5 (TAI optimalus pH), o natyvios FDH optimalus pH yra 4,5 [78], visų pirma, buvo tiriami, biojutiklio atsakai į 4,4 mM D-fruktozę ir D-tagatozę K-fosfatiniame buferiniame tirpale. Lyginant amperometrinius atsakus į D-fruktozę, nustatyta, kad biojutiklio jautris, K-fosfatiniame buferiniame tirpale, tapo mažesnis ir sudarė tik $37,8 \pm 2,7 \%$ lyginant su jautriu išmatuotu McIlvaino buferiniame tirpale. Tuo tarpu, lyginant atsakus į D-fruktozę ir D-tagatozę K-fosfatiniame buferiniame tirpale, nustatyta, kad atsakas į D-tagatozę sudarė $1,9 \pm 0,5 \%$ D-fruktozės atsako. Tokio atsako į D-tagatozę padidėjimo D-fruktozės atžvilgiu priežastis galėtų būti pasikeitęs FDH molekulėje esančių polinių amino rūgščių šoninių grupių jonizacijos laipsnis t.y. didėjant tirpalo pH mažėja vandenilio

jonų koncentracija, todėl polinės funkcinės grupės gali deprotonizuotis, ko pasekoje kinta tiek fermento tretinė struktūra, tiek pats jo aktyvusis centras [14]. Šie duomenys parodė, kad tokios konstrukcijos biojutiklis, gali būti pritaikytas D-tagatozės kokybiniam ir kiekybiniam įvertinimui, tačiau tik tokiose terpėse, kuriose nėra natūralaus FDH substrato D-fruktozės.

Taip pat darbo metu buvo patikrinta ar sukurtas biojutiklis K-fosfatiniame buferiniame tirpale nekatalizuoja D-galaktozės oksidacijos reakcijos. Tuo tikslu į elektrocheminę celę nuosekliai buvo pridėdami skirtingi kiekiai D-galaktozės ir D-tagatozės. Gauti amperometriniai duomenys pateikti 3.28 paveiksle.



3.28 pav. Biojutiklio anodinės srovės atsakai į 11 mM D-galaktozės ir D-tagatozės. Intarpas – biojutiklio atsakų į 11 mM D-tagatozės atsikartojamumas. Matavimai atlikti K-fosfatiniame buferiniame tirpale pH 7,5, 20 °C, $E = 0,4V$ vs. Ag/AgCl.

Iš 3.28 paveiksle pateiktų duomenų matoma, kad į sistemą pridėjus skirtingus kiekius D-galaktozės (praėjus 43, 124, 200, 260 ir 313 sekundėms), nėra stebimas anodinės srovės išaugimas, tačiau praėjus 370 sekundėms į sistemą pridėjus D-tagatozės stebimas greitas anodinės srovės augimas, kuris stabilizuojasi per 150 sekundžių. Dėl šios priežasties, galime, teigti, kad imobilizuota FDH ant TRGO1 paviršiaus, K-fosfatiniame buferiniame tirpale

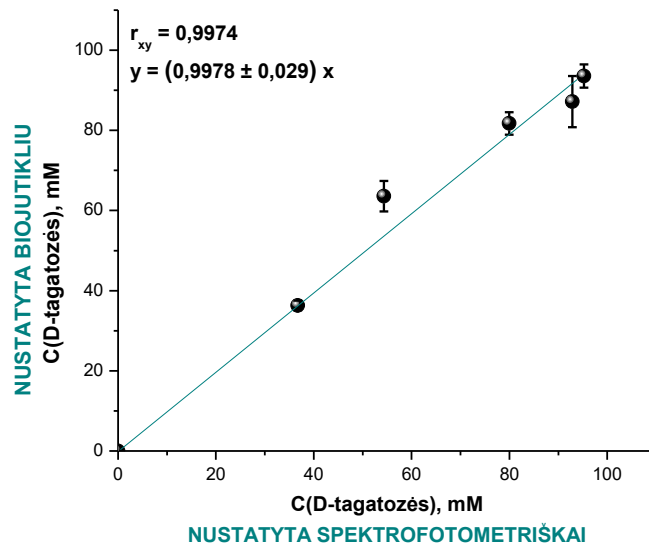
nekatalizuoja D-galaktozės oksidacijos reakcijos, todėl šis biojutiklis yra tinkamas D-tagatozės kiekio nustatymui D-galaktozės biokonversijos reakcijos mišinyje. Buvo nustatytas ir biojutiklio atsakų į 11 mM D-tagatozės, K-fosfatiniame buferiniame tirpale, variacijos koeficientas – 5,6 %. Tai rodo, kad biojutiklio generuojamų anodinės srovės ataskų sklaida yra nedidelė.

Biojutikliu, buvo tiriami penki D-galaktozės biokonversijos reakcijos mišinio pavyzdžiai paimti iš reaktoriaus kas 10 valandų Amperometriškai D-tagatozės koncentracija buvo nustatoma, naudojant standarto pridėjimo būdą t.y. į elektrocheminę celę buvo pridedama reakcijos mišinio su žinoma D-tagatozės koncentracija (priedas), po to buvo lyginami priedo ir reakcijos mišinio, kartu su priedu, generuojami anodinės srovės atsakai tarpusavyje. Iš gautų srovės stiprių išskaičiuoti D-tagatozės kiekiai D-galaktozės biokonversijos reakcijos mišinyje pateikti 3.8 lentelėje. Taip pat D-tagatozės kiekiai tuose pačiuose bandiniuose buvo nustatyti ir spektrofotometriškai.

3.8 lentelė. *Amperometriškai ir spektrofotometriškai nustatytos D-tagatozės koncentracijos biokonversijos reakcijos mėginiuose.*

t, h	C(D-tagatozės) biokonversijos reakcijos mišinyje, mM	
	Nustatyta amperometriškai	Nustatyta spektrofotometriškai
0	0,0	0,0
10	36,3 ± 1,2	36,7
20	63,6 ± 3,8	54,3
30	81,7 ± 2,8	80,0
40	87,2 ± 6,4	92,9
50	93,5 ± 2,9	95,3

Kaip matoma iš aukščiau pateiktų duomenų, per 50 valandų buvo pasiekta 21 % D-galaktozės biokonversijos reakcijos išeiga. Siekiant įvertinti, kaip koreliuoja gauti rezultatai, buvo atidėta priklausomybė tarp amperometriniu ir spektrofotometriniu būdu nustatytų D-tagatozės koncentracijų biokonversijos reakcijos mėginiuose (3.29 pav.)



3.29 pav. Koreliacija tarp *D*-tagatozės koncentracijų nustatytų amperometriniu biojutikliu ir spektrofotometriškai.

