

# MEDIJATORI PRIJENOSA ELEKTRONA

- redoks centar – nalazi se u dubini proteinskog lanca
- - nema električnog kontakta između redoks centra i površine elektrode
- - tanki proteinski lanac stvara kinetičku barijeru prijelazu elektrona (tuneliranju elektrona)

# Marcusova- teorija o prijenosu elektrona

Marcusova teorija –prijelaz elektrona u biološkim sustavima

$$k_{\text{et}} \propto e^{[-\beta(d-d_0)]} e^{\left[ \frac{-(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4RT\lambda} \right]}$$

$\Delta G^0, \lambda$  – slobodna energija i energija reorganizacije elektronskog prijelaza (eV)

- $d_0, d$ - Wan der Waalsov razmak između donorskog i akceptorskog centra elektrona (Å)
- $k_{\text{et}}$ - (electron-transfer rate constant) konstanta prijelaza elektrona ( $M^{-1}s^{-1}$ )
- $\beta$  -konstanta razmaka propadanja (Å<sup>-1</sup>)
- $0.4 < \beta < 1.3 \text{ Å}^{-1}$
- koeficijent proporcionalnost =  $10^{13}$

## Konstanta prijelaza elektrona ovisi o :

- Standardnom redukcijском potencijalu medijatora
  - pH vrijednosti
  - Ionskoj jakosti otopine
  - Utjecaju interferenata
  - Elektrostatskim interakcijama (međudjelovanje) reaktanta, medijatora i enzima.
- 
- Kod biosenzora se zahtjevaju visoke konstante prijelaza elektrona
  - za elektronsko tuneliranje od 8-17Å ,  $k_{et} \approx 1$  do  $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

# SVOJSTVA MEDIJATORA ELEKTRONA

- **DOBRA TOPLJIVOST U VODENIM I NEVODENIM OTAPALIMA**
- **REVERZIBILNO ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE**
- **KEMIJSKA STABILNOST OKSIDACIJSKOG I REDUKCIJSKOG OBLIKA MEDIJATORA**
- **NISKI REDUKCIJSKI REDOKS POTENCIJAL-SPREČAVANJE OKSIDACIJE POTENCIJALNIH INTERFERENATA**
- **KEMIJSKA INAKTIVNOST PREMA SUPSTRATU**
- **AKTIVAN U ŠIROKOM pH PODRUČJU**
- **NEOSJETLJIVOST NA PROMJENE IONSKE JAKOSTI OTOPINA**
- **EFIKASNA I BRZA REAKCIJA S ENZIMSKIM REDOKS CENTROM**
- **EFIKASNO PRIMANJE I PREDAJA ELEKTRONA NA ELEKTRODNOJ POVRŠINI**

