

(19)



(10) **LT 6239 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **6239**

(51) Int. Cl. (2015.01): **C08F 251/00**

(21) Paraiškos numeris: **2015 025**

(22) Paraiškos padavimo data: **2015-04-17**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2015-10-26**

(45) Patent paskelbimo data: **2016-01-11**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

**Eivydas ANDRIUKONIS, LT
Arūnas STIRKĖ, LT
Lina MIKOLIŪNAITĖ, LT
Zigmas BALEVIČIUS, LT
Almira RAMANAVIČIENĖ, LT
Arūnas RAMANAVIČIUS, LT**

(73) Patent savininkas:

**Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Fizinių ir technologijos mokslų centras,
Savanorių pr. 231, LT-02300 Vilnius, LT**

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

**Reda ŽABOLIENĖ, Advokatės Redos Žabolienės kontora METIDA, Verslo
centras VERTAS, Gynėjų g. 16, LT-01109 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

Pirolų bio-polimerizacija naudojant redokso tarpininką

(57) Referatas:

Šis išradimas priskiriamas biotechnologijų ir biokuro celių gamybos technologijos sričiai. Išradimas atskleidžia galimybes ląstelės išorėje polimerizuoti organines medžiagas, naudojant redokso tarpininką. Konkrečiau, šis išradimas susijęs su $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ jonų oksidacija mielių (*Saccharomyces cerevisiae*) ląstelių sienelės paviršiuje, polimerizuojant pirolą ir susidarant polimerui - polipirolui (Ppy). Šios reakcijos metu susidaręs $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ buvo verčiamas atgal į $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ procesų, kurie vyksta ląstelių citoplazmoje ir ląstelių membranose, pagalba. Atlikus ląstelių modifikavimą Ppy taip pat gauti mielių sienelės mechaniniai pokyčiai, kurie gali būti pritaikomi biokuro celėse mielių ląstelių mechaniniam atsparumui padidinti.

TECHNIKOS SRITIS

Šis išradimas priskiriamas biotechnologijų ir biokuro celių gamybos technologijos sričiai. Išradimas atskleidžia galimybes ląstelės išorėje polimerizuoti organines medžiagas, naudojant redokso tarpininką. Konkrečiau, šis išradimas sietinas su $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ jonų oksidacija mielių (*Saccharomyces cerevisiae*) ląstelių sienelės paviršiuje polimerizuojant pirolą susidarant polimerui - polipiroliui (Ppy). Atlikus ląstelių modifikavimą Ppy taip pat gauti mielių sienelės mechaniniai pokyčiai kurie būtų pritaikomi biokuro celėse mielių ląstelių mechaniniam atsparumui padidinti.

IŠRADIMO TECHNIKOS LYGIS

RU2495509 aprašo kompozicinės medžiagos gavimo būdą, monomerų, konkrečiai polianilino, polipirolo arba polietilentiofeno, polimerizacija, kaip biokatalizatorių naudojant grybines lakazes, kurios yra ekodraugiški fermentai, ir redokso tarpininką, kuris yra pereinamojo metalo cianido komplekso druska, pvz., oktacianomolibdatas (+4), taip pat naudojamas molekulinis deguonis.

US2013250484 aprašo polidisulfido elektropolizavimo būdą, naudojant 2,5-dimerkapto-1,3,4-tiadiazolo monomerą, anglies nanodalelių struktūras bei elektroaktyvius redokso polimerus.

US8444834 kaip ir daugiau panašių patentų, aprašo dažniausiai naudojamą redokso sistemą, kuri susideda ir polimero redokso, fermento ir skersinės jungtis sudarančio agento.

US 7799194 aprašo gelinio mišinio gavimą, naudojant redokso sistemą, paruoštą su agaroze ir polimerizacijos iniciatoriumi, tokiu kaip $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$, pridėdant tirpiklio ir poletilenglikolio metilo eterio akrilato arba metakrilato, kuri skirta panaudoti nukleorūgščių atskyrimui.

US3255164 aprašo monomerinių vinilideno junginių polimerizaciją vandeninėje emulsijoje, naudojant redokso polimerizacijos katalizatorių, apimantį sieros dioksido ir peroksido junginį. Sieros dioksidas yra ištirpinamas polimerizuojamame monomere ir gautas tirpalas patalpinamas į vandeninę terpę, turinčią peroksido junginio polimerizacijos sąlygomis.

US4933394 aprašo polipirolo elektrocheminį gavimo būdą, kuris yra

oksiduotos formos elektrai laidus polimeras. Kovalentine jungtimi prie jo prijungiamas redokso junginys, geriau 3- arba 4- polipirolo žiedo padėtyje. Redokso junginiai yra chinonai arba hidrochinonai. Chinonas yra hidrochinono oksiduota forma, kuri pradžioje gali būti prijungta prie polipirolo ir po to paverčiama kita. Konkrečiai naudojami redokso junginiai yra benzohidrochinonai ir antrachinono sulfonatas.

EP 0308109 aprašo elektrai laidžią polimero kompoziciją, gaunamą homo- arba kopolimero iš vieno arba daugiau pirolų oksidacinės polimerizacijos būdu, turinčią polidentato anijoninį kompleksą, veikiantį kaip redokso potencialas, sąlygojantis pirolų oksidacinę polimerizaciją.

CA 2047392 yra aprašyta kompozicija, susidedanti iš mažiausiai vieno 1,4-diketopirolo[3,4-c]pirolų, redokso sistemos iš ferocianido, konkrečiai kalio ferocianido, feroceno arba amonio geležies (II) sulfato, derinyje su mažiausiai viena elektrai laidžia druska ir jos gavimo būdas.

WO2012150900 yra aprašytos redokso aktyvios organinės medžiagos, kur jungiamas polimeras yra sujungiamas su redokso aktyviomis funkcinėmis grupėmis molekuliniame lygyje ir kur biopolimeras veikia kaip redokso junginys.

US6797785 aprašo polivinilamino polimerų sintezės būdą, naudojant N-vinilformamido monomerą ir redokso katalizatorių, 25°C temperatūroje atmosferos slėgyje.

CA1286447 aprašytas akrilamido homopolimerizacijos ir akrilamido kopolimerizacijos su vinilo polimerais būdas. Minėta homopolimerizacija ir kopolimerizacija inicijuojama naudojant geležies/hidroperoksido redokso sistemą, kuri turi geležies junginį. Polimerizacija atliekama vandeninėje reakcijos terpėje nuo -20 iki 40°C.

KR20050011958 aprašytas fenolio polimerų gavimo būdas, naudojant biokatalizatorius, kurie polimerizuoja fenolio monomerus redokso fermentų organiniame tirpiklyje su oksidantais.

US5282955 aprašo kompoziciją, kuri apima elektrai laidų polimerą, kuris yra polipirolas. Polipirolo ciklinimas vyksta vandeniniame tirpale, turinčiame K_2SO_4 , $K_3[Fe(CN)_6]$ ir $Fe_2(SO_4)_3$. Gauta medžiaga naudojama elektrodų padengimui ir gautas kompozitas turi daug redokso savybėmis pasižyminčių vienetų.

Visi anksčiau minėti išradimai aprašo kitokius sintezės būdus, naudojant skirtingas redokso sistemas bei įvedant atskirus komponentus, kas daro polimerizacijos reakcijas komplikutas. Šiame išradime pateiktas ekologiškas polimerų sintezės būdas, naudojant gyvas ląsteles ir kalio heksacianoferatą kaip stabilų redokso tarpininką.

