

VILNIAUS UNIVERSITETAS
BIOCHEMIJOS INSTITUTAS

Ilja Ignatjev

**ESTERAZIŲ VEIKIMO FAZIŲ SĄLYČIO RIBOJE
DETEKCIJA**

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2009

Disertacija rengta 2004-2008 metais Biochemijos institute.

Mokslinis vadovas:

doc. dr. Gintaras Valinčius (Biochemijos institutas, fiziniai mokslai,
biochemija – 04 P)

TURINYS

Turinys	3
Santrumpų sąrašas	6
Įvadas	8
1. Literatūros apžvalga	13
1.1. Fermentai ir jų klasifikacija.....	13
1.2. Fermentinės reakcijos, vykstančios fazių riboje.....	16
1.3. Faktoriai, įtakojantys fermentinių reakcijų greitį: pH ir temperatūra.....	18
1.4. Esterazių lipolizės molekuliniai mechanizmai.....	22
1.4.1. <i>Thermomyces lanuginosus</i> lipazė.....	22
1.4.2. Fosfolipazė A ₂ : bičių nuodų ir kiaulės kasos.....	27
1.5. Eksperimentiniai esterazių hidrolitinio aktyvumo nustatymo metodai.....	31
1.5.1. Titrimerijos metodas.....	32
1.5.2. Spektroskopiniai (spektrofotometrinis, infraraudonoji spektroskopija, fluorimetrija) metodai.....	32
1.5.3. Chromatografiniai metodai.....	34
1.5.4. Kontroliuojamo įtempimo sudarymo sąlyčio paviršiuje metodas.....	35
1.5.5. Nefelometrija ir turbidimetrija.....	36
1.5.6. Radiometrija.....	37
1.5.7. Atominės jėgos mikroskopija.....	38
2. Medžiagos ir tyrimo metodai	39
2.1. Aparatūra.....	39
2.2. Medžiagos ir reagentai.....	39
2.3. Tirpalai.....	41
2.4. Hidrolizės reakcijos substratų sintezė.....	42
2.5. Elektrocheminiai metodai.....	50
2.5.1. Ciklinė voltamperometrija.....	50

2.5.2. Sukamojo diskinio elektrodo metodus	55
2.5.3. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodus.....	57
2.6. Spektroskopiniai metodai.....	61
2.6.1. Sustiprintos paviršiumi IR adsorbcijos spektroskopijos (SEIRA) metodus.....	61
2.6.2. ATR–FT–IR spektroskopijos metodus.....	63
2.6.3. Suminio dažnio generacijos (SDG) spektroskopija.....	69
2.6.4. Paviršiaus plazmono rezonanso (PPR) spektroskopija.....	73
3. Rezultatai ir jų aptarimas.....	76
3.1. Elektrocheminė lipazių detekcija, naudojant sintetinius, paviršiuje fizisorbuotus substratus.....	76
3.1.1. Redokso aktyvaus lipazei jautraus substrato formavimo sąlygų ant kieto pagrindo tyrimas.....	76
3.1.2. Elektrocheminio signalo mažėjimas, vykstant hidrolizei, ir jo fermentinės prigimties įrodymas.....	86
3.1.3. Maksimalios fermento koncentracijos nustatymas ant elektrodo paviršiaus PPR ir ATR-FT-IR metodais	93
3.1.4 Stereoselektyvaus fermentinio aktyvumo įvertinimas elektrocheminės detekcijos metodu.....	100
3.2. PDCHQ kaip substrato panaudojimas esterazių aktyvumui tirti.....	103
3.2.1. Lipazių aktyvumo fazių riboje oras/vanduo (SDG) tyrimas.....	103
3.2.2. Lipazės aktyvumo nustatymas SDE metodu, naudojant naujus sintetinius micles formuojančius substratus (PDCHQ).....	116
3.3. OPNQ kaip substrato panaudojimas esterazių aktyvumui tirti.....	120
3.3.1. Lipolitinio esterazės aktyvumo nustatymas, naudojant OPNQ gebą absorbuotis ant stiklo grafitinio elektrodo paviršiaus...	120

3.3.2. OPNQ micelių panaudojimas esterazių katalitiniam aktyvumui tirti UV-VIS spektroskopiniu metodu. Palyginimas su elektrocheminiu metodu.....	127
3.4. Fosfolipazių aktyvumo tyrimas, naudojant paviršiuje imobilizuotus fosfolipidinius bisluoksnius.....	130
3.4.1. Bisluoksnių formavimas ir jų elektriniai parametrai.....	130
3.4.2. Elektrocheminio impedanso spektro kitimo taikymas fermentiniam aktyvumui detektuoti.....	133
3.4.3. EIS signalo panaudojimas fermentų aktyvumo detekcijai (palyginami išskirtos iš bičių nuodų ir kiaulės kasos fosfolipazės bei <i>TLL</i> aktyvumai).....	135
Išvados	139
Publikacijos disertacijos tema	140
Padėka	142
Literatūros sąrašas	143

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

Γ_{O} – medžiagos oksiduotos formos kiekis, adsorbuotas ant paviršiaus (mol/cm²)

Γ_{R} – medžiagos redukuotos formos kiekis, adsorbuotas ant paviršiaus (mol/cm²)

1-ODT – 1-oktadekantiolis

2 ME (arba β ME) – 2-merkptoetanolis

A – elektrodo plotas

AJM – atominės jėgos mikroskopija

ATP – adenozintrifosfatas

ATR-FT-IR – visiško vidinio atspindžio Furje transformacijų infraraudonoji spektroskopija

BrNFcP – 9-bromnonil-5'-ferocenilpentanoatas

C_{o}^* – elektroaktyvios medžiagos koncentracija tirpale (mol/cm³)

CV – ciklinė voltamperometrija

DCHFp – 2,3-diciano-4-hidroksifenilpropionatas

DFcP – dekanoil-5'-ferocenilpentanoatas

D_{o} – elektroaktyvios medžiagos difuzijos koeficientas

DOPC – 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocholinas

DTGS – deuteruotas triglicinsulfato detektorius

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis

E_{gal} – galutinis potencialas

EIS – elektrocheminio impedanso spektroskopija

E_{pr} – pradinis potencialas

F – Faradėjaus konstanta (96 500 C/mol)

FPOHD – 1,16-di-(5'-ferocenilpentanoiloksi)heksadekanas

FPONDS – 9-(5'-ferocenilpentanoiloksi)nonildisulfidas

HNQ – 2-hidroksi-1,4-naftochinonas

LU – lipazės aktyvumo vienetas, kuris parodo, kiek μmol gliceroltributirato hidrolizuoja per vieną minutę

MNFcP – 9-merkaptanonil-5'-ferocenilpentanoatas

MNMFP – (\pm)9-merkaptanonil-3-metil-5'-ferocenilpentanoatas

n – elektronų, dalyvaujančių redokso reakcijoje, skaičius

Nd:YAG – lazerio kietojo kūno sutrumpinimas, kurį galima užrašyti chemine formule $\text{Nd}^{3+}:\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$

NOCHROMIKSas – 8,3% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ koncentruotos sieros rūgšties tirpalas

OPNQ – 2-oksipalmitoil-1,4-naftochinonas

PDCHQ – *O*-palmitoil-2,3-dicianohidrochinonas

PEG tiolis – polietilenglikolio tiolis ($n = 6$)

POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocholinas

PPR – paviršiaus plazmono rezonansas

PR – palmitino rūgštis

SDE – sukamasis diskinis elektrodas

SDG – suminio dažnio generacijos spektroskopija

SEIRA – paviršiaus sustiprinta infraraudonosios spinduliuotės absorbcinė spektroskopija (“surface enhanced IR absorption” spectroscopy)

SM – savitvarkis monosluoksnis

SNKE – užpildytas sočiuoju natrio chlorido tirpalu kalomelio elektrodas

SSCE – užpildytas sočiuoju natrio chlorido tirpalu sidabro chloridinis elektrodas

SVE – standartinis vandenilio elektrodas

tBLM – prikabinta bisluoksnė membrana

TLL – *Thermomyces lanuginosus* lipazė

Tweens – įvairaus grandinės ilgio polietilenglikoliai

V_E – potencialo skleidimo greitis

WC14 – 20-tetradeciloksi-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatrikontan-1-tiolis (*Wilmos* junginys)

ω – sukamojo diskinio elektrodo sukimosi greitis

ν – kinematinis klampis

ĮVADAS

Šiame darbe tiriami baltymai, priklausantys didelei hidrolazių (taip pat vadinamos esterazėmis) fermentų klasei ir esterazių pogrupiui 3.1.1.x. Esterazės visada buvo dėmesio centre dėl jų fiziologinių savybių ir funkcijų įvairovės. Priklausomai nuo to, iš kur jos yra išskirtos, kinta ir jų savybės bei funkcijos. Pvz., lipazės, išskirtos iš organizmo kasos, dalyvauja maistinių lipidų skaldyme, kurio metu susidarę produktai lengvai įsisavinami bei pernešami organizme. Tuo tarpu lipazės, išskirtos iš grybelių arba bakterijų, palengvina medžiagų patekimą iš išorės, o patogeninių mikrobu sekretuojamos lipazės padeda jiems patekti į šeimininko organizmą. Taip pat esterazės gali dalyvauti uždegiminiuose procesuose, pavyzdžiui, bičių arba vapsvos nuodų fosfolipazei A₂ sąveikaujant su fosfolipidais, įeinančiais į membranos sudėtį, išskiriama arachidono rūgštis, kuri yra prostaglandinų, tramboksanų, leukotrienų biosintezės pirmtakas. Žmogaus organizmo virškinimo procesuose taip pat veikia lipazės, kurios sekretuojamos iš kasos ir kepenų. Baltymai, išskirti iš mikroorganizmų, labai plačiai naudojami: maisto pramonėje (pvz., fermentinio sūrio gamyboje), kosmetikoje, riebalų skaidymui, kaip skalbimo miltelių priedas, medicinoje (vaistų gamyboje), atskiriant optinius izomerus iš racemato, biodyzelino gamyboje (šiuo metu ji yra labai svarbi, nes naftos kaina pasaulinėje rinkoje pasižymi rekordiniais svyravimais ir vis dažniau kalbama apie alternatyvių kuro šaltinių atradimą) ir kitur [Schmid ir kiti **1998**, Bornscheuerand ir kiti **1999**, Houde ir kiti **2004**, Hyneck ir kiti **1990**, Hernandez–Martin ir Otero **2008**, Dizge ir Keskinler **2008**].

Daugelio esterazių hidrolitiniam aktyvumui esminės įtakos turi fazių sąlyčio riba tarp vandens terpės ir hidrolizuojamo substrato, kuris dažniausiai yra blogai vandenyje tirpstanti medžiaga ar medžiagų mišinys. Todėl ir esterazių aktyvumo nustatymui naudojami blogai arba visiškai netirpstantys vandenyje junginiai. Šie substratai dėl savo amfifilinių savybių gali būti įvairaus agregatinio pavidalo: monomerai, micelės, monosluoksniai, plėvelės

(fazių riboje vanduo/oras), pūslelės, membranos arba išvardintų formų mišinys. Fermento aktyvumas (fermentinės reakcijos kinetika) labai priklauso nuo substrato pavidalo tiriamojoje sistemoje. Pvz., fosfolipazė A₂ 1000 kartų greičiau hidrolizuoja fosfolipidus, esančius micelių pavidalo, negu ištirpintas pavienes substrato molekules. Kadangi nuo substrato koncentracijos ir prigimties priklauso reakcijos greitis, todėl tiriant šių fermentinių reakcijų kinetiką labai svarbu išlaikyti vienodas substrato paruošimo ir tyrimo sąlygas arba sukurti tokias substrato formas, kurios būtų lengvai charakterizuojamos bei pasižymėtų savybių stabilumu.

Nors fermentų aktyvumą galima nustatyti daugeliu metodų (titrimetrija, fluorimetrija, infraraudonosios spinduliuotės spektroskopija, chromatografija, turbidimetrija, imunocheminiais metodais), tačiau elektrocheminiai metodai turi pranašumą, nes galima tirti ir heterogenines sistemas (daugeliui kitų metodų tai yra trūkumas), o tai yra didelis privalumas, ypač tuo atveju, kai tiriami tokie fermentai, kurie nagrinėjami šioje disertacijoje, veikiantys fazių riboje. Šiuo metu sparčiai vystosi biosensorių taikymas elektrocheminėje analizėje. Jie leidžia tiesiogiai atlikti analizuojamos medžiagos tyrimus pavyzdžių mišiniuose. Atsižvelgdami į šiuolaikinių spektroskopijos analizės metodų pasiekimus, tiriant fermentinių reakcijų savybes, šiame darbe taip pat pasinaudojome paviršiaus plazmono rezonanso, IR bei suminio dažnio generacijos spektroskopija.

Mūsų darbe vienas centrinių esterazių grupės atstovas – *Thermomyces lanuginosus* lipazės (TLL) – pasirinkimas susijęs su Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriaus dalyvavimu ES 6-tosios bendrosios programos (6BP) projekte „BIOSCOPE“, kurio tikslas buvo ištirti saviindikuojančias biologines nanosistemas vienos biomolekulės veikimo mechanizmo lygyje. Kitas fermentas, fosfolipazė A₂, pasirinktas kaip alternatyvus hidrolazių klasės fermentas hidrolizės reakcijoms, vysktančioms fosfolipidų sistemose, tirti.

Šio darbo tikslas: įvertinant esterazių veikimo fazių sąlyčio ribose ypatybes, pasiūlyti naujus elektrocheminius ir spektroskopinius šių fermentų aktyvumo detekcijos metodus, panaudojant Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje sukurtus susintetintus substratus.

Darbo uždaviniai:

1) Elektrochemiškai detektuoti *TLL* aktyvumą, panaudojant redokso aktyvią žymę turinčius fisisorbuotus ir chemisorbuotus substratus.

2) Pademonstruoti sukamojo diskinio elektrodo (SDE) metodo taikymą tūrinei esterazių elektrocheminei detekcijai, naudojant redokso aktyvaus substrato mices.

3) Elektrochemiškai detektuoti *TLL* aktyvumą, pasinaudojant darbe nustatytu redokso aktyvių naftochinono esterių fisisorbicijos iš jų micelių tirpalo ant stiklo grafitinio elektrodo reiškiniu.

4) Pademonstruoti suminio dažnio generacijos (SDG) spektroskopijos metodo galimybes esterazių aktyvumo detekcijai fazių riboje vanduo/oras.

5) Pritaikyti paviršiuje imobilizuotas fosfolipidines membranas (*angl. tethered bilayer membranes, tBLM*) fosfolipazės A_2 ir *TLL* detekcijai elektrocheminio impedanso spektroskopijos (EIS) metodu.

Mokslinis naujumas:

Esterazių taikymas pramonėje yra vienas sparčiai besivystančių biotechnologijos kryptų uždavinys. Aktyvumas yra pagrindinė fermentų savybė, kuri suteikia informacijos, leidžiančios tirti fermentinių reakcijų mechanizmus. Šiame darbe siūlomos naujos metodikos esterazių, ypač tokių kaip *TLL* ir fosfolipazės A_2 , kurios veikia fazių riboje, fermentiniam aktyvumui nustatyti. Priešingai negu klasikiniai aktyvumo nustatymo metodai, kuriuose naudojami blogai tirpių junginių mišraus agregatinio laipsnio tirpalai, šiame darbe aktyvumo detekcijos metodai parengti taip, jog būtų galima maksimaliai išvengti komplikacijų, susijusių su substratų polimorfiškumu. Manome, jog tai suteikia naujų eksperimentinių galimybių tokių fermentų, kaip *TLL* ir PLA_2 , fermentiniam aktyvumui tirti. Elektrocheminiai ir spektroskopiniai metodai, pasiūlyti šiame darbe, praplečia biosensorių, veikiančių šių fermentų pagrindu, kūrimo ir taikymo galimybes. Kita vertus, pirmieji pasiūlėme nelineinius spektroskopijos metodus lipazių hidrolitiniam aktyvumui vanduo/oras riboje tirti ir tuo pačiu metu parodėme SDG spektroskopijos galimybes tiesiogiai nustatyti fermento ir jo substrato fazių riboje molekulinio lygio informaciją.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

1. Ciklinės voltamperometrijos metodu galima sėkmingai detektuoti *Thermomyces lanuginosus* lipazės (*TLL*) aktyvumą, naudojant fizisorbuoto 9-(5'-ferocenilpentanoiloksi)nonildisulfido (FPONDS) sluoksnelius ant aukso paviršiaus, padengto 1–heksantioliu.
2. Ant hidrofobinio paviršiaus vyksta *TLL* persitvarkymas, kurį lydi žymus *TLL* aktyvumo išaugimas, kai substratu naudojamas FPONDS, o tai tiesiogiai įrodo konformacinių pokyčių įtaką fermento aktyvumui.
3. Elektrocheminiu metodu galima įvertinti *TLL* stereospecifiškumą, naudojant fizisorbuotą (\pm)9-merkaptanonil-3-metil-5'-ferocenilpentanoato racemato sluoksnelį.
4. Sukamojo diskinio elektrodo metodu, galima detektuoti *TLL* aktyvumą *O*-palmitoil-2,3-dicianohidrochinono micelių sistemoje.
5. Pusiausvyrinį adsorbcijos reiškinį tarp 2-oksipalmitoil-1,4-naftochinono (OPNQ) micelių tirpale ir stiklo grafitinio elektrodo galima panaudoti *TLL* aktyvumui nustatyti micelių sistemoje.
6. *TLL* pavyzdžiu pademonstruota esterazių aktyvumo detekcijos koncepcija, besiremianti suminio dažnio generacijos spektroskopijos metodo taikymu fazių sąlyčio riboje oras/vanduo.
7. Panaudojant prikabintų bisluoksnių fosfolipidinių membranų technologiją elektrocheminio impedanso spektroskopijos pagalba galima įvertinti fosfolipazių aktyvumą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Fermentai ir jų klasifikacija

Beveik visos cheminės reakcijos vyksta organizme, dalyvaujant biologiniams katalizatoriams. Jei ląstelėse jų nebūtų, tai biocheminės reakcijos vyktų labai lėtai arba visai nevyktų, todėl ląstelės negalėtų egzistuoti ir nebūtų gyvybės arba ji egzistuotų kitokiu pavidalu. Didžioji dalis biologinių katalizatorių, vadinamų fermentais, yra baltymai. Fermentai turi visas katalizatoriams būdingas savybes:

1. Reakcijos paspartinimui reikalingos labai mažos fermentų koncentracijos;

2. Jei tik dėl kokių nors priežasčių nevyksta degradacija, vykstant reakcijai jų koncentracija ir molekulinė sandara nekinta;

3. Katalizatoriai neveikia reakcijos pusiausvyros, jie vienodai katalizuoja ir tiesioginę, ir grįžtamąją reakciją, todėl negali katalizuoti termodinamiškai neįmanomų reakcijų.

Katalitinis aktyvumas priklauso nuo baltymo konformacijos. Jeigu baltymas denatūruojasi arba disocijuoja į subvienetus, jo katalitinis aktyvumas iš dalies arba visiškai prarandamas. Suskaidžius fermentą iki aminorūgščių, jis visada netenka katalitinio aktyvumo. Fermentai neatsparūs temperatūros, rūgščių, šarmų, druskų ir kitų chemiškai agresyvių medžiagų poveikiui.

Fermentai šiek tiek skiriasi nuo nebiologinių katalizatorių:

1. Yra specifiški: dažniausiai katalizuoja tik vieno substrato vartimą produktu. Vykstant reakcijai nesusidaro pašalinių medžiagų, tai yra, reakcija dažniausiai vyksta „vienu maršrutu“. Fermentai, skaidantys baltymus, nekatalizuoja nukleorūgščių virsmų, ir atvirkščiai. Yra fermentų, kurie atskiria net optinius izomerus, tai yra aukščiausias specifiskumo laipsnis. Pvz., D-aminorūgščių oksidazės katalizuoja tik D-aminorūgščių oksidaciją, o L-aminorūgščių oksidazės – tik L-aminorūgščių. Mažiausias reaguojančios

medžiagos molekulės struktūros pakitimas gali pakeisti fermentinės reakcijos greitį.

2. Fermentų aktyvumas dažniausiai yra daug didesnis negu nebiologinių katalizatorių. Fermentų katalizuojamos reakcijos 10^{10} – 10^{16} vyksta greičiau už nekatalizuojamas reakcijas. Pavyzdžiui, viena fermento katalazės molekulė per sekundę suskaido per 40 000 000 vandenilio peroksido molekulių į vandenį ir deguonį [Praškevičius ir kiti **2003**, Nelson ir Cox **2004**].

3. Fermentų veikla reguliuojama. Pagal organizmo poreikį fermento aktyvumas gali padidėti arba sumažėti. Tai yra viena iš svarbiausių fermentų savybių. Fermentinis aktyvumas gali būti reguliuojamas kovalentiškai modifikuojant, proteolitiškai aktyvuojant, alosteriškai reguliuojant, prijungiant įvairius regulatorinius baltymus, aktyviklius, inhibitorius.

4. Fermentinės reakcijos vyksta švelniomis sąlygomis: atmosferos slėgyje, dažniausiai neutralioje (pH 7) reakcijos terpėje, žemoje temperatūroje; cheminių katalizatorių veikiamos reakcijos priešingai – dažniausiai vyksta aukštoje temperatūroje ir dideliame slėgyje, esant didelėms rūgščių arba šarmų koncentracijoms.

Fermentai skirstomi į 6 klases:

1. *Oksidoreduktazės* katalizuoja oksidacijos-redukcijos reakcijas. Dauguma šios klasės fermentų yra vadinami dehidrogenazėmis, kai kurie oksidazėmis, oksigenazėmis, peroksidazėmis arba reduktazėmis.

2. *Transferazės* katalizuoja reakcijas, kurioms vykstant cheminės grupės pernešamos nuo vienos molekulės prie kitos. Grupės pernešimo reakcijose substrato molekulė dažnai kovalentiniu ryšiu prisijungia prie fermento arba kofermento. Šiai fermentų klasei priklauso kinazės, katalizuojančios fosforilo pernešimą nuo ATP prie substrato.

3. *Hidrolazės* katalizuoja reakcijas, kurioms vykstant hidrolitiškai skyla molekulių viduje esantys cheminiai ryšiai (C–O, C–N, C–S). Šiose reakcijose dalyvauja vanduo. Prie hidrolazių klasės priskiriamos ir šiame darbe tirtos **esterazės**.

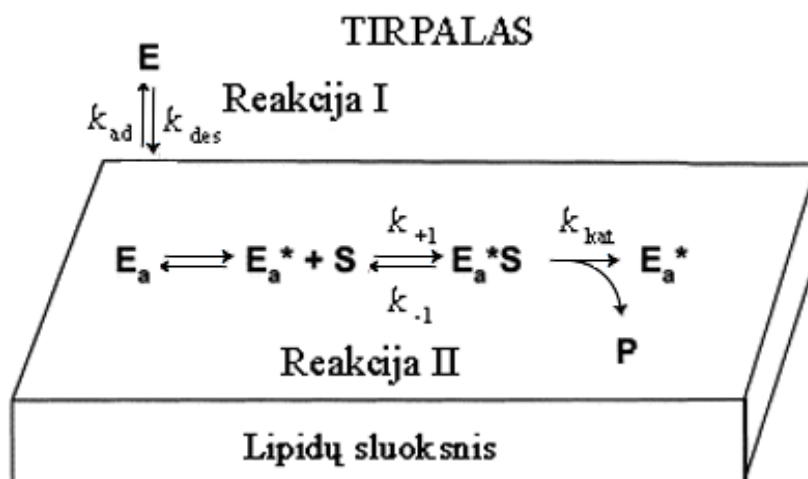
4. *Liazės* katalizuoja reakcijas, kurioms vykstant funkcinės grupės prijungiamos prie dvigubųjų ryšių arba susidaro dvigubasis ryšys, pašalinant chemines grupes.

5. *Izomerazės* katalizuoja izomerizacijos reakcijas (grupės pernešamos molekulės viduje).

6. *Ligazės* (sintetazės) katalizuoja naujų cheminių ryšių (C–C, C–S, C–O, C–N) susidarymą, vykstant kondensacijos reakcijoms ir naudojant ATP didžiaenergių ryšių skilimo energiją [Praškevičius ir kiti **2003**, Nelson ir Cox **2004**].

1.2. Fermentinės reakcijos, vykstančios fazių riboje

Plačiai žinomas Michaelio-Menten modelis tinka fermentinėms reakcijoms, kurios vyksta homogeninėje terpėje, aprašyti. Esterazių veikimui tirti tiesiogiai negalima taikyti šio modelio, nes vandeninėje terpėje esterazių substratai gali būti micelių, monomero, pūslelių arba emulsijos formos dinaminėje pusiausviroje. Tokie substratai užtikrina fazių ribą, reikalingą fermento veikimui. Jų kinetikai aprašyti siūlomas kitas metodas, pavaizduotas 1 paveiksle [Martinelle ir kiti 1996].



1 pav. Lipolizės reakcijos kinetinis modelis: E – laisvo fermento koncentracija tirpalo tūryje, E_a – fermento koncentracija fazių riboje, E_a^* – aktyvios fermento formos koncentracija fazių riboje, S – laisvo substrato koncentracija, P – laisvo produkto koncentracija, E_a^*S – fermento–substrato kompleksio koncentracija fazių riboje, k_{ad} – fermento adsorbcijos konstanta, k_{des} – fermento desorbcijos konstanta, k_{kat} – fermento–substrato kompleksio skilimo į reakcijos produktą konstanta, k_{-1} ir k_{+1} – fermento–substrato kompleksio skilimo ir jo susidarymo iš pradinių medžiagų greičio konstantos.

Visą kinetinį modelį galima suskirstyti į dvi pagrindines reakcijas. Pirmoji reakcija iliustruoja laisvo fermento vartimą aktyvia fermento būseną. Šią reakciją sudaro keturios stadijos: adsorbcija, orientacija, aktyvacija

(konformaciniai pokyčiai, pavyzdžiui, hidrofobinio dangtelio poslinkiai ir/arba kofaktoriaus prisijungimas), substrato prisijungimas prie aktyviojo centro.

Antroji reakcija aprašo katalitinę reakcijos dalį, į kurią įeina E_a^*S komplekso susidarymo/skilimo pusiausvyris procesas ir jo suirimas į reakcijos produktus. Pateiktas modelis leidžia gauti eilę formaliosios kinetikos sąryšių, kurie yra naudingi atskleidžiant molekulinis šio tipo fermentų veikimo mechanizmus. Detaliau molekuliniai lipolizės reakcijos procesai, kuriuose dalyvauja darbe tirtos esterazės, bus aptariami vėliau 1.4. skyriuje.

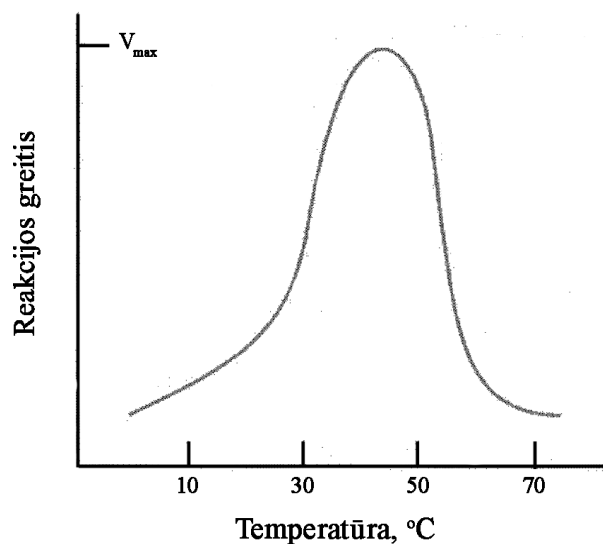
1.3. Faktorai, įtakojančys fermentinių reakcijų greitį: pH ir temperatūra

Tiriant fermentinių reakcijų mechanizmus, labai svarbu kiekybiškai įvertinti fermentinių reakcijų kinetiką. Įvertinus fermentinės reakcijos greičio priklausomybę nuo įvairių aplinkos faktorių, galima prognozuoti fermentinių reakcijų mechanizmus. Griežtas fermentinių reakcijų kinetikos aprašymas yra gana sudėtingas, todėl kinetinės lygtys dažniausiai labai supaprastinamos, aprašomi tiksliai pagrindiniai modeliai. Modelių matematinė analizė reikalinga tam, kad būtų galima patikslinti, ar pasiūlytas mechanizmas atitinka eksperimentiškai gautus kinetinius rezultatus. Pagrindinis fermentinės kinetikos tyrimo tikslas – pagal gautą eksperimentinį rezultatą geriau suprasti fermento veikimo molekulinį mechanizmą.

Fermentinės reakcijos greitis priklauso nuo įvairių faktorių:

- a) reaguojančių medžiagų cheminės prigimties;
- b) temperatūros;
- c) vandenilio jonų koncentracijos (pH);
- d) substrato koncentracijos;
- e) įvairių aktyviklių ir slopiklių [Praškevičius ir kiti **2003**, Nelson ir Cox **2004**].

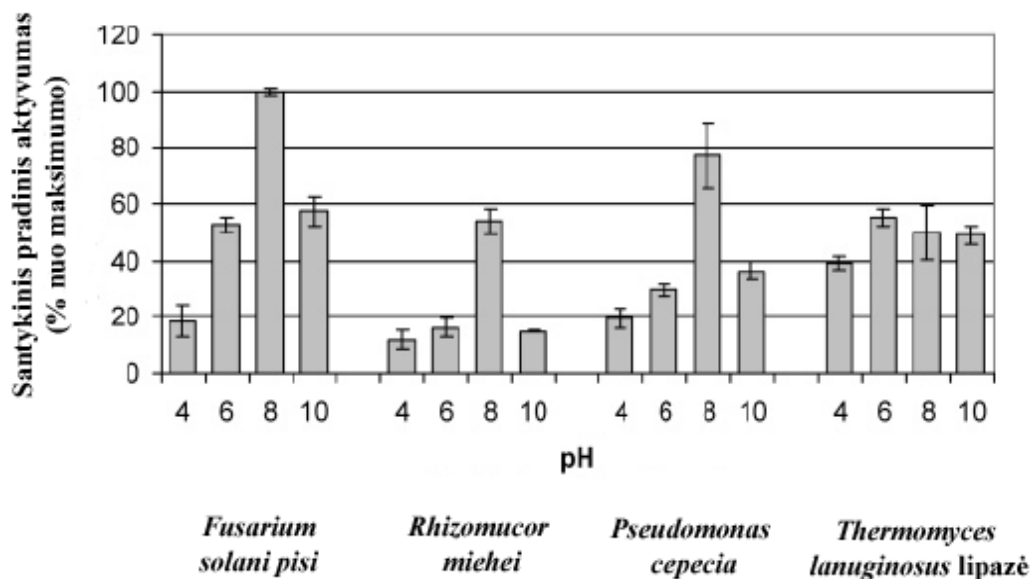
Fermentinės reakcijos, kaip visos cheminės reakcijos, didinant temperatūrą greitėja. Pakėlus temperatūrą 10 laipsnių, cheminės reakcijos greitis padidėja 2–3 kartus. Kadangi fermentai yra baltymai, kurių struktūrą lemia temperatūrai jautrios sąveikos, tai pasiekus 60–70 °C temperatūrą, dauguma baltymų ima denatūruoti, tai yra, kinta ar net suyra tretinė bei aktyviojo centro erdvinė struktūra, ir fermentinių reakcijų greitis pradeda mažėti. Tipinė fermentinės reakcijos greičio priklausomybė nuo temperatūros vaizduojama varpo formos kreive (2 pav.).



2 pav. Reakcijos greičio priklausomybė nuo temperatūros

Įvairių fermentų optimali veikimo temperatūra yra skirtinga, todėl ir fermentinių reakcijų maksimalus greitis pasiekiamas, esant skirtingoms temperatūroms. Daugelis fermentinių reakcijų greičiausiai vyksta esant 30-40 °C temperatūrai, nes jau nuo šios temperatūros pradeda skilti silpnėsi baltymo ryšiai ir iš dalies prarandamas baltymo aktyvumas, o pasiekus 60 °C, suyra disulfidiniai tilteliai baltymo viduje ir baltymas denatūruoja. Kai kuriems fermentams, pvz., išskirtiems iš termofilinių bakterijų, gyvenančių aukštos temperatūros vandenyse, fermentinės reakcijos maksimalus greitis pasiekiamas daug aukštesnėje temperatūroje (80–90 °C).

Fermentinės reakcijos greitis priklauso nuo reakcijos terpėje esančių vandenilio jonų koncentracijos. Baltymų molekulių šoninėse grandinėse yra polinių aminorūgščių, kurių poliškumą lemia pH, be to daugelio baltymų kofaktorių jonizacijos laipsnis taip pat priklauso nuo pH. Pastarieji gali būti sudėtinė fermento aktyviojo centro dalis ir įtakoti tretinę baltymo struktūrą. Substrato molekulės taip pat gali būti jonizuotos, be to su fermentu gali jungtis tik viena substrato forma – teigiama, neigiama arba neutralia. Tiriama reakcijos greičio priklausomybė nuo pH, daugeliu atveju gaunama varpo formos kreivė (3 pav.).



3 pav. Keturių fermentų (*Fusarium solani pisi* (kutinazės), *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas cepacia*, *Thermomyces lanuginosus* lipazės) aktyvumo priklausomybė nuo pH. Aktyvumai nustatyti ATR–FT–IR metodu, substratu naudota trioleino plėvelė. Matavimai atlikti 30 °C temperatūroje ir 3 x 50 mM citrato/TRIS–glicino buferiniame tirpale, esant pH 4, 6, 8, ir 10. Rezultatai gauti įvertinant esterio C=O (1745 cm⁻¹) ir riebalų rūgšties C=O grupės (1710 cm⁻¹) juostų intensyvumus [Poulsen ir kiti 2005].

Dažniausiai fermentai yra aktyvūs esant neutraliam terpės pH, jų veikimo optimalus pH 7,0. Yra ir išimčių, pvz., skrandyje esančio proteolitinio fermento pepsino veikimo optimalus pH yra 1,5, šarminės fosfatazės yra aktyviausios esant pH ~ 10, o 3 paveiksle pavaizduotų hidrolazių maksimalus aktyvumas pasiekiamas šarminėje terpėje apie 8.

Dideli pH pokyčiai keičia baltymo struktūrą: jis denatūruoja, suyra aktyvusis centras ir fermentas praranda savo aktyvumą. Nedideli pH pokyčiai gali pakeisti:

- 1) substrato jonizacijos laipsnį, todėl substratas sunkiau jungiasi su fermentu;
- 2) kofaktorių susirišimą su baltymu;
- 3) aktyviajame centre esančių aminorūgščių disociaciją, todėl:

a) pakinta fermento susijungimas su substratu;

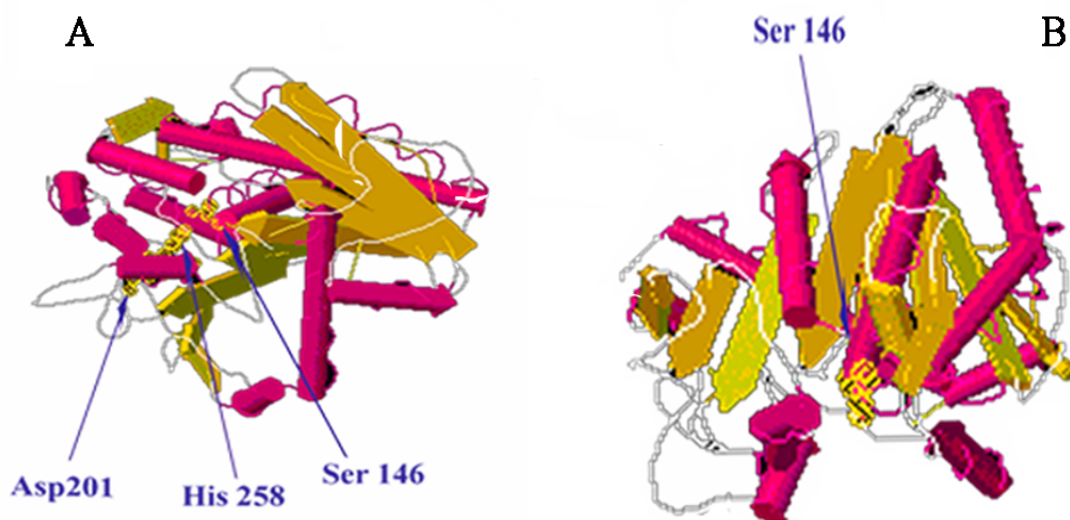
b) sumažėja katalizės greitis, nes aminorūgščių funkcinės grupės nebegali būti protonų donoriais ar akceptoriais ir dalyvauti rūgštinėje–bazinėje katalizėje.

Tiriant fermentinės reakcijos greičio priklausomybę nuo pH, galima bandyti įvertinti funkcinių grupių, esančių fermento aktyviajame centre, pK ir tuo pačiu nustatyti, kokia aktyviojo centro aminorūgštis tiesiogiai dalyvauja katalitinėje reakcijoje. Tačiau šiuos rezultatus reikia vertinti labai atsargiai. Baltymo molekulėje aminorūgščių funkcinių grupių pK gali kisti priklausomai nuo hidrofobinės ir hidrofilinės aplinkos, kuri dažniausiai nežinoma, jei nėra žinoma molekulinė funkcionalaus baltymo struktūra.

1.4. Esterazių lipolizės molekuliniai mechanizmai

1.4.1. *Thermomyces lanuginosus* lipazė

Thermomyces lanuginosus lipazė (*TLL*) (anksčiau naudotas pavadinimas – *Humicola lanuginosa*) – baltymas, sudarytas iš 269 aminorūgščių (4 pav.). *TLL* priklauso esterazių pogrupiui, kurio fermentų bendroji savybė yra aktyvusis centras, sudarytas iš Ser-His-Asp triados [Svendsen 2000]. Šis fermentas išskiriamas iš mikroorganizmų.



4 pav. Antrinė *Thermomyces lanuginosus* lipazės (*TLL*) struktūra: A – atvira fermento forma, B – uždara fermento forma (struktūros paimtos iš baltymų duomenų bazės 1DTE). Nurodytos aminorūgštys įeina į *TLL* aktyvųjį centrą.

TLL aktyvusis centras yra uždengtas iš α -spiralinių segmentų sudarytos struktūros, vadinamos „dangteliu“. Vandeninėje terpėje, „dangtelis“ uždengia aktyvųjį centrą, t.y. fermentas yra neaktyvios formos. Kai fermentas adsorbuojasi ant hidrofobinio paviršiaus, vyksta „dangtelio“ konformaciniai pokyčiai: kai „dangtelis“ atidaromas, substratas patenka į aktyvųjį centrą. „Dangtelis“ yra fermento molekulės pakraštyje. Tam, kad *TLL* katalizuotų esterinio ryšio hidrolizę, būtinas paviršius, prie kurio „dangtelis“ galėtų prisikabinti. Įrodyta, jog *TLL* adsorbuojasi lipidai–vanduo fazių paviršiuje nuo

šio sąlyčio paviršiaus nukreiptu „dangteliu“ [Jensen ir kiti, **2002**]. Riebalinės prigimties medžiagų sąlyčio paviršius veikia fermento konformaciją – pastumia „dangtelio“ α -spiralių aktyviają sritį į vandeninį tirpalą. Šis postūmis būtinas, kad substratas patektų į aktyvųjį centrą. Tuo pačiu metu atidengiama „dangtelio“ hidrofobinė dalis, kuria fermentas prisikabina prie paviršiaus. Sąveika tarp lipidų paviršiaus ir „dangtelio“ hidrofobinių sričių padidina fermento atviros konformacijos stabilumą, o tai siejama su tarpfazine fermento aktyvacija. Žinoma, kad ne tik lipidai, bet ir detergentai bei organiniai tirpikliai, pvz., izopropanolis, veikia „dangtelio“ atidarymą [Zhu ir kiti, **2001**]. Atviroje konformacijoje katalitinį centrą supanti sritis yra stipriai hidrofobinė. Tai leidžia lipazei absorbuotis fazių sąlyčio paviršiuje, kurį sudaro hidrofobinis substratas. Taigi, hidrofobinių substratų paviršiuje padidintas lipazės aktyvumas sietinas ne tik su stabilesne atvirosios konformacijos būseną, bet ir su fermento koncentracija substrato paviršiuje dėl adsorbcijos.

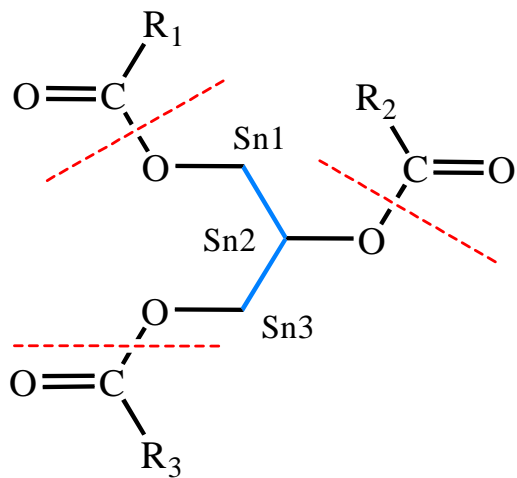
Tam, kad lipazė sudarytų tarpinį kompleksą su substratu, reikia, kad:

1. „Dangtelis“ prisitvirtintų prie paviršiaus;
2. Fermentas būtų aktyvios būsenos, t.y. kai „dangtelis“ neuždengia aktyviojo centro;
3. Į aktyvųjį centrą patektų substratas [Zhu ir kiti, **2001**].

Viena svarbiausių „dangtelio“ aminorūgščių – Trp89. Žinoma, jog ji būtina, kad substrato hidrolizė būtų naši. Ji taip pat reikalinga lipazei adsorbuojantis ant substrato paviršiaus bei aktyviajame centre surišant substratą [Jutila ir kiti, **2004**; Martinelle ir kiti, **1996**]. Trp89 poveikis hidrolizei priklauso nuo procese dalyvaujančio substrato. Tačiau esant bet kokiai mutacijai (pvz., Trp89Phe, Leu, Gly, Glu) hidrolizės efektyvumas yra mažesnis, lyginant su natūralios *TLL* veikimu [Martinelle ir kiti, **1996**].

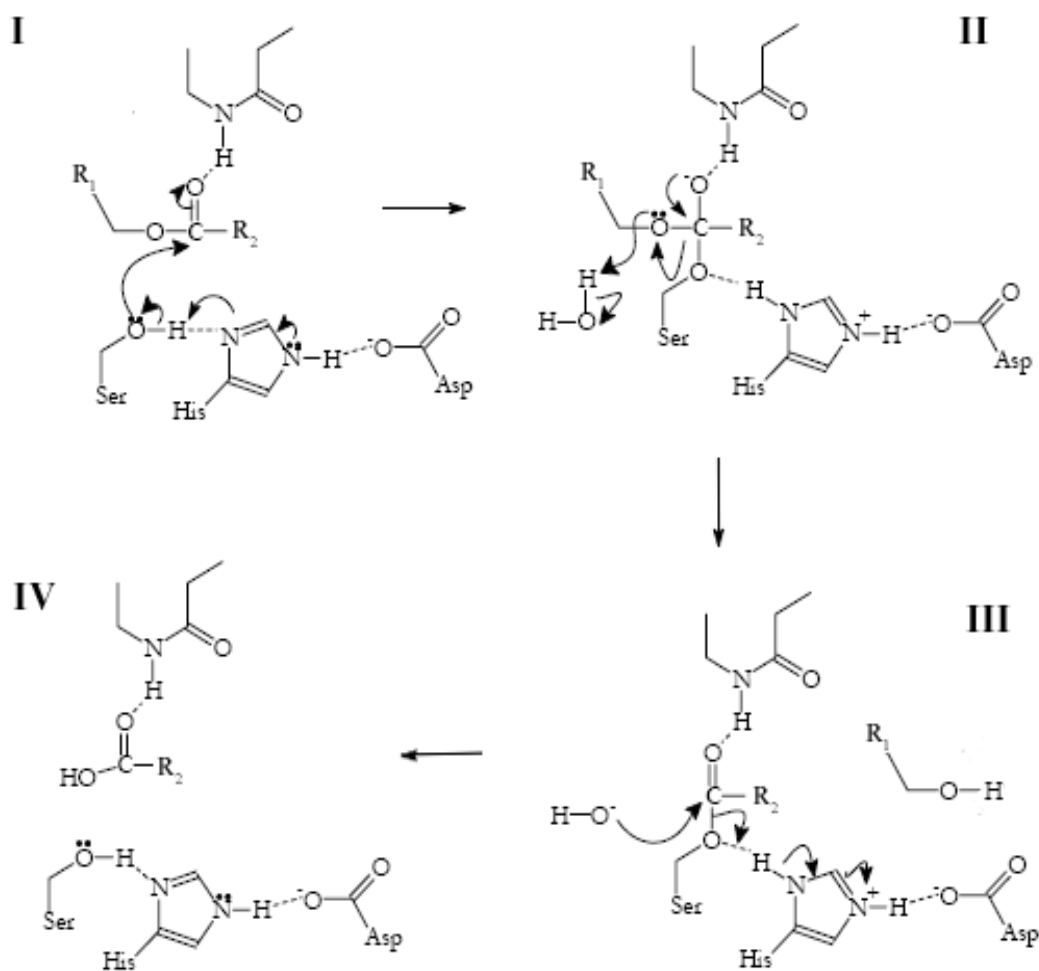
Esterazės yra labai specifiškos substratui: nuo pasirinkto substrato priklauso galutinis reakcijos produktas, pvz., jei kaip reakcijos substratas naudojamas trigliceridas arba digliceridas, susidaro digliceridas, monogliceridas, o ne glicerolis ir laisva riebalų rūgštis. Labiausiai fermentas

linkęs reaguoti su Sn1 ir Sn3, o ne Sn2 padėtyje esančiais esteriniais ryšiais (5 pav.) [Schmid ir Verger, **1998**, Stadler ir kiti, **1995**].



