



VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS INSTITUTAS
ANALIZINĖS IR APLINKOS CHEMIJOS KATEDRA

Viktorija Lisytė

Pagrindinių studijų programa Chemija – 2 kursas
Magistro baigiamasis darbas

**REDUKUOTO GRAFENO OKSIDO IR POLIANILINO
NANOPLUOŠTŲ TAIKYMAS ELEKTROCHEMINIUOSE
GLIUKOZĖS BIOLOGINIUIOSE JUTIKLIUIOSE**

Darbo vadovas
dr. Anton Popov

Vilnius, 2021



VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES
INSTITUTE OF CHEMISTRY
DEPARTMENT OF ANALYTICAL ENVIRONMENTAL CHEMISTRY

Viktorija Lisyte

Chemistry

Master thesis

**APPLICATION OF REDUCED GRAPHENE OXIDE AND
POLYANILINE NANOFIBERS NANOCOMPOSITE IN
ELECTROCHEMICAL GLUCOSE BIOSENSORS**

Scientific adviser

dr. Anton Popov

Vilnius, 2021

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪRINĖ APŽVALGA.....	6
1.1. Biologiniai jutikliai	6
1.2. Elektrocheminiai gliukozės biologiniai jutikliai.....	6
1.3. Amperometriniai biologiniai jutikliai	7
1.3.1. Pirmos kartos amperometriniai gliukozės biologiniai jutikliai	8
1.3.2. Antrosios kartos amperometriniai gliukozės biologiniai jutikliai.....	8
1.3.3. Trečios kartos amperometriniai gliukozės biologiniai jutikliai.....	8
1.4. Nanomedžiagų pritaikymas biologiniuose jutikliuose.....	9
1.5. Grafenas	9
1.6. Redukuotas grafeno oksidas	10
1.7. PANI	10
1.8. PANI ir rGO kompozitas	11
1.9. Gliukozės oksidazė	11
1.10. Gliukozės oksidazės taikymas	13
2. EKSPERIMENTINIO TYRIMO METODIKA	15
2.1. Prietaisai ir priemonės.....	15
2.2. Medžiagos ir reagentai	15
2.3. Etaloninių tirpalų paruošimas	16
2.4. Programinė įranga	16
2.5. PANI nanopluoštų sintezė.....	16
2.6. rGO sintezė	16
2.7. Medžiagų charakterizavimas	17
2.8. PANI, rGO ir PANI-rGO dispersijų paruošimas	17
2.9. Grafito elektrodo modifikavimas.....	17
2.10. Elektrocheminiai tyrimai	18
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	19
3.1. PANI nanopluoštų sintezė.....	19
3.2. PANI nanopluoštų ir rGO dispersijų įtakos tyrimai	21
3.3. Optimalaus PANI:rGO dispersijos santykio parinkimas	23
3.4. Stabilumo ir priemaišų įtakos tyrimai.....	24
3.5. Atrankumo substratui tyrimai	25
IŠVADOS.....	27
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	28
SANTRAUKA.....	33

SANTRUMPOS

ADA – Amerikiečių su negalia įstatymas;

ANI – anilinas;

APS – amonio persulfatas;

BAE – biologinis atpažinimo elementas;

CSLSI – Klinikinių ir laboratorinių standartų institutas;

DMSO – dimetilsulfoksidas;

EPT – elektronų pernašos tarpininkas;

FAB – fosfatinis acetatinis buferis;

FAD – flavino adenino nukleotidas;

FMS – N-metilfenazino metosulfatas;

GA – glutaro aldehidas;

GO – grafeno oksidas.

GO_x – gliukozės oksidazė;

GR – grafito elektrodas;

LOD – aptikimo riba;

LOQ – nustatymo riba;

LP – laidūs polimerai;

LPO – laktoperoksidazė;

PANI – polianilinas;

PSO – Pasaulio sveikatos organizacija;

Pt – platina;

rGO – redukuoto grafeno oksidas;

SN – standartinis nuokrypis;

TCNQ – tetracianochinodimetanas;

TTF – tetratiafulavenas.

IVADAS

Diabetas yra pasaulinė visuomenės sveikatos problema, žinoma kaip viena iš pagrindinių priežasčių, sukeliančių mirtį ir negalią dėl nepakankamo insulino ir hiperglikemijos. Diabetas siejamas su nereguliaria gliukozės koncentracija kraujyje. Diabetu sergantiems žmonėms yra didesnė širdies priepuolio, inkstų nepakankamumo, apatinių galūnių amputacijos, insulto ar apakino rizika. Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, diabetu sergančių žmonių skaičius pasaulyje 2014 m. buvo 422 mln. Taigi, labai svarbu turėti lengvai atliekamą ir jautrų gliukozės kiekio kraujyje nustatymo metodą [1].

Per pastaruosius kelis dešimtmečius daugybė mokslinių tyrimų buvo skirta elektrocheminių fermentinių gliukozės biologinių jutiklių kūrimui, nes tokie jutikliai pasižymi dideliu jautrumu, greitai atsako laiku ir atrankumu. Norint pagerinti fermento gliukozės oksidazės (GOx) veikimą biologiniuose jutikliuose, galima atlikti jo imobilizaciją biologiškai suderinamoje aplinkoje.

Skirtingi metodai bei protokolai buvo sukurti, norint paruošti fermentų imobilizavimo matricą [2]. Vieni iš dažniausiai naudojamų medžiagų imobilizacijos matricos paruošimui yra polimerai [3]. Laidūs polimerai (LP) yra ypač tinkami įvairių fermentų imobilizavimui. Fermentų imobilizacijai plačiausiai naudojami LP yra polianilinas (PANI), polipirolas ir politiofenas. Šie polimerai suteikia stabilią ir poringą matricą fermento imobilizacijai, taip pat palengvina elektronų pernašos procesus [4].

Redukuotas grafeno oksidas (rGO) gali būti pritaikytas panaudojimui kartu su PANI, ruošiant fermento imobilizacijai skirtą matricą. Tai yra dėl abiejų medžiagų konjuguotos elektroninės struktūros panašumo ir būdingo elektroaktyvumo. Be to, rGO turi didelį paviršiaus plotą, gerą lankstumą, didelį mechaninį tvirtumą bei pasižymi dideliu laidumu elektrai. Į lakštą panaši rGO struktūra leidžia jį panaudoti kaip polimerų užpildą. Karboksilinės, hidroksilinės, epoksidinės ir karbonilinės funkcinės grupės palaiko rGO pasiskirstymą polimero matricoje per π - π jungtis ir dėl elektrostatinės sąveikos bei vandenilinių ryšių susidarymą. Net mažas rGO kiekis gali pagerinti PANI kompozicines savybes. Tokį PANI:rGO kompozitą galima panaudoti gerinant biologinių jutiklių savybes [5].

Darbo tikslas:

Pritaikyti rGO ir PANI nanopluoštų nanokompozitus elektrocheminio gliukozės biologinio jutiklio kūrime.

Darbo uždaviniai:

1. Susintetinti PANI nanopluoštus.
2. Parinkti optimalų PANI ir rGO dispersijų santykį elektrodo modifikavimui, siekiant pagerinti gliukozės biologinio jutiklio analizinius parametrus.
3. Įvertinti paruošto biologinio jutiklio analizinio signalo atsikartojamumą, atrankumą bei elektroaktyvių medžiagų įtaką jutiklio veikimui.
4. Ištirti paruošto biologinio jutiklio veikimą praskiestame kraujo serume.

1. LITERATŪRINĖ APŽVALGA

1.1. Biologiniai jutikliai

Biologinis jutiklis gali būti apibrėžiamas kaip kompaktiškas analitinis įtaisas, kuriame yra biologinis ar fiziologinis gautas jautrus atpažinimo elementas, integruotas arba susijęs su fizikiniu ir cheminiu vertikliu. Yra trys pagrindinės biologinio jutiklio dalys: biologinio atpažinimo elementas (BAE), signalo vertiklis, kuris paverčia BAE sąveika su analite į išmatuojama signalą, ir signalo apdorojimo sistema. Biologiniais atpažinimo elementais gali būti receptoriai, fermentai, antikūnai, nukleorūgštys, mikroorganizmai ir lėktiniai. Penkios pagrindinės vertiklių klasės yra elektrocheminės, optinės, termometrinės, pjezoelektrinės ir magnetinės. Dauguma dabartinių gliukozės biologinių jutiklių yra elektrocheminio tipo dėl geresnio jautrumo, atkuriamumo, lengvos priežiūros ir dėl mažos savikainos [6]. Biologiniai jutikliai gali būti klasifikuojami dviem būdais: pagal signalo perdavimo būdą (optinį, mechaninį ar elektrocheminį) arba pagal BAE tipą. Klasifikuojant pagal BAE, gaunamos dvi plačios kategorijos: kataliziniai jutikliai, kuriuose naudojami fermentai, ir afininiai jutikliai, kuriuose naudojami surišantys baltymai ar nukleotidai. Svarstant biologinių jutiklių regeneraciją, svarbu atsižvelgti į BAE ir analitės sąveiką. Daugelis fermentinių biologinių jutiklių pasižymi geru atkuriamumu, todėl tokius jutiklius galima naudoti pakartotinai. Taip pat reikėtų paminėti, kad biologiniai jutikliai skirstomi pagal analitės nustatymo būdą. Ją galima nustatyti tiesiogiai arba atliekant tyrimą, pavyzdžiui, konkurencinį. Konkurenciniu tyrimu pagrįsti biologiniai jutikliai tiesiogiai neatkuria duomenų iš pačios analitės, bet veikia konkurenciniu antrinio proceso prijungimu arba jo slopinimu [7].

1.2. Elektrocheminiai gliukozės biologiniai jutikliai

Fermentinių gliukozės biologinių jutiklių istorija prasidėjo, kai 1962 m. Clarkas ir Lionas sukūrė pirmąjį biologinį jutiklį. Jų pirmasis fermentinis gliukozės elektrodas rėmėsi plonu GOx sluoksniu, kuriuo buvo modifikuotas platinos (Pt) elektrodas ir apgaubtas membranos sluoksniu. Matavimai buvo atlikti remiantis deguonies, sunaudoto fermento katalizuojamoje reakcijoje, stebėjimu. Originalus Clark patentas apėmė vieno ar daugiau fermentų naudojimą. Trukdžių poveikis, matuojant srovės skirtumą, buvo ištaisytas panaudojant du elektrodus, kurių vienas buvo padengtas fermentu. Vėliau Clarko technologija buvo perduota bendrovei „Yellow Spring Instrument“, kuri 1975 m. išleido pirmąjį specialų gliukozės jutiklį. Naudojant šį jutiklį buvo galima matuoti gliukozės kiekį 25 μ L tūrio kraujo mėginiuose. Įmonės „Updike“ ir „Hick5“ toliau plėtojo šį principą naudodami deguonį nustatymo pagrindu veikiančius elektrodus, kai vienas iš jų padengtas fermentu, ir matuodami srovę, kad kontroliuotų ištirpusio deguonies kiekį mėginiuose. Guilbault ir Lubrano 1973 m. aprašė fermentinį elektrodą gliukozės kiekiui kraujyje matuoti, pagrįstą amperometriniu (anodiniu) vandenilio peroksido produkto stebėjimu. Pagamintu biologiniu jutikliu buvo galima išmatuoti gliukozės koncentraciją 100 μ L tūrio kraujo mėginius. Nuo tada, kai buvo sukurtas amperometrinis gliukozės biologinis jutiklis, imta plačiau domėtis šių fermentinių elektrodų taikymo sritimis, kurios skyrėsi elektrodo konstrukcija, medžiagų imobilizavimo metodais ir membranos kompozicijomis. Elektronų akceptorius, atliekančių deguonies vaidmenį, panaudojimas matuojant gliukozės kiekį kraujyje buvo pristatytas 1974 m. Devintame dešimtmetyje biologiniai jutikliai tapo viena iš svarbiausių temų, kuri atspindi vis didesnę dėmesį biotechnologijoms. Per pastarąjį dešimtmetį buvo sutelktos didelės pastangos plėtojant tarpininkais pagrįstus antrosios kartos gliukozės biologinių jutiklių savybių gerinimui. Dešimtame dešimtmetyje buvo intensyviai vystoma

sritis, skirta į elektros ryšio tarp GOx redokso centro ir elektrodo paviršiaus užmezgimui. Ypač didelis dėmesys buvo skiriamas Hallerio darbui, kuris pristatė lankstaus polimero su osmio redokso vietomis naudojimą. Šiuo laikotarpiu, buvo nemažas susidomėjimas minimaliai invazinių poodyje implantuojamų prietaisų kūrimu [8].

Gliukozės biologinius jutiklius lengva valdyti, jiems reikia mažai kraujo ir jų pagalba galima greitai atlikti matavimus. Nepakankama matavimo kokybė gali sukelti didelių netikslumų ir padidinti pacientų sergamumą bei mirtingumą. Todėl rekomenduojama, kad matavimai atitiktų keletui analizinės rezultatų kriterijų. Amerikiečių su negalia įstatymas (ADA) 1994 m. pateikė pirmąsias gliukozės biologinių jutiklių analitinių charakteristikų rekomendacijas, kuriose buvo siūloma <10 % didžiausio leistino poslinkio riba, palyginus su etaloniniais metodais, kai gliukozės koncentracija yra nuo 1,6 iki 22,2 mmol L⁻¹. Šis analitinis žymuo 1996 m. buvo dar labiau sumažintas iki <5 %. Remiantis JAV maisto ir vaistų administracijos (angl.: FDA) rekomendacijomis, gliukozės jutiklių paklaida turi būti mažesnė 20 %, kai gliukozės koncentracija yra nuo 1,65 iki 22 mmol L⁻¹, palyginus su etaloniniais laboratoriniais matavimais. Tarptautinės standartizacijos organizacijos (ISO) 15187:2003 (*In vitro* diagnostinių tyrimų sistemos. Reikalavimai gliukozės kiekio kraujyje stebėjimo sistemoms, atliekant savikontrolę, valdant cukrinį diabetą) siūlomi kriterijai yra suskirstyti pagal gliukozės kiekį kraujyje, kai jos koncentracija yra mažesnė nei 4,2 mmol L⁻¹ arba lygi arba didesnė nei 4,2 mmol L⁻¹. Be to, reikalaujama, kad 95 % individualių gliukozės nustatymo rezultatų paklaida būtų nedidesnė nei ±0,83 mmol L⁻¹, kai gliukozės koncentracija mažesnė nei 4,2 mmol L⁻¹, ir nedidesnė nei ±20 %, kai gliukozės koncentracija yra didesnė ar lygi 4,2 mmol L⁻¹.

Daugelio gliukozės stebėjimo prietaisų analizės rezultatus patvirtina sveikatos priežiūros specialistai pagal Klinikinių ir laboratorinių standartų instituto (CLSI) gaires. Tačiau ISO techninis komitetas ISO/TC212 išleido protokolą, aprašantį gliukozės matavimo prietaisų tikslumą ir pakartojamumą esant 3-5 skirtingoms gliukozės koncentracijoms pagal ISO 15197 gaires. Šiose gairėse pabrėžiamas poreikis įvertinti gliukozės biologinius jutiklius realaus gyvenimo situacijose. Be to, gairėse nurodomi gliukozės stebėjimo *in vitro* sistemų, matuojančių gliukozės koncentraciją kapiliarų kraujo mėginiuose, reikalavimai ir procedūros.

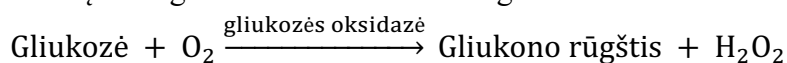
JAV FDA gairių dokumente taip pat pateikiamos rekomendacijos dėl gliukometrų, kurie patogiai atlieka matavimus bendrame kraujo tūryje, o tada konvertuoja rezultatus į gliukozės kiekį plazmoje [6].