IŠRADIMO ESME

Šio tyrimo tikslas yra polimerizacijos procesas, kuris leistų padengti mielių ląstelių sienelę elektrai laidžiu polimeru polipirolo, kuris yra sintetinamas oksidacinės polimerizacijos metu sąveikoje su $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Siūlomos polimerizacijos proceso metu susidaręs $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ yra nuolatos verčiamas į oksiduotą formą redokso procesais vykstančiais ląstelių citoplazmoje ir ties jų membranomis. Šiame išradime pateiktas naujas polipirolo sintezės būdas, kuris yra vykdomas ciklinio oksidacijos - redukcijos proceso inicijavimu, sąveikaujant $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ su gyvomis ląstelėmis, kai redukuota $\text{K}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$ redokso tarpininko forma prieš pirolą oksidaciją yra oksiduojama į $\text{K}_3[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$. Gyvos ląstelės yra parinktos iš mielių ląstelių arba kitų ląstelių, kurios gali turėti paviršines oksidoreduktazes.

Oksidacinė polipirolo sintezė inicijuojama elektronų nešiklio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, kuris sintezės metu redukuojamas yra iki $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Susidariusi pastaroji elektronų nešiklio forma yra atgal oksiduojama į $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ redokso procesų, kurie vyksta mielių ląstelėse, metu. Šio proceso metu susidaręs polipirolas yra lokalizuotas ties mielių ląstelių sienele ar periplazminėje ertmėje. Modifikuotos ląstelės išlaikydavo savo formą, bei pakeitė paviršiaus žemėlapi. Taip pat buvo nustatyta, kad ši ląstelių modifikacija turi įtaką ląstelių gyvybingumui.

TRUMPAS BRĖŽINIŲ PAVEIKSLŲ APRAŠYMAS

Pav. 1 pavaizduotas mėginio, kuriame yra $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ir $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolas, sugerties spektras registruotas skirtingais laiko momentais nuo reakcijos pradžios.

Pav. 2 pavaizduota sugerties ties 420 nm priklausomybė nuo laiko kai yra aerobinės ir anaerobinės sąlygos. Reakcijos tirpaluose buvo $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ir $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo, pH 7.

Pav. 3: a – kontrolė, mielių ląstelės PBS buferiniame tirpale, į kurių inkubacijos tirpalą nebuvo dėta $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ar pirolo; b – įmobilizuotos ir išdžiovintos kontrolinės ląstelės (a) ant mikroskopinio stiklelio; įmobilizavimui buvo naudotas poli-L-lizinas ir glutaraldehydas; c – Ppy aglomeratai susidarę reakcijos metu tarp $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo ir $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$; d – imobilizuotos mielių ląstelės po inkubacijos modifikacijos reakcijos mišinyje, kuriame buvo $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo ir $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$; e – imobilizuotos mielių ląstelės po inkubacijos modifikacijos reakcijos mišinyje, kuriame buvo $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo ir $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$; f – išdžiovintas (e) mėginys.

Pav. 4 pavaizduota Ppy susidarymo schema, kai mielės sąveikauja su elektronus pernešančia medžiaga per plazminės membranos oksido-reduktazes (PMOR).

Pav. 5 pavaizduoti reakcijų greičiai ties skirtingomis pH vertėmis: (a) $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ sunaudojimas reakcijos metu su Py, kai pradinė $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ koncentracija $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ir matavimai atlikti ties 420 nm; (b) $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ susidarymas iš redukuotos formos, kai $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ buvo reakcijos pradžioje ir matavimai atlikti ties 420 nm; (c) polimerizacijos sąlyginis greitis pradiname reakcijos mišinyje, esant $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, matuojant ties 460 nm; (d) polimerizacijos sąlyginis greitis pradiname reakcijos mišinyje, esant $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, matuojant ties 460 nm. Visuose mėginiuose buvo $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo. Paklaidos rodo standartinį nuokrypį nuo vidutinės greičio reikšmės, kai greičio reikšmės buvo apskaičiuojamos laiko intervalais tarp analitinio signalo registravimo.

Pav. 6 pavaizduota sugerties priklausomybė nuo reakcijos inkubacijos laiko, kai kiuvetėje buvo įmobilizuotos mielės ir reakcijos mišinyje buvo $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo ir $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ gliukozės.

Pav. 7 Mielių gyvybingumo tyrimas naudojant skirtingą pirolo koncentraciją ląstelių modifikavimo procese.

Pav. 8 pavaizduoti mikroskopu gauti atominių jėgų žemėlapiai, naudojant kontaktinį režimą. Nemodifikuotos (a, b, c) ir modifikuotos mielių ląstelės (d, e, f). Modifikacijai naudotas tirpalas, kuriame buvo $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo ir $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$.

TINKAMIAUSI ĮGYVENDINIMO VARIANTAI

Mielių *Saccharomyces cerevisiae* Y00000 (BY4741 *MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*) padermė buvo auginama per naktį aerobinėmis sąlygomis įs purtant 200 aps./min. greičiu, 30°C temperatūroje. Mielės buvo auginamos įprastinėje auginimo terpėje, kuri susideda iš 1 % mielių ekstrakto, 2% peptono (dalinais suskaidyti baltymai) ir 2% anglies šaltinio – gliukozės (toliau YPD terpė). Po auginimo ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant iki 2 min. 3000 x g greičiu. Auginimo terpė buvo nupilama ir ląstelės plaunamos du kartus su 0,1 mol·dm⁻³ fosfato buferiniu tirpalu (toliau PBS). Ląstelės tada pakartotinai buvo surenkamos centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis.

Ppy sintezės įvertinimas

Visiems mėginiams paruošti buvo naudojami standartiniai tirpalai: skirtingo rūgštingumo 0,1 mol·dm⁻³ PBS tirpalai (pH = 3; 5; 7; 9); 0,1 mol·dm⁻³ [Fe(CN)₆]³⁻ arba [Fe(CN)₆]⁴⁻ tirpalai paruošti iš prieš tai minėtų atitinkamų PBS tirpalų. Mėginiai buvo ruošiami įvairiais santykiais maišant standartinius tirpalus. Į sumaišytus 0,5 mmol·dm⁻³ [Fe(CN)₆]³⁻ arba [Fe(CN)₆]⁴⁻ tirpalus buvo pilama 0,5 mol·dm⁻³ pirolo (pertekliaus sąlygos, apytiksliai puse galimo šios medžiagos tirpumo vandenyje). Greičių priklausomybės tyrimai buvo atliekami matuojant spektrofotometru elektromagnetinės spinduliuotės sugertį ties 420 nm ir ties 460 nm. Šiuose bangų ilgiuose atitinkamai yra stebimi [Fe(CN)₆]³⁻ koncentracijų kitimai ir Ppy susidarymas. Optinis ekstinkcijos koeficientas [Fe(CN)₆]³⁻ kompleksui yra 1179.

Ppy sintezės inicijuojamos [Fe(CN)₆]³⁻ įvertinimas aerobinėmis sąlygomis

Spektrofotometriniams polimerizacijos tyrimams esant ištirpusiam atmosferiniam deguoniui mėginiai buvo ruošiami kaip paminėta anksčiau. Buvo tirama reakcija tarp [Fe(CN)₆]³⁻ ir Py esant skirtingoms: i) [Fe(CN)₆]⁴⁻ koncentracijoms – 0,1, 0,5 ir 1 mmol·dm⁻³ ir esant skirtingam reakcijos mišinio rūgštingumui (pH=3; 5; 7; 9); ii) [Fe(CN)₆]³⁻ koncentracijoms 0,1 ir 0,5 mmol·dm⁻³ ir esant skirtingam reakcijos mišinio rūgštingumui (pH=3; 5; 7; 9).

Ppy sintezės inicijuojamas [Fe(CN)₆]³⁻ įvertinimas anaerobinėmis sąlygomis

Mėginiai buvo ruošiami kaip buvo minėta anksčiau, tik prieš maišant

standartinius tirpalus, pro juos 20 min. buvo leidžiamos inertinės dujos – argonas. Ir reagentai supilami į argonu pripildytą kiuvetės. Kievetės buvo sandariai uždaromos, siekiant išvengti dujų maišymosi. Buvo tiriama esant pH 7.

