

Bioelektrokataliza

Renata Bilewicz

*Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski*



Plan wykładu

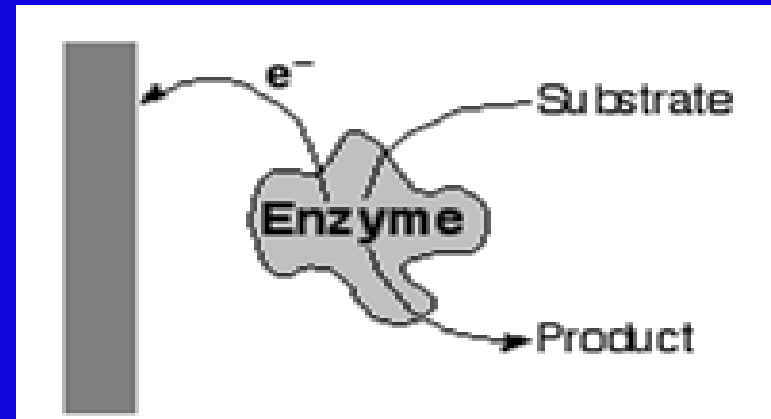
- Bioelektrokataliza – trochę historii
- Elektrokataliza mediowana (MET – mediated electron transfer)
- Elektrokataliza bezpośrednia (DET – direct electron transfer)
- Bioelektrokatalityczna redukcja tlenu
- Monitorowanie poziomu tlenu
- Enzymatyczne bioogniwa

Elektrokataliza

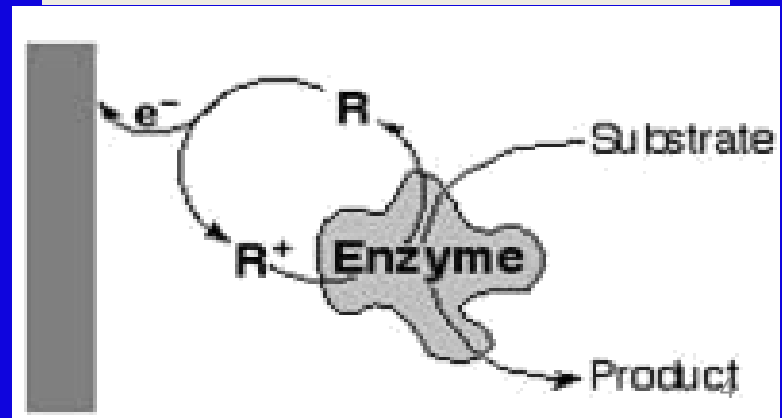
Mechanizm przeniesienia elektronów między enzymem redoks a elektrodą

- centrum aktywne enzymu jest umieszczone wewnątrz cząsteczki, apoenzym izoluje je od powierzchni elektrody,
- bezpośredni kontakt z powierzchnią metalicznej elektrody zwykle powoduje częściową lub pełną denaturację enzymu,
- konieczny jest dobry kontakt elektryczny enzymu z elektrodą

Bezpośrednie przeniesienie elektronu (DET)



Mediowane przeniesienie elektronu (MET)



Mediacja przeniesienia elektronu pomiędzy enzymem i elektrodą

Teoria Marcusa tłumaczy przeniesienie elektronu i stosuje się do układów biologicznych:

- Szybkość zewnątrzsferowego przeniesienia elektronu:

$$k_{ET} = \kappa A \exp(-\Delta G^*/RT)$$

κ – współczynnik transmisji elektronu

A – częstość zderzeń

$$\Delta G^* = (\Delta G^0 + \lambda)^2/4\lambda$$

ΔG^* i ΔG^0 – energia aktywacji i energia Gibbsa

λ – energia reorganizacji

$$\Delta G^0 = -nF \eta$$

$$\eta = (E - E^0')$$

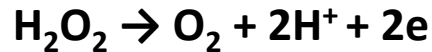
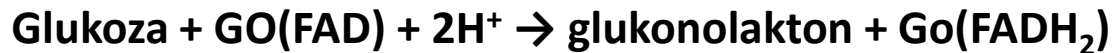
$$k_{ET} = k_0 \exp(-\beta(d-d_0))$$

β – współczynnik tunelowania

d – odległość do centrum aktywnego : potrzebny mediator

Idealny mediator: skraca odległość do centrum (d) mały, szybka reakcja elektrodowa (k_s – wysoka), szybka reakcja z enzymem

Mediowana bioelektrokataliza – amperometryczny czujnik glukozy



Elektroda drugiej generacji (Cass et al. Anal Chem, 1984):

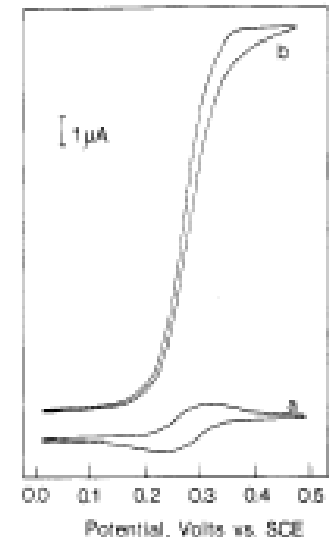
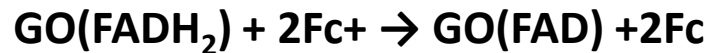
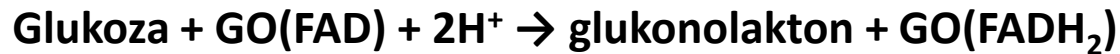
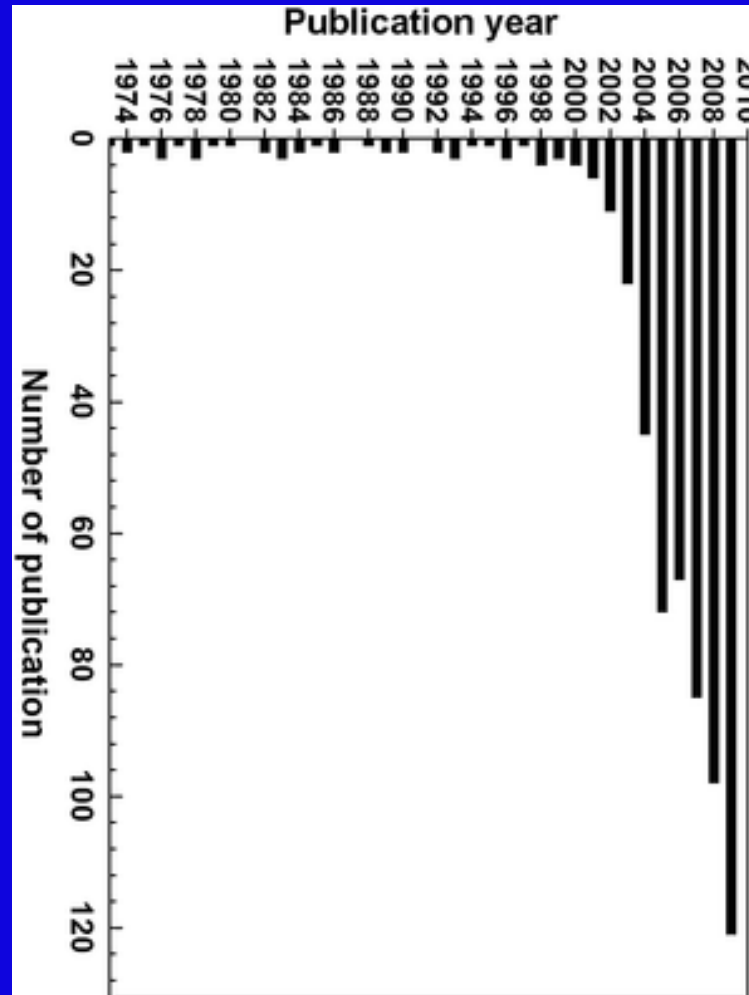


Figure 1. (a) Cyclic voltammogram of ferrocene monocarboxylic acid (0.5 mM) at pH 7 and 25 °C, in the presence of α -glucose (50 mM) at a scan rate of 1 mV s⁻¹. (b) As for (a), but with the addition of glucose oxidase (10.0 µM).

Motory wprowadzania nowych układów elektrochemicznych

Driver	Year	Power source	Important application
Flashlight	1900	Leclanche Zn-MnO₂ fuel - cell	Wireless military devices
Automotive	1930	Pb battery	Telephony
First mobile electronics	1970	Li batteries	Mobile electronics
Laptop	1995	Ion-Li batteries	miniaturization
Sensors, Implanted medical sensors	now!	Biofuel cells	Monitoring, tracking

Zainteresowanie bioogniwami wg Chemical Abstracts



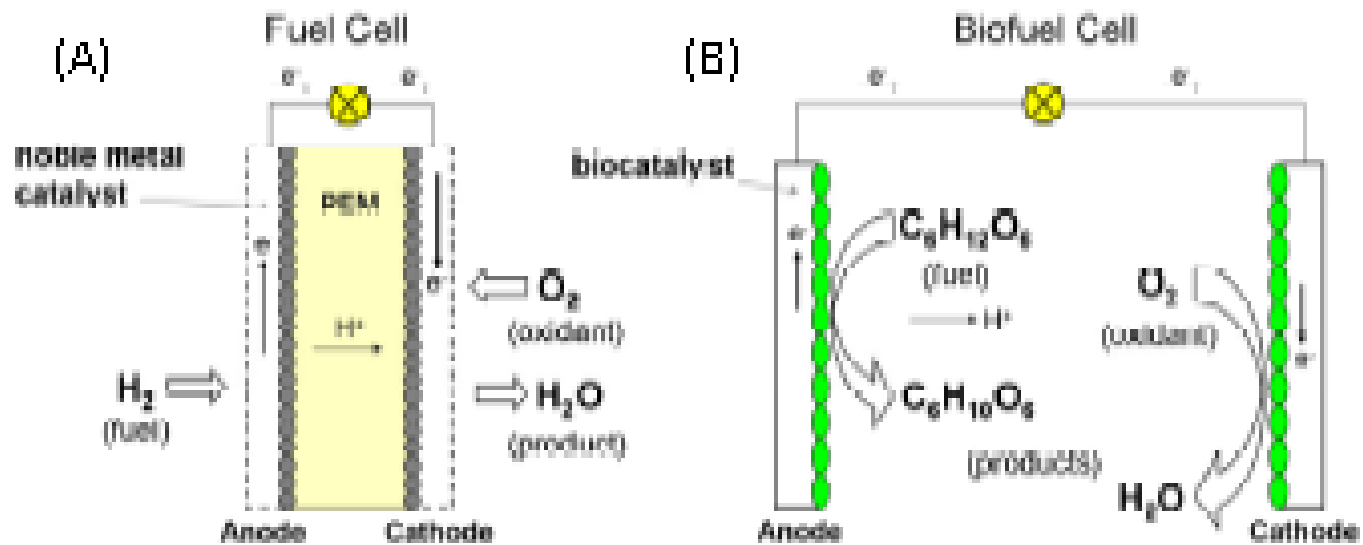


Fig. 1.1. Schematic presentation of conventional PEM fuel cell (A) and enzymatic biofuel cell (B) [3].

Ogniwo paliwowe a bioogniwo

	Traditional fuel cell	Biofuel cell
Catalyst	Noble metals	Microorganisms or enzymes
pH	Highly acid or basic pH	pH between 5.0 and 8.0
Temperature	Above 80 °C	22 to 25 °C
Efficiency (%)	40 to 60	40
Fuels	H ₂ , methanol, etc.	Carbohydrate, methanol, ethanol



www.ecn.nl/bct/products/pemfc/stack.en.html

Dlaczego odchodzimy od elektrod platynowych

- cena i dostępność
- zatrucie przez CO, H₂S etc.;
- niska selektywność;
- zatrucie środowiska

Pt prices

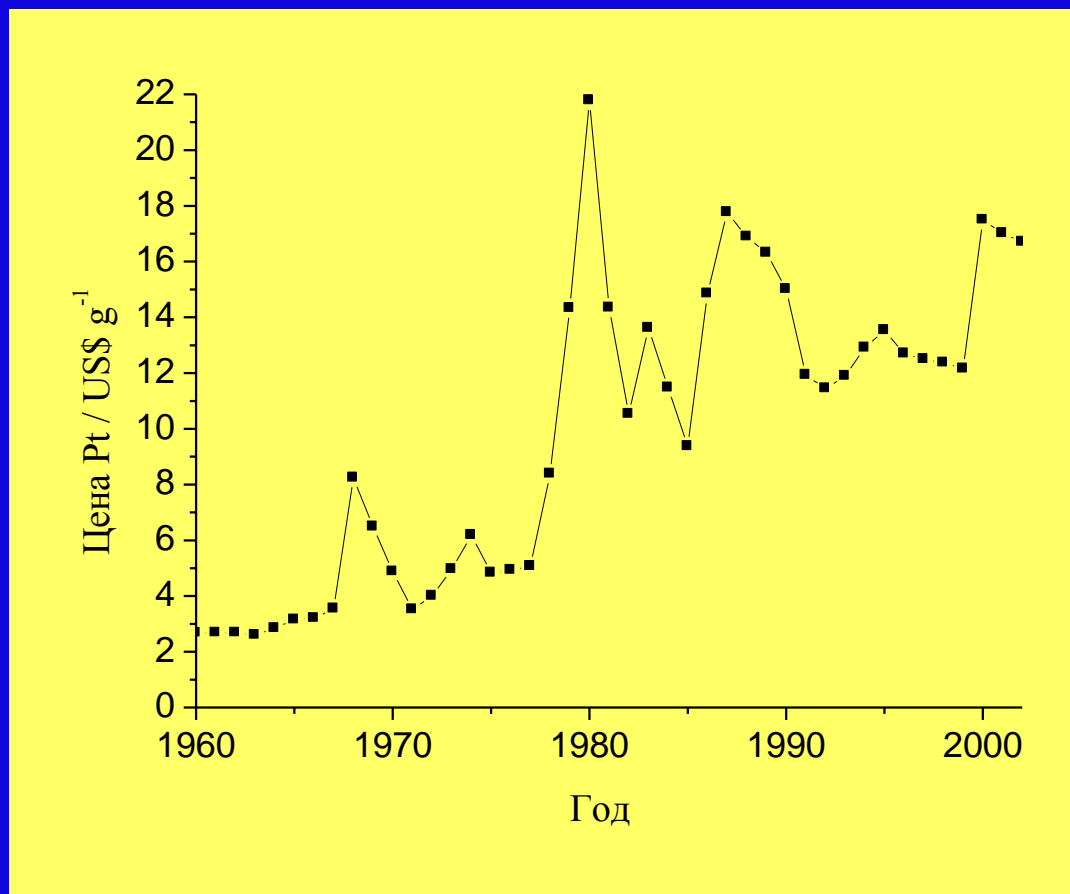


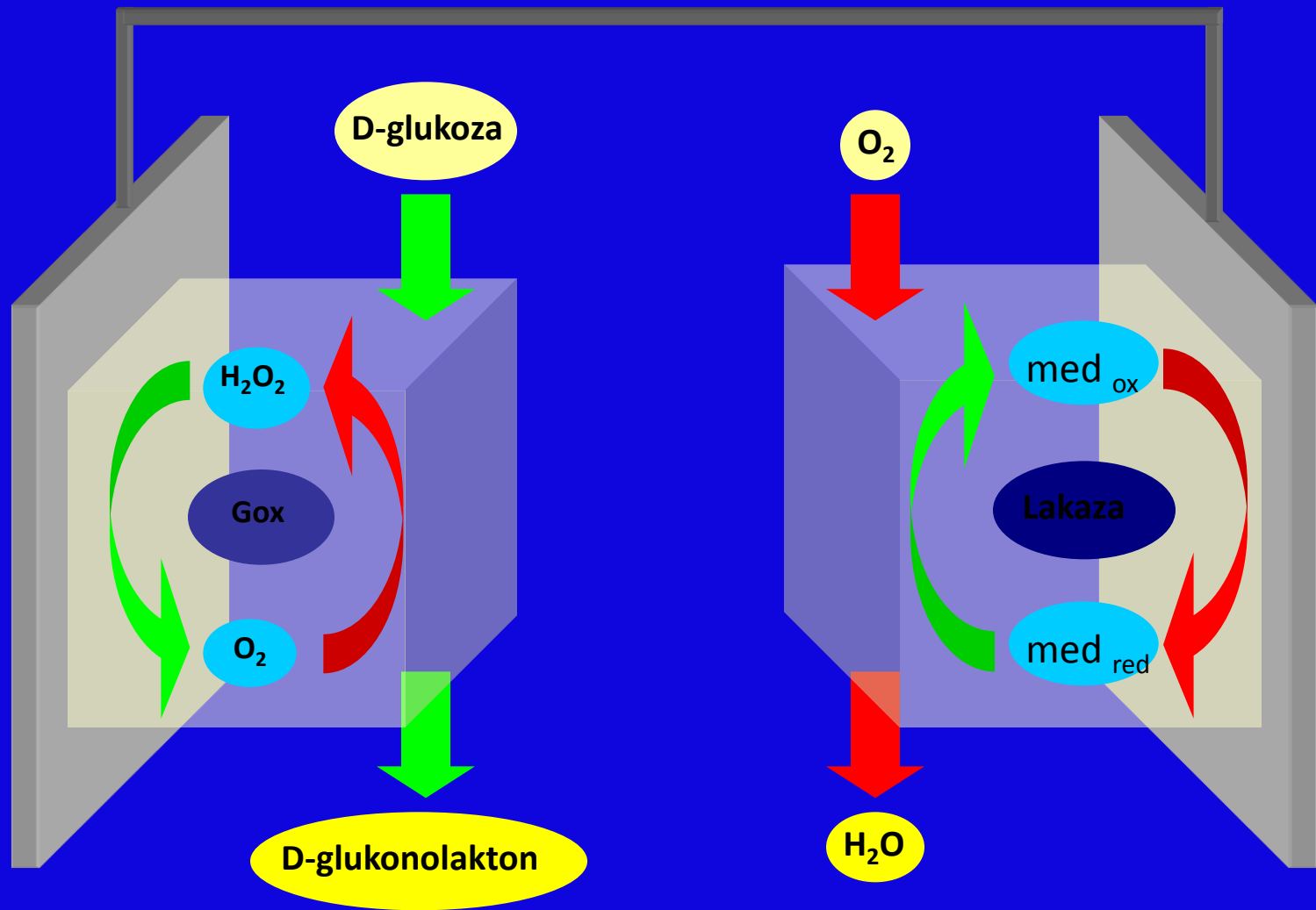
Table 3 Comparison of projected characteristics of methanol-O₂ (introduced in 1972 by James J. Auborn and the author of this article. This battery is used today) and glucose-O₂ cells