1.3. Amperometriniai biologiniai jutikliai

Amperometriniai biologiniai jutikliai yra viena iš plačiausiai paplitusių ir sėkmingai komercializuotų biomolekulinės elektronikos prietaisų klasė [9]. Amperometriniai biologiniai jutikliai yra pagrįsti matuojamos srovės pokyčiais. Paprastai tokioje amperometrinėje sistemoje naudojama trijų elektrodų sistema: darbinis elektrodas, paprastai pagamintas iš aukso, anglies arba platinos; palyginamasis elektrodas, paprastai sidabro arba sidabro/sidabro chlorido (Ag/AgCl) elektrodas, palaikantis stabilų potencialą ir pagalbinis, kuris įtrauktas, kad padėtų išmatuoti srovę [10]. Svarbu paminėti, kad prie reikiamo analitės oksidacijai ar redukcijai potencialo gali vykti ir kitų tirpale ištirpusių medžiagų oksidacija ar redukcija. Dėl šios priežasties elektrodo paviršius gali būti padengtas pralaidžia tik tam tikrai analizei membrana arba naudojamas elektronų pernašos tarpininkas (EPT) [11]. Amperometrija yra plačiai naudojama analitinėje praktikoje, nes esant tam tikroms sąlygoms aptiktos medžiagos koncentracija gali būti mažesnė nei 10⁻⁸ mmol L⁻¹, o dinaminis diapazonas yra 3-4 laipsniai [9].

1.3.1. Pirmos kartos amperometriniai gliukozės biologiniai jutikliai

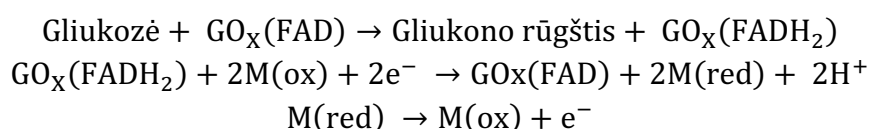
Pirmos kartos amperometriniai gliukozės jutikliai pagrįsti natūralaus deguonies substrato sunaudojimu ar susidariusio vandenilio peroksido aptikimu [6]. Analizuojamame tirpale ištirpęs fiziologinis deguonis turi įtakos gaunamam analiziniam signalui.



Elektrocheminė deguonies redukcija paprastai naudojama stebint deguonies suvartojimą gliukozės kiekybiniam įvertinimui [12]. Yra žinoma, kad šioje sistemoje vykstant fermentinei reakcijai susidaro šalutinis produktas H_2O_2 , kurį matuojant taip pat galima nustatyti gliukozės koncentraciją tiriamame tirpale. Šio tipo amperometrinuose gliukozės jutikliuose gaunamas signalas priklauso nuo H_2O_2 difuzijos ir oksidacijos veikiančiame elektrode, tačiau pirmosios kartos biologiniai jutikliai nenaudoja EPT. Reikia pabrėžti, kad tokiuose biologiniuose jutikliuose svarbu tinkamai imobilizuoti fermentą, tam kad būtų išsaugotas fermentinis stabilumas ir aktyvumas, norint pasiekti kuo didesnę analizinį signalą [13].

1.3.2. Antrosios kartos amperometriniai gliukozės biologiniai jutikliai

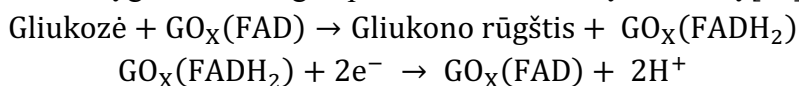
Anksčiau minėtų pirmosios kartos gliukozės biologinių jutiklių apribojimai buvo įveikti naudojant gliukozės jutiklius su EPT, tai yra antros kartos jutiklius. Pakeitimai buvo pasiekti deguonį pakeitus ne fiziologiniais elektronų akceptoriais, vadinamais redokso tarpininkais, kurie gali nunešti elektronus nuo fermento aktyviojo centro į darbinio elektrodo paviršių. Vietoj H_2O_2 fermentinės reakcijos metu gaunamas redukuotas mediatorius, kuris vėliau oksiduojamas prie elektrodo. Tokiu būdu išmatuojamas amperometrinis signalas ir regeneruojama oksiduota mediatoriaus forma. Norėdami pagerinti jutiklio veikimą, buvo naudojami įvairūs elektronų pernašos tarpininkai, tokie kaip ferocenas, fericianidas, chininai, tetratrafalvalenas (TTF), tetracianochinodimetanas (TCNQ), tioninas, metileno mėlynasis ir metilo viologenas [6]. Idealus elektronų pernašos tarpininkas turi pasižymėti maža molekuline mase, inertiškumu, kad reakcijų metu nesudarytų kompleksinių junginių, mažesniu redokso potencialu, geru stabilumu, atsparumu besiformuojantiems šalutiniams junginiams bei mažu toksiškumu.



Nepaisant to, vis dar išlieka problemų naudojant EPT. Kadangi EPT galima apibūdinti kaip mažas difuzines molekules, jas sunku išlaikyti tarp elektrodo ir fermento paviršiaus, ypač jeigu sistema naudojama ilgesnį laiką. Nors EPT reaguoja žymiai greičiau nei deguonis, tačiau išlieka tikimybė, kad sistemoje ištirpęs deguonis gali konkuruoti su EPT. Tokiu atveju sumažėja fermentinės reakcijos greitis ir padidėja H_2O_2 koncentracija. EPT taip pat gali reaguoti su kitomis medžiagomis, kurias galima rasti kraujyje, kas gali dar labiau paveikti analitinės sistemos tikslumą bei efektyvumą [14].

1.3.3. Trečios kartos amperometriniai gliukozės biologiniai jutikliai

Trečios kartos gliukozės biologiniai jutikliai buvo sukurti siekiant pašalinti reakcijos tarpininko poreikį, kad elektronus būtų galima tiesiogiai perkelti iš fermento į elektrodą [15]:



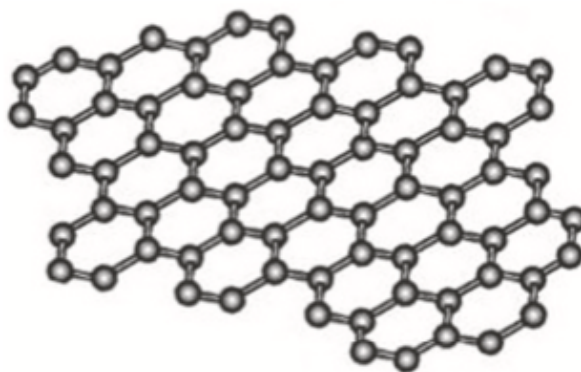
Tai daug žadantis fermentinio gliukozės jutiklio tipas ir pastaraisiais metais jo komercinis taikymas tampa vis realistiškesnis. Naudojant tokius jutiklius būtų išvengta pritaikytų tarpininkų sukeliama trikdžių, o sistema pasižymėtų dideliu atrankumu ir jautrumu. Kaip jau minėta aukščiau, didžiausias sunkumas siekiant tiesioginio elektronų pernašos yra aktyviojo redokso centro vieta fermento globulėje. EPT ir gliukozė patenka į šį centrą difuzijos būdu. Esant tobulam plokštuminiam elektrodui, šis judėjimas nėra galimas. Dėl šios priežasties, pastaraisiais metais sparčiai tobulėjant nanomedžiagų sintezės metodams bei kuriant porėtus junginius, buvo sukurta metodų, kurie padėjo padidinti darbinio elektrodo paviršiaus plotą. Tokios medžiagos leidžia įvykti tiesioginei elektronų pernašai ir tiesiogiai stebėti srovę, kuri atitinka fermentų oksidaciją be tarpininkų ar priklausomybę nuo ištirpusio deguonies [14].

1.4. Nanomedžiagų pritaikymas biologiniuose jutikliuose

Pastaruosius kelis dešimtmečius buvo stebimas milžiniškas susidomėjimas nanomedžiagų panaudojimu biologinių jutiklių srityje. Daug pastangų buvo sutelkta sintezės metodų srityje, kurioje buvo siekiama paruošti norimomis savybėmis (kontroliuojami dydis, forma bei paviršiaus krūvis) pasižyminčios nanomedžiagos. Be to įvairios nanomedžiagos buvo taikomos nanokompozitų pavidalu su įvairiais polimerais ar biomolekulėmis, kad būtų pasiektas geresnis medžiagų biologinis suderinamumas. Tai leido integruoti nanomedžiagas į biologinius jutiklius, pritaikant reikiamai funkcijai, ir paskatino vis dažniau naudoti nanomedžiagas kuriant elektrocheminius amperometrinius jutiklius. Literatūroje publikuota tūkstančiai mokslinių straipsnių, apibūdinančių nanomedžiagų ir biomolekulių sąveiką [16]. Tobulėjant metodams, leidžiantiems kontroliuoti nanomedžiagų savybes, dydžius bei formas, atsiranda naujų biologinių jutiklių, galinčių nustatyti greitai norimos analizės koncentraciją. Nanomedžiagos paprastai naudojamos elektrodų modifikavimui, kas yra svarbi biologinių jutiklių kūrimo dalis. Naudojant biologinius jutiklius galima tirti įvairius mėginius, tokius kaip kūno skysčiai, maisto mėginiai ir ląstelių kultūra [17].

1.5. Grafenas

Grafenas yra dvimatė (2D) anglies pagrindu pagaminta medžiaga. Ši medžiaga pirmą kartą buvo izoliuota 2003 m. ir iškart tapo potencialia kandidate pritaikymui elektroniniuose prietaisuose. Neseniai buvo įrodyta, kad grafenas taip pat suteikia nepaprastų optinių savybių. Grafenas sugeria 2,3 % krintančios baltos šviesos dalį ir dėl to grafenas suteikia unikalias elektronines savybes ir struktūras [18].



1 pav. Grafeno struktūra [18].

Idealizuota grafeno struktūra yra visiškai dvimatė. Ją sudaro vienas sluoksnis sp^2 hibridizuotų anglies atomų, sujungtų kovalentinėmis jungtimis, kad susidarytų plokščia šešiakampė gardelė [19]. Grafenas pasižymi puikiomis elektrocheminėmis savybėmis, tokiomis kaip didelis šilumos laidumas (viršija 3000 m K^{-1}), kuris yra milijoną kartų didesnis nei vario šilumos laidumas, ir mažas redokso potencialas ($-0,5 \text{ V} - 1,2 \text{ V}$). Be to, ši medžiaga rodo optinę absorbciją infraraudonųjų spindulių riboje, visišką bet kokių dujų nepralaidumą, didelį paviršiaus plotą ($2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) ir gerą mechaninį stiprumą (apie 1100 GPa), todėl medžiaga pasižymi puikiomis savybėmis, kurios padidino jos panaudojimą elektronikos ar biomedicinos srityse [20]. Grafeno pagrindu pagamintiems elektrocheminiams jutikliams reikia užtikrinti tinkamą konjungaciją tarp grafeno ir biologinių molekulių, tokių kaip fermentai, DNR, RNR ir aptamerai. Tam tikslui, galima atlikti grafeno funkcionalizavimą, būtinai stebinant defektų atsiradimą ant grafeno paviršių [21].

Grafeno pagrindu pagamintos medžiagos apibūdinamos kaip anglies medžiagų klasė, pagrįsta anglies atomų monosluoksniu, išsidėsčiusiu korio gardelėje. Grafeno oksidas (GO) ir redukuotas grafeno oksidas (rGO) yra pagrindiniai šios klasės atstovai. Pastaruoju metu pastebimas padidėjęs šios medžiagų klasės panaudojimas dėl jų puikių fizikinių ir cheminių savybių, paprastų paruošimo būdų ir buvimo jų sudėtyje tokių funkcinių grupių, kaip hidroksilinės, karboksilinės ar epoksidinės [22].

1.6. Redukuotas grafeno oksidas

Įvairiose mokslo srityse pastebimas vis didesnis rGO panaudojimas kartu su skirtingomis polimerinėmis medžiagomis. Šis susidomėjimas atsirado dėl galimybės paruošti laidžius kompozitus, turinčius norimas elektrines charakteristikas. Taip pat pasinaudojant būdingomis geromis mechaninėmis savybėmis, susijusiomis su stipriais ir standžiais sp^2 hibridizuotais sujungtų anglies atomų lakštais [23]. Ši junginį galima gauti iš GO redukcijos būdu. Tai galima pasiekti elektrocheminiu, cheminiu ir terminiu redukavimu. Kiekvienas procesas turi savo privalumų ir trūkumų. Tačiau galutinis tikslas yra tas pats, tai yra pašalinti deguonies grupes ir pašalinti GO defektus, kad būtų atkurtas ilgojo nuotolio konjuguotas grafeno tinklas ir taip atstatytas laidumas [24]. Palyginti su GO, rGO savo struktūra yra panašesnis į grafeną ir todėl pasižymi didesniu elektriniu laidumu, mechaninėmis savybėmis ir fototerminiu efektu. Puikus fototerminis efektas suteikia rGO dideles fototerminės terapijos galimybes prieš vėžį ir šilumos sukeltą kontroliuojamą vaistų išsiskyrimą. Fototerminis rGO poveikis taip pat gali atlikti svarbų vaidmenį taikant antibakterinius preparatus [25].

1.7. PANI

PANI yra vienas iš populiariausių polimerų elektrai laidžių polimerų šeimoje. PANI yra plačiai tiriamas dėl savo savybių, tokių kaip maža savikaina, stabilumas bei platus laidumo diapazonas [26]. PANI sintezė paprastai atliekama cheminės oksidacinės polimerizacijos arba elektrocheminės polimerizacijos metodais. Norint paruošti PANI, reikia įvykdyti jo monomero - anilino (ANI) molekulių oksidaciją, kad galėtų įvykti reakcija ir susidarytų ANI dimerai, rekombinuojant katijonines oksidacijos vietas arba per elektrofilinį pakaitalą. Nuolatinis katjonų radikalų oksidacijos vietų susidarymas leidžia augti toliau ANI dimerams. Po to jie jungiasi į PANI oligomerus taip galiausiai susidarant PANI [27]. Sintezės metu susidaro trys idealizuotos PANI oksidacijos būsenos: leukemeraldinas, pernigranilinas ir emeraldinas. Emeraldinas, atitinkantis iš dalies oksiduotą polimerą, laikomas naudingiausia PANI forma. PANI yra p tipo puslaidininkas. Sistemoje esančios

delokalizuotos π jungtys yra atsakingos už puslaidininkes savybes. Jo elektrinį laidumą daugiausia gali įtakoti molekulinė masė, kristališkumo procentinė dalis, oksidacijos lygis ir molekulių išsidėstymas. Be to, PANI pripažįstamas kaip vienintelis laidus polimerus, stabilus ore. Įsibėgėjus nanotechnologijoms, buvo sukurtas nanostruktūrizuotas PANI. Jis pasižymi didesniu paviršiaus plotu, poringumu ir puikiomis elektrocheminėmis savybėmis, leidžiančiomis elektrodą modifikuoti didesniu fermentu kiekiu bei stebėti greitą analitės difuziją [28]. PANI yra chemiškai stabilus ir pasižymi dideliu cheminiu ir struktūriniu atsparumu rūgštiniuose ir šarminiuose tirpaluose be jokių cheminių reakcijų ar skaidymo [29]. PANI yra pirmasis komercinis laidus polimeras. Šiuo metu yra daugybė atliktų tyrimų apie šio polimero naudojimą įvairiose srityse, pradedant baterijomis, baigiant cheminiais jutikliais ir biologiniais jutikliais. Mokslininkai dažnai panaudoja PANI projektuodami ir konstruodami biologinius jutiklius. Toks susidomėjimas PANI polimerų galima paaiškinti jo unikaliomis savybėmis. PANI yra geras pernašos tarpininkas perduodant elektronus redokso ar fermentinėse reakcijose. Šis reiškinys galimas dėl būdingo PANI elektroaktyvumo. PANI gali būti naudojamas kaip tinkama biomolekulių imobilizavimo matrica. Be to, PANI taikomas biologinių jutiklių srityje dėl savo didelio laidumo, redokso grįžtamumo, ilgalaikio aplinkos stabilumo ir paprastų sintezės būdų su galimybe kontroliuoti jo sluoksnio storį elektrodo paviršiuje. Yra įvairių PANI nanostruktūrų, įskaitant nanosferas, nanovielas, nanodiodus ir nanovamzdelius, kurių savybės gali stipriai skirtis [30].

