

**MILKICA JANEVA**

**Index 31147**

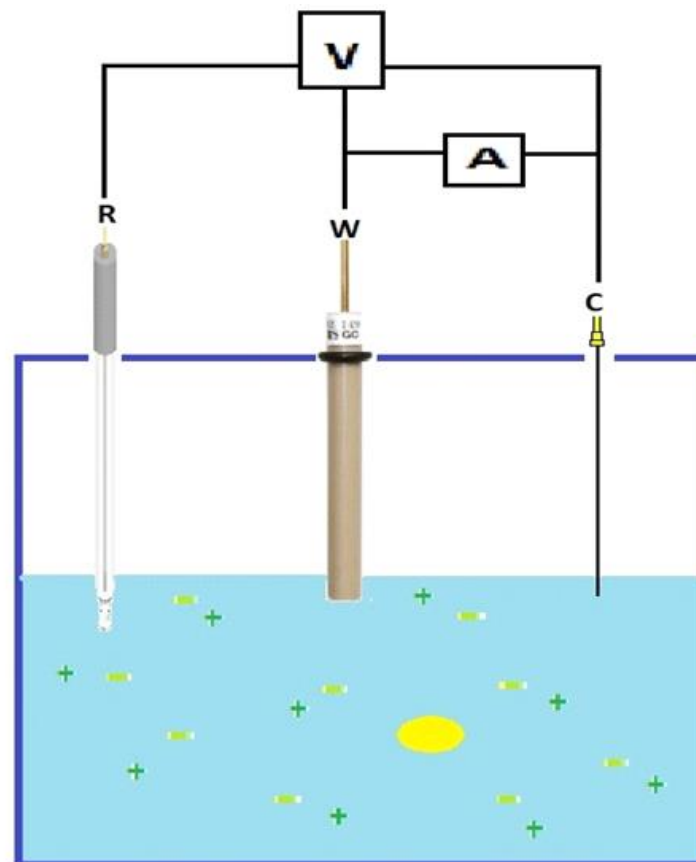
**Theoretical study of activity of  
redox enzymes with protein-film  
square-wave voltammetry  
-PhD-Seminar-**

**Supervisor:**

**Prof Rubin Gulaboski**

# ШТО Е ВОЛТАМЕТРИЈА?

Волтаметријата претставува електроаналитичка метода во која информацијата за аналитот се изведува преку мерењето на струјата како функција од потенцијалот применет врз работната електрода



евтина  
и брза

разни  
варијатни и  
модификации

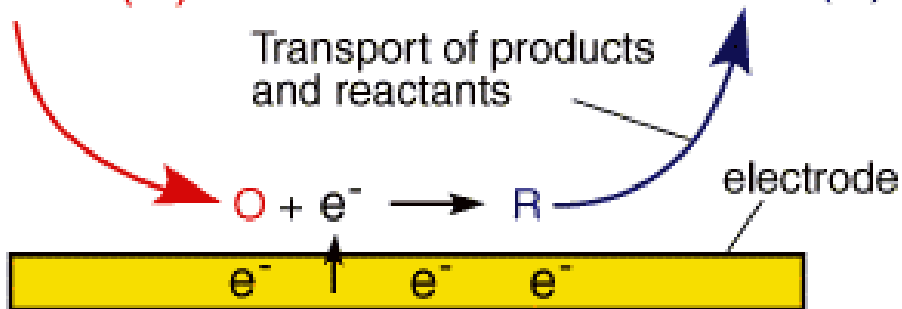
осетливи во  
микро и  
милимоларна  
конц. на S

# ИНСТРУМЕНТАЦИЈА



Reactant (O)

Product (R)

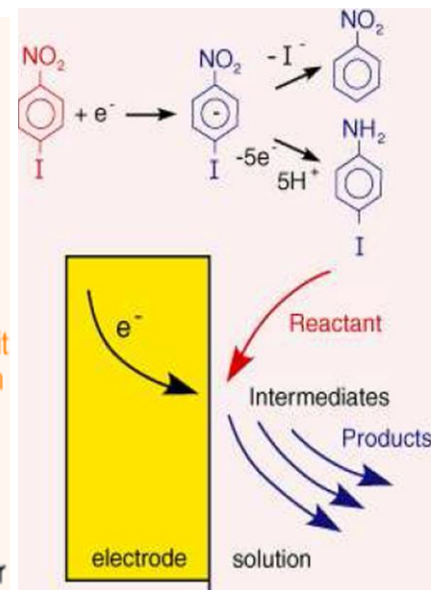
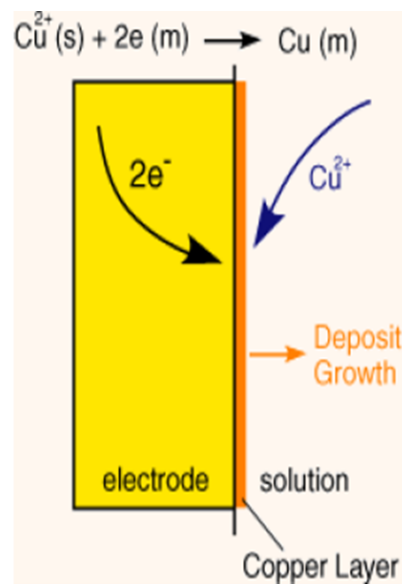
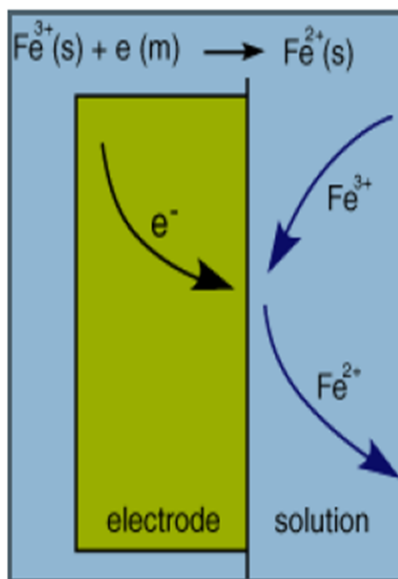
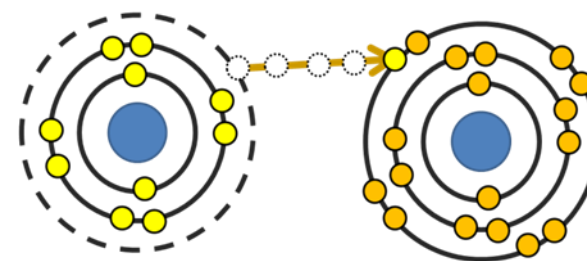


