

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.109>

<https://orcid.org/0000-0003-3516-6425>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Martynas

TALAIKIS

Biomembranas formuojančių
monosluoksnių ir adsorbuotų
biomolekulių struktūros tyrimas
virpesinės spektroskopijos metodais

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biochemija (N 004)

VILNIUS 2020

Disertacija rengta 2011–2015 metais Vilniaus Universiteto Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje.

Disertacija ginama eksternu

Mokslinis konsultantas:

prof. habil. dr. Gediminas Niaura (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – **prof. dr. Ričardas Makuška** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003).

Nariai:

dr. Žilvinas Anusevičius (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004);

dr. Vytautas Smirnovas (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004);

dr. Arūnas Stirkė (Fizinių ir technologijos mokslų centras, gamtos mokslai, chemija, N 003);

dr. Ramūnas Valiokas (Fizinių ir technologijos mokslų centras, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2020 m. lapkričio mėn. 25 d. 10 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje.

Adresas: Saulėtekio al. 7, LT-10257 Vilnius, Lietuva

Tel. +370 522 34420; el. paštas: info@gmc.vu.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.109>

<https://orcid.org/0000-0003-3516-6425>

VILNIUS UNIVERSITY

Martynas

TALAIKIS

Vibrational spectroscopy study of membrane anchoring monolayers and adsorbed biomolecules

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2020

This research for the dissertation was performed between 2011 and 2015 at department of Bioelectrochemistry and Biospectroscopy at Institute of Biochemistry, Vilnius University

The dissertation is defended on an external basis.

Academic consultant:

prof. habil. Dr. Gediminas Niaura (Vilnius University, Natural sciences, Biochemistry, N 004).

Dissertation Defence Panel:

Chairman – prof. dr. Ričardas Makuška (Vilnius University, Natural sciences, Chemistry, N 003).

Members:

dr. Žilvinas Anusevičius (Vilnius University, Natural sciences, Biochemistry, N 004);

dr. Vytautas Smirnovas (Vilnius University, Natural sciences, Biochemistry, N 004);

dr. Arūnas Stirkė (Center for Physical Sciences and Technology, Natural sciences, Chemistry, N 003);

dr. Ramūnas Valiokas (Center for Physical Sciences and Technology, Natural sciences, Biochemistry, N 004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 10 h on 25th November 2020 in meeting room R401 of the of the Life Science Center, Vilnius University.

Address: Saulėtekio al. 7, LT-10257 Vilnius, Lithuania.

Tel. +370 522 34420; e-mail: info@gmc.vu.lt

The text of this dissertation can be accessed at the Vilnius University Library as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPŲ IR ŽYMĖJIMŲ SĄRAŠAS.....	7
ĮVADAS.....	9
I DALIS. TYRIMO METODAI IR MEDŽIAGOS	15
1. Virpesinė spektroskopija.....	16
2. Medžiagos ir tirpalai	23
3. Metodai	25
II DALIS. SAVITVARKIŲ MONOSLUOKSNIŲ IR PAKABINAMŲ DVISLUOKSNIŲ LIPIDINIŲ MEMBRANŲ TYRIMAS VIRPESINE SPEKTROKOPIJA	33
4. Literatūros apžvalga.....	34
5. Rezultatai ir jų aptarimas	46
6. Rezultatų apibendrinimas.....	80
III DALIS. PAVIRŠIUJE ADSORBUOTŲ LAKAZIŲ VIRPESINĖ SPEKTROKOPIJA	83
7. Literatūros apžvalga.....	84
8. Rezultatai ir jų aptarimas	91
9. Rezultatų apibendrinimas.....	100
IŠVADOS.....	101
PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA	103
KITOS PUBLIKACIJOS	103
KONFERENCIJŲ MEDŽIAGA.....	104
TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĄ	106
SUMMARY	107
1. Introduction.....	107
2. Materials and methods	112
3. Results and discussion	116
4. Conclusions.....	131

LITERATŪROS SAĶAŠAS.....	133
PADĒKA.....	148
PUBLIKACIJŪ KOPIJOS	149
1 Publikacija.....	149
2 Publikacija.....	161
3 Publikacija.....	167
UŽRAŠAMS	181

SANTRUMPŲ IR ŽYMĖJIMŲ SĄRAŠAS

2DCOS	dvidimensinė koreliacinė analizė
α	poliarizuojamumas
AAR	aromatinė aminorūgštis
Ag/AgCl	palyginamasis sidabro chlorido elektrodas
AI	spektrinė amidas-I juosta
AR	aminorūgštis
Au₁₀-ME-D₄	deuteriu žymėto 2-merkptoetanolio ir 10 aukso atomų kompleksas
AuND	aukso nanodalelės
CV	ciklinė voltamperometrija
Cys	cisteinas
δ	deformacinis virpesys
δ	žirklinis deformacinis virpesys, (angl. <i>scissoring</i>)
DE	darbinis elektrodas
DFT	tankio funkcionalo metodas
DOPC	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicerolio-3-fosfocholinas, (žr. 5 pav.)
E	elektrinis laukas
EM	elektromagnetinis stiprinimo mechanizmas
EO	etilenoksido fragmentas
EP	elektronų pernaša
EtOH	etanolis
FWHM	virpesinės juostos plotis ties puse aukščio, (angl. <i>full width at half-maximum</i>)
G	goš konformacija
HOMO	aukščiausia užpildyta orbitalė (angl. <i>highest occupied molecule orbital</i>)
IR	infraraudonoji spektroskopija
Lac	lakazė
LUMO	žemiausia neužpildyta orbitalė (angl. <i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
λ_z	lazerio bangos ilgis, (nm)
ME	2-merkptoetanolis, (žr. 5 pav.)
ME-D₄	deuteriu žymėtas 2-merkptoetanolis, (žr. 5 pav.)
MEP	mediatorinė elektronų pernaša
MLV	daugiasluoksnės lipidinės liposomos, (angl. <i>multilamellar lipid vesicles</i>)

v	valentinis virpesys
v_s	valentinis simetrinis virpesys
v_{as}	valentinis asimetrinis virpesys
NHE	palyginamasis vandenilio elektrodas
ocp	atviros grandinės potencialas (angl. <i>open circuit potential</i>)
P	dipolio momentas
PagE	pagalbinis elektrodas
PE	palyginamasis elektrodas
Phe	fenilalaninas
ρ	depolarizacijos santykis
ρ	svyruoklinis deformacinis virpesys, (angl. <i>rocking</i>)
RRS	rezonansinė Ramano sklaida
RS	Ramano sklaida
SAM	savitvarkis monosluoksnis, (angl. <i>self-assembled monolayer</i>)
SERS	paviršiaus sustiprinta Ramano sklaida (angl. <i>surface enhanced Raman scattering</i>)
T	trans konformacija
t	sukamasis deformacinis virpesys, (angl. <i>twisting</i>)
tBLM	pakabinta dvisluoksnė lipidinė membrana, (angl. <i>tethered bilayer lipid membrane</i>)
TEP	tiesioginė elektronų pernaša
Trp	triptofanas
Tyr	tirozinas
w	vėduoklinis deformacinis virpesys, (angl. <i>wagging</i>)
WC14	20-tetradeciloksio-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatrikontano 1-tiolis, (žr. 5 pav.)
ν̃	bangos skaičius, (cm ⁻¹)

ĮVADAS

Dauguma gyvybiškai svarbių procesų vyksta fazių riboje arba ant paviršiaus.¹ Gyvuose organizmuose tokie procesai kaip biomolekulių adsorbicija ir jų lateralinė difuzija, faziniai virsmai, katalizė, oksidacija ir elektronų pernaša vyksta ties ląstelių ir organelių fosfolipidinėmis membranomis. Fosfolipidinės membranos yra sudėtingos struktūros, kurių funkcija – apsaugoti ląstelės ir organelių vidinį turinį nuo išorės, palaikyti įsiterpiančius baltymus, dalyvauti medžiagų ir signalo perdavime. Membranos taip pat yra ir bakterinių toksinų taikiny.² Toksinai pažeidžia membranos vientisumą įsiterpdami į lipidų dvisluoksnį ir formuodami poras bei ženkliai pakeičia dielektrines dvisluoksnio savybes.³ Nuodugnesnius lipidinių membranų tyrimus lėmė jų biologinė svarba ir su jomis susiję sutrikimai, tačiau kompleksiška cheminė sandara ir procesų gausa pastūmėjo naudoti dirbtines modelines membranas, savo chemine sudėtimi primenančios gyvų ląstelių membranas. Šios modelinės membranos taikomos tiek tiriant lipidų-baltymų sąveikas ir įsiterpiančių baltymų savybes, tiek konstruojant biojutiklius ir diagnostines atpažinimo sistemas.⁴

Tikroms biologinėms membranoms savo struktūrinėmis savybėmis artimiausios yra pakabinamos dvisluoksnės lipidinės membranos (tBLM). tBLM sudaro lipidų dvisluoksnis, kurį nedideliu atstumu nuo paviršiaus pritvirtina inkarinis molekulių sluoksnis. Inkarinį monosluoksnį dažniausiai sudaro ilgagrandės į lipidus panašios inkarinės molekulės ir mažos molekulinės masės paviršiaus skiediklis. Patikimam tBLM imobilizavimui inkarinės molekulės privalo turėti šiuos struktūrinius elementus: (i) paviršiui giminingą grupę, (ii) hidrofiliinį fragmentą, kuris atitraukia membraną nuo paviršiaus ir kuria pomembraninį rezervuarą ir (iii) hidrofobinį segmentą, įsiterpiantį į lipidų dvisluoksnį ir jį imobilizuojantį. Taigi, inkarinės molekulės pritvirtina lipidų dvisluoksnį keliolikos angstromų atstumu nuo paviršiaus, formuoja kontroliuojamo aukščio pomembraninį rezervuarą ir sumažina paviršiaus šiurkštumo poveikį membranai. Be to, keičiant inkarinių molekulių koncentraciją ant paviršiaus yra valdoma tBLM lipidų sluoksnio struktūra, takumas ir pomembraninio sluoksnio laidis – parametrai, svarbūs membraninių baltymų įsiterpimui ir jų funkcijai.

Pomembraninis vandens rezervuaras talpina į membraną įsiterpiančių baltymų hidrofiliinius domenus ir apsaugo juos nuo tiesioginio kontakto su metalo paviršiumi, dėl to baltymai išlaiko savo natyvią struktūrą ir funkcionalumą. Bakteriniai toksinai, membranoje formuoja pažaidas, kurios

didina membranos elektrinį laidį. Registruojant elektrinio laidžio pokyčius dirbtinėse tBLM membranose nustatomas pažaidų kiekis ir pasiskirstymas, elektrinė lipidų dvisluoksnio ir pomembraninės erdvės talpa. Vanduo yra vienas pagrindinių komponentų palaikančių membranos ir membraninių baltymų struktūrą ir funkciją bei kuriančių terpę elektrocheminiams procesams. Tačiau vandens ir elektrinio potencialo poveikis inkarinio sluoksnio molekulėms, ir tai, kaip inkarinių molekulių struktūra veikia pakabinamos membranos funkcionalumą, nėra pilnai iširta. Šiame darbe tiriami inkariniai tBLM membranos sluoksniai sudaryti iš į lipidus panašių WC14 molekulių ir paviršiaus skiediklio 2-merkaptotanolio ir jų struktūros pokyčiai dėl vandens ir elektrinio potencialo poveikio.

Biomolekulių orientacija paviršiuje taip pat svarbi ir fermentinių elektrodų funkcijai užtikrinti. Gebėjimas suvaldyti oksidoreduktazių ir kitų fermentų adsorbciją turi didelės reikšmės praktikoje, bandant užtikrinti efektyvią elektronų pernašą tarp elektrocheminės sistemos komponentų. Tinkama fermentų orientacija paviršiuje lemia biojutiklių, katalizinių sistemų ir kuro elementų efektyvumą bei ilgaamžiškumą. Biokatalitinėse sistemose vario mėlynųjų oksidazių fermentai naudojami katodo funkcijai atlikti, tačiau jų veikimo efektyvumas yra slopinamas sudėtingų heterogeninės ir vidumolekulinės elektrono pernašos mechanizmų.⁵ Ši problema sprendžiama orientuojant fermentą adsorbcijos metu. Šiame darbe tirama ant elektrodo adsorbuotų lakazių priklausančių vario mėlynosioms oksidazėms molekulinė struktūra ir jų pokyčiai kintant elektriniam potencialui, ieškoma fermento molekulių orientacijos paviršiaus atžvilgiu žymenų.

Darbe nagrinėjamų inkarinių membranos sluoksnių ir adsorbuotų fermentų funkcija tiesiogiai priklauso nuo jų struktūros ir erdvinės orientacijos. Norint giliau suprasti ir numatyti ryšį tarp molekulių struktūros ir jų funkcijos, būtina taikyti aukšto jautrio metodus. Vienas tokių metodų – paviršiaus sustiprinta Ramano spektroskopija (angl. *surface-enhanced Raman spectroscopy*, SERS) pasižymi galimybe tirti tarpmolekulines sąveikas, molekulių ir jų funkcinių grupių orientaciją ir konformacijos kitimus. Didelis šio metodo privalumas – galimybė atlikti spektrinius matavimus vandeniniuose tirpaluose *in-situ* ir kontroliuojamo potencialo sąlygomis.

Šiame darbe buvo naudoti Ramano ir kontroliuojamos temperatūros Ramano spektroskopijos, SERS ir elektrocheminės-SERS, izotopų pakeitimo, elektrocheminės desorbcijos, kvantinės chemijos skaičiavimų ir dvidimensinės koreliacinės analizės (2DCOS) metodai.

Darbo **tikslas**: ištirti vandens ir elektrinio potencialo poveikį inkariniam tBLM monosluoksniui ir nustatyti elektrinio potencialo poveikį lakazės fermentų struktūrai ant elektrodo paviršiaus.

Šiam tikslui pasiekti buvo suformuluoti **uždaviniai**:

1. Suformuoti savitvarkius monosluoksnius sudarytus iš WC14 ir ME-D₄ molekulių aukso paviršiuje ir priskirti virpesines juostas;
2. Nustatyti savitvarkių monosluoksnių sudarytų iš WC14 ir ME-D₄ molekulių struktūros ir orientacijos ant paviršiaus spektrinius žymenis;
3. Nustatyti vandens ir elektrinio potencialo poveikį savitvarkių monosluoksnių struktūrai ir orientacijai ant paviršiaus;
4. Suformuoti elektrodo paviršiuje tBLM membraną. SERS metodu nustatyti jos spektrinius žymenis ir būseną;
5. Nustatyti lakazių J6 iš *Didymocrea sp.* ir TaLc iš *Trichaptum abietinum* adsorbcijos elektrodo paviršiuje spektrinius žymenis;
6. Ištirti elektrinio potencialo poveikį paviršiuje adsorbuotų lakazės fermentų molekulinei struktūrai, katalitiniam vario centrui ir aminorūgščių būsenai.

Mokslinis naujumas ir aktualumas

Darbe parodyta, kad inkariniai membranos sluoksniai sudaryti iš ilgagrاندžio į lipidus panašaus junginio WC14 ir paviršiaus skiediklio merkptoetanolio (ME-D₄) išlieka adsorbuoti ant aukso paviršiaus inkubuojant juos vandenyje.

Pirmą kartą spektroskopiniais metodais parodyta, kad adsorbuotas merkptoetanolis su aukso paviršiumi susidaro ne tik Au–S, bet ir cheminį Au–O ryšį. Mišriame monosluoksnyje merkptoetanolio goš konformerų skaičius išauga ilgėjant inkubacijos vandenyje laikui. Kvantinės chemijos skaičiavimai parodė, jog Au–O ryšys sustiprėja susidarant vandeniliniam ryšiui tarp merkptoetanolio hidroksilo grupės ir vandens molekulės.

Veikiamos vandens ilgagrاندžių WC14 molekulių hidrofobinės grandinės įgauna pilnai-trans konformaciją ir suformuoja molekulinius klasterius ant paviršiaus.

Parodyta, kad neigiamėjant potencialui cheminis metalo-adsorbato (Au–S ir Au–O) ryšys susilpnėja ir pradinės molekulių grupės persiorientuoja ant paviršiaus. Šis persiorientavimas ir vandens poveikis hidrofobinėms ilgagrاندžių WC14 molekulių dalims sukelia molekulių klasterių formavimąsi ant paviršiaus. Nustatytas šių molekulinių klasterių spektrinis

žymuo – juosta ties 1129 cm^{-1} , kuri priskiriama valentiniam $\nu(\text{C}-\text{C})$ virpesiui kai grandinė yra trans konformacijos.

Užregistruotas pirmasis tBLM paviršiaus sustiprintas Ramano sklaidos spektras. Nustatyta, kad tBLM lipidai yra skystos būsenos hidrofobinėje molekulės dalyje ties nesočiaja $\text{C}=\text{C}$ jungtimi.

Nustatyta, kad J6 ir TaLc lakazės fermentai negrįžtamai adsorbuojasi ant aukso elektrodo paviršiaus ir išlieka stabilūs $-0,3-0,8$ ir $0,1-0,9\text{ V}$ (atž. NHE) ribose.

Nustatyti baltymo funkcių grupių sąveikos su metalu spektriniai žymenys: „minkšta“ $\text{C}-\text{H}$ moda, fenilalanino žiedo F12 virpesio dažnis ir juostos pusplotis, karboksilo grupės juostos intensyvumas.

Remiantis spektriniais žymenimis, parodyta, kad elektrodą poliarizavus neigiamai fermentai priglunda prie paviršiaus, įgauna plokščią formą ir netenka katalitinio aktyvumo. Elektrodą poliarizuojant teigiamai, fermentai sąveikauja su paviršiumi per karboksilo grupes, atgauna pirminę struktūrą ir katalitinį aktyvumą.

SERS metodu nenustatyti T1 katalitinio centro spektriniai žymenys rodo, kad fermentų T1 centras yra nutolęs nuo paviršiaus.

Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Adsorbuotas merkaptoetanolis (ME-D₄) sąveikauja su aukso paviršiumi susidarant ne tik Au-S, bet ir Au-O ryšiai. Parodyta, kad vandenilinis ryšys tarp ME-D₄ hidroksilo grupės ir vandens molekulės stabilizuoja Au-O ryšį.

2. Vanduo skatina goš konformaciją turinčių ME-D₄ molekulių skaičius didėjimą ir paviršiaus klasterių sudarytą iš inkarinių WC14 molekulių alkilinių grandinių formavimąsi.

3. Neigiamėjant elektrodo potencialui mažėja adsorbuotų molekulių Au-S ryšio energija ir pasikeičia pradinės grupės orientacija. Tai sumažina aktyvacijos energiją reikalingą molekulių persiorientavimui ant paviršiaus.

4. Užregistruotas pirmasis tBLM membranos SERS spektras ir nustatyta, kad membrana ties nesočiaja jungtimi ($\text{C}=\text{C}$) yra skystos būsenos.

5. Lakazės fermentai negrįžtamai adsorbuojasi ant aukso nanodalelių ir ant aukso elektrodo paviršių ir išlieka stabilūs potencialo ribose nuo $-0,3$ iki $0,8\text{ V}$ (J6) ir $0,1-0,9\text{ V}$ (TaLc) atž. NHE.

6. Dėl neigiamos elektrodo poliarizacijos fermentai prispaudžiami prie paviršiaus, įgauna plokščią formą ir praranda savo katalitinį aktyvumą. Dėl teigiamos poliarizacijos – fermentai įgauna vertikalią orientaciją paviršiaus atžvilgiu ir savo pradinį aktyvumą.

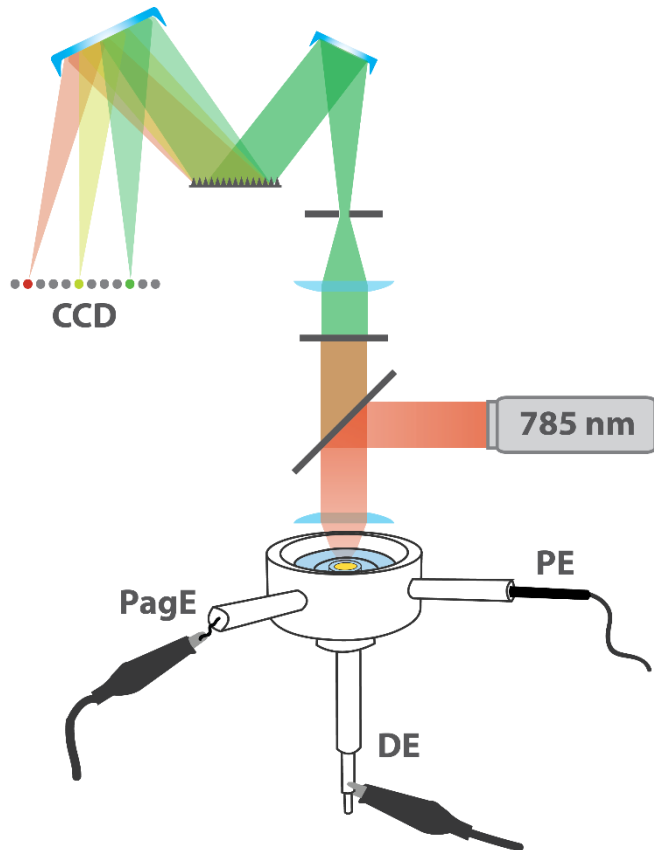
7. Adsorbuotų lakazių SERS spektruose T1 vario centro spektriniai žymenys nenustatyti. Tai rodo, kad T1 vario centras yra nutolęs nuo paviršiaus.

Autoriaus indėlis

SAM, tBLM ir adsorbuotų fermentų tyrimai atlikti VU Gyvybės mokslų centro Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje (skyriaus vadovas prof. dr. Gintaras Valinčius) ir Fizinių ir technologijos mokslų centro Organinės chemijos skyriuje (skyriaus vadovas prof. habil. dr. Albertas Malinauskas).

Visus spektroskopinius, elektrocheminius matavimus ir kvantinės chemijos skaičiavimus atliko autorius. Lakazės fermentų elektrodų paruošimą ir jų elektrocheminių savybių tyrimą atliko dr. Dalius Ratautas ir dr. Irina Bratkovskaja (VU, Biochemijos institutas), fermentus tyrimams paruošė dr. Liucija Marcinkevičienė (VU, Biochemijos institutas). Duomenų analizę ir disertacijos straipsnių rengimą atliko autorius kartu su disertacijos moksliniu konsultantu.

I DALIS. TYRIMO METODAI IR MEDŽIAGOS



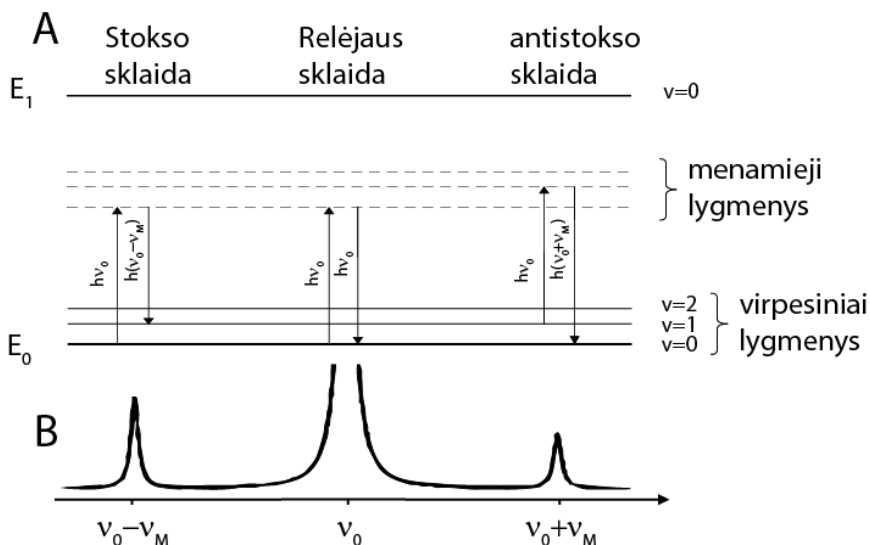
1. Virpesinė spektroskopija

1.1. Ramano spektroskopija

Virpesinės spektroskopijos metodais gaunama informacija apie šviesos sąveiką su medžiaga ir tos medžiagos molekulių virpesinę energiją. Šviesai sąveikaujant su molekulėmis, ji yra sugerama arba išsklaidoma. Ramano sklaidos metu tik nedidelė dalis fotonų sudalyvauja energijos mainuose su molekulėmis įgaudami arba netekdami energijos.

Molekulės energijos lygmenys yra kvantuoti, dėl to apsikėitimas energija tarp molekulės ir šviesos kvanto ($h\nu_0$) vyksta diskrečiais dydžiais, kurie atitinka molekulės virpesinio sužadino energiją.⁶ Energijos mainai vyksta keliomis pakopomis. Lazerinė spinduliuotė sužadina molekulės perėjimą į menamą energetinį lygmenį. Šis lygmuo yra metastabilus, todėl molekulė greitai relaksuoja išspinduliuodama fotoną (1 pav.).⁷ Relaksacija gali vykti tiek į aukštesnės, tiek į žemesnės energijos lygmenį nei pradinis, atitinkamai išspinduliuojant mažesnės ($h(\nu_0 - \nu_M)$) arba didesnės ($h(\nu_0 + \nu_M)$) energijos fotoną. Šie sklaidos būdai atitinkamai vadinami Stokso Ramano sklaida ir antistokso Ramano sklaida.

Mažas Ramano sklaidos efektyvumas lėmė, kad ši spektroskopijos rūšis nuo jos atradimo 1928 m. vystėsi lėtai. Praktiniam Ramano spektroskopijos



1 pav. (A) Ramano (Stokso ir antistokso) ir Relėjaus sklaidos diagrama ir (B) atitinkamas virpesinis spektras. E_0 ir E_1 – pagrindinis ir sužadintas elektroniniai lygmenys, ν_0, ν_1, ν_2 – pagrindinis, pirmasis, antrasis virpesinis lygmuo, ν_0 – žadinančios spinduliuotės dažnis. Adaptuota pagal ⁷.

pritaikymui trukdė tiek fundamentiniai, tiek techniniai sunkumai. Tobulėjanti optinė ir detekcijos įranga paspartino Ramano metodo vystymąsi. Didesnis šuolis įvyko septintojo dešimtmečio pradžioje pradėjus naudoti lazerius vietoje iki tol naudotų gyvsidabrio garų lempų. Ypač reikšmingas buvo 1974–1977 m. atrastas paviršiaus sustiprintos Ramano sklaidos (SERS) reiškinys dar labiau paspartinęs Ramano spektroskopijos vystymąsi.

1.2. Paviršiaus sustiprinta Ramano spektroskopija

SERS efektas pasireiškia tiriamai molekulei esant adsorbuotai arba labai arti (nanometrų atstumu) prie šiurkštaus aukso, sidabro arba vario paviršiaus. SERS efektyvumas apibūdinamas stiprinimo faktoriumi, kuris nusako kiek kartų sustiprėja vienos molekulės sklaida pasireiškus SERS efektui. Tipinis SERS stiprinimo faktorius (10^4 – 10^6) yra pakankamas užregistruoti mažesniai kiekiui medžiagos nei vienas paviršiuje adsorbuotas molekulių sluoksnis.⁸

Unikalios SERS metodo savybės: aukštas spektrinis jautris, galimybė tirti adsorbuotų molekulių konformaciją, cheminį paviršiaus-adsorbato ryšį, tarpmolekulines sąveikas. Be to, dėl silpnos vandens Ramano sklaidos matavimus galima atlikti *in-situ* ir kontroliuojamo potencialo sąlygomis.⁹ Šios savybės labai svarbios tiriant biologines ir biochemines sistemas.

1.2.1. SERS stiprinimo mechanizmai

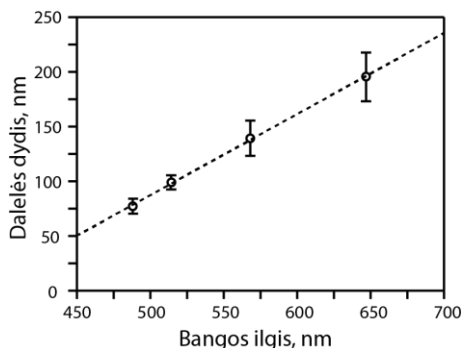
Ramano sklaidos stipris proporcingas molekulėje indukuoto dipolio momento P kvadratui, kuris priklauso nuo molekulės poliarizuojamumo α ir žadinančio elektrinio lauko amplitudės E :

$$P = \alpha E \quad (1)$$

Sklaidos stipris auga didėjant α ir (arba) E . Šis sąryšis savyje talpina du SERS stiprinimo mechanizmus: cheminį, susijusį su poliarizuojamumo pokyčiais, ir elektromagnetinį, vykstantį dėl metalo dalelės paviršiaus plazmonų rezonanso.¹⁰

Elektromagnetinio (EM) stiprinimo mechanizmas yra pagrindinis SERS mechanizmas kylantis iš elektrinio lauko sustiprėjimo prie nanometrų dydžio metalo nelygumų. Krintanti šviesa sužadina laisvųjų paviršiaus elektronų, vadinamų lokalizuotu paviršiaus plazmonu (LPP), virpėjimą metalo-dielektriko sandūroje. LPP turi savitą virpėjimo dažnį, kuriam sutapus

su šviesos dažniu pasireiškia lokalizuotų paviršiaus plazmonų rezonansas (LPPR). LPPR dažnis priklauso nuo metalo prigimties, nanodarinių dydžio ir formos. Ši savybė ypač svarbi SERS spektroskopijoje, nes pasirenkant metalą ir nanodalelių geometrines savybes galima suderinti LPPR ir lazerinės spinduliuotės dažnius. S. R. Emory atliktas tyrimas parodė esant tiesinei priklausomybei tarp sidabro nanodalelėse dydžio ir šviesos bangos ilgio ties kuriuo pasireiškia LPPR (2 pav.).¹¹



2 pav. Sidabro nanodalelių LPPR dažnio priklausomybė nuo dalelės dydžio.¹¹

Plazmonų virpesių dažnis ω_p aprašomas lygtimi:

$$\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{m\varepsilon_0\varepsilon_\infty}}, \quad (2)$$

kur n – laisvųjų elektronų koncentracija, e – elektrono krūvis, m – efektyvinė elektrono masė, ε_0 – vakuumo dielektrinė skvarba. Kaip matome iš formulės, plazmonų virpėjimo dažnis priklauso ir nuo elektronų tankio ir efektyviosios elektrono masės. Todėl poliarizavus šiuurkštintą elektrodą potencialu, kuris yra neigiamesnis nei to metalo nulinio krūvio potencialas, metalo laidumo juostoje padaugėtų laisvųjų elektronų, galinčių dalyvauti plazmos virpėjime.¹⁰

Metalo optinį atsaką nusako dielektrinė funkcija $\varepsilon(\omega)$, kuri pagal Drudės modelį aprašomas lygtimi:

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma_0\omega} \right), \quad (3)$$

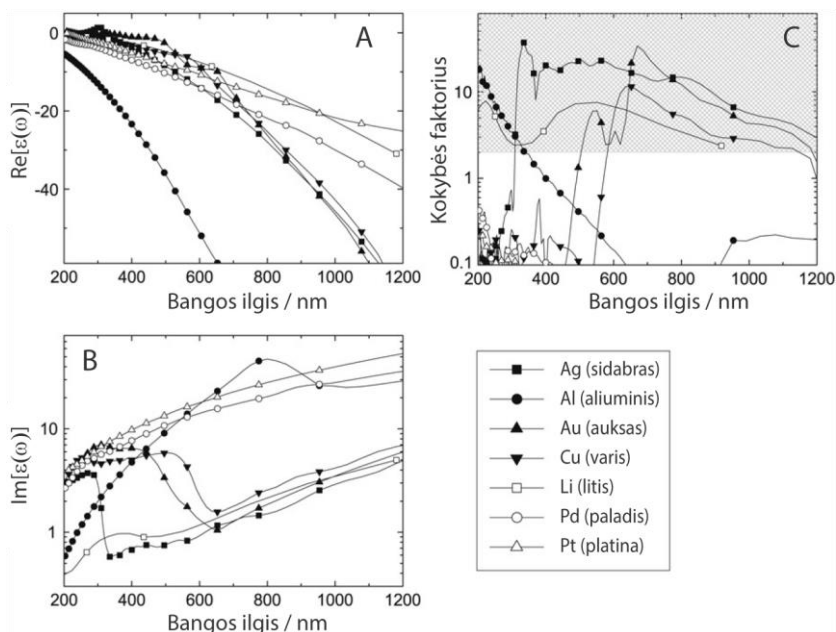
kur ε_∞ yra katijonų atsakas, ω_p – laisvųjų elektronų plazmos virpesių dažnis, ω – elektrinio lauko dažnis ir γ_0 – slopinimo faktorius. Kai $\omega < \omega_p$, metalai šviesą atspindi, nes metalo elektronai ekranuoja išorinį elektrinį lauką, o kai $\omega > \omega_p$, šviesa praleidžiama, nes elektronai nespėja reaguoti į išorinį

lauką ir ekranuoti spinduliuotės. Daugumos metalų LPPR dažnis yra UV spektrinėje srityje, dėl to regimojoje spektro srityje šie metalai šviesą atspindi.¹² Metalų dielektrinė funkcija dažniausiai nusakoma kompleksine išraiška, kurios realioji ($\Re\{\varepsilon(\omega)\}$) ir menamoji dalys ($\Im\{\varepsilon(\omega)\}$) aprašo atitinkamai šviesos sklaidą ir sugertį.

Nagrinėjant nanodalelę elektriniame lauke E_0 , kurio bangos ilgis daug didesnis už dalelės skersmenį, elektrinis laukas E_{in} dalelės viduje yra proporcingas išoriniam laukui:

$$E_{in} = \frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_M}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_M} E_0, \quad (4)$$

kur ε_M – aplinkos dielektrinė konstanta. Rezonanso sąlygos pasiekiamos, kai vardiklis priartėja prie nulio, t. y. kai $\varepsilon(\omega) = -2\varepsilon_M$. Šios sąlygos negali patenkinti dielektrikai, kurių $\varepsilon(\omega)$ yra tarp 1 ir 10. Tačiau metalų realioji dielektrinės funkcijos dalis visoje regimojoje spektro srityje yra neigiama ir tenkina $\Re\{\varepsilon(\omega)\} \approx -2\varepsilon_M$ sąlygą, be to optinė sugertis ($\Im\{\varepsilon(\omega)\}$) maža (3 pav.). Iš visų metalų tik aukso, sidabro ir vario $\Im\{\varepsilon(\omega)\}$ vertės yra pakankamai mažos regimojoje spektro srityje todėl šie metalai pasižymi aukštu LPPR intensyvumu ir yra laikomi pagrindiniais SERS metalais. Apjungus realiosios ir menamosios dalies įtaką optiniam atsakui gaunamas



3 pav. (A) Realios ir (B) menamos dielektrinės funkcijos bei (C) metalų LPPR kokybės faktorius priklausomybė nuo spinduliuotės bangos ilgio.¹⁵

metalu LPPR kokybės faktorius, kuris nusako, kad auksas ir varis efektyviausiai stiprina 600–1200 nm bangos ilgių srityje, o sidabras visoje regimojoje spektro srityje (ca. 400–1000 nm) (3 pav. C).

LPPR sukeltas elektromagnetinio lauko amplitudės padidėjimas ties nanodariniams pasiekia 10^5 kartų.⁸ LPPR dažnis ir stipris tampriai susijęs su nanodalelės dydžiu ir forma: nanovamzdeliai sukelia didesnę stiprinimą nei sferinės nanodalelės, o žvaigždžių formos nanodalelės lauko stiprinimu lenkia nanovamzdelius.¹³ Krūvis paviršiuje linkęs telktis ties aštriais dalelių kampais, todėl didžiausias EM stiprinimas pasiekiamas tose paviršiaus vietose, kuriose yra daugiau briaunų ir viršūnių bei mažas atstumas tarp jų. Šiose paviršiaus vietose, vadinamose karštaisiais taškais, lokalaus elektrinio lauko stipris ženkliai padidėja ir gali siekti 10^9 – 10^{11} kartų.^{14,15}

Stiprinimo faktorius (SF) yra pagrindinis SERS metodo parametras. Prie metalo nelygumų esanti molekulė yra veikiamą elektrinio lauko E_M , kuris yra lazerinės spinduliuotės (E_0) ir metale indukuoto dipolio (E_{sp}) elektrinių laukų suma ($E_M = E_0 + E_{sp}$). Elektrinio lauko sustiprėjimas $A(\nu_L)$ nusakomas bendro molekulę veikiančio ir žadinančio laukų santykiu:

$$A(\nu_L) = \frac{E_M(\nu_L)}{E_0(\nu_L)} \sim \frac{\varepsilon(\nu_L) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\nu_L) + 2\varepsilon_0} \left(\frac{r}{r+d} \right)^3 \quad (5)$$

Molekulė išspinduliuoja Ramano fotoną, kuris yra taip pat sustiprinamas metalo dalelės LPPR. Šio, antrojo, proceso stiprinimo faktorius $A(\nu_R)$ yra analogiškas aprašytam 5 formulėje ($A(\nu_L)$). Taigi, bendrą elektromagnetinio stiprinimo faktorių $G_{em}(\nu)$ sudaro ir žadinančio, ir Ramano elektrinių laukų stiprinimas. Šis stiprinimo faktorius aprašomas lygtimi:

$$G_{em}(\nu) = |A(\nu_L)|^2 |A(\nu_R)|^2 \sim \left| \frac{\varepsilon(\nu_L) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\nu_L) + 2\varepsilon_0} \right|^2 \left| \frac{\varepsilon(\nu_R) - \varepsilon_0}{\varepsilon(\nu_R) + 2\varepsilon_0} \right|^2 \left(\frac{r}{r+d} \right)^{12} \quad (6)$$

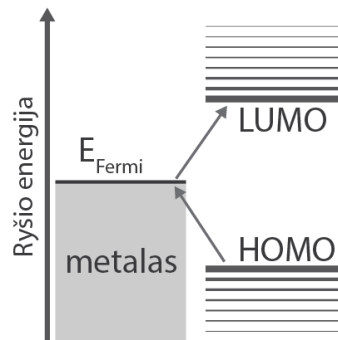
Šiems dviem (lazerinės spinduliuotės ir Ramano) laukams sutampant arba esant arti plazmos rezonanso dažnio elektrinis laukas stiprinamas ketvirtuoju laipsniu (6 formulė). Dėl tokio stiprinimo mechanizmo spektre žemų bangos skaičių ribose pasireiškia aukštas neelastinis fonas, kuris palaipsniui krinta bangos skaičiui didėjant (t. y. kai Ramano fotono dažnis tolsta nuo LPPR dažnio).¹⁶

Tam, kad elektromagnetinis stiprinimo mechanizmas veiktų molekulę, adsorbicija nėra būtina, tačiau stiprinimo efektas greitai slopsta molekulei tolstant nuo paviršiaus. Iš 6 formulės matyti, kad SERS efektas gesta pagal

$I_{SERS} \sim d^{12}$ santykį tolstant nuo metalo paviršiaus (atsižvelgiant į tai, kad procesas vyksta tūryje, išraiška pakoreguojama – $I_{SERS} \sim d^{10}$).¹⁶

Apibendrinant, tam kad pasireikštų SERS efektas būtina pasiekti rezonansą tarp žadinančios elektromagnetinės spinduliuotės ir metalo laisvųjų elektronų virpėjimo. LPPR priklauso nuo dalelės dydžio, formos, nuo metalo ir aplinkos dielektrinių konstantų reikšmių.¹⁷ Optimalus SERS aktyvių dalelių dydis yra 10–100 nm.¹⁸ Vidutiniškai LPPR sukeltas elektromagnetinio lauko intensyvumo padidėjimas siekia 10^5 kartų.⁸

Cheminio stiprinimo mechanizmas. Molekulėms esant adsorbuotoms ant SERS paviršiaus gali pasireikšti cheminis stiprinimas, dar vadinamas pirmojo sluoksnio efektu. Mechanizmas aiškinamas molekulės ir metalo energetinių lygmenų persiklojimu susidarant krūvio pernešimo kompleksui ir vykstant rezonansinei Ramano sklaidai. Persiklojimas vyksta tarp aukščiausios užpildytos molekulinės orbitalės (HOMO), metalo Fermi energetinio lygmens ir žemiausios neužpildytos orbitalės (LUMO). Elektroninis sužadimas vyksta krūviui pereinant iš HOMO į Fermi lygmenį ir tada į LUMO.¹⁹ Šiam, pakopiniam, perėjimui reikalinga mažesnė šuolio energija (4 pav.), dėl to didėja Ramano sklaidos efektyvumas. Cheminis efektas nesusijęs su elektromagnetiniu. Veikiant šiam efektui Ramano signalas papildomai sustiprėja apie 10–100 kartų.



4 pav. Cheminis SERS stiprinimo mechanizmas.

1.2.2. SERS paviršiai

Tiek cheminio, tiek elektromagnetinio stiprinimo mechanizmai yra susiję su metalo paviršiumi, todėl norint gauti kokybiškus, atsikartojančius bei stabilius spektrus yra svarbus tinkamų metalų pasirinkimas ir paviršiaus paruošimas. SERS-aktyvūs metalai yra skirstomi į tris grupes: (i) tauriųjų metalų (Ag, Au, Cu), (ii) laisvųjų elektronų tipo (Al, Na, K), (iii) pereinamųjų metalų (Ni, Pd, Pt).^{18,20} SERS matavimuose dažniausiai naudojami taurieji metalai dėl jų aukšto signalo stiprinimo faktoriaus, LPPR regimojoje spektro srityje ir pakankamo cheminio stabilumo.²¹

SERS paviršių tipai suskirstomi į tris pagrindines grupes: (i) šiurkštinti metalo elektrodai, (ii) metalo nanodalelių tirpalai ir (iii) metalo nanostruktūros

ant lygių stiklo, silicio, metalo padėklų.¹⁵ Vienas plačiausiai paplitusių šiurkštintų SERS elektrodų paruošimo būdų – elektrocheminė oksidacija ir redukcija.^{22,23} Šis metodas gana paprastas, vykdomas elektrolitu (dažniausiai Cl⁻) tirpale. Oksidacijos metu ant elektrodo paviršiaus susidaro metalo jonai Me⁺, kurie redukcijos metu virsta neutralaus metalo Me⁰ nanodariniiais. Susiformuoja stabilūs, įvairaus dydžio ir formos nanostruktūromis dengti paviršiai, tačiau nepasižymintys aukštu atsikartojamumu.²⁴

Kitą SERS-aktyvių paviršių grupę sudaro nanodalelių (koloidų) tirpalai gaunami metalo druskų redukcijos,²⁵ lazerinės abliacijos²⁶ metodais. Abiem atvejais objektas tiriamas sumaišius jį su koloidų tirpalu. Pastaruoju metu ypatingo dėmesio susilaukia dielektriko sluoksniu apsaugotos nanodalelės SHINERS (angl. *shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy*).²⁷ Šios dalelės yra švaresnės nei įprastinės, jos nesąveikauja su tiriamu objektu ir nekeičia sistemos elektrocheminio potencialo. Visgi, SHINERS dalelės nėra universalios – jos sunkiai pritaikomos sudėtingiems biologiniams objektams tirti.

Paskutinei grupei priklausantys stabilūs, turintys reguliaraus dydžio ir formos metalo nanostruktūras paviršiai gaunami litografijos metodu.²⁸

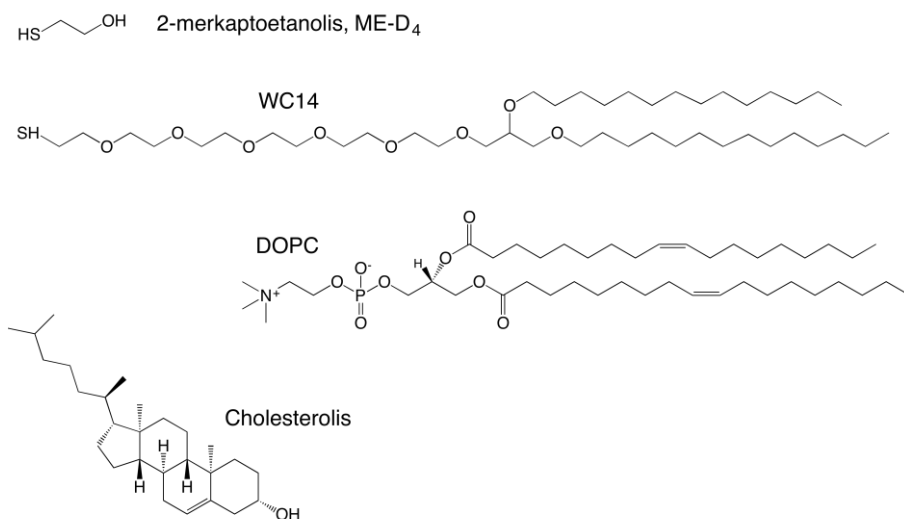
1.3. Apibendrinimas

Aukštas jautris cheminei sudėčiai ir struktūrai, tarpmolekulinėms sąveikoms, galimybė dirbti vandeninėje terpėje *in-situ* ir esant kontroliuojamo potencialo sąlygoms – savybės, dėl kurių virpesinė spektroskopija vis dažniau pasirenkama biomolekulių tyrimams. Šiame darbe naudotas SERS metodas pasižymi aukštu jautriu cheminėms ir orientacinėms pirmojo molekulių sluoksnio savybėms. SERS suteikia vertingos informacijos apie paviršiuje adsorbuotas biomolekulines sistemas: **SAM** (savitvarkius monosluoksnius), **tBLM** (pakabinamas dvisluoksnės lipidinės membranas) ir **elektrodo paviršiuje adsorbuotus fermentus**.

2. Medžiagos ir tirpalai

<i>Dejonizuotas vanduo</i>	Milli-Q plus, JAV, 18,2 MW·cm;
<i>Etilo alkoholis</i>	Vilniaus degtinė, Lietuva, 96 %;
<i>H₂SO₄</i>	Roth, Vokietija;
<i>CHCl₃</i>	Sigma Aldrich, Vokietija;
<i>NaCl</i>	
<i>NaH₂PO₄·H₂O</i>	Fluka, Šveicarija;
<i>Na₂HPO₄·H₂O</i>	
<i>Na₂SO₄</i>	
<i>NaOH</i>	Sigma Aldrich, Vokietija;
<i>ME-D₆</i>	Deuteruotas 2-merkaptoetanolis (DS–C2D ₂ –C1D ₂ –OD) C/D/N Isotopes, Jungtinė Karalystė, grynumas 99,6 %;
<i>DOPC</i>	1,2-dioleilo- <i>sn</i> -glicerolio-3-fosfocholinas Avanti Polar Lipids (JAV);
<i>Cholesterolis</i>	Avanti Polar Lipids, JAV;
<i>1-heptantiolis</i>	Sigma Aldrich, Vokietija;
<i>WC14</i>	20-tetradeciloksi-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatrikontano-1-tiolis (5 pav.). Junginį susintetino David J. Vanderah grupė (NIST Chemical Science and Technology Laboratory, Gaithersburg, Maryland, USA) pagal protokolą aprašytą ²⁹ šaltinyje;
<i>Lakazė J6 ir TaLc</i>	Fermentas išskirtas ir išgrynintas iš grybo <i>Didymocrea</i> (J6) ir iš <i>Trichaptum abietinum</i> (TaLc). Fermentas gautas iš dr. Liucija Marcinkevičienės, (Vilniaus universitetas, Biochemijos institutas). Aukso nanodalelių (AuND)

sintezę ir lakazės J6 adsorbciją atliko Dalius Ratautas (Vilniaus universitetas, Biochemijos institutas). Aukso elektrodo aktyvaciją ir lakazės TaLc adsorbciją atliko dr. Irina Bratkovskaja (Vilniaus universitetas, Biochemijos institutas).



5 pav. Pagrindinių darbe naudotų junginių molekulinės struktūros.

3. Metodai

3.1. Izotopinis pakeitimas

Selektyvus molekulės atomų žymėjimas stabiliais izotopais leidžia vienareikšmiškai priskirti virpesines juostas ir atskirti persiklojusias tiriamo objekto komponentų juostas. Bangos skaičius $\tilde{\nu}$ priklauso nuo virpesyje dalyvaujančių atomų ryšio konstantos K (mdyn/Å) ir yra atvirkščiai proporcingas tų atomų redukuotai masei μ (7 formulė). Žymėjimas izotopais pakeičia molekulės atomų masę, tačiau tik nežymiai keičia ryšio konstantos vertę. Dėl to spektre matomas su žymėtais atomais susijusių juostų poslinkis.

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{K \frac{m_1 + m_2}{m_1 m_2}} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{K}{\mu}} \quad (7)$$

Siekiant atskirti persiklojusias mišraus monosluoksnio juostas matavimų metu buvo naudotas deuteriais žymėtas merkaptetanolis (ME-D₆). Protonai esantys prie N, O ir S atomų yra mobilūs ir greitai apsieičia vietomis su aplinkoje esančiais vandeniliais arba deuteriais,³⁰ dėl to vandens arba etanolio tirpale merkaptetanolis įgauna HS–CD₂–CD₂–OH formą (ME-D₄).

3.2. Paviršių paruošimas

Savitvarkių monosluoksnių tyrimai atlikti ant auksu dengtų nanotekstūruotų safyro plokštelių ir elektrochemiškai šiurkštinto elektrodo. **Paviršiuje adsorbuotos lakazės tyrimai** atlikti ant aukso nanodalelėmis dengto elektrodo ir ant elektrochemiškai šiurkštinto aukso elektrodo.

3.2.1. Magnetroniniu būdu dengtos plokštelės

Komercinės nanotekstūruotos safyro plokštelės (UAB Altechna, Lietuva)³¹ dengtos 2 nm chromo adheziniu pasluoksniu ir 200 nm aukso sluoksniu naudojant magnetroninio garinimo sistemą PVD75 (Kurt J. Lesker Company, JAV). Šios plokštelės naudotos tiriant vandens poveikį SAM.

3.2.2. Šiurkštintas aukso elektrodas

Aukso elektrodo (99,99 %, metalo bazės), kurio aktyvaus ploto skersmuo yra 6,35 mm, paruošimą SERS matavimams sudarė keli etapai: (i) mechaninis

elektrodo dangos atnaujinimas švitriniumi popieriumi (P2500) ir poliravimas aliuminio oksido pasta (0,3 μm). Po šių procedūrų elektrodas veiktas ultragarsu 1:1 etanolio ir vandens mišinyje, tam kad būtų pašalintos aliuminio oksido pastos liekanos. (ii) Elektrocheminio valymo etapą sudarė potencialo skleidimas 0,5 M koncentracijos H_2SO_4 tirpale. Pirmieji penki ciklai vykdyti 0,00–2,00 V srityje, 100 mV/s greičiu. Vėliau pakartota dešimt ciklų skleidžiant potencialą tarp 0,00 ir 1,66 V. Po to elektrodas apie 10 min. veikiamas -0,90 V potencialu 0,1 M NaCl tirpale. (iii) Elektrodas šiurkštinamas 0,1 M NaCl tirpale, keičiant potencialą tarp teigiamos (1,30 V) ir neigiamos (-0,30 V) verčių. Ties neigiama potencialo verte išlaikoma 30 sek., ties teigiama 2 sek. Elektrodo aktyvaciją sudaro trisdešimt ciklų, po kurių elektrodas praplaunamas dejonizuotu vandeniu ir etanoliumi ir iškart talpinamas į inkubacinį SAM tirpalą.

3.2.3. Aukso nanodalelėmis dengtas elektrodas

Aukso nanodalelėmis dengtą elektrodą paruošė dr. Dalius Ratautas pagal aprašymą pateiktą³² publikacijoje.

3.3. Biomolekulių adsorbcija

3.3.1. SAM formavimas

Keturių skirtingų kompozicijų SAM suformuoti iš WC14 ir ME-D₄ tirpalų etanolyje, kuriuose santykinis junginių kiekis buvo 100:0, 70:30, 30:70 ir 100:0 molinėmis proporcijomis. Bendra tiolių tirpalų koncentracija buvo 0,2 mM.

Vandens poveikio SAM tyrimui nanotekstūruotos plokštelės inkubuotos tiolių tirpaluose kambario temperatūroje 24 val. Paruošta po keturias plokšteles kiekvienam skirtingos kompozicijos SAM suformuoti. Po inkubacijos plokštelės atsargiai nuplaunamos etanoliumi ir nudžiovinamos azoto srove. Po vieną kiekvienos kompozicijos plokštelių atidedama SERS matavimui ore, likusios merkiamos į celes su dejonizuotu vandeniu. SAM vandenyje spektrai registruojami iškart (5 min.) ir po 30 min., 60 min., 24 val., 48 val., 72 val.

Potencialo poveikio SAM tyrimui šiurkštintas aukso elektrodas po aktyvacijos inkubuojamas apie 4 val. tiolių tirpaluose. Po inkubacijos elektrodas plaunamas etanoliumi, merkiamas į fosfatinį buferį (pH 6,5). Elektrocheminiai SERS matavimai atlikti nedelsiant.

3.3.2. tBLM formavimas

tBLM (pakabinamos dvisluoksnės lipidinės membranos) formuojamos liejant daugiasluoksnės lipidines liposomas (MLV), sudarytas iš DOPC ir cholesterolio (50:50 molinėmis proporcijomis) ant anksčiau pasiruošto mišraus WC14/ME-D₄ (30:70) monosluoksnio. MLV paruošimą sudaro šie etapai: (i) buteliuke sumaišomi 10 mM koncentracijos DOPC ir cholesterolio chloroformo tirpalai (po 50 µl); (ii) chloroformas išgarinamas pučiant silpna azoto srove apie 30 min. Ant buteliuko sienelių lieka plona lipidų plėvelė; (iii) į buteliuką įpilamas 1 ml fosfatinio tirpalo (0,1 M Na₂SO₄ + 0,01 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 4,7), susidaro 1 mM lipidų tirpalas; (iv) tirpalas atsargiai pipetuojamas kelias minutes, kol praranda skaidrumą – jame susidaro MLV. Toks tirpalas gali būti laikomas apie mėnesį kambario temperatūroje prieš kiekvieną naudojimą atsargiai jį papipetuojant.³³

MLV tirpalas užpilamas ant aukso elektrodo dengto mišriu SAM (WC14/ME-D₄ 30:70, molinėmis proporcijomis) ir inkubuojama apie 20 min. Vėliau elektrodas gausiai plaunamas fosfatinio tirpalu (pH 4,7) nenudžiovinant elektrodo paviršiaus. Fosfatinis tirpalas neturi buferinės talpos esant tokiam pH, tačiau eksperimentiškai pastebėta, kad pH pokyčiai neturi didelės reikšmės membranos stabilumui. Visgi membrana gaunama mažiau defektuota kai yra formuojama rūgštinėmis sąlygomis.³³

3.3.3. Fermentų adsorbcija ant paviršiaus

Lakazė j6 iš *Didymocrea sp.* adsorbuota ant aukso nanodalelėmis dengto aukso elektrodo. Fermentinį elektrodą paruošė dr. Dalius Ratautas pagal aprašymą pateiktą ³² publikacijoje. Adsorbcija vykdyta palaikant elektrocheminį potencialą ties 0,80 V atž. NHE.

Lakazė TaLc iš *Trichaptum abietinum* adsorbuota užpylus fermento tirpalą ant šiurkštinto aukso elektrodo ir inkubuojant 30 min. esant atviros grandinės potencialui. Fermentinį elektrodą paruošė dr. Irina Bratkovskaja pagal 3.2.2. dalyje aprašytą elektrocheminio šiurkštinimo metodą.

3.4. SAM desorbcija

Tiolių elektrocheminės desorbcijos rezultatai suteikia informacijos apie paviršiaus padengimą, metalo-sieros ryšio stiprį ir tarpmolekulinę sąveiką.³⁴ Elektrocheminė SAM desorbcija nuo šiurkštinto aukso elektrodo atlikta 0,5 M NaOH ir 0,1 M Na₂SO₄ tirpale, kuriame potencialas skleistas 50 mV/s greičiu nuo 0 V iki -1,50 V palyginamojo Ag/AgCl elektrodo atžvilgiu. WC14,

ME-D₄ ir mišraus monosluoksniu potenciodinaminės kreivės buvo lyginamos su modeliniu junginiu 1-heptantioliu (HPT).

3.5. Spektroskopiniai matavimai

Visi darbe pateikiami spektroskopinių matavimų rezultatai gauti trejomis Ramano sistemomis:

LabRam HR 800 (Horiba, Prancūzija). Spektrometras kalibruotas pagal silicio standarto juostą ties 520,7 cm⁻¹.

Dispersinis *RamanFlex 400* (PerkinElmer Inc., JAV) su termoelektriškai šaldomu (-50 °C) CCD detektoriumi, turintis 785 nm bangos ilgio diodinį lazerį. Spinduliuotę perduodama iki mėginio optiniu kabeliu. Eksperimento metu Ramano sklaidos geometrija buvo 180°. Spektrometro bangos ilgių ašis kalibruota pagal polistireno spektrą (ASTM E 1840), o santykinis Ramano sklaidos intensyvumas kalibruotas pagal NIST (National Institute of Standards and Technology) intensyvumo standartą SRM 2241.

InVia Ramano mikroskopas (Renishaw, Jungtinė Karalystė) su termoelektriškai šaldomu CCD detektoriumi. 785 nm lazeris derinamas su 1200 rėžių/mm gardele. Spektrometras kalibruotas pagal silicio standarto juostą ties 520,7 cm⁻¹.

3.6. Poliarizaciniai Ramano matavimai

ME-D₄ tirpalo (0,5 M) etanolyje Ramano spektrai registruoti LabRam HR 800 spektrometru. Ramano depoliarizacijos matavimai atlikti mėginį žadinant 532 nm bangos ilgio spinduliuotę generuojančiu lazeriu (Cobolt, Švedija), kurio galia ties pavyzdžiu 22 mW. Naudotas 5x/NA 0,12 (Leica, Vokietija) objektyvas. Kalibravimui nustatytos CCl₄ standarto spektrinių juostų depoliarizacijos ρ vertės yra 0,75 (218 cm⁻¹), 0,75 (315 cm⁻¹) ir 0,007 (459 cm⁻¹).

3.7. Kontroliuojamos temperatūros Ramano matavimai

Visi kontroliuojamos temperatūros matavimai atlikti temperatūrinėje celėje PE95/T95 (LinKam), kurios paklaidų vertė 0,05 °C. Mėginys užlašinamas ant plieninės Tienta SpectRIM plokštelės.

Temperatūriniai **WC14** junginio Ramano matavimai atlikti LabRam HR 800 spektrometru. Mėginys prieš kiekvieną matavimą 50 min. buvo laikomas

nustatytoje (293 K arba 243 K) temperatūroje. Spektrams žadinti naudotas 785 nm bangos ilgio diodinis lazeris (Lion, Sacher Lasertechnik GmbH, Vokietija), kurio galia ties pavyzdžiu 22 mW. Naudotas 10x/NA 0,25 (MPlan N, Olympus, Japonija) objektyvas.

Temperatūriniai **DOPC** ir **cholesterolio** Ramano matavimai atlikti RamanFlex 400. Lazerinės spinduliuotės galia ties pavyzdžiu apribota iki 100 mW, spindulys sufokusuotas į 200 μm skersmens dėmę ant paviršiaus. Spektrai registruoti 300–1000 sek. Mėginiai matuoti esant 293 ir 173 K temperatūrai.

3.8. SERS matavimai

Vandens poveikio SAM struktūrai tyrimas. Inkarnių monosluoksnių savybių tyrimas inkubacijos vandenyje metu atliktas InVia Ramano mikroskopu. 785 nm bangos ilgio spinduliuotės galia apribota iki 5 mW ties mėginiu. Vieno spektro registravimo laikas – 100 sek. Spektrai registruoti tolumo židinio objektyvu 50x/NA 0,5 (Leica, Vokietija). Siekiant sumažinti spinduliuotės sukiamą foto ir terminę mėginio degradaciją mėginys buvo judinamas 15–25 mm/s greičiu lazerio spindulio atžvilgiu.^{35,36} Celės judinimas lazerio spinduliuotės atžvilgiu taip pat sumažina atsitiktinių klaidų tikimybę, nes tokiu būdu užregistruojamas spektras nuo didesnio elektrodo paviršiaus ploto.

Elektrinio potencialo poveikio SAM struktūrai tyrimas. Elektrocheminiai SERS tyrimai atlikti RamanFlex 400 spektrometru. 785 nm lazerinės spinduliuotės galia ties pavyzdžiu apribota iki 30 mW, o lazerio spindulys sufokusuotas į 200 μm skersmens dėmę ant mėginio paviršiaus. Vieno spektro registravimas truko nuo 300 sek. iki 500 sek.

SERS matavimų metu potencialas palaikytas AutoLab PG101 (Methorms, Olandija) potenciostatu. Matavimai atlikti cilindrinėje trijų elektrodų celėje, naudojant darbinį (DE) aukso elektrodą, pagalbinį platinos vielos elektrodą (PGE) ir palyginamąjį Ag/AgCl/3M KCl (PE) elektrodą. SAM tirti 0,01 M fosfatiniame ir 0,1 M Na₂SO₄ buferyje (pH 6–7). Matavimų metu mėginys buvo nuolatos judinamas 15–25 mm/s greičiu lazerio spindulio atžvilgiu.

Elektrinio potencialo poveikio adsorbuotiems fermentams tyrimas. Paviršiuje adsorbuotos lakazės tirtos RamanFlex 400 spektrometru 0,05 M fosfatiniame tirpale (pH – 5,4). Matavimo sąlygos atitinka aprašytas ankstesnėje dalyje (*Elektrinio potencialo poveikio SAM struktūrai tyrimas*).

3.9. Kvantinės chemijos skaičiavimai

Kvantinės chemijos skaičiavimai taikomi interpretuojant eksperimentinius duomenis, modeliuojant trumpalaikius, nestabilius tarpinius reakcijų produktus ir pereinamąsias būsenas. Skaičiavimais nustatoma stabili geometrinė struktūra, virpesiniai spektrai, termodinaminės charakteristikos ir reakcijų keliai.

Teoriniam virpesiniam spektrui apskaičiuoti dažniausiai taikomi *ab-initio* ir tankio funkcionalo teorijos (DFT) metodai. Taikant šiuos metodus naudojami ne eksperimentiškai gauti parametrai, o fundamentinės fizikinės konstantos. *Ab-initio* metodais sprendžiama molekulių sistemos elektronų banginių funkcijų Šriodingerio lygtis. Koordinačių skaičius šiuose skaičiavimuose priklauso nuo elektronų skaičiaus ir yra lygus $3N$, čia N – elektronų skaičius.³⁷ Tuo tarpu DFT metodu, kuris remiasi Hohenberg–Kohn teorija,³⁸ skaičiuojamas elektronų tankio pasiskirstymas trijose erdvinėse Dekarto koordinatėse. Taip sumažinus sistemos kintamųjų skaičių skaičiavimas trunka trumpiau.

Šiame darbe teoriniam modeliavimui ir kvantinės chemijos skaičiavimams naudota Gaussian programa (G09W A.02).³⁹ Molekulinių struktūrų optimizavimas ir virpesinių spektrų skaičiavimas atliktas DFT metodu su B3LYP funkcionalu ir 6-311++G(d,p) bazinių funkcijų rinkiniu C, H, S, O atomams ir LANL2DZ funkcionalu su efektyviojo potencialo (ECP) bazinių funkcijų rinkiniu aukso atomams. Skaičiavimuose aukso paviršių imitavo 10 Au atomų klasteris, kuris, kaip buvo parodyta ankstesniais darbais, yra tinkamas aukso paviršiui imituoti.⁴⁰

Teoriniais metodais apskaičiuotiems virpesiniams dažniams būdingi sisteminiai neatitikimai eksperimentinėms reikšmėms.^{41–43} Paprasti ir vidutinio sudėtingumo algoritmai taikant tam tikrus banginių funkcijų rinkinius neatsižvelgia į virpesių anharmoniškumą ir netiksliai apskaičiuoja elektronų koreliaciją.⁴¹ Geresniam teorinių ir eksperimentinių duomenų sutapimui teorinio spektro dažniai ir intensyvumai yra normuojami pagal formulę: $v' = \alpha(v) \cdot v$, kur v' – normuotas dažnis, o $\alpha(v)$ – normavimo faktorius. Normavimo faktoriaus vertės priklauso nuo pasirinkto skaičiavimo metodo ir bazinių funkcijų rinkinio.⁴² Normavimo faktorius aprašomas formule:⁴³

$$\alpha(v) = 1 - (1 - \alpha^F) \frac{v - v^0}{v^F - v^0}, \quad (8)$$

Šiame darbe normavimo faktorius $\alpha^F = 0,97$ pasirinktas atsižvelgus į metodą ir bazinių funkcijų rinkinį.⁴² Paprastai v^F ir v^0 reikšmės pasirenkamos

pagal tai, kokiose ribose bus nagrinėjamas spektras.⁴³ Šiame darbe buvo $\nu^F = 4000$ ir $\nu^l = 600$.

Ramano spektrinis intensyvumas yra proporcingas sklaidos skerspjūviui ($\partial\sigma/\partial\Omega$), todėl su eksperimentiniais rezultatais tinkamiau lyginti sklaidos skerspjūvio vertę. Apskaičiuotas sklaidos aktyvumas S_j pakeičiamas sklaidos skerspjūviu pritaikius formulę:^{44,45}

$$\frac{\partial\sigma_j}{\partial\Omega} = \left(\frac{2^4\pi^4}{45}\right) \left(\frac{(\nu_0-\nu_j)^4}{1-\exp\left[\frac{-h\nu_j}{kT}\right]}\right) \left(\frac{h}{8\pi^2 c\nu_j}\right) S_j, \quad (9)$$

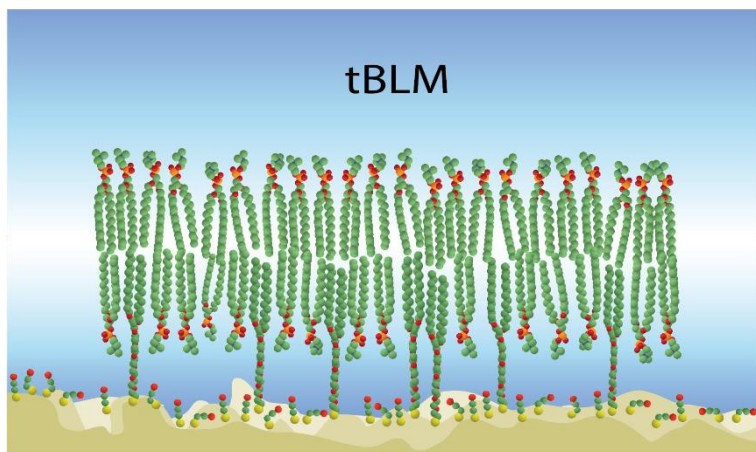
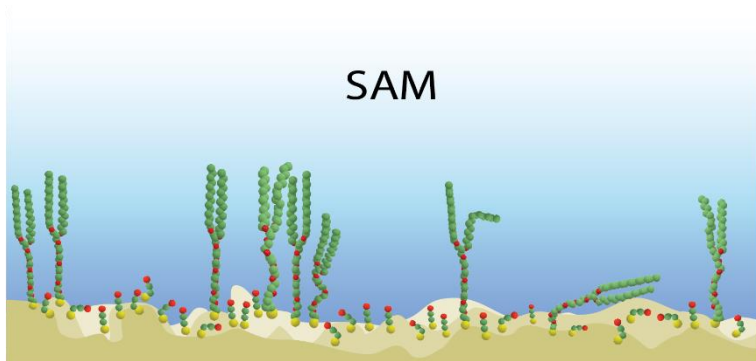
kur ν_0 yra lazerinės spinduliuotės dažnis, ν_j – virpesinis j modos dažnis, k , c , h – universalios konstantos. Skaičiuotame Ramano spektre juostos išplėtos iki 4 cm^{-1} pločio ties virpesinės juostos pusaukščiu (FWHM), taikant Gauso funkciją. Tarp apskaičiuotų harmoninių dažnių nebuvo menamų (turinčių neigiamą energiją), o tai rodo, kad molekulė yra optimalios geometrijos ir mažiausios galimos energijos.

Teorinio modeliavimo duomenims atvaizduoti ir pirminiam spektrinių juostų priskyrimui naudota Chemcraft programa. Spektrinių juostų priskyrimas šia programa yra nesudėtingas, tačiau kartais yra nepakankamai tikslus dėl pervertinamos vandenilio atomų įtakos pasirinktam virpesiui. Tam, kad kiekybiškai būtų įvertintas kiekvieno virpesyje dalyvaujančio atomo indėlis, atlikta potencinės energijos pasiskirstymo (PED) analizė VEDA 4 programiniu paketu.⁴⁶

3.10. Duomenų apdorojimas

Spektrai apdoroti GRAMS/AI 8,0 (Thermo Scientific Inc., JAV) programiniu paketu. Visų spektrų intensyvumai normuoti vienai sekunde, atimtas fonas, smailių dažniai ir intensyvumai gauti aprašius eksperimentines juostas Lorencio-Gauso komponentėmis. Dvidimensinės koreliacinės analizės (2DCOS) spektrai gauti pasinaudojus mūsų pačių parašyta programa MATLAB R2013 (The MathWorks Inc.) paketu. Statistiniai duomenys pateikiami trijų arba daugiau matavimų vidurkiu \pm standartine paklauda.

II DALIS. SAVITVARKIŲ MONOSLUOKSNIŲ IR
PAKABINAMŲ DVISLUOKSNIŲ LIPIDINIŲ MEMBRANŲ
TYRIMAS VIRPESINE SPEKTROKOPIJA

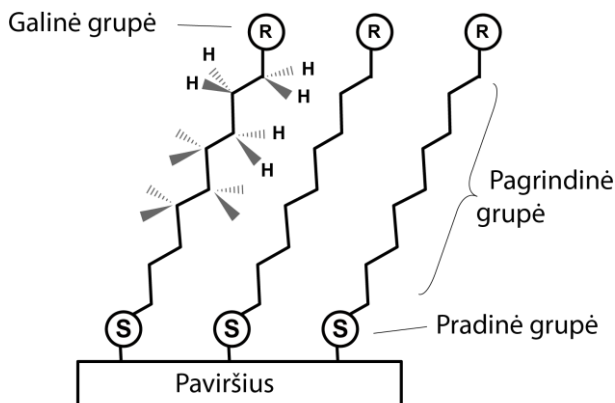


4. Literatūros apžvalga

4.1. Savitvarkiai monosluoksniai

SAM (savitvarkiais monosluoksniais) vadinamos ant paviršių spontaniškai susiformuojančios molekulių struktūros, pasižyminčios bendra tvarka ir orientacija paviršiaus atžvilgiu. SAM svarbūs nagrinėjant fundamentinius reiškinius, kuriant biologinius ir elektrocheminius jutiklius,^{47,48} molekulinės elektronikos įrenginius,⁴⁹ tiriant modelines biomembranas ir į jas įsiterpiančius baltymus,²⁹ elektronų pernašos procesus fazių riboje,⁴⁴ katalizėje.⁵² Technologijos moksluose SAM naudojami paviršiaus drėkinimo, tepimo, trinties ir nusidėvėjimo tyrimams,⁵³ metalo paviršių antikorozinei apsaugai,⁵⁴ kuriant antiadhezinius paviršius, trukdančius mikroorganizmų adsorbacijai.⁵⁵ SAM didina nanostruktūrų stabilumą, užtikrinta fizinį ir elektrostatinį barjerą mažinantį nanodalelių agregavimą, sumažina paviršiaus atomų reaktyvumą ir veikia kaip elektriškai izoliuojanti danga.⁵⁶

SAM pritaikymas priklauso nuo jį sudarančių molekulių struktūros ir orientacijos. Pagrindiniai veiksniai lemiantys monosluoksnio struktūrą yra **paviršiaus morfologija** (makroskopinė struktūra, defektai, dislokacijos, augimo laipteliai, ir kt.) ir jo **cheminė sudėtis** bei **sąveikos tarp molekulių ir paviršiaus** ir **tarpmolekulinės jėgos** (elektrostatinė, hidrofobinė ir Van der Valso sąveikos, vandeniliniai ryšiai). Sąveikų stiprumą tarp molekulių ir paviršiaus bei tarp pačių molekulių apsprendžia jas sudarantys struktūriniai domenai, kurie skirstomi į pradinę, pagrindinę ir galinę grupes (6 pav.). Kiekviena šių grupių atlieka atskirą funkciją:



6 pav. SAM modelis.

