

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Nanotechnologie pro elektrody a bioelektrody

HABILITAČNÍ PRÁCE

2023

Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Nanotechnologie pro elektrody a bioelektrody Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.

Habilitační práce 2023

Prohlášení autora

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Ve Zlíně dne 09. 01. 2023

Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce vděčí za svůj obsah především Ing. Jánovi Tkáčovi, DrSc. z Chemického ústavu Slovenské akademie věd a jeho neutuchající podpoře nekonvenčních nápadů. Poděkování patří také všem kolegům z CHÚ SAV, Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB a jiných pracovišť, s nimiž jsem měl čest spolupracovat.

Děkuji mé ženě za zásadní podporu během práce na tomto díle.

Některé výzkumy byly prováděny v rámci řešení GAČR projektu 20-27735Y. Ostatní výsledky jsou výstupy projektů, jichž nebyl/není autor hlavním zodpovědným řešitelem.

ANOTACE

Habilitační práce shrnuje hlavní výsledky výzkumu integrace nanotechnologií, biotechnologie a elektrochemie. Ty jsou rozděleny do třech hlavních oblastí, tj. nanotechnologie pro biopalivové články, nanotechnologie pro afinitní biosenzory a nanotechnologie pro elektrochemické senzory a elektrokatalyzátory bez biologické složky. Každé oblasti je věnována samostatná kapitola práce.

V první oblasti se výzkum zaměřil primárně na nanomateriály vhodné pro fyzisorpci enzymů bilirubin oxidázy a fruktóza dehydrogenázy. Za tímto účelem byl testován chitosan jako disperzní činidlo a stabilizační matrice pro uhlíkové nanočástice (saze) místo běžněji využívaného polyvinylidenfluoridu. V chitosanové matrici bylo nutné zvýšit vodivost integrací uhlíkových nanotrubiček, což ale nebylo nutné v dalším testovaném disperzním činidle – poly(mléčné kyselině). Samostatné publikace pak byly věnovány popisu elektronové výměny mezi aktivními místy bilirubin oxidázy a elektrodou, přičemž bylo zjištěno, že imobilizační matrice sestávající z chitosanu a v něm dispergovaných uhlíkových nanotrubiček a sazí má výborné vlastnosti právě pro tento typ experimentů, neboť poskytuje unikátní elektronový transfer mezi všemi aktivními místy bilirubin oxidázy a elektrodou. Dalším testovaným nanomateriálem byl oxid grafenu, který se ukázal jako výborný substrát pro nekovalentní imobilizaci bilirubin oxidázy. Navíc bylo možné provést jeho elektrochemickou redukci za účelem zvýšení vodivosti rozhraní, aniž by došlo ke ztrátě aktivity nasorbovaného enzymu. V dalších experimentech byly bakterie *Gluconobacter oxydans* integrovány s různými typy uhlíkových nanomateriálů (sférické nanočástice, uhlíkové nanotrubičky, grafitové nanočástice...) pomocí ultrazvukové lázně. Tímto způsobem bylo dosaženo efektivnější elektronové výměny (pouze zprostředkované, nikoliv přímé) mezi periplasmatickými enzymy bakterií a povrchem elektrody, což bylo využito pro konstrukci citlivého mikrobiálního biosenzoru monitorujícího modelovou fermentaci bez nutnosti upravovat odebrané vzorky.

V oblasti afinitních biosenzorů byly především studovány možnosti imobilizace lektinu konkanavalin A na povrch modifikovaný oxidem grafenu. Toho bylo dosaženo pomocí aktivace karboxylů oxidu grafenu karbodiimidem, které reakcí s aminy proteinové struktury imobilizují lektin vznikem amidové vazby. Dále byla zkoumána imobilizace konkanavalinu A na redukovaný grafenový oxid modifikovaný thioninem, na nějž byla proteinová struktura lektinu kovalentně navázána síťovacím činidlem glutaraldehydem. V obou případech byl sestrojen lektinový biosenzor schopný selektivní detekce glykosylované invertázy. V rámci dalších studií

byly pak připravovány povrchy funkcionalizované pomocí karboxybetainových derivátů kyseliny lipové tak, aby bylo možné nastavit jejich vlastnosti (hydrofobnost/hydrofilnost, povrchový náboj...). Toho je možné využít např. při cíleném uvolňování DNA či zlatých nanočástic, navíc bylo zjištěno, že aplikací thioninu lze zvýšit elektrochemickou odezvu na DNA nasorbovanou na připravený funkcionalizovaný povrch.

Třetí oblast výzkumu zahrnuje charakterizaci platinových nanočástic syntetizovaných na povrchu vrstveného karbidu titanu „MXenu“. Syntéza těchto nanočástic probíhá i spontánně díky redukčnímu potenciálu atomů Ti ve struktuře MXenu, je tedy možné vyhnout se použití redukčních činidel. Syntetizovaný nanomateriál byl testován jako katalyzátor elektrochemické redukce H^+ , tedy produkce vodíku, což má význam např. při udržitelné výrobě/skladování elektrické energie. Dále byly podobným způsobem syntetizovány a charakterizovány stříbrné nanočástice na povrchu MXenu a na povrchu nanočástic oxidu grafenu. Oba typy nanomateriálu byly opět syntetizovány bez přídavků redukčních činidel, za laboratorní teploty. Byly pak použity pro přípravu elektrochemických senzorů chloridů a herbicidu metazachloru. Dále byla testována modifikace elektrod hydrogely připravenými termálním síťováním derivátů celulózy kyselinou citronovou. Tento velmi jednoduchý postup vedl k přípravě elektrochemických senzorů těžkých kovů, což je dáno především přítomností vazebných míst (karboxyly z kyseliny citronové či hydroxyly z derivátů celulózy) pro kationty. Takto modifikované povrchy navíc v určitých případech vykazovaly významný posun elektrochemických vlastností v závislosti na pH roztoku.

Poslední kapitola pak shrnuje dosažené výsledky a jejich kontext v oblasti environmentální chemie a inženýrství.

KLÍČOVÁ SLOVA

nanomateriály, elektrochemie, biotechnologie, senzory, detekce polutantů, biopalivové články

TITLE

Nanotechnologies for fabrication of electrodes and bioelectrodes

ANNOTATION

The habilitation thesis introduces main results of the author's research on integration of nanotechnology, biotechnology and electrochemistry. The results are divided into three main parts, namely nanotechnology for biofuel cells, nanotechnology for affinity biosensors and nanotechnology for electrochemical sensors without the biological component. Each one is discussed in the separate chapter.

The first research area is focused mainly to nanomaterials suitable for physisorption of enzymes bilirubin oxidase and fructose dehydrogenase. To achieve this, carbon black was dispersed in chitosan, as an alternative to more commonly employed poly(vinylidene fluoride). It was necessary to increase the conductivity of such matrix by integration of carbon nanotubes. Interestingly, when poly(lactic acid) was employed as another alternative dispersing agent, such amelioration was not needed. Furthermore, the nature of electron exchange between active sites of bilirubin oxidase was investigated in other papers with finding that chitosan matrix with integrated carbon black and bilirubin oxidase is more than suitable for such types of investigation, because it provides unique electron transfer between all three active sites of bilirubin oxidase and the electrode surface. Graphene oxide was another nanomaterial found to provide excellent properties for of physisorption of bilirubin oxidase. In addition, it could be electrochemically reduced without losing the activity of bilirubin oxidase adsorbed on its surface. Other experiments were focused on integration of bacteria *Gluconobacter oxydans* cells with diverse types of carbonaceous nanomaterials (spherical carbon nanoparticles, carbon nanotubes, graphite nanoplatelets...) using simple ultrasound treatment. Such treatment led to more efficient electron exchange (mediated electron transfer, not the direct one) between the bacterial periplasmic enzymes and the electrode surface allowing for fabrication of sensitive microbial biosensor for monitoring of model fermentation, without a need for sample pretreatment.

The affinity biosensors research was mainly aimed to an immobilization of lectin concanavalin A on the graphene oxide-modified surface. It was achieved by activation of graphene oxide's carboxyls by carbodiimides which tether lectins by formation of amide bonds with the amine groups of protein structure. Next study was focused to concanavalin A immobilization to the

reduced graphene oxide surface, grafted by thionine. Both lectin's and thionine's amine groups reacts with crosslinking agent glutaraldehyde, forming strong covalent bond. In both cases, lectin biosensor was developed, capable to selectively determine glycosylated invertase. Other experiments were devoted to preparation and characterisation of surfaces modified by carboxybetain derivatives of lipoic acid with adjustable properties (hydrophobicity/hydrophilicity, surface charge...). It can be employed for controlled release of DNA or other molecules. Furthermore, the integration of thionine into the prepared modified surface increased the electrochemical response of the surface towards the adsorption of DNA.

The third research area includes preparation of platinum nanoparticles on the surface of layered titanium carbide "MXene". Synthesis of the nanoparticles was found to occur spontaneously because of the reducing potential of Ti atoms in the MXene structure, hence there is no need to use additional reducing agents. The prepared nanomaterial was employed as a catalyst of electrochemical reduction of H^+ , that is, hydrogen evolution reaction important, for example, for sustainable energy storage/generation. In a similar way, silver nanoparticles were synthesized on the surface of MXene and graphene oxide nanosheets. Both types of nanomaterials could be also prepared by spontaneous reaction, without the additional reducing agents, at room temperature. These nanomaterials were employed for preparation of electrochemical sensors of chlorides and of herbicide metazachlor. Further, modification of electrode surfaces by hydrogels prepared by thermal crosslinking of cellulose derivatives by citric acid was investigated. This simple method has been employed for fabrication of electrochemical sensors of heavy metals taking advantage of number of binding sites (citric acid's carboxyls, cellulose derivatives' hydroxyls...) for cations. Furthermore, electrodes coated by these hydrogels exhibited significant shift in electrochemical properties (surface charge resistance) with a varied pH of the surrounding electrolyte.

The last chapter summarizes the results and their context in the environmental chemistry and engineering.

KEYWORDS

nanomaterials, electrochemistry, biotechnology, sensors, pollutants detection, biofuel cells

OBSAH

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK | 10 |
| 1. Úvod do problematiky | 11 |
| 1.1 (Bio)elektrochemická zařízení | 11 |
| 1.2 Nanomateriály | 17 |
| 2. NANOTECHNOLOGIE PRO BIOPALIVOVÉ ČLÁNKY A VOLTAMETRICKÉ BIOSENZORY | 19 |
| 2.1 Elektrochemie biokatalyzátorů - enzymy | 19 |
| 2.1.1 Bilirubin oxidáza a uhlíkové nanomateriály v chitosanové matrici | 20 |
| 2.1.2 Bilirubin oxidáza imobilizovaná na oxid grafenu | 24 |
| 2.1.3 Přímý elektronový transfer fruktóza dehydrogenázy, enzymové biopalivové články 28 | |
| 2.2 Mikrobiální bioelektrody | 34 |
| 3. AFINITNÍ BIOSENZORY | 38 |
| 3.1 Glyko(nano)biotechnologie | 38 |
| 3.2 Využití oxidu grafenu v lektinových biosenzorech | 40 |
| 3.3 Funkcionalizované povrchy | 44 |
| 4. NANOMATERIÁLY PRO NEBIOLOGICKÉ INTERAKCE | 46 |
| 4.1 Nanomateriály pro „energetické“ reakce | 47 |
| 4.2 Nanomateriály pro elektrochemické senzory | 48 |
| 4.2.1 Senzor herbicidu metazachloru | 48 |
| 4.2.2 Senzor chloridových iontů | 52 |
| 4.2.3 Senzor těžkých kovů | 53 |
| 5. ZÁVĚR | 58 |
| 6. Použitá literatura | 62 |
| 7. Přílohy | 73 |

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

| | |
|----------|-------------------------------------------------|
| apoGOx | apoenzym glukóza oxidáza, bez kofaktoru |
| AuNP | zlaté nanočástice |
| BFC | biopalivový článek |
| BOD | bilirubin oxidáza |
| CBE | karboxybetain ester |
| CHI | chitosan |
| (T-)CMC | (termálně předupravená) karboxymethyl celulóza |
| CNT | uhlíkové nanotrubičky |
| ConA | konkanavalin A |
| DET | přímý elektronový transfer |
| DLS | dynamický rozptyl světla |
| EDC | (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid |
| ELS | elektroforetický rozptyl světla |
| FAD | flavinadenindínukleotid |
| FDH | fruktóza dehydrogenáza |
| GO | oxid grafenu, grafenoxid |
| GOx | glukóza oxidáza |
| HEC | hydroxyethyl celulóza |
| HER | produkce plynného vodíku redukcí H ⁺ |
| IUPAC | Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii |
| <i>j</i> | proudová hustota (A/cm ²) |
| KB | saze „Ketjan Black“ |
| MET | zprostředkovaný elektronový transfer |

| | |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| MXene | vrstvený planární karbid titanu ($\text{Ti}_3\text{C}_2(\text{F}, \text{OH})_x$) |
| NAD^+/NADH | oxidovaná/redukovaná verze nikotinaminadenindinukleotidu |
| NHS | N-hydroxysukcinimid |
| ORR | redukce kyslíku |
| PLA | poly(mléčná kyselina) |
| PNT | polypyrolové nanotrubičky |
| PtNP | platinové nanočástice |
| PQQ | pyrrolochinolin chinon |
| PVDF | polyvinylidenfluorid |
| R_{CT} | odpor povrchu pro přenos elektrického náboje |
| SAM | samoskladebná monovrstva |
| TP | papír z uhlíkových vláken „Toray Paper“ |
| ζ_{NOM} | nominální ζ -potenciál, vztažený na jednotkovou plochu povrchu nanočástic |

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1.1 (Bio)elektrochemická zařízení

V roce 1911 popsal M. C. Potter „uvolňování“ elektrické energie metabolickou aktivitou mikroorganismů změřené pomocí anody a katody ponořené do živného média s bakteriemi *E. coli* a kvasinkami rodu *Saccharomyces* [1]. Na to v r. 1935 navázal Barnett Cohen z John Hopkins Medical School v Baltimoru svým popisem prvních bakteriálních poločlánků a biobaterií [2]. V r. 1962 popsali Clark a Lyons z Medical College of Alabama elektrochemické stanovení glukózy a močoviny v krvi pomocí pH elektrod překrytých membránami s imobilizovanými glukóza oxidázou a ureázou [3], což je považováno za vůbec první zmínku o elektrochemických enzymatických biosenzorech. V kontextu elektrochemických senzorů pak nelze nezmínit objev polarografie prof. Heyrovským [4, 5], který odstartoval vývoj elektrochemických analytických metod v mnoha různých odvětvích, včetně environmentálního inženýrství (elektrochemické stanovení stopových množství polutantů i v komplexních matricích, často bez nutnosti speciální předúpravy).

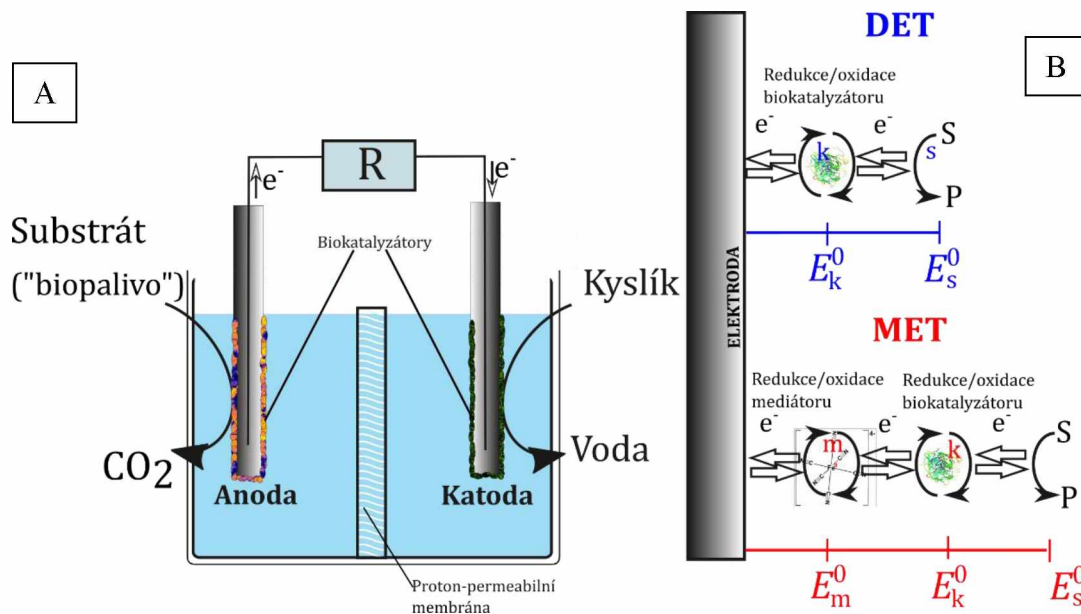
Uvedené práce lze považovat za principiální milníky, v kvantitativním vylepšení elektrochemických (bio)senzorů a biopalivových článků dosaženém v uplynulé dekádě nicméně hrály významnou roli nanotechnologie, jak je patrné z mnoha přehledových článků na toto téma [6–14]. Způsob, jakým nanomateriály zlepšují operační vlastnosti těchto zařízení, závisí na funkčním principu (bio)elektrochemického systému. Ty mohou být následující:

Biopalivové články (BFC)

Jedná se o zařízení, kde dochází biologickými reakcemi k přeměně chemické energie substrátu na energii elektrickou. Součástí BFC jsou vždy dvě elektrody, na jejichž povrchu dochází k oxidaci substrátu/paliva (anoda) a k redukci oxidujícího činidla (katoda). Tento princip je využíván i u konvenčních baterií a palivových článků, u BFC je pak minimálně jedna z těchto reakcí zajišťována mikroorganismy či jejich částmi nebo izolovanými enzymy. Při anodické reakci dochází k transferu elektronů z molekuly oxidovaného paliva na povrch elektrody. Anodická reakce je spřažena s komplementárním katodickým dějem, při němž migrují elektrony z povrchu katody na molekulu redukováného oxidačního činidla (obr. 1 A).

Z hlediska přenosu náboje je možné rozlišit BFC na bázi přímého (DET, Direct Electron Transfer) a nepřímého (MET, Mediated Electron Transfer) elektronového transferu [15]. V prvním případě jsou elektrony přenášeny přímo mezi biokatalyzátorem a povrchem

elektrody, na což lze pohlížet jako na kontinuální regeneraci aktivního místa biokatalyzátoru (typicky např. kofaktoru enzymu) přímo elektrodovou reakcí¹. V druhém případě je přenos zajištěn pomocí tzv. elektronových mediátorů, tedy látek, které mohou být oxidovány/redukovány na povrchu elektrody a zároveň být redukovány/oxidovány molekulou biokatalyzátoru a tím regenerovat jeho aktivní místo. Schéma přímého a zprostředkovaného elektronového transferu je na obr. 1 B.



Obrázek 1: A – schéma dvoukomorového uspořádání biopalivového článku s bioanodou i biokatodou v kompartmentech oddělených proton-permeabilní membránou. B - přímý (DET) a zprostředkovaný (MET) elektronový transfer. S – substrát, P – produkt, index k – biokatalyzátor, m – mediátor, s – substrát. E^0 – redoxní potenciál. A i B – převzato, upraveno z [15].

Jsou-li anoda a katoda vodivě propojeny, rozdíl mezi redoxním potenciálem anodické a katodické reakce pak udává teoretické napětí E (V) celého článku. Další základní veličinou charakterizující BFC je proud I (A), který je určen množstvím elektronů přenesených za jednotku času elektrickým obvodem spojujícím anodu a katodu. Celkový výkon w (W) potom bude násobkem obou hodnot dle vztahu $w = EI$ (W). Z uvedeného vyplývá, že lepšího výkonu BFC je možné dosáhnout zvýšením rozdílu anodického a katodického potenciálu, tedy nastavením podmínek pro termodynamicky efektivnější redoxní reakce. Toho lze dosáhnout aplikací takových biokatalyzátorů, které poskytují nejvyšší absolutní hodnotu redoxního potenciálu dané reakce – viz např. rozdíly mezi různými typy lakáz velmi podrobně diskutované v přehledovém článku [16]. Druhou možností je úprava biokatalyzátorů tak, aby byl zajištěn efektivnější přenos elektronu mezi biokatalyzátorem a povrchem elektrody (např. odstranění

¹ Při oxidaci jedné molekuly substrátu enzymem je jeho aktivní místo (kofaktor) redukováno. Aby bylo možné oxidovat další molekulu substrátu, je zapotřebí kofaktor reoxidovat, tedy odevzdat získaný elektron (či elektrony), nejlépe na povrch anody. Analogicky je nutné regenerovat kofaktory katodických biokatalyzátorů.

povrchových glykánů umožňující „těsnější“ kontakt enzymu s povrchem elektrody [17]) nebo modifikace povrchu elektrody tak, aby byla umožněna např. výhodnější orientace molekul vůči elektrodě. Využití nanotechnologií pro tato zlepšení je podrobněji diskutováno v kapitole 2.1.

Zdánlivě jednodušší možnost navýšení výkonu BFC představuje navýšení množství přenášených elektronů na geometrickou jednotku plochy povrchu elektrody, tedy zvýšením hustoty aktivních (elektrokatalytických) míst. Zde je principiální rozdíl mezi BFC a konvenčními palivovými články/bateriemi; v prvním případě reakce nastává pouze v aktivním místě příslušného enzymu, kdežto ve druhém případě bývá reaktivní celý povrch příslušného katalyzátoru, např. nanočástic Pt. V obou případech je ale možné navýšit množství reakčních míst právě modifikací povrchu elektrod v nanoškále, což vede ke zvětšení plochy aktivního povrchu.

Zvýšení výkonu lze dosáhnout i aplikací vhodných elektronových mediátorů, především při použití biokatalyzátorů, které svou strukturou neumožňují DET. Jejich použití je ale vždy spojeno s nižším napětím (daným vyšším přepětím požadované reakce, tedy jejím vyšším redoxním potenciálem – viz obr. 1 B) oproti systémům s přímým elektronovým transferem. Navíc mohou představovat problém z hlediska biokompatibility (např. azinové mediátory [18, 19] mohou vykazovat toxicitu). Třetí nevýhodou MET je nutnost zamezit reakci anodového mediátoru na katodě a naopak, což je nejčastěji řešeno separací obou prostor proton-permeabilní membránou.

Velkou výhodou BFC oproti konvenčním palivovým článkům je možnost využít jako palivo i odpadní látky, obecně levné organické sloučeniny (ethanol, glukóza...), často bez nutnosti předčištění. Ne pro všechny substráty jsou ale běžně dostupné enzymy aplikovatelné na elektrody a pracující v režimu přímého elektronového transferu. Mezi často využívané a testované anodické biokatalyzátory patří např. glukóza či fruktóza dehydrogenázu – enzymy se „snadno dostupným“ kofaktorem pyrrolochinolin chinon (PQQ). Jako katodické katalyzátory pro enzymatické BFC se pak ukázaly zejména některé lakázy a bilirubin oxidázy, jejichž primární funkcí je především štěpení fenolických sloučenin a jako akceptory elektronů využívají kyslík. Kofaktory těchto enzymů často bývají atomy mědi, jak je dále rozvedeno v kapitole 2.1

U mikrobiálních BFC je situace komplikovaná jednak malou hustotou reakčních center a také nízkou mírou přímého elektronového transferu mezi enzymy bakterií a povrchem elektrody [20, 21]. Aplikace elektronových mediátorů v těchto zařízeních znamenala důležitý pokrok od konceptu blíže k možnostem reálných aplikací [22], stejně jako lze za důležitý milník

považovat popis „exoelektrogenů“, tedy bakterií schopných přímé elektronové komunikace s povrchem elektrod [23, 24].

Elektrochemické biosenzory

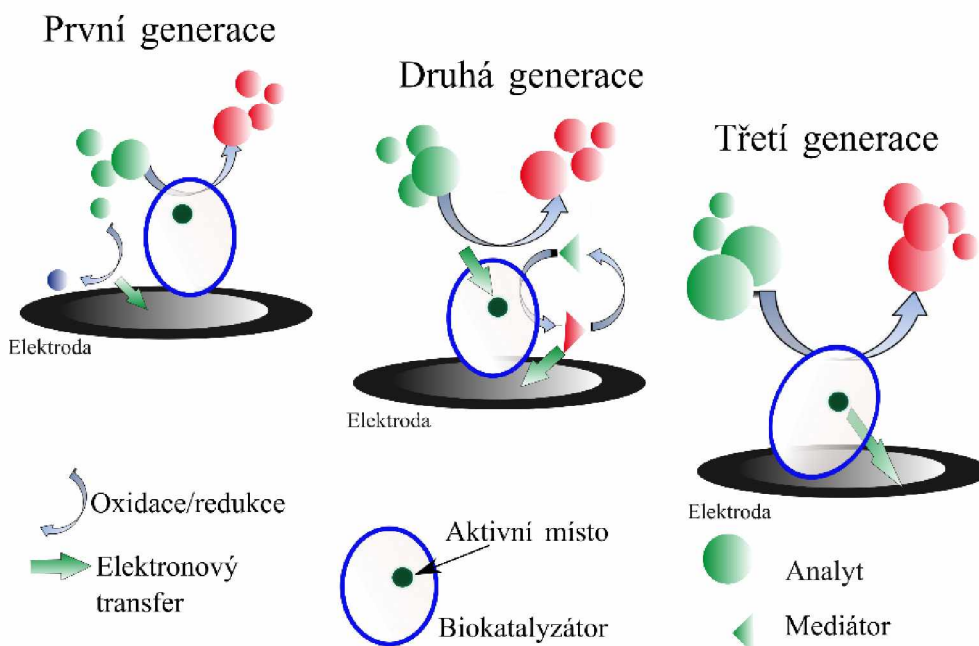
Podle definice IUPAC je biosenzor zařízení, které „využívá specifických biochemických reakcí katalyzovaných izolovanými enzymy, částmi imunitního systému, tkáněmi, organelami nebo celými buňkami („biorozpoznávací prvky“) za účelem detekce chemických sloučenin [25].“

Biorozpoznávací prvky vyjmenované v definici jsou nejčastěji imobilizovány na povrch tzv. převodníku, jenž může být optický, gravimetrický, termální či elektrochemický. Posledně jmenované mohou využívat několik principů. V první řadě se může jednat o elektrochemickou (voltametrickou nebo amperometrickou) detekci látek vznikajících nebo naopak spotřebovávaných při specifických reakcích biorozpoznávacích prvků. Příkladem může být i první zmiňovaný biosenzor na glukózu (Clark a Lyon, 1962 [3]), kde glukóza oxidáza oxiduje glukózu na kyselinu glykuronovou, což se projeví měřitelným snížením pH, přímo úměrným koncentraci glukózy. Obdobný princip využívá velké množství biosenzorů s oxidázami, jejichž produktem je (kromě molekuly oxidovaného substrátu) i peroxid vodíku vznikající redukcí kyslíku jako finálního elektronového akceptoru. H_2O_2 je pak relativně snadné elektrochemicky stanovi, podobně jako lze využít k aproximaci enzymové aktivity (a tedy koncentrace substrátu) měření koncentrace kyslíku². Takto fungují biosenzory tzv. první generace (obr. 2). Biosenzory druhé generace pak využívají zprostředkovaný elektronový transfer, což umožnilo rozšířit škálu biorozpoznávacích elementů a zlepšit operační vlastnosti senzorů (citlivost, rychlost stanovení...), zároveň to ale přineslo problémy s biokompatibilitou zmiňované již v předchozí části. Třetí generace biosenzorů pak využívá přímého elektronového transferu (obr. 2), což je optimální jak z hlediska citlivosti a rychlosti měření, tak z hlediska konstrukčního, nicméně přímý elektronový transfer není možné využít u všech biokatalyzátorů. Hlavním faktorem je zde umístění katalytického centra (kofaktoru) v proteinové struktuře daného enzymu, jak je detailněji rozvedeno v kapitole 2.1.

Elektrochemicky aktivní molekuly u všech tří generací biosenzorů (včetně kofaktorů) bývají nejčastěji detekovány voltametrickými metodami (cyklická, diferenční pulzní

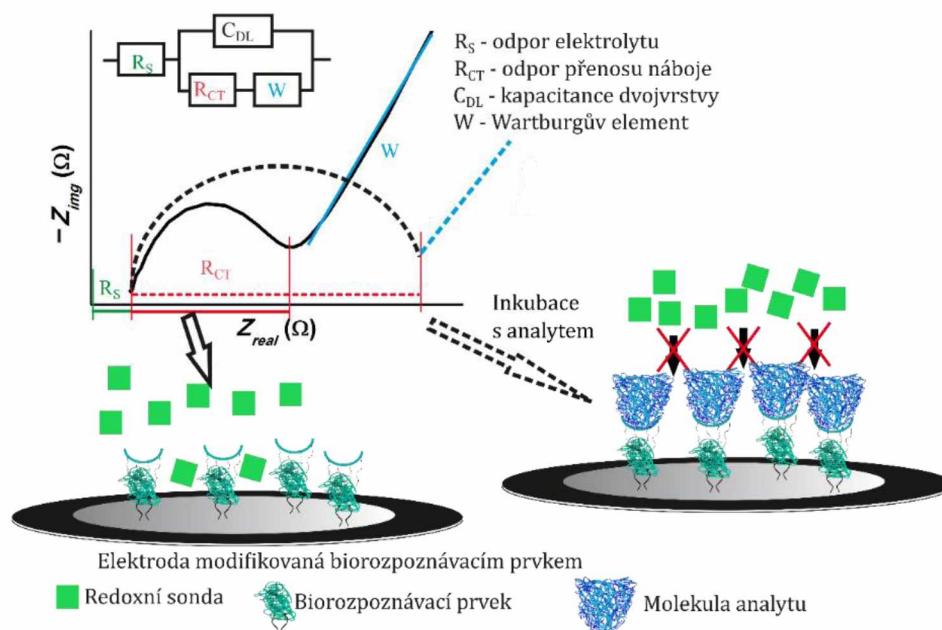
² Resp. poklesu koncentrace způsobeného právě přenosem elektronu na molekuly kyslíku a jejich redukcí na vodu (např. bilirubin oxidáza), častěji pak na peroxid vodíku (diaminoxidáza, glukóza oxidáza...). V obou případech ale může tato reakce způsobovat problémy, neboť konkuruje přenosu elektronů na povrch elektrody. To způsobí snížení elektrochemické odezvy biosenzoru nebo výkon biopalivového článku.

voltametrie nebo voltametrie čtvercové vlny). Časté je rovněž využití amperometrické metody, při níž je na pracovní elektrodu vkládáno konstantní napětí a jakákoliv změna koncentrace se projeví jako změna monitorovaného elektrického proudu v systému.