Oxidation

(atom loses an electron)

Reduction

(átomo gains an electron)

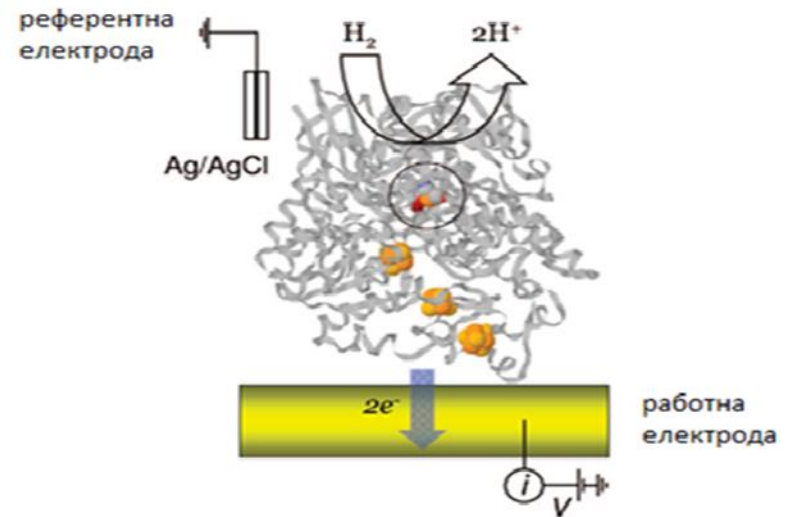
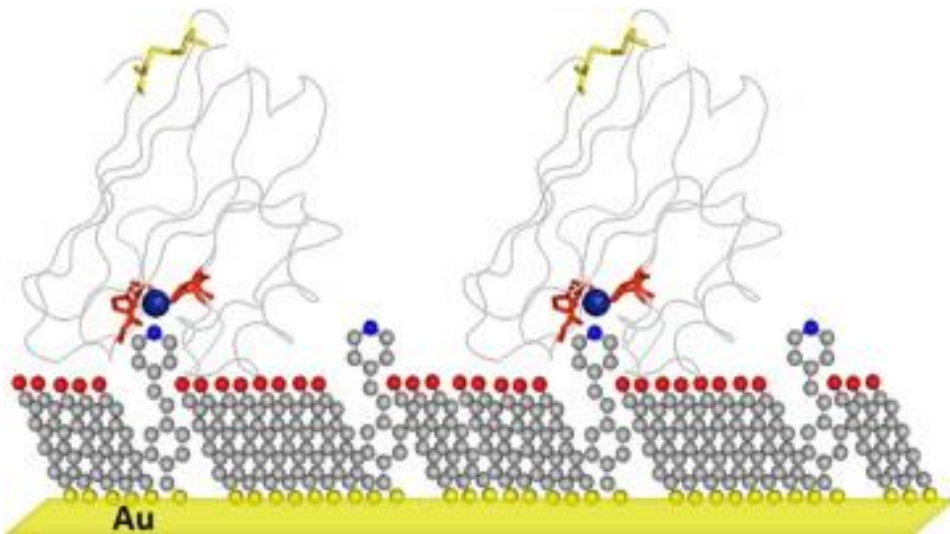


Редукцијата или оксидацијата на супстанција на површината на работната електрода, на соодветно применет потенцијал, резултира со транспорт на маса на новиот материјал на површината на електродата и генерирање на струја.