5 pav. Molekulinė *Thermomyces lanuginosus* lipazės poveikio substratui (trigliceridui) schema

Bendra monoesterio hidrolizės reakcija, kurią katalizuoja esterazės, vyksta aktyviajame centre, kurį sudaro aminorūgščių triada Ser-Asp(Glu)-His, pavaizduota 6 paveiksle.



6 pav. Lipolizės reakcijos molekulinis mechanizmas

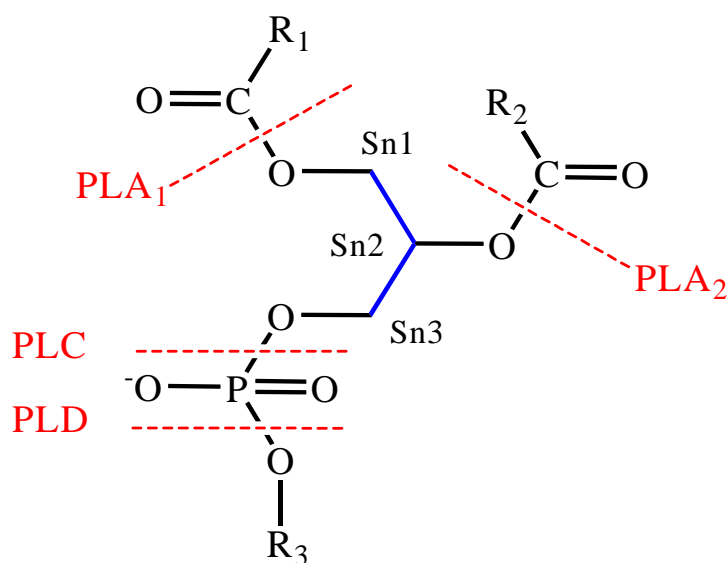
Pagrindinė hidrolazių katalitinė reakcija, vykstanti aktyviajame centre, į kurią įeina aminorūgščių triada Ser-Asp(Glu)-His, pavaizduota anksčiau 6 paveiksle. Reakcijos mechanizmą sudaro keturios pakopos. Serino OH-grupė prisijungia prie esterinio ryšio karbonylgrupės anglies atomo ir susidaro tetraedrinis tarpinis junginys, kurį stabilizuoja His ir Asp aminorūgštys. Dėl to His imidazolo žiedas tampa protonizuotas ir teigiamai įkrautas. Šį teigiamą krūvį stabilizuoja neigiamai įkrauta Asp arba Glu liekana. Tarpinis tetraedrinis junginys stabilizuojamas dviem vandenilniais ryšiais su amidinių ryšių liekanomis, vadinamomis oksianijoninėmis skylėmis [Jaeger ir kiti **1994**; Derewenda ir kiti **1993**.]. Oksianijoninės skylės (jas turi Leu, Gly, Phe, Ser) – vandenilinių ryšių donorų plejada, kuri, hidrolazių atveju, užima reikiamą poziciją esant aktyvaus fermento konformacijai. Tolesnėje, antroje pakopoje,

tetraedriniam tarpiniam junginiui sąveikaujant su vandens molekule, nuo jo atsiskiria alkoholis. Vandens molekulė praranda vandenilio atomą ir tampa hidroksilo anijonu. Trečioje pakopoje acilintas fermento kompleksas, paveiktas šiuo anijonu, per anglies atomą atpalaiduoja riebalų rūgštį ir ketvirtoje pakopoje vyksta fermento regeneravimas.

Hidrolazių katalizuojamos reakcijos priskiriamos bisubstratėms reakcijoms, kuriose dalyvauja, pvz., triacilglicerolio ir vandens molekulės, ir susidaro du reakcijos produktai.

1.4.2. Fosfolipazė A₂: bičių nuodų ir kiaulės kasos

Fosfolipidų skaidymą katalizuoja fosfolipazės, kurios randamos visuose žinduolių audiniuose ir kasos sultyse, taip pat aptinkamos gyvačių, bičių ir vabzdžių nuoduose [Nicolas ir kiti, 1997]. Kai kurios bakterijos taip pat išskiria fosfolipazes, kurios suardo ląstelės membraną ir palengvina infekcijos patekimą. Fosfolipazės specifiskai hidrolizuoja fosfolipidų esterinius ryšius. Specifinių fosfolipazių poveikis pavaizduotas 7 paveiksle.

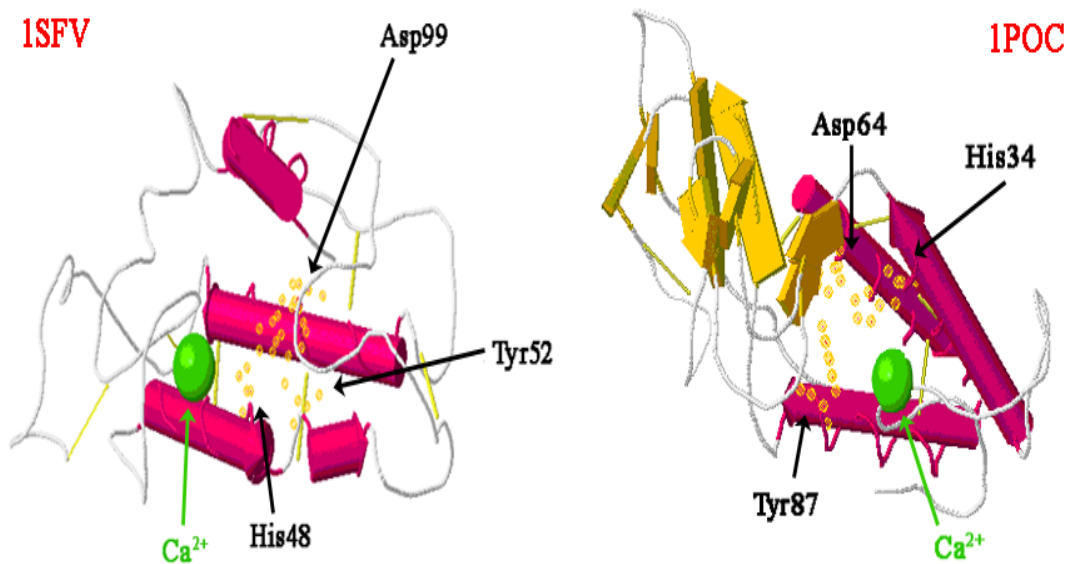


7 pav. Specifinių fosfolipazių katalitinis poveikis

Fosfolipazės A₂ hidrolizuoja esterinį ryšį prie Sn2 anglies atomo. Pavyzdžiui, gyvačių kobros (*Naja naja*) nuoduose esanti fosfolipazė A₂, patekusi į kraują, katalizuoja eritrocitų membranoje esančių acilglicerolių hidrolizę, susidarant lizofosfolipidams. Jie veikia kaip detergentai, suardydami eritrocitų membranas, ko pasekoje vyksta raudonųjų kraujo kūnelių hemolizė ir organizmo žūtis. Avys yra atsparios gyvačių nuodų poveikiui, nes jų eritrocitų membranos išoriniame sluoksnyje yra ne fosfoacilgliceroliai, o sfingolipidai [Kadziauskas 2008]. Fosfolipazė A₂ iš membraninių fosfolipidų atpalaiduoja arachidono rūgštį, iš kurios dviem pagrindiniais būdais susidaro eikozanoidai: ciklooksigenaziniu būdu sintetinami prostaglandinai, tromboksanai ir prostaciklinai, o lipooksigenaziniu būdu sintetinami leukotrienai ir lipoksinai.

Fosfolipazę aktyvuoja hormonai bradikininas, adrenalinas, gyvačių nuoduose esantis melitinas, trombinas.

Šiame darbe buvo naudojama fosfolipazė A_2 , išskirta iš bičių nuodų ir kiaulės kasos. Šis fermentas yra mažos molekulinės masės aminorūgščių darinys – iš bičių nuodų išskirtą fosfolipazę sudaro 134 aminorūgštys (15274 Da), o iš kiaulės kasos – 124 aminorūgštys (14010 Da) (8 pav.). Fosfolipazė A_2 , priešingai negu *TLL*, neturi aktyvųjį centrą uždengiančio „dangtelio“, tačiau fermento perėjimui į aktyviają būseną reikalingas kofaktorius – Ca^{2+} jonai; ji taip pat veikia fazių sąlyčio riboje.

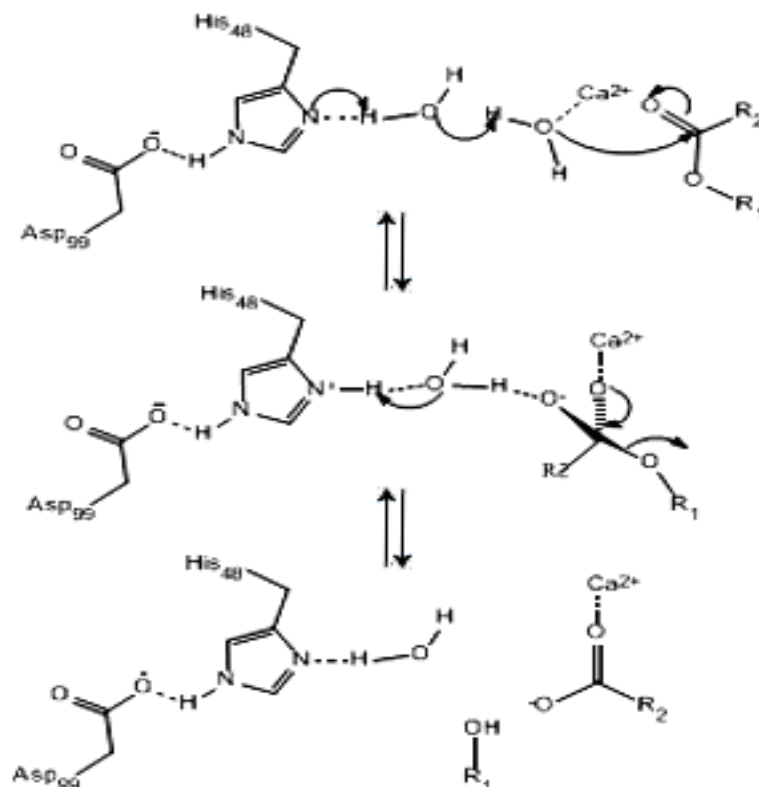


8 pav. Antrinės fosfolipazių A_2 struktūros, paimtos iš baltymų domenų bazės:

1SFV – išskirta iš kiaulės kasos, 1POC – išskirta iš bičių nuodų

Kofaktorius – Ca^{2+} jonai – sėkmingai gali būti pakeistas mažais katijonais, tokiais kaip kobalto arba nikelio jonai, tuo tarpu bario jonai slopina fosfolipazės A_2 katalitinį poveikį.

Lipolizės, kurioje dalyvauja šie fermentai, mechanizmas pateiktas 9 paveiksle.



9 pav. Fosfolipazės A_2 katalizuojamos lipolizės molekulinis mechanizmas
 [Berg ir kiti, 2001]

9 paveiksle pateiktas fosfolipazės A_2 , išskirtos iš kiaulės kasos (sPLA₂), katalizuojamos lipolizės mechanizmas. Šią reakciją inicijuoja His48/Asp99/kalcio kompleksinio tarpinio junginio susidarymas aktyviajame centre (fosfolipazės A_2 , išskirtos iš bičių nuodų, katalizuojamos lipolizės mechanizme dalyvauja tos pačios aminorūgštys, tačiau jos yra kitoje fermento vietoje – His34, Asp64). Kalcio jonai poliarizuoja S_N2 padėtyje esantį karbonilgrupės deguonies atomą, tuo pačiu metu susijungdami su vandens molekule, kuri dalyvauja katalitinėje reakcijoje. His48 aminorūgštis padidina katalitinio vandens nukleofiliškumą, prijungdama antrą vandens molekulę. Dvi vandens molekulės reikalingos, kaip yra manoma, tam, kad užtikrintų reikiamą atstumą tarp katalitinio histidino ir esterio, t.y. padidintų reakcijos našumą. His48 valentingumas padidinamas, susidarant vandeniliniam ryšiui su Asp99, kuri yra paveikta šalia esančios aminorūgšties Tyr54 (Tyr87 fosfolipazės A_2 ,

išskirtos iš bičių nuodų, atveju). Reakcijos produktams atlaisvinti naudojamos laisvos vandens molekulės.

His48 pakeitus asparagino aminorūgštimi, lieka dalinis fermento aktyvumas, lyginant su pradiniu laukinio tipo fermento aktyvumu, o pakeitus His48 alaninu, katalitinis aktyvumas prarandamas [Annand ir kiti, **1996**].

1.5. Eksperimentiniai esterazių hidrolitinio aktyvumo nustatymo metodai

Fermento aktyvumas išreiškiamas substrato arba susidariusio produkto koncentracijos pokyčiu per laiko vienetą. Dažniausiai fermento molinė koncentracija nėra tiksliai žinoma, todėl Tarptautinė fermentų komisija 1961 metais pasiūlė fermento vieneto sąvoką [Praškevičius ir kiti **2003**].

Tarptautinis fermento vienetas (IU) (labai dažnai vadinamas fermento vienetu, U) yra fermento kiekis, kuris katalizuoja 1 μmol substrato vartimą produktu per 1 minutę, esant optimalioms sąlygoms. Optimalios reakcijos sąlygos yra optimalus pH, optimali temperatūra. Šios sąlygos kiekvienam fermentui yra skirtingos. 1972 metais pereinant prie SI sistemos buvo rekomenduota naudoti fermentų aktyvumo vienetą – katalą. Katalas yra fermento kiekis, katalizuojantis 1 M substrato vartimą produktu per 1 sekundę. Vienas katalas lygus $6 \cdot 10^7$ tarptautinių vienetų. Tai yra labai didelis vienetas ir gana retai naudojamas. Fermento specifinis aktyvumas – fermento vienetų skaičius viename miligrame baltymo (U/mg) arba SI sistemoje katalų skaičius 1 kg fermento (kat/kg).

Hidrolitinis aktyvumas nustatomas, naudojant gryno fermento preparatą arba jo turinčią kultūrinę terpę. Fermento aktyvumui nustatyti dažniausiai naudojami šie fizikocheminiai metodai:

1. titrimetrija, 2. spektroskopiniai (spektrofotometrija, fluorimetrija, infraraudonosios spinduliuotės) metodai, 3. chromatografija, 4. radioaktyvumo metodas, 5. kontroliuojamo įtempimo sąlyčio paviršiaus sudarymo metodas, 6. turbidimetrija, 7. konduktometrija, 8. imunologiniai metodai, 9. atominės jėgos mikroskopija ir kiti [Brockerhoff ir kiti, **1974**; Jensen **1983**; Tietz ir Shuey **1993**].

1.5.1. Titrimerijos metodas

Šiuo metodu nustatomas ekvivalentinis riebalų rūgšties kiekis, atsipalaidavęs vykstant triacilglicerolio arba kito lipazių substrato hidrolizės reakcijai. Kokybiniam reakcijos produkto nustatymui patogu naudoti rūgštinius-bazinius indikatorius (pvz., fenolftaleiną). Iš tirpalo spalvos pasikeitimo galima spręsti apie hidrolizės reakcijos vyksmą. Kiekybiniam hidrolizės reakcijos nustatymui patogu naudoti pastovaus pH metodą. Šio metodo esmė – pastovaus pH palaikymas vykstant hidrolizės reakcijai. Fermento aktyvumas nustatomas pagal nuo reakcijos pradžios sunaudoto žinomos koncentracijos NaOH arba kito šarmo kiekį, kuris neutralizuoja riebalų rūgštį, susidariusią per hidrolizės reakciją. Substratu naudojamas natūralus arba sintetinis emulguotas triacilglicerolis, kurio koncentracija išreiškiama tūrio, svorio procentinėmis dalimis arba moliais, tenkančiais paviršiaus ploto vienetui. Šiuo atveju reakcijos greitis priklauso nuo fazių sąlyčio paviršiaus kokybės, todėl ruošiant substrato tirpalą naudojamas ultragarsas bei hidrolizės reakcijos eigoje ypač svarbus intensyvus maišymas [Jaeger 1994; Hoppe ir Themier 1998; Hernaiz ir kiti, 1994].

1.5.2. Spektroskopiniai (spektrofotometrinis, infraraudonoji spektroskopija, fluorimetrija) metodai

Šių metodų veikimas grindžiamas tuo, kad, vykstant hidrolizės reakcijai, vienas iš reakcijos produktų pasižymi optiniu aktyvumu tam tikrame bangos ilgio diapazone. Daugelis substratų, naudojamų hidrolizės reakcijoms tirti, yra vandenyje netirpūs junginiai ir sudaro mices. Ši jų savybė turi įtakos šviesos adsorbcijai, nes pasireiškia šviesos išsibarstymas, todėl naudojami labai praskiesti substrato tirpalai, taip pat pridedama organinių tirpiklių (kurie gali būti ir hidrolizės reakcijos inhibitoriai), ploviklių ir t.t. Galimi du reakcijos tyrimo metodai: susidaro spalvotas hidrolizės reakcijos produktas, kurį galima tiesiogiai nustatyti, pvz., *p*-nitrofenolis [Stuer ir kiti, 1986], arba, vykstant

substrato hidrolizei, kurią katalizuoja lipazė, atpalaiduojami produktai, kurie su kitais junginiais formuoja optiškai aktyvius darinius [Van Autryve ir kiti, **1991**] arba paverčiami tokiais dariniais per kitas fermentines reakcijas [Woollett ir kiti, **1984**].

Fluorimetrija

Šiuo metodu lipolitinis aktyvumas nustatomas matuojant fluorescencijos pokyčius, kuriuos lemia fluoresceinas, susidarantis vykstant riebalų rūgščių ir fluoresceino esterių hidrolizei [Guilbault ir Kramer, **1964**; Haigh ir Rennie, **1994**], taip pat ir kitos fluorescuojančios medžiagos, kuriomis pažymėti triacilgliceroliai arba kiti lipidai bei jų analogai (pirenas [Zandonella ir kiti, **1999**; Negre – Salvayre ir kiti, **1991**], dansilas, kumarinas, naftinas [Hendrickson **1994**]). Šiais atvejais fluorescuojančią žymę turi lipazės substratai.

Taip pat naudojamos fluorescuojančios riebalų rūgštys, prijungtos prie specifinio surišančio baltymo (pvz., žiurkių kepenų riebalų rūgšties rišantis baltymas), kurios pakeičiamos hidrolizės reakcijos produktu – ką tik pagaminta riebalų rūgštimi – ir vyksta intensyvi fluorescencija [Wilton **1991**].

Infraraudonosios spektroskopijos metodas

Nenutraukiamą metodą hidrolitiniam fermento aktyvumui nustatyti, panaudojus Furje transformacijos infraraudonosios spektroskopijos (FTIR) metodą, pasiūlė Walde ir Liusi [Walde ir Luisi, **1989**]. Riebalų rūgšties esterių fermentinis skaidymas kontroliuojamas registruojant FTIR spektrus nuo viso reakcijos mišinio. Gaunama riebalų rūgšties esterių juosta, kurios maksimumas yra ties 1751 cm^{-1} , o laisvosios rūgšties ties 1715 cm^{-1} . Iš molekulių žinomų molinių ekstinkcijos koeficientų galima pagal Beer'o dėsnį apskaičiuoti jų kiekį. Šis metodas buvo taikytas naudojant įvairius hidrolizės reakcijos substratus (pvz., trioktanonilglicerolį, augalinius aliejus). Šis metodas bus aprašytas vėliau, aptariant šioje disertacijoje tirto fermento maksimalią adsorbciją ant fizesorbuoto sluoksnio.

1.5.3. Chromatografiniai metodai

Chromatografiniai metodai tinka įvairių hidrolizės produktų išskyrimui ir analizei. Naudojama florisilo (magnio ir silicio gelio) ir silicio rūgšties kolonos, plonasluoksnė, dujų arba dujų–skysčių chromatografija [Mangold 1984; Kates 1986; Christie 1987; Gunstone 1994]. Pastarajam metodui reikia, kad riebalų rūgštys prieš matavimą būtų paverstos lakiais metilesteriais. Po plonasluoksnės chromatografijos išsiskyrusios laisvos riebalų rūgštys kiekiui nustatyti atliekama kiekybinė analizė densiometrijos arba autoradiografijos metodais, kai triacilglicerolis turi izotopinę žymę. Šie analizės metodai yra tikslūs. Jais galima nustatyti mažą kiekį (iki pmolio eilės) riebalų rūgšties, susidariusios vykstant hidrolizei [Ruiz ir Rodriguez-Fernandez, 1982]. Tačiau šie metodai ne tik reikalauja daug laiko tyrimams atlikti, bet ir yra nenutraukiami.

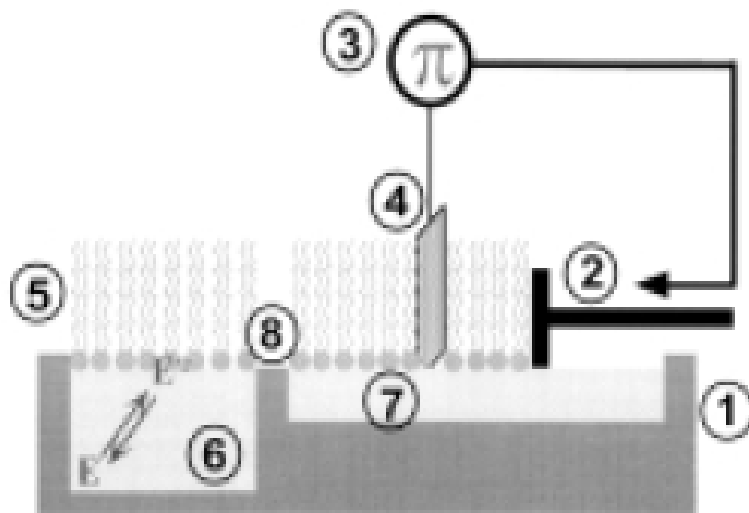
Maurich'o grupė pritaikė aukšto slėgio skysčio chromatografiją lipazės, išskirtos iš kiaulės kasos, aktyvumui nustatyti [Maurich, Moneghini ir kiti, 1991] ir kaip substratą panaudojo β -naftillauratą. Nustatytas specifinis aktyvumas su šiuo substratu siekia tik 1,5 LU/mg ir yra labai mažas, palyginus jį su tuo pačiu fermento aktyvumu, kuris buvo nustatytas kitais metodais ir naudojant kitus substratus (pvz., kaip substratą naudojant tributirino emulsiją fermento specifinis aktyvumas siekia apie 10000 LU/mg). Tam, kad nustatyti lipazės, išskirtos iš kiaulės kasos, aktyvumą, Maurich ir kiti kurdami aukšto slėgio skysčio chromatografijos metodą substratu panaudojo palmitino rūgšties ir dodekano rūgšties *p*-nitrofenolio esterius. Autoriai pateikė fermento specifinio aktyvumo tyrimų rezultatus, gautus substratu naudojant dodekano rūgšties esterį. Palmitino rūgšties esteris pasirodė esantis netinkamas substratas šiam metodui [Maurich, Zacchigna ir kiti 1991].

1.5.4. Kontroliuojamo įtempimo sudarymo sąlyčio paviršiuje metodas

Wilhelmy'io plokštelės metodas

Esterazių katalizuojamos reakcijos vyksta fazių ribos lipidus/vanduo paviršiuje, todėl paviršiaus įtempimas yra svarbus parametras, taip pat kaip ir terpės pH arba temperatūra [Jaeger 1994].

Paviršiaus įtempimą galima kontroliuoti ir pritaikyti esterazių hidrolizės reakcijai tirti, sudarant gryną arba mišrų monomolekulinį substrato sluoksnį fazių riboje oras/vanduo, kaip pavaizduota 10 paveiksle. Šį metodą fermentams tirti plačiai naudoja dvi nepriklausomos Vergerio [Verger 1980; Ransac ir kiti, 1990; Ransac ir kiti, 1991; Laurent ir kiti, 1994; Ivanova ir kiti, 1996] ir Brokmano [Brockman ir kiti, 1975; Momenir kiti, 1997] mokslininkų grupės.



10 pav. Wilhelmy'io plokštelės metodo sistemos struktūra, naudojama fermento katalitiniui aktyvumui nustatyti, esant monomolekuliniui substrato sluoksniui:

1. tefloninis lovelis, 2. judrus tefloninis barjeras, 3. elektromikrobalansas, 4. platinos plokštelė, 5. monosluoksnis, 6. reakcijos sritis, į kurią įvedamas fermentas, 7. rezervuaras, 8. paviršinis kanalas

Naudojant šią tyrimų sistemą elektromikrobalansu matuojamas paviršinis slėgis (π), kuris susietas su paviršiniu įtempimu (γ) šia lygtimi: $\pi = \gamma_o - \gamma$, čia γ_o yra standartinė paviršinio įtempimo fazių paviršiuje vanduo/oras vertė.

Monomolekulinis lipidų sluoksnis paskirstomas ant vandeninės fazės paviršiaus užlašinus lakaus, blogai vandenyje tirpstančio lipido chloroforme tirpalo. Įvedus į sistemą fermentą ir vykstant hidrolizės reakcijai, automatiškai reaguojant į elektromikrobalanso kitimus su judriu tefloniniu barjeru galima kontroliuoti substrato pasiskirstymo paviršiuje plotą ir palaikyti pastovų paviršinių slėgį. Kinetikos aprašymui sudaroma tefloninio barjero padėties priklausomybė nuo laiko.

„Aliejaus lašo“ metodas

Sąlyčio paviršiaus įtempimą galima įvertinti ir „aliejaus lašo“ metodu. Vandeninio tirpalo lašas ant hidrofilinio silicio pagrindo, esant detergentui arba riebalų rūgšties esterui, yra apvalios, panašios į obuolį formos. Įvedus į lašą fermento ir prasidėjus hidrolizės reakcijai, lašas palaipsniui įgauna kriaušės formą, kuri vėliau suyra. Šis procesas stebimas kompiuteriu kontroliuojamu tensiometru [Jaeger 1994].

1.5.5. Nefelometrija ir turbidimetrija

Nefelometrija kietoje terpėje

Šį metodą galima palyginti su metodu, kuriame esterazių veikimui tirti naudojami spalvoti indikatoriai. Tiriant šiuo metodu agarą plokštelės padengiamos karboksirūgščių esteriais ir nustatomas produkto difuzinės zonos skersmuo. Hidrolizė padidina agarą plokštelės difuzinę zoną [Lawrence ir kiti, 1967]. Šis optinis fenomenas stebimas tik tuo atveju, kai vykstant hidrolizei susidariusios riebalų rūgštys santykinai tirpsta vandenyje. Šio praskaidrėjimo priežastis – hidrolizuojamų emulsijos dalelių dydžio sumažinimas, kuris savo ruožtu sumažina praeinančios šviesos intensyvumą. Šiuo metodu galima tirti ir Tweens (polisorbato) hidrolizę, kurią sukelia tam tikros lipazės ir nespecifinės esterazės [O'Leary ir Weld 1964].

Nefelometrija skystoje terpėje

Šiuo atveju matuojamas triacilglicerolio emulsijos adsorbcijos mažėjimas laike. Šis metodas jautrus įvairiems artefaktams, todėl prieš nustatant fermento

aktyvumą, reikia nustatyti kalibracinę kreivę, esant tik grynam fermento tirpalui [Arzoglou ir kiti, **1982**].

Turbidimetrija

Turbidimetrinis esterazių nustatymo metodas buvo sukurtas naudojant Tweens 20 (polietilenglikolio) tirpalą, esant CaCl_2 ir *Lysobacter enzymogenes* esterazei [Tigerstrom ir Stelmaschuk **1989**]. Reakcija buvo tirta matuojant optinio tankio augimą prie 500 nm bangos ilgio. Optinio tankio vertė didėja vykstant Tweens 20 hidrolizei ir susidarant riebalų rūgštims netirpių kalcio druskų pavidalu. Svarbu paminėti, kad Tweens nėra specifinis hidrolazių substratas.

1.5.6. Radiometrija

Šiame metode naudojami hidrolizės reakcijos substratai, turintys izotopinę žymę acilgrandinėje [Belfrage ir Vaughan **1969**; Briquet-Laugier ir kiti, **1999**]. Radiometriniu metodu yra specifinis ir labai jautrus lipazės aktyvumo nustatymui. Tačiau metodas yra neištisinis, nes chromatografiškai arba organinio tirpiklio frakcionavimu reikia išskirti reakcijos eigoje susidariusią riebalų rūgštį su izotopine žyme, todėl šiuo metodu negalima sekti fermentinę reakciją realiuoju laiku. Be to, substratai, naudojami šiame analizės metode, yra labai brangūs.

Literatūroje yra aprašyti metodai, kai izotopinę žymę galima įvesti į hidrolizės reakcijos produktą. J. Huangas su kolegomis į iš reakcijos mišinio išskirtą riebalų rūgštį įvedė radioaktyvią ^{63}Ni žymę. Jie nustatė, kad ^{63}Ni ir oleino rūgšties surišimas yra tiesinės priklausomybės esant iki 100 nmol koncentracijai, o su metodu galima nustatyti išskirtos rūgšties 1 nmol. Tačiau šis metodas reikalauja laiko sąnaudų, nes reikia reakcijos produktą išvalyti nuo heksanolio – tirpiklio, kuris naudojamas riebalų rūgščių išskirti.

1.5.7. Atominės jėgos mikroskopija

Atominės jėgos mikroskopijos (AJM) metodo veikimas pagrįstas analizuojamo mėginio ir skenuojančios adatos sistema. Tarp atomų esant mažiems atstumams – vieno angstromo (teigiant, kad vienas atomas yra ant analizuojamo pagrindo, kitas ant adatos), sistemą veikia atostūmio jėgos, o esant dideliems atstumams – traukos jėgos. Jėgos dydis eksponentiškai priklauso nuo atstumo tarp analizuojamo mėginio ir skenuojančio zondo galiuko. Zondo nukreipimo stebėjimui naudojami optiniai, talpuminiai, tuneliniai sensoriai. Apjungiant X, Y ašimis adatos judėjimą su Z ašimi, adatos virpesiais gaunama skenuojančio paviršiaus topografinė nuotrauka.

Fosfolipidinio bisluoksniu hidrolizė, kurią katalizuoja fosfolipazė A_2 [Nielsen ir kiti, **1999**], buvo tirta atominės jėgos spektroskopijos metodu (AJM) skystoje terpėje. Panašūs tyrimai atlikti sąveikaujant mišriems acilglicerolių/fosfolipidų bisluoksniams su *Thermomyces lanuginosus* lipaze (*TLL*) [Balashev ir kiti, **2003**].

Žėrutis padengiamas lipidiniu bisluoksniu, nuo kurio, po sąveikos su *TLL*, reakcijos produktai pasišalina į buferinį tirpalą ir atsiradę defektai nustatomi atominės jėgos mikroskopijos adata. Realiame laike bisluoksniu hidrolizės reakcijos gautus vaizdus analizuoja tam tikslui skirta programinė įranga. Specifiniam lipazės aktyvumui įvertinti naudojama bisluoksniu defektų ploto priklausomybė laike, sutarus, kad viena fermento molekulė veikia viename bisluoksniu defekte. Gauti rezultatai naudojami fermentų kinetikos fazių riboje lipidus/vanduo modeliavimui. Šie rezultatai pirmiausiai parodė lipidų skaidymo, jiems sąveikaujant su lipazėmis, nanoeilės kinetinį modelį [Balashev ir kiti, **2003**].

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

2.1. Aparatūra

Dializės membrana (14 kDa pralaidumo), Vokietija;
FT-Ramano spektrometras (PerkinElmer, Model Spectrum GX), Jungtinės Amerikos Valstijos;
Laboratorinis KNICK pH-metras 766, Vokietija;
Magnetinė maišyklė, Rusija;
Potenciostatas PARSTAT 2273 (Advance Electrochemical System), Jungtinės Amerikos Valstijos;
SDG (suminio dažnio generacijos) spektrometras, Lietuva;
Svarstyklės KERN PLS510–3, Vokietija;
Termostatas, Vokietija;
Ultragarsinė vonia BRANSONIC, Vokietija;
UV-VIS spektrofotometras (PerkinElmer, Model Spectrum GX), Jungtinės Amerikos Valstijos;
Vandens valymo sistema „Milli-Q PF plus“, Prancūzija.

2.2. Medžiagos ir reagentai

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ amonio peroksidisulfatas, Slovakija;
1,16-di(5-ferocenilpentanoiloksi)heksadekanas, susintetintas Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje;
1,2-di-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocholinas (DOPC), Avanti Polar lipids, Jungtinės Amerikos Valstijos;
1-heksantiolis $\geq 97\%$, Fluka, Švedija;
1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocholinas (POPC), Avanti Polar Lipids, Jungtinės Amerikos Valstijos;
20-tetradeciloksi-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatrikontan-1-tiolas (*Wilmos* junginys) – sintetinis fosfocholino analogas. Susintetintas ir gautas iš

David Vanderah, dirbančio NIST'e (National Institute of Standards and Technology).

2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis (TRIS) – Serva, Jungtinės Amerikos Valstijos;

2-merkaptioetanolis $\geq 97\%$, Fluka, Švedija;

9-(5'-ferocenilpentanoiloksi)nonildisulfidas – susintetintas Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje;

Al₂O₃ milteliai, Danija;

benzopurpurinas 4B – Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Vokietija;

etanolis (95-96,3%) ir distiliuotas etanolis (99,6%) – UAB „Vilniaus degtinė“, Lietuva;

etilendiamintetraacto rūgštis $\geq 99\%$, Fluka, Švedija;

fosfolipazė A₂, išskirta iš bičių nuodų, Sigma, Izraelis;

fosfolipazė A₂, išskirta iš kiaulės kasos, Sigma, Izraelis;

kalio chloridas (KCl) – analiziškai grynas, Sigma, Izraelis;

lipazė iš *Thermomyces lanuginosus*, inaktyvuotas mutantas S146A. Novozyme, Danija;

lipazė iš *Thermomyces lanuginosus*, Sigma, Vokietija;

NaCl, Fluka puriss., p. a. Acs; $>98\%$ (T), Švedija;

NaClO₄·2H₂O, Fluka, puriss., p. a. Acs; $>98\%$ (T), Prancūzija;

NaH₂PO₄·2H₂O, Fluka purum p.a.; crystallized; $> 99.0\%$ (T), Švedija;

sieros rūgštis 95%, Lenkija;

tritonas X-100 (polietilenglikol($n = 9,10$)-p-(*tert*-oktil)fenolis) – Ferak, Vokietija;

Fosfolipidai (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocholinas, 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocholinas) – sintetiniai, miltelių pavidalo, iš *Avanti Polar Lipids*.

2.3. Tirpalai

Buferiniai tirpalai ruošti naudojant dejonizuotą vandenį „Milli-Q PF plus“, JAV. Tirpalų pH nustatyti naudotas laboratorinis pH-metras Knick 766, Vokietija. Ruošiant tirpalus, norimas pH pasiekiamas, pridedant reikiamą tūrį koncentruotų NaOH arba HCl tirpalų.

0,01 M TRIS–0,1 M NaCl buferinis tirpalas, pH 8

0,01 M TRIS–0,1 M NaCl buferinis tirpalas, pH 9

0,01 M TRIS–0,1 M NaClO₄ buferinis tirpalas, pH 8

0,01 M TRIS–0,1 M NaClO₄ buferinis tirpalas, pH 9

0,01 M NaH₂PO₄–0,1 M NaCl buferinis tirpalas, pH 6

0,01 M NaH₂PO₄–0,1 M NaCl buferinis tirpalas, pH 7

0,01 M NaH₂PO₄–0,1 M NaClO₄ buferinis tirpalas, pH 6

0,01 M NaH₂PO₄–0,1 M NaClO₄ buferinis tirpalas, pH 7

0,01 M TRIS–0,1 M NaCl, esant 1 mM EDTA, buferinis tirpalas, pH 7,3

0,01 M TRIS–0,1 M NaCl, esant 1 mM EDTA, buferinis tirpalas, pH 8,2

0,01 M TRIS–0,1 M NaCl, esant 1 mM EDTA, buferinis tirpalas, pH 9,2

Buferiniai tirpalai paruošti pagal [Досон Р. и др. **1991**] literatūros šaltinį.

1 mM 1-heksantiolio etanolinis tirpalas,

10 mM 1,2–dioleoil–*sn*–glicero–3–fosfocholino etanolinis tirpalas,

10 mM 1–palmitoil–2–oleoil–*sn*–glicero–3–fosfocholino etanolinis tirpalas,

10 mM 2–merkpto etanolio etanolinis tirpalas,

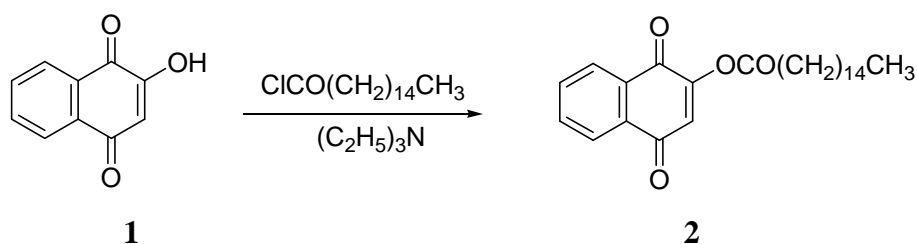
10 mM 1-oktadekantiolio etanolinis tirpalas.

2.4. Hidrolizės reakcijos substratų sintezė

Susintintų junginių struktūra buvo patvirtinta spektroskopiniais ir kitais analizės metodais. ^1H NMR spektrai užrašyti Varian Unity Inova 300 spektrometru (300 MHz), alternatyviu standartu naudojamas tetrametilsilanas (TMS). Cheminiai poslinkiai nurodomi ppm (δ), o signalas analizuojamas kaip s (singletas), t (tripletas), q (kvartetas), m (multipletas). Analizuojama medžiaga sumaišoma su KBr ir suspaudžiama į tabletę. IR spektrai užrašyti Perkin-Elmer Spectrum GX FT-IR spektrometru. Analitės lydymosi temperatūra nustatoma lydant ją kapiliare.

2-Oksipalmitoil-1,4-naftochinono (OPNQ) (**2**) sintezės metodika

2-Oksipalmitoil-1,4-naftochinono (**2**) sintezė parodyta 1 schemeje.

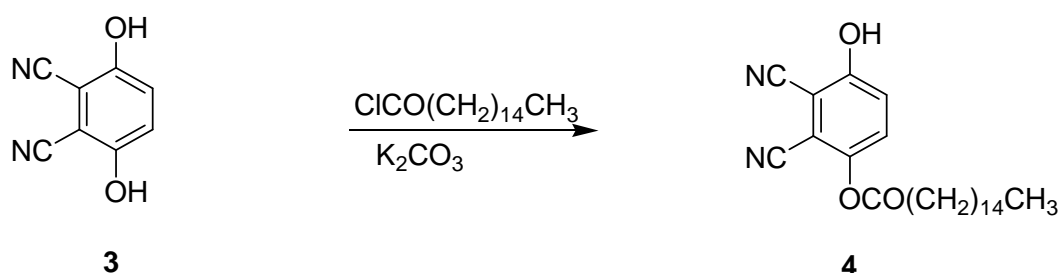


1 schema. 2–Oksipalmitoil–1,4–naftochinono sintezė

Trietilamino (0,15 ml, 1,1 mmol) ir absoliutaus acetono (15 ml) tirpalas 30 min $0-5\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje lašinamas į 2–hidroksi–1,4–naftochinono (**1**, 174 mg, 1 mmol), palmitoilchlorido (301 mg, 1,1 mmol) ir absoliutaus acetono (15 ml) tirpalą. Mišinys maišomas kambario temperatūroje 2 h, nuosėdos nufiltruojamos, o iš filtrato vakuume pašalinamas tirpiklis. Liekana gryninama chromatografijos būdu (silikagelis, eliuentas – CH_2Cl_2). Nugarinus tirpiklį, 2–oksipalmitoil–1,4–naftochinonas (**2**) kristalinamas iš heksano. Gaunami geltoni kristalai (248 mg, išeiga 60%, lydymosi temperatūra $70-71\text{ }^\circ\text{C}$, ^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm): 0,86–0,90 (m, 3H, CH_3), 1,25–1,82 (m,

26 H, 13 CH₂), 2,65 (t, *J* (sąveikos konstanta) = 7,4 Hz, 2H, CH₂CO), 6,75 (s, 1H, CH), 7,73–7,82 ir 8,08–8,15 (du m, 4H, C₆H₄); IR (KBr, ν, cm⁻¹): 1764 (C=O)).

***O*-palmitoil-2,3-dicianohidrochinono (PDCHQ) (4) sintezės metodika**

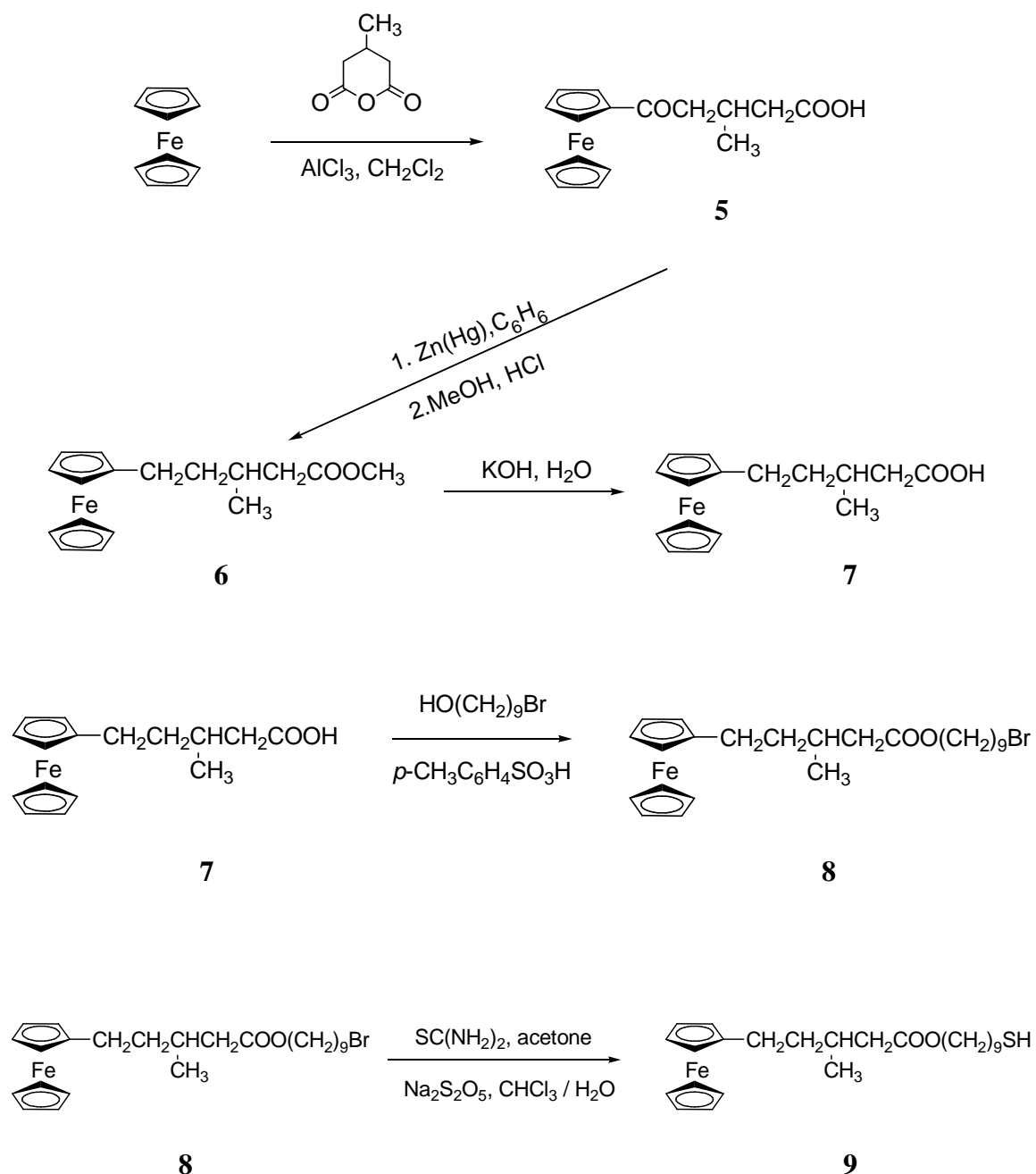


2 schema. *O*-palmitoil-2,3-dicianohidrochinono sintezė

2,3-Dicianohidrochinono (160 mg, 1 mmol), palmitoilo chlorido (274 mg, 1 mmol), bevandenio K₂CO₃ (2,4 g, 17 mmol) ir absoliutaus acetono mišinys (40 ml) maišomas ir virinamas 2 h. Nuosėdos filtruojamos iškart pasibaigus reakcijai, o filtratas nugarinamas vakuume. Liekana užpilama vandeniu (100 ml) ir parūgštinama praskiesta HCl (1:10) iki pH 6. Gautas mišinys du kartus ekstrahuojamas dietileteriu (30 ml), gauti ekstraktai sumaišomi, eterinis tirpalas du kartus plaunamas vandeniu ir džiovinamas virš MgSO₄. Nugarinus tirpiklį, liekana kristalinama iš metanolio. Gaunami balti *O*-palmitoil-2,3-dicianohidrochinono kristalai (250 mg, išeiga 63%, lydymosi temperatūra 100–102 °C; ¹H NMR (CDCl₃), δ (ppm), su CDCl₃: 7,25 (2H, AB q, *J* = 8,9 Hz, Ar), 2,65 (2H, CH₂CO, t, *J* = 7,5 Hz), 1,85–1,15 (m, 26 H, 13 CH₂), 0,90–0,86 (6H, m, 2 CH₃); IR (KBr, ν, cm⁻¹): 1779 (C=O)).

