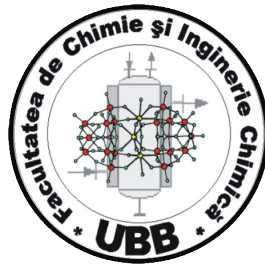


FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ
UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI, CLUJ-NAPOCA



☞ Rezumatul tezei de doctorat ☞

SILAI (căs. KILLYÉNI) Catalina Anikó

Electrozi modificați cu proprietăți de recunoaștere moleculară

Comisie:

Președinte:

Prof. Liana Maria MUREȘAN, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

Conducător științific:

Prof. Ionel Cătălin POPESCU

Referenți:

Prof. Camellia BALA, Universitatea din București

Prof. Lo GORTON, Universitatea din Lund, Sweden

Conf. Graziella TURDEAN, Univeritatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

Susținere: 26 August 2013

CUPRINS

<i>Cuvinte cheie</i>	2
1. Întroducere	3
2. Obiectivele principale ale tezei	4
3. Efectul deglicozilării asupra activității electrocatalitice mediată a AmPDH conectată electric prin Os-RP	5
3.1. Optimizarea bioelectrozilor.....	5
3.2. Efectul deglicozilării asupra oxidării electrocatalitice a glucozei	7
3.3. Stabilitatea bioelectrozilor.....	8
3.4. Selectivitatea bioelectrozilor	9
3.5. Descompunerea enzimei deglicozilate AmPDH și influența condițiilor de depozitare.	10
3.5.1. Urmărirea descompunerii enzimei deglicozilate prin SDS-PAGE.....	10
3.5.2. Determinarea spectrofotometrică a activității enzimei	11
3.5.3. Oxidarea electrocatalitică a glucozei pe electrozi modificați cu gPDH, dgPDH și sdgPDH	11
4. Studiul cinetic al adsorbției S-acetil-clix[8]arenei și reorganizării filmului format pe suprafața Au policristalin	13
4.1. Măsurători de voltametrie ciclică	13
4.2. Măsurători de spectroscopie de impedanță electrochimică	14
4.2.1. Adsorbția S-Calix.....	14
4.2.2. Procesul de reorganizare a monostratului de S-Calix	18
5. Concluzii generale	23
6. Activitatea științifică	24
6.1. Articole.....	24
6.2. Participări la conferințe.....	25
7. Referințe (Selective)	26

Cuvinte cheie

Piranoz dehidrogenază, polimer redox cu osmiu, transfer mediat de electroni, deglicozilarea enzimei, S-calix[8]arenă, cinetica adsorbției, straturi auto-asamblate

1. ÎNTRUDUCERE

De-a lungul secolului trecut, mai multe studii au fost publicate cu scopul de a elabora o metodă eficientă și simplă pentru funcționalizarea suprafețelor metalice cu diverse molecule. Pe de altă parte utilizarea enzimelor vizând creșterea selectivității electrozilor modificați este bine stabilită, dar mai există încă multe provocări și în acest domeniu (Frew *et al.* 1987)

Piranoz dehidrogenază (PDH; CE 1.1.99.29) este o oxidoreductază care este produsă într-un grup restrâns de ciuperci. PDH poartă un centru activ (flavin-adenin-dinucleotidă, FAD) cu legătură covalentă (Sygmund *et al.* 2008) (Figura 1).

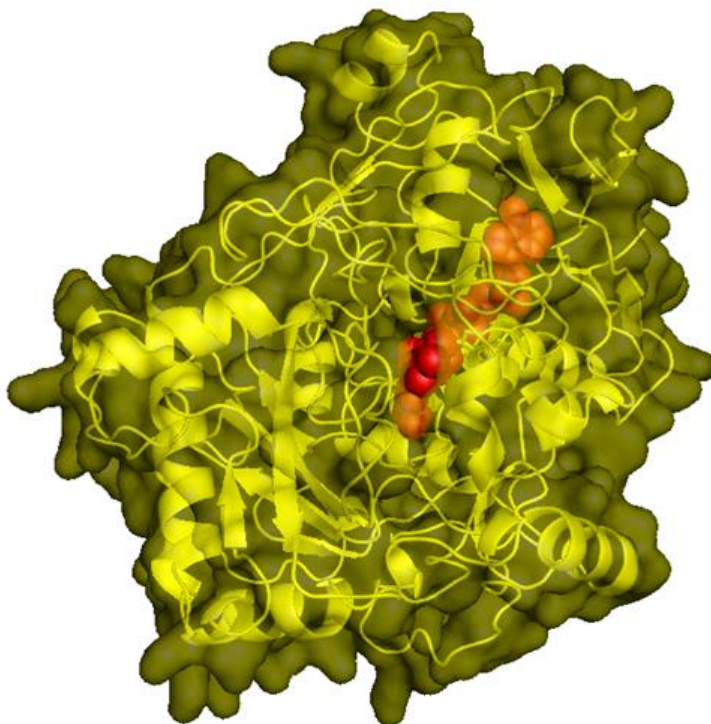


Figura 1. PDH izolată din *Agaricus meleagris* (*Am*), în roșu centrul active al enzimei.

În funcție de sursa de enzimă și substrat, PDH poate cataliza mono- și dioxidarea unor varietăți de substraturi în poziția C-2, C-3 și C-2,3, respectiv C-3, 4 (Volc *et al.* 1998; Volc *et al.* 2002; Peterbauer *et al.* 2010), cu o eficiență catalitică asemănătoare, ceea ce face enzima atractivă pentru aplicarea ei în chimia analitică, producția industrială de zaharuri rare și construirea de pile galvanice enzimatică (EBFC).

Glicozilarea este una din cele mai frecvente modificări ale proteinelor. Mai mult de 50% din proteine sunt glicozilate. Eliminarea învelișului de glicani din molecula enzimei, poate conduce la o scădere a distanței dintre centrul redox al enzimei și suprafața electrodului (Lindgren *et al.* 1999; Presnova *et al.* 2000; Ferapontova *et al.* 2001; Prévotau *et al.* 2010), și în conformitate cu ecuația Marcus (Marcus 1964), acesta poate facilita transferul direct de electroni.

Masa moleculară (MW) a enzimei PDH izolată din *Agaricus meleagris* (AmPDH) exprimată în *P. pastoris* a fost determinată a fi ~93 kDa, conținând ~30% glicani, în timp ce MW a enzimei native este ~66.5 kDa însemnând doar 7% glicani.

Deglicozilarea unei enzime poate oferi noi posibilități pentru creșterea eficienței biocatalitice a bioelectrodului, așa cum s-a observat anterior în transfer direct de electroni (Lindgren *et al.* 1999; Presnova *et al.* 2000; Ferapontova *et al.* 2001; Ferapontova *et al.* 2005; PrévotEAU *et al.* 2010; Ortiz *et al.* 2012), dar și transfer mediat de electroni (Fraser *et al.* 1992; Courjean *et al.* 2010; PrévotEAU *et al.* 2010).

Printre diferitele metode de realizare a interfețelor electrochimice modificate cu molecule, monostraturile formate prin auto-asamblare s-au dovedit a avea o eficiență remarcabilă și o mare versatilitate (Buck 2009). Prin urmare, un număr mare de studii fundamentale și aplicative au fost publicate vizând exploatarea structurilor auto-asamblate.

Calixarenele sunt compuși macrociclici. Ele există în formă de cupă având o parte superioară, una inferioară respectiv un spațiu inelar central. Calixarenele pot fi utilizate pentru realizarea unor senzori electrochimici, cu scopul de a detecta specii ionice și moleculare de interes biologic sau pentru protecția mediului. Fiind cunoscută marea afinitate dintre sulf și aur, s-a presupus faptul că prezența sulfurii în compușii calixarenici poate asigura dezvoltarea unor straturi auto-asamblate ale acestor compuși pe o suprafață de Au.

În lucrarea de față sunt descrise două abordări pentru modificarea electrozilor:

(i) Prima se bazează pe imobilizarea enzimei deglicozilate (dgPDH) cu scopul de a îmbunătăți proprietățile biocatalitice ale bioelectrodului modificat;

(ii) A doua are la bază modificarea prin auto-asamblare, rezultată prin absorbția S-calix[8]arenei pe suprafața electrodului de Au, în scopul de a obține o interfață inteligentă, capabilă să recunoască diverse specii chimice.

Teza este structurată în două părți principale: o descriere bibliografică și contribuțiile originale. În partea bibliografică următoarele teme sunt evidențiate: biosenzori, transferul de electroni între centrul redox al enzimei și electrozi, generalități despre enzima PDH și proprietățile sale moleculare, mono-straturi auto-asamblate (SAM) pe Au și calixarene, precum și o scurtă descriere a metodelor folosite pentru investigarea experimentală. Partea originală este structurată pe două capitole distincte: prima parte cuprinde investigarea efectului deglicozilării PDH asupra electroactivității acesteia, în timp ce, în a doua parte, este prezentat un studiu cinetic al adsorbției unui derivat S-calix[8]arenic pe Au.

2. OBIECTIVELE PRINCIPALE ALE TEZEI

Există multe cercetări de-a lungul ultimelor trei decenii care încearcă să “risipească ceața din domeniul” electrozilor modificați. Lucrarea de față are scopul de a:

(i) Caracteriza și de a dezvolta un nou bioelectrod cu proprietăți biocatalitice îmbunătățite, bazate pe deglicozilarea enzimei PDH;

(ii) Investiga procesul de reorganizare observat în cazul unui SAM, construit prin adsorbția unui derivat S-Calix[8]arenic pe suprafața Au policristalin.

3. EFECTUL DEGLICOZILĂRII ASUPRA ACTIVITĂȚII ELECTROCATALITICE MEDIATĂ A AMPDH CONECTATĂ ELECTRIC PRIN OS-RP

Efectul deglicozilării asupra activității bioelectrocatalitice a PDH a fost investigată prin efectuarea imobilizării enzimelor gPDH sau dgPDH pe suprafața electrodului de grafit (Killyeni *et al.* 2012; Killyéni *et al.* 2013). Imobilizarea enzimei a fost realizată prin simpla adsorbție a acesteia, dizolvată într-un amestec care conține Os-RP și un agent de reticulare (PEGDGE).

