



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Živilė Buivydaitė

**AUKSO NANOSTRUKTŪROSE IMOBILIZUOTO BIOKATALIZATORIAUS
TYRIMAS**

**INVESTIGATION OF A BIOCATALYST IMMOBILIZED IN GOLD
NANOSTRUCTURES**

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX018

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2021

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU

Katedros vedėjas

(Parašas)

Jaunius Urbonavičius

(Vardas, pavardė)

2021-05-24

(Data)

Živilė Buivydaite

**AUKSO NANOSTRUKTŪROSE IMOBILIZUOTO BIOKATALIZATORIAUS
TYRIMAS**

**INVESTIGATION OF A BIOCATALYST IMMOBILIZED IN GOLD
NANOSTRUCTURES**

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX018

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas

lekt. Eimantas Ramonas

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Lietuvių kalbos konsultantas

lekt. dr. Vaida Buivydienė

(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2021

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijos studijų kryptis

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX018

TVIRTINU

Katedros vedėjas

(Parašas)

Jaunius Urbonavičius

(Vardas, pavardė)

2021-05-24

(Data)

BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO

UŽDUOTIS

..... Nr.

Vilnius

Studentui (ei) _____ Živilei Buivydaitei

(Vardas, pavardė)

Baigiamojo darbo tema:

AUKSO NANOSTRUKTŪROSE IMOBILIZUOTO BIODKATALIZATORIAUS TYRIMAS

Patvirtinta 2021 m. balandžio 14 d. dekanų potvarkiu Nr. 91fm

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2021 m. gegužės 24 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

Susintetinus skirtingo diametro sferines aukso nanodaleles įvertinti skirtingo dydžio aukso nanodalelių katalizuojamos gliukozės oksidacijos priklausomybę nuo substrato koncentracijos bei įvertinti aukso nanostruktūrose imobilizuotos gliukozės oksidazės katalizuojamos reakcijos greičio priklausomybę nuo aukso nanodalelių dydžio.

Vadovas _____

(Parašas)

lekt. Eimantas Ramonas

(Moksl. laipsnis/pedag.vardas, vardas, pavardė)

Užduotį gavau _____

(Parašas)

Živilė Buivydaitė

(Vardas, pavardė)

2019-10-01

(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk.
Data-....-....

Antrosios pakopos studijų **Nanobiotechnologijos** programos magistro baigiamasis darbas

Pavadinimas **Aukso nanostruktūrose imobilizuoto biokatalizatoriaus tyrimas**

Autorius **Živilė Buivydaitė**

Vadovas **Eimantas Ramonas**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Magistro baigiamajame darbe yra pateikiami gliukozės oksidacijos reakcijos, kurią katalizuoja aukso nanodalelės (AuND), gliukozės oksidazė (GOx) arba AuND ir GOx konjugatai, kinetikos tyrimų rezultatai. Atlikus chronoamperometrinę analizę panaudojant analitinę potenciostato sistemą su Klarko deguoniniu elektrodu, buvo iširta gliukozės oksidacijos reakcijos kinetikos priklausomybė nuo AuND dydžio. Tyrimo metu esant skirtingoms substrato – gliukozės – koncentracijoms bei AuND diametrai, buvo fiksuojamas deguonies koncentracijos pokytis, iš kurio buvo apskaičiuojamas pradinis reakcijos greitis. Nagrinėjant skirtumus nustatyta, jog didėjant AuND diametrai nuo 13 nm iki 50 nm pradinis reakcijos greitis didėja. Taip pat, GOx imobilizacija ant AuND paviršiaus fermento kinetikai reikšmingos įtakos neturi, o didėjant imobilizuotos GOx koncentracijai ant AuND paviršiaus, AuND katalizuojamos gliukozės oksidacijos reakcijos pradinis greitis mažėja.

Darbą sudaro šešios dalys: įvadas, mokslinės literatūros apžvalga, metodai ir priemonės, rezultatai ir jų aptarimas, išvados ir literatūra. Darbo apimtis – 49 p., 17 paveikslų, 4 lentelės ir 56 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: aukso nanodalelės, chronoamperometrija, gliukozės oksidacija, Klarko elektrodas

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of Fundamental Sciences
Department of Chemistry and Bioengineering

ISBN ISSN
Copies No.
Date-.....-.....

Master Degree Studies **Nanobiotechnology** study programme Master's Graduation Thesis

Title **Investigation of a Biocatalyst Immobilized in Gold Nanostructures**

Author **Živilė Buivydaite**

Academic supervisor **Eimantas Ramonas**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

The data of reaction kinetic studies of glucose oxidation, catalyzed by gold nanoparticles (AuNPs), glucose oxidase (GOx) or AuNPs and GOx conjugates, is submitted in the final thesis for the master's degree. The influence of AuNPs size on the kinetics of glucose oxidation reaction was investigated by chronoamperometric analysis using an analytical potentiostat system with a Clark's oxygen electrode. The experiment was carried out using different substrate – glucose – concentrations and AuNPs varying in diameter. During the analysis, the change of oxygen concentration was recorded, from which the initial reaction rate was calculated. Examining the differences, it was found that the initial reaction rate increases when AuNPs diameter increases from 13 nm to 50 nm. Also, immobilization of GOx on AuNPs surface has no significant effect on the kinetics of the enzyme, but increasing immobilized GOx concentration on the surface of AuNPs lowers the initial rate of the AuNPs catalyzed glucose oxidation reaction.

The work consists of six parts: introduction, review of scientific literature, methods and tools, results and their discussion, conclusions and literature. Thesis consists of: 49 pages, 17 figures, 4 tables and 56 bibliographical entries.

Keywords: gold nanoparticles, chronoamperometry, glucose oxidation, Clark electrode

TURINYS

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS	8
LENTELIŲ SĄRAŠAS	10
SANTRUMPOS	11
ĮVADAS	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1. Nanodalelių klasifikacija	14
1.2. Aukso nanodalelės	15
1.2.1. Paviršiaus plazmoninis rezonansas.....	16
1.3. Aukso nanodalelių sintezės metodai.....	17
1.3.1. Palaipsninė aukso nanodalelių sintezė.....	18
1.4. Nanozimai.....	19
1.4.1. Aukso nanodalelių katalizinės savybės	20
1.5. Biojutikliai	21
1.5.1. Gliukozės biojutikliai ir gliukozės oksidazė.....	21
1.5.2. Klarko elektrodas.....	23
1.5.3. Aukso nanodalelių panaudojimas gliukozės biojutikliuose.....	24
2. METODAI IR PRIEMONĖS.....	26
2.1. Įranga ir reagentai	26
2.2. Aukso nanodalelių sintezė	27
2.3. Aukso nanodalelių bendras plotas	29
2.4. Fermentas.....	29
2.4.1. Fermento imobilizavimas	30
2.5. Celės tūrio apskaičiavimas.....	30

2.6.	Klarko elektrodo paruošimas	31
2.7.	Elektrocheminės analizės metodas	32
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	33
3.1.	Skirtingo dydžio aukso nanodalelių sintezė.....	33
3.2.	Aukso nanodalelių katalizuojama gliukozės oksidacija bei reakcijos kinetiniai parametrai	34
3.3.	Gliukozės oksidazės katalizuojama gliukozės oksidacija bei reakcijos kinetiniai parametrai	37
3.4.	Aukso nanodalelių ir gliukozės oksidazės komplekso katalizuojama gliukozės oksidacija bei reakcijos kinetiniai parametrai	38
	IŠVADOS	43
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	44

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1.1 pav. Likurgo taurė: A – šviesai atspindėjus taurė žalia, B – šviesai praėjus pro taurę – rausva. Adaptuota iš (Loos, 2015)	15
1.2 pav. A – koloidinio AuND tirpalo spalvos prilausomybė nuo AuND dydžio, B – skirtingo AuND dydžio įtaka smailių pasiskirstymui UV-vis spektre. Adaptuota iš (Ajdari ir kt., 2017)	16
1.3 pav. Įvairių formų AuND: A – sfera, B – lazdelė, C – prizmė, D – piramidė, E – žvaigždė, F – kubas. Adaptuota iš (Lou-Franco ir kt., 2020)	17
1.4 pav. Palaipsninės AuND sintetės eigos priklausomybė nuo aukso pirmtako ir tirpale esančių AuND santykio. Adaptuota iš (Bastús ir kt., 2011).....	19
1.5 pav. Iliustracinis GOx vaizdas. Mėlyna ir šviesiai mėlyna – baltymo monomerai, geltona – kofaktorius FAD, raudona – aktyvusis centras. Adaptuota iš (Janati-Fard ir kt., 2016)	22
1.6 pav. Bendroji deguoninio Klarko elektrodo schema. Adaptuota iš (Button, 2015)	23
2.1 pav. AuND sintezės schema: A – palaipsninė AuND sintezė iki 30 nm, B – palaipsninė AuND sintezė iki daugiau nei 30 nm. Adaptuota iš (Bastús ir kt., 2011).....	27
2.2 pav. Iliustracinis ant AuND imobilizuotos GOx pagal [GOx]/[AuND] santykį (0–118) vaizdas 30	
2.3 pav. Elektrocheminei analizei naudojamas Klarko deguoninis elektrodas	31
3.1 pav. Skirtingo diametro AuND UV-vis spektrai.	33
3.2 pav. Deguonies sunaudojimo gliukozės oksidacijos metu katalizuojant AuND priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos (0-500 mM) ir AuND dydžio: A – 13 nm AuND, B – 19 nm AuND, C – 32 nm AuND, D – 50 nm AuND.....	34
3.3 pav. AuND katalizuojamos gliukozės oksidacijos reakcijos pradinio greičio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos ir AuND dydžio. Punktyrinės linijos žymi duomenų atitikimą Michaelis-Menten modeliui.....	35
3.4 pav. AuND kinetinių parametrų priklausomybė nuo AuND diametro.....	36
3.5 pav. GOx katalizuojamos gliukozės oksidacijos reakcijos pradinio greičio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos. Punktyrinė linija žymi duomenų atitikimą Michaelis-Menten modeliui. $R^2 = 0,992$	38

3.6 pav. Laisvo fermento katalizinis aktyvumas: A – deguonies sunaudojimo gliukozės oksidacijos metu katalizuojant GOx priklausomybė nuo santykinės GOx koncentracijos, B – v_0 priklausomybė nuo santykinės GOx koncentracijos; $R^2 = 0,995$	39
3.7 pav. AuND ir gliukozės oksidazės komplekso katalizuojamos gliukozės oksidacijos v_0 priklausomybė nuo [GOx]/[AuND] santykio (1–118) bei AuND diametro. Kontrolė – laisva GOx 40	
3.8 pav. Ant ND imobilizuoto fermento aktyvumui įtakos turintys veiksniai. Adaptuota iš (Ding ir kt., 2015).....	41

LENTELIŲ SĄRAŠAS

2.1 lentelė. Parametrai skirtingo dydžio AuND centrifugavimui. Adaptuota iš (Walkey, 2014)	28
3.1 lentelė. Eksperimentiškai nustatyti parametrai skirtingo dydžio AuND centrifugavimui.....	34
3.2 lentelė. Skirtingo dydžio aukso nanodalelių kinetiniai parametrai (K_M ir v_{max}) ir atitikimas Michaelis-Menten modeliui (R^2).....	36
3.3 lentelė. Skirtingo dydžio aukso nanodalelių k_{cat} ir k_{cat}/K_M reikšmės	37

SANTRUMPOS

AuND	Aukso nanodalelės
AuND-GOx	Aukso nanodalelių ir gliukozės oksidazės konjugatas
FAD	Flavino adenino dinukleotidas
FADH ₂	Redukuotos formos flavino adenino dinukleotidas
GOx	Gliukozės oksidazė, fermentas
k_{cat}	Katalizinė konstanta
K_M	Michaelis-Menten konstanta
ND	Nanodalelės
OT	Optinis tankis
PPR	Paviršiaus plazmoninis rezonansas
UV-vis	UV ir regimoji šviesa
v_0	Pradinis reakcijos greitis
v_{max}	Maksimalus reakcijos greitis

IVADAS

Koloidinės metalų dalelės, lyginant su metalų luitais, domina tyrėjus dėl nanoskalės lygmenyje įgaunamų naujų fizikinių, optinių ar cheminių savybių, praplečiant jų panaudojimo ribas (Khan ir kt., 2019). Neseniai buvo nustatyta, jog auksas, nors yra mažai reaktyvus metalas, koloidinės būsenos pasižymi gana dideliu paviršiaus kataliziniu reaktyvumu. Tyrimais buvo įrodyta, kad aukso nanodalelių (AuND) katalizinės savybės yra panašios į fermentų – peroksidazių, katalazių, reduktazių bei oksidazių, todėl AuND gali būti vadinamos nanozimais (Lou-Franco ir kt., 2020). AuND nanoziminės savybės gali būti priklausomos nuo reakcijos sąlygų: pH ir temperatūros. Katalizinės AuND savybės taip pat priklauso nuo pačių dalelių paviršiaus chemijos ir morfologijos. Šiame baigiamajame magistro darbe plačiau tyrinėjama sferinių AuND dydžio įtaka reakcijos kinetikai gliukozės oksidacijos metu.

Kadangi AuND pritaikomumas *in vivo* yra ribotas dėl toksiškumo tyrimų trūkumo, AuND plačiai taikomos biojutiklių kūrimui. Dalelės yra patrauklios dėl paprastos sintezės metodikos, mažos kainos bei suderinamumo su biologinės kilmės medžiagomis (fermentai, DNR ir RNR). Dėl šių savybių AuND panaudojamos biomedicininės ar biocheminės analizės tikslais. Pavyzdžiui, AuND gali būti pritaikomos gliukozės biojutikliuose. Juose AuND įprastai naudojamos kaip paviršius fermentui – gliukozės oksidazei (GOx) – imobilizuoti. Buvo pastebėta, jog imobilizuotas fermentas pasižymėjo didesniu kataliziniu aktyvumu negu laisvoje formoje (D. Li ir kt., 2007; Xiao ir kt., 2003). Tačiau žinant faktą, kad AuND yra nanozimai, svarbu įvertinti, ar tokių reakcijų metu AuND taip pat daro įtaką reakcijos kinetikai. Todėl šiame darbe tyrinėjama AuND ir GOx konjugatų (AuND-GOx) vykdomos gliukozės oksidacijos reakcijos kinetika.

Naujausi tyrimai rodo, jog AuND taip pat pasižymi dideliu antibakteriniu ir priešgrybeliniu poveikiu prieš daugelį patogeninių mikroorganizmų. Dėl to AuND siekiama pritaikyti odontologijoje, kosmetikos bei maisto pramonėje. Ypač daug dėmesio skiriama AuND panaudojimui nanopakuočių kūrimo dėl jų terapinių ir antibakterinių savybių (Paidari ir Ibrahim, 2021). Tačiau toks AuND taikymas vis dar yra tyrimų stadijoje, kadangi trūksta informacijos apie dalelių poveikį žmogui. Taigi, išsamūs AuND tyrimai, ypač AuND ir baltymų sąveikos, yra būtini siekiant jas saugiai naudoti.

Šio darbo **tikslas** – įvertinti aukso nanostruktūrose imobilizuoto biokatalizatoriaus reakcijos greičio priklausomybę nuo aukso nanodalelių dydžio.

