

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRO
CHEMIJOS INSTITUTAS

JAROSLAV VORONVIČ

**AUKSO NANODALELIŲ IR π - π KONJUGUOTO
POLIMERO POLIPIROLO TAIKYMAS GLIUKOZĖS
BIOLOGINIUOSE JUTIKLIUOSE**

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, chemija (03 P)

Vilnius, 2014 metai

Disertacija buvo ruošiama 2009 – 2013 metais Vilniaus universitete, Chemijos fakultete, Analizinės ir aplinkos chemijos katedroje.

Moksliniai vadovai:

doc. dr. Almira Ramanavičienė (Vilniaus universitetas, fizikiniai mokslai, chemija – 03 P) (nuo 2010-11-23 iki 2013-09-30)

prof. habil. dr. Arūnas Ramanavičius (Vilniaus universitetas, fizikiniai mokslai, chemija – 03 P) (nuo 2009-10-01 iki 2010-11-22)

TURINYS

SANTRUMPOS.....	5
1 ĮVADAS.....	7
2 LITERATŪROS APŽVALGA.....	11
2.1 Pagrindiniai jutiklių tipai.....	11
2.2 Gliukozės biologiniai jutikliai.....	12
2.2.1 Gliukozės biologinių jutiklių signalo vertikliai.....	12
2.2.2 Elektrocheminiai gliukozės biologiniai jutikliai.....	13
2.3 Amperometriniai tyrimo metodai.....	16
2.4 Elektronų pernašos tarpininkai.....	18
2.4.1 Dažniausiai naudojami elektronų pernašos tarpininkai.....	19
2.5 Gliukozės oksidazė.....	20
2.5.1 Fermentų imobilizavimo būdai.....	21
2.6 π - π konjuguoti polimerai.....	23
2.6.1 Polipirolo monomeras - pirolas.....	23
2.6.2 Polipirolas.....	24
2.7 Aukso nanodalelės.....	27
2.7.1 Aukso nanodalelių sintezė vandens ir organinėje terpėje.....	27
2.7.2 Aukso nanodalelių koloidinio tirpalo stabilumas.....	31
2.7.3 Aukso nanodalelių panaudojimas biologiniuose jutikliuose.....	36
3 TYRIMŲ APŽVALGA IR DARBO METODOLOGIJA.....	41
3.1 Reagentai ir medžiagos.....	41
3.2 Matavimo įranga.....	42
3.2.1 Elektrocheminių tyrimų įranga ir elektrodai.....	42
3.2.2 Atominių jėgų mikroskopas.....	43
3.2.3 UV-vis spektrofotometras.....	45
3.3 Eksperimentinės procedūros.....	45
3.3.1 Aukso nanodalelių sintezė.....	45
3.3.2 Anglies elektrodo paviršiaus paruošimas bei jo modifikavimas gliukozės oksidaze ir aukso nanodalelėmis.....	47
3.3.3 Anglies elektrodo padengimas chemiškai susintetintu polipirolo sluoksniu... 48	
3.3.4 Amperometriniai matavimai.....	50
4 TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	51
4.1 Gliukozės biologinis jutiklis naudojant elektrodą modifikuotą gliukozės oksidaze ir aukso nanodalelėmis.....	51
4.1.1 Aukso nanodalelių (13,0 nm) įtakos gliukozės biologinio jutiklio analiziniam signalui tyrimas.....	51
4.1.2 Gliukozės biologinio jutiklio modifikuoto aukso nanodalelėmis ir gliukozės oksidaze tyrimas AFM.....	56
4.1.3 Gliukozės biologinio jutiklio modifikuoto aukso nanodalelėmis ir gliukozės oksidaze stabilumo tyrimas.....	58
4.2 Skirtingo dydžio aukso nanodalelių įtakos gliukozės amperometriniams nustatymui tyrimas.....	59

4.3	Aukso nanodalelių esančių tirpale įtakos gliukozės elektrocheminiam nustatymui tyrimas.....	62
4.4	13,0 nm aukso nanodalelių bei π - π konjuguoto polimero polipirola taikymas gliukozės biologiniame jutiklyje	70
4.4.1	Gliukozės biologinio jutiklio modifikuoto aukso nanodalelėmis, gliukozės oksidaze, bei π - π konjuguoto polimero polipirola sluoksniu tyrimas AJM	74
4.5	Skirtingo dydžio aukso nanodalelių bei π - π konjuguoto polimero polipirola įtakos gliukozės amperometriniams nustatymams tyrimas	75
4.6	Elektrochemiškai susistetinto π - π konjuguoto polimero polipirola taikymas biologiniuose jutikliuose	77
4.7	Gliukozės oksidazių išskirtų iš skirtingų pelėsinių grybelių bei įvairių elektronų pernašos tarpininkų atranka efektyviam gliukozės amperometriniams nustatymams	81
	IŠVADOS	90
	PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA	92
	KITOS AUTORIAUS PUBLIKACIJOS NEĮTRAUKTOS Į DISERTACIJĄ.....	92
	PRANEŠIMŲ MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE TEZĖS	93
	LITERATŪRA.....	96

SANTRUMPOS

- α -MF – α -metilferocenmetanolis
AJM – atominių jėgų mikroskopas
AuND – aukso nanodalelės
CV – ciklinė voltamperometrija
DLVO – Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek dėsnis
ELP – elektrai laidūs polimerai
EPT – elektronų pernašos tarpininkas
FAD – flavino adenino dinukleotidas
FC – ferocenas
FCA – ferocenkarboksilinė rūgštis
FCAld – ferocenkarboksialdehidas
FMS – N-metilfenazino metosulfatas
GA – glutaro aldehidas
Glu – gliukozė
GOx – gliukozės oksidazė
GOx_{P.adametzii} – gliukozės oksidazė išskirta iš *Penicillium adametzii* pelėsinių grybelių
GOx_{P.funiculosum} – gliukozės oksidazė išskirta iš *Penicillium funiculosum* pelėsinių grybelių
GOx_{A.niger} – gliukozės oksidazė išskirta iš *Aspergillus niger* pelėsinių grybelių
GR – grafito elektrodas
GR/GOx – grafito elektrodas modifikuotas GOx
GR/AuND/GOx – grafito elektrodas modifikuotas AuND, o po to GOx
GR/GOx/AuND – grafito elektrodas modifikuotas GOx, o po to AuND
GR/GOx/PPy – grafito elektrodas modifikuotas GOx ir PPy sluoksniu
GR/GOx/AuND/PPy – grafito elektrodas modifikuotas GOx, AuND ir PPy sluoksniu
ITO – indžio alavo oksidas
 I_{max} – maksimalus srovės stipris
 K_M – Michaelis konstanta
Py – pirolas
PPy – polipirolas
PPR – paviršiaus plazmono rezonansas
Pt – platina
Pt/PPy – platinos elektrodas modifikuotas PPy

Pt/PPy/GOx – platinos elektrodas modifikuotas PPy ir GOx

QCM – kvarco kristalo mikrogravimetrinės svarstyklės

SAM – savitvarkis monosluoksnis

SEM – skenuojantis elektroninis mikroskopas

TCNQ – tetracianochinodimetanas

TOAB – tetraoktilamonio bromidas

TTF – tetratiofulvalenas

V_{\max} – maksimalus fermentinės reakcijos greitis

1 ĮVADAS

Biologiniai jutikliai yra labai svarbi šiuolaikinės analizinės chemijos priemonė. Naujos kartos elektrocheminiai biologiniai jutikliai išsprendžia tokias svarbias analizinių sistemų problemas, kaip specifiškumas, stabilumas bei atrankumas [1]. Analizė panaudojant biologinius jutiklius yra greita, paprasta ir pigi [2]. Labai plačiai ir sėkmingai naudojami amperometriniai biologiniai jutikliai modifikuoti įvairiais elektroaktyviais junginiais, fermentais bei nanodalelėmis.

Fermentas gliukozės oksidazė (GOx) išskirtas iš pelėsinų grybelių *Apergillus* [3, 4] arba *Penicillium* [5, 6] yra labai plačiai naudojama amperometriniuose gliukozės biologiniuose jutikliuose. Šis fermentas yra labai svarbi minėtų jutiklių dalis, nuo kurios priklauso analizinės sistemos charakteristikos. Amperometriniai gliukozės biologiniai jutikliai, kuriuose elektrodai yra modifikuoti GOx bei aukso nanodalelėmis, yra naudojami maisto pramonėje, biocheminiuose, klinikiniuose bei aplinkos taršos tyrimuose [7,8,9,10].

Kuriant fermentinį biologinį jutiklį labai svarbu tinkamai paruošti biologinio atpažinimo elementą, išsaugant imobilizuojamų medžiagų aktyvumą, taip pat užtikrinant efektyvią elektronų pernašą fermentinės reakcijos metu. Dėl to stengiamasi kurti tokius biologinius jutiklius, kurių indikatorinio elektrodo paviršiuje imobilizuojamos elektronus gebančios pernešti medžiagos bei organiniai junginiai. Nanomedžiagos anglies pagrindu [11] bei aukso nanodalelės [12] pasižymi dideliu elektrochemiškai aktyviu paviršiumi bei palankiomis elektroninėmis ir elektrokatalitinėmis savybėmis, kurios leidžia jas efektyviai panaudoti biologiniuose jutikliuose [13,14,15]. Didžiausiu uždaviniu šioje srityje yra naujų, efektyvių, pasižymintį biosuderinamumu nanomedžiagų kūrimas ir taikymas. Dažniausiai fermentinio biologinio jutiklio veikliaja dalimi yra indikatorinio elektrodo paviršiuje imobilizuotas fermentas, todėl labai svarbu yra sukurti aukso nanodalelių ir

fermento konjugatus, kurie pasižymėtų išskirtinėmis savybėmis, pvz. terminiu stabilumu [16], stabilumu laike, fermentas šiuose konjugatuose turi išlaikyti savo katalizinę aktyvumą. Kadangi paskutiniu metu daug mokslinių publikacijų yra skirta skirtingų nanodalelių panaudojimo fermentiniuose biologiniuose jutikliuose galimybių tyrimui, buvo nuspręsta ištirti bei palyginti gliukozės biologinių jutiklių su skirtingo dydžio aukso nanodalelėmis analizes charakteristikas bei kinetinius parametrus, naudojant skirtingus elektronų pernašos tarpininkus. Taip pat buvo atlikti aukso nanodalelių koloidinio tirpalo įtakos gliukozės biologinio jutikliui veikimui tyrimai.

Elektrai laidūs π - π konjuguoti polimerai yra labai plačiai naudojami įvairiose srityse, taip pat ir biologinių jutiklių elektrodų modifikavimui. Daugelis konjuguotų polimerų (pvz., polipirolas, polianilinas) pasižymi puikiu biosuderinamumu, o tai leidžia juos panauduoti kaip biologiškai aktyvių medžiagų imobilizavimo ant įvairių paviršių matricas [17]. Taip pat pastebėta, kad elektrai laidūs polimerai atlieka elektronų pernašos tarpininko vaidmenį tarp fermento ir elektrodo paviršiaus [18]. Svarbu paminėti, kad kai kurie π - π konjuguoti polimerai (polipirolas, polianilinas) gali būti lengvai susintetinami cheminiu, elektrocheminiu bei fermentiniu būdu, o taip pat pasižymi geru stabilumu laike [19]. Netirpūs, stabilūs aplinkoje polipirolo sluoksniai dažniausiai sintetunami iš standartinių komercinių pirolo monomerų. Šiam tikslui yra naudojama cheminė bei elektrocheminė polimerizacija. Taip pat, biologinių jutiklių tobulinimui naudojami polipirolo-aukso nanodariniai, kurie yra sintetunami chemiškai polimerinant pirolą oksidatoriumi naudojant tetrachloraukso rūgštį [20]. Tokiu būdu gaunamos dalelės yra stabilios, gali atlikti elektronų pernašos tarpininko vaidmenį, kadangi į polipirolo sluoksnį įterptos aukso nanodalelės padidina polimero laidį. Sekančioje disertacinio darbo dalyje buvo ištirtos elektrodų, modifikuotų gliukozės oksidaze ir aukso nanodalelėmis bei polipirolo elektrokatalizinės savybės.

Elektronų pernašos mechanizmo tarp biologiškai aktyvios molekulės ir elektrodo paviršiaus supratimas yra labai svarbus kuriant įvairius bioelektroninius įrenginius: biokuro elementus, biologinius jutiklius ir k.t.

Tačiau, tiesioginė elektronų pernaša tarp GOx ir elektrodo standartinėmis sąlygomis nevyksta, kadangi fermento aktyvusis centras yra giliai baltyminėje globulėje, todėl elektronų pernašos tarpininkų panaudojimas yra būtinas [21]. Be to, skirtingų elektronų pernašos tarpininkų efektyvumas naudojant tą patį fermentą gali būti skirtingas. Todėl paskutinėje disertacinio darbo dalyje buvo nutarta ištirti gliukozės oksidazių išskirtų iš skirtingų pelėsinių grybelių veikimą naudojant skirtingus elektronų pernašos tarpininkus.

Darbo tikslas:

Pritaikyti aukso nanodaleles, skirtingas gliukozės oksidazes bei π - π konjuguotą polimerą polipirolą grafito elektrodo modifikavimui bei gliukozės amperometriniam nustatymui biologiniais jutikliais

Darbo uždaviniai:

- ✓ Ištirti aukso nanodalelių dydžio ir elektrodo modifikavimo procedūros įtaką gliukozės amperometriniam nustatymui.
- ✓ Įvertinti aukso nanodalelių koloidinio tirpalo koncentracijos įtaką gliukozės amperometriniam nustatymui bei įvertinti fermentinio biologinio jutiklio efektyvumą terpėje esant tirpiam elektronų pernašos tarpininkui ir be jo.
- ✓ Ištirti π - π konjuguoto polimero polipirolo įtaką fermentinių biologinių jutiklių, kuriuose panaudotos skirtingo dydžio aukso nanodalelės, analizinėms charakteristikoms.
- ✓ Palyginti elektrodų, paruoštų naudojant gliukozės oksidazes iš *Penicillium adametzii*, *Penicillium funiculosum* ir *Aspergillus niger*, stabilumą bei analizinius signalus, naudojant elektrodų paviršiuje imobilizuotus elektronų pernašos tarpininkus.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

- ✓ Aukso nanodalelės imobilizuotos grafito elektrodo paviršiuje kartu su tirpiu elektronų pernašos tarpininku užtikrina efektyvesnę elektronų pernašą nuo gliukozės oksidazės aktyvaus centro elektrodui fermentinės gliukozės oksidacijos metu ir padidina registruojamą analizinį signalą.
- ✓ Maža aukso nanodalelių koncentracija (0,01 - 0,60 nmol L⁻¹ intervale) tiriamajame tirpale kartu su tirpiu elektronų pernašos tarpininku užtikrina efektyvesnę elektronų pernašą nuo gliukozės oksidazės aktyvaus centro elektrodui ir tai nepriklauso nuo nanodalelių dydžio (3,5 nm, 6,0 nm ir 13,0 nm).
- ✓ Polipirolo sluoksnis suformuotas elektrodų modifikuotų skirtingo dydžio aukso nanodalelėmis ir fermentu paviršiuje praplečia biologinio jutiklio tiesinės priklausomybės intervalą, bet mažesnėmis aukso nanodalelėmis modifikuotas elektrodas pasižymi didesniu analiziniu atsaku į tą pačią gliukozės koncentraciją prieš ir po polipirolo sluoksnio suformavimo.
- ✓ Gliukozės oksidazės iš *P. adametzii* ir *P. funiculosum* pelėsinų grybelių imobilizuotos elektrodo paviršiuje yra stabilesnės nei gliukozės oksidazė išskirta iš *A. niger*. Didžiausi analiziniai signalai registruojami naudojant gliukozės oksidazę išskirtą iš *P. funiculosum* ir elektronų pernašos tarpininkus - ferocenkaboksilinę rūgštį arba α -metilferocenmetanolį.

2 LITERATŪROS APŽVALGA

2.1 Pagrindiniai jutiklių tipai

Jutiklis – prietaisas, skirtas kokybinei arba kiekybinei analizei, kurio veikimo principas pagrįstas cheminiu vyksmu arba tiriamųjų objektų fizikinių savybių pokyčiu. Paprasčiausiu jutikliu, sutinkamu visose laboratorijose, yra lakmuso popierius, skirtas nustatyti terpės rūgštingumo ar šarmingumo laipsniui. Kiekvienas jutiklis turi tris sudedamąsias dalis: atpažinimo elementą, signalo vertiklį, signalo įvertinimo ir vaizdavimo elementą. Jutikliai gali būti suskirstyti į tris pagrindinius tipus: fizikiniai jutikliai skirti atstumo, masės, temperatūros, slėgio ir kt. pokyčio nustatymui; cheminiai jutikliai, skirti cheminių medžiagų nustatymui pagal fizikocheminių savybių pokyčius ir biologiniai jutikliai, skirti įvairių junginių nustatymui naudojant biologinį atpažinimo elementą. Visų jutiklių atveju turi būti naudojamas signalo vertiklis, kad gautume suprantamą tyrėjui analizinį signalą [22].

Biologinis jutiklis – tai analizinė sistema, kurioje biologinę atpažinimo funkciją pasižyminti struktūra yra integruota į fizikinę ar fizikocheminę sistemą [23,24]. Kaip ir paprastas jutiklis, biologinis jutiklis yra sudarytas iš trijų pagrindinių dalių:

1. Jautraus biologinio atpažinimo elemento (mikroorganizmai, audiniai, organoidai, fermentai, antikūnai, nukleorūgštys ir k.t.), kuris sąveikauja su analite.
2. Signalo vertiklio (optinio, pjezoelektrinio, elektrocheminio ir k.t.), kuris atsaką gautą analitei sąveikaujant su biologiniu atpažinimo elementu paverčia elektriniu signalu, kuris gali būti sėkmingai išmatuotas ir kiekybiškai įvertintas.
3. Signalą registruojančio įrenginio, kuris yra sudarytas iš elektroninės dalies ir signalo pateikimo programų, kurios yra svarbios galutiniam

analizinio signalo atvaizdavimui vartotojui suprantamu būdu bei gautų rezultatų įvertinamui.

2.2 *Gliukozės biologiniai jutikliai*

Dažniausiai modernūs biologiniai jutikliai kuriami gliukozės nustatymui. Gliukozė yra vienas iš svarbiausių energijos šaltinių ląstelėse. Normali gliukozės koncentracija žmogaus kraujyje yra 4,1 - 5,9 mmol L⁻¹ [25], tuo tarpu esant sutrikimams koncentracija gali būti 2 - 30 mmol L⁻¹ intervale [26]. Todėl, labai svarbu tiksliai ir greitai nustatyti bei įvertinti gliukozės kiekį paciento kraujyje. L. C. Clark ir C. Lions 1962 m. pasiūlė pradinę fermentinio elektrodo skirtą gliukozės amperometriniam nustatymui koncepciją. Biologinio jutiklio veikimo principas buvo pagrįstas deguonies koncentracijos matavimu naudojant deguonies elektrodą sudarytą iš vidinės pusiau pralaidžios membranos, plono GOx sluoksnio ir dializės membranos [27].

2.2.1 *Gliukozės biologinių jutiklių signalo vertikliai*

Viena svarbiausių biologinių jutiklių dalių yra signalo vertiklis. Gliukozės biologinių jutiklių signalo vertikliai skirstomi pagal tai, ką jie gali išmatuoti: elektrinį aktyvumą (elektrocheminiai), šviesą (optiniai), garsą (akustiniai), masę (pjezoelektriniai) arba temperatūrą (kalorimetriniai). Elektrocheminiai analizinio signalo vertikliai skirstomi į voltamperimetrinius, potenciometrinius bei konduktometrinius. Potenciometriniai vertikliai gali būti jonams atrankūs bei elektrinio lauko vertikliai (ang. field effect transistors). Optiniai analizinio signalo vertikliai skirstomi į šviesolaidinius bei paviršiaus plazmonų rezonanso (PPR). Kalorimetriniai vertikliai skirstomi į šiluminio laidumo ir izoterminius vertiklius. Akustiniai vertikliai yra skirti paviršinių akustinių bangų bei pjezokristalo mikrogravimetrinius vertiklius [28]. Masės vertikliai yra skirstomi į masės srauto ir kvarco kristalo mikrogravimetrinius vertiklius [29].

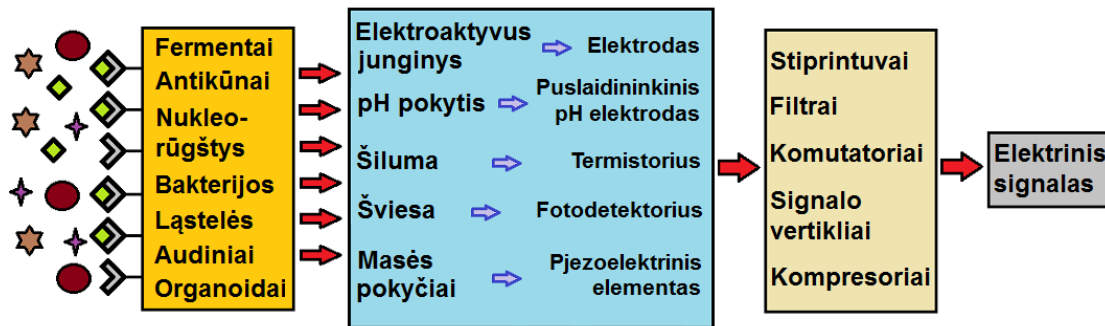
Dažniausiai naudojamais elektrocheminiais analizinio signalo vertikliais yra voltamperometriniai ir potenciometriniai. Iš voltamperometrinių signalo vertiklių bene dažniausiai naudojami yra amperometriniai. Amperometriniame vertiklyje potencialas tarp dviejų elektrodų yra pastovus, o matuojamas analizinis signalas yra srovės stiprio pokytis, kuris atsiranda dėl elektroaktyvių junginių oksidacijos arba redukcijos indikatorinio elektrodo paviršiuje. Indikatoriniai elektrodai būna įvairūs: platinos, aukso, sidabro, plieno arba anglies junginių, kurie yra inertiški tiriamajame potencialų intervale. Kadangi prie tinkamo analitės redukcijai arba oksidacijai potencialo redukuojasi arba oksiduoja ir dalis kitų eančių tirpale analičių, elektrodo paviršius dažnai dengiamas pralaidžia tik tam tikrai analitei membrana arba naudojamas elektronų pernašos tarpininkas, turintis žemesnį oks-red potencialą [29].

Potenciometriniu signalo vertikliu galima išmatuoti elektrocheminės gardelės potencialų skirtumą tarp elektrodų praktiškai netekant srovei. Elektrinio lauko vertikliai tai potenciometriniai prietaisai, kurių veikimas yra pagrįstas potencialo matavimu izoliatoriaus-elektrolito riboje [30].

2.2.2 Elektrocheminiai gliukozės biologiniai jutikliai

Daugelio gliukozės biologinių jutiklių veikimas yra pagrįstas elektrocheminiu virsmu, vykstančiu tarp imobilizoto fermento ir elektrodo paviršiaus. Dažniausiai naudojamais fermentais elektrocheminiuose biologiniuose jutikliuose yra gliukozės oksidazė išskirta iš *Aspergillus niger* ir gliukozės dehidrogenazė išskirta iš *Acinetobacter calcoaceticus* [26]. Gliukozės elektrocheminiai biologiniai jutikliai skirstomi į potenciometrinius, amperometrinius ir konduktometrinius [22].

Amperometrinis gliukozės biologinis jutiklis – analizinė sistema, kurios veikimas yra pagrįstas elektroaktyvaus junginio (šiuo atveju gliukozės) oksidacijos arba redukcijos proceso metu sukulto analizinio signalo registravimu.



1 pav. Principinė biologinių jutiklių schema [31].

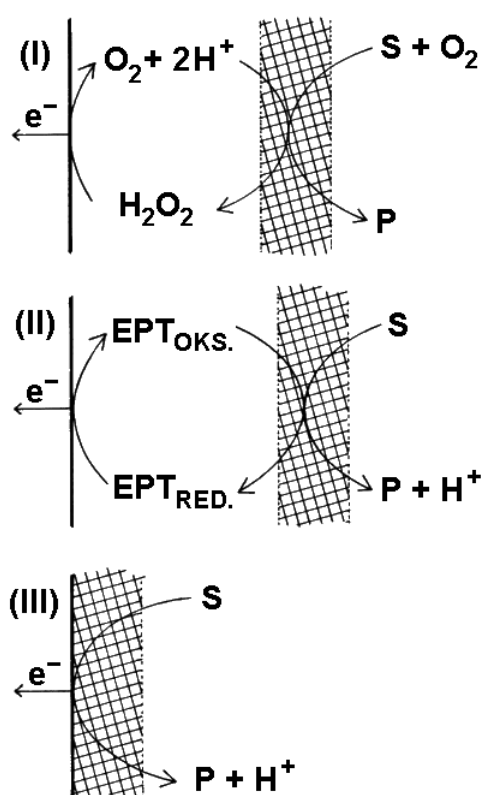
Pagal elektrochemines reakcijas, vykstančias tarp elektrodo ir analizuojamų elektroaktyvių junginių, amperometriniai gliukozės biologiniai jutikliai skirstomi į tris kartas:

- ❖ Pirmos kartos – biologiniai jutikliai, kurių veikimas pagrįstas analizuojamame tirpale ištirpusio deguonies ar fermentinės reakcijos metu susidariusio vandenilio peroksido nustatymu;
- ❖ Antros kartos – biologiniai jutikliai, kurių veikimas yra pagrįstas elektronų pernašos tarpininko oksidacijos/redukcijos reakcijomis;
- ❖ Trečios kartos – biologiniai jutikliai, kuriuose vyksta tiesioginė elektronų pernaša tarp fermento aktyvaus centro ir elektrodo.

Verta paminėti, kad šis skirstymas tinka ne tik gliukozės, bet ir kitų elektrochemiškai aktyvių analizių nustatymui skirtiems biologiniams jutikliams.