Obrázek 2: Schématické znázornění funkčních principů jednotlivých generací biosenzorů. Červené symboly pro analyt a mediátor symbolizují molekuly již oxidované či redukované.

Velmi širokou a v posledních letech intenzivně prozkoumávanou oblast tvoří tzv. afinitní biosenzory. Ty využívají biorozpoznávací prvky vykazující specifickou afinitu k molekulám analytu, což je např. DNA pro stanovení komplementárních úseků DNA, protilátky či antigeny, aptamery (DNA úseky se specificitou vůči různým molekulám) lektiny nebo glykány. Jelikož se většinou nejedná o molekuly s elektrochemickou aktivitou (tedy alespoň ne za „biologických“ podmínek), je zde často využívána elektrochemická impedanční spektroskopie. Touto metodou lze velmi citlivě změřit změnu v odporu, který představuje povrch elektrody pro elektrochemickou redoxní přeměnu molekuly sondy – nejčastěji hexakynoželezitanových (ferrikyanidových) iontů. Tento odpor se navýší, pokud dojde k „zanesení“ povrchu navázáním molekuly analytu na povrch. Schematicky je tento princip znázorněn na obr. 3.



Obrázek 3: Schématické znázornění funkce afinitních senzorů měřených pomocí elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS). Výsledek EIS měření je nejčastěji prezentován ve formě tzv. Nyquistova diagramu (horní část obrázku), kde průměr vzniklého půlkruhu koreluje s odporem přenosu náboje (R_{CT} – charge transfer resistance), tedy s množstvím molekul analytu zachyceného na povrchu elektrody.

Uvedené principy je možné kombinovat v různých metodách amplifikace signálu – např. při tzv. „sendvičovém“ uspořádání jsou na molekuly analytu (které jsou již přichyceny na povrchu elektrody pomocí biorozpoznávacích molekul) navázány sekundární („tracer“) sondy sestávající nejčastěji z nanočástic nesoucích molekuly enzymu, jehož aktivita může být jednoduše detekována elektrochemicky (např. již zmíněné oxidázy). Výhody enzymových sekundárních sond jsou následující: i) zvýšení signálu spočívající v prostém faktu, že jedna navázaná molekula analytu je schopna navázat jednu nanočástici sondy nesoucí mnoho molekul enzymu; ii) kontinuita enzymové reakce, kdy může dojít k akumulaci produktu a tedy i velmi významnému navýšení měřeného analytického signálu [26, 27].

Jednou z oblastí, kde se ukázal významný potenciál afinitních biosenzorů je glykobiotechnologie, tedy monitorování biologických interakcí zprostředkovaných vazbou glykán (sacharid)-lektin (protein). Změny v glykosylaci proteinů či povrchu buněk měřitelné právě afinitními impedančními biosenzory tak často mohou být důležitými a včasnými biomarkery různých onemocnění či obecně změn fyziologického stavu [6]. Afinitní biosenzory ale mají velký význam i pro detekci polutantů, toxinů, ať již v oblasti environmentálního inženýrství nebo např. bezpečnosti potravin.

Elektrochemická zařízení bez biologických komponent

Tato oblast přímo navazuje na výše zmíněný objev polarografie, kteroužto metodou je možné v jednom měření získat kvalitativní i kvantitativní informace např. o koncentraci iontů různých kovů v analyzovaném roztoku. Tento příklad ilustruje základní rámec voltametrických stanovení polutantů, kdy potenciál voltametrického píku (příp. při polarografii půlvlnový potenciál) podává informaci o druhu analytu, zatímco elektrický proud naměřený během této reakce (výška píku na voltamogramu) koreluje s koncentrací analytu v roztoku. Stejně jako u výše popsanych biosenzorů i u voltametrických senzorů je požadováno, aby elektrodová heterogenní redoxní reakce probíhala co nejefektivněji (tedy aby se za časovou jednotku stihlo redukovat/oxidovat co nejvíce molekul analytu) a zároveň je žádoucí dosáhnout kýžené reakce při co nejnižší absolutní hodnotě potenciálu. Tím se značně sníží možnost, že při aplikovaném potenciálu dojde k oxidaci/redukci jiné složky roztoku, tedy ke zkreslení analytického signálu.

Pro tento typ zařízení je typická modifikace elektrod nanočásticemi kovů, které při zvýšení plochy aktivního povrchu zároveň často mají i žádané elektrokatalytické vlastnosti. To se týká např. stříbra (stříbrných nanočástic), které vykazuje vysokou afinitu k chloridům, ale i k atomu chloru v různých molekulách, působí tedy mj. jako katalyzátor elektrochemické reduktivní dehalogenace chlor obsahujících organických polutantů [28]. Druhou oblastí elektrochemických zařízení jsou „energetické“ reakce, nejčastěji redukce kyslíku rozpuštěného ve vodě jako častá katodová reakce palivových článků nebo redukce protonů H^+ na plynný vodík, který dále může být využit např. jako palivo. Při druhém zmíněném typu reakce je zapotřebí použít katalyzátory, které co nejvíce sníží hodnotu potenciálu dané reakce, tj. napětí vkládané na elektrody, což umožní levnější produkci vodíku. Své nezastupitelné místo zde mají nanočástice Pt, Pd a jiných vzácných kovů. U obou typů reakcí pak je zřejmou výhodou zvýšení plochy aktivního elektrokatalytického povrchu, což lze dosáhnout aplikací co největšího množství co nejmenších nanočástic na povrch elektrody [29].

1.2 Nanomateriály

Většina textů zabývajících se nanotechnologií zmiňuje jako historický milník této oblasti přednášku profesora Richarda P. Feynmana na výročním zasedání Americké fyzikální společnosti r. 1959 s titulem „There's a plenty of room at the bottom“. Zde byl vysloven (tehdy teoretický) předpoklad možného využití různých nanočástic. Současný pokrok v nanotechnologiích umožňuje rutinní syntézu nejrůznějších typů nanočástic, které jsou dostupné na trhu (viz např. katalog firmy Merck <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en>), což na

druhou stranu umožňuje využití (byť mnohdy teprve experimentální) nanomateriálů v mnoha odvětvích, např. v medicíně [30], potravinářství [31], při remediacích [32] atd.

Nanomateriálem je dle nejběžnější definice materiál sestávající z či obsahující částice s alespoň jedním rozměrem mezi 1 a 100 nm. Běžně se rozlišuje mezi částicemi sférickými (0-dimenzionální), nanotrubicemi či nanovlákný (1-dimenzionální), planárními (2-dimenzionálními) a trojdimenzionálními. Syntetizovat lze ale např. i nanokvěty, nanohroty, nanohvězdy atd. Tvarová pestrost je pak doprovázena různorodostí složení. Principiálně lze rozlišit nanočástice kovové (z elementárního kovu nebo z oxidu/ů kovu/ů), křemičité a na bázi uhlíku (včetně polymerů). Často nicméně vykazují nejlepší vlastnosti nanomateriály vícesložkové, ať již např. jednotlivé nanočástice z více kovů, nebo hybridní nanomateriály, např. nanočástice grafenu se stříbrnými nanočásticemi na povrchu.

Jak již bylo zmíněno, aplikaci nanomateriálů lze zlepšit vlastnosti (bio)elektrochemických zařízení popsaných výše. Jednou z často využívaných možností je aplikace na povrch pracovní elektrody nanočástic připravených „ex-situ“, tedy mimo elektrodu různými metodami (viz např. přehledové studie [33–36]). V takovém případě se nejčastěji na povrch elektrody nanese disperze nanočástic v rozpouštědle, které se následně odpaří a na povrchu zůstanou pouze deponované částice. Ty mohou být vázány nejčastěji elektrostatickými silami (mají-li nanočástice elektrochemický náboj) nebo hydrofobními π - π interakcemi (typické pro uhlíkové nanočástice – grafen, uhlíkové nanotrubičky a jejich deriváty). Dále je možné aplikovat disperzi nanočástic v roztoku polymeru, který po odpaření rozpouštědla vytvoří kompaktní film s vyšší stabilitou než samotné nanočástice. Další možností je syntéza in-situ nanočástic přímo na povrchu elektrody. To se týká především nanočástic kovů, které mohou být připraveny elektrochemickou redukcí příslušných iontů. Častá je i aplikace hybridních, tedy vícesložkových nanomateriálů. Příkladem mohou být uhlíkové částice (kulovité, planární či jednodimenzionální nanotrubičky nebo nanovlákná) s kovovými nanočásticemi na povrchu. Samostatnou kapitolou je potom chemická modifikace nanočástic tak, aby jejich povrch vykazoval např. požadovanou míru hydrofobnosti/hydrofilnosti nebo za účelem vnesení specifických funkčních skupin pro kovalentní navázání biorozpoznávacích prvků.

V neposlední řadě je potřeba zmínit, že mnohdy je při přípravě nanomateriálů s kýženými vlastnostmi použito nebezpečných/toxických, případně ne zcela levných výchozích surovin. Ekonomika a bezpečnost pro člověka a životní prostředí je tedy další úhel pohledu, kterým je možné tuto problematiku nazírat.

Vzhledem k relativní různorodosti třech hlavních nastíněných témat se jeví jako účelnější podat, na úkor obsažnosti obecného úvodu, více detailů v následujících kapitolách, které budou věnovány: nanotechnologiím pro přípravu biopalivových článků a elektrochemických biosenzorů (kap. 2); nanotechnologiím při přípravě afinitních biosenzorů (kap. 3); nanotechnologiím pro přípravu elektrochemických zařízení bez biologické složky využitelných v environmentálním inženýrství (kap. 4). Souhrn těchto výsledků a jejich význam pro environmentální chemii a inženýrství je pak obsahem kapitoly 5.

2. NANOTECHNOLOGIE PRO BIOPALIVOVÉ ČLÁNKY A VOLTAMETRICKÉ BIOSENZORY

2.1 Elektrochemie biokatalyzátorů - enzymy

Za bioelektrokatalyzátory můžeme nejčastěji považovat enzymy, které sestávají z proteinové struktury a aktivního centra, kde dochází k samotné katalyzované reakci, tedy navázání a přeměna substrátu. Již bylo zmíněno, že první a druhá generace biosenzorů spoléhaly na elektrochemickou reakci látek, které buďto souvisí s aktivitou enzymu (produkt, akceptor nebo donor elektronu...) nebo regenerují aktivní místo enzymu (elektronové mediátory), zatímco třetí generace využívají přímý elektronový transfer. Tyto principy byly stručně shrnuty v přehledových člancích předkladatele [15, 37].

Heterogenní redoxní transformaci kofaktorů či aktivních míst enzymů na povrchu elektrody lze sledovat voltametricky, podobně jako redoxní transformaci jakékoliv elektroaktivní látky v roztoku. Takto lze pomocí fundamentálních elektrochemických studií poznat redoxní vlastnosti jednotlivých aktivních center či kofaktorů, což je v podstatě nezbytná podmínka pro přípravu enzymových elektrod. Uvedené studie mohou být prováděny jednak s enzymy v roztoku elektrolytu nebo s elektrodami, na jejichž povrchu je enzym imobilizován. Takto byly již před několika dekádami charakterizovány např. aktivní centra fumarát reduktázy [38] či jiných enzymů [39] za použití planárních elektrod.

Jakkoliv jsou informace o redoxní aktivitě enzymů důležité, není možné je vždy spojovat s možností přímého elektronového transferu, jehož hlavní (a pro efektivitu biopalivových článků a enzymových biosenzorů nezbytnou) charakteristikou je kontinuální výměna elektronů mezi elektrodou, aktivním místem enzymu a molekulami substrátu. V této souvislosti je vhodné zmínit příklad velmi často využívaného enzymu glukóza oxidázy (GOx) s flavinadenin dinukleotid (FAD) kofaktorem [40]. V přehledovém článku [37] jakož i

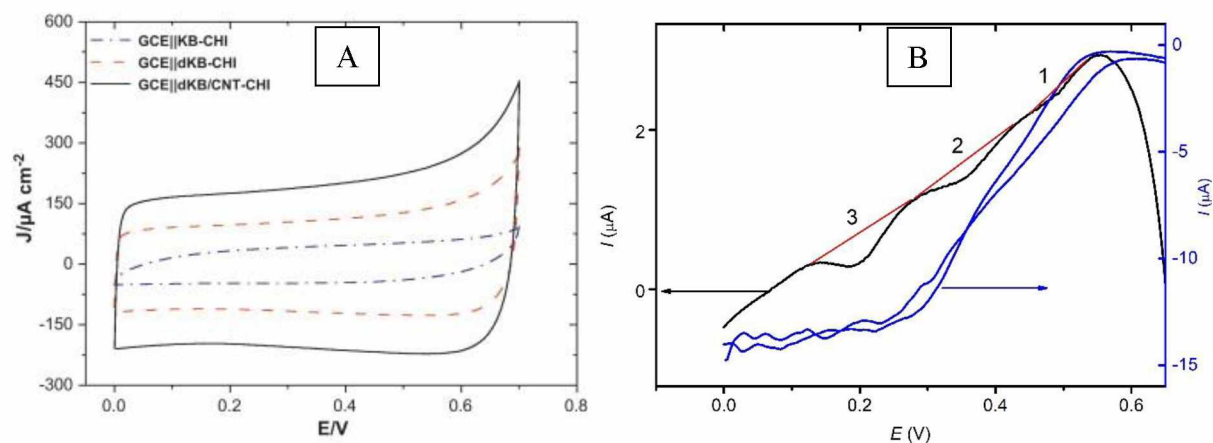
v editoriale Biosensors and Bioelectronics 82, 2016 [41] je mimo jiné zmíněn fakt, že v mnoha studiích byla pozorovaná voltametrická odezva GOx bez elektronových mediátorů, což je mylně vydáváno za přímý elektronový transfer. Pravděpodobně ale jde pouze o redoxní přeměnu disociovaného kofaktoru, bez vlastní katalytické aktivity. V přítomnosti substrátu (glukózy) zde proto nebyl pozorován typický průběh voltametrické odezvy, který by svědčil o kontinuální oxidaci glukózy, s tím spřažené redukci FAD kofaktoru a jeho regeneraci (opětovné oxidaci) na povrchu elektrody. Takto byly ne zcela vhodně za přímý elektronový transfer vydávány i případy nepřímé úměry mezi voltametrickou odezvou elektrody s imobilizovanou GOx a koncentrací glukózy. Jakkoliv se jedná o funkční a použitelný princip elektrochemického biosenzoru glukózy (např. [42, 43]), je v těchto případech měřena pouze voltametrická odezva redukce kyslíku, jehož koncentrace se snižuje se zvyšující se aktivitou GOx, tedy s vyšší koncentrací glukózy (tedy první generace biosenzoru, nikoliv třetí). Toto bylo později experimentálně ověřováno např. P. Bartlettem [44].

Přímý elektronový transfer může být zefektivněn (či přímo umožněn) použitím elektrod modifikovaných nanomateriály, které umožní lepší kontakt elektroaktivních částí enzymu s povrchem elektrody (jednou ze základních podmínek přímého elektronového transferu je vzdálenost elektroaktivního místa enzymu od povrchu elektrody menší než cca 1 nm – přes tuto vzdálenost dochází k přenosu elektronů i skrze nevodivé proteinové prostředí [39]). Dalšími možnostmi jsou pak specifické způsoby úpravy enzymů; např. deglykosylace celobióza dehydrogenázy zvýšila efektivitu přímého elektronového transferu tohoto enzymu díky zmenšení vzdálenosti mezi kofaktorem a elektrodou [17] a úprava struktury GOx s následnou imobilizací na zlaté nanočástice [45] se ukázala jako jeden ze dvou možných způsobů, jak zajistit přímý elektronový transfer u tohoto enzymu. Výrazný efekt může mít i vhodná imobilizace enzymu, například kovalentní imobilizace FAD kofaktoru na elektrodu s následnou rekonstitucí inkubací s apoGOx [46] je druhý ze způsobů, jak u tohoto enzymu dosáhnout přímý elektronový transfer.

2.1.1 Bilirubin oxidáza a uhlíkové nanomateriály v chitosanové matici

Jedním z enzymů vykazujících přímý elektronový transfer je bilirubin oxidáza (BOD; bilirubin:kyslík oxidoreduktáza, EC 1.3.3.5) která, podobně jako GOx, při oxidaci substrátu využívá jako elektronový akceptor kyslík, který ale není redukován na peroxid vodíku, nýbrž na vodu dle souhrnné rovnice: $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$. Přímý elektronový transfer zde spočívá ve schopnosti BOD oxidovat elektrodu, tedy odebírat z ní elektrony za současné redukce kyslíku [16], jedná se tedy o katodový bioelektrokatalyzátor. To bylo experimentálně prověřeno

jednoduchou adsorpcí BOD na elektrodu modifikovanou sférickými uhlíkovými nanočásticemi KB (saze, „Ketjan Black“). Takto připravená biokatoda vykazovala stabilní proudovou odezvu v přítomnosti rozpuštěného kyslíku v elektrolytu [47]. V uvedené studii byly nicméně saze dispergované v polyvinylidenfluoridu, tedy syntetickém polymeru, který musel být navíc pro přípravu nanomodifikované elektrody rozpuštěn v N-mehtyl pyrolidonu. Jako další velmi efektivní cesta se jevila integrace BOD do matrice s uhlíkovými nanotrubičkami [48, 49], které jsou nicméně poměrně drahé. V rámci zjednodušení přípravy byla proto testována možnost použití jiného disperzního činidla pro KB, konkrétně biopolymeru chitosanu [50] (**příloha P.1**). V prvních experimentech byla testována adsorpce BOD na elektrodu modifikovanou pouze KB dispergovanými v roztoku chitosanu v koncentraci 13 mg/ml, která byla použita ve zmíněné studii Miyake *et al.*, 2009 [47]. Podle očekávání však díky nižší hydrofobicitě chitosanu nevytvořila tato směs po zaschnutí stabilní film, proto byla koncentrace KB snížena na 4,3 mg/ml. Takto byla připravena homogenní disperze KB/CHI na povrchu elektrody, nicméně s poměrně nízkou kapacitací. Proto byla disperze KB/CHI smíchána ještě s disperzí uhlíkových nanotrubiček (CNT) v chitosanu, který se již dříve projevil jako vhodné disperzní činidlo (použito např. ve studii Filip *et al.*, 2011 [51]³). Po aplikaci připravené směsi KB-CNT/CHI na uhlíkové elektrody a zaschnutí při laboratorní teplotě vznikl konzistentní a stabilní film. Takto modifikované elektrody pak vykazovaly vyšší kapacitanci (obr. 4 A).



Obrázek 4: A - cyklické voltamogramy elektrod modifikovaných směsí KB-CHI (koncentrace KB 13 mg/ml; modrá přerušovaná čára), směsí dKB-CHI s koncentrací KB 4,3 mg/ml (červená přerušovaná čára) a směsí dKB/CNT-CHI s koncentrací KB 4,3 mg/ml a koncentrací CNT 0,67 mg/ml (černá plná čára). Převzato z [50]. B – černá křivka – katodická část CV elektrody modifikované dKB/CNT-CHI s inkubovanou bilirubin oxidázou, v deaerovaném elektrolytu. CV je korigováno o pozadí odečtením CV elektrody bez nasorbovaného enzymu. 1, 2, 3 – vyznačené katodické píky pro jednotlivé redoxní procesy. Modrá křivka – CV téže elektrody měřené v provzdušňovaném elektrolytu, korigováno o CV změřené toutéž elektrodou v deaerovaném elektrolytu. Křivka tedy znázorňuje pouze bioelektrokatalytickou redukci kyslíku.

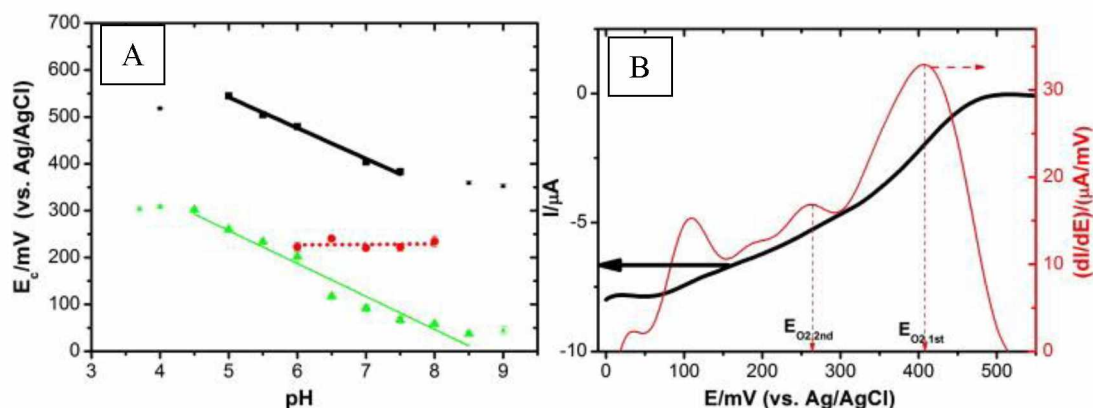
³ Nutno podotknout, že pro aplikaci v uvedené studii (elektrochemická oxidace NADH kofaktoru) se ukázalo jako vhodnější disperzní činidlo kyselina hyaluronová.

V dalším kroku byla na takto modifikované elektrody imobilizována BOD jednoduchou inkubací elektrod v roztoku enzymu v acetátovém pufru. Elektrokatalytické vlastnosti takto imobilizované BOD byly testovány cyklickou voltametrií v elektrolytu (acetátový pufr, pH = 6) v přítomnosti nebo nepřítomnosti kyslíku (deaerace inertním plynem nebo aerace vzduchem). V souladu s jinými studii byl pozorován nárůst katodického proudu jako důsledek přímého elektronového transferu při kontinuální redukci kyslíku katalyzované právě BOD (obr. 4). Korekcí na voltametrickou odezvu zjištěnou v deaerovaném elektrolytu byla získána hodnota biokatalytického proudu (tedy takového, který je pouze důsledek enzymové reakce) a z něj vyjádřena výsledná proudová hustota připravené biokatody $j = 272 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. V kontextu jiných studií to sice nebyla nejvyšší hodnota, biokatalytickou odezvu lze nicméně zvýšit zajištěním vyšší koncentrace rozpuštěného kyslíku v elektrolytu (tj. probublávání čistým kyslíkem, nikoliv vzduchem), navíc byly naměřené hodnoty dosaženy elektrodami připravenými inkubací s roztokem obsahujícím pouze 0,25 U BOD na elektrodu. Lze tedy shrnout, že testovaná modifikace nanomateriálem obsahujícím sférické saze a uhlíkové nanotrubičky v chitosanové matici se ukázala zcela funkční pro jednoduchou a efektivní sorpci bilirubin oxidázy. Důležitou roli se zde ukázaly mít jednak části chitosanu s částečně kladným nábojem a zároveň CNT a KB, kde je částečný náboj záporný. BOD má pak za podmínek inkubace částečný záporný povrchový náboj, nicméně disponuje i částí s kladným povrchovým nábojem. To umožnilo takovou orientaci BOD na povrchu, jež je výhodná právě z hlediska přímého elektronového transferu.

Důležitou součástí testování elektrokatalýzy BOD na elektrodách modifikovaných výše zmíněným nanomateriálem byla detailní charakteristika jednotlivých elektroaktivních míst nasorbovaného enzymu. V první řadě je třeba poznamenat, že cyklická voltametrie v deaerovaném roztoku ukázala přítomnost tří katodických píků přiřazených třem redoxním procesům označeným jako 1 (493 mV), 2 (374 mV) a 3 (203 mV) (viz obr. 4), což bylo prozatím zaznamenáno jen v jednom případě [52]. Tyto tři elektrochemické děje by mohly být spojeny s třemi redoxními místy bilirubin oxidázy, které jsou označovány jako T1, T2 a T3, jsou tvořeny atomy mědi a představují řetězec pro elektronový transfer. Ten začíná oxidací molekuly substrátu v místě T1, což je spřaženo s přijmutím elektronu atomem mědi na daném místě. Následuje transfer tohoto elektronu na tzv. T2/T3 klastr tvořený celkem třemi atomy mědi a odtud až na finální elektronový akceptor [16, 53]. Bylo tedy nutné ověřit, zda uvedené katodické reakce odpovídají jednotlivým aktivním místům, proto byly změřeny cyklické voltamogramy v různých rozsazích potenciálů. Z nich vyplynulo, že v aktivním místě

s nejvyšším redoxním potenciálem (1) nastává jistá míra bioelektrokatalýzy (v přítomnosti kyslíku je vidět nárůst katodického proudu), její intenzita je však téměř lineárně závislá na vloženém napětí jakožto hnací síle. Oproti tomu redoxní centrum projevující se při absenci kyslíku jako katodický pík při 200 mV (3) vykazuje výraznou elektrokatalytickou aktivitu, proto byl identifikován jako aktivní centrum T2. Zde je potřeba zmínit, že redoxní děj (nikoliv bioelektrokatalýza) byl v dané potenciálové oblasti pozorován i při testování termálně denaturované BOD (což by poukazovalo na to, že atom(y) mědi redoxního centra T2 je přítomen v BOD i po denaturaci, jakkoliv již není funkční), ale i při testování sérového albuminu jakožto zástupce proteinu bez aktivního centra. Tyto výsledky snižují možnost jednoznačně identifikovat jednotlivá redoxní centra a komplexnost elektronové výměny mezi BOD a elektrodou ještě dokresluje vyhodnocení elektrokinetických parametrů zjištěných redoxních jevů (potenciál a výška píku při různých rychlostech změny potenciálu při cyklické voltametii, integrované množství náboje prošlé při jednotlivých redoxních procesech a závislost těchto nábojů na rychlosti skenování při měření v různých potenciálových oknech atd. – viz **příloha P.1**). Z nich mimo jiné vyplývá, že vliv na aktivitu jednotlivých redoxních center má i redoxní stav okolních center a dále že lze poměrně jednoznačně identifikovat přesun elektronů z redoxního místa 1 do redoxního místa 2. Navíc je pravděpodobné, že cest pro elektronový transfer při sledované bioelektrokatalýze může být i více než jen jedna.

V další fundamentální studii funkce redoxních center BOD adsorbované na KB/CNT-CHI povrchu bylo popsáno jejich chování v závislosti na pH elektrolytu [54] (**příloha P.2**). Zde bylo zjištěno, že výše popsané redoxní děje 1 a 3 (obr. 4) vykazují závislost na pH, zatímco redoxní proces 2 nikoliv (obr. 5 A). Jeho redoxní transformace tedy nezahrnuje výměnu protonů, není tedy zřejmě ve styku s elektrolytem. Zjištěné závislosti potenciálů na pH jsou lineární, vykazují nicméně v hraničních oblastech zlomy, které byly přisouzeny aktivitě dvou konkrétních aminokyselin v proteinové struktuře (Asp105 a Glu463). Celkový obraz pak odpovídal hypotéze vznesené již v první studii (**příloha P.1**), totiž že elektrony přechází z T1 (redoxní proces 1) na redoxní místo 2 a dále na redoxní místo 3 tzv. „uphill“ transferem, tedy proti směru očekávanému na základě elektrochemických potenciálů. Dále je z obr. 5 A patrné, jak se rozdíl potenciálů mezi jednotlivými aktivními místy mění s měnícím se pH, což souvisí i s různou mírou elektrokatalytické aktivity BOD při různých pH. Při vyhodnocování získaných voltametrických dat bylo dále využito první derivace voltamogramů pro indentifikaci redoxních potenciálů jednotlivých dějů i při kontinuální redukci kyslíku (obr. 5 B).