Iš aukščiau pateiktų duomenų matoma, kad priklausomybė tarp amperometriškai ir spektrofotometriškai gautų duomenų yra tiesinė. Šiai priklausomybei nustatytas koreliacijos koeficientas ($r_{xy} = 0,9997$) patvirtino gerą sutapimą tarp amperometriniu ir spektrofotometriniu metodu gautų rezultatų, o tiesės lygties nuolinkio kampas ($0,9978$) parodė, kad amperometriniu biojutikliu nustatytos *D*-tagatozės koncentracijos yra nežymiai mažesnės už išmatuotas spektrofotometriškai. Rezultatai leidžia teigti, kad sukurto biojutiklio pagalba galima tiksliai išmatuoti *D*-tagatozės kiekius *D*-galaktozės biokonversijos reakcijos mišinyje.

4 IŠVADOS

- 1 Tiesioginei elektronų pernašai (TEP) tinkamomis savybėmis pasižyminčios devynios anglinės medžiagos susintetintos grafitą oksiduojant H_2O_2 , $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ šarminėje terpėje (GOP(1 – 4)), veikiant fermentu lakaze išskirta iš *Corioloropsis byrsina* (GOP5), termiškai redukuojant grafito oksidą (TRGrO), naujai pasiūlytu terminės grafeno oksido redukcijos ir frakcionavimo metodu (TRGO1, TRGO2, TRGO3).
- 2 Aštuoniais metodais charakterizavus gautas anglines medžiagas nustatyta, kad visos turi deguoninių funkcinių grupių: atitinkamai GOP1 ir GrO nuo $0,108$ iki $5,222 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$. Medžiagos turi skirtingą struktūrą – GO kristalinę, TRGO1 amorfinę struktūrą, tačiau visos yra sudarytos iš nanometrinių eilės dalelių, kurių d_{vid} kito nuo 11 iki 62 nm , o h_{vid} nuo $0,5$ iki $5,5 \text{ nm}$ (atitinkamai TRGrO ir GOP3). Medžiagų savitasis paviršiaus plotas kito nuo $8,1 \pm 0,03$ iki $689,5 \pm 11,3 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ (atitinkamai GOP1 ir TRGO2), o defektiškumas (I(D)/I(G)) kito nuo $0,36$ iki $1,4$ (atitinkamai GOP3 ir TRGO2).
- 3 GOP(1 – 5), TRGrO ir TRGO frakcijos yra tinkamos bereagentinių sistemų kūrimui, kurių biologinę dalį sudaro nuo pirolo chinolinchinono priklausoma gliukozės dehidrogenazė išskirta iš *Acinetobacter calcoaceticus* sp. (PQQ-GDH), ureazė išskirta iš *Canavalia ensiformis* arba D-fruktozės dehidrogenazė išskirta iš *Gluconobacter industrius* (FDH), tačiau efektyviausiai TEP/TKRO išreikšta $j_{\text{max}}^{\text{tar}}$ ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$) vyko sistemose naudojant anglines medžiagas gautas terminės redukcijos būdu: $63,6 \pm 5,8$ (PQQ-GDH ir TRGrO); $117,6 \pm 3,5$ (ureazė ir TRGO1); $335,2 \pm 6,1$ (FDH ir TRGO1).
- 4 Įvertinus sukurtų sistemų kinetinius parametrus TRGrO ir TRGO frakcijos atrinktos kaip tinkamiausios anglinės medžiagos bereagentinių D-gliukozės, karbamido ir D-fruktozės biojutiklių kūrimui. Nustatytas karbamido biojutiklių efektyvumas yra dešimt kartų didesnis nei biojutiklių su GOP ir daugiau nei šimtą kartų didesnis nei kontrolinio

biojutiklio su grafitu. D-fruktozės biojutiklių jautris yra tos pačios eilės, kaip ir mediatorinių sistemų.

- 5 Atrinktu biojutikliu su ureaze ir TRGO2 galima tiksliai įvertinti karbamido koncentraciją dializate. Nustatytas koreliacijos koeficientas tarp rezultatų gautų naudojant biojutiklį ir VUL Santariškių klinikų biochemijos laboratorijos – 0,9912.

Atrinktu ir pritaikytu biojutikliu su Im-FDH3 būdu imobilizuota FDH ir TRGO1 galima tiksliai įvertinti D-tagatozės koncentraciją biokonversijos iš D-galaktozės reakcijos mėginiuose. Nustatytas koreliacijos koeficientas tarp rezultatų gautų spektrofotometriniu metodu ir naudojant biojutiklį – 0,9974.

5 AUTORIAUS MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

5.1 Straipsniai recenzuojamuose žurnaluose

5.5.1 Straipsniai doktorantūros tema

1. J. Razumienė, V. Gurevičienė, M. Dagys, I. Šakinytė, A. Jonuška, L. Rimševičius, S. Marchenko, A. Soldatkin, Development of multi-parameter analyser based on electrochemical urea biosensors and electrolyte electrodes for monitoring of hemodialysis patients, 9th International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies, Biodevices, proceedings (2016) 93 – 101 ISBN: 9789897581700.
2. M. Puida, J. Dabulytė-Bagdonavičienė, F. Ivanauskas, V. Razumas, J. Razumienė, I. Šakinytė, Glucose sensor based on nanostructured carbon electrode with immobilized PQQ-containing glucose dehydrogenase: Construction, experimental study and mathematical modelling, *Nonlinear Analysis: Modelling and Control* 21 (2016) 702 – 715.
3. I. Šakinytė, J. Barkauskas, J. Gaidukevič, J. Razumienė, Thermally reduced graphene oxide: the study and use for reagentless amperometric D-fructose biosensors, *Talanta* 144 (2015) 1096 – 1103.
4. J. Razumiene, I. Sakinyte, J. Barkauskas, R. Baronas, Nano-structured carbon materials for improved biosensing applications, *Appl. Surf. Sci.* 334 (2015) 185 – 191.
5. J. Razumiene, I. Sakinyte, V. Gureviciene, K. Petrauskas, Amperometric urea sensor enzyme immobilization into adjustable membrane and mathematical characterization of the biosensor, 8th International Conference on Biomedical Electronics and Devices, Biodevices, proceedings (2015) 144 – 149 ISBN: 978-989-758-071-0.
6. J. Razumiene, I. Sakinyte, V. Gureviciene, A. Jonuska, From carbon modification to analyzer design, *IJEERT* 5 (2015) special issue 19 – 24.
7. J. Razumienė, V. Gurevičienė, I. Sakinyte, J. Barkauskas, K. Petrauskas, R. Baronas, Modified SWCNTs for reagentless glucose biosensor:

electrochemical and mathematical characterization, *Electroanal.* 25 (2013) 166 – 173.