Ppy susidarymo įvertinimas, esant $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ir mielių ląstelėms

Tam tikrų eksperimentų metu mielių ląstelės buvo „priklijuojamos“ ant spektrofotometrinių kiuvečių sienelių arba dugno naudojant vandenyje tirpintą poli-L-lizina (PPL) (0,1% v/v). 50 μl PPL buvo pilama į kiuvetės ir paliekama per naktį džiuoti. Tada perteklinis PPL kiekis plaunamas vandeniu. Po plovimo mielių ląstelių suspensija (vandenyje) buvo pilama į kiuvetės ir paliekama 10 min. įmobilizuotis ties PPL dengtomis kiuvečių sienelėmis. Dėl elektrostatinės sąveikos tarp teigiamai įkrautų lizino amino grupių ir plačiai paplitusių įvairių neigiamų grupių ties ląstelių paviršiumi ląstelės prilipdavo prie PPL dengtų paviršių. Tada ląstelių suspensija nupilama, kiuvetės švelniai plaunamos mažu kiekiu vandens. Po to kiuvetės paliekamos papildomam įmobilizavimui inde su garuojančiu 25 % GA. Kiuvetės buvo laikomos 15 min. GA garų atmosferoje. Šios procedūros taip pat buvo naudojamos ląsteles įtvirtinant prie plastikinių ar stiklinių paviršių, kurie buvo naudoti optinių analizių metu. Tada kiuvetės buvo pripildomos reakcijos mišiniu: 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, 0,2 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ gliukozės, 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Py, visi išvardinti komponentai buvo ištirpinti 0,1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ PBS. Reakcija buvo esant pH 7. Tam tikrų komponentų susidarymas buvo stebimas spektrofotometru ties įvairiais elektromagnetinių bangų ilgiais: 420, 460, 800 nm. Atitinkamai ties šiais bangų ilgiais buvo stebima $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ koncentracijos pokytis, trumpų Ppy grandinių susidarymas (oligomerinės struktūros iki 20 pirolo molekulių grandinėje), ir ilgų Ppy grandinių formavimasis (ilgesnių nei 20 pirolo molekulių grandinėje). Ties 800 nm stebėjome ilgų Ppy grandinių susidarymą, nes ilgėjant Ppy konjuguotai dvigubųjų jungčių sistemai medžiaga gali sugerti ilgesnių bangų šviesą.

Mielų gyvybingumo tyrimas

Atlikus keletą paprastų testų, buvo pasirinktos sąlyginai optimalios sąlygos, kurių metu manome, kad biokatalizuojama polimero sintezė vyko geriausiai reakcijos mišinyje esant redukuotai elektronų pernašos medžiagai - $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Gyvybingumo testams buvo paruošti 4 mėginiai: kontrolė – be Py, ir mėginiai su skirtingomis Py koncentracijomis (0,1; 0,3; 0,5 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Kiti parametrai visiems mėginiams buvo

vienodi: $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7); $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ir $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ gliukozės. Į kiekvieno mėginio 10 ml buvo dedama apie 0,1 g surinktų ir išplautų mielių ląstelių (procedūra aprašyta anksčiau). Mėginiai buvo inkubuojami purtyklėje 20-24 h, ties 30°C temperatūra ir purtomi 200 aps./min. greičiu. Po modifikavimo Ppy ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant jas ties $3000 \times g$ ir du kart plaunamos $0,1 \text{ PBS}$. Tada praskiedžiamos vienodu kiekiu tokiu pat PBS, pamatuojama suspensijos optinė sugertis ties 595 nm ir atliekami serijiniai skiedimai, norint pasiekti reikiama CFU (kultūros formuojantys vienetai). Tada ląstelės užsėjamos į agarizuotas YPD terpes. Į petri lėkšteles buvo inokuliuojama po 100 μl atskiestų ląstelių suspensijų. Užsėtos ląstelės buvo inkubuotos termostate ties 30°C dvi dienas. Išaugus kultūroms jos buvo skaičiuojamos.

Mielių sienelės paviršiaus tyrimai atominių jėgų mikroskopu

Atominių jėgų mikroskopas BioScope Catalyst buvo naudojamas mielių ląstelių vizualizavimui ir sienelių elastingumo matavimams. Kontaktinis režimas buvo taikomas stebėti modifikuotoms ir kontrolinėms ląstelėms ore. Tam buvo naudojama silicio nitrido adatėlė, kurios rezonansinis dažnis 18kHz, tamprumo konstanta – 0,06 N/m (Bruker, Vokietija). Jėgos matavimai buvo atliekami jau minėtame PBS buferyje (pH 7), naudojant įprastinę adatėlę su panašiais fiziniais parametrais. Polikarbonatinės membranos (Millipore, Vokietija) su įstrigusiomis ląstelėmis jų porose (porų dydis 5 μm) buvo priklijuojamos ant mikroskopinio stikliuko. Paviršius padengiamas PBS tirpalu ir atliekami AFM matavimai skenuojant mielių ląstelių paviršių.

Polipirolo susidarymas

Pirmame tyrimo etape buvo nagrinėjamas Ppy susidarymas inicijuojamas oksiduojančios medžiagos $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Šiam tikslui pasiekti buvo registruojami duomenys su UV-Vis ir optiniu mikroskopu iš skirtingomis eksperimentinėmis sąlygomis paruoštų mėginių (skirtingos pradinių komponentų koncentracijos, reakcijos mišinio pH). Skirtingos reagentų kombinacijos buvo maišomos, siekiant nustatyti ar vyksta Ppy susidarymas (lentelė 1). Mėginiai analizuojami optiniu mikroskopu. Jai reakcijos metu buvo stebimas aiškus Ppy susidarymas, juodų dalelių susidarymas ar ryškus tirpalo spalvos pokytis, rezultatai buvo interpretuojami kaip teigiami (lentelėje pažymėta +), kitu atveju – neigiami, turint omenyje kad reakcija nevyko arba buvo labai lėta (lentelėje pažymėta -). Kaip ir buvo tikėtasi $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$,

kaip oksidatorius, inicijuoja daug greitesnį Ppy susidarymo procesą (lentelė 1, mėginys Nr. 1) lyginant su $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (lentelė 1, mėginys Nr. 2). Mėginiuose, kuriuose nebuvo nei vienos iš $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ formų, reakcija nevyko (lentelė 1, mėginiai Nr. 3-5). Dėl to galima teigti, kad Ppy susidarymui yra būtini fericianatai. Mėginiuose, kuriuose buvo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ taip pat buvo stebimas Ppy susidarymas, tačiau daug lėčiau. Remiantis stebėtais reiškiniais, buvo aišku, kad tik $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ geba atlikti Py oksidaciją ir inicijuoti polimerizacijos procesą. Dėl to daroma išvada, kad $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ turi būti pirmiau oksiduojamas į kitą savo būseną, prieš reaguojant su Py.

1 lentelė. Ppy paruošimo skirtinguose kompozicijų tirpaluose įvertinimas

Mėginio Nr.	Sudėtis	PPy susidarymas
1	$0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + 0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo	+
2	$0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} + 0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo	+
3	Mielės + $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo	-
4	$0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ gliukozės + $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo	-
5	Mielės + $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ gliukozės + $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo	-
6	Mielės + $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ gliukozės + $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + 0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo	+
7	Mielės + $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ gliukozės + $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} + 0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo	+
8	Mielės + $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + 0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo	+
9	Mielės + $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} + 0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo	-

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ labai dažnai yra naudojami biokuro modulių gamyboje naudojant juos kaip elektronų nešiklius į ir iš fermentų ar gyvų ląstelių. Todėl sekančioje dalyje bus nagrinėjama Ppy sintezė su jau minėtais elektronų nešikliais ir mielėmis. Pav. 5c ir 5d yra pavaizduota pirola susidarymo greičiai ir tai, kad esant $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ medžiagai reakcija vyksta daug lėčiau negu esant $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Mėginiuose Nr. 6 (1 lentelė), kurio reakcijos mišinyje buvo mielių ląstelių, gliukozės ir $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, ir Nr. 7 (1 lentelė), kurio reakcijos mišinyje buvo mielių ląstelių, gliukozės ir $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, buvo stebimas Ppy susidarymas po 20 h inkubacijos laikotarpio, tačiau jo išsidėstymas/sąveika tarp mielių buvo skirtinga (pav. 3). Mėginiuose Nr. 8 ir Nr. 9 (1 lentelė), kurių sudėtyje buvo mielių Py ir atitinkamai $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ar $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ taip pat buvo tiriamas Ppy susidarymas. Reiktu pabrėžti, kad šiuose mėginiuose nebuvo gliukozės, kuri užtikrina mielių biologinį aktyvumą. Mėginyje Nr. 8, kuriame buvo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ kaip įprastai buvo stebimas Ppy susidarymas, tačiau mėginyje kur buvo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ Ppy nesusidarė. Todėl nesant gliukozės nėra palaikomas aukštas ląstelių metabolinis aktyvumas, kuris yra svarbus oksiduojant $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ į kitą formą, kuri toliau dalyvauja Ppy sintezėje.

