



Proiect finanțat de  
UNIUNEA EUROPEANĂ



MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI  
PROTECȚIEI SOCIALE  
AMPOSDRU



FONDUL SOCIAL EUROPEAN  
POSDRU  
2007-2013



INSTRUMENTE  
STRUCTURALE  
2007-2013



MINISTERUL EDUCAȚIEI,  
CERCETĂRII ȘI INOVĂRII  
OIPOSDRU

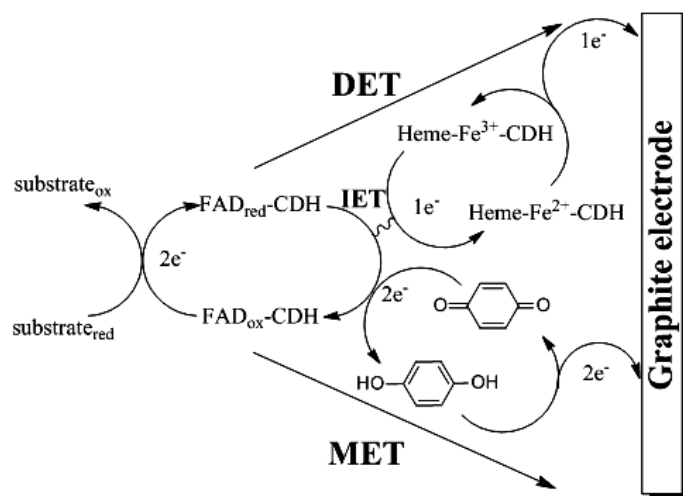


UNIVERSITATEA BABEȘ-  
BOLYAI  
CLUJ-NAPOCA

**Universitatea Babeș-Bolyai**  
**Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică**

*Rezumatul tezei de doctorat*

**Biosenzori amperometrici pentru detecția  
unor analiți de interes biotehnologic**



*Conducător de doctorat:*

**Prof. Ionel Cătălin POPESCU**

*Doctorand:*

**KOVÁCS Gábor**

# Cuprins

<i>Cuvinte cheie</i> .....	2
<i>În loc de introducere</i> .....	2
<b>I. Studiu bibliografic</b> .....	<b>3</b>
1. Generalități despre biosenzori .....	3
2. Metodele de caracterizare ale biosenzorilor .....	4
3. Cellobioz dehidrogenaza .....	6
<b>II. Contribuții originale</b> .....	<b>9</b>
1. Obiectivele tezei de doctorat .....	9
2. Electrozi din grafit, modificați cu <i>NcCDH</i> .....	10
2.1. Influența potențialului aplicat .....	10
2.2. Influența pH-ului .....	11
2.3. Curbele de calibrare pentru diferite substraturi .....	13
2.4. Stabilitatea operațională a biosenzorului .....	19
2.5. Concluzii .....	20
3. Comparația între comportamentul electrochimic al electrozilor modificați <i>G/CDH</i> și <i>Au-S-Ph-OH-CDH</i> .....	21
3.1. Imobilizarea enzimei <i>CDH</i> pe diferite materiale de electrod .....	21
3.2. Influența pH-ului .....	22
3.3. Eficiența electrocatalitică .....	23
3.4. Concluzii .....	26
4. Comportamentul electrocatalitic al electrozilor modificați de <i>Au-SYX-CDH</i> .....	27
4.1. Imobilizarea enzimei <i>CDH</i> pe electrozii modificați din <i>Au</i> .....	27
4.2. Comportamentul voltametric al electrozilor modificați - <i>Au-SYX-CDH</i> .....	28
4.3. Comportamentul electrocatalitic al electrozilor modificați <i>Au-SYX-CDH</i> .....	30
4.4. Influența pH-ului asupra $E^{0'}$ al cuplului redox hem din <i>CDH</i> .....	32
4.5. Concluzii .....	33
<b>III. Bibliografie</b> .....	<b>34</b>
<b>IV. Lista de publicații</b> .....	<b>37</b>

## *Cuvinte cheie*

- biosenzori amperometrici;
- celobioz dehidrogenază;
- transfer de electroni;
- electrozi din grafit;
- electrod de aur modificat.

## *În loc de introducere*

Care ar fi fraza ideală pentru introducerea acestei teze ce descrie biosenzorii utilizați în detecția unor analiți de interes biotehnologic? Aceasta a fost prima întrebare la care a trebuit să găsesc răspuns...și, ca de obicei în publicațiile de acest gen, am găsit propoziția folosită în majoritatea recenziilor: ”Încă din cele mai vechi timpuri oamenii foloseau...” ”biosenzori” pentru detecția compușilor otrăvitori din alimente, vin și alte tipuri de băuturi (Figura 1.).



**Figura 1. Folosirea unui ”biosenzor”/sclav pentru a preveni otrăvirea conducătorului.**

Istoria acestui tip de ”biosenzi” (de asemenea, putem menționa utilizarea păsărilor pentru detectarea metanului din mine) ar fi interesantă, dar dimensiunea unei lucrări de acest gen este limitată și de asemenea, fiind nevoit să limitez conținutul acestei lucrări la fapte mult mai științifice, suntem nevoiți să sărim peste câteva sute de ani, până la începutul anilor ‘60...

# I. Studiu bibliografic

## 1. Generalități despre biosenzori

Istoria biosenzorilor a început în anul 1962 cu dezvoltarea electrozilor modificați cu enzime de către Leland C. Clark<sup>1</sup>. De atunci, comunitatea științifică din diverse domenii, cum ar fi chimia, fizica și știința materialelor a colaborat în vederea dezvoltării unor dispozitive cu elemente biologice mai sofisticate, fiabile pentru diferite aplicații în medicină, agricultură, biotehnologie, precum și în domeniul militar la prevenirea bioterorismului<sup>2</sup>.

O varietate largă de definiții și terminologii sunt folosite în funcție de domeniul de aplicare. Biosenzorii sunt cunoscuți ca: immunosenzori, canari chimici, oglinzi cu rezonanță, glucometre, biochipuri, biocomputere etc. O definiție citată frecvent, acceptată de IUPAC este următoarea: ”un biosenzor electrochimic este un dispozitiv care este capabil să furnizeze anumite informații analitice cantitative sau semi-cantitative cu ajutorul unui element de recunoaștere biologică (receptor biochimic) care este în contact direct cu un element electrochimic numit traductor”<sup>3</sup>.

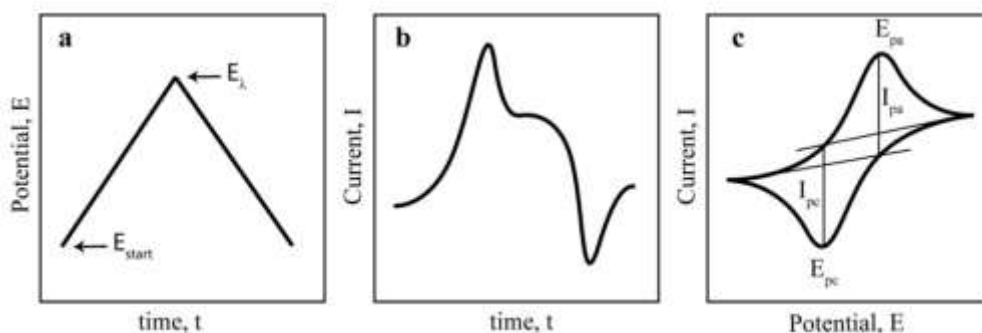
Biosenzorii pot avea o varietate de aplicații biotehnologice. Domeniul de aplicație cel mai important până în prezent este detectarea glucozei din sânge, datorită potențialului său comercial. Deși având aplicativitate extinsă și potențial economic important, punerea în comerț a mai multor biosenzori este întârziată datorită mai multor provocări tehnologice cum ar fi: complexitatea probelor reale, miniaturizarea și simplificarea tehnologiei, selectivitatea și stabilitatea elementului de recunoaștere<sup>4-6</sup> etc.

## 2. Metodele de caracterizare ale biosenzorilor

În ultimii 50 de ani, s-au dezvoltat diverse tipuri de biosenzori, precum numeroase alte tehnologii de detectare și dispozitive de biodetecție. În următoarele rânduri vor fi descrise pe scurt metodele electrochimice utilizate la dezvoltarea tezei: amperometria cuplată cu metoda analizei prin injecție în flux și voltametria (ciclică).

**Voltametria** aparține unei categorii de metode electro-analitice, prin care informația despre o specie este obținută prin schimbarea continuă a potențialului și înregistrarea curentului rezultat. Există numeroase modalități de a varia un potențial, de asemenea există și mai multe forme de voltametrie, cum ar fi: polarografia <sup>7,8</sup>, puls normal, puls invers, puls diferențial etc. <sup>9,10</sup>.

Voltametria ciclică (CV) este una dintre formele cele mai utilizate pe scară largă a tehnicilor voltametrice și este utilă în obținerea informațiilor cu privire la potențialul redox și al reacțiilor electrochimice în soluțiile speciilor detectate. În voltametria ciclică, potențialul electrozului de lucru este baleiat continuu în timp, cu o viteză definită (viteză de baleiaj), ciclic între potențialul de pornire și de comutare, curentul generat fiind înregistrat și analizat. O reprezentare schematică tipică de CV este prezentată mai jos, în figura de mai jos fiind vizibilă schimbarea de potențial (a), curentul generat (b) și voltamograma ciclică rezultată (Figura 2)<sup>11</sup>.



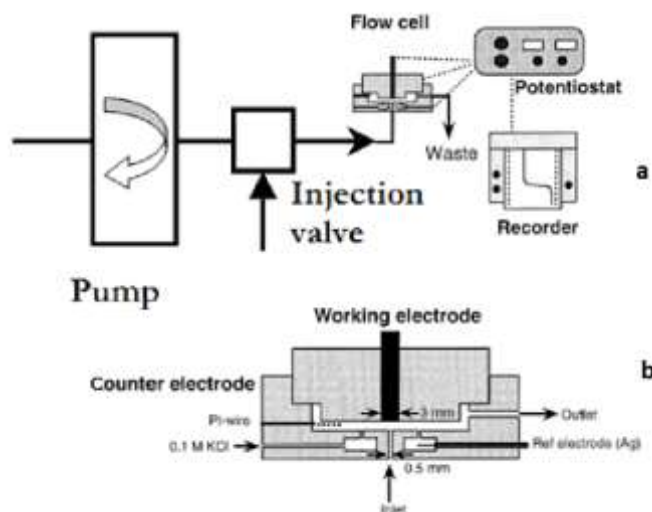
**Figura 2.** Semnalul de excitare (a), răspunsul în funcție de timp (b) și reprezentarea curent vs. potențial (c) al unei CV.

Voltametria ciclică este una din tehnicile electrochimice folosite cel mai frecvent în publicațiile despre interacțiunea enzimelor cu electrozii din aur, modificați cu diferiți tioli. Pe parcursul cercetărilor mele, am utilizat voltametria ciclică în investigarea electrochimică a celobioz dehidrogenazei (CDH) din *Neurospora crassa* și interacțiunea acestei enzime cu diferite monostraturi auto-asamblate (SAM) formate din tioli. Biosenzorii obținuți au fost studiați în absența și prezența lactozei, în soluții tampon și la pH-uri diferite.

Metoda electrochimică de detecție cea mai simplă și folosită cel mai frecvent este măsurarea curentului la un potențial constant, cunoscută sub numele de **amperometrie**. Menținerea potențialului constant are avantajul de a evita efectele schimbărilor în stratul dublu-electric, la interfața dintre electrodul de lucru și soluție, care cauzează curenți non-faradaici. Amperometria este utilizată pe scară largă, atât în sistemele "batch" cât și în flux. Pentru un transport de masă controlat, poate fi utilizată o analiză în flux sau un electrod disc-rotitor (EDR).

Metodele electrochimice au fost folosite pentru **detecția în flux încă** de la primii săi ani de dezvoltare<sup>12-14</sup>. Analiza în flux este considerată ca tehnică analitică, bazată pe introducerea unei probe prin aspirație sau injecție într-un flux purtător, cu procesarea și detecția probei on-line, pentru furnizarea/îmbunătățirea selectivității răspunsului.

Exemplul tipic pentru sistemul de analiză cu injecție în flux (FIA) este compus dintr-o pompă peristaltică, o supapă de injecție, o celulă electrochimică, un potențiostat, un procesor de semnal și un înregistrator (Figura 3a). Celula electrochimică utilizată constă, de obicei, dintr-o configurație cu trei electrozi (Figura 3b). În scopul de a minimaliza schimbările potențialului la electrodul de referință, curentul a fost colectat prin intermediul unui contra-electrod (în cazul nostru, un fir de platină).



**Figura 3. Un sistem FIA (a) și o celulă electrochimică utilizată în amperometrie (b)**<sup>15</sup>.

FIA a fost una din tehnicile electrochimice folosite cel mai des pe parcursul părții experimentale a acestei teze, în special pentru investigarea CDH-ului din *Neurospora crassa* depeș pe electrodul de grafit, folosind atât transferul direct de electroni (DET) cât și cel mediat (MET) pentru un număr mare de glucide la pH-uri diferite.

### 3. Cellobioz dehidrogenaza

Celobioz dehidrogenaza (CDH) (EC 1.1.99.18) este o enzimă produsă extracelular de diverse ciuperci. Literatura de specialitate raportează mai mult de 25 de specii producătoare de CDH. Enzimele CDH se împart în două subgrupe: clasa I, sintetizată doar de bazidiomicete și clasa II, cu o structură mai complexă, sintetizată de ascomicete.

CDH-urile cel mai des întâlnite și bine-cunoscute sunt cele sintetizate de ciupercile degradante de lemn și de agenții patogeni ai plantelor<sup>16,17</sup>. Recent, cum mai multe secvențe din genomul CDH-ului au devenit disponibile, o a treia clasă de CDH-uri ipotetice au fost găsite în *ascomicete* și introduse de către Zamocky<sup>16</sup> *et. al.*, însă fără confirmarea experimentală a proprietăților electrocatalitice ale acestora<sup>17</sup>.