Cell	Current density	Life	pH	Temp °C	Volume	Footprint	Cost
Methanol/O ₂	> 100 mA cm ²	Years	0	>70	>1 cm ³	>1 cm ²	>\$100
Glucose/O ₂	~1 mA cm ²	Weeks	7	37	0.01 mm ³	<1 mm ²	<\$ 1

Bioogniwa paliwowe

- przekształcają energię chemiczną w elektryczną z wykorzystaniem enzymów redoks,
- mogą działać w łagodnych warunkach - w temperaturze pokojowej, w pH bliskim do neutralnego (w przeciwieństwie do katalizatorów metalicznych w ogniwach)
- wykorzystują naturalne surowce jako paliwo np. glukozę, etanol
- są odnawialne i tanie (biomasa jest tania) i jest łatwo je miniaturyzować
- woda i CO_2 powinny być jedynymi produktami procesów w bioogniwie

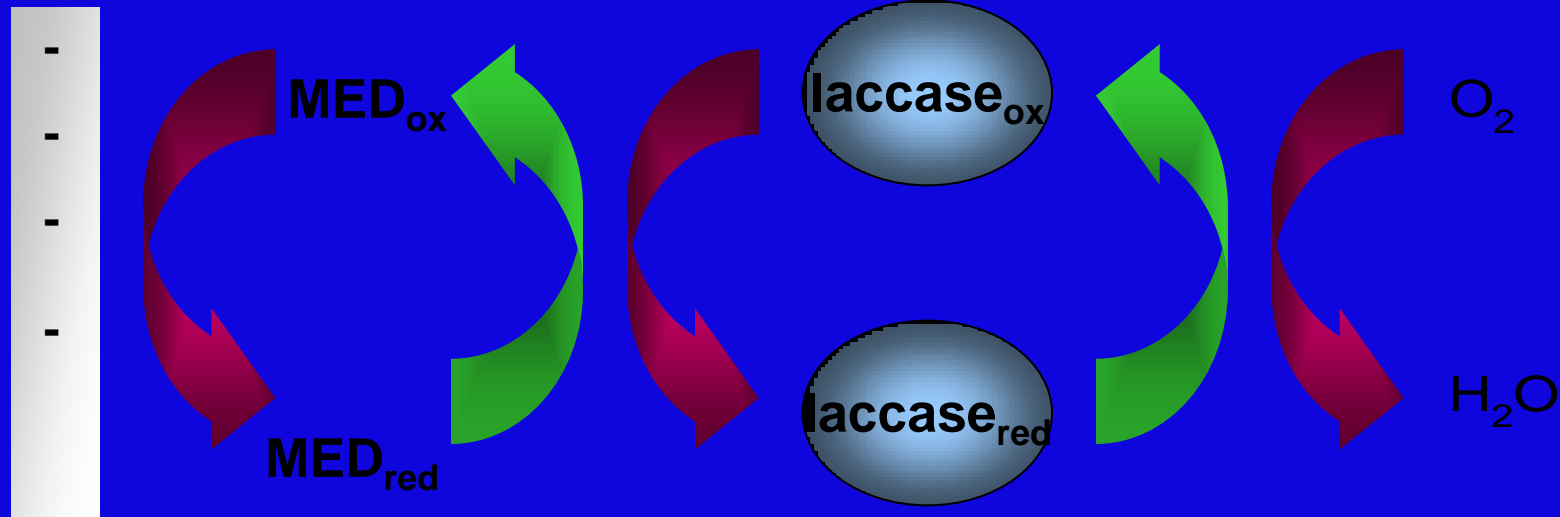
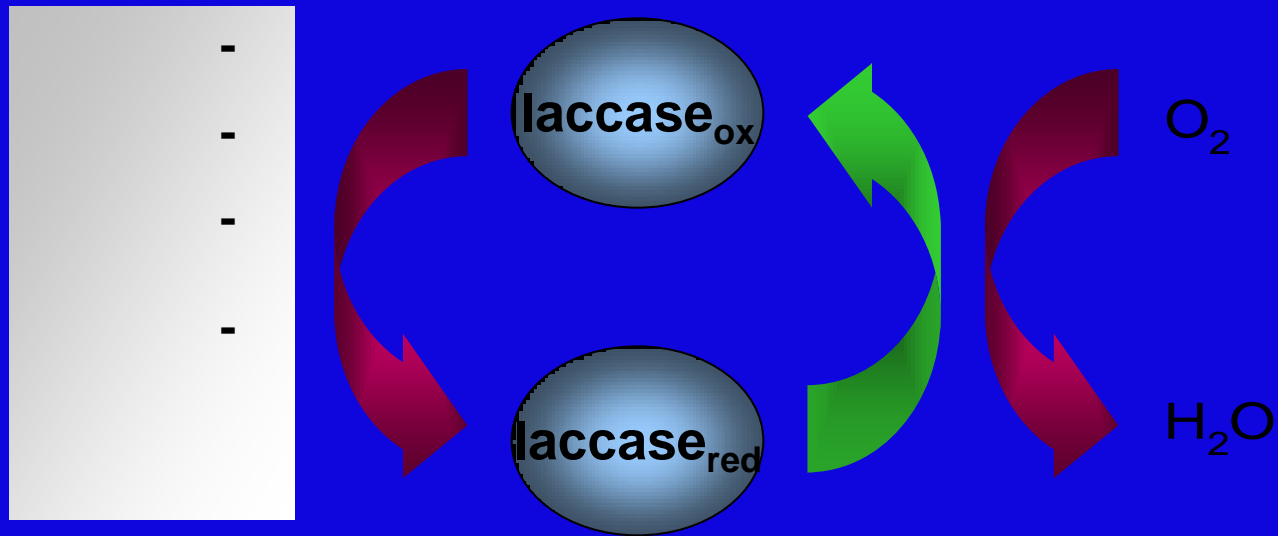
BIOOGNIWO



Problemy kontaktu materiału biologicznego z elektrodą

- Trzeba poznać strukturę biokatalizatora i położenie centrów redoks;
- Odległość elektrody od centrum aktywnego jest często zbyt duża i przenoszenie ładunku wymaga dodatku dyfundującego mediatora jako przekaźnik elektronów między białkiem i elektrodą;
- Enzym powinien być w pobliżu elektrody poprzez unieruchomienie w odpowiedniej matrycy lub wiązanie z elektrodą;
- Bezpośredni kontakt enzymu z elektrodą jest niekorzystny - enzym się denaturuje;

Kataliza enzymatyczna na elektrodzie

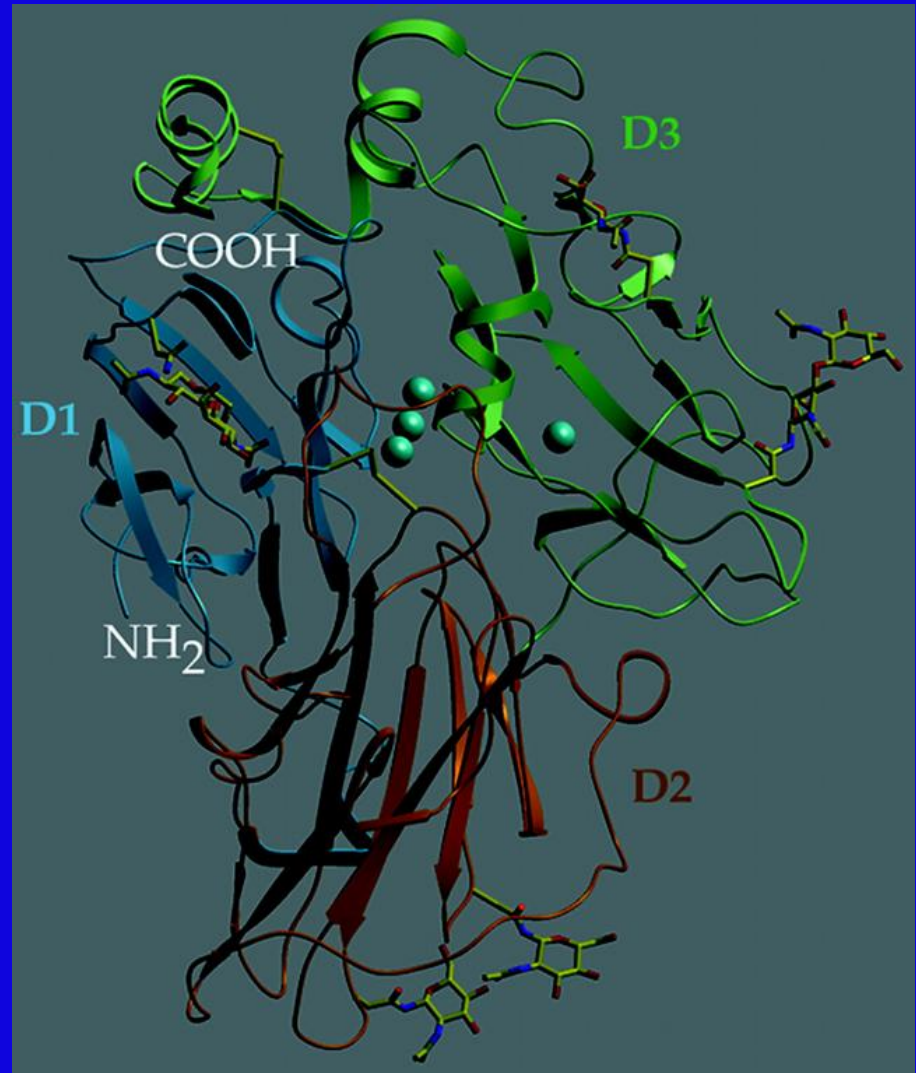


LACCASE

Crystalline structure of
Trametes versicolor laccase



Cerrena unicolor fungus



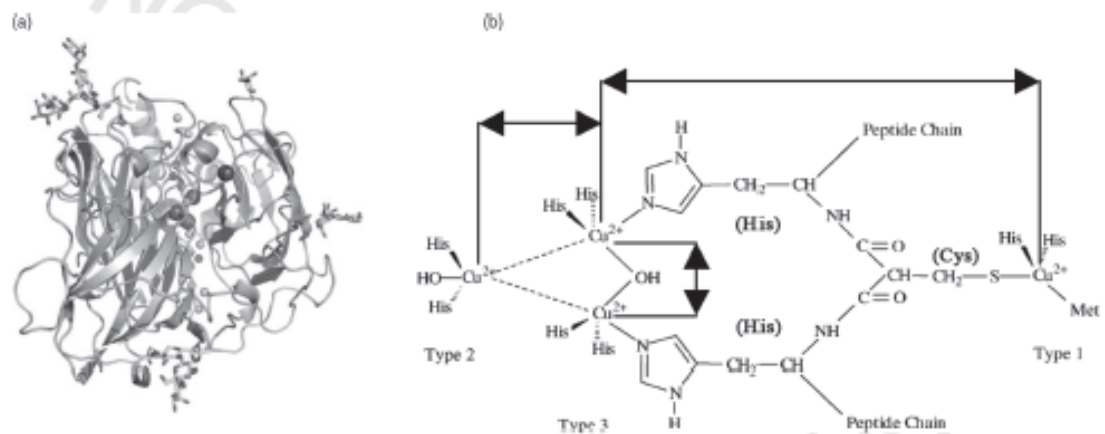
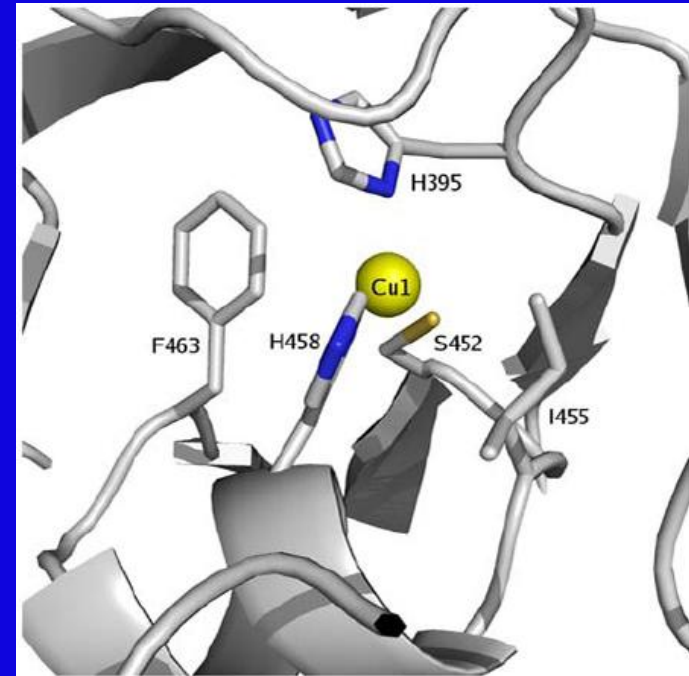
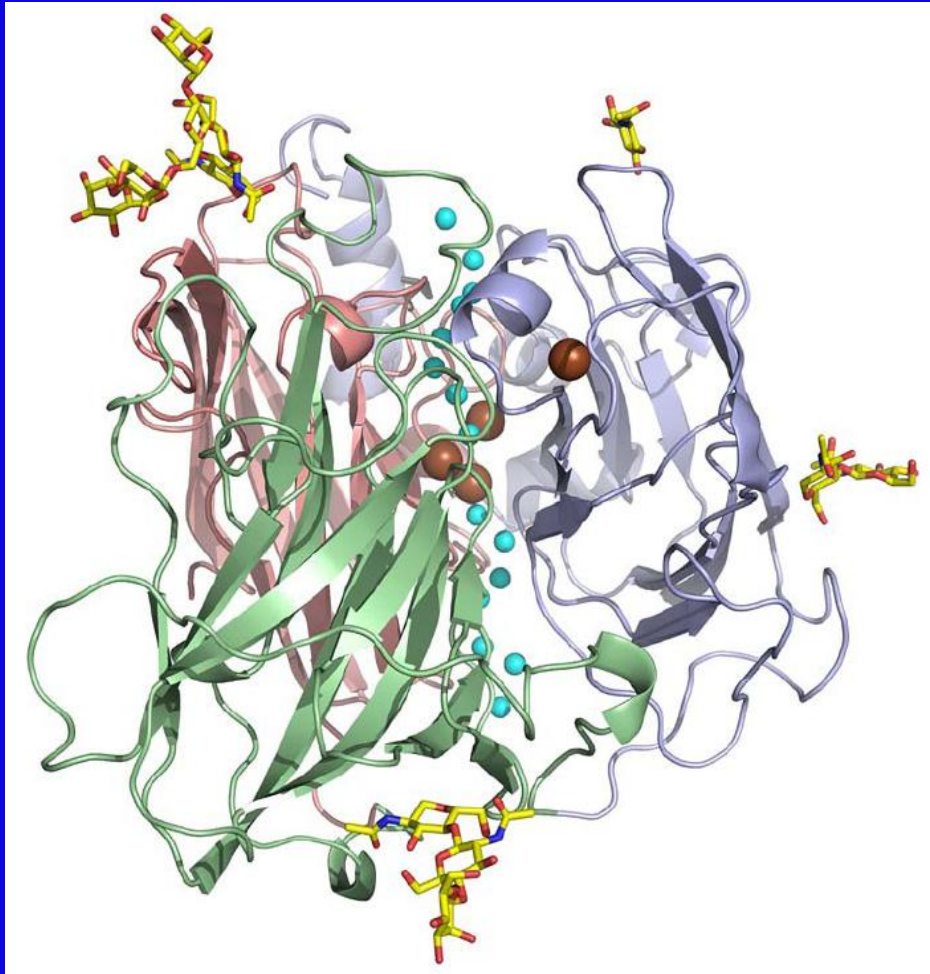


FIGURE 5.1 (a) Three-dimensional structure of lactase from *Cerrena asiatica*; (b) active center of lactase containing 4 copper atoms (types T₁, T₂, and T₃, from right to left) [19].