8. J. Razumienė, I. Sakinyte, T. Kochane, S. Maciulyte, A. Straksys, S. Budriene, J. Barkauskas, Carbon electrode based urea sensor– modification of graphite and new polymeric carriers for enzyme immobilization, 6th International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies, *Biodevices*, proceedings (2013) 197 – 201 ISBN: 978–989–8565–34–1.

5.5.2 Kiti straipsniai

1. J. Barkauskas, J. Dakševič, S. Budrienė, J. Razumienė, I. Šakinytė, Adhesion of graphene oxide on a transparent PET substrate: a study focused on the optimization process, *J. Adhes. Sci. Technol.* 28 (2014) 2016 – 2031.

5.2 Tarptautinių ir nacionalinių mokslinių konferencijų pranešimų tezės

Tarptautinės konferencijos:

1. J. Razumiene, I. Sakinyte, V. Gureviciene, J. Gaidukevic, Barkauskas J., Thermally reduced graphene oxide fractions for urea biosensor design: implementation and study, 150 th ICB Seminar, Micro and Nanosystems in biochemical Analysis, Program of the seminars, Varšuva, Lenkija, 2016 11 12 – 14, 22.
2. J. Razumienė, V. Gurevičienė, M. Dagys, I. Šakinytė, A. Jonuška, L. Rimševičius, S. Marchenko, A. Soldatkin, Development of multi-parameter analyser based on electrochemical urea biosensors and electrolyte electrodes for monitoring of hemodialysis patients, 9th International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies, *Biodevices*, Roma, Italija, 2016 02 21 – 23, 42.
3. J. Barkauskas, J. Gaidukevič, J. Razumienė, I. Šakinytė, Electrocatalytic activity of graphene/(SCN)_n composites for oxygen reduction reaction, *Carbon'16: World Conference on Carbon*, Pennsylvania, JAV, 2016 07 10 – 15, 1 – 6.

4. J. Gaidukevič, J. Barkauskas, I. Šakinytė, J. Razumienė, Graphite oxide/(SCN)_x Nanocomposite Materials: Synthesis, Characterization and Applications for ORR, 18th International Conference-School Advanced Materials and Technologies, Palanga, Lietuva, 2016 08 27 – 31, 116.
5. J. Gaidukevič, J. Barkauskas, J. Razumienė, I. Šakinytė, R. Baronas, K. Petrauskas, Graphene/(SCN)_n Composites as Efficient Electrocatalysts for the Oxygen Reduction Reaction, 3rd European Conference on Smart Inorganic Polymers, Porto, Portugalija, 2016 09 12 – 14, 61.
6. J. Razumienė, V. Gurevičienė, M. Dagys, I. Šakinytė, A. Jonuška, L. Rimševičius, Applications of inexpensive and accurate biosensors in commercial analysers, Life Sciences Baltics 2016, Vilnius, Lietuva, 2016 09 14 – 17.
7. J. Razumiene, I. Sakinyte, V. Gureviciene, A. Jonuska. From Carbon Modification to Analyzer Design. Application of enzymes in bioelectrocatalytic systems. ICITSEM 2015 Proceedings of the Second International Conference on Innovative Trends in Science, Engineering and Management 2015, Dubajus, JAE, 2015 02 25 – 26, 78 – 81.
8. J. Barkauskas, J. Gaidukevič, J. Razumienė, I. Šakinytė, Synthesis and investigation of graphene-based parathiocyanogen nanocomposites, 2nd European Conference on Smart Inorganic Polymers: book of abstracts, Uppsala, JAV, 2015 09 24 – 26, 43.
9. J. Razumiene, I. Sakinyte, V. Gureviciene, K. Petrauskas, Amperometric urea sensor enzyme immobilization into adjustable membrane and mathematical characterization of the biosensor, 8th International Conference on Biomedical Electronics and Devices, Biodevices, Lisabona, Portugalija, 2015 01 12 – 15, 144.
10. I. Sakinyte, J. Razumiene, J. Barkauskas, J. Daksevic, Synthesis and characterization of sp² hybridized carbonaceous materials for D-(-)-tagatose biosensing, 2nd USA International Conference on Surfaces, Coatings and Nanostructured Materials (NANOSMAT-USA), Hiustonas, JAV, 2014 05 19 – 22, 118 – 119.

11. J. Razumiene, I. Sakinyte, R. Baronas, Nano-structured carbon materials for improved biosensing applications, International Conference on Surfaces, Coatings and Nanostructured Materials (NANOSMAT-USA), Houston, TX, 2014 05 19 – 22, 178.
12. J. Barkauskas, J. Dakševič, E. Štikūnaitė, J. Razumienė, I. Šakinytė, Application of carbon nanomaterials in bioanalysis, The international and interdisciplinary conference “Nanotechnology: Research and Development, Vilnius, Lithuania, 2014 05 15 – 16, 37.
13. J. Razumienė, I. Šakinyte, T. Kochanė, S. Mačiulyte, A. Strakšys, S. Budrienė, J. Barkauskas, Modification of graphite and new polymeric carriers for enzyme immobilization, 6th International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies, Biodevices, Barcelona, Spain, 2013 02 11 – 14, 30.
14. I. Šakinytė, J. Razumienė, J. Dakševič, J. Barkauskas, Graphite oxidation products: characterization and application, 5th International Symposium: Advanced micro- and mesoporous materials, Golden Sands, Bulgaria, 2013 09 06 – 09, 79.
15. J. Razumienė, I. Šakinyte, V. Gurevičienė, B. Kurtinaitienė, A. Strakšys, T. Kochanė, S. Budriene, Polymeric carriers for immobilization of biocatalysts, 5th International Symposium: Advanced micro- and mesoporous materials, Golden Sands, Bulgaria, 2013 09 06 – 09, 80.
16. S. Mačiulytė, G. Valungevičiūtė, J. Razumienė, I. Šakinytė, T. Kochanė, I. Gerasimcik, S. Budrienė, Poly(urethane-urea) microcapsules for immobilization of maltogenase, Baltic Polymer Symposium 2013, Trakai, Lithuania, 2013 09 18 – 21, 145.
17. A. Strakšys, A. Dulko, J. Razumienė, I. Šakinytė, T. Kochane, S. Budrienė, Immobilization and catalytic properties of maltogenic α -amylase on puu microparticles, Baltic Polymer Symposium 2013, Trakai, Lithuania, 2013 09 18 – 21, 166.
18. I. Šakinytė, J. Razumienė, J. Barkauskas, Graphite oxidation products: synthesis, characterization and application, International conference of

young chemists „Nanochemistry and Nanomaterials“, Palanga, Lietuva, 2012 12 07 – 09, 46.