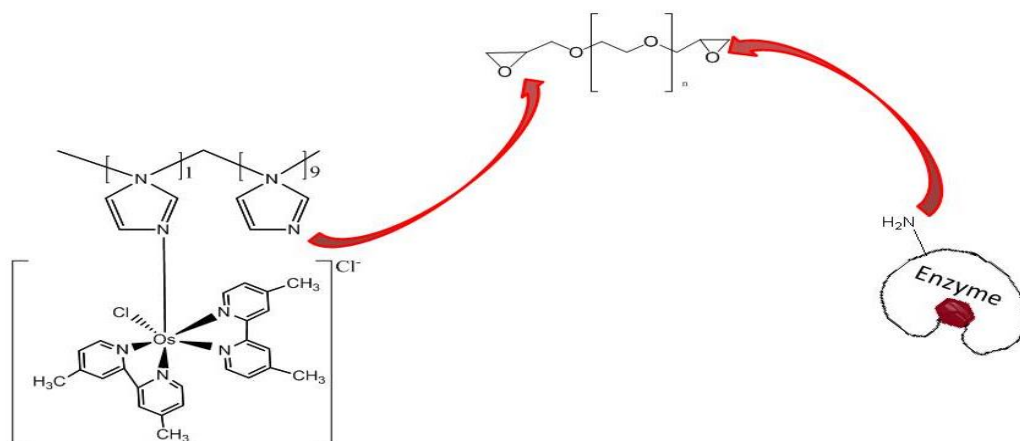


Figura 2. Prezentarea schematică a reacției de reticulare a Os-RPII și enzimă folosind PEGDGE ca agent de reticulare.

Reacția de reticulare este prezentată în Figura 2. PEGDGE este solubil în apă și poate să se lege de amine primare, secundare, și terțiare, precum și de azot heterociclic. În scopul de a efectua o comparație fiabilă, cantități egale (în termeni de activitate) ale gPDH și dgPDH au fost depuse pe suprafața electrodului.

3.1. Optimizarea bioelectrozilor

Răspunsul unui bioelectrod este puternic influențat de câțiva parametri-cheie de lucru, dintre care potențialul aplicat, pH, debitul electrolitului purtător și încărcarea cu enzimă a bioelectrodului joacă un rol important. Pentru a avea un sistem eficient este necesară optimizarea acestor parametri-cheie.

i. Polimerul redox cu osmiu

Pentru conectarea electrică a centrului activ al *Am*PDH la electrodul de grafit au fost testați doi polimeri redox cu Os, solubili în apă (Os-RP) având diferite potențiale formale redox standard.

Răspunsul amperometric maxim înregistrat la electrodul G/gPDH-(Os-RPII) a fost de aproximativ 3,5 ori mai mare decât cel măsurat pentru electrodul G/gPDH-(Os-RPI). Pentru a avea un transfer eficient de electroni Os-RPII, având $E^{\circ'}$ de +32 mV *vs.* Ag|AgCl, 0.1M KCl, a fost ales cu scopul de a conecta electric centrul activ al enzimei de electrod.

ii. Debit

AmPDH este capabilă de mono- respectiv dioxidarea D-glucozei, în primul pas la 2-dehidro-D-glucoză sau 3-dehidro-D-glucoză și în continuare la 2,3-didehidro-D-glucoză (Peterbauer *et al.* 2010). Prin urmare, ținând cont de acest comportament complex al enzimei PDH, a fost interesant să se evalueze influența debitului electrolitului purtător (domeniul studiat a fost 0.1 -1.8 ml / min) asupra răspunsului bioelectrodului. Cum era de așteptat pentru măsurători tranzitorii, creșterea debitului conduce la o scădere semnificativă a curentului.

În continuare toate măsurătorile s-au efectuat la un debit de 0.45 mL/min. Pentru această valoare a debitului, ambii biosenzori au arătat o scădere minoră a răspunsului (mai mică de 10%).

iii. Potențial aplicat

Pentru un potențial aplicat mai mare de +200 mV vs. Ag|AgCl, 0.1 M KCl, în cazul bioelectrozilor investigați, răspunsul se plafonează (Figura 4). Prin urmare, cu scopul de a realiza cea mai mare sensibilitate la cea mai mică valoare a potențialului aplicat, un potențial aplicat de +200 mV vs. Ag|AgCl, s-a ales 0.1M KCl pentru toate măsurătorile ulterioare.

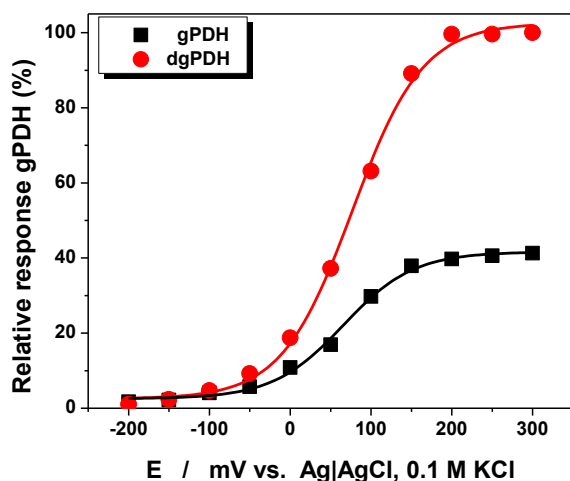


Figura 3. Influența potențialului aplicat asupra răspunsului amperometric al bioelectrozilor G/gPDH-(Os-RPII) and G/dgPDH-(Os-RPII).

Condiții experimentale: încărcare enzimatică, 17,6 Ucm⁻²; 10mg/mL Os-RPII; electrolit de fond, 50 mM PB conținând 137 mM NaCl (pH 7.4); probă injectată, 50 μ L de 5 mM glucoză debit, 0.45 mL/min.

iv. Încărcarea enzimatică

În scopul de a optimiza cantitatea de enzimă imobilizată, electrozii modificați *AmPDH*-(Os-RPII) au fost realizați cu diferite încărcări ale enzimei. Pentru ambii electrozi modificați pentru o încărcare enzimatică de 23.6 Ucm⁻² a fost înregistrat un curent maxim. Pentru o încărcare enzimatică mai mare, răspunsul acestora a fost aproape la fel, în timp ce pentru încărcări enzimatică mai mici curentul înregistrat a fost semnificativ mai mic.

În consecință, indiferent de tipul de *AmPDH* imobilizată pe suprafața electrodului de grafit, o încărcare enzimatică de 23.6 Ucm⁻² a fost considerată ca valoare optimă.

v. pH utilizat

O mică diferență a fost observată între valorile corespunzătoare pH-ului optim pentru gPDH (pH 9) și dgPDH (pH = 9,5). Cu toate acestea, toate experimentele

ulterioare au fost efectuate la o valoare pH corespunzătoare condițiilor fiziologice (pH = 7.4).

3.2. Efectul deglicozilării asupra oxidării electrocatalitice a glucozei

În scopul de a evalua parametrii cinetice ale electrozilor modificați cu *Amp*PDH atât electrozi modificați cu gPDH, cât și dgPDH au fost investigați într-un sistem FI, iar curbele de calibrare obținute pentru glucoză sunt prezentate în Figura 4 A. Parametrii cinetici corespunzători bioelectrozilor investigați au fost estimați prin fitarea curbelor de calibrare pentru glucoză cu ecuația Michaelis-Menten (Tabel 1).

Tabel 1. Compararea parametrilor cinetici ai electrozilor modificați cu gPDH și dgPDH utilizând glucoză ca și substrat. (condiții experimentale Figura 4; 10 mg/mL *Os-RPII*)

Bioelectrod	j_{\max} (μAcm^{-2})	K_M^{app} (mM)	DL* (mM)	Domeniul linear (mM)	Electrozi testați
G/gPDH-(<i>Os-RPII</i>)	80.9 ± 1.9	7.5 ± 0.3	0.01	0.1-1	5
G/dgPDH-(<i>Os-RPII</i>)	146.6 ± 2.6	2.4 ± 0.1	0.003	0.1-1	5

* estimată pentru un raport între semnal/zgomot de 3.

Bioelectrodul bazat pe dgPDH a arătat o densitate de curent catalitică semnificativ mai mare decât cea observată pentru gPDH. Aceasta constatare dovedește activitatea bioelectrocatalitică mai mare a enzimei deglicozilate.

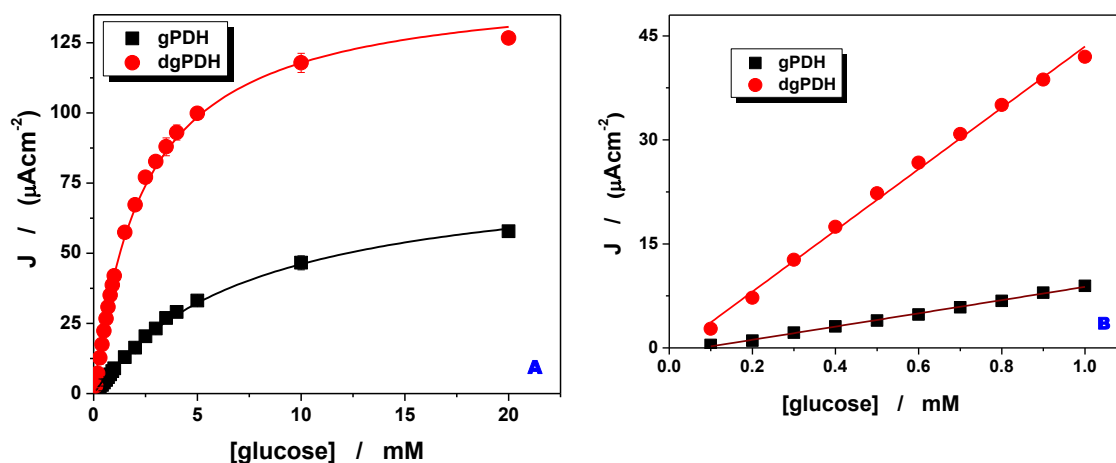


Figura 4 (A) curbele de calibrare și (B) domeniul linear corespunzătoare electrozilor modificați G/gPDH-(*Os-RPII*) și G/dgPDH-(*Os-RPII*) utilizând glucoză ca substrat.

Condiții experimentale: potențial aplicat, +200 mV vs. Ag/AgCl, 0.1M KCl; încărcare enzimatică, 17.6 Ucm^{-2} ; 10 mg/mL *Os-RPII*; electrolit de fond, 50 mM PB conținând 137 mM NaCl (pH 7.4); debit, 0.45 mL/min.