Three-dimensional structure of laccase from *Cerrena maxima*



T1 center of laccase and hydrophobic pocket with phenylalanine responsible for DET

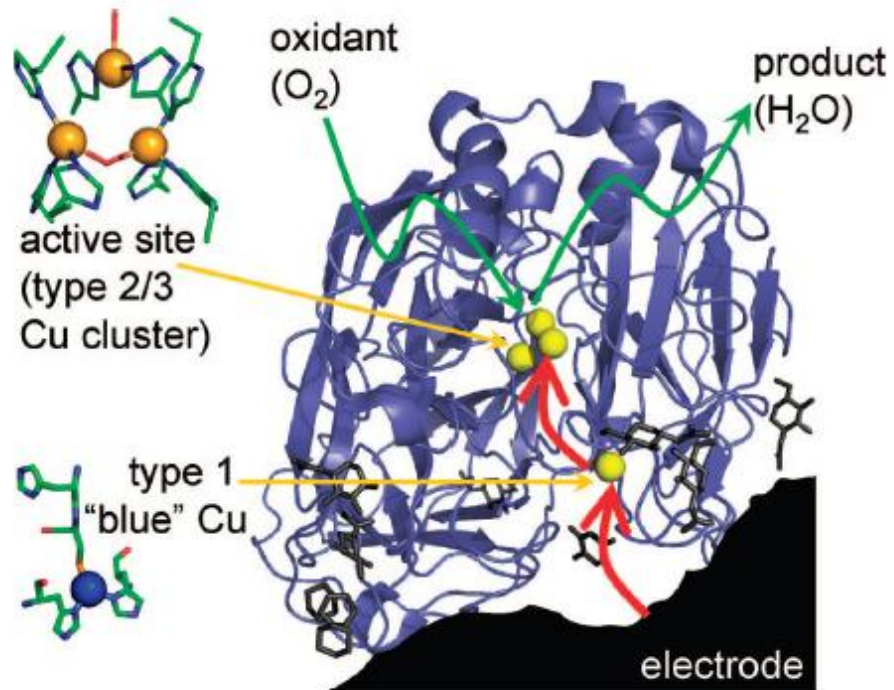
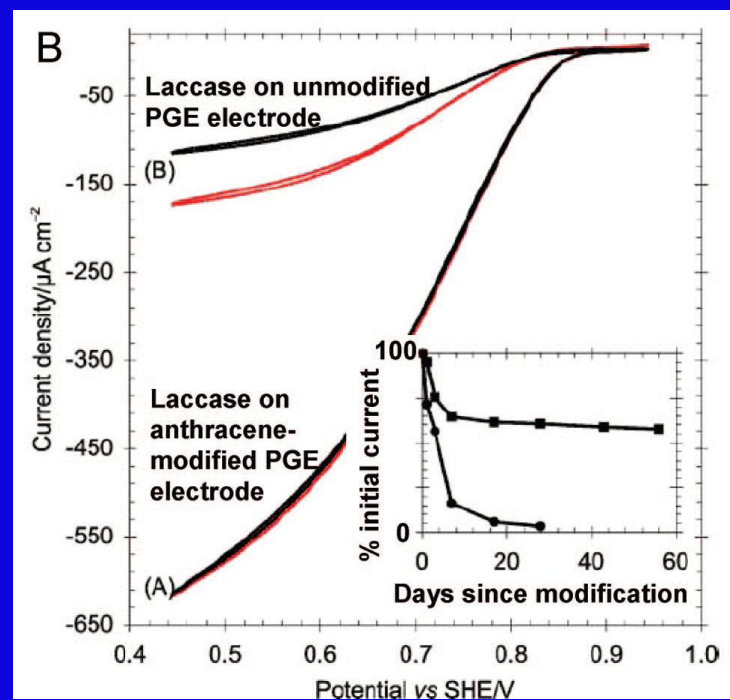
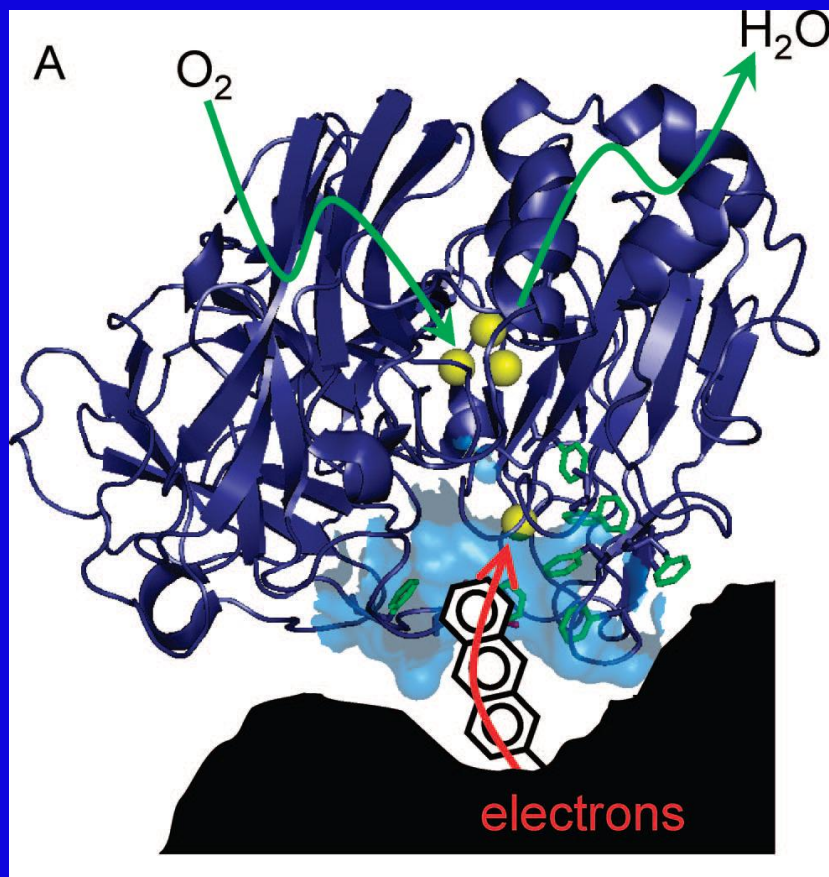


Fig. 3.2. The structure of *T. versicolor* laccase showing the protein superstructure in blue and the copper atoms as yellow spheres [83].

2-Aminoantracenen jako układ transportujący elektrony do centrum T1 lakazy.



Cracknell, 2008.

Blandford, C.F., Heath, R.S., Armstrong, F.A., Chem.Comm. 2007, 1710.

J. A. Cracknell, K.A. Vincent, F.A. Armstrong, Chem. Rev., 2008,108 , 2439.

Awidyna-Biotyna do wiązania lakazy

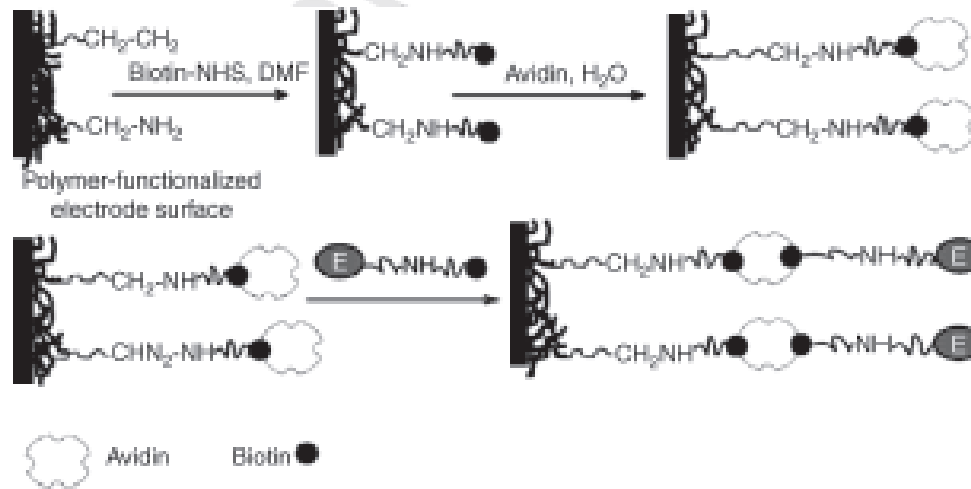


FIGURE 5.6 Construction of the lacase (E) electrodes by molecular recognition [106].

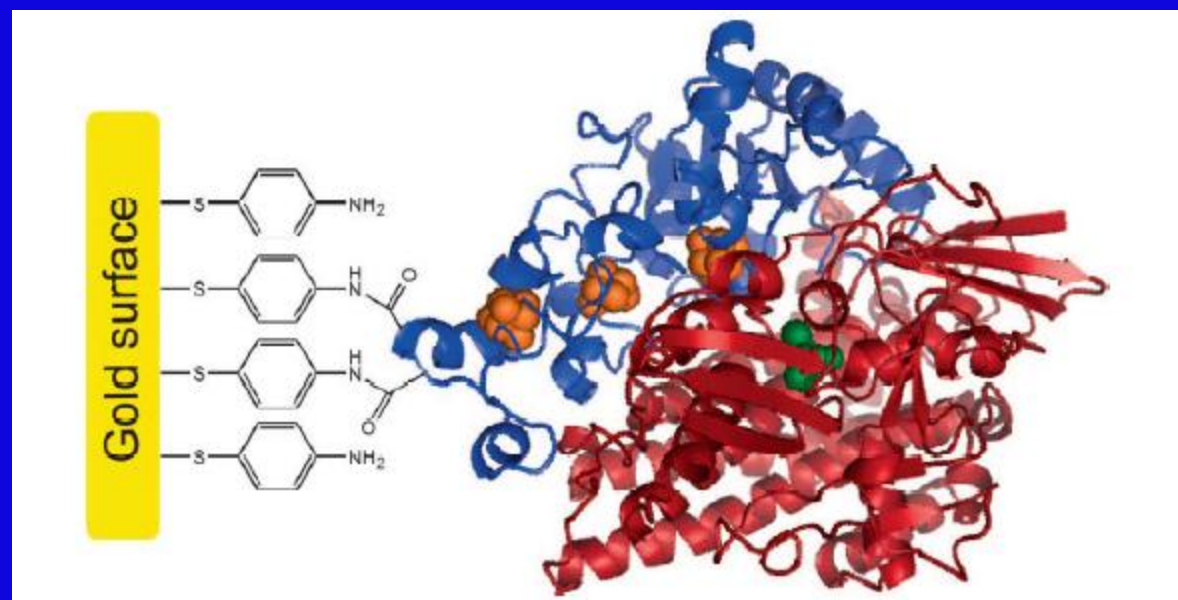
Monowarstwy organotiolowe jako łącznik elektryczny enzymu z podłożem elektrodowym



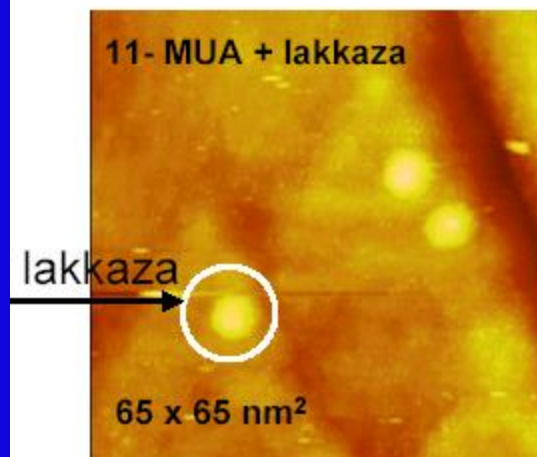
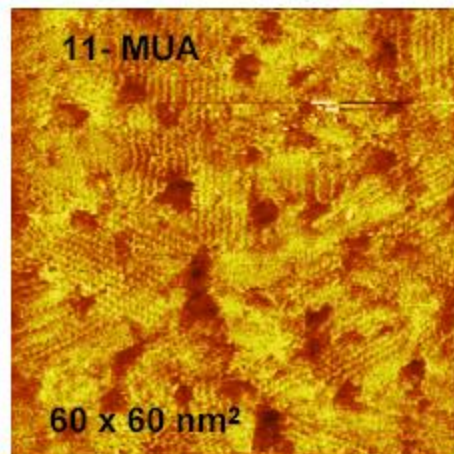
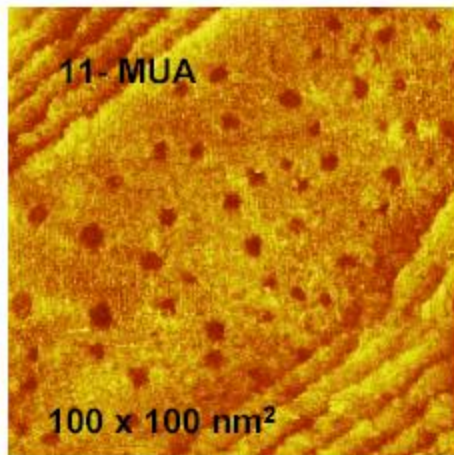
X - -SH, -S-, -S-S-, -P<,

R - grupa mostkująca np. łańcuch alkilowy

Y - -COOH, -NH₂

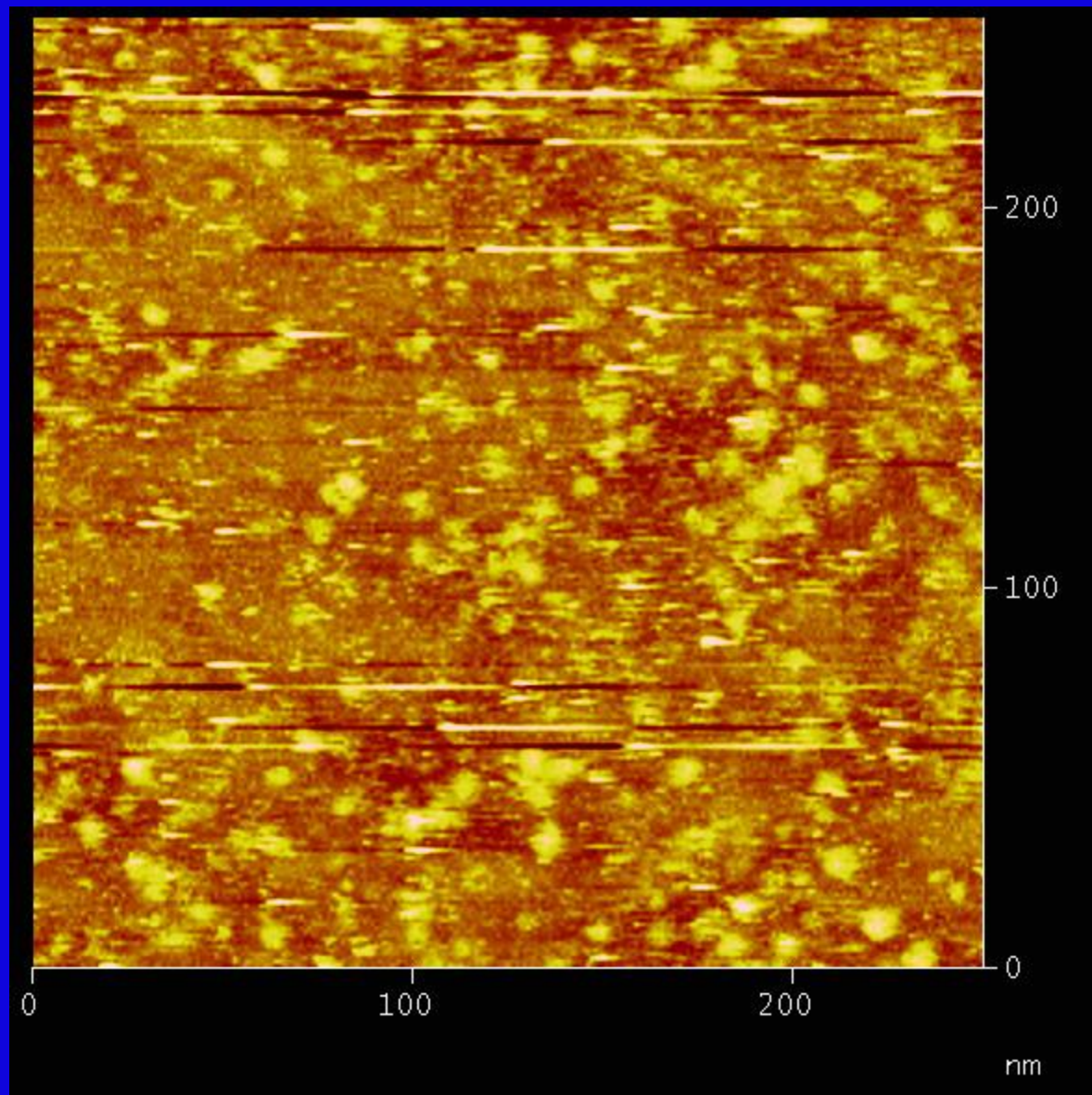


Schematic view of hydrogenase covalently attached to Au surface modified with SAM



Elektroda zmodyfikowana 11-MUA
Adsorpcja z 1 mM roztworu w EtOH + 2% CF₃COOH

Unieruchamianie lakkazy:
aktywacja grup COOH przez 2h w buforze o pH=4.8 w
obecności karbodiimidu, płukanie wodą i 20 minut w
roztworze buforowym o takim samym pH zawierającym lakkazę
(ok. 200 µg).