Darbo tikslui įgyvendinti yra suformuluoti **uždaviniai**:

1. Susintetinti skirtingo dydžio aukso nanodaleles ir optimizuoti sintezės metodiką;
2. Įvertinti skirtingo dydžio nanodalelių ir gliukozės oksidazės katalizuojamos gliukozės oksidacijos priklausomybę nuo substrato koncentracijos;
3. Įvertinti aukso nanostruktūrose imobilizuotos gliukozės oksidazės katalizuojamos reakcijos greičio priklausomybę nuo aukso nanodalelių dydžio.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

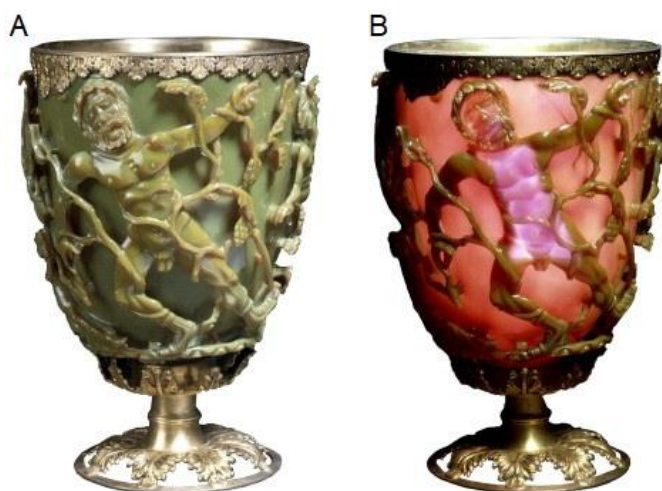
1.1. Nanodalelių klasifikacija

Nanotechnologijos yra plati ir tarpdisciplininė tyrimų sritis, kuri per pastaruosius kelerius metus sparčiai augo visame pasaulyje. Šis mokslas yra paremtas nanoskalės lygmens medžiagomis – nanodalelėmis. Nanodalelės (ND) yra plati medžiagų klasė, į kurią įeina kietosios dalelės, kurių vienas matmuo yra mažesnis nei 100 nm (Laurent ir kt., 2010). Įvairios ND yra skirstomos į tam tikras kategorijas atsižvelgiant į jų morfologiją, dydį, chemines ir kitas savybes. Remiantis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis, literatūroje pateikiamos kai kurios gerai žinomos nanodalelių klasės: anglies, metalų, keramikinės, puslaidininkės, polimerinės ir lipidinės ND. Anglies ND klasėje pagrindinės nanomedžiagos yra geru elektriniu laidumu bei mechaniniu atsparumu pasižymintys fulerenai bei anglies nanovamzdeliai (Astefanei ir kt., 2015). Metalų ND yra sintetamos tik iš įvairių metalų pirmtakų, tokių kaip Au, Ag, Cu ir kt. Tokios dalelės dėl paviršiaus plazmoninio rezonanso charakteristikų turi unikalias optoelektrines savybes, kurios labai priklauso nuo dalelių struktūros, dydžio ir formos (Dreaden ir kt., 2012). Keramikinės ND yra neorganinės, nemetalinės kietosios medžiagos. Jos gali būti amorfinės, polikristalinės, tankios, porėtos arba tuščiavidurės formos, todėl šios ND sulaukia didelio tyrėjų susidomėjimo, nes jos gali būti panaudojamos tokiose srityse kaip katalizė, fotokatalizė, dažų fotodegradacija ir dar daugelyje kitų sričių (Thomas ir kt., 2015). Puslaidininkės ND pasižymi metalų ir nemetalų savybėmis ir jos yra labai svarbios medžiagos fotokatalizėje, fotooptikoje ir elektroniniuose prietaisuose (Khan ir kt., 2019). Polimerinės ND paprastai yra organinės kilmės. Tokios dalelės yra sferinės formos ir sudarytos iš šerdies bei paviršinių medžiagų. Lipidinės ND taip pat kaip ir polimerinės yra sferinės formos ir turi lipidinę šerdį bei lipofilines molekules, įprastai ištirpusias matricos viduje. Kadangi šiose dalelėse yra lipidinių fragmentų, jie efektyviai naudojami daugelyje biomedicinos sričių, kaip kad terapinių vaistų pernešime, kuris turi perspektyvų gydyme nuo vėžinių susirgimų (Puri ir kt., 2009). Taigi, įvairios nanodalelės tampa vis svarbesnės dėl jų ypatingų optinių, elektrinių ir struktūrinių savybių, kuriomis paprastai atskiros molekulės ar iš jų sudarytos kietos medžiagos nepasižymi. Ypač šių dalelių svarba pasireiškia tuo, kad, pavyzdžiui, dalelių dydis gali turėti įtakos fizikinėms ir cheminėms jų savybėms, todėl tokių nanodalelių tyrimų sritys ir taip pat pritaikymo galimybės yra labai plačios (Khan ir kt., 2019). Šiame darbe tikslui įgyvendinti buvo pasirinktos

tauriųjų metalų ND, t. y. – aukso nanodalelės (AuND) – kurios yra laikomos stabiliausiomis iš visų metalų ND.

1.2. Aukso nanodalelės

Datuoja, kad aukso gavyba buvo pradėta penktame tūkstantmetyje pr. m. e. Numanoma, kad „tirpus“, t. y., koloidinis, auksas buvo pradėtas naudoti tik V–IV amžiuje pr. m. e. Tuo metu ir vėliau koloidinis auksas buvo naudojamas tiek gydomaisiais, tiek estetiniais tikslais, pavyzdžiui, vitražiniam stiklui gaminti bei keramikai dažyti (Daniel ir Astruc, 2004). Turbūt garsiausias koloidinio aukso panaudojimo mene pavyzdys yra IV amžiuje, romėnų sukurta karaliaus Likurgo taurė (angl. *Lycurgus cup*). Ši taurė garsi savo neįprastomis savybėmis keisti spalvą. Esant įprastam apšvietimui, kai šviesa atsispindi nuo taurės, ši yra žalios spalvos (1.1 pav. A), o šviesai praėjus pro ją stiklas tampa rausvas (1.1 pav. B) (Loos, 2015).



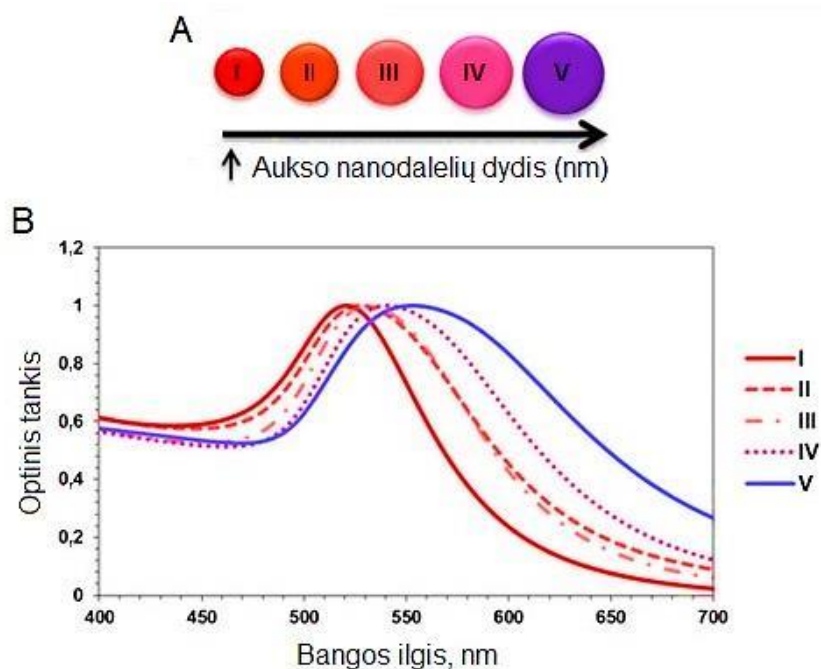
1.1 pav. Likurgo taurė: A – šviesai atsispindėjus taurė žalia, B – šviesai praėjus pro taurę – rausva. Adaptuota iš (Loos, 2015).

Šios ypatingos taurės paslaptis buvo išaiškinta tik 1990 m. po to, kai mokslininkai ištyrė taurę atominės jėgos mikroskopu. Nustatyta, kad spalvas lemia taurės stikle išsisklaidžiusios iki 100 nm dydžio nanodalelės. Apskaičiuota, kad stikle yra apie 66,2 % sidabro ND, 31,2 % aukso ND ir 2,6 % vario ND. Matoma raudona spalva yra AuND absorbuotos šviesos (~520 nm bangos ilgyje) rezultatas. Violetinė spalva atsiranda dėl didesnių dalelių absorbcijos, o žalia spalva priskiriama šviesos sklaidai koloidinėmis sidabro ND, kurių dydis didesnis nei 40 nm (Loos, 2015).

Nuo to laiko pažangos koloidinio aukso tyrimuose nebuvo daug, kol galiausiai XIX a. įvyko mokslinis proveržis. M. Faradėjus sukūrė pirmuosius aukso koloidų pavyzdžius, kai jis ant mikroskopo stiklelių tvirtino plonus aukso lapų lakštus (Tweney, 2006). Toliau, R. Kochas atrado *in vitro* bakteriostatines koloidinio aukso savybes, dėl kurių buvo sukurta terapija gydyti tuberkuliozę ir reumatoidinį artritą (Fernández-Moreira ir kt., 2019). Visa tai atlikta iki 1951 m. kai Turkevich su bendraautorais atliko išsamius koloidinio aukso susidarymo ir nukleacijos proceso tyrimus (Turkevich ir kt., 1951), kurie sukūrė pagrindą naujam aukso nanomedžiagų, taikomų skirtingose srityse, įskaitant biomediciną, padidėjimui (Lou-Franco ir kt., 2020).

1.2.1. Paviršiaus plazmoninis rezonansas

Dėl dalelių dydžio atsirandantis spalvinis pokytis yra aiškinamas paviršiaus plazmoninio rezonanso sąvoka. Paviršiaus plazmonas yra apibūdinamas kaip kolektyvinis krūvininkų tankio svyravimas, kuris susidaro metalų ir dielektrikų riboje (Daniel ir Astruc, 2004). Paviršiaus plazmoninis rezonansas (PPR) stebimas, kai tiesiškai poliarizuotos šviesos bangos atsispindi nuo metalo paviršiaus, taip šviesos energiją perduodant metalų paviršiuje esantiems elektronams ir sukeliant jų virpesius (Guo, 2012). Taigi, keičiantis dalelių dydžiui keičiasi ne tik koloidinio tirpalo spalva, bet ir sugerties spektras (1.2 pav.).



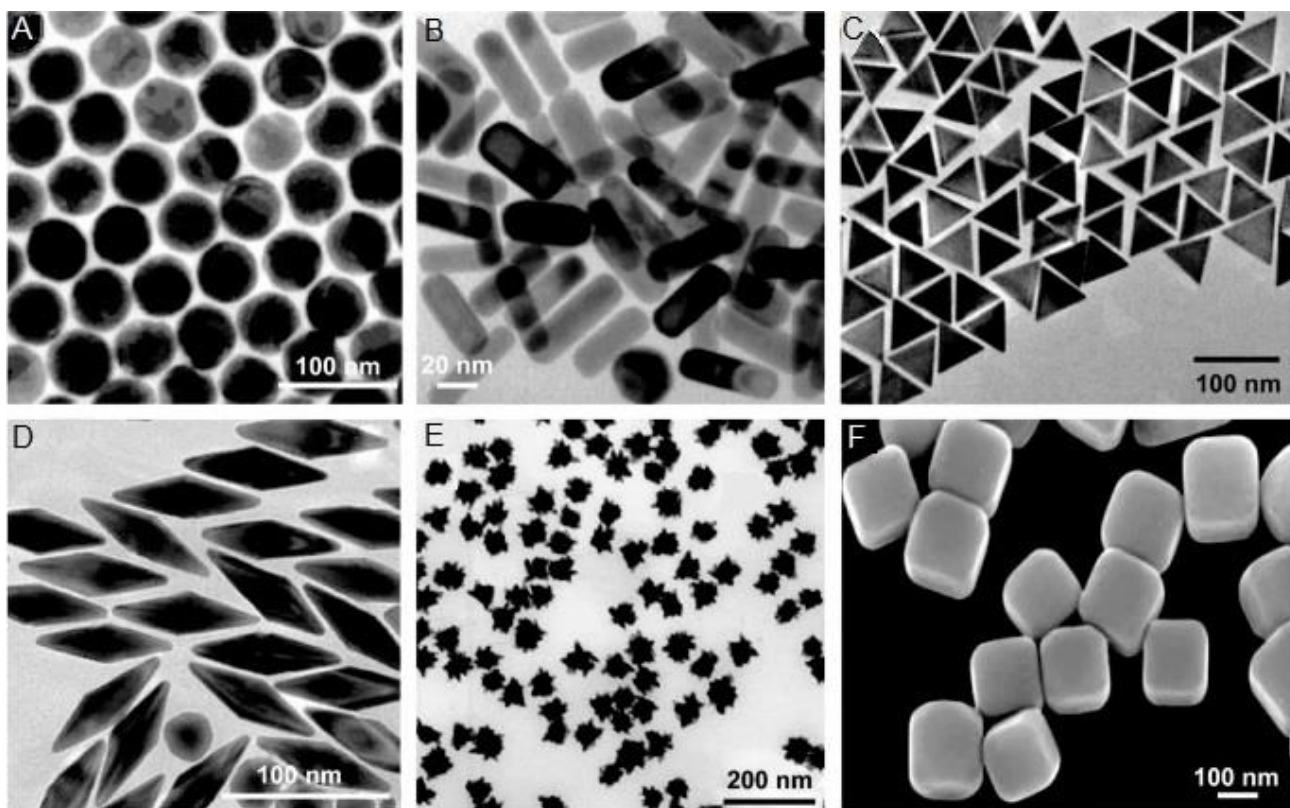
1.2 pav. A – koloidinio AuND tirpalo spalvos prilausomybė nuo AuND dydžio, B – skirtingo AuND dydžio įtaka smailių pasiskirstymui UV-vis spektre. Adaptuota iš (Ajdari ir kt., 2017).

Todėl UV ir regimosios šviesos spektrai gali būti naudojami nustatyti ND dydžiams, kadangi PPR intensyvumas didėja, kai elektromagnetinės bangos ilgis yra didesnis už ND dydį. Kalbant apie AuND, įprastai jų koloidinio tirpalo spalva kinta nuo raudonos iki violetinės didėjant dalelių dydžiui, o smailė sugerties spektre pasislenka į ilgabangių bangų pusę (Ajdari ir kt., 2017).

PPR savybės gali būti pritaikomos daugelyje įvairių sričių. Dažniausiai šis efektas pritaikomas biojutiklių kūrime, katalizėje, mikroskopijoje ląstelių vaizdinimui, taip pat Ramano spektroskopijoje jautrumui padidinti (Guo, 2012).

1.3. Aukso nanodalelių sintezės metodai

Koloidiniam AuND tirpalui paruošti yra sukurta labai daug metodų. Literatūroje yra aprašomi fizikiniai, cheminiai, fotocheminiai ir net biologiniai metodai (Sengani ir kt., 2017). Renkantis įvairių tipų metodikas, skirtingų reakcijoms reikalingų medžiagų derinius bei reakcijos sąlygas (temperatūra, pH ir kt.), galima gauti skirtingų savybių AuND, pavyzdžiui, skirtingos morfologijos (1.3 pav.).