1.8. PANI ir rGO kompozitas

PANI yra vienas iš labiausiai naudojamų junginių jutiklių srityje. PANI, kaip jutimo elementas, leidžia stebėti ir aptikti įvairias analites kambario temperatūroje. Jo sąveika su analitėmis daro įtaką jo redokso savybėms, dėl ko pasikeičia atsparumas ar elektrocheminis potencialas. Taip pat galimas fermentų ar kitų biologinių medžiagų imobilizavimas ant PANI ar jo nanokompozitų [31].

Pastaruoju metu rGO sulaukė didelio mokslininkų susidomėjimo ir dėl savo puikių fizinių ir cheminių savybių tapo idealia elektronikos bei optoelektronikos prietaisų ir grandinių medžiaga. Tačiau negrįžtamasis grafeno nanodalelių agregavimas iškrovimo ir įkrovimo procesų metu sukelia nepakankamą rGO paviršiaus panaudojimą [32]. Naujausi tyrimai parodė, kad įtraukus rGO į PANI, kad padidėtų savitasis paviršiaus plotas ir elektrinis laidumas, galima pasiekti didelę savitąją talpą 777 F g^{-1} esant $1 \text{ A g}^{-1,8}$ srovės tankiui. Šiuo metu PANI ir rGO tapo viena iš labiausiai ištirtų medžiagų tarp įvairių laidžių polimerinių kompozitų [33]. Nanostruktūrizuoto rGO integravimas į PANI taip pat sulaukė daugelio mokslininkų dėmesio. Taip yra dėl abiejų medžiagų konjunguotos elektroninės struktūros panašumo ir būdingo elektroaktyvumo. Be to, rGO turi didelį paviršiaus plotą, gerą lankstumą, didelį mechaninį stiprumą ir puikų laidumą elektrai. Į lakštą panaši rGO struktūra leidžia jį panaudoti kaip idealų polimerų užpildą. Funkcinės rGO grupės tokios kaip karboksilinės, hidroksilinės, epoksidinės ar karbonilinės palaiko jo pasiskirstymą PANI matricoje per π - π jungtį, elektrostatines jėgas ir vandenilines jungtis. Mažas rGO kiekis gali pagerinti visas rGO-PANI kompozicinės medžiagos savybes [34]. Kadangi šis PANI-rGO kompozitas išsiskiria palankiu elektrocheminiu aktyvumu, jį galima pritaikyti biologinių jutiklių kūrime [35].

1.9. Gliukozės oksidazė

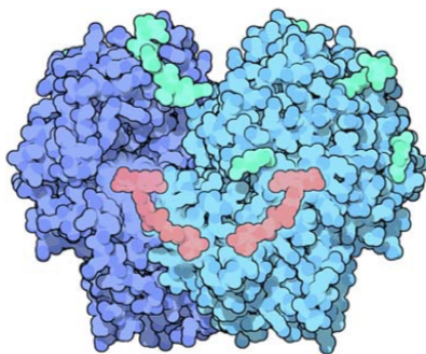
Gliukozės oksidazė (GOx) yra svarbus fermentas, kuris pasižymi dideliu specifiškumu ir stabilumu bei plačiai taikomas įvairiose srityse [36]. GOx yra naudojama biologinių jutiklių, skirtų gliukozės koncentracijos nustatymui, kūrime. Šio fermento randama meduje, kur GOx veikia kaip

natūralus maisto konservantas, nes deguonis paverčiamas vandenilio peroksidu, kuris veikia antibakteriškai. Taigi, maisto pramonėje GOx naudojama maisto konservavimui. Kadangi GOx aktyvumas susijęs su elektronų perdavimu, šis fermentas yra patrauklus panaudojimui biokuro elementuose, kuriuose gliukozė yra naudojama kaip kuras [37].

Gliukozės oksidazę 1928 m. atrado Mulleris. Po metų Flemingas iš *Penicillium notatum* pelėsio išskyrė peniciliną. Flemingo atradimas paskatino ieškoti panašių bakterocidų tos pačios genties pelėsiuose. Kurį laiką dirbti šioje srityje trukdė nepastovūs rezultatai, gauti analizuojant kultūros filtratų baktericidines savybes prieš *Staphylococcus aureus*. Kai kuriuose filtratuose buvo medžiagos, panašios pagal baktericidines savybes į tą, kurią jau aprašė Flemingas. Kitos turėjo baktericidinių savybių tik esant gliukozei. Iš pradžių medžiagą pavadino penicilinu A, tačiau vėliau jos pavadinimas buvo pakeistas į notatiną, kad būtų galima ją atskirti ją nuo penicilino. Kitur beveik tuo pačiu metu buvo išskirtos medžiagos, vadinamos penicilinu B ir penatinu. Netrukus paaiškėjo, kad penicilinas B ir penatinas yra identiški notatinui. Be to, visi jie buvo identiški Mullerio atrastai GOx. Vėlesniais laikotarpiais buvo siekiama atskleisti šios medžiagos savybes [36].

GOx iš pradžių buvo išskirta ir gaminama iš grybelio *Aspergillus niger*, kuris išlieka dažniausiu naudojamu GOx šaltiniu. GOx galima įsigyti iš įvairių fermentus gaminančių kompanijų. GOx galima išskirti iš kelių skirtingų grybelių, taip pat iš kelių vabzdžių. GOx išskirtos iš *Aspergillus niger* svarbi savybė yra didelis specifiškumas gliukozei. Šia savybė buvo patvirtinta 1940 m., be to buvo atrasta, kad GOx gali būti pritaikyta matuojant gliukozės koncentraciją esant kitiems cukrams tirpale. Taip pat, žinoma, kad kitos prigimties GOx taip pat oksiduoja kitus cukrus, įskaitant maltozę [38].

Struktūriškai GOx yra homodimeras, sudarytas iš dviejų vienodų 80 kDa subvienetų ir dviejų nekovalentiškai surišų flavino adenino dinukleotidų (FAD), kaip parodyta 2 paveiksle. GOx turi FAD tašką, kuris visiškai apsuptas apoenzimo. FAD kofermentas fermentinės reakcijos metu veikia kaip elektronų akceptorius [36]



2 pav. GOx struktūra. Subvienetai pažymėti tamsiai ir šviesiai mėlyna spalva, o FAD kofermentas yra rožinės spalvos [39].

Nustatyta, kad GOx, išskirtos iš *Aspergillus niger*, struktūroje vieno subvieneto vienoje polipeptido grandinėje yra 583 aminorūgščių liekanos [40]. GOx yra 16 % angliavandenių sudėtyje turintis glikoproteinas, kurį daugiausiai sudaro manozė. Fermentinė GOx reakcija gali vykti pH intervale nuo 4 iki 7. Tyrimams dažniausiai pasirenkamas optimalus pH – 5,5. Manozė, ksilozė, galaktozė ir skirtingi dezoksigliukozės izomerai taip pat gali būti GOx substratais, tačiau jų atveju fermentinės reakcijos greitis yra daug mažesnis [41]. GOx geriausiai apibūdinama fermentu, kuris katalizuoja beta-D-gliukozės oksidaciją į D-gliukonolaktoną ir vandenilio peroksidą [42]. Vandenilio peroksidas ir D-gliukonolaktonas skyla į gliukono rūgštį. Be to, stebimas fermentinės reakcijos greičio sumažėjimas, kai sistemoje pradeda kauptis H₂O₂. Taip pat didėja D-gliukonolaktono skilimo

produkto, kuris sumažina tirpalo pH. Šių produktų koncentracijų didėjimas sukelia fermentinės reakcijos greičio sumažėjimą [43].

GOx natūraliai gaminama kai kuriuose grybeliuose, taip pat aptinkama vabzdžių organizmuose. Natūrali šio fermento funkcija yra glaudžiai susijusi su jo kataliziniu aktyvumu. Pagrindinė GOx funkcija yra gaminti vandenilio peroksidą, kaip antibakterinį ir priešgrybelinį agentą. Literatūroje rašoma, kad nuolatinis oksidacinis stresas, palaikant mažą vandenilio peroksido koncentraciją, esant pastoviam GOx kataliziniam aktyvumui, labai veiksmingas prieš bakterijų ar grybelių augimą [44].

GOx gali oksiduoti monosacharidus, nitroalkanus ir hidroksilo junginius [39]. Jei priimti gliukozės oksidacijos reakcijos greitį kaip etaloną (100 %), naudojant iš *A. Niger* išskirtą GOx fermentą, tai 2-deoksi-D-gliukozė, 4-O-metil-D-gliukozė ir 6-deoksi-D-gliukozė oksiduojasi atitinkamai 20-30 %, 15 % ir 10 % reikšmingu greičiu. GOx aktyvumas kitų substratų atžvilgiu paprastai yra menkas, o reakcijos greitis pasiekia nedaugiau nei 2 % gliukozės oksidacijos greičio [45].

Be reduktoriaus ar elektronų donoro, kuris yra cukrų molekulės, GOx fermentinei katalizei užbaigti taip pat reikalingas oksidatorius arba elektronų akceptorius. Natūralus elektronų akceptorius yra ištirpęs deguonis, kuris suteikia aukščiausią entalpiją. Kiti potencialūs elektronų akceptoriai, įskaitant chinonus, palyginus su deguonimi paprastai turi mažesnę redokso potencialą ir dėl to neleidžia pasiekti tokią pat reakcijos greitį [46].

1.10. Gliukozės oksidazės taikymas

Monosacharidų oksidacijos reakcijos yra įvairių modernių biologiškai aktyvių junginių gavimo metodų pagrindas. Viena iš tokių reakcijų yra D-gliukozės oksidacija į D-gliukono rūgštį, kuri yra plačiai naudojama farmacijos ir maisto pramonėje [47]. Pateikiama daugybė pramoninių ir komercinių sričių, kuriose gali būti naudojama GOx. Jos naudingumas įvairiose srityse paskatino ieškoti naujų GOx šaltinių. Bandoma išskirti GOx iš įvairių grybelių rūšių bei vabzdžių, nes šie fermentai gali pasižymėti geresnėmis savybėmis, tokiomis kaip didesnis katalizinis aktyvumas [48]. Pagal FDA klasifikaciją GOx paprastai laikoma saugia, todėl ją galima naudoti maisto pramonėje skystoje formoje arba miltelių pavidalu. GOx dažnai klasifikuojama pagal antioksidantų, konservantų ir stabilizatorių savybes. Yra daugybė maisto produktų, kuriuose gali būti naudojama gliukozės oksidazė. Maistinis GOx preparatas paprastai yra GOx ir katalazės mišinys, nes šie du fermentai natūraliai randami grybienos ląstelių sienelėje [49]. GOx atskyrimas nuo katalazės yra brangus ir nėra būtinas maisto produktams. Be to, katalazė padeda skaidyti vandenilio peroksidą, kurį gamina GOx, taip sumažinant H_2O_2 įtaką bei padidinant GOx fermentinės reakcijos greitį [43].

Vienas iš svarbiausių GOx panaudojimo būdų maisto perdirbimo pramonėje yra konservavimas. Optimalios antibakterinės GOx ir gliukozės sąlygos buvo nustatytos išrūgose augantiems mastiniams patogenams. Šių tyrimų tikslas buvo ištirti galvijų piene esančią laktoperoksidazės (LPO) sistemą [44]. LPO yra hemoproteinų fermentas, kurio didžiausios koncentracijos aptinkamos tirpioje pieno ar išrūgų frakcijoje. Tokį tyrimą 1988 m. atliko Sandholm ir kt., kai šią LPO sistemą panaudojo piene augančių mastito sukėlėjų stebėjimui. Turbidometrinis bakterijų augimas išrūgose gali būti panaudojamas nustatant pradinį bakterijų augimą piene. Tyrimo metu buvo tiesiogiai pridodamas substratas, kad suaktyvėtų LPO antibakterinė sistema. Fermentas GOx tapo vienu iš pieno konservantų, kuris suaktyvina LPO sistemą, taip išskiriant antibakterinių savybių turintį H_2O_2 [50]. Taigi laktoperoksidazės (LPO) sistema, vartojant ją kartu su GOx, yra labai naudinga antimikrobinė priemonė. LPO yra įgimto imuninės sistemos gynybos nuo svetimų mikroorganizmų dalis ir gali būti randama žinduolių išskyrose, tokiose kaip pienas, ašaros ir seilės.

Šią sistemą sudaro trys komponentai – laktoperoksidazė, tiocianatas ir vandenilio peroksidas. Tiocianato ir vandenilio peroksido būvimas suaktyvina LPO sistemą. LPO fermentinės reakcijos metu susidaro aktyvūs tarpiniai produktai, kurie pasižymi antimikrobinėmis savybėmis ir yra visiškai saugūs žmonėms. GOx ir jo substrato (gliukozės) buvimas leidžia nuolat kurti ir papildyti reikalingą LPO sistemai vandenilio peroksidą [51]. Galima naudoti ir aktyvuoti LPO sistemą, gabenant ir laikant šviežią pieną, kad jis nesugestų. Be to, rekomenduojama naudoti LPO sistemą, kai negalima šaldyti maisto produktus arba kaip šaldymo priedą. Eksperimentai parodė, kad pieno su aktyvia LPO galiojimo laikas beveik padvigubėjo, palyginus su pienu, kuriame yra inaktyvuotas šis fermentas [52].

GOx taip pat gali būti panaudojama duonos gamyboje. GOx naudojama kaip veiksmingas oksidantas, kuris panaudojamas gaminant patobulintą duonos struktūrą. Tyrimai buvo patvirtinti tuo, kad dėl susidariusio H₂O₂ duonos tešla įgauna geresniu savybių, tokių kaip didesnis elastingumas bei klampumas. Brandinantys ir oksiduojantys agentai yra būtinas miltų priedas. Vienas iš jų tikslų yra sustiprinti glitimą ir taip pagerinti duonos galutinę tekstūrą. Tai pasiekama oksiduojant miltuose du baltymus – gliadiną ir gluteneną. Tai leidžia glitimui sudaryti daugiau ryšių. Glitimas susidaro, kai gliadinas ir glutenas liečiasi su vandeniu, o jo brendimui padeda mielių reakcijos [53].

