

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS FAKULTETAS
FIZIKINĖS CHEMIJOS KATEDRA**

VIDA KRIKŠTOLAITYTĖ

**FERMENTINIAMS BIOKURO ELEMENTAMS SKIRTŲ ELEKTRODŲ
KŪRIMAS IR CHARAKTERIZAVIMAS**

Daktaro disertacijos santrauka

Fiziniai mokslai, chemija (03P)

Vilnius, 2014

Disertacija rengta 2009 – 2013 metais Vilniaus universiteto Chemijos fakultete ir Malmės universiteto Sveikatos ir visuomenės fakultete.

Mokslinis vadovas:

prof. habil. dr. Arūnas Ramanavičius (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Mokslinis konsultantas:

prof. dr. Tautgirdas Ruzgas (Malmės universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Chemijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas – prof. habil. dr. Aivaras Kareiva (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Nariai:

dr. Rasa Pauliukaitė (Fizinių ir technologijos mokslų centro Fizikos institutas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

prof. habil. dr. Saulius Balevičius (Fizinių ir technologijos mokslų centro Puslaidininkių fizikos institutas, fiziniai mokslai, fizika – 02P).

dr. Žilvinas Anusevičius (Vilniaus universiteto Biochemijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

prof. habil. dr. Eugenijus Norkus (Fizinių ir technologijos mokslų centro Chemijos institutas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Oponentai:

prof. habil. dr. Rimantas Vaišnoras (Lietuvos edukologijos universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02P).

dr. Arūnas Jagminas (Fizinių ir technologijos mokslų centro Chemijos institutas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Disertacija bus ginama viešame Chemijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2014 m. rugsėjo mėn. 30 d. 14 val. Vilniaus universiteto Chemijos fakulteto Neorganinės chemijos auditorijoje.

Adresas: Naugarduko 24, LT-03225, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2014 m. rugpjūčio mėn. 29 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje.

**VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY
DEPARTMENT OF PHYSICAL CHEMISTRY**

VIDA KRIKSTOLAITYTE

**DESIGN AND CHARACTERISATION OF THE ELECTRODES OF
ENZYMATIC BIOFUEL CELLS**

Summary of doctoral dissertation

Physical sciences, Chemistry (03P)

Vilnius, 2014

The dissertation was prepared at Vilnius University Faculty of Chemistry and Malmo University Faculty of Health and Society in the period of 2009 – 2013.

Scientific supervisor:

prof. habil. dr. Arunas Ramanavicius (Vilnius University, Physical Sciences, Chemistry – 03P).

Scientific co-supervisor:

prof. dr. Tautgirdas Ruzgas (Malmo University, Physical Sciences, Biochemistry – 04P).

Doctoral dissertation will be defended at the Chemical Science Council of Vilnius University:

Chairman – prof. habil. dr. Aivaras Kareiva (Vilnius University, Physical sciences, Chemistry – 03P).

Members:

dr. Rasa Pauliukaite (Institute of Physics of Center for Physical Sciences and Technology, Physical sciences, Chemistry – 03P).

prof. habil. dr. Saulius Balevicius (Semiconductor Physics Institute of Center for Physical Sciences and Technology, Physical sciences, Physics – 02P).

dr. Zilvinas Anusevicius (Vilnius University Institute of Biochemistry, Physical sciences, Biochemistry – 04P).

prof. habil. dr. Eugenijus Norkus (Institute of Chemistry of Center for Physical Sciences and Technology, Physical sciences, Chemistry – 03P).

Oponents:

prof. habil. dr. Rimantas Vaisnoras (Lithuanian University of Educational Sciences, Physical sciences, Physics – 02P).

dr. Arunas Jagminas (Institute of Chemistry of Center for Physical Sciences and Technology, Physical sciences, Chemistry – 03P).

The defence of dissertation will take place at 2 p.m. on the 30th of September, 2014 at the open meeting of Chemical Sciences Council at the Auditorium of Inorganic Chemistry at the Faculty of Chemistry of Vilnius University.

Address: Naugarduko 24, LT-03225 Vilnius, Lithuania.

The summary of the doctoral dissertation distributed on the 29 of August. The dissertation is available at the Library of Vilnius University

IVADAS

Fermentiniai biokuro elementai (FBKE) yra toks kuro elementų tipas, kuriuose kaip katalizatoriai, biocheminių reakcijų metu verčiantys cheminę energiją elektrine, yra naudojami išgryninti redokso fermentai [1].

Ypatingai aukštas redokso fermentų (toliau – fermentų) biokatalizinis aktyvumas bei jų atrankumas substratui, taipogi pigaus, atsikuriančio ir ekologiško biokuro, kuris yra oksiduojamas esant minimaliam viršįtampiui, naudojimas, bei švelnios FBKE veikimo sąlygos, kelia ypatingą susidomėjimą ir skatina perspektyvas FBKE panaudoti labai specifinėse nišose, tokiuose kaip, implantuojamuose/pritvirtinamuose biomediciniuose įrenginiuose, pavyzdžiui, implantuojamuose/pritvirtinamuose elektros srovės šaltiniuose bei save energija aprūpinančiuose biologiniuose jutikliuose [2], arba kituose mažai energijos naudojančiuose prietaisuose, tokiuose kaip maži nešiojami elektroniniai įrenginiai [3]. Ypatingai perspektyvūs yra taip vadinami gliukozės/deguonies FBKE, kadangi gliukozė ir molekulinis deguonis (O_2) yra biologinės kilmės medžiagos, dalyvaujančios daugelio gyvų organizmų medžiagų apykaitoje. Dėl šios priežasties šie FBKE galėtų būti naudojami įvairiais biomedicininiais tikslais, tarkime, kaip save energija aprūpinantys biologiniai jutikliai kraujo, ašarų, seilių ir kt., analizei.

Nepaisant aukščiau paminėtų privalumų, praktikoje taikytinų FBKE vystymas yra iki šiol keliantis didelių sunkumų dėl ganėtinai mažo jų generuojamo galingumo ir trumpalaikio stabilumo. Skirtingai nei abiotiniai KE, kurie geba generuoti galios tankį intervale nuo $mW\ cm^{-2}$ iki $kW\ cm^{-2}$ [4], FBKE generuoja galios tankį intervale nuo $\mu W\ cm^{-2}$ iki $mW\ cm^{-2}$ [5, 6]. Mokslinėje spaudoje dažnai įvardijama, jog nešiojami FBKE turėtų apytiksliai būti stabilūs, kai eksploatuojami, mažiausiai vieną savaitę ar, chirurginės intervencijos atveju, daugiau nei metus [3]. Kaip grindžiama ankstesniais tyrimais, FBKE elektrodai gali išlikti stabilūs kelias savaites ar mėnesį [7], bet ne keletą metų, kaip reikalaujama implantacijos atveju.

Angliavandenių/ O_2 FBKE generuojamą galią ir stabilumą dažniausiai riboja anodinio elektrodo veikimas [8]. Todėl pirmiausia ieškoma įvairių būdų anodinių elektrodų charakteristikų pagerinimui. Tuo tikslu šiame darbe tirta daugeliu aspektų ganėtinai skirtingų anodinių fermentų, tai yra, gliukozės oksidazės (GO) ir celiobiozės dehidrogenazės (CDH), bioelektrokatalizė.

GO yra aukšto katalizinio aktyvumo fermentas, demonstruojantis ypatingai aukštą atrankumą substratui gliukozei [9]. Šis fermentas kaip anodinis biokalizatorius buvo panaudotas pirmą kartą (1964 m.) mokslinėje spaudoje aprašytame FBKE [10]. Vis dėlto, GO negali tiesiogiai „perduoti“ elektronų nuo savo aktyvaus centro elektrodui [11], kadangi jo aktyvus centras yra izoliuotas storu nelaidžiu apo-fermentą sudarančiu baltymo sluoksniu [12]. Ribotos heterogeninės elektronų pernašos (EP) problemai spręsti dažnai naudojami EP tarpininkai [13]. Ypatingai gali būti naudingi tie EP tarpininkai, kurie yra dalinai netirpūs vandeninėje terpėje, tačiau ištirpinti organiniame tirpiklyje, jie gali būti tiesiogiai imobilizuojami ant elektrodo paviršiaus, taip išvengiant jų difundavimo tirpale. Šiame darbe buvo tiriamos 1, 10-fenantrolinų junginių, turinčių skirtingas funkcines grupes, EP tarpininkavimo savybės GO katalizuojamoje gliukozės oksidacijos heterogeninėje reakcijoje. Tuo tarpu siekiant pagerinti GO modifikuotų elektrodų stabilumą buvo tirama GO katalizuojama fermentinė laidžių polimerų polimerizacija, kuomet plonas polimero sluoksnis padengia elektrodo paviršiuje adsorbuotą GO.

CDH yra ganėtinai neseniai FBKE anodinių elektrodų konstrukcijose pradėtas naudoti fermentas [8], daugeliu atveju ant elektrodo paviršiaus galintis pasiekti tiesioginę EP, tačiau pasižymintis mažesniu biokataliziniu aktyvumu bei atrankumu gliukozei nei GO fermentas. Vis dėlto, tiesioginės EP principu veikiančių fermentų efektyvumas gali būti žymiai pagerintas juos imobilizuojant nanostruktūrizuotuose elektrodų paviršiuose, tokiu būdu padidinant adsorbuoto fermento kiekį, o dažnai pagerinant bioelektrokatalizinį stabilumą bei tiesioginę EP. Tiesioginę EP demonstruojantys fermentai turi ypatingai dideles perspektyvas jų pritaikymui biomedicinoje.

Šiame darbe kaip stabilūs, elektriškai laidūs ir biologiškai suderinami elementai elektrodų paviršiaus nanostruktūrizavimui buvo naudojamos neigiamai įkrautos citrato jonais padengtos aukso nanodalelės (AuND). Labai svarbu, kad atliekant kruopščius fermentų bioelektrokatalizės vienos AuND lygmenyje tyrimus, gali būti ganėtinai lengvai kontroliuojamas AuND dydis, forma bei paviršiaus charakteristikos. Kaip modelinis fermentas šioms studijoms pasirinktas lakazės fermentas, kadangi jis tiesioginę EP demonstruoja išskirtinai tik AuND, bet ne plokštuminio aukso paviršiuje. Be to, tai ganėtinai pigus, plačiai tyrinėtas fermentas, kurio fizikocheminės savybės yra gerai charakterizuotos.

Reikėtų pabrėžti, jog pagrindiniai FBKE veikimo principai bei siekis atitikti stabilumo ir galios reikalavimus yra nuolatos tiriami ir tam tikras progresas jau yra pasiektas [14]. Vis dėlto, FBKE elektrodų viskoelastiškumas dar niekada nebuvo tirtas; šiame darbe atlikti patys pirmieji tyrimai, skirti charakterizuoti FBKE elektrodų viskoelastines savybes. Labai svarbu žinoti, ar FBKE, tarkime, pritvirtintas prie kateterio sienelių, gali atlaikyti mechanines deformacijas, ir kaip FBKE lankstumas siejasi su jo funkcionalumu įrenginyje.