Pirmosios kartos biologinis jutiklis susideda iš metalo arba anglies indikatorinio elektrodo, kurio paviršiuje polimero arba membranos matricijoje yra imobilizuotas fermentas. Indikatoriniu elektrodu matuojama produkto – vandenilio peroksido koncentracija. Šio tipo biologinių jutiklių veikimui yra reikalingas didelis potencialas. Analizuojamame tirpale esantis ištirpęs

deguonis turi įtakos registruojamam analiziniam signalui. Į tai buvo atsižvelgta kuriant antros kartos gliukozės biologinius jutiklius. Deguonies įtakos analiziniam signalui sumažinimui pradėti naudoti elektronų pernašos tarpininkai: ferocenas, fericianidas, tetratiofulvalenas (TTF), tetracianochinodimetanas (TCNQ), metileno mėlynasis ir k.t. Elektronų pernašos tarpininkai užtikrina elektronų pernašą iš fermento aktyvaus centro link elektrodo paviršiaus [26]. Fermentinės reakcijos metu EPT yra redukuojamas, o elektrodo paviršiuje reoksiduojamas, ko pasekoje yra registruojamas amperometrinis signalas.



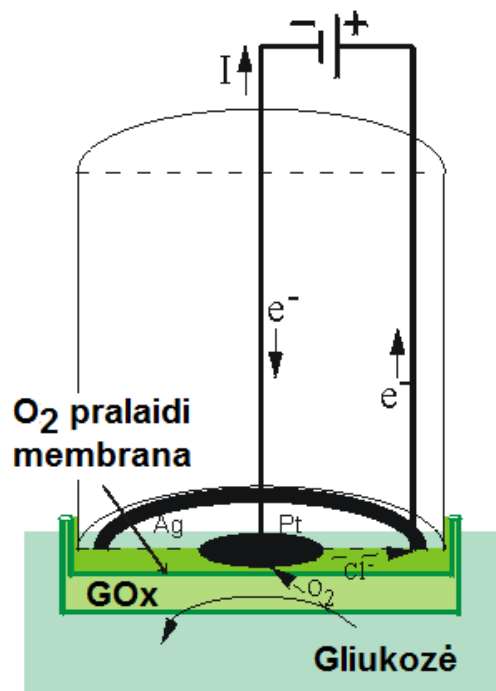
2 pav. Principinė amperometrinių biologinių jutiklių oksidazių pagrindu veikimo schema: (I) pirmoji, (II) antroji ir (III) trečioji karta. S – substratas, P – produktas, EPT – elektronų pernašos tarpininkas, užbrūkšniuotas plotas – fermentas. [32].

Antros kartos gliukozės biologiniuose jutikliuose substrato oksidacijos metu elektronų pernašos tarpininkas elektronus iš redukuotos fermento formos perneša prie elektrodo paviršiaus, kur elektronų pernašos tarpininkas yra oksiduojamas ir to pasekoje registruojamas amperometrinis signalas.

Trečios kartos biologiniuose jutikliuose tapo įmanoma tiesioginė elektronų pernaša iš fermento aktyviojo centro elektrodui. Šiuo atveju nereikia elektronų pernašos tarpininkų. Tai tam tikrais atvejais padidina jutiklių atrankumą bei galimybę atlikti analizę naudojant mažiau reagentų [26].

2.3 Amperometriniai tyrimo metodai

Amperometriniai tyrimo metodai yra elektrocheminiai metodai, kuriuos atliekant indikatoriniam elektrodui suteikiamas pastovus potencialas lyginamo elektrodo atžvilgiu, o išmatuojamas analizinis signalas (srovės stipris) atsiranda dėl oksidacijos/redukcijos reakcijų vykstančių indikatorinio elektrodo paviršiuje. Srovės stipris yra registruojamas kaip laiko funkcija.



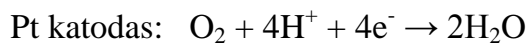
3 pav. Principinė amperometrinio biologinio jutiklio schema. Pastovus potencialas yra palaikomas tarp platininio katodo ir lyginamojo Ag/AgCl elektrodo. Standartiškai toks jutiklis būna 1 cm skersmens, bet yra sistemų ir su 0,25 mm skersmens jutikliais [34].

Kai kartu su amperometriniais metodais naudojami kiti analizės metodai, pvz. kapiliarinė elektroforezė arba skysčių chromatografija elektrocheminė

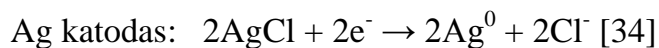
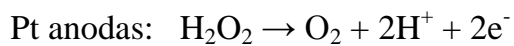
atpažinimo dalis – elektrodai įmontuojami pačiame analizinės sistemos gale [33].

Amperometrinių biologinių jutiklių analizinio atsako trukmė bei jautrio charakteristikos yra panašios kaip potenciometrinių biologinių jutiklių. Paprasčiausiu amperometriniu biologiniu jutikliu yra L. C. Clark ir C. Lions 1962 metais sukonstruotas jutiklis. Pagal šį modelį iki šiol kūriami amperometriniai jutikliai. Pagrindinės tokio jutiklio dalys yra indikatorinis elektrodas - platinos katodas, kurio paviršiuje vyksta deguonies redukcija ir Ag/AgCl lyginamasis elektrodas. Abu elektrodai panardinami į KCl tirpalą ir yra atskirti nuo analizuojamojo tirpalo deguoniui pralaidžia polimerine membrana (pvz., teflonas, politetrafluoretilenas). Reakcijos vykstančios tokioje sistemoje:

Ag/AgCl lyginamasis elektrodas, kuris yra grįžtamasis elektrodas – gali būti ir katodas ir anodas: $4\text{Ag}^0 + 4\text{Cl}^- \rightarrow 4\text{AgCl} + 4\text{e}^-$



Elektrocheminės redukcijos greitis šioje sistemoje priklauso nuo deguonies difuzijos greičio per polimerinę membraną. Šiame jutiklyje naudojama gliukozės oksidazė, bet gali būti naudojama ir alkoholio oksidazė, D- ir L-amino rūgščių oksidazės, cholesterolio oksidazė, galaktozės oksidazė ir kiti fermentai. Tokiu tikslu gali būti registruojama ir išsiskiriančio H_2O_2 koncentracija. Šiuo atveju indikatoriniam elektrodui yra suteikiamas + 0,68 V potencialas ir sistemoje vyksta tokios reakcijos:



Amperometriniuose tyrimuose dažnai naudojamos trijų elektrodų sistemos: indikatorinis elektrodas, lyginamasis elektrodas (dažniausiai Ag/AgCl elektrodas) ir pagalbinis elektrodas (dažniausiai Pt elektrodas).

Tokioje sistemoje indikatorinis ir pagalbinis elektrodai sudaro grandinę, kuria dėl atitinkamos elektrodų poliarizacijos teka srovė, o lyginamasis elektrodas reikalingas palaikyti pastoviai indikatorinio elektrodo potencialo reikšmei [35].

2.4 Elektronų pernašos tarpininkai

Analizuojamame tirpale ištirpęs deguonis trukdo atlikti analizę amperometriniu biologiniu jutikliu. Deguonies įtakos analiziniam signalui sumažinimui naudojami elektronų pernašos tarpininkai (EPT), kurie tiesiogiai perneša elektronus iš fermento aktyviojo centro prie indikatorinio elektrodo paviršiaus. Tinkami EPT turi atitikti šiuos pagrindinius reikalavimus:

- ✓ Turi greitai reaguoti su imobilizuoto fermento redukuota forma;
- ✓ Tiek oksiduota, tiek redukuota EPT forma turi būti pakankamai tirpi, kad laisvai difunduočiau tarp fermento aktyviojo centro ir elektrodo paviršiaus.
- ✓ Turi būti toksiškas biologiškai aktyviai medžiagai
- ✓ Potencialo reikšmė, reikalinga oksiduoto ar redukuoto EPT regeneracijai turi būti žema ir nepriklausyti nuo terpės pH;
- ✓ Redukuota EPT forma neturėtų lengvai reaguoti su deguonimi [34];
- ✓ Neturi dalyvauti kituose procesuose;
- ✓ Turi būti stabilus tiriamojoje terpėje [36].

Elektronų pernašos tarpininkais gali būti organiniai ir neorganiniai pereinamųjų metalų kompleksiniai junginiai, organinės kilmės junginiai bei $\pi - \pi$ konjuguoti polimerai pasižymintys dideliu elektriniu laidžiu – polianilinas, polipirolas ir kt. (4 pav.).

Elektronų pernašos tarpininkų sistemos būna kelių tipų:

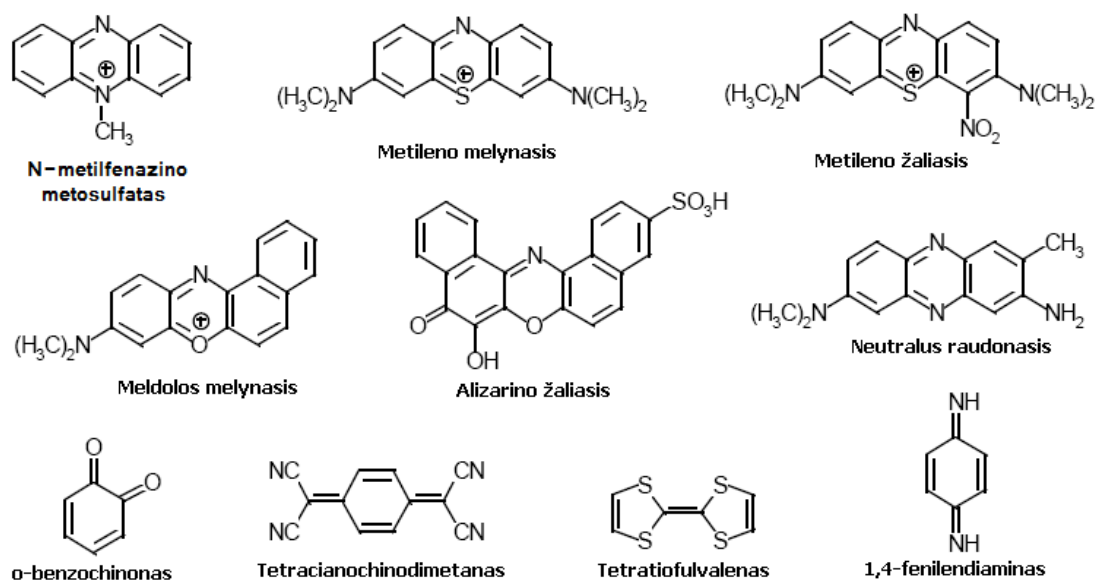
❖ Difuziniai EPT – kai EPT yra analizuojamame tirpale ir fermento aktyvusis centras pasiekiamas difuzijos pagalba. Šiuo atveju difuzija priklauso nuo: hidrofobinių/hidrofilinių fermento savybių, tarpininko formos ir dydžio bei elektrostatinų sąveikų. Plačiausiai naudojamais difuziniais EPT yra feroceno dariniai.

❖ EPT modifikuoti elektrodai.

❖ EPT mofikuoti fermentai. Šiuo atveju tarp fermento ir EPT sudaromas stiprus kovalentinis ryšis.

❖ Daugiasluoksniai fermento sluoksniai su EPT.

❖ Fermentas įterptas į elektrai laidaus polimero sluoksnį [37].



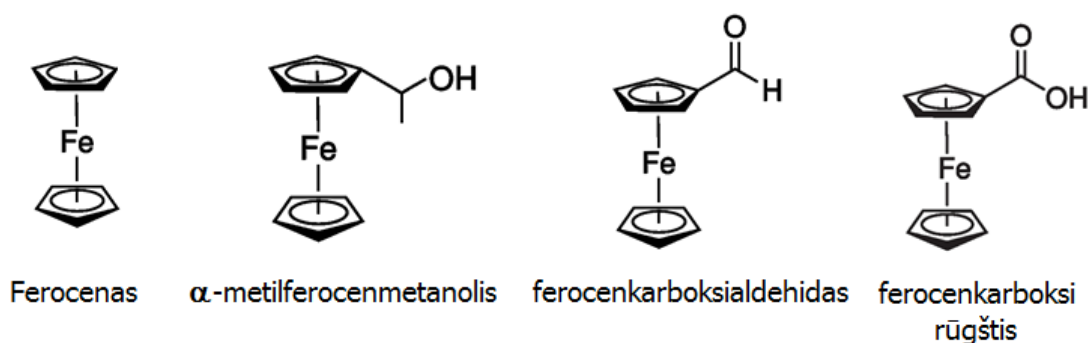
4 pav. Dažniausiai biologiniuose jutikliuose naudojami elektronų pernašos tarpininkai.

2.4.1 Dažniausiai naudojami elektronų pernašos tarpininkai

N-metilfenazino metosulfatas (FMS) – vienas plačiausiai naudojamų EPT atliekant tyrimus su oksidoreduktazėmis [38,39]. Tai tirpus vandenyje, labai

jautrus šviesai EPT. Kaip ir kiti tirpūs EPT, FMS išsiplauna iš analizinės sistemos, todėl prieš kiekvieną matavimą yra įvedamas pakartotinai.

Ferocenas – organometalinis junginys, kurio cheminė formulė $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$. Tai metalocenų grupės junginys susidedantis iš dviejų ciklopentadienilo žiedų tarp kurių yra metalo atomas (šiuo atveju geležis). Tokie organometaliniai junginiai dažnai vadinami „sumuštinio“ junginiais [40]. Dėl savo red-oks savybių ferocentas, bei jo dariniai dažnai taikomi biologiniuose jutikliuose. Susintetinti elektrochemiškai aktyvūs feroceno red-oks kopolimerų sluoksniai ant indžio-alavo oksido (ITO) elektrodo pasižymi aukštu biosuderinamumu su biologiškai aktyviomis medžiagomis, lyginant su ITO sistema be kopolimero. Feroceno kopolimeru modifikuoto elektrodo atveju yra registruojamas didelis analizinis signalas, todėl tokios analizinės sistemos pasižymi dideliu jautriu [41].



5 pav. Dažniausiai elektronų pernašai naudojami feroceno dariniai.

Feroceno darinių (5 pav.) pagrindų kuriami elektrocheminiai jutikliai, kurių modifikavimui naudojami ferocenu modifikuoti tiofeno junginiai ar stireno kopolimerai. Tokie jutikliai naudojami fosfato jonų nustatymui [42].

2.5 Gliukozės oksidazė

Fermentas GOx sudarytas iš dviejų identiškų subvienetų (kiekvieno molekulinė masė yra lygi 80 kDa), sujungtų tarpusavyje disulfidiniais ryšiais. Kiekviena GOx molekulė turi du flavino adenino dinukleotido (FAD) kofaktorius, sujungtus tarpusavyje. FAD lemia fermento aktyvumą. Švaraus fermento sudėtis yra tokia: 74 % aminorūgštys, 16 % neutralūs karbohidratai ir

2 % amino cukrai. GOx išskirtos iš *Aspergillus niger* pelėsinio grybelio veikimo pH intervalas yra nuo 4,0 iki 7,0, bet optimaliausias yra pH 5,5 [43]. Gliukozės oksidazė yra naudojama tiek reakcijos tirpale, tiek imobilizuota elektrodo paviršiuje [44].

Gliukozės oksidazė katalizuoja D-gliukozės oksidaciją į D-gliukono-1,5-laktoną ir vandenilio peroksidą. Tarpinis katalizinės reakcijos produktas – redukuota GOx forma (GOx-FADH₂), esant tirpale deguoniui, oksiduojama iki oksiduotos GOx formos (GOx-FAD) išsiskiriant H₂O₂.

2.5.1 Fermentų imobilizavimo būdai

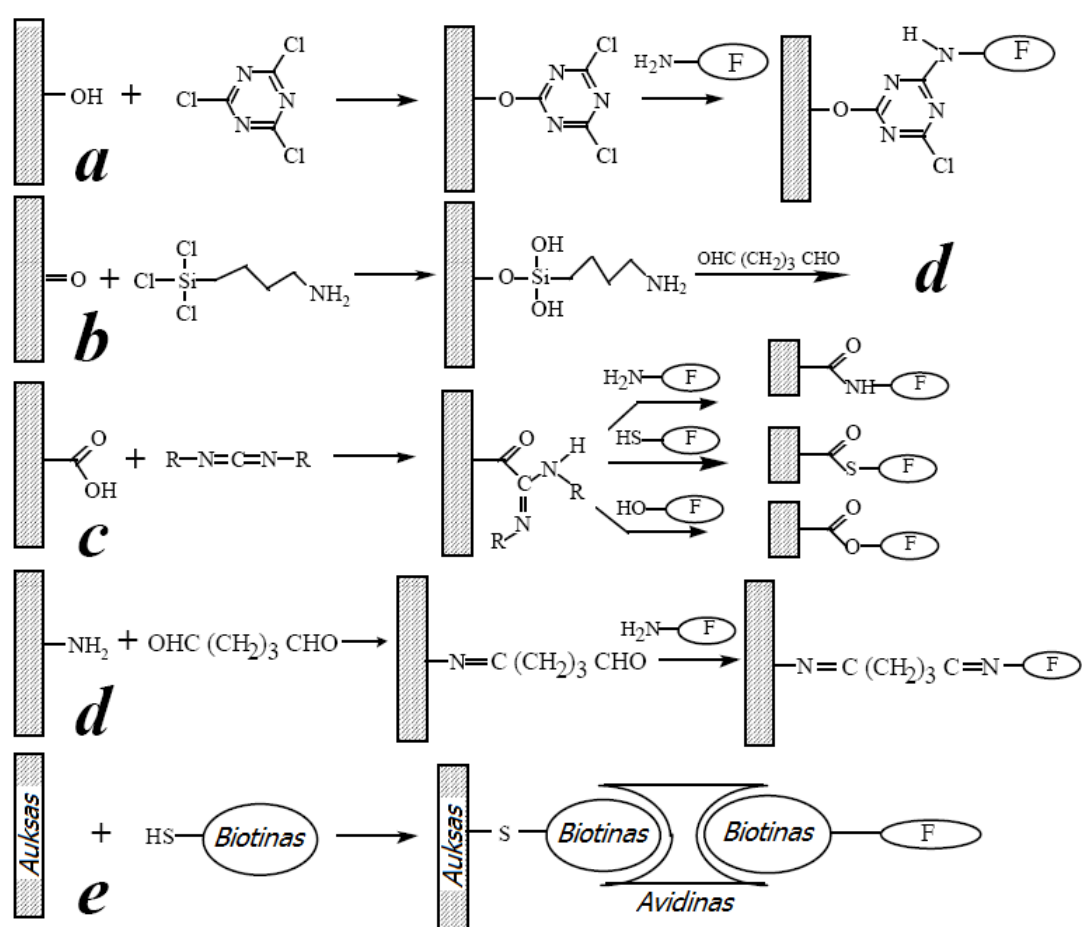
Biologiniuose jutikliuose fermentai dažniausiai yra imobilizuojami trimis pagrindiniais būdais:

I. Adsorbicija ant stiklo arba specialiai tam paruoštoje matricoje. Šiuo atveju fermentas adsorbuojamas inertinio pagrindo išorinėje dalyje. Kadangi adsorbicija vyksta nesusidarant cheminiams ryšiams, fermento aktyvusis centras gali būti užblokuotas matricos paviršiaus nelygumais. Dėl to sumažėja imobilizuoto fermento aktyvumas.

II. Membraninė arba gel-matricinė pagava – fermentas yra įterpiamas į netirpias sferas ar mikrosferas pvz., kalcio alginato sferos (alginatas – anijoninis polisacharidas). Tačiau šiuo atveju yra apsunkinta tiek substrato, tiek produkto difuzija per sferos sienes.

III. Kovalentinis prijungimas. Šiuo atveju fermentas yra kovalentiškai prijungiamas prie pagrindo paviršiaus. Šis būdas yra efektyvesnis nei aukščiau minėti imobilizavimo būdai. Kadangi cheminė imobilizavimo reakcija užtikrina, kad fermento aktyvusis centras bus laisvai pasiekiamas substratui, fermento aktyvumas priklauso tik nuo substrato judrio. Etilenglikolio molekulių panaudojimas sumažina modifikuojamo paviršiaus nelygumus ir sudaro palankias sąlygas substrato difuzijai [45,46].

Adsorbciją ir membraninę (gel-matricinę) pagavą galima priskirti prie fizikinių imobilizavimo būdų. Taip pat, prie šių būdų yra priskiriamas įterpimas į polimerinius sluoksnius ir elektropolimerizacija. Surišimas kryžminiais ryšiais su bifunkciniais reagentais, t.y. kovalentinis fermento molekulių sujungimas yra priskiriamas prie cheminės imobilizacijos būdų. Dažnai kovalentinis imobilizavimas susideda iš dviejų pagrindinių etapų: kietos matricos funkcinių grupių aktyvavimo ir kovalentinio fermento prijungimo.



6 pav. Kovalentinių fermento (F) imobilizavimo elektrodo paviršiuje pavyzdžiai [47].

Kaip imobilizavimo matrica gali būti naudojami įvairūs paviršiai: platina, auksas, grafitas, stiklas, kvarcas. Fermentų matricos funkcinių grupių aktyvavimui naudojami įvairūs organiniai ir neorganiniai junginiai:

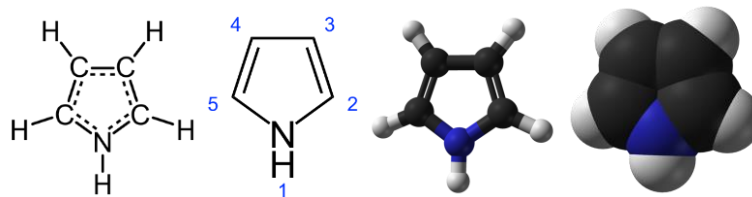
modifikuoti azoto heterocikliniai junginiai (6 a pav.), įvairiai modifikuoti silanai (6 b pav.) bei karbodiimido junginiai (6 c pav.). Fermentai auksinio elektrodo paviršiuje gali būti imobilizuojami panaudojant biotino-avidino kompleksus (6 e pav.). Plačiausiai fermentų imobilizavimui, sujungiant fermento molekules kryžminiais ryšiais naudojamas glutaro aldehidas (6 d pav.) [47,48]. Taip pat, kaip jau minėta aukščiau, kaip fermento imobilizavimo matrica sėkmingai gali būti naudojami π - π konjuguoti elektrai laidūs polimerai [49,50,51].

2.6 π - π konjuguoti polimerai

π - π konjuguoti elektrai laidūs polimerai – tai organiniai polimerai pasižymintys laidumu elektros srovei. Jie gali būti tiek laidininkais, tiek puslaidininkiais. Šie polimerai yra sudaryti iš heterociklinių aromatinių monomerų grandžių, turinčių π - π konjugotą sistemą. Didžiausiu elektrai laidžių polimerų privalumu yra tai, jog jie gali būti legvai pervedami į įvairias fizikines būsenas sintezės metu, pvz. disperguojami. Šio tipo polimerai nėra termosplatiški, t.y. jų mechaninės savybės nesikeičia didinant temperatūrą. π - π konjuguoti elektrai laidūs polimerai tinka elektrodų paviršių ant kurių yra imobilizuota biologiškai aktyvi medžiaga, modifikavimui. Biologiniam jutikliams modifikuoti dažniausiai taikomi polipirolas, polianilinas ir politiofenas. Jie gali būti susintetinami tiek cheminiu, tiek elektrocheminiu būdu [52].

2.6.1 Polipirolas - pirolas

Pirolas (Py) – heterociklinis aromatinis organinis junginys, kurio empirinė formulė yra C_4H_4NH [53]. Grynas pirolas yra bespalvis skystis, bet, kaip ir daugelis aminų, keičia spalvą iš bespalvio į rudą sąlytyje su oru ir šviesa. Tirpalo spalvos pasikeitimas reiškia, kad tirpale susidaro polipirolas ir įvairūs aminų oksidai. Pirolas pasižymi mažu baziškumu, lyginant su kitais aminais ir aromatiniais junginiais, tokiais, kaip piridinas.



7 pav. Elektrai laidaus polimero polipirolas - pirolas [54].

2.6.2 Polipirolas

Polipirolas (PPy) – π - π konjuguotas elektrai laidus organinis polimeras gaunamas pirolas polimerizacijos būdu [54]. Vieni iš pirmųjų polipirolą susintetino mokslininko Weiss vadovaujama grupė, 1963-ais metais. Laidaus PPy sintezė buvo atlikta pirolizuojant tetraodpirolas junginį [55]. Šiuolaikinėse laboratorijose polipirolas dažniausiai sintetinamas oksiduojant pirolą stipriais oksidatoriais, pvz., panaudojant geležies trichloridą metanolyje:



Šiuo atveju, polimerizacijos metu gaunamas $C_4H_4NH^{\bullet+}$ katijon-radikalas, kuris yra stiprus elektrofilas. Neoksiduota pirolas molekulė per antroje padėtyje esantį anglies atomą su $C_4H_4NH^{\bullet+}$ katijon-radikalu sudaro dimerinį katijon-radikalą $[(C_4H_4NH)_2]^{\bullet+}$. Procesas kartojasi daug kartų. Taip pat, oksidatoriumi labai dažnai naudojamas H_2O_2 . Polipirolas gali būti susintetintas ne tik cheminiu būdu, bet ir elektrocheminiu. Efektyviausiai elektrocheminė pirolas polimerizacija vyksta prie pastovaus + 0,8 V potencialo, bet polimerizacija įmanoma ir prie žemesnių potencialo verčių [56,57,58].

Gautas polimerizacijos būdu polimeras yra pilkos spalvos, juoduojančios kambario temperatūroje ir šviesoje. Polimero sluoksniai yra tamsiai pilki arba juodi, priklausomai nuo polimerizacijos laiko ir pradinių medžiagų koncentracijos. Polipirolas yra amorfinis polimeras. Šis polimeras yra stabilus iki 150 °C temperatūros [59].

Chemiškai susintetinto polipirola laidis priklauso nuo daugelio faktorių: pradinių oksidacijos proceso reagentų savybių, jų kiekių, paruošimo technikos, priedų kiekio esančio monomere. Kadangi polipirolas yra higroskopinis, vandens pašalinimas iš sintezės tirpalo žymiai įtakoja gauto polimero laidumą. Papildomai, PPy laidis gali būti padidinamas polimerizacijos metu pridėdant etilenglikolį [60]. PPy laidis gali būti nuo 2 iki 100 S cm⁻¹ [61].