Gliukozės lygis yra svarbus biologiniuose bei klinikiuose tyrimuose [54]. Cukrinis diabetas yra viena iš pagrindinių mirties ir neįgalumo priežasčių pasaulyje. Diabeto pasėkoje gali išsivystyti inkstų nepakankamumas, širdies veiklos sutrikimai ar aklumas. Maždaug 200 milijonų žmonių pasaulyje serga cukriniu diabetu [55]. Taigi gliukozės kiekio kraujyje nustatymas greitai, patogiai, tiksliai ir pigiai yra gyvybiškai svarbus diagnozuojant ir efektyviai valdant šią lygą [56]. Todėl ekonomiškai efektyvus, paprasto, tikslaus, nešiojamojo ir greito gliukozės jutiklio sukūrimas ir gamyba yra svarbūs sergant cukriniu diabetu [57]. Šiuo tikslu gliukozei nustatyti sėkmingai naudojami elektrocheminiai biologiniai jutikliai. GOx naudojama cukriniu diabetu sergančių pacientų gliukozės kiekiui kraujyje nustatyti, nes šis fermentas yra nebrangus, stabilus ir praktiškas [58]. Dauguma gliukozės matavimų yra pagrįsti GOx imobilizavimu, siekiant nustatyti H₂O₂ koncentraciją, kuri gaunama vykstant GOx fermentinei reakcijai. Kadangi GOx gali greitai ir tiksliai atpažinti tikslines molekules sudėtingose sistemose, todėl svarbu sukurti tinkamą matricą ant elektrodo paviršiaus, kad būtų galima imobilizuoti GOx, išlaikant jos didelį fermentinį aktyvumą [59].

2. EKSPERIMENTINIO TYRIMO METODIKA

2.1. Prietaisai ir priemonės

Skenuojantis elektroninis mikroskopas (SEM) SU-70 (Hitachi, Japonija);
Potencio statas Autolab PGSTAT302 („Eco chemike BV“, Olandija);
Ultragarso vonia RK 31 H („Bandelin electronic“, Vokietija);
Analizinės svarstyklės KERN ABJ 220 – 4M („Kern & Sohn GmbH“, Vokietija);
Automatinės pipetės („Eppendorf“, Vokietija);
Lyginamasis elektrodas – Ag/AgCl_{3 mol L⁻¹ KCl};
Pagalbinis elektrodas – Pt elektrodas;
Magnetinė maišyklė HI 190M (Hanna Instruments, Rumunija).

2.2. Medžiagos ir reagentai

Acetonas CH₃COCH₃ („REACHEM“, Slovakija);
Acto rūgštis CH₃COOH („Fluka“, Šveicarija);
Amonio persulfatas (APS) (NH₄)₂S₂O₈ („Fluka“, Vokietija);
Anilinas (ANI) C₆H₅NH₂ („Fluka“, Vokietija);
Askorbo rūgštis („Fluka“, Vokietija);
Chloroformas CHCl₃ („PENTA“, Čekija);
D-(+)-fruktozė („MERK“, Vokietija);
D-(+)-galaktozė („Carl ROTH“, Vokietija);
D-(+)-gliukozė („Alfa Aesar“, Vokietija);
D-(+)-manozė („Carl ROTH“, Vokietija);
Druskos rūgštis HCl („Dr. Jan Kulich“, Čekija);
Fermentas gliukozės oksidazė GOx išskirtas iš *Aspergillus niger* („AppliChem“, Vokietija);
Glutaro aldehidas 25 % C₅H₅O₈ („Carl ROTH“, Vokietija);
Kalio divandenilio fosfatas KH₂PO₄ („Riedel-deHaën“, Vokietija);
N-metilfenazino metosulfatas (FMS) C₁₄H₁₄N₂O₄S („SIGMA-ALDRICH“, Vokietija);
Natrio acetatas CH₃COONa („AppliChem“, Vokietija);
Natrio dihidrofosfatas Na₂HPO₄ · 12 H₂O („Carl ROTH“, Vokietija);
Sacharozė („MERK“, Vokietija);
Šlapimo rūgštis („AppliChem“, Vokietija);
Kalio chloridas KCl („Scharlau“, Ispanija);
2-propanolis C₃H₈O („SIGMA-ALDRICH“, Vokietija);
Grafito milteliai („Merck“, Vokietija);
Kalio persulfatas K₂S₂O₈ („SIGMA-ALDRICH“, Vokietija);
Fosforo oksidas P₂O₅ („Carl ROTH“, Vokietija);
Sieros rūgštis H₂SO₄ („Carl ROTH“, Vokietija);
Malono rūgštis („SIGMA-ALDRICH“, Vokietija);
Nafionas („Alfa Aesar“, Vokietija).

2.3. Etaloninių tirpalų paruošimas

0,05 mol L⁻¹ fosfatinis acetatinis buferinis tirpalas (FAB) pH 6,0 buvo pagamintas sumaišant atitinkamus kiekius natrio dihidrofosfato, natrio acetato, kalio chlorido ir kalio divandenilio fosfato ir praskiedžiant juos distiliuotu vandeniu. Reikiamo buferinio tirpalo pH privedimui buvo panaudotas 1 mol L⁻¹ acto rūgšties tirpalas. Pabaigoje tirpalas buvo perpilamas į matavimo kolbą ir skiedžiamas iki žymės. Pagamintas fosfatinis acetatinis buferis buvo laikomas šaldytuve.

Etaloninio 0,1 mol L⁻¹ fenazino metasulfato (FMS) tirpalo ruošimas: 0,767 g FMS atsveriami ir suberiami į matavimo kolbą, ištirpinama distiliuotame H₂O ir praskiedžiama 25 mL matavimo kolboje iki žymės. Tirpalas buvo laikomas tamsaus stiklo buteliuke šaldytuve.

Etaloninio gliukozės tirpalo ruošimas: 9 g gliukozės atsveriami ir praskiedžiama distiliuotu vandeniu matavimo kolboje iki 50 mL. Šiame tirpale gliukozės koncentracija 1 mol L⁻¹. Gliukozės tirpalas po paruošimo buvo paliekamas 24 val. šaldytuve, kad nusistovėtų pusiausvyra taip gliukozės formų, vykstant mutarotacijai.

Anilinas (ANI) prieš naudojimą buvo distiliuojamas. Surinktas tirpalas buvo supilamas į tamsaus stiklo buteliuką ir laikomas šaldytuve.

40 mg mL⁻¹ GOx tirpalas buvo gaminamas užpylus reikiama kieki GOx fosfatinio acetatinio buferiu pH 6,0. GOx tirpalas švelniais judesiais buvo išmaišomas ir išskirstytas į mažesnius kiekius, kurie buvo laikomi šaldiklyje.

2.4. Programinė įranga

Magistrinio darbo elektrocheminiai tyrimai buvo atlikti naudojant Nova programinę įrangą, o rezultatai apdorojami Microsoft Word ir OriginPro 2019 programomis.

2.5. PANI nanopluoštų sintezė

PANI nanopluoštų sintezei buvo panaudotas tarpfazinės polimerizacijos metodas. Polimerizacija buvo atliekama organinio ir vandeninio tirpiklių sąlyčio zonoje. Sintezei buvo panaudoti du tirpalai: 20 mL 1 mol L⁻¹ HCl tirpalas su 4 mol L⁻¹ amonio persulfato (APS) ir 20 mL chloroformo tirpalas su 4 mol L⁻¹ anilino. Tirpalai buvo maišomi ant magnetinės maišyklės 1 val. prieš sintezę. Tada neskubant organinis tirpalas supilamas į vandeninį tirpalą. Paruoštas mėginys paliekamas stovėti 24 val. kambario temperatūroje. Po paros laiko tamsiai žalios PANI nanopluoštų nuosėdos surenkamos iš vandeninės fazės, nufiltruojamos bei praplaunamos nedideliu acetono kiekiu, o vėliau plaunamos distiliuotu vandeniu, kol filtratas tampa skaidrus. Susintetinti PANI nanopluoštai džiovinami kambario temperatūroje [60].

2.6. rGO sintezė

rGO pavyzdžiai buvo susintetinti Vilniaus universiteto Chemijos ir geomokslų fakulteto Chemijos instituto Neorganinės chemijos katedroje. Pirmiausia buvo susintetinamas GO. Sintezės metu 6 g grafito milteliai buvo apdorojami su 5,0 g K₂S₂O₈ ir 5,0 g P₂O₅ su 24 mL 98 % sieros rūgštimi [61]. Tada sausas GO filtruojamas ir plaunamas 0,5 L 10 % HCl vandeniniu tirpalu, kad būtų pašalinti metalų jonai. Po to, GO dalelės buvo suspenduotos dejonizuotame vandenyje ir išgrynintos naudojant dializės vamzdelių celiuliozės membraną (10000 – 20000 Da). Dializė užėmė apie 14 dienų, kol dializato pH vertė tapo apie 5. Gauta GO suspensija filtruojama naudojant Buchnerio piltuvą, o gauti rudi milteliai džiovinami kambario temperatūroje iki pastovaus svorio [62].

Susintetintas GO ir malono rūgštis santykiu 1:3 atitinkamai buvo šlifuojami agato skiedinyje 10 min. Paruoštas kietas mišinys buvo atkaitinamas horizontalioje vamzdžių krosnyje argono sraute (60 mL min^{-1}) 30 min $600 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje. Galiausiai termiškai redukuotas GO ir malono rūgšties mišinys buvo plaunamas dejonizuotu vandeniu ir džiovinamas ore.

2.7. Medžiagų charakterizavimas

Susintetintų medžiagų formos ir morfologijos buvo analizuojamos naudojant skenuojantį mikroskopą (SEM). Tyrimo mėginiai buvo analizuojami priartinant juos 20000 ir 50000 kartus.

Difraktogramos buvo užfiksuotos 2θ intervale nuo 5° to 60° , naudojant $\text{CuK}\alpha$ $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ spinduliuotę. Matavimai buvo atlikti esant 30 kV ir 15 mA įtampai, kai žingsnio dydis buvo $0,010^\circ$, o sulaikymo trukmė – 1 s. Grafito, GO ir rGO tarp sluoksnių atstumas d buvo įvertintas naudojant Braggo lygtį:

$$n\lambda = 2d\sin\theta,$$

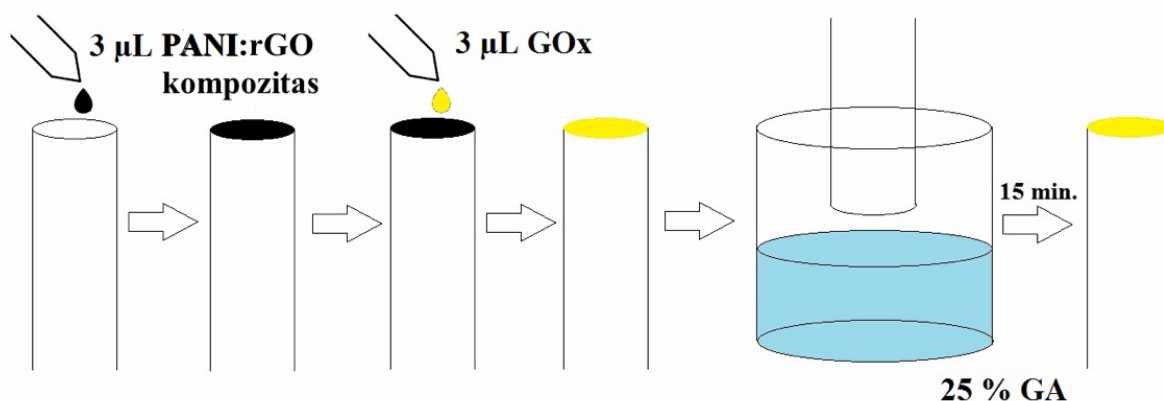
kur n – teigiamas sveikasis skaičius, λ – rentgeno spindulio bangos ilgis, d – atstumas tarp gretimų tarp sluoksnių ir θ – difrakcijos kampas.

2.8. PANI, rGO ir PANI-rGO dispersijų paruošimas

PANI-rGO dispersijos, kurios buvo naudojamos GR elektrodo modifikavimui, buvo ruošiamos 2-propanolyje. PANI nanostruktūrų dispersija buvo gaminama atsveriant 1 mg PANI nanostruktūrų ir ištirpinant 100 μL 2-propanolyje, kuriame yra 0,5 % Nafiono. Prieš naudojimą dispersija buvo maišoma ultragarso vonelėje 15 min. Analogiškai buvo paruošta rGO dispersija. Tai pat PANI nanopluoštų ir rGO dispersijos buvo sumaišytos atitinkamais santykiais (5:1, 1:1, 1:5 ir 1:15) ir dar 15 min paliekamos maišytis ultragarso vonelėje. Paruoštos dispersijos buvo laikomos plastikiniuose mėgintuvėliuose šaldytuve.

2.9. Grafito elektrodo modifikavimas

Vienas iš svarbiausių aspektų kuriant jutiklius yra elektrodo paruošimas bei modifikavimas. Šiame tyrime naudoto GR elektrodo paviršius buvo nušveistas skirtingo šiuurkštumo švitriniumi, o pabaigoje baltu popieriaus lapu tol kol GR elektrodo paviršius įgaudavo metalinį blizgesį. Tada nušveistas grafito elektrodas nuplaunamas distiliuotu vandeniu. Tolimesnis GR elektrodo modifikavimas pateiktas 3 paveiksle.



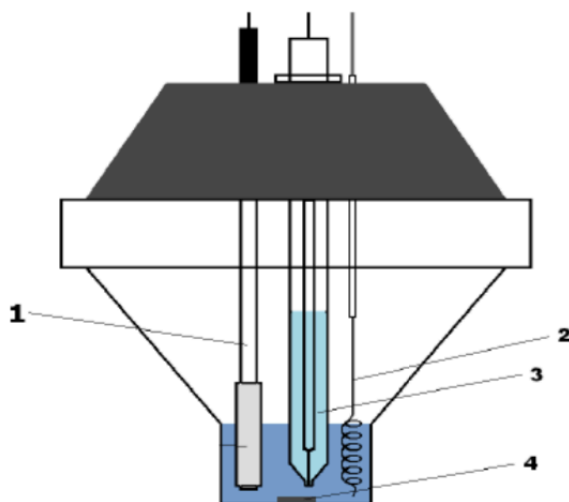
3 pav. Principinė GR elektrodo modifikavimo schema.

Visi GR elektrodo paruošimo darbai buvo atliekami kambario temperatūroje. Pirmiausia ant paruošto GR elektrodo paviršiaus užlašinama 3 μL PANI ar rGO dispersijos. Taip buvo paruošti elektrodai ant kurių buvo užlašinamos tam tikrais santykiais (5:1, 1:1, 1:5 ar 1:15) sumaišytos PANI ir rGO dispersijos. Kai elektrodas išdžiūna, užlašinama 3 μL 40 mg mL^{-1} GOx tirpalo. Palaukiama kol elektrodas nudžiūna ir toks elektrodas laikomas 15 min virš 25 % glutaro aldehido (GA) tirpalo, kad elektrodo paviršiuje esančios medžiagos būtų kovalentiškai surištos. Galiausiai elektrodas nuplaunamas distiliuotu vandeniu ir silikonine gumele izoliuojami elektrodo šonai.

2.10. Elektrocheminiai tyrimai

Magistrinio darbo metu elektrocheminiai tyrimai buvo atlikti elektrocheminėje celėje su trijų elektrodų sistema (pav. 4). Elektrodų sistema buvo sudaryta iš trijų elektrodų: darbinio – grafito elektrodo, pagalbinio - Pt viela ir palyginamojo – $\text{Ag}/\text{AgCl}_{3\text{mol L}^{-1}\text{KCl}}$ elektrodo.

Pirmiausia elektrocheminė celė buvo užpildyta 4,7 mL FAB ir 319 μL FMS tirpalo. Tada sujungiami elektrodai, įjungiamas potenciostatas ir kompiuteryje paleidžiama Nova programa ir elektrodai suteikiamas +0,3 V potencialas. Tyrimai atliekami, kai buvo pastoviai maišomas tirpalas magnetine maišykle. Kai nusistovi bazinė linija, pradedama pilti reikalingas gliukozės tirpalo kiekis. GR elektrodo paviršiuje vyksta fermentinė reakcija, kurios metu elektronus padeda pernešti FMS iš fermento aktyviojo centro link elektrodo paviršiaus. Kompiuteryje registruojami anodinės srovės stiprio pokyčiai laike. Kai užrašomas matavimo rodmuo, toliau pilamas kitas gliukozės tirpalo kiekis. Kai užrašomi visi rezultatai, brėžiama srovės stiprio pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos. Visi elektrocheminiai tyrimai buvo atlikti kambario temperatūroje.