(±)9-Merkaptononil-3-metil-5-ferocenilpentanoato (MNMFP) (9) sintezės metodika

(±)9-Merkaptononil-3-metil-5-ferocenilpentanoato sintezė vyksta penkiomis stadijomis ir parodyta 3 schemeje.



3 schema. (±)9-Merkaptononil-3-metil-5-ferocenilpentanoato sintezė

(±)4-Ferocenoil-3-metilbutano rūgštis (5) sintezės metodika

Į 4,8 g (36 mmol) AlCl_3 ir 50 ml CH_2Cl_2 suspensiją kambario temperatūroje 45 min lašinamas 6,7 g (36 mmol) feroceno, 1,7 g (13 mmol) 3-metilglutaro rūgštis anhidrido ir CH_2Cl_2 (100 ml) tirpalas. Reakcijos mišinys maišomas kambario temperatūroje dar 2 h ir išpilamas ant ledu (500 g). Mišinys parūgštinamas iki pH 4. Organinis sluoksnis atsiskiriamas, o vandeninis sluoksnis ekstrahuojamas CH_2Cl_2 . CH_2Cl_2 tirpalai sumaišomi ir sukonzentruojami iki 200 ml tūrio. Gautas tirpalas ekstrahuojamas 2 N NaOH vandeniniu tirpalu (100 ml), organinio tirpiklio pėdsakai pašalinami iš vandens fazės vakuume. Reakcijos produktas išskiriamas lėtai pridėjus ortofosforo rūgštis (50%) 5 °C temperatūroje. Oranžinės spalvos nuosėdos filtruojamos, plaunamos vandeniu ir džiovinamos ore. Gaunama 1,2 g geltonos kietos medžiagos, (±)4-ferocenoil-3-metilbutano rūgštis (**5**, išeiga 30%; lydymosi temperatūra 96–98 °C. ^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm): 1,11 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H, CH_3), 2,62–2,82 (m, 5H, CH_2CHCH_2), 4,20–4,80 (m, 9H, Fc); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 20,45, 26,76, 40,86, 45,68, 69,35 (2C), 69,81 (5C), 72,35 (2C), 79,04, 178,23 (CO), 203,63 (CO)).

(±)Metil-3-metil-5-feroceniilpentanoato (6) sintezės metodika

Į (±)4-ferocenoil-3-metilbutano rūgštis (**5**, 3,14 g, 10 mmol), 50 ml metanolio, 16 ml H_2O ir 16 ml koncentruotos HCl tirpalą įdedama šviežiai paruošta cinko amalgama. Mišinys virinamas 6 h, atšaldomas iki kambario temperatūros ir pridedama 50 ml benzeno. Amalgama nufiltruojama ir nuplaunama benzenu (20 ml). Gautas organinis tirpalas plaunamas vandeniu ir džiovinamas virš MgSO_4 , tirpiklis nugarinamas vakuume, o liekana gryninama chromatografijos būdu (silikagelis, eliuentas – CH_2Cl_2). Gaunama 2,5 g geltonos alyvos (**6**), išeiga 80%; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 0,98 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, CH_3), 1,35–1,63 (m, 2H, CH_2), 1,99 (m, 1H, CH), 2,12–2,42 (m, 4H, FcCH_2 , CH_2CO), 3,67 (s, 3H, CH_3O), 4,02–4,12 (m, 9H, Fc); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 19,72, 26,81, 30,32, 37,81, 41,52, 51,40,

67,11 (2C), 67,91 (2C), 68,49 (5C), 89,11, 173,58 (C=O); IR (KBr, v, cm^{-1}): 1738 (C=O)).

(±)3-Metil-5-ferocetilpentano rūgštis (7) sintezės metodika

(±)Metil-3-metil-5-ferocetilpentanoato (**6**) (3,14 g, 10 mmol), 100 ml metanolio, 50 ml H_2O ir KOH (2,8g, 50 mmol) mišinys virinamas 3 h ir sukonzentruojamas iki 50 ml tūrio. Liekana išpilama ant ledu (200 g) ir parūgštinama konc. HCl iki pH 4. Mišinys ekstrahuojamas CH_2Cl_2 , po to organinis sluoksnis plaunamas vandeniu ir sotaus NaCl tirpalu, džiovinamas virš MgSO_4 . Nugarinus tirpiklį, produktas (**7**) gryninamas chromatografijos būdu (eliuentas – $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$, 3:1=v/v). Gaunama geltona kieta medžiaga (**7**, 2,1 g, išeiga 70%, lydymosi temperatūra – 62–65 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1,01 (br. d, $J = 6,6$ Hz, 3H, CH_3), 1,35–1,70 (br. m, 2H, CH_2), 2,00 (br. m, 1H, CH), 2,12–2,5 (br. m, 4H, $\text{FcCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 4,02–4,12 (br. m, 9H, Fc); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 19,69, 26,82, 30,17, 37,79, 41,40, 67,10 (2C), 67,87 (2C), 68,46 (5C), 88,96, 179,29 (C=O)).

(±)9'-Bromnonil-3-metil-5-ferocetilpentanoato (8) sintezės metodika

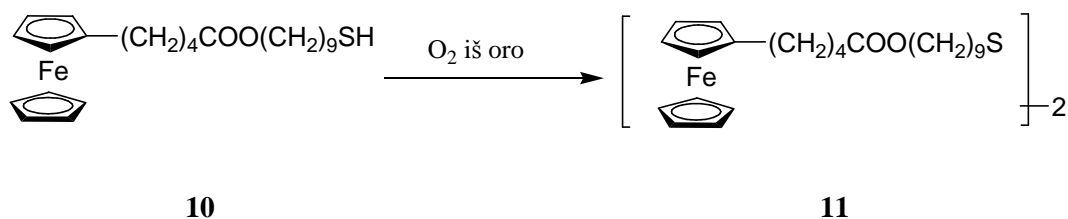
(±)3-Metil-5-ferocetilpentano rūgštis (**7**, 600 mg, 2,0 mmol), *p*-toluensulfonrūgštis (344 mg, 2,0 mmol) ir benzeno (60 ml) mišinys 12 valandų argono atmosferoje virinamas su Deano-Starko gaudykle. Reakcijos mišinys atšaldomas iki kambario temperatūros, plaunamas vandeniu ir džiovinamas virš MgSO_4 . Benzenas nugarinamas vakuume, liekana gryninama chromatografijos būdu (silikagelis, eliuentas – $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_6\text{H}_{14}$; 3:1=v/v). Gaunama geltona aliejiška medžiaga (**8**, 660 mg, išeiga 65,3%; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 0,98 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, CH_3), 1,22–1,91 (m, 16H, 7 CH_2 , CH_2), 2,10–2,44 (m, 4H, $\text{FcCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 3,40 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, CH_2Br), 4,02–4,11 (m, 11H, CH_2O , Fc); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 19,73, 25,89, 26,82, 28,11, 28,63 (2C), 29,11, 29,28, 30,36, 32,77,

34,02, 37,87, 41,83, 64,34, 67,05 (2C), 67,85, 67,87, 68,43 (5C), 89,06, 173,26 (CO). IR (KBr, ν , cm^{-1}): 1732 (C=O)).

(\pm)9'-Merkaptononil-3-metil-5-ferocenilpentanoato (9) sintezės metodika

(\pm)9'-Bromnonil-5-ferocenil-3-metilpentanoato (8, 505 mg, 1,0 mmol), tiokarbamido (304 mg, 4,0 mmol) ir absoliutaus acetono (30 ml) tirpalas argono atmosferoje virinamas apie 90 h. Acetonas nugarinamas vakuume, gauta izotiuonio druska dedama į CHCl_3 (40 ml), vandens (20 ml) ir $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (380 mg, 2 mmol) mišinį. Reakcijos mišinys intensyviai maišomas ir virinamas argono atmosferoje. Po 4 h organinis sluoksnis atskiriamas, plaunamas vandeniu, džiovinamas virš MgSO_4 , tirpiklis nugarinamas vakuume. Liekana gryninama chromatografijos būdu (silikagelis, eliuentas – $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_6\text{H}_{14}$; 1:1 = v/v). Gaunama geltona aliejiška medžiaga – (\pm)9'-merkaptononil-3-metil-5-ferocenilpentanoatas (9) (190 mg, išeiga 41,5%, ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 0,98 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, CH_3), 1,22–1,70 (m, 17H, 7 CH_2 , CH_2 , SH), 1,99 (m, 1H, CH), 2,10–2,42 (m, 4H, FcCH_2 , CH_2CO), 2,52 (kvartetas, $J = 7,5$ Hz, 2H, CH_2S), 4,03–4,12 (m, 11H, CH_2O , Fc), ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 19,72, 24,62, 25,90, 26,82, 28,30, 28,63, 28,96, 29,14, 29,35, 30,35, 33,98, 37,87, 41,82, 64,34, 67,04 (2C), 67,83 (2C), 68,43 (5C), 89,06, 173,24 (CO); IR (KBr, ν , cm^{-1}): 1570 (SH), 1732 (C=O)).

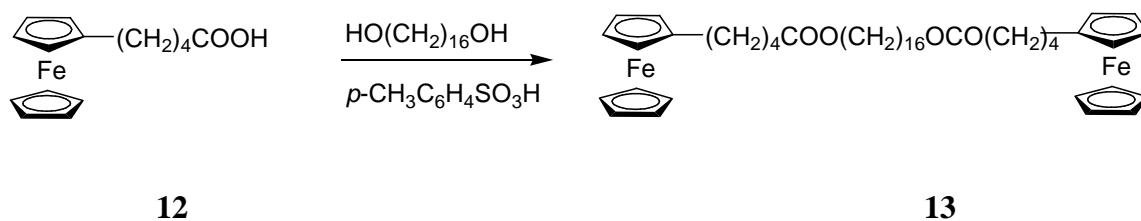
9-(5'-Feročenilpentanoiloksi)nonildisulfido (FPONDS) (11) sintezės metodika



4 schema. 9-(5'-Feročenilpentanoiloksi)nonildisulfido sintezė

9-Merkaptononil-5'-ferocetilpentanoatas (**MNFcP**) (**10**) (1 mmol, 444 mg) (šio junginio sintezė panaši į (±)9-merkaptononil-3-metil-5-ferocetilpentanoato sintezę, tačiau vietoj 3-metilglutaro rūgšties anhidrido pirmoje stadijoje naudojamas glutaro rūgšties anhidridas) plonu sluoksniu paskleidžiamas Petri lėkštelėje ir laikomas ore 25–27 °C temperatūroje. Po 12 dienų alyva ištirpinama CH₂Cl₂ ir tirpiklis nugarinamas vakuume. Liekana gryninama chromatografijos būdu (silikagelis, eliuentas – CH₂Cl₂/C₆H₁₄, 10:1 = v/v). Nugarinus tirpiklį, gaunamas 9-(5'-ferocetilpentanoiloksi)nonildisulfidas (**11**, geltonos spalvos aliejiška medžiaga, 200 mg, išeiga 45%; ¹H NMR (CDCl₃), δ (ppm): 1,25–1,74 (m, 36H, 18CH₂), 2,31–2,39 (m, 8H, 2CH₂CO, 2CH₂Fc), 2,70 (t, *J* = 7,3 Hz, 4H, 2CH₂S), 4,04–4,13 (m, 22H, 2Fc žiedas, 2OCH₂); IR (juosta, cm⁻¹): 1733 (esteris C=O)).

1,16-Di-(5-ferocetilpentanoiloksi)heksadekano (**FPOHD**) (**13**) sintezės metodika



5 schema. 1,16-Di-(5-ferocetilpentanoiloksi)heksadekano (**13**) sintezė

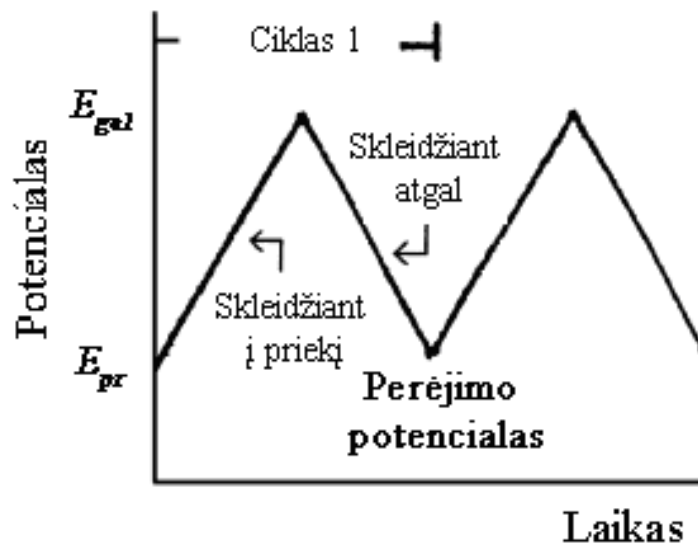
5-Ferocetilpentano rūgšties (**12**) (286 mg, 1,0 mmol), 1,16-heksadekandiolio (129 mg, 0,05 mmol), *p*-toluensulfonrūgšties (189 mg, 1,1 mmol) ir benzeno (30 ml) mišinys virinamas argono atmosferoje panaudojant Dino–Starko gaudyklę. Po 12 h reakcijos mišinys atšaldomas iki kambario temperatūros, plaunamas vandeniu ir džiovinamas virš MgSO₄. Nugarinus vakuume benzeną, liekana gryninama chromatografijos būdu (silikagelis, eliuentas – CH₂Cl₂). Gaunama geltona kieta medžiaga (**13**)

(200 mg, išeiga 50,3%; lydymosi temperatūra 62–64 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 2,25–1,70 (m, 36H, 14CH_2 , $2 \times 2\text{CH}_2$), 2,28–2,36 (m, 8H, $2\text{CH}_2\text{CO}$, $2\text{CH}_2\text{Fc}$), 4,03–4,09 (m, 22H, 2Fc, $2\text{CH}_2\text{O}$); IR (KBr, ν , cm^{-1}): 1735 (C=O)).

2.5. Elektrocheminiai metodai

2.5.1. Ciklinė voltamperometrija

Ciklinėje voltamperometrijoje (CV) potencialas skleidžiamas tolygiai užduotu greičiu, tarp pasirinkto pradinio E_{pr} ir galutinio E_{gal} potencialo, kuriuos mes parenkame su programine įranga. Šis metodas naudojamas kiekybiniam arba kokybiniam elektrocheminės sistemos įvertinimui. Toks potencialo skleidimas yra trikampio formos (potencialas–laikas koordinatėse) 11 pav.

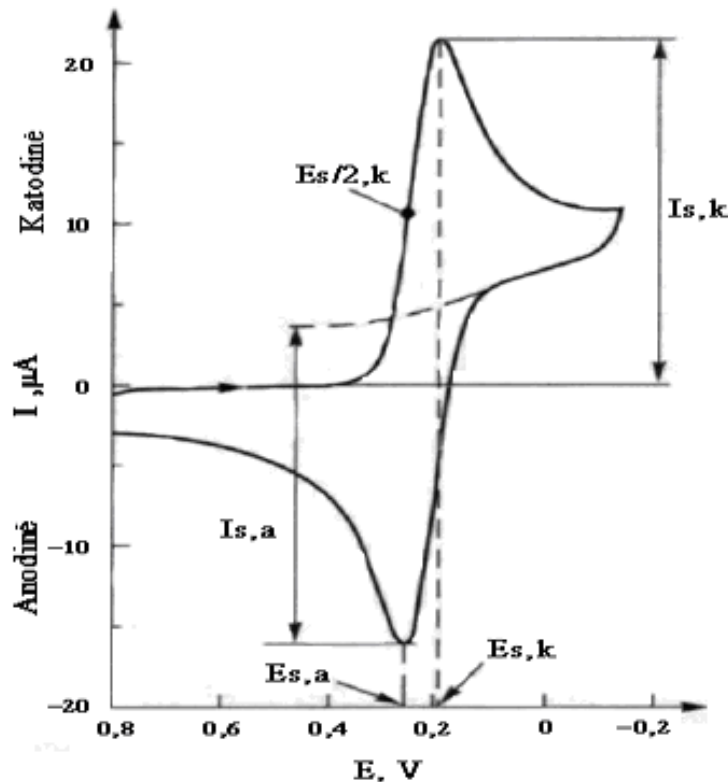


11 pav. Potencialo kitimas laike ciklinės voltamperometrijos metode

Gautas atsakas – srovė, iš kurios galima spręsti apie vykstančius oksidacijos-redukcijos procesus, jų grįžtamumą, oksidacijos-redukcijos smailių padėčių potencialus, būdingus konkrečiai medžiagai, krūvių pernašos procesus, medžiagos kiekį ant elektrodo paviršiaus, taip pat galima nustatyti, ar vyksta procesai ant elektrodo paviršiaus ir kokie jie yra.

Elektrodui suteikiami poliarizacijos impulsai tiesiškai keičiasi iš pradžių katodine, po to anodine kryptimi. Grįžtamojo vyksmo metu medžiaga, kuri redukuojasi per katodinę poliarizaciją, dėl spartaus potencialo kitimo nespėja pasišalinti nuo elektrodo paviršiaus iš difuzijos sluoksnio, todėl vėl oksiduojasi antrojo ciklo pusėje, skleidžiant potencialą nuo galinio potencialo (E_{gal}) link

pradinio (E_{pr}). Gaunamos dvi skirtingo poliškumo srovės smailės (12 pav.) [Mickevičius 1999].



12 pav. Grįžtamojo vyksmo ciklinė voltamperometrija: $C_{K_3Fe(CN)_6} = 6 \cdot 10^{-3}$ mol/l, indiferentinis elektrolitas – 1 mol/l KNO_3 ; $V_E = 50$ mV/s, palyginamasis elektrodas – sotasis kalomelio elektrodas

Grįžtamiesiems elektrocheminiams procesams galima surasti formalųjį potencialą:

$$E^0 = \frac{E_{s,k} + E_{s,a}}{2}, \quad (1)$$

kurio vertė yra redokso medžiagos charakteringas dydis, nepriklausantis nuo potencialo skleidimo greičio, bet priklausantis nuo medžiagos prigimties. Kai redokso medžiaga yra adsorbuota ant elektrodo paviršiaus, ciklinės voltamperogramos smailės yra kitokios formos negu pavaizduota 12 paveiksle: yra labiau simetrinės, pasibaigus medžiagos oksidacijos arba redukcijos reakcijai srovės vertės siekia talpumines sroves. Kai oksiduotos formos medžiaga stipriai adsorbuojasi ant paviršiaus sudarydama tolygų

sluoksnį ir tirpale yra labai maža redokso medžiagos koncentracija, ištirpusi oksiduotos formos medžiaga nelabai turi įtakos detektuojamai srovei. Tuomet:

$$-\frac{\partial \Gamma_{\text{O}}(t)}{\partial t} = \frac{\partial \Gamma_{\text{R}}(t)}{\partial t} = \frac{i}{nFA}, \quad (2)$$

čia Γ_{O} ir Γ_{R} – medžiagos oksiduotos ir redukuotos formos kiekio suma laiko momentu t (mol/cm^2), i/nFA yra medžiagos vartimo kita greitis, matuojamas moliais per sekundę ploto vienetui. Iš šios lygties seka, jog redukuojant adsorbuotą oksiduotą formą ant elektrodo paviršiaus, jei nepasireiškia elektroaktyvios medžiagos desorbcija, gaunama adsorbuota redukuotos formos medžiaga [Bard ir Faulkner 2001].

Suintegravus aukščiau pateiktą lygtį gaunama paprastesnė jos išraiška:

$$-\Gamma_{\text{O}} = \Gamma_{\text{R}} = \frac{q}{nFA}. \quad (3)$$

Redukuotos medžiagos smailės plotas, kurį galima lengvai rasti suintegravus gautą smailę (potencialas paverčiamas laiku, žinant potencialo skleidimo greitį), atspindi medžiagos sluoksnio krūvį. Anodinė oksidacijos smailė yra katodinės smailės atspindys, idealiu atveju, kai procesas yra visiškai grįžtamas. Idealium atveju anodinės ir katodinės smailės pikų potencialų vertės yra vienodos: $E_{\text{a}} = E_{\text{k}}$.

Pusaukščio plotis apskaičiuojamas iš šios lygties:

$$\Delta E_{\text{p},1/2} = 3,53 \frac{RT}{nF} = \frac{90,6}{n} \text{mV} (25 \text{ } ^\circ\text{C}). \quad (4)$$

Smailės potencialo $E_{\text{p},1/2}$ lokalizacija priklauso nuo adsorbuotų molekulių tarpusavio sąveikos stiprumo. Kai adsorbuotas molekules veikia traukos jėgos, tai $E_{\text{p},1/2}$ yra mažesnis už 90,6 mV (viennelektroninei pernašai) ir jei veikia stūmos jėgos, $E_{\text{p},1/2}$ yra didesnis už 90,6 mV.

Ciklinės voltamperometrijos matavimai atlikti trijų elektrodų celėje. Darbiniu elektrodu naudotas Au elektrodas, pagalbinis – Pt viela, palyginamuoju – kalomelio elektrodas, užpildytas sočiuoju natrio chlorido tirpalu (SNKE). Voltamperogramos gautos VersaStat (EG&G) potenciostatu valdoma kompiuterizuota elektrocheminė sistema (Princeton Applied

Research, Princeton, JAV). Eksperimentai atlikti 25 °C temperatūroje, esant skirtingos sudėties ir pH buferiniams tirpalams.

Polikristalinis darbinis aukso elektrodas poliruojamas 0,05 μm Al₂O₃ milteliais (Struers, Danija) 5 minutes ant dejonizuotu vandeniu sudrėkinto kilimėlio. Nupoliruotas elektrodas maždaug 10 minučių veikiamas ultragarsu ultragarsinėje vonioje (Branson 1510, JAV) vandens–etanolio tirpale (1:1). Tokiu būdu nuo elektrodo paviršiaus pašalinami poliravimui naudoti milteliai ir bet kokios kitos organinės arba neorganinės kilmės priemaišos, adsorbuotos ant paviršiaus. Po to darbinis elektrodas ciklinės voltamperometrijos metodu valomas 0,1 M sieros rūgštyje, skleidžiant potencialą 100 mV/s greičiu tarp 0,0 V ir 1,5 V potencialo (kalomelio, užpildyto sočiuoju natrio chlorido tirpalu, elektrodo atžvilgiu; SNKE yra $E = 236 \text{ mV SVE}$ atžvilgiu) 25 °C temperatūroje. Iš gautų voltamperogramų apskaičiuojamas tikrasis elektrodo paviršiaus plotas: suintegravus oksidacijos reakcijos kreivės dalį tarp 0,90–1,45 V, gaunamas krūvis, kuris padalinamas iš $400 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Nuvalytas elektrodas nuplaunamas dejonizuotu vandeniu ir etanolium, nusausinamas prapučiant jo paviršių argono dujomis (AGA, Švedija). Tokiu būdu paruoštas elektrodo paviršius modifikuojamas dviem būdais:

1. Elektrodas įmerkiamas į 0,1 mM MNFcP etanolio tirpalą ir laikomas jame 3 val. Ant elektrodo paviršiaus susiformuoja elektroaktyvių MNFcP molekulių savitvarkis monosluoksnis.

2. Traukos spintoje ant viso elektrodo paviršiaus (ant aukso dalies ir aplink esančio teflono) su dozatoriumi užlašinamas 5 μl 25 μM feroceno funkcinę grupę turinčio junginio (MNFcP, FPONDS arba FPOHD) etanolinis tirpalas. Etanoliumi išgaravus nuo elektrodo paviršiaus, lieka fisisorbuotas elektroaktyvaus junginio sluoksnis.

Srovės tankis, gaunamas vykstant eksperimentui, yra nefaradėjinės (i_{nf}) ir faradėjinės (i_{f}) srovės tankių suma:

$$i = i_{\text{nf}} + i_{\text{f}} = C_{\text{d}} \frac{dE}{dt} + i_{\text{f}}. \quad (5)$$

Pirmas šios lygties narys priklauso nuo potencialo ir dvigubojų sluoksnio talpos. Kai potencialo sklaidymo greitis < 1000 mV/s, o elektrodo talpa yra apie $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (su tokia sąlyga dažnai susiduriame SM atveju), tada aukščiau nurodytą lygtį galima supaprastinti:

$$i \approx i_f. \quad (6)$$

Tačiau, priešingu atveju, kai sklaidymo greitis ≥ 1000 mV/s, dažniausiai nebegalima ignoruoti pirmąją lygties narį, nes šiuo atveju jis turi didelės įtakos bendram srovės tankiui.

Iš ciklinės voltamperometrijos kreivių, apskaičiavus smailės plotą, gauname krūvį, atitinkantį oksiduotą arba redukuotą medžiagos kiekį. Iš šių parametrų palyginimo galima pasakyti apie proceso grįžtamumą.

Kiekvienos kreivės smailės aukštis priklauso nuo potencialo sklaidymo greičio (V_E), kuo V_E yra didesnis, tuo atitinkamai smailių aukščiai bus didesni.

Potencialas, atitinkantis maksimalią srovę, yra pastovus dydis konkrečiam junginiui ir gali būti pritaikytas medžiagos atpažinimui, kokybinei analizei.

Smailės pusaukščio plotis – dydis, charakterizuojantis paviršiuje esančių molekulių sąveiką. Jei savitvarkio monosluoksnio redokso signalo pusaukščio pločio skaitinė vertė daug didesnė už $90/n$, mV (n – elektronų skaičius), tai tarp molekulių pasireiškia stiprios atostūmio jėgos, ir atvirkščiai, jei mažesnė – traukos jėgos. Voltamperometriniu metodu, keičiant elektrodo potencialą, galima *in situ* gauti oksiduotą arba redukuotą savitvarkio monosluoksnio formą.

2.5.2. Sukamojo diskinio elektrodo metodas

Sukamasis diskinis elektrodas vertikaliai užmaunamas ant strypo, kuris sujungtas su motoriuku ir sinchroniškai suka elektrodą nustatytu kampiniu sukimosi greičiu (ω), kuris lygus $2\pi f$ (f yra sukimosi greitis, apsisukimai per minutę). Vykstant sukimuisi arčiausias prie elektrodo paviršiaus skysčio sluoksnis įgauna išcentrinį greitį, kuris jį nukreipia nuo elektrodo centro. Tai užtikrina skysčio atėjimą iš tirpalo tūrio, t.y. sukelia maišymą. Kai tirpalo maišymą apsprendžia laminarinis tirpalo judėjimas (t.y. kai sukimosi greitis neviršija 4000 apsisukimų per minutę), difuzijos sluoksnio storis prie elektrodo paviršiaus mažėja, didėjant sukimosi greičiui. Keičiant sukamojo diskinio elektrodo sukimosi greitį nuo 100 aps/min iki 4000 aps/min, difuzijos sluoksnio storis keičiasi nuo 50 μm iki 5 μm . Gaunamos „S“ raidės formos voltamperogramos. Esant mažam sukimosi greičiui, nuo 0 aps/min iki 100 aps/min, prieš pasiekiant ribinę srovę voltamperogramose matomos srovės didesnės už ribinę srovę, iškilimo lankelis, kuris atsiranda dėl natūralios konvekcijos. Sukamojo diskinio elektrodo matavimai atlikti trijų elektrodų celėje, kuri įstatoma į termostatuojamus „marškinėlius“. Darbiniu elektrodu naudojamas stiklo grafitinis, pagalbinis – Pt viela, palyginamuoju – Ag/AgCl/NaCl_{sotus} elektrodas (SSCE, $E = 197 \text{ mV SVE atžvilgiu}$) 40 °C temperatūroje. Voltamperogramos registruotos VersaStat (EG&G) kompiuterizuota elektrochemine sistema (Princeton Applied Research, JAV), sujungta su sukamuoju diskiniu elektrodu (13 pav.).



13 pav. Sukamasis diskinis elektrodas

Tirpalų paruošimas: 50 μ l Tritono X-100 sumaišoma su 19,95 ml 0,1 M NaCl ir 0,01 M fosfatiniu buferiniu tirpalu (pH 7; 7,6; 8,7; 9,6 – **tirpalas A**), gautas tirpalas tol šildomas 40 °C temperatūros vonioje, kol tampa homogeninis. Lipazės substrato tirpalas paruošiamas ištirpinus 2,1 mg OPNQ arba 2 mg PDCHQ 1 ml etanolio (konc. 96,4%) ir šildant 40 °C temperatūroje (**tirpalas B**). Matavimams atlikti celėje, termostatuojamoje 40 °C temperatūroje, sumaišoma 9 ml **tirpalo A** ir 1 ml **tirpalo B**, gaunamas 0,5 mM substrato tirpalas, naudojamas analizėje.

Tyrimai atlikti termostatuojant celę 40 °C temperatūroje aerobinėmis (OPNQ atveju) arba anaerobinėmis (PDCHQ atveju) sąlygomis. Stiklo grafitinis elektrodas buvo poliruojamas sudrėkintais 0,05 μ m dydžio Al₂O₃ milteliais apie 30 sekundžių prieš kiekvieną užrašomą voltamperogramą.

Gautų voltamperogramų analizėje naudojama Levičio lygtis (7):

$$I_{\text{rib}} = 0,62 \cdot n \cdot F \cdot A \cdot D_o^{2/3} \cdot \omega^{1/2} \cdot \nu^{-1/6} \cdot C_o^*, \quad (7)$$

čia:

A – elektrodo plotas (cm^2),

D_o – elektroaktyvios medžiagos difuzijos koeficientas (cm^2/s),

ω – sukamojo diskinio elektrodo sukimosi greitis (rad/s),

ν – kinematinis klampis (cm^2/s); praskiestų vandeninių tirpalų, kai $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$, kinematinio klampio skaitinė vertė artima $0,01 \text{ cm}^2/\text{s}$,

C_o^* – elektroaktyvios medžiagos koncentracija tirpale (mol/cm^3),

n – elektronų, dalyvaujančių redokso reakcijoje, skaičius,

F – Faradėjaus konstanta ($96\,500 \text{ C/mol}$).

Kaip matome iš lygties, tarp ribinės srovės ir sukamojo diskinio elektrodo sukimosi greičio kvadratinės šaknies yra tiesinė priklausomybė. Padidinus sukimosi greitį nuo 400 aps/min iki 1600 aps/min ribinė srovė išauga dvigubai. Užrašius 5–10 voltamperogramas, esant skirtingam sukimosi greičiui, ir iš gautų duomenų sudarius priklausomybę I_{rib} nuo $\omega^{0,5}$, nustatomas tiesės nuolinkio kampo koeficientas α , iš kurio pagal 8 lygtį nustatomas elektroaktyvios medžiagos difuzijos koeficientas:

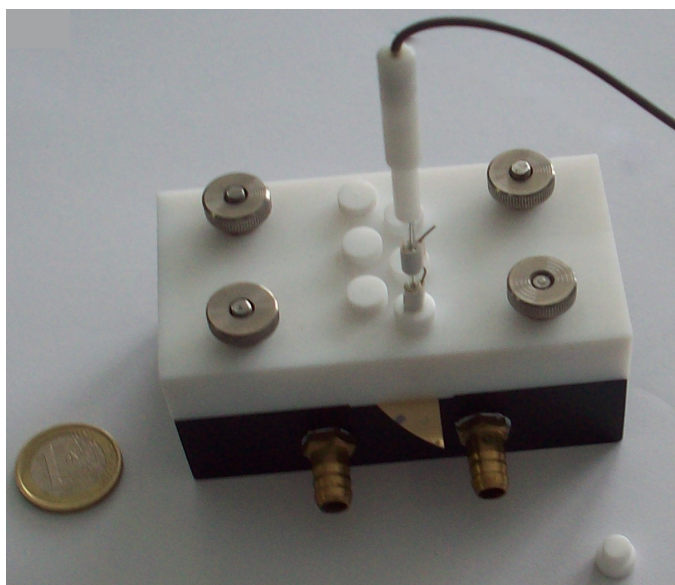
$$\alpha = 0,62 \cdot n \cdot F \cdot A \cdot D_o^{2/3} \cdot \nu^{-1/6} \cdot C_o^*. \quad (8)$$

Difuzijos koeficientas yra charakteringas medžiagos dydis, kuris skaitine verte lygus medžiagos kiekiui, difunduojančiam per laiko vienetą pro ploto vienetą, kai koncentracijos gradientas yra lygus 1.

2.5.3. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodas

Elektrocheminio impedanso spektroskopijos (EIS) tyrimai buvo atlikti naudojant kompiuterizuotą sistemą Parstat 2273 (Princeton Applied Research, JAV), valdomą Power Suite programiniu paketu. Gautų duomenų analizėje naudotas EIS spektrų optimizavimo, laisvai prieinamas programų paketas Zview. Matavimai atlikti trijų elektrodų elektrocheminėje matavimo sistemoje.

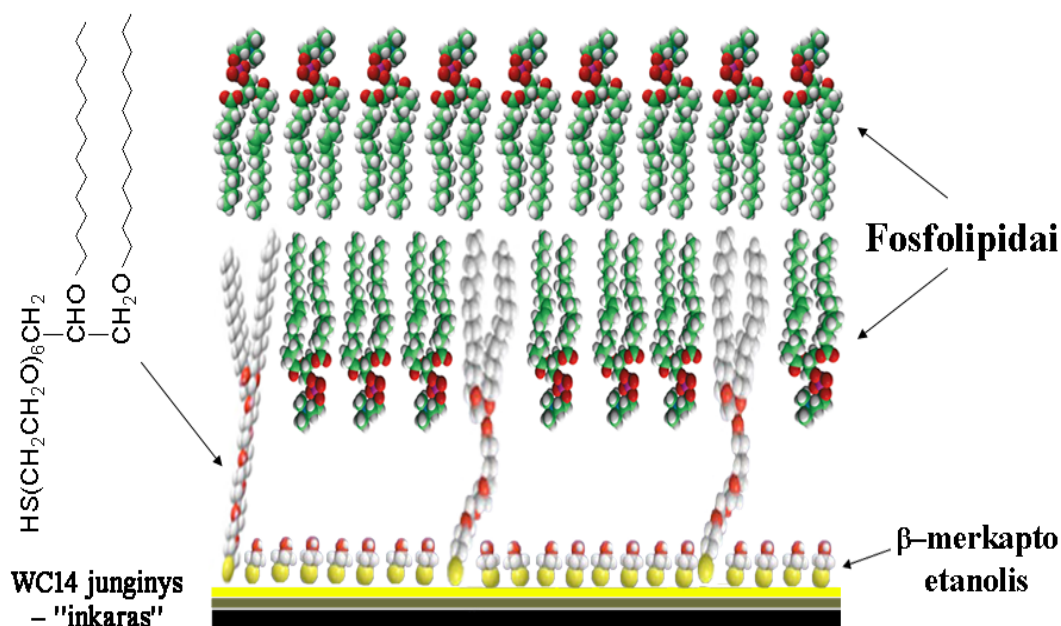
Palyginamuoju elektrodu naudotas Ag/AgCl/NaCl_{sotus} (Microelectrodes, Inc firmos) elektrodas, pagalbinis elektrodu – 0,25 mm diametro Pt viela, susukta į spiralę aplink palyginamojo elektrodo stiklo vamzdelio galiuką. Darbiniu elektrodu buvo naudojama Si plokštelė, magnetronu padengta plonu ~ 3 nm Cr sluoksneliu, ant kurio užgarinamas 100–200 nm storio aukso sluoksnelis. Tyrimai atlikti su specialiai šiam analizės metodui parengtu elektrocheminių celių bloku, leidžiančiu atlikti elektrocheminius tyrimus pastovioje temperatūroje (14 pav.). Visi tyrimai buvo atliekami 20 °C temperatūroje aerobiniuose elektrolitų tirpaluose. Tyrimuose naudoti 0,01 M TRIS ir 0,1 M NaCl įvairių pH buferiniai tirpalai, į kuriuos buvo pridėta 1 mM EDTA (naudojama Ca²⁺ jonų – fermento kofaktorius – pėdsakams surišti paruoštuose tirpaluose, nes jie trukdo įvertinti fermento įtaką membranai eksperimento pradžioje).



14 pav. Šešių elektrocheminių celių termostatuojamas blokas, surinktas elektrocheminio impedanso matavimams. Vertikalus stiklinis elektrodas – Ag/AgCl/NaCl_{sotus} palyginamasis elektrodas, geltona plokštelė – darbinis Au elektrodas, pagalbinis elektrodas – Pt viela, apvyniota aplink palyginamojo elektrodo vamzdelio galiuką, įstatomą į celės vidų, ir išvesta į išorę. Šalia bloko palyginimui padėta 1 euro moneta.

Dirbtinių fosfolipidinių membranų, su kuriomis buvo tiriami esterazių veikimo mechanizmai, molekulinė sandara pavaizduota 15 paveiksle. Paviršiuje imobilizuotoms membranoms formuoti buvo naudojamas 20-tetradeciloksi-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatrikontan-1-tiolis (sintetinis fosfocholino analogas, toliau žymimas WC14) ir 2-merkptoetanolis (2ME).

Tokia *t*BLM struktūra paruošiama dviem etapais: pirmiausia švari silicio plokštelė su užgarintu aukso sluoksniu, laikoma WC14 ir β -merkptoetanolio (30%:70% = WC14: β ME) etanoliniame tirpale 3–4 val. Susidaręs savitvarkis yra mišrus β ME ir WC14 junginių (15 pav.) monosluoksnis, naudojamas fosfolipidinio bisluoksnio prikabinimui antrame paruošimo etape.

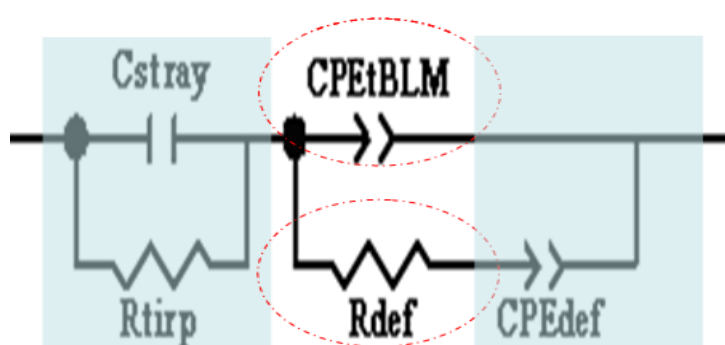


15 pav. Paviršiuje imobilizuotų fosfolipidų bisluoksnių (*t*BLM) molekulinė sandara

Au plokštelė, modifikuota tioliais, buvo įstatoma į 14 pav. parodytą celių bloką ir į kiekvieną indelį pridedama 45 μl 10 mM norimo fosfolipido etanolinio tirpalo. Tyrimams buvo naudojami šie fosfolipidai:

- 2-oleoil-1-palmitoil-*sn*-glicerolio-3-fosfocholinas (POPC),
- 1,2-dioleoil-*sn*-glicerolio-3-fosfocholinas (DOPC).

Visi lipidai gauti iš Avanti Polar Lipids, Inc (JAV). Po maždaug 5–10 minučių inkubacijos į kiekvieną indelį dideliu greičiu (maždaug 3 ml/s) virš kriauklės su švirkštu įpilamas iki 15–20 ml atitinkamos sudėties buferinis tirpalas; šio tirpalo perteklius nuteka iš celės per bloko paviršių į kriauklę, taip pakeičiamas tirpiklis. Tai sukelia spontanišką fosfolipido „išsūdymą“ iš etanolinio tirpalo. Ant modifikuoto Au paviršiaus fosfolipidas saviorganizuojasi į bisluoksnį, kurio molekulinė struktūra neseniai įrodyta neutronų reflektometrijos metodu [Valincius ir kiti, 2006].



16 pav. Ekvivalentinis prikabintos fosfolipidinės membranos modelis

1. parametrai, charakterizuojantys membranų paviršines savybes: CPE_{tBLM} – fosfolipidinio bisluoksniu talpa, R_{def} – defekto varža, CPE_{def} – pastovios fazės elementas; esant nedidelei defektų koncentracijai, šio elemento laipsnis turi būti 0,5;
2. parametrai, charakterizuojantys tūrio savybes: R_{sol} – tirpalo varžą modeliuojantis elementas, C_{stray} – matavimo grandinės parazitinė talpa, pasireiškianti didelių dažnių srityje $>10^4$ Hz.

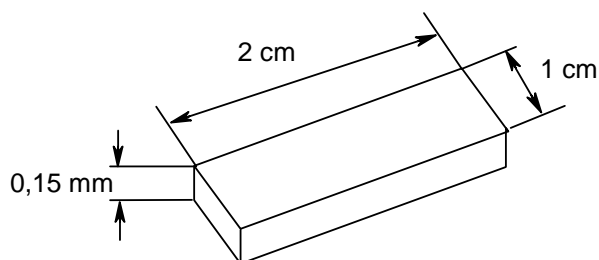
Pagal ekvivalentinį modelį, pavaizduotą 16 paveiksle, galima matematiškai analizuoti prikabintų ant paviršiaus fosfolipidinių membranų impedansą ir įvertinti membranų parametrų kitimus dėl temperatūros, elektrolito, baltymo koncentracijos poveikio ir kitų.

2.6. Spektroskopiniai metodai

2.6.1. Sustiprintos paviršiumi IR absorbcijos spektroskopijos (SEIRA) metodas

Sustiprintos paviršiumi IR spektroskopijos (SEIRA) matavimams atlikti naudotos 0,4–0,6 mm storio Si plokštelės, kurios prieš substrato fizisorbuoto sluoksnio formavimą buvo paruošiamos kaip aprašyta žemiau.

1). Si plokštelės (17 pav.) paviršiaus valymas. Plokštelė įmerkiamą į specialų paviršiaus nuriebalinimo tirpalą ~ 20 minučių (mes naudojome amonio persulfato tirpalą koncentruotoje sieros rūgštyje). Laikant nuriebalinimo tirpale Si plokštelę, ant jos paviršiaus formuojasi SiO_2 , todėl nuriebalinimo procedūra užtrukdavo 15–20 min.



17 pav. Nušlifotos Si plokštelės parametrai (patikrinti 0,15 mm)

2). Gausus praplovimas dejonizuotu vandeniu. Po praplovimo Si plokštelė įmerkiamą į stiklinę su nauju dejonizuotu vandeniu maždaug 20 minučių.

3). Susidariusio SiO_2 sluoksnio pašalinimas. Plokštelė 3 minutes laikoma 40% NH_4F tirpale.

4). Plokštelės praplovimas vandeniu ir džiovinimas ~ 60 °C temperatūroje.

5). Au tirpalo paruošimas:

tirpalas I: 100 ml HAuCl_4 ,

tirpalas II: 200 ml 2% HF.

Sumaišius 60 μl I tirpalo su 120 μl II tirpalo, gaunamas mišinys, kuris užlašinamas ant Si plokštelės paviršiaus. Vyksta šios cheminės reakcijos:



Po 60–90 sekundžių šios reakcijos sustabdomos, gausiai praplaunant Si plokštelę dejonizuotu vandeniu. Po praplovimo silicio paviršiuje susiformuoja plona, 1,2–1,5 cm² plotą dengianti Au plėvelė, kuri praplaunama 95% etanoliu ir iškart įmerkiama į 1-HT etanolinį tirpalą (1 mM) ir laikoma jame 3 valandas – susiformuoja 1-HT savitvarkis monosluoksnis.

SEIRA matavimai atlikti FT-IR spektrometru (PerkinElmer, Model Spectrum GX), naudojant DTGS (deuteruotas triglicino sulfatas) detektorių. Šis detektorius yra labai jautrus viduriniojoje IR spinduliuotės srityje. Vienas iš svarbiausių tokio detektoriaus trūkumų yra tai, kad jis nustoja veikti aukštesnėje negu 41 °C temperatūroje (aukštesnėje temperatūroje jis depoliarizuojasi). Spektrinė skiriamoji deba – 4 cm⁻¹, visi spektrai gauti po 500 nuskanavimo kartų. Matavimams naudotas oru aušinamas diodinis Nd-YAG lazeris, generuojantis 1064 nm bangos ilgio lazerinę spinduliuotę. Spektrų sužadimui naudota 50–500 mW galingumo spinduliuotė, spindulį fokusuojant į 1 mm² dydžio dėmę.

Sustiprintos paviršiumi IR absorbcijos spektroskopijos (SEIRA) tyrimus bei duomenų interpretavimą padėjo atlikti Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriaus darbuotojas habil. dr. G. Niaura.

