

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Diplomová práce

**KATALYTICKÉ A ADSORPČNÍ VLASTNOSTI  
PAPAINU A JEHO DERIVÁTŮ**

**CATALYTIC AND ADSORPTION PROPERTIES OF  
PAPAIN AND ITS DERIVATIVES**

Bc. Štěpánka Lachmanová

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Mgr. Magdaléna Hromadová Ph. D.

Praha 2012

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Prof. RNDr. Jiřího Hudečka CSc. a školitelky specialistky Mgr. Magdalény Hromadové, Ph. D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne:

.....

Štěpánka Lachmanová

## Poděkování

Děkuji Prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za vedení práce, Mgr. Magdaléně Hromadové, Ph. D. za odborné náměty, rady a připomínky a Dr. Michéle Salmain a dalším pracovníkům Laboratoire de chimie et biochimie des complexes moléculaires, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris ve Francii za syntézu organometalických komplexů, jejich charakterizaci a navázání na papain. Dále bych chtěla poděkovat kolegům z laboratoře Elektrodové kinetiky oddělení Molekulární elektrochemie Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského, AV ČR, v. v. i. za pomoc při měřeních, především Mgr. Viliamu Kolivoškovi, Ph. D. a Ing. Janě Bulíčkové, Ph. D. za spolupráci při měření metodou AFM. V neposlední řadě patří velký dík mé rodině a Mát'ovi za poskytnutí zázemí a psychické pomoci.

Tato práce vznikla za finanční podpory GAAV (IAA400400802).

# Obsah

Prohlášení.....	2
Poděkování.....	3
Seznam použitých zkratk .....	5
Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
1. Úvod.....	8
1.1. Papain.....	8
1.2. Organometalické komplexy .....	9
1.3. Syntetické metaloproteiny založené na papainu .....	10
1.4. Elektrochemie proteinů.....	11
1.4.1. Vylučování vodíku katalyzované proteiny .....	11
1.5. Adsorpce proteinů.....	13
2. Cíl práce.....	15
3. Materiál a metody .....	16
3.1. Chemikálie a komerční substráty.....	16
3.2. Modifikované substráty .....	17
3.3. Přístroje.....	19
3.4. Metody.....	20
3.4.1. Elektrochemická měření .....	20
3.4.1.1. Metody využívající stejnosměrný elektrický signál .....	20
3.4.1.2. Metody využívající střídavý elektrický signál.....	22
3.4.2. Mikroskopie atomárních sil .....	25
3.4.2.1. Příprava substrátů pro adsorpci proteinů .....	27
3.4.3. Křemenné krystalové mikrováčky .....	27
4. Výsledky .....	29
4.1. Elektrochemické vlastnosti organometalických komplexů .....	29
4.2. Elektrochemie čistého a modifikovaného papainu .....	36
4.3. Adsorpce papainu .....	46
4.3.1. Vlastnosti připravených samoorganizovaných monovrstev .....	46
4.3.2. Adsorpce papainu na různě hydrofobní povrchy .....	48
5. Diskuse.....	55
5.1. Elektrochemické vlastnosti organometalických komplexů, papainu a jeho derivátů .....	55
5.2. Adsorpce papainu .....	59
5.2.1. Adsorpce samoorganizovaných monovrstev .....	59
5.2.2. Adsorpce papainu na různě hydrofobní povrchy .....	60
6. Souhrn.....	63
7. Seznam použité literatury .....	64



## Seznam použitých zkratek

AC	střídavý proud (z <i>angl.</i> alternating current)
AFM	mikroskopie atomárních sil (z <i>angl.</i> atomic force microscopy)
DC	stejnoseměrný proud (z <i>angl.</i> direct current)
DMSO	dimethylsulfoxid
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda (z <i>angl.</i> hanging mercury drop electrode)
HOPG	vysoce orientovaný pyrolytický grafit (z <i>angl.</i> highly oriented pyrolytic graphite)
NS	z <i>angl.</i> nanoshaving
QCM	křemenné krystalové mikrováčky (z <i>angl.</i> quartz crystal microbalance)
SAM	samoorganizovaná monovrstva (z <i>angl.</i> self-assembled monolayer)
SMDE	statická rtuťová kapková elektroda (z <i>angl.</i> static mercury drop electrode)
SPL	nanolitografie rastrovací sondou ( <i>angl.</i> scanning probe lithography)
SPM	mikroskopie rastrovací sondou (z <i>angl.</i> scanning probe microscopy)
STM	rastrovací tunelové mikroskopie (z <i>angl.</i> scanning tunneling microscopy)
TBAPF <sub>6</sub>	tetrabutylamonium hexafluorofosfát

## Abstrakt

Aminokyselinová sekvence papainu (EC 3.4.22.2) obsahuje 212 aminokyselin. Jeho jediná volná sulfhydrylová skupina je lokalizována v aktivním centru proteinu. Vhodně zvolené organometalické komplexy se mohou vázat pouze na tuto volnou -SH skupinu. Takto připravené syntetické metaloproteiny mají jiné elektrochemické vlastnosti než samotný papain. V rámci této diplomové práce byly studovány elektrochemické vlastnosti papainu a jeho derivátů se zaměřením na katalytické vylučování vodíku. Za použití chronopotenciometrie byly porovnány katalytické vlastnosti papainu a jeho tří derivátů.

Práce byla doplněna zkoumáním elektrochemických vlastností organometalických komplexů ruthenia použitých pro modifikaci papainu, které doposud nebyly elektrochemicky studovány.

Proces katalytického vylučování vodíku probíhá v adsorbovaném stavu. Práce byla proto doplněna studií adsorpčních vlastností papainu na substrátech o různé hydrofobicitě.

## **Abstract**

The aminoacid sequence of papain (EC 3.4.22.2) consists of 212 aminoacids. It has only one free sulfhydryl group, which is located in the active site of the protein. Some organometallic complexes could be bonded only to this free -SH group due to their structure. The artificial metalloproteins synthesised by this way may have different electrochemical properties. In this work, we have studied the electrochemical properties of papain and its derivatives. We compared the ability of papain and its three artificial derivatives to catalyse the hydrogen evolution by the chronopotentiometry.

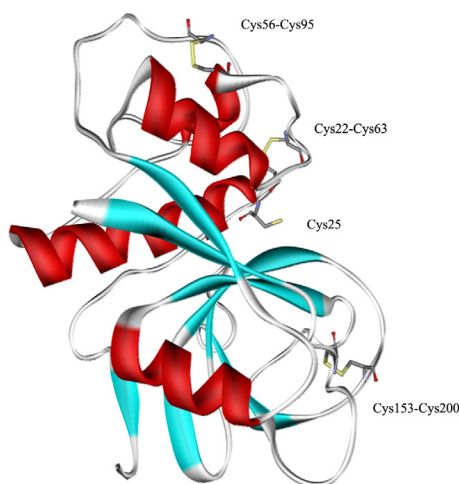
The work was completed by the study of the electrochemical properties of the organometallic complexes of ruthenium, which were used for the artificial metalloprotein preparation. The electrochemical properties of the compounds were never studied before.

The process of the hydrogen evolution catalysed by the proteins is held in the adsorbed state of the catalyst. Due to this fact we have also studied the adsorption properties of papain on the substrates with different level of hydrofobicity. (In Czech)

# 1. Úvod

## 1.1. Papain

Enzym papain (EC 3.4.22.2) patří do rodiny peptidas C1.<sup>1</sup> Strukturu papainu tvoří pouze jeden aminokyselinový řetězec složený z 212 aminokyselin.<sup>2</sup> Jak je patrné na obrázku Obr. 1, sekvence papainu obsahuje kromě volné sulfhydrylové skupiny cysteinu označovaného jako Cys25 ještě dalších šest -SH skupin, které tvoří 3 disulfidické můstky, a to propojením cysteinů Cys22-Cys63, Cys56-Cys95 a Cys153-Cys200.(ref.<sup>1</sup>) Molekula papainu má podle krystalografických měření<sup>3</sup> rozměry přibližně 6,6 nm × 5,1 nm × 3,2 nm.



**Obr. 1: Molekula papainu s označenými pozicemi cysteinu<sup>4</sup>**

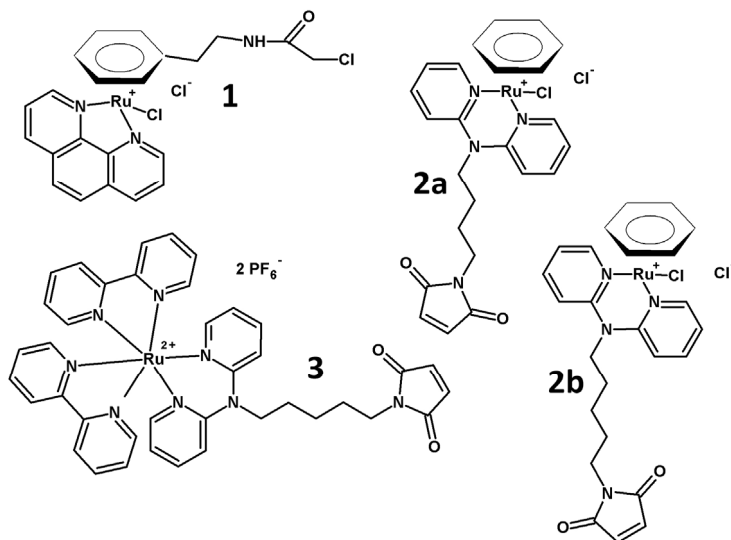
Teplotní optimum<sup>5</sup> pro katalytickou aktivitu papainu je v rozmezí 60 až 63 °C, hodnota pH optima<sup>6</sup> byla určena na  $6,50 \pm 0,10$ .

Papain vykazuje vysokou stabilitu i při přidavku některých organických rozpouštědel do jeho vodného roztoku. Proteasová aktivita papainu se téměř nemění do 60 % zastoupení ethanolu, 1,4-dioxanu nebo acetonitrilu ve vodě. Na druhou stranu již nízká koncentrace tetrahydrofuranu snižuje aktivitu papainu velmi výrazně.<sup>7</sup>

Papain se izoluje z nezralých plodů a z latexu rostliny *Carica papaya*.<sup>8</sup> Pro rostlinu plní obrannou funkci, inhibuje růst larev hmyzích škůdců (zejména hmyzu rodu *Samia ricini*, *Mamestra brassicae* a *Sporodoptera litura*).<sup>9</sup>

## 1.2. Organometalické komplexy

V této práci byly studovány organometalické komplexy ruthenia (Obr. 2), které byly syntetizovány v laboratoři M. Salmain ve Francii.<sup>10-12</sup>



Obr. 2: Organometalické komplexy ruthenia

Sloučenina **1** je okrový prášek, který je velice dobře rozpustný ve vodě, methanolu i v DMSO. Strukturální součástí sloučeniny **1** je kromě kationtu ruthenia i 1,10-fenanthrolin a chloroacetamidová skupina. Sloučenina **1** katalyzuje Dielsovu-Alderovu reakci<sup>13</sup> a redukci NAD(P)<sup>+</sup> na NAD(P)H.<sup>14</sup> Elektrochemické chování sloučeniny **1** ve vodném i nevodném prostředí bylo studováno v bakalářské práci.<sup>15</sup> Sloučenina **1** nevykázala žádné výrazné oxidační vlastnosti. DC (z *angl.* direct current, DC) polarografické křivky nevodného roztoku sloučeniny **1** ukázaly čtyři redukční vlny, které se zvyšovaly s rostoucí koncentrací sloučeniny **1**. Dvě z uvedených vln přísluší redukci 1,10-fenanthrolinu, který je strukturální součástí sloučeniny **1**. Odpovídající výsledky poskytly i cyklické voltamogramy. Elektrochemické chování sloučeniny **1** ve vodném prostředí signalizovalo probíhající katalytický děj vylučování vodíku a také poukázalo na adsorpci studované látky na povrchu pracovní elektrody.

Sloučeniny **2a** a **2b** se strukturálně liší pouze délkou uhlovodíkového řetězce propojujícího jednotlivé heterocyklické složky. Sloučeniny **2a** a **2b** byly syntetizovány za účelem přípravy katalyzátoru hydrogenačních reakcí ketonů a iminů.<sup>11</sup> Obě sloučeniny jsou pevné látky oranžové barvy, které jsou stabilní na vzduchu. Velice dobře se rozpouštějí v polárních rozpouštědlech (voda, methanol).<sup>11</sup>

Sloučenina **3** byla primárně připravena pro své potenciální fotofyzikální vlastnosti.<sup>12</sup> Struktura sloučeniny **3** obsahuje kromě iontu ruthenia i bipyridiny a maleimidovou skupinu, která může být použita pro vazbu na volnou -SH skupinu papainu. Zásadní nevýhodou práce se sloučeninou **3** je nerozpustnost tohoto černého prášku ve vodě.

### **1.3. Syntetické metaloproteiny založené na papainu**

Aminokyselinová sekvence papainu obsahuje pouze jednu volnou sulfhydrylovou skupinu,<sup>2</sup> a to přímo v aktivním centru. Tato volná -SH skupina lokalizovaná na Cys25 může být modifikována vazbou organometalického komplexu. Vhodně zvolené organometalické komplexy se pak mohou vázat na papain pouze v této pozici. Sloučenina **1** se na volnou sulfhydrylovou skupinu papainu váže přes chloroacetamidovou skupinu, sloučeniny **2a**, **2b** a **3** pak využívají maleimidovou skupinu. Struktura jednotlivých sloučenin studovaných v této diplomové práci neumožňuje komplexům vázat se na papain v jiné pozici, než právě přes -SH skupinu Cys25. Právě tato sulfhydrylová skupina je nutná pro enzymovou aktivitu papainu, po její modifikaci se endopeptidasová schopnost papainu ztrácí.

Úspěšnost vazby studovaných sloučenin na volnou -SH skupinu papainu byla sledována kolorimetricky v laboratoři Dr. M. Salmain.<sup>10-12</sup> V typickém uspořádání experimentu byl do roztoku papainu přidán studovaný organometalický komplex ve velkém nadbytku. Enzymová aktivita papainu byla poté sledována na reakci s L-pyroglutamyl-L-fenylalanyl-L-leucin-*p*-nitroanilidem. Tato látka slouží papainu jako substrát. V enzymatické reakci vzniká žlutý *p*-nitroanilin, který může být stanoven kolorimetricky. Za přítomnosti všech jednotlivých sloučenin uvedených v této diplomové práci došlo k prudkému poklesu enzymatické aktivity papainu. Tím bylo prokázáno, že došlo k modifikaci volné -SH skupiny přítomného papainu organometalickými komplexy.

Papain-**1** (papain s navázaným komplexem **1**) katalyzuje Dielsovu-Alderovu cykloadici stejně jako samotná sloučenina **1**. Bylo však prokázáno, že katalytické vlastnosti sloučeniny **1** se pro tuto reakci zvyšují navázáním na papain.<sup>13</sup> Enantiomerní efekt nebyl pozorován. Byla studována i katalytická aktivita papainu-**1** při redukci NAD<sup>+</sup>. Katalytická aktivita papainu-**1** byla slabá, ale měřitelná. Byl zde zaznamenán pokles aktivity sloučeniny **1** po navázání na papain oproti volné formě.<sup>14</sup> Papain-**2b** byl také

studován jako možný kandidát na katalyzátor redukce  $\text{NAD}^+$ . Výtěžky však byly ještě nižší než u papainu-1.<sup>14</sup> Systém papain-3 byl připraven pro své luminiscenční vlastnosti.<sup>12</sup> Jeho katalytické chování dosud nebylo studováno.

Studium elektrochemických vlastností systému papain-1 bylo již částečně zahájeno v bakalářské práci.<sup>15</sup> Průběh AC (z *angl.* alternating current, AC) voltamogramu roztoku papainu-1 ukázal na silnou adsorpci analytu na povrch elektrody a také výrazný signál vylučování vodíku katalyzovaného přítomným papainem. Oproti AC voltamogramu čistého papainu se zde ale projevil i katalytický signál způsobený přítomností kovalentně vázaného organometalického substituentu **1**.

## **1.4. Elektrochemie proteinů**

Z elektrochemického hlediska se proteiny dělí podle přítomnosti nebo nepřítomnosti redoxního centra, které může být tvořeno kovem nebo jinou neproteinovou složkou. Většina proteinů s redoxním centrem (ať již přírodního nebo syntetického původu), byla prostudována i za použití elektrochemických metod.<sup>16</sup> Rozdělení, význam a vlastnosti syntetických metaloproteinů byly již uvedeny v bakalářské práci.<sup>15</sup>

Na druhou stranu i proteiny bez redoxního centra mohou být studovány elektrochemickými metodami. Thyrosin a tryptofan mohou být oxidovány na uhlíkových elektrodách, disulfidické můstky mohou být naopak redukovány na elektrodách rtuťových,<sup>16</sup> cystein může na rtuťové elektrodě katalyzovat vylučování vodíku za přítomnosti iontů kobaltu nebo niklu.<sup>22</sup> Vylučování vodíku katalyzovaném proteiny se v poslední době věnuje zejména skupina E. Palečka v Brně.<sup>16</sup>

### **1.4.1. Vylučování vodíku katalyzované proteiny**

Ačkoliv by se dalo předpokládat, že hydrogenasy by měly patřit mezi nejvhodnější proteinové kandidáty pro produkci vodíku, bylo zjištěno, že za jistých podmínek je většina proteinů schopná katalyzovat vylučování vodíku stejně dobře.<sup>17</sup>

Elektrochemické vylučování vodíku katalyzované proteiny v mírně bazickém prostředí je vůbec první děj, který byl sledován při studiu vlastností proteinů za použití rtuťové kapkové elektrody.<sup>18</sup>

V roce 1930 J. Heyrovský a J. Babička<sup>19</sup> přisoudili vznik tzv. prenatriové vlny, která byla pozorována při polarografickém studiu elektrochemických vlastností lidských tělních tekutin,<sup>20</sup> přítomnosti albuminů. Také ukázali, že se prenatriová vlna zvyšuje s přidávkou amonných iontů do studovaného roztoku. Zároveň se ukázalo, že závislost výšky této vlny na koncentraci bílkovin spěje k limitě. Dospěli k názoru, že tato vlna je spojená se signálem vylučování vodíku katalyzovaným proteiny, kde amonné ionty působí jako protonové donory. Jedná se tedy o snížení přepětí vodíku vylučujícího se z amonného aniontu.<sup>19</sup> Rudolf Brdička později ukázal, že donorem protonů nemusí být pouze amonné ionty, ale mohou je zastoupit i kyselé složky pufrů o pH v rozmezí 7 až 12.<sup>21</sup> Při pH o hodnotě vyšší než 12 prenatriová vlna mizí a při pH pod hodnotou 7 ji nelze pozorovat, protože vylučování vodíku z pufru prenatriovou vlnu potenciálově předchází.<sup>21</sup> Brdička také pozoroval, že katalyticky aktivními složkami proteinů jsou jejich sulfhydrylové skupiny.<sup>22</sup> Na druhou stranu G. J. Millar ukázal, že katalyticky účinnými skupinami bílkovin v pufovaných roztocích jsou převážně jejich aminoskupiny.<sup>23</sup> Rozsáhlá práce skupiny M. Stackelberga přivedla výzkumníky k závěru, že jsou v pufovaných roztocích katalyticky aktivní pouze sloučeniny obsahující formu dusíku, která je schopna vázat proton na elektronový pár.<sup>24</sup>

Katalytické vylučování vodíku, tedy katalytické snižování přepětí vodíku na rtuťové elektrodě, je proces složený z několika kroků. Atomární vodík se z roztoku deponuje na povrch rtuťové elektrody a sdílí s ní svůj elektron. Reaktivní radikál vodíku je kontaktem s rtuťovou elektrodou stabilizován až do okamžiku, kdy se vlivem dalšího snižování potenciálu zachytí na povrchu elektrody tolik radikálů vodíku, že spolu začnou tvořit stabilnější molekuly H<sub>2</sub>. Ty nemohou s elektrodou sdílet elektrony, a proto se uvolňují z jejího povrchu.<sup>25</sup> Známa Brdičkova reakce popisuje speciální druh katalytického vylučování vodíku, kdy je atom síry v sulfhydrylové skupině proteinu komplexován kationty kobaltu nebo niklu, a tím je usnadněno uvolnění protonu v elektrodovém procesu.<sup>22</sup>

Proces vylučování vodíku katalyzovaný proteiny je silně ovlivněn adsorpcí katalyzátoru (proteinu) na povrch elektrody.<sup>17,18</sup> Pokles proudu po dosažení katalytického maxima je někdy přisuzován desorpci proteinu z povrchu elektrody při negativnějších potenciálech.<sup>18</sup>



## 1.5. Adsorpce proteinů

Význam studia adsorpce proteinů na syntetické povrchy vzrostl například s rozšířením používání implantátů z umělých materiálů. Vhodná modifikace povrchu může umožnit adsorpci biogenních proteinů na povrch implantátu a tím i zvýšit jeho biokompatibilitu.<sup>26</sup>

Adsorpce proteinů je komplexní proces, ve kterém hrají roli van der Waalsovy síly, hydrofobní a elektrostatické interakce i tvorba vodíkových můstků. Chemické a fyzikální vlastnosti povrchu substrátu ovlivňují množství adsorbovaného proteinu, hustotu adsorpční vrstvy i konformaci a orientaci adsorbovaných molekul.<sup>26</sup>

Jako modelový substrát se často využívá povrch monokrystalického zlata(111) pokrytý samoorganizovanou alkanthiolovou monovrstvou.<sup>26-33</sup> Výběrem použitého alkanthiolu podle jeho koncové funkční skupiny lze připravit substráty s různým stupněm hydrofobicity. Jako další modelový příklad hydrofobního substrátu se používá vysoce orientovaný pyrolytický grafit (*angl.* highly oriented pyrolytic graphite, HOPG).<sup>34-39</sup>

Lidský sérový albumin (*angl.* human serum albumin, HSA) se adsorbuje ve větším množství na zlatý substrát pokrytý vrstvou alkanthiolu s methylovou koncovou funkční skupinou (-CH<sub>3</sub>) než na zlatý povrch modifikovaný alkanthiolem zakončeným karboxylovou skupinou (-COOH).<sup>27</sup> Navíc bylo skupinou Ch. C. Duponta-Gillaina ukázáno, že na povrchu pokrytém -COOH nedochází k reorientaci již adsorbovaných molekul, zatímco na substrátu pokrytém -CH<sub>3</sub> adsorbované molekuly HSA mění konformaci a orientaci.<sup>27</sup>

Rozdílné adsorpční vlastnosti hovězího sérového albuminu (*angl.* bovine serum albumin, BSA) a fibrinogenu byly studovány metodou QCM skupinou P. Roacha.<sup>26</sup> BSA se v této studii adsorbovalo ve větším množství na povrch pokrytý alkanthiolem zakončeným -CH<sub>3</sub> skupinou než na povrch modifikovaný alkanthiolem zakončeným skupinou -CH<sub>2</sub>OH. Na druhou stranu, fibrinogen se adsorboval na oba povrchy se stejnou rychlostí a ve stejném množství.<sup>26</sup>

Adsorpce hovězího sérového albuminu na různě modifikované povrchy byla studována i japonskou skupinou J. Anzaie.<sup>28</sup> Podle jejich výsledků se BSA adsorboval v největším množství na substrát modifikovaný alkanthiolem zakončeným -CH<sub>3</sub> skupinou. Výrazně nižší množství BSA bylo adsorbováno při modifikaci povrchu alkanthiolem s koncovou funkční skupinou -NH<sub>2</sub>. Ještě méně BSA se adsorbovalo na povrch

modifikovaný alkanthiolem zakončeným  $-CH_2OH$  skupinou. Nejmenší množství BSA se adsorbovalo na substrát modifikovaný alkanthiolem s koncovou  $-COOH$  skupinou.<sup>28</sup>

## 2. Cíl práce

Cílem diplomové práce je studium přenosu elektronu a s ním spojených katalytických proudů vylučování vodíku v molekulách papainu modifikovaných kovalentně vázanými organometalickými fragmenty typu  $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\text{N},\text{N})\text{Cl}]^{n+}$  ( $n = 1$ ) a  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{NRpy}_2)]^{n+}$  ( $n = 2$ ) v aktivním centru papainu, jehož součástí je -SH skupina cysteinu Cys25. Součástí práce je také studium adsorpčních vlastností papainu na vodivých substrátech, které mají vliv na katalytické vylučování vodíku.