Pradinė grupė dažniausiai sudaryta iš tiolio, disulfido, amino, silano, fosfato, karboksirūgšties ar kitų grupių, sudaro kovalentinį ryšį su paviršiumi.⁵⁷ Per šią grupę molekulės yra imobilizuojamos paviršiuje.

Pagrindinė grupė užtikrina kontroliuojamą monosluoksniu storį. Ją sudaro nuo kelių iki keliolikos anglies atomų ilgio angliavandenilinė grandinė, kuri gali būti tiek alifatinė tiek aromatinė. Ši dalis, veikia kaip fizinis barjeras, keičia elektros laidumą bei optines sistemos savybes.

Ilgėjant alifatinei grandinei stiprėja hidrofobinė sąveika tarp molekulių. Šią sąveiką valdo molekulinį hidrofobinių grupių hidratacijos termodinamika. Molekulės turinčios grandinėje dešimt ir daugiau metileno grupių formuoja glaudžius SAM, kurie išlieka stabilūs ore ilgesnį laiką.^{58,59} Tokie ilgagrandžių molekulių monosluoksniai pasižymi mažesniu defektų skaičiumi, tolygesniu paviršiaus padengimu ir didesne tvarka. SAM stabilumą didina į alifatinę grandinę įterpiamos cheminės (pvz. amidinė) grupės, kurios sudaro vandenilinius ryšius tarp gretimų molekulių.⁶⁰

Galinės grupės sąveikauja su tirpikliu fazių riboje, dalyvauja paviršiaus modifikacijose ir prijungiant biomolekules, sudaro galimybę vykdyti kitas chemines reakcijas.⁵⁶ Galinė karboksirūgšties grupė, $-\text{COOH}$, svarbi baltymų, biomolekulių ir ląstelių prijungimui prie monosluoksniu paviršiaus. Atskirą kategoriją sudaro molekulės, kurių funkcija yra įsiterpti į lipidinę membraną taip ją pritvirtinant nedideliu atstumu nuo paviršiaus. Jų galinės grupės yra ilgos hidrofobinės angliavandenilių grandinės, lengvai įsiterpiančios į lipidinės membranos dvisluoksnį. Plačiau šių molekulių taikymas konstruojant modelines membranas nagrinėjamas 4.5.2 skyriuje „Biologinės membranos“.

4.2. Monosluoksnių formavimasis

Iki šiol plačiausiai tiriami ant aukso paviršiaus adsorbuoti ir pradinėje grupėje sierą turintys monosluoksniai. Šį pasirinkimą pirmiausiai lemia gana stiprus Au–S ryšys (ca. 44 kcal/mol).⁶¹ Be to auksas sunkiau oksiduojasi nei sidabras, todėl prieš formuojant SAM nereikia pašalinti paviršiaus oksidų, todėl paprastėja paviršių paruošimas.⁶² Sieros ir seleno atomai pasižymi aukštu giminingumu ir kitiems pereinamosios grupės metalams: sidabru, platinai, geležiai, variui ir kitiems.

Molekulės su tiolio grupe adsorbuojasi skylant S–H ir sudarant metalo sieros Me–S cheminiam ryšiui. Proceso metu vandenilis yra redukuojamas ir pašalinamas. SAM formavimąsi sudaro keli etapai, kurių skaičius ir trukmė priklauso nuo molekulių prigimties ir išorinių veiksnių.⁶³

Pirmasis etapas trunka nuo kelių minučių iki kelių valandų.⁶⁴ Jo metu susidaro cheminis paviršiaus-pradinės grupės (Au–S) ryšys. Etapo trukmė priklauso nuo molekulių koncentracijos tirpale, jų difuzijos greičio bei nuo cheminei reakcijai reikalingos aktyvacijos energijos. Iš pradžių molekulės adsorbuojasi ant paviršiaus atsitiktine tvarka, jų tankiui didėjant, ima reikštis tarpmolekulinės sąveikos, didėti tvarka. Užsipildžius visoms aktyvioms paviršiaus vietoms prasideda kitas etapas.

Antrasis etapas trunka kelias valandas. Jo metu vyksta SAM reorientacija: didėja tvarka tarp grandinių, sumažėja molekulių pasvirimo kampas paviršiaus normalės atžvilgiu.⁶³ Prasideda kristalizacijos procesai: kieto būvio molekulių salelės palaipsniui prisijungia aplink esančias pavienes molekules, kristalo salelės auga ir pilnai padengia paviršių.⁶⁵ Proceso sparta priklauso nuo netvarkos (goš defektų), sąveikos tarp grandinių (Van der Valso, dipolio-dipolio) ir molekulių mobilumo.

4.3. Monosluoksnių struktūra ir stabilumas

Įprastomis sąlygomis monosluoksniai yra stabilūs ir chemiškai inertiški, tačiau galimi tam tikri jų struktūros pokyčiai dėl temperatūros, tirpiklių, pH, elektrinio potencialo, šviesos (UV) ir deguonies poveikio.^{48,66}

Temperatūros poveikis monosluoksnių struktūrai. Dauguma alkantiolių molekulių kambario temperatūroje sudaro tvarkingus monosluoksnius, kurių angliavandenilinės grandinės veikiamos tarpmolekulinėse jėgose įgauna pilnai ištiestą konformaciją. Nuzzo *et al.*^{67,68} tyrė 16, 17, 22 anglies atomus turinčius alkantiolius. Infraraudonosios sugerties duomenys parodė, kad goš defektai pirmiausiai susidaro grandinės dalyse prie galinės grupės, kadangi šios dalys yra mobilesnes už vidines.⁶⁹ Mažinant temperatūrą, molekulių šiluminis judėjimas slopsta, mažėja goš defektų, molekulės pradeda formuoti į kristalus panašias struktūras. Šiuos persitvarkymus virpesiniuose spektruose atitinka CH₂ valentinio asimetrinio virpesio poslinkis į žemesnių dažnių pusę bei daugumos spektrinių juostų susiaurėjimas ir intensyvumo išaugimas.⁶¹

Monosluoksnių oksidacija. T. Willey *et al.*⁷⁰ tyrimas atskleidė, kad vienu iš pagrindinių oksiduojančių agentų yra ozonas, kuris susidaro ultravioletinei spinduliutei veikiant oro deguonį. Jie parodė, kad monosluoksniai išlieka stabilūs laikomi sandariai ir tamsoje ilgesnį laiką. Kito tyrimo metu nustatyta, kad veikiant ozonu, vyksta intensyvi alkantiolių monosluoksnių ant aukso paviršiaus degradacija.⁷¹ Alkantioliams oksiduojantis susidaro alkil-sulfonatai (–SO₃⁻), sulfinitai (–SO₂⁻), sulfitai (–SO₃²⁻) ir sulfatai (–SO₄²⁻). Šių

junginių giminingumas paviršiui mažas, todėl jie pažeidžia monosluoksnio stabilumą ir tvarką.⁶⁶

Kaip greitai oksiduosis pagrindinė grupė priklauso nuo SAM izoliacinių savybių (grandinės ilgio) ir goš defektų skaičiaus.⁶⁶ Oksiduojantiems junginiams sunkiau prasiskverbti per kompaktiškai susipakavusių ilgagrandžių tiolių grandines iki pradinių grupių esančių ties metalo paviršiumi. Monosluoksniuose ilgagrandės molekulės taip pat pasižymi mažesniu santykinu grandinės goš defektų skaičiumi.

Ant Au(111) paviršiaus suformuotas tvarkus, defektų neturintis alkantiolių monosluoksnis pasižymi geromis izoliacinėmis savybėmis. Sieros atomai išsidėsto mozaikos principu pagal metalo paviršiaus atomų gardelės struktūrą. Tačiau molekulių pagrindinės grandinės skerspjūvis yra mažesnis nei atstumas tarp dviejų su paviršiumi sąveikaujančių sieros atomų. Dėl to tarp monosluoksnio molekulių susidaro apie 3 Å pločio kanalai, kuriais nesant išoriniam elektriniam laukui jonai ir vandens molekulės nesugeba prasiskverbti.⁷² Vandens molekulė ir kai kurie jonai turi panašų arba mažesnę Van der Valso skersmenį nei vandens kanalų skersmuo, tačiau dėl vandens molekulės rišančių vandenilinių ryšių ir jonų hidratacijos, kanalai jiems neįveikiami. Sukūrus išorinį elektrinį lauką, tirpale esantys jonai (pvz.: K⁺, Cl⁻) praranda solvacinę apvalkalą, įveikia SAM pagrindinių grupių kuriamą hidrofobinį barjerą, prasiskverbia pro SAM ir pasiekia metalo paviršių.⁷²

Elektrinio potencialo poveikis SAM. Potencialų ribos, kuriose alkantioliai išlieka stabilūs elektrodo paviršiuje, yra apytiksliai tarp -1,00 ir 0,50 V atž. Ag/AgCl.⁷³ Šios ribos atitinka daugumos per SAM sluoksnį adsorbuotų fermentinių elektrodų veikimo ribas. Tačiau potencialui išeinant iš šių ribų SAM molekulės gali desorbuotis vykstant jų pradinės grupės oksidacijai arba redukcijai. Ankstesni tyrimai parodė, kad teigiama elektrodo poliarizacija monosluoksnio formavimosi metu paskatina greitesnę molekulių adsorbciją ir padidina susiformavusio SAM tvarką.⁷⁴⁻⁷⁶

Desorbcijos potencialo vertę lemia daugybė veiksnių, tarp kurių: paviršiaus energetinė būseną, molekulės hidrofobinės dalies ilgis, monosluoksnio tvarkingumas, tarpmolekulinių sąveikų stipris. Nustatyta, kad ant polikristalinio paviršiaus adsorbuoto SAM desorbcijos potencialas yra labiau neigiamas nei monosluoksnio ant žemo kristalinio indekso paviršiaus, pavyzdžiui Au(111), dėl stipresnio molekulių ryšio su paviršiumi.⁷⁷ Aukso-sieros ryšio energijos mažėjimas Au(110) > Au(100) > Au(111) siejasi su šių paviršių aukso atomų koordinacijos skaičiaus didėjimu.⁷⁸

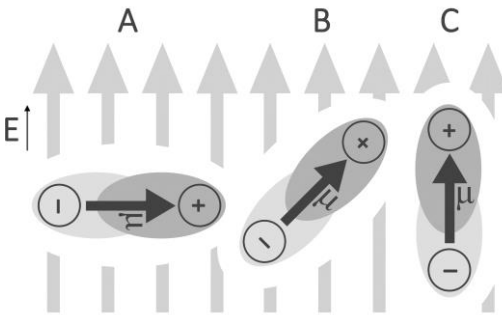
Statiniame elektriniame lauke molekulėms pasireiškia virpesinis Štarko efektas. **Štarko efektu** vadinamas lokalaus ir statinio elektrinio lauko sukeltas

virpesinių juostų poslinkis.⁷⁹ Elektrinis laukas keičia virpančio dipolio (μ) energiją dėl ryšio anharmoniškumo ($\Delta\mu_{\text{anh}}$), ir dėl cheminio ryšio jėgos konstantos pokyčio ($\Delta\mu_{\text{rys}}$).⁸⁰

Štarko efektas tiesiogiai priklauso nuo nagrinėjamo virpesio dipolio momento orientacijos elektrinio lauko krypties atžvilgiu (7 pav.) pagal šį sąryšį:⁸¹

$$\nu \cong \nu_0 - |\nu\vec{\mu}| \cdot |\vec{E}_f| \cdot \cos \theta \quad (10)$$

Kur μ yra virpesio dipolio momentas, E_f – išorinis elektrinis laukas, θ – kampas tarp virpesio dipolio momento ir elektrinio lauko vektorių. Virpesio dipolio momento orientacijai sutampant su elektriniu lauku – efektas pasireiškia stipriausiai, o kai vektoriai yra statmeni vienas kito atžvilgiu – nepasireiškia.



7 pav. Dipolių (μ) orientacija elektriniame lauke (E). Štarko efektas A dipoliui nepasireiškia; B dipoliui pasireiškia, bet silpniau nei C.

Lokalus elektrinis laukas ne tik lemia baltymų susilankstymą, bet ir yra svarbus molekulių atpažinime ir užtikrinant fermentų katalitinę funkciją. Štarko efektu pasinaudojama tiriant lokalų elektrinį lauką vykstant baltymų sąveikoms,⁸² taip pat tiriant dvigubą elektrinį sluoksnį ties SAM-tirpalo fazių riba.^{83,84}

Lokaliam elektriniam laukui ir Štarko efektui tirti dažniausiai pasirenkama reportinė nitrilo ($-\text{C}\equiv\text{N}$) grupė, kurios pagrindinis virpesys pasireiškia gana laisvame spektriniame ruože (ca. 2250 cm^{-1}).^{81–84}

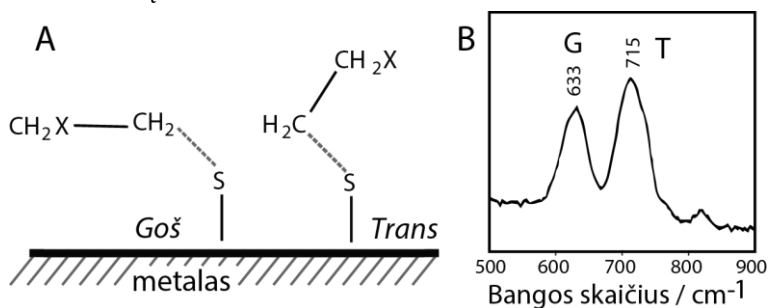
Vandens ir kitų tirpiklių poveikis monosluoksnių struktūrai. Heksadekantoliolio ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$) struktūros kitimus sidabro paviršiuje veikiant skirtingais tirpikliais tyrė C. J. Sandroff *et al.*⁸⁵ SERS metodu buvo nustatyta, kad molekulių pilnai-trans angliavandenilinių grandinių konformacija mažai kinta veikiant jas vandeniu, o mažiau polinis tirpiklis, CHCl_3 , dėl giminingumo galinėms grupėms ($-\text{CH}_3$) monosluoksniu tvarkai turėjo didesnės įtakos. Chloroformas padidino molekulių judrumą ir goš defektų skaičių prie galinės grupės, bet nepaveikė prie paviršiaus esančios Ag-S-C grupės.

Vanduo fazių riboje pasižymi kitokiomis struktūrinėmis ir fizinėmis savybėmis nei laisvas vanduo tūryje. Neutronų reflektometrijos tyrimų

duomenimis, vandens tankis hidrofobines galines grupes turinčio monosluoksnių fazių riboje yra mažesnis nei vandens tankis tūryje.⁸⁶ Vanduo yra ypač svarbus biocheminėse ir biologinėse sistemose, pirmiausia dėl to, kad įvairūs šių sistemų procesai vyksta vandens apsuptyje. Ne išimtis – tBLM (pakabinamos dvisluoksnės lipidinės membranos), kurios yra funkcionalios tik vandeninėje terpėje.

4.4. Monosluoksnių tyrimas Ramano spektroskopijos metodu

Alkantiolių monosluoksniai plačiai tiriama paviršiaus sustiprintos Ramano (SERS) ir atspindžio-sugerties infraraudonosios sugerties (RAIRS) metodais. Šie metodai skiriasi atrankos taisyklėmis: infraraudonojoje spektroskopijoje aktyviausi tie virpesiai, kurių metu kinta dipolio momentas, o Ramano sklaidos metu aktyviausi tik su molekulės poliarizuojamo pokyčiais susiję virpesiai. Todėl nors metodai ir giminingi, gaunami rezultatai nesidubliuoja ir papildo vienas kitą.

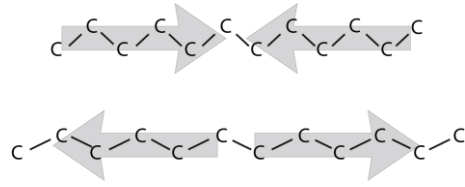


8 pav. (A) goš (G) ir trans (T) konformacijų palyginimas. (B) Goš ir trans konformacija spektre tiriama S–C valentiniams virpesiams priskiriamoje srityje (600–750 cm^{-1}).

SERS spektruose unikali žemo dažnio metalo-adsorbato (aukso, sidabro ir vario tiolatų) moda pasireiškia 200–280 cm^{-1} srityje.⁸⁷ Šis metodas leidžia nustatyti adsorbcijos paviršiuje sukeltą S–H ryšio disociaciją ir Me–S ryšio susidarymą, S–C bei C–C ryšių orientaciją. Adsorbuotų molekulių izomerinę būseną ties pradine grupe nusako valentinio S–C virpesio dažnis, spektre pasireiškiantis goš ir trans konformacinėmis juostomis, 600–750 cm^{-1} srityje (8 pav.). Santykinis konformerų kiekis nusakomas intensyvumų santykiu A_T/A_G .

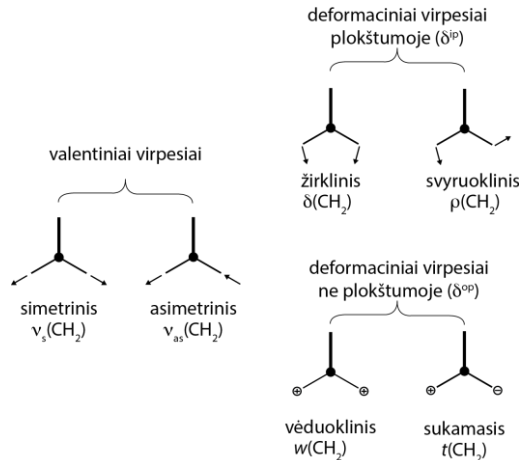
Valentinių $\nu(\text{C–C})$ alkilinės grandinės virpesių sritis ties 1030–1150 cm^{-1} suteikia informacijos apie konformacinę pagrindinės grupės būseną.⁸⁸ Vienas pagrindinių sočios grandinės būsenos žymenų – pilnai-trans juosta ties 1130 cm^{-1} . Šios juostos atsiradimas siejamas su grandinės faziniu perėjimu į pilnai ištiestą ir goš defektų neturinčią būseną. Tokią būseną ardo šiluminis

judėjimas, oksidacija ir kiti veiksniai didinantys netvarką monosluoksnyje, todėl pilnai-trans juosta yra kietos molekulių būsenos ir klasterizacijos žymuo (9 pav.).



9 pav. Vykstant angliavandenilinės grandinės pinai-trans virpesiui, grandinė išsitempia ir susitraukia.

Valentinių $\nu(\text{C-H})$ virpesių sritį sudaro daug virpesių, priklausančių simetrinėms ir antisimetrinėms metilo ir metileno grupių modoms (10 pav.), taip pat kombinacinėms ir Fermi rezonanso juostoms. Tiriant valentinius $\nu(\text{C-H})$ virpesius nustatoma bendra molekulių orientaciją paviršiaus atžvilgiu.⁸⁹ Tarpmolekulinėms sąveikoms ypač jautrūs $\nu(\text{CH}_3\text{FR})$ ir $\nu(\text{CH}_2)$ virpesiai – padidėjusi netvarka didina $\nu(\text{CH}_3\text{FR})$ ir mažina $\nu(\text{CH}_2)$ juostų intensyvumą.⁹⁰ Simetrinio bei antisimetrinio valentinių CH_2 (ca. 2850 ir 2920 cm^{-1}) virpesių dažnis ir pusplotis RAIRS spektre suteikia informacijos apie monosluoksno kompaktiškumą. Esant didesniai goš defektų skaičiui alkilinėje grandinėje, ar nepakankamai glaudžiam grandinių susipakavimui, šios juostos linkusios slinkti į aukštesnių dažnių pusę, jų pusplotis – didėti.^{61,91}



10 pav. Alifatinių molekulių CH_2 grupės virpesinės modos. Adaptuota pagal ⁷.

4.5. Biologinės membranos

Membranos yra sudėtingos biologinės struktūros sudarančios barjerą tarp ląstelių ar organelių vidaus turinio ir aplinkos. Pro membranoje esančius kanalus ir nešiklius vyksta ląstelei reikalingų molekulių pernaša, membrana dalyvauja transformuojant energiją, perduodant nervinius impulsus.

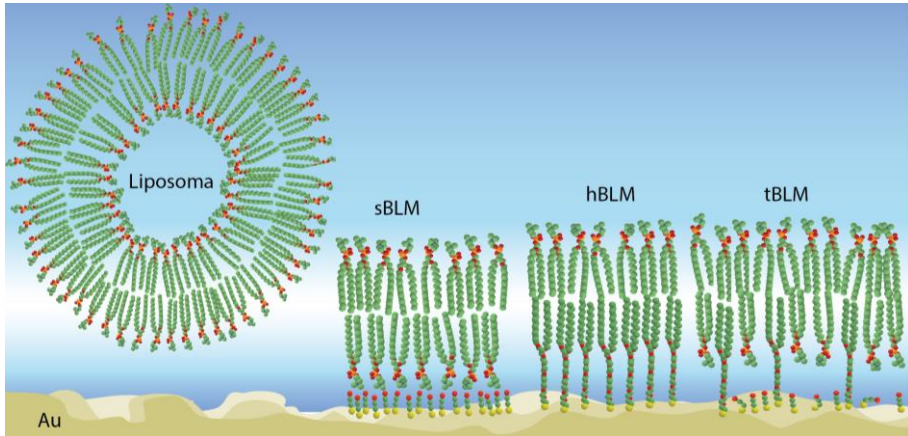
Pagrindiniai biologinių membranų komponentai yra lipidai ir baltymai. Amfifilinės lipidų molekulės poliniame tirpiklyje formuoja savitvarkį dvisluoksnį, į kurį įsiterpiančys baltymai gali atlikti transporto ir biokatalizės funkcijas. Membranos yra dinamiškos struktūros, jose nuolat vyksta lateralinė ir tarp sluoksninė lipidų difuzija. Visgi, nepaisant lipidų mobilumo, membranose yra asimetriškos: jų vidinio ir išorinio sluoksnių sudėtis skiriasi, daugumos biologinių membranų vidinis sluoksnis turi neigiamą krūvį.

Gyvūnų ląstelių membranose daugiausiai aptinkama fosfatidilcholino (PC), sfingomielino, fosfatidiletanolamino, taip pat fosfatidilserino ir fosfatidilglicerolio.⁹² Pagrindinės riebalų rūgštis gyvūnų ir augalų ląstelių membranų lipiduose yra 12–24 anglies atomų ilgio. Iš šių rūgščių oleino rūgštis ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$) aptinkama dažniausiai. Molekulinė membranų sudėtis lemia membranų takumą, fazinio virsmo temperatūrą, asimetriškumą. Cholesterolis – vienas gausiausių eukariotų plazminę membraną sudarančių elementų. Molekulė turi mažą polinę dalį – hidroksilo grupę ir hidrofobinę dalį iš keturių sujungtų žiedų (5 pav.). Pagrindinė cholesterolio funkcija – keisti membranų takumą ir padidinti susipakavimą tarp riebiųjų rūgščių grandinių, kuris užtikrina membranų vientisumą.

Tirti biologines membranas sudėtinga dėl jų kompleksiškos sandaros ir vykstančių procesų gausos, be to tokie tyrimai galimi tik *in-situ*. Sprendžiant šiuos sunkumus tyrimuose pradėtos naudoti sintetinės modelinės membranų chemine sudėtimi primenančios gyvūnų ląstelių membranų. Pagrindinis šių membranų privalumas – nesudėtingas paruošimas ir lengvas pritaikomumas tyrimuose. Platesnius biologinių membranų tyrimus paskatino ir tai, jog didelė dalis ligų yra susijusi su sutrikusiu membraninių baltymų funkcionalumu.⁹³

Dirbtinės membranų privalo pasižymėti fizinėmis ir cheminėmis savybėmis, būdingomis gyvūnų ląstelių membranoms: izoliuoti vidaus ir išorės tūrius, būti elektriškai nelaidžiomis, tačiau takiomis ir užtikrinančiomis lateralinį molekulių judrumą. Takumas ypač svarbi savybė į membraną įsiterpiančių baltymų funkcionalumui išlaikyti.

11 paveiksle pateikiamos modelinės membranų, iš kurių paprasčiausias iš vieno arba daugiau lipidų dvisluoksnių sudarytos pūslelės – **liposomos**. Vidinis liposomų turinys apribotas lipidine membrana, kuri pakankamai taki, kad į ją galėtų įsiterpti ir funkcionuoti membraniniai baltymai. Tačiau šiomis sistemomis sudėtinga tirti pernašos procesus, konstruoti biojutiklius.⁹³ Dvisluoksnės liposomas išliejus iš skystos fazės ant hidrofiliinio metalo paviršiaus gaunamos paprastosios lipidinės membranų (*angl.* suspended bilayer lipid membrane, **sBLM**). sBLM nuo paviršiaus skiria tik plonas vandens sluoksnis, o pačią membraną prie paviršiaus palaiko silpna fizikinė



11 pav. Membranų modeliai: dvisluoksnė liposoma, paprastoji lipidinė membrana (sBLM), hibridinė lipidinė membrana (hBLM) ir pakabinama dvisluoksnė lipidinė membrana (tBLM).

adsorbicija. sBLM pritaikomos atliekant elektrocheminius tyrimus, konstruoti biojutiklius, tačiau dėl pernelyg artimo kontakto su paviršiumi, jos netinkamos membraninių baltymų įsiterpimui, kadangi ekstramembraniniai šių baltymų domenai dėl kontakto su kietu paviršiumi denatūruoja.^{94,95} Be to šios membranos yra nestabilios bei turi daug defektų.

Hibridinės lipidinės membranos (*angl.* hybrid bilayer lipid membrane, **hBLM**) gaunamos vienasluoksnės liposomas adsorbuojant ant savitvarkiu monosluoksniu funkcionalizuoto metalo paviršiaus.⁹⁶ Vidinis membranos sluoksnis jungiasi prie SAM paviršiaus dėl hidrofobinės sąveikos. hBML fazinio virsmo temperatūra yra aukštesnė nei liposomų, todėl hibridinės membranos lipidų ir baltymų judrumas normaliomis sąlygomis gerokai mažesnis, o pačios membranos pasižymi stabilumu ir kietumu. hBLM modelio savybės nutolusios nuo gyvų ląstelių membranos savybių, dėl to jų pritaikymas tiriant biologinius procesus ribotas. Nepaisant to, jos panaudojamos tiriant į išorinį membranos sluoksnį įsiterpiančius receptorių ir tik su išoriniu membranos sluoksniu sąveikaujančias molekules.

4.5.1 Pakabinamomis dvisluoksnės lipidinės membranos

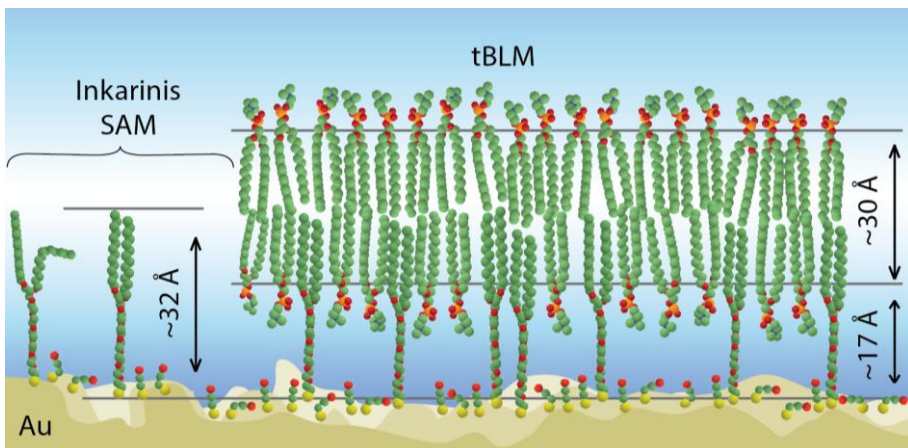
Pagrindiniai aptartų modelių membranų trūkumai – standumas ir pernelyg mažas atstumas tarp lipidų sluoksnio ir metalo paviršiaus. Šie trūkumai sprendžiami atitraukiant lipidinį dvisluoksnį nuo paviršiaus per įvairius polimerų, specialių inkarinių junginių sluoksnius, membraną formuojant ant porėto paviršiaus. Tokios architektūros membranos yra

vadinamos pakabinamomis dvisluoksnėmis lipidinėmis membranomis (*angl.* tethered bilayer lipid membrane, **tBLM**).^{97,98}

tBLM ruošiami keliais etapais. Ant metalo paviršiaus suformuojamas mišrus inkarinis SAM sluoksnis, ant kurio tirpiklio pakeitimo arba liposomų liejimo metodu imobilizuojama lipidinė membrana.^{29,98} Pastaruoju metu dėl paprasto paruošimo ir atsikartojamumo pradėtas naudoti daugiasluoksnis liposomų liejimo metodas.³³ Šiuo metodu ant SAM užpilamas daugiasluoksnis liposomų tirpalas ir inkubuojamas 20–30 min, po kurių gausiai nuplaunamas fosfatiniu tirpalu neleidžiant paviršiui nudžiūti.

tBLM pritvirtinama prie paviršiaus 15 Å atstumu per inkarinį monosluoksnį (12 pav.), užtikrinant pomembraninio jonų rezervuaro palaikymą ir sumažinant paviršiaus šiurkštumo poveikį membranos tolygumui.⁹⁹ Panaudojant tBLM kaip matricą į membraną įsiterpiančių baltymų tyrimams išoriniai baltymų domenai išsikiša į pomembranę erdvę, todėl tiesiogiai su paviršiumi nesąveikauja, kaip tai nutinka sBLM tipo membranose. tBLM yra stabilios ir tinkamos tirti membraninių baltymų įsiterpimą, lipidų-baltymų sąveikas, receptorių bei fermentų funkcionalumą, konstruoti biojutiklius.

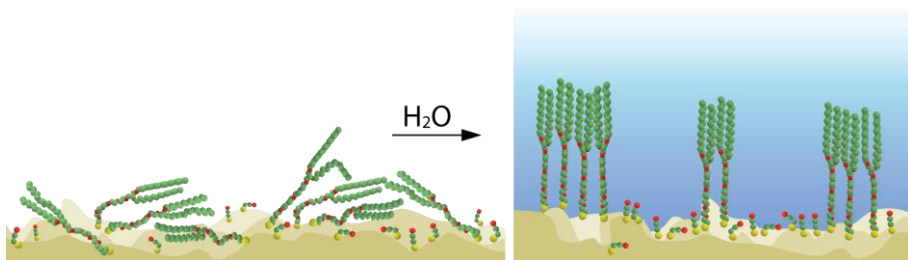
Kuriant dirbtines membranas, pasirenkama lipidų sudėtis artima gyvos ląstelės membranos sudėčiai. Šiame darbe formuojama lipidinė membrana yra sudaryta iš 1,2-dioleoil-*sn*-glicerolio-3-fosfocholinas (DOPC) ir cholesterolio.



12 pav. Modelinė tBLM membrana pritvirtinta prie aukso paviršiaus per inkarinį SAM. SAM sudaro 2-merkaptioetanolis ir WC14; tBLM sudarytas iš DPhyPC (1,2-difitanoil-*sn*-glicerolio-3-fosfatidilcholinas). Dydziai pateikiami remiantis neutronų reflektometrijos duomenimis.⁹⁹

4.5.2. Inkarinio sluoksnio poveikis tBLM funkcionalumui

Inkarinės tBLM membranos molekulės prie paviršiaus pritvirtinamos per kovalentinius metalo-sieros, -disulfido, -silano ir kitus cheminius ryšius.^{100,101} Kovalentiškai imobilizuotos membranos turi pranašumą prieš fiziškai adsorbuotas hBLM, kurios nors ir būdamos kietesnės, gali lengviau desorbuotis, pavyzdžiui, veikiamos elektriniu lauku.²⁹



13 pav. Spėjamas vandens sukiamas inkarinių molekulių persitvarkymas.

Disertacijos darbe naudotų inkarinių molekulių struktūra yra tokia, kad membrana būtų patikimai imobilizuota ant paviršiaus, tačiau tiesiogiai su juo nesąveikautų. Molekules sudaro ausui gimininga tiolio grupė, etileno oksido fragmentas (EO), kurio funkcija yra atitraukti membraną nuo paviršiaus ir sukurti hidrofiliinį pomembraninį rezervuarą ir dvi hidrofobines alkanų grandines, įsiterpiančios į lipidų dvisluoksnį ir jį imobilizuojančios (žr. į 5 pav.).

Specifinė inkarinių molekulių struktūra lemia tai, kad šios molekulės vandens apsuptyje formuoja klasterius, dėl kurių paviršius netolygiai jomis padengiamas, t. y. tam tikrose paviršiaus vietose molekulių tankis yra gerokai didesnis nei kitose. Išliejus liposomas ant tokio heterogeniško inkarinio sluoksnio susidaro defektuota membrana su pakitusio lipidų tankio salelėmis bei įvairiais plyšiais ir pūromis, kurie lemia padidėjusį membranos elektrinį laidį. Inkarinių molekulių klasterizacija padidina membranos defektiškumą ir sukelia izoliacinių savybių praradimą.²⁹ Molekulių hidrofobinės dalys tarpusavyje suartėdamos išstumia iš savo aplinkos vandens molekules taip sumažindamos kontakto su vandeniu plotą (13 pav.). Tokia struktūra yra termodinamiškai stabilesnė. Taigi vanduo sustiprina hidrofobinį efektą tarp nepolinių angliavandenilinių grandinių, o tai sukelia molekulių reorganizaciją bei klasterių susidarymą, kuris yra neigimas veiksnys tBLM funkcinėms savybėms palaikyti.

Fizinės tBLM savybės gali būti valdomos keičiant mišraus SAM inkaro/skiediklio santykį²⁹ ir keičiant inkarų cheminę struktūrą. Nesočiųjų

grandinių turinčios inkarinės molekulės formuoja mažiau tvarkingus inkarinius monosluoksnius, kurių netvarka išlaikoma iki gana aukštos inkarinių molekulių koncentracijos (~80 %).⁹¹

4.6. Apibendrinimas

Savitvarkių monosluoksnių ir biologinių membranų literatūros apžvalgoje aptarta SAM morfologija ir formavimosi ant paviršiaus etapai, monosluoksnių struktūros kitimas dėl temperatūros, oksidacijos, vandens ir elektrinio potencialo poveikio. Aptarti modelių lipidinių membranų tipai, jų privalumai ir trūkumai, tBLM formavimo etapai.

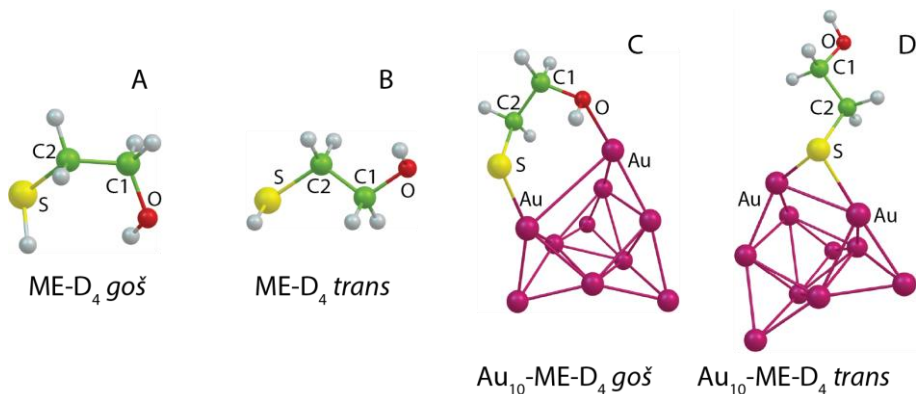
tBLM funkcionalumas kritiškai priklauso nuo SAM struktūros ir orientacijos metalo paviršiuje, todėl rezultatų aptarimo dalyje pirmiausiai nagrinėjamas vandens ir elektrinio lauko poveikis inkariniam SAM sluoksniui. SERS efektyvumas slopsta eksponentiškai tostant nuo paviršiaus, dėl to per keliolika angstromų nuo paviršiaus nutolusios lipidinės membranos tyrimas yra sudėtingas uždavinys. Tačiau, šiame darbe parodome, kad toks tyrimas yra įmanomas ir pateikiame pirmąjį tBLM membranos SERS spektrą.

5. Rezultatai ir jų aptarimas

5.1. Vandens poveikis inkariniam membranos sluoksniui

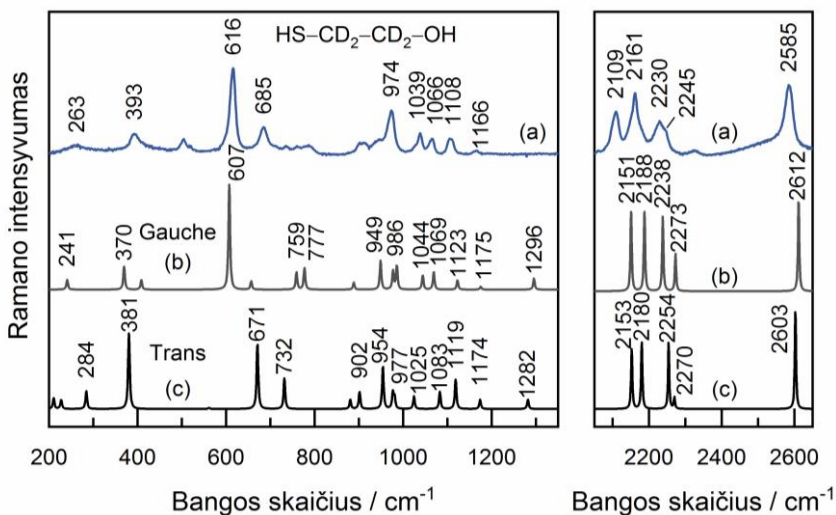
5.1.1. Spektrinės ME-D₄ monosluoksnio juostos

tBLM (pakabinamos dvisluoksnės lipidinės membranos) yra vienas modelinių membranų tipų, pritvirtintų prie paviršiaus per inkarinį monosluoksnį. Inkarinės molekulės atlieka svarbias funkcijas – atitraukia membraną nuo paviršiaus užtikrindamos pomembraninio tūrio susidarymą, sumažina aukso paviršiaus nelygumų poveikį membranos homogeniškumui. Biologinei funkcijai svarbu, kad tBLM būtų taki ir plastiška, o tai užtikrinama mažinant į lipidų dvisluoksnį įsiterpiančių inkarinių molekulių koncentraciją. Paviršinė inkarinių molekulių koncentracija valdoma keičiant paviršiaus aktyvaus skiediklio koncentraciją. 2-merkaptoetanolis (ME) yra vienas plačiausiai naudojamų junginių, atliekančių paviršiaus skiediklio funkciją, nes jis sudaro stiprų kovalentinį ryšį su aukso ir sidabro paviršiais, yra trumpagrandis ir turi hidrofilinę -OH grupę, formuojančią hidrofilinį paviršių. Mažamolekulinis ME užpildo aktyvias paviršiaus vietas, hidrofilinės galinės grupės suriša vandenį ir kuria hidrofilinę pomembraninę aplinką.



14 pav. Optimizuotos *gaš* ir *trans* konformacijų ME-D₄ ir Au₁₀-ME-D₄ kompleksų struktūros. Skaičiavimams naudotas DFT-B3LYP/6-311++G(d,p) teorijos lygis C, D, H, S ir O atomams bei LANL2DZ/EPC aukso atomams.

Tam, kad nepersiklotų 2-merkaptoetanolio ir WC14 junginių spektrinės juostos šiame darbe buvo naudotas deuteriu žymėtas ME-D₄ (2-merkaptoetanolis). ME-D₄ žymenys artimojoje (200–1350 cm⁻¹) bei aukšto dažnio C–D srityse (2050–2640 cm⁻¹), nustatyti lyginant 0,5 M vandeninio



15 pav. ME-D₄ vandeninio tirpalo (0,5 M) Ramano spektras (a) ir apskaičiuoti ME-D₄ goš (b) ir trans (c) konformacijų spektrai.

ME-D₄ tirpalo Ramano spektrus su ME-D₄ aukso paviršiuje SERS spektrais. Ramano spektrai registruoti InVia Ramano mikroskopu (Renishaw) žadinant 532 nm bangos ilgio lazeriu, SERS spektrai registruoti 785 nm bangos ilgio lazeriu. Paviršiaus spektrams registruoti naudoti „Altechna“ safyro padėklai magnetroninio dulkinimo metodu padengti 200 nm storio aukso sluoksniu.

Ramano ir SERS duomenų interpretacijai palengvinti buvo atlikti ME-D₄ ir aukso klasterio su prijungtu ME-D₄ (Au₁₀-ME-D₄) teoriniai skaičiavimai. Skaičiavimai atlikti taikant DFT-B3LYP/6-311++G(d,p) lygio teoriją C, D, H, S ir O atomams ir LANL2DZ/EPC aukso atomams. Minimizuotos šių junginių struktūros vaizduojamos 14 paveiksle; eksperimentinis bei apskaičiuoti vakuume molekulių spektrai pateikti 15 paveiksle. Virpesinių juostų nustatymui papildomai buvo remtasi ankstesniais panašių junginių tyrimais^{43,102–111} bei eksperimentiškai išmatuotais depoliarizacijos santykiais. 1 lentelėje pateikiami junginių virpesiniai dažniai, jų priskyrimai ir ME-D₄ Ramano depoliarizacijos santykiai.

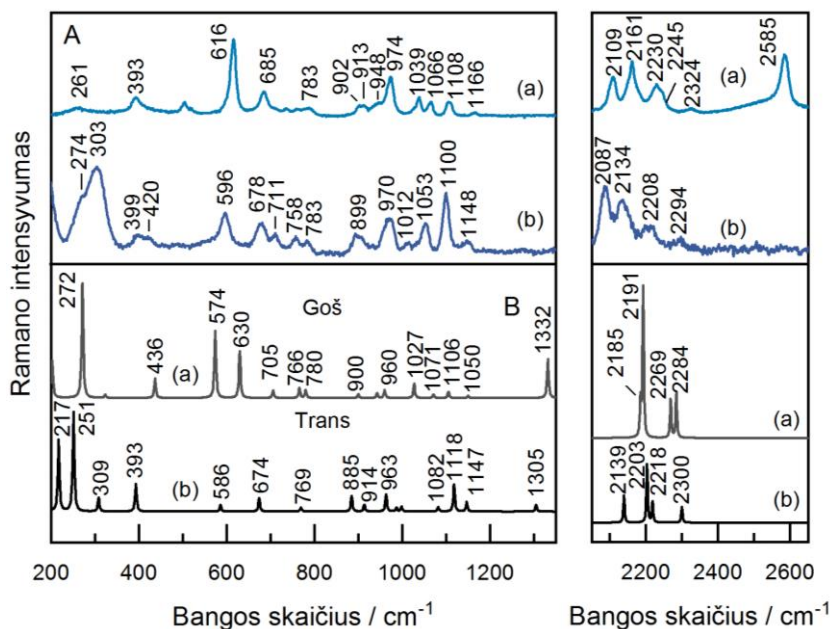
Pokyčiai 16A paveiksle pateiktuose spektruose rodo ME-D₄ prisijungimą paviršiuje. Intensyvi ME-D₄ tirpalo spektro juosta $\nu(\text{S-H})$ ties 2585 cm⁻¹ išnyksta dėl adsorbcijos sklytant S-H ryšiui ir susidarant merkaptoetanolio-paviršiaus kompleksui (Au-ME-D₄). Valentinių S-C virpesių ruožas (550–700 cm⁻¹) suteikia informacijos apie molekulės S-CD₂ dalies trans/goš konformaciją.^{34,88,103,104,107,110–113} Abi izomerinės $\nu(\text{S-C})$ juostos tirpalo spektre nustatytos ties 616 ir 685 cm⁻¹, tačiau dėl adsorbcijos aukso paviršiuje

1 lentelė. Vandeninio ME-D₄ (SH-C₂D₂-C₁D₂-OH) tirpalo (0,5 M) Ramano, adsorbuoto aukso paviršiuje ME-D₄ SERS, apskaičiuotų ME-D₄ vakuume ir paviršiaus kompleksų (Au₁₀-ME-D₄, Au₁₀-ME-D₄·H₂O) juostų dažniai (cm⁻¹) ir priskyrimai, Ramano juostų depoliarizacijos santykiai (ρ).

Ramano (tirpale)		SERS	Skaičiuotas						Priskyrimas
0,5 M ME-D ₄	ρ	Au-ME-D ₄ vandenyje	ME-D ₄ Goš	ME-D ₄ Trans	Au ₁₀ -ME-D ₄ Goš	Au ₁₀ -ME-D ₄ Trans	Au ₁₀ -ME-D ₄ -H ₂ O Goš	Au ₁₀ -ME-D ₄ -H ₂ O Trans	
2585 vs	0,12	n.a.	2612	2603	n.a	n.a	n.a	n.a	v(S-H)
2324 w	n.d.	2294 m	2273	2270	2284	2300	2270	2296	v _{as} (C ₂ D ₂)
2230 s	0,55	2208 m	2238	2254	2269	2218	2262	2232	v _{as} (C ₁ D ₂)
2161 vs	0,06	2134 s	2188	2180	2191	2203	2185	2196	v _s (C ₂ D ₂)
2109 s	0,07	2087 s	2151	2153	2185	2139	2180	2149	v _s (C ₁ D ₂)
1166 w	0,48	1148 w	1175	1174	1150	1147	1155	1164	v _{as} (C ₂ -C ₁ -O)
1108 m	0,31	1100 vs	1123	1119	1106	1118	1109	1125	δ(C ₁ D ₂) + ν(C-O) + δ(OH)
1066 m	0,42	1053 s	1069	1083	1071	1082	1070	1082	δ(C ₂ D ₂) + δ(C ₁ D ₂) + δ(OH)
1039 m	0,18	1012 w	1044	1025	1027	999	1033	1010	w(C ₂ D ₂) + ν(S-C) + ν(C-O)
974 s	0,17	970 s	986	977	943	963	945	978	v(C-O) + t(C ₁ D ₂) + t(C ₂ D ₂) + w(CD ₂) trans
902 w	0,54	899 br, s	889	902	900	885	921	882	t(C ₁ D ₂) + δ(OH) [ν(C-C) + w(CD ₂) trans]
783 br, w	0,30	783 m	777	732	780	769	792	775	t(C ₂ D ₂)
762 w	n.d.	758 m	759	n.d.	766	n.d.	771	n.d.	t(C ₁ D ₂)
736 w	n.d.	711 m	656	n.d.	705	n.d.	698	n.d.	r(C ₂ D ₂)
685 m	0,15	678 s	n.a	671	n.a.	674	n.a.	652	v(S-C) _T + w(C ₂ D ₂) + [δ(SH) tirpalo ME-D ₄]
616 vs	0,13	596 s	607	n.a.	574/630	n.d.	595	n.a.	v(S-C) _G + r(OH) + t(C ₁ D ₂)

393 m	0,21	399 w	409	381	436	393	n.d.	386	$\delta(\text{C2-C1-O})$
n.a.	n.a.	303 br, s	n.a.	n.a.	272	n.a.	308/343	n.a.	$\nu(\text{Au-S})_{\text{G}} + \nu(\text{Au-O})_{\text{G}}$
n.a.	n.a.	274 sh, m	n.a.	n.a.	n.a.	251	n.a.	282	$\nu(\text{Au-S})_{\text{T}}$

Santrumpos: ν – valentinis, ν_s – valentinis simetrinis, ν_{as} – valentinis asimetrinis, δ – deformacinis, t – sukamasis, ρ – svyruoklinis, w – vėduoklinis, δ – žirklinis, vs – labai stiprus, s – stiprus, m – vidutinis, w – silpnas, sh – petys, br – platus, T – trans, G – goš, n.a. – netaikoma, n.d. – nenustatyta.



16 pav. (A) Vandensinio ME-D₄ tirpalo (0,5 M) Ramano spektras (a) ir ME-D₄ ant Au paviršiaus (1 val. vandenyje) SERS spektras (b). (B) Skaičiuoti goš (a) ir trans (b) konformacijų Au₁₀-ME-D₄ kompleksų spektrai.

jos slenkasi į žemesnių dažnių pusę (596 ir 678 cm⁻¹). Poslinkis nulemiamas molekulių sąveikos su metalo klasterio metu sumažėjusiu S–C ryšio elektroniniu tankiu ir metalo masių efektu.^{88,113} Bangos skaičiaus poslinkis (Δ), pasireiškiantis junginiui adsorbuojantis, yra gerokai didesnis goš konformerams ($\Delta=-20$ cm⁻¹) nei trans konformerams ($\Delta=-7$ cm⁻¹). Teoriniai skaičiavimai patvirtina gana didelį goš juostos poslinkį ($\Delta=-33$ cm⁻¹) formuojantis paviršiaus kompleksui Au₁₀-ME-D₄ (1 lentelė).

Skaičiavimai taip pat rodo, kad trans konformero juosta turėtų nesmarkiai slinkti į aukštesnių dažnių pusę ($\Delta=3$ cm⁻¹). Toks poslinkis nustatytas dėl to, jog trans molekulei esant tirpale šią juostą sudaro $\nu(\text{S-C})_T$ moda ir deformacinis S–H virpesys, $\delta(\text{S-H})$. Goš juosta dominuoja tiek paviršiaus, tiek Ramano spektre, tačiau trans juostos intensyvumas po adsorbcijos paviršiuje padidėja (po 1 val. Au-ME-D₄ komplekso inkubacijos vandenyje). Molekulei jungiantis paviršiuje trans/goš juostų intensyvumų santykis $A_{\nu(\text{C-S})_T}/A_{\nu(\text{C-S})_G}$ pakinta iš 0,25 į 0,62.

Žemų dažnių (200–400 cm⁻¹) srities Au–S bei Au–O virpesinės juostos rodo, kad ME-D₄ yra prisijungęs prie paviršiaus.^{114–118} Remiantis ankstesniais darbais^{34,36,88,112–114} bei atliktais paviršiaus komplekso kvantinės chemijos skaičiavimais, intensyvią plačią juostą ties 274–303 cm⁻¹ paviršiaus spektre priskiriamos valentiniam Au–S virpesiui. Tačiau, analizuojant goš

konformacijos adsorbuoto ME-D₄ junginio teorinio modeliavimo rezultatus paaiškėjo, kad deguonies atomas taip pat sudaro cheminį ryšį su paviršiumi (14 pav. C). Žemo dažnio juosta priskirta persiklojusioms valentinėms Au–O ir Au–S virpesinėms modams (1 lentelė). Remiantis aukštos raiškos elektronų energijos netekimo spektroskopijos (HREELS) tyrimais, etoksido (CH₃CH₂O) ir metoksido (CH₃O) kompleksuose su auksu susidarancio auksas-deguonis ryšio valentinio $\nu(\text{Au-O})$ virpesio dažnis yra ties 270 ir 330 cm⁻¹.¹¹⁹ Teoriniai trans konformacijos molekulių skaičiavimų duomenys rodo susidarantį bidentatinį koordinacinį ryšį tarp sieros ir dviejų aukso atomų, tuo tarpu goš molekulių sudaromas ryšys su aukso klasteriu yra monodentatinis (14 pav., Au-ME-D₄ goš ir Au-ME-D₄ trans).

2 lentelėje pateikiami goš ir trans izomerinių formų ME-D₄ bei Au₁₀-ME-D₄ cheminių ryšių ilgiai pikometrais. Aukštesnis $\nu(\text{S-C})_{\text{T}}$ dažnis palyginus su $\nu(\text{S-C})_{\text{G}}$ susijęs su trumpesniu trans ME-D₄ konformerio S–C cheminio ryšio ilgiu. Dėl ME-D₄ adsorbcijos ant aukso paviršiaus abiejų konformerų S–C ryšiai pailgėja. Panaši tendencija pastebima ir susidarant kovalentiniam Au–O ryšiui, kuomet ilgėja C–O ryšys. Taigi, goš konformerų adsorbcijos metu susidarantys Au–S ir Au–O ryšiai nulemia S–C ir C–O ryšių pailgėjimą ir kartu atitinkamų valentinių $\nu(\text{S-C})_{\text{G}}$ juostų poslinkį į žemesnių dažnių pusę. ME-D₄ tirpalo spektre vidutinio intensyvumo juostą ties 1108 cm⁻¹ sudaro keletas virpesinių modų, iš kurių didžiausias įnašas priklauso valentiniam C–O virpesiui (16 pav., 1 lentelė). Dėl adsorbcijos šios juostos dažnis sumažėja iki 1100 cm⁻¹. Kvantinės chemijos skaičiavimai numato goš konformerų –OH grupės sąveiką su paviršiumi. Ši sąveika lemia valentinio C–O virpesio dažnio sumažėjimą, akivaizdu, kad trans molekulių adsorbcijos metu C–O juostos dažnio poslinkis neregistruojamas.

2 lentelė. Apskaičiuoti ME-D₄, paviršiaus kompleksų Au₁₀-ME-D₄ bei Au₁₀-ME-D₄-H₂O goš ir trans konformacijų ryšių ilgiai (pm).

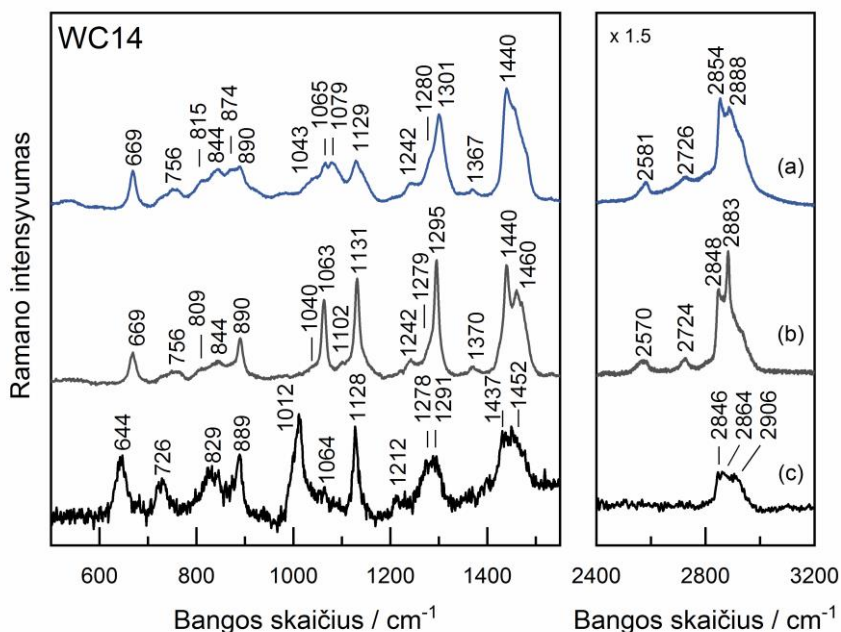
Ryšys	ME-D ₄ goš	ME-D ₄ trans	Au ₁₀ - ME-D ₄ goš	Au ₁₀ - ME-D ₄ trans	Au ₁₀ - ME-D ₄ - H ₂ O, goš	Au ₁₀ - ME-D ₄ - H ₂ O, trans
S–C	184,69	183,99	185,66	185,72	185,82	186,08
C–C	152,75	152,87	152,59	152,72	152,57	153,60
C–O	142,19	142,75	145,32	142,16	144,55	140,95
O–H	96,71	96,53	97,58	96,62	99,52	97,66
O···HO					167,22	184,57
Au–S			234,53	241,66 245,37	234,76	241,64 245,40
Au–O			230,74		225,79	

Apibendrinant galima teigti, kad kvantinės chemijos skaičiavimai ir eksperimentiniai duomenys rodo tiesioginę goš konformacijos ME-D₄ molekulės sąveiką su aukso paviršiumi per hidroksilo grupę. Nustatyta, kad Au–S ryšys yra trumpesnis kai molekulė yra goš konformacijos.

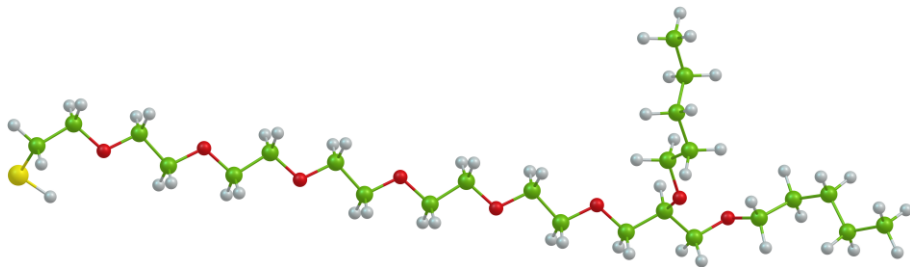
5.1.2. Spektrinės WC14 monosluoksniu juostos

Siekiant nustatyti spektrinius WC14 junginio žymenis jautrius molekulių glaudumui atlikti kontroliuojamos temperatūros Ramano spektroskopijos matavimai. Matavimai atlikti LabRam HR 800 spektrometru (Horiba) naudojant LinKam kontroliuojamos temperatūros celę PE95/T95. Spektrai registruoti diodiniu 785 nm bangos ilgio lazeriu, kurio galia – 30 mW, nustatyta celės temperatūra 243 K ir 293 K buvo palaikoma 50 min. prieš kiekvieną eksperimentą ir jų metu. Skystos (293 K) ir kietos (243 K) būsenos WC14 Ramano spektrai bei adsorbuoto WC14 vandeninėje terpėje SERS spektras pateikti 17 paveiksle. Virpesinės juostos priskirtos remiantis ankstesniais tyrimais^{34,88,119–123,90,112–118} ir šiame darbe atliktais WC14 junginio fragmento kvantinės chemijos skaičiavimais (18 pav.).

Teoriniam ilgagrاندės molekulės modeliavimui pasirinktas WC14 fragmentas, kurio dvi miristoilo (C14) grandinės pakeistos dvejomis C5 ilgio



17 pav. WC14 skysto (293 K) (a) ir kieto būvio (243 K) (b) Ramano spektrai bei WC14 adsorbuoto ant aukso paviršiaus vandeninėje terpėje SERS spektras (c).



18 pav. WC14 junginio fragmentas naudotas kvantinės chemijos skaičiavimams.

grandinėmis, tačiau EO (etilenoksido) segmentas nepakeistas. Virpesinių juostų dažniai ir jų priskyrimai pateikti 3 lentelėje. Lyginant skystos ir kietos būsenos junginio Ramano spektrus nustatomos WC14 juostos, kurios yra jautrios molekulių grandinių tvarkai ir glaudumui bei tarpmolekulinei sąveikai.

Kietos būsenos molekulių intensyvios juostos ties 1063 ir 1131 cm^{-1} priskiriamos valentiniams $\nu(\text{C}-\text{C})_{\text{T}}$ virpesiams, o 1295 cm^{-1} metileno sukamajam $t(\text{CH}_2)$ virpesiui (17 pav. b). Aukštas šių juostų intensyvumas ir mažas pusplotis yra nulemiamas glaudaus molekulių išsidėstymo su pilnai-trans konformacijos alkilinėmis grandinėmis.^{88,113,114,120} Žemos temperatūros WC14 spektre ties 890 cm^{-1} pasireiškia galinės CH_3 grupės dominuojanti trans konformacinė juosta $r(\text{CH}_3)_{\text{T}}$.^{88,90}

Temperatūros sukelti struktūriniai pokyčiai pasireiškia ir aukšto dažnio virpesinių juostų persitvarkymu. Asimetrinės valentinės metileno $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ juostos intensyvumas išauga ir pasislenka į žemesnių dažnių pusę iš 2888 į 2883 cm^{-1} junginiui pereinant iš skystos būsenos į kietą. Metileno valentinio simetrinio $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ virpesio juosta taip pat slenkasi į žemesnius dažnius, iš 2854 į 2848 cm^{-1} . Šie spektriniai pokyčiai yra gerai žinomi didėjančios tarpmolekulinės tvarkos alkilinėse grandinėse žymenys.^{88,113,120}

Intensyvi juosta ties 669 cm^{-1} Ramano spektruose priskirta pradinei $\text{SH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ grupei, rodo jog vyraujanti tiek skysto, tiek kieto būvio junginio WC14 konformacija yra goš (3 lentelė). Skaičiavimai patvirtina minėtos juostos priskyrimą valentiniam S–C goš virpesiui – skaičiuotame spektre $\nu(\text{S}-\text{C})_{\text{G}}$ yra ties 663 cm^{-1} . Ramano spektrai suteikia daug informacijos apie alkilinę molekulės dalį, tačiau nėra tokie informatyvūs nagrinėjant EO fragmento struktūrą. Skysto WC14 Ramano spektre neintensyvi juosta ties 1243 cm^{-1} priskirta sukamajam deformaciniam EO grupės metileno virpesiui.^{121,122} Šios juostos savybės nekinta junginiui pereinant į kietą būvį (243 K). Pagrindinė juostos ties 1129 cm^{-1} moda priskirta valentiniam alkilinės grandinės C–C virpesiui, tačiau tikėtina, kad įtakos tam gali turėti ir C–O–C grupės asimetrinis valentinis virpesys, $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{O}-\text{C})$.

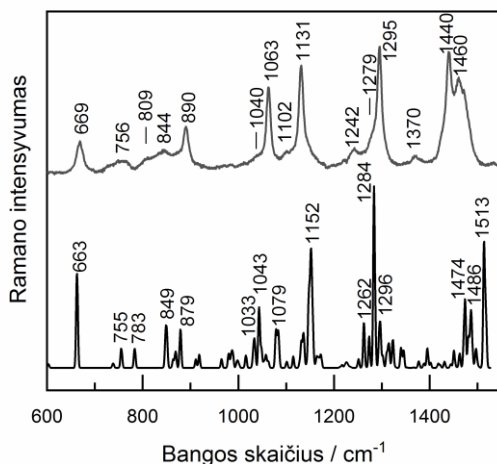
3 lentelė. WC14 Ramano ir SERS virpesinių juostų dažniai ir priskyrimas.

Skystas WC14 (293 K)	Bangos skaičius (cm ⁻¹)		Priskyrimas
	Kietas WC14 (243 K)	SERS Au-WC14-H ₂ O	
2888 s	2883 vs	2864 m	v _{as} (CH ₂)
2854 s	2848 s	2846 m	v _s (CH ₂)
2581 w	2570 w	n.a.	v(S–H)
1460 s, sh	1460 s	1452 s	δ(CH ₂) sc
1440 vs	1440 vs	1437 s	δ(CH ₂) sc
1367 w	1370 w	1363 w, br	t(CH ₂); w(CH ₂)
1301 vs	1295 vs	1291 m, br	t(CH ₂)
1280 w, sh	1279 w, sh	1278 m	t(CH ₂) EO grandinės
1243 w	1242 w	1212 w	t(CH ₂) EO grandinės
1129 m	1131 vs	1128 vs	v(C–C) _T ; v _{as} (C–O–C)
1079 m			v(C–C) _G
1065 w	1063 s	1064 w	v(C–C) _T
1043 w	1040 w	1012 vs	v _s (C–O–C)
890 w	890 m	889 s	r(CH ₃) _T
874 m			r(CH ₃) _G
844 m	844 w	829 m, br	r(CH ₂) EO grandinės
756 w	756 w		r(CH ₂)
731 w	733 w, sh	726 m	v(S–C) _T
669 m	669 m	644 s	v(S–C) _G

Santrumpos: v – valentinis, v_s – valentinis simetrinis, v_{as} – valentinis asimetrinis, δ – deformacinis, t – sukamasis, r – svyruoklinis, w – vėduoklinis, δ – žirklinis, vs – labai stiprus, s – stiprus, m – vidutinis, w – silpnas, sh – petys, br – platus, T – trans, G – goš.

WC14 molekulių adsorbcija ant aukso paviršiaus lemia žymius spektrinius pakitimus (17 pav. c). Valentinės S–C goš juostos, v(S–C)_G, dažnis po adsorbcijos sumažėja Δ=-25 cm⁻¹ (SERS spektre 644 cm⁻¹). Sumažėjimas lemiamas kovalentinio Au–S ryšio susidarymo, dėl kurio elektronai yra atitraukiami nuo S–C ryšio ir dėl metalo masės poveikio.^{88,113} Adsorbcija sukelia ir trans konformacijos molekulių S–C virpesio poslinkį į žemesnius dažnius (726 cm⁻¹). Siaura juosta SERS spektre ties 1128 cm⁻¹ priskirta pilnai-trans v(C–C)_T virpesiui, rodo, kad alkilinės grandinės yra pilnai ištiestos ir defektų neturinčios konformacijos. Vidutinio intensyvumo juosta ties 889 cm⁻¹ priklauso WC14 molekulių galinių metilo grupių vyraujančiai valentinio virpesio trans konformacijai.

Ramano signalo stiprinimas priklauso nuo atstumo tarp molekulės ar jos dalies ir paviršiaus, todėl EO grupių virpesiai stiprinami smarkiau nei atitolusios nuo paviršiaus alkilinės grandinės virpesiai. Intensityvi juosta ties 1012 cm⁻¹ priskirta EO grupės v_s(C–O–C) virpesinei modai. Ši juosta yra



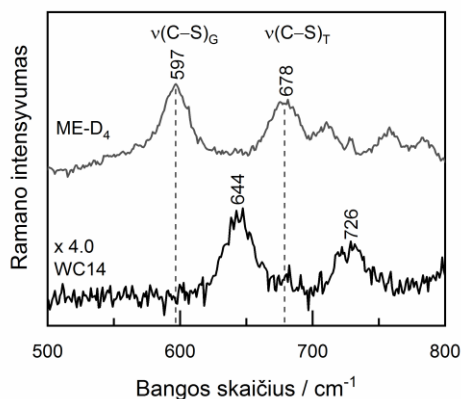
19 pav. Kieto būvio WC14 (243 K) (a) ir kvantinės chemijos metodais skaičiuoto WC14 fragmento (b) spektrų palyginimas.

žemesnio dažnio nei skysto WC14 spektre (1043 cm^{-1}) dėl adsorbcijos metu vykstančių struktūrinių EO segmento persitvarkymų. EO grupei priskirtas ir sukamasis deformacinis CH_2 virpesys SERS spektre pasireiškiantis ties 1278 cm^{-1} . Juostą ties 1128 cm^{-1} sudaro keletas virpesinių modų, tarp kurių pilnai-trans $\nu(\text{C-C})_{\text{T}}$ ir, tikėtina, EO srities $\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$ virpesys.^{121,122} Skaičiuotame modelinės struktūros spektre juosta ties 1152 cm^{-1} priskirta fazėje vykstančiam EO segmento valentiniam $\nu(\text{C-O})$ virpesiui (19 pav.).

5.1.3. Mišraus inkarinio monosluoksniu SERS

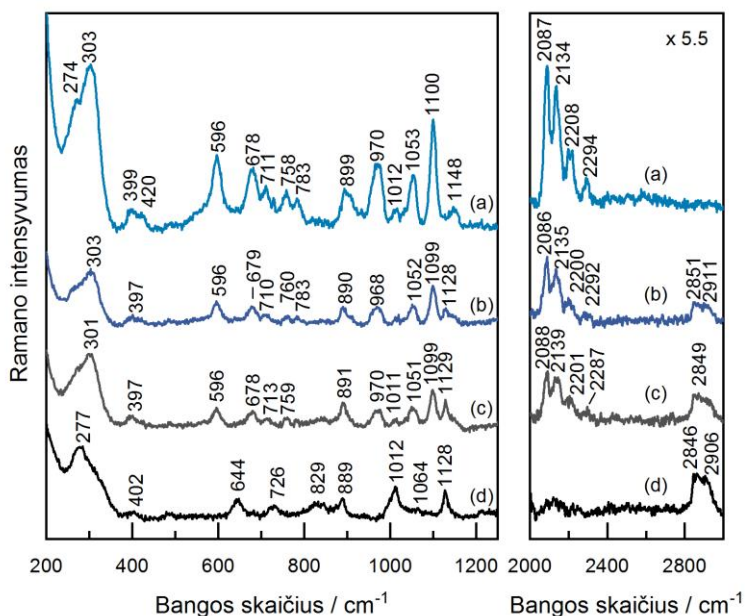
Tolesniems tyrimams buvo suformuoti mišrūs ME-D₄ ir WC14 monosluoksniai (WC14/ME-D₄, 70:30 ir 30:70) aukso paviršiuje. S-C ryšio trans/goš izomerizacijos santykis – viena svarbiausių charakteristikų apibūdinančių merkptoetanolio formuojamą monosluoksnį. Norint išvengti ME ir WC14 junginio virpesinių $\nu(\text{S-C})_{\text{T}}$ ir $\nu(\text{S-C})_{\text{G}}$ juostų persidengimo, naudotas deuteriais žymėtas merkptoetanolis, ME-D₄. 20 paveiksle pateikti ant aukso plokštelės ME-D₄ ir WC14 junginių formuojamų monosluoksnių spektrai valentinių S-C virpesių srityje.

Lyginant su WC14 junginio spektru, ME-D₄ valentinės S-C goš ir trans juostos pasislinkusios į žemesnių dažnių pusę atitinkamai per 47 ir 48 cm^{-1} . Spektrinis poslinkis leidžia atlikti abiejų junginių nepriklausomą izomerizacijos santykio analizę. Vienkomponenčių ir mišrių monosluoksnių (WC14/ME-D₄, (i) 100:0, (ii) 70:30, (iii) 30:70, (iv) 0:100 molinėmis proporcijomis) spektrai aukso paviršiuje pateikiami 21 paveiksle.



20 pav. ME-D₄ ir WC14 spektrinių juostų palyginimas S–C valentinių virpesių srityje. SERS spektrai registruoti molekules adsorbavus ant aukso paviršiaus, matuota padėklą panardinus į vandenį.

Vienkomponenčio WC14 monosluoksniu plati ir intensyvi juosta ties 277 cm⁻¹ priskiriama ν(Au–S) virpesiui (21 pav. d). Tačiau monosluoksniuose, kurie buvo formuoti su merkaptetanoliu (21 pav. a, b, c), dėl dviejų metalo-ligando ν(Au–S) ir ν(Au–O) virpesinių modų maišymosi, šių juostų padėtis yra pasislinkusi į aukštesnius dažnius (301–303 cm⁻¹).



21 pav. Savitvarkių monosluoksnių ant aukso paviršiaus SERS spektrai. Monosluoksniai sudaryti iš ME-D₄ (a), WC14/ME-D₄, 30:70 (b), WC14/ME-D₄, 70:30 (c) ir WC14 (d). Mėginiai inkubuoti vandenyje 1 val. Spektro žadimui naudotas 785 nm bangos ilgio lazeris.

Bendras ME-D₄ spektro intensyvumas yra didesnis už WC14 spektro. Aukšto dažnio srityje ME-D₄ valentinės C–D juostos aiškiai atsiskiria nuo WC14 valentinių C–H juostų. Viena iš ryškiausių WC14 junginio pirštų antspaudų srities juostų ties 1129 cm⁻¹ priskirta valentiniam $\nu(\text{C–C})_{\text{T}}$ virpesiui. Šios juosta rodo, kad dalis alkilinių grandinių yra pilnai-trans konformacijos. WC14 monosluoksniu $\nu_s(\text{C–O–C})$ juostos ties 1012 cm⁻¹ intensyvumas smarkiai sumažėja, formuojant mišrų monosluoksnį su ME-D₄. Tokį sumažėjimą greičiausiai lemia EO segmentų orientacijos pokytis į labiau gulsčią padėtį paviršiuje koadsorbuojantis ME-D₄.

