

Vilniaus universitetas  
Fizikos fakultetas

Raminta Mazėtytė

**GLIUKOZĖS OKSIDAZĖS AKTYVUMO IR STABILUMO TYRIMAI**

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas  
Biofizikos studijų programa

Studentė

Raminta Mazėtytė

Leisti ginti

Darbo vadovas

Dr. Renata Karpič

Instituto/Centro direktorius/atstovas

Prof. Habil. Dr. Ričardas Rotomskis

Vilnius 2018

## TURINYS

Santrumpos.....	3
ĮVADAS.....	4
1 LITERATŪROS APŽVALGA .....	7
1.1 Gliukozės oksidazė.....	7
1.1.1 GOx fermento panaudojimo sritys .....	9
1.1.2 Gliukozės biojutikliai .....	10
1.1.3 Neinvaziniai gliukozės biojutikliai.....	11
1.2 Fermentų aktyvumas .....	13
1.3 Fermentinės reakcijos.....	16
1.4 Flavino adenino dinukleotidas.....	18
1.5 Pirolas ir polipirolas .....	21
1.6 Fermentų imobilizavimas .....	22
1.7 Jablonskio diagrama.....	22
1.7.1 Sugertis.....	23
1.7.2 Liuminescencija .....	24
2 TIRIAMOS MEDŽIAGOS .....	26
2.1 Tirti bandiniai.....	26
2.2 Tirpalų paruošimas.....	26
3 METODIKA.....	28
3.1 Sugerties spektrų matavimas .....	28
3.2 Fluorescencijos spektrų matavimas.....	28
3.3 Fluorescencijos relaksacijos trukmių matavimas .....	29
3.4 Ultrasparčiosios fluorescencijos relaksacijos trukmė registravimas .....	31
3.5 GOx aktyvumo nustatymo metodas .....	32
3.6 Kalorimetrinis GOx aktyvumo nustatymo metodas .....	34
4 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	36
4.1 FAD ir GOx spektroskopiniai tyrimai skirtingo rūgštingumo terpėse .....	36
4.2 Integralinio fluorescencijos intensyvumo kitimai 29 dienų laikotarpyje .....	41
4.3 Fluorescencijos relaksacijos trukmių kitimas.....	43
4.4 GOx aktyvumo tyrimas .....	48
4.5 GOx stabilumo tyrimas .....	51
PAGRINDINIAI REZULTATAI IR IŠVADOS: .....	56
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	57
SANTRAUKA .....	60
SUMMARY .....	62

## Santrumpos

BAM – biologiškai aktyvios medžiagos.

Da – atominės masės vienetas, kurio dydis lygus 1/12 izotopo  $^{12}\text{C}$  masės.

EC – Fermentų komisijos paskirtas numeris, Enzyme Commission santrauka.

FAD - flavino adenino dinukleotidas.

GA – Gliukono rūgštis

GLU – gliukozė.

GOx – gliukozės oksidazė.

pH – vandenilio potencialas, kuris yra vandenilio jonų ( $\text{H}^+$ ) koncentracijos tirpale matas, parodantis tirpalo rūgštingumą ar šarmingumą.

Ppy – polipirolas

Trp – Triptofanas.

Tyr – tirozinas.

$\lambda_{\text{ex}}$  – fluorescencijos žadinimo bangos ilgis.

## ĮVADAS

Cukrinis diabetas – viena iš sparčiausiai plintančių ligų pasaulyje. Remiantis tarptautinės diabeto federacijos duomenimis, 2017m. šia liga visame pasaulyje sirgo 425 milijonai žmonių, o 2045m. sergančiųjų skaičius padidės beveik 50% iki 629 milijonų [1].

Diabetas – tai lėtinė sutrikusios medžiagų apykaitos liga, kuriai būdingas nepakankamas insulino išskyrimas bei sutrikusi organizmo geba panaudoti gliukozę. Insulino trūkumas (1 tipo diabetas) arba sutrikusi insulino sekrecija (2 tipo diabetas) sukelia disbalansą organizmo veikloje bei didelį diskomfortą dėl invazinių priemonių būtinumo: insulino leidimasis į kūną bei nuolatinė gliukozės kiekio kontrolė [1]. Dažniausiai gliukozės kiekis yra nustatomas iš paciento kraujo mėginio. Per 10 metų laikotarpį sergantieji patiria net apie 30 000 dūrių. Nors šiuolaikinės adatos yra labai plonos, tačiau didelis dūrių dažnis sukelia nepageidaujamų simptomų: nuolat pažeidžiama kraujotakos sistema, sukliamas skausmas bei ilgai padidėja pirštų jautrumas ir infekcijų tikimybė.

Universalus neinvazinio jutiklio sukūrimas palengvintų daugybės diabetu sergančių žmonių kasdienybę bei būtų naudingas biotechnologiniams matavimams. Sukūrus technologiją leidžiančią nustatyti gliukozės koncentraciją panaudojant įvairius kūno skysčius (ašaras, prakaitą, šlapimą, seiles, audinių skystį), būtų galima neinvaziškai bei be jokio skausmo nustatyti gliukozės kiekį kraujyje ne tik realiu laiku, bet ir registruoti koncentracijos kitimą laike [2].

Gliukozės oksidazė (GOx) yra flavoproteinas, kuris kaip fermentas randamas kai kuriose bakterijose ir eukariotuose. GOx yra patogus biotechnologijos įrankis, kai reikia nustatyti gliukozės koncentraciją biologiniuose objektuose ar terpėse [3]. Siekiant sukurti neinvazinį biojutiklį GOx pagrindu, reikia suprasti šio fermento veikimą, susijusį su artimos aplinkos įtaka. Nepaisant didėjančio GOx tyrimų skaičiaus, yra pakankamai mažai informacijos apie šio fermento makromolekulinius kitimus dėl terpės rūgštingumo (pH) bei temperatūros pokyčių [4].

Šio darbo metu buvo tiriamas GOx ir flavinadenindinukleotido (FAD) spektroskopinių savybių kitimas skirtingo rūgštingumo terpėse: trijuose skirtinguose buferiniuose tirpaluose, kurių pH vertės kito intervale [2÷9]. Tyrimo metu buvo matuoti paruoštų bandinių stacionarios sugerties ir fluorescencijos spektrai bei fluorescencijos gesimo kinetikos pikosekundinėse ir nanosekundinėse laikų skalėse. Taip pat buvo stebima, kaip keičiasi GOx ir FAD spektroskopinės savybės laikui bėgant - nuo tirpalų pagaminimo praėjus 1, 8, 15, 22 ir 29 dienoms.

GOx fermento aktyvumas buvo nustatomas dviem skirtingais būdais. Spektrofotometrinis GOx aktyvumo nustatymo metodas remiasi fermentinės reakcijos metu vykstančiu benzochinono

virtimu į hidrochinoną. Hidrochinono susidarymas įvertinamas matuojant sugerties ties 290 nm kitimą laike [5]. Kalorimetrinis aktyvumo nustatymas atliekamas naudojant komerciškai įsigytą GOx aktyvumo tyrimo testą (MAK097). Atliekant tyrimus fermento aktyvumas nustatomas iš sugerties spektro kitimo ties 570nm bangos ilgiu. Apskaičiuoti fermento aktyvumai teikia papildomos informacijos apie GOx fermento kitimus 29-ų dienų laikotarpyje.

Siekiant kuo ilgiau išsaugoti fermento aktyvumą, galimas jo imobilizavimas į polimero matricą [6]. GOx stabilumo tyrimo metu kaip imobilizavimo matrica buvo naudojamas polipirolas. 29-ų dienų laikotarpyje buvo stebimas polipirolo susidarymas, kuris stipriai paveikė GOx ir FAD spektroskopines savybes bei lėmė kompozitų su FAD (Ppy/FAD) bei kompozitų su GOx (Ppy/GOx) susidarymą.

**Darbas atliktas** 2016-2018 metais Fizinių ir technologijos mokslų centro (FTMC) Molekulinių darinių fizikos skyriuje, bendradarbiaujant su VU chemijos ir geomokslų fakulteto Fizikinės chemijos katedra.

### **Darbo tikslas**

Šio darbo tikslas nustatyti gliukozės oksidazės aktyvumą bei susieti jo pokyčius su spektroskopinių savybių kitimais. Nustatyti polipirolo įtaką GOx fermento stabilumui.

### **Darbo užduotys:**

1. Paruošti skirtingus buferinius ir tiriamus (GOx, FAD) tirpalus bei užregistruoti jų sugerties ir fluorescencijos spektrus bei gesimo kinetikas skirtingose laiko skalėse.
2. Apibendrinti GOx ir FAD spektroskopinių savybių kitimus 29 dienų laikotarpyje.
3. Nustatyti GOx fermento aktyvumus 29 dienų laikotarpyje bei susieti aktyvumo pokyčius su spektroskopinių savybių kitimais.
4. Ištirti polipirolo įtaką GOx fermento stabilumui, esant optimaliam rūgštingumui (pH 6).

**Darbo aprobacija.** Šio darbo medžiaga buvo skelbta viename straipsnyje, viename žodiniame konferencijos pranešime (asmeniškai) ir šešiuose stendiniuose konferencijų pranešimuose.

### **Straipsniai – 1**

1. Urte Bubniene, Raminta Mazetyte, Almira Ramanaviciene, Vidmantas Gulbinas, Arunas Ramanavicius, and Renata Karpicz, *Fluorescence Quenching Based Evaluation of Glucose Oxidase Composite with Conducting Polymer – Polypyrrole*, 2018, The Journal of Physical Chemistry C, 122, 9491 – 9498.

### **Žodinis pranešimas konferencijoje (asmeniškai) – 1**

- 1 **R. Mazėtytė.** U,Bubnienė, A, Ramanavičius, R, Karpič; *pH influence on spectroscopic properties of glucose oxidase*, 60<sup>th</sup> International conference for students of physics and natural sciences „Open Readings“, 2017, 55 psl.

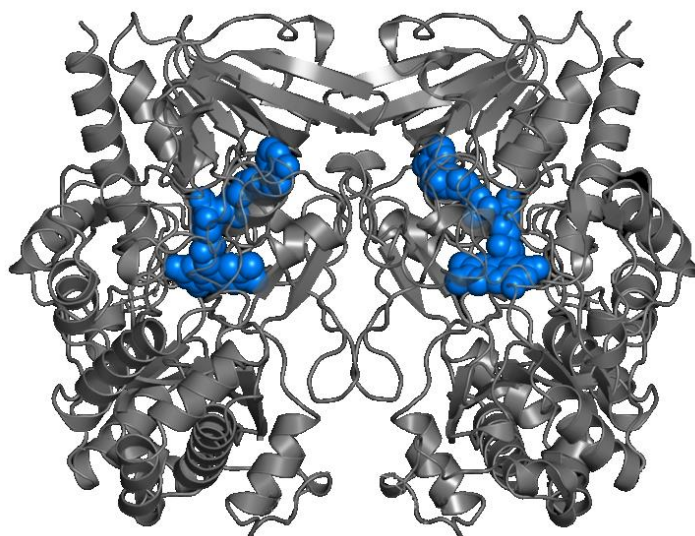
### **Stendiniai pranešimai konferencijose – 6**

- 1 **R. Mazetyte,** U. Bubniene, V. Gulbinas, A. Ramanavicius, R. Karpicz, *Fluorescence quenching based evaluation of glucose oxidase composite with polypyrrole*, XI International Conference "Electronic Processes in Organic and Inorganic Materials" (ICEPOM-11), 2018, Ivano-Frankivsk, Ukraine, 72 psl.
- 2 **R, Mazėtytė,** U,Bubnienė, A, Ramanavičius, R, Karpič, *Spectroscopic properties and activity of glucose oxidase*, 61<sup>st</sup> International conference for students of physics and natural sciences „Open Readings“, 2018, Vilnius, 260psl.
- 3 **R, Mazėtytė,** U,Bubnienė, A, Ramanavičius, R, Karpič, *Impact of Polypyrrole on Fluorescence Quenching of Glucose Oxidase*, International Conference of Life Sciences „The COINS“, 2018, Vilnius, 82 psl.
- 4 **R, Mazėtytė,** U,Bubnienė, A, Ramanavičius, R, Karpič, *pH influence on spectroscopic properties of glucose oxidase*, 10<sup>th</sup> Nanoconference “Current Trends in Electrochemistry and Material Sciences“, 2017, Vilnius, 22 psl.
- 5 **R, Mazėtytė,** U,Bubnienė, A, Ramanavičius, R, Karpič, *pH daroma įtaka gliukozės oksidazės spektroskopinėms savybėms*, 42-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija, 2017, Vilnius, 314 psl.
- 6 **R, Mazėtytė,** U,Bubnienė, A, Ramanavičius, R, Karpič; *pH influence on spectroscopic properties of glucose oxidase*, International Conference of Life Sciences „The COINS“, 2017, Vilnius, 86 psl.

# 1 LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Gliukozės oksidazė

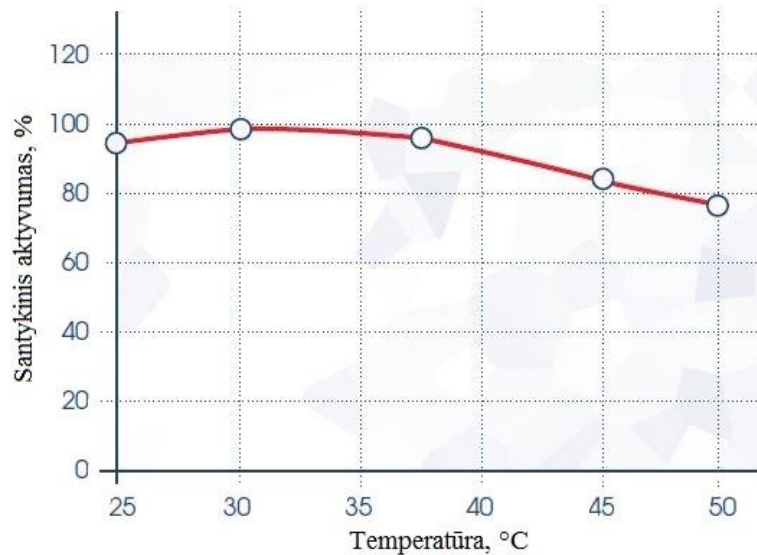
Gliukozės oksidazė (GOx) yra – bakterijų ir žemesniųjų eukariotų fermentas, kurio erdvinė struktūra vaizduojama 2.1 pav. GOx lemia vandenilio peroksido ( $H_2O_2$ ) susidarymą, kuris suteikia antibakterinį aktyvumą. Dažniausiai GOx yra išgaunama iš pelėsinio grybelio *Aspergillus niger* [7]. GOx fermentui, kaip ir kitiems biologiniams katalizatoriams būdinga tai, kad fermentinės reakcijos metu didėja tik reakcijos greitis, o reakcijos pusiausvyra nesikeičia (fermento kiekis išlieka nepakitęs).



2.1 pav. Gliukozės oksidazės struktūra. Adaptuota pagal [8].

Vienos iš svarbiausių fermentų apibūdinančių savybių yra selektyvumas ir fermentinis aktyvumas, kuris gali būti reguliuojamas. Fermento selektyvumas substratui priklauso nuo erdvinio substrato prijungimo prie fermento aktyviojo centro. Tuo tarpu fermento aktyvumą lemia jo struktūra, kuriai kintant, pakinta ir fermentinės savybės. Dažnai aktyvumą lemia nebaltyminė prostetinė grupė – kofaktorius. Kofaktorius gali būti sudarytas iš metalų jonų arba iš organinių junginių, dar vadinamų kofermentais. Fermentų aktyvumui didelę įtaką daro ir aplinkos sąlygos: terpės šarmingumo, temperatūros, slėgio pokyčiais [9].

GOx katalizinės gebos priklausomybė nuo aplinkos temperatūros yra pavaizduota 2.2 pav. Optimali temperatūra – tai temperatūra, kuriai esant fermentinė reakcija vyksta greičiausiai. GOx fermentui optimali temperatūra –  $30^{\circ}C$  [10]. Viršijus optimalią temperatūrą, reakcijos greitis mažėja dėl didėjančio chaotiško molekulių judėjimo. Molekulėms judant chaotiškiau, pakinta fermento tretinė struktūra ir aktyviojo centro erdvinė struktūra. Jei temperatūra didinama ir toliau, prasideda fermento denatūracija ir fermentinės reakcijos greitis staigiai sumažėja [9].



2.2 pav. GOx santykinio aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros. Adaptuota pagal [10].

Selektyvus tik tam tikrų substratų ar reakcijų katalizavimas lemia didelę fermentų įvairovę. Siekiant sistemingai suskirstyti fermentus nuo 1961 m. pradėta vartoti fermentų klasifikacija, kurios pagrindas yra fermento katalizuojama cheminė reakcija. Visi fermentai klasifikuojami į 6 klases. Toliau klasės skirstomos į poklasius ir galiausiai kiekvienam fermentui priskiriamas unikalus EC numeris [11].

Oksidazės priskiriamos plačiausiai gamtoje paplitusiai oksireduktazių klasei, kurių žymėjimo numeris yra EC 1.1.3. Šie fermentai katalizuoja oksidacijos-redukcijos reakcijas. Nuo oksiduojamo substrato pernešant  $H^+$  joną deguoniui ( $O_2$ ), gali susidaryti vanduo ( $H_2O$ ) arba vandenilio peroksidas ( $H_2O_2$ ) [9].

GOx fermentas (EC 1.1.3.4) yra homodimerinis glikoproteinas sudarytas iš dviejų subvienetų, kurių molekulinės masės po 80 kDa. Pirminėje subvieneto struktūroje yra 583 aminorūgščių liekanos, išsidėsčiusios polipeptidinėje grandinėje. Tarp fermento molekulių fragmentų susiformuoja du disulfidiniai ryšiai, o fermento sudėtyje yra dvi sulfhidrilinės grupės bei du kofermentai. Kiekvienas subvienetas turi nekovalentiškai prijungtą kofermentą – FAD [12]. Pavienių molekulių tyrimai parodė, kad 4 Trp ir 9 Tyr liekanos yra išsidėstę FAD prijungimo srityje [4]. Fermentui pakeičiant savo struktūrą, FAD yra išlaisvinamas iš aktyviojo centro, o fermentas virsta apofermentu ir praranda savo aktyvumą [12].

GOx fluorescuoja dėl fermente esančių fluoroforų: FAD, triptofano bei tirozino. Gliukozės oksidazės sugerties spektre yra taip pat dvi FAD sugerties juostos ties 380 nm ir 450 nm bangos ilgiais [13].



### 1.1.1 GOx fermento panaudojimo sritys

GOx tyrimų svarba susijusi su gausiu ir svarbiu šio fermento pritaikymu ir panaudojimu maisto bei gėrimų pramonėje, farmacijoje, klinikinėje chemijoje, biotechnologijose [4], medicinoje, tekstilės ir energetikos pramonėje [14].

Plačiomis taikymo galimybėmis pasižymintis GOx yra svarbus tuo, kad jį galima imobilizuoti, fermentas turi palankias elektrochemines savybes. Taip pat GOx substratas (gliukozė) yra pigus ir nors pats fermentas yra komerciškai brangus, tačiau reikalingi maži jo kiekiai. Kita svarbi savybė yra ta, kad fermentinės reakcijos metu, fermentas išlieka nepakitęs, tad reakcijos vyksta tol kol yra gliukozės [14].

**Panaudojimas maisto pramonėje.** Kepinių pramonėje GOx yra naudojama kaip efektyvus oksidantas duonos gamyboje. Fermentinės reakcijos metu susidaręs  $H_2O_2$  kiekis paverčia tešlą elastingesne bei klampensne. Taip pat stebimas ir tešlos sausinimo efektas. GOx naudojama kaip maisto priedas kartu su kitais junginiais, kurie padeda pagerinti kepinų kokybę. GOx fermento, askorbo rūgšties, ir alfa-amilazės naudojimas miltų gamyboje, sumažina trupinių kietumą ir tvirtumą. Naudojant GOx fermentą gliuteno neturinčiuose kepinuose, padidinamas duonos tūris [14].

Gėrimų pramonėje GOx naudojama siekiant sumažinti alkoholio kiekį vyno gamybos metu. Fermentas sunaudoja perteklinį gliukozės kiekį, kuris būtų virtęs alkoholiu anaerobinio fermentavimo metu. Taip pat susidaręs  $H_2O_2$  suteikia antibakterinį poveikį bei sumažina fermentavimo metu susidarančių mikroorganizmų kiekį. Jei  $H_2O_2$  yra nepageidaujamas, tai įdėjus mažą katalazės fermento kiekį  $H_2O_2$  yra suskaldomas į deguonį bei vandenį.

Kiaušinių miltelių pramonėje GOx naudojama siekiant pašalinti gliukozės ir deguonies kiekį, taip siekiama prailginti kiaušinių miltelių galiojimo laiką. Susidaręs  $H_2O_2$  padeda sunaikinti nepageidaujamus mikroorganizmus, kurie yra skystuose kiaušiniuose.

**Panaudojimas tekstilės ir energetikos pramonėje.** Fermentinis balinimas tekstilės pramonėje pasižymi natūralaus pigmento spalvos sumažinimu. Naudojant GOx išsiskiria  $H_2O_2$ , kuris yra pats efektyviausias šioje pramonėje [15].

Biokuro gamyboje GOx fermentas naudojamas kaip biokatalizatorius generuojantis elektros srovę iš gliukozės. Šios fermentu besiremiančios sistemos yra plačiai tyrinėjamos dėl galimo panaudojimo implantuojamuose prietaisuose [16].

**Panaudojimas medicinoje.** Gliukozės ir GOx fermentinės reakcijos metu susidaro gliukono rūgštis (GA), kuri lemia didelį vaidmenį skirtingose maisto industrijose ir yra naudojama kaip

spalvos stabilizatorius, kildinimo medžiaga, antioksidantas. Pieno pramonėje GA naudojama sūrio varškės formavime bei aliuminio skardinių valyme. Na, Ca, Zn, Fe druskos gaunamos iš cheminių reakcijų su GA yra naudojamos įvairių vaistinių preparatų gamyboje. Natrio gliukonatas gali būti naudojamas kartumo pašalinimui iš maisto produktų [14].

Nors GA galima pagaminti biochemiškai, elektrochemiškai, bioelektrochemiškai, tačiau fermentinis GA gavimo būdas (parinkus tinkamiausias aplinkos sąlygas ir reagentų koncentracijas) yra ekonomiškiausias bei efektyviausias [14].

Dauguma maisto produktų savyje turi deguonies, kuris skatina bakterijų augimą. Maisto produktuose paruoštuose ilgam laikymui skardinėse, buteliuose labai svarbu panaikinti anaerobines sąlygas- pašalinti deguonį. Taip pat GOx dažnai naudojamas kaip antimikrobinė medžiaga (GOx ir laktroperoksidazė yra naudojamos burnos priežiūroje) [14].

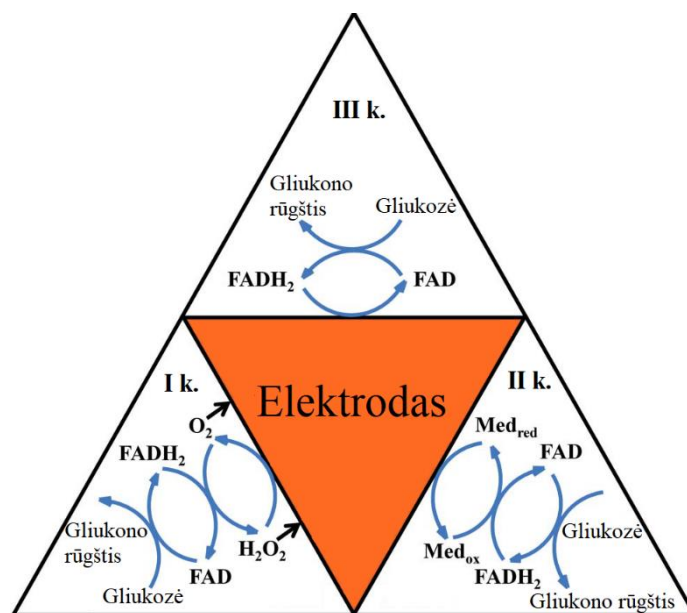
Taip pat Gox naudojamas ir atliekant įvairius mokslinius tyrimus. Dažnai šis fermentas naudojamas pavienių molekulių fluorescencijos mikroskopiniuose tyrimuose siekiant iš bandomųjų pašalinti deguonį. Deguonis stipriai gesina pavienių molekulių fluorescenciją, tad šis fermentas padeda gauti patikimesnį ir stipresnį signalą.

### **1.1.2 Gliukozės biojutikliai**

GOx biojutikliai yra dažniausiai naudojami maisto pramonėje bei klinikiniuose tyrimuose. GOx plačiai naudojama dėl ypač didelio selektyvumo gliukozei ir atsparumo geležies junginiams [17].

Šiomis dienomis populiariausi gliukozės jutikliai cheminį signalą apie gliukozės kiekį kraujo laše paverčia elektriniu signalu bei konvertuoja jį į koncentracijos išraišką. Tačiau tokio veikimo principo jutikliai yra invaziniai ir suteikia informaciją tik apie realiu matavimo laiku esantį gliukozės kiekį kraujyje.

Elektrocheminiai GLU biojutikliai skirstomi pagal veikimo principą į tris kartas, kurių schematiški veikimo principai pavaizduoti 2.3 pav. I kartos biojutikliuose gliukozės kiekio nustatymas remiasi deguonies arba H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentracijos kitimo matavimu, nes vienos gliukozės molekulės oksidavimo metu susidaro viena H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekulė. II kartos jutikliuose siekiant gauti patikimesnius rezultatus yra naudojami tarpininkai (schemoje žymimi Med), kurie padeda tiksliau užregistruoti elektronų srautus. III kartos jutikliai yra patys tiksliausi, nes juose yra registruojamas tiesioginis elektronų perdavimas iš fermento į elektrodą [17].



2.3 pav. Skirtingų kartų biojutiklių registruojami gliukozės oksidacijos mechanizmai. Adaptuota pagal [17].

### 1.1.3 Neinvaziniai gliukozės biojutikliai

Skirtingos mokslininkų grupės visame pasaulyje ieško būdų kaip neinvaziškai nustatyti gliukozės koncentraciją panaudojant įvairius kūno skysčius. Yra žinoma, kad gliukozės koncentracija kraujyje yra proporcinga gliukozės koncentracijai ašarose, prakaitė, šlapime, seilėse ir audinių skystyje. Sukūrus technologiją leidžiančią tirti žmogaus kūno skysčius būtų galima be jokio skausmo nustatyti gliukozės kiekį kraujyje ne tik realiu laiku, bet ir registruoti koncentracijos kitimą laike [2].