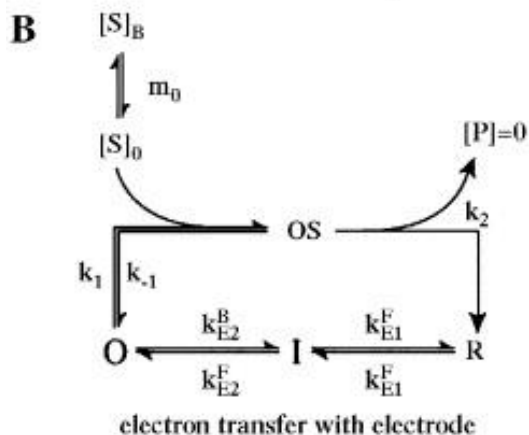
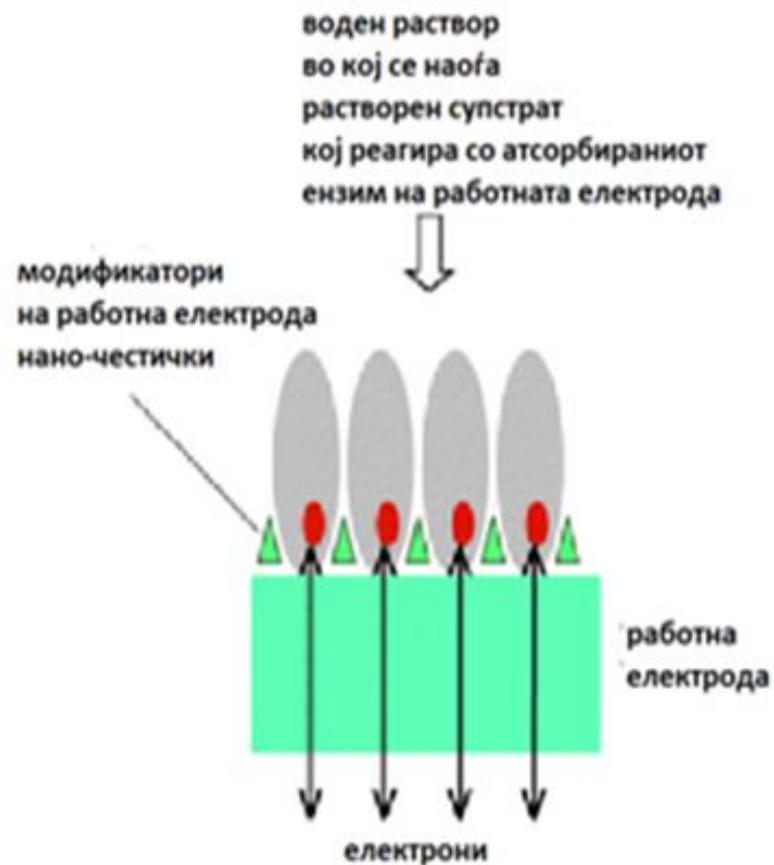
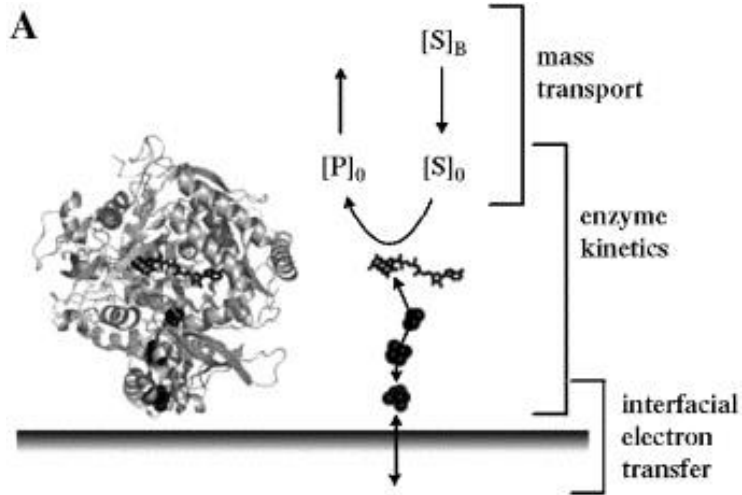
# АНАЛИТИЧКИ ИНФОРМАЦИИ И УПОТРЕБА НА ВОЛТАМЕТРИЈАТА

- *Квалитативни*
- *Квантитативни*
- Мерење на кинетички параметри и константи на брзина на хемиски реакции
- • Одредување на процесите на апсорпција на површините од работните електроди
- • Одредување на кинетика на трансфер на електрони и механизми на реакција
- Основни студии на процесите на оксидација и редукција во различни медиуми
- • Одредување на вредности на комплексирачки константи при формирање на комплекси
- Опредлеување на СИЛАТА НА ИНТЕРАКЦИИ ПОМЕЃУ ЛЕКОВИ или помеѓу ензими и супстрати...