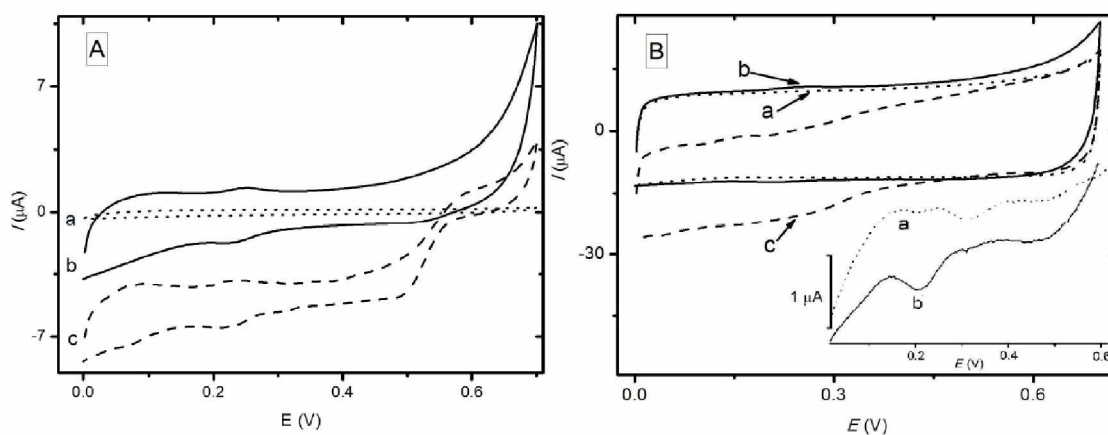
Obrázek 5: A – závislosti potenciálu katodických voltametričeských píků na pH pro BOD adsorbovanou na uhlíkových elektrodách modifikovaných sazemí “Ketjen Black” a uhlíkovými nanotrubičkami v chitosanové polymerní matrici. Píky odečítány z cyklických voltamogramů korigovaných o pozadí, v nepřítomnosti kyslíku. Černé body a přímka – redoxní místo 1 (T1); červené body a přímka – redoxní místo 2; zelené body a přímka – redoxní místo 3. B – černá křivka – katodická část voltamogramu korigovaného o pozadí získaného měřením elektrody s BOD nasorbovanou na KB/CNT-CHI v přítomnosti kyslíku (aerovaný elektrolyt). Červená křivka – první derivace tohoto voltamogramu s vyznačením píků, které jsou analogy půlvlnových potenciálů. A i B – převzato z [54].

2.1.2 Bilirubin oxidáza imobilizovaná na oxid grafenu

Enzymu bilirubin oxidáza byla věnována i série experimentů zkoumajících možnost fyzikální imobilizace enzymu na částice oxidu grafenu (GO). Ty jsou, na rozdíl od jednodimenzionálních uhlíkových trubiček, dvojrozměrné a obecně nejsou tak vhodným materiálem pro zvýšení vodivosti polymerních matric. Nehledě na to, že samotný GO má velmi nízkou vodivost elektronů v rovině nanovrstev jako důsledek oxidací narušeného systému konjugovaných vazeb [55, 56]. Hlavní výhodou GO je ale dobrá dostupnost a nízká cena, příp. relativně snadná příprava oxidací grafitu, dále vysoká hydrofilnost daná přítomností kyslík obsahujících skupin (karboxyly, hydroxyly, epoxy skupiny...). To umožňuje jednak vysokou stabilitu vodných disperzí GO a tudíž snadnou práci s nimi a také různé způsoby jejich funkcionalizace. V neposlední řadě je nutné zmínit možnost přípravy redukováného GO (rGO), který je svými vlastnostmi hybridem mezi GO a grafenem. O obecných vlastnostech grafenových derivátů vč. GO a především o jejich využití v biosenzorech a biopalivových člancích bylo stručně pojednáno např. v přehledových pracích předkladatele [7, 8], výraznější citační ohlas nicméně získala přehledová práce diskutující aplikovatelnost grafenu (či jeho derivátů) v biopalivových člancích [9] (**příloha P.3**).

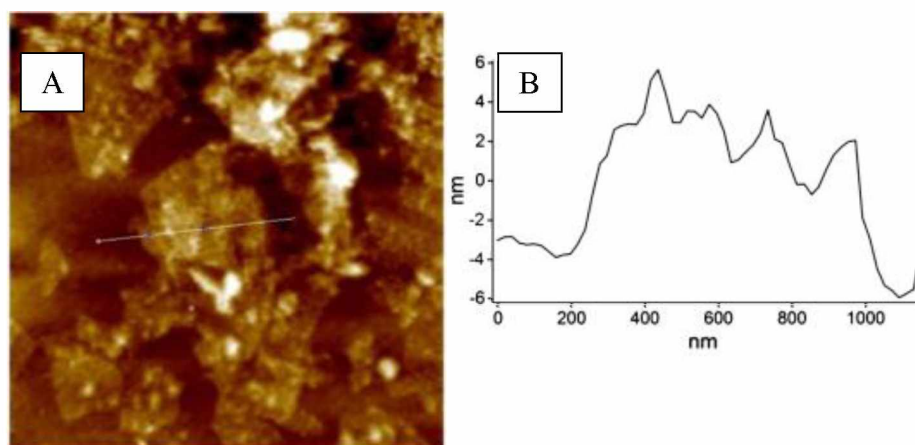
Výzkum integrace oxidu grafenu s bilirubin oxidázou vycházel z předpokladu, že nanočástice GO s parciálním záporným nábojem na povrchu by mohly mít pro sorpci BOD podobný efekt jako výše zmíněné uhlíkové nanomateriály. Proto byla první studie [57] (**příloha**

P.4) zaměřená na porovnání biokatod připravených sorpcí BOD na GO a na KB/CNT-CHI nanokompozit zmíněný v kapitole 2.1.1. V této fázi již byla sorpce BOD na GO prováděna „*ex situ*“, tedy v separátním kroku sestávajícího z jednoduchého smíchání roztoku BOD a vodné disperze GO a inkubace směsi po určitý čas. Následovala separace vzniklých GO/BOD nanočástic jednoduchou centrifugací, dekantací supernatantu a resuspendováním precipitátu v menším množství fosfátového pufru. Tím vznikla zakoncentrovaná disperze nanočástic oxidu grafenu s molekulami enzymu nasorbovanými na povrchu. Po nanesení této disperze na uhlíkovou elektrodu a zaschnutí za laboratorní teploty vznikl stabilní film. Elektrokatalytická aktivita takové biokatody je ovšem zásadně limitovaná nízkou elektronovou vodivostí použitých materiálů. V dalším kroku proto bylo testováno, zda by bylo možné aplikovat na připravené biokatody elektrochemickou redukci a překvapivě se ukázalo, že aktivita BOD integrovaná v GO matrici je i po aplikaci redukčního potenciálu (cyklická voltametrie, 30 skenů v rozmezí $-1,25 \rightarrow 0$ V proti Ag/AgCl referenční elektrodě) zachována. Pro porovnání byla podrobena redukci i biokatoda modifikovaná KB/CNT-CHI s BOD nasorbovanou až po modifikaci elektrody (viz metodika v přílohách **P.1** a **P.2**). Ukázalo se, že i na této biokatodě zůstala aktivita BOD po aplikaci redukčního potenciálu zachována, je nicméně patrné, že došlo ke změně orientace enzymu na elektrodě, neboť stabilní bioelektrokatalýza je pozorována až při nižší absolutní hodnotě potenciálu. Z toho je patrné, že elektronový transfer probíhá po elektrochemické redukci jinou cestou. Oproti tomu maxima bioelektrokatalytického proudu je na elektrodě s redukovánými GO/BOD dosaženo již při cca 500 mV (proti Ag/AgCl), což odpovídá toku elektronu z elektrody přímo na aktivní centrum T1 a z něj přímo na kyslík rozpuštěný v roztoku. Tyto skutečnosti jsou patrné z cyklických voltamogramů zobrazených na obr. 6.



Obrázek 6: CV elektrod modifikovaných GO-BOD (A) a KB/CNT-CHI (B) před (křivky a) a po (křivky b a c) elektrochemické redukci. Voltamogramy měřeny v acetátovém pufru pH=6 deaerovaném (křivky a, b) a aerovaném (křivky c). Převzato z [57].

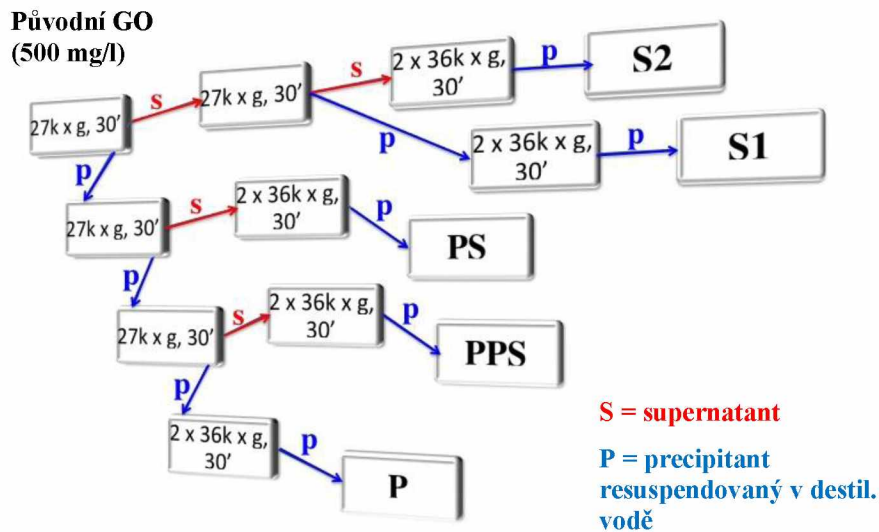
Uvedené výsledky podnítily hlubší studii fungování BOD integrované v redukovaném GO. Ve studii [58] (**příloha P.5**) byly testovány další možné způsoby sorpce BOD na GO, tj. inkubace roztoku BOD s elektrodou dříve modifikovanou GO, příp. redukovaným GO, dále „*in situ*“ inkubaci kdy byla na povrchu elektrody nechána zaschnout směs GO+BOD v pufru. Jako optimální se nicméně ukázala již dříve testovaná možnost inkubace „*ex situ*“. Při ní byl v mikrozkušivce 4 h inkubován roztok BOD spolu s disperzí GO, tato směs byla následně centrifugací zbavena větší části kapalného podílu a takto zakoncentrovaná byla aplikována na elektrodu. Po zaschnutí při laboratorní teplotě se vytvořil konzistentní film s dobrou stabilitou. Takto připravené elektrody byly podrobeny elektrochemické redukci a poté byla měřena jejich bioelektrokatalytická aktivita. Kromě elektrochemických měření byla potvrzena sorpce molekul BOD na nanočástice GO i pomocí mikroskopie atomárních sil – viz obr. 7.



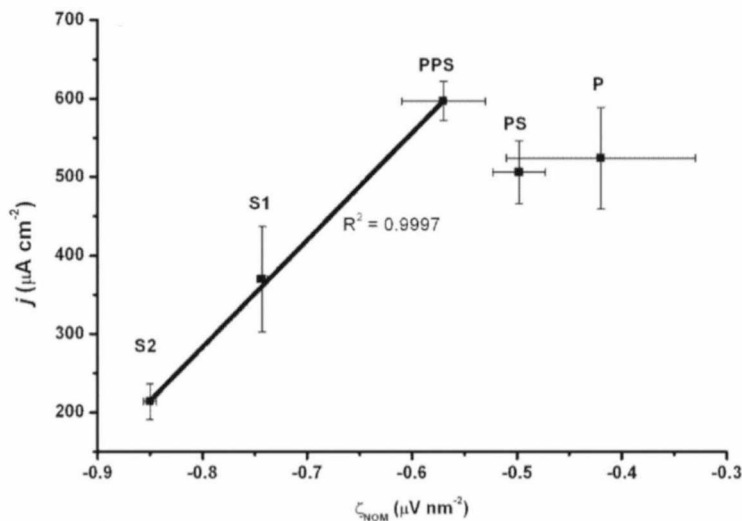
Obrázek 7: Zobrazení topografie pomocí mikroskopie atomárních sil (A) pro GO s nasorbovanými molekulami BOD. B – výškový profil řezu podle linie zaznačené v panelu A. Převzato, upraveno z [58].

Dalším zajímavým zjištěním v rámci těchto experimentů byla pozorovaná vyšší míra bioelektrokatalýzy, pokud byl jako substrát pro sorpci BOD použit GO po separaci specifické velikostní frakce z původní komerčně dostupné vodné disperze. Separace bylo dosaženo jednoduchou centrifugací, na základě hmotnosti a povrchového náboje. Podrobněji byl tento fenomén zkoumán v práci [59] (**příloha P.6**). Zde byla nejprve provedena série centrifugačních a separačních kroků, podle schématu na obr. 8. Výsledkem těchto kroků byly jednotlivé velikostní frakce původní směsné disperze GO; tyto se použily jako substrát pro sorpci BOD stejným způsobem jako v předchozích experimentech. Pro každou frakci byly dále pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) a elektroforetického rozptylu světla (ELS) zjištěny průměrné velikosti částic a hodnoty ζ -potenciálů. Z těchto veličin byl vyjádřen „nominální ζ -potenciál“ ζ_{NOM} , tedy hodnota průměrného ζ -potenciálu vztaženého na jednotku plochy povrchu GO nanočástice aproximovanou z naměřeného hydrodynamického poloměru. Ukázalo

se, že tato veličina pro část velikostních frakcí koreluje s naměřenými maximálními bioelektrokatalytickými proudovými hustotami v přítomnosti kyslíku a z nich vypočítaných hodnot množství BOD nasorbované na povrch elektrody (přibližně 8 – 23 pmol/cm²). Respektive, jak je patrné z grafu závislosti proudové hustoty na ζ_{NOM} na obr. 9, maximum proudové hustoty (a tedy zřejmě i nejefektivnější uspořádání BOD na povrchu nanočástic grafen oxidu) je dosaženo při hodnotě $\zeta_{\text{NOM}} = -0,6 \mu\text{V}/\text{nm}^2$. Při vyšších hodnotách je bioelektrokatalýza katod o něco nižší, ale víceméně na stejné úrovni, kdežto při nižších hodnotách je pozorován pokles proudové hustoty, lineárně s poklesem ζ_{NOM} ($R^2 = 0,997$).



Obrázek 8: Schéma centrifugačních a separačních kroků s jednotlivými vzniklými supernatanty (S) a precipitáty (P) pro separaci různých velikostních frakcí (označených jako S1, S2, P, PS a PPS) z původní komerčně dostupné vodné disperze GO. Převzato, upraveno z [59].



Obrázek 9: Graf závislosti naměřené biokatalytické proudové hustoty j na nominálním ζ potenciálu materiálu, který byl použit na přípravu biokatody. Převzato z [59].

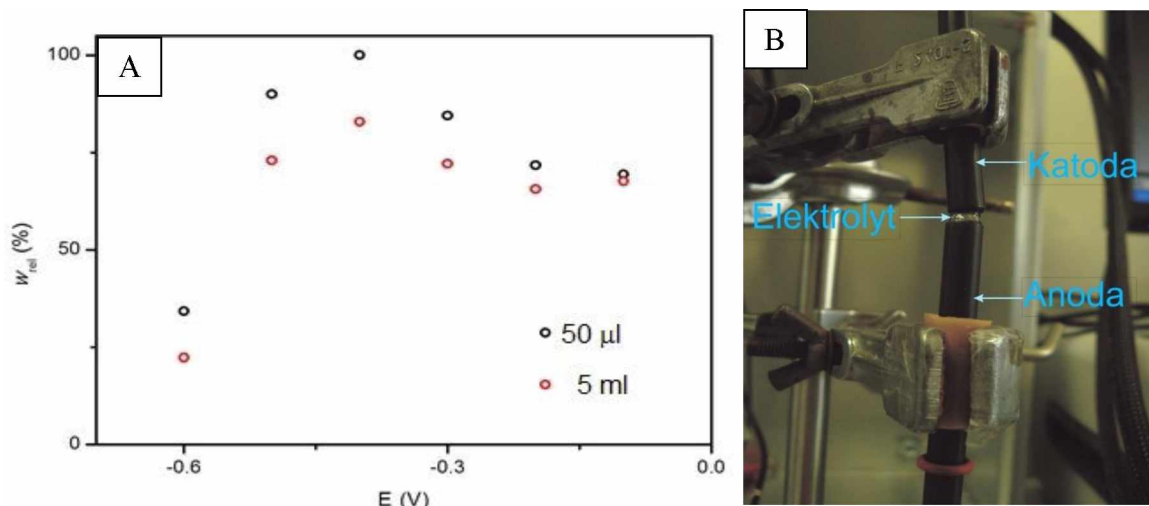
Uvedené výsledky jednak potvrzují schopnost BOD zachovat si bioelektrokatalytickou aktivitu i po adsorpci na GO a následné elektrochemické redukci, zároveň ale předestírá jednoduchou možnost separace určitých frakcí GO z komplexní vodné disperze. Tyto frakce přitom nejsou určeny jen velikostí nanočástic, ale i hodnotou povrchového náboje.

2.1.3 Přímý elektronový transfer fruktóza dehydrogenázy, enzymové biopalivové články

Fruktóza dehydrogenáza (D-fruktóza:akceptor 5-oxidoreduktáza; FDH; EC 1.1.99.11) je enzym katalyzující oxidaci fruktózy, přičemž elektrony uvolněné touto reakcí jsou předávány na molekulu elektronového akceptoru, mohou být ale předávány i na povrch elektrody. FDH tedy slouží jako anodický bioelektrokatalyzátor s přímým elektronovým transferem. Ten je zajištěn s největší pravděpodobností pomocí kofaktoru pyrrolochinolin chinonu (PQQ) a jednoho či více hemů c. Nejasnosti okolo struktury FDH jsou dány faktem, že se jedná o membránový enzym a tudíž není jednoduché jej krystalizovat a získat strukturální data typickými metodami (rentgenová difrakce). Lokace FDH v periplasmatické membráně bakterií (*Gluconobacter sp.*) má ještě jeden aspekt – spolu s ostatními membránovými dehydrogenázami je FDH alokováno tak, že její aktivní centrum míří do periplasmatického prostoru, tudíž velmi efektivně přeměňuje substrát transportovaný pouze přes bakteriální stěnu. Není zde tedy limitace difuzí či transportem substrátu až do cytoplasmy [60], což dělá z bakterií rodu *Gluconobacter* vhodné adepty na anodické mikrobiální elektrokatalyzátory (o nich bude pojednáno v kap. 2.2).

FDH je jakožto membránový enzym poměrně hydrofobní a je popsána její efektivní adsorpce na různé nanomateriály [61–64]. V první fázi experimentů [65] (**příloha P.7**) byla testována imobilizace na komerčně dostupné zlaté nanočástice deponované na zlatou polykrystalickou elektrodu bez fixační polymerní matrice. Připravené elektrody byly dále inkubovány v roztoku merkaptoethanolu za účelem zformování samoskladebné monovrstvy pro zvýšení hydrofobicity povrchu (podle studie Murata *et al.*, 2009 [61]). Následná voltametrická měření prokázala, že v přítomnosti fruktózy v roztoku systém generuje enzymaticky katalyzovaný elektrický proud, jakkoliv maximální proudová hustota byla cca o řád nižší než jaká byla publikována se stejným systémem [61]. Přínosem ale bylo i zjištění, že uvedených maximálních proudových hustot nemohlo být dosaženo bez elektrochemické předúpravy zlaté elektrody modifikované zlatými nanočásticemi. Té bylo dosaženo pomocí cyklické voltametrie v roztoku H_2SO_4 v takovém rozsahu potenciálů, který umožnil opakovanou oxidaci Au a redukci oxidů zlata, které zůstaly na povrchu. Zdá se být

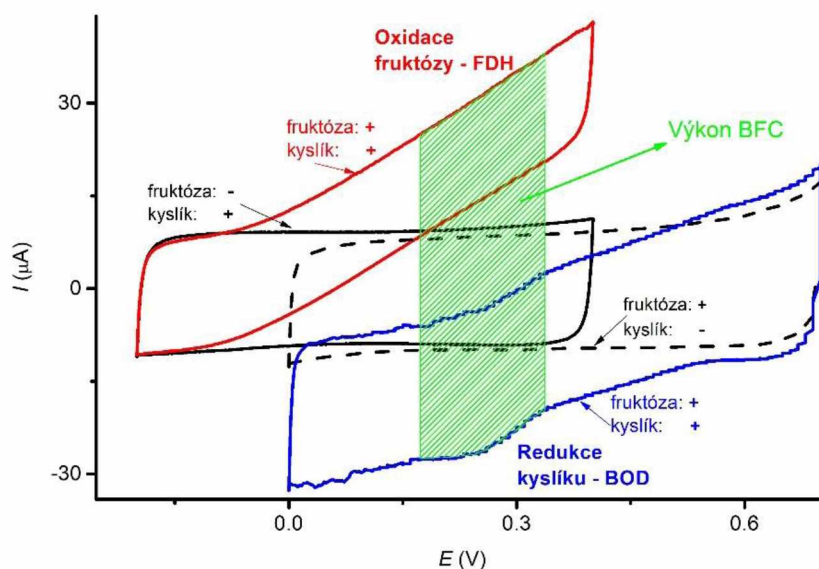
pravděpodobné, že tímto došlo k odstranění povrchových nečistot či jiných molekul blokuujících tvorbu samoskladebné monovrstvy, je ale nutné vzít v potaz, že stejná aktivace byla nutná i pro konstrukci biokatody. Ta byla připravena stejným způsobem jako bioanoda, pouze bez merkptoethanolové monovrstvy a místo FDH byla elektroda inkubována s roztokem BOD. Je tedy možné, že opakovanou oxidací a redukcí povrchové vrstvy zlatých nanočástic dochází k určité reorganizaci, která např. zvyšuje vodivost elektrodového rozhraní. Tento fenomén nebyl dále zkoumán, připravené elektrody byly spojeny v jednokomorový biopalivový článek s fruktózou jako „biopalivem“, kyslíkem jako oxidovadlem (elektronovým akceptorem) a acetátovým pufrům pH 6 jako elektrolytem. Takto připravený biopalivový článek poskytoval maximální výkonovou hustotu 27,4 μW na cm^2 geometrické plochy elektrod při napětí okolo 300 mV. V porovnání s hodnotami dosaženými v jiných publikacích se nejednalo o příliš vysoký výkon, přidaná hodnota zde ale tkví v možnosti miniaturizace. Proto byl testován i biopalivový článek se stejnými elektrodami, oxidovadlem, palivem a elektrolytem, tentokrát ale v konfiguraci, kdy bylo použito jen cca 50 μl elektrolytu. Uspořádání je na obr. 10. Naměřený výkon tohoto zařízení byl dokonce mírně vyšší než při „klasické“ konfiguraci (tj. anoda a katoda ponořena do 5 ml elektrolytu v měřicí cele, roztok je nemíchaný), což lze pravděpodobně přičíst efektivnější difuzi kyslíku ke katodě.



Obrázek 10: A – graf výkonové hustoty v závislosti na napětí sestavených biopalivových článků. Černé body – miniaturizované uspořádání, červené body – „klasické“ uspořádání s 5 ml elektrolytu. B – fotografie miniaturizovaného uspořádání biopalivového článku. Převzato z [65].

V dalších sériích experimentů byla testována sorpce FDH na již dříve popsany hybridní nanomateriál Ketjen Black/uhlíkové nanotrubičky v polymerní matici z chitosanu (KB/CNT-CHI) – viz příloha P.1. Ukázalo se, že elektrody modifikované tímto nanomateriálem (viz sekce 2.1.1) jsou přímo použitelné i pro přípravu bioanod jednoduchou inkubací s roztokem FDH. Ty pak vykazovaly maximální bioelektrokatalytickou proudovou hustotu 0,45 mA/cm^2 .

Enzymatická oxidace fruktózy (tj. nárůst biokatalytického proudu) byla pozorována v oblasti potenciálu od -0,09 V proti Ag/AgCl referenční elektrodě (viz obr. 11) Po zapojení do biopalivového článku s KB/CNT-CHI biokatodou s bilirubin oxidázou popsanou v sekci 2.1.1 bylo dosaženo maximální výkonové hustoty $50 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ při 300 mV. Není bez zajímavosti, že prakticky stejný výkon vykazovalo i zařízení ve studii Miyake *et al.*, 2009 [47]. V té byla místo FDH imobilizována na elektrodu (modifikovanou Ketjen Black nanočásticemi v polyvinylidenfluoridové polymerní matici, KB-PVDF) glukóza dehydrogenáza a NAD^+ jako její kofaktor. Biokatoda byla připravená z BOD sorbované na stejně modifikované elektrodě. Při samostatných měřeních ale obě elektrody vykazovaly téměř dvakrát vyšší maximální hustotu biokatalytického proudu než námi připravené elektrody. To by poukazovalo na menší vnitřní odpor biopalivového článku sestaveného z elektrod modifikovaných nanomateriály i) v chitosanové matici (lepší vodivost než PVDF) a ii) obsahujícím uhlíkové nanotrubičky.



Obrázek 11: Cyklické voltamogramy biokatody (černá přerušovaná a modrá) a bioanody (černá plná a červená) modifikovaných KB-CNT/CHI a příslušným enzyme (FDH – fruktóza dehydrogenáza, BOD – bilirubin oxidáza). Voltamogramy naměřené v nepřítomnosti (černá plná a přerušovaná) a v přítomnosti (modrá a červená) příslušného substrátu (fruktózy, kyslíku).

Jakkoliv se chitosan ukázal být za jistých podmínek použitelné disperzní činidlo, přece jen je díky své hydrofilicitě ne zcela kompatibilní s převážně hydrofobními uhlíkovými nanomateriály. Proto byla jako další platforma pro imobilizaci elektrokatalytických enzymů testována disperze KB v poly(mléčné kyselině) (PLA) [66] (**Příloha P.8**). PLA je více hydrofobní než chitosan, neprokázalo se ale, že by díky ní mohlo být na povrch elektrody nanášeno větší množství KB nanočástic. Pokud se nicméně povrch elektrody modifikoval disperzí o koncentraci 4,3 mg KB/ml PLA, vzniklý nanostrukturovaný film byl stabilní a

umožňoval inkubaci s roztoky BOD a FDH. Takto byly připraveny enzymové bioanody a biokatody, které vykazovaly velmi podobné elektrokatalytické vlastnosti jako bioanody a biokatody připravené z elektrod modifikovaných směsí KB-CNT/CHI. Využití PLA jako polymerní matrice pravděpodobně umožnilo lepší dispergování KB nanočástic, což se projevilo vyšší vodivostí kompozitu. Důležité je, že již nebylo nutné integrovat do elektrodového rozhraní uhlíkové nanotrubičky.

Další výsledek této studie je ověření možnosti škálovatelnosti enzymových bioanod a biokatod. Za tímto účelem byly použity elektrody z papíru z uhlíkových vláken („Toray paper“, viz např. <https://www.fuelcellearth.com/fuel-cell-products/toray-paper-060/>), kde byla KB-PLA nanokompozitem modifikována geometrická plocha přibližně 1 cm² (pozn.⁴). Tyto elektrody byly pro porovnání modifikovány i nanokompozitem KB/CNT-CHI (viz kap. 2.1.1) a všechny typy připravených elektrod pak byly inkubovány s roztokem BOD nebo FDH.

Jelikož srovnání na úrovni pouze dosažených proudových hustot je sice užitečné, ale nikoliv zcela informativní, z naměřených dat bylo pomocí matematického modelu aproximováno množství elektrokatalyticky aktivních molekul enzymu na povrchu každé elektrody a rychlostní konstanty reakcí probíhajících na elektrodách. Pro modelování byl použit vztah pro proudovou hustotu [67]:

$$j = \frac{n.F.I.k_C}{1 + \frac{k_C + k_b}{k_f} + \frac{k_b}{k_f}} \quad (1)$$

kde platí:

$$k_f = k^0 \cdot \exp \left[(1 - \alpha) \cdot \left(\frac{n.F}{R.T} \right) \cdot (E - E^0) \right] \quad (2)$$

a

$$k_b = k^0 \cdot \exp \left[-\alpha \cdot \left(\frac{n.F}{R.T} \right) \cdot (E - E^0) \right] \quad (3)$$

kde: j – proudová hustota (A/cm²); n – počet elektronů vyměněných při pozorované reakci⁵; F – Faradayova konstanta; I – množství elektroaktivního enzymu na jednotkové ploše povrchu (mol/cm²); k_C – rychlostní konstanta intramolekulárního elektronového transportu (s⁻¹), k_f –

⁴ Diskové elektrody ze skelného uhlíku používané v předchozích experimentech mají plochu 0,07 cm². Dále je třeba brát v potaz porozitu (78%) uhlíkového papíru, díky níž bude skutečná plocha aktivního povrchu několikanásobně větší než geometrická.

⁵ Jakkoliv se v konečném důsledku jedná o dvouelektronovou redukci O₂ na vodu, samotná heterogenní reakce jejíž kinetické parametry byly zjišťovány, tj. oxidace kofaktoru bilirubin oxidázy, je pouze jedoelektronová reakce.

rychlostní konstanta elektronového transportu z elektrody k aktivnímu místu enzymu (s^{-1}); k_b – rychlostní konstanta elektronového transportu z aktivního místa enzymu k elektrodě (s^{-1}); k^0 – rychlostní konstanta heterogenní elektrochemické reakce na povrchu elektrody (s^{-1}); α – transportní koeficient; E – aktuální hodnota potenciálu aplikovaného při cyklické voltametrii (V); $E^{0'}$ – redoxní potenciál aktivního místa enzymu, které bezprostředně přijímá elektrony z povrchu elektrody (V); R a T – molární plynová konstanta a teplota.