Wykorzystanie aminofenylowych grup i 2-aminofenolu do wiązania enzymów redoks na elektrodach

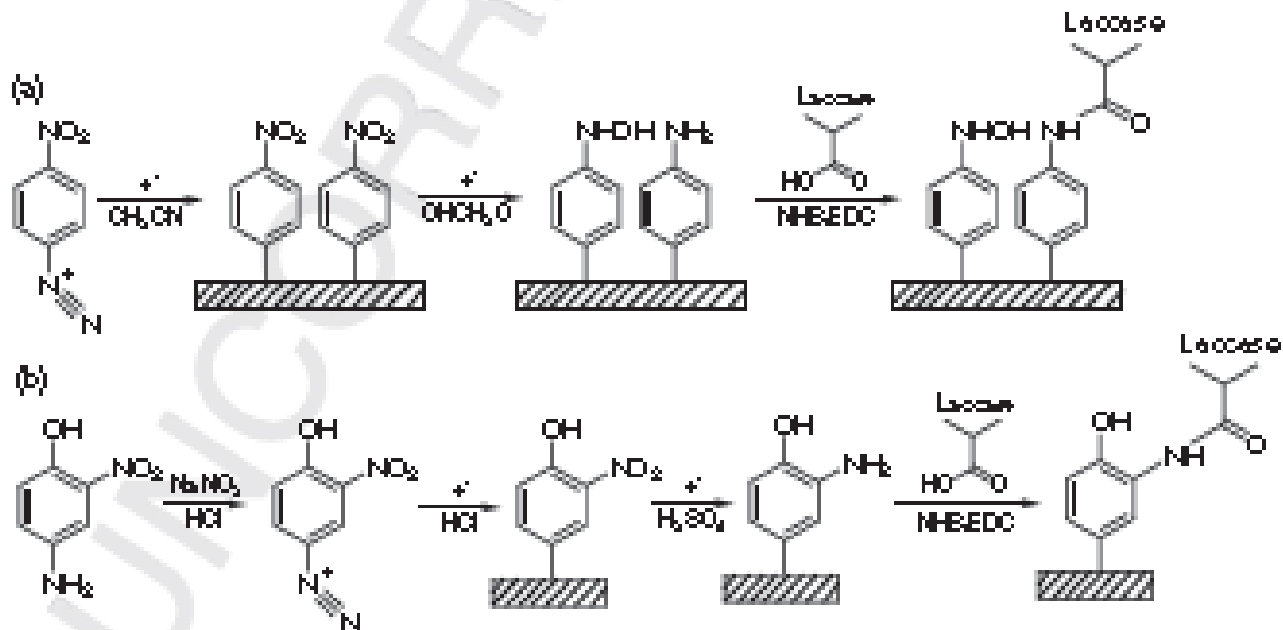


FIGURE 5.20 A scheme of electrode modification with laccase via (a) aminophenyl groups and (b) 2-aminophenol groups [217].

Wyznaczanie parametrów kinetycznych reakcji biokatalitycznej w przypadku enzymu unieruchomionego na elektrodzie wirującej

$E_{ads} + S \rightleftharpoons ES$ stała dysocjacji $K_M / \mu M$

$ES \rightarrow E + P$ stała szybkości tworzenia produktu k_{kat} / s^{-1}

k_{kat} / K_M [$\mu M^{-1} s^{-1}$] często używane do porównywania reakcji enzymatycznych

Równanie Kouteckiego-Levicha:

$$1/I_L = 1/I_{kat} + 1/I_{Lev}$$

$$I_{Lev} = 0.62nFA D^{2/3} C_V^{-1/6} \omega^{1/2}$$

ω - częstość obrotów

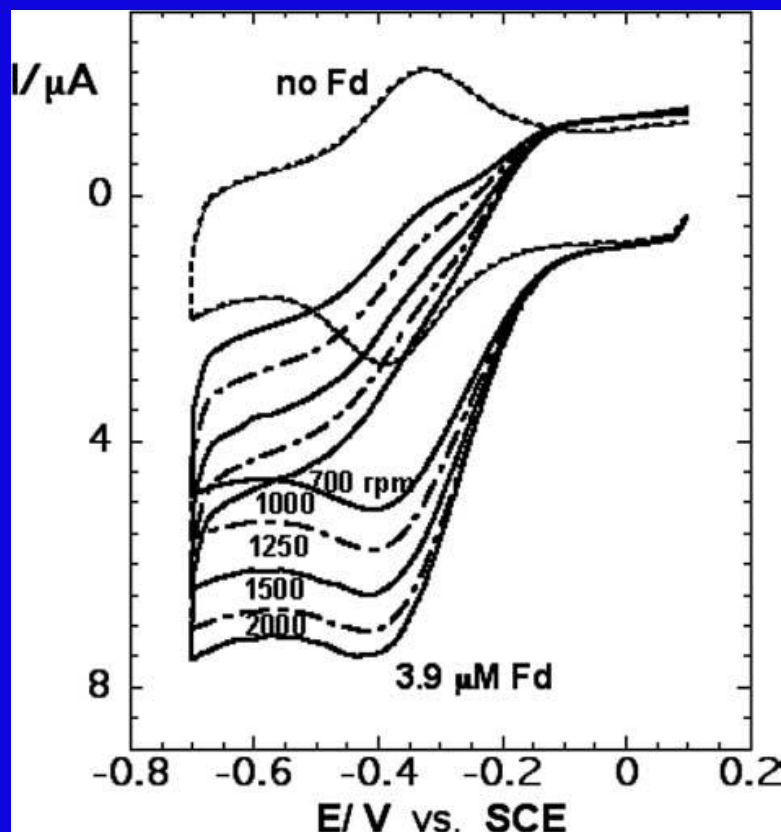
ν - lepkość kinematyczna

Elektrochemiczna forma równania Michaelisa-Menten

$$I_{kat} = nFA\Gamma k_{kat} C / (C + K_M)$$

Γ - stężenie powierzchniowe enzymu

Wyznaczanie parametrów kinetycznych reakcji biokatalitycznej w przypadku enzymu unieruchomionego na elektrodzie wirującej



Równanie Kouteckiego-Levicha:

$$1/I_L = 1/I_{\text{kat}} + 1/I_{\text{Lev}}$$

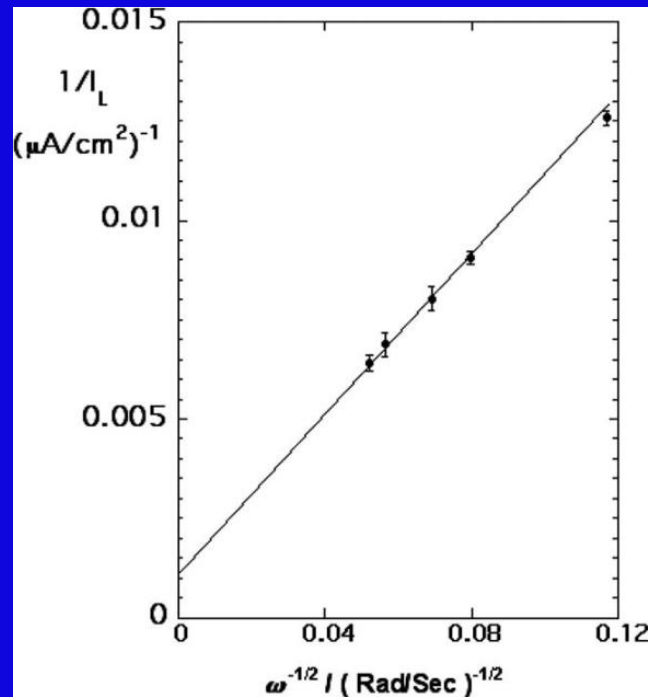
$$I_{\text{Lev}} = 0.62nFA D^{2/3} C_V^{-1/6} \omega^{1/2}$$

ω - częstość obrotów

ν - lepkość kinematyczna

Woltamogramy dla **mioglobiny** unieruchomionej w monowarstwie lipidowej na elektrodzie wirującej w obecności i nieobecności katalizowanego białka – feredoksyny jako substratu. Różne szybkości obrotów

Zależność prądu od częstości obrotów elektrody pozwala obliczyć udział prądu katalitycznego, I_{kat}



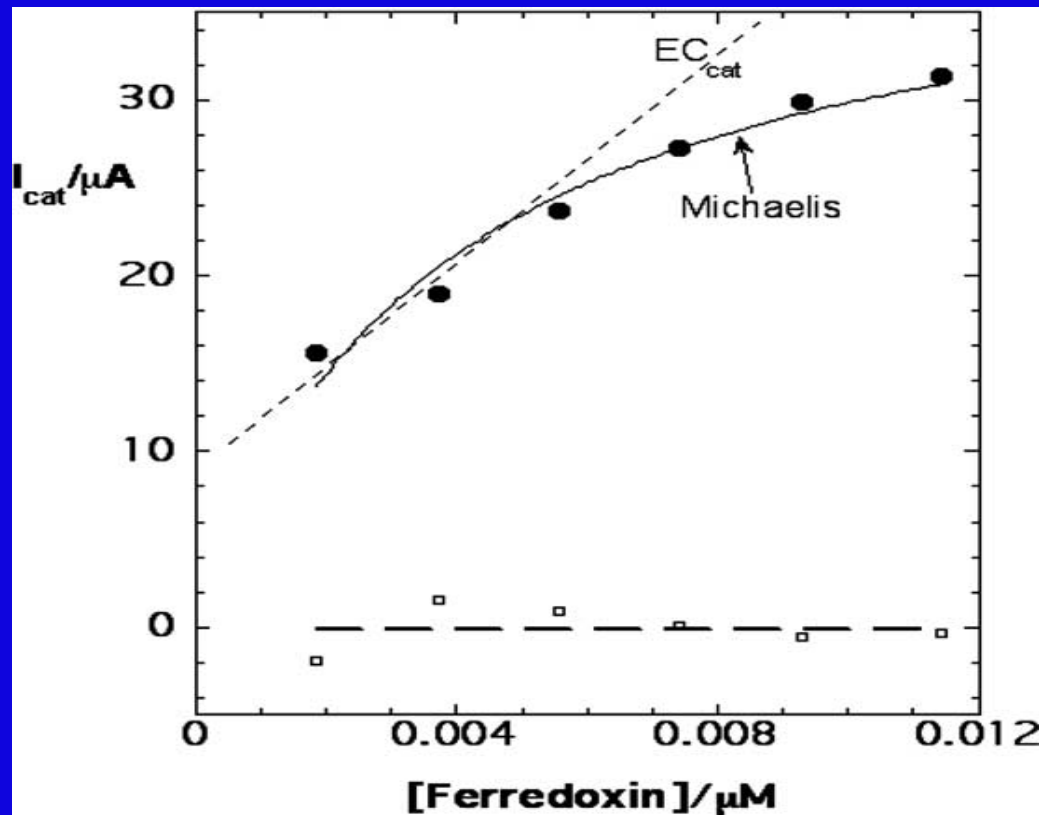
Równanie Kouteckiego-Levicha: $1/I_L = 1/I_{\text{kat}} + 1/I_{\text{lev}}$

$$I_{\text{Lev}} = 0.62nFA D^{2/3} C_V^{-1/6} \omega^{1/2}$$

ω - częstość obrotów

ν - lepkość kinematyczna

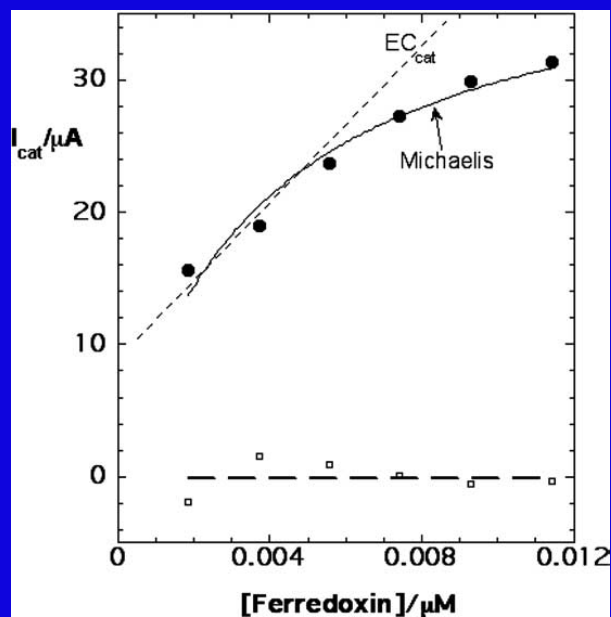
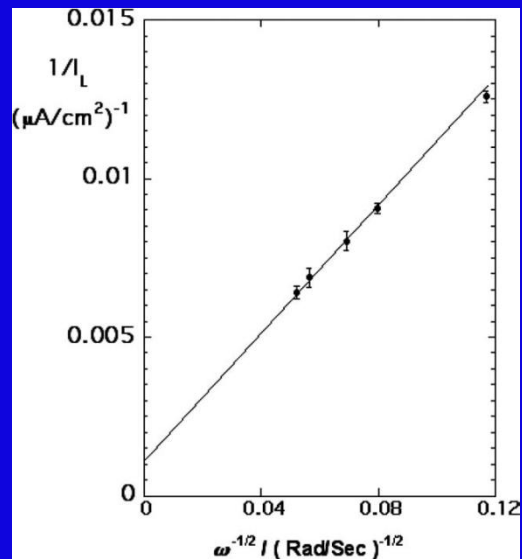
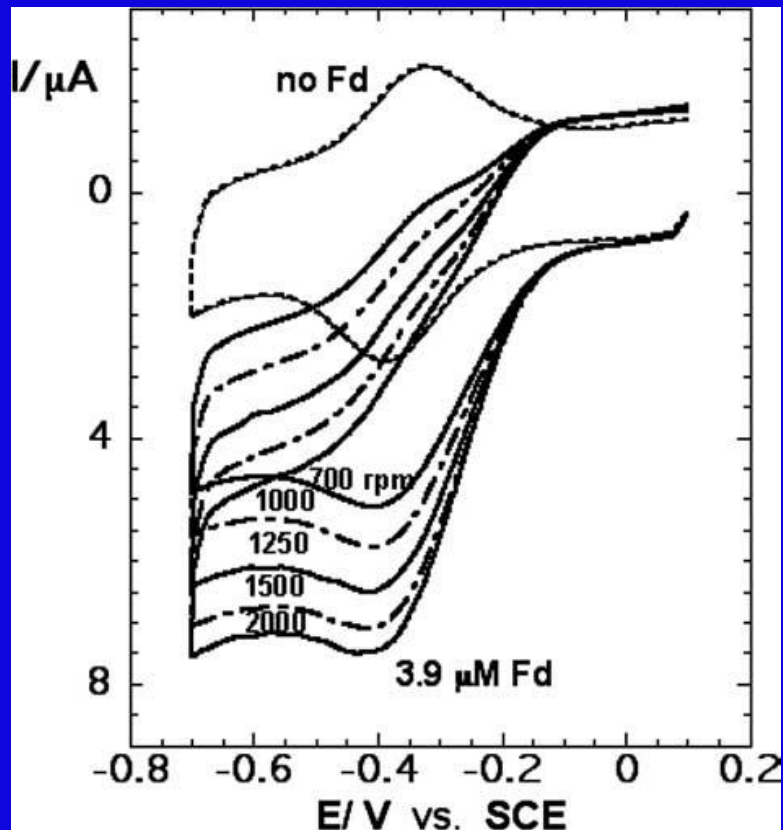
Zależność wielkości prądu katalitycznego od stężenia substratu reakcji (tu - feredoksyny)