# ПРОТЕИН-ФИЛМ ВОЛТАМЕТРИЈА



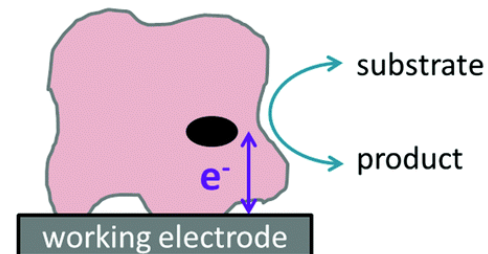
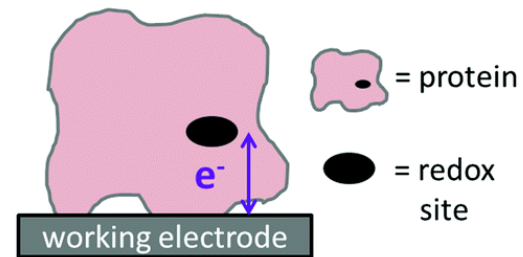
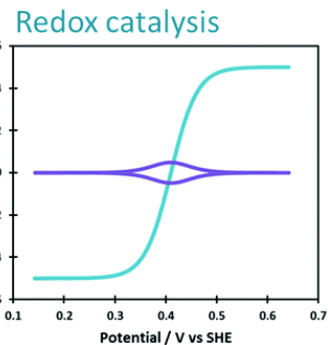
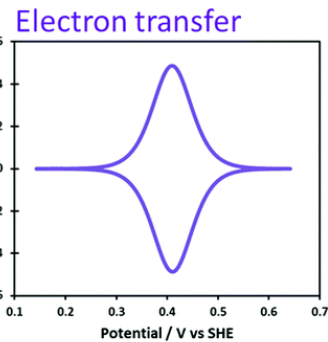
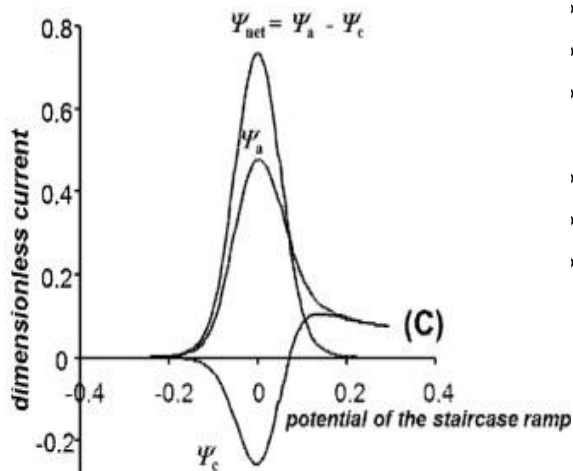
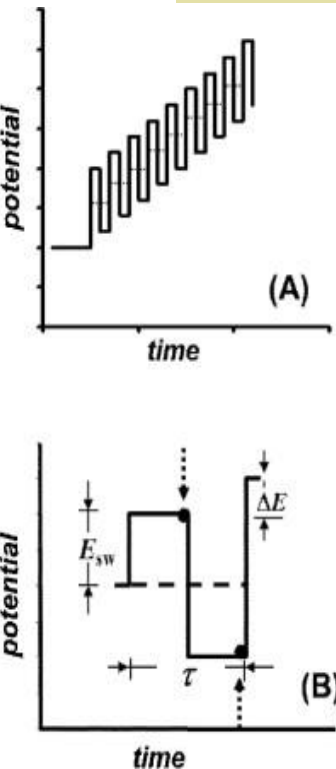
**ПРОТЕИН-ФИЛМ ВОЛТАМЕТРИЈА** е релативно нов пристап кон проучувањето на т.н. редокс ензими, при што се темели на концептот дека примерокот од редокс протеин е конфигуриран како филм на електрода и испитуван со различни електрохемиски техники. Ензимските молекули се врзани на површината на електродата на таков начин што има брз пренос на електрони и целосно задржување на хемијата на активното место.



Промените во потенцијалот на електродата резултираат со движење на електрони до, од и во рамките на ензимот-оваа појава се манифестира преку проток на струја што варира на карактеристични начини со промена на времето и потенцијалот.

Високата каталитичка активност (односно големата кинетика на реакција помеѓу ензимот и даден супстрат) предизвикува зголемување на струјата, а корисни информации може да се добијат дури и ако покриеноста на електродата е ниска. Одредени ензими покажуваат оптимална активност на одреден потенцијал, и ова може да даде информации за механизмот и исто така да биде физиолошки релевантно.