# REDOKS POTENCIJAL MEDIJATORA ELEKTRONA

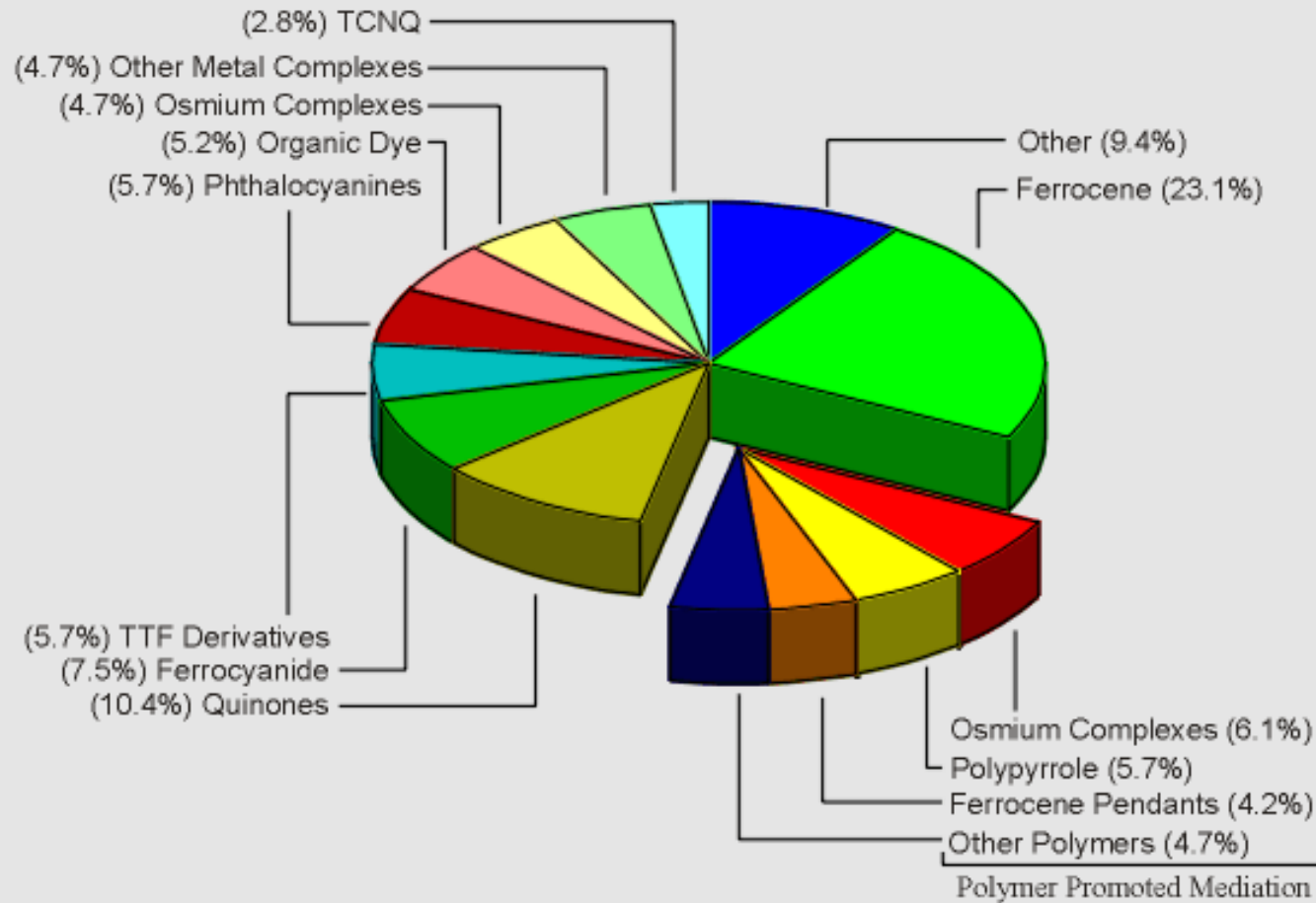
- **OKSIDACIJSKA BIOKATALIZA**

- $E^0_{\text{MEDIJATORA}} > E^0_{\text{ENZIMA}}$

- **REDUKCIJSKA BIOKATALIZA**

- $E^0_{\text{MEDIJATORA}} < E^0_{\text{ENZIMA}}$

# Mediators Used in Enzyme Electrodes

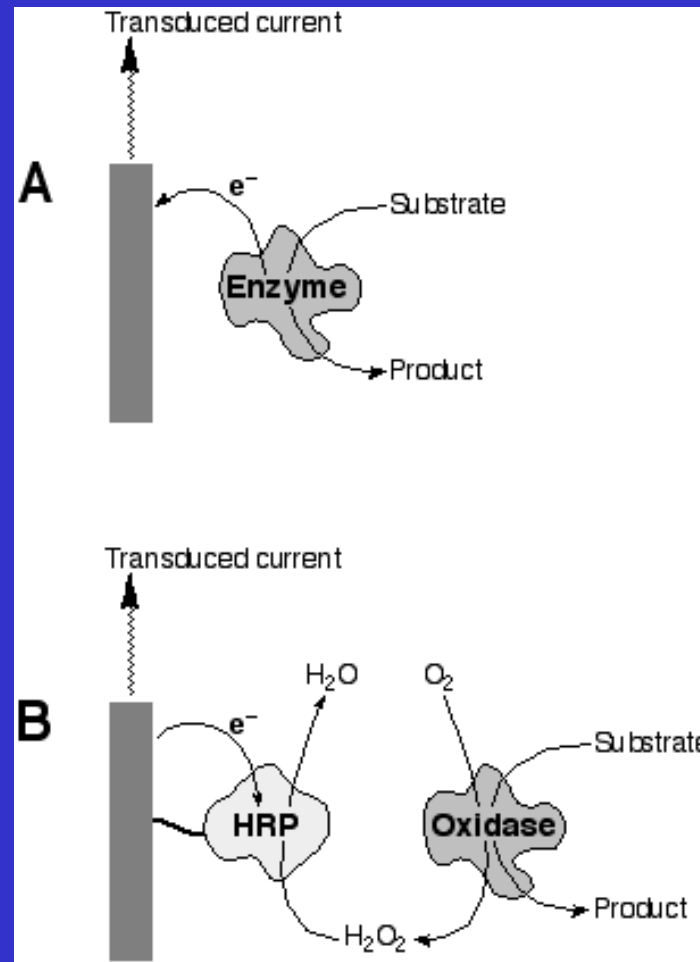


# PRIMJENA MEDIJATORA ELEKTRONA U IZVEDBAMA BIOSENZORA

- **Direktni kontakt površine elektrode i enzimskog redoks centra - biosenzori bez medijatora elektrona**
- **Elektronski prijenos elektrona ostvaren difuzijom medijatora**
- **Koimobilizacija enzima i medijatora u polimernom sloju i unutar anorganske matrice**
- **Električki kontakt enzima i medijatora unutar sol-gel matrice**
- **Električki kontakt enzima i medijatora unutar grafitne paste**

