

VILNIAUS UNIVERSITETAS

MARIUS DAGYS

**ADSORBUOTŲ ANT AUKSO NANODARINIŲ DAUGIAVARIŲ OKSIDAZIŲ
FUNKCIJA**

Daktaro disertacijos santrauka
Fiziniai mokslai, biochemija (04P)

Vilnius, 2012

Disertacija rengta 2007 – 2011 metais Vilniaus universiteto Biochemijos institute.

Mokslinis vadovas:

Prof. habil. dr. Juozas Kulys, LMA tikrasis narys, (Vilniaus universiteto Biochemijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Biochemijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas – prof. habil. dr. Valdemaras Razumas, LMA tikrasis narys (Vilniaus Universiteto Biochemijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

Nariai:

– prof. habil. dr. Valdas Stanislovas Laurinavičius, LMA tikrasis narys (Vilniaus Universiteto Biochemijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

– dr. Ilja Ignatjev (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Fizinių ir technologijos mokslų centras, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

– prof. habil. dr. Albertas Malinauskas (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Fizinių ir technologijos mokslų centras, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

– dr. Ramūnas Valiokas (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Fizinių ir technologijos mokslų centras, fiziniai mokslai, fizika – 02P).

Oponentai:

– habil. dr. Narimantas Čėnas (Vilniaus Universiteto Biochemijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

– dr. Arūnas Jagminas (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Fizinių ir technologijos mokslų centras, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Disertacija bus ginama viešame Biochemijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2012 m. rugsėjo mėn. 27 d. 14 val. Vilniaus universiteto Biochemijos institute, 522 kamb.

Adresas: Mokslininkų g. 12, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2012 m. rugpjūčio mėn. 27 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje.

IVADAS

Šiame darbe nagrinėjamos daugiavarių oksidazių bioelektrokatalitinės funkcijos. Geriausiai charakterizuotos daugiavarės oksidazės yra lakazės (benzendiolio: deguonies oksidoreduktazė, EC 1.10.3.2), bilirubino oksidazės (bilirubino: deguonies oksidoreduktazė, EC 1.3.3.5), askorbato oksidazė (L-askorbato: deguonies oksidoreduktazė, EC 1.10.3.3) ir žmogaus ceruloplazminas (feroksidazė, geležies(II): deguonies oksidoreduktazė, EC 1.16.3.1). Bendri spektroskopijos ir rentgeno spindulių kristalografijos tyrimai parodė, kad visos daugiavarės oksidazės savo sudėtyje turi bent vieną mėlynąjį vario aktyvųjį centrą, kitaip vadinamą T1 vario centrą, ir T2/T3 trijų vario atomų kompleksą užtikrinančius specifinį fermentinį aktyvumą. Žmogaus ceruloplazminas yra unikalus tuo, kad savo sudėtyje turi kelis T1 vario centrus (Solomon, Sundaram ir kiti 1996). Visos daugiavarės oksidazės vykdo deguonies redukciją iki vandens oksiduojant atitinkamą substratą pagal keturių elektronų redukcijos mechanizmą (Morozova, Shumakovich ir kiti 2007). Gyvuose organizmuose šie fermentai atlieka įvairias funkcijas susijusias su organinių substratų oksidacija skirtingais cheminiais mechanizmais.

Viena iš daugiavarių oksidazių – lakazė yra redoks aktyvus fermentas, kuris oksiduoja įvairius organinius ir neorganinius substratus ir redukuoja deguonį iki vandens nesudarant tarpinems reaktyvioms deguonies grupėms (Solomon, Sundaram ir kiti 1996). Šios lakazių savybės leidžia naudoti jas biojutiklių konstravimui (Kruus 2000; Duran, Rosa ir kiti 2002; Minussi, Pastore ir kiti 2002) ir biokuro elementų biokatodų kūrimui (Yan, Su ir kiti 2007; Coman, Vaz-Dominguez ir kiti 2008; Gallaway, Wheeldon ir kiti 2008; Gallaway ir Calabrese Barton 2009). Pirmą kartą šis fermentas buvo atrastas japoniško lako medžio *Rhus vernicifera* syvuose 19 amžiuje (Yoshida 1883). Lakazės yra randamos tiek aukštesniuosiuose augaluose, tiek grybuose. Augalų lakazės dalyvauja ligninio sintezės procesuose, katalizuodamos monomerinių junginių (p-kumaril, koniferil ir sinapil alkoholių) polimerizacijos reakcijas pagal radikalinių reakcijų mechanizmus. Grybuose randamos lakazės katalizuoja lignino degradaciją, grybų vystymosi, morfogenezės, patogenezės ir detoksikacijos procesus (Thurston 1994; Zhao ir Kwan 1999; Leonowicz, Cho ir kiti 2001).

Žmogaus ceruloplazminas yra sudėtingiausia daugiavarė oksidazė (Solomon, Sundaram ir kiti 1996). Jo molekulinė struktūra sudaryta iš šešių kompaktiškų domenų su dideliais kilpiniais intarpais, ir turinčių šešis stipriai surištus vario atomus: trys iš jų sudaro T2/T3 aktyvųjį centrą ir trys atomai yra surišti trijuose T1 vario centruose. Be to, Cp yra monomeras turintis aukštą glikozilinimo laipsnį (7 – 8%) (Lindley, Card ir kiti 1997).

Biologinėse ir cheminėse sistemose vykstantys cheminiai procesai yra susiję su elektronų pernaša. Todėl šie procesai nagrinėjami įvairiais aspektais įvairiose mokslo srityse. Elektronų pernaša gamtoje yra paprastai susijusi su energijos apykaita. Principiniai biologinės elektronų pernašos principai yra neblogai išnagrinėti, juos bandoma panaudoti technologiniuose procesuose (Gilardi ir Fantuzzi 2001). Ypatingai įdomus tokių biokatalizatorių panaudojimas tiesioginės elektronų pernašos (TEP) bioelektrokatalitinėse sistemose, kuriose redoks aktyvios biomolekulės tiesiogiai sąveikauja su įvairios kilmės elektrodų paviršiais (Freire, Pessoa ir kiti 2003).

Pirmosios publikacijos apie TEP tarp redoks aktyvaus baltymo turinčio fermentinį aktyvumą buvo susijusios su aukšto potencialo lakaze iš papėdgrybio *Trametes versicolor* (Berezin, Bogdanovskaya ir kiti 1978; Tarasevich, Yaropolov ir kiti 1979).

Publikacijų autoriai parodė, kad tirpale esant molekuliniam deguoniui, lakaze padengti anglies elektrodai vykdo TEP bioelektrokatalizės principu veikiančią deguonies redukciją. Iki šiol TEP tarp elektrodų ir daugiavarių oksidazių mechanizmai nėra visiškai išaiškinti. Šis klausimas labai aktualus nagrinėjant elektrochemines sistemas kuriose naudojamos aukštą potencialą turinčios grybinės lakazės (Shleev, Christenson ir kiti 2005).

Šiame darbe nagrinėjami TEP tarp aukso nanodalelių (AuND) paviršiaus ir daugiavarių oksidazių, konkrečiai lakazių ir žmogaus ceruloplazmino, aktyviųjų centrų.

AuND pasižymi specifinėmis optinėmis ir elektroninėmis savybėmis, kurias galima panaudoti įvairiose detekcijos sistemose (Pong, Elim ir kiti 2007). Jų inertiškumas leidžia jas taikyti biologinėse sistemose su įvairiomis makromolekulėmis (imunoglobulinais, fermentais, lektiniais, baltymais, streptavidinu, DNR ir kt. (Katz, Willner ir kiti 2004; Yanez-Sedeno ir Pingarron 2005; Pingarron, Yanez-Sedeno ir kiti 2008). Biomolekulės susijungusios su AuND paviršiumi išlaiko savo biologinį aktyvumą, baltymai turi daug laisvės keisti savo orientaciją AuND paviršiaus atžvilgiu (Liu, Leech ir kiti 2003). Įrodžius, kad daugiavarės oksidazės gali vykdyti TEP ir ja pagrįstą deguonies redukciją, šis tyrimas ne tik pagilintų fundamentines žinias apie TEP mechanizmus ant AuND, bet ir sudarytų galimybes konstruoti didelio srovės tankio biokuro elementų katodus naudojant trimates struktūras (Bartlett 2008).

Darbo tikslas yra ištirti bioelektrokatalitines TEP sistemas sudarytas iš daugiavarių oksidazių adsorbuotų ant AuND, naudojant klasikinius elektrochemijos, kvarcinio kristalo mikrosvarstyklių ir paviršinio stiprinimo Ramano spektroskopijos metodus. Nagrinėtos daugiavarės oksidazės – lakazės iš *Trametes hirsuta* ir *Trichaptum abietinum* bei žmogaus ceruloplazminas. Darbo tikslui įgyvendinti iškeliami šie uždaviniai:

- nustatyti naujai išskirtos ir išgrynintos *Trichaptum abietinum* lakazės biochemines savybes ir nustatyti T1 vario centro redokso potencialą;
- sukonstruoti TEP bioelektrokatalitines sistemas sudarytas iš aukso elektrodų dengtų AuND ir daugiavarėmis oksidazėmis ir jas ištirti elektrocheminiais ir paviršiaus analizės metodais;
- ištirti lakazių adsorbciją ant AuND kvarcinio kristalo mikrosvarstyklių metodu.

Mokslinis naujumas:

- Pirmą kartą parodyta TEP tarp AuND ir lakazių aktyvaus centro. Gautų sistemų generuojami srovės tankiai yra lygintini su anglies pagrindu paruoštų biokuro elementų biokatodų srovės tankiais.
- Nustatyta, kad lakazės T1 vario centrai nėra tiesiogiai orientuoti į AuND paviršių. Imobilizuotuose fermentuose gali vykti tiek tiesioginė tiek mediatorinė elektronų pernaša.
- Pirmą kartą parodyta, kad ant AuND imobilizuotų *Trametes hirsuta* ir *Trichaptum abietinum* lakazių katalizuojamos deguonies bioredukcijos greitis priklauso nuo AuND dydžio. Didesnio skersmens AuND (70 – 90 nm) sistemos generuoja mažesnę srovės tankį nei vidutinio dydžio (40 – 50 nm) AuND sistemos.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

- Lakazė iš *Trichaptum abietinum* priklauso aukšto redokso potencialo lakazėms, jos T1 vario centro redokso potencialas yra 714 ± 12 mV vs. NHE.
- Lakazės iš *Trametes hirsuta* ir *Trichaptum abietinum* bei žmogaus ceruloplazminas vykdo tiesioginę elektronų pernašą (TEP) tarp fermento aktyviojo centro ir aukso nanodalelių (AuND).
- Lakazės iš *Trametes hirsuta* ir *Trichaptum abietinum* vykdo greitą deguonies redukciją TEP pagalba.
- Lakazės iš *Trametes hirsuta* ir *Trichaptum abietinum* keičia orientaciją ant AuND paviršiaus priklausomai nuo elektrodo potencialo. Paviršinio stiprinimo Ramano spektroskopijos tyrimais parodyta, kad T1 vario centrų signalai nuo AuND paviršiaus nėra stebimi.
- Heterogeninės elektronų pernašos greitis AuND – lakazės sistemose priklauso nuo AuND dydžio. Didesnio skersmens AuND (60 – 90 nm) ir lakazės sistemos pasižymi lėtesne deguonies redukcijos bioelektrokatalize negu vidutinio skersmens AuND ir lakazės sistemos. AuND - lakazės sistemose, naudojant optimalaus dydžio AuND ir atitinkamai *Trichaptum abietinum* ir *Trametes hirsuta* lakazes, heterogeninės elektronų pernašos konstantos gali pasiekti 45 s^{-1} ir 11 s^{-1} .

Daktaro disertacijos sudėtis:

Daktaro disertacija parašyta anglų kalba ir turi šias dalis: Įvadas, Literatūros apžvalga, Medžiagos ir Metodai, Rezultatai ir diskusija, Išvados, Publikacijų sąrašas, Literatūros sąrašas. Darbe yra 8 lentelės ir 47 iliustracijos, bendra apimtis - 144 puslapiai.

MEDŽIAGOS IR METODAI

Įranga: Potenciostatai – kompiuteriu valdomas Autolab potenciostatas iš Metrohm Autolab, kompaktiškas potenciostatas IVIUM CompactStat iš Ivium Technologies B.V.; spektrofotometrai – Anthelie Advanced spektrofotometras, Thermo Spectronics *Helios Beta* ir Nicolet Evolution 300 kompiuteriu valdomi spektrofotometrai; kvarcinio kristalo mikrosvarstyklių su disipacijos stebėjimu sistema Q-Sense E4 su QWE401 elektrocheminiu moduliu iš Q-Sense®, BiolinScientific AB, Švedija; Echelle tipo RamanFlex 400 spektrometras iš PerkinElmer, Inc., turintis termoelektriškai šaldomą (-50 °C) CCD kamerą ir šviesolaidžio jungtį Ramano spektro sužaditimui ir registravimui, bei 785 nm lazerį, kuris buvo naudotas kaip šviesos šaltinis paviršiaus stiprinimo Ramano spektroskopijos tyrimams; skenuojantis elektroninis mikroskopas EVO® Life Science LS10 iš Carl Zeiss SMT, naudotas su LaB₆ filamentu; submikroninių dalelių dinaminio šviesos išbarstymo stebėjimo sistema NICOMP™ 380 ZLS iš Santa Barbara, JAV.

Medžiagos: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfoninė rūgštis) (ABTS), citrinos rūgšties monohidratas, tetrachloroaukso rūgšties trihidratas, poli-L-lizinas, natrio chloridas, dinatrio fosfato dihidratas, natrio sulfatas, vandenilio peroksidas, natrio oktacianomolibdatos, siringaldazinas (SYR) buvo gauti iš Sigma – Aldrich. Azoto rūgštis, kalio fluoridas, natrio fluoridas, sieros rūgštis, buvo gauti iš Merck, Darmstadt, Vokietija. Trinatrio citrato dihidratas buvo gautas iš Riedel-de-Haën, Vokietija. Kalio ferocianidas, katecholis (PYR), hidrochinonas (HQU) buvo gauti iš Reachim, Rusija. Visi reagentai buvo analitiškai grynai.