4 pav. Elektrocheminė celė su trijų elektrodų sistema: 1 – darbinis elektrodas – GR elektrodas, 2 – pagalbinis elektrodas – Pt viela, 3 – palyginimasis elektrodas – $\text{Ag}/\text{AgCl}_{3\text{mol L}^{-1}\text{KCl}}$ elektrodas, 4 – maišymo magnetukas.

Kinetiniai Michaelis-Menten lygties parametrai buvo apskaičiuojami norint palyginti paruoštų elektrodų veikimą. Gauti rezultatai buvo apskaičiuoti naudojant hiperbolinę funkciją:

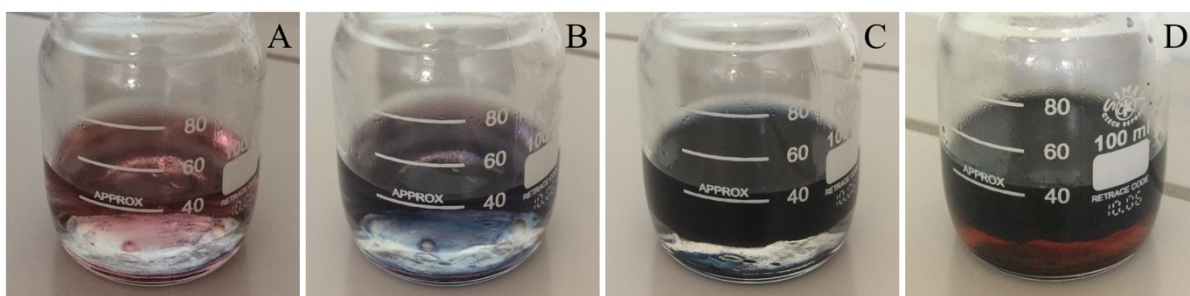
$$y = ax/(b + x)$$

Parametras a yra įvardijamas kaip maksimali srovė (ΔI_{max}), o tariamoji Michaelio konstanta ($K_{Mtar.}$) yra funkcijos parametras b. Taip pat buvo įvertinti kalibravimo kreivės parametrai, tokie kaip nuolinkis ir koreliacijos koeficientas (R).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

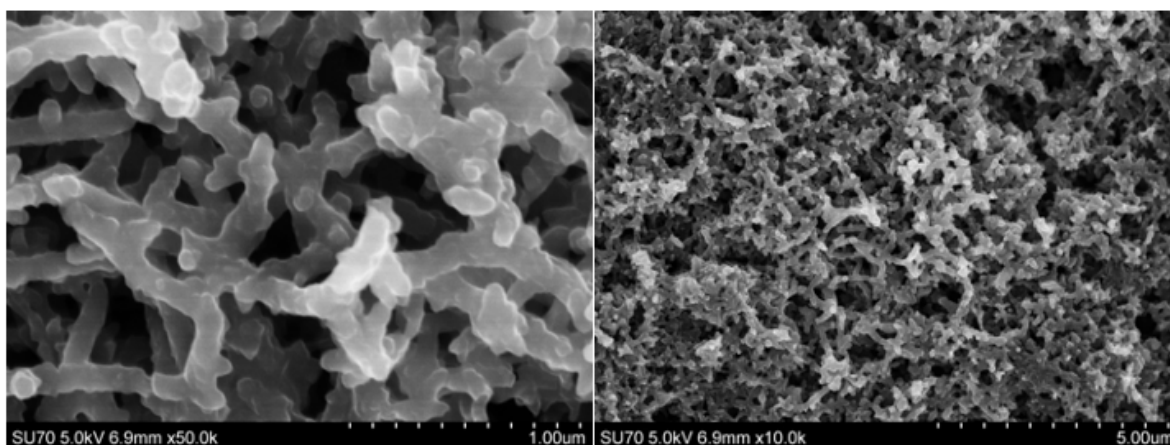
3.1. PANI nanopluoštų sintezė

Panaudojus tarpfazinės polimerizacijos metodą, buvo formuojami PANI nanopluoštai, kurių sintezė vyko dviejų nesimaišančių fazių sąlytyje. Po inkubacinio laikotarpio, kuris paprastai trunka iki 30 s, PANI nanostruktūros juda į vandeninę fazę. Sintezės pradžioje matoma mėlyna spalva susijusi su pernigranilino (pilnai oksiduota PANI forma) grandinių susidarymu, kurios vėliau redukuojasi į emeraldino druską [63]. Sintezės metu didėjanti PANI koncentracija vandeninėje tirpalo fazėje, įtakoja spalvos pokyčius nuo skaidrios iki tamsiai žalios (pav. 5). Tirpumo skirtumai tarp ANI, jo oligomerų ir ilgų PANI grandinių leidžia kontroliuoti susidariusių PANI nanostruktūrų grynumą. Mažesnis ANI molekulių bei oligomerų skaičius polimerizacijos reakcijos galutiniame produkte padidina PANI biologinį suderinamumą [64].



5 pav. PANI nanopluoštų sintezės tirpalo nuotraukos po (A) 5 s, (B) – 1 min, (C) 1 h, (D) 24 val. nuo reakcijos pradžios.

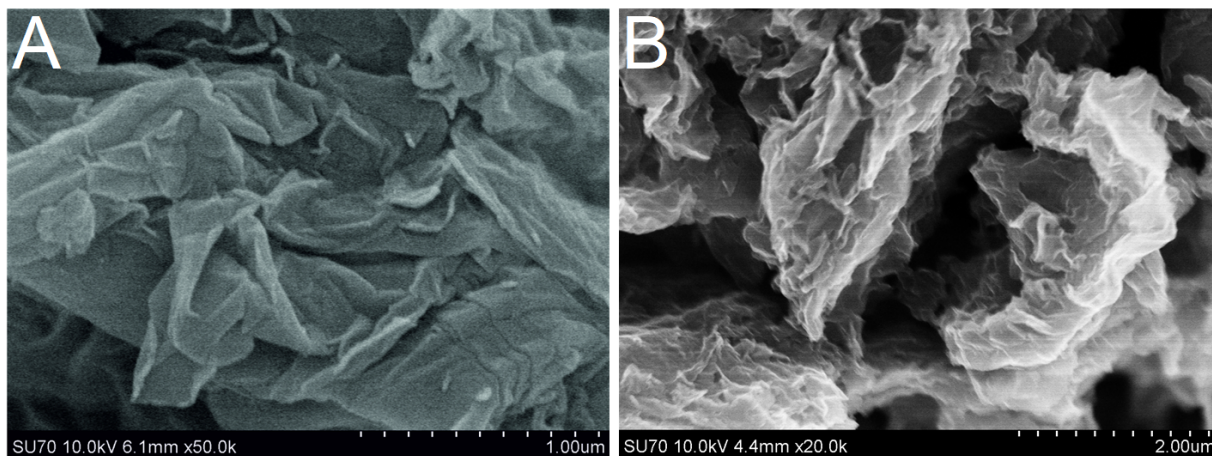
Sintezės metu gautų PANI nanostruktūrų morfologija buvo įvertinta naudojant SEM vaizdavimo techniką. Charakterizavimui mėginiai buvo užlašinami ant GR elektrodo. Gauti SEM nuotraukos yra pateiktos 6 paveiksle.



6 pav. PANI nanopluoštų SEM nuotraukos.

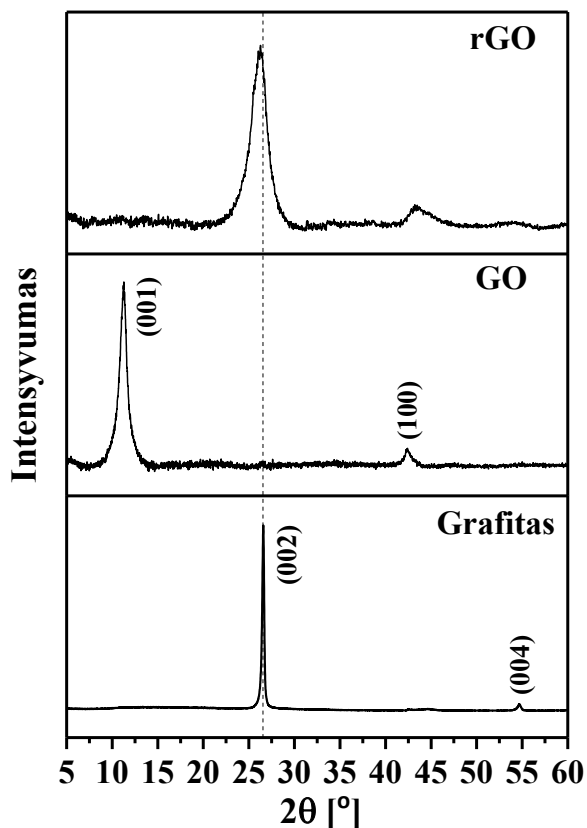
Gauti rezultatai patvirtino sėkmingą nanopluoštų sintezę. PANI mėginyje buvo pastebėti nanopluoštai, tarpusavyje susijungę į tinklo pavidalo struktūrą. Paruoštų nanostruktūrizuotų PANI nanopluoštų skersmuo buvo 118 ± 19 nm, o ilgis labai skyrėsi. Porėta PANI nanopluoštų tinklo pavidalo struktūra gali būti naudojama kaip fermento imobilizavimo matrica, kurios PANI nanopluoštų diametrą ir ilgį būtų galima kontroliuoti keičiant ANI ir APS koncentracijas [60].

Taip pat tyrimui buvo susintetinti rGO mėginiai pagal 2.6 skyriuje pateiktą metodiką. Norint įvertinti rGO susidarymą bei gautų medžiagų morfologiją buvo atlikti GO ir rGO mėginių SEM tyrimai. Mėginiai buvo užlašinami ant GR elektrodo. Gautas nuotraukos yra pateiktos 7 paveiksle.



7 pav. (A) GO ir (B) rGO mėginių SEM nuotraukos.

Pateiktose nuotraukose aiškiai matyti, kad GO yra ploni, lankstūs ir raukšlėti sluoksniai su keliomis klostėmis. Stebimą susiraukšlėjimą galima paaiškinti hidroksilinių ir epoksidinių funkcinių grupių prisijungimu prie bazinės grafeno plokštumos. Termiškai redukuojant rGO esant malono rūgščiai, buvo gautas rGO su netaisyklingais suplyšusiais grafeno sluoksniais, panašius į šydą lakštus su susisukusiais kraštais (7 pav. B). Be to, rGO atveju buvo stebimi atsiskirti vienas nuo kito lakštai, pasižyminti porėtą plyšių struktūrą, kuri yra tinkamesnė PANI:rGO kompozitui paruošti palyginus su daugiasluoksne, raukšlėta banguota struktūra būdinga grafenui [65].

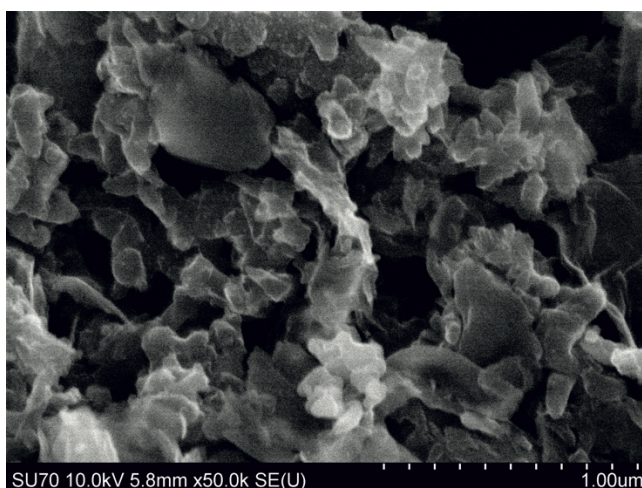


8 pav. Grafito, GO ir rGO mėginių XRD difraktogramos.

Struktūriniai GO pokyčiai po atkaitinimo buvo ištirti XRD analize. Užregistruoti grafito, GO ir rGO Rentgeno spindulių difrakcijos rezultatai pateikti 8 paveiksle.

Grafito rentgeno difraktogramoje aptiktos būdingos smailės ties $2\theta = 26,60^\circ$ ir $2\theta = 54,70^\circ$, kurios atitinkamai būdingos plokštumai (002) ir heksagoninei gardelei (004). Pagal Braggo lygtį (2.7.2. skyrius) apskaičiuotas tarpplokštuminis atstumas tarp (002) plokštumų yra lygus 0,335 nm. Ši vertė yra būdinga tarpplokštuminiui atstumui grafito struktūroje. GO difraktogramoje aptiktos dvi smailės ties $2\theta = 11,28^\circ$ ir $2\theta = 42,38^\circ$, atitinkamai atspindinčias (001) ir (100). GO difraktograma yra panaši į XRD rezultatus, kuriuos aprašė Bandara [66]. GO tarpplokštuminis atstumas d_{001} buvo išplėstas iki 0,784 nm, nes tarp grafeno sluoksnių yra deguonies turinčių funkcinių grupių. Tai patvirtino sėkmingą grafito oksidaciją. Atlikus terminę GO redukciją su malonu rūgštimi, rGO mėginio XRD rezultatai rodo, kad (001) smailė išnyksta, o (002) smailė pasislenka į grafitui būdingą padėtį ($2\theta = 26,33^\circ$), kai tarpplokštuminis atstumas yra lygus 0,338 nm. Tai galima sieti su vandens ir deguonies turinčių grupių pašalinimu bei daliniu sp^2 anglies tinklo atstatymu. Be to, po terminės GO redukcijos XRD difraktogramoje smailės tampa platesnės. Taip vyksta dėl kristalitų dydžio sumažėjimo. Difrakcijos smailės, kurių centras yra maždaug ties $2\theta = 26,33^\circ$ yra asimetriškos dėl sumaišytos grafitinių ir netvarkingų sričių polikristalinės struktūros. (002) ir (100) plokštumų buvimas patvirtina, kad susintetintų rGO mėginių struktūrą yra kažkur tarp grafito ir GO struktūromis.

Norint įvertinti PANI ir rGO nanokompozitų morfologiją buvo atlikti SEM matavimai. Mėginių paruošimui PANI ir rGO dispersijos buvo sumaišytos 1 : 10 santykiu. Gautos nuotraukos yra pateiktos 9 paveiksle.



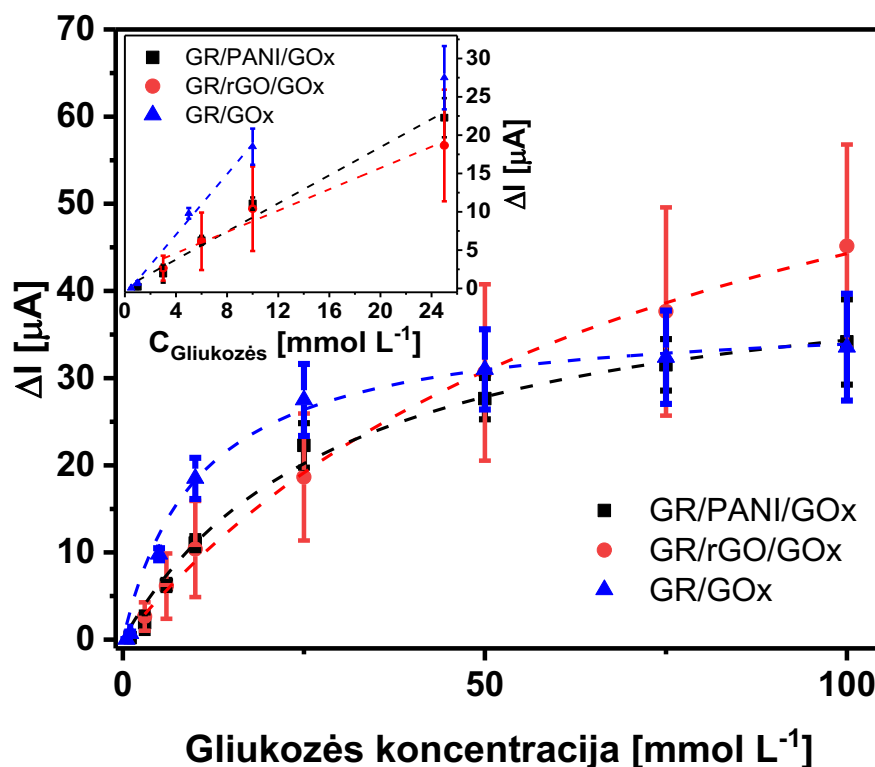
9 pav. PANI ir rGO, sumaišytų 1 : 10 santykiu, nanokompozitų SEM nuotrauka.