# Direktni kontakt površine elektrode i enzimskog redoks centra - biosenzori bez medijatora elektrona

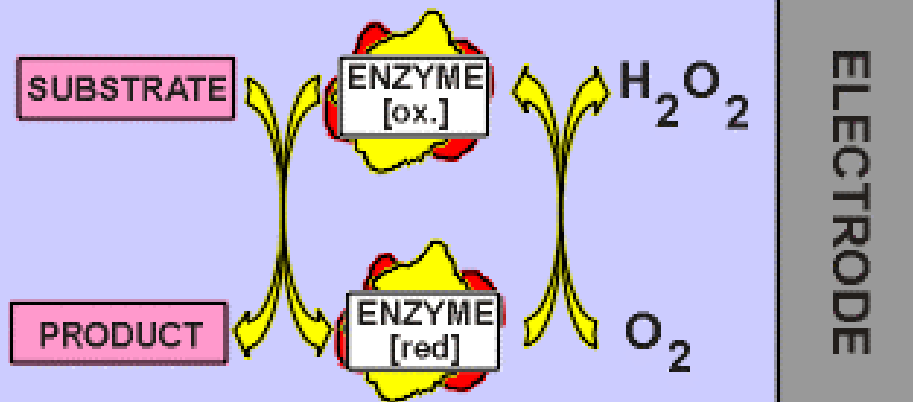
- *elektroredukcija  $O_2$  i  $H_2O_2$  biokatalizirana lakazom i peroksidazom*





# Biokataliza s peroksidazom kao direktnim prijenosnikom elektrona

- **ENZIM:**
  - - peroksidaza
  - - citokrom c peroksidaza
  - - laktoperoksidaza
  - - kloroperoksidaza
- **Osnovno svojstvo:**
  - 42% površine enzima leži na površini elektrode, HEM je u kontaktu s elektrodom



Oxygen Electrode  
*or*  
Peroxide Oxidation

- **MOLEKULARNI KISIK:**

- **kisik služi kao elektron akceptor za oksidaciju supstrata**

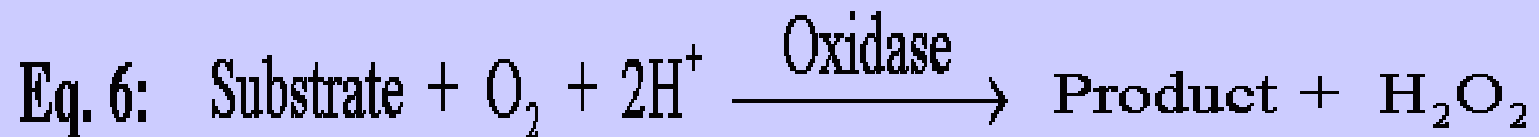
- **Radius GO = 43 Å – nemoguć direktan kontakt s površinom elektrode**

- **Upotreba biosenzori s enzimima:**

- **glukoza oksidaza**
- **laktat oksidaza**
- **alkohol oksidaza**
- **kolesterol oksidaza**
- **ksantin oksidaza**
- **katehol oksidaza**

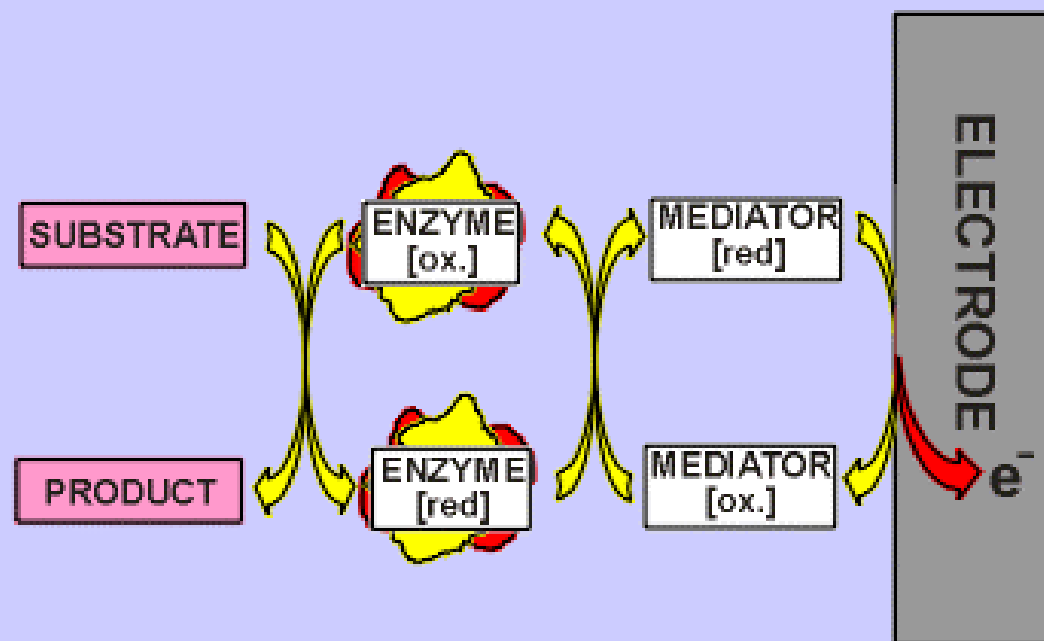
# Reakcije s oksidazom i O<sub>2</sub>

- Mjeri se: -smanjenje koncentracije kisika u uzorku
- redukcija ili oksidacija vodikovog peroksida
- direktni kontakt redoks centra enzima i površine elektrode može se ostvariti vodljivim nanočesticama-najnovije izvedbe biosenzora