Z výsledků (Tabulka 1) vyplynulo, že redukce kyslíku katalyzovaná imobilizovanou BOD probíhala daleko rychleji při použití nanokompozitu KB-PLA než při použití chitosanu (KB/CNT-CHI). Tento nárůst rychlostní konstanty k^0 byl v případě velkoformátových elektrod zhruba trojnásobný, v případě diskových maloplošných elektrod pak dokonce až šestinásobný. To se nicméně neprojevilo odpovídajícím nárůstem biokatalytické proudové hustoty, je tedy zřejmé, že při daném uspořádání (tj. modifikovaná biokatoda ponořená ve vodném elektrolytu, který je probubláván vzduchem) není limitující faktor rychlost reakce, ale s největší pravděpodobností difúze kyslíku k povrchu elektrody. Dále bylo zjištěno, že zatímco u maloplošných diskových elektrod modifikovaných KB-PLA prakticky nedošlo ke změně množství elektrokatalyticky aktivních molekul BOD v porovnání s elektrodami modifikovanými KB/CNT-CHI, u velkoplošných elektrod se tento parametr zvýšil přibližně dvojnásobně. Není zcela jasné, jaký mechanismus by za takový rozdíl mohl být zodpovědný, přesto je možné tvrdit, že PLA tvoří vhodnější polymerní matici pro sorpci BOD než chitosan. U bioanod nebyl pozorován tak dramatický nárůst reakční rychlosti (zvýšení o 42% a o 13% v případě velkoplošných a maloplošných diskových elektrod) ani nasorbovaného množství elektrokatalyticky aktivní FDH (procentuální navýšení přibližně stejné jako u reakční rychlosti). Jakkoliv rozdíly nejsou tak velké jako u biokatod, i na bioanodě vytváří PLA vhodnější prostředí pro sorpci biokatalyzátoru. Největší nevýhodou nicméně zůstává nutnost použít při přípravě roztoku PLA organická rozpouštědla, např. dimethylformamid.

Tabulka 1: Hodnoty vypočtených rychlostních konstant k^0 a množství nasorbovaného elektroaktivního enzymu Γ na jednotlivých typech bioanod (FDH) a biokatod (BOD): GCE – diskové elektrody ze skelného uhlíku, geometrická plocha 0,0707 cm²; TP – elektrody z uhlíkového papíru, geometrická plocha 1 cm²; KB-PLA – elektrody modifikované směsí sazí KB dispergované v kyselině polymléčné; KB/CNT-CHI – elektrody modifikované směsí sazí KB a uhlíkových nanotrubiček dispergovaných v chitosanu; TP|BOD – bilirubin oxidáza sorbována přímo na nemodifikovaný uhlíkový papír.

| Konfigurace bioelektrody | k^0 (s^{-1}) | Γ ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) |
|--------------------------|--------------------|---------------------------------------------|
| BIOANODY | GCE KB-PLA FDH | 14.6 ± 0.7 |
| | GCE KB/CNT-CHI FDH | 10.3 ± 0.3 |

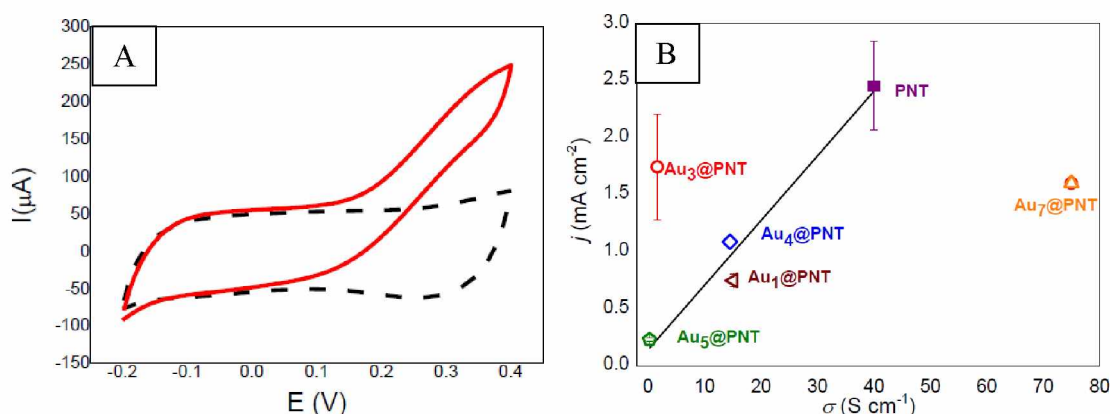
| | | | |
|-----------|--------------------|------------|------------|
| | TP KB-PLA FDH | 11.0 ± 1.0 | 19.4 ± 2.6 |
| | TP KB/CNT-CHI FDH | 9.7 ± 2.6 | 18.1 ± 1.2 |
| BIOKATODY | GCE KB-PLA BOD | 300 ± 2 | 10.5 ± 1.9 |
| | GCE KB/CNT-CHI BOD | 46 ± 24 | 9.4 ± 2.2 |
| | TP KB-PLA BOD | 113 ± 6 | 9.3 ± 0.6 |
| | TP KB/CNT-CHI BOD | 32 ± 4 | 4.3 ± 0.8 |
| | TP BOD | 52 ± 4 | 2.1 ± 0.2 |

Ještě více se ale projeví rozdíly mezi elektrodami připravenými z KB/CNT disperze v chitosanu a KB disperze v poly(mléčné kyselině), když byly velkoformátové elektrody zapojeny jako biopalivový článek. Zatímco prvně jmenované poskytovaly výkonovou hustotu pouze 12 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ a potenciál při nulovém proudu 450 mV, při použití poly(mléčné kyseliny) to bylo již 33 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ a 600 mV. Vzhledem k tomu, že při použití stejného nanokompozitu KB-PLA na maloplošných diskových elektrodách byly naměřeny hodnoty 57 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ a 680 mV, je velmi pravděpodobné, že vnitřní odpor větších elektrod představuje zásadní překážku pro konstrukci větších biopalivových článků. Nanokompozit na bázi PLA se však pro tyto aplikace jeví jako efektivnější než nanokompozit dispergovaný pomocí chitosanu.

Posledním příspěvkem v této oblasti je testování aktivity elektrobiokatalyzátorů sorbovaných na nově vyvinuté polypyrolové nanotrubičky (PNT) s integrovanými zlatými nanočásticemi (Au@PNT) [68] – viz **příloha P.9**. Tyto nanomateriály byly dispergovány v roztoku chitosanu a v této formě naneseny na povrch diskových elektrod ze skelného uhlíku, kde po zaschnutí vytvořily stabilní film. Následná imobilizace fruktóza dehydrogenázy, bilirubin oxidázy a lakázy probíhala stejně jako v předcházejících experimentech, tj. inkubací modifikované elektrody s roztokem příslušného enzymu. Bylo zjištěno, že FDH se velmi dobře sorbuje na samotné polypyrolové nanotrubičky bez zlatých nanočástic – takto připravené bioanody vykazovaly hustotu biokatalytického proudu 2,5 mA/cm² v přítomnosti 0,2 M fruktózy (obr. 13 A). Elektrody modifikované hybridními nanomateriály Au@PNT pak vykazovaly maximální biokatalytické proudové hustoty 1,7 mA/cm². Různým nastavením reakčních podmínek při syntéze byly získány nanomateriály s různou velikostí uhlíkových nanočástic a elektrické vodivosti σ , označené jako Au₁@PNT – Au₇@PNT. V grafu na obr. 12 B je vidět, že právě vodivost nanomateriálu koreluje s maximální biokatalytickou proudovou hustotou. Z této závislosti se ale vymykají nanomateriály Au₃@PNT a Au₇@PNT, při jejichž použití bylo dosaženo proudových hustot blízkých se proudovým hustotám bioanod modifikovaných pouze PNT dispergovanými v chitosanu. Tyto výsledky by mohly opravňovat

k závěru, že je efektivnější sorbovat fruktóza dehydrogenázu na samotné polypyrolové nanotrubičky nemodifikované zlatými nanočásticemi. Experimenty nicméně ukázaly, že díky nekovalentní interakci mezi AuNP a aminy chitosanu jsou nanokompozity připravené z Au@PNT významně stabilnější než při použití samotných PNT.

Pro porovnání byly pomocí syntetizovaných nanomateriálů připraveny i biokatody stejným způsobem jako výše uvedené anody, pouze inkubace proběhla s roztokem bilirubin oxidázy a lakázy. Následná voltametrická měření prokázala, že Au_x@PNT nejsou vhodné nanomateriály pro fyzisorpci těchto enzymů, neboť nebyl pozorován přímý elektronový transfer. Připravené biokatody tedy vykazovaly elektrokatalytickou redukci kyslíku pouze v přítomnosti elektronového mediátoru v elektrolytu.

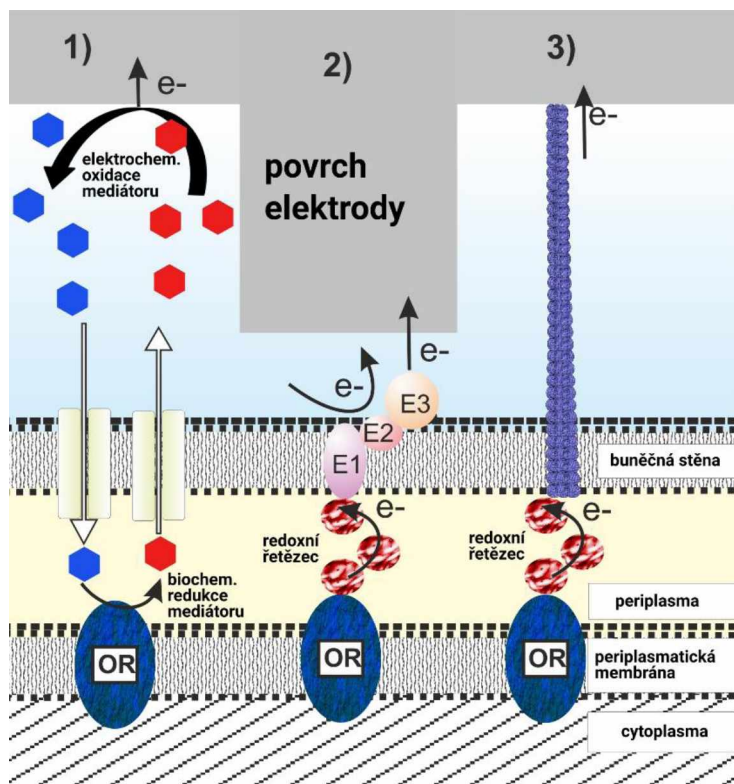


Obrázek 12: A – cyklické voltamogramy bioanody na jejíž přípravu bylo použito disperze Au₃@PNT v chitosanu. Černá přerušovaná křivka – CV v samotném pufru, červená křivka – CV v pufru s obsahem fruktózy. B – průměrné katalytické proudové hustoty bioanod z různých nanomateriálů v závislosti na zjištěné vodivosti těchto nanomateriálů. Bioelektrody byly připraveny nanesením na povrch diskové elektrody ze skelného uhlíku a následným zaschnutím disperzí polypyrolových nanotrubiček (PNT) a PNT s in-situ syntetizovanými zlatými nanočásticemi (Au_x@PNT) v roztoku chitosanu. Takto modifikované elektrody byly inkubovány s roztokem fruktóza dehydrogenázy a pomocí cyklické voltametrie ve 100 mM acetátovém pufru pH 5 se 100 mM fruktózou byly zjištěny hodnoty katalytického proudu. Převzato z [68].

2.2 Mikrobiální bioelektrody

Jak již bylo zmíněno, bioelektrody pro biosenzory i biopalivové články mohou být připraveny nejen pomocí enzymů, ale i z intaktních mikrobiálních buněk. V této oblasti jsou zmiňovány především tzv. „exoelektrogeny“, tedy bakterie schopné elektronového transferu bez přidaného mediátoru. V současnosti jsou známy tři způsoby tohoto přenosu (obr. 13): i) pomocí řetězce cytochromů, jejichž koncové členy se nachází na povrchu buňky. Ta musí tedy být ve fyzickém kontaktu s materiálem, na nějž předává elektrony (nebo z nějž je přijímá); ii) pomocí elektronových mediátorů, které si bakterie samy syntetizují. Zde je princip přenosu

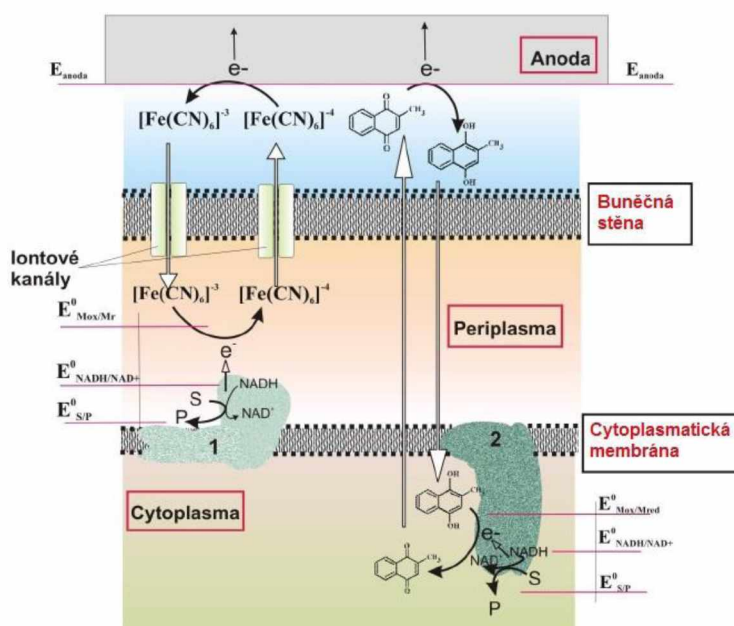
stejný jako u umělého zprostředkovaného elektronového transferu; iii) pomocí vodivých pilusů, které mohou přenášet elektrony až na vzdálenosti desítek μm . Konce těchto vodivých výrostků nicméně musí být v kontaktu s materiálem, s nímž jsou vyměňovány elektrony (např. povrch elektrody). Je nutné poznamenat, že různé mikroorganismy mohou uvedené způsoby i kombinovat, případně mohou v závislosti na podmínkách vypínat/zapínat jednotlivé typy přenosů. Základní aspekty mikrobiálních elektrod pro biopalivové články a biosenzory byly stručně představeny v přehledových studiích [69, 70].



Obrázek 13: Schematické znázornění tří hlavních typů přímého elektronového transferu bakterií pomocí 1) bakteriemi produkovaných elektronových mediátorů; 2) řetězce povrchových cytochromů c, na obrázku označených E1-E3; 3) vodivými pilusy. Intracelulární elektronový transport mezi vlastním elektrokatalytickým enzymem (v obrázku označen jako OR) a cytochromem c nebo vodivými pilusy pak může být zajištěn např. kaskádou oxidoreduktáz, v obrázku naznačeno jako redoxní řetězec. Převzato, upraveno z [9].

Kromě exoelektrogenů jako *Shewanella oneidensis* nebo *Geobacter sulfurreducens* je v souvislosti s mikrobiálními biosenzory a biopalivovými články často diskutován i *Gluconobacter oxydans*. Někteří zástupci rodu *Gluconobacter* zřejmě disponují biochemickou výbavou pro přímý elektronový transfer [71, 72], jako rozpoznávací prvky biosenzorů se však osvědčil *G. oxydans* především díky alokaci velkého množství oxidoreduktáz v periplasmatické membráně tak, že jejich aktivní centrum míří do periplasmatického prostoru, tudíž velmi efektivně přeměňuje substrát transportovaný pouze přes bakteriální stěnu. Není zde tedy limitace difuzí či transportem substrátu až do cytoplasmy [60], kde by byl teprve

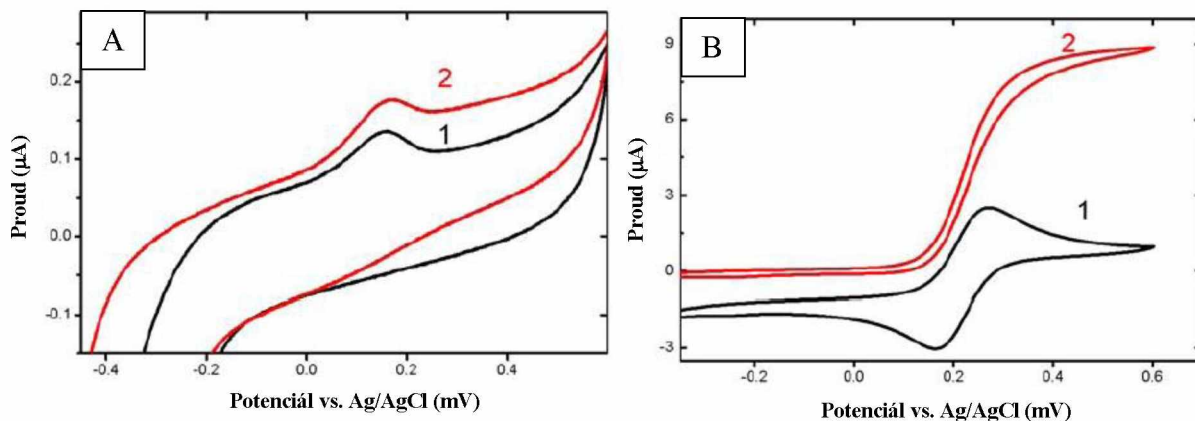
oxidován/redukován cytoplazmatickými enzymy. Toto uspořádání umožňuje využití polárních, ve vodě rozpustných elektronových mediátorů, neboť není nutné, aby difundovaly až do cytoplasmy (skrže buněčnou stěnu se pak transportují, podobně jako molekuly substrátu, iontovými kanály) – viz schéma na obr. 14. Dalším důležitým rysem *G. oxydans* je variabilita ve skladbě membránových oxidoreduktáz v závislosti na složení inkubačního média. Takto je možné jednoduše zvýšit selektivitu mikrobiálního biosenzoru s *G. oxydans* (mikrobiální senzory jsou obecně poměrně málo selektivní, pokud není tento jev potlačen různými mechanismy).



Obrázek 14: schematické znázornění mikrobiálního zprostředkovaného elektronového transferu mezi anodou a membránovými oxidoreduktázami s aktivním místem orientovaným do periplasmatického prostoru (1) a do cytoplasmatického prostoru (2). V obou případech je substrát (S) enzymem oxidován na product (P), což je doprovázeno redukcí kofaktoru ($\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$). Ten je vzápětí regenerován molekulou mediátoru - 1 – polární ferrikyaniid, 2 – nepolární menadiol (vitamin K3). Převzato, upraveno z [69].

Imobilizací intaktních viabilních buněk *G. oxydans* na elektrodu je tedy zajištěna efektivní přeměna substrátu. To bylo již dříve, v kombinaci s vhodnými elektronovými mediátory, využito pro přípravu mikrobiálních biosenzorů, jak bylo shrnuto např. v přehledovém článku [73]. V něm jsou mimo jiné zmíněny výsledky předběžných experimentů naznačujících, že za jistých podmínek lze pozorovat i přímý elektronový transfer mezi buňkami *G. oxydans* a povrchem elektrody, na nichž jsou imobilizovány. Těmito podmínkami je myšlena především integrace bakteriálních buněk s nanomateriály. Experimentálně byly za tímto účelem testovány suspenze *G. oxydans* s přidavkem vodné suspenze grafen oxidu. Tyto směsi byly po odstranění větší části vodné fáze centrifugací nanášeny na uhlíkové elektrody, kde po zaschnutí a elektrochemické redukci přítomného grafen oxidu vytvořily stabilní film. U takto připravených

elektrod byl pozorován nárůst anodického proudu po přidavku ethanolu (substrátu) do elektrolytu (obr. 16 A), což svědčí o jisté míře přímého elektronového transferu. Faktem nicméně zůstává, že u stejných elektrod byly pozorovány řádově vyšší biokatalytické proudové hustoty (stovky $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) byl-li v roztoku přítomen i hexakynoželezitan jako elektronový mediátor. Rozdíly v elektrochemické odezvě na přítomnost ethanolu jsou patrné z voltamogramů na obr. 15.



Obrázek 15: Cyklické voltamogramy naměřené uhlíkovými elektrodami modifikovanými buňkami *G. oxydans* s integrovanými nanočásticemi elektrochemicky redukováného grafitu oxidu. Černé křivky (1) – elektrolyt, červené křivky (2) – elektrolyt s přidavkem substrátu (ethanol). A – přímý elektronový transfer, B – elektronový transfer zprostředkovaný hexakynoželezitanovými ionty. Převzato, upraveno z [73].

Výše zmíněné experimenty vychází ze studie integrace uhlíkových nanotrubiček a buněk *G. oxydans* [74] (**příloha P.10**). Ty ukázaly, že pokud jsou obě složky smíchány a podrobeny ultrazvukové dispergaci, vytvoří unikátní „bionano“ kompozit, který po nanesení na elektrodu a imobilizaci v chitosanové matici vykazuje velmi dobré elektrokatalytické vlastnosti. Toho bylo využito pro přípravu stabilního biosenzoru na ethanol, který byl schopen monitorovat modelovou fermentaci glukózy kvasinkami *S. cerevisiae*.

Integrace buněk *G. oxydans* s různými nanomateriály pak byla zkoumána detailněji, jako potenciální metoda pro přípravu vysoce citlivých biosenzorů ethanolu. Princip byl vesměs podobný jako v případě výše, tj. disperze buněk byla inkubována s disperzí zvolených nanočástic. Výsledky studie [75] (**příloha P.11**) ukazují, že nejlepších výsledků bylo dosaženo při integraci buněk s uhlíkovými nanotrubičkami (jedno- i vícečetnými), v porovnání se sférickými uhlíkovými nanočásticemi „Ketjan Black“ (KB), grafitovými nanočásticemi a dvěma typy mezoporézních uhlíkových nanočástic. To je s největší pravděpodobností důsledek jejich morfologie, resp. jejich schopnosti zvyšovat vodivost matrice, do které jsou integrovány. Otázkou zůstává, zda zde hrála roli penetrace nanotrubiček skrze buněčnou stěnu, tento jev nicméně nebyl potvrzen. Důležitým výsledkem je nicméně i fakt, že při využití mnohem levnější uhlíkové černi Ketjan Black bylo dosaženo rovněž poměrně dobrých výsledků

(citlivost připraveného biosenzoru s KB 88 $\mu\text{A}/\text{cm}^2\cdot\text{mM}$, při využití nanotrubiček pak 121 $\mu\text{A}/\text{cm}^2\cdot\text{mM}$).

Na tomto místě je třeba poznamenat, že výše zmíněné bioelektrody na bázi kompozitu *G. oxydans*/nanočástice mohou mít uplatnění nejen jako elektrochemické biosenzory s možností měření vzorků bez nutnosti čištění či předúpravy, ale i jako bioanody mikrobiálního biopalivového článku. Ten by sice nejspíše musel být konfigurován jako dvojkomorový, nicméně při této aplikaci by ani nemuselo být nutné použít kmeny *G. oxydans* s vysokou selektivitou.

3. AFINITNÍ BIOSENZORY

Afinitní biosenzory využívají biorozpoznávací prvek, který nevykazuje vlastní elektroaktivitu a tudíž většinou nebývá možné detekovat jej voltametří v běžných („biologických“) rozsazích potenciálů. Místo toho se nejčastěji zjišťuje změna elektrochemických vlastností povrchu po navázání molekul analytu na molekuly biorozpoznávacího prvku. Aby byl takový detekční princip funkční a efektivní, je zapotřebí i) zvolit správný biorozpoznávací prvek, na nějž se budou selektivně a přitom dostatečně silně vázat molekuly analytu a ii) molekuly (částice) biorozpoznávacího prvku imobilizovat na povrch elektrody, která bude mít vhodné vlastnosti.

Obsah této kapitoly tedy bude zaměřen jednak na konstrukci afinitních biosenzorů využívajících vazbu lektin-glykán a dále budou shrnuty hlavní příspěvky k oblasti modifikace povrchů s možnou aplikací pro přípravu právě afinitních biosenzorů.

3.1 Glyko(nano)biotechnologie

V současnosti je známo, že oligosacharidy na povrchu buněk a proteinů a proteiny, k nimž mají specifickou afinitu (tzv. lektiny) jsou extrémně všestranným a variabilním nástrojem komunikace jednotlivých komponent živého organismu mezi sebou a organismu s vnějšími podněty. Specifická vazba lektin-glykán např. určuje, zda je ten který kmen viru chřipky patogenní pro lidi nebo ne a na stejném systému komunikace je založena i celá komplexní informační síť imunitního systému. V neposlední řadě jsou změny v glykosylaci (tj. struktura a množství povrchových glykánů) spojovány i s progresem různých onemocnění a mohou být považovány za jejich markery. To se týká např. některých onkologických nebo autoimunitních onemocnění. Není tedy divu, že je snaha o využití těchto jevů jednak pro včasnou detekci onemocnění (revmatoidní artritida, rakovina prostaty...) analýzou glykanových markerů, ale i

pro medicínské využití, tj. především cílenou distribuci léčiv, vývoj vakcín apod. Stejně jako v jiných biotechnologických oblastech i zde se ukázalo být jako klíčové využití nanotechnologií; pokrok v této oblasti byl velmi detailně zrevidován v publikaci Došeková *et al.*, 2017 [6] na níž se předkladatel podílel jako spoluautor, či v kapitole 8 knihy Glyconanotechnology (ed. T. Bertók, 2019) [76], již je předkladatel autorem.

Glykánové afinitní biosenzory mohou pracovat na různých principech, v této práci bude pozornost zaměřena pouze na senzory impedanční. Jejich princip byl popsán již v kapitole 1, jedná se o detekci změny odporu povrchového přenosu náboje (charge transfer resistance, R_{CT}) způsobenou navázáním molekul analytu na povrch s imobilizovanými biorozpoznávacími molekulami. Při samotné přípravě takto konfigurovaného biosenzoru je pak snaha maximalizovat množství a vhodnou orientaci molekul lektinu (biorozpoznávacího prvku) na povrchu elektrody, což je ideální prostor pro využití nanomateriálů.

Poměrně velkou perspektivu mají v této oblasti samoskladebné monovrstvy⁶ připravené inkubací zlatých elektrod s molekulami s thiolovou funkční skupinou. Ty mají několik funkcí:

- mohou zvyšovat odpor přenosu náboje a tím zvyšovat citlivost stanovení. To je podmíněno vytvořením homogenní monovrstvy z molekul s nevodivým uhlovodíkovým řetězcem, např. 11-merkaptoundekanová kyselina [77]. Většina ultracitlivých impedančních biosenzorů vykazuje vysoké výchozí hodnoty R_{CT} , možné jsou ale i konfigurace, kdy je naopak povrchový přenos náboje záměrně zvyšován, především aplikací redukováného GO [78].)

- mohou vnést na povrch funkční skupiny pro kovalentní imobilizaci biorozpoznávacích molekul. Typickým příkladem jsou karboxylové skupiny, které po aktivaci (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidem (EDC) vytvoří stabilní ester s N-hydroxysukcinimidem (NHS). Ten pak snadno reaguje s primárními aminy konjugované molekuly za vzniku kovalentní amidové vazby. Takto lze na povrch imobilizovat jak lektiny pro detekci glykánů [77, 79] tak glykány pro detekci jejich specifických receptorů (např. na povrchu virů [80]). Zde je důležité zmínit, že optimální výsledky poskytují často monovrstvy vícesložkové. Příkladem může být již zmíněná monovrstva pro konjugaci lektinů připravená z 11-merkaptoundekanové kyseliny, kdy nejlepších výsledků je dosaženo při „naředění“ této monovrstvy merkaptalkanolem [77].

⁶ Samoskladebné monovrstvy (self-assembled monolayers, SAM) jsou považovány za nanotechnologie, neboť tloušťka typické monovrstvy je v řádech jednotek nm.

– mohou výrazně snížit nespecifické interakce. Důležitým rysem biosenzorů je vysoká selektivita a z toho vyplývající možnost stanovení analytu v komplexních biologických matricích bez předúpravy. Z této matrice se mohou nespecificky sorbovat proteiny na povrch elektrody a tím zvyšovat odpor přenosu náboje povrchu nad rámec vazby lektin - glykán. Tomu je často zamezováno inkubací proteinů (často např. sérový albumin) s připravenou elektrodou, případně aplikací polymerů zabraňujících nespecifickému usazování proteinů, např. polyvinylalkoholu. Podobný efekt nicméně vykazují i monovrstvy s amfoterní částí, např. monovrstva sulfobetainu [79] nebo karboxybetainu [81].

Další možností, kterou v této oblasti nanotechnologie nabízí, je zvětšení plochy aktivního povrchu biosenzoru umožňující imobilizaci většího počtu biorozpoznávacích molekul. Takto byl např. snížen detekční limit lektinového afinitního biosenzoru připraveného imobilizací lektinu na povrch modifikovaný zlatými nanočásticemi (3D), oproti biosenzoru s lektinem imobilizovaným na nemodifikovaný „2D“ povrch [82].