Spektrofotometriniai Ppy susidarymo tyrimai

Šie tyrimai prasideda nuo viso spektro matavimo (nuo 350 iki 1100nm) eksperimento, kurio metu yra naudojama $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ir $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirola, $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS buferio pH 7, kai šviesos sugertis buvo matuojama intervalais kas 10 minučių (pav. 1). Iš rezultatų buvo daroma išvada, kad tiek $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, tiek Ppy spektrai neuždengia vienas kito spektrų, nes tarp jų yra izobestinis taškas ties $\lambda=452 \text{ nm}$. Tai reiškia, kad atliekant vieną matavimą, galima nustatyti dviejų skirtingų medžiagų koncentracijas/ kiekius atskirai. Taip pat buvo pastebėta, kad laikui bėgant didėja šviesos sugertis ilgesnių elektros magnetinių bangų srityse, kas liudija apie ilgų/didelių polimero grandinių susidarymą, tuo pačiu apie ilgas dvigubų ryšių konjuguotas sistemas, kas lemia platesnį Ppy sugerties spektrą.

Panašūs matavimai buvo atliekami ties $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ sugerties maksimumu ($\lambda=420 \text{ nm}$). Šiame bandyme buvo stebima $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ redukcija į $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ dalyvaujant Py, kaip reduktoriui. Pav. 2 atvaizduoja reakcijas tarp paminėtų reagentų, kurios buvo vykdomos tiek aerobinėmis, tiek anaerobinėmis sąlygomis. Rezultatai

pavaizduoti kaip kelių matavimų vidutinės $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ koncentracijos priklausomybė nuo laiko. Reakcija, kuri buvo vykdoma aerobinėse sąlygose, nuo 35 minutės pradeda pasiekti pusiausvyros sąlygas, nes vyksta susidarančio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ atbulinė reoksidacija dėl tirpale esančio deguonies. Kita vertus, anaerobinėse sąlygose $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ lėtai, bet tiesiškai nyksta, nes jo bendroji koncentracija nėra papildoma. Tiesinis nykimas su $R^2 > 0,99$ reiškė prasideda nuo 20 minutės, tiesinis mažėjimas šio regento atžvilgiu. Iš šio grafiko galima matyti, kad kai yra anaerobinės sąlygos ir Py perteklius, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ bendras kiekis tirpale nėra papildomas ir reakcija bus baigtinė ir ji vyks, kol $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ pasieks pačią mažiausią aktyvią koncentraciją. Tuo tarpu aerobinėse sąlygose vyksta redokso ciklas, kuris sustoja, kai baigiasi Py. Abiejų reakcijų metu buvo stebimas polipirolo susidarymas. Atskiro eksperimento metu, anaerobinėmis sąlygomis virtimas iš $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ į $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ kaip ir Ppy susidarymas nebuvo stebimas (pav. 2). Aprašytas bandymas įrodo, kad yra būtinas oksidatorius.

Pav. 3 yra atvaizduoti įvairūs reakcijų metu susidarę tirti produktai. 3d paveiksle pavaizduota mielės inkubuotos su $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ir pirolu. Ląstelės buvo apsuptos ir sukabintos juodų struktūrų, kurios susideda iš mažesnių sferinių dalelių. Šios struktūros išsidėstė tiek tarp ląstelių, tiek ir ląstelių sienelėse. Taip pat buvo stebėtos Ppy dalelės/struktūros, kurias suformavo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ jonai (lentelė 1, Nr.1; pav. 3c). Geležies (III) heksacianidas būdamas sąlyginai stipriu oksidatoriumi inicijuoja greitą Ppy polimerizaciją, kurios metu susidaro įvairios formos ir dydžio Ppy struktūros, turinčios tokius pat mažus sferinius sandus kaip ir struktūros paminėtos anksčiau. Buvo pastebėta, kad ląstelės, kurios buvo inkubuojamos su $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ bei pirolu, buvo apsuptos tamsiu Ppy sluoksliu (pav. 3f). Buvo padaryta išvada, kad Ppy sintezė gali būti lokalizuota ties ląstelių sienele ar jų periplazmoje, nes ten vyksta $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ oksidacija į $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ten esančių oksidoreduktazių pagalba. Šis Ppy sintezės metodas yra patrauklus tuo, kad galimai elektrai laidus polimeras susidaro toje srityje, kuri pasižymi didžiausia elektrine varža. Iš visų anksčiau aprašytų rezultatų pateikiame apibendrintą proceso schemą, kuri pavaizduota pav. 4. Ši schema yra pagrindžiama ir kitais faktais, kuriuos pasiūlė kiti autoriai [12, 16, 17], iš jų išskiriant Rawson'ą [12] ir keleta kitų autorių [13-15], kurie postulavo, kad gyvos ląstelės geba dalyvauti išoriniuose redokso procesuose. Todėl dalies $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ oksidacija yra įmanoma, pabrėžiant tai, kad $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ koncentracijų

santykis yra didelis.

Pav. 4 pavaizduota Ppy susidarymo schema periplazminėje ertmėje arba sienelėje. Mielių ląstelėms įsijungiant į redokso procesus susidaro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Tada dėl sąveikos su mieliu, kurios yra išsidėsčiusios ląstelių membranose, oksido-reduktazėmis didėja pastarojo jono koncentracija. Esant $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ir mažesnei $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ koncentracijai Ppy sintezė sėkmingai vyksta (pav. 1, pav. 3c). Esant mielėms susidaro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, kuriam reaguojant su Py susidaro pav. 3f pavaizduoti mielių Ppy konjugatai.

Pav. 5 vaizduojama skirtingi reakcijų greičiai, matuojant $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ didėjimo arba mažėjimo spektrus ties 420 nm esant skirtingoms pH reikšmėms (5a, 5b) ir Ppy susidarymo greičiai ties 460 nm (5c, 5d). 5a vaizduoja kaip greitai $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ reaguoja su pirolu. Reakcija greitesnė neutraliose ir šiek tiek bazinėse sąlygose. Grafike 5b vaizduojamas $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ susidarymas iš $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ dėl reakcijos su ištirpusiu atmosferiniu deguonimi. Taip pat galima atkreipti dėmesį, kad $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ susidaro daug lėčiau nei jis reaguoja su Py, ir kad lėčiausiai oksidacija į $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ vyksta esant pH 7. Grafikai 5c ir 5d vaizduoja Ppy susidarymo greičius atitinkamai naudojant $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ir $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Abejais atvejais polipirolo dalelės lėčiausiai susidaro pH esant 7. Verta pabrėžti, kad įprastai polimerizacija buvo atliekama esant pH 7. Tai yra labai svarbi savybė, nes vykstant greitam polimerizacijos procesui vyksta nespecifinė Ppy sintezė (pav. 3c). Iš šių grafikų (pav. 5) matosi, kad Ppy polimerizacija vyksta $9,59 \cdot 10^{-7} \text{ } \Delta\text{A} \cdot \text{s}^{-1}$ greičiu visame tirpale. Tačiau kiuvetėje įmobilizavus (ant jos paviršiaus) mieles, polimerizacijos greitis padidėjo iki $2,02 \cdot 10^{-6}$, (skaičiavimai atlikti pagal duomenis pateiktus pav. 6). Tai reiškia, kad esant net mažam mielių kiekiui, mielės paspartina $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ oksidaciją į $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ir tai yra tiesiogiai susiję su greitesniu Ppy susidarymu. Todėl, kad procesas yra paspartintas tik ties ląstelių paviršiumi, polimerizacija vyksta tik ties ląstelės sienelėmis.