Nacionalinės konferencijos:

1. I. Šakinytė, J. Razumienė, J. Barkauskas, J. Gaidukevič, Termiškai redukuoto grafeno oksido frakcijos: savybių studija ir taikymas efektyviai bioelektrokatalizei, penktoji jaunųjų mokslininkų konferencija „Fizinių ir technologijos mokslų tarpdalykiniai tyrimai“, Vilnius, Lietuva, 2015 02 10, 31 – 32.
2. I. Šakinytė, J. Razumienė, J. Barkauskas, Grafito oksidacijos produktų sintezė, tyrimas ir taikymas bioelektrokatalizėje, Jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“, Vilnius, Lietuva, 2012 12 05, 16.

5.3 Dalyvavimas projektuose

1. Nuo 2014 10 iki 2016 04 dalyvavau MITA finansuojamame projekte E! 8835 HemoSensor “Daugiafunkcinis biojutiklis skirtas hemodializės pacientams”, Nr. 31V-8/LSS-570000-534 2015-03-19.
2. Nuo 2013 03 iki 2014 09 dalyvavau Europos komisijos finansuojamame projekte 7 BP Leonardo da Vinci Training Action Programe „Maisto pramonė - Maisto įstatymai, poveikio analizė, mokymų ir bendradarbiavimo tinklas Europos – E-mokymų sistemoje“, Nr. 2012-1-TRI-LEO05-35116.
3. Nuo 2012 09 iki 2014 12 dalyvavau ES struktūrinių fondų finansuojamame projekte „Biotechnologija ir Biofarmacija: fundamentiniai ir taikomieji tyrimai“, Nr. VP1-3.1-ŠMM-08-K-01-005, buvau 1.1.4. veiklos (Biokatalizatorių ir biokatalizinių procesų kūrimas angliavandenių biokonversijai) dalies vykdytoja.

6 PADĖKOS

Norėčiau nuoširdžiai padėkoti savo darbo vadovei dr. Julijai Razumienei (VU GMC BchI) ir konsultantui prof. habil. dr. Jurgiui Barkauskui (VU ChGf) už puikų vadovavimą, suteiktas žinias ir visokeriopą pagalbą. Taip pat dėkoju visiems kolegoms iš VU GMC BchI Bioanalizės skyriaus, o ypač Vidutei Gurevičienei, Jadvygai Matulevič ir Algimantui Jonuškai už pagalbą ir palaikymą. Labai dėkoju savo šeimai už kantrybę ir buvimą kartu, sunkiausiose situacijose. Be jūsų visų nebučiau ten, kur dabar esu.

Norėčiau padėkoti ir doktorantei Justinai Gaidukevič (VU ChGf), habil. Dr. Gediminui Niaurai (VU GMC BchI), doktorantui Martynui Talaikiui (VU GMC BchI), doc. Dr. Arūnui Šetkui (FMTC), dr. Virginijai Bukauskui (FMTC), Doc. Dr. Artūriui Žalgai (VU ChGf) už atliktus ir pagalbą atliekant anglinių medžiagų tyrimus bei vertingus patarimus.

Dėkoju visam VU GMC BchI Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriui, o ypač Dr. Jonitai Stankevičiutei ir Dr. Rolandui Meškiui, už suteiktus fermentus ir atliktus spektrofotometrinius tyrimus bei konsultacijas.

Taip pat dėkoju Lietuvos mokslo tarybai už suteiktas stipendijas už akademinis pasiekimus 2013, 2014, 2015 ir 2016 metais.

7 NAUDOTOS LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. S. Borgmann, A. Schulte, S. Neugebauer, W. Schuhmann, Amperometric Biosensors, in: R.C. Alkire, D.M. Kolb, J. Lipkowski (Eds.), *Advances in Electrochemical Science and Engineering: Bioelectrochemistry*, Wiley-VCH, Germany, 2011.
2. W. Putzbach, N.J. Ronkainen, *Sensors* 13 (2013) 4811 – 4840.
3. D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, E. Reimhult, *Sensors* 8 (2008) 1400 – 1458.
4. S. Viswanathan, H. Radecka, J. Radecki *Monatsh. Chem.* 140 (2009) 891 – 899.
5. P. Das, M. Das, S.R. Chinnadayala, I.M. Singha, P. Goswam, *Biosens. Bioelectron.* 79 (2016), 386 – 397.
6. J. Wang, *Analyst* 130 (2005) 421 – 426.
7. B. Liang, L. Fang, G. Yang, Y. Hu, X. Guo, X. Ye, *Biosens. Bioelectron.* 43 (2013) 131 – 136.
8. Y. Shao, J. Wang, H. Wu, J. Liu, I.A. Aksay, Y. Lin, *Electroanal.* 22 (2010) 1027 – 1036.
9. A. Poulpiquet, A. Ciaccafava, E. Lojou, *Electrochim. Acta* 126 (2014) 104 – 114.
10. S. Wu, Q. He, C. Tan, Y. Wang, H. Zhang, *Small* (2013) 1 – 13.
11. T. Kuila, S. Bose, P. Khanra, A.K. Mishra, N.H. Kim, J.H. Lee, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4637 – 4648.
12. J. Razumiene. A. Vilkanauskite, V. Gureviciene, J. Barkauskas, R. Meskys, V. Laurinavicius, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 5150 – 5156.
13. G. Brauer, *Handbuch der Präparativen Anorganischen Chemie*. 3rd end., Ferdinand Enke verlag Stuttgart, Germany, 1975.
14. J. Kadziauskas, *Biochemijos pagrindai*, VUL, Lietuva, (2012), ISBN 97899966332985.
15. R. Monošik, M. Středanský, E. Šturdík, *Acta. Chim. Slov.* 5 (2012) 109 – 120.
16. P.A. Prakash, U. Yogeswaran, S.M. Chen, *Sensors* 9 (2009) 1821 – 1844.
17. U. Guzik, K. Hupert-Kocurek, D. Wojcieszynska, *Molecules* 19 (2014) 8995 – 9018.
18. G. Rocchitta, A. Spanu, S. Babudieri, G. Latte, G. Madeddu, G. Galleri, S. Nuvoli, P. Bagella, M.I. Demartis, V. Fiore, R. Manetti, P.A. Serra, *Sensors* 16 (2016) 780: 2 – 21.
19. T.T. Le, C.J. Johnson, J. Trzebinski, A.E.G. Cass, *Biosensor design with molecular engineering and nanotechnology in Body Sensor Networks*, Springer-Verlag, London, 2014, 117 – 153.
20. K. Murugesan, I.H. Yang, Y.M. Kim, J.R. Jeon, Y.S. Chang, *Appl. Microbiol. Biot.* 82 (2009) 341 – 350.
21. T.M.H. Lee, *Sensors* 8 (2008) 5535 – 5559.
22. A.N. Sekretaryova, D.V. Vokhmyanina, T.O. Chulanova, E.E. Karyakina, A.A. Karyakin, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1220 – 1223.
23. A.N. Sekretaryova, M.Y. Vagin, V. Beni, A.P. Turner, A.A. Karyakin, *Biosens. Bioelectron.* 53 (2014) 275 – 282.
24. S. Borgmann, G. Hartwich, A. Schulte, W. Schuhmann, *Perspectives in Bioanalysis* 1 (2005) 599 – 655.
25. R.S. Frere, C.A. Pessoa, L.D. Mello, L.T. Kubota, *J. Braz. Chem. Soc.* 14 (2003) 230 – 243.
26. H. Razavi, S. Janfaza, *Nanomed. J.* 2 (2015) 74 – 87.
27. M. Holzinger, A.L. Goff, S. Cosnier, *Front. Chem.* 2 (2014) 1– 10.

