

Katarzyna Jakubów-Piotrowska

Warszawa, 29.07.2020 r.

Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

Zakład Elektroanalizy Chemicznej

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**„Zastosowanie funkcjonalizowanych nanostruktur jako nośników dla oksydoreduktaz w układach bioelektrokatalitycznych”.**

"Application of functionalized nanostructures as a template for oxidoreductase enzymes in bioelectrocatalytic systems".

Promotor: dr hab. Krzysztof Miecznikowski  
Promotor pomocniczy: dr Barbara Kowalewska

Nanotechnologia jest dziedziną nauki, która wywiera istotny wpływ na rozwój współczesnej cywilizacji. Badania dotyczące budowy urządzeń, opierających się na funkcjonalizowanych nanomateriałach węglowych wpisują się bardzo dobrze w obszar nanotechnologii, a ponadto, są wysoce interdyscyplinarne i stanowią połączenie takich dziedzin jak: chemia, fizyka oraz inżynieria materiałowa. Projektowanie, charakterystyka oraz optymalizacja enzymatycznych warstw bioelektrokatalitycznych opartych na nanostrukturalnych nośnikach do utleniania glukozy, etanolu czy mleczanów w środowisku obojętnym o potencjalnym zastosowaniu w bioczuJNIkach analitycznych czy bioogniwach paliwowych cieszy się w ostatnich latach ogromnym zainteresowaniem.

W tym kontekście szybkość i efektywność procesu przeniesienia elektronu pomiędzy centrum aktywnym enzymu a powierzchnią elektrody odgrywa znaczącą rolę w opracowywaniu nowych układów bioelektrokatalitycznych. Transport ten może zachodzić zarówno w sposób bezpośredni, jak i z wykorzystaniem mediatora. Szczególnie poszukiwane są rozwiązania prowadzące do uzyskania bezpośredniego przeniesienia elektronu, które nie jest jednak powszechnym zjawiskiem. Aby udało się zaobserwować szybki i efektywny przepływ elektronów należy spełnić kilka podstawowych kryteriów: niezbędne jest uzyskanie dobrego kontaktu, pomiędzy centrum aktywnym enzymu a elektrodą. Istotna jest także odpowiednia orientacja cząsteczki biokatalizatora na powierzchni nośnika, która umożliwia bliskie położenie centrum redoks względem powierzchni enzymu lub centrów przekąźnikowych względem otoczki glikoproteinowej. W ostatnim dziesięcioleciu w literaturze zaproponowano wiele rozwiązań układów, opartych na bezpośrednim przeniesieniu elektronu, zawierających oksydazę glukozy jako enzym modelowy. W tym

przypadku centrum aktywne tego biokatalizatora znajduje się głęboko w strukturze białka, dlatego dąży się do odpowiedniej jego orientacji poprzez zastosowanie funkcjonalizowanych nanomateriałów. Mogą one działać jak łącznik, ułatwiając w ten sposób kontakt pomiędzy kofaktorem enzymu a powierzchnią elektrody.

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zaprojektowanie, konstrukcja, a następnie charakterystyka elektrochemiczna układów bioelektrokatalitycznych opartych na wybranych enzymach z grupy oksydoreduktaz. Zostały one unieruchomione na matrycach złożonych z funkcjonalizowanych nanostruktur węglowych, takich jak: wielościenne nanorurki węglowe, elektrochemicznie redukowany tlenek grafenu, grafen czy fulereny ( $C_{60}$  lub  $C_{70}$ ). Istotnym było, aby nośnik ten umożliwiał przyspieszenie procesu przeniesienia elektronu w układach zawierających enzymy z grupy oksydaz o różnej budowie: dimerycznej, tetramerycznej i oktamerycznej oraz wpływał na inne parametry elektrochemiczne i kinetyczne przygotowanych układów bioelektrokatalitycznych. Tego typu warstwy enzymatyczne do utleniania między innymi: glukozy, etanolu czy mleczanów w środowisku obojętnym mają potencjalne zastosowanie jako bioczuJNIKI analityczne czy bioogniwa paliwowe i są przedmiotem intensywnych badań.