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Chemikálie a komerční substráty

**Papain:** Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; z latexu *Carica papaya*, specifická aktivita 23 jednotek na mg, dvakrát rekrystalizovaný,  $M_r = 23406$

**Sloučenina 1:** syntéza proběhla v laboratoři Dr. M. Salmain (Laboratoire de chimie et biochimie des complexes moléculaires, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Francie),  $M_r = 549,84$

**Sloučenina 2a:** syntéza proběhla v laboratoři Dr. M. Salmain (Laboratoire de chimie et biochimie des complexes moléculaires, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Francie),  $M_r = 572,45$

**Sloučenina 3:** syntéza proběhla v laboratoři Dr. M. Salmain (Laboratoire de chimie et biochimie des complexes moléculaires, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Francie),  $M_r = 1039,75$

**Papain-1:** navázání sloučeniny **1** na papain proběhlo v laboratoři Dr. M. Salmain (Laboratoire de chimie et biochimie des complexes moléculaires, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Francie),  $M_r = 23919$

**Papain-2b:** navázání derivátu sloučeniny **2b** na papain proběhlo v laboratoři Dr. M. Salmain (Laboratoire de chimie et biochimie des complexes moléculaires, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Francie),  $M_r = 23992$

**Papain-3:** navázání sloučeniny **3** na papain proběhlo v laboratoři Dr. M. Salmain (Laboratoire de chimie et biochimie des complexes moléculaires, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Francie),  $M_r = 24446$

**Dodekan-1-thiol:** Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; čistota 98 %,  $M_r = 202,4$

**Oktadekan-1-thiol:** Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; čistota 98 %,  $M_r = 286,57$

**11-sulfanylundekanová kyselina:** Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; čistota 95 %,  $M_r = 204,38$

**11-sulfanylundekan-1-ol:** Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; čistota 97 %,  $M_r = 202,4$

**TBAPF<sub>6</sub>** (tetrabutylamonium hexafluorofosfát): Fluka, čistota minimálně 99 %, před použitím dosušen při teplotě 60-80 °C  $M_r = 387,43$

**KCl** (chlorid draselný): Lachema Brno, čistota minimálně 99 %,  $M_r = 74,55$

**DMSO** (dimethylsulfoxid): Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; čistota p.a., uchováván pod inertní atmosférou

**Ethanol**: Lach-Ner, Neratovice, čistota p.a.

**Ethanol (abs.)**: AppliChem GmbH, Darmstadt, Německo, čistota: molecular biology grade (užíván pro adsorpci SAM na zlaté substráty)

**Deionovaná voda**: připravena deionací v Mili-Q (Milipore, USA), výstupní odpor vody při 25 °C je  $18,2 \times 10^6 \Omega \cdot \text{cm}$

**HOPG**: SPI Supplies, West Chester, USA, 10 mm × 10 mm × 2 mm

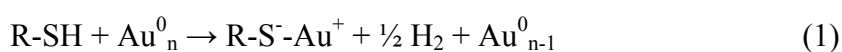
**Au na skle**: Arrandee, Werther, Německo, Au vrstva ( $250 \pm 50$  nm) na vrstvě Cr ( $2,5 \pm 0,5$  nm) na skle ( $0,7 \pm 0,1$  mm); plocha  $11 \times 11 \text{ mm}^2$

**QCM krystaly**: Stanford Research Systems, USA; 5 MHz, Au na vrstvě Cr, AT-cut, průměr 2,54 cm, leštěné

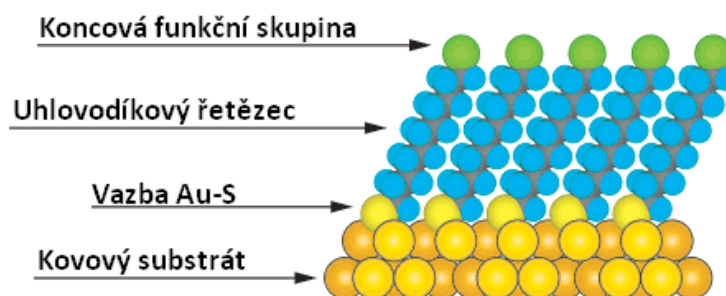
### 3.2. Modifikované substráty

Samoorganizované monovrstvy (*angl.* self-assembled monolayer, SAM) se používají pro vhodnou modifikaci povrchu před samotnou adsorpcí studovaných struktur. SAM vznikají adsorpcí molekul z kapalně nebo plynně fáze na povrch pevných nebo kapalných (například rtuťových) elektrod. Pro tvorbu SAM se používají takové molekuly, které mají funkční skupinu vyznačující se specifickou afinitou k povrchu elektrody. Někdy je tato afinita natolik silná, že molekuly samoorganizované monovrstvy vytěsní nečistoty přítomné na povrchu elektrody. Bylo popsáno mnoho funkčních skupin s dostatečně silnou afinitou k povrchům různých materiálů, nejčastěji se ale používají monovrstvy alkanthiolových molekul, které se silně váží zejména na povrchy zlata, stříbra, mědi, palladia, platiny nebo rtuti. Alkanthioly navíc poskytují možnost přípravy vysoce organizovaných monovrstev zakončených variabilními funkčními skupinami.<sup>40</sup> Volbou použitého alkanthiolu tak mohou vznikat například monovrstvy o různé hydrofobicitě.<sup>41</sup>

Adsorpce alkanthiolu na povrch zlata probíhá podle rovnice (1):<sup>42</sup>



Vazba mezi atomy zlata a síry je velice silná a stabilní. Její energie<sup>43</sup> je přibližně  $40 \times 10^3 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . V SAM svírá uhlovodíkový řetězec alkanthiolu vůči povrchu substrátu úhel přibližně  $30^\circ$  (Obr. 3).<sup>40,44,45</sup>



Obr. 3: Schéma samoorganizované monovrstvy alkanthiolu na povrchu kovu<sup>40</sup>

Výhodou používání SAM je poměrná snadnost jejich přípravy. Úspěšnost tvorby SAM může ovlivnit hned několik faktorů. Patří mezi ně volba rozpouštědla, teploty, koncentrace roztoku adsorbentu, doba kontaktu roztoku adsorbentu a substrátu, čistota povrchu substrátu i roztoku adsorbentu, koncentrace kyslíku v roztoku adsorbentu i délka řetězce a struktura adsorbujících molekul.<sup>40,41</sup>

Doba tvorby SAM a koncentrace roztoku adsorbentu ovlivňuje nejen hustotu pokrytí povrchu substrátu, ale také může způsobit vznik většího množství defektů z důvodu silnějšího působení případných nečistot v roztoku adsorbentu. Experimentálně zjištěné podmínky ukazují reprodukovatelnou tvorbu SAM při vystavení povrchu substrátu roztoku adsorbentu o koncentraci přibližně  $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  po dobu 12 - 18 hodin. Adsorpce molekul na povrch elektrody probíhá během prvních desítek sekund až minut po ponoření substrátu do roztoku,<sup>44</sup> ale reorganizace molekul potřebná pro vytvoření dostatečně reprodukovatelné monovrstvy trvá dalších několik hodin.<sup>40</sup> Tvorba reprodukovatelné monovrstvy může trvat až deset dní.<sup>40,41</sup>

Ačkoliv jsou pro přípravu SAM vhodná i jiná rozpouštědla než ethanol (např. tetrahydrofuran, toluen, hexan), právě ethanol se používá nejčastěji. Rozpouští se v něm mnoho často používaných alkanthiolů, je dostupný ve vysoké čistotě za poměrně nízkou cenu, navíc se vyznačuje nízkou toxicitou.<sup>40</sup>

Tvorba SAM při zvýšené teplotě může urychlit vznik monovrstvy a navíc snížit počet defektů této vrstvy. Vliv teploty je nejsilnější během prvních pár minut tvorby vrstvy.<sup>45</sup>

Vliv koncentrace rozpuštěného kyslíku v roztoku adsorbentu není příliš popsán, ale empiricky bylo zjištěno, že odstranění kyslíku z roztoku inertním plynem zvyšuje reprodukovatelnost tvorby monovrstvy.<sup>40</sup>

Samoorganizované monovrstvy byly za účelem využití pro tuto diplomovou práci připraveny následujícím způsobem. Zlaté monokrystalické substráty pro studium metodou AFM a QCM krystaly pokryté zlatou vrstvou byly modifikovány alkanthioly s methylovou, karboxylovou nebo hydroxylovou koncovou funkční skupinou. Vybrané alkanthioly byly rozpuštěny v ethanolu (abs.) o teplotě 60 °C, který byl zbaven rozpuštěného kyslíku proudem argonu. Deponace adsorbentů na povrch substrátů probíhala přes noc při teplotě 60 °C v inertní atmosféře. Po vyjmutí z roztoků byly substráty omyty ethanolem. Fyzisorbované molekuly byly odstraněny ponořením omytých substrátů do ethanolu o teplotě 60 °C, který byl argonovým proudem zbaven rozpuštěného kyslíku. Po 6 hodinách při teplotě 60 °C v inertní atmosféře byly substráty vyjmuty, omyty ethanolem a deionisovanou vodou a osušeny proudem argonu.

Příprava SAM na povrchu křemenných krystalů probíhala v ještě jedné variantě. Čistý QCM krystal byl v tomto případě rozvíbrován v ethanolu o teplotě 25 °C. Po ustálení frekvence vibrací byl za stálého míchání ke krystalu přidán ethanolický roztok alkanthiolu.

### **3.3. Přístroje**

Elektrochemická měření byla ve většině případů prováděna na potenciostatu s rychlou odezvou, který byl zkonstruován v Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AVČR, v. v. i. v Praze. Spojení potenciostatu s počítačem zajišťovalo IEEE-rozhraní (PC-Lab, AdvanTech, Model PCL-848). Digitalizace měřených výstupů byla provedena za využití PCL-818 karty o 12 bitové přesnosti (AdvanTech Co., USA). AC voltametrie byla měřena pomocí výše uvedeného potenciostatu domácí výroby v kombinaci s dvoufázovým lock-in zesilovačem SR830 (Stanford Research Systems, USA). Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS) a chronopotenciometrie byly měřeny na potenciostatu Autolab PGSTAT30 (Ecochemie, Nizozemí). Pracovní statická rtuťová kapková elektroda (*angl.* static mercury drop electrode, SMDE) vyrobená firmou Laboratorní přístroje Praha, byla použita i jako visící rtuťová kapková elektroda (*angl.* hanging mercury drop electrode,

HMDE). Velikost kapky byla dána nastavením otevření ventilu na dobu 80 ms, plocha použité rtuťové kapkové elektrody byla 0,0097 cm<sup>2</sup>.

AFM měření byla prováděna na přístroji Agilent Technologies 5500 SPM za použití nosníků typu II MACLevers<sup>TM</sup> (Agilent Technologies, USA) s rezonanční frekvencí 45-115 kHz a tuhostí 0,5-9,5 N·m<sup>-1</sup>.

QCM měření byla prováděna na systému od Stanford Research Systems, USA složeném z digitální řídicí jednotky QCM200, 5MHz oscilátoru QCM25, držáku krystalů a leštěných křemenných krystalů částečně pokrytých zlatem.

### **3.4. Metody**

#### **3.4.1. Elektrochemická měření**

Elektrochemická měření byla prováděna v elektrochemických celách v tříelektrodovém zapojení. Jako pracovní elektrody sloužily SMDE a HMDE. Pro měření v objemu nad  $5 \times 10^{-3}$  dm<sup>3</sup> byla jako pomocná elektroda používána platinová síťka. Argentochloridová referenční elektroda Ag | AgCl (chlorid stříbrný) | 1M LiCl (chlorid lithný) byla oddělena od měřeného roztoku solným můstkem. Při měření v objemu  $1 \times 10^{-3}$  dm<sup>3</sup> až  $2 \times 10^{-3}$  dm<sup>3</sup> ml byl jako pomocná elektroda používán platinový drátek a jako referenční elektroda stříbrný drátek pokrytý vrstvou AgCl.

Rtuťová kapková elektroda byla čištěna roztokem kyseliny dusičné (v poměru s vodou 1:1). Pomocné elektrody a elektrochemické cely byly čištěny směsí koncentrované kyseliny sírové a 30 % peroxidu vodíku v poměru 3:1 (tzv. Piranha roztok).

Před každým elektrochemickým měřením byl z měřeného roztoku odstraněn rozpuštěný kyslík proudem argonu. Samotná měření probíhala pod argonovou atmosférou.

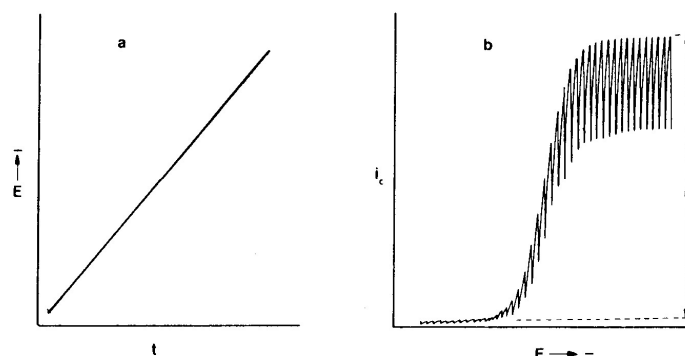
Získaná digitální data byla zpracována v programu Origin 8 (OriginLab Corporation, USA).

##### **3.4.1.1. Metody využívající stejnosměrný elektrický signál**

Principy DC polarografie a cyklické voltametrie byly podrobněji vysvětleny již v teoretické části bakalářské práce.<sup>15</sup>

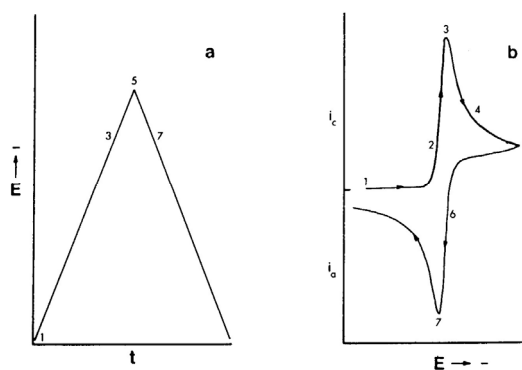


Při DC polarografickém i voltametrickém měření je na elektrodu aplikováno stejnosměrné napětí, které se lineárně mění s časem, a sleduje se proud, který elektrodou prochází (Obr. 4).<sup>46</sup>



**Obr. 4: DC polarografie:**<sup>46</sup> a: Lineární závislost vkládaného napětí na čase; b: Průběh DC polarografické křivky

Na rozdíl od DC polarografie, která využívá pro měření rtuťovou kapající elektrodu (*angl.* dropping mercury electrode, DME), cyklická voltametrie využívá stacionární elektrody, tedy pevné elektrody nebo visící rtuťovou kapkovou elektrodu HMDE. V cyklické voltametii je na pracovní elektrodu vkládán potenciál trojúhelníkového průběhu (Obr. 5).<sup>46</sup>



**Obr. 5: Cyklická voltametrie:**<sup>46</sup> a: Časová závislost vkládaného potenciálu; b: Tvar cyklického voltamogramu

Chronopotenciometrie je elektrochemická metoda, kdy je na elektrodu vkládán malý konstantní stejnosměrný proud. Výstupem měření je pak potenciál jako funkce času.

V současné době se chronopotenciometrie využívá pro studium látek schopných katalyzovat vylučování vodíku na rtuťových elektrodách i bez přítomnosti -SH nebo -S-S- skupin.<sup>47</sup> Tyto látky poskytují výrazný signál, který bývá v literatuře popisován jako „vlna H“ už při nanomolárních nebo dokonce subnanomolárních koncentracích.<sup>16,47</sup>

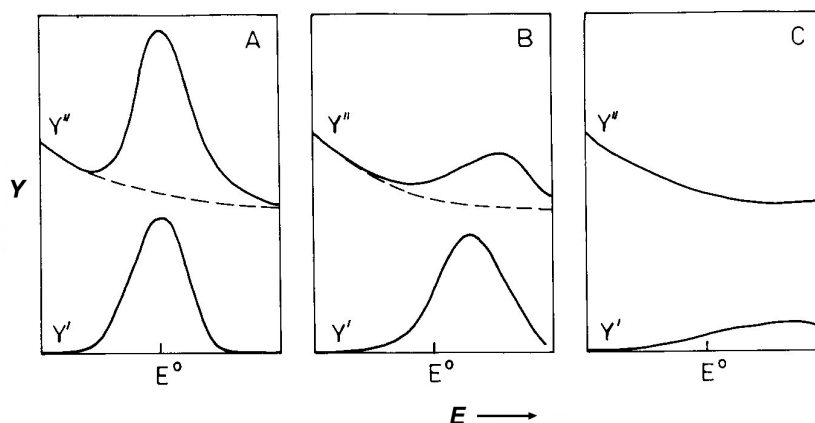
Velikost a pozice vlny H závisí na hodnotách elektrodového akumulčního potenciálu,<sup>48-50</sup> délky akumulce,<sup>51</sup> počátečního potenciálu křivky a změnách složení základního roztoku.<sup>51,52</sup> Všechny tyto aspekty mohou ovlivnit strukturu a konformaci katalyzátoru při katalytickém ději.<sup>47</sup> Výraznou roli zde hraje i zvolená hodnota polarizujícího proudu.<sup>49,50</sup> Optimální podmínky se pro jednotlivé katalyzátory liší.<sup>47</sup>

Vlna H byla pozorována již u více než 25 proteinů, mezi které patří kromě sérových albuminů i cytochrom c, myoglobin, insulin, lysozym nebo avidin.<sup>16</sup>

### **3.4.1.2. Metody využívající střídavý elektrický signál**

AC metody využívají ke studiu elektrochemických dějů střídavé napětí. Sledovanou veličinou je střídavý proud. Podle použitého zapojení rtuťové elektrody se rozlišuje AC polarografie (kapající rtuťová elektroda) a AC voltametrie (visící kapková elektroda), kromě nich byla v této práci použita i metoda elektrochemické impedanční spektroskopie EIS.

Při měření AC metodami je elektroda polarizována v čase lineárně rostoucím napětím, které je modulováno střídavou složkou se sinusovým průběhem, konstantní malou amplitudou a frekvencí v rozsahu do několika tisíc Hertzů.<sup>53</sup> Měří se závislost střídavého proudu procházejícího elektrodou v závislosti na jejím potenciálu. Výstupním signálem AC voltametrie a AC polarografie je reálná a imaginární složka admitance. AC metody se uplatňují zejména při měření rychlostních konstant elektrodových reakcí a při detekci adsorpce reaktantů nebo produktů elektrodové reakce na povrch elektrody.<sup>53</sup> Na obrázku Obr. 6 na straně 23 jsou uvedeny průběhy AC voltametrických křivek pro modelové děje o různém stupni reverzibility.<sup>54</sup>



**Obr. 6: Modelové průběhy signálu v AC voltametii při dějích o různé reverzibilitě:**<sup>54</sup> obrázek **A** ukazuje tvar křivek pro reverzibilní děj, **B** pro kvazi-reverzibilní děj a **C** pro ireverzibilní děj; přerušovanou čarou jsou znázorněny křivky pro základní elektrolyt

Pro stejnosměrný proud platí Ohmův zákon:

$$I = \frac{E}{R} \quad (2)$$

kde  $I$  je proud,  $E$  napětí a  $R$  odpor. Při použití střídavého proudu platí analogický vztah:<sup>54</sup>

$$I(\omega) = \frac{E(\omega)}{Z(\omega)} \quad (3)$$

ve kterém  $\omega$  značí frekvenci střídavých složek a  $Z$  je impedance. Admittance  $Y$  je převrácenou hodnotou impedance a proto platí i rovnice:<sup>54</sup>

$$I(\omega) = E(\omega) \cdot Y(\omega) \quad (4)$$

Jestliže jsou impedance a admittance vektory, pak platí:<sup>55</sup>

$$Z = Z' + jZ'' \quad (5)$$

a analogicky platí:<sup>55</sup>

$$Y = Y' + jY'' \quad (6)$$

V rovnicích (5) a (6) jsou jednou čarou označeny reálné složky impedance a admittance a dvěma čarami jejich imaginární složky,  $j$  je imaginární jednotka. Pro převody mezi impedancí a admittancí pak platí následující vztahy:<sup>55</sup>

$$Z' = \frac{Y'}{(Y')^2 + (Y'')^2} \quad (7)$$

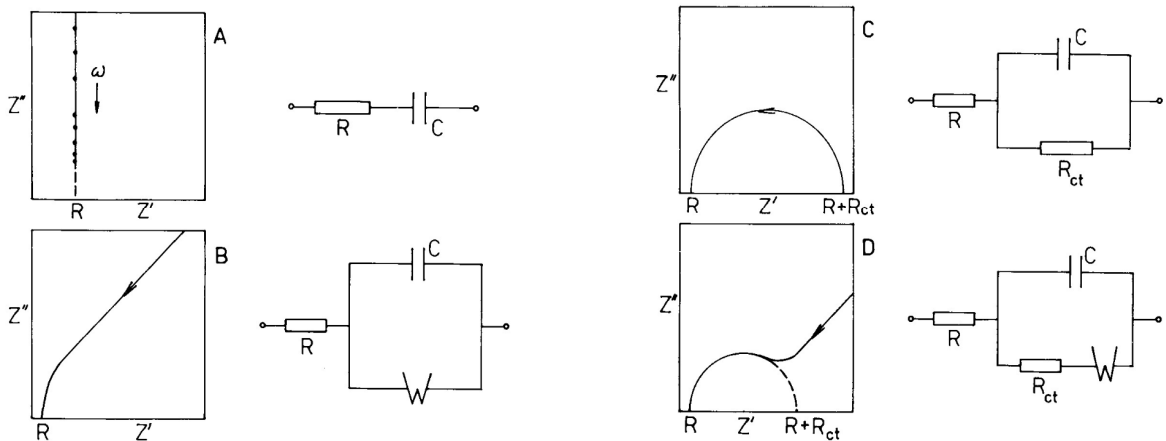
$$Z'' = \frac{Y''}{(Y')^2 + (Y'')^2} \quad (8)$$

$$Y' = \frac{Z'}{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad (9)$$

$$Y'' = \frac{Z''}{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad (10)$$

Potenciál aplikovaný na elektrodu ponořenou do měřeného roztoku způsobuje v roztoku v těsné blízkosti elektrody vznik elektrodové dvojvrstvy. Tato dvojvrstva se chová jako kondensátor.<sup>54</sup> Vlastnosti fázového rozhraní elektroda-roztok jsou ovlivněny potenciálem vkládaným na elektrodu, materiálem, ze kterého je elektroda vyrobena, druhem a koncentrací elektrolytu v roztoku, zvoleným rozpouštědlem i teplotou.<sup>55</sup> Pro názornost se někdy impedance elektrody znázorňuje pomocí náhradního elektrického obvodu, kde se používá stejné značení jako v klasických elektrotechnických schématech. Pro elektrodu ponořenou do roztoku elektrolytu platí sériová kombinace odporu elektrolytu a kapacity elektrodové dvojvrstvy. Pro jednoduchý elektrodový děj je pak faradaická impedance složena ze dvou sériových impedancí, tedy z přenosového odporu (*angl.* charge-transfer resistance,  $R_{ct}$ ) a difuzní složky impedance, která se nazývá Warburgova impedance a bývá označována písmenem  $W$ .<sup>54,55</sup>

Na obrázku Obr. 7 jsou znázorněny tvary impedančních křivek pro modelové příklady jednoduchých elektrodových dějů a jim odpovídající elektrotechnické obvody.<sup>54</sup>



**Obr. 7: Tvar impedančních křivek a odpovídající náhradní elektrické obvody pro modelové příklady elektrodových procesů:**<sup>54</sup> Vlevo nahoře (A) ideálně polarizovaná elektroda, vlevo dole (B) rychlá redoxní reakce řízená difúzí, vpravo nahoře (C) ireverzibilní elektrodová reakce, vpravo dole (D) kvazi-reverzibilní elektrodová reakce; šipky v grafech ukazují směr rostoucí hodnoty frekvence

Pomocí simulačních programů je možné z naměřených impedančních křivek získat hodnoty rychlostních konstant přenosu elektronu za použití vztahu:<sup>56</sup>

$$k_f(E) = \frac{RT}{n^2 F^2 R_{ct}(E) A c} \quad (11)$$

kde  $k_f(E)$  značí rychlostní konstantu přenosu elektronu,  $R$  je univerzální plynová konstanta,  $T$  je teplota v Kelvinech,  $n$  počet přenesených elektronů,  $F$  značí Faradayovu konstantu,  $R_{ct}(E)$  přenosový odpor,  $A$  plochu elektrody a  $c$  koncentraci reaktantu.