1.3 pav. Įvairių formų AuND: A – sfera, B – lazdelė, C – prizmė, D – piramidė, E – žvaigždė, F – kubas. Adaptuota iš (Lou-Franco ir kt., 2020).

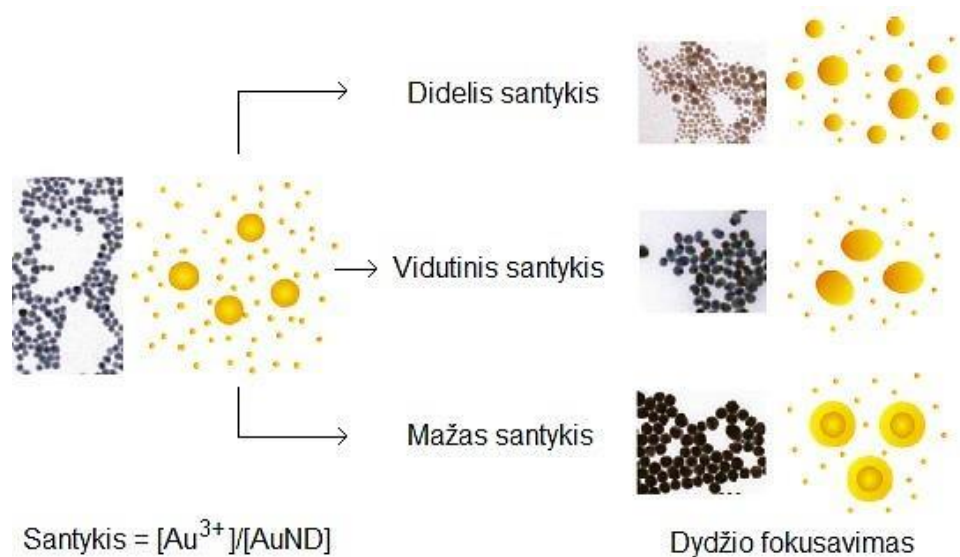
Dažniausiai AuND yra sferos, kubo ar lazdelės formos (Nikoobakht ir El-Sayed, 2003; Ruan ir kt., 2014; Sun ir Xia, 2002), tačiau yra publikacijų, kuriose parodyta, kad galima gauti ir prizmės, žvaigždės ar piramidės formos AuND (Ha ir kt., 2007; Kumar ir kt., 2007; Lou-Franco ir kt., 2020).

Labai dažnu atveju dėl metodikos paprastumo AuND paruošimui laboratorinėmis sąlygomis yra naudojama cheminė sintezė. Šiais laikais cheminių AuND sintezės metodų yra gausu, o iš jų pagrindiniu yra laikomas „Turkevich“ metodas, kuris yra vienas pirmųjų detaliai aprašytų. Sinteze yra pagrįsta tetrachloro aukso rūgšties redukcija natrio citratu vandeninėje fazėje (Turkevich ir kt., 1951). Šiuo metodu paprastai galima susintetinti iki 20–30 nm dydžio AuND. 1973 m. mokslininkas G. Frensas metodą papildė ir pateikė metodiką, skirtą susintetinti pasirinkto dydžio AuND (nuo 16 nm iki 147 nm). Ši sintezė paremta tetrachloro aukso rūgšties ir natrio citrato santykio pokyčiais. Esant pastoviam reagentų moliniam santykiui, pradinė tetrachloro aukso rūgšties koncentracija galutiniam AuND dydžiui reikšmingos įtakos neturi, tačiau mažinant natrio citrato koncentraciją yra galimybė gauti didesnio dydžio AuND (Frens, 1973). Taip pat yra įvardijama keletas veiksnių, kurie potencialiai gali turėti reikšmingos įtakos galutiniam AuND dydžiui, tai – reakcijos metu palaikoma temperatūra, tirpalo pH bei reagentų pridėjimo į reakcijos mišinį eiliškumas (Zhao ir kt., 2013). Apskritai, „Turkevich“ metodas yra gana paprastas ir greitas bei našus, kadangi susintetintos AuND yra sferinės, stabilios ir gana monodispersiškos, tačiau metodas patikimiausias yra AuND sintezei tarp 15 nm ir 30 nm dydžio (Dong ir kt., 2020). Taip pat išskiriama, kad natrio citratu stabilizuotų AuND paviršius yra lengviau modifikuojamas įvairiais ligandais, o tai suteikia galimybes kurti įvairius kompleksus – AuND gali būti konjuguojamos su peptidais, lipidais, antikūnais, fermentais, vaistų arba DNR molekulėmis (Daniel ir Astruc, 2004).

1.3.1. Palaipsninė aukso nanodalelių sintezė

Kitas galimas AuND sintezės metodas yra palaipsninė sintezė. Šiuo metodu galima susintetinti įvairaus dydžio AuND, o pati sintezė yra lengvai kontroliuojama. Dauguma tokios sintezės metodų remiasi pirmine ir antrine sinteze. Pirmosios sintezės metu įprastai yra susintetinamos apie 10 nm dydžio AuND, remiantis „Turkevich“ arba analogišku metodu. Susintetinus pirmines daleles esminis žingsnis yra sumažinti reakcijos mišinio temperatūrą, pavyzdžiui, iki 90 °C (Bastús ir kt., 2011) arba iki kambario temperatūros (Leng ir kt., 2015) prieš pradedant antrinę sintezę. Žemiau tirpalo virimo ribos sumažinta temperatūra užtikrina, jog antrinės sintezės metu neprasidėtų antrinė mažesnių AuND nukleacija, o kiekvieno papildomo reagentų pridėjimo metu didėtų jau esamos AuND (Bastús ir kt., 2011). Antrinė sintezė pradedama reakcijos

mišinį papildant tetrachloroauro rūgštimi bei natrio citratu (Bastús ir kt., 2011) arba kitu reduktoriumi, pavyzdžiui, askorbo rūgštimi (Jana ir kt., 2001). Taip pat labai svarbu, kad kiekvieno reagentų pridėjimo etapo metu būtų parinktos tokios reagentų koncentracijos, kad būtų išlaikomas mažas priedamo aukso pirmtako, įprastai tetrachloroauro rūgšties, ir pirminio tirpalo dalelių, santykis (1.4 pav.). Esant mažam santykiui, vyksta dydžio fokusavimas, dėl ko kiekvieno sintezės etapo eigoje vyksta tolygus AuND didėjimas. Kitais atvejais, kai santykis vidutinis arba didelis, AuND gali įgyti ne sferinę, o ovalią formą bei gali prasidėti antrinė mažesnių ND nukleacija (Bastús ir kt., 2011).



1.4 pav. Palaipsninės AuND sintezės eigos priklausomybė nuo aukso pirmtako ir tirpale esančių AuND santykio. Adaptuota iš (Bastús ir kt., 2011).

Taigi, palaipsninės sintezės metodu, tinkamai kontroliuojant reakcijos tirpalo temperatūrą bei reagentų koncentraciją, gali būti gaunamos gana didelio dydžio AuND, kurios išlaiko tiek stabilumą, tiek monodispersiškumą, todėl šis metodas naudojamas baigiamajame darbe.

1.4. Nanozimai

Nanodalelės, pasižyminčios fermento savybėmis, vadinamos nanozimais, arba nanokatalizatoriais. Nanozimai, lyginant su natūraliais fermentais, sąlyginai yra pranašesni. Biologiniai fermentai yra makromolekuliniai katalizatoriai, katalizuojantys biologinių sistemų biochemines reakcijas. Nors kiekvienas fermentas atlieka tam tikrą funkciją, vis dėlto turi keletą trūkumų, kurie riboja jų platų pritaikymą, t. y., fermentams reikalingos griežtos fiziologinės sąlygos katalizinėms funkcijoms atlikti, jie pasižymi ribotu stabilumu nepalankiomis aplinkos sąlygomis,

taip pat santykinai didelės sintezės ar išskyrimo ir gryninimo išlaidos (Blanco ir Blanco, 2017). Nanokatalizatoriai šiuo atveju pasižymi gana paprastais sintezės metodais, mažesne kaina, didesniu stabilumu, geru kataliziniu efektyvumu bei teikia galimybę paviršiaus modifikacijoms, kurios potencialiai galėtų pagerinti nanokatalizatorių veikimą (Singh, 2019). Taigi šiame kontekste nanozimai yra plačiai tyrinėjami, siekiama ištirti jų panaudojimo galimybes biojutiklių kūrimo, imunologiniuose tyrimuose, ligų diagnostikoje ir terapijoje, apsaugoje nuo oksidacinio streso bei teršalų pašalinime (Zhou ir kt., 2017).

1.4.1. Aukso nanodalelių katalizinės savybės

Yra žinoma, kad kaip ir kitos metalų ND, AuND yra reaktyvios ir pasižymi nanozimų savybėmis. Atlikus platesnius tyrimus buvo nustatyta, kad AuND gali katalizuoti tokias reakcijas, kurias įprastai katalizuoja tokie fermentai, kaip peroksidazės, oksidazės, katalazės ar reduktazės ir kt. (Lou-Franco ir kt., 2020). Taip pat, Comotti ir kt. atliktame tyrime parodyta, kad gliukozės oksidacijos metu ~3,6 nm AuND buvo 6 kartus reaktyvesnės už kitų metalų – sidabro, platinos, paladžio ir vario – ND (Comotti ir kt., 2004).

D-gliukozė yra labiausiai paplitęs monosacharidas, dėl ko tai yra viena iš priežasčių, kodėl gliukozės oksidacija yra intensyviausiai tiriamas procesas AuND tyrimuose. Tačiau gliukozė nėra vienintelė molekulė, kurią gali oksiduoti AuND. L-arabinozė, D-galaktozė ir D-laktozė, kurie yra sąlyginai reti cukrūs gaunami iš hemiceliuliozių, taip pat yra geriausiai oksiduojami 3–6 nm dydžio AuND (T. Kusema ir Yu. Murzin, 2013).

Tyrimais buvo parodyta, kad AuND oksiduoja β -D-gliukozę molekulinio deguonimi, susidarant D-gliukono-1,5-laktonui ir vandenilio peroksidui (Comotti ir kt., 2006). Susidarę produktai ir pati reakcijos eiga yra panaši su GOx vykdoma katalize. Taip pat, AuND vykdoma katalizė atitinka tipinę Michaelis-Menten reakcijos kinetiką (Beltrame ir kt., 2006), todėl AuND katalizinės savybės gali būti aprašomos įprastais fermentinėms reakcijoms kinetiniais parametrais – K_M , v_{max} ir k_{cat} (Lang ir kt., 2014; Singh, 2019). Atradus šias AuND savybes, buvo atlikta nemažai tyrimų, siekiant ištirti AuND oksidacines galimybes ir pačių dalelių panaudojimo ribas, taip pat taikymą biojutiklių kūrimo ir tobulinime. Dėl to įvairiuose tyrimuose buvo eksperimentuojama su pagal skirtingą sintezės metodiką gautomis ar modifikuoto paviršiaus AuND, taip pat su skirtingos formos ar dydžio AuND, buvo vertinama temperatūros bei pH įtaka AuND katalizinėms savybėms (Karra ir kt., 2016; Lou-Franco ir kt., 2020).

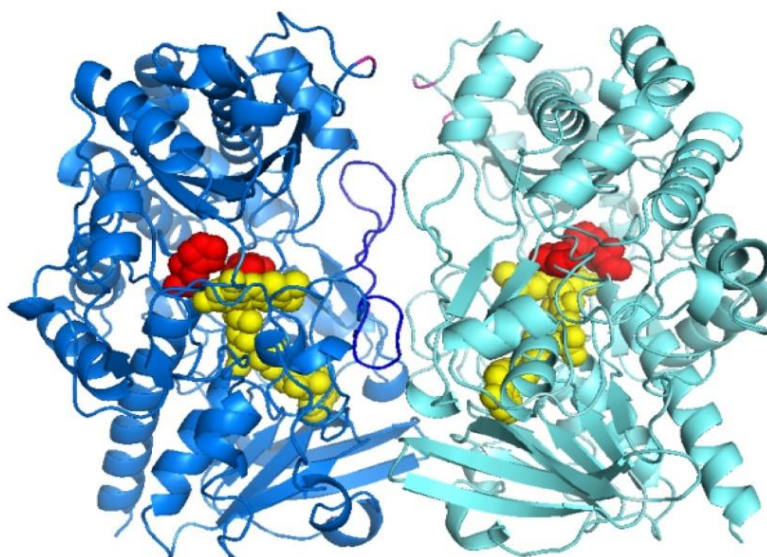
1.5. Biojutikliai

Biojutikliais yra vadinami analitiniai prietaisai – elektrodai, kurie biologinį atsaką paverčia elektriniu signalu. Siekiama, kad biojutikliai būtų labai specifiški, nepriklausomi nuo fizinių parametrų, tokių kaip pH ir temperatūra, ir būtų pakartotinai naudojami. Tam pasiekti būtinos tarpdisciplininės chemijos, biologijos ir inžinerijos žinios (Mehrotra, 2016). Yra išskiriamos trys pagrindinės biojutiklio dalys: 1 – atpažinimo elementai, kurie diferencijuoja tikslines molekules, 2 – keitiklis, kuris įvykusią atpažinimo reakciją paverčia išmatuojamu signalu, ir 3 – signalo apdorojimo sistema. Molekulinio atpažinimo elementai apima receptorius, fermentus, antikūnus, nukleorūgštis bei mikroorganizmus. Keitiklio perduodamas signalas gali būti elektrocheminis (pavyzdžiui, potenciometrinis, amperometrinis), optinis, termometrinis, pjezoelektrinis ir magnetinis (Yoo ir Lee, 2010). Fermentiniai biosensoriai yra sukuriama imobilizacijos metodais, t. y., fermentai adsorbuojami elektrodo paviršiuje silpnų nekovalentinių ryšių dėka bei per joninį arba kovalentinį ryšį (Datta ir kt., 2013). Šiuo tikslu dažniausiai naudojami fermentai yra oksidoreduktazės, oksidazės, peroksidazės ir aminooksidazės (Mehrotra, 2016).

1.5.1. Gliukozės biojutikliai ir gliukozės oksidazė

Fermentiniai amperometriniai gliukozės biojutikliai yra labiausiai paplitę prietaisai tiek rinkoje, tiek mokslinėse institucijose dėl gero jų jautrumo, daugkartinio naudojimo, lengvos priežiūros, ir taip pat dėl mažų sąnaudų. Anot Yoo ir Lee, gliukozės biojutikliai paprastai yra pagrįsti dviejomis fermentų šeimomis – gliukozės oksidazėmis (GOx) (1.5 pav.) ir gliukozės dehidrogenazėmis. Šie fermentai skiriasi redokso potencialu, kofaktoriais, taip pat selektyvumu gliukozei (Yoo ir Lee, 2010).

GOx yra standartinis biojutiklių fermentas, pasižymintis santykinai didesniu gliukozės selektyvumu lyginant su dehidrogenazėmis. Fermentas lengvai gaunamas, gana pigus, gali atlaikyti didesnius pH svyravimus, joninės jėgos bei temperatūrinius pokyčius nei daugelis kitų fermentų (Yoo ir Lee, 2010). GOx gali būti išgryninama iš įvairių mikroskopinių grybų, bet įprastai moksliniams tyrimams yra gaunama iš *Aspergillus* arba *Penicillium* genties grybų (Bankar ir kt., 2009).