Tirpalai: Buferiniai ir kiti tirpalai buvo ruošiami naudojant vandenį (18 MΩ/cm) grynintą PURELAB UHQ II sistema iš ELGA Labwater, High Wycombe, DB. Jei reikėjo, deguonis iš tirpalų buvo šalinamas per tirpalą leidžiant azoto iš AGA Gas AB, Švedija, arba argono iš AGA, Vilnius, dujas, ne trumpiau nei 10 min.

Pagrindinio naudoto buferinio tirpalo sudėtis – 50 mM natrio fosfato, 100 mM natrio sulfato, reikiamas tirpalo pH gautas į tirpalą pridėdant citrinos rūgšties. Dažniausiai naudotas buferinis tirpalas kurio pH 4,0, tačiau buvo naudojami ir buferiniai tirpalai kurių pH kito intervale nuo 2,5 iki 8,0. Natrio fosfato ir citrato buferinė sistema užtikrina, kad tirpalas tik iš dviejų junginių gali būti naudojamas plačiame pH intervale nuo 2,2 iki 8,0, nenaudojant papildomų junginių (McIlvaine 1921). Natrio sulfatas buvo naudojamas tirpalų joninei jėgai padidinti, kad plačiame pH intervale buferinių tirpalų joninė jėga būtų panaši.

Fermentai: Homogeninis lakazės iš *Trametes hirsuta* (ThL) tirpalas, gautas iš dr. Sergey Shleev, buvo ruošiamas pagal metodiką aprašytą (Shleev, Morozova ir kiti 2004). Baltymo molekulinė masė buvo 70 kDa, o angliavandenių kiekis 12% (Haghighi, Jarosz-Wilkolazka ir kiti 2005). Baltymo koncentracija ThL tirpale buvo 14,4 – 17,9 mg/ml. Homogeninis tirpalas (0,1 M fosfatinis buferinis tirpalas, pH 6,5) buvo laikomas -18°C temperatūroje. Skiesti bei atšildyti tirpalai laikyti 4 - 8°C temperatūroje. Homogeninė lakazė iš *Trichaptum abietinum* (TaL) buvo gryninta Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje, VU Biochemijos institute. Baltymo koncentracija tirpale, nustatyta pagal Lowry metodą, kaip standartą naudojant BSA baltymą (Lowry, Rosebrough ir kiti 1951), buvo 20,76 mg/ml. Nustatyta baltymo masė pagal SDS - PAGE - 51 ±2,5 kDa. Homogeninis tirpalas (10 mM fosfatinis buferinis tirpalas, pH

7,0) buvo laikomas -18°C temperatūroje. Skiesti ir atšildyti tirpalai laikyti $4 - 8^{\circ}\text{C}$. Žmogaus ceruloplazminas buvo gautas iš Sigma-Aldrich ir papildomai negrynintas.

Elektrocheminiai metodai: ciklinės voltamperometrijos (CV) eksperimentai buvo atliekami naudojant 20 ml elektrocheminę celę, palyginamieji elektrodai – kalomelio ($\text{Hg}|\text{HgCl}|\text{satKCl}$, 242 mV vs. NHE) ir sidabro chlorido ($\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{satKCl}$, 201 mV vs. NHE), platinos viela naudota kaip pagalbinis elektrodas. Darbiniai elektrodai – polikristalinio aukso elektrodai, paviršiaus plotas - $0,0256 \text{ cm}^2$ (Bioanalytical Systems (West Lafayette, IN, JAV) ir $0,196 \text{ cm}^2$. Elektrodo valymo procedūra – poliravimas $0,3 \mu\text{m}$ aliuminio oksido suspensija, nuplovimas dejonizuotu vandeniu, ultragarsinimas 10 min, papildomas valymas CV metodu ($5 - 10$ potencialo skleidimų $0,2 \text{ V/s}$ greičiu $0,5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ nuo 0 iki $1,9 \text{ V vs. NHE}$ ir atgal) ir nuplovimas vandeniu. Eksperimentų su AuND ir daugiavarėmis oksidazėmis metu ant elektrodo užnešta $10 \mu\text{l}$ AuND tirpalo, elektrodas išdžiovintas ir nuplautas švariu vandeniu. Tada $10 \mu\text{l}$ koncentruoto lakazės ar ceruloplazmino tirpalo užnešta ant paviršiaus, išdžiovinta ir nuplauta švariu vandeniu. Atskirais atvejais AuND ir fermento tirpalų koncentracijos buvo parenkamos, kad būtų gaunamas norimas AuND – fermento santykis ar siekiant paviršių padengti norimu kiekiu AuND.

CV eksperimentai paprastai buvo atliekami potencialą skleidžiant nuo 1 iki $0,2 \text{ V vs. NHE}$ ir atgal pasirinktu potencialo skleidimo greičiu (5 ar 10 mV/s). Tyrimuose su ant elektrodo imobilizuotomis daugiavarėmis oksidazėmis, naudoti trys skirtingai ruošti buferiniai tirpalai: a) tikslinis buferinis tirpalas, b) tirpalas be deguonies, kuris pašalintas per tirpalą leidžiant Ar ar N_2 dujas ir c) tirpalas su fermento inhibitoriumi (paprastai $1 - 5 \text{ mM NaF}$).

Sukamojo disko aukso elektrodai (RDE) su analogiškai adsorbuotomis AuND ir lakazėmis buvo naudojami ir CV eksperimentuose. Elektrodo paviršiaus plotas – $0,071 \text{ cm}^2$, sidabro chlorido elektrodas naudotas kaip palyginamasis elektrodas, o CV eksperimento sąlygos kaip ir naudojant stacionarų Au elektrodą.

Visos darbe pateikiamos potencialo vertės yra nurodytos pagal NHE.

Spektroelektrocheminiai matavimai: siekiant nustatyti ThL T1 vario redokso potencialą buvo naudojama $0,1 \text{ ml}$ spektroelektrocheminė celė, aprašyta (Shleev, Kuznetsov ir kiti 2000). Šiam tikslui naudotas T1 vario centro redoks titravimo redukuotu mediatoriumi $\text{K}_4[\text{Mo}(\text{CN})_8]$ metodas, aprašytas (Xu, Brown ir kiti 1996). Elektrocheminiams matavimams buvo naudojamas dviejų elektrodo voltmetras (Ionomer I-130.1, Rusija), sidabro chlorido elektrodas naudotas kaip palyginamasis, platinos viela - kaip pagalbinis elektrodas, kapiliarinis aukso elektrodas - kaip darbinis elektrodas. Šis aukso elektrodas prieš eksperimentą buvo laikomas 24 h piranijos tirpale, tada papildomai valytas CV metodu ($0,5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$, potencialas skleistas nuo $0,2$ iki $1,9 \text{ V vs. NHE}$ 50 mV/s greičiu 5 kartus) ir nuplautas vandeniu. Titravimo procedūra pradėta į celę, užpildytą 10 mM fosfatinu buferiniu tirpalu, $\text{pH } 7,0$, įvedant $100 \mu\text{l}$ $10,38 \text{ mg/ml}$ lakazės tirpalo, kuriame taip pat buvo $0,5 \text{ mM}$ mediatoriaus. Redokso potencialas buvo registruojamas nusistovėjus pusiausvyrai (40 min po tirpalo įleidimo) – pradedant nuo 500 mV vs. NHE , potencialas didintas 50 mV kas 5 min , registruojant sugerties spektrą. Procedūra kartota kol potencialas pasiekė 100 mV (anodinis titravimas), tada potencialas mažinamas kas 50 mV , registruojant sugerties spektrą, potencialas sumažinamas iki 500 mV (katodinis titravimas). Tarp spektrų registravimų, šviesos šaltinis buvo uždengiamas, kad tirpalas nebūtų kaitinamas. Daroma prielaida, kad deguonis savaime pasišalino iš

tirpalo, kadangi esant žemam elektrodo potencialui, mediatoriui ir lakazei, 40 min laikotarpyje buvo sudarytos sąlygos pilnai deguonies redukcijai iki vandens. T1 vario centro redokso potencialo nustatymui buvo naudotos sugerties prie 602 nm (smailės maksimumas) reikšmės ir gauta sugerties priklausomybė nuo elektrodo potencialo, bei paskaičiuotas redokso potencialas.

Aukso nanodalelių sintezė: AuND buvo sintetamos pagal metodiką aprašytą (Schmid ir Corain 2003). Sintezės metu į 50 ml 1 mM HAuCl₄ vandeninio tirpalo (įkaitinto iki 90° C) maišant pilamas atitinkamas kiekis (nuo 1 iki 4 ml) 1 % trinatrio citrato tirpalo. Mišinys kaitinamas dar 15 min maišant, ir 10 min nemaišant. Tirpalas atvėsintas ir saugotas +4 °C temperatūroje.

Aukso nanodalelių dydžio nustatymas: AuND dydis buvo nustatomas trimis būdais – pagal tirpalo sugerties spektro analizę, dinaminio šviesos išbarstymo ir skenuojančiosios elektroninės mikroskopijos metodais. Pirmu atveju, sferinės nanodalelės, kurios dydis yra daug mažesnis už krentančios šviesos bangos ilgį, atsakas kintančio elektrinio lauko atžvilgiu gali būti charakterizuojamas pagal Mie teoriją (Mulaney 1996). Šios teorijos pagrindu sudarytas Mie šviesos išbarstymo algoritmas – *MiePlot* programa, kurią galima nemokamai gauti iš <http://www.philiplaven.com/mieplot.htm>. Ši programa sukuria teorinius AuND tirpalų spektrus pagal jai pateiktus parametrus, tarp jų ir AuND dydį. Svarbiausias gautas parametras yra teorinė λ_{\max} vertė, charakteringa pasirinkto diametro AuND. Šia programa buvo sukurti įvairaus dydžio AuND teoriniai spektrai, ir eksperimentiškai gautų AuND spektrų smailių maksimumo vertės buvo lyginamos su teorinių spektrų smailių maksimumų vertėmis. Nustatytas AuND dydis buvo pasirinktas pagal teorinio spektro, kurio smailės maksimumas sutapo su realaus spektro maksimumu, gautu iš programos pagal atitinkamą AuND dydį.

AuND dydis buvo taip pat nustatomas naudojantis NICOMP™ submikroninių dalelių analizatoriumi Nicomp 380 ZLS (Santa Barbara, California), kurio veikimas pagrįstas dinaminio šviesos išbarstymu. Analizatoriaus detektorius buvo nustatomas 90° kampu, pasirinkta pradinė 300 kHz jautrumo vertė, taip pat automatiniai šviesos srauto pločio ir bazinės linijos parametrai. Visi matavimai buvo atliekami 23°C temperatūroje, tirpalo klampumas pasirinktas pagal eksperimentiškai nustatytą $9.533 \cdot 10^{-4}$ kg/m*s esant 23°C temperatūrai (skirtingų dydžių AuND tirpalų klampumas buvo panašus). Duomenys analizuoti naudojant tiek Gauso, tiek NICOMP pasiskirstymo algoritmus. Visi AuND tirpalai buvo skiedžiami vandeniu 1:10 (v/v).

Skenuojantis elektroninis mikroskopas (SEM) taip pat buvo naudojamas AuND dydžio nustatymui. Tyrimai atlikti naudojant EVO® Life Science LS10SEM platformą, gautą iš Carl Zeiss SMT, elektronų pluoštas generuotas naudojantis LaB₆ filamentu. Priklausomai nuo analizuojamo preparato, elektroninės įtampos parametras buvo pasirinktas 8 - 10 kV, darbinis atstumas – 5 - 7 mm, antrinių elektronų detektoriaus kolektoriaus įtampa - 350 - 400 V ir I_{probe} – 10 - 100 pA. Prieš užnešant AuND tirpalo lašelius ant tiriamojo paviršiaus jis buvo padengtas plonu anglies pagrindo epoksidiniu sluoksniu. Lašeliai laikyti po stikline siekiant apsaugoti juos nuo išdžiūvimo 15 -20 min, po to paviršius nuplautas vandeniu.

AuND tirpalų koncentracija buvo nustatyta MiePlot programa pagal šią formulę:

$$C_{AuNP_{real}} = \frac{A_{\max} \times \ln(10)}{C_{ext_{\max}} \times 10 \times l \times N_A}$$

kur C_{extmax} – parametras gautas iš MiePlot, atitinkantis maksimalią sugerties spektro smailės reikšmę vienos AuND ištirpintos 1 ml atveju, A_{max} – maksimali eksperimento metu nustatyta sugerties spektro smailės reikšmė, l – kiuvetės storis (cm).

Aukso nanodalelių ir lakazių sistemų analizė paviršinio stiprinimo Ramano spektroskopiniu metodu: šiam tyrimui aukso elektrodai buvo ruošiami naudojant 39 nm AuND ir atitinkamą lakazės tirpalą pagal anksčiau aprašytą metodiką. Matomos šviesos – infraraudonosios spinduliuotės Ramano spektras buvo registruojamas naudojant 785 nm lazerį kaip šviesos šaltinį 180° šviesos išbarstymo geometrijos principu. Lazerio galia buvo apribota iki 30 mW, spindulys sufokusuotas 200 μ m skersmeniu ant elektrodo paviršiaus. Pasirinktas 10 s integravimo laikas, kiekvienas registruotas spektras – 30 spektrinių matavimų vidurkis. Spektroelektrocheminiai matavimai atlikti cilindro formos judančioje trijų elektrodų elektrocheminėje celėje, sudarytoje iš darbinio, palyginamojo ir pagalbinio elektrodų, aprašytų anksčiau. Deguonis buvo šalinamas viso eksperimento metu per tirpalą leidžiant argono dujas. Darbinis elektrodas buvo laikomas maždaug 3 mm atstumu nuo celės langelio. Siekiant išvengti foto- ir termoeфекtų, visa celė kartu su elektrodais buvo judinama tiesiškai lazerio spindulio atžvilgiu 15 – 25 mm/s greičiu (Niaura, Gaigalas ir kiti 1997; Bulovas, Dirvianskyte ir kiti 2006). Ramano spinduliuotės dažniai kalibruoti naudojant polistireno standarto (ASTM E 1840) spektrą, intensyvumai kalibruoti NIST intensyvumo standartu (SRM 2241). Eksperimentai atlikti 20° C temperatūroje.