EIS data byla vyhodnocována v programu FRA 4.9.005 (Ecochemie, Holandsko).

### 3.4.2. Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil (z *angl.* atomic force microscopy, AFM) patří do skupiny mikroskopie rastrovací sondou (z *angl.* scanning probe microscopy, SPM). Metodu AFM si nechal v roce 1988 patentovat Gerd K. Binnig,<sup>57</sup> jeden z nositelů Nobelovy ceny za fyziku z roku 1986 udělené za metody rastrovací tunelové mikroskopie (z *angl.* scanning tunneling microscopy, STM). AFM se využívá pro zobrazování povrchů vodivých i nevodivých vzorků na vzduchu, v kapalině i ve vakuu.<sup>58</sup>

Ve většině případů je snahou při používání metod SPM omezit interakce mezi rastrující sondou a povrchem substrátu, aby nedošlo ke změně struktury studovaného vzorku. Na druhé straně se ale používají i nanolitografické metody (*angl.* scanning probe lithography, SPL), kdy je na vzorku materiál cíleně přesouván sondou a tím se na povrchu substrátu tvoří jiné nanostruktury.<sup>39,59,60</sup> Mezi tyto metody patří například tzv. nanoshaving (AFM NS).<sup>27,39,61</sup>

Metoda AFM NS byla v této práci využita pro získání informace o výšce vrstvy na povrchu jednotlivých substrátů. Pro aplikaci postupu AFM NS je nutné nejprve na substrátu zobrazit vhodnou rovnou plochu v magneticky řízeném přerušovaně kontaktním režimu. Následně je část vrstvy na povrchu substrátu odstraněna použitím kontaktního AFM režimu se zadanou přítlačnou silou. Na závěr je celá původní plocha opět zobrazena v magneticky řízeném přerušovaně kontaktním režimu. Dodržením tohoto postupu je možné získat a porovnat stejnou oblast povrchu substrátu před aplikací a po aplikaci AFM NS.

Aplikovaná přítlačná síla použitá pro odstranění části povrchového filmu rastrující sondou byla vypočítána z rovnice:

$$F = k \cdot \Delta Z \quad (12)$$

kde  $F$  je přítlačná síla,  $k$  je tuhost pružiny a  $\Delta Z$  změna vzdálenosti sondy od povrchu vzorku. Hodnota tuhosti pružiny  $k$  se vypočítá ze vztahu:

$$k = k_N \frac{f_0^3}{f_N^3} \quad (13)$$

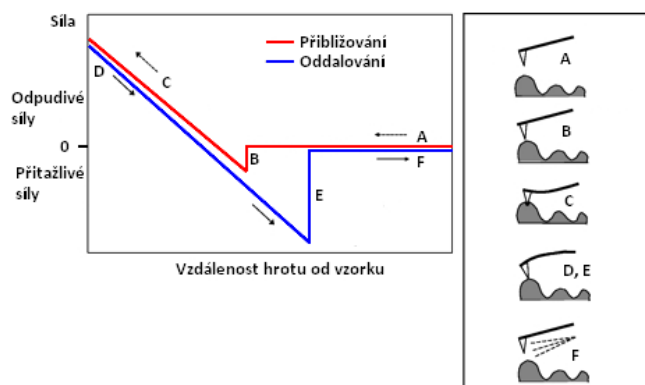
kde  $k_N$  a  $f_N$  jsou nominální hodnoty tuhosti pružiny a rezonanční frekvence nosníku zadaná výrobcem a  $f_0$  je rezonanční frekvence použitého nosníku. Hodnota změny vzdálenosti sondy od povrchu vzorku  $\Delta Z$  se získá ze vztahu:

$$\Delta Z = \frac{\Delta D}{S} \quad (14)$$

ve kterém  $\Delta D$  značí změnu prohnutí nosníku a  $S$  je směrnice závislosti změny prohnutí nosníku na změně vzdálenosti sondy od povrchu vzorku. Směrnice  $S$  se vypočítá ze vztahu:

$$S = \frac{dD}{dZ} \approx \frac{(D_2 - D_1)}{(Z_2 - Z_1)} \quad (15)$$

hodnoty  $D_i$  a  $Z_i$ , tedy konkrétní hodnoty prohnutí nosníku  $D$  a vzdálenosti sondy od povrchu vzorku  $Z$ , se odečtou z křivky obvykle anglicky zvané *force-distance curve* (obrázek Obr. 8). V této křivce může být síla na ose y vyjádřena i prohnutím nosníku nebo napětím vzniklém na fotodetektoru.

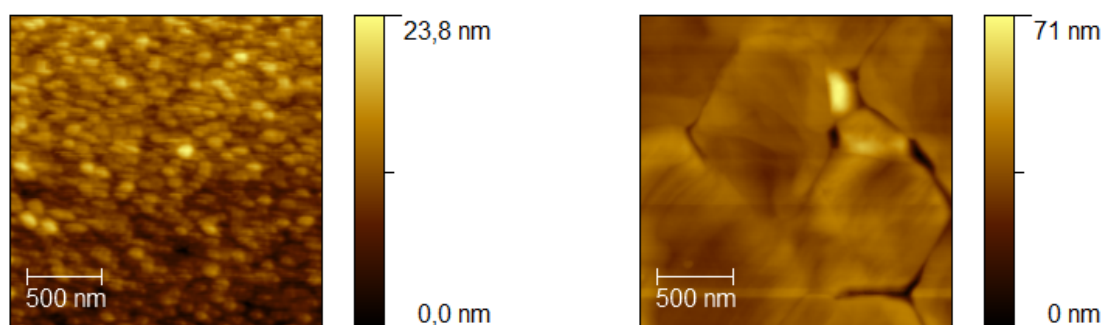


**Obr. 8: Závislost síly mezi AFM sondou a vzorkem na jejich vzájemné vzdálenosti.**<sup>62</sup> **Červená křivka:** při přiblížování nosníku k povrchu vzorku (A) je hodnota síly působící mezi hrotem a vzorkem nulová; při přitažení hrotu vlivem přitažlivých sil k povrchu vzorku (B) se nosník mírně prohne a to se projeví prudkým poklesem síly; při dalším přitlačování hrotu k povrchu vzorku přiblížováním nosníku (C) se nosník prohýbá. **Modrá křivka:** při oddalování nosníku od vzorku (D) se snižuje síla mezi hrotem a povrchem vzorku, k uvolnění hrotu dochází skokem (E); při dalším odtahování nosníku od vzorku (F) je síla mezi hrotem a vzorkem nulová.

Získaná data byla zpracována v programu Gwyddion 2.7 (Český metrologický institut, ČR; ořez obrázků, úprava barevné škály, potlačení šumu). Výška vrstev byla odečtena z příčného řezu povrchu vzorků v programu PicoView (Agilent Technologies, USA) a následně analyticky zpracována v programu Origin 8 (OriginLab Corporation, USA).

### 3.4.2.1. Příprava substrátů pro adsorpci proteinů

Čistý povrch HOPG pro měření metodou AFM byl připraven odstraněním svrchní vrstvy lepicí páskou. Monokrystalický povrch zlatého substrátu byl připraven žiháním skleněné destičky pokryté zlatou vrstvou (obrázek Obr. 9). Chlazení substrátu po žihání bylo provedeno proudem argonu.



**Obr. 9:** Zlatý povrch na skleněné destičce před žiháním (vlevo) a po žihání (vpravo), zobrazeno v kontaktním režimu AFM.

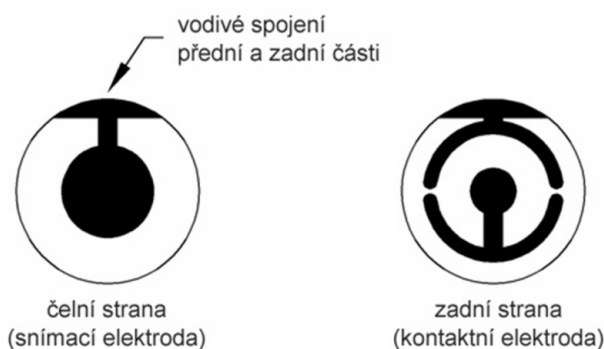
Modifikované zlaté substráty byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 3.2. Pro měření metodou AFM byla adsorpce papainu na čerstvě připravený povrch HOPG, čerstvě žiháný povrch monokrystalického zlata a na monokrystalické zlato pokryté alkanthiolovou samoorganizovanou monovrstvou provedena překrytím substrátů vodným roztokem papainu o koncentraci  $4,3 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Po hodině byly substráty vyjmuty, opláchnuty deionisovanou vodou a osušeny proudem argonu.

### 3.4.3. Křemenné krystalové mikrováčky

Křemenné krystalové mikrováčky (z *angl.* quartz crystal microbalance, QCM) využívají piezoelektrický efekt, který byl poprvé popsán bratry Curieovými v roce 1880.<sup>63</sup> Při aplikaci střídavého napětí na elektrody umístěné na křemenném krystalu (obrázek Obr. 10 na str. 28), dojde k jeho rozvibrování o charakteristické frekvenci (většinou v rozmezí 5 až 20 MHz).<sup>64</sup> Tato frekvence klesá při navázání hmoty na povrch krystalu. Vztah mezi změnou frekvence a hmotností vyjadřuje pro ideální případ Sauerbreyova rovnice:<sup>65</sup>

$$\Delta f = -C_f \cdot \Delta m \quad (16)$$

kde  $\Delta f$  značí pokles rezonanční frekvence krystalu v Hz,  $C_f$  je citlivost krystalu rovna  $56,6 \text{ Hz} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^2$  a  $\Delta m$  je změna hmotnosti v  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ .



**Obr. 10: Krystaly používané pro metodu QCM, bíle křemenné plochy, černě pokovené oblasti sloužící jako elektrody<sup>66</sup>**

Adsorpce papainu na krystaly modifikované alkanthiolovou vrstvou probíhala vždy přidáním temperovaného roztoku papainu do roztoku KCl o koncentraci  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  o teplotě  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , ve kterém ustáleně vibroval modifikovaný krystal. Zásobní roztok papainu byl vždy připraven tak, aby celková koncentrace papainu v roztoku s umístěným vibrujícím krystalem byla  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Získaná data byla zpracována v programu Origin 8 (OriginLab Corporation, USA). Hmotnost molekul adsorbovaných na povrch krystalu byla vypočítána za použití Sauerbreyovy rovnice (16).

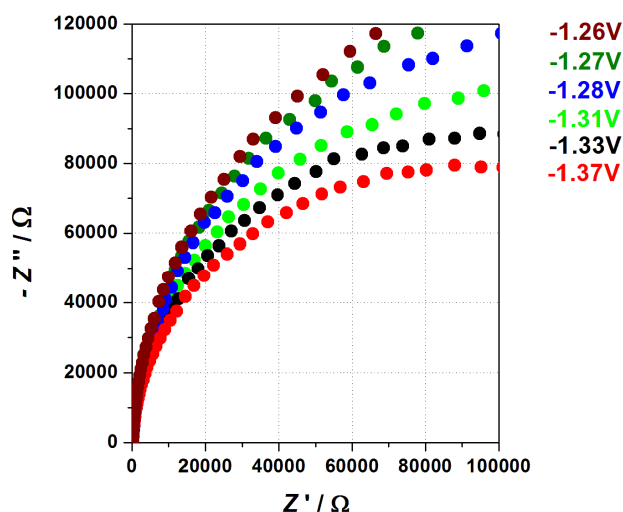


## 4. Výsledky

### 4.1. Elektrochemické vlastnosti organometalických komplexů

Elektrochemické vlastnosti sloučeniny **1** byly studovány některými metodami (DC polarografie, cyklická voltametrie, elektrolýza, AC voltametrie) již v bakalářské práci.<sup>15</sup> V rámci této diplomové práce byla studie elektrochemických vlastností sloučeniny **1** doplněna o měření elektrochemické impedanční spektroskopie.

Reprezentativní křivky měření elektrochemické impedanční spektroskopie vodného roztoku sloučeniny **1** o koncentraci  $1,75 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  jsou na obrázku Obr. 11. Měření bylo provedeno na HMDE při rozsahu frekvencí 2 Hz až 100 kHz při potenciálech -1,26 V až -1,38 V. Toto potenciálové rozmezí odpovídá vlně přítomné na AC voltamogramu sloučeniny **1** ve vodném prostředí.<sup>15</sup>

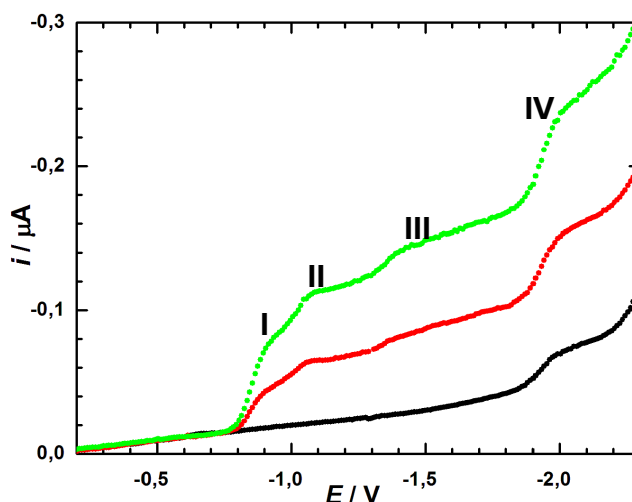


**Obr. 11: EIS vodného roztoku sloučeniny 1:** Sloučenina **1** ( $c = 1,75 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) - 0,1M KCl - deionisovaná voda; Pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinová síťka, referentní argentochloridová elektroda Ag | AgCl | 1M LiCl; rozsah frekvencí 2 Hz až 100 kHz, počáteční frekvence 100 kHz, potenciály -1,26 V; -1,27 V; -1,28 V; -1,31 V; -1,33 V; -1,37 V

Sloučeniny **2a** ani **2b** doposud nebyly elektrochemicky studovány. Pro sloučeninu **2a** byla provedena řada elektrochemických měření v nevodném a vodném prostředí za účelem srovnání redukčních vlastností **2a** s již dříve zkoumanou sloučeninou **1**, která katalyzuje vylučování vodíku.<sup>15</sup> Nevodné prostředí eliminuje komplikace spojené s adsorpcí látek a vodné prostředí poskytuje informace o možném katalytickém ději.

Sloučenina **2a** byla zkoumána v oxidační i redukční oblasti potenciálů. V oxidační oblasti nebyla za použití zlaté elektrody zaznamenána žádná odezva sloučeniny **2a**, proto byla další měření prováděna pouze v oblasti redukce.

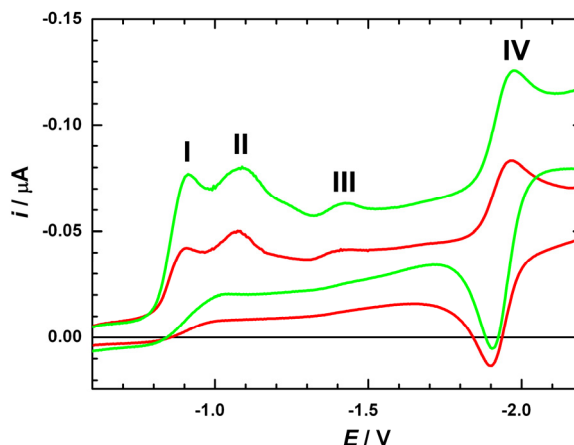
Na obrázku Obr. 12 jsou ukázány DC polarografické křivky pro nevodný roztok sloučeniny **2a**. DC polarografie byla provedena na SMDE s dobou kapky 1,5 s. Černá křivka odpovídá základnímu elektrolytu, tedy TBAPF<sub>6</sub> o koncentraci 0,1 mol·dm<sup>-3</sup>. Redukční vlna na křivce základního elektrolytu s půlvlnovým potenciálem -1,93 V odpovídá redukci draselných kationtů přítomných jako nečistota v použitém TBAPF<sub>6</sub>. Na grafu jsou křivky pro dvě odlišné koncentrace sloučeniny **2a** v roztoku. Červená křivka ( $c = 2,5 \times 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>) vykazuje 4 redoxní vlny. Stejný počet vln byl zaznamenán i pro koncentraci roztoku  $4,9 \times 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>. U všech čtyř vln bylo pozorováno zvýšení signálu se zvýšením koncentrace sloučeniny **2a**. Nárůst vlny označené v grafu číslem **IV** s koncentrací analytu jasně ukazuje na redukční děj paralelně probíhající s vylučováním nečistot ze základního elektrolytu.



**Obr. 12: DC polarografie sloučeniny 2a v nevodném prostředí:** Sloučenina **2a** ( $c = 2,5 \times 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup> - červená křivka;  $c = 4,9 \times 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup> - zelená křivka) - 0,1M TBAPF<sub>6</sub> - DMSO; Pracovní elektroda SMDE, pomocná elektroda platinová síťka, referentní argentochloridová elektroda Ag | AgCl | 1M LiCl; doba kapky 1,5 s. Černá křivka platí pro základní elektrolyt.

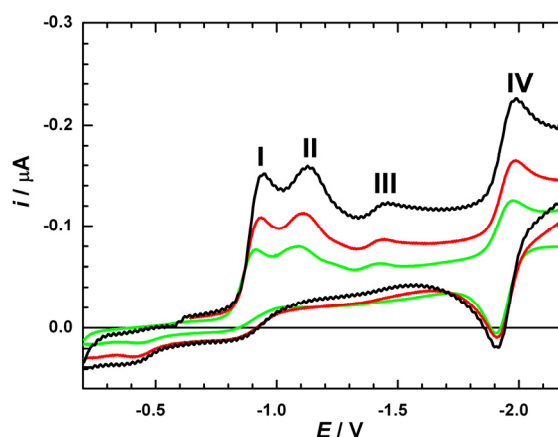
V prostředí 0,1M TBAPF<sub>6</sub> v DMSO byla provedena elektrolýza roztoku sloučeniny **2a** o koncentraci  $1,22 \times 10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup> při potenciálu -1,22 V. Za těchto podmínek systém přijal  $6,05 \times 10^{-2}$  C, což odpovídá přibližně 1,7 elektronu na molekulu sloučeniny **2a** a neúplné elektrolýze sloučeniny **2a** z roztoku, což bylo ověřeno DC polarograficky (graf neuveden).

Záznam cyklické voltametrie pro nevodné roztoky sloučeniny **2a** o různých koncentracích ( $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a  $4,9 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) je na obrázku Obr. 13. Měření byla provedena na HMDE při rychlosti polarizace  $0,5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ . Stejně jako DC polarografie i cyklická voltametrie poskytla vlny ukazující na 4 probíhající procesy v daném potenciálovém rozsahu.



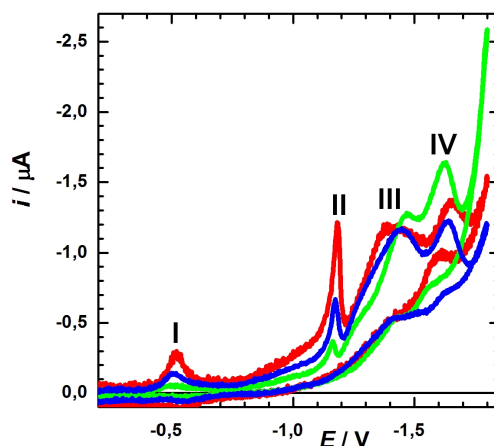
**Obr. 13:** Cyklická voltametrie sloučeniny **2a** v nevodném prostředí: Sloučenina **2a** ( $c = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  - červená křivka;  $c = 4,9 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  - zelená křivka) -  $0,1\text{M TBAPF}_6$  - DMSO; Pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinová síťka, referentní argentochloridová elektroda  $\text{Ag} | \text{AgCl} | 1\text{M LiCl}$ ; rychlost polarizace  $0,5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

Pro nevodný roztok sloučeniny **2a** o koncentraci  $4,9 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  byly měřeny cyklické voltamogramy s proměnlivou rychlostí polarizace HMDE (Obr. 14) a všechny pozorované vlny vykazovaly růst signálu s rostoucí rychlostí polarizace elektrody v rozsahu  $0,02 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  až  $2 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ .



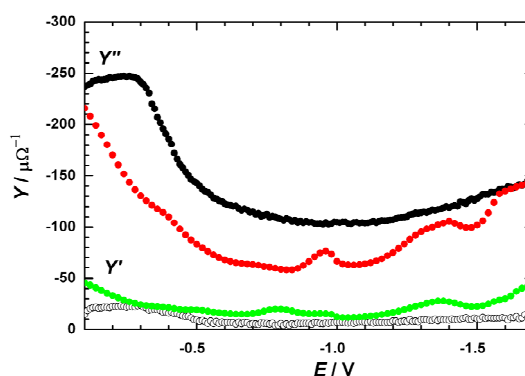
**Obr. 14:** Cyklická voltametrie sloučeniny **2a** v nevodném prostředí: Sloučenina **2a** ( $c = 4,9 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) -  $0,1\text{M TBAPF}_6$  - DMSO; Pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinová síťka, referentní argentochloridová elektroda  $\text{Ag} | \text{AgCl} | 1\text{M LiCl}$ ; rychlost polarizace  $0,05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  (zelená křivka),  $0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  (červená křivka),  $0,2 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  (černá křivka)

Elektrochemická měření roztoků sloučeniny **2a** byla provedena i ve vodném prostředí. Na obrázku Obr. 15 jsou uvedeny vybrané cyklické voltamogramy roztoku sloučeniny **2a** o koncentraci  $1,4 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  v 0,1M vodném roztoku KCl. Pro daný roztok byly měřeny cyklické voltamogramy při různých rychlostech polarizace HMDE v rozmezí  $0,015 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  až  $2 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ . U vln na obrázku označených jako **I** a **II** byl pozorován obvyklý trend, tedy zvyšování signálu s rostoucí hodnotou rychlosti polarizace. Chování sloučeniny **2a** při negativnějších potenciálech (vlny **III** a **IV**) tento trend již nevykazuje.



**Obr. 15: Cyklická voltametrie sloučeniny 2a ve vodném prostředí:** Sloučenina **2a** ( $c = 14 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) - 0,1M KCl - deionisovaná voda; pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinová síťka, referenční argentochloridová elektroda Ag | AgCl | 1M LiCl; rychlost polarizace  $0,125 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  (červená křivka),  $0,063 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  (modrá křivka) a  $0,031 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  (zelená křivka)

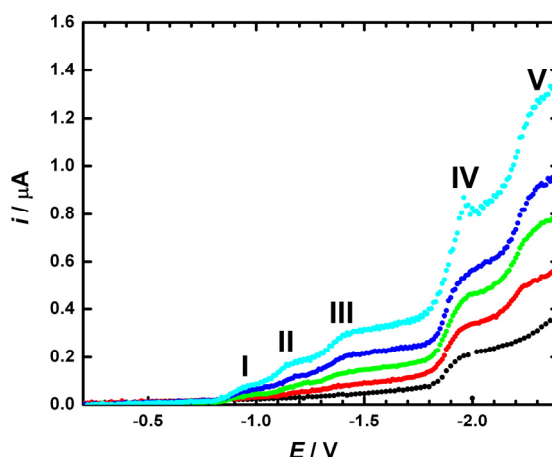
DC měření byla doplněna AC voltametří a elektrochemickou impedanční spektroskopií (graf neuveden). AC voltamogram sloučeniny **2a** o koncentraci  $1,4 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ve vodném prostředí je zobrazen na Obr. 16. Měření bylo provedeno na HMDE v 0,1M KCl (černé křivky) při frekvenci 160 Hz.



**Obr. 16: AC voltametrie sloučeniny 2a:** Sloučenina **2a** ( $c = 1,4 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) - 0,1M KCl - deionisovaná voda; pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinová síťka, referenční argentochloridová elektroda Ag | AgCl | 1M LiCl; 160 Hz, rychlost polarizace  $2,5 \times 10^{-3} \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ . Imaginární složka admittance  $Y''$  (červená křivka), reálná složka admittance  $Y'$  (zelená křivka), černé křivky platí pro  $Y''$  a  $Y'$  základního elektrolytu

Vlastnosti sloučeniny **3** nebyly dosud studovány elektrochemicky. Zásadní komplikací studia elektrochemických vlastností sloučeniny **3** je její nerozpustnost ve vodě. Z tohoto důvodu byla sloučenina **3** studována uvedenými metodami (DC polarografie, cyklická voltametrie, elektrolýza, AC voltametrie, elektrochemická impedanční spektroskopie) pouze v nevodném prostředí, a to v DMSO za použití TBAPF<sub>6</sub> jako základního elektrolytu.

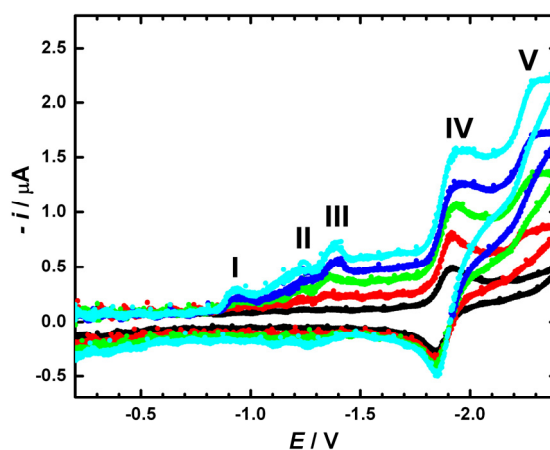
Na obrázku Obr. 17 jsou uvedeny DC polarografické křivky pro sloučeninu **3** v nevodném prostředí o čtyřech různých koncentracích ( $1,5 - 9,2 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). DC polarografická měření byla prováděna na SMDE s dobou kapky 1,5 s. Černá křivka základního elektrolytu (0,1M TBAPF<sub>6</sub> v DMSO) signalizuje při -1,9 V redukci draselných kationtů přítomných v základním roztoku jako nečistota. Sloučenina **3** vykazuje v měřeném potenciálovém rozsahu 5 redukčních vln. Nárůst čtvrté vlny s rostoucí koncentrací ukazuje na elektrochemický proces probíhající při potenciálu shodném s redukcí nečistot přítomných v základním elektrolytu.



**Obr. 17: DC polarografie sloučeniny 3 v nevodném prostředí:** Sloučenina **3** ( $c = 1,5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  - červená křivka;  $c = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  - zelená křivka;  $c = 6,5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  - tmavě modrá křivka;  $c = 9,2 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  - světle modrá křivka) - 0,1M TBAPF<sub>6</sub> - DMSO; Pracovní elektroda SMDE, pomocná elektroda platinová síťka, referentní argentschloridová elektroda Ag | AgCl | 1M LiCl; doba kapky 1,5 s. Černá křivka platí pro základní elektrolyt

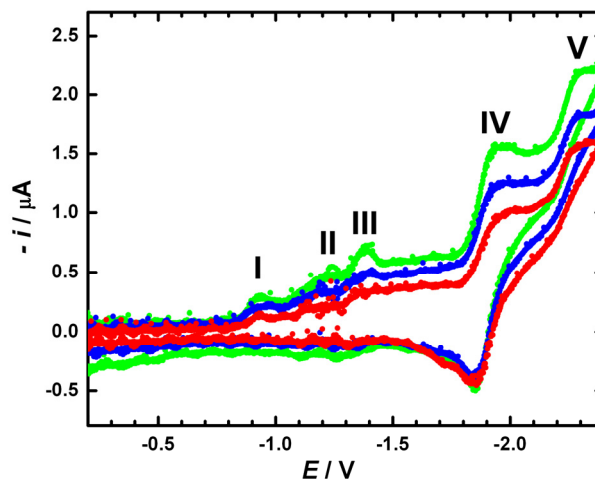
Po měření DC polarografie byl roztok sloučeniny **3** podroben elektrolýze. K úplné redukci roztoku o koncentraci  $9,2 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  bylo při potenciálu -1,1 V zapotřebí  $8,6 \times 10^{-2} \text{ C}$  náboje. Tato hodnota odpovídá příjmu 1,93 elektronu na molekulu sloučeniny **3**. Úplnost elektrolýzy sloučeniny **3** byla ověřena DC polarograficky (graf neuveden).

Obrázek Obr. 18 zachycuje cyklické voltamogramy nevodného roztoku sloučeniny **3** o různé koncentraci při rychlosti polarizace HMDE  $0,5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ . Signály všech zobrazených vln rostly se zvyšující se koncentrací sloučeniny **3**. Výrazná vlna na cyklickém voltamogramu základního elektrolytu (černá křivka) ukazuje na vylučování nečistot obsažených v TBAPF<sub>6</sub>. Signál nebylo možné zvýšit v důsledku nízké rozpustnosti sloučeniny **3** v běžně dostupných rozpouštědlech vhodných pro elektrochemická měření.



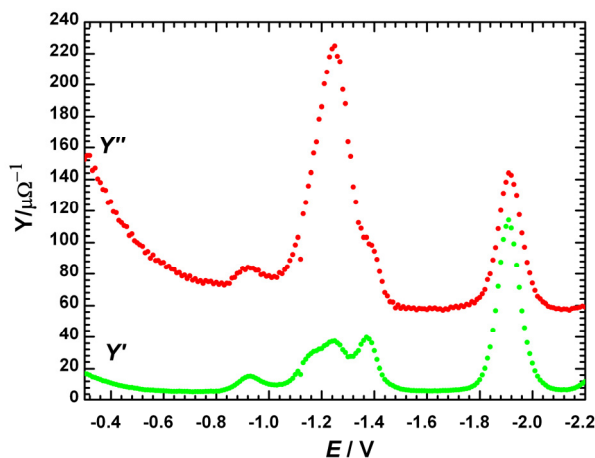
**Obr. 18:** Cyklická voltametrie sloučeniny **3** v nevodném prostředí – závislost na koncentraci: Sloučenina **3** ( $c = 1,5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  - červená křivka;  $c = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  - zelená křivka;  $c = 6,5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  - tmavě modrá křivka;  $c = 9,2 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  - světle modrá křivka) - 0,1M TBAPF<sub>6</sub> - DMSO; Pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinová síťka, referentní argentochloridová elektroda Ag | AgCl | 1M LiCl; rychlost polarizace  $0,5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

Na obrázku Obr. 19 na straně 35 jsou uvedeny cyklické voltamogramy nevodného roztoku sloučeniny **3** o koncentraci  $9,2 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  měřené při různé rychlosti polarizace HMDE. Stejně jako u roztoků sloučeniny **3** o jiných koncentracích ( $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a  $6,5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) byly měřeny voltamogramy při rychlostech polarizace v rozmezí  $0,03 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  až  $2 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ . Roztoky o všech studovaných koncentracích vykazovaly pokles signálu všech voltametrických vln s klesající rychlostí polarizace.



**Obr. 19: Cyklická voltametrie sloučeniny 3 v nevodném prostředí – závislost na rychlosti polarizace:** Sloučenina 3 ( $c = 9,2 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) - 0,1M TBAPF<sub>6</sub> - DMSO; Pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinová síťka, referenční argentochloridová elektroda Ag | AgCl | 1M LiCl; rychlost polarizace 0,5 V·s<sup>-1</sup> - zelená křivka, 0,25 V·s<sup>-1</sup> - modrá křivka, 0,125 V·s<sup>-1</sup> - červená křivka

AC voltamogramy nevodného roztoku sloučeniny 3 o koncentraci  $9,2 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  byly měřeny při frekvencích v rozmezí 6,4 Hz až 1,6 kHz. Na obrázku Obr. 20 je uveden AC voltamogram sloučeniny 3 při frekvenci 160 Hz na SMDE v prostředí 0,1M TBAPF<sub>6</sub> v DMSO.

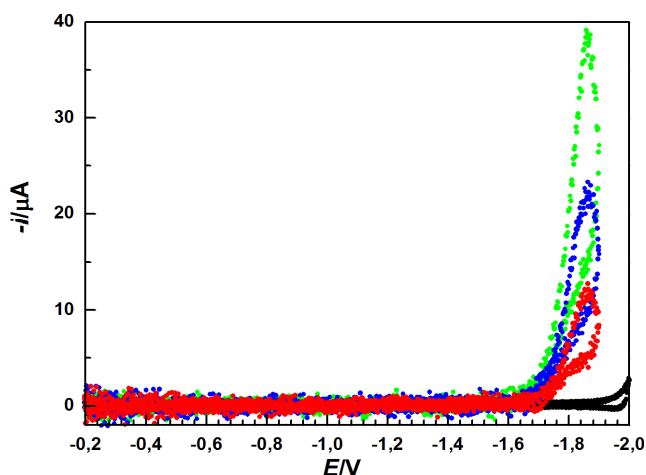


**Obr. 20: AC voltametrie sloučeniny 3:** Sloučenina 3 ( $c = 9,2 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) - 0,1M TBAPF<sub>6</sub> - DMSO; pracovní elektroda SMDE, pomocná elektroda platinová síťka, referenční argentochloridová elektroda Ag | AgCl | 1M LiCl; 160 Hz, rychlost polarizace  $3,3 \times 10^{-3} \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ . Imaginární složka admittance Y'' (červená křivka), reálná složka admittance Y' (zelená křivka)

## 4.2. Elektrochemie čistého a modifikovaného papainu

Elektrochemické vlastnosti čistého papainu a papainu modifikovaného sloučeninou **1** byly částečně studovány už v bakalářské práci.<sup>15</sup> Škála použitých elektrochemických metod byla rozšířena o elektrochemickou impedanční spektroskopii (podobně, jako tomu bylo v případě sloučeniny **1**), ale navíc byla přidána i metoda chronopotenciometrie. Katalytické vylučování vodíku bylo dále studováno rozšířením experimentálních podmínek AC voltametrie.

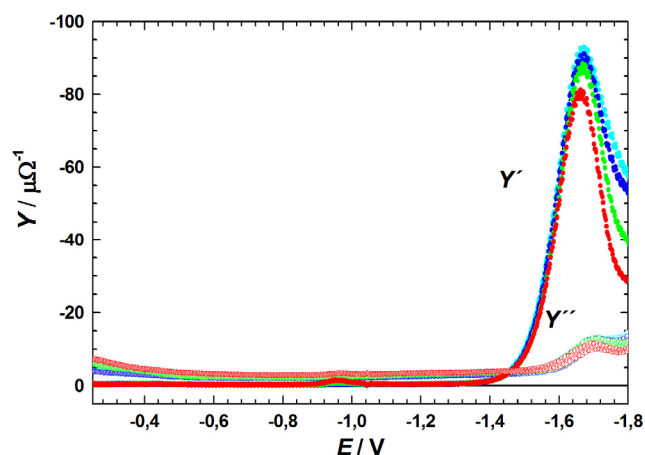
Závislost výšky signálu na koncentraci papainu v roztoku byla sledována za použití cyklické voltametrie. Na cyklických voltamogramech roztoku papainu o koncentracích 1 až  $3 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  je při rychlosti polarizace HMDE  $0,5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  patrný pouze jeden výrazný signál. Z grafu je jasně patrný nárůst signálu s rostoucí koncentrací papainu (Obr. 21).



**Obr. 21: Cyklická voltametrie vodného roztoku papainu:** Papain ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  - červená křivka,  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  - modrá křivka,  $c = 3 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  - zelená křivka) - 0,1M KCl - deionisovaná voda; pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinová síťka, referentní argentochloridová elektroda Ag | AgCl | 1M LiCl; rychlost polarizace  $0,5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ ; černá křivka pro základní elektrolyt

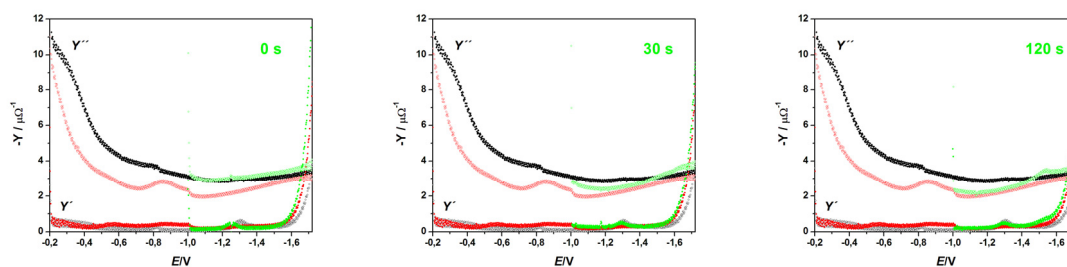
Koncentrační závislost byla měřena i metodou AC voltametrie. Na HMDE při frekvenci 3,2 Hz byl měřen signál papainu v koncentračním rozmezí  $1 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  až  $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Vybrané reprezentativní křivky jsou uvedeny v grafu na obrázku Obr. 22 na straně 37. Se zvyšující se koncentrací papainu v měřeném roztoku se imaginární složka admitance v oblasti -1,67 V zvyšuje, ale při koncentraci vyšší než  $3 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  není další nárůst výrazný.





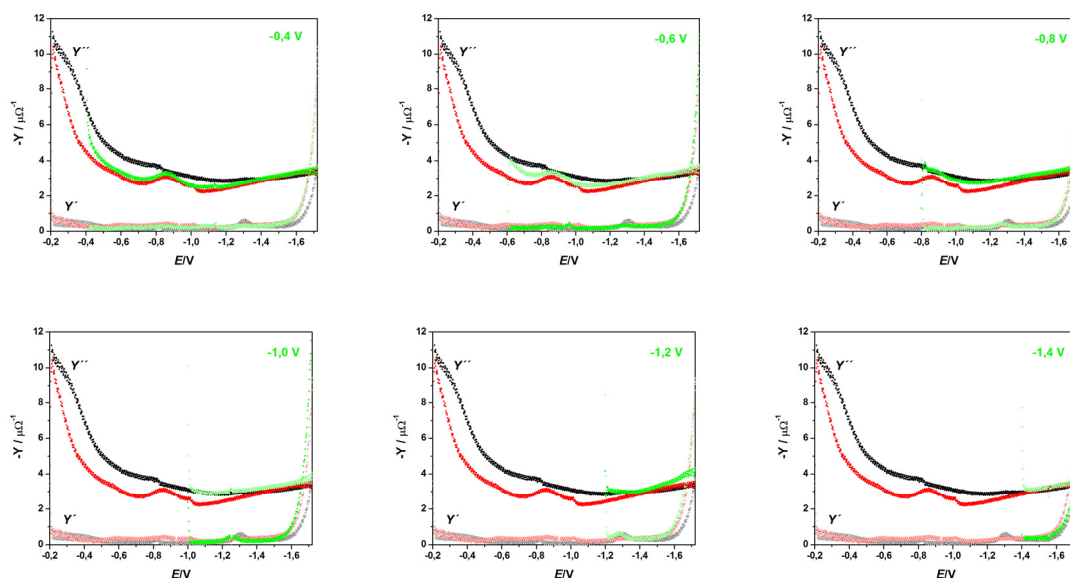
**Obr. 22: AC voltametrie papainu - koncentrační závislost:** Papain - 0,1M KCl - deionisovaná voda; pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinová síťka, referentní argentochloridová elektroda Ag | AgCl | 1M LiCl; frekvence 3,2 Hz, rychlost polarizace  $2,5 \times 10^{-3} \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ , koncentrace papainu  $1 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (červená křivka),  $3 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (zelená křivka),  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (tmavě modrá křivka),  $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (světle modrá křivka)

AC metoda byla použita i pro měření odezvy papainu po různě dlouhém čase akumulace papainu na povrch pracovní HMDE elektrody (Obr. 23). Pro toto měření bylo zvoleno prostředí Sørensenova pufru o hodnotě pH 7,0 (černé křivky). Roztok papainu o koncentraci  $5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  byl měřen při frekvenci 3,2 Hz (červené křivky). Zelené křivky přísluší AC voltamogramům měřeným v potenciálovém rozpětí -1,0 V až -1,8 V. Při potenciálu -1,0 V probíhala akumulace po danou dobu (0 s až 840 s). Na níže uvedených grafech jsou černě zobrazeny křivky pro základní elektrolyt a červeně křivky pro roztok papainu měřený v potenciálovém rozsahu -0,2 V až -1,80 V. Zeleně znázorněné jsou křivky měřené po akumulaci při potenciálu -1,0 V po dobu 30 s (uprostřed) a 120 s (vpravo). Zelené křivky na grafu vlevo odpovídají měření bez akumulace.



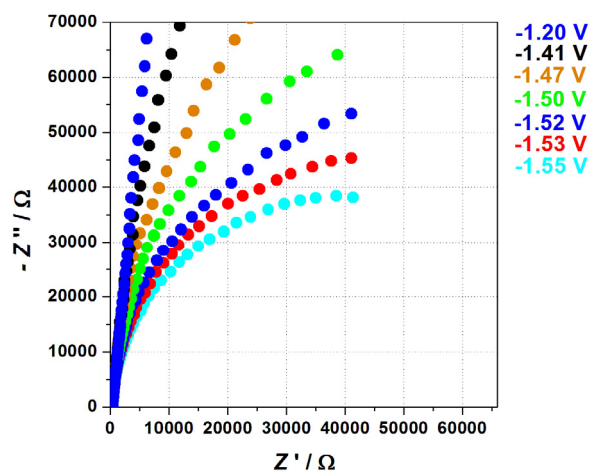
**Obr. 23: AC voltametrie roztoku papainu - vliv akumuláční doby:** Papain ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) - Sørensenův pufr - deionisovaná voda; pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinový drátek, referentní elektroda stříbrný drátek pokrytý AgCl, posun proti argentochloridové elektrodě 0,150 V; frekvence 3,2 Hz; rychlost polarizace  $1 \times 10^{-2} \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $Y''$  a  $Y'$  pro základní elektrolyt (černé křivky) a pro papain (červené křivky);  $Y''$  a  $Y'$  po akumulaci papainu při -1,0 V (zelené křivky) po dobu 0 s (vlevo), 30 s (uprostřed) a 120 s (vpravo)

Na obrázku Obr. 24 jsou uvedeny AC voltamogramy roztoku papainu o koncentraci  $5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  v Sörensonově pufru o pH 7,0 při frekvenci 3,2 Hz. Černě jsou zobrazeny reálná a imaginární složka admittance základního roztoku. Červenou barvou jsou uvedeny křivky měřené s počáteční hodnotou potenciálu -0,2 V. Zeleně jsou uvedeny křivky měřené při různé volbě počátečního potenciálu v rozsahu -0,4 V až -1,4 V.