Darbo tikslai:

1. Sukonstruoti fermentinius angliavandenių/O₂ biokuro elementus (FBKE);
2. Nustatyti FBKE veikimą ribojančius faktorius;
3. Apibūdinti fermentų bioelektrokatalizines charakteristikas AuND nanostruktūrose ir šių nanostruktūrų viskoelastines savybes;

Darbo uždaviniai:

1. panaudoti angliavandenių oksidaciją katalizuojančius fermentus (GO, CDH) anodinio elektrodo konstrukcijoje;
2. panaudoti imobilizuotą GO fermentą fermentinei politiofeno polimerizacijai;
3. panaudoti O₂ ir vandenilio peroksido redukciją katalizuojančius fermentus (krienu peroksidazę, bilirubino oksidazę ir lakazę) katodinio elektrodo konstrukcijoje;
4. sukonstruoti tarpininkaujama ir tiesiogine EP pagrįstus angliavandenių/O₂ FBKE elektrodus;
5. nustatyti reakcijas ir procesus, ribojančius anodinių ir katodinių elektrodų veikimą;
6. nustatyti lakazės molekulių, adsorbuotų ant vienos AuND, skaičių bei įvertinti kinetines konstantas aprašančias O₂ bioelektroredukciją ant lakazės molekulėmis modifikuotų AuND, sudarančių skirtingo tankumo monosluoksnius (bioelektrokatalizės priklausomybė nuo AuND paviršiaus koncentracijos);
7. suformuoti kontroliuojamas AuND mono- ir daugia-sluoksnių nanostruktūras tioliais/polielektrolitais modifikuoto plokštuminio aukso paviršiuje, keičiant AuND dispersijos tirpalo joninę jėgą.
8. įvertinti AuND mono- ir daugia-sluoksnių nanostruktūrų, suformuotų panaudojant skirtingus molekulinis rišiklius (tiolius/polielektrolitus), viskoelastines savybes;

9. palyginti O₂ bioelektroredukciją, lakazę inkorporavus AuND mono- ir daugia-sluoksnėse nanostruktūrose.

Mokslinis naujumas:

1. Pirmą kartą pademonstruota fermentinė politiofeno polimerizacija naudojant ant elektrodo paviršiaus imobilizuotą GO fermentą;
2. 1,10-fenantrolinų junginiai (FJ) pirmą kartą panaudoti kaip GO elektronų pernašos tarpininkai. Geriausias iš jų – 5-amino-1,10-fenantrolinas (5AF) panaudotas anodinio elektrodo konstrukcijoje, kuriant gliukozės/O₂ FBKE;
3. Teigiamą krūvį turintis bi-funkcinis tiolinis junginys N-(6-merkapt)heksilpiridinis (MHP) pirmą kartą panaudotas elektrostatinės sąveikos būdu AuND paviršiuje imobilizuoti CDH fermentus išskirtus iš *Corynascus thermophilus* (CtCDH) ir *Humicola insolens* (HiCDH) kamienų. Ši sąveika atitinkamai įgalino tiesioginę EP tarp šių fermentų ir AuND modifikuoto aukso elektrodo paviršiaus;
4. Tiesioginė EP tarp HiCDH fermento ir AuND paviršiaus nustatyta pirmą kartą. Atitinkamai HiCDH pritaikytas kaip biokatalizatorius anodinio elektrodo konstrukcijoje kuriant tiesioginę EP paremtus angliavandenių (gliukozės, laktozės)/O₂ FBKE;
5. Pirmą kartą pademonstruota, jog vienalaikiškai atliekant elektrocheminius ir kvarco kristalo mikrogravimetrijos su disipacija (E-KKM-D) matavimus galima įvertinti O₂ bioelektrokatalizę vienos AuND, modifikuotos lakazės molekulėmis, lygmeniu;
6. Pirmą kartą KKM-D metodas panaudotas analizuoti bioelektrokatalizinių AuND-fermentų nanostruktūrų viskoelastines savybes.

Ginamieji teiginiai:

1. GO fermentas gali būti panaudotas fermentinei politiofeno (PTF) polimerizacijai. PTF sluoksniu padengta GO, imobilizuota ant elektrodo paviršiaus, pasižymėjo geresniu bioelektrokataliziniu stabilumu;
2. 5AF junginys, imobilizuotas kartu su GO grafitinio elektrodo paviršiuje, veikia kaip EP tarpininkas GO heterogeninėje EP. Atitinkamai 5AF/GO modifikuotas elektrodas gali būti panaudotas kaip anodas tarpininkaujamos EP principu veikiančio gliukozės/O₂ FBKE;
3. MHP junginys įgalina skirtingų celiobiozės dehidrogenazės fermentų, imobilizuotų ant MHP-modifikuoto AuND paviršiaus, tiesioginę EP;

4. Celiobiozės dehidrogenazė, išskirta iš *Humicola insolens* kamieno, yra atspari inhibicijai substratu laktoze. Taigi, fermentas galėtų būti naudojamas kaip anodinis biokatalizatorius aukštos koncentracijos angliavandenių tirpaluose;
5. Vienalaikiai elektrocheminiai ir KKM-D matavimai bei kontroliuojama elektrostatine sąveika formuojami AuND monosluoksniai, įgalina tiksliai įvertinti bioelektrokatalizę vienos AuND, modifikuotos lakazės molekulėmis, lygmeniu. Bioelektrokatalizė vienai NP koreliuoja su AuND paviršine koncentracija;
6. Sluoksnis po sluoksnio (LbL) metodu suformuotos poli-L-lizino (PLL)/AuND daugiasluoksnės struktūros (4 sluoksniai), pasižymi aukštu elektriniu laidumu bei yra tinkamos adsorbuoti lakazės molekules pasižyminčias efektyvia tiesiogine EP.

DISERTACIJOS SANDARA

Daktaro disertacija parašyta anglų kalba ir turi šias dalis: Įvadas, Literatūros apžvalga, Medžiagos, įranga ir metodai, Rezultatai ir jų aptarimas, Išvados, Papildoma informacija, Publikacijų sąrašas, Literatūros sąrašas, Padėka. Darbe yra 9 lentelės ir 67 iliustracijos, bendra apimtis - 186 puslapiai

1.Literatūros apžvalgą sudaro 7 skyriai.

1.1. Fermentiniai biokuro elementai. Apibrėžiama fermentinių biokuro elementų (FBKE) sąvoka, paaiškinamas veikimo mechanizmas ir svarbiausios ypatybės, apžvelgiamos FBKE pritaikymo galimybės ir aptariamos problemos, su kuriomis susiduriama siekiant sukurti realias praktinio pritaikymo galimybes turinčius FBKE.

1.2. Redokso fermentai. Bendrai apžvelgiamos redokso fermentų struktūrinės ypatybės. Išsamiai aprašomos fermentų, naudotų atliekant disertacinius tyrimus, biologinės, struktūrinės ir bioelektrocheminės ypatybės. Atskirame poskyryje diskutuojama galimybė GO fermentą panaudoti fermentinei politiofeno polimerizacijai.

1.3. FBKE elektrodų kūrimo ypatumai. Aprašomi elektronų pernašos (EP) mechanizmai redokso fermentuose, aptariami bioelektrocheminių sistemų, veikiančių tarpininkaujamos ir tiesioginės EP principu, privalumai ir trūkumai. Pabrėžiamas nanotechnologijų vaidmuo tiesioginei heterogeninei EP.

1.4. Aukso nanodalelės. Pateikiami plačiausiai naudojami aukso nanodalelių (AuND) sintezės pavyzdžiai, diskutuojama fermentų, adsorbuotų ant AuND, bioelektrokatalizė ir jos priklausomybė nuo tam tikrų AuND savybių, pavyzdžiui, dydžio.

1.5. Plokštuminio aukso ir AuND paviršiaus funkcionalizavimas. Apžvelgiama aukso paviršių modifikavimo svarba ir būdai, plačiau diskutuojant paviršiaus modifikavimą tiolinių junginių savitvarkiais monosluoksniais bei polielektrolitų plonais sluoksniais. Aptariamas tiolinio junginio MHP ir polielektrolito PLL pasirinkimas modifikuoti elektrodų paviršius disertacinio darbo tyrimuose.

1.6. AuND mono- ir daugia-sluoksnių struktūrų formavimas kietuose paviršiuose. Diskutuojami reikalavimai ir sunkumai formuojant visapusiškai naudingus AuND nanostruktūrizuotus elektrodų paviršius, tinkamus naudoti tiesioginės EP principu veikiančiuose FBKE. Aptariamos galimybės kontroliuojamos ir nekontroliuojamos adsorbcijos būdu formuoti didelio tankio laidžias AuND struktūras. Aprašomas

atsitiktinio nuoseklumo adsorbcijos (angl. RSA: random sequential adsorption) modelis siekiant suprasti ir charakterizuoti AuND adsorbciją paviršiuje elektrostatinės sąveikos būdu.

1.7. Bioelektrokatalizinių AuND-fermentų nanostruktūrų tyrimas E-KKM-D metodu. Diskutuojama galimybė, vienalaikiškai atliekant elektrocheminius ir kvarco kristalo mikrogravimetrijos su disipacija (KKM-D) matavimus, vienu metu registruoti adsorbuojamų AuND ir fermentų masę bei matuoti bioelektrokatalizines charakteristikas, ir tokiu būdu įvertinti bioelektrokatalizę vienos, fermento molekulėmis modifikuotos, AuND lygmeniu. Aptariami KKM-D veikimo principas ir būdai, skirti analizuoti KKM-D metodu gautus duomenis.

2. Medžiagų, įrangos ir metodų dalį sudaro trys pagrindiniai skyriai: medžiagos, įranga ir metodai.

2.1. Medžiagos. Išvardintos tyrimuose naudotos cheminės medžiagos, tirpalai bei fermentai.

Darbe naudoti septyni fermentai: (i) trys anodiniai fermentai, tai yra., celiobiozės dehidrogenazės (CDH) išskirtos atitinkamai iš *Corynascus thermophilus* (CtCDH) ir *Humicola insolens* (HiCDH), bei gliukozės oksidazė iš (GO) išskirta iš *Aspergillus niger*, ir (ii) keturi katodiniai fermentai – lakazės (Lk) išskirtos iš *Trametes hirsuta* (ThLk) ir *Trichaptum abietinum* (ThLk), krienų peroksidazė (KP) ir bilirubino oksidazė išskirta iš *Myrothecium verrucaria* (MvBO). CDH, GO, BO ir KP fermentai panaudoti kurti ir tirti gliukozės/O₂ FBKE, o Lk fermentai – atskiro katodinio elektrodo tyrimams mono (2D)- ir daugia (3D)-sluoksnėse AuND nanostruktūrose.

Naudoti buferiniai tirpalai:

- (i) FBT (pH 4) – 50 mM fosfatinis buferinis tirpalas, pH 4, esant 100 mM Na₂SO₄ (pH koreguotas naudojant citrinos rūgšties monohidratą);
- (ii) C-FBT (pH 3.4-5.4) – 50 mM citratinis-fosfatinis buferinis tirpalas esant 100 mM KCl;
- (iii) FBT (pH 6.4-8.2) – 50 mM fosfatinis buferinis tirpalas esant 100 mM KCl;
- (iv) A-FBT (pH 6) – 50 mM acetatinis-fosfatinis buferinis tirpalas esant 100 mM KCl.