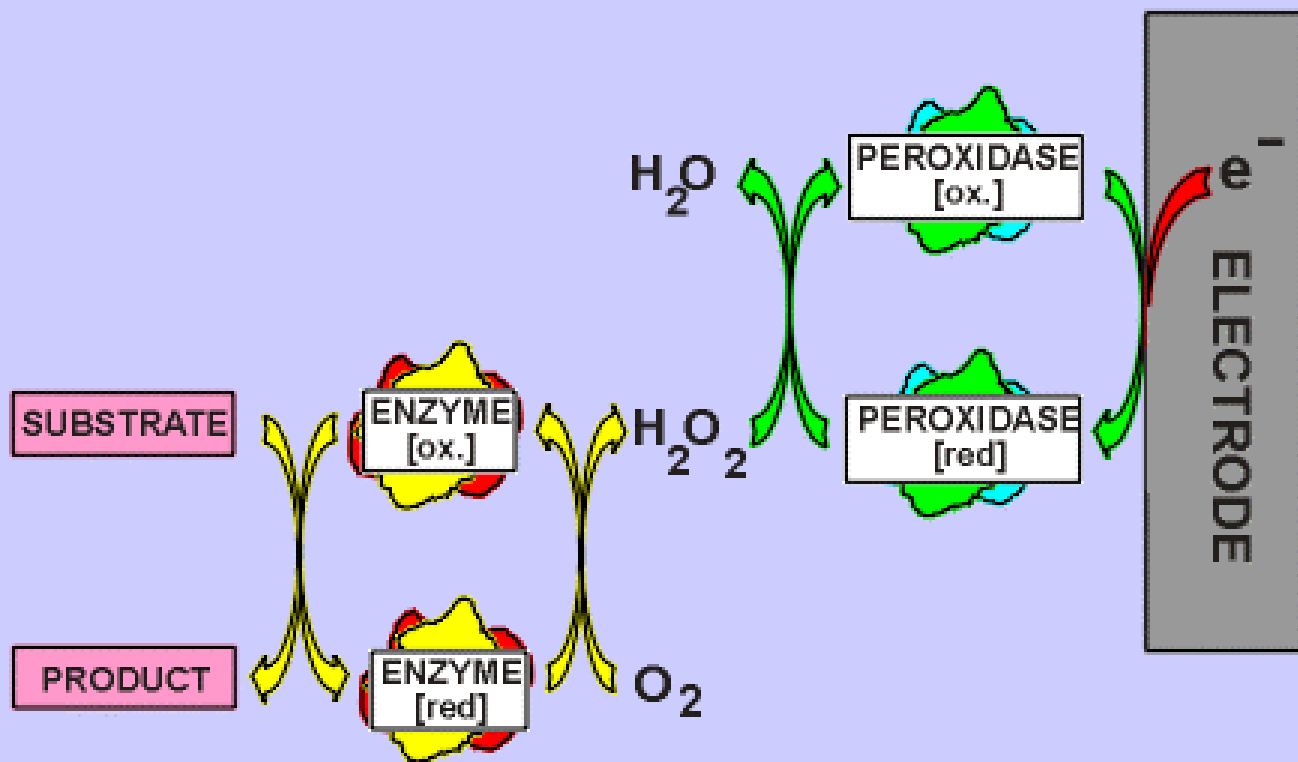


# BIENZIMSKI SUSTAV PEROKSIDAZA-OKSIDAZA

- -direktni kontakt HRP s elektrodom
- Poznati biosenzori:
- peroksidaza +
  - glukoza oksidaza
  - alkohol oksidaza
  - amino kiselina oksidaza
  - kolin oksidaza



Mediated Enzyme



Peroxidase Bienzyme

# ELEKTROKEMIJSKI INAKTIVNI SPOJEVI MALE MOLEKULARNE MASE

- Promotori: vezivanje redoks centra enzima (citokrom c) i površine elektrode
- - vežu se na površinu elektrode
- - tiolima
- - disulfidnim skupinama
- - amino kiselinama
- - imidazolima
- - jodidom
- - tiofenom