Polipirolas yra puiki medžiaga pasižyminti naudingomis savybėmis, leidžiančiomis jį panaudoti kuriant elektroanalizines sistemas. Chemiškai sintetinant PPy jis susidaro tirpale juodų nuosėdų pavidale. Naudojant paprastą elektrocheminės polimerizacijos būdą gaunami stabilūs polipirola sluoksniai, pasižymintys dideliu laidžiu ir puikiomis mechaninėmis savybėmis. Be to, elektrocheminė PPy polimerizacija trunka vidutiniškai 10 kartų trumpiau, nei cheminė. PPy sluoksniai sintetinami naudojant daugiapakopinį elektronusodinimą su tirpiklio pašalinimu prieš kiekvieną pakopą. Sluoksnių storis gali būti reguliuojamas keičiant srovės stiprį. Daugiapakopinis tirpiklio pašalinimas eliminuoja dendritinių PPy struktūrų bei porų atsiradimą. Tirpiklio pašalinimas mažina oligomerinių struktūrų koncentraciją prie elektrodo paviršiaus ir neleidžia susidaryti trimatėms struktūroms, linkusioms formuotis iš tirpale esančių monomerų. Taigi, palaipsniui polimerinami PPy sluoksniai pasižymi didesniu tankiu [62].

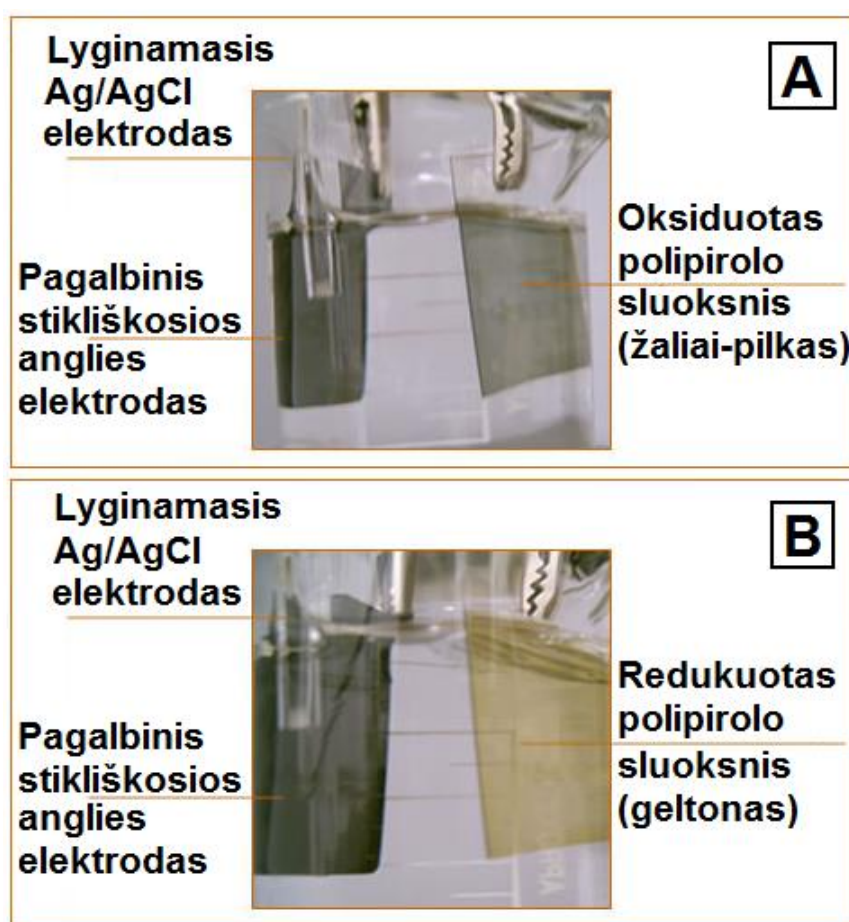
2.6.2.1 Elektrochrominės polipirola savybės

Elektrochromizmas – reiškinys, kaip tam tikra medžiaga keičia savo spalvą priklausomai nuo šiai medžiagai suteikto potencialo. Įvairūs medžiagų ir struktūrų tipai gali būti panaudoti konstruojant elektrochrominius įrenginius. Elektrochromizmo reiškinys atsiranda dėl red-oks reakcijų kurios vyksta su medžiagomis, kurioms būdingas elektrochromizmas.

Elektrochromizmas yra būdingas elektrai laidiesiems polimerams: politiofeniui, polianilinui ir polipirolui [63]. Elektrochemiškai sintetinami polipirola sluoksniai taip pat pasižymi šiuo reiškiniu (8 pav.).

Kaip matyti iš 8 paveikslo A dalies, kai polipirolo elektrocheminės sintezės metu indikatoriniam elektrodui suteikiamas teigiamas potencialas, gaunama oksiduota polimero forma, kuri yra žaliai-pilkos spalvos. Tuo tarpu, kai sintezės metu elektrodui suteikiamas neigiamas potencialas, gaunamas redukuoto polipirolo sluoksnis, kuris yra geltonos spalvos su pilku atspalviu.

Elektrochrominės medžiagos turi platų panaudojimą įvairiose srityse, pvz., šis reiškinys naudojamas kuriant taip vadinamus „inteligentinius langus“ (ang. intelligent windows). Jie reaguoja į aplinkos šviesą ir automatiškai kontroliuoja lango stiklo pralaidumą. Taip pat tokie stiklai naudojami kai kuriuose Boeing lėktuvų modeliuose [64].



8 pav. Skirtingos spalvos elektrochemniškai susintetinto polipirolo sluoksniai priklausomai nuo sintezės metu indikatoriniam elektrodui suteikiamo potencialo: A – teigiamas potencialas, B – neigiamas potencialas [64].

2.6.2.2 Polipirolas biologiniuose jutikliuose

Elektrai laidaus polimero polipirolu sluoksniai plačiai naudojami biologinių jutiklių elektrodų modifikavimui. Jie naudojami kaip elektrokatalizatoriai ar biologinių molekulių imobilizavimo matricos [11]. Polipirolu sluoksniai sujungti su biologiškai aktyvia medžiaga (fermentu, antikūnu ir kt.) sėkmingai naudojami analizinio signalo registravimui, o taip pat jie atlieka biologinio jutiklio apsauginę funkciją, darant jį atrankiu tik tam tikrai analizių grupei [65].

Polipirolas pasižymi ne tik laidumu elektros srovei, bet ir skirtingu pralaidumu įvairioms cheminėms medžiagoms, geru plastiškumu, gebėjimu keisti savo fizikines savybes elektrinio lauko poveikyje arba keičiant terpės rūgštingumą, todėl jis tinka elektrodų paviršių ant kurių yra imobilizuota biologiškai aktyvi medžiaga, modifikavimui [66].

2.7 Aukso nanodalelės

2.7.1 Aukso nanodalelių sintezė vandeninėje ir organinėje terpėje

Aukso nanodalelės bei jų dariniai yra vienos iš labiausiai ištirtų nanomedžiagų šiuolaikiniame mokslo pasaulyje ir yra pritaikomos daugelyje sričių: elektronikoje, biologijoje, katalizėje, medicinoje ir k.t. Apsaugant aukso nanodaleles nuo agregacijos bei jų optinių, elektrinių ir katalizinių savybių kontroliavimui, AuND yra modifikuojamos tam tikromis funkcinėmis organinėmis arba neorganinėmis molekulėmis. Todėl intensyviai vykdoma aukso nanodalelių sintezė skirtingais metodais, funkcionalizavimas bei paviršiaus tyrimai. Taip pat labai svarbu yra ištirti ir nustatyti aukso nanodalelių agregacijos ir dispersijos laipsnius, kadangi šios savybės yra svarbios pritaikant jas įvairiose analizinėse sistemose [67].

Nanodalelėmis laikomi dariniai, kurių dydis varijuoja nuo 1 iki 100 nm [68,69]. Priklausomai nuo sintezės ir paruošimo metodikos bei funkcinių grupių, dalelės išlieka stabilios vandenyje (hidrozoliai) arba organiniame

tirpiklyje (organozoliai). Daugelio nanodalelių sintezės metodų trukmė ilga [70], kadangi reikalingas specifinis jų paviršiaus padengimas įvairiomis funkcinėmis grupėmis, siekiant tolimesnio jų panaudojimo sudėtinguose nanostruktūrizuotuose įrenginiuose [67].

Koloidiniai nanodydžių eilės metalinių dalelių tirpalai gali būti gaunami dviem pagrindiniais būdais. Vienas iš jų yra vadinamas „iš viršaus į apačią“ (ang. top-down) [71] būdas. Tam tikro metalo nanodalelės gaunamos smulkinant įvairiais būdais pradinę medžiagą. Smulkinimo metu į tirpalą dedami koloidinio tirpalo stabilumą palaikantys junginiai. „Iš viršaus į apačią“ technologijoje labai plačiai naudojamas metalų garinimo būdas, kai plonas metalo sluoksnis ant substrato užgarinamas vakume. Vakuminėje aplinkoje metalų dalelės, kurios yra garų pavidale, nusėda tiesiogiai ant substrato ir kondensuojasi iki kietos būsenos. Tokiu būdu gaunamas plonas, plastiškas metalo sluoksnis [72]. Antru nanodalelių tirpalų gavimo būdu yra vadinamas „iš apačios į viršų“ (ang. bottom-up), kai koloidinis tirpalas gaunamas redukuojant metalų druskas arba skaldant metastabilius organometalinius junginius. Tvarkingam nanostruktūrų augimo ir stabilumo užtikrinimui naudojami stabilizatoriai – polimerai arba paviršinio aktyvumo medžiagos [67].

Cheminė metalų druskų redukcija iki neutralių metalo atomų vandeninėje terpėje esant stabilizuojantiems junginiams yra labiausiai paplitęs aukso nanodalelių sintezės metodas [73]. Šį metodą 1951 m. pasiūlė J. Turkevich [74], o 1970 m. G. Frens jį patobulino [75]. Gaunamos sferinės, monodispersinės nanodalelės, kurių skersmuo yra iki ~ 20 nm. Didesnio dydžio dalelės pasižymi blogesnėmis monodispersiškumo charakteristikomis. Šios sintezės mechanizmas susideda iš trijų etapų: nanodalelės branduolio iš aukso atomų susidarymo, augimo ir aglomeracijos [76]. Aukso nanodalelės gaunamos redukuojant tetrachloraukso rūgštį natrio citratu vandeninėje terpėje. Natrio citratas veikia kaip reduktorius ir stabilizatorius, nes neigiami citrato jonai adsorbuojasi ant aukso nanodalelių, suteikdami joms neigiamą krūvį,

kurio dėka dalelės stumia viena kitą ir taip yra išvengiama jų agregacijos. Kaip redukuojanti medžiaga taip pat gali būti panaudoti borhidridai ir kiti reduktoriai. Kaip jau minėta anksčiau, dalelės gaunamos citrato pagalba yra sferinės ir iki 20 nm skersmens, o jų dydis kontroliuojamas keičiant reagentų koncentracijas [77]. Be aukso druskų redukcijos yra nemažai kitų būdų gauti koloidinėms aukso nanodalelėms: sonochemija, fotochemija bei auginimas terpėje esant mažų aukso nanodalelių, reikalingų nanodalelių augimui [67]. Taip pat metalų nanodalelės gali būti padengtos įvairiais neorganiniais sluoksniais, tokiais kaip laidaus nemetalinio grafito arba pusiau laidaus CdS [67].

Aukso nanodalelių sintezė gali būti atlikta ir organiniuose tirpikliuose nesimaišančiuose su vandeniu. Pirmą kartą toks aukso nanodalelių sintezės ir stabilizavimo metodas literatūroje buvo paminėtas 1994-aisiais ir buvo pavadintas Brust-Schiffirin metodu [78]. Dar kitaip šitas metodas yra vadinamas dviejų fazių pernešimo metodu. Metodo esmė yra tetrachloraukso rūgšties reakcija su tetraoktilamonio bromidu (TOAB) tolueno terpėje. Taip pat yra naudojamas natrio borhidridas kaip reduktorius ir kaip stabilizatorius.

Brust-Schiffirin metodas taip pat naudojamas, kai norima susintetinti Au nanodaleles su savitvarkiu monosluoksniu (SAM). Tam tikslui naudojami įvairūs alkantioliai. Tetrachloraukso rūgštis iš vandeninės terpės pervedama į organinę fazę naudojant TOAB ir vykdoma redukcija natrio borhidridu terpėje esant alkantiolių. Šis metodas leidžia susintetinti monodispersines aukso nanodaleles padengtas tankiai išsidėsčiusiu monosluoksniu. Šiuo būdu susintetintos AuND yra termiškai stabilios bei pasižymi geru stabilumu deguonies atmosferoje. Tokių dalelių skersmuo svyruoja nuo 1,5 iki 5,2 nm. Vienu didžiausiu šio metodo privalumu yra tai, jog tokios aukso nanodalelės gali būti pakartotinai izoliuotos ir ištirpintos organiniuose tirpikliuose be negrįžtamos agregacijos ar suirimo. Jos gali būti lengvai transportuojamos ir lengvai modifikuojamos. Aukso nanodalelės padengtos SAM gali būti sėkmingai panaudotos kuriant nanostruktūras ir nanoįrenginius pritaikomus

biologijoje, katalizėje, paviršiaus inžinerijoje bei optoelektronikoje [79]. Per SAM sluoksnį nanodalelių paviršiuje galima imobilizuoti įvairias biologiškai aktyvias molekules, fermentus bei kitus junginius.

Aukso nanodaleles galima susintetinti ir taip vadinamu Perrault ir Chan metodu [80]. Jo esmė – tetrachloraukso rūgšties redukcija hidrochinonu vandeniniuose tirpaluose, kuriose yra nanodalelių branduolių, reikalingų tolimesniam AuND augimui (ang. seeds). Stabilizatoriaus (pvz., natrio citrato) buvimas terpėje sąlygoja kontroliuojamą nanodalelių augimą. Dažniausiai, nanodalelių branduoliai yra sintetiniams citratiniu metodu. Perrault ir Chan metodas papildo Turkevich-Frens sintezės metodą, kadangi praplečiamas monodispersinių dalelių dydžio intervalas – Turkevich-Frens metodu gaunamos dalelės yra iki 20 nm dydžio, o hidrochinoniniu Perrault ir Chan metodu – 30 - 250 nm dydžio.

Navarro mokslinė grupė modifikavo Turkevich-Frens metodą. Reduktoriumi ir kompleksadariu pirmiausiai naudojamas natrio acetilacetatas, o po to į sintezės tirpalą įvedamas natrio citratas. Šiuo metodu gaunamos pakankamai didelės (iki 90 nm) ir monodispersinės aukso nanodalelės [81].

Kitu pakankamai dažnai aukso nanodalelėms susintetinti naudojamu metodu yra sonolizė. Šiame metode naudojamas ultragarsas (sonifikacija), kurio aplinkoje vandeninėje terpėje tetrachloraukso rūgštis sumaišoma su gliukoze. Reduktoriais šiuo atveju yra hidroksilo ir gliukozės pirolizės radikalai. Gaunami nanodariniai yra 30 - 50 nm skersmens bei kelių mikrometrų ilgio. Nanodariniai pasižymi dideliu lankstumu - juos galima sulenkti net 90° kampu. Naudojant gliukozę gaunamos juostelinės struktūros, o norint gauti sferines daleles – naudojamas ciklodekstrinas [82].

Labai svarbu sugebėti susintetinti ne tik koloidines nanodaleles, bet ir vienmates, dvimates arba trimates nanostruktūras, kadangi gautų struktūrų savybės priklauso nuo jų formos bei dydžio. Nanodalelių darinių formavimui ir pritaikymui kuriant nanostruktūras naudojami įvairūs cheminiai junginiai ir

skirtingi formavimo būdai: tirpiklio išgarinimas, elektrostatinė sąveika, kovalentinis surišimas naudojant organines molekules. Tokie nanodalelių dariniai sėkmingai naudojami konstruojant biologinius jutiklius ir elektrodų modifikavimui [83].

2.7.2 Aukso nanodalelių koloidinio tirpalo stabilumas

Koloidinis tirpalas – tai heterogeninė sistema, kurioje dalelės yra disperguotos tirpiklyje ir jų dydis gali kisti nuo 1 nm iki 1 μm. Kadangi agregacijos laipsnis ir dalelių tirpalo sklaidos savybės įtakoja jų optines, elektronines ir katalizines savybes, labai svarbu mokėti tiksliai nustatyti ir kontroliuoti jėgas, kurios įtakoja koloidinio tirpalo stabilumą.

Dažniausiai koloido stabilumas vandeniniuose tirpaluose yra aprašomas Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) dėsnio [84]. Bendra laisvoji sąveikos tarp koloidinių dalelių energija susideda iš dviejų sudedamųjų – Van der Valso jėgų ir elektrostatinės sąveikos.

$$G = G_{\text{van der Valso}} + G_{\text{elektrostatinė}}$$

Van der Valso jėgos komplekse nanodalelė-nanodalelė gali būti aprašyta tokia formule:

$$\omega(r) = -A/\pi^2 \sigma_1 \sigma_2 r^6.$$

kur σ_1 ir σ_2 yra kiekvieno iš dalyvaujančių komplekse kūno atomų skaičius tūrio vienetu (atomo ar atomų darinio), A – Hamaker konstanta [85].

Kadangi efektyvios Hamaker konstantos reikšmė visada yra teigiama, tai Van der Valso jėgos tarp dviejų vienodų nanodalelių sąlygoja dalelių prisitraukimą. Elektrostatinės jėgos dėl nanodaleles dengiančio elektrostatinio sluoksnio yra atstumiančios. Dviejų tipų jėgų tarpusavio sąveika generuoja energetinį barjerą, nuo kurio sluoksnio storio priklauso ar dalelės bus stabilios tirpale ar iškris į nuosėdas. Tokie faktoriai, kaip Hamaker konstanta, paviršiaus potencialas ir elektrolitų koncentracija tiesiogiai įtakoja energetinio barjero

sluoksnio storį, o juos kontroliuojant galima įtakoti aukso nanodalelių koloidinio tirpalo stabilumą. Kuo didesnis paviršiaus potencialas, tuo didesnė stūmos jėga stebima tarp nanodalelių. Kuo mažesnė elektrolito koncentracija terpėje, tuo didesnis atstumas yra tarp nanodalelių paviršių, kur yra svarbios stūmos jėgos. Abu šie faktoriai didina energetinio barjero sluoksnio storį. Kuo didesnė Hamaker konstanta, tuo didesnė yra trauka tarp atskirų nanodalelių, o energetinio barjero sluoksnis plonesnis.

Standartinis DLVO dėsnis tinka sistemoms, kai atstumai tarp nanodalelių yra didesni nei keli nanometrai. Esant mažesniai atstumui yra įvedamos koreliacijos. Taip yra dėl to, kad esant tokiam atstumui daleles veikia papildomos jėgos: hidrofobinės bei solvatacijos sąveikos. Šios sąveikos gali veikti kaip stūmos, traukos ar net osciliacijos jėgos, ir gali būti stipresnės, nei dvi pagrindinės DLVO jėgos – traukos ir stūmos [86]. Todėl tradicinio DLVO dėsnio išraiška būtų tokia:

$$G = G_{\text{van der Valso traukos jėga}} + G_{\text{elektrostatinė stūmos jėga}} + G_{\text{ne-DLVO jėgos}}$$

Hidrofobinis efektas stebimas, kai vandens molekulės sąveikauja su nepolinėmis alkanų, hidrokarbonatų, florkarbonatų arba inertinėmis molekulėmis. Sąveikos metu vandens molekulės struktūra pasikeičia ir susidaro naujas vandens molekulių sluoksnis aplink nepolines molekules [67].

Labai dažnai koloidinių AuND stabilumo palaikymui į terpę yra pridedamas mažas kiekis polimero. Kai dvi polimeru padengtos dalelės priartėja viena prie kitos, jos atsistumia dėl atsirandančių tarpusavio sąveikų [87]. Šiuo atveju turime koloido erdvinės stabilizacijos atvejį. Polimeriniai stabilizatoriai plačiai naudojami pramonėje – gaminant dažus, emulsijas, kosmetiką, farmacines prekes bei lubrikantus.

Nanodalelių koloidinio tirpalo stabilumas tai pat priklauso nuo paviršiaus drėkinimo. Jo poveikis koloidui padidėja, kai tirpiklio molekulės yra skatinamos patekti tarp dviejų koloido dalelių ir tuomet šios dalelės osciliuoja

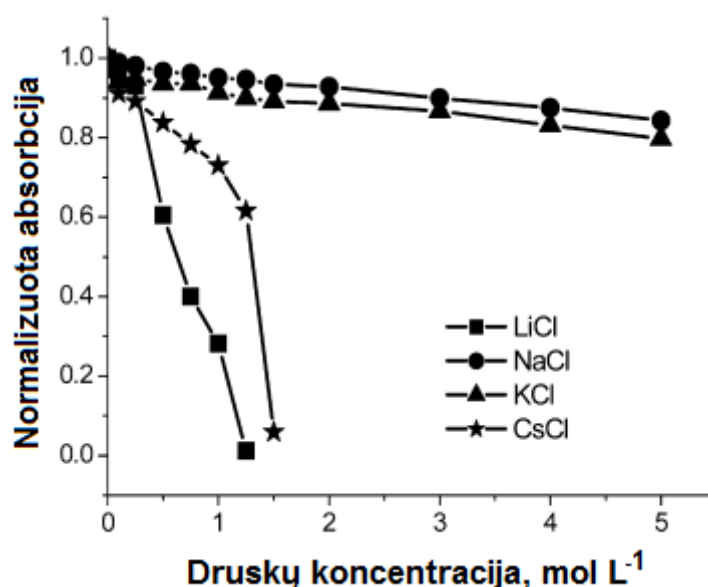
tokiu atstumu, kurį sudaro kelios tirpiklio molekulės. Sąveikos tarp koloidinių dalelių paviršiaus ir tirpiklio molekulės gali įtakoti koloidinių dalelių savitvarką ir padidinti solvatacijos jėgą [85]. Kai tirpiklio molekulės yra vandens molekulės, šios jėgos vadinamos hidratacijos jėgomis.

Hidratacijos jėgų poveikio mechanizmas koloidinėms nanodalelėms dar nėra iki galo ištirtas, nors yra nemažai publikacijų, kuriose teigiama, kad hidratacijos jėgos labai įtakoja koloidinių nanodalelių stabilumą. Iki galo nėra ištirta ir specifinio jonų efekto stabilumui kilmė. Šiems reiškiniams paaiškinti kiekybiškai yra taikomas struktūros modifikavimo būdas, kai jonai adsorbuojami nanodalelių paviršiuje [67]. Hidratacijos jėgos yra didelės hidratuotiems ir „struktūrą palaikantiems“ jonams ir gali būti sumažintos dedant į koloidinį tirpalą silpnai hidratuotus jonus ar „struktūrą ardančius“ jonus.

Koloidinio aukso nanodalelių tirpalo stabilumas priklauso nuo tirpale esančių elektrolitų prigimties bei koncentracijos. Kai elektrolito koncentracija didelė, dėl dvigubojo elektrinio sluoksnio dominuoja stūmos jėgos ir jos mažėja, mažėjant elektrolito koncentracijai. Kai elektrolito koncentracija maža, dominuoja hidratacinės stūmos jėgos. Todėl, didėjant druskų koncentracijai bendra stūmos jėgų vertė mažėja, o pasiekus minimumą vėl padidėja, t.y. stūmos jėgos mažiausiai įtakoja koloidinio tirpalo stabilumą, kai elektrolito koncentracija yra optimali, nei per didelė, nei per maža. Toks procesas, kai dvigubojo elektrinio sluoksnio ir hidratacijos jėgos veikia kartu paaiškinamas paviršiaus dipolio teorija. Teorijos autoriai nustatė, kad bendras dvigubo sluoksnio ir hidratacijos jėgų veikimas gali sumažinti stūmos jėgų intervalą, ypač kai dominuoja didelės joninės jėgos [88].

Šios teorijos patvirtinimui, be druskų įtakos koloidinio tirpalo stabilumui buvo atlikta serija tyrimų su timinu modifikuotomis AuND. Yra žinoma, kad timino molekulės yra jautrios terpės pH pokyčiams ir jonizuojasi. Pagal literatūros duomenis timino junginių, turinčių ilgą angliavandenilių grandinę,

pK_a yra 11,2 [89]. Vadinasi, kai terpės pH vertė didesnė nei 11,2, įvyksta vandenilio protono, esančio timino molekulėje N3 padėtyje, atskilimas. Todėl timino molekulėmis modifikuotos nanodalelės gali būti disperguotos nevandeniniuose didelio šarmingumo tirpaluose. Kai turime vandeninius tirpalus, mechanizmas yra kiek kitoks. Kai nanodalelių skersmuo yra labai mažas ir jos modifikuotos tankiu organinių molekulių sluoksniu labai svarbu nustatyti kaip organinių molekulių prigimtis ir jomis modifikuotų nanodalelių dydis įtakoja daleles veikiančias Van der Valso jėgas. Pačios timino molekulės taip pat sąveikauja tarpusavyje. Šių prielaidų patikrinimui mokslininkų grupė vadovaujama J. Zhuo atliko tokį tyrimą [90].

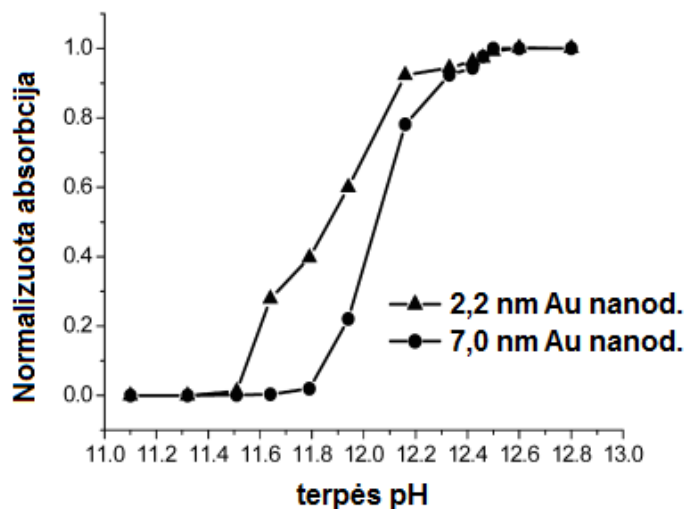


9 pav. Monovalentinių druskų (LiCl, NaCl, KCl bei CsCl) įtaka 2,2 nm skersmens timinu modifikuotų aukso nanodalelių koloidinio tirpalo stabilumui. Aplinka – vandeninis tirpalas pH 12,5 [67].