În general, clasa I de CDH (bazidiomicete) prezintă o selectivitate mai mare față de celobioză și celo-oligozaharide, acestea fiind oxidate la atomul de carbon anomer, în timp ce glucoza și alte monozaharide sunt substraturi slabe. Clasa II de CDH, produs de *ascomicete*, preferă de asemenea celobioza ca și substrat, dar monozaharidele, cum ar fi glucoza și maltoza sunt mai puțin discriminate în comparație cu omologii lor din *basidiomicete*<sup>16</sup>. CDH-urile din clasa I au pH-ul optim în jurul valorii de 3.5-4, dar de obicei nu mai mult de 5.5, pe când cele din clasa II, în funcție de originea lor, funcționează și în condiții alcaline sau neutre. Acest lucru poate fi atribuit adaptării ciupercii la habitatul său natural și mecanismului de degradare a polimerului<sup>18,19</sup>.

Activitatea CDH-ului a fost descoperită pentru prima dată în anul 1974, prin reducerea chinonelor dependente de celobioză în ciupercile albe de putregai, de către Westermarck și Eriksson<sup>20,21</sup>.

CDH-ul este o enzimă interesantă în domeniul bioelectrochimiei pentru aplicațiile sale multilaterale și flexibilitatea sa în ceea ce privește mecanismul transferului de electroni. Această enzimă fungică a fost folosită la dezvoltarea biosenzorilor pentru detecția celobiozei și altor celodextrine<sup>22,23</sup>, pentru maltoză<sup>24</sup>, lactoză<sup>25</sup>, compuși difenolici<sup>26</sup> precum și pentru anozii în celule de biocombustie, alimentate cu glucoză, lactoză sau celobioză<sup>27</sup>.

Structural, enzima este compusă din două domenii: un domeniu catalitic ( $DH_{CDH}$ ) de tip flavinic care conține dehidrogenaza, aparținând superfamiliei proteice: glucoză-metanol-colină oxidoreductaza, având o unitate flavin-adenin dinucleotid (FAD) ca și grupare prostetică, care este conectat printr-o legătură flexibilă la domeniul citocromic ( $Cyt_{CDH}$ )

conținând gruparea hem b (Figura 4). Masa moleculară este de obicei în jurul valorii de 90-100 kDa. Conexiunea între cele două domenii poate fi desfăcută de proteazele prezente în cultura supernatantă obținând un domeniu catalitic ( $DH_{CDH}$ ) încă activ<sup>18</sup>.

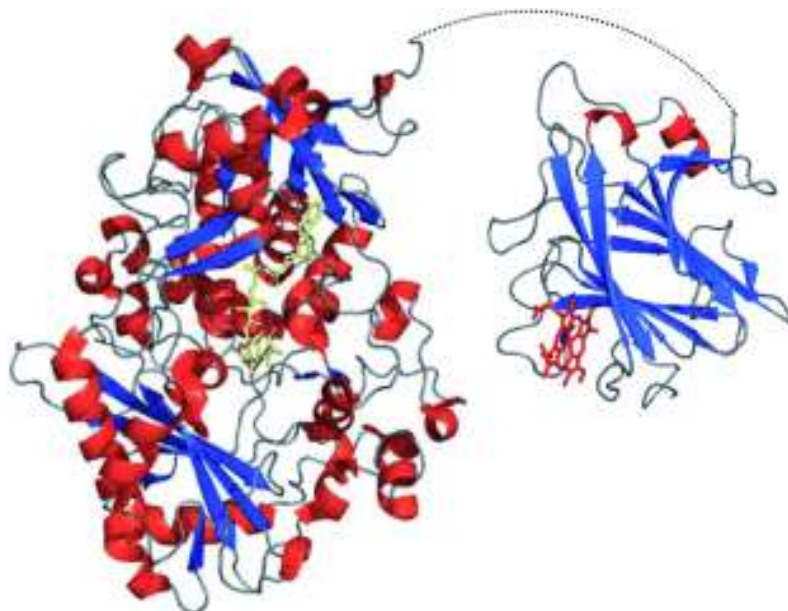


Figura 4. Domeniul dehidrogenază (stânga) și domeniul citocromic (dreapta), PDB 1D7C) al CDH-ului din *P. chrysosporium*. Poziția conexiunii este reprezentată punctat. Ambele domenii sunt rotite din pozițiile lor față-în-față cu 45° față de observator pentru a oferi o perspectivă mai bună la FAD (galben) și hem *b* (roșu)<sup>18</sup>.

Există două posibilități de a studia comportamentul electrochimic al enzimelor CDH, cel prin transfer direct de electroni (DET) și transferul mediat de electroni (MET). Aceste căi de transfer al electronilor sunt reprezentate în Figure 5.

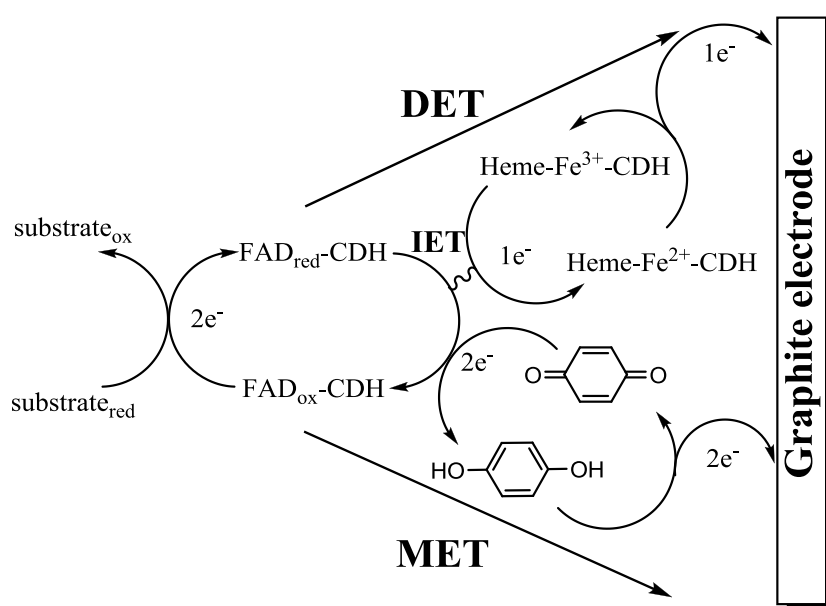


Figure 5: Reprezentarea schematică a transferului de electroni direct (DET) și mediat (MET) între CDH și electrod.



Aceste căi de transfer al electronilor pot fi studiate folosind metoda analizei amperometrice prin injectare în flux, cu enzima adsorbită pe suprafața electrodului din grafit. Prin injectarea celobiozei în soluția tampon purtătoare, se obține un curent de oxidare ca urmare a transferului direct de electroni, în timp ce adăugarea celobiozei în soluția tampon purtătoare, se va obține un palier de curent, caracteristic pentru starea de echilibru în DET. Folosirea benzochinone în amestec cu soluția de substrat va genera un curent mai mare, ca urmare a reciclării chinonă/benzochinonă între domeniul FAD și electrod. Acest curent se referă în continuare la transferul mediat de electroni (MET).

Datorită capacității sale pentru a arăta DET eficient cu electrodul prin intermediul domeniului citocromic și stabilitatea operațională pe termen lung, CDH a demonstrat deja un potențial mare pentru a fi utilizată în dezvoltarea biosenzorilor.

O altă abordare în punerea în aplicare a CDH-ului este domeniul biopilelor de combustie (BFC). Acestea sunt dispozitive care utilizează biocatalizatori (enzime sau celule vii) în scopul de a converti energia chimică în energie electrică. Substraturile energetice tipice care au fost folosite în cercetările pentru "hrănirea" BFC-urilor sunt glucoza<sup>28,29</sup>, metanolul<sup>30</sup> și etanolul<sup>31</sup> dar o varietate mai mare de combustibili poate fi utilizată, deoarece organismele folosite în construcția celulelor pot oxida o mare varietate de substraturi, inclusiv alcooli, carbohidrați și acizi grași. Un număr mare de recenzii scrise în ultimii ani reflectă interesul mare în acest domeniu<sup>32-35</sup>. Unele CDH-uri au fost utilizate în prototipuri de BFC folosind atât abordarea DET<sup>28,36</sup> cât și MET<sup>37,38</sup> cu rezultate promițătoare.

## II. Contribuții originale

### 1. Obiectivele tezei de doctorat

(i) Studiile prezentate mai jos au fost efectuate cu intenția de a caracteriza un CDH nou din ciuperca ascomicetă *Neurospora crassa* pe electrozi din grafit și din aur, luând în considerare anumiți factori experimentali, cum ar fi concentrația substratului, prezența sau absența unui mediator redox, efectul diferitelor soluții tampon și a pH-ului. Secțiunea dedicată contribuțiilor originale este împărțită în două părți: în prima parte sunt prezentate rezultatele obținute pentru caracterizarea CDH-ului imobilizat prin simpla adsorbție pe electrozi din grafit, folosind măsurători de tip FIA, în timp ce a doua parte rezumă rezultatele cu privire la comportamentul CDH-ului adsorbit pe electrozi din aur, modificați cu monostraturi auto-asamblate (SAM) de tioli.

(ii) O multitudine de tioli a fost folosită la construcția SAM-uri pe electrozii din aur cu scopul de a îmbunătăți proprietățile electrochimice al CDH-ului imobilizat. Enzima prezintă un DET eficient și curenți catalitici pe electrozi din aur, modificați cu SAM-uri, dar eficiența comunicării a fost influențată decisiv de lungimea spacer-ului și de gruparea terminală a tiolului utilizat, sugerând importanța relației dintre structura CDH și natura SAM-ului.

(iii) Referitor la posibile aplicații analitice, electrochimia CDH-ului pe electrozi din grafit a fost studiată pentru un număr mare de substraturi, cum ar fi celodextrinele, lactoza și glucoza, speciile analizate având o mare importanță în domeniul biotehnologiei. Biosenzorul a arătat o bună stabilitate operațională, în condițiile de lucru pentru o lungă perioadă de timp, cu rezultate promițătoare pentru posibile aplicații, cum ar fi biosenzori amperometrici și biopile de combustie.

## 2. Electrozi din grafit, modificați cu *NcCDH*<sup>39</sup>

### 2.1. Influența potențialului aplicat

Electrodul modificat G/CDH, folosind modul de preparare descris în<sup>23</sup>, a fost montat într-un suport de Teflon și a fost introdus într-o celulă, menținând debitul soluției tampon purtătoare la un debit constant de  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$ , iar potențialul aplicat a fost variat treptat de la  $-100$  până la  $+600 \text{ mV vs.}$  electrodul de referință (Ag|AgCl  $0.1 \text{ M KCl}$ ), în trepte de  $50$  de mV. Pentru fiecare valoare a potențialului aplicat, curentul de răspuns pentru electrodul G/CDH a fost monitorizat și înregistrat în timpul injectării unei soluții de lactoză ( $5 \text{ mM}$ ,  $50 \text{ }\mu\text{L}$ ).

Rezultatele sunt ilustrate în Figura 6.

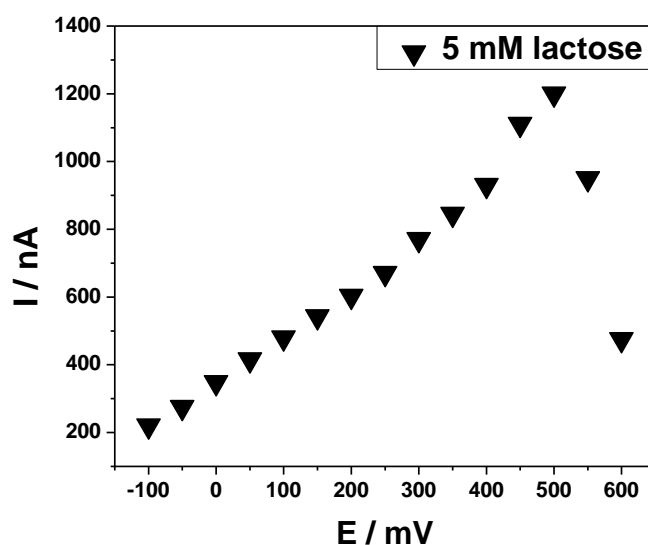


Figura 6: Dependența curentului de pic (*vs.* Ag|AgCl  $0.1 \text{ M KCl}$ ) pentru injecții de lactoză ( $5 \text{ mM}$ ) în soluție de tampon fosfat,  $50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7.0$ . Debitul a fost de  $0.5 \text{ mL/min}$ .

După cum se poate observa din Figura 6, o creștere a răspunsului amperometric al electrodului G/CDH este observată în paralel cu creșterea potențialului aplicat, până la atingerea valorii maxime la  $+500 \text{ mV vs. RE}$ . La aplicarea potențialelor mai pozitive, răspunsul bioelectrodului scade semnificativ, ca o urmare a denaturării ireversibile al enzimei. Această presupunere a fost verificată și confirmată prin înregistrarea răspunsului de electrod la valori mai scăzute, după atingerea valorii critice de  $+600 \text{ mV}$  iar curenții înregistrați au fost mai mici față de cei înregistrați inițial la același potențial (datele nu sunt prezentate).

Studiile anterioare<sup>15,40,41</sup> au arătat că potențialul formal ( $E^{\circ}$ ) al  $Cyt_{CDH}$  din diferite enzime de tip CDH, implicate în procesul DET între CDH și suprafața electrodului, este situat sub 0 mV vs. Ag|AgCl, 0.1 M KCl, în intervalul de pH 5-7, și variază cu aproximativ 30 de mV pe unitatea de pH a soluției. Cu toate acestea, în cazul nostru, pentru toate măsurătorile efectuate cu electrodul modificat G/CDH în modul de operare DET, potențialul de lucru a fost stabilit la valoarea potențialului de +300 mV vs. RE, care este un potențial suficient de mare în comparație cu  $E^{\circ}$  al  $NcCYT_{CDH}$ . Această valoare este în concordanță cu potențialele raportate pentru electrozii modificați cu diferite tipuri de CDH. referinte?