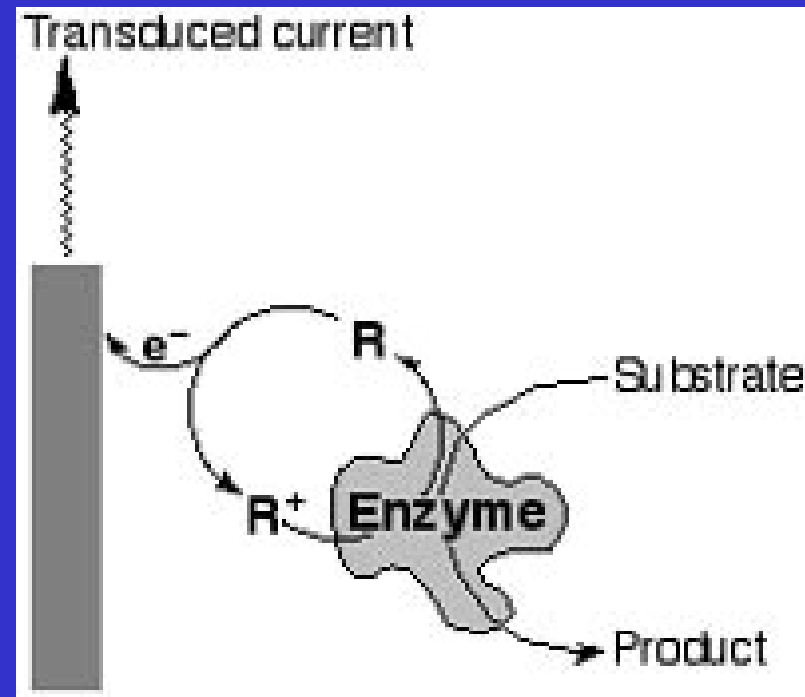


# ELEKTRONSKI TRANSFER OSTVAREN DUFUZIJOM MEDIJATORA

- **Medijator difundira od redoks centra do elektrode**
- **medijator je otopljen unutar enzimskog sloja**
- **imobiliziran u monosloju ili multi sloju na elektrodi**
- **uklopljen u poroznoj matrici**
- **Funkcionalnost biosenzora: - postiže se odabirom hidrofobih/hidrofilnih svojstava medijatora i enzima**
-

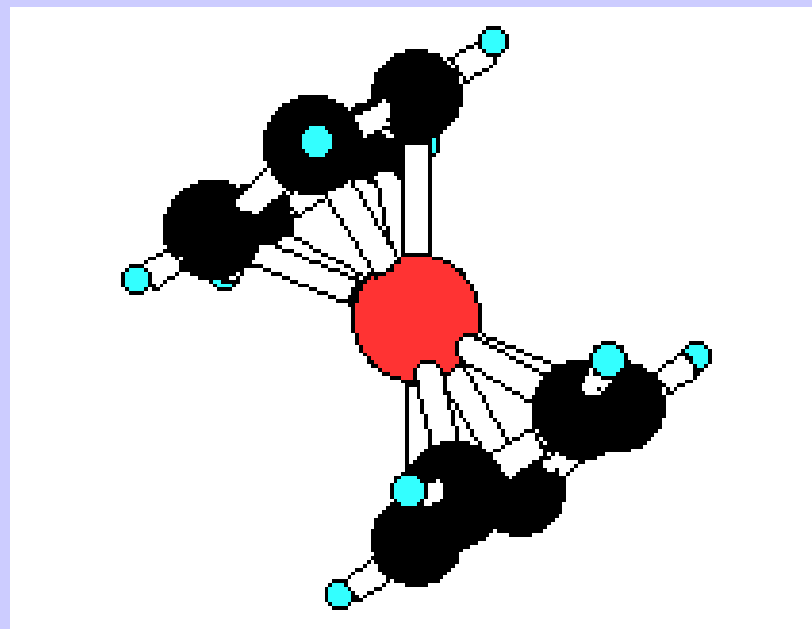
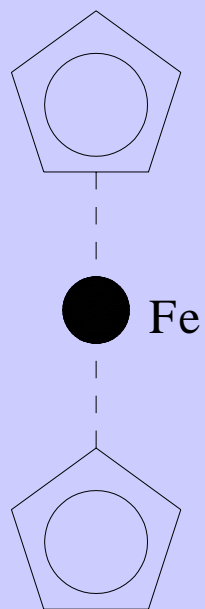
# Difuzijski medijatori elektrona u biosenzorima

- Feroceni
- Organske boje
- Heksacianoferati
- Ru-kompleksi
- Ostali



# FEROCEN

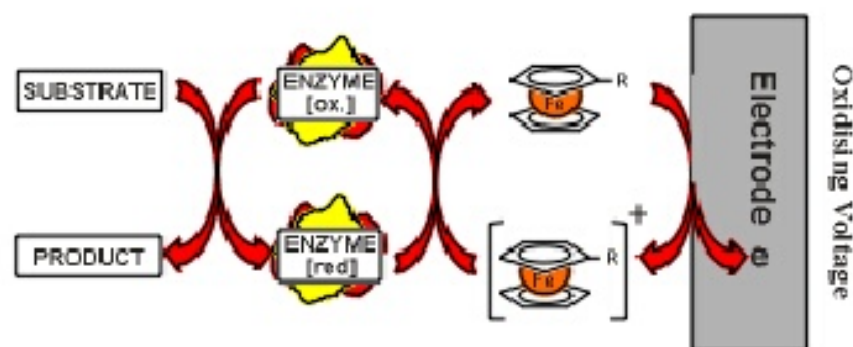
- Diciklopentadienilželjezo
- Kordinacijski broj 2 (10 veza)