Tiriamuoju objektu buvo pasirinktos anksčiau minėtos timinu modifikuotos 2,2 nm skersmens AuND. Jos buvo ištirpintos vandeniniame tirpale, kurio pH 12,5. Tyrimo metu, pasitelkiant paviršiaus sustiprintą Ramano spektroskopijos metodą buvo matuojamas elektroforetinis AuND mobilumas esant skirtingoms jų koncentracijoms. Gryname tirpale buvo stebima labai

nedidelė mobilumo reikšmė ir elektrostatinė sąveika. Į tirpalą palaipsniui buvo įnešama monovalentinių druskų (LiCl, NaCl, KCl, CsCl).

Kaip matyti iš 9 paveikslo, NaCl ir KCl druskos neturi didelės įtakos aukso nanodalelių koloidinio tirpalo stabilumui. Net ir prisotintuose šiomis druskomis tirpaluose AuND išlieka stabilios. Iš 9 paveikslo taip pat matyti, kad net sąlyginai nedidelės LiCl ir CsCl koncentracijos įtakoja nanodalelių padidėjimą. Tirpale, esant maksimalioms LiCl ir CdCl koncentracijoms, AuND visiškai iškrisdavo į nuosėdas. Nesant tirpale druskų, koloidinio tirpalo stabilumas palaikomas dėl silpnos dvigubojo elektrinio sluoksnio bei stiprios hidratacijos stūmos jėgų. Didinant druskų koncentraciją didėja tirpalo joninė jėga, tuo pačiu sumažinama ir galų gale eliminuojama elektrostatinė sąveika tarp nanodalelių. Šiuo atveju AuND stabilizuojamos tik hidratacijos jėgų pagalba. Nanodalelių agregacija yra Van der Valso traukos jėgų pasekmė, dėl to, esant tirpale LiCl ir CsCl druskų, sumažėja hidratacijos stūmos jėgos. Tokia pat tendencija buvo pastebėta ir su 7,0 nm skersmens AuND bei nustatyta, kad didesnės nanodalelės yra labiau jautrios mažesnėms druskų koncentracijoms [90].



10 pav. Terpės pH įtaka 2,2 nm ir 7,0 nm skersmens timinu modifikuotų aukso nanodalelių koloidinio tirpalo stabilumui nesant monovalentinių druskų. [90].

Tyrimo metu taip pat buvo nustatyta, kad Van der Valso jėgos susideda iš kelių dedamųjų, ir tik nedidelę jų dalį sudaro “timintolio sluoksnis - timintolio sluoksnis“ sąveikos ir “timintolio sluoksnis – aukso nanodalelės branduolys“ sąveikos. Tiek 2,2 nm, tiek 7,0 nm AuND atveju didžiausią sudedamąją Van der Valso jėgų dalį sudaro jėgos tarp aukso nanodalelių branduolių, o 7,0 nm aukso nanodalelių atveju ši dedamoji yra didžiausia [90]. Kaip matyti iš 6 paveikslo, nuo pH 11,0 iki 11,5 pokyčiai nėra stebimi. 2,2 nm AuND atveju Van der Valso jėgos mažėja pH intervale nuo 11,5 iki 12,5. Tuo tarpu 7,0 nm AuND mažėja intervale nuo pH 11,5 - 11,8 iki 12,5. Kaip galime pastebėti, dalelių dydį nestipriai įtakoja terpės pH. Kai pH vertė mažesnė už timino molekulių pK_a , dalelių paviršinis krūvis yra neutralus. Tokiu atveju sistemoje nėra dvigubojo elektros sluoksnio stūmos jėgų ir dalelės linkusios agreguoti. Kai terpės pH didesnis už pK_a , įvyksta timino molekulių deprotonizacija. Kuo labiau pH reikšmė skiriasi nuo pK_a , tuo didesnis yra nanodalelių paviršiaus potencialas ir tuo didesnės dvigubojo elektrinio sluoksnio stūmos jėgos [91].

Taip pat, kuo labiau pH reikšmė skiriasi nuo pK_a , tuo labiau padidėja hidratacijos jėgos ir sumažėja adhezijos jėgos tarp nanodalelių. Dėl šių priežasčių padidėja aukso nanodalelių koloidinio tirpalo stabilumas. Kuo didesnės nanodalelės ištirpinamos šarmingesnėje terpėje, tuo greičiau jos agreguoja dėl stipresnių Van der Valso jėgų [67].

2.7.3 Aukso nanodalelių panaudojimas biologiniuose jutikliuose

2.7.3.1 Nanostruktūrizuoti gliukozės biologiniai jutikliai

Nanomastelių dydžio biologinių medžiagų panaudojimas konstruojant jutiklius – reikšmingas žingsnis biologinių jutiklių skirtų gliukozės kiekio nustatymui tobulinime [92]. Nanostruktūrizuoti biologiniai jutikliai pasižymi dideliu jautriu bei atrankumu. Tai ypač svarbu, kai analizuojami realūs mėginiai į kurių sudėtį įeina labai daug įvairių medžiagų. Nanomedžiagų sąveikaujančių su biologinėmis molekulėmis panaudojimas padidina biologinių

jutiklių stabilumą laike, atkuriamumą ir patikimumą. Nanotechnologijos leidžia biokomponentų, vertiklių sistemų ir elektroninių įrenginių miniaturizavimą bei integravimą tarpusavyje. Šiam tikslui naudojamas platus nanomedžiagų spektras: įvairių dydžių ir formų metalų nanodalelės, magnetinės nanodalelės, kvantiniai taškai. Taip pat labai plačiai naudojami anglies nanovamzdeliai, nanokompozitai bei nanopolimerai. Šios medžiagos ženkliai pagerina analizinių sistemų charakteristikas, kadangi jos pasižymi patraukliomis ir unikaliomis fizinėmis, cheminėmis, optinėmis, mechaninėmis, laidžio, magnetinėmis ir optinėmis savybėmis [93].

2.7.3.2 Nanodalelės gliukozės biologiniuose jutikliuose

Modifikuojant elektrodus, skirtus gliukozės biologiniams jutikliams, dažnai naudojamos įvairios metalų nanodalelės. AuND gali būti naudojamos kaip paviršius įvairių biologinių molekulių imobilizavimui. Biologinis jutiklis, kuriame gliukozės oksidazė imobilizuota aukso nanodalelių paviršiuje, turėtų pasižymėti geromis stabilumo laike charakteristikomis, kadangi aukso nanodalelės stipriai sąveikauja su fermentu, todėl jo išsiplovimo laipsnis yra mažesnis [26]. AuND taip pat plačiai naudojamos laboratorinių gyvūnų organų bei ląstelių vaizdinimui. Šiuolaikiniai medicininės diagnostikos metodai pritaiko neinvazinį, saugų organizmui optinį vaizdinimą, vaizdinimą su radioaktyviomis žymėmis žymėtomis dalelėmis, ultragarsinį bei rentgeno spindulių vaizdinimus. Visais atvejais naudojamos žymėtos nanodalelės arba kontrastinės medžiagos, kurios suleidžiamos į organizmą siekiant paženklinti ligos pažeistų vietų lokalizaciją. Toks vaizdinimas yra svarbus nustatant uždegimo židinį, vizualizuojant kraujagyslių struktūras ir pažeistus audinius. Taip pat jį galima naudoti siekiant anksti nustatyti netikėtą, sveikatai pavojų keliantį vaistų kaupimąsi. Taigi, svarbiausios galimybės, kurias nanovaizdinimas suteikia diagnostikai yra ankstyvas ligų nustatymas, ligos stadijų stebėjimas, pacientų atranka individualiam gydymui bei chirurgijos veiksmingumo įvertinimas realiu laiku [94].

Elektronų pernašos pagerinimui GOx yra kovalentiškai prijungiama prie aukso nanodalelių sluoksnio imobilizuoto auksinio elektrodo paviršiuje. Ciklinės voltamperometrijos (CV) bei elektrocheminio impedanso tyrimų duomenys parodė, kad gautas biokomponentas sėkmingai imobilizuojamas auksinio elektrodo paviršiuje stipriais ryšiais [95]. AuND taip pat gali dalyvauti tiek tiesioginėje, tiek netiesioginėje elektronų pernašoje. Jos naudojamos, kaip elektronų pernašos tarpininkai nes palengvina elektronų pernašą nuo fermento aktyviojo centro link elektrodo [96]. Todėl AuND naudojamos tokiose analizinėse sistemose, kur dėl tam tikrų priežasčių negalima naudoti papildomo EPT [97,117]. Šiuo atveju labai svarbi nanodalelių ir imobilizuotų fermentų aktyviųjų dalių sąveika.

Biologinių jutiklių modifikavimui taip pat naudojamos magnetinės metalų nanodalelės. Dėl savo biosuderinamumo, stiprių supermagnetinių savybių biologinių komponentų imobilizavimui dažniausiai naudojamos geležies oksido magnetinės nanodalelės (Fe_3O_4). Šios dalelės gali būti panaudotos kaip gliukozės oksidazės imobilizacijos matrica ant chitozano užgarinto ant ITO plokštelės. Tokia sistema pasižymi gera elektronų pernaša [98]. Taip pat, dažnai naudojamos platinos, paladžio ir grafeno magnetinės nanodalelės. Tiek magnetinių, tiek AuND palyginimui buvo ištirtas konduktometriniis biologinis jutiklis [99], kur GOx buvo imobilizuota ant poli(alilamino hidrochlorido) (PAH) dalelių ir tokios dalelės nusodintos indikatorinio elektrodo paviršiuje. Geriausias jautris bei analizės nustatymo riba buvo gautas sistemoje su magnetinėmis nanodalelėmis ($70 \mu\text{M mM}^{-1}$ ir $3 \mu\text{M}$). Dirbant su aukso nanodalelėmis jautris buvo $45 \mu\text{M mM}^{-1}$, o nustatymo riba – $9 \mu\text{M}$, o su sistema, kur GOx buvo tiesiogiai imobilizuota elektrodo paviršiuje, jautris buvo tik $30 \mu\text{M mM}^{-1}$ ir nustatymo riba – $50 \mu\text{M}$ [99].

Taip pat, dėl gero jautrio cheminėms ir biologinėms medžiagoms, įvairios metalų nanodalelės bei jų dariniai plačiai taikomi biologinių jutiklių kūrimui [100]. Labai plačiai naudojamos metalų, oksidų ir puslaidininkinės nanodalelės, net nanomatmenų dydžio elektrai laidžių polimerų dalelės.

Plačiausiai biologiniame atpažinime naudojamos aukso, sidabro bei hibridinės sidabro-silicio dioksido nanodalelės [101,102,103]. Dažniausiai metalų nanodalelės naudojamos kaip taip vadinamų „elektroninių laidų“ sudedamoji dalis. Oksidų nanodalelės yra naudojamos įvairių biologinių medžiagų imobilizavimui, o puslaidininkinės dalelės - kaip žymės [104].

Kaip jau minėta aukščiau, iš metalų nanodalelių plačiausiai naudojamos 1 - 100 nm dydžio aukso nanodalelės. Jos pasižymi dideliu paviršiaus ploto ir tūrio santykiu bei didelės paviršinės energijos reikšmėmis. Pagal analizinio signalo keitiklio tipus, aukso nanodalelėmis modifikuoti biologiniai jutikliai yra skirstomi į optinius, elektrocheminius ir pjezo-elektrinius. Pagrindinis dėmesys skiriamas aukso nanodalelių vaidmeniui šiuose jutikliuose, bei jų analizinio signalo padidinimo mechanizmui. AuND pasižymi didele dielektrinės konstantos reikšme bei didele molekuline mase. Pavyzdžiui, kadangi jos stiprina lūžio rodiklio pokytį, DNR jutiklis modifikuotas AuND yra ~1000 kartų jautresnis nei be AuND [105]. Jos taip pat pasižymi biosuderinamumu, dideliu tankiu bei didelė paviršius/tūris santykio reikšmė. Pjezo-elektrinio DNR biologinio jutiklio AuND pagrindu aptikimo riba yra net 10 - 16 mol L⁻¹ [106].

Kūriant biologinius jutiklius nanodalelių ir gliukozės oksidazės pagrindu plačiausiai naudojami amperometriniai signalo vertikliai. Gliukozės biologiniai jutikliai sukurti elektrochemiškai nusodintų AuND ir GOx nanodarinių pagrindu pasižymi geromis analizinėmis charakteristikomis. Tokių sistemų teisiškumo intervalas yra nuo 0 iki 20 mmol L⁻¹ gliukozės koncentracijų intervale [107]. Sistemų, kur AuND ir GOx dariniai yra imobilizuojami per Nafiono sluoksnį stikliškosios anglies elektrodo paviršiuje, teisiškumo intervalas yra kiek mažesnis – iki 6 mmol L⁻¹ substrato koncentracijos. Bet šiuo atveju aptikimo riba yra 0,034 mmol L⁻¹ [118]. Geresnės nustatymo ribos buvo apskaičiuotos biologiniams jutikliams su chitozano-GOx-AuND biokompozitais modifikuotu aukso elektrodu – 0,0027 mmol L⁻¹ [108], su kovalentiškai imobilizuota GOx ir AuND auksinio elektrodo paviršiuje SAM

pagalba – $0,0082 \text{ mmol L}^{-1}$ [95] bei naudojant daugiasluoksnę aukso nanodalelių ir GOx sistemą, kur sluoksniai yra prijungiami kovalentiškai prie aukso elektrodo paviršiaus – $0,008 \text{ mmol L}^{-1}$ [109]. Visose aukščiau aptartose sistemose naudojami amperometriniai tyrimo metodai, bet taip pat gali būti sėkmingai panaudota ir ciklinė voltamperometrija. Tokios sistemos sudarytos iš indikatorinio anglies pastos elektrodo, kurio paviršiuje kovalentiškai imobilizuota GOx, prieš tai elektrodą modifikavus aukso nanodalelėmis aptikimo riba yra $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$, o teisiškumo intervalas – nuo $0,04$ iki $0,28 \text{ mmol L}^{-1}$ gliukozės koncentracijos [125].

Kaip jau minėta anksčiau, aukso nanodalelės yra puikūs elektronų pernašos tarpininkai, kadangi geba greitai pernešti elektronus nuo elektroaktyvių biologinių junginių dalių link elektrodo paviršiaus. Papildomai aukso nanodalelių šviesos sklaidos savybės ir didelis gebėjimas sustiprinti lokalų elektromagnetinį lauką leidžia jas panaudoti elektrinio analizinio signalo stiprinimui [110].

3 TYRIMŲ APŽVALGA IR DARBO METODOLOGIJA

3.1 Reagentai ir medžiagos

Pagrindinis disertaciniame darbe tirtas fermentas – gliukozės oksidazė, kurios specifinis aktyvumas sudaro 215,266 U mg⁻¹ (Fluka, Šveicarija) – išskirtas iš *Aspergillus niger* rūšies pelėsinių grybelių. Darbe buvo naudotas 40 mg mL⁻¹ koncentracijos GOx tirpalas 0,05 mol L⁻¹ fosfatiniame buferiniame tirpale, pH 6,0. Taip pat buvo ištirtos GOx išskirtos iš *Penicillium adametzii* bei *Penicillium funiculosum* pelėsinių grybelių Nacionalinės Mokslų Akademijos Minsko Mikrobiologijos institute, Baltarusija.

Etaloninis 1 mol L⁻¹ koncentracijos gliukozės tirpalas buvo ruošiamas ištirpinant D-(+)-gliukozę (Carl Roth GmbH & Co., Vokietija) distiliuotame vandenyje. Gliukozės tirpalai gali būti naudojami praėjus parai nuo jo paruošimo, nes turi įvykti dalinė mutarotacija ir nusistovėti pusiausvyra tarp α ir β gliukozės formų. Darbe buvo naudojami keli buferiniai tirpalai – 0,05 mol L⁻¹ acetatinis, fosfatinis, bei fosfatinis-acetatinis buferiai su 0,1 mol L⁻¹ KCl (Scharlau Chemie S.A., Ispanija).

Darbe buvo naudojami keli EPT – tirpus vandenyje N-metilfenazino metosulfatas (FMS) (AppliChem GmbH, Vokietija) bei netirpūs vandenyje EPT: ferocenas (FC), α -metilferocenmetanolis (α -MF), ferocenkarboksialdehidai (FCAld), ferocenkarboksilinė rūgštis (FCA) (Sigma-Aldrich, JAV). Kiekvieno iš jų buvo paruošiamas pradinis etaloninis 10 mg mL⁻¹ tirpalas organiniame tirpiklyje acetonitrile (Sigma-Aldrich, Vokietija).

Darbe buvo naudotas 0,5 mol L⁻¹ etaloninis pirolas, kuris buvo ruošiamas iš koncentruoto pirolas (Fluka, JAV). Polimerizacijos tirpalą sudarė 0,05 mol L⁻¹ gliukozės ir 0,5 mol L⁻¹ pirolas ištirpintų 0,05 mol L⁻¹ fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 6,0). Palyginimui, siekiant ištirti GOx modifikuoto

elektrodo stabilumą, indikatorinis elektrodas buvo laikomas 0,05 mol L⁻¹ gliukozės ir 0,05 mol L⁻¹ fosfatinio buferio (pH 6,0) tirpale be pirolo.

Taip pat tyrimuose buvo naudoti 37 % druskos rūgštis (Dr. Jan Kulich, Čekija), 25 % koncentracijos glutaro aldehidas (Fluka Chemie GmbH, Šveicarija), distiliuotas vanduo ($\kappa = 3 - 9 \mu\text{S cm}^{-1}$), tetrachloraukso rūgštis (Alfa Aesar, Vokietija), tri-natrio citratas (Avsista, Lietuva), 0,3 μm N tipo α aliuminio oksido milteliai (Electron Microscopy Sciences, JAV), tanino rūgštis (Carl Roth GmbH & Co., Vokietija), grafito strypeliai (99,999 % grynumo) (Sigma-Aldrich, JAV), stambus (600), smulkesnis (1200) ir smulkus (3500) švitrinis popierius.

3.2 *Matavimo įranga*

3.2.1 Elektrocheminių tyrimų įranga ir elektrodai

Substrato (gliukozės) nustatymas buvo tiriamas amperometriniu metodu, naudojant kompiuterizuotą potenciostatą-galvanostatą Autolab/PGSTAT-30 (Eco Chemie BV, Olandija) su programine įranga GPES 4.9. Matavimai buvo atliekami 5 cm³ tūrio elektrocheminėje gardelėje užpildytoje 0,05 mol L⁻¹ fosfatinio buferiniu tirpalu su 0,1 mol L⁻¹ KCl (pH 6,0), naudojant trijų elektrodų sistemą. Tirpalas buvo maišomas magnetine maišykle HANNA Instruments (HI180F-2, Vokietija). Indikatoriniu elektrodu buvo naudojamas 7,1 mm² paviršiaus ploto ir 3 mm skersmens grafito strypelis (Sigma-Aldrich, JAV), lyginamuoju elektrodu – Ag/AgCl/KCl_{3M} elektrodas (Metrohm, Šveicarija), pagalbinis – platinos viela (Metrohm, Šveicarija). Elektrocheminiam gliukozės įvertinimui buvo naudojami amperometrijos ir ciklinės voltamperometrijos metodai. Ciklinės voltamperometrijos parametrų vertės: $E_1 = 0 \text{ V}$, $E_2 = +0,6 \text{ V}$, potencialo skleidimo greitis – 50 mV s⁻¹. Amperometrijos metodo parametrų vertės: $E_1 = +0,3 \text{ V}$ arba $+0,6 \text{ V}$, priklausomai nuo eksperimento.

Reagentai buvo sveriami analizinėmis svarstyklėmis KERN ABJ 120-4M (KERN & Sohn GmbH, JAV). Tirpalų pH buvo matuojamas pH-metru

(Thermo Electron Corporation, JAV) ir reikalui esant tirpalai buvo išmaišomi magnetine maišykle (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Vokietija). Visi eksperimentai atlikti kambario temperatūroje ($20 \pm 2^\circ\text{C}$).

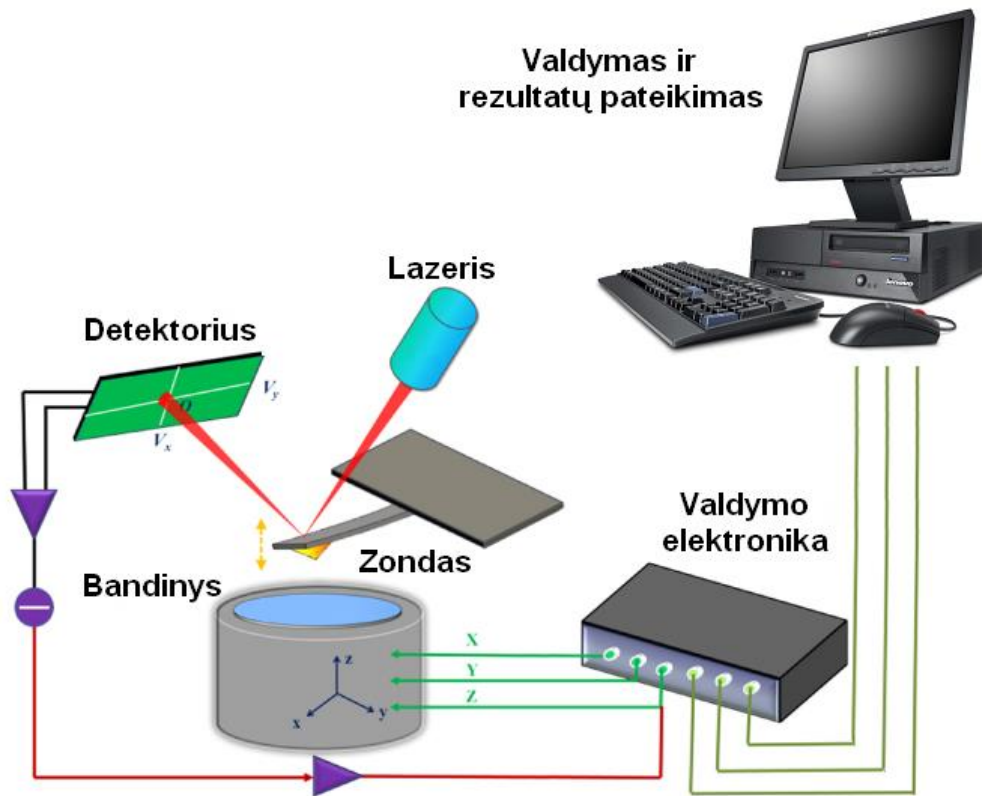
3.2.2 Atominių jėgų mikroskopas

Disertaciniame darbe buvo dirbama su kompiuterizuotu AJM, kurio pagrindines dalis sudarė valdymo elektronika Digital Instruments (NanoScope V, JAV) bei matavimo įrenginys Bioscope II (Veeco Instruments Ltd, JAV), kuriame AJM yra sujungtas su optiniu mikroskopu IX-71 (Olympus, JAV). Optinis mikroskopas buvo naudojamas pradiniam tyrimų objekto įvertinimui ir pozicijos AJM matavimams parinkimui. Principinė AJM įrangos schema yra pavaizduota 11 paveiksle. Prietaisas buvo izoliuotas nuo aplinkinių virpesių antivibraciniu stalu. Tyrimai buvo atlikti virpančio zondo (ang. tapping mode) režimu.

Kontaktiniame režime, kai adatėlė turi pastovų kontaktą su skenuojamuoju paviršiumi, atstumas tarp adatėlės ir paviršiaus pasirenkamas toks, kad tarpatominės jėgos stumtų adatą. Yra du kontaktinio režimo būdai – pastovios jėgos ir pastovaus aukščio. Matuojant pastovaus aukščio režimu zontas stumdomas tik horizontaliai X ir Y kryptimis. Adatėlės aukštis kinta dėl sąveikos su paviršiaus atomais. Kai dirbama pastovios jėgos režimu liežuvėlis atlenkiamas, kad adatėlę veikianti jėga nekistų. Pastovios jėgos režimas yra naudojamas dažniau, bet dirbant šiuo režimu skenavimo sparta yra mažesnė. Pastovaus aukščio režimas labiau tinka gana plokštiems paviršiams skenuoti, be to jo skenavimo sparta yra didesnė [111]. Lazerio spindulys atsispindi nuo adatėlės ir keičia savo padėtį ant fotodiodinio detektoriaus. Fotodiodu registruojamas signalas yra proporcingas mėginio paviršiaus nelygumams. Darbe buvo naudojamas pastovios jėgos kontaktinis skenavimo režimas.

Matuojant virpančio zondo režimu adatėlė virpa tam tikru rezonansiniu dažniu ir signalas detektuojamas fotodiodu. Virpančio zondo režimas

apibudinamas tam tikrais parametrais, kaip amplitudė, dažnis ir fazė, kurie pasikeičia zondui trumpam kontaktuojant su mėginio paviršiumi.



11 pav. Principinė atominių jėgų mikroskopo veikimo schema [112].

AJM skiriamoji geba priklauso nuo adatėlės savybių ir gali būti mažesnė nei 1 nm. Priklausomai nuo zondo konstrukcijos ir adatos padengimo medžiagos, galima tirti ne tik topografiją, bet ir matuojant sąveiką tarp zondo ir mėginio galima įvertinti elektrines, magnetines, elastines mėginio savybes. Darbe pristatyti AJM vaizdai buvo gauti su ant lankstaus laikiklio pritvirtinta silicio adatėle (modelis TESP, Veeco, veecoprobes.com, parametrai: $T = 3,5 - 4,5 \mu\text{m}$, $f_0 = 297 - 347 \text{ kHz}$, $L = 110 - 140 \mu\text{m}$, $k = 20-80 \text{ N m}^{-1}$, $W = 25 - 35 \mu\text{m}$) ir naudojant virpančio zondo režimą.

Tiriant elektrodų modifikuotų gliukozės oksidaze, aukso nanodalelėmis bei polipirolo paviršiaus struktūras, 1 mm aukščio grafito strypeliai buvo

tvirtinami ant specialių stiklo plokštelių. Tiriami objektai buvo analizuojami AJM, naudojant virpančio zondo režimą. Tyrimai AJM buvo atliekami $20 \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūroje.