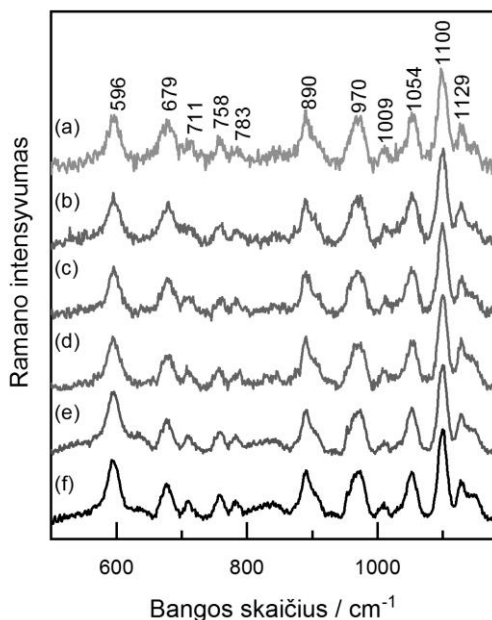
Didėjant WC14 koncentracijai paviršiuje, juosta, esanti ties 1053 cm⁻¹ vienkomponenčio ME-D₄ spektre, slenkasi per kelis atvirkštinius centimetrus į žemesnių dažnių pusę. Ši juosta priskirta deformaciniam žirkliniam CD₂ grupės virpesiui susijusiam su O–H deformacine moda. Šį dažnio poslinkį mišraus monosluoksniu spektre lemia tarp molekulių susidarantis vandenilinis ryšys. Aukšto dažnio srityje $\nu_{\text{as}}(\text{C1D}_2)$ ir $\nu_{\text{as}}(\text{C2D}_2)$ juostų padėtys slenkasi į žemesnių dažnių sritį iš 2208 ir 2294 cm⁻¹ į 2201 ir 2287 cm⁻¹.

5.1.4. Vandens sukelti mišraus inkarinio monosluoksniu pakitimai

Tiriant vandens poveikį monosluoksniu struktūrai atlikti spektroskopiniai ant SERS aktyvių plokštelių adsorbuoto monosluoksniu matavimai nuo inkubacijos vandenyje laiko. 22 paveiksle pateikiami WC14/ME-D₄ (30:70) monosluoksniu spektrai, plokštelėms išbuvus vandenyje nuo 5 min. (22 pav. a) iki 72 val. (22 pav. f).

Registruojant spektrus sąlygos nebuvo keičiamos, tačiau ilgėjant mėginių inkubacijai bendras spektrų intensyvumas išsaugo. Tokius pokyčius greičiausiai lemia fazių ribos metalas-tirpalas struktūros pasikeitimas dėl paviršiuje vykstančių monosluoksniu molekulių persitvarkymų. Tyrime atsižvelgiama tik į santykinį spektrinių juostų intensyvumą, gautą spektrus normavus pagal ME-D₄ deformacinę $\delta(\text{C1D}_2)$ juostą ties 1100 cm⁻¹. Valentinė S–C virpesių ruožė vyksta pakitimai susiję su konformacinėmis $\nu(\text{S–C})_{\text{G}}$ ir $\nu(\text{S–C})_{\text{T}}$ juostomis esančiomis ties 596 ir 679 cm⁻¹. Ilgėjant inkubacijos laikui, santykinis trans juostos intensyvumas mažėja. Skirtuminiame spektre ši tendencija dar ryškesnė (23 pav. A).

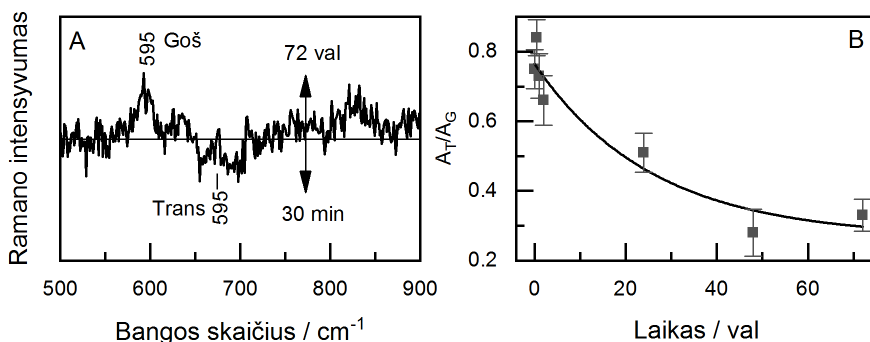
Teigiama mišraus monosluoksniu skirtuminio spektro juosta ties 595 cm⁻¹ rodo inkubacijos metu padidėjusią merkaptoetanolio goš konformerų dalį. Izomerizacijos kitimo priklausomybė nuo inkubacijos laiko pateikiama 23 paveiksle, B grafike. Ilgėjant inkubacijai trans/goš juostų intensyvumų



22 pav. Mišraus savitvarkio WC14/ME-D₄ (30:70) monosluoksniu SERS spektrai. Mėginiai inkubuoti vandenyje 5 min. (a), 30 min. (b), 60 min. (c), 24 val. (d), 48 val. (e), 72 val. (f). Spektrai normuoti pagal deformacinės $\delta(\text{C1D}_2)$ juostos ties 1100 cm^{-1} intensyvumą.

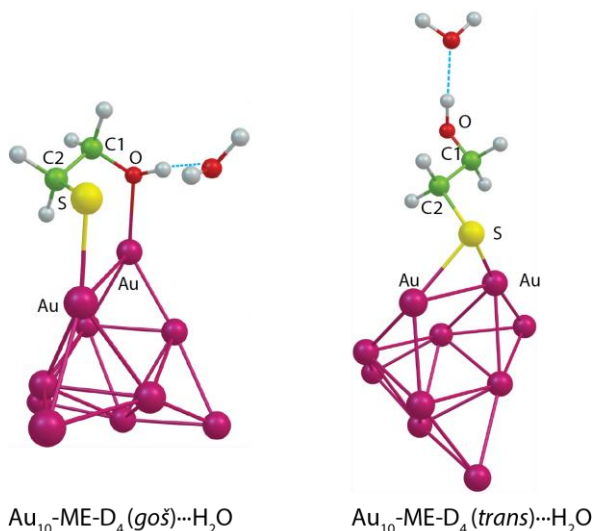
santykis A_T/A_G sumažėja nuo 0,75 iki 0,33. Goš geometrinę būseną palaiko molekules sąveiką su paviršiumi per galinę hidroksilo grupę (14 pav. C).

ME-D₄ hidroksilo grupė sudaro vandenilinį ryšį su tirpalo molekulėmis, dėl to kvantinės chemijos skaičiavimuose paviršiaus kompleksui pridėta papildoma vandens molekulė ($\text{Au}_{10}\text{-ME-D}_4\cdots\text{H}_2\text{O}$) (24 pav.). Skaičiavimai patvirtina, kad abiejų konformacijų paviršiaus molekules sudaro vandenilinį



23 pav. (A) Savitvarkio WC14/ME-D₄ (30:70) monosluoksniu skirtuminis spektras inkubacijos vandenyje laikui esant 72 val. ir 30 min. (B) ME-D₄ trans ir goš konformerų valentinių S–C virpesių intensyvumų santykio (A_T/A_G) priklausomybė nuo inkubacijos vandenyje laiko.

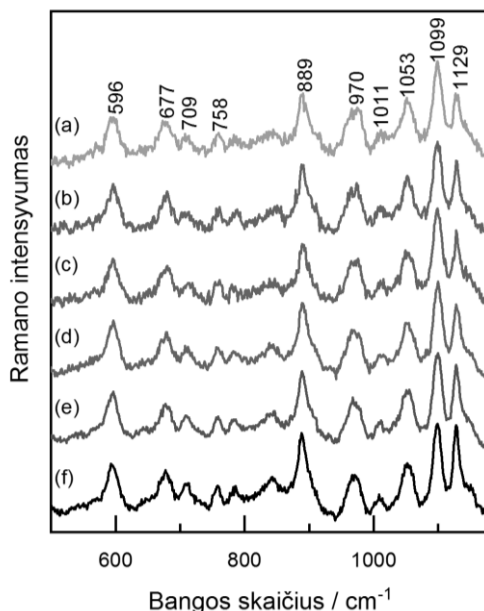
ryšį su tirpiklio molekulėmis per hidroksilo grupes ($\text{H}_2\text{O}\cdots\text{HO}-$). Skaičiavimai rodo netikėtą efektą: dėl sąveikos su tirpiklio molekule Au–O ryšys sutrumpėja per $\Delta=-4,95$ pm (2 lentelė). Apskaičiuotas vandenilinio ryšio ilgis goš ir trans konformacijos molekulėms yra 167,22 pm ir 184,57 pm – ryšio stiprumas didesnis goš konformerui. Vandenilinio ryšio ilgio variacijos lemia skirtingą fazių riboje esančio vandens išsidėstymą.



24 pav. Goš (kairėje) ir trans (dešinėje) konformacijų paviršiaus struktūros modeliai su pridėta papildoma vandens molekule $\text{Au}_{10}\text{-ME-D}_4\cdots\text{H}_2\text{O}$. Struktūros optimizacija atlikta DFT-B3LYP/6-311++G(d,p) teorijos lygiu C, D, H, S ir O atomams bei LANL2DZ/ECP teorijos lygiu Au atomams.

25 paveiksle vaizduojami mišraus WC14/ME-D₄ (70:30) monosluoksniu išlaikyto skirtingą laiką vandenyje spektrai. Spektrai sunormuoti pagal ME-D₄ deformacinės $\delta(\text{C1D}_2)$ juostos ties 1099 cm^{-1} intensyvumą. Inkubacijos metu merkptoetanolio goš juosta (596 cm^{-1}) ima vyrauti trans juostos (677 cm^{-1}) atžvilgiu, be to pastebimai išauga WC14 valentinės $\nu(\text{C-C})_{\text{T}}$ juostos ties 1129 cm^{-1} intensyvumas. Skirtuminis spektras šiuos pokyčius dar labiau išryškina (26 pav. A). Po 72 val. inkubacijos spektre aiškiai matoma intensyvi teigiama juosta ties 1128 cm^{-1} bei dvi mažiau intensyvios 888 ir 843 cm^{-1} juostos.

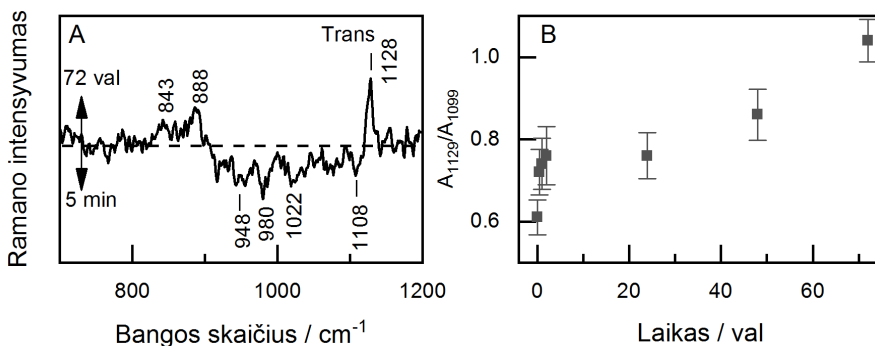
Pilnai-trans angliavandenilinės grandinės būsenos žymens intensyvumas inkubacijos metu stiprėja beveik tiesiškai 1099 cm^{-1} juostos atžvilgiu (26 pav. B). Šis pokytis atspindi vidumolekulinius struktūros pakitimus, kuomet WC14 molekulių alkilinės grandinės įgauna pilnai-trans konformaciją. Įdomu tai, kad monosluoksnyje, kuriame dominuoja paviršiaus skiediklis



25 pav. Mišraus savitvarkio WC14/ME-D₄ (70:30) monosluoksnio SERS spektrai. Mėginiai inkubuoti vandenyje 5 min. (a), 30 min. (b), 60 min. (c), 24 val. (d), 48 val. (e), 72 val. (f). Spektrai normuoti pagal deformacinės $\delta(\text{CID}_2)$ juostos ties 1099 cm^{-1} intensyvumą. Spektrui matuoti naudotas 785 nm bangos ilgio lazeris.

(WC14/ME-D₄, 30:70), ši juosta registruojama visuose spektruose, tačiau jos intensyvumas nuo inkubacijos laiko nepriklauso (22 pav.).

Skirtuminiame spektre pasireiškia galinės metilo grupės struktūrinių kitimų ženymys. Svyruokliniam $\rho(\text{CH}_3)_T$ virpesiui priskiriama teigiama juosta ties 888 cm^{-1} (3 lentelė). Šios juostos intensyvėjimas rodo ilgagrاندžių molekulių persitvarkymą vandenyje formuojantis paviršiaus klasteriams. Šis



26 pav. (A) Mišraus savitvarkio WC14/ME-D₄ (70:30) monosluoksniu skirtuminiis SERS spektras inkubacijos vandenyje laikui esant 72 val. ir 30 min. (B) Integruotų WC14 valentinio pilnai-trans C–C virpesio ir ME-D₄ juostos ties 1099 cm^{-1} intensyvumų santykio (A_{1128}/A_{1099}) priklausomybė nuo inkubacijos vandenyje laiko.

procesas lemia galinės grupės persiorientavimą į palankesnę trans konformaciją.

Apibendrinant, SERS duomenys rodo vandens sukeltus persitvarkymus mišraus SAM struktūroje: WC14 molekulės formuoja paviršiaus klasterius su ištemptomis alkilinėmis grandinėmis, kurių spektrinis žymuo yra pilnai-trans $\nu(\text{C}-\text{C})_{\text{T}}$ virpesys, be to didėja santykinis goš konformaciją turinčių ME-D₄ molekulių skaičius. Skaičiavimuose į goš konformacijos Au₁₀-ME-D₄ kompleksą papildomai įtraukus vandens molekulę, ryšys su paviršiumi per Au–O jungtį stabilizuojamas: jungties ilgis sumažėja per $\Delta=-4,95$ pm. Taigi, galima teigti, kad vanduo skatina goš izomerizacijos reakciją.

5.2. Elektrinio potencialo poveikis inkariniam membranos sluoksniui

Modelinių membranų tyrimuose vieni iš plačiausiai naudojamų yra elektrocheminiai metodai. Šie metodai suteikia informacijos apie membranų tvarkingumą, defektų tankį ir pasiskirstymą, elektrinę lipidinio dvisluoksniu talpą, pomembraninio Hemholtzo sluoksniu talpą.^{124,125}

Pagrindinis šios darbo dalies uždavinys yra ištirti, kaip kinta inkarinio membranos sluoksniu struktūra ir orientacija veikiant jį išoriniu elektriniu lauku. Inkarinį sluoksniu sudaro skirtingų koncentracijų WC14 ir ME-D₄ molekulių mišiniai (100:0, 30:70 ir 0:100, mol:mol). Kontroliuojamo potencialo eksperimentai atlikti ant elektrochemiškai šiuurkštinto aukso elektrodo, pasirinkus potencialo ribas atsižvelgiant į monosluoksniu desorbcijos vertes.

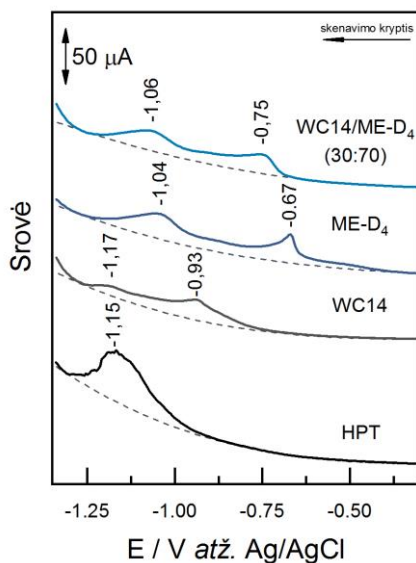
5.2.1. Redukcinė monosluoksniu desorbcija

Analizuojant tiolių elektrocheminės desorbcijos rezultatus gaunama informacija apie paviršiaus padengimą molekulėmis, metalo-sieros ryšio stiprį ir tarpmolekulinę sąveiką.³⁴ Elektrocheminės redukcijos tyrimas buvo atliktas 0,5 M NaOH ir 0,1 M Na₂SO₄ tirpale skleidžiant potencialą 50 mV/s greičiu. Tiriamų molekulių potenciodinaminės kreivės buvo lyginamos su modelinio junginio 1-heptantolio (HPT) (27 pav.). Desorbcijos potencialo reikšmė priklauso nuo paviršiaus ant kurio adsorbuotos molekulės. Nustatyta, kad sudaromas Au–S cheminis ryšys tarp molekulių ir polikristalinio aukso paviršiaus yra stipresnis, nei tarp molekulių ir aukšto kristalinio indekso, pavyzdžiui Au(111), paviršiaus.⁷⁷ Didesnė ryšio energija tarp molekulių ir polikristalinio elektrodo lemia aukštesnį molekulių desorbcijos potencialą.

HTP desorbcija prasideda ties labiausiai neigiamu potencialu (-1,15 V) ir tai rodo, kad iš visų tirtų monosluoksnis šis yra stabiliausias.

Aukso elektrodo paviršiaus heterogeniškumą rodo išplitusi HTP desorbcijos juosta, kurios FWHM reikšmė (154 mV) yra gerokai didesnė už anksčiau nustatytą oktantiolio desorbcijos nuo Au(111) paviršiaus juostos FWHM (52 mV).¹²⁶ Toks juostos išplitimas sietinas su padidėjusiu paviršiaus energetinių būsenų pasiskirstymu elektrochemiškai šiurkštinto elektrodo paviršiuje.

HPT monosluoksnis turi tik vieną desorbcijos juostą, o kitų junginių SAM po dvi. Dvejų juostų buvimą galima paaiškinti tuo, kad molekulės su paviršiumi sąveikauja keliais skirtingais būdais. ME-D₄ prie paviršiaus gali adsorbuotis tiek per tiolio, tiek per hidroksilo grupes. Tik per sierą su paviršiumi yra surištos trans konformacijos molekulės (Au–S), jų desorbcijos potencialas -0,67 V. Tuo tarpu goš konformacijos molekulės yra papildomai stabilizuotos sąveika per hidroksilo grupę (Au–O), todėl jų desorbcijai reikia didesnio neigiamo potencialo (-1,04 V).



27 pav. Potenciodinaminės redukcinės desorbcijos kreivės. Desorbcija atlikta nuo elektrochemiškai šiurkštinto aukso elektrodo 0,5 M NaOH ir 0,1 M Na₂SO₄ tirpale, potencialą skleidžiant 50 mV/s greičiu, Ag/AgCl palyginamojo elektrodo atžvilgiu.

Dėl WC14 monosluoksnį stabilizuojančių jėgų (Van der Valso ir hidrofobinės sąveikos tarp angliavandenilinių grandinių, vandenilinių ryšių tarp EO grupių) molekulės desorbuojasi ties aukštesnėmis neigiamomis potencialo vertėmis nei ME-D₄ (4 lentelė). Pagrindinę WC14 desorbcijos juostą ties -0,93 V lydi satelinė juosta ties -1,17 V, kuri gali būti priskirta WC14 paviršiaus klasterių desorbcijai.

4 lentelė. Mišraus, ME-D₄, WC14 ir modelinio HPT monosluoksnių desorbcijos krūvio tankis, desorbcijos potencialų reikšmės ir apskaičiuotas monosluoksnių santykinio padengimo laipsnis.

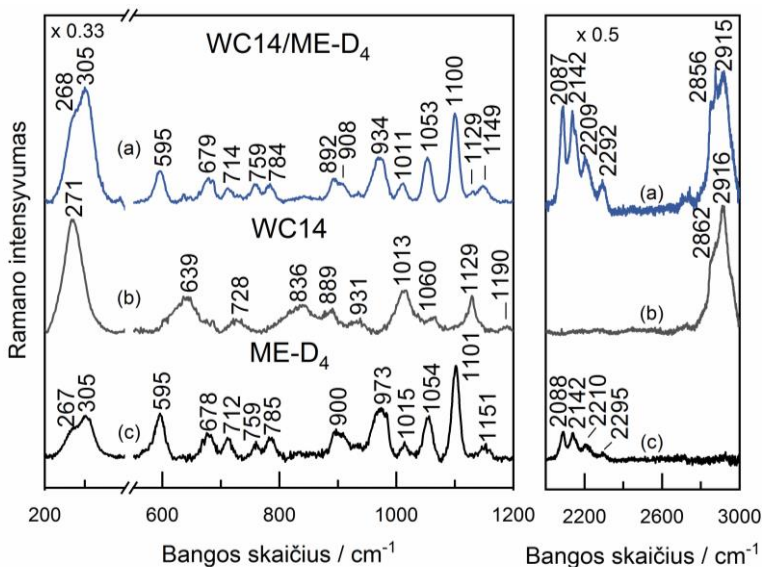
SAM	Krūvio tankis, $\mu\text{C cm}^{-2}$	Santykinis padengimas	Potencialas, V	
WC14/ME-D ₄	89	0,77	-1,06	-0,75
ME-D ₄	120	1,04	-1,04	-0,67
WC14	64	0,56	-1,17	-0,93
HPT	115	1,00	-1,15	

ME-D₄ ir WC14 molekulės mišriame monosluoksnyje sąveikauja tarpusavyje. Aukštesnis gryno (100 %) WC14 monosluoksnių desorbcijos potencialas (-0,93 V) mišriame monosluoksnyje dėl kolektyvinės desorbcijos kartu su mažamolekuliniu merkaptotanolio sumažėja iki -0,75 V. Atitinkamai, žemesnis gryno ME-D₄ monosluoksnių desorbcijos potencialas (-0,67 V) mišriame monosluoksnyje sąveikaujant su didesne molekule padidėja. Molekulės tarpusavyje sąveikauja hidrofilinėmis dalimis, sudarydamos vandenilinius ryšius.

Paviršiaus padengimas tiolių molekulėmis nustatomas iš redukcinių juostų ploto. Redukcinės desorbcijos krūvis susijęs su paviršiaus padengimu, tačiau yra nepriklausomas nuo alkantiolio molekulės ilgio.¹²⁷ Anglies atomų skaičius alkantiolių grandinėse lemia desorbcijos potencialo vertę, nes jis apsprendžia Van der Valso sąveikų kiekį, tačiau neturi poveikio krūvio kiekiui kurio reikia desorbcijai įvykti. Lyginant HTP ir inkarinių molekulių desorbcijos krūvius įvertinamas paviršiaus padengimo laipsnis, t. y. nustatoma kiek molekulių yra paviršiaus ploto vienetu. Merkaptotanolio monosluoksnių padengimas artimas HPT monosluoksniui. Tuo tarpu WC14 molekulės skerspjūvis dėl dviejų ją sudarančių EO (etilenoksido) fragmentų yra didesnis, todėl ir nustatytas padengimo laipsnis beveik du kartus mažesnis (0,56). Žinoma, kad lygaus aukso paviršių padengimas alkantioliais (tarp jų ir HPT) yra $7,6 \cdot 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$.¹²⁷

5.2.2. Monosluoksnių ant elektrodo paviršiaus SERS

Mišraus WC14/ME-D₄ (30:70) ir WC14 ir ME-D₄ monosluoksnių SERS spektrai užregistruoti esant atviros grandinės potencialui ($o_{cp}=0,28-0,32 \text{ V}$) (28 pav.). Spektrinės juostos priskirtos remiantis ankstesniais tyrimais (1 ir 2 lentelės) ir kitų autorių duomenimis.^{87,102,110,128}



28 pav. Mišraus WC14/ME-D₄ (30:70) ir grynų WC14 ir ME-D₄ monosluoksnių SERS spektrai ties atviros grandinės potencialu (*ocp*=0,28–0,32 V). Pateikiamos metalo-adsorbato, artimoji ir valentinių C–D/C–H virpesių sritys. Metalo-adsorbato srities intensyvumas padalintas iš 3, C–D/C–H virpesių srities padalintas iš 2.

WC14 monosluoksnyje žemo dažnio srityje matoma viena aiškiai išreikšta juosta ties 271 cm⁻¹ kylanti iš molekulos sąveikos su auksu per sierą, Au–S, tačiau ME-D₄ ir mišraus monosluoksniu spektre matoma ir antra dedamoji ties 305 cm⁻¹ atsirandanti iš ME-D₄ sąveikos su paviršiumi per hidroksilo grupę susidarant Au–O ryšiui.

Tipinės goš ir trans konformacijos WC14 molekulių valentinių S–C virpesių juostos matomos ties 639 ir 728 cm⁻¹. Izotopais žymėto merkptoetanolio (ME-D₄) valentiniai S–C virpesiai pasislinkę per $\Delta=-44$ ir -50 cm⁻¹ į žemesnių energijų pusę. Juostų pasislinkimas užtikrinta nepriklausomą trans/goš konformacijų santykio analizę abiem junginiams, tačiau mišriame monosluoksnyje, dėl mažesnio WC14 Ramano sklaidos skerspjūvio ir mažesnės paviršiaus molekulių koncentracijos, WC14 valentinės S–C juostos nepasireiškia. Vykstant ME-D₄ adsorbacijai ant paviršiaus goš ir trans juostos slenkasi iš 616 ir 685 cm⁻¹ į žemesnius dažnius per $\Delta=-21$ ir -6 cm⁻¹. Poslinkis siejamas su elektronų atitraukimu nuo S–C jungties link Au–S ir su metalo masės efektu.¹⁰⁹ Mišraus monosluoksniu pirštų antspaudų srityje dominuoja merkptoetanolio juostos, tačiau tolimojoje srityje valentiniai C–D ir C–H virpesiai aiškiai atsiskiria, todėl galima analizuoti C–D/C–H virpesius individualiai.

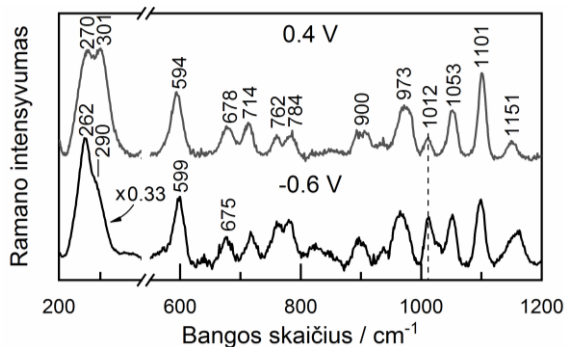
5.2.3. ME-D₄ monosluoksnio elektrocheminis SERS tyrimas

Žemos energijos Au–S/Au–O juostos (29 pav.) poliarizuojant elektroda neigiamai pasilenka į žemesnes energijas iš 270 į 262 cm⁻¹ ir iš 301 į 290 cm⁻¹. Panašus poslinkis nustatytas ir kvantinės chemijos skaičiavimais, kuris rodo Au–S jungties bangos skaičiaus sumažėjimą iš 302 į 277 cm⁻¹ ir iš 321 į 301 cm⁻¹ pakeitus bendrą Au₁₀-ME-D₄ komplekso krūvį iš +1 į -1 (5 lentelė). Elektrostatinė stūma tarp neigiamai poliarizuoto elektrodo ir sieros atomo didina Au–S jungties ilgį. Apskaičiuotas goš ir trans konformerų Au–S ryšio pailgėjimas yra Δ=3,00 pm ir Δ=6,52 pm. Eksperimentiškai nustatytas ryšio energijos sumažėjimas dera su teoriškai apskaičiuotu cheminio ryšio pailgėjimu.

5 lentelė. Apskaičiuoti goš ir trans konformacijos Au₁₀-ME-D₄ komplekso ryšių ilgiai (pm) ir bangos skaičiai (cm⁻¹). Apskaičiuotų kompleksų krūviai +1 arba -1.

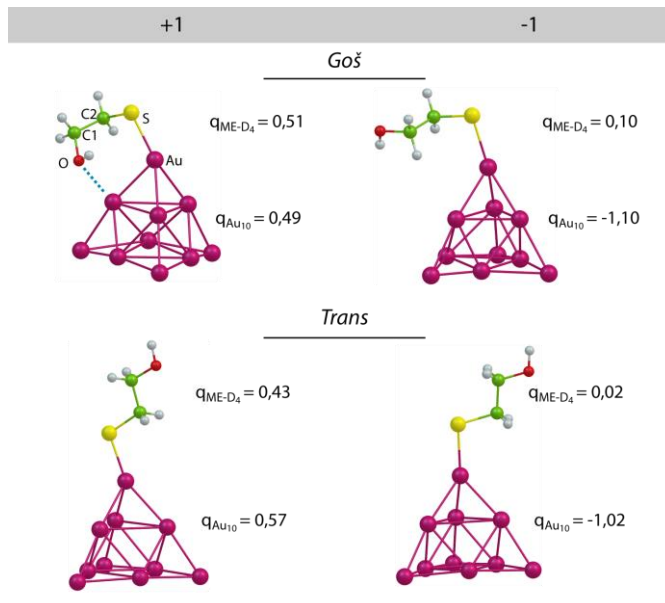
Ryšys	Au ₁₀ -ME-D ₄ , goš		Au ₁₀ -ME-D ₄ , trans	
	+1	-1	+1	-1
	Ryšio ilgis / pm			
Au–S	234,88	237,88	232,64	239,15
Au–O	248,57	(500,67)		
C–S	185,01	184,57	184,93	185,00
C–C	152,45	152,31	152,20	151,57
C–O	144,59	143,53	142,38	143,98
O–H	97,07	96,36	96,34	96,25
	Bangos skaičius / cm ⁻¹			
Au–S	302	277	321	301
C–S	604	678	675	686

Teoriniai duomenys taip pat rodo, kad esant teigiamam sistemos krūviui, molekulė palinksta ties paviršiumi taip, kad atstumas tarp aukso klasterio ir hidroksilo grupės sumažėja (248,57 pm) ir tampa artimas cheminiam Au–S ryšio ilgiui (234,88 pm). Poliarizuojant sistemą neigiamai daliniai krūviai pasiskirsto taip, kad aukso klasteriui tenkantis krūvis yra apie -1, o ME-D₄ pasidaro neutralus. Šioje konfigūracijoje hidroksilo grupė yra atitolusi nuo paviršiaus (30 pav.). Mažiausias nustatytas atstumas tarp aukso ir deguonies atomų dėl neigiamos poliarizacijos yra 500,67 pm. Eksperimentiniai duomenys rodo spektrinės metalo-adsorbato juostos intensyvumo išaugimą apie tris kartus, kai potencialas yra -0,60 V. Intensyvumo sustiprėjimas susijęs su molekulių reorientacija paviršiuje Au–S ir Au–O ryšiams įgaunant statesnę orientaciją paviršiaus atžvilgiu ties labiausiai neigiama elektrodo poliarizacija.



29 pav. ME-D₄ monosluoksnio SERS spektrai esant aukso elektrodo poliarizacijai 0,40 ir -0,60 V valentinių Au–S virpesių srityje (kairėje) ir pirštų antspaūdų srityje (dešinėje).

Kolektyvią ME-D₄ monosluoksnio molekulių konformaciją atskleidžia ir SERS spektrų pirštų antspaūdų sritis. Dėl neigiamos poliarizacijos valentinio goš virpesio, $\nu(\text{S}-\text{C})_{\text{G}}$, dažnis padidėja per $\Delta=5 \text{ cm}^{-1}$, o trans, $\nu(\text{S}-\text{C})_{\text{T}}$, sumažėja per $\Delta=-3 \text{ cm}^{-1}$ (29 pav.). Nustatytas nedidelis šių juostų santykinio intensyvumo (T/G) kitimas. Pradinė T/G vertė 0,34 padidėja iki 0,41 poliarizuojant elektrodą -0,60 V potencialu. Neigiamas potencialas dalį molekulių verčia persiorientuoti į statmeną būseną paviršiaus atžvilgiu. Galiausiai poliarizavus elektrodą 0,40 V T/G santykis vėl sumažėja iki 0,30.



30 pav. Kvantinės chemijos metodais apskaičiuotos aukso klasterio ir merkaptotetanolio (Au₁₀-ME-D₄) struktūros. Molekulės yra goš ir trans konformacijų, bendras nustatytas komplekso krūvis +1 arba -1. Prie aukso klasterio ir ME-D₄ nurodyti apskaičiuoti tų dalių krūviai, q.

Spektrinė juosta ties 1012 cm^{-1} priskiriama nefazėje vykstančiam valentiniam merkptoetanolio karkaso C–C–O virpesiui, $\nu_{\text{oop}}(\text{C–C–O})$, o dupletas ties 762 ir 784 cm^{-1} priklauso metileno sukamiesiems deformaciniams virpesiams, $t\text{CD}_2$ (1 lentelė).^{109,110} Atsižvelgus į SERS atrankos taisykles, visų šių juostų sustiprėjimas patvirtina ME-D₄ persiorientavimą į labiau statmeną poziciją paviršiui ties labiausiai neigiamomis potencialo vertėmis.

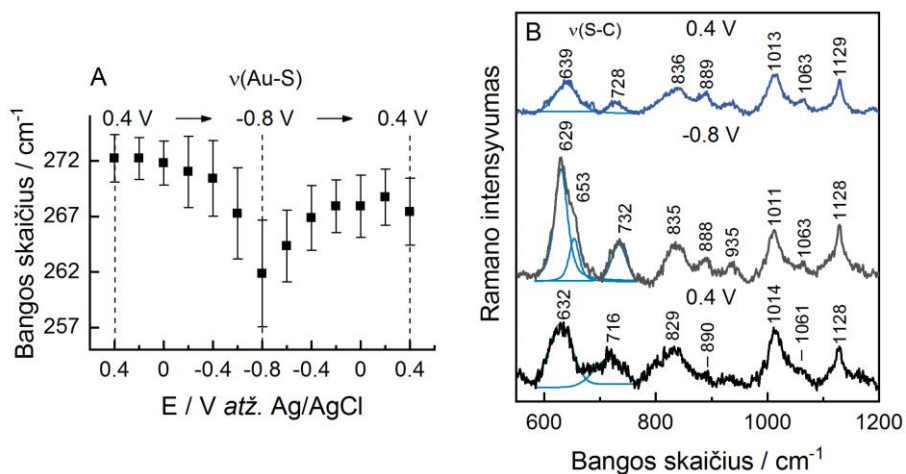
Trumpai apibendrinant šį poskyrį galima padaryti tokias išvadas: dėl neigiamos elektrodo poliarizacijos ME-D₄ monosluoksnyje nežymiai padaugėja trans konformaciją turinčių molekulių (T/G kinta iš $0,34$ į $0,41$). Tai patvirtina T/G santykio kitimas ir sustiprėjusios $\nu_{\text{oop}}(\text{C–C–O})$ ir $t\text{CD}_2$ spektrinės juostos. Teorinio modeliavimo duomenys atskleidžia Au–S jungties pailgėjimą, taip parodydami kryptingą molekulių orientacijos kitimo tendenciją keičiantis potencialui. Tačiau, kaip aptarta literatūros apžvalgos dalyje, nedidelės iki dešimties anglies atomų (taip pat ir ME-D₄) turinčios molekulės nesudaro kolektyvia orientacija pasižyminčių monosluoksnių. Gana didelė duomenų sklaida yra elektrinio potencialo, silpnų tarp molekulių jėgų ir šiluminio judėjimo procesų pasekmė.

5.2.4. WC14 monosluoksnių elektrocheminis SERS tyrimas

WC14 molekulės yra sudarytos iš paviršiaus aktyvios merkpto grupės, šešių EO (etilenoksido) fragmentų ir dviejų miristoilo grandinių (5 pav.). Monosluoksnių stabilumas palaikomas Van der Valso jėgų tarp gretimų monosluoksnių alkilinių grandinių ir hidrofobinės sąveikos monosluoksniui esant vandenyje. Ilgesnės grandinės stabilizuoja monosluoksnį ir mažina metalo nulinio krūvio potencialą.¹²⁹ Elektrocheminės desorbcijos matavimai parodė, kad WC14 monosluoksnių yra stabilus platesnėse potencialų ribose nei ME-D₄ ir mišrus monosluoksnių. WC14 monosluoksnių tirtas potencialų ribose nuo $0,40$ ir $-0,80\text{ V}$ palyginamojo Ag/AgCl elektrodo atžvilgiu.

Grįžtama Au–S bangos skaičių priklausomybė nuo potencialo pateikiama 31 paveiksle. Au–S bangos skaičius katodinio skleidimo metu sumažėja per $\Delta = -10\text{ cm}^{-1}$ (iš 272 į 262 cm^{-1}), sekančio anodinio skleidimo metu dažnis grįžta tik iki 267 cm^{-1} . Skirtumas tarp pradinės ir galinės verčių sietinas su monosluoksnių persitvarkymu ties labiausiai neigiamomis potencialo vertėmis. Tačiau, nutraukus neigiamą poliarizaciją molekulės monosluoksnyje ne iš karto grįžta į pradinę būseną, savaiminis persitvarkymas gali trukti kelias valandas ir ilgiau, kaip buvo aptarta 4.2. skyriuje.

Kitas aiškus požymis, kad WC14 monosluoksnių stipriai paveikiamas katodinio skleidimo – S–C valentinių virpesių sritis. Abiejų goš ir trans



31 pav. (A) WC14 monosluoksnio $\nu(\text{Au-S})$ bangos skaičių priklausomybė nuo elektrodo poliarizacijos, skleidžiant potencialą į neigiamą pusę ir po to į teigiamas vertes. (B) WC14 monosluoksnio SERS spektrai pirštų antspaudų srityje esant 0,40 ir -0,80 V potencialui (katodinis skleidimas) ir 0,40 V (anodinis skleidimas). S–C goš ir trans juostos aprašytos Lorencio-Gauso komponentėmis.

konformacijų spektrinės juostos yra jautrios potencialo pokyčiui, tačiau atsakas yra skirtingas. Goš konformacijos $\nu(\text{S-C})_G$ moda (639 cm^{-1}) ties labiausiai neigiamu potencialu ženkliai sustiprėja (3,7 karto) ir skyla į dvi juostas: 629 ir 653 cm^{-1} . Tuo tarpu trans juosta slenkasi per $\Delta=4 \text{ cm}^{-1}$ į aukštesnių dažnių pusę ir yra randama ties 732 cm^{-1} . Aukšto dažnio (653 cm^{-1}) peties atsiradimas liudija apie dalinai desorbuotų molekulių turinčių goš konformaciją atsiradimą. Kaip matoma 17 paveiksle, tirpale WC14 molekulių $(\text{S-C})_G$ virpesys yra gana aukšto dažnio (669 cm^{-1}), kuris molekulei adsorbuojantis paviršiuje sumažėja per $\Delta=-30 \text{ cm}^{-1}$. Atitinkamai, aukštesnio dažnio petys paviršiaus spektre (31 pav.) ties 653 cm^{-1} rodo, kad dėl neigiamo potencialo dalis monosluoksnio molekulių pradeda silpniau sąveikauti su paviršiumi ir tampa būsenos artimos laisvai, su paviršiumi nesąveikaujančiai molekulei. Poliarizavus elektrodą pradinėmis potencialo vertėmis (0,40 V) juostos grįžta į artimas pradinėms vertes, aukšto dažnio goš petys išnyksta. Ties visomis potencialų vertėmis paviršiaus molekulių orientacija ties S–C grupe yra goš.

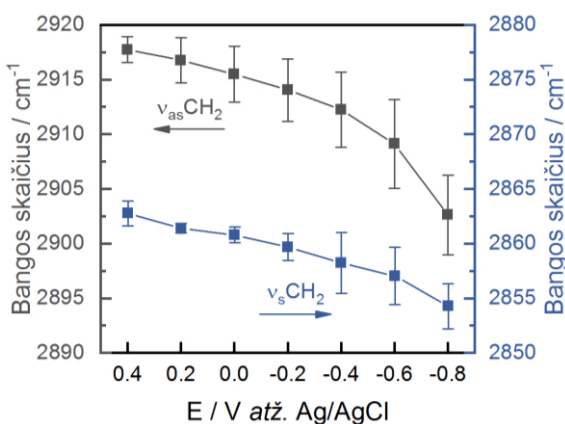
Dvi juostos ties 1063 ir 1129 cm^{-1} priskiriamos alkilinės grandinės valentiniams C–C virpesiams, $\nu(\text{C-C})_T$. Aukštesnės energijos (1129 cm^{-1}) spektrinė moda priskiriama alkilinės grandinės anglies atomų pilnai-trans virpesiams (9 pav.). Ši juosta išlieka mažai pakitusio intensyvumo visų matavimų metu. Goš defektų, $\nu(\text{C-C})_G$, juosta neužregistruota. WC14

miristoilo grandinės išlieka pilnai ištiestos dėl stabilizuojančios Van der Valso ir hidrofobinės sąveikos visų matavimų metu.

Detalesnė persiklojusių WC14 monosluoksnio C–H virpesinių juostų analizė atlikta aprašius eksperimentinį spektrą Lorencio-Gauso komponentėmis (32 pav.). Metileno valentinių simetrinių (2863 cm^{-1}) ir asimetrinių (2918 cm^{-1}) virpesių dažniai slenkasi per $\Delta=-8,49\text{ cm}^{-1}$ ir $\Delta=-15,12\text{ cm}^{-1}$ pakeitus potencialą iš 0,40 į $-0,80\text{ V}$. Procesas grįžtamas ir skleidžiant potencialą atgal į teigiamą pusę juostos grįžta į vertes artimas pradinėms – 2859 ir 2911 cm^{-1} . Metileno grupės molekulėje yra tiek EO fragmente, tiek alkilinėse grandinėse ir tai apsunkina vienareikšmę tolimos srities virpesių analizę. Vieno iš fragmentų pažymėjimas vandenilio izotopais palengvintų spektro interpretaciją.

Kaip minėta, vyraujanti S–C jungties konformacija yra goš. Tai reiškia,

kad dauguma molekulių yra pasvirusios paviršiaus atžvilgiu ties pradine molekulių dalimi. Molekulei gulint ant paviršiaus, EO fragmento ir alkilinės grandinės metileno dipolio momentų krypties dedamosios paviršiaus atžvilgiu nėra nulinės. Kampas θ , esantis tarp virpesio



32 pav. Valentinių ν_sCH_2 ir $\nu_{as}CH_2$ metileno virpesių priklausomybė nuo potencialo.

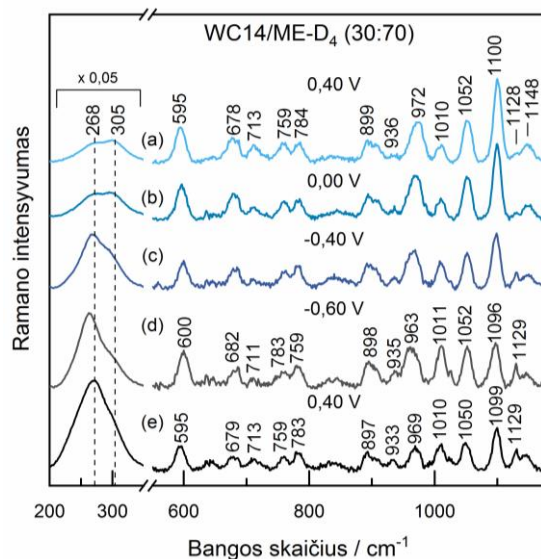
dipolio momento ir išorinio elektrinio lauko krypties \vec{E}_f , lemia Štarko efekto stiprumą pagal $\cos\theta$ sąryšį: dipolio ir išorinio lauko kryptims sutampant – efektas pasireiškia stipriausiai; dipolis lygiagretus – efektas nepasireiškia (žr. į 10 formulę).⁸¹ Tai, kad C–H virpesių bangos skaičiai slenkasi dėl potencialui patvirtina, kad molekulės su paviršiaus normale sudaro nenulinį kampą.

Apibendrinant, WC14 molekulių orientacija kinta elektrodo atžvilgiu jas veikiant elektriniu lauku. Neigiama elektrodo polarizacija sumažina pradinės grupės ir aukso paviršiaus Au–S ryšio energiją. Dalies goš konformacijos molekulių sąveika su paviršiumi susilpnėja, jos tampa dalinai desorbuotos nuo paviršiaus, tai matome iš aukšto dažnio peties ties 652 cm^{-1} atsiradimo. Virpesinis Štarko efektas rodo, kad metileno grupės yra orientuotos taip, kad jų dipolio momento kryptis turi nenulinę dedamąją paviršiaus normalės atžvilgiu, vadinasi molekulės yra pasvirusios paviršiaus atžvilgiu.

5.2.5 Mišrus monosluoksnio elektrocheminis SERS tyrimas

Mišrus inkarinis monosluoksnis yra integrali tBLM (pakabinamoms dvisluoksnėms lipidinėms membranoms) dalis. Toliau nagrinėjamos mišrus monosluoksnio suformuoto iš WC14 ir ME-D₄ (30:70) savybės esant išoriniam elektriniam laukui. Potencialo ribos, kuriose atlikti elektrocheminiai SERS matavimai buvo tarp 0,40 ir -0,60 V atž. Ag/AgCl.

Mišrus monosluoksnis išliko stabilus potencialo ribose tarp 0,40 ir -0,60 V. Nežymus spektrinio intensyvumo sumažėjimas (< 2%) buvo pastebėtas tarp pirmojo spektro ir tarp spektro ties labiausiai neigiamu potencialu, o didesnis sumažėjimas, siekiantis 25 %, registruojamas paskutiniame spektre, grįžus prie pradinių potencialo reikšmių. Spektrinio intensyvumo kitimai sietini su paviršiaus šiurkštumo sumažėjimu ir dėl to silpnėjančiu SERS efektu bei molekulių reorientacija paviršiuje.



33 pav. Mišrus monosluoksnio SERS spektras Au-S/Au-O ir 550–1200 cm⁻¹ srityse, potencialui esant 0,40, 0,00, -0,40 ir -0,60 V (katodinis skleidimas) ir 0,40 V (anodinis skleidimas). Metalo-adsorbato srities spektrinis intensyvumas padalintas iš 20.

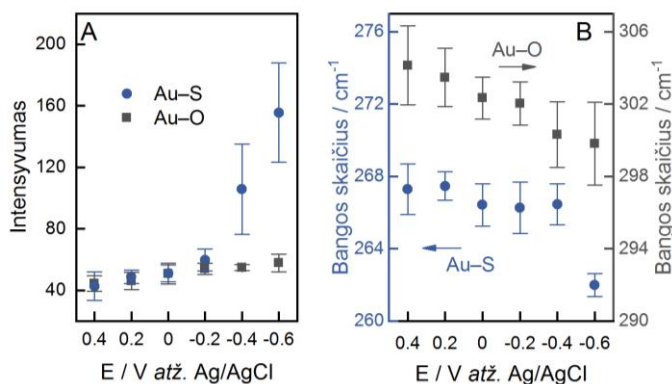
Naujų spektrinių juostų dėl potencialo pokyčio, pavyzdžiui, kaip juostos ties 653 cm⁻¹ atsiradimas WC14 monosluoksnyje rodęs dalinę goš konformacijos molekulių desorbciją (31 pav. B), neatsirado. Mišrus monosluoksnio spektre dominuoja ME-D₄ juostos (33 pav.). Elektrinio lauko sukelti spektriniai pokyčiai didžiausi tose molekulių grupėse, kurios turi didžiausią dipolio momentą: S–C ir C–O. Dėl tos pačios priežasties deformaciniai CD virpesių energija (713, 759, 784, 1052 cm⁻¹) beveik nekinta.

Tolesnė analizė suskirstoma į spektrines sritis pagal jose dominuojančių cheminių grupių virpesines modas: (i) *metalo-adsorbato virpesių* $\nu(\text{Au-S})/\nu(\text{Au-O})$ sritis; (ii) *pradinės S–C grupės virpesių sritis*; (iii) *alkilinių grandinių* $\nu(\text{C-C})$ virpesių sritis ir (iv) $\nu(\text{C-D})/\nu(\text{C-H})$ virpesių sritis.

i. Metalo-adsorbato virpesių $\nu(\text{Au-S})/\nu(\text{Au-O})$ sritis

Metallo-adsorbato juosta ties 268 cm^{-1} kyla dėl ME-D₄ ir WC14 sąveikos su aukso elektrodo paviršiumi per sierą, o 305 cm^{-1} dėl ME-D₄, kuris dar sudaro Au–O ryšį. $\nu(\text{Au-O})$ juostos intensyvumas kinta tiesiškai ir padidėja 1,33 karto (34 pav. A). Metallo-tiolato juosta, $\nu(\text{Au-S})$, 0,40–0,20 V ribose kinta nežymiai, tačiau ties -0,60 V jos intensyvumas padidėja beveik 4 kartus. Didesnis spektrinis intensyvumas rodo, kad ryšys įgauna labiau statmeną orientaciją paviršiaus atžvilgiu.

Au–S ryšio energija tirtų potencialų ruože kinta netolygiai. Pirmiausia, užregistruotas tik nedidelis juostos poslinkis per $\Delta = -0,83\text{ cm}^{-1}$ pakeitus potencialą iš 0,40 į -0,40 V, tačiau tarp -0,40 ir -0,60 V ryšio energija ženkliai mažėja $\Delta = -4,47\text{ cm}^{-1}$ (34 pav. B). Nustatytas bendras poslinkis yra $\Delta = -5,30\text{ cm}^{-1}$. Energijos mažėjimas sietinas su ryšio ilgio didėjimu dėl atsirandančios elektrosstatinės stūmos tarp neigiamai poliarizuoto elektrodo ir tiolato. Au–O ryšio energijos pokytis artimas tiesiniam, jo vertė $\Delta = -3,43\text{ cm}^{-1}$.

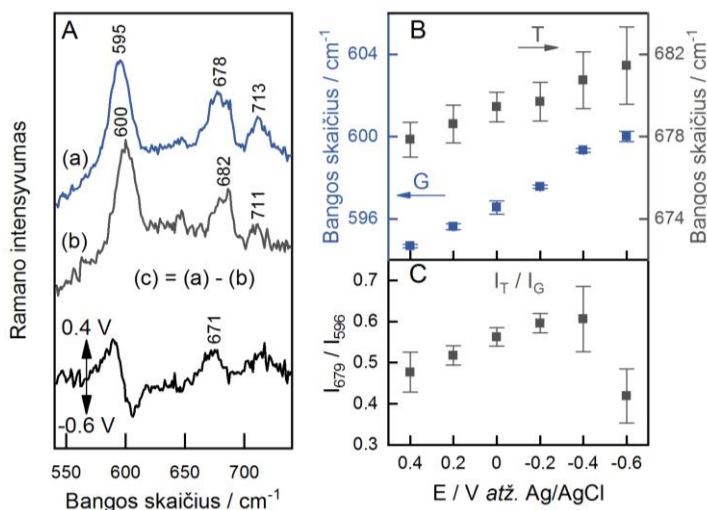


34 pav. (A) Mišraus monosluoksniu Au–S ir Au–O spektrinių juostų intensyvumo ir (B) bangos skaičius priklausomybė nuo potencialo.

ii. Pradinės S–C grupės virpesių sritis

Izotopais žymėtos merkaptotetanolio molekulės charakteringų virpesių dupletas ties 595 ir 678 cm^{-1} , priskiriamas goš ir trans konformacijos pradinės S–C grupės virpesiams (35 pav. A). Mišriame monosluoksnyje nepavyko užregistruoti WC14 pradinės grupės goš ir trans juostų, kurios gryno WC14 monosluoksnyje užregistruotos ties 639 ir 728 cm^{-1} .

S–C goš ir trans virpesių bangos skaičius didėja elektrodo poliarizacijai



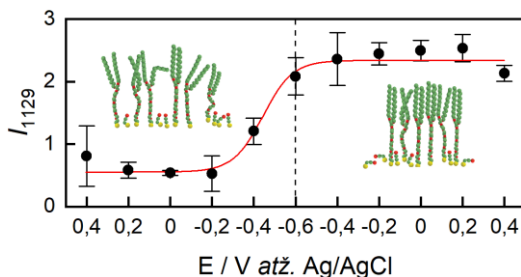
35 pav. (A) Mišraus monosluoksniu elektrocheminio-SERS spektrai valentinių S–C virpesių srityje ties 0,40 V (a) ir –0,60 V (b) potencialu. (B) Skirtuminis spektras taip pat pateiktas (c). Goš ir trans virpesių bangos skaičiai ir (C) santykinio intensyvumo (T/G) priklausomybė nuo potencialo.

darantis labiau neigiamai (35 pav. B). Pokytis yra tiesinis tiek goš, tiek trans konformerams ir jo dydis yra $\Delta = -5,32$ ir $\Delta = -4,12$ cm^{-1} . Skirtuminiame spektre (35 pav. Ac) teigiama juosta ties 671 cm^{-1} rodo, didesnę merkaptetanolio trans konformerų skaičių esant teigiamai elektrodo polarizacijai (0,40 V). Tačiau nenuoseklus T/G intensyvumų santykio kitimas atskleidžia sudėtingą elektrocheminę fazių riboje vykstančių procesų pobūdį (35 pav. C), kuriuos būtų galima interpretuoti keliais etapais.

Pirmiausia, 0,40–0,40 V potencialo ribose ilgėjant Au–S ryšiui taip pat didėja ir santykinis trans konformaciją turinčių molekulių skaičius. Šiose ribose T/G santykis padidėja iš 0,47 į 0,60. Vėliau, pereinant iš –0,40 į –0,60 V trans konformerų kiekis sumažėja iki 0,42 (35 pav. C). Šiuos nelinejinius procesus skatina silpnėjantis metalo-tiolato ryšys ir didėjanti monosluoksniu netvarka.^{73,83} Netiesiškumą taip pat gali paaikškinti ir WC14 molekulių klasterizacijos reiškinys, kuris plačiau aptariamas kitame poskyryje.

iii. Alkilinių grandinių tvarka, $\nu(\text{C–C})$ virpesių sritis

Mišraus monosluoksniu pilnai-trans 1129 cm^{-1} juosta yra tarpmolekulinio grandinių susipakavimo žymuo.^{88,113} Ankstesniame tyrime nustatyta nevienareikšmė šios juostos priklausomybė nuo inkubacijos vandenyje laiko. (i) Monosluoksnyje, kuriame dominavo paviršiaus skiediklis, WC14/ME-D₄ (30:70), pilnai-trans pasireiškė iškart, tačiau ilgėjant inkubacijos laikui jos intensyvumo kitimas nebuvo reikšmingas (22 pav.). (ii) Monosluoksnyje su didesne ilgagrاندžių molekulių koncentracija, WC14/ME-D₄ (70:30),



36 pav. Pilnai-trans $\nu(\text{C}-\text{C})_{\text{T}}$ virpesio ties 1129 cm^{-1} priklausomybė nuo elektrodo potencialo, aprašyta Boltzmano sigmoidine kreive ($R^2=0,9964$). Įterpinys kairėje vaizduoja netvarkingą SAM matavimo pradžioje; įterpinys dešinėje – agreguotos būsenos SAM po poveikio neigiamu potencialu. Apskaičiuotas potencialas ties juostos stiprėjimo pusaukščiu yra $-0,46 \pm 0,03 \text{ V}$.

užregistruotas beveik tiesinis pilnai-trans juostos augimas, kuris prasidėjo iškart po monosluoksnio patalpinamo į vandenį (26 pav. B).

1129 cm^{-1} intensyvumo atsakas į potencialo kitimą nėra tiesiškas – ši moda nors ir silpna, bet matoma pirmuose spektruose (ties $0,4$ ir $-0,2 \text{ V}$), pasiekus $-0,4 \text{ V}$ ji ima stiprėti ir įsisotinimą pasiekia ties maždaug $-0,6 \text{ V}$. Vėliau sekančio anodinio skleidimo metu jos intensyvumas išlieka beveik nepakitęs. Neigiama elektrodo poliarizacija mažina Au–S ryšio energiją (34 pav. B), o tai lemia padidėjusį molekulių judrumą paviršiaus plokštumoje. Molekulėms silpniau sąveikaujant su paviršiumi sumažėja jų persitvarkymui reikalinga aktyvacijos energija, todėl išauga vandens poveikis hidrofobinėms molekulėms dalims. Polinėje aplinkoje hidrofobinės alkilinės grandinės persiorientuoja minimizuodamos sąveikos su vandeniu plotą ir formuoja kietą struktūrą primenančius dvidimensinius alkilinių grandinių klasterius, kurių spektrinis žymuo pilnai-trans $\nu(\text{C}-\text{C})_{\text{T}}$ virpesys ties 1129 cm^{-1} .

Klasterizacija lemia heterogeninį molekulių tankio pasiskirstymą paviršiuje: vienos paviršiaus vietose susidarant ilgagrاندžių molekulių sankaupoms kitose jų beveik nelieka. Šiose, laisvose nuo WC14, vietose dominuoja ME-D₄ molekulės. Vanduo skatina ME-D₄ molekulių goš izomerizaciją susidarant su paviršiumi Au–O ryšiui. Taigi, WC14 klasterizacija yra veiksnys lemiantis ME-D₄ goš izomerizacijos reakciją. Panašus efektas nustatytas ir vandens sukulto mišraus monosluoksnio struktūros pakitimų tyrime – WC14 molekulėms formuojant paviršiaus klasterius daugėja ME-D₄ goš konformerų.¹³⁰

iv. $\nu(\text{C}-\text{D})/\nu(\text{C}-\text{H})$ virpesių sritis

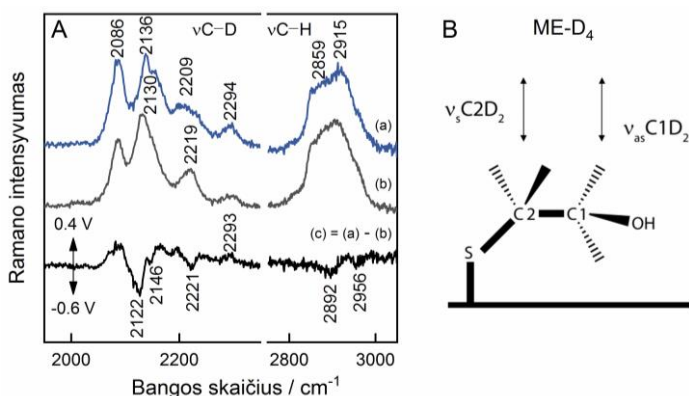
Didžiausias izotopinio pakeitimo sukeltas poslinkis matomas aukšto dažnio srityje, lyginant merkaptoetanolio C–D ir WC14 C–H juostas (37 pav.). Simetriniai ir asimetriniai prie sieros esančio metileno C1D₂ virpesiai pasireiškia ties 2086 ir 2209 cm^{-1} , o metileno esančio prie deguonies atomo

C2D₂ ties 2136 ir 2294 cm⁻¹. Poliarizacija į neigiamą pusę pastebimai keičia tik $\nu_s(\text{C2D}_2)$ ir $\nu_{as}(\text{C1D}_2)$ virpesių energiją: per $\Delta = -6$ ir 10 cm⁻¹.

SERS atrankos taisyklės teigia, kad kuo virpesio kryptis yra statmenesnė paviršiaus atžvilgiu, tuo virpesys labiau stiprinamas. Nors paviršiaus atrankos taisyklė dėl mažiau apibrėžto paviršiaus lygumo nėra tokia griežta, kokia yra atspindžio-sugerties infraraudonosios sugerties (RAIRS) spektroskopijoje, ji galioja ir SERS. Taip yra dėl to, kad dažniausiai SERS paviršių nelygumai yra daug didesni už tiriamų molekulių dydį. Ankstesnėje publikacijoje parodyta, jog mūsų laboratorijoje elektrochemiškai šiuurkštinto aukso elektrodo paviršiaus nanodarinių skersmuo yra 100–500 nm,¹³¹ tuo tarpu ilgagrاندžių SAM molekulių ilgis yra apie 3 nm.^{99,132} Dėl tokio mastelių skirtumo adsorbuotas molekules nagrinėjame neatsižvelgdami į paviršiaus nelygumą.

Skirtuminiame spektre (37 pav. Ac) užregistruotas juostų intensyvumo pokytis. Neigiamos 2122 ir 2221 cm⁻¹ spektrinės juostos rodo, kad ties neigiamu potencialu (i) sustiprėja prie sieros atomo esančio metileno simetrinio valentinio virpesio intensyvumas – $\nu_s(\text{C2D}_2)$ virpesio kryptis tampa labiau statmena elektrodo paviršiui; (ii) ties deguonimi esantis metilenas, C1D₂, pasisuka per C2–C1 jungtį. C1D₂ grupės asimetrinio virpesio kryptis taip pat tampa statmena paviršiui. Simetrinio C2D₂ virpesio stiprėjimas rodo, kad dalis molekulių persiorientuoja taip, kad būtų palinkusios link paviršiaus (37 pav. B). Tai dera su anksčiau parodytu T/G santykio kitimu, kuomet ties labiausiai neigiamomis elektrinio potencialo vertėmis nustatytas ženklus goš konformerų santykinio skaičiaus didėjimas (35 pav. A).

Valentinių C–H virpesių srityje dvi persiklojusios juostos ties 2859 ir 2915 cm⁻¹ priskiriamos simetriniam ir asimetriniam metileno virpesiams.



37 pav. (A) Mišraus monosluoksniu C–D ir C–H srities SERS spektrai ties 0,40 V (a) ir -0,60 V (b). Skirtuminis (c) spektras taip pat pateikiamas. (B) ME-D₄ orientacija, kuriai esant $\nu_s\text{C2D}_2$ ir $\nu_{as}\text{C2D}_2$ metileno virpesiai yra stiprinami paviršiaus labiausiai.

Atlikus metileno juostų aprašymą Lorencio-Gauso komponentėmis aiškios priklausomybės nuo potencialo nepastebėta. Priešingi rezultatai gauti vienkomponenčio WC14 monosluoksnio tyrime, kur juostos slinkosi į žemesnius dažnius per $\Delta=8,49 \text{ cm}^{-1}$ ir $15,12 \text{ cm}^{-1}$ simetriniam ir asimetriniam valentiniams virpesiams. Šie rezultatai leidžia daryti prielaidą, bendra WC14 orientacija mišriame ir vieno komponento monosluoksnuose skiriasi.

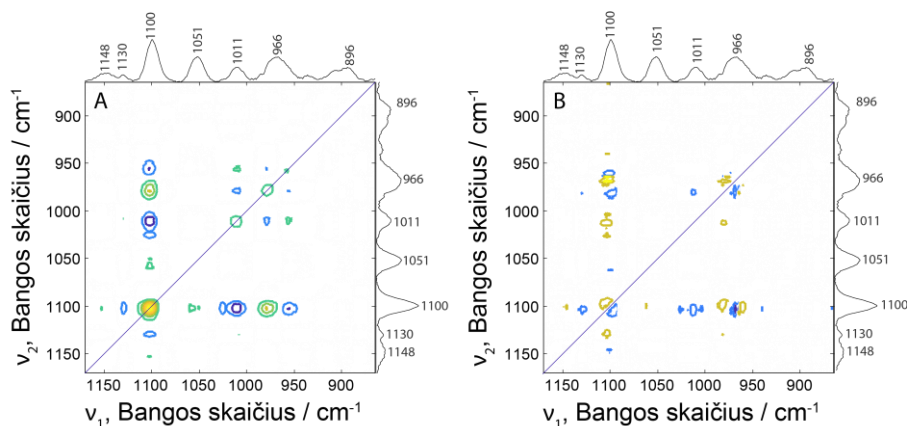
Skirtuminiame C–H srities spektre ryškėja dvi neigiamos juostos ties 2892 ir 2956 cm^{-1} , priskiriamos galinės metilo grupės simetriniams ir asimetriniams virpesiams. Šių juostų atsiradimas ties neigiamu potencialu kyla dėl alkilinės grandinės persitvarkymų į tokią poziciją, kurioje metilo grupės įgauna labiau statmeną orientaciją paviršiaus atžvilgiu.

5.2.6. Mišraus monosluoksnio dvidimensinė koreliacinė analizė

Dvidimensinė koreliacinė analizė (2DCOS) yra spektrų analizės metodas padidinantis rezoliuciją ir padedantis išsiaiškinti spektrinių kitimų eigą.¹³³ 2DCOS yra universalus ir pritaikomas (i) įvairiems virpesinės spektroskopijos, branduolio magnetinio rezonanso, Rentgeno spindulių difrakcijos, chromatografijos metodams, taip pat (ii) įvairiems tyrimo objektams bei (iii) išoriniams poveikiams ir vidiniams kitimams: temperatūrai, elektriniam ir magnetiniam laukui, cheminės reakcijos laikui, medžiagų koncentracijos pokyčiams ir kitiems.

2DCOS žemėlapiams formuoti reikalingas palyginamasis spektras, kuriuo gali būti pirmas, vidurinis, paskutinis serijos spektras arba spektras gautas suvidurkintus visą seriją. 2DCOS žemėlapyje matoma, kiek viena ar kita spektrinė juosta pakito palyginamojo spektro atžvilgiu. Nepaisant to, palyginamojo spektro pasirinkimas turi nedidelę reikšmę galutiniam rezultatui, be to tam tikrais atvejais jo galima iš viso nenaudoti. Pagal susitarimą, dvidimensiniame žemėlapyje abscisių ašis vadinama v_1 , o ordinačių v_2 . Spektrinių juostų pora sudaranti 2DCOS piką užrašoma (v_1, v_2).

Tiriamoje mišraus WC14/ME-D₄ (30:70) monosluoksnio sistemoje išorinis poveikis buvo elektrodo potencialas, kurio vertės nustatytos $0,20 \text{ V}$ intervalais tarp $0,40$ ir $-0,60 \text{ V}$ palyginamojo Ag/AgCl atžvilgiu. Palyginamuoju spektru pasirinkta suvidurkinta visų šešių matavimų serija. Spektrinės juostos, kurių vertės teigiamos, pažymėtos geltonai ir žaliai, neigiamos – mėlynai (38 pav.). Tam, kad išryškėtų dvidimensinės juostos ir paveikslai būtų aiškesni, nedideli intensyvumo kitimai ties nuline verte buvo panaikinti (pažymėti balta spalva).



38 pav. (A) Mišraus SAM sinchroninis ir (B) asinchroninis dvidimensiniai koreliaciniai žemėlapiai (2DCOS) 865–1170 cm^{-1} srityje. 2DCOS suformuoti iš 6 spektrų užregistruotų ties skirtingomis potencialo vertėmis nuo 0,40 iki -0,60 V. Ašyje pateiktas palyginamasis spektras. Geltona ir žalia spalvos žymi teigiamas vertes, mėlyna – neigiamas.

Sinchroniniame 2DCOS žemėlapyje (38 pav. A) ant įstrižainės esančios smailės vadinamos auto-pikais. Šie auto-pikai būna tik teigiamų verčių ir nurodo vienos juostos autokoreliaciją, t. y. kaip smarkiai kinta juosta dėl išorinio poveikio. Kuo auto-pikas intensyvesnis, tuo virpesinė juosta jautresnė išoriniam, šiuo atveju elektrinio lauko, poveikiui. 865–1170 cm^{-1} srityje stipriausias auto-pikas yra ties 1100 cm^{-1} ; kiti, mažiau stiprūs randami ties 1011, 978, 956 cm^{-1} . Tai, kad neregistruojami 1053 ($\delta(\text{CD}_2) + \delta(\text{OH})$), 934 ir 889 cm^{-1} ($t(\text{CD}_2) + \delta(\text{OH})$) auto-pikai, rodo šios juostos nejautrios elektrinio lauko pokyčiams.

Greta auto-pikų sinchroniniame žemėlapyje yra ir kryžminiai pikai (angl. *cross-peaks*). Šie pikai randami ne ant įstrižainės ir gali būti tiek teigiami, tiek neigiami. Teigiami kryžminiai pikai ties (1102,978), (1102,1153) ir (1011,956) rodo, kad šių spektrinių juostų porų intensyvumas kinta ta pačia kryptimi, t. y. arba abi juostos dėl potencialo poveikio stiprėja arba abi silpsta. Juosta ties 1053 cm^{-1} yra mažai jautri išoriniam poveikiui, todėl pasireiškia kryžminiu piku tik dėl stipraus 1102 cm^{-1} juostos kitimo, (1102,1053). Neigiamų (1129,1102), (1102,956), (1102,1010), (1102,1025), (1011,978) ir (978,956) pikų pažymėtų mėlynai vertės yra juos sudarančių porų intensyvumo kitimo į priešingas kryptis pasekmė – vienas iš poros pikų stiprėja, kitas netenka intensyvumo.

Asinchroninis 2DCOS žemėlapis (38 pav. B) padeda atskirti persiklojusias spektrines juostas ir nustatyti tų juostų vystymosi eiliškumą. Šiame žemėlapyje pasireiškia tik kryžminiai pikai, kurie būdingi dviejų virpesinių juostų intensyvumui kintant ne fazėje viena kitos atžvilgiu. Teigiami asinchroniniai pikai (v_1, v_2) atsiranda, kai pirmiau pradeda kisti v_1 juostos

intensyvumas, o tik tada ν_2 . Ši taisyklė galioja ir atvirkščiai: neigiamas pikas rodo, kad pokyčiai prasidėjo pirmiau ν_2 nei ν_1 . Taikant šias taisykles, peršasi išvada, kad potencialo sukelti pokyčiai neigiamoje asinchroninio (1129,1102) piko poroje pirmiausiai pasireiškia $\nu_2 - 1102 \text{ cm}^{-1}$. Atitinkamas pikas sinchroniniame žemėlapyje yra su neigiamu ženklu, tai reiškia, viena spektrinė juosta stiprėja, o kita silpsta. Kad 1129 cm^{-1} atsilieka matėme iš I_{1129}/I_{1100} santykio priklausomybės nuo elektrinio lauko (36 pav. B), kur santykis ima didėti tik potencialui pasiekus $-0,20 \text{ V}$.

Asinchroninis 2DCOS žemėlapis atskleidžia potencialo sukeltus pokyčius: 1102 cm^{-1} juostos priskiriamos $\nu(\text{C-O})$ intensyvumo pokyčiai vyksta anksčiau nei 940 ir 880 cm^{-1} juostų. Atitinkamai, 978 cm^{-1} pralenkia 1011 cm^{-1} . Vienas intensyviausių asinchroninių pikų ($1102,1010$) rodo, kad pokyčiai pirmiausia prasideda valentiniame C-O virpesyje (1102 cm^{-1}), o tik vėliau 1010 cm^{-1} juostoje, kuri skaičiavimais buvo priskirta $w(\text{C2D}_2) + \nu(\text{S-C}) + \nu(\text{C-O})$. Taip pat iš sinchroninio žemėlapio matome, kad šių juostų intensyvumas kinta skirtingomis kryptimis. Asinchroniniame žemėlapyje nebuvo užregistruotas ($1011,956$) pikas rodo, kad šių juostų pokyčiai sinchronizuoti.