În același timp, în cazul bioelectrodului modificat cu dgPDH constanta aparentă Michaelis are o valoare mai mică comparativ cu cea estimată pentru bioelectrodul modificat cu enzima glicozilată. Acest comportament sugerează fie:

- (i) o mai mare afinitate între enzimă-substrat pentru dgPDH,
- (ii) o mai mare permeabilitate pentru glucoză prin matricea enzimei deglicozilată asociată cu o accesibilitate mai mare a Os-RP pentru enzima deglicozilată.

Pentru ambii electrozi modificați domeniul linear a fost practic aceeași, de la 0.1 până la 1 mM glucoză (Figura 3 B), în timp ce limitele de detecție au fost semnificativ diferite: 0.01 și 0.003 mM pentru *Am*PDH glicozilată respectiv deglicozilată.

Panta domeniului linear pentru bioelectrodul G/dgPDH-(Os-RPII) [$(43.6 \pm 1.1) \mu\text{A}/(\text{mM}/\text{cm}^2)$] a fost aproximativ de 4.5 ori mai mare decât cea pentru bioelectrodul G/gPDH-(Os-RPII) [$(9.74 \pm 0.16) \mu\text{A}/(\text{mM}/\text{cm}^2)$].

Pentru aceeași încărcare enzimatică (exprimată în Ucm^{-2}), bioelectrodul G/dgPDH-(Os-RPII) prezintă un răspuns amperometric mai mare comparativ cu bioelectrodul G/gPDH-(Os-RPII), probabil datorită:

- (i) unui transfer mai rapid de electroni între Os-RP și cofactorul enzimei dgPDH;
- (ii) creșterii accesibilității substratului la centrul activ al enzimei dgPDH, indusă de permeabilitatea mai mare a rețelei Os-RP – dgPDH (PrévotEAU *et al.* 2010).

3.3. Stabilitatea bioelectrozilor

Stabilitatea operațională a unui bioelectrod este unul dintre parametrii-cheie pentru eventuala utilizare a acestuia, din acest motiv, în continuare aceasta a fost evaluată prin efectuarea unui test de stabilitate pe termen de 80 h sub un flux constant de 5 mM glucoză (Figura 5).

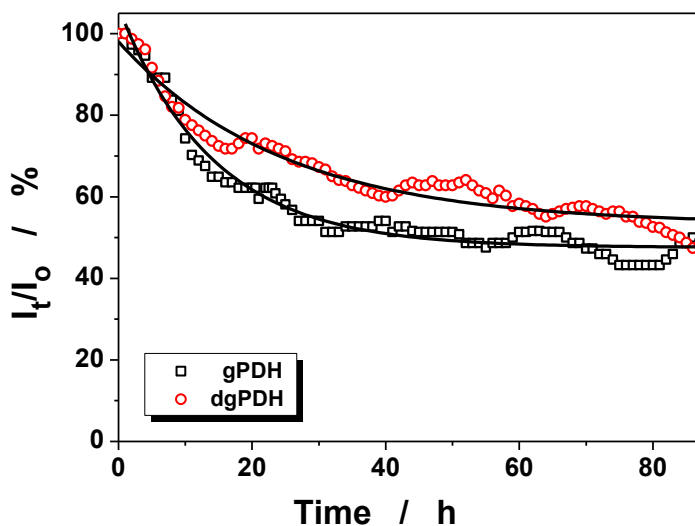


Figura 5. Stabilitatea bioelectrozilor G/gPDH-(Os-RPII) și G/dgPDH-(Os-RPII) sub un flux constant de 5 mM glucoză.

Condiții experimentale: potențial aplicat, +200 mV vs. Ag/AgCl, 0.1M KCl; încărcarea enzimatică, 23.6 Ucm^{-2} ; 5 mg/mL Os-RPII; electrolit de fond, 50 mM PB (pH 7.4); debit, 0.45 mL/min.

Liniile continue reprezintă fitarea datelor experimentale cu ecuația care descrie descreșterea exponențială a răspunsului bioelectrozilor.

Pentru ambii electrozi modificați, a fost observată o scădere accentuată a răspunsului în primele 20 de ore. Astfel, pentru G/dgPDH-(Os-RPII), scăderea a

fost de ~26%, în timp ce pentru G/gPDH-(Os-RPII) scăderea răspunsului a fost mai accentuată (~38%).

3.4. Selectivitatea bioelectrozilor

*Am*PDH arată o activitate bioelectrocatalitică semnificativă pentru diverse substraturi, cum ar fi: 2-deoxi-D-galactoză, celobioză, fucoză, zaharoză, trehaloză, galactoză, xiloză (Tasca *et al.* 2007). În scopul de a se stabili dacă deglicozilarea enzimei induce schimbări în ordinea selectivității acesteia, parametrii cinetici corespunzători bioelectrozilor G/gPDH-(Os-RPII) și G/dgPDH-(Os-RPII) au fost estimați prin fitarea cu ecuația Michaelis-Menten a curbelor de calibrare înregistrate pentru următoarele substraturi: glucoză, galactoză, lactoză, maltoză, manoză, celobioză, 2-deoxi-D-glucoză, fucoză, zaharoză și xiloză. Sensibilitatea bioelectrozilor G/gPDH-(Os-RPII) și G/dgPDH-(Os-RPII) pentru toate substraturile investigate a fost estimată ca raportul dintre $I_{\max} / K_M^{\text{app}}$ (Figura 6).

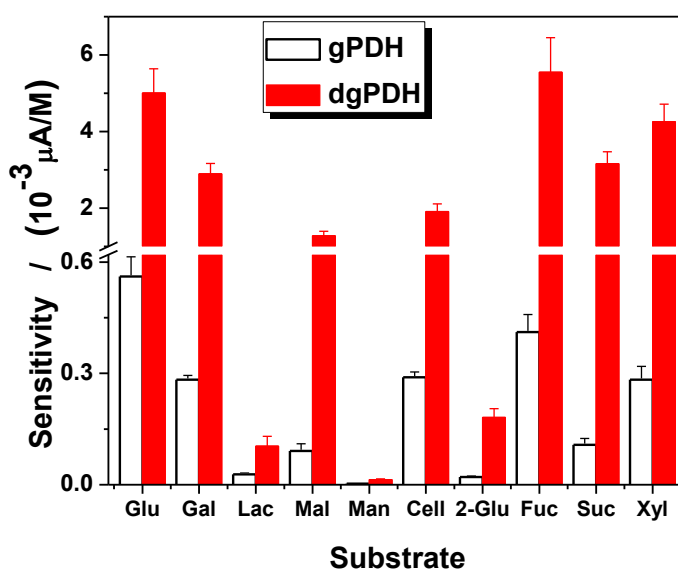


Figura 6. Sensibilitatea bioelectrozilor G/gPDH-(Os-RPII) și G/dgPDH-(Os-RPII) pentru diferite substraturi: *Glu*, glucoză; *Gal*, galactoză; *Lac*, lactoză; *Mal*, maltoză; *Man*, manoză; *Cell*, celobioză; *2-Glu*, 2-deoxi-D-glucoză; *Fuc*, fucoză; *Suc*, zaharoză; *Xyl*, xiloză.

Condiții experimentale: potențial aplicat, +200 mV vs. Ag|AgCl, 0.1M KCl; încărcare enzimatică, 23.6 Ucm⁻²; 5 mg/ml Os-RPII; electrolit de fond, 50 mM PB conținând 137 mM NaCl (pH 7.4); debit, 0.45 mL/min

După cum se poate observa din Figura 6 deglicozilarea enzimei *Am*PDH induce schimbări semnificative în ordinea de selectivități a acesteia:

- **gPDH:** Glucoză > Fucoză > Galactoză > Celobioză > Xiloză > Zaharoză > Maltoză > Lactoză > 2-Deoxi-D-glucoză > Manoză
- **dgPDH:** Fucoză > Glucoză > Xiloză > Zaharoză > Galactoză > Celobioză > Maltoză > 2-Deoxi-D-glucoză > Lactoză > Manoză

3.5. Descompunerea enzimei deglicozilate *AmPDH* și influența condițiilor de depozitare

S-a observat că atunci când dgPDH este stocată în anumite condiții, enzima pierde aproximativ 20 kDa din MW totală (Yakovleva *et al.* 2013). Pierderea unui fragment de peptidă a dgPDH din partea C-terminal a rezultat în formarea unei enzime deglicosilate stabile (sdgPDH).

Pentru a urmări procesul de descompunere, o cantitate de enzimă PDH proaspăt purificată și deglicozilată a fost stocată la o temperatură de 4 °C în loc de -30 °C (temperatura la care enzima a arătat a fi stabilă (Sygmund *et al.* 2012)).

Procesul de fragmentare a fost urmărit prin electroforeză în gel (SDS-PAGE) respectiv măsurătorile de activitate a enzimei prin utilizarea Fc^+ ion ca acceptor de electroni. Toate cele trei forme ale enzimei *AmPDH* (gPDH, dgPDH și sdgPDH) au fost electric conectate cu Os-RPII pe suprafața electrozilor de grafit. Curentul generat de oxidarea biocatalitică a glucozei la bioelectrozi modificași cu gPDH, dgPDH sau sdgPDH au fost comparat utilizând voltametrie ciclică, respectiv amperometrie în sistem FI.

3.5.1. Urmărirea descompunerii enzimei deglicozilate prin SDS-PAGE

Toate cele trei forme ale enzimei *AmPDH* (gPDH, dgPDH și sdgPDH) au fost investigate prin utilizarea SDS-PAGE, gelurile fiind colorate cu azotat de argint pentru vizualizarea proteinelor (Bartsch *et al.* 2012). Greutatea moleculară a gPDH exprimată în *P. pastoris* a fost determinată a fi de aproximativ ~95 kDa (Figura 7 A, B) valoare similară cu cea raportată precedent (Sygmund *et al.* 2012). PDH apare într-o bandă largă datorită posibilităților variații structurale datorită conținutului mare de glicani (Mechref *et al.* 2002). Bandă majoră la ~65 kDa poate fi atribuită enzimei deglicozilate (dgPDH), diferența de ~30-35 kDa fiind atribuită glicanilor înlăturați de pe lanțul peptidei. Bandă minoră la ~46 kDa este asociată cu enzima deglicozilată fragmentată (sdgPDH), fragmentarea fiind un proces care are loc atunci când dgPDH a fost stocată la + 4 °C (Figura 7). PDH deglicozilată stabilizată (sdgPDH) apare ca urmare a pierderii unui fragment de ~20 kDa din partea C-terminală a proteinei, chiar și în absența unei activități proteolitice.