3.2.3 UV-vis spektrofotometras

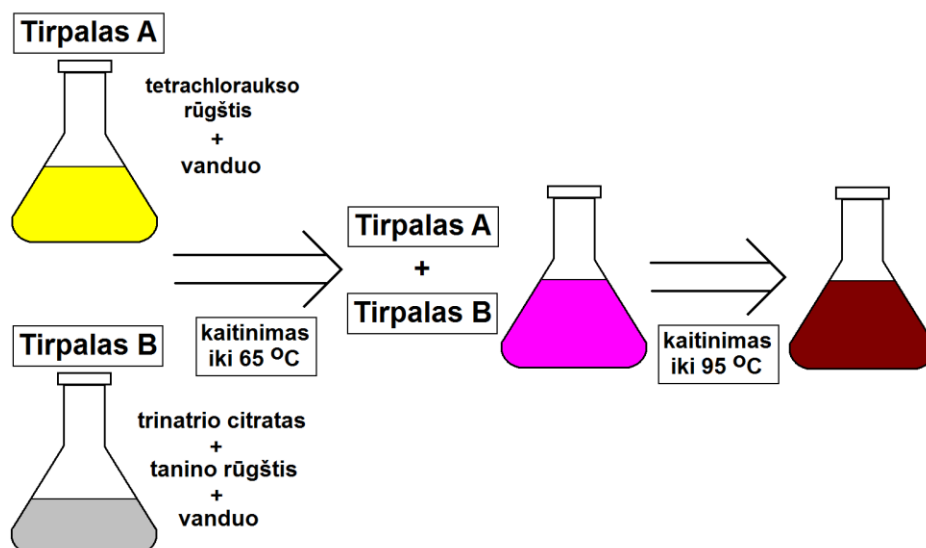
Matavimai atlikti naudojant spektrofotometrą Lambda 25 UV/VIS (Perkin Elmer Inc., JAV). Tyrimams buvo naudotos plastikinės UV mikrokiuvetės. Optinio kelio ilgis 1 cm. Duomenys buvo apdorojami naudojant UV Winlab v.2.85.04 programinę įrangą.

Tiriant susintetintų aukso nanodalelių tirpalus, į plastikines mikrokiuvetes buvo supilamas tiriamasis tirpalas ir palyginamasis tirpalas. Palyginamuoju tirpalu buvo naudotas $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatinis buferinis tirpalas (pH 6,0). Buvo registruojami šviesos sugerties spektrai 300 - 800 nm srityje. Spektrofotometriniai matavimai buvo atliekami kambario temperatūroje ($20 \pm 2^\circ\text{C}$).

3.3 Eksperimentinės procedūros

3.3.1 Aukso nanodalelių sintezė

Pirmiausia, siekiant susintetinti aukso nanodaleles vandeninėje terpėje, buvo ruošiami du darbiniai tirpalai – tirpalas A ir tirpalas B. Tirpalas A buvo gaminamas sumaišant 79 ml distiliuoto vandens ir 1 mL 1 % tetrachloraukso rūgšties vandeninio tirpalo. Tirpalas B buvo ruošiamas sumaišant 4 ml 1 % trinatrio citrato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ir 16 ml distiliuoto vandens su reikiamu kiekiu tanino rūgšties, priklausomai nuo to, kokio skersmens daleles norima susintetinti (1 lentelė).



12 pav. Principinė aukso nanodalelių sintezės schema.

Kai sintetamos mažesnės nei 5 nm aukso nanodalelės, t.y. kai naudojamas 1 mL arba daugiau tanino rūgšties tirpalo, siekiant išlaikyti pastovų terpės rūgštingumą, buvo pridėdamas toks pats tūris $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ kalio karbonato tirpalo.

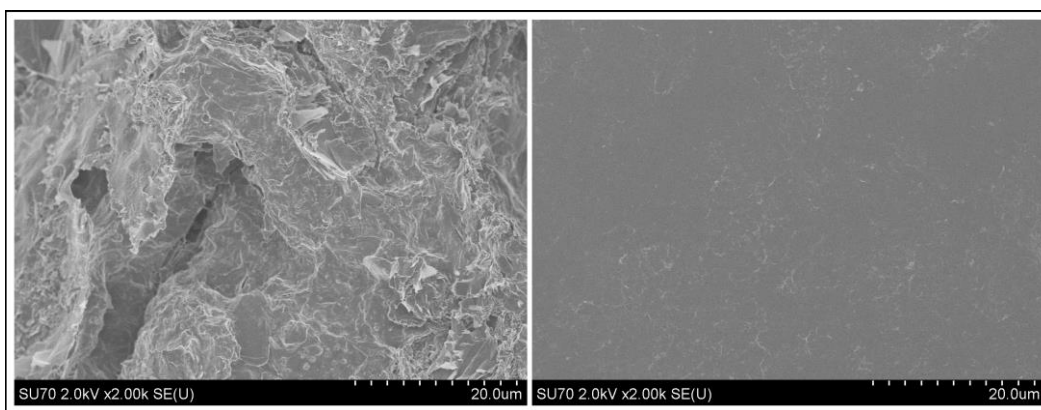
1 lentelė. Tanino rūgšties tūrio įtaka aukso nanodalelių dydžiui.

AuND dydis, nm	3,5	4,0	5,0	6,0	7,5	9,5	10,0	11,5	13,0
1 % tanino rūgšties tirpalo tūris, mL	5,00	2,50	1,00	0,50	0,25	0,10	0,08	0,05	0,03

Tirpalai A ir B pašildomi iki $+65 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūros ir tirpalas A supilamas į tirpalą B, pastoviai maišant magnetine maišykle. Įgavus tirpalui raudoną spalvą pastoviai maišant šildoma iki $+95^\circ\text{C}$ (8 pav.), vėliau atvėsinama kambario temperatūroje ($20 \pm 2^\circ\text{C}$). Tyrimams buvo naudojamos trijų dydžių aukso nanodalelės: 3,5, 6,0 ir 13,0 nm.

3.3.2 Anglies elektrodo paviršiaus paruošimas bei jo modifikavimas gliukozės oksidaze ir aukso nanodalelėmis

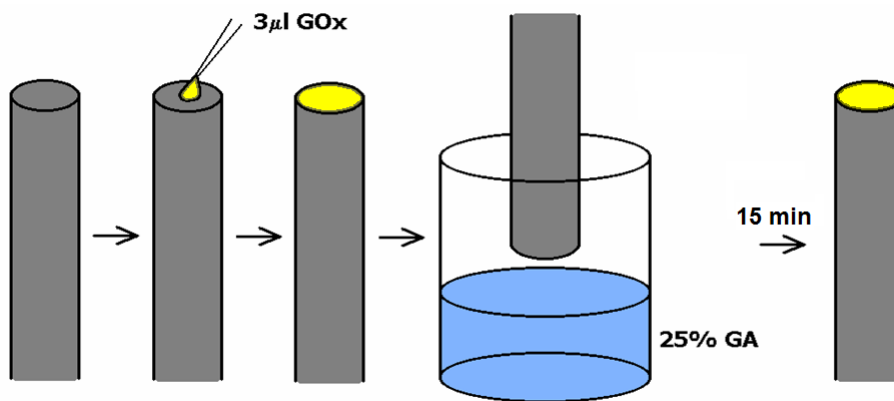
Kiekvieno grafito elektrodo paviršius buvo šlifuojamas iki veidrodinio blizgesio: iš pradžių stambiu (600), po to smulkesniu (1200) ir smulkiausiu (3500) švitriniu popieriumi. Vėliau elektrodo paviršius šlifuojamas paprastu baltu popieriumi ir galiausiai poliruojamas α aliuminio oksido miltelių pasta. Po tokio paruošimo, elektrodas nuplaunamas distiliuotu vandeniu ir paliekamas džiūti kambario temperatūroje ($20 \pm 2^\circ\text{C}$).



13 pav. Nešlifuoto ir šlifuoto grafito elektrodo paviršiaus SEM vaizdai.

Taip paruošto grafito strypelio paviršius buvo dengiamas fermentu, aukso nanodalelėmis arba elektronų pernašos tarpininkais įvairiais būdais priklausomai nuo eksperimento tikslo. Kambario temperatūroje nudžiovintas elektrodas laikomas 15 min uždareme inde 1,5 cm aukštyje virš 25 % glutaro aldehido tirpalo (14 pav.). Gliukozės oksidazės molekulės tarpusavyje kovalentiškai sujungiamos glutaro aldehido garais.

Prieš kiekvieną elektrocheminį matavimą elektrodas buvo nuplaunamas distiliuotu vandeniu ir išdžiovinamas kambario temperatūroje. Tarp matavimų ar tiriant modifikuoto elektrodo stabilumą laike elektrodas buvo laikomas mėgintuvėlyje virš buferinio tirpalo, su kurio dirbama tame eksperimente, lašo.

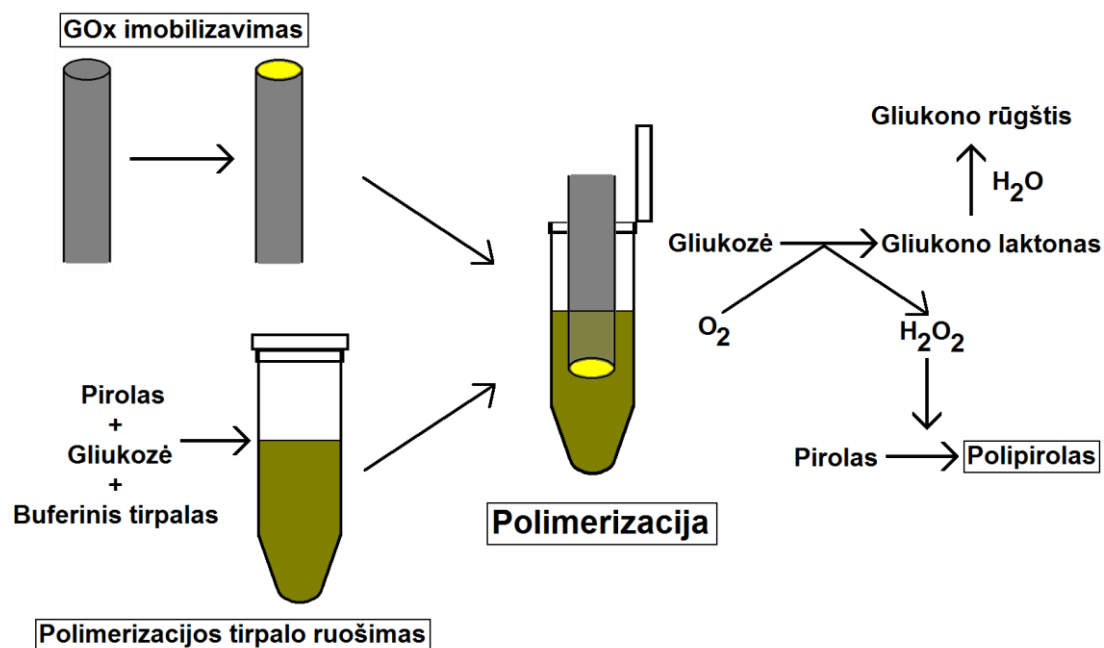


14 pav. Grafito elektrodo paruošimo etapai.

3.3.3 Anglies elektrodo padengimas chemiškai susintetintu polipirolo sluoksniu

3.3.3.1 Cheminė polipirolo sintezė

Norint, kad gliukozės oksidaze modifikuoti elektrodai pasidengtų PPy sluoksniu, jie buvo merkami į polimerizacijos tirpalą, kurio sudėtis buvo tokia: $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatinis buferinis tirpalas (pH 6,0), $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ gliukozės ir $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pirolo (15 pav.). Laikant indikatorinį elektrodą polimerizacijos tirpale (2 - 17 val.) vyksta cheminė polipirolo sintezė. Polimerizacijos tirpale esant gliukozės ir ištirpusio O_2 , o elektrodo paviršiuje imobilizuotos gliukozės oksidazės vyksta fermentinė reakcija, kurios metu susidaro vandenilio peroksidas ir gliukono laktonas, kuris nefermentiškai hidrolizuojasi iki gliukono rūgšties (15 pav.). Susidarant šiems junginiams, tirpale fermentui artimoje zonoje didėja tirpalo rūgštingumas, bei H_2O_2 koncentracija. Šios sąlygos yra palankios Py polimerizacijai, taigi jo sluoksnis ir gaunamas elektrodo paviršiuje. Polimeru padengti elektrodai buvo laikomi virš $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatinio buferinio tirpalo lašo + 4 °C temperatūroje

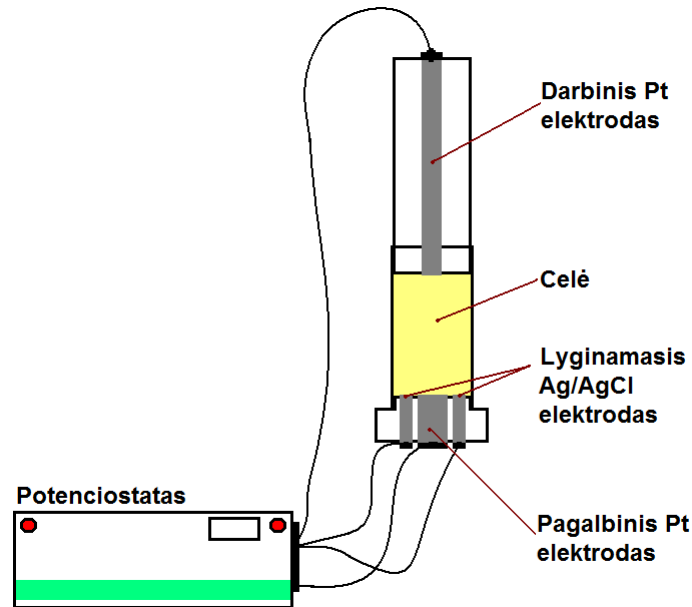


15 pav. Cheminės polipirolų sintezės ant elektrodo modifikuoto gliukozės oksidazės pagrindiniai etapai.

3.3.3.2 Elektrocheminė polipirolų sintezė

PPy buvo sintetintas elektrocheminėje gardelėje, pateiktoje 12 paveiksle. Pirmiausia buvo atliekamas elektrocheminis Pt elektrodo paviršiaus valymas gardelėje užpildytoje $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ tirpalu skleidžiant potencialą $-0,2 - +1,2 \text{ V}$ ribose 50 ciklų. Skleidimo greitis – 20 mV s^{-1} [113].

Elektrocheminei PPy sintezei reikalinga speciali elektrocheminė gardelė (tūris $500 \mu\text{l}$) ir potenciostatas. Elektrocheminė gardelė susideda iš 3-jų elektrodų – indikatorinio Pt elektrodo (ant kurio sintetintas PPy sluoksnis), lyginamojo Ag/AgCl elektrodo ir pagalbinio Pt elektrodo (16 pav.). Lyginamasis ir pagalbinis elektrodai įtvirtinami elektrocheminės gardelės apačioje, o indikatorinis – viršuje. PPy sintezei buvo naudojamas $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatinis buferinis tirpalas (pH 6,0) su 500 mmol L^{-1} pirolu. Elektrocheminei sintezei buvo naudojami keli metodai – ciklinė voltamperometrija (30 ciklų nuo 0 iki 1 V) ir impulsinė amperometrija (10 impulsų - pirmas impulsas 1,0 V, antras impulsas 0 V, trečias impulsas 1,0 V, ketvirtas impulsas 0 V ir vėl kartojama).



16 pav. Elektrocheminės polipirolų sintezės schema.

3.3.4 Amperometriniai matavimai

Prieš pradėdant kiekvieną amperometrinių matavimų seriją, modifikuotas grafito elektrodas patalpinamas į gardelę užpildytą 5 mL 0,05 mol L⁻¹ fosfatinio arba acetatinio buferinio tirpalo (pH 6,0) su 2 mmol L⁻¹ FMS. Elektrodui suteikus +0,3 V potencialą Ag/AgCl/KCl_{3M} lyginamojo elektrodo atžvilgiu ir pastoviai tirpalą maišant magnetine maišykle, vyksta modifikuoto anglies elektrodo poliarizacija. Į tirpalą įpilant gliukozės, registruojamas anodinės srovės stiprio kitimas laike yra proporcingas fermentu oksiduoto substrato koncentracijai. Srovės stipris bei signalo užregistravimo laikas buvo įvertinami programinės GPES 4.9 įrangos pagalba. Atlikus matavimus buvo brėžiamos srovės stiprio skirtumo (ΔI) priklausomybės nuo substrato koncentracijos kalibracinės kreivės, iš kurių įvertinami kinetiniai Michaelis-Menten lygties parametrai: maksimalus srovės stiprio pokytis (I_{\max} atitinka V_{\max} pagal Michaelis-Menten lygtį) ir tariamoji Michaelis konstanta ($K_{M(\text{tar.})}$), kurie atitinkamai laikomi hiperbolės lygties $y = ax/(b + x)$ a ir b kintamaisiais.

Kiekvienas matavimas buvo atliekamas tris kartus ir atlikus pakartotinių matavimų serijas, analizinių signalų vidurkiai, standartiniai bei santykiniai nuokrypiai buvo skaičiuojami pagal įprastines statistikos formules.

4 TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

4.1 *Gliukozės biologinis jutiklis naudojant elektrodą modifikuotą gliukozės oksidaze ir aukso nanodalelėmis*

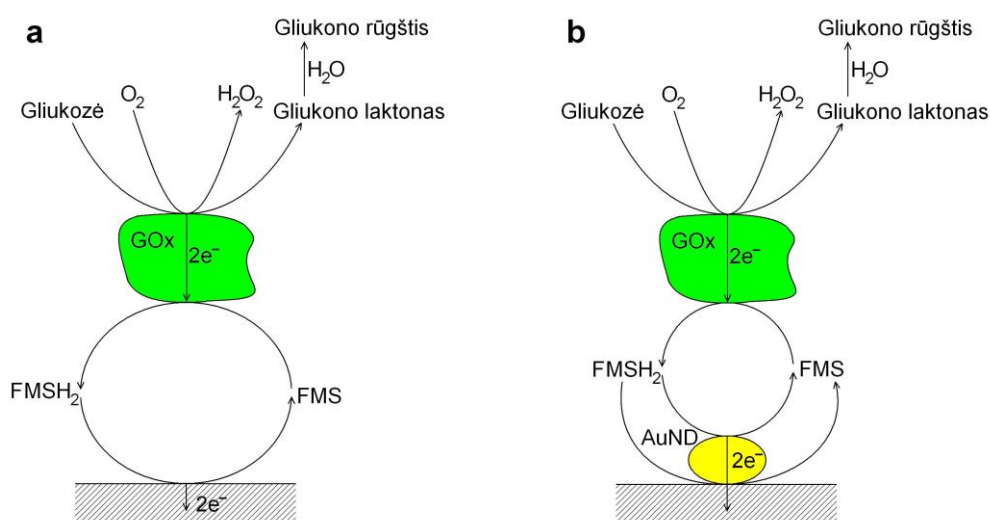
4.1.1 **Aukso nanodalelių (13,0 nm) įtakos gliukozės biologinio jutiklio analiziniam signalui tyrimas**

Kūriant biologinius jutiklius labai plačiai naudojamos aukso nanodalelės. Jos pasižymi puikiomis cheminėmis, optinėmis, elektroninėmis, magnetinėmis ir, kas labai svarbu biologiniame atpažinime, katalizinėmis savybėmis. Dėl šių savybių jos plačiai naudojamos signalo generavimui ir perdavimui nustatinėjant įvairias analites [114]. Buvo atlikti skirtingai aukso nanodalelėmis bei fermentu modifikuotų elektrodų savybių tyrimai. Yra žinoma, kad dėl didelio aukso nanodalelių paviršiaus ploto jos puikiai tinka biologinių molekulių imobilizavimui, o tai gali būti sėkmingai panaudota fermentinių ir afiniškumo biologinių jutiklių kūrimui. Taip pat, iš mokslinės literatūros žinoma, jog dėl gero biosuderinamumo aukso nanodalelės nesumažina biologinių molekulių aktyvumo [115]. Atsižvelgiant į tai, amperometrinio gliukozės biologinio jutiklio tobulinimui buvo pasirinkta sistema su AuND.

Amperometrinio gliukozės jutiklio veikimo principas yra pagrįstas GOx, imobilizuotos grafito elektrodo paviršiuje, katalizuojama gliukozės oksidacija. Tyrimo eigoje registruojamas srovės stipris, apskaičiuojamas srovės stiprio pokytis tarp bazinės srovės reikšmės ir registruojamo srovės stiprio, kuris ir yra analizinis signalas. Buvo tiriami du elektrodų tipai: grafito elektrodas modifikuotas gliukozės oksidaze (17 a pav.) ir grafito elektrodas modifikuotas aukso nanodalelėmis ir gliukozės oksidaze (17 b pav.).

Elektrodo modifikavimui AuND ir fermentu buvo pasirinkti du būdai: pirmu atveju elektrodas buvo modifikuojamas GOx, o po to aukso nanodalelėmis (GR/GOx/AuND); antru atveju eiliškumas buvo atvirkštinis –

pirma buvo adsorbuojamos aukso nanodalelės, o vėliau fermentas (GR/AuND/GOx). Amperometriniai tyrimai buvo atliekami su abiem elektrodų tipais kontrole naudojant elektrodus be AuND (GR/GOx). Elektrocheminėje gardelėje užpildytoje buferiniu tirpalu ir esant substrato – gliukozės bei ištirpusio deguonies, GOx katalizuojamos fermentinės reakcijos metu susidaro vandenilio peroksidas ir gliukono laktonas, kuris vandeninėje terpėje hidrolizuojasi iki gliukono rūgšties (17 pav.). Šio proceso eigoje tirpaus EPT FMS pagalba du elektronai nuo GOx aktyviojo centro perduodami elektrodai.



17 pav. Elektrocheminis gliukozės nustatymas naudojant elektrodą modifikuotą gliukozės oksidaze (a) arba elektrodą modifikuotą gliukozės oksidaze ir aukso nanodalelėmis (b) ir tirpų elektronų pernašos tarpininką N-metilfenazino metosulfatą.

Iš mokslinės literatūros žinoma, kad gliukozės oksidazė negali tiesiogiai perduoti elektronų iš fermento aktyviojo centro elektrodai, nes fermento aktyvusis centras yra apgaubtas baltyminiu sluoksniu, erdviškai atitolinančiu jį nuo elektrodo paviršiaus [1]. Taip pat žinoma, kad nanovamzdeliai sudaryti iš aukso nanodalelių (nanovamzdelio vidinis diametras apie 200 nm, o storis apie 50 nm) gali būti naudojami nefermentinei gliukozės elektrocheminei oksidacijai ir netgi nefermentinių biologinių jutiklių kūrimui [116]. Taip pat buvo parodyta, kad mažos (dydis apie 2,5 nm) AuND gali dalyvauti tiesioginėje elektronų pernašoje panaudojus specifinį fermento imobilizavimo būdą [83,101]. Naudojant elektrodus modifikuotus GOx ir AuND buvo

patikrinta, ar vyksta tiesioginė elektronų pernaša šiuo atveju. Buvo pastebėta, kad sistemoje nesant elektronų pernašos tarpininko registruojamas srovės stipris nesikeičia pridėjus substrato. Atlikus amperometrinius matavimus elektrocheminėje gardelėje naudojant tirpų EPT ir indikatoriniam elektrodui suteikiant + 0,3 V potencialą lyginamojo elektrodo atžvilgiu yra stebimas didelis elektrokatalizinis fermento aktyvumas. Tai rodo, kad mūsų naudotas GOx imobilizavimo ant elektrodo kartu su AuND būdas yra tinkamas, nes fermentas neprarado savo aktyvumo. Reakcijos vykstančios sistemoje su AuND parodytos 17 paveikslo b dalyje. Šiuo atveju elektronų pernaša FMS pagalba nuo fermento aktyvaus centro elektrodui vyksta dviem būdais – tiesiogiai elektrodui ir/arba per aukso nanodaleles. Panašūs elektronų pernašos būdai sistemose su AuND buvo pastebėti ir kitų autorių [7]. Amperometrinių tyrimų rezultatai parodė, kad imobilizuota grafito elektrodo paviršiuje gliukozės oksidazė yra biologiškai aktyvi.

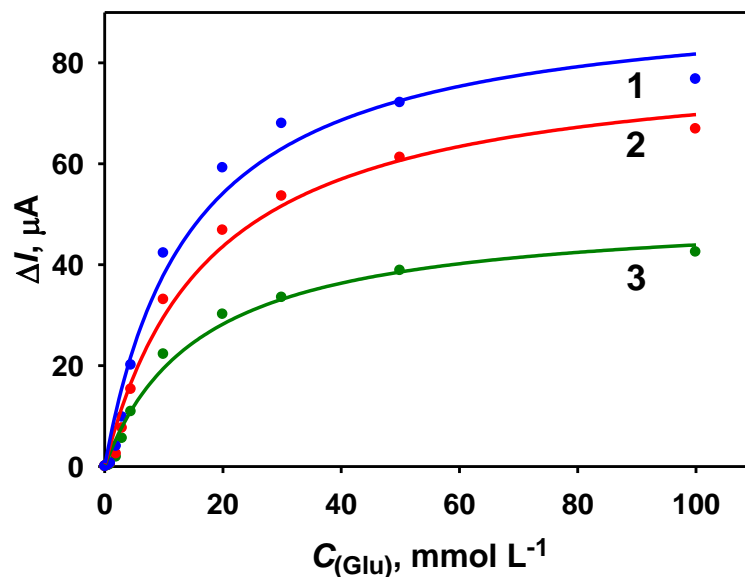
Hiperbolinė srovės stiprio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos buvo stebima visų trijų elektrodų atveju (GR/GOx, GR/GOx/AuND ir GR/AuND/GOx). Visos pateiktos priklausomybės gali būti aprašomos dviejų kintamųjų hiperbolinėmis lygtimis, kurio yra suderinamos su Michaelis-Menten kinetika. Kiekvieno elektrodo kinetiniai parametrai – maksimalus srovės stipris I_{\max} (kas pagal Michaelis-Menten kinetiką atitinka maksimalų fermentinės reakcijos greitį V_{\max}) ir tariamoji Michaelis konstanta $K_{M(\text{tar})}$, atitinka hiperbolės lygties:

$$y = \frac{ax}{b + x}$$

“a“ ir “b“ nariams. “x“ yra gliukozės koncentracija, o “y“ - srovės stipris.