Nuo potencialo priklausomi paviršiaus stiprinimo Ramano spektrai registruoti keičiant elektrodo paviršiaus potencialą nuo 0,8 V (vs. NHE) iki 0 V ir atgal iki 0,8 V.

Aukso nanodalelių ir lakazių sistemų analizė kvarcinio kristalo mikrobalo su disipacijos nustatymu metodu: Kvarcinio kristalo mikrobalo su disipacijos nustatymu (KKM-D) eksperimentai buvo atliekami siekiant nustatyti AuND ir lakazės molekulių kiekį ant aukso paviršiaus, tuo pačiu nustatant bioelektrochemines susidarančių sistemų savybes. Matavimai atlikti $23 \pm 0,02$ C temperatūroje, skirtingi tirpalai buvo leidžiami per kvarco kristalo paviršių pastoviu greičiu. KKM-D jutiklio paviršius buvo padengtas poli-L-lizino (PLL), AuND ir fermento sluoksniais pagal atitinkamą metodiką. Pirmiausia jutiklio paviršius buvo dengiamas PLL sluoksniu, ant kurio gali nusėsti tiek fermentas, tiek AuND. Kiti žingsniai - lakazės sorbcija ant PLL, tada AuND sorbcija ant PLL – lakazės sluoksnio ir galiausiai vėl formuojamas lakazės sluoksnis leidžiant lakazės tirpalą. Pirmasis lakazės sluoksnis ant PLL užtikrina, kad antrasis lakazės sluoksnis (nuolat matuojamas KKM-D), turėtų adsorbuotis tik ant AuND paviršiaus. Tokiu būdu, pamatavus galutinio sluoksnio CV be NaF ir su juo, galima nustatyti, kiek elektronų per tam tikrą laiką perkeliama per vieną lakazės molekulę bioelektrokatalizės ciklo metu.

Tikslesnė eksperimento eiga buvo tokia. KKM-D celė buvo išplauta Hellmanex® II tirpalu iš LabShop bei švairiu vandeniu. KKM-D aukso paviršiaus jutiklis nuplautas 99,5% etanoliu ir vandeniu, išdžiovinamas azoto dujų srautu, ir 10 min valytas Harrick plazminio paviršiaus valymo sistema PDC-32G didžiausiu intensyvumu. Prieš matavimus jutiklis įdėtas į KKM-D celę, tada pastoviu 100 μ l/min greičiu per celę leistas vanduo, kol nusistovėdavo stabili bazinė linija, t.y. Δf ir ΔD priklausomybė nuo laiko išlikdavo pastovi. Potenciostatas nustatomas registruoti CV nuo 1000 mV (vs. NHE) iki 400 mV ir atgal 5 mV/s skleidžiant potencialą 5 mV/s greičiu. Eksperimento metu buvo nuosekliai keičiami tiksliniai tirpalai, tekantys pastoviu greičiu per jutiklio paviršių.

Tirpalai leidžiami tokia seka – 5 min 0,002 % vandeninis PLL (w/v) tirpalas, 10 min vanduo, 20 min buferinis tirpalas, 10 min 50 µg/ml lakazės tirpalas, 20 min buferinis tirpalas (iki pastovaus Δf ir ΔD), užrašoma CV. Tada 10 min leidžiamas vanduo, ~3 h AuND tirpalas, siekiant gauti maksimalų AuND užpildymą, 2 min vanduo, 20 min buferinis tirpalas (iki pastovaus Δf ir ΔD), užrašoma CV. Po to 10 min leidžiamas 50 µg/ml lakazės tirpalas, 20 min buferinis tirpalas (iki pastovaus Δf ir ΔD), užrašoma CV. Galiausiai 5 min leidžiamas buferinis tirpalas su inhibitoriumi (5 mM NaF) užrašoma CV.

Gautos Δf ir ΔD priklausomybės nuo laiko buvo modeliuojamos naudojantis gamintojo pateikta QTools programine įranga. Siekiant sumodeliuoti duomenis iš AuND ir lakazės sluoksnių buvo pasirinktas dviejų viskoelastinių sluoksnių modelis. Pirmu sluoksniu buvo laikoma PLL – lakazės sluoksnis, antruoju – AuND sluoksnis. Siekiant įvertinti PLL – lakazės sluoksnio storį ir viskoelastines savybes, parinkta adsorbuoto baltyminio sluoksnio tankio vertė buvo 1.20 g/cm³ (Rodahl, Hook ir kiti 1997). Sumodeliuoti pirmojo sluoksnio parametrai buvo pasirinkti kaip pastovūs modeliuojant antro, AuND, sluoksnio parametrus. Sluoksnio storis, t.y. AuND skersmuo buvo pasirinktas kaip nekintamas parametras. Modeliuojant trečiąjį sluoksnį, nustatyti PLL – lakazės – AuND sluoksnio viskoelastiniai parametrai pasirinkti kaip pastovūs pirmojo sluoksnio parametrai, o trečiasis, lakazės, sluoksnis buvo modeliuojamas kaip ir antrasis sluoksnis. Modeliavimo kokybė buvo apibrėžta mažiausia modelio paklaidos funkcijos χ^2 verte – geriausi viskoelastiniai parametrai atitiko žemiausias paklaidos funkcijos vertes.

Svarbiausias KKM-D eksperimentų tikslas – heterogeninės elektronų pernašos tarp fermento aktyviojo centro ir AuND konstantų nustatymas vienos lakazės molekulės atžvilgiu. CV matavimuose buvo analizuojamas PLL – lakazės – AuND – lakazės sistemos vidutinis katodinės srovės skirtumas tirpale esant ir nesant lakazės inhibitoriui. CV analizuota intervale nuo 0,45 iki 0,55 V vs. NHE. KKM-D modeliavimo metu gauta lakazės masė perskaičiuota į lakazės molekulių ant AuND kiekį. Konstanta apskaičiuota pagal formulę:

$$k_{obs} = \frac{-\Delta I_{cat}}{N_A \times e \times n_{lac}}$$

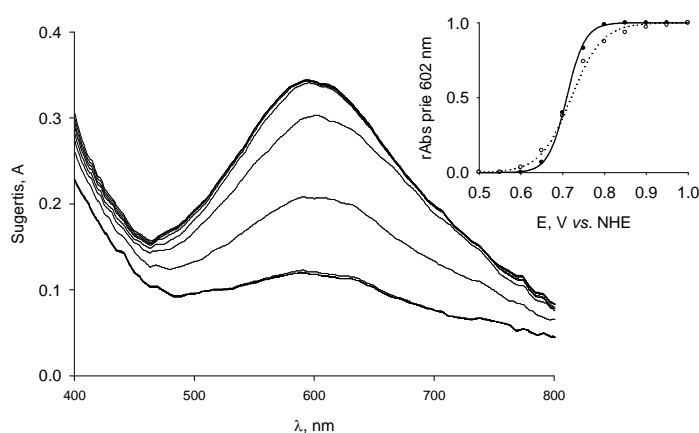
kur k_{obs} – heterogeninė elektronų pernašos konstanta (s⁻¹), ΔI_{cat} – vidutinis katodinės srovės skirtumas sistemoje su inhibitoriumi ir be jo (A), e – elementarusis krūvis, n_{lac} – lakazės kiekis ant AuND paviršiaus (mol).

KKM-D eksperimentų metu baltymų sluoksnyje esantis vanduo (ar kitos tirpiklių bei junginių molekulės) yra registruojamas bendroje sluoksnio masėje. Baltyminiai sluoksniai iš esmės registruojami kaip viskoelastiniai hidrogeliai, sudaryti iš makromolekulių ir vandens (Höök, Kasemo ir kiti 2001). Todėl, norint gauti „sausą“ fermento masę baltyminiame sluoksnyje, reikia naudotis papildomais paviršiaus analizės metodais. Vienas iš tokių metodų yra elipsometrija. Darbo metu buvo atliekami 50 µl/mg lakazės tirpalo adsorbcijos ant švaraus aukso paviršiaus stebėjimas tiek KKM-D, tiek elipsometrijos metodais. Eksperimentų sąlygos buvo panašios – fermento tirpalas buvo maišomas (elipsometrijos atveju) arba nuolat leidžiamas per jutiklio paviršių (KKM-D atveju), esant pastoviai 23 °C temperatūrai. Gavus modeliavimo duomenis (fermento masė be vandens iš elipsometrinių duomenų ir su vandeniu iš KKM-D duomenų) ir juos suliginus, nustatytas vandens kiekis lakazės sluoksnyje.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Trichaptum abietinum lakazės savybės.

Nustatytos kai kurios *Trichaptum abietinum* lakazės (TaL) katalitinės savybės. Pastebėta, kad ši lakazė, skirtingai nei *Trametes hirsuta* lakazė (ThL), silpnai oksiduoja organinius junginius lyginant su neorganiniu junginiu ferocianidu. Siekiant nustatyti TaL lakazės redokso potencialą atlikti spektroelektrocheminio T1 vario centro titravimo tyrimai, jų rezultatai pateikti 1 pav.



1 pav. *Trichaptum abietinum* lakazės T1 vario centro redokso titravimas mediatoriumi $K_4[Mo(CN)_8]$. Vidinėje iliustracijoje vaizduojama santykinė sugertis ties 602 nm priklausomybė nuo elektrocheminės celės potencialo, kur vientisa kreivė atitinka anodinį, punktyrinė – katodinį potencialo skleidimą.

Nustatytas TaL T1 vario centro redokso potencialas kuris lygus 714 mV vs. NHE ir yra žemesnis nei ThL potencialas (780 mV vs. NHE (Shleev, Morozova ir kiti 2004)). Abi lakazės priskirtinos aukštą potencialą turinčių lakazių grupei.

AuND dydis ir koncentracija.

Susintetintos įvairaus dydžio AuND ir naudojant skirtingus metodus nustatyti jų dydžiai. Gauti rezultatai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. AuND dydžiai gauti naudojant skirtingus nustatymo metodus.

Mėginio nr.	Norėtas gauti skersmuo, nm	d_{SPA} , nm	d_{SEM} , nm	d_{DLS} , nm	
				NICOMP pasisk.	Gauso pasisk.
1	15	≤ 20	$33,3 \pm 2,4$	$20,2 \pm 0,8$	$79,5 \pm 69,5$
2	15	≤ 20	$41,3 \pm 2,9$	$30,6 \pm 0,7$	$62,5 \pm 45,3$
3	20	35	$57,7 \pm 5,9$	$35,6 \pm 1,0$	$33,9 \pm 14,0$
4	20	28	$51,2 \pm 3,9$	$36,5 \pm 1,4$	$32,8 \pm 9,8$
5	20	32	$50,0 \pm 4,9$	$39,3 \pm 1,6$	$25,4 \pm 8,2$
6	30	39	$58,2 \pm 4,0$	$45,4 \pm 1,1$	$24,0 \pm 9,2$
7	60	49	$61,3 \pm 6,6$	$46,9 \pm 1,4$	$31,0 \pm 9,9$
8	70	54	$70,2 \pm 1,0$	$52,0 \pm 1,8$	$44,7 \pm 16,6$
9	70	52	$74,2 \pm 3,9$	$60,1 \pm 1,6$	$68,5 \pm 43,1$
10	75	64	$103,9 \pm 10,9$	$91,6 \pm 3,1$	$32,3 \pm 23,6$

Iš 1 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad AuND dydžių vertės, gautos dinaminio šviesos išbarstymo metodu (d_{DSI}), yra didesnės nei vertės, gautos analizuojant tirpalo sugerties spektrus pagal MiePlot algoritmą (d_{abs}). Tai nėra netikėta, nes dinaminės šviesos išbarstymo metodas yra pagrįstas dalelių difuzija tirpale, kai vertinama AuND difuzijos greičio priklausomybė nuo AuND dydžio. Realus matuojamas dydis šiuo atveju yra hidrodinaminis AuND spindulys R_S (Berne ir Pecora 2000), todėl tikroji AuND forma (ne idealiai apvali) irgi turi įtakos galutiniam rezultatui. SEM atveju stebimos AuND gali būti aplipusios citrato sluoksniu, kadangi matuojamos AuND yra išdžiovinotos, matomai todėl d_{SEM} reikšmės yra didžiausios. Visgi, šie trys metodai koreliuoja tarpusavyje, ir vienas iš metodų negali būti pasirenkamas kaip teisingas vertinant AuND dydžius. Šiais skirtumais galima pasinaudoti vertinant AuND struktūrines savybes. Paprastumo dėlei AuND dydžio įvertinimui tolesniuose eksperimentuose buvo pasirinkti d_{DSI} rezultatai.

Tipiškos gautos AuND koncentracijos buvo maždaug 0,2 – 0,4 nM (50 – 40 nm AuND, atitinkamai) - mažesnių AuND tirpalų koncentracija buvo didesnė.