Siekiant sukurti neinvazinį jutiklį ir jį pritaikyti kasdieniniam naudojimui yra labai svarbu atsižvelgti į keliamus reikalavimus: nesudėtingas jutiklio valdymas, mėginio paėmimas turi būti nebrangus bei sukeliantis kuo mažesnę diskomfortą, nešiojamas bei žmogaus organizmui nekenksmingas detektavimo elementas, tikslus ir greitas gliukozės koncentracijos nustatymo principas [18].

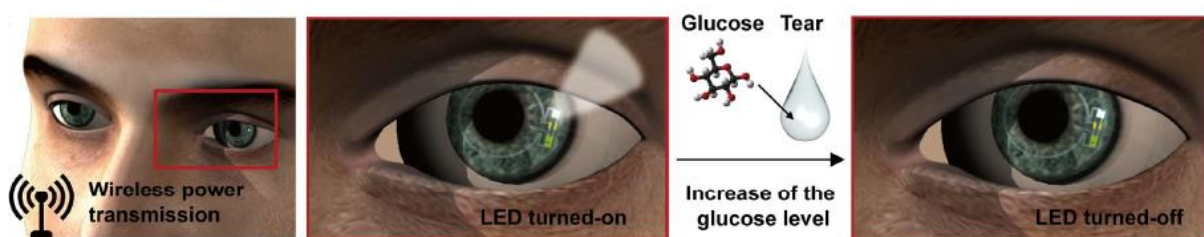
Tad neinvazinio gliukozės biojutiklio veikimas gali remtis dviem skirtingomis aptikimo technologijomis: chemine arba optine. Cheminio signalo aptikimas susijęs su gliukozės oksidazės (GOx) fermento imobilizavimu ant elektrodo paviršiaus. GOx fermentas katalizuoja gliukozės oksidaciją ir reakcijos metu susidarę produktai teikia informaciją apie įvykusių reakcijų skaičių, kuris yra proporcingas gliukozės koncentracijai. Siekiant sukurti tokio tipo jutiklį yra svarbu tiksliai aptikti gliukozės kiekį kūno skysčiuose bei žinoti tikslią priklausomybę tarp išmatuoto ir realaus gliukozės kiekio kraujyje [18].

Daug pastangų dedama ir į optinės detektavimo sistemos kūrimą, kuri leistų per šviesai laidžius audinius (pirštą ar ausies kamputį) neinvaziškai išmatuoti gliukozės koncentraciją

kapiliaruose. Spektroskopiniai tyrimai yra visiškai neskausmingi, nealergizuoja odos paviršiaus ir yra atliekami greitai. Tačiau yra daugybė sunkumų, kuriuos būtina įveikti kuriant tokio tipo detektavimo įrenginius. Vienas iš pagrindinių sunkumų yra biologinių audinių sugertis bei sklaida, kuri paveikia tiek zondavimo, tiek detektavimo signalus bei kartu stipriai priklauso nuo žmogaus fiziologijos (riebalinio audinio storio, vaskuliarizacijos) [19].

Gliukozės kiekio nustatymas iš seilių mėginio yra visiškai neskausmingas, bet leidžia nustatyti tik realiu matavimo laiku esančią koncentraciją. Tokio tipo jutikliai labiausiai tiktų vaikams, diabeto profilaktikai ar sergant antrojo tipo diabetu. Svarbu paminėti, kad jutiklis turi būti individualiai pritaikytas pacientams, nes seilių klampa tarp skirtingų pacientų gali skirtis. Klampumas taip pat stipriai priklauso nuo aplinkos sąlygų (temperatūros, drėgmės) bei fiziologinės žmogaus būklės. Siekiant kuo tiksliau nustatyti gliukozės koncentraciją kraujyje reikia atlikti išsamesnius tyrimus apie gliukozės koncentracijos ryšį kraujyje ir seilėse skirtingo amžiaus grupėse, priklausomybę nuo lyties bei asmens sveikatos būklės [18].

Šlapimo mėginio analizė leido detektuoti gliukozės kiekį dar 1908m. Analizei buvo naudojamas vario reagentas, kuris reaguodamas su šlapime esančiu cukrumi pakeisdavo tirpalo spalvą ir taip pagal pateiktą spalvų gamą buvo nustatoma gliukozės koncentracija. Metodas nebuvo labai patogus bei tikslus, bet tai buvo pirmasis bandymas stebėti bei nustatyti gliukozės kiekį. Šiuo metu tobulinamos optinio jutiklio technologijos, kurios fiksuodamos sidabro nanodalelių sugerties spektro kitimą bei leistų tiksliai nustatyti gliukozės koncentraciją šlapime. Šiuo atveju taip pat susiduriame su neatitikimu tarp gliukozės koncentracijos kraujyje ir šlapime, bei kiekvieno organizmo individualumu [20].



2.4 pav. Išmaniojo lęšio modelis. Adaptuota pagal [21].

Vienas iš patogiausių būdų gliukozės koncentracijai nustatyti yra elektroniniai jutikliai, kurie įmontuojami į išmanųjį lęšį (2.4 pav.). Tokio tipo įrenginiai yra pranašūs tuo, kad galima nuolatos registruoti gliukozės kiekį ašarose bei informaciją siųsti tiesiai į mobilųjį telefoną. Tai pacientui leidžia tiksliau nustatyti reikalingą insulino kiekį bei koreguoti mitybą. Remiantis įvairiais moksliniais tyrimais yra nustatyta, kad sveiko žmogaus ašarose yra vidutiniškai 0.2 – 0.6 mM gliukozės, tačiau diabeto atveju koncentracija išauga iki 0.9 mM. Kadangi kraujyje esančios

gliukozės kiekis yra apie 30 kartų didesnis, tad kuriant jutiklį būtina atsižvelgti į koncentracijų diapazoną bei užtikrinti didelį jautrumą detektuojant mažus koncentracijos pokyčius [21].

Kitas plačiai tyrinėjimas ir pacientams patogus būdas - registruoti gliukozės difuziją odos paviršiuje arba jos koncentraciją prakaitu. Modeliuojami įrenginiai yra nešiojami, lengvai pritvirtinami ant odos paviršiaus bei nesuteikiantys diskomforto. Vieni iš patraukliausių pavyzdžių yra ant riešo nešiojamos išmaniosios apyrankės, auskarų pavidalo biojutikliai ar net tatuiruotės tipo jutikliai. Epiderminis elektrocheminis gliukozės kiekio nustatymas remiasi tarpaudininio skysčio bei prakaito sudėties analizavimu. Gliukozės aptikimas šiuose bioskysčiuose paremtas gliukozės difuzija iš kraujagyslių per endotelį bei prakaito liaukas, kuri atspindi gliukozės koncentraciją kraujyje. Tačiau difuzijos procesai yra pakankamai lėti, tad yra vėlinimo laikas tarp gliukozės koncentracijos padidėjimo kraujyje bei bioskysčiuose. Taip pat gliukozės kiekiai prakaitu ir tarpaudininiam skystyje yra tūkstantį kartų mažesni, tad dar nėra pakankamai tikslų jutiklių, kurie būti pardavinėjami rinkoje [22].

Nepaisant didėjančios paklausos, gausių skiriamų investicijų (finansavimų) bei visame pasaulyje vykdomų mokslinių tyrimų, nėra technologijos galinčios tiksliai aptikti labai mažas gliukozės koncentracijas kūno skysčiuose ar odos paviršiuose bei gautus rezultatus susieti su žmogaus individualumu.

## 1.2 Fermentų aktyvumas

Fermento aktyvumas išreiškiamas substrato arba susidariusio produkto koncentracijos pokyčiu per laiko vienetą. Dažniausiai jis vadinamas dydžiu U, kuris parodo koks kiekis fermento katalizuoja 1  $\mu\text{mol}$  substrato per vieną minutę optimaliomis sąlygomis [9].

Fermentų veikimą gali reguliuoti prie fermento molekulės prisijungusios mažos molekulinės masės medžiagos, vadinamos efektoriais. Efektoriai gali būti teigiami – aktyvikliai arba neigiami – slopikliai. Aktyvikliai ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  ir kt) prisijungia prie ne tokio aktyvaus fermento, pakeisdami jo konformaciją, tuomet susidaro kataliziškai aktyvi fermento forma. Slopikliai (neorganinės druskos, metabolitai ir kt.) taip pat gali pakeisti fermento konformaciją ir lemti sumažėjusį katalizinį aktyvumą. Šie reiškiniai labai svarbūs medžiagų apytakos procesų reguliavime. Taip pat slopikliai gali užimti substrato vietą fermento aktyviajame centre ir taip blokuoti substrato prisijungimą. Tokiu atveju fermentas negali katalizuoti substrato virtimo produktu, tad jo aktyvumas yra slopinamas [9].

Fermento slopinimas gali būti grįžtamasis arba negrįžtamasis procesas. Negrįžtamo slopinimo atveju, fermentas nesugeba atstatyti savo katalizinę gebą, o susidaręs slopiklio ir fermento

kompleksas lėtai disocijuoja. Grįžtamojo slopinimo atveju, sumažinus slopiklio koncentraciją, disociacija vyksta lengvai [9].

### **Fermentų aktyvumo tyrimo metodai**

Fermentinių reakcijų tyrimai remiasi substrato koncentracijos mažėjimo arba produkto susidarymo matavimais tam tikrame laiko intervale. Yra keletas skirtingų metodų, kurių taikymas priklauso nuo specifinių reakcijų, kurias katalizuoja fermentai. Visi fermentų tyrimų metodai skirstomi į du tipus: fiksuoto laiko ir nuolatinio laiko [23].

Fiksuoto laiko tyrimuose matuojama fermento aktyvumas nustatytame laiko periode, kuris susijęs su susidariusio produkto arba su sunaudotu produkto kiekiu. Šis metodas remiasi fermentinės reakcijos nutraukimu (po tam tikro laiko) ir susidariusio produkto matavimu. Fermentinės reakcijos sustabdymui, naudojamos tam tikros medžiagos (stiprios rūgštys, inhibitoriai) arba pakeičiamos aplinkos sąlygos (didinama temperatūra), siekiant denatūruoti fermentą [24].

Nuolatinio matavimo tyrimas atliekamas siekiant įvertinti susidariusį produktą arba sumažėjusį substrato kiekį realiu laiku. Siekiant gauti geriausius fermento aktyvumo matavimų rezultatus, fermentui optimalus pH turi būti nustatytas iki tyrimo vykdymo. Nepertraukiamo tyrimo trūkumas yra tas, kad gali būti matuojama tik viena reakcija [25]. Šis metodas yra daug patogesnis, nes visi rezultatai matomi iš karto. Tačiau ne visų fermentų aktyvumas gali būti stebimas šiuo metodu. Šiuo būdu paprasčiausia tirti fermentų kitimus, kurie lemia sugerties, fluorescencijos spektrų, pH ar kitų fizikinių parametrų kitimus.

Fermentinių reakcijų vaizdinimui optiniais metodais dažniausiai taikoma sugerties ir fluorescencijos spektroskopija. Abu šie metodai remiasi molekulės elektroninės konfigūracijos pokyčiais. Kadangi energijos tarpas tarp sužadintos ir pagrindinės būsenos yra didelis, tad sugerties ir fluorescencijos matavimai gali būti vykdomi regimosios šviesos arba ultravioletinės spinduliuotės diapazone [26].

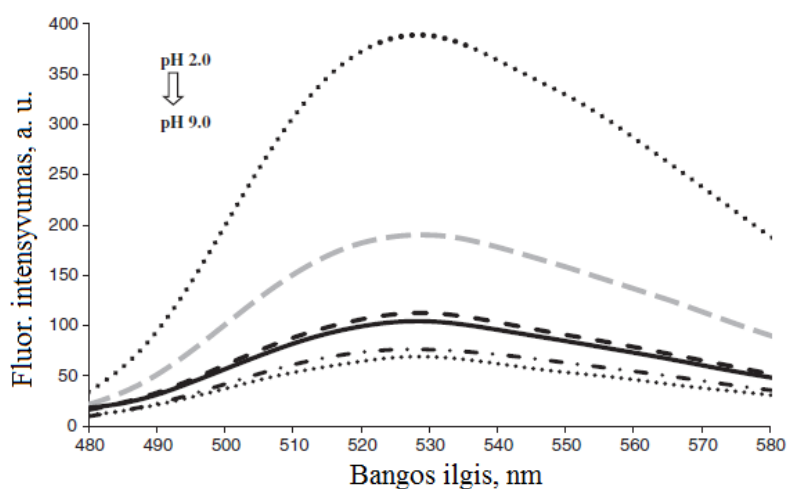
Spektrofotometrinis bei fluorimetrisis vaizdinimo būdas remiasi sugerties bei fluorescencijos spektrų kitimu laike. Ties tam tikru bangos ilgiu stebint spektrinės juostos intensyvumo didėjimą galima spręsti apie didėjančią susidarančio produkto koncentraciją. Nustačius juostos intensyvumo mažėjimą gauname informaciją apie substrato mažėjimą, kuris teikia informacijos apie fermentinės reakcijos greitį bei fermento aktyvumą [26].

## GOx aktyvumo priklausomybė nuo pH

Fermentų aktyvumo priklausomybę nuo pH sąlygoja baltymo funkcinių grupių jonizacijos pokyčiai, substrato joninės formos pasikeitimai, tiesioginis H<sup>+</sup> ir OH<sup>-</sup> jonų dalyvavimas reakcijoje. Dideli terpės pH pokyčiai gali pakeisti baltymo struktūrą [9].

GOx fermentas yra jautrus terpės rūgštingumo pokyčiams. Fermentui optimaliausiu rūgštingumu vadinama pH vertė, kuriai esant fermentinės reakcijos greitis yra maksimalus. Optimalus rūgštingumas priklauso nuo fermente esančių aminorūgščių liekanų. Net maži pH terpės pakitimai keičia katalizinių aminorūgščių krūvį, dėl kurio pasikeičia ir fermentinės reakcijos greitis [27]. GOx optimali pH terpė yra 5,5 – 6,0, tačiau veikimo intervalas yra nuo 4,0 iki 8,0 pH [10]. Terpei tapus stipriai rūgštine (pH < 3) arba stipriai šarmine (pH > 9), fermento molekulė praranda katalizinę gebą ir denatūruoja [27].

GOx struktūros ir konformacijos pokyčiai yra stebimi, esant skirtingiems tirpalo rūgštingumui ir siejami su FAD fluorescencijos kitimais. Didžiausias FAD fluorescencijos intensyvumas yra stebimas pH 2 buferiniame tirpale. Taip pat fluorescencijos intensyvumas mažėja didinant buferinio tirpalo pH. Fluorescencijos maksimumo padėties kitimas yra labai mažas. Palyginus optimalų pH su buferinio tirpalo pH verte, kai fluorescencijos intensyvumas buvo maksimalus, nustatyta, kad tirpale su pH 2 FAD fluorescencijos intensyvumas yra 4 kartus didesnis. Tokia intensyvi fluorescencija yra siejama su FAD struktūriniais pokyčiais. FAD fluorescencijos spektrų kitimai esant skirtingiems pH buferiniams tirpalams yra pavaizduoti 2.5 pav. FAD tirpalai buvo žadinami su  $\lambda_{ex}=450$  nm spinduliuote [4].



2.5 pav. FAD fluorescencijos spektrai skirtinguose pH buferiniuose tirpaluose. Adaptuota pagal [4].

Į pH pakitimus reaguoja ne tik FAD, bet ir Tyr bei Trp. Sužadinto Trp ( $\lambda_{\text{ex}} = 292 \text{ nm}$ ) liekanos intensyviausiai fluorescuoja esant pH 6, kai fluorescencijos maksimumas yra ties 351 nm. Tuo tarpu sužadinto Tyr ( $\lambda_{\text{ex}} = 274 \text{ nm}$ ) liekanos intensyviausiai fluorescuoja pH 7 buferiniuose tirpaluose, kai fluorescencijos maksimumas yra ties 350 nm. Abiejų aminorūgščių fluorescencijos intensyvumai mažėja rūgštėjant bei šarmėjant buferiniams tirpalams. Taip pat svarbu paminėti, kad rūgštinant buferinius tirpalus iki pH 4, fluorescencijos maksimumo padėtys pasislenka per 7 nm Trp ir 6 nm Tyr į trumpabangę sritį [4].

### 1.3 Fermentinės reakcijos

Fermentinę reakciją schematiškai galima aprašyti (2.1) lygtimi [9]:

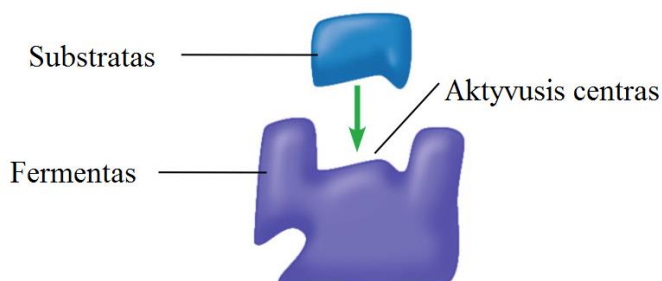


F – fermentas; S – substratas; P – produktas.

FS ir FP – atitinkamai susidaręs substrato, produkto bei fermento kompleksai.

Substratas – tai cheminis junginys, kurio struktūra pasikeičia fermentinės reakcijos metu. Produktas yra po fermentinės reakcijos susidaręs naujas junginys [27].

Vykstant fermentinėms reakcijoms substratas virsta produktu. Kadangi fermento molekulės yra daug kartų didesnės už substrato molekules, tai cheminės reakcijos vyksta ne visame paviršiuje, o tik tam tikroje fermento srityje. Sritis, kurioje vyksta fermentinės reakcijos, yra vadinama aktyviuoju centru. Aktyvųjį centrą sudaro aminorūgščių liekanos, kurios yra išsidėsčiusios įvairiose fermento pirminės struktūros vietose, bei kurių šoninės grupės yra chemiškai aktyvios. Formuojantis tretinei fermento struktūrai, polipeptidinė grandinė susivynioja ir joje esančios aminorūgščių liekanos priartėja viena prie kitos, taip sudarydamos lokalią aktyviojo centro vietą fermento molekulėje [9]. Fermento ir substrato sąveika yra pavaizduota 2.6 pav.



2.6 pav. Fermento ir substrato komplekso susidarymas. Adaptuota pagal [28].

Ryšiai susidarantys formuojant fermento ir substrato kompleksą gali būti skirtingi: elektrostatinė sąveika, vandeniliniai ryšiai, hidrofobinė sąveika, van der Valso jėgos. Susijungimas negali būti stiprus, nes fermentas tik padeda substratui virsti produktu [29].

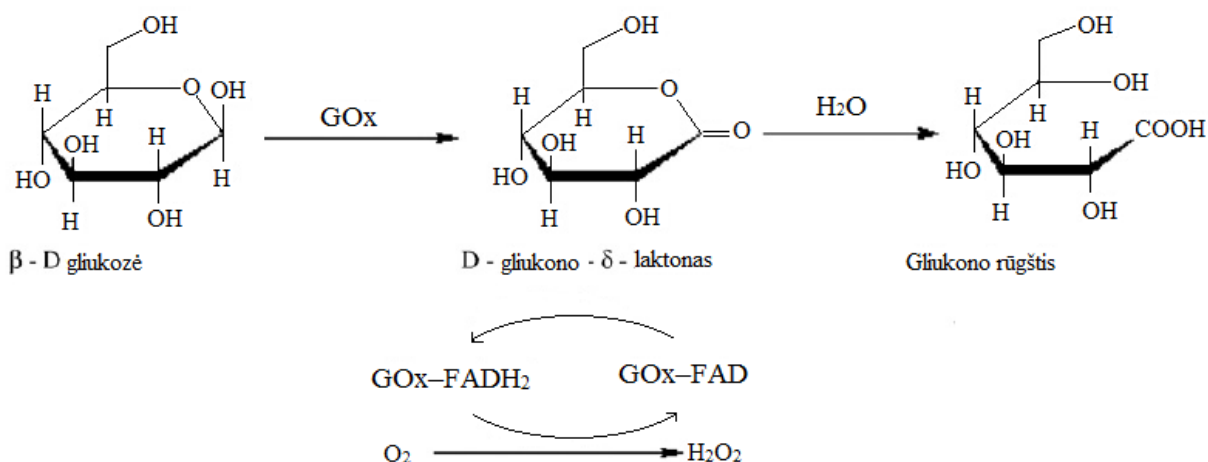
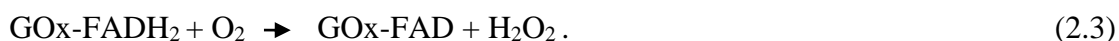
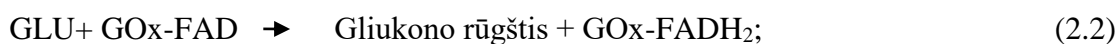


Fermentinės reakcijos metu kofermentai chemiškai pakinta (oksiduojasi, redukuojasi, prisijungia funkcinės grupės), tačiau jie yra reguliuojami kitų arba to paties fermento [9].

### GOx katalizuojama fermentinė reakcija.

GOx fermentas savo sudėtyje turi oksidacijos redukcijos reakcijos elementą FAD, kuris lemia tai, kad GOx katalizuoja  $\beta$ -D-gliukozės oksidaciją į D-gliukono-1,5-laktoną. D-gliukono-1,5-laktonas hidrolizuojasi iki gliukono rūgšties (lygtis 2.1).

Vykstant oksidacijos-redukcijos reakcijoms (dar vadinamoms redokso), vyksta elektronų prisijungimas ir atidavimas, FAD atlieka elektronų transporterio funkciją. GOx katalizuojamose redokso reakcijose, FAD redukuojasi iki FADH<sub>2</sub>, prisijungdamas elektronus ir H<sup>+</sup> jonus. Tolimesnėse reakcijose FADH<sub>2</sub> reaguoja su molekulinio deguonimi (O<sub>2</sub>) ir reoksiduojasi iki oksiduotos FAD formos. Šios reakcijos metu susidaro vandenilio peroksidas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (lygtis 2.2). GOx, kurios sudėtyje yra oksiduotas FAD, vėl gali prisijungti GLU ir spartinti jos oksidaciją [27].



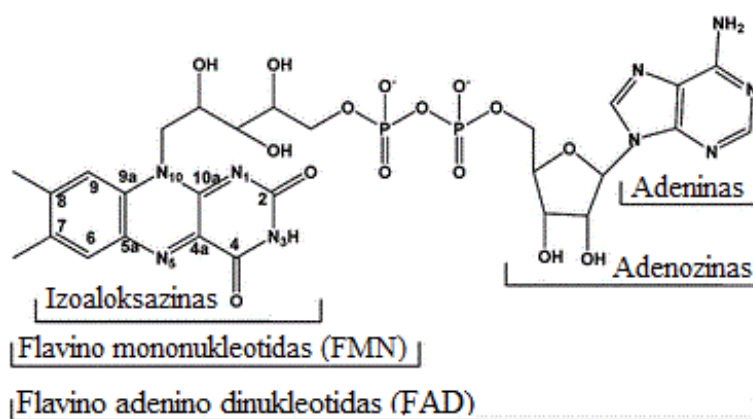
2.7 pav. GOx katalizuojamų gliukozės virsmų atvaizdavimas. Adaptuota pagal [30].

Grafiškas vykstančių reakcijų atvaizdavimas pateikiamas 2.7 pav. GLU katalizavimo reakcija gali būti padalinama į redukcijos ir oksidavimo etapus. Redukavimo dalyje vyksta gliukozės oksidacija į gliukono rūgštį, kurios metu FAD redukuojasi [30]. Vykstant substrato oksidavimui, vyksta FAD redukavimas [27]. Oksidavimo dalyje redukuota FAD forma reaguoja su molekulinio deguonimi, kuris atlieka elektrono akceptorius funkciją. Taip susidaro vandenilio peroksidas [30].

GOx fermento panaudojimas bijutikliuose remiasi deguonies, vandenilio peroksido arba redukcijos-oksidacijos tarpininko koncentracijos pokyčių registravimu, prie elektrodo paviršiaus esančiame sluoksnyje [6].

#### 1.4 Flavino adenino dinukleotidas

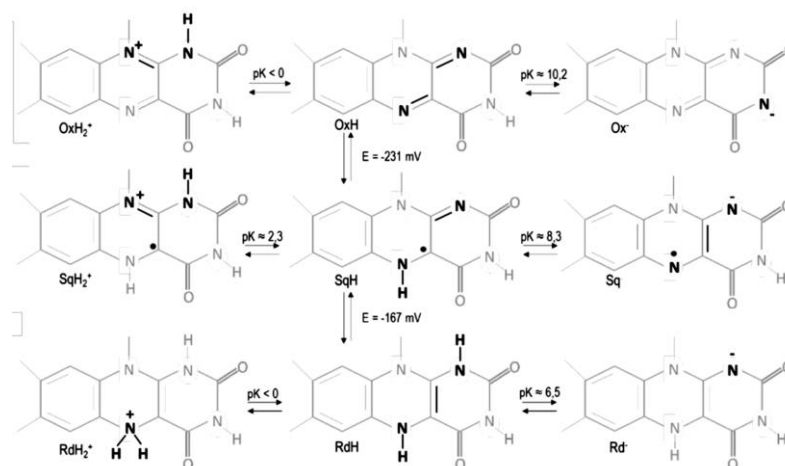
Flavino adenino dinukleotidas (FAD) – kofermentas, dalyvaujantis oksidacijos-redukcijos fermentinėse reakcijose bei lemiantis GOx fermento aktyvumą. FAD yra nekovalentiškai prisijungęs prie fermento aktyviojo centro. Yra žinoma, kad oksireduktazių klasės fermentai, struktūroje turintys FAD kofermentą, oksiduoja substratus, kurių molekulės turi [-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-] fragmentą [27].



2.8 pav. FAD struktūrinė formulė. Adaptuota pagal [31].

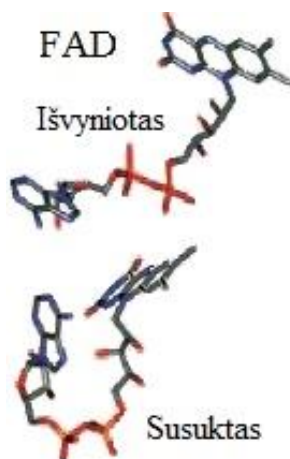
FAD struktūra sudaryta iš flavoproteino ir adenino dinukleotido (2.8 pav). Izoaloksazino žiedų sistema yra atsakinga už FAD šviesos emisiją regimosios spektro dalies ruože [32]. Įvairios FAD formos yra gaunamos prie izoaloksazino žiedų sistemos N<sub>1</sub> ir N<sub>5</sub> atomų prisijungus elektronus ir H<sup>+</sup> jonus [9].