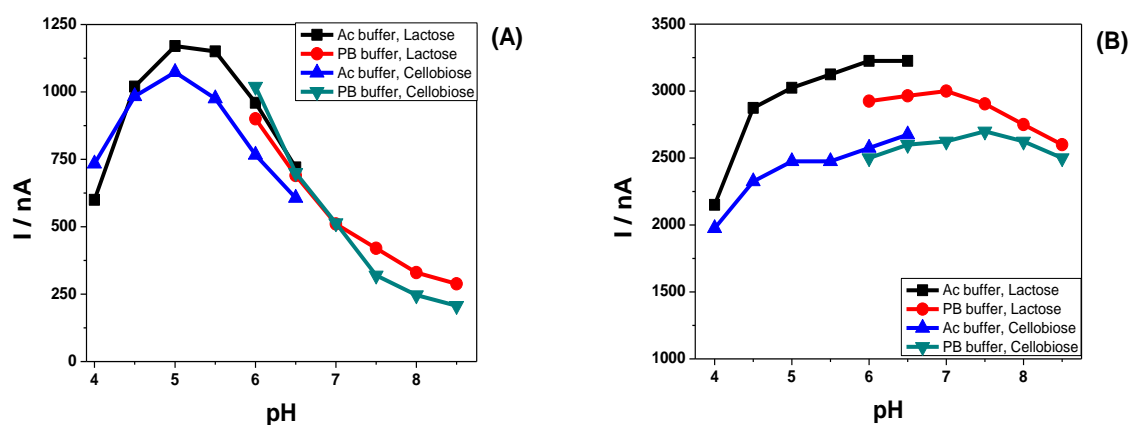
Pentru modul de operare MET, electrodul G/CDH a fost investigat în condiții similare celor folosite la alte enzime CDH din clasa II<sup>23</sup>, folosind un mediator redox de  $2 e^-$ ,  $2 H^+$ , respectiv 1,4-benzochinona (BQ) în cazul nostru, în scopul de a re-oxida direct  $Nc_{DH}CDH$  redus ( $FAD_{H2}$  la FAD, Figure 5). În scopul de a facilita comparația dintre caracteristicile pentru DET și MET, valoarea potențialului aplicat folosit pentru MET a fost ales identic cu cel selectat pentru DET (+300 mV vs. RE). În același context, având ca scop estimarea concentrației optime de mediator, concentrația de BQ a fost crescută treptat în proba injectată conținând în aceeași timp 5 mM lactoză (pH 7.0), iar răspunsul amperometric a fost înregistrat în condiții de flux continuu. Răspunsul maxim al bioelectrodului a fost atins în jurul concentrației de ~50  $\mu$ M BQ. Având în vedere că o creștere a concentrației de două ori generează o creștere a răspunsului cu doar 13.3%, toate experimentele în modul de operare MET a fost efectuate cu o concentrație de BQ de 25  $\mu$ M.

## 2.2. Influența pH-ului

Răspunsul amperometric al electrodului modificat G/CDH, operate atât în modul DET cât și în MET, a fost înregistrat în condiții de flux continuu pentru injecții de 5 mM de lactoză sau celobioză, dizolvată în soluție tampon (50 mM); soluția fără substraturi a fost folosită în același timp ca și purtător. Domeniul de pH investigat a fost de la 4.0 până la 8.5 și a fost acoperit cu două soluții tampon: 50 mM tampon citrat între pH 4.0 și 6.5 și 50 mM tampon fosfat între pH 6.0 și 8.5.

Așa cum se poate observa din Figura 7A, pentru ambele substraturi investigate, intervalul de pH optim pentru DET este situat între 4.5 și 5.5. Acest rezultat este concordanță cu datele publicate anterior privind  $NcCDH$  în soluție, când s-a utilizat un  $cyt c^{16}$  ca și acceptor de electroni. In studiul prezent, cele mai mari valori de curent s-au

observat la pH ~ 5.2 pentru lactoză și la ~ 4.9 pentru celobioză. Aceste rezultate confirmă faptul că atât procesul DET cât și IET sunt dependente atât de substrat cât și de pH. În comparație cu alte enzime CDH din clasa II <sup>16,23</sup>, *NcCDH* prezintă un interval de pH optim acid, aflat mai aproape de pH neutru. Mai mult decât atât, curenții înregistrați în DET sunt mai mari decât în cazul electrodului modificat cu *MtCDH*<sup>23</sup>, reflectând o eficiență mai mare al transferului intern de electroni (IET) pentru *NcCDH*. Intensitățile de curent obținute la pH 7.0 reprezintă 43%, respectiv 48% în cazul lactozei și al celobiozei raportat la curenții maximi obținuți la pH-ul optim.



**Figura 7: Dependența răspunsului amperometric în funcție de pH și soluția tampon în cazul DET (A) și MET (folosind 1,4-benzochinonă) (B). Potențialul aplicat +300 mV (vs. Ag | AgCl 0.1 M KCl), injecții de lactoză și celobioză de 5 mM, concentrația soluției tampon a fost 50 mM, debitul soluției a fost de 0.5 mL/min.**

Cum era de așteptat, intensitățile de curent măsurate în modul de operare MET pentru electrodul modificat G/CDH, pentru lactoză și celobioză (Figura 7B), sunt mai mari decât cele înregistrate în modul de operare DET (Figura 7A). Astfel, raportul dintre curenții maximi observate la MET vs. DET la pH optim a fost 2.75 pentru lactoză și 2.5 pentru celobioză, crescând la pH 7.0 la 5.9 și respectiv 5.1. În condițiile MET, valoare optimă de pH pentru lactoză și celobioză a fost ușor mai mare decât cea observată pentru DET, iar intervalul optim de lucru este mult mai larg (de la pH 5 până la 8) decât în cazul DET. Acest rezultat este similar cu cel obținut în soluție atunci când se utilizează DCPIP ca și acceptor de electroni<sup>42</sup>. În plus, în modul de operare MET răspunsul bioelectrodului a fost influențat mai puternic de natura substratului ( $I_{\max, \text{lactoză}}/I_{\max, \text{celobioză}} \approx 1.21$  la pH 6.5) decât în modul DET ( $I_{\max, \text{lactoză}}/I_{\max, \text{celobioză}} \approx 1.09$  at pH 5.0). În cele din urmă, comparând rezultatele din Figura 7A și B, se poate afirma că, în modul DET, influența pH-ului asupra răspunsului bioelectrodului este mai mare în comparație cu cel pentru modul MET, aceste schimbări

având impact puternic asupra modificărilor conformationale din domeniile enzimei și din regiunea de legătură, care afectează IET și DET la suprafața electrodului.

### 2.3. Curbele de calibrare pentru diferite substraturi

Electrodul modificat G/CDH a fost calibrat pentru lactoză și celobioză atât în modul de operare DET, cât și în MET, folosind condițiile experimentale optime: potențialul aplicat de +300 mV vs. RE și pH 5.2 (50 mM tampon citrat). Luând în considerare potențialele aplicații ale acestui bioelectrod în condiții fiziologice (neutre), măsurători suplimentare au fost efectuate la pH 7.0 (50 mM tampon fosfat). Curenții catalitici pentru fiecare concentrație de substrat au fost înregistrați pentru 4 injecții consecutive folosind trei electrozi similari de G/CDH iar rezultatele sunt expuse în Table 1 și Table 2.

Așa cum era de așteptat, indiferent de valoarea pH-ului, bioelectrodul G/CDH, oferă în modul DET un comportament Michaelis-Menten bine conturat și identic pentru lactoză și celobioză (Figure 8A). După cum s-a menționat deja, indiferent de substratul studiat, răspunsul bioelectrodului este influențat de valoarea pH-ului, cu cea mai mare eficiență în mediu acid. Curbele de calibrare obținute sunt în conformitate cu modul de funcționare MET, susținând concluziile formulate în secțiunea anterioară. Astfel, prezența BQ ca mediator redox diminuează diferențele observate în modul DET între lactoză și celobioză, precum și efectul pH-ului cu privire la activitatea CDH-ului (Figure 8B). Acest lucru este de așteptat dacă luăm în considerare faptul că mediatorul este direct redus la  $DH_{NcCDH}$  (Figure 5) iar modificările pH-ului au un efect mai puternic asupra regiunii de legătură și asupra procesului IET<sup>43,44</sup>.

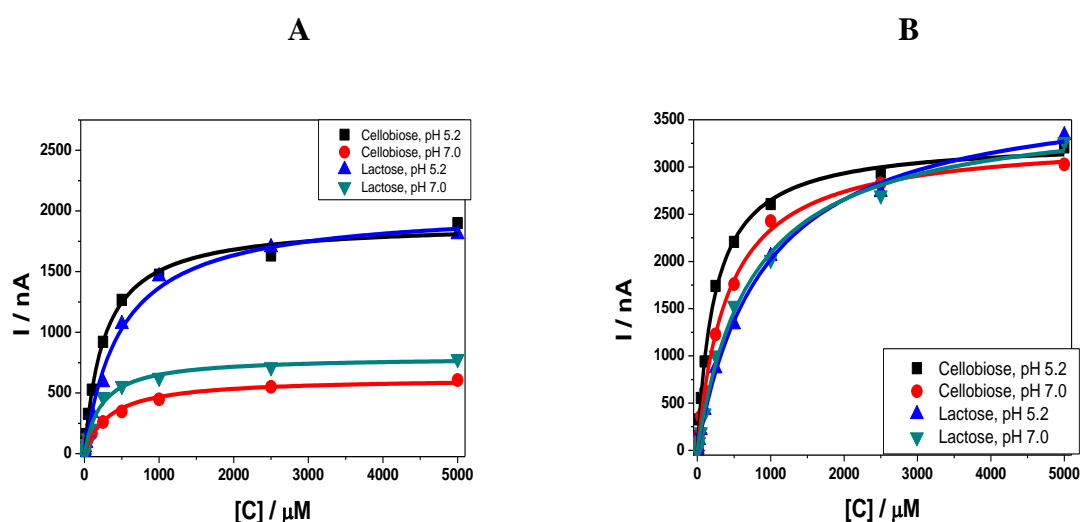


Figure 8: Dependența răspunsului amperometric al electrodului G/CDH referitor la pH și compoziția

soluției tampon în cazul DET (A) și MET (B) (folosind 1,4-benzochinonă), pentru diferite concentrații de lactoză și celobioză. Potențialul aplicat +300 mV (vs. Ag | AgCl 0.1 M KCl), debit 0.5 mL/min.

Parametrii cinetici și analitici, folosind fitarea non-lineară pe curbele de calibrare ilustrate în Figure 8A and B cu ajutorul ecuației Michaelis-Menten, sunt sintetizați în Table 1 și Table 2.

Folosirea mediatorului a crescut valorile  $I_{\max}$  (diferența cauzată de pH a fost mai mică decât în DET) precum și raportul  $I_{\max}/K_m$ , ceea ce poate fi interpretat ca și eficiența catalitică<sup>45</sup>, pentru toate substraturile studiate la acest grup de zaharide. Creșterea raportului  $I_{\max}/K_M$  a fost cea mai mare pentru celobioză; pentru lactoză, mediatorul n-a avut un efect semnificativ asupra acestui raport. Modul transferului de electroni și valoarea de pH nu au influență clară asupra intervalului linear (0.5-500  $\mu\text{M}$ ) și asupra limitei de detecție (0.5-1  $\mu\text{M}$ ), aceste valori au rămas mai mult sau mai puțin aceleași în cadrul acestui grup de substraturi.

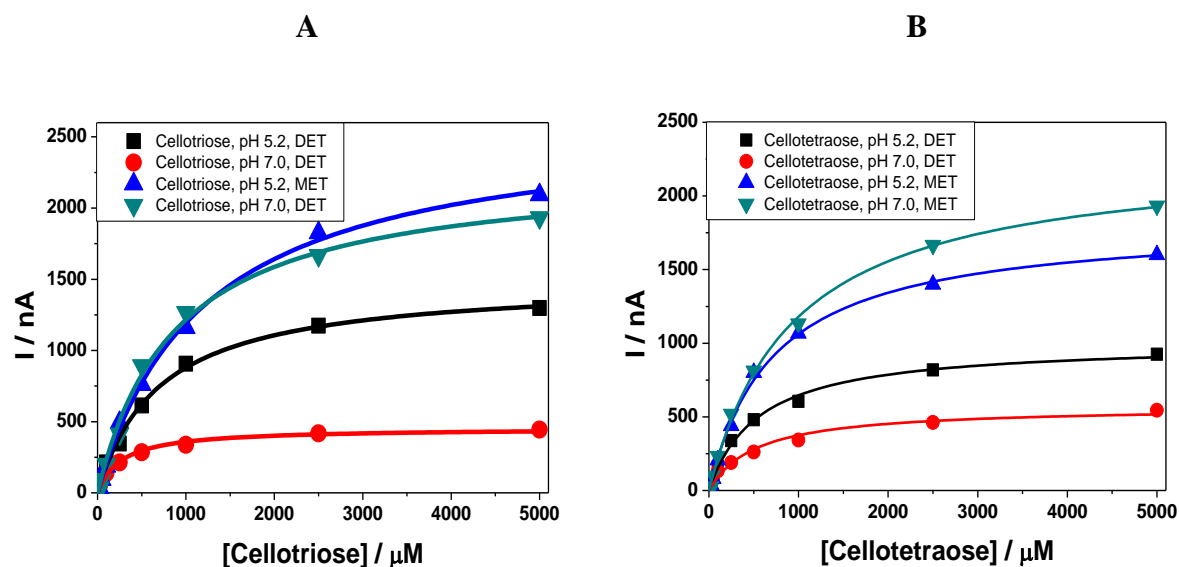


Figure 9: Dependența răspunsului amperometric al electrodului G/CDH referitor la pH și compoziția soluției tampon în cazul DET și MET (folosind 1,4-benzochinonă) la diferite concentrații de celotrioză (A) și celotetraoză (B). Potențialul aplicat +300 mV (vs. Ag | AgCl 0.1 M KCl), debit 0.5 mL/min.