# КВАДРАТНО-БРАНОВА ВОЛТАМЕТРИЈА-SWV ТЕХНИКА СО КОЈА ЌЕ РАБОТИМЕ



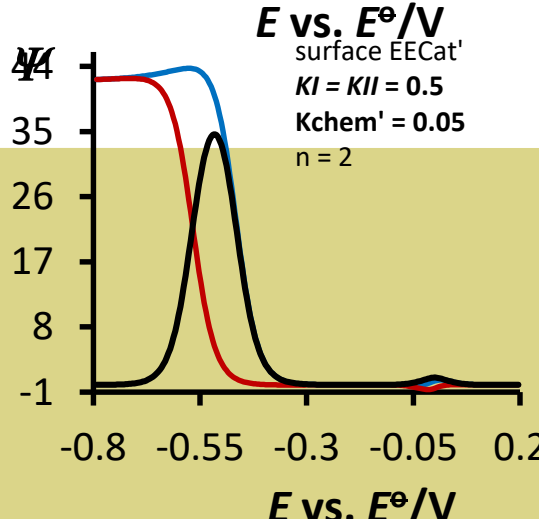
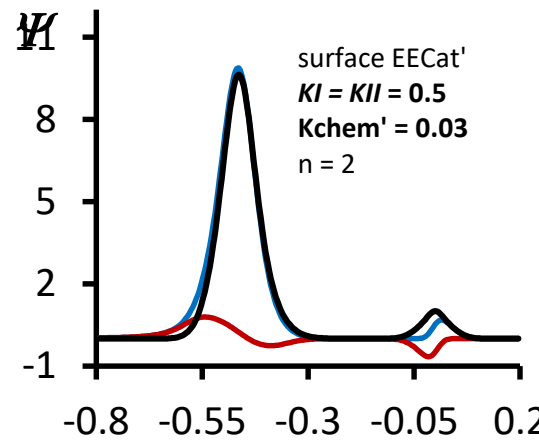
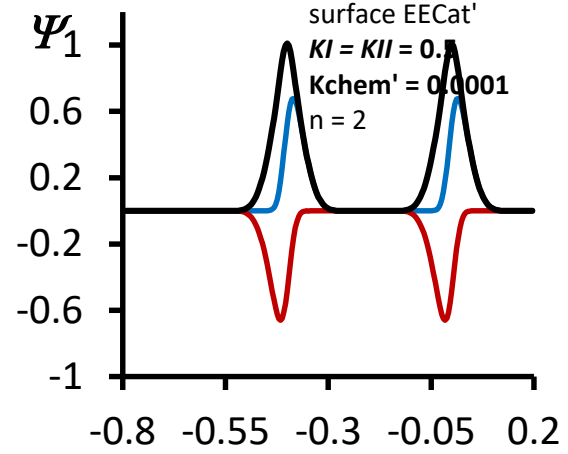
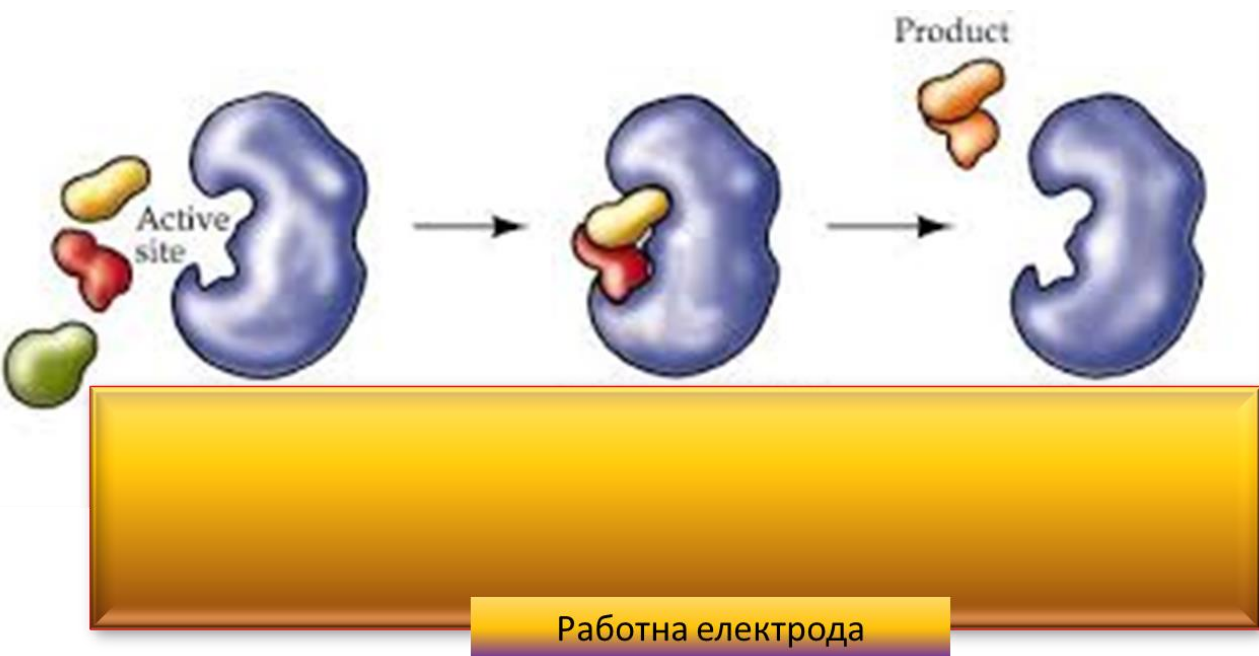
Екситацискиот сигнал кај SWV се состои од симетричен квадратно-бранов пулс со висина т.е. амплитуда  $E_{sw}$  што е нанесена на скалила од бранови чиј чекор се менува со вредност  $\Delta E$  во текот на времето.

-Струите измерени во оксидациските пулсеви се позитивни, а оние измерени во редуциските пулсеви се негативни. ВКУПНАТА струја на волтамограмот се добива како разлика меѓу оксидациските (+) и редуциските (-) струи .

-Висина на ВКУПНИОТ пикот е директно пропорционална со концентрацијата на електроактивните видови како и со кинетиката на електродната реакција, а е поврзана и со одвивање на дополнителни хемиски реакции во електрохемиската ќелија