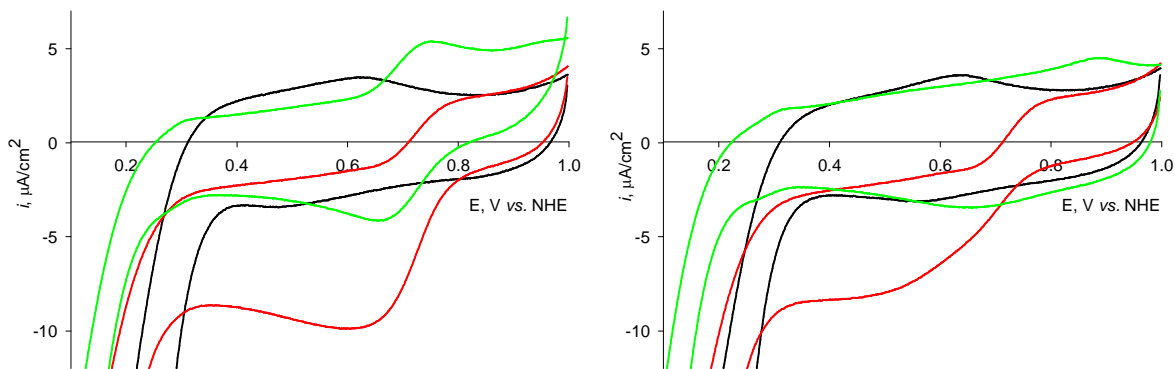
AuND ir *Trametes hirsuta* lakazės sąveika.

Pradžioje buvo tirta AuND ir ThL sąveika buferiniuose tirpaluose, t.y. AuND – ThL mišinio fermentinis aktyvumas ir šio mišinio aktyvumo pokytis po 20 h. Eksperimentu siekama išsiaiškinti ar AuND, sąveikaudamos su ThL dalinai blokuoja T1 vario centrą ir lėtina ThL katalizuojamos ABTS oksidacijos deguonimi reakcijos greitį. AuND ir ThL sumaišymo santykis parinktas toks, kad 30% AuND paviršiaus būtų padengta ThL, taip užtikrinant, kad visos tirpale esančios ThL susijungia su AuND. Gauta, kad iškart po sumaišymo ThL aktyvumas buvo 54 – 73 % lyginant su natyviu aktyvumu, o po 20 h aktyvumas nukrito iki 30 – 49 % pradinio aktyvumo vertės. Aktyvumo kritimo lygis priklausė nuo AuND dydžio.

ThL aktyvumo kritimą gali sąlygoti fermento denatūracija ant AuND paviršiaus ar ABTS difuzijos link T1 vario centro sulėtėjimas. Sėkmingi rezultatai lėmė tolesnius bioelektrokatalitinių sistemų tyrimus.

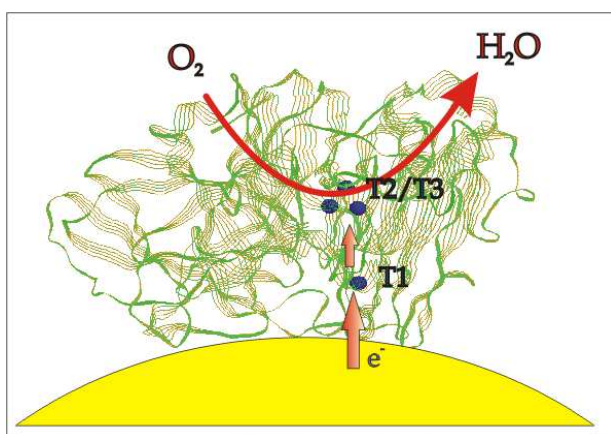
Daugiavarių oksidazių tiesioginė elektronų pernaša ant AuND.

Pastebėjus, kad AuND sąveikauja su ThL, buvo konstruojamos bioelektrokatalitinės sistemos iš aukso elektrodų, dengtų AuND ir ThL. Elektrodo paruošimas buvo atliekamas kaip aprašyta anksčiau. Dengti elektrodai tirti ciklinės voltamperometrijos (CV) metodu, eksperimentiniai rezultatai pateikiami 2 pav.



2 pav. ThL, adsorbuotos ant aukso elektrodų su 40 nm (kairėje) ir 50 nm (dešinėje) AuND, CV. Juoda kreivė vaizduoja elektrodo tik su AuND CV, raudona kreivė – to paties elektrodo CV su papildomai adsorbuota ThL, žalia kreivė – CV tirpale esant 1 mM NaF. CV registruotos skleidžiant potencialą 10 mV/s greičiu. Buferinis tirpalas - 50 mM Na₂HPO₄, 0,1 M Na₂SO₄, pH 4,0.

Iš 2 pav. pateiktos CV (raudona kreivė) matosi, kad mažinant potencialą nuo 1 V, ties 850 mV pradeda atsirasti redukcinė srovė, CV smailė išryškėja ties 650 mV. Stebima srovė yra sąlygojama deguonies bioelektroredukcijos, kadangi tiek deguonies pašalinimas iš tirpalo (rezultatai nepateikti), tiek lakazės inhibitoriaus NaF pridėjimas sąlygoja redukcinės srovės išnykimą. ThL adsorbavus ant gryno aukso elektrodo bioelektroredukcinė srovė nebuvo stebima (rezultatai nepateikti). Tai patvirtina ir kitų mokslininkų gauti rezultatai (Shleev, Christenson ir kiti 2005; Shleev ir Ruzgas 2008). Akivaizdu, kad stebima bioelektrokatalizė yra sąlygojama TEP tarp lakazės aktyviojo centro ir AuND, nes nenaudojami papildomi elektronų mediatoriai, tiek tirpale, tiek integruoti į polimerinę struktūrą. Siūlomas elektronų pernašos modelis (3 pav.), kai elektronai nuo AuND paviršiaus pernešami link T1 vario centro, o iš ten tuneliuojami link T2/T3 vario centro, kur panaudojami deguonies redukcijai iki vandens.

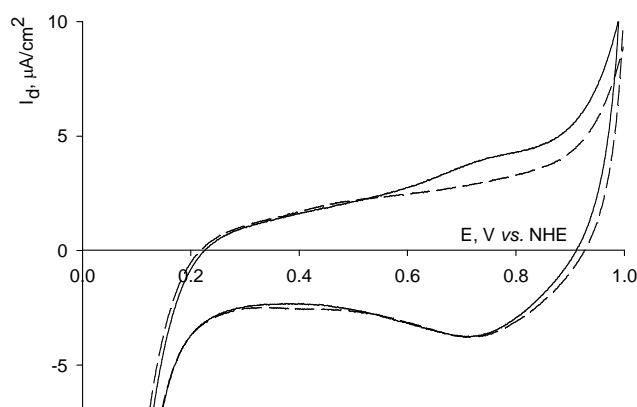


3 pav. Siūlomas TEP tarp AuND ir lakazės mechanizmas. T1 ir T2/T3 vario centrai pažymėti mėlynai, raudonos rodyklės vaizduoja elektronų pernašos kryptis.

Daroma prielaida, kad T1 vario centras pirmiausia paima elektronus nuo AuND. Ši prielaida pagrįsta šiais faktais: pirma - formalusis CV potencialas (730 mV) yra artimas T1 vario centro potencialui (780 mV); antra - šis formalusis potencialas išlieka nepakitęs pridėjus fermento inhibitoriaus (žinoma, kad NaF reaguoja su T2/T3 vario centru ir blokuoja deguonies redukciją (Shleev, Christenson ir kiti 2005)); trečia - TEP tarp T2/T3 ir elektrodo paviršiaus naudojant aukštą redoks potencialą turinčias lakazes vyksta esant mažesniais (300 - 400 mV), potencialui (Shleev, Christenson ir kiti 2005; Ramírez, Mano ir kiti 2008).

Gauti rezultatai leidžia teigti, kad adsorbuotos ant AuND lakazės pagalba galima deguonies redukcija ant aukso (metalo) paviršiaus ir ji vyksta pagal 3 pav. pasiūlytą mechanizmą. Darbe registruoti bioredukcinės srovės tankiai yra panašūs į anglies elektrodų su lakazėmis sistemų generuojamus srovės tankius (Shleev, Jarosz-Wilkolazka ir kiti 2005). Visgi detalus molekulinis elektronų pernašos mechanizmas lieka neaiškus. Rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad adsorbicija ant AuND sumažina elektronų pernašos atstumą tarp elektrodo ir T1 vario centro.

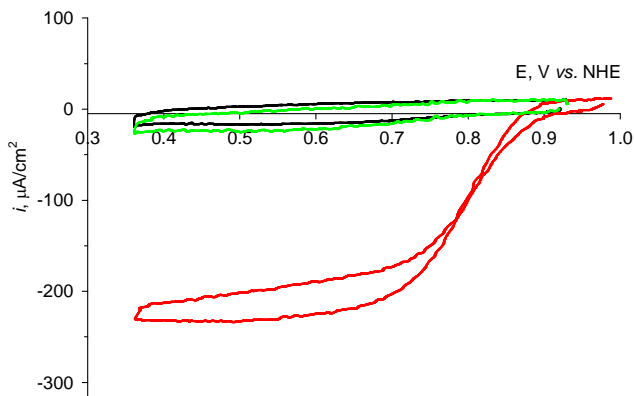
Vėlesniuose tyrimuose buvo analizuojama TEP bioelektrokatalizės galimybė ant AuND su kitomis daugiavarėmis oksidazėmis. Viena jų - žmogaus ceruloplazminas. Elektrodas su ceruloplazminu ruošiamas kaip ir ThL sistemos atveju, o gauti rezultatai pateikti 4 pav.



4 pav. Žmogaus ceruloplazmino, adsorbuoto ant aukso elektrodų su 39 nm AuND CV, registruota be (ištisinė kreivė) ir su 1 mM NaF (punktyrinė linija). Matavimo sąlygos – 0,1 M fosfatinis buferinis tirpalas, pH 7,4, potencialo skleidimo greitis - 10 mV/s.

4 pav. pateiktose CV stebimas elektrocheminis procesas ties maždaug 730 mV vs. NHE. Šio proceso prigimtis nėra aiški, tikėtina, kad jis galėjo atsirasti dėl ceruloplazmino oksidacinės - redukcinės transformacijos. Šie rezultatai ir rezultatai gauti su ant AuND imobilizuota lakaze (2 pav.) leidžia daryti prielaidą, kad žmogaus ceruloplazminas gali vykdyti TEP ant AuND, bet deguonies redukcija šioje sistemoje nėra stebima. Šie ir kiti žmogaus ceruloplazmino elektrocheminių sistemų, sudarytų naudojant spektrografinį grafitą, aukso paviršius be modifikacijos ir paviršius dengtus tioliniais junginiais, stiklo anglies paviršius dengtus anglies nanovamzdeliais, tyrimai buvo aprašyti (Haberska, Vaz-Domínguez ir kiti 2009). Tyrimų metu nebuvo stebima TEP pagrįsta deguonies bioredukcija ir tai buvo siejama su sudėtingais vidumolekuliniiais elektronų pernašos mechanizmais.

Kita darbe naudota TEP pagrindu veikianti daugiavarė oksidazė buvo nauja lakazė iš *Trichaptum abietinum*. Eksperimentiniai rezultatai, gauti tiriant elektrochemines sistemas su TaL imobilizuota ant AuND, pateikti 5 pav.

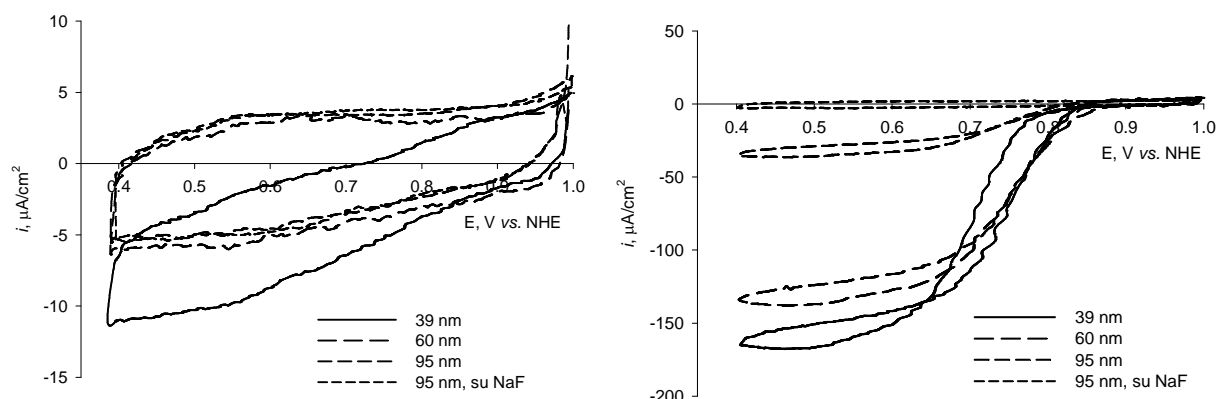


5 pav. TaL, adsorbuotos ant sukamojo disko aukso elektrodų su 40 nm AuND, CV. Juoda kreivė vaizduoja CV elektrodo tik su AuND, raudona kreivė – to paties elektrodo CV su adsorbuota TaL, žalia kreivė – CV tirpale esant 2 mM NaF. CV registruotos skleidžiant potencialą 5 mV/s greičiu. Sąlygos kaip 2 pav., elektrodas sukamas 400 aps./min greičiu.

Iš 5 pav. matyti, kad mažinant potencialą nuo 1 V (raudona kreivė), ties 900 mV pradeda ryškėti redukcinė srovė, voltamperogramos smailė išryškėja ties 700 mV (40 nm AuND atveju). Kaip ir imobilizuotos ThL atveju, stebima srovė yra sąlygojama deguonies bioelektroredukcijos - tiek deguonies pašalinimas iš tirpalo, tiek fermento inhibitoriaus pridėjimas sąlygoja redukcinės srovės išnykimą. TaL adsorbavus ant gryno aukso elektrodo bioelektroredukcinė srovė nebuvo gaunama (rezultatai nepateikti). Naudojant šią sistemą gaunamos didžiausios bioelektrokatalitinės srovės tokio tipo sistemoms, siekusios $>200 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Kadangi skleidžiant potencialą žemiau nei 700 mV elektrodo srovė nekinta, galima daryti prielaidą, kad TEP procesas yra limituojamas imobilizuoto fermento katalinio aktyvumo, nes srovės atsakas nedidėja didinant elektrodo sukimo greitį ar viršpotencialį, kas rodo, kad srovės stiprio neriboja deguonies difuzija ar heterogeninė elektronų pernaša, atitinkamai.