În condiții de DET pentru *NcCDH*-ul utilizat, valorile pentru  $K_M^{\text{app}}$  și  $I_{\max}$  în cazul tuturor substraturilor investigate (Tabel 1) au fost mai mari decât cele raportate în condiții similare pentru *MtCDH*<sup>23</sup>, sugerând faptul că *NcCDH* prezintă afinitate redusă pentru substrat dar eficiență îmbunătățită. Cum era de așteptat, indiferent de tipul substratului, valori mai mari ale  $I_{\max}$  au fost înregistrate în mediu acid (pH 5.2) în comparație cu cele măsurate în condiții neutre (pH 7.0). Acest comportament argumentează din nou faptul că

*NcCDH* aparține clasei II de CDH<sup>16</sup>, cu preferințe evidente pentru domeniile acide în cadrul măsurătorilor în mod DET, având, totuși activitate semnificativă și în domeniul neutru.

În modul de operare MET (vezi Tabelul 1 și Tabelul 2), parametrii cinetici ai *NcCDH*-ului adsorbit, pentru substraturile cercetate sunt aproape identice în mediul acid respectiv neutru, confirmând ușoara influență a pH-ului asupra proprietăților catalitice a  $DH_{NcCDH}$  operată în MET. Indiferent de natura substratului, valorile curentului  $I_{max}$  au fost mai mari în timpul măsurătorilor cu metoda MET în comparație cu DET, diferențele fiind accentuate la pH 7.0. În consecință, se poate afirma că, prin aplicarea unui mediator, eficiența catalitică crește (estimată ca raportul  $I_{max}/K_M^{app}$ ) în cazul tuturor substraturilor energetice investigate.

În ambele moduri de operare, enzima *NcCDH* manifestă activitate mărită pentru substraturile cu legături  $\beta$ -1,4 (lactoză și celodextrine) în comparație cu substraturile cu legături  $\alpha$ -1,4 (maltodextrine). Concomitent au fost înregistrate cele mai mari afinități ale CDH pentru lactoză și celobioză. În cazul tuturor substraturilor, limita de detecție și domeniul liniar pentru modurile DET și MET nu diferă în mod semnificativ, valorile pentru substraturile cu legături  $\beta$ -1,4 fiind situate în domeniul  $\mu$ M, iar pentru substraturile cu legături  $\alpha$ -1,4 în domeniul mM (Tabelul 1 și Tabelul 2).

Valorile  $K_m$  pentru maltodextrine sunt aproximativ de 100 de ori mai mari în decât în cazul lactozei și a celodextrinelor; cele mai mici valori ale parametrului  $K_m$  din acest grup fiind înregistrate pentru maltoză și maltopentoză în ambele cazuri de DET și MET. Utilizarea mediatorului a crescut valorile  $K_m$ , așa cum se poate observa în cazul maltotriozei și al maltotetrozei (cu excepția maltopentozei, care la pH 5.2 prin utilizarea BQ valorile  $K_m$  au scăzut). Valorile curentului  $I_m$  variază de la 46 nA (maltoză, pH 7.0) la 232 nA (maltotrioza, pH 5.2). Efectul utilizării BQ poate fi observat în modul de operare MET, valorile  $I_{max}$  crescând în comparație cu DET, iar diferența între cele două bufferi/pH-uri rămânând mică. Limita de detecție variază între 1–10 mM, domeniul liniar între 1–100 mM, prezentând o tendiță de scădere către domeniile molare mai mici în cazul măsurătorilor realizate fără mediator.

Pentru evaluarea selectivității enzimei pentru monozaharide, s-au trasat curbe de calibrare în DET/MET pentru glucoză (Figura 10), galactoză, arabinoză și xilitol. Indiferent de modul de operare (DET, MET), nu s-au înregistrat răspunsuri semnificative pentru galactoză, arabinoză și xilitol (semnale mai mici de 10nA/0.1M). Pentru glucoză, valorile  $K_M^{app}$  (de la 200 la 500 mM) confirmă similaritatea cu alte enzime CDH din clasa II<sup>16,23,28,46-48</sup>, *NcCDH* posedând activitate redusă către acest substrat<sup>16,23,28,46-48</sup>. Parametrii



cinetici ( $K_M^{app}$  și  $I_{max}$ ) și limitele de detecție (~10 mM) nu a fost influențate în mod semnificativ de către modul de operare (DET sau MET).

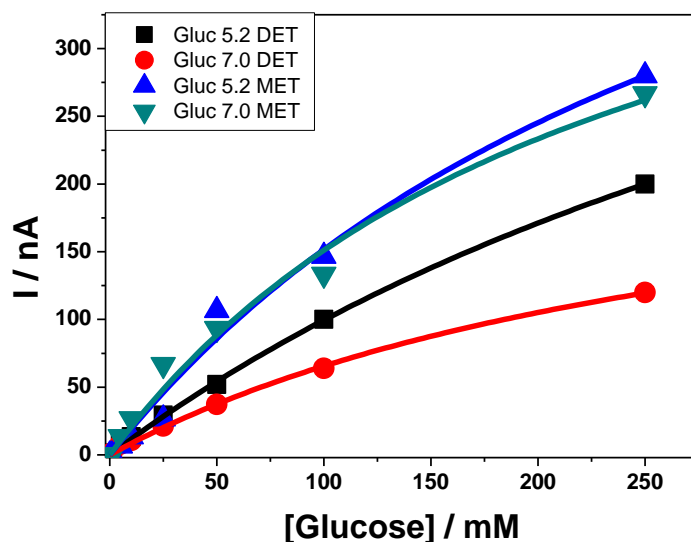


Figure 10: Dependența răspunsului amperometric al electrodului G/CDH referitor la pH și compoziția soluției tampon în cazul DET (A) și MET (B) (folosind 1,4-benzochinonă), pentru diferite concentrații de glucoză. Potențialul aplicat +300 mV (vs. Ag | AgCl 0.1 M KCl), debit 0.5 mL/min.

Prin comparația sensibilităților calculate pentru cele două moduri de operare, se poate afirma că *Nc*CDH se atașează mai eficient de suprafața electrodică în momentul exploatării în prezența unui mediator redox. Indiferent de modul de operare și pH, se pot nota: (i) celodextrinele și lactoza sunt preferate în comparație cu maltodextrinele; (ii) în cazul substraturilor din grupul celodextrinelor, secvența de sensibilitate rămâne practic neschimbată, cu mențiunea că celobioza > (celotrioza ≈ celopentoza). Influența pH-ului asupra maltodextrinelor este mai puternică decât asupra celodextrinelor, sensibilitățile individuale urmând secvența: maltopentoză > maltotetrazoă > maltotrioză > maltoză. În ambele moduri de operare, sensibilitatea *Nc*CDH pentru glucoză a fost cea mai mică dintre zahărurile investigate, fiind aproape de cele observate pentru maltoză în cazul enzimei *Mt*CDH<sup>23</sup>.

**Table 1. Parametrii cinetici aparenti (calculati pe baza cineticii Michaelis-Menten) si analitici (calculati din curbele de calibrare), estimati pentru diferite substraturi in cazul electrodului modificat in modul de operare DET.**

Substrat	pH	$K_M^{app}$ (mM)	$I_{max}$ ( $\mu A$ )	Domeniul linear (mM)	LD* (mM)	$R^2 / N$
Celobioză	5.2	$0.265 \pm 0.019$	$1.90 \pm 0.04$	0.005 – 0.25	0.001	0.9963 / 11
	7.0	$0.334 \pm 0.040$	$0.62 \pm 0.02$	0.01 – 0.25	0.005	0.9902 / 11
Celotrioză	5.2	$0.698 \pm 0.042$	$1.49 \pm 0.03$	0.01 – 0.25	0.004	0.9978 / 11
	7.0	$0.289 \pm 0.024$	$0.46 \pm 0.01$	0.01 – 0.25	0.006	0.9940 / 11
Celopentaoză	5.2	$0.556 \pm 0.036$	$1.01 \pm 0.32$	0.001 – 0.25	0.005	0.9972 / 11
	7.0	$0.522 \pm 0.084$	$0.57 \pm 0.03$	0.025 – 0.25	0.008	0.9818 / 11
Lactoză	5.2	$0.488 \pm 0.041$	$2.03 \pm 0.05$	0.005 - 0.5	0.002	0.9953 / 11
	7.0	$0.225 \pm 0.021$	$0.80 \pm 0.02$	0.005 – 0.25	0.003	0.9939 / 11
Maltoză	5.2	$35.5 \pm 3.4$	$0.056 \pm 0.002$	10 - 50	5.8	0.9947 / 6
	7.0	$40.8 \pm 3.4$	$0.047 \pm 0.001$	10 - 50	7.7	0.9962 / 6
Maltotrioză	5.2	$69.3 \pm 8.4$	$0.23 \pm 0.01$	5 – 25	2.7	0.9932 / 6
	7.0	$63.3 \pm 9.8$	$0.15 \pm 0.01$	5 – 25	3.8	0.9881 / 6
Maltotetraoză	5.2	$47.8 \pm 2.7$	$0.226 \pm 0.006$	5 – 25	1.9	0.9990 / 6
	7.0	$53.6 \pm 9.1$	$0.20 \pm 0.02$	5 – 25	2.5	0.9913 / 6
Maltopentaoză	5.2	$44.3 \pm 6.7$	$0.17 \pm 0.01$	5 – 25	2.4	0.9921 / 6
	7.0	$36.0 \pm 7.0$	$0.11 \pm 0.01$	5 – 25	2.9	0.9857 / 6
Glucoză	5.2	$514 \pm 48.4$	$0.61 \pm 0.04$	10 – 100	7.6	0.9993 / 6
	7.0	$302 \pm 35.6$	$0.26 \pm 0.02$	25 – 100	10.3	0.9977 / 6

\* Limita de detecție (LD) a fost estimată la un raport de semnal/zgomot de 3 (intensitatea de curent 10 nA).

Table 2. Parametrii cinetici aparenti (calculati pe baza cineticii Michaelis-Menten) si analitici (calculati din curbele de calibrare), estimati pentru diferite substraturi in cazul electrodului modificat in modul de operare MET(folosind BQ, 25µM) .

Substrat	pH	$K_M^{app}$ (mM)	$I_{max}$ (µA)	Domeniul linear (mM)	LD* (mM)	$R^2 / N$
Celobioză	5.2	0.419 ± 0.016	3.31 ± 0.04	0.005 – 0.25	0.002	0.9991 / 6
	7.0	0.239 ± 0.010	3.28 ± 0.03	0.01 – 0.25	0.004	0.9989 / 6
Celotrioza	5.2	0.874 ± 0.070	2.28 ± 0.06	0.025 – 0.25	0.014	0.9962 / 6
	7.0	1.20 ± 0.06	2.63 ± 0.05	0.025 – 0.25	0.011	0.9987 / 6
Celopentaoza	5.2	0.936 ± 0.044	2.29 ± 0.04	0.025 – 0.25	0.012	0.9987 / 6
	7.0	0.719 ± 0.039	1.83 ± 0.03	0.025 – 0.25	0.012	0.9982 / 6
Lactoză	5.2	0.743 ± 0.053	3.64 ± 0.09	0.01 – 0.25	0.007	0.9969 / 6
	7.0	0.912 ± 0.044	3.87 ± 0.07	0.01 – 0.5	0.006	0.9986 / 6
Maltoza	5.2	44 ± 11.7	0.082 ± 0.008	25 - 100	16.3	0.9684 / 6
	7.0	41.1 ± 9.6	0.086 ± 0.007	25 - 100	14.3	0.9747 / 6
Maltotrioza	5.2	173 ± 25.7	0.74 ± 0.06	10 – 100	7.0	0.9942 / 6
	7.0	98 ± 15.2	0.57 ± 0.04	10 – 50	5.2	0.9910 / 6
Maltotetraza	5.2	106.2 ± 5.7	0.67 ± 0.02	10 – 50	4.8	0.9989 / 6
	7.0	86 ± 10.8	0.66 ± 0.04	10 – 50	3.8	0.9933 / 6
Maltopentaoza	5.2	82.5 ± 9.5	1.10 ± 0.07	5 – 25	2.3	0.9972 / 6
	7.0	36.6 ± 8.7	0.88 ± 0.09	5 – 10	1.2	0.9779 / 6
Glucosa	5.2	239 ± 63.9	0.51 ± 0.08	25 – 100	14.0	0.9851 / 6
	7.0	323 ± 104.3	0.64 ± 0.13	25 – 100	15.1	0.9854 / 6

\* Limita de detectie (LD) a fost estimata la un raport de semnal/zgomot de 3 (intensitatea de curent 10 nA).

## 2.4. Stabilitatea operațională a biosenzorului

S-au implementat două protocoale experimentale pentru evaluarea stabilității operaționale a electrodului modificat G/CDH la temperatura camerei: (i) injecții repetate de lactoză în fluxul continuu de tampon fosfat la pH 7 (Figura 11A); (ii) un flux continuu de lactoză (5 mM) dizolvată în soluția de tampon fosfat (Figura 11B). Rezultatele au subliniat faptul că în prima parte al experimentului (care a durat timp de 11 ore,  $\approx 10\%$  din durata totală a experimentului) răspunsul bioelectrodului a scăzut linear și s-a micșorat până la  $\sim 86\%$  din răspunsul inițial iar în a doua parte a experimentului ( $\approx 90\%$  din durata totală a experimentului) scăderea semnalului a fost lentă comparativ cu prima parte, ajungând la un semnal de  $\sim 70\%$  din cel inițial al biosenzorului la finalizarea experimentului (5 zile). Acest comportament bifazic<sup>18,23</sup> dovedește că stabilitatea sistemului investigat a fost afectată în principal de doi factori: (i) desorbția moleculelor de enzime legate slab de suprafața electrodului din grafit, predominant în prima parte a experimentelor și (ii) scăderea activității enzimei în condițiile de lucru date, care s-a manifestat pe întreaga durată a experimentului.