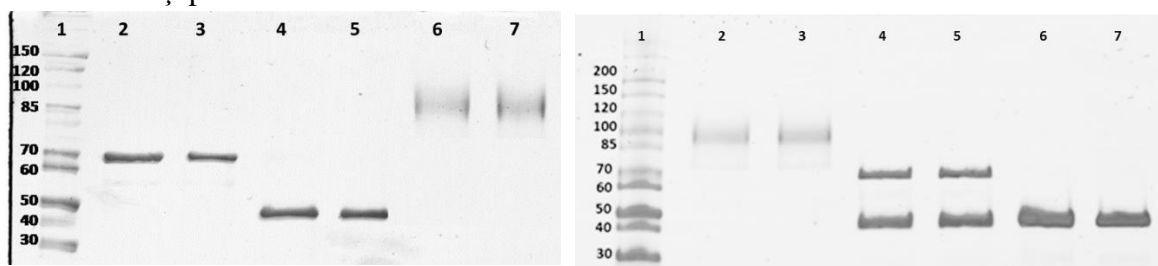


Figura 7. Caracterizarea descompunerii enzimei în timp utilizând 10% acrilamidă SDS-PAGE; pentru vizualizarea peptidei s-a folosit azotat de argint: (A) coloana 1 – marker de greutate moleculară; coloana 2,3 – dgPDH; coloana 4,5 – sdgPDH; coloana 6,7 – gPDH; (B) coloana 1 – marker de greutate moleculară; coloana 2,3 – gPDH; coloana 4,5 – sdgPDH (după 2 săptămâni); coloana 6,7 – sdgPDH (după 3 luni).

Enzima a fost păstrată la 4 °C.

3.5.2. Determinarea spectrofotometrică a activității enzimei

Activitatea volumetrică a dgPDH (sdgPDH) respectiv gPDH a fost măsurată în termen de trei luni utilizând Fc^+ ca electron acceptor și glucoză ca substrat.

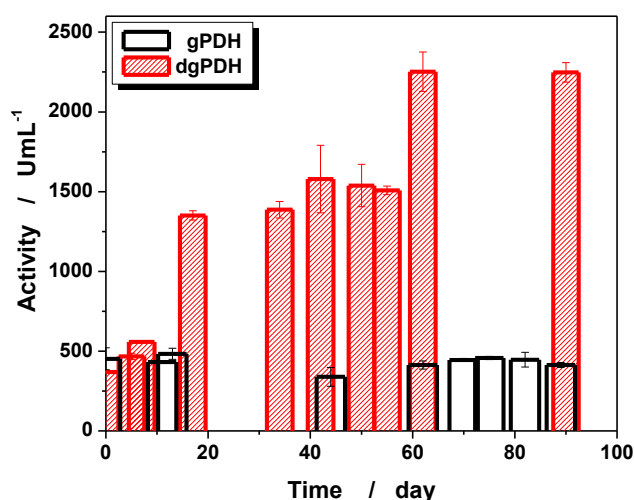


Figura 8. Schimbarea în timp a activității enzimice a enzimelor gPDH și dgPDH. Activitatea volumetrică a fost măsurată cu ajutorul glucozei utilizată ca substrat și Fc^+ ca electron acceptor

Din Figura 8 se poate observa că activitatea enzimei dgPDH crește progresiv atingându-se un platou după aproximativ două luni, în timp ce pentru gPDH nu s-au observat modificări de activitate.

3.5.3. Oxidarea electrocatalitică a glucozei pe electrozi modificați cu gPDH, dgPDH și sdgPDH

Enzima sdgPDH a pierdut o parte din lanțul peptidic, fapt ce ar putea micșora distanța dintre centrul activ al enzimei și mediator sau electrod, facilitând astfel transferul de electroni. Pentru a investiga acest aspect, comportamentul electrochimic al enzimei sdgPDH a fost comparat cu cel al enzimelor gPDH și dgPDH. Toate cele trei forme ale enzimei *AmPDH* (sdgPDH, dgPDH și gPDH) au fost co-immobilizate consecutiv cu Os-RPII în prezența PEGDGE pe suprafața unui electrod de grafit, în același mod precum cel descris în (Yakovleva *et al.* 2012) și au fost investigate utilizându-se voltametria ciclică (*rezultate doar in teză*) și amperometria în sistem FI.

Curbele de calibrare corespunzătoare oxidării electrocatalitice a glucozei pe bioelectrozii modificați cu gPDH, dgPDH, respectiv sdgPDH sunt prezentate în Figura 9. Parametrii cinetici pentru bioelectrozii investigați au fost estimați prin fitarea rezultatelor experimentale cu ecuația Michaelis-Menten.

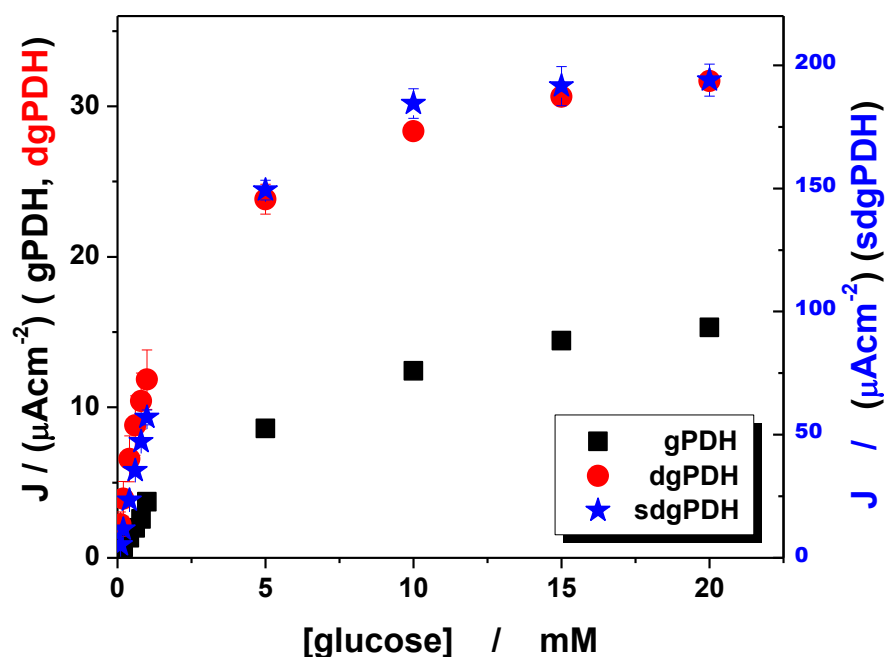


Figura 9. Curbe de calibrare ai bioelectrozilor G/gPDH-(Os-RPII), G/dgPDH-(Os-RPII) și G/sdgPDH-(Os-RPII) utilizând glucoză ca substrat.

Condiții experimentale: potențial aplicat +200 mV vs. Ag/AgCl, 0.1M KCl; electrolit de fond, 50 mM PB conținând 137 mM NaCl (pH 7.4); debit, 0.45 mL/min.

O creștere semnificativă a densității de curent catalitic maxim [$j_{\max} = (230.8 \pm 4.9) \mu\text{Acm}^{-2}$] poate fi observată în cazul bioelectrodului G/sdgPDH-(Os-RPII) comparativ cu cea înregistrată pentru bioelectrodul G/gPDH-(Os-RPII) [$j_{\max} = (16.3 \pm 0.7) \mu\text{Acm}^{-2}$] sau pentru bioelectrodul G/dgPDH-(Os-RPII) [$j_{\max} = (33.9 \pm 0.4) \mu\text{Acm}^{-2}$]. Constanta aparentă Michaelis pentru ambii, dgPDH [$K_M^{\text{app}} = (1.8 \pm 0.1) \text{mM}$] și sdgPDH [$K_M^{\text{app}} = (3.0 \pm 0.2) \text{mM}$] este mai mare comparativ cu cea pentru gPDH [$K_M^{\text{app}} = (5.5 \pm 0.5) \text{mM}$] fapt care indică:

- o mai mare afinitate între enzimă și substrat, în cazul bioelectrozilor modificați cu sdgPDH și dgPDH;
- o permeabilitate mai mare a matricelor enzimatică, în cazul sdgPDH și dgPDH pentru glucoză, ceea ce înseamnă că difuzia substratului spre centrul activ al acestor enzime este mai ușoară

Atât creșterea remarcabilă a curentului catalitic de oxidare pentru sdgPDH, cât și scăderea K_M^{app} susțin ideea că pierderea spontană a fragmentului peptidic din partea terminală a proteinei joacă un rol important în performanța catalitică a enzimei descompuse care își păstrează centrul activ.

4. STUDIUL CINETIC AL ADSORBȚIEI S-ACETIL-CLIX[8]ARENEI ȘI REORGANIZĂRII FILMULUI FORMAT PE SUPRAFAȚĂ AU POLICRISTALIN

Studiul de față (Killyeni *et al.* 2013) a fost realizat cu scopul de a obține un electrod modificat cu un derivat calixarenic (S-Calix). Datorită binecunoscutelor proprietăți de recunoaștere ale calixarenei, s-a presupus că electrodul modificat cu S-Calix va avea capacitatea de a recunoaște anumite specii chimice.

În acest scop, utilizând interacțiunea puternică dintre atomii de S și Au s-a format un strat de S-Calix, prin simpla adsorbție a acestuia pe suprafața unui electrod de Au policristalin. Cu ajutorul măsurătorilor de spectroscopie de impedanță a fost posibilă urmărirea cineticii adsorbției S-Calix pe Au și în continuare s-a putut studia cinetica procesului de reorganizare a mono-stratului auto-asamblat (SAM) forat pe electrodul de Au policristalin.

Electrozii modificați Au/S-Calix au fost preparați prin simpla imersie a unor fire de Au într-o soluție adecvată de S-Calix.

4.1. Măsurători de voltametrie ciclică

Voltamogramele ciclice pentru cuplul HCF(III/II) înregistrate pentru un electrod de Au, un electrod modificat Au/S-calix și un electrod modificat Au/S-Calix,MUA sunt prezentate în

Figura 10.