28. J. Wang, *Electroanal.* 17 (2005) 7 – 14.
29. S.V. Dzyadevych, V.N. Arkhypova, A.P. Soldatkin, A.V. El'skaya, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, *ITBM-RBM* 29 (2008) 171 – 180.
30. E.H. Yoo, S.Y. Lee, *Sensors* 10 (2010) 4558 – 4576.
31. Y. Wu, S. Hu, *Microchim. Acta* 159 (2007) 1 – 17.
32. X. Dominguez-Benetton, S. Y. Satyawali, K. Vanbroekhoven, D. Pant, *J. Microbiol. Biochem. Technol.* S6 (2013) 1 – 20.
33. A.A Karyakin, *Bioelectrochemistry* 88 (2012) 70 – 75.
34. R.A Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* 811 (1985) 265 – 322.
35. R.A. Marcus, *Rew.Mod. Phys.* 65 (1993) 599 – 610.
36. T.S. Wong, U. Schwaneberg, *Current Opinion in Biotechnology*, 14 (2003) 590 – 596.
37. L.J.C. Jeuken, A.K. Jones, S.K. Chapman, G. Cecchini, F.A. Armstrong, *Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 5702 – 5713.
38. A. Vilkanauskytė, Nuo PQQ priklausomų alkoholio ir gliukozės dehidrogenazių veikimas biosensorinėse sistemose, Doctoral thesis, Institute of Biochemistry, Vilnius University, 2004.
39. K. Kano, T. Ikeda, *Bioelectrocatalysis in: A.G. Volkov (Eds.), Interfacial catalysis*, Taylor & Francis Group, USA, 2003, 461 – 492.
40. T. Ikeda, D. Kobayashi, F. Matsushita, *J. Electroanal. Chem.* 361(1993) 221 – 228.
41. E. Voitechovič, Oksidoreduktazių veikimo bioelektrocheminėse sistemose tyrimas ir taikymas, Doctoral thesis, Institute of Biochemistry, Vilnius University, 2013.
42. S. Ferri, K. Kojima, K. Sode, *J. Diabetes. Sci. Technol.* 5 (2011) 1068 – 1076.
43. C. Anthony, *Antioxid. Redox. Signal.* 3 (2001) 757 – 774.
44. A. Oubrie, *Biochim. Biophys. Acta* 1647 (2003) 143 – 151.
45. S.Y. Reddy, T.C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 2431 – 2438.
46. A. Oubrie, H.J. Rozeboom, K.H. Kalk, J.A. Duine, B.W. Dijkstra, *J. Mol. Biol.* 289 (1999) 319 – 333.
47. D. Ivnitski, P. Atanassov, C. Apblett, *Electroanal.* 19 (2007) 1562 – 1568.
48. Toyobo Enzymes, Glucose dehydrogenase (PQQ-dependent) from Microorganism, prieiga per internetą: <http://www.toyobousa.com/enzyme-GLD-321.html>, 2016 11 02.
49. A. Oubrie, H.J. Rozeboom, K.H. Kalk, A.J.J. Olsthoorn, J.A. Duine, B.W. Dijkstra, *EMBO J.* 18 (1999) 5187 – 5194.
50. S.K. Vashist, D. Zhenga, K. Al-Rubeaand, J.H.T. Luonge, F.S. Sheu, *Anal. Chim. Acta* 703 (2011) 124 – 136.
51. Y. Wang, H. Xu, J. Zhang, G. Li, *Sensors* 8 (2008) 2043 – 2081.
52. J. Razumienė, R. Meškys, V. Gurevičienė, V. Laurinavičius, M.D. Reshetova, A.D. Ryabov, *Electrochem. Commun.* 2 (2000) 307 – 311.
53. J. Razumienė, V. Gurevičienė, A. Vilkanauskytė, L. Marcinkevičienė, I. Bachmatova, R. Meškys, V. Laurinavičius, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 95 (2003) 378 – 383.
54. M. Alkasrawi, I. C. Popescu, V. Laurinavičius, B. Mattiassona, E. Csöregi, *Anal. Commun.* 36 (1999) 395 – 398.