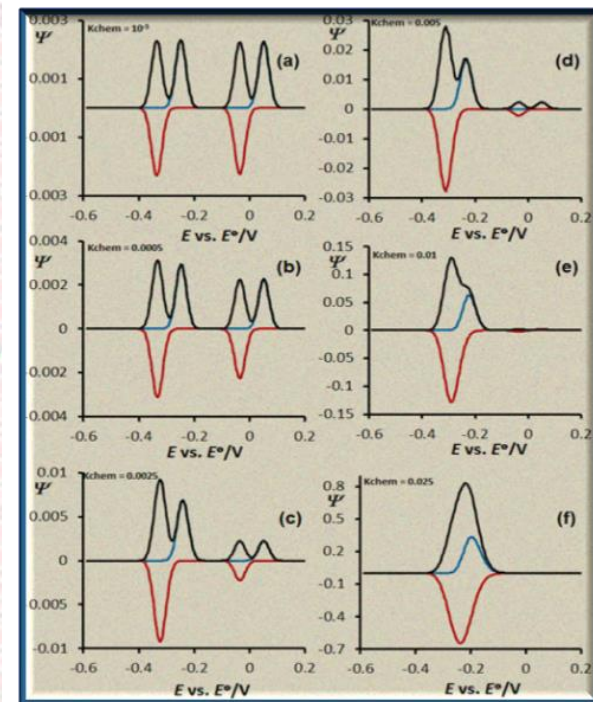
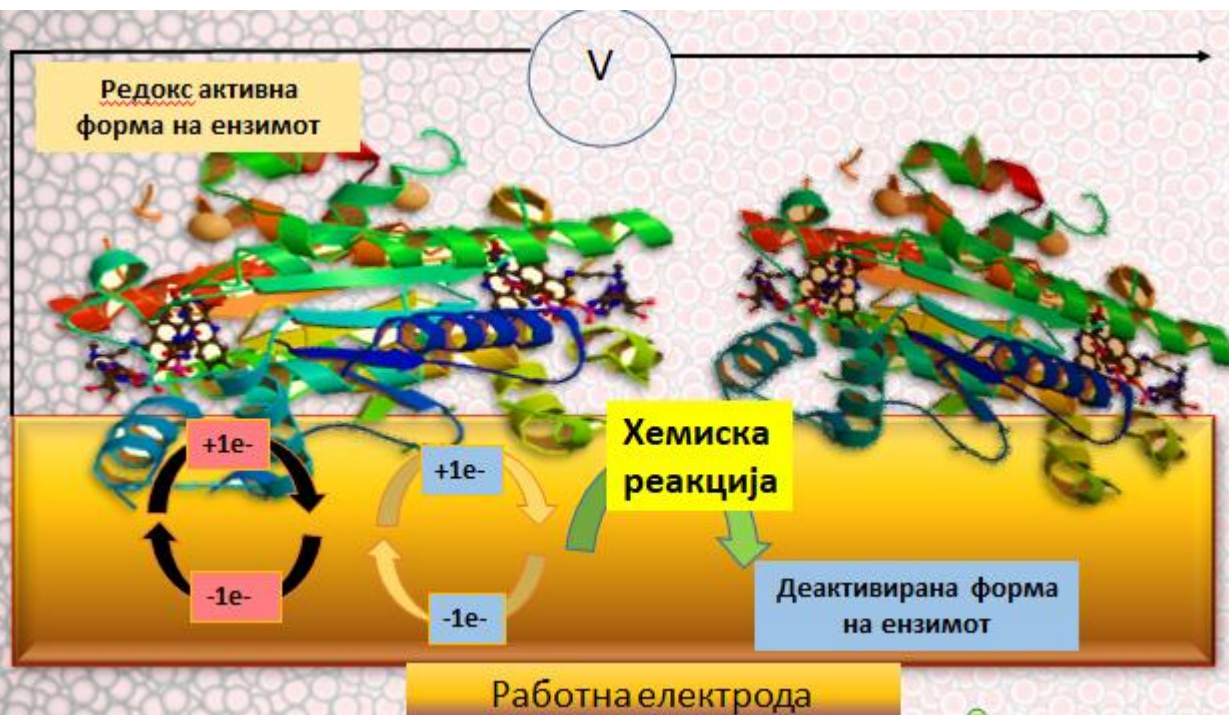


**МЕХАНИЗМОТ, КИНЕТИКАТА И ТЕРМОДИНАМИКАТА НА ЕНЗИМСКО-СУПСТРАТНИ РЕАКЦИИ МОЖЕ МНОГУ ЛЕСНО И ЕФЕКТИВНО ДА СЕ СТУДИРА СО ПОМОШ НА ТЕХНИКАТА ПРОТЕИН-ФИЛМ ВОЛТАМЕТРИЈА КОГА КАКО РАБОТНА ТЕХНИКА СЕ УПОТРЕБИ КВАДРАТНО-БРАНОВА ВОЛТАМЕТРИЈА**



Од својствата на симулираните волтамограми (т.е. од нивната форма, позиција, висина, полуширина, раздвоеност на потенцијалната скалаво и сл) кои може да се менуваат **само со промена на концентрацијата на супстратот**, може да се определат сите релевантни физички параметри за ензимско супстратните реакции и за денатурацијата на ензимите

ДОКОЛКУ ЛИПОФИЛЕН РЕДОКС АКТИВЕН ЕНЗИМ СЕ АПСОРБИРА (ИМОБИЛИЗИРА) НА РАБОТНАТА ЕЛЕКТРОДА И ДОКОЛКУ МОЖЕ ДА РАЗМЕНУВА ЕЛЕКТРОНИ СО РАБОТНАТА ЕЛЕКТРОДА, ТОГАШ, СО ПОМОШ НА СВОЈСТВАТА НА ВОЛТАМОГРАМИТЕ СИМУЛИРАНИ ЗА ДАДЕН МОДЕЛ ВО КВАДРАТНО-БРАНОВА ВОЛТАМЕТРИЈА МОЖЕ ДА СЕ ОПРЕДЕЛАТ ГОЛЕМ БРОЈ ФИЗИЧКИ ПАРАМЕТРИ ШТО СЕ РЕЛЕВАНТНИ ЗА АКТИВНОСТА НА ТОЈ ЕНЗИМ, КАКО НА ПРИМЕР:



стабилноста на ензимот: -механизмот на електрохемиска трансформација

кинетика на ензимска електродна реакција

денатурација на ензимите: брзина на реакција на денатурација

кинетички параметри (кинетика на реакција) на реакцијата на ензимот со даден супстрат