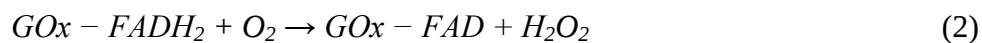
1.5 pav. Iliustracinis GOx vaizdas. Mėlyna ir šviesiai mėlyna – baltymo monomerai, geltona – kofaktorius FAD, raudona – aktyvusis centras. Adaptuota iš (Janati-Fard ir kt., 2016).

Iš literatūros žinoma, kad GOx yra homodimerinis baltymas, sudarytas iš dviejų identiškų domenų, kurių kiekvieno molekulinė masė yra apie 80 kDa (Leskovac ir kt., 2005). Sudėtimi iš *Aspergillus niger* išskirta GOx yra glikoproteinas, kurio manozės tipo angliavandenių kiekis sudaro 10–16 % baltymo molekulinės masės. Abu fermento subvienetai turi po vieną nekovalentiškai prisijungusią kofermento FAD molekulę, kuri katalizės metu veikia kaip redokso nešiklis (Leskovac ir kt., 2005).

Pagrindinis gliukozės biojutiklio veikimo principas remiasi tuo, kad GOx katalizuoja β -D-gliukozės oksidaciją molekuliniu deguonimi iki D-gliukono-1,5-laktono ir vandenilio peroksido. GOx kataliziniam veikimui reikalingas kofaktorius flavino adenino dinukleotidas (FAD). FAD veikia kaip pradinis elektronų akceptorius ir yra redukuojamas iki $FADH_2$ (1).



Kofaktorius regeneruojamas reaguojant su deguonimi, susidarant vandenilio peroksidui (2).



Toliau reakcijos metu vandenilio peroksidas yra oksiduojamas elektrodo paviršiuje ir generuojamas elektrinis signalas (3).

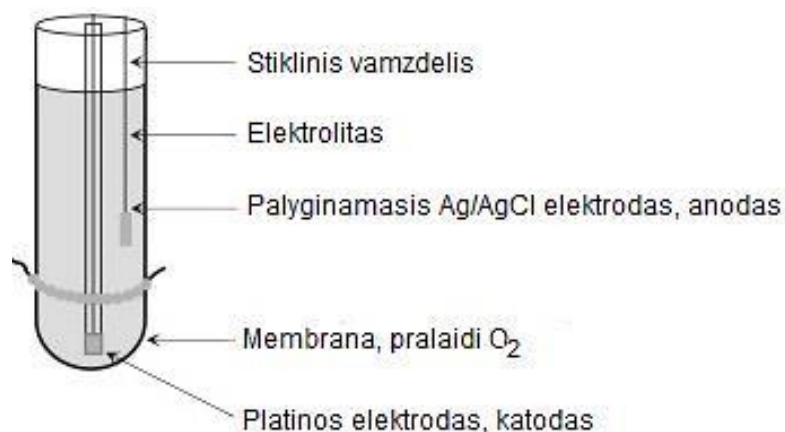


Tokiu principu veikiantys gliukozės biojutikliai yra vadinami pirmosios kartos biojutikliais. Tokiam elektrocheminiam gliukozės jutimui matuojamas deguonies arba vandenilio peroksido koncentracijos pokytis (Yoo ir Lee, 2010).

Taip pat yra išskiriami antrosios bei trečiosios kartos biojutikliai. Antrosios kartos biojutikliuose įprastai elektronų pernašai į elektrodą yra naudojami dirbtiniai, iš dalies toksiški mediatoriai arba nanomedžiagos, todėl tokie jutikliai nėra priklausomi nuo deguonies, vandenilio peroksido ar kitų galimų tirpale esančių medžiagų. Trečiosios kartos biojutiklių veikimas yra paremtas tiesiogine elektronų pernaša iš fermento į elektrodą be jokių tarpinių etapų nenaudojant mediatorinių medžiagų (Rahman ir kt., 2010).

1.5.2. Klarko elektrodas

Šiame darbe tyrimams naudojamas pirmosios kartos deguoninis elektrodas, generuojantis elektrocheminį, t. y., amperometrinį signalą. Toks elektrodas plačiau yra žinomas kaip Klarko elektrodas (1.6 pav.).



1.6 pav. Bendroji deguoninio Klarko elektrodo schema. Adaptuota iš (Button, 2015)

1954 m. Clarkas sukonstravo pirmąją membrana padengtą deguonies elektrodą, kuriame tiek anodas, tiek katodas buvo atskirti nuo mėginio nelaidžia, deguoniui selektyvia, membrana. Jis išbandė įvairias membranas, iš kurių pasirinko būtent polietileno membraną, kuri geriausiai riboja pralaidumą deguoniui, sumažino deguonies išeikvojimą iš mėginio, todėl buvo įmanoma kiekybiškai atlikti mėginių elektrocheminius matavimus (Severinghaus, 2004). Klarko deguoniniame elektrode katodas ir anodas yra panardinami į elektrolitinį tirpalą, tačiau tarp mėginio ir metalinių elektrodų

nėra elektrinio kontakto – būtent pralaidi membrana, o ne elektrolitas, kontroliuoja deguonies difuziją tarp mėginio ir elektrodo (Button, 2015; Severinghaus, 2004).

Įvairiems metabolitams aptikti skirtas Klarko elektrodas gali turėti papildomą membraną su imobilizuotu fermentu, kuris liečiasi su deguoniui laidžia membrana (Sawyer, 2003). Vienas iš pavyzdžių būtų Klarko elektrodas, padengtas membrana imobilizuota GOx. Išmatuojamas junginys čia yra deguonis, kurio koncentracija keičiasi keičiantis fermento aktyvumui, savo ruožtu, priklausomai nuo analitės, t. y., gliukozės koncentracijos. Laikantis tokio biojutiklio principo, buvo naudojamos ir kitos oksidazės, daugiausiai maisto pramonėje, nustatant biologiškai svarbius junginius, įskaitant fruktozę, laktozę, etanolį, glicerolį, fenolio junginius, L-glutamą ir cholesterolį. (Filip ir Tkac, 2018).

1.5.3. Aukso nanodalelių panaudojimas gliukozės biojutikliuose

Tarp įvairių nanomedžiagų, kurios potencialiai gali būti naudojamos kaip fermentinių biojutiklių komponentai, AuND sulaukia gana daug tyrėjų dėmesio. Šios dalelės dėl tokių savybių kaip didelis paviršiaus plotas bei biosuderinamumas gali užtikrinti fermentų stabilumą imobilizacijos metu bei išlaikyti jų biologinį aktyvumą. Kitaip tariant, fermentų imobilizavimas ant įvairių paviršių reikalingas, kad juos būtų galima praktiškai panaudoti baltymui nenatyvioje aplinkoje, pavyzdžiui, biojutikliuose, aplinkos remediacijos medžiagose, bioreaktoriuose ir kitose taikomosiuose biotechnologijų srityse (Ding ir kt., 2015).

Yra žinoma, kad GOx pI vertė yra 4,2, todėl terpės pH vertei esant didesnei nei 4,2, baltymas yra neigiamai įkrautas. Tos AuND, kurios sintetamos redukuojant tetrachloroauro rūgštį natrio citratu, taip pat yra neigiamai įkrautos terpės pH esant 7,0, todėl elektrostatinės jėgos tarp AuND ir GOx iš esmės nėra labai stiprios. Kita vertus, GOx kofaktorius FAD fermente yra išsidėstęs baltymo hidrofobinėje dalyje, dėl ko šis regionas galimai yra artimesnis AuND, kurios taip pat pasižymi hidrofobiškumu. (Ramanaviciene ir kt., 2009). Be to, AuND turi savybę greitai ir tiesiogiai elektrodui perduoti fermentinės reakcijos metu susidariusius elektronus, tad tokiuose biojutikliuose nėra būtinas mediatorinės medžiagos naudojimas, kas supaprastina biojutiklių veikimą ir panaudojimą (Y. Li ir kt., 2010).

Šiais laikais gliukozės biojutiklių poreikis vis dar auga. Jų naudojimo ribos yra plačios ir apima maisto pramonę, mediciną bei kitas pramonės šakas. Siekiama, kad naujai kuriami biojutikliai būtų kur kas stabilesni, jautresni, pasižymėtų ilgesniu naudojimo laiku bei mažesne kaina. AuND panaudojimo kuriant gliukozės biojutiklius tyrimai buvo pradėti gana neseniai. Moksliniuose

žurnaluose jau yra nemažai publikacijų, įvertinančių AuND poveikį gliukozės oksidacijos metu, tačiau trūksta duomenų, kokios įtakos reakcijos kinetikai galėtų turėti nanodalelių dydis (Karra ir kt., 2016). Yra žinoma, kad įvairių nanodalelių, įskaitant ir AuND, dydžio skirtumas lemia jų optinių, mechaninių, elektrinių bei kt. savybių pokyčius, todėl aukso nanodalelių dydžio reikšmės gliukozės oksidacijos metu tyrimai turi realių perspektyvų ieškant kelio inovatyvių biojutiklių link (Dreaden ir kt., 2012).

2. METODAI IR PRIEMONĖS

2.1. Įranga ir reagentai

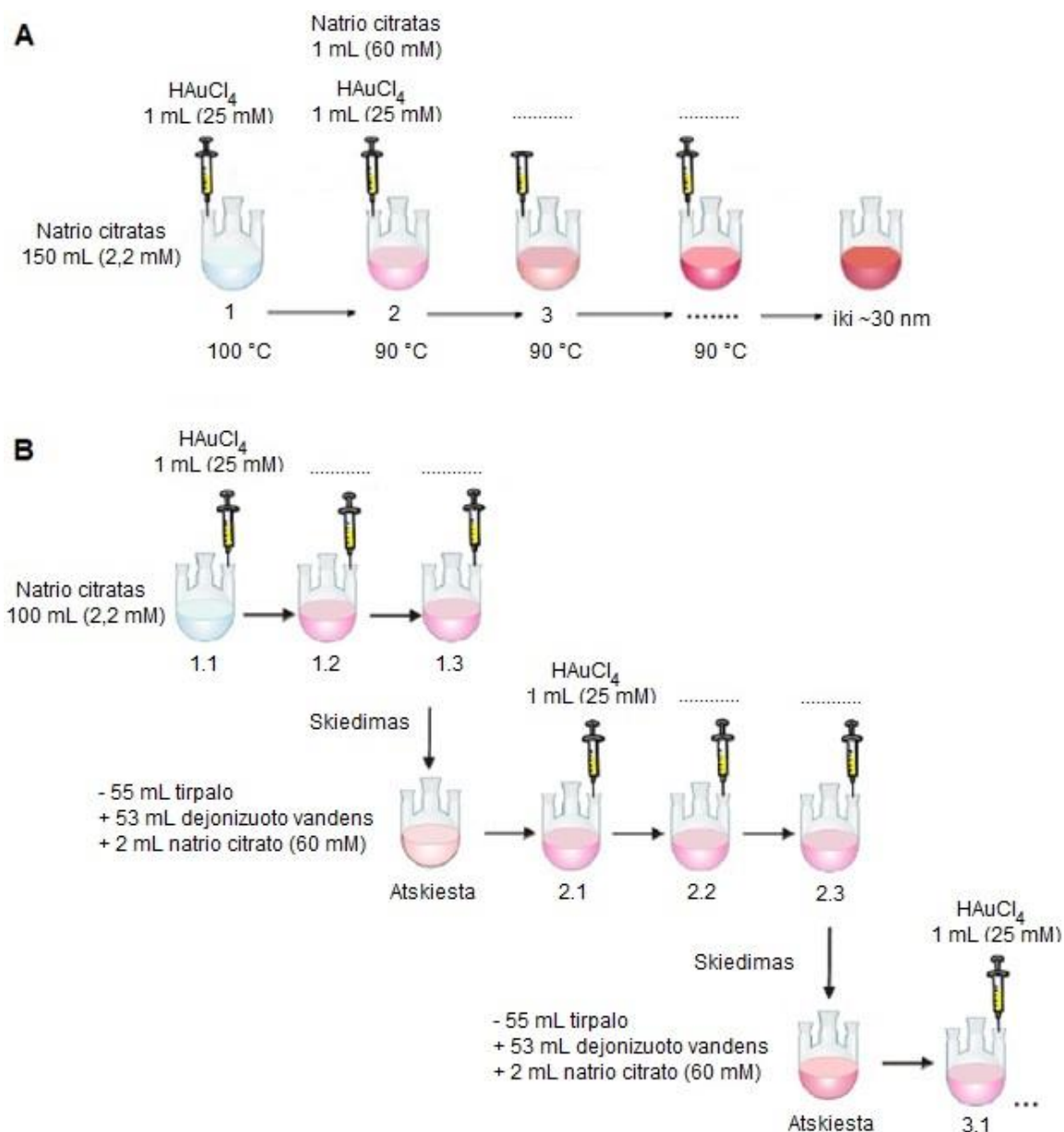
Baigiamojo magistro darbo metu naudota laboratorinė įranga bei reagentai:

- Laboratorinė įranga:
 - UV ir regimosios šviesos spektrofotometras („Thermo evolution 300“);
 - Analitinė potenciostato sistema su Klarko deguoniniu elektrodu („Bioanalizės sistemos“);
 - Termostatas („Lauda Eco Silver AL-12“);
 - Termopurtyklė „MKR 13“;
 - pH matuoklis („HI 211“);
 - Svarstyklės („Kern abj 220-4m“);
 - Centrifuga („Sigma 1-14“);
 - Ultragarso vonelė („Bandelin sonorex RK 31“);
 - Magnetinė maišyklė–kaitlentė („C-MAG H77“);
 - Reguliuojamo tūrio pipetės („Eppendorf“);
 - Kiti standartiniai laboratoriniai indai bei įrankiai.
- Reagentai:
 - Tetrachloroauro rūgšis ($\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$);
 - Natrio citratas ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$);
 - „Karališkasis vanduo“ ($\text{HNO}_3 + 3\text{HCl}$);
 - Kalio dihidrofosfatas (KH_2PO_4);
 - Kalio hidrofosfatas (K_2HPO_4);
 - Kalio chloridas (KCl);
 - Natrio šarmas (NaOH);
 - Sieros rūgštis (H_2SO_4);
 - Gliukozė ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$);
 - Kalio ferocianidas ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$).

Darbo metu visi tirpalai buvo gaminami naudojant dejonizuotą vandenį, gautą naudojant Crystal E Ultrapure sistemą. Reikiamas buferinių tirpalų pH buvo reguliuojamas įpilant natrio šarmo.

2.2. Aukso nanodalelių sintezė

Metodika aukso nanodalelių (AuND) sintezei buvo adaptuota iš Bastus ir kt. mokslinės publikacijos (Bastús ir kt., 2011). Pateikiamo metodo metu AuND sintezė vyksta palaipsniui iki reikiamo dydžio (2.1 pav.).



2.1 pav. AuND sintezės schema: A – palaipsninė AuND sintezė iki 30 nm, B – palaipsninė AuND sintezė iki daugiau nei 30 nm. Adaptuota iš (Bastús ir kt., 2011).