55. G. Li, H. Xu, W. Huang, Y. Wang, Y. Wu, R. Parajuli, Meas. Sci. Technol. 19 (2008) 065203: 1 – 7.
56. J. Okuda, J. Wakai, S. Igarashi, K. Sode, Anal. Lett. 37 (2004) 1847 – 1857.
57. E.L.Carter, N. Flugga, J.L. Boer, S.B. Mulrooney, R.P. Hausinger, Metallomics 1 (2009) 207 – 221.
58. A. Balasubramanian, K. Ponnuraj, J. Mol. Biol. 400 (2010) 274 – 283.
59. B. Krajewska, S. Ciurli, Plant. Physiol. Bioch. 43 (2005) 651 – 658.
60. Sigma-Aldrich product information sheet, Urease, Type IX from *Canavalia ensiformis* (Jack Bean), prieiga per internetą: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/2/u4002dat.pdf>, 2016 11 02.
61. F. Kuralay, H. Özyörük, A. Yıldız, Sensor. Actuat. B-Chem. 114 (2006) 500 – 506.
62. A. Sederevičius, A. Kabašinskienė, S. Savickis, V. Švedaitė, S. Makauskas, Vet. Med. Zoot. 44 (2008) 23 – 30.
63. X. Wang, H. Watanabe, N. Sekioka, H. Hamana, S. Uchiyama, Electroanal. 19 (2007) 1300 – 1306.
64. M. Singh, N. Verma, A.K. Garg, N. Redhu, Sensor. Actuat. B-Chem. 134 (2008) 345 – 351.
65. A. Pizzariello, M. Stredanský, S. Stredanská, S. Miertus, Talanta 54 (2001) 763 – 772.
66. P. Bertocchi, D. Compagnone, G. Palleschi, Biosens. Bioelectron. 11 (1996) 1 – 10.
67. I. Vostiar, J. Tkac, E. Sturdik, P. Gemeiner, Bioelectrochemistry 56 (2002) 113 – 115.
68. N. Stasyuk, O. Smutok, G. Gayda, B. Vus, Y. Koval'chuk, M. Gonchar, Biosens. Bioelectron. 37 (2012) 46 – 52.
69. M. Zhybaka, V. Beni, M.Y. Vagin, E. Dempsey, A.P.F. Turner, Y. Korpan, Biosens. Bioelectron. 77 (2016) 505 – 511.
70. C. Eggenstein, M. Borchardt, C. Diekmann, B. Gründig, C. Dumschat, K. Cammann, M. Knoll, F. Spener, Biosens. Bioelectron. 14 (1999) 33 – 41.
71. P.Y. Chen, T.H. Cho, L.T. Yin, Life Sci. J 11 (2014) 707 – 710.
72. Informacija pacientui, Peritoninė dializė ir hemodializė – kurią pasirinkti?, prieiga per internetą: http://www.rkligonine.lt/uploads/docs/apie_peritonine_dialize_ir_hemodialize.pdf, 2016 11 02.
73. M. Gudynaitė, L. Rimševičius, S. Daugirdaitė, M. Miglinas, Medicinos teorija ir praktika 20 (2014) 207 – 212.
74. S.V. Marchenko, I.S. Kucherenko, O.O. Soldatkin, A.P. Soldatkin, Electroanal. 27 (2015) 1699 – 1706.
75. G. Dhawan, G. Sumana, B.D. Malhotra, Biochem. Eng. J. 44 (2009) 42 – 52.
76. Lietuvos respublikos sveikatos apsaugos ministro įsakymas NR.V-661 „Dėl dializės paslaugų teikimo bendrųjų ir specialiųjų reikalavimų patvirtinimo“.
77. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita, O. Adachi, J. Bacteriol. 145 (1981) 814 – 823.
78. Toyobo Enzymes, D-fructose dehydrogenase from *glysonobactor sp.*, prieiga per internetą: http://www.toyobo-global.com/seihin/xr/enzyme/pdf_files/093_096FCD_302.pdf, 2016 11 02, FCD-302.

79. J. Tkac, J. Svite, I. Vostiar, M. Navratil, P. Gemeiner, 76 (2009) 53 – 62.
80. P.A. Paredes, J. Parellada, V.M. Fernández, I. Katakis, E. Domínguez, *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 1233 – 1243.
81. C.A.B. Garcia, G. de Oliveira Neto, L.T. Kubota, *Anal. Chim. Acta* 374 (1998) 201 – 208.
82. K.T. Kinnear, H.G. Monbouquette, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1771 – 1775.
83. S. Campuzano, R. Gálvez, M. Pedrero, F.J.M de Villena, J.M. Pingarrón, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 600 – 607.
84. J.L. Montanez-Soto, S. Alegret, J.A. Salazar-Montoya, E.G. Ramos-Ramirez, *Eur. Food Res. Technol.* 223 (2006) 379 – 386.
85. J. Parellada, E. Domínguez, V.M. Fernández, *Anal. Chim. Acta* 330 (1996) 71 – 77.
86. Y. Kamitaka, S. Tsujimura, K. Kano, *Chem. Lett.* 36 (2007) 218-2 – 19.
87. K. Damar, D.O. Demirkol, *Talanta* 87 (2011) 67 – 73.
88. S. Piermarini, G. Volpe, M. Esti, M. Simonetti, G. Palleschi, *Food Chem.* 127 (2011) 749 – 754.
89. U.B. Trivedi, D. Lakshminarayana, I.L. Kothari, P.B. Patel, C.J. Panchal, *Sens. Actuators B* 136 (2009) 45 – 51.
90. E. Vargas, M. Gamella, S. Campuzano, A. Guzman-Vazquez de Prada, M.A. Ruiz, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, *Talanta* 105 (2013) 93 – 100.
91. C.A.B. Garcia, G. de Oliveira Neto, L.T. Kubota, L.A. Grandin, *J. Electroanal. Chem.* 418 (1996) 147 – 151.
92. R. Antiochia, G. Vinci, L. Gorton, *Food Chem.* 140 (2013) 742 – 747.
93. M. Tominaga, S. Nomura, I. Taniguchi, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1184 – 1188.
94. M. Tominaga, C. Shirakihara, I. Taniguchi, *J. Electroanal. Chem.* 610 (2007) 1 – 8.
95. L.C. Cantley, *BMC Biol.* 12 (2014) 1 – 4.
96. V. Douard, R.P. Ferraris, *J. Physiol.* 291 (2013) 401 – 414.
97. V. Douard, A. Asgerally, Y. Sabbagh, S. Sugiura, S.A. Shapses, D. Casirola, R.P. Ferraris, *J. Am. Soc. Nephrol.* 21 (2010) 261 – 271.
98. S.E. Lakhan, A. Kirchgessner, *Nutr. J.* 12 (2013) 1 – -12.
99. M.F. Abdelmalek, A. Suzuki, C. Guy, A. Unalp-Arida, R. Colvin, R.J. Johnson, A.M. Diehl, *Hepatology* 51 (2010) 1961 – 1971.
100. M.J. Khandekar, P. Cohen, B.M. Spiegelman, *Nat. Rev. Cancer* 11 (2011) 886 – 95.
101. J. Biscay, E.C. Rama, M.B.G. García, A.J. Reviejo, J.M.P. Carrazón, A.C. García, *Talanta* 88 (2012) 432 – 438.
102. R. Antiochia, L. Gorton, *Sens. Actuat. B-Chem.* 195 (2014) 287 – 293.
103. Z. Xu, S. Li, F. Fu, G. Li, X. Feng, H. Xu, P. Ouyang, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166 (2012) 961 – 973.
104. F. Jørgensen, O.C. Hansen, P. Stougaard, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64 (2004) 816 – 822.
105. F. Patra, S.K. Tomar, S. Arora, *J. Food Sci.* 74 (2009) R16 – 23.
106. G.V. Levin, *J. Med. Food* 5 (2002) 23 – 36.
107. D.K. Oh, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76 (2007) 1 – 8.