Początkowo aby poprawić przewodnictwo elektronowe oraz orientację białka na powierzchni nośnika wykorzystane nanomateriały były niekowalencyjnie modyfikowane kwasem 4-pirol-1-ylo benzoesowym poprzez oddziaływania elektrostatyczne  $\pi$ - $\pi$ . Metoda ta umożliwiła wprowadzenie na ich powierzchnię karboksylowych grup funkcyjnych (-COOH), które były kluczowym elementem w procesie unieruchomienia białka na elektrodzie. Wraz z postępem prac i uzyskanych wyników zaczęto tworzyć układy hybrydowe składające się z dwóch nanostruktur tj. wielościenne nanorurek węglowych oraz elektrochemicznie zredukowanego tlenku grafenu. Na tak przygotowanych matrycach scharakteryzowano układy zawierające oksydazę glukozy oraz oksydazę mleczanową. Następnie, zaczęto zastanawiać się nad alternatywnym sposobem modyfikacji powierzchni nanomateriału, w celu zwiększenia stałej szybkości przeniesienia elektronu ( $k_s$ ). Doprowadziło to do zaprojektowania i syntezy nowych nanomateriałów: grafenu oraz fulerenów ( $C_{60}$  i  $C_{70}$ ) kowalencyjnie funkcjonalizowanych pochodną kwasu 4-(2-formylo-1H-pirolu) benzoesowego. Dowiedziono, że trwałe połączenie nanostruktur węglowych z czynnikiem modyfikującym ma znaczący wpływ na wyznaczane parametry elektrochemiczne oraz kinetyczne. Na tak przygotowanych matrycach unieruchomiono enzymy z grupy oksydaz tj: oksydazę glukozy, oksydazę mleczanową czy oksydazę alkoholową. Głównym problemem rozważanym w przypadku oksydaz było położenie

centrum aktywnego. Uzyskanie dobrego kontaktu, pomiędzy nim a powierzchnią elektrody było kluczowe podczas projektowania ww. układów enzymatycznych. Istotna była także odpowiednia orientacja cząsteczki oraz metoda immobilizacji zachowująca aktywność enzymatyczną stosowanego białka. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazywały, że dla wszystkich zaprojektowanych układów uzyskano dobry kontakt matrycy z enzymem, który umożliwiał szybki transport elektronów.

Innym omawianym zagadnieniem było projektowanie mediatorowych układów bioelektrokatalitycznych do utleniania glukozy katalizowanych przez oksydazę glukozy oraz oksydazę piranozową. Jako mediator wykorzystano tetratriafulwalen, którego zadaniem było zwiększenie szybkości przeniesienia elektronu pomiędzy centrum aktywnym enzymu a powierzchnią elektrody.

Wykonano również badania z wykorzystaniem dehydrogenazy glukozy. Enzym ten katalizuje reakcję utleniania glukozy do glukonolaktonu w obecności kofaktora dyfuzyjnego  $\text{NAD}^+$ . W celu przeprowadzenia reakcji do roztworu elektrolitu podstawowego wprowadzony został koenzym  $\text{NAD}^+$ . W przeciwieństwie do GOx kofaktor enzymu GDH nie był związany z cząsteczką białka. Dużą zaletą tego typu układów był brak powstawania niepożądanego produktu jakim jest nadtlenek wodoru. Wykazano, że obecność kowalencyjnie funkcjonalizowanych matryc zapewniła bardzo korzystny potencjał utleniania NADH. Zaprojektowane układy charakteryzowały się wysoką czułością oraz brakiem aktywności elektrokatalitycznej w obecności związków interferujących tj. kwas askorbinowy, kwas moczowy czy dopamina. Wyniki te potwierdziły możliwość ich zastosowania jako czujników do szybkiej i czulej detekcji glukozy.

Opracowanie odpowiednich funkcjonalizowanych nanomateriałów węglowych oraz zastosowanie ich do konstrukcji warstw bioelektrokatalitycznych zawierających enzymy z grupy oksydoreduktaz były głównymi zadaniami badawczymi niniejszej rozprawy doktorskiej. Wyniki otrzymane dla układów, opierających się na funkcjonalizowanych nanomateriałach węglowych i enzymach z grupy oksydoreduktaz potwierdzają, że charakteryzują się one wysoką czułością. Z powodzeniem mogą być one wykorzystywane jako bioczujniki do określania stężenia np. glukozy, etanolu, mleczanów w próbkach spożywczych czy medycznych oraz przy konstrukcji bioogniw paliwowych.

Za główne osiągnięcia niniejszej rozprawy doktorskiej uważam:

- konstrukcję biocujników opartych na oksydazach oraz dehydrogenazach unieruchomionych na funkcjonalizowanych nanostrukturach węglowych do oznaczania np. glukozy, etanolu czy mleczanów;
- wyznaczenie parametrów elektrochemicznych tj. współczynnika przeniesienia elektronu, stałej szybkości przeniesienia elektronu oraz kinetycznych tj. stałej Michaelisa-Menten, jak również parametrów analitycznych zaproponowanych biosensorów tj. czułości, limitu detekcji, zakresu liniowości dla wszystkich zaprojektowanych i skonstruowanych układów. Dla niektórych warstw biokatalitycznych parametry te zostały wyznaczone po raz pierwszy;
- wyznaczenie po raz pierwszy potencjału formalnego pochodzącego od kofaktora FMN dla układów bioelektrokatalitycznych zawierających oksydazę mleczanową;
- uzyskanie znacznie lepszych parametrów analitycznych biosensorów na bazie enzymów LOx oraz AOx unieruchomionych na funkcjonalizowanym grafenie GR@fPyBA w porównaniu do nośników MWCNT/PyBA czy ERGO/MWCNT/PyBA.