Elektrochemiczna forma równania Michaelisa-Menten :

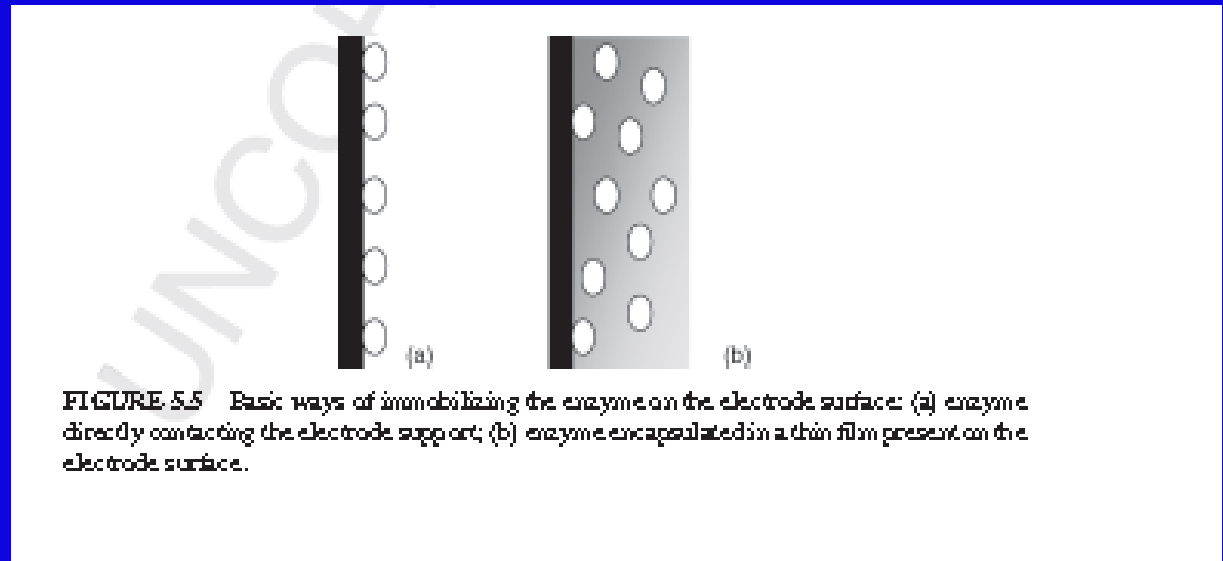
$$I_{kat} = nFA\Gamma k_{kat} C / (C + K_M) \quad \Gamma - \text{stężenie powierzchniowe enzymu}$$

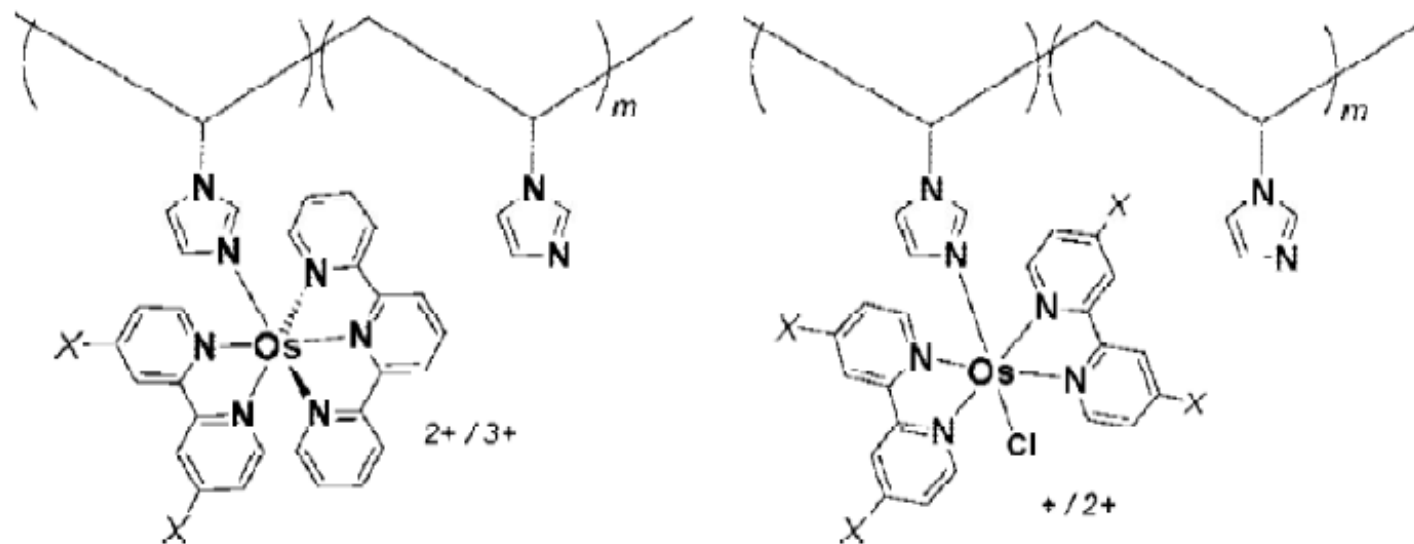
Najlepsze dopasowanie daje nam wartość $E + S \rightleftharpoons$ stałej dysocjacji kompleksu ES: $K_M / \mu M$ i stałą szybkości tworzenia produktu k_{kat} / s^{-1}



Rotating disk voltammograms of myoglobin-DMPC films with and without 3.9 μM ferredoxin at various rotation rates in pH 7 phosphate buffer containing 100 mM NaCl. Voltammogram marked "no Fd" was at 1000 rpm.

Unieruchamianie enzymu na elektrodzie





General structure of the redox polymers with the backbone polymer polyvinyl pyridine

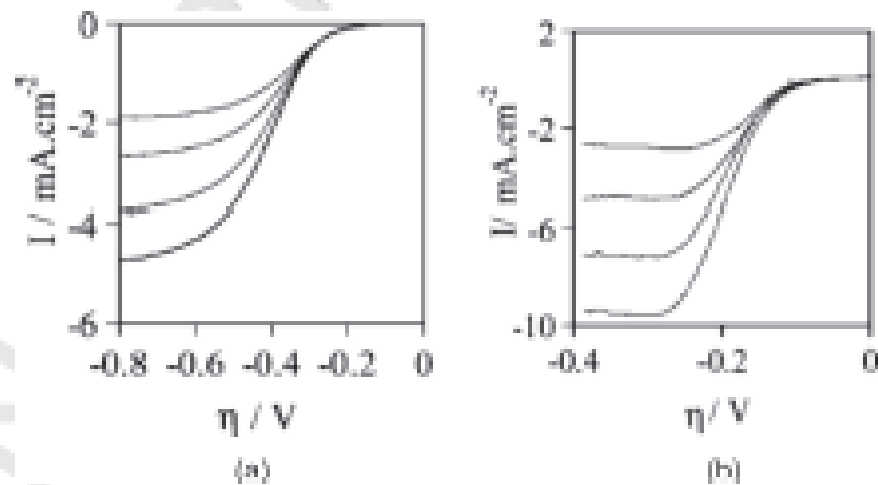


FIGURE 5.9 Comparison of the dependence of current density on overvoltage on rotating disk electrodes in deoxygenated solution at 37°C at scan rate 5 mV/s at different rotation rates: (a) Pt electrode in $0.5\text{ mol/dm}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$; (b) vitreous carbon modified by Os polymer with encapsulated bovine in saline phosphate buffer [116].

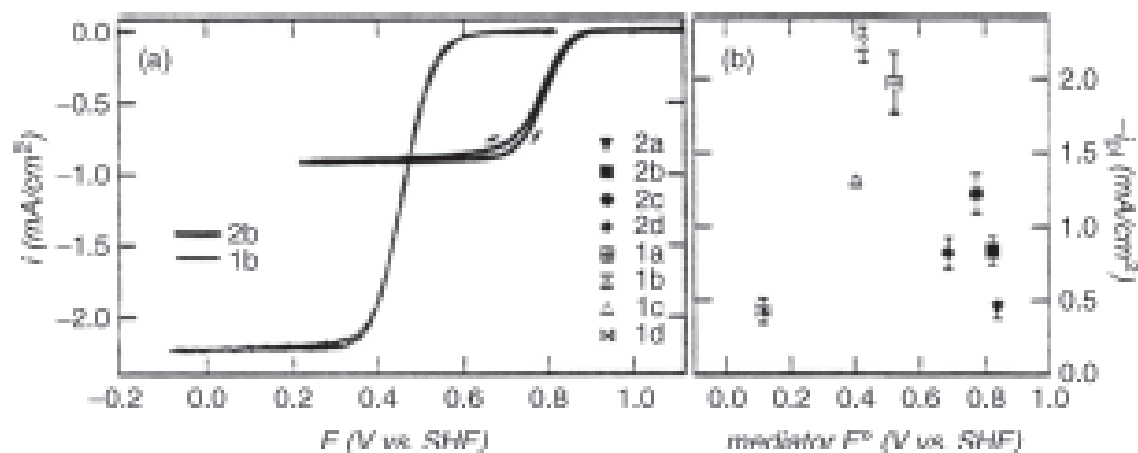
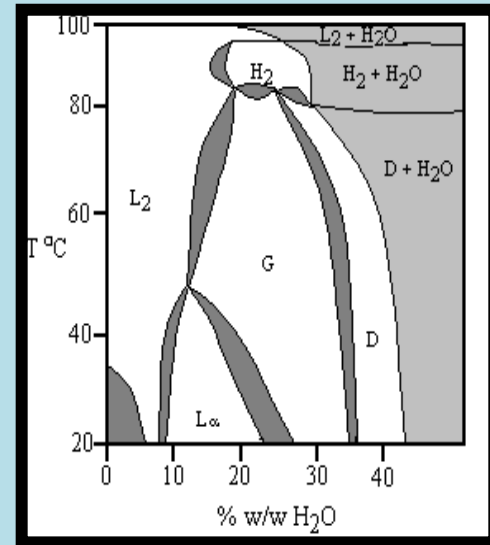
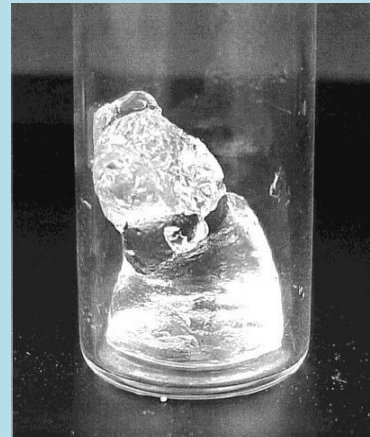
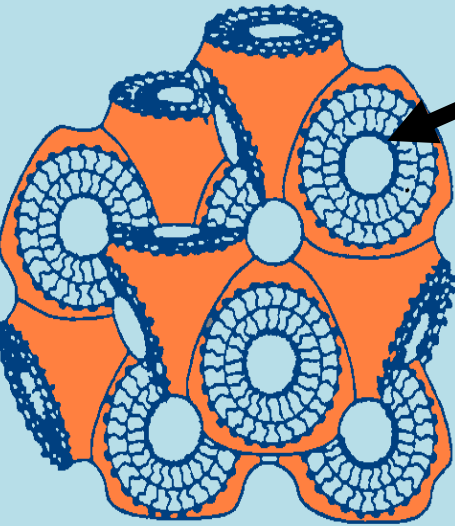
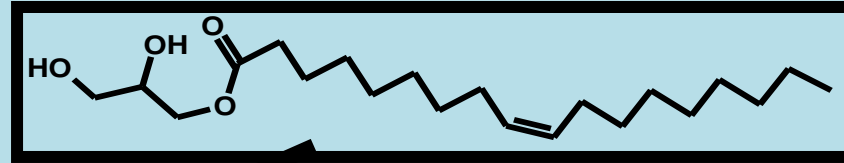


FIGURE 5.10 (a) Polarization curves obtained with rotated glassy carbon disk electrode modified by two selected osmium polymers in 1 atm O₂ saturated citrate buffer at 900 rpm rotation, scan rate 1 mV/s (b) plateau current values for electrode modified with different osmium polymers versus their redox potentials [110].

Ciekłokrystaliczna faza kubiczna

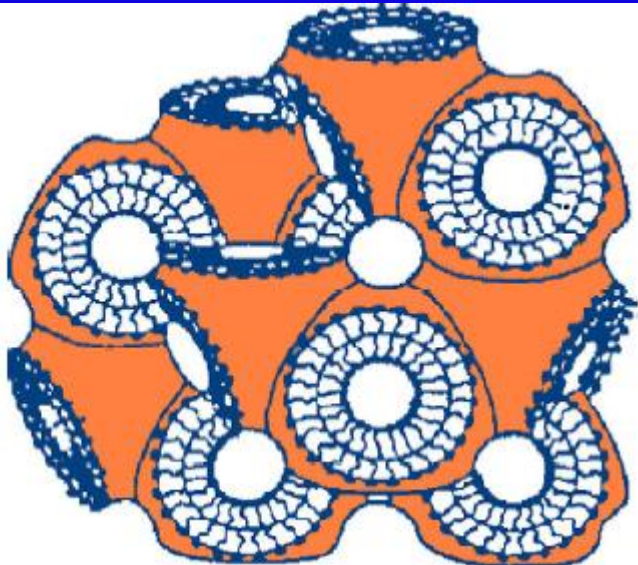
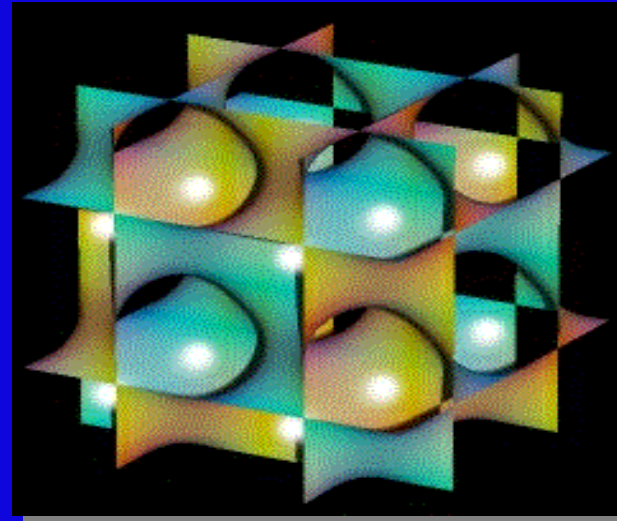
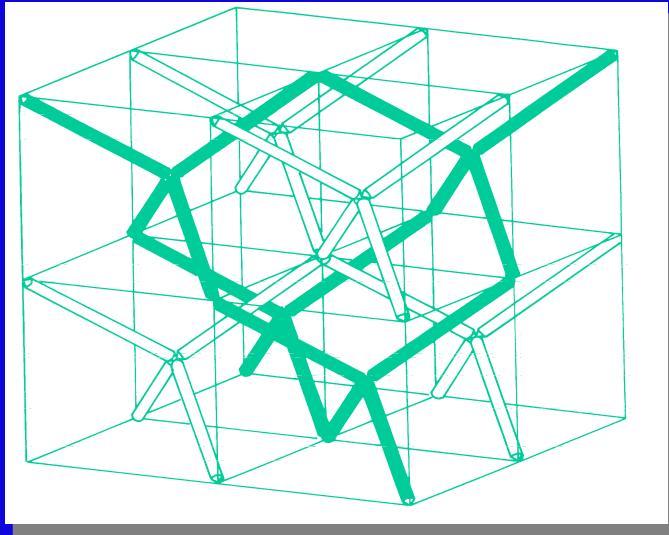


Cubic phase structure

Phase diagram for monoolein-water system

Eriksson P.O., Lindblom G., Biophysical Journal 64 (1993) 129-136 Spicer, P.T., Hayden, K.L., Lynch, M.L., Ofori-Boateng, A., Burns, J.L., Langmuir 2001, 17, 5748-5756