<b>Enzyme</b>	<b>Mediator</b>	<b>Mediator redox potential / mV (vs. SCE)</b>
<u><b>Glucose oxidase</b></u> EC 1.1.3.4. from <i>Aspergillus niger</i>	1,4-benzoquinone	39
	1,1-dimethylferrocene	100
	ferrocene carboxylic acid	275
	phenazine methosulphate	-161
	tetrathiofulvalene	300
	tetracyanoquinodimethane	127
<u><b>Xanthine oxidase</b></u> EC 1.1.3.22. from buttermilk	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$	180
<u><b>Cholesterol oxidase</b></u> EC 1.1.3.6. from <i>Pseudomonas sp.</i>	ferrocene carboxylic acid	275
<u><b>Hydrogen hydrogenase</b></u> EC 1.12.1.2	dimethylviologen	-681
<u><b>Peroxidase</b></u> EC 1.11.1.7. from horseradish	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$	180
<u><b>Lactate dehydrogenase (cyt.b<sub>2</sub>)</b></u> EC 1.1.2.3. from yeast	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$	180
<u><b>Glucose dehydrogenase</b></u> EC 1.1.99.17. from <i>A. Calcoaceticus</i>	1,1'-dimethylferrocene	100
	phenazine ethosulfate	-172
<u><b>NADH dehydrogenase</b></u> EC 1.6.99.3 from <i>Bacillus stearothermophilus</i>	ferrocenylmethanol	185
	ferrocenecarboxylic acid	

# Ferroceni - difuzijski medijatori elektrona

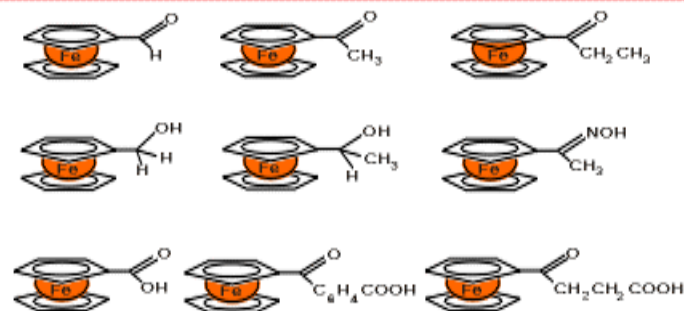
The ability of ferrocene derivatives to shuttle electrons between enzymes and electrodes has been utilised in the construction of biosensors as shown below



Mediated Enzyme Electrode

In order to successfully mediate an enzyme reaction a potential mediator must possess the following attributes

Low Redox Potential  
Reversible Electrochemistry  
Fast Electron Transfer Kinetics  
Good Stability



Derivatives Prepared From Ferrocene

## Electrochemical Properties of Selected Ferrocene Derivatives in pH 7.4 Phosphate Buffer



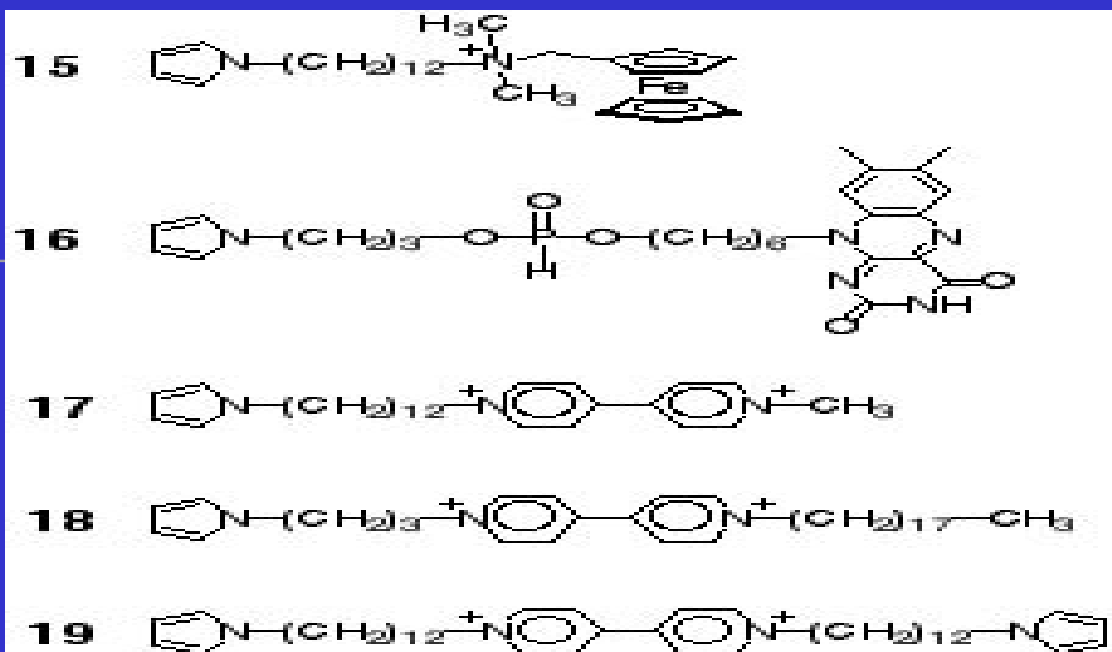
R =	$E' / \text{mV}$ vs Ag/AgCl	$\Delta E_p / \text{mV}$ at 50 mV/s	$I_a/I_c$ at 50 mV/s	$D_{ox} /$ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ $10^{-6}$	$D_{red} /$ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ $10^{-6}$	$k_s /$ $\text{cm s}^{-1}$
CHO	518	133	0.32	0.29	0.85	1.06
COCH <sub>3</sub>	487	67	0.84	0.59	0.84	1.08
COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	475	71	0.94	0.53	1.1	0.63
COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	458	73	0.84	0.19	0.39	0.75
COCH <sub>2</sub> H <sub>2</sub> COOH	455	71	0.77	0.54	0.94	0.91
C(NO <sub>2</sub> )CH <sub>3</sub>	325	67	0.95	0.29	0.48	1.25
COOH	309	66	0.97	0.93	1.2	0.99
CH <sub>2</sub> OH	216	64	1.00	1.5	1.8	2.43
CH(OH)CH <sub>3</sub>	211	64	1.01	1.4	1.6	2.32