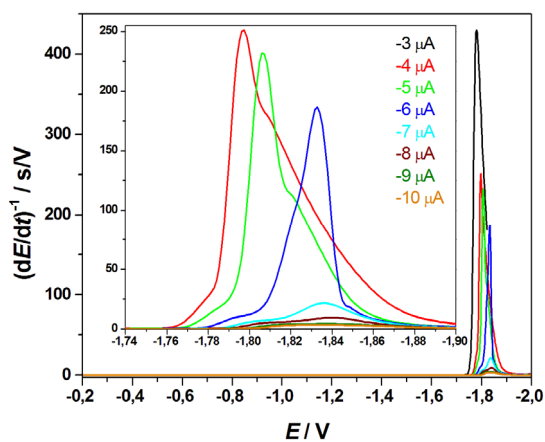
**Obr. 24: AC voltametrie roztoku papainu - vliv volby potenciálového rozsahu:** Papain ( $c = 0,5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) - Sörensonův pufr - deionisovaná voda; pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinový drátek, referentní elektroda stříbrný drátek pokrytý AgCl, posun proti argentochloridové elektrodě 0,150 V; 3,2 Hz, rychlost polarizace  $1 \times 10^{-2} \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $Y''$  a  $Y'$  pro základní elektrolyt (černé křivky) a pro papain bez akumulace s počátečním potenciálem -0,2 V (červené křivky); zeleně křivky bez akumulace s počátečním potenciálem v rozmezí od -0,4 V do -1,4 V. Počáteční potenciál je indikován v grafu.

Na obrázku Obr. 25 na straně 39 jsou uvedeny výsledné křivky EIS vodného roztoku papainu o koncentraci  $1,1 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Měření bylo provedeno v potenciálovém rozsahu -1,20 V až -1,55 V při frekvencích 2 Hz až 100 kHz.



**Obr. 25: EIS vodného roztoku papainu:** Papain ( $c = 1,1 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) - 0,1M KCl - deionisovaná voda; Pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinová síťka, referentní argentochloridová elektroda Ag | AgCl | 1M LiCl; rozsah frekvencí 2 Hz až 100 kHz, počáteční frekvence 100 kHz, potenciály -1,20 V; -1,41 V; -1,47 V; -1,50 V; -1,52 V; -1,53 V; -1,55 V

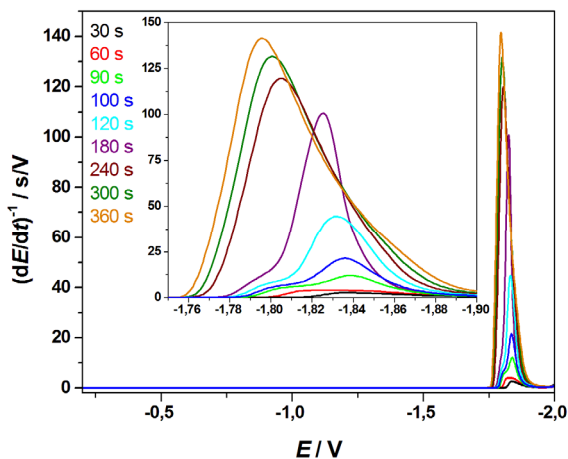
Roztok papainu o koncentraci  $5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  byl studován také chronopotenciometricky. Na obrázku Obr. 26 jsou zobrazeny křivky při deponiční době 100 s před začátkem měření při potenciálu -0,2 V s proměnnou hodnotou vkládaného proudu v rozmezí  $-3 \times 10^{-6} \text{ A}$  až  $-10 \times 10^{-6} \text{ A}$ . Pro přehlednost je ve výřezu zvětšena potenciálová oblast, kde byly zaznamenány vlny. Křivka měřená při proudu  $-3 \times 10^{-6} \text{ A}$  není ve výřezu uvedena. Výška vln klesá s rostoucí hodnotou vkládaného proudu při všech měřeních.



**Obr. 26: Chronopotenciometrie roztoku papainu - závislost na vkládaném proudu:** Papain ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) - 0,1M KCl - deionisovaná voda; pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinový drátek, referentní elektroda stříbrný drátek pokrytý AgCl, posun proti argentochloridové elektrodě 0,079 V; depozice 100 s při potenciálu -0,2 V; ve výřezu detail křivek v potenciálové oblasti -1,74 V až -1,90 V

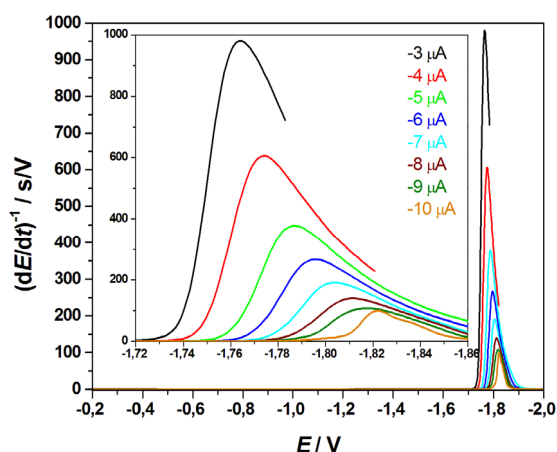
Chronopotenciometricky byla měřena i závislost signálu papainu o koncentraci  $5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  na době depozice (v rozmezí 30 s až 360 s) před začátkem měření při

potenciálu -0,2 V (obrázek Obr. 27). Všechny uvedené křivky byly měřeny na HMDE při vkládaném proudu  $-7 \times 10^{-6}$  A. Ve výřezu je uveden zvětšený graf pro vybranou potenciálovou oblast. S delší dobou deposice získaný signál roste.



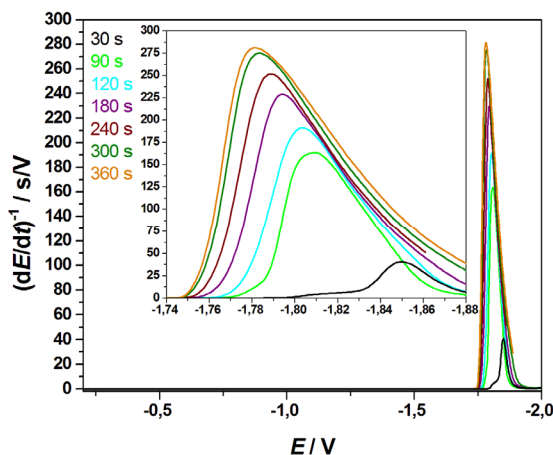
**Obr. 27: Chronopotenciometrie roztoku papainu - závislost na době deposice:** Papain ( $c = 5 \times 10^{-7}$  mol·dm<sup>-3</sup>) - 0,1M KCl - deionisovaná voda; pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinový drátek, referentní elektroda stříbrný drátek pokrytý AgCl, posun proti argentschloridové elektrodě 0,079 V; deposice při potenciálu -0,2 V, vkládaný proud  $-7 \times 10^{-6}$  A; ve výřezu detail křivek v potenciálové oblasti -1,75 V až -1,90 V

Na obrázku Obr. 28 je zobrazen výsledný graf chronopotenciometrických měření papainu-1 v závislosti na hodnotě vkládaného proudu v rozmezí  $-3 \times 10^{-6}$  A až  $-10 \times 10^{-6}$  A. Všechny křivky byly měřeny na HMDE po deposici dlouhé 100 s při potenciálu -0,2 V. Ve výřezu je patrný pokles a posun signálu s rostoucí hodnotou vkládaného proudu.



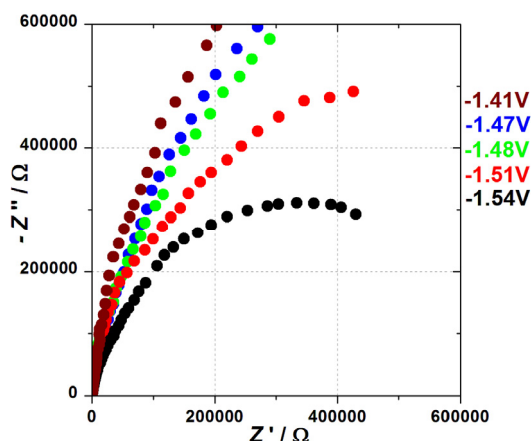
**Obr. 28: Chronopotenciometrie roztoku papainu-1 - závislost na vkládaném proudu:** Papain-1 ( $c = 5 \times 10^{-7}$  mol·dm<sup>-3</sup>) - 0,1M KCl - deionisovaná voda; pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinový drátek, referentní elektroda stříbrný drátek pokrytý AgCl, posun proti argentschloridové elektrodě 0,079 V; deposice 100 s při potenciálu -0,2 V; ve výřezu detail křivek v potenciálové oblasti -1,72 V až -1,86 V

Na obrázku Obr. 29 jsou uvedeny chronopotenciometrické křivky roztoku papainu-1 měřené na HMDE s vkládaným proudem  $-7 \times 10^{-6}$  A v závislosti na době deposice při potenciálu -0,2 V. Z výřezu, kde jsou ukázány zvětšené křivky, je patrný trend rostoucího signálu při delší době deposice.



**Obr. 29: Chronopotenciometrie roztoku papainu-1 - závislost na době deposice:** Papain-1 ( $c = 5 \times 10^{-7}$  mol·dm<sup>-3</sup>) - 0,1M KCl - deionisovaná voda; pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinový drátek, referentní elektroda stříbrný drátek pokrytý AgCl, posun proti argtochloridové elektrodě 0,079 V; deposice při potenciálu -0,2 V, vkládaný proud  $-7 \times 10^{-6}$  A; ve výřezu detail křivek v potenciálové oblasti - 1,74 V až - 1,88 V

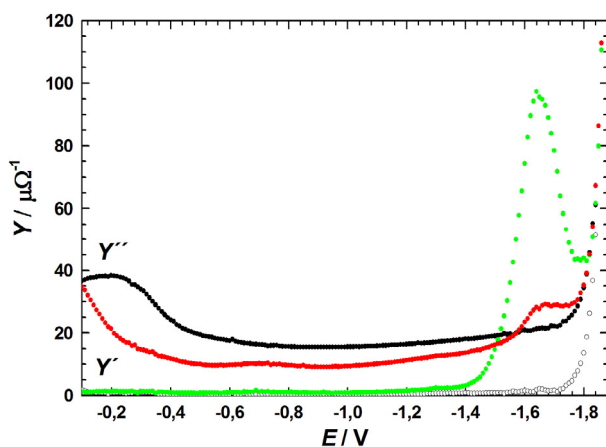
Na obrázku Obr. 30 jsou uvedeny vybrané křivky EIS měření vodného roztoku papainu-1 o koncentraci  $1 \times 10^{-6}$  mol·dm<sup>-3</sup>. Měření bylo provedeno v potenciálovém rozsahu -1,39 V až -1,55 V při frekvencích 2 Hz až 100 kHz.



**Obr. 30: EIS vodného roztoku papainu-1:** Papain-1 ( $c = 1 \times 10^{-6}$  mol·dm<sup>-3</sup>) - 0,1M KCl - deionisovaná voda; Pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinová síťka, referentní argtochloridová elektroda Ag | AgCl | 1M LiCl; rozsah frekvencí 2 Hz až 100 kHz, počáteční frekvence 100 kHz, potenciály -1,41 V; -1,47 V; -1,48 V; -1,51 V; -1,54 V

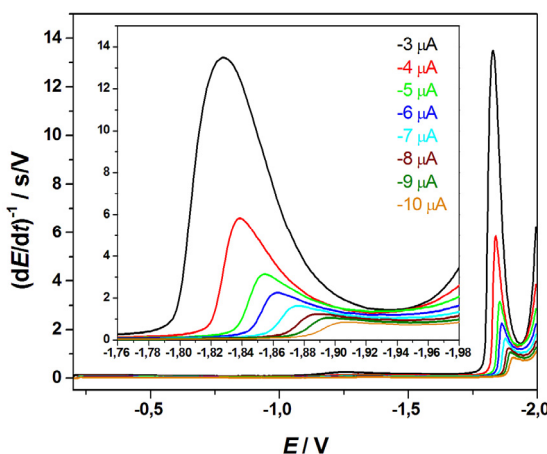
AC voltamogram vodného roztoku papainu-2b je na obrázku Obr. 31 na straně 42. Graf byl měřen na HMDE při frekvenci 16 Hz. Reálná složka admittance (zelená křivka)

vykazuje jediný výrazný signál, a to při potenciálu -1,62 V. Pokles křivky pro imaginární složku admitance (červená křivka) oproti křivce pro základní elektrolyt v oblasti pozitivnějších potenciálů ukazuje na adsorpci papainu-2b na povrch pracovní elektrody.



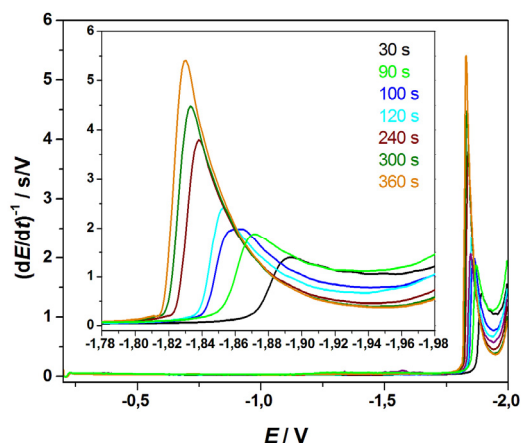
**Obr. 31: AC voltametrie papainu-2b:** Papain-2b ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , barevné křivky) - 0,1M KCl - deionisovaná voda; pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinová síťka, referentní argentochloridová elektroda Ag | AgCl | 1M LiCl; 16 Hz, rychlost polarizace  $2,5 \times 10^{-2} \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ , černé křivky pro základní elektrolyt

Na obrázku Obr. 32 jsou uvedeny výsledné chronopotenciometrické křivky pro vodný roztok papainu-2b o koncentraci  $5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . V tomto případě byla sledována závislost výšky signálu na hodnotě proudu vkládaného na HMDE při konstantních akumulčních podmínkách (depozice po dobu 100 s při potenciálu -0,2 V). Z grafu je patrné, že se hodnota signálu zvyšuje s klesající hodnotou vkládaného proudu. Zároveň se s klesajícím vkládaným proudem posouvá maximum vlny směrem ke kladnějším hodnotám potenciálu.



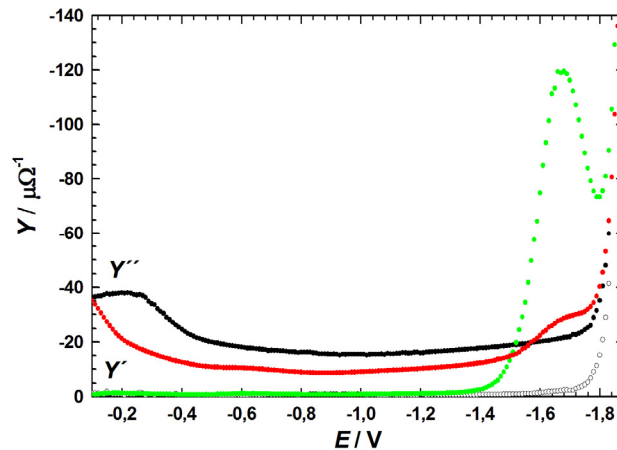
**Obr. 32: Chronopotenciometrie roztoku papainu-2b - závislost na vkládaném proudu:** Papain-2b ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) - 0,1M KCl - deionisovaná voda; pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinový drátek, referentní elektroda stříbrný drátek pokrytý AgCl, posun proti argentochloridové elektrodě 0,074 V; depozice 100 s při potenciálu -0,2 V; ve výřezu detail křivek v potenciálové oblasti -1,76 V až -1,98 V

Chronopotenciometrická závislost výšky signálu na době deposice papainu-**2b** na povrch HMDE je uvedena na obrázku Obr. 33. V tomto případě byly jednotlivé křivky měřeny za konstantních podmínek, jen se změnou doby deposice před počátkem měření. Všechny zobrazené křivky byly měřeny po akumulaci při -0,2 V a při hodnotě vkládaného potenciálu  $-7 \times 10^{-6}$  A. S prodlužující se akumulací se signál výrazně zvyšuje a posouvá ke kladnějším hodnotám potenciálu.



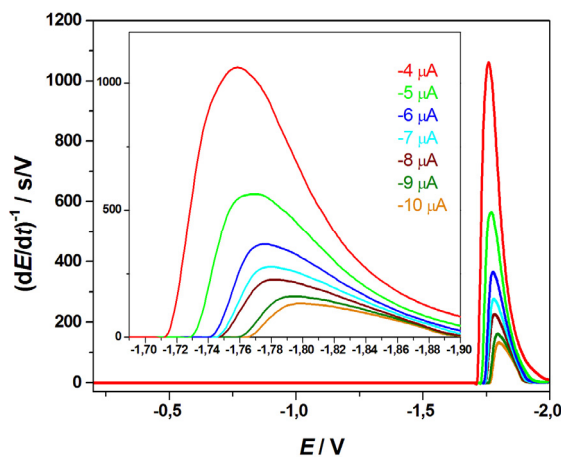
**Obr. 33: Chronopotenciometrie roztoku papainu-2b - závislost na době deposice:** Papain-**2b** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) - 0,1M KCl - deionisovaná voda; pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinový drátek, referentní elektroda stříbrný drátek pokrytý AgCl, posun proti argentochloridové elektrodě 0,074 V; deposice při potenciálu -0,2 V, vkládaný proud  $-7 \times 10^{-6}$  A; ve výřezu detail křivek v potenciálové oblasti - 1,78 V až - 1,98 V

Na obrázku Obr. 34 na straně 44 je AC voltamogram vodného roztoku papainu-**3** měřený na HMDE při frekvenci 16 Hz. Křivka imaginární složky admitance (červená křivka) vykazuje jasný pokles oproti černé křivce základního elektrolytu (KCl o koncentraci  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Tento pokles je přisuzován adsorpci analytu na povrch pracovní elektrody. Reálná složka admitance (zelená křivka) vykazuje pouze jeden výrazný signál při potenciálu -1,65 V.



**Obr. 34: AC voltametrie papainu-3:** Papain-3 ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , barevné křivky) - 0,1M KCl - deionisovaná voda; pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinová síťka, referentní argentochloridová elektroda Ag | AgCl | 1M LiCl; 16 Hz, rychlost polarizace  $2,5 \times 10^{-2} \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ , černé křivky pro základní elektrolyt

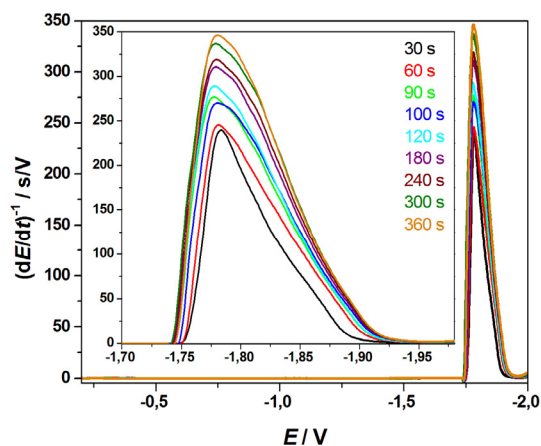
Výsledky chronopotenciometrických měření vodného roztoku papainu-3 o koncentraci  $5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  jsou na obrázcích Obr. 35 a Obr. 36 na stranách 44 a 45. Na obrázku Obr. 35 je uveden graf závislosti výšky signálu na hodnotě vkládaného potenciálu. Všechny ostatní parametry byly konstantní, depozice probíhala vždy při -0,2 V po dobu 100 s. Výška získaných vln klesala s rostoucím vkládaným proudem pro všechny měřené křivky. Zároveň docházelo k posunu maxim vln do zápornějších potenciálových oblastí.



**Obr. 35: Chronopotenciometrie roztoku papainu-3 - závislost na době depozice:** Papain-3 ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) - 0,1M KCl - deionisovaná voda; pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinový drátek, referentní elektroda stříbrný drátek pokrytý AgCl, posun proti argentochloridové elektrodě 0,088 V; depozice při potenciálu -0,2 V, vkládaný proud  $-7 \times 10^{-6} \text{ A}$ ; ve výzevu detail křivky v potenciálové oblasti -1,69 V až -1,90 V



Dalším trendem sledovaným chronopotenciometricky pro roztok papainu-3 byla výška signálu v závislosti na době deposice analytu na povrch HMDE při hodnotě potenciálu -0,2 V (Obr. 36). Všechny zobrazené křivky byly měřeny při hodnotě vkládaného proudu  $-7 \times 10^{-6}$  A. Pro všechny měřené křivky platí, že s prodlužující se dobou deposice se zvyšuje signál.

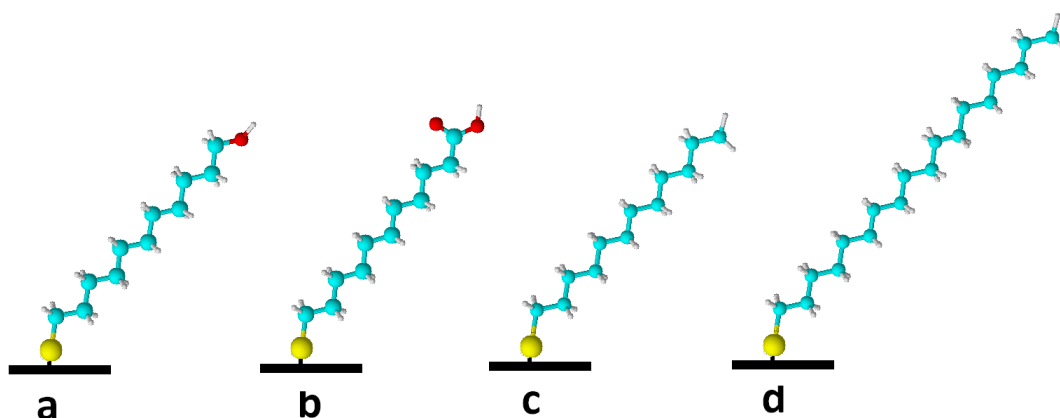


**Obr. 36: Chronopotenciometrie roztoku papainu-3 - závislost na době deposice:** Papain-3 ( $c = 5 \times 10^{-7}$  mol·dm<sup>-3</sup>) - 0,1M KCl - deionisovaná voda; pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda platinový drátek, referentní elektroda stříbrný drátek pokrytý AgCl, posun proti argentochloridové elektrodě 0,088 V; deposice při potenciálu -0,2 V, vkládaný proud  $-7 \times 10^{-6}$  A; ve výřezu detail křivek v potenciálové oblasti - 1,70 V až - 1,98 V

### 4.3. Adsorpce papainu

#### 4.3.1. Vlastnosti připravených samoorganizovaných monovrstev

Pro přípravu samoorganizovaných monovrstev na monokrystalickém zlatě byly zvoleny čtyři různé alkanthioly, jejichž struktura je znázorněna na obrázku Obr. 37. SAM tvořené kyselinou 11-sulfanylundekanovou (-COOH) a 11-sulfanylundekan-1-olem (-CH<sub>2</sub>OH) byly použity pro měření metodami AFM i QCM. SAM zakončená methylovou skupinou byla pro jednotlivé metody připravená odlišně. Pro QCM se ukázalo výhodnější použít dodekan-1-thiol, zatímco pro metodu AFM oktadekan-1-thiol.