Ppy sintezės spektrofotometrinis stebėjimas su įmobilizuotomis mielių ląstelėmis

Norėdami stebėti Ppy sintezę, kurią katalizavo ląstelės versdamos $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ į $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, sukūrėme metodą įmobilizuojant ląsteles spektrofotometrinių kiuvėčių dugne (detali procedūra aprašyta „Ppy susidarymo įvertinimas, esant $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ir mielių ląstelėms“). Tada buvo matuojami sugerties spektrai (pav. 6). Matavimai atlikti ties 420, 460, 595, 800 nm ilgio elektromagnetinėmis

bangomis. Atitinkamai jos nurodo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ koncentracijos didėjimą, Ppy susidarymą, mielių ląsteles ir ilgų Ppy grandinių susidarymą. Pastarieji du sugerties spektrai persidengė. Pirmiausiai buvo stebimas $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ virtimas į $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, tada sekė Ppy susidarymas, o daug vėliau, po 6-8 val., ir ilgų Ppy grandinių susidarymas. Ląstelių augimas nebuvo stebimas, nes reakcijos mišinyje nebuvo augimui reikalingų maistinių medžiagų, tik gliukozė, kuri yra būtina palaikyti mielių gyvybingumui. Tačiau 4 h nuo eksperimento pradžios buvo stebimas sugerties augimas ir šioje srityje. Tai taip pat buvo Ppy signalas. Pirmiau susidarė trumpos Ppy, kurios neturi ilgų labai konjuguotų π - π elektronų sistemų, todėl absorbcijos maksimumas išlieka ties 460 nm. Ilgėjant polimerinėms grandinėms ilgėjo ir konjuguotos dvigubųjų ryšių sistemos. Įrodymas, kad ilgesnės Ppy grandinės daro įtaką sugerties spektrams, pavaizduotas pav. 1. Šiuo eksperimentu taip parodome, kad mielės geba katalizuoti Ppy sintezę pasirinktomis sąlygomis esant neutraliam pH.

Ląstelių gyvybingumas po modifikacijos Ppy

Mielių ląstelių mėginys su $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, bet be jokio pradinio pirolo kiekio buvo laikomas turintis 100 % gyvybingumą. Kai į analogišką mėginį buvo įdėta $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo, ląstelių gyvybingumas mažėjo. Kai pirolo koncentracija buvo padidinta iki $0,3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, gyvybingumas toliau mažėjo. Tačiau kai koncentracija buvo padidinta iki $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, gyvybingumas liko nepakitęs. Tai rodo, kad ląstelių gyvybingumas mažėja didinant pirolo koncentraciją tik iki $0,3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, ir tolimesnis koncentracijos didinimas neturi įtakos ląstelėms. Spektrofotometriniai tyrimai teigia, kad didinant pirolo koncentraciją nuo $0,1$ iki $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, susidaro proporcingai didesni Ppy kiekiai periplazmoje ar ląstelių sienelėje. Šis tyrimas įrodo, kad polipirolo citotoksiškumas pasireiškia tik iki tam tikros ribos. Ankstesniame tyrime buvo teigiama, kad dėl hidrofobinės Ppy prigimties, jis gali integruotis į ląstelių membraną, ir esant dideliems jo kiekiams tai gali membranas padaryti termodinamiškai nestabiliomis struktūromis. Šis efektas tam tikromis sąlygomis mažina ląstelių gyvybingumą. Šiame tyrime teigiame, kad Ppy susidaro periplazmoje ir/arba sienelėje, dėl to susidaręs netikras ląstelės dangalas gali mažinti medžiagų difuziją į ir iš ląstelės.

Visos eukariotinės ląstelės turi transplazminės membranos elektronų pernašos sistemas (tPMET), taip pat jas turi ir mielių ląstelės. Šios sistemos dar vadinamos plazminės membranos oksidoreduktazių sistemomis (PMOR), kurios yra

pasiekiamos mielėse būtent iš periplazminės ertmės. Taip pat jos gali priimti iš ar atiduoti elektronus hidrofiliniam nešikliui, tokiam kaip $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Elektronų nešikliai gali priimti elektronus iš eukariotinių ląstelių keliais būdais, tačiau hidrofilinis nešiklis, kurį mes naudojome, negali pereiti ląstelių membranos, todėl jų sąveika su ląstelėmis yra apribota. Todėl šis nešiklis gali sąveikauti tik su tPMET sistemomis iš periplazminės ertmės pusės (pav. 4.). Priklausomai nuo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ koncentracijų santykio, šie jonai gali būti oksiduoti arba redukuoti per tPMET sistemas, kurios yra *Saccharomyces cerevisiae* membranoje. Merker parodė, kad redukcija/oksidacija toluidino mėlio, hidrofilinis elektronų nešiklis, redukcija yra susijusi su citoplazmoje esančių nikotinamido adenino dinukleotido (NADH/NAD^+) oksidacija/redukcija. Žinant tai, kad $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ir $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ išlieka ląstelių išorėje, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ gali būti oksiduojamas tik tPMET sistemose ir galimai kitų elektronų akceptorų, kurie ištirpę ląstelių membranoje ir juda per ją laisvai.

Atominių jėgų mikroskopo matavimai

Atominių jėgų mikroskopas naudotas palyginti mielių ląsteles modifikuotas polipirolo su kontrolinėmis mielėmis. Buvo įvertintos paviršiaus struktūros. Eksperimentams buvo naudojamos mielės, užaugintos ir surinktos aukščiau aprašytu būdu ir modifikuotos su 0,1; 0,3; 0,5 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pirolo, esant 0,04 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (detalesnė procedūra aprašyta dalyje „Mielių sienelės paviršiaus tyrimai atominių jėgų mikroskopu“). Vėliau ląstelės buvo plaunamos su pH 7 0,1 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS buferiu, tada ląstelių suspensijos užpildtos ant mikroskopinių stikliukų ir paliktos per naktį džiūti kambario temperatūroje. Tada tokie mėginiai buvo matuojami su AJM kontaktiniu režimu naudojant silicio nitrido adatėlę. Gauti paviršiaus žemėlapiai atvaizduoti pav. 8. Ląsteles džiovinant kontrolinės (nemodifikuotos) ląstelės susitraukė ir prarado savo formą (pav. 8a), o modifikuotos ląstelės džiūvimo metu išlaikė savo sferinę formą (pav. 8b). Šį reiškinį galima aiškinti dėl didelio Ppy hidrofobiškumo, kuris neleido vandeniui išeiti iš ląstelių arba susidaręs jo sluoksnis stipriai sulėtino vandens difuziją iš ląstelių. Kita priežastis - susidaręs polipirolo sluoksnis sustiprino ląstelių sienelę, todėl jos neprarado savo formos. Detalus paviršiaus žemėlapiai buvo gauti atlikus didelės raiškos skenavimus (pav. 8b ir 8e). Ant modifikuotų ląstelių paviršiaus buvo stebimos naujos struktūros, o kontrolinių ląstelių paviršius buvo glotnus. Pritaikius antro lygmens paviršiaus „išlyginimo“ (flattening) algoritmus iš pav. 8b ir pav. 8e žemėlapių buvo gauti pav. 8c ir pav. 8f

žemėlapiai. Šie sugeneruoti žemėlapiai parodė, kad modifikuojant ląsteles Ppy pakeisdavo paviršiaus šiurkštumą. Buvo stebimi paviršiaus nelygumai, leidžiantys manyti kad Ppy formuojasi mažose salelėse.