2.6.2. ATR–FT–IR spektroskopijos metodas

Vienas iš šiuolaikinės spektrinės analizės metodų yra ATR–FT–IR (visiško vidinio atspindžio Furje transformacijų infraraudonoji spektroskopija). Tai metodas, pagrįstas IR spinduliuote ir sukurtas iš dviejų IR metodų: FT–IR ir ATR. Pradžioje trumpai aptarsime IR spektroskopinių metodų principus.

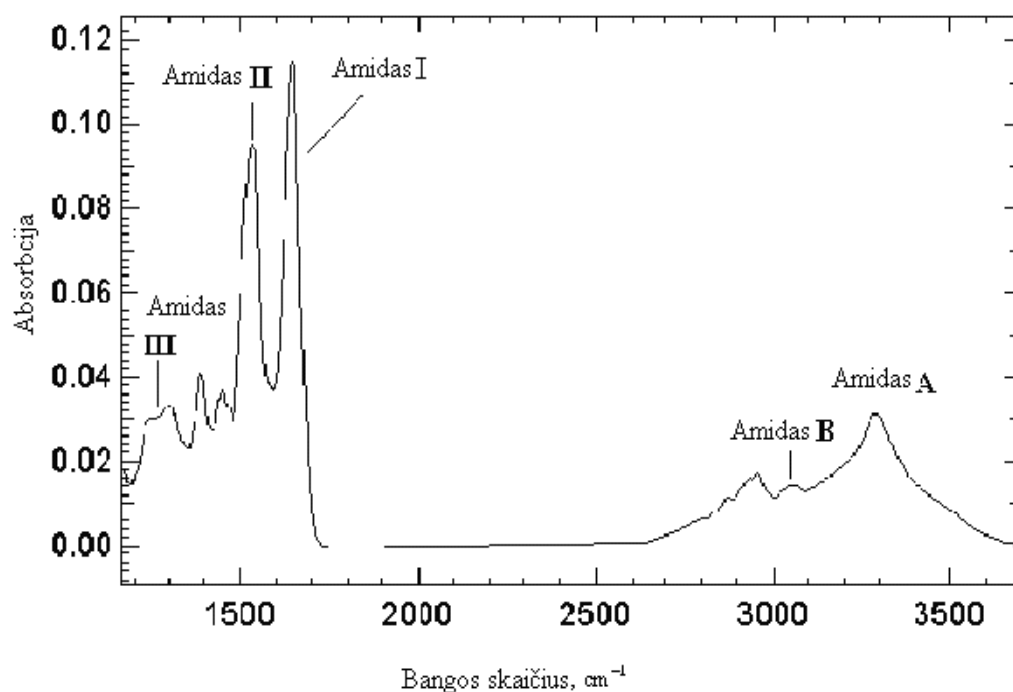
Infraraudonosios spinduliuotės spektrai susidaro dėl molekulių atomų virpesių. Energija, reikalinga sužadinti atomų virpesiams molekulėje, atitinka elektromagnetinės spinduliuotės kvantus, t.y. pagrindinę IR spektro sritį ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$). Absorbavusi elektromagnetinės spinduliuotės kvantą, molekulė peršoka į aukštesnį energijos lygmenį, o absorbuota energija perduodama rotaciniams lygmenims sužadinti arba virsta kinetine molekulių energija. Molekulėse galimi valentiniai, kai pakinta cheminio ryšio ilgis tarp atomų, ir deformacijos, kai ryšio ilgis nekinta, bet keičiasi kampas tarp ryšių, virpesiai [Mickevičius 1998]. Valentiniai virpesiai skirstomi į simetrinius ir asimetrinius. Virpesių dažnis priklauso nuo atomo masės ir ryšio stiprio (kuo didesnė masė, tuo bangos skaičius mažesnis, kuo ryšys stipresnis, tuo bangos skaičius didesnis). Deformaciniams virpesiams sužadinti reikia mažesnės energijos negu valentiniams virpesiams, todėl jiems būdingi mažesni bangos skaičiai. IR spinduliuotei sąveikaujant su medžiaga, cheminiai ryšiai pakinta (išsitempia, susitraukia, susilenkia), todėl infraraudonoji spinduliuotė sugerama ties tam tikru bangos skaičiumi, kuris būdingas tai atomų grupei ir yra pastovus visuose junginiuose. IR spinduliuotės diapazonas platus: nuo 700 nm iki 10^6 nm (dažniausiai naudojama $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ sritis). IR spektruose absorbcijos juostos apibūdina tam tikras atomų grupes, o jų intensyvumas dažnai tiesiogiai proporcingas šių grupių koncentracijai.

Baltymų koncentraciją taip pat galima nustatyti pagal IR spektrus, nes jų molekulių atomų virpesiai turi absorbcijos juostas, nusakančias jų struktūrą ir koncentraciją. Baltymų analizėje naudojami FT–IR ir ATR metodai, kuriais

gaunamos 9 amidinio ryšio absorbcijos juostos (amidas A, B, I–VII; 1 lentelė, 18 pav.) vidurinėje infraraudonojoje spektrų srityje. Pagal šias juostas nustatoma antrinė baltymo struktūra (dažniausiai pagal amidas I juostą).

1 lentelė. Pagrindinės baltymų amidinio ryšio sugerties sritys [Smith 2002].

Ryšys	Bangos skaičius, cm^{-1}	Virpesiai
Amidas A	≈ 3300	N–H valentiniai
Amidas B	≈ 3100	N–H valentiniai
Amidas I	1600–1700	Dominuoja C=O valentiniai
Amidas II	1500–1575	N-H deformaciniai ir C–N valentiniai
Amidas III	1230–1300	Mišinys: C–N valentiniai ir N–H deformaciniai
Amidas IV	625–767	Mišinys: daugiausia O=C–N deformaciniai ir kiti.
Amidas V	550–700	N–H neplokštuminiai deformaciniai
Amidas VI	537–606	C=O neplokštuminiai deformaciniai
Amidas VII	≈ 200	Grandinės sukimasis



18 pav. Baltymo spektras vidurinėje IR srityje [Smith 2002]

Amidų juostos, gaunamos spektruose, yra įvairių virpesių mišinys: amidą I sudaro C=O valentiniai virpesiai (70–85%), C–N valentiniai virpesiai (10–20%) ir C–C valentiniai virpesiai (10%); amidą II sudaro N–H deformaciniai virpesiai (40–60%), C–N valentiniai virpesiai (18–40%) ir C–C valentiniai virpesiai (10%); amidas III sudaro 40% C–N valentinių virpesių, 30% N–H deformacinių virpesių [Siam **2001**]. α -spiralinei struktūrai būdinga varpo formos amido I absorbcijos juosta, kurios maksimumas yra 1656–1648 cm^{-1} , β -klostinės struktūros juostos maksimumas yra 1624–1633 cm^{-1} srityje, o antilygiagreti β -klostinė struktūra turi papildomą silpną juostą 1675–1685 cm^{-1} . α -spiralinei ir β -klostinei struktūrai amido II juosta yra ties 1545 cm^{-1} . Netvarkingą struktūrą ir atsitiktines sekas nustatyti sunku dėl mažo gaunamų juostų intensyvumo ir jų uždengimo ar sutapimo [Kirsch ir Koenig **1989**]. Amidas III juosta naudojama α -spiralinės ir β -klostinės struktūrų santykiui baltymuose arba peptiduose nustatyti.

Baltymų antrinei struktūrai tirti dėl didelio jautrumo ir bangos skaičiaus tikslumo naudojamas FT–IR yra nedispersinis metodas (vietoj monochromatoriaus naudojamas interferometras). Šiuo atveju visų spektrinių išskaidymo elementų energija pasiekia detektorių vienu metu [Siam **2001**]. Tuomet iš šaltinio išėjusi IR polichromatinė spinduliuotė išsklaidoma į 2 optinius spindulius (vienas spindulys atsispindi nuo plokščiojo veidrodžio, įtvirtinto tam tikroje vietoje, o kitas spindulys atsispindi nuo veidrodžio, kuris juda labai mažu atstumu). Vėliau šie abu spinduliai susijungia, interferuoja ir gautas signalas vadinamas interferograma. Jos bangos ilgis sumažėja arba padidėja – tai priklauso nuo judančio veidrodžio padėties. Gauta interferograma turi kiekvieną IR dažnį ir jos signalas praleidžiamas per tiriamą medžiagą, kuri sugeria tam tikro dažnio energiją. Iš gautų spektrų galima apskaičiuoti pralaidumą T (%) arba absorbciją A :

$$\frac{I}{I_0} = T = 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot d}, \quad (11)$$

$$A = -\log T = \varepsilon \cdot c \cdot d, \quad (12)$$

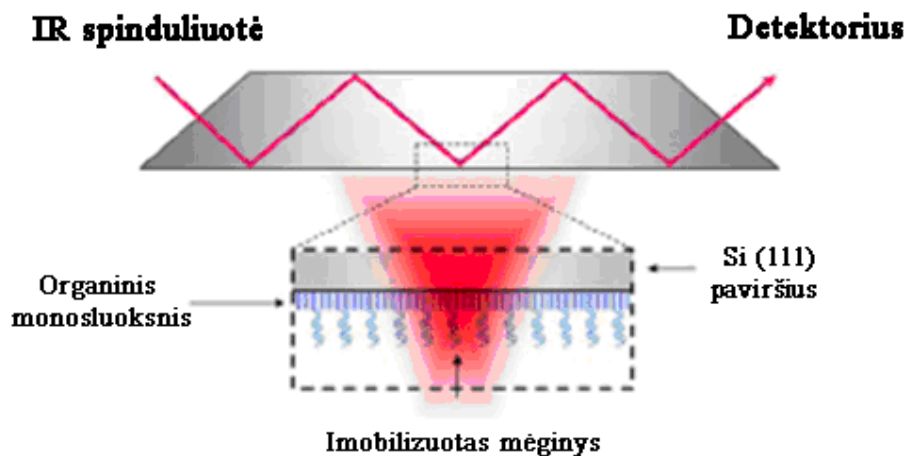
čia c – pavyzdžio koncentracija, ε – absorbcijos koeficientas, d – sluoksnio storis [Siam 2001].

Pralaidumo metodo trūkumas – jautrumas tirpikliui, kuriuo dažniausiai naudojamas vanduo. Amido I spektro srityje stebima vandens absorbcija, kuri gali būti net 3 kartus intensyvesnė nei amidinio ryšio. Tai išsprendžia ATR-FT-IR, atspindžio nuo fazių sąlyčio ribos pagrįstas metodas, nes čia tirpiklis neužstoja baltymo spektro dėl infraraudonosios šviesos prasiskverbimo gylio, priklausančio nuo bangos skaičiaus, pvz., esant 1650 cm^{-1} bangos skaičiui prasiskverbimo gylis atitinkamai yra $0,4 \mu\text{m}$. Šioje analizėje naudojamos labai mažos celės, tai leidžia naudoti algoritmus vandens spektrams atimti iš baltymo spektro. ATR-FT-IR metode Ge arba ZnSe prizmė (bangolaidis) kaip vidinio atspindžio elementas naudojamas absorbuotų molekulių orientacijai tirti ir medžiagos kiekiui tirpale nustatyti. Ge ir ZnSe lūžio rodiklis yra pakankamai didelis (2 lentelė), todėl esant tam tikram spindulio kritimo kampui, infraraudonoji spinduliuotė iš vidaus yra visiškai atspindėta. Jei kampas, kuriuo krinta infraraudonoji šviesa per vidinį atspindžio elementą (ATR kristalą) yra didesnis už kritinį kampą, šviesa bus visiškai atspindėta iš vidaus (19 pav.) Tai vadinama visišku vidiniu atspindžiu (attenuated total reflection, ATR). Dėl didelio ATR kristalo lūžio rodiklio ir atitinkamos prizmės geometrijos IR spindulys atsispindi per ATR elementą keletą kartų (kokybinėje analizėje naudojamas elementas, kuriame įvyksta vienas vidinis atspindys). Dėl to padidėja metodo jautrumas bei gautos informacijos tikslumas, nes įėjusi šviesa atspindima viduje jai neišėjus iš ATR elemento. ATR-FT-IR metodas naudojamas adsorbcijai ir reakcijoms, vykstančioms paviršiuje arba fazių sąlyčio riboje, tirti. Pastaruoju metu daugelyje tyrimų ATR-FT-IR metodas naudotas baltymų ir ląstelių

adsorbacijai tirti, biomembranų struktūrai ir orientacijai, fermentinėms reakcijoms nustatyti [Liao ir kiti, 2006].

2 lentelė. Medžiagos, naudojamos kaip ATR kristalas

Medžiaga	Lūžio rodiklis, 1000 cm^{-1}	Spektroskopijos matavimo diapazonas, cm^{-1}
AMTIR (As/Ge/Se stiklas)	2,5	11000–750
Cinko selenidas	2,4	20000–650
Germanis	4,0	5500–870
Cinko sulfidas (ZnS)	2,2	17000–950
Kadmio telūridas (CdTe)	2,65	10000–450
Safyras (Al_2O_3)	1,74	25000–1800
Kubinės fazės cirkonio oksidas (ZrO_2)	2,15	25000–1800
Deimantas	2,4	45000–25000; 1650–200



19 pav. ATR kristalas, modifikuotas organiniu monosluoksniu, ant kurio imobilizuota analizuojama medžiaga [Liao ir kiti, 2006]

TLL maksimaliai paviršinei koncentracijai nustatyti buvo naudojama Biochemijos institute pagaminta tefloninė matavimo celė. Prieš kiekvieną matavimą jos pagrindo apačioje buvo įdedamas $0,32\text{ cm}^2$ ploto žiedelis, fiksuojantis darbinio elektrodo plotą. Pro celės šonuose padarytas 1 mm skylutes leidžiamas argonas. Ant celės pagrindo statomas stogelis su kiauryme

šone, pro kurią keičiami celės tirpalai. Stogeliu galima tvirtai prispausti celę prie ZnSe prizmės pagrindo ir keisti celės tirpalus nekeičiant jos padėties ir prispaudimo.

Tefloninė celė išvaloma taip: apie 10 min laikoma amonio persulfato sieros rūgšties tirpale, tada keletą kartų plaunama dejonizuotu vandeniu. Kad neliktų jokių priemaišų, celė įmerkama į 2% detergento tirpalą ir sonikuojama ultragarsinėje vonioje apie 15 min. Tuomet gausiai keletą kartų plaunama dejonizuotu vandeniu, o praplovus sonikuojama dejonizuotame vandenyje. Nuvalyta celė gerai iššluostoma, nes ir maži vandens kiekiai gali trukdyti tolesniems ATR–FT–IR matavimams.

ZnSe prizmė nuplaunama etanoliu, o jam išgaravus, ant jos pritvirtinama celė. Prieš kiekvieną matavimo seką užrašomas spektras su tuščia cele.

Pro celės dangtelyje esančią kiaurymę į celę dozatoriumi sulašinama 20 μ l 12,5 μ M FPOHD etanolinio tirpalo (toks kiekis reikalingas monosluoksniui susidaryti). Kadangi celės žiedelio, ant kurio formuojamas FPOHD monosluoksnis, plotas yra 0,32 cm^2 , toks tirpalo tūris yra didelis ir jam išdžiūti reikia daug laiko. Kad paspartėtų etanolio garavimas, pro celės šonuose esančias 1 mm skersmens skylutes leidžiamos argono dujos. Išgaravus etanoliumi (matoma iš spektro) įleidžiama buferinio tirpalo, ir praėjus ~20 min įleidžiama ir *TLL* mutanto.

Visi spektrai užrašomi 700–4000 cm^{-1} srityje, skiriamoji geba 4 cm^{-1} . Kiekvienas spektras nuskanuojamas 50 kartų, kol užrašomas galutinis variantas.

2.6.3. Suminio dažnio generacijos (SDG) spektroskopija

Suminio dažnio generacijos (SDG) spektroskopija yra vienas iš naujų spektrinės analizės metodų, sukurtas 1987 metais. Šis metodas yra antros eilės netiesinis virpesių spektroskopijos metodas, kuriuo galima nustatyti orientuotas molekules, turinčias dipolinį momentą, fazių sąlyčio riboje. SDG spektroskopija galima gauti detalią, molekulinio lygio informaciją apie paviršiuje esančių junginių orientaciją bei jų sąveiką.

Suminio dažnio generacijos (SDG) spektrai gauti pasinaudojus pikosekundiniu SDG spektroskopu, surinktu „EKSPLA“ (Vilnius, Lietuva) firmos darbuotojų. Spektrometro pagrindą sudaro uždaras PL2143A/20 Nd:YAG „EKSPLA“ lazeris, generuojantis 28 pikosekundžių impulsą prie 1064 nm bangos ilgio, esant 20 Hz dažniui, pasikartojamu greičiu. Kai kuriuose eksperimentuose naudojamas PL2143A/20 Nd:YAG „EKSPLA“ lazeris su pulso generacijos greičiu, esant 50 Hz dažniui. Antros harmonikos spinduliavimas (bangos ilgis 532 nm, pulso energija 300–400 μJ) iš šito lazerio naudojamas kaip matomos šviesos spindulys (ω_{VIS}). Suderinti infraraudonosios spinduliuotės impulsai (ω_{IR}) 1500–3750 cm^{-1} dažnio srityje su 80–200 μJ pulso energija, gaminami parametriniame EKSPLA PG401VIR/DFG generatoriuje, pulsuojant trečią harmoniką prie 355 nm bangos ilgio ir lazerio fundamentinio spinduliavimo. ω_{IR} dažnio juostos plotis buvo $< 6 \text{ cm}^{-1}$. ω_{IR} ir ω_{VIS} spindulių pluoštai krenta atitinkamai 53° and 60° kampu ir persikloja pavyzdėlyje maždaug $0,04 \text{ cm}^2$ plote. Suminio dažnio (ω_{SD}) spinduliavimas buvo filtruojamas holografiniu išpjautu filtru ir monochromatoriumi ir sugaudoamas fotodaugikliniu vamzdeliu ir uždara registravimo sistema.

Dažniausiai gautas signalas buvo 100 impulsų vidurkis, tuo tarpu gautose priklausomybėse laike pridėta papildomai 60 impulsų, kurių matavimų triukšmas vidutiniškai siekdavo apie 12% signalo intensyvumo. SDG spektrai normalizuoti pagal infraraudonosios spinduliuotės intensyvumą tam, kad būtų galima atsižvelgti į ω_{IR} energijos pokyčius nuo bangos ilgio. Dažniai kalibruoti pagal IR spektrus su polistireno plėvele, kai su ja buvo uždaromas

infraraudonosios spinduliuotės kelias.

Naudojami du būdai SDG spektrams gauti. Pirmasis, SDG spektrai buvo gauti skenuojant IR spinduliuotės bangos ilgio diapazone. Antrasis, SDG dinamika stebėta registruojant SDG signalo kitimus laike prie pasirinkto specifinio bangos ilgio. SDG rezonanso parametrai surandami išnagrinėjus gautus spektrus pagal žemiau nurodytą 13 lygtį [Miranda ir Shen **1999**]:

$$I_{SDG} = \left| \chi_{NR}^{(2)} + \sum \frac{A_n e^{i\psi_n}}{\omega_{IR} - \omega_n + i\Gamma_n} \right|^2, \quad (13)$$

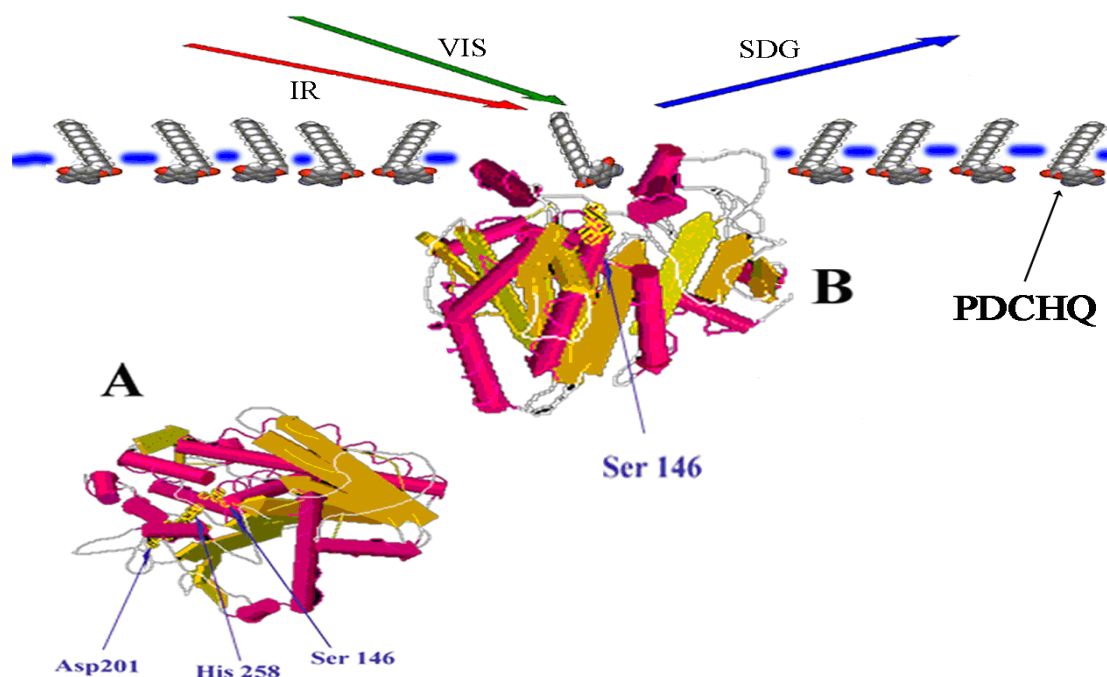
čia I_{SDG} yra suminio dažnio intensyvumas, $\chi_{NR}^{(2)}$ – nerezonansinis įnašas į nelinejinę priklausomybę, A_n , ψ_n , ω_n ir Γ_n atitinkamai yra n virpesių stiprumas, santykinė fazė, rezonansinis dažnis ir juostos plotis.

SDG eksperimentai atlikti naudojant cilindrinės formos celę, kurios skersmuo 38 mm. Prieš eksperimentus celė buvo plaunama natrio hidroksido tirpalu, o po to azoto ir sieros rūgčių mišiniu. Po šio valymo celė buvo praplauta dejonizuotu vandeniu. SDG spektroskopijos metodu buvo patikrintas celės švarumas užrašius vanduo/oras fazių ribos spektrą. Jokie virpesiai C–H fazių įtempimo riboje nebuvo aptikti kol nepridėjome PDCHQ, o tai parodo, kad celėje, esantis vandens tirpalas, fazių riboje vanduo/oras neužterštas jokiais organiniais junginiais. SDG matavimai buvo 3–5 kartus pakartoti su ką tik paruoštais panašiais mėginiais. Eksperimentai atlikti kambario temperatūroje.

PDCHQ ištirpinamas dietileteryje iki 0,015 mM ir tokio tirpalo 100 μ l tūris su dozatoriumi paskleidžiamas ant vandeninio buferinio tirpalo fazių ribos vanduo/oras paviršiaus, ir laukiama, kol išgaruos tirpiklis. Eksperimentuose naudojami 0,1 M NaCl ir 0,01 M Na₂HPO₄ buferiniai tirpalai (pH 7,0). Didesnės PDCHQ koncentracijos tirpalai taip pat buvo naudojami pradiniuose SDG spektroskopijos matavimuose, tačiau dėl mažo signalo intensyvumo ir substrato sluoksnio stabilumo fazių sąlyčio riboje kiti matavimai atlikti naudojant mažesnes koncentracijas. Santykinai žemas pH (t.y. šarminiame pH hidrolizės reakcija vyksta sparčiau) naudojamas spontaninei, savaiminei PDCHQ hidrolizės reakcijai pašalinti.

Tiriant baltymo hidrolitinę poveikį tiriamai sistemai, naudojama laukinio tipo *TLL*, nupirktą pasirenkant iš SIGMA katalogo. Iš UV adsorbcijos intensyvumo santykio prie 280 nm ir 260 nm bangos ilgio nustatėme, kad *TLL* koncentracija yra 34,5 mg/ml. Tam, kad įrodyti, jog stebimas efektas yra susijęs su fermento katalitiniu poveikiu, darbe naudotas modifikuotas baltymas mutantas, kuriame serinas – aminorūgštis, įeinanti į aktyvų centrą 146 padėtyje, pakeistas alaninu. Toks baltymas turi tokias pačias funkcijas kaip ir laukinio tipo fermentas, tik negali katalizuoti lipidų hidrolizės reakcijos. *TLL* mutantas gautas iš Novozymes A/S (Bagsvaerd, Danija), kurio koncentracija pradinuose tirpaluose siekė 3–6 mg/ml. Fermentų švarumas patikrintas elektroforeze.

Sistema, pasirinkta hidrolitiniam aktyvumui tirti SDG spektroskopija, pavaizduota žemiau pateiktame 20 paveiksle.



20 pav. Esterazių aktyvumo fazių riboje vanduo/oras SDG spektroskopijos tiriamosios sistemos iliustravimas: A – neaktyvi fermento forma, hidrofobinis dangtelis uždengia lipazės aktyvų centrą (Ser 146, His 258, Asp 201), B – aktyvi fermento forma, dangtelis dėl sąveikos su substrato, pasiskirsčiusio fazių riboje vanduo/oras, hidrofobine sluoksnelio dalimi pakeičia konfigūraciją, todėl substratas lengvai sudaro su fermentu pereinamąjį kompleksą – įvyksta hidrolizės reakcija.

Suminio dažnio generacijos (SDG) spektroskopijos tyrimus bei duomenų interpretavimą padėjo atlikti Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriaus darbuotojas habil. dr. G. Niaura ir „EKSPLA“ firmos darbuotojas dr. Z. Kuprionis.

2.6.4. Paviršiaus plazmono rezonanso (PPR) spektroskopija

PPR yra kvantinis optinis-elektrinis reiškinys, atsirandantis dėl šviesos sąveikos su metalo paviršiumi. Esant tam tikroms sąlygoms energiją perneša šviesos fotonai, ji metalo paviršiuje perduodama elektronams, kurie priverčia juos virpėti tam tikru dažniu. Šie virpesiai vadinami plazmonų rezonansu. PPR yra plačiai taikomas analizės metodas, naudojamas analizuojamų medžiagų koncentracijai įvairiose cheminėse ir biocheminėse reakcijose, etanolio koncentracijai vandenyje, anglies(II) oksidui ir drėgmei ore nustatyti. Sužadintos šviesos PPR naudojamas metalų paviršiaus analizėje, nes yra labai jautrus fizikinėms metalo paviršiaus savybėms. PPR spektroskopija galima tirti realiame laike *in situ*, kokie pokyčiai vyksta analizuojamame paviršiuje bei stebėti desorbcijos-adsorbcijos reiškinius jame. PPR metodas nereikalauja fluorescencinės arba kitos žymės buvimo analitėje – tai yra vienas iš metodo pranašumų [Nylander ir kiti, 1982; Liedberg ir kiti, 1983].

PPR metodas grindžiamas vienu pagrindinių optikos reiškinių – visiškuoju vidiniu atspindžiu. Kai šviesos spindulys patenka į prizmę, šviesa nukreipiama sąlyčio paviršiaus plokštumos link. Esant tam tikram šviesos kritimo kampui, kuris vadinamas kritiniu kampu, visa įeinanti šviesa atspindima prizmės viduje. Kadangi šiuo atveju šviesa neišeina iš prizmės, šis reiškinys, kaip jau minėta ankstesniame skyriuje, vadinamas visiškuoju vidiniu atspindžiu.

PP bangos, pasiskleidžiančios pusiau begalinio dielektriko ir metalo fazių riboje, skleidimo konstanta aprašoma žemiau pateikta lygtimi [Homola ir kiti, 1999]:

$$\beta = k \sqrt{\frac{\epsilon_m n_x^2}{\epsilon_m + n_s^2}}, \quad (14)$$

čia k – laisvas bangos skaičius, ϵ_m – kompleksinė metalo dielektrinė konstanta, kuri yra lygi $\epsilon_m = \epsilon_m' + i\epsilon_m''$, n_s – dielektriko lūžio rodiklis.

Ši lygtis galioja tik kai kuriems metalams, dažniausiai naudojami taurieji metalai, tokie kaip auksas, sidabras. Prizmės, naudojamos PPR, dažniausiai padengiamos plonu tauriojo metalo sluoksniu. Rezonansas priklauso nuo bangos ilgio, kritimo kampo, dielektrinės terpės konstantos, metalo plėvelės storio ir kokybės.

Kai pasiekama lazerio išspinduliuoto fotono pakankama elektrinio lauko energija, jis sąveikauja su laisvu elektronu aukso paviršiuje. Krintančios šviesos fotonus absorbuoja aukso plėvelė ir jie paverčiami paviršiniaisiais plazmonais. Esant visiškajam vidiniam atspindžiui, atspindėti fotonai sukuria elektrinį lauką priešingoje fazių sąlyčio paviršiui pusėje. Plazmonai sukuria panašų lauką, kuris registruojamas kitoje metalo sluoksnio pusėje. Toks laukas vadinamas greitai nykstančia banga todėl, kad bangos amplitudė mažėja eksponentiškai didėjant atstumui nuo sąlyčio paviršiaus. Ši greitai nykstanti banga puikiai tinka biologinių sistemų matavimams, nes daugelio afiniškai sąveikaujančių biologiškai aktyvių medžiagų molekulių ir jų tarpusavio kompleksų matmenys yra mažesni negu 300 nm.

PPR būtina sukurti greitai nykstantį lauką. Jis sukuriamas, kai suminis krintančios šviesos vidinis atspindys patenka į dviejų skirtingų medžiagų sąlyčio paviršių. Vienos iš šių medžiagų lūžio rodiklis turi būti didelis, o kitos mažas.

Eksperimentams buvo pasirinktos dviejų tipų prizmės Au plėvelei ant jų paviršiaus užgarinti. Viena prizmė pagaminta iš 45° BK stiklo, kita iš 45° SF10 stiklo. Esant bangos ilgiui $\lambda = 632,8$ nm, nustatėme jų lūžio rodiklius stiklas/oras fazių riboje, kurie atitinkamai yra 1,508 ir 1,722. Po to šių prizmių vieną briauną padengėme ~50 nm Au plėvele. Su prizme, pagaminta iš 45° BK stiklo, matavimai atlikti oras/kietas kūnas fazių riboje, o su prizme, pagaminta iš 45° SF10 stiklo – skystis/kietas kūnas fazių riboje. 1-HT arba oktadekantiolio (ODT) savitvarkis monosluoksnis ant šių prizmių buvo formuojamas 12 valandų, įmerkus jas į 1-HT (1 mM) 96% etanolinį tirpalą. Po to prizmė plaunama spiritu, džiovinama ir ant jos paviršiaus, padengto

1-HT savitvarkiu monosluoksniu, užlašinamas 25 μM 8 μL FPONDS etanolinis tirpalas (pasiskleidimo plotas maždaug 1–1,5 cm^2). Išgaravus etanoliui, ant Au/1-HT arba Au/ODT lieka fizisorbuotas FPONDS sluoksnelis.

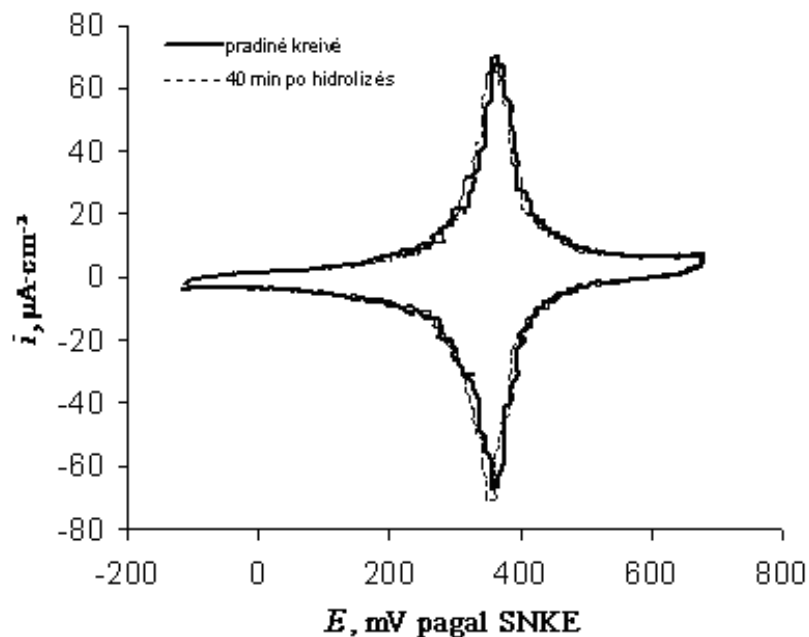
3. Rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Elektrocheminė lipazių detekcija, naudojant sintetinius, paviršiuje fisorbuotus substratus

3.1.1 Redokso aktyvaus lipazei jautraus substrato formavimo sąlygų ant kieto pagrindo tyrimas

Substrato sluoksnius formuoti ant aukso elektrodo paviršiaus galima įvairiais būdais. Pavyzdžiui, jei substratas turi sieros atomą ir yra linkęs sudaryti Au-S cheminį ryšį, ant Au elektrodo paviršiaus galima suformuoti pasirinkto substrato chemiškai prijungtą (chemosorbuotą) savitvarkį monosluoksnį (SM). Mes pasiūlėme alternatyvų, taip vadinamą „drip-and-dry“ („užlašink ir išdžiovink“) metodą, kai ant specialiai paruošto elektrodo paviršiaus užlašinamas ir išdžiovinamas substrato tirpalas. Tirpikliu naudojama laki medžiaga, kuriai išgaravus ant elektrodo paviršiaus susiformuoja fisorbuotas substrato sluoksnis. Aptarsime abiejų metodų taikymą fermentų katalizuojamoms reakcijoms tirti.

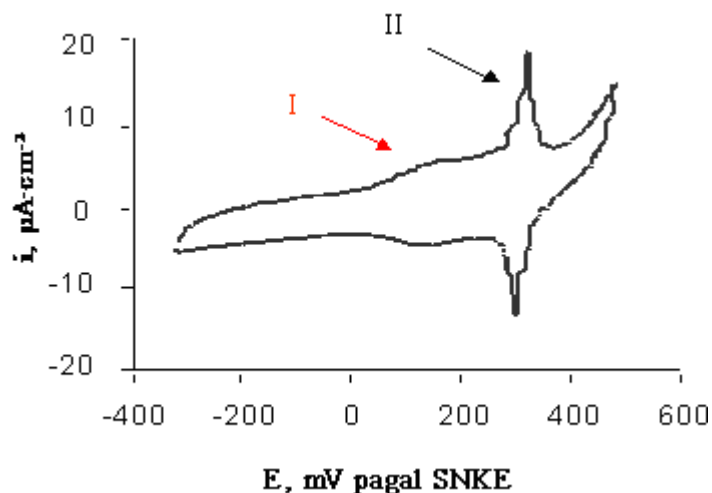
Pradžioje įvertinome galimybes panaudoti chemosorbuotus tiolinius organinius junginius, pavyzdžiui MNFcP savitvarkį monosluoksnį, suformuotą ant Au paviršiaus, fermento aktyvumui detektuoti. Galimam *TLL* hidrolitiniam poveikiui įvertinti 40 minučių bėgyje buvo bandoma ciklinės voltamperometrijos metodu detektuoti šio savitvarkio monosluoksnio degradaciją (21 pav.). Šio eksperimento idėja gana paprasta – chemiškai prijungus prie paviršiaus MNFcP savitvarkį monosluoksnį, turintį esterinę *TLL* taikinio grupę, galima tikėtis, jog po tam tikro laiko prasidės hidrolitinis šių molekulių skaidymas, ir redokso ferocenu grupių koncentracijos mažėjimas paviršiuje, kurį galėtume pabandyti detektuoti elektrochemiškai.



21 pav. MNFcP savitvarkio monosluoksnio hidrolizė ant Au elektrodo paviršiaus $C(TLL) = 25 \mu\text{M}$, $0,1 \text{ M}$ natrio perchlorato ir $0,01 \text{ M}$ natrio dihidrofosfato buferinis tirpalas, $\text{pH } 7$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $V_E = 100 \text{ mV/s}$.

Kaip matome iš 21 paveiksle pateiktų kreivių, registruojama MNFcP SM voltamperinė kreivė beveik nepasikeičia pridėjus *TLL*. Taigi, šio savitvarkio monosluoksnio atžvilgiu lipazė nepasižymėjo žymesniu hidrolitiniu aktyvumu. Šis reiškinys gali būti aiškinamas feroceną turinčio savitvarkio monosluoksnio tankiu susipakavimu ant Au pagrindo ir esterinių grupių buvimu sluoksnio viduje. Taigi, galime teigti, jog tradiciniu, tiolų chemija paremtu monosluoksnių formavimo būdu negalima gauti lipazei jautrių redokso taikinių.

Buvo taip pat pabandyta suformuoti mišrius βME ir MNFcP sluoksnius iš jų etanolinių tirpalų, esant įvairiam šių medžiagų molekulių santykiui tirpale. Gerą analitinį signalą pavyko gauti esant tokiam šių junginių molekulių santykiui: $(1:5) = (\text{MNFcP}:\beta\text{ME})$ (22 pav.).



22 pav. Dvi feroceno formos, formuojant SM iš (1:5) = (MNFcP:2ME) tirpalų

I – hidrofilinė, II – hidrofobinė feroceno forma

0,1 M natrio perchlorato ir 0,01 M natrio dihidrofosfato buferinis tirpalas, pH 7,

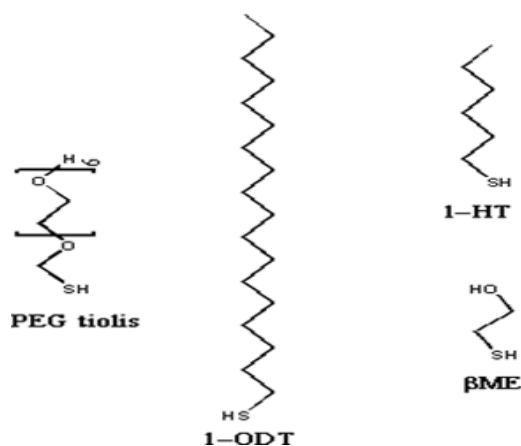
$T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_E = 100\text{ mV/s}$

Mišraus β ME-MNFcP monosluoksnio voltamperogramoje matome kelias feroceno elektroaktyvias formas. I forma duoda platų signalą neigiamesnio potencialo srityje ir yra nejautri lipazės poveikiui. II feroceno grupės formą vaizduoja siaura (pusaukščio plotis sudaro tik 20–30 mV) smailė, tai rodo stiprią sąveiką tarp feroceno molekulių. Pastaroji feroceno forma yra jautri lipazei, nes pridėjus lipazės į tirpalą, stebėjome spartų šios smailės mažėjimą.

Norint išsiaiškinti šių feroceno elektrocheminių signalų prigimtį, formuojant mišrų sluoksnį buvo atliktas toks eksperimentas: išėmę elektrodą iš etanolinio MNFcP tirpalo, praplovėm elektrodo paviršių ne etanoliu, bet vandeniui. II feroceno smailė smarkiai padidėjo, tuo tarpu, I smailės maksimumas išliko nepakitęs. Iš to galime padaryti išvadą, jog paviršiuje egzistuoja dvi MNFcP formos – chemisorbuota, šiuo atveju greičiausiai mišrus MNFcP ir β ME monosluoksnis (I maksimums), kuris yra nejautrus *TLL*, ir lipazei jautri MNFcP forma (II maksimumas), kuri susidaro ne dėl cheminės reakcijos tarp merkaptido junginio tiolio grupės ir paviršiuje esančių aukso atomų, o kaip fizioisorbuotas sluoksnis. Nuplaunant vandeniui etanolinį MNFcP ir β ME tirpalą, vanduo dėl hidrofobinės sąveikos išsūdo MNFcP, tai yra,

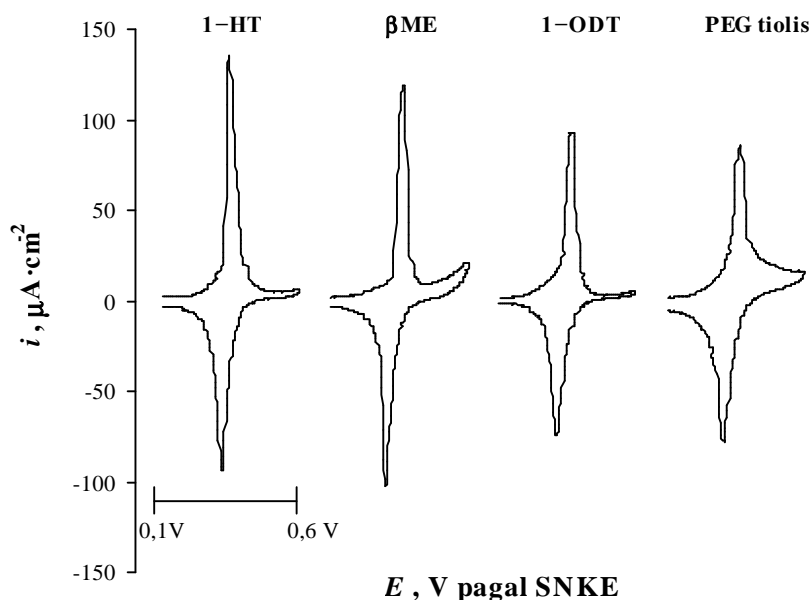
išstumia MNFcP į aukso paviršių, todėl stebime ryškų II smailės padidėjimą. Iš to seka, kad lipazei jautrus MNFcP (arba kito esterio ir feroceno grupę turinčio junginio) sluoksnis gali būti formuojamas ne chemiškai, o paprastu „drip-and-dry” metodu, t.y. užlašinant esterio etanolinį tirpalą ant, pavyzdžiui inaktyviu (ne redokso aktyviu) tioliu modifikuoto elektrodo paviršiaus, ir jį išdžiovinant (turi išgaruoti etanolis). Inaktyvaus tiolio monosluoksnis gali būti panaudotas tiesioginiam kontaktui tarp MNFcP, kaip ir baltymų, ir Au paviršiaus išvengti, nes baltymo struktūroje tarp sierą turinčių aminorūgščių yra disulfidiniai tilteliai, kuriems suskilus (suskilti gali tuomet, kai tarp sieros ir aukso susidaro cheminis ryšys) denatūruotų baltymas, be to, galima būtų išvengti lipazei neaktyvaus feroceno chemosorbato susidarymo. Elektroaktyvios medžiagos koncentraciją ir tūrį, kuri užlašiname ant tioliu padengto elektrodo paviršiaus, galima parinkti taip, jog išgaravus etanolui, ant modifikuoto elektrodo susiformuotų vienas elektroaktyvaus substrato fizisorbuotas monosluoksnis. Aišku toks įvertinimas atitinka idealizuotą situaciją, kai paviršiuje esančios feroceno funkcinės grupės išsidėsto tankiausios sanglaudos struktūra. Praktikoje dažniausiai taip niekada nevyksta, todėl šis „monosluoksnio” kiekio fiksavimas tėra patogi kiekybinė substrato kiekio ant paviršiaus išraiška.

Kadangi fizisorbuotas sluoksnis mūsų darbe buvo formuojamas ant Au paviršiaus, padengto chemosorbentu elektrochemiškai neaktyviu tiolio sluoksniu („paklotu”), įvertinome ir šį sluoksnį sudarančių tiolių grandinės ilgio įtaką sukkelto elektrocheminio signalo ypatybėms. Analizėje naudoti tioliai pavaizduoti 23 paveiksle.



23 pav. Tioliai, naudoti chemisorbuoto sluoksnio ant Au paviršiaus formavimui

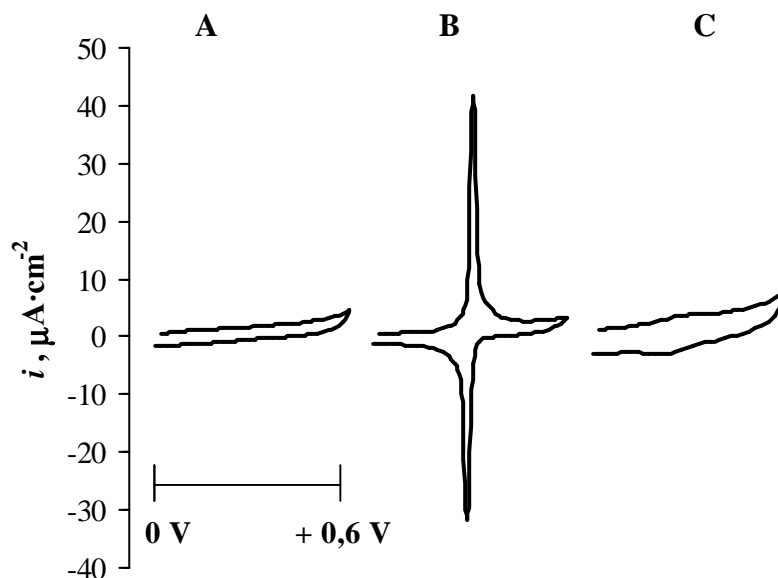
Suformavus šių, aukščiau pateiktų, tiolių savitvarkius monosluoksnius ant polikristalinio Au paviršiaus, „drip-and-dry“ metodu buvo formuojamas elektroaktyvus lipazės taikinio grupę turintis sluoksnis. Šiuo atveju panaudojome FPONDS (žiūrėti 2.4 skyrių), kurio 5 μ l 25 mM etanolinio tirpalo buvo užlašinta ant įvairių „paklotų“ ir išdžiovinta. Gautos voltamperogramos pateiktos 24 paveiksle.