Pateiktose nuotraukose matosi, kad PANI:rGO_{1:10} nanokompozitai ryškiai skiriasi nuo anksčiau PANI (pav 6) ir rGO (pav. 7-B) vaizdus. Be to, matosi, kad PANI nanopluoštai atsitiktinai paskirstyti tarp rGO lakštų.

3.2. PANI nanopluoštų ir rGO dispersijų įtakos tyrimai

Norint įvertinti PANI ir rGO dispersijų įtaką amperometriniam gliukozės koncentracijos nustatymui buvo ištirti keli elektrodai. GR/GOx elektrodas buvo paruoštas užnešant fermentą ant GR elektrodo paviršiaus ir surišant GA garais. GR/PANI/GOx ir GR/rGO/GOx elektrodai buvo paruošti panašiai, tik jų atveju fermentas buvo užnešamas ant GR elektrodo paviršiaus, kuris prieš tai buvo modifikuotas atitinkamai PANI nanopluoštų ar rGO dispersijomis. Visiems tyrimams buvo naudojamos PANI ir rGO dispersijos 2-propanolyje, kuriose buvo 0,5 % Nafiono. Buvo įvertintas

rGO ir PANI dispersijų poveikis gliukozės biologinio jutiklio amperometriniam atsakui. Srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos kreivės yra pateiktos 10 paveiksle.

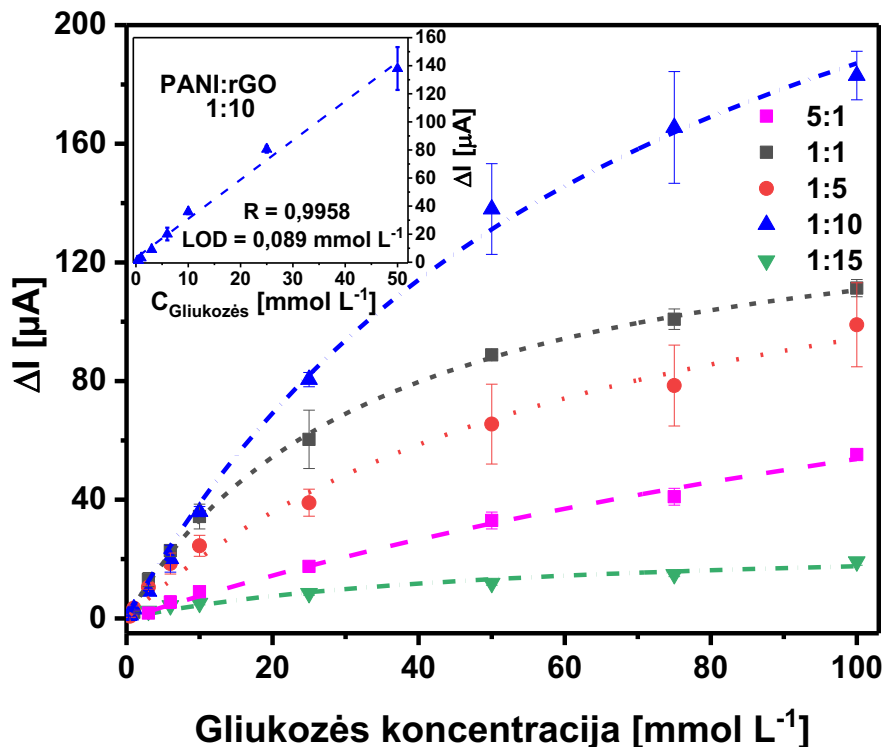


10 pav. Skirtingai modifikuotų GR elektrodų srovės stiprio pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos tirpale. Sąlygos: 0,05 mol L⁻¹ FAB pH 6,0 tirpalas, 6 mmol L⁻¹ FMS. Naudota trijų elektrodų sistema: palyginamasis – Ag/AgCl₃ mol L⁻¹ KCl elektrodas, pagalbinis – Pt viela ir darbinis – GR elektrodas modifikuotas GOx (▲), rGO ir GOx (●) arba PANI nanopluoštais ir GOx (■).

Rezultatai parodė, kad elektrodų modifikavimas PANI nanopluoštais arba rGO įtakoja pagamintų biologinių jutiklių elektrocheminį atsaką. Dėl PANI arba rGO dispersijos panaudojimo biologinio jutiklio jautrumas sumažėjo atitinkamai iki 0,92 μA mmol L⁻¹ ir 0,69 μA mmol L⁻¹ palyginus su 2,0 μA mM⁻¹ jautrumu, kuris buvo apskaičiuotas GR/GOx elektrodo atveju. Taip pat buvo pastebėta, kad naudojant tiek PANI, tiek rGO dispersijas srovės stiprio pokyčio tiesinės priklausomybės intervalas nuo gliukozės koncentracijos tapo platesnis. GR/GOx elektrodo atveju tiesinės priklausomybės intervalas buvo nuo 0,5 iki 10 mmol L⁻¹ (R = 0,9980), o GR/PANI/GOx ir GR/rGO/GOx elektrodų atveju buvo atitinkamai nuo 1 iki 25 mmol L⁻¹ (R = 0,9908) ir nuo 3 iki 25 mmol L⁻¹ (R = 0,9839). Modifikavus GR elektrodą PANI nanostruktūromis ar rGO K_{Mtar} vertė padidėjo nuo 12,0 ± 1,9 mmol L⁻¹ (GR/GOx) atitinkamai iki 77,7 ± 9,5 mmol L⁻¹ ir 30,5 ± 4,9 mmol L⁻¹. Didžiausia ΔI_{max} (78,7 ± 5,2 μA) reikšmė buvo fiksuojama kai buvo naudojamas GR/rGO/GOx elektrodas. Tai gali būti susiejama su geresne elektronų pernaša per matricą. Standartinio nuokrypio (SN) padidėjimas naudojant GR/rGO/GOx elektrodą, parodo sumažėjusį atsikartojamumą. Tuo tarpu GR/PANI/GOx ir GR/GOx elektrodų atveju apskaičiuotos SN vertės buvo panašios. Atsižvelgiant į hidrofobinį rGO prigimtį, tai galima paaiškinti geresniu PANI nanostruktūrų tinkamumu panaudojimui kaip matrica fermentų imobilizacijai.

3.3. Optimalaus PANI:rGO dispersijos santykio parinkimas

Siekiant pagerinti gliukozės biologinio jutiklio veikimą, buvo iširta dar viena elektrodų modifikacija, panaudojant PANI ir rGO dispersijas. Siekiant parinkti optimalią PANI ir rGO dispersijų santykį, buvo iširtas skirtingais santykiais sumaišytų dispersijų poveikis biologinio jutiklių analiziniam signalui. Gauti rezultatai pateikti 11 paveiksle.



11 pav. Skirtingais PANI:rGO dispersijų santykiais modifikuotų elektrodų srovės stiprios pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos tirpale. Sąlygos: 0,05 mol L⁻¹ FAB pH 6,0 tirpalas, 6 mmol L⁻¹ FMS. Naudota trijų elektrodų sistema: palyginamasis – Ag/AgCl_{3 mol L⁻¹ KCl} elektrodas, pagalbinis – Pt viela ir darbinis GR elektrodas modifikuotas skirtingais santykiais (■) 5:1, (■) 1:1, (●) 1:5, (▲) 1:10 ar (▼) 1:15 sumaišytomis PANI:rGO dispersijomis.

Buvo nustatyta, kad nuo PANI ir rGO dispersijų santykio, kuris naudojamas darbinio elektrodo modifikacijai, priklauso biologinio jutiklio analizinės charakteristikos. Biologinis jutiklis, kuriame buvo panaudotas darbinis elektrodas modifikuotas PANI ir rGO dispersijomis sumaišytomis santykiu 5:1, pasižymėjo gana mažu analiziniu signalu, jautrumas buvo lygus 1,0 μA mmol L⁻¹, o tiesinės priklausomybės intervalas buvo nuo 3 iki 100 mmol L⁻¹. Palaipsnis rGO kiekio padidėjimas dispersijoje leido pagerinti sukurtų biologinių jutiklių analizes charakteristikas. Geriausi rezultatai buvo pasiekti naudojant GR/PANI:rGO_{1:10}/GOx elektrodą. Šio elektrodo atveju tiesinės priklausomybės intervalas buvo nuo 0,5 iki 50 mmol L⁻¹ (R = 0,9958) ir jautrumas buvo lygus 2,8 μA mmol L⁻¹, o aptikimo riba (LOD) - 0,089 mmol L⁻¹. Tuo metu nustatymo riba (LOQ) buvo 0,30 mmol L⁻¹. Dėl plataus tiesinio priklausomybės intervalo paruoštas GR/PANI:rGO_{1:10}/GOx elektrodas gali būti naudojamas biologiniuose jutikliuose, kurie yra skirti nustatymui mėginiuose, kuriuose yra didelė gliukozės koncentracija arba kuriuose gliukozės koncentracija gali labai skirtis.

Taip pat sukurtas biologinis jutiklis pasižymėjo geru atsikartojamumu, nes santykinis SN, apskaičiuotas atlikus po tris nepriklausomus 3, 10 ir 100 mmol L⁻¹ gliukozės koncentracijos matavimus, buvo atitinkamai lygus 4,66 %, 4,7 % ir 4,48 %. Be to, dėl padidėjusio difuzijos

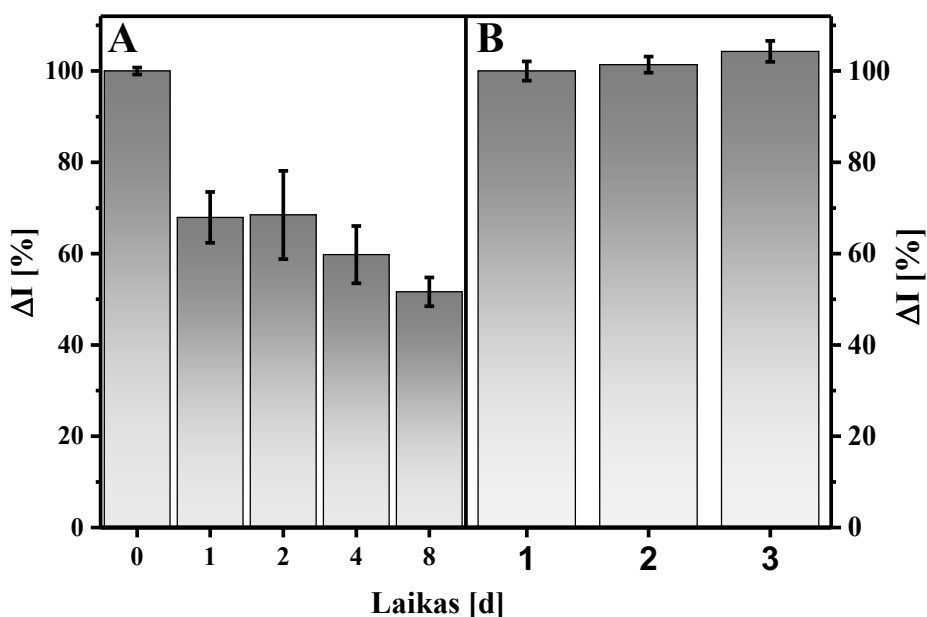
apribojimo, PANI:rGO dispersijos matrica turėjo įtaką K_{Mtar} vertei. Tik fermentu modifikuoto GR/GOx elektrodo atveju K_{Mtar} vertė buvo $12,0 \pm 1,9 \text{ mmol L}^{-1}$, o GR/PANI:rGO_{1:10}/GOx elektrodo – $74,4 \pm 9,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Taip pat buvo pastebėta, kad tolimesnis 1:15 santykiu sumaišytos PANI ir rGO dispersijos neigiamai paveikė biologinio jutiklio veikimą. Tai aiškiai parodo, kad PANI ir rGO santykis 1:10 yra optimalus darbinio elektrodo modifikavimui. Gautus rezultatus galima paaiškinti tuo, kad PANI nanostruktūros matricos padeda palaikyti GOx fermento aktyvumą atliekant matavimus. Taip pat reikia atkreipti dėmesį į rGO hidrofobiškumą. Didelis kiekis rGO dispersijoje gali įtakoti GOx molekulių konformacijos pokyčiams, o tai paveikia fermento stabilumą ir jo katalizinę aktyvumą [67]. Kita vertus, dėl rGO buvimo matricoje galimai padidėjo elektronų perdavimo greitis per matricą.

Norint įvertinti sukurto biologinio jutiklio veikimą realiuose mėginiuose buvo atlikti gliukozės koncentracijos nustatymo tyrimai praskiestame kraujo serume. Tokiu tyrimo metu, elektrocheminė celė buvo užpildoma ne tik FAB ir FMS tirpalais, bet dar įpilamas atitinkamas kiekis filtruoto ir praskiesto žmogaus serumo. Tolimesnė tyrimo eiga analogiška kaip aprašyta 2.10. skyriuje. Gliukozės koncentracija, kuri buvo apskaičiuota kaip trijų nepriklausomų eksperimentų vidutinė vertė, buvo lygi $4,99 \pm 0,11 \text{ mmol L}^{-1}$. Tyrimai parodė, kad paruoštas biologinis jutiklis gali būti naudojamas gliukozės koncentracijos nustatymui praskiestame kraujo serume.

3.4. Stabilumo ir priemaišų įtakos tyrimai

Stabilumas yra vienas iš svarbių biologinio jutiklio analizinių parametrų, kuris yra įvertinamas stebint kaip pasikeičia analizinis signalas laike, matuojant tą patį gliukozės koncentraciją. Tyrimo metu GR/PANI:rGO_{1:10}/GOx elektrodas buvo įstatomas į elektrocheminę celę. Matavimai atliekami fosfatiname acetatiniame buferyje pH 6,0, kuriame yra 6 mmol L^{-1} FMS. Nusistovėjus bazinei linijai pilamas reikalingas gliukozės tirpalo tūris, kad galutinė koncentracija tirpale būtų 25 mmol L^{-1} . Pagamintas GR/PANI:rGO_{1:10}/GOx elektrodas buvo laikomas tarp matavimų virš FAB pH 6,0 tirpalo uždarytame inde $4 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje. Matavimai buvo pakartotinai atliekami 8 dienas. Stabilumo tyrimo rezultatai yra pateikti 12 A paveiksle.