Analogiški sukamojo aukso disko elektrodo eksperimentai buvo atlikti su ThL sistemomis, kur paaiškėjo, kad bioredukcinė srovė nedidėja sukant elektrodą. Tai reikėtų, kad srovės atsaką limituoja arba heterogeninė elektronų pernaša, arba adsorbuoto fermento katalitinis aktyvumas.

Tirta AuND dydžio įtaka bioredukcinės srovės atsakui. Šiuo atveju aukso elektrodai buvo padengti AuND kiekiu, pakankamu sudaryti dvidimensinį heksagonalinio išsidėstymo monosluoksnį ant elektrodo paviršiaus. Gauti rezultatai pavaizduoti 6 pav., kurie leidžia manyti, kad AuND – lakazės TEP sistemų deguonies bioredukcinės srovės atsakas priklauso nuo AuND dydžio.



6 pav. ThL (kairėje) ir TaL (dešinėje), adsorbuotos ant sukamojo disko aukso elektrodų atitinkamo dydžio AuND, CV. Nagrinėjamosiose sistemose į tirpalą įdėjus 2 mM NaF CV atsakas buvo panašus - iliustracijose pavaizduota 95 nm AuND – lakazės sistemos CV, kai tirpale yra 2 mM NaF. Elektrodo sukimo greitis - 400 aps./min.

Iš 6 pav. pateiktų CV matyti, kad didesnės srovės gaunamos naudojant mažesnio skersmens AuND. Eksperimentas nebuvo tikslus, nes AuND nebūtinai formuoja tvarkingą monosluoksnį, kai AuND tirpalas yra užlašinamas ant paviršiaus, taip pat nežinoma ir kiek AuND nusiplauna CV eksperimento metu. Siekiant patvirtinti AuND dydžio svarbą bioredukcinės srovės atsakui, AuND – lakazės sistemos tirtos kvarcinio kristalo mikrosvarstyklių su disipacijos nustatymu (KKM-D) metodu (žr. *toliau*).

Tirta inhibitorių NaCl ir NaF įtaka bioredukcinės srovės atsakui. Elektrodai, dengti AuND ir lakazėmis, buvo sukami 400 aps./min greičiu, esant pastoviam 0,4 V potencialui, ir registruojamas srovės tankio kitimas laike, į tirpalą nuosekliai pridėdant lakazės inhibitoriaus. Po inhibitoriaus pridėjimo srovės atsakas registruotas bent 15 min, tačiau srovės stipris iki galo nenusistovėdavo, todėl galutinės pastovios srovės vertės buvo gaunamos matematiškai, rezultatus modeliuojant paprastojo eksponentinio augimo modeliu. Modeliuojant buvo daroma prielaida, kad lakazės katalizuojamoje ABTS oksidacijos reakcijoje NaF yra nekonkurentinis, o NaCl – konkurentinis inhibitorius. Gauti rezultatai pateikti 2 lentelėje.

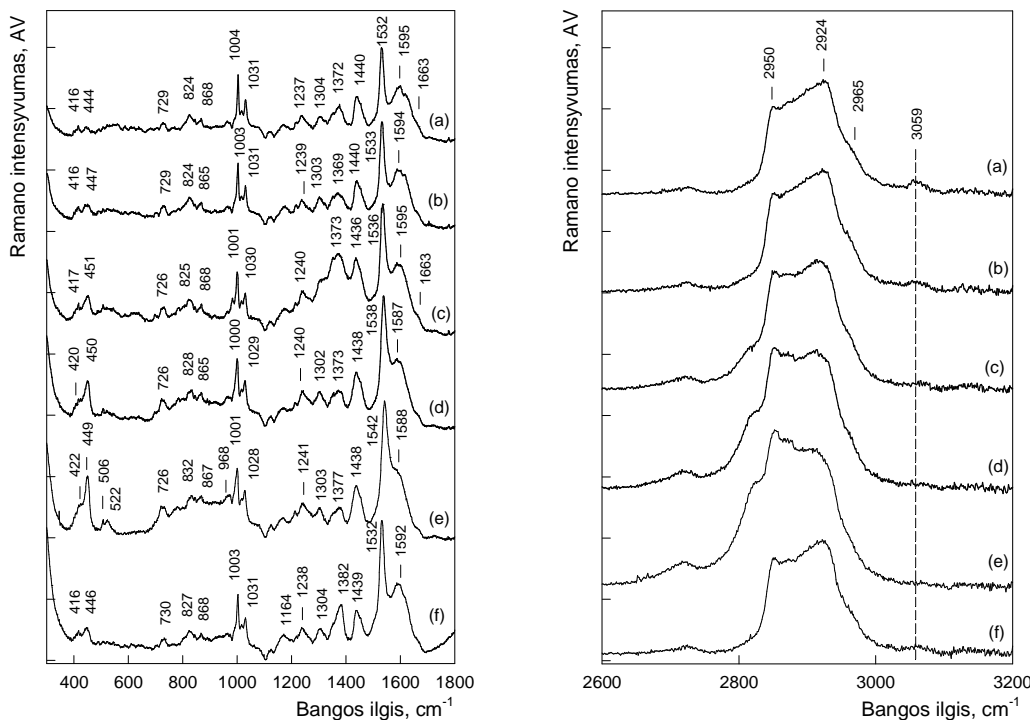
2 lentelė. Lakazės inhibicijos konstantų (K_i , mM) palyginimas, nagrinėjant homogeninę (lakazė tirpale su 2 mM ABTS) ir heterogeninę (lakazė adsorbuota ant AuND) sistemas. Visais atvejais buvo naudojamas vienodas buferinis tirpalas, eksperimentai atlikti kambario temperatūroje.

Lakazė	NaCl (konkurentinė inhibicija)		NaF (nekonkurentinė inhibicija)	
	Homogeninė sistema	Heterogeninė sistema	Homogeninė sistema	Heterogeninė sistema
<i>Trichaptum abietinum</i>	20,2 ± 2,6	5,6 ± 1,1	12,4 ± 2,0	0,087 ± 0,003
<i>Trametes hirsuta</i>	8,8 ± 3,7	13,8 ± 5,7	0,037 ± 0,009	0,071 ± 0,007

Iš 2 lentelės matyti, kad tiek natyvi, tiek adsorbuota ThL pasižymi beveik vienodu jautrumu tiek NaCl, tiek NaF. Tuo tarpu TaL, adsorbuota ant AuND paviršiaus, praranda atsparumą NaF, tuo pačiu išlaikydama panašų jautrumą NaCl.

Lakazių T1 vario centro padėties AuND paviršiaus atžvilgiu tyrimai

Paviršinio stiprinimo Ramano spektroskopijos (PSRS) metodas buvo naudojamas analizuoti ant aukso elektrodo adsorbuotų AuND ir lakazių sąveiką. Siekiant patikrinti 3 pav. pavaizduotą modelį buvo bandoma gauti lakazės T1 vario centro paviršinio stiprinimo nuo AuND Ramano signalus, nes šis vario centras pasižymi intensyviu Ramano signalu 415 - 430 cm^{-1} srityje (Augustine, Kragh ir kiti 2008), kai tirpalas sužadinamas raudonos šviesos lazerio spinduliu (pvz., 647 nm, darbe naudota 785 nm lazerio spinduliuotė). 7 pav. pavaizduoti paviršinio stiprinimo Ramano spektrai aukso elektrodo su AuND ir ThL sistemose 300 - 1800 cm^{-1} ir 2600 - 3200 cm^{-1} spektro srityse.



7 pav. Aukso elektrodo su AuND ir ThL PSRS, spektrų intervalai: 300-1800 cm^{-1} (kairėje) ir 2600-3200 cm^{-1} (dešinėje), elektrodo potencialai: 0,8 V (a), 0,6 V (b), 0,4 V (c), 0,2 V (d), 0 V (e), ir 0,8 V (f). NHE), matavimo sąlygos: šviesos šaltinio bangos ilgis – 785 nm, lazerio signalo galia ties elektrodu – 30 mW, bendra spektrų registravimo trukmė - 300 s. Viena Ramano intensyvumo padala lygi 100 AU.

Iš 7 pav. pateiktų spektroskopinių tyrimų rezultatų matyti, kad baltymas yra adsorbuotas – stebimi aiškūs Phe žiedo „kvėpavimo“ signalai ties 1004 cm^{-1} (7 pav., kairėje) ir aromatinio žiedo $\nu(\text{C}=\text{H})$ valentinės vibracijos signalai ties 3059 cm^{-1} (7 pav., dešinėje). Keičiant elektrodo potencialą aštri 1004 cm^{-1} smailė plėtėja ir pasislenka į ilgesnių bangų pusę (1001 cm^{-1}), o aukšto dažnio komponentas ties 3059 cm^{-1} visiškai išnyksta ties 0 V. Šie rezultatai leidžia teigti, kad baltymas reorientuojasi keičiant elektrodo potencialą, baltymo domenai, turintys daug Phe, tolsta nuo AuND paviršiaus mažinant potencialą.

Citrato jonų, adsorbuotų kartu su baltymu, signalai matomi iš 1372 cm^{-1} juostos (Munro, Smith ir kiti 1995), ir, ko gero, iš stipraus 1532 cm^{-1} ir plataus 1595 cm^{-1} signalų. 1372 cm^{-1} signalas yra sąlygojamas karboksilato grupės valentinių virpesių. Jo dažnis mažėja palyginus su citrato tirpalo spektru (1417 cm^{-1}) (Munro, Smith ir kiti 1995), tai turėtų reikšti tiesioginę karboksilato grupių sąveiką su aukso paviršiumi. Pažymėtina, kad nebuvo gauti lakazės T1 vario centro signalai. Žemo dažnio juostos ties 416 and 444 cm^{-1} nepriskirtini T1 vario centrui, kadangi T1 signalas prie žemesnių potencialų turėtų mažėti dėl prerezonansinio Ramano žadinimo praradimo (Gaigalas ir Niaura 1997). T1 signalo nebuvimas gali reikšti, kad ThL adsorbuojasi tokia orientacija, kad T1 vario centras atsiduria 2 – 4 nm atstumu nuo 39 nm AuND paviršiaus (Murray ir Allara 1982; Kovacs, Loutfy ir kiti 1986; Kennedy, Spaeth ir kiti 1999). Analogiškai ant aukso elektrodo adsorbuotų AuND ir TaL tyrimų rezultatai buvo panašūs, t.y. T1 vario centro Ramano signalas nebuvo stebimas.

Phe sričių ties 100 cm^{-1} analizė parodė, kad ~87 % baltymo lieka adsorbuota ant AuND keičiant elektrodo potencialą. Taip pat buvo pastebėta nuo potencialo priklausoma

adsorbuoto baltymo reorientacija, ir stebima negrįžtama lakazių adsorbpcija ant AuND. Nustatyta, kad citrato jonai lieka prisijungę prie AuND po AuND dengimo lakaze.

Heterogeninė elektronų pernaša AuND – lakazės sistemose

Vandens masės baltymų sluoksnyje nustatymas. Norint nustatyti tikslų bioelektrokatalitiname procese dalyvaujančių lakazių skaičių, būtina nustatyti vandens masės dalį lakazės sluoksnyje, kadangi KKM-D metodu yra matuojama viskoelastinio sluoksnio, sudaryto iš makromolekulių ir vandens, masė.

Šiame tyrime panaudotas nulinės elipsometrijos metodas, kuris leidžia nustatyti „sauso“ baltymo sluoksnį ant analizuojamo paviršiaus. Abiejuose matavimo metoduose lakazės adsorbpcijos sąlygos ant aukso paviršiaus labai panašios. KKM-D atveju, išvalytas aukso paviršiaus jutiklis buvo įmontuotas į celę, ir lakazės tirpalas buvo leidžiamas 100 μl/min greičiu. Nulinės elipsometrijos eksperimentų atveju, šis lakazės tirpalas buvo įpiltas į celę su nuvalyta aukso plokštele ir lėtai maišomas. Abiem atvejais buvo palaikoma 23 °C temperatūra. Tyrimų rezultatai modeliuoti pagal formulę:

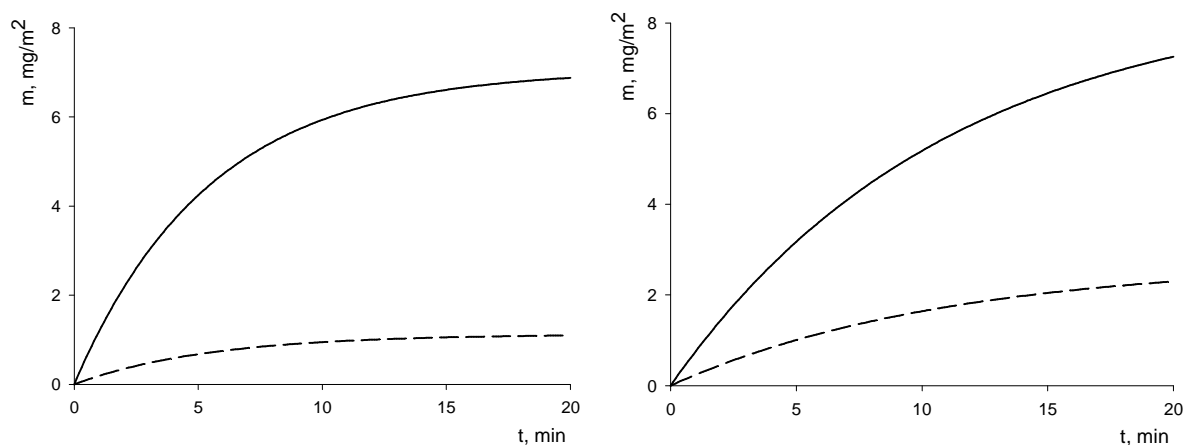
$$m_{lac} = x_1 e^{x_2 * t} + x_3$$

kur m_{lac} – adsorbuotos lakazės masė laiko t momentu, x_1 , x_2 ir x_3 – modeliuojami paprastojo eksponentinio augimo modelio parametrai. Kadangi tyrimai atlikti skirtingose celėse, lakazės nusėdimo greitis skyrėsi. Naudojamo modelio x_2 parametras susijęs su lakazės sluoksnio augimo greičiu, todėl tolesni skaičiavimai atlikti remiantis šiomis formulėmis:

$$m_{KKM} = xq_1 * e^{(xq_2 + xe_2)/2 * t_{KKM}} + xq_3$$

$$m_{el} = xe_1 * e^{(xq_2 + xe_2)/2 * t_{el}} + xe_3$$

kur m_{KKM} ir m_{el} – adsorbuotos lakazės masė laiko t_{KKM} ir t_{el} momentu; xq_1 , xq_2 , xq_3 ir xe_1 , xe_2 , xe_3 atitinka x_1 , x_2 , x_3 parametrai gauti iš KKM-D ir nulinės elipsometrijos matavimų, atitinkamai. Gautos priklausomybės pavaizduotos 8 pav.