FAD gali turėti tris skirtingas oksidacijos būsenas: oksiduota forma, tarpinis vienelektroninės redukcijos produktas (semichinonas) ir pilnai redukuota forma. Taip pat kiekviena oksidacinė būsena turi po tris rūgštines-bazines formas, kurios priklauso nuo pH ir yra vadinamos katijonine, neutralia ir anijonine [33]. Galimos FAD struktūros pavaizduotos 2.9 pav. Dėl didelės būsenų įvairovės, FAD dalyvauja įvairiose biologinėse veiklose, tokiose kaip apoptozė, detoksikacija, redukcijos reakcijos. Jis labai svarbus ląsteliniam kvėpavimui ir energijos gamybai [34].



2.9 pav. Skirtingos FAD būsenos. Adaptuota pagal [33].

FAD skirtingos būsenos gali būti nustatomos spektroskopiškai, kadangi skiriasi jų sugeriamos šviesos bangos ilgis. Oksiduoto FAD sugerties juosta ties 450 nm, todėl jis yra geltonos spalvos. Protonuotas semichinonas (FADH) sugeria 560 nm šviesą, o visiškai redukuota forma FADH<sub>2</sub> yra bespalvė [9]. Vienelektroninės redukcijos produktas (semichinonas) tirpale yra nestabilus. Sugerties spektrui įtaką daro ne tik oksidacinė būsena, bet ir rūgštinė-bazinė forma. Tuo tarpu FAD fluorescencija stebima tik neutralioje formoje [35].



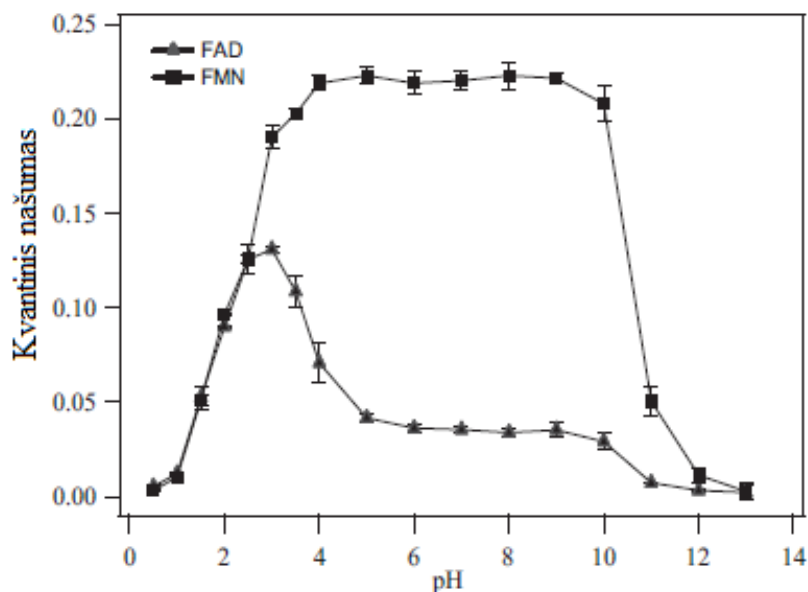
2.10 pav. FAD erdvinės konfigūracijos. Adaptuota pagal [34].

FAD gali turėti kelias skirtingas erdvinės konfigūracijas, kurių metu kofermentas deformuojasi ir erdvėje išsidėsto skirtingomis formomis. Galimos „išvynioto“ bei „susukto“ FAD struktūros, pavaizduotos 2.10 pav. Straipsnyje [34] nagrinėjamas FAD tirpalo fluorescencijos gesimas ties 530 nm, kuris aprašomas dvi eksponentiniu dėsnio. Trumpesnė gesimo komponentė atitinka FAD fluorescencijos gesimą, esant susuktai struktūrai, o ilgoji – esant išvyniotei struktūrai. Susuktoje struktūroje vyksta greitesnė elektrono pernaša iš adenino fragmento į izoaloksazino žiedų sistemą, todėl ir gesimo laikas trumpesnis [34]. Egzistuoja ir visiškai susukto FAD struktūra, kuri pasižymi silpna fluorescencija ir pikosekundinės trukmės fluorescencijos gesimu [35].

### FAD konformacijos kitimas skirtinguose pH.

FAD fluorescencija stipriai priklauso nuo terpės rūgštingumo, o fluorescencijos pokyčiai yra siejami su FAD molekulinės struktūriniais kitimais. Yra žinoma, kad FAD fluorescencijos kvantinis

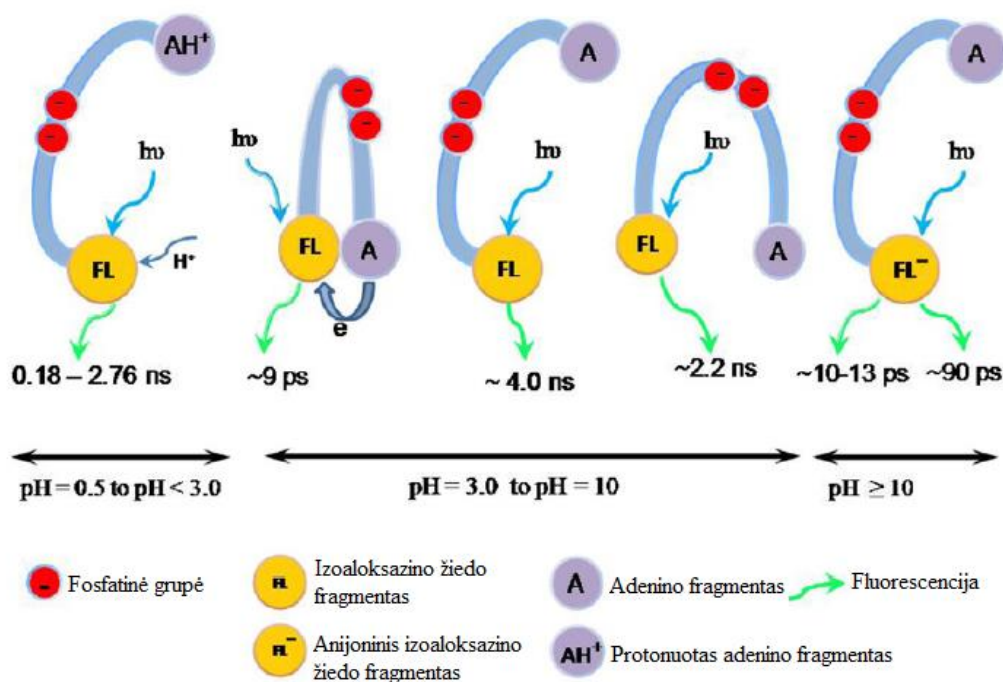
(2.11 pav.) našumas yra didžiausias esant pH 2,5 rūgštingumui. Kvantinis našumas mažėja iki pH 5 ir pH 5-9 intervale praktiškai nekinta. Šį kvantinio našumo sumažėjimą lemia susiformuojantys visiškai susukti FAD konformerai, kurie fluorescuoja silpnai dėl vykstančios vidumolekulinės elektrono pernašos iš adenino fragmento į flavino fragmentą (izoalaksazino žiedą). Kvantinis našumas lygus nuliui esant pH 1 ir pH 12 vertėms. Tai siejama su skirtingomis oksiduotos būsenų savybėmis: katijoninės (FLH) ir anijoninės (FL<sup>-</sup>) formos flavinai pasižymi labai silpna fluorescencija [35].



2.11 pav. FAD kvantinio našumo priklausomybė nuo buferio rūgštingumo. Adaptuota pagal [35].

FAD erdvinės konfigūracijos kitimai skirtingo rūgštingumo terpėse pavaizduoti 2.12 pav. Rūgštinėse terpėse (iki pH 3) FAD būdinga išvyniota struktūra, kuri nulemia didelę fluorescencijos relaksacijos laikų įvairovę. Stipriai rūgštinėse terpėse susiformuoja protonuotas adenino junginys, kuris pasižymi silpna fluorescencija. Nuo pH 3 iki pH 10 yra galimi įvairūs FAD išsidėstymai: išsivyniojęs, visiškai susisukęs bei visos tarpinės struktūros. Kiekviena iš erdvinių konfigūracijų lemia fluorescencijos gesimo trukmės vertę. Kaip jau minėta anksčiau, visiškai susuktai FAD formai būdinga labai trumpa 5-9 ps gesimo trukmė dėl vidumolekulinės elektrono pernašos. Išvyniota FAD struktūra siejama su 4 ns fluorescencijos gesimo trukme. FAD esant dalinai susuktoje konfigūracijoje adenino fragmentas ir izoaloksazino žiedų sistema nėra visiškai susijungusios, tačiau sąveikauja tarpusavyje ir lemia fluorescencijos gesimo laiką apytiksliai lygų 2,2 ns. Terpės rūgštingumo intervale nuo pH 3 iki pH 10 vyrauja susukta arba dalinai susukta FAD struktūros. Šarminėse terpėse (nuo pH 10) susidaręs anijoninis flavino fragmentas sąveikauja su

neigiamą krūvį turinčiomis fosfatinėmis grupėmis ir FAD keičia struktūrą – iš susuktos pereina į išvyniotą [35].



2.12 pav. Struktūriniais FAD kitimai skirtingo rūgštingumo terpėse. Adaptuota pagal [35].

## 1.5 Pirolas ir polipirolas

Pirolas – heterociklinis aromatinis junginys. Šis organinis monomeras yra bespalvis, tačiau, kaip ir dauguma aminių, įgauna rudą spalvą sąlyčio vietoje su oru ir šviesa. Tokie spalvos pakitimai atsiranda dėl to, kad tirpale susiformuoja polipirolas ir amino oksidai [36].

Polipirolas – elektrai laidus, organinis polimeras, kuris sudarytas iš pirolo monomerų. Polimeras susidaro pirolo monomerams susijungus į ilgas  $\pi$ - $\pi$  konjuguotas grandines. Elektroninis laidumas atsiranda dėl delokalizotos elektroninės struktūros išilgai konjuguotos grandinės. Pirmieji didelį polipirola elektrinį laidumą aprašė Weiss et al 1963 metais [37].

Polipirola kaip ir kitų elektrai laidžių polimerų savybės stipriai priklauso nuo polimerinės grandinės ilgio bei sintetinimo būdo. Dažniausiai konjuguotas polimeras sudarytas iš keleto šimtų monomerų, susijungusių į vieną grandinę. Šių polimerų įvairios savybės gali būti pakeistos į polimero struktūrą įterpiant įvairias priemaišas. Toks polimerų legiravimas praplečia jų pritaikymo galimybes [6].

Polimerizacija gali būti dviejų rūšių: elektrocheminė arba cheminė. Atliekant elektrocheminę polimerizaciją, netirpus polipirolas nusėda ant elektrodo (anodo) paviršiaus. Ši reakcija efektyviausiai vyksta esant pastoviai 0,8 V įtampai. Cheminė polimerizacija vyksta naudojant

oksidatorių. Šios polimerizacijos metu gaunamas didelis polimero kiekis. Dažniausiai naudojami oksidatoriais:  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bei  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Ce}^{+4}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Cr}^{+6}$ ,  $\text{Mn}^{+7}$  [9]. Chemiškai susintetintas polipirolas tirpale nusėda tamsių nuosėdų pavidalu.

Polipirolas dažniausiai naudojamas elektrocheminiuose biologiniuose jutikliuose. Bioanalizinėse sistemose jis lengvina analizinio signalo perdavimą darbiniam elektrodui, kadangi turi didelį elektrinį laidumą. Polipirolas gali būti naudojamas ir kaip imobilizavimo matrica, skirta biologiškai aktyvių medžiagų (BAM) imobilizavimui. Polipirole imobilizuotos BAM ilgesnį laiką išlaiko savo biologinį aktyvumą. Kita svarbi savybė yra ta, kad polipirolas pasižymi imobilizuojamų junginių fluorescencijos gesinimu [6].

## 1.6 Fermentų imobilizavimas

Fermentai fermentai gali būti imobilizuojami skirtingais būdais [38]:

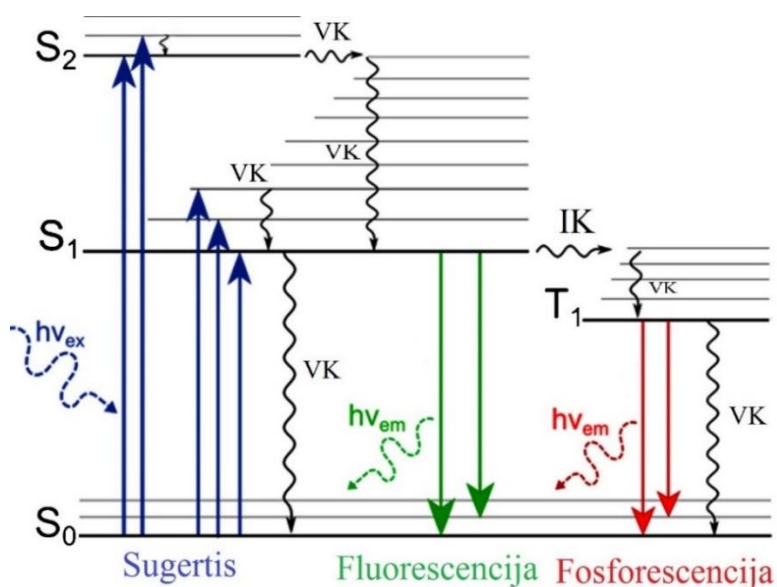
1. Adsorbicija ant stiklo arba ant specialios matricos. Fermentui adsorbuojantis, cheminiai ryšiai nesusidaro, tačiau jo aktyvusis centras gali būti užblokuotas dėl matricos paviršiaus nelygumų. Tai gali paveikti fermento aktyvumą: jei aktyvusis centras užblokuojamas, tai fermento aktyvumas sumažėja.
2. Membraninė pagava. Imobilizavimo metu fermentas patalpinamas į netirpią sferą, tačiau tai ap sunkina substrato ir produkto difuziją.
3. Kovalentinis prijungimas. Tai cheminis imobilizacijos būdas, pasižymintis dideliu efektyvumu. Vykstant cheminei imobilizacijos reakcijai, fermento aktyvusis centras nėra užblokuojamas, tad substratas gali lengvai jį pasiekti.

Konstruojant biojutiklį, svarbu atkreipti dėmesį į dvi svarbias charakteristikas: stabilumą ir biosuderinamumą. Imobilizavimo matrica turi užtikrinti fermento stabilumą bei būti laidus elektros srovei. GOx imobilizavimui kaip imobilizavimo matrica yra naudojamas polipirolas. Polimerizacijos tirpale GOx katalizuoja gliukozę ir vykstant redokso reakcijoms FAD redukuojasi. Redukuota FAD forma reaguoja su deguonimi ( $\text{O}_2$ ) ir susidaro vandenilio peroksidas ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Prie fermento aktyviojo centro lokaliai pasikeitęs pH (pažemėjęs) bei aukšta vandenilio peroksido koncentracija inicijuoja polipirola sintezę ir GOx imobilizavimą [38].

## 1.7 Jablonskio diagrama

Grafinis molekulėje vykstančių šuolių ir energijos būsenų atvaizdavimas pateikiamas Jablonskio diagramoje (2.13 pav.). Diagramoje pavaizduotos elektroninės singletinės ( $S_0, S_1, S_2$ ) būsenos ir virpesinės energijos lygmenys. Simboliu  $T_1$  pažymėta sužadinta elektroninė tripletinė

būseną. Kiekviena horizontali elektroninė būseną turi virpesinių lygmenų sistemą ( $v=0, 1, 2, 3\dots$ ) [39]. Vertikaliomis spalvotomis rodyklėmis pažymėti spinduliniai vyksmai: sugertis, fluorescencija, fosforescencija. Vertikalios banguotos rodyklės vaizduoja vidinę konversiją (VK) – nespindulinę relaksaciją į žemesnės energijos būseną. Horizontali banguota rodyklė pavaizduoja interkombinacinę konversiją (IK) iš  $S_1$  (singletinės) į  $T_1$  (tripletinę) būseną. Šuolio metu keičiasi elektrono sukiny ir sužadinta molekulė pereina į tripletinę būseną.



2.13 pav. Jablonskio diagrama. Adaptuota pagal [40].

### 1.7.1 Sugertis

Sugertis arba absorbcija – tai spindulinis fotovyksmas, kurio metu sugeriamas šviesos kvantas. Tai elektromagnetinės spinduliuotės sąlygojamas procesas tarp dviejų stacionarių molekulės energetinių lygmenų, turinčių tam tikras energetines būsenas. Jei elektromagnetinės spinduliuotės energija atitinka energijos skirtumą tarp  $E_0$  ir  $E_1$  būsenų, tuomet gali vykti elektromagnetinės spinduliuotės kvanto sugertis (formulė 2.4). Molekulė, sugėrusi fotoną, įgauna perteklinės energijos, kuri gali būti panaudojama tolimesniems fotofizikiniams, fotocheminiams ir fotobiologiniams vyksmams inicijuoti bei vykdyti [39]:

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h\nu = h \frac{c}{\lambda}. \quad (2.4)$$

$h$  – Planko konstanta;  $h=6,626 \cdot 10^{-34}$  [J·s];

$\nu$  – elektromagnetinės spinduliuotės dažnis [Hz];

$\lambda$  – elektromagnetinės spinduliuotės bangos ilgis [m];

$c$  – šviesos greičio konstanta;  $c = 299792458$  [m/s].

Sugerties matavimo eksperimentas paremtas Bugerio, Lamberto ir Bero dėsniais. Tiriamasis tirpalas patalpinamas į kiuvetę bei apšviečiamas intensyvumo  $I_0$  monochromatine spinduliuote.

Tirpalui sugėrus šviesą, per jį perėjusios spinduliuotės intensyvumas  $I$  sumažės. Perėjusios ir krintančios šviesos intensyvumų santykis yra vadinamas pralaidumu ir žymimas  $T$  [39]:

$$T = \frac{I}{I_0}. \quad (2.5)$$

Perėjusios šviesos intensyvumas priklauso nuo tirpalo koncentracijos, šviesos nueito kelio bei ekstinkcijos koeficiento ir išreiškiamas priklausomybe [39]:

$$I = I_0 e^{-\varepsilon c l}. \quad (2.6)$$

$c$  – tirpalo koncentracija [mol/l] = [M];

$l$  – optinio kelio ilgis, kiuvetės storis [cm];

$\varepsilon$  – ekstinkcijos koeficientas [ $M^{-1}cm^{-1}$ ].

Spektroskopijoje dažnai naudojamas dar vienas fizikinis dydis – optinis tankis, kuris yra žymimas  $D$ . Pagrindinis spektroskopijos dėsnis teigia, kad tirpalo optinis tankis yra tiesiogiai proporcingas sugeriančių molekulių koncentracijai [39]:

$$D = \varepsilon c l. \quad (2.7)$$

Optinio tankio sąryšis su pralaidumu:

$$\lg\left(\frac{1}{T}\right) = \varepsilon c l = D \quad \text{arba} \quad T = 10^{-D}. \quad (2.8)$$

### 1.7.2 Liuminescencija

Liuminescencija – šviesos emisijos vyksmas, kuris suteikia informacijos apie biologiniame objekte vykstančius procesus bei plačiai naudojamas molekulių tyrimuose. Vykstant šviesos kvanto sugerčiai, molekulės išorinės orbitalės elektronas peršoka į vieną iš laisvų elektroninių lygmenų ir molekulė tampa sužadinta. Molekulė esanti sužadintoje būsenoje yra nepusiausvira, tad ji stengiasi pasiekti energetiškai palankiausią - žemiausią būseną. Molekulė gali relaksuoti į pagrindinę būseną vienu iš šių galimų būdų: perteklinę energiją perduoti kitoms molekulėms, atlikti nespindulinę relaksaciją transformuojant perteklinę energiją į savo atomų virpesinę/rotacinę energiją arba išspinduliuoti energiją fotono pavidalu – liuminescuoti [39].

Liuminescencijos sąvoka apjungia du optiškai sužadintos molekulės energijos relaksacijos kelius – fluorescenciją ir fosforescenciją. Fluorescencijos metu elektronas atlieka šuolį tarp vienodo



multiplėtiškumo (singletinių) būsenų. Fluorescencijos šuolio tipiška trukmė – apie 10 ns. Fosforescencija – spindulinis šuolis tarp skirtingo multiplėtiškumo (tripletinės ir singletinės) būsenų. Fluorescencija trunka nuo  $10^{-4}$  s ir gali siekti net kelias sekundes [39].

Relaksacijos tikimybę lemia energijos tarpas tarp lygmenų. Kuo energijos tarpas tarp singuletinių sužadintos ir pagrindinės būsenos lygmenų yra didesnis, tuo vidinės konversijos tikimybė yra mažesnė, o fluorescencijos tikimybė didesnė. Taigi fluorescencijos tikimybė priklauso nuo konkuruojančių reiškinų, kurių metu molekulė iš sužadintos būsenos pereina į pagrindinę. Fosforescencijos tikimybė nedidelė dėl ilgos tripletinio lygmens gyvavimo trukmės, o kambario temperatūros sąlygose fosforescencija yra stipriai gesinama vidinių ir vidumolekulinių procesų [39].

Fluorescencijos šuolis vyksta iš žemiausios energijos sužadinto lygmens į pagrindinės būsenos  $S_0$  vibracinius lygmenis. Šuolio metu yra išspinduliuojamas fotonas, kurio energija atitinka energijų skirtumą tarp lygmenų. Lyginant su sugerties spektru, fluorescencijos spektras yra pasislinkęs į ilgesnių bangų pusę, dėl energijos nuostolių. Vykstant sugerčiai, elektronas sugeria fotoną ir atlieka šuolį į sužadintos būsenos virpesinį lygmenį, kuris nebūtinai yra žemiausios energijos. Tuomet vyksta virpesinė relaksacija, kurios metu elektronas relaksuoja į žemiausios energijos sužadintą lygmenį bei perteklinę energiją perduoda atomų virpesiams.

Stokso dėsnis apibrėžia, kad dėl energijos praradimo fluorescencijos šuolio energija yra visada mažesnė už sugerties šuolio energiją. Tačiau srityje, kurioje ilgabangė sugerties spektro dalis kertasi su trumpabangė fluorescencijos spektro dalimi Stokso dėsnis negalioja. Šį Stokso dėsnio prieštaravimą pašalina Liomelis teigdamas, kad liuminescencijos spektras ir jo maksimumas viusomet yra pasislinkęs sugerties spektro ir jo maksimumo atžvilgiu į ilgabangę pusę. Stokso ir Liomelio dėsnį galima užrašyti [39]:

$$h\nu_{fl}^{max} < h\nu_s^{max}. \quad (2.9)$$

## 2 TIRIAMOS MEDŽIAGOS

### 2.1 Tirti bandiniai

GOx ir FAD tirpalai buvo paruošti VU chemijos ir geomokslų fakulteto Fizikinės chemijos katedros bei Fizinių ir technologijos mokslų centro Molekulinių darinių fizikos skyriaus laboratorijose.

Matavimai buvo atliekami periodiškai nuo tirpalų paruošimo dienos praėjus 1, 8, 15, 22, 29 dienoms. Tyrimo metu buvo išmatuoti 118 tirpalų sugerties ir fluorescencijos spektrai, bei gesimo kinetikos ties 450 nm ir 530 nm. Atliekant ultrasparčios fluorescencijos gesimo trukmės tyrimus, buvo matuojami 6 tirpalai.

Matavimo sąlygos tapačios. Visų spektroskopinių prietaisų parametrai matavimo metu nekito. Kiuvetės su tirpalais būdavo įstatomos vienodose padėtyse, taip užtikrinant lazerio spinduliuotės tapatų optinį kelią bandiniuose.

Visi tirpalai buvo laikomi kambario temperatūroje tamsioje vietoje.

### 2.2 Tirpalų paruošimas

#### *Skirtingų pH tirpalų paruošimas*

Tirpalų paruošimui buvo naudojami keletas skirtingų buferinių tirpalų.

1. Acetatinis (0,05 mol/l) buferis su KCl. Keičiant KCl koncentraciją gaunamas norimas buferinio tirpalo rūgštingumas, kurio vertės kito nuo pH 3 iki pH 8.

2. Acetatinis–fosfatinis buferis. Tirpalai buvo ruošiami iš  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , KCl vandeninių tirpalų. Rūgštinimui naudojant HCl, o šarminimui NaOH gaunamas norimos rūgštingumo vertės pH [2÷9] intervale.

3. Citrinų rūgšties natrio fosfatinis buferis. Tirpalai buvo ruošiami iš citrinų rūgšties ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) ir natrio fosfatinės druskos ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) vandeninių tirpalų. Pagaminti 0,1 M citrinų rūgšties (21,01 g/l) ir 0,2 M natrio fosfatinės druskos (35,61 g/l) tirpalai sumaišomi atitinkamais santykiais, siekiant gauti skirtingo rūgštingumo buferius, kurių pH kinta 2,6 – 7,6 diapazone.

Tiriamieji tirpalai buvo ruošiami tirpinant GOx (fermentas išgautas iš *Aspergillus Niger*) ir FAD ( $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{O}_{15}\text{N}_9\text{Na}_2\text{P}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $M=865,55$  g/mol) buferiniuose tirpaluose. GOx koncentracija visuose matuotuose tirpaluose buvo 1,1 mg/ml. Tirpaluose su FAD, jo koncentracija buvo mažesnė ir siekė 0,011 mg/ml arba 0,022 mg/ml.

Po tirpalų paruošimo praėjus ~ 24 h. jie buvo patalpinami į PMMA kiuvetes, kurių optinis kelio ilgis 1 cm. Kiuvetės buvo naudojamos visiems optiniams matavimams ir tirpalų laikymui.

### *Imobilizavimo tirpalų paruošimas*

Polimerizacijos acetatiniai tirpalai buvo sudaryti iš keturių pagrindinių komponentų:

- 1) pirolo (polimerizuojamasis monomeras). Tirpaluose pirolo koncentracija buvo 236 mM.
- 2) gliukozės oksidazės (fermentas, gaminantis vandenilio peroksida). GOx koncentracija buvo 1,1 mg/ml.
- 3) gliukozės.
- 4) ištirpusio deguonies (oksidacijos substrato).

### 3 METODIKA

#### 3.1 Sugerties spektrų matavimas

Sugerties matavimai dažniausiai atliekami su standartiniais spektrofotometrais. Spektrofotometras – spektrinis prietaisas skirtas matuoti tiriamojo bandinio sugerties spektrus. Šiame prietaise bandiniai yra matuojami atitinkamo optinio kelio kiuvetėse. Viena iš spektrofotometro sudedamųjų dalių yra spinduliuotės šaltinis, kuris skleidžia ištisinį spektrą. Dispersinis elementas (prizmė, gardelinis monochromatorius) suskaido spinduliuotę į spektrines dedamąsias. Toliau monochromatinė spinduliuotė krinta į pluošto daliklį, kuriame yra padalinama į du pluoštelius. Vieno iš padalintų pluoštų kelyje įstatoma kiuvetė su bandiniu, o kito pluošto kelyje – kiuvetė su tirpikliu. Tokia schema leidžia vienu metu matuoti krintančios ( $I_0$ ) ir per bandinį praėjusios ( $I$ ) spinduliuotės intensyvumus, kurie užregistruojami jutikliu. Žinant  $I$  ir  $I_0$  ir naudojantis (formulė 2.6) yra apskaičiuojama bandinio sugertis. Keičiant dispersinio elemento konfigūraciją, išmatuojamas visas sugerties spektras [39].