Literatūros šaltiniai

1. Ansari, R., *Polypyrrole Conducting Electroactive Polymers: Synthesis and Stability Studies*. E-Journal of Chemistry, 2006. 3(4): p. 186-201.
2. Fischer, R.L. and A.B. Bennett, *ROLE OF CELL-WALL HYDROLASES IN FRUIT RIPENING*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1991. 42: p. 675-703.
3. Mazur, M., A. Krywko-Cendrowska, P. Krysinski, and J. Rogalski, *Encapsulation of laccase in a conducting polymer matrix: A simple route towards polypyrrole microcontainers*. Synthetic Metals, 2009. 159(17-18): p. 1731-1738.
4. Ramanaviciene, A., W. Schuhmann, and A. Ramanavicius, *AFM study of conducting polymer polypyrrole nanoparticles formed by redox enzyme - glucose oxidase - initiated polymerisation*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2006. 48(2): p. 159-166.
5. Vaitkuvienė, A., V. Kasetas, J. Voronovic, G. Ramanauskaite, G. Biziuleviciene, A. Ramanaviciene, and A. Ramanavicius, *Evaluation of cytotoxicity of polypyrrole nanoparticles synthesized by oxidative polymerization*. Journal of Hazardous Materials, 2013. 250: p. 167-174.
6. Varesano, A., C. Vineis, A. Aluigi, F. Rombaldoni, C. Tonetti, and G. Mazzuchetti, *Antibacterial Efficacy of Polypyrrole in Textile Applications*. Fibers and Polymers, 2013. 14(1): p. 36-42.
7. Song, H.K. and G.T.R. Palmore, *Conductive polypyrrole via enzyme catalysis*. Journal of Physical Chemistry B, 2005. 109(41): p. 19278-19287.
8. Chakrabarti, M.H. and E.P.L. Roberts, *Analysis of Mixtures of Ferrocyanide and Ferricyanide using UV-Visible Spectroscopy for Characterisation of a Novel Redox Flow Battery*. Journal of the Chemical Society of Pakistan, 2008. 30(6): p. 817-823.
9. Ramanavicius, A., A. Kausaite, A. Ramanaviciene, J. Acaite, and A. Malinauskas, *Redox enzyme - glucose oxidase - initiated synthesis of polypyrrole*.

Synthetic Metals, 2006. 156(5-6): p. 409-413.

10. Tan, Y. and K. Ghandi, *Kinetics and mechanism of pyrrole chemical polymerization*. Synthetic Metals, 2013. 175: p. 183-191.

11. Tokonami, S., H. Shiigi, and T. Nagaoka, *Chapter 4 - Molecularly Imprinted Overoxidized Polypyrrole Films for Sensor Applications from Enantiorecognition to Trace Analysis*, in *Molecularly Imprinted Sensors*, S.L. Ge and S.A.P. Lunec, Editors. 2012, Elsevier: Amsterdam. p. 73-89.

12. Rawson, F.J., A.J. Downard, and K.H. Baronian, *Electrochemical detection of intracellular and cell membrane redox systems in Saccharomyces cerevisiae*. Scientific Reports, 2014. 4: p. 9.

13. Heiskanen, A., J. Yakovleva, C. Spegel, R. Taboryski, M. Koudelka-Hep, J. Emneus, and T. Ruzgas, *Amperometric monitoring of redox activity in living yeast cells: comparison of menadione and menadione sodium bisulfite as electron transfer mediators*. Electrochemistry Communications, 2004. 6(2): p. 219-224.

14. Heiskanen, A., V. Coman, N. Kotesha, D. Sabourin, N. Haslett, K. Baronian, L. Gorton, M. Dufva, and J. Emneus, *Bioelectrochemical probing of intracellular redox processes in living yeast cells-application of redox polymer wiring in a microfluidic environment*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. 405(11): p. 3847-3858.

15. Nagamine, K., Y. Takahashi, K. Ino, H. Shiku, and T. Matsue, *Influence of Tip Size on Single Yeast Cell Imaging Using Scanning Electrochemical Microscopy*. Electroanalysis, 2011. 23(5): p. 1168-1174.

16. Ballav, N. and M. Biswas, *Oxidative polymerization of aniline and pyrrole by isopolymetallates of vanadium*. Journal of Applied Polymer Science, 2005. 96(4): p. 1483-1486.

17. Torres-Gomez, G. and P. Gomez-Romero, *Conducting organic polymers with electroactive dopants. Synthesis and electrochemical properties of hexacyanoferrate-doped polypyrrole*. Synthetic Metals, 1998. 98(2): p. 95-102.

18. Qin, Y., L.M. Liu, C.H. Li, S. Xu, and J.A. Chen, *Accelerating Glycolytic Flux of Torulopsis glabrata CCTCC M202019 at High Oxidoreduction Potential Created Using Potassium Ferricyanide*. Biotechnology Progress, 2010.

26(6): p. 1551-1557.

19. Merker, M.P., R.D. Bongard, N.J. Kettenhofen, Y. Okamoto, and C.A. Dawson, *Intracellular redox status affects transplasma membrane electron transport in pulmonary arterial endothelial cells*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2002. 282(1): p. L36-L43.

20. Lesuisse, E., M. CasterasSimon, and P. Labbe, *Evidence for the Saccharomyces cerevisiae ferriredutase system being a multicomponent electron transport chain*. Journal of Biological Chemistry, 1996. 271(23): p. 13578-13583.

21. Rawson, F.J., A.J. Gross, D.J. Garrett, A.J. Downard, and K.H.R. Baronian, *Mediated electrochemical detection of electron transfer from the outer surface of the cell wall of Saccharomyces cerevisiae*. Electrochemistry Communications, 2012. 15(1): p. 85-87.

22. Palmqvist, E., C.B. Kriz, M. Khayyami, B. Danielsson, P.O. Larsson, K. Mosbach, and D. Kriz, *Development of a Simple Detector for Microbial Metabolism, Based on a Polypyrrole Dc Resistometric Device*. Biosensors & Bioelectronics, 1994. 9(8): p. 551-556.

23. Balci, Z., U. Akbulut, L. Toppare, S. Alkan, U. Bakir, and Y. Yagci, *Immobilization of yeast cells in several conducting polymer matrices*. Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry, 2002. 39(3): p. 183-197.

24. Baronian, K.H.R., A.J. Downard, R.K. Lowen, and N. Pasco, *Detection of two distinct substrate-dependent catabolic responses in yeast cells using a mediated electrochemical method*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002. 60(1-2): p. 108-113.

25. Huang, Z.H., S.C. Hu, N. Zhang, X.L. Chen, D. Chen, Q. Jin, and X. Jian, *Effect of volume ratio of acetonitrile to water on the morphology and property of polypyrrole prepared by chemical oxidation method*. Polymer Engineering and Science, 2012. 52(7): p. 1600-1605.

26. Lesuisse, E. and P. Labbe, *Iron Reduction and Trans Plasma Membrane Electron Transfer in the Yeast Saccharomyces cerevisiae*. Plant Physiol, 1992. 100(2): p. 769-77.

27. Rabinowitz, J.D., J.F. Vacchino, C. Beeson, and H.M. McConnell,

Potentiometric measurement of intracellular redox activity. Journal of the American Chemical Society, 1998. 120(10): p. 2464-2473.

28. Suchodolskis, A., V. Feiza, A. Stirke, A. Timonina, A. Ramanaviciene, and A. Ramanavicius, *Elastic properties of chemically modified baker's yeast cells studied by AFM*. Surface and Interface Analysis, 2011. 43(13): p. 1636-1640.