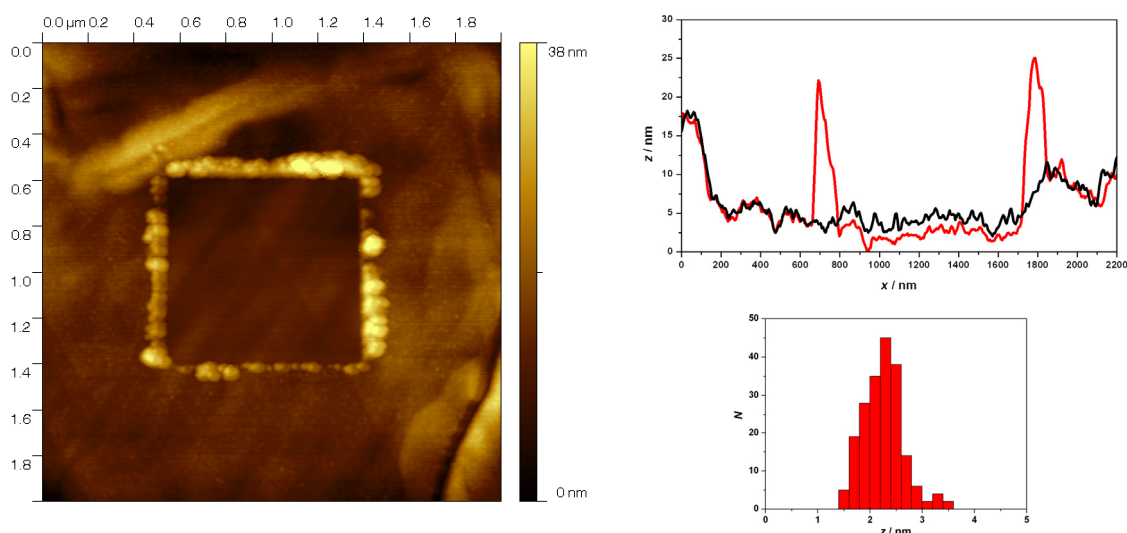


**Obr. 37: Struktura thiolů použitých pro tvorbu SAM:** 11-sulfanylundekan-1-ol (a), kyselina 11-sulfanylundekanová (b), dodekan-1-thiol (c) a oktadekan-1-thiol (d)

Pro orientační zjištění počtu molekul tvořících SAM bylo použito QCM měření při teplotě 25 °C za přístupu kyslíku. Byla sledována pouze první fáze tvorby monovrstvy, tedy adsorpce alkanthiolů na povrch pozlaceného QCM krystalu.

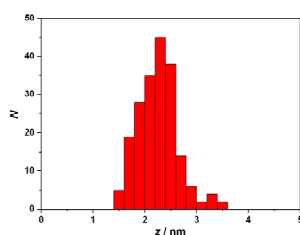
Struktura jednotlivých SAM na Arrandee substrátech byla za použití metody AFM vždy sledována na několika různých oblastech povrchu substrátu. Na vhodné oblasti byla aplikována metoda AFM NS pro zjištění výšky vrstvy na povrchu substrátu. Reprezentativní ukázka postupu je uvedena pro monovrstvu tvořenou 11-sulfanylundekan-1-olem (-CH<sub>2</sub>OH) na obrázku Obr. 38 na straně 47. U všech ostatních SAM byl zvolen stejný postup. Na získaných AFM obrázcích je vždy jasně zřetelná oblast s odstraněnou vrstvou molekul. Ty kolem této shrabané oblasti utvořily nepravidelné bariéry.

11-sulfanylundekan-1-ol vytvořil na povrchu monokrystalického zlata jednolitou monovrstvu. Za použití metody AFM NS byla vybraná oblast zbavena povrchového filmu silou  $6,53 \times 10^{-8}$  N aplikovanou na povrch vzorku hrotem. Pod vrstvou thiolu byla jasně patrná struktura monokrystalického zlata i v neodškrabané oblasti. Metodou QCM bylo zjištěno zachycení molekul 11-sulfanylundekan-1-olu na povrch krystalu při teplotě 25 °C za přístupu kyslíku. Byl zaznamenán pokles hodnoty frekvence o 4,78 Hz.



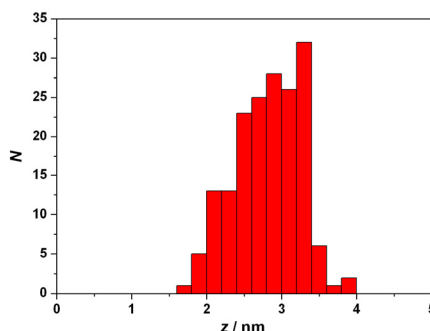
**Obr. 38: Samoorganizovaná monovrstva 11-sulfanylundekan-1-olu na povrchu monokrystalického zlata:** vlevo topografie oblasti  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$  v magneticky řízeném přerušované kontaktním AFM režimu po aplikaci AFM NS; vpravo nahoře horizontální průřez vrstvou alkanthiolu: černou křivkou průřez neporušenou vrstvou, červeně průřez vrstvou ve stejné oblasti, ale po aplikaci AFM NS; vpravo dole histogram distribuce výšky vrstvy.

Pro SAM tvořenou 11-sulfanylundekanovou kyselinou byly použity stejné postupy jako v předchozím případě. Pro získání plochy s odstraněným povrchovým filmem, byla hrotem aplikována síla  $1,83 \times 10^{-8}$  N. Na obrázku Obr. 39 je zachycena distribuce výšky alkanthiolové vrstvy na povrchu monokrystalického zlata. Alkanthiol se na pozlacený povrch QCM krystalu adsorboval za přístupu kyslíku při teplotě 25 °C za poklesu frekvence vibrujícího krystalu o hodnotě 5,01 Hz.



**Obr. 39: Histogram distribuce výšky SAM kyseliny 11-sulfanylundekanové na povrchu monokrystalického zlata**

SAM zakončená methylovou skupinou byla pro měření metodou AFM tvořena oktadekan-1-thiolem. Hodnoty pro vytvoření histogramu distribuce výšky monovrstvy (Obr. 40) byly získány stejně jako v předchozích případech, tedy použitím metody AFM NS. Síla aplikovaná hrotem na povrch vzorku pro odstranění povrchového filmu byla  $9,24 \times 10^{-8}$  N. Metodou QCM byla při teplotě 25 °C za přístupu kyslíku sledována tvorba SAM tvořená molekulami dodekan-1-thiolu. Pokles frekvence vibrujícího QCM krystalu byl roven hodnotě 4,95 Hz.



Obr. 40: Histogram distribuce výšky SAM oktadekan-1-thiolu na povrchu monokrystalického zlata

### 4.3.2. Adsorpce papainu na různě hydrofobní povrchy

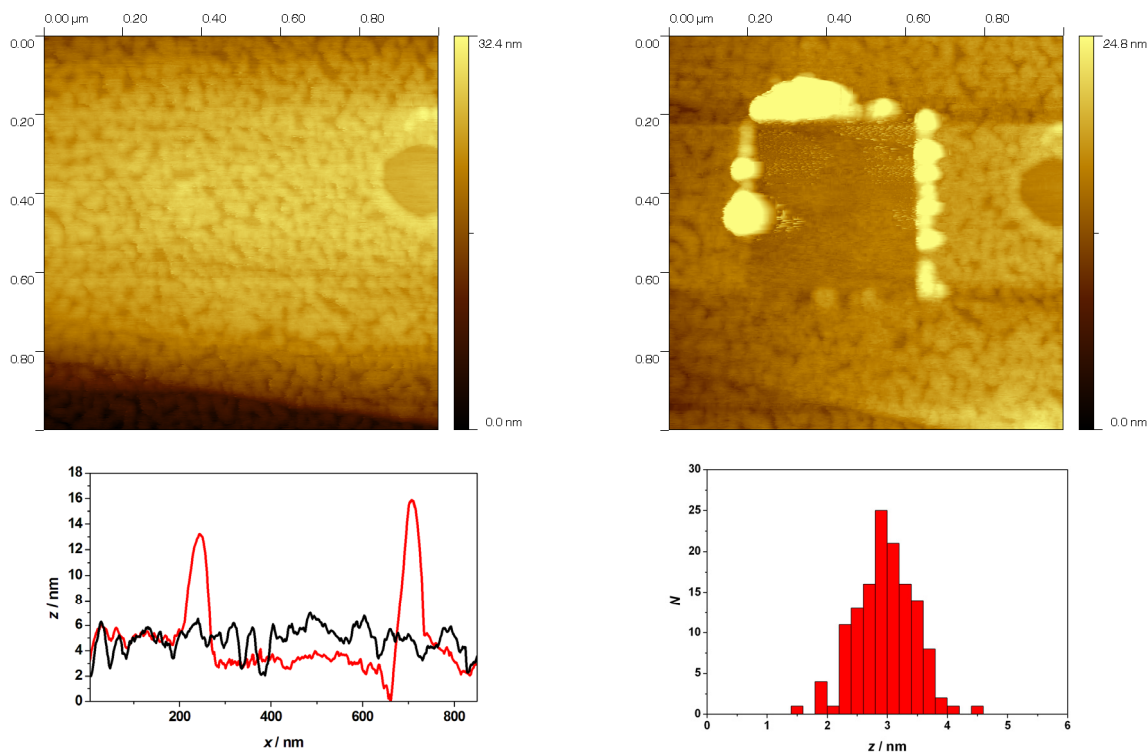
Povrchy o různé hydrofobicitě byly připraveny pokrytím povrchu monokrystalického zlata různými alkanthioly. Série substrátů modifikovaných SAM s koncovými skupinami  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{COOH}$  a  $\text{CH}_2\text{OH}$  byla doplněna i o čistý povrch monokrystalického zlata a o nemodifikovaný povrch HOPG. U všech vzorků byl použit stejný způsob nanesení papainu na jejich povrch i způsob studia připravených vrstev.

Měření metodou QCM probíhalo ve dvou sériích. Měření bylo provedeno jak na krystalech modifikovaných při teplotě 25 °C za přístupu kyslíku, tak na krystalech pokrytých vrstvou SAM při teplotě 60 °C bez přístupu kyslíku. Pokud byly krystaly modifikovány při nízké teplotě, bez odstranění kyslíku a po krátkou dobu, nebyly QCM záznamy adsorpce papainu reprodukovatelné.

Jednotný postup byl použit při studiu vrstev papainu metodou AFM. Pro určení výšky vrstev byla použita metoda AFM NS aplikovaná na několika vybraných vhodných oblastech povrchu vzorku.

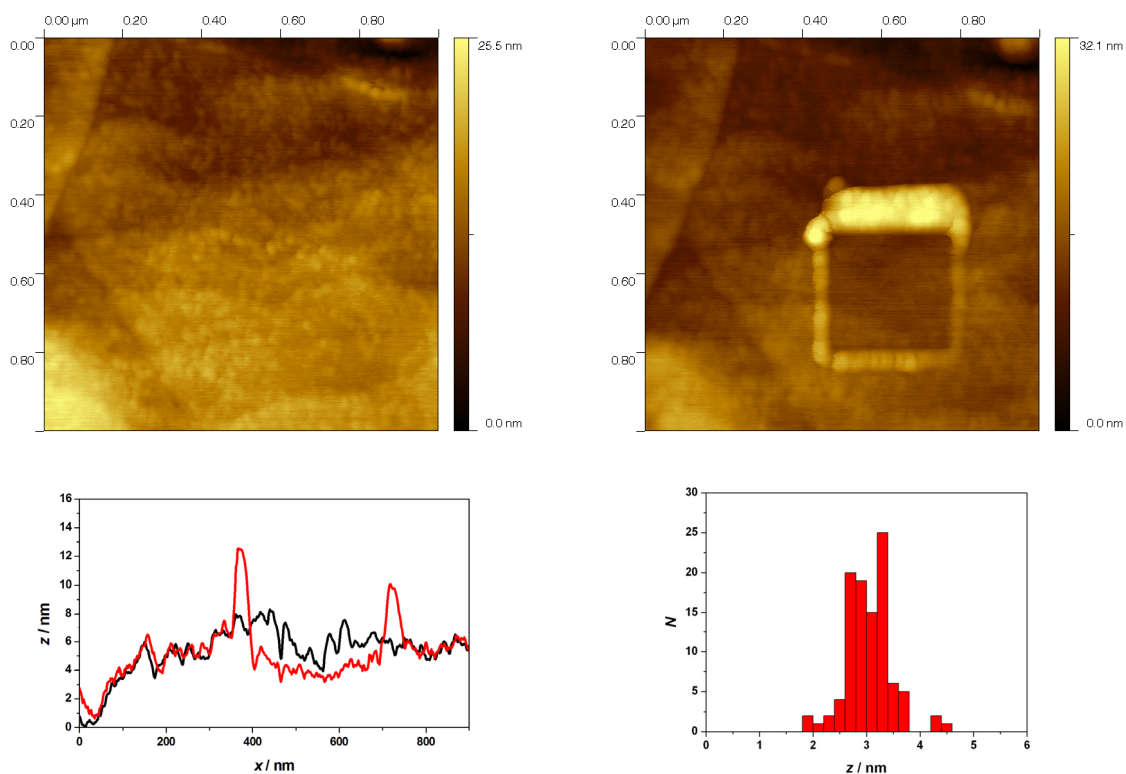
Papain adsorbovaný na povrch čistého HOPG (Obr. 41, str. 49) vytvořil nejednotlivou vrstvou adsorbovaných molekul. Pro odstranění molekul z povrchu substrátu byla

aplikována síla  $2,59 \times 10^{-8}$  N. Na obou uvedených vyobrazeních topografie jsou patrné oblasti (zejména na pravé straně obrázků), které nebyly pokryty proteinem.



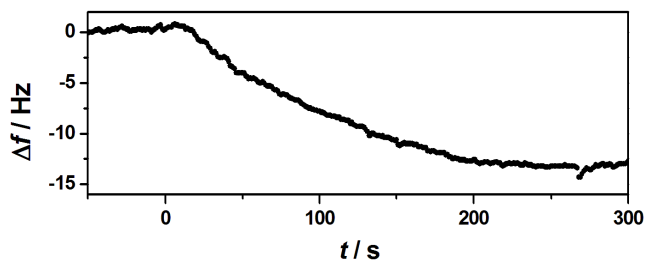
**Obr. 41: Vrstva papainu na HOPG:** vlevo nahoře topografie povrchu oblasti o rozměrech  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  zobrazená v magneticky řízeném přerušované kontaktním AFM režimu; vpravo nahoře oblast  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  zobrazená ve stejném režimu, ale po aplikaci AFM NS; vlevo dole horizontální průřez vrstvou papainu na HOPG: černou křivkou průřez neporušenou vrstvou a červenou křivkou průřez vrstvou ve stejné oblasti, ale po aplikaci AFM NS; vpravo dole histogram výšky vrstvy papainu na HOPG

Na obrázku Obr. 42 na straně 50 je zachycena AFM analýza vrstvy papainu na nemodifikovaném povrchu monokrystalického zlata. Metodou AFM NS byla silou  $5,03 \times 10^{-8}$  N odstraněna povrchová vrstva ve vybrané oblasti. Přemístěné molekuly vytvořily na všech stranách vyčištěné plochy jasně patrné bariéry.



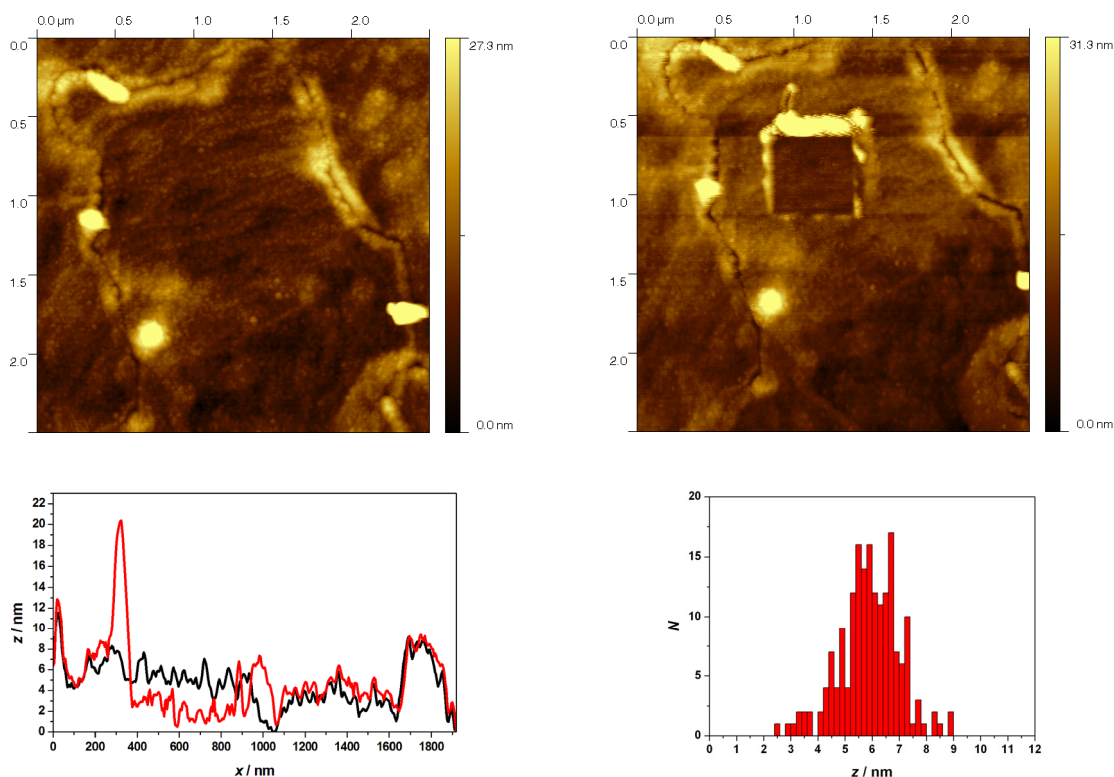
**Obr. 42: Vrstva papainu na povrchu monokrystalického zlata Au(111):** vlevo nahoře topografie povrchu oblasti o rozměrech  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  zobrazená v magneticky řízeně přerušované kontaktním AFM režimu; vpravo nahoře oblast  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  zobrazená ve stejném režimu, ale po aplikaci AFM NS; vlevo dole horizontální průřez vrstvou papainu na monokrystalickém zlatě: černou křivkou průřez neporušenou vrstvou a červenou křivkou průřez vrstvou ve stejné oblasti, ale po aplikaci AFM NS; vpravo dole distribuce výšky vrstvy papainu na monokrystalickém zlatě

QCM záznam adsorpce papainu na čistý QCM krystal je uveden na Obr. 43. V čase označeném 0 s byl do  $6,0 \times 10^{-2} \text{ dm}^3$  roztoku 0,1M KCl o teplotě  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  přidán zásobní roztok papainu tak, aby výsledná koncentrace papainu dosáhla  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Pokles frekvence vibrujícího QCM krystalu měl hodnotu 13,5 Hz.



**Obr. 43: QCM záznam adsorpce papainu na čistý QCM krystal:** 0,1M vodný roztok KCl,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , sběr dat v intervalu 1 s; nástřik roztoku papainu do 0,1M roztoku KCl o teplotě  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  v čase označeném 0 s

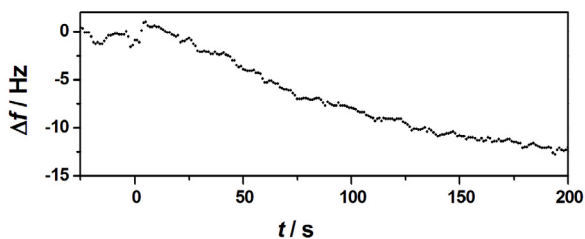
Obrázek Obr. 44 ukazuje výsledky AFM studie papainu na monokrystalickém zlatě pokrytém samoorganizovanou vrstvou oktadekan-1-thiolu. Vrstva byla odstraněna silou  $4,34 \times 10^{-8}$  N aplikovanou hrotem na povrch vzorku při použití metody AFM NS.



**Obr. 44:** Vrstva papainu na zlatu(111) pokrytém alkanthiolem s  $-\text{CH}_3$  koncovou skupinou: vlevo nahoře topografie povrchu oblasti o rozměrech  $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$  zobrazená v magneticky řízeném přerušované kontaktním AFM režimu; vpravo nahoře oblast  $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$  zobrazená ve stejném režimu, ale po aplikaci AFM NS; vlevo dole horizontální průřez vrstvou papainu na monokrystalickém zlatě pokrytém SAM s methylovou koncovou skupinou: černou křivkou průřez neporušenou vrstvou a červenou křivkou průřez vrstvou ve stejné oblasti, ale po aplikaci AFM NS; vpravo dole histogram výšky vrstvy papainu na monokrystalickém zlatě modifikovaném alkanthiolovou SAM s  $-\text{CH}_3$  koncovou skupinou

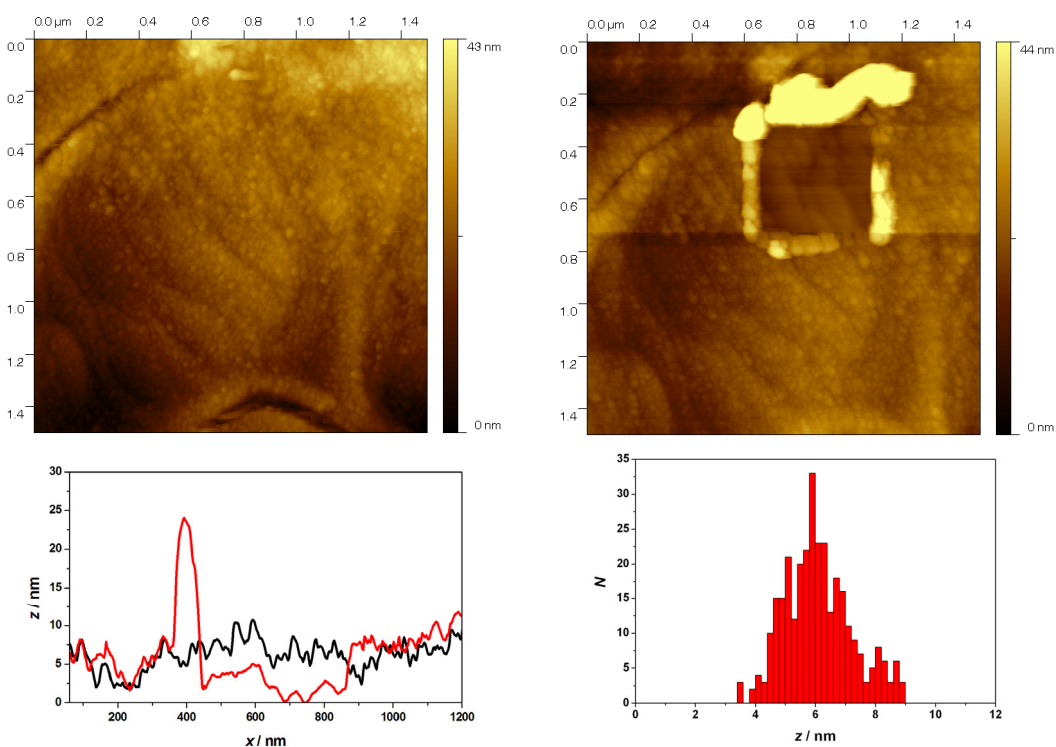
QCM záznam adsorpce papainu na povrch QCM krystalu, který byl pokryt SAM dodekan-1-thiolu, je uveden na obrázku Obr. 45 na straně 52. V tomto případě byla monovrstva alkanthiolu připravena při  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  bez přístupu kyslíku. Pokles frekvence vibrujícího QCM krystalu po přidavku roztoku papainu o koncentraci v čase na grafu označeném jako 0 s byl 12,1 Hz.