5.3. Pakabinamos dvisluoksnės lipidinės membranos SERS

Ant inkarinio WC14/ME-D₄ (30:70) monosluoksnio MLV (daugiasluoksnių liposomų) liejimo metodu suformuota tBLM (pakabinama dvisluoksnė lipidinė membrana). Po membranos formavimo etapo elektrodas gausiai plaunamas fosfatiniu tirpalu, norint pašalinti laisvus, nesuagregavusius, lipidus ir lipidų viršsluoksnius. MLV sudarė DOPC ir cholesterolio (50:50) mišinys (5 pav.). Nustatyti spektriniam tBLM komponentų žymenims ir įvertinti suformuotos membranos savybėms buvo užregistruoti DOPC ir cholesterolio Ramano spektrai kambario temperatūroje ir esant $-100 \text{ }^\circ\text{C}$ (tik DOPC). DOPC ir cholesterolio fazinio virsmo temperatūros yra atitinkamai $-17 \text{ }^\circ\text{C}$ ir $148 \text{ }^\circ\text{C}$, todėl eksperimento buvo metu užregistruoti tik kietos ir skystos būsenos DOPC ir kietos būsenos cholesterolio Ramano spektrai (39 pav.). Lipidų Ramano spektruose nustatytos būdingos juostos ties $1655\text{--}1659$ ir 1672 cm^{-1} , priskiriamos valentiniam dvigubos C=C jungties virpesiui nesočiosiose DOPC molekulės grandinėse ir valentiniam dvigubos C=C jungties virpesiui cholesterolio B žiede.^{120,134} DOPC molekulės karbonilo grupės virpesys $\nu(\text{C=O})$ registruojamas ties $1738\text{--}1739 \text{ cm}^{-1}$, o intensyvi žemo dažnio juosta ties $718\text{--}719 \text{ cm}^{-1}$ priskiriama valentiniam hidrofilinės molekulės dalies etanolamino

$\nu(\text{N}^+(\text{CH}_3)_3)$ virpesiui.¹²⁰

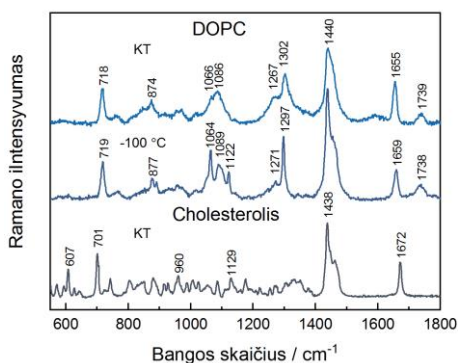
Cholesterolio spektre taip pat aiškiai matomos juostos ties 607 ir 701 cm^{-1} , iš kurių didesnės energijos priskiriama žiedo deformaciniam virpesiams.¹³⁴

Juosta ties 1655 cm^{-1} yra angliavandenilinės grandinės būsenos ties dviguba C=C jungtimi indikatorius. Temperatūrinis

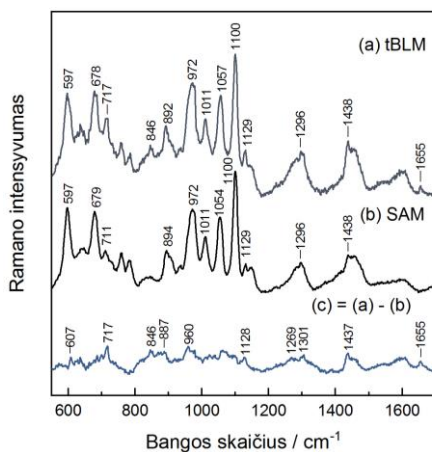
Ramano eksperimentas atskleidžia, kad fazinio DOPC molekulių virsmo iš skysto būvio į kietą, t. y. didėjant tarpmolekulinei tvarkai, $\nu(\text{C}=\text{C})$ virpesio energija padidėja per 4 cm^{-1} . Didėjančią tvarką sočiojoje angliavandenilinės grandinės dalyje rodo deformacinio $t(\text{CH}_2)$ virpesio ties 1302 cm^{-1} energijos sumažėjimas iki 1297 cm^{-1} ir šios juostos pusplėčio (FWHM) sumažėjimas.¹³⁵

SERS spektrai registruoti fosfatiniame tirpale (4,6 pH) elektrocheminėje celėje. Pirmiausia užregistruoti paviršiaus SAM spektrai. Vėliau ant šio SAM išlieta tBLM ir užregistruotas spektras. 40 paveiksle pateikti susumuoti trijų atskirų eksperimentų duomenys, kurių bendras spektrų registravimo laikas SAM ir tBLM atitinkamai susidarė 80 ir 230 min. Mūsų žiniomis iki šiol nėra publikuotų mokslinių straipsnių skelbiančių sėkmingai užregistruotus tBLM membranos SERS spektrus. To priežastis gali būti ypatingai silpnas membranos signalas, dėl to, kad lipidų molekulės yra nutolusios nuo paviršiaus gana dideliu atstumu (ca. 15 Å).⁹⁹

SERS efektas itin greitai silpsta didėjant molekulių atstumui nuo paviršiaus, dėl to didesnis paviršiaus stiprinimo efektas teks arčiau jo esančioms lipidų molekulių dalims. Įprastai apatinio tBLM membranos sluoksnio molekulės į paviršių yra nukreipusios hidrofiliškos dalis, tuo tarpu jų



39 pav. Kambario temperatūros (KT) ir -100 °C DOPC Ramano spektrai ir KT cholesterolio Ramano spektras.



40 pav. tBLM (a) ir inkarinio membranos sluoksnio (SAM) ir (b) SERS spektrai 550–1700 cm^{-1} srityje. Spektrai sunormuoti pagal 1100 cm^{-1} juostą. Pateikiamas taip pat ir skirtuminis spektras (c).

angliavandenilinės grandinės nukreiptos tolyn. Dėl to formuojantis tvarkingai membranai būtų tikimasi stipriausių juostų priskiriamų polinės molekulių dalies virpesiams. Siekiant išryškinti nedidelius pokyčius tarp SAM ir tBLM spektrų, sukonstruotas skirtuminis spektras, normuotas pagal 1100 cm^{-1} juostos intensyvumą. (40 pav. C). Skirtuminiame paviršiaus spektre ryškėja kelios DOPC ir cholesteroliui būdingos juostos, rodančios, kad prie paviršiaus yra lipidų molekulių darinių. Juostos ties 717 ir 1655 cm^{-1} priskiriamos valentiniams DOPC polinės etanolamino grupės ir dvigubo $\text{C}=\text{C}$ ryšio virpesiams, tuo tarpu 607 ir 960 cm^{-1} juostos priskiriamos cholesteroliui. Pastebėtina, kad paviršiaus spektre nepasireiškia cholesteroliui būdingas žiedo dvigubos jungties virpesys $\nu(\text{C}=\text{C})$, kuris Ramano spektre užregistruotas ties 1672 cm^{-1} . Skirtuminiame spektre taip pat pasireiškia CH grupių deformacinės virpesinės juostos (1269 , 1301 ir 1437 cm^{-1}), kurios gali kilti tiek iš tBLM lipidų, tiek iš SAM molekulių (17 pav., 3 lentelė ir 39 pav.).

DOPC fazinė būseną ties dviguba jungtimi $\text{C}=\text{C}$ koreliuoja su šios jungties valentinio virpesio $\nu(\text{C}=\text{C})$ energija. Temperatūrinis Ramano eksperimentas parodė, kad fazinio virsmo į kietą būvį metu šio virpesio energija didėja iki 1659 cm^{-1} . Lyginant paviršiaus ir Ramano spektrus aiškėja, kad DOPC molekulės tBLM membranoje yra skysto būvio ties dviguba jungtimi angliavandenilinėje grandinėje. Tai leidžia daryti prielaidą, kad membranos ar jos darinių būseną prie paviršiaus yra skystakristalė.

Imobilizavus tBLM taip pat nustatyti nežymūs pokyčiai inkarinio sluoksnio struktūroje. Skirtuminiame spektre išryškėja teigiama 1129 cm^{-1} juosta, kuri priskiriama WC14 angliavandenilinių grandinių pilnai-trans virpesiams. Šios juostos suintensyvėjimas ankstesnėse šio darbo dalyse buvo priskirtas paviršiaus molekulių klasterių formavimuisi. Tačiau, šiuo atveju juostos išaugimas gali būti siejamas su hidrofobinių WC14 molekulių grandinių įsiterpimu į lipidinę membraną ir ištemptos jų formos stabilizavimu membranos hidrofobinėje aplinkoje. Šiuos duomenis papildo ir mažo intensyvumo juostos ties 887 cm^{-1} atsiradimas skirtuminiame spektre. Ši juosta yra galinės metilo grupės trans konformacijos žymuo, $\nu(\text{CH}_3)_T$. Kita WC14 molekulių spektrinė juosta ryškėjanti skirtuminiame spektre ties 846 cm^{-1} priskiriama EO (etilenoksido) fragmento $\nu(\text{CH}_2)$ ir $\nu(\text{CO})$ virpesiams. Ankstesniuose darbuose ši juostos atsiradimas buvo sietas su EO fragmento struktūros pokyčiais fragmentui įgaunant spiralinės formą.¹³⁶⁻¹³⁸

SERS duomenimis membraną formuojant iš MLV ant paviršiaus susidaro stabilūs lipidų dariniai, atsparūs praplovimui fosfatiniu tirpalu. Nepaisant to spręsti apie tBLM struktūrą sudėtinga, pirmiausia dėl prastai apibrėžto elektrodo šurkštumo.

6. Rezultatų apibendrinimas

Pakabintų dvisluoksnių fosfolipidinių membranų savybės priklauso nuo jas paviršiuje pritvirtinančio inkarinio sluoksnio. Inkariniam monosluoksniui formuoti dažniausiai naudojamos ilgagrاندės į membraną prie paviršiaus pritvirtinančios tiolio molekulės ir mažos molekulinės masės paviršiaus skiediklis.^{29,98} Šioje dalyje aprašyti vandens ir elektrinio potencialo sukelti inkarinio membranos sluoksnio struktūros kitimai. Deuterio izotopais žymėtas ME-D₄ (2-merkaptobetanolis) naudotas siekiant, kad nepersiklotų inkarinio monosluoksnio molekulių spektrinės juostos S–C ir C–H/C–D valentinių virpesių srityse. SERS matavimai *in-situ*, izotopinio pakeitimo metodas ir kvantinės chemijos skaičiavimai atskleidė molekulių sudaromų cheminių ryšių su paviršiumi ypatybes bei vandens ir elektrinio potencialo sukeltus struktūrinius molekulių persitvarkymus.

Vandens poveikis SAM struktūrai

Vienkomponenčio WC14 monosluoksnio plati ir intensyvi valentinio Au–S virpesio juosta užregistruota ties 277 cm⁻¹. Ši žemo dažnio juosta mišriuose (WC14/ME-D₄, 30:70 ir 70:30) ir vienkomponenčio ME-D₄ monosluoksniuose turi antrą dedamąją ties 301–303 cm⁻¹. Teorinis Au₁₀-ME-D₄ kompleksų modeliavimas patvirtino, kad ji priklauso tarp aukso paviršiaus ir merkaptobetanolio deguonies susidaroimo Au–O ryšio valentiniam virpesiui. Skaičiavimai atskleidė, reikšmingą goš konformerio komplekso Au–O ryšio ilgio sumažėjimą ($\Delta=4,95$ pm) pridėjus papildomą vandens molekulę (Au₁₀-ME-D₄-H₂O), o tai rodo, kad vanduo stabilizuoja ME-D₄ ant paviršiaus ir iš dalies pakreipia molekulių izomerizacijos reakciją į goš pusę.

Adsorbuoto merkaptobetanolio santykinis valentinio $\nu(\text{S–C})_G$ virpesio intensyvumas didėja ilgėjant inkubacijos vandenyje laikui. Skaičiavimai rodo, kad tokią geometriją palaiko susidarantys papildomi merkaptobetanolio ryšiai su paviršiumi per deguonį, Au–O. Spektriniais metodais nustatyti ir ilgagrاندžio WC14 tiolio tarpmolekulinės tvarkos pakitimai vandenyje: didėja WC14 molekulių alkilinių grandinių fragmentų turinčių pilnai-trans konformaciją skaičius. SERS metodu nustatyti mišraus monosluoksnio struktūros pakitimai: vandenyje vyksta WC14 molekulių klasterizacija ir santykinis goš konformaciją turinčių ME-D₄ molekulių didėjimas.

Elektrinio potencialo poveikis SAM struktūrai

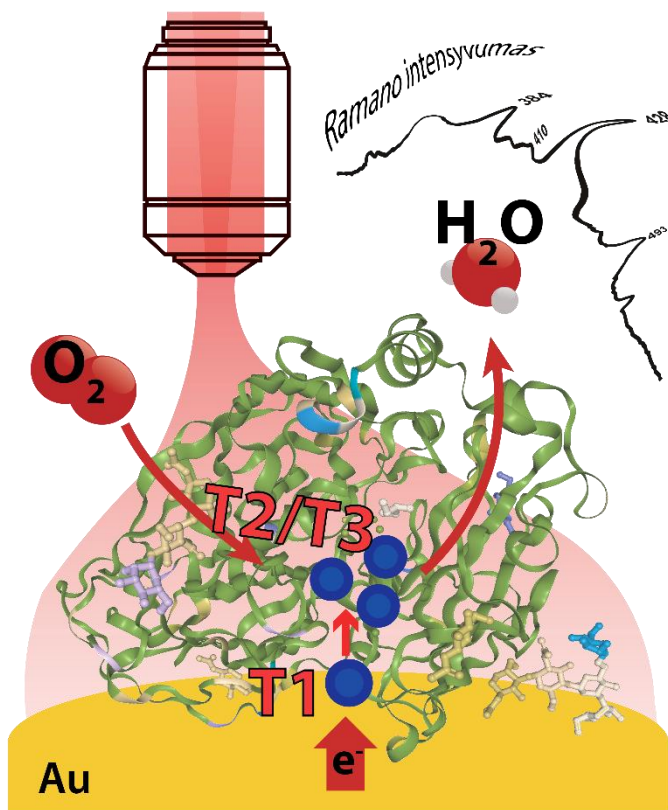
Monosluoksnių elektrocheminės redukcijos tyrimas atskleidė, kad ME-D₄ ir mišrus WC14/ME-D₄ (30:70) monosluoksniai išlieka stabilūs pasirinktose potencialo ribose iki -0,60 V, o WC14 monosluoksnis iki -0,80 V. Pokyčiai

vienkomponenčio WC14 monosluoksniu SERS spektre rodo, kad jautriausia potencialo poveikiui molekulių dalis yra paviršiumi artima pradinė grupė, tuo tarpu alkilinės grandinės visame potencialų ruože išlieka pilnai-trans konformacijos. Ties $-0,80$ V goš konformacijos molekulių valentinė S–C juosta skyla į dvi modas ties 629 ir 653 cm^{-1} , iš kurių aukštesnės energijos moda priskiriama silpniau su paviršiumi sąveikaujančioms molekulėms.

Mišraus WC14/ME-D₄ (30:70) monosluoksniu spektriniai pakitimai elektriniame lauke atskleidžia kelių pakopų procesus. Poliarizuojant elektrodą neigiamai nustatytas Au–S ryšio bangos skaičiaus sumažėjimas per $\Delta = -5,30$ V, kas rodo silpnėjančią molekulių kontaktą su paviršiumi. Ryšio susilpnėjimas padidina molekulių mobilumą paviršiaus plokštumoje ir paspartina polinėje vandens aplinkoje esančių WC14 hidrofobinių grandinių klasterių formavimąsi. Klasterizacijos žymuo – pilnai ištiestų angliavandenilinių grandinių pilnai-trans $\nu(\text{C–C})_{\text{T}}$ virpesio juosta. Šios juostos intensyvumas ima augti ties $-0,2$ V ir savo didžiausią reikšmę pasiekia ties $-0,6$ V. Dėl WC14 molekulių klasterizacijos didėja neužimtas paviršiaus plotas, kuris paskatina ME-D₄ goš izomerizacijos reakciją. ME-D₄ trans/goš konformerų santykis (T/G) pasikeičia iš $0,60$ į $0,42$ pakeitus potencialą iš $-0,40$ V į $-0,60$ V ir tai rodo goš konformaciją turinčių molekulių skaičiaus didėjimą ties labiausiai neigiamomis potencialo vertėmis.

Ant šiurkštinto aukso elektrodo paviršiaus adsorbuotas inkarinis WC14/ME-D₄ (30:70) monosluoksniu pritaikytas kaip matrica tBLM (pakabinamai dvisluoksnei lipidinei membranai) suformuoti MLV (daugiasluoksnių liposomų) liejimo būdu. Mūsų žiniomis iki šiol nėra publikuotų straipsnių, kuriuose būtų pranešta apie SERS metodu užregistruotą tBLM spektrą. Tai, kad membrana išlieka prie paviršiaus po praplovimo fosfatiniu tirpalu liudija valentinis DOPC molekulės $\nu(\text{C=C})$ virpesys ties 1655 cm^{-1} ir etanolamino $\nu(\text{N}^+(\text{CH}_3)_3)$ virpesys ties 701 cm^{-1} . Nustatyta, kad lipidai prie paviršiaus yra skystakristalės būsenos.

III DALIS. PAVIRŠIUJE ADSORBUOTŲ LAKAZIŲ VIRPESINĖ SPEKTROKOPIJA



7. Literatūros apžvalga

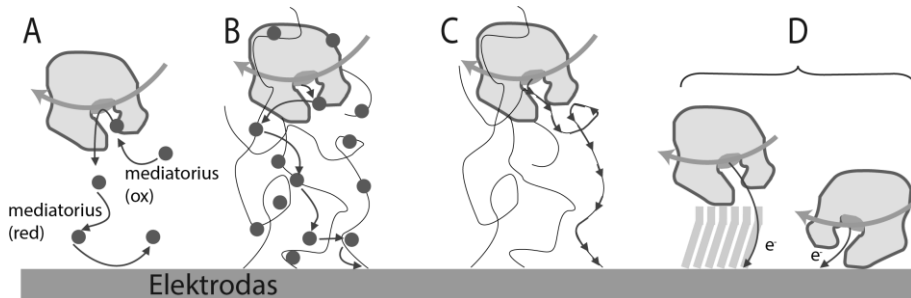
7.1. Elektronų pernaša fermentinėse sistemose

Elektronų pernaša (EP) yra vienas svarbiausių procesų vykstančių įvairiose fizikos ir chemijos srityse, biologinėse sistemose.¹³⁹ Gyvoje ląstelėje EP susijusi su energijos transformacijomis, pavyzdžiui oksidacinio fosforilavimo metu NADH redukuoja deguonį iki vandens, o išsiskyrusi energija naudojama ATP molekulėms susidaryti iš ADP ir P_i . Fermentai transformuojantys cheminę energiją į elektrinę pritaikomi biojutikliuose, kuro elementuose ir bioelektrosintetinėse sistemose.¹⁴⁰

Heterogeninė EP tarp fermento redokso centro ir elektrodo paviršiaus gali vykti mediatoriniu (MEP) arba tiesioginiu būdu (TEP). MEP sistemose elektronus perneša mažamolekuliniai dariniai. Šių sistemų privalumas tas, kad fermento aktyvus centras gali būtų nutolęs nuo elektrodo paviršiaus. Vis dėlto aukštas biokatalitinis viršįtampis, prastas stabilumas ir mediatorių toksiškumas buvo priežastys lėmusios mažėjančių MEP biojutiklių taikymą. Minėti trūkumai išsprendžiami TEP sistemose, tačiau tiesioginei pernašai būtina, kad fermento redokso centras būtų nutolęs nedideliu atstumu nuo elektrodo paviršiaus (iki 15–20 Å).¹⁴¹

Iki šių dienų bioelektroninių prietaisų su redokso fermentais kūrimą apsunkina du pagrindiniai trūkumai: (i) nepakankamas tokių prietaisų stabilumas ir (ii) sunkiai valdomas ir neefektyvus EP procesas tarp fermento ir elektrodo.¹⁴² Šiam trūkumui spręsti gali būti atliekamos cheminės fermentų modifikacijos sustiprinančios jų surišimą su elektrodu. Modifikacijos, pavyzdžiui deglikozilinimas, ne tik sumažina izoliacinio oligosacharidų sluoksnio storį ir tokiu būdu palengvina substrato patekimą prie aktyvaus fermento centro, be ir sumažina atstumą tarp redokso centro ir elektrodo paviršiaus.¹⁴³

EP stiprinimui sukurtos kelios fermento elektroninio surišimo su elektrodu strategijos. Pirmoji, MEP pagrindu naudojant tirpius reakcijos terpėje laisvai judančius mediatorius. Tokia strategija taikoma pirmo ir antro tipo biojutikliuose (41 pav. A). Antroji, per polimerų matricoje tvirtai surištus mediatorius (41 pav. B) arba laidžias polimerų grandines (41 pav. C). Abu šie metodai naudojami antro tipo biojutikliuose. Trečio tipo biojutikliuose fermentas atiesiogiai adsorbuojamas elektrodo paviršiuje arba prijungiamas per tarpinį monosluoksnį (41 pav. D). Šiose, trečio tipo biokatalitinėse sistemose, vyksta TEP.



41 pav. (A) MEP vyksta per tirpius mediatorius, (B) per polimerų matricoje esančius redokso centrus, (C) per laidžius polimerus; (D) TEP per SAM (kairėje) ir tiesiogiai ant paviršiaus adsorbuoto baltymo (dešinėje). Adaptuota pagal ¹⁰.

Konstruojant TEP pagrindo biojutiklius fermentai pritvirtinami prie chemiškai modifikuoto elektrodo paviršiaus per SAM (savitvarkius monosluoksnius), tBLM (pakabinamas dvisluoksnes lipidines membranas), laidžius polimerus, grafeną ir įvairius nanodarinius, tokius kaip anglies ar aukso nanodalelės.¹⁴² Per tokį „minkštą“ sluoksnį pritvirtinti fermentai nedematūruoja, tampa įmanoma valdyti molekulių koncentraciją ir orientaciją, taip pat ir elektroninę sąveiką tarp paviršiaus ir aktyvaus centro. Greitesnei EP tarp fermento ir elektrodo, SAM sudaryti iš π elektronines orbitales turinčių aromatinių molekulių yra pranašesni už alifatinius.¹⁴⁴

Ant nanostruktūruotų paviršių adsorbuojasi didesni fermento kiekiai ir dėl to pasiekiamos aukštesnės biokatalitinės srovės. Baltymai dažnai geba išlaikyti savo biologinį aktyvumą ant nanodalelių paviršiaus.^{145–147} Nanodalelės taip pat pasižymi optinėmis ir elektrinėmis savybėmis, kurios sukuria galimybę tirti adsorbuotus fermentus SERS metodu.

Atstumas tarp aktyvaus fermento centro ir elektrodo paviršiaus yra vienas iš pagrindinių veiksnių ribojančių TEP kinetiką. Dick *et al.*¹⁴⁸ tyrė sidabro paviršiuje per SAM pritvirtinto ferro-citochromo aktyvumo priklausomybę nuo atstumo tarp elektrodo ir aktyvaus centro, keisdamas SAM grandinės ilgį. Fermento adsorbcija ir orientacija buvo užtikrinta SAM molekulių galine karboksilo grupe. Tiesiškai didėjant SAM molekulių ilgiui EP greičio konstanta mažėja eksponentiškai.¹⁴⁸ EP greitis taip pat priklauso ir nuo SAM molekulių cheminės sudėties, įsiterpiančių funkcinių grupių ir galinės grupės.

7.2. Spektroskopiniai baltymų struktūros ir funkcionalumo tyrimai

Infraraudonosios sugerties spektroskopija yra pagrindinis tyrimo metodas baltymų antrinės struktūros, konformacinių pakitimų ir tarpmolekulinių sąveikų nustatymui.¹⁴⁹ Ramano spektroskopija, nors ir mažiau populiori

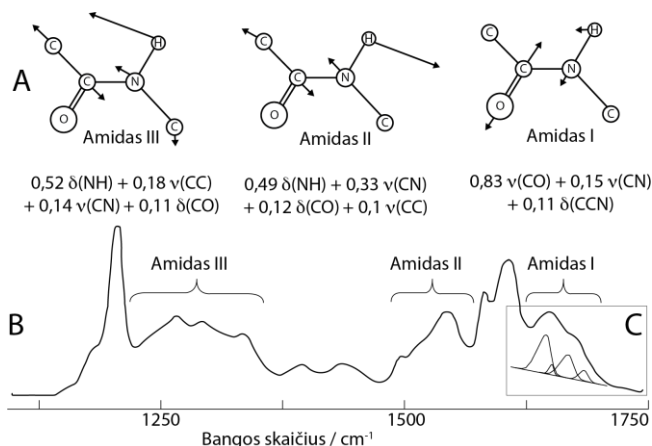
baltymų tyrimuose, suteikia panašios informacijos apie antrinę struktūrą, be to, ja galima selektyviai tirti skirtingus baltymo struktūros domenus. Pagrindiniai Ramano spektroskopijos pranašumai – silpnas vandens spektras ir galimybė registruoti rezonansinę Ramano sklaidą (RRS), kuri ne tik sustiprina silpną Ramano signalą 100–10000 kartų, bet ir leidžia selektyviai tirti atskirus baltymo struktūrinius domenus: (i) aromatinės aminorūgštis, (ii) pirminę ir antrinę baltymo struktūrą, (iii) kofaktorių ir aktyvų centrą.¹⁵⁰ Ši informacija leidžia daryti išvadas apie tretinę baltymo struktūrą.¹⁵¹ Trumpai apie kiekvieną iš šių dalių:

(i) **Aromatinių aminorūgščių (AAR)** fenilalanino (Phe), tirozino (Tyr), triptofano (Trp) ir histidino (His) žiedo elektroninis $\pi \rightarrow \pi^*$ sužadinimas vyksta UV (190–300 nm) srityje, todėl registruojant RRS spektrą UV srities lazeriais, matomos tik aromatinių aminorūgščių juostos. Šių juostų padėtis ir intensyvumas priklauso nuo baltymo struktūros ir AAR šoninių grupių būsenos, tokios kaip: protonavimas ar deprotonavimas, erdvinė konformacija, koordinacija su metalo jonais, aplinkos poliškumas ir hidrofobinės sąveikos, vandeniliniai ryšiai, katijonų ir π orbitalių sąveika.¹⁵²

AAR spektriniai žymenys yra vandenilinio ryšio, lokalsios aplinkos būsenos ir tarpmolekulinių sąveikų indikatoriai. Pavyzdžiui, Trp Fermi dupletas 1360/1340 cm^{-1} intensyvumų santykis susijęs su Trp indolo žiedo aplinkos hidrofobiškumu. Didesnis aplinkos hidrofobiškumas lemia didesnę santykio vertę.¹⁵³ Trp W3 juostos padėtis (ca. 1550 cm^{-1}) kinta dėl indolo žiedo pasisukimo peptidinio ryšio plokštumos atžvilgiu.¹⁵³ Tyr Fermi dupletas 850/830 cm^{-1} intensyvumų santykis parodo Tyr fenolio –OH grupės sudaromo vandenilinio ryšio stiprumą.¹⁵⁴ Spektriniai AAR žymenys atskleidžia dėl išorinių veiksnių baltymo molekulėje vykstančius sudėtingus procesus. Žymenys gali būti panaudoti baltymo konformaciniams pakitimams stebėti, pavyzdžiui natyvios baltymo formos susidarymui tirti kintant jo hidratacijos lygiui.¹⁵⁵

(ii) Spektrinės peptidinio ryšio juostos yra svarbiausi **antrinę baltymo struktūrą** nusakantys žymenys. Amidas-I (AI), amidas-II (AII) ir amidas-III (AIII) yra pagrindiniai plokštumoje vykstantys peptidinės grupės virpesiai (42 pav.). AI nesunkiai užregistruojamas Ramano spektre, tačiau selektyviai tirti amido grupės būtina taikyti RRS su UV srities lazeriais (UVR). UVR spektroskopijoje ženkliai sustiprėja AII juosta, kurios nerezonansinis spektras silpnas.^{30,156}

AI ryšys yra jautrus nedideliems baltymo molekulės geometrijos ir vandenilinio ryšio pakitimams. Jis naudojamas analizuojant antrinės baltymo struktūros elementų – α -spiralių ir β -klosčių, linkių ir netvarkių struktūrų –



42 pav. (A) Amidinės jungties virpesiai.³⁰ (B) Hemoglobino UVR spektras, λ_z – 197 nm.¹⁵⁶ (C) AI sritis išskaidyta Lorencio-Gauso komponentėmis.

santykinių pasiskirstymą (42 pav. C). AI juosta pasireiškiančią 1600–1700 cm^{-1} srityje sudaro valentinis $\nu(\text{C}=\text{O})$ virpesys (83 %) kartu su valentiniu $\nu(\text{CN})$ ir deformaciniu $\delta(\text{CCN})$ virpesiais. AI komponentų analizė parodo antrinių struktūros elementų santykinių pasiskirstymą. α -spiralės susidaro formuojantis vandeniliniams ryšiams tarp toje pačioje grandinėje esančių $\text{C}=\text{O}$ ir NH grupių ($-\text{C}=\text{O}\cdots\text{HN}-$), ši juosta spektre matoma ties ca. 1655 cm^{-1} . β -linkiai ir β -klostės palaikomi vandenilinių ryšių tarp gretimų polipeptidinių grandinių, jų AI juosta pasireiškia 1670–1680 cm^{-1} ir 1690 cm^{-1} ribose.¹⁴⁹ Pagrindinės AII ir AIII juostų dedamosios yra deformaciniai $\delta(\text{NH})$ virpesiai. Šių juostų padėtys spektre yra atitinkamai ties 1480–1580 cm^{-1} ir 1230–1300 cm^{-1} .¹⁵⁷

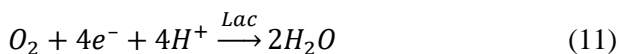
(iii) **Aktyvusis centras** atsakingas už katalitinę baltymo funkciją. Dalies fermentų funkcionalumui pakanka iš aminorūgščių sudaryto katalitinio centro, kitiems būtini neorganiniai jonai arba kompleksinės organinės ir metaloorganinės molekulės. Manoma, kad maždaug 25–33 % visų baltymų yra koordinuoti metalo jonais.¹⁵⁸ Koordinuoti metalo jonai sudaro katalitinę centrą arba dalyvauja elektronų pernašoje. Tokių koordinuotų metalo jonų pavyzdžiai: heminių baltymų geležies jonai, kurie koordinuojami porfirino grupe; varis mėlynuosiuose vario fermentuose koordinuotas aminorūgščių liekanomis. Dauguma aktyviųjų centrų fermentuose pasižymi chromoforinėmis savybėmis, todėl gali būti tiriami rezonansinės Ramano spektroskopijos (RRS) metodu.³⁰

RRS metodas suteikia unikalios informacijos apie aktyvaus centro struktūrą ir dinamiką. RRS yra suderinama su SERS, todėl pasižymi aukštu jautriu ir selektyvumu adsorbuotų biomolekulių aktyviems centrums. Vario mėlynujų baltymų, tarp jų ir lakazių, intensyvi (1300–1500 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)¹⁵⁹ elektroninės sugerties juosta ties 600 nm priklauso T1 centre esančio vario

cisteinato $S(\pi) \rightarrow Cu(II)$ krūvio pernešimui.¹⁶⁰ Nepaisant to, kad vario mėlynųjų baltymų T1 centre varis koordinuotas keliais pakaitais, rezonansiniame spektre matomi tik tie virpesiai, kurie susiję su Cu–S(Cys) ryšiu. Intensyvios juostos 250–500 cm^{-1} srityje priklauso Cu–S valentiniam virpesiui ir deformaciniams prie vario esančio cisteino Cu–S–C $_{\beta}$ –C $_{\alpha}$ –N srities virpesiams.¹¹⁷ Valentinio $\nu(Cu-S)$ virpesio dažnis yra jautrus indikatorius leidžiantis $\pm 0,05$ Å tikslumu nustatyti Cu–S ryšio ilgį.¹⁶² Šio virpesio dažnis taip pat suteikia svarbios informacijos apie pakaitų išsidėstymą: juostai esant 405–430 cm^{-1} srityje, geometrija yra plokščia-trigonalinė, 340–360 cm^{-1} – tetraedrinė, 300–320 cm^{-1} pakaitų išsidėstymas tetragonalus.¹⁶² Žinoma, kad skirtingų mėlynųjų vario baltymų vidutinis $\nu(Cu-S)$ virpesio dažnis koreliuoja su Cu²⁺ standartine redukcijos proceso entalpija (ΔH°) bei redokso potencialu (E°).¹⁶³

7.3. Lakazės struktūra ir funkcija

Mėlyniesiems vario baltymams priskiriamas fermentas lakazė (Lac, deguonies oksidoreduktazė, EC 1.10.3.2) yra sintetinamas vabzdžių, aukštesniųjų augalų, grybų ir bakterijų.¹⁶⁴ Lakazė yra glikoproteinas, kurio 10–45 % masės sudaro angliavandeniai.¹⁶⁴ Šis fermentas katalizuoja įvairių organinių (fenolių ir į juos panašių junginių) ir neorganinių molekulių oksidaciją, kartu keturiais elektronais redukuoja deguonį (O₂) į vandenį, nesudarydama tarpinių reaktyvių deguonies darinių (11 formulė).¹⁶⁵ Lakazės fermentas yra biokatodų dalis ir gali būti pritaikomas fermentiniuose biokuro elementuose ir implantuojamuose medicininiuose įrenginiuose.¹⁶⁶ Aukščiausias lakazių aktyvumas pasiekiamas silpnai rūgštinėse terpėse (pH 4–5), jas slopina halogenai – chlorido, fluorido jonai.¹⁶⁷

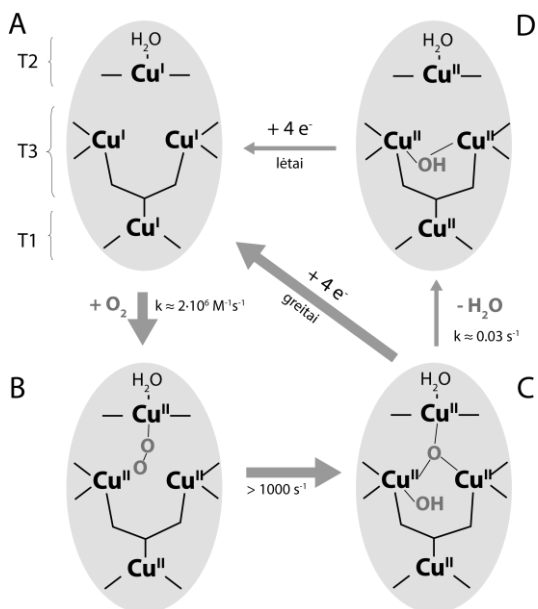


Nors vario centras visų lakazių fermentuose panašus, iš skirtingų šaltinių išskirtų fermentų termodinaminės ir kinetinės savybės skiriasi. Lakazės aktyvų centrą sudaro keturi vario jonai esantys trijuose skirtinguose centruose: T1, T2 ir T3. Vienas vario atomas sudaro T1 centrą, likę trys – T2 ir T3 centrus, formuojančius T2/T3 klasterį.¹⁶⁸ Katalitinis fermento aktyvumas priklauso nuo T1 vario centro redokso potencialo.¹⁶⁹ Priklausomai nuo fermento šaltinio, T1 centro redokso potencialo vertė yra tarp 430 mV ir 790 mV vandenilio elektrodo atžvilgiu (NHE). Pagal šio potencialo vertę

lakazės skirstomos į žemo, vidutinio ir aukšto.¹⁷⁰ Aukščiausią redokso potencialą – 780 mV, turi lakazės išskirtos iš grybų.¹⁷¹

Lakazės T1 centras sujungtas su T2/T3 klasteriu per aminorūgščių liekanas: T1-His-Cys-T2/T3.

Hidrofobinėje kišenėje esantis T1 centras prisijungia substratą ir jį oksiduoja. Vėliau vyksta vidumolekulinė EP į T2/T3 klasterį, kuriame deguonis redukuojamas į vandenį keturiais elektronais (11 formulė).¹⁷² 43 paveiksle pateikiama klasikinė lakazės heterogeninės deguonies redukcijos schema.^{164,173}

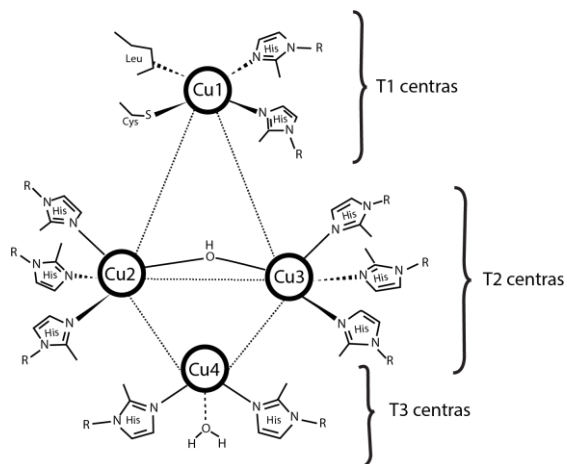


43 pav. Lakazės katalitinio ciklo schema. (A) Fermento katalitinis centras redukuotos būsenos. (B) Tarpinė būsena su peroksido tilteliu tarp T2 ir T3 centrų. (C) Tarpinė būsena. (D) Oksiduota būsena; fermentas nevykdo katalizės. Adaptuota pagal^{164,173}.

Heterogeninės katalizės metu mėlynųjų vario oksidazių T1 centras elektronus prisijungia pirmasis, todėl efektyviam deguonį redukuojančiam bioelektrodui sukurti stengiamasi suvaldyti fermento adsorbcijos geometriją taip, kad jo T1 centras būtų kuo arčiau laidaus paviršiaus. Viena iš strategijų yra prijungti ir orientuoti fermentus paviršiuje pasinaudojant į fermento substratą panašiais inkariniais junginiais. SAM-fermento susirišimas vyksta dėl hidrofobinės sąveikos arba dėl π - π orbitalių sanklodos tarp galinės inkarinių molekulių grupės ir T1 katalitinio centro.¹⁷⁴ Ši konstrukcija užtikrina ne tik fermento imobilizaciją paviršiuje bet ir tai, kad fermentas yra atsuktas į elektrodą T1 katalitiniu centru.

Visgi, vidumolekulinė EP tarp T1 ir T2/T3 klasterio yra limituojanti katalitinio proceso stadija lakazėse. Norint apeiti šią stadiją buvo pasiūlyta kita lakazės adsorbcijos strategija – fermento adsorbcija T2/T3 centrą nukreipiant į paviršių. Tokiu būdu T2/T3 centras tampa pirmuoju elektronų akceptoriumi iš paviršiaus ir limituojanti vidumolekulinė EP apeinama.^{175–179} Tačiau tik neseniai įrodyta, kad toks fermentinis elektrodas yra funkcionalus ir vykdo deguonies elektroredukciją.³²

Lakazės T1 centro vario atomas ekvatorinėse padėtyse yra koordinuotas cisteinu ir dviem histidiniais. Dar viena ašinė pozicija yra kintanti, dažniausiai ją užima fenilalaninas arba leucinas. Manoma, kad aminorūgštis ašinėje pozicijoje nulemia T1 katalitinį aktyvumą (44 pav.).¹⁸⁰ Spalvą lakazėms suteikia T1



centras, kurio pagrindinės **44 pav.** Lakazės T1, T2 ir T3 vario centrai. Adaptuota pagal¹⁸⁰

elektroninės sugerties juostos maksimumo yra ties 600 nm, dėl to galima selektyvi T1 centro analizė rezonansine Ramano spektroskopija. T2 vario centras koordinuojamas dviem histidiniais ir yra bespalvis. T2 yra nedaug nutolęs nuo T3 centro. T3 sudaro du vario atomai koordinuojami šešiais histidiniais, jis pasižymi silpna sugertimi ultravioletinėje (UV) srityje.^{180,181} Vario mėlynųjų baltymų elektrodų efektyvumas pakankamai aukštas, siekia mA/cm² ribą, jis ribojamas deguonies difuzijos greičiu ties elektrodu.¹⁶⁷

7.4. Apibendrinimas

Elektronų pernaša yra pagrindinė energijos mainų reakcija vykstanti biologinėse ir dirbtinėse sistemose, tokiose kaip biokuro elementai ir biojutikliai. Efektyviai EP heterogeninėse sistemose užtikrinti yra svarbus tinkamas elektrodo ir fermento elektroninis susietumas. Literatūros apžvalgos dalyje aprašomos baltymų imobilizavimo paviršiuje strategijos, nagrinėjama, kokia informacija gaunama apie paviršiuje adsorbuotus baltymus virpesinės spektroskopijos metodais. Paskutinė apžvalgos dalis skirta lakazei (deguonies oksidoreduktazių šeimos fermentui), kuri vykdo deguonies elektroredukciją, kartu oksiduodama organines molekules. Šios klasės fermentai atlieka katodo funkciją biojutikliuose ir kuro elementuose.

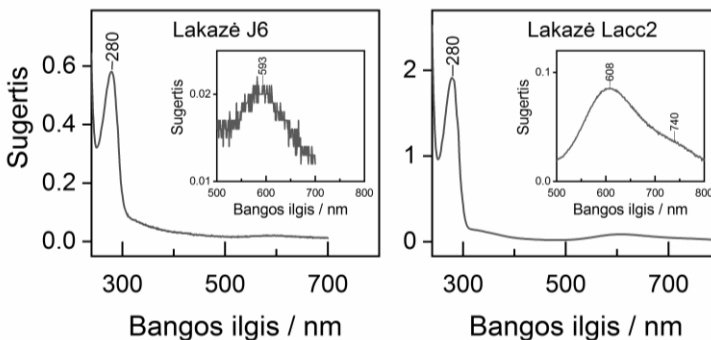
Rezultatų aptarimo dalyje nagrinėjama lakazės struktūra elektrodo paviršiuje. Dėl adsorbcijos vykstantys baltymo struktūros pakitimai ir išorinis elektrinis laukas veikia fermento katalitinį aktyvumą. Lakazių struktūros pokyčius ir orientaciją ant elektrodo paviršiaus statiniame elektriniame lauke tyrėme molekulių struktūrai jautriu SERS metodu *in-situ*.

8. Rezultatai ir jų aptarimas

8.1. Lakazės adsorbicija ant elektrodo

Molekulių struktūra ir funkcija yra glaudžiai susijusios, todėl kuriant fermentinius elektrinius prietaisus svarbu suprasti, kaip potencialas veikia elektrodo paviršiuje imobilizuotas biomolekules ir jų funkcionalumą. Šiame darbe tirtos lakazių, išskirtų iš *Didymocrea* (lakazė J6) ir *Trichaptum abietinum* (lakazė TaLc), struktūros fermentinių elektrodų paviršiuje. Ankstesniuose darbuose spektrofotometriškai buvo nustatytos šių fermentų katalitinės konstantos: lakazės J6 katalitinio T1 centro redokso potencialas yra 680 mV oksiduojant ABTS ir $K_4[Fe(CN)_6]$ substratus (pH 4,0). Fermento katalitinis aktyvumas siekia $k_{cat}=23,2\text{ s}^{-1}$, k_M vertė 2,0 ($\pm 0,2$) μM . Tuo tarpu TaLc lakazės T1 redokso potencialas yra 714 (± 12) mV oksiduojant $K_4[Mo(CN)_8]$ substratą (pH 4,0). Fermento katalitinis aktyvumas yra $k_{cat}=45\text{ s}^{-1}$, k_M vertė 46 (± 10) μM . k_{cat} ir k_M vertės apskaičiuoto pagal deguonies suvartojimą.¹⁸²

Fermento orientaciją paviršiuje valdo įvairūs veiksniai: krūvių pasiskirstymas baltymo globulės paviršiuje, tirpalo sudėtis, elektrinis laukas.¹⁷⁴ **Lakazė sp. J6** adsorbuota ant aukso nanodalelėmis dengto elektrodo esant skirtingoms potencialo vertėms: 200, 400, 600, 800, 1000 mV, NHE elektrodo atžvilgiu. Fermento koncentracija 2,79 $\mu\text{g/ml}$, inkubacijos trukmė – 30 min. Nustatyta, kad adsorbuojant fermentą esant 800 mV potencialui paviršiuje adsorbavosi mažesnis fermento kiekis, tačiau deguonies bioelektroredukcijos srovė buvo aukščiausia. Tolesniuose spektroelektrocheminiuose tyrimuose naudotas fermentinis J6 lakazės elektrodas ant kurio, fermentas adsorbuotas 800 mV elektrostatiiniu lauku.



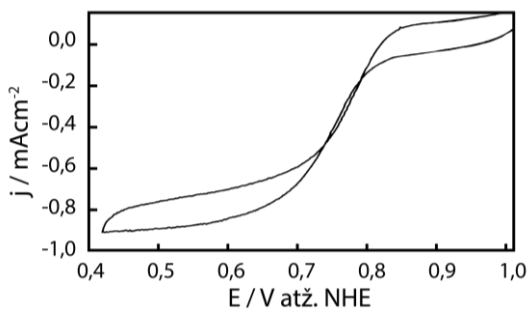
45 pav. J6 ir TaLc lakazių elektroninės sugerties UV/Vis spektrai. Įterptuose paveikluose priartinta 500–800 nm spektro sritis.

Lakazė TaLc iš *Trichaptum abietinum* adsorbuota ant šiurkštinto elektrodo paviršiaus netaikant elektrostatinio pritraukimo. 45 paveiksle pateikiama J6 ir TaLc fermentų UV/Vis sugerties spektrai, kuriuose matomos mėlyniesiems vario baltymams būdingos sugerties juostos raudonojoje spektro srityje. Sugerties juostų intensyvumai skiriasi dėl skirtingų fermento koncentracijų matavimo metu.

Lakazių T1 centro elektroninės sugerties maksimumas yra ties 600 nm, dėl to registruojant Ramano spektrą 785 nm lazeriu sužadinama prerezonansinė Ramano sklaida. Rezonansas trukdytų tinkamai įvertinti T1 centro padėtį, nes jam pasireiškiant būtų gautas T1 centro spektras nepriklausomai nuo jo atstumo iki paviršiaus. SERS signalo intensyvumas (I) yra priklausomas nuo tiriamos molekulės atstumo iki paviršiaus (r) pagal $I \sim r^{-10}$, dėl to tiriamam objektui tolstant nuo paviršiaus atitinkamos spektrinės juostos susilpnėja ir visai išnyksta.

8.2. Lakazės J6 SERS spektroskopija

Tirdami elektrodo paviršiuje adsorbuotą lakazę SERS metodu siekėme (i) nustatyti ar lakazė J6 adsorbavosi ant nanodalelėmis modifikuoto elektrodo, (ii) gauti informacijos apie specifinių baltymo aminorūgščių ir vario kompleksu būseną ir (iii) iširti potencialo poveikį adsorbuoto fermento struktūrai. Ciklinės voltamperometrijos matavimu nustatytas aukštas srovės tankis siekiantis 900 mAcm^{-2} esant $\text{pH}=4,0$ (46 pav.).

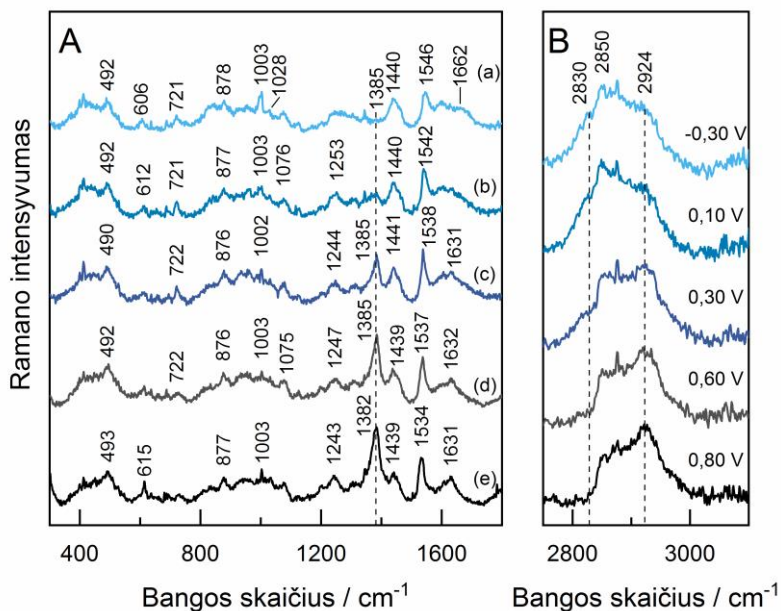


46 pav. Lakazės J6 elektrostatiškai adsorbuotos ant aukso nanodalelėmis dengto elektrodo katalitinis atsakas fosfatiniame tirpale, $\text{pH } 4,0$.³²

Elektrocheminiai SERS matavimai atlikti $0,05 \text{ M}$ fosfatiniame tirpale ($\text{pH } 5,4$). SERS sklaida žadinta diodinio lazerio generuojama 785 nm bangos ilgio spinduliuote, kurios galia apribota iki 30 mW . Virpesiniai spektrai registruoti esant $-0,30$ – $0,80 \text{ V}$ elektriniam potencialui vandenilio elektrodo (NHE) atžvilgiu.

Tai kad lakazė adsorbavosi ant AuND liudija juosta ties $1002\text{--}1003\text{ cm}^{-1}$, priskirta Phe žiedo virpesiui F12, AI (amidas-I) ties $1631\text{--}1662\text{ cm}^{-1}$ ir AIII (amidas-III) ties $1243\text{--}1253\text{ cm}^{-1}$ juostos. Plati deformacinio žirklinio CH_2 virpesio juosta pasireiškia ties $1439\text{--}1440\text{ cm}^{-1}$. CH_2/CH_3 grupių valentinės C–H juostos registruojamos aukšto dažnio srityje (47 pav., $2750\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$).

Visų mėlynujų vario baltymų molekulinė lakazių struktūra yra panaši.¹⁸³ Remiantis Rentgeno struktūrinės analizės metodu nustatytas lakazės išskirtos iš *Trametes versicolor* dydis – $65 \times 55 \times 45\text{ Å}^3$, T1 centras lokalizuotas netoli



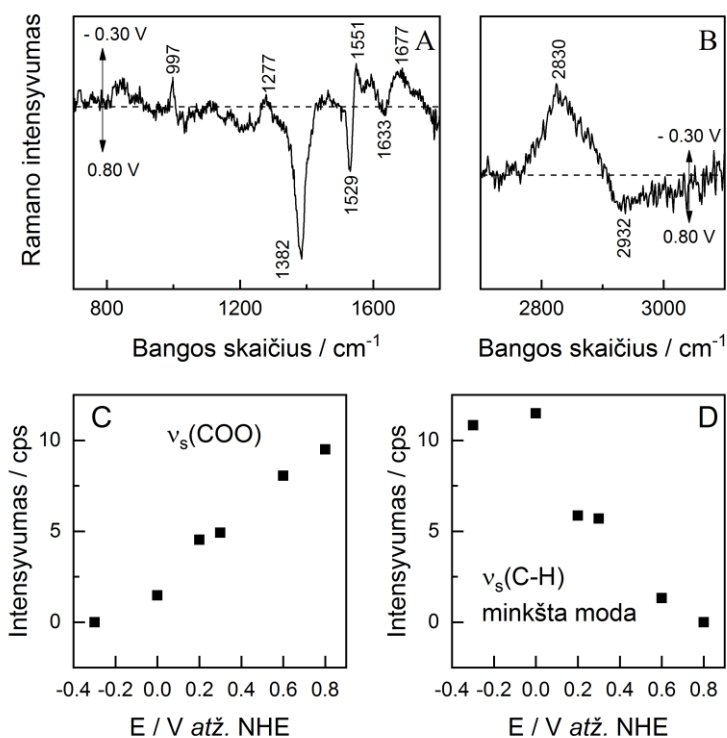
47 pav. (A) Lakazės adsorbuotos ant elektrodo padengto aukso nanodalelėmis SERS spektrai potencialo vertėms esant ties -0.30 (a), 0.10 (b), 0.30 (c), 0.60 (d) ir 0.80 V (e) standartinio vandenilio elektrodo atžvilgiu (atž. NHE) pirštų anspaudų ir (B) C–H valentinių virpesių srityse. Žadinimas 785 nm lazeriu (30 mW).

paviršiaus ($6,5\text{ Å}$), o T2/T3 centras paslėptas giliau nuo paviršiaus per 12 Å .¹⁸⁴ Tačiau, nepaisant gana negilios T1 centro lokalizacijos baltymo globulėje, mūsų tirtos lakazės paviršiaus spektre nepavyko užregistruoti tipinių T1 centro valentinių $\nu(\text{Cu-S})$ virpesių, paprastai randamų $388\text{--}494\text{ cm}^{-1}$ ribose.¹⁶⁵ Tai leidžia daryti prielaidą, kad T1 centras yra nutolęs nuo elektrodo paviršiaus. Tą patvirtina bendra autorių atlikti elektrocheminiai tyrimai ir matematiniai sistemos modeliavimas, parodęs, kad fermentas adsorbuotas elektrodo paviršiuje taip, kad T2/T3 yra pirmasis elektronus priimančias centras yra arčiau elektrodo paviršiaus nei T1 centras.³²

Disulfidų tilteliai susidarantys tarp dviejų cisteino aminorūgščių Cys-Cys, yra svarbūs elementai palaikantys baltymo tretinę struktūrą.¹⁸⁵

Spektroskopijoje disulfido juostos dingimas gali būti baltymo natyvios formos ir funkcijos praradimo indikatorius. Juosta ties 492 cm^{-1} priskiriama disulfidų tiltelio valentiniam $\nu(\text{S-S})$ virpesiui.¹⁸⁶ Disulfido tiltelis taip pat gali turėti ir $\nu(\text{C-S})$ virpesius, kurių energija priklauso nuo C-C-S-S-C-C dalies orientacijos: goš konformerų smailė randamas ties 606 cm^{-1} , o trans – ties 721 cm^{-1} (47 pav.). Disulfidų tiltelio juosta $\nu(\text{S-S})$ išliko visose tirtose potencialų ribose, tačiau didėjant teigiamoms potencialo vertėms susilpnėjo $\nu(\text{C-S})$ trans konformerų juostos intensyvumas ir pastebimai išaugo goš. Tai galima sieti su mažėjančiu atstumu tarp grandinių, kurias riša cisteinai baltymui įgaunant ištemptą formą.

Neigiamos juostos ties 1382 , 1529 ir 1633 cm^{-1} skirtuminio spektro pirštų antspaudų srityje (48 pav. A) rodo padidėjusį šių juostų intensyvumą esant teigiamai elektrodo polarizacijai. O juostų ties 997 , 1277 , 1551 ir 1677 cm^{-1}



48 pav. (A) Lakazės adsorbuotos ant AuND funkcionalizuoto elektrodo skirtuminis spektras pirštų antspaudų srityje ir (B) valtinių C-H virpesių srityje. Spektras gautas atėmus spektrą registruotą ties $0,80\text{ V}$ iš $-0,30\text{ V}$ spektrą. (C) Adsorbuotos aminorūgščių šoninių grandinių karboksilato grupių simetrinio valentinio CCO^- virpesio ties 1382 cm^{-1} intensyvumo priklausomybė nuo elektrodo potencialo ir (D) su metalu kontaktuojančios metileno C-H „minkštos“ modos ties 2830 cm^{-1} intensyvumo priklausomybė nuo elektrodo potencialo. Žadinimas 785 nm lazeriu (30 mW).

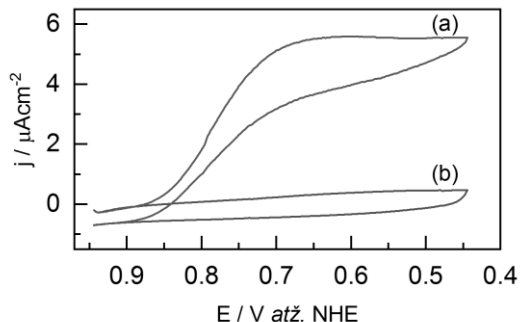
intensyvumas, esant labiau teigiamoms reikšmėms sumažėja. Intensyviausia juosta skirtuminiame spektre ties 1382 cm^{-1} priskirta valentiniam su metalo paviršiumi kontaktuojančių šoninių grandinių karboksilato grupės virpesiui.

Teigiamėjant potencialui spektrinės karboksilato juostos $\nu_s(\text{COO}^-)$ ties 1385 cm^{-1} intensyvumas išauga dėl stiprėjančios šių grupių sąveikos su metalo paviršiumi. Intensyvumo augimas ir poslinkis į mažesnių dažnių pusę (iš $1403\text{--}1413\text{ cm}^{-1}$ į $1383\text{--}1396\text{ cm}^{-1}$) siejamas su peptido adsorbicija ant elektrodo paviršiaus.^{187,188} Keičiant elektrinio potencialo vertę matomas C–H srities spektrinių juostų formos pokytis. Skirtuminiame SERS spektre (48 pav. B) ties 2830 cm^{-1} matoma plati „minkšta“ C–H virpesio moda, atsirandanti CH_2 grupei tiesiogiai sąveikaujant su metalo paviršiumi.¹⁸⁹ Šios modos intensyvumas mažėja potencialo vertei tampant labiau teigiamai.

Spektriniai $\nu_s(\text{COO}^-)$ ir $\nu(\text{C–H})$ žymenys atskleidžia fermento struktūros pokyčius elektriniame lauke. Esant neigiamoms potencialo vėrtėms baltymo struktūra yra labiau ištempta ir plokščia, tą rodo didesnis „minkštos“ modos spektrinis intensyvumas CH_2 grupės sąveikos su metalu metu. Elektriniam potencialui įgaunant teigiamas vertes baltymo forma išsitempia, jis tampa labiau statmenas paviršiaus atžvilgiu; sustiprėja baltymo sąveika su metalu per aminorūgščių šoninių grandinių karboksilo grupes. Dėl tokios molekulės formos metileno grupės nutolsta nuo metalo paviršiaus ir „minkštos“ modos intensyvumas sumažėja. Yra žinoma, kad fermentinis lakazės aktyvumas, adsorbavus ją ant elektrodo per galines karboksilato grupes, išlieka.¹⁹⁰

8.3. Lakazės TaLc SERS spektroskopija

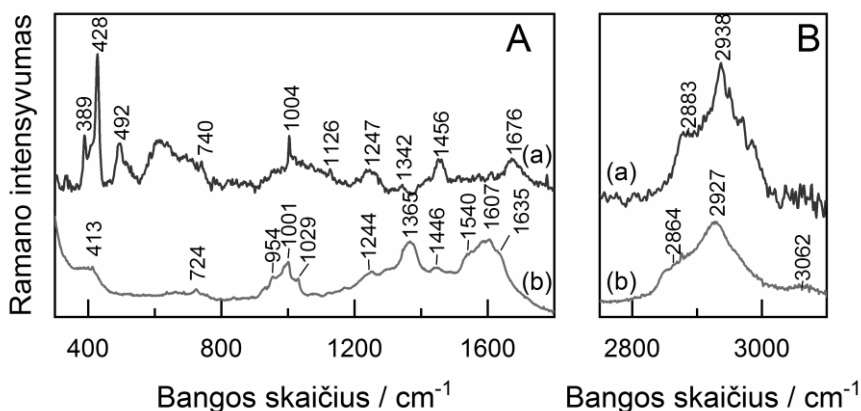
Lakazė TaLc išskirta iš *Trichaptum abietinum* yra priskiriama aukštą katalitinį potencialą turinčių lakazių grupei. Šiuose tyrimuose TaLc



49 pav. Katalitinis lakazės TaLc atsakas fosfatiniame tirpale (a) ir tirpale su pridėtu 20 mM NaF palyginamojo NHE elektrodo atžvilgiu.

adsorbuota ant elektrochemiškai šiuurkštinto aukso elektrodo. Po adsorbcijos atlikta ciklinė voltamperometrija 5 mV/s greičiu (i) fosfatiniame-citratiname buferiniame tirpale (pH=4,0) ir (ii) tame pačiame buferyje su pridėtu slopikliu 20 mM NaF (49 pav.). Neslopinama proceso srovės tankis – 5,6 μAcm^{-2} ties 0,58 V, o pridėjus NaF fermentas inkatyvuojamas. Fluoro jonai jungiasi prie lakazės T2/T3 centro ir slopina vidumolekulinę EP (elektronų pernašą) iš T1 į T2/T3, ir atitinkamai katalitinį fermento aktyvumą. Tai rodo, kad fermentinėje sistemoje elektronai yra pernešami iš elektrodo per T1 centrą į T2/T3 centrą, taigi fermento orientacija ant elektrodo paviršiaus yra tokia, kad pirmasis elektronus priimantis centras yra T1. Ši orientacija yra kitokia, nei elektrostatiškai adsorbuotos lakazės J6 atveju, kai fermentas į paviršių buvo atsuktas per T2/T3 centrą. Bioelektrokatalitinės lakazių J6 ir TaLc srovės ženkliai skiriasi (atitinkamai 900 ir 5,6 μAcm^{-2}) greičiausiai (i) dėl skirtingo fermentų kiekio adsorbuoto ant aukso nanodalelėmis dengto elektrodo ir elektrochemiškai šiuurkštinto elektrodo, (ii) dėl skirtingų fermentų aktyvumo (k_{cat}) konstantų ir TEP tarp fermento ir elektrodo (k_0) konstantų bei (iii) dėl specifinės J6 orientacijos, kuriai esant apeinama limituojanti vidumolekulinės EP reakcija.

Lakazės TaLc tirpalo (274 μM) Ramano spektre (50 pav. a) žemų energijų srityje matomos tipinės rezonansinės T1 vario centro $\nu(\text{Cu-S})$ juostos (389, 428 ir 492 cm^{-1}), tačiau šios juostos nebuvo užregistruotos paviršiaus spektre (50 pav. b). Lygindami Ramano ir SERS duomenis matome daugelio juostų parametrų pakitimus: AI juosta pasislenka iš 1676 į 1635 cm^{-1} , susilpnėja AIII juostos intensyvumas ir ji pasislenka per 3 cm^{-1} į 1244 cm^{-1} , padidėja Phe F12 piko pusplotis ir jis pasislenka į žemesnes energijas per $\Delta=-3 \text{ cm}^{-1}$ į 1001 cm^{-1}



50 pav. (A) Lakazės TaLc Ramano (a) ir SERS (b) spektrų palyginimas žemo dažnio ir (B) valentinių CH virpesių srityse. SERS spektras registruotas esant 0,70 V elektrodo poliarizacijai NHE atžvilgiu, pH=4,0. Ramano spektras registruotas 785 nm lazeriu, 100 mW, 3000 s; SERS spektras registruotas 785 nm lazeriu, 30 mW, 500 s.

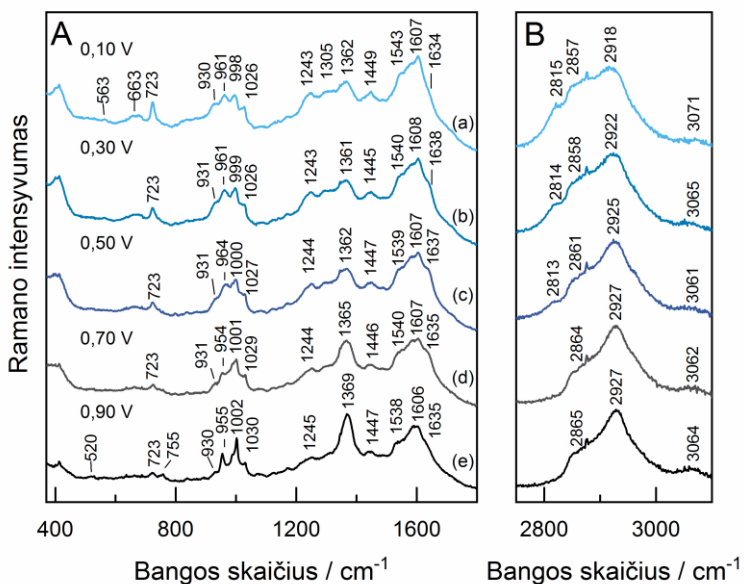
(lyginant su SERS spektru užregistruotu esant 0,70 V elektrodo potencialui). Valentinio COO⁻ grupės virpesio juosta (1365 cm⁻¹) išauga ir pasislenka į aukštesnius dažnius. Ryškūs energijos pokyčiai tolimojoje spektro dalyje (50 pav. B) – dėl adsorbcijos metileno simetrinis ir asimetrinis valentiniai virpesiai slenkasi per $\Delta = -19$ ir -11 cm⁻¹ į mažesnių energijų pusę. Šie spektriniai žymenys rodo, kad dėl sąveikos su elektrodo paviršiumi baltymo struktūra pakinta, tačiau, kaip buvo parodyta elektrocheminiu atsaku ties 0,70 V (49 pav.), šie struktūros pakitimai nesutrikdo fermento katalitinio aktyvumo.

SERS matavimai atlikti su elektrochemiškai šiurkštintu aukso elektrodu. 51 paveiksle pateikiami TaLc paviršiaus spektrai ties 0,10, 0,30, 0,50, 0,70 ir 0,90 V elektrodo poliarizacija rodo negrįžtamą fermento adsorbciją ant aukso elektrodo paviršiaus šiose potencialų ribose. SERS spektruose nebuvo užregistruotos charakteringos žemo dažnio T1 vario centro virpesinės juostos. Tai gali būti susiję su specifine adsorbuoto baltymo geometrija, kuomet T1 vario centras yra nutolęs nuo metalo paviršiaus.

SERS spektrai (51 pav.) rodo baltymo struktūros priklausomybę nuo elektrinio lauko prie elektrodo paviršiaus. Keičiant potencialą į teigiamą pusę silpsta ir galiausiai beveik išnyksta cisteino trans konformacijos S–C grupės valentinio $\nu(\text{S}-\text{C})_{\text{T}}$ virpesio juosta ties 723 cm⁻¹, taip pat išryškėja ir į aukštesnius dažnius pasislenka Phe F12 ir F18a juostos (1002 ir 1030 cm⁻¹). Didėjantis aukšto dažnio (3064 cm⁻¹) valentinio $=\text{C}-\text{H}$ virpesio intensyvumas rodo, kad Phe pereina iš gulsčios orientacijos paviršiaus atžvilgiu į labiau statmeną. Išauga juosta ties 1362–1369 cm⁻¹, priskiriama valentiniam COO⁻ grupės virpesiui.

Antrinės baltymo struktūros pokyčius sunku įvertinti, nes pagrindinė amido AI juosta yra užgožiama kitų pikų ir matoma tik kaip neišraiškingas petys ties 1635 cm⁻¹. Tačiau, AIII juostos rodo vyraujančią β -klosčių struktūrą (1243–1245 cm⁻¹) su mažesniu α -spiralių kiekiu (1305 cm⁻¹).¹⁵¹ Tai patvirtina kitos lakazės, išskirtos iš *Trametes Versicolor*, struktūrinės Rentgeno analizės duomenys, rodantys, kad vyraujanti β -klosčių struktūra – joje dalyvauja 37 % visų aminorūgščių, o α -spiralių struktūroje – 11 %.¹⁸⁴ Nors mėlynieji vario baltymai pasižymi labai panašia struktūra, tikėtina, kad TaLc antrinės struktūros elementų santykis gali šiek tiek skirtis nuo *T. Versicolor*.

β -klosčių struktūros juostos ties 1243–1245 cm⁻¹ intensyvumas keičiant potencialą iš 0,10 į 0,90 V sumažėja iš 45,5 į 21,7. Elektrodo poliarizacija aukštesniu teigiamu potencialu padidina atstumą tarp šių struktūrų ir paviršiaus.



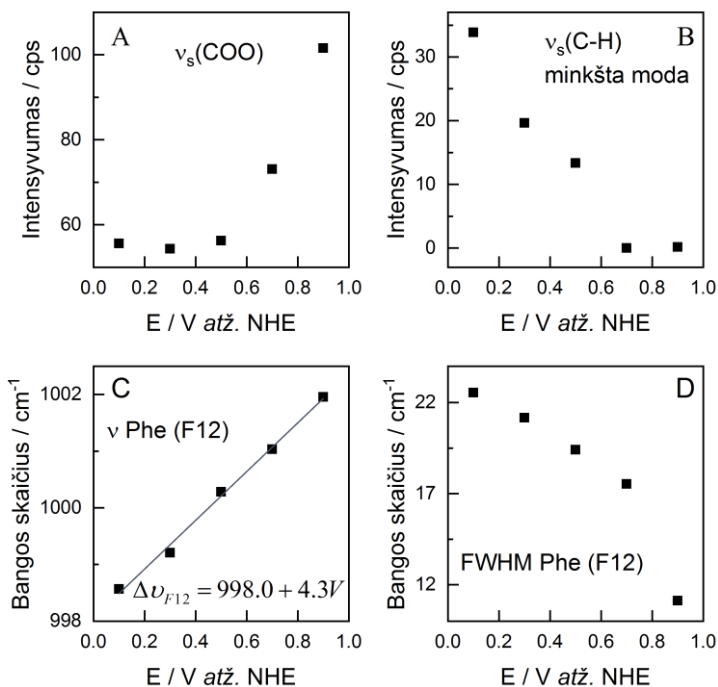
51 pav. (A) Lakazės TaLc ant aukso elektrodo SERS spektrai žemo dažnio ir (B) valentinių CH virpesių srityse. Potencialo vertės: 0,10 (a), 0,30 (b), 0,50 (c), 0,70 (d) ir 0,90 V (e) atž. NHE.

Tolimojoje spektrų srityje pastebimas simetrinio ir asimetrinio metileno grupės virpesių energijos padidėjimas prie labiausiai teigiamų potencialo verčių. Užregistruotas $\Delta=8$ ir 9 cm^{-1} padidėjimas lyginant spektrus tarp 0,10 ir 0,90 V simetriniam ir asimetriniam virpesiams.

Baltymo struktūra paviršiuje atskleidžiama per valentinės COO^- grupės virpesio ir „minkštos“ C–H modos intensyvumų pokyčius, kurie 52 paveikslo A ir B dalyse nagrinėjami detaliau. Dėl teigiamos poliarizacijos potencialui įgaunant aukštesnes nei 0,50 V vertes sustiprėja COO^- grupės sąveika su paviršiumi ir išauga juostos intensyvumas. Tuo tarpu, „minkštos“ modos intensyvumas mažėja tiesiškai, o potencialui pasiekus 0,70 V, visiškai išnyksta. Panašios tendencijos užregistruotos J6 lakazei rodo bendrą šių fermentų atsaką į išorinį elektrinį lauką: poliarizuojant elektrodą teigiamai baltymas tolsta nuo paviršiaus, tačiau yra palaikomas cheminio ryšio tarp paviršiaus ir karboksilo grupių. Baltymui išsitempiančiam ir tolstant nuo elektrodo sumažėja C–H sąveika su paviršiumi. Elektrodą poliarizuojant neigiamai fermentas prisispaudžia prie paviršiaus ir ima su juo smarkiau sąveikauti per C–H grupes, o sąveika per COO^- sumažėja.

Phe F12 juostos dažnio mažėjimas ir juostos pusplėčio (FWHM) didėjimas (52 pav. C ir D), potencialui artėjant prie neigiamų verčių, yra susijęs su aromatinio žiedo π -orbitalių persiklojimu su elektrodu. Žiedui esant beveik lygiagrečios orientacijos paviršiaus atžvilgiu vyksta elektronų pernaša

iš elektrodo į anti-rišančias žiedo π -orbitales, tai mažina virpesių energiją.^{191,192} Pakeitus elektrodo poliarizaciją iš 0,90 į 0,10 V, F12 juosta slenkasi per $\Delta=-3,4 \text{ cm}^{-1}$ į žemesnės energijos pusę (998 cm^{-1}), be to ženkliai padidėja jos pusplotį iš $11,1 \text{ cm}^{-1}$ į $22,5 \text{ cm}^{-1}$. Visai kitokia tendencija užfiksuota J6 lakazei, kurios silpna Phe juosta liko nepakitusio dažnio visoje tirtoje potencialų srityje (47 pav.). Nagrinėdami TaLc tolimąją C–H virpesių sritį, matome nedidelį santykinio (aromatinis $\nu(\text{C-H})$, 3064 cm^{-1}) juostos intensyvumo padidėjimą ties teigiamomis reikšmėmis, kuris reiškia, kad Phe žiedas keičia savo orientaciją į labiau statmeną paviršiui.



52 pav. (A) Lakazės TaLc karboksilo rūgšties (ca. 1369 cm^{-1}) intensyvumo, (B) CH minkštos modos (ca. 2815 cm^{-1}), (C) Phe F12 modos padėties ir (D) pusplotio priklausomybė nuo potencialo, NHE atžvilgiu.

Iš šių duomenų matome, kad lakazė J6 adsorbuota ant nanodalelių su jų paviršiumi nesąveikauja per Phe žiedo delokalizuoatą π elektronų sistemą. Lakazės TaLc, kuri buvo imobilizuota ant šiuurkštinto aukso elektrodo, gana ženklūs Phe F12 modos spektriniai pokyčiai rodo, kad žiedas sąveikauja su paviršiumi ir yra jautrus elektrinio lauko pokyčiams: žiedo orientacija kinta ir darosi labiau statmenesnė elektrodo poliarizacijai tampant vis labiau teigiamai.^{192,193} Šie skirtumai tarp dviejų fermentų greičiausiai lemiami skirtingos baltymo adsorbcijos geometrijos.

9. Rezultatų apibendrinimas

Biokatodas iki šių dienų yra silpnoji biojutiklių ir kuro elementų dalis. Mažą biokatodo efektyvumą ir greitą inaktyvaciją lemia sudėtingi heterogeninės ir vidumolekulinės EP (elektronų pernašos) mechanizmai. Siekiant pagerinti biokatalitinio prietaiso veikimą, kritiškai svarbu suvaldyti TEP (tiesioginę elektronų pernašą), kuri pirmiausiai priklauso nuo atstumo tarp redokso centro ir elektrodo, ir nuo fermento orientacijos.

Mėlynųjų vario baltymų šeimai priklausanti lakazė (deguonies oksidoreduktazė) redukuoja deguonį ir kartu vykdo organinių molekulių oksidaciją. Šios klasės fermentai atlieka katodo funkciją biologinio pagrindo elektroninėse sistemose. Lakazių išskirtų iš *Didymocrea* (lakazė J6) ir *Trichaptum abietinum* (TaLc) struktūra ir orientacija ant elektrodo paviršiaus statiniame elektriniame lauke buvo tirta molekulių struktūrai jautriu SERS metodu *in-situ*.