Standartiškai sintezei naudojami stiklinis indas bei magnetukas yra plaunami traukos spintoje „Karališkuoju vandeniu“ ir po to išskalaujami dejonizuotu vandeniu. AuND sintezė pradedama, kai yra užverdamos natrio citratas (2,2 mM, 150 mL) ir į jį įpilama tetrachloroauro rūgštis (25 mM, 1 mL), nuolatos tirpalą maišant. Šiuo būdu įprastai yra gaunamos apie 10 nm dydžio dalelės. Tuomet tirpalo temperatūra yra sumažinama iki 90 °C. Toliau atliekamas žingsnis – į paruoštą pradinį tirpalą įpilama natrio citrato (60 mM, 1 mL) ir tetrachloroauro rūgštis (25 mM, 1 mL). Vykstant sintezei šis žingsnis kartojamas kas 30 min, kol palaipsniui gaunamas tyrimams reikiamas AuND dydis, tačiau apytiksliai tik iki 30 nm (2.1 pav., A).

Siekiant gauti didesnio nei 30 nm dydžio daleles, sintezė vykdoma pagal eigą, schemiškai parodytą 2.1 pav. B dalyje. Pradiniame žingsnyje taip pat yra užverdamos natrio citratas (2,2 mM, 100 mL) ir į jį įpilama tetrachloroauro rūgštis (25 mM, 1 mL), nuolatos tirpalą maišant. Tačiau toliau yra atliekami du žingsniai, kuriuose reakcijos tirpalas papildomas tik tetrachloroauro rūgštimi. Po šių žingsnių tirpalas turi būti skiedžiamas ekstrahuojant dalį tirpalo (55 mL) ir pakeičiant ją dejonizuotu vandeniu (53 ml) bei papildant natrio citratu (60 mM, 2 ml). Toliau vėl pridedama tetrachloroauro rūgštis (2.1 pav. B). Sintezė tokiu principu gali būti tęsiama iki reikiamo dydžio. Šiuo metodu galima pasiekti daleles iki 200 nm dydžio. Rezultate gaunamos gana monodispersiškos bei homogeniškos AuND.

Pasibaigus AuND sintezei gautos dalelės yra koncentruojamos 1,5 ml mėgintuvėliuose centrifuguojant, parametrus parenkant pagal literatūrą (Walkey, 2014) ir eksperimentiškai, atsižvelgiant į koncentruojamų dalelių dydį (2.1 lentelė).

2.1 lentelė. Parametrai skirtingo dydžio AuND centrifugavimui. Adaptuota iš (Walkey, 2014).

AuND diametras, nm	Centrifugavimo greitis, g	Centrifugavimo laikas, min
5	100000	30
10	17000	30
15	15000	30
20	6500	30
30	4500	30
40	2500	30
50	2000	30
60	1125	30

Po centrifugavimo supernatantas yra nupilamas ir ant dugno nusėdusios AuND yra atsargiai surenkamos į atskirą mėgintuvėlį. Sukoncentravus AuND, jos bent 15 min. palaikomos ultragarso vonelėje. Po sintezės AuND galutinai įvertinamos spektrofotometriškai ir apskaičiuojamas jų dydis bei koncentracija pagal Haiso ir kt. mokslinėje publikacijoje pateiktą protokolą (Haiss ir kt., 2007). Susintetintos dalelės iki panaudojimo tyrimuose laikomos atokiai nuo tiesioginės saulės šviesos bei 4 °C temperatūroje.

2.3. Aukso nanodalelių bendras plotas

Atliekant skirtingo dydžio AuND elektrocheminę analizę svarbus veiksnys yra į celę įvedamų AuND kiekis. Eksperimentiškai buvo nustatyta, kad siekiant tinkamų matavimų į celę tikslinga įvesti tokį kiekį AuND, kad celėje būtų palaikomas vienodas AuND bendras plotas matuojant skirtingo diametro daleles. Kadangi AuND sintezės metu yra gaunamos sferinės formos dalelės, vienos AuND plotas yra apskaičiuojamas pagal sferos ploto formulę (4):

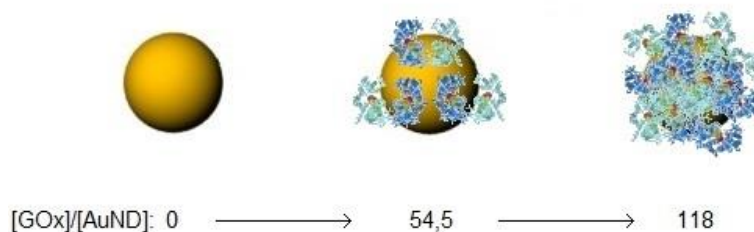
$$S = 4\pi r^2 \quad (4)$$

Bendras AuND plotas apskaičiuojamas vienos AuND plotą padauginus iš visų mėginyje esančių AuND skaičiaus. Remiantis skaičiavimais ir eksperimentiniais matavimais, tyrimams parinktas bendras AuND plotas buvo $1,4 \cdot 10^{15} \text{ nm}^2$.

2.4. Fermentas

Baigiamajame darbe tyrimai buvo atlikti naudojant gliukozės oksidazę (GOx). Fermentas liofilizuotų miltelių forma buvo įsigytas iš Sigma-Aldrich. Naudojama GOx buvo išskirta iš pelėsinio grybo *Aspergillus niger*.

Pasigamintas koncentruotas fermento tirpalas iki tyrimų buvo laikomas šaldiklyje -18 °C temperatūroje. Prieš darbą fermentas buvo atitirpintas ir laikomas lede iki tyrimų pabaigos. Skirtingų matavimų metu, tiek tiriant laisvą fermentą, tiek AuND ir GOx konjugatus (AuND-GOx), koncentruotas fermento tirpalas buvo atskiedžiamas iki reikiamos koncentracijos. Reikiama koncentracija buvo apskaičiuojama taip, kad GOx ir AuND santykis AuND-GOx konjugatuose kistų nuo 0 iki 118 (2.2 pav.). Taip buvo pasiekiamos sąlygos, kai didėjant santykiui fermento koncentracija ant AuND paviršiaus didėja, kol paviršius pilnai imobilizuojamas GOx (didžiausias AuND-GOx santykis).



2.2 pav. Iliustracinis ant AuND imobilizuotos GOx pagal $[GOx]/[AuND]$ santykį (0–118) vaizdas.

2.4.1. Fermento imobilizavimas

AuND-GOx konjugatai buvo gaunami skirtingais santykiais sumaišant fermento ir dalelių tirpalus, kai kintamoji konjugatų dalis buvo fermento koncentracija, o AuND plotas išliko pastovus. GOx imobilizacija AuND paviršiuje įyksta dėl elektrostatinės adsorbcijos, todėl metodas yra paprastas ir nereikalaujantis papildomų medžiagų naudojimo ar specialių sąlygų. Elektrostatinė adsorbcija įvyksta dėl silpnų molekulinį sąveikų tarp GOx ir AuND paviršiaus. Jas daugiausiai lemia hidrofobinės ir Van der Valso jėgos, vandeniliniai ryšiai (Datta ir kt., 2013).

2.5. Celės tūrio apskaičiavimas

Elektrocheminių matavimų metu esminiai komponentai yra potenciostatas, Klarko deguoninis elektrodas ir celė. Į celę įstatant elektrodą, šis išstumia dalį skysčio. Šiuo atveju reikia apskaičiuoti galutinį celės tūrį, kadangi tai svarbu norint apsiskaičiuoti kiek prasiskiedžia analizės matavimų metu. Žinant galutinę AuND arba GOx koncentraciją celėje matavimų metu, galima apskaičiuoti tokius katalitinius reakcijos parametrus, kaip kad k_{cat} .

Celės tūrio apskaičiavimas buvo vykdomas šiais esminiais žingsniais:

1. Pasigaminamas neapibrėžtos koncentracijos kalio ferocianido tirpalas;
2. Matavimams skirta celė užpildoma dejonizuotu vandeniu, įstatomas elektrodas ir atsargiai nusausinamas celės paviršius;
3. Į celę per šoninę angą, atsargiai, kad nesusidarytų oro burbulų, pipete įleidžiama 200 μL pasigaminto kalio ferocianido tirpalo;
4. Iš celės pipete, per šonines angas ir neišimant elektrodo, paimama 100 μL prasiskiedusio tirpalo;
5. Spektrofotometru esant 420 nm bangos ilgiui iš pradžių pamatuojamas koncentruoto kalio ferocianido tirpalo optinis tankis;

6. Iš celės paimtas atsiskiedęs tirpalas pamatuojamas tokiu pačiu skiedimu;
7. Apskaičiuojama, kiek kartų skiriasi abiejų tirpalų optinis tankis;
8. Celės tūris apskaičiuojamas sudauginus spektrofotometriškai nustatytų optinių tankių santykį su tūriu koncentruoto kalio ferocianido tirpalo, kuris buvo supiltas į celę.

2.6. Klarko elektrodo paruošimas

Elektrocheminei analizei Klarko deguoninis elektrodas (2.3 pav.) yra paruošiamas keletu esminių žingsnių:

1. Elektrodas ir jo plastikinio induko vidus labai gerai išvalomi;
2. Induko gale uždedama reikiamo dydžio polietileninė membrana ir užspaudžiama gumine tarpine;
3. Iki induko viršaus pripilama Klarko buferio (100 mM K_2HPO_4 , 100 mM KCl, pH 7,0);
4. Į užpildytą induką įstatomas elektrodas ir tvirtai užsukamas;
5. Tuomet nuimami tarpinė ir membrana, ir uždedamas naujai iškirptas membranos gabaliukas, kuris užtvirtinamas su tarpine bei papildomai apsukamas valu. Labai svarbu membraną uždėti taip, kad tarp membranos ir elektrodo neliktų oro burbuliukų, taip pat negali būti nelygių vietų;
6. Galiausiai elektrodas apvyniojamas parafilmu taip, kad įstačius į celę laikytųsi tvirtai.



2.3 pav. Elektrocheminei analizei naudojamas Klarko deguoninis elektrodas.

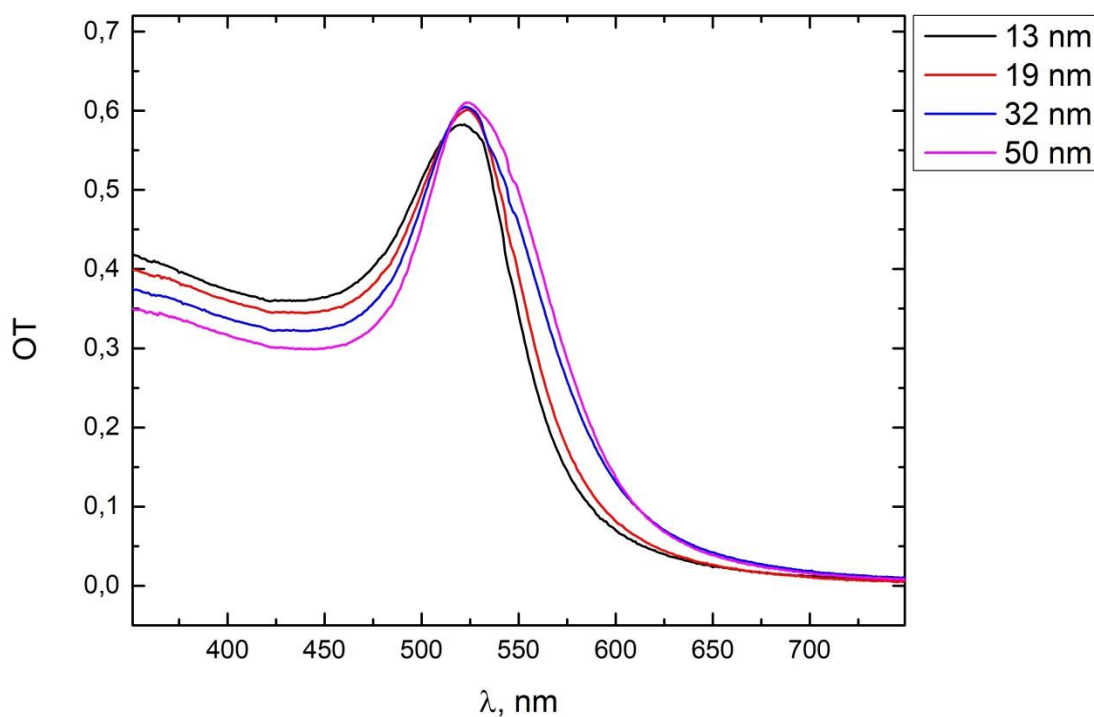
2.7. Elektrocheminės analizės metodas

Elektrocheminiam GOx, AuND bei fermento, imobilizuoto aukso nanostruktūrose, – AuND-GOx – aktyvumo įvertinimui naudojamas chronoamperometrijos metodas. Chronoamperometrija yra elektrocheminės analizės metodas, kurio metu matuojamas srovės stiprio kitimas laike esant pastoviam elektrodo potencialui (Franklin ir kt., 2016). Šiam metodui magistro darbe yra naudojami potenciostatas, Klarko deguoninis elektrodas ir celė. Matavimų pradžioje celė, kurioje palaikoma 25 °C temperatūra ir pastovus maišymas, yra užpildoma fosfatinio buferinio tirpalo (pH 7,0, 10 mM) ir gliukozės tirpalu (pH 7,0, 5-500 mM). Reakcijos kinetikos nuo substrato koncentracijos įvertinimui gliukozės koncentracija buvo parinkta nuo 5 mM iki 500 mM. Kaip kontrolė matavimai buvo atliekami su fosfatinio buferiu be gliukozės. Tuomet į celę įtvirtinus elektrodą ir pajungus sistemą, kompiuterinėje programoje fiksuojama tam tikra srovė, kuri susidaro dėl deguonies molekulių redukcijos platinos elektrodo paviršiuje (Mendelson, 2012). Srovei esant pastoviai, į celę įpilama vieno iš trijų tiriamųjų, t. y. – GOx, AuND arba AuND-GOx – ir prasideda gliukozės oksidacija – stebimas srovės pokytis. Šiuo atveju fiksuojama srovė artėja prie nulio, kadangi vykstant gliukozės oksidacijai deguonies molekulės yra sunaudojamos šios reakcijos metu, todėl galiausiai elektrodo paviršiuje nebevyksta deguonies redukcija. Tarp skirtingų matavimų celė kelis kartus praplaunama dejonizuotu vandeniu, o jei matuojama su fermentu, celė ir elektrodas gerai praplaunami H_2SO_4 (50 mM) ir dejonizuotu vandeniu. Matavimų metu srovės pokytis užfiksuojamas ir iš gautų empirinių duomenų pasinaudojus įvairiomis duomenų apdorojimo programomis („Wolfram Mathematica“, „OriginPro“, „Microsoft Excel“) daromos išvados apie vykusios reakcijos kinetiką.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Skirtingo dydžio aukso nanodalelių sintezė

Baigiamojo darbo metu, remiantis metodika adaptuota iš Bastus ir kt. mokslinės publikacijos (Bastus ir kt., 2011), buvo susintetintos skirtingo diametro sferinės AuND. Jų dydis buvo įvertintas spektrofotometriškai (3.1 pav.). Atlikta spektrofotometrinė analizė parodė, kad visų dydžių AuND po atitinkamo centrifugavimo išlaikė koloidinį stabilumą ir diametrą bei nebuvo pastebėta dalelių agregatų, todėl susintetintas AuND buvo galima tikslingai panaudoti amperometriniuose matavimuose.



3.1 pav. Skirtingo diametro AuND UV-vis spektrai.