Užregistruotas sugerties spektras yra tiriamo bandinio optinio tankio priklausomybė nuo sugeriamos šviesos bangos ilgio. Remiantis Bugerio, Lamberto, Bero dėsniais yra žinoma, kad optinis tankis priklauso nuo bandinio storio, ekstinkcijos koeficiento bei yra tiesiogiai proporcingas sugeriančių molekulių koncentracijai. Tačiau jei šviesos srautas yra nepakankamai monochromatiškas ar įvyksta tam tikri cheminiai pasikeitimai tirpale, tuomet atsiranda netiesinė optinio tankio priklausomybė nuo molekulių koncentracijos. Esant didelei sugeriančių molekulių koncentracijai, molekulės pradeda sąveikauti tarpusavyje bei formuoti agregatus – dimerus. Suformuoti dimerai turi mažesnę sugerties skerspjūvį nei monomerai, tad pasikeičia sugerties spektras. Siekiant išvengti šių nukrypimų, tiriamų bandinių koncentracija negali būti labai didelė, o optinis tankis neviršyti 1 [39].

Sugerties spektrai buvo matuojami su Jasco V-670 spektrofotometru. Spektrai buvo matuojami 300 nm – 800 nm diapazone. Tirpalai buvo laikomi ir matuojami PMMA 1 cm kiuvetėse.

#### 3.2 Fluorescencijos spektrų matavimas

Fluorescencijos matavimams reikalinga sąlyga yra matuojamų molekulių sužadimas. Šviesos kvanto sugėrimas suteikia molekulei energiją, kuri lemia elektrono šuolį į aukštesnės energijos elektroninę orbitalę [41]. Spektras matuojamas per visą emisijos intervalą, žadinant vieno bangos ilgio šviesa. Sužadinta molekulė gali išspinduliuoti šviesos kvantą į visas puses vienodomis tikimybėmis, tad spinduliavimas nėra kryptingas. Geriausias būdas detektuoti sužadintų molekulių

spinduliavimo spektrą yra registruoti ją  $90^\circ$  laipsnių kampu nuo žadinimo spinduliuotės krypties [39].

Kadangi žadinama su intensyviu lazeriu, tai labai svarbu užtikrinti, kad fluorescencijos spektro matavimuose detektorius užfiksuotų tik išfluorescuotus fotonus. Siekiant nufiltruoti žadinančią spinduliuotę yra naudojami įvairūs filtrai [39].

Fluorescencijos matavimai pasižymi ypač dideliu jautrumu, tad galima tirti mažų koncentracijų tirpalus. Fluorescencijos signalas tiesiškai priklauso nuo fluoroforų tirpale koncentracijos. Tačiau reikia atkreipti dėmesį, kad fluorescencijos matavimai nebūtų atliekami esant per aukštai fluoroforų koncentracijai. Sužadintos pavienės molekulės išspinduliuoja atitinkamo bangos ilgio fotoną, kuris turi sklįsti bandiniu, pereiti per kiuvetę ir būti užregistruojamas detektoriumi. Esant didelei koncentracijai, padidėja kliūčių pasiekti detektorių, tad fluorescencijos intensyvumas ženkliai sumažėja. Šis reiškinys vadinamas vidiniu filtro efektu [26].

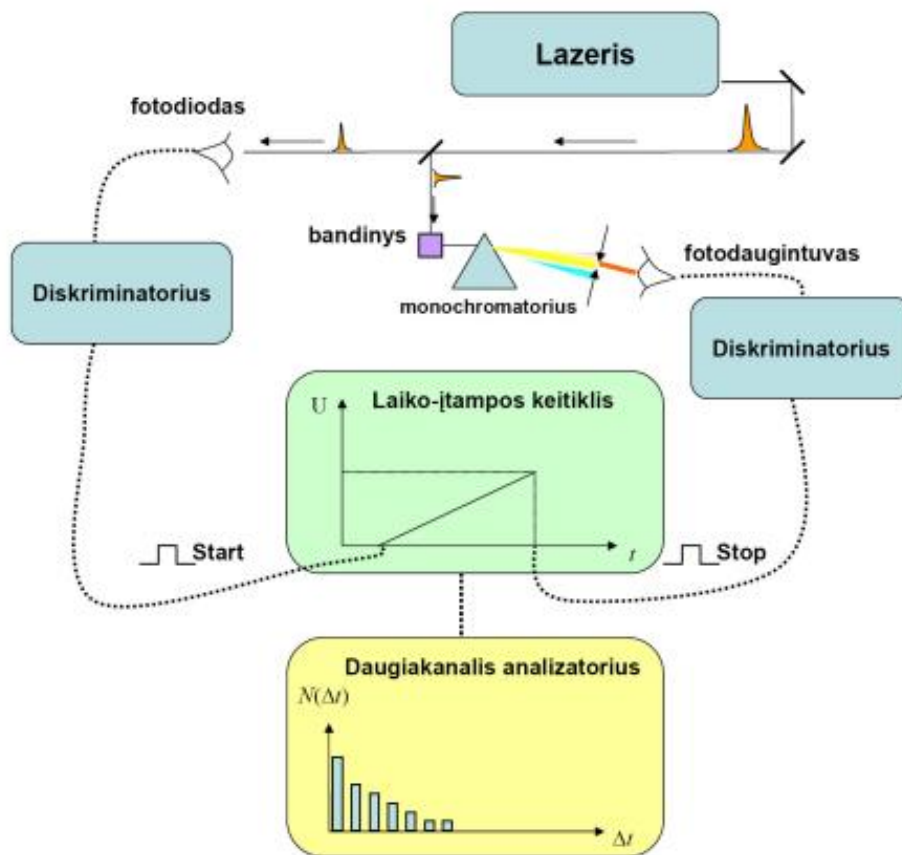
Fluorescencijos spektrai buvo registruojami su spektrometru Edinburgh Instruments F900. Sužadinimui buvo naudotas pikosekundinis diodinis lazeris EPL-375, kuris skleidžia monochromatinius 375 nm pikosekundinės trukmės impulsus. Impulsų trukmė buvo 57 ps, o impulsų pasikartojimo dažnis 2 MHz ( $T=500$  ns). Vidutinė impulsų galia  $0,15$  mW/mm<sup>2</sup>. Visų matavimų metu lazerio spinduliuotės intensyvumas buvo maksimalus, o diafragmos plyšys – 5 nm. Fluorescencijos spektrai buvo registruojami 390 nm – 700 nm diapazone. Taip pat buvo atliekta spektrinė korekcija per visą matuotą fluorescencijos spektrą.

### **3.3 Fluorescencijos relaksacijos trukmių matavimas**

Fluorescencijos gyvavimo trukmių matavimui buvo naudojamas laike koreliuotų pavienių fotonų skaičiavimo metodas (angl. time-correlated single-photon counting, TCSPC). Metodas taikomas, kai bandinio sužadinimui naudojamas didelio impulsų pasikartojimo dažnio lazeris. Lazerio impulsu sužadinta molekulė po tam tikro laiko  $\Delta t$  išspinduliuoja fotoną. Sužadinus molekulę daugybę kartų ir matuojant  $\Delta t$  laikus, gauname fotonų išspinduliavimo laikų tikimybinį pasiskirstymą. Metodo eksperimentinė schema pavaizduota 3.1 pav. [42].

Lazerio siunčiami ultratrumpieji impulsai patenka į bandinį. Pluošto dalikliu dalis lazerio spinduliuotės nukreipiama į fotodiodą, kuris generuoja elektroninį impulsą. Į diskriminatorių patekęs diodo impulsas virsta skaitmeniniu elektroniniu impulsu (vadinamas „start“), kuris toliau patenka į laiko-įtampos keitiklį ir jį aktyvuoja. Bandinio išspinduliuotą fluorescencijos fotoną užregistruoja jautrus fotodaugintuvas. Užregistruotas fotodaugintuvo signalas diskriminatoriuje taip

pat tampa skaitmeniniu elektroniniu impulsu (vadinamas „stop“) bei patenka į laiko-įtampos keitiklį.



3.1 pav. Laike koreliuoto pavienių fotonų skaičiavimo eksperimento schema. Adaptuota pagal [42].

Laiko-įtampos keitiklyje atsiranda įtampa, kuri yra proporcinga laiko tarpui tarp dviejų elektroninių signalų („start“ ir „stop“) pasirodymo. Kitaip tariant, įtampa atitinka trukmę tarp bandinio sužadavimo ir fotono išspinduliavimo. Įtampos vertės užregistruojamos daugiakanaliniame analizatoriuje. Jame skirtingos vertės patenka į skirtingus kanalus, kuriuose sumuojamas patekusių verčių skaičius. Iš rezultatų gauname fluorescencijos gesimo histogramą, kurioje kanalai, atitinkantys dažniausiai stebimas fluorescencijos užlaikymo trukmes, sukaupia didžiausias vertes. Galiausiai, duomenys pateikiami kaip fotonų skaičiaus priklausomybė nuo laiko [42].

Fluorescencijos gyvavimo trukmė ( $\tau$ ) – tai vidutinis laikas, kurį gyvuoja sužadintosios būsenos molekulė. Ši trukmė priklauso nuo fluorescencijos gesimo būdo. Fluorescencijos gesimas aprašomas eksponentiniu dėsnio ir nusako fluorescencijos intensyvumo mažėjimą. Eksponentinis gesimo vyksmas aprašomas formule [39]:

$$I = I_0 \exp(-kt), \quad (3.1)$$

$I_0$  – pradinis intensyvumas laiko momentu  $t = 0$ ;

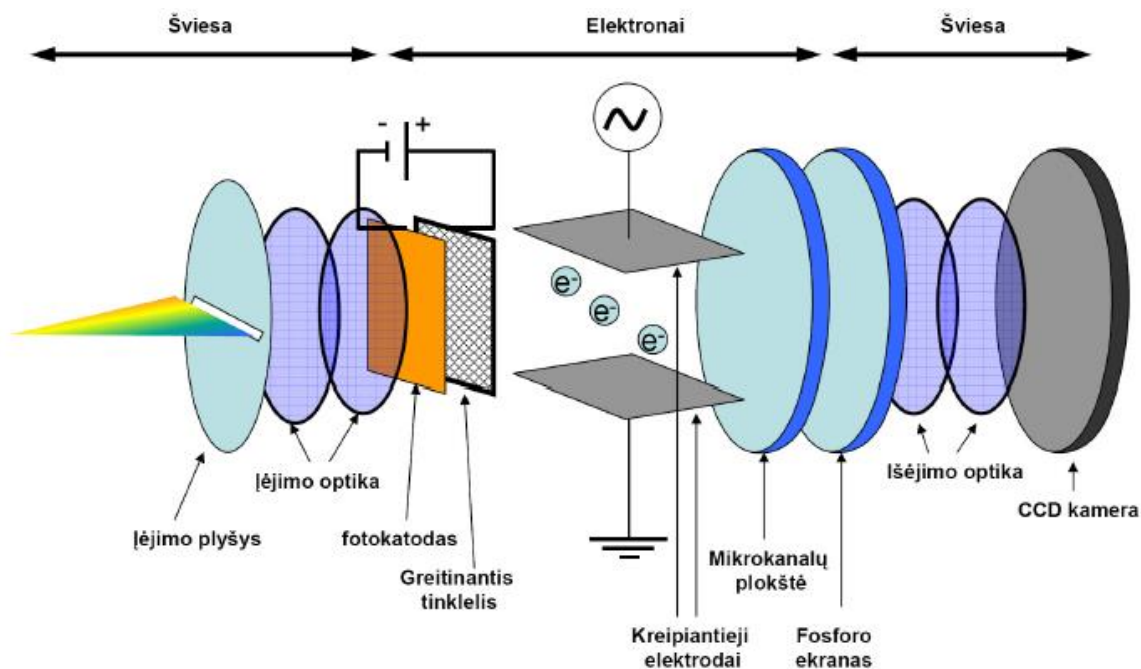
$k$  – greičio konstanta, sudaryta iš spindulinio ( $\tau_{sp}$ ) ir nespindulinio ( $\tau_{nosp}$ ) gesimų konstantų;

$$k = \frac{1}{\tau_{sp}} + \frac{1}{\tau_{nosp}} = \frac{1}{\tau}. \quad (3.2)$$

Fluorescencijos gesimo trukmės buvo matuojamos su laike koreliuoto pavienių fotonų skaičiavimo spektrometru Edinburgh-F900, ties fluorescencijos maksimumą atitinkančiais bangos ilgiais – 450 nm ir 530 nm. Matavimai buvo atliekami 150 sekundžių 0 – 50 ns diapazone. Kaip ir fluorescencijos matavimuose buvo naudojamas diodinis lazeris EPL-375, žadinantis 375 nm pikosekundiniais impulsais, kurių pasikartojimo dažnis 2 MHz ( $T=500$  ns). Visų matavimų metu lazerio spinduliuotės intensyvumas buvo maksimalus, o diafragmos plyšys taip pat išliko pastovus ir buvo lygus 5 nm.

### 3.4 Ultrasparčiosios fluorescencijos relaksacijos trukmė registravimas

Bandinių ultrasparčios relaksacijos kinetikos buvo matuojamos su fotoelektronų kamera „Hamamatsu“. Metodas remiasi elektroniniu laiko skyros fluorescencijos registravimu, o registracijos schema pavaizduota 3.2 pav. [42].



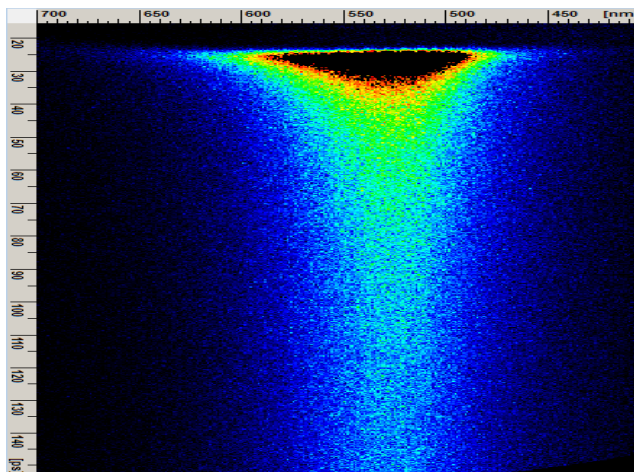
3.2 pav. Fotoelektronų kameros principinė schema. Adaptuota pagal [42].

Bandinys yra sužadintas tam tikro bangos ilgio šviesa. Bandinio išspinduliuoti fluorescencijos fotonai pataiko į fotokatodą ir išmuša iš jo elektronus. Fotokatodas yra pagamintas iš mažą išlaisvinimo darbą turinčių medžiagų. Fotonai paverčiami elektronais, kurių skaičius yra proporcingas signalo intensyvumui. Išmušti elektronai pagreitinami elektriniame lauke, o jų

trajektorijos iškreipiamos kintamu elektriniu lauku. Kreipiančiojo lauko kitimas yra sinchronizuotas su žadinančiu impulsu, todėl vertikalų nuokrypį lemia laiko momentas, kuriuo atėjo elektroną išmušęs fotonas. Šis elektrinis laukas pastoviai stiprėja, todėl vėliausiai atkeliavusių elektronų trajektorijos bus smarkiausiai užlenktos. Į fosforo ekraną pataikę elektronai registruojami su jautria CCD kamera. Siekiant padidinti prietaiso jautrumą, prieš fosforo ekraną yra įtaisyta mikrokanalė plokštelė, kuri atlieka daugintuvo funkciją. Kadangi skirtingo laiko momentais išlaisvinti elektronai fosforo ekraną pasiekia skirtingose padėtyse, tai suformuotas erdvinis pasiskirstymas teikia informaciją apie signalo intensyvumo pasiskirstymą laike [42].

Kadangi elektronai kreipiami tik vertikalia kryptimi, tai horizontalioji kryptis gali būti naudojama spektrinei informacijai. Tai suteikia didelį privalumą, nes iškart registruojamas fluorescencijos spektras (200-1600nm) ir gesimo kinetikos.

Tyrimų metu naudojama „Hamamatsu“ fotoelektronų kamera pasižymi itin didele laikine skyra ~1,9 ps. Fotoelektronų kamera itin naudinga norint išmatuoti tik pačią bandinio sužadavimo gesimo pradžią. Sistema naudoja ~3W optinės galios, 1030 nm bangos ilgio lazerį („Pharos“ osciliatorius) ir generuojant trečią harmoniką („Hiro“ harmonikų generatorius) gaunami 343 nm bangos ilgio impulsai.

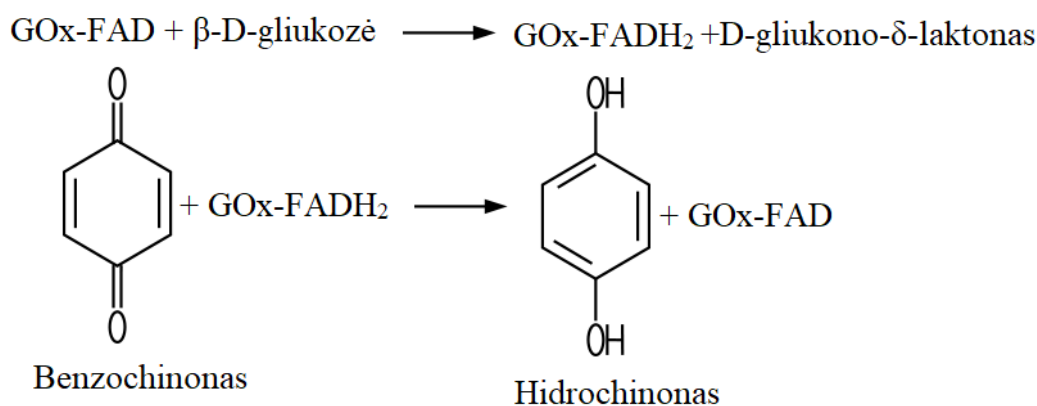


3.3 pav. Gliukozės oksidazės pH 6 spektrinė kinetika užregistruota 1-ąją dieną su fotoelektronų kamera.

### 3.5 GOx aktyvumo nustatymo metodas

Spektrofotometrinis GOx aktyvumo nustatymas remiasi fermentinės reakcijos metu vykstančiu benzochinono virstimu į hidrochinoną, kurio greitis matuojamas ties 290 nm bangos ilgiu [5]. Paveikslėlyje 3.4 pav. vaizduojama schematiška reakcijos eiga. Vykstančios fermentinės reakcijos metu benzochinonas veikia kaip elektronų akceptorius. Viena hidrochinono molekulė susidaro fermentui oksidavus vieną gliukozės molekulę.





3.4 pav. Benzochino redukcija iki hidrochino vykstanti GOx katalizuojamos fermentinės reakcijos metu [5].

Tyrimui reikalingi tirpalai:

- 1 mol/l  $\beta$ -D-gliukozės vandeninis tirpalas, kuris turi būti paruoštas mažiausiai prieš 24h iki matavimo. Reikiamas tūris 0,5 ml.
- Citrinų rūgšties natrio fosfatinis pH 5 buferis. Reikiamas tūris 0,225 ml.
- 0.1 % benzochinono vandeninis tirpalas. Reikiamas tūris 0,25 ml.
- Gliukozės oksidazės tirpalas. Reikiamas tūris 33  $\mu$ l.

Ruošiamos dvi kiuvetės, kurių optinio kelio ilgis 1 cm. Bandinio kiuvetė paruošiama sumaišius reikiamus gliukozės tirpalo, buferio, benzochinono tirpalo bei gliukozės oksidazės tūrius. Atraminėje kiuvetėje vietoj gliukozės oksidazės tirpalo įmaišoma 33  $\mu$ l distiliuoto vandens.

Matavimai atliekami registruojant optinio tankio ties 290 nm kitimą laike. Matavimai atliekami 120 s. 1-osios dienos GOx aktyvumo tyrimų pavyzdys pavaizduotas 3.5 pav. GOx fermento aktyvumas apskaičiuojamas pagal formulę [5]:

$$\text{Aktyvumas} = \frac{\Delta A \times V_t}{l \times \varepsilon \times V_f \times t \times c} \quad (3.3)$$

$\Delta A$  – Optinis tankio skirtumas ties 290 nm;

$V_t$  – viso tirpalo tūris ( 1,008 ml);

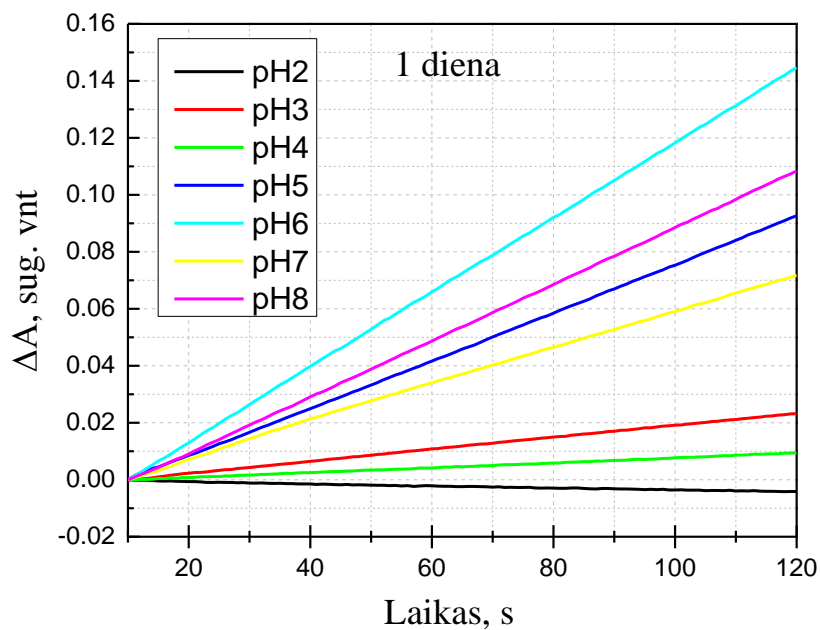
$V_f$ – fermento tūris ( 0,033 ml);

$L$  – optinio kelio ilgis (1 cm);

$\varepsilon$  – ekstinkcijos koeficientas ( 2,31  $\text{mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ );

$t$  – reakcijos laikas (1 min);

$c$  – gliukozės oksidazės koncentracija (mg/ml);



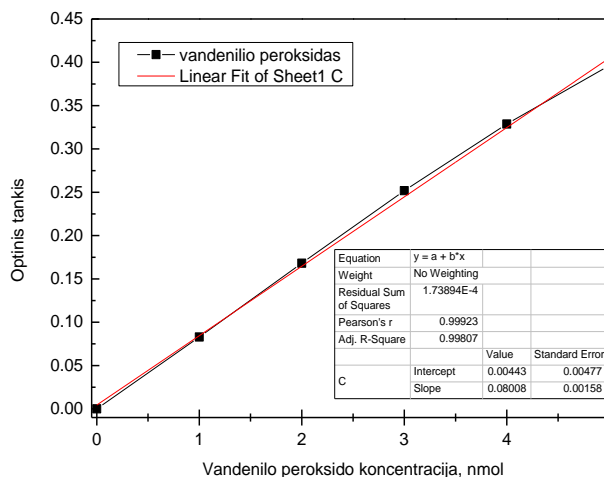
3.5 pav. Gliukozės oksidazės aktyvumo tyrimai 1-ąją dieną.

### 3.6 Kalorimetrinis GOx aktyvumo nustatymo metodas

Siekiant tiksliau ir patikimiau įvertinti fermento aktyvumą buvo naudojamas komerciškai įsigytas gliukozės oksidazės aktyvumo tyrimo testas (MAK097). Gliukozės oksidazės aktyvumas nustatomas iš sugerties spektro kitimo ties 570nm bangos ilgiu.

Rinkinyje yra 5 skirtingi elementai, kurie sumaišomi reikiamomis koncentracijomis. Aktyvumo nustatymas remiasi gliukozės fermentinės reakcijos metu susidariusiu vandenilio peroksido kiekiu, kuris reaguoja su kita medžiaga ir lemia avietinės spalvos produkto susidarymą. Taip bespalvis tirpalas laikui bėgant įgauna spalvą, o kitimo greitis tiekia informacijos apie susidariusio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kiekį, kuris yra proporcingas gliukozės oksidazės aktyvumui.

Tyrimui atlikti būtina nustatyti standartinę kreivę: tirpalo optinio tankio priklausomybę nuo vandenilio koncentracijos (3.6 pav.). Naudojamas 0, 1, 2, 3, 4, 5 nmolių vandenilio peroksido tirpalas, kuris reaguoja su reakcijos tirpalu ir sąlygoja tam tikrą optinį tankį. Gauta tiesė yra aproksimuojama ir nustatomi koeficientai, kurie tolimesnių skaičiavimų metu padeda nustatyti sugeneruoto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kiekį.



3.6 pav. Gliukozės oksidazės aktyvumo tyrimo standartinė kreivė.

Atliekant gliukozės oksidazės tyrimus, į reakcijos tirpalą įlašinamas nustatytas gliukozės oksidazės kiekis. Iš karto po sumaišymo kiuvetė patalpinama į kaitinimo krosnelę, įkaitintą iki 37°C, ir joje laikoma 5 min. Po to registruojamas sugerties spektras kas vieną minutę. Sugerties juostos ties 570nm kitimas teikia informacijos apie sugeneruoto peroksido kiekį kuris yra tiksliai nustatomas iš standartinės kreivės duomenų. Galiausiai aktyvumas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$Aktyvumas = \frac{B}{t \times V \times c} \quad (3.3)$$

$B$  – sugeneruotas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kiekis nmol per laiką  $t$ ;

$t$  – reakcijos laikas (min) ;

$V$  – bandinio tūris (ml);

$c$  – gliukozės oksidazės koncentracija (mg/ml);

Remiantis formule apskaičiuojamas milivienetų skaičius esantis vienama g. 1 vienetas tai GOx fermento kiekis, kuris sugeneruoja 1 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 1 minutę 37°C temperatūroje.