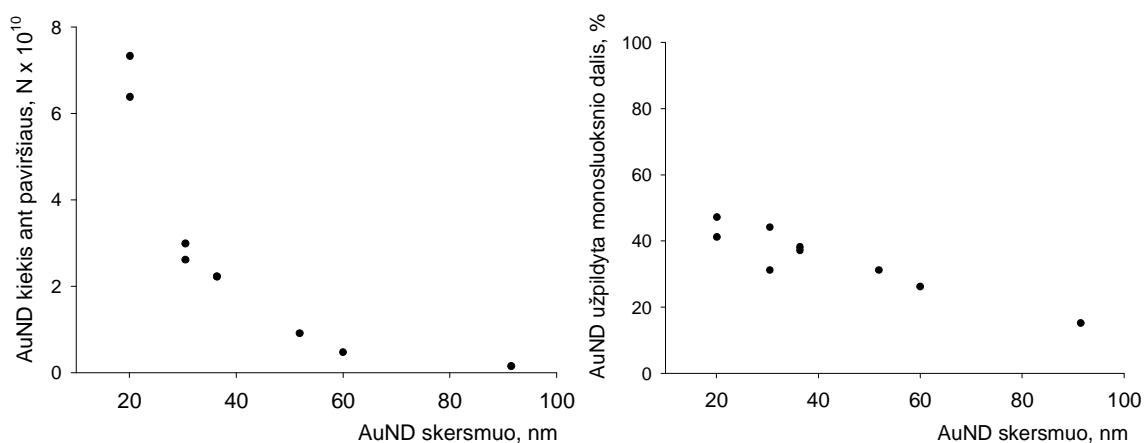


8 pav. Parametrų m_{KKM} (vientisa kreivė) ir m_{el} (punktyrinė kreivė) priklausomybė nuo t_{KKM} ir t_{el} sistemų su ThL (kairėje) ir TaL (dešinėje) atvejais.

Gauta, kad m_{el}/m_{qcm} santykis bet kuriuo laiko momentu atitinka vandens masės dalį (w/w) baltymo sluoksnyje. Apskaičiuota vandens masės dalis (w/w) ThL atveju buvo $84 \pm 5\%$, TaL atveju – $68 \pm 2\%$.

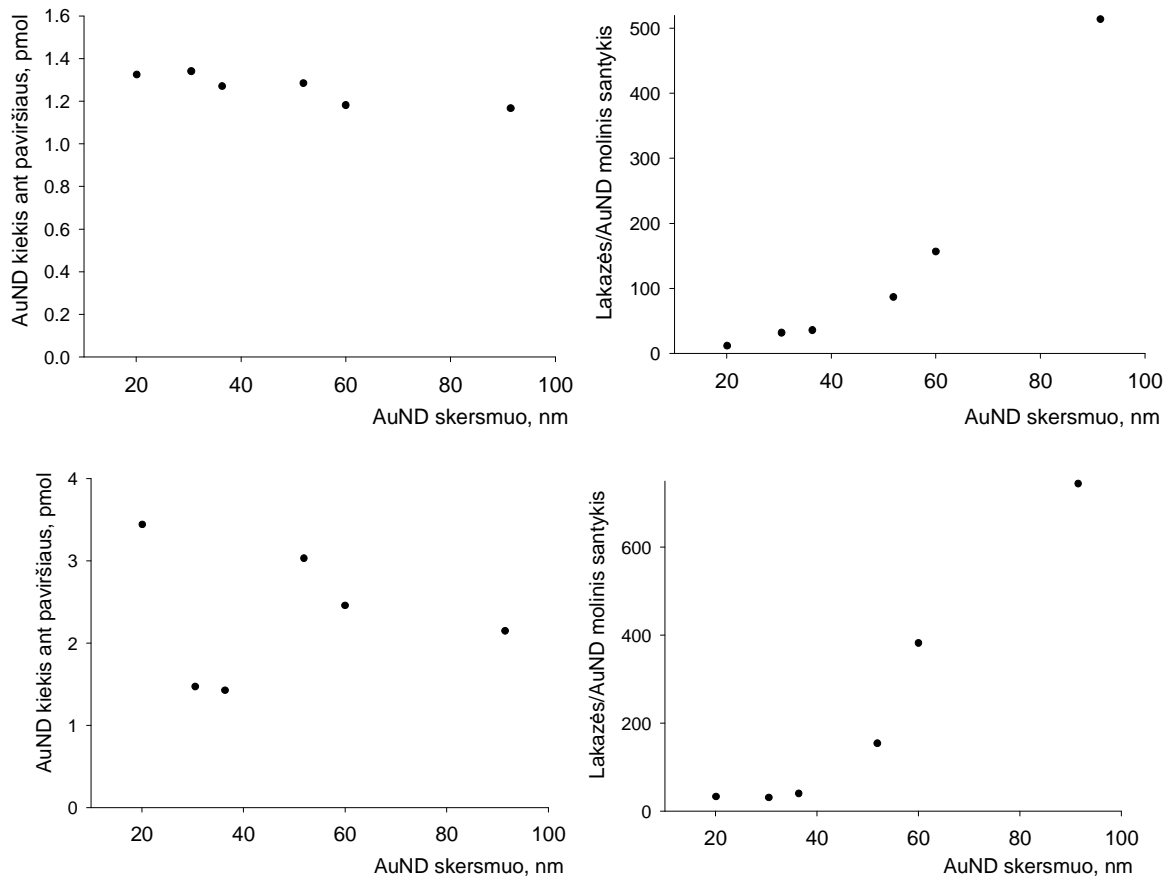
Šie skaičiavimai galioja sistemoms, kur lakazė yra adsorbuojama ant plokščio aukso paviršiaus, o ne AuND, ir tinka tuo atveju kai ant AuND adsorbuotas lakazės sluoksnis iš tikrųjų turi panašų vandens kiekį kaip ir lakazės sluoksnis ant aukso paviršiaus.

Heterogeninės elektronų pernašos konstantų nustatymas. Elektrocheminiai KKM-D eksperimentai buvo atliekami ant KKM jutiklio formuojant PLL – lakazės – AuND – lakazės sluoksnius ir modeliuojant Δf bei ΔD priklausomybes nuo laiko Qtools programine įranga, analizuojant pokyčius penktame, septintame ir devintame obertonuose. Pirmo, PLL, sluoksnio matavimai parodė, kad PLL adsorbicija sąlygoja mažus Δf pokyčius, ΔD kitimo nebuvo stebima. Vidutinis PLL sluoksnio su vandeniu masės tankis - 74 ± 39 ng/cm². Antro, lakazės, sluoksnio matavimai rodė ryškesnius Δf ir ΔD pokyčius, nustatyti vidutiniai lakazės sluoksnių su vandeniu masės tankiai - 440 ± 250 ng/cm² ir 50 ± 32 ng/cm² ThL ir TaL atvejais, atitinkamai. Trečio, AuND sluoksnio, masės matavimo rezultatai, perskaičiuoti į AuND kiekius, skaičiuotus naudojantis nustatytomis skersmens vertėmis (d_{DSI}), pateikti 9 pav.



9 pav. Adsorbuotų AuND kiekio priklausomybė nuo AuND dydžio (kairėje) ir apskaičiuotas AuND monosluoksnio užpildymas pagal AuND dydį (dešinėje).

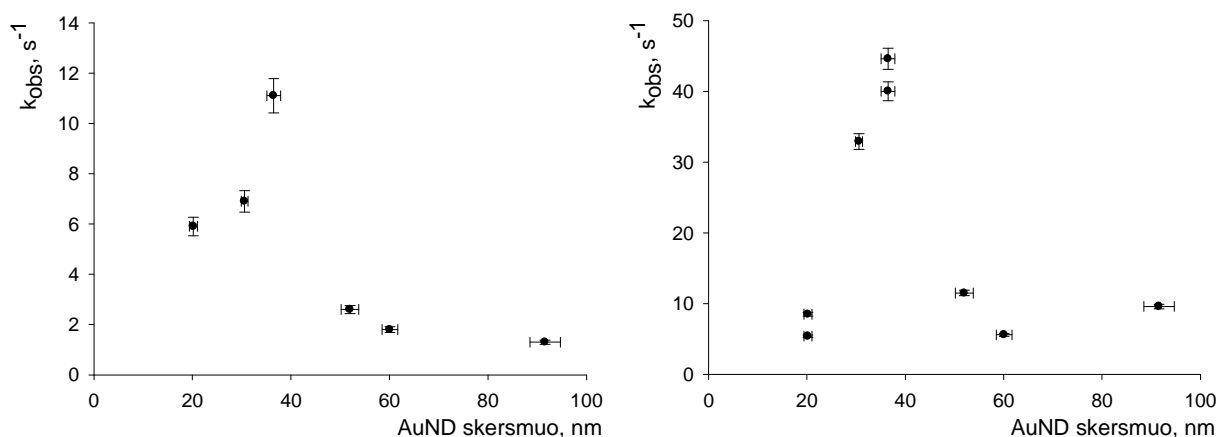
Ketvirtas, lakazės, sluoksnis buvo formuojamas 50 µg/ml koncentracijos lakazės tirpalą leidžiant per jutiklio paviršių ne ilgiau nei 10 min. Gauta galutinė lakazės masė buvo perskaičiuojama kaip „sausos“ lakazės masė, ir, žinant baltymo molinę masę, apskaičiuotas lakazės molekulių kiekis, adsorbuotas ant AuND.



10 pav. Viršutiniuose pav. - adsorbuotos ThL kiekio (kairėje) ir ThL/AuND molinio santykio (dešinėje) priklausomybės nuo AuND dydžio. Apatiniuose pav. – analogiški rezultatai TaL lakazės atveju.

Lyginant rezultatus gautus sorbuojant ThL ir TaL matyti, kad TaL adsorbuojasi labiau nei ThL. Tai turbūt susiję su tuo, kad ThL sluoksnyje baltymo ir vandens santykis yra didesnis.

Iš eksperimentinių PLL- AuND – lakazės KKM-D CV analizės rezultatų paskaičiuotos heterogeninės elektronų pernašos konstantos k_{obs} pateikiamos 11 pav.

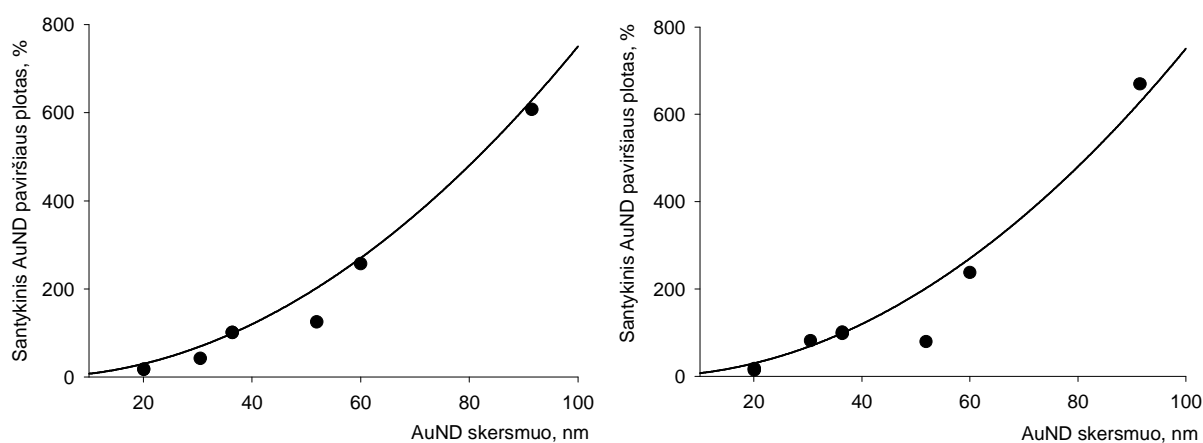


11 pav. k_{obs} priklausomybės nuo AuND dydžio ThL (kairėje) ir TaL (dešinėje) atvejais. AuND paklaidos atitinka d_{DSI} paklaidas, k_{obs} paklaidos apskaičiuots remiantis vandens masės lakazės sluoksnyje matavimo rezultatų paklaidomis.

Iš heterogeninės elektronų pernašos konstantų k_{obs} priklausomybių nuo AuND dydžio matyti, kad nanodalelių dydis turi didelės įtakos k_{obs} , kas buvo stebėta atliekant elektrocheminius CV tyrimus. Didesnių AuND atveju k_{obs} yra mažesnės nei naudojant vidutines AuND, tačiau netikėta yra tai, kad sistemos su mažomis AuND taip pat pasižymi mažesnėmis k_{obs} .