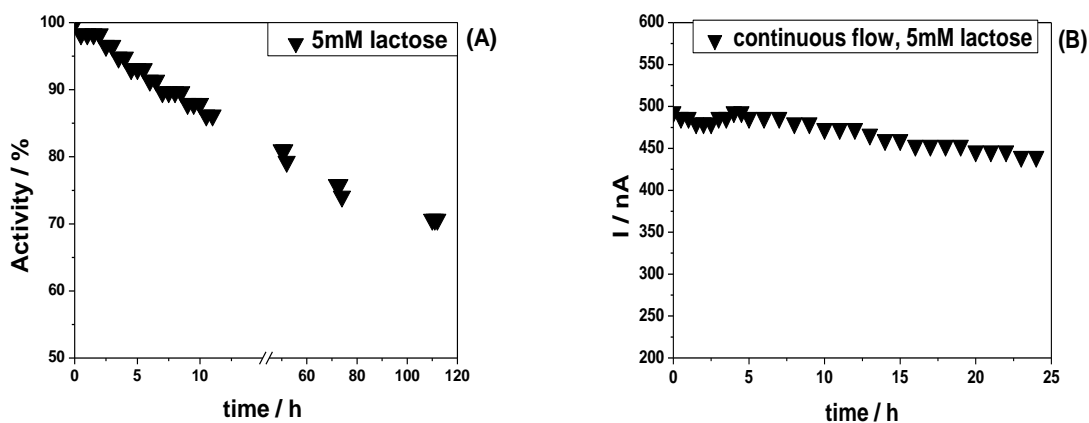


Figura 11. Rezultatele măsurătorilor de stabilitate în FIA pentru electrodul modificat, cu injecția succesivă a lactozei (5 mM) în flux (A) și în flux continuu de lactoză în soluția de tampon fosfat (concentrația de lactoză 5 mM, soluție de tampon fosfat 50 mM) (B). Potențialul aplicat: +300 mV (vs. Ag | AgCl 0.1 M KCl), debitul soluției 0.5 mL/min.

În cazul în care electrodul G/CDH a fost folosit în condiții de debit constant de soluție de lactoză (Figura 11B), scăderea răspunsului a fost mai mică, comparând cu prima metodă. Astfel, după 24 de ore de funcționare continuă cu un debit constant de lactoză, răspunsul amperometric al electrodului modificat a scăzut cu  $\approx 11\%$  față de

răspunsul inițial. Rezultatele din ambele experimente ne-au dus la concluzia că, prin simpla adsorpția a enzimei *NcCDH* pe suprafața electrodului din grafit se poate obține un biosenzor cu o stabilitate operațională mare, menținând o mare parte din răspunsul inițial timp de o săptămână. Această caracteristică poate fi considerată suficient de promițătoare pentru a justifica fabricarea de biosensori cu acest electrod pentru diferite aplicații biotehnologice.

## 2.5. Concluzii

Pentru a înțelege mai bine modul de funcționare al enzimei CDH și mecanismele care apar în condiții de funcționare DET și MET, în prezența diferitelor substraturi, a fost efectuată caracterizarea electrochimică a unei enzime CDH din clasa a II-a, izolată din ciuperca ascomicetă *Neurospora crassa*, adsorbită pe grafit. Cu scopul de a găsi condițiile experimentale optime, efectul potențialului aplicat, al concentrației de mediator (1,4-benzochinonă) și pH-ul soluției tampon purtătoare, au fost investigate în condiții de flux.

Din curbele de calibrare, înregistrate la două valori de pH (5.2 și 7), parametrii cinetici și analitici au fost estimați pentru nouă glucide, în modurile de funcționare DET și MET. Aceste rezultate ne-au arătat că: (i) pentru toate cele nouă substraturi, sensibilitatea enzimei a fost mai mare pentru MET comparativ cu DET, respectiv pentru pH 5.2 comparativ cu pH 7; (ii) indiferent de modul de operare DET/MET, sensibilitatea enzimei față de zaharurile investigate a scăzut în următoarea secvență: celobioză > lactoză > (celotrioză ≈ celopentaoză) >> (maltotrioză ≈ maltotetraoză ≈ maltopentaoză) > (maltoză ≈ glucoză); (iii) pentru ambele moduri de operare, sensibilitatea enzimei *NcCDH* la glucoză a fost cea mai mică dintre substraturile investigate, fiind aproape de cea observată pentru maltoză; (iv) când *NcCDH* este operată în DET, preferă mediul acid dar își menține o activitate semnificativă și în condiții de pH neutru; (v) biosenzorul G/CDH obținut prezintă o stabilitate operațională promițătoare pentru aplicațiile de interes biotehnologic.

### 3. Comparația între comportamentul electrochimic al electrozilor modificați G/CDH și Au-S-Ph-OH-CDH<sup>49</sup>

#### 3.1. Imobilizarea enzimei CDH pe diferite materiale de electrod

Imobilizarea enzimei CDH pe electrozi din grafit implică o adsorbție fizico-chimică simplă pe suprafața electrodului. În consecință, orientarea optimă a enzimelor pe suprafața electrodului nu este garantată, fiindcă moleculele sunt adsorbite la întâmplare. Unele molecule adsorbite vor putea să participe în cataliză și în transferul de electroni, dar unele vor fi imobilizate într-un mod în care fie domeniul hem nu este orientat într-un mod favorabil transferului de electroni produs în timpul procesului de electrocatalitică la domeniul FAD, ori orientarea centrului catalitic nu permite intrarea substratului din soluție în "buzunarul catalitic" (Figura 12A). O altă abordare necesită modificarea suprafeței de electrod (aur) cu tioli, formând un monostrat auto-asamblat (SAM) și legarea ordonată a enzimei pe această suprafață. Teoretic, această abordare presupune că toate moleculele de enzimă adsorbite sunt implicate în cataliză și în transferul de electroni (Figura 12 B).

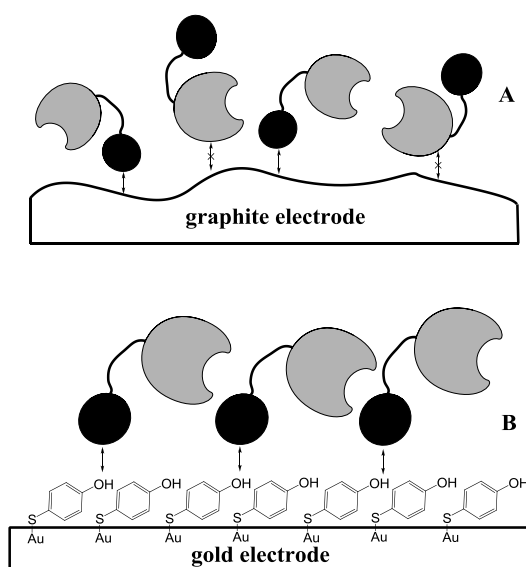
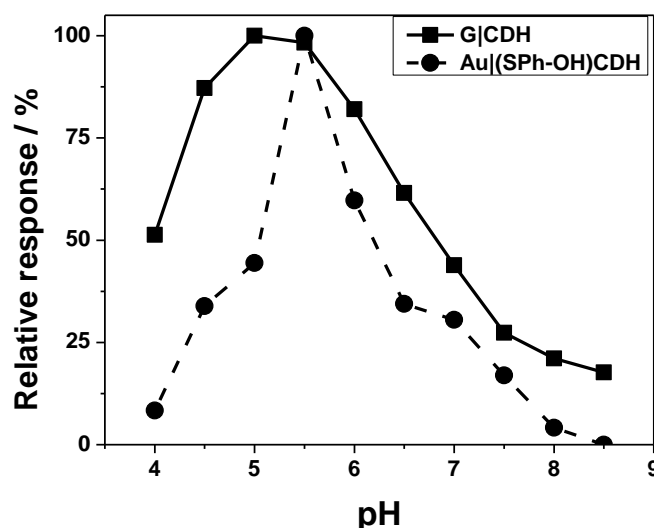


Figura 12. Adsorbția/orientarea enzimei CDH (domeniul FAD – gri; domeniul hem – negru) pe grafit (A) și pe electrodul din aur, modificat cu un monostrat auto-asamblat din 4-mercaptofenol (B).

În acest context, subiectul acestei cercetări s-a îndreptat spre compararea celor două variante de construcție a electrozilor descrise mai sus, prin eficiența electrocatalitică a acestora. În acest scop, două tipuri de electrozi modificați cu *Nc*CDH (*G/Nc*CDH și *Au-S-Ph-OH/CDH*) au fost pregătite și comparate prin comportamentul lor electrocatalitic față de același substrat (lactoza).

### 3.2. Influența pH-ului

Răspunsul relativ ai electrozilor modificați de *G/CDH* și *Au-S-Ph-OH/CDH* în prezența lactozei (5 mM), în funcție de pH, au fost înregistrate în condiții de flux (*G/CDH*) sau folosind voltametria ciclică (*Au-S-Ph-OH/CDH*), rezultatele fiind prezentate în Figure 13.



**Figure 13.** Dependența răspunsului amperometric relativ de pH a electrozilor *G/CDH* (■, —) și *Au-SPh-OH/CDH* (●, - -). Condiții experimentale pentru *G/CDH*: metoda fluxului continuu, injecții de lactoză (5 mM), volumul probei injectate 50  $\mu$ L; debit 0.5 mL / min; potențial aplicat +300 mV vs. Ag|AgCl, 0.1M KCl; pentru *Au-SPh-OH/CDH*, voltametrie ciclică, potențialul de pornire -300 mV vs. SCE,  $v=10$  mV/s; soluții de tampon citrat 50 mM (pH 4 to 6) și fosfat 50 mM (pH 6.5 to 8.5).

Se poate observa că ambii electrozi au pH-ul optim de lucru în jurul valorii de 5.5. Diferența dintre comportamentul electrozilor investigați poate fi explicată prin interacțiunile între conformațiile schimbate, induse de pH, ale moleculelor de enzimă imobilizată și efectul acestuia asupra procesului de transfer de electroni, care au avut loc la diferitele suprafețe de electrozi. În același timp, trebuie luată în considerare structura mai organizată, caracteristică electrodului modificat de *Au-S-Ph-*

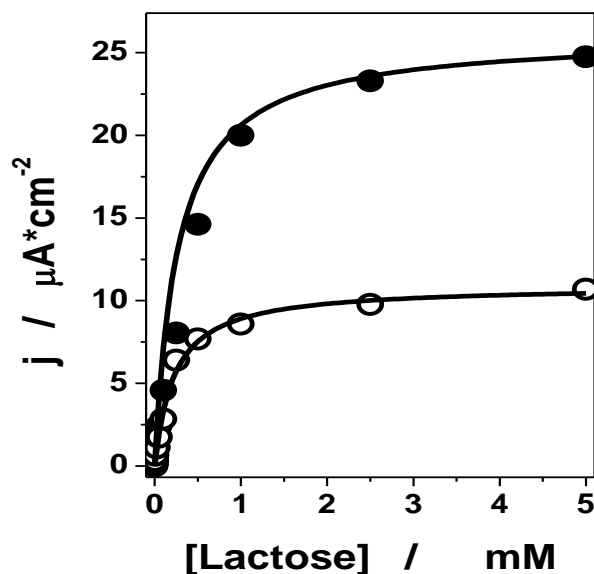
OH/CDH. Astfel se poate presupune, că, în anumite limite, proprietățile suprafeței de grafit și de Au-SPh-OH nu sunt afectate semnificativ de variațiile pH-ului. Contrar, procesele DET și IET (transferul de electron intern) între moleculele de CDH și suprafețele electrozilor sunt influențate puternic de modificările conformaționale ale enzimei, care sunt induse de variația distanței între cele două domenii funcționale, care apar în urma modificării pH-ului înconjurător. În concluzie, maximul pe un domeniu mult mai strâns de pH în cazul electrodului Au-S-Ph-OH/CDH reflectă sensibilitatea ridicată pentru schimbări minore de pH a structurii ordonate, care au loc în jurul valorii de pH optim. În acest context trebuie să menționăm că activitatea electrocatalitică observată la electrodul modificat Au-S-Ph-OH/CDH scade cu  $\approx 50\%$  din valoarea sa maximă la o schimbare a valorii de pH cu numai 0.5 unități (Figure 13).

### 3.3. Eficiența electrocatalitică

Răspunsul amperometric al electrozilor modificați a fost înregistrat la două valori diferite de pH: valoarea optimă de pH 5.5 și la o valoare de interes practic, pentru posibile aplicații biotehnologice (pH 7.0).

Curbele de calibrare obținute în cazul electrodului modificat G/CDH în prezența lactozei sunt prezentate în Figura 4. Cum era de așteptat, bioelectrodul arată un comportament de tip Michaelis-Menten la ambele valori de pH. Eficiența mai mare a fost înregistrată în mediu ușor acid. Valoarea constantei aparente Michaelis-Menten ( $K_{Mapp}$ ) scade la jumătate față de valoarea estimată la pH optim, de la 488  $\mu\text{M}$  la 225  $\mu\text{M}$  pentru lactoză. Intensitatea maximă de curent ( $I_{max}$ ) prezintă un comportament similar, în scădere de la valoarea de 2.03  $\mu\text{A}$  (pH 5.5) la 0.8  $\mu\text{A}$  (pH 7.0). În consecință, sensibilitatea bioelectrodului este ușor influențată de schimbările de pH, valoare scăzând cu mai puțin de 15%, de la 57.5 (pH 5.5) până la valoarea de 49.1 (pH 7.0)  $\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ .

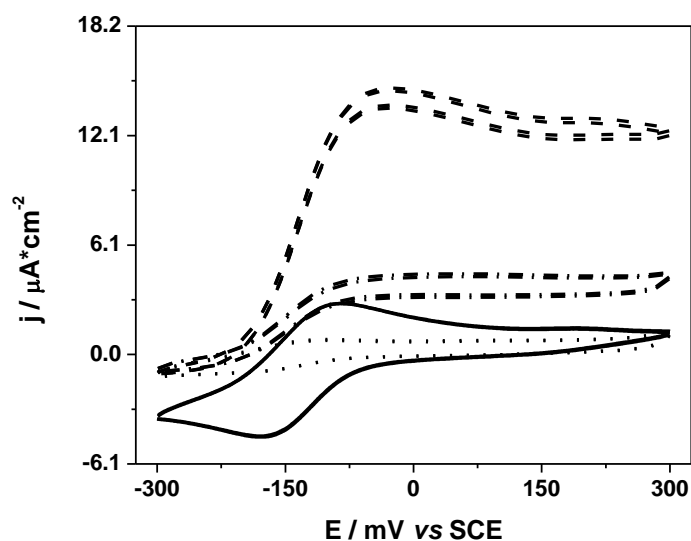




**Figure 14.** Curbele de calibrare pentru electrodul G/CDH în prezența lactozei, la două pH-uri diferite. Condiții experimentale: potențialul aplicat +300 mV vs. Ag|AgCl, 0.1M KCl; volumul injectat de lactoză 50 μL; debit 0.5 mL/min; soluții tampon 50 mM citrat (pH 5.5) și 50 mM tampon fosfat (pH 7.0); simbolurile pline reprezintă valorile la pH 5.5 iar simbolurile goale cele la pH 7.0.

Electrochimia CDH-ului și răspunsul voltametric al acestuia folosind electrodul modificat Au-SPh-OH/CDH a fost studiat în prezența și absența lactozei, la valorile de pH 5.5 și pH 7.0.

În absența substratului, poate fi observat răspunsul cuplului redox  $Fe^{2+/3+}$  din domeniul hem. La pH 5.5 potențialul standard formal ( $E^0$ ) a fost de +150 mV vs. SCE, în timp ce la pH 7.0  $E^0$  a fost +160 mV vs. SCE (Figure 15). Indiferent de pH-ul soluției, în prezența substratului se poate observa un curent electrocatalitic clar. Așa cum a fost sugerat pentru un CDH similar<sup>50</sup>, tiolii cu grupare alcoolică imobilizați pe suprafața electrozilor din aur induc orientarea moleculelor de enzimă într-o poziție favorabilă pe suprafața electrozilor modificați. Astfel, procesul biocatalitic poate fi îmbunătățit, rezultând un bioelectrod activ și selectiv. Scăderea observată la pH neutru poate fi atribuită scăderii eficienței transferului direct de electroni și din cauza interacțiunii mai slabe dintre (Au-S-Ph-OH) și CDH, cauzată fie de schimbările nefavorabile de conformație care au loc în enzimă, fie de schimbările de la nivelul SAM-ului. În consecință, transferul de electroni devine mai puțin eficient și răspunsul bioelectrodului scade.



**Figure 15.** Răspunsul voltametric al electrodului modificat Au-SPh-OH/CDH în absența [pH 5.5 (—); pH 7.0 (····)] și în prezența [pH 5.5(- -); pH 7.0 (- · -)] lactozei (5 mM). Condiții experimentale: potențial de pornire -300 mV vs. SCE; viteza de baleiaj 10 mV/s; tampon citrat 50 mM (pH 5.5) și fosfat 50 mM (pH 7.0).

Valorile estimate pentru eficiența electrocatalitică a electrozilor modificați sunt prezentate în Tabel 3. Valoarea  $I_0$  se referă la curentul măsurat în absența substratului, în timp ce  $I_{\text{peak, s}}$  se referă la curentul măsurat în prezența substratului. Se poate observa că valorile de eficiență corespunzătoare electrodului modificat G/CDH sunt mult mai mari decât cele estimate pentru electrodul modificat Au-SPh-OH/CDH. Acest comportament este cauzat de încărcarea mai mare de enzimă în cazul primului bioelectrod. Într-adevăr, o suprafață caracterizată printr-o rugozitate mai mare (grafit) permite o distribuție fără restricții a moleculelor CDH cu o activitate enzimatică mai mare decât în cazul suprafeței cu o rugozitate mai mică (Au-SPh-OH) cu o constrângere de dimensiune pentru moleculele de CDH.

**Tabel 3.** Eficiența electrocatalitică pentru electrozii modificați cu CDH în prezența lactozei (5 mM) (pentru condițiile experimentale vezi Figura 15 pentru Au-SPh-OH/CDH și Figura 14 pentru G/CDH).

Electrod	Eficiență electrocatalitică ( $I_{\text{peak, s}}/I_0$ )	
	pH 5.5	pH 7.0
G/CDH	72	30
Au-SPh-OH/CDH	9.76	3.84

### 3.4. Concluzii

În istoria de o jumătate de secol a biosenzorilor, diferite materiale de electrod și diverse căi de transfer de electroni au fost investigate, vizând posibile aplicații în medicină și biotehnologie. În capitolul de mai sus au fost prezentate asemănările și diferențele în modul DET dintre electrozi diferiți modificați cu CDH. Ambele abordări au avantajele și dezavantajele lor.

Imobilizarea de CDH prin "adsorbție simplă" pe suprafața de grafit oferă o modalitate rapidă și eficientă din punct de vedere economic pentru biosenzori și/sau biopile de combustie. Punctul slab al acestei metode constă într-o adsorbție aleatorie a enzimei, rezultând o reproductibilitate teoretică mai mică. Abordarea "SAM", ilustrată de electrozii din aur, modificați cu 4-mercaptolenol, oferă avantajul unei versatilități mai mari, datorită numărului mare de tiocompuși care pot fi utilizați în această abordare. Un alt "pro" pentru "SAM" este prezența unei structuri cvasi-ordonate, construite pe suprafața electrodului. Principalul dezavantaj al acestei abordări se referă la activitatea enzimatică scăzută a suprafeței de electrod cuplată cu instabilitatea relativă al monostratului.

Pe lângă acestea, capitolul prezentat mai sus arată faptul că, în cazul enzimei CDH, o enzimă capabilă să susțină DET pe diferite materiale de electrozi, abordarea "SAM" prezintă o vulnerabilitate mai mare la modificările pH-ului decât adsorbția "simplă". Acest comportament a fost explicat luând în considerare schimbările conformaționale ale moleculelor CDH, care, în cazul unei interfețe mai bine-organizate, exercită o influență puternică asupra activității bioelectrodului.

## 4. Comportamentul electrocatalitic al electrozilor modificați de Au-SYX-CDH<sup>51</sup>

### 4.1. Imobilizarea enzimei CDH pe electrozii modificați din Au

Pentru a obține un modalitate eficientă de cuplare DET între centrii redox ai proteinei/enzimei și electrod, o orientare corespunzătoare a enzimei pe suprafața electrodului este crucială. Conform teoriei lui Marcus<sup>52</sup>, DET între o proteină și un electrod depinde de trei factori majori: i) distanța dintre centrul redox și suprafața electrodului; ii) de energia de reorganizare, care reflectă rigiditatea structurală a site-ului redox în formele sale oxidată și redusă; iii) forța motrică termodinamică a transferului de electroni (ET), care depinde de o sincronizare corectă între potențialul redox al proteinei și polarizarea suprafeței de electrod<sup>53-55</sup>.

Printre enzimele cu caracteristici DET pe diferite materiale de electrod, celobioz dehidrogenaza a fost subiectul cercetărilor intense în ultimii ani<sup>18,19,56,57</sup>. Clasa de enzime CDH studiată cel mai mult până în momentul de față sunt cele din clasa I obținute din *bazidiomicete*, în timp ce doar informații limitate ne stau la dispoziție despre clasa II<sup>16,19</sup>. Comportamentul DET al acestor enzime, pe electrozi din aur, modificați cu diferite tipuri de SAM a fost studiat cu ajutorul voltametriei ciclice și al spectroelectrochimiei UV-Vis (predominant cele din clasa I)<sup>41,58-62</sup>. O reprezentare schematică a principiului de funcționare, care implică DET, ilustrat în cazul unui bioelectrod construit prin imobilizarea CDH-ului pe un electrod din SAM-Au este prezentată în Figure 16A. În prezența substratului (de exemplu lactoză), CDH-ul oxidează zaharul la lactona corespunzătoare pe domeniul catalitic FAD iar electronii sunt transferate printr-o cale internă (IET) la domeniul hem conectat. În cazul în care enzima este orientată corect pe suprafața electrodului modificat (Figure 16B), domeniul hem transferă electronii la suprafața electrodului printr-un proces eficient de DET.

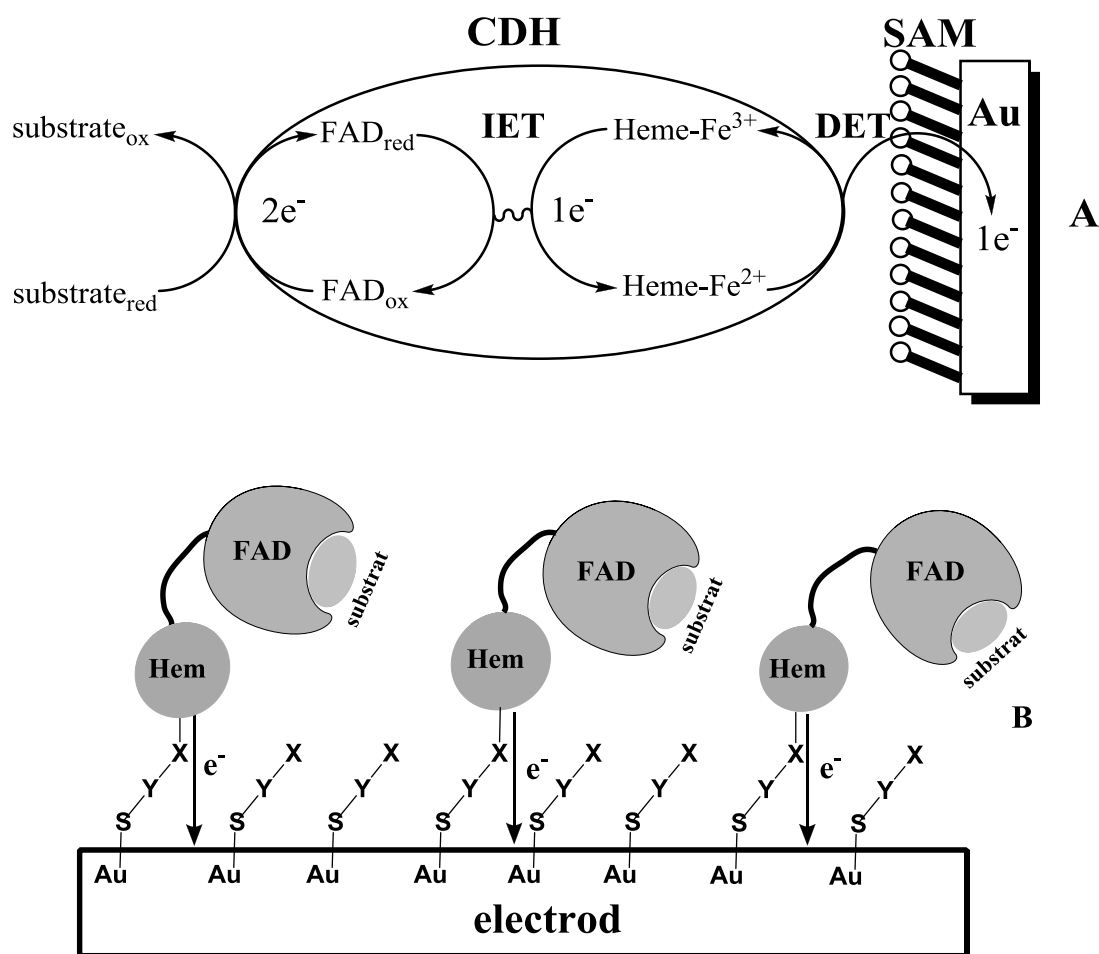


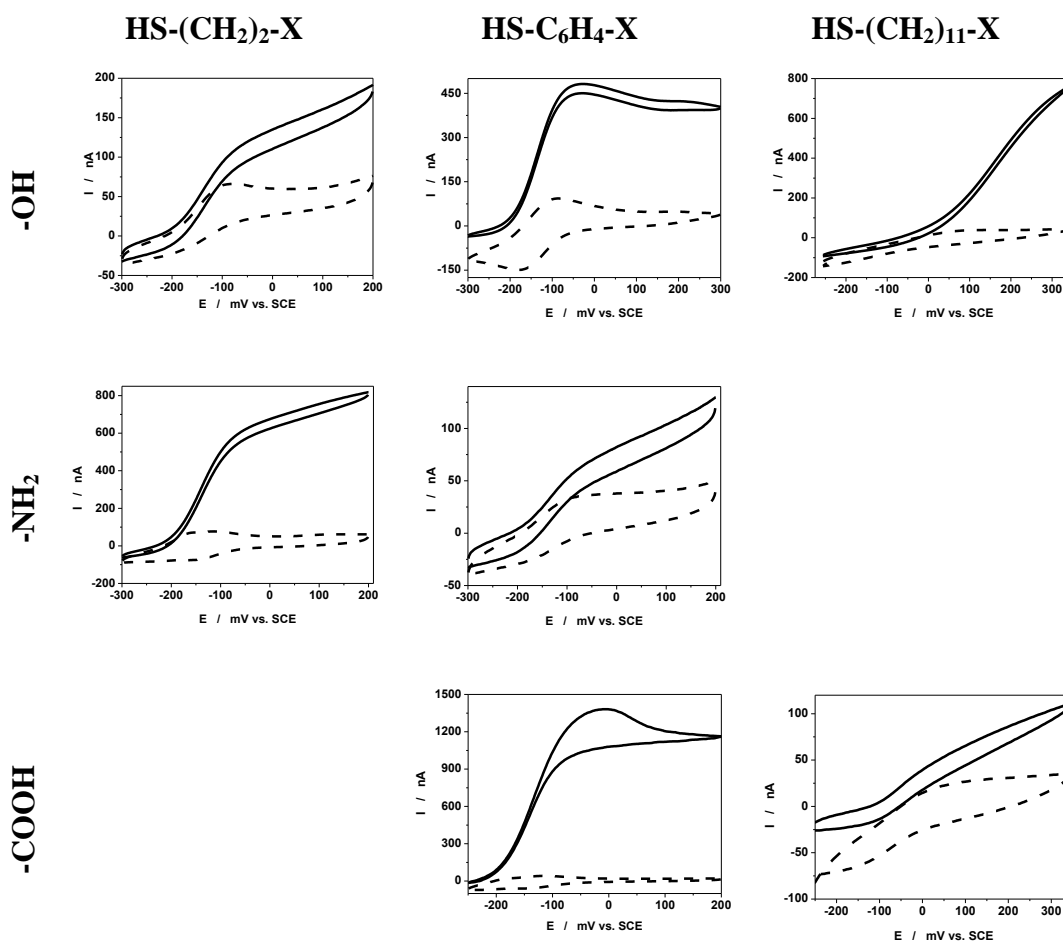
Figure 16: (A) Schema transferului direct de electroni (având la bază transferul intern de electroni) pentru enzima CDH, adsorbită pe un electrod modificat SAM-Au; (B) structura bioelectrodului bazat pe CDH adsorbită pe diferite tipuri de electrozi SAM-Au, unde  $Y = -(\text{CH}_2)_2-$ ,  $-\text{C}_6\text{H}_4-$ ,  $-(\text{CH}_2)_{11}-$ , iar  $X = -\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ .

## 4.2. Comportamentul voltametric al electrozilor modificați - Au-SYX-CDH

Scopul capitolului următor a fost furnizarea mai multor informații cu privire la procesul DET, în cazul *NcCDH*. În acest scop, enzima a fost prinsă sub o membrană permselectivă pe suprafața electrodului din aur modificat cu SAM, cum a fost descris anterior<sup>63</sup>. Măsurători de voltametrie ciclică au fost efectuate la pH-uri diferite pentru a estima eficiența catalitică față de lactoză. Comportamentul observat a fost explicat în termeni de influență a structurii SAM-ului privind procesul de DET care apare între enzima și suprafața electrodului din aur. În același timp, dependența de pH a potențialului standard formal al grupului hem, coroborată cu datele de

eficiență electrocatalitică, confirmă încă o dată, că CDH-ul depus pe monostratul tiolic este capabil să susțină un proces eficient de DET.

După cum se poate observa din Figura 17, trei tipuri de comportamente voltametrice au fost observate pentru electrozii modificați Au-SYX-CDH: (i) un răspuns electrocatalitic bine-conturat, observat pentru electrozii de aur acoperiți cu HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> și HS-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-X (X= -OH, -COOH); (ii) un răspuns mixt, observat în cazul HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH, HS-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> și HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-COOH, care poate fi explicat prin suprapunerea răspunsului catalitic cu o oxidare parțială a substratului direct pe suprafața electrodului din aur; (iii) un răspuns electrocatalitic slab, observat în cazul HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-OH, datorită oxidării directe a substratului pe suprafața electrodului din aur nemodificat<sup>59,64</sup>.



**Figura 17.:** Răspunsul voltametric al electrozilor modificați Au-SYX-CDH în absența (linie întreruptă) și în prezența (linie continuă) lactozei (5 mM). Condiții experimentale: viteză de baleiaj 10 mV/s; electrolit suport, tampon citrat 50 mM (pH 5.5).

Trebuie menționat faptul că electrodul modificat Au-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH-CDH a arătat o instabilitate mare și din acest motiv, rezultatele corespunzătoare n-au fost luate în considerare.

Aceste comportamente pot fi interpretate prin combinația complexă a următorilor factori: (i) distanța dintre suprafața electrodului și centrul activ al enzimei, care este controlată de grosimea stratului tiolic și (ii) interacțiunile existente, pentru un anumit SAM, între molecula CDH și gruparea funcțională terminală.

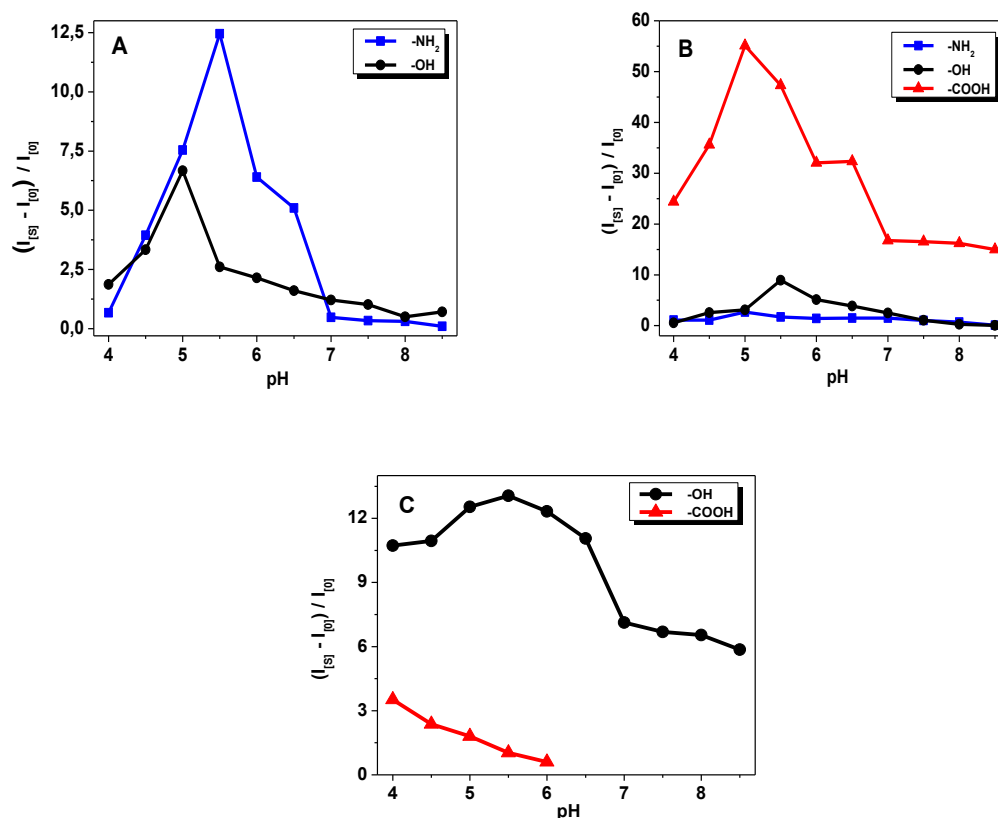
Pentru un anumit SAM, interacțiunile electrostatice între molecula CDH și grupul terminal/funcțional depinde foarte mult de pH-ul mediului înconjurător care controlează atât starea de ionizare a grupărilor respective, cât și pe suprafața enzimei. Un exemplu care ilustrează această situație este cazul tiolului HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, care la pH-ul 5.5 este încărcată pozitiv și prin urmare va dezvolta interacțiuni care atrag moleculele de CDH, promovând astfel procesul DET<sup>65</sup>. Discrepanța aparentă între eficiența electrocatalitică observată pentru electrozii modificați Au-S-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>-CDH și Au-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-CDH pot fi atribuite alcalinității crescute a grupării -NH<sub>2</sub> alifatică comparat cu cea aromatică.

Cu toate acestea, în afară de aceste aspecte electrostatice, alte interacțiuni, cum ar fi legăturile de hidrogen, van der Waals și interacțiunile hidrofile/hidrofobe ar trebui să fie luate în considerare pentru a înțelege de ce, de exemplu, electrodul modificat Au-S-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-COOH-CDH a arătat activitatea electrocatalitică cea mai mare printre electrozii investigați.

### **4.3. Comportamentul electrocatalitic al electrozilor modificați Au-SYX-CDH**

Cu toate acestea, în afară de aceste aspecte electrostatice, alte interacțiuni, cum ar fi legăturile de hidrogen, van der Waals și interacțiunile hidrofile/hidrofobe ar trebui să fie luate în considerare pentru a înțelege de ce, de exemplu, electrodul modificat Au-S-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-COOH-CDH a arătat activitatea electrocatalitică cea mai mare printre electrozii investigați **la fel ca si mai sus** (Figura 18). Astfel, preferința deja raportată de *Nc*CDH<sup>16,66</sup> pentru mediul acid a fost confirmată încă o dată. În ceea ce privește comportamentul specific al electrodului Au-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-COOH-CDH (Figura 18C), creșterea pH-ului induce ionizarea treptată a grupării carboxil, determinând o

scădere monotonă a eficienței electrocatalitice. La valorile de pH mai mari de 5, activitatea electrocatalitică a electrodului dispare, probabil datorită interacțiunilor nefavorabile dintre CDH și suprafața SAM-ului încărcat negativ.



**Figura 18: Dependența eficienței electrocatalitice de pH, calculată ca și  $(I_{[S]} - I_{[O]}) / I_{[O]}$ , pentru electrozii modificați Au-SYX-CDH, unde Y =  $-(CH_2)_2-$  (A);  $-C_6H_4-$  (B) și  $-(CH_2)_{11}-$  (C). Condiții experimentale: potențialul aplicat, +200 mV vs. SCE; substrat: lactoză, 5 mM.**

Efectul grupării terminale asupra eficienței electrocatalitice poate fi pusă în evidență, atunci când valorile maxime de eficiență electrocatalitică, estimat pentru toți electrozii de tip Au-SYX-CDH, sunt grupate pentru aceeași unități -Y- (Figura 19). Astfel, în limitele erorilor experimentale, se poate afirma, că: (i) în cazul în care gruparea  $-COOH$  este conectată la electrod printr-o unitate ( $-C_6H_4-$ ), activitatea electrocatalitică se va îmbunătăți în mod clar; (ii) alcalinitatea mai mare a aminelor alifatiche, comparativ cu cele aromatice, va favoriza interacțiunile dintre CDH și suprafața electrodului modificat, determinând o creștere a eficienței electrocatalitice.



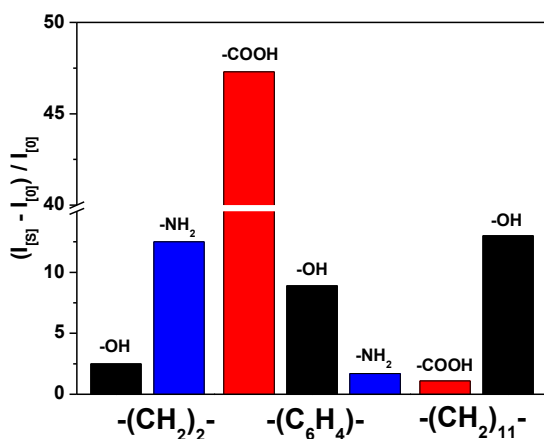


Figura 19. Influența tipului de SAM asupra eficienței electrocatalitice pentru electrozii modificați Au-SYX-CDH. Condiții experimentale: potențial aplicat, +200 mV vs. SCE; pH 5.5; substrat 5 mM lactoză.

#### 4.4. Influența pH-ului asupra $E^{0'}$ al cuplului redox hem din CDH

Răspunsurile voltametrice corespunzătoare cuplului redox hem<sup>41,43,58-60</sup>, s-au înregistrat la valori diferite de pH pentru electrozii modificați Au-SYX-CDH. Parametrii electrochimici al acestora, estimați la pH 5.5, sunt prezentați în Tabel 4.

Tabel 4. Parametrii electrochimici al hem-ului, la electrozii modificați Au-SYX (pH 5.5).

Thiolic compound	X	$\Delta E_p$ (mV)	$E^{0'}$ (mV)
HS-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -X	-OH	50	-135
	-NH <sub>2</sub>	40	-130
HS-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -X	-OH	70	-135
	-COOH	30	-135
	-NH <sub>2</sub>	70	-135

Se poate observa faptul că potențialul standard formal ( $E^{0'}$ ) rămâne practic neschimbat, atunci când se schimbă SAM-ul, iar separarea dintre picuri ( $\Delta E_p$ ) este caracteristică unui cuplu redox adsorbit pe suprafață. Valoarea cea mai mică de  $\Delta E_p$ , observat pentru electrodul modificat Au-S-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-COOH-CDH subliniază faptul, că, în acest caz interacțiunile între suprafața electrodului și enzima CDH sunt cele mai puternice, confirmând și cea mai mare eficiență electrocatalitică observată.

## 4.5. Concluzii

Măsurătorile de voltametrie ciclice pe electrozii modificați Au-SYX-CDH ( $Y = -(CH_2)_2-$ ,  $-C_6H_4-$  și  $-(CH_2)_{11}-$ ;  $X = -OH$ ,  $-COOH$ ,  $-NH_2$ ), în absența sau în prezența substratului (lactoză) permit estimarea eficiențelor electrocatalitice ale CDH-ului față de lactoză.

Variațiile observate între eficiențele electrocatalitice au fost explicate în termeni de influență a structurii SAM-ului cu privire la transferul direct de electroni între CDH și suprafața electrodului din Au. Acest comportament a fost explicat ca fiind rezultatul unei combinații complexe de doi factori: (i) distanța dintre suprafața electrodului și centrul activ al enzimei și (ii) interacțiunile existente pentru un anumit SAM între moleculă și gruparea terminală.

Dependența de pH a potențialului standard formal al grupului hem validează ipoteza că CDH-ul extras din *Neurospora crassa* și immobilizat pe un electrod modificat Au-SYX este capabil să susțină un DET eficient, constând în trei etape consecutive: (i) oxidarea substratului de domeniul FAD; (ii) un transfer de electroni intern rapid la domeniul hem; (iii) conexiunii electrice între domeniul hem și suprafața electrodului modificat.