## **Enzimi imobilizirani u anorganskim i polimernim matricama**

- **Vodljivi polimeri (polipirol)-direktan kontakt redoks centra i elektrode-slabo osjetljivi senzori**
- **Dodatak difuzijskog medijatora- pospješuje elektronsku komunikaciju**
- **Sol-gel imobilizacije**
- **Efikasnost difuzijskog medijatora limitirana ispiranjem iz imobiliziranog sloja- polimerna poroznost**
- **Najčešći medijatori: benzokinon, hidrokinonsulfonat, feroceni, heksacianoferati**

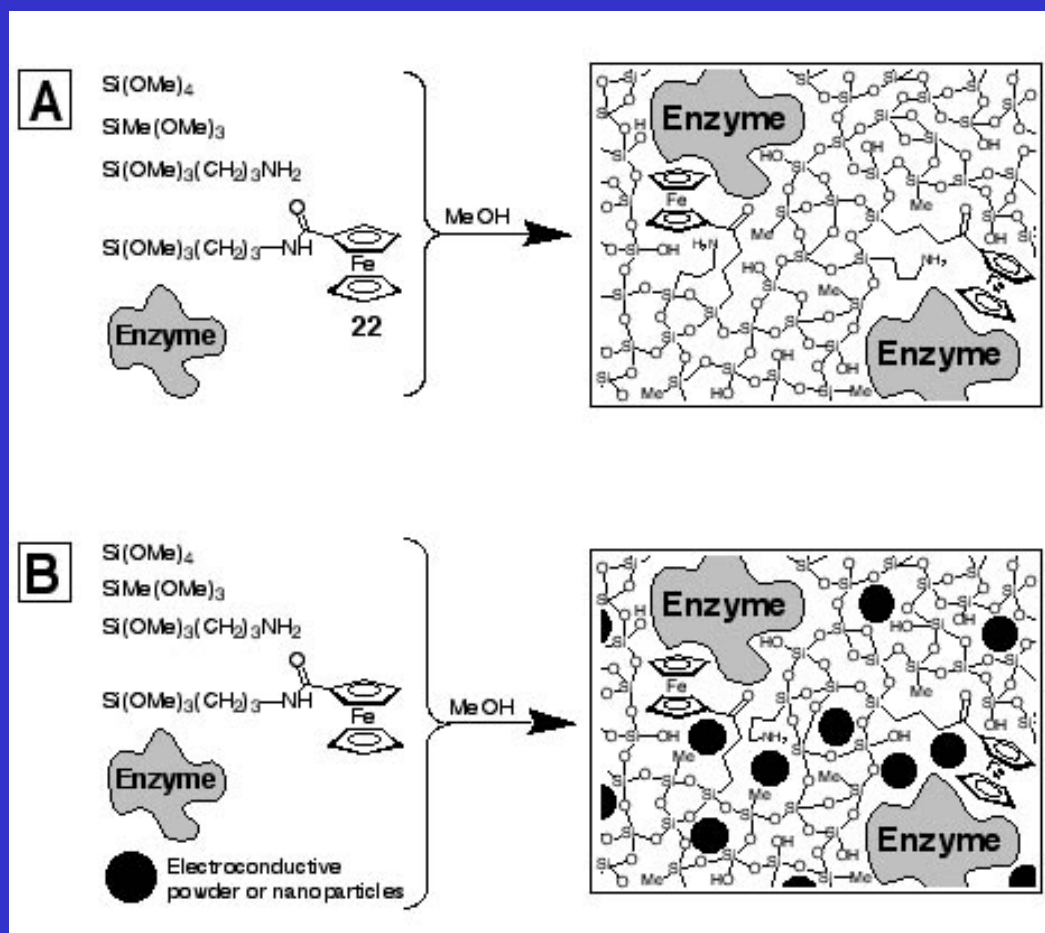
## Koimobilizacija enzima i medijatora u polimernom sloju i unutar anorganske matrice