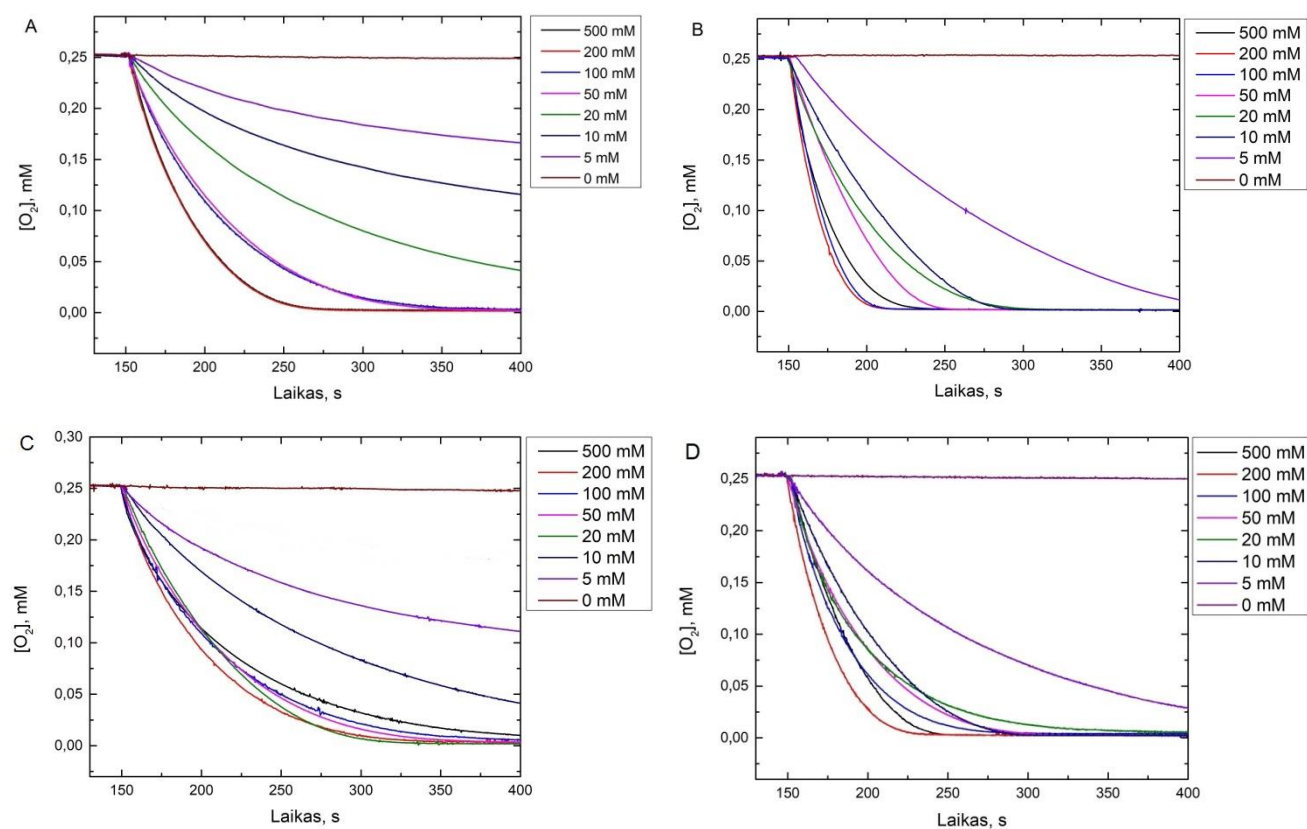
Taip pat, atsižvelgiant į literatūroje pateiktus AuND centrifugavimo pavyzdžius (Walkey, 2014), eksperimentiškai buvo parinkti tinkamiausi skirtingo dydžio AuND centrifugavimo parametrai. Šie parametrai bei susintetintų AuND dydžiai pateikti 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Eksperimentiškai nustatyti parametrai skirtingo dydžio AuND centrifugavimui.

AuND diametras, nm	Centrifugavimo greitis, aps./min	Centrifugavimo laikas, min
13	12000	30 ± 5
19	9000	30 ± 5
32	7000	25 ± 5
50	5000	20 ± 5

3.2. Aukso nanodalelių katalizuojama gliukozės oksidacija bei reakcijos kinetiniai parametrai

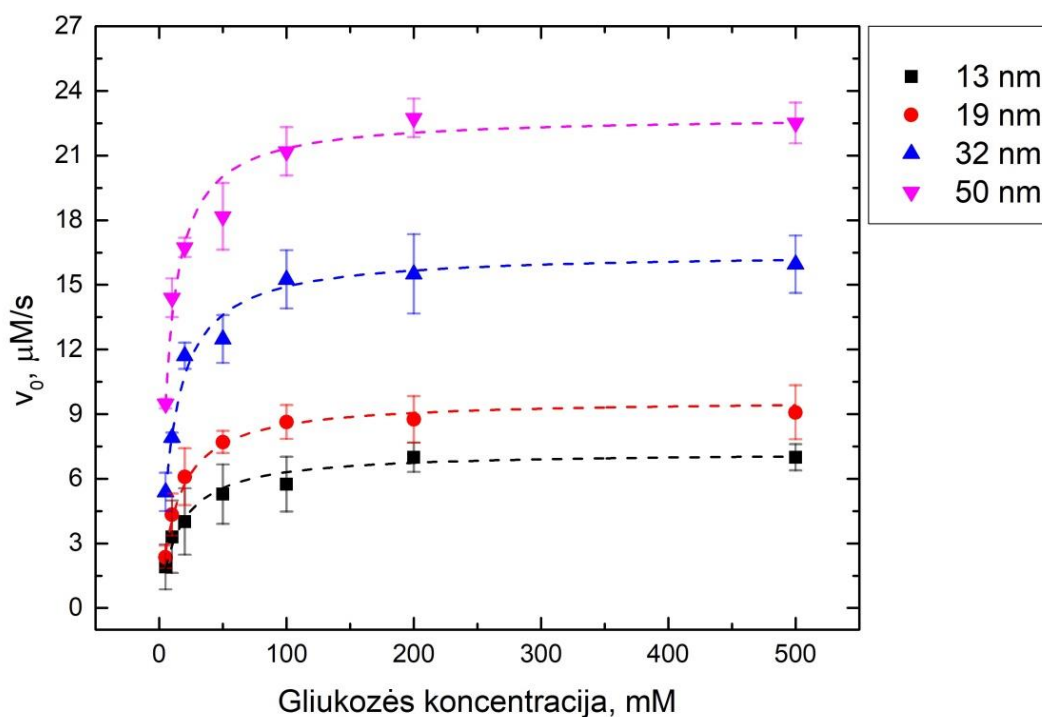
Amperometrinių matavimų metu deguoniniu elektrodu buvo įvertintas AuND katalizuojamos gliukozės oksidacijos metu celėje vykstantis deguonies koncentracijos pokytis.



3.2 pav. Deguonies sunaudojimo gliukozės oksidacijos metu katalizuojant AuND priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos (0-500 mM) ir AuND dydžio: A – 13 nm AuND, B – 19 nm AuND, C – 32 nm AuND, D – 50 nm AuND.

Celėje keičiant substrato – gliukozės – koncentraciją nuo 5 mM iki 500 mM, buvo gautos deguonies kitimo laike kreivės (3.2 pav. A–D). Pagal gautus eksperimentinius duomenis celėje esant didesnėms gliukozės koncentracijoms (100–500 mM) deguonis pilnai sunaudojamas per 200–250 s, o mažesnių koncentracijų (5–50 mM) atveju deguonis reakcijos metu naudojamas lėčiau. Taip pat, kontrolė – tai kreivės, gautos celėje esant 0 mM gliukozės. Kreivės rodo, jog tirpale nesant gliukozės, reakcija nevyksta, nes matavimo metu deguonies koncentracija nekinta.

Iš kiekvienos gautos kreivės tiesinės dalies buvo apskaičiuotas pradinis reakcijos greitis (v_0). Buvo gauta skirtingo dydžio AuND v_0 priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos (3.3 pav.)



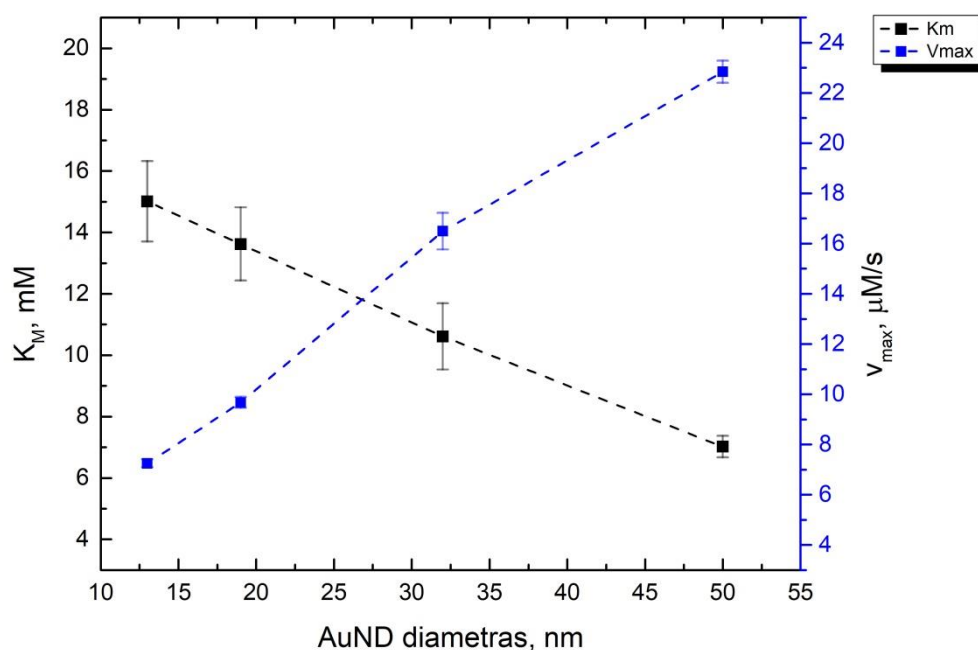
3.3 pav. AuND katalizuojamos gliukozės oksidacijos reakcijos pradinio greičio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos ir AuND dydžio. Punktyrinės linijos žymi duomenų atitikimą Michaelis-Menten modeliui.

Remiantis gautais duomenimis, didėjant AuND diametrai v_0 taip pat didėja. Esant didžiausiai gliukozės koncentracijai (500 mM) 13 nm diametro AuND pasiekė $7,0 \pm 0,6 \mu\text{M/s}$ pradinį greitį, o 50 nm AuND – $22,5 \pm 0,9 \mu\text{M/s}$ – apie 3,2 karto didesnę pradinį greitį.

Eksperimentiniams duomenims buvo pritaikytas Michaelis-Menten modelis. Remiantis šiuo modeliu buvo apskaičiuoti reakcijos kinetiniai parametrai – skirtingo AuND dydžio K_M gliukozei ir maksimalus reakcijos greitis (v_{max}). Duomenys pateikiami 3.2 lentelėje bei grafiškai 3.4 paveiksle.

3.2 lentelė. Skirtingo dydžio aukso nanodalelių kinetiniai parametrai (K_M ir v_{max}) ir atitikimas Michaelis-Menten modeliui (R^2)

AuND diametras	13 nm	19 nm	32 nm	50 nm
K_M , mM	15 ± 2	14 ± 1	11 ± 1	$7,0 \pm 0,4$
v_{max} , $\mu\text{M/s}$	$7,3 \pm 0,2$	$9,7 \pm 0,2$	$16,5 \pm 0,7$	$22,8 \pm 0,4$
R^2	0,978	0,992	0,966	0,993



3.4 pav. AuND kinetinių parametų priklausomybė nuo AuND diametro.

Apskaičiuoti kinetiniai parametrai parodė, kad didėjant AuND diametrai nuo 13 nm iki 50 nm v_{max} reikšmė padidėjo nuo $7,3 \pm 0,2 \mu\text{M/s}$ iki $22,8 \pm 0,4 \mu\text{M/s}$, o K_M reikšmė sumažėjo nuo $15 \pm 1 \text{ mM}$ iki $7,0 \pm 0,4 \text{ mM}$. Toks kinetinių parametų pokytis rodo, kad didėjant AuND diametrai, dalelių, kaip nanozimų, giminingumas gliukozei didėja.

Taip pat šiems duomenims buvo apskaičiuotos reakcijos katalizinė konstanta k_{cat} bei katalizinio efektyvumo konstanta k_{cat}/K_M . Reakcijos katalizinė konstanta buvo apskaičiuota v_{max} ($\mu\text{M/s}$) padalinus iš AuND koncentracijos (μM). Gauta, kad k_{cat} 13 nm dydžio AuND buvo 2581 s^{-1} , 19 nm – 7382 s^{-1} , 32 nm – $2,8 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$, ir 50 nm – $1,06 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$. Gauti skaičiai rodo, kad didėjant AuND diametrai nuo 13 nm iki 50 nm, k_{cat} taip pat didėja.

Toliau AuND kataliziniam efektyvumui įvertinti buvo apskaičiuota k_{cat}/K_M konstanta, kuri apskaičiuojama k_{cat} reikšmę padalinus iš K_M reikšmės. Gauta, kad k_{cat}/K_M 13 nm dydžio AuND buvo $172 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, 19 nm – $542 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, 32 nm – $2,64 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, ir 50 nm – $1,51 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. Apskaičiuotos k_{cat} ir k_{cat}/K_M reikšmės pateikiamos 3.3 lantelėje. Gauti skaičiai rodo, kad tiek k_{cat} , tiek k_{cat}/K_M , didėjant AuND diametrai nuo 13 nm iki 50 nm, taip pat didėja. Iš šios tendencijos galima daryti išvadą, jog didėjant AuND diametrai, AuND katalizinis efektyvumas didėja.

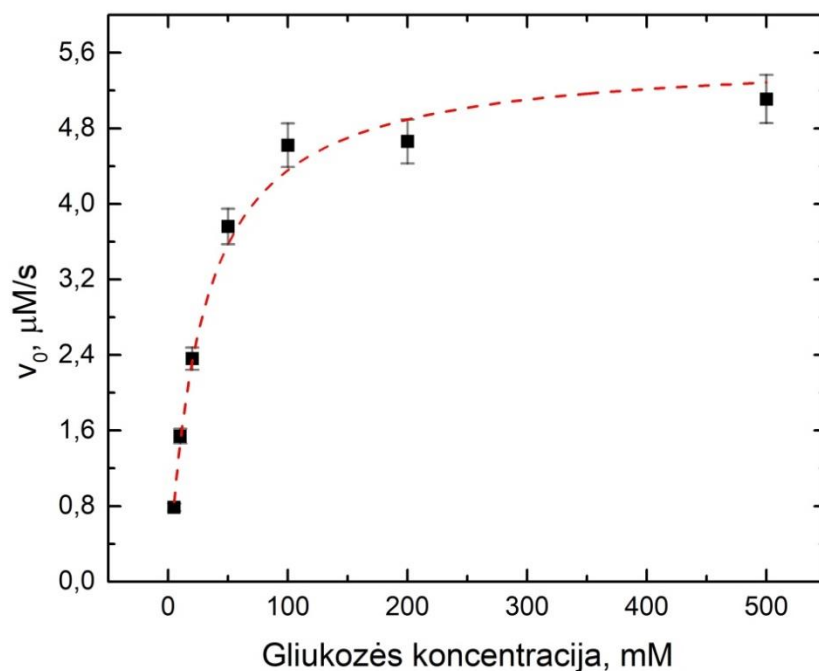
3.3 lentelė. Skirtingo dydžio aukso nanodalelių k_{cat} ir k_{cat}/K_M reikšmės.