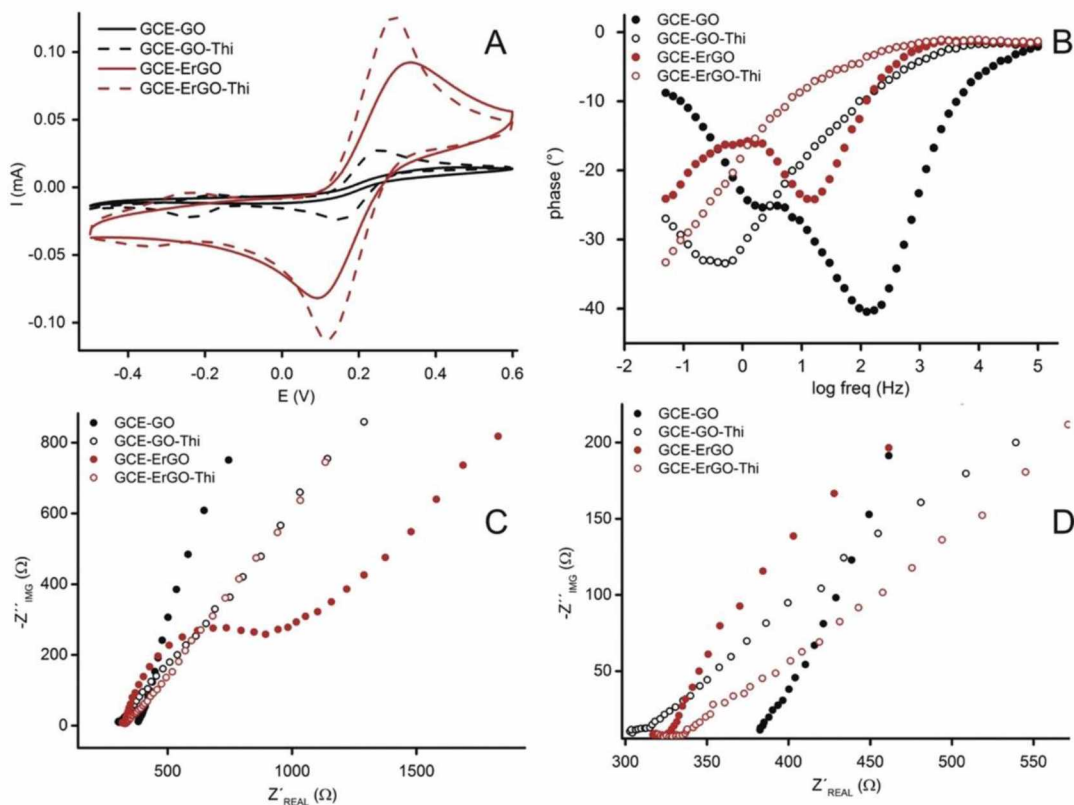
3.2 Využití oxidu grafenu v lektinových biosenzorech

Výše uvedená fakta jsou podkladem pro výzkum v oblasti afinitních biosenzorů na bázi grafenových nanomateriálů, především oxidu grafenu (GO). Ten vykazuje velmi nízkou vodivost, čímž lze zajistit vysoký počáteční odpor přenosu náboje elektrody, na jejíž povrch je GO nanesen. Důležitá je i přítomnost karboxylů na povrchu nanočástic GO – ty lze využít pro kovalentní konjugaci lektinů, stejně jako lze využít neoxidované, grafenové části GO pro imobilizaci pomocí nekovalentních vazeb (π - π interakce). V neposlední řadě je důležitá možnost ovlivnit uvedené vlastnosti např. různou mírou redukce či naopak oxidace. Nabízí se tedy analogie s výše uvedenými možnostmi precizní funkcionalizace povrchu biosenzoru pomocí samoskladebných monovrstev, která je ještě navíc spojená i se zvětšením aktivní plochy povrchu (nanočástice GO).

Proto byla v první řadě testována možnost kovalentní imobilizace lektinu konkanavalin A (ConA) přímo na karboxylové skupiny GO deponovaného bez nutnosti polymerní fixační matrice na povrch uhlíkové elektrody. Bylo zjištěno, že ConA lze snadno imobilizovat pomocí výše zmíněné EDC aktivace karboxylových skupin a následné konjugace pomocí NHS na povrch modifikovaný oxidem grafenu [83]. Jediným dalším krokem, který byl potřeba pro kompletaci vysoce citlivého biosenzoru byla inkubace s činidlem snižujícím nespecifické interakce (komerčně dostupný „carbo-free blocking solution“). V rámci těchto experimentů byla zjišťována i možnost využití GO zbaveného tzv. „oxidačních zbytků“, tedy vysoce

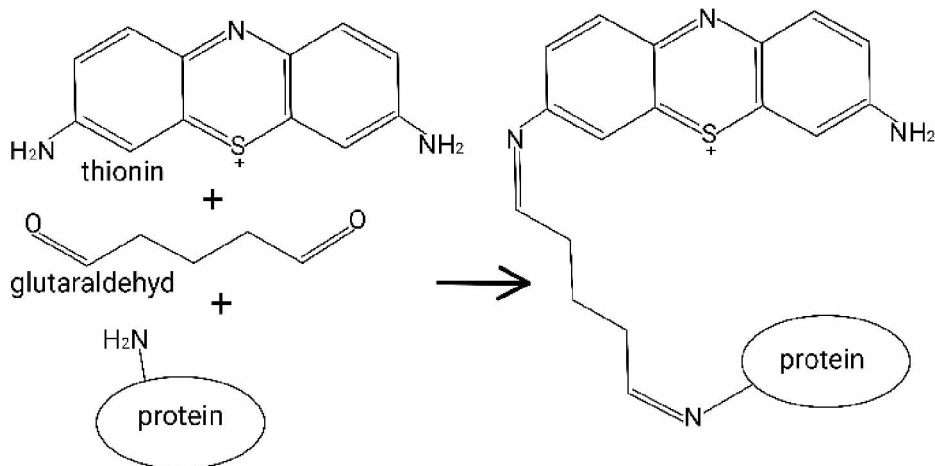
oxidovaných polyaromatických makromolekul. Ty jsou dle Rourke a dalších [84–86] součástí GO nanočástic a mohou být separovány působením alkalického roztoku za zvýšené teploty [86]. Takto upravený GO vykazoval nižší koncentraci kyslíkových skupin, jak bylo patrné z výsledků měření infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací, zároveň ale vysoké teploty ani silně alkalické prostředí nevedly k jeho zásadní redukci, což bylo potvrzeno Ramanovou spektroskopií. Dle očekávání byly ale operační vlastnosti (tedy citlivost, lineární rozsah a limit detekce modelového glykoproteinu invertázy) horší, než při použití původního GO. To je s největší pravděpodobností důsledek odstranění ne nevýznamné části kyslíkových skupin, které vytváří vhodné prostředí pro kovalentní imobilizaci konkanavalinu A [83].

Kromě výše popsaného kovalentního navázání je možné využít i jiné typy imobilizace. Za tímto účelem byly připraveny elektrody modifikované GO, které byly následně elektrochemicky redukovány, čímž se sníží množství kyslíkových funkčních skupin na úkor hydrofobních, neredukovaných částí [87] (**příloha P.12**). Je zde předpoklad, že pomocí π - π interakcí bude možné funkcionalizovat redukováný GO (ErGO) pomocí vhodných molekul obsahujících jak benzenová jádra, tak funkční skupiny pro další vazby. Pro ověření tohoto předpokladu byly elektrody modifikované ErGO inkubovány s roztokem thioninu, který splňuje výše uvedené požadavky. Následná elektrochemická analýza takto modifikovaných elektrod (cyklická voltametrie, impedanční spektroskopie) nicméně ukázala, že i při imobilizaci thioninu na redukováný GO zřejmě hrají ne nepodstatnou roli i elektrostatické interakce. Ve všech případech aminové funkční skupiny thioninu vnesly na povrch parciální kladný náboj, případně vykompenzovaly parciální negativní náboj povrchu, což se projevilo jako zmenšení separace anodického a katodického píku při cyklické voltametii v elektrolytu s obsahem ferrikyanidu (obr. 16 A) a jako změna naměřeného EIS spektra (obr. 16 B-D).

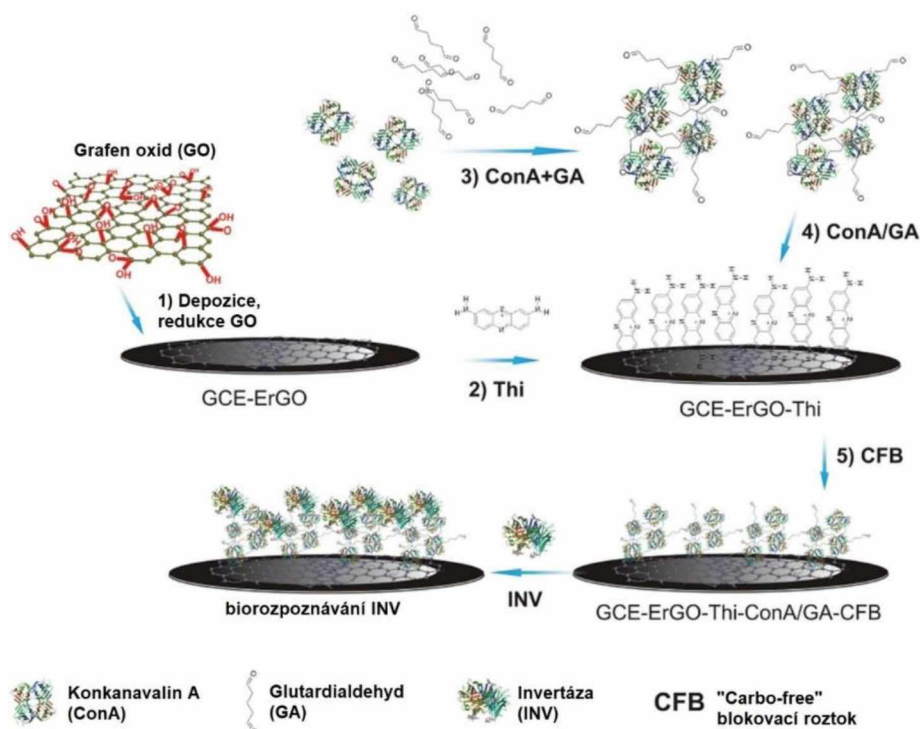


Obrázek 16: Cyklické voltamogramy (A), Bodeho (B) a Nyquistovy (C, D) diagramy uhlíkových elektrod modifikovaných GO před (černé čáry, černé body) a po redukcí (červené čáry, červené body) a před (plné čáry, plné body) a po (přerušované čáry, prázdné body) inkubaci s thioninem. Měření prováděna ve fosfátovém pufru, pH = 7, 100 mM s 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$. Převzato z [87].

V každém případě lze tvrdit, že molekuly thioninu byly sorbovány na povrch elektrody, v dalším kroku byly tedy navázány biorozpoznávací molekuly konkanavalinu A (ConA). Toho bylo dosaženo inkubací s roztokem ConA s přidavkem glutardialdehydu, který působí jako síťovací činidlo – karbonylové skupiny na obou koncích mohou reagovat s volnými aminy konjugovaného proteinu za vzniku Schiffovy báze – viz obr. 17. Celý postup přípravy lektinového biosenzoru je schematicky znázorněn na obr. 18.



Obrázek 17: Schéma konjugace proteinu (ConA) na thionin pomocí glutaraldehydu.

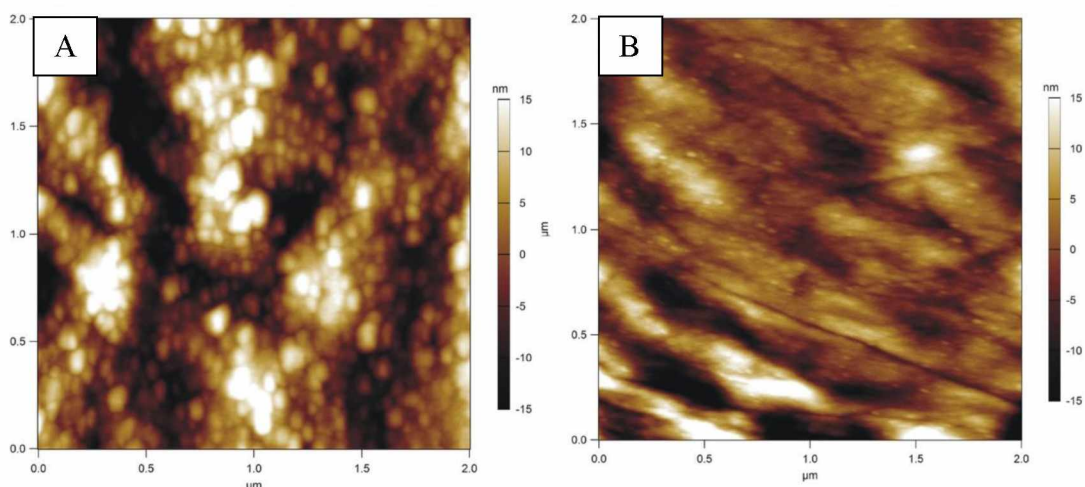


Obrázek 18: Schematické znázornění jednotlivých kroků přípravy lektinového (konkanavalin A) afinitního impedančního biosenzoru s biorozpoznávacími molekulami konjugovanými pomocí glutaraldehydu na thioninem modifikovaný redukovaný grafen oxid. Převzato, upraveno z [87].

Důležitým výsledkem studie je především zjištění, že výše uvedená konfigurace neposkytuje biosenzor s dostatečnou citlivostí, pokud nebyl použit agregovaný ConA získaný jednoduchou inkubací roztoku tohoto lektinu s roztokem glutaraldehydu. Metodou dynamického rozptylu světla bylo zjištěno, že hydrodynamický poloměr nanočástic v inkubačním roztoku vzrostl na přibližně dvojnásobek po 1,5h inkubaci ConA s 0,125% roztokem glutaraldehydu. To odpovídá agregátům přibližně 4 molekul ConA. Pětinasobným zvýšením koncentrace glutaraldehydu bylo dosaženo ještě větších agregátů s hydrodynamickým poloměrem 36 ± 4 nm, což odpovídá přibližně 30 molekul ConA. Rozdíly ve velikosti byly patrné i zobrazením pomocí mikroskopie atomárních sil – na obr. 19 je zřetelně vidět povrch ErGO-Thi s nasorbovanými jak malými tak velkými agregáty ConA. Aplikace agregovaného ConA nicméně snížila citlivost biosenzoru vůči invertáze z $6,7 \% \Delta R_{CT} / \log c_{INV}$ (pozn.⁷) pro první typ koagulátů na $3,27 \% \Delta R_{CT} / \log c_{INV}$ při inkubaci s většími koaguláty. Jakkoliv je jistě výhodnější použít konfiguraci s vyšší citlivostí, je potřeba zmínit, že méně citlivý biosenzor poskytoval nižší signál i pro nespecifické interakce; poměr odezvy nativní

⁷ Pro impedanční (bio)senzory je citlivost udávána nejčastěji jako procentuální změna odporu povrchu vůči přenosu náboje ($\% \Delta R_{CT}$) při zvýšení koncentrace analytu o jeden řád ($\log c$). Všechny změny R_{CT} jsou počítány proti odporu povrchu vůči přenosu náboje zjištěnému v elektrolytu s nulovou koncentrací analytu.

invertázy k odezvě s invertázou zbařenou povrchové kyseliny sialové zodpovědné za specifickou vazbu na ConA byl 11,3, zatímco u více citlivého biosenzoru to bylo pouze 2,97.



Obrázek 19: Topografické zobrazení pomocí mikroskopie atomárních sil pro ErGO-Thi povrch s konjugovanými ConA agregáty vzniklé inkubací s 0,625% (A) a 0,125% glutaraldehydem (B).

Z výsledků je patrné, že i) lze dosáhnout zvýšení odezvy agregací molekul biorozpoznávacích lektinů a ii) že nastavením vhodných podmínek této agregace (koncentrace síťovacího činidla, v jiných případech např. čas síťování atd.) by bylo možné optimalizovat operační vlastnosti biosenzoru tak, aby bylo dosaženo kompromisu mezi vysokou selektivitou a vysokou citlivostí.

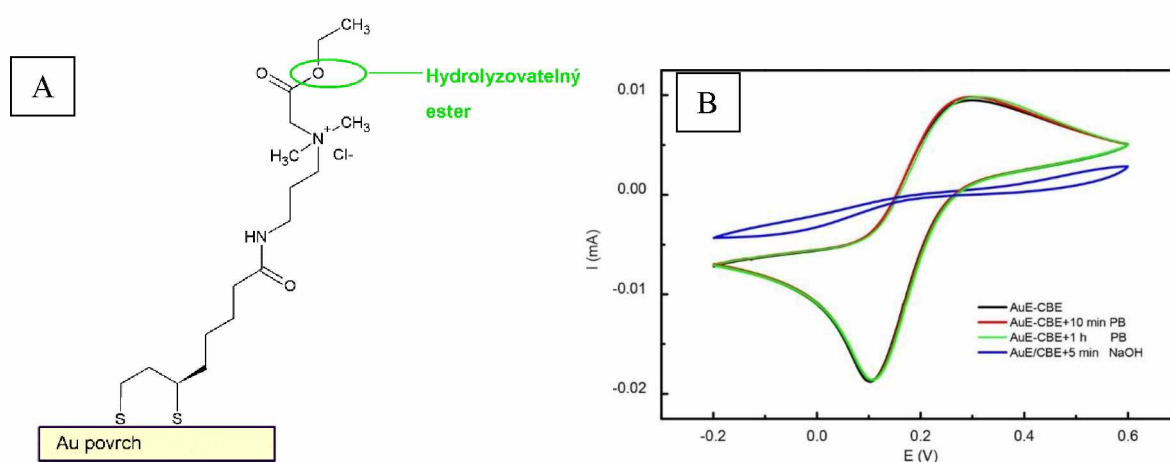
3.3 Funkcionalizované povrchy

Jak již bylo zmíněno v části 3.1, častým nástrojem funkcionalizace povrchu použitelného pro přípravu biosenzorů jsou samoskladebné (self-assembled) monovrstvy (SAM). Jednou z nejběžnějších metod nanášení SAM je inkubace zlatého povrchu, který má být monovrstvou modifikován, roztokem molekul s funkční thiolovou skupinou. Atom síry v této skupině tvoří preferenčně koordinační vazbu s atomy zlata, opačné konce molekul monovrstvy jsou pak orientovány do prostoru, směrem od povrchu. Tento konec pak typicky nese funkcionalitu, díky které má povrch požadované vlastnosti.

V práci Mosnáček a spol. [88] byly zlaté povrchy modifikované derivátem kyseliny L-lipoové s kvarternizovaným aminem jako funkcionalitou umožňující iontovou výměnu. Takto byl připraven povrch, který bylo možné inkubací ve vhodném roztoku měnit ze superhydrofobního (po inkubaci s perfluorooktanovou kyselinou) na superhydrofilní (inkubace s Cl⁻). Tato změna je díky afinitě jednotlivých ligandů reverzibilní. Stejného efektu bylo dosaženo i s derivátem, kde byla kvarternizace aminu provedena konjugací ethyl acetátové

skupiny. Tento ester navíc podléhá hydrolýze při vyšším pH, čímž dojde k permanentní ireverzibilní změně povrchového náboje. Rychlost hydrolýzy je přitom závislá na pH a době inkubace, čehož lze využít pro přípravu povrchu s chemickým gradientem. Toho bylo dosaženo ponořením jednoho konce substrátu (zlatý čip s připravenou SAM vrstvou) do hydrolyzačního roztoku (NaOH); díky kapilárnímu vztlínání byly nižší části inkubovány delší dobu než horní části, což má za následek již zmíněný gradient. Stejným způsobem bylo ale možné vytvořit i gradient smáčivosti povrchu.

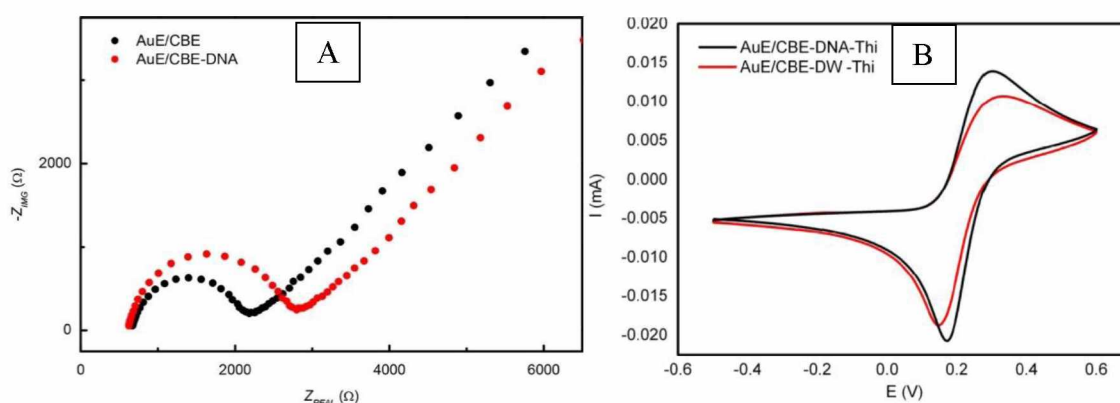
Takto modifikované povrchy s karboxybetain-esterovou funkční skupinou („CBE“, viz obr. 20) byly dále v práci Filip *et al.* [89] (**příloha P.13**) testovány pro řízené uvolňování DNA, jejíž molekuly se nejprve pomocí elektrostatické interakce imobilizovaly na povrch (disponující kladným nábojem). Při zvýšení pH došlo k hydrolýze esterové skupiny (obr. 20) a změně funkcionality na amfoterní karboxybetain, čímž se uvolnily molekuly DNA z povrchu. Podobně byly sorbovány a desorbovány i zlaté nanočástice modifikované citrátem, tj. se záporným povrchovým nábojem.



Obrázek 20: A - struktura thiolu „CBE“ s funkční karboxybetain esterovou skupinou hydrolyzovatelnou zvýšením pH. B – cyklické voltamogramy zlatých planárních elektrod modifikovaných monovrstvou CBE před (černá, červená a zelená pro čerstvě připravenou elektrodu, elektrodu inkubovanou 10 minut a 1 h ve fosfátovém pufru pH 7 - PB) a po alkalické hydrolýze (modrá, 5 min NaOH). Měřeno v elektrolytu 100 mM KCl obsahujícím 5 mM směs ferikyanidu a ferokyanidu. Převzato z [89].

V rámci této studie byla mimo jiné prováděna elektrochemická charakterizace monovrstev z „CBE“ molekul. Pomocí cyklické voltametrie provedené v deaerovaném roztoku NaOH (redukční prostředí) lze provést desorpci molekul thiolu z povrchu, což je patrné jako katodický pik (nebo piky). Jejich integrací, tj. vyjádřením množství náboje odpovídající danému procesu, lze snadno vypočítat množství desorbovaných, a tedy aproximovat počet původně nasorbovaných, molekul. Touto technikou byla zjištěna hustota $0,84 \pm 0,02$ molekul CBE na nm^2 . Dále byla pomocí cyklické voltametrie měřena stabilita CBE monovrstev kdy i po 1h

inkubaci elektrody s monovrstvou ve fosfátovém pufru (pH = 7,4) nebyla patrná zásadní změna anodického ani katodického píku pro ferokyanid – záporně nabitou elektrochemickou sondu (obr. 20). Oproti tomu po 5min inkubaci v 100 mM NaOH byla evidentní téměř naprostá eliminace těchto píků značící blokování přístupu záporně nabitých molekul ferokyanidu, tedy přítomnost záporného náboje na povrchu elektrody. Elektrochemickou impedanční spektroskopií byla detekována i sorpce DNA molekul na CBE monovrstvu – viz obr. 21, nicméně o něco větší rozdíly byly patrné, pokud byly elektrody po inkubaci s DNA ještě inkubovány s roztokem thioninu (kladně nabité molekuly, viz obr. 17) a až poté byla měřena cyklická voltametrie v přítomnosti ferrikyanidu. Výsledkem byla o 35% nižší separace anodického a katodického píku u elektrody inkubované i s DNA a následně s thioninem v porovnání s elektrodou, kde byl na CBE monovrstvu sorbován pouze thionin (obr. 21). V prvním případě, díky zápornému náboji DNA, byla na povrchu vyšší hustota thioninu, který má pozitivní vliv na redoxní transformaci ferikyanidu. Zjištěný jev by mohl mít využití jako zesilovač signálu afinitních biosenzorů vzhledem ke skutečnosti, že výše zmíněný rozdíl v odporu přenosu náboje po inkubaci s DNA byl pouze $24 \pm 10 \%$, tedy nižší než 35% pokles v separaci CV píků zjištěných při použití „thioninové amplifikace“.



Obrázek 21: A – ilustrativní Nyquistovy diagramy pro zlaté elektrody s CBE monovrstvou (AuE/CBE) před (černé body) a po (červené body) inkubací s DNA. B – ilustrativní cyklické voltamogramy AuE/CBE inkubované v destilované vodě (červená) a roztoku DNA (černá) a následně v roztoku thioninu. Všechna měření prováděna ve 100 mM KCl s obsahem 5 mM směsi ferro- a ferrikyanidu. Převzato z [89].

4. NANOMATERIÁLY PRO NEBIOLOGICKÉ INTERAKCE

Elektrochemické senzory mohou pracovat i bez biorozpoznávací složky. Při přípravě těchto zařízení se nejčastěji modifikuje povrch elektrod nanomateriály vykazujícími elektrokatalytický efekt vůči žádanému analytu, např. nanočástice různých kovů. Běžnými zástupci jsou zde nanočástice platiny, zlata či stříbra, jež mohou být syntetizovány např. na

povrchu grafenových nebo jiných nanomateriálů. Kromě senzorů mohou být ale elektrokatalytické nanomateriály použity i pro „energetické“ reakce, např. elektrolýzu vody za produkce plynného vodíku („HER“, Hydrogen evolution reaction) nebo redukci kyslíku rozpuštěného v elektrolytu („ORR“, Oxygen reduction reaction). Zatímco „HER-katalyzátory“ hrají důležitou roli především pro efektivní získávání vodíku využitelného jako alternativní nefosilní palivo, druhá zmiňovaná reakce je důležitá pro konstrukci palivových článků jako alternativních zdrojů elektrické energie. V rámci této kapitoly budou shrnuty příspěvky předkladatele jak k oblasti chemických senzorů tak energetických reakcí.

4.1 Nanomateriály pro „energetické“ reakce

Hlavním tématem této kapitoly je analýza elektrokatalytických vlastností nanočástic vrstevnatého karbidu titanu s *in situ* syntetizovanými platinovými nanočásticemi na povrchu. Karbidy (nitridy, karbonitridy) titanu či jiných přechodných kovů patří mezi nové a perspektivní 2D nanomateriály skupiny tzv. MXenů, typicky připravovaných selektivním rozpuštěním a odstraněním Al atomů z počáteční tzv. „MAX“ fáze. V té značí „M“ atom uhlíku, dusíku nebo jejich kombinaci, „X“ atomy přechodného kovu (Ti, V, W, Ni...) a „A“ atomy hliníku. Pro dále popsané experimenty byl využit MXene se strukturou $Ti_3C_2T_X$, kde T označuje povrchové –OH nebo –F skupiny vzniklé vyloužením Al fáze kyselinou fluorovodíkovou [90]. MXeny obecně vykazují díky své struktuře vlastnosti vhodné pro konstrukci kapacitorů a baterií [91, 92], díky obsahu transičních prvků jsou zajímavé i jejich chemické vlastnosti. Bylo např. zjištěno, že elektrochemická oxidace Ti atomů ve struktuře $Ti_3C_2T_X$ je ireverzibilní a že takto připravený „oxidovaný MXene“ ztratil elektrokatalytickou aktivitu vůči oxidaci kofaktoru NADH [93], nicméně původní MXene s neoxidovanými Ti atomy ve své struktuře je výborný elektrokatalyzátor redukce H_2O_2 , což bylo využito pro konstrukci elektrochemického senzoru této biologicky významné sloučeniny [93]. Další vlastností je elektrochemický potenciál Ti atomů ve struktuře MXenu umožňující spontánní redukci oxidovaných iontů. Toho bylo ve studii Filip *et al.*, 2019 [29] (**příloha P.14**) využito pro jednoduchou syntézu Pt nanočástic na povrchu $Ti_3C_2T_X$. Tento typ hybridních nanomateriálů (tzv. Pt/C) je tradičně využíváný, komerčně dostupný a vysoce efektivní katalyzátor redukce kyslíku (ORR) v palivových článcích či příbuzných zařízeních⁸. Kromě dalších reakcí [94] pak platinové nanočástice katalyzují i redukci H^+ , tedy HER [95]. Typickým způsobem syntézy kovových (včetně Pt) nanočástic je redukce příslušných iontů (např. Pt^{4+} v roztoku hexachloroplaticité kyseliny) přidavkem redukčního činidla. V příslušné studii bylo nicméně zjištěno, že Pt nanočástice

⁸ Nelze opomenout, že komerčně nejčastější aplikací Pt/C je součást automobilových katalyzátorů.

(PtNP) mohou být syntetizovány i bez přídavku redukčních činidel, právě díky přítomnosti Ti ve struktuře MXenu. Metodou rentgenové fotoemisní spektroskopie a rentgenové difrakční analýzy byla potvrzena domněnka, že redukce Pt^{4+} je doprovázena vznikem částic oxidů titanu a tedy že Ti v MXenu lze považovat za redukční činidlo. Při syntéze Pt nanočástic na povrchu MXenu pomocí přídavku borohydrátu sodného byl tento efekt méně výrazný, dá se tedy tvrdit, že redukční činidlo pomáhá zachovat původní strukturu MXenu.