Iš duomenų, pateiktų 18 paveiksle ir 2 lentelėje matome, kad 13,0 nm skersmens aukso nanodalelės padidina biologinio jutiklio analizinį signalą nepriklausomai nuo AuND padėties ant elektrodo lyginant su jutikliu nemodifikuotu nanodalelėmis. Tai gali būti paaiškinama efektyvesne elektronų

pernaša nuo gliukozės oksidazės aktyviojo centro elektrodi. Aukso nanodalelės ne tik padidina efektyvų elektrodo paviršiaus plotą, bet ir dalyvauja elektronų pernašoje kartu su FMS (17 b pav.) [101]. Didžiausias analizinis signalas buvo registruojamas AuND esant tarp elektrodo ir fermento. Naudojant GR/AuND/GOx elektroda apskaičiuota I_{\max} buvo 1,07 ir 1,42 karto didesnė lyginant su GR/GOx/AuND ir GR/GOx, atitinkamai.



18 pav. Skirtingais būdais aukso nanodalelėmis ir gliukozės oksidaze modifikuotų grafito elektrodo srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos. 1 – GR/AuND/GOx, 2 – GR/GOx/AuND, 3 – GR/GOx elektrodai. Sąlygos: $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ acetatinis buferinis tirpalas (pH 6,0), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, 2 mmol L^{-1} FMS, $E = +0,3 \text{ V}$.

Naudojant GR/AuND/GOx elektroda, biologiniu jutikliu užregistruotas analizinis signalas esant 10 mmol L^{-1} gliukozės buvo palygintas su kitų tyrėjų rezultatais, gautais esant tai pačiai analitės koncentracijai. Mūsų sistemoje srovės stipris yra $42 \mu\text{A}$, tuo tarpu sistemoje su 10 nm dydžio AuND ir GOx sluoksniais imobilizuotais Pt elektrodo paviršiuje signalo reikšmė yra $1,0 \mu\text{A}$ [117], o stikliškosios anglies elektrodo modifikuoto AuND/GOx/Nafiono sluoksniu ir naudojant ferocenmetanolį signalo reikšmė yra $4,5 \mu\text{A}$ [118].

Verta paminėti, kad maksimalus analizinis signalas mūsų tirto elektrodo atveju yra 40 kartų didesnis, nei aptarto platinos elektrodo ir 9 kartus didesnis, nei stikliškosios anglies elektrodo atveju. Skirtingai modifikuotais elektrodais užregistruotas analizinis signalas galėjo skirtis dėl skirtingų EPT panaudojimo – mūsų atveju tai buvo N-metilfenazino metosulfatas (FMS) ir dalinai AuND, tuo tarpu Pt elektrodo atveju – AuND, o stikliškosios anglies atveju kaip EPT buvo naudojamas ferocenmetanolis.

2 lentelė. Michaelis-Menten lygties kinetiniai parametrai, aproksimavus 14 pav. pateiktas kreives. Sąlygos: $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ acetatinis buferinis tirpalas (pH 6,0), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, 2 mmol L^{-1} FMS, $E = + 0,3 \text{ V}$.

Elektrodo rūšis	$K_{M(\text{tar.})}$, mmol L^{-1}	I_{max} , μA	R^2
GR/GOx	16,2	51,0	0,9928
GR/GOx/AuND	17,6	82,0	0,9896
GR/AuND/GOx	14,6	93,7	0,9911

Kitame darbo etape buvo apskaičiuotos ir palygintos Michaelis-Menten lygties kinetinės konstantos. Literatūros šaltiniai [119] teigia, kad elektrodo, kurio paviršiuje yra imobilizuotas oksidoreduktazių klasės fermentas (pvz., gliukozės oksidazė, krienų peroksidazė) bei AuND $K_{M(\text{tar.})}$ reikšmė yra pakankamai maža. Tai parodo, kad imobilizuotas ant elektrodo paviršiaus fermentas nepraranda savo aktyvumo bei sistema pasižymi santykinai mažu difuzijos barjeru substrato ir EPT atžvilgiu. Nustatyta $K_{M(\text{tar.})}$ reikšmė visiems mūsų tirtiems elektrodų tipams yra kelis kartus mažesnė, lyginant su K_M reikšme, kai GOx yra tirpale ($K_{M(\text{tar.})} = 33 \text{ mmol L}^{-1}$) (2 lentelė).

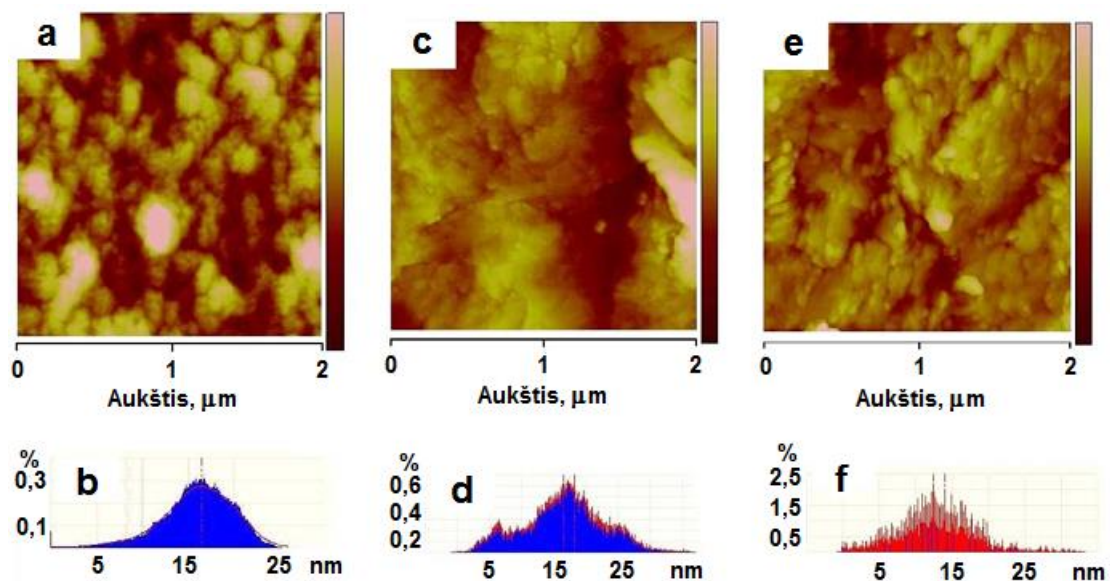
Anksčiau aptarto Pt elektrodo, modifikuoto 10,0 nm aukso nanodalelių ir gliukozės oksidazės sluoksniais $K_{M(\text{tar.})}$ vertė yra 35 mmol L^{-1} [116]. Mūsų sistemos – elektrodo modifikuoto 13,0 nm aukso nanodalelėmis ir fermentu

$K_{M(\text{tar.})}$ yra mažiausia $14,6 \text{ mmol L}^{-1}$. Toks žymus $K_{M(\text{tar.})}$ skirtumas gali būti dėl nevienodos modifikuojamų elektrodų prigimties – grafitas ir platina, o taip pat dėl nevienodų analizuojamų tirpalų pH reikšmių, nevienodo fermento kiekio bei GOx ir AuND sluoksnio storio elektrodo paviršiuje.

Verta paminėti, kad aukščiau aptartos analizinių signalų bei $K_{M(\text{tar.})}$ priklausomybės galioja ir kai dirbame su tokios pačios koncentracijos ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) fosfatinu buferiniu tirpalu (pH 6,0). Tik šiuo atveju maksimalūs srovės stipriai yra mažesni: $49,8 \text{ } \mu\text{A}$ – GR/GOx, $66,0 \text{ } \mu\text{A}$ – GR/GOx/AuND ir $70,6 \text{ } \mu\text{A}$ – GR/AuND/GOx elektrodams. Taigi tolimesniems tyrimams grafito elektrodą pirmiausia modifikuodavome AuND, o tada gliukozės oksidaze ir tyrimus atlikome $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ acetatiniame buferiniame tirpale (pH 6,0) su $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl ir 2 mmol L^{-1} FMS.

4.1.2 Gliukozės biologinio jutiklio modifikuoto aukso nanodalelėmis ir gliukozės oksidaze tyrimas AFM

Yra žinoma, jog AuND sintetamos pagal mūsų pasirinktą metodiką turi būti $13,5 \pm 0,5 \text{ nm}$ skersmens [120]. Mūsų ištirtų elektrodų atveju, GR/AuND/GOx elektrodo nelygumai buvo $16,5 \pm 6 \text{ nm}$ (19 a,b pav.). Grafito elektrodo paviršiuje yra AuND ir gliukozės oksidazės klasteriai, kurių dydis vidutiniškai yra didesnis nei vien AuND arba vien GOx dydis. Tyrimai parodė, kad švaraus grafito elektrodo paviršiuje buvo 5 – 25 nm aukščio nelygumai (19 c,d pav.), o elektrodo modifikuoto tik 13,0 nm AuND – 10 - 15 nm, bet, atsižvelgiant į aukščio pasiskirstymo histogramą, paviršiuje vyrauja struktūros, kurių dydis 13,5 nm. Išnagrinėjus aukščio pasiskirstymo histogramas, padaryta išvada, kad imobilizuotos aukso nanodalelės užima mikrometrų eilės dydžio ertmes, esančias grafito elektrodo paviršiuje, ir taip elektrodo paviršius tampa lygesnis. Papildomas elektrodo paviršiaus modifikavimas gliukozės oksidaze padidina paviršiaus nelygumus iki 16,5 nm (19 a pav.).

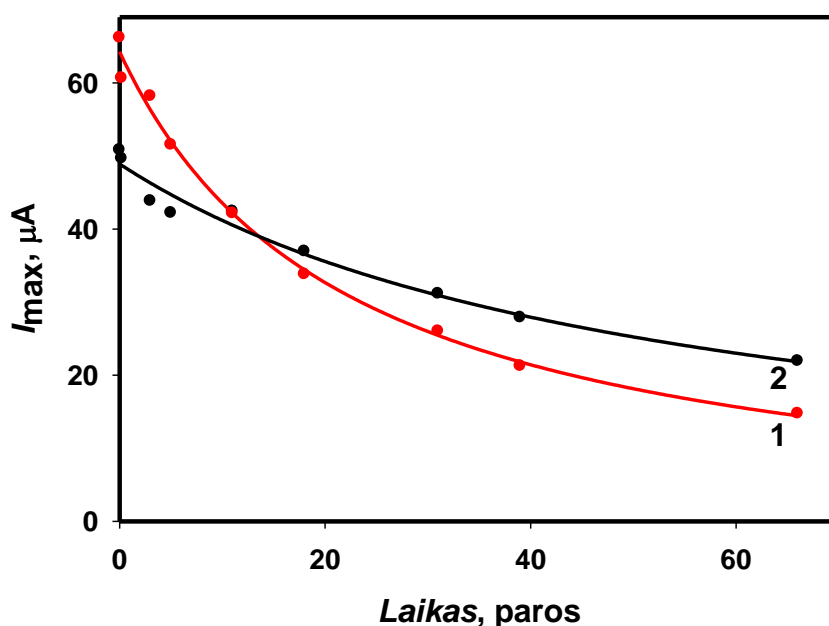


19 pav. AJM vaizdai (a,c,e) ir aukščio pasiskirstymo histogramos (b,d,f) grafito elektrodo modifikuoto aukso nanodalelėmis ir gliukozės oksidaze (a,b), nemodifikuoto (c,d) ir modifikuoto tik aukso nanodalelėmis (e,f).

Įvertinus ankstesniame skyriuje pateiktas kalibracines kreives, bei AJM vaizdus ir aukščio pasiskirstymo histogramas, padarėme prielaidą, kad aukso nanodalelių sluoksnis ant grafito elektrodo paviršiaus sąlygoja palankų gliukozės oksidazės molekulių erdvinį išsidėstymą. Atsižvelgiant į amperometrinių matavimų rezultatus, galime teigti, kad aukso nanodalelės kartu su FMS atlieka elektronų pernašos tarpininko vaidmenį, kadangi jos yra arčiau gliukozės oksidazės red-oks centro. Tai savo ruožtu sumažina fermento sluoksnio izoliacines savybes, kadangi red-oks centras yra arčiau elektrai laidaus grafito/aukso nanodalelių sluoksnio paviršiaus, atstumą kurį turi įveikti oksiduotos ir redukuotos elektronų pernašos tarpininko formos ir palengvina elektronų pernašą nuo fermento elektrodo [121]. Šie veiksniai teigiamai įtakoja aukso nanodalelėmis modifikuoto amperometrinio gliukozės jutiklio veikimą.

4.1.3 Gliukozės biologinio jutiklio modifikuoto aukso nanodalelėmis ir gliukozės oksidaze stabilumo tyrimas

Sekančiame darbo etape buvo ištirta 13,0 nm skersmens aukso nanodalelių įtaka fermentinio biologinio jutiklio stabilumui. Buvo tiriami GR/AuND/GOx ir GR/GOx elektrodai tirpale esant 10 mmol L^{-1} gliukozės. Tarp amperometrinių matavimų elektrodai buvo laikomi šaldytuve esant pastoviai $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūrai. Vien tik gliukozės oksidaze modifikuotu elektrodu 50 % maksimalaus signalo buvo registruojama iki 49,3 parų, tuo tarpu GR/AuND/GOx – tik 19,5 parų (20 pav.). Galutinis skirtingai modifikuotų elektrodų stabilumo tikrinimo taškas buvo 66 paros – po tokio laikotarpio GR/GOx elektrodo analizinis signalas sudarė 43 %, o GR/AuND/GOx elektrodo – 22 % pradinio signalo.



20 pav. Aukso nanodalelėmis ir gliukozės oksidaze modifikuotų grafito elektrodų stabilumo laike kreivės. 1 – GR/AuND/GOx, 2 – GR/GOx. Sąlygos: $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ acetatinis buferinis tirpalas (pH 6,0), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, 2 mmol L^{-1} FMS, 10 mmol L^{-1} gliukozės, $E = +0,3 \text{ V}$.

Pagal 20 paveiksle pateiktus tyrimo rezultatus galima daryti išvadą, kad elektrodas modifikuotas aukso nanodalelėmis ir gliukozės oksidaze pasižymi

didesniu analiziniu signalu savaitės laikotarpyje ir mažesniu stabilumu ilgesniame laiko tarpe (66 paros) lyginant su elektrodu, modifikuotu tik gliukozės oksidaze. Šie rezultatai koreliuoja su mokslinėje literatūroje pateiktais rezultatais, kur taip modifikuoti elektrodai buvo naudojami biologinių kuro elementų kūrimui [122,123].

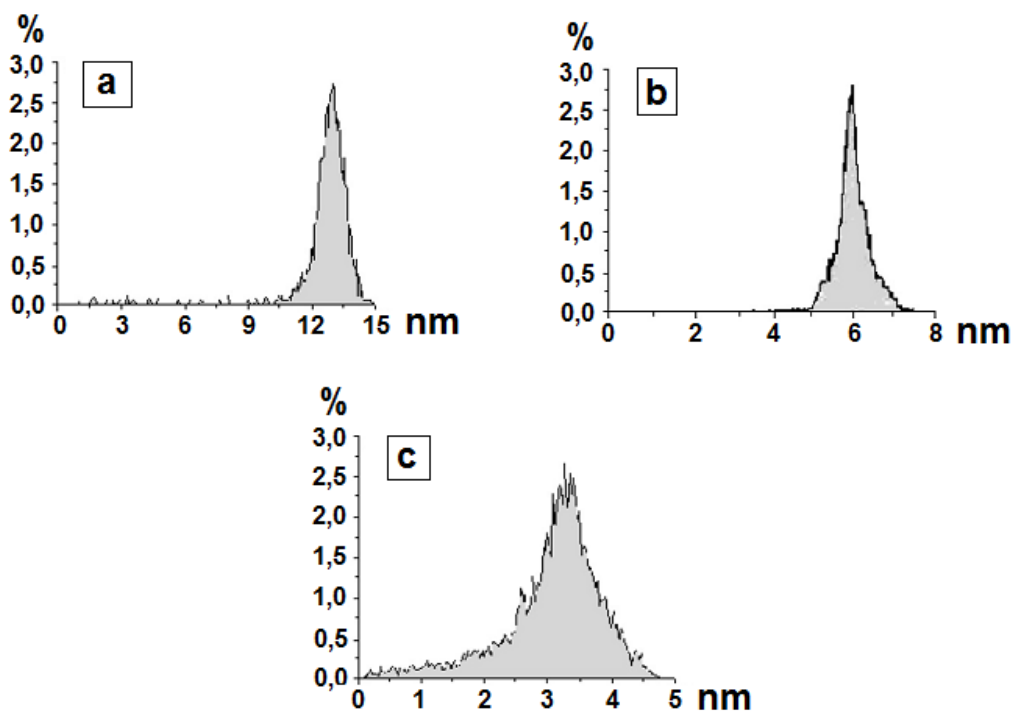
GR/AuND/GO_x elektrodo stabilumo sumažėjimą galima paaiškinti tuo, kad dalis aukso nanodalelių ir gliukozės oksidazės galimai nusiplovė nuo elektrodo paviršiaus elektrocheminių matavimų metu intensyviai maišant analizuojamą tirpalą. Apskaičiuotos stabilumo vertės yra mažesnės, ne sutinkamos literatūros šaltiniuose – panašios sistemos analizinio signalo sumažėjimas iki 96 % ir 90 % buvo stebimas po 2 savaičių [124,125], o sumažėjimas iki 70 % pradinės analizinio signalo vertės buvo stebimas po 2 mėnesių [95]. Kita vertus, geras elektrodo stabilumas daugiau nei 2 savaičių laikotarpyje nėra pati svarbiausia charakteristika, nes prekyboje siūlomos automatizuotos analizinės sistemos dažnai kalibruojamos, o jų pagrindinės dalys keičiamos vidutiniškai kas savaitę.

4.2 Skirtingo dydžio aukso nanodalelių įtakos gliukozės amperometriniam nustatymui tyrimas

Biologinio jutiklio, modifikuoto aukso nanodalelėmis ir gliukozės oksidaze, analizinės charakteristikos turėtų priklausyti nuo imobilizuojamų aukso nanodalelių dydžio. Šios prielaidos patikrinimui, buvo padaryta serija matavimų su 3,5, 6,0 ir 13,0 nm skersmens aukso nanodalelėmis, imobilizuotomis grafito elektrodo paviršiuje.

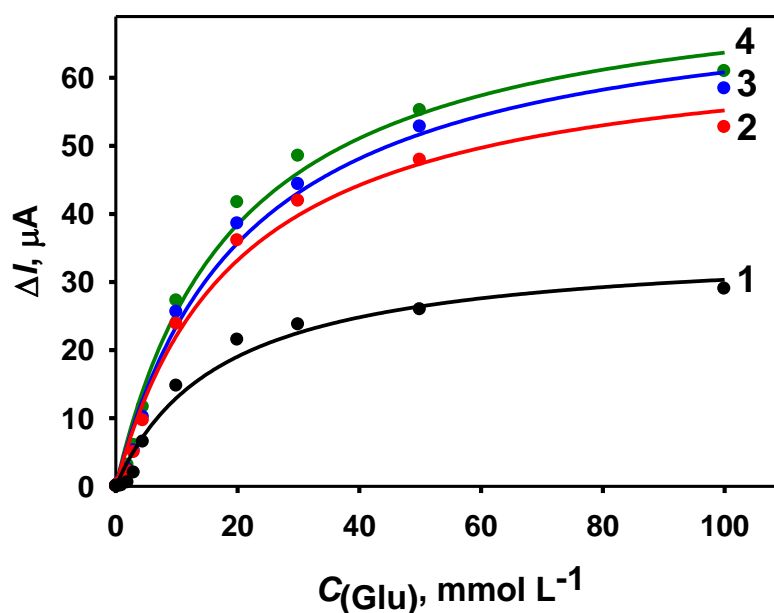
Pradiniame etape AJM buvo įvertintas AuND dydis. Iš pateiktų histogramų matome (21 pav.), kad didžioji dalis aukso nanodalelės yra norimo dydžio, bet susidaro ir kitokių nanodalelių. Pagal 13,0 nm dydžio AuND

syntezės metodiką sintetintų dalelių tirpale yra 12 - 16 nm, pagal 6,0 nm – 5 - 7 nm ir pagal 3,5 nm – 2 - 5 nm skersmens AuND.



21 pav. Skirtingo dydžio aukso nanodalelių aukščio pasiskirstymo histogramos užregistruotos AJM. a – 13,0, b – 6,0 ir c – 3,5 nm AuND. Sąlygos: AJM virpančio zondo režimas; eksperimentiniai duomenys apibendrinti “diNanoScope 7.30” ir “Gwyddion 2.10 NT-MDT Nova“ programomis.

Sekančiame etape buvo atliekami amperometriniai tyrimai su skirtingo skersmens (13,0; 6,0; 3,5 nm) AuND modifikuotais elektrodais. Matavimai buvo atliekami 0,05 mol L⁻¹ acetatiniame buferiniame tirpale, pH 6,0. Nustatyta hiperbolinė srovės stiprio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos su visomis skirtingo dydžio AuND nuo 0,01 mmol L⁻¹ iki 100 mmol L⁻¹ analitės koncentracijų intervale (22 pav.). Aproximavus gautas kreives, buvo įvertinti Michaelis-Menten lygties parametrai, kurie pateikti 3 lentelėje.



22 pav. Skirtingo dydžio aukso nanodalelėmis ir gliukozės oksidaze modifikuotų grafito elektrodų srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos: 1 – GR/GOx, 2 – GR/AuND_{13,0nm}/GOx, 3 – GR/AuND_{6,0nm}/GOx, 4 – GR/AuND_{3,5nm}/GOx elektrodai. Sąlygos: 0,05 mol L⁻¹ acetatinis buferinis tirpalas (pH 6,0), 0,1 mol L⁻¹ KCl, 2 mmol L⁻¹ FMS, gliukozės koncentracijų intervalas 0,1 mmol L⁻¹ – 100 mmol L⁻¹.

Iš pateiktų 22 paveiksle kreivių matome, kad elektrodais modifikuotais mažesnėmis aukso nanodalelėmis registruojami didesni analiziniai signalai esant vienodoms gliukozės koncentracijoms. 13,0 nm AuND ir GOx modifikuotu elektrodu buvo nustatytas 1,84 karto, 6,0 nm AuND – 2,07 karto, o 3,5 nm AuND – 2,14 karto didesni maksimalūs analiziniai signalai, lyginant su vien tik gliukozės oksidaze modifikuotu elektrodu. Lyginant $K_{M(\text{tar.})}$ vertes apskaičiuotas elektrodams su AuND ir be jų matome, kad papildomai ant elektrodo esant AuND $K_{M(\text{tar.})}$ vertės yra didesnės. Tai galime paaiškinti papildomu aukso nanodalelių sluoksniu ant elektrodo. AuND tankis paviršiuje (AuND pasiskirstymo/išsidėstymo paviršiuje negalime įtakoti) priklauso nuo AuND tirpale esančių nanodalelių koncentracijos bei jų dydžio.

3 lentelė. Michaelis-Menten lygties parametrai gauti aproksimavus kreives, pateiktas 18 pav. Sąlygos: 0,05 mol L⁻¹ acetatinis buferinis tirpalas (pH 6,0), 0,1 mol L⁻¹ KCl, 2 mmol L⁻¹ FMS.

Elektrodo rūšis	$K_{M(\text{tar.})}$, mmol l ⁻¹	I_{max} , μA	R^2
GR/AuND _{3,5nm} /GOx	19,7	76,2	0,9939
GR/AuND _{6,0nm} /GOx	21,3	73,8	0,9941
GR/AuND _{13,0nm} /GOx	19,9	66,2	0,9931
GR/GOx	17,4	35,6	0,9875

Tiek elektrodų modifikuotų tik fermentu, tiek modifikuotų skirtingo dydžio aukso nanodalelėmis ir fermentu teisiškumo intervalas yra iki 10 mmol L⁻¹. Aptikimo riba GR/GOx elektrodui yra 0,1 mmol L⁻¹, o GR/AuND_{13,0nm}/GOx elektrodui – 0,08 mmol L⁻¹. Taip pat, abiejų elektrodų atveju stebimas geras rezultatų atsikartojamumas.

Tokia pati analizinio signalo priklausomybės nuo AuND dydžio tendencija stebima ir dirbant 0,05 mol L⁻¹ fosfatiniame buferiniame tirpale pH 6,0. $K_{M(\text{tar.})}$ reikšmės elektrodams su AuND skirtinguose buferiniuose tirpaluose skiriasi nežymiai.

4.3 Aukso nanodalelių esančių tirpale įtakos gliukozės elektrocheminiam nustatymui tyrimas

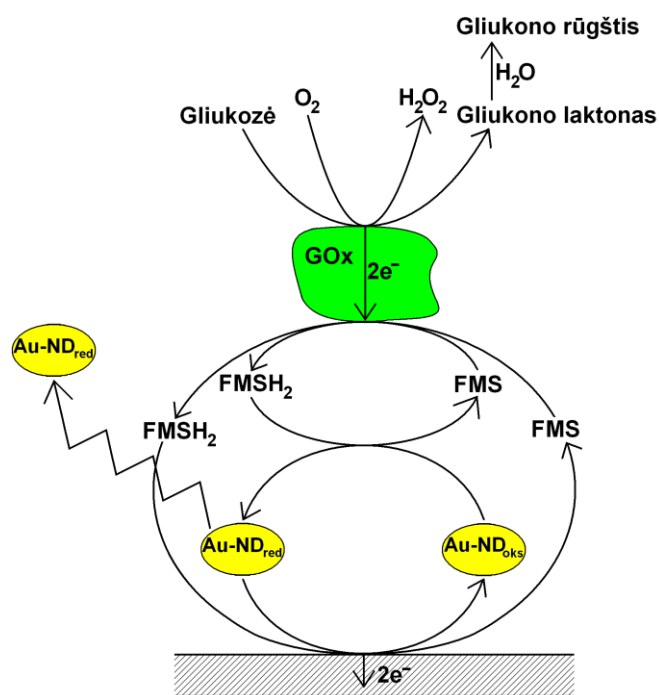
Šio tyrimo tikslas buvo įvertinti koloidinių aukso nanodalelių, kaip elektronų pernašos tarpininkų, poveikį amperometriniam gliukozės nustatymui naudojant elektrodą modifikuotą gliukozės oksidaze. Verta paminėti, kad lyginant su anksčiau tirtomis sistemomis, šiuo atveju AuND nėra imobilizuotos elektrodo paviršiuje, o yra tiriamajame tirpale.