În cazul electrodului de Au nemodificat se observă o pereche de picuri voltametrice bine definite, specifice unui cuplu redox dizolvat, cu transfer de sarcină cuasi-reversibil. Valoarea estimată a potențialului standard formal, obținută prin medierea potențialelor de pic, este de 0.26 V vs. Ag/AgCl, 3 M NaCl, fiind o valoare apropiată de cea caracteristică cuplului HCF(III/II).

După modificarea electrodului cu S-Calix, perechea de picuri voltametrice se modifică prin scăderea curenților de pic și prin creșterea separării potențialelor de pic. Scăderea intensității curentului de pic a fost atribuită unor modificări de la interfața electrodică în sensul micșorării suprafeței accesibile cuplului redox ca urmare a adsorbției calixarenei. Scăderea importantă a curentului sugerează că o fracțiune mare a interfeței este blocată cu S-Calix și astfel accesul cuplului redox utilizat ca sondă electrochimică la interfață devine restricționat. Totodată, trebuie să menționăm că în intervalul de potențial studiat nu au fost prezente alte picuri adiționale datorate prezenței calixarenei.

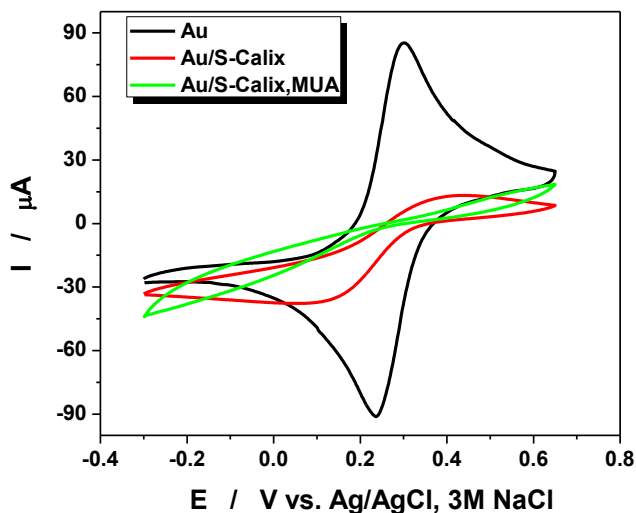


Figura 10. Răspunsul voltametric al 5 mM HCF(II)/(III) înregistrat la electrodul de Au, respectiv electrozii modificați Au/S-Calix și Au/S-Calix,MUA.
Condiții experimentale: viteză de baleiaj, 50 mV/s; potențial de start, -0.3 V vs. Ag|AgCl, 3M NaCl; electrolit de fond, 1 M KCl.

Alura voltamogramei înregistrate la electrodul modificat Au/S-Calix arată că suprafața electrodului nu este complet blocată. Pentru a se verifica această presupunere au fost trasate voltamograme ciclice pentru cuplu redox HCF(III/II) la electrozii modificați Au/S-Calix,MUA, deoarece moleculele de MUA au o mare abilitate de a forma un mono-strat compact pe suprafața electrodului de Au în comparație cu S-Calix.

Scăderea curentului de pic observat în cazul electrodului modificat cu Au/S-Calix,MUA indică faptul că toată suprafața electrodică este blocată cu molecule de S-Calix și MUA, ambii compuși fiind electrochimic inactivi în domeniul de potențial investigat.

4.2. Măsurători de spectroscopie de impedanță electrochimică

4.2.1. Adsorbția S-Calix

Cinetica adsorbției S-Calix pe Au a fost monitorizată prin măsurători de impedanță electrochimică, efectuate succesiv la intervale de 87 secunde, în timpul procesului de adsorbție (4 ore). Spectrele de impedanță obținute au acoperit intervalul de frecvență cuprins între 100 Hz și 23 kHz, interval în care s-au ales 23 de frecvențe. Pentru fiecare spectru de impedanță, amplitudinea semnalului alternativ a fost de 10 mV, iar valoarea componentei continue a corespuns valorii potențialului de circuit deschis (OPC).

Spectrele de impedanță obținute au fost interpretate folosindu-se circuitul electric echivalent prezentat în Figura 11.

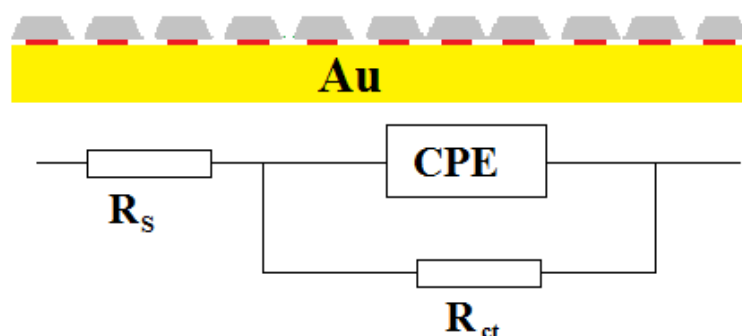


Figura 11. Circuitul electric echivalent utilizat pentru modelarea spectrelor de impedanță înregistrate în timpul adsorbției S-Calix pe electrod de Au. Elementele circuitului electric echivalent sunt: R_s rezistența soluției, R_{ct} rezistența de transfer de sarcină; CPE element de fază constantă.

Spectrele de impedanță înregistrate au fost fitate pe circuitul electric echivalent menționat anterior, iar o selecție reprezentativă a valorilor parametrilor modelului, pentru câteva valori de timp, este prezentată în Tabel 2. Toate valorile parametrilor sunt însoțite de semilățimea intervalelor de încredere (calculate pentru un interval de încredere de 95%) și de criteriul de calitate al corelațiilor (Chi^2).

Pentru identificarea etapei determinante de viteză a procesului de adsorbție, s-au utilizat două modele cinetice, care corelează fracția de acoperire cu timpul (Subramanian *et al.* 2000):

- i. **Modelul pur difuziv**, model descris de ecuația:

$$\theta(t) = k_d C t^{1/2} \quad (1)$$

unde: $\theta(t)$ este fracția acoperită, C este concentrația S-Calix, t este timpul, k_d este constanta de viteză a difuziei

În prima parte a procesului ($t < 20$ min) se constată o bună liniarizare a dependenței fracției de acoperire de $t^{1/2}$, fapt care susține valabilitatea modelului pur difuziv (Figura 12 A).

- ii. **Modelul Langmuir**, model descris de ecuația:

$$\theta(t) = 1 - \exp(-k_m t) \quad (2)$$

Unde: $\theta(t)$ este fracția de acoperire; t este timpul; k_m este constanta de viteză a procesului de adsorbție.

În a doua parte a procesului de adsorbție se observă o liniarizare mai bună în coordonate $\ln(1-\theta)$ vs. t , ceea ce indică faptul că procesul de adsorbție este bine descris în această etapă de un modelul Langmuir (Figura 12 A).

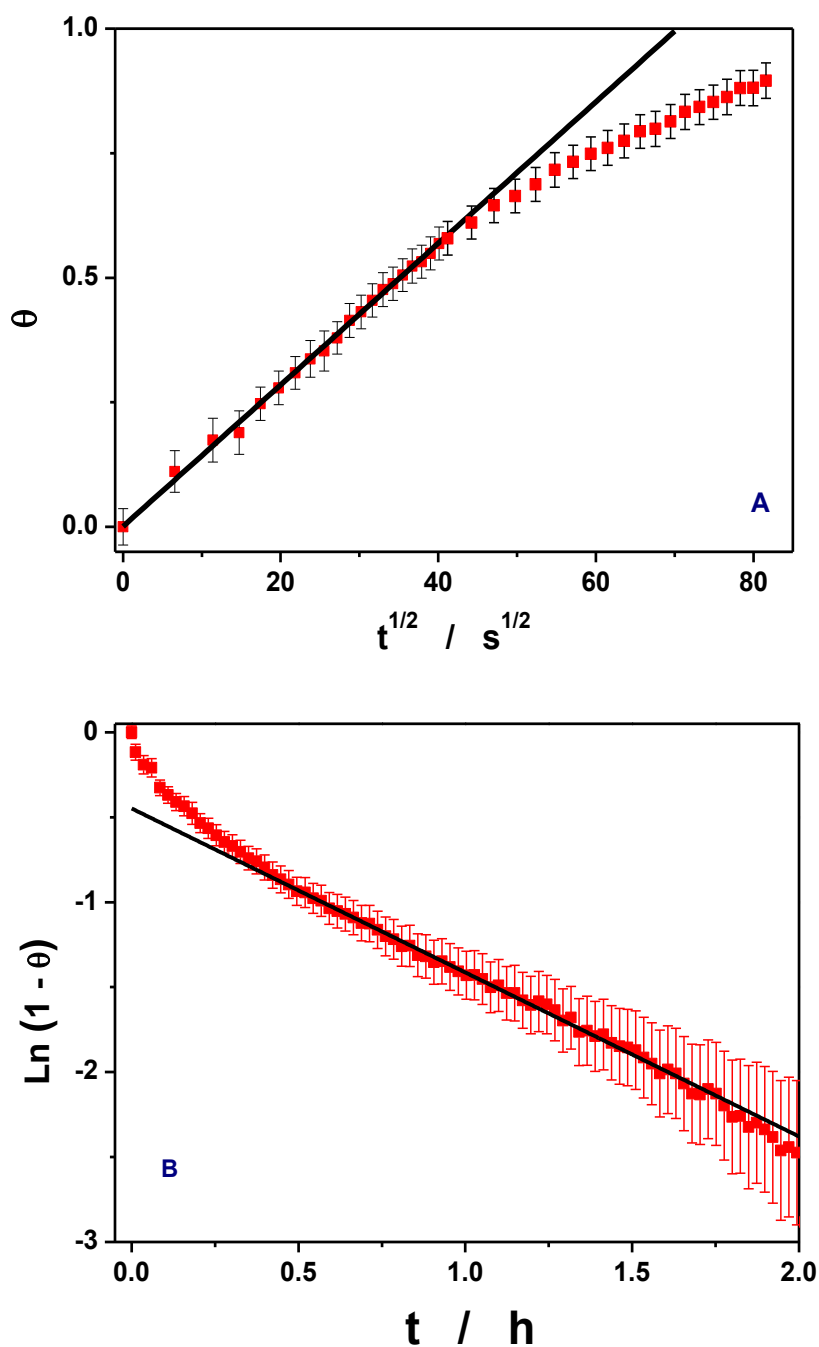


Figura 12. (A) Variația fracției acoperite cu $t^{1/2}$ (liniarizare corespunzătoare modelului pur difuziv); (B) variația of $\ln(1 - \theta)$ cu t (liniarizarea modelului Langmuir cu control difuziv).