- Električka veza: ostvaruje se koimobilizacijom enzima i medijatora
- najčešće: ionskoizmjenjivačko svojstvo polipirola i fercenova karboksilata





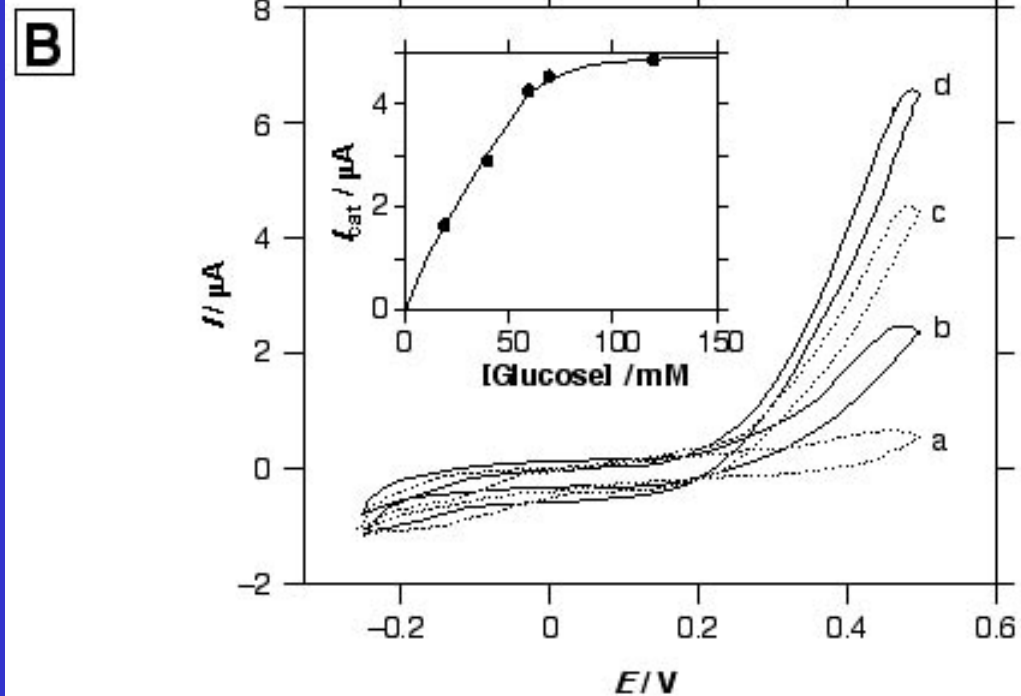
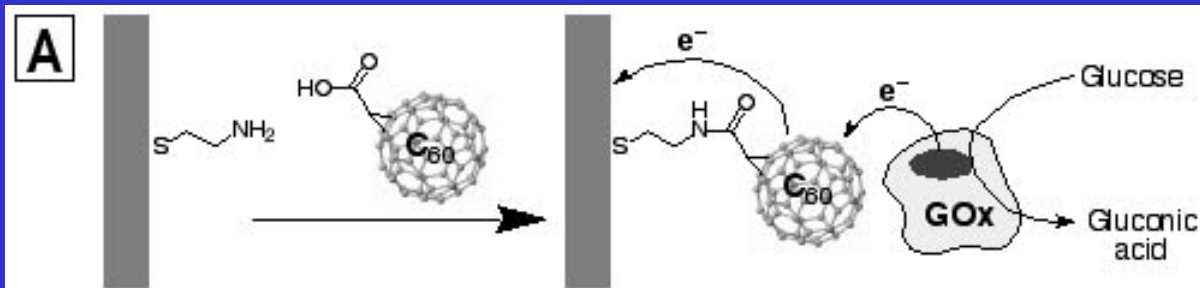
# Električki kontakt enzima i medijatora unutar sol-gel matrice



## Električki kontakt enzima i medijatora unutar grafitne paste

- najčešći medijatori:
  - -feroceni
  - -benzokinon
  - -tetratiofulven
  - -kobalt ftalocianin
  - -metilensko zeleno
  - - bakrov heksacianoferat

# ELEKTRIČKI KONTAKT MEDIJATOROM FUNKCIONALIZIRANE ELEKTRODE



# ELEKTRIČKI KONTAKT MEDIJATOROM MODIFICIRANOG ENZIMA