24 pav. FPONDS, fizisorbuoto elektroaktyvaus substrato, ciklinės voltamperometrijos kreivės ant aukso elektrodo, padengto įvairiais tioliais. Buferinio tirpalo sudėtis: 0,1 M natrio perchloratas ir 0,01 M natrio dihidrofosfatas, pH 7, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_E = 100\text{ mV/s}$.

Šiame paveiksle pavaizduotos ciklinės voltamperogramos, gautos naudojant skirtingus tiolius, ir atitinkančios 4–5 matavimų vidurkį. Kaip matyti iš šio paveikslo, oksidacijos-redukcijos procesai yra grįžtami. Kiekvienos smailės pusaukščio ploto potencialas yra mažesnis už 90 mV. Tai rodo, kad paviršiuje fizioisorbuotos FPONDS molekulės stipriai sąveikauja tarpusavyje. Iš smailių formos galima spręsti apie elektrono pernašos procesus: 1-HT ir β ME atveju smailių simetriškumą ir smailumą lemia neilgos tiolių angliavandenilinės grandinės buvimas, todėl elektronų pernaša vyksta lengvai. Kai naudojami 1-ODT ir PEG tioliai, jų kaip elektronų perėjimo „barjero“ veikimas yra stipresnis, nes angliavandenilio grandinė ilgesnė. Šiuo atveju, elektronų perėjimas lydimas viršįtampio ir gautos smailės yra labiau asimetriškos. Elektroaktyvios medžiagos kiekis, kuris nustatomas iš krūvio, suintegravus oksidacijos arba redukcijos smailės plotą, yra nevienodas. Tai parodo, kad paviršių padengus ilgesnės grandinės tioliais, elektroaktyvi medžiaga (FPONDS) pasiskirsto taip, kad ne visos molekulės sugeba pernešti elektroną iš feroceno grupės į elektrodą ir atgal, arba tai, jog dalis FPONDS molekulių savaime pasišalina („nusiplauna“) nuo paviršiaus į tirpalo tūrį kontakto su tirpalu metu.

Ar tikrai ant Au elektrodo, padengto tioliu, susidaro fizioisorbuotas feroceno grupę turinčio junginio sluoksnis, galima lengvai patikrinti praplovus suformuotą elektroaktyvų sluoksnį etanoliniu tirpalu, kuriame visi šiame darbe naudoti junginiai yra tirpūs. 25 pav. pateikti šio eksperimento rezultatai.



Potencialas pateiktas pagal SNKE

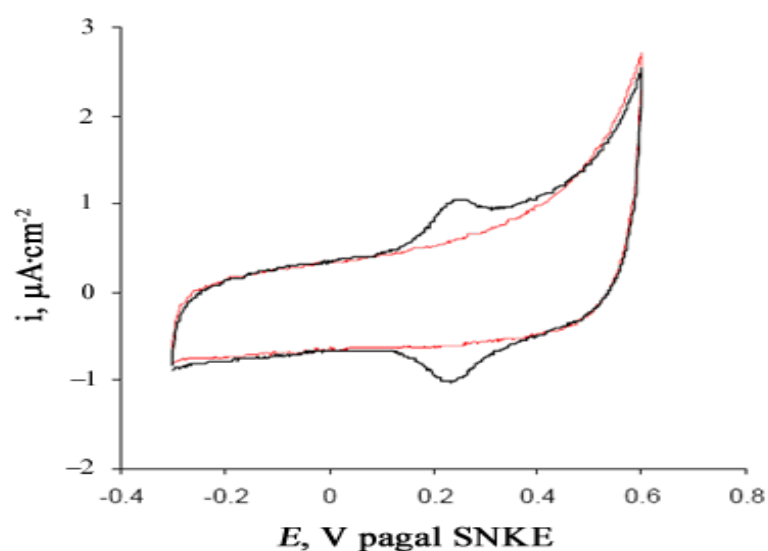
25 pav. FPONDS ant tioliu modifikuoto Au paviršiaus fisisorbuoto sluoksnio suformavimo įrodymas:

A – 1-HT savitvarkio monosluoksnio ant Au paviršiaus ciklinės voltamperometrijos signalas, B – suformuoto iš 5 μl 25 mM FPONDS etanolinio tirpalo fisisorbuoto sluoksnio ant 1-HT/Au paviršiaus elektrocheminis signalas (signalas 3 kartus sumažintas, kad būtų galima geriau palyginti talpines elektrodo sroves), C – elektrocheminis signalas, gautas praplovus elektrodą, padengtą 5 μl 25 mM FPONDS ant 1-HT/Au, etanoliniu tirpalu. pH 7, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_E = 100\text{ mV/s}$.

25 pav. A kreivėje, pateiktas 1-HT savitvarkio monosluoksnio ant Au elektrodo paviršiaus CV signalas, kuris atspindi talpines elektrodo sroves. Kadangi ant paviršiaus nėra redokso grupių, kreivė yra plokščia, be jokių smailių. Talpinės srovės dydis yra atvirkščiai proporcingas organinio sluoksnio storiui. Užnešus elektroaktyvų FPONDS junginį ant 1-HT/Au, gaunama ryški oksidacijos-redukcijos smailė potencialo intervale, kuriame oksiduojasi feroceno radikalas (B smailė). Praplovus elektrodą etanolium, feroceno radikalo oksidacijos smailė išnyksta, o kreivės pobūdis tampa toks, koks buvo iki FPONDS sluoksnio suformavimo. Kaip matyti iš C smailės signalo, po

praplovimo gautas signalas šiek tiek skiriasi nuo to, kuris gaunamas tik suformavus 1-HT sluoksnį ant Au elektrodo. Absoliučios talpinių srovių vertės kiek išauga. Tai galima paaiškinti tuo, kad praplovimo etanoliu metu kartu su elektroaktyviu junginiu iš dalies degraduoja ir apsauginio tiolio sluoksnis.

Formuojant FPONDS, kuris turi disulfidinį ryšį, sluoksnį galime susidurti su gerai žinoma situacija, kai SM, suformuoti iš tiolių, turinčių trumpą angliavandenilinę grandinę (pvz., 1-HT), yra netvarkingi, turi defektų ir todėl gali būti išstumti nuo paviršiaus ilgesnės angliavandenilinės grandinės tiolių/disulfidų. Eksperimento rezultatas, pavaizduotas 26 paveiksle, įrodo jog toks procesas vyksta labai nežymiai.

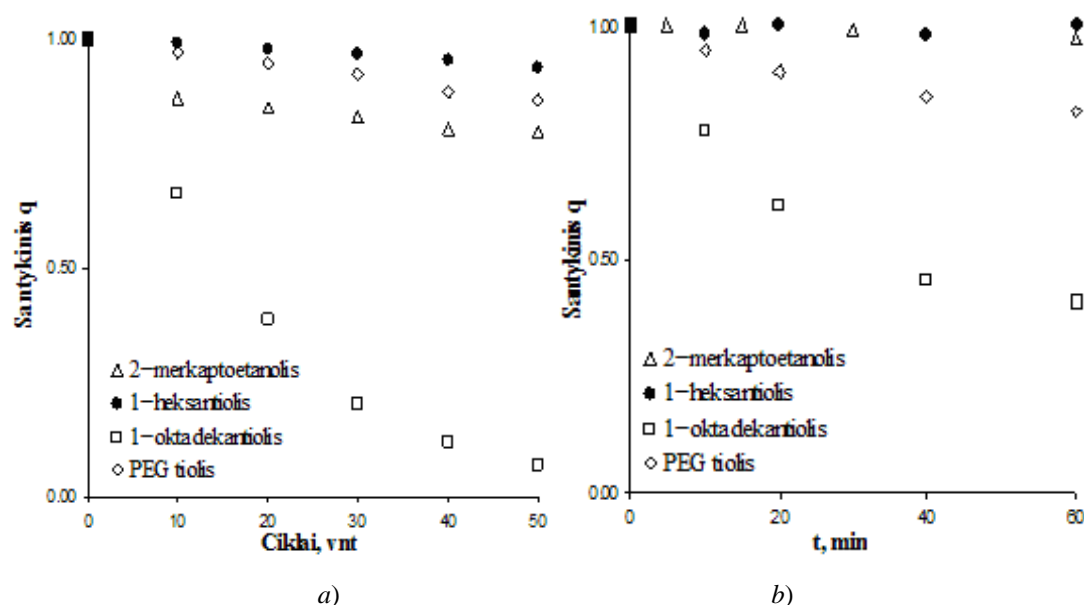


26 pav. Ciklinės voltamperometrijos kreivės. Raudonos spalvos kreivė – 1-HT savitvarkio monosluoksnio, išlaikius elektrodą 3 valandas 1 mM 1-HT etanolio (95%) tirpale, voltamperograma. Juodos spalvos kreivė – to pačio savitvarkio monosluoksnio, išlaikius 3 valandas 200 mM FPONDS etanolio (95%) tirpale, voltamperograma. Tioliu modifikuotas elektrodas po ištraukimo iš tiolio etanolinio tirpalo buvo praplautas etanoliu. pH 7, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_E = 100\text{ mV/s}$. Apskaičiuotas elektrodo plotas $0,04\text{ cm}^2$.

Kaip matyti iš šio paveikslo, išlaikius 3 valandas Au elektrodą, padengtą 1-HT, didelės koncentracijos FPONDS tirpale (verta paminėti, kad „drip-and-dry“ metode naudotas $25\text{ }\mu\text{M}$ koncentracijos FPONDS tirpalas, kuri

užlašindavome ant paruošto paviršiaus, o džiuvimas truko tik 3-4 min) elektrocheminis voltamperogramos signalas pasikeitė tik labai nežymiai. Atsiradusio signalo maksimumas yra toje srityje, kuri būdinga feroceno grupę turintiems junginiams. Šio atsiradusio signalo apskaičiuotas FPONDS krūvis sudaro $\leq 6\%$ monosluoksnio. Galima daryti išvadą, kad „drip-and-dry“ metodu formuojant FPONDS sluoksnį beveik visa jo dalis yra fizisorbuotoje būsenoje ir tik „pėdsakai“ gali sudaryti cheminį ryšį su auksu, išstumiant nuo paviršiaus 1-HT.

Nežiūrint to fakto, jog fizisorbuotas sluoksnis yra jautrus *TLL*, tokio sluoksnio pritaikymas ferementinio aktyvumo detekcijai yra priklausomas nuo tokio sluoksnio stabilumo. Taigi, prieš pradėdant eksperimentus su fermentais, įvertinome ant skirtingo tiolio pagrindo suformuotų fizisorbuotų sluoksnių patvarumą. Sluoksnių patvarumo matavimų rezultatai pateikti 27 paveiksle.

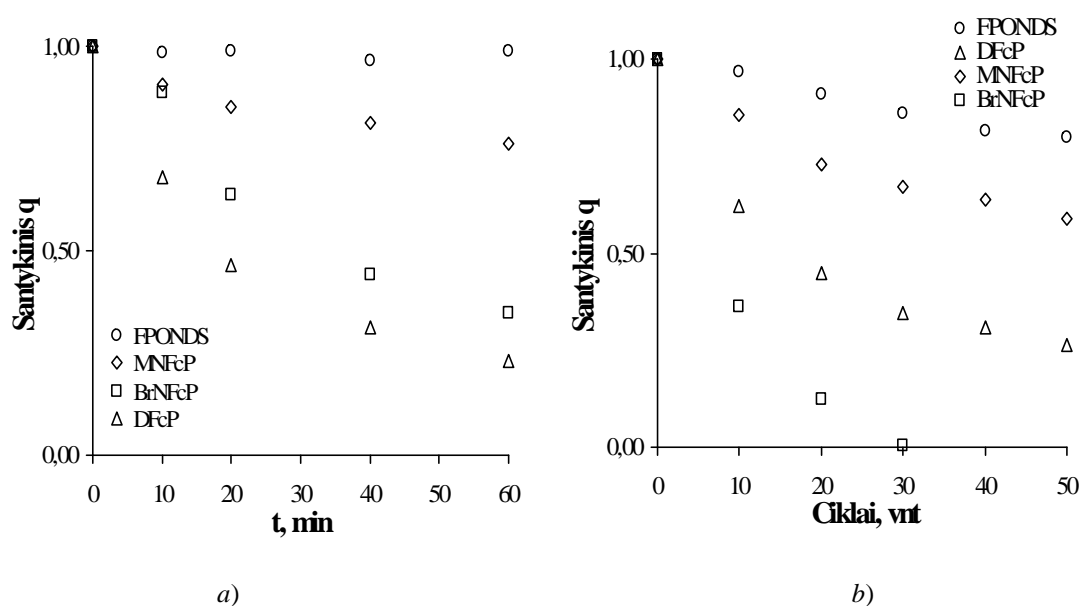


27 pav. 5 μ l 25 mM FPONDS fizisorbuoto sluoksnio ant Au elektrodo, padengto skirtingo ilgio angliavandenilinės grandinės tiolio savitvarkiais monosluoksniais, ciklinės voltamperogramos. Skleidimo greitis $E = 100$ mV/s. Eksperimentai atlikti 0,01 M natrio dihidrofosfato buferiniame tirpale, turinčiame 0,1 M NaClO₄. pH 7,0, $T = 25$ °C. Tirpalas nemaišomas. Elektrodo plotas 0,04 cm².

Kaip matome iš pavaizduotų 27 paveiksle kreivių, fizisorbuotas FPONDS sluoksnis yra stabiliausias laike ir atspariausias poliarizacijai, t.y. pastoviai

skleidžiant potencialą cikliška, kai jis formuojamas ant nedidelio storio hidrofobinio 1-HT savitvarkio monosluoksnio. Suformuotas ant ilgos angliavandinilinės grandinės hidrofobinio tiolio SM FPONDS sluoksnelis yra nestabilus laike, ypač poliarizuojant (skanuojant elektrodo potencialą tarp 0 V ir +0,6 V). Redokso aktyvių substrato sluoksnelių, išsodintų ant labiau hidrofiliųjų SM (2ME ir PEG tiolio), stabilumas laike ir poliarizuojant yra irgi mažesnis nei 1-HT atveju. Taigi natūralu, jog mūsų pasirinkimas šiame darbe buvo 1-HT SM „pasluoksnis”.

Taip pat įvertintinome ir sieros atomo neturinčių feroceno darinių tinkamumą šiam detekcijos metodui. Šie junginiai (DFcP ir BrNFcP) sintetunami lengviau, nes sintezė vyksta per mažiau stadijų (2.4. skyrius). Įvairių junginių patvarumas laike ir atsparumas poliarizacijai palyginti 28 pav.



28 pav. Fizisorbuotų feroceno grupę turinčių junginių (5 μ l 25 μ M etanolinis tirpalas), suformuotų ant 1-heksantiolio pagrindo:

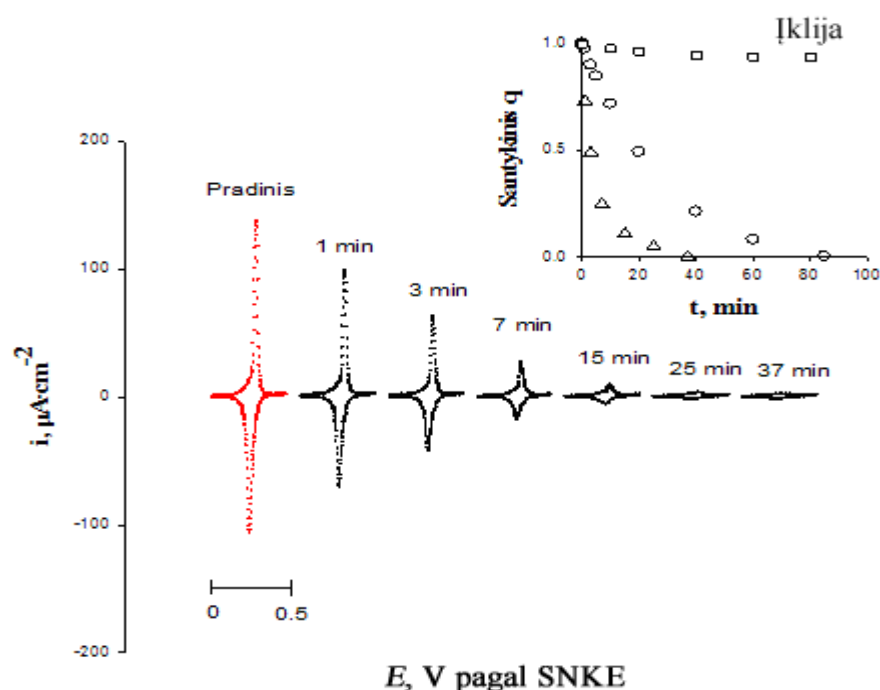
a) patvarumas laike ir b) atsparumas poliarizacijai.

0,1 M natrio perchlorato ir 0,01 M natrio dihidrofosfato buferinis tirpalas, pH 7, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_E = 100\text{ mV/s}$. Tirpalas nemišomas. Elektrodo plotas 0,04 cm².

Iš šių rezultatų galima daryti išvadą, kad iš sieros turinčių feroceno junginių paruošti biojutikliai yra patvaresni laike ir atsparesni poliarizacijai. Tai nulėmė mūsų pasirinkimą substratu naudoti FPONDS.

3.1.2. Elektrocheminio signalo mažėjimas vykstant hidrolizei ir jo fermentinės prigimties įrodymas

Šiame skyrelyje nagrinėsime, kaip kinta iš elektrochemiškai aktyvaus junginio suformuoto biojutiklio elektrocheminis signalas, įvedus į sistemą esterinį ryšio hidrolizę katalizuojantį fermentą. Žemiau pateiktame 29 pav. parodytas elektrochemiškai aktyvaus (FPONDS) junginio ciklinės voltamperogramos kitimas laike, sąveikaujant su *TLL*.



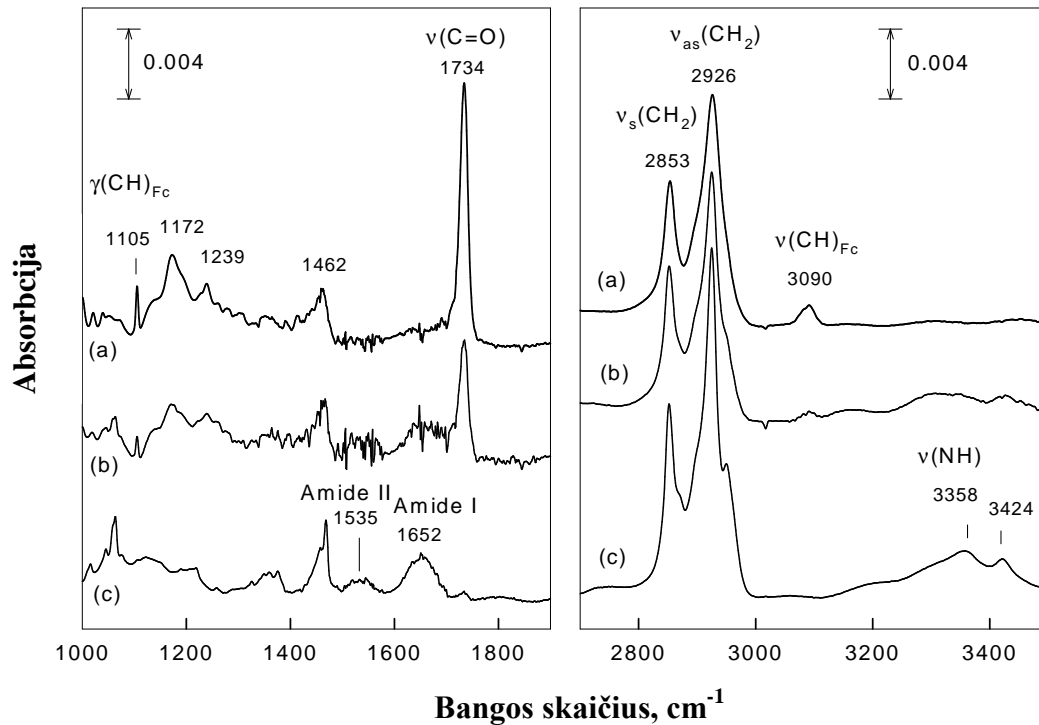
29 pav. 25 μM 5 μl FPONDS, fizioisorbuoto ant 1-HT/Au, ciklinės voltamperogramos, pridėjus *TLL*, kurios koncentracija 2 ml fosfatinio buferio tirpale yra $C(TLL) = 2,5 \mu\text{M}$. Pradinis FPONDS elektrocheminis signalas pavaizduotas raudonai, o juoda spalva – to signalo kitimas laike, FPONDS sąveikaujant su fermentu. Visos kreivės užrašytos skleidžiant potencialą 100 mV/s greičiu nuo 0 V iki 0,5 V intervale, 0,1 M NaClO_4 ir 0,01 M natrio dihidrofosfato buferiniame tirpale, pH 7,0, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Pradinis FPONDS užpildymas yra $2,7 \cdot 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$. $S_{\text{elektrodo}}$ yra $0,042 \text{ cm}^2$. Įklijoje (viršutinėje dešinėje paveikslo dalyje) pavaizduotas elektroaktyvaus junginio santykinio krūvio, kuris rastas suintegravus smailės plotą tam tikru laiko momentu, mažėjimas laike nemaišomame tirpale, esant skirtingai lipazės koncentracijai: $C(TLL) = 0$ (kvadratai), $C(TLL) = 0,25 \mu\text{M}$ (apskritimai) ir $C(TLL) = 25 \mu\text{M}$ (trikampiai) 2 ml buferiniame tirpale.

Maksimali smailės srovė yra tiesiogiai proporcinga feroceno grupių skaičiui ant elektrodo paviršiaus ir pradeda mažėti įvedus į sistemą *TLL*. Iš 29 pav. įklijos matyti, kad elektrochemiškai aktyvaus substrato santykinio krūvio mažėjimas laike proporcingai priklauso nuo į sistemą įvestos fermento koncentracijos. Tai leidžia kiekybiškai įvertinti *TLL* fermentinį aktyvumą pagal elektrocheminio signalo mažėjimo greitį. Oksidacijos-redukcijos signalo mažėjimas yra susijęs su feroceno grupių ant elektrodo paviršiaus mažėjimu, tačiau signalo mažėjimas nebūtinai turi būti susijęs su feroceninio junginio esterinio ryšio hidrolize, katalizuojama *TLL*. Iš esmės, galimos ir kitos šio signalo mažėjimo priežastys. Pavyzdžiui, baltymas gali konkuruoti su feroceninio junginiu dėl absorbcijos ant elektrodo paviršiaus ir tokiu būdu išstumti substratą nuo paviršiaus arba nestiprus fizinis ryšys, fiksuojantis FPONDS molekules 1-HT paviršiuje, gali susilpnėti dėl sąveikos su fermentu ir panašiai. Siekdami įrodyti, jog esterinis ryšys suardomas fermentinės hidrolizės proceso metu, buvo užrašyti substrato SEIRA spektrai, iki ir sąveikos su fermentu metu (30 pav.).

SEIRA signalas buvo gautas transmisijos režime, naudojant chemiškai nusodintą Au plėvelę ant Si pagrindo. Iš pradžių užrašytas Au paviršiaus, padengto 1-HT savitvarkiu monosluoksniu, SEIRA spektras. Tada buvo suformuotas fizisorbuotas FPONDS sluoksnis ir užrašytas FPONDS ir 1-HT SM suminis spektras.

Skirtumas šių dviejų spektrų, pavaizduotas 30 paveiksle (*a*), yra grynas fizisorbuoto ant 1-HT FPONDS spektras. Vidutinio bangos ilgio diapazone (30 pav. *a*, kairėje pusėje) gerai matyti siaura neplokštuminė feroceno žiedo virpesių juosta ties 1105 cm^{-1} ir ryški esterio karbonilgrupės juosta – 1734 cm^{-1} . Didelio bangos ilgio diapazone (30 pav., *a*, dešinėje pusėje) matyti feroceno žiedo CH virpesių juosta ties 3090 cm^{-1} bei alkilinės grandinės simetrinių ir asimetrinių CH virpesių juostos ties 2853 cm^{-1} ir 2926 cm^{-1} , atitinkamai. CH virpesių smailės padėtis yra jautri angliavandenilinės grandinės konfigūracijai. Dažniai 30 paveikslo *a* dalyje yra didesni keliais atvirkštiniais centimetrais negu tvarkingai išsidėsčiusios kristalinės struktūros

(2850 cm^{-1} ir $2917\text{--}2920\text{ cm}^{-1}$). Tai rodo, kad FPONDS angliavandenilinė grandinė yra dezorientuota ir joje gausu defektų.



30 pav. FPONDS/HT/Au/Si substrato SEIRA spektrai užrašyti vidutiniame ir dideliame bangos ilgio diapazone, išlaikius sistemą skirtingą laiko tarpą nemaišomame buferiniame tirpale, esant *TLL*. (a) Si/Au/HT/FPONDS be fermento; (b) laikyta lipazės tirpale 1 val. ir nuplauta H_2O ; (c) laikyta lipazės tirpale papildomai 15 val. ir nuplauta H_2O . Foninis/HT/Au/Si spektras yra atimtas iš pavaizduotų spektrų. Spektrinė skiriamoji deba – 4 cm^{-1} , visi spektrai gauti po 500 nuskanavimo kartų. Buferinio tirpalo sudėtis: 4 ml 0,1 M NaClO_4 , 0,01 M NaH_2PO_4 , pH 7,0, $C(\text{TLL}) = 25\ \mu\text{M}$. Pradinis FPONDS ant paviršiaus kiekis – $1,7 \cdot 10^{-9}\text{ mol/cm}^{-2}$.

Pridėjus *TLL*, SEIRA spektrai pradeda keistis. 30 paveikslo *b* spektras gautas, išlaikius substratą nemaišomame buferiniame fermento tirpale 1 valandą. Įdomiausia tai, kad feroceno žiedo ir karbonilgrupės juostų intensyvumai mažėja sinchroniškai tuo pačiu mastu (3 lentelė). Tai yra akivaizdus eksperimentinis įrodymas, jog feroceno grupė pasišalina kartu su esterine grupe. Taigi, feroceno žiedo savaiminė degradacija, kuri, kaip žinome, tam tikromis sąlygomis vyksta tirpaluose, turinčiuose stirpių

nukleofilų, pvz, neorganinių anijonų, nėra atsakinga už feroceno pasišalinimą nuo paviršiaus (šiuo atveju karbonilgrupė liktų ant paviršiaus).

3 lentelė. Suintegruotų SEIRA substrato spektro kelių juostų intensyvumų priklausomybė nuo išlaikymo laiko nemaišomame tirpale su *TLL*.

Išlaikymo laikas, val.	Suintegruotas intensyvumas, av		
	$\gamma(\text{CH})_{\text{Fc}}$ prie 1105 cm^{-1}	$\nu(\text{C}=\text{O})$ prie 1734 cm^{-1}	$\nu(\text{CH})_{\text{Fc}}$ prie 3090 cm^{-1}
0	0,0170 (100)	0,3232 (100)	0,03234 (100)
1	0,00652 (38,4)	0,1360 (42,1)	0,01024 (31,7)
15	0,000564 (3,3)	0,00922 (2,9)	

Po 1 val. buferiniame tirpale su fermentu, feroceno žiedo ir karbonilgrupės juostos suintegruoti spektro intensyvumai nukrito iki ~ 40% pradinės vertės. Išlaikius 15 valandų buferiniame tirpale, esant fermentui, šios juostos parodė liekamąjį 3% integruotą intensyvumą (žiūrėti 3 lentelę).

Tuo tarpu, išlaikius 1 val. fermento tirpale, ferocenui nepriklausančių CH virpesių juostų intensyvumai pasikeitė nežymiai (t.y. suintegruoti intensyvumai prie 2853 cm^{-1} juostos sumažėjo nuo 0,29 iki 0,26). Tai rodo, kad pagrindinė FPONDS angliavandenilinės grandinės dalis lieka ant paviršiaus. Tokie rezultatai nors ir neįrodo, bet ir neprieštarauja ir dera su prielaida apie fermentinę FPONDS junginio degradaciją.

Kitas įdomus svarbus rezultatas matomas 30 paveikslo *b* spektruose. Amido I ir amido II juostos prie 1652 cm^{-1} ir 1535 cm^{-1} atitinkamai (32 paveikslo kairėje pusėje pavaizduotas *b* spektras), taip pat ir NH valentinių virpesių juosta prie 3358 cm^{-1} (30 paveikslo dešinėje pusėje pavaizduotas *b* spektras) atsiranda po to, kai į buferinį tirpalą pridedama fermento. Šios juostos parodo fermento prisikabinimą prie paviršiaus, o tai yra pirmoji *TLL* fermento hidrolizės reakcijos pakopa.

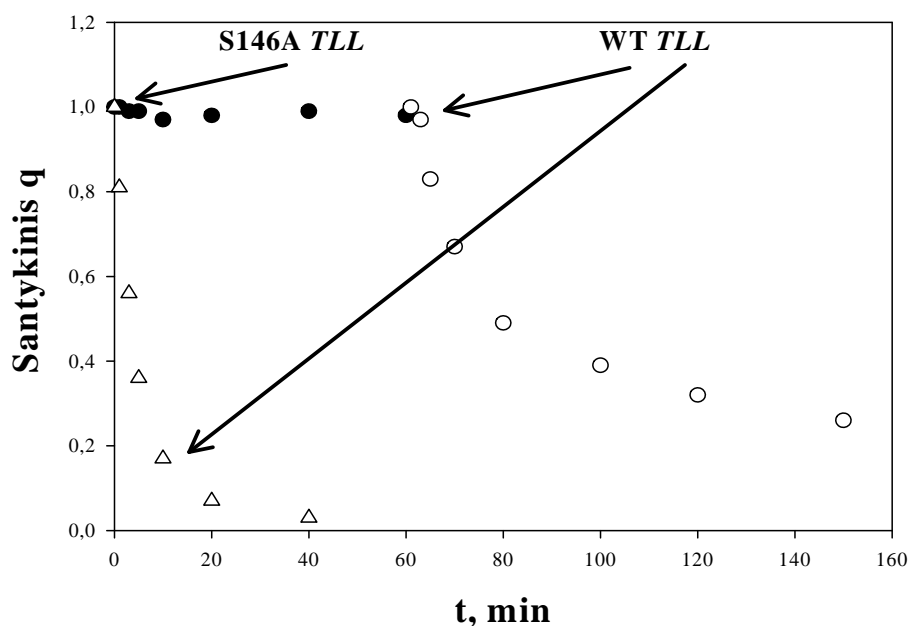
Kaip matoma iš 30 pav., po 15 val. feroceno juostos beveik visiškai išnyksta (30 paveikslo *c* spektrai). Šis išnykimas yra lydymas ir karbonilgrupės signalo išnykimu ties 1734 cm^{-1} . Feroceno juostų integralinis intensyvumas po

15 valandų sudaro vos 3% pradinio signalo (3 lentelė). Tokiu būdu, fermento sukeltas substrato esterinio ryšio skilimas, galime manyti, yra įvykęs iki galo. Tuo metu, po 15 valandų išlaikymo fermentui priklausančių juostų (1535 cm^{-1} , 1652 cm^{-1} ir 3358 cm^{-1}) intensyvumai išaugo, palyginus su tais pačiais intensyvumais, praėjus tik 1 valandai.

Nors 30 paveiksle pavaizduoti rezultatai rodo, kad esterinio ryšio skilimas įvyksta po fermento *TLL* įvedimo į tirpalą, tačiau akivaizdu, jog tik SEIRA spektroskopijos duomenų neužtenka tam, kad galima būtų teigti, jog tas skilimas vyksta pagal fermentinį mechanizmą. Todėl, substrato esterinio ryšio skilimo fermentinės prigimties įrodymui atlikome žemiau aprašytą eksperimentą.

Žinoma, kad aminorūgščių katalitinė triada Ser-His-Asp apsprendžia hidrolitinį *TLL* aktyvumą, kur Ser146 substratą veikia kaip nukleofilas. Todėl įrodymui panaudojome modifikuotą (inaktyvuotą) *TLL* baltymą, kurio aktyviajame centre Ser146 aminorūgštis pakeista alaninu (S146A – *TLL* mutantas). S146A mutanto aktyvumas yra net ~500 kartų mažesnis nei laukinio tipo *TLL*. Todėl nenustebome, nustatę, jog ciklinėse voltamperogramose, gautose panaudojant S146A lipazės mutantą, pradinio laiko intervale (~10 min), FPONDS molekulių hidrolitinis skaldymas faktiškai yra nulinis.

31 paveiksle pateikta elektroaktyvaus junginio santykinio krūvio kitimo priklausomybė nuo WT *TLL* ir S146A fermentų hidrolitinio veikimo pasirinktoje sistemoje.



31 pav. FPONDS, ant 1-HT/Au paviršiaus, suintegruoto santykinio krūvio priklausomybė laike, esant WT *TLL* arba S146A su WT *TLL*. Šių baltymų koncentracija buferiniame tirpale yra 3,5 mg/ml – WT *TLL* (trikampiai ir balti apskritimai) ir 9,25 mg/ml – S146A (juodi apskritimai). Celės tūris – 2 ml, užpildas 0,1 M NaClO₄ ir 0,01 M NaH₂PO₄ buferiniu tirpalu (pH 7, *T* = 25 °C). Pradinė paviršinė FPONDS koncentracija yra $\sim 2,6 \cdot 10^{-10}$ mol/cm², apskaičiuotas elektrodo plotas yra 0,042 cm².

Akivaizdu, kad neaktyvaus S146A (31 pav., juodi apskritimai) fermento poveikis elektrocheminiam signalui yra vos pastebimas. Po fermento pridėjimo, 60 minučių bėgyje, smailės santykinis krūvis sumažėja $\leq 4-5\%$. Šį kitimą galima palyginti su savaiminiu fisisorbuoto FPONDS sluoksnio elektrocheminio signalo mažėjimu (žiūrėti 28 pav.). Tačiau nuosekliai įvedus WT *TLL* fermentą į sistemą, FPONDS elektrocheminio signalo integruotas santykinis krūvis pradeda mažėti (31 pav., balti apskritimai).

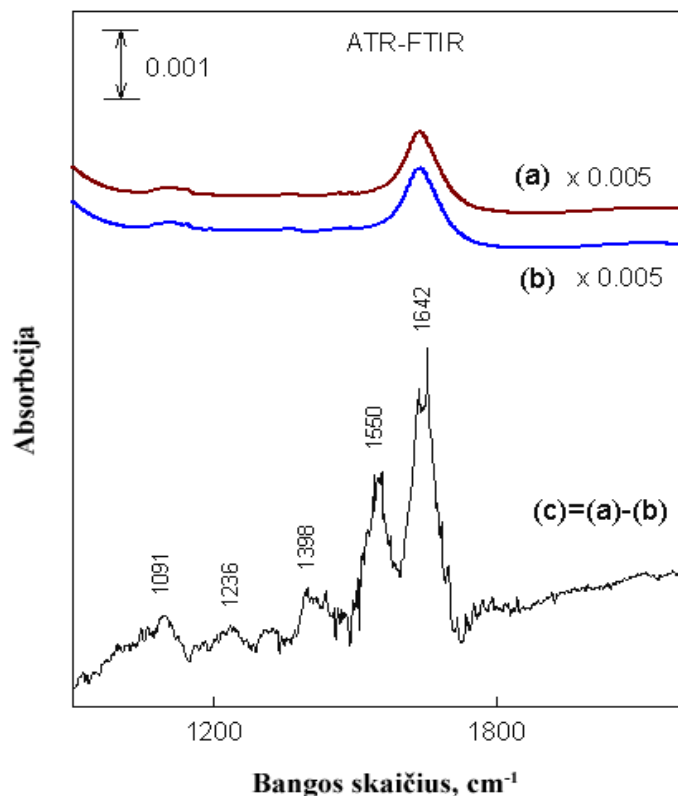
31 paveiksle pavaizduotos kreivės atskleidžia dar vieną įdomią detalę - signalo mažėjimas priklauso nuo to, ar buferiniame tirpale iki WT *TLL* pridėjimo jau buvo neaktyvaus fermento molekulių. Elektrocheminis FPONDS signalo mažėjimas, kurį dabar jau tikrai galime sieti su hidrolitiniu fermento

veikimu, vyksta lėčiau (apie 5 kartus; 31 pav.), jeigu neaktyvus fermentas jau buvo sistemoje iki WT *TLL* įvedimo. Manoma, kad šis reiškinys galimas dėl to, kad aktyviam ir neaktyviam baltymui būnant vienu metu tirpale, jie tarpusavyje konkuruoja dėl vietos elektrodo paviršiuje. Yra gerai žinomas faktas, kuris aprašytas literatūrinėje dalyje, kad fermentui reikia adsorbuotis ant hidrofobinio substrato paviršiaus tam, kad galėtų katalizuoti esterinio ryšio skaldymą. Taigi, kada neaktyvus S146A fermentas yra buferiniame tirpale iki aktyvaus fermento pridėjimo, neaktyvus konkurentas užima substrato paviršiaus dalį. Šio reiškinio priežastis ir yra hidrolitinio FPONDS skilimo greičio sumažėjimas. Apibendrinant teigiame, jog šis eksperimentas (31 pav.) įrodo, kad fizisorbuoto FPONDS substrato elektrocheminio signalo mažėjimas vyksta pagal hidrolitinį fermentinį mechanizmą.

3.1.3. Maksimalios fermento koncentracijos nustatymas ant elektrodo paviršiaus PPR, ATR–FT–IR metodais

ATR–FT–IR ir PPR metodai buvo panaudoti *TLL* adsorbicijai ant hidrofobinio paviršiaus tirti. Šie metodai atlikti norint sužinoti, kokioje fermento tūrinėje koncentracijoje visas hidrofobinis elektrodo paviršius pilnai užpildomas fermento molekulėmis. Tiksliai žinant fermento paviršinės koncentracijos priklausomybę nuo jo kiekio tūryje, galima tiksliau apskaičiuoti fermento katalitinį aktyvumą.

Fermento adsorbicijos tyrimuose naudotas *TLL* mutantas S146A, nes manome, jog vienos aminorūgšties mutacija aktyviajame fermento centre tik silpnai gali paveikti fermento paviršiaus savybes, kurios lemia jo susijungimą su substratu. Be to, mutantas reikalingas tam, kad nekatalizuotų substrato hidrolizės ir tokiu būdu organinės medžiagos sluoksnio storis išliktų pastovus. Taip galima nustatyti lipazės koncentracijos didėjimą ant paviršiaus didinant jos koncentraciją tirpale. ZnSe prizmės pagrindas buvo dengiamas FPOHD elektroaktyviu junginiu. Suformavus „drip-and-dry“ metodu fizisorbuoto FPOHD sluoksnį, įpilama buferinio tirpalo ir užrašomas spektras. Vėliau į sistemą buvo pridėdama *TLL* mutanto ir užrašomas spektras. Tarp užrašytų spektrų be lipazės (32 pav., *b*) ir su lipaze (32 pav., *a*) skirtumų nematyti, t.y. dėl žymios vandens sugerties šioje spektro dalyje nesimato lipazei priklausančių spektre smailelių. Todėl tam, kad gautume smailes, priklausančias fermentui, randamas skirtuminis spektras: iš spektro, užrašyto esant lipazei sistemoje, atimamas spektras be lipazės ir taip gaunamas skirtuminis spektras, kuriame matomos lipazės amido I, amido II juostos (32 pav., *c*).

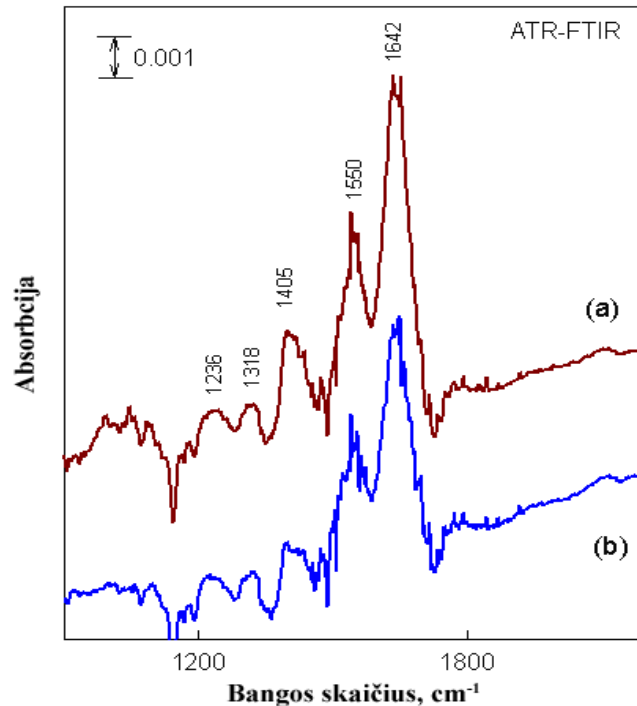


32 pav. *TLL* S146A spektras: (a) FPOHD buferiniame tirpale, esant $3,4 \mu\text{M}$ S146A *TLL* koncentracijai, (b) FPOHD buferiniame tirpale, (c) skirtuminis spektras.

Buferinio tirpalo sudėtis: $0,1 \text{ M NaCl}$ ir $0,01 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Šiame paveiksle pavaizduoti spektrai rodo, kad fermentas adsorbuojasi ant FPOHD hidrofobinio paviršiaus. Tai patvirtina amido I (1642 cm^{-1}) ir amido II (1550 cm^{-1}) juostos, priklausančios fermentui. Baltymų adsorbcija įvertinama integruojant amido I smailės plotą, rečiau – amido II smailės plotą.

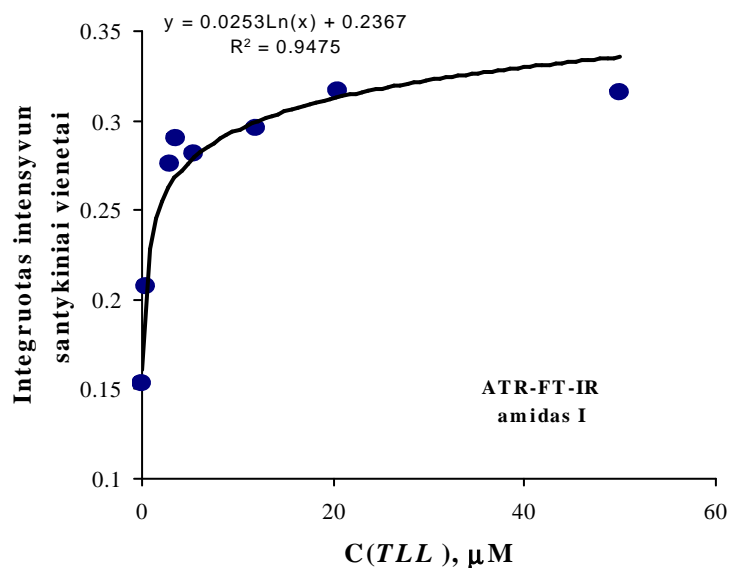
Fermento adsorbcijos priklausomybei nuo koncentracijos ištirti eksperimentas buvo pradedamas nuo mažiausios *TLL* S146A koncentracijos – $0,05 \mu\text{M}$. Vėliau į celę buvo įvedami vis didesni *TLL* mutanto kiekiai. Adsorbcinio proceso grįžtamumui įvertinti užrašius spektrą, kai *TLL* mutanto koncentracija tirpale buvo $50 \mu\text{M}$ (33 pav., a), celė buvo praplauta 10 kartų didesniu buferinio tirpalo kiekiu. Po to užrašytas spektras (33 pav., b). Kaip matome iš 33 pav. pavaizduotų spektrų, *TLL* adsorbuojasi ant hidrofobinio paviršiaus negrįžtamai.



33 pav. *TLL* negrįžtamos adsorbcijos įrodymas ant hidrofobinio fisisorbuoto elektrochemiškai aktyvaus FPOHD paviršiaus. (a) FPOHD su 50 μM S146A *TLL* buferiniame tirpale; (b) praplovus sistemą buferiniu tirpalu. Pateikti skirtuminiai spektrai, atėmus nuo kiekvieno spektro FPOHD buferiniame tirpale spektrą. Buferinio tirpalo sudėtis: 0,1 M NaCl ir 0,01 M NaH_2PO_4 , pH 7; $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$.

Tai patvirtina 33 pav. spektruose stebimos amido I ir amido II juostos prieš ir po praplovimo. Tai, matyt, sąlygota tuo, kad *TLL* energetiškai yra palankiau būti hidrofobinio sluoksnio paviršiuje, nei būti tirpale, nes šio proceso laisvoji energija yra $\Delta G < 0$. *TLL* perėjimui nuo paviršiaus į tirpalo tūrį reikia daug daugiau energijos, todėl jos adsorbcija yra negrįžtama.