Condiții experimentale: potențial aplicat (OCP), 0.33 V vs. Ag/AgCl, 3 M NaCl; interval de frecvență, 100 Hz la 23 kHz (23 valori); amplitudine, 10 mV;

soluție de lucru, 1.16 mg/L S-Calix în $CHCl_3/C_2H_5OH$ 1:1 (v/v) conținând 0.05 M $LiClO_4$ ca electrolit de fond.

Tabel 2. Evoluția în timp a parametrilor R_s , R_{ct} , Q și α (circuit electric echivalent din Figura 11) în timpul adsorbției S-Calix pe electrodul de Au

Timp (s)	R_s ($\Omega \text{ cm}^2$)	R_{ct} ($\text{k}\Omega \text{ cm}^2$)	Q ($\text{M}\Omega^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{\alpha}$)	α	Chi^2 / N ($\Omega^2 \text{ cm}^4$)
0	75.30 ± 0.33	0.97 ± 0.16	6.127 ± 0.075	0.669 ± 0.034	0.81 / 23
304	75.21 ± 0.35	0.98 ± 0.14	5.551 ± 0.067	0.644 ± 0.034	0.89 / 23
652	74.82 ± 0.41	1.13 ± 0.19	5.344 ± 0.081	0.598 ± 0.042	1.19 / 23
1000	75.14 ± 0.38	1.09 ± 0.16	5.143 ± 0.064	0.635 ± 0.036	1.06 / 23
2044	75.32 ± 0.41	1.23 ± 0.19	4.828 ± 0.062	0.616 ± 0.037	1.18 / 23
3001	75.25 ± 0.42	1.30 ± 0.20	4.649 ± 0.060	0.607 ± 0.038	1.27 / 23
5002	74.48 ± 0.44	1.32 ± 0.19	4.406 ± 0.055	0.604 ± 0.038	1.35 / 23
8047	73.20 ± 0.48	1.44 ± 0.19	4.099 ± 0.053	0.585 ± 0.041	1.58 / 23
14050	73.56 ± 0.47	1.46 ± 0.21	4.062 ± 0.069	0.590 ± 0.039	1.63 / 23

4.2.2. Procesul de reorganizare a monostratului de S-Calix

Măsurătorile voltametrice au evidențiat faptul că stratul de S-Calix, auto-asamblat pe suprafața Au, trece printr-o evoluție lentă în timp, probabil datorită reorganizării sale ceea ce determină o creștere a fracției acoperite a electrodului modificat Au/S-Calix. Acest proces de reorganizare a fost explorat tot prin utilizarea spectroscopiei de impedanță pentru electrozi modificați Au/S-Calix. Spectrele Nyquist obținute, conținând 57 de valori ale frecvenței (de la 0,01 Hz până la 100 kHz), prezintă caracteristicile tipice ale unui proces controlat de activare și difuzie.

După cum se poate observa din Figura 1112, indiferent de timpul de înregistrare toate spectrele sunt alcătuite: (i) dintr-un semicerc (datorat procesului de transfer de sarcină și situat în domeniul de frecvențe înalte) (ii) cuplat cu o linie de transport Warburg (corespunzând difuziei cuplul redox și situată în domeniul de frecvențe joase). Acest comportament este similar cu cel observat în cazul electrodului de Au (

Figura 13), cu excepția faptului că procesul transfer de sarcină este mult mai rapid în cazul electrodului nemodificat.

În timp, rezistența transferului de sarcină, arată o creștere monotonă, sugerând o creștere a suprafeței blocate a electrodului, care îngreunează procesul de transfer de sarcină. Acest comportament este foarte probabil o consecință a creșterii acoperirii electrodului, indusă de o rearanjare a statului auto-asamblat de S-Calix.

Chiar și după un interval mare de timp ($t > 20$ h), în spectrele de impedanță înregistrate se poate observa semicercul reprezentând transferul de sarcină. Acest lucru indică faptul că stratul S-Calix, format și reorganizat pe suprafața electrodului nu blochează complet procesul de transfer de electroni al suprafeței de Au.

Această ipoteză a fost confirmată, prin scăderea semnificativă a diametrului semicercului observat în spectrele de impedanță înregistrate la electrodul modificat Au/S-Calix, MUA, care coroborează și cu răspunsul voltametric înregistrat la același electrod.

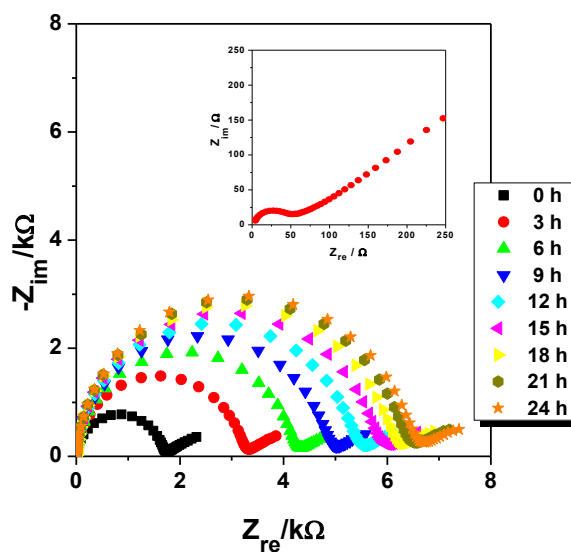


Figura 13. Spectre de impedanță înregistrate la electrozi modificați Au/S-Calix. Înserat: spectrul de impedanță înregistrat la electro de Au la pH 7.

Condiții experimentale: Potențial aplicat, +0.24 V vs. Ag/AgCl, 3M NaCl; domeniu de frecvență, de la 10 mHz la 100 kHz (57 valori); ac amplitudinea, 10 mV; electrolit de fond, 1 M KCl

Pentru modelarea spectrele de impedanță înregistrate în etapa de reorganizare a stratului S-Calix format pe suprafața Au, s-a utilizat circuitul electric echivalent prezentat în Figura 14. Acest circuit echivalent pornește de la modelul propus de Finklea

(Finklea *et al.* 1993; Rueda *et al.* 2011) pentru pori activi înconjurați de zone inactive. Această idee este rezonabilă luând în considerare conformația aparte a moleculei S-Calix, care formează un strat auto-asamblat mai puțin compact decât tioalkeneii.

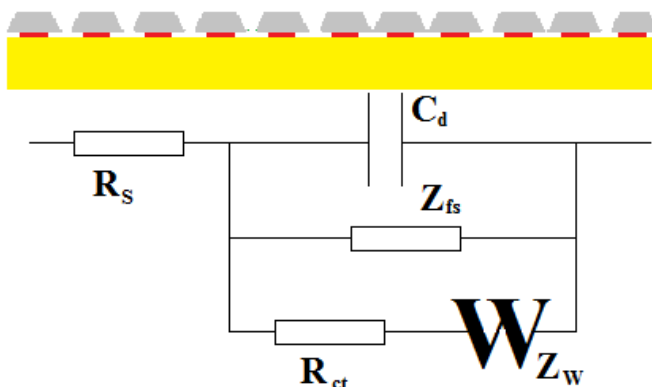


Figura 14. Circuitul electric echivalent utilizat pentru modelarea spectrelor de impedanță înregistrate în timpul reorganizării stratului de S-Calix pe suprafața electrodului modificat Au/S-Calix. Elementele circuitului electric echivalent sunt: R_s rezistența soluției, R_{ct} rezistența de transfer de sarcină; C_d capacitatea stratului dublu electric, Z_w este impedanța Warburg.

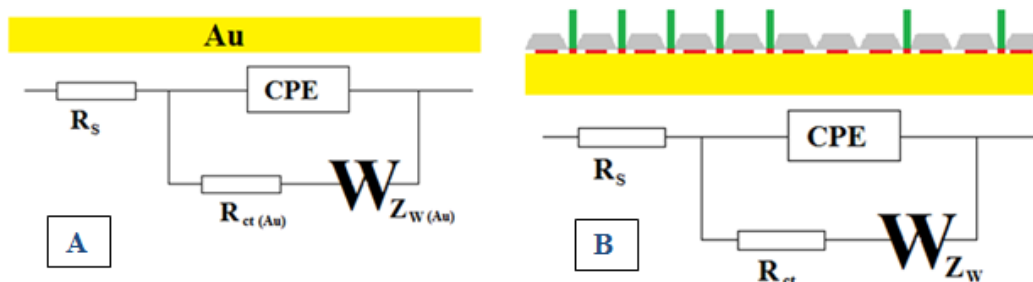


Figura 15. Circuitul electric echivalent utilizat pentru modelarea spectrelor de impedanță înregistrate pentru (A) electrodul de Au și (B) electrodul modificat Au/S-Calix,MUA. Elementele circuitului electric echivalent sunt: R_s rezistența soluției, R_{ct} rezistența de transfer de sarcină; C_d capacitatea stratului dublu electric, CPE element de fază constantă, Z_w este impedanța Warburg.

Datele suplimentare, necesare pentru a modela circuitul echivalent, au fost obținute prin modelarea spectrelor de impedanță înregistrate la electrozi de Au folosind circuitul echivalent din Figura 14 (A) și electrozi modificați cu Au/S-Calix,MUA din Figura 14 (B).

Cu ajutorul datelor estimate prin fitarea spectrelor de impedanță înregistrate la electrozi de Au și electrozii modificați Au/S-Calix,MUA prezentate în tabel 3 și valorile estimate prin fitarea spectrelor corespunzătoare electrodului modificat Au/S-Calix tabel 4 s-a putut calcula fracția de acoperire a electrozilor modificați cu S-Calix la diferite intervale de timp.