**Obr. 45:** QCM záznam adsorpce papainu na povrch QCM krystalu modifikovaný SAM s  $-CH_3$  koncovou skupinou: 0,1M vodný roztok KCl, 25 °C, sběr dat v intervalu 1 s; nástřik roztoku papainu do 0,1M roztoku KCl o teplotě 25 °C v čase označeném 0 s

Na obrázku Obr. 46 je AFM zobrazení vrstvy papainu na monokrystalickém zlatě modifikovaném vrstvou 11-sulfanylundekan-1-olu. Metodou AFM NS vybrané oblasti byla silou  $9,14 \times 10^{-8}$  N odstraněna povrchová vrstva proteinu. U svrchní strany odškrabané oblasti vznikla vysoká bariéra přesunutých molekul.

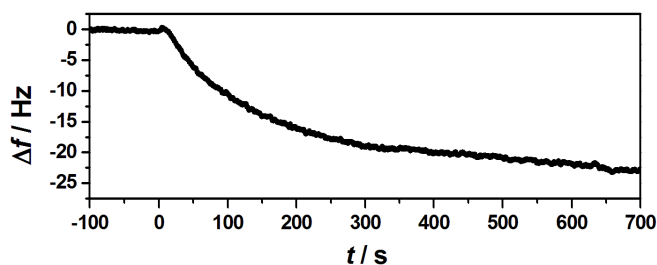


**Obr. 46:** Vrstva papainu na zlatě Au(111) modifikovaném alkanthiolem s koncovou skupinou  $-CH_2OH$ : vlevo nahoře topografie povrchu oblasti o rozměrech  $1,5 \times 1,5 \mu m^2$  zobrazená v magneticky řízeném přerušovaně kontaktním AFM režimu; vpravo nahoře oblast  $1,5 \times 1,5 \mu m^2$  zobrazená ve stejném režimu, ale po aplikaci AFM NS; vlevo dole horizontální průřez vrstvou papainu na monokrystalickém zlatě pokrytém alkanthiolovou SAM s  $-CH_2OH$  koncovou skupinou: černou křivkou průřez neporušenou vrstvou a červenou křivkou průřez vrstvou ve stejné oblasti, ale po aplikaci AFM NS; vpravo dole histogram výšky vrstvy papainu na monokrystalickém zlatě modifikovaném alkanthiolovou SAM s  $-CH_2OH$  koncovou skupinou

QCM měření adsorpce papainu na krystal modifikovaný samoorganizovanou vrstvou 11-sulfanylundekan-1-thiolu je na obrázku Obr. 47 na straně 53. V čase na grafu označeném 0 s byl do 0,1M roztoku KCl o teplotě 25 °C přidán roztok papainu připravený

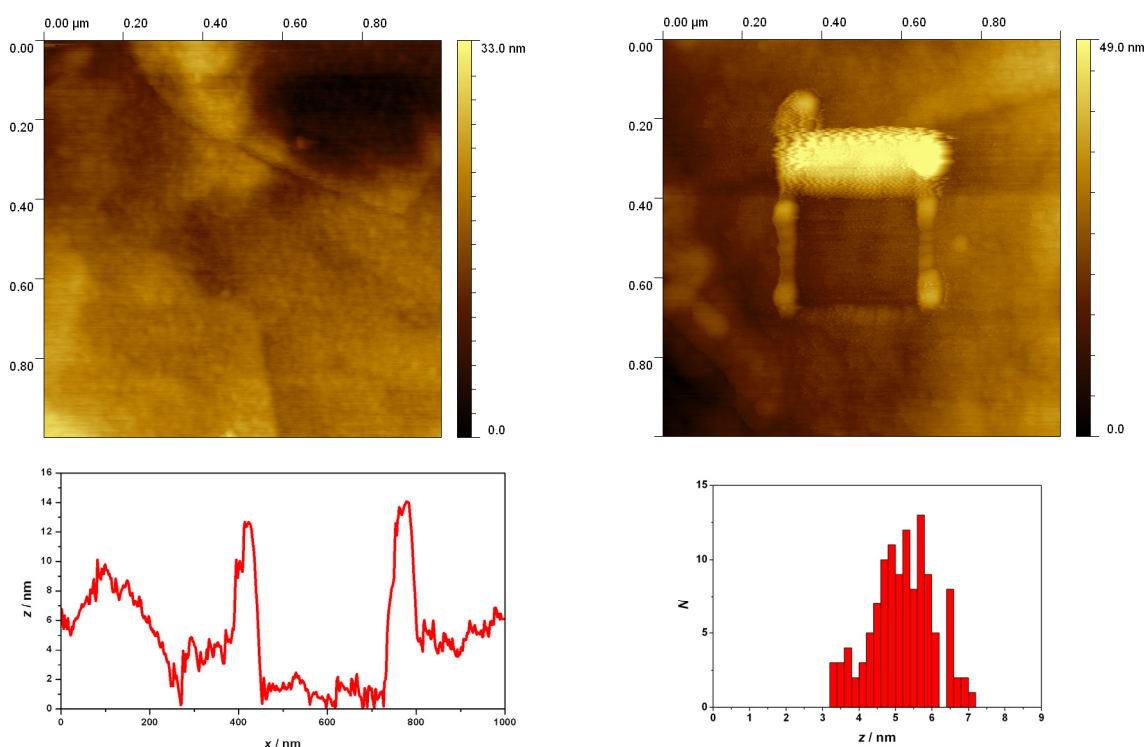


tak, aby výsledná koncentrace papainu v roztoku byla  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Pokles frekvence vibrujícího krystalu dosáhl hodnoty 22,5 Hz.



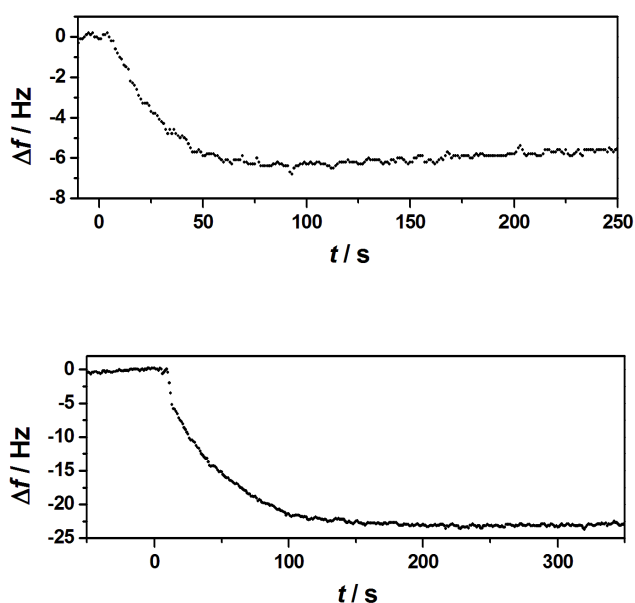
**Obr. 47:** QCM záznam adsorpce papainu na krystal pokrytý SAM 11-sulfanylundekan-1-thiolu: 0,1M vodný roztok KCl, 25 °C, sběr dat v intervalu 1 s; nástřik roztoku papainu do 0,1M roztoku KCl o teplotě 25 °C v čase označeném 0 s

AFM zobrazení topografie vzorku monokrystalického zlata pokrytého monovrstvou 11-sulfanylundekanové kyseliny je na obrázku Obr. 48. Část povrchového filmu byla odstraněna aplikací síly  $4,89 \times 10^{-8} \text{ N}$  na povrch vzorku metodou AFM NS. Přesunutě molekuly vytvořily na horním okraji očištěné oblasti vysokou, nsnadno zobrazitelnou bariéru.



**Obr. 48:** Vrstva papainu na zlatě Au(111) modifikovaném alkanthiolem s koncovou skupinou -COOH: vlevo nahoře topografie povrchu oblasti o rozměrech  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  zobrazená v magneticky řízeném přerušované kontaktním AFM režimu; vpravo nahoře oblast  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  zobrazená ve stejném režimu, ale po aplikaci AFM NS; vlevo dole horizontální průřez vrstvou papainu na monokrystalickém zlatě pokrytém alkanthiolovou SAM s -COOH koncovou skupinou: černou křivkou průřez po aplikaci AFM NS; vpravo dole histogram výšky vrstvy papainu na monokrystalickém zlatě modifikovaném alkanthiolovou SAM s -COOH koncovou skupinou

QCM měření adsorpce papainu na povrch QCM krystalu pokrytého vrstvou kyseliny 11-sulfanylundekanové bylo provedeno v roztoku KCl o koncentraci 0,1 mol/l (Obr. 49 nahoře) a v čisté deionisované vodě (Obr. 49 dole). Při adsorpci papainu v celkové koncentraci  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  v 0,1M KCl poklesla frekvence vibrujícího krystalu o 6,3 Hz. Pokud QCM krystal pokrytý SAM kyseliny 11-sulfanylundekanové vibroval v čisté deionisované vodě a byl přidán roztok papainu, klesla frekvence vibrací krystalu o 23,4 Hz.



**Obr. 49: QCM záznam adsorpce papainu na krystal pokrytý SAM 11-sulfanylundekanové kyseliny: nahoře: : 0,1M vodný roztok KCl, 25 °C, sběr dat v intervalu 1 s; nástřik roztoku papainu do 0,1M roztoku KCl o teplotě 25 °C v čase označeném 0 s; dole: deionisovaná voda, 25 °C, sběr dat v intervalu 1 s; nástřik roztoku papainu do 0,1M roztoku KCl o teplotě 25 °C v čase označeném 0 s**

## 5. Diskuse

### 5.1. *Elektrochemické vlastnosti organometalických komplexů, papainu a jeho derivátů*

Papain, stejně jako mnoho dalších proteinů,<sup>16</sup> má schopnost elektrochemicky katalyzovat vylučování vodíku. Jak již bylo uvedeno v kapitole 1.4.1., děje katalyzované proteiny jsou silně ovlivněny adsorpcí katalyzátoru na povrch elektrody. Rtuťová elektroda poskytuje možnost studia katalytických vlastností proteinů jak při potlačení adsorpce při polarografickém měření na kapající rtuťové elektrodě, tak při měření v adsorbovaném stavu s různou dobou akumulace při využití visící kapkové elektrody.

Příslušný signál vylučování vodíku katalyzovaný nemodifikovaným papainem byl pozorován a popsán již v bakalářské práci za využití výsledků AC voltametrických měření jeho vodného roztoku.<sup>15</sup> Vlna katalytického vylučování vodíku za přítomnosti papainu je jasně patrná i na AC voltamogramech uvedených v této práci (např. na obrázku Obr. 22 na straně 37). Výška této vlny je částečně ovlivněna množstvím papainu v roztoku, ale pouze při velice nízkých koncentracích. Při koncentraci vyšší než  $3 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  se signál s dalšími přídávky papainu již téměř nezvyšuje (Obr. 22 na straně 37). Naopak při použití cyklické voltametrie (Obr. 21 na straně 36) se projevil vliv koncentrace papainu v roztoku výrazně i při koncentracích  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  až  $3 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Tento jev je důsledkem rozdílných rychlostí polarizace použitých v AC a DC voltametrických metodách a potvrzuje, že signál vylučování vodíku nemodifikovaným papainem je spojený s adsorpcí proteinu na povrch elektrody.

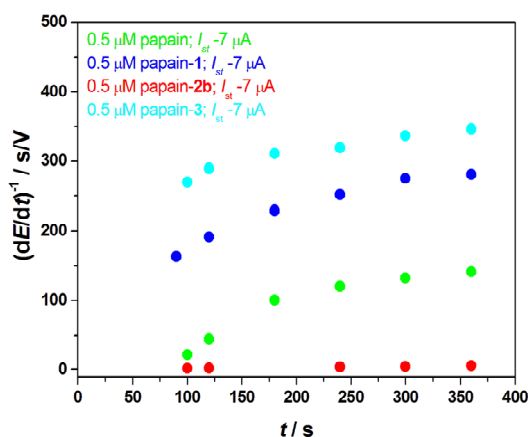
Průběh křivky imaginární složky admitance v AC voltamogramech papainu upozornil na probíhající adsorpci papainu na povrch pracovní elektrody. Vliv doby akumulace papainu na povrch HMDE byl sledován na Obr. 23 na straně 37. Bez čekání u potenciálu -1,0 V (graf vlevo) měla imaginární složka admitance průběh podobný křivce základního elektrolytu. Při akumulaci proteinu po dobu 30 s (graf uprostřed) byla hodnota imaginární složky admitance nižší oproti křivce bez akumulací doby. Výraznější pokles byl zaznamenán pro křivku při akumulaci 60 s (neuvedena) a 120 s (graf vpravo). Při delším akumulacím čase (300 s, 420 s, 840 s; křivky neuvedeny) nebyla zaznamenána žádná změna průběhu oproti křivce s akumulacím časem 120 s. Imaginární složka admitance souvisí s hodnotou kapacity elektrické dvojvrstvy a adsorbáty snižují tuto

hodnotu oproti hodnotám naměřeným pro základní elektrolyt.<sup>56</sup> Měření zkoumající vliv počátečního potenciálu na adsorpci nemodifikovaného papainu je uvedeno na obrázku Obr. 24 na straně 38.

Alternativou k AC voltamogramům zobrazeným na Obr. 23 na straně 37 je chronopotenciometrické měření, jehož výsledky jsou zobrazeny na Obr. 27 na straně 40. V tomto případě jsme se zaměřili na sledování katalytického vylučování vodíku, tzv. vlny H při potenciálu -0,2 V při různé době akumulace nemodifikovaného papainu po dobu 30 s až 360 s. Výška vlny H s dobou akumulace papainu roste, což potvrzuje katalýzu v adsorbovaném stavu.

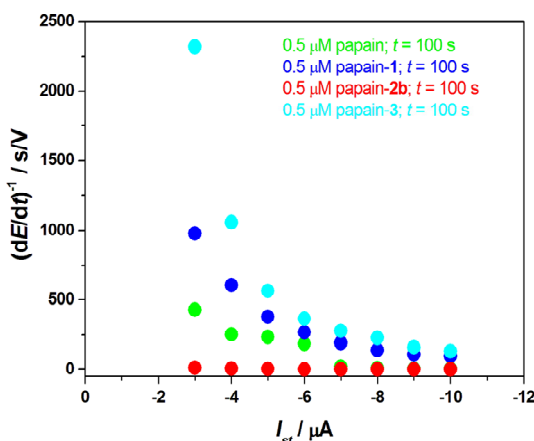
Chronopotenciometricky byly studovány i roztoky jednotlivých derivátů papainu. Pro všechny zkoumané deriváty byl pozorován vznik vlny H, tedy signálu příslušejícímu katalytickému vylučování vodíku. Základním předpokladem je, že katalytické vylučování vodíku nemodifikovaným papainem je spojeno s přítomností volné -SH skupiny v aktivním centru proteinu. Srovnání katalytických vlastností modifikovaných derivátů papainu, které mají v daném aktivním centru organometalický fragment poskytuje informace o uchování aktivity, resp. snížení nebo zvýšení aktivity takto vzniklého syntetického metaloproteinu.

Dodržení konstantních reakčních podmínek poskytuje možnost porovnat výšky pozorovaných vln H jednotlivých proteinů a tím i porovnat jejich schopnost katalyzovat elektrochemické vylučování vodíku. Na obrázku Obr. 50 na straně 57 je graf porovnávající výšky signálů poskytovaných papainem a jeho deriváty v závislosti na čase akumulace jednotlivých proteinů na povrchu HMDE. U všech proteinů bylo pozorováno zvyšování vlny H s prodlužující se dobou akumulace proteinu. Stejný trend byl popsán i v literatuře pro elektrochemické chování vasopresinu.<sup>67</sup> Nejnižší signály poskytl papain-**2b** (červené body) u všech deposičních časů. Deriváty papain-**1** a papain-**3** naopak poskytly výrazně vyšší signály než nemodifikovaný papain (zelené body).



**Obr. 50:** Závislost výšky vlny H čistého papainu a jeho derivátů na čase akumulace: zeleně: papain ( $5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), tmavě modře: papain-1 ( $5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), červeně: papain-2b ( $5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), světle modře: papain-3 ( $5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ); 0,1M KCl - deionisovaná voda; HMDE - Pt drátek - Ag | AgCl kvazi referentní elektroda; deposice při -0,2 V, proud  $-7 \times 10^{-6} \text{ A}$

Podobné porovnání je možné i pro výšky vln H papainu a jeho derivátů v závislosti na vkládaném proudu (Obr. 51 na straně 57). Ostatní experimentální podmínky byly konstantní pro všechny studované roztoky. U všech proteinů byl pozorován trend snižujícího se signálu s rostoucí hodnotou vkládaného proudu. Tato závislost je ve shodě s výsledky skupiny E. Palečka pro vodný roztok  $\alpha$ -synucleinu,<sup>50</sup> vasopresinu<sup>67</sup> i hovězího sérového albuminu.<sup>49</sup> Stejně jako v předchozím případě, i při tomto porovnání poskytli nejnižší měřené hodnoty derivát papain-2b. Nejvyšší signál poskytl pro všechny sledované hodnoty vkládaného proudu papain-3.



**Obr. 51:** Závislost výšky vlny H čistého papainu a jeho derivátů na vkládaném proudu: zeleně: papain ( $5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), tmavě modře: papain-1 ( $5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), červeně: papain-2b ( $5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), světle modře: papain-3 ( $5 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ); 0,1M KCl - deionisovaná voda; HMDE - Pt drátek - Ag | AgCl kvazi referentní elektroda; deposice při -0,2 V po dobu 100 s

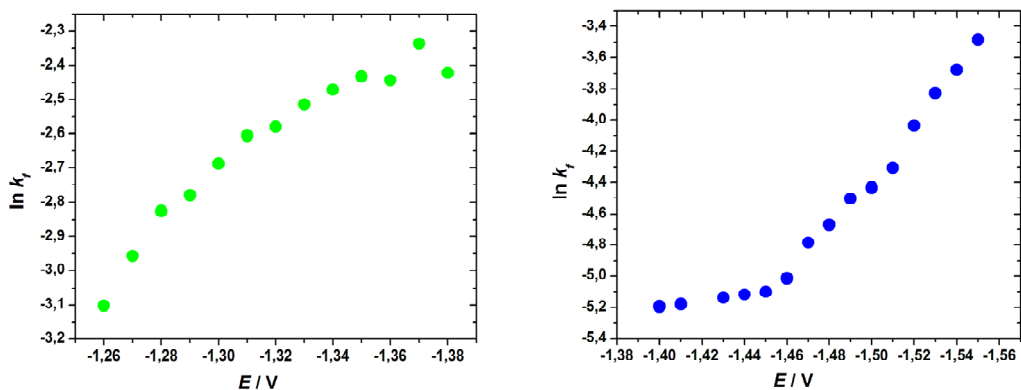
Sloučenina **3**, která se ukázala být nejvhodnějším kandidátem při porovnání výsledků chronopotenciometrických měření mohla být studována elektrochemicky pouze v nevodném prostředí (DC polarografie na obrázku Obr. 17 na straně 33 a cyklická voltametrie na obrázku Obr. 18 na straně 34), protože není rozpustná ve vodě. V DMSO nebyly přímo pozorovány katalytické efekty.

Určitý katalytický efekt byl pozorován na cyklickém voltamogramu vodného roztoku sloučeniny **2a** (Obr. 15 na straně 32). Stejně jako u sloučeniny **3** a sloučeniny **1**<sup>15</sup> nebyl katalytický proces zaznamenán při elektrochemickém měření nevodného roztoku.

Elektrolýza sloučeniny **3** v nevodném prostředí ukázala na příjem 2 elektronů na molekulu analytu. V případě sloučeniny **2a** neproběhla elektrolýza k úplné přeměně reaktantu, ale hodnota 1,7 elektronu s největší pravděpodobností ukazuje na to, že by úplná elektrolýza roztoku vedla taktéž k příjmu 2 elektronů na molekulu analytu. Jak již bylo uvedeno v bakalářské práci, 2 elektrony přijímala i sloučenina **1**, která právě přijetím 2 elektronů zahajuje katalytický cyklus vylučování vodíku.<sup>15</sup>

Elektrochemické chování sloučeniny **1** ve vodném prostředí ukazovalo na proces katalytického vylučování vodíku i bez přítomnosti papainu.<sup>15</sup> AC voltametrické měření vodného roztoku papainu-**1** poskytlo oproti AC voltamogramům čistého papainu při použití frekvence 16 Hz hned 2 signály katalytického vylučování vodíku.<sup>15</sup> Ve vodných roztocích papainu-**2b** (AC voltamogram na obrázku Obr. 31 na straně 42) ani papainu-**3** (Obr. 34 na straně 44) nebyl podobný efekt pozorován.

Pro roztoky sloučeniny **1** (Obr. 11, str. 29) a papainu-**1** (Obr. 30, str. 41) bylo provedeno v této práci vyhodnocení křivek EIS. Výpočtem podle rovnice (11) byla určena pro roztok sloučeniny **1** při potenciálu -1,37 V rychlostní konstanta děje o hodnotě  $9,5 \times 10^{-2} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ . Hodnota  $R_{ct}$  byla při stejném potenciálu stanovena na  $159,7 \times 10^3 \Omega$ . Stejný výpočet byl proveden i pro EIS data pro roztok papainu-**1**. V tomto případě byla při potenciálu -1,54 V určena hodnota  $R_{ct}$  rovna  $626,5 \times 10^3 \Omega$  a hodnota rychlostní konstanty  $k_f$   $4,4 \times 10^{-2} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ . Na obrázku Obr. 52 na straně 59 jsou uvedeny grafy závislosti  $\ln k_f$  na hodnotě vkládaného potenciálu pro oba výše uvedené roztoky. Z vypočítaných hodnot rychlostní konstanty je patrné, že sloučenina **1** katalyzuje vylučování vodíku pomaleji, pokud je kovalentně vázaná v aktivním centru papainu.



**Obr. 52:** Vyhodnocení EIS - závislost  $\ln k_f$  na potenciálu: vlevo (zeleně) Sloučenina 1 ( $c = 1,75 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), vpravo (modře) papain-1 ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )

## 5.2. Adsorpce papainu

### 5.2.1. Adsorpce samoorganizovaných monovrstev

Samoorganizované monovrstvy byly připravovány dvěma odlišnými postupy. Standardní postup přípravy SAM (16-18 hodin při teplotě 60 °C bez přístupu kyslíku a s odstraněním fyzisorbovaných molekul) byl použit pro modifikaci AFM zlatých substrátů i QCM krystalů.