Lakazė J6 buvo adsorbuota ant aukso nanodalelėmis dengto elektrodo, o lakazė TaLc ant elektrochemiškai šiurkštinto aukso elektrodo. SERS metodu siekėme (i) nustatyti ar lakazės adsorbavosi elektrodo paviršiuje, (ii) gauti informacijos apie specifinių baltymo aminorūgščių ir vario kompleksų būseną, (iii) ištirti potencialo poveikį adsorbuoto fermento struktūrai.

Nustatyta, kad lakazės fermentai išliko adsorbuoti $-0,30$ – $0,80$ V (J6) ir $0,10$ – $0,90$ V (TaLc) potencialo ribose atž. NHE. T1 vario centro $\nu(\text{Cu-S})$ virpesinės juostos nebuvo nustatytos nei viename paviršiaus spektre, o tai leidžia daryti prielaidą, kad šis centras nutolęs nuo paviršiaus. Phe juostos dažnio poslinkis per $\Delta = -3,4 \text{ cm}^{-1}$ ir juostos susiaurėjimas iš $22,5$ į $11,1 \text{ cm}^{-1}$ keičiant potencialą iš $0,10$ į $0,90$ V rodo, kad TaLc lakazės Phe tiesiogiai sąveikauja su paviršiumi. Tiriant J6 lakazę tokių pokyčių nepastebėta.

Valentinių aukšto dažnio metileno „minkštos“ modos $\nu(\text{C-H})$ ir karboksilato $\nu_s(\text{COO}^-)$ virpesio intensyvumo kitimai atskleidžia, kad ties labiau neigiamomis potencialo vertėmis baltymo struktūra yra ištempta ir plokščia, jis prisispaudęs prie paviršiaus. Esant teigiamoms potencialo vertėmis baltymo metileno grupės nutolsta nuo paviršiaus, tačiau sustiprėja karboksilato grupės virpesinė juosta. Šių persitvarkymų metu baltymo globulė tampa labiau statmena paviršiaus atžvilgiu.

IŠVADOS

1. SERS ir DFT skaičiavimais parodyta, kad merkaptoetanolis sąveikauja su aukso paviršiumi sudarydamas ne tik Au–S bet ir Au–O cheminį ryšį.

2. Adsorbuoto merkaptoetanolio trans/goš konformacijų santykis sumažėja iš 0,75 į 0,33 inkubuojant monosluoksnį vandenyje 72 val. Merkaptoetanolio goš konformacija yra palaikoma su aukso klasteriu susidaromo cheminio Au–O ryšio. Šio ryšio ilgis sutrumpėja per 4,95 pm susidarant vandeniliniam ryšiui tarp vandens molekulės ir merkaptoetanolio hidroksilo grupės.

3. WC14 molekulių alkilinės grandinės veikiamos vandens suformuoja molekulinis klasterius. Nustatytas šių molekulių klasterių formavimosi spektrinis žymuo – valentinis $\nu(\text{C–C})_{\text{T}}$ virpesys ties 1129 cm^{-1} .

4. Elektroda poliarizuojant neigiamai mažėja Au–S ryšio energija ir kartu aktyvacijos energija reikalinga molekulių persitvarkymui. Dėl to sustiprėja vandens poveikis hidrofobinėms inkarinių molekulių dalims ir jos pradeda formuoti molekulinis klasterius ant paviršiaus. Šis procesas turi neigiamą poveikį tBLM membranos vientisumui ir izoliacinėms savybėms, todėl mes siūlome membranos inkarinio sluoksnio kokybės žymenį – 1129 cm^{-1} juostą. Šios juostos atsiradimas ir stiprėjimas žymi tinkamumo formuoti tBLM praradimą.

5. Pirmą kartą užregistruotas virpesinis tBLM spektras *in-situ* vandeniniame tirpale. Nustatyti spektriniai membranos žymenys: juostos ties 717 ir 1655 cm^{-1} priskirtos DOPC molekulės $\nu(\text{N}^+(\text{CH}_3)_3)$ ir $\nu(\text{C=C})$ virpesiams. Spektriniai žymenys rodo, kad DOPC molekulės ties dvigubą jungtimi yra skystos būsenos.

6. J6 lakazė išskirta iš *Didymocrea sp.* negrįžtamai adsorbuojasi ant aukso nanodalelių $0,30\text{--}0,80 \text{ V}$ ribose ir TaLc lakazė išskirta iš *Trichaptum abietinum* negrįžtamai adsorbuojasi ant aukso elektrodo $0,10\text{--}0,90 \text{ V}$ ribose (atž. NHE). Nustatyti spektriniai žymenys rodantys fermentų sąveiką su paviršiumi: „minkšta“ C–H moda, fenilalanino žiedo F12 modos dažnis ir pusplotis, karboksilo grupės juostos intensyvumas.

7. SERS duomenimis neigiamėjant potencialui lakazių fermentai yra prispaudžiami prie paviršiaus. Stiprėjant fermento kontaktui su metalu išauga CH_2 grupių „minkštos“ modos ties $2815\text{--}2830\text{ cm}^{-1}$ intensyvumas bei silpnėja ir išnyksta šoninių aminorūgščių karboksilato juosta ties $1369\text{--}1382\text{ cm}^{-1}$. Elektroda poliarizuojant teigiamai fermentas atgauna pradinę struktūrą, mažėja jo kontaktas su paviršiumi per C–H grupes ir stiprėja sąveikos per aminorūgščių karboksilato grupes.

8. Nepriklausomai nuo fermento adsorbcijos sąlygų ir elektrodo poliarizacijos katalitinio T1 vario centro spektroskopinis žymuo nebuvo užregistruotas. Tai liudija, kad T1 vario centras yra nutolęs nuo elektrodo paviršiaus.

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

1. **Talaikis, M.**, Eicher-Lorka, O., Valincius, G., Niaura, G. Water-Induced Structural Changes in the Membrane-Anchoring Monolayers Revealed by Isotope-Edited SERS. *J. Phys. Chem. C*, *120* (39), 22489–22499 (2016).

2. Dagys, M., Laurynėnas, A., Ratautas, D., Kulys, J., Vidžiūnaitė, R., **Talaikis, M.**, Niaura, G., Marcinkevičienė, L., Meškys, R., Shleev, S. Oxygen Electroreduction Catalysed by Laccase Wired to Gold Nanoparticles via the Trinuclear Copper Cluster. *Energy Environ. Sci.*, *10* (2), 498–502 (2017).

3. **Talaikis, M.**, Valincius, G., Niaura, G. Potential-Induced Structural Alterations in the Tethered Bilayer Lipid Membrane-Anchoring Monolayers Revealed by Electrochemical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C*, *124* (35), 19033–19045 (2020).

KITOS PUBLIKACIJOS

4. Tamulis, A., Majauskaite, K., **Talaikis, M.**, Zborowski, K., Kairys, V. Acetylcholine Molecular Arrays Enable Quantum Information Processing. *Chem. Phys. Lett.*, *684*, 39–43 (2017).

5. Kausteklis, J., **Talaikis, M.**, Aleksa, V., Balevičius, V. Raman Spectroscopy Study of Water Confinement in Ionic Liquid 1-Butyl-3-Methylimidazolium Nitrate. *J. Mol. Liq.*, *271* (3), 747–755 (2018).

6. **Talaikis, M.**, Valldeperas, M., Matulaitienė, I., Borzova, J. L., Barauskas, J., Niaura, G., Nylander, T. On the Molecular Interactions in Lipid Bilayer–Water Assemblies of Different Curvatures. *J. Phys. Chem. B*, *123*, 2662–2672 (2019).

7. Valldeperas, M., **Talaikis, M.**, Dhayal, S. K., Velička, M., Barauskas, J., Niaura, G., Nylander, T. Encapsulation of Aspartic Protease in Nonlamellar Lipid Liquid Crystalline Phases. *Biophysical Journal*, *117* (5), 829–843 (2019).

8. Pavliukeviciene B., Zentelyte A., Jankunec M., Valiuliene G., **Talaikis M.**, Niaura G., Valincius G. Amyloid β oligomers inhibit growth of human cancer cells. *PLOS ONE*, *14* (9), e0221563 (2019).

9. Al-Ashouri, A., Magomedov, A., Roß, M., Jošt, M., **Talaikis, M.**, Chistiakova, G., Bertram, T., Márquez, J. A., Köhnen, E., Kasparavičius, E., Levenco, S., Gil-Escrig, L., Hages, C. J., Schlatmann, R., Rech, B., Malinauskas, T., Unold, T., Kaufmann, C. A., Korte, L., Niaura, G., Getautis, V., Albrecht, S. Conformal monolayer contacts with lossless interfaces for perovskite single junction and monolithic tandem solar cells. *Energy Environ. Sci.*, 12 (11), 3356–3369 (2019).

10. Vagner, M., Plausinaitiene, V., Lukose, R., Kersulis, S., **Talaikis, M.**, Knasiene, B., Stanionyte, S., Kubilius, V., Motiejutis, K., Saltyte, Z., Niaura, G., Naujalis, E., Zurauskiene, N. PI-MOCVD technology of (La, Sr)(Mn, Co)O₃: From epitaxial to nanostructured films. *Surf. Coat. Technol.*, 385, 125287 (2020).

11. Zdaniauskiene, A., Charkova, T., Ignatjev, I., Melvydas, V., Garjonyte, R., Matulaitiene, I., **Talaikis, M.**, Niaura, G. Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy for characterization of living yeast cells. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 240, 118560 (2020).

12. **Talaikis, M.**, Strazdaitė, S., Žiaunys, M., Niaura, G. Far-Off Resonance: Multiwavelength Raman Spectroscopy Probing Amide Bands of Amyloid-β-(37–42) Peptide. *Molecules*, 25 (3556), 1–11 (2020).

KONFERENCIJŲ MEDŽIAGA

1. Lietuvos Biochemikų draugijos XIII tarptautinė konferencija, 2014.

Talaikis, M., Mickevičius, M., Valinčius, G., Niaura, G., Water Induced Structural Changes in Tethered Membrane Anchoring Self-Assembled Monolayers Probed by SERS, Biochemistry Soc., 2015, Proceedings.

2. International Conference of Lithuanian Chemical Society “Chemistry and Chemical Technology 2015“.

Talaikis, M., Mickevičius, M., Valinčius, G., Niaura, G., Surface Enhanced Raman Spectroscopic Study of Water Induced Structural Changes in the Membrane Anchoring Self-Assembled Monolayers, Chemistry and Chemical Technology, 2015, Proceedings, p 49–52.

3. Open Readings, 2015.

Talaikis, M., Mickevičius, M., Valinčius, G., Niaura, G., Density Functional Theory and Surface Enhanced Raman Scattering Study of

Structural Properties of Membrane Anchoring Self-Assembled Monolayers, Open Readings, 2015, Proceedings, p 109.

4. 41-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija (LNFK), 2015.

Talaikis, M., Mickevičius, M., Valinčius, G., Niaura, G., Vandens sukelti membranas sudarančių savitvarkius monosluoksnius formuojančių junginių struktūros pokyčiai: tyrimas paviršiaus sustiprintos Ramano spektroskopijos ir kvantinės chemijos skaičiavimų metodais, 41-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija, 2015, Proceedings, p 280.

5. 40th Congress of the Federation of the European Biochemical Societies (FEBS), 2015. Talaikis, M., Mickevičius, M., Rakovska, B., Valinčius, G., Niaura, G., Water and Electrode Potential Effect on The Structure and Function of Tethered Bilayer Membranes Probed by Vibrational Spectroscopy, FEBS (Berlin), 2015.

6. International Conference of Lithuanian Chemical Society Chemistry “Chemistry and Chemical Technology 2016“.

Talaikis, M., Rakovska, B., Niaura, G., FTIR Characterization of Amyloids. wISBN 978-609-95511-3-5.

7. Open Readings, 2019.

Martynas Talaikis, Maria Valdeperas, Ieva Matulaitienė, Jekaterina Latynis Borzova, Justas Barauskas, Gediminas Niaura, Tommy Nylander, On the Molecular Interactions in Lipid Bilayer-Water Assemblies of Different Curvature.

TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĄ

Martynas Talaikis

Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras

Saulėtekio al. 7, LT-10257 Vilnius, Lithuania,

El. paštas: martynas.talaikis@gmc.vu.lt

Išsilavinimas:

2009–2011 bioinžinerijos magistras, Vilniaus Gedimino technikos universitetas;

2005–2009 bioinžinerijos bakalauras, Vilniaus Gedimino technikos universitetas.

Darbinė patirtis:

Nuo 2020 dalyvauja Lietuvos mokslo tarybos finansuojamame aukšto lygio MTEP projekte “Magneto-plazmoninės nanodalelės biologinių paviršių SERS analizei (SM-ARTSERS)” (01.2.2-LMT-K-718-03-0078);

Nuo 2018 dalyvauja ES fondų finansuojamame projekte “Perovskitinių saulės elementų stabilumas: degradacijos vyksmų identifikavimas ir valdymas” (Nr.09.3.3-LMT-K-712-01-0031);

2013–2015 dalyvavo ES fondų finansuojamame projekte ”Miniatiurizuoti fosfolipidiniai biojutikliai- ‘MiniFOB’” (VP1-3.1-ŠMM-10-V-02-024);

Nuo 2015 – biochemikas tyrėjas Biochemijos institute.

SUMMARY

1. Introduction

Many of the vital processes that take place in living organisms occur at interfaces or surfaces. These processes include adsorption of biomolecules and their lateral diffusion, phase transition, catalysis, oxidation, electron transfer, to name a few.¹ At the cell level, these processes occur near the phospholipid membrane that encloses the inner parts of the cell and organelles. The phospholipid membranes are complex structures that insulate the cell's inner content, incorporate transmembrane proteins, participate in selective transport of substances, and signal transduction. The biological relevance and various related malfunctions have propelled the research of the membranes. However, because of high complexity and diverse composition, a more simplistic approach was in search, which led to the development of model membranes. Among various model membranes, tethered bilayer lipid membranes (tBLM) emerged as the most promising architecture reliable mimicking the real biological membranes.

To construct the tBLM, a lipid bilayer is suspended in nanometer distance from the surface through an anchoring monolayer (SAM), ensuring the formation of polar submembrane space. This space is needed to accommodate the outer domains of membrane-incorporated proteins.

Anchor molecules, that comprise SAM, usually consist of (i) surface-active moiety, (ii) hydrophilic domain, and (iii) hydrophobic acyl chains. The structure of anchor molecules is specifically designed to support tBLM in nanometer distance from the solid and form the submembrane reservoir. Because of the tight association of two entities, the quality of tBLM is highly dependent on the structure of the underlying SAM

In this study, the influence of water and electrochemical potential on the structure of anchoring monolayer is tested. Water is a fundamental component that maintains the biological function of lipid membranes and incorporated proteins and provides a medium for electrochemical measurements of the system. Electrochemical methods are routinely used to investigate the lipid membranes and provide information on their integrity, defect population, and distribution, the electrical capacitance of the lipid layer, and the submembrane reservoir.

In this study, we also investigated the structure dependence of electrode surface-adsorbed redox enzymes on electrochemical potential. The ability to orient enzymes on a conductive surface is of great importance for the construction of biosensors and biofuel cells. In such catalytic systems, the

biocathode is typically formed from blue multicopper oxidases (MCO), *e.g.* laccases. The limiting phase in MCO cathodes involves heterogeneous and intermolecular electron transfer. It was shown previously, that the limiting phase in such systems could be bypassed by adopting the specific enzyme orientation during the adsorption process.³² The appropriate orientation of surface adsorbed enzymes is essential to optimize their function.

To address surface-related questions, the surface-sensitive technique is needed. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) provides detailed information on bonding, structure, and orientation of adsorbed molecules with the ability to probe *in-situ* in a controlled electrochemical potential regime. In this work, we analyze changes in the structure of self-assembled monolayers composed from long-chain membrane tethering thiol (WC14) and small-molecular weight dilutor 2-mercaptoethanol (ME) as the function of (i) immersion time in water and (ii) the change of bias electrochemical potential. Further, we investigate the surface-orientation markers for J6 and TaLc laccases from *Didymocrea sp.* and *Trichaptum abietinum* and provide electrochemical-spectroscopy data on alterations in their structure, state of the catalytic copper site, and amino acids.

The work was accomplished by using Raman and temperature-Raman, SERS and electrochemical-SERS, isotope substitution, electrochemical desorption, quantum chemical calculation, and two-dimensional correlation spectroscopy techniques.

The aim of the work is to evaluate water and potential induced alterations in the tethered bilayer lipid membrane-anchoring monolayers and to assess the potential induced changes in electrode-surface adsorbed laccase enzymes.

The objectives of the work:

1. To form stable monolayers from WC14 and ME-D₄ molecules on a gold surface and assign vibrational bands;
2. To identify spectral bands that are sensitive to the structure and orientation of self-assembled monolayers composed from WC14 and ME-D₄;
3. To determine the alterations in the structure, orientation, and order of the self-assembled monolayers with respect to the immersion time in water and electrode potential;
4. To form the tethered bilayer lipid membrane (tBLM) and identify the spectral markers of tBLM's state by using SERS;
5. To determine the spectral markers that correspond to the adsorption of J6 laccase from *Didymocrea sp.* and TaLc laccase from *Trichaptum abietinum* on a gold electrode;

6. To evaluate the effect of electrochemical potential on the structure of electrode-adsorbed laccases, their catalytic copper sites, and amino acids based on SERS.

The novelty of the work

Membrane anchoring SAMs formed from long-chain WC14 and mercaptoethanol (ME-D₄) remain intact during the immersion in water. Based on SERS data along with the modeling of the surface complex by the means of density functional theory (DFT) method, we provide evidence for the interaction of mercaptoethanol in gauche conformation with Au surface through both S and O atoms. Calculations show that the length of Au–O bond shortens when an explicit water molecule is added to the model system. In the presence of water, the alkyl chains of WC14 molecules adopt extended all-trans conformation and form molecular surface clusters. The clustering process is evident spectroscopically by analysis of the C–C stretching band at 1129 cm⁻¹ of hydrocarbon chains in all-trans configuration.

Electrochemical-SERS data reveal reduced energy of metal-ligand bonds (Au–S, and Au–O) and reorganization of molecules at the head-group region at more negative electrode polarization. The head-group structural changes coupled with the effect of water on the hydrophobic chains of long-chain anchor molecules result in the formation of molecular clusters, evident from the emergence of 1129 cm⁻¹ band. Therefore, we propose that the 1129 cm⁻¹ band could serve as a new spectroscopic marker for potential-induced formation of phase-segregation clusters of the hydrophobic membrane anchors. The clustering phenomenon should be considered in the preparation of tBLMs, construction of membrane-based biosensors, bioengineering developments, and studies of biomolecular processes using model membranes. These results have important implications for the general use of tethered membranes in many biochemical applications.

For the first time, we show the direct spectroscopic evidence for the formation of lipid bilayer at mixed anchoring SAM. The analysis of the $\nu(\text{C}=\text{C})$ vibrational mode indicates that the structure of the lipid molecules near the olefin group is fluid-like. These findings can be used in the analysis and interpretation of the function of biosensors and biotechnological processes based on tBLM

SERS indicates irreversible adsorption of laccase enzymes onto a gold electrode with retained stability within a wide potential range. We found spectroscopic markers that identify the structure of adsorbed enzymes: the “soft” mode of C–H stretching, phenylalanine ring F12 vibration wavenumbers, and full width at half-maximum, and the intensity of

carboxylate vibration near 1380 cm^{-1} . Based on these spectral markers, the extended-flat configuration of an enzyme at the surface is determined at the more negative electrode polarization; while more vertical orientation, which is supported predominantly by the interaction of the carboxylate groups with metal, is found at more positive electrode polarization.

The spectroscopic results show that the characteristic modes of the T1 copper site of adsorbed laccases are not observed, pointing to the orientation of laccases in which the T1 center is positioned further away from the substrate surface.

The defense statements of the work

1. Mercaptoethanol molecules attach to the surface not only by forming the Au–S bond, but also the Au–O bond. DFT calculations with added explicit H_2O molecule revealed considerable shortening of Au–O bond for surface coordinated gauche conformer.

2. During incubation of anchor monolayer in the water, the relative amount of mercaptoethanol in gauche conformation increases, while the alkyl chains of WC14 molecules adopt extended all-trans conformation and form surface clusters.

3. Alkane chains of membrane anchoring WC14 molecules form potential-induced clusters at more negative electrode polarization in mixed monolayer.

4. SERS spectrum of tBLM is obtained for the first time. The state of tBLM membrane is fluid-like in the vicinity of the olefin group.

5. The laccase enzymes irreversibly adsorb on a gold surface and remain intact in the potential range of $-0.3\text{--}0.8\text{ V}$ for J6 and $0.1\text{--}0.9\text{ V}$ for TaLc vs. NHE.

6. The surface-adsorbed laccase enzymes tend to adopt a more flat configuration during the excursion towards more negative potentials, while at an increasingly positive potential more vertical orientation is obtained.

7. The adsorbed laccase enzymes are oriented on a surface in such a way, that the catalytic T1 copper site is positioned further from the electrode, as evidenced by the lack of vibrational spectroscopy markers for the T1 center.

List of publications

1. **Talaikis, M.**, Eicher-Lorka, O., Valincius, G., Niaura, G. Water-Induced Structural Changes in the Membrane-Anchoring Monolayers Revealed by Isotope-Edited SERS. *J. Phys. Chem. C*, 120 (39), 22489–22499 (2016).

2. Dagys, M., Laurynėnas, A., Ratautas, D., Kulys, J., Vidžiūnaitė, R., **Talaikis, M.**, Niaura, G., Marcinkevičienė, L., Meškys, R., Shleev, S. Oxygen Electroreduction Catalysed by Laccase Wired to Gold Nanoparticles via the Trinuclear Copper Cluster. *Energy Environ. Sci.*, 10 (2), 498–502 (2017).

3. **Talaikis, M.**, Valincius, G., Niaura, G. Potential-Induced Structural Alterations in the Tethered Bilayer Lipid Membrane-Anchoring Monolayers Revealed by Electrochemical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C*, 124 (35), 19033–19045 (2020).

2. Materials and methods

2.1. Materials

<i>Deionized water</i>	Milli-Q plus, USA, 18.2 MW·cm;
<i>Ethanol</i>	Vilniaus degtinė, Lithuania, 96%;
<i>Chloroform</i>	Sigma-Aldrich, Germany, 99%
<i>H₂SO₄</i>	Roth, Germany;
<i>NaOH,</i> <i>1-heptantiol,</i> <i>CHCl₃</i>	Sigma Aldrich, Germany;
<i>NaCl,</i> <i>NaH₂PO₄·H₂O,</i> <i>Na₂HPO₄·H₂O,</i> <i>Na₂SO₄,</i> <i>NaCl</i>	Fluka, Switzerland;
<i>ME-D₆</i> , (DC–C2D ₂ –C1D ₂ –OD)	C/D/N Isotopes, UK, 99.6%;
<i>DOPC</i> , (1,2-dioleoyl-sn-glycero- 3-phosphocholine), <i>Cholesterol</i>	Avanti Polar Lipids, USA;
<i>WC14</i> , (20-tetradecyloxy- 3,6,9,12,15,18,22- heptacontane-1-thiol)	The compound was synthesized by David J. Vanderah at NIST Chemical Science and Technology Laboratory, Gaithersburg, Maryland, USA according to a method detailed in ²⁹ ;
<i>Laccase J6</i> (from <i>Didymocrea</i>) <i>and</i> <i>Laccase TaLc</i> (from <i>Trichaptum abietinum</i>)	The enzymes were purified and kindly given by dr. Liucija Marcinkevičienė (Vilnius University Life Sciences Center, VU LSC). For the enzymatic electrode preparation, the author is grateful to dr. Dalius Ratautas and dr. Irina Bratkovskaja (VU LSC).

2.2. Raman measurements

2.2.1. Raman spectroscopy systems

LabRam HR 800 (Horiba, France) equipped with 532 and 785 nm lasers. The wavenumber axis was adjusted according to silicon's band at 520.7 cm^{-1} .

RamanFlex 400 (PerkinElmer, USA) equipped with a thermoelectrically cooled ($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$) CCD detector and 785 nm diode laser. The wavenumber axis was calibrated according to the spectrum of polystyrene (ASTM E 1840) and spectral intensities were calibrated according to the intensity standard SRM 2241 by NIST (National Institute of Standards and Technology, USA).

InVia (Renishaw, UK) with a thermoelectrically cooled CCD detector and 785 nm lasers. The wavenumber axis was adjusted according to silicon's band at 520.7 cm^{-1} .

2.2.2. Temperature-controlled Raman measurements

Temperature-controlled Raman measurements were performed using PE95/T95 (LinKam, UK) temperature control system with a temperature accuracy of $0.05\text{ }^{\circ}\text{C}$. Measurement of **WC14** was performed with LabRam HR 800 spectrometer at 293 and 243 K. Measurements of **DOPC** and **cholesterol** were performed with RamanFlex 400 spectrometer at 293 and 173 K.

2.2.3. Preparation of SERS substrates

Commercial SERS substrates. Commercial sapphire plates with laser-rippled surfaces were fabricated by "Altechna" (Vilnius) and subsequently coated with 2 nm Cr adhesion layer and 200 nm gold layer by the magnetron sputtering using the PVD75 (Kurt J. Lesker Company, USA) system. The ripple formation was described elsewhere.³¹

SERS electrode preparation. The Teflon press-fitted polycrystalline gold rod working electrode was polished with sandpaper (P2500) and $0.3\text{ }\mu\text{m Al}_2\text{O}_3$ slurry to refresh the surface and then sonicated in water-ethanol mixture (1:1, v/v). Further, five potential cycles between 0.00 and 2.00 V were performed in 0.5 M H_2SO_4 solution at 0.10 V/s speed, followed by ten cycles between 0.00 and 1.66 V. Then, the electrode was reduced in 0.1 M NaCl solution at -0.90 V for 10 min. Finally, the electrode was roughened in 0.1 M NaCl solution switching between oxidation (1.30 V) and reduction (-0.30 V) potentials and holding for 30 s at negative and 2 s at positive potentials. The procedure was finished after thirty oxidation-reduction cycles.

2.3. Adsorption of biomolecules

Self-assembled monolayer. SAMs were adsorbed either on commercial SERS substrates (for incubation in water experiment) or electrochemically roughened Au electrode (for potential-dependent SERS experiment). The adsorption solution contained a total of 0.2 mM of thiols, which included WC14, and/or ME-D₄ with molar fractions of 100:0, 70:30, 30:70, and 0:100.

Tethered bilayer lipid membranes. To form tBLM a multilamellar vesicle fusion (MLV) was done according to the method detailed in ³³ publication. Briefly, equal molar parts (50:50 mol. %) of DOPC and cholesterol were dissolved in chloroform to form a 10 mM lipid solution. The chloroform was evaporated under a gentle nitrogen stream and the remaining lipid film was resuspended in phosphate solution (0.05 M + 0.1 M Na₂SO₄, pH 4.7, deoxygenated by N₂) to a final MLV solution containing 1 mM of lipids. MLV solution was placed and immobilized for 20 min on a roughened gold electrode which was pre-adsorbed with mixed WC14/ME-D₄ (30/70 mol:mol) SAM. The SAM was prepared as described previously. Then gold-SAM-tBLM electrode was rinsed with a copious amount of phosphate solution to remove lipid overlayers without allowing the surface to dry.

Enzymes. Preparations of the enzymatic laccase J6 and TaLc electrodes were done by dr. Dalius Ratautas and dr. Irina Bratkovskaja (Vilnius University, Life Sciences Center). (i) Laccase J6 from *Didymocrea sp.* was adsorbed under 0.80 V potential on the gold nanoparticles covered working electrode. (ii) Electroless adsorption of the laccase TaLc from *Trichaptum abietinum* was carried out on a roughened gold electrode.

2.4. Desorption of SAMs

The desorption of mixed, ME-D₄, WC14, and model compound HPT monolayers from the roughened gold electrode were carried out in the alkaline solution of 0.5 M NaOH + 0.1 M Na₂SO₄ in scanning potential regime at a sweep rate of 50 mV/s.

2.5. SERS measurement details

Water induced changes in SAMs. Water induced changes in anchor SAMs were studied using InVia Raman microscope equipped with 785 nm laser which power at the sample was restricted to 5 mW. The integration time was 100 s. Raman spectra were taken using long working distance 50×/0.5

NA (Leica, Germany) objective lens. To reduce photo- and thermal-degradation of the sample, the probe holder was constantly moved with respect to the laser beam at a rate of 15-25 mm/s.^{35,36} Raman measurements were taken at 5 min, 30 min, 60 min, 24 hr., 48 hr., and 72 hr. timestamps of SAMs' incubation in water.

Spectroelectrochemical measurements of SAMs and adsorbed enzymes. Spectroelectrochemical experiments of SAMs and electrode adsorbed enzymes were conducted in three-electrode cell, that was constantly bubbled with ultra-pure N₂ gas to remove residual oxygen traces from solution. The Teflon press-fitted polycrystalline gold rod served as a working electrode. The platinum wire and Ag/AgCl electrodes were used as the counter and reference electrodes. During the measurements, the cell was constantly moved in a direction perpendicular to the laser radiation as described previously. Spectra were collected from the working electrode at determined potentials. Before each measurement, the electrode was held at the selected potential for 60 s, which was followed by the spectral acquisition of 300 s.

2.6. Theoretical modeling

Theoretical modeling was performed using Gaussian 09 distribution for Windows. Geometry optimization and frequency calculations were completed with the DFT method using B3LYP functional. Calculations were performed using 6-311++G(d,p) basis set for C, S, O, and H atoms and LANL2DZ with ECP for Au atoms. The surface was represented by the Au₁₀ gold cluster. Calculated frequencies and intensities were scaled according to the procedure described previously.¹³⁰

2.7. Data handling

Position, intensity, and FWHM of spectral bands were acquired by fitting the experimental spectra with a Gaussian/Lorentzian shape curves using GRAMS/AI 8.0 (Thermo Electron. Corp.). Measurements were repeated three times and presented as mean \pm standard deviation (SD).

3. Results and discussion

3.1. Water induced changes in membrane anchoring self-assembled monolayer

3.1.1 Assignment of ME-D₄ and WC14 bands

The anchoring monolayer of the tBLM typically consists of long-chain thiols such as WC14 and small molecular weight surface backfiller 2-mercaptoethanol (ME). Here, avoiding spectral interference with WC14, a fully deuterated ME was used. However, in the presence of water ME interchanges its hydrogens/deuterons near the O and S with the ones from the solvent, resulting in HS-CD₂-CD₂-OH (ME-D₄). To clarify the assignments of the SERS bands the quantum chemical calculations were performed for the ME-D₄ and Au₁₀-ME-D₄ surface clusters in gauche and trans conformations (figure 1).

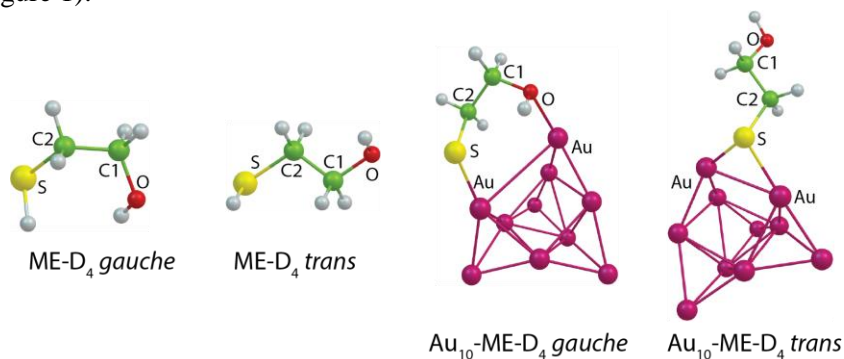


Figure 1. Structures of ME-D₄ and surface model complexes Au₁₀-ME-D₄ in gauche and trans conformations.

The adsorption of ME-D₄ at the gold surface is evident from a couple of changes in vibrational spectra (figure 2A). First, the high-energy feature at 2585 cm⁻¹ disappears from the surface spectrum indicating the cleavage of the S-H bond. Second, the intense and broad band assigned to the stretching vibrations of a metal-ligand complex appears at 274–303 cm⁻¹. We associate this band with the dominant Au-S stretch contribution. However, previous studies and our theoretical modeling suggest that the oxygen atom also binds to the surface and forms the Au-O bond for ME-D₄ in gauche conformation.^{34,36,112}

The prevailing conformation for ME-D₄ in an S-C moiety in both solution and surface spectra is gauche. However, the analysis of integrated intensities revealed an increase in trans to gauche ratio, A_T/A_G , from 0.25 for solution

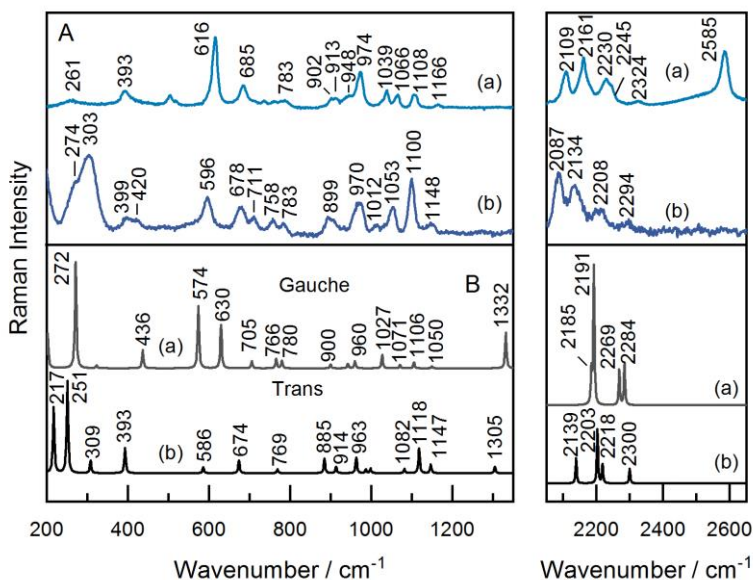


Figure 2. (A) Comparison of Raman spectrum of ME-D₄ (0.5 M aqueous solution) (a) and SERS spectrum of Au adsorbed ME-D₄ after incubation in water for 1 h (b). (B) Calculated spectra of Au₁₀-ME-D₄ complexes in gauche (a) and trans (b) conformations.

ME-D₄ to 0.62 for the Au-ME-D₄ complex. Both gauche and trans bands of the solution spectrum were found to downshift from 616 and 685 cm⁻¹ to 596 and 678 cm⁻¹ due to adsorption. This downshift was explained by the surface-induced withdrawal of electron density from S-C bond and metal mass effect.^{88,113}

The intense 974 cm⁻¹ band in the solution spectrum is associated with $\nu(\text{C}-\text{O})$ vibrational mode coupled with $t(\text{C1D}_2)$ and $t(\text{C2D}_2)$. The 1108 and 1066 cm⁻¹ bands contain a contribution from the scissoring vibration of CD₂ and the $\delta(\text{OH})$. The asymmetric stretching and deformation bands of the C2-C1-O backbone is found at 1166 and 393 cm⁻¹. Two well-defined bands in high-frequency region at 2109 and 2161 cm⁻¹ belong to $\nu_s(\text{C1D}_2)$ and $\nu_s(\text{C2D}_2)$. Table 1 compares the calculated bond lengths for gauche and trans conformers and surface-bound complexes. Higher $\nu(\text{C}-\text{S})_T$ frequency compared with $\nu(\text{C}-\text{S})_G$ corresponds well with the shorter C-S bond of the trans ME-D₄ conformer. Bond formation between the molecule and the Au cluster increases the length of the C-S bond for both studied conformers. Similarly, the formation of the Au-O covalent bond increases the C-O bond length. Thus, a redshift is expected for the corresponding stretching vibrational mode for a gauche conformer coordinating with the surface through both S and O atoms.

Table 1. Calculated bond lengths (pm) of gauche and trans conformers of ME-D₄ and surface complexes Au₁₀⁻-ME-D₄ and Au₁₀⁻-ME-D₄··H₂O.

Bond	ME-D ₄ gauche	ME-D ₄ trans	Au ₁₀ ⁻ - ME-D ₄ gauche	Au ₁₀ ⁻ - ME-D ₄ trans	Au ₁₀ ⁻ - ME-D ₄ -H ₂ O gauche	Au ₁₀ ⁻ - ME-D ₄ -H ₂ O trans
S-C	184.69	183.99	185.66	185.72	185.82	186.08
C-C	152.75	152.87	152.59	152.72	152.57	153.60
C-O	142.19	142.75	145.32	142.16	144.55	140.95
O-H	96.71	96.53	97.58	96.62	99.52	97.66
O··HO					167.22	184.57
Au-S			234.53	241.66 245.37	234.76	241.64 245.40
Au-O			230.74		225.79	

For the long-chain WC14 molecule, the assignment of the spectral bands is based on previous studies of similar compounds and our calculation of the model compound.^{88,90,113,119,121,122} Comparison of Raman spectra of WC14 molecules in melted and solid states allows us to identify spectral markers that are being sensitive to the order of the chains and intermolecular interactions (figure 3). A well-discernible increase in the intensity of 1063, 1131, and 1295 cm⁻¹ bands assigned to $\nu(\text{C-C})_{\text{T}}$ and $\text{t}(\text{CH}_2)$ is consistent with the formation of the extended structure of alkyl chains at 243 K.^{88,113}

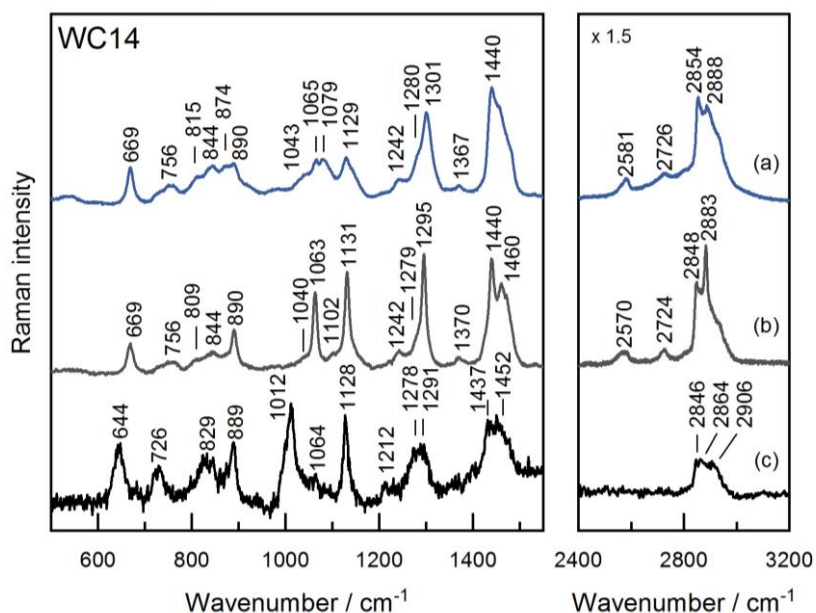


Figure 3. Raman spectra of melted WC14 at 293 K (a), solid state at 243 K (b) and SERS spectrum of gold adsorbed WC14 monolayer in aqueous solution.

The formation of ordered hydrocarbon chains is evident from the changes in the high-frequency range. The lowering of the temperature induces considerable frequency downshift of the spectral $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ and $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ bands that are found at 2888–2883 cm^{-1} and 2854–2848 cm^{-1} .^{88,113} The intensification of $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ band is also observed. However, the presence of a 669 cm^{-1} band indicates, that gauche is the predominant conformation at both studied temperatures. The position of $\nu(\text{S}-\text{C})_{\text{G}}$ peak downshifts by 25 cm^{-1} in a SERS spectrum as a consequence of Au–S formation induced withdrawal of electron density from S–C bond and metal mass effect.^{88,113} A similar effect is also observed for trans conformer band found in the surface spectrum at 726 cm^{-1} .

The narrow band near 1128 cm^{-1} assigned to the $\nu(\text{C}-\text{C})_{\text{T}}$ indicates the dominant extended state of alkyl chains at the surface. Also, a band near 889 cm^{-1} points to the trans conformation of the terminal methyl group of alkyl chains.

3.1.2. SERS of mixed monolayers

The $\nu(\text{S}-\text{C})_{\text{G}}$ and $\nu(\text{S}-\text{C})_{\text{T}}$ bands reveal the isomerization state of surface adsorbed mercaptoethanol. To discriminate against these bands originating from ME with the ones from WC14, we have used isotopically labeled mercaptoethanol, ME-D₄. The deuteration results in the downshift of $\nu(\text{S}-\text{C})$

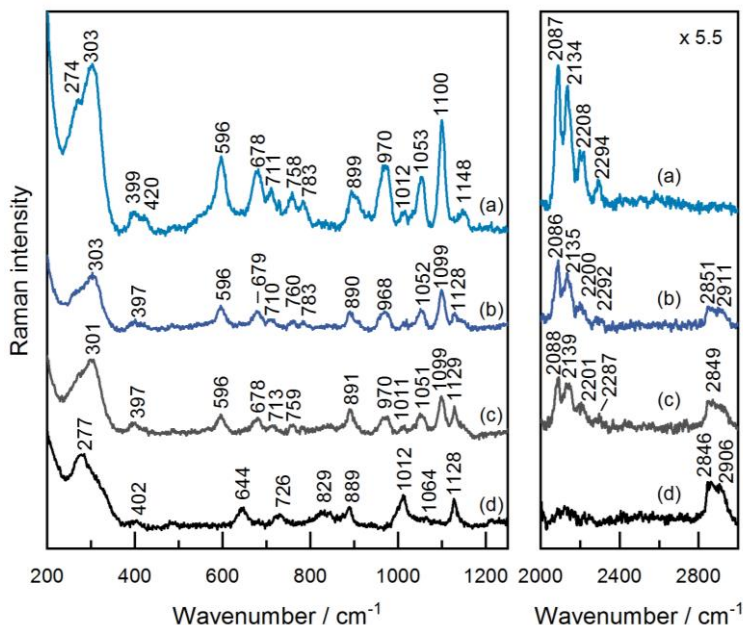


Figure 4. SERS spectra of self-assembled monolayers on Au containing WC14/ME-D₄ 0:100 (a), 30:70 (b), 70:30 (c) and 100:0 (d).

bands by as much as 47–48 cm^{-1} compared to the undeuterated counterpart. Gauche and trans conformational band for WC14 are found at 644 and 726 cm^{-1} (figure 4d) and for ME-D₄ at 596 and 678 cm^{-1} (figure 4a). The 1128 cm^{-1} band appears in each composition SAM that contains long-chain thiol, but it is most prominent in pure (100 %) WC14 monolayer. Observation of this band points to the organization of some alkyl chains in an extended, trans conformation. Similarly, the band found at 1012 cm^{-1} in pure WC14 monolayer assigned to $\nu_s(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ vibration diminishes quite considerably upon the introduction of ME-D₄. This might be associated with the alignment of ethyleneoxide segments more parallel to surface with the addition of the backfiller and therefore reduction of surface enhancement effect on these segments.

3.1.3. Effect of water on the structure of mixed monolayer

Figure 5A presents SERS spectra of a tethered monolayer on the Au surface composed from WC14/ME-D₄ (30:70) at different immersion times. The most prominent changes appear in the S–C stretching region. The relative intensity of mercaptoethanol's $\nu(\text{S}-\text{C})_{\text{T}}$ at 679 cm^{-1} decreases at longer incubation times. More quantitative analysis of the dependence of integrated ratio $A_{\text{T}}/A_{\text{G}}$ on incubation time revealed a significant decrease from 0.75 at the initial time to 0.33 at 72 h (figure 5B). An increasing fraction of adsorbed

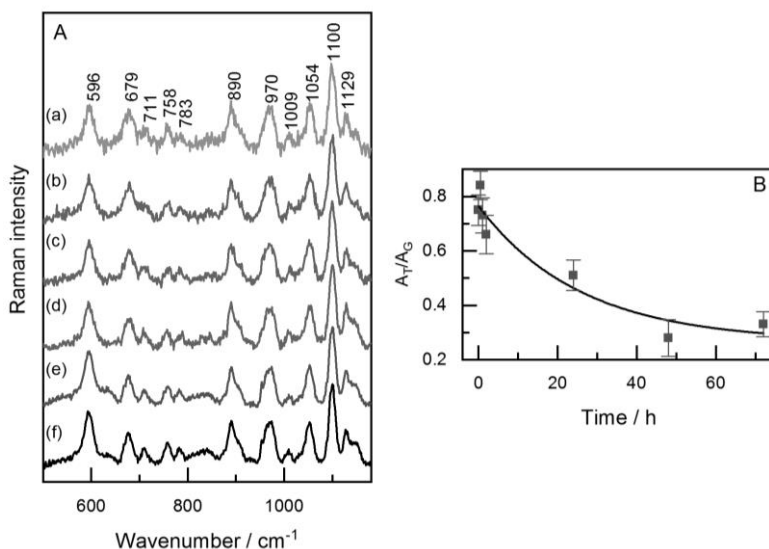


Figure 5. (A) SERS spectra of tethered layer on the Au surface containing WC14/ME-D₄ (30:70) incubated in water for (a) 5 min, (b) 30 min, (c) 60 min, (d) 24 h, (e) 48 h, (f) 72 h. (B) Dependence of integrated intensity ratio of trans and gauche components of S–C stretching of ME-D₄ ($A_{\text{T}}/A_{\text{G}}$) on immersion time.

gauche conformers favors an interaction of ME-D₄ with the gold substrate through the oxygen atoms.

Quantum chemical calculations for the gold-mercaptoethanol complex with an added water molecule, Au₁₀-ME-D₄···H₂O, show surprising shortening by 4.95 pm of the Au–O bond upon the formation of hydrogen bonding between ME-D₄'s hydroxyl group and an explicit water molecule. Besides, hydrogen bonding between the surface molecule and an explicit water molecule is considerably stronger for the adsorbed gauche conformer. The bond was found to be 167.22 and 184.57 pm for gauche and trans complexes. Thus, we conclude that water supports the gauche conformation of adsorbed ME-D₄.

To ascertain water-induced changes of adsorbed WC14, the mixed monolayer containing 70% WC14 and 30% ME-D₄ was formed (figure 6A). An increase of relative intensity of 1129 cm⁻¹ band associated mainly with the $\nu(\text{C-C})_{\text{T}}$ vibrational mode of WC14 is seen with longer incubation times. Also, a slight increase in the intensity of 843 and 889 cm⁻¹ bands, which correspond to rocking deformations of methylene r(CH₂) in EO chains and rocking vibrational mode of CH₃ groups in trans conformation, is observed. These spectral changes point to water-induced rearrangement of interchain order of adsorbed WC14 molecules in such a way that the portion of chains with all-trans conformation is increased. Thus, *in-situ* SERS data reveal the formation of WC14 clusters with more extended alkyl chains and an increase

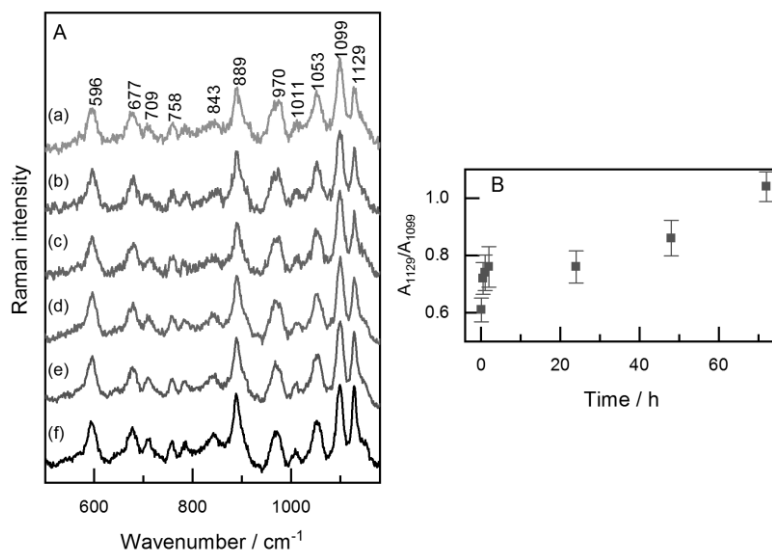


Figure 6. (A) SERS spectra of tethered layer on the Au surface containing WC14/ME-D₄ (70:30) incubated in water for (a) 5 min, (b) 30 min, (c) 60 min, (d) 24 h, (e) 48 h, (f) 72 h. (B) Dependence of integrated intensity ratio of C–C stretching of WC14 in all-trans configuration and 1099 cm⁻¹ band of ME-D₄ on immersion time.

in the fraction of gauche conformers for adsorbed short mercaptoethanol molecules.

3.2. Electrochemical potential induced changes in membrane anchoring self-assembled monolayer

3.2.1. Desorption of tethered layer from gold electrode

The reductive desorption experiment was carried out to ascertain the potential range in which studied monolayers remain intact. The desorption curves for pure 1-heptanethiol (HPT), WC14, and ME-D₄ monolayers and mixed monolayer composed of 30% WC14 and 70% ME-D₄ from roughened Au electrode are shown in figure 7. Detail desorption data for each studied monolayer are presented in table 2. The position of desorption peak correlates with the strength of the metal-ligand bond (Au-S) and allows to indicate the

Table 2. Desorption charge densities, potentials and relative surface coverage of mixed, ME-D₄, WC14, and HPT monolayers.

SAM	Charge density, $\mu\text{C cm}^{-2}$	Relative coverage	Potential, V	
WC14/ME-D ₄	89	0.77	-1.06	-0.75
ME-D ₄	120	1.04	-1.04	-0.67
WC14	64	0.56	-1.17	-0.93
HPT	115	1.00	-1.15	

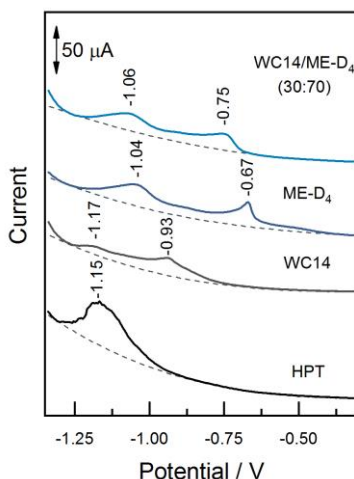


Figure 7. Potentiodynamic curves of reductive desorption of pure HPT, WC14, and ME-D₄ monolayers and a mixed monolayer composed from 30% WC14 and 70% ME-D₄ adsorbed on Au electrode surface.

most negative potential at which molecules remain adsorbed. While the model compound HPT desorption curve contains only one peak, other monolayers exhibit two well-discernable peaks, indicating at least two distinct states of adsorbed molecules. We associate the first desorption peak for pure ME-D₄ monolayer (-0.67 V) with the molecules in trans conformation, i.e. the ones that interact with the surface only through Au-S. Similarly, ME-D₄ molecules in gauche conformation are additionally stabilized by the Au-O bond, thus desorption potential increases up to -1.04 V. Two peaks for WC14 are found at -0.93 and -1.17 V correspond to the desorption of individual molecules and molecular clusters. In the mixed monolayer (-0.75 V) the first desorption peak appears to be shifted with respect to the ones of pure monolayers. Such a shift indicates the intermolecular interactions between ME-D₄ and WC14.

The electrochemical desorption experiment reveals that ME-D₄ and mixed monolayers remain stable in potential up to -0.60 V, while WC14 monolayer stays stable up to -0.80 V.

3.2.2. Electrochemical SERS study of ME-D₄ and WC14 monolayers

The spectra of gold electrode adsorbed ME-D₄ monolayer at 0.40 and -0.60 V are presented in figure 8. Au-S and Au-O stretching modes redshift by $\Delta=-8$ and -11 cm⁻¹ upon negative electrode polarization and their intensity increase by a factor of 3. Such spectral changes indicate the

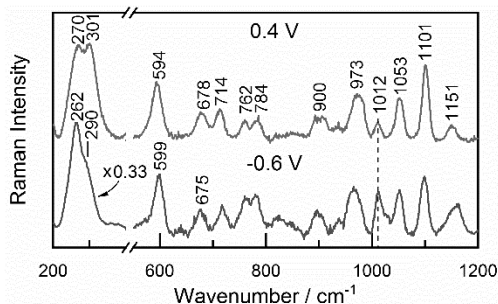


Figure 8. SERS spectra of ME-D₄ monolayer at 0.40 and -0.60 V.

rearrangement of adsorbed molecules and the reduction of metal-ligand bond strength. The Au-S bond lengthening was theoretically estimated for Au₁₀-ME-D₄ complexes when changing the total system charge from +1 to -1. The calculated increase of the bond length of Au-S for gauche and trans conformers is $\Delta=3.00$ and 6.52 pm.

SERS data indicate an upshift of $\nu(\text{S-C})_{\text{G}}$ wavenumbers by 5 cm⁻¹ at -0.60 V potential, on the other hand, the position of $\nu(\text{S-C})_{\text{T}}$ decreases by 3 cm⁻¹. The insignificant intensity ratio $I_{\text{T}}/I_{\text{G}}$ change favors trans

conformation (from 0.34 to 0.41) upon negative polarization. However, quite a reasonable intensification of 1012 cm^{-1} mode assigned to the out of phase stretching of C–C–O, $\nu_{\text{oop}}(\text{C–C–O})$, indicates that molecules adopt a more vertical orientation to the surface.

Depicted in figure 9A is a reversible dependence of the $\nu(\text{Au–S})$ wavenumbers on the potential for the pure WC14 monolayer. On the cathodic scan the mode shifts by -10 cm^{-1} to 262 cm^{-1} , while on a successive scan towards positive values it returns to 267 cm^{-1} . In a fingerprint region spectral mode for S–C bond for the gauche conformation separates into two features at the most negative potential. The one at the higher energy (653 cm^{-1}) could be assigned to a portion of molecules that interact with the surface more loosely. Thus, allowing us to speculate that molecules reach pre-desorption state. The prevailing orientation of both adsorbed ME-D₄ and WC14 molecules is gauche. Spectral modes at 1063 and 1129 cm^{-1} are assigned to the trans vibrations of the C–C bond of alkane chain, $\nu(\text{C–C})_{\text{T}}$. The intensity of 1129 cm^{-1} band is invariant with respect to changes in potential and no spectral bands corresponding to gauche defects of carbohydrate chain were observed. Thus, it allows us to speculate that alkyl chain clusters remain intact in an electric field.

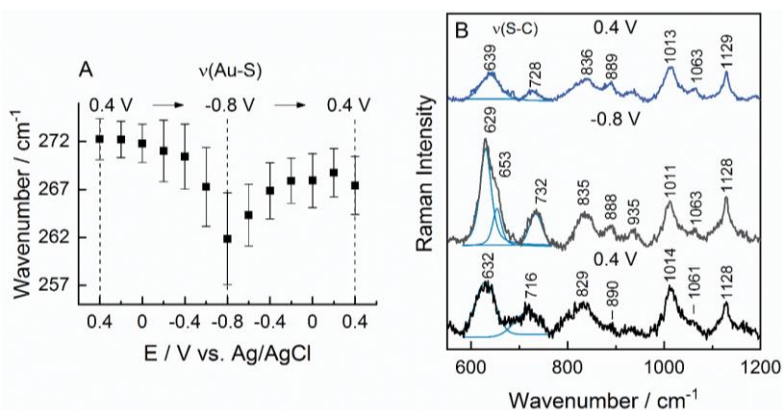


Figure 9. (A) Dependence of $\nu(\text{Au–S})$ mode’s wavenumbers on electrode potential. (B) SERS spectra of Au adsorbed WC14 monolayer at potentials of 0.40, -0.80 V in a forward scan and at 0.40 V in a successive scan.

3.2.3. Electrochemical SERS study of mixed monolayer

Figure 10 compares the SERS spectra of mixed monolayer composed from 30% WC14 and 70% ME-D₄ at different electrode polarization. In the low energy portion of a spectra, wavenumbers of the Au–S bond decrease by $\Delta=5.21\text{ cm}^{-1}$ with increasingly negative polarization. The detailed depiction

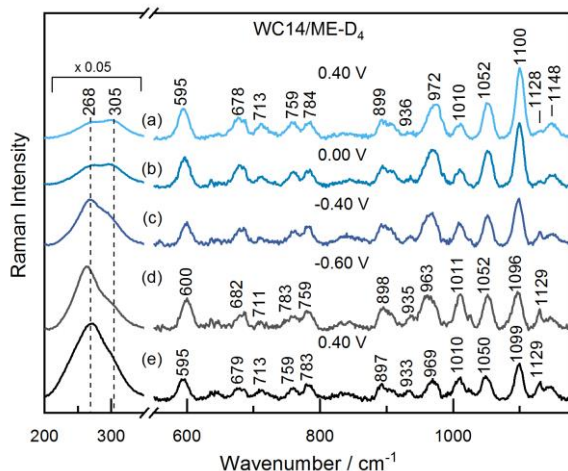


Figure 10. SERS spectra of mixed tethered monolayer in 200-400 cm^{-1} and 550–1200 cm^{-1} regions.

provided in figure 11A shows a sharp drop at -0.60 V that indicates a weakening of the Au–S bond strength. Correspondingly, theoretical modeling of Au_{10} -ME- D_4 complex in trans and gauche conformations predicts lengthening of Au–S bond by $\Delta=6.51$ and 3.00 pm while changing the net charge from +1 to -1. In accordance, the calculations predict the diminution of wavenumbers by $\Delta=-20$ and -25 cm^{-1} .

Both gauche and trans bands of the ME- D_4 upshift by a couple of wavenumbers upon negative polarization. The intensity ratio $I_{\text{T}}/I_{\text{G}}$ increases from 0.47 to 0.60 during the excursion to negative potentials favoring trans conformation of adsorbed ME- D_4 , however as the potential is set to -0.60 V ratio decreases to 0.42 (figure 11B).

Although most of the bands in SERS spectra belong to ME- D_4 , the band near 1129 cm^{-1} assigned to all-trans vibration of the carbohydrate backbone, $\nu(\text{C-C})_{\text{T}}$ is also visible. This feature is instrumental in defining the conformational state of alkyl chains of the adsorbed WC14 anchors. Shown in

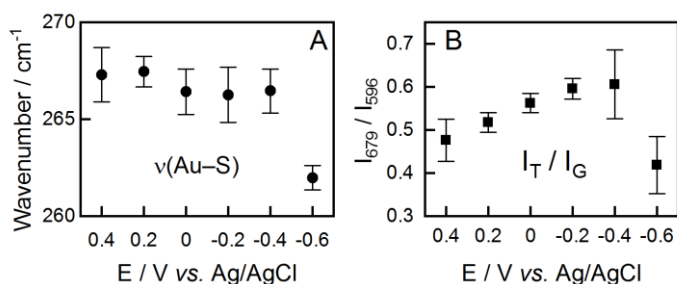


Figure 11. (A) Dependence of Au–S bond wavenumbers and (B) intensity ratio of trans and gauche conformation $\nu(\text{S-C})$ bands on electrochemical potential.

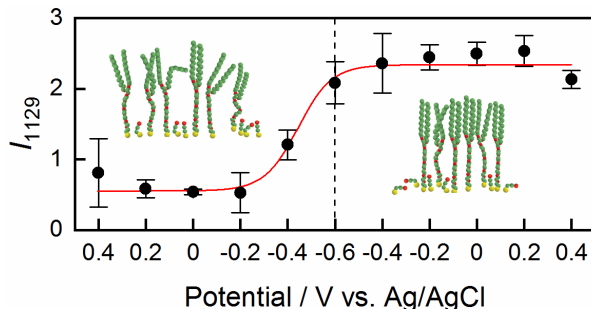


Figure 12. Dependence of the intensity of all-trans C–C stretching band at 1129 cm^{-1} upon electrode potential in both cathodic and anodic directions fitted with Boltzmann sigmoidal curve ($R^2=0.996$). Left side inset shows the distorted state of alkane chains at initial measurements, and right side inset shows aggregated state after excursion to negative potential. The transition midpoint potential value was determined to be -0.46 ± 0.03 V

figure 12 is the nonlinear dependence of the band's intensity on the potential. The intensification starts at the -0.40 V and it reaches the plateau at -0.60 V. The process is irreversible because extended polymethylene chains retained their structure even after the return to the initial values of potential (figure 12).

Arguably, the $\nu(\text{C-C})_{\text{T}}$ intensity change with respect to electric potential is governed by two processes: (i) potential-induced changes in intrachain gauche/trans isomerization and (ii) changes in orientation of alkyl chains with respect to the electrode surface. Increased interaction between the hydrocarbon chains results in a reduction of gauche defects and the arrangement of extended alkyl chains into hydrophobic clusters that are featured by the $\nu(\text{C-C})_{\text{T}}$ band in SERS spectrum.

From the molecular point of view, the application of increasingly negative potential leads to reduced energy of gold-thiolate bond (figure 11A), which in turn liberates the lateral motion of surface adsorbed molecules. Increased lateral mobility and the effect of water on the hydrophobic WC14 chains stimulate the rearrangement of these molecules and results in the formation of a gauche-defect-free condensed phase of the alkyl chains.

3.3. SERS of tBLM

The tBLM composed of 50% DOPC and 50% cholesterol was formed on a gold electrode adsorbed WC14/ME-D₄ (30/70 mol:mol) monolayer. The difference spectrum in figure 13c contains spectral bands associated with the vibrations of lipid molecules from the bilayer membrane. The presence of lipids at the surface is evident from the stretching vibration of a double bond in the acyl chain, $\nu(\text{C=C})$, which appears at 1655 cm^{-1} and from ethanolamine

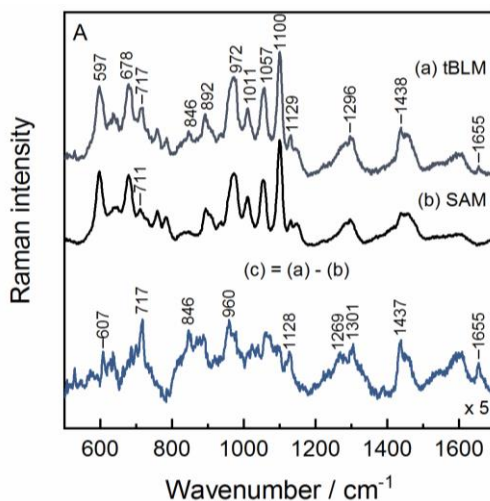


Figure 13. SERS spectra of (a) tBLM and (b) tethering layer in 550-1700 cm^{-1} range. Difference spectrum (c) is also included.

vibration $\nu(\text{N}^+(\text{CH}_3)_3)$ at 717 cm^{-1} in difference spectrum.¹²⁰ The bands at 607 , 960 cm^{-1} assigned to vibrations of the cholesterol.

Spectral bands of SAM do not change significantly due to the formation of the tBLM. The intensity of an 1129 cm^{-1} band slightly increases indicating an increased portion of extended conformation of WC14's alkyl chains. This may be the result of both increased interaction between acyl chains of WC14 due to prolonged incubation in phosphate solution and interactions arising between acyl chains of WC14 and DOPC. Yet another feature that appears at 846 cm^{-1} is assigned to the rocking of methylene $\nu(\text{CH}_2)$ and $\nu(\text{CO})$ of WC14s' ethyleneoxide fragment (EO) in a helical conformation.¹³⁶⁻¹³⁸ These spectral changes indicate conformational reorganization anchoring molecules due to the addition of the lipid layer.

To the best of our knowledge, this is the first time the direct spectroscopic evidence for the formation of the tBLM membrane is shown. These findings can be used in the analysis and interpretation of the function of biosensors and biotechnological processes based on tBLM

3.4. Spectroelectrochemical study of electrode adsorbed laccases

Enzymatic electrodes were prepared by adsorbing laccase J6 from *Didymocrea* on gold-nanoparticle (AuNP) covered electrode at a static electric field of 0.80 V and by adsorbing laccase TaLc from *Trichaptum abietinum* on the surface of the electrochemically roughened gold electrode. SERS measurements were carried out to (i) verify the presence of the enzymes on

the electrode surface; (ii) investigate spectral markers that convey information on the state of amino acids and catalytic copper sites; (iii) analyze the electric field-induced changes in the structure of electrode adsorbed enzymes.

3.4.1. SERS of electrode adsorbed laccase J6

Figure 14 shows a potential-dependent SERS spectra of AuNP-laccase J6 complex. The presence of adsorbed protein in a wide potential range is evident from typical Raman markers of phenylalanine F12 ring-breathing mode at 1002–1003 cm^{-1} , amide-I at 1631–1662 cm^{-1} and amide-III at 1243–1253 cm^{-1} . The high-intensity band at 1439–1440 cm^{-1} is assigned to scissoring vibration of methylene. Stretching vibrations of CH_2/CH_3 are visible in high-frequency region (2750–3100 cm^{-1}). Notably, SERS data do not indicate low-frequency mode from the T1 copper site. This might be associated with such an adsorption geometry of the protein in which the T1 Cu center is positioned relatively far from the AuNP surface.

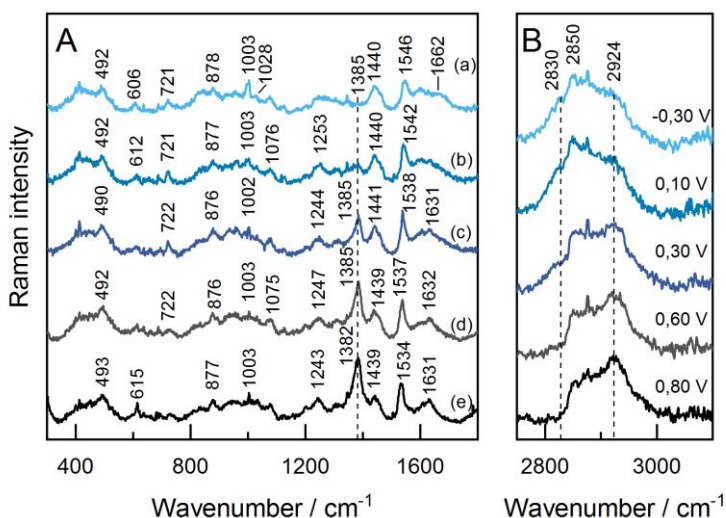


Figure 14. SERS spectra of laccase J6 adsorbed at AuNP-modified electrode at -0.30 V (a), 0.10 V (b), 0.30 V (c), 0.60 V (d), and 0.80 V (e) (vs. NHE) potentials.

The most intense negative-facing features in the potential-difference SERS spectrum in figure 15A at 1382 cm^{-1} is assigned to vibrations of the surface contacting COO^- groups. Interaction of carboxylate groups with the surface is increased at more positive potentials. The enhancement and downshift (from 1403–1413 to 1383–1396 cm^{-1}) of COO^- groups of peptides and amino acids were previously assigned to direct interaction of carboxyl groups with an electrode surface.^{187,188} In the potential-difference SERS spectrum a broad “soft” C–H stretching mode appears, which is assigned to stretching vibrations

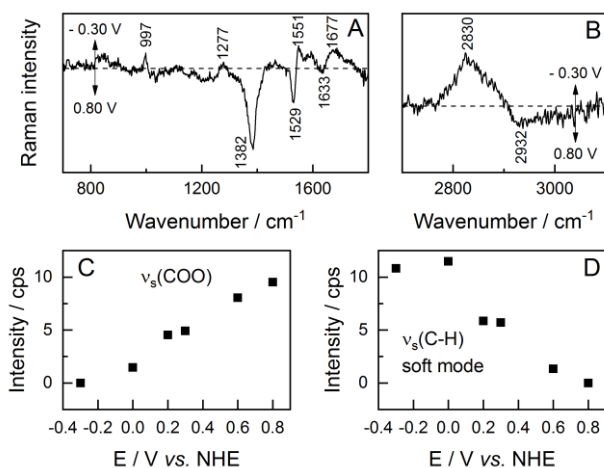


Figure 15. (A) Potential-difference SERS spectra of laccase J6 electrode in fingerprint and (B) CH stretching regions. (C) Electrode polarization dependence of the intensity of adsorbed carboxylate groups $\nu_s(\text{CCO}^-)$ at 1382–1385 cm^{-1} (D) and intensity of the C–H soft mode near 2830 cm^{-1} .

of methylenes which directly interact with the surface at more negative potentials (figure 15B). These two spectral markers $\nu_s(\text{CCO}^-)$ and soft $\nu(\text{C-H})$ mode reveal enzyme changes from the more extended and flat configuration of protein at the more negative electrode polarizations to the more vertical configuration at positive electrode polarization. While at a positive potential, enzyme interacts with the surface through the carboxylate groups of the side chains. These changes, however, do not impede the enzymatic activity of the laccases adsorbed via the terminal carboxylate groups.¹⁹⁰

3.4.2. SERS of electrode adsorbed laccase TaLc

The laccase TaLc from *Trichaptum abietinum* was adsorbed onto the roughened electrode surface under stationary open circuit potential conditions. Potential-dependent SERS spectra in figure 16 demonstrate irreversible adsorption of laccase TaLc on electrode surface in a wide potential range.

SERS data reveal changes in enzyme structure due to increasingly positive potential. The carboxylate spectral mode at 1361–1369 cm^{-1} gains intensity and blue-shifts, while the intensity of the soft C–H mode decreases. The soft-mode is assigned to the stretching of methylenes that participate in direct contact with the electrode. The weak band at 723 cm^{-1} associated with a stretch of S–C group in trans conformation adjacent to a disulfide bond completely diminishes. The Phe F12 band at 998 cm^{-1} upshifts by 4.3 cm^{-1} and becomes significantly narrower at more positive electrode potentials, while the high-frequency component $\nu(\text{C-H})$ (3064 cm^{-1}) emerges (figure 17C, D). Such

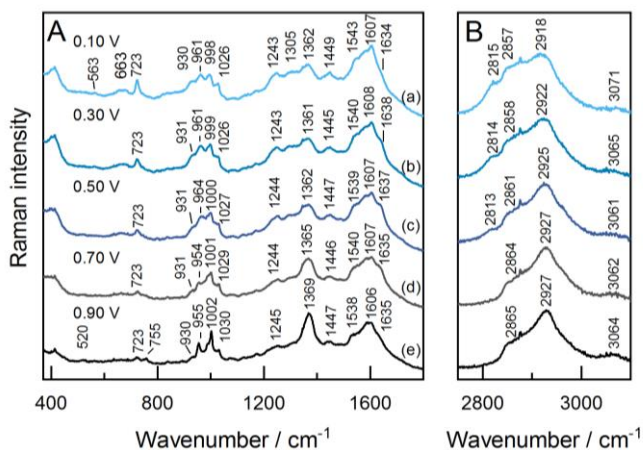


Figure 16. SERS spectra of TaLc adsorbed at gold electrode at 0.10 V (a), 0.30 V (b), 0.50 V (c), 0.70 V (d), and 0.90 V (e) (vs. NHE) potentials.

change in wavenumbers and FWHM was explained by the direct interaction of the Phe ring with the metal.¹⁹³ These data allow us to deduce that the Phe ring is susceptible to an external electric field and obtains more vertical orientation with respect to the surface at positive potentials.

Similarly to laccase J6, the laccase TaLc adopts an extended and flat

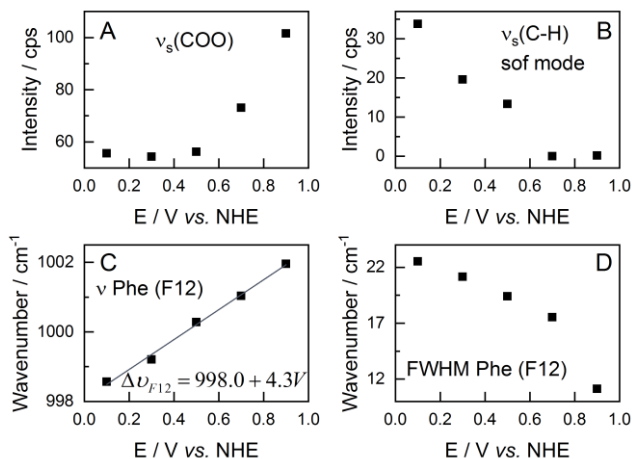


Figure 17. (A) Electrode polarization dependence of the intensity of adsorbed carboxylate groups $\nu_s(\text{CCO}^-)$ at 1361–1369 cm^{-1} and (B) intensity of the C–H soft mode near 2830 cm^{-1} . (C) Dependence of phenylalanine F12 band's position and (D) full width at half-maximum (FWHM) on potential.

configuration, in which the enzyme interacts with the surface through methylenes from amino acids, at a more negative electrode polarization. At increasingly positive electrode polarization more vertical configuration is gained, with the enzyme strongly interacting with the surface through carboxyl groups.