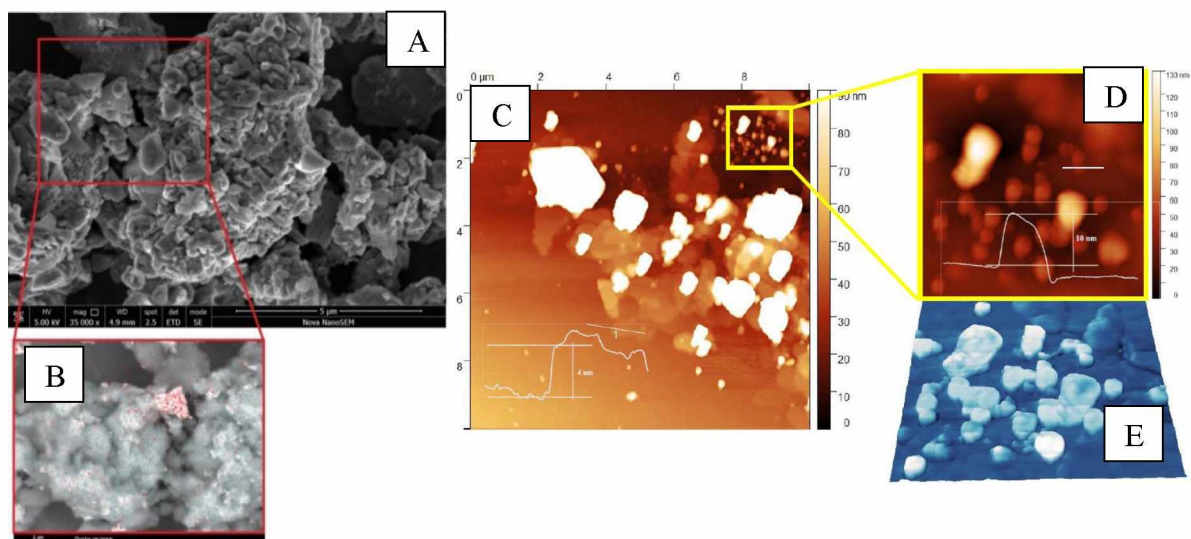
Připravené nanomateriály MXene/PtNP (ve vodné disperzi) byly dále nanášeny na uhlíkové elektrody, kde po odpaření vody vytvořily stabilní elektrokatalytický film. Celkové množství katalyticky aktivní Pt na elektrodě (0,09-1,5 μg /elektroda) nebylo natolik vysoké, aby se projevil výraznější efekt pro zvýšení účinnosti ORR, ať již v kyselém nebo zásaditém elektrolytu. Jednoznačně byl ale pozorován nárůst katodického proudu při HER reakci, z jednotek mA/cm^2 pro nemodifikovanou elektrodu na 17 mA/cm^2 pro elektrodu modifikovanou samotným MXenem $\text{Ti}_3\text{C}_2\text{T}_x$ až po 87 mA/cm^2 pro elektrodu modifikovanou MXene/PtNP nanomateriálem. Za zmínku rovněž stojí, že efektivnější katalýzy HER (ve smyslu vyššího elektrokatalytického proudu) bylo dosaženo s nanomateriály MXene/Pt nanočástice, při jejichž syntéze nebyl použit NaBH_4 jako redukční činidlo, což je jistě výhodné nejen z hlediska ceny, ale i z hlediska nebezpečných vlastností této sloučeniny.

4.2 Nanomateriály pro elektrochemické senzory

4.2.1 Senzor herbicidu metazachloru

Podobným způsobem jako Pt nanočástice v předchozí části byla testována i syntéza stříbrných nanočástic (AgNP) na povrchu MXenu $\text{Ti}_3\text{C}_2\text{T}_x$ [28] (**příloha P.15**). I zde byl pomocí rentgenové fotoemisní spektroskopie a rentgenové difrakce potvrzen vznik AgNP spontánní redukcí z roztoku AgNO_3 spolu s komplementární oxidací Ti v $\text{Ti}_3\text{C}_2\text{T}_x$. Další analýzou (mikroskopie atomárních sil, elektronová mikroskopie) byl zjištěn jejich relativně pravidelný tvar, zároveň ale byla patrná různá velikost jednak v rámci různých testovaných časů syntézy (2h inkubace – cca 10 nm; 24h inkubace – cca 5 nm) a zároveň v rámci jednotlivých

měřených vzorků – výše uvedené průměrné velikosti AgNP platí pouze pro nejmenší zjištěné částice, kromě nich byly pozorovány i větší klastry (obr. 22).

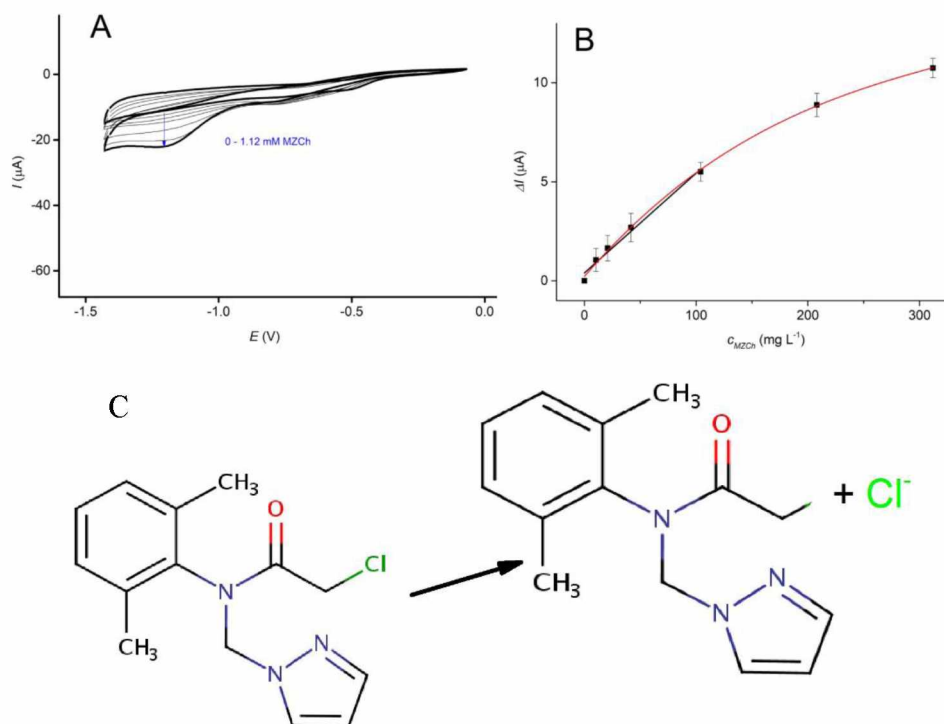


Obrázek 22: A – Zobrazení MXene/AgNP částic pomocí skenovací elektronové mikroskopie s modulem energeticky disperzní rentgenové spektroskopie umožňující mapování prvkového složení. B – zobrazení obsahu Ag (červeně) a Ti (zeleně). C – zobrazení téhož nanomateriálu pomocí mikroskopie atomárních sil, topografie, 10x10 μm ; D – zobrazení topografie 2x2 μm ; E – zobrazení rozdílů fází poukazující na rozdílné mechanické vlastnosti (2x2 μm). Převzato z [28].

U připravených nanomateriálů MXene/AgNP byly po nanesení jejich vodných disperzí na elektrody a následném zaschnutí zjišťovány jejich elektrochemické vlastnosti. Dle očekávání byl při cyklické voltametii elektrod modifikovaných samotným MXenem pozorován anodický proces odpovídající oxidaci Ti atomů ve struktuře MXenu. Při stejných experimentech s MXene/AgNP pak byla pozorována reverzibilní oxidace a redukce atomů stříbra. Voltametrické píky příslušející tomuto procesu se s počtem CV cyklů snižovaly, což svědčí o postupném rozpouštění AgNP. To prakticky vylučuje využití tohoto senzoru pro detekci analytů v oxidační oblasti potenciálu, nikoliv ovšem v katodické oblasti.

V rámci dalších experimentů byla proto zjišťována elektrokatalytická aktivita elektrod modifikovaných MXene/AgNP vůči elektrochemické reduktivní dehalogenaci (dechloraci) herbicidu metazachlor (struktura viz obr. 23). Již dříve byl popsán pozitivní vliv stříbrných nanočástic na reduktivní dehalogenaci sloučenin na bázi derivátů fenyln-chloracetátů [96–98], přičemž elektrokatalytické vlastnosti jsou připisovány vysoké afinitě halogenidů ke stříbru. Elektrochemická redukce méně biodegradabilních pesticidů je obecně považována za proces vedoucí ke snížení jejich perzistence [99–102]. Za tímto účelem byla testována i elektrochemická reduktivní dehalogenace chloracetanilidových herbicidů [103], nicméně pouze ve studii Carrai *et al.*, 1992, byla poprvé nastíněna i možnost využít korelace mezi

velikostí katodického píku identifikovaného s procesem dehalogenace a koncentrací alachloru⁹ k jeho detekci [104]. Podobným způsobem byly testovány i výše zmíněné elektrody modifikované hybridními nanomateriály MXene/AgNP. Na obr. 23 A je vidět nárůst katodického proudu při měřeních se zvyšující se koncentrací metazachloru v elektrolytu (50 mM NaOH). Takto bylo možné sestavit kalibrační křivku (obr. 23 B) a využít připravený senzor i pro měření odezvy na metazachlor v reálných vzorcích (výluhy zeminy s přidavkem známého množství metazachloru).



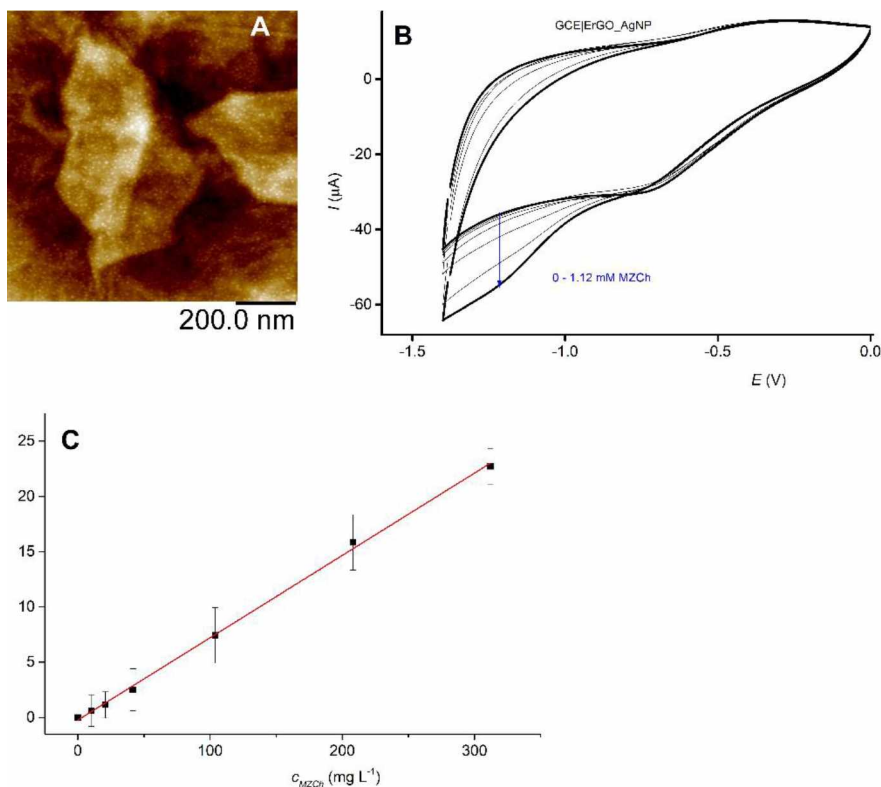
Obrázek 23: A – cyklické voltamogramy měřené elektrodami modifikovanými MXene/AgNP v přítomnosti různých koncentrací metazachloru (indikováno v grafu). B – kalibrační křivka sestavená jako závislost katodického proudu odečteného při potenciálu -1,18 V z voltamogramů korigovaných o signál v elektrolytu (20 mM NaOH) bez přidavku metazachloru. Černá čára – kalibrační přímka v lineární části, červená křivka – regrese celého koncentračního rozsahu pomocí polynommické funkce. Převzato z [28]. C – struktura metazachloru a jeho elektrochemické dechlorace.

Reálná odezva při měření ve výluzích zemin byla o cca 75 a 40 % nižší¹⁰, než odezva očekávaná na základě kalibrační křivky a známého přidavku metazachloru. Jedním z důvodů takto nízké účinnosti může být obsah huminových látek ve výluhu. Tyto výsledky nejsou příliš povzbudivé, proto byl stejným způsobem testován i materiál připravený jednoduchou inkubací vodné disperze oxidu grafenu s AgNO₃ – GO/AgNP. I zde byla potvrzena spontánní syntéza AgNP bez přidavku redukčního činidla jednak pomocí mikroskopie atomárních sil (obr. 24 A),

⁹ Jedná se o další herbicid ze skupiny chloracetanilidů, se strukturou podobnou metazachloru. Jeho použití na území ČR není v současné době povoleno.

¹⁰ Odlišné hodnoty byly zjištěny pro vzorek půdy z lesa a z parku.

ale i rentgenovou difrakční a rentgenovou fotoemisní spektroskopií. Uhlíkové elektrody modifikované GO/AgNP a ošetřené ještě elektrochemickou redukcí vykazovaly, stejně jako v případě modifikace MXene/AgNP, schopnost elektrokatalýzy reaktivní dehalogenace metazachloru umožňující jeho stanovení. Cyklické voltamogramy měřené při různých koncentracích analytu včetně sestavené kalibrační křivky jsou na obr. 24 B a C.



Obrázek 24: A – nanočástice oxidu grafenu pokrytá in-situ syntetizovanými AgNP. B - cyklické voltamogramy měřené elektrodami modifikovanými redukovanými GO/AgNP v přítomnosti různých koncentrací metazachloru (indikováno v grafu). C - kalibrační křivka sestavená jako závislost katodického proudu odečteného při potenciálu -1,18 V z voltamogramů korigovaných o signál v elektrolytu (20 mM NaOH) bez přidavku metazachloru. Červeně je vyznačena přímka lineární regrese. Převzato z [28]

Samotná kalibrační křivka vykazovala lepší parametry (lineární v rozsahu 37-1123 μM, detekční limit 27 μM, citlivost 75 nA/L.mg) než při použití MXene/AgNP (lineární jen do koncentrace 375 μM, detekční limit 40 μM, citlivost 50,4 nA/L.mg), což se odrazilo i při stanovení v reálných vzorcích. Pokud bylo definované množství metazachloru přidáno k již připraveným výluhům půdy, přesnost stanovení byla 108±14 a 110±7% pro půdu z lesa a půdu z parku. Pokud byl přidán metazachlor k vzorkům půd ještě před jejich louhováním, v takto připraveném výluhu byla zjištěná více než dvojnásobná odezva oproti odezvě očekávané z kalibrační křivky a ze známého přidavku metazachloru.

Výsledek této studie tedy ukázal, že i) metazachlor může být elektrochemicky detekován s využitím elektrochemické reaktivní dehalogenace katalyzované stříbrnými nanočásticemi;

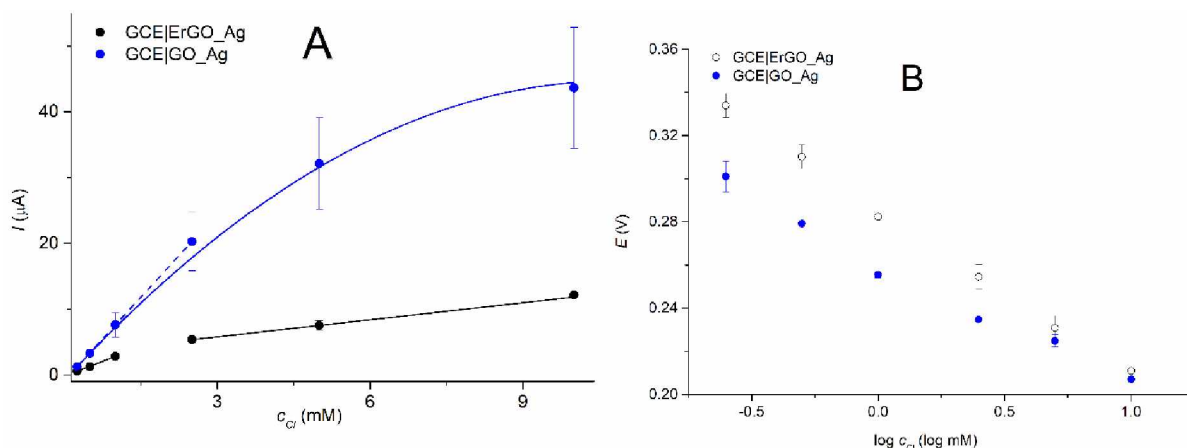
ii) pro tento účel se jako výhodnější jeví AgNP syntetizované na nanočásticích redukovaného oxidu grafenu (ErGO/AgNP) oproti AgNP připravených na povrchu MXenu Ti_3C_2Tx ; iii) zmíněný ErGO/AgNP vykazoval i daleko nižší míru interferencí při měření reálných vzorků.

4.2.2 Senzor chloridových iontů

Ve studii Filip *et al.* [105] (příloha P.16) byla podrobněji studována možnost *in situ* syntézy stříbrných nanočástic na povrchu oxidu grafenu spontánní redukcí Ag^+ z roztoku $AgNO_3$. Sérií experimentů a charakterizací bylo zjištěno, že při tomto uspořádání vznikají na povrchu oxidu grafenu prakticky monokrystalické stříbrné nanočástice, jak vyplývá z analýzy pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Jejich přítomnost nicméně nebyla potvrzena rentgenovou difrakční analýzou, pravděpodobně díky nízkému celkovému obsahu nanočástic v připravených materiálech. Poněkud překvapivě nebyly v této fázi pozorovatelné zásadní rozdíly vlastností „spontánního“ GO/AgNP v porovnání s tímtož nanomateriálem připraveným s přidavkem kyseliny citronové. Tu lze využít jako redukční činidlo pro přípravu stříbrných nanočástic (vč. *in situ* na površích jiných (nano)částic), nicméně klasická syntéza touto metodou využívá zvýšené teploty, zatímco v tomto případě byla syntéza vždy prováděna za laboratorní teploty. Zásadnější rozdíl byl pozorován pouze při analýze velikostí nanočástic zjištěných mikroskopií atomárních sil, jejíž výsledky poukázaly na snížení průměrné velikosti z přibližně 6 nm na 3 nm po přidavku kyseliny citronové.

Cyklické voltamogramy elektrod modifikovaných GO/AgNP vykazovaly anodické a katodické píky, které nebyly pozorovány u elektrod modifikovaných samotnou disperzí GO. Je tedy možné je identifikovat s reverzibilní redoxní transformací atomů Ag a brát je tak jako další důkaz přítomnosti stříbra v GO/AgNP nanomateriálu. V další sérii experimentů byla testována elektrochemická odezva v přítomnosti chloridových iontů. Za tímto účelem byla aplikována voltametrie čtvercové vlny v takové oblasti potenciálů, aby nedošlo k již zmíněné oxidaci stříbrných nanočástic a jejich rozpouštění. Při takovém nastavení byl pozorován pouze proces oxidace komplexu $AgCl$ spontánně vzniklého na povrchu AgNP. Tímto způsobem bylo možné stanovit koncentraci chloridů v elektrolytu, přičemž nejprve bylo nutné sestavit kalibrační křivku s výškou (obr. 25 A) nebo pozicí (obr. 25 B) voltametrického píku jako analytickým signálem. Z výsledků je patrné, že výška píku oxidace $Ag-Cl$ komplexu rostla přímo úměrně s koncentrací chloridů, s vyšší citlivostí u elektrody s GO/AgNP než u elektrody, která byla před vlastním měřením ještě elektrochemicky redukována (ErGO/AgNP). Naopak pozice voltametrického píku s rostoucí koncentrací Cl^- (resp. jejím dekadickým logaritmem) klesala směrem k nulovému potenciálu. Tento posun vyplývá z faktu, že vzniklý komplex $Ag-Cl$ je

redukovanou formou Cl^- v roztoku a podle Nernstovy rovnice bude tedy redoxní potenciál oxidace Ag-Cl daný logaritmem poměru aktivity oxidované a redukované formy analytu, v důsledku tedy koncentrací Cl^- [105].



Obrázek 25: A – kalibrační křivky jako závislost výšky voltametričeského píku na koncentraci chloridů pro elektrodu modifikovanou ErGO/AgNP (černá) a GO/AgNP (modrá). Naměřená data – body – jsou spojena přímkami lineární regrese a v případě GO/AgNP i polynomičké regrese. B – kalibrační křivky jako závislost pozice voltametričeského píku na dekadickém logaritmu koncentrace chloridů. Převzato z [105].

V dalších experimentech bylo zjištěno, že senzor připravený modifikací elektrody GO/AgNP bez elektrochemické redukce je použitelný pro stanovení koncentrace chloridů v pitné vodě. Jako analyt byl v těchto experimentech použit chlorid železitý, což je běžně využívané srážedlo pro úpravu vod. Průběh tohoto úpravárenského procesu by tedy mohl být monitorován připraveným GO/AgNP senzorem, je nicméně pravdou, že pro optimální výsledky byl k měřenému vzorku přidán pro zvýšení vodivosti fosfátový pufr nebo roztok Na_2SO_4 .

4.2.3 Senzor těžkých kovů

Těžké (toxické) kovy – především olovo, kadmium, měď, rtuť... - jsou dalším z řady závažných polutantů, je tedy žádoucí mít nástroje pro jejich monitoring a sekvestraci. Pro druhou zmíněnou operaci je vyvíjena celá řada sorbentů na různých bázích, mimo jiné na bázi derivátů celulózy. Evidentními výhodami těchto materiálů jsou kromě dobrých sorpčních vlastností i snadná dostupnost (časté jsou různé metody přípravy z odpadních materiálů [106, 107]) a nízká cena.

Absorpce kovů (ve formě rozpustných kationtů) do matic na bázi celulózy spočívá především v elektrostatických interakcích zmíněných kationtů se záporně nabitými funkčními skupinami polysacharidů (hydroxylové, příp. karboxylové skupiny). Množství těchto funkčních/vazebných skupin lze zvýšit chemickou modifikací (derivátů) celulózy, přičemž jednou z možností je reakce s polyvalenčními karboxylovými kyselinami. Při aplikaci zvýšené

teploty dojde k odštěpení vody a přeměně dvou sousedních karboxylů na anhydridovou formu, která snadno reaguje s hydroxyly za vzniku relativně stabilní esterové vazby [108–110]. Tímto způsobem lze do struktury použitého polysacharidu jednak vnést další funkční skupiny, ale i sesít'ovat jinak rozpustné polymery (obr. 26). Toho bylo již dříve využito pro přípravu různých hydrogelů [111, 112]. V práci Sotolářové *et al.* [113] (**příloha P.17**) byla poprvé testována možnost využít tento mechanismus pro jedнокrokovou modifikaci uhlíkových elektrod hydroxyethyl (HEC) a karboxymethyl celulózu (T-CMC¹¹) sesít'ovanou kyselinou citronovou. Toho bylo dosaženo aplikací směsi vodného roztoku použitého derivátu celulózy s roztokem kyseliny citronové na uhlíkovou elektrodu a následným umístěním do sušárny (110 °C, 30 min).

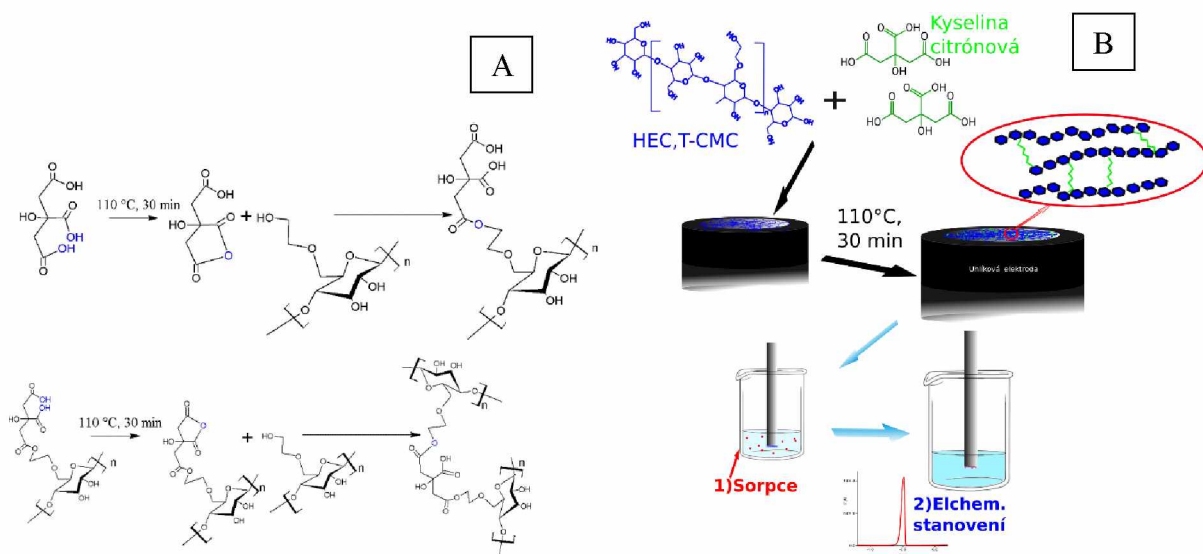
Připravené deriváty byly charakterizovány pomocí infračervené spektroskopie, která prokázala vznik esterových vazeb po síťování jak u HEC, tak u T-CMC. U HEC byla po sesít'ování potvrzena vyšší teplotní stabilita pomocí termální gravimetrie, ve shodě s výsledky uvedenými v literatuře [110].

Po potvrzení vzniku síťovaných derivátů na elektrodách byly tyto testovány pro absorpci a následné elektrochemické stanovení kationtů těžkých kovů z roztoku. Oba kroky probíhaly odděleně, což dává mj. možnost odběru případných environmentálních vzorků přímo „na elektrodu“ ponořením senzoru do testovaného analytu na určitou dobu, po kterou bude docházet k sorpci těžkých kovů. Následně může být senzor uchován po relativně dlouhou dobu, po níž bude následovat samotné měření.

Elektrochemická charakterizace byla prováděna především aplikací anodické rozpouštěcí voltametrie čtvercové vlny (ASSWV, anodic stripping square wave voltammetry). Tato metoda standardně sestává z depozice (redukce kationtů v roztoku a jejich vysrážení, zakoncentrování, na povrchu elektrody) a měřicího kroku, při němž je deponovaný kov oxidován, tedy „rozpouštěn“. V případě uvedených senzorů byly nicméně redukovány pouze kationty

¹¹ V práci byl využit vzorek karboxymethyl celulózy, která byla již dříve termálně ošetřena, proto T-CMC.

nasorbované předchozím krokem v polysacharidové matici na povrchu elektrody, což je rozdíl oproti standardnímu uspořádání rozpouštěcí voltametrie.

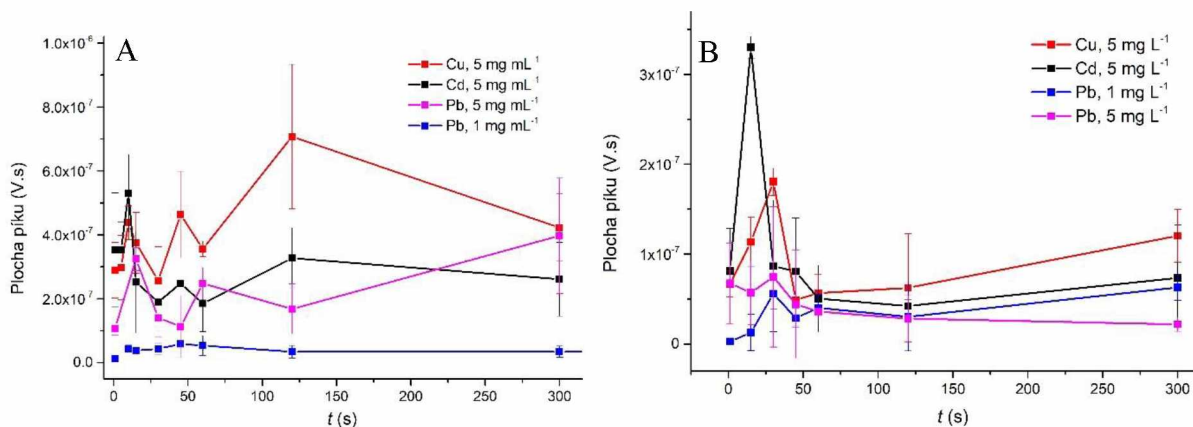


Obrázek 26: A – předpokládané schéma síťování hydroxyethyl celulózy kyselinou citronovou. Převzato ze [113]. Vpravo – schematické znázornění modifikování uhlíkových elektrod hydrogely a postup při dvoukrokovém stanovení těžkých kovů, tj. absorpce iontů kovů do hydrogelové matrice z analyzovaného roztoku (1) a samotné elektrochemické stanovení množství nasorbovaných iontů pomocí anodické rozpouštěcí voltametrie čtvercové vlny (2).