AuND diametras	13 nm	19 nm	32 nm	50 nm
k_{cat}, s^{-1}	2581	7382	$2,8 \cdot 10^4$	$1,06 \cdot 10^5$
$k_{cat}/K_M, \text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$	172	542	$2,64 \cdot 10^3$	$1,51 \cdot 10^4$

3.3. Gliukozės oksidazės katalizuojama gliukozės oksidacija bei reakcijos kinetiniai parametrai

Tokiu pačiu principu kaip tyrimuose su AuND, taip pat buvo atlikti matavimai su laisvu fermentu. Grafiškai atidėjus apskaičiuotas pradinio reakcijos greičio reikšmės nuo gliukozės koncentracijos buvo gauta priklausomybė, kuri pateikta 3.5 paveiksle.

Gauti duomenys rodo, kad gliukozės koncentracijai didėjant nuo 5 mM iki 500 mM, GOx v_0 didėja nuo $0,78 \pm 0,04 \text{ } \mu\text{M/s}$ iki $5,1 \pm 0,3 \text{ } \mu\text{M/s}$. Šiems eksperimentiniams duomenims pritaikius Michaelis-Menten modelį, buvo apskaičiuota, kad GOx K_M gliukozei yra lygi $28 \pm 1 \text{ mM}$, o v_{max} – $5,6 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{M/s}$. Lyginant su skirtingo diametro AuND, GOx K_M gliukozei yra apie 1,9 karto didesnė už 13 nm K_M ir apie 4 kartus didesnė už 50 nm K_M , o GOx v_{max} už 13 nm v_{max} mažesnis apie 1,4 karto, o už 50 nm v_{max} – apie 4,4 karto. Šie rezultatai rodo, kad šiomis eksperimentinėmis sąlygomis, AuND kaip nanokatalizatorius yra giminingesnis gliukozei bei pasiekia didesnę maksimalų reakcijos greitį nei laisva GOx. Taip pat šioms duomenims buvo apskaičiuota reakcijos katalizinė konstanta k_{cat} . Ši konstanta buvo apskaičiuota GOx v_{max} ($\mu\text{M/s}$) padalinus iš fermento koncentracijos (μM). Gauta, kad GOx k_{cat} lygi $8,9 \text{ s}^{-1}$. Taip pat GOx kataliziniam efektyvumui įvertinti buvo apskaičiuota k_{cat}/K_M konstanta. Gauta, kad GOx k_{cat}/K_M lygi $0,3 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

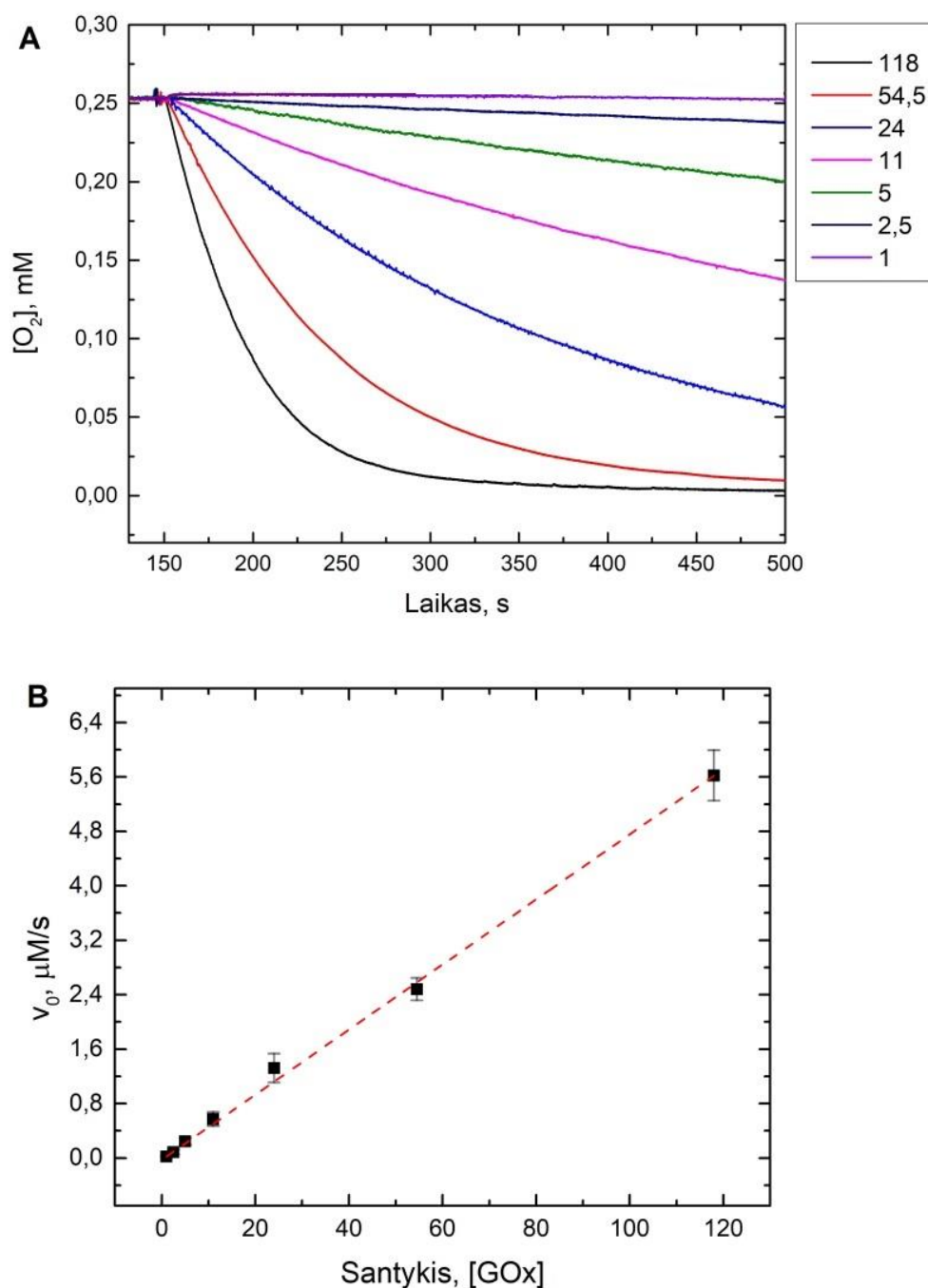


3.5 pav. GOx katalizuojamos gliukozės oksidacijos reakcijos pradinio greičio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos. Punktyrinė linija žymi duomenų atitikimą Michaelis-Menten modeliui. $R^2 = 0,992$.

Lyginant AuND ir GOx k_{cat} bei k_{cat}/K_M reikšmes, GOx atveju jos yra mažesnės negu mažiausio tirto dydžio – 13 nm – AuND. Remiantis šiuo stebėjimu, galima teigti, jog šiomis eksperimentinėmis sąlygomis AuND katalizinis efektyvumas yra didesnis negu laisvo fermento homogeninėje terpėje.

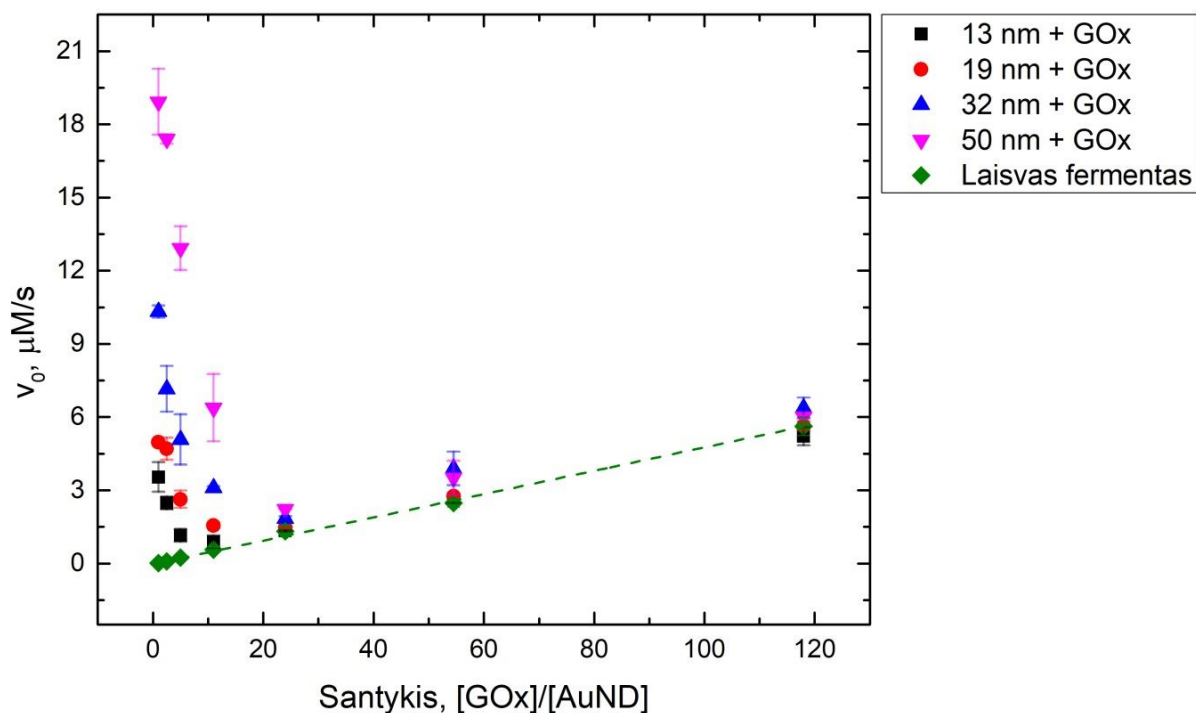
3.4. Aukso nanodalelių ir gliukozės oksidazės komplekso katalizuojama gliukozės oksidacija bei reakcijos kinetiniai parametrai

Amperometrinių matavimų metu taip pat buvo įvertintas AuND ir gliukozės oksidazės komplekso (AuND-GOx) katalizuojamos gliukozės oksidacijos metu vykstantis deguonies koncentracijos pokytis. Šiuose matavimuose kaip kontrolė buvo išmatuotas laisvos GOx katalizinis aktyvumas – deguonies sunaudojimo priklausomybė nuo santykinės GOx koncentracijos gliukozės koncentracijai esant 500 mM (3.6 pav. A), o iš gautų kreivių tiesinės dalies apskaičiuotas v_0 – gauta tiesinė priklausomybė (3.6 pav. B).



3.6 pav. Laisvo fermento katalizinis aktyvumas: A – deguonies sunaudojimo gliukozės oksidacijos metu katalizuojant GOx priklausomybė nuo santykinės GOx koncentracijos, B – v_0 priklausomybė nuo santykinės GOx koncentracijos; $R^2 = 0,995$.

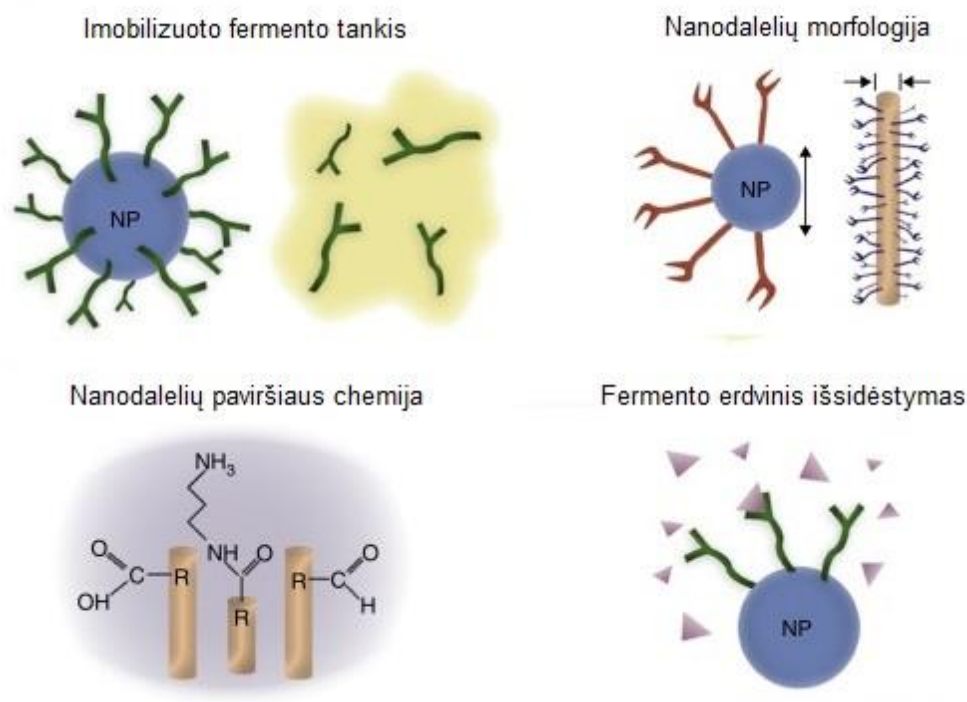
AuND-GOx matavimų metu celėje esant 500 mM gliukozės koncentracijai ir keičiant fermento ir dalelių santykį AuND-GOx komplekse ($[GOx]/[AuND]$: santykis nuo 1 iki 118) buvo gautos deguonies kitimo laike kreivės, iš kurių tiesinės dalies buvo apskaičiuotas v_0 . Buvo gauta AuND-GOx v_0 priklausomybė nuo $[GOx]/[AuND]$ santykio bei AuND diametro (3.7 pav.).



3.7 pav. AuND ir gliukozės oksidazės kompleksu katalizuojamos gliukozės oksidacijos v_0 priklausomybė nuo $[GOx]/[AuND]$ santykio (1–118) bei AuND diametro. Kontrolė – laisva GOx.

Remiantis gautais rezultatais, esant mažiems santykiams (1–11), t. y., mažoms ant AuND imobilizuotos GOx koncentracijoms, gliukozės oksidacijos reakcijos metu lyginant su laisvu fermentu dominuoja AuND vykdoma katalizė. Taip pat, išlieka tendencija, kad didėjant AuND diametrai didėja v_0 reikšmė. Esant didesniems santykiams (24–118), t. y., didelėms ant AuND imobilizuotos GOx koncentracijoms, gliukozės oksidacijos reakcijos metu dominuoja imobilizuota GOx, tačiau v_0 atitinka laisvo fermento aktyvumą. Dėl to galima formuluoti išvadą, kad GOx imobilizavimas aukso nanostruktūrose reakcijos kinetikai įtakos neturi. Taip pat svarbu atkreipti dėmesį į tai, jog GOx imobilizavimas AuND paviršiuje, riboja pačių dalelių nanozimines savybes didėjant imobilizuotos GOx koncentracijai.

Pastaruoju metu literatūroje atsiranda mokslinių straipsnių, kuriuose nagrinėjami pagrindiniai fizikocheminiai mechanizmai, susiję su fermentų, imobilizuotų įvairiose nanostruktūrose, veikimu. Nors fermentų-ND sistemų sąveikos ir katalizės veikimas yra sudėtingas, specifinės fermentų-ND konjugatų charakteristikos dažnai siejamos su padidėjusiu fermentų veikimu (Ding ir kt., 2015; Johnson ir kt., 2014; D. Li ir kt., 2007; Xiao ir kt., 2003). Įvardijama, jog šią savybę gali lemti fermentų tankis, ND morfologija, ND paviršiaus chemija ir fermentų erdvinis išsidėstymas ND paviršiuje (3.8 pav.) (Ding ir kt., 2015).