J. Li mokslinės grupės rezultatai parodė, kad gliukozės oksidazės konjugotos su aukso nanodalelėmis sistema pasižymi geru terminiu stabilumu, bei elektrokataliziniu aktyvumu plačiame pH intervale; efektyviausiai sistema

veikia, kaip terpės pH 6,0 [126]. Taip pat literatūroje minimos kitos analizinės sistemos sudarytos iš kelių sluoksnių AuND ir GOx, kurios efektyviausiai veikia pH 4,5 – 7,0 intervale [117,127,128]. Atsižvelgus į šiuos literatūroje pateiktus bei GOx tinkamus pH intervalus, taip pat į ankstesnius mūsų tyrimų rezultatus, tolimesniems tyrimams buvo pasirinktas 0,05 mol L⁻¹ acetatinis buferinis tirpalas pH 6,0. Tyrimai buvo atlikti su grafito elektrodais, kurių paviršiuje glutaro aldehido garais GOx buvo imobilizuota paviršiuje. Schema, pagal kurią vyksta reakcijos analizuojamoje sistemoje, pavaizduota 19 paveiksle.

Kaip ir anksčiau aptartuose biologiniuose jutikliuose, gliukozės oksidazė fermentinės reakcijos metu, tirpale esant gliukozei ir ištirpusiam deguoniui, generuoja vandenilio peroksidą ir gliukono laktoną, kuris vandeninėje terpėje hidrolizuojasi iki gliukono rūgšties (23 pav.). Elektronai iš fermento aktyviojo centro pernešami prie teigiamai įkrauto elektrodo paviršiaus FMS ir AuND esančių tirpale pagalba. Teigiamas 0,3 V potencialas suteiktas indikatoriniam elektrodai lyginamojo Ag/AgCl/KCl_{3M} elektrodo atžvilgiu buvo pasirinktas atsižvelgiant į elektronų pernašos tarpininko FMS red-oks potencialą ir jį viršijant. Be to, esant tokiam potencialui, imobilizuota grafito elektrodo paviršiuje GOx išsaugo savo aktyvumą. Tai atitinka anksčiau atliktų bei publikuotų tyrimų rezultatus [121,129].

Kaip galima pastebėti iš 23 paveikslo, aukso nanodalelės esančios tirpale turėtų įtakoti biologinio jutiklio elektrokatalizines savybes. AuND labai plačiai naudojamos kartu su biologiškai aktyviomis medžiagomis, kadangi jos pasižymi biosuderinamumu, dideliu paviršiaus ploto-tūrio santykiu ir puikiomis elektronų pernašos savybėmis (didelis laidis). Dėl šių savybių tam tikrais atvejais metalų nanodalelės padidina elektronų pernašos greitį tarp fermento ir elektrodo paviršiaus [15,130], o taip gali sujungti fermento aktyvų centrą su elektrodu [126,131].

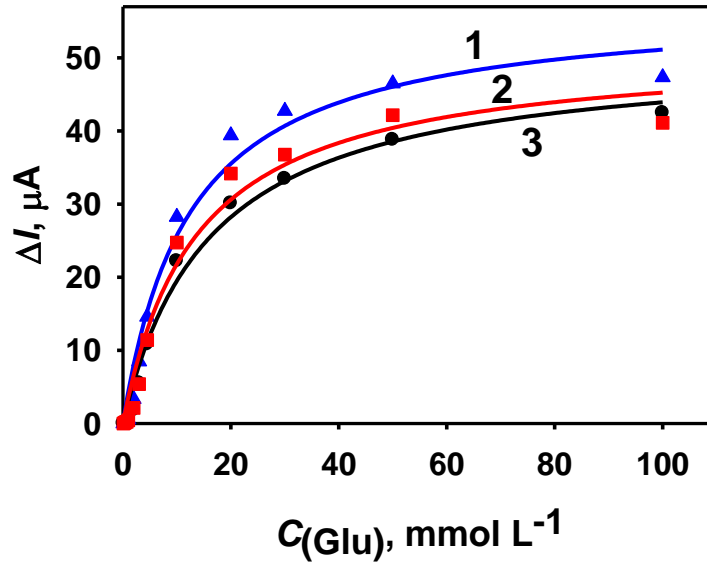


23 pav. Principinė elektrocheminio gliukozės nustatymo schema kaip mediatorių naudojant aukso nanodaleles ir elektronų pernašos tarpininką – N-metilfenazino metosulfatą (FMS). Aukso nanodalelės yra tiriamajame tirpale.

Nanodalelės yra chemiškai ir elektrochemiškai aktyvesnės, nei sluoksniai iš šių medžiagų. Šio tyrimo pagrindiniu uždaviniu ir buvo ištirti, kaip efektyviai AuND esančios tirpale gali atlikti elektronų pernašos tarpininko vaidmenį.

Pirmiausia buvo ištirti grafito elektrodai modifikuoti GOx esant skirtingoms 13,0 nm AuND koncentracijoms tiriamajame tirpale – 0,60 ir 1,50 mmol L⁻¹ AuND arba be jų (nanodalelių koncentracija 0 mmol L⁻¹). Visose elektrocheminėse sistemose buvo gauta hiperbolinė analizinio signalo priklausomybė nuo substrato (gliukozės) koncentracijos 0,1 – 100 mmol L⁻¹ koncentracijų intervale (24 pav.).

Nustatyta, kad visų elektrodų atveju gauta hiperbolinė analizinio signalo nuo substrato koncentracijos priklausomybė atitinka Michaelis-Menten kinetiką, o jos parametrai yra pateikti 4 lentelėje.



24 pav. GOx modifikuotų grafito elektrodų srovės stiprio skirtumo priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos esant skirtingoms 13,0 nm AuND koncentracijoms tirpale: 1 – 0,6 mmol L⁻¹, 2 – 1,5 mmol L⁻¹ ir 3 – be AuND. Sąlygos: 0,05 mol L⁻¹ acetatinis buferinis tirpalas (pH 6,0), 0,1 mol L⁻¹ KCl, 2 mmol L⁻¹ FMS, $E = + 0,3V$.

Pagal šiuos rezultatus galime daryti išvadą, kad AuND esančios tirpale padidina sistemos analizinį signalą, lyginant su sistema, kai tirpale nėra AuND. Sistemoje su GR/GOx elektrodu ir tirpale esančiomis AuND (kai jų koncentracija 0,60 arba 1,50 mmol L⁻¹) fiksuojamos apytiksliai 11 % didesnės maksimalaus srovės stiprio pokyčio reikšmės, nei sistemoje be AuND. Analizinio signalo pokyčiai sistemoje be FMS nebuvo stebimi nei esant AuND tirpale, nei be jų. Tai gali būti paaiškinta mažu 13,0 nm skersmens aukso nanodalelių judriu, bei labai lėta elektronų pernaša nuo fermento aktyviojo centro elektrodui. Nustatyta, kad visais atvejais (be ir su AuND) tirpus elektronų pernašos tarpininkas FMS užtikrina elektronų pernašą nuo GOx elektrodui.

Kitame tyrimo etape buvo palygintos analizinių signalų reikšmės elektrodams, kurie buvo tiriami skirtingose 13,0 nm skersmens AuND koncentracijų tirpaluose esant ir nesant FMS (koncentracija 2 mmol L⁻¹). Maksimalus srovės stiprio pokytis užregistruotas GR/GOx elektrodu tirpale esant 1,5 mmol L⁻¹ 13,0 nm skersmens AuND bei 2 mmol L⁻¹ FMS yra 6,43

karto didesnis lyginant su sistema be FMS. Atitinkamai sistemoje su GR/GOx elektrodu ir tirpale esant 0,6 mmol L⁻¹ 13,0 nm skersmens AuND bei 2 mmol L⁻¹ FMS maksimalus srovės stiprio pokytis yra 7,18 karto didesnis lyginant su sistema, kurioje nėra FMS.

4 lentelė. Michaelis-Menten lygties parametrai gauti aproksimavus 20 paveiksle pateiktas kreives. Sąlygos: 0,05 mol L⁻¹ acetatinis buferinis tirpalas (pH 6,0), 0,1 mol L⁻¹ KCl, 2 mmol L⁻¹ FMS, $E = + 0,3V$.

Elektrodo tipas	su FMS		be FMS	
	$K_{M(tar.)}$, mmol L ⁻¹	I_{max} , μA	$K_{M(tar.)}$, mmol L ⁻¹	I_{max} , μA
GR/GOx be AuND	16,2	51,0	6,16	0,008
GR/GOx esant 0,6 mmol L ⁻¹ AuND	12,3	57,4	3,20	0,008
GR/GOx esant 1,5 mmol L ⁻¹ AuND	13,6	51,4	5,72	0,008

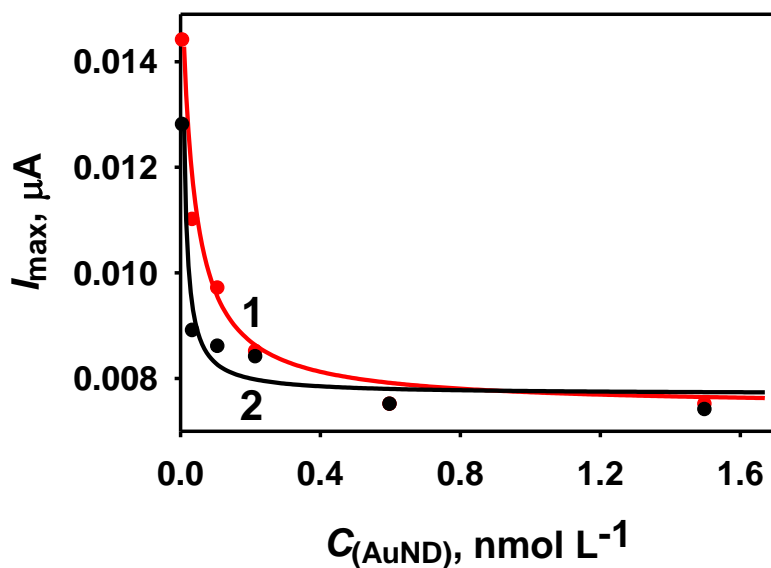
Atsižvelgiant į šiuos rezultatus galime daryti išvadą, kad elektronų pernaša per AuND nesant elektronų pernašos tarpininkui yra mažai efektyvi. Analizinis signalas, kai tirpale yra ir 13,0 nm skersmens AuND ir elektronų pernašos tarpininkas FMS, priklauso nuo dalelių koncentracijos ir kai jų koncentracija yra 0,6 mmol L⁻¹ tokios sistemos analizinis signalas yra didesnis, lyginant su sistema, kai nanodalelių koncentracija tirpale yra 1,5 mmol L⁻¹.

Nustatyta, kad biologinio jutiklio, acetatiniame buferiniame tirpale, pH 6,0 esant elektronų pernašos tarpininko FMS bei 1,5 mmol L⁻¹ arba 0,6 mmol L⁻¹ 13,0 nm skersmens AuND, $K_{M(tar.)}$ reikšmės yra atitinkamai 1,2 ir 1,3 karto mažesnės, nei sistemos be nanodalelių. Kai analizinėje sistemoje nebuvo naudojamas FMS, $K_{M(tar.)}$ reikšmės yra atitinkamai 1,1 ir 1,9 karto mažesnės, nei sistemoje be AuND (4 lentelė). $K_{M(tar.)}$ reikšmė tirpale esant 0,6 ir 1,5 mmol L⁻¹ AuND atitinkamai yra 3,20 ir 5,72 mmol L⁻¹ bei 12,3 ir 13,6 mmol L⁻¹ tirpale esant AuND ir FMS. Šie rezultatai koreliuoja su kitų

tyrėjų gautais rezultatais panašiose analizinėse sistemose be elektronų pernašos tarpininko. Biologinio jutiklio, kuriame platinos elektrodo paviršiuje GOx imobilizuota kryžminiais kovalentiniais ryšiais albumino matricoje, $K_{M(\text{tar.})}$ reikšmė yra $4,58 \text{ mmol L}^{-1}$ [128]; sistemoje, kai GOx yra imobilizuota stikliškosios anglies elektrodo paviršiuje, ant kurio prieš tai nusodintas chitozano/aukso nanodalelių sluoksnis, $K_{M(\text{tar.})}$ reikšmė yra $3,5 \text{ mmol L}^{-1}$ [132]. Tačiau, kai kuriose panašiose į mūsų sistemose paminėtose literatūroje, be elektronų pernašos tarpininko apskaičiuota $K_{M(\text{tar.})}$ reikšmė yra šiek tiek didesnė, nei mūsų atveju. Biologinio jutiklio, kuriame GOx yra imobilizuota ant ITO elektrodo paviršiuje nusodintų aukso nanodalelių, $K_{M(\text{tar.})}$ yra $12,1 \text{ mmol L}^{-1}$ [133]; amperometrinio biologinio jutiklio, kuriame GOx yra imobilizuota ant anglies nanovamzdelių modifikuotų aukso ir platinos nanodalelėmis, $K_{M(\text{tar.})}$ reikšmė yra $10,7 \text{ mmol L}^{-1}$ [134]. Mūsų apskaičiuota $K_{M(\text{tar.})}$ reikšmė sistemai su FMS ir skirtinga AuND koncentracija yra 12,3 ir $13,6 \text{ mmol L}^{-1}$ atitinkamai $0,6$ ir $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ AuND, t.y. šiek tiek mažesnė lyginant su mūsų rezultatais gautais $13,0 \text{ nm AuND}$ imobilizuojant ant elektrodo ($17,6 \text{ mmol L}^{-1}$), o taip lyginant su sistema, kurioje GOx yra imobilizuota aukso elektrodo paviršiuje, prieš tai modifikuoto savitvarkiu monosluoksniu ir aukso nanodalelėmis ($16,0 \text{ mmol L}^{-1}$) [135].

Aptikimo riba sistemai, kurioje indikatoriniu elektrodu yra GOx modifikuotas elektrodas, o tirpale yra $0,6 \text{ nmol L}^{-1}$ $13,0 \text{ nm AuND}$ ir 2 mmol L^{-1} FMS yra lygi $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$. Tiesinės priklausomybės intervalas yra iki 10 mmol L^{-1} substrato koncentracijos.

Sekančiame darbo etape buvo įvertinta AuND koncentracijos įtaka amperometriniam signalui tirpale nesant elektronų pernašos tarpininko. Tyrimams buvo pasirinktos $13,0$ ir $6,0 \text{ nm}$ dydžio aukso nanodalelės praskiestos $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ acetatiniu buferiniu tirpalu (pH 6,0). Elektronų pernašos tarpininkas nebuvo naudojamas, kadangi tikėtasi, kad AuND atliks elektronų pernašos tarpininko vaidmenį. Aukso nanodalelių koncentracijų intervalas buvo parinktas nuo $0,01$ iki $1,5 \text{ nmol L}^{-1}$.



25 pav. GR/GOx elektrodų maksimalaus analizinio signalo priklausomybė nuo 13,0 nm (1 kreivė) ir 6,0 nm skersmens AuND (2 kreivė) koncentracijos tiriamajame tirpale. Sąlygos: 0,05 mol L⁻¹ acetatinis buferinis tirpalas (pH 6,0), 0,1 mol L⁻¹ KCl, E = + 0,3 V.

Nustatyta, kad parinktame AuND koncentracijų intervale (tiek 13,0 nm, tiek 6,0 nm AuND atveju) amperometrinis signalas hiperboliškai mažėja didinant AuND koncentraciją (25 pav.). Tai gali būti paaiškinta tuo, kad tirpale yra nevienodas kiekis oksiduotos (AuND(oks.)) ir redukuotos AuND (AuND(red.)) formos, kas sąlygoja amperometrinio signalo dydį. Tiriamajame tirpale AuND(red.)/AuND(oks.) santykis mažėja didėjant AuND(oks.) koncentracijai, kadangi tik tam tikras nedidelis apibrėžtas kiekis AuND(oks.) gali būti panaudotas imobilizuotos GOx, ko pasekoje susidaro atitinkamas kiekis AuND(red.) (23 pav.). Dalis AuND(red.) perduoda elektronus elektrodui, tačiau tam tikra jų dalis gali likti tirpale nepasiekusios elektrodo.

Kaip galima pastebėti iš duomenų pateiktų 25 paveiksle bei 5 lentelėje, visoms analizinėms sistemoms I_{max} reikšmės yra panašios. Kai tirpale yra mažiausia iš tirtų AuND koncentracija (0,01 nmol L⁻¹), I_{max} reikšmė yra apie 1,8 karto didesnė lyginant su didžiausia AuND koncentracija (1,5 nmol L⁻¹). Kuo mažesnė AuND koncentracija tiriamajame tirpale, tuo didesnė analizinio signalo reikšmė yra registruojama.

5 lentelė. Michaelis-Menten lygties kinetiniai parametrai gliukozės biologiniams jutikliams tiriamajame tirpale naudojant skirtingas AuND koncentracijas be FMS.

AuND, nm	Parametrai	AuND koncentracija, nmol L ⁻¹						
		0	0,01	0,04	0,11	0,22	0,60	1,5
6,0	$K_{M(\text{tar.})}$, mmol L ⁻¹	1,69	7,08	4,26	2,12	2,91	5,80	3,04
	I_{max} , μA	0,007	0,013	0,009	0,009	0,008	0,008	0,007
13,0	$K_{M(\text{tar.})}$, mmol L ⁻¹	6,16	2,13	1,01	1,74	8,41	3,20	5,72
	I_{max} , μA	0,008	0,014	0,011	0,010	0,009	0,008	0,008

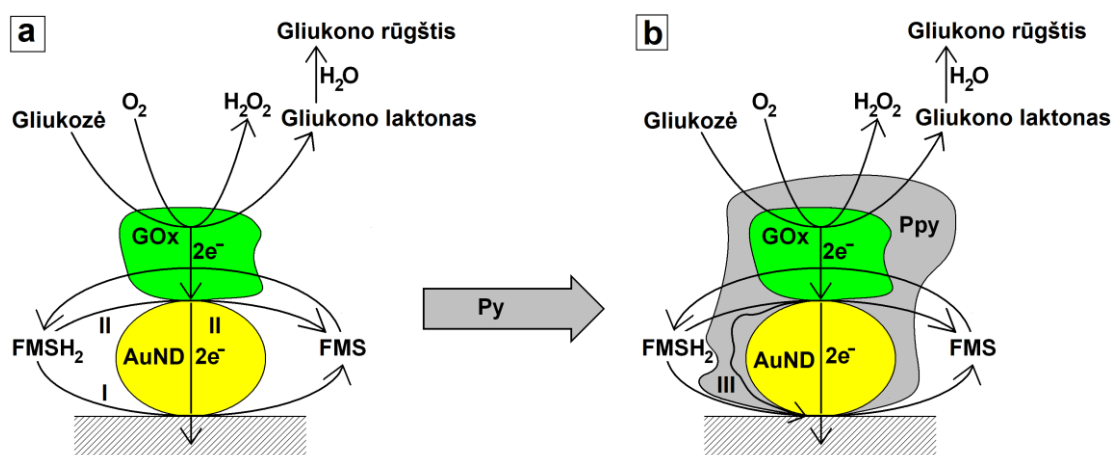
Sąlygos: 0,05 mol L⁻¹ acetatinis buferinis tirpalas (pH 6,0), 0,1 mol L⁻¹ KCl, E = + 0,3 V.

Taip pat I_{max} reikšmė yra panaši sistemose, kai tirpale yra didžiausia AuND koncentracija ir kai jų nėra. Taigi, didesnė AuND koncentracija sąlygoja mažiau efektyvią elektronų pernašą analizinėje sistemoje, nei maža jų koncentracija. Be to, kaip matome iš rezultatų pateiktų 23 paveiksle, dalis elektronų susidariusių fermentinės reakcijos metu AuND(red.) pagalba nėra perduodami elektrodui. Apskaičiuotos $K_{M(\text{tar.})}$ reikšmės visose sistemose yra 3,04 - 7,08 mmol L⁻¹ intervale ir koreliuoja su reikšmėmis gautomis tiriant panašias sistemas [23,136,137].

Didžiausi analiziniai signalai registruojami sistemose, kuriose yra mažiausia tirta AuND koncentracija (0,01 nmol L⁻¹). Ši taisyklė galioja tiek 6,0 nm, tiek 13,0 nm AuND. Tačiau, norint dar efektyviau veikiančio biologinio jutiklio, vien AuND tirpale neužtenka, yra patartina papildomai naudoti elektronų pernašos tarpininką.

4.4 13,0 nm aukso nanodalelių bei π - π konjuguoto polimero polipirola taikymas gliukozės biologiniame jutiklyje

Elektronų pernaša biologiniame jutiklyje naudojant elektrodą modifikuotą 13,0 nm AuND ir GOx bei gardelėje esant tirpaus elektronų pernašos tarpininko vyksta dviem pagrindiniais būdais: tiesiogiai per elektronų pernašos tarpininką nuo fermento aktyviojo centro elektrodai (26 pav., I kelias) bei per elektronų pernašos tarpininką ir AuND (26 pav., II kelias), kaip parodyta ankstesniame šio darbo skyriuje. Tikimasi, kad įvedus į sistemą π - π konjuguotą polimerą polipirolą galėsime pagerinti biologinio jutiklio analizes charakteristikas.



26 pav. Elektrocheminio gliukozės nustatymo, naudojant elektrodą modifikuotą aukso nanodalelėmis ir gliukozės oksidaze (a) bei papildomai suformavus polipirola sluoksnį (b) schema ir galimi elektronų pernašos keliai gardelėje esant FMS.

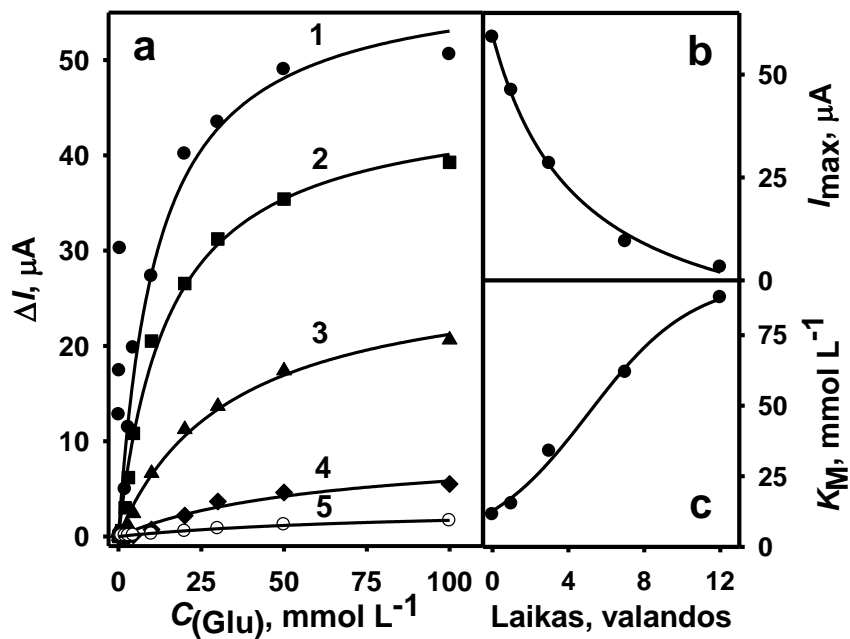
Gliukozės oksidazė imobilizuota indikatorinio elektrodo paviršiuje, terpėje esant gliukozės ir ištirpusio deguonies, katalizuoja gliukozės oksidacijos reakciją, kurios metu susidaro vandenilio peroksidas ir gliukono laktonas, kuris vėliau hidrolizuojams iki gliukono rūgšties. Kadangi vyksta gliukozės oksidacija, tirpale netoli fermento palaipsniui didėja H₂O₂ ir gliukono rūgšties koncentracijos (terpė rūgštėja). Iš literatūros šaltinių žinoma, kad didelė oksidatoriaus (šiuo atveju H₂O₂) koncentracija ir rūgštinė terpė yra palankios sąlygos polipirola polimerizacijos procesui. Vykstant fermentinei polipirola polimerizacijai, GOx molekulė pasidengia polimero sluoksniu

neigiamą krūvį esant terpės pH 6,0 turinti GOx elektrostatiškai sąveikauja su teigiamai įkrautu polipirolo (PPy) [138]. Taip pat, vykstant polimerizacijai, dėl PPy grandinių tarpusavio sąveikos atsiranda nauji, stabilūs PPy kompozitai [139]. Šiame darbo etape buvo ištirta fermentiniu būdu suformuoto PPy sluoksnio įtaka GR/GOx bei GR/AuND/GOx modifikuotų elektrodų charakteristikoms.

Siekiant suformuoti polipirolo sluoksnį elektrodai buvo skirtingą laiko tarpą (0, 1, 3, 7 ir 12 val.) laikomi polimerizacijos tirpale, sudarytame iš 0,5 mol L⁻¹ pirolo, 0,05 mol L⁻¹ gliukozės ir 0,05 mol L⁻¹ acetatinio buferinio tirpalo, pH 6,0. Pasirinktame gliukozės koncentracijų intervale nuo 0,1 iki 100 mmol L⁻¹ buvo stebimos hiperbolinės analizinio signalo priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos dirbant tiek su GR/GOx/PPy (27 a pav.), tiek su GR/AuND/GOx/PPy elektrodais (28 b pav.). Polimerizacijos trukmė ženkliai įtakoja modifikuotais elektrodais registruojamo analizinio signalo dydį. I_{\max} mažėjimas ir $K_{M(\text{tar.})}$ didėjimas priklausomai nuo polimerizacijos laiko apibendrinti 27 paveikslo a ir b dalyse GR/GOx/PPy elektrodai, o 28 paveikslo b,c dalyse – GR/AuND/GOx/PPy elektrodai.