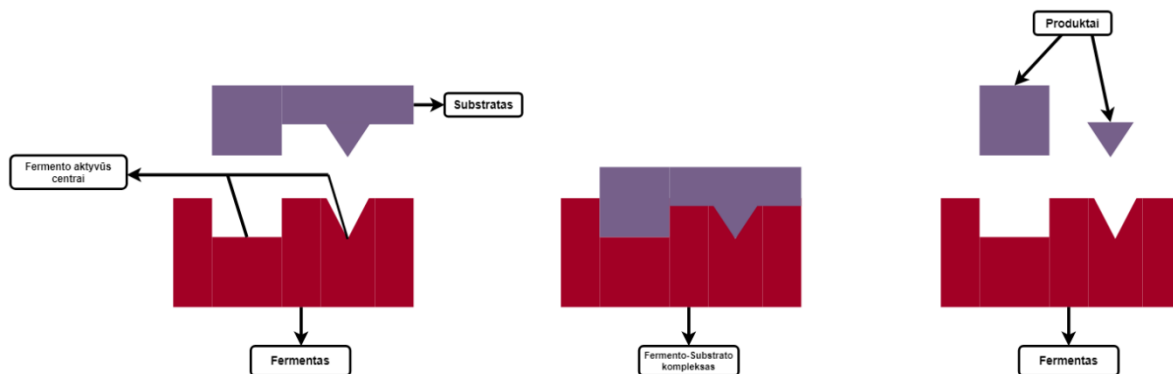
12 pav. GR/PANI:rGO_{1:10}/GOx elektrodo srovės stiprio priklausomybės nuo gliukozės tyrimai, atliekant pakartotinius matavimus. Sąlygos: $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ FAB pH 6,0 tirpalas, 6 mmol L^{-1} FMS ir 25 mmol L^{-1} gliukozės.

Iš gautų rezultatų buvo nustatyta, kad antrą dieną buvo užregistruotas 32 % atsako sumažėjimas. Tuo tarpu po 2 dienų tolimesnis sumažėjimas nebuvo registruojamas. Tačiau 8 dieną gautas atsakas buvo dar mažesnis, bet vis dar didesnis nei 50 % pradinio analizinio signalo.

Elektrocheminių biologinių jutiklių atsakui gali įtakoti kai kurios elektroaktyvios medžiagos, esančios žmogaus serumo mėginyje [68]. Norint įvertinti šį poveikį buvo tiriamas 0,2 mmol L⁻¹ askorbo rūgšties ir 0,6 mmol L⁻¹ šlapimo rūgšties koncentracijų įtaką GR/PANI:rGO_{1:10}/GOx elektrodo atsakui. Koncentracijos buvo parinktos tokios, nes tipiškos askorbo rūgšties ir šlapimo rūgšties koncentracijos sveiko suaugusio žmogaus kraujo serume yra atitinkamai 0,040 - 0,141 mmol L⁻¹ ir 0,149 - 0,446 mmol L⁻¹ [69]. Kaip realus mėginys buvo naudojamas serumas, praskiestas 10 kartų FAB tirpalu. Kaip matyti iš 12 B paveikslo, registruotas analizinis signalas padidėjo maždaug 4,3 % ir 1,4 %, kai tirpale buvo atitinkami kiekiai askorbo rūgšties ir šlapimo rūgšties. Naudotos askorbo rūgšties ir šlapimo rūgšties koncentracijos yra panašios į žmogaus kraujo serume esančias. Taigi, galima daryti prielaidą, kad išbandytos elektroaktyvios medžiagų rūšys daro nereikšmingą įtaką amperometriniu atsako tikslumui matuojant gliukozės koncentraciją praskiestame žmogaus serume. Tokius rezultatus galima paaiškinti tuo, kad šioje sistemoje, PANI nanoplauštų ir rGO sluoksnis padidina difuzijos barjerą, taip apsunkindami elektroaktyvių medžiagų pateikimą prie GR elektrodo paviršiaus. Taip pat likusios rGO struktūroje karboksilinės grupės deprotonizuojamos ir yra neigiamai įkrautos, esant pH 6,0. Todėl šios funkcinės grupės elektrostatiškai atstumia panašiai įkrautus elektroaktyvios medžiagos. Be to, elektroaktyvių medžiagų poveikis galimai sumažinamas naudojant papildomą kryžminį GOx surišimą su Nafionu. Tai gali veikti kaip veiksmingas pusiau laidus barjeras [70], o tai labai apsunkina anijoninių medžiagų įsiskverbimą.

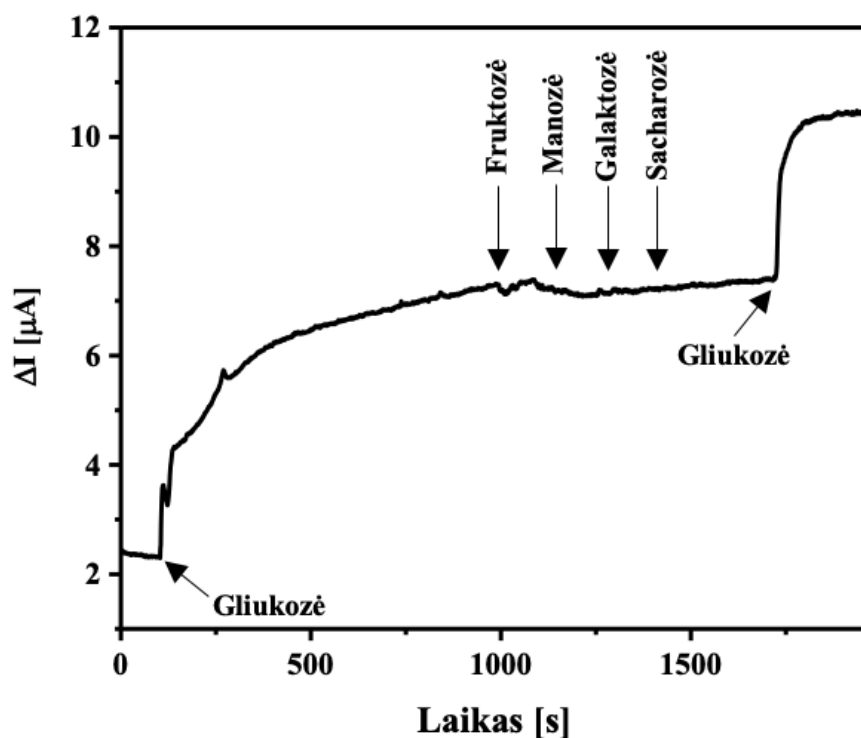
3.5. Atrankumo substratui tyrimai

Kitas tyrimas buvo atliktas norint įvertinti GR/PANI:rGO_{1:10}/GOx biologinio jutiklio atrankumą gliukozės substratui. Yra žinoma, kad tam tikri fermentai gali specifiskai paversti tam tikrus substratus į produktus, ir net gali atskirti optinius izomerus. Viena žinomiausių teorijų, paaiškinančių fermento veikimo mechanizmą yra raktų ir spynos modelis. Šią teoriją 1894 m. pasiūlė Emilis Fisheris. Šiame modelyje spyna yra analogiška fermentui, o raktas – substratui [71].



13 pav. Fermento ir substrato giminingumo schema. Fermentas apibrėžiamas kaip spyna, o substratas – kaip raktas.

Atlikto tyrimo metu sukurtas biologinio jutiklio atrankumas buvo įvertintas pridėdant penkių skirtingų angliavandenių (gliukozės, fruktozės, manozės, galaktozės ir sacharozės). Gauti rezultatai yra pateikti 14 paveiksle.



14 pav. Amperometrinis GR/PANI:rGO_{1:10}/GOx elektrodo atsakas į skirtingų angliavandenių pridėjimą. Sąlygos: 0,05 mol L⁻¹ FAB tirpalas pH 6,0, 6 mmol L⁻¹ FMS, +0,3 V potencialas. Gliukozės, fruktozės, manozės, galaktozės ir sacharozės koncentracijos celėje 5 mmol L⁻¹.

Šiame eksperimente 5 mmol L⁻¹ gliukozės, 5 mmol L⁻¹ fruktozės, 5 mmol L⁻¹ manozės, 5 mmol L⁻¹ galaktozės, 5 mmol L⁻¹ sacharozės ir vėl 5 mmol L⁻¹ gliukozės buvo pilama viena po kitos į elektrocheminę celę, laukiant kol po ankstesniojo cukraus pridėjimo pasiekama prisotinimo srovė. Nustatyta, kad cukrų (išskyrus gliukozę) pridėjimas į celę neturėjo įtakos sukurto biologinio jutiklio amperometriniam signalui. Šie rezultatai leidžia teigti, kad biologinis jutiklis, sukurtas naudojant GR/PANI:rGO_{1:10}/GOx darbinį elektrodą, yra atrankus gliukozei.

IŠVADOS

1. Tyrimuose naudojami PANI nanopluoštai buvo susintetinti naudojant tarpfazinės polimerizacijos metodą. Gautų nanopluoščių skersmuo buvo 118 ± 19 nm.

2. Nustatyta, kad optimalus PANI ir rGO santykis dispersijoje, naudojamoje darbinio elektrodo modifikavimui, siekiant pagerinti elektrocheminio gliukozės biologinio jutiklio veikimą, yra 1 prie 10. Šio atveju tiesinis priklausomybės intervalas buvo lygus nuo 0,5 iki 50 mmol L⁻¹, aptikimo riba – 0,085 mmol L⁻¹, nustatymo riba – 0,30 mmol L⁻¹, o K_{Mar} . vertė – $74,4 \pm 9,0$ mmol L⁻¹.

3. Paruoštas biologinis jutiklis pasižymi geru analizinio signalo atsikartojamumu.

4. Tyrimuose panaudotas GOx fermentas, kuris išskirtas iš *Aspergillus niger*, pasižymi didžiausiu giminingumu gliukozei. Nustatyta, kad analizinis signalas nebuvo registruojamas kai į sistemą buvo įvedami tos pačios koncentracijos fruktozės, manozės, galaktozės ir sacharozės tirpalai.

5. Paruoštas biologinis jutiklis gali būti naudojamas nustatant gliukozės koncentraciją praskiestame kraujo serume, kuriame esančios askorbo rūgšties ir šlapimo rūgšties priemaišos daro nežymią įtaką nustatant gliukozės koncentraciją.

6. rGO ir PANI nanopluoščių nanokompozitai buvo sėkmingai panaudoti elektrocheminio gliukozės biologinio jutiklio kūrime.

Šiame darbe pateikti rezultatai buvo publikuoti reikšmingumo faktorių (IF = 3,4) turinčiame tarptautiniame žurnale:

A. Popov, R. Aukstakojyte, J. Gaidukevic, **V. Lisyte**, A. Kausaite-Minkstimiene, J. Barkauskas, A. Ramanaviciene, Reduced Graphene Oxide and Polyaniline Nanofiber Nanocomposites for the Development of an Amperometric Glucose Biosensor. *Sensors* 2021, 21, 948. DOI: 10.3390/s21030948

Taip pat rezultatai buvo pristatyti tarptautinėje konferencijoje:

V. Lisyte, G. Agasarjanaite, A. Popov, A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene, Amperometric glucose biosensor based on reduced graphene oxide and polyaniline nanofibers, *The Vital Nature Sign*, May 20-21, 2021, Vilnius, Lietuva (Virtuali konferencija), p. 64.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Christwardana, M., Ji, J., Chung, Y., & Kwon, Y. Highly sensitive glucose biosensor using new glucose oxidase based biocatalyst. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2017, 34.11: 2916-2921. <https://doi.org/10.1007/s11814-017-0224-9>.
2. Gomathi, P., Kim, M. K., Park, J. J., Ragupathy, D., Rajendran, A., Lee, S. C., Ghim, H. D. Multiwalled carbon nanotubes grafted chitosan nanobiocomposite: A prosperous functional nanomaterials for glucose biosensor application. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011, 155.2: 897-902. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.12.050>.
3. Fang, L., Liang, B., Yang, G., Hu, Y., Zhu, Q., & Ye, X. A needle-type glucose biosensor based on PANI nanofibers and PU/E-PU membrane for long-term invasive continuous monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 97: 196-202. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.04.043>.
4. Kausaite-Minkstiniene, A., Mazeiko, V., Ramanaviciene, A., & Ramanavicius, A. Enzymatically synthesized polyaniline layer for extension of linear detection region of amperometric glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 26.2: 790-797. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.06.023>.
5. Haque, S. ul, Nasar, A., Inamuddin, & Rahman, M. M. Applications of chitosan (CHI)-reduced graphene oxide (rGO)-polyaniline (PAni) conducting composite electrode for energy generation in glucose biofuel cell. *Scientific Reports*, 2020, 10.1: 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67253-6>.
6. Yoo, E.-H., & Lee, S.-Y. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. *Sensors*, 2010, 10.5: 4558-4576. <https://doi.org/10.3390/s100504558>.
7. Goode, J. A., Rushworth, J. V. H., Millner, P. A. Biosensor regeneration: a review of common techniques and outcomes. *Langmuir*, 2015, 31.23: 6267-6276. <https://doi.org/10.1021/la503533g>.
8. Wang, J. Electrochemical glucose biosensors. *Chemical reviews*, 2008, 108.2: 814-825. <https://doi.org/10.1021/cr068123a>.
9. Dzyadevych, S. V., Arkhypova, V. N., Soldatkin, A. P., El'skaya, A. V., Martelet, C., & Jaffrezic-Renault, N. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *Irbm*, 2008, 29.2-3: 171-180. <https://doi.org/10.1016/j.rbmret.2007.11.007>.
10. Perumal, V., & Hashim, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of applied biomedicine*, 2014, 12.1: 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2013.02.001>.
11. Grieshaber D., MacKenzie R., Vörös J., Reimhult E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors (Basel)*. 2008;8(3):1400-1458. Published 2008 Mar 7. <https://doi.org/10.3390/s80314000>.
12. Chen, C., Xie, Q., Yang, D., Xiao, H., Fu, Y., Tan, Y., & Yao, S. Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review. *Rsc Advances*, 2013, 3.14: 4473-4491. <https://doi.org/10.1039/C2RA22351A>.
13. Poulos, N. G., Hall, J. R., & Leopold, M. C. Functional layer-by-layer design of xerogel-based first-generation amperometric glucose biosensors. *Langmuir*, 2015, 31.4: 1547-1555. <https://doi.org/10.1021/la504358t>.
14. Toghill, K E., Compton, R. G. Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: a perspective and an evaluation. *Int. J. Electrochem. Sci*, 2010, 5.9: 1246-1301.