Naudoti reagentai pateikti disertacijoje, skyriuje 2.1.1., lentelėje 4.

2.2. Įranga.

- a) Potenciostatas PGSTAT 30 su GPES3 v3.2 programine įranga ECO-Chemie/Autolab (Utrecht, Nyderlandai);
- b) Kompaktinis potenciostatas Ivium CompactStat iš Ivium Technologies (Eindhoven, Nyderlandai);
- c) Potenciostatas EC Epsilon 50 iš BASi (West Lafayette, IN, JAV).

Vienalaikiai elektrocheminiai ir kvarco kristalo mikrogravimetrijos su disipacija (E-KKM-D) matavimai atlikti naudojant QWEM401 elektrocheminę gardelę (Q-Sense, Goteborgas, Švedija).

NICOMPTM submikroninių dalelių analizatorius iš Nicomp 380 ZLS (Santa Barbara, JAV).

2.3. Metodai

Metodų dalyje pateikiami MHP (žr. 2.3.1.), 1,10-fenantrolinų junginių (žr. 2.3.2.), AuND (žr. 2.3.3.) sintezės protokolai. Aprašomas AuND dydžio įvertinimas spektrofotometrijos (žr. 2.3.4.1.) ir atominės jėgų mikroskopijos (žr. 2.3.4.2.) būdu bei ξ -potencialo nustatymas elektroforezinio šviesos išsklaidymo būdu (žr. 2.3.5.).

Įvairūs elektrodų paruošimo būdai bei elektrocheminiai matavimai aprašyti atitinkamai 2.3.7. ir 2.3.9 skyriuose.

Kombinuotų E-KKM-D matavimų bei rezultatų analizės aprašymas pateiktas 2.3.10. skyriuje.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

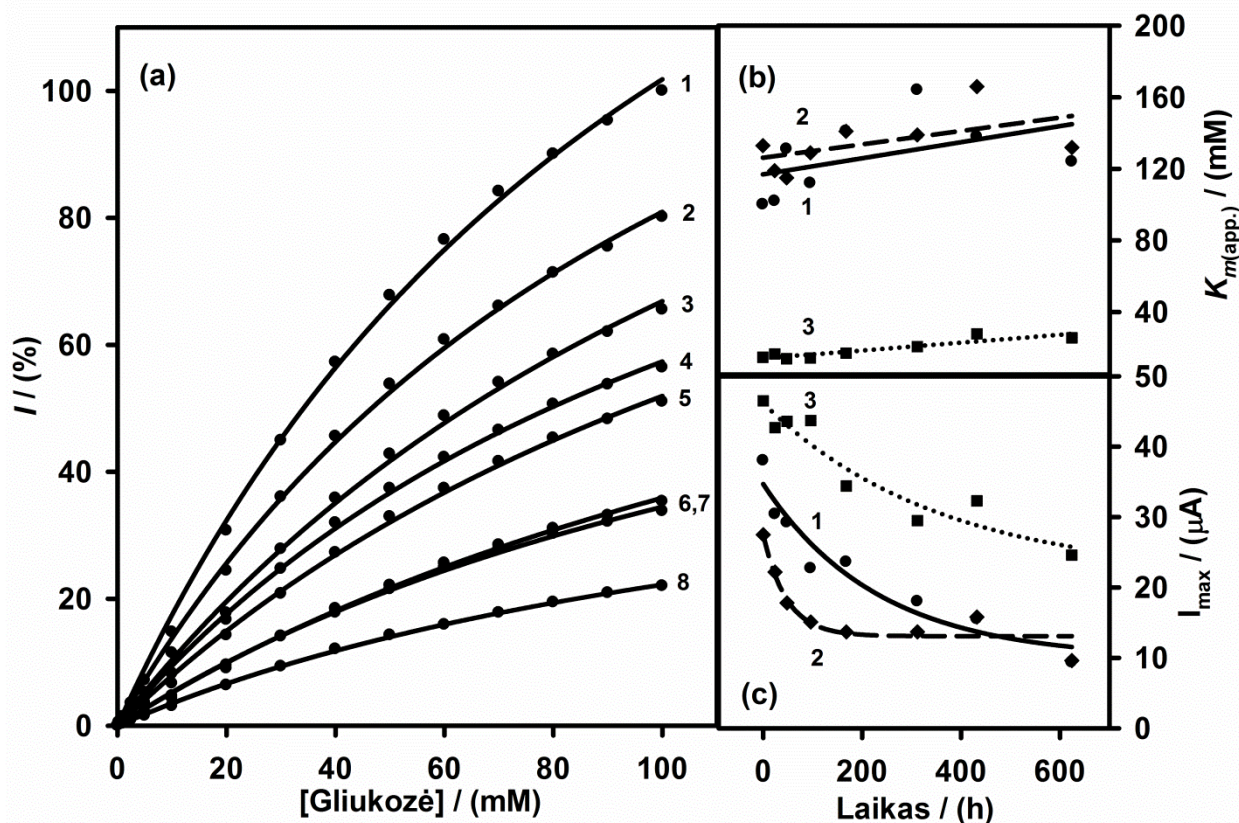
3.1. Gliukozės oksidazės panaudojimas fermentinėje politiofeno polimerizacijoje

Šiame tyrimų etape tirta GO, adsorbuotos grafitinio elektrodo (GE) paviršiuje, padengimas politiofeno (PTF) sluoksniu fermentinės polimerizacijos būdu. Tiofeno polimerizacija inicijuota vandenilio peroksidu (H_2O_2), susidarančiu GO katalizuojamos gliukozės oksidacijos metu. H_2O_2 veikė kaip laisvuosius radikalus generuojantis oksidatorius, kurie savo ruožtu pradėjo polimerizacijos reakciją (žr. disertacijoje skyrių 1.2.3.2.). Amperometriniu būdu, aprašytu disertacijos metodinėje dalyje, skyriuje 2.3.9.1., buvo įvertinta PTF sluoksnio įtaka GO bioelektrokataliziniam aktyvumui ir stabilumui. PTF sluoksnio formavimasis buvo patvirtintas susilpninto visiško atspindžio Furjė transformacinės infraraudonųjų spindulių spektroskopijos (ATR-FTIR) matavimais, kurie pateikti disertacijoje, skyriuje 3.1.2.

Polimerizacijos trukmės optimizavimas ir įtaka GO bioelektrokataliziniam aktyvumui detaliam aprašyti disertacijoje, skyriuje 3.1.1. Šių tyrimų metu nustatyta, kad pakankamo storio polimeras susidaro laikant elektrodą polimerizacijos tirpale 16 h. Todėl atliekant GO/PTF elektrodo stabilumo matavimus buvo pasirinktas 20 h polimerizacijos trukmė. Stabilumo matavimai buvo atliekami 624 h laikotarpyje (Pav. 1). Tarp matavimų elektrodai buvo laikomi $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, uždarytame mėgintuvėlyje virš A-FBT, pH 6.0, lašo. GE/GO-modifikuoto elektrodo $K_{m(app.)}$ ir I_{max} reikšmės prieš modifikavimą PTF sluoksniu buvo atitinkamai lygios $19.0\pm 2.0\text{ mM}$ ir $63.2\pm 2.0\text{ }\mu\text{A}$. Po 20 h inkubacijos polimerizacijos tirpale formuojantis PTF sluoksniui $K_{m(app.)}$ reikšmė padidėjo iki $100\pm 6.0\text{ mM}$, o I_{max} sumažėjo iki $38.0\pm 1.4\text{ }\mu\text{A}$. 624 h laikotarpyje $K_{m(app.)}$ pakito 1.3 karto, o I_{max} parametrui buvo stebimas nuoseklus mažėjimas (Pav. 1b ir 1c, kreivė 1). Eksperimento pabaigoje I_{max} sumažėjo 4 kartus.

Kontrolinio elektrodo, paruošto inkubuojant A-FB tirpale turinčiame vien tiktai gliukozės, kinetiniai parametrai buvo tokie: $K_{m(app.)}=133.0\pm 8.0\text{ mM}$, $I_{max}=27.5\pm 1.0\text{ }\mu\text{A}$. Stabilumo matavimų pabaigoje, t.y. po 624 h periodo, parametrai pasikeitė atitinkamai: $K_{m(app.)}=132.0\pm 5.0\text{ mM}$, $I_{max}=9.61\pm 0.23\text{ }\mu\text{A}$. Maksimali generuojama srovė sumažėjo 3 kartus, taigi GO bioelektrokatalizinis stabilumas šiam kontroliniam elektrodai nebuvo aukštas (Pav. 1b ir 1c, kreivė 2).

Kitas kontrolinis elektrodas paruoštas GE/GO-modifikuotą elektrodą 20 h inkubuojant tiofeno turinčiame A-FB tirpale be gliukozės. Nustatyti $K_{m(app.)}$ ir I_{max} parametrai buvo atitinkamai lygūs 14.6 ± 1.5 mM ir 46.5 ± 1.2 μ A, o po 624 h parametrai pasikeitė atitinkamai: $K_{m(app.)} = 25.6 \pm 2.4$ mM, $I_{max} = 24.6 \pm 0.8$ μ A. Bioelektrokatalizinė srovė sumažėjo apytiksliai 2.15 kartų (Pav. 1c, kreivė 3). Šie duomenys rodo itin aukštą antrojo kontrolinio elektrodo stabilumą.



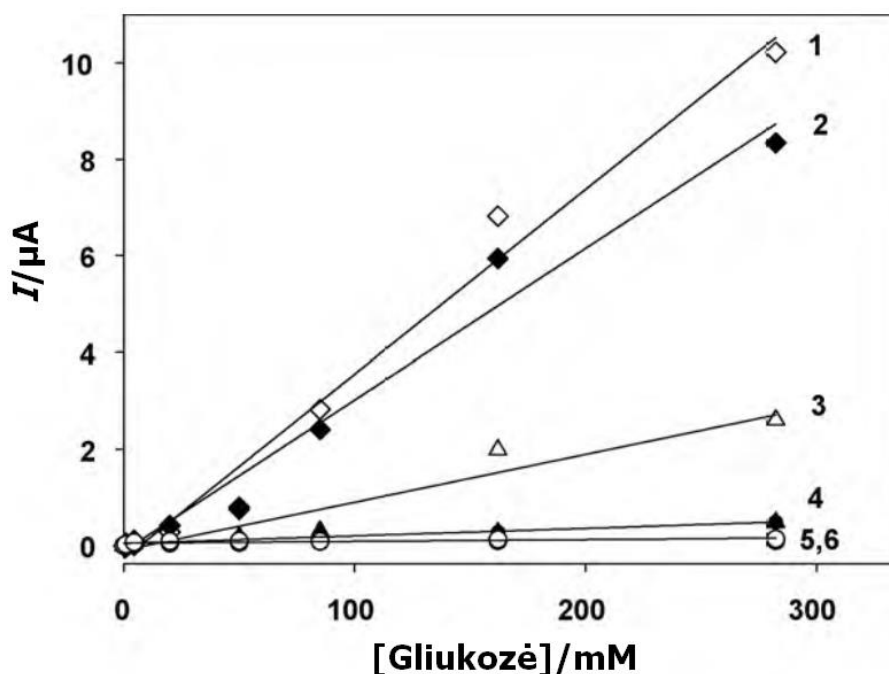
Paveikslas 1. (a) Gliukozės gradavimo kreivės laike naudojant GO/PTF-modifikuotą GE. GE/GO elektrodas padengtas PTF sluoksniu šį elektrodą inkubuojant 20 h kambario temperatūroje A-FBT, pH 6, turinčiame 200 mM tiofeno ir 50 mM gliukozės (polimerizacijos tirpalas). Skaičiai rodo laiko intervalus tarp stabilumo matavimų (kreivė 1 – 0 h, 2 – 24 h, 3 – 48 h, 4 – 96 h, 5 – 168 h, 6 – 312 h, 7 – 432, 8 – 624 h) atliktų esant +0.3 V Ag/AgCl/3M KCl palyginamojo elektrodo atžvilgiu kambario temperatūroje maišomame A-FBT, pH 6, turinčiame 2 mM fenazino metasulfato. Nustatytos $K_{m(app.)}$ (b) and I_{max} (c) reikšmės laike GE/GO elektrodą prieš stabilumo matavimus 20 h inkubavus polimerizacijos tirpale (kreivė 1) bei kontroliniuose tirpaluose nesant tiofeno (kreivė 2) arba gliukozės (kreivė 3).