3.8 pav. Ant ND imobilizuoto fermento aktyvumui įtakos turintys veiksniai. Adaptuota iš (Ding ir kt., 2015).

Iš esmės ND morfologija gali padėti išlaikyti fermento konformaciją, paviršiaus chemija užtikrina pačio fermento imobilizaciją, taip pat nulemia erdvinį išsidėstymą, kuris gali būti palankus reakcijos kinetikai, jei fermento molekulių aktyvieji centrai nukreipiami tolyn nuo ND paviršiaus, taip atveriant galimybes efektyvesnei substrato molekulių prieigai (Ding ir kt., 2015; Johnson ir kt., 2014). Taigi yra daug variantų, kaip fermentai gali būti aktyvesni juos imobilizavus ND paviršiuje. Kita vertus, kalbant apie imobilizuoto fermento tankį, arba koncentraciją, galima įžvelgti, kad jeigu fermento katalizinis aktyvumas padidėja sumažinus imobilizuoto fermento kiekį, realu, kad tokį stebimą suaktyvėjimą gali lemti nanoziminės ND savybės. Šis niuansas buvo ištirtas šiame baigiamajame magistro darbe, kadangi tyrimai parodė, kad GOx imobilizavimas neturi reikšmingos įtakos pačio fermento aktyvumui, tačiau neigiamai veikia AuND katalizinį aktyvumą, nes didėjant imobilizuotos GOx koncentracijai, AuND vykdomos reakcijos kinetika žymiai sulėtėjo.

Kalbant apie pačių AuND vykdomos gliukozės oksidacijos reakcijos kinetiką, literatūroje vyrauja tyrimai, kuriais buvo parodyta, kad gliukozės oksidacijos greitis yra atvirkščiai proporcingas AuND diametrai (tirti dydžiai iki 10 nm) (Comotti ir kt., 2004; Ishida ir kt., 2008). O padidėjęs katalizinis aktyvumas dažnai aiškinamas įvertinant didesnę monodispersinių AuND paviršiaus ploto ir tūrio santykį (Hafez ir kt., 2019). Šiame baigiamajame darbe buvo gautas rezultatas, jog gliukozės

oksidacija vyksta greičiau katalizuojant kaip tik didesnio dydžio AuND (tirti dydžiai nuo 13 iki 50 nm). Tokiam rezultatui įtakos galėjo turėti tokie veiksniai kaip eksperimentinės sąlygos, AuND sintezė ir dalelių charakterizavimo metodai, o taip pat AuND paviršiaus chemija.

IŠVADOS

1. Baigiamojo magistro darbo metu buvo susintetintos skirtingo diametro – 13, 19 , 32 ir 50 nm – sferinės AuND bei eksperimentiškai nustatyta, kad mažiausias – 13 nm dydžio – daleles reikia koncentruoti prie didžiausio 12000 aps./min greičio 30 min, o didžiausias – 50 nm dydžio daleles prie mažiausio 5000 aps./min greičio 20 min, stabiliam koloidiniam tirpalui gauti;
2. Atlikus matavimus deguoniniu elektrodu parodyta, jog esant didžiausiai gliukozės koncentracijai (500 mM) ir AuND diametrui didėjant nuo 13 iki 50 nm pradinis reakcijos greitis padidėja daugiau nei 3 kartus, nuo $7,0 \pm 0,6 \mu\text{M/s}$ iki $22,5 \pm 0,9 \mu\text{M/s}$, o laisva GOx šiomis sąlygomis pasiekia mažesnę – $5,1 \pm 0,3 \mu\text{M/s}$ pradinę reakcijos greitį;
3. GOx imobilizacija ant skirtingo diametro AuND paviršiaus fermento kinetikai reikšmingos įtakos neturi, kadangi katalizė panaši į laisvo fermento kinetiką, tačiau didėjant imobilizuotos GOx koncentracijai ant AuND paviršiaus, AuND katalizuojamos gliukozės oksidacijos reakcijos pradinis greitis mažėja.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ajdari, N., Vyas, C., Bogan, S. L., Lwaleed, B. A., ir Cousins, B. G. (2017). Gold nanoparticle interactions in human blood: a model evaluation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(4), 1531–1542. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.01.019>
2. Astefanei, A., Núñez, O., ir Galceran, M. T. (2015). Characterisation and determination of fullerenes: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 882, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.025>
3. Bastús, N. G., Comenge, J., ir Puntès, V. (2011). Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: size focusing versus Ostwald ripening. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 27(17), 11098–11105. <https://doi.org/10.1021/la201938u>
4. Beltrame, P., Comotti, M., Della Pina, C., ir Rossi, M. (2006). Aerobic oxidation of glucose: II. Catalysis by colloidal gold. *Applied Catalysis A: General*, 297(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2005.08.029>
5. Blanco, A., ir Blanco, G. (2017). Chapter 8 - Enzymes. In A. Blanco & G. Blanco (Eds.), *Medical Biochemistry* (pp. 153–175). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00008-2>
6. Comotti, M., Della Pina, C., Falletta, E., ir Rossi, M. (2006). Aerobic Oxidation of Glucose with Gold Catalyst: Hydrogen Peroxide as Intermediate and Reagent. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 348(3), 313–316. <https://doi.org/10.1002/adsc.200505389>
7. Comotti, M., Pina, C. D., Matarrese, R., ir Rossi, M. (2004). The Catalytic Activity of “Naked” Gold Particles. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(43), 5812–5815. <https://doi.org/10.1002/anie.200460446>
8. Daniel, M.-C., ir Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*, 104(1), 293–346. <https://doi.org/10.1021/cr030698+>

9. Datta, S., Christena, L. R., ir Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
10. Ding, S., Cargill, A. A., Medintz, I. L., ir Claussen, J. C. (2015). Increasing the activity of immobilized enzymes with nanoparticle conjugation. *Current Opinion in Biotechnology*, 34, 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.04.005>
11. Dong, J., L. Carpinone, P., Pyrgiotakis, G., Demokritou, P., ir M. Moudgil, B. (2020). Synthesis of Precision Gold Nanoparticles Using Turkevich Method. *KONA Powder and Particle Journal*. <https://doi.org/10.14356/kona.2020011>
12. Dreaden, E. C., Alkilany, A. M., Huang, X., Murphy, C. J., ir El-Sayed, M. A. (2012). The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2740–2779. <https://doi.org/10.1039/C1CS15237H>
13. Fernández-Moreira, V., Herrera, R. P., ir Gimeno, M. C. (2019). Anticancer properties of gold complexes with biologically relevant ligands. *Pure and Applied Chemistry*, 91(2), 247–269. <https://doi.org/10.1515/pac-2018-0901>
14. Filip, J., ir Tkac, J. (2018). Enzymatic Electrodes: Characteristics, Fabrication Methods, and Applications. In K. Wandelt (Ed.), *Encyclopedia of Interfacial Chemistry* (pp. 190–199). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13471-7>
15. Franklin, R. K., Martin, S. M., Strong, T. D., ir Brown, R. B. (2016). Chemical and Biological Systems: Chemical Sensing Systems for Liquids. In *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.00549-X>
16. Frens, G. (1973). Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science*, 241(105), 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
17. Guo, X. (2012). Surface plasmon resonance based biosensor technique: A review. *Journal of Biophotonics*, 5(7), 483–501. <https://doi.org/10.1002/jbio.201200015>
18. Ha, T. H., Koo, H.-J., ir Chung, B. H. (2007). Shape-Controlled Syntheses of Gold Nanoprisms and Nanorods Influenced by Specific Adsorption of Halide Ions. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(3), 1123–1130. <https://doi.org/10.1021/jp066454l>

19. Hafez, M. E., Ma, H., Ma, W., ir Long, Y.-T. (2019). Unveiling the Intrinsic Catalytic Activities of Single-Gold-Nanoparticle-Based Enzyme Mimetics. *Angewandte Chemie*, 131(19), 6393–6398. <https://doi.org/10.1002/ange.201901384>
20. Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., ir Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Analytical Chemistry*, 79(11), 4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>
21. Ishida, T., Kinoshita, N., Okatsu, H., Akita, T., Takei, T., ir Haruta, M. (2008). Influence of the Support and the Size of Gold Clusters on Catalytic Activity for Glucose Oxidation. *Angewandte Chemie*, 120(48), 9405–9408. <https://doi.org/10.1002/ange.200802845>
22. Jana, N. R., Gearheart, L., ir Murphy, C. J. (2001). Evidence for Seed-Mediated Nucleation in the Chemical Reduction of Gold Salts to Gold Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 13(7), 2313–2322. <https://doi.org/10.1021/cm000662n>
23. Janati-Fard, F., Housaindokht, M. R., ir Monhemi, H. (2016). Investigation of structural stability and enzymatic activity of glucose oxidase and its subunits. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 134, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.09.008>
24. Johnson, B. J., Russ Algar, W., Malanoski, A. P., Ancona, M. G., ir Medintz, I. L. (2014). Understanding enzymatic acceleration at nanoparticle interfaces: Approaches and challenges. *Nano Today*, 9(1), 102–131. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.02.005>
25. Karra, S., Wooten, M., Griffith, W., ir Gorski, W. (2016). Morphology of Gold Nanoparticles and Electrocatalysis of Glucose Oxidation. *Electrochimica Acta*, 218, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.09.097>
26. Khan, I., Saeed, K., ir Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
27. Kumar, P. S., Pastoriza-Santos, I., Rodríguez-González, B., Abajo, F. J. G. de, ir Liz-Marzán, L. M. (2007). High-yield synthesis and optical response of gold nanostars. *Nanotechnology*, 19(1), 015606. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/01/015606>
28. Lang, N. J., Liu, B., ir Liu, J. (2014). Characterization of glucose oxidation by gold nanoparticles using nanoceria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 428, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.04.025>

29. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., ir Muller, R. N. (2010). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews*, 110(4), 2574–2574. <https://doi.org/10.1021/cr900197g>
30. Leng, W., Pati, P., ir Vikesland, P. J. (2015). Room temperature seed mediated growth of gold nanoparticles: mechanistic investigations and life cycle assesment. *Environmental Science: Nano*, 2(5), 440–453. <https://doi.org/10.1039/C5EN00026B>
31. Leskovac, V., Trivić, S., Wohlfahrt, G., Kandrač, J., ir Peričin, D. (2005). Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(4), 731–750. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.10.014>
32. Li, D., He, Q., Cui, Y., Duan, L., ir Li, J. (2007). Immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles with enhanced thermostability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355(2), 488–493. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.183>
33. Li, Y., Schluesener, H. J., ir Xu, S. (2010). Gold nanoparticle-based biosensors. *Gold Bulletin*, 43(1), 29–41. <https://doi.org/10.1007/BF03214964>
34. Loos, M. (2015). Chapter 1 - Nanoscience and Nanotechnology. In M. Loos (Ed.), *Carbon Nanotube Reinforced Composites* (pp. 1–36). William Andrew Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3195-4.00001-1>
35. Lou-Franco, J., Das, B., Elliott, C., ir Cao, C. (2020). Gold Nanozymes: From Concept to Biomedical Applications. *Nano-Micro Letters*, 13(1), 10. <https://doi.org/10.1007/s40820-020-00532-z>
36. Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
37. Mendelson, Y. (2012). Chapter 10 - Biomedical Sensors. In J. D. Enderle & J. D. Bronzino (Eds.), *Introduction to Biomedical Engineering (Third Edition)* (pp. 609–666). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374979-6.00010-1>
38. Nikoobakht, B., ir El-Sayed, M. A. (2003). Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chemistry of Materials*, 15(10), 1957–1962. <https://doi.org/10.1021/cm020732l>

39. Paidari, S., ir Ibrahim, S. A. (2021). Potential application of gold nanoparticles in food packaging: a mini review. *Gold Bulletin*, 54(1), 31–36. <https://doi.org/10.1007/s13404-021-00290-9>
40. Puri, A., Loomis, K., Smith, B., Lee, J.-H., Yavlovich, A., Heldman, E., ir Blumenthal, R. (2009). Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 26(6), 523–580. <https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v26.i6.10>
41. Rahman, M. M., Saleh Ahammad, A. J., Jin, J.-H., Ahn, S. J., ir Lee, J.-J. (2010). A Comprehensive Review of Glucose Biosensors Based on Nanostructured Metal-Oxides. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 10(5), 4855–4886. <https://doi.org/10.3390/s100504855>
42. Ramanaviciene, A., Nastajute, G., Snitka, V., Kausaite, A., German, N., Barauskas-Memenas, D., ir Ramanavicius, A. (2009). Spectrophotometric evaluation of gold nanoparticles as red-ox mediator for glucose oxidase. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 137(2), 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.01.021>
43. Ruan, Q., Shao, L., Shu, Y., Wang, J., ir Wu, H. (2014). Growth of Monodisperse Gold Nanospheres with Diameters from 20 nm to 220 nm and Their Core/Satellite Nanostructures. *Advanced Optical Materials*, 2(1), 65–73. <https://doi.org/10.1002/adom.201300359>
44. Sawyer, D. T. (2003). Electrochemistry. In R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition)* (pp. 161–197). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00206-4>
45. Sengani, M., Grumezescu, A. M., ir Rajeswari, V. D. (2017). Recent trends and methodologies in gold nanoparticle synthesis – A prospective review on drug delivery aspect. *OpenNano*, 2, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2017.07.001>
46. Singh, S. (2019). Nanomaterials Exhibiting Enzyme-Like Properties (Nanozymes): Current Advances and Future Perspectives. *Frontiers in Chemistry*, 7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00046>
47. Sun, Y., ir Xia, Y. (2002). Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles. *Science*, 298(5601), 2176–2179. <https://doi.org/10.1126/science.1077229>
48. Thomas, S. C., Harshita, null, Mishra, P. K., ir Talegaonkar, S. (2015). Ceramic Nanoparticles: Fabrication Methods and Applications in Drug Delivery. *Current*

- Pharmaceutical Design*, 21(42), 6165–6188.
<https://doi.org/10.2174/1381612821666151027153246>
49. T. Kusema, B., ir Yu. Murzin, D. (2013). Catalytic oxidation of rare sugars over gold catalysts. *Catalysis Science & Technology*, 3(2), 297–307.
<https://doi.org/10.1039/C2CY20379K>
 50. Turkevich, J., Stevenson, P. C., ir Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11(0), 55–75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>
 51. Tweney, R. D. (2006). Discovering Discovery: How Faraday Found the First Metallic Colloid. *Perspectives on Science*, 14(1), 97–121. <https://doi.org/10.1162/posc.2006.14.1.97>
 52. Walkey, C. (2014). *The Biological Identity of Nanoparticles* [PhD Thesis]. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33021.36323>
 53. Xiao, Y., Patolsky, F., Katz, E., Hainfeld, J. F., ir Willner, I. (2003). “Plugging into Enzymes”: nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5614), 1877–1881. <https://doi.org/10.1126/science.1080664>
 54. Yoo, E.-H., ir Lee, S.-Y. (2010). Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors*, 10(5), 4558–4576. <https://doi.org/10.3390/s100504558>
 55. Zhao, P., Li, N., ir Astruc, D. (2013). State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coordination Chemistry Reviews*, 257(3), 638–665.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.09.002>
 56. Zhou, Y., Liu, B., Yang, R., ir Liu, J. (2017). Filling in the Gaps between Nanozymes and Enzymes: Challenges and Opportunities. *Bioconjugate Chemistry*, 28(12), 2903–2909.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00673>