

Warszawa 16.10.2018

mgr Valentina Grippo

Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski

Chemia Nieorganiczna i Analityczna

Pracownia Teorii i Zastosowań Elektrod

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.

Nowe materiały do unieruchamiania enzymów na elektrodach do zastosowań w bioogniwach.

New materials for the immobilization of redox enzymes on electrodes for the application in biofuel cells.

wykonanej w ramach projektu ITN 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej no. 607793 pt. "Bioenergy"

Promotor: prof. dr hab. Renata Bilewicz

W ostatnich latach połączenie biomolekuł z materiałem przewodzącym stało się ważnym tematem w elektrochemii, ze względu na możliwość konstruowania nowych urządzeń bioelektronicznych do różnorodnych zastosowań np. sensorowych czy bioogniw. Zintegrowanie enzymów, DNA czy białek receptorowych z przetwornikiem elektronicznym pozwoliło otrzymać biosensory do analizy żywności, środowiska, detekcji patogenów, diagnostyki klinicznej itd. Synergiczne efekty obserwowane po związaniu biomolekuł z różnymi materiałami węglowymi, nanocząstkami metalicznymi czy półprzewodnikowymi mają istotne znaczenie dla rozwoju w obszarze materiałów hybrydowych o ciekawych właściwościach elektronicznych.

Celem tej pracy doktorskiej było określenie właściwości katalitycznych trzech enzymów (dehydrogenazy celobiozowej *Corynascus Thermophilus*, dehydrogenazy D-fruktozowej oraz oksydazy bilirubinowej *Myrothecium verrucaria*) w formie zaadsorbowanej na węglowych nanorurkach (MWCNT), lub umieszczonej w ciekłokrystalicznej lipidowej mezofazie tzw. fazie

kubicznej na powierzchni elektrod. Te dwie metody unieruchamiania enzymów na elektrodach zastosowano do przygotowania bioelektrod do redukcji i utleniania analitów, lub konstrukcji biokatod oraz bioanod do enzymatycznych ogniw jako alternatywnych źródeł zasilania.

Zbadano przydatność dehydrogenazy D-fruktozy (FDH) oraz dehydrogenazy celobiozowej *Corynascus thermophilus* (*CtCDH*) jako katalizatorów anodowych. Oksydaza bilirubinowa *Myrothecium verrucaria* (*MvBOD*) była wykorzystana jako enzym na biokatodzie. Enzymy umieszczano na powierzchni elektrodowej na warstwie nanorurek węglowych na elektrodzie z węgla szklistego lub grafitu pirolitycznego, albo w monooleinowej warstwie ciekłokrystalicznej pokrywającej to samo podłoże węglowe.

Aktywność katalityczną *CtCDH* badano w warunkach bezpośredniego (czyli bez czynnika mediującego, DET) oraz w warunkach mediowanego przeniesienia elektronu (MET). Wykorzystano dwa związki jako mediatory, przenoszące elektrony pomiędzy flawinowym centrum aktywnym enzymu i elektrodą: 2,6-dichlorofenoloindofenol (DCPIP) oraz aminowy kompleks rutenu ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$). Uzyskano wysokie gęstości prądu katalitycznego utleniania laktozy, odpowiednio 26.77 i 32.10 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ dla DCPIP i $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$ jako mediatorów.

Dla *CtCDH*, jako katalizatora, zmiana z adsorpcji na unieruchomienie w matrycy ciekłokrystalicznej spowodowała wzrost gęstości prądu katalitycznego z 2.07 na 9.22 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, co faworyzuje ten sposób umieszczenia enzymu na elektrodzie. Jednocześnie, bardzo wzrosła trwałość w czasie układu GCE/MWCNTs/*CtCDH* w warstwie lipidowej – działa on przynajmniej 28 dni, podczas, gdy układ adsorpcyjny GCE/MWCNTs/*CtCDH*_{ads} traci zupełnie aktywność po tygodniu. Należy jednak podkreślić, że po ok. tygodniu białko to ulega częściowej degradacji a produkt degradacji może pełnić rolę mediatora w utlenieniu katalizowanym przez enzym nie zdegradowany. Dodatek cytochromu daje wzrost prądu katalitycznego przy podobnym potencjale, ale dokładna charakterystyka produktów rozkładu enzymu nie została jeszcze zakończona.

Hydrofobowy enzym, dehydrogenaza fruktozowa - jest drugim, alternatywnym biokatalizatorem procesu utleniania cukru. Zaadsorbowana na nanorurkach węglowych lub warstwie grafenowej wykazuje dużą trwałość i katalityczną aktywność. Gęstości prądu są czterokrotnie większe niż w przypadku *CtCDH* jako katalizatora. Nie ma jednak dotąd struktury rentgenowskiej tego enzymu. W ramach niniejszej rozprawy spróbowano przeprowadzić krystalizację w fazach kubicznych tego białka, ale jak dotąd bez rezultatu.

Katoda pokryta oksydazą bilirubinową wykazywała lepszą aktywność, gdy wykorzystano synergiczny efekt naftyłowanych nanorurek węglowych i nanocząstek złotych modyfikowanych krótkim tiolem. Gęstość prądu redukcji tlenu była zadowalająca - 650 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. Elektroda pokryta lipidową fazą ciekłokrystaliczną z enzymem zachowywała 70% wyjściowej aktywności po 10 dniach pracy.

Biokatodę Naft-MWCNTs/*Mv*BOD połączono z anodą, zawierającą FDH lub *Ct*CDH w celu otrzymania enzymatycznego bioogniwa. W skonstruowanym układzie była także elektroda odniesienia, umożliwiająca monitorowanie potencjału każdej z elektrod w czasie pracy bioogniwa. Potencjał biokatody był niemal stały. Efektywność całego ogniwa określała więc anoda. Gdy zastosowano fazę kubiczną na anodzie MWCNTs/*Ct*CDH, moc bioogniwa wzrosła w porównaniu z wersją opartą o zaadsorbowany na elektrodzie. Dalszą poprawę mocy uzyskano przez pracę w warunkach przepływu nasyconego tlenem roztworu przez ogniwo, co wyeliminowało efekty związane ze zubażaniem warstwy przy elektrodzie w tlen. Praca w warunkach przepływowych dała pozytywne efekty szczególnie, gdy enzymy były w warstwie ciekłokrystalicznej – nie notowano wtedy ubywania enzymu z elektrody, co występowało czasem dla elektrod z zaadsorbowanymi enzymami. Wyznaczono parametry optymalnego ogniwa – napięcie otwartego obwodu wynosiło 540 mV. Zaproponowano także zminiaturyzowaną wersję bioogniwa, oraz nowy typ ogniwa – bioogniwo ciekłokrystaliczne: grafen/FDH//Naft-MWCNTs/*Mv*BOD/grafen, uzyskując dwukrotne zwiększenie mocy, w porównaniu z ogniwem ciekłym o tych samych rozmiarach. Taki projekt ogniwa warto dalej optymalizować ze względu na łatwość miniaturyzacji i łatwiejszą obsługę oraz transport układu.

Dysertacja jest napisana po angielsku (Valentina jest Włoszką i nie poznała jeszcze wystarczająco dobrze języka polskiego). Część wyników rozprawy została już opublikowana w czasopismach *Electroanalysis* i *Bioelectrochemistry*.