3.2. 1,10-fenantrolinų junginių EP tarpininkavimo savybių tyrimas naudojant gliukozės oksidazę

Amperometriškai ir potenciometriškai tirta penkių 1,10-fenantrolinų junginių (FJ), tai yra, 1,10-fenantrolino monohidrato (FMH), 5-nitro-1,10-fenantrolino (5NF), 5-amino-1,10-fenantrolino (5AF), 5-amino, 6-nitro-1,10-fenantrolino (5A6NF), 5,6-

diamino-1,10-fenantrolino (56DAF) (disertacijoje lentelė 3) EP tarpininkavimo savybės naudojant gliukozės oksidazę (GO). Šiuo tikslu tiek dalinai vandeninėje terpėje netirpūs FJ, tiek GO fermentas buvo imobilizuoti grafitinio elektrodo paviršiuje pagal metodiką, aprašytą disertacijoje, skyriuje 2.3.7.3.

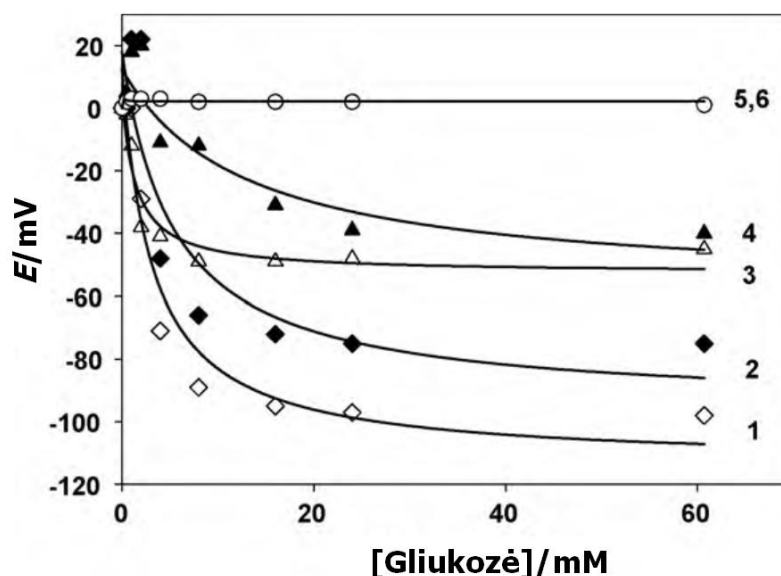
Ženklius amperometrinius signalai didinant gliukozės koncentraciją A-FB tirpale, pH 6, buvo registruojami GE/5AF/GO, GE/56DAF/GO ir GRE/5NF/GO elektrodams (Pav. 2, kreivės 1-3). Tai reiškia, jog 5AF, 56DAF ir 5NF galėtų būti taikomi kaip EP tarpininkai pernešti elektronus tarp GO ir GE paviršiaus. Nemodifikuotas FMH bei 5A6NF tokioje pat elektrodo konstrukcijoje nepasižymėjo EP tarpininkų savybėmis (Pav. 2, kreivės 4 ir 5).



Paveikslas 2. GE/GO ir GE/FJ/GO modifikuotų elektrodų amperometrinis atsakas didinant gliukozės koncentraciją: (1) GE/5AF/GO, (2) GE/56DAF/GO, (3) GE/5NF/GO, (4) GE/5A6NF/GO_x, (5) GE/FMH/GO ir (6) GE/GO esant +0.6 V Ag/AgCl_{sat.} elektrodo atžvilgiu.

Siekiant ištirti galimybę FJ panaudoti FBKE elektrodų kūrime, papildomai atlikti potenciometriniai matavimai (Pav. 3). Geriausias potenciometrinis atsakas gautas naudojant 5AF/GO pagrindu veikiančią elektrodą. Truputį mažesnis potenciometrinis atsakas buvo stebimas elektrodai, modifikuotam 56DAF/GO. Kitais atvejais registruojamas atviros grandinės potencialas buvo žymiai mažesnis. Dėl registruojamos santykinai aukštos srovės ir generuojamo efektyvus potencialo, 5AF ir 56DAF junginiais

modifikuoti elektrodai galėtų būti taikomi GO pagrindu veikiančiuose biologiniuose jutikliuose ar FBKE kaip anodiniai elektrodai.



Paveikslas 3. Skirtingai modifikuotų GE potenciometrinis atsakas (esant atvirai grandinei) elektrocheminėje gardelėje didinant gliukozės koncentraciją: (1) GE/5AF/GO, (2) GE/56DAF/GO, (3) GE/5NF/GO, (4) GE/5A6NF/GO, (5) GE/FMH/GO ir (6) GE/GO.

Diskusija, koku būdu prie 1,10-fenantrolino monohidrato karkaso prijungtos funkcinės grupės įtakoja atskirų FJ savybes, yra aprašoma disertacijoje, skyriuje 3.2.1.

3.3. Angliavandenių/ O_2 FBKE kūrimas ir charakterizavimas

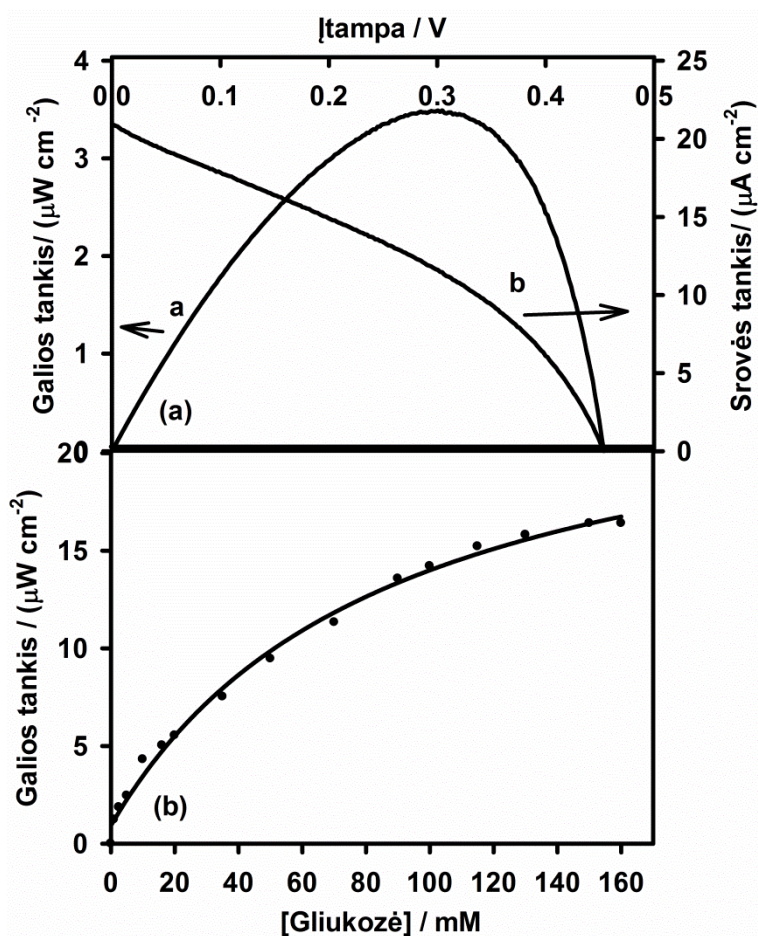
Šiame skyriuje aprašomas tarpininkaujamos ir tiesioginės EP principu veikiančių angliavandenių FBKE vystymas ir tyrimas. Papildomai charakterizuojamos atskirų FBKE elektrodų savybės siekiant įvertinti FBKE ribojančius veiksnius.

3.3.1. Tarpininkaujamos EP principu veikiantys gliukozės FBKE

Šiame tyrimų etape buvo sukonstruotas ir tirtas FBKE, kurio tiek anodinio, tiek katodinio elektrodų kūrimui panaudotas GO fermentas kaip biokurą naudojantis gliukozę. 5AF junginys, ankstesniame tyrimų etape įvertintas kaip geriausias EP tarpininkas iš penkių tirtų FJ, kartu su GO fermentu (5AF/GO) buvo panaudotas anodinio elektrodo konstrukcijoje. Atitinkamai bifermeninė krienų peroksidazės (KP) ir GO sistema (KP/GO) buvo panaudota katodinio elektrodo kūrimui. Individualių

katodinio ir anodinio elektrodų charakterizavimas pateiktas disertacijoje, skyriuje 3.3.1.1.

Maksimali registruota FBKE atviros grandinės įtampa lygi 0.45 V esant 16 mM gliukozės koncentracijai. Pav. 4a vaizduoja galios (a) ir srovės (b) tankio priklausomybę nuo elemento potencialo. Nemaissant 16 mM gliukozės turinčiame A-FBT maksimalus nustatytas srovės tankis buvo lygus $3.5 \mu\text{W cm}^{-2}$ esant 0.3 V elemento potencialui. Didinant gliukozės koncentraciją, maksimalus, tai yra $16.3 \mu\text{W cm}^{-2}$, galios tankis pasiektas esant 150 mM gliukozės (Pav. 4b).



Paveikslas 4. (a) Tipinės galios (a) ir srovės (b) tankių priklausomybės nuo FBKE įtampos nemaissant A-FBT, pH 6, esant 16 mM gliukozės aerobinėse sąlygose. Linijinė voltamperometrija atlikta 0.1 mV s^{-1} potencialo skleidimo greičiu. (b) Galios tankio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos matuota chronampermetrijos būdu, esant potencialui atitinkančiam maksimalų galios tankį.