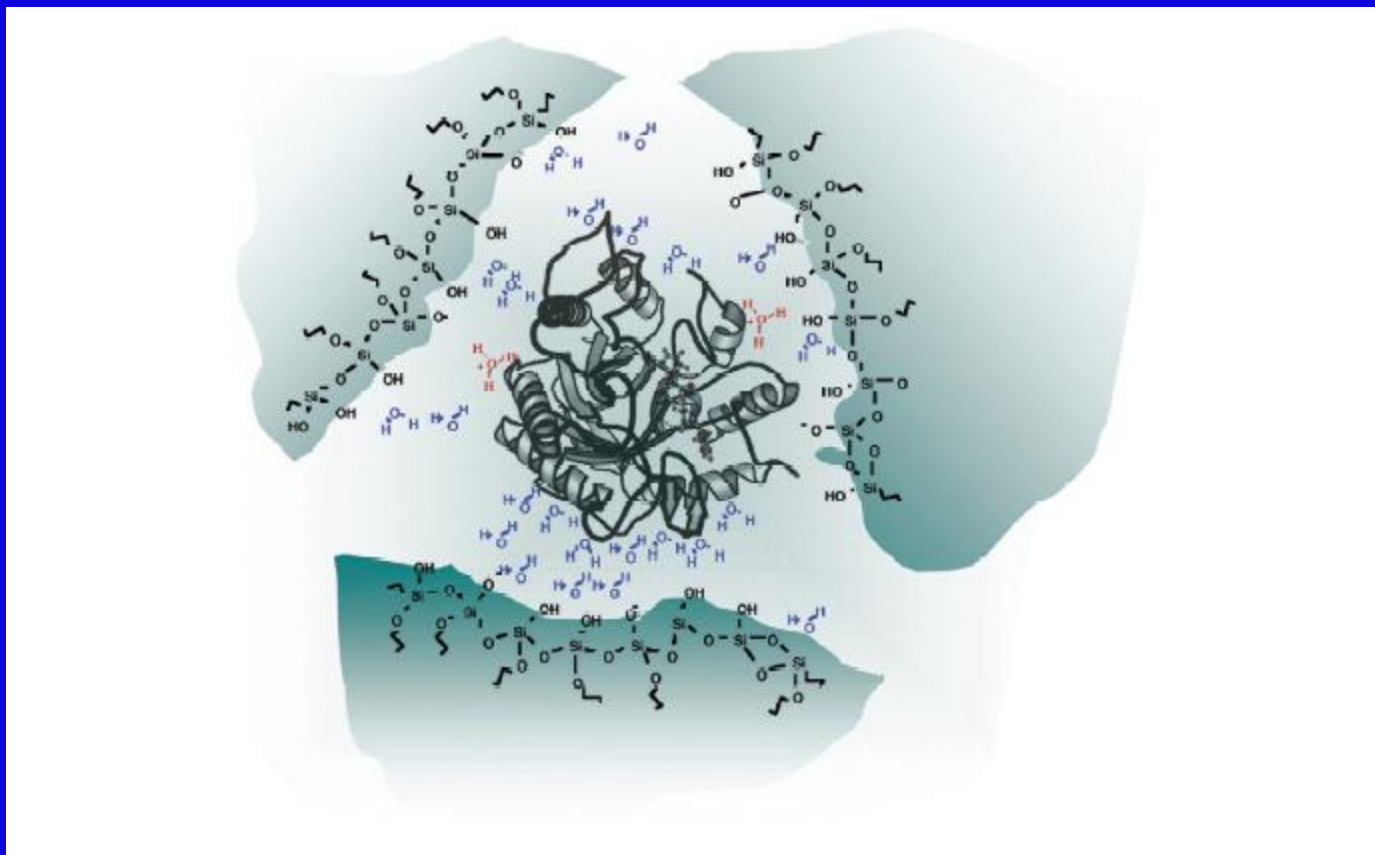
Struktura ciekłokrystalicznej fazy kubicznej



P. Rowiński, A. Korytkowska, R. Bilewicz, „Diffusion of Hydrophilic Probes in Bicontinuous lipidic Cubic Phases”, Chem.Phys.Lipids. 124(2003)147.

E. Nazaruk R. Bilewicz G. Lindblom B. Lindholm-Sethson “Biosensors based on Cubic Phases”, ABC, 2008,391,1569-1578

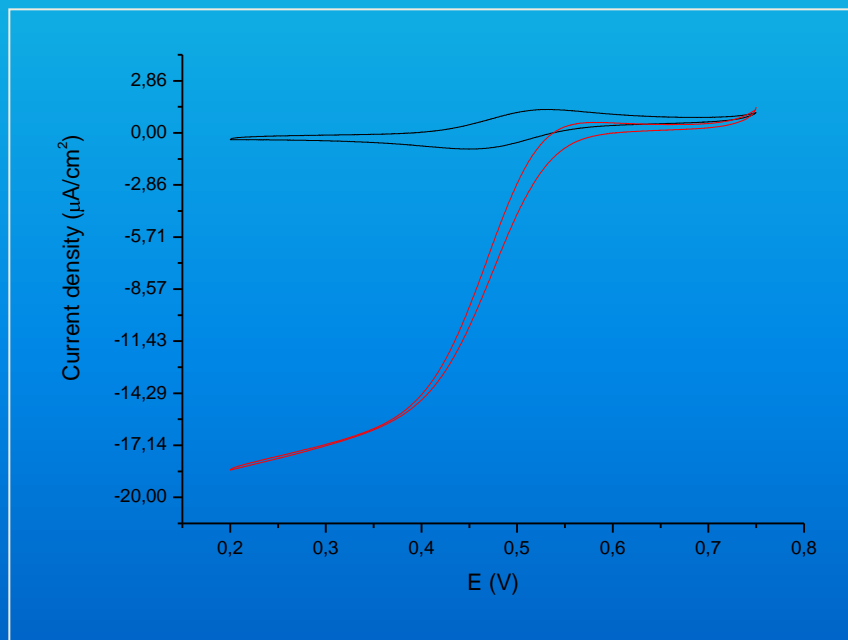
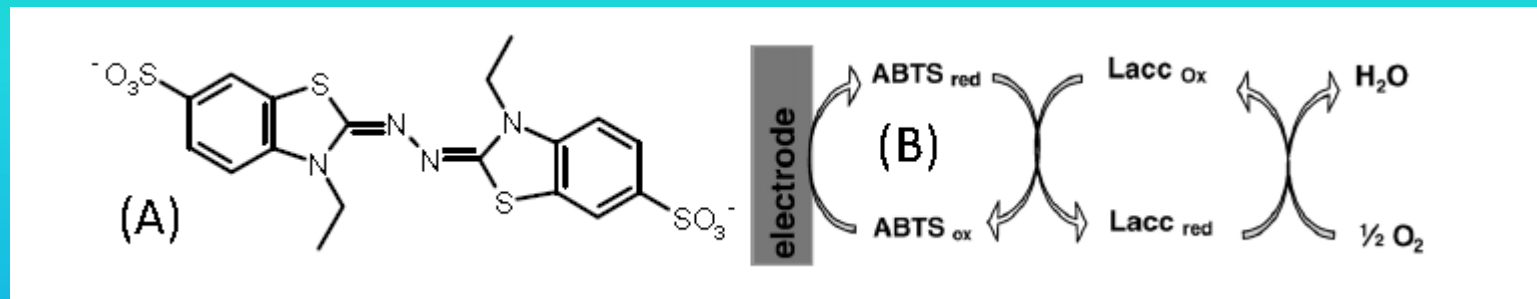
Elektrody ceramiczne – lakaza pułapkowana w matrycy krzemianowej



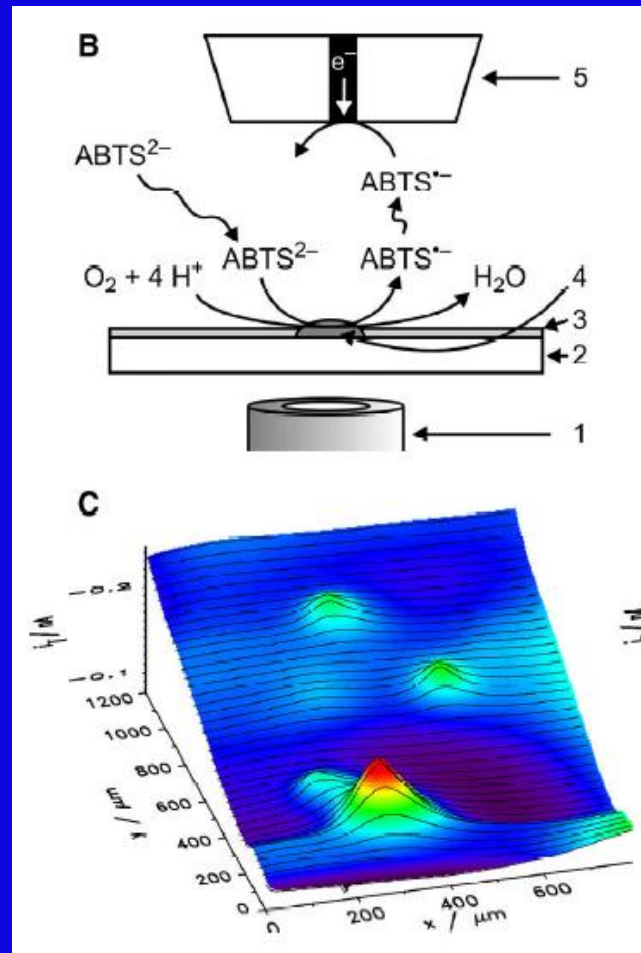
Schematic view of the entrapped enzyme inside a pore in silicate matrix

Mediowana bioelektrokatalityczna redukcja tlenu

ABTS - 2,2'-Azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy kwas)



Mapowanie aktywności katalitycznej lakazy w stosunku do tlenu metodą SECM (skaningowa mikroskopia elektrochemiczna)



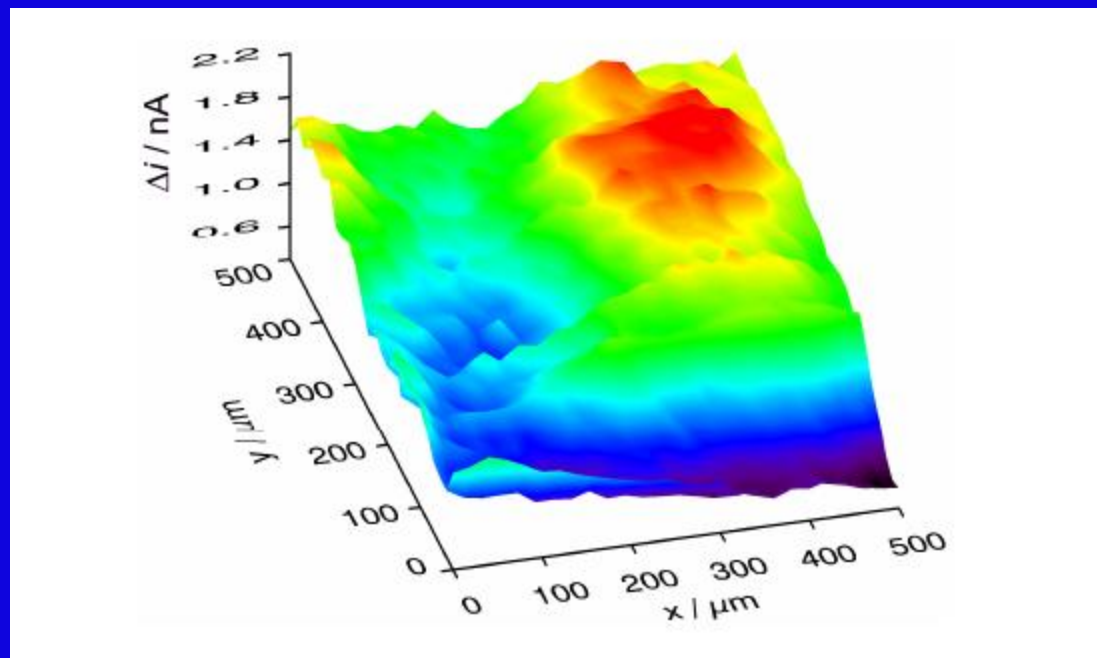


Fig. 13.15. SECM (RC mode) visualization of lateral activity distribution of Syr-CCE/Lc in 0.1 M phosphate buffer (pH 4.8) saturated with air. The image is a plot of the differences between currents obtained when sample is disconnected and with $E_S = 0.1$ V (see Fig. 13.14 A and B for individual images).

Organizacja warstwowego układu z enzymem

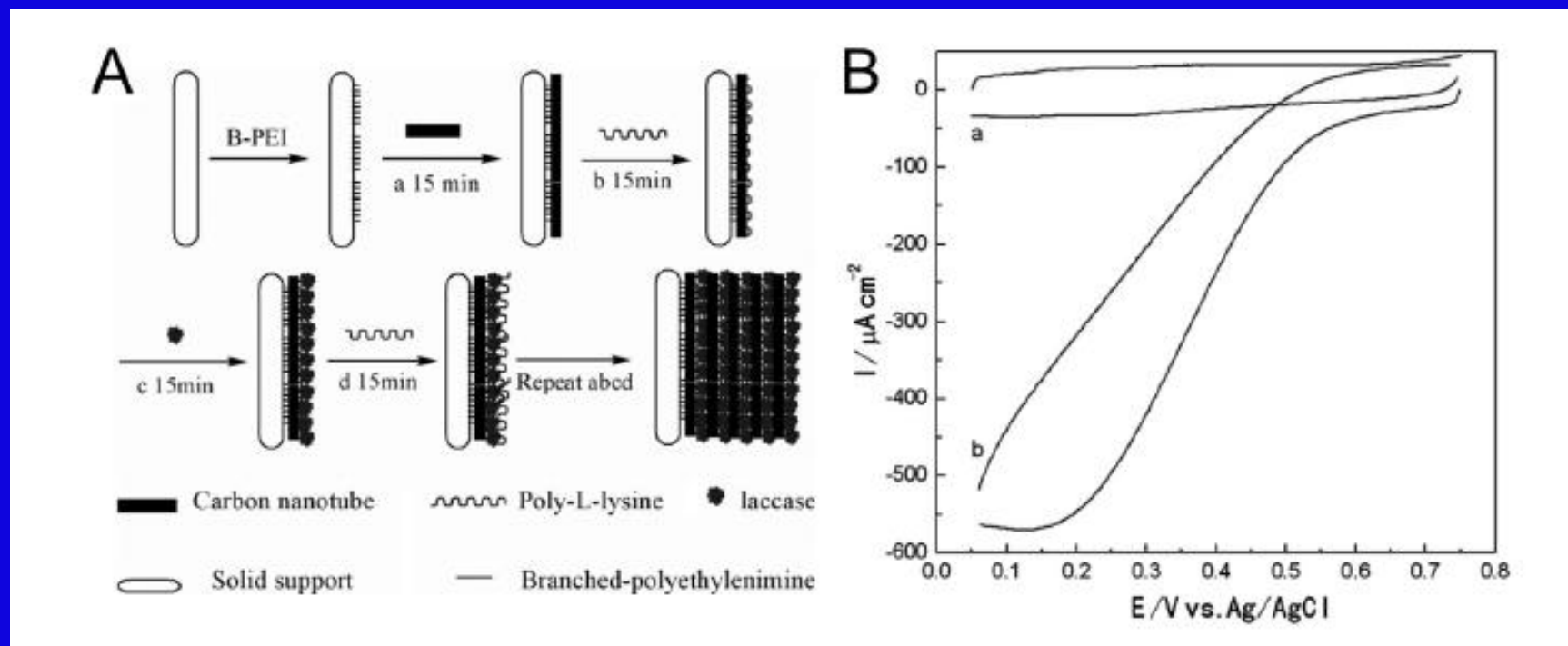


Fig. 3.12. (A) Assembly process of the (MWNT/PLL/laccase) multilayer film. (B) CVs of the MWNTs/PLL/laccase modified ITO electrodes in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0), under (a) N_2 -saturated condition, and (b) air-saturated condition, respectively. Scan rate: 50 mV s^{-1} .