Tabel 3. Valorile parametrilor utilizați pentru modelarea spectrelor de impedanță corespunzătoare electrozului de Au, respectiv electrozului modificat Au/S-Calix,MUA (Circuit electric echivalent din Figura 14)

Electrod	pH	R_s ($\Omega \text{ cm}^2$)	R_{ct} ($\Omega \text{ cm}^2$)	Q ($\text{M}\Omega^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^a$)	a	σ ($\Omega \text{ s}^{-1/2} \text{ cm}^2$)	Chi^2 / N ($\Omega^2 \text{ cm}^4$)
Au	5	0.93 ± 0.74	5.23 ± 1.29	615 ± 124	0.55 ± 0.10	22.8 ± 0.2	0.00001 / 57
	7	0.45 ± 0.38	10.29 ± 0.80	161 ± 44	0.75 ± 0.03	28.2 ± 0.6	0.00006 / 57
Au/S-Calix,MUA	5	0.87 ± 1.11	655.7 ± 1.2	6.12 ± 0.07	0.940 ± 0.002	30.6 ± 0.4	2.66 / 57
	7	1.37 ± 1.58	2440.9 ± 3.8	6.61 ± 0.05	0.943 ± 0.002	28.7 ± 1.2	33.32 / 57

Tabel 4. Evoluția în timp a parametrilor circuitului electric echivalent prezentat în Figura 14 pentru monitorizarea reorganizării stratului de S-Calix format prin auto-asamblare pe electrozii de Au

Electrode	pH	Timp (h)	R_s ($\Omega \text{ cm}^2$)	C_d ($\mu\text{F cm}^{-2}$)	$1-\theta$ (%)	q (s^{-1})	Chi^2 / N ($\Omega^2 \text{ cm}^4$)
		0	0.86 ± 1.53	2.82 ± 0.62	3.96 ± 0.19	245 ± 55	$61.3 / 57$
		6	0.50 ± 2.67	2.89 ± 0.26	1.42 ± 0.03	236 ± 34	$110.5 / 57$
		12	1.06 ± 3.80	2.76 ± 0.27	0.95 ± 0.03	222 ± 33	$161.4 / 57$
		18	0.89 ± 7.02	2.67 ± 0.47	0.77 ± 0.04	189 ± 28	$249.7 / 57$
Au/S-Calix							
		0	3.17 ± 0.76	5.39 ± 0.03	4.59 ± 0.02	334 ± 13	$0.9 / 57$
		6	4.07 ± 1.39	4.92 ± 0.03	1.53 ± 0.01	221 ± 12	$7.2 / 57$
		12	4.22 ± 2.56	4.64 ± 0.05	1.09 ± 0.01	171 ± 13	$29.3 / 57$
		18	4.12 ± 3.63	4.46 ± 0.06	0.90 ± 0.01	149 ± 14	$62.1 / 57$

Datele prezentate în tabelul 4 indică în mod clar faptul că stratul S-Calix trece printr-un proces de reorganizare lent, implicând moleculele deja immobilizate de S-Calix. Reorganizarea induce o scădere semnificativă a suprafeței libere a electrodului (Figura 6). Este demn de menționat că scăderea totală a suprafeței libere este în concordanță cu scăderea observată pe voltamogramele înregistrate la electrodul modificat Au/S-Calix (vezi Figura 10).

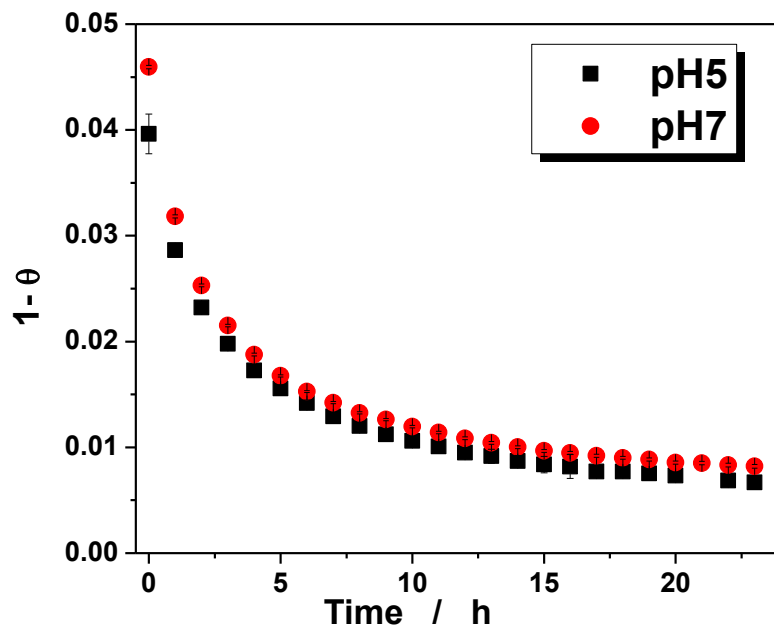


Figura 16. Evoluția în timp a suprafeței libere ($1-\theta$) pentru electrodul modificat Au/S-Calix la pH 5 și pH 7.

În esență, procesul de reorganizare constă în creșterea numărului de legături S-Au pentru moleculele de S-Calix deja immobilizate prin conversia conformațională adecvată a moleculelor S-Calix. Acest proces este datorat afinității remarcabile dintre atomi de S și Au, care favorizează legarea tuturor atomilor de S din molecula S-Calix. Pe de altă parte, procesul de reorganizare este facilitat de flexibilitatea binecunoscută a scheletului moleculei calix[8]arenei, care permite o multitudine de conformații, consolidată de prezența substituenților de mici dimensiuni, cum ar fi -S-CO-CH₃ (pe partea superioară) și -O-CH₃ (pe partea inferioară) (Neri *et al.* 2002).

5. CONCLUZII GENERALE

I. Efectul deglicozilării enzimei *AmPDH* exprimată în *P. pastoris* a fost studiat prin realizarea de electrozi modificați cu *AmPDH*. Stabilitatea enzimei *dgPDH* în soluție a fost urmărită prin măsurători SDS-PAGE și UV/Vis. Activitatea biocatalitică a electrozilor modificați cu enzima *PDH* a fost evaluată cu ajutorul voltametriei ciclice și măsurătorilor amperometrice în sistem FI.

- Din măsurătorile de electroforeză în gel (SDS-PAGE) s-a observat că, datorită expresiei în organism-gază *P. pastoris*, *gPDH* este în mai mare măsură glicozilată. Prin diminuarea parțială a conținutului de glicani, masa enzimei scade de la 95-100 kDa la ~ 65 kDa (diferența fiind glicanii eliminați din lanțul peptidic)

- Pentru aceeași încărcare enzimatică (exprimată în Ucm^{-2}), bioelectrodul *G/dgPDH*-(Os-RPII) prezintă un răspuns amperometric mai mare comparativ cu bioelectrodul *G/gPDH*-(OS-RPII). În același timp, deglicozilarea enzimei *AmPDH* a dus la scăderea valorii constantei Michaelis, comparativ cu cea estimată pentru enzima inițială.

- Deglicozilarea enzimei *AmPDH* induce modificări semnificative în ordinea selectivității acesteia:

- **gPDH:** Glucoză > Fucoză > Galactoză > Celobioză > Xiloză > Zaharoză > Maltoză > Lactoză > 2-Deoxi-*D*-glucoză > Manoză

- **dgPDH:** Fucoză > Glucoză > Xiloză > Zaharoză > Galactoză > Cellobioză > Maltoză > 2-Deoxi-*D*-glucoză > Lactoză > Manoză

- Bioelectrodul bazat pe enzima *PDH* deglicozilată arată o stabilitate în timp mai bună decât bioelectrodul bazat pe enzima *PDH* glicozilată.

- S-a constatat că după două luni de stocare la 4 °C, enzima *dgPDH* suferă o fragmentare spontană. Enzima stabilă rezultată (*sdgPDH*) are MW de ~46 kDa și dispune de o activitate enzimatică mai ridicată comparativ cu cea a enzimelor glicozilate și deglicozilate.

II. A doua parte a lucrării de față a fost consacrată investigării: absorbției moleculei S-Calix și procesului de reorganizare a SAM format pe suprafața de Au policristalin, folosind voltametrie ciclică, spectroscopie Raman, microbalanță de cuarț și măsurători de spectroscopie de impedanță electrochimică.

- Măsurătorile de voltametrie ciclică efectuate în prezența cuplului redox HCF (III/II), evidențiază o evoluție în timp a permeabilității stratului format prin simpla adsorbție a moleculei S-Calix pe suprafața de Au. Răspunsul voltametric observat la electrodul modificat Au/S-Calix sugerează un proces de reorganizare care apare în stratul auto-asamblat de S-Calix, având ca rezultat creșterea suprafeței blocate de electrodul modificat Au/S-Calix.

- Măsurătorile de spectroscopie de impedanță au fost utilizate pentru a descrie procesul de adsorbție a moleculei S-Calix. Astfel, începutul procesului de adsorbție prezintă caracteristicile unui proces controlat de difuzie pură, dar în a doua parte se supune modelului Langmuir.

- La sfârșitul procesului de adsorbție ($\theta > 0,9$), un proces lent de reorganizare are loc, care constă în creșterea numărului de legături S-Au pentru moleculele de S-Calix deja adsorbite. Acest proces de reorganizare este determinat de mare afinitatea existentă între atomi de S și Au. Pe de altă parte, acest proces este facilitat de flexibilitatea remarcabilă a scheletului moleculei de calix[8]arenă. La starea de echilibru, moleculele S-Calix sunt organizate într-un monostrat pe suprafața Au policristalin, fiecare moleculă fiind atașată prin 3-4 atomii de S.
- Se poate afirma că monostratul de S-Calix format prin auto-asamblare pe Au oferă un mod simplu, rapid și eficient pentru un design versatil de materiale inteligente, care prezintă proprietăți interesante pentru recunoașterea ionică sau moleculară

6. ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ

6.1. Articole

- I. Maria E. Yakovleva, **Aniko Killyeni**, Roberto Ortiz, Christopher Schulz, Domhnall MacAodha, Peter Ó. Conghaile, Dónal Leech, Ionel Catalin Popescu, Christoph Gonaus, Clemens K. Peterbauer, Lo Gorton, (2012) *Recombinant pyranose dehydrogenase — A versatile enzyme possessing both mediated and direct electron transfer*. *Electrochemistry Communications* 24, 120–122
- II. **Aniko Killyeni**, Maria E. Yakovleva, Clemens K. Peterbauer, Dónal Leech, Lo Gorton, Ionel Catalin Popescu, (2012) *Effect of enzyme deglycosylation on the amperometric detection of glucose at PDH-modified electrode*, *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Seria Chemia* 4, 87-99
- III. **Aniko Killyeni**, Adrian Nicoara, Vali Canpean, Attila Kun, Simion Astilean, Ionel Catalin Popescu, (2013) *S-acetyl-calix[8]arene adsorption on polycrystalline Au surface: A kinetic study*, *Electrochimica Acta* 102, 225–232
- IV. **Anikó Killyéni**, Maria E. Yakovleva, Domhnall MacAodha, Peter Ó Conghaile, Christoph Gonaus, Dónal Leech, Ionel Catalin Popescu, Clemens K. Peterbauer, Lo Gorton, (2013) *Effect of deglycosylation on the mediated electrocatalytic activity of recombinantly expressed Agaricus meleagris pyranose dehydrogenase wired by osmium- redox polymer*, *Electrochimica Acta* (trims spre publicare)
- V. Maria Yakovleva, **Anikó Killyéni**, Oliver Seubert, Peter Ó Conghaile, Domhnall MacAodha, Dónal Leech, Christoph Gonaus, Ionel Catalin Popescu, Clemens K. Peterbauer, Sven Kjellström, Lo Gorton, (2013) *Further insights into the catalytical properties of deglycosylated pyranose dehydrogenase from Agaricus meleagris recombinantly expressed in Pichia pastoris*, *Electrochimica Acta* (trimis spre publicare)