4. Conclusions

1. SERS and DFT modeling of mercaptoethanol-gold surface clusters revealed that the molecule in gauche conformation attaches to the surface not only by a metal-sulfur bond but also by an oxygen atom forming Au–O bond.

2. Water drives isomerization reaction towards gauche conformation of the adsorbed mercaptoethanol in the anchoring monolayer, with trans/gauche ratio changing from 0.75 at the initial time to 0.33 at 72 h of incubation in water. The Au–O bond is found to shorten considerably (by 4.95 pm) due to the introduction of an explicit water molecule in a model cluster.

3. Water drives the formation of the phase-segregation clusters of the hydrophobic alkyl chains of the anchor molecule WC14 in the tethering layer of the membrane. Cluster formation is associated with an increase in the intensity of the $\nu(\text{C-C})_{\text{T}}$ vibration of the alkyl chains in all-trans configuration found at 1129 cm^{-1} .

4. Reduction of Au–S bond strength is registered for WC14/ME-D₄ (30:70) monolayer during the excursion towards negative polarization. Such an effect coupled with the water-induced rearrangement of hydrophobic chains of the lipid-like anchor molecules result in the formation of the molecular surface-clusters with extended alkyl chains. The clustering of membrane anchors impairs the tBLMs' integrity and electric insulation, therefore we propose the 1129 cm^{-1} band as a conventional predictor of the functional properties of tBLM.

5. Spectroscopic evidence for the formation of the tBLM is presented. The SERS markers of $\nu(\text{C=C})$ at 1655 cm^{-1} and $\nu(\text{N}^+(\text{CH}_3)_3)$ at 701 cm^{-1} assigned to DOPC indicate that the tBLM remains attached to the surface after its formation. The marker peak position of olefin group stretching vibration suggests a fluid-like structure of tBLM.

6. Electrochemical-SERS data indicate that the J6 and TaLc laccase enzymes remain intact at the surface in a potential range of -0.30 – 0.80 V and 0.10 – 0.90 V vs. NHE respectively. We determined spectroscopic markers that indicate enzyme's structure at the surface: the "soft" C–H stretching mode, the wavenumbers and full width at half-maximum of phenylalanine's ring vibration F12, and the intensity of carboxylate vibration near 1380 cm^{-1} .

7. The enzyme adopts extended-flat configuration and contacts the surface through the C–H bonds at more negative electrode potentials. A more vertical configuration is established and interaction with the surface through carboxylate groups takes place at positive electrode potentials.

8. The SERS results indicate that characteristic low-frequency modes from the T1 copper site for adsorbed laccases are not observed. This could be associated with the orientation of the adsorbed enzyme, with the T1 center being positioned further away from the substrate surface.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ratner, B. D., Castner, D. G., Horbett, T. A., Lenk, T. J., Lewis, K. B., Rapoza, R. J. Biomolecules and surfaces. *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.* **8**, 2306–2317 (1990).
2. Los, F. C. O., Randis, T. M., Aroian, R. V., Ratner, A. J. Role of Pore-Forming Toxins in Bacterial Infectious Diseases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**, 173–207 (2013).
3. Valinčius, G., Heinrich, F., Budvytytė, R., Vanderah, D. J., McGillivray, D. J., Sokolov, Y., Hall, J. E., Lösche, M. Soluble amyloid β -oligomers affect dielectric membrane properties by bilayer insertion and domain formation: Implications for cell toxicity. *Biophys. J.* **95**, 4845–4861 (2008).
4. Lipkowski, J. Building biomimetic membrane at a gold electrode surface. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 13874–13887 (2010).
5. Dos Santos, L., Climent, V., Blanford, C. F., Armstrong, F. A. Mechanistic studies of the ‘blue’ Cu enzyme, bilirubin oxidase, as a highly efficient electrocatalyst for the oxygen reduction reaction. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 13962–13974 (2010).
6. Ferraro, J. R., Nakamoto, K., Brown, C. W. *Introductory Raman Spectroscopy. Direct* (2003).
7. Šablinskas, V., Čeponkus, J. Modernioji molekulių virpesinė spektrometrija. 240 (2014).
8. Le Ru, E. C., Etchegoin, P. G. Quantifying SERS enhancements. *MRS Bull.* **38**, 631–640 (2013).
9. Duynes, R. P. Van, Haynes, C. L. Raman Spectroscopy. In *Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition)* (ed. Bakeev, K. A.) 845–866 (2003).
10. Królikowska, A. Surface-enhanced resonance Raman scattering (SERRS) studies of electron-transfer redox-active protein attached to thiol-modified metal: case of cytochrome c. In *Vibrational Spectroscopy at Electrified Interfaces* (eds. Wieckowski, A., Korzeniewski, C. & Braunschweig, B.) 153–219 (John Wiley & Sons, 2013).
11. Emory, S. R., Haskins, W. E., Nie, S. Direct observation of size-dependent optical enhancement in single metal nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 8009–8010 (1998).
12. Zhang, J., Zhang, L. Nanostructures for surface plasmons. *Adv. Opt. Photonics* **4**, 157 (2012).
13. Li, M., Cushing, S. K., Zhang, J., Lankford, J., Aguilar, Z. P., Ma, D., Wu, N. Shape-dependent surface-enhanced Raman scattering in gold-Raman probe-silica sandwiched nanoparticles for biocompatible applications. *Nanotechnology* **23**, 115501 (2012).
14. Le Ru, E. C., Etchegoin, P. G. Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annu. Rev. of Physical Chem.* 65–87 (2012).

15. Le Ru, E. C., Etchegoin, P. G. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects. Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy* (2009).
16. Kneipp, K., Kneipp, H., Itzkan, I., Dasari, R. R., Feld, M. S. Surface-enhanced Raman scattering and biophysics. *J. Phys. Condens. Matter* **14**, R597–R624 (2002).
17. Procházka, M. *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*. (Springer International Publishing, 2016).
18. Schlücker, S. *Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications. Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications* (2010).
19. Fateixa, S., Nogueira, H. I. S., Trindade, T. Hybrid nanostructures for SERS: Materials development and chemical detection. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 21046–21071 (2015).
20. Niaura, G. Paviršiumi sustiprinta Ramano spektroskopija. In *Paviršiaus optinė spektroskopija* 113–150 (TEV, 2008).
21. McNay, G., Eustace, D., Smith, W. E., Faulds, K., Graham, D. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) and surface-enhanced resonance raman scattering (SERRS): A review of applications. *Appl. Spectrosc.* **65**, 825–837 (2011).
22. Otto, A. Surface-enhanced Raman scattering: “classical” and “chemical” origins. In *Light scattering in solids IV. Electronics Scattering, Spin Effects, SERS, and Morphic Effects* 289–418 (1984).
23. Moskovits, M. Surface-enhanced spectroscopy. *Rev. Mod. Phys.* **57**, 783 (1985).
24. Lin, X. M., Cui, Y., Xu, Y. H., Ren, B., Tian, Z. Q. Surface-enhanced raman spectroscopy: Substrate-related issues. *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 1729–1745 (2009).
25. Creighton, J. A., Blatchford, C. G., Albrecht, M. G. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **75**, 790 (1979).
26. Neddersen, J., Chumanov, G., Cotton, T. M. Laser ablation of metals: A new method for preparing SERS active colloids. *Appl. Spectrosc.* **47**, 1959–1964 (1993).
27. Li, J. F., Huang, Y. F., Ding, Y., Yang, Z. L., Li, S. B., Zhou, X. S., Fan, F. R., Zhang, W., Zhou, Z. Y., Wu, D. Y., *et al.* Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy. *Nature* **464**, 392–395 (2010).
28. Willets, K. A., Van Duyne, R. P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58**, 267–297 (2007).
29. McGillivray, D. J., Valinčius, G., Vanderah, D. J., Febo-Ayala, W., Woodward, J. T., Heinrich, F., Kasianowicz, J. J., Lösche, M.

- Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes. *Biointerphases* **2**, 21–33 (2007).
30. Niaura, G. Raman Spectroscopy in Analysis of Biomolecules. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* 1–34 (2014).
 31. Buividas, R., Rosa, L., Šliupas, R., Kudrius, T., Šlekys, G., Datsyuk, V., Juodkasis, S. Mechanism of fine ripple formation on surfaces of (semi)transparent materials via a half-wavelength cavity feedback. *Nanotechnology* **22**, 055304 (2011).
 32. Dagys, M., Laurynėnas, A., Ratautas, D., Kulys, J., Vidžiūnaitė, R., Talaikis, M., Niaura, G., Marcinkevičienė, L., Meškys, R., Shleev, S. Oxygen electroreduction catalysed by laccase wired to gold nanoparticles via the trinuclear copper cluster. *Energy Environ. Sci.* **10**, 498–502 (2017).
 33. Ragaliauskas, T., Mickevicius, M., Rakovska, B., Penkauskas, T., Vanderah, D. J., Heinrich, F., Valinčius, G. Fast formation of low-defect-density tethered bilayers by fusion of multilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1859**, 669–678 (2017).
 34. Matulaitienė, I., Kuodis, Z., Matijoška, A., Eicher-Lorka, O., Niaura, G. SERS of the Positive Charge Bearing Pyridinium Ring Terminated Self-Assembled Monolayers: Structure and Bonding Spectral Markers. *J. Phys. Chem. C* **119**, 26481–26492 (2015).
 35. Niaura, G., Gaigalas, A. K., Vilker, V. L. Moving spectroelectrochemical cell for surface Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **28**, 1009–1011 (1997).
 36. Bulovas, A., Dirvianskytė, N., Talaikytė, Z., Niaura, G., Valentukonytė, S., Butkus, E., Razumas, V. Electrochemical and structural properties of self-assembled monolayers of 2-methyl-3-(ω -mercaptoalkyl)-1,4-naphthoquinones on gold. *J. Electroanal. Chem.* **591**, 175–188 (2006).
 37. Friesner, R. A. Ab initio quantum chemistry: methodology and applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 6648–6653 (2005).
 38. Hohenberg, P., Kohn, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* **136**, B864–B871 (1964).
 39. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.A. et al. Gaussian 09, Revision D.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT (2013)
 40. Castillo, J. J., Rindzevicius, T., Rozo, C. E., Boisen, A. Adsorption and Vibrational Study of Folic Acid on Gold Nanopillar Structures Using Surface-enhanced Raman Scattering Spectroscopy. *Nanomater. Nanotechnol.* **1** (2015).
 41. Palafox, M. A. Scaling Factors for the Prediction of the Frequencies of the Ring Modes in Benzene Derivatives. *J. Phys. Chem. A* **103**, 11366–11377 (1999).
 42. Johnson, R. D., Irikura, K. K., Kacker, R. N., Kessel, R. Scaling factors

- and uncertainties for ab initio anharmonic vibrational frequencies. *J. Chem. Theory Comput.* **6**, 2822–2828 (2010).
43. Riauba, L., Niaura, G., Eicher-Lorka, O., Butkus, E. A study of cysteamine ionization in solution by Raman spectroscopy and theoretical modeling. *J. Phys. Chem. A* **110**, 13394–13404 (2006).
 44. Polavarapu, L. Ab Initio Vibrational Raman and Raman Optical Activity Spectra. *J. Phys. Chem.* **94**, 8106–8112 (1990).
 45. Guirgis, G. A., Klaboe, P., Shen, S., Powell, D. L., Gruodis, A., Aleksa, V., Nielsen, C. J., Tao, J., Zheng, C., Durig, J. R. Spectra and structure of silicon-containing compounds. XXXVI+ - Raman and infrared spectra, conformational stability, ab initio calculations and vibrational assignment of ethyldibromosilane. *J. Raman Spectrosc.* **34**, 322–336 (2003).
 46. Jamróz, M. H. Vibrational Energy Distribution Analysis VEDA 4. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **114**, 220–230 (2013).
 47. Wang, J. Modified Electrodes for Electrochemical Sensors. *Electroanalysis* **3**, 255–259 (1991).
 48. Chen, D., Li, J. Interfacial design and functionalization on metal electrodes through self-assembled monolayers. *Surf. Sci. Rep.* **61**, 445–463 (2006).
 49. Akkerman, H. B., Blom, P. W. M., De Leeuw, D. M., De Boer, B. Towards Molecular Electronics with Large-Area Molecular Junctions. *Nature* **441**, 69–72 (2006).
 50. Bronshtein, M. D., Nazmutdinov, R. R., Schmickler, W. An approach to optimised calculations of the potential energy surfaces for the case of electron transfer reactions at a metal/solution interface. *Chem. Phys. Lett.* **399**, 307–314 (2004).
 51. Ly, H. K., Wisitruangsakul, N., Sezer, M., Feng, J.-J., Kranich, A., Weidinger, I. M., Zebger, I., Murgida, D. H., Hildebrandt, P. Electric-field effects on the interfacial electron transfer and protein dynamics of cytochrome c. *J. Electroanal. Chem.* **660**, 367–376 (2011).
 52. Kakkar, A. K. Nano-organometallics: Heterogenizing homogeneous catalysts via thin film methodology. *Chem. Rev.* **102**, 3579–3588 (2002).
 53. Bain, C. D., Whitesides, G. M. Depth Sensitivity of Wetting: Monolayers of ω -Mercaptoethers on Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5897–5898 (1988).
 54. Laibinis, P. E., Whitesides, G. M. Self-Assembled Monolayers of n-Alkanethiolates on Copper Are Barrier Films That Protect the Metal against Oxidation by Air. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9022–9028 (1992).
 55. Torres, N., Oh, S., Appleford, M., Dean, D. D., Jorgensen, J. H., Ong, J. L., Agrawal, C. M., Mani, G. Stability of antibacterial self-assembled monolayers on hydroxyapatite. *Acta Biomater.* **6**, 3242–3255 (2010).

56. Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G., Whitesides, G. M. *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology*. *Chemical Reviews* vol. 105 (2005).
57. Chaki, N. K., Vijayamohan, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* **17**, 1–12 (2002).
58. Porter, M. D., Bright, T. B., Allara, D. L., Chidsey, C. E. D. Spontaneously Organized Molecular Assemblies. 4. Structural Characterization of n-Alkyl Thiol Monolayers on Gold by Optical Ellipsometry, Infrared Spectroscopy, and Electrochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3559–3568 (1987).
59. Schönenberger, C., Jorritsma, J., Sondag-Huethorst, J. a M., Fokkink, L. G. J. Domain Structure of Self-Assembled Alkanthiol Monolayers on Gold. *J. Phys. Chem.* **99**, 3259–3271 (1995).
60. Špandyreva, M., Ignatjev, I., Matulaitienė, I., Kuodis, Z., Niaura, G. Sum frequency generation spectroscopy probing of formation of self-assembled monolayers from thiols with terminal phenylalanine ring and intrachain amide groups. *Chemija* **29**, 219–226 (2018).
61. Dubois, L. H. L., Nuzzo, R. G. Synthesis, structure, and properties of model organic surfaces. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **43**, 437–463 (1992).
62. Tao, F., Bernasek, S. L. Understanding Odd – Even Effects in Organic Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* **107**, 1408–1453 (2007).
63. Schwartz, D. K. Mechanisms and Kinetics of Self-Assembled Monolayer Formation. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **52**, 107–137 (2001).
64. Ulman, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* **96**, 1533–1554 (1996).
65. Poirier, G. E., Pylant, E. D. The self-assembly mechanism of alkanethiols on Au(111). *Science* (80-.). **272**, 1145–1148 (1996).
66. Schoenfish, M. H., Pemberton, J. E. Air stability of alkanethiol self-assembled monolayers on silver and gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 4502–4513 (1998).
67. Dubois, L. H., Zegarski, B. R., Nuzzo, R. G. Temperature induced reconstruction of model organic surfaces. *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena* **54–55**, 1143–1152 (1990).
68. Nuzzo, R. G., Korenic, E. M., Dubois, L. H. Studies of the temperature-dependent phase behavior of long chain n-alkyl thiol monolayers on gold. *J. Chem. Phys.* **93**, 767 (1990).
69. Shibue, T. Analysis of self-assembled monolayers by thermal desorption mass spectrometry: neighborhood interaction and hydrogen/deuterium exchange. *Anal. Sci.* **20**, 1223–1225 (2004).
70. Willey, T. M., Vance, A. L., Van Buuren, T., Bostedt, C., Terminello, L. J., Fadley, C. S. Rapid degradation of alkanethiol-based self-assembled monolayers on gold in ambient laboratory conditions. *Surf. Sci.* **576**, 188–196 (2005).
71. Zhang, Y., Terrill, R. H., Bohn, P. W. Ultraviolet Photochemistry and

- ex Situ Ozonolysis of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Gold. *Chem. Mater.* **11**, 2191–2198 (1999).
72. Dai, J., Li, Z., Jin, J., Shi, Y., Cheng, J., Kong, J., Bi, S. Some thoughts on the existence of ion and water channels in highly dense and well-ordered CH₃-terminated alkanethiol self-assembled monolayers on gold. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 1074–1082 (2009).
 73. Schoenfish, M. H., Pemberton, J. E. Effects of Electrolyte and Potential on the in Situ Structure of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Silver. *Langmuir* **15**, 509–517 (1999).
 74. Diao, P., Hou, Q., Guo, M., Xiang, M., Zhang, Q. Effect of substrate potentials on the structural disorders of alkanethiol monolayers prepared by electrochemically directed assembly. *J. Electroanal. Chem.* **597**, 103–110 (2006).
 75. Petrović, Ž., Metikoš-Huković, M., Babić, R. Potential-assisted assembly of 1-dodecanethiol on polycrystalline gold. *J. Electroanal. Chem.* **623**, 54–60 (2008).
 76. Brett, C. M. A., Kresak, S., Hianik, T., Oliveira Brett, A. M. Studies on Self-Assembled Alkanethiol Monolayers Formed at Applied Potential on Polycrystalline Gold Electrodes. *Electroanalysis* **15**, 557–565 (2003).
 77. Muglali, M. I., Erbe, A., Chen, Y., Barth, C., Koelsch, P., Rohwerder, M. Modulation of electrochemical hydrogen evolution rate by araliphatic thiol monolayers on gold. *Electrochim. Acta* **90**, 17–26 (2013).
 78. Ford, M. J., Masens, C., Cortie, M. B. The application of gold surfaces and particles in nanotechnology. *Surf. Rev. Lett.* **13**, 297–307 (2006).
 79. Bublitz, G. U., Boxer, S. G. Stark spectroscopy: applications in chemistry, biology, and materials science. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **48**, 213–242 (1997).
 80. Park, E. S., Boxer, S. G. Origins of the sensitivity of molecular vibrations to electric fields: Carbonyl and nitrosyl stretches in model compounds and proteins. *J. Phys. Chem. B* **106**, 5800–5806 (2002).
 81. Staffa, J. K., Lorenz, L., Stolarski, M., Murgida, D. H., Zebger, I., Utesch, T., Kozuch, J., Hildebrandt, P. Determination of the Local Electric Field at Au/SAM Interfaces Using the Vibrational Stark Effect. *J. Phys. Chem. C* **121**, 22274–22285 (2017).
 82. Biava, H., Schreiber, T., Katz, S., Völler, J. S., Stolarski, M., Schulz, C., Michael, N., Budisa, N., Kozuch, J., Utesch, T., *et al.* Long-Range Modulations of Electric Fields in Proteins. *J. Phys. Chem. B* **122**, 8330–8342 (2018).
 83. Oklejas, V., Harris, J. M. In-situ investigation of binary-component self-assembled monolayers: A SERS-based spectroelectrochemical study of the effects of monolayer composition on interfacial structure. *Langmuir* **19**, 5794–5801 (2003).
 84. Oklejas, V., Sjostrom, C., Harris, J. M. Surface-enhanced Raman

- scattering based vibrational Stark effect as a spatial probe of interfacial electric fields in the diffuse double layer. *J. Phys. Chem. B* **107**, 7788–7794 (2003).
85. Sandroff, C. J., Garoff, S., Leung, K. Surface-enhanced Raman study of the solid/liquid interface: Conformational changes in adsorbed molecules. *Chem. Phys. Lett.* **96**, 547–551 (1983).
 86. Schwedel, D., Hayashi, T., Dahint, R., Pertsin, A., Grunze, M., Steitz, R., Schreiber, F. Interaction of water with self-assembled monolayers: Neutron reflectivity measurements of the water density in the interface region. *Langmuir* **19**, 2284–2293 (2003).
 87. Kudelski, A. Characterization of thiolate-based mono- and bilayers by vibrational spectroscopy: A review. *Vib. Spectrosc.* **39**, 200–213 (2005).
 88. Bryant, M. A., Pemberton, J. E. Surface Raman Scattering of Self-Assembled Monolayers Formed from 1-Alkanethiols at Ag. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 3629–363 (1991).
 89. Pemberton, J. E., Bryant, M. A., Sobocinski, R. L., Joa, S. L. A Simple Method for Determination of Orientation of Adsorbed Organics of Low Symmetry Using Surface-Enhanced Raman-Scattering. *J. Phys. Chem.* **96**, 3776–3782 (1992).
 90. Meuse, C. W., Niaura, G., Lewis, M. L., Plant, A. L. Assessing the Molecular Structure of Alkanethiol Monolayers in Hybrid Bilayer Membranes with Vibrational Spectroscopies. *Langmuir* **14**, 1604–1611 (1998).
 91. Budvytytė, R., Valinčius, G., Niaura, G., Voiciuk, V., Mickevičius, M., Chapman, H., Goh, H.-Z., Shekhar, P., Heinrich, F., Shenoy, S., *et al.* Structure and Properties of Tethered Bilayer Lipid Membranes with Unsaturated Anchor Molecules. *Langmuir* **29**, 8645 (2013).
 92. Kadziauskas, J. *Biologinės membranos*. (Technologija, 2008).
 93. Köper, I., Schiller, S. M., Giess, F., Naumann, R., Knoll, W. Chapter 2 Functional Tethered Bimolecular Lipid Membranes (tBLMs). *Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes* **3**, 37–53 (2006).
 94. Sackmann, E. Supported Membranes: Scientific and Practical Applications Self-Assembly and Manipulation of Supported Membranes. *Science (80-)*. **271**, 43–48 (1996).
 95. McConnell, H. M., Tamm, L. K., Weis, R. M. Periodic structures in lipid monolayer phase transitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 3249–3253 (1984).
 96. Plant, A. L. Self-Assembled Phospholipid Alkanethiol Biomimetic Bilayers on Gold. *Langmuir* **9**, 2764–2767 (1993).
 97. Lang, H., Duschl, C., Vogel, H. A new class of thiolipids for the attachment of lipid bilayers on gold surfaces. *Langmuir* **10**, 197–210 (1994).
 98. Naumann, R., Schiller, S. M., Giess, F., Grohe, B., Hartman, K. B., Kärcher, I., Köper, I., Lübben, J., Vasilev, K., Knoll, W. Tethered lipid

- bilayers on ultraflat gold surfaces. *Langmuir* **19**, 5435–5443 (2003).
99. McGillivray, D. J., Valinčius, G., Heinrich, F., Robertson, J. W. F., Vanderah, D. J., Febo-Ayala, W., Ignatjev, I., Lösche, M., Kasianowicz, J. J. Structure of functional *Staphylococcus aureus* α -hemolysin channels in tethered bilayer lipid membranes. *Biophys. J.* **96**, 1547–1553 (2009).
 100. Raguse, B., Braach-Maksvytis, V., Cornell, B. A., King, L. G., Osman, P. D. J., Pace, R. J., Wieczorek, L. Tethered lipid bilayer membranes: formation and ionic reservoir characterization. *Langmuir* **14**, 648–659 (1998).
 101. Atanasov, V., Knorr, N., Duran, R. S., Ingebrandt, S., Offenhäusser, A., Knoll, W., Köper, I. Membrane on a Chip: a Functional Tethered Lipid Bilayer Membrane on Silicon Oxide Surfaces. *Biophys. J.* **89**, 1780–1788 (2005).
 102. Tarabara, V. V., Nabiev, I. R., Feofanov, A. V. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study of mercaptoethanol monolayer assemblies on silver citrate hydrosol. Preparation and characterization of modified hydrosol as a SERS-active substrate. *Langmuir* **14**, 1092–1098 (1998).
 103. Michota, A., Kudelski, A., Bukowska, J. Chemisorption of cysteamine on silver studied by surface-enhanced Raman scattering. *Langmuir* **16**, 10236–10242 (2000).
 104. Kudelski, A. Structures of monolayers formed from different HS-(CH₂)₂-X thiols on gold, silver and copper: comparative studies by surface-enhanced Raman scattering. *J. Raman Spectrosc.* **34**, 853–862 (2003).
 105. Hong, S., Li, X. One step surface modification of gold nanoparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy. *Appl. Surf. Sci.* **287**, 318–322 (2013).
 106. Wiedemair, J., Le Thi Ngoc, L., Van Den Berg, A., Carlen, E. T. Surface-enhanced Raman spectroscopy of self-assembled monolayer conformation and spatial uniformity on silver surfaces. *J. Phys. Chem. C* **118**, 11857–11868 (2014).
 107. Kudelski, A., Hill, W. Raman study on the structure of cysteamine monolayers on silver. *Langmuir* **15**, 3162–3168 (1999).
 108. Cao, Q., Li, F., Lu, Y., Xue, G. The Adsorption of 2-Mercaptoethanol on Silver Mirror and HCl-Etched Iron. *Spectrosc. Lett.* **31**, 167–175 (1998).
 109. Wehling, B., Hill, W., Klockow, D. Crosslinking of organic acid and isocyanate to silver SERS substrates by mercaptoethanol. *Chem. Phys. Lett.* **225**, 67 (1994).
 110. Kudelski, A. Chemisorption of 2-mercaptoethanol on silver, copper, and gold: Direct Raman evidence of acid-induced changes in adsorption/desorption equilibria. *Langmuir* **19**, 3805–3813 (2003).
 111. Bloxham, S., Eicher-Lorka, O., Jakubėnas, R., Niaura, G. Adsorption

- of Cysteamine at Copper Electrodes as Studied by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Spectrosc. Lett.* **36**, 211–226 (2003).
112. Joo, S. W., Han, S. W., Kim, K. Adsorption Characteristics of 1,3-Propanedithiol on Gold: Surface-Enhanced Raman Scattering and Ellipsometry Study. *J. Phys. Chem. B* **104**, 6218–6224 (2000).
 113. Bryant, M. A., Pemberton, J. E. Surface Raman Scattering of Self-Assembled Monolayers Formed from 1-Alkanethiols: Behavior of Films at Au and Comparison to Films at Ag. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 8284–8293 (1991).
 114. Szafranski, C., Tanner, W., Laibinis, P., Garrell, R. Surface-enhanced Raman spectroscopy of halogenated aromatic thiols on gold electrodes. *Langmuir* **14**, 3580–3589 (1998).
 115. Fletcher, M. C., Vivoni, A., Moore, M. M., Lui, J., Caldwell, J., Prokes, S. M., Glembocki, O., Hosten, C. M. NIR-FT-SERS of 4''-trimethylsilylethylsulfanyl-4,4'-di(phenyleneethynylene)benzenethiol on Au nanospheres. *Surf. Sci.* **602**, 1614–1621 (2008).
 116. Bron, M., Holze, R. Structural Studies of Self Assembled Monolayers of 4-Mercaptopyridine on Gold Electrodes with Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Solid State Electrochem.* **19**, 2673–2682 (2015).
 117. Schmitt, K. G., Schmidt, R., Von-Horsten, H. F., Vazhenin, G., Gewirth, A. A. 3-Mercapto-1-Propanesulfonate for Cu Electrodeposition Studied by in Situ Shell-Isolated Nanoparticle-Enhanced Raman Spectroscopy, Density Functional Theory Calculations, and Cyclic Voltammetry. *J. Phys. Chem. C* **119**, 23453–23462 (2015).
 118. Mrozek, M. F., Weaver, M. J. Periodic trends in monoatomic chemisorbate bonding on platinum-group and other noble-metal electrodes as probed by surface-enhanced raman spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 150–155 (2000).
 119. Dai, Q., Gellman, A. J. A HREELS study of C1-C5 straight chain alcohols on clean and pre-oxidized Ag(110) surfaces. *Surf. Sci.* **257**, 103–112 (1991).
 120. Czamara, K., Majzner, K., Pacia, M. Z., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M. Raman spectroscopy of lipids: A review. *J. Raman Spectrosc.* **46**, 4–20 (2015).
 121. Yamini, D., Devanand Venkatasubbu, G., Kumar, J., Ramakrishnan, V. Raman scattering studies on PEG functionalized hydroxyapatite nanoparticles. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **117**, 299–303 (2014).
 122. Noto, V. Di, Furlani, M., Lavina, S. Synthesis, characterization and ionic conductivity of poly[(oligoethylene oxide) ethoxysilane] and poly[(oligoethylene oxide) ethoxysilane]/(EuCl₃)_{0.67}. *Polym. Adv. Technol.* **7**, 759–767 (1996).
 123. Dai, S., Zhang, X., Du, Z., Huang, Y., Dang, H. Structural properties

- and Raman spectroscopy of lipid Langmuir monolayers at the air-water interface. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **42**, 21–28 (2005).
124. Valinčius, G., Mickevičius, M., Penkauskas, T., Jankunec, M. Electrochemical Impedance Spectroscopy of Tethered Bilayer Membranes: An Effect of Heterogeneous Distribution of Defects in Membranes. *Electrochim. Acta* **222**, 904–913 (2016).
 125. Valinčius, G., Mickevičius, M. Tethered Phospholipid Bilayer Membranes. An Interpretation of the Electrochemical Impedance Response. In *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* 27–61 (Elsevier Inc., 2015).
 126. García-Raya, D., Madueño, R., Sevilla, J. M., Blázquez, M., Pineda, T. Electrochemical Characterization of a 1,8-Octanedithiol Self-Assembled Monolayer (ODT-SAM) on a Au(1 1 1) Single Crystal Electrode. *Electrochim. Acta* **53**, 8026–8033 (2008).
 127. Widrig, C. A., Chung, C., Porter, M. D. the Electrochemical Desorption of N-Alkanethiol Monolayers From Polycrystalline Au and Ag Electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **310**, 335–359 (1991).
 128. Nandy, S. K., Mukherjee, D. K., Roy, S. B., Kastha, G. S. Vibrational Spectra and Rotational Isomerism in 2-Mercaptoethanol. *Can. J. Chem.* **51**, 1139–1141 (1973).
 129. Ramírez, P., Andreu, R., Cuesta, Á., Calzado, C. J., Calvente, J. J. Determination of the potential of zero charge of Au(111) modified with thiol monolayers. *Anal. Chem.* **79**, 6473–6479 (2007).
 130. Talaikis, M., Eicher-Lorka, O., Valincius, G., Niaura, G. Water-induced structural changes in the membrane-anchoring monolayers revealed by isotope-edited SERS. *J. Phys. Chem. C* **120**, 22489–22499 (2016).
 131. Proniewicz, E., Ignatjev, I., Niaura, G., Sobolewski, D., Prahl, A., Proniewicz, L. M. Role of Phe-D5 isotopically labeled analogues of bradykinin on elucidation of its adsorption mode on Ag, Au, and Cu electrodes. Surface-enhanced Raman spectroscopy studies. *J. Raman Spectrosc.* **44**, 1096–1104 (2013).
 132. Valinčius, G., McGillivray, D. J., Febo-Ayala, W., Vanderah, D. J., Kasianowicz, J. J., Lösche, M. Enzyme activity to augment the characterization of tethered bilayer membranes. *J. Phys. Chem. B* **110**, 10213–10216 (2006).
 133. Noda, I. Advances in two-dimensional correlation spectroscopy (2DCOS). In *Frontiers and Advances in Molecular Spectroscopy* 47–75 (Elsevier Inc., 2018).
 134. Krafft, C., Neudert, L., Simat, T., Salzer, R. Near infrared Raman spectra of human brain lipids. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **61**, 1529–1535 (2005).
 135. Orendorff, C. J., Ducey, M. W., Pemberton, J. E. Quantitative correlation of Raman spectral indicators in determining conformational order in alkyl chains. *J. Phys. Chem. A* **106**, 6991–6998

- (2002).
136. Koenig, L., Angood, A. C. Spectra of Poly(ethylene Glycols) in Solution. *J. Polym. Sci. Part A-2* **8**, 1787–1796 (1970).
 137. Samuel, A. Z., Umapathy, S. Energy funneling and macromolecular conformational dynamics: A 2D Raman correlation study of PEG melting. *Polym. J.* **46**, 330–336 (2014).
 138. Sagitova, E. A., Prokhorov, K. A., Nikolaeva, G. Y., Baimova, A. V., Pashinin, P. P., Yarysheva, A. Y., Mendelev, D. I. Raman analysis of polyethylene glycols and polyethylene oxides. *J. Phys. Conf. Ser.* **999**, 1–10 (2018).
 139. Freire, R. S., Pessoa, C. A., Mello, L. D., Kubota, L. T. Direct electron transfer: An approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. *J. Braz. Chem. Soc.* **14**, 230–243 (2003).
 140. Minter, S. D., Milton, R. D. Direct enzymatic bioelectrocatalysis: differentiating between myth and reality. *J. R. Soc. Interface* **14**, 20170253 (2017).
 141. Gutiérrez-Sánchez, C., Pita, M., Vaz-Domínguez, C., Shleev, S., De Lacey, A. L. Gold nanoparticles as electronic bridges for laccase-based biocathodes. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 17212–17220 (2012).
 142. Saboe, P. O., Conte, E., Farrell, M. E., Bazan, G. C., Kumar, M. Biomimetic and bioinspired approaches for wiring enzymes to electrode interfaces. *Energy Environ. Sci.* **10**, 14–42 (2017).
 143. Lindgren, A., Tanaka, M., Ruzgas, T., Gorton, L., Gazaryan, I., Ishimori, K., Morishima, I. Direct electron transfer catalysed by recombinant forms of horseradish peroxidase: insight into the mechanism. *Electrochem. commun.* **1**, 171–175 (1999).
 144. Kudelski, A. Surface-enhanced Raman scattering study of monolayers formed from mixtures of 4-mercaptobenzoic acid and various aromatic mercapto-derivative bases. *J. Raman Spectrosc.* **40**, 2037–2043 (2009).
 145. Dagys, M., Haberska, K., Shleev, S., Arnebrant, T., Kulys, J., Ruzgas, T. Laccase-gold nanoparticle assisted bioelectrocatalytic reduction of oxygen. *Electrochem. commun.* **12**, 933–935 (2010).
 146. Murata, K., Kajiya, K., Nakamura, N., Ohno, H. Direct electrochemistry of bilirubin oxidase on three-dimensional gold nanoparticle electrodes and its application in a biofuel cell. *Energy Environ. Sci.* **2**, 1280 (2009).
 147. Keating, C. D., Kovaleski, K. M., Natan, M. J. Protein:colloid conjugates for surface enhanced Raman scattering: Stability and control of protein orientation. *J. Phys. Chem. B* **102**, 9404–9413 (1998).
 148. Dick, L., Haes, A., Duyne, R. Van. Distance and Orientation Dependence of Heterogeneous electron transfer: a surface-enhanced resonance Raman scattering study of cytochrome c bound to carboxylic acid terminated alkanethiols adsorbed. *J. Phys. Chem. B*

- 104**, 11752–11762 (2000).
149. Kong, J., Yu, S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **39**, 549–559 (2007).
 150. Oladepo, S. A., Xiong, K., Hong, Z., Asher, S. A., Handen, J., Lednev, I. K. UV resonance Raman investigations of peptide and protein structure and dynamics. *Chem. Rev.* **112**, 2604–2628 (2012).
 151. Wen, Z.-Q. Raman spectroscopy of protein pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.* **96**, 2861–2878 (2007).
 152. Takeuchi, H. UV Raman markers for structural analysis of aromatic side chains in proteins. *Anal. Sci.* **27**, 1077–86 (2011).
 153. Takeuchi, H. Raman structural markers of tryptophan and histidine side chains in proteins. *Biopolym. - Biospectroscopy Sect.* **72**, 305–317 (2003).
 154. Siamwiza, M. N., Lord, R. C., Chen, M. C., Takamatsu, T., Harada, I., Matsuura, H., Shimanouchi, T. Interpretation of the Doublet at 850 and 830 cm⁻¹ in the Raman Spectra of Tyrosyl Residues in Proteins and Certain Model Compounds. *Biochemistry* **14**, 4870–4876 (1975).
 155. Kocherbitov, V., Latynis, J., Misiūnas, A., Barauskas, J., Niaura, G. Hydration of lysozyme studied by Raman spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **117**, 4981–4992 (2013).
 156. Huang, C.-Y., Balakrishnan, G., Spiro, T. G. Protein Secondary Structure from Deep-UV Resonance Raman Spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **37**, 277–282 (2006).
 157. Rygula, A., Majzner, K., Marzec, K. M., Kaczor, A., Pilarczyk, M., Baranska, M. Raman spectroscopy of proteins: A review. *J. Raman Spectrosc.* **44**, 1061–1076 (2013).
 158. Waldron, K. J., Robinson, N. J. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 25–35 (2009).
 159. Siiman, O., Young, N. M., Carey, P. R. Resonance raman spectra of ‘blue’ copper proteins and the nature of their copper sites. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 744–748 (1976).
 160. Andrew, C. R., Sanders-Loehr, J. Copper-Sulfur Proteins: Using Raman Spectroscopy to Predict Coordination Geometry. *Acc. Chem. Res.* **29**, 365–372 (1996).
 161. Han, J., Adman, E. T., Beppu, T., Codd, R., Freeman, H. C., Huq, L. L., Loehr, T. M., Sanders-Loehr, J. Resonance Raman spectra of plastocyanin and pseudoazurin: evidence for conserved cysteine ligand conformations in cupredoxins (blue copper proteins). *Biochemistry* **30**, 10904–10913 (1991).
 162. Andrew, C. R., Han, J., Den Blaauwen, T., Van Pouderoyen, G., Vijgenboom, E., Canters, G. W., Loehr, T. M., Sanders-Loehr, J. Cysteine Ligand Vibrations are Responsible for the Complex Resonance Raman Spectrum of Azurin. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2**, 98–

- 107 (1997).
163. Blair, D. F., Campbell, G. W., Schoonover, J. R., Chan, S. I., Gray, H. B., Malmstrom, B. G., Pecht, I., Swanson, B. I., Woodruff, W. H., Cho, W. K., *et al.* Resonance Raman Studies of Blue Copper Proteins: Effect of Temperature and Isotopic Substitutions. Structural and Thermodynamic Implications. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 5755–5766 (1985).
164. Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. a, Shleev, S. V, Yaropolov, A. I. ‘Blue’ Laccases. *Biochem.* **72**, 1136–1150 (2007).
165. Dagys, M., Lamberg, P., Shleev, S., Niaura, G., Bachmatova, I., Marcinkeviciene, L., Meškys, R., Kulys, J., Arnebrant, T., Ruzgas, T. Comparison of bioelectrocatalysis at *Trichaptum abietinum* and *Trametes hirsuta* laccase modified electrodes. *Electrochim. Acta* **130**, 141–147 (2014).
166. Ratautas, D., Tetianec, L., Marcinkevičienė, L., Meškys, R., Kulys, J. Bioanode with alcohol dehydrogenase undergoing a direct electron transfer on functionalized gold nanoparticles for an application in biofuel cells for glycerol conversion. *Biosens. Bioelectron.* **98**, 215–221 (2017).
167. Falk, M., Blum, Z., Shleev, S. Direct electron transfer based enzymatic fuel cells. *Electrochim. Acta* **82**, 191–202 (2012).
168. Lee, S. K., George, S. D., Antholine, W. E., Hedman, B., Hodgson, K. O., Solomon, E. I. Nature of the intermediate formed in the reduction of O₂ to H₂O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 6180–6193 (2002).
169. Olejnik, P., Palys, B., Kowalczyk, A., Nowicka, A. M. Orientation of laccase on charged surfaces. Mediatorless oxygen reduction on amino- and carboxyl-ended ethylphenyl groups. *J. Phys. Chem. C* **116**, 25911–25918 (2012).
170. Shleev, S., Jarosz-Wilkolazka, A., Khalunina, A., Morozova, O., Yaropolov, A., Ruzgas, T., Gorton, L. Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. *Bioelectrochemistry* **67**, 115–124 (2005).
171. Shleev, S., Tkac, J., Christenson, A., Ruzgas, T., Yaropolov, A. I., Whittaker, J. W., Gorton, L. Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 2517–2554 (2005).
172. Thorum, M. S., Anderson, C. A., Hatch, J. J., Campbell, A. S., Marshall, N. M., Zimmerman, S. C., Lu, Y., Gewirth, A. A. Direct, electrocatalytic oxygen reduction by laccase on anthracene-2-methanethiol-modified gold. *J. Phys. Chem. Lett.* **1**, 2251–2254 (2010).
173. Shleev, S., Reimann, C. T., Serezhenkov, V., Burbaev, D. Autoreduction and aggregation of fungal laccase in solution phase: possible correlation with a resting form of laccase. *Biochimie* **88**,

- 1275–1285 (2006).
174. Wu, F., Su, L., Yu, P., Mao, L. Role of organic solvents in immobilizing fungus laccase on single-walled carbon nanotubes for improved current response in direct bioelectrocatalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 1565–1574 (2017).
 175. Pita, M., Shleev, S., Ruzgas, T., Fernandez, V. M., Yaropolov, A. I., Gorton, L. Direct heterogeneous electron transfer reactions of fungal laccases at bare and thiol-modified gold electrodes. *Electrochem. commun.* **8**, 747–753 (2006).
 176. Cracknell, J. A., McNamara, T. P., Lowe, E. D., Blanford, C. F. Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*: X-ray determination of the complete crystal structure and a rational surface modification for enhanced electrocatalytic O₂ reduction. *Dalt. Trans.* **40**, 6668–6675 (2011).
 177. Shleev, S., Pita, M., Yaropolov, A. I., Ruzgas, T., Gorton, L. Direct heterogeneous electron transfer reactions of *Trametes hirsuta* laccase at bare and thiol-modified gold electrodes. *Electroanalysis* **18**, 1901–1908 (2006).
 178. Shleev, S., Andoralov, V., Falk, M., Reimann, C. T., Ruzgas, T., Srnc, M., Ryde, U., Rulišek, L. On the possibility of uphill intramolecular electron transfer in multicopper oxidases: electrochemical and quantum chemical study of bilirubin oxidase. *Electroanalysis* **24**, 1524–1540 (2012).
 179. Shleev, S., Christenson, A., Serezhenkov, V., Burbaev, D., Yaropolov, A., Gorton, L., Ruzgas, T. Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native *Trametes hirsuta* laccase at gold electrode. *Biochem. J.* **385**, 745–754 (2005).
 180. Agrawal, K., Chaturvedi, V., Verma, P. Fungal Laccase Discovered but Yet Undiscovered. *Bioresour. Bioprocess.* **5**, 1 (2018).
 181. Fernández-Fernández, M., Sanromán, M. Á., Moldes, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol. Adv.* **31**, 1808–1825 (2013).
 182. Dagys, M. Function of Multicopper Oxidases Adsorbed on Gold Nanoparticles. *Daktaro disertacija.* (2012).
 183. Hakulinen, N., Kiiskinen, L. L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paanen, A., Koivula, A., Rouvinen, J. Crystal structure of a laccase from *melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 601–605 (2002).
 184. Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.* **277**, 37663–37669 (2002).
 185. Kitagawa, T., Hirota, S. Raman Spectroscopy of Proteins. *Handbook of Vibrational Spectroscopy* vol. 1 3426–3446 (2006).
 186. López-Tobar, E., Hernández, B., Ghomi, M., Sanchez-Cortes, S. Stability of the disulfide bond in cystine adsorbed on silver and gold

- nanoparticles as evidenced by SERS data. *J. Phys. Chem. C* **117**, 1531–1537 (2013).
187. Suh, J. S., Moskovits, M. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Amino Acids and Nucleotide Bases Adsorbed on Silver. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 4711–4718 (1986).
188. Lee, H. I., Suh, S. W., Kim, M. S. Raman spectroscopy of L-tryptophan-containing peptides adsorbed on a silver surface. *J. Raman Spectrosc.* **19**, 491–495 (1988).
189. Razmoute-Razmè, I., Kuodis, Z., Eicher-Lorka, O., Niaura, G. SERS observation of soft C-H vibrational mode of bifunctional alkanethiol molecules adsorbed at Au and Ag electrodes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 4564–4568 (2010).
190. Mazur, M., Krysinski, P., Michota-Kaminska, A., Bukowska, J., Rogalski, J., Blanchard, G. J. Immobilization of laccase on gold, silver and indium tin oxide by zirconium-phosphonate-carboxylate (ZPC) coordination chemistry. *Bioelectrochemistry* **71**, 15–22 (2007).
191. Gao, P., Weaver, M. J. Surface-enhanced Raman spectroscopy as a probe of adsorbate-surface bonding: Benzene and monosubstituted benzenes adsorbed at gold electrodes. *J. Phys. Chem.* **89**, 5040–5046 (1985).
192. Ohta, N., Yagi, I. In situ surface-enhanced Raman scattering spectroscopic study of pyridine adsorbed on gold surfaces comprised of plasmonic crystal structures. *J. Phys. Chem. C* **112**, 17603–17610 (2008).
193. Podstawka-Proniewicz, E., Ignatjev, I., Niaura, G., Lombardi, J. R., Proniewicz, L. M. Potential Induced Changes in Neuromedin B Adsorption on Ag, Au, and Cu Electrodes Monitored by Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Phys. Chem. B* **115**, 10525–10536 (2011).

PADĖKA

Dėkoju disertacijos darbo moksliniam vadovui prof. habil. dr. Gediminui Niaurai už suteiktą galimybę atlikti mokslinį darbą, pagalbą ruošiant disertaciją, už patarimus, perduotas žinias, susižavėjimą mokslu ir meilę virpesinei spektroskopijai. Dėkoju moksliniam konsultantui prof. dr. Gintarui Valinčiui už suteiktą galimybę atlikti doktorantūrą Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje. Taip pat dėkoju dr. Olegui Eicher-Lorkai davusiam vertingų patarimų gilinantis į kvantinės chemijos skaičiavimus.

Taip pat esu be galo dėkingas bendradarbiams, kolegoms ir draugams iš Biochemijos instituto (VU) ir Organinės chemijos skyriaus (FTMC) už darbingą ir kartais nevisai darbingą atmosferą.

Noriu padėkoti dr. Daliui Ratautui ir dr. Irinai Bratkovskajai už fermentinių elektrodų paruošimą bei dr. Liucijai Marcinkevičienei iš VU Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus, vadovaujamo dr. Rolando Meškio, už *Didymocrea sp.* ir *Trichaptum abietinum* lakazes.

Dėkoju tiems, kurie prisidėjo prie šios disertacijos *kitaip*. Pirmiausiai dėkoju savo žmonai Ievai už palaikymą, mamai Zitai ir seneliui Vytautui. Dėkoju pasiutusiam gamtos vaikiui Jusčiui ir ^\ . Atskira padėka keliauja Simonai ir ponui Charmsui už neprailgstančius pastarojo vizitus ir po jų liekančius neišbrendamus kalnus katino plaukų.

PUBLIKACIJŲ KOPIJOS

1 Publikacija

Talaikis, M., Eicher-Lorka, O., Valincius, G., Niaura, G.

**Water-Induced Structural Changes in the Membrane-Anchoring
Monolayers Revealed by Isotope-Edited SERS**

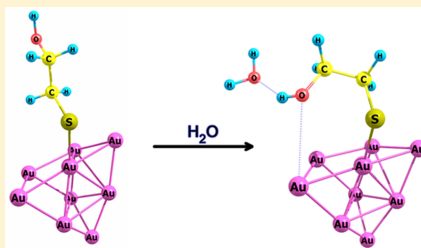
J. Phys. Chem. C, 120 (39), 22489–22499 (2016)

Water-Induced Structural Changes in the Membrane-Anchoring Monolayers Revealed by Isotope-Edited SERS

Martynas Talaikis,[†] Olegas Eicher-Lorka,[‡] Gintaras Valincius,[†] and Gediminas Niaura^{*†}[†]Institute of Biochemistry, Vilnius University, Sauletekio Ave. 7, LT-10257 Vilnius, Lithuania[‡]Department of Organic Chemistry, Center for Physical Sciences and Technology, Sauletekio Ave. 3, LT-10257 Vilnius, Lithuania

Supporting Information

ABSTRACT: Water is required for biological function of tethered bilayer lipid membranes (tBLMs) consisting of a lipid bilayer anchored by a mixed self-assembled monolayer (SAM) to a solid support. In this work, water-induced structural changes in mixed SAMs and bonding with gold substrate were probed in situ by the isotope-edited SERS coupled with the first-principles calculations. The assignment of the bands was based on experimental analysis of deuterated 2-mercaptoethanol (ME-D₄) and quantum chemical modeling of adsorption complexes consisting of a Au cluster of 10 atoms. Evidence for interaction of the gauche conformer with the Au surface through both S and O atoms was obtained from the analysis of the Au–S/Au–O vibrational mode near 303 cm⁻¹ and adsorption-induced downshift of the C–O stretching band near 1100 cm⁻¹. First-principles calculations of adsorption complexes revealed shortening of the Au–O bond upon hydrogen bonding of explicit water molecule to the OH group of ME-D₄. Intense bands in the SERS spectrum near 679 and 597 cm⁻¹ were assigned to C–S vibrational modes of adsorbed ME-D₄ in trans and gauche conformation, respectively. Analysis of relative intensities revealed a decrease in relative amount of trans conformers after 72 h incubation of the SAM in water. At the same time an increase in the population of a long carbon chain molecular anchor (WC14) in the all-trans hydrocarbon chain conformation was detected by SERS. Observed structural changes suggest water-induced clustering of long-chain anchors and conformational transition for short-chain thiols.



1. INTRODUCTION

Tethered bilayer lipid membranes (tBLMs) are useful models of biological membranes as well as a matrix for construction of biosensors and development of biomedical-related diagnostic tools.^{1–5} Self-assembled monolayers (SAMs) are widely used to tether bilayer lipid membranes to the surface of the metal substrate. The function of these molecular anchors is to 2-fold. First of all, the lipid motif of anchor molecules intercalates into the bilayer of phospholipids and ligates the membrane to the planar support. The second function of anchors is to keep the bilayer of phospholipids at a certain distance from the metal surface and provide an exchangeable water reservoir between the membrane and solid substrate. The thin water layer is an essential structural element of tBLMs ensuring functional reconstitution of transmembrane proteins.⁶

The anchor molecule typically contains bonding to a surface group (usually thiol or disulfide in the case of gold substrate), a hydrophilic oligoethylene oxide segment, and hydrophobic alkane or alkene chains. These long-chain anchor molecules must be diluted at the surface by low molecular weight thiols or disulfides (backfiller) to provide required space for an internal water reservoir and biologically relevant fluidity of the proximal layer of the tethered membrane. Properties of the submembrane are critically important in understanding the electrical response of the tethered bilayer.⁷ Surprisingly, regardless of

their importance, there is very little detailed information on submembrane arrangement as well as the role of water in shaping molecular architecture of the tethered bilayer. Molecular simulations have revealed that clustering of the tether molecules may lead to detachment of the bilayer and formation of pore-like membrane structure.⁸ The importance of covalent bond formation between the tether molecule and substrate for preparation of membranes with hydrated underlayer was demonstrated by neutron and X-ray reflectometry.⁹ It was shown that the tether molecules containing a double bond in the alkyl segments form membranes with increased fluidity required for the incorporation of integral membrane proteins.⁵ Recent studies by reflection absorption infrared spectroscopy (RAIRS) and atomic force microscopy (AFM) have revealed the formation of packed clusters of long-chain tether molecules containing saturated alkyl groups upon prolonged time exposure of monolayer to water.¹⁰ However, water-induced structural changes in the underlayer SAM cannot be fully understood without the detailed analysis of structural conformations taking place in backfillers, short anchoring monolayer dilution thiols.

Received: July 30, 2016

Revised: September 10, 2016

Published: September 12, 2016

In this work, in situ surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) was applied to determine water-induced conformational changes in the membrane-anchoring mixed monolayer composed from short-chain hydrophilic 2-mercaptoethanol (ME) molecules and long-chain compound 20-tetradecyloxy-3,6,9,12,15,18,22-heptaotaxtricantane-1-thiol (hereinafter denoted as WC14) (Figure 1) adsorbed on a nanostructured

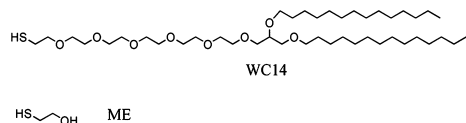


Figure 1. Structures of WC14 [20-tetradecyloxy-3,6,9,12,15,18,22-heptaotaxtricantane-1-thiol, C14 (myristoyl)] and ME (2-mercaptoethanol).

gold substrate. WC14 is quite frequently used as a molecular anchor to form tethered bilayers.^{1–6} SERS is one of the most sensitive spectroscopic tools for probing the adsorbate–surface interactions and structure of adsorbed molecules at certain nanostructured metals.^{11–16} To separate conformation-sensitive C–S stretching bands of ME from that of the long-chain tether molecules (WC14), we have used deuterated 2-mercaptoethanol (ME-D₄, SH–CD₂–CD₂–OH). Theoretical modeling of the surface complex was used to ensure the accurate assignments of SERS spectra and to access bonding with surface details.

2. EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Deuterium-labeled 2-mercaptoethanol-*d*₆ was purchased from C/D/N isotopes. Isotopic enrichment of the compound was 99.6 atom % D. Because of rapid D/H exchange at SD and OD groups this compound rapidly transforms to HS–CD₂–CD₂–OH in water or methanolic solutions. 20-tetradecyloxy-3,6,9,12,15,18,22-heptaotaxtricantane-1-thiol (WC14) was synthesized in house according to the protocol described elsewhere.⁴ Millipore-purified water (18 MΩ cm) was used for preparation of solutions. Chemicals were of ACS reagent grade.

SERS Measurements. All SERS spectra provided in this work were recorded by an inVia Raman microscope (Renishaw) equipped with the thermoelectrically cooled CCD detector and 1200 grooves/mm grating. The near-infrared diode laser provided an excitation beam at 785 nm. The laser power was restricted to 5 mW. The integration time was 100 s. Raman spectra were taken using a long working distance 50×/0.75 NA (Leica) objective lens. In order to reduce laser-irradiation-induced photo- and/or thermal effects the probe holder was constantly moved with respect to the laser beam at a rate of 15–25 mm/s, similarly to that described previously.^{17,18} The Raman frequencies were calibrated using the silicon standard according to the line at 520.7 cm⁻¹. Frequencies and intensities of the Raman bands were determined by fitting the experimental contour with the Gaussian–Lorentzian form components by using GRAMS/AI 8.0 (Thermo Scientific, USA) software. SERS substrates were fabricated by “Altechna” (Laser related products company, Vilnius) and subsequently coated with 2 nm Cr adhesion layer and 200 nm gold layer by the magnetron sputtering using the PVD75 (Kurt J. Lesker Company, USA) system. The substrates were sapphire plates with laser-rippled surfaces which upon

coating with the gold exhibited excellent enhancement of surface Raman spectra. The ripple formation was described elsewhere.^{19,20} Ethanol solutions containing different proportions of long-chain hydrophobic thiols, 20-tetradecyloxy-3,6,9,12,15,18,22-heptaotaxtricantane-1-thiol (hereinafter referred as to WC-14) and short-chain hydrophilic deuterated thiol, β-mercaptoethanol (ME-D₄) with total thiol concentration 0.2 mM, were used to prepare mixed SAMs (Figure 1). The proportions of thiols (ME-D₄/WC14) were as follows: 100/0, 70/30, 30/70, and 0/100. Gold-coated SERS substrates were incubated in SAM formation solutions for 24 h at room temperature, rinsed with ethanol, and blown dried with a nitrogen stream.

Raman Measurements. Raman measurements of depolarization ratios (ρ) of ME-D₄ were performed using a 532 nm (22 mW) excitation wavelength with 5×/0.12 NA objective lens (Leica) by using an inVia Raman microscope (Renishaw). Frequencies were calibrated by the Si line at 520.7 cm⁻¹. The ρ values for standard CCl₄ solution were found to be 0.75 (218 cm⁻¹), 0.75 (315 cm⁻¹), and 0.007 (459 cm⁻¹). Temperature-controlled Raman measurements of the WC14 compound were performed with a LabRam HR 800 spectrometer (Horiba) by using a LinKam temperature control system PE95/T95 with temperature accuracy of 0.05 °C using 785 nm excitation wavelength (30 mW) from the diode laser. Experiments were performed after 50 min equilibration times at each temperature.

Theoretical Modeling. Modeling was performed using Gaussian for Windows package version G09.²¹ Geometry optimization and frequency calculations were accomplished with the DFT method using the B3LYP functional. Calculations were done using the 6-311++G(d,p) basis set for C, H, S, and O atoms and LANL2DZ with ECP for Au atoms. The cluster model used to represent the metal surface was built from 10 Au atoms (Au₁₀). The usefulness of the Au₁₀ cluster for modeling the adsorption of folic acid on the gold surface was recently demonstrated.²² It should be noted that similar results were obtained by using the smaller metal cluster composed of 8 metal atoms. However, to ensure reliable adsorption modeling the Au₁₀ cluster was employed throughout all calculations in this work. Calculated frequencies were scaled by the relation $\nu' = \alpha(\nu) \cdot \nu$, where ν' and $\alpha(\nu)$ are the scaled frequency and scaling factor, respectively. The scaling factor was defined by the following equation²³

$$\alpha(\nu) = 1 - (1 - \alpha^F) \frac{\nu - \nu^0}{\nu^F - \nu^0} \quad (1)$$

using the parameters: $\alpha^F = 0.97$, $\nu^F = 4000$, and $\nu^0 = 600$. Calculated Raman scattering activities (S_j) were scaled by converting them to the Raman cross sections $\partial\sigma/\partial\Omega$ which are proportional to the Raman intensities and can be compared with the experimental data. The Raman scattering cross sections were calculated by using the following equation^{24,25}

$$\frac{\partial\sigma_j}{\partial\Omega} = \left(\frac{2^4\pi^4}{45} \right) \left(\frac{(\nu_0 - \nu_j)^4}{1 - \exp\left[\frac{-h\nu_j}{kT}\right]} \right) \left(\frac{h}{8\pi^2c\nu_j} \right) S_j \quad (2)$$

where ν_0 is the laser excitation frequency; ν_j is the vibrational frequency of the *j*th normal mode; and *h*, *c*, and *k* are the universal constants. Predicted vibrational spectra were generated by using the Lorentzian function for broadening of Raman lines with 4 cm⁻¹ full width at half-maximum (fwhm)

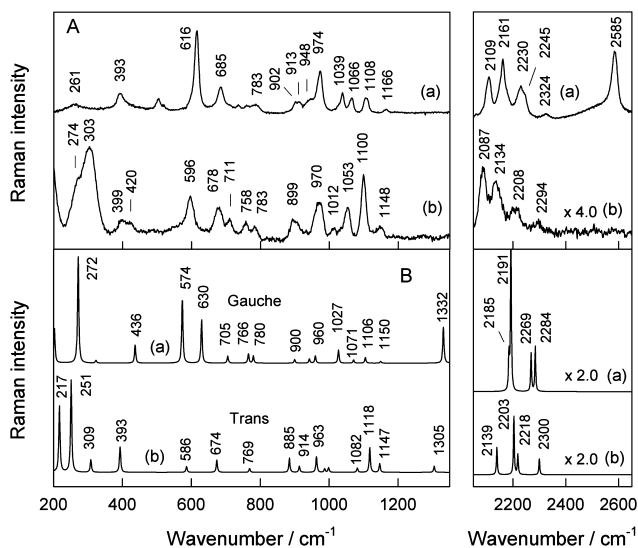


Figure 2. (A) Comparison of Raman spectrum of ME-D₄ (0.5 M aqueous solution) (a) and SERS spectrum of ME-D₄ adsorbed on a Au electrode after 1 h holding time in water (b). (B) Calculated spectra of Au₁₀-ME-D₄ complexes in gauche (a) and trans (b) conformations. Excitation wavelength is 785 nm.

values. The calculated spectra have been free from imaginary wavenumbers confirming that optimized structures of surface complexes are at the minimum of the potential energy surface.²⁶

3. RESULTS AND DISCUSSION

SERS of Deuterated 2-Mercaptoethanol (ME-D₄). 2-Mercaptoethanol (Figure 1) is widely employed as a backfiller for construction of tBLM because of strong covalent bonding with the Au or Ag substrate through the thiol group, short alkyl chain, and hydrophilic terminal group.^{4,5} In this work to avoid spectral interference with the second monolayer component (WC14), we have used deuterated 2-mercaptoethanol (SH-CD₂-CD₂-OH, ME-D₄). Figure 2A compares aqueous solution (0.5 M) and SERS spectra of ME-D₄ in the fingerprint and high frequency spectral regions. To clarify assignments of the SERS bands we have conducted the first-principles quantum chemical calculations of the structure and vibrational spectrum of free ME-D₄ and surface complexes. The calculated spectra of ME-D₄ in both gauche and trans conformations are shown in Figure S1 (Supporting Information).

Figure 3 shows structures of studied compounds optimized at the DFT-B3LYP/6-311++G(d,p) level for C, D, H, S, and O atoms and LANL2DZ with EPC for Au atoms. The calculated spectra of the surface complex from ME-D₄ in gauche and trans conformations and 10 gold atoms (Au₁₀-ME-D₄) are displayed in Figure 2B. Assignments of the bands based on previous studies of similar compounds^{23,27–37} and our own DFT calculations as well as experimental depolarization ratios of ME-D₄ are listed in Table 1. The most intense band in the solution spectrum near 616 cm⁻¹ corresponds to C-S stretching vibration, $\nu(C-S)_G$, of the gauche conformer, while the corresponding trans conformer band, $\nu(C-S)_T$, is

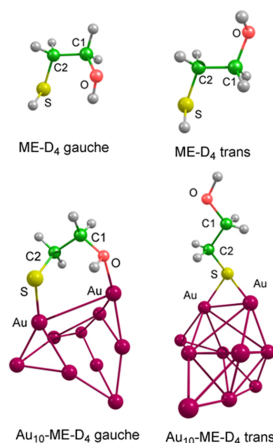


Figure 3. Structures of ME-D₄ in gauche and trans conformation and surface model complexes Au₁₀-ME-D₄ in gauche and trans conformation optimized at the DFT-B3LYP/6-311++G(d,p) level for C, D, H, S, and O atoms and LANL2DZ with EPC for Au atoms.

visible near 685 cm⁻¹. The integrated intensity ratio $A_{\nu(C-S)_T}/A_{\nu(C-S)_G}$ was found to be 0.25. Thus, in the solution phase the dominant -CD₂-CD₂-SH moiety conformation is gauche. The intense 974 cm⁻¹ band in the fingerprint spectral region is associated with the $\nu(C-O)$ vibrational mode coupled with twist(C1D₂) and twist(C2D₂) vibrations. Two middle intensity bands at 1108 and 1066 cm⁻¹ contain contribution from deformation (scissoring) vibration of CD₂ groups and the

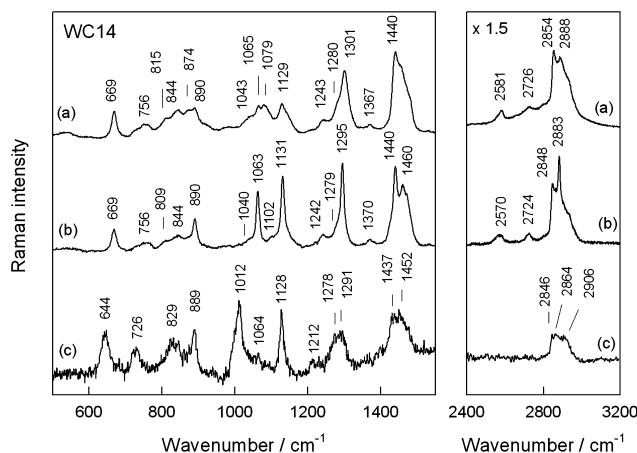
Table 1. Wavenumbers (cm^{-1}), Depolarization Ratios (ρ), and Corresponding Band Assignments of Solution Raman and SERS Spectra of ME-D₄ (SH-C2D₂-CID₂-OH) and Calculated Spectra for ME-D₄ and Surface Complexes Au₁₀-ME-D₄ and Au₁₀-ME-D₄-Water^a

Raman (solution) 0.5 M ME-D ₄	SERS		calculated				assignments
	Au/ME-D ₄ / water	ρ	ME-D ₄ gauche	ME-D ₄ trans	Au ₁₀ -ME-D ₄ gauche	Au ₁₀ -ME-D ₄ -H ₂ O gauche	
2585 vs	0.12	n.a.	2612	2603	n.a.	n.a.	n.a.
2324 w	n.d.	2294 m	2273	2270	2284	2270	2296
2230 s	0.55	2208 m	2238	2254	2269	2262	2232
2161 vs	0.06	2134 s	2188	2180	2191	2185	2196
2109 s	0.07	2087 s	2151	2153	2139	2180	2149
1166 w	0.48	1148 w	1175	1174	1150	1155	1164
1108 m	0.31	1100 vs	1123	1119	1106	1109	1125
1066 m	0.42	1053 s	1069	1083	1071	1070	1082
1039 m	0.18	1012 w	1044	1025	1027	1033	1010
974 s	0.17	970 s	986	977	943	945	978
902 w	0.54	899 br, s	889	902	900	921	882
783 br, w	0.30	783 m	777	732	780	792	775
762 w	n.d.	758 m	759	n.d.	766	771	n.d.
736	n.d.	711 m	656	n.d.	705	698	n.d.
685 m	0.15	678 s	n.a.	671	n.a.	n.a.	652
616 vs	0.13	596 s	607	n.a.	574/630	595	n.a.
393 m	0.21	399 w	409	381	436	n.d.	386
n.a.	n.a.	303 br, s	n.a.	n.a.	272	308/343	n.a.
n.a.	n.a.	274 sh, m	n.a.	n.a.	251	n.a.	282
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

^aAbbreviations: n.a., not applicable; n.d., not determined; vs, very strong; s, strong; m, medium; w, weak; br, broad; sh, shoulder; T, trans; G, gauche.

Table 2. Calculated Bond Lengths (pm) of Gauche and Trans Conformers of ME-D₄ and Surface Complexes Au₁₀-ME-D₄ and Au₁₀-ME-D₄-H₂O

bond	ME-D ₄ gauche	ME-D ₄ trans	Au ₁₀ -ME-D ₄ gauche	Au ₁₀ -ME-D ₄ trans	Au ₁₀ -ME-D ₄ -H ₂ O gauche	Au ₁₀ -ME-D ₄ -H ₂ O Trans
C-S	184.69	183.99	185.66	185.72	185.82	186.08
C-C	152.75	152.87	152.59	152.72	152.57	153.60
C-O	142.19	142.75	145.32	142.16	144.55	140.95
O-H	96.71	96.53	97.58	96.62	99.52	97.66
O...HO					167.22	184.57
Au-S			234.53	241.66/245.37	234.76	241.64/245.40
Au-O			230.74		225.79	

**Figure 4.** Raman spectrum of (a) melted WC14 at 293 K, (b) solid-state WC14 at 243 K, and (c) SERS spectrum of WC14 self-assembled monolayer on the gold electrode in aqueous solution. Excitation wavelength is 785 nm.

$\delta(\text{OH})$ mode. The low intensity highest frequency band in the fingerprint spectral range (1166 cm^{-1}) belongs to the $\nu_{\text{as}}(\text{C2}-\text{C1}-\text{O})$ mode (Table 1). Deformation vibration $\delta_{\text{as}}(\text{C2}-\text{C1}-\text{O})$ is visible near 393 cm^{-1} . In the high frequency region the stretching S-H vibrational mode, $\nu(\text{S}-\text{H})$, appears at 2585 cm^{-1} . Two well-defined bands near 2109 and 2161 cm^{-1} belong to symmetric stretching vibrations $\nu_s(\text{C1D}_2)$ and $\nu_s(\text{C2D}_2)$, respectively.

Adsorption of ME-D₄ at the gold electrode surface results in considerable changes of the vibrational spectrum (Figure 2Ab). The well-defined $\nu(\text{S}-\text{H})$ band at 2585 cm^{-1} of the thiol group disappears in the surface spectrum indicating the cleavage of the S-H bond upon adsorption of ME-D₄ at the Au surface. The frequency region of the C-S stretching mode ($550-700\text{ cm}^{-1}$) provides information on gauche/trans isomerization of the $-\text{CD}_2-\text{CD}_2-\text{S}-$ moiety.^{30-34,38-41} Both gauche and trans bands of the ME-D₄ solution spectrum visible at 616 and 685 cm^{-1} downshift upon adsorption to 596 and 678 cm^{-1} , respectively. Such a wavenumber downshift of the $\nu(\text{C}-\text{S})$ mode for adsorbed thiols was explained by interaction with surface-induced withdrawal of electron density from the C-S bond and metal mass effect.^{40,41} However, the adsorption-induced wavenumber shift (Δ) is considerably higher for the gauche conformer ($\Delta = 20\text{ cm}^{-1}$) compared with the trans ($\Delta = 7\text{ cm}^{-1}$) one. Theoretical analysis of adsorption complexes Au₁₀-ME-D₄ and ME-D₄ confirms a considerable $\nu(\text{C}-\text{S})_{\text{G}}$ frequency shift ($\Delta = 33\text{ cm}^{-1}$) for the gauche conformer upon

the formation of the surface complex (Table 1). In contrast, a slight $\nu(\text{C}-\text{S})_{\text{T}}$ frequency upshift ($\Delta = -3\text{ cm}^{-1}$) was predicted for the trans conformer. This is due to the coupling of the $\nu(\text{C}-\text{S})_{\text{T}}$ mode with S-H deformation vibration, $\delta(\text{SH})$, for the ME-D₄ trans conformer in the solution phase. In the surface spectrum the relative intensity of the $\nu(\text{C}-\text{S})_{\text{T}}$ band due to the trans conformer is higher compared with the solution spectrum (Figure 2A). Analysis of integrated intensities revealed an increase in $A_{\nu(\text{C}-\text{S})_{\text{T}}}/A_{\nu(\text{C}-\text{S})_{\text{G}}}$ ratio from 0.25 of solution Me-D₄ to 0.62 for adsorbed thiol. Direct evidence for bonding of ME-D₄ with the surface and formation of Au-S/Au-O bonds comes from the analysis of the low frequency metal-adsorbate stretching spectral region ($200-400\text{ cm}^{-1}$).⁴²⁻⁴⁶ The intense and broad band emerges in the surface spectrum near $303-274\text{ cm}^{-1}$. Based on previous studies^{18,38-44} and our DFT calculations of surface complexes we assign this band to the dominant Au-S stretch contribution. However, in the case of adsorbed Me-D₄ in the gauche conformation, theoretical modeling suggests that the oxygen atom also participates in surface bonding (Figure 3), and this band arises from mixed Au-S and Au-O stretching vibrational modes (Table 1). High-resolution electron energy loss spectroscopic studies have revealed $\nu(\text{Au}-\text{O})$ frequencies at 270 and 330 cm^{-1} for adsorbed ethoxide ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$) and methoxide (CH_3O), respectively.⁴⁷ Theoretical modeling suggests bidentate coordination of the S atom with a gold cluster for the trans conformer, while monodentate coordination is expected for the gauche

structure. Table 2 compares the calculated bond lengths for different conformers and surface-bound complexes. Higher $\nu(\text{C-S})_{\text{T}}$ frequency compared with $\nu(\text{C-S})_{\text{G}}$ corresponds well with the shorter C-S bond of the trans ME-D₄ conformer. Bonding with the Au cluster increases the length of the C-S bond for both studied conformers. Similarly, formation of the Au-O covalent bond increases the C-O bond length. Thus, a red shift is expected for the corresponding stretching vibrational mode for a gauche conformer coordinating with the surface through both S and O atoms. The middle intensity band in the solution ME-D₄ spectrum at 1108 cm⁻¹ contains a high contribution from the C-O stretching vibration (Figure 2A, Table 1). The frequency of this band decreases down to 1100 cm⁻¹ upon adsorption at the Au surface. Calculations predict such a frequency downshift of this mode for the gauche conformer because of the involvement of the OH group in the interaction with the surface; no downshift is expected for the adsorbed trans conformer. Thus, SERS data coupled with first-principles calculations suggest direct bonding of the hydroxyl group of ME-D₄ with the Au surface in the case of gauche adsorption geometry. It should be noted that the Au-S bond is shorter for the surface-bound gauche conformer.