термодинамички параметри (константа на рамнотежа); константа на комплексирање

# “НУМЕРИЧКО СИМУЛИРАЊЕ НА SW-ВОЛТАМОГРАМИ СО MATHCAD,, ВО ТЕХНИКАТА ПРОТЕИН-ФИЛМ ВОЛТАМЕТРИЈА НА ЕНЗИМИ

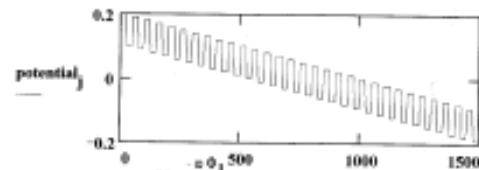
- MATHCAD е програм за нумеричко симулирање на SW-волтамограми
- Разработени ќе бидат преку соодветни математички модели неколку важни ензимско-супстратни реакции, како и реакции на денатурација на мембрански ензими (површински EC и CE реакции, како и двостепени површински EEC, ECE и EECat механизми)
- Симулирањето на овие механизми ќе биде изведено со Математички програмски пакет MATHCAD
- Симулациите ќе дадат одговори и дијагностички критериуми за препознавање на механизмот што се одвива помеѓу ензимот и даден супстрат. Покрај тоа, преку моделите ќе бидат предложени **НОВИ МЕТОДСКИ ПРИСТАПИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА КИНЕТИКАТА И ТЕРМОДИНАМИКАТА на ЕНЗИМСКО-СУПСТРАТНИТЕ РЕАКЦИИ** или на кинетиката на денатурирање на ензимите
- *Тоа ќе биде овозможено со проучување на теоретските функционални зависимости помеѓу параметрите на квадратно-брановиот одзив и кинетичките параметри на редокс-реакцијата како и параметрите на ексцитациониот сигнал*

$$E_s = 0.15 \Delta E = 0.3 \quad dE = 0.01 \quad E_{sw} = 0.05 \quad K = 10$$

$$n = 1 \quad F = 96500 \quad R = 8.314 \quad T = 298.15 \quad \alpha = 0.5$$

$$j = 1 \dots \frac{\Delta E}{dE} 50 \quad (I)$$

$$\text{potential}_j = E_s + E_{sw} - \left[ \left( \text{ceil} \left( \frac{j-1}{25} \right) \right) dE + \text{if} \left( \frac{\text{ceil} \left( \frac{j}{25} \right)}{2} = \text{ceil} \left( \frac{j-1}{25} \right), 1, -1 \right) \cdot E_{sw} + E_{sw} \right] - dE \quad (II)$$



Plot 1

$$\Phi_j = n \frac{F}{R \cdot T} \text{potential}_j \quad (III)$$

$$k = 2 \dots \frac{\Delta E}{dE} 50$$

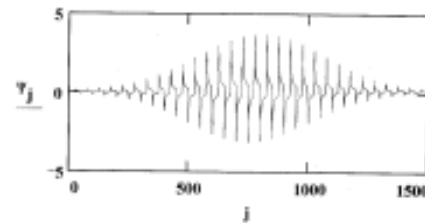
$$S_k = \sqrt{k} - \sqrt{k-1}$$

$$\Psi_1 = \frac{K e^{-\alpha \Phi_1} j}{1 + 2 \cdot K \cdot \left[ \frac{1}{(50-j)^2} \cdot (1 + e^{\Phi_1}) \right] \cdot e^{-\alpha \Phi_1}}$$

$$\Psi_k = \frac{K e^{-\alpha \Phi_k} \left[ 1 - 2 \cdot \frac{1}{(50-j)^2} \cdot (1 + e^{\Phi_k}) \right] \cdot \sum_{i=1}^{k-1} \Psi_i \cdot S_{k-1+i}}{1 + 2 \cdot K \cdot \left[ \frac{1}{(50-j)^2} \cdot (1 + e^{\Phi_k}) \right] \cdot e^{-\alpha \Phi_k}}$$

$$(IV)$$

$$(V)$$



Plot 2

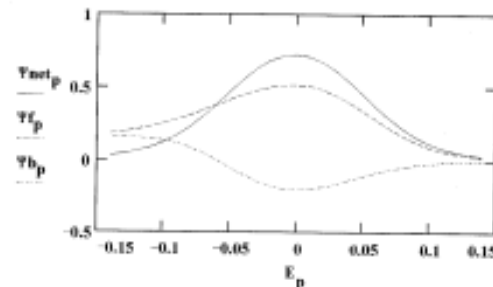
$$p = 1 \dots \left( \frac{\Delta E}{dE} \right) - 1$$

$$\Psi_{b_p} = \Psi_{50p+25} \quad (VI)$$

$$\Psi_{f_p} = \Psi_{(p+1)50} \quad (VII)$$

$$\Psi_{net_p} = \Psi_{f_p} - \Psi_{b_p} \quad (VIII)$$

$$E_p = E_s - p \cdot dE \quad (IX)$$



Plot 3.