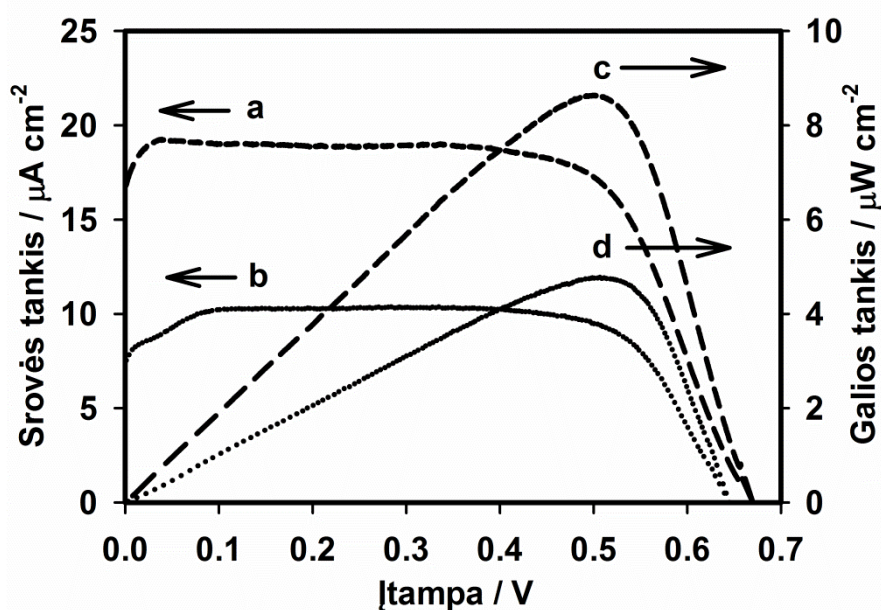
3.3.1. Tiesioginės EP principu veikiantys angliavandenių/ O_2 FBKE

Atliktas tiesiogine ET paremtų ir fiziologinio pH terpėje veikiančių angliavandenių/ O_2 FBKE konstravimas ir charakterizavimas ant AuND modifikuoto aukso paviršiaus. Panaudojant teigiamą krūvį turintį bi-funkcinį tiolinį junginį MHP, elektrostatinės

sąveikos būdu AuND paviršiuje imobilizuoti CDH fermentai išskirti iš *Corynascus thermophilus* (CtCDH) ir *Humicola insolens* (HiCDH) kamienų, tokiu būdu įgalinant tiesioginę EP tarp šių fermentų ir elektrodo paviršiaus. Disertacijoje pateiktas išsamus šių dviejų CDH fermentų bioelektrokatalizės tyrimas ir palyginimas gliukozės ir laktozės tirpaluose (žr. skyrių 3.3.2.1.). HiCDH fermentas, pasižymintis atsparumu inhibicijai laktoze, pritaikytas kaip biokatalizatorius anodinio elektrodo konstrukcijoje AuND/MHP/HiCDH. Katodinio elektrodo kūrimui panaudota bilirubino oksidazė, tiesiogiai adsorbuota ant AuND paviršiaus (AuND/BO). Ši FBKE konstrukcija yra naudinga tuo, jog galėtų funkcionuoti aukštos koncentracijos laktozės tirpaluose, pavyzdžiui, piene ar pieno produktuose.

Nustatytos tokios FBKE charakteristikos (Pav. 5):

- (i) 5 mM gliukozės turinčiame FBT, pH 7.4 - atviros grandinės įtampa lygi 0.65 V ir atitinkamai maksimalus galios tankis lygus $4.77 \mu\text{W cm}^{-2}$ esant 0.50 V elemento įtampai;
- (ii) 10 mM laktozės turinčiame FBT, pH 7.4 - atviros grandinės įtampa lygi 0.67 V ir maksimalus galios tankis lygus $8.64 \mu\text{W cm}^{-2}$ esant 0.50 V elemento įtampai.

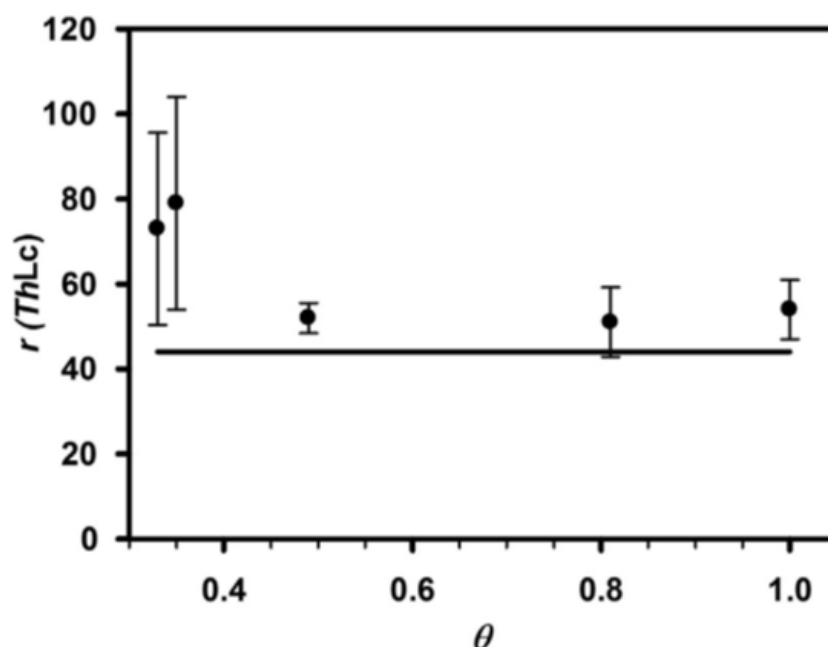


Paveikslas 5. Tipinės srovės tankio ir galios tankio priklausomybės nuo HiCDH-MvBOx FBKE įtampos nemaišomuose angliavandenių turinčiuose 50 mM FBT tirpaluose, pH 7.4. Sąlygos: FBT turintis (a ir c) 10 mM laktozės ir (b ir d) 5 mM gliukozės. Linijinės amperometrijos matavimai atlikti 0.1 mV s^{-1} potencialo skleidimo greičiu.

Tirto FBKE galios išeišos pusamžis (esant $1 \text{ M}\Omega$ išorinei varžai) nustatytas esantis lygus 13 h ir 44 h atitinkamai gliukozės- ir laktozės- turinčiuose FBT.

3.4. O₂ bioelektroredukcija lakaze inkorporuota skirtingo tankio AuND monosluoksniuose

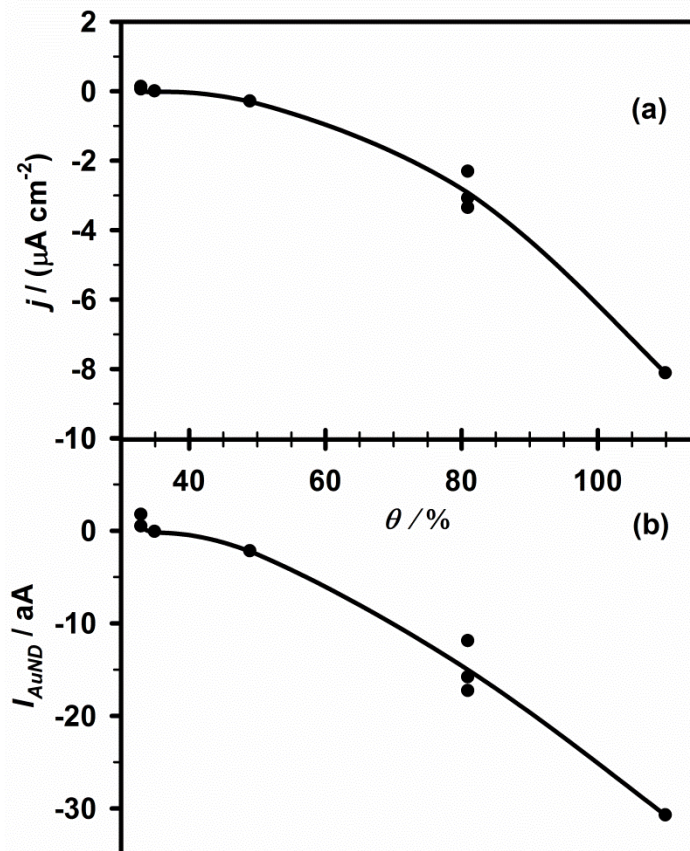
Siekiant įvertinti elektrodo paviršiuje besiadSORBUOJANČIŲ AuND and *ThLk* molekulių skaičių bei įvertinti O₂ bioelektroredukciją lakaze AuND-*ThLk* struktūroje, atlikti vienalaikiai elektrocheminiai ir KKM-D matavimai. Keičiant AuND dispersijos joninę jėgą, pasiektas skirtingas AuND monosluoksniu užpildymas (θ) intervale nuo 0.33 iki 1. Esant skirtingam AuND monosluoksniu užpildymui θ , visais atvejais nustatytas panašus vienos AuND paviršiuje besiadSORBUOJANČIŲ *ThLk* molekulių skaičius, kuris atitinkamai buvo artimas teoriškai įvertintam *ThLk* molekulių kiekiui, nusakančiam, kiek *ThLk* molekulių teoriškai galėtų sorbuotis 22 nm skermens AuND paviršiuje (Pav. 6)



Paveikslas 6. *ThLk* molekulių, adsorbuotų ant vienos AuND, skaičius $r(ThLc)$ esant skirtingai AuND monosluoksniu koncentracijai. Stora linija vaizduoja 44 *ThLk* molekules, teoriškai galinčias adsorbuotis vienos AuND paviršiuje.

Aukštesnės biokatalizinės srovės buvo registruojamos esant tankesniam AuND monosluoksniu užpildymui θ (Pav. 7a). Bioelektrokatalizinė srovė buvo paskaičiuota vienai AuND. Neprognozuojamai srovė vienai AuND buvo didesnė esant tankesniam AuND sluoksniu užpildymui (Pav. 7b). Nustatyta maksimali bioelektrokatalizinė srovė vienai *ThLk* molekulėmis modifikuotai AuND, kuri atitinkamai buvo lygi $31 \cdot 10^{-18}$ A. Ši reikšmė atitiko katalizinės konstantos (k_{cat}) vertę lygią 13 s^{-1} . Ši reikšmė yra žymiai mažesnė lyginant ją su homogenine *ThLk* konstanta (190 s^{-1}), todėl atitinkamai daroma

prielaida, jog adsorbcijos metu vyko dalinė *ThLk* molekulių denatūracija, arba tam tikra dalis *Lk* molekulių AuND paviršiuje adsorbavosi orientacija, neįgalinančia tiesioginę EP.



Paveikslas 7. O_2 bioelektrokatalizinės srovės priklausomybė nuo paviršiaus padengimo AuND koncentracijos (θ): (a) srovės tankis geometriniam elektrodų plotui ($\text{Au}_{\text{KKM-D}}$); (b) absoliučios srovės reikšmė vienai AuND. Bioelektrokatalizinės srovės reikšmė buvo pasirinkta esant $E = 0.4 \text{ V Ag/AgCl}$ palyginamojo elektrodo atžvilgiu naudojant LSV eksperimentų duomenis (žr. disertacijoje pav. 59 esant $\theta = 1$). Geometrinis elektrodo paviršius buvo 0.785 cm^2 . Srovė vienai ND buvo įvertinta srovės tankį dalijant iš AuND skaičiaus, tenkančio 1 cm^2 nustatyto KKM-D matavimų metu.