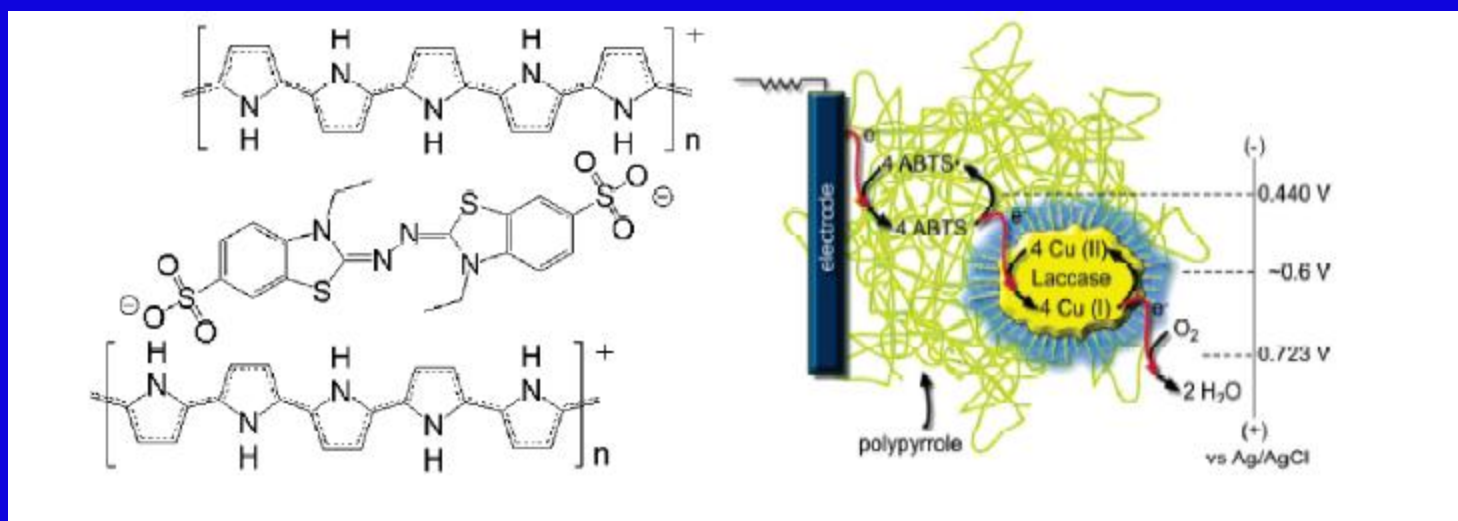
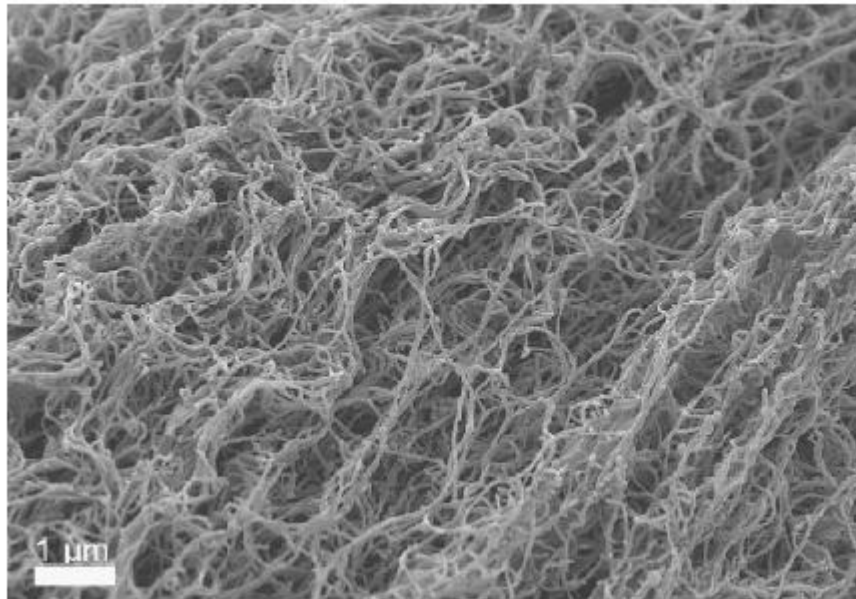


Fig. 4.5. Molecular structure of polypyrrole and ABTS composite and a scheme of bio-ORR at an electrode coated with this composite and laccase [151].

Anoda/matryca/mediator	Katoda/matryca/mediator	Potencjał obwodu otwartego (V_{oc})	Gęstość mocy ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)	Literatura
Matryca polipirol, GOx, mediator: pochodna hydroksychinoliny, HQS	Matryca polipirol,, Lc mediator: ABTS	0.24	19 at 0.24 V	Brunel et al.. Elchem. Comm. 2007
Aerożele węglowe – dehydrogenaza D-fruktozy	Aerożele (CG) węglowe Laccase - ABTS	0.580	850\wirująca elektroda	Kamitaka,Kano PhsChemChemPh ys2007,9
zmodyfikowane dehydrogenazą glukozową (lub alkoholową dehydrogenazą) nanorurki SWCNT, NADPH - mediator	zmodyfikowane BOD nanorurki SWCNT NAD+ jako mediator	0.7 (0.6)	23 (48)	Yan, Yehezkeli, Willner Chem Eur J 2007,13
Grafit porowaty. GOx, mediator: FcCOOH	Grafit porowaty, Lc mediator: ABTS	0.41	2	Liu et al., Chem. Eur. J. 2005



SEM image of a CNTs agglomerate

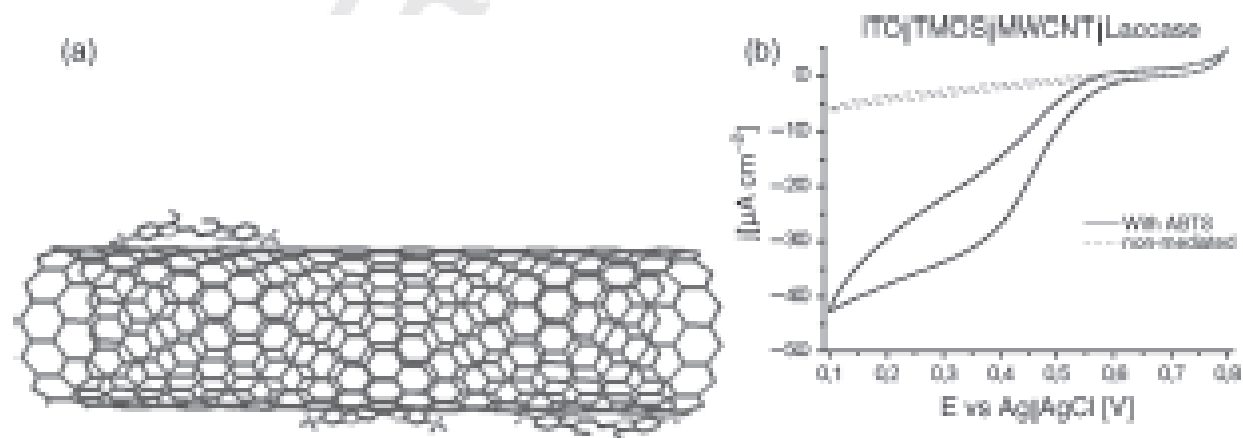


FIGURE 5.14 A scheme of adsorbed $ABTS^{2-}$ on carbon nanotube (a) The voltammetric curve (scan rate 1 mV/s) was obtained with electrode modified by the sol-gel processed silicate film with encapsulated laccase in dioxygen saturated buffer solution; the solid curve was obtained after adsorption of $ABTS^{2-}$ [170].

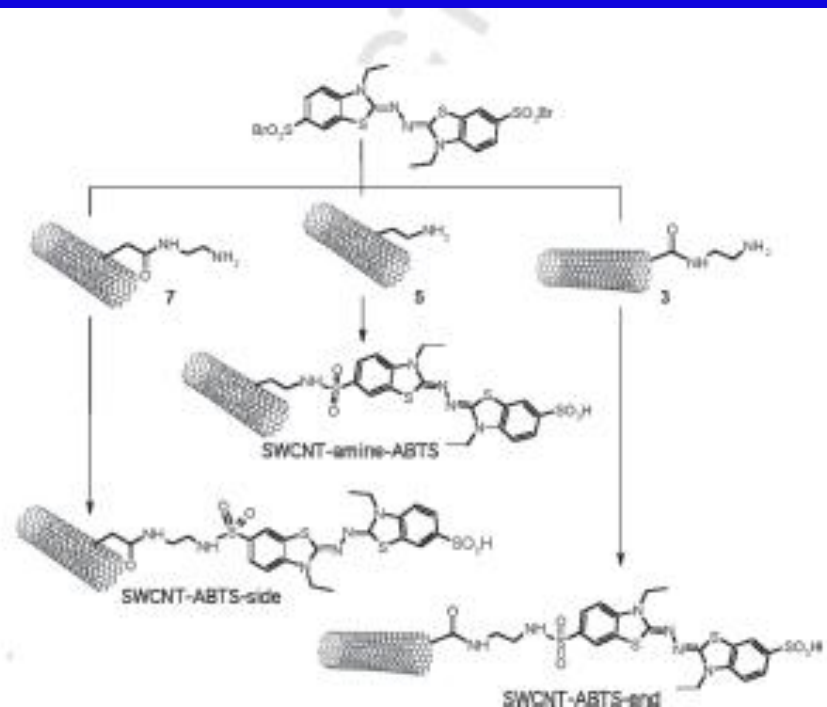


FIGURE S.15 A scheme of covalent derivatization of SWCNTs with ABTS [208].

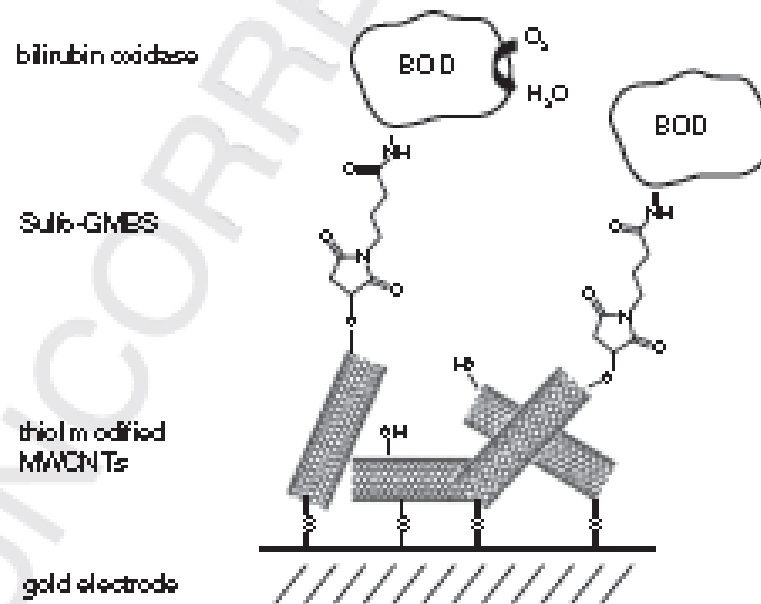


FIGURE 5.27 A scheme of self assembly of thiol functionalized and bilirubine oxidase appended MWNTs on gold electrode [92].

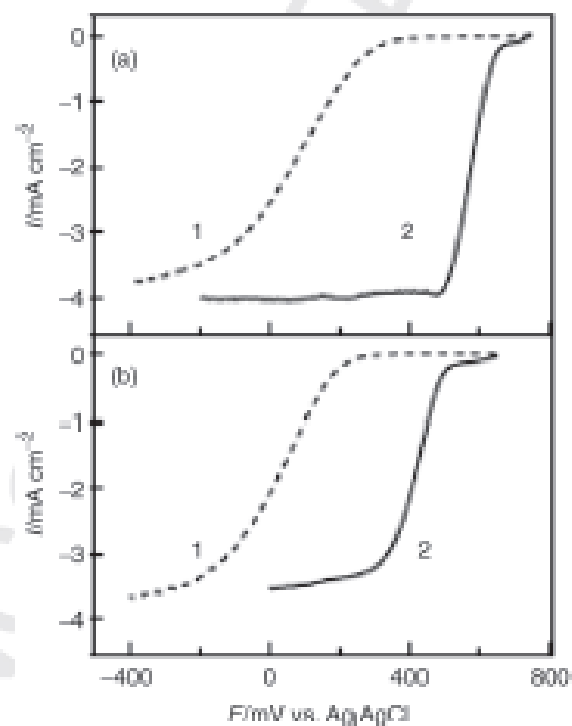


FIGURE 5.16 Voltammograms of (a) Pt (1) and laccase adsorbed carbon aerogel (2) electrode in pH 5 McIlvaine buffer and (b) Pt (1) and bilirubin oxidase adsorbed carbon aerogel (2) in pH 7 phosphate buffer at 25°C; the measurements were made at rotation rate of 1000 rpm and scan rate of 20 mV/s [68].

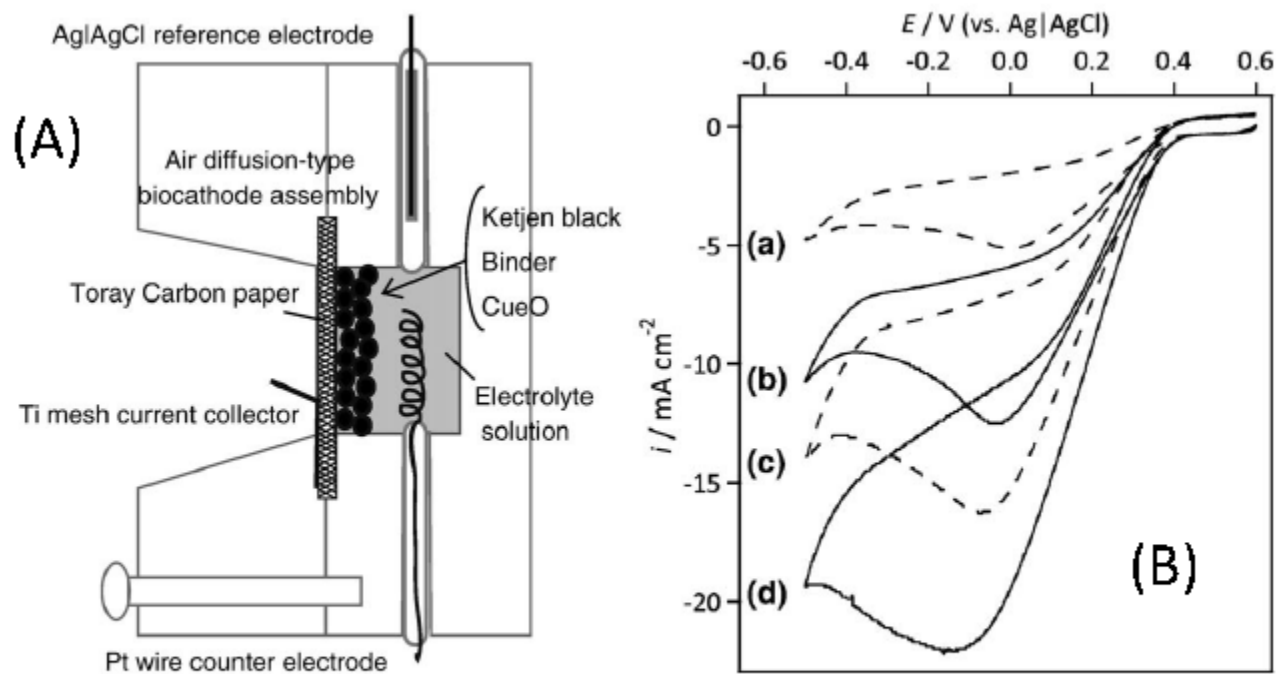
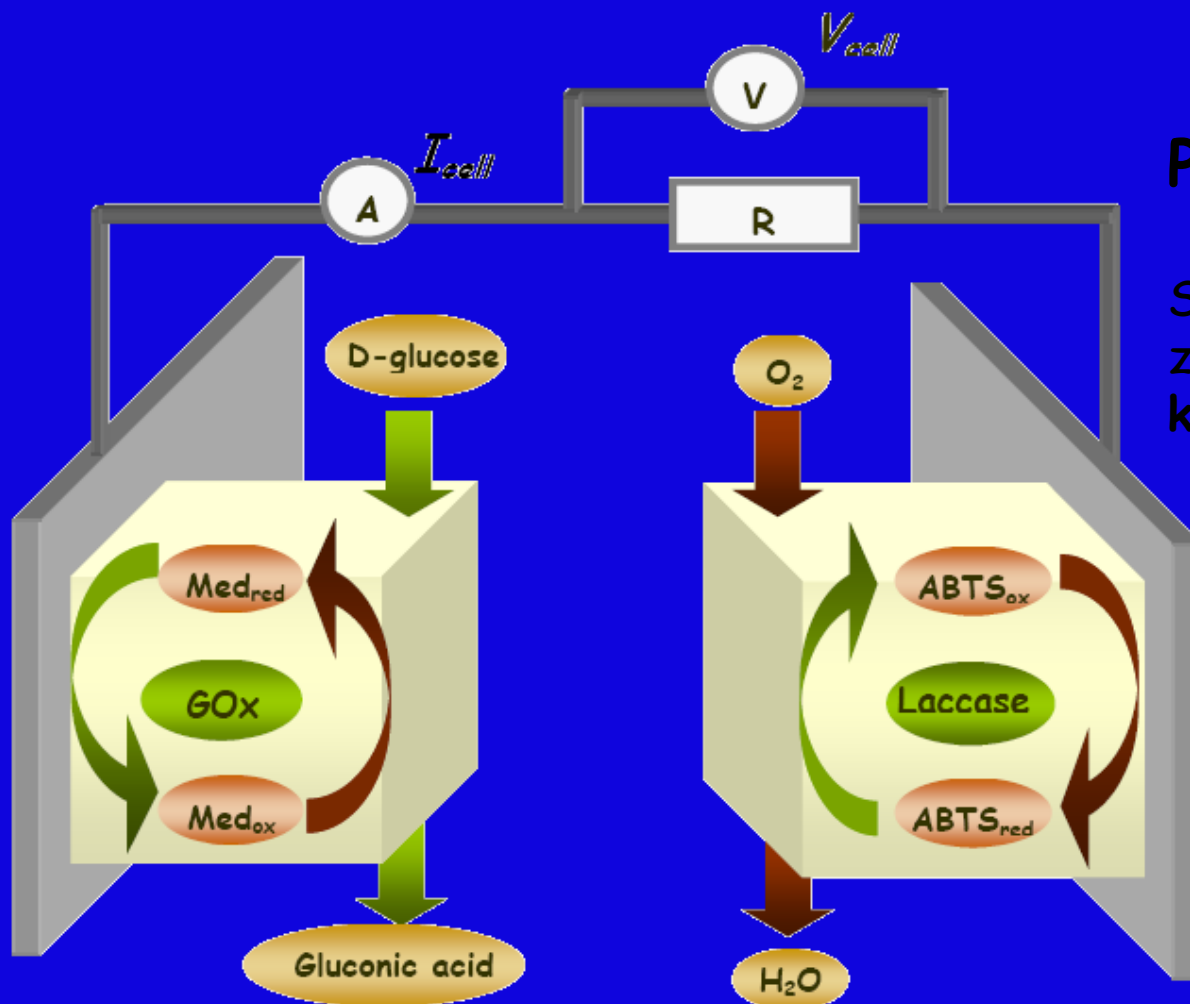


Fig. 3.3. A scheme of the air diffusion CueO-adsorbed on carbon black-based electrode (A), CVs of ORR at different concentrations of citrate (a) 0.05, (b) 0.1, (c) 0.5 and (d) 1.0 M (B) [101].