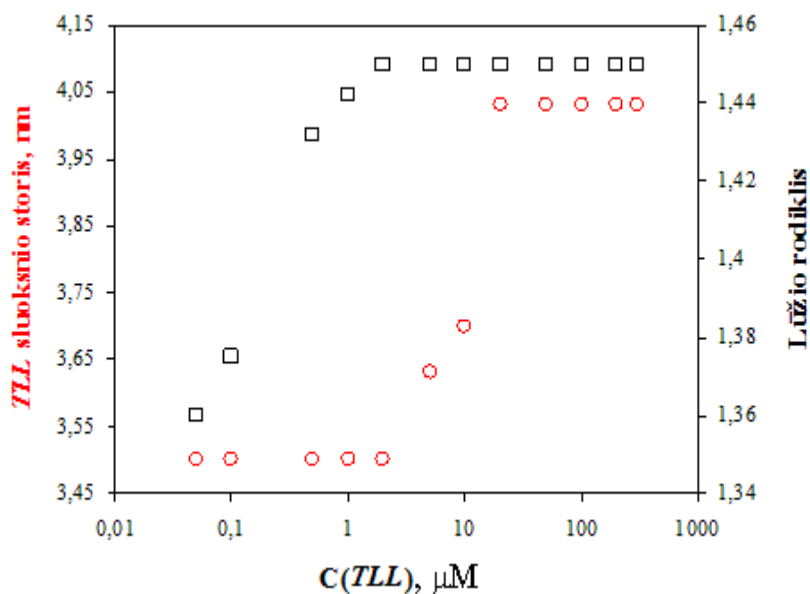
Rezultatai, parodantys koncentracinę *TLL* adsorbcijos ant FPONDS priklausomybę, pateikti 34 pav. Kaip matome šiame paveiksle, kai tirpale pasiekama 2-5 μM *TLL* koncentracija, ATR-FT-IR amido I integruotų spektrų intensyvumų kitimas labai sulėtėja. Šie rezultatai parodo, kad, esant tirpale tokiai fermento koncentracijai, ant hidrofobinio paviršiaus pasiekiamas fermento įsisotinimas.



34 pav. Amido I smailės integralinio intensyvumo priklausomybė nuo *TLL* koncentracijos tirpale. Buferinio tirpalo sudėtis: 0,1 M NaCl ir 0,01 M NaH₂PO₄, pH 7; *T* = 20 °C.

Lygiagrečiai ATR–FT–IR metodui buvo atliktas PPR metodu panašus eksperimentas, norint nustatyti *TLL* sluoksnio storio ant hidrofobinio pagrindo priklausomybę nuo jos koncentracijos tirpalo tūryje ir įvertinti šio sluoksnio lūžio rodiklio kitimą didėjant *TLL* koncentracijai. Rezultatai pavaizduoti 35 paveiksle.

Kaip matyti iš šių rezultatų, lūžio rodiklis didėja nuo 1,352 iki 1,450, kai baltymo koncentracija tirpale kinta nuo 0,05 μM iki maždaug 1-2 μM *TLL* koncentracijos ir po to pasiekia „plato“. Pastovi lūžio rodiklio 1,45 vertė rodo, kad sluoksnis yra užpildytas ir sudarytas iš organinio junginio. Tuo metu *TLL* sluoksnio storis, esant 0,05 μM iki 2 μM *TLL* koncentracijai, nekinta ir yra 3,5 nm. Tai galima susieti su tuo, kad vykstant fermento adsorbacijai ant hidrofobinio paviršiaus jo molekulės išsidėsto taip, kad padengtų visą paviršių ir kad molekulė užimtų kuo didesnę plotą. Taigi, *TLL* molekulė išsidėsto maksimalaus su paviršiumi kontakto būdu, t.y. mažojo elipsoido, modeliuojančio *TLL* molekulės formą, ašimi statmenai paviršiui.



35 pav. Ant hidrofobinio 1-ODT paviršiaus adsorbavusios *TLL* sluoksnio storio (raudonos spalvos apskritimai) ir lūžio rodiklio (juodos spalvos stačiakampiai) priklausomybė nuo fermento koncentracijos tirpale. Buferinio tirpalo sudėtis: 0,1 M NaCl ir 0,01 M NaH₂PO₄, pH 7; $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tačiau, esant didesnei už 2 μM koncentracijai, kai lūžio rodiklis pasiekia maksimalią vertę, organinės medžiagos tankis paviršiuje beveik nebekinta, sluoksnio storis pradeda augti. Šį reiškinį galima paaiškinti *TLL* molekulių orientacijos ant paviršiaus kitimu. Esančios paviršiuje *TLL* molekulės, augant *TLL* koncentracijai tirpale, priverčiamos pakeisti paviršinę konfigūraciją iš horizontalios (maksimalaus kontakto) į dalinai vertikalią, t.y, sutankėti. Galima spėti, jog tai turėtų stipriai įtakoti absoliutų paviršinį fermento aktyvumą. Tai iš tikrųjų ir stebima, kaip parodyta toliau.

Priėmus, jog esant $> 20\text{ }\mu\text{M}$ paviršiuje pasiekiamas maksimalus užpildymas *TLL* molekulėmis, kurios yra vertikalioje padėtyje, ir panaudojus iš www.pdb.org duomenų bazės *TLL* molekulės parametrus (4,2 nm, 3,6 nm, 3,8 nm), apskaičiavome, kad maksimalus *TLL* paviršinis tankis yra $\sim 3,9 \cdot 10^{-7}\text{ g/cm}^2$. Ši konstanta leidžia rasti baltymo paviršinį tankį, esant visoms kitoms *TLL* koncentracijoms tirpale, taigi, ir apskaičiuoti tikrąjį *TLL* fermentinį

aktyvumą pagal 34 pav. pateiktą baltymo adsorbcijos priklausomybę nuo koncentracijos. Apibendrinti duomenys pateikti 4 lentelėje.

4 lentelė. Tikrasis *Thermomyces lanuginosus* lipazės aktyvumas su FPONDS substratu, 0,01 M fosfato ir 0,1M NaClO₄ buferiniame tirpale (pH 7,0, kambario temperatūroje), nustatytas pagal FPONDS srovę integruotą laike nuo 0,13 V iki 0,5 V (vs kalomelio elektroda). Elektrodo tikrasis plotas 0,042 cm².

1	2	3	4	5
<i>TLL</i> koncentracija tirpale, μM	<i>TLL</i> kiekis ant paviršiaus, ×10⁸ g	FPONDS kiekis ant paviršiaus, ×10¹¹ mol	Specifinis fermento aktyvumas, μmol/(min g)	FPONDS kiekis, kurį hidrolizuoja viena <i>TLL</i> molekulė per minutę, 1/min
0,025	0,75	1,90±0,15	60±5	1,75±0,15
0,25	1,06	2,40±0,40	80±15	2,35±0,45
2,5	1,37	2,00±0,15	530±40	15,55±1,20

Iš 4 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad esant 2,5 μM *TLL* koncentracijai tirpale, fermentinės reakcijos greitis ženkliai padidėja. Esant šiai koncentracijai PPR spektroskopijos duomenys rodo (35 pav.), kad lūžio rodiklis nustoja didėti, kinta tik *TLL* sluoksnio storis. Šie rezultatai patvirtina hipotezę, pagal kurią šioje *TLL* tūrinėje koncentracijoje vyksta fermento molekulių reorientacija ant hidrofobinio paviršiaus, ko pasekoje jos molekulės susipakuoja tankiau. Akivaizdu, jog ši perorientacija yra palanki fermentinio aktyvumo augimui, o tai, matyt, yra susiję *TLL* atveju su hidrofobinio „dangtelio“ konformacijos pasikeitimu, kurį inicijuoja augantis *TLL* tankis ant paviršiaus.

Apibendrinant galima teigti, kad tam jog būtų nustatytas tikrasis fermentinis aktyvumas, turi būti išpildytos dvi sąlygos:

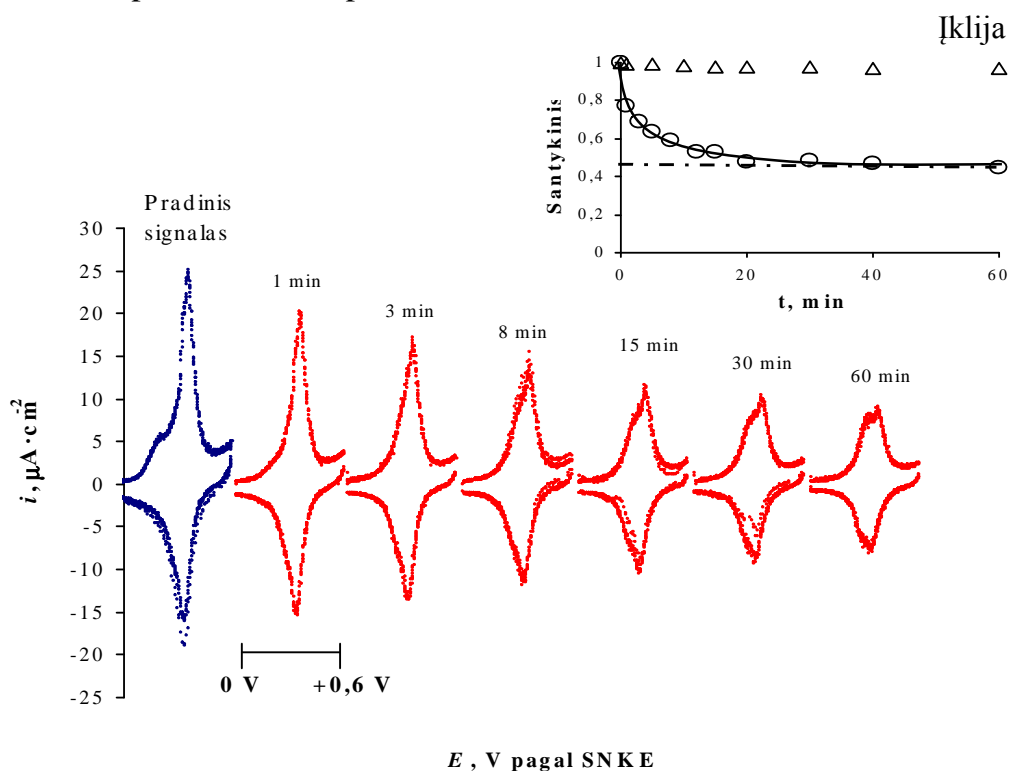
i) sudaryto substrato sluoksnis turi būti tam tikro netvarkingumo laipsnio ir slankus (judrus),

ii) substrato paviršiaus įsisotinimas fermentu turi būti tokio lygio, kad *TLL* molekulės būtų vertikalioje pozicijoje.

Kita vertus, laisvumo laipsnis negali viršyti ribos, kuriai esant substrato sistema būtų nestabili. Tokios molekulės, kaip MNFcP, BrNFcP ir DFcP sudaro nestabilius viršsluoksnius, todėl juos sunkiau pritaikyti fermentiniam aktyvumui nustatyti. Manome, jog ši nauja sukurta metodika *TLL* fermentiniam aktyvumui nustatyti (arba šiek tiek pakeista) gali būti pritaikyta kitų ryši skaldančių fermentų aktyvumui tirti, pavyzdžiui, proteazėms, restrikcijos fermentams ir kt.

3.1.4. Stereoselektyvaus fermentinio aktyvumo įvertinimas elektrocheminės detekcijos metodu

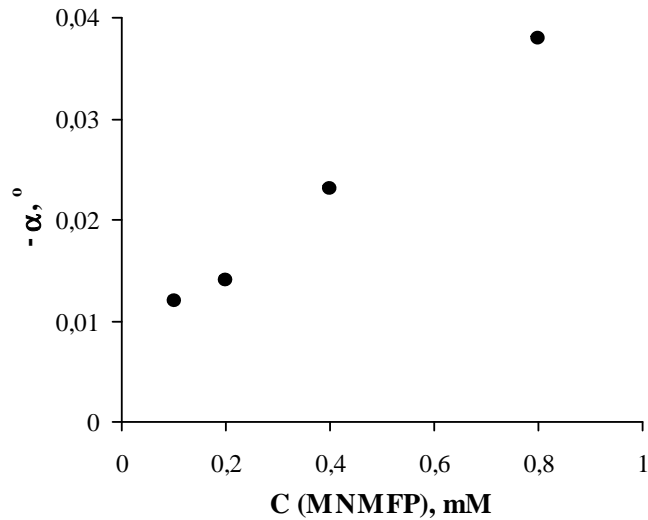
Literatūrinėje dalyje buvo minėta, kad fermentai naudojami farmacijoje vaistų gamyboje, racematui perskirti. Todėl buvo įdomu patikrinti, ar aprašytas elektrocheminis metodas gali būti taikomas optiniam fermentų aktyvumui įvertinti. Substratu pasirinktas optiškai aktyvaus MNMFP junginio racematas. Rezultatai pavaizduoti 36 paveiksle.



36 pav. 25 μM 5 μL MNMFP (racemato), fizisorbuoto ant 1-HT/Au, ciklinės voltamperogramos, pridėjus TLL, kurios koncentracija 2 ml buferinio tirpalo yra $C(\text{TLL}) = 25 \mu\text{M}$. Pradinis MNMFP elektrocheminis signalas pavaizduotas mėlynai, o raudona spalva – to signalo kitimas laike, MNMFP sąveikaujant su baltymu. Visos kreivės užrašytos skleidžiant potencialą 100 mV/s greičiu, 0,1 M NaClO_4 ir 0,01 M natrio dihidrofosfato buferiniame tirpale, pH 7,0, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Pradinis MNMFP užpildymas yra $5,5 \cdot 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$. $S_{\text{elektrodo}}$ yra $0,042 \text{ cm}^2$. Įklijoje pavaizduotas MNMFP junginio santykinio krūvio mažėjimas laike nemaišomame tirpale, esant vienodai (25 μM) aktyvaus (apskritimai) ir neaktyvaus (trikampiai) fermento koncentracijai.

Mes gavome palyginus platų (smailės pusaukščio plotis – 100 mV, formalusis potencialas yra 345 ± 5 mV) MNMFP junginio pradinį ciklinės voltamperometrijos signalą, kuris yra stabilus laike. Galima matyti, kad CH_3 grupės prisijungimas prie MNFcP 3-oje padėtyje, pastumia formalųjį potencialą į didesnių potencialų pusę. Įvedus į sistemą TLL $C(TLL) = 25 \mu\text{M}$, pradinis signalas sumažėja iki pastovios 50% pradinio signalo suintegruoto krūvio vertės (36 pav. įklijoje – apskritimai). Tuo tarpu paveikus šią sistemą neaktyvia S146A baltymo forma nesimato stipraus poveikio ir signalas išlieka beveik nepakitęs (36 pav. įklijoje – trikampiai). Tokiu būdu galima daryti prielaidą, kad fermentas paveikia tik vieną iš optiškai aktyvaus substrato formų arba hidrolizės reakcijoje dominuoja R arba S substrato izomeras.

Tam, kad netiesiogiai nustatyti, ar tikrai hidrolizė dominuojančiai vyksta tik su vienu iš optinių izomerų, buvo paruošti MNMFP junginio įvairių koncentracijų su Tritono X-100 micelėmis tirpalai ir išlaikyti su aktyvia fermento forma vieną dieną tam, kad reakcija įvyktų 100% iki galo. Tokiu būdu buvo nustatyta, kaip keičiasi poliarizuotos šviesos, praėjusios pro šiuos tirpalus, sukimosi kampas. Gauti rezultatai pateikti 37 paveiksle.



37 pav. Sukimosi kampo priklausomybė nuo substrato koncentracijos. Tritono X 100 yra 0,25%, $C(TLL) = 25 \mu\text{M}$, pH 7, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 0,1 M natrio perchlorato ir 0,01 M natrio dihidrofosfato buferinis tirpalas. Kontroliniame tirpale vietoj aktyvios lipazės naudota neaktyvi S146A fermento forma.

Sukimosi kampas priklauso nuo substrato koncentracijos tiesiškai ir didėja didėjant substrato koncentracijai. Vadinasi, kuo daugiau yra optiškai aktyvaus junginio, jautraus *TLL* fermentui, tuo didesnis gaunamas sukimosi kampas. Nors šis eksperimentas neatsako į klausimą, kokia substrato forma S arba R yra jautri hidrolizės reakcijai, tačiau rodo, kad fermentas ir ant paviršiaus, ir micelėse sugeba atskirti racematą sudarančius enantiomerus, o tai leidžia panaudoti elektrocheminę detekciją fermentų optiniam specifiškumui įvertinti. Kadangi laukinė *TLL* mūsų atveju yra 100% stereospecifiška, kaip ir tikėtasi tik pusė substrato (vienas iš enantiometų) pasišalina nuo paviršiaus.

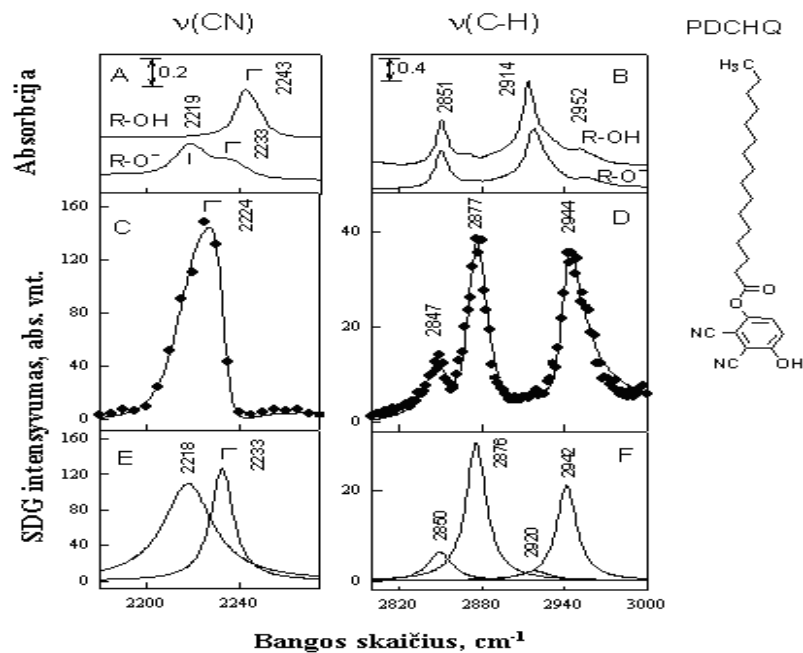
3.2. PDCHQ kaip substrato panaudojimas esterazių aktyvumui tirti

3.2.1. Lipazių aktyvumo fazių riboje oras–vanduo (SDG) tyrimas

PDCHQ yra panašus į lipidus, turi ilgą 14 anglies atomų alkilgrandinę, esterinę ryšį ir prie aromatinio žiedo prijungtas dvi –CN grupes ir vieną –OH grupę (junginys 4). Šiame skyriuje mes pademonstruosime, kaip panaudojant šį junginį galima detektuoti esterazių aktyvumą fazių sąlyčio riboje oras/vanduo suminio dažnio generacijos metodu.

Norint suprasti šio junginio SDG spektrą, svarbu išanalizuoti alkilgrandinės, aromatinio žiedo ir prie jo prijungtų grupių virpesių spektrinę informaciją. Šioje disertacijoje nustatyti hidrofilinės ir hidrofobinės PDCHQ junginio dalių fazių sąlyčio riboje SD rezonansai. Analizuojamo junginio valentinių virpesių $C\equiv N$ ir $C-H$ srities infraraudonosios spinduliuotės ir SDG spektrai parodyti 38 paveiksle.

Stebimi gerai išreikšti rezonansai, kurie rodo, kad PDCHQ molekulės fazių riboje oras/vanduo yra tvarkingai išsidėsčiusios. Panagrinėkime pirmiausia prie aromatinio žiedo esančius $C\equiv N$ grupės virpesius. Valentiniai $C\equiv N$ grupės virpesiai atsiranda prie 2224 cm^{-1} (38 pav., *C*). Smailės asimetriškumas rodo, kad egzistuoja interferencinis efektas tarp keleto rezonansų ir fono. Pritaikius 13 lygtį eksperimentiniuose spektruose nustatytas dviejų smailių buvimas ties 2218 cm^{-1} ir 2233 cm^{-1} (38 pav., *E*). SDG spektrų interpretacijai reikalinga eksperimentinė (IR ir Ramano) ir teorinė PDCHQ junginio bei panašių junginių $C\equiv N$ virpesių analizė. $C\equiv N$ valentinių virpesių padėtis suteikia dviejų rūšių informaciją: (i) apie vandenilinio CN ryšio sąveiką fazių riboje ir (ii) –OH grupės jonizacijos būseną. $C\equiv N$ virpesių interpretacija, nagrinėjant PDCHQ, sudėtinga, nes yra dvi ciano grupės *orto-* (*o*-CN) ir *meta-* padėtyje (*m*-CN) hidroksigrupės atžvilgiu.



38 pav. PDCHQ junginio FT-IR spektrai (A, B) kietoje būsenoje (R-OH) ir jonizuotoji būseną vandeniniame tirpale (R-O⁻) ir SDG spektrai (C, D) fazių riboje oras/vanduo gauti su ssp (s-SDG, s-532 nm ir p-IR) poliarizacijos kombinacija. Vientisos linijos (C, D) atitinka SDG spektrus, naudojant Lorentso (*Lorentzian*) funkcijas. E ir F – virpesių modos, sudarančios SDG spektrus. 2218 cm⁻¹ ir 2233 cm⁻¹ modų fazės yra 0 ir π , atitinkamai. Modų fazės F iliustracijoje yra 0. Buferinio tirpalo sudėtis: 0,1 M NaCl ir 0,01 M NaH₂PO₄ (pH 7,0).

Kitų mokslininkų eksperimentai (Binev ir kiti **2004**, Georgieva ir kiti **2004**) su cianofenoliais rodo, kad izomerų, ištirpintų dimetilsulfoksido, C≡N dažnis mažėja tokia seka: *m*-cianofenolis (2228 cm⁻¹) > *o*-cianofenolis (2223 cm⁻¹) > *p*-cianofenolis (2221 cm⁻¹). Šis efektas buvo susietas su -CN ir -OH grupių poliariniu rezonansu. DCHFP junginiui kvantiniai paskaičiavimai numato *o*-CN ir *m*-CN dažnius prie 2310 cm⁻¹ ir 2329 cm⁻¹ atitinkamai. 5 lentelėje apibendrinti nustatyti PDCHQ junginio C≡N dažnių pasikeitimai, priklausomai nuo aplinkos, kartu su DCHFP junginio modeliu paskaičiuotais duomenimis.

5 lentelė. PDCHQ C≡N valentinių virpesių dažniai (cm⁻¹) įvairioje aplinkoje

Aplinka ir substrato būseną	Metodas	CN grupė	
		<i>orto-</i>	<i>meta-</i>
PDCHQ			
Kieti milteliai	FT-IR	2242	2247 smailė
Kieti milteliai	FT-Raman	2242	neišspręstas
Metilenchloridas	FT-IR	2238	neišspręstas
Dietilesteris	FT-IR	2236	neišspręstas
DCHFП junginio modelis vakuume	apskaičiuotas	2310	2329
PDCHQ oksianijonas			
Kieti milteliai, druska	FT-IR	2208	2237
Vandeninis tirpalas, druska	ATR-FT-IR	2219	2233
Vandeninis tirpalas, 2% Triton X-100, 0,1 M NaCl ir 0,01 M natrio dihidrofosfato buferinis tirpalas (pH 8,0)	FT-IR	2216	2232
DCHFП oksianijono modelis	apskaičiuotas	2247	2319
DCHFП oksianijono modelis, Na ⁺ , 2H ₂ O	apskaičiuotas	2261	2318
Oras/vanduo fazių riba	SDG	2218 ± 3	2233 ± 3

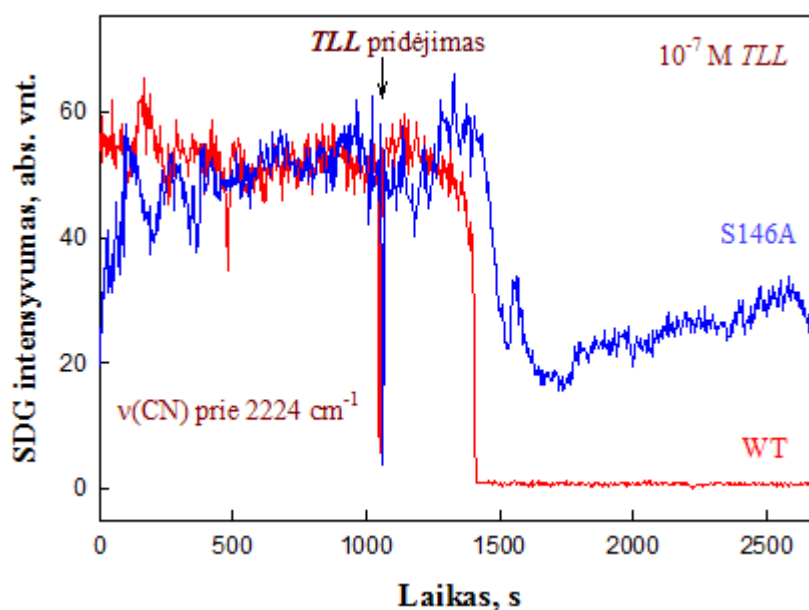
Kietoje būsenoje, kurioje PDCHQ formuoja C≡N•••O-H vandenilinius ryšius, FT-Ramano ir FT-IR spektrai rodo intensyvią *o*-CN smailę ties 2242 cm⁻¹. Yra gerai žinoma, kad C≡N valentinių virpesių dažniai pasislenka į mėlynos spalvos sritį, kai reaguoja į vandenilinių ryšių susidarymą vykstant redukcijai, nesudarant ryšio su C≡N trigubuoju ryšiu ir neįkraunant jo. Ištirpinant PDCHQ aprotoniniame tirpiklyje, tokiame kaip metilenchloridas, C≡N valentiniai virpesiai pasislenka į žemesnių dažnių sritį – 2238 cm⁻¹ (5 lentelė). Ištirpinant junginį dietilesteryje, signalas pasislenka į raudonos spalvos dažnį – 2236 cm⁻¹. Šis reiškinys atspindi konkurenciją su dietilesteriu, kuri susilpnina intramolekulinį vandenilinių ryšių tarp *o*-CN- ir OH-grupių.

Ryškūs pokyčiai įvyksta po hidroksigrupės jonizacijos – $C\equiv N$ dažnis sumažėja ir atsiradusi antra mažesnio intensyvumo smailė tampa gerai matoma IR spektre (38 pav., *A*). Toks poslinkis ir suintegruota intensyvumo vertė charakterizuoja cianofenolio virsmą oksianijonais. UV-VIS metodu buvo nustatyta, kad pK_a , esant Tritono X-100, yra $6,0\pm 0,2$, todėl, esant pH 7, turėtų dominuoti jonizuota PDCHQ būseną. Tačiau amfifilinių PDCHQ molekulių fazių riboje vanduo/oras pK_a gali skirtis. Todėl jonizacijos būseną turėtume iširti nepriklausomai, esant šiai fazių ribai. $C\equiv N$ smailių padėtys IR spektruose (2219 cm^{-1} ir 2233 cm^{-1}) yra labai artimos apskaičiuotų SDG spektrų dažnių rezonansams (2218 cm^{-1} ir 2233 cm^{-1} , 38 pav., *A* ir *E*, 5 lentelė). Be to, smailė ties 2233 cm^{-1} yra siauresnė už 2218 cm^{-1} – tai stebėjome paviršiuje (SDG spektroskopija) ir tirpalo tūryje (FT-IR spektroskopija). Tokiu būdu, mūsų SDG spektrai rodo, kad PDCHQ molekulės adsorbuojasi fazių riboje vanduo/oras daugiausiai jonizuotoje būsenoje ir *o*-CN sudaro vandenilinį ryšį su vandens molekule. Dalyvavimas šiame procese tik vienos iš dviejų CN-grupių patvirtina tai, kad stebimos 2233 cm^{-1} ir 2218 cm^{-1} komponentų skirtingos fazės (38 pav. *E*) rodo šių CN-grupių skirtingą išsidėstymą fazių sąlyčio ribos atžvilgiu. Tačiau negalima 2233 cm^{-1} juostos priskirti tik neutralioms PDCHQ CN-grupėms, bet 2218 cm^{-1} juosta yra PDCHQ oksianijono *o*-CN-grupės su vandeniliniu ryšiu.

C-H valentinių virpesių sritis SDG spektruose suteikia informacijos apie alkilgrandinės fazių sąlyčio riboje konformaciją ir orientaciją. Eksperimentinis PDCHQ SD spektras, pritaikant nelinejinę mažiausio kvadrato priklausomybę, pavaizduotas 38 pav., *D* ir virpesiai, sudarantys spektrą 38 pav., *F*. Labai svarbu teisingai interpretuoti virpesių spektrus, norint teisingai išanalizuoti alkilgrandinės struktūrą. Rezonansiniai intensyvumai 2876 cm^{-1} ir 2942 cm^{-1} (38 pav., *F*) priklauso simetriniams valentiniams CH_3 ir Fermi CH_3 poslinkiams atitinkamai. CH_2 -grupės fazių sąlyčio riboje gali būti aptinkamos iš žemo intensyvumo simetrinių valentinių virpesių ties 2850 cm^{-1} . Šis rezonansas yra gerai išreikštas infraraudonosios spinduliuotės spektre ties 2851 cm^{-1} , kartu su intensyvia CH_2 asimetrinių valentinių virpesių smaile prie

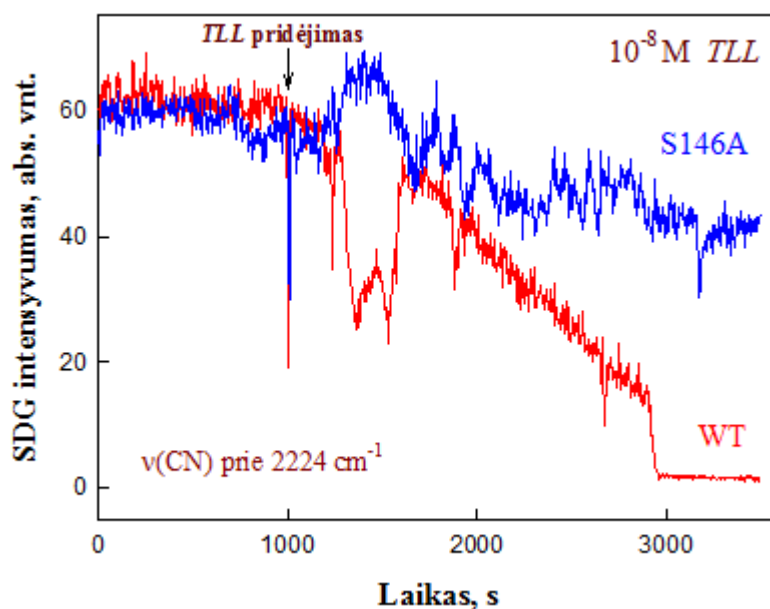
2914 cm^{-1} (38 pav., *B*). Pagal poliarizacijos atrankos taisyklės, žemo intensyvumo rezonansas prie 2920 cm^{-1} (38 pav., *F*) priklauso simetriniams valentiniams Fermi rezonansams. SDG spektroskopija labai jautri molekulėje vykstantiems konformacijos ir orientacijos pokyčiams fazių sąlyčio riboje dėl inversijos simetrijos atrankos taisyklės trūkumo. Goš defektai panaikina molekulių lokalią simetriją, todėl pradeda skirtis CH_2 signalo intensyvumai. Šių juostų SD spektroskopijos intensyvumų santykis charakterizuoja alkilgrupių konformacinį išsidėstymą. Šiame darbe iš šių intensyvumų santykio gavome, kad PDCHQ junginio monosluoksniu yra skystoje būsenoje.

$\text{C}\equiv\text{N}$ (2224 cm^{-1}) rezonansinio intensyvumo kitimas realiame laike pridėjus *TLL* į sistemą pavaizduotas 39 paveiksle. Dėl santykinai mažo duomenų kaupimo (60 impulsai/taškas), gautos kreivės yra pakankamai triukšmingos. Be fermento, $\text{C}\equiv\text{N}$ virpesių signalas yra santykinai stabilus laike.



39 pav. PDCHQ $\text{C}\equiv\text{N}$ grupės valentinių virpesių prie 2224 cm^{-1} SDG rezonanso intensyvumo priklausomybė laike prieš ir po fermento pridėjimo. Raudonos spalvos kreivė – laukinio tipo 10^{-7} M *TLL* poveikis, o mėlynos – tokios pačios koncentracijos baltymo mutanto S146A poveikis

Pridėjus laukinio tipo *TLL* į sistemą, $C\equiv N$ grupės signalas lieka stabilus tam tikrą laiką, kol nepradedą mažėti (39 pav.). Šiame laiko intervale, kuris priklauso nuo fermento koncentracijos, kreivė pradeda staigiai mažėti iki foninės vertės. Toks SD signalo kritimas gali būti susijęs su monosluoksnio suyrimu, vykstant PDCHQ fermentinės hidrolizės reakcijai, arba/ir stipria sluoksnio perturbacija fermento adsorbcijos metu. Tam, kad būtų galima atskirti šiuos du efektus, vietoj laukinio tipo *TLL* panaudojome jos neaktyvią S146A formą. Kaip matome (39 pav., mėlynos spalvos kreivė), šio mutanto tokios pačios koncentracijos pridėjimas nepaveikia $C\equiv N$ signalo intensyvumo kritimo, kaip laukinio *TLL* tipo atveju. Stebimas ~ 60% pradinio sluoksnio intensyvumo kritimas. Šis rezultatas rodo, kad vyksta $C\equiv N$ grupių orientacijos pasikeitimas tuo metu, kai į monosluoksnį fazių sąlyčio riboje ateina fermentas. Jeigu šito efekto paaiškinimas yra teisingas, tai jis turėtų priklausyti nuo fermento koncentracijos sistemoje. 40 paveiksle pavaizduotas panašus eksperimentas, pateiktam 39 paveiksle, tik su mažesnėmis *TLL* koncentracijomis.



40 pav. PDCHQ $C\equiv N$ grupės valentinių virpesių prie 2224 cm^{-1} SDG rezonanso intensyvumo priklausomybė laike prieš ir po fermento pridėjimo. Raudonos spalvos kreivė – laukinio tipo 10^{-8} M TLL poveikis, o mėlynos – tokios pačios koncentracijos baltymo mutanto S146A poveikis.

Iš gautų rezultatų galima padaryti dvi pagrindines išvadas:

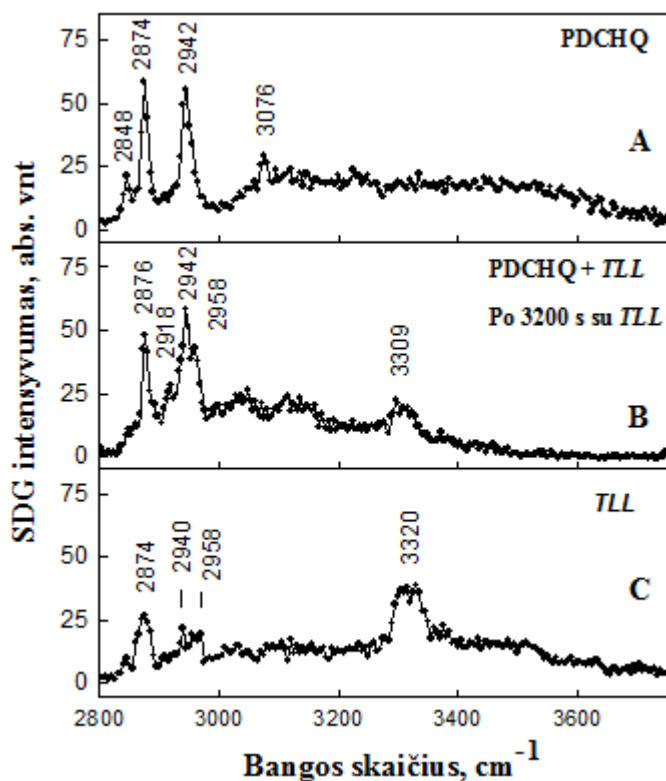
i) pradinio signalo intensyvumo mažėjimo greitis, sąveikaujant su S146A baltymu, sumažėjo ~ 40% (trečdaliu lėčiau, nei esant didesnei fermento koncentracijai),

ii) laikas per kurį išnyksta $C\equiv N$ signalas, sąveikaujant su laukinio tipo *TLL*, padidėjo nuo 400 iki 2000 sekundžių.

Šie rezultatai įrodo, kad sluoksnis, sudarytas iš PDCHQ, skyla pagal fermentinį mechanizmą. $C\equiv N$ virpesių intensyvumai pradeda mažėti pridėjus *TLL* ne iš karto, o praėjus 400-2000 s, tai gali būti susiję su tuo, kad fermentui reikia laiko adsorbuotis ant sluoksnelio ir pradėti sąveikauti su PDCHQ (40 pav.). Yra žinoma, kad lipazės aktyvumas žymiai išauga iškart po prisijungimo prie lipidinio agregato. Nors šiuo metu šio prisijungimo mechanizmas nėra visiškai suprantamas, jis ir toliau intensyviai tyrinėjamas [Cajal ir kiti, **2000**, Hedin ir kiti, **2005**]. Svarbu paminėti, kad pastebėtas 400-2000 s užlaikymo periodas, pridėjus 10^{-8} M *TLL*, nebuvo atsikartojantis, tačiau galima teigti, kad atsikartojamumu pasižymėjo eksperimentai, kuriuose, PDCHQ sąveikaujant su laukinio tipo *TLL*, $C\equiv N$ grupės signalas bėgant laikui išnykdavo iki foninio arba įvykdavo dalinis šio signalo sumažėjimas esant mutanto S146A. Abiejų eksperimentų parametrai priklauso nuo lipazių koncentracijos (39 ir 40 pav.).

Tiesioginis įrodymas, kad lipazė „įlenda“ į PDCHQ suformuotą monosluoksnį, gautas nagrinėjant $2800\text{--}3750\text{ cm}^{-1}$ (41 pav.) ir $1500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ dažnių diapazonus (42 pav.). Lipazei charakteringi spektro pakeitimai aukšto dažnio diapazone pavaizduoti 41 pav., B. Du gerai išreikšti rezonansai prie 2876 cm^{-1} ir 2942 cm^{-1} yra siejami su simetriniais CH_3 valentiniais ir Fermi virpesiais atitinkamai, kurie rodo alkilgrandinės buvimą fazių sąlyčio riboje. Šie rezonansiniai virpesiai priklauso PDCHQ hidrolizės reakcijos produkto ($CH_3(CH_2)_{14}COOH$) CH_3 grupei. Asimetriniai metileno ir metilo valentiniai virpesiai gerai matomi sps poliarizacijos spektre prie 2920 cm^{-1} ir 2966 cm^{-1} . Reikia pabrėžti, kad asimetrinių metileno virpesių juostos nebuvo stebėtos sps

poliarizacijoje PDCHQ monosluoksniu atveju, o asimetrinių metilo virpesių santykinis intensyvumas išaugo pridėjus *TLL*.



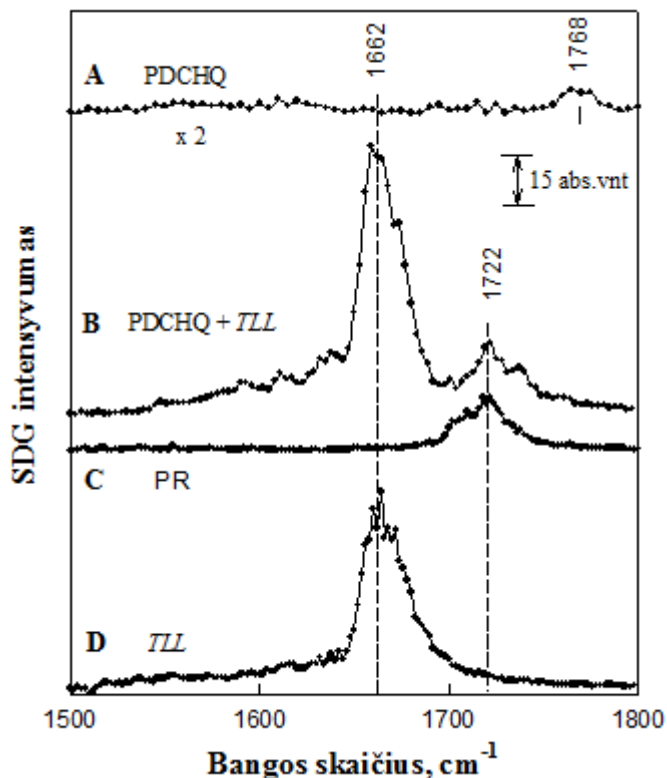
41 pav. SDG spektrai: *A* – PDCHQ fazių riboje oras/vanduo, *B* – praėjus 3200 s po 10^{-6} M *TLL* pridėjimo ir *C* – *TLL* (10^{-6} M) fazių riboje oras/vanduo užrašytas, esant ssp (s-SDG, s-532 nm ir p-IR) poliarizacijos kombinacijai. Ištinės linijos nubrėžtos iš akies. Buferinio tirpalo sudėtis: 0,1 M NaCl ir 0,01 M natrio dihidrofosfatas (pH 7).

Šis pastebėjimas rodo orientacijos pokyčius vykstant hidrolizei palmitato rūgšties alkilgrandinėje arba/ir fermento, aminorūgščių liekanų, SD rezonansinį indėlį. Iš tikrųjų, *TLL* C–H rezonansai fazių riboje oras/vanduo gerai matomi 2800–3000 cm^{-1} dažnio diapazone (41 pav., *C*). Galima daryti išvadą, kad pagrindinis C–H valentinių virpesių įnašas gaunamas iš *TLL* signalo interferencijos. Reikia pastebėti, kad smailas ir mažas rezonansas ties 3076 cm^{-1} (41 pav., *A*), priskirtas PDCHQ žiedo C-H valentiniams virpesiams, išnyksta į sistemą pridėjus *TLL* (41 pav., *B*). Be to, galima pabrėžti, kad 3400–3600 cm^{-1} dažnio diapazone, išnyksta plati vandens juosta. Šie du efektai

rodo, kad hidrofilinė (įkrauta) PDCHQ dalis po hidrolizės palieka paviršių, tuo metu hidrofobinė molekulės dalis pasilieka ant paviršiaus. Svarbu paminėti, kad atsiradęs 3309 cm^{-1} srityje rezonansas gali būti susijęs su *TLL* buvimu fazių sąlyčio riboje (41 pav., *B*).

Įrodymui, kad šis rezonansas atsiranda iš *TLL*, išnagrinėjome SDG spektrus esant tik fermentui fazių riboje oras/vanduo buferiniuose tirpaluose (41 pav., *C*). C–H valentinių virpesių diapazone nustatyta plati simetrinių metilgrupės virpesių smailė prie 2874 cm^{-1} kartu su mažesniais asimetriniais metileno 2940 cm^{-1} ir metilo 2958 cm^{-1} intensyvumais. Šie virpesiai susiję su *TLL* aminorūgščių liekanų C–H valentiniais virpesiais ir patvirtina tai, kad fermentas yra fazių sąlyčio riboje. 3320 cm^{-1} virpesių rezonansą preliminariai galima priskirti prie N–H valentinių virpesių. Manoma, kad intensyvus 3320 cm^{-1} rezonansas rodo adsorbuoto fermento išlygiuotas N–H grupes. Netiesioginis šio teiginio įrodymas gaunamas iš $1500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ dažnio diapazono analizės.

Vidutiniame dažnio diapazone (42 pav., *A*) prieš baltymo įvedimą į sistemą, stebimas žemo intensyvumo rezonansas ties 1768 cm^{-1} , kuris priskiriamas PDCHQ esterio C=O valentiniais virpesiams. Šis rezonansas išnyksta išlaikius PDCHQ monosluoksnį 3200 s ir atsiranda didelio (1662 cm^{-1}) ir mažo (1772 cm^{-1}) intensyvumo rezonansai.

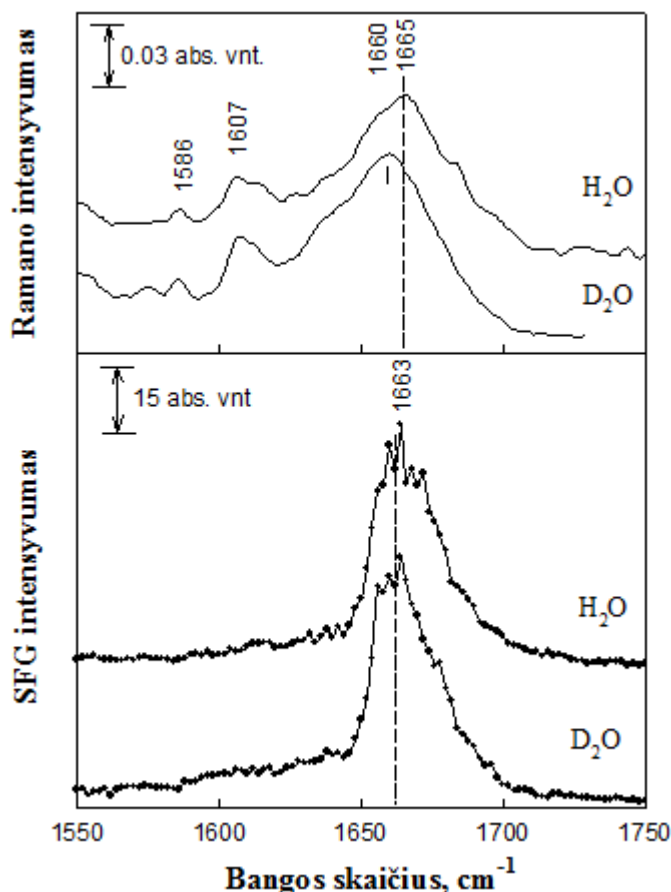


42 pav. SDG spektrai: *A* – PDCHQ fazių riboje oras/vanduo, *B* – praėjus 3200 s po 10^{-6} M *TLL* pridėjimo, *C* – palmitato rūgšties (PR) ir *D* – *TLL* (10^{-6} M) fazių riboje oras/vanduo, esant ssp (s-SDG, s-532 nm ir p-IR) poliarizacijos kombinacijai. Ištinės linijos nubrėžtos iš akies. Buferinio tirpalo sudėtis: 0,1 M NaCl ir 0,01 M natrio dihidrofosfatas (pH 7).