SERS of Anchor Molecule WC14. Figure 4 compares Raman spectra of WC14 in the melted and solid state as well as the SERS spectrum of a WC14 self-assembled monolayer on Au in aqueous solution. Assignments of the bands based on previous studies of similar compounds^{38–52} and our own calculation of model structure (Figure S2, Supporting Information) are listed in Table 3. Comparison of Raman spectra in melted and solid states allows us to distinguish the specific bands sensitive to ordering of the chains and intermolecular interaction between the molecules. A dramatic

Table 3. Raman and SERS Peak Wavenumbers and Vibrational Assignments for WC14^a

wavenumber (cm ⁻¹)			
melted WC14 (293 K)	solid state WC14 (243 K)	SERS Au/WC14/water	assignment
2888 s	2883 vs	2864 m	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
2854 s	2848 s	2846 m	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$
2581 w	2570 w	n.a.	$\nu(\text{S-H})$
1460 s, sh	1460 s	1452 s	$\delta(\text{CH}_2)$ scissoring
1440 vs	1440 vs	1437 s	$\delta(\text{CH}_2)$ scissoring
1367 w	1370 w	1363 w, br	$t(\text{CH}_2)$; wag(CH_2)
1301 vs	1295 vs	1291 m, br	$t(\text{CH}_2)$
1280 w, sh	1279 w, sh	1278 m	$t(\text{CH}_2)$ EO chain
1243 w	1242 w	1212 w	$t(\text{CH}_2)$ EO chain
1129 m	1131 vs	1128 vs	$\nu(\text{C-C})_{\text{T}}$; $\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$
1079 m			$\nu(\text{C-C})_{\text{G}}$
1065 w	1063 s	1064 w	$\nu(\text{C-C})_{\text{T}}$
1043 w	1040 w	1012 vs	$\nu_{\text{s}}(\text{C-O-C})$
890 w	890 m	889 s	$r(\text{CH}_3)_{\text{T}}$
874 m			$r(\text{CH}_3)_{\text{G}}$
844 m	844 w	829 m, br	$r(\text{CH}_2)$ EO chain
756 w	756 w		$r(\text{CH}_2)$
731 w	733 w, sh	726 m	$\nu(\text{C-S})_{\text{T}}$
669 m	669 m	644 s	$\nu(\text{C-S})_{\text{G}}$

^aAbbreviations: n.a., not applicable; s, strong; vs, very strong; m, middle; w, weak; sh, shoulder; ν , stretching; ν_{as} , asymmetric stretching; ν_{s} , symmetric stretching; δ , deformation; t, twist; wag, wagging; r, rock; T, trans; G, gauche.

increase in intensity of three well-defined bands at 1063, 1131, and 1295 cm⁻¹ due to $\nu(\text{C-C})_{\text{T}}$ and $t(\text{CH}_2)$ vibrational modes is consistent with the formation of the extended all-trans conformation structure of hydrocarbon chains at 243 K temperature.^{40–42,48} The dominant trans conformation of terminal CH₃ groups at low temperature is visible from the sharp trans conformational marker band $r(\text{CH}_3)_{\text{T}}$ at 890 cm⁻¹.^{40,49}

In the high frequency region, lowering the temperature-induced shift of the $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ band near 2888–2883 cm⁻¹ and considerable increase of its intensity, the $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ band downshifts to 2848 cm⁻¹. These spectral changes are consistent with the formation of ordered hydrocarbon chains.^{40,41,48} However, the presence of the $\nu(\text{C-S})_{\text{G}}$ band at 669 cm⁻¹ indicates that the terminal SH-CH₂-CH₂-O- group remains in gauche conformation at both studied temperatures (Table 3). Calculations of the model structure (Figure S2, Supporting Information) support assignment of the 669 cm⁻¹ band to the gauche conformer of WC14; in the calculated Raman spectrum the $\nu(\text{C-S})_{\text{G}}$ band was found at 663 cm⁻¹ (Figure S3, Supporting Information). While the Raman spectra provide a comprehensive description of alkyl chains of WC14, less information can be acquired about the structure of the ethylene oxide (-CH₂-CH₂-O-, EO) segment. The low intensity band at 1243 cm⁻¹ of melted WC14 was assigned to twisting vibration of EO methylene groups.^{50,51} Lowering of temperature does not induce significant changes in parameters of this band. Some contribution from the asymmetric stretching vibration of the C-O-C group might be expected for the 1129 cm⁻¹ band (Table 3). Formation of a self-assembled monolayer of WC14 molecules on the Au electrode surface at 293 K results in noticeable changes in parameters of vibrational bands (Figure 4c). The peak position of the $\nu(\text{C-S})_{\text{G}}$ band downshifts by 25 cm⁻¹ in the SERS spectrum (644 cm⁻¹) due to the formation of a covalent Au-S bond induced withdrawal of electron density from the C-S bond and metal mass influence.^{40,41} The corresponding trans conformer band $\nu(\text{C-S})_{\text{T}}$ also appears at lower wavenumbers (726 cm⁻¹) compared with the solid state WC14 spectrum. The narrow band near 1128 cm⁻¹ corresponds to the $\nu(\text{C-C})_{\text{T}}$ vibrational mode and indicates the dominant trans conformation of alkyl chains of WC14 in the adsorbed state. Similarly, the well-defined band near 889 cm⁻¹ points to the trans conformation of terminal methyl groups of alkyl chains. Some enhancement of bands associated with the EO group is expected in the SERS spectrum because of closer proximity to the surface of the EO segment compared with alkyl chains. The intense 1012 cm⁻¹ band is assigned to the $\nu_{\text{s}}(\text{C-O-C})$ vibrational mode of the EO segment. The frequency downshift compared with the liquid-state WC14 spectrum (1043 cm⁻¹) indicates structural transformation of the EO moiety in the adsorbed state. The other EO band, $t(\text{CH}_2)$, is located near 1278 cm⁻¹ in the SERS spectrum. It should be noted that an intense 1128 cm⁻¹ band may contain some contribution from $\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$ of EO as well.^{50,51} The strong band visible in the calculated spectrum of the model structure near 1152 cm⁻¹ belongs to in-phase $\nu(\text{C-O})$ stretching vibration of the EO chain (Figure S3, Supporting Information).

SERS of Mixed Monolayers. One of the most important features of a mercaptoethanol self-assembled monolayer is the gauche/trans isomerization in the adsorbed state. To separate $\nu(\text{C-S})_{\text{T}}$ and $\nu(\text{C-S})_{\text{G}}$ bands from similar bands of adsorbed WC14, we have used isotopically edited SERS by replacing

mercaptoethanol with a deuterated analogue (ME-D₄). Figure 5 compares SERS spectra in the C–S stretching frequency region of self-assembled monolayers formed from ME-D₄ and WC14 compounds.

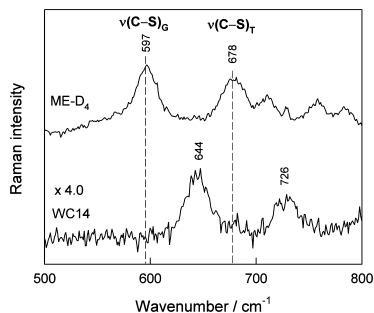


Figure 5. SERS spectra in the C–S stretching band spectral region of pure ME-D₄ and WC14 self-assembled monolayers on gold electrode in aqueous solution. Excitation wavelength is 785 nm.

The $\nu(\text{C-S})_{\text{G}}$ and $\nu(\text{C-S})_{\text{T}}$ bands of ME-D₄ downshift from undeuterated compound by as much as 47 and 48 cm^{-1} , respectively, enabling independent analysis of the isomerization ratio for both studied compounds in the mixed monolayer. Figure 6 shows SERS spectra of pure ME-D₄ and WC14 as well as mixed ME-D₄/WC14 self-assembled monolayers on Au. The broad and intense low frequency band near 277 cm^{-1} for pure WC14 monolayer corresponds to the $\nu(\text{Au-S})$ stretching vibrational mode. In the mixed SAMs and pure ME-D₄ monolayer the peak position of the metal–ligand band upshifts to 301–303 cm^{-1} because of mixing $\nu(\text{Au-S})/\nu(\text{Au-O})$

vibrations. The relative intensity of ME-D₄ bands is considerably higher compared with WC14. In the high frequency region the C–D stretching vibrations of ME-D₄ are well separated from C–H vibrations of WC14. In the fingerprint spectral region the WC14 contribution can be most clearly recognized from the sharp 1129 cm^{-1} band. Observation of this band in the mixed monolayer points to the organization of some alkyl chains in trans conformation. However, the intensity of the $\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$ mode of WC14 drops considerably in the presence of ME-D₄. This might be associated with alignment of EO segments more parallel to surface configuration and thus decreasing the surface enhancement for this vibrational mode. The 1053 cm^{-1} band of ME-D₄ downshifts by several cm^{-1} upon mixing the ME-D₄ with WC14. Because this band is associated with scissoring deformation vibration of CD₂ groups coupled with OH deformation mode, frequency shift might be associated with changes in hydrogen bonding interaction in the mixed monolayer. In the high frequency range the peak positions of $\nu_{\text{as}}(\text{C1D}_2)$ and $\nu_{\text{as}}(\text{C2D}_2)$ downshift in the mixed monolayer from 2208 and 2294 cm^{-1} to 2201 and 2287 cm^{-1} , respectively.

Effect of Water on the Structure of Mixed Monolayers. Figure 7 shows evolution of SERS spectra obtained from the mixed monolayer Au/ME-D₄/WC14 (70%/30%) with increasing time of exposure to water. The incubation time in water was varied from 5 min to 72 h. All the presented SERS spectra were collected at the same acquisition and laser power conditions; however we found that the intensity of SERS spectra increases at higher incubation times. This might be associated with structural rearrangement of the monolayer and modification of the metal/ligand interface. Therefore, in this work only relative intensities were considered, which were normalized according to the intensity of the 1100 cm^{-1} band associated with the $\delta(\text{C1D}_2)$ vibrational mode of ME-D₄. The most obvious changes are associated with $\nu(\text{C-S})_{\text{G}}$ and $\nu(\text{C-S})_{\text{T}}$

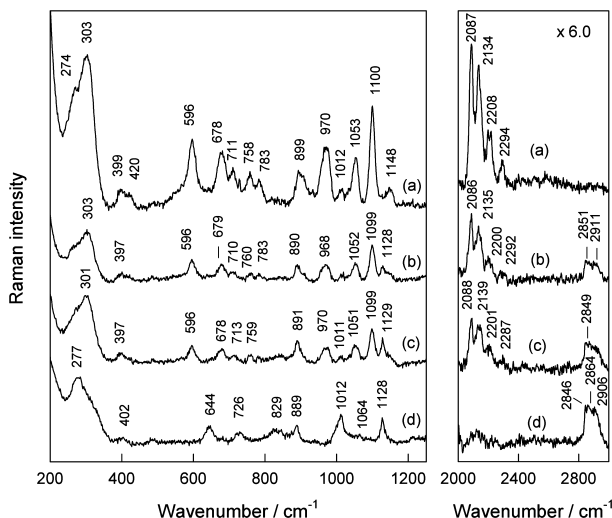


Figure 6. SERS spectra of monolayers self-assembled on Au from ethanolic solution containing (a) 100% ME-D₄, (b) 70% ME-D₄/30% WC14, (c) 30% ME-D₄/70% WC14, and (d) 100% WC14. Samples were incubated in water for 1 h. Excitation wavelength is 785 nm.

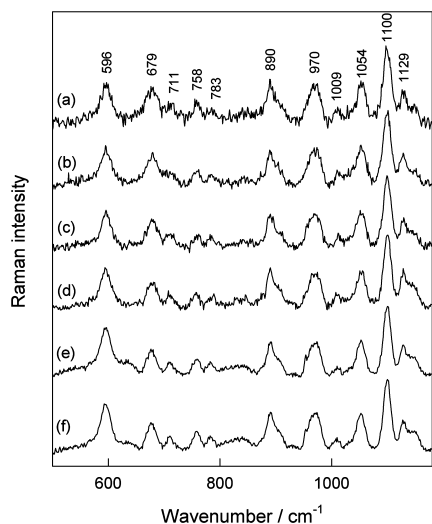


Figure 7. SERS spectra of the tether layer self-assembled on the Au surface from ethanolic solution containing ME-D₄ (70%) and WC14 (30%) incubated in water for (a) 5 min, (b) 30 min, (c) 60 min, (d) 24 h, (e) 48 h, and (f) 72 h. Spectra are normalized according to the intensity of the ME-D₄ band $\delta(\text{C1D}_2)$ at 1100 cm⁻¹. Excitation wavelength is 785 nm.

S)_T bands in the vicinity of 596 and 679 cm⁻¹, respectively; the relative intensity of the $\nu(\text{C-S})_T$ band decreases at longer incubation times. Such a tendency is clearly visible from the incubation time-difference spectrum presented in Figure 8A.

The positive going peak in the difference spectrum at 595 cm⁻¹ indicates an increase in relative intensity of gauche conformers in the mixed monolayer at 72 h incubation time compared with a 30 min one. More quantitative analysis of the dependence of integrated intensity ratio A_T/A_G on monolayer incubation time in water is depicted in Figure 8B; 72 h exposure to water decreases ratio A_T/A_G from 0.75 to 0.33 indicating an increase in fraction of adsorbed gauche conformers. Such an adsorption geometry favors an interaction with the gold substrate through both sulfur and oxygen atoms (Figure 3). Because the OH group of ME-D₄ is able to participate in strong H-bonding with solvent molecules we have considered the surface complexes with an added explicit water molecule (Figure 9). Calculation of model structures with explicit water molecule Au₁₀-ME-D₄-H₂O shows hydrogen bonding interaction with adsorbed ME-D₄ through the hydrogen atom of the OH group for both gauche and trans conformers. Surprisingly, interaction with the solvent molecule results in considerable shortening of the Au-O bond for surface-coordinated gauche conformer (Table 2). The hydrogen-bonding (O...HO) strength between the explicit water molecule and surface complex is considerably stronger for the adsorbed gauche conformer; the bond length was found to be 167.22 and 184.57 pm for gauche and trans complexes, respectively (Table 2). Adsorption geometry in the gauche conformation should induce changes in water arrangement at the interface because of stronger hydrogen bonding interaction with the OH group of adsorbed ME-D₄.

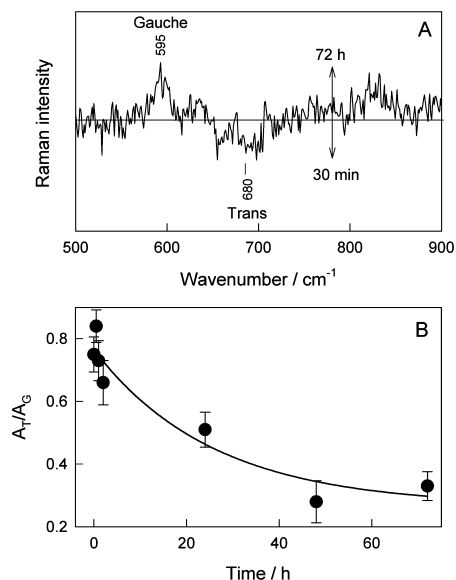


Figure 8. (A) Difference SERS spectrum of the tether layer self-assembled on the Au surface from ethanolic solution containing ME-D₄ (70%) and WC14 (30%) obtained by incubation in water for 72 h and 30 min. (B) Dependence of integrated intensity ratio of trans and gauche components of C-S stretching band of ME-D₄ (A_T/A_G) on immersion time.

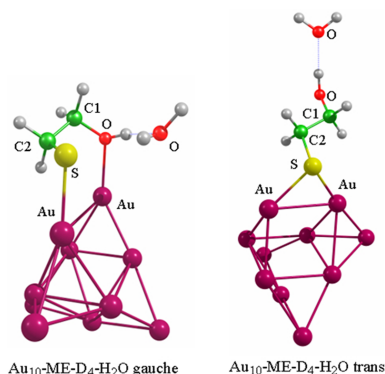


Figure 9. Structures of surface model complexes with explicit water molecule Au₁₀-ME-D₄-H₂O in gauche and trans conformation optimized at the DFT-B3LYP/6-311++G(d,p) level for C, D, H, S, and O atoms and LANL2DZ with EPC for Au atoms.

To ascertain water-induced structural changes of adsorbed WC14, we have formed the mixed monolayer from the solution containing 70% WC14 and 30% ME-D₄ (Figure 10). Again, intensities of SERS spectra were higher at longer incubation times. Therefore, spectra were normalized according to the intensity of the ME-D₄ band $\delta(\text{C1D}_2)$ at 1099 cm⁻¹. An increase in relative intensity of the gauche band of ME-D₄ near

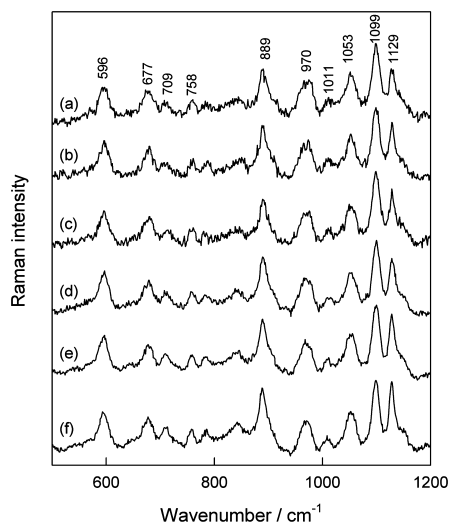


Figure 10. SERS spectra of the tether layer self-assembled on the Au surface from ethanolic solution containing ME-D₄ (30%) and WC14 (70%) incubated in water for (a) 5 min, (b) 30 min, (c) 60 min, (d) 24 h, (e) 48 h, and (f) 72 h. Spectra are normalized according to the intensity of the ME-D₄ band $\delta(\text{C1D}_2)$ at 1099 cm⁻¹. Excitation wavelength is 785 nm.

596 cm⁻¹ compared to the trans component at 677 cm⁻¹ is visible at longer incubation times. In addition, the increase in relative intensity of the sharp band near 1129 cm⁻¹ associated mainly with the $\nu(\text{C}-\text{C})_{\text{T}}$ vibrational mode of WC14 is clearly seen. Water-induced spectral changes are clearly visible in the incubation time-difference spectrum (Figure 11A). The intense positive-going feature appears near 1128 cm⁻¹ together with less intense bands at 888 and 843 cm⁻¹. As can be seen from Figure 11B, the integrated intensity ratio A_{1129}/A_{1099} increases nearly linearly with increasing incubation time in water. Because this band is associated with C–C stretching vibration of the hydrocarbon chain in all-trans conformation, observed augmentation of the SERS band indicates water-induced changes in intrachain order of adsorbed WC14; the portion of chains with all-trans conformation increases. In addition, the difference spectrum demonstrates that structural changes take place in the vicinity of terminal methylene groups of alkyl chains. The positive-going feature at 888 cm⁻¹ belongs to the rocking vibrational mode of CH₃ groups in trans conformation (Table 3). An increase of this band intensity at longer incubation times points to water-induced reorganization of terminal methylene groups toward the preferred trans conformation. Thus, presented in situ SERS data reveal the water-induced rearrangement of the mixed monolayer toward formation of WC14 clusters with more extended all-trans conformation of alkyl chains and increase in fraction of gauche conformers for adsorbed short mercaptoethanol molecules.

4. CONCLUSIONS

The function of tethered bilayer lipid membranes critically depends on the structure of the anchor monolayer.¹⁰ The anchor monolayer usually consists of short low molecular

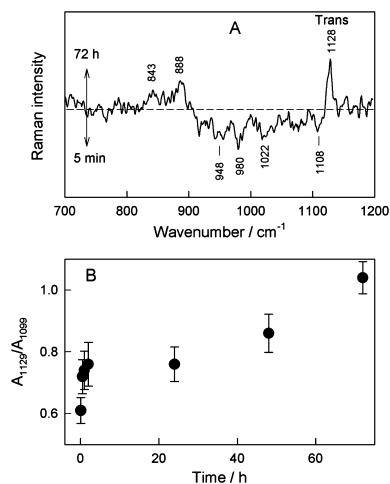


Figure 11. (A) Difference SERS spectrum of the tether layer self-assembled on a Au surface from ethanolic solution containing ME-D₄ (30%) and WC14 (70%) obtained by incubation in water for 72 h and 5 min. (B) Dependence of integrated intensity ratio of C–C stretching vibration of WC14 in all-trans hydrocarbon chain conformation and 1099 cm⁻¹ band of ME-D₄ (A_{1129}/A_{1099}) on immersion time.

weight thiols (backfillers) and long-chain anchor molecules self-assembled at the metal surface.^{3–5} The present study provides a detailed insight into the water-induced structural changes in mixed monolayers employed to anchor phospholipid bilayers to surfaces. To distinguish 2-mercaptoethanol C–S stretching bands from that of WC14 in the mixed monolayer, we have employed isotope-edited SERS spectroscopy by using thiol labeled by four deuterium atoms (SH–CD₂–CD₂–OH, ME-D₄). In situ isotope-edited surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with theoretical modeling of surface complexes revealed bonding with surface details and water-induced rearrangement of both monolayer constituents. The Au–S stretching vibrational mode was identified to a broad and intense band near 277 cm⁻¹ for the pure WC14 monolayer. In the mixed SAMs and pure ME-D₄ monolayer, the metal-adsorbate band was found at higher frequency (301–303 cm⁻¹). Theoretical modeling of gauche and trans Au₁₀–ME-D₄ complexes revealed that this upshift is associated with mixing of $\nu(\text{Au}-\text{S})$ and $\nu(\text{Au}-\text{O})$ vibrational modes, thus confirming interaction of the oxygen atom with a gold substrate for the gauche conformer of ME-D₄. DFT calculations with added explicit water molecule (Au₁₀–ME-D₄–H₂O) revealed considerable shortening of the Au–O bond ($\delta = 4.95$ pm) for the surface-coordinated gauche conformer. Analysis of the C–S stretching band has demonstrated that the fraction of –CD₂–CD₂–S– moiety gauche conformers for adsorbed mercaptoethanol increases with increasing immersion time in water. Theoretical modeling suggests that such adsorption geometry favors the interaction of thiol with the gold substrate through both sulfur and oxygen atoms. In the case of long-chain monolayer constituent WC14, we observed changes in intramolecular ordering of the thiol. Particularly, we found that the fraction of alkyl chains in all-trans conformation increases with increasing time of sample exposure to water.

Spectroscopically observed changes in the structure of mixed anchor monolayer are consistent with water-induced formation of clusters of long-chain WC14 thiols¹⁰ with simultaneous increase in fraction of adsorbed gauche conformers of short backfiller thiol.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b07686.

Raman spectrum of ME-D₄ and calculated spectra of ME-D₄ in gauche and trans conformations (Figure S1), fragment of WC14 compound used for calculations of Raman spectrum (Figure S2), Raman spectrum of solid-state WC14 at 243 K and calculated spectrum of WC14 fragment (Figure S3), and full citation of refs 5 and 21(PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +370 52729642. Fax: +370 52729196. E-mail: gediminas.niaura@ftmc.lt.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the Department of Organic Chemistry of the Center for Physical Sciences and Technology in Vilnius (Lithuania) and Center of Spectroscopic Characterization of Materials and Electronic/Molecular Processes (SPECTROVERSUM) for use of in Via Raman microscope. The authors gratefully acknowledge the European Social Fund for the financial support through the agreement No. VPI-3.1-ŠMM-10-V-02-024 (project MiniFob). The authors thank the High Performance Computing Center "HPC Sauletekis" of Faculty of Physics at Vilnius University for computational resources.

■ REFERENCES

- (1) Naumann, R. L. C.; Nowak, C.; Knoll, W. Proteins in Biomimetic Membranes: Promises and Facts. *Soft Matter* **2011**, *7*, 9535–9548.
- (2) Cornell, B. A.; Braach-Maksyitis, V. L. B.; King, L. G.; Osman, P. D. J.; Raguse, B.; Wiczorek, L.; Pace, R. J. A Biosensor that Uses Ion-Channel Switches. *Nature* **1997**, *387*, 580–583.
- (3) Naumann, R.; Schiller, S. M.; Giess, F.; Grohe, B.; Hartman, K. B.; Kärcher, I.; Köper, I.; Lübbers, J.; Vasilev, K.; Knoll, W. Tethered Lipid Bilayers on Ultraflat Gold Surfaces. *Langmuir* **2003**, *19*, 5435–5443.
- (4) McGillivray, D. J.; Valincius, G.; Vanderah, D. J.; Febo-Ayala, W.; Woodward, J. T.; Heinrich, F.; Kasianowicz, J. J.; Lösche, M. Molecular-Scale Structural and Functional Characterization of Sparsely Tethered Bilayer Lipid Membranes. *Biointerphases* **2007**, *2*, 21–33.
- (5) Budvytyte, R.; Valincius, G.; Niaura, G.; Voicuk, V.; Mickevicius, M.; Chapman, H.; Goh, H.-Z.; Shekhar, P.; Heinrich, F.; Shenoy, S.; et al. Structure and Properties of Tethered Bilayer Lipid Membranes With Unsaturated Anchor Molecules. *Langmuir* **2013**, *29*, 8645–8656.
- (6) McGillivray, D. J.; Valincius, G.; Heinrich, F.; Robertson, J. W. F.; Vanderah, D. J.; Febo-Ayala, W.; Ignatjev, I.; Lösche, M.; Kasianowicz, J. J. Structure of Functional *Staphylococcus aureus* α -Hemolysin Channels in Tethered Bilayer Lipid Membranes. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 1547–1553.
- (7) Valincius, G.; Meškauskas, T.; Ivanauskas, F. Electrochemical Impedance Spectroscopy of Tethered Bilayer Membranes. *Langmuir* **2012**, *28*, 977–990.
- (8) Liu, C.; Faller, R. Conformational, Dynamical, and Tensional Study of Tethered Bilayer Lipid Membranes in Coarse-Grained Molecular Simulations. *Langmuir* **2012**, *28*, 15907–15915.
- (9) Watkins, E. B.; El-Khoury, R. J.; Miller, C. E.; Seaby, B. G.; Majewski, J.; Marques, C. M.; Kuhl, T. L. Structure and Thermodynamics of Lipid Bilayers on Polyethylene Glycol Cushions: Facts and Fiction of PEG Cushioned Membranes. *Langmuir* **2011**, *27*, 13618–13628.
- (10) Rakovska, B.; Ragalauškas, T.; Mickevicius, M.; Jankunec, M.; Niaura, G.; Vanderah, D. J.; Valincius, G. Structure and Function of Membrane Anchoring Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **2015**, *31*, 846–857.
- (11) Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G. *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects*; Elsevier: Amsterdam, 2009.
- (12) Tian, Z. Q.; Ren, B. Adsorption and Reaction at Electrochemical Interfaces Probed by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2004**, *55*, 197–229.
- (13) Schlücker, S. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Concepts and Chemical Applications. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 4756–4795.
- (14) Butcher, D. P.; Boulos, S. P.; Murphy, C. J.; Ambrosio, R. C.; Gewirth, A. A. Face-Dependent Shell-Isolated Nanoparticle Enhanced Raman Spectroscopy of 2,2'-Bipyridine on Au(100) and Au(111). *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 5128–5140.
- (15) Fletcher, M. C.; Alexson, D. M.; Prokes, S. M.; Glembocki, O. J.; Vivoni, A.; Hosten, C. M. Determination of Molecular Orientation and Order of N-(6-Mercaptoacetylhexyl)quinolinium Tricyanoquinodimethanide Adsorbed on Ag Nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *450*, 54–61.
- (16) Costa, J. C. S.; Ando, R. A.; Camargo, P. H. C.; Corio, P. Understanding the effect of Adsorption Geometry over Substrate Selectivity in the Surface-Enhanced Raman Scattering Spectra of Simazine and Atrazine. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 4184–4190.
- (17) Niaura, G.; Gaigalas, A. K.; Vilker, V. L. Moving Spectroelectrochemical Cell for Surface Raman Spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **1997**, *28*, 1009–1011.
- (18) Bulovas, A.; Dirviainskyte, N.; Talaikyte, Z.; Niaura, G.; Valentukonyte, S.; Butkus, E.; Razumas, V. Electrochemical and Structural Properties of Self-Assembled Monolayers of 2-Methyl-3-(*o*-Mercaptoalkyl)-1,4-Naphthoquinones on Gold. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *591*, 175–188.
- (19) Buividas, R.; Stoddart, P. R.; Juodkazis, S. Laser Fabricated Ripple Substrates for Surface-Enhanced Raman Scattering. *Ann. Phys. (Berlin, Ger.)* **2012**, *524*, L5–L10.
- (20) Buividas, R.; Rosa, L.; Šliupas, R.; Kudrius, T.; Šlekys, G.; Datsyuk, V.; Juodkazis, S. Mechanism of Fine Ripple Formation on Surfaces of (Semi)transparent Materials via a Half-Wavelength Cavity Feedback. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 055304.
- (21) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; et al. *Gaussian 09*, Revision D.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2013.
- (22) Castillo, J. J.; Rindzevicius, T.; Rozo, C. E.; Boisen, A. Adsorption and Vibrational Study of Folic Acid on Gold Nanopillar Structures Using Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy. *Nanomater. Nanotechnol.* **2015**, *5*, 29.
- (23) Riauba, L.; Niaura, G.; Eicher-Lorka, O.; Butkus, E. A Study of Cysteamine Ionization in Solution by Raman Spectroscopy and Theoretical Modeling. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 13394–13404.
- (24) Polavarapu, P. L. Ab Initio Vibrational Raman and Raman Optical Activity Spectra. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 8106–8112.
- (25) Guirgis, G. A.; Klabeo, P.; Shen, S.; Powell, D. L.; Gruodis, A.; Aleksa, V.; Nielsen, C. J.; Tao, J.; Zheng, C.; Durig, J. R. Spectra and Structure of Silicon-Containing Compounds. XXXVI-Raman and Infrared Spectra, Conformational Stability, Ab Initio Calculations and Vibrational Assignments of Ethyldibromosilane. *J. Raman Spectrosc.* **2003**, *34*, 322–336.

- (26) Costa, J. C. S.; Ando, R. A.; Sant'Ana, A. C.; Corio, P. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Studies of Organophosphorous Model Molecules and Pesticides. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 15645–15651.
- (27) Wehling, B.; Hill, W.; Klockow, D. Crosslinking of Organic Acid and Isocyanate to Silver SERS Substrates by Mercaptoethanol. *Chem. Phys. Lett.* **1994**, *225*, 67–71.
- (28) Cao, Q.; Li, F.; Lu, Y.; Xue, G. The Adsorption of 2-Mercaptoethanol on Silver Mirror HCl-Etched Iron. *Spectrosc. Lett.* **1998**, *31*, 167–175.
- (29) Tarabara, V. T.; Nabiev, I. R.; Feofanov, A. V. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Study of Mercaptoethanol Monolayer Assemblies on Silver Citrate Hydroxol. Preparation and Characterization of Modified Hydroxol as a SERS-Active Substrate. *Langmuir* **1998**, *14*, 1092–1098.
- (30) Kudelski, A. Chemisorption of 2-Mercaptoethanol on Silver, Copper, and Gold: Direct Raman Evidence of Acid-Induced Changes in Adsorption/Desorption Equilibria. *Langmuir* **2003**, *19*, 3805–3813.
- (31) Kudelski, A. Structures of Monolayers Formed from Different HS-(CH)₂-X Thiols on Gold, Silver, and Copper: Comparative Studies by Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Raman Spectrosc.* **2003**, *34*, 853–862.
- (32) Bloxham, S.; Eicher-Lorka, O.; Jakubėnas, R.; Niaura, G. Adsorption of Cysteamine at Copper Electrodes as Studied by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Spectrosc. Lett.* **2003**, *36*, 211–226.
- (33) Kudelski, A.; Hill, W. Raman Study on the Structure of Cysteamine Monolayers on Silver. *Langmuir* **1999**, *15*, 3162–3168.
- (34) Michota, A.; Kudelski, A.; Bukowska, J. Chemisorption of Cysteamine on Silver Studied by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Langmuir* **2000**, *16*, 10236–10242.
- (35) Wiedemair, J.; Le Thi Ngoc, L.; van den Berg, A.; Carlen, E. T. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Self-Assembled Monolayer Conformation and Spatial Uniformity on Silver Surfaces. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 11857–11868.
- (36) Hong, S.; Li, X. One Step Surface Modification of Gold Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Appl. Surf. Sci.* **2013**, *287*, 318–322.
- (37) Stewart, S.; Fredericks, P. M. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Amino Acids Adsorbed on an Electrochemically Prepared Silver Surface. *Spectrochim. Acta, Part A* **1999**, *55*, 1641–1660.
- (38) Matulaitiene, I.; Kuodis, Z.; Matijoska, A.; Eicher-Lorka, O.; Niaura, G. SERS of the Positive Charge Bearing Pyridinium Ring Terminated Self-Assembled Monolayers: Structure and Bonding Spectral Markers. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 26481–26492.
- (39) Joo, S. W.; Han, S. W.; Kim, K. Adsorption Characteristics of 1,3-Propanedithiol on Gold: Surface-Enhanced Raman Scattering and Ellipsometry Study. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 6218–6224.
- (40) Bryant, M. A.; Pemberton, J. E. Surface Raman Scattering of Self-Assembled Monolayers Formed from 1-Alkanethiols at Ag. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3629–3637.
- (41) Bryant, M. A.; Pemberton, J. E. Surface Raman Scattering of Self-Assembled Monolayers Formed from 1-Alkanethiols: Behavior of Films at Au and Comparison to Films at Ag. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8284–8293.
- (42) Szafranski, C. A.; Tanner, W.; Laibinis, P. E.; Garrell, R. L. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Halogenated Aromatic Thiols on Gold Electrodes. *Langmuir* **1998**, *14*, 3580–3589.
- (43) Fletcher, M. C.; Vivoni, A.; Moore, M. M.; Lui, J.; Caldwell, J.; Prokes, S. M.; Glembocki, O.; Hosten, C. M. NIR-FT-SERS of 4'-trimethylsilylthiolsulfanyl-4,4'-di-(phenyleneethynylene)benzenethiol on Au nanospheres. *Surf. Sci.* **2008**, *602*, 1614–1621.
- (44) Bron, M.; Holze, R. Structural Studies of Self-Assembled Monolayers of 4-Mercaptopyrindine on Gold Electrodes with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Solid State Electrochem.* **2015**, *19*, 2673–2682.
- (45) Schmitt, K. G.; Schmidt, R.; von-Horsten, H.; Vazhenin, G.; Gewirth, A. A. 3-Mercapto-1-Propanesulfonate for Cu Electrodeposition Studied by in Situ Shell-Isolated Nanoparticle-Enhanced Raman Spectroscopy, Density Functional Theory Calculations, and Cyclic Voltammetry. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 23453–23462.
- (46) Mrozek, M. F.; Weaver, M. J. Periodic Trends in Monoatomic Chemisorbate Bonding on Platinum-Group and Other Noble-Metal Electrodes as Probed by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 150–155.
- (47) Dai, Q.; Gellman, A. J. A HREELS Study of C₁-C₂ Straight Chain Alcohols on Clean and Pre-oxidized Ag(110) Surfaces. *Surf. Sci.* **1991**, *257*, 103–112.
- (48) Czamara, K.; Majzner, K.; Pacia, M. Z.; Kochan, K.; Kaczor, A.; Baranska, M. Raman Spectroscopy of Lipids: a Review. *J. Raman Spectrosc.* **2015**, *46*, 4–20.
- (49) Meuse, C. W.; Niaura, G.; Lewis, M. L.; Plant, A. L. Assessing the Molecular Structure of Alkanethiol Monolayers in Hybrid Bilayer Membranes with Vibrational Spectroscopies. *Langmuir* **1998**, *14*, 1604–1611.
- (50) Yamini, D.; Devanand Venkatasubbu, G.; Kumar, J.; Ramakrishnan, V. Raman Scattering Studies on PEG Functionalized Hydroxyapatite Nanoparticles. *Spectrochim. Acta, Part A* **2014**, *117*, 299–303.
- (51) Di Noto, V.; Furlani, M.; Lavina, S. Synthesis, Characterization and Ionic Conductivity of Poly[(oligoethylene oxide)ethoxysilane] and Poly[(oligoethylene oxide)ethoxysilane]/(EuCl₃)_{0.67}. *Polym. Adv. Technol.* **1996**, *7*, 759–767.
- (52) Dai, S.; Zhang, X.; Du, Z.; Huang, Y.; Dang, H. Structural Properties and Raman Spectroscopy of Lipid Langmuir Monolayers at the Air-Water Interface. *Colloids Surf, B* **2005**, *42*, 21–28.

2 Publikacija

Dagys, M., Laurynėnas, A., Ratautas, D., Kulys, J., Vidžiūnaitė, R.,
Talaikis, M., Niaura, G., Marcinkevičienė, L., Meškys, R., Shleev, S.

**Oxygen Electroreduction Catalysed by Laccase Wired to Gold
Nanoparticles via the Trinuclear Copper Cluster**

Energy Environ. Sci., 10 (2), 498–502 (2017)



Cite this: *Energy Environ. Sci.*, 2017, 10, 498

Received 2nd August 2016,
Accepted 26th October 2016

DOI: 10.1039/c6ee02232d

www.rsc.org/ees

Oxygen electroreduction catalysed by laccase wired to gold nanoparticles via the trinuclear copper cluster†

Marius Dagys,^{‡*a} Audrius Laurynėnas,^{‡,ab} Dalius Ratautas,^{‡,ab} Juozas Kulys,^a Regina Vidžiūnaitė,^a Martynas Talaikis,^a Gediminas Niaura,^a Liucija Marcinkevičienė,^a Rolandas Meškys^a and Sergey Shleev^{*cd}

Specific wiring of biocatalysts par excellence, viz. redox enzymes, to an electrode can be exploited in the fabrication of high-performance bioelectronic devices. Here we report oxygen electroreduction catalysed by *Didymocrea* sp. J6 laccase wired to gold nanoparticles via the trinuclear copper cluster. Bypassing the intramolecular electron transfer, which under certain conditions is the rate-limiting step of oxygen bioelectroreduction, has resulted in the fabrication of a high current density biocathode based on high-redox-potential laccase, which is able to operate in electrolytes with a broad pH range in the presence of high fluoride concentrations.

Blue multicopper oxidases (MCOs), in general, and laccase (LAC, benzenediol: O₂ oxidoreductase, EC 1.10.3.2),¹ in particular, are used as biocatalysts in a variety of applications,^{2–4} including the development of cathodes for biofuel cells.^{4,5} Despite certain advantages, such as high redox potentials (up to 790 mV vs. NHE)⁶ and high turnover numbers (up to 500 s^{−1}),⁷ wild-type fungal (*i.e.* high potential) LACs are catalytically active only in acidic electrolytes in the absence of halogens, such as fluoride and chloride ions,^{8,9} which hinders possible application of LAC in cathodes, in bio-solar cells, bio-batteries and biofuel cells including potentially implantable biodevices.

All MCOs, including LAC, catalyse the oxidation of numerous organic and inorganic substrates by O₂, which is reduced directly to H₂O.¹⁰ However, LAC is also the first enzyme for which direct electron transfer (DET) based bioelectrocatalysis has been

Broader context

Oxygen reduction directly to water is a reaction of utmost importance in aerobes as well as in artificial systems like fuel cells. Among different catalysts, redox enzymes are promising objects utilized to achieve efficient, selective, and rapid oxygen electroreduction. However, enzymatic cathodes currently suffer from low performance and rapid inhibition. One of the main reasons is a complex electron transfer mechanism during the biodevice operation, which involves heterogeneous and intramolecular electron transfer reactions. The latter is the rate-limiting step in oxygen bioelectroreduction under physiological conditions. Here we present a unique high-redox-potential enzymatic cathode able to operate in electrolytes with a broad pH range and in the presence of high concentrations of halogen ions. The efficiency of adsorbed enzymes is higher than that in homogeneous catalysis, because of the change of the reaction rate-limiting step achieved by specific orientation of a nanometer-size biocatalyst on a nanostructured surface.

discovered as early as 1978.¹¹ DET reactions imply that no mediators are needed to design LAC based cathodes.⁵ To fabricate high-performance DET-based biodevices, electrodes with a high surface area and high enzyme loading are necessary, which can be accomplished by *e.g.* electrode modification with gold nanoparticles (AuNPs).

AuNPs have received significant attention lately due to unique physical and chemical properties emerging at their nanoscale surfaces.¹² One of the examples of successful application of AuNPs in bioelectrocatalysis is the electrochemistry of MCOs on Au surfaces. Direct adsorption of LAC on bare Au surfaces results in well-pronounced faradaic signals, which are attributed to Cu ions of redox enzymes; however, no bioelectrocatalysis is observed.^{13,14} Meanwhile, bilirubin oxidase (BOX), another member of the MCO family, is bioelectrocatalytically active when adsorbed on bare Au surfaces, but just for a short time.^{15,16} A conformational change has been suggested as a cause of the fast inactivation of these enzymes on smooth electrodes.¹⁶ However, the immobilization of both enzymes on Au covered with AuNPs results in highly active and relatively stable biocathodes.^{17,18}

^a Institute of Biochemistry, Vilnius University, Saulėtekio al. 7, LT-10257, Vilnius, Lithuania. E-mail: marius.dagys@bchi.vu.lt

^b Faculty of Fundamental Sciences, Vilnius Gediminas Technical University, Saulėtekio al. 11, LT-10223, Vilnius, Lithuania

^c Malmö University, Jan Waldenströmsgata 25, SE-214 28, Malmö, Sweden. E-mail: sergey.shleev@mah.se

^d Kurchatov NBICS Centre, National Research Centre "Kurchatov Institute", Akademika Kurchatova pl. 1, 123 182 Moscow, Russia

† Electronic supplementary information (ESI) available: Enzyme purification, characterization, electrode preparation, measurements, calculations and modelling. See DOI: 10.1039/c6ee02232d

‡ These authors contributed equally.

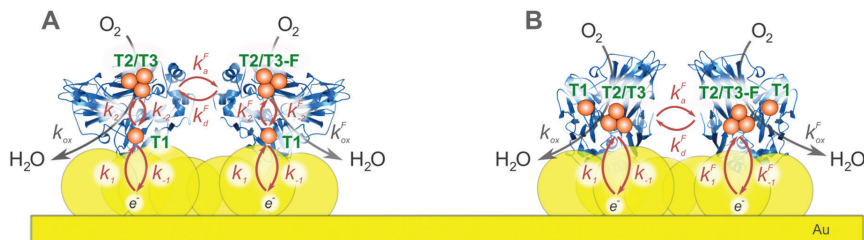


Fig. 1 (A) Generally accepted and (B) proposed schemes of *Didymocrea* sp. J6 LAC catalytic activity on an AuNP modified surface. Parameters k_1 , k_{-1} , k_1^F , and k_{-1}^F represent forward and backward heterogeneous ET constants for native and F^- -inhibited systems, respectively; k_2 , k_{-2} , k_2^F , and k_{-2}^F represent forward and backward intramolecular ET constants for native and F^- -inhibited systems, respectively; k_5^F and k_6^F are F^- association and dissociation rate constants, respectively, for the T2/T3 Cu site; and k_{ox} and k_{ox}^F are bimolecular O_2 reduction rate constants of the native and inhibited T2/T3 Cu sites, respectively.

MCOs, including LAC and BOX, contain four Cu ions at sites denoted as T1, T2 and T3.¹⁰ One T2 and two T3 Cu ions form a trinuclear cluster responsible for O_2 reduction directly to water.¹⁹ It is widely accepted that the T1 Cu site of MCOs including LAC is always the first electron acceptor during homogeneous¹⁰ or heterogeneous^{10,20} biocatalytic reduction of O_2 (Fig. 1A). Therefore, in order to design high-performance enzymatic electrodes for O_2 bioelectroreduction, various strategies are being developed to orient LAC on the electrode such that the T1 site is specifically localized in close proximity to the surface.^{21–23} There are, however, experimentally based indications of DET between the T2/T3 Cu cluster of MCOs and electrode surfaces.^{13,14,24–26} But despite the suggestion of a direct T2/T3 Cu cluster wiring, no biocatalytic currents of O_2 electroreduction have been registered at high redox potentials, probably due to enzyme inactivation. Understanding of the mechanism of electron transfer (ET) during bioelectrocatalysis is both fundamentally and practically relevant. Even though the reduction of O_2 by the T2/T3 Cu cluster of MCOs is a fast process (with apparent bimolecular O_2 reduction constants exceeding $10^6 M^{-1} s^{-1}$),^{19,27,28} bioelectrocatalytic signals can be limited by intramolecular ET (IET).^{15,24,29} Thus, the successful wiring of MCOs to the electrode *via* the T2/T3 copper cluster could be exploited in the fabrication of high-performance biocathodes. Because IET is bypassed, such biocathodes could operate at a maximal rate that exceeds the enzyme turnover in nature. To our best knowledge, this has never been achieved so far.

To create a new bioelectrocatalytic system with a DET contact between the T2/T3 Cu cluster and the electrode surface, the *Didymocrea* sp. J6 LAC, a small enzyme (49 kDa), the carbohydrate content of which does not exceed a few percent of the total mass (*cf.* ESI[†]), has been used therein. The negative effect of glycosylation on heterogeneous ET rates between the active centres of redox enzymes and electrode surfaces is well reported.^{30–32} LAC was immobilized on charged, AuNP-covered electrodes that were polarized at different potentials (0.20–1.00 V *vs.* NHE). Protein adsorption on charged surfaces is well studied,^{33,34} but to our best knowledge no successful attempt to obtain a highly efficient DET-based bioelectrocatalytic system

by adsorbing oxidoreductases to charged surfaces has been reported so far. Typical relationships between working electrode potential, amount of adsorbed LAC and maximum current outputs of the systems are presented in the ESI[†] Table S1. It appears that the amount of the enzyme adsorbed on the electrode was lower at high potentials, but DET-based O_2 bioelectroreduction current densities were higher in this case. The most efficient system was developed by using a potential of 0.80 V. A further increase of the potential up to 1.00 V drastically reduced enzyme adsorption and the turnover number of LAC, possibly due to LAC inactivation. In further experiments, the enzyme was adsorbed on AuNP-modified electrodes (referred to below as AuNP/LAC electrodes) by setting the immobilization potential to 0.80 V. As presented in the ESI[†] Table S1, the one-electron enzyme turnover number in this bioelectrocatalytic system can reach values as high as $23.2 s^{-1}$ (*cf.* ESI[†]).

Cyclic voltammograms (CVs) of LAC–AuNP modified electrodes in working buffer solution (WBS) (50 mM disodium phosphate, 100 mM sodium sulphate, pH adjusted by the addition of citric acid) with different O_2 concentrations were conducted in order to estimate the apparent Michaelis constant (K_M) of LAC towards O_2 (ESI[†] Fig. S1A). Assuming that O_2 concentrations in air and O_2 -saturated WBS were 0.23 and 1.23 mM, respectively,³⁵ K_M values would be 2.0 ± 0.2 , 1.6 ± 0.2 , and 1.1 ± 0.2 mM at potentials of 0.50, 0.60 and 0.70 V *vs.* NHE, respectively (ESI[†] Fig. S1A). These values are significantly higher compared to previously reported values of K_M of MCOs (0.1–0.4 mM) measured in homogeneous biocatalytic^{24,36} and heterogeneous^{15,24,29} bioelectrocatalytic systems. This also indicates that K_M of *Didymocrea* sp. J6 LAC towards O_2 in heterogeneous bioelectrocatalytic system is higher than the O_2 concentration in air-saturated solutions. To prove that there was no limitation in O_2 mass transfer, the influence of the electrode rotation rate on CVs was analysed (ESI[†] Fig. S1B). The data showed the absence of serious diffusion limitations, at least when measurements were performed at 1000 rpm.

AuNP/LAC electrodes were further studied electrochemically in WBS with varying NaF concentrations under different pH values, adjusted after the addition of F^- (Fig. 2, left panel; ESI[†] Table S1). On the one hand, the results are in good agreement

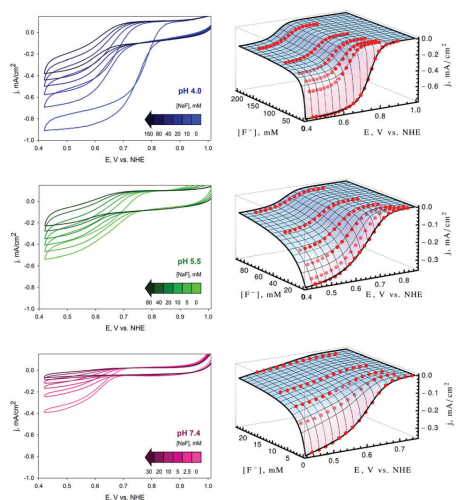


Fig. 2 Left panel: CVs of AuNP/LAC electrodes recorded in WBS with various pH values and NaF concentrations, shown in the insets of the graphs. Conditions: cathodic–anodic scan rate -10 mV s^{-1} , 1000 rpm, 23°C . Right panel: Surface plots (current density vs. electrode potential vs. NaF concentration) generated from the results of mathematical modeling (*cf.* ESI[†] Table S3) of background-current-removed cathodic scan portions of CVs presented in the left panel.

with the literature data concerning bioelectrochemical reduction of O_2 by different MCOs including LACs.⁸ On the other hand, F^- , a well-known LAC inhibitor,³⁶ diminished both bioelectrocatalytic current densities and half-wave potentials of O_2 bioelectroreduction, and these effects were much more pronounced at acidic pH values (*cf.* Fig. 2, left panel). These findings differ from previously published data concerning the electrochemical behaviour of MCOs, including LACs. Usually, F^- ions do not affect the half-wave potentials of O_2 electroreduction catalysed by LACs,^{37,38} and bioelectrocatalytic currents from AuNP/LAC electrodes are completely diminished even when lower concentrations of the inhibitor (1–30 mM) are present.^{18,39} Taking into account that both F^- and OH^- bind to the T2/T3 Cu cluster and hinder the IET from the T1 site to the Cu cluster without any decrease in the cluster's ability to bind O_2 ,³⁶ we speculate that in the designed bioelectrocatalytic system this IET process is absent, or in other words, the orientation of the T2/T3 cluster towards the electrode surface is favourable for DET. To test this hypothesis, additional studies were performed.

Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) investigations of AuNP/LAC electrodes were carried out in order to (i) verify the presence of the enzyme on the electrode surface, (ii) investigate possible spectral features of specific amino acids and/or Cu sites of LAC, and (iii) provide insight into the effect of electrode potential during adsorption on the structure of the adsorbed enzyme. Potential-dependent spectra of adsorbed LAC at an AuNP-modified electrode are presented in Fig. 3. The presence of

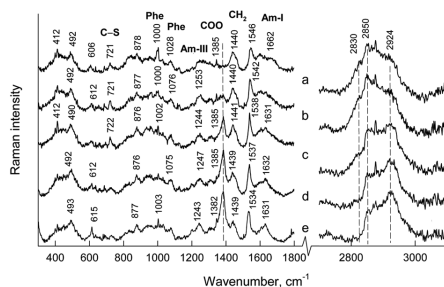


Fig. 3 Typical SERS spectra of LAC immobilized on AuNP-modified electrodes polarized at -0.30 V (a), 0.10 V (b), 0.30 V (c), 0.60 V (d), and 0.80 V (e) (vs. NHE) potentials in the fingerprint (left) and C–H stretching (right) frequency regions. Excitation wavelength was 785 nm (30 mW).

adsorbed proteins can be deduced from the sharp Phe ring vibration near $1000\text{--}1003 \text{ cm}^{-1}$ and the amide-I (Am-I) and amide-III (Am-III) vibrational bands in the vicinity of $1631\text{--}1662$ and $1243\text{--}1253 \text{ cm}^{-1}$, respectively. The broad band located at $1439\text{--}1440 \text{ cm}^{-1}$ belongs to the scissoring vibration of CH_2 groups. The C–H stretching bands of the CH_2/CH_3 groups are visible in the high frequency spectral region (Fig. 3, right). The shift of deposition potential to more positive values resulted in several clear changes. The intense band due to surface-bound COO^- groups appeared near 1385 cm^{-1} and changes in the shape of the broad C–H stretching spectral contour took place. The potential-difference SERS spectra (ESI[†] Fig. S5) show the presence of a broad “soft” C–H stretching mode from CH_2 groups directly interacting with the metal surface at more negative potentials (*cf.* description in the ESI[†]). Thus, SERS spectra revealed potential-induced structural changes from a more extended, flat configuration at more negative electrode potentials, where CH_2 groups directly contact the metal, to a more vertical configuration at positive potentials, where interaction with the surface takes place through the carboxylate groups of protein side chains. Retained enzymatic activity for laccase immobilized on conducting surfaces through the terminal carboxylate groups was recently confirmed.⁴⁰ The presence of SERS spectra from the adsorbed LAC in a wide potential range indicates an irreversible adsorption of the protein on AuNPs. The SERS results indicate that characteristic low-frequency modes from the T1 Cu site are not observed. This might be associated with the geometry of the adsorbed protein, in this case the T1 Cu centre would be positioned relatively far away and the T2/T3 Cu cluster close to the AuNP surface.

To investigate the possible role of the T1 Cu site in the heterogeneous DET mechanism, its redox potential was measured at pH 4.0 and 7.4, as well as in the presence and absence of F^- (*cf.* description in the ESI[†] Fig. 4). The potentials of the T1 Cu site were determined to be 683, 716, and 720 mV at pH 4.0, pH 4.0 with 20 mM NaF, and pH 7.4 without NaF, respectively. The potential of the T1 Cu site was almost independent of the solution pH, as well as on the presence and

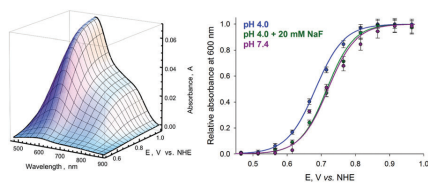


Fig. 4 Spectroelectrochemical measurements of the redox potentials of the LAC T1 Cu site. Left: Oxidative scan in WBS, pH 4.0 without NaF. Right: Dependence of relative absorbance at 600 nm on the electrode potential under different conditions: pH 4.0, pH 4.0 with 20 mM NaF, and pH 7.4. Absorbance values from reductive and oxidative scans are averaged; the curves were modeled according to eqn (S35) and (S36) (cf. ESI†).

absence of F^- . A slight increase in the potential could be attributed to the incomplete removal of O_2 from WBS in the case of pH 7.4 and pH 4.0 with enzyme inhibitor NaF. These results differ to a great extent from the previous data concerning redox potentials of the T1 site of MCOs in homogeneous and heterogeneous systems. In all previous studies, the redox potential increases slightly when pH is decreased, *i.e.* changes by about 0.02 V per pH-unit in another direction.^{24,41} Moreover, F^- ions have no influence on the redox potential of the T1 site of MCOs, but significantly decrease the redox potential of the T2/T3 Cu cluster.^{24,42} Our data concerning the T1 site redox potential of *Didymocrea* sp. J6 LAC have again pointed to the fact that the T2/T3 Cu cluster is the first electron acceptor in the LAC-AuNP bioelectrocatalytic system, since the half-wave potentials of O_2 bioelectroreduction were significantly affected by both solution pH and F^- (ESI,† Table S2).

To strongly support the main claim that LAC is oriented *via* the T2/T3 cluster, when immobilized on bare AuNPs, other electrodes, where LAC is oriented with the T1 Cu site facing the Au surface (Fig. 1A), have also been fabricated and tested. For this purpose, LAC was immobilized on AuNP electrodes modified with a self-assembled monolayer (SAM) using 4-mercaptobenzoic acid (MBA) as a modifier (further referred to as AuNP/MBA/LAC electrodes, ESI†). It has been previously demonstrated that appropriate modification of the Au surface helps to orient LAC *via* the T1 Cu site.^{43,44} Despite a sigmoidal shape of CVs, suggesting the absence of serious limitations in heterogeneous ET, maximal bioelectrocatalytic currents from AuNP/MBA/LAC electrodes were much smaller compared to AuNP/LAC electrodes (ESI,† Fig. S2). Moreover, the addition of even low concentrations of F^- significantly decreased bioelectrocatalytic currents, *e.g.* already at 10 mM NaF in the electrolyte just a negligible bioelectrocatalytic current was observed in the case of AuNP/MBA/LAC, whereas the AuNP/LAC electrodes showed more than 60% of the maximum current output under the same conditions (cf. Fig. S2A and B in the ESI†). Furthermore, the half-wave potential of CVs in the case of the AuNP/MBA/LAC electrode was only slightly decreased when F^- was added to the electrolyte (ESI,† Fig. S3). All the above-mentioned results point to the fact that LAC in AuNP/MBA/LAC is oriented with the T1 Cu site interacting closely with the thiol-modified electrode surface,

demonstrating “usual” electrochemical behaviour of the AuNP/MBA/LAC-based cathodes.

Last but not least, to obtain the final proof for the initially proposed hypothesis concerning the T2/T3-oriented enzyme, detailed kinetic studies of AuNP/LAC in WBS at pH 4.0, 5.5, and 7.4 were performed. The experimental results were modelled according to two kinetic schemes presented in Fig. 1, as summarized in the ESI† (Tables S2–S4 and eqn (S1)–(S22)). Dependences of current density on potential *vs.* NaF concentration, showing a close relationship of modelled parameters to experimental results, are presented in the right panel of Fig. 2. Briefly, the calculated values of $E_{T2/T3}^0$ coincided well with the measured half-wave potentials of O_2 electroreduction for all pH values, only when the kinetic scheme from Fig. 1B was used. Also, calculated apparent bimolecular O_2 reduction constants k_{ox} in the heterogeneous system are comparable to the ones in the homogeneous system at respective pH only for the scheme in Fig. 1B (ESI,† Tables S2 and S4). Moreover, similar modelling was also performed for AuNP/MBA/LAC electrodes, according to the reaction scheme presented in Fig. 1A (eqn (S23)–(S34), ESI†). The results are summarized in the ESI† (Table S5, eqn (S23)–(S29) and Fig. S3). Contrary to AuNP/LAC, in the case of AuNP/MBA/LAC the dependence of the half-wave potential on the F^- concentration could be mathematically described using the kinetic scheme presented in Fig. 1A.

A comparison of the developed bioelectrocatalytic system to state-of-the-art laccase-modified Au electrodes clearly shows that *Didymocrea* sp. AuNP/LAC outperforms most of the previously described LAC-based cathodes, when it comes to current densities and onset potentials of O_2 electroreduction, especially taking into account the redox potential of the T1 site of *Didymocrea* sp. LAC *vs.* *Cerrena unicolor* and *Trametes hirsuta* enzymes (ESI,† Table S6). Moreover, *Didymocrea* sp. AuNP/LAC operates well in neutral and basic electrolytes, whereas other wild-type high-redox-potential laccases are inactive under such conditions. The quite low operational stability of *Didymocrea* sp. AuNP/LAC compared to other LAC-based cathodes is, in all likelihood, attributable to enzyme desorption from the surface of the electrode rotating at high rpm, whereas in all other studies covalently-bound enzymes were exploited (Table S6, ESI†). Nevertheless, direct comparison of biocathodes based on *Didymocrea* sp. LAC showed similar or much better operational stabilities of AuNP/LAC compared to AuNP/MBA/LAC (ESI,† Fig. S4).

In summary, a unique MCO-based bioelectrocatalytic system with the T2/T3 Cu cluster facing the electrode surface was developed. Fundamentally, we have shown the existence of bioelectrocatalytically relevant intermediates of the T2/T3 Cu cluster with redox potentials lower than the potential of the T1 site. This implies a theoretical possibility for an uphill IET during the biocatalytic cycle of LAC under certain conditions, *viz.* high activity of anions in solutions, as was also suggested for another MCO, BOX.²⁴ One can speculate about the possible role of the slow uphill IET as an important factor in regulating the activity of high redox potential MCOs. For practical applications, our findings have potential utility in the design of high-performance

biocathodes operating at room temperature in electrolytes with a broad pH range with an enzyme efficiency higher than that in homogeneous catalysis because of the change of the reaction rate-limiting step.

Acknowledgements

This work was supported by the Research Council of Lithuania (Grant No. MIP-042/2012) in cooperation with the Russian Science Foundation (14-14-00530) as well as the Swedish Research Council (Grant No. 621-2013-6006). The authors thank the Centre for Physical Sciences and Technology (SPECTROVERSUM infrastructure, Vilnius) for the use of the RamanFlex400 spectrometer. The authors also thank Dr Curt T. Reimann from Clarksburg Technical Editing (Clarksburg, MD, USA) for critical reading and useful suggestions.

References

- O. V. Morozova, G. P. Shumakovich, M. A. Gorbacheva, S. V. Shleev and A. I. Yaropolov, *Biochemistry*, 2007, **72**, 1136.
- N. Durán, M. A. Rosa, A. D'Annibale and L. Gianfreda, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **31**, 907.
- O. V. Morozova, G. P. Shumakovich, S. V. Shleev and Y. I. Yaropolov, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2007, **43**, 523.
- M. Fernandez-Fernandez, M. A. Sanroman and D. Moldes, *Biotechnol. Adv.*, 2013, **31**, 1808.
- R. Bilewicz and M. Opallo, *Biocathodes for Dioxygen Reduction in Biofuel Cells, Fuel Cell Science: Theory, Fundamentals, and Biocatalysis*, Wiley, New York, 2010.
- S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. I. Yaropolov, J. W. Whittaker and L. Gorton, *Biosens. Bioelectron.*, 2005, **20**, 2517.
- S. V. Shleev, O. V. Morozova, O. V. Nikitina, E. S. Gorshina, T. V. Rusinova, V. A. Serezhenkov, D. S. Burbaev, I. G. Gazaryan and A. I. Yaropolov, *Biochimie*, 2004, **86**, 693.
- S. Shleev, A. Jarosz-Wilkolazka, A. Khalunina, O. Morozova, A. Yaropolov, T. Ruzgas and L. Gorton, *Bioelectrochemistry*, 2005, **67**, 115.
- D. M. Mate, D. Gonzalez-Perez, M. Falk, R. Kittl, M. Pita, A. L. De Lacey, R. Ludwig, S. Shleev and M. Alcalde, *Chem. Biol.*, 2013, **20**, 223.
- E. I. Solomon, U. M. Sundaram and T. E. Machonkin, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2563.
- I. V. Berezin, V. A. Bogdanovskaya, S. D. Varfolomeev, M. R. Tarasevich and A. I. Yaropolov, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 1978, **240**, 615.
- R. W. Murray, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2688.
- S. Shleev, A. Christenson, V. Serezhenkov, D. Burbaev, A. Yaropolov, L. Gorton and T. Ruzgas, *Biochem. J.*, 2005, **385**, 745.
- M. Pita, S. Shleev, T. Ruzgas, V. M. Fernández, A. I. Yaropolov and L. Gorton, *Electrochem. Commun.*, 2006, **8**, 747.
- L. dos Santos, V. Climent, C. F. Blanford and F. A. Armstrong, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, **12**, 13962.
- D. Pankratov, J. Sotres, A. Barrantes, T. Arnebrant and S. Shleev, *Langmuir*, 2014, **30**, 2943.
- K. Murata, K. Kajiya, N. Nakamura and H. Ohno, *Energy Environ. Sci.*, 2009, **2**, 1280.
- M. Dagys, K. Haberska, S. Shleev, T. Arnebrant, J. Kulys and T. Ruzgas, *Electrochem. Commun.*, 2010, **12**, 933.
- S.-K. Lee, S. DeBeer George, W. E. Antholine, B. Hedman, K. O. Hodgson and E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 6180.
- T. Sakurai and K. Kataoka, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007, **64**, 2642.
- C. F. Blanford, R. S. Heath and F. A. Armstrong, *Chem. Commun.*, 2007, 1710.
- V. Bolland, C. Hureau, A. M. Cusano, Y. Liu, T. Tron and B. Limoges, *Chem. – Eur. J.*, 2008, **14**, 7186.
- C. Vaz-Dominguez, S. Campuzano, O. Ruediger, M. Pita, M. Gorbacheva, S. Shleev, V. M. Fernandez and A. L. De Lacey, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, **24**, 531.
- S. Shleev, V. Andoralov, M. Falk, C. T. Reimann, T. Ruzgas, M. Smeec, U. Ryde and L. Rulisek, *Electroanalysis*, 2012, **24**, 1524.
- S. Shleev, M. Pita, A. I. Yaropolov, T. Ruzgas and L. Gorton, *Electroanalysis*, 2006, **18**, 1901.
- J. A. Cracknell, T. P. McNamara, E. D. Lowe and C. F. Blanford, *Dalton Trans.*, 2011, 6668.
- J. Kulys, K. Krikstopaitis and A. Ziemys, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2000, **5**, 333.
- I. Bratkovskaya, R. Ivanec and J. Kulys, *Biochemistry (Moscow)*, 2006, **71**, 550.
- M. H. Thuesen, O. Farver, B. Reinhammar and J. Ulstrup, *Acta Chem. Scand.*, 1998, **52**, 555.
- A. Lindgren, M. Tanaka, T. Ruzgas, L. Gorton, I. Gazaryan, K. Ishimori and I. Morishima, *Electrochem. Commun.*, 1999, **1**, 171.
- O. Courjean, F. Gao and N. Mano, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 5897.
- R. Ortiz, H. Matsumura, F. Tasca, K. Zahma, M. Samejima, K. Igarashi, R. Ludwig and L. Gorton, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 10315.
- R. A. Hartvig, M. van de Weert, J. Østergaard, L. Jorgensen and H. Jensen, *Langmuir*, 2011, **27**, 2634.
- S. Pasche, J. Vörös, H. J. Griesser, N. D. Spencer and M. Textor, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 17545.
- G. A. Truesdale and A. L. Downing, *Nature*, 1954, **173**, 1236.
- A. Naqui and S. D. Varfolomeev, *FEBS Lett.*, 1980, **113**, 157.
- D. L. Johnson, J. L. Thompson, S. M. Brinkmann, K. A. Schuller and L. L. Martin, *Biochemistry*, 2003, **42**, 10229.
- Y. Liu, L. Huang and S. Dong, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **23**, 35.
- C. Gutierrez-Sanchez, M. Pita, C. Vaz-Dominguez, S. Shleev and A. L. De Lacey, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 17212.
- M. Mazur, P. Krysiński, A. Michota-Kamińska, J. Bukowska, J. Rogalski and G. J. Blanchard, *Bioelectrochemistry*, 2007, **71**, 15.
- B. R. M. Reinhammar, *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, **275**, 245.
- C. Leger, S. J. Elliott, K. R. Hoke, L. J. C. Jeuken, A. K. Jones and F. A. Armstrong, *Biochemistry*, 2003, **42**, 8653.
- M. Pita, C. Gutierrez-Sanchez, D. Olea, M. Velez, C. Garcia-Diego, S. Shleev, V. M. Fernandez and A. L. De Lacey, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 13420.
- P. Olejnik, B. Palys, A. Kowalczyk and A. M. Nowicka, *J. Phys. Chem. C*, 2012, **116**, 25911.

3 Publikacija

Talaikis, M., Valincius, G., Niaura, G.

Potential-Induced Structural Alterations in the Tethered Bilayer Lipid Membrane-Anchoring Monolayers Revealed by Electrochemical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

J. Phys. Chem. C, *124* (35), 19033–19045 (2020)

Potential-Induced Structural Alterations in the Tethered Bilayer Lipid Membrane-Anchoring Monolayers Revealed by Electrochemical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

Martyntas Talaikis, Gintaras Valincius, and Gediminas Niaura*

Cite This: *J. Phys. Chem. C* 2020, 124, 19033–19045

Read Online

ACCESS |



Metrics & More

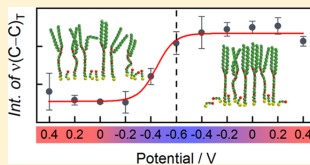


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Mixed self-assembled monolayers (SAMs) are widely used to anchor tethered lipid bilayer membranes (tBLMs) that mimic biological membranes and are useful platforms for fundamental studies and construction of biosensors. Electrode potential is an important variable in the construction of biosensors based on tBLMs and fundamental studies. In this work, potential-induced structural changes in mixed SAMs composed of lipid-like long-chain WC14 molecules and short surface backfiller 2-mercaptoethanol (ME-D₄) was probed in situ by isotope-edited electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy (EC-SERS) coupled with first-principles calculations, reductive desorption voltammetry, and generalized two-dimensional correlation spectroscopy (2DCOS). We show that negative electrode polarization leads to the lengthening of Au–S and Au–O bonds and reorganization of molecules in the headgroup region. Calculations predicted the preferential formation of Au–O bonds of ME-D₄ at more positive electrode potentials. Alkane chains of WC14 form potential-induced clusters at more negative electrode polarization in mixed monolayers, a phenomenon that is witnessed from all-trans vibrations of the C–C group at 1129 cm⁻¹. The evidence of the formation of tBLM on mixed WC14/ME-D₄ SAMs is documented by SERS. Specifically, the peak position of olefin group stretching vibration suggests a fluid-like structure of tBLM. This work provides vibrational spectroscopy evidence for the potential-induced formation of phase-segregation clusters of the hydrophobic thiols in mixed monolayers, a phenomenon that should be considered in preparation of tBLMs, construction of membrane-based biosensors, bioengineering developments, and studies of biomolecular processes using model membranes.



INTRODUCTION

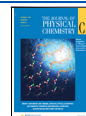
Solid-supported lipid bilayers are a versatile platform that mimics processes at biological membranes and are also used in biosensing and biomedical screening applications.¹ One of the possible architectures of the supported lipid bilayer is the tethered lipid bilayer membrane (tBLM), which is attached to the surface through a self-assembled monolayer (SAM).^{2–4} Anchor molecules, which comprise SAM, usually consist of (i) a surface-active moiety, (ii) a hydrophilic domain, and (iii) hydrophobic acyl chains. The structure of anchor molecules is specifically designed to support tBLM in close proximity to the solid surface and form the submembrane reservoir. Due to a close association of these two properties, the quality of tBLM is highly dependent on the structure of the underlying SAM.

Electrochemical methods are routinely used to investigate tBLMs as they provide key information on the membrane integrity, defect population and distribution,⁵ the electrical capacitance of phospholipid bilayer, and the electrical capacitance of submembrane (Helmholtz) reservoir.^{5,6} Despite that, the effect of potential on the anchoring SAM and, subsequently, the impact on the phospholipid bilayer are not well understood. Several studies have reported that positive potential facilitates the development of SAM and increases the integrity of the final film.^{7–9} On the other hand, higher

potential (starting with 0.60 V vs SHE)⁵ causes oxidation of headgroup's sulfur of the gold–thiolate complex and therefore impels its detachment from the substrate. Furthermore, potential-assisted deposition results in a rigid and well-organized SAM,⁷ the property that is detrimental for the functional properties of tBLM.