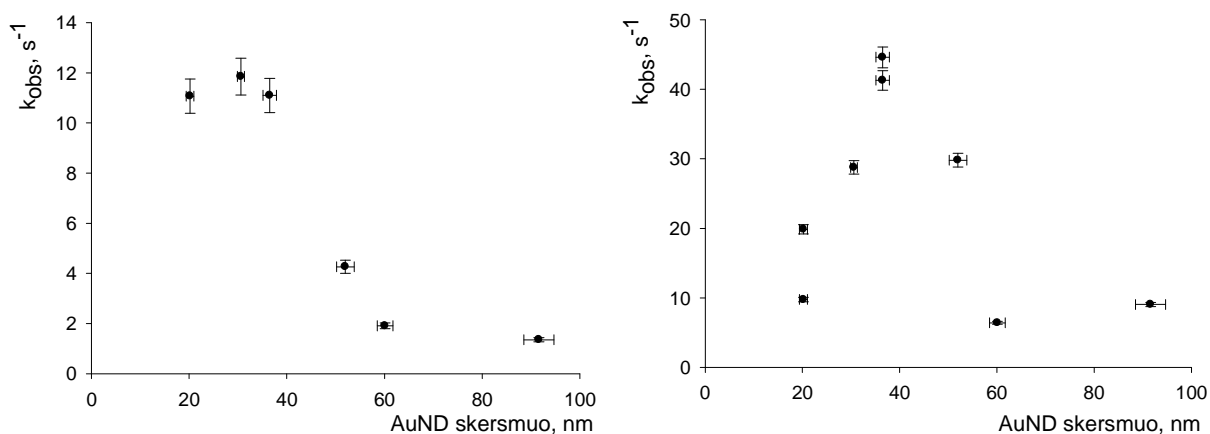
Daroma prielaida, kad galbūt KKM-D eksperimentų metu AuND turi silpną kontaktą su aukso paviršiumi dėl adsorbuoto PLL sluoksnio, ir, pavyzdžiui, mažesnio skersmens AuND nesugeba tinkamai „nuskęsti“ į PLL ir sudaryti gerą Au/AuND kontaktą. Jei tai būtų tiesa, bendru atveju nesusijungusių ir susijungusių AuND santykis būtų panašus į TEP dalyvaujančių ir nedalyvaujančių lakazių molekulinį santykį.

Tolesni skaičiavimai buvo atliekami integruojant ir lyginant eksperimentų metu gautų PLL – lakazės – AuND CV plotus, kurie atitinka bendrą AuND paviršiaus plotą. Realūs vidutiniai vienos AuND elektrocheminiai plotai gauti imant CV integravimo rezultatų ir AuND kiekio santykį. Jų priklausomybė nuo AuNP dydžio lyginta su teorine AuND paviršiaus ploto priklausomybe nuo AuND dydžio (12 pav.).



12 pav. Teorinė ir eksperimentinė vienos AuND paviršiaus ploto priklausomybė nuo AuND dydžio ant AuND imobilizavus ThL (kairėje) ir TaL (dešinėje). Teorinė priklausomybė - ištisinė linija, eksperimentinė priklausomybė - juodi taškai; 100% atitinka 36,5 nm AuND paviršiaus plotą.

Fermentų k_{obs} reikšmės buvo atitinkamai perskaičiuotos, kur k_{obs} gauti iš sistemų su 36,5 nm AuND tyrimų buvo laikomi kaip standartas (13 pav.).



13 pav. Perskaičiuotos k_{obs} priklausomybės nuo AuND dydžio ThL (kairėje) ir TaL (dešinėje) atvejais. AuND paklaidos atitinka d_{DSI} paklaidas, k_{obs} paklaidos apskaičiuotos remiantis vandens masės lakazės sluoksnyje matavimo rezultatų paklaidomis.

Šie konstantų perskaičiavimai leidžia manyti, kad ThL sistemų atveju mažos AuND turi panašią įtaką k_{obs} kaip ir vidutinės AuND. Maksimalios k_{obs} reikšmės ThL atveju siekė 12 s⁻¹, TaL 45 s⁻¹. Atitinkamai ThL ir TaL fermentiniai aktyvumai tirpaluose su 2 mM ABTS buvo maždaug 200 s⁻¹ ir 300 s⁻¹, vertės skyrėsi priklausomai nuo fermentų laikymo sąlygų.

Tiesioginės ir mediatorinės elektronų pernašos santykis AuND – lakazės sistemose. Siekiant išsiaiškinti, kodėl vidutinio dydžio AuND sąlygoja geresnes k_{obs} , buvo iškelta hipotezė, kad tai lemia skirtinga T1 vario centro pozicija AuND atžvilgiu. Tokiu atveju, į AuND – lakazės bioelektrokatalitinę sistemą įdėjus 2 mM ABTS, turėtume stebėti skirtingą bendros mediatorinės elektronų pernašos (MEP) sąlygojamą srovę sistemose su įvairiomis AuND. Tam tikslui ant KKM-D jutiklio suformuota PLL – AuND – TaL multisluosknė struktūra ir per KKM-D celę iš pradžių leistas buferinis tirpalas (registruota TEP redukcinė srovė esant 0,5 V potencialui), po to leistas buferinis tirpalas su 2 mM ABTS (registruota bendra srovė, atitinkanti suminę savaiminės oksiduotos ABTS formos redukcijos ant aukso paviršiaus ir MEP deguonies bioredukcijos srovę). Vėliau, į 2 mM ABTS buferinį tirpalą įdėjus 2 mM NaF, buvo stebima likutinė ABTS redukcijos srovė, kuri skaičiuojant rezultatus buvo atimta iš bendros ABTS redukcijos ir MET srovės reikšmės. KKM-D analize nustatytus lakazės kiekį ant AuND paviršiaus srovės reikšmės gautos perskaičiavus (normavus) 1 ng TaL. Gauti rezultatai:

AuND dydis, nm	TEP srovės tankis, $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	MEP srovės tankis, $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	TEP/MEP santykis, %
20.2 ± 0.8	3.8 ± 0.1	24.9 ± 0.2	15.4 ± 0.6
36.5 ± 1.4	9.3 ± 0.1	34.3 ± 0.2	26.9 ± 0.4
91.6 ± 3.1	1.28 ± 0.03	27.0 ± 0.3	4.7 ± 0.1

Pateikti rezultatai rodo, kad sistemos, savo sudėtyje turinčios vidutinio dydžio AuND, generuoja didžiausias TEP ir MEP srovės tankio reikšmes. Galima daryti prielaidą, kad tokios AuND užtikrina geriausią kontaktą su fermento aktyviuoju centru bei mažiausiai denatūruoja ar degradoja lakazę, su sąlyga, kad rezultatų neveikia substratų difuzija link AuND paviršiaus.

Rezultatų aptarimas

Vienas svarbiausių disertacijos darbe gautų rezultatų yra bioelektrokatalitinės deguonies redukcijos, pagrįstos tiesiogine elektronų pernaša (TEP), stebėjimas sistemose su lakaze, adsorbuota ant aukso nanodalelių (AuND). Kai buvo pademonstruota TEP bioelektrokatalitinė sistema, sudaryta iš 40 – 50 nm AuND ir *Trametes hirsuta* lakazės (2010 metais), literatūroje jau buvo paskelbta apie TEP galimybę tarp AuND ir fermentų aktyvių centrų sistemose su citochromu *c* (Ju, Liu ir kiti 2002), mioglobinu (Liu ir Ju 2003), krienų peroksidaze (Zhao, Henkens ir kiti 1992), superoksido dismutaze (El-Deab ir Ohsaka 2007) ir bilirubino oksidaze (Murata, Kajiya ir kiti 2009). Nors jau anksčiau buvo parodyta TEP galimybė sistemose su anglies elektrodais dalyvaujant lakazei (Berezin, Bogdanovskaya ir kiti 1978), tačiau efektyvi TEP bioelektrokatalizė sistemose

iš lakazių ir metalinių elektrodų nebuvo parodyta (Shleev, Christenson ir kiti 2005; Shleev ir Ruzgas 2008).

Darbe parodyta TEP pagrįsta deguonies bioredukcija sistemose su AuND ir *Trametes hirsuta* lakaze buvo efektyvi, nes ciklinės voltamperometrijos eksperimentuose redukcinė srovė atsirasdavo ties 850 mV (vs. NHE), o redukcinė smailė išsilygindavo ties 650 mV (*Trametes hirsuta* lakazės T1 vario centro redokso potencialas - 780 mV (Shleev, Morozova ir kiti 2004). Vis dėlto, sistemose, kuriose panaudotas AuND kiekis buvo pakankamas monosluoksniui ant elektrodo paviršiaus sudaryti, redukcinės srovės tankis nebuvo didesnis kaip $15 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Iš kitų darbų (Pita, Gutierrez-Sanchez ir kiti 2011) paaiškėjo, kad TEP sistemose lakazė turi būti tinkamai orientuota į aukso paviršių. Lakazės orientacija AuND paviršiaus atžvilgiu gali būti keičiama įvairiais būdais, tačiau darbe, siekiant gauti kuo didesnius bioredukcinės srovės tankius sistemose su AuND, buvo bandomos skirtingos daugiavarės oksidazės.

Viena iš tirtų oksidazių buvo žmogaus ceruloplazminas. Elektrocheminiai ceruloplazmino - AuND (40 nm) sistemos tyrimai parodė redukcinę srovę ties 730 mV (vs. NHE). Efektyvi deguonies bioredukcija šioje sistemoje nebuvo stebima. Šį procesą galima būtų priskirti fermento redokso grupių transformacijai, tačiau tikroji proceso priežastis nėra aiški.

Kita oksidazė – lakazė iš *Trichaptum abietinum* – TEP bioelektrokatalitinėse sistemose su AuND pasiekdavo aukštesnes redukcines sroves nei sistemos su *Trametes hirsuta* lakaze. Sukamasis aukso elektrodas, padengtas AuND (40 nm) ir *Trichaptum abietinum* lakaze, sukurdavo maždaug $170 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ bioredukcinės srovės tankį. Eksperimentiniai rezultatai, gauti naudojant sukamąjį aukso elektrodą, leidžia manyti, kad TEP procesas ir maksimalus redukcinės srovės tankis yra ribojami fermento bioelektrokatalizės greičio.

Darbe buvo siekiama išsiaiškinti, kodėl *Trichaptum abietinum* lakazės sistemos yra pranašesnės už analogiškas *Trametes hirsuta* lakazės sistemas. Nustatytas *Trichaptum abietinum* lakazės redokso potencialas – 714 mV, yra mažesnis už *Trametes hirsuta* lakazės potencialą (780 mV (Shleev, Morozova ir kiti 2004), tačiau abu fermentai gali būti priskirti aukšto potencialo lakazėms. *Trichaptum abietinum* lakazė, skirtingai nei *Trametes hirsuta*, po imobilizacijos ant AuND paviršiaus praranda atsparumą nekongruentiniam T2/T3 vario centro inhibitoriui NaF. Jų inhibicijos konstantos skiriasi 140 kartų. Tačiau abi lakazės išlaiko panašų jautrumą T1 vario centro kongruentiniam inhibitoriui NaCl. *Trichaptum abietinum* lakazė gerai katalizuoja neorganinio junginio ferocianido oksidaciją, bet prastai katalizuoja fenolinių junginių oksidaciją. Nors dar neturime šios lakazės PDB struktūros, gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad lakazės T1 vario centro aplinka turi didesnį teigiamąjį krūvį nei *Trametes hirsuta* lakazė, kuri gerai oksiduoja tiek organinius, tiek neorganinius junginius. Todėl *Trichaptum abietinum* lakazės atveju, dėl didesnio teigiamo krūvio, organiniai junginiai sunkiau pasiekia T1 vario centrą. Jei ši prielaida teisinga, galima būtų manyti, kad labiau teigiama T1 sritis geriau sąveikauja su neigiamai įkrautu AuND paviršiumi, todėl atstumas tarp T1 ir AuND yra trumpesnis nei *Trametes hirsuta* lakazės sistemoje. Šiuo metu bandoma nustatyti *Trichaptum abietinum* lakazės struktūrą, gauti rezultatai leistų patvirtinti ar atmesti siūlomas prielaidas.

Mažai tikėtina, kad T1 vario centro pozicija AuND paviršiaus atžvilgiu yra lemianti TEP pagrįstos deguonies bioredukcijos veikimo sąlyga. AuND ir abiejų lakazių sistemų paviršiaus stiprinimo Ramano spektroskopijos matavimuose nebuvo stebėta T1 vario centro Ramano stiprinimo efekto, o tai reiškia, kad T1 vario centras yra toliau nei 2 – 4

nm nuo AuND paviršiaus. Tačiau buvo stebima nuo elektrodo potencialo priklausoma biomolekulių reorientacija. Yra iškelta hipotezė (Shleev, Jarosz-Wilkolazka ir kiti 2005), kad TEP sistemose T2/T3 vario centras yra arčiau aukso paviršiaus, o būtent T1 vario centras yra nutolęs aukso paviršiaus. Tai, kad *Trichaptum abietinum* lakazė, adsorbicijos ant AuND metu praranda atsparumą T2/T3 vario centro inhibitoriui NaF, gali reikšti, kad AuND paviršiaus sąveika keičia T2/T3 vario centro struktūrą. Todėl, *Trichaptum abietinum* lakazės atveju, išauga deguonies bioredukcinės srovės tankis, nes T2/T3 vario centras atsiranda arčiau AuND paviršiaus negu *Trametes hirsuta* lakazės atveju.