3.5. AuND mono-ir multi-sluoksnių fizikocheminių savybių įvertinimas

Sluoksnis po sluoksnio metodikos būdu (angl. layer by layer) plokštuminio aukso elektrodo paviršiuje suformuotos kontroliuojamas AuND mono (2D)- ir daugiau (3D)-sluoksnės nanostruktūros. Neigiamai įkrautų AuND prijungimui aukso paviršiuje bei sluoksnių sujungimui į 3D struktūras, panaudoti teigiamai įkrauti mažos ir didelės molekulinės masės molekuliniai rišikliai, tai yra ilgas polielektrolitas poli-L-lizinas (PLL) ir mažas tiolinis junginys 1-(6-merkaptohexil)piridinis (MHP). Taipogi, tirta AuND adsorbcija ant PLL-*ThLk* bisluoksnio, kuris naudotas 3.4 dalies tyrimuose, šiame

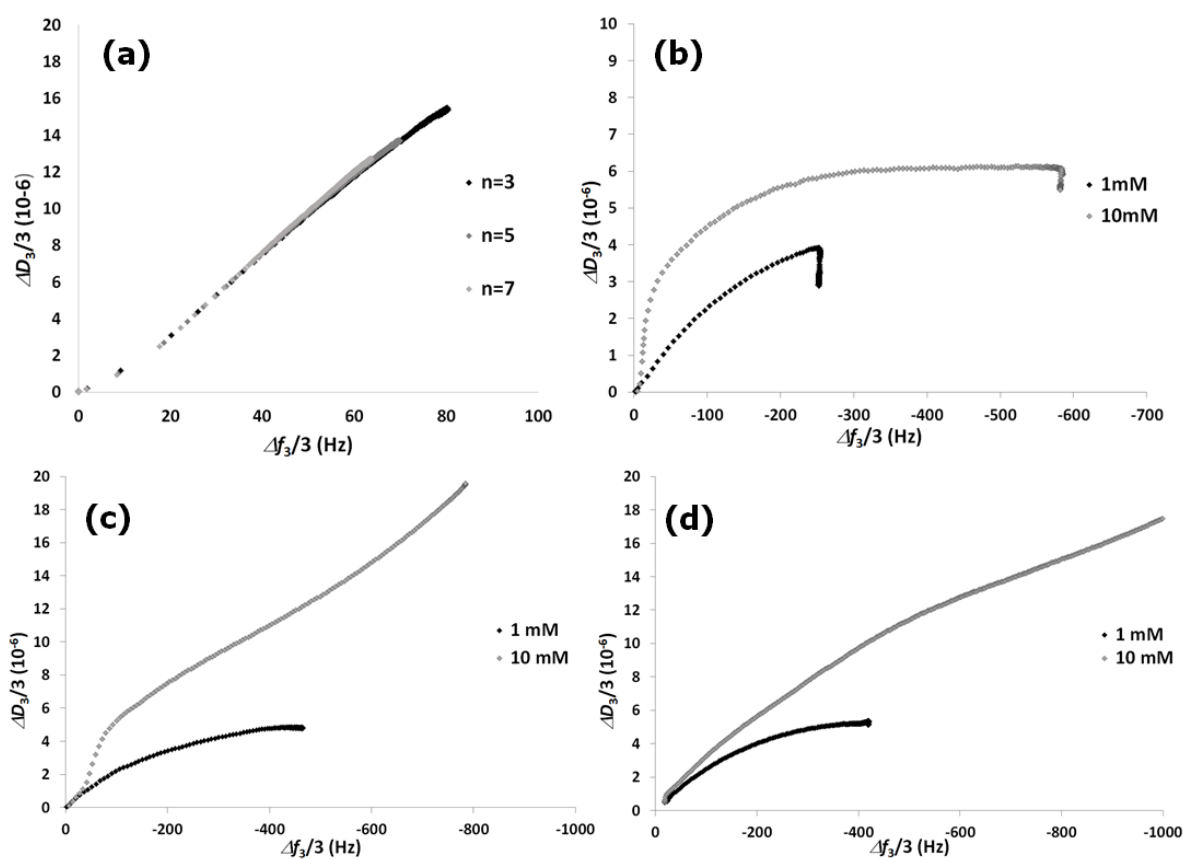
tyrimu etape siekiant įvertinti šios sistemos reologines/struktūrines savybes. Šių struktūrų fizikocheminės savybės, tai yra paviršinė koncentracija, struktūriniai pokyčiai ir t.t., esant skirtingai sorbuojamų AuND dispersijos joninei jėgai (taigi ir skirtingai besiformuojančios struktūros paviršinei koncentracijai) buvo tiriamos atliekant KKM-D matavimus. Pirmiausia buvo vertinama vien tikrai rišiklio molekulių pagrindu formuojamų struktūrų adsorbcija. Iš nežymių disipacijos parametro pokyčių atitinkamai buvo sprendžiama, jog PLL ir MHP suformavo ganėtinai plonus ir kietus sluoksnius. Jų paviršinėms koncentracijoms apskaičiuoti naudota Sauerbrey formulė (Disertacijoje, skyrius 1.7.1.1.).

	Paviršinė koncentracija (ng cm⁻²)	nm² per molekulę	Tankis (g cm⁻³)
MHP	47.8 ± 0.2	0.68	0.8
PLL	18.8 ± 6.3	972	-
ThLk	226.7±66.5	51.3	-

Vėlesniame tyrimų etape charakterizuotos AuND 2D ir 3D struktūros. Visų pirma struktūriniai pokyčiai buvo vertinami remiantis $\Delta D/\Delta f$ -grafikais, kurie suteikia galimybę preliminariai įvertinti formuojamų struktūrų homogeniškumą, sąveikų stiprumą ir pan. Kaip modelinė homogeniškai besiformuojanti sistema, $D/\Delta f$ -grafikais buvo charakterizuota ir baltyminė mucino struktūra (Pav. 8a). Formuojantis homogeniškai struktūrai, turėtų būti stebima tiesiogiai proporcinga ΔD ir Δf parametų priklausomybė. Ši $\Delta D/\Delta f$ tendencija ir buvo stebima baltyminėje modelinėje sistemoje. AuND adsorpcijos pobūdis esant 1 mM NaCl AuND dispersijoje visuose skirtingai modifikuotose (MHP, PLL ir PLL-ThLk) aukso paviršiuose buvo panašus, tai yra, didėjant sluoksnio masei, buvo stebimi mažesni disipacijos pokyčiai (Pav. 8 b, c, d). Ši tendencija rodo, jog didėjant AuND koncentracijai paviršiuje, mažėjo jų judėjimo galimybės. Esant 10 mM joninei jėgai, kai AuND buvo sorbuojamos PLL-modifikuoto aukso paviršiuje, atvirkščiai, didėjant sluoksnio tankiui, disipacijos pokytis didėjo labiau. Tai galėjo įtakoti AuND prijungimas prie ilgų, lanksčių PLL molekulių. Disipacijos

ryškaus didėjimo nebuvo stebima tais atvejais, kai AuND buvo adsorbuojamas ant MHP ir PLL-*ThLk* modifikuotų paviršių, pirmiausia todėl, kad mažos MHP molekulės AuND pririša elektrodo paviršiuje, o PLL sąveika su AuND pasikeičia dėl sąveikos su *ThLk*

Dėl AuND formuojamų struktūrų heterogeniškumo, jų fizikocheminių savybių, tai yra, paviršinės koncentracijos, viskoelastiškumo, įvertimui naudoti skirtingi KKM-D duomenų analizės metodai, kurie vėliau atitinkamai palyginti tarpusavyje. Tam tikslui naudota Sauerbrey formulė, Voigt modelis bei taip vadinama modeliui nepriklausoma analizė. Šių metodų teorinė įžanga bei jais remiantis atlikta duomenų analizė pateikta disertacijos skyriuose 1.7 ir 3.4.2.



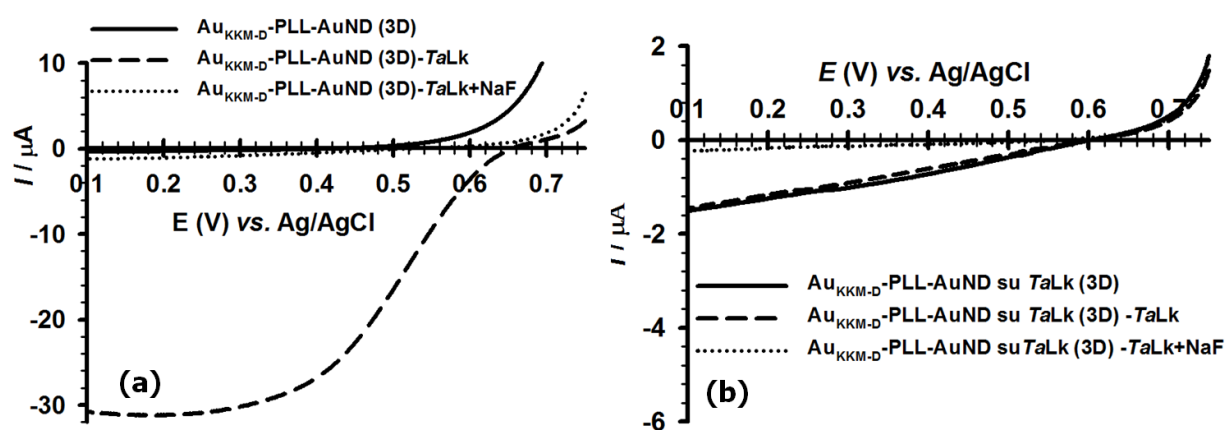
Paveikslas 8. $\Delta D/\Delta f$ -grafikai charakterizuojantys baltymo mucino (a), AuND ant MHP (b), AuND ant PLL (c) ir AuND ant PLL-Lk (d) adsorbciją atitinkamai esant 1 arba 10 mM NaCl.

3.5. O_2 bioelektroredukcija lakaze, inkorporuota skirtingai paruoštuose AuND daugiasluoksniuose

Atliktas *TaLk* fermento, inkorporuoto skirtingai suformuotose AuND nanostruktūrose, bioelektrocheminis charakterizavimas. Šiais tyrimais siekiama nustatyti, koku būdu paruoštuose AuND daugiasluoksniuose (3D) struktūrose galėtų būti imobilizuojamas

didžiausias fermento, galinčio efektyviai veikti tiesioginės EP principu, kiekis. *TaLk* inkorporacija į 3D AuND struktūras buvo atlikta tokia tvarka: (i) pirmiausia surenkant 3D AuND struktūrą ir tada ją impregnuojant *TaLk* molekulėmis; (ii) adsorbuojant AuND-*TaLk* konjugatus į 3D struktūrą ir tuomet jos paviršiuje papildomai adsorbuojant *TaLk* sluoksnį (Pav. 8). 3D struktūrų formavimas (4 sluoksniai) atliktas 20 nm skersmens AuND sluoksnius sujungiant teigiamai įkrauto poli-L-lizino sluoksniais.

Labiau efektyvi AuND adsorbcija ir tuo pačiu geresnė *TaLk* fermento bioelektrokatalizė buvo stebima 3D AuND struktūroje, kuri buvo suformuota naudojant fermentu nemodifikuotas AuND (Pav. 9).