29. Wang, J., *Electrochemical glucose biosensors*. Chemical Reviews, 2008. 108(2): p. 814-825.

30. Zhao, J.S., M. Wang, Z.Y. Yang, Z. Wang, H.S. Wang, and Z.Y. Yang, *The different behaviors of three oxidative mediators in probing the redox activities of the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Analytica Chimica Acta, 2007. 597(1): p. 67-74.

31. Zhao, J.S., Z.Y. Yang, Q.T. Gong, L. Yao, Z.Y. Yang, and W. Min, *Electrochemical insights into the glucose metabolism pathways within Saccharomyces cerevisiae*. Analytical Letters, 2005. 38(1): p. 89-98.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Ekologiškas polimerų polimerizacijos būdas, naudojant redokso tarpininką, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šis būdas apima reakcijos vykdymą buferiniame tirpale, kur į reakcijos mišinį yra įvedami:

a. gyvos ląstelės, kurių paviršiuje vyksta kalio heksacianoferato, kaip redokso tarpininko, oksidacija, kurią katalizuoja oksidoreduktazės;

b. D-gliukozė, kuri užtikrina biologinį mielių aktyvumą;

c. redukuota $K_4[Fe^{II}(CN)_6]$ redokso tarpininko forma, kuri prieš pirola oksidaciją yra oksiduojama į $K_3[Fe^{III}(CN)_6]$;

d. pirola monomeras;

kur polipirola polimerizacija yra inicijuojama elektronų nešiklio $[Fe(CN)_6]^{3-}$, kuris sintezės metu redukuojamas yra iki $[Fe(CN)_6]^{4-}$ ir pastaroji elektronų nešiklio forma yra atgal oksiduojama į $[Fe(CN)_6]^{3-}$ ir yra lokalizuota ties gyvų ląstelių sienele arba jų periplazmoje.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad gyvos ląstelės yra mielių *Saccharomyces cerevisiae* ląstelės.

3. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad oksidatorius yra vandenyje ištirpęs elektronų tarpininkas.

4. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pirola koncentracija yra nuo 0,1 iki 0,5 mol·dm⁻³.

5. Būdas pagal 1 ir 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ciklinis oksidacijos - redukcijos proceso inicijavimas, sąveikaujant $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ su gyvomis ląstelėmis, vyksta mielių ląstelių sienelės paviršiuje.

6. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad polipirolas Ppy susidaro ląstelių periplazmoje ir/arba sienelėje.

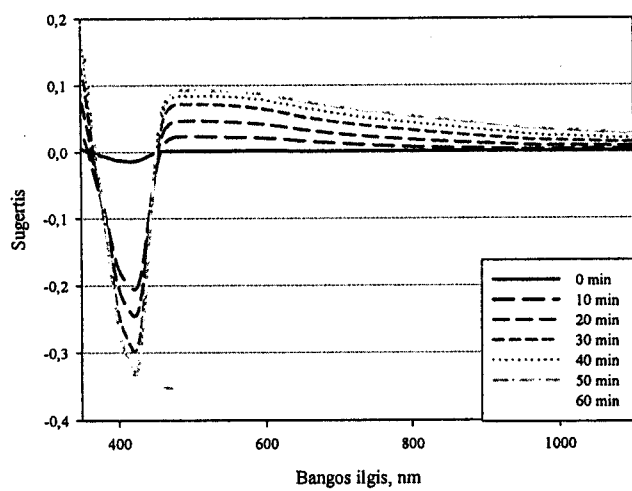
7. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad gliukozės koncentracija yra $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

8. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad redukuoto redokso tarpininko $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$ koncentracija yra nuo apie $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ iki apie $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

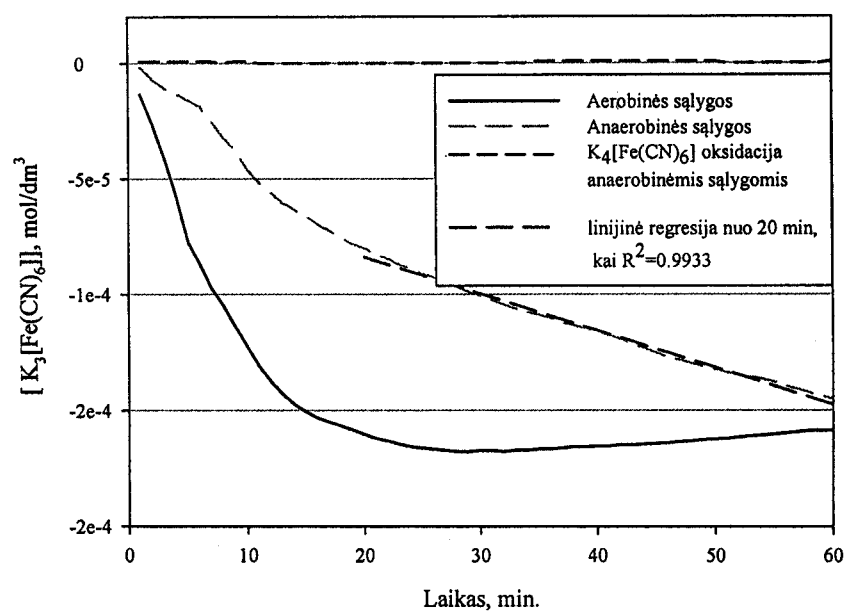
9. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad oksiduoto redokso tarpininko $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$ koncentracija tirpale yra nuo apie $0,04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ iki apie $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

10. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad reakcija yra vykdoma 18-24 valandas.

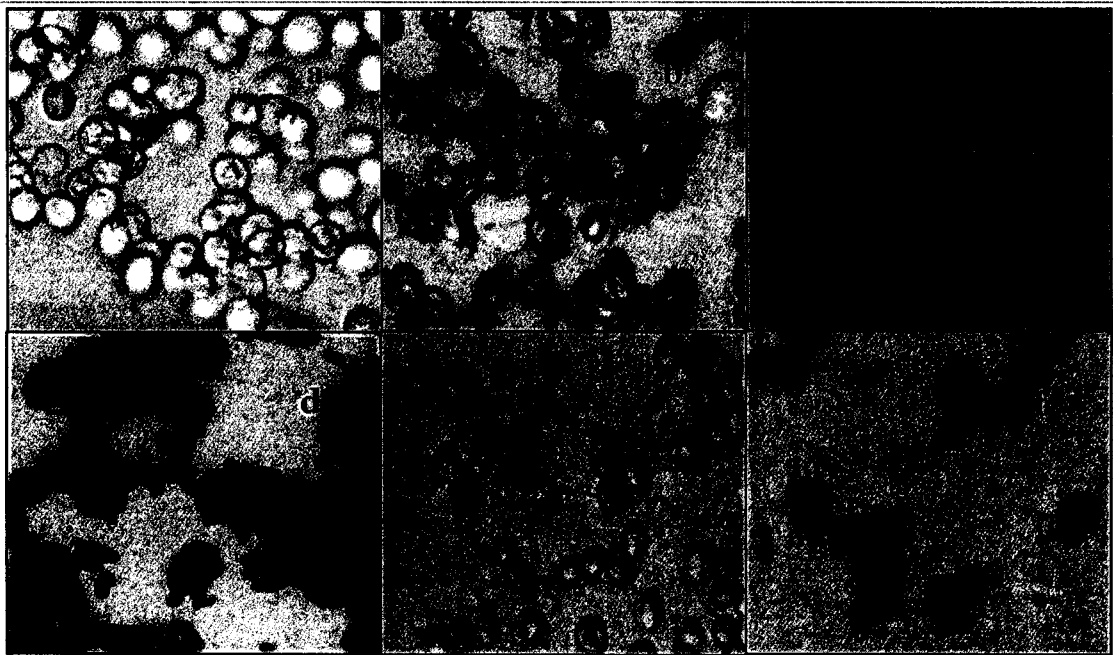
11. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad reakcijos pH yra 7.