- 108.M. Manzoni, M. Rollini, S. Bergomi, *Process Biochem.* 36 (2001) 971 – 977.
- 109.J.R. Beadle, J.P. Saunder, T.J. Wajada, *Process for manufacturing tagatose*, Biospherics Inc., U.S. patent 5002612., 1991.
- 110.Y. Mena, Y. Zhu, L. Zhang, Z. Kang, K. Izumori, Y. Sun, Y. Ma, *Microbiol. Res.* 169 (2014) 171 – 178.
- 111.M. Liang, M. Chen, X. Liu, Y. Zhai, X.W. Liu, H. Zhang, M. Xiao, P. Wang, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (2012) 1469 – 1474.
- 112.M. Rhimia, H. Chouayekh, I. Gouillouard, E. Maguin, S. Bejar, *Bioresource Technol.* 102 (2011) 3309 – 3315.
- 113.N.J. Coville, S.D. Mhlanga, E.N. Nxumalo, A. Shaikjee, *S. Afr. J. Sci.* 107 (2011) 1 – 15.
- 114.Atomic world, Different types of Carbon, prieiga per internetą: http://www.hk-physics.org/atomic_world/carbon/carbon01_e.html, 2016 11 02.
- 115.L. Zhuang, L. Xing-Jie, *Theranostics* 2 (2012) 235 – 237.
- 116.Y.P. Sun, F. Kefu, Y. Lin, W. Huang, *Acc. Chem. Res.* 35 (2002) 1096 – 1104.
- 117.L.Greenemeier, Study says carbon nanotubes as dangerous as asbestos, prieiga per internetą: <https://www.scientificamerican.com/article/carbon-nanotube-danger/>, 2016 11 02.
- 118.Y. Wang, Z. Li, J. Wang, J. Li, Y. Lin, *Trends Biotechnol.* 29 (2011) 205 – 212.
- 119.M. Holzinger, A.L. Goff, S. Cosnier, *Front. Chem.* 2 (2014) 1 – 10.
- 120.I. Suarez-Martinez, N. Grobert, C.P. Ewels, *Carbon* 50 (2012) 741 – 747.
- 121.A. Charlier, E. McRae, R. Heyd, M.F. Charlier, D. Moretti, *Carbon* 37 (1999) 1779 – 1783.
- 122.M. Moniruzzaman, K.I. Winey, *Macromolecules* 39 (2006) 5194 – 5205.
- 123.W. Gao, L.B. Alemany, L. Ci, P.M. Ajayan, *Nat. Chem.* 1 (2009) 403 – 408.
- 124.J. Barkauskas, *Kristalų chemija, Mokomoji medžiaga*, VU ChGf, Vilnius, 2008.
- 125.F. Banhart, J. Kotakoski, A.V. Krasheninnikov, *ACS Nano* 5 (2011) 26 – 41.
- 126.A. Zobelli, V. Ivanovskaya, P. Wagner, I. Suarez-Martinez, A. Yaya, C.P. Ewels, *Phys. Status Solidi B* 249 (2012) 276 – 282.
- 127.I.S. Martinez, C. Ewels, G. Lier, M. Montieux, A jungle of carbon nanoforms: is the nanotube the king, konferencijos „Carbon 2009“ pranešimų medžiaga, France, 2009, 366.
- 128.B.W. Jeong, J. Ihm, G.D. Lee, *Phys. Rev. B* 78 (2008) 165403: 1 – 5.
- 129.O.V. Yazyev, S.G. Louie, *Phys. Rev. B* 81 (2010) 195420: 1 – 7.
- 130.P. Koskinen, S. Malola, H. Häkkinen, *Phys. Rev. Lett.* 101 (2008) 115502: 1 – 4.
- 131.J. Malig, J.M. Englert, A. Hirsch, D.M. Guldi, *Electrochem. Soc. Interface* (2011) 53 – 56.
- 132.W. Zhang, Z. Zhang, J. Zhang, *Nanoscale Res. Lett.* 6 (2011) 1 – 22.
- 133.R. Bakry, R.M. Vallant, M. Najam-ul-Haq, M. Rainer, Z. Szabo, C.W. Huck, G.K Bonn, *Int. J. Nanomedicine* 2 (2007) 639 – 649.
- 134.A. Lurf, H. He, M. Forster, J. Klinowski, *Phys. Chem. B* 102 (1998) 4477 – 4482.
- 135.W.S. Hummers, R.E. Offeman, *Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 1339 – 1339.
- 136.E. Papirer, E. Brendle, F. Ozil, H. Balard, *Carbon* 37 (1999) 1265 – 1274.
- 137.M.A. Montes-Morán, D. Suárez, J.A. Menéndez, E. Fuente, *Carbon* 42 (2004) 1219 – 1225.
- 138.W. Shen, Z. Li, Y. Liu, *Rec. Pat. Chem. Eng.* 1 (2008) 27 – 40.