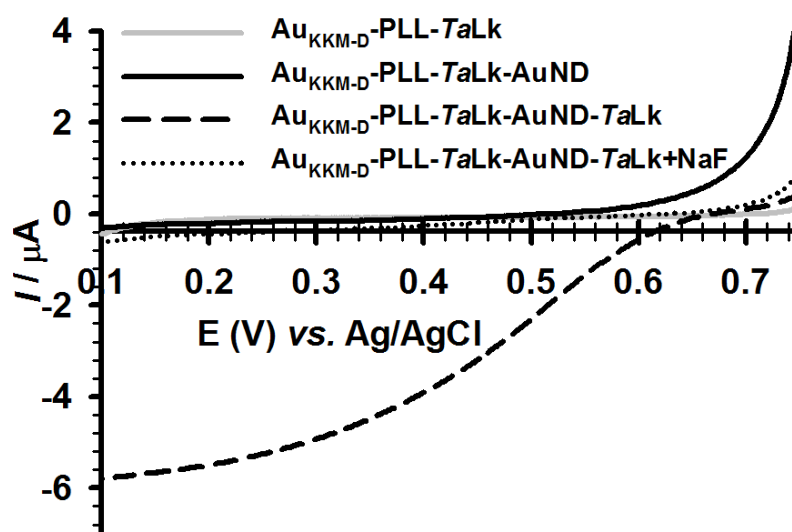


Paveiklas 9. *TaLk* katalizuojama deguonies bioelektroredukcija, kai *TaLk* adsorbuota skirtingai suformuotose 3D AuND struktūrose. AuND arba AuND-*TaLk* konjugatų adsorbcija atlikta naudojant 20 mM NaCl tirpalą. Potencialo skleidimo greitis: 1 mV s⁻¹; tėkmės greitis: 100 μL min⁻¹; 50 mM C-FBT, pH 4.0.

Lyginant abiejose struktūrose adsorbuotų AuND kiekį nustatyta, jog, adsorbuojant fermento molekulėmis nemodifikuotas AuND, suformuota triskart tankesnė struktūra. Tuo tarpu imobilizuojant *TaLk* AuND paviršiuje nustatyta, jog 3D PLL/AuND struktūroje imobilizavosi dukart daugiau fermento molekulių nei struktūroje, sudarytoje iš AuND-*TaLk* konjugatų. Kaip parodyta pav. 9b, *TaLk* adsorbuota 3D PLL/AuNP-*TaLk* struktūros paviršiuje demonstravo nežymią nuo potencialo priklausomą srovę, reiškiančią, jog ši struktūra pasižymi blogu elektriniu laidumu.

Svarbu pabrėžti, jog *TaLk* adsorbavus 3D PLL/AuND struktūros paviršiuje, PLL tarpiniai sluoksniai neįtakoją suformuotos 3D struktūros laidumo, kadangi šiuo atveju

registruota labai efektyvi O₂ bioelektroredukcija. Ši srovė buvo maždaug penkis kartus didesnė nei tuo atveju, kai *TaLk* katalizuojama O₂ bioelektroredukcija buvo registruojama *TaLk* imobilizavus AuND monosluoksnio paviršiuje (Pav. 10). Vis dėlto, lyginant *TaLk* molekulių kiekį adsorbuotą monosluoksnėje (2D) ir 3D (4 sluoksniai) struktūroje, nustatytas panašus adsorbuoto fermento kiekis. Taigi, šiuo būdu suformuotose 3D AuND struktūrose *TaLk* gali būti imobilizuojama tiesiogiai EP palankia orientacija, tačiau negali difunduoti į gilesnius AuND sluoksnius.



Paveikslas 9. *TaLk* katalizuojama O₂ bioelektrokatalizinė redukcija, kai *TaLk* buvo adsorbuota skirtingai suformuotose 3D AuND struktūrose. AuND adsorbicija atlikta naudojant 20 mM NaCl tirpalą. Sąlygos: potencialo skleidimo greitis - 1 mV s⁻¹; tėkmės greitis - 100 μL min⁻¹; 50 mM C-FBT, pH 4.0.

IŠVADOS

1. GO fermentas įgalino fermentinę politiofeno (PTF) polimerizaciją, gliukozės oksidacijos metu veikdamas kaip biokatalizatorius. PTF sluoksniu padengta GO, pasižymėjo geresniu stabilumu;
2. Fenantrolinų junginiai (FJ), turintys amino funkcines grupes, tai yra, 5-amino-1,10-fenantrolinas (5AF) ir 5,6-diamino-1,10-phenanthroline (56DAF) pasižymi geriausiomis EP pernašos savybėmis GO fermentui iš tirtų, skirtingas funkcines grupes turinčių, FJ junginių. Nemodifikuotas 1,10-fenantrolino monohidratas (FMH) bei 5-amino,6-nitro-1,10-fenantrolinas (5A6NF) nepasižymi EP tarpininkų savybėmis;
3. 5AF junginys kartu su GO fermentu imobilizuotas ant grafito elektrodo (GE) anodo konstrukcijoje GE/5AF/GO ir sujungus šį elektrodą su GE/KP/GO katodu į dvi-elektrodę sistemą, sukonstruotas tarpininkaujamos EP principu veikiantis gliukozės FBKE;
4. Panaudojant teigiamą krūvį turintį bi-funkcinį tiolinį junginį MHP, elektrostatinės sąveikos būdu AuND paviršiuje imobilizuoti CDH fermentai išskirti iš *Corynascus thermophilus* (CtCDH) ir *Humicola insolens* (HiCDH) kamienų, tokiu būdu įgalinant TEP tarp šių fermentų ir elektrodo paviršiaus. HiCDH fermentas, pasižymintis atsparumu inhibicijai laktoze, pritaikytas kaip biokatalizatorius anodinio elektrodo konstrukcijoje AuND/MHP/HiCDH kuriant tiesioginės EP principu paremtus angliavandenių (gliukozės, laktozės)/O₂ FBKE. Katodinio elektrodo kūrimui panaudota bilirubino oksidazė, tiesiogiai adsorbuota ant AuND paviršiaus (AuND/BO). Ši FBKE konstrukcija yra naudinga tuo, jog galėtų yra tinkama funkcionuoti aukštos koncentracijos laktozės tirpaluose, pavyzdžiui, piene ar pieno produktuose;
5. Tiriant atskirų FBKE elektrodų konstrukcijas nustatyta, jog tiek tarpininkaujamos, tiek tiesioginės EP principu veikiančiuose FBKE konstrukcijose, jų veikimą limituoja anodiniai elektrodai;
6. Keičiant AuND dispersijos joninę jėgą, pasiektas skirtingas AuND monosluoksnio užpildymas (θ) intervale nuo 0.33 iki 1. Esant skirtingam AuND monosluoksnio užpildymui θ , visais atvejais nustatytas vienos AuND paviršiuje

besiadsorbuojančių Lk molekulių skaičius buvo artimas 44 teoriškai galinčioms 22 nm skermens AuND paviršiuje sorbuotis Lk molekulėms. Maksimali vienai AuND nustatyta bioelektrokatalizinė srovė lygi $31 \cdot 10^{-18}$ A, kuri atitinka katalizinę konstantą (k_{cat}) lygią 13 s^{-1} . Ši reikšmė yra žymiai mažesnė lyginant ją su homogenine ThLk konstanta (190 s^{-1}). Daroma prielaida, jog adsorbcijos metu vyko dalinė ThLk molekulių denatūracija, arba tam tikra dalis Lk molekulių AuNP paviršiuje jungiasi tiesioginei EP netinkama orientacija;

7. Tiriant AuND mono (2D)- ir daugia (3D)- sluoksnių struktūras KKM-D metodu, ΔD parametras parodė, jog adsorbcijos metu labai kito viskoelastinės besiformuojančio sluoksnio savybės. 2D ir 3D AuND struktūrų sąlygojami ΔD buvo palyginti su baltymo, formuojančio labai homogenišką sluoksnį, adsorbcijos metu registruojamu ΔD ;
8. PLL/AuND pagrindu suformuota laidi daugiasluoksnė (4 sluoksniai) struktūra yra tinkama Lk, veikiančios TEP principu, paviršinei adsorbcijai. Lk nepasižymėjo gebėjimu difunduoti į gilesnius šios struktūros sluoksnius.

Autoriaus mokslinių darbų, apibendrintų daktaro disertacijoje, sąrašas

Paskelbtos mokslinės publikacijos:

1. Oztekin, Y., **Krikstolaityte, V.**, Ramanaviciene, A., Yazicigil, Z., Ramanavicius A. 1,10-Phenanthroline derivatives as mediators for glucose oxidase. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 26 (1), 267-270;
2. Ramanavicius, A., Oztekin, Y., Balevicius, Z., Kausaite-Minkstimiene, A., **Krikstolaityte, V.**, Baleviciute, I., Ratautaite, V., Ramanaviciene, A. Conducting and electrochemically generated polymers in sensor design (Mini Review). *Procedia Engineering*, 2012, 47, 825-828;
3. **Krikstolaityte, V.**, Oztekin, Y., Kuliesius, J., Ramanaviciene, A., Yazicigil, Z., Ersoz, M., Okumus, A., Kausaite-Minkstimiene, A., Kilic, Z., Osman Solak, A., Makaraviciute, A., Ramanavicius, A. biofuel cell based on anode and cathode modified by glucose oxidase. *Electroanalysis*, 2013, 25, 2677-2683.
4. **Krikstolaityte, V.**, Barrantes, A., Ramanavicius, A., Arnebrant, T., Shleev, S., Ruzgas., T. Bioelectrocatalytic reduction of oxygen at gold nanoparticles modified with laccase. *Bioelectrochemistry*, 2014, 95, 1-6.
5. **Krikstolaityte, V.**, Kuliesius, J., Ramanaviciene, A., Mikoliunaite, L., Kausaite-Minkstimiene, A., Oztekin., Y., Ramanavicius, A. Enzymatic polymerization of polythiophene by immobilized glucose oxidase. *Polymer*, 2014, 7, 1613-1620.
6. **Krikstolaityte, V.**, Lamberg, P., Toscano, M. D., Silow, M., Eicher-Lorka, O., Ramanavicius, A., Niaura, G., Abariute, L., Ruzgas, T., Shleev S. Mediatorless carbohydrate/oxygen biofuel cells with improved cellobiose dehydrogenase based bioanode. *Fuel Cells*, 2014 (Priimtas spaudai).