Tam, kad nustatyti hidrolizės reakcijos spektrines charakteristikas, buvo užrašytas grynos palmitato rūgšties (PR) spektras (42 pav., *C*). Šiame spektre dominuoja vienas rezonansas ties 1772 cm^{-1} , kuris priskiriamas palmitato rūgšties protonizuotiems karboksilo C=O valentiniais virpesiams. *B* ir *C* spektrų palyginimas rodo, kad 1772 cm^{-1} rezonansas priklauso PDCHQ hidrolizės produktui. SDG spektras (42 pav., *B*) taip pat rodo, kad PDCHQ hidrolizės reakcijos metu PR pagrindinė grupė yra protonizuota fazių riboje oras/vanduo. Tam, kad įvertinti 1662 cm^{-1} rezonansą (42 pav., *B*), užrašėme SD spektrą, kai sistemoje yra tik 10^{-6} M *TLL* be substrato (42 pav., *D*). Dėl *TLL* buvimo sistemoje stebimas intensyvus rezonansas ties 1663 cm^{-1} , kuris yra identiškasis rezonansui, gautam 42 pav., *B*. Todėl galima daryti išvadą, kad

po PDCHQ hidrolizės reakcijos, fazių riba oras/vanduo be PR (reakcijos produkto) yra užpildyta fermentu.

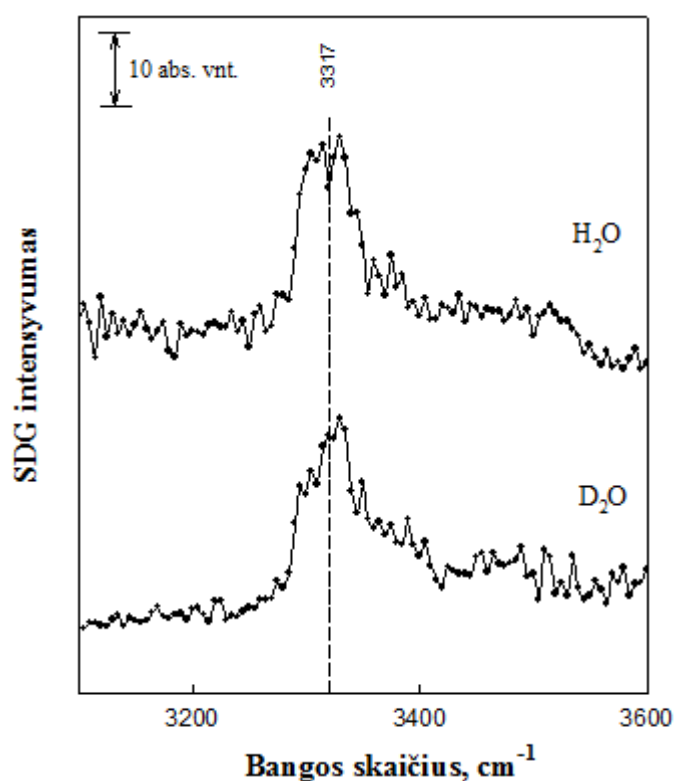
Norint detaliau ištirti *TLL* rezonanso prigimtį, atlikti eksperimentai naudojant H₂O/D₂O tirpalus, kuriuose vyksta izotopų mainai (43 ir 44 pav.).



43 pav. *TLL* FT-Ramano spektrai 0,02 M natrio dihidrofosfato tirpale (pH 7,5) ir *TLL* SDG spektrai fazių riboje oras/vanduo, naudojant H₂O ir D₂O pagrindu paruoštus tirpalus. SDG spektrai užrašyti su ssp poliarizacijos (s-SDG, s-532 nm ir p-IR) kombinacija. Buferinio tirpalo sudėtis: 0,1 M NaCl ir 0,01 M natrio dihidrofosfatas (pH 7). SDG spektrai buvo užrašyti išlaikius 2 val. su 10⁻⁶ M *TLL*.

Jokie dažnių poslinkiai nebuvo nustatyti lyginant D₂O aplinkoje gautus spektrus su H₂O, amido I (43 pav.) ir aukšto dažnio srityje prie 3317 cm⁻¹ (44 pav.) po to, kai išlaikėme 2 valandas su *TLL*. Svarbu pabrėžti, kad amido I SD signalas, sukauptas fazių riboje oras/vanduo baltymo tirpaluose nesiskiria, keičiant H₂O į D₂O aplinką, tuo metu FT-Ramano spektrai pasislenka per

5 cm^{-1} į žemesnių dažnių sritį (43 pav.). Stebimą H/D katijonų mainų skirtumą galima paaiškinti tuo, kad FT-Raman spektroskopija analizuoja visą antrinę baltymo struktūrą tirpale, o SDG spektroskopija tik tam tikrus baltymo antrinės struktūros fragmentus (amido grupes, išsidėsčiusias oras/vanduo paviršiuje). Ankstesnė *TLL* FT-IR spektroskopinė analizė tirpale parodė, kad apie 63% peptido CONH grupės pakeičiamos COND 2 valandų bėgyje. Izotopų mainai taip pat buvo stebimi ir fermentui adsorbuojantis ant hidrofobinio paviršiaus. Jie paaiškinami tuo, kad adsorbuotas baltymas yra atviroje konformacijoje. Tai rodo, kad peptidams su atsitiktinai dominuojančiomis struktūromis amidinio ryšio H/D mainų procesas vyksta greitai. Tokiu būdu atsitiktines struktūras galima eliminuoti kaip galimus rezonanso šaltinius. Gauti rezultatai rodo, kad β -apsisukimai yra atsakingi už 1662 cm^{-1} smailės atsiradimą.



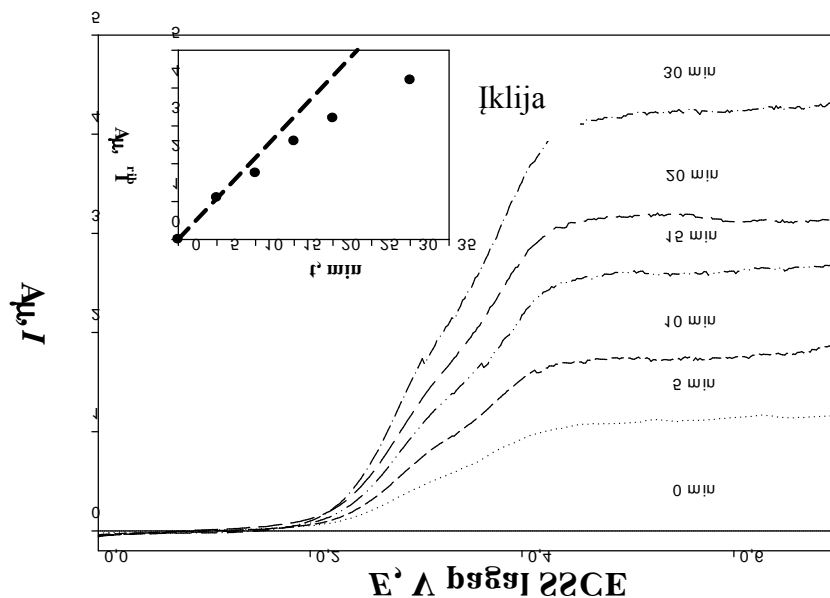
44 pav. *TLL* SDG spektrai fazių riboje oras/vanduo, naudojant H₂O ir D₂O pagrindu paruoštus tirpalus. Spektrai užrašyti su ssp poliarizacijos (s-SDG, s- 532 nm ir p-IR) kombinacija. Buferinio tirpalo sudėtis: 0,1 M NaCl ir 0,01 M natrio dihidrofosfatas (pH 7), esant 10^{-6} M *TLL*. Fermento SDG spektrai oras/D₂O fazių riboje užrašyti išlaikius 2 valandas su *TLL*.

β -apsisukimai susideda iš keturių aminorūgščių liekanų su arba be vidinio vandenilinio ryšio ir yra svarbūs elementai tretinėje struktūroje, kaip papildymas prie α -spiralių ir β -klosčių informacijos, kas leidžia nustatyti tridimensinę baltymų struktūrą. Tų pačių amidinių ryšių N-H valentiniai virpesiai (amidai A) rodo aukšto dažnio diapazone rezonansą ties 3320 cm^{-1} . Vandeniliniuose tirpaluose *TLL* amido A juosta FT-IR spektroskopijoje buvo stebima žemesniame bangos ilgyje (3280 cm^{-1}). Dažnio padidėjimas SD spektre rodo, kad N–H ryšys labai silpnai linkęs sudaryti vandenilinius ryšius. H/D katijonų mainų nebuvimas (44 pav.) rodo, kad amino grupės, atsakingos už SDG spektroskopijos signalą, yra paslėptos hidrofobinėje *TLL* srityje. Gauti rezultatai demonstruoja SDG spektroskopijos galimybes tiesioginiam fermentinių reakcijų, vykstančių fazių riboje oras/vanduo, ir fermentinio aktyvumo detektavimui.

3.2.2. Lipazės aktyvumo nustatymas SDE metodu, naudojant naujus sintetinius micles formuojančius substratus (PDCHQ)

Elektrocheminiai analizės metodai yra beveik nejautrūs kietų arba skystų dalelių buvimui sistemoje (pvz., spektroskopiniuose metoduose matuojant šviesos pralaidumą dėl kietų dalelių vyksta šviesos išsibarstymas, o tai yra trūkumas), todėl jie naudojami fermentiniam aktyvumui tirti neskaidrių tirpalų sistemose. Tai paragino mus sukurti naują elektrocheminį analizės metodą, kuris būtų pagrįstas hidrolizės produktų amperometrine detekcija. Į lipidą panašų sintetinį PDCHQ, turintį esterinę grupę ir elektroaktyvią hidrochinono grupę, galima panaudoti, kaip substratą. Galima tikėtis, kad blogai tirpaus PDCHQ substrato, tirpale esančio su Tritonu X-100 micelėmis, elektrocheminė oksidacija bus prislopinta, tuo tarpu hidrolizės reakcijos produktą – hidrochinoną, galima būtų lengvai oksiduoti ant elektrodo paviršiaus tokiomis sąlygomis, kai procesą ribos jo difuzija tirpale. Kai procesą riboja difuzija, srovės stipris priklauso nuo elektroaktyvios medžiagos koncentracijos ir taip pat nuo difuzijos koeficiento. Atitinkamai difuziją, kuri riboja hidrochinono oksidacijos srovę, galima naudoti lipazei nustatyti. Charakteringos voltamperogramos pavaizduotos 45 paveiksle.

Kaip ir tikėtasi, pradinė ką tik paruošto PDCHQ tirpalo voltamperograma nerodo beveik jokio elektrocheminio signalo nuo 0 V iki 0,7 V diapazone (45 pav.). Tai rodo, kad substratas šiame diapazone yra elektrochemiškai neaktyvus. Tačiau pridėjus į sistemą *TLL* (esant $E \geq 0,2$ V) atsiranda srovės padidėjimas iki ribinės vertės, atitinkantis vandeniniuose tirpaluose tirpaus ir atsirandančio vykstant hidrolizės reakcijai 2,3-dicianochidrochinono oksidaciją. Ši ribinė srovė tiesiogiai priklauso nuo sukimosi greičio kvadratinės šaknies, kas rodo difuzijos srovės prigimtį.



45 pav. 0,5 mM PDCHQ voltamperogramos, atėmus foninę buferinio tirpalo voltamperogramą, 10 ml 0,01 M natrio dihidrofosfato buferiniame tirpale (pH 7,0, $T = 39 \pm 1,5$ °C), esant 0,1 M NaCl ir 0,25 % Triton X 100, užrašytos ant stiklo grafitinio elektrodo (100 rpm, elektrodo plotas $0,07 \text{ cm}^2$) prieš (0 min) ir po (5, 10, 15, 20 ir 30 min) $25 \mu\text{M}$ TLL pridėjimo. Įklijoje pavaizduota ribinės srovės stiprio prie 0,5 V priklausomybė nuo hidrolizės reakcijos laiko. Pradinis reakcijos greitis ($182 \pm 14 \text{ nA/min}$) pavaizduotas ištisine linija. Savaiminės hidrolizės proceso greitis yra $\sim 2 \text{ nA/min}$.

Iš 45 pav. matyti, kad galima sudaryti ribinės srovės, atsiradusios įvedus fermentą, priklausomybę laike (pateikta šio paveiksluko įklijoje, paėmus ribinės srovės vertes ties 0,5 V potencialo). Tam, kad SDE ribinę srovę susieti su hidrolizės reakcijos produkto kiekiu, panaudojame Levičio lygtį (7).

6 lentelėje apibendrintos reakcijos greičio vertės, nustatytos hidrolizės reakcijoms su SDE, priklausančioms nuo pridėto į sistemą TLL kiekio.

Šios lentelės ketvirto stulpelio duomenys gauti: (i) nustačius pradinį reakcijos greitį esant TLL ir (ii) atėmus savaiminės PDCHQ hidrolizės reakcijos greitį (trečias stulpelis). Penkto stulpelio duomenys gauti naudojant

Levičio lygtį, o paskutiniame stulpelyje duomenys gauti padalinus penktame stulpelyje pateiktas vertes iš antro stulpelio verčių.

6 lentelė. Nustatytas *Thermomyces lanuginosus* lipazės aktyvumas PDCHQ 0,01 M natrio dihidrofosfato buferiniame tirpale (pH 7,0, $T = 39 \pm 1.5$ °C), esant 0,1 M NaCl ir 0,25% Triton X-100, prie 0,5 V (pagal SSCE), naudojant sukamąjį diskiniį stiklo grafitinį elektrodą. Elektrodo plotas 0,07 cm². Ketvirtame stulpelyje nurodytos vidutinės vertės.

1	2	3	4	5	6
Pridėtos TLL kiekis, μl	Baltymo kiekis, mg	Savaiminės hidrolizės greitis, nA/min	Bendras srovės augimo greitis, nA/min	Aktyvumas $\times 10^3$, μmol/min	Specifinis aktyvumas, μmol/(min g)
100	3,45	~2	93 \pm 3	50,67	14,69
200	6,9		182 \pm 14	100,22	14,52
300	10,5		276 \pm 23	152,56	14,53
Vidurkis:					14,58 \pm 0,11

Kaip ir buvo tikėtasi, ribinės srovės kitimo greitis yra proporcingas lipazės kiekiui, įvestam į sistemą. Šis rezultatas patvirtina galimybę stebėti hidrolitinį fermento veikimą amperometrijos metodu (tolygiame chronoamperometriniame režime, esant pastoviam potencialui) ir naudojant sintetinius substratus, kurių hidrolizės produktai būtų elektrochemiškai aktyvūs. *Thermomyces lanuginosus* lipazei specifinis aktyvumas PDCHQ atveju yra $14,58 \pm 0,11$ μ mol/(min·g) (6 lentelė) ir yra apie 40 kartų mažesnis už nustatytą spektrofotometru pagal šį literatūros šaltinį - [Gupta ir kiti, 2002.], kai substratu buvo naudotas *p*-nitrofenolpalmitatas (molinis ekstinkcijos koeficientas nustatytas prie 400 nm ir pH 7,0 gautas 6900 M⁻¹·cm⁻¹). Tačiau

gautas mažesnis specifinis aktyvumas su PDCHQ neturi didelės įtakos metodo kokybei, nes savaiminės hidrolizės reakcija santykinai maža, lyginant su fermento sukeliama hidrolize (6 lentelė). Be to sukamojo diskinio elektrodo specifika yra ta, jog, esant reikalui, registruojamų srovių dydžius galima padidinti, nes difuzijos ribinės srovės yra proporcingos kvadratinei šakniai nuo SDE sukimosi greičio.

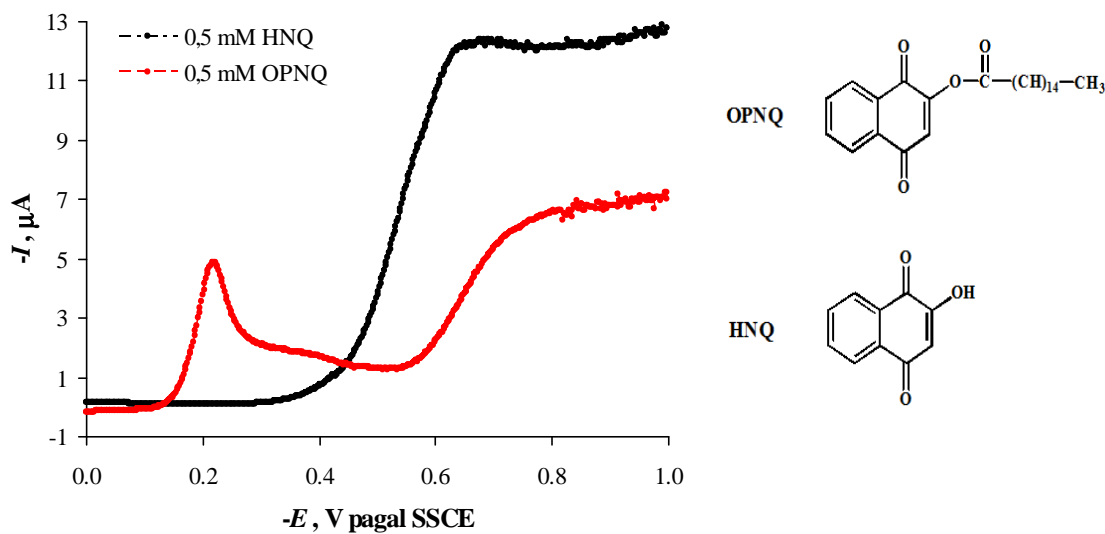
3.3. OPNQ kaip substrato panaudojimas esterazių aktyvumui tirti

3.3.1 Lipolitinio esterazės aktyvumo nustatymas, naudojant OPNQ gebą absorbuotis ant stiklo grafitinio elektrodo paviršiaus

Dažniausia problema tiriant/nustatant fermentinį esterazių aktyvumą yra substrato, kuris blogai tirpsta vandeninėje terpėje, polimorfiškumas. Pasiskirstęs vandeninėje terpėje substratas gali sudaryti įvairias formas, tokias kaip micelės, netirpūs agregatai, nuosėdos, adsorbuoti sluoksniai ir kiti. Kai tik fermentas įvedamas į sistemą ir prasideda fermentinio tipo substrato skaldymo reakcija, hidrolizės reakcijos greitis gali būti nustatomas iš reakcijos produkto atsipalaidavimo greičio. Tačiau kai substratas yra polimorfinis tirpale hidrolizės reakcijos produktas vienu metu išskiriamas nuo visų galimų substrato formų. Toks trūkumas nepageidaujamas tokiose sistemose, kai reikalingas tikslus fermento aktyvumo apibūdinimas. Iš kitos pusės, micelių sistemos yra lengvai paruošiamos ir reguliuojamos. Tai paragino mus sukurti sistemą fermentiniam aktyvumui tirti, kuri neturėtų anksčiau minėtų trūkumų ir tuo pačiu metu apimtų micelinių tirpalų paruošimo paprastumą.

Metodas pagrįstas chinonų ir naftochinonų darinių geba adsorbuotis ant stiklo grafitinio elektrodo paviršiaus. Ištyrėme blogai tirpstančių naftochinono esterų gebą adsorbuotis, sudarant sluoksnius iš tirpalų, kuriuose naftochinono molekulės vyrauja micelių pavidale. Buvo tikimasi, kad naftochinono molekulės iš micelių pereis ant paviršiaus ir sudarys adsorbuotą monosluoksnį, taip, kaip tai vyksta iš tikrųjų tirpalų. Tokiu būdu cikline voltamperometrija būtų galima elektrochemiškai detektuoti ant paviršiaus esantį naftochinono darinį. Tam tikslui buvo pasirinktas 2-oksipalmitoil-1,4-naftochinonas (OPNQ), kurio micelės buvo paruoštos panašiai kaip ir PDCHQ anksčiau aprašytu atveju. Iš tiesų, micelės generuoja grįžtamą elektrocheminį signalą, kuris patvirtina absorbcinės pusiausvyros tarp OPNQ micelių ir jo molekulių ant paviršiaus egzistavimą.

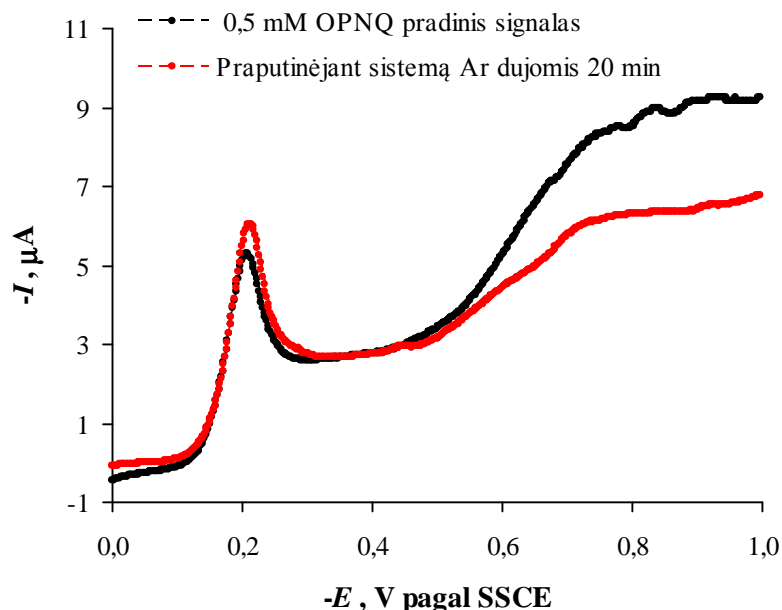
46 pav. pateikta tipinė OPNQ micelių tirpalo ant sukamojo diskinio stiklo grafitinio elektrodo voltamperograma.



46 pav. 0,5 mM OPNQ ir HNQ redukcijos voltamperogramos. 0,1 M NaCl ir 0,01 M natrio dihidrofosfato buferinis tirpalas pH 7, $C(\text{Tritono X } 100) = 0,25\%$, $V_E = 20 \text{ mV/s}$, $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $\omega = 100 \text{ aps/min}$, $S_{\text{geometrinis}} = 7,06 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2$. Matavimai atlikti deguonies atmosferoje.

Kreivė parodo tris skirtingas OPNQ signalo sritis: maksimumas apie -0,2 V, žema plato sritis nuo -0,3 V iki -0,6 V, ir aukšta plato sritis už -0,7 V.

Pirmiausia įvertinome, ar šiam signalui turi įtakos deguonies buvimas sistemoje. Tam tikslui atlikome eksperimentą, kurio rezultatai pateikti 47 paveiksle.

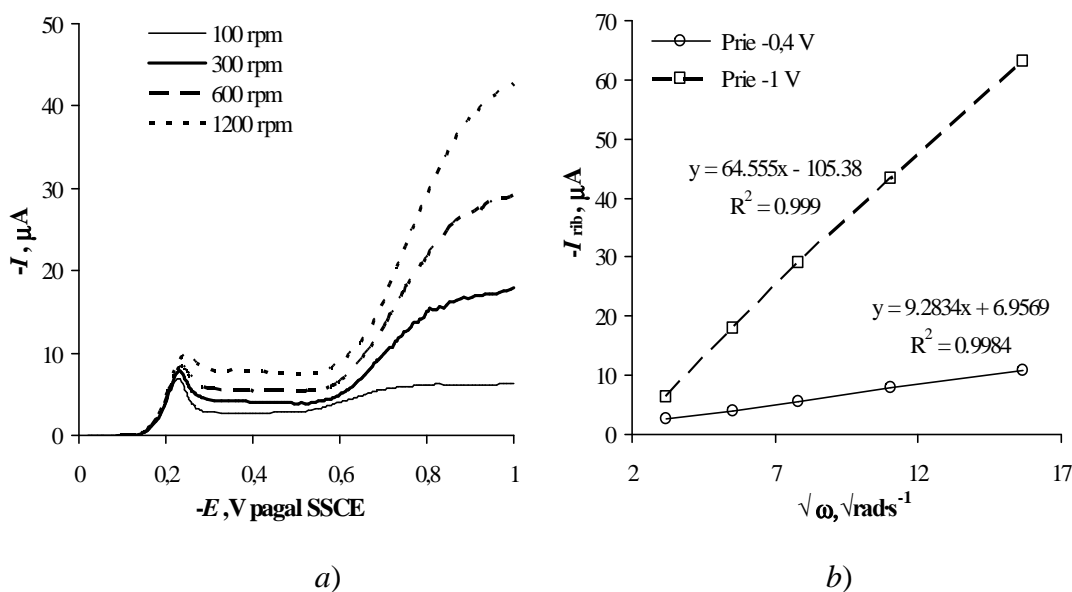


47 pav. 0,5 mM OPNQ redukcijos voltamperogramos atsakas į deguonies buvimą sistemoje. 0,1 M NaCl ir 0,01 M natrio dihidrofosfato buferinis tirpalas, pH 7, $C(\text{Tritono X 100}) = 0,25\%$, $V_E = 20 \text{ mV/s}$, $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $\omega = 100 \text{ aps/min}$, $S_{\text{geometrinis}} = 7,06 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2$.

Tik suformavus mišrias Tritono X-100 ir OPNQ micleles, gauta voltamperograma, pavaizduota 47 paveiksle juoda spalva. Tada virš tirpalo (į patį tirpalą negalėjome leisti dujų, nes jos pradėdavo stipriai putoti) 20 min buvo leistos inertinės Ar dujos, kurios tam tikru kiekiu sumažino deguonies koncentraciją tirpale. Kaip matome 47 paveiksle, po šio veiksmo pradeda mažėti ribinė substrato redukcijos srovė, tuo tarpu mus dominantis signalas 0,1-0,4 V srityje lieka beveik nepakitęs, o suintegravus smailę, gautas krūvis skiriasi tik dešimčia procentų. Todėl galima sakyti, kad deguonies buvimas labiau įtakoja ribinę difuzijos srovę potencialų srityje $E < -0,5 \text{ V}$, negu šią smailę.

Norėdami išsiaiškinti nuo -0,1 V iki -0,4 V srityje signalo prigimtį, nubrėžėme tiriamo substrato voltamperogramas esant skirtingam elektrodo sukimosi greičiui. Tuo atveju, jei šis signalas tiesiogiai priklausytų nuo

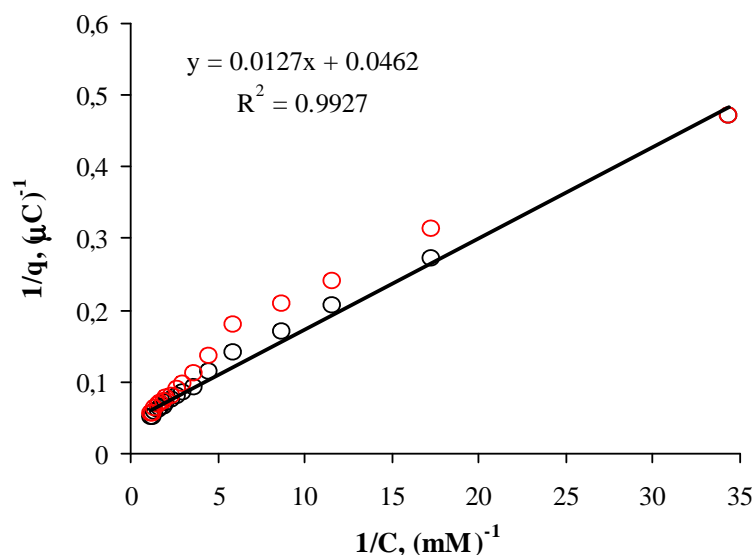
elektrodo sukimosi greičio kvadratinės šaknies, būtų galima teigti, kad šis procesas yra susijęs su difuzijos reiškiniais.



48 pav. 0,5 mM OPNQ redukcijos proceso voltamperogramos kitimai, keičiant elektrodo sukimosi greitį (a) ir ribinių redukcijos srovių priklausomybės nuo elektrodo sukimosi greičio kvadratinės šaknies (b) prie $-0,4$ V ir -1 V potencialų. 0,1 M NaCl ir 0,01 M natrio dihidrofosfato buferinis tirpalas, pH 7, $C(\text{Tritono X-100}) = 0,25\%$, $V_E = 20$ mV/s, $T = 40$ °C, $S_{\text{geometrinis}} = 7,06 \cdot 10^{-2}$ cm².

Kaip matome iš 48 pav. (a), signalas ties $-0,25$ V didinant sukimosi greitį deformuojasi ir palaipsniui pereina į ribinę ties $-0,4$ V srovę. Tačiau kaip matome iš 48 pav. (b) pateiktų priklausomybių, procesų, vykstančių ties $-0,4$ V ir -1 V, nuolinkio kampai yra skirtingi. Tai rodo, kad substrato OPHQ difuzijos koeficientas yra didesnis ties -1 V už nustatytą ties $-0,4$ V. Gali būti, kad smailės ties $-0,25$ V atsiradimo priežastis yra susijusi su OPNQ adsorbcija ant elektrodo paviršiaus. Todėl įvertinome atsiradusios smailės ties $-0,25$ V suintegruoto krūvio priklausomybę nuo įvesto į sistemą OPNQ kiekio. Gavome, kad iki 0,8 mM OPNQ koncentracijos tirpale krūvis proporcingai auga nuo substrato, įvesto į sistemą, kiekio. Galima sakyti, kad pasiekus šią substrato koncentraciją tirpale, gauname maksimalią substrato adsorbciją ant paviršiaus. Mes pabandėme atidėti gautus integruoto krūvio kiekius kaip funkciją nuo substrato koncentracijos tirpale, pasinaudodami atvirkštinėmis

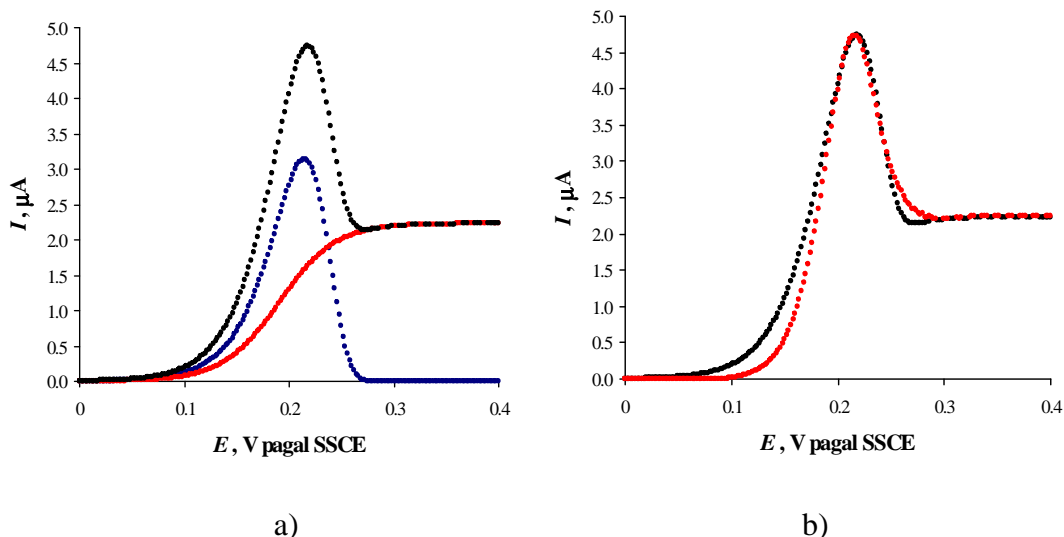
Langmuiro koordinatėmis. Kaip matome 49 pav, raudoni simboliai, tirtų koncentracijų intervale stebimos sudėtinės tiesinės priklausomybės, tarytum indikuojančios kelis galimus adsorbcinius būvius ant paviršiaus.



49 pav. Suintegruotos smailės ties $-0,25\text{ V}$ (nuo 0 V iki $-0,33\text{ V}$) krūvio priklausomybė nuo įvesto OPNQ kiekio į sistemą Langmuiro koordinatėse. Pateikti visų eksperimentų vidurkiai. Aerobinė aplinka. $0,1\text{ M NaCl}$ ir $0,01\text{ M}$ natrio dihidrofosfato buferinis tirpalas, $\text{pH } 7$, $C(\text{Tritono X } 100) = 0,25\%$, $V_E = 20\text{ mV/s}$, $T = 40\text{ }^\circ\text{C}$, $\omega = 100\text{ aps/min}$, $S_{\text{geometrinis}} = 7,06 \cdot 10^{-2}\text{ cm}^2$. Raudonos spalvos apskritimais pažymėta adsorbcijos izoterma, gauta neatskyrus difuzijos ir fizisorbcijos procesų srovių, juodais apskritimais – atskyrus fizisorbcijos ir difuzijos procesus, sudarančius bendrą vaizdą voltapmerogramoje nuo 0 V iki $-0,4\text{ V}$.

Tačiau, atsižvelgdami į tai, jog integruodami, mes galbūt įvedame sisteminę paklaidą dėl dviejų procesų vykstančių persiklojančių potencialų intervaluose (maksimumo sritis apie $-0,2\text{ V}$, ir plato sritis nuo maždaug $-0,28\text{ V}$ iki $-0,6\text{ V}$).

Pabandėme atskirti šiuos signalus, pasinaudodami atitinkamomis elektrocheminės adsorbcijos [Laviron, E. **1974**] ir Levičio, aprašančios difuziją, lygtimis.



50 pav. Fizisorbuoto elektrocheminio signalo prie $-0,2$ V atskyrimas nuo ribinės difuzinės srovės signalo. a) atskirtų procesų kreivės, b) signalų palyginimas. Abiejuose paveiksluose juoda spalva pavaizduota eksperimento metu gauta kreivė.

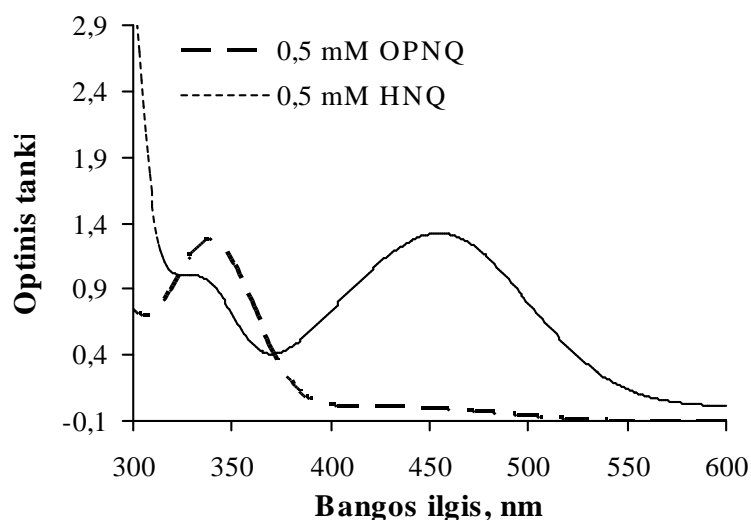
50 paveiksle (a) mėlyna spalva pavaizduotas elektrocheminis adsorbcijos signalas, atskirtas, mechaniškai parinkus parametrus, nuo juoda spalva pavaizduoto abiejų procesų signalo. Raudona spalva pavaizduotas signalas, gautas taip pat mechaniškai parinkus parametrus, pagal Levičio ribinės srovės lygtį. 50 paveiksle (b) yra pateiktas signalų, gautų eksperimentiniu būdu (juoda spalva) ir mechaniškai parinkus parametrus (raudona spalva) palyginimas. Kaip matyti iš 50 pav. (b) abu signalai beveik sutampa. Todėl tokiu būdu galima surasti tikslesnį adsorbuoto substrato kiekį ant elektrodo paviršiaus.

Pagal šiuos skaičiavimus gavome labiau tiesinę priklausomybę Langmiuro izotermą (49 pav. juodos spalvos apskritimai). Iš šios izotermos, pratęsus tiesę iki y-ašies, susikirtimo taško, apskaičiavome, kad maksimalus adsorbcijos kiekis OPNQ substrato ant stiklo grafitinio elektrodo yra $21,6 \pm 0,4 \mu\text{C}$. Įrodžius, kad smailės ties $-0,25$ V integruotas krūvis yra susijęs su tirpale esančio substrato koncentracija, o su benzopurpurinu 4B [Becher, **1962**] nustatančius, kad OPNQ kritinė micelių koncentracija su Tritonu X-100 yra

apie 5 μM (vadinasi, visas substratas vykstant hidrolizės reakcijai yra micelių pavidalo), konstatuojame jog priklausomybė 49 pav. įrodo, jog tarp OPNQ micelių ir absorbuotų OPNQ ant paviršiaus egzistuoja gana labili adsorbcinė pusiausvyra, kurią galima panaudoti *TLL* katalizuojamai OPNQ micelių hidrolizei tirti. Dėl hidrolizės mažėjanti micelių koncentracija, sukelia maksimumo ties $-0,25\text{ V}$ mažėjimą, taigi šis elektrocheminis signalas gali būti panaudojamas hidrolizuojančio fermento aktyvumui tirti. Nustatytos *TLL* specifinio aktyvumo vertės pateiktos 7 lentelėje. Šias aktyvumo vertes palyginome su tokiomis pačiomis vertėmis, gautomis spektroskopiniais metodais. Duomenys pateikti kitame skyrelyje.

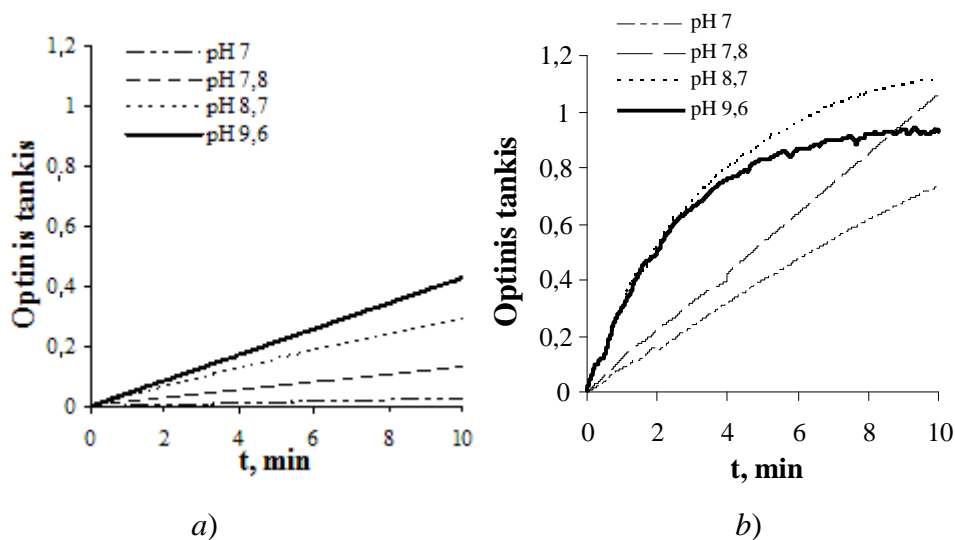
3.3.2. OPNQ micelių panaudojimas esterazių katalitiniam aktyvumui tirti UV-VIS spektroskopiniu metodu. Palyginimas su elektrocheminiu metodu.

Lygiagrečiai OPNQ elektrocheminiams atlikti spektroskopinės adsorbcijos matavimai (eksperimento sąlygos vienodos), kurie leido palyginti skirtingais metodais gautus *TLL* specifinius aktyvumus. Pirmiausia buvo iširta galimybė OPNQ kaip substratą panaudoti tiriant spektroskopiniais analizės metodais. Tam tikslui buvo užrašyti hidrolizės reakcijos substrato ir produkto spektrai (51 pav.).



51 pav. OPNQ (substrato $\lambda_{\max} = 340$ nm) ir HNQ (produkto $\lambda_{\max} = 450$ nm) adsorbcijos spektrai, užrašyti UV-VIS spektroskopu, $T = 40$ °C, $C(\text{Tritono X-100}) = 0,25\%$ (KMC Tritonas X-100 yra 0,015 %).

Kaip matome, substrato ir reakcijos produkto spektrų maksimumai yra skirtingame bangos ilgyje, todėl OPNQ galime panaudoti šiame metode *TLL* hidrolizės reakcijai tirti. Pirmiausia nustatomas HNQ molinis ekstinkcijos koeficientas (7 lentelė) skirtingame pH. Toliau atliekant hidrolizės reakciją su *TLL* ir be fermento, stebima, kaip keičiasi reakcijos produkto optinis tankis ties 450 nm (52 pav.).



52 pav. 0,5 mM OPNQ optinio tankio kitimai laike, esant skirtingam pH prie pastovaus bangos ilgio $\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$: a) savaiminė hidrolizė, b) bendra savaiminė ir fermento ($C(TLL) = 15 \mu\text{M}$) sukelta hidrolizė. $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $C(\text{Tritono X 100}) = 0,25\%$, (KMK Tritono X-100 yra 0,015%).

Kaip matome, didelio pH buferiniuose tirpaluose savaiminė OPNQ hidrolizė dėl laisvų OH^- jonų pertekliaus yra didesnė, todėl tiriant hidrolizės reakciją, sukeltą TLL, būtinai reikia atsižvelgti į savaiminę hidrolizę. Atėmus savaiminės hidrolizės vertes, surandamas optinio tankio kitimas dėl TLL poveikio. Atsižvelgus į hidrolizės reakcijos produkto molinius ekstinkcijos koeficientus, apskaičiuojamas specifinis TLL aktyvumas (7 lentelė).

7 lentelė. Elektrocheminiu ir spektrofotometrijos metodais nustatytas *Thermomyces lanuginosus* lipazės specifinis aktyvumas OPNQ, atsižvelgiant į molinio ekstinkcijos koeficiento kitimą nuo pH. 0,1 M NaCl ir 0,25% Triton X 100, $T = 39 \pm 1,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

pH	Spektrofotometrijos metodu nustatytas specifinis aktyvumas, AV/g	Elektrochemijos metodu nustatytas specifinis aktyvumas, AV/g
7	70 ± 5	40 ± 5
7,8	90 ± 5	50 ± 5
8,7	170 ± 5	155 ± 5
9,6	150 ± 5	115 ± 10

Kaip galima pastebėti iš šios lentelės spektroskopijos ir elektrochemijos metodais nustatyti specifiniai aktyvumai neutraliame pH skiriasi apie du kartus. Stebimą skirtumą galima paaiškinti tuo, kad spektroskopiniuose matavimuose hidrolizės reakcijos greitis registruojamas pagal atsipalaiduojančio produkto kiekį, kuris susidaro iš visų substrato formų. Tačiau elektrocheminiuose matavimuose fermentinės reakcijos greitis registruojamas tik nuo vienos substrato formos – micelių, kurių kiekis tirpale registruojamas tam tikru laiko momentu, neatsižvelgiant į substrato polimorfiškumą. Įdomu tai, kad didesniame tirpalų pH abiejų metodų gauti duomenys yra artimesni. Tai galima paaiškinti tuo, kad didesniame pH amfifilinis OPNQ substratas tirpsta geriau ir gaunamas labiau homogeninis tirpalas. Darome išvadą, kad šis aprašytas elektrocheminis metodas gali būti naudojamas esterazių aktyvumui nustatyti, panaudojus nusistovėjusią pusiausvyrą tarp substrato micelių tirpale ir ant stiklo grafitinio elektrodo.

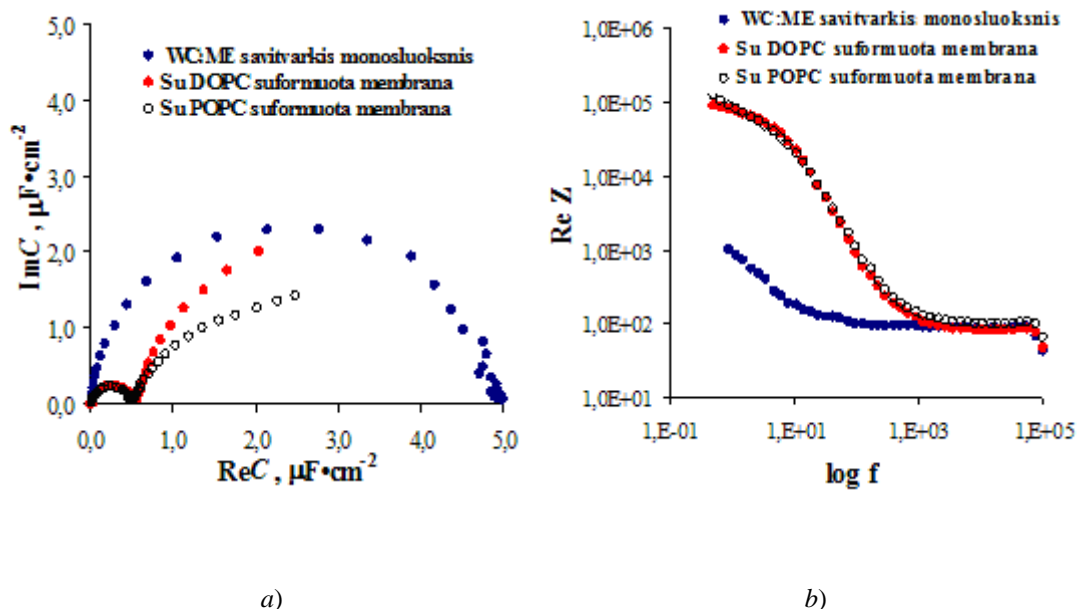
Specifinis *TLL* aktyvumas OPNQ substrato atveju yra apie 3 kartus didesnis už PDCHQ, bet išlieka ~ 15 kartų mažesnis nei su *p*-nitrofenilpalmitatu.