Elektrochemická charakterizace senzorů na bázi síťovaných HEC a T-CMC spočívala nejprve v hledání vhodného postupu jejich přípravy, tj. vhodné koncentrace síťovacího činidla, polysacharidů, jejich objemový poměr, doba a teplota síťování, metoda regenerace elektrod atd. Po nalezení těchto parametrů, které vedly k elektrodě poskytující nejvyšší voltametriickou odezvu po 1 min inkubaci senzoru v 20 mg/l Pb^{2+} roztoku byla sestrojena standardní kalibrační křivka, přičemž bylo zjištěno, že senzor na bázi síťované HEC vykazuje vyšší citlivost (9,91 $\mu A/l.mg$) než senzor se síťovanou T-CMC (8,67 $\mu A/l.mg$), ale horší limit detekce (0,54 mg/l vs. 0,24 mg/l pro HEC a T-CMC). Uvedené hodnoty platí pro délku inkubace 5 min, při 1 min inkubaci byly operační vlastnosti senzorů horší.

Studie je kromě toho doplněna charakterizací kinetiky sorpce kationtů (Pb, Cu, Cd) na připravené elektrody, jejímž výstupem jsou grafy ploch voltametriických rozpouštěcích píků v závislosti na délce sorpčního kroku (obr. 27). Zde byly pozorovány zásadní rozdíly mezi senzory na bázi síťované HEC a T-CMC. Zatímco v prvním případě víceméně rostla výška píku s prodlužující se inkubací (maximum odezvy pozorováno při inkubaci 5 min), u T-CMC tomu bylo naopak, odezva byla vesměs nízká a s delší inkubací se blížila nule. Uvedené platí pro Pb a Cu a pro měření prováděné v neutrálním elektrolytu (100mM KCl). Pokud bylo měření se senzorem na bázi síťované HEC prováděno v kyselém prostředí (KCl okyseleno kyselinou

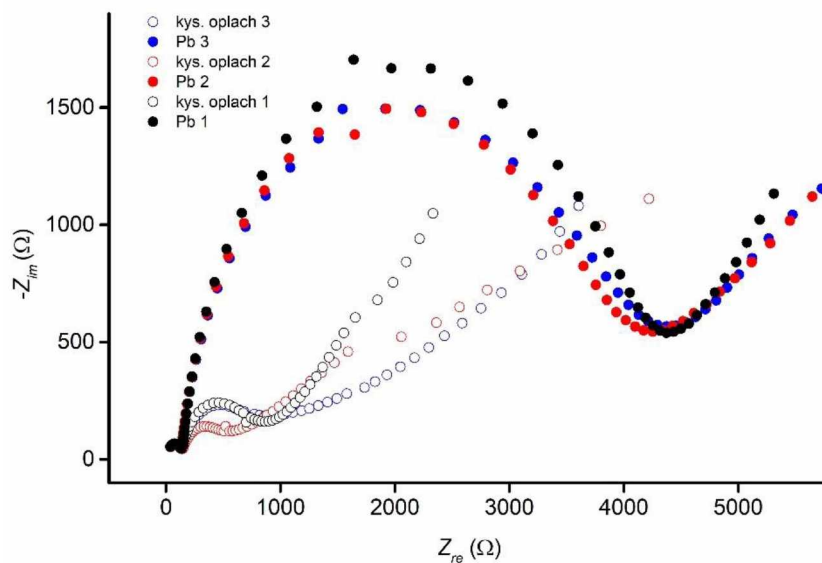
dusičnou na hodnotu pH přibližně 1,9), pak pro Pb a Cu došlo k výraznému poklesu odezvy oproti neutrálnímu elektrolytu, ovšem u Cd tomu bylo naopak. Oproti tomu měření s elektrodou modifikovanou síťovanou T-CMC vždy poskytovalo vyšší odezvu v kyselém prostředí než v neutrálním, z hlediska kinetiky pak lze mluvit o maximu odezvy při délce sorpce mezi 15 a 45 s, delší inkubace kupodivu vedla k poklesu odezvy. Tyto výsledky poukazují na možnost nastavit vlastnosti absorpční matrice tak, aby co nejlépe vyhovovala specifickým požadavkům (selektivita, pH vzorku...).



Obrázek 27: Závislost plochy voltametrických rozpouštěcích píků na délce absorpčního kroku pro absorpci Cu (červená), Cd (černá) a Pb (magenta) z jejich 5 mg/ml roztoků a Pb z 1 mg/ml roztoku (modrá). Stripovací voltametrie po absorpci provedena v 100 mM KCl (A) a v tomtéž elektrolytu okyseleném kyselinou dusičnou na pH = 1,9 (B). Převzato ze [113].

Mezi další velmi zajímavé výsledky lze zařadit charakterizaci připravených elektrod modifikovaných hydrogely pomocí impedanční spektroskopie, kdy bylo zjištěno, že elektrody modifikované síťovanou T-CMC vykazují daleko vyšší odpor přenosu náboje (R_{CT}) než při modifikaci síťovanou HEC. V druhém případě byla ale pozorována cyklická změna hodnoty R_{CT} v závislosti na sorpci/desorpci kationtů olova do matrice (obr. 28). Jelikož snížení odporu nastalo vždy po regeneraci elektrody prováděné oplachem kyselinou dusičnou (desorpce případně „zbylých“ kationtů kovů), lze usuzovat, že tento krok způsobil protonizaci funkčních skupin (hydroxylů). Ty mají kladný náboj, což usnadní difuzi a následnou redoxní transformaci ferrikyanidu jakožto záporně nabitě elektrochemické sondy použité při impedimetrických měřeních. Tyto výsledky jsou rovněž velmi zajímavé z hlediska potenciálu přípravy povrchu elektrod se specifickými vlastnostmi (nábojem). Dále bylo při analýze odezvy v přítomnosti

různých dalších kovů zjištěno, že zatímco u Pb a Cd byl pozorován jednoznačný pokles odezvy (v přítomnosti ostatních kovů), odezva Cu naopak v přítomnosti dalších kovů narostla.



Obrázek 28: Nyquistovy diagramy elektrod modifikovaných síťovanou HEC po opakovém oplachu kyselinou dusičnou (desorpce Pb) a sorpci olova z 5 mM roztoku Pb^{2+} . Měřeno v 100mM KCl obsahujícím 5mM ferri/ferrokyanid. Převzato ze [113].

Celkově je tedy možno shrnout, že uvedená studie otevírá dveře dalším možnostem v přípravě jak elektrochemických biosenzorů, tak senzorů.

5. ZÁVĚR

Habilitační práce shrnuje hlavní vědecké výstupy předkladatele v oblasti nanotechnologií aplikovatelných pro konstrukci (bio)elektrochemických zařízení. Dosažené výsledky lze rozdělit do třech základních oblastí, tj. aplikace nanomateriálů pro přípravu biopalivových článků, aplikace nanomateriálů pro impedimetrické afinitní biosenzory, vč. přípravy modifikace povrchů s potenciálním využitím v této oblasti, a aplikace nanomateriálů pro elektrochemické senzory.

V první oblasti byl výzkum zaměřen především na přímý elektronový transfer enzymů bilirubin oxidáza a fruktóza dehydrogenáza; nejprve byl testován biopolymer chitosan jako méně materiálově náročná polymerní matrice pro saze „Ketjan black“, oproti běžněji používanému polyvinylidenfluoridu který je drahý a problematicky rozpustný. V chitosanu, který je díky své polycharadické povaze spíše hydrofilní, nebylo možné připravit disperzi s tak vysokou koncentrací sazí, tento nedostatek byl ale odstraněn zvýšením vodivosti elektrodového rozhraní integrací uhlíkových nanotrubiček. Připravený nano-povrch bylo možné použít jak pro přípravu bioanody (fruktóza dehydrogenáza), tak biokatody (bilirubin oxidáza) jednoduše biopalivového článku poskytujícího z aerovaného fosfátového pufru s obsahem fruktózy výkon $57 \mu\text{W}$ na 1 cm^2 plochy elektrod při napětí 300 mV. Fundamentální studie povahy elektronového transferu bilirubin oxidázy imobilizované v tomto rozhraní pak identifikovaly elektrochemickou odezvu (tj. přímý elektronový transfer) aktivního centra bilirubin oxidázy označovaného jako T1. Analýzou ostatních aktivních míst se zjistil vliv orientace enzymu vůči povrchu na povahu výměny elektronů mezi jednotlivými aktivními místy a elektrodou. V této souvislosti je třeba zmínit, že testované rozhraní je svým způsobem unikátní, neboť bilirubin oxidáza na něj nasorbovaná vykazuje elektrochemickou odezvu pro tři aktivní místa, na rozdíl od většiny ostatních studií, kde jsou popsány jen dvě elektrochemicky aktivní místa bilirubin oxidázy. Dalším zkoumáním vlivu redoxních potenciálů těchto dějů na pH prostředí byl identifikován pravděpodobný vliv aminokyselinových ligandů aktivních center a zároveň bylo identifikováno aktivní centrum inertní vůči změně pH, což poukazuje na jeho izolovanost od elektrolytu – dochází zde k výměně protonů pouze s ostatními aktivními centry.

V dalších experimentech bylo testováno využití poly(mléčné kyseliny) jako polymerní matrice sazí se srovnatelnými výsledky (z hlediska biokatalytického proudu vyprodukovaného bilirubin oxidázou v přítomnosti kyslíku) jako při použití chitosanu. Důležité ale je, že zde již

nebylo nutné zvýšit vodivost pomocí uhlíkových nanotrubiček. Testována byla i adsorpce bilirubin oxidázy a fruktóza dehydrogenázy na polypyrolové nanotrubičky se zlatými nanočásticemi na povrchu. Tento nanomateriál je poměrně vodivý a výhodný pro imobilizaci fruktóza dehydrogenázy, bilirubin oxidáza nicméně nevykazovala žádné známky přímého elektronového transferu. V přítomnosti mediátoru ale byla pozorována enzymatická redukce kyslíku, což poukazuje na přítomnost enzymu v rozhraní, ale jeho nevhodnou orientaci.

Dalšími studiemi byla prokázána dobrá afinita bilirubin oxidázy k nanočásticím oxidu grafenu. Ten lze po aplikaci na elektrodu elektrochemicky redukovat, i když byl již dříve na jeho povrch imobilizován enzym, který si zachová i přes vystavení redukčnímu potenciálu svoji elektrokatalytickou aktivitu. Díky tomu lze dosáhnout efektivní imobilizace jednoduchým smícháním roztoku enzymu a disperze oxidu grafenu s následnou inkubací (4 h) a aplikací na povrch elektrody. Pro objasnění dalších detailů byly aplikací centrifugačních kroků separovány jednotlivé velikosti frakce z komerčně dostupné disperze oxidu grafenu a zjišťována efektivita sorpce bilirubin oxidázy na tyto částice. Výsledky ukázaly jednoznačnou závislost naměřené bioelektrokatalytické aktivity enzymu na hodnotě tzv. nominálního ζ -potenciálu oxidu grafenu, tedy hustotě elektrického náboje na povrchu nanočástice.

V rámci výzkumu mikrobiálních elektrod byly bakterie *Gluconobacter oxydans* integrovány s různými typy uhlíkových nanomateriálů (sférické nanočástice, uhlíkové nanotrubičky, grafit...) pomocí ultrazvukové lázně. Tímto způsobem bylo dosaženo efektivnější elektronové výměny (pouze zprostředkované, nikoliv přímé) mezi periplasmatickými enzymy bakterií a povrchem elektrody, což bylo využito pro konstrukci citlivého mikrobiálního biosenzoru monitorujícího modelovou fermentaci bez nutnosti upravovat odebrané vzorky.

Pokud by měly být výše uvedené výsledky být shrnuty z hlediska environmentální chemie a inženýrství, lze konstatovat následující: i) samotné biopalivové články jsou považovány za „udržitelnou“ alternativu k určitému typu baterií, jakkoliv oblast jejich aplikací je poměrně specifická (nabíjení malých baterií, napájení implantovaných biomedicínských zařízení, „off-grid“ aplikace...); ii) při přípravě těchto zařízení je možné využít i biopolymery (chitosan, poly(kyselina mléčná) a vyhnout se použití aprotických rozpouštědel (chitosan se rozpouští v kyselině octové); iii) v určitých případech je možné vyhnout se použití jakéhokoliv polymeru,

což je z hlediska udržitelného rozvoje optimální možnost. To se nicméně týká imobilizace bilirubin oxidázy na oxid grafenu, jehož vliv na zdraví a životní prostředí ještě není zcela jasný.

V oblasti impedimetrických afinitních biosenzorů byla zkoumána kovalentní imobilizace lektinu (konkanavalin A) na elektrodu modifikovanou oxidem grafenu. Jeho karboxyly po aktivaci karbodiimidem tvoří amidové vazby s aminy proteinové struktury konkanavalinu A, což umožnilo připravit jednoduchý afinitní biosenzor invertázy, což je modelový analyt pro lektinové biosenzory. Dále se předkladatel zabýval vývojem metody imobilizace konkanavalinu A na elektrochemicky redukováný oxid grafenu funkcionalizovaný thioninem s následnou kovalentní imobilizací lektinu pomocí síťovacího činidla glutaraldehydu. Zde bylo poprvé ukázáno, že je možné imobilizovat nikoliv pouze samotné molekuly lektinu, ale i jejich aglomeráty vzniklé reakcí s glutaraldehydem, což zvýšilo specifitu odezvy.

V této oblasti byly prováděny i výzkumy funkcionalizovaných povrchů připravených inkubací zlatých čipů s nově vyvinutými deriváty kyseliny lipoové s karboxybetainovou nebo karboxybetain-esterovou funkční skupinou. Tyto povrchy vykazovaly odlišné vlastnosti v závislosti na pH (ireverzibilní disociace esterové vazby) a zároveň byla elektrochemicky detekována vazba DNA na tyto povrchy. Ta se projevila nárůstem impedance daného povrchu, přičemž tento nárůst byl větší, pokud byla elektroda po adsorpci DNA funkcionalizovaná inkubací s thioninem. Tento princip „thioninové amplifikace“ by mohl být využit při konstrukci dalších DNA biosenzorů.

Význam zkoumaných afinitních biosenzorů pro environmentální inženýrství a chemii může spočívat např. v monitorování fyziologických/biochemických pochodů v živých organismech po expozici polutanty. Především je možné se domnívat, že bude nalezena souvislost s chronickou expozicí látek nevykazujících akutní toxicitu (emergentní polutanty) a změnami v glykoprofilu určitých proteinů či buněk. Zkušenosti z výzkumu afinitních biosenzorů ale mohou být uplatněny i při detekci polutantů či toxinů.

Další kapitolou je výzkum katalýzy elektrochemické redukce H^+ za účelem produkce vodíku. Za tímto účelem byly charakterizovány Pt nanočástice syntetizované na nanočásticích „MXenu“, tedy planárního karbidu titanu se souhrnnou strukturou $Ti_3C_2(OH, F)_x$. Hlavním výsledkem je zjištění, že Ti ve struktuře MXenu může spontánně redukovat ionty Pt^{4+} , platinové nanočástice tedy mohou být syntetizovány bez přídavku redukčního činidla, jinak běžně

aplikovaného při syntéze kovových nanočástic. Nanomateriál syntetizovaný pouze spontánní reakcí dokonce vykazoval lepší výsledky ve smyslu elektrochemické produkce vodíku.

V dalších výzkumech byl použit stejný princip spontánní redukce Ag^+ iontů na syntézu stříbrných nanočástic na povrchu MXenu a na povrchu oxidu grafenu. I druhý jmenovaný nanomateriál je schopen spontánně redukovat ionty kovů, avšak jiným reakčním mechanismem než MXene. Připravené nanomateriály pak byly testovány pro elektrochemickou detekci chloridů, včetně FeCl_3 jakožto běžného srážecího činidla pro úpravy vod. Z hlediska environmentální chemie a inženýrství je nicméně zajímavější, že tyto nanomateriály byly s úspěchem testovány i pro detekci metazachloru, což je chloracetanilidový herbicid, jehož povolené limity ve vodách bývají relativně často překračovány.

Poslední kapitolou je příprava elektrod modifikovaných hydrogely připravenými jednoduchým síťováním ve vodě rozpustných derivátů celulózy kyselinou citronovou. Jakkoliv je známo, že tyto materiály vykazují výborné sorpční vlastnosti vůči těžkým kovům, v žádné studii ještě nebyly takto modifikované elektrody použity pro elektrochemické stanovení Pb, Cd a Cu v roztoku. Samotná příprava hydrogelů je přitom velmi rychlá, vyžaduje pouze zahřívání (30 min – 1 h, 110°C) reakční směsi aplikované na elektrodě.

Lze tedy shrnout, že kromě charakterizace nového katalyzátoru reakce s jednoznačným významem pro environmentální technologie a inženýrství (produkce vodíku) a testování elektrochemických senzorů polutantů je v této kapitole důležitý i důraz na co nejjednodušší přípravu nanomateriálů, s minimem reakčních činidel a kroků, při nichž by mohl vznikat odpad.

Směrem nastíněným v poslední části povede předkladatel i další výzkumy zaměřené především na senzory či biosenzory polutantů. Zároveň bude možné navázat na trendy představované např. tištěnými jednorázovými senzory na „papírových“ elektrodách a kompaktními elektrochemickými zařízeními umožňujícími přesné, jednoduché, rychlé a levné analýzy při terénních měřeních.

6. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] POTTER, M C a Augustus Desire WALLER. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* [online]. 1911, **84**(571), 260–276. Dostupné z: doi:10.1098/rspb.1911.0073
- [2] COHEN, Barnett. The bacterial culture as an electrical half-cell. *J. Bacteriol.* 1931, **21**(1), 18–19.
- [3] CLARK JR., Leland C a Champ LYONS. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 1962, **102**(1), 29–45. ISSN 0077-8923. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x
- [4] HEYROVSKÝ, J a M SHIKATA. Researches with the dropping mercury cathode: Part II. The Polarograph. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* [online]. 1925, **44**(6), 496–498. ISSN 0165-0513. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/recl.19250440606
- [5] HEYROVSKÝ, Jaroslav. Elektrolysa se rtufovou kapkovou katodou. *Chemické listy.* 1922, **16**, 256–264.
- [6] DOSEKOVA, Erika, Jaroslav FILIP, Tomas BERTOK, Peter BOTH, Peter KASAK a Jan TKAC. Nanotechnology in Glycomics: Applications in Diagnostics, Therapy, Imaging, and Separation Processes. *Medicinal Research Reviews* [online]. 2017, **37**(3), 514–626. ISSN 0198-6325. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/med.21420
- [7] FILIP, J, T BERTOK a J TKAC. Electrochemical biosensors and biofuel cells based on graphene and graphene derivatives. In: *Graphene Science Handbook: Mechanical and Chemical Properties*. 2016, s. 179–206.
- [8] FILIP, Jaroslav, Peter KASÁK a Jan TKAC. Graphene as signal amplifier for preparation of ultrasensitive electrochemical biosensors. *Chemical Papers* [online]. 2015, **69**(1), 112–133. Dostupné z: doi:doi:10.1515/chempap-2015-0051
- [9] FILIP, Jaroslav a Jan TKAC. Is graphene worth using in biofuel cells? *Electrochimica Acta* [online]. 2014, **136**, 340–354. ISSN 0013-4686. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.05.119
- [10] DI PIETRANTONIO, Fabio, Domenico CANNATÀ a Massimiliano BENETTI. Chapter 8 - Biosensor technologies based on nanomaterials. In: Valentina DINCA a Mirela Petruta B T - Functional Nanostructured Interfaces for Environmental and Biomedical Applications SUCHEA, ed. *Micro and Nano Technologies* [online]. B.m.: Elsevier, 2019, s. 181–242. ISBN 978-0-12-814401-5. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814401-5.00008-6
- [11] HASHEM, Abu, M A Motalib HOSSAIN, Ab Rahman MARLINDA, Mohammad Al MAMUN, Khanom SIMARANI a Mohd Rafie JOHAN. Nanomaterials based electrochemical nucleic acid biosensors for environmental monitoring: A review. *Applied Surface Science Advances* [online]. 2021, **4**, 100064. ISSN 2666-5239. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2021.100064
- [12] MISHRA, Abhilasha, Rinkesh BHATT, Jaya BAJPAI a A K BAJPAI. Nanomaterials based biofuel cells: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* [online]. 2021,

- [13] SHARMA, Archita, Gursharan SINGH a Shailendra Kumar ARYA. Biofuel cell nanodevices. *International Journal of Hydrogen Energy* [online]. 2021, **46**(4), 3270–3288. ISSN 0360-3199. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.02.164
- [14] KUMAR, Ashutosh, Swati SHARMA, Lalit Mohan PANDEY a Pranjal CHANDRA. Nanoengineered material based biosensing electrodes for enzymatic biofuel cells applications. *Materials Science for Energy Technologies* [online]. 2018, **1**(1), 38–48. ISSN 2589-2991. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.mset.2018.04.001
- [15] FILIP, Jaroslav a Ján TKÁČ. Enzymatic biofuel cells. *Chemicke Listy*. 2014, **108**(5), 442–450.
- [16] SHLEEV, Sergey, Jan TKAC, Andreas CHRISTENSON, Tautgirdas RUZGAS, Alexander I YAROLOV, James W WHITTAKER a Lo GORTON. Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2005, **20**(12), 2517–2554. ISSN 0956-5663. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.10.003
- [17] ORTIZ, Roberto, Hirotoshi MATSUMURA, Federico TASCA, Kawah ZAHMA, Masahiro SAMEJIMA, Kiyohiko IGARASHI, Roland LUDWIG a Lo GORTON. Effect of Deglycosylation of Cellobiose Dehydrogenases on the Enhancement of Direct Electron Transfer with Electrodes. *Analytical Chemistry* [online]. 2012, **84**(23), 10315–10323. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac3022899
- [18] BONFIN, Carolina Souza, Jefferson Honorio FRANCO a Adalgisa R DE ANDRADE. Ethanol bioelectrooxidation in a robust poly(methylene green-pyrrole)- mediated enzymatic biofuel cell. *Journal of Electroanalytical Chemistry* [online]. 2019, **844**, 43–48. ISSN 1572-6657. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.04.075
- [19] COONEY, Michael J, Vojtech SVOBODA, Carolin LAU, Georgianna L MARTIN a Shelly D MINTEER. Enzyme catalysed biofuel cells. *Energy & Environmental Science* [online]. 2008, **1**(3), 320–337. ISSN 1754-5692. Dostupné z: doi:10.1039/B809009B
- [20] ANDRIUKONIS, Eivydas, Raimonda CELIESIUTE-GERMANIENE, Simonas RAMANAVICIUS, Roman VITER a Arunas RAMANAVICIUS. *From Microorganism-Based Amperometric Biosensors towards Microbial Fuel Cells* [online]. 2021. ISBN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s21072442
- [21] RESHETILOV, Anatoly N. Biosensors and biofuel cells: Research focused on practical application (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. 2015, **51**(2), 264–269. ISSN 1608-3024. Dostupné z: doi:10.1134/S0003683815020167
- [22] ALLEN, Robin M a H Peter BENNETTO. Microbial fuel-cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 1993, **39**(1), 27–40. ISSN 1559-0291. Dostupné z: doi:10.1007/BF02918975
- [23] BOND, Daniel R a Derek R LOVLEY. Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2003, **69**(3), 1548–1555. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.69.3.1548-1555.2003
- [24] LOVLEY, Derek R. The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2008, **19**(6), 564–571. ISSN 0958-1669.

Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.10.005>

- [25] NAGEL, Bertram, Hanswerner DELLWEG a Lila M GIERASCH. Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992): . *Pure and Applied Chemistry* [online]. 1992, **64**(1), 143–168. Dostupné z: doi:[doi:10.1351/pac199264010143](https://doi.org/10.1351/pac199264010143)
- [26] JOHARI-AHAR, Mohammad, Mohammad R RASHIDI, Jaleh BARAR, M. AGHAIE, Daryosh MOHAMMADNEJAD, Ali RAMAZANI, Pari KARAMI, George COUKOS a Yadollah OMIDI. An ultra-sensitive impedimetric immunosensor for detection of the serum oncomarker CA-125 in ovarian cancer patients. *Nanoscale* [online]. 2015, **7**(8), 3768–3779. ISSN 2040-3364. Dostupné z: doi:[doi:10.1039/C4NR06687A](https://doi.org/10.1039/C4NR06687A)
- [27] YANG, Zhe-Han, Ying ZHUO, Ruo YUAN a Ya-Qin CHAI. A nanohybrid of platinum nanoparticles-porous ZnO–hemin with electrocatalytic activity to construct an amplified immunosensor for detection of influenza. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2016, **78**, 321–327. ISSN 0956-5663. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.073>
- [28] FILIP, Jaroslav, Stepan VINTER, Pavel SKACELIK, Jitka SOTOLAROVA, Katarina BORSKA a Josef OSICKA. Silver Integrated with Carbonaceous 2D Nanomaterials as an Electrocatalyst for Reductive Dechlorination of Chloroacetanilide Herbicide. *Journal of The Electrochemical Society* [online]. 2021, **168**(3), 37504. ISSN 0013-4651. Dostupné z: doi:[doi:10.1149/1945-7111/abe8ec](https://doi.org/10.1149/1945-7111/abe8ec)
- [29] FILIP, Jaroslav, Sifani ZAVAHIR, Lenka LORENCOVA, Tomas BERTOK, Ammar Bin YOUSAF, Khaled A MAHMOUD, Jan TKAC a Peter KASAK. Tailoring Electrocatalytic Properties of Pt Nanoparticles Grown on Ti3C2TXMXene Surface. *Journal of The Electrochemical Society* [online]. 2019, **166**(2), H54–H62. ISSN 0013-4651. Dostupné z: doi:[doi:10.1149/2.0991902jes](https://doi.org/10.1149/2.0991902jes)
- [30] BLOCH, Khalida, Karishma PARDESI, Cristina SATRIANO a Sougata GHOSH. *Bacteriogenic Platinum Nanoparticles for Application in Nanomedicine* . 2021. ISBN 2296-2646
- [31] SAHANI, Shalini a Yogesh Chandra SHARMA. Advancements in applications of nanotechnology in global food industry. *Food Chemistry* [online]. 2021, **342**, 128318. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128318>
- [32] JALEH, Babak, Mahmoud NASROLLAHZADEH, Bahareh Feizi MOHAZZAB, Mahtab ESLAMIPANAH, Mohaddeseh SAJJADI a Hossein GHAFURI. State-of-the-art technology: Recent investigations on laser-mediated synthesis of nanocomposites for environmental remediation. *Ceramics International* [online]. 2021, **47**(8), 10389–10425. ISSN 0272-8842. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.12.197>
- [33] LI, Zhanfeng, Tingting ZHUANG, Jun DONG, Lun WANG, Jianfei XIA, Huiqi WANG, Xuejun CUI a Zonghua WANG. Sonochemical fabrication of inorganic nanoparticles for applications in catalysis. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2021, **71**, 105384. ISSN 1350-4177. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105384>
- [34] LIN, Liangliang, Yijian YIN, Sergey A STAROSTIN, Hujun XU, Chengdong LI, Kejun WU, Chaohong HE a Volker HESSEL. Microfluidic fabrication of fluorescent nanomaterials: A review. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2021, **425**, 131511. ISSN 1385-8947. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131511>

- [35] GOSWAMI, Abhijeet D, Dhwanil H TRIVEDI, Nilesh L JADHAV a Dipak V PINJARI. Sustainable and green synthesis of carbon nanomaterials: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2021, **9**(5), 106118. ISSN 2213-3437. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106118>
- [36] CAMPEA, Matthew A, Michael J MAJCHER, Andrew LOFTS a Todd HOARE. A Review of Design and Fabrication Methods for Nanoparticle Network Hydrogels for Biomedical, Environmental, and Industrial Applications. *Advanced Functional Materials* [online]. 2021, **31**(33), 2102355. ISSN 1616-301X. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/adfm.202102355>
- [37] FILIP, Jaroslav a Jan TKAC. Enzymatic Electrodes: Characteristics, Fabrication Methods, and Applications. In: Klaus B T - Encyclopedia of Interfacial Chemistry WANDEL, ed. [online]. Oxford: Elsevier, 2018, s. 190–199. ISBN 978-0-12-809894-3. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13471-7>
- [38] SUCHETA, Artur, Richard CAMMACK, Joel WEINER a Fraser A ARMSTRONG. Reversible electrochemistry of fumarate reductase immobilized on an electrode surface. Direct voltammetric observations of redox centers and their participation in rapid catalytic electron transport. *Biochemistry* [online]. 1993, **32**(20), 5455–5465. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00071a023
- [39] LÉGER, Christophe a Patrick BERTRAND. Direct Electrochemistry of Redox Enzymes as a Tool for Mechanistic Studies. *Chemical Reviews* [online]. 2008, **108**(7), 2379–2438. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr0680742
- [40] BANKAR, Sandip B, Mahesh V BULE, Rekha S SINGHAL a Laxmi ANANTHANARAYAN. Glucose oxidase — An overview. *Biotechnology Advances* [online]. 2009, **27**(4), 489–501. ISSN 0734-9750. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.003>
- [41] WILSON, George S. Native glucose oxidase does not undergo direct electron transfer. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2016, **82**, vii–viii. ISSN 0956-5663. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.083>
- [42] SHAN, Changsheng, Huafeng YANG, Jiangfeng SONG, Dongxue HAN, Ari IVASKA a Li NIU. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Biosensing for Glucose Based on Graphene. *Analytical Chemistry* [online]. 2009, **81**(6), 2378–2382. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac802193c
- [43] KRISHNAN, Siva Kumar, Evgen PROKHOROV, Daniel BAHENA, Rodrigo ESPARZA a M MEYYAPPAN. Chitosan-Covered Pd@Pt Core-Shell Nanocubes for Direct Electron Transfer in Electrochemical Enzymatic Glucose Biosensor. *ACS Omega* [online]. 2017, **2**(5), 1896–1904. ISSN 2470-1343. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.7b00060
- [44] BARTLETT, Philip N a Firas A AL-LOLAGE. There is no evidence to support literature claims of direct electron transfer (DET) for native glucose oxidase (GOx) at carbon nanotubes or graphene. *Journal of Electroanalytical Chemistry* [online]. 2018, **819**, 26–37. ISSN 1572-6657. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.06.021>
- [45] HOLLAND, J Todd, Carolin LAU, Susan BROZIK, Plamen ATANASSOV a Scott BANTA. Engineering of Glucose Oxidase for Direct Electron Transfer via Site-Specific Gold Nanoparticle Conjugation. *Journal of the American Chemical Society* [online].