### III. Bibliografie

- (1) Clark, L. C., Jr.; Lyons, C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1962, 102, 29-45.
- (2) Mohanty, S. P.; Kougiianos, E. *IEEE Potentials* 2006, 25, 35-40.
- (3) Thevenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. *Biosens. Bioelectron.* 2001, 16, 121-131.
- (4) Mao, X.-L.; Wu, J.; Ying, Y.-B. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 2008, 36, 1749-1755.
- (5) Velasco-Garcia, M. N.; Mottram, T. *Biosystems Engineering* 2003, 84, 1-12.
- (6) Luong, J. H. T.; Male, K. B.; Glennon, J. D. *Biotechnology Advances*, 26, 492-500.
- (7) Heyrovsky, J. *Analyst* 1956, 81, 189-192.
- (8) Heyrovsky, J. *Analytica Chimica Acta* 1948, 2, 533-541.
- (9) Speiser, B. In *Encyclopedia of Electrochemistry*; Bard, A. J., Stratmann, M., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2003; Vol. 3 Instrumentation and Electroanalytical Chemistry; pp 81-104.
- (10) Laviron, E. In *Electroanalytical Chemistry: A series of advances*; Marcel Dekker: New York, 1982; Vol. 12; pp 53-157.
- (11) Coman, V. In *Doctoral Thesis*; Lund University, Sweden, 2009; pp 18-20.
- (12) Ruzicka, J.; Hansen, E. H. *Anal. Chim. Acta* 1975, 78, 145-57.
- (13) Ruzicka, J.; Stewart, J. W. B. *Anal. Chim. Acta* 1975, 79, 79-91.
- (14) Ruzicka, J.; Hansen, E. H. *Flow injection analysis, 2nd Edition*; John Wiley & Sons: New York, 1988.
- (15) Appelqvist, R.; Marko-Varga, G.; Gorton, L.; Torstensson, A.; Johansson, G. *Anal. Chim. Acta* 1985, 169, 237-47.
- (16) Harreither, W.; Sygmund, C.; Augustin, M.; Narciso, M.; Rabinovich Mikhail, L.; Gorton, L.; Haltrich, D.; Ludwig, R. *Applied and environmental microbiology* 2011, 77, 1804-1815.
- (17) Zamocky, M.; Schumann, C.; Sygmund, C.; Callaghan, J.; Dobson, A. D. W.; Ludwig, R.; Haltrich, D.; Peterbauer, C. K. *Protein expression and purification.* 2008, 59, 258-265.
- (18) Ludwig, R.; Harreither, W.; Tasca, F.; Gorton, L. *ChemPhysChem* 2010, 11, 2674-2697.
- (19) Zamocky, M.; Ludwig, R.; Peterbauer, C.; Hallberg, B. M.; Divne, C.; Nicholls, P.; Haltrich, D. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 2006, 7, 255-280.
- (20) Westermarck, U.; Eriksson, K. E. *Acta Chem. Scand. B* 1974, 28, 204-208.
- (21) Westermarck, U.; Eriksson, K. E. *Acta Chem. Scand. B* 1974, 28, 209-214.
- (22) Larsson, T.; Elmgren, M.; Lindquist, S.-E.; Tessema, M.; Gorton, L.; Tessema, M.; Henriksson, G. *Anal. Chim. Acta* 1996, 331, 207-215.
- (23) Harreither, W.; Coman, V.; Ludwig, R.; Haltrich, D.; Gorton, L. *Electroanalysis* 2007, 19, 172-180.
- (24) Ludwig, R.; Salamon, A.; Varga, J.; Zámocky, M.; Peterbauer, C. K.; Kulbe, K. D.; Haltrich, D. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004, 64, 213-222.
- (25) Safina, G.; Ludwig, R.; Gorton, L. *Electrochimica Acta* 2010, 55, 7690-7695.

- (26) Rabinovich, M. L.; Vasil'chenko, L. G.; Karapetyan, K. N.; Shumakovich, G. P.; Yershevich, O. P.; Ludwig, R.; Haltrich, D.; Hadar, Y.; Kozlov, Y. P.; Yaropolov, A. I. *Biotechnology Journal* 2007, 2, 546-558.
- (27) Coman, V.; Vaz-Dominguez, C.; Ludwig, R.; Harreither, W.; Haltrich, D.; De Lacey, A. L.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; Shleev, S. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2008, 10, 6093-6096.
- (28) Coman, V.; Ludwig, R.; Harreither, W.; Haltrich, D.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Shleev, S. *Fuel Cells* 2010, 10, 9-16.
- (29) Kavanagh, P.; Boland, S.; Jenkins, P.; Leech, D. *Fuel Cells* 2009, 9, 79-84.
- (30) Zhang, X. C.; Ranta, A.; Halme, A. *Biosensors and Bioelectronics* 2006, 21, 2052-2057.
- (31) Deng, L.; Shang, L.; Wen, D.; Zhai, J.; Dong, S. *Biosensors and Bioelectronics* 2010, 26, 70-73.
- (32) Willner, I.; Yan, Y. M.; Willner, B.; Tel-Vered, R. *Fuel Cells* 2009, 9, 7-24.
- (33) Bullen, R. A.; Arnot, T. C.; Lakeman, J. B.; Walsh, F. C. *Biosensors and Bioelectronics* 2006, 21, 2015-2045.
- (34) Ivan, I.; Tanja, V.-K.; Kai, S. *Energies* 2010, 3, 803-846.
- (35) Arechederra, R. L.; Minter, S. D. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2011, 400, 1605-1611.
- (36) Tasca, F.; Gorton, L.; Harreither, W.; Haltrich, D.; Ludwig, R.; Noll, G. *J. Phys. Chem. C* 2008, 112, 9956-9961.
- (37) Stoica, L.; Dimcheva, N.; Ackermann, Y.; Karnicka, K.; Guschin, D. A.; Kulesza, P. J.; Rogalski, J.; Haltrich, D.; Ludwig, R.; Gorton, L.; Schuhmann, W. *Fuel Cells* 2009, 9, 53-62.
- (38) Tasca, F.; Gorton, L.; Kujawa, M.; Patel, I.; Harreither, W.; Peterbauer, C. K.; Ludwig, R.; Noll, G. *Biosensors and Bioelectronics* 2010, 25, 1710-1716.
- (39) Kovács, G.; Ortiz, R.; Coman, V.; Harreither, W.; Popescu, I. C.; Ludwig, R.; Gorton, L. *Bioelectrochemistry* 2011, submitted.
- (40) Larsson, T.; Lindgren, A.; Ruzgas, T.; Lindquist, S. E.; Gorton, L. *J. Electroanal. Chem.* 2000, 482, 1-10.
- (41) Lindgren, A.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Baminger, U.; Haltrich, D.; Schulein, M. *J. Electroanal. Chem.* 2001, 496, 76-81.
- (42) Zhang, R.; Fan, Z.; Kasuga, T. *Protein Expression and Purification* 2011, 75, 63-69.
- (43) Lindgren, A.; Larsson, T.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *J. Electroanal. Chem.* 2000, 494, 105-113.
- (44) Stoica, L.; Ruzgas, T.; Ludwig, R.; Haltrich, D.; Gorton, L. *Langmuir* 2006, 22, 10801-10806.
- (45) Nazaruk, E.; Michota, A.; Bukowska, J.; Shleev, S.; Gorton, L.; Bilewicz, R. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2007, 12, 335-344.
- (46) Federico, T.; Wolfgang, H.; Roland, L.; John Justin, G.; Lo, G. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* 2011, 83, 3042-3049.
- (47) Coman, V.; Vaz-Dominguez, C.; Ludwig, R.; Harreither, W.; Haltrich, D.; De Lacey, A. L.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; Shleev, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2008, 10, 6093-6096.
- (48) Tasca, F.; Gorton, L.; Harreither, W.; Haltrich, D.; Ludwig, R.; Noll, G. *J. Phys. Chem. C* 2008, 112, 13668-13673.
- (49) Kovács, G.; Popescu, I. C. *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Seria Chemia* 2011, 56.

- (50) Stoica, L.; Dimcheva, N.; Haltrich, D.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *Biosensors and Bioelectronics* 2005, 20, 2010-2018.
- (51) Kovács, G.; Ortiz, R.; Coman, V.; Harreither, W.; Popescu, I. C.; Ludwig, R.; Gorton, L. *Revue roumaine de chimie* 2012, *submitted*.
- (52) Marcus, R. A.; Sutin, N. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Bioenerg.* 1985, 811, 265-322.
- (53) Gorton, L.; Lindgren, A.; Larsson, T.; Munteanu, F. D.; Ruzgas, T.; Gazaryan, I. *Anal. Chim. Acta* 1999, 400, 91-108.
- (54) Willner, I.; Katz, E. *Angewandte Chemie International Edition* 2000, 39, 1180-1218.
- (55) Armstrong, F. A. *Russian Journal of Electrochemistry* 2002, 38, 49-62.
- (56) Henriksson, G.; Johansson, G.; Pettersson, G. *J. Biotechnol.* 2000, 78, 93-113.
- (57) Cameron, M. D.; Aust, S. D. *Enzyme Microb. Technol.* 2001, 28, 129-138.
- (58) Larsson, T.; Lindgren, A.; Ruzgas, T. *Bioelectrochemistry* 2001, 53, 243-249.
- (59) Stoica, L.; Dimcheva, N.; Haltrich, D.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *Biosens. Bioelectron.* 2005, 20, 2010-2018.
- (60) Stoica, L.; Ludwig, R.; Haltrich, D.; Gorton, L. *Anal. Chem.* 2006, 78, 393-398.
- (61) Coman, V.; Harreither, W.; Ludwig, R.; Haltrich, D.; Gorton, L. *Chem. Anal. (Warsaw)* 2007, 52, 945-960.
- (62) Sarauli, D.; Ludwig, R.; Haltrich, D.; Gorton, L.; Lisdat, F. *Bioelectrochemistry*.
- (63) Haladjian, J.; Bianco, P.; Nunzi, F.; Bruschi, M. *Analytica Chimica Acta* 1994, 289, 15-20.
- (64) Vidaković - Koch, T.; Ivanov, I.; Falk, M.; Shleev, S.; Ruzgas, T.; Sundmacher, K. *Electroanalysis* 2011, 23, 927-930.
- (65) Lindgren, A.; Larsson, T.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2000, 494, 105-113.
- (66) Kovács, G.; Ortiz, R.; Coman, V.; Harreither, W.; Popescu, I. C.; Ludwig, R.; Gorton, L. *Bioelectrochemistry* 2012, *submitted*.

## IV. Lista de publicații

### Articole

1. **Gábor Kovács**, Ionel Cătălin Popescu, *Electrochemical behavior of cellobiose dehydrogenase from Neurospora crassa immobilized on graphite and Au-4-mercaptophenol modified electrodes*, Studia Univ. Babeș-Bolyai, *Chimia*, 56(4), **2011**.
2. **Gábor Kovács**, Roberto Ortiz, Vasile Coman, Wolfgang Harreither, Ionel Cătălin Popescu, Roland Ludwig, Lo Gorton, *Graphite electrodes modified with Neurospora crassa cellobiose dehydrogenase: comparative electrochemical characterization under direct and mediated electron transfer*, *Bioelectrochemistry*, *submitted*, **2011**.
3. **Gábor Kovács**, Vasile Coman, Ionel Cătălin Popescu, Lo Gorton, *Influence of SAM structure on direct electron transfer at Au electrodes modified with cellobiose dehydrogenase from Neurospora crassa*, *Revue Roumaine de Chimie*, *submitted*, **2012**.
4. **Gábor Kovács**, Laura Mureșan, Graziella Liana Turdean, Csaba Bolla, Ionel Cătălin Popescu, *Módosított elektródok a glükóz borból történő kimutatására / Modified electrodes for detection of glucose from wine*, Proceedings of 14<sup>th</sup> International Conference of Chemistry, Ed. Hungarian Technical Society of Transylvania, Cluj-Napoca, **2008**, 70-76.

## Participări la conferințe

1. **Gábor Kovács**, Csaba Bolla, Ionel Cătălin Popescu, Lo Gorton, *Új CDH (Neurospora crassa-ból előállított) enzimmel módosított harmadik generációs bioszenzorok/Third generation biosensor modified with a new CDH from Neurospora Crassa*, 16<sup>th</sup> International Conference of Chemistry, Cluj-Napoca, Romania, 11-14 November **2010**, *prezentare orală*.
2. **Gábor Kovács**, Laura Mureșan, Graziella Turdean, Csaba Bolla, Ionel Cătălin Popescu, *Bioszenzorok a glükóz kimutatására / Biosensors for Detection of Glucose*, 15<sup>th</sup> International Conference of Chemistry, Cluj-Napoca, Romania, 12-15 November **2009**, *prezentare orală*.
3. Laura Mureșan, **Gábor Kovács**, Graziella Turdean, Ionel Cătălin Popescu, *Détection du Glucose dans le Vin a l'aide d'un Biocapteur a Glucose Oxydase*, Journées d'Electrochimie, Sinaia, Romania, 6-10 July **2009**, *poster*.
4. **Gábor Kovács**, Laura Mureșan, Graziella Turdean, Ionel Cătălin Popescu, Csaba Bolla, *Módosított elektródok a glükóz borból történő kimutatására / Modified electrodes for detection of glucose from wine*, 14th International Conference of Chemistry, Cluj-Napoca, Romania, 13-15 November **2008**, *prezentare orală*.
5. Laura Mureșan, **Gábor Kovács**, Graziella Turdean, Ionel Cătălin Popescu, *Biocapteur Amperometrique Bienzymatique Pour la Detection de la Glucose Dans des Vins*, Le 2ème Congrès des Sciences Analytiques, Casablanca, Morocco, 29-31 October **2008**, *poster*.