- 139.R.S. Sundaram, C. Gómez-Navarro, K. Balasubramanian, M. Burghard, K. Kern, *Adv. Mater.* 20 (2008) 3050 – 3053.
- 140.A. Contescu, M. Vass, C. Contescu, K. Putyera, J.A. Schwarz, *Carbon* 36 (1998) 247 – 258.
- 141.V. Laurinaviciusa, J. Razumienea, A. Ramanavicius, A. D. Ryabovc, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2004) 1217 – 1222.
- 142.D.R. Dreyer, S. Park, C.W. Bielawski, R.S. Ruoff, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 228 – 240.
- 143.M. Seredych, T.J. Bandosz, *Phys. Chem. C* 111 (2007) 15596 – 15604.
- 144.X. Zhang, Y. Huang, Y. Wang, Y. Ma, Z. Liu, Y. Chen, *Carbon* 47 (2008) 313 – 347.
- 145.T. Szabó, O. Berkesi, P. Forgó, K. Josepovits, Y. Sanakis, D. Petridis, I. Dékány, *Chem. Mater.* 18 (2006) 2740 – 2749.
- 146.Y. Si, E.T. Samulski, *Nano Lett.* 8 (2008) 1679 – 1682.
- 147.D. Zhan, Z. Ni, W. Chen, Li Sun, Z. Luo, L. Lai, T. Yu, A.T.S. Wee, Z. Shen, *Carbon* 49 (2011) 1362 – 1366.
- 148.M. Pumera, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 4146 – 4157.
- 149.B. Zhao, P. Liu, Y. Jianga, D. Pan, H. Tao, J. Song, T. Fang, W. Xu, *J. Power Sources* 198 (2012) 423 – 427.
- 150.A.C. Ferrari, J. Robertson, *Phys. Rev. B* 61 (2000) 14095 – 14107.
- 151.C. Casiraghi, J. Robertson, A.C. Ferrari, *Mater. Today* 10 (2007) 44 – 53.
- 152.F. Guittonneau, A. Abdelouas, B. Grambow, S. Huclier, *Ultrason. Sonochem.* 17 (2010) 391 – 398.
- 153.A.J.J. Olsthoorn, J.A. Duine, *Arch. Biochem. Biophys.* 336 (1996) 42 – 48.
- 154.L. Marcinkeviciene, R. Vidziunaitė, D. Tauraite, R. Rutkiene, I. Bachmatova, M. Morkunas, J. Razumiene, V. Casaitė, R. Meskiene, J. Kulys, R. Meskys, *Chemija* 24 (2013) 48 – 58.
- 155.R.E. Wrolstad, T.E. Acerr, 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.
- 156.X. Yan, J. Chen, J. Yang, Q. Xue, P. Miele, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2 (2009) 2521 – 2529.
- 157.Potassium Ferricyanide, prieiga per internetą: <http://belhim.com/en/catalog/salt/potassium-releasescontact/>, 2016 11 02.
- 158.M. Alcalde, Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications in: J. Polaina, A.P. MacCabe (Eds.), *Industrial Enzymes, structure, function and applications*, Springer, The Netherlands, 2007, 461 – 476.
- 159.H.P. Boehm, E. Diehl, W. Heck, R. Sappok, *Angew. Chem.* 76 (1964) 742 – 751.
- 160.M. Hosokawa, K. Nogi, M. Naito and T. Yokoyama, *Nanoparticle Technology Handbook*, Elsevier, Amsterdam, 2007.
- 161.F.D. Munteanu, A. Cavaco-Paulo, *Anal. Lett.* 43 (2010) 1126 – 1131.
- 162.D.R. Thvénot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 121 – 131.
- 163.A. Turner, I. Karube, G.S. Wilson, *Biosensors. Fundamentals and applications*, Oxford Science Publications, New York, 1987.
- 164.A. Shrivastava, V.B. Gupta, *Chron. Young Sci.* 2 (2011) 21 – 25.

165. C.A. Leon, L.R. Radovic, *Interfacial chemistry and electrochemistry of carbon surfaces. Chemistry and Physics of carbon*, Marcel Dekker, New York, 1994.
166. K. Haubner, J. Murawski, P. Olk, L.M. Eng, C. Ziegler, B. Adolphi, E. Jaehne, *ChemPhysChem* 11 (2010) 2131 – 2139.
167. Hamilton C. E., Barron A. R., Graphene, prieiga per internetą: <http://cnx.org/content/m29187/1.2/>.
168. M.S. Amer, *Raman Spectroscopy, Fullerenes and Nanotechnology*, RSC Nanoscience & Nanotechnology, RSC Publishing, UK, 2010.
169. L.G. Cançado, M.A. Pimenta, B.R.A. Neves, M.S.S. Dantas, A. Jorio, *Phys. Rev. Lett.* 93 (2004) 247401: 1 – 4.
170. K.N. Kudin, B. Ozbas, H.C. Schniepp, R.K. Prud'homme, I.A. Aksay, *R. Car, Nano lett.* 8 (2008) 36 – 41.
171. T. Shimada, T. Sugai, C. Fantini, M. Souza, L.G. Cançado, A. Jorio, M.A. Pimenta, R. Saito, A. Gruñeis, G. Dresselhaus, M.S. Dresselhaus, Y. Ohno, T. Mizutani, H. Shinohara, *Carbon* 43 (2005) 1049 – 1054.
172. J.M.C. Martin, G.B. Brieva, L.G. Fierro, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 6962 – 6984.
173. V.P. Shilov, A.V. Gogolev, *Russ. J. Gen. Chem.* 79 (2009) 1773 – 1777.
174. C.G. Navarro, R.T. Weitz, A.M. Bittner, M. Scolari, A. Mews, M. Burghard, K. Kern, *Nano Lett.* 7 (2007) 3499 – 3503.
175. Z. Osvath, A. Darabont, P.N. Incze, E. Horvath, Z.E. Horvath, L.P. Biro, *Carbon* 45 (2007) 3022 – 3026.
176. F.J. Hernandez, V.C. Ozalp, *Biosensors* 2 (2012) 1 – 14.
177. A.B. Bourlinos, Th.A. Steriotis, M. Karakassides, Y. Sanakis, V. Tzitzios, C. Trapalis, E. Kouvelos, A. Stubos, *Carbon* 45 (2007) 852 – 857.
178. M. Thommes, *Chem. Ing. Tech.* 82 (2010) 1059 – 1073.
179. J. Li, X. Zeng, T. Ren, E. van der Heide, *Lubricants* 2 (2014) 137 – 161.
180. G. Srinivas, Y. Zhu, R. Piner, N. Skipper, M. Ellerby, R. Ruoff, *Carbon* 48 (2010) 630 – 635.
181. T. Szabó, E. Tombácz, E. Illés, I. Dékány, *Carbon* 44 (2006) 537 – 545.
182. V. Laurinavicius, J. Razumiene, V. Gureviciene, *IEEE Sens. J.* 13 (2013) 2208 – 2213.
183. E.N. Danial, A.H. Hamza, R.H. Mahmoud, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 58 (2015) 147 – 153.
184. F. Ivanauskas, I. Kaunietis, V. Laurinavičius, J. Razumienė, R. Šimkus, *J. Math. Chem.* 43 (2008) 1516 – 1526.
185. F. Nabati, M. Habibi-Rezaei, M. Amanlou, A.A. Moosavi-Movahedi, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 70 (2011) 17 – 22.
186. NanoScienceWorks, Carbon allotropes, prieiga per internetą: <http://www.nanoscienceworks.org/nanopedia/carbon-allotropes>, 2016 11 02.
187. R. Baronas, J. Kulys, A. Lančinskas, A. Žilinskas, *Sensors* 14 (2014) 4634 – 4656.
188. J. Tkáč, I. Voštiar, E. Šturdík, P. Gemeiner, V. Mastihuba, *J. Annu. Anal. Chim. Acta* 439 (2001) 39 – 46.
189. V. Laurinavičius, *Biocheminiai analizės metodai*, VUL, Lietuva, 2012, ISBN 9786094591.

190.S. Yabuki, F. Mizutani, *Electroanal.* 9 (1997) 23 – 25.

191.L.D. Grant, L.N. Bell, *J. Food Sci.* 77 (2012) C308 – 313.