- 2011, **133**(48), 19262–19265. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja2071237
- [46] XIAO, Yi, Fernando PATOLSKY, Eugenii KATZ, James F HAINFELD a Itamar WILLNER. "Plugging into Enzymes": Nanowiring of Redox Enzymes by a Gold Nanoparticle. *Science* [online]. 2003, **299**(5614), 1877 LP – 1881. Dostupné z: doi:10.1126/science.1080664
- [47] MIYAKE, Takeo, Masato OIKE, Syuhei YOSHINO, Yohei YATAGAWA, Keigo HANEDA, Hirokazu KAJI a Matsuhiko NISHIZAWA. Biofuel cell anode: NAD⁺/glucose dehydrogenase-coimmobilized ketjenblack electrode. *Chemical Physics Letters* [online]. 2009, **480**(1), 123–126. ISSN 0009-2614. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.cplett.2009.08.075
- [48] ZHENG, Wei, Qingfen LI, Lei SU, Yiming YAN, Jun ZHANG a Lanqun MAO. Direct Electrochemistry of Multi-Copper Oxidases at Carbon Nanotubes Noncovalently Functionalized with Cellulose Derivatives. *Electroanalysis* [online]. 2006, **18**(6), 587–594. ISSN 1040-0397. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/elan.200503444
- [49] GAO, Feng, Yiming YAN, Lei SU, Lun WANG a Lanqun MAO. An enzymatic glucose/O₂ biofuel cell: Preparation, characterization and performance in serum. *Electrochemistry Communications* [online]. 2007, **9**(5), 989–996. ISSN 1388-2481. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.elecom.2006.12.008
- [50] FILIP, Jaroslav, Jana ŠEFČOVIČOVÁ, Peter GEMEINER a Jan TKAC. Electrochemistry of bilirubin oxidase and its use in preparation of a low cost enzymatic biofuel cell based on a renewable composite binder chitosan. *Electrochimica Acta* [online]. 2013, **87**, 366–374. ISSN 0013-4686. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.09.054
- [51] FILIP, Jaroslav, Jana ŠEFČOVIČOVÁ, Peter TOMČÍK, Peter GEMEINER a Jan TKAC. A hyaluronic acid dispersed carbon nanotube electrode used for a mediatorless NADH sensing and biosensing. *Talanta* [online]. 2011, **84**(2), 355–361. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.01.004
- [52] IVNITSKI, Dmitri M, Constantine KHRIPIN, Heather R LUCKARIFT, Glenn R JOHNSON a Plamen ATANASSOV. Surface characterization and direct bioelectrocatalysis of multicopper oxidases. *Electrochimica Acta* [online]. 2010, **55**(24), 7385–7393. ISSN 0013-4686. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.07.026
- [53] BROCATO, Shayna, Carolin LAU a Plamen ATANASSOV. Mechanistic study of direct electron transfer in bilirubin oxidase. *Electrochimica Acta* [online]. 2012, **61**, 44–49. ISSN 0013-4686. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.11.074
- [54] FILIP, Jaroslav a Jan TKAC. The pH dependence of the cathodic peak potential of the active sites in bilirubin oxidase. *Bioelectrochemistry* [online]. 2014, **96**, 14–20. ISSN 1567-5394. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2013.11.007
- [55] DREYER, Daniel R, Rodney S RUOFF a Christopher W BIELAWSKI. From Conception to Realization: An Historical Account of Graphene and Some Perspectives for Its Future. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2010, **49**(49), 9336–9344. ISSN 1433-7851. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/anie.201003024
- [56] DREYER, Daniel R, Sungjin PARK, Christopher W BIELAWSKI a Rodney S RUOFF. The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews* [online]. 2010, **39**(1), 228–

240. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/B917103G

- [57] FILIP, Jaroslav, Jana ŠEFČOVIČOVÁ, Peter GEMEINER a Jan TKAC. Electrochemical Features of Bilirubin Oxidase Immobilized on Different Carbon Nanostructures. *Key Engineering Materials* [online]. 2013, **543**, 13–17. ISSN 1662-9795. Dostupné z: doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.543.13
- [58] FILIP, Jaroslav a Jan TKAC. Effective bioelectrocatalysis of bilirubin oxidase on electrochemically reduced graphene oxide. *Electrochemistry Communications* [online]. 2014, **49**, 70–74. ISSN 1388-2481. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.elecom.2014.10.012
- [59] FILIP, Jaroslav, Anita ANDICSOVÁ-ECKSTEIN, Alica VIKARTOVSKÁ a Jan TKAC. Immobilization of bilirubin oxidase on graphene oxide flakes with different negative charge density for oxygen reduction. The effect of GO charge density on enzyme coverage, electron transfer rate and current density. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2017, **89**, 384–389. ISSN 0956-5663. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.006
- [60] TKAC, Jan, Juraj SVITEL, Igor VOSTIAR, Marian NAVRATIL a Peter GEMEINER. Membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter* sp.: Interfacial electrochemistry and direct bioelectrocatalysis. *Bioelectrochemistry* [online]. 2009, **76**(1), 53–62. ISSN 1567-5394. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.02.013
- [61] MURATA, Kenichi, Masato SUZUKI, Kazuki KAJIYA, Nobuhumi NAKAMURA a Hiroyuki OHNO. High performance bioanode based on direct electron transfer of fructose dehydrogenase at gold nanoparticle-modified electrodes. *Electrochemistry Communications* [online]. 2009, **11**(3), 668–671. ISSN 1388-2481. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.01.011
- [62] KAMITAKA, Yuji, Seiya TSUJIMURA, Norihiko SETOYAMA, Tsutomu KAJINO a Kenji KANO. Fructose/dioxygen biofuel cell based on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis. *Physical Chemistry Chemical Physics* [online]. 2007, **9**(15), 1793–1801. ISSN 1463-9076. Dostupné z: doi:10.1039/B617650J
- [63] KAMITAKA, Yuji, Seiya TSUJIMURA a Kenji KANO. High Current Density Bioelectrolysis of D-Fructose at Fructose Dehydrogenase-adsorbed and Ketjen Black-modified Electrodes without a Mediator. *Chemistry Letters* [online]. 2006, **36**(2), 218–219. ISSN 0366-7022. Dostupné z: doi:10.1246/cl.2007.218
- [64] IKEDA, Tokuji, Fumio MATSUSHITA a Mitsugi SENDA. Amperometric fructose sensor based on direct bioelectrocatalysis. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 1991, **6**(4), 299–304. ISSN 0956-5663. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/0956-5663(91)85015-O
- [65] FILIP, Jaroslav, Peter GEMEINER a Jan TKÁČ. Miniaturizovaný biopalivový článok na bázi priameho elektronového transferu fruktóza dehydrogenázy a bilirubin oxidázy. In: *Študentská vedecká konferencia Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave, zborník recenzovaných príspevkov*. 2011, s. 847–852.
- [66] FILIP, Jaroslav, Rastislav MONOSIK a Jan TKAC. Poly (lactic acid)-based nanocomposite for construction of efficient bilirubin oxidase-based biocathodes and stable biofuel cells. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2014, **9**, 2491–2506.
- [67] TSUJIMURA, Seiya, Takaaki NAKAGAWA, Kenji KANO a Tokuji IKEDA. Kinetic

- Study of Direct Bioelectrocatalysis of Dioxygen Reduction with Bilirubin Oxidase at Carbon Electrodes. *Electrochemistry* [online]. 2004, **72**(6), 437–439. Dostupné z: doi:10.5796/electrochemistry.72.437
- [68] ILČÍKOVÁ, Markéta, Jaroslav FILIP, Miroslav MRLÍK, Tomáš PLACHÝ, Ján TKÁČ a Peter KASÁK. Polypyrrole nanotubes decorated with gold particles applied for construction of enzymatic bioanodes and biocathodes. *International Journal of Electrochemical Science*. 2015. ISSN 1452-3981.
- [69] FILIP, Jaroslav, Peter GEMEINER, Peter TOMČÍK a Ján TKÁČ. Microbial fuel cells - features and development. *Chemické Listy*. 2012, **106**(3), 158–165.
- [70] TKAC, Jan, Jaroslav FILIP a Peter KASAK. Microdetectives: Fundamentals, Fabrication, and Applications of Electrochemical Microbial Biosensors. In: Klaus B T - Encyclopedia of Interfacial Chemistry WANDEL T, ed. [online]. Oxford: Elsevier, 2018, s. 337–349. ISBN 978-0-12-809894-3. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13590-5
- [71] RENGASAMY, Karthikeyan a Sheela BERCHMANS. Simultaneous degradation of bad wine and electricity generation with the aid of the coexisting biocatalysts *Acetobacter aceti* and *Gluconobacter roseus*. *Bioresource Technology* [online]. 2012, **104**, 388–393. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.092
- [72] KARTHIKEYAN, Rengasamy, Kamaraj SATHISH KUMAR, M. MURUGESAN, Sheela BERCHMANS a Venkataraman YEGNARAMAN. Bioelectrocatalysis of *Acetobacter aceti* and *Gluconobacter roseus* for Current Generation. *Environmental Science & Technology* [online]. 2009, **43**(22), 8684–8689. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es901993y
- [73] BERTOKOVA, Aniko, Tomas BERTOK, Jaroslav FILIP a Jan TKAC. *Gluconobacter* sp. cells for manufacturing of effective electrochemical biosensors and biofuel cells: . *Chemical Papers* [online]. 2015, **69**(1), 27–41. Dostupné z: doi:doi:10.1515/chempap-2015-0040
- [74] ŠEFČOVIČOVÁ, Jana, Jaroslav FILIP, Vladimír MASTIHUBA, Peter GEMEINER a Jan TKAC. Analysis of ethanol in fermentation samples by a robust nanocomposite-based microbial biosensor. *Biotechnology Letters* [online]. 2012, **34**(6), 1033–1039. ISSN 1573-6776. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-012-0875-x
- [75] ŠEFČOVIČOVÁ, Jana, Jaroslav FILIP a Jan TKAC. Interfacing of microbial cells with nanoparticles: Simple and cost-effective preparation of a highly sensitive microbial ethanol biosensor. *Chemical Papers* [online]. 2015, **69**(1), 176–182. Dostupné z: doi:doi:10.1515/chempap-2015-0012
- [76] FILIP, Jaroslav. Glyconanobiotechnology for Medical Applications. In: Tomas BERTOK, ed. *Glyconanotechnology* [online]. 1st Editio. Boca Raton: Jenny Stanford Publishing, 2019, s. 44. ISBN 9780429448492. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1201/9780429448492
- [77] BERTOK, Tomas, Pavol GEMEINER, Milan MIKULA, Peter GEMEINER a Jan TKAC. Ultrasensitive impedimetric lectin based biosensor for glycoproteins containing sialic acid. *Microchimica Acta* [online]. 2013, **180**(1), 151–159. ISSN 1436-5073. Dostupné z: doi:10.1007/s00604-012-0902-6
- [78] ENSAFI, Ali A, F. AKBARIAN, Elahe HEYDARI-SOURESHJANI a Behzad REZAEI.

- A novel aptasensor based on 3D-reduced graphene oxide modified gold nanoparticles for determination of arsenite. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2018, **122**, 25–31. ISSN 0956-5663. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.034>
- [79] BERTOK, Tomas, Ludmila KLUKOVA, Alena SEDIVA, Peter KASÁK, Vladislav SEMAK, Matej MICUSIK, Maria OMASTOVA, Lucia CHOVANOVÁ, Miroslav VLČEK, Richard IMRICH, Alica VIKARTOVSKA a Jan TKAC. Ultrasensitive Impedimetric Lectin Biosensors with Efficient Antifouling Properties Applied in Glycoprofiling of Human Serum Samples. *Analytical Chemistry* [online]. 2013, **85**(15), 7324–7332. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:[10.1021/ac401281t](https://doi.org/10.1021/ac401281t)
- [80] HUSHEGYI, András, Dominika PIHÍKOVÁ, Tomas BERTOK, Vojtech ADAM, René KIZEK a Jan TKAC. Ultrasensitive detection of influenza viruses with a glycan-based impedimetric biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2016, **79**, 644–649. ISSN 0956-5663. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.102>
- [81] BERTOK, Tomas, Alena ŠEDIVÁ, Jaroslav FILIP, Marketa ILCIKOVA, Peter KASAK, Dusan VELIC, Eduard JANE, Martina MRAVCOVÁ, Jozef ROVENSKÝ, Pavol KUNZO, Peter LOBOTKA, Vasilij ŠMATKO, Alica VIKARTOVSKÁ a Jan TKAC. Carboxybetaine Modified Interface for Electrochemical Glycoprofiling of Antibodies Isolated from Human Serum. *Langmuir* [online]. 2015, **31**(25), 7148–7157. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:[10.1021/acs.langmuir.5b00944](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00944)
- [82] BERTOK, Tomas, Alena SEDIVA, Alica VIKARTOVSKA a Jan TKAC. Comparison of the 2D and 3D nanostructured lectin-based biosensors for in situ detection of sialic acid on glycoproteins. *International Journal of Electrochemical Science*. 2014, **9**(2), 890–900.
- [83] KLUKOVA, Ludmila, Jaroslav FILIP, Stefan BELICKY, Alica VIKARTOVSKA a Jan TKAC. Graphene oxide-based electrochemical label-free detection of glycoproteins down to aM level using a lectin biosensor. *Analyst* [online]. 2016, **141**(14), 4278–4282. ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:[10.1039/C6AN00793G](https://doi.org/10.1039/C6AN00793G)
- [84] ROURKE, Jonathan P, Priyanka A PANDEY, Joseph J MOORE, Matthew BATES, Ian A KINLOCH, Robert J YOUNG a Neil R WILSON. The Real Graphene Oxide Revealed: Stripping the Oxidative Debris from the Graphene-like Sheets. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2011, **50**(14), 3173–3177. ISSN 1433-7851. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/anie.201007520>
- [85] COLUCI, Vitor R, Diego Stéfani T MARTINEZ, Jaqueline G HONÓRIO, Andréia F DE FARIA, Daniel A MORALES, Munir S SKAF, Oswaldo L ALVES a Gisela A UMBUZEIRO. Noncovalent Interaction with Graphene Oxide: The Crucial Role of Oxidative Debris. *The Journal of Physical Chemistry C* [online]. 2014, **118**(4), 2187–2193. ISSN 1932-7447. Dostupné z: doi:[10.1021/jp409501g](https://doi.org/10.1021/jp409501g)
- [86] BONANNI, Alessandra, Adriano AMBROSI, Chun Kiang CHUA a Martin PUMERA. Oxidation Debris in Graphene Oxide Is Responsible for Its Inherent Electroactivity. *ACS Nano* [online]. 2014, **8**(5), 4197–4204. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:[10.1021/nn404255q](https://doi.org/10.1021/nn404255q)
- [87] FILIP, Jaroslav, Sifani ZAVAHIR, Ludmila KLUKOVA, Jan TKAC a Peter KASAK. Immobilization of concanavalin A lectin on a reduced graphene oxide-thionine surface by glutaraldehyde crosslinking for the construction of an impedimetric biosensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry* [online]. 2017, **794**, 156–163. ISSN 1572-6657.

Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.04.019>

- [88] MOSNÁČEK, Jaroslav, Anton POPELKA, Josef OSICKA, Jaroslav FILIP, Marketa ILCIKOVA, Jozef KOLLAR, Ammar B YOUSAF, Tomas BERTOK, Jan TKAC a Peter KASAK. Modulation of wettability, gradient and adhesion on self-assembled monolayer by counterion exchange and pH. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2018, **512**, 511–521. ISSN 0021-9797. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.10.086>
- [89] FILIP, Jaroslav, Anton POPELKA, Tomas BERTOK, Alena HOLAZOVA, Josef OSICKA, Jozef KOLLAR, Marketa ILCIKOVA, Jan TKAC a Peter KASAK. pH-Switchable Interaction of a Carboxybetaine Ester-Based SAM with DNA and Gold Nanoparticles. *Langmuir* [online]. 2017, **33**(27), 6657–6666. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:[10.1021/acs.langmuir.7b00568](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00568)
- [90] NAGUIB, Michael, Murat KURTOGLU, Volker PRESSER, Jun LU, Junjie NIU, Min HEON, Lars HULTMAN, Yury GOGOTSI a Michel W BARSOUM. Two-Dimensional Nanocrystals Produced by Exfoliation of Ti₃AlC₂. *Advanced Materials* [online]. 2011, **23**(37), 4248–4253. ISSN 0935-9648. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/adma.201102306>
- [91] BYEON, Ayeong, Meng-Qiang ZHAO, Chang E REN, Joseph HALIM, Sankalp KOTA, Patrick URBANKOWSKI, Babak ANASORI, Michel W BARSOUM a Yury GOGOTSI. Two-Dimensional Titanium Carbide MXene As a Cathode Material for Hybrid Magnesium/Lithium-Ion Batteries. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2017, **9**(5), 4296–4300. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:[10.1021/acsami.6b04198](https://doi.org/10.1021/acsami.6b04198)
- [92] RAKHI, R B, Bilal AHMED, M N HEDHILI, Dalaver H ANJUM a H N ALSHAREEF. Effect of Postetch Annealing Gas Composition on the Structural and Electrochemical Properties of Ti₂C_{Tx} MXene Electrodes for Supercapacitor Applications. *Chemistry of Materials* [online]. 2015, **27**(15), 5314–5323. ISSN 0897-4756. Dostupné z: doi:[10.1021/acs.chemmater.5b01623](https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.5b01623)
- [93] LORENCOVA, Lenka, Tomas BERTOK, Erika DOSEKOVA, Alena HOLAZOVA, Darina PAPRCKOVA, Alica VIKARTOVSKA, Vlasta SASINKOVA, Jaroslav FILIP, Peter KASAK, Monika JERIGOVA, Dusan VELIC, Khaled A MAHMOUD a Jan TKAC. Electrochemical performance of Ti₃C₂T_x MXene in aqueous media: towards ultrasensitive H₂O₂ sensing. *Electrochimica Acta* [online]. 2017, **235**, 471–479. ISSN 0013-4686. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.03.073>
- [94] CHEN, Jingyi, Byungkwon LIM, Eric P LEE a Younan XIA. Shape-controlled synthesis of platinum nanocrystals for catalytic and electrocatalytic applications. *Nano Today* [online]. 2009, **4**(1), 81–95. ISSN 1748-0132. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2008.09.002>
- [95] SHENG, Wenchao, Hubert A GASTEIGER a Yang SHAO-HORN. Hydrogen Oxidation and Evolution Reaction Kinetics on Platinum: Acid vs Alkaline Electrolytes. *Journal of The Electrochemical Society* [online]. 2010, **157**(11), B1529. ISSN 0013-4651. Dostupné z: doi:[10.1149/1.3483106](https://doi.org/10.1149/1.3483106)
- [96] PASCIAK, Erick M a Dennis G PETERS. Reduction of Substituted Phenyl 2-Chloroacetates at Silver Cathodes: Electrosynthesis of Coumarins. *Journal of The Electrochemical Society* [online]. 2014, **161**(12), G98–G102. ISSN 0013-4651. Dostupné z: doi:[10.1149/2.0551412jes](https://doi.org/10.1149/2.0551412jes)

- [97] PASCIAK, Erick M, Arkajyoti SENGUPTA, Mohammad S MUBARAK, Krishnan RAGHAVACHARI a Dennis G PETERS. Electrochemical reduction of 2-chloro-N-phenylacetamides at carbon and silver cathodes in dimethylformamide. *Electrochimica Acta* [online]. 2014, **127**, 159–166. ISSN 0013-4686. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.01.133
- [98] VERLATO, Enrico, Wenyan HE, Abdeltif AMRANE, Simona BARISON, Didier FLONER, Florence FOURCADE, Florence GENESTE, Marco MUSIANI a Roberta SERAGLIA. Preparation of Silver-Modified Nickel Foams by Galvanic Displacement and Their Use as Cathodes for the Reductive Dechlorination of Herbicides. *ChemElectroChem* [online]. 2016, **3**(12), 2084–2092. ISSN 2196-0216. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/celec.201600214
- [99] SALLES, Nara Alonso, Florence FOURCADE, Florence GENESTE, Didier FLONER a Abdeltif AMRANE. Relevance of an electrochemical process prior to a biological treatment for the removal of an organophosphorous pesticide, phosmet. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2010, **181**(1), 617–623. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.05.057
- [100] FONTMORIN, Jean-Marie, Florence FOURCADE, Florence GENESTE, Didier FLONER, Samuel HUGUET a Abdeltif AMRANE. Combined process for 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid treatment—Coupling of an electrochemical system with a biological treatment. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2013, **70**, 17–22. ISSN 1369-703X. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.09.015
- [101] ASASI, Mirvet, Florence FOURCADE, Florence GENESTE, Didier FLONER, Rachida MAACHI a Abdeltif AMRANE. Combined electrochemical and biological treatment for pesticide degradation – application to phosmet. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL RESEARCH (IJER)*. 2011, **5**(1), 41–46. ISSN 1735-6865.
- [102] FONTMORIN, Jean-Marie, J. SIGUIÉ, Florence FOURCADE, Florence GENESTE, Didier FLONER, Isabelle SOUTREL a Abdeltif AMRANE. Combined electrochemical treatment/biological process for the removal of a commercial herbicide solution, U46D®. *Separation and Purification Technology* [online]. 2014, **132**, 704–711. ISSN 1383-5866. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.06.024
- [103] HE, Wenyan, Jean-Marie FONTMORIN, Isabelle SOUTREL, Didier FLONER, Florence FOURCADE, Abdeltif AMRANE a Florence GENESTE. Reductive dechlorination of a chloroacetanilide herbicide in water by a Co complex-supported catalyst. *Molecular Catalysis* [online]. 2017, **432**, 8–14. ISSN 2468-8231. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.mcat.2017.01.021
- [104] CARRAI, Patrizio, Lamberto NUCCI a Francesco PERGOLA. Polarographic Behaviour of Alachlor Application to Analytical Determination. *Analytical Letters* [online]. 1992, **25**(1), 163–172. ISSN 0003-2719. Dostupné z: doi:10.1080/00032719208020017
- [105] FILIP, Jaroslav, Philipp WECHSLER, Josef STASTNY, Veronika MALKOVA, Antonin MINARIK, Stepan VINTER a Josef OSICKA. Simplified synthesis of silver nanoparticles on graphene oxide and their applications in electrocatalysis. *Nanotechnology* [online]. 2020, **32**(2), 25502. ISSN 0957-4484. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6528/abb8a4
- [106] PITSARI, S., E. TSOUFAKIS a Maria D LOIZIDOU. Enhanced lead adsorption by unbleached newspaper pulp modified with citric acid. *Chemical Engineering Journal*

- [online]. 2013, **223**, 18–30. ISSN 1385-8947. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.02.105](https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.02.105)
- [107] KADRY, Ghada, Ehab I ABOELMAGD a Maha M IBRAHIM. Cellulosic-based hydrogel from biomass material for removal of metals from waste water. *Journal of Macromolecular Science, Part A* [online]. 2019, **56**(10), 968–981. ISSN 1060-1325. Dostupné z: [doi:10.1080/10601325.2019.1640063](https://doi.org/10.1080/10601325.2019.1640063)
- [108] NGUYEN, Dang T a Quan T PHAM. A Theoretical and Experimental Study on Esterification of Citric Acid with the Primary Alcohols and the Hydroxyl Groups of Cellulose Chain ($n = 1-2$) in Parched Condition. *Journal of Chemistry* [online]. 2020, **2020**, 8825456. ISSN 2090-9063. Dostupné z: [doi:10.1155/2020/8825456](https://doi.org/10.1155/2020/8825456)
- [109] GRIGORYAN, G. S., Z. G. GRIGORYAN a A. T. MALKHASYAN. Obtaining esters of citric acid with high aliphatic alcohols. *Proceedings of the Yerevan state university*. 2017, **51**(2), 88–91. ISSN 1829-1767.
- [110] PENG, Zhiyuan a Fangeng CHEN. Hydroxyethyl Cellulose-Based Hydrogels with Various Pore Sizes Prepared by Freeze-Drying. *Journal of Macromolecular Science, Part B* [online]. 2010, **50**(2), 340–349. ISSN 0022-2348. Dostupné z: [doi:10.1080/00222341003772217](https://doi.org/10.1080/00222341003772217)
- [111] ERCEG, Tamara, Alena STUPAR, Miroslav CVETINOV, Vesna VASIĆ a Ivan RISTIĆ. Investigation the correlation between chemical structure and swelling, thermal and flocculation properties of carboxymethylcellulose hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2021, **138**(10), 50240. ISSN 0021-8995. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1002/app.50240](https://doi.org/10.1002/app.50240)
- [112] DEMITRI, Christian, Roberta DEL SOLE, Francesca SCALERA, Alessandro SANNINO, Giuseppe VASAPOLLO, Alfonso MAFFEZZOLI, Luigi AMBROSIO a Luigi NICOLAIS. Novel superabsorbent cellulose-based hydrogels crosslinked with citric acid. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2008, **110**(4), 2453–2460. ISSN 0021-8995. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1002/app.28660](https://doi.org/10.1002/app.28660)
- [113] SOTOLÁŘOVÁ, Jitka, Štěpán VINTER a Jaroslav FILIP. Cellulose derivatives crosslinked by citric acid on electrode surface as a heavy metal absorption/sensing matrix. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2021, **628**, 127242. ISSN 0927-7757. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127242](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127242)

7. PŘÍLOHY

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Příloha P.1 – <i>J. Filip, J. Šefčovičová, P. Gemeiner, J. Tkac, Electrochim. Acta 87, 2013, 366-374</i> | 75 |
| Příloha P.2 – <i>J. Filip, J. Tkac, Bioelectrochemistry 96, 2014, 14-20</i> | 88 |
| Příloha P.3 – <i>J. Filip, J. Tkac, Electrochim. Acta 136, 2014, 340-354</i> | 97 |
| Příloha P.4 – <i>J. Filip, J. Šefčovičová, P. Gemeiner, J. Tkac, Key Eng. Mater. 543, 2013, 13-17</i> | 112 |
| Příloha P.5 – <i>J. Filip, J. Tkac, Electrochem. Commun. 49, 2014, 70-74</i> | 117 |
| Příloha P.6 – <i>J. Filip, A. Andicsová-Eckstein, A. Vikartovská, J. Tkac, Biosens. Bioelectron. 89, 2017, 384-389</i> | 122 |
| Příloha P.7 – <i>J. Filip, P. Gemeiner, J. Tkáč, Študentská vedecká konferencia Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave, Sborník recenzovaných príspevkov, 2011, 847-852</i> | 133 |
| Příloha P.8 – <i>J. Filip, R. Monosik, J. Tkac, Int. J. Electrochem. Sci. 9, 2014, 2491-2509</i> | 139 |
| Příloha P.9 – <i>M. Ilčíková, J. Filip, M. Mrlik, T. Plachý, J. Tkáč, P. Kasák, Int. J. Electrochem. Sci. 10, 2015, 6558-6571</i> | 155 |
| Příloha P.10 – <i>J. Šefčovičová, J. Filip, V. Mastihuba, P. Gemeiner, J. Tkac, Biotechnol. Lett. 34, 2012, 1033-1039</i> | 169 |
| Příloha P.11 – <i>J. Šefčovičová, J. Filip, J. Tkac, Chem. Pap. 69, 2015, 176-182</i> | 176 |
| Příloha P.12 – <i>J. Filip, S. Zavahir, L. Klukova, J. Tkac, P. Kasak, J. Electroanal. Chem 794, 2017, 156-163</i> | 183 |
| Příloha P.13 – <i>J. Filip, A. Popelka, T. Bertok, A. Holazova, J. Osicka, J. Kollar, M. Ilcikova, J. Tkac, P. Kasak, Langmuir 33, 2017, 6657-6666</i> | 191 |
| Příloha P.14 – <i>J. Filip, S. Zavahir, L. Lorencova, T. Bertok, A. B. Yousaf, K. A. Mahmoud, J. Tkac, P. Kasak, J. Electrochem. Soc. 166, 2019, H54-H62</i> | 206 |
| Příloha P.15 – <i>J. Filip, S. Vinter, P. Skacelik, J. Sotolarova, K. Borska, J. Osicka, J. Electrochem. Soc. 168, 2021, 037504</i> | 215 |
| Příloha P.16 – <i>J. Filip, P. Wechsler, J. Stastny, V. Malkova, A. Minarik, S. Vinter, J. Osicka, Nanotechnology 32, 2020, 025502</i> | 231 |

Příloha P.17 – *J. Sotolářová, Š. Vinter, J. Filip, Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 628, 2021, 127242*249