## 4 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

### 4.1 FAD ir GOx spektroskopiniai tyrimai skirtingo rūgštingumo terpėse

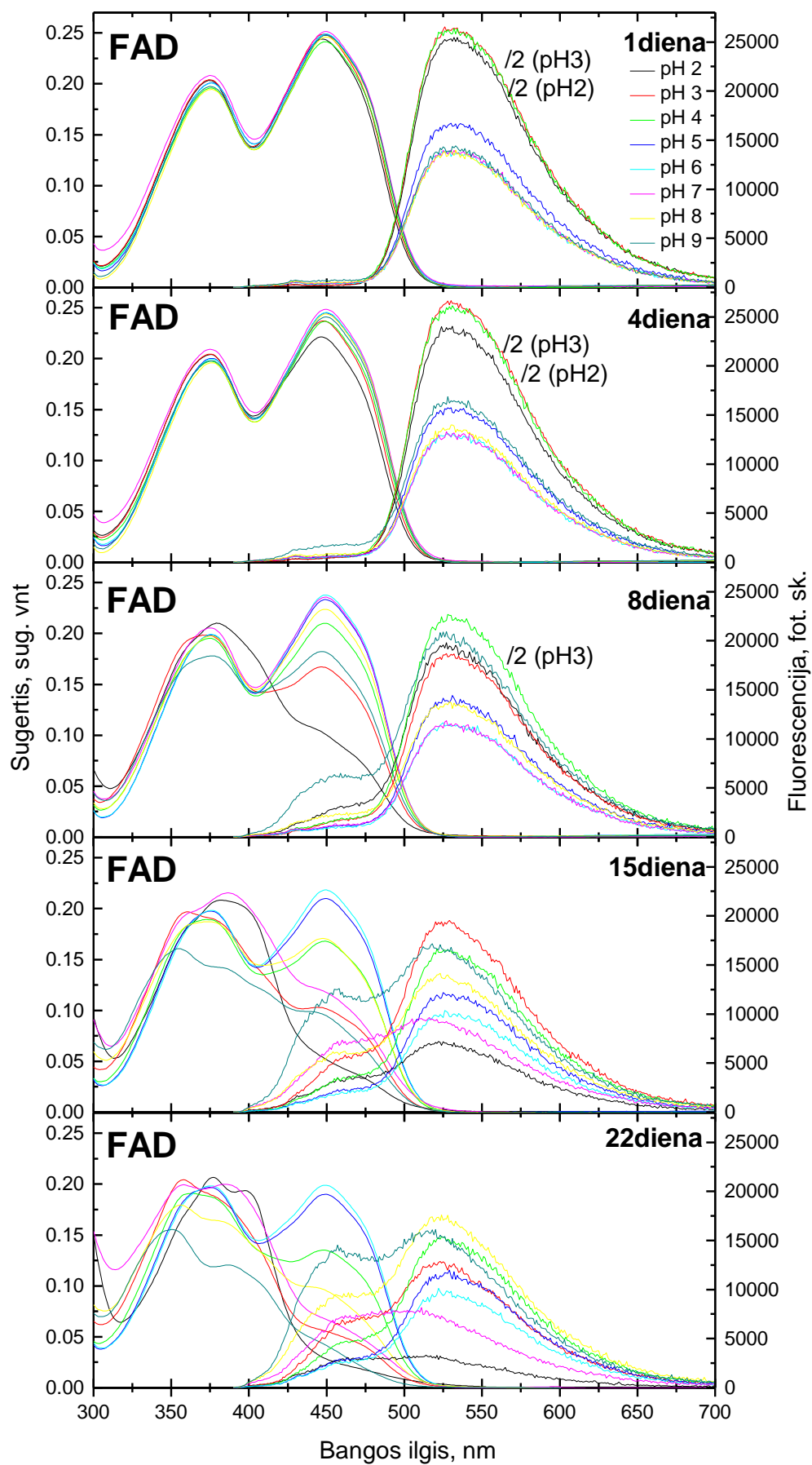
4.1 pav. ir 4.2 pav. pavaizduoti skirtingose acetatinio–fosfatinio buferio pH terpėse užregistruoti flavinadenindinukleotido (FAD) ir gliukozės oksidazės (GOx) tirpalų sugerties ir fluorescencijos spektrų pokyčiai, atsiradę 22–ų dienų laikotarpyje.

Regimajame spektro ruože stebimos dvi, oksiduotai būsenai būdingos, FAD sugerties juostos, kurios atitinka elektrono šuolius į sužadintų būsenų  $S_2$  ir  $S_1$  elektroninius lygmenis. Stebint 1–osios dienos sugerties spektrus, nustatyta, kad pirmoji sugerties juosta yra ties 375 nm ir jos maksimumo padėtis skirtingo rūgštingumo buferiuose nesikeičia. Antroji sugerties juosta užregistruota ties 450 nm. Ji taip pat paklaidų ribose nekito. Sugerties spektrai, esant skirtingiems pH, sutampa, tad 1–ąją matavimo dieną visuose tirpaluose FAD yra oksiduotos būsenos.

4–ąją matavimo dieną stebimas pH 2 tirpale esančio FAD antrosios sugerties juostos intensyvumo sumažėjimas. Vėlesnių matavimų metu pH 2 sugerties spektruose atsirado daugiau pakitimų. Nuo 8–osios dienos sugerties spektro forma stipriai pakito nuo pradinės: antroji sugerties juosta sumažėjo, o pirmosios juostos maksimumo padėtis pasislinko į ilgesnių bangų pusę. Taip pat galima pastebėti, kad 22–ų dienų laikotarpyje pirmoji sugerties juosta ne tik slenkasi į ilgesnių bangų pusę, bet ir plėtėja. Šie kitimai siejami su FAD struktūriniais pokyčiais pH 2 acetatiniame–fosfatiname buferiniame tirpale. Esant šiam rūgštingumui oksiduotas FAD prisijungia  $H^+$  jonus ir virsta redukuota  $FADH_2$  forma, kuri lemia sugerties formos kitimą [34]. Taip pat esant pakankamai dideliam rūgštingumui gali susiformuoti katijoninė oksiduoto FAD forma, kurios sugerčiai būdinga viena juosta ties 390 nm [33].

Nuo 15–osios matavimo dienos matomi FAD sugerties spektro kitimai ir pH 3, 7, 8, 9 tirpaluose. Kaip ir aptartu pH 2 atveju, pH 3 tirpale susidaro redukuota FAD būsena. Šarminiuose buferiuose taip pat vyksta FAD sąveika su buferio jonais, kuri lemia sugerties spektro kitimus. Kitimų metu atsiranda ne tik sugerties intensyvumo pakitimai, bet ir maksimumo padėtis pasislenka į ilgesnių bangų pusę. Svarbu paminėti, kad pH 5 – 6 tirpaluose sugerties forma, maksimumų padėtys bei santykiniai intensyvumai nekito 22–ų dienų intervale.

Oksiduotos FAD būsenos fluorescencijos spektras sudarytas iš vienos intensyvios juostos, kurios maksimumas užregistruotas ties 530 nm [34]. Stebint 1–osios ir 4–osios dienos fluorescencijos spektrus matome, kad fluorescencijos juostos maksimumo padėtis nekito skirtingo rūgštingumo buferiniuose tirpaluose.



4.1 pav. FAD, ištirtino acetatiniuose–fosfatiniuose buferiuose, sugerties ir fluorescencijos spektrai 1, 4, 8, 15, 22 dienomis.

Matavimų metu stebime fluorescencijos intensyvumo kitimo tendenciją: fluorescencijos intensyvumas yra didžiausias pH 2 tirpale ir didinant pH fluorescencija mažėja, o pats mažiausias intensyvumas užregistruotas pH 6 tirpale. Intensyvūs fluorescencijos juostos kitimai siejami su FAD erdvinės konformacijos [35] pokyčiais. Rūgštinėse terpėse dominuoja išvyniota FAD erdvinė struktūra, o intervale nuo pH 3 iki pH 10 vyrauja dalinai susukta, išvyniota arba visiškai susukta struktūros.

Nuo 8-osios matavimo dienos matome ryškų fluorescencijos intensyvumo sumažėjimą pH 2 tirpale, kuris siejamas su FAD katijoninės būsenos susidarymu. Sugerties juostos ties 450 nm intensyvumo mažėjimas tai patvirtina. Taip pat šarminių tirpalų fluorescencijos spektruose matome, kad 450 – 460 nm intervale išryškėja nauja fluorescencijos juosta, kuri siejama su redukuotos FADH<sub>2</sub> struktūros susiformavimu. Redukuota FADH<sub>2</sub> struktūros fluorescencijos juosta stebima pH 9 buferyje.

Kaip ir sugerties atveju, 15-osios ir 22-osios dienų fluorescencijos spektruose matome ryškiausius kitimus. FAD fluorescencijos intensyvumas dar labiau sumažėja, o ypač didelis sumažėjimas stebimas pH 3 tirpale. Taip pat dar labiau ryškėja fluorescencijos juosta tie 450 – 460 nm. Tai reiškia intensyviai vykstantį redukuotos FADH<sub>2</sub> atsiradimą.

Regimajame spektro ruože stebimas GOx sugerties spektras susidedantis iš dviejų FAD būdingų sugerties juostų, kurių intensyvumai ir maksimumų padėtys kito laike bei skirtingų pH tirpaluose. Stebint 1 – 8 dienomis užregistruotus sugerties spektrus, nustatyta, kad pH 2 buferyje GOx sugerties juostos yra ties 374 nm ir 445 nm. Taip pat sugerties spektras stipriai skiriasi nuo kitų spektrų optinio tankio sumažėjimu, kuris siejamas su fermento sąveika su buferinio tirpalo jonais. Sąveikos metu fermentas keičia savo erdvinę konformaciją ir sugerties ekstinkcijos koeficientas sumažėja.

Acetatiniuose–fosfatiniuose buferiniuose pH 3 – 4 tirpaluose GOx sugerties juostos užregistruotos ties 372 nm ir 462 nm bei nustatyta, kad pirmoji sugerties juosta yra intensyvesnė už antrąją. Esant pH 6 – 9 rūgštingumui, sugerties juostos yra ties 383 nm ir 452 nm, o intensyvesnė yra antroji sugerties juosta. Taip pat buferiuose, kurių pH 5 – 8, GOx sugerties antroji juosta yra intensyvesnė už pirmąją. Pastebėta, kad šarminat terpę, GOx tirpalams būdingas pirmosios sugerties juostos pasislinkimas į ilgabangę pusę, o antrosios – į trumpabangę.

15-osios ir 22-osios dienos sugerties spektruose, kaip ir FAD atveju, atsiranda pastebimi pokyčiai. Esant pH 2 rūgštingumui, GOx antroji sugerties juosta sumažėja, o pirmosios juostos maksimumo padėtis pasislenka į ilgesnių bangų pusę per 5 nm. Esant šiam rūgštingumui fermentas yra pakeitęs savo struktūrą, o FAD kofermentas yra disocijavęs iš fermento aktyviojo centro.

Laisvas FAD rūgštinėje terpėje prisijungia  $H^+$  jonus ir virsta redukuota  $FADH_2$  forma, kuri lemia sugerties formos kitimą.

Stebint GOx pH 3 – 4 tirpalus, matome antrosios sugerties juostos mažėjimą ypač pH 3 tirpaluose. Kitų rūgštingumų buferiuose (pH 5 – 7), GOx sugerties juostų padėtis ir intensyvumas kito tik paklaidų ribose. Šarminiuose pH 8 – 9 tirpaluose, stebimas sugerties sklaidymas, kurį sukėlė artefaktai.

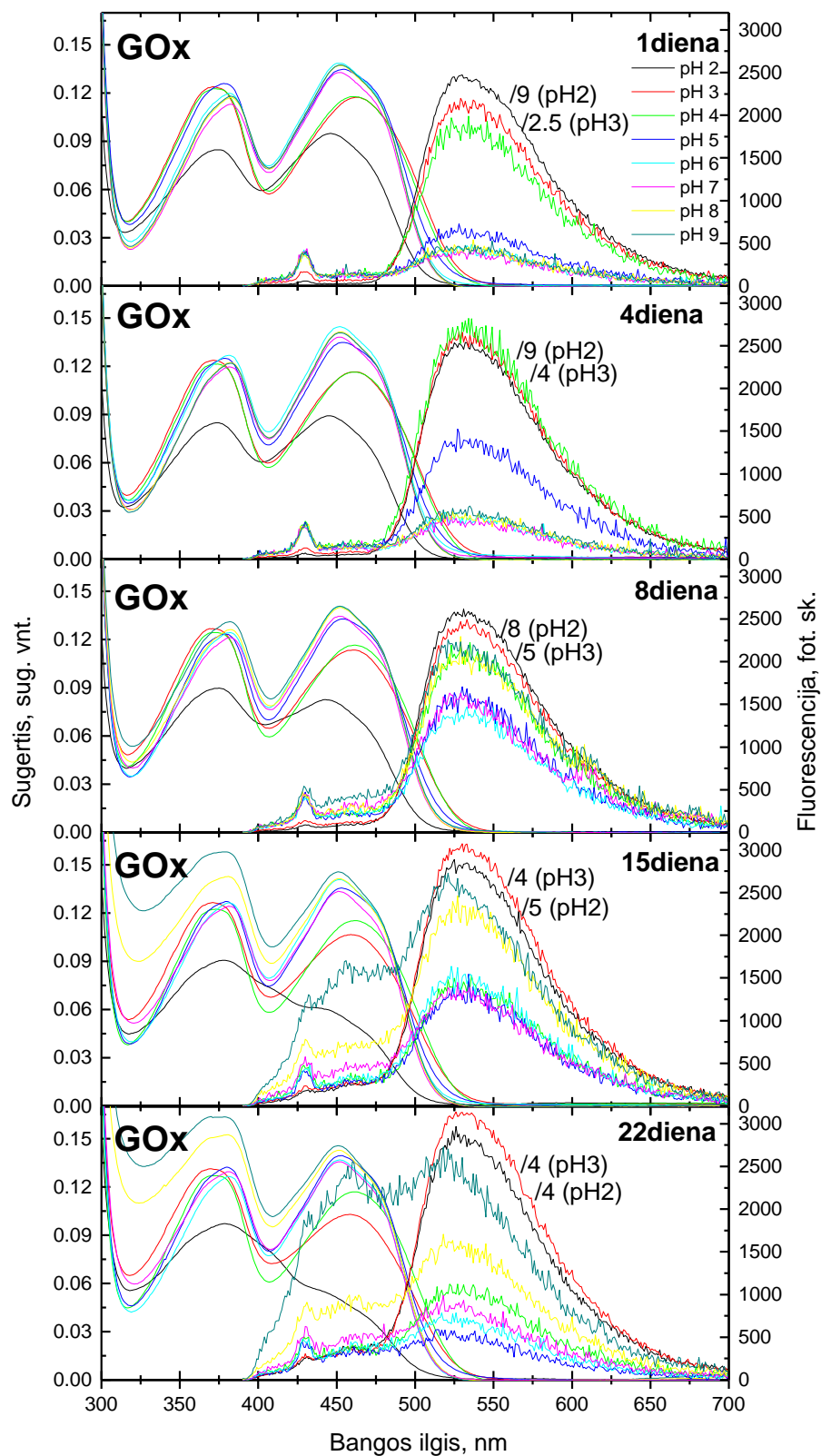
GOx fluorescencijos spektras pasižymi dvejomis fluorescencijos juostomis: mažo intensyvumo juosta yra ties 450 nm, o intensyvi fluorescencijos juosta yra ties 530 nm. Matavimų atliktų skirtingomis dienomis metu bei esant skirtingam terpės rūgštingumui, keitėsi fluorescencijos juostų padėtys bei fluorescencijos intensyvumai.

Pirmoji fluorescencijos juosta 1–ąją bei 4–ąją matavimo dienomis nekito pH 2 – 9 intervale. Šios juostos pokyčiai, kaip ir FAD atveju, užfiksuoti tik vėlesnių matavimų metu. 8–ąją matavimo dieną, intensyvumas labiausiai padidėjo GOx pH 2, 3, 9 tirpaluose. 15–ąją bei 22–ąją dieną ši fluorescencijos juosta intensyviausia pH 9 buferiniame tirpale. Fluorescencijos juostos ties 450 – 460 nm didėjimas siejama su redukuotos  $FADH_2$  struktūros susiformavimu.

GOx fluorescencijos juosta ties 530 nm siejama su oksiduotos FAD struktūros fluorescencija. Ši juosta visų matavimų metu intensyviausia rūgštinuose (pH 3 – 4) GOx tirpaluose. Ši santykinai didelio intensyvumo fluorescencijos juosta yra siejama su FAD disociacija iš fermento dėl panaikinto nekovalentinio ryšio. Lyginant fluorescencijos spektrus užregistruotus skirtingomis matavimo dienomis, bendros fluorescencijos intensyvumo kitimo tendencijos nustatyti negalime, bet pirmosiomis matavimų dienomis intensyvumas dažniausiai padidėdavo, o nuo 15-os dienos pradėdavo mažėti.

Taip pat nustatyta, kad mažiausias fluorescencijos intensyvumas yra GOx pH 5 – 6 tirpaluose. Šis tirpalo rūgštingumas yra optimaliausias GOx fermentui, dėl to fermento aktyvumas tose terpėse yra pats didžiausias [27]. Silpna fluorescencija yra siejama su tuo, kad GOx aktyviajame centre esančio FAD fluorescencija yra gesinama fermento apvalkalo. Taip pat fluorescencijos gesinimas vyksta dėl vidumolekulinės elektronų pernašos iš adenino fragmento į tiroziną, esantį GOx fermento apvalkale [41]. Taip pat esant optimaliam rūgštingumui, nėra palankių sąlygų FAD disociacijai. Buferiuose, kurių pH 7 – 9, stebimas labai nedidelis fluorescencijos intensyvumo pokytis lyginant su optimaliu pH 1-osios ir 4-osios dienos matavimo metu. Tačiau vėlesnių matavimų metu fluorescencijos intensyvumas padidėjo bei fluorescencijos juosta pasislinko į trumpesnių bangų pusę.

Tyrimo metu matavimai buvo atliekami 3 skirtinguose buferiuose: acetatiniame, acetatiniame–fosfatiniame bei citratiniame. Lygindami duomenis pastebėjome, kad katijoninių bei redukuotų FAD struktūrų susidarymo laikas priklauso ir nuo buferio sudėties.

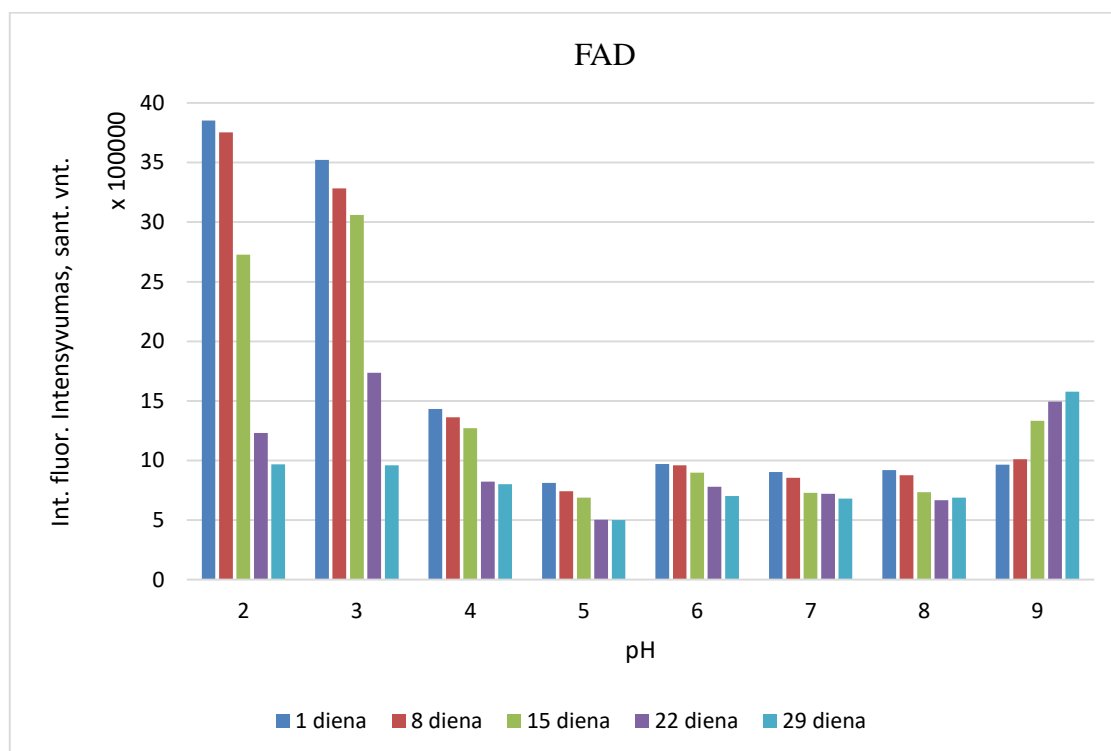


4.2 pav. GOx, ištirpinto acetatiniuose–fosfatiniuose buferiuose, sugerties ir fluorescencijos spektrai 1, 4, 8, 15, 22 dienomis.



## 4.2 Integralinio fluorescencijos intensyvumo kitimai 29 dienų laikotarpyje

Grafikuose 4.3 pav. ir 4.3 pav. pavaizduoti skirtingose pH terpėse užregistruoti flavinadenindinukleotido (FAD) ir gliukozės oksidazės (GOx) tirpalų integraliniai fluorescencijos intensyvumų kitimai, atsiradę 29–ų dienų laikotarpyje. Fluorescencijos integraliniai intensyvumai buvo koreguoti atsižvelgiant į tirpalų optinį tankį ties žadinimo bangos ilgiu ( $\lambda_{ex}=375$  nm). Grafikuose vaizduojami 12 serijų matavimų suvidurkinti duomenys.

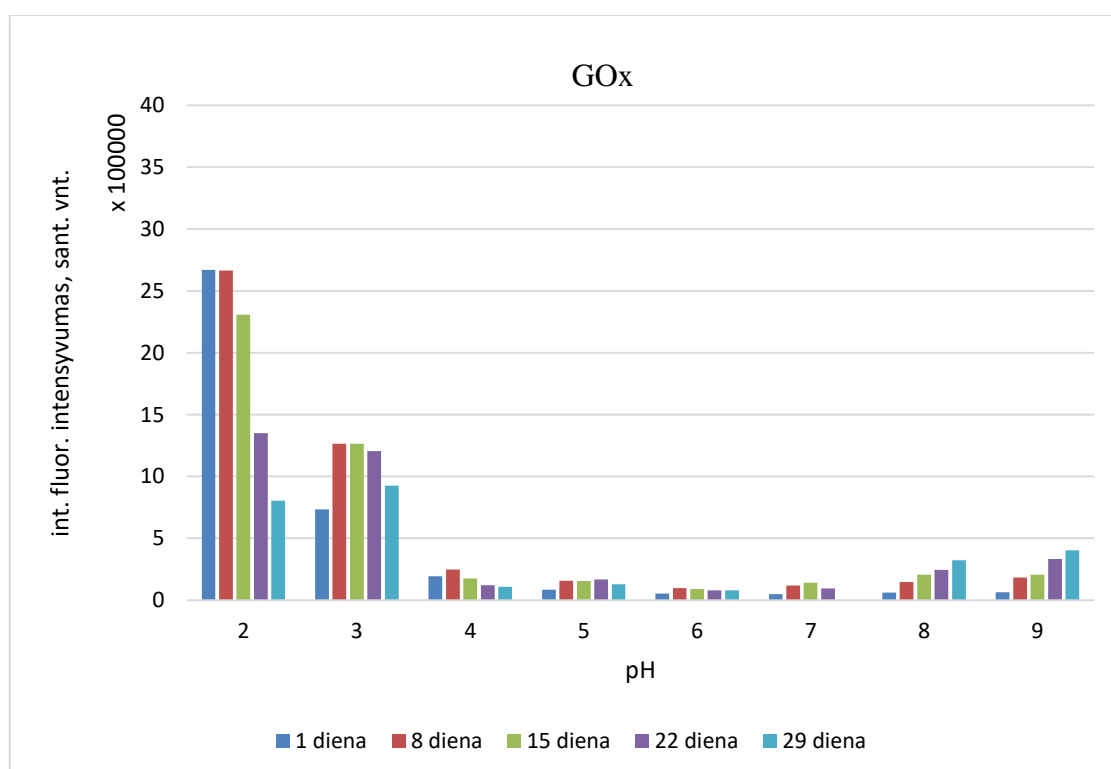


4.3 pav. Integraliniai FAD fluorescencijos intensyvumų kitimai 29–ų dienų laikotarpyje.

Esant pH 2 – 8 rūgštingumui, stebimas FAD fluorescencijos intensyvumų mažėjimas 29–ų dienų laikotarpyje. Fluorescencijos slopinimas rūgštiniuose tirpaluose siejamas su katijoninės FAD formos susidarymu, kuri pasižymi labai silpna fluorescencija [35]. Pats intensyviausias FAD fluorescencijos intensyvumų kitimas, matomas pH 2 – 3 tirpaluose, nes šis rūgštingumas palankiausias FAD struktūros kitimui.

Maksimalus FAD fluorescencijos integralinis intensyvumas užregistruotas pH 2 – 3 tirpaluose. Tai patvirtina literatūroje pateikiamus duomenis, kad maksimalus FAD kvantinis našumas yra stebimas pH 3 rūgštingumo terpėje [35]. Taip pat yra žinoma, kad kvantinis našumas tirpaluose, kurių pH 5 – 8, yra beveik 3 kartus mažesnis už maksimalų. Lyginant 4.3 grafike pateiktus duomenis, matome, kad pH 6 integralinis fluorescencijos intensyvumas ir yra beveik 3 kartus mažesnis už intensyvumą pH 2 – 3 buferiniame tirpale.

Nagrinėjant GOx integralinius fluorescencijos intensyvumų kitimus 29–ų dienų laikotarpyje, matome, kad pats didžiausias intensyvumų mažėjimas yra pH 2 buferiniame tirpale. Taip pat šiame buferyje fluorescencijos intensyvumas yra apie 10 kartų didesnis nei optimaliame pH 6 tirpale. Intensyvią fluorescenciją lemia tai, kad rūgštinėje terpėje FAD disocijuoja iš GOx fermento ir jo fluorescencija nebėra gesinama fermento apvalkalo bei tai, kad FAD fluorescencijos kvantinis našumas yra didžiausias rūgštinėje terpėje. Tirpaluose, kurių pH 3 – 9 fluorescencijos integralinis intensyvumas didėja 8-osios dienos matavimo metu. Šis didėjimas siejamas su FAD disocijavimu iš fermento aktyviojo centro bei GOx aktyvumo mažėjimu.