Darbe parodyta, kad AuND – lakazės sistemose (abiejų lakazių atveju) - AuND dydis daro įtaką heterogeninei elektronų pernašai (EP). Nagrinėjant EP vienos lakazės molekulės atžvilgiu, pastebėta, kad heterogeninė EP vyksta greičiau naudojant 40 - 50 nm, bet ne 70 - 90 nm AuND. Optimalaus dydžio AuND panaudojimas užtikrina efektyviausią TEP bei mažiausią fermento denatūraciją ir/ar degradaciją. Reiškinių priežastys nėra visiškai aiškios. Literatūroje nėra duomenų apie 10 – 100 nm dydžio AuND struktūros analizės studijas, bet yra aprašomi sėkmingi TEP bioelektrokatalitinių sistemų bandymai imobilizuojant oksidoreduktazes ant monokristalinio Au(111) paviršiaus (González Arzola, Gimeno ir kiti 2010). Jeigu AuND būtų monokristalinės, ko gero nebūtų stebima aiški TEP atsako priklausomybė nuo AuND dydžio. Jeigu AuND struktūra iš tikrųjų yra polikristalinė, galima būtų spekuliuoti, kad efektyviai TEP reikalingas optimalus AuND paviršiaus išlinkimas, užtikrinantis trumpiausią atstumą tarp AuND ir fermento aktyviojo centro. Naujausia studija (Suzuki, Murata ir kiti 2012) parodė priešingą efektą – AuND ir bilirubino oksidazės sistemos su didesnėmis (70 nm) AuND sukuria aukštesnę deguonies bioredukcijos srovės tankį nei sistemos su mažesnėmis (7 ir 15 nm) AuND. Tai galėtų patvirtinti prielaidą, kad būtent optimalus AuND dydis yra svarbiausias veiksnys optimalaus atstumo tarp AuND ir fermento aktyviojo centro susidarymui.

IŠVADOS

1. Naujai išgryninta *Trichaptum abietinum* lakazė yra priskirtina aukšto redokso potencialo lakazių grupei, jos T1 vario centro redokso potencialas yra 714 ± 12 mV vs. NHE.
2. Lakazės iš *Trametes hirsuta* ir *Trichaptum abietinum*, taip pat žmogaus ceruloplazminas, gali vykdyti tiesioginę elektronų pernašą tarp aktyviojo centro ir aukso nanodalelių paviršiaus.
3. Paviršinio stiprinimo Ramano spektroskopijos matavimai leidžia teigti, kad kai kurios ant aukso nanodalelių adsorbuotų lakazių amino rūgštys keičia orientaciją į aukso paviršių keičiant elektrodo potencialą, tačiau T1 vario centro signalų nebuvo nustatyta.
4. Elektronų pernaša priklauso nuo aukso nanodalelių dydžio. Lakazės, adsorbuotos ant vidutinio dydžio (40 – 50 nm) aukso nanodalelių, pasižymi greitesne elektronų pernaša nei adsorbuotos ant didesnių (70 – 90 nm) aukso nanodalelių. Aukso nanodalelių - lakazės sistemose, naudojant optimalaus dydžio nanodaleles ir atitinkamai *Trichaptum abietinum* ir *Trametes hirsuta* lakazes, heterogeninės elektronų pernašos konstantos siekia 45 s^{-1} ir 11 s^{-1} .
5. Ant aukso nanodalelių adsorbuotos *Trametes hirsuta* ir *Trichaptum abietinum* lakazės katalizuoja tiesiogine elektronų pernaša pagrįstą deguonies bioredukciją. Maksimali bioelektrokatalitinė srovė yra ribojama adsorbuoto fermento katalitinio aktyvumo arba heterogeninės elektronų pernašos atitinkamai *Trichaptum abietinum* ar *Trametes hirsuta* lakazių atvejais. *Trichaptum abietinum* lakazė, adsorbuota ant aukso nanodalelių, praranda atsparumą inhibicijai fluoridu.

PUBLIKACIJOS

Straipsniai:

1. Haberska, K.; Vaz-Domínguez, C.; De Lacey, A.L.; Dagys, M.; Reimann, C.T.; Shleev, S. Direct electron transfer reactions between human ceruloplasmin and electrodes. *Bioelectrochemistry*. 2009, 76(1-2), 34-41.
2. Dagys, M.; Haberska, K.; Shleev, S.; Arnebrant, T.; Kulys, J.; Ruzgas, T. Laccase – gold nanoparticle assisted bioelectrocatalytic reduction of oxygen. *Electrochemistry Communications*. 2010, 12(7), 933-935.

Tezės:

1. Dagys, M.; Shleev, S.; Arnebrant, T.; Niaura, G.; Kulys, J.; Ruzgas, T. Bioelectrocatalysis of oxygen reduction with *Trametes hirsuta* laccase immobilized on gold nanoparticles. Oxizymes & 9th International Symposium on Peroxidases, Leipzig 2010.
2. Dagys, M.; Shleev, S.; Arnebrant, T.; Niaura, G.; Kulys, J.; Ruzgas, T. Bioelectrocatalysis of oxygen reduction with *Trametes hirsuta* laccase immobilized on gold nanoparticles. 6th Annual Workshop of Biofilms – Research Center for Biointerfaces “Biomaterials – From Fundamentals to Market Application”, Malmö 2010.
3. Dagys, M.; Lamberg, P.; Shleev, S.; Niaura, G.; Bachmatova, I.; Marcinkeviciene, L.; Meskys, R.; Kulys, J.; Arnebrant, T.; Ruzgas, T. Direct electron transfer of laccase immobilized on gold nanoparticles of different diameters. 14th International Conference on Electroanalysis ESEAC 2012, Portoroz 2012.

Tarptautinės konferencijos:

1. Dagys, M.; Haberska, K.; Shleev, S.; Arnebrant, T.; Kulys, J.; Ruzgas, T. Gold nanoparticle assisted bioelectrocatalytic reduction of oxygen by *Trametes hirsuta* laccase. 15th International Student and Young Scientists conference „Chemistry and Chemical Technology 2010“. Faculty of Chemistry, Vilnius University. Vilnius, 2010 05 07.
2. Dagys, M.; Shleev, S.; Arnebrant, T.; Niaura, G.; Kulys, J.; Ruzgas, T. Bioelectrocatalysis of oxygen reduction with *Trametes hirsuta* laccase immobilized on gold nanoparticles. Oxizymes & 9th International Symposium on Peroxidases, Leipzig, Germany, 2010 06 14 – 16.
3. Dagys, M.; Shleev, S.; Arnebrant, T.; Niaura, G.; Kulys, J.; Ruzgas, T. Bioelectrocatalysis of oxygen reduction with *Trametes hirsuta* laccase immobilized on

gold nanoparticles. 6th Annual Workshop of Biofilms – Research Center for Biointerfaces “Biomaterials – From Fundamentals to Market Application”, Malmö, Sweden, 2010 10 13 – 15.

4. Dagys, M.; Lamberg, P.; Shleev, S.; Niaura, G.; Bachmatova, I.; Marcinkeviciene, L.; Meskys, R.; Kulys, J.; Arnebrant, T.; Ruzgas, T. Direct electron transfer of laccase immobilized on gold nanoparticles of different diameters. 14th International Conference on Electroanalysis ESEAC 2012, Portoroz, Slovenia, 2012 06 03 – 07.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti savo darbo vadovui prof. habil. dr. Juozui Kuliui už pagalbą ruošiant daktaro disertaciją ir atliekant tyrimus.

Taip pat esu dėkingas prof. dr. Tautgirdui Ruzgui ir doc. dr. Sergey Shleev, kaip ir visam Malmö universiteto Visuomenės ir sveikatos fakulteto Biomedicinos laboratorinių mokslų departamentui, kuriam vadovauja prof. dr. Thomas Arnebrant, už pagalbą, paramą ir galimybę atlikti tyrimus šioje įstaigoje, taip pat už *Trametes hirsuta* lakazę.

Noriu padėkoti dr. Irinai Bachmatovai ir dr. Liucijai Marcinkevičienei iš VU Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus, vadovaujamo dr. Rolando Meškio, už *Trichaptum abietinum* lakazę.

Dėkoju habil. dr. Gediminui Niaurai už pagalbą atliekant paviršinio stiprinimo Ramano spektroskopijos eksperimentus.

Esu dėkingas dr. Alejandro Barrantes už pagalbą atliekant elipsometrijos eksperimentus.

Dėkoju dr. Reginai Vidžiūnaitei už pagalbą nustatant *Trichaptum abietinum* lakazės katalitines savybes. Taip pat esu dėkingas visam Fermentų chemijos skyriaus kolektyvui (ypač dr. Lidijai Tetianec ir Irinai Bratkovskajai) už moralinę ir profesinę pagalbą.

Taip pat dėkoju Lietuvos Mokslo Tarybai ir Marie Curie Actions – Research Fellowship programai už finansinę paramą stažuotėms Malmö universitete.

Esu dėkingas savo šeimai ir artimiesiems už asmeninę paramą.

Abstract

In this work bioelectrocatalytic functions of multicopper oxidases adsorbed on gold nanoparticles are studied. As multicopper oxidases, laccases and human ceruloplasmin are used. The enzymes have been employed in electrochemical systems consisting of gold electrodes covered by gold nanoparticles and particular enzymes, ensuring efficient direct electron transfer between gold nanoparticles and active centres of multicopper oxidases. For the first time direct electron transfer between gold nanoparticle and active centre of laccase has been reported. Laccases from *Trametes hirsuta* and *Trichaptum abietinum*, also human ceruloplasmin, exhibited direct electron transfer between active centres of the enzyme and gold nanoparticles, meanwhile the mentioned laccases exhibited efficient direct electron transfer based oxygen bioreduction on electrode surface. Heterogeneous electron transfer rate in gold nanoparticle - laccase bioelectrocatalytic systems depended on nanoparticle size. In general larger diameter (60 – 90 nm) gold nanoparticle systems exhibited slower oxygen bioreduction than medium sized (40 – 50 nm) gold nanoparticle systems. Heterogeneous electron transfer constants reached as high as 45 s^{-1} and 11 s^{-1} in *Trichaptum abietinum* and *Trametes hirsuta* laccase systems, respectively.

Direct electron transfer between laccase and gold nanoparticles mechanism has also been studied. It was discussed that T1 site is not detectable at gold nanoparticle surface, whereas potential dependent enzyme reorientation was evident based as revealed by surface enhanced Raman spectroscopy measurements. Several changes of *Trichaptum abietinum* laccase catalytic properties upon adsorption on gold nanoparticles have been revealed. It was discussed that probably the optimum curvature of gold nanoparticles are responsible for formation of most efficient direct electron transfer based bioelectrocatalytic systems.

Curriculum vitae

Vardas, pavardė: Marius Dagys
Gimimo data ir vieta: 1983 m. birželio mėn. 10 d., Kaunas
Adresas: Kovo 11 – osios 47 – 36, Grigiškės, Vilniaus m.sav.
Telefonas: (+370) 613 91 030
E-paštas: marius.dagys@bchi.vu.lt

Išsilavinimas:

2007 – 2011 Doktorantūros studijos, Vilniaus universiteto Biochemijos institutas, Vilnius
2005 – 2007 Magistrantūros studijos, Vilniaus universiteto Chemijos fakultetas, Vilnius
2001 – 2005 Bakalauro studijos, Vilniaus universiteto Chemijos fakultetas, Vilnius

Darbo patirtis:

2011 10 03 iki šiol Tyrėjas, UAB „Lietuvos tyrimų centras“, Gedimino pr. 2 / Odminių g. 1, LT-01103, Vilnius
2011 10 03 iki šiol Vyr. specialistas, Vilniaus universiteto Biochemijos institutas, Vilnius
2007 10 01 – 2011 09 31 Vyr. laborantas, Vilniaus universiteto Biochemijos institutas, Vilnius

Stažuotės:

2010 08 15 - 2010 11 15 Stažuotė Malmö universiteto Visuomenės ir Sveikatos fakultete Laboratorinių Biomedicinos mokslų departamente Švedijoje, finansuota Lietuvos Mokslo Tarybos.
2009 12 14 – 2009 12 20 Stažuotės Malmö universiteto Visuomenės ir Sveikatos fakultete Laboratorinių Biomedicinos mokslų departamente Švedijoje, finansuotos kviečiančiosios organizacijos.
2009 09 13 – 2009 09 15
2008 04 01 – 2008 12 31 Stažuotė Malmö universiteto Visuomenės ir Sveikatos fakultete Laboratorinių Biomedicinos mokslų departamente Švedijoje, finansuota pagal Lundo universiteto Marie Curie Actions programą.

Mokslinės publikacijos:

1. Dagys, M.; Haberska, K.; Shleev, S.; Arnebrandt, T.; Kulys, J.; Ruzgas, T. Laccase - gold nanoparticle assisted bioelectrocatalytic reduction of oxygen. *Electrochemistry Communications* 2010, 12(7), 933 – 935.
2. Haberska, K.; Vaz-Dominguez, C.; De Lacey, A. L.; Dagys, M.; Reimann, C. T.; Shleev, S. Direct electron transfer reactions between human ceruloplasmin and electrodes. *Bioelectrochemistry* 2009, 76, (1-2), 34 - 41.
3. Tetianec, L.; Dagys, M.; Kulys, J.; Ziemys, A.; Meskys, R. Study of the reactivity of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase with heterocycle-pentacyanoferrate(III) complexes and the electron transfer path calculations. *Central European Journal of Biology* 2007, 2, (4), 502 - 517.
4. Dagys, M.; Tetianec, L.; Kulys, J. Investigation of the polyacrylamide – polyvinylimidazole – pentacyanoferrate(III) redox polymer as the electron mediator in the enzymatic assays. 9-th conference of Young Scientist Bioengineering and Bioinformatics, Technika, Vilnius, 2006, 27 - 33.
5. Dagys, M.; Tetianec, L.; Kulys, J.; Bachmatova, I.; Marcinkeviciene, J.; Investigation of the PQQ-dependent enzymes' reactions with various electron acceptors at steady-state conditions. 8-th conference of Young Scientist Bioengineering and Bioinformatics, Technika, Vilnius, 2005, 36 - 43.