MATCAD датотеката создадена за нумеричка симулација на SW волтамограми на квази-реверзибилна редокс реакција

# Објавени резултати од досегашната работа -2 трудови во списанија со ИМПАКТ ФАКТОР = 2.85

Wiley Online Library

Search



Login / Register

## ELECTROANALYSIS

An International Journal Devoted to Electroanalysis, Sensors and Bioelectronic Devices

Full Paper

### New Aspects of Protein-film Voltammetry of Redox Enzymes Coupled to Follow-up Reversible Chemical Reaction in Square-wave Voltammetry

Rubin Gulaboski , Milkica Janeva, Viktorija Maksimova

First published: 15 February 2019 | <https://doi.org/10.1002/elan.201900028>

[Read the full text >](#)



PDF



TOOLS



SHARE

### Abstract

Protein-film square-wave voltammetry of uniformly adsorbed molecules of redox lipophilic enzymes is applied to study their electrochemical properties, when a reversible follow-up chemical reaction is coupled to the electrochemically generated product of enzyme's electrode reaction. Theoretical consideration of this so-called "surface ECre



[Volume 31, Issue 5](#)

May 2019

Pages 946-956



Related



Information

### Metrics

Am score 0

### Details

© 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

### Keywords

enzymatic voltammetry



# ELECTROANALYSIS

*An International Journal Devoted to Electroanalysis, Sensors and Bioelectronic Devices*

Full Paper

## Protein-film Voltammetry of Two-step Electrode Enzymatic Reactions Coupled with an Irreversible Chemical Reaction of a Final Product—a Theoretical Study in Square-wave Voltammetry

Pavlinka Kokoskarova, Viktorija Maksimova, Milkica Janeva, Rubin Gulaboski

First published: 16 May 2019 | <https://doi.org/10.1002/elan.201900225>

[Read the full text >](#)



PDF



TOOLS



SHARE

### Abstract

Redox mechanisms in which a consecutive two-step electrode transformation occurs, and the product generated in the second electrochemical step at the electrode surface is coupled to a follow-up irreversible chemical reaction, is theoretically considered under conditions of square-wave voltammetry. The electrochemical description of considered



[Early View](#)

Online Version of Record before inclusion in an issue



Related



Information

### Metrics

score 0

### Details

© 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

### Keywords

two-step electrode mechanisms

*Abstract*

# Getting Insight into Enzymes Kinetics and Thermodynamics via Theoretical Models in Protein-film Square-wave Voltammetry †

Milkica Janeva<sup>1</sup>, Viktorija Maksimova<sup>1</sup>, Rubin Gulaboski<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Goce Delcev University, Faculty of Medical Sciences; [milkica.janeva@ugd.edu.mk](mailto:milkica.janeva@ugd.edu.mk), [viktorija.maksimova@ugd.edu.mk](mailto:viktorija.maksimova@ugd.edu.mk), [rubin.gulaboski@ugd.edu.mk](mailto:rubin.gulaboski@ugd.edu.mk)

\* Correspondence: [rubin.gulaboski@ugd.edu.mk](mailto:rubin.gulaboski@ugd.edu.mk);

† Presented at the 7th International Symposium on Sensor Science, Napoli, Italy, 9-11 May 2019

**Abstract:** We present in this work several relevant theoretical models of Protein-film square-wave voltammetry of uniformly adsorbed molecules of redox enzymes. Theoretical consideration of several one-electron step and two-electron step mechanisms that are coupled to preceding, follow up or regeneration (catalytic) chemical steps under conditions of square-wave voltammetry reveal many new aspects, especially by enzymatic electrode reactions featuring fast electron transfer. We show in this work that the phenomena of “split net-SWV peak” and “quasireversible maximum”, which are typical for simple protein-film reactions studied in square-wave voltammetry, are

## References

1. **Gulaboski, Rubin** *Theoretical Contribution Towards Understanding Specific Behaviour of “Simple” Protein-film Reactions in Square-wave Voltammetry.* ***Electroanalysis***, 31 (2019) 545-553
2. **Gulaboski Rubin**, Milkica Janeva, Viktorija Maksimova, “New Aspects of Protein-film Voltammetry of Redox Enzymes Coupled to Follow-up Reversible Chemical Reaction in Square-wave Voltammetry”, ***Electroanalysis***, 31 (2019) 846-956.
3. **Gulaboski, Rubin** and Kokoskarova, Pavlinka and Petkovska, Sofija (2018) *Time-Independent Methodology to Access Michaelis-Menten Constant by Exploring Electrochemical-Catalytic Mechanism in Protein-Film Cyclic Staircase Voltammetry.* ***Croatica Chemica Acta***, 91 (3) 377-382.
4. **Gulaboski, R.** Petkovska, S. A time-independent approach to evaluate the kinetics of enzyme-substrate reactions in cyclic staircase voltammetry, ***Anal&Bioanal Electrochem.*** 10 (2018) 566-575;
5. **Rubin Gulaboski, Valentin Mirceski**, *New aspects of the electrochemical-catalytic (EC') mechanism in square-wave voltammetry*, ***Electrochimica Acta***, 167, 2015, 219-225.
6. **Rubin Gulaboski**, Valentin Mirčeski and Fritz Scholz, “*Determination of the standard Gibbs energies of transfer of cations and anions of amino acids and small peptides across the water nitrobenzene interface.*”, ***Amino Acids***, 24 (2003) 149-154
7. P. Kokoskarova, M. Janeva, V. Maksimova, R. Gulaboski, **Protein-film Voltammetry of Two-step Electrode Enzymatic Reactions Coupled with an Irreversible Chemical Reaction of a Final Product-a Theoretical Study in Square-wave Voltammetry**, ***Electroanalysis*** (2019) [doi.org/10.1002/elan.201900225](https://doi.org/10.1002/elan.201900225)



**ВИ БЛАГОДАРАМ ЗА ВНИМАНИЕТО !!!**