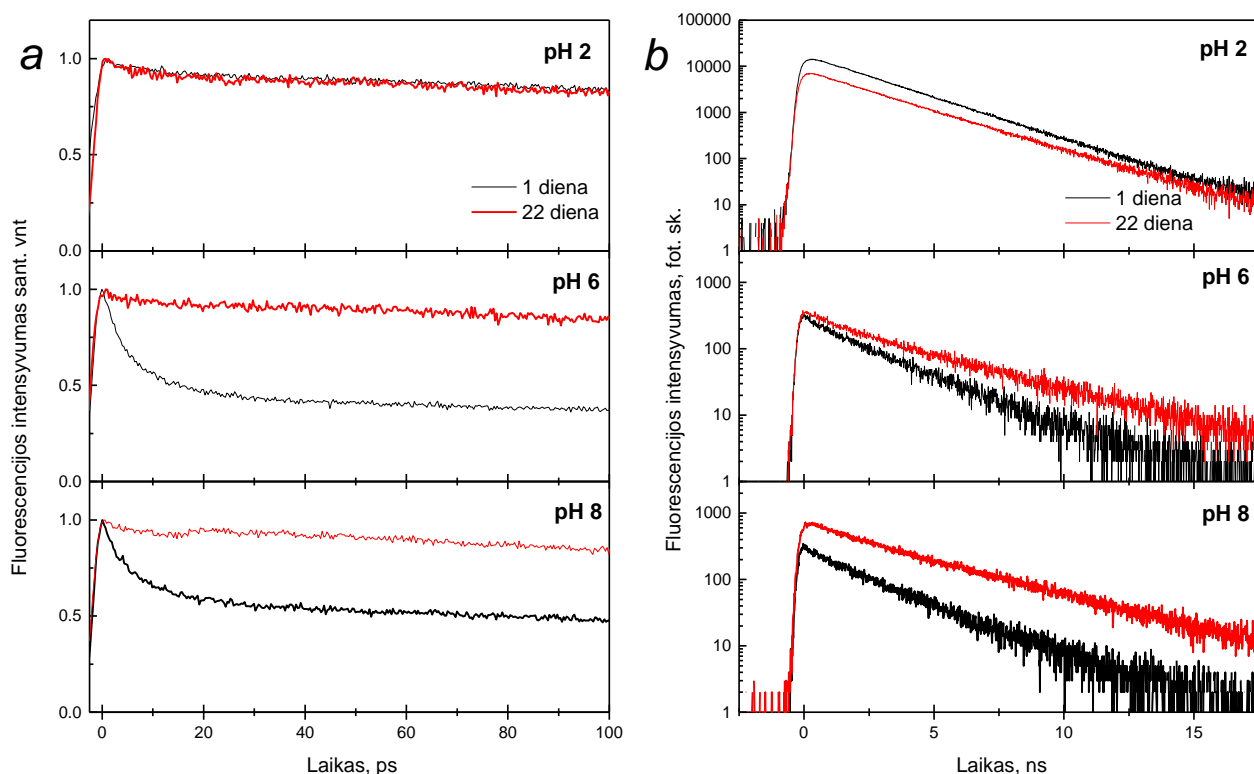
4.4 pav. Integraliniai GOx fluorescencijos intensyvumų kitimai 29–ų dienų laikotarpyje.

Lyginant 4.3 ir 4.4 grafikuose pateiktus duomenis, matome, kad 1–ąją matavimo dieną pH 2 tirpaluose FAD bei GOx integraliniai fluorescencijos intensyvumai yra patys didžiausi. Tai leidžia patvirtinti prielaidą, kad esant šiam rūgštingumui didžioji dalis FAD yra disocijavęs iš GOx aktyviojo centro. Tačiau esant optimaliam pH 6, FAD ir GOx fluorescencijos integraliniai intensyvumai 1-ąją matavimo dieną skiriasi apie 8 kartus, vėlesnių matavimų metu šis santykis sumažėja. GOx tirpaluose fluorescencija silpnesnė, nes FAD yra nekovalentiškai prijungtas prie fermento aktyviojo centro, tad jo fluorescencija yra gesinama fermento apvalkalo.

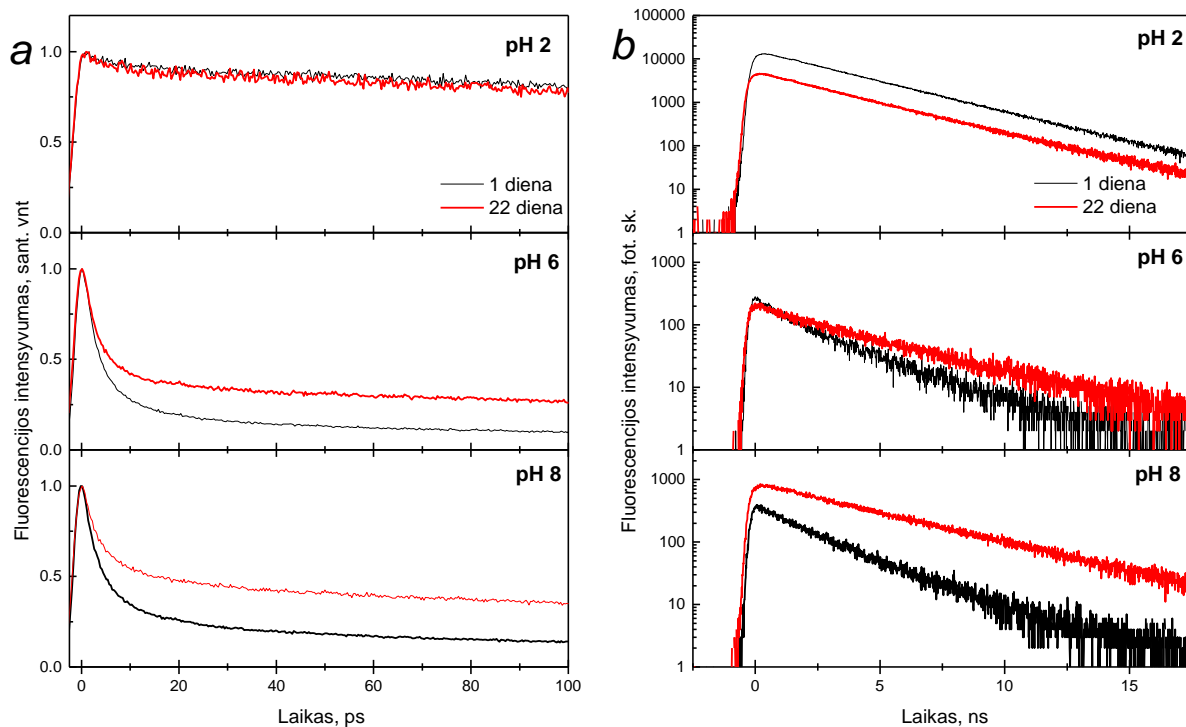
### 4.3 Fluorescencijos relaksacijos trukmių kitimas

Tyrimų metu fluorescencijos gesimo kinetikos buvo matuojamos ties 450 nm ir 530 nm, tačiau detalesnei analizei pasirinkta intensyvesnės fluorescencijos juostos kinetika ties 530 nm. Fluorescencijos gesimo kinetikos buvo aproksimuotos dviem eksponentėmis ( $\tau_2$ ,  $\tau_3$ ), iš kurių buvo apskaičiuota vidutinė relaksacijos trukmė ( $\tau_{vid}$ ). Ultrasparti fluorescencijos gesimo trukmė ( $\tau_1$ ) atspindi viso fluorescencijos spektro 440 – 620 nm gesimą ps skalėje. Lentelėse 1, 2 pateikiamas apibendrinti 12 serijų fluorescencijos relaksacijos trukmių palyginimai 22-ų dienų laikotarpyje.

Sugerties bei fluorescencijos spektrų kitimai leidžia spręsti apie FAD oksiduotos struktūros bei rūgštinės–bazinės formos [33] pokyčius, o fluorescencijos relaksacijos trukmės teikia informaciją FAD erdvinę konformaciją [35]. FAD erdvinė struktūra stipriai priklauso nuo terpės rūgštingumo, tad užregistruotų kinetikų kitimams daro įtaką buferio pH bei matavimo laikas. Vidutinės relaksacijos trukmės vertė priklauso nuo vyraujančios išsuktos, susuktos ar dalinai susuktos FAD struktūros. FAD bei GOx fluorescencijos gesimo kinetikos skirtingo rūgštingumo terpėse bei skirtingose laiko skalėse pavaizduotos 4.5 pav. ir 4.6 pav. grafikuose. Lentelėse pateikti 12 serijų matavimų suvidurkinti gesimo laikų duomenys, kurių paklaida yra  $\pm 0,1$  ns.



4.5 pav. FAD fluorescencijos gesimo kinetikų palyginimas 1 ir 22 dienomis citratiniame buferyje, (a) sunormuotos fluorescencijos (440 - 620 nm) gesimo kinetikos ( $\lambda_{ex}=343$  nm), (b) gesimo kinetikos ties 530 nm ( $\lambda_{ex}=375$  nm).



4.6 pav. GOx fluorescencijos gesimo kinetikų palyginimas 1 ir 22 dienomis citratiname buferyje, (a) sunormuotos fluorescencijos (440 - 620 nm) gesimo kinetikos ( $\lambda_{ex}=343$  nm), (b) gesimo kinetikos ties 530 nm ( $\lambda_{ex}=375$ nm).

1–ąją matavimo dieną FAD vidutinė relaksacijos trukmė pH 2 tirpale yra lygi 2,5 ns. Šiame rūgštingume vyrauja molekulės išsidėstymas išsukta struktūra. Esant pH 6 rūgštingumui, vidutinė fluorescencijos relaksacijos trukmė yra 2,9 ns. Tačiau šiame rūgštingume stipriai padidėja  $\tau_2$  gesimo komponentės indėlis, kuris siejamas su susukta FAD struktūra. Esant pH 8 rūgštingumui matavimų rezultatai yra artimi pH 6 duomenims. Taip pat pH 6, 8 tirpaluose yra stebimas ultraspartus fluorescencijos gesimas, kurio trukmė atitinkamai lygi 10 ps ir 16 ps.

1–ąją matavimo dieną GOx vidutinė fluorescencijos relaksacijos trukmė pH 2 tirpale yra lygi 2,7 ns. Šiame rūgštingume, kaip ir FAD atveju, vyrauja molekulės išsidėstymas išsukta struktūra. Esant pH 6 rūgštingumui, vidutinė relaksacijos trukmė sumažėja iki 2,5 ns. Tačiau šiame rūgštingume padidėja  $\tau_2$  gesimo komponentės indėlis iki 14%. Esant pH 8 rūgštingumui matavimų rezultatai yra artimi pH 6 duomenims. Kaip ir FAD atveju pH 6, 8 tirpaluose yra registruojama ultraspartus fluorescencijos gesimo trukmė, kuri yra lygi 6 ps.

Vėlesnių matavimų metu (22–ąją matavimo dieną) stebimas FAD vidutinių fluorescencijos relaksacijos trukmių padidėjimas pH 6–9 terpėse. Rūgštinėse terpėse (pH 2–5) vidutinė relaksacijos trukmė keičiasi nežymiai. Tačiau GOx tirpaluose, vidutinių relaksacijos trukmių kitimai yra intensyvesni ir pasireiškia pH 5–9 terpėse. Taip pat padidėja ilgosios gesimo komponentės indėlis. Ultraspartus fluorescencijos gesimas išlieka tik GOx tirpaluose, kurių rūgštingumas pH 6, 8. Be to stebimas gesimo trukmės padidėjimas 8 ps (pH 6) ir 12 ps (pH 8).

1 lentelē. Fluorescencijas gesimo trukmēs (ties fluorescencijas maksimumu 530nm,  $\lambda_{ex}=375$  nm.)

pH	diena	FAD			GOx		
		$\tau_a$ , ns	$\tau_l$ , ns (%)	$\tau_2$ , ns (%)	$\tau_a$ , ns	$\tau_l$ , ns (%)	$\tau_2$ , ns (%)
pH2	1	<b>2,5</b>	0,9 (6%)	2,6 (94%)	<b>2,7</b>	1,2 (9%)	2,9 (91%)
	8	<b>2,6</b>	0,8 (7%)	2,7 (93%)	<b>2,9</b>	1,2 (10%)	3,1 (90%)
	15	<b>2,6</b>	0,8 (8%)	2,8 (92%)	<b>2,7</b>	1 (9%)	2,9 (91%)
	22	<b>2,5</b>	0,8 (10%)	2,7 (90%)	<b>2,7</b>	0,9 (9%)	2,9 (91%)
	29	<b>2,6</b>	0,8 (15%)	2,9 (85%)	<b>2,9</b>	0,9 (10%)	3,1 (90%)
pH3	1	<b>3,2</b>	1 (7%)	3,4 (93%)	<b>3,8</b>	1, (4%)	3,9 (96%)
	8	<b>3,2</b>	1 (7%)	3,4 (93%)	<b>3,9</b>	0,9 (4%)	4 (96%)
	15	<b>3,2</b>	0,9 (7%)	3,4 (93%)	<b>3,9</b>	0,9 (5%)	4 (95%)
	22	<b>3,2</b>	1 (9%)	3,4 (91%)	<b>4,1</b>	1 (4%)	4,2 (96%)
	29	<b>3,3</b>	1 (7%)	3,5 (93%)			
pH4	1	<b>3,2</b>	1,3 (15%)	3,5 (85%)	<b>4</b>	0,9 (5%)	4,2 (95%)
	8	<b>3,1</b>	1,3 (14%)	3,4 (86%)	<b>4,1</b>	0,8 (5%)	4,3 (95%)
	15	<b>3,1</b>	1,2 (12%)	3,4 (88%)	<b>4,1</b>	0,9 (7%)	4,3 (93%)
	22	<b>3,2</b>	1,2 (14%)	3,5 (86%)	<b>4,1</b>	0,8 (6%)	4,3 (94%)
	29	<b>3,3</b>	1,2 (14%)	3,6 (86%)			
pH5	1	<b>2,9</b>	1,7 (37%)	3,6 (63%)	<b>3,2</b>	0,7 (10%)	3,5 (90%)
	8	<b>2,8</b>	1,7 (40%)	3,6 (60%)	<b>4</b>	0,7 (5%)	4,2 (95%)
	15	<b>2,8</b>	1,6 (37%)	3,5 (63%)	<b>4</b>	0,7 (8%)	4,3 (92%)
	22	<b>2,7</b>	1,2 (23%)	3,2 (77%)	<b>3,9</b>	0,7 (12%)	4,3 (88%)
	29	<b>2,7</b>	1,3 (27%)	3,2 (73%)			
pH6	1	<b>2,9</b>	1,8 (46%)	3,8 (54%)	<b>2,5</b>	0,4 (14%)	2,8 (86%)
	8	<b>3,2</b>	1,7 (33%)	4,0 (67%)	<b>3,9</b>	0,5 (8%)	4,2 (92%)
	15	<b>3,4</b>	1,5 (24%)	4,0 (76%)	<b>4</b>	0,6 (9%)	4,3 (91%)
	22	<b>3,8</b>	1,2 (12%)	4,3 (88%)	<b>4</b>	0,7 (8%)	4,3 (92%)
	29	<b>4,1</b>	1,2 (9%)	4,4 (91%)	<b>4</b>	0,6 (8%)	4,3 (92%)
pH7	1	<b>3</b>	1,8 (40%)	3,8 (60%)	<b>2,6</b>	0,4 (15%)	3 (85%)
	8	<b>3,4</b>	1,7 (28%)	4,1 (72%)	<b>4,2</b>	0,5 (5%)	4,4 (95%)
	15	<b>3,8</b>	1,1 (12%)	4,2 (88%)	<b>4,2</b>	0,7 (6%)	4,4 (94%)
	22	<b>4,05</b>	0,9 (10%)	4,4 (90%)	<b>4,1</b>	0,6 (8%)	4,4 (92%)
	29	<b>4</b>	1 (15%)	4,5 (85%)	<b>4,4</b>	0,6 (5)	4,6 (95%)
pH8	1	<b>3</b>	1,8 (42%)	3,9 (58%)	<b>2,5</b>	0,4 (14%)	2,8 (86%)
	8	<b>3,4</b>	1,6 (28%)	4,1 (72%)	<b>4,1</b>	0,6 (10%)	4,5 (90%)
	15	<b>3,6</b>	1,2 (18%)	4,1 (82%)	<b>4,2</b>	0,9 (7%)	4,5 (93%)
	22	<b>3,9</b>	1,1 (12%)	4,3 (88%)	<b>4,1</b>	0,9 (10%)	4,5 (90%)
	29	<b>3,8</b>	1,3 (20%)	4,4 (80%)	<b>4,4</b>	0,7 (5%)	4,6 (95%)
pH9	1	<b>3</b>	1,7 (39%)	3,8 (61%)	<b>2,5</b>	0,3 (12%)	2,8 (88%)
	8	<b>3,6</b>	1,5 (18%)	4,1 (82%)	<b>4</b>	0,6 (7%)	4,3 (93%)
	15	<b>3,8</b>	1,1 (12%)	4,2 (88%)	<b>4,2</b>	0,7 (5%)	4,4 (95%)
	22	<b>3,9</b>	1,2 (14%)	4,3 (86%)	<b>4,2</b>	0,8 (8%)	4,5 (92%)
	29	<b>3,9</b>	1,2 (20%)	4,6 (80%)	<b>4,1</b>	0,9 (10%)	4,5 (90%)

2 lentelė. FAD ir GOx fluorescencijos relaksacijos trukmės skirtingose pH terpėse.

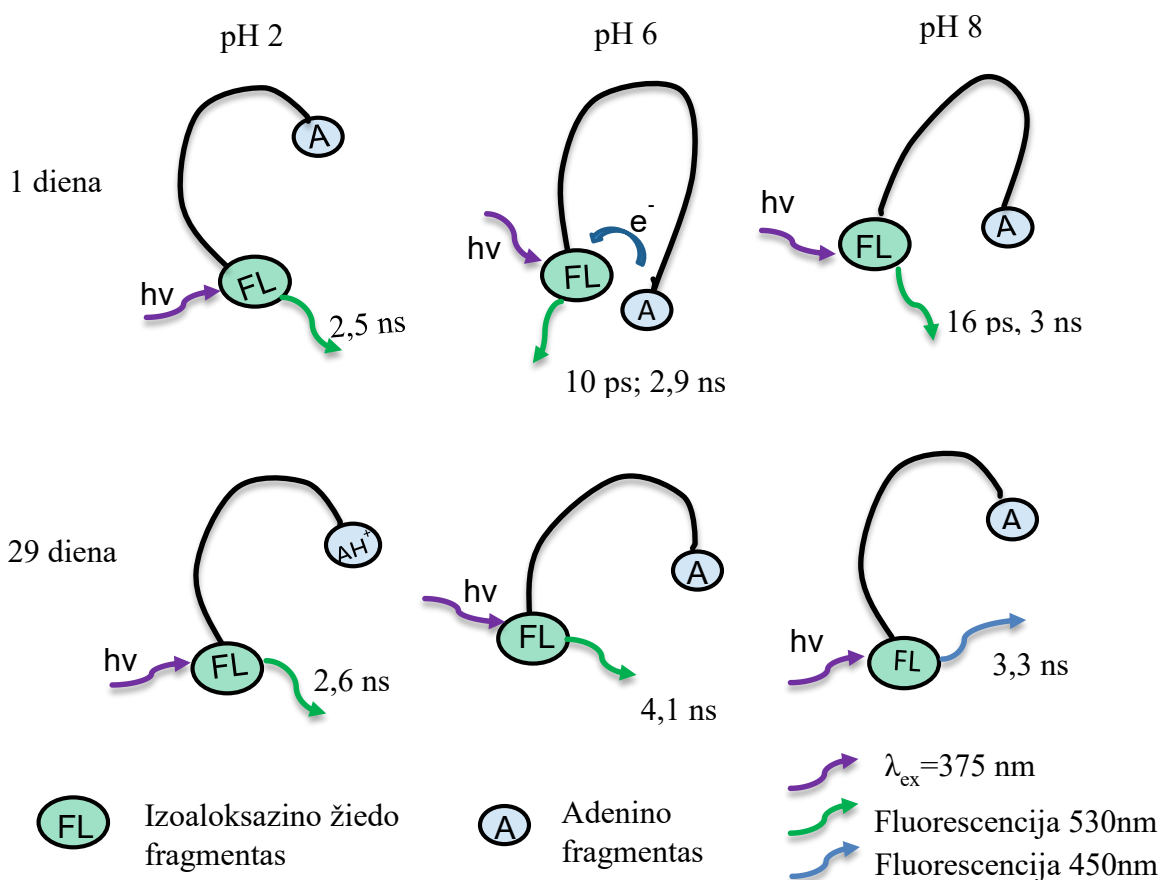
	pH2		pH 6		pH 8	
	FAD	GOx	FAD	GOx	FAD	GOx
<b>1 diena</b>						
$\lambda_{Fl}$ , nm	530	530	530	530	530	530
$I_{Fl}$ , arb.un.	3853623	2670492	970648	52568	919053	61437
$\tau_1$ , ps*	-	-	10	6	16	6
$\tau_2$ , ns (%)	0,9 (6%)	1,2 (9%)	1,8 (46%)	0,4 (14%)	1,80 (42%)	0,4 (14%)
$\tau_3$ , ns (%)	2,6 (94%)	2,9 (91%)	3,8 (54%)	2,8 (86%)	3,9 (58%)	2,8 (86%)
$\tau_{vid}$ , ns	2,5±0,1	2,7±0,1	2,9±0,1	2,5±0,1	3±0,1	2,5±0,1
<b>22 diena</b>						
$\lambda_{Fl}$ , nm	500	530	530	530	450, 520	450, 520
$I_{Fl}$ , arb.un.	1231267	1349158	779714	78545	666308	243658
$\tau_1$ , ps*	-	-	-	8	-	12
$\tau_2$ , ns (%)	0,8 (10%)	0,9 (9%)	1,2 (12%)	0,7 (8%)	1,1 (12%)	0,9 (10%)
$\tau_3$ , ns (%)	2,7 (90%)	2,9 (91%)	4,3 (88%)	4,3 (92%)	4,3 (88%)	4,5 (90%)
$\tau_{vid}$ , ns	2,5±0,1	2,7±0,1	3,8±0,1	4±0,1	3,9±0,1	4,1±0,1

\* matavimai atlikti su fotoelektronų kamera  $\lambda_{ex}=343$  nm.

Lyginant GOx relaksacijos trukmių kitimą su FAD, pastebime, kad GOx vidutinės fluorescencijos relaksacijos trukmės kinta didesniame intervale. Nagrinėjant  $\tau_2$  ir  $\tau_3$  gesimo komponentes pastebėta, kad FAD atveju rūgštinėse terpėse dominuoja ilgoji ( $\tau_3$ ) gesimo komponentė, o GOx tirpaluose ši komponentė dominuoja visuose pH. Šarminant FAD tirpalus pradeda keistis  $\tau_3$  gesimo komponentės dominavimas nuo 94% iki beveik 60%, vėlesnių matavimų metu komponentės indėlis keičiasi nuo 85% iki 80%. GOx atveju šarminant terpę  $\tau_3$  komponentės dominavimas išlieka apie 90% o ir vėlesnių matavimų metu komponentės indėlis beveik nekinta. Tačiau keičiasi skaitinės  $\tau_2$  ir  $\tau_3$  komponentių vertės.

4.7 pav. yra apibendrinti FAD molekulos struktūriniai ir vidutinių fluorescencijos gesimo trukmių kitimai 1 ir 29 dienomis. Pavaizduota skirtingų terpių (pH 2, 6, 8) daroma įtaka izoaloksazino ir adenino fragmentams. 1-ąją matavimo dieną pH 2 terpėje FAD yra išvyniotos būsenos, o pH 6, 8 terpėje dominuoja dalinai susuktos FAD konfigūracijos. FAD esant dalinai susuktoje konfigūracijoje atstumas tarp adenino fragmento ir izoaloksazino žiedų sistemos padidėja, tačiau silpna tarpusavio sąveika išlieka ir lemia fluorescencijos gesimo laiką apytiksliai lygų 2,2 ns [35]. Taip pat šiuose pH egzistuoja ir visiškai susuktos FAD struktūros, kurioms pasižymi kelių ps fluorescencijos gesimo trukme dėl vidumolekulinės elektrono pernašos.

29-ąją matavimo dieną pH 2 terpėje susiformavo katijoninės FAD struktūros. Nors vidutinės fluorescencijos relaksacijos trukmės pakito nežymiai, bet apie FAD pakitimus informaciją teikia pokyčiai sugerties bei fluorescencijos spektruose. Esant pH 6 rūgštingumui matomas fluorescencijos gesimo trukmės pailgėjimas, kuris yra siejamas su išsuktos struktūros susiformavimu. Apie molekulės išsivyniojimą rodo ir išnykęs ultraspartus fluorescencijos gesimas. Esant pH 8 rūgštingumui, FAD molekulė taip pat išsivynioja bei vidutinės fluorescencijos relaksacijos trukmės pailgėja. Tačiau lyginant su pH 6 terpe, fluorescencijos spektruose matome naujos juostos ties 450 nm atsiradimą, kurios vidutinė fluorescencijos relaksacijos trukmė yra lygi 3,3ns. Fluorescencijos juosta ties 450 nm yra susijusi su redukuotos FADH<sub>2</sub> struktūros susidarymu.

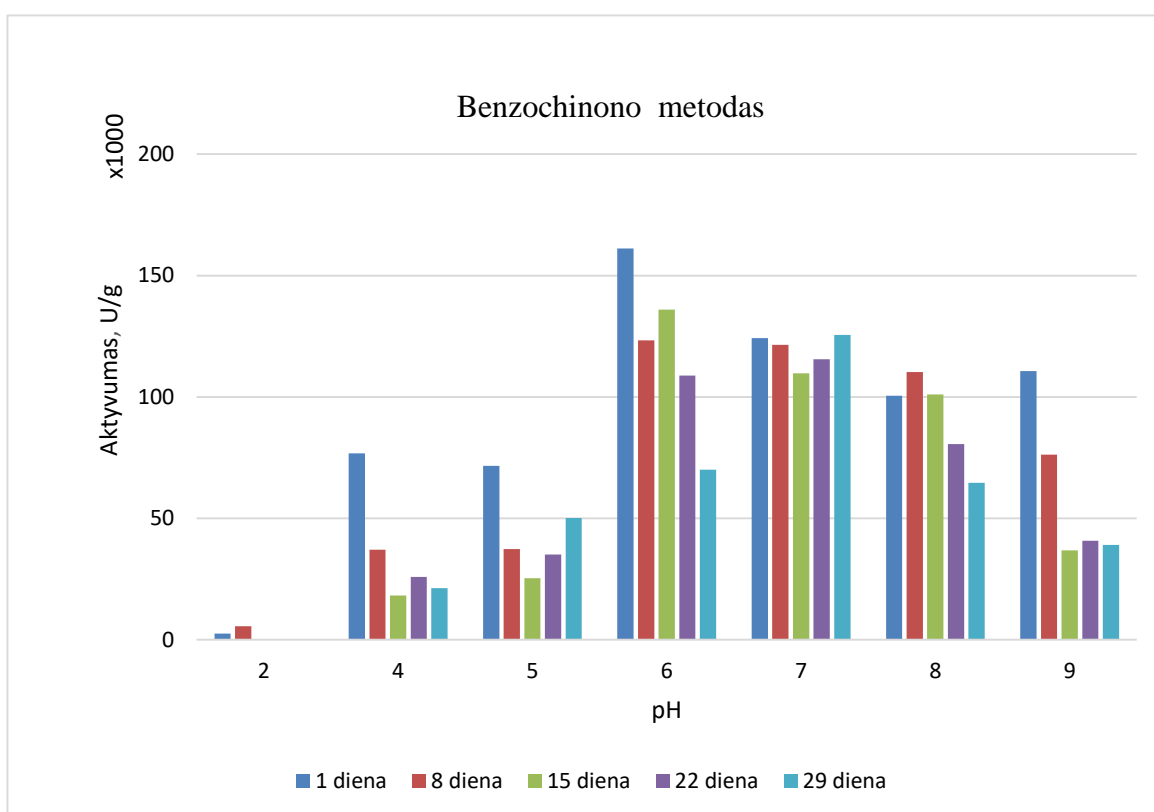


4.7 pav. FAD molekulės struktūriniai ir vidutinių fluorescencijos gesimo kinetikų kitimai 1 ir 29 dienomis.