15. Zhu, H., Li, L., Zhou, W., Shao, Z., & Chen, X. Advances in non-enzymatic glucose sensors based on metal oxides. *Journal of Materials Chemistry B*, 2016, 4.46: 7333-7349. <https://doi.org/10.1039/C6TB02037B>.
16. Hayat, A., Catanante, G., & Marty, J. Current trends in nanomaterial-based amperometric biosensors. *Sensors*, 2014, 14.12: 23439-23461. <https://doi.org/10.3390/s141223439>.
17. Malhotra, B. D., & Ali, M. A. Nanomaterials in biosensors: fundamentals and applications. *Nanomaterials for Biosensors*, 2018, 1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44923-6.00001-7>.
18. Schmiedova, V., Pospisil, J., Kovalenko, A., Ashcheulov, P., Fekete, L., Cubon, T., Weiter, M. Physical properties investigation of reduced graphene oxide thin films prepared by material inkjet printing. *Journal of Nanomaterials*, 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3501903>.
19. Castro Neto, A. H., Guinea, F., Peres, N. M. R., Novoselov, K. S., & Geim, A. K. The electronic properties of graphene. *Reviews of modern physics*, 2009, 81.1: 109. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.81.109>.
20. Raslan, A., Saenz del Burgo, L., Ciriza, J., & Luis Pedraz, J. Graphene oxide and reduced graphene oxide-based scaffolds in regenerative medicine. *International journal of pharmaceutics*, 2020, 580: 119226. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119226>.
21. Kuila, T., Bose, S., Khanra, P., Mishra, A. K., Kim, N. H., & Lee, J. H. Recent advances in graphene-based biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, 2011, 26.12: 4637-4648. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.05.039>.
22. Rotariu, L., Lagarde, F., Jaffrezic-Renault, N., & Bala, C. Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants—trends and perspective. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 79: 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.017>.
23. Guex, L. G., Sacchi, B., Peuvot, K. F., Andersson, R. L., Pourrahimi, A. M., Ström, V., Olsson, R. T. Experimental review: chemical reduction of graphene oxide (GO) to reduced graphene oxide (rGO) by aqueous chemistry. *Nanoscale*, 2017, 9.27: 9562-9571. <https://doi.org/10.1039/C7NR02943H>.
24. Ahammad, A. J. S., Islam, T., & Hasan, M. M. Graphene-based electrochemical sensors for biomedical applications. In: *Biomedical Applications of Graphene and 2D Nanomaterials*. Elsevier, 2019. p. 249-282. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815889-0.00012-X>.
25. Xia, M.-Y., Xie, Y., Yu, C.-H., Chen, G.-Y., Li, Y.-H., Zhang, T., & Peng, Q. Graphene-based nanomaterials: the promising active agents for antibiotics-independent antibacterial applications. *Journal of Controlled Release*, 2019, 307: 16-31. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.06.011>.
26. Bhadra, J., Alkareem, A., & Al-Thani, N. A review of advances in the preparation and application of polyaniline based thermoset blends and composites. *Journal of Polymer Research*, 2020, 27.5: 1-20. <https://doi.org/10.1007/s10965-020-02052-1>.
27. Tanguy, N. R., Thompson, M., & Yan, N. A review on advances in application of polyaniline for ammonia detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 257: 1044-1064. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.008>.
28. Lai, J., Yi, Y., Zhu, P., Shen, J., Wu, K., Zhang, L., & Liu, J. Polyaniline-based glucose biosensor: A review. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2016, 782: 138-153. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.10.033>.

29. Zare, E. N., Makvandi, P., Ashtari, B., Rossi, F., Motahari, A., & Perale, G. Progress in conductive polyaniline-based nanocomposites for biomedical applications: a review. *Journal of medicinal chemistry*, 2019, 63.1: 1-22. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00803>.
30. Shoaie, N., Daneshpour, M., Azimzadeh, M., Mahshid, S., Khoshfetrat, S. M., Jahanpeyma, F., Foruzandeh, M. Electrochemical sensors and biosensors based on the use of polyaniline and its nanocomposites: A review on recent advances. *Microchimica Acta*, 2019, 186.7: 1-29. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3588-1>.
31. Sen, T., Mishra, S., & Shimpi, N. G. Synthesis and sensing applications of polyaniline nanocomposites: a review. *RSC advances*, 2016, 6.48: 42196-42222. <https://doi.org/10.1039/C6RA03049A>.
32. Wu, S., Su, F., Dong, X., Ma, C., Pang, L., Peng, D., Zhang, Z. Development of glucose biosensors based on plasma polymerization-assisted nanocomposites of polyaniline, tin oxide, and three-dimensional reduced graphene oxide. *Applied Surface Science*, 2017, 401: 262-270. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.01.024>.
33. Wu, J., Zhang, Q., Wang, J., Huang, X., & Bai, H. A self-assembly route to porous polyaniline/reduced graphene oxide composite materials with molecular-level uniformity for high-performance supercapacitors. *Energy & Environmental Science*, 2018, 11.5: 1280-1286. <https://doi.org/10.1039/C8EE00078F>.
34. Haque, S. ul, Nasar, A., Inamuddin, & Rahman, M. M. Applications of chitosan (CHI)-reduced graphene oxide (rGO)-polyaniline (PAni) conducting composite electrode for energy generation in glucose biofuel cell. *Scientific Reports*, 2020, 10.1: 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67253-6>.
35. Chen, Y., Li, Y., Yang, Y., Wu, F., Cao, J., & Bai, L. A polyaniline-reduced graphene oxide nanocomposite as a redox nanoprobe in a voltammetric DNA biosensor for Mycobacterium tuberculosis. *Microchimica Acta*, 2017, 184.6: 1801-1808. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2184-5>.
36. Wilson, R., & Turner, A. P. F. Glucose oxidase: An ideal enzyme. *Biosens. Bioelectron.* 1992, 7 (3), 165–185. [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(92\)87013-F](https://doi.org/10.1016/0956-5663(92)87013-F).
37. Tellechea, E., Wilson, K. J., Bravo, E., & Hamad-Schifferli, K. Engineering the interface between glucose oxidase and nanoparticles. *Langmuir*, 2012, 28.11: 5190-5200. <https://doi.org/10.1021/la2050866>.
38. Ferri, S., Kojima, K., & Sode, K. Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes. *Journal of diabetes science and technology*, 2011, 5.5: 1068-1076. <https://doi.org/10.1177/193229681100500507>.
39. Goodsell, D. S. Glucose oxidase. *Molecule of the month: PCSB Protein Data Bank*, 2006.
40. Wohlfahrt, G., Trivić, S., Zeremski, J., Peričin, D., & Leskovac, V. The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Molecular and cellular biochemistry*, 2004, 260.1: 69-83. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000026056.75937.98>.
41. Hanft, F., & Koehler, P. Studies on the effect of glucose oxidase in bread making. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, 86.11: 1699-1704. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2455>.
42. Kleppe, K. The effect of hydrogen peroxide on glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry*, 1966, 5.1: 139-143. <https://doi.org/10.1021/bi00865a018>.
43. Bao, J., Furumoto, K., Yoshimoto, M., Fukunaga, K., & Nakao, K. Competitive inhibition by hydrogen peroxide produced in glucose oxidation catalyzed by glucose oxidase. *Biochemical engineering journal*, 2003, 13.1: 69-72. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00120-1](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00120-1).

44. Tiina, M., Sandholm, M. Antibacterial effect of the glucose oxidase-glucose system on food-poisoning organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 1989, 8.2: 165-174. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(89\)90071-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(89)90071-8).
45. Leskovac, V., Trivić, S., Wohlfahrt, G., Kandrač, J., & Peričin, D. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2005, 37.4: 731-750. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.10.014>.
46. Bohmhammel, K., Hüttl, R., Pritzkat, K., & Wolf, G. Calorimetric investigations into enzyme catalysed glucose oxidation. *Thermochimica acta*, 1993, 217: 1-7. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(93\)85092-N](https://doi.org/10.1016/0040-6031(93)85092-N).
47. Golikova, E. P., Lakina, N. V., Grebennikova, O. V., Matveeva, V. G., & Sulman, E. M. A study of biocatalysts based on glucose oxidase. *Faraday discussions*, 2017, 202: 303-314. <https://doi.org/10.1039/C7FD00042A>.
48. Fiedurek, J., & Gromada, A. Screening and mutagenesis of molds for improvement of the simultaneous production of catalase and glucose oxidase. *Enzyme and microbial technology*, 1997, 20.5: 344-347. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00148-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00148-2).
49. Witteveen, C. F., Veenhuis, M., & Visser, J. Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. *Applied and environmental microbiology*, 1992, 58.4: 1190-1194. <https://doi.org/10.1128/aem.58.4.1190-1194.1992>.
50. Sandholm, M., Ali-Vehmas, T., Kaartinen, L., & Junnila, M. Glucose oxidase (GOD) as a source of hydrogen peroxide for the lactoperoxidase (LPO) system in milk: antibacterial effect of the GOD-LPO system against mastitis pathogens. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 1988, 35.1-10: 346-352. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1988.tb00506.x>.
51. Seifu, E., Buys, E. M., & Donkin, E. F. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 2005, 16.4: 137-154. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.11.002>.
52. Marks, N. E., Grandison, A. S., & Lewis, M. J. Challenge testing of the lactoperoxidase system in pasteurized milk. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 91.4: 735-741. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01435.x>.
53. Wong, C. M., Wong, K. H., & Chen, X. D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 2008, 78.6: 927-938. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1407-4>.
54. Liu, S., & Ju, H. Reagentless glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase immobilized on colloidal gold modified carbon paste electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, 19.3: 177-183. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00172-6](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00172-6).
55. Rahman, M. M., Ahammad, A. J. S., Jin, J.-H., Ahn, S. J., & Lee, J.-J. A comprehensive review of glucose biosensors based on nanostructured metal-oxides. *Sensors*, 2010, 10.5: 4855-4886. <https://doi.org/10.3390/s100504855>.
56. Cass, A. E. G., Davis, G., Francis, G. D., Hill, H. A. O., Aston, W. J., Higgins, I. J., Turner, A. P. F. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Analytical chemistry*, 1984, 56.4: 667-671. <https://doi.org/10.1021/ac00268a018>.
57. Rahman, M. M., Umar, A., & Sawada, K. Development of amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase co-immobilized with multi-walled carbon nanotubes at low potential. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2009, 137.1: 327-333. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.10.060>.

58. Kang, X., Mai, Z., Zou, X., Cai, P., & Mo, J. A novel glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in chitosan on a glassy carbon electrode modified with gold–platinum alloy nanoparticles/multiwall carbon nanotubes. *Analytical biochemistry*, 2007, 369.1: 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.07.005>.
59. Li, J., & Lin, X. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in poly (o-aminophenol) film on polypyrrole-Pt nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22.12: 2898-2905. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.12.004>.
60. Abdolahi, A., Hamzah, E., Ibrahim, Z., & Hashim, S. Synthesis of uniform polyaniline nanofibers through interfacial polymerization, *Materials* 5(8) (2012) 1487-1494. <https://doi.org/10.3390/ma5081487>.
61. Yan, X., Chen, J., Yang, J., Xue, Q., & Miele, P. Fabrication of free-standing, electrochemically active, and biocompatible graphene oxide– polyaniline and graphene– polyaniline hybrid papers. *ACS applied materials & interfaces*, 2010, 2.9: 2521-2529. <https://doi.org/10.1021/am100293r>.
62. Hummers, W. S., & Offeman, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80, 1339. <https://doi.org/10.1021/ja01539a017>.
63. Park, H.-W., Kim, T., Huh, J., Kang, M., Lee, J. E., & Yoon, H. Anisotropic growth control of polyaniline nanostructures and their morphology-dependent electrochemical characteristics. *ACS nano*, 2012, 6.9: 7624-7633. <https://doi.org/10.1021/nn3033425>.
64. Humpolicek, P., Kasparkova, V., Saha, P., & Stejskal, J. Biocompatibility of polyaniline. *Synthetic metals*, 2012, 162.7-8: 722-727. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2012.02.024>.
65. Li, R., Liu, L., & Yang, F. Preparation of polyaniline/reduced graphene oxide nanocomposite and its application in adsorption of aqueous Hg (II). *Chemical engineering journal*, 2013, 229: 460-468. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.05.089>.
66. Bandara, N., Esparza, Y., & Wu, J. Graphite oxide improves adhesion and water resistance of canola protein–graphite oxide hybrid adhesive. *Scientific reports*, 2017, 7.1: 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11966-8>.
67. Shao, Q., Wu, P., Xu, X., Zhang, H., & Cai, C. Insight into the effects of graphene oxide sheets on the conformation and activity of glucose oxidase: towards developing a nanomaterial-based protein conformation assay. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2012, 14.25: 9076-9085. <https://doi.org/10.1039/C2CP40654C>.
68. Peng, W., Li, H., Hu, Y., Liu, Y., & Song, S. Characterisation of reduced graphene oxides prepared from natural flaky, lump and amorphous graphites. *Materials Research Bulletin*, 2016, 78: 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2016.02.034>.
69. Kausaite-Minkstiniene, A., Glumbokaite, L., Ramanaviciene, A., Dauksaite, E., & Ramanavicius, A. An Amperometric Glucose Biosensor Based on Poly (Pyrrole-2-Carboxylic Acid)/Glucose Oxidase Biocomposite. *Electroanalysis*, 2018, 30.8: 1642-1652. <https://doi.org/10.1002/elan.201800044>.
70. Wilson, G. S., & Hu, Y. Enzyme-based biosensors for in vivo measurements. *Chemical reviews*, 2000, 100.7: 2693-2704. <https://doi.org/10.1021/cr990003y>.
71. Gupta, A. *Comprehensive biochemistry for dentistry: textbook for dental students*. Springer, 2018, 185-205.

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

Viktorija Lisytė

REDUKUOTO GRAFENO OKSIDO IR POLIANILINO NANOPLUOŠTŲ TAIKYMAS ELEKTROCHEMINIUOSE GLIUKOZĖS BIOLOGINIUIOSE JUTIKLIUISE

Šio tyrimo tikslas buvo ištirti redukuoto grafeno oksido (rGO) ir polianilino (PANI) nanokompozitų taikymą amperometriniame gliukozės biologiniame jutiklyje. Tyrimams PANI nanopluoštai buvo susintetinti naudojant tarpfazinės polimerizacijos metodą. Paruoštų nanostruktūrizuotų PANI nanopluoštų skersmuo buvo 118 ± 19 nm. Panaudojant rentgeno difrakcijos metodą (XRD) buvo patvirtinta sėkminga rGO sintezė. Nustatyta, kad optimalus PANI ir rGO santykis yra 1 : 10, kas leidžia pasiekti geriausias gliukozės biologinio jutiklio analitinius parametrus. Paruošto biologinio jutiklio K_{Mapp} buvo $74,4 \pm 9,0$ mmol L⁻¹. Sukurtas gliukozės biologinis jutiklis gali būti pritaikytas mėginiams, kuriuose yra didelė gliukozės koncentracija arba kur gliukozės koncentracija gali būti nepastovi. Ši analizinė sistema gali būti tinkama nustatant gliukozės koncentraciją praskiestuose kraujo mėginiuose. Atliekant matavimus buvo naudojamas gliukozės oksidazės fermentas, kuris išskirtas iš *Aspergillus niger* ir pasižymi dideliu atrankumu gliukozei. Sukurtas gliukozės biologinis jutiklis pasižymėjo dideliu giminingumu gliukozei, priešingai nei kitiems cukrams, kuriuos tyrimo metu įpylus į sistemą, nebuvo fiksuojamas analizinis signalas. Tokios žmogaus serumo priešaimos kaip šlapimo rūgštis ar askorbo rūgštis turi nedidelę įtaką gliukozės nustatymui, naudojant paruoštą gliukozės biologinį jutiklį.

Viktorija Lisytė

Research adviser: Dr. Anton Popov

APPLICATION OF REDUCED GRAPHENE OXIDE AND POLYANILINE NANOFIBERS NANOCOMPOSITE IN ELECTROCHEMICAL GLUCOSE BIOSENSORS

SUMMARY

The aim of this study was to investigate application of reduced graphene oxide (rGO) and polyaniline (PANI) nanocomposite in fabrication of amperometric glucose biosensor. In this study PANI nanowires were synthesized using an interphase polymerization method. The diameter of the prepared nanostructured PANI nanowires was 118 ± 19 nm. The successful synthesis of rGO was confirmed using X-ray diffraction (XRD) method. The optimal ratio of PANI and rGO was found to be 1:10, which allows to achieve the best analytical parameters of the glucose biosensor. The K_{Mapp} of a biosensor was 74.4 ± 9.0 mmol L⁻¹. Due to the wide linear detection range from 0.5 to 50 mmol L⁻¹, the developed biosensor can be used for glucose concentration detection in the samples with a high glucose concentration or in which the glucose concentration can vary greatly. The developed glucose biosensor is suitable for detection of glucose concentration in human serum. Glucose oxidase enzyme, which was isolated from *Aspergillus niger* and was used for biosensor fabrication, is characterized by high affinity to glucose. The developed biosensor was highly selective for glucose, because in the case of addition of other sugars to the solution analytical signal was not monitored. Ascorbic acid and uric acid in diluted human serum have a slight effect on glucose determination.