Doplňkový postup pro získání QCM záznamů pokrývání QCM krystalů vrstvou alkanthiolů při nižší teplotě v kratší době a za přístupu kyslíku poskytl orientační informaci o množství molekul tvořících jednotlivé SAM. Podle QCM záznamů se za těchto podmínek na povrch QCM krystalů zachytilo  $2,5 \times 10^{14} \text{ molekul}\cdot\text{cm}^{-2}$  v případě adsorpce 11-sulfanylundekan-1-thiolu a 11-sulfanylundekanové kyseliny a  $2,6 \times 10^{14} \text{ molekul}\cdot\text{cm}^{-2}$  v případě dodekan-1-thiolu. Podle citace Karpoviche a Blancharda<sup>44</sup> by jedna molekula alkanthiolu v SAM měla pokrývat plochu přibližně  $2,5 \times 10^{-15} \text{ cm}^2$  na dokonalém monokrystalickém povrchu zlaté elektrody. Pokrytí QCM krystalu je oproti maximálně dosažitelné hodnotě  $4 \times 10^{14} \text{ molekul}\cdot\text{cm}^{-2}$  menší.

Výška alkanthiolových samoorganizovaných monovrstev na zlatém monokrystalickém povrchu byla zjišťována metodou AFM NS. Teoretická délka jednotlivých alkanthiolových molekul byla vypočítána v programu Spartan 2 (Wavefunction Inc., USA). Výsledky výpočtů a měření výšky jednotlivých SAM jsou uvedeny v tabulce TAB. 1 na straně 60.

**TAB. 1: Hodnoty výšky SAM získané metodou AFM NS a teoretická délka molekul tvořících SAM**

SAM	Výška vrstvy (AFM NS) [nm]	Teoretická délka molekul (Spartan 2) [nm]
oktadekan-1-thiol	2,8 ± 0,5	2,4
kyselina 11-sulfanylundekanová	2,3 ± 0,4	1,5
11-sulfanylundekan-1-thiol	2,2 ± 0,4	1,6

Jak je patrné z tabulky TAB. 1, změřená výška alkanthiolových vrstev je vždy vyšší než teoreticky vypočítaná délka molekul. Ve výpočtu není sice zahrnuta délka vazby mezi atomem síry a zlatým substrátem, ale zároveň je nutné do úvah zahrnout sklon<sup>40,44,45</sup> alkanthiolových molekul v samoorganizované monovrstvě, který se udává o nezanedbatelné hodnotě 30°. Vrstvy SAM byly odstraněny metodou AFM NS hrotem tlačícím na povrch vzorku o síle do  $1 \times 10^{-7}$  N, přičemž tyto přitlačné síly nepoškozují povrch zlata. Přesnost AFM NS metody ovlivňuje přítomnost kontaminační vrstvy, která se tvoří téměř vždy na povrchu vzorků při měření na vzduchu. Odstranění jejího nepříznivého vlivu by přineslo měření AFM NS v roztoku.

Problematickou se ukázala volba dodekan-1-thiolu pro tvorbu SAM s methylovou koncovou skupinou. I přes důsledné dodržování postupu přípravy přesahovala výška získané SAM teoretickou hodnotu délky molekuly vypočtenou v programu Spartan 2 nejméně dvojnásobně. Zlepšení nepřineslo ani použití undekan-1-thiolu. Pravděpodobně se tedy nejednalo o problémy způsobené znečištěním látek dodaných firmou Sigma-Aldrich a použitých bez dalších úprav. Reprodukovatelné výsledky poskytlo až použití oktadekan-1-thiolu dodané od stejné firmy.

### **5.2.2. Adsorpce papainu na různě hydrofobní povrchy**

Pro studii adsorpce papainu na povrchy lišící se hydrofobicitou bylo vybráno celkem pět substrátů. Obdobná AFM studie adsorpce papainu na různé substráty byla uvedena už v bakalářské práci<sup>15</sup>, byla však doplněna a rozšířena. Série substrátů byla doplněna o čistý monokrystalický zlatý povrch. Zásadním doplněním je charakterizace samoorganizovaných vrstev, které byly navíc připraveny za důsledného dodržování standardního postupu. Dalším rozšířením pak bylo použití metody QCM.



Souhrn nejdůležitějších výsledků je pro lepší přehlednost uveden v tabulce TAB. 2.

**TAB. 2: Výsledky měření adsorpce papainu na jednotlivé substráty metodami AFM a QCM**

Substrát	Výška vrstvy (AFM NS) [nm]	Množství adsorbovaných molekul (QCM) [molekul·cm <sup>-2</sup> ] × 10 <sup>12</sup>
HOPG	2,9 ± 0,5	×××
Au	3,0 ± 0,4	6,1
Au-CH <sub>3</sub>	5,9 ± 1,1	5,5
Au-COOH	5,1 ± 0,9	10,5* / 2,9**
Au-CH <sub>2</sub> OH	6,1 ± 1,1	10,2

\* hodnota získaná při měření v čisté deionisované vodě; \*\* hodnota pro 0,1M KCl

Au-CH<sub>3</sub> = Au-S(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>; Au-COOH = Au-S(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>COOH; Au-CH<sub>2</sub>OH = Au-S(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>2</sub>OH

Na povrchu HOPG vytvořil papain nejednotlivou vrstvu o výšce  $2,9 \pm 0,5$  nm. Zejména v pravé části zobrazení topografie povrchu vzorku (Obr. 41 na straně 49) je jasně patrná oblast, která není pokryta proteinem. Menší nepokrytá místa jsou rozseta po celé zobrazené oblasti. Po aplikaci AFM NS se ukázalo, že tyto nepokryté oblasti jsou ve stejné rovině s oblastí očištěnou hrotem. Ačkoliv jsem se v bakalářské práci přikláníla k názoru, že se vrstva papainu tvořila postupně, tedy že se nejprve vytvořilo centrum, ke kterému se následně připojovaly další molekuly, zdá se nyní pravděpodobnější, že zde hraje roli přítomnost tzv. nanobublin (*angl.* nanobubbles) během adsorpce papainu na povrch HOPG. Pojmem nanobubliny se označují stabilní plynné nanostruktury vznikající na rozhraní hydrofobní pevné a hydrofilní kapalné fáze.<sup>68</sup> Právě papain dokáže zobrazit existenci těchto nanostruktur tím, že se adsorbuje preferenčně na oblasti povrchu HOPG substrátu nepokrytém nanobublinami. V jiné studii jsme prokázali, že papain představuje také vhodnou modelovou látku pro studium stability nanobublin na povrchu hydrofobního substrátu.<sup>69</sup>

Monovrstvu o výšce  $3,0 \pm 0,4$  nm, tedy o téměř stejné výšce jako na HOPG, tvořil papain na povrchu čistého monokrystalického zlata Au(111). I na zlatém substrátu pokrytém SAM oktadekan-1-thiolu a kyseliny 11-sulfanylundekanové se papain adsorboval za vzniku monovrstvy. Oproti zjištěným výškám vrstev alkanthiolů na zlatě (TAB. 1 na straně 60) vzrostla vrstva adsorpce papainu o přibližně 3 nm. Vrstva papainu adsorbovaná na zlatě modifikovaném 11-sulfanylundekan-1-olem zvýšila původní

alkanthiolovou vrstvou o téměř 4 nm. Ze známých krystalografických měření<sup>3</sup> rozměru papainu (6,6 nm × 5,1 nm × 3,2 nm) se dá usuzovat, že tyto hodnoty odpovídají monomolekulární vrstvě proteinu.

Záznamy QCM měření adsorpce papainu na krystaly modifikované při teplotě 25 °C byly špatně vyhodnotitelné, proto nebyly v této práci uvedeny. Alkanthiolové molekuly za těchto podmínek neutvořily samoorganizované monovrstvy s dostatečně nízkým počtem defektů.

Papain se adsorboval na QCM krystaly čisté i modifikované vrstvou SAM, které byly připraveny při teplotě 60 °C po dobu 12 až 18 hodin bez přístupu kyslíku. Pokrytí krystalu vrstvou alkanthiolů nezabránilo krystalu ve vibracích, a tyto i po modifikaci vibrovaly o frekvenci blízké nominální hodnotě 5 MHz. Pokles frekvence vibrujícího krystalu byl po vstříknutí temperovaného roztoku papainu rychlý a jasně znatelný (Obr. 43 na straně 50). Se změnou frekvence byl zároveň sledován i vývoj změny odporu, která nebyla v žádném zde uvedeném případě natolik vysoká, aby vylučovala využití Sauerbreyovy rovnice (16) pro výpočet množství adsorbovaných molekul.

Jak je z tabulky TAB. 2 na straně 61 patrné, papain se na povrchy čistého krystalu a krystalu pokrytého SAM dodekan-1-thiolu adsorboval v menším množství než na krystal modifikovaný SAM 11-sulfanylundekan-1-olu. Tato data odpovídají i výsledkům získaným metodou AFM.

Adsorpce papainu na povrch krystalu pokrytého samoorganizovanou monovrstvou kyseliny 11-sulfanylundekanové byla nejprve studována za stejných podmínek jako u ostatních krystalů. V roztoku 0.1M KCl došlo pouze k malému poklesu frekvence vibrujícího krystalu, a to i po zopakování experimentu. Protože adsorpce papainu na substráty používané pro měření ex-situ AFM proběhla ve vodě, byl pro lepší porovnání proveden i QCM experiment adsorpce papainu na krystal vibrující v čisté deionisované vodě při zachování všech podmínek, používaných při měření ostatních experimentů v QCM sérii. V tomto případě se na krystal zachytilo až 3,6 krát vyšší množství papainu než při adsorpci v 0,1M roztoku KCl (Obr. 49 na straně 54). Zásadní úlohu zde pravděpodobně hraje vliv rozdílného pH a iontové síly roztoků na koncové -COOH skupiny SAM a její interakce s molekulou proteinu. Vliv iontové síly a typu iontů elektrolytu (Hofmeisterova řada) na adsorpci papainu by mohl být použit v příští studii adsorpce tohoto proteinu na samoorganizované monovrstvě kyseliny 11-sulfanylundekanové.

## 6. Souhrn

Bylo prokázáno, že papain je schopen katalyzovat vylučování vodíku, a to i po jeho modifikaci kovalentně vázanými organometalickými komplexy ruthenia na jeho jedinou volnou -SH skupinu.

Katalytické účinky jednotlivých derivátů papainu byly studovány za využití chronopotenciometrie. Ukázalo se, že papain-**1** má vyšší katalytickou aktivitu než nemodifikovaný papain. Nejvyšší katalytická aktivita však byla zaznamenána pro papain-**3**. Porovnání katalytických vlastností organometalických sloučenin **1** a **3** ve volné formě pomocí cyklické voltametrie v protickém prostředí však není možné z důvodu nerozpustnosti sloučeniny **3** ve vodě.

Pro sloučeninu **1** ve volné formě i po navázání na papain byla provedena EIS studie. Prokázalo se, že sloučenina **1** je schopná katalyzovat vylučování vodíku ve volné formě s vyšší rychlostní konstantou  $k_f$  než po vazbě na papain.

Adsorpce ovlivňuje elektrochemické chování papainu a jeho derivátů a tím hraje zásadní roli i v procesu katalytického vylučování vodíku. Proto byla diplomová práce doplněna studií adsorpčních vlastností papainu na substrátech o různé hydrofobicitě. Pro účely studie byly optimalizovány podmínky pro tvorbu samoorganizovaných alkanthiolových monovrstev.

## 7. Seznam použité literatury

- <sup>1</sup> Otto H.-H., Schirmeister T.: *Chem. Rev.* *97* (1997) 133-171
- <sup>2</sup> Mitchel R. E. J., Chaiken I. M., Smith E. L.: *J. Biol. Chem.* *245* (1970) 3485-3492
- <sup>3</sup> Pickersgill R. W., Harris G. W., Garman E.: *Acta Cryst. B* *48* (1992) 59-67
- <sup>4</sup> Reetz T. M., Rentzsch M., Pletsch A., Maywald M., Maiwald P., Peyralans J. J.-P., Maichele A., Fu Y., Jiao N., Hollmann F., Mondière R., Taglieber A.: *Tetrahedron* *63* (2007) 6404-6414
- <sup>5</sup> Rajalakshmi N., Sundaram P. V.: *Protein Engng.* *8* (1995) 1039-1047
- <sup>6</sup> Ménard R., Khouri H. E., Plouffe C., Laflamme P., Dupras R., Vernet T., Tessier D. C., Thomas D. Y., Storer A. C.: *Biochemistry* *30* (1991) 5531-5538
- <sup>7</sup> Szabó A., Kotormán M., Laczkó I., Simon L. M.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* *41* (2006) 43-48
- <sup>8</sup> Nitsawang S., Hatti-Kaul R., Kanasawud P.: *Enzyme Microb. Technol.* *39* (2006) 1103-1107
- <sup>9</sup> Konno K., Hirayama Ch., Nakamura M., Tateishi K., Tamura Y., Hattori M., Kohno K.: *Plant J.* *37* (2004) 370-378
- <sup>10</sup> Haquette P., Talbi B., Canaguier S., Dagorne S., Fosse C., Martel A., Jaouen G., Salmain M.: *Tetrahedron Lett.* *49* (2008) 4670-4673
- <sup>11</sup> Haquette P., Dumat B., Talbi B., Arbabi S., Renaud J.-L., Jaouen G., Salmain M.: *J. Organomet. Chem.* *694* (2009) 937-941
- <sup>12</sup> Haquette P., Jacques J., Dagorne S., Fosse C., Salmain M.: *Eur. J. Inorg. Chem.* (2010) 5087-5095
- <sup>13</sup> Talbi B., Haquette P., Martel A., de Montigny F., Fosse C., Cordier S., Roisnel T., Jaouen G., Salmain M.: *Dalton Trans.* *39* (2010) 5605-5607
- <sup>14</sup> Haquette P., Talbi B., Barilleau L., Madern N., Fosse C., Salmain M.: *Org. Biomol. Chem.* *9* (2011) 5720-5727
- <sup>15</sup> Lachmanová Š.: Redoxní a katalytické vlastnosti modifikovaného papainu: Bakalářská práce PřF UK Praha, Katedra biochemie (2010)
- <sup>16</sup> Paleček E., Ostatná V.: *Electroanalysis* *19* (2007) 2383-2403
- <sup>17</sup> Doneux T., Ostatná V., Paleček E.: *Electrochim. Acta* *56* (2011) 9337-9343
- <sup>18</sup> Heyrovský M.: *Electroanalysis* *16* (2004) 1067-1073

- <sup>19</sup> Heyrovský J., Babička J.: *Coll. Czech. Chem. Commun.* 2 (1930) 370-379, cit. dle Heyrovský M.: *Electroanalysis 16* (2004) 1067-1073
- <sup>20</sup> Herles F., Vančura A.: *Bull. Internat. Acad. Sci.* 42 (1932) 4, cit. dle Heyrovský M.: *Electroanalysis 16* (2004) 1067-1073
- <sup>21</sup> Brdička R.: *Coll. Czech. Chem. Commun.* 8 (1936) 366-376, cit. dle Heyrovský J., Kůta J.: Katalytické proudy vodíku, v knize *Základy polarografie*, str. 280-295, Nakladatelství Československé akademie věd, Praha (1962)
- <sup>22</sup> Brdička R.: *Coll. Czech. Chem. Commun.* 5 (1933) 148-164, cit. dle Heyrovský M.: *Electroanalysis 16* (2004) 1067-1073
- <sup>23</sup> Millar G. J.: *Biochem. J.* 53 (1953) 385-393, cit. dle Heyrovský J., Kůta J.: Katalytické proudy vodíku, v knize *Základy polarografie*, str. 280-295, Nakladatelství Československé akademie věd, Praha (1962)
- <sup>24</sup> Stackelberg v. M., Hans W., Jentsch W.: *Z. Elektrochem.* 62 (1958) 839-850, cit. dle Heyrovský J., Kůta J.: Katalytické proudy vodíku, v knize *Základy polarografie*, str. 280-295, Nakladatelství Československé akademie věd, Praha (1962)
- <sup>25</sup> Mader P., Veselá V., Dorčák V., Heyrovský M.: *Coll. Czech. Chem. Commun.* 66 (2001) 397-410
- <sup>26</sup> Roach P., Farrar D., Perry C. C.: *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 8168-8173
- <sup>27</sup> Dupont-Gillain Ch. C., Fauroux C. M. J., Gardner D. C. J., Leggett G. J.: *J. Biomed. Mater. Res.* 67A (2003) 548-558
- <sup>28</sup> Anzai J., Guo B., Osa T.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 40 (1996) 35-40
- <sup>29</sup> Rixman M. A., Dean D., Macias C. E., Ortiz C.: *Langmuir* 19 (2003) 6202-6218
- <sup>30</sup> Denis F. A., Hanarp P., Sutherland D. S., Gold J., Mustin Ch., Rouxhet P. G., Dufrene Y. F.: *Langmuir* 18 (2002) 819-828
- <sup>31</sup> Li L., Chen S., Jiang S.: *Langmuir* 19 (2003) 2974-2982
- <sup>32</sup> Servoli E., Maniglio D., Aguilar M. R., Motta A., San Roman J., Belfiore L. A., Migliaresi C.: *Macromol. Biosci.* 8 (2008) 1126-1134
- <sup>33</sup> Yuan Y., Oberholzer M. R., Lenhoff A. M.: *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 165 (2005) 125-141
- <sup>34</sup> Wu Z., Zhang X., Zhang X., Sun J., Dong Y., Hu J.: *Chin. Sci. Bull.* 52 (2007) 1913-1919
- <sup>35</sup> Cullen D. C., Lowe Ch. R.: *J. Colloid Interface Sci.* 166 (1994) 102-108

- <sup>36</sup> Haward S. J., Shewry P. J., Miles M. J., McMaster T. J.: *Biopolymers* 93 (2009) 74-84
- <sup>37</sup> Marchin K. L., Berrie C. L.: *Langmuir* 19 (2003) 9883-9888
- <sup>38</sup> Contera S. A., Iwasaki H., Suzuki S.: *Ultramicroscopy* 97 (2003) 65–72
- <sup>39</sup> Kolivoška V., Gál M., Lachmanová Š., Janda P., Sokolová R., Hromadová M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 76 (2011) 1075-1087
- <sup>40</sup> Love Ch. J., Estroff L. A., Kriebel J. K., Nuzzo R. G., Whitesides G. M.: *Chem. Rev.* 105 (2005) 1103-1169
- <sup>41</sup> Bain C. D., Troughton E. B., Tao Y.-T., Evall J., Whitesides G. M., Nuzzo R. G.: *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 321-335
- <sup>42</sup> O'Dwyer C., Gay G., Viaris de Lesegno B., Weiner J.: *Langmuir* 20 (2004) 8172-8182
- <sup>43</sup> Schlenoff J. B., Li M., Ly H.: *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 12528-12536
- <sup>44</sup> Karpovich D. S., Blanchard G. J.: *Langmuir* 10 (1994) 3315-3322
- <sup>45</sup> Yamada R., Wano H., Uosaki K.: *Langmuir* 16 (2000) 5523-5525
- <sup>46</sup> Geiger W. E., Dale Hawley M.: Choosing and Performing an Electrochemical Experiment, v knize *Physical Methods of Chemistry, Volume II: Electrochemical Methods* (Rossiter B. W., Hamilton J. F. ed.) John Wiley & Sons, Inc., USA, str. 1-52 (1985)
- <sup>47</sup> Heyrovský M.: 27<sup>th</sup> International Seminar on Modern Electrochemical Methods, Jetřichovice, Āeská republika (2007)
- <sup>48</sup> Paleček E., Ostatná V.: *Analyst* 134 (2009) 2076-2080
- <sup>49</sup> Ostatná V., Kuralay F., Trnková L., Paleček E.: *Electroanalysis* 20 (2008) 1406-1413
- <sup>50</sup> Paleček E., Ostatná V., Masařík M., Bertoncini C. W., Jovin T. M.: *Analyst* 133 (2008) 76-84
- <sup>51</sup> Ostatná V., Paleček E.: *Electrochim. Acta* 53 (2008) 4014-4021
- <sup>52</sup> Paleček E., Ostatná V.: *Chem. Commun.* (2009) 1685-1687
- <sup>53</sup> Kalvoda R., Kůta J.: *Chem. listy* 74 (1980) 674-693
- <sup>54</sup> Pospíšil L.: *Electrochemical Impedance and Related Techniques*, v knize *Experimental Techniques in Bioelectrochemistry, Volume 3* (Brabec V., Waltz D., Milazzo G., ed.) Birkhäuser Verlag, Basel, str. 1-39 (1996)
- <sup>55</sup> Pospíšil L.: *Chem. listy* 74 (1980) 694-714
- <sup>56</sup> Bard A. J., Faulkner L. R.: *Techniques Based on Concepts of Impedance*, v knize *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons Inc., USA (2001) 368-416

- <sup>57</sup> Gerd K. Binnig: Atomic Force Microscope and Method for Imaging Surfaces with Atomic Resolution, U. S. Pat. 4724318 (1988)
- <sup>58</sup> Ošťádal I., Sobotík P.: Rastrovací tunelová mikroskopie (STM) a příbuzné techniky, v knize *Metody analýzy povrchů - iontové, sondové a speciální metody* (Frank L., Král J. ed.), Academia Praha, str. 275-297 (2002)
- <sup>59</sup> Janda P.: Rastrovací sondové mikroskopie v elektrochemii, v knize *Metody analýzy povrchů - iontové, sondové a speciální metody*, (Frank L., Král J. ed.), Academia Praha, str. 323-348 (2002)
- <sup>60</sup> Nyffenegger R. M., Penner R. M.: *Chem. Rev.* *97* (1997) 1195-1230
- <sup>61</sup> Kolivoška V., Gál M., Hromadová M., Lachmanová Š, Tarábková H., Janda P., Pospíšil L., Morovská Turoňová A.: *Colloid Surf. B - Biointerphases* *89* (2012) 213-219
- <sup>62</sup> Shahin V., Ludwig Y., Schafer C., Nikova D., Oberleithner H.: *J. Cell Sci.* *118* (2005) 2881-2889
- <sup>63</sup> Curie J., Curie P.: *Comput. Rend. Acad. Sci.* *91* (1880) 294-297 cit. dle Marx K. A.: *Biomacromolecules* *4* (2003) 1009-1120
- <sup>64</sup> Marx K. A.: *Biomacromolecules* *4* (2003) 1009-1120
- <sup>65</sup> Sauerbrey G.: *Z. Phys.* *155* (1959) 206-222 cit. dle Marx K. A.: *Biomacromolecules* *4* (2003) 1009-1120
- <sup>66</sup> <http://www.chempoint.cz/kremenne-mikrovahy-eqcm>, staženo 21. 3. 2012
- <sup>67</sup> Tomschik M., Havran L., Fojta M., Paleček E.: *Electroanalysis* *10* (1998) 403-409
- <sup>68</sup> Craig V. S. J.: *Soft Matter* *7* (2011) 40-48
- <sup>69</sup> Kolivoška V., Gál M., Hromadová M., Lachmanová Š, Pospíšil L.: *Biointerphases* *6* (2011) 164-170