#### 4.4 GOx aktyvumo tyrimas

Fermento aktyvumas išreiškiamas substrato arba susidariusio produkto koncentracijos pokyčiu per laiko vienetą. GOx fermento aktyvumas buvo nustatomas A. Ciucu aprašytu metodu [5]. Spektrofotometrinis GOx aktyvumo nustatymas remiasi fermentinės reakcijos metu vykstančiu benzochinono virstimu į hidrochinoną (benzochinono metodas). Metodo paklaida siekia daugiau nei 20%. Netikslumus lemia aplinkos veiksniai (temperatūra, drėgmė), cheminės reakcijos našumas ir eksperimentinės paklaidos (medžiagų svėrimas, tūrio tikslumo matavimas). Hidrochinono susidarymas įvertinamas registruojant sugerties juostos ties 290 nm intensyvumo kitimą laike. Apskaičiuoti GOx aktyvumo kitimai 29-ų dienų laikotarpyje pavaizduoti 4.8 pav.

Gliukozės oksidazės aktyvumo vienetu (U) yra laikomas toks fermento kiekis, kuris katalizuoja 1 mM benzochinono virstimą hidrochinonu per vieną minutę optimaliomis sąlygomis (25°C) [5]. Yra žinoma, kad tyrimuose naudojama GOx pasižymi >100000 U/g aktyvumu [43].



4.8 pav. Benzochinono metodu nustatyti GOx aktyvumo kitimai 29-ų dienų laikotarpyje.

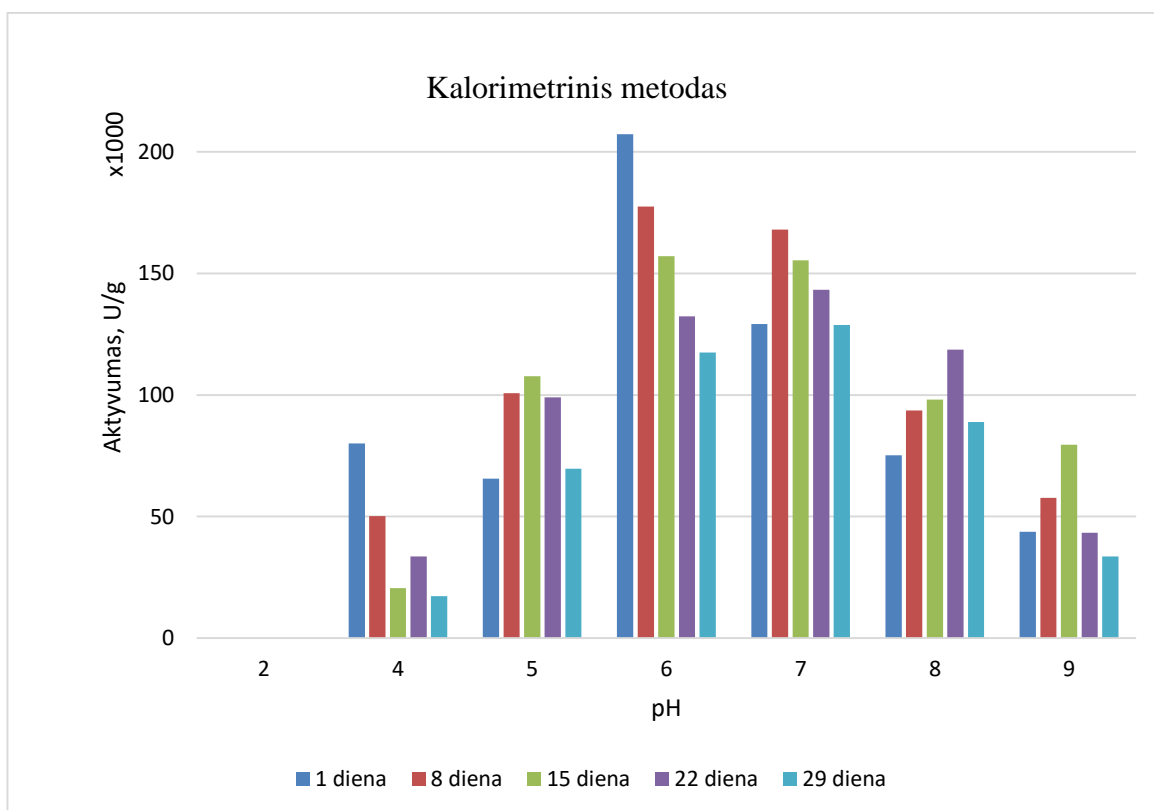
1-ąją matavimo dieną nustatyta, kad esant pH 2 rūgštingumui, GOx fermentas yra visiškai neaktyvus. Pats didžiausias aktyvumas yra pH 6 rūgštingume. Taip pat svarbu paminėti, kad fermento aktyvumas yra pakankamai didelis pH intervale nuo 6 iki 8. Tai sutampa su literatūroje pateiktu GOx veikimo intervalu, kuris yra nuo 4 – 8 pH [10].



Esant pH 2 rūgštingumui, GOx fermentas yra visiškai neaktyvus visame 29-ų dienų laikotarpyje. Esant pH 4,5 rūgštingumui, matome fermento aktyvumo mažėjimą, tačiau net maksimali aktyvumo vertė nepasiekia 100000 U/g aktyvumo. 3 savaites GOx aktyvumas pH 6 terpėje buvo didesnis už nominalų aktyvumą. Nustatyta, kad 29-ų dienų laikotarpyje GOx aktyvumas sumažėjo dvigubai.

Neįprastas GOx aktyvumo kitimas stebimas pH 7 terpėje. Visų matavimų metu GOx intensyvumas buvo didesnis už nominalųjį bei laikui bėgant kito nežymiai. Esant pH 8, fermento aktyvumas 29-ų dienų laikotarpyje sumažėjo beveik 2 kartus. GOx esant pH 9 terpėje, pastebime, kad fermentas buvo minimaliai aktyvus tik 1-ąją matavimo dieną, o vėlesnių matavimų metu aktyvumas stipriai sumažėjo.

Siekiant tiksliau ir patikimiau įvertinti fermento aktyvumą buvo naudojamas komerciškai įsigytas gliukozės oksidazės aktyvumo tyrimo kalorimetrinis metodas (MAK097). Metodo paklaida siekia 10÷15%. Netikslumus lemia aplinkos veiksniai (temperatūra, drėgmė), cheminės reakcijos našumas ir eksperimentinės paklaidos (tūrio tikslumo matavimas). Gliukozės oksidazės aktyvumas nustatomas iš sugerties spektro kitimo ties 570nm bangos ilgiu. Aktyvumo kitimai 29-ų dienų laikotarpyje pavaizduoti grafike 4.9 pav.



4.9 pav. GOx aktyvumo kitimai 29-ų dienų laikotarpyje.

Atliekant aktyvumo tyrimus nustatėme, kad pH 2 terpėje fermentas yra visiškai neaktyvus. Pats didžiausias GOx aktyvumas yra pH 6 rūgštingume, tačiau remiantis šiuo metodu GOx aktyvumo intervalas šiek tiek pakinta: nuo pH 5÷7. Esant pH 4 ir pH 9 GOx fermento aktyvumas nepasiekia nominalaus.

Iš fluorescencijos spektrų (4.4 pav.) ir GOx aktyvumo matavimų (4.8 pav., 4.9 pav.) tyrimų rūgštinėse terpėse (pH 3÷4), galima pastebėti, kad pH 2 terpėje integraliniai fluorescencijos intensyvumai FAD ir GOx patys intensyviausi, nes beveik visas FAD yra disocijavęs iš GOx aktyviojo centro. Šiuo atveju GOx fermentas yra visiškai neaktyvus, o aktyvumo tyrimai patvirtina šią prielaidą. Didėjant fluorescencijos juostos ties 530 nm intensyvumui, kuri yra priskiriama oksiduotai FAD būsenai, GOx aktyvumas sumažėja.

Esant optimaliam terpės rūgštingumui (pH 6) GOx fluorescencijos intensyvumas yra pats mažiausias, o tuo pačiu aktyvumas didžiausias. 4 savaitių laikotarpyje, fermento aktyvumas sumažėja dvigubai. Tuo tarpu fluorescencijos intensyvumas beveik nekinta, bet keičiasi fluorescencijos gyvavimo trukmė nuo 2,5 iki 4 ns. Esant didesniam terpės pH (pH 8÷9), fluorescencijos intensyvumas didėja, o aktyvumas sumažėja lyginant su pH 6 atveju.

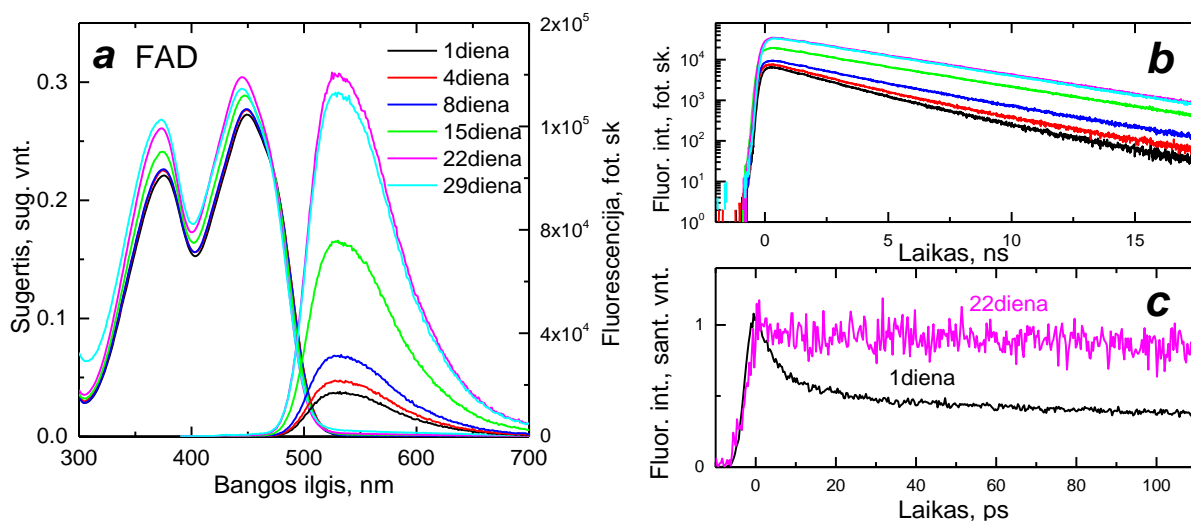
Lyginant GOx ir FAD integralinių fluorescencijos intensyvumų santykį ir jų dinamiką, o taip pat ir fluorescencijos gesimo trukmių dinamiką 4 savaitių laikotarpyje, galime pastebėti, kad rūgštinėse terpėse beveik visas FAD (daugiau nei 80%) disocijuoja iš GOx. Mažėjant terpės rūgštingumui tik dalis FAD disocijuoja (iki 20%). Esant optimaliam terpės rūgštingumui tik apie 5% FAD disocijuoja iš GOx pirmą pagaminimo dieną, o laikui bėgant (5-10 dienos) acetatiniam–fosfatiniam buferyje FAD disocijavimas padidėja iki 10%. Disocijavęs FAD pakeičia savo konformaciją – išsisuka.

Visgi, negalime vien iš fluorescencijos spektrų kitimų spręsti apie GOx aktyvumą. Fluorescencijos intensyvumo kitimui įtakos turi oksiduoto FAD struktūriniai kitimai: susidarancios rūgštinės–bazinės struktūros, redukuotos būsenos kitimai bei pačios organinės molekulės senėjimo procesai.

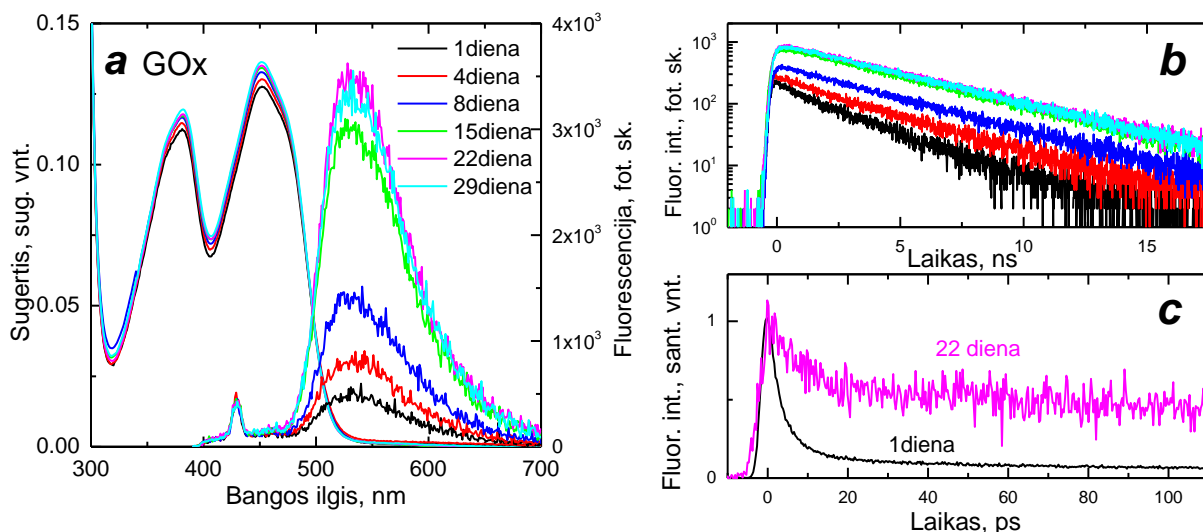
#### 4.5 GOx stabilumo tyrimas

Gliukozės oksidazės sugerties ir fluorescencijos spektrai yra nulemti kofaktoriaus FAD, tad siekiant aiškiau suprasti GOx spektroskopinių savybių kitimus buvo registruojami ir gryno FAD spektroskopinių savybių kitimai. Stabilumo matavimams buvo pasirinkta pH 6 rūgštingumo terpė, kurioje GOx fermentas pasižymi dideliu aktyvumu.

Grafikuose pavaizduoti 4.10 pav. ir 4.11 pav. pavaizduoti acetatiniame pH 6 buferyje užregistruoti FAD ir GOx tirpalų sugerties ir fluorescencijos spektrų pokyčiai, atsiradę 29–ų dienų laikotarpyje. Sugerties spektrai sudaryti iš dviejų sugerties juostų. Laikui bėgant stebimas sugerties juostų intensyvumo padidėjimas. 22-ą matavimo dieną FAD ir GOx sugerties spektrų intensyvumai buvo didžiausi, o po savaitės intensyvumas nežymiai sumažėjo. Šie kitimai siejami su FAD erdvinės konfigūracijos kitimais.



4.10 pav. FAD sugerties ir fluorescencijos spektrai (a), fluorescencijos gesimo kinetikos ties 530 nm nanosekundinėje laiko skalėje (b) ir fluorescencijos gesimo kinetikos pikosekundinėje laiko skalėje (c) 29-ų dienų laikotarpyje.



4.11 pav. GOx sugerties ir fluorescencijos spektrai (a), fluorescencijos gesimo kinetikos ties 530 nm nanosekundinėje laiko skalėje (b) ir fluorescencijos gesimo kinetikos pikosekundinėje laiko skalėje (c) 29-ų dienų laikotarpyje.

FAD fluorescencijos spektre matoma viena juosta ties 530nm, kuri 29–ų dienų laikotarpyje pasislinko į trumpesnių bangų pusę per 5 nm. Laikui bėgant stebimas fluorescencijos intensyvumo didėjimas iki 8 kartų. Kaip ir sugerties atveju, 22-ą matavimo dieną FAD ir GOx fluorescencijos spektrų intensyvumai buvo didžiausi. Lyginant GOx ir FAD fluorescencijos spektrus nustatėme, kad GOx fluorescencijos intensyvumas yra 20 kartų mažesnis už FAD fluorescenciją. Tai leidžia daryti prielaidą, kad po GOx tirpalų pagaminimo 5% FAD disocijavo iš fermento aktyviojo centro.

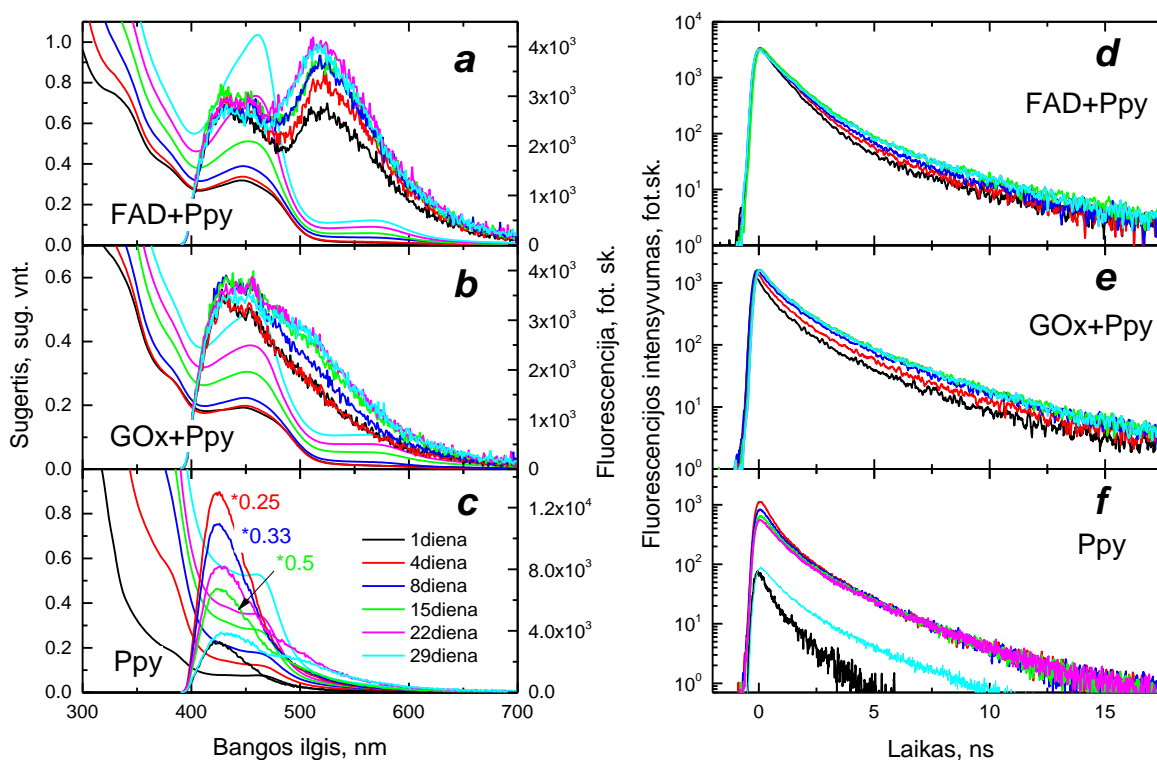
Iš GOx aktyvumo tyrimų matyta, kad laikui bėgant fermento aktyvumas mažėja. Vienas iš būdų siekiant kuo ilgiau išsaugoti fermento aktyvumą yra imobilizavimas. Polipirolo (Ppy) polimeras buvo naudojamas kaip imobilizavimo matrica GOx stabilumo tyrimuose. Tyrimo metu buvo stebimas fermentinės reakcijos sąlygotas Ppy susidarymas, kuris stipriai paveikė GOx ir FAD spektroskopines savybes. 4.12 pav. pateikiami polipirolo kompozito su FAD (Ppy/FAD), polipirolo kompozito su GOx (Ppy/GOx) bei gryno pirolo (py) sugerties ir fluorescencijos spektrų pokyčiai, atsiradę 29–ų dienų laikotarpyje.

Pirolo oligomerų sugerties spektruose yra keletas sugerties juostų – ties 380 nm, 462 nm ir 550 nm. Laikui bėgant sugerties intensyvumas padidėjo daugiau kaip 7 kartus. Šis intensyvumo didėjimas siejamas su pirolo oligomerų susidarymu. Tuo tarpu, fluorescencijos spektre stebimas vienos juostos ties 420nm intensyvumo kitimas. Taip pat nuo 15-os dienos atsirado papildoma fluorescencijos juosta 460-550 nm regione. 1-ąją savaitę fluorescencijos intensyvumas augo, tačiau tolimesnių matavimų metu jis pradėjo mažėti. Fluorescencijos didėjimą sąlygojo py oligomerų susidarymas bei polipirolo formavimasis, o fluorescencijos mažėjimas siejamas su Ppy savigesimu.

Ppy/FAD ir Ppy/GOx spektroskopinių savybių kitimai stipriai skiriasi nuo Ppy tirpalo dinamikos. Ppy/FAD kompozito tirpalo sugerties spektre užregistruotos kelios sugerties juostos. 1-ąją dieną sugerties juosta užregistruota ties 448 nm, o 29-os dienos matavimuose užfiksuota ties 461 nm. Sugerties juostos intensyvumas 4 savaitių laikotarpyje padidėjo 3,2 karto. Sugerties juostą ties 573 nm galima išskirti tik nuo 15-os dienos matavimų, tačiau jos maksimalus intensyvumas 8,5 karto silpnesnis. Ši sugerties juosta yra siejama su didesnių pirolo oligomerų susidarymu. Taip pat spektro srityje ties 300 – 400 nm, stebime didėjančią sugertį.

Ppy/GOx kompozito sugerties spektruose, kaip ir Ppy/FAD atveju, yra keletas sugerties juostų. 1-ąją matavimo dieną ilgabangę sugerties juostą užregistruotą ties 445 nm, o ties 380 nm galima matyti neryškią juostą, kurios po savaitės atliktų matavimų metu jau negalime išskirti. Po 29-ių dienų sugerties juosta pasislinko per 16 nm ir atsидūrė ties 461 nm. Ši juostą priskiriama imobilizuotos GOx sugerčiai, o jos intensyvumas 4 savaitių laikotarpyje padidėjo 2,5 karto. Nuo 7-osios dienos matavimų pradėjo ryškėti kita silpna sugerties juosta ties 575 nm, priklausanti pirolo

oligomerų sugerčiai. Juostos intensyvumas 29-ąją matavimų dieną buvo 5 kartus silpnesnis už pagrindinės sugerties juostos intensyvumą. 29-ių dienų laikotarpyje, taip pat stebime sugerties padidėjimą, spektro srityje ties 300 – 400 nm.



5.12 pav. FAD/Ppy (a), GOx/Ppy (b), Ppy (c) sugerties ir fluorescencijos spektrai, fluorescencijos gesimo kinetikos ties 530 nm (d-f) 29-ų dienų laikotarpyje.

Ppy/FAD fluorescencijos spektras turi dvi juostas. Pirmoji sugerties juosta 1-ąją matavimo dieną užregistruotas ties 434 nm ir pasiekė maksimalų intensyvumą 8-ąją dieną, tuo metu jos intensyvumas padidėjo 10%. Po to intensyvumas pradėjo mažėti ir pasiekė pradinį. Antroji juosta 1-ąją dieną užfiksuotas ties 526 nm ir maksimalų intensyvumą pasiekė 22-ą matavimų dieną. Tuo metu intensyvumas padidėjo 1,5 karto. Šis maksimumas pasislinko į trumpesnių bangų pusę per 11 nm. 29-ąją dieną maksimumo intensyvumas šiek tiek sumažėjo. Antroji fluorescencijos juosta siejama su FAD fluorescencija FAD/Ppy komplekse, kuri yra stipriai gesinama lyginant su gryno FAD fluorescencija.

Ppy/GOx komplekso fluorescencija pasižymi dvejomis fluorescencijos juostomis. Fluorescencijos juosta ties 430 nm siejama su pirola oligomerų ir Ppy fluorescencija. Šios juostos maksimalus intensyvumas pasiektas 8-osios dienos matavimo metu ir yra 13% intensyvesnis lyginant su 1-osios dienos matavimų duomenimis. Vėliau intensyvumas sumažėjo ir pasiekė pradinį. Nuo 8-os dienos fluorescencijos spektre atsiranda pakitimai bei ties 530 nm pradeda ryškėti

antroji juosta, kuri atitinka GOx fluorescenciją. Toje vietoje, remiantis 29-osios dienos matavimų duomenimis, intensyvumas padidėjo 1,7 karto.

Palyginus matavimo rezultatus matome, kad FAD/Ppy ir GOx/Ppy fluorescencijos juostos ties 530 nm intensyvumai skiriasi 2 kartus. Grynuose FAD ir GOx fluorescencijos spektruose fluorescencijos intensyvumų tiek 530 nm santykis yra apie 40. Žinant, kad FAD ir GOx optiniai tankiai taip pat skiriasi 2 kartus, galime daryti išvadą, kad FAD koncentracijos GOx ir gryno FAD tirpaluose skiriasi taip pat dvigubai. Atsižvelgiant į koncentracijos skirtumus, gauname, kad FAD/Ppy ir GOx/Ppy fluorescencijos juostos ties 530 nm intensyvumai praktiškai sutampa ir, kad Ppy gesina tokią pačią FAD fluorescenciją. Iš duomenų analizės darome išvadą, kad Ppy ištraukia visą FAD ir fermento aktyviojo centro.

Pirolol oligomerai sukuria stabilų kompozitą su izoaloksazino fragmentu ir taip neleidžia FAD visiškai atitrūkti nuo GOx. Panašus reiškinys buvo aprašytas ir Y. Xiao et al grupės darbuose, kuomet aukso nanodalelės sudarė kompozitą su FAD [44]. Yra žinoma, kad Ppy yra puikus p-tipo laidus polimeras ir yra elektronų akceptorius FAD/Ppy kompozite.