Previous studies have shown that mixed-component SAMs molecules in the presence of water tend to aggregate and form surface clusters.^{10,11} This effect diminishes the insulating properties of the tBLMs as aggregation in some surface domains leads to a reduced amount of anchor molecules in other domains. Such heterogeneity is thought to produce bilayer waviness and fluctuation of a lipid density and result in direct contact between tBLM and solid surface.¹¹ In short, the homogeneous distribution of anchor molecules in monolayers is crucial for tethered bilayer systems. Such homogeneity can be achieved by the usage of unsaturated anchor molecules that

Received: May 22, 2020
Revised: July 28, 2020
Published: August 5, 2020



tend less to associate with each other in SAM and consequently results in less defective bilayer membranes.¹²

This work aims to evaluate the structure and order of SAM in relation to the polarization of the electrode. We focus on a mixed-component SAM consisting of membrane-anchoring long-chain thiol WC14 and backfiller deuterated 2-mercaptoethanol (ME-D₄, SH–C2D₂–C1D₂–OH), adsorbed on a gold electrode, probed by using in situ electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy (EC-SERS) technique.^{13–16} Usage of isotopically labeled short backfiller molecules allowed us to discriminate between spectroscopic features of ME-D₄ and WC14 and provided the opportunity to track structural alterations induced by the change in bias potential.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Deuterium-labeled 2-mercaptoethanol-1,1,2,2-d₄ (ME-D₄) was purchased from Sigma-Aldrich. Isotopic enrichment of the compound was 98 atom % D. Long-chain thiol 20-tetradecyloxy-3,6,9,12,15,18,22-heptaaxahexatricontane-1-thiol (WC14) was synthesized in house according to the previously reported protocol.⁴ Figure 1 shows the molecular structures of the studied compounds. Throughout the measurements, ultrapure water (18.2 MΩ cm) and ethanol (99.5%) were used.

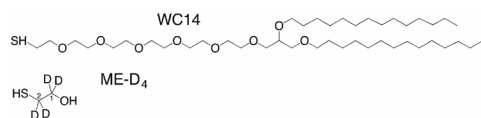


Figure 1. Structures of WC14 [20-tetradecyloxy-3,6,9,12,15,18,22-heptaaxahexatricontane-1-thiol, C₁₄ (myristoyl)] and ME-D₄ (deuterium-labeled 2-mercaptoethanol-1,1,2,2-d₄).

Reductive Desorption. Measurements of the electrode surface coverage and desorption potentials were obtained from the potentiodynamic reductive desorption curves of heptanethiol (HPT), WC14 and ME-D₄ thiols, and mixed WC14/ME-D₄ (30%:70%) monolayers. The desorption was performed from the roughened Au electrode in 0.5 M NaOH + 0.1 M Na₂SO₄ solution at a sweep rate of 50 mV s⁻¹. To calculate the desorption charge density, the real surface area of an electrode was calculated from the analysis of gold oxide reduction peak in the CV curve recorded in 0.5 M H₂SO₄ solution, as previously described.^{17,18} The oxide reduction theoretical charge density was assumed to be 390 μC cm⁻².¹⁷ The real surface was found to be 1.37 cm², yielding the surface roughness factor for the SERS-active Au electrode of 4.89.

SERS Measurements. Electrochemical SERS measurements of monolayers at the Au electrode were carried out using an Echelle-type spectrometer RamanFlex 400 (Perkin Elmer, Inc.) equipped with a thermoelectrically cooled (−50 °C) CCD camera. The 785 nm excitation beam was transmitted and the Raman signal was collected using a fiber optic cable, employing 180° scattering geometry. The laser power at the sample was set to 30 mW and the beam was focused to 200 μm-diameter spot on the surface. Spectroelectrochemical experiments were conducted in a three-electrode cell, which was constantly bubbled with ultrapure N₂ gas to remove residual oxygen from the working solution. Teflon press-fitted polycrystalline Au rod served as a working electrode. The Pt wire and Ag/AgCl (3 M KCl) electrodes

were used as the counter and reference electrodes, respectively. To decrease laser-induced degradation of the sample, the spectroelectrochemical cell was constantly moved in a direction perpendicular to the laser radiation.^{19,20} The working buffer solution contained 0.1 M Na₂SO₄ and 0.01 M Na₂HPO₄ (pH 7). The most negative potential value (−0.80 V) was applied for the WC14 monolayer only. In each measurement sequence, the potential was changed from positive values to negative (cathodic scan) and, subsequently, from negative to positive (anodic scan). Prior to each measurement, the electrode was kept at the selected potential for at least 60 s, which was followed by the spectral acquisition of 300 s. Raman frequencies were calibrated using the polystyrene standard (ASTM E 1840) spectrum and intensities were calibrated by the NIST intensity standard (SRM 2241).²¹

Before the measurements, Au electrode was polished with sandpaper (P2500) and 0.3 μm Al₂O₃ slurry and then sonicated in water-ethanol mixture (1:1, v/v) to refresh the surface. Further, five potential cycles between 0.00 and 2.00 V in 0.5 M H₂SO₄ solution were performed at 100 mV/s speed and then 10 cycles repeated between 0.00 and 1.66 V. Then, the electrode was kept in 0.1 M NaCl solution at −0.90 V for 10 min. The electrode was roughened in 0.1 M NaCl solution by switching the electrode potential between positive (1.30 V) and negative (−0.30 V) values and holding for 30 s at the negative potential extreme and 2 s at the positive potential extreme. The procedure was finished after 30 oxidation–reduction cycles. This Au roughening procedure is similar to that previously reported by Gao et al.²² Immediately after activation, the electrode was rinsed with water and ethanol and placed in the incubation solution, consisting of either ME-D₄, WC14, or WC14/ME-D₄ mixture (30:70, mol/mol) in ethanol for 2 h at room temperature. The total concentration of thiols in each preparation was 0.2 mM. After that, the electrode was rinsed with ethanol and blow-dried with a nitrogen stream.

Precise position, intensity, and full width at half maximum (FWHM) values of SERS bands were acquired by fitting the experimental spectra with Gaussian–Lorentzian shape curves by using GRAMS/AI 8.0 (Thermo Electron Corp.) software. Measurements were repeated three times to obtain statistical means, which are presented as mean ± SD.

Theoretical Modeling. Theoretical modeling was performed with Gaussian 09 distribution for Windows.²³ Geometry optimization and frequency calculations were completed with the DFT method using the B3LYP functional. Calculations were done using the 6-311++G(2d,p) basis set for C, S, O, and H atoms and LANL2DZ with ECP for Au atoms.²⁴ The surface was represented by the Au₁₀ gold cluster. The net charge and multiplicity of the Au₁₀–ME-D₄ model complex were set to −1/+1 and 1, respectively. During the geometry optimization, the Au₁₀ coordinates were constrained for the cluster calculation. Calculated frequencies and intensities were scaled according to the procedure described elsewhere.^{10,24}

Formation of the tBLM Layer. The tBLM was formed according to the previously described formulation by fusion of multilamellar vesicles (MLV) on a gold film.²⁵ Briefly, equal molar parts (50 mol % and 50 mol %) of DOPC and cholesterol from Avanti Polar Lipids Inc., USA, were dissolved in chloroform (99%, Sigma-Aldrich) to form a 10 mM lipid solution. The chloroform was evaporated under a gentle nitrogen stream and the remaining lipid film was resuspended in phosphate buffer (0.05 M PBS, 0.1 M Na₂SO₄, pH 4.7,

deoxygenated by N_2) to a final MLV solution containing 1 mM of lipids. MLV solution was placed and immobilized for 20 min on a roughened Au, which was preadsorbed with mixed WC14/ME-D₄ (30/70, mol:mol) SAM. The SAM was prepared as described previously. Then, the Au-SAM-tBLM electrode was rinsed with a copious amount of phosphate buffer solution to remove lipid overlayers and without allowing the surface to become dry. The SERS spectra were collected immediately. The low spectral intensity of tBLM necessitated to increase the measurement time and repeat the experiment several times, which added up to a total of 230 min of acquisition.

RESULTS AND DISCUSSION

Reductive Desorption of Membrane-Anchoring Monolayers. Important information on surface coverage of SAM, the strength of metal–adsorbate bonding, and intermolecular interactions might be extracted from the electrochemical analysis of reductive desorption curves.^{26,27} However, it should be noted that this method yields too high surface coverages (overestimated by 15–20%) and unreasonably low areas per molecule because of double-layer current interference.²⁸ Recently, an elegant new method was developed to determine packing densities (area per molecule) and charge numbers per adsorbed molecule in SAMs.²⁹ The application of this method for analysis of SAMs formed from thiolipid²⁹ and octadecanethiol²⁸ molecules yielded physically reasonable areas per molecule. In this work, we intended to compare desorption potentials and surface coverages of mixed and one-component monolayers. Therefore, we conducted electrochemical reductive desorption experiments.

The desorption of mixed, ME-D₄, WC14, and reference compound heptanethiol (HPT) monolayers from the roughened SERS-active Au electrode was carried out in 0.5 M NaOH solution containing 0.1 M Na₂SO₄ at a sweep rate of 50 mV/s (Figure 2). The parameters of the reductive desorption peaks as well as the relative surface coverages calculated with respect to the monolayer of reference compound HPT are listed in Table 1. The estimated charge density is higher compared with the theoretically required charge for completely packed monolayer ($70 \mu\text{C cm}^{-2}$).³⁰ This might be related to non-Faradaic current contribution^{28,29} and errors in determining the real surface area of SERS electrode. Previously, it was demonstrated that the polycrystalline metal surface contributes to the formation of stronger gold–thiolate bonding compared with the smooth gold layer deposited on a mica substrate.³¹ The metal–adsorbate bond strength (Au–S) correlates with the voltage required to desorb surface-bound molecules. Thus, the desorption potential of HPT, which is the most negative among all the studied monolayers (−1.15), indicates highly stable metal–ligand bonding (Figure 2). The full width at half maximum (FWHM) of HPT desorption peak from roughened Au electrode (152 mV) is significantly higher compared with the previously reported FWHM value (52 mV) for octanethiol desorption from Au(111).³² Such broadening corresponds to increased distribution of energetically different surface sites of the roughened electrode.

In contrast to HPT, the other composition monolayers contain two well-defined desorption peaks, each of which originates from the molecules bound to the surface differently. It was demonstrated previously that ME-D₄ molecules could be bound to the surface through both thiolate and hydroxyl groups,¹⁰ thus resulting in two energetically different states of

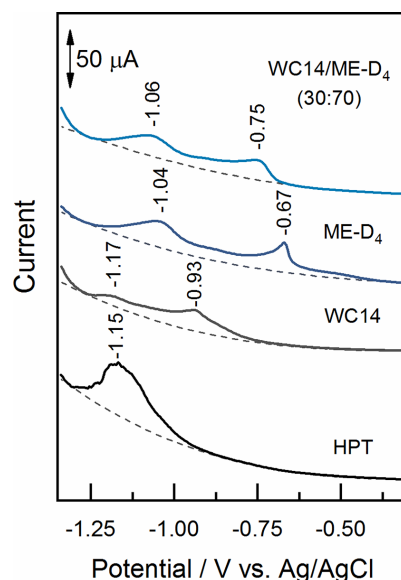


Figure 2. Potentiodynamic reductive desorption curves of heptanethiol (HPT), WC14, and ME-D₄ thiols as well as a monolayer prepared from mixed WC14/ME-D₄ (30 mol %:70 mol %) composition from the roughened Au electrode in 0.5 M NaOH + 0.1 M Na₂SO₄ aqueous solution at a sweep rate of 50 mV/s.

Table 1. Reductive Desorption Charge Densities, Potentials of Desorption Peaks, and Relative Surface Coverages of Mixed, ME-D₄, WC14, and HPT Monolayers

SAM	charge density ($\mu\text{C cm}^{-2}$)	relative coverage	potential-I (V)	potential-II (V)
ME-D ₄	120	1.04	−1.04	−0.67
WC14	64	0.56	−1.17	−0.93
WC14/ME-D ₄	89	0.77	−1.06	−0.75
HPT	115	1.00	−1.15	

gold–ligand complexes. The ME-D₄ molecules that are bound to the surface solely through a thiolate group desorb at −0.67 V, while the molecules that are additionally stabilized by gold–hydroxyl bonding desorb at −1.04 V (Table 1). Only in gauche conformation can ME-D₄ possess bidentate coordination. Thus, observed two desorption peaks could be assigned to molecules in trans and gauche conformations, respectively. The first peak of the WC14 monolayer appears at a significantly more negative value compared with that of ME-D₄; in addition, the low-intensity satellite is visible at −1.17 V. The satellite might be related to surface sites of increased intermolecular interactions, such as domains of surface clusters of WC14 molecules. This issue will be discussed in more detail, considering the spectroscopic results.

The reductive peaks of mixed monolayer are shifted compared with single-component WC14 and ME-D₄ monolayers (cf. the first desorption peak at −0.75 V for mixed monolayer and −0.67 and −0.93 V for ME-D₄ and WC14, respectively). The observed shift indicates that molecules of a

different kind interact with each other within the monolayer. Such finding is not surprising since both molecules share a hydrophilic segment (Figure 1) that can participate in hydrogen bonding. The integrated desorption peak area provides a value of desorption charge density, which is an approximate measure of surface thiol coverage (Table 1). Previously, it was shown that for a complete monolayer of *n*-alkanethiols ($n = 3–10, 12, 16, 18$) self-assembled on the Au/mica substrate, the surface coverage is independent of the length of the thiol and corresponds to 7.6×10^{-10} mol/cm².²⁶ For a monolayer self-assembled from one-component short thiol molecules (ME-D₄), the surface coverage is close to the complete monolayer of the reference compound HPT (Table 1). However, in the case of a bulky WC14 compound, almost twofold lower surface concentration was obtained (4.2×10^{-10} mol/cm²); this might be related to the double size of WC14 molecule's cross section. In the case of a mixed monolayer composed of both WC14 and ME-D₄ thiols, the surface concentration was found to be in between the values of the single-component monolayers (5.8×10^{-10} mol/cm²).

Overview of the SERS Spectra of Membrane-Anchoring Monolayers. We report on the molecular structure, conformations, and interactions of a single-component (WC14 and ME-D₄) and mixed (WC14 with ME-D₄) monolayers at the electrochemical interface. Properties of these monolayers were elucidated using SERS, a technique that provides comprehensive molecular-level information on species adsorbed or in close proximity to a metal surface at submonolayer coverages.^{33–40} Owing to the intrinsic SERS selection rule, it is possible to reveal molecular orientation on the surface; however, some precautions have to be made.³³ An important issue in SERS studies is the structure of the SERS-active substrate.^{33,34} In this work, we have used electrochemically prepared Au by a procedure similar to that reported by Gao et al.²² Such pretreatment yields unusually stable, intense, and reproducible SERS spectra.²² Comparison with a formerly used laser-fabricated ripple substrate⁴¹ revealed a similar SERS spectrum from adsorbed mercaptoethanol.¹⁰ The previous report by our group demonstrated that the surface of electrochemically activated Au electrode is composed of amorphous formulations with a diameter in the 100–500 nm range.⁴² Since the WC14 molecules can stretch up to 3 nm, we can safely assume that the surface is somewhat flat from the perspective of SAM. Considering the approximation of surface flatness, we can infer on the collective orientation of SAM molecules on the metal surface.

The mixed monolayer is constructed in a sense that the long-chain WC14 molecule acts as a surface anchor for tBLM, while the small molecular mass backfiller ME-D₄ occupies active metal surface sites. The standard SAM composition in the formation of functional tBLMs is 30/70 (mol %/mol %) for WC14/ME-D₄, respectively.^{11,12} This composition was used in the present study for mixed monolayers; in addition, monomolecular layers containing either WC14 or ME-D₄ were considered as well. Isotopically labeled backfiller 2-mercaptoethanol (HS-C₂D₂-C₁D₂-OH, ME-D₄) was used to ensure clear spectral separation between the vibrational modes of two components of the studied SAM.

The assignments of the vibrational bands were based on data provided in previous studies.^{10,43–47} The two-dimensional correlation spectroscopy (2DCOS) analysis method enabled

us to access temporal changes in the spectral feature order and distinguish between the overlapped spectral modes.⁴⁸

Figure 3 compares the SERS spectra of mixed WC14/ME-D₄ and single-component WC14 and ME-D₄ monolayers at

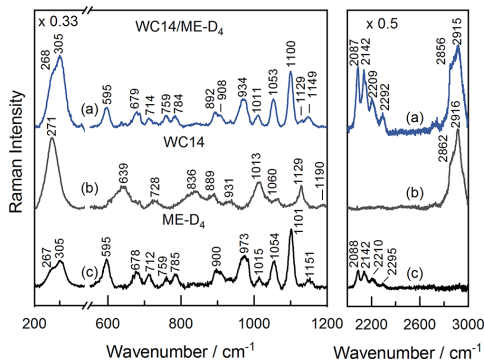


Figure 3. SERS spectra of (a) mixed WC14/ME-D₄, (b) WC14, and (c) ME-D₄ monolayers in 200–400 and 550–1200 cm⁻¹ (left panel) and 2000–3000 cm⁻¹ (right panel) regions at an open-circuit potential.

the open-circuit potential ($E_{oc} = 0.28–0.32$ V) in different spectral ranges. Chemical adsorption of the molecules is evident due to metal–ligand stretching motion bands at low frequencies. For the ME-D₄ and mixed monolayers, the Au–S and Au–O bands are visible at ca. 267–268 and 305 cm⁻¹, respectively.^{10,24} The Au–S stretching band originates from both WC14 and ME-D₄ interactions with the surface through a sulfur headgroup, whereas Au–O is due to ME-D₄ interaction with the metal through an OH group. Yet, the WC14 spectrum exhibits only one $\nu(\text{Au–S})$ band at 271 cm⁻¹.

The characteristic bands of stretching C–S motion for adsorbed WC14 molecules in gauche and trans conformations are found at 643 and 728 cm⁻¹, respectively. However, due to the deuteration of two methylene groups (CD₂) in the ME-D₄ compound, the same gauche and trans vibrational bands are downshifted by 48 and 50 cm⁻¹, respectively. This shift allows us to assess individually spectral features of each compound in the mixed monolayer. Unfortunately, the majority of WC14 bands in the mixed monolayer are obscured by the more intense ME-D₄ bands. Such a difference might be accounted for the lower surface concentration of WC14. Previously, the positions of gauche and trans bands for ME-D₄ aqueous solution were found at 616 and 685 cm⁻¹, respectively, and at 669 and 756 cm⁻¹ for the powder WC14 compound.¹⁰ A corresponding downshift by 21 and 6 cm⁻¹ for gauche and trans conformations of ME-D₄ as the molecule adsorbs on the Au surface is related to the withdrawal of electron density from S–C bond to Au–S and metal mass effect.⁴⁹

A clear separation for two types of molecules is visible in the $\nu(\text{C–D})/\nu(\text{C–H})$ stretching vibration region. Less than 3 cm⁻¹ shift is observed for all stretching C–D vibrations, comparing ME-D₄ and mixed monolayers; however, in the case of the WC14 compound, the symmetric stretching vibrational mode of methylene groups, $\nu_s(\text{CH}_2)$, downshifts by 6 cm⁻¹, comparing pure WC14 and mixed monolayers. In addition, the relative intensity of $\nu_s(\text{CH}_2)$ mode increases in the mixed

monolayer. These data indicate that the interaction of WC14 methylene groups with ME-D₄ results in environmental and orientation changes of hydrocarbon chains of WC14.

Potential-Dependent Changes in the SERS Spectra of ME-D₄ Monolayer. The potential-dependent SERS spectra of ME-D₄ are shown in Figure 4. The chemisorption of ME-D₄ is

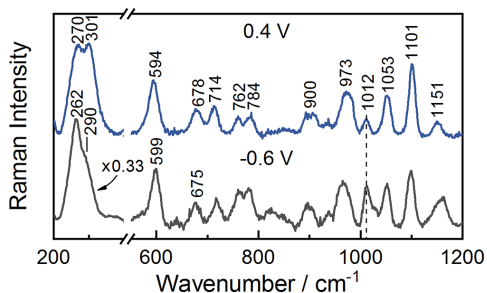


Figure 4. SERS spectra of the ME-D₄ monolayer in 200–400 and 550–1200 cm^{−1} spectral regions at 0.40 and −0.60 V electrode potentials.

evident from the low-frequency bands associated with the stretching motion of Au–S and Au–O bonds. The latter indicates the interaction of hydroxyl's oxygen atom with the Au surface. The Au–S and Au–O bands are observed to redshift from 270 to 262 and from 301 to 290 cm^{−1}, respectively, with an increasingly negative electrode potential. To complement experimental data, we modeled a 10-atom gold cluster with ME-D₄ molecule adsorbed atop. From a previous DFT study,⁵⁰ the carboxylate preferentially adsorbs to low-coordination atoms at vertices of the pyramidal gold cluster. Recently, it was demonstrated that modeling of the gold surface by a cluster of 10 atoms provides a suitable structure for the analysis of folic acid adsorption.⁵¹ However, an uneven electron density distribution within the gold cluster⁵² may affect charge distribution within the adsorbed molecule. In such a way, the connection between the ligand-adsorption site and the alterations of the vibrational spectrum could be suspected. The Au–S wavenumbers in theoretical surface complex spectra predict a shift from 302 to 277 cm^{−1} for gauche conformation and from 321 to 301 cm^{−1} for trans conformation, respectively. The calculated Au–S frequencies are higher compared with

experimental values, probably because the Au₁₀ cluster coordinates were constrained (Table 2). However, a predicted decrease in frequency at a more negative electrode potential is preserved in the experimental spectra. Similarly, an increase in bond lengths (*l*) is expected as a consequence of the negative polarization of the gold cluster. Calculations predict lengthening of the Au–S bond ($\Delta = l_{(+1)} - l_{(-1)}$) by $\Delta = 3.00$ pm for the gauche surface complex and $\Delta = 6.51$ pm for the trans surface complex (Table 3). The theoretical modeling also

Table 3. Calculated Bond Lengths (pm) for Gauche and Trans Conformers of Au₁₀–ME-D₄ Surface Complexes with Charge Set to −1 and +1

bond	trans		gauche	
	+1	−1	+1	−1
Au–S	232.64	239.15	234.88	237.88
Au–O			248.57	(500.67)
C–S	184.93	185.00	185.01	184.57
C–C	152.20	151.57	152.45	152.31
C–O	142.38	143.98	144.59	143.53
O–H	96.34	96.25	97.07	96.36

shows that at positive polarization, the ME-D₄ molecule in gauche conformation forms a chemical bond between the hydroxyl group and gold atom (Au–O), while at negative electrode charge, hydroxyl is drawn away from the Au cluster (Figure 5). Threefold intensity gain for the Au–S/Au–O bands in the surface spectrum is observed, pointing to the reorientation of molecules at the headgroup segment. Increased intensity indicates that the Au–S and Au–O bond direction coincides or is close to the direction of surface normal.^{24,53}

The fingerprint region of ME-D₄ spectrum conveys information on a potential-induced reorientation of adsorbed molecule. The wavenumber of characteristic S–C bond stretching vibration increases toward negative potentials by 5 cm^{−1} for gauche conformation and slightly decreases in the case of trans S–C structure. An increase in ν (S–C) is consistent with a decrease in Au–S bonding strength visible from the lowering of the corresponding band frequency (Figure 4). In addition, trans-to-gauche band intensity ratio (T/G) changes from 0.34 (at 0.40 V) to 0.41 (at −0.60 V). Thus, negative polarization induces conformational change, favoring more vertically oriented molecules (trans configuration of the S–C–C moiety). The out-of-phase stretching

Table 2. Assignments of Vibrational Bands and Comparison of SERS and Calculated Wavenumbers (cm^{−1}) of Adsorbed ME-D₄ at 0.4 and −0.6 V^a

assignment	SERS		calculated			
	0.4 V	−0.6 V	T (+1)	T (−1)	G (+1)	G (−1)
$\nu_{as}(C2D_2)$ [+ $\nu_{as}(C1D_2)$ for G]	2294	2295	2273	2260	2263	2251
$\nu_{as}(C1D_2)$ [+ $\nu_{as}(C2D_2)$ for G]	2209	2219	2209	2204	2251	2233
$\nu_s(C2D_2)$ [+ $\nu_s(C1D_2)$ for G (+1)]	2136	2130	2184	2176	2177	2161
$\nu_s(C1D_2)$ [+ $\nu_s(C2D_2)$ for G (+1)]	2086	2087	2134	2131	2172	2148
$\nu_{oop}(C-C-O) + \delta(C2D_2) + t(C1D_2)$	1012	1015	1079	1077	1074	1077
$t(C2D_2)$	784	783	747	745	782	766
$\nu(C-S)_T$	678	675	675	686		
$\nu(C-S)_G$	594	599			604	678
$\nu(Au-S)$	270	262	321	301	302	277

^aAbbreviations: G, gauche; T, trans; ν , stretching; δ , deformation; t, twisting.

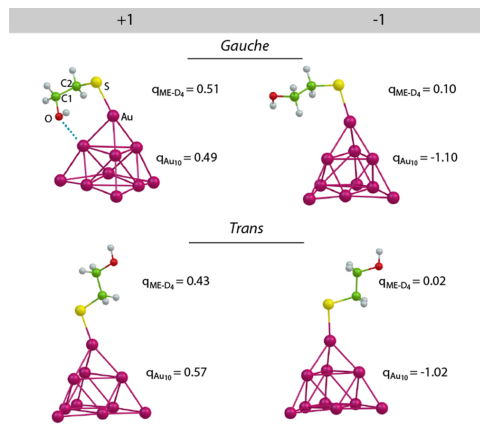


Figure 5. Structures of Au_{10} -ME- D_4 model complexes in gauche and trans conformations. The net charge is set to +1 and -1. The calculated Mulliken charges (q) for the Au cluster and ME- D_4 molecule are indicated next to the corresponding structure.

vibration of C-C-O bonds, $\nu_{\text{oop}}(\text{C-C-O})$, found at 1012 cm^{-1} and a couple of methylene twisting vibrations, $t(\text{CD}_2)$, at 762 and 784 cm^{-1} might be used as the sensitive orientation marker bands.^{45,49} The intensification of these bands points to potential-induced adoption of the more vertical orientation of C-C-O moiety with respect to the electrode surface.

Potential-Dependent Changes in the SERS Spectra of WC14 Monolayer. WC14 molecule is composed of a surface-active thiol group, an ethoxide moiety (EO)₆, and a couple of myristoyl chains (Figure 1). One can expect an increase in monolayer stability due to van der Waals interactions between the neighboring carbohydrate chains. The reductive desorption studies of n -alkanethiol monolayers from polycrystalline Au electrodes have revealed a shift of the reduction potential to progressively more negative values with an increasing number of methylene groups in the thiol molecules.²⁶ The increasing length of carbohydrate chain has been also shown to decrease the potential of zero charge (pzc) of the metal substrate.⁵⁴ Accordingly, we changed experiment conditions so that the most negative potential set for the WC14 monolayer was -0.80 V vs Ag/AgCl (3 M KCl), while the potential set for ME- D_4 and mixed SAMs was -0.60 V . Although applied potentials were more positive to the expected reductive desorption potential of studied thiols, an early stage of detachment was observed. Figure 6A shows a reversible dependence of low-frequency $\nu(\text{Au-S})$ wavenumber on the electrode potential. The peak downshifts from 272 to 262 cm^{-1} upon negative electrode polarization, indicating the weakening of Au-S bond, and it changes the direction back to high wavenumbers, 267 cm^{-1} , on the following anodic scan. Theoretical modeling of adsorption complexes confirms such tendency; the Au-S bond length increases and corresponding stretching frequency decreases at negative polarization (Tables 2 and 3). The hysteresis of the peak position of SERS spectra could be explained by disruption of the intact monolayer and partial desorption of the molecules at the most negative potential. The effect of negative potential on monolayer is, however, not overcome in the consecutive anodic scan.

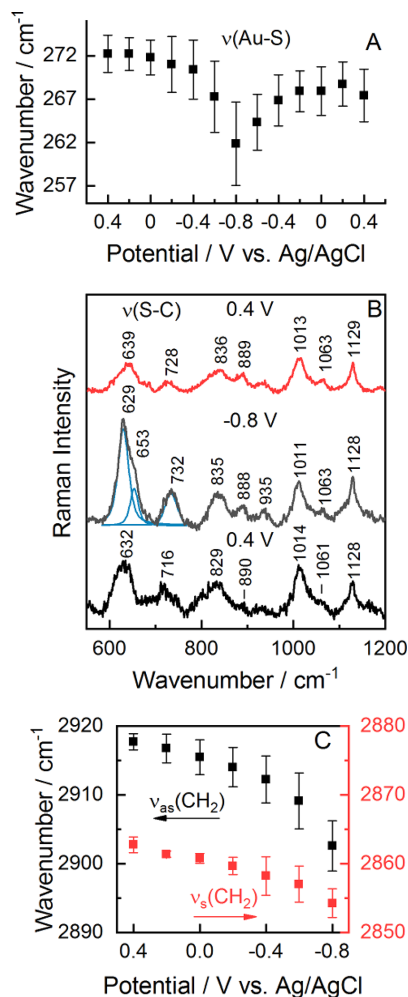


Figure 6. SERS analysis of the WC14 monolayer at the Au electrode. (A) Dependence of $\nu(\text{Au-S})$ mode wavenumber on the potential at cathodic and anodic scans. (B) Spectra of the monolayer in the fingerprint region at potentials of 0.40 and -0.80 V (forward potential scan) and 0.40 V in a successive scan. The gauche S-C stretching band is fitted with Gaussian-Lorentzian form components. (C) Dependence of methylene symmetric (red curve) and asymmetric (black curve) stretching wavenumbers on the electrode potential.

Monolayer disruption becomes even more evident then, considering the spectroscopic features of surface vicinal -S-C- group (Figure 6B). Both conformations of this group are affected, although the response is rather contrasting. The gauche band at 639 cm^{-1} splits into two bands, which at the most negative potential, appear at 629 and 653 cm^{-1} , while the trans band shifts to higher energy (Table S1). The 3.7-fold intensification of gauche peak intensity also signals on

structural rearrangements occurring on the surface. The Raman spectrum of solid-state WC14 molecules at 243 K observed in the previous study exhibited a significantly higher energy for S–C gauche stretching vibration $\nu(\text{S–C})_{\text{G}}$, which appeared near 669 cm^{-1} .¹⁰ Free molecules that are not attached to the surface usually have higher energy $\nu(\text{S–C})$.^{24,55,56} Therefore, we ascribe the 653 cm^{-1} shoulder in the surface spectrum to WC14 that is detached or very weakly bonded to gold. Such thiol molecules weakly interact with the surface and, in a way, is similar to those in a bulk solution. As the potential is set back to a positive value, the S–C bands tend to return close to their initial wavenumbers. The trans-to-gauche intensity ratio (T/G) points to prevailing gauche conformation at every electrode polarization.

Spectral modes at 1063 and 1129 cm^{-1} are assigned to trans vibrations of the C–C bond of alkane chain, $\nu(\text{C–C})_{\text{T}}$ (Table S1).^{10,55–57} The band at 1129 cm^{-1} indicates the presence of extended polymethylene chains in all-trans configuration and is present with almost invariant intensity at every studied potential. This suggests that alkane chains are insensitive to potential, supposedly due to water-induced hydrophobic pull between the chains and the van der Waals interaction effect. At this point, the precise orientation of molecules remains a question for debate as the molecules can adopt both somewhat vertical and parallel orientations to the surface. However, each orientation is compatible with the condensed state of the alkane chains.

The high-energy region provides information on intermolecular interaction and coupling of alkyl chains,^{58–62} however, due to the spread spectral feature of WC14, we performed fitting of the experimental spectra with the Gaussian–Lorentzian shape components (Figure 3). The negative potential induces a shift of the symmetric (2863 cm^{-1}) and asymmetric (2918 cm^{-1}) stretching vibrations of the methylene group by 8.49 ± 2.85 and $15.12 \pm 3.80\text{ cm}^{-1}$, respectively (Figure 6C). The process is reversible and the bands upshift to 2859 and 2911 cm^{-1} on a consecutive anodic scan (data not shown). Methylene spectral bands originate from both ethoxide fragments and alkane chains; however, the number of CH_2 groups in alkane chains is about two times higher. The Raman spectra of bulk WC14 in the melted and solid states exhibited strong bands at 2854 and 2848 cm^{-1} , respectively, due to the alkyl chain methylene symmetric stretching vibration (Table S1);¹⁰ frequency downshift is an indicator for the presence of a closely packed and ordered structure. Vibrational analysis of extended oligo(ethylene glycol) chains predicts the most intense band in the infrared spectra of SAMs near 2890 cm^{-1} (CH_2 asymmetric stretching mode).^{63,64} Such a band was not resolved in the Raman or SERS spectra of WC14. Observed SERS bands at 2862 and 2916 cm^{-1} are typical for adsorbed molecules containing alkyl chains and terminal functional groups different from CH_3 .^{24,65} Meanwhile, thiol monolayers with a terminal methyl group exhibit several additional bands in the C–H spectral region, resulting in a different spectral pattern.^{55,56,66} Thus, our SERS spectrum of WC14 shows the typical pattern of adsorbed thiols with long CH_2 chain without any evidence of the bands from terminal CH_3 groups. Several reasons might be responsible for downshifting of $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ and $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ bands as the electrode potential becomes progressively negative (Figure 6C) including the following: (i) potential-induced changes in the interaction between the alkyl chains of adsorbed molecules, (ii) vibrational Stark effect, and (iii) potential-induced changes

in the interaction between the alkyl chains and electrode surface. Direct interaction of CH_2 groups with the metal surface can be recognized from the appearance of C–H stretching soft mode at lower wavenumbers (2815 – 2830 cm^{-1}) compared with the Raman spectra of bulk compounds containing alkyl chains.⁶⁶ Such soft mode was not observed in the potential-dependent SERS spectra of WC14. It should be noted that peak positions of methylene stretching bands shift to lower wavenumbers for well-packed monolayers.^{13,24,67} The vibrational Stark effect critically depends on dipole moment orientation;⁶⁸ therefore, the appearance of significant wavenumber shift indicates that methylene stretching vibration motion is oriented somewhat along the surface normal. It should be noted that the transition dipole moment direction for $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ mode lies in the CCC plane and perpendicular to the hydrocarbon axis.⁶⁹ Thus, we speculate that a majority of WC14 molecules adopt horizontal orientation with respect to the surface. In fact, the previously discussed predominant gauche orientation of headgroup (S–C–C) complements such a picture.

Potential-Dependent Changes in SERS Spectra of Mixed Monolayer. Figure 7 compares the SERS spectra of

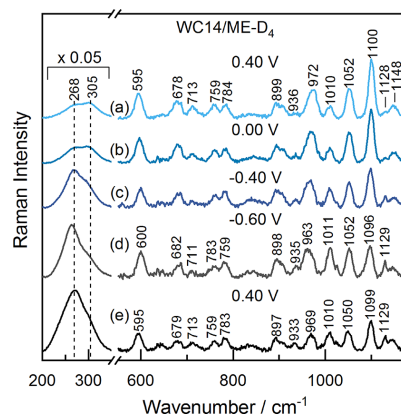


Figure 7. SERS spectra of the mixed self-assembled monolayer in 200 – 400 and 550 – 1200 cm^{-1} spectral regions at 0.40 , 0.00 , -0.40 , and -0.60 V in cathodic stepwise scan and successive anodic scan from -0.60 to 0.40 V .

SAM prepared from mixed WC14/ME-D₄ (30 mol %:70 mol %) composition. Potentiodynamic reductive desorption curves reveal that a mixed SAM appears to be stable in the 0.40 – -0.60 V potentials and does not show signs of desorption (Figure 2). Indeed, only negligible intensity decrease (<2%) is observed, comparing the area under the curve of baseline-subtracted SERS spectra at 0.40 and -0.60 V potentials, while a slightly higher drop of about 25% is found between the first spectrum at 0.40 V and the last one at 0.40 V recorded after an excursion to the negative potential zone (Figure 7). Such an intensity decrease might be associated with the reduction of SERS substrate roughness and reorientation of surface species. No new spectral bands emerged, opposed to the WC14 monolayer, where the shoulder at 653 cm^{-1} appeared at -0.80 V . The ME-D₄ bands dominate the mixed SAM. The groups of higher dipole moment, i.e., Au–S, S–C, and C–O, are more

sensitive to the electric field; therefore, the most obvious changes in band position and intensity are mainly associated with these vibrations. In addition, potential-induced changes in bonding with metal strength are reflected in $\nu(\text{Au-S})$ and $\nu(\text{S-C})$ bands. Accordingly, spectral bands that stay invariant are mostly related to deformation vibrations of CD_2 groups (713 , 759 , 784 , and 1052 cm^{-1}).

The following analysis is presented in portions of the spectra. Each portion is related to the particular chemical segment of SAM-forming molecules: (i) $\nu(\text{Au-S})/\nu(\text{Au-O})$, (ii) $\nu(\text{S-C})$, (iii) $\nu(\text{C-C})$, and (iv) $\nu(\text{C-D})/\nu(\text{C-H})$.

Vibrations of Gold-Ligand Modes $\nu(\text{Au-S})/\nu(\text{Au-O})$. ME-D₄ and WC14 are bound to the surface through the Au-S bond, which appears as the broad mode near 268 cm^{-1} in the surface spectrum; however, ME-D₄ is also bound through a hydroxyl group, forming the Au-O bond, which is visible near 305 cm^{-1} (Figure 7). Data show almost 4-fold intensification of $\nu(\text{Au-S})$ band at negative electrode potentials (Figure 8A), while the intensity of $\nu(\text{Au-O})$ does not change significantly. Intensification is related to the change in bond orientation, and this is only a case for Au-thiolate linkage.

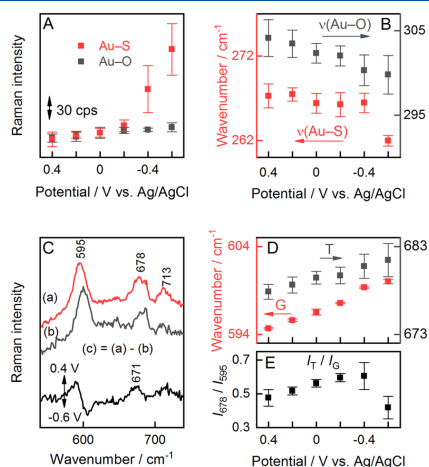


Figure 8. SERS analysis of mixed monolayer WC14/ME-D₄ in Au-S and C-S stretching frequency regions. (A) Dependence of $\nu(\text{Au-O})$ and $\nu(\text{Au-S})$ mode intensity and (B) peak position on the electrode potential. The potential was changed from 0.40 to -0.60 V . (C) Spectra in the C-S bond stretching vibration region at (a) 0.40 V and (b) -0.60 V and (c) the potential-difference spectrum. (D) Dependence of gauche (G) and trans (T) conformation C-S bond wavenumbers on potential. (E) Trans-to-gauche intensity ratio (I_T/I_G) dependence on electrode polarization.

While the wavenumbers of $\nu(\text{Au-O})$ mode in response to the potential act as expected, a decrease at more negative electrode potentials, rather surprising behavior of $\nu(\text{Au-S})$ wavenumber, is observed (Figure 8B). Only slight downshift in wavenumbers in the $0.40/-0.40 \text{ V}$ potential window is observed followed by a sharp dip at -0.60 V . Similarly, the Au-S bond lengthening and diminishing of vibrational energy were observed for the theoretical Au₁₀-ME-D₄ complex model while changing the net charge from +1 to -1 (Table 3).

Therefore, the spectral data suggest a loosening of a gold-thiolate bond at -0.60 V .

Gauche/Trans Isomerization of the S-C Bond. The characteristic S-C bond stretching doublet assigned to gauche and trans conformations provides valuable information on the headgroup orientation of surface-bound molecules. The positions of C-S bond stretching vibrations of gauche and trans conformers were found at 595 and 679 cm^{-1} , respectively, for deuterated ME-D₄ in the mixed monolayer at the open-circuit potential (Figure 3). Although gauche/trans isomerization bands for WC14 molecules were expected to be around 639 and 728 cm^{-1} , intensities of these bands were found to be too low for further detailed analysis. The downshift of $\nu(\text{C-S})$ peak positions of the gauche conformer by 22 cm^{-1} is due to the chemisorption of a molecule on the electrode surface, similar to the previously discussed ME-D₄ monolayer. The potential-dependent SERS spectra in the C-S bond stretching vibration region are shown in Figure 8C. The position of $\nu(\text{C-S})$ mode shifts to higher wavenumbers by $\Delta = 5.32 \pm 0.21 \text{ cm}^{-1}$ and $\Delta = 3.59 \pm 1.09 \text{ cm}^{-1}$ for gauche and trans conformations, respectively, as the electrode potential changes from 0.40 to -0.60 V (Figure 8D). Theoretical calculations confirmed a blue shift of gauche and trans isomerization bands of Au₁₀-ME-D₄ complexes, switching the net charge from +1 to -1 (Table 2), although no significant difference in corresponding bond lengths was identified (Table 3). The potential-difference spectrum in Figure 8C shows a positive-going feature near 671 cm^{-1} , which indicates a higher trans conformer contribution to the spectrum at positive potentials (comparing 0.40 and -0.60 V). In addition, a red-shifted position of this feature indicates the presence of stronger bonding with the surface through the sulfur atom of trans conformers at more positive electrode potentials. Going from positive potentials to negative ones (ca. -0.40 V), electrostatic pull reorients ME-D₄ molecules into the more vertical orientation so that the T/G intensity ratio changes from 0.47 ± 0.04 to 0.60 ± 0.07 (Figure 8E). However, at -0.60 V , the ratio changes the direction and decreases to 0.42 ± 0.06 . These processes could be accounted for increased monolayer disorder due to the negative potential and perhaps initial stages of the detachment of the molecules from the metal surface.^{58,70} Reorientation toward gauche conformation is also supported by spectral changes in the C-D stretching region, where the dips at 2122 and 2221 cm^{-1} in the difference spectrum appear. This indicates that a portion of mercaptoethanol molecules at the most negative electrode polarization adopt a flat orientation with respect to the surface, which is characterized by the increasing gauche conformation of the C-S bond (Figure S2A).

Collective Motion of Alkane Chain Mode, $\nu(\text{C-C})_T$. The feature at 1129 cm^{-1} is instrumental in defining the conformational state of alkyl chains for adsorbed WC14 thiols as it is assigned to the all-trans vibration of the carbohydrate backbone, $\nu(\text{C-C})_T$.^{10,55,56} This feature alongside the lower energy one at 1060 cm^{-1} , which is also assigned to $\nu(\text{C-C})_T$ mode, is obvious in the pure WC14 monolayer SERS spectrum (Figure 3b). In our previous publication, the 1130 cm^{-1} band was observed to emerge immediately after submerging WC14/ME-D₄ (30:70, mol/mol) SAM in water.¹⁰ At the initial times, the peak gained intensity exponentially and starting from 60 min, the intensification became linear with incubation time.¹⁰ In this study, a sigmoidal shape response of the 1129 cm^{-1} band intensity upon potential change was observed (Figure 9).

It is worth noting that despite its low intensity, the 1129 cm^{-1} mode is present at initial times at the open-circuit potential.

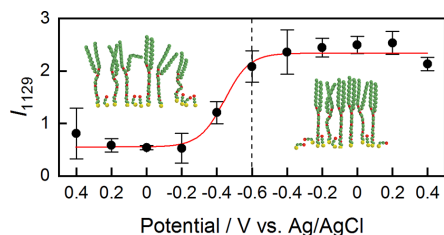


Figure 9. Dependence of intensity of all-trans C–C stretching band at 1129 cm^{-1} on electrode potential in both cathodic and anodic directions fitted with the Boltzmann sigmoidal curve ($R^2 = 0.9964$). The left side inset shows the distorted state of alkane chains at initial measurements, and the right side inset shows an aggregated state after an excursion to a negative potential. The transition midpoint potential value was determined to be $-0.46 \pm 0.03\text{ V}$.

Complementing the spectral results, 2DCOS analysis provides insights into the subtle potential-induced perturbations in vibrational bands due to the amplification of slight changes in SERS intensities.⁴⁸ Thus, the 2DCOS study indicates a strong correlation between the 1102 and 1129 cm^{-1} bands (Figure S3). The negative asynchronous peak at ($1129, 1102\text{ cm}^{-1}$) proves that potential-induced structural rearrangements in polymethylene chains (represented by 1129 cm^{-1}) occur after some structural changes have happened in the ethyleneoxide segment (represented by 1102 cm^{-1}) (Figure S3B). In contrast, the 100% WC14 monolayer exhibits a well-defined 1129 cm^{-1} mode in each spectrum, indicating that alkyl chains of WC14 molecules stay closely packed and it is independent of electrode potential (Figure 6B). Arguably, the response of $\nu(\text{C}-\text{C})_{\text{T}}$ intensity to variation of electrode potential is governed by two processes: (i) potential-induced changes in intrachain gauche/trans isomerization and (ii) changes in orientation of alkyl chains with respect to the electrode surface. Increased interaction between the hydrocarbon chains may result in a reduction of gauche defects and an increase in the intensity of the $\nu(\text{C}-\text{C})_{\text{T}}$ band. Figure 9 shows that I_{1129} starts increasing once the potential decreases below ca. -0.40 V . Application of increasingly negative potential leads to reduced energy of gold–thiolate bond (Figure 8B), which in turn liberates the lateral motion of surface-adsorbed molecules. The lateral motion is highly facilitated at -0.60 V . Increased lateral mobility and hydrophobic effect stimulate the rearrangement of adsorbed molecular anchors, resulting in the decreased number of gauche defects, increasing the intensity of the vibrational band at 1129 cm^{-1} . As expected, the process was irreversible; thus, extended polymethylene chains retained their structure even after the potential was set to an initial value of 0.40 V .

Spectroscopic Evidence for Tethered Bilayer Lipid Membrane (tBLM) Formation. The mixed WC14/ME-D₄ (30 mol %:70 mol % adsorption solution) SAM was used to immobilize tBLM. First, the SERS spectrum (Figure 10A) was collected from SAM submerged in phosphate buffer solution (0.05 M PBS, 0.1 M Na₂SO₄, pH 4.7, deoxygenated by N₂). The tBLM was formed by adding a DOPC/cholesterol (50/50 mol:mol) MLV solution to a SAM-covered electrode. The

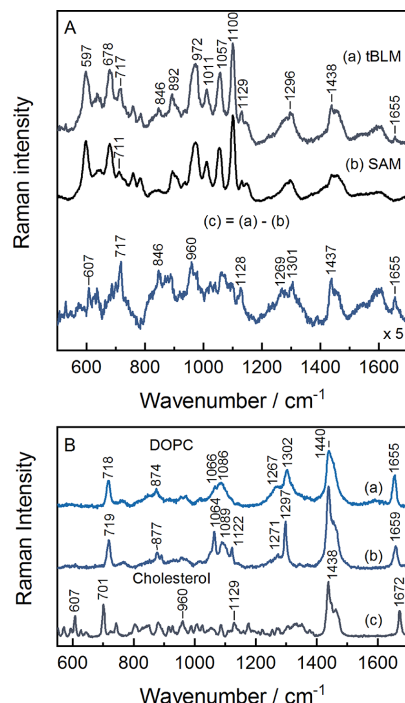


Figure 10. (A) SERS spectra of (a) tBLM and (b) underlying membrane-anchoring SAM. (c) The difference spectrum is also shown. The tBLM and SAM spectra are acquired by combining data from three independent experiments with a total time of acquisition for tBLM and SAM of 230 and 80 min, respectively. The (a) and (b) spectra are normalized according to the intensity of the 1100 cm^{-1} band. (B) Raman spectra of DOPC at (a) room temperature (RT) and (b) $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ and cholesterol at (c) RT.

SERS measurements of SAM and tBLM were repeated several times and the data were co-added. Overall, 80 and 230 min of total acquisition time for SAM and tBLM were required, respectively, to record the SERS spectra.

According to neutron reflectivity data, the tBLM is suspended with respect to the electrode surface at a distance of $1\text{--}2\text{ nm}$.⁴ In fact, lipid molecules in the inner leaflet of tBLM on unsaturated anchor SAMs are usually positioned at $\sim 1\text{--}1.2\text{ nm}$ to the surface, while the double bond C=C Raman reporter group of DOPC acyl chains is even further;¹² therefore, the SERS spectrum of the tBLM is expected to be extremely weak. Figure 10A(a) shows the SERS spectrum of tBLM. One can see that the most intense bands correspond to the spectrum of anchor monolayer. However, upon the subtraction of the spectrum of anchor SAM (Figure 10A(b)), spectral features assigned to the vibrations of DOPC and cholesterol become visible in the difference spectrum (Figure 10A(c) and Table S2). The presence of DOPC tBLM is evident from the stretching vibration of the double bond in acyl chain, $\nu(\text{C}=\text{C})$ at 1655 cm^{-1} , and from the headgroup $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ stretching band at 717 cm^{-1} in the difference spectrum.³⁷ Furthermore, the band at 607 cm^{-1} is assigned to

the vibration of cholesterol, while the positive-going features at 1269, 1301, and 1437 cm^{-1} in the difference spectrum might originate from both SAM and tBLM layers (Table S2).

The spectral bands of underlying SAM undergo subtle changes during the formation of tBLM. The intensity of the all-trans C–C stretching band increases by a factor of 1.64 ± 0.93 , indicating the formation of acyl chain clusters. The positive-going feature near 846 cm^{-1} is associated with rocking vibration $\nu(\text{CH}_2)$ coupled with $\nu(\text{C–O})$ stretching of the ethyleneoxide (EO) fragment of WC14 in a helical conformation.^{71–73} Such bands indicate the reorganization of EO fragment in the presence of the lipid membrane.

To determine the state of a tBLM, we recorded the Raman spectra of DOPC and cholesterol (structures of molecules are depicted in Figure S1, Supporting Information) at room temperature (RT) and $-100\text{ }^\circ\text{C}$ (Figure 10B). These temperatures cover melted and solid states of DOPC and the solid state of cholesterol. The position of C=C stretching band is indicative of intermolecular interactions at the double bond site in the oleic acid chain. The temperature-dependent Raman study revealed the upshift frequency of the $\nu(\text{C}=\text{C})$ band from 1655 to 1659 cm^{-1} as the DOPC solidifies and the molecular ordering at the double bond site increases (Table S2). Comparing the temperature-dependent Raman study and SERS measurements, it becomes obvious that the state of tBLM on the electrode surface is fluid-like since the SERS position of $\nu(\text{C}=\text{C})$ band was found to be at 1655 cm^{-1} . This value coincides well with the Raman spectrum of bulk DOPC at RT. The cholesterol signal band of double bond stretching vibration $\nu(\text{C}=\text{C})$ is expected at 1672 cm^{-1} (Figure 10B); this mode was not observed in the SERS spectrum.

CONCLUSIONS

The structural properties and function of tethered bilayer lipid membranes (tBLMs) critically depend on the molecular structure of SAM utilized to anchor the lipid bilayer.^{10,74} Electrode potential is an important variable in the construction of biosensors based on tBLMs and fundamental studies of the interaction of biomolecules and pharmaceuticals with lipid membranes.^{4,5} In this work, electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy (EC-SERS) combined with DFT calculations, reductive desorption voltammetry, and generalized 2D correlation spectroscopy (2DCOS) has been used to determine in situ the potential-induced changes in the molecular structure of mixed self-assembled monolayers employed for the construction of tBLMs. Mixed SAMs were assembled from the long-chain lipid-like thiols (WC14) and short backfiller 2-mercaptoethanol molecules. To discriminate spectroscopically vibrational modes in the mixed monolayer, the deuterated backfiller thiols were employed (SH–C₂D₂–C₁D₂–OH, ME–D₄). Combining EC-SERS and first-principles calculations, two low-frequency metal–adsorbate vibrational modes of ME–D₄ near 268–270 and 301–305 cm^{-1} were identified to $\nu(\text{Au–S})$ and $\nu(\text{Au–O})$ vibrations, respectively, at 0.40 V. In agreement with theoretical modeling, both bands were observed to redshift with increasing negative electrode potential, indicating an increase in corresponding bond length. Calculations predicted the preferential formation of Au–O bonding at more positive electrode potentials. The electrode potential-induced accelerated increase in the intensity of $\nu(\text{C–C})_{\text{T}}$ vibrational mode due to C–C stretching vibration of alkyl chains in all-trans configuration at 1129 cm^{-1} was observed with a transition inflection potential of -0.46 ± 0.03 V,

indicating the potential-controlled formation of clusters of long-chain thiol molecules in the mixed monolayer. Such a phase-segregation process in mixed thiol-based monolayers was suggested earlier by Basit et al.⁷⁴ based on quartz crystal microbalance and atomic force microscopy data.

Our data suggest that the negative potential facilitates the mobility of anchor molecules on the surface by decreasing the strength of metal–adsorbate bonding. At the same time, the interaction between water and hydrophobic polymethylene chains drives the clustering of hydrophobic molecules to minimize the energy of the system. As previously shown, clustering of molecular anchors has a detrimental effect on the integrity of tBLMs and their electric insulation.¹¹ Therefore, the all-trans spectral band near 1129 cm^{-1} of the WC14 molecules could conventionally serve as a predictor of the functional properties of tBLM. Observed conformational changes in the vicinity of Au–O bonding of ME–D₄ might be related to the activation of favorable conditions for the clustering of WC14.

To the best of our knowledge, we discovered the direct spectroscopic evidence for the formation of lipid bilayer at mixed anchoring SAM. Based on the analysis of $\nu(\text{C}=\text{C})$ mode of lipids, we conclude that the structure of lipid layer in the vicinity of olefin group is fluid-like. These findings can be used in the analysis and interpretation of the function of biosensors and biotechnological processes based on tBLM.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcc.0c04636>.

Description of 2DCOS analysis; molecular structures of DOPC and cholesterol (Figure S1); SERS spectra in C–D and C–H stretching regions of mixed monolayer (Figure S2); description of stretching vibration of C–D/C–H bonds; synchronous and asynchronous 2DCOS spectra of mixed monolayer (Figure S3); description of 2DCOS study of mixed monolayer; assignments of vibrational bands and Raman and SERS wavenumbers of WC14 (Table S1); assignments of vibrational bands and SERS wavenumbers of DOPC, cholesterol, and tBLM (Table S2); and full citation of refs 12 and 23 (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Gediminas Niaura – Department of Bioelectrochemistry and Biospectroscopy, Institute of Biochemistry, Life Sciences Center, Vilnius University, LT-10257 Vilnius, Lithuania; orcid.org/0000-0002-2136-479X; Email: gediminas.niaura@gmc.vu.lt

Authors

Martynas Talaikis – Department of Bioelectrochemistry and Biospectroscopy, Institute of Biochemistry, Life Sciences Center, Vilnius University, LT-10257 Vilnius, Lithuania

Gintaras Valincius – Department of Bioelectrochemistry and Biospectroscopy, Institute of Biochemistry, Life Sciences Center, Vilnius University, LT-10257 Vilnius, Lithuania

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcc.0c04636>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

G.N. gratefully acknowledges the Center of Spectroscopic Characterization of Materials and Electronic/Molecular Processes (SPECTROVERSUM Infrastructure) for the use of Raman spectrometer. G.V. acknowledges the support from the Research Council of Lithuania for supporting part of this study through the grant agreement no. P-MIP-19-394.

■ REFERENCES

- (1) Lipkowski, J. Building biomimetic membrane at a gold electrode surface. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 13874–13887.
- (2) Cornell, B. A.; Braach-Maksvytis, V. L. B.; King, L. G.; Osman, P. D. J.; Raguse, B.; Wiczorek, L.; Pace, R. J. A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature* **1997**, *387*, 580–583.
- (3) Rebaud, S.; Maniti, O.; Girard-Egrot, A. P. Tethered bilayer lipid membranes (tBLMs): Interest and applications for biological membrane investigations. *Biochimie* **2014**, *107*, 135–142.
- (4) McGillivray, D. J.; Valincius, G.; Vanderah, D. J.; Febo-Ayala, W.; Woodward, J. T.; Heinrich, F.; Kasianowicz, J. J.; Lösche, M. Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes. *Biointerphases* **2007**, *2*, 21–33.
- (5) Valincius, G.; Mickevicius, M.; Penkauskas, T.; Jankunec, M. Electrochemical impedance spectroscopy of tethered bilayer membranes: An effect of heterogeneous distribution of defects in membranes. *Electrochim. Acta* **2016**, *222*, 904–913.
- (6) Valincius, G.; Mickevicius, M. Tethered Phospholipid Bilayer Membranes. An Interpretation of the Electrochemical Impedance Response. In *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*; Elsevier Inc., 2015, 27–61.
- (7) Diao, P.; Hou, Q.; Guo, M.; Xiang, M.; Zhang, Q. Effect of substrate potentials on the structural disorders of alkanethiol monolayers prepared by electrochemically directed assembly. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *597*, 103–110.
- (8) Petrović, Ž.; Metikoš-Huković, M.; Babić, R. Potential-assisted assembly of 1-dodecanethiol on polycrystalline gold. *J. Electroanal. Chem.* **2008**, *623*, 54–60.
- (9) Brett, C. M. A.; Kresak, S.; Hianik, T.; Oliveira Brett, A. M. Studies on self-assembled alkanethiol monolayers formed at applied potential on polycrystalline gold electrodes. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 557–565.
- (10) Talaikis, M.; Eicher-Lorka, O.; Valincius, G.; Niaura, G. Water-induced structural changes in the membrane-anchoring monolayers revealed by isotope-edited SERS. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 22489–22499.
- (11) Rakovska, B.; Ragaliauskas, T.; Mickevicius, M.; Jankunec, M.; Niaura, G.; Vanderah, D. J.; Valincius, G. Structure and function of the membrane anchoring self-assembled monolayers. *Langmuir* **2015**, *31*, 846–857.
- (12) Budvytyte, R.; Valincius, G.; Niaura, G.; Voiciuk, V.; Mickevicius, M.; Chapman, H.; Goh, H.-Z.; Shekhar, P.; Heinrich, F.; Shenoy, S.; et al. Structure and properties of tethered bilayer lipid membranes with unsaturated anchor molecules. *Langmuir* **2013**, *29*, 8645–8656.
- (13) Willets, K. A. Probing nanoscale interfaces with electrochemical surface-enhanced Raman scattering. *Curr. Opin. Electrochem.* **2019**, *13*, 18–24.
- (14) Greene, B. H. C.; Alhabab, D. S.; Pye, C. C.; Brosseau, C. L. Electrochemical-surface enhanced Raman spectroscopic (EC-SERS) study of 6-thiouric acid: A metabolite of the chemotherapy drug azathioprine. *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121*, 8084–8090.
- (15) Rooney, R. T.; Jha, H.; Rohde, D.; Schmidt, R.; Gewirth, A. A. Suppression of copper electrodeposition by PEG in methanesulfonic acid electrolytes. *J. Electrochem. Soc.* **2019**, *166*, D551–D558.
- (16) Schmitt, K. G.; Schmidt, R.; Gaida, J.; Gewirth, A. A. Chain length variation to probe the mechanism of accelerator additives in copper electrodeposition. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 16838–16847.
- (17) Trasatti, S.; Petrii, O. A. Real surface area measurements in electrochemistry. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 711–734.
- (18) Pankratov, D.; Sotres, J.; Barrantes, A.; Arnebrant, T.; Shleev, S. Interfacial behavior and activity of lacase and bilirubin oxidase on bare gold surfaces. *Langmuir* **2014**, *30*, 2943–2951.
- (19) Niaura, G.; Gaigalas, A. K.; Vilker, V. L. Moving spectroelectrochemical cell for surface Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **1997**, *28*, 1009–1011.
- (20) Bulovas, A.; Dirvianskytė, N.; Talaikytė, Z.; Niaura, G.; Valentukonytė, S.; Butkus, E.; Razumas, V. Electrochemical and structural properties of self-assembled monolayers of 2-methyl-3-(*o*-mercaptopalkyl)-1,4-naphthoquinones on Gold. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *591*, 175–188.
- (21) Etz, E. S.; Choquette, S. J.; Hurst, W. S. Development and certification of NIST standard reference materials for relative Raman intensity calibration. *Microchim. Acta* **2005**, *149*, 175–184.
- (22) Gao, P.; Gosztoła, D.; Leung, L.-W. H.; Weaver, M. J. Surface-enhanced Raman scattering at gold electrodes: Dependence on electrochemical pretreatment conditions and comparisons with silver. *J. Electroanal. Chem.* **1987**, *233*, 211–222.
- (23) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A. et al. *Gaussian 09*, Revision D.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2013.
- (24) Matulaitienė, I.; Kuodis, Z.; Matijoška, A.; Eicher-Lorka, O.; Niaura, G. SERS of the positive charge bearing pyridinium ring terminated self-assembled monolayers: Structure and bonding spectral markers. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 26481–26492.
- (25) Ragaliauskas, T.; Mickevicius, M.; Rakovska, B.; Penkauskas, T.; Vanderah, D. J.; Heinrich, F.; Valincius, G. Fast formation of low-defect-density tethered bilayers by fusion of multilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2017**, *1859*, 669–678.
- (26) Widrig, C. A.; Chung, C.; Porter, M. D. The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline Au and Ag electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **1991**, *310*, 335–359.
- (27) Hatchett, D. W.; Uibel, R. H.; Stevenson, K. J.; Harris, J. M.; White, H. S. Electrochemical measurements of the free energy of adsorption of n-alkanethiols at Ag(111). *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1062–1069.
- (28) Laredo, T.; Leitch, J.; Chen, M.; Burgess, I. J.; Dutcher, J. R.; Lipkowski, J. Measurement of the charge number per adsorbed molecule and packing densities of self-assembled long-chain monolayers of thiols. *Langmuir* **2007**, *23*, 6205–6211.
- (29) Kunze, J.; Leitch, J.; Schwan, A. L.; Faragher, R. J.; Naumann, R.; Schiller, S.; Knoll, W.; Dutcher, J. R.; Lipkowski, J. New method to measure packing densities of self-assembled thiophilic monolayers. *Langmuir* **2006**, *22*, 5509–5519.
- (30) Jacob, J. D. C.; Lee, T. R.; Baldelli, S. In situ vibrational study of the reductive desorption of alkanethiol monolayers on gold by sum frequency generation spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 29126–29134.
- (31) Muglali, M. I.; Erbe, A.; Chen, Y.; Barth, C.; Koelsch, P.; Rohwerder, M. Modulation of electrochemical hydrogen evolution rate by arylphatic thiol monolayers on gold. *Electrochim. Acta* **2013**, *90*, 17–26.
- (32) García-Raya, D.; Madueño, R.; Sevilla, J. M.; Blázquez, M.; Pineda, T. Electrochemical characterization of a 1,8-octanedithiol self-assembled monolayer (ODT-SAM) on a Au(111) single crystal electrode. *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 8026–8033.
- (33) Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G. *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects*; Elsevier: Amsterdam, 2009.
- (34) Tian, Z. Q.; Ren, B.; Wu, D. Y. Surface-enhanced Raman scattering: From noble to transition metals and from rough surfaces to ordered nanostructures. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 9463–9483.
- (35) Bruzas, I.; Lum, W.; Gorunmez, Z.; Sagle, L. Advances in surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) substrates for lipid and protein characterization: sensing and beyond. *Analyst* **2018**, *143*, 3990–4008.

- (36) dos Santos, D. P.; Temperini, M. L. A.; Brolo, A. G. Intensity fluctuations in single-molecule surface-enhanced Raman scattering. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 456–464.
- (37) Rodrigues, D. C.; de Souza, M. L.; Souza, K. S.; dos Santos, D. P.; Andrade, G. F. S.; Temperini, M. L. A. Critical assessment of enhancement factor measurements in surface-enhanced Raman scattering of different substrates. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 21294–21301.
- (38) Dey, P.; Thurecht, K. J.; Fredericks, P. M.; Blakey, I. Tagged core-satellite nanoassemblies: role of assembling sequence on surface-enhanced Raman scattering (SERS) performance. *Appl. Spectrosc.* **2019**, *73*, 1428–1435.
- (39) Stewart, S.; Fredericks, P. M. Surface-enhanced Raman spectroscopy of peptides and proteins on an electrochemically prepared silver surface. *Spectrochim. Acta, Part A* **1999**, *55*, 1615–1640.
- (40) de Albuquerque, C. D. L.; Sobral-Filho, R. G.; Poppi, R. J.; Brolo, A. G. Digital protocol for chemical analysis at ultralow concentrations by surface-enhanced Raman scattering. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 1248–1254.
- (41) Buividas, R.; Stoddart, P. R.; Juodkazis, S. Laser fabricated ripple substrates for surface-enhanced Raman scattering. *Ann. Phys.* **2012**, *524*, L5–L10.
- (42) Proniewicz, E.; Ignatjev, I.; Niaura, G.; Sobolewski, D.; Prah, A.; Proniewicz, L. M. Role of Phe-D₅ isotopically labeled analogues of bradykinin on elucidation of its adsorption mode on Ag, Au, and Cu electrodes. Surface-enhanced Raman spectroscopy studies. *J. Raman Spectrosc.* **2013**, *44*, 1096–1104.
- (43) Nandy, S. K.; Mukherjee, D. K.; Roy, S. B.; Kastha, G. S. Vibrational spectra and rotational isomerism in 2-mercaptoethanol. *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 1139–1141.
- (44) Tarabara, V. V.; Nabiev, I. R.; Feofanov, A. V. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study of mercaptoethanol monolayer assemblies on silver citrate hydroxol. Preparation and characterization of modified hydroxol as a SERS-active substrate. *Langmuir* **1998**, *14*, 1092–1098.
- (45) Kudelski, A. Chemisorption of 2-mercaptoethanol on silver, copper, and gold: Direct Raman evidence of acid-induced changes in adsorption/desorption equilibria. *Langmuir* **2003**, *19*, 3805–3813.
- (46) Kudelski, A. Structures of monolayers formed from different HS-(CH₂)_{2-x} thiols on gold, silver and copper: comparative studies by surface-enhanced Raman scattering. *J. Raman Spectrosc.* **2003**, *34*, 853–862.
- (47) Kudelski, A. Characterization of thiolate-based mono- and bilayers by vibrational spectroscopy: A review. *Vib. Spectrosc.* **2005**, *39*, 200–213.
- (48) Podstawka, E.; Niaura, G.; Proniewicz, L. M. Potential-dependent studies on the interaction between phenylalanine-substituted bombesin fragments and roughened Ag, Au, and Cu electrode surfaces. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 1010–1029.
- (49) Wehling, B.; Hill, W.; Klockow, D. Crosslinking of organic acid and isocyanate to silver SERS substrates by mercaptoethanol. *Chem. Phys. Lett.* **1994**, *225*, 67.
- (50) Provorse, M. R.; Aikens, C. M. Binding of carboxylates to gold nanoparticles: A theoretical study of the adsorption of formate on Au₂₀. *Comput. Theor. Chem.* **2012**, *987*, 16–21.
- (51) Castillo, J. J.; Rindzevicius, T.; Rozo, C. E.; Boisen, A. Adsorption and vibrational study of folic acid on gold nanopillar structures using surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. *Nanomater. Nanotechnol.* **2015**, *5*, 29.
- (52) Abdalmoneam, M. H.; Waters, K.; Saikia, N.; Pandey, R. Amino-acid conjugated gold clusters: interaction of alanine and tryptophan with Au₈ and Au₂₀. *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121*, 25585–25593.
- (53) Creighton, J. A. The selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy. In *Advances in spectroscopy*; John Wiley & Sons, Ltd.: New York, 1988.
- (54) Ramirez, P.; Andreu, R.; Cuesta, Á.; Calzado, C. J.; Calvente, J. J. Determination of the potential of zero charge of Au(111) modified with thiol monolayers. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6473–6479.
- (55) Bryant, M. A.; Pemberton, J. E. Surface Raman scattering of self-assembled monolayers formed from 1-alkanethiols: Behavior of films at Au and comparison to films at Ag. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8284–8293.
- (56) Bryant, M. A.; Pemberton, J. E. Surface Raman scattering of self-assembled monolayers formed from 1-alkanethiols at silver [electrodes]. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3629–3637.
- (57) Czamara, K.; Majzner, K.; Pacia, M. Z.; Kochan, K.; Kaczor, A.; Baranska, M. Raman spectroscopy of lipids: a review. *J. Raman Spectrosc.* **2015**, *46*, 4–20.
- (58) Schoenfish, M. H.; Pemberton, J. E. Effects of electrolyte and potential on the in situ structure of alkanethiol self-assembled monolayers on silver. *Langmuir* **1999**, *15*, 509–517.
- (59) Mihailescu, M.; Vaswani, R. G.; Jardón-Valadez, E.; Castro-Romá, N. F.; Freitas, J. A.; Worcester, D. L.; Chamberlin, A. R.; Tobias, D. J.; White, S. H. Acyl-chain methyl distributions of liquid-ordered and -disordered membranes. *Biophys. J.* **2011**, *100*, 1455–1462.
- (60) Lee, C.; Bain, C. D. Raman spectra of planar supported lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1711*, 59–71.
- (61) Chatzigeorgiou, P.; Mourelatou, A.; Pollatos, E.; Margari, D.; Zogzas, N.; Viras, K.; Mavromoustakos, T.; Semidalas, C. E. Comparison of the thermal behavior and conformational changes in partially and fully hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine systems. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2017**, *131*, 887–898.
- (62) Orendorff, C. J.; Ducey, M. W., Jr.; Pemberton, J. E. Quantitative correlation of Raman spectral indicators in determining conformational order in alkyl chains. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 6991–6998.
- (63) Lee, H.-H.; Ruželá, Ž.; Malysheva, L.; Onipko, A.; Gutés, A.; Björefors, F.; Valiokas, R.; Liedberg, B. Long-chain alkythiol assemblies containing buried in-plane stabilizing architectures. *Langmuir* **2009**, *25*, 13959–13971.
- (64) Malysheva, L.; Onipko, A.; Fyrner, T.; Lee, H.-H.; Valiokas, R.; Konradsson, P.; Liedberg, B. Spectroscopic characterization and modeling of methyl- and hydrogen-terminated oligo(ethylene glycol) self-assembled monolayers. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 12008–12016.
- (65) Zdaniauskiene, A.; Charkova, T.; Matulaitienė, I.; Eicher-Lorka, O.; Matijoška, A.; Skapas, M.; Selskis, A.; Niaura, G. Electrochemical shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy: Bonding, structure, and ion-pairing of the positive charge bearing pyridinium ring terminated monolayer at smooth gold electrode. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122*, 1234–1242.
- (66) Razmte-Razmė, I.; Kuodis, Z.; Eicher-Lorka, O.; Niaura, G. SERS Observation of soft C-H vibrational mode of bifunctional alkanethiol molecules adsorbed at Au and Ag electrodes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *12*, 4564–4568.
- (67) Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M.; Allara, D. L.; Tao, Y. T.; Parikh, A. N.; Nuzzo, R. G. Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal-surfaces, copper, silver, and gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7152–7167.
- (68) Staffa, J. K.; Lorenz, L.; Stolarski, M.; Murgida, D. H.; Zebger, I.; Utesch, T.; Kozuch, J.; Hildebrandt, P. Determination of the local electric field at Au/SAM interfaces using the vibrational Stark effect. *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121*, 22274–22285.
- (69) Elzein, T.; Fahs, A.; Brogly, M.; Elhri, A.; Lepoittevin, B.; Roger, P.; Planchot, V. Adsorption of alkanethiols on gold surfaces: PM-IRRAS study of the influence of terminal functionality on alkyl chain orientation. *J. Adhes.* **2013**, *89*, 416–432.
- (70) Oklejas, V.; Harris, J. M. In-situ investigation of binary-component self-assembled monolayers: A SERS-based spectroelectrochemical study of the effects of monolayer composition on interfacial structure. *Langmuir* **2003**, *19*, 5794–5801.

(71) Sagitova, E. A.; Prokhorov, K. A.; Nikolaeva, G. Y.; Baimova, A. V.; Pashinin, P. P.; Yarysheva, A. Y.; Mendeleev, D. I. Raman analysis of polyethylene glycols and polyethylene oxides. *J. Phys.: Conf. Ser.* **2018**, *999*.

(72) Koenig, J. L.; Angood, A. C. Spectra of poly(ethylene glycols) in solution. *J. Polym. Sci., Part A-2 Polym. Phys.* **1970**, *8*, 1787–1796.

(73) Samuel, A. Z.; Umpathy, S. Energy funneling and macromolecular conformational dynamics: A 2D Raman correlation study of PEG melting. *Polym J* **2014**, *46*, 330–336.

(74) Basit, H.; Van der Heyden, A.; Gondran, C.; Nysten, B.; Dumy, P.; Labbé, P. Tethered bilayer lipid membranes on mixed self-assembled monolayers of a novel anchoring thiol: Impact of the anchoring thiol density on bilayer formation. *Langmuir* **2011**, *27*, 14317–14328.

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius
El. p. Info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 12 egz.