Pranešimų mokslinėse konferencijose tezės:

- 1. Krikstolaityte, V.,** Lamberg, P., Toscano, M. D., Silow, M., Eicher-Lorka, O., Ramanavicius, A., Niaura, G., Abariute, L., Ruzgas, T., Shleev, S. Mediatorless carbohydrate/oxygen biofuel cells with improved cellobiose dehydrogenase based bioanode. The 15th International Conference on Electroanalysis (ESEAC), Malmö, Sweden, June 11-15, 2014;
- 2. Krikstolaityte, V.,** Lamberg, P., Toscano, M. D., Silow, M., Eicher-Lorka, O., Ramanavicius, A., Niaura, G., Abariute, L., Ruzgas, T., Shleev, S. Mediatorless carbohydrate/oxygen biofuel cell based on *Humicola insolens* cellobiose dehydrogenase as anodic biocatalyst. The 14th European Student Colloid Conference, Potsdam, Germany, June 10-13, 2013;
- 3. Krikstolaityte, V.** Mediatorless carbohydrate/oxygen biofuel cells. The 7th Nanoschool “Novel nanomaterials and their application in bioanalysis”, Vilnius, Lithuania, May 8-10, 2013;
- 4. Krikstolaityte, V.,** Toscano, M. D., Silow, M., Eicher-Lorka, O., Ramanavicius, A., Ruzgas T., Shleev S. Sugar/oxygen biofuel cells based on redox enzymes adsorbed on gold nanoparticle multilayers. The 8th Annual Biofilms Workshop - Research Center of Biointerfaces “Hydration of Biomolecules and Biointerfaces”, Malmö, Sweden, October 4-5, 2012;
- 5. Ramanaviciene, A., Krikstolaityte, V.,** Oztekin, Y., German, N., Kausaite-Minkstimiene, A., Kuliesius, J., Baniukevic, J., Mazeiko V., Voronovic, J., Ramanavicius, A. Some aspects in conducting polymers synthesis. The 26th Conference of the European Colloid and Interface Society, Malmö, Sweden, September 2-7, 2012;
- 6. Ramanaviciene, A., Krikstolaityte, V.,** Oztekin, Y., German, N., Kausaite-Minkstimiene, A., Kuliesius, J., Baniukevic, J., Mazeiko V., Voronovic, J., Ramanavicius, A. Enzymatic synthesis of conducting polymers. The 26th Conference of the European Colloid and Interface Society, Malmö, Sweden, September 2-7, 2012;

7. **Krikstolaityte, V.**, Hamit-Eminovski, J., Barrantes, A., Ramanavicius, A., Abariute, L., Niaura, G., Arnebrant, T., Ruzgas, T. Investigation of viscoelastic properties of assembled gold nanoparticle mono- and multi-layer structures using quartz crystal microbalance with dissipation. The 26th Conference of the European Colloid and Interface Society, Malmö, Sweden, September 2-7, 2012;
8. **Krikstolaityte, V.**, Barrantes, A., Arnebrant, T., Ramanavicius, A., Shleev, S., Ruzgas, T. Direct electron transfer of laccase incorporated in 2D and 3D gold nanoparticle nanostructures. The 14th International Conference of Electroanalysis (ESEAC), Portorož, Slovenia, June 3-7, 2012;
9. **Krikstolaityte, V.**, Barrantes, A., Sotres, J., Arnebrant, T., Ramanavicius, A., Ruzgas, T. Physicochemical properties of gold nanoparticle multilayers. The 7th Annual Biofilms Workshop - Research Center of Biointerfaces "Non-Invasive Biomedical Monitoring and Devices", Malmö, Sweden, October 24-25, 2011;
10. **Krikstolaityte, V.**, Barrantes, A., Sotres, J., Arnebrant, T., Ramanavicius, A., Ruzgas, T. Influence of ionic strength on physicochemical properties of gold nanoparticle multilayer structures. The 13th International Conference-School „Advanced Materials and Technologies“, Palanga, Lithuania, August 27-31, 2011;
11. **Krikstolaityte, V.**, Ramanavicius, A., Arnebrant, T., Shleev, S., Ruzgas., T. Control of laccase-gold nanoparticle assembly for reduction of oxygen to water. The XXI International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, Cracow, Poland, May 8-12, 2011;
12. **Krikstolaityte, V.**, Dagys, M., Kulys, J., Ramanavicius, A., Arnebrant, T., Shleev, S., Ruzgas, T. Reduction of oxygen at laccase modified gold nanoparticles. The 61st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Nice, France, September 26 - October 1, 2010;
13. Ramanavicius, A., Oztekin, Y., **Krikstolaityte, V.**, Kausaite, A., German, N., Voronovic, J., Ramanaviciene, A. Development of enzymatic biofuel cells. The 24th Conference of the European Colloid and Interface Society, Prague, Czech Republic, September 5-10, 2010

14. **Krikstolaityte, V.**, Ramanavicius, A., Arnebrant, T., Ruzgas, T. Evaluation of gold nanoparticle assembly by electrochemical and QCM-D methods. The 15th Annual International Research Conference for Students and Young Researchers "Chemistry and Chemical Technology", Vilnius, Lithuania, May 7, 2010;
15. Oztekin, Y., **Krikstolaityte, V.**, Voronovic, J., Ramanaviciene, A., Ramanavicius, A. New electron transfer mediators for redox enzymes. PITTCON 2010, Orlando, USA, March 2, 2010.

Naudota literatūra

- [1] J.A. Cracknell, K.A. Vincent, F.A. Armstrong, Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2439-2461.
- [2] E. Katz, K. MacVittie, Implanted biofuel cells operating in vivo - methods, applications and perspectives - feature article, *Energ. Environ. Sci.* 6 (2013) 2791-2803.
- [3] S.C. Barton, J. Gallaway, P. Atanassov, Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices, *Chem. Rev.* 104 (2004) 4867-4886.
- [4] J. Larminie, A. Dicks, *Fuel Cell Systems Explained*, 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2003.
- [5] A. Zebda, C. Gondran, A. Le Goff, M. Holzinger, P. Cinquin, S. Cosnier, Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes, *Nat. Commun.* 2 (2011) 370.
- [6] Z. Zhu, T. Kin Tam, F. Sun, C. You, Y.H. Percival Zhang, A high-energy-density sugar biobattery based on a synthetic enzymatic pathway, *Nat. Commun.* 5 (2014).
- [7] C.F. Blanford, R.S. Heath, F.A. Armstrong, A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O₂ reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface., *Chem. Commun.* 17 (2007) 170-1712.
- [8] X.J. Wang, M. Falk, R. Ortiz, H. Matsumura, J. Bobacka, R. Ludwig, M. Bergelin, L. Gorton, S. Shleev, Mediatorless sugar/oxygen enzymatic fuel cells based on gold nanoparticle-modified electrodes, *Biosens. Bioelectron.* 31 (2012) 219-225.
- [9] J.H. Pazur, K. Kleppe, The oxidation of glucose and related compounds by glucose oxidase from *Aspergillus niger**, *Biochemistry* 3 (1964) 578-583.
- [10] A.T. Yahiro, S.M. Lee, D.O. Kimble, Bioelectrochemistry: I. Enzyme utilizing bio-fuel cell studies, *Biochim. Biophys. Acta* 88 (1964) 375-383.
- [11] B.A. Gregg, A. Heller, Cross-linked redox gels containing glucose oxidase for amperometric biosensor applications, *Anal. Chem.* 62 (1990) 258-263.
- [12] H.J. Hecht, H.M. Kalisz, J. Hendle, R.D. Schmid, D. Schomburg, Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 229 (1993) 153-172.
- [13] W. Schuhmann, T.J. Ohara, H.L. Schmidt, A. Heller, Electron transfer between glucose oxidase and electrodes via redox mediators bound with flexible chains to the enzyme surface, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 1394-1397.
- [14] K. Murata, K. Kajiya, N. Nakamura, H. Ohno, Direct electrochemistry of bilirubin oxidase on three-dimensional gold nanoparticle electrodes and its application in a biofuel cell, *Energ. Environ. Sci.* 2 (2009) 1280-1285.

SUMMARY

Design and characterisation of the electrodes of enzymatic biofuel cells

The objectives of the doctoral thesis are following: (i) to design carbohydrate/oxygen enzymatic biofuel cells (EBFCs); (ii) to determine the factors limiting the performance of EBFCs; (iii) to characterise the bioelectrochemical properties of the enzymes adsorbed at conductive nanostructures and evaluate the viscoelasticity of these nanostructures.

In this work 5-amino-1,10-phenanthroline (5AP) has been found to be the best redox mediator for glucose oxidase (GOx) enzyme among five studied phenanthroline derivatives with different functional groups. Later the 5AP cross-linked with GOx enzyme on a graphite rod electrode (GRE) was employed as an anode while GRE with co-immobilised horseradish peroxidase (HRP) and GOx was exploited as a cathode in order to design a glucose powered EBFC.

A positively charged bi-functional thiol, N-(6-mercapto)hexylpyridinium (MHP), was exploited to electrostatically attach the cellobiose dehydrogenase (CDH) enzymes from *Corynascus thermophilus* (CtCDH) and *Humicola insolens* (HiCDH) to the gold nanoparticle (AuNP) surface. This coupling enabled a sufficient direct electron transfer between the enzymes and the AuNP-modified gold surface. Therefore, the HiCDH enzyme, showing better performance characteristics, was employed as an anodic biocatalyst in the designing of a mediatorless carbohydrate (glucose or lactose)/oxygen EBFC. The biocathode of the EBFC was based on bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* directly immobilised on the surface of AuNPs.

When separate electrodes of the designed EBFCs were studied, it was estimated that the anodes were the limiting electrodes of the performance of both mediated and direct ET based EBFCs.

The controlled assembly of mono- and multi-layer structures of AuNPs on a planar thiol/polyelectrolytes modified gold surfaces has been studied, while alternating the ionic strength of the AuNP dispersion. The viscoelastic properties of the AuNP nanostructures were assessed. Moreover, the bioelectrocatalytic characteristics of the laccase (Lc) enzyme, incorporated into those nanostructures, were estimated. Specifically, the number of the Lc molecules adsorbed on a single NP was determined, the bioelectrocatalytic at a single AuNP was evaluated, and the standard heterogeneous ET rate constant between the enzyme molecule and an AuNP was assessed.

GYVENIMO APRAŠYMAS

Vardas, pavardė: Vida Krikštolaitytė
Gimimo data ir vieta: 1984 m. vasario mėn. 10 d., Šilalė, Lietuva

Išsilavinimas:

2003 – 2007 Vilniaus Gedimino technikos universiteto Fundamentinių mokslų fakultetas, įgytas bioinžinerijos bakalauro kvalifikacinis laipsnis

2007 – 2009 Vilniaus universiteto Chemijos fakultetas, įgytas biochemijos magistro kvalifikacinis laipsnis

2009 – 2013 Vilniaus universiteto Chemijos fakultetas, doktorantūros studijos

Darbo patirtis:

2013 spalio – 2014 birželis Kviestinis tyrėjas, Malmės universitetas Biomedicinos mokslų skyrius (Švedija).

Mokslinės stažuotės ir kursai:

2012 rugsėjis – 2012 spalio Lundo universitetas, Švedija (kursas „Paviršiaus ir koloidų chemija“ (angl. Surface and Colloid Chemistry), 15 ECTS kreditų)

2011 rugsėjis – 2012 rugpjūtis Malmės universiteto Biomedicinos mokslų skyrius, Švedija (Švedijos Instituto stipendija pagal Visby programą)

2010 spalio – 2011 gruodis Malmės universiteto Biomedicinos mokslų skyrius, Švedija (Lietuvos Mokslo Tarybos doktorantų mobilumo stipendija)

2010 vasaris – 2010 rugsėjis Malmės universiteto Biomedicinos mokslų skyrius, Švedija (Erasmus mobilumo stipendija)