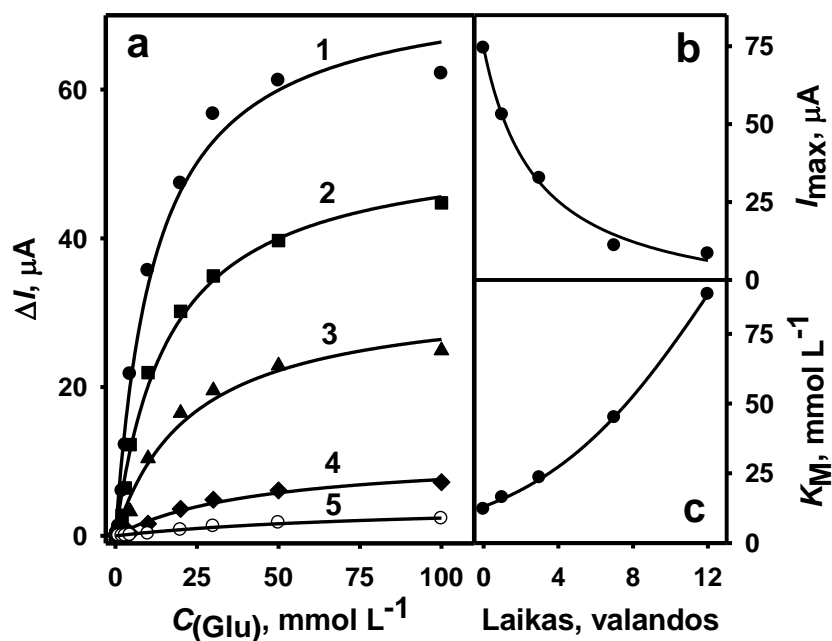
Vykstant fermentinei Py polimerizacijai elektrodai su AuND ir be jų buvo padengti polimero sluoksniu. Po 12 valandų polimerizacijos maksimalus srovės stipris GR/GOx/PPy elektrodai sumažėjo 18,5 karto, o GR/AuND/GOx/PPy elektrodai – 8,9 karto. Atitinkamai $K_{M(\text{tar.})}$ GR/GOx/PPy elektrodai padidėjo 7,75 karto, o GR/AuND/GOx/PPy elektrodai – 7,37 karto.

$K_{M(\text{tar.})}$ reikšmės padidėjimas daugiau nei 7 kartu rodo, kad GOx molekulė imobilizuota grafito elektrodo paviršiuje, polimerizacijos metu yra padengiama PPy sluoksniu. Taip pat, palyginus GR/GOx/PPy ir GR/AuND/GOx/PPy elektrodų $K_{M(\text{tar.})}$ reikšmes, galima daryti išvada, kad AuND imobilizuotos elektrodo paviršiuje labai neženkliai įtakoja $K_{M(\text{tar.})}$ reikšmių pokyčius polimerizacijos metu.



27 pav. GR/GOx/PPy elektrodo kalibracinės kreivės užregistruotos po skirtingo laiko tarpo nuo polimerizacijos pradžios (a), I_{max} (b) bei $K_{M(\text{tar.})}$ (c) priklausomybės nuo polimerizacijos laiko. 1 kreivė – amperometriniai signalai užregistruoti prieš polimerizacijos pradžią; 2–5 kreivės – amperometriniai signalai užregistruoti po 1, 3, 7 ir 12 val. nuo polimerizacijos pradžios. Sąlygos: $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ acetatinis buferinis tirpalas (pH 6,0), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, 2 mmol L^{-1} FMS, $E = +0,3V$.

Tyrimo metu nustatyta, kad polimerizacijos laikas įtakoja PPy modifikuotų elektrodų analizinio signalo tiesinės priklausomybės nuo gliukozės intervalą, t.y. GR/GOx/PPy ir GR/AuND/GOx/PPy elektrodų tiesinės priklausomybės intervalai didėjo ilginant polimerizacijos laiką. Po 3 val. nuo polimerizacijos pradžios tiek GR/GOx/PPy, tiek GR/AuND/GOx/PPy elektrodų tiesinės priklausomybės intervalai prasiplečia iki 20 mmol L^{-1} – dvigubai platesnis, nei polimero sluoksniu nmodifikuotų elektrodų (10 mmol L^{-1}). Bet didėjant tiesinės priklausomybės intervalui mažėja biologinio jutiklio analizinis signalas.



28 pav. GR/AuND/GOx/PPy elektrodo kalibracinės kreivės užregistruotos po skirtingo laiko tarpo nuo polimerizacijos pradžios (a), I_{max} (b) bei $K_{M(tar.)}$ (c) priklausomybės nuo polimerizacijos laiko. 1 kreivė – amperometriniai signalai užregistruoti prieš polimerizacijos pradžią; 2–5 kreivės – amperometriniai signalai užregistruoti po 1, 3, 7 ir 12 val. nuo polimerizacijos pradžios. Sąlygos: 0,05 mol L⁻¹ acetatinis buferinis tirpalas (pH 6,0), 0,1 mol L⁻¹ KCl, 2 mmol L⁻¹ FMS, E = + 0,3V.

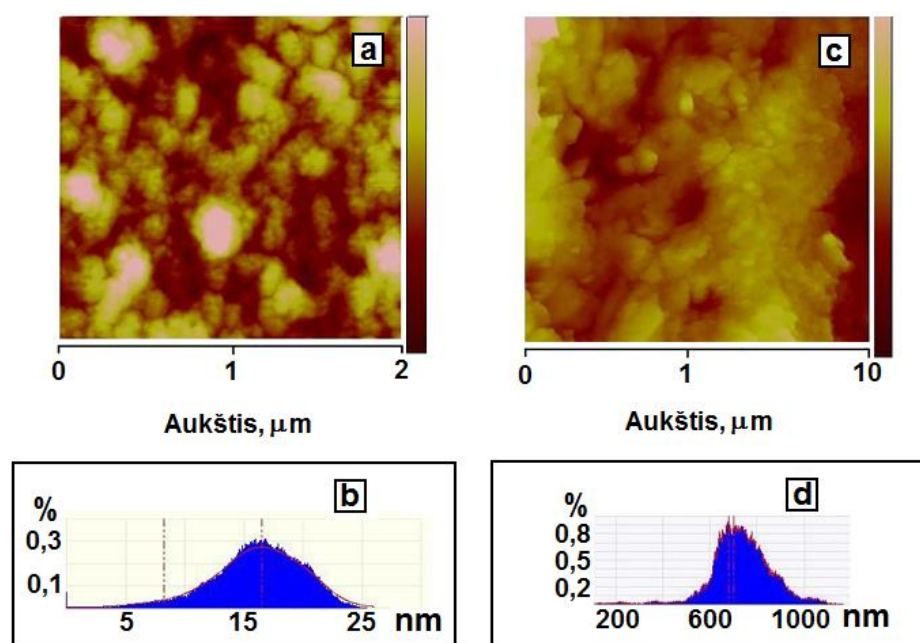
Nustatytos I_{max} (27 b pav. ir 28 b pav.) bei K_M (27 c pav. ir 28 c pav.) reikšmės iliustruoja, kad didėjant $K_{M(tar.)}$ iki 50 mmol L⁻¹ GR/GOx/PPy elektrodo registruojamas analizinis signalas sumažėja 7,8 karto, o GR/AuND/GOx/PPy elektrodo – 6,2 karto lyginant su pradine analizinio signalo reikšme. Toks žymus $K_{M(tar.)}$ reikšmių padidėjimas abiejų elektrodų sistemų atveju sąlygoja teisiškumo intervalo padidėjimą ir todėl tokie elektrodai gali būti sėkmingai panaudoti gliukozės nustatymui realiuose mėginiuose, kur gliukozės koncentracija gali būti nuo 1,5 iki 20 mmol L⁻¹.

Tyrimo metu buvo nustatyta, kad biologinių jutiklių aptikimo riba, kuri yra lygi 0,07 mmol L⁻¹. Tai pat buvo įvertintas abiejų sistemų amperometrinių analizinių signalų atsikartojamumas. Esant didesnėms gliukozės koncentracijoms (20 mmol L⁻¹) GR/GOx/PPy elektrodo signalų

atsikartojamumas yra lygus 12,5 %, o GR/AuND/GOx/PPy elektrodo – 9,4 %. Palyginimui, atsikartojamumo reikšmės panašioms analizinėms sistemoms, kur buvo naudojamos 2,6 nm skersmens AuND bei PPy, yra geresnės ir sudaro 4,2 %, kas gali būti paaiškinta palankesniu GOx molekulių išsidėstymu, bei stipresne adsorbcija AuND paviršiuje [140].

4.4.1 Gliukozės biologinio jutiklio modifikuoto aukso nanodalelėmis, gliukozės oksidaze, bei π - π konjuguoto polimero polipirolo sluoksniu tyrimas AJM

Šio darbo etapo tikslas buvo patvirtinti, kad polipirolo sluoksnis padengia elektrodo paviršiuje imobilizuotas gliukozės oksidazės molekules, vertinant GR/AuND/GOx elektrodo paviršiuje susidariusias struktūras prieš ir po fermentinės polipirolo sintezės. Nagrinėjant aukščio pasiskirstymo histogramas matome, kad grafito elektrodo modifikuoto 13,0 nm AuND ir GOx paviršiuje dominuoja $16,5 \pm 6$ nm struktūros. Toks rezultatas gali būti paaiškintas 13,0 nm skersmens AuND ir GOx konglomeratų susidarymu (29 a,b pav.).



29 pav. AJM vaizdai (a, c) bei aukščio pasiskirstymo histogramos (b, d) aukso nanodalelėmis ir gliukozės oksidaze modifikuoto grafito elektrodo prieš (a, b) ir po 12 val. vykdytos PPy sintezės (c, d). Polimerizacijos tirpalo sudėtis – $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ acetatinis buferinis tirpalas (pH 6,0), $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ gliukozės ir $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pirolo.

AJM tyrimai po 12 val. polimerizacijos parodė, kad GR/AuND/GOx elektrodo paviršius pasidengia π - π konjuguoto polimero sluoksniu, kuris yra pasiskirstęs netolygiai (29 c pav.). Aukščio pasiskirstymo histogramų nagrinėjimas parodė, kad paviršiuje susidarė skirtingo aukščio struktūros, kuriose dominuoja 700 nm AuND/GOx/PPy dariniai. Atlikti tyrimai bei gauti rezultatai patvirtina polipirolo sluoksniu susidarymą elektrodo paviršiuje (29 d pav.).

4.5 Skirtingo dydžio aukso nanodalelių bei π - π konjuguoto polimero polipirolo įtakos gliukozės amperometriniams nustatymams tyrimas

Ankstesni mūsų tyrimai parodė, kad, naudojant elektrodą modifikuotą skirtingo dydžio aukso nanodalelėmis ir GOx, biologinio jutiklio analizinis signalas priklauso nuo imobilizuojamų grafito elektrodo paviršiuje AuND dydžio. 3,5, 6,0 ir 13,0 nm AuND buvo sintetintos pagal metodinę dalyje pateiktą aprašą. GR/AuND/GOx atveju didžiausias analizinis signalas buvo užregistruotas elektrodą modifikavus 3,5 nm AuND – I_{\max} buvo 2,14 karto didesnis lyginant su AuND nemodifikuotu elektrodu. Tuo tarpu naudojant 6,0 ir 13,0 nm skersmens AuND I_{\max} buvo 2,07 ir 1,84 karto didesnis lyginant su sistema be AuND.

Šiame darbo etape buvo įvertinta skirtingo dydžio AuND ir π - π konjuguoto polimero polipirolo įtaka amperometriniams signalams. Elektrocheminiai matavimai buvo atlikti 0,05 mol L⁻¹ acetatiniame buferiniame tirpale (pH 6,0) esant 2 mmol L⁻¹ FMS. Buvo paruoštos ir iširtos 4-ios amperometrinės sistemos naudojant elektrodą modifikuotą tik GOx, 3,5, 6,0 ar 13,0 nm AuND ir GOx bei papildomai elektrodus padengus PPy sluoksniu. Amperometrinių tyrimų rezultatai parodė, kad GOx imobilizuota ant skirtingo dydžio AuND išlaiko savo katalizinį aktyvumą. Procesai vykstantys tiriamojoje sistemoje yra pavaizduoti 26 paveiksle.

Tyrimo metu buvo nustatyta, kad aukso nanodalelių dydis ženkliai įtakoja Michaelis-Menten lygties kinetinius parametrus esant vienodam PPy

polimerizacijos laikui (6 lentelė). Po 13 val. polimerizacijos 3,5 nm AuND modifikuoto elektrodo I_{\max} sumažėjo 1,66, 6,0 nm AuND – 2,07, o 13,0 nm AuND – 2,14 karto, lyginant su amperometriniais signalais užregistruotais polipirolo sluoksniu nemodifikuotais elektrodais. Naudojant elektrodą nemodifikuotą aukso nanodalelėmis I_{\max} sumažėjo 1,53 karto.

6 lentelė. Michaelis-Menten lygties kinetiniai parametrai gliukozės biologiniame jutiklyje naudojant elektrodus modifikuotus skirtingo dydžio AuND (3,5, 6,0 ir 13,0 nm) bei GOx prieš ir po fermentinės PPy sintezės.

Elektrodo rūšis	Polimerizacijos laikas, val.	I_{\max} , μA	$K_{M(\text{tar.})}$, mmol L^{-1}	R^2
GR/AuND _{3,5nm} /GOx	0	76,2	19,7	0,9877
	13	46,0	43,7	0,9921
GR/AuND _{6nm} /GOx	0	73,8	21,3	0,9882
	13	35,7	48,1	0,9920
GR/AuND _{13,0nm} /GOx	0	66,2	19,9	0,9862
	13	30,9	46,9	0,9922
GR/GOx	0	35,6	17,4	0,9751
	13	23,3	30,3	0,9768

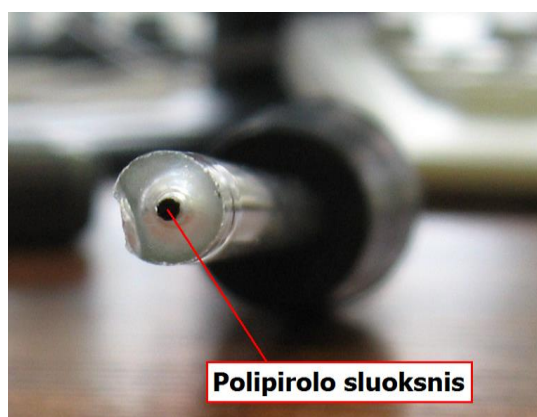
Sąlygos: 0,05 mol L⁻¹ acetatinis buferinis tirpalas (pH 6,0) esant 0,1 mol L⁻¹ KCl, gliukozės koncentracijų intervalas nuo 0,1 iki 100 mmol L⁻¹, $E = +0,3\text{V}$.

Kaip galima pastebėti, I_{\max} sumažėjimas tiesiogiai priklauso nuo AuND skersmens: 3,5 nm AuND atveju I_{\max} sumažėjimas yra mažiausias, o 13,0 nm AuND atveju – didžiausias. Šie rezultatai gali būti paaiškinti padidėjusiu elektrochemiškai aktyviu elektrodo plotu po modifikavimo AuND ir nuo to priklausančiu elektronų pernašos efektyvumu. Todėl, elektrodais modifikuotais mažesnio skersmens AuND, registruojame didesnę analizinę signalą tirpale esant gliukozės prieš ir po PPy sintezės, lyginant su elektrodais modifikuotais 3,5 ir 6,0 nm AuND. Tačiau analizinis signalas elektrodų, modifikuotų skirtingo skersmens AuND, prieš ir po polimerizacijos yra didesnis, lyginant su

GR/GOx elektrodu. Taip pat, AuND įtakoja PPy modifikuotų elektrodų $K_{M(tar.)}$ reikšmes (6 lentelė). Po 13 val. polimerizacijos GR/AuND_{3,5nm}/GOx/PPy elektrodo $K_{M(tar.)}$ padidėjo 2,22, GR/AuND_{6,0nm}/GOx/PPy elektrodo – 2,26, GR/AuND_{13,0nm}/GOx/PPy elektrodo – 2,36, o GR/GOx/PPy elektrodo – 1,74 karto. Atsižvelgiant į šiuos rezultatus galima daryti išvadą, kad didžiausiu $K_{M(tar.)}$ reikšmės pokyčiu pasižymi elektrodai modifikuoti skirtingo dydžio AuND ir π - π konjuguoto polimero polipirolu. Tokiu būdu, panaudojant AuND ir PPy yra praplečiamas biologinių jutiklių analizinio signalo tiesinės priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos intervalas (elektrodai su 13,0 nm AuND nuo 1,5 iki 20 mmol L⁻¹ gliukozės koncentracijos), o tai yra labai svarbu nustatant gliukozės koncentraciją realiuose mėginiuose.

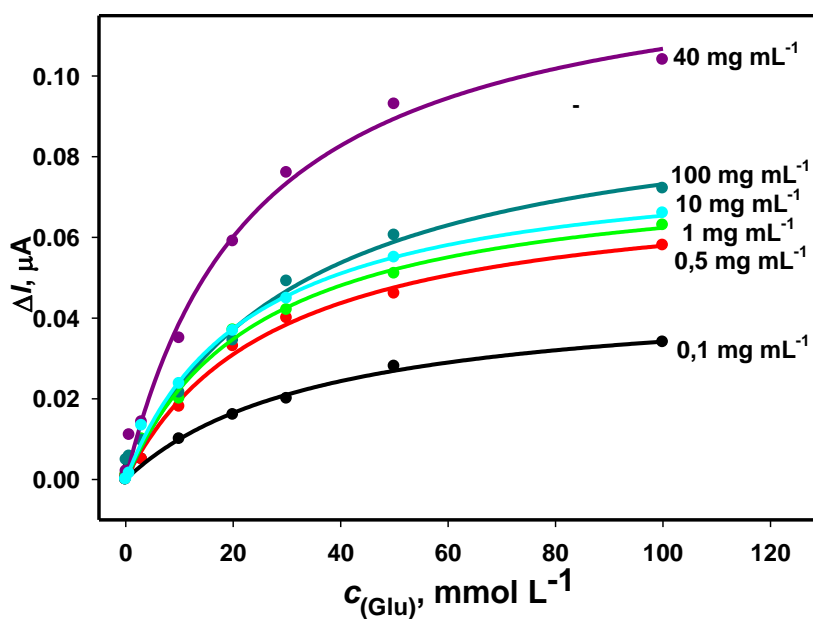
4.6 Elektrochemiškai susintetinto π - π konjuguoto polimero polipirolu taikymas biologiniuose jutikliuose

Prieš tai aprašytame skyriuje π - π konjuguotas polimeras polipirolas, naudojamas GOx imobilizuotų elektrodų modifikavimui, buvo susintetinamas cheminiu būdu. Šiame darbo etape buvo pabandyta padengti Pt elektrodą elektrochemiškai susintetintu PPy sluoksniu (Pt/PPy) ir tokį elektrodą pritaikyti gliukozės bei gliukozės oksidazės analizei.



30 pav. Elektrochemiškai susintetinto polipirolu sluoksnio platinos elektrodo paviršiuje nuotrauka.

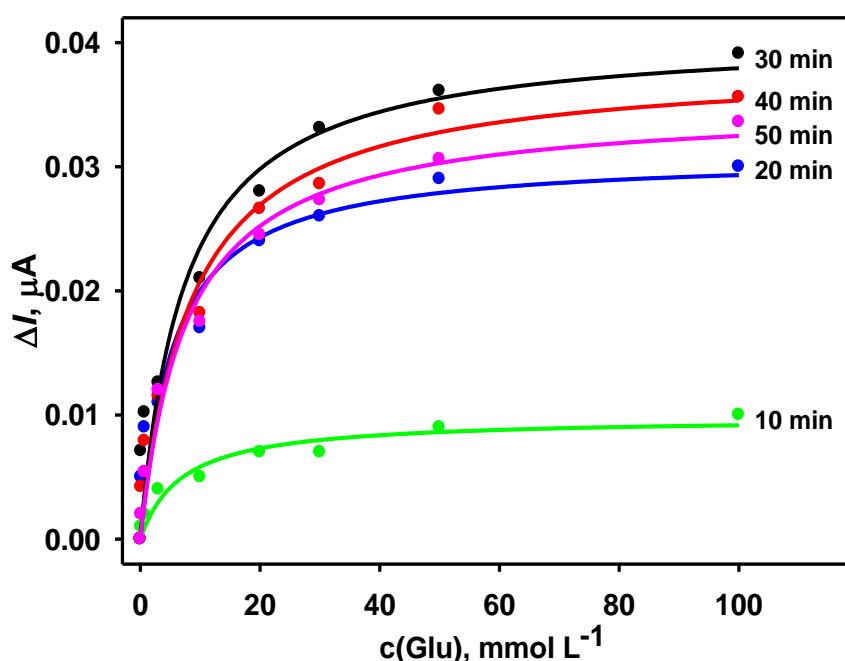
Šio tyrimo esmė buvo Pt/PPy elektrodo modifikavimas GOx, elektrodą inkubuojant skirtingos koncentracijos gliukozės oksidazės tirpaluose (Pt/PPy/GOx), ir taip modifikuoto elektrodo pritaikymas gliukozės koncentracijos nustatymui. PPy sluoksnio elektrocheminės sintezės metodika pateikta metodinėje dalyje. Pirmiausia buvo atliktas srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo Pt/PPy elektrodo inkubavimo skirtingos koncentracijos fermento tirpaluose tyrimas. Buvo parinktos šios gliukozės oksidazės koncentracijos: 0,1, 0,5, 1,0, 10,0, 40,0 ir 100,0 mg mL⁻¹, inkubavimo fermento tirpale laikas – 10 min. Kaip galime pastebėti iš 31 paveiksle pateiktų kalibracinių kreivių, Pt/PPy elektrodą inkubuojant fermento tirpale vienodą laiko tarpą, srovės stiprio pokytis priklauso fermento tirpalo koncentracijos 0,1 – 40 mg mL⁻¹ intervale.



31 pav. Pt/PPy elektrodo inkubuoto skirtingų koncentracijų gliukozės oksidazės tirpaluose srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos. Sąlygos: 0,05 mol L⁻¹ fosfatinis buferinis tirpalas (pH 7,0) esant 0,1 mol L⁻¹ KCl ir 2 mmol L⁻¹ FMS, inkubavimo laikas GOx tirpale - 10min.

Inkubavimo 100 mg mL⁻¹ GOx tirpale atveju, registruojamas 1,4 karto mažesnis signalas, nei inkubuojant polipirolo sluoksniu modifikuotą elektrodą 40 mg mL⁻¹ GOx tirpale. Taip gali būti dėl to, kad, esant didelei GOx

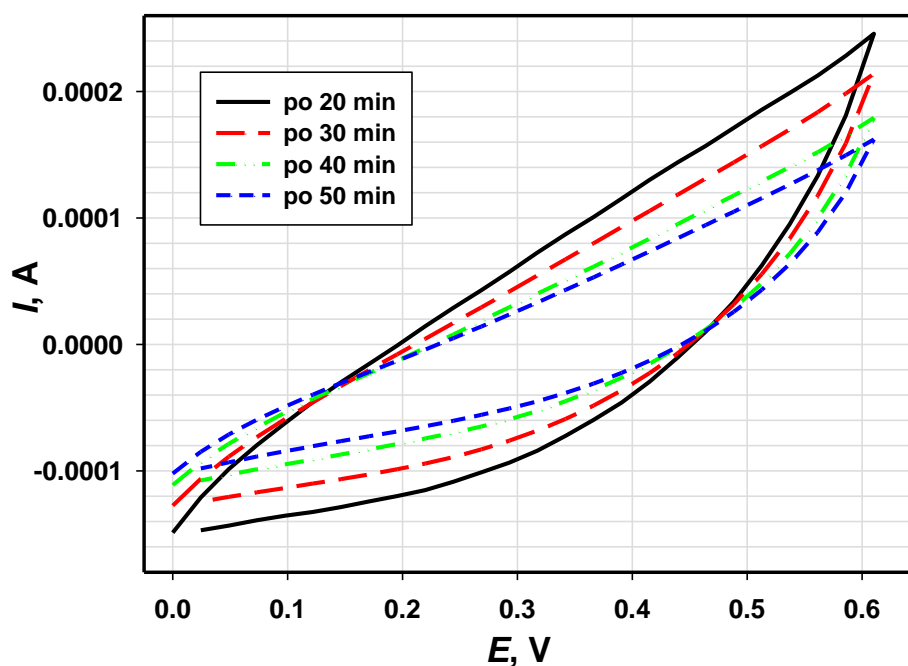
koncentracijai, elektrodą padengia sąlyginai storas baltymo sluoksnis, o tai įtakoja difuzinius apribojimus gliukozei ir elektronų pernašos tarpininkui FMS, ko pasekoje sumažėja registruojamas analizinis signalas. Taigi, optimali gliukozės oksidazės tirpalo koncentracija siekiant Pt/PPy elektrodą modifikuoti gliukozės oksidaze yra 40 mg mL^{-1} (31 pav.). Kitame tyrimo etape buvo nustatytas optimalus Pt/PPy elektrodo inkubavimo 40 mg mL^{-1} GOx tirpale laikas.



32 pav. Pt/PPy elektrodo inkubuoto skirtingą laiko tarpą 40 mg mL^{-1} koncentracijos GOx tirpale srovės stiprio pokyčio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos. Sąlygos: $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatinis buferinis tirpalas (pH 7,0) esant $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl ir 2 mmol L^{-1} FMS.

Nagrinėjant 32 paveiksle pateiktas kreives, galime pastebėti, kad srovės stiprio pokytis didėja, ilgėjant elektrodo inkubavimo laikui iki 30 min. Po 40 min. Pt/PPy elektrodo inkubavimo GOx tirpale stebimas analizinio signalo sumažėjimas, kuris dar labiau išryškėja po 50 min. inkubavimo. Taip gali būti dėl to, kad greičiausiai po 30 min. inkubavimo polipirolo sluoksnis optimaliai padengiamas GOx molekulėmis ir per tolimesnį laiką naujos GOx molekulės

absorbuojamos PPy sluoksnyje tik padidina difuzinius apribojimus, ko pasekoje registruojame mažesnę analizinę signalą. Šios prielaidos patikrinimui buvo registruotos ciklinės voltamperogramos atlikus Pt/PPy elektrodo inkubavimą 40 mg mL^{-1} GOx tirpale skirtingą laiko tarpą (33 paveikslas).



33 pav. Pt/PPy elektrodo inkubuoto skirtingą laiko tarpą 40 mg mL^{-1} koncentracijos gliukozės oksidazės tirpale ciklinės voltamperogramos. Sąlygos: $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatinis buferinis tirpalas (pH 7,0) esant $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl ir 2 mmol L^{-1} FMS, $E_1 = 0 \text{ V}$, $E_