Wyznaczanie parametrów bioogniwa - schemat układu pomiarowego

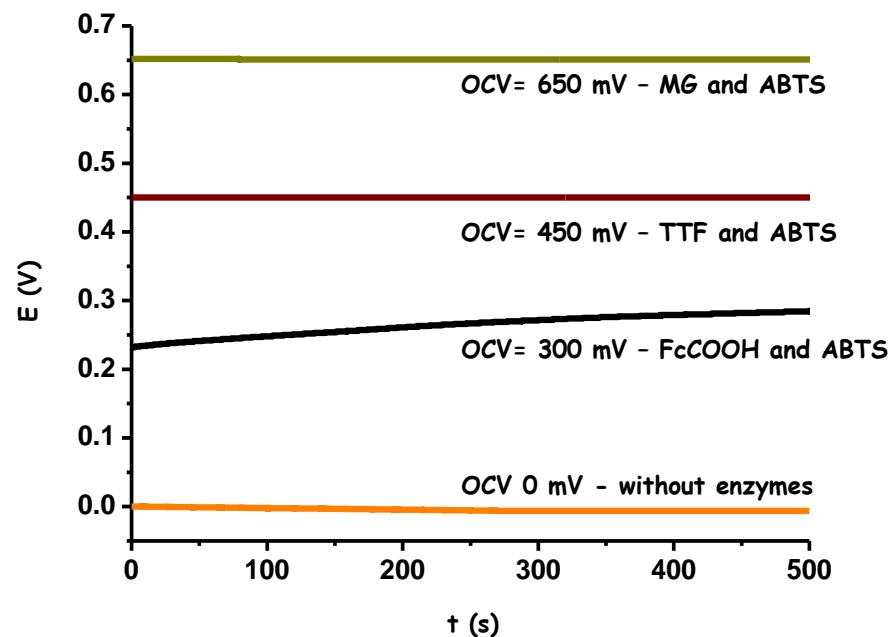
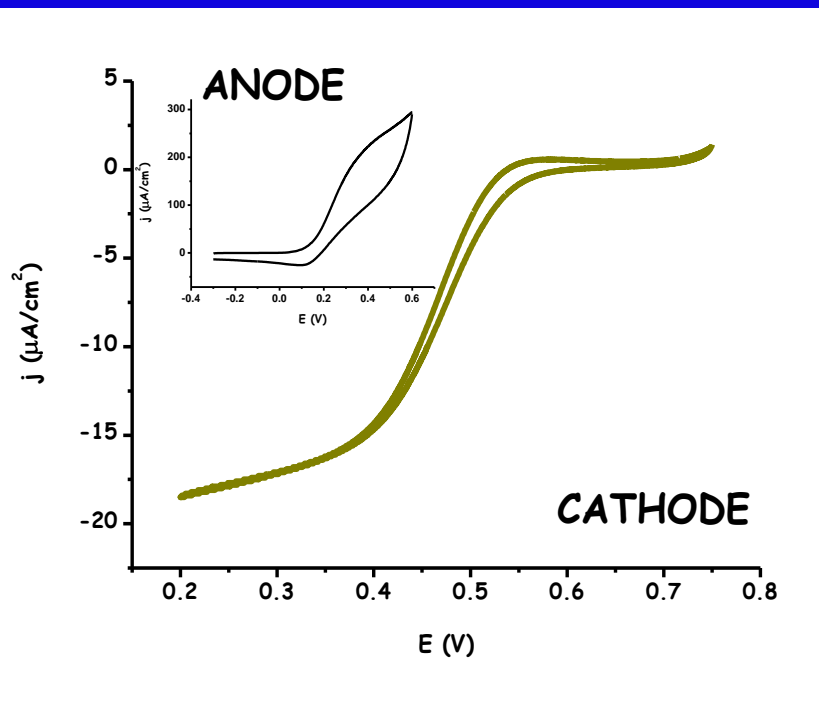


$$P_{cell} = V_{cell} \times I_{cell}$$

Stosowany opór zewnętrzny: od 10 kΩ do 10 MΩ

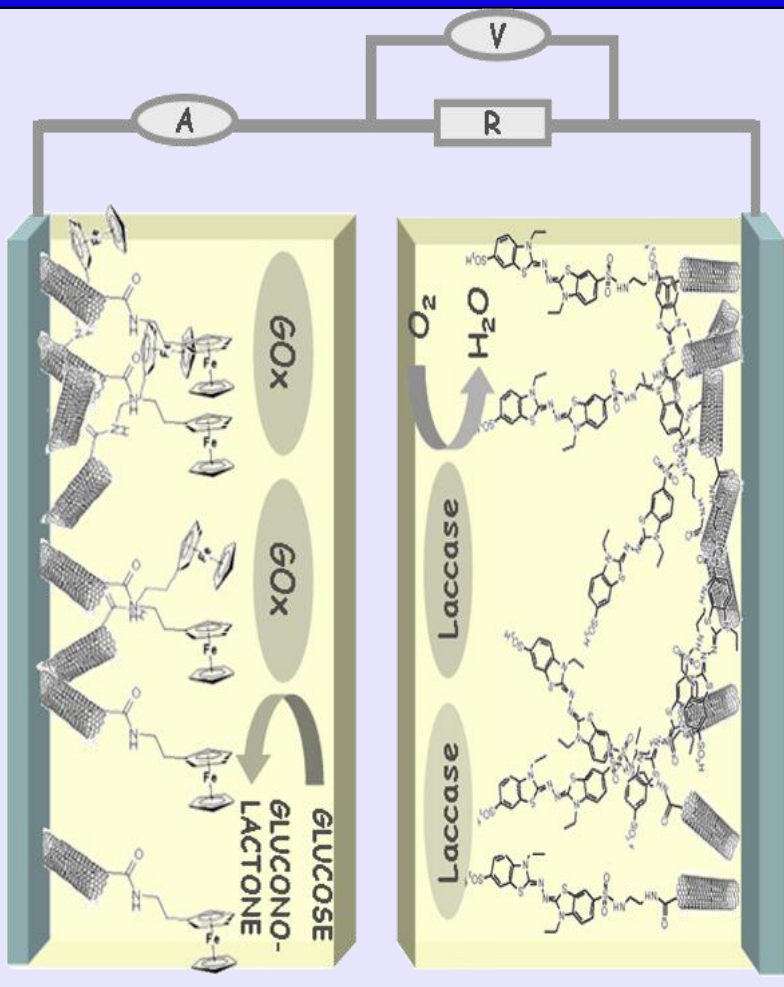
Bioogniwo z TTF oraz ABTS jako mediatorami

Potencjał obwodu otwartego



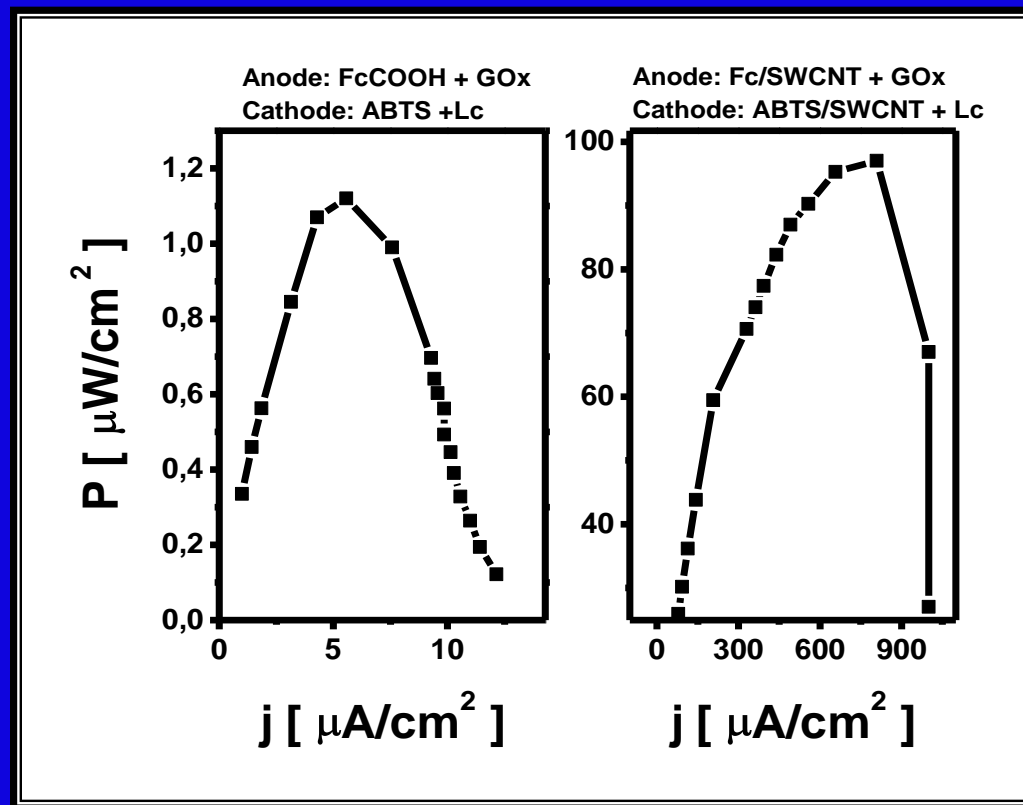
CATHODE - Oxygen reduction catalysed by laccase *Cerrena unicolor* and ABTS as mediator.

INSET: ANODE - Catalytic glucose oxidation on GCE modified with cubic phase with glucose oxidase from *Aspergillus niger* with tetrathiafulvalene (TTF) as mediator.



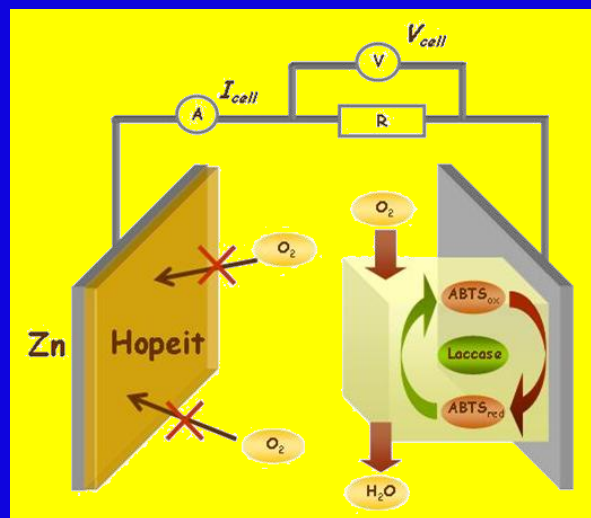
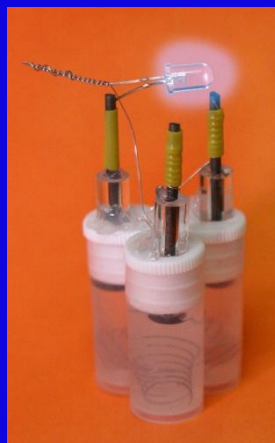
Schemat bioogniwa z mediatorami na nanorurkach węglowych

Moc ogniwa wzrasta 100razy po wprowadzeniu nanorurek węglowych



Hybrydowe bioogniwa – etap przejściowy

System	Anode Biocatalysts/electrodes	Cathode Biocatalysts/electrodes	Open circuit voltage [V]	Power density ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)	Reference
Hybrid biofuel cell MET $\text{CH}_3\text{OH}/\text{Pt}$	ADH (alcohol dehydrogenase), AldDH (aldehyde dehydrogenase), FDH, diaphorase	Graphite plate anode, platinised platinum gauze cathode	0.8 V	680 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, $j_{\text{sc}}=2,6$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	Palmore, G.T.R., 1998. <i>J. Electroanal. Chem.</i> 443 (1), 155–161
Hybrid biofuel cell MET EtOH/Pt (MET EtOH to CH_3CHO to CH_3COOH or MeOH to H_2CO to HCOOH to CO_2/O_2)	Enzyme: ADH, ADH +AldDH, or ADH+ formaldehyde Dehydrogenase + FDH Anode: Carbon felt coated with poly(methylene green) and TBATFB/Nafion with enzyme(s) entrapped anode	Cathode: ELAT gas diffusion Cathode with 20% [1 mg cm^{-2}] Pt	0.62 (EtOH-ADH). 0.82 (EtOH-ADH/AldDH). 0.64–0.71 (MeOH)	1160 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$	C.M., Minteer, S.D., 2005. <i>Electrochim. Acta</i> 50 (12), 2521–2525
Hybrid biofuel cell Zn/MET O_2	Zn electrode covered with Nafion and Hopeit, $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Laccase immobilized In carbon ceramic electrode. Mediator-syringaldazine	1.25	75 $\mu\text{W cm}^{-2}$ at 0.54 V $J_{\text{sc}}=140$ $\mu\text{A cm}^{-2}$	W. Nogala,, M. Opallo-2009
Hybrid biofuel		Gas permeable ELAT		1.21 mW/cm ²	57



System (oxidation/reduction)	Anode Biocatalysts/electrodes	Cathode Biocatalysts/electrodes	Open circuit voltage [V]	Power density ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)	Reference
Hybrid biofuel cell Zn/MET O_2	Zn electrode covered with Nafion and Hopeit, $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Laccase immobilized in carbon ceramic electrode. Mediator-syringaldazine	1.25	$75 \mu\text{W cm}^{-2}$ at 0.54 V $J_{sc} = 140 \mu\text{A cm}^{-2}$	W. Nogala, E. Rozniecka, J. Rogalski, M. Opallo-

Immobilization methodology	Substrate	Enzymatic system	Power output (mW cm ⁻²)	Reference
Modified Nafion® membrane	Ethanol/O ₂	Alcohol dehydrogenase/bilirubin oxidase	0.46	Topcagic and Minteer
Sol–gel silica matrix/carbon nanotubes	Glucose/O ₂	Glucose oxidase and bilirubin oxidase	0.12	Lim et al.
Modified chitosan and Nafion® membranes	Glucose	Glucose dehydrogenase	0.035	Klotzbach et al.
Glutaraldehyde	Ethanol	Quino-hemoprotein-alcohol dehydrogenase	0.0015	Ramanavicius et al.
Modified Nafion® membrane	Ethanol	Dehydrogenase enzymes in cascade	1.01	Sokic-Lazic and Minteer
Polypyrrole film	Glucose/O ₂	Glucose dehydrogenase/laccase	0.042	Habrioux et al.
Modified Nafion® membrane	Pyruvate	Dehydrogenase enzymes in cascade	0.93	Sokic-Lazic and Minteer
Polyacrylic acid sodium salt	Glucose/O ₂	Glucose dehydrogenase/Bilirubin oxidase	1.45	Sakai et al.
Conducting polymer copolymerized with 3-methylthiophene	Glucose/O ₂	Glucose oxidase and bilirubin oxidase	0.15	Kuwahara et al.
Cellulose–multiwall carbon nanotubes matrix	Fructose/O ₂	D-fructose dehydrogenase/bilirubin oxidase	0.12	Wu et al.
“Ketjenblack” electrode	Glucose	Glucose dehydrogenase	0.052	Miyake et al..
Pyrroloquinoline onto gold electrodes	Lactate	Lactate dehydrogenase	0.14	Lee et al.
Ultra-small silicon nanoparticles	Glucose	Glucose dehydrogenase	0.0037	Choi et al.
PAMAM dendrimers	Ethanol	Alcohol dehydrogenase	0.28	Forti et al.