3.4. Fosfolipazių aktyvumo tyrimas, naudojant paviršiuje imobilizuotus fosfolipidinius bisluoksnius

3.4.1. Bisluoksnių formavimas ir jų elektriniai parametrai

Prikabintos bisluoksnių fosfolipidinės membranos (*t*BLM) yra nauja biomimetinė sistema kuri gali būti taikoma bioanalizėje [Valincius ir kt., 2007]. Šios membranos savo struktūra yra panašios į natūralius membranų bisluoksnius. Šiame darbe pabandėme praplėsti bioanalitines šių sistemų taikymo sritis, apjungiant prikabintų bisluoksnių fosfolipidinių membranų technologiją ir elektrocheminio impedanso spektroskopiją.

Suformuoto mišraus WC14 ir ME (β -merkaptotetanolio) savitvarkio monosluoksnio ir prie jo prikabintų bisluoksnių fosfolipidinių membranų EIS spektrai pavaizduoti 53 paveiksle. Jame kreivės pateiktos kompleksinės talpos koordinatėse (*a*) ir impedanso modulio nuo dažnio koordinatėse (*b*), kurios yra patogios stebint pokyčius, analizuojant sistemos EIS spektrus.



53 pav. Savitvarkio monosluoksnio ir prie jo prijungtų lipidinių membranų talpos pokyčiai ir elektrocheminiai modeliai, esant 0,01 M TRIS, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,3, $T = 22 \pm 3$ °C, $S_{\text{elektrodo}} = 0,45$ cm². EIS spektro dažnis skleidžiamas 0,5–10⁵ Hz. a) Kompleksinės talpos koordinatėse (Cole-Cole diagrama), b) impedanso modulio priklausomybė nuo dažnio (Bode diagrama).

Yra žinoma, kad registruojamų pusapskritimių (53 pav., *a*) diametras yra tiesiogiai proporcingas elektrinei talpai. Kaip matome, mišraus WC14 ir ME savitvarkio monosluoksnio pusapskritimis yra per eilę didesnis už suformuotų *t*BLM pusapskritimus. Tai rodo, jog užnešant fosfolipidinį sluoksnį ant WC14 ir ME mišraus savitvarkio monosluoksnio, dielektrinio darinio ant paviršiaus storis išauga, o efektyvinė dielektrinė sluoksnio skvarba sumažėja.

Kita įdomi spektrinė detalė yra stebima žemų dažnių srityje. Čia atsiranda „uodegytės“ (53 pav., *a*) ir padidėja impedanso reali dalis (varža) (53 pav., *b*). Tai, visų pirma rodo išaugančias dėl fosfolipidinio sluoksnio izoliacines sistemos savybes, tačiau kartu matyti, jog net ir šios membranos pasižymi baigtine varža. Stebimus eksperimentinius duomenis galima aprašyti elektriniu ekvivalentiniu modeliu, pavaizduotu 16 paveiksle. Žemiau esančioje 8 lentelėje pateikti elektriniai parametrai, gauti panaudojus šią ekvivalentinę elektrinę schemą modeliavimui.

8 lentelė. Iš POPC ir DOPC fosfolipidų suformuotų *t*BLM membranų, apskaičiuotų pagal ekvivalentinį modelį EIS elektrinių parametų vidurkiai. Buferinio tirpalo sudėtis: 0,01 M TRIS, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA. pH 7,3, $T = 22 \pm 3$ °C. $S_{\text{elektrodo}} = 0,45 \text{ cm}^2$.

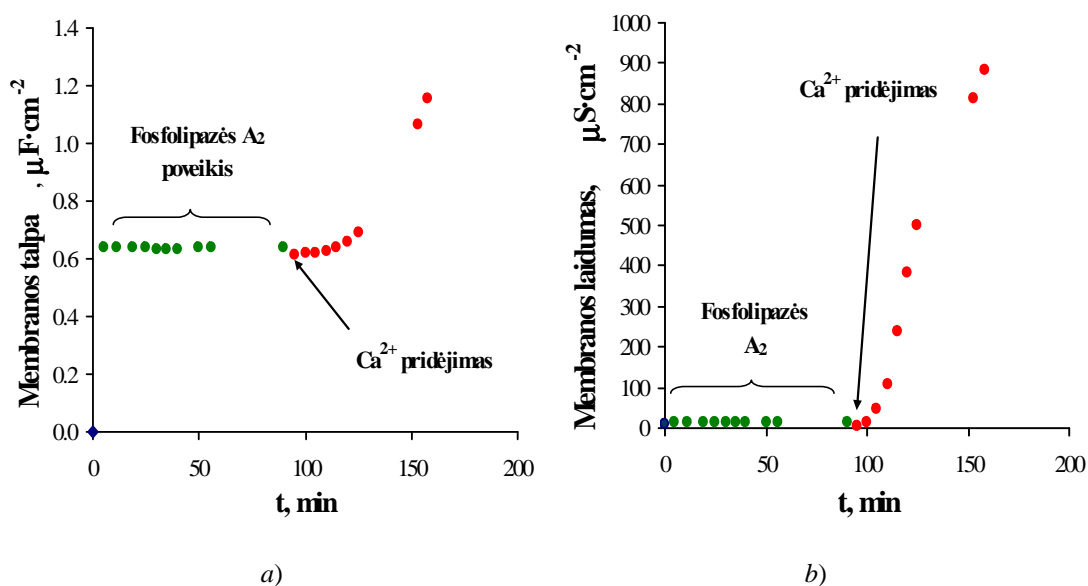
Nustatytas elektrinis parametras	<i>Fofolipidai, iš kurių suformuotos tBLM</i>	
	POPC	DOPC
$CPE_{tBLM}, \mu F \cdot cm^{-2}$	0,71	0,77
α_{tBLM}	0,980	0,972
$CPE_{def}, \mu F \cdot cm^{-2}$	5,73	7,86
α_{def}	0,629	0,705
$R_{def}, k\Omega \cdot cm^{-2}$	670	220
<i>Modelio atitikimo koeficientas, $\chi^2 \cdot 10^4$</i>	2,67	2,22

Membranos talpos (CPE_{tBLM}) yra DOPC didesnės už POPC talpas, nors šių suformuotų membranų sluoksnio storis yra panašus ir elektrodo plotas yra toks pat, todėl šiuos rezultatus galima paaiškinti santykinės dielektrinės konstantos skirtumu. Pastarosios vertė priklauso nuo membranoje esančių defektų, į

kuriuos lengvai gali skverbtis jonai arba vandens molekulės, skaičiaus. Membranos defektai didina santykinės dielektrinės konstantos vertę. Kuo didesnis defektų skaičius, tuo didesnė CPE_{tBLM} . Defektų santykinį kiekį galima įvertinti analizuojant α_{tBLM} , α_{def} , R_{def} parametrų vertes. Kuo α_{tBLM} yra didesnis ir artimas 1, tuo mažiau defektų turi membranos ($\alpha_{tBLM}(POPC) > \alpha_{tBLM}(DOPC)$). Tuo tarpu α_{def} parametrui yra atvirkščiai, kuo jis yra didesnis ir labiau artimas vienetui, tuo membranos turi daugiau defektų ($\alpha_{def}(DOPC) > \alpha_{def}(POPC)$) [Valincius ir kt., 2007]. R_{def} parametras yra tiesiogiai susijęs su membranos defektais: kuo jis mažesnis, tuo membrana turi daugiau defektų, į kuriuos, kaip jau minėjau, gali skverbtis jonai ir vandens molekulės mažindami R_{def} vertę ($R_{def}(POPC) > R_{def}(DOPC)$). CPE_{def} auga dėl didėjančio elektrinio lauko skverbimosi po dielektriko sluoksniu, šiuo atveju – po membranos bisluoksniu. Įvertinus visus iš skirtingų fosfolipidų suformuotų membranų elektrinių parametrų skirtumus, galima sakyti, kad membranos suformuotos iš POPC yra mažiau laidžios, turi mažesnę defektų skaičių negu DOPC membranos. Tai dera su akivaizdžiu faktu – POPC membranos yra sudarytos iš mononesočiosios riebalų rūgšties, o DOPC – iš dinesočiosios rūgšties.

3.4.2. Elektrocheminio impedanso spektro kitimo taikymas fermentiniam aktyvumui detektuoti

Prieš pradėdant tyrimus su fosfolipaze A₂ (išskirta iš bičių nuodų (PLA₂bv) ir iš kiaulės kasos (PLA₂pp)) patikrinome, kaip šis fermentas veikia membranų elektrocheminio impedanso spektrus. Fermento veikimas patikrintas tokiu eksperimentu: membranos buvo suformuotos tirpiklio pakeitimo metodu su buferiniu tirpalu, kurio sudėtyje buvo EDTA. EDTA suriša katijonus, šiuo atveju, buferiniame tirpale kaip priemaišas esančius Ca²⁺ jonus, kurie yra fosfolipazės A₂ kofaktorius. Tuomet į sistemą su jau suformuotomis membranomis buvo įvesta fosfolipazė A₂ (300 nM) ir stebimas jos poveikis membranai 2 val. bėgyje. Vėliau į sistemą buvo papildomai su buferiniu tirpalu įvestas Ca²⁺ jonų perteklius. Gauti rezultatai pateikti 54 pav.



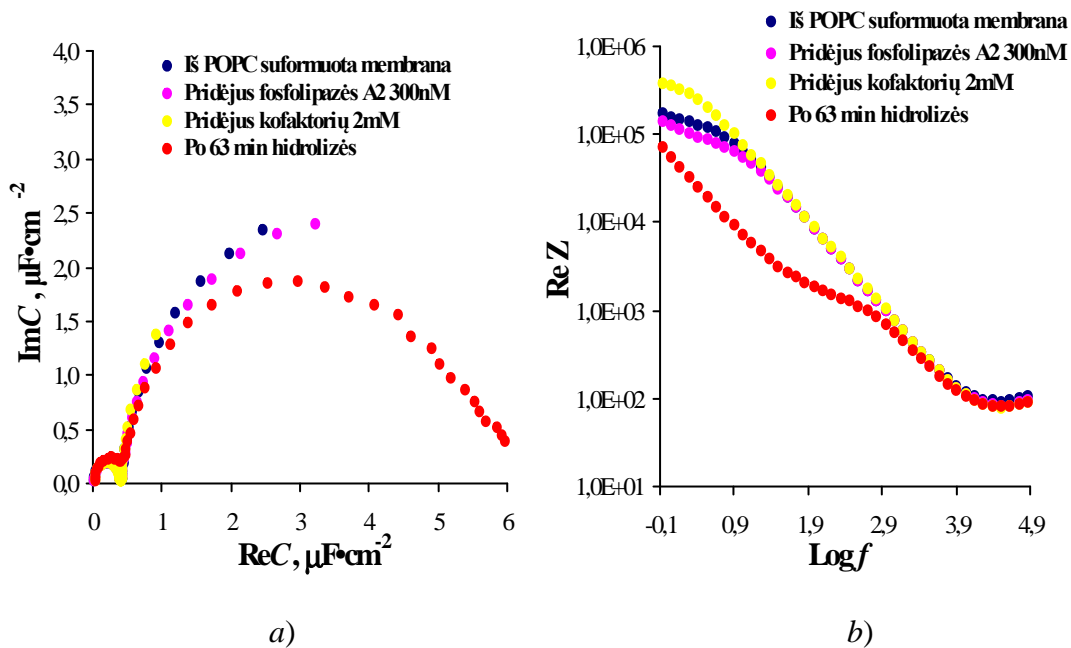
54 pav. Membranos, suformuotos iš POPC, talpos (a) ir laidumo (b) kitimas prieš hidrolizę ir jai vykstant. Rezultatai apskaičiuoti iš gautų EIS spektrų, naudojant anksčiau pateiktą ekvivalentinį modelį. $C(\text{PLA}_{2_pp}) = 300 \text{ nM}$, $C(\text{Ca}^{2+}) = 2 \text{ mM}$. Buferinis tirpalas: 0,01 M TRIS, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl, pH 7,3, $T = 22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, $S_{\text{elektrodo}} = 0,45 \text{ cm}^2$.

Kaip matyti iš šių paveikslų, pridėjus PLA₂ 2 val. bėgyje membranos, suformuotos iš POPC fosfolipido, varža ir talpa beveik nepakinta. Tai rodo, kad membrana atspari fermento poveikiui, esant kofaktoriaus trūkumui.

Priešingu atveju, kai į sistemą įvedame Ca^{2+} jonų perteklių, pirmu laiko momentu sumažėja membranos talpa, o membranos varža šiek tiek išauga. Tokį reiškinį galima paaiškinti Ca^{2+} jonų sąveika su fosfolipido fosfato anijonu, iš dalies įkraunant kviterijoninę fosfocholino grupę. Atsiradęs abiejuose bisluoksnių pusėse dalinai įkrautos fosfocholino grupės pasižymi elektrostatine stūma, ko pasekoje efektyvinis bisluoksnių storis gali išaugti, sumažindamas membranos elektrinę talpą. Panašus efektas buvo stebimas ir žemesniuose pH, esant H^+ jonų pertekliui, kas rodo, jog šie reiškiniai turi vienodą fizikinį pagrindą. Tačiau gana greitai po Ca^{2+} jonų pridėjimo prasideda membranos laidumo ir elektrinės talpos augimas, nors pradžioje membranos talpos kitimas yra lėtas (54 pav.). Eksperimento pabaigoje membrana suyra. Taigi, įrodžius, kad fosfolipazės A_2 poveikis fosfolipidiniams bisluoksniams yra susijęs su kofaktoriumi Ca^{2+} , galima teigti, kad EIS metodu realiaame laike stebime fermento inicijuotą fosfolipidų hidrolizę. Šis efektas gali būti panaudotas fosfolipazių aktyvumui detektuoti.

3.4.3. EIS signalo panaudojimas fermentų aktyvumo detekcijai (palyginami išskirtos iš bičių nuodų ir kiaulės kasos fosfolipazės bei *TLL* aktyvumai)

Toliau buvo tirima fermento koncentracijos įtaka hidrolizės reakcijos greičiui. Žemiau pateikti EIS spektrų elektrinių parametru kitimai kompleksinėse talpos ir Bode koordinatėse, 55 pav.

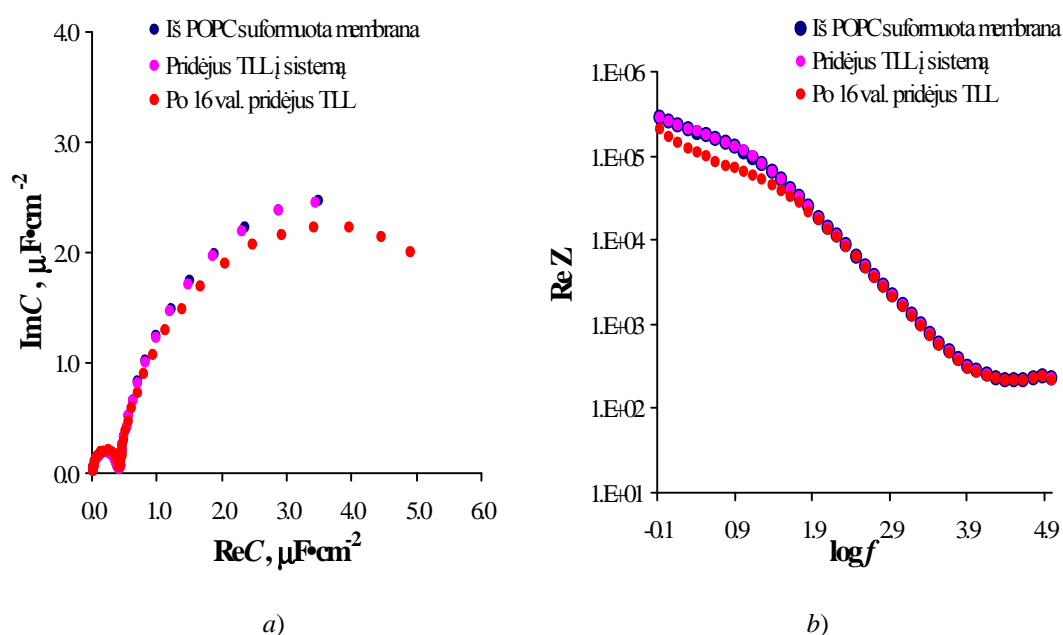


55 pav. Suformuotos, iš POPC, membranos EIS atsakas į sistemą pridedamus komponentus, esant 0,01 M TRIS, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,3, $T = 22 \pm 3$ °C, $S_{\text{elektrodo}} = 0,45 \text{ cm}^2$: *a*) kompleksinės talpos koordinatėse (Cole-Cole diagrama), *b*) realios impedanso komponentės priklausomybė nuo dažnio (Bode diagrama).

Pridėjus į sistemą fermento aukštų dažnių srityje sumažėja spektro pusapskritimis (55 pav., *a*). Tai rodo, kad membranos talpa šiek tiek sumažėja. Tuo metu 55 pav. (*b*) žemų dažnių srityje sumažėjo reali impedanso komponentė, rodanti, kad membrana pasidaro laidesnė, bei išaugo spektro „uodegytė“ (55 pav., *a*). Šis reiškinys gerai dera su tuo, kad fermentas pasiekęs membranos paviršių jį deformuoja bei įtakoja sluoksnio storio augimą. Tik įvedus į sistemą Ca^{2+} jonų perteklių, atsiranda priešingas efektas – „uodegytė“ pradeda mažėti, o reali impedanso komponentė žemų dažnių srityje žymiai

išauga ir sumažėja membranos talpa. Tai rodo, kad pirmu laiko momentu Ca^{2+} jonai pagerina membranos savybes, ji tampa mažiau laidži bei tvarkingesnė. Praėjus trumpam laikotarpiui spektrai pradeda keistis: auga membranos talpa ir spektro „uodegytė“. Praėjus 63 minutėms iš spektro „uodegytės“ išauga antras pusapskritimis. Membrana pasidaro dar laidesnė ir praranda struktūrą, pavaizduotą 15 pav. Po dar didesnio laiko tarpo lieka tik vienas pusapskritimis, primenantis mišraus WC ir ME savitvarkio monosluoksnio spektrą. Galima daryti išvadą, kad vykstant hidrolizei visiškai suyra membrana.

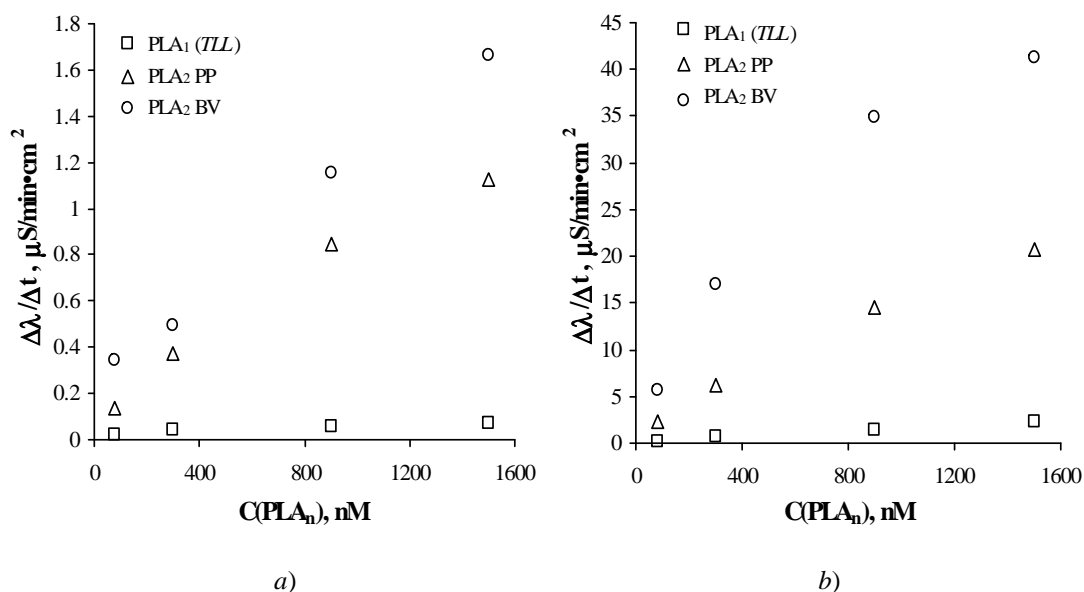
Visiškai kitokius rezultatus gavome su *TLL* (56 pav.).



56 pav. Suformuotos, iš POPC, membranos EIS atsakas į fosfolipazę A_1 (*TLL*), esant 0,01 M TRIS, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,3, $T = 22 \pm 3$ °C, $S_{\text{elektrodo}} = 0,45 \text{ cm}^2$: a) kompleksinės talpos koordinatėse (Cole-Cole diagrama), b) realios impedanso komponentės priklausomybė nuo dažnio (Bode diagrama).

Kaip matome iš 56 pav., išlaikius membraną su *TLL* ilgiau nei 16 val., pateiktų spektrų kompleksinės talpos ir Bode koordinatėse pokyčiai yra nežymūs. Tai rodo, kad fermentas nelinkęs stipriai sąveikauti su *tBLM*.

Ekspirimentuose su skirtinga fermento koncentracija membranos laidumo priklausomybės nuo laiko, parodytos 57 pav.



57 pav. Membranų, suformuotų iš fosfolipidų, hidrolizės reakcijos greičio priklausomybė nuo fosfolipazės A₂, esant $C(Ca^{2+}) = 2$ mM, ir nuo fosfolipazės A₁ koncentracijos: 0,01 M TRIS, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,3, $T = 22 \pm 3$ °C, $S_{\text{elektrodo}} = 0,45$ cm²: a) membranos, suformuotos iš DOPC fosfolipido, b) membranos, suformuotos iš POPC fosfolipido.

Ir šie duomenys aiškiai rodo TLL neaktyvumą. Šie rezultatai yra panašūs į tuos, kuriuos gavome tiriant MNFcP savitvarkį monosluoksnį. Galima numanyti, kad kaip ir MNFcP substrato savitvarkio monosluoksnio atveju, kai fermentas negalėjo pasiekti esterinio ryšio ir katalizuoti hidrolizės, taip ir šiuo atveju nors yra nustatyta, kad membranose, suformuotose iš DOPC ir POPC, yra defektų, bet jų neužtenka fermentui katalizuoti hidrolizės reakcijos.

Fosfolipazės, atvirkščiai, rodo gana žymų aktyvumą bei jo priklausomybę nuo fermento koncentracijos (57 pav.). Tačiau čia matome kitą efektą, būtent fermento aktyvumo priklausomybę nuo fosfolipido prigimties. Membranose, suformuotose iš POPC, fosfolipazės katalizuojamos reakcijos greičiai ($\mu S/min$) yra apie 25 kartus didesni nei su DOPC membranomis. PLA₂bv sąveikaujant

su DOPC ir POPC membranomis, katalitinis hidrolizės greitis kelis kartus didesnis už PLA₂pp sąveikaujant su tomis pačiomis membranomis.

Gauti rezultatai rodo, kad apjungus EIS ir *t*BLM metodus, juos galima panaudoti ne tik esterazių aktyvumui nustatyti bet ir charakterizuoti įvairios sudėties fosfolipidines membranas. Tai turi praktinę reikšmę, nes fermentinis aktyvumas priklauso nuo įvestos į sistemą fermento koncentracijos ir *t*BLM pagrindu sudarytos priemonės gali būti išvystytos PLA₂ koncentracijai įvertinti tiek modelinėse, tiek ir, matyt, realių pavyzdžių sistemose.

Išvados

- Pasiūlytas tiesioginis lipazės aktyvumo detekcijos metodas, panaudojant sintetinį fizesorbuotą substratą, 9-(5'-ferocenilpentanoiloksi)nonildisulfidą (FPONDS), turintį feroceno redokso žymę ir esterinę fermento taikinio grupę. Metodas pasižymi paprasta „drip-and-dry“ sensorinio paviršiaus paruošimo technologija.
- PPR ir ATR-FT-IR metodais nustatytas *Thermomyces lanuginosus* lipazės (*TLL*) sluoksnio persitvarkymas ant hidrofobinio paviršiaus. Ši persitvarkymą lydi žymus *TLL* aktyvumo išaugimas, kai substratu naudojamas FPONDS, o tai tiesiogiai įrodo konformacinių pokyčių įtaką fermento aktyvumui.
- Pademonstruota galimybė siūlomą elektrocheminį metodą panaudoti esterazių, pavyzdžiui *TLL* stereospecifiškumui įvertinti.
- Pasiūlytas sukamojo diskinio elektrodo metodas, leidžiantis detektuoti *TLL* aktyvumą micelių substratų sistemose.
- Pusiausvyrinis adsorbcijos reiškinys tarp OPNQ micelių tirpale ir stiklo grafitinio elektrodo panaudotas *TLL* aktyvumui nustatyti micelių sistemose. Metodas grindžiamas tiesioginiu micelių koncentracijos nustatymu, todėl sumažėja esterazių substrato polimorfizmo įtaka analizei.
- *TLL* pavyzdžiu pasiūlyta esterazių aktyvumo detekcijos koncepcija, besiremianti suminio dažnio generacijos spektroskopijos metodu taikymu fazių salyčio riboje oras/vanduo; metodas leidžia išvengti komplikacijų, susijusių su substratų polimorfizmu, būdingų klasikiniams esterazių aktyvumo matavimo metodams.
- Pasiūlytas elektrocheminio impedanso spektroskopinis metodas fosfolipazių aktyvumui detektuoti, panaudojant prijungtas prie paviršiaus bisluoksnes membranas.

Publikacijos disertacijos tema

1. **Ignatjev I.**, Valinčius G., Švedaitė I., Gaidamauskas E., Kažemėkaitė M., Razumas V. and Svendsen A.. Direct amperometric determination of lipase activity. *Analytical Biochemistry*, **2005**, Volume 344, Issue 2, p 275-277.
2. Valinčius G., **Ignatjev I.**, Niaura G., Kažemėkaitė M., Talaikytė Z., Razumas V. and Svendsen A.. Electrochemical Method for the Detection of Lipase Activity. *Analytical Chemistry*, **2005**, 77(8): 2632-2636,.
3. Niaura G., Kuprionis Z., **Ignatjev I.**, Kažemėkaitė M., Valincius G., Talaikytė Z., Razumas V., and Svendsen A.. Probing of Lipase Activity at Air/Water Interface by Sum-Frequency Generation Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, **2008**, 112, 4094-4101.
4. Balevičius Z., Vaičiškauskas V., Valinčius G. and **Ignatjev I.** Analysis of T. Lanuginosus lipase growth on octadecanethiol using surface Plasmon resonance ellipsometry. *Phys. Stat. Sol.*, **2008**, C. 5, No. 5, 1419-1422.

Kitos publikacijos, susijusios su disertacija

1. Vaičiškauskas V., Balevičius Z., **Ignatjev I.** and Valinčius G.. Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Au/ Hexanethiol/ 9-(5'-ferrocenylpentanoyloxy) nonyl disulfide Thin Film. *Lithuanian Journal of Physics*, **2006**, Vol. 46, No. 1, pp. 117-121.
2. Paida M., Ivanauskas F., **Ignatjev I.**, Valinčius G., and Razumas V.. Computational Modelling of the Amperometric Bioanalytical System for Lipase Activity Assay: a Time-Dependent Response. *Nonlinear Analysis: Modelling and Control*, **2007**, 12, 245-251.
3. Paida M., Ivanauskas F., **Ignatjev I.**, Valinčius G., Razumas V.. Computational modelling of the electrochemical system of lipase activity detection. *Sensors*. **2008**, 8, Iss. 6, 3873-3879.

Konferencijų tezės bei pranešimai

1). **Ignatjev I.**, Valinčius G., Švedaitė I., Gaidamauskas E.. *Naujas elektrocheminis metodas lipazės aktyvumo nustatymui*, “Chemija 2005”, p. 48–49, **2005**.

2) **Ignatjev I.**, Milkantaitė D., Razumas V., Kažemėkaitė M., Valinčius G.. 2-oksipalmitoil–1,4–naftochinono ir tritono X-100 micelinės sistemos naudojimas fermento aktyvumui nustatyti, “Chemija ir cheminė technologija 2007”, p.96-100, **2007**.

3) **Ignatjev I.**, Milkantaitė D., Balevičius Z., *Redox-active Physisorbed Monolayers: Substrates for Electrochemical Lipase Activity Assay*, Nanoscale Engineering of the Biointerface, Playa del Aro, Spain (28 May–1 June) **2007**.

Stażuotė

Nuo 2006-01-22 iki 2006-03-23 – Carnegie Mellon University, 5000 Forbes Avenue, Pittsburg, Pennsylvania, United States.

Padėka

Nuoširdžiai dėkoju:

darbo vadovui dr. Gintarui Valinčiui už suteiktą galimybę atlikti mokslinį darbą bei visapusišką pagalbą ruošiant disertaciją; už geranoriškumą, kantrybę bei įdomias diskusijas disertacijos tema;

Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriaus vedėjui prof. habil. dr. Valdemarui Razumui, LMA akad., už suteiktą galimybę dirbti su naujausia šiuolaikine aparatūra, patarimus, už šiltą priėmimą į kolektyvą;

habil. dr. Gediminui Niaurai bei dr. Zitai Talaikytei, padėjusiems atlikti įvairius spektroskopijos matavimus;

dr. Marytei Kažemėkaitei ir dr. Irenai Švedaitei už substratų, naudojamų hidrolizės reakcijos tyrimuose, sintezę;

dr. Allan'ui Svendsen'ui, iš Novozymes kompanijos mokslinių tyrimų skyriaus vedėjui, už atsiųstą nemokamai TLL muntantą;

„EKSPLA“ firmos darbuotojui dr. Zenonui Kuprioniui už suteiktą galimybę naudotis SDG spektroskopu;

Fizikos instituto dr. Viktorui Vaičiškai ir dr. Zigmui Balevičiui (buvusiam doktorantui) už bendradarbiavimą;

Vilniaus universiteto MIF prof. habil. dr. Feliksui Ivanauskui ir jo doktorantui Mantui Puidai už matematinių modelių kūrimą ir taikymą mūsų sistemoms;

dr. David Vanderah iš NIST'o (Nacionalinis Standartų ir Technologijos Institutas Merilendas, JAV), už susintetintą fosfocholino analogą – WC14 ir Frank Heinrich (NIST, Merilendas, JAV) už Si plokštelių, magnetronu užgarintų Au, paruošimą bei jų atsiuntimą į Lietuvą;

visam Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriaus kolektyvui už pagalbą ir bendradarbiavimą;

Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui, suteikusiam finansinę paramą vykdant šį darbą;

artimiesiems už paramą, kantrybę ir supratimą.

Literatūros saraksts

Rašant disertāciju, pasinaudota 82 literatūros šaltinij.

Annand R. R., Kontoyianni M., Penzotti J. E., Dudler T., Lybrand T. P. and Gelb M.H. Active Site of Bee Venom Phospholipase A2: The Role of Histidine-34, Aspartate-64 and Tyrosine-87. *Biochemistry*, **1996**, 35, 4591–4601.

Arzoglou P.L., Ferard G., Khalfa F., Metais P. Conditions for assay of pancreatic lipase from human plasma using a nephelometric technique. *Clin. Chem. Acta*. **1982**, 119, 329.

Balashev K., Gudmand M., Iversen L., Callisen T. H., Svendsen A., Bjørnholm T. Humicola lanuginosa lipase hydrolysis of mono-oleoyl-rac-glycerol at the lipid–water interface observed by atomic force microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2003**, 1615, 93–102.

Bard A. J., Faulkner L. R. Electrochemical methods fundamentals and applications. WILEY, **2001**. ISBN 0–471–04372–9.

Becher P. Non-ionic surface-active compounds. VI. Determination of critical micelle concentration by a spectral dye method. *J. Phys. Chem.*, **1962**, 66, 374–378.

Becher P.. Non-ionic surface-active compounds. VI. Determination of critical micelle concentration by a spectral dye method. *J. Phys. Chem.*, 66, 1962, 374–378.

Belfrage P., Vaughan M. Simple liquid-liquid partition system for isolation of labelled oleic acid from mixtures with glycerides. *J. Lipid Res.* **1969**, 10, 341–344.

Berg O. G., Gelb M. H., Tsai M-D., Jain M. K., Interfacial Enzymology: The Secreted Phospholipase A2-Paradigm. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2613–2653.

Binev Y. I., Georgieva M. K., Daskalova L. I.. Spectrochemical, ab initio and density functional studies on the conversion of 2-hydroxybenzonitrile (*o*-cyanophenol) into the oxyanion. *Spectrochim. Acta*. **2004**, 60A, 2601–2610.

Bornscheuerand U. T., Kazlauskas R. J. *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio – and Stereoselective Biotransformations*; Wiley-VCH: Weinheim, **1999**.

Briquet–Laugier V., Ben–Zeev O., Doolittle M. H. Determining Lipoprotein Lipase and Hepatic Lipase Activity Using Radiolabelled Substrates. *Methods in Molecular Biology*. **1999**, 81-94.

Brockerhoff H., Jensen R. G. *Lipolytic Enzymes*. Academic Press, New York, **1974**.

Brockman H. L., Kezdy F. J. Isobaric titration of reacting monolayers: kinetics of hydrolysis of glycerides by pancreatic lipase B. *J. Lipid Res.* **1975**, 16, 67-74.

Cajal Y., Svendsen A., Girona V., Patkar S. A., Alsina M. A.. *Biochemistry*, **2000**, 39, 413-423.

Christie W. *HPLC and lipids: A practical guide*. Pergamon press, Oxford, New York, **1987**.

Daukšas K., Barkauskas J., Daukšas V. ir kiti. *Chemijos terminų aiškinamasis žodynas*. Mokslo ir enciklopedijų leidybos institutas. Vilnius 2003. ISBN 5-420-01510-2.

Derewenda Z.S. and Sharp A.M. News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases. *Trends Biochem Sci.* **1993**, 18, 20–25.

Dizge N. and Keskinler B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. *Biomass and bioenergy*. Available online 5 May **2008**.

Georgieva M. K., Angelova P. N., Binev I. G.. The conversion of 3- and 4-hydroxybenzonitriles (m- and p-cyanophenols) into oxyanions, followed by IR spectra, ab initio and density functional calculations. *J. Mol. Struct.* **2004**, 692, 23-35.

Guilbault G.G. and Kramer D.N. Fluorometric determination of lipase, acylase, alpha– and gamma–chymotrypsin and inhibitors of these enzymes. *Anal. Chem.* **1964**, 36, 409–412.

Gunstone F., Harwood J. L., Padley F. B. *The Lipid Handbook*. Chapman & Hall, London, **1994**.

Gupta N., Rathi P., Gupta R.. Simplified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases, *Anal. Biochem.* **2002**, 311, 98-99.

Haigh S.D., Rennie A. F. K. Rapid methods to assess the effects of chemicals on microbial activity in soil. *Ins. Environ. Toxicol. Water Quality.* **1994**, 9, 347–354.

Hedin E. M. K., Høytrup P., Patkar S. A., Vind J., Svendsen A., Hult K.. *Biochemistry*, **2005**, 44, 16658-16671.

Hendrickson H.S. Fluorescence-based assays of lipases, phospholipases and other lipolytic enzymes. *Anal. Biochem.* **1994**, 219, 1–8.

Hernaiz M.J., Rua M., Celda B., Medina P., Sinisterra J. V., Sanchez-Montero J. M.. Contribution to the study of the alteration of lipase activity of *Candida rugosa* by ions and buffers. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1994**, 44, 213–229.

Hernandez–Martin E. and Otero C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM, *Bioresource Technology.* **2008**, 99, 277–286.

Hyneck, M., Dent, J., Hook, J. B. *Chirality in drug design and synthesis*, Brown, C. (Ed.), Academic Press, **1990**, New York, 1-28.

Homola J., Yee S.S. and Gauglitz G. Surface Plasmon resonance sensors: Review. *Sensors and Actuators.* **1999**, 54, 3–15.

Hoppe A., and Themier R.R. Titrimetric test for lipase activity using stabilized triolein emulsions. *Phytochemistry.* **1998**, 42, 973–978.

Houde A., Kademi A., Leblanc D. Lipases and their industrial applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2004**, 118, 155-170.

Huang J., Roheim P. S., Sloop C. H., Wong L. A sensitive, inexpensive method for determining minute quantities of lipase activity. *Anal. Biochem.* **179** (1989) 413–417.

Ivanova M. G., Ivanova T., Verger R., Panaiotov I. Hydrolysis of monomolecular films of long chain phosphatidylcholine by phospholipase A2

in the presence of beta-cyclodextrin. *Colloids Surfaces B: Biointerface* ,**1996**, 6, 9-17.

Jaeger, K.-E., Ransac S., Dijkstra BW., Colson C., van Heuvel M., Misset O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* **1994**, 15, 29–63.

Jensen M. E., Jensen T. R., Kjaer K., Bjernholm T., Ole G. Mouritsen, Orientation and conformation of a lipase at an interface studied by molecular dynamics simulations. *Biophysical*, **2002**, 83, p. 98–111.

Jensen R. G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids*. **1983**, 18, 650-657.

Jutila A., Zhu K., Tuominen E. K.J., Kinnunen P. K. J. Fluorescence spectroscopic characterization of *Humicola lanuginosa* lipase dissolved in its substrate. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2004**, 1702, p. 181–89.

Kadziauskas J. Biochemija, VU leidykla. 2008, ISBN: 978-9955-33-298-5.

Kates M. Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids. Eds. *R. H. Burdon, P.H. van Knippenberg*, Elsevier, Amsterdam, New York, **1986**.

Kirsch J. L., Koenig J. L. The variable-temperature FT-IR study of the secondary structure of γ -globulin, chymotrypsin, serum albumin, and β -lactoglobulin in aqueous solution. *Applied Spectroscopy*. **1989**, 43, 3, 445–451.

Laurent S., Ivanova M. G., Pioch D., Graille J., Verger R.: Interactions between β -Cyclodextrin and insoluble glyceride monomolecular films at the argon/water interface: application to lipase kinetics. *Chem. Phys. Lipids*, **1994**, 70, 35-42.

Laviron E.. Surface linear potential sweep voltammetry: Equation of the peaks for a reversible reaction when interactions between the adsorbed molecules are taken into account. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **1974**, 52(3), 395-402.

Lawrence R. C., Frayer T. F., Reiter B. Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. *Nature*. **1967**, 213, 1264-1265.

Liao W., Wei F., Liu D., Qian M. X., Yuan G., Zhao X. S. FTIR–ATR detection of proteins and small molecules through DNA conjugation. *Sensors and Actuators*. **2006**, B 114, p. 445–450.

Liedberg B., Nylander C. and Lundstrom I. Surface plasmons resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators*. **1983**, 4, 299–304.

Mangold H. Lipids. Eds. G. Zweig, J. Sherma, CRC press. Inc., Boca Raton, Florida **1984**.

Martinelle M., Holmquist M., Clausen I.G., Patkar S.A., Svendsen A., Hult K.. The role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa*, *Protein Eng.* **1996**, 9, 516–524.

Maurich V., Moneghini M., Zacchigna M., Pitotti A., Lencioni E.: High-performance liquid chromatographic assay of pancreatic lipase activity. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1991**, 9, 427–431.

Maurich V., Zacchigna M., Pitotti A. p-Nitrophenyllaurate: a substrate for the high-performance liquid chromatographic determination of lipase activity. *J. Chromatogr.* **1991**, 566, 453–459.

Mickevičius D. Cheminės analizės metodai 1. Vilnius, „Žiburio leidykla“, **1998**, 130–170, ISBN 9986–524–20–2.

Mickevičius D. Cheminės analizės metodai 2. Vilnius, „Žiburio leidykla“, **1999**, p. 87–147. ISBN 9986–524–25–3.

Miranda, P. B., Shen, Y. R. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 3292–3307.

Momsen W. E., Brockman H. L.: Recovery of monomolecular films in studies of lipolysis. *Methods Enzymol.* **1997**, 286, 292–305.

Negre–Salvayre A., Dagan A., Gatt S., Salvayre R.. New fluorescent pyrene–containing substrates for assaying cellular lipases, cholesterol esterases and carboxyl esterases. *Appl. Fluoresc. Technol.* **1991**, 3, 1–6.

Nelson D. L. ir Cox M. M. Principles of biochemistry 4th leninger. WH Freeman. ISBN 0716–743–39–6. **2004** balandžio 23.

Nicolas J.-P., Lin Y., Lambeau G., Ghomashchi F., Lazdunski M. and Gelb M. H. Localization of Structural Elements of Bee Venom Phospholipase

A2 Involved in N-type Receptor Binding and Neurotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*. **1997**, 227, 7173–7181.

Nielsen L., Risbo J., Callisen T., Bjornholm T. Lag-burst kinetics in phospholipase A2 hydrolysis of DPPC bilayers visualized by atomic force microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*. **1999**, 1420, 266–271.

Nylander C., Liedberg B. and Lind T. Gas detection by means of surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators*. **1982**, 3, 79 –88.

O'Leary W. M., Weld J. T. Lipolytic activities of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol*. **1964**, 88, 1356.

Poulsen K. R., Snabe T., Petersen E.I., Fojan P., Neves-Petersen M. T., Wimmer R. and Petersen S.B. Quantization of pH: Evidence for Acidic Activity of Triglyceride Lipases, *Biochemistry* **2005**, 44, 11574 – 11580.

Praškevičius A., Ivanovienė L., Stasiūnienė N., Burneckienė J., Rodovičius H., Lukoševičius L., Kondratas D. Biochemija. KMU leidykla. Kaunas, **2003**. IBNS 9986–451–58–2.

Ransac S., Moreau H., Riviere C., Verger R.: Monolayer techniques for studying phospholipase kinetics. *Methods in Enzymology*, Eds. E. Dennis, Academic Press, New York, **1991**, 49-65.

Ransac S., Riviere C., Gancet C., Verger R., de Haas G. H. Competitive inhibition of lipolytic enzymes. I. A kinetic model applicable to water-insoluble competitive inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*. **1990**, 1043, 57-66.

Ruiz L., Rodriguez-Fernandez M.F., C. Kinetic study of hepatic triglyceride lipase from rat liver soluble fraction. *Enzyme*, **1982**, 27, 215–219.

Schmid R.D., Verger R. Lipase: Interfacial enzymes with attractive applications, *Angew. Chem. Int. Ed*. **1998**, 37, 1608–1633.

Schmid, R. D.; Verger, R. *Angew. Chem., Int. Ed*. **1998**, 37, 1608-1633.

Siam M. Structural investigations of lipid model biomembranes by FTIR ATR spectroscopy: dissertation. **2001**.

Smith B. M.. The application of single-pass attenuated total reflectance fourier–transform infrared spectroscopy for protein analysis: dissertation.

Physical and mathematical sciences department of chemistry north Carolina state university Raleigh. **2002**, 288.

Stadler P., Kovac A., Paltauf F. Understanding lipase action and selectivity, *Croat. Chem. Acta*, **1995**, 68, 649–674.

Stuer W., Jaeger K. E. ir Winkler U. K.. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1986**, 168, 1070–1074.

Svendsen A. Lipase protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta. Protein Structure and Molecular Enzymology*. **2000**, 1543, 223-238.

Tietz N. W., Shuey D. F. Lipase in serum - the elusive enzyme: an overview. *Clin. Chem.* **1993**, 39, 746-756.

Tigerstrom R. G., Stelmaschuk S. The use of *Tween 20* in a sensitive turbidimetric assay of lipolytic enzymes. *Can. J. Microbiol.* **1989**, 35, 511-514.

Valincius G., McGillivray D. J., Febo-Ayala W. , Vanderah D. J. , Kasianowicz J. J., Losche M. Enzyme Activity to Augment the Characterization of Tethered Bilayer Membranes. *J.Phys. Chem. B.*, **2006**, 110, 10213–10216.

Van Autryve P., Ratomahenina R., Riaublanc A., Mitrani C., Pina M., Graille J., P. Galzy. Spectrophotometry assay of lipase activity using Rhodamine 6G. *Oleagineux*. **1991**, 46, 29–31.

Verger R. Enzyme kinetics of lipolysis. *Meth. in Enzymol.* **1980**, 64, 340-392.

Walde P., Luisi P.L. A continuous assay for lipases in reverse micelles based on Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochem.* **1989**, 28, 3353–3360.

Wilton D.C. A continuous fluorescence-displacement assay for triacylglycerol lipase and phospholipase C that also allows the measurement of acylglycerols. *Biochem. J.* **1991**, 276, 129–133.

Woollett L. A., Beitz C., Hood R. L., Aprahamian S.. An enzymatic assay for activity of lipoprotein lipase. *Anal. Biochem.* **1984**, 143, 25–29.

Zandonella G., Stadler P., Haalck L., Spener F., Paltauf F. ir Hermetter A.. Interactions of fluorescent triacylglycerol analogs covalently bound to the active site of lipase from *Rhizopus oryzae*. *Eur. J. Biochem.* **1999**, 262, 63–69.

Zhu K., Jutila A., Tuominen E. K.J., Kinnunen P. K. J. Effects of i-propanol on the structural dynamics of *Thermomyces lanuginosa* lipase revealed by tryptophan fluorescence. *Protein Sci*, **2001**, 10, p. 339–351.

Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонсон К. Справочник биохимика: Пер. с англ. М.:МИР, 1991, стр. 354-369.