6.2. Participări la conferințe

- I. **Anikó Killyéni**, Adrian Nicoara, Graziella Liana Turdean, Ionel Catalin Popescu, (2011) *Electrochemical investigation of self-assembled calixarenes on gold*. 17th Conferință internațională chimie, Cluj-Napoca, Romania, 4-6 Noiembrie (poster)
- II. **Aniko Killyeni**, Vali Canpean, Adrian Nicoara, Graziella Liana Turdean, Ionel Catalin Popescu, Simion Astilean, (2011) *Electrochemical investigation of self-assembled S-acetyl-calix[8]arene on gold for molecular recognition*. Advance Spectroscopies on Biomedical Nanostructured Systems (BioNanoSpec), 7 Septembrie (comunicare orală)
- III. **Aniko Killyeni**, Maria E. Yakovleva, Lo Gorton, Ionel Catalin Popescu, (2012) *Effect of PDH deglycosylation on the glucose amperometric detection*. 18th Conferință internațională chimie, Băile Felix, Romania, 23-25 Noiembrie (comunicare orală)
- IV. **Anikó Killyéni**, Maria Yakovleva, Lo Gorton, Ionel Catalin Popescu, (2013) *Effect of Deglycosylation on the Selectivity of Agaricus meleagris Pyranose Dehydrogenase Modified Electrodes*. 12th Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry/XXII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society, 17-21 Martie (poster)
- V. Maria Yakovleva, **Anikó Killyéni**, Clemens K. Peterbauer, Ionel Catalin Popescu, Lo Gorton, (2013) *Further insights into catalytical properties of deglycosylated pyranose dehydrogenase from Agaricus meleagris recombinantly expressed in Pichia pastoris*. 12th Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry/XXII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society, 17-21 March (comunicare orală)
- VI. **Anikó Killyéni**, Maria Yakovleva, Lo Gorton, Ionel Catalin Popescu, (2013) *Improved biosensors by deglycosylation of pyranose dehydrogenase isolated from Agaricus meleagris*. 4th Regional Symposium on Electrochemistry South East Europe, 26 - 30 Mai (poster)
- VII. Adrian Nicoara, **Anikó Killyéni**, Ionel Catalin Popescu (2013) *Formation and reorganization kinetics of self-assembled calixarene on gold* 4th Regional Symposium on Electrochemistry South East Europe, 26 - 30 Mai (poster)

7. REFERINȚE (SELECTIVE)

Bartsch, H., Arndt, C., Koristka, S., Cartellieri, M., Bachmann, M., **2012**. *Silver staining techniques of polyacrylamide gels*. In: Kurien, B.T., Scofield, R.H. (Eds.), Protein Electrophoresis, pp. 481-486. Humana Press.

Buck, M., **2009**. *Structure, Electrochemistry and Applications of Self-Assembled Monolayers of Thiols*. Chemically Modified Electrodes, pp. 197-255. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Courjean, O., Flexer, V., PrévotEAU, A., Suraniti, E., Mano, N., **(2010)**; *Effect of Degree of Glycosylation on Charge of Glucose Oxidase and Redox Hydrogel Catalytic Efficiency*, ChemPhysChem 11(13), 2795-2797.

Ferapontova, E.E., Grigorenko, V.G., Egorov, A.M., Borchers, T., Ruzgas, T., Gorton, L., **(2001)**; *Direct electron transfer in the system gold electrode-recombinant horseradish peroxidases*, Journal of Electroanalytical Chemistry 509(1), 19-26.

Ferapontova, E.E., Shleev, S., Ruzgas, T., Stoica, L., Christenson, A., Tkac, J., Yaropolov, A.I., Gorton, L., **2005**. *Direct Electrochemistry of Proteins and Enzymes*. In: Emil Paleček, F.S., Wang, J. (Eds.), Perspectives in Bioanalysis, pp. 517-598. Elsevier.

Fraser, D.M., Zakeeruddin, S.M., Grätzel, M., **(1992)**; *Mediation of glycosylated and partially-deglycosylated glucose oxidase of Aspergillus niger by a ferrocene-derivatised detergent*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1099(1), 91-101.

Frew, J.E., Hill, H.A.O., Thomas, J.D.R., **(1987)**; *Electron-Transfer Biosensors [and Discussion]*, Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 316, 95-106.

Killyeni, A., Nicoara, A., Canpean, V., Kun, A., Astilean, S., Popescu, I.C., **(2013)**; *S-acetyl-calix[8]arene adsorption on polycrystalline Au surface: A kinetic study*, Electrochim. Acta 102(0), 225-232.

Killyéni, A., Yakovleva, M.E., MacAodha, D., Conghaile, P.Ó., Gonaus, C., Leech, D., Popescu, I.C., Peterbauer, C.K., Gorton, L., **(2013)**; *Effect of deglycosylation on the mediated electrocatalytic activity of recombinantly expressed Agaricus meleagris pyranose dehydrogenase wired by osmium- redox polymer*, Electrochim. Acta submitted.

Killyeni, A., Yakovleva, M.E., Peterbauer, C.K., Leech, D., Gorton, L., Popescu, I.C., **(2012)**; *Effect of enzyme deglycosylation on the amperometric detection of glucose at PDH-modified electrode*, Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Seria Chimia 4.

Lindgren, A., Tanaka, M., Ruzgas, T., Gorton, L., Gazaryan, I., Ishimori, K., Morishima, I., **(1999)**; *Direct electron transfer catalysed by recombinant forms of horseradish peroxidase: insight into the mechanism*, Electrochemistry Communications 1(5), 171-175.

Marcus, R.A., **(1964)**; *Chemical and Electrochemical Electron-Transfer Theory*, Annual Review of Physical Chemistry 15, 155-196.

Mechref, Y., Novotny, M.V., **(2002)**; *Structural Investigations of Glycoconjugates at High Sensitivity*, Chemical Reviews 102(2), 321-370.

Ortiz, R., Matsumura, H., Tasca, F., Zahma, K., Samejima, M., Igarashi, K., Ludwig, R., Gorton, L., (2012); *Effect of Deglycosylation of Cellobiose Dehydrogenases on the Enhancement of Direct Electron Transfer with Electrodes*, Analytical Chemistry 84(23), 10315-10323.

Peterbauer, C.K., Volc, J., (2010); *Pyranose dehydrogenases: biochemical features and perspectives of technological applications*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 85(4), 837-848.

Presnova, G., Grigorenko, V., Egorov, A., Ruzgas, T., Lindgren, A., Gorton, L., Borchers, T., (2000); *Direct heterogeneous electron transfer of recombinant horseradish peroxidases on gold*, Faraday Discussions 116, 281-289.

PrévotEAU, A., Courjean, O., Mano, N., (2010); *Deglycosylation of glucose oxidase to improve biosensors and biofuel cells*, Electrochemistry Communications 12(2), 213-215.

Subramanian, R., Lakshminarayanan, V., (2000); *A study of kinetics of adsorption of alkanethiols on gold using electrochemical impedance spectroscopy*, Electrochim. Acta 45(27), 4501-4509.

Sygmund, C., Gutmann, A., Krondorfer, I., Kujawa, M., Glieder, A., Pscheidt, B., Haltrich, D., Peterbauer, C., Kittl, R., (2012); *Simple and efficient expression of Agaricus meleagris pyranose dehydrogenase in Pichia pastoris*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 94(3), 695-704.

Sygmund, C., Kittl, R., Volc, J., Halada, P., Kubatova, E., Haltrich, D., Peterbauer, C.K., (2008); *Characterization of pyranose dehydrogenase from Agaricus meleagris and its application in the C-2 specific conversion of d-galactose*, J. Biotechnol. 133(3), 334-342.

Tasca, F., Timur, S., Ludwig, R., Haltrich, D., Volc, J., Antiochia, R., Gorton, L., (2007); *Amperometric Biosensors for Detection of Sugars Based on the Electrical Wiring of Different Pyranose Oxidases and Pyranose Dehydrogenases with Osmium Redox Polymer on Graphite Electrodes*, Electroanalysis 19(2-3), 294-302.

Volc, J., Sedmera, P., Halada, P., Daniel, G., Prikrylova, V., Haltrich, D., (2002); *C-3 oxidation of non-reducing sugars by a fungal pyranose dehydrogenase: spectral characterization*, J. Mol. Catal. B-Enzym. 17(2), 91-100.

Volc, J., Sedmera, P., Halada, P., Prikrylova, V., Daniel, G., (1998); *C-2 and C-3 oxidation of d-Glc, and C-2 oxidation of d-Gal by pyranose dehydrogenase from Agaricus bisporus*, Carbohydr. Res. 310(1), 151-156.

Yakovleva, M., Killyén, A., Seubert, O., Conghaile, P., Ó , MacAodha, D., Leech, D., Gonaus, C., Popescu, I.C., Peterbauer, C.K., Kjellström, S., Gorton, L., (2013); *Further insights into the catalytical properties of deglycosylated pyranose dehydrogenase from Agaricus meleagris recombinantly expressed in Pichia pastoris*, manuscript.

Yakovleva, M.E., Killyéni, A., Ortiz, R., Schulz, C., MacAodha, D., Conghaile, P.Ó., Leech, D., Popescu, I.C., Gonaus, C., Peterbauer, C.K., Gorton, L., (2012); *Recombinant pyranose dehydrogenase—A versatile enzyme possessing both mediated and direct electron transfer*, Electrochemistry Communications 24, 120-122.