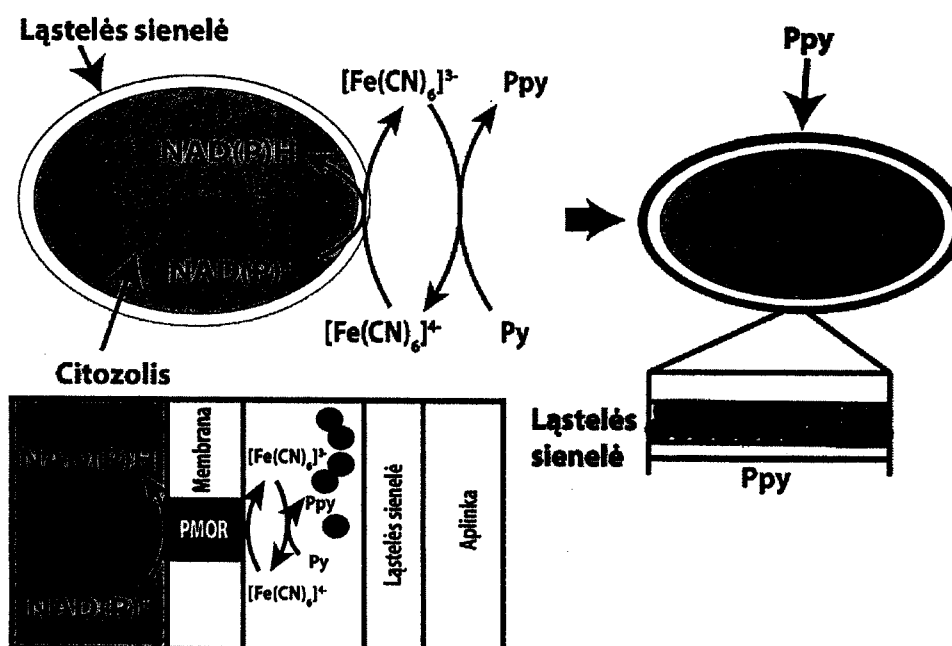
Pav. 1



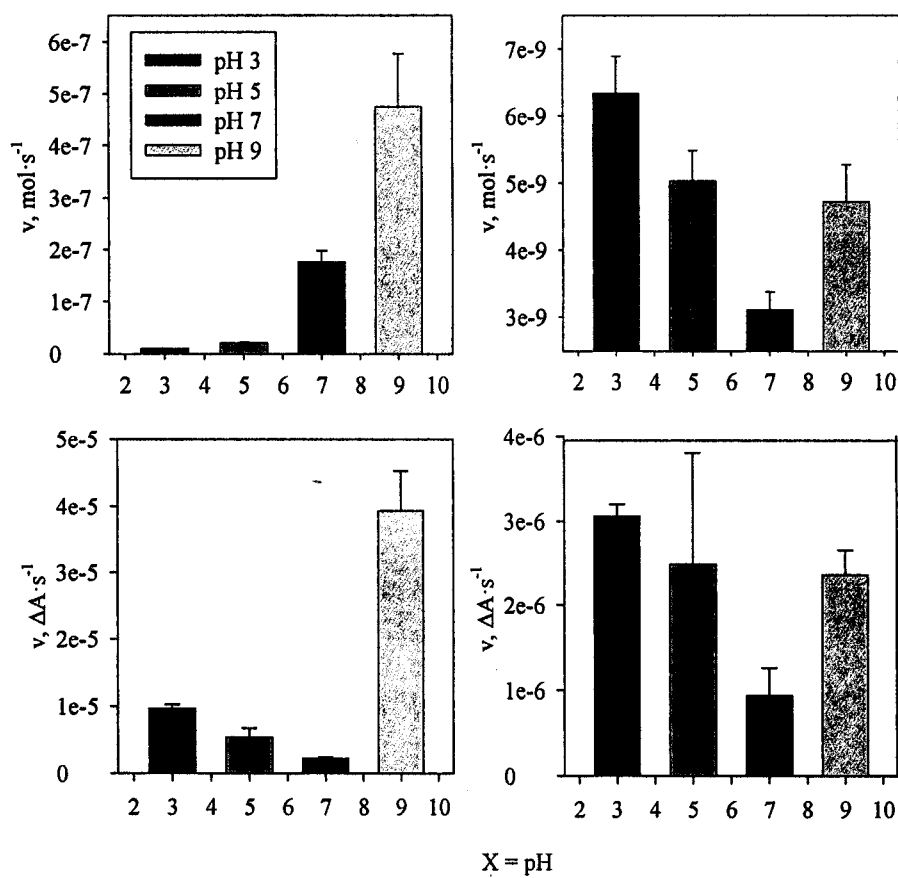
Pav. 2



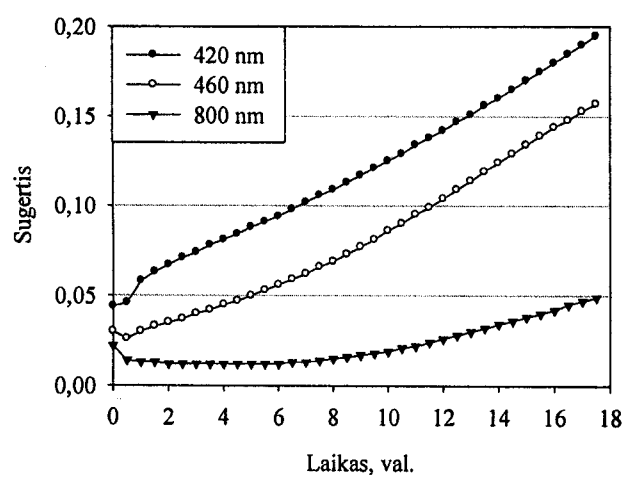
Pav. 3



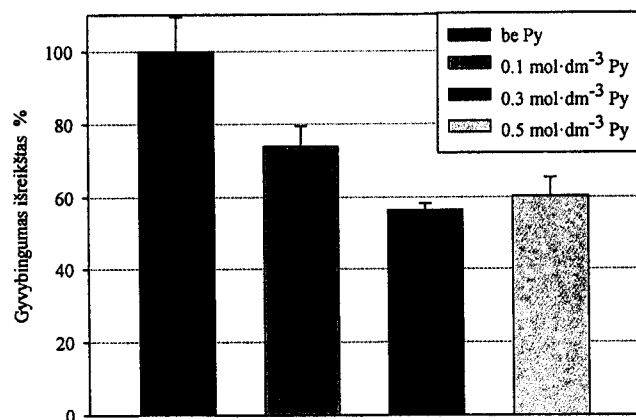
Pav. 4



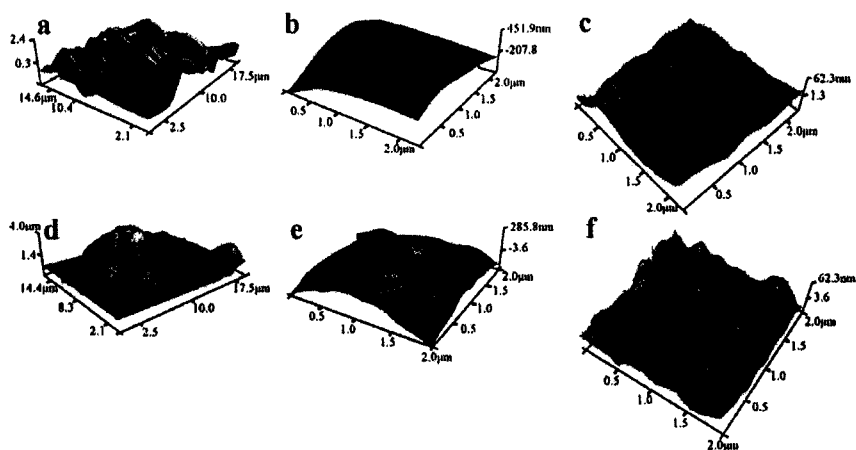
Pav. 5



Pav. 6



Pav. 7



Pav. 8