3 lentelė. Fotocheminių FAD, GOx, FAD/Ppy, GOx/ Ppy ir Ppy savybių palyginimas 1-ąją ir 22-ąją dieną. (Tirpalai paruošti acetatiniame buferyje)

	FAD	GOx	FAD/Ppy	GOx/Ppy	Ppy
<b>1 diena</b>					
$\lambda_{Fl}$ , nm	530	450, 533	434, 521	430	424
$I_{Fl}$ , arb,un,	1180750	61150	465160	391860	189420
$\tau_1$ , ps*	4,4±0,3	5,4±0,3		8,6±0,3	6,6±0,3
$\tau_2$ , ns (%)	1,2 (29%)	0,8 (10%)	0,55 (84%)	0,35 (52%)	0,3 (64%)
$\tau_3$ , ns (%)	3,6 (71%)	2,9 (90%)	2,5 (16%)	2,8 (48%)	1,6 (36%)
$\tau_{vid}$ , ns	2,9±0,2	2,7±0,2	0,9±0,2	1,5±0,2	0,65±0,2
<b>22 diena</b>					
$\lambda_{Fl}$ , nm	530	450, 533	440, 520	440, 525	425, 495
$I_{Fl}$ , arb,un,	7942050	336700	625200	524540	409800
$\tau_1$ , ps*	-	10±0,3		10,8±0,3	6,0±0,3
$\tau_2$ , ns (%)	1,2 (2%)	1 (2%)	0,7 (71%)	0,55 (46%)	0,6 (45%)
$\tau_3$ , ns (%)	4,5 (98%)	4,5 (98%)	2,8 (29%)	2,9 (54%)	2,8 (55%)
$\tau_{vid}$ , ns	4,4±0,2	4,4±0,2	1,3±0,2	1,8±0,2	1,8±0,2

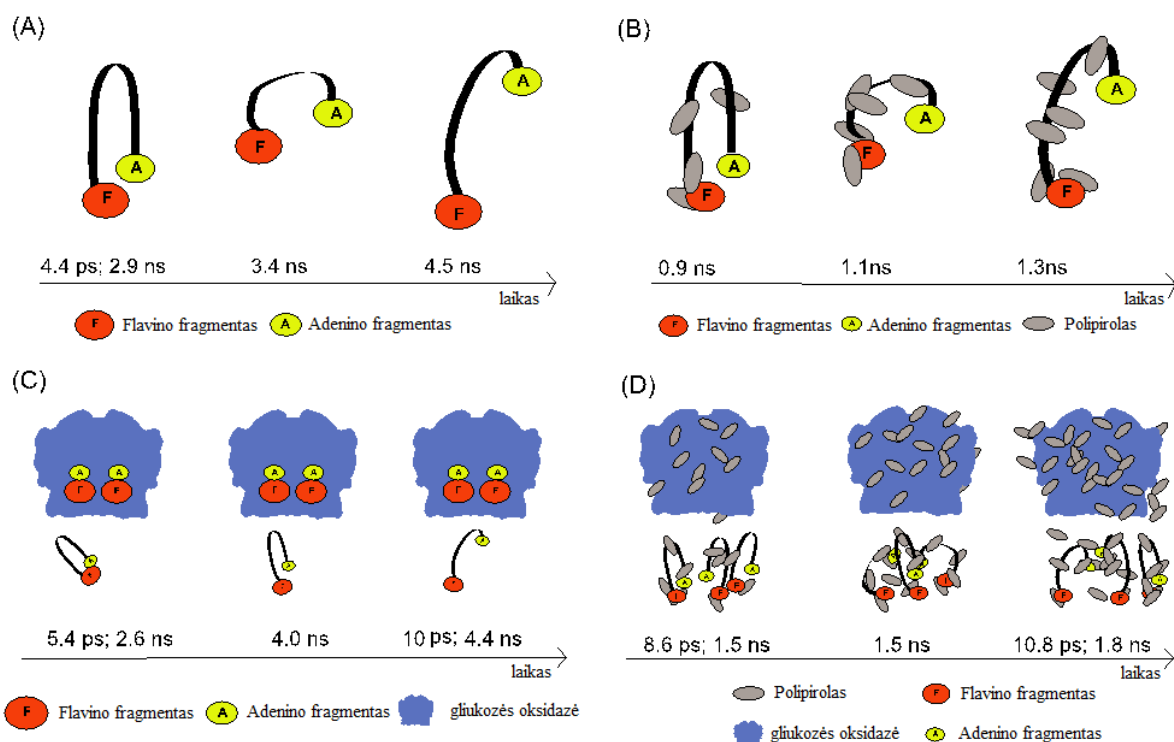
\* matavimai atlikti su fotoelektronų kamera  $\lambda_{ex}=343$  nm.

Tirtų tirpalų fluorescencijos gesimo kinetikos pavaizduotos 4.10, 4.11, 4.12 pav. 3 lentelėje pateiktos fotofizikinės tirtų medžiagų savybės. Iš pateiktų duomenų matyti, kad 29-ų dienų laikotarpyje Ppy/FAD vidutinės fluorescencijos gesimo trukmės kito nuo 0,9 ns iki 1,3 ns, tuo tarpu

Ppy/GOx – nuo 1,5 ns iki 1,8 ns. Lyginant su GOx ir FAD vidutinėmis fluorescencijos gesimo trukmėmis matome, kad Ppy beveik du kart sumažina fluorescencijos gesimo trukmes. Taip pat Ppy stipriai sumažina ir fluorescencijos intensyvumus.

Stabilumo tyrimai apibendrinami modelyje, pateiktame 4.13 pav. 3 savaičių laikotarpyje FAD, acetatiniame pH 6 buferyje, pakeitė erdvinį išsidėstymą: iš susuktos būsenos pirmosiomis matavimų dienomis į išsuktą struktūrą. Pakitę fluorescencijos relaksacijos trukmės tai patvirtina. Tuo tarpu Ppy sulėtina išsivyniojimo procesą bei lemia silpnesnį fluorescencijos spektrą ir gyvavimo trukmių kitimą.

Kai GOx fermentas buvo ištirpintas acetatiniame pH 6 buferyje, beveik 5% FAD disocijavo iš GOx aktyviojo centro į buferinę terpę. Disocijavęs FAD taip pat laikui bėgant iš susuktos būsenos perėjo į išvyniotą. Svarbu paminėti ir tai, kad GOx tirpalas išlaikė ultraspartų fluorescencijos gesimą 22-ų dienų matavimo laikotarpyje. Kaip ir FAD atveju, Ppy stipriai gesina fluorescencijos intensyvumą bei sumažina fluorescencijos gesimo trukmę. Polimeras sukuria stabilų kompozitą su disocijavusiu FAD ir neleidžia jam pilnai atitrūkti nuo fermento.



4.13 pav. Schematinis įvairių FAD struktūrų (A), FAD/Ppy kompozito (B), GOx (C) ir GOx/Ppy kompozito (D) dinamikos kitimo modelis.

## PAGRINDINIAI REZULTATAI IR IŠVADOS:

1. Matavimų rezultatai parodo, kad nuo 8-osios dienos rūgštiniuose acetatiniuose–fosfatiniuose (pH 2 – 3) FAD tirpaluose formuojasi katijoninė FAD struktūra. Nuo 8-osios matavimo dienos FAD ir GOx fluorescencijos spektruose atsiranda neintensyvi fluorescencijos juosta ties 450 nm, kuri siejama su redukuotos FADH<sub>2</sub> struktūros formavimusi.
2. Nustatyta bendra GOx aktyvumo kitimo tendencija: laikui bėgant GOx aktyvumas mažėja. Esant pH 2 rūgštingumui, GOx fermentas yra visiškai neaktyvus visame 29-ų dienų laikotarpyje bei pasižymi maksimaliu fluorescencijos intensyvumu. Mažėjant terpės rūgštingumui (pH 3-4), fluorescencijos intensyvumas mažėja, o fermento aktyvumas padidėja lyginant su pH 2 terpe. Esant optimaliam terpės rūgštingumui (pH 6) GOx fluorescencijos intensyvumas yra pats mažiausias, o tuo pačiu aktyvumas didžiausias.
3. Acetatinėse–fosfatinėse rūgštingose terpėse beveik visas FAD (daugiau nei 80%) disocijuoja iš GOx. Mažėjant terpės rūgštingumui, disocijuoja tik dalis FAD (iki 20%). Esant optimaliam terpės rūgštingumui (acetatiniuose–fosfatiniuose ir acetatiniuose buferiuose) tik apie 5% FAD disocijuoja iš GOx pačią 1-ąją pagaminimo dieną. Laikui bėgant acetatiniame–fosfatiniame buferyje disocijavusio FAD kiekis padidėja iki 10%, o acetatiniame buferyje disocijavusio FAD koncentracija nekinta.
4. Polipirolas stipriai gesina FAD ir GOx fluorescenciją bei sumažina fluorescencijos gesimo trukmes. Polimeras paskatina FAD disocijavimą iš GOx fermento bei tuo pačiu sukuria stabilų kompozitą su disocijavusiu FAD.



## LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] International Diabetes Federation, „IDF DIABETES ATLAS“, 2017, p. 150.
- [2] F. Su, L. Zhang, X. Kong, F. Lee, Y. Tian ir D. R. Meldrum, „Ratiometric glucose sensing based on fluorescent oxygen films and glucose oxidase“, *Sensing and Bio-Sensing Research*, pp. 1-6, 2017.
- [3] E. H. Yoo ir S. Y. Le, „Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice“, *Sensors*, pp. 4558-4576, 2010.
- [4] L. Dumitrascu, N. Stanciuc, G. E. Bahrim, A. Ciumac ir I. Aprodu, „pH and heat-dependent behaviour of glucose oxidase down to single molecule level by combined fluorescence spectroscopy and molecular modelling“, *J Sci Food Agric*, p. 1906–1914, 2016.
- [5] A. Ciucu ir C. Pătroescu, „Fast Spectrometric Method of Determining the Activity of Glucose Oxidase“, *Analytical Letters*, pp. 1417-1427, 1984.
- [6] A. Ramanavičius, *Elektrai laidūs polimerai elektrocheminiuose biologiniuose jutikliuose*, Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 2006, p. 71.
- [7] S. Ferri, K. Kojima ir K. Sode, „Review of Glucose Oxidases and Glucose Dehydrogenases: A Bird’s Eye View of Glucose Sensing Enzymes“, *Journal of Diabetes Science and Technology*, t. 5, 2011.
- [8] [http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1gpe/portfolio/1?view=protein\\_index#ad-image-0](http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1gpe/portfolio/1?view=protein_index#ad-image-0)
- [9] J. Kadziauskas, *Biochemijos pagrindai*, Vilnius: Vilniaus universitetas, 2008, p. 647.
- [10] S. enzymes, „Glucose Oxidase HPS300“, *Catalogue no. GLOX-70-6456.*
- [11] „<http://www.namrata.co/classification-of-enzymes/>“, [Tinkle].
- [12] V. Leskovac, S. Trivic, G. Wohlfahrt, J. Kandrač ir D. Peričin, „Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptor“, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, pp. 731-750, 2005.
- [13] A. Ramanavicius, N. Ryskevi, A. Kausaite-Minkstimiene, U. Bubniene, I. Baleviciute, Y. Oztekin ir A. Ramanaviciene, „Fluorescence study of glucose oxidase self-encapsulated within polypyrrole“, *Sensors and Actuators B*, p. 753–759, 2012.
- [14] I. Delfino, R. Esposito, M. Portaccio ir M. Lepores, „Dynamical and structural properties of flavin adenine dinucleotide in aqueous solutions and bound to free and sol–gel immobilized glucose oxidase“, *J Sol-Gel Sci Technol*, pp. 239-252, 2017.
- [15] K. Opwis, D. Knittel, E. Schollmeyer, P. Hoferichter ir A. Cordes, „Simultaneous Application of Glucose Oxidases and Peroxidases in Bleaching Processes“, *Engineering in Life Sciences*, p.

175–178, 2008.

- [16] G. Slaughter ir T. Kulkarni, „Enzymatic Glucose Biofuel Cell and its Application,“ *Biochip Tissue Chip*, 2015.
- [17] C. Chen, Q. Xie, D. Yang, H. Xiao, Y. Fu, Y. Tan ir S. Yao, „Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review,“ *SC Advances*, 2013.
- [18] W. Zhang, Y. Du ir M. L. Wang, „Noninvasive glucose monitoring using saliva nano-biosensor,“ *Sensing and Bio-Sensing Research* 4, pp. 23-29, 2015.
- [19] X. Feng, G. Li, H. Yu, S. Wang, X. Yi ir L. Lin, „Wavelength selection for portable noninvasive blood component measurement system based on spectral difference coefficient and dynamic spectrum,“ *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, pp. 40-46, 2018.
- [20] N. D. Nguyen, T. V. Nguyen, A. D. Chu, H. V. Tran, L. T. Tran ir C. D. Huynh, „A label-free colorimetric sensor based on silver nanoparticles directed to hydrogen peroxide and glucose,“ *Arabian Journal of Chemistry*, 2018.
- [21] J. Park, J. Kim, S. Kim, W. H. Cheong, J. Jang, Y. G. Park, K. Na, Y. T. Kim, J. H. Heo, C. Y. Lee, J. H. Lee, F. Bien ir J. U. Park, „Soft, smart contact lenses with integrations of wireless circuits, glucose sensors, and displays,“ *Science Advances*, 2018.
- [22] J. Kim, A. S. Campbell ir J. Wang, „Wearable non-invasive epidermal glucose sensors: A review,“ *Talanta* 177, pp. 163-179, 2018.
- [23] „[https://chem.libretexts.org/Core/Biological\\_Chemistry/Catalysts/Enzymatic\\_Kinetics/Enzyme\\_Assays](https://chem.libretexts.org/Core/Biological_Chemistry/Catalysts/Enzymatic_Kinetics/Enzyme_Assays),“ [Tinkle].
- [24] R. K. Scope, įtraukta *Enzyme Activity and Assays*, Bundoora, Victoria, Australia, La Trobe University, 2002.
- [25] „[https://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme\\_assay](https://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme_assay),“ [Tinkle].
- [26] R. A. Copeland, įtraukta *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2000, p. 390.
- [27] A. Praškevičius, L. Ivanovienė, R. Gailys, I. Sadauskienė, R. Banienė ir L. Labanauskas, „Dažniausiai vartojamų biomedicinos terminų ir sąvokų aiškinamasis žinynas (medikams),“ Kaunas, LSMU leidybos namai, 2014, p. 494.
- [28] „<https://biogenediary.wordpress.com/2014/03/page/3/>,“ [Tinkle].
- [29] D. W. Ball, J. W. Hill ir R. J. Scott, įtraukta *Introduction to Chemistry*, 2011, p. 1228.
- [30] S. B. Bankar, M. V. Bule, R. S. Singhal ir L. Ananthanarayan, „Glucose oxidase — An

- overview," *Biotechnology Advances*, p. 489–501, 2009.
- [31] R. K. Zhao, A. Lukacs, A. Haigney, R. Brust, G. Greetham, M. Towrie, P. Tonge ir S. Meech, „Ultrafast transient mid IR to visible spectroscopy of fully reduced flavin," *Phys Chem Chem Phys*, 2011.
- [32] R. Esposito, B. D. Ventura, S. D. Nicola, C. Altucci, R. Velotta, D. G. Mita ir M. Lepore, „Glucose Sensing by Time-Resolved Fluorescence of Sol-Gel Immobilized Glucose Oxidase," *Sensors*, pp. 3483-3497, 2011.
- [33] J. Galbán, I. Sanz-Vicente, J. Navarro ir S. d. Marcos, „The intrinsic fluorescence of FAD and its application in analytical chemistry: a review," *Methods and Applications in Fluorescence*, 2016.
- [34] Y. Kao, C. Saxena, T. He, L. Guo, L. Wang, A. Sancar ir D. ZhongA, „ Ultrafast Dynamics of Flavins in Five Redox States," *Journal of the American Chemical Society*, p. 13132–13139, 2008.
- [35] A. Sengupta, R. V. Khade ir P. Hazra, „ pH dependent dynamic behavior of flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD) in femtosecond to nanosecond time scale," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* , p. 105–112, 2011.
- [36] M. Loudon, *Chemistry of Naphthalene and the Aromatic Heterocycles. Organic Chemistry*, New York: Oxford University Press, 2002.
- [37] R. McNeill, R. Siudak, J. H. Wardlaw ir D. E. Weiss, „Electronic Conduction in Polymers. The Chemical Structure of Polypyrrole," *Australian Journal of Chemistry*, 1963.
- [38] A. Ramanaviciene, W. Schuhmann ir A. Ramanavicius, „AFM study of conducting polymer polypyrrole nanoparticles formed by redox enzyme –glucose oxidase – initiated polymerization," *Colloids and Surfaces B* , 2006.
- [39] R. Rotomskis, S. Bagdonas ir J. Valančiūnaitė, *Biofotonika*, Vilnius: VU leidykla, 2007, p. 165.
- [40] h. image=314840907. [Tinkle].
- [41] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 2006.
- [42] M. Vengri, *Kinetinė spektroskopija: paskaitų konspektas*, Vilnius, 2006-2008, p. 71.
- [43] „<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g2133?lang=en&region=LT>," [Tinkle].
- [44] Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz ir J. F. Hainfeld, „“Plugging into Enzymes”: Nanowiring of Redox Enzymes by a Gold Nanoparticle," *Science*, t. 299, pp. 1877-1881, 2003.

## GLIUKOZĖS OKSIDAZĖS AKTYVUMO IR STABILUMO TYRIMAI

Cukrinis diabetas – viena iš sparčiausiai plintančių ligų pasaulyje [1]. Universalaus neinvazinio jutiklio sukūrimas palengvintų daugybės diabetu sergančių žmonių kasdienybę bei būtų naudingas biotechnologiniams matavimams. Sukūrus technologiją leidžiančią nustatyti gliukozės koncentraciją panaudojant įvairius kūno skysčius (ašaras, prakaitą, šlapimą, seiles, audinių skystį), būtų galima neinvaziškai bei be jokio skausmo nustatyti gliukozės kiekį kraujyje ne tik realiu laiku, bet ir registruoti koncentracijos kitimą laike [2]. Veiklioji biojutiklio dalis būtų elektrodo paviršiuje imobilizuotas gliukozės oksidazės (GOx) fermentas. Siekiant sukurti neinvazinį biojutiklį GOx pagrindu, reikia suprasti šio fermento veikimą, susijusį su artimos aplinkos įtaka. Nepaisant didėjančio GOx tyrimų skaičiaus, yra pakankamai mažai informacijos apie šio fermento makromolekulinius kitimus dėl terpės rūgštingumo (pH) [4].

**Šio darbo tikslas** buvo nustatyti gliukozės oksidazės aktyvumą bei susieti jo pokyčius su spektroskopinių savybių kitimais. Taip pat nustatyti polipirolo įtaką GOx fermento stabilumui. Šio darbo metu buvo tiriami GOx ir flavinadenindinukleotido (FAD) spektroskopinių savybių kitimai skirtingo rūgštingumo terpėse: trijuose skirtinguose buferiniuose tirpaluose, kurių pH vertės kito intervale [2÷9]. Tyrimo metu buvo stebimi stacionarios sugerties ir fluorescencijos spektrų bei fluorescencijos gesimo kinetikų (pikosekundinėse ir nanosekundinėse laikų skalėse) kitimai 29–ų dienų laikotarpyje. GOx fermento aktyvumas buvo nustatomas dviem skirtingais būdais, o GOx stabilumo tyrimo metu kaip imobilizavimo matrica buvo naudojamas polipirolas.

Darbo metu nustatėme, kad nuo 8-osios dienos rūgštiniuose acetatiniuose–fosfatiniuose (pH 2 – 3) FAD tirpaluose formuojasi katijoninė FAD struktūra, kuri lemia fluorescencijos intensyvumo sumažėjimą tolimesnių matavimų metu. Taip pat nuo 8–osios matavimo dienos, bazinėse terpėse, FAD ir GOx fluorescencijos spektruose atsiranda neintensyvi fluorescencijos juosta ties 450 nm, kuri siejama su redukuotos FADH<sub>2</sub> struktūros formavimusi.

Sugerties bei fluorescencijos spektrų kitimai leidžia spręsti apie FAD oksiduotos struktūros bei rūgštinės–bazinės formos [33] pokyčius, o fluorescencijos relaksacijos trukmės teikia informaciją apie FAD erdvinę konformaciją [35]. Tyrimų metu fluorescencijos gesimo kinetikos buvo matuojamos ties 450 nm ir 530 nm, tačiau detalesnei analizei pasirinkta intensyvesnės fluorescencijos juostos kinetika ties 530 nm. Fluorescencijos gesimo kinetikos buvo aproksimuotos dviem eksponentėmis ( $\tau_2$  ir  $\tau_3$ ), iš kurių buvo apskaičiuota vidutinė relaksacijos trukmė ( $\tau_{vid}$ ).

Ultraspartoji fluorescencijos gesimo trukmė ( $\tau_1$ ) atspindi viso fluorescencijos spektro 440 – 620 nm gesimą ps skalėje.

FAD erdvinė struktūra stipriai priklauso nuo terpės rūgštingumo ir kinta 4 savaitių laikotarpyje. Iš vidutinių fluorescencijos gesimo kinetikų kitimų nustatėme, kad 1–ąją matavimo dieną pH 2 terpėje FAD yra išvyniotos būsenos, o pH 6, 8 terpėje dominuoja dalinai susuktos FAD konfigūracijos. Taip pat šiuose pH egzistuoja ir visiškai susuktos FAD struktūros, kurioms pasižymi kelių ps fluorescencijos gesimo trukmė dėl vidumolekulinės elektrono pernašos. 29–ąją matavimo dieną esant pH 6, 8 rūgštingumui matomas fluorescencijos gesimo trukmės pailgėjimas, kuris yra siejamas su išsuktos struktūros susiformavimu. Apie molekulės išsivyniojimą rodo ir išnykęs ultraspartus fluorescencijos gesimas.

Atliekant fermento aktyvumo tyrimus buvo nustatyta bendra GOx aktyvumo kitimo tendencija: laikui bėgant GOx aktyvumas mažėja. Esant pH 2 rūgštingumui, GOx fermentas yra visiškai neaktyvus visame 29-ų dienų laikotarpyje bei pasižymi maksimaliu fluorescencijos intensyvumu. Mažėjant terpės rūgštingumui (pH 3-4), fluorescencijos intensyvumas mažėja, o fermento aktyvumas padidėja lyginant su pH 2 terpe. Esant optimaliam terpės rūgštingumui (pH 6) GOx fluorescencijos intensyvumas ties 530 nm yra pats mažiausias, o tuo pačiu aktyvumas didžiausias.

Taip pat iš GOx stabilumo tyrimų nustatėme, kad polipirolas stipriai gesina FAD ir GOx fluorescenciją bei sumažina fluorescencijos gesimo trukmes. Polimeras paskatina FAD disocijavimą iš GOx fermento bei tuo pačiu sukuria stabilų kompozitą su disocijavusiu FAD.

## SUMMARY

Raminta Mazėtytė

### ACTIVITY AND STABILITY OF GLUCOSE OXIDASE ENZYME

Diabetes is one of the fastest-spreading diseases in the world [1]. The creation of a universal, non-invasive biosensor would facilitate the daily routine of many people with diabetes and help benefit biotechnological measurements. By creating a technology to detect glucose concentrations by using various body fluids (tears, sweat, urine, gums, tissue fluid), it is possible to determine the level of glucose in a non-invasive and painless manner in real time and also to continuously record the changes of glucose concentration [2]. The active part of the biosensor is the glucose oxidase (GOx) enzyme immobilized on the surface of the electrode. In order to create a non-invasive biosensor based on GOx, it is necessary to understand the properties of this enzyme related to the influence of the surrounding environment. Despite the increasing number of GOx studies, there is little information about the pH influence on macromolecular variations of this enzyme[4].

**The purpose of this research** was to evaluate absorption and fluorescence spectra changes and to associate them with changes of GOx activity. Also, the impact of Ppy composites on stability of GOx enzyme was investigated. During this work, the changes of the spectroscopic properties of GOx and flavin adenine dinucleotide (FAD) were investigated in different acidic medium: in three different buffering solutions with pH values in the range [2 ÷ 9]. During the study, changes in stationary absorption, fluorescence spectra, and fluorescence emission kinetics (picosecond and nanosecond time scale) were observed during the 29-day period. The activity of the GOx enzyme was determined in two different ways, and in the study of GOx stability polypyrrole was used as the immobilization matrix.

During the work we found that from the 8th day in acid acetate-phosphate (pH 2 - 3) FAD solutions, a cationic structure of FAD was formed, which caused a reduction of the fluorescence intensity. Also, from the 8th day of measurement, in the basic medium, a non-intense fluorescence band at 450 nm appeared in FAD and GOx fluorescence spectra. This band is associated with the formation of a reduced FADH<sub>2</sub> structure.

The changes in absorption and fluorescence spectra make it possible to determine the changes of a structure of the FAD and the acid-base form [33], while the relaxation time of the fluorescence provides information on the spatial conformation of the FAD molecule [35]. In the studies, fluorescence lifetimes of GOx and FAD have been measured at fixed 530 nm wavelength. The fluorescence decay kinetics were well approximated by two exponents ( $\tau_2$ ,  $\tau_3$ ), those were used to

calculate the average relaxation time ( $\tau_a$ ). The ultrafast fluorescence decay kinetics ( $\tau_1$ ) reflect the total decay of fluorescence spectrum (440 - 620 nm) on a ps scale.

The spatial structure of the FAD strongly depends on the acidity of the medium and varies within a 4-week period. We found out that, on the 1st day of the measurement, the FAD in the pH medium 2 is in open (unstacked) conformation, while in pH 6, 8, the dominated partially stacked conformations. In these pHs, there are also fully stacked conformations of FAD with a shortened lifetime of 5–9 ps due to the excited state intramolecular electron transfer from adenine to flavin moiety. On the 29th day of measurement, pH 6, 8 shows the changes of the fluorescence lifetimes, which are associated with the formation of the unstacked conformation.

The tendency of GOx activity changes was determined: GOx activity decreases over time. At pH 2, the GOx enzyme is completely inactive throughout the 29-day period and has the maximum fluorescence intensity. With decreasing acidity of the medium (pH 3-4), the fluorescence intensity decreases and the enzyme's activity increases as compared to the pH 2 medium. At optimal medium acidity (pH 6), the GOx fluorescence intensity at 530 nm is the smallest and, at the same time, enzymatic activity is the highest.

Also, from the stability study of GOx, we found that polypyrrole strongly quenches the FAD fluorescence in both FAD and GOx solutions. On the contrary, Ppy aggregation causes Ppy fluorescence in the same spectral region as FAD fluorescence impedes its investigations. Identical FAD fluorescence quenching in FAD and GOx solutions suggests that Ppy causes a release of all FAD molecules from GOx. The polymer induces the dissociation of FAD from the GOx enzyme and at the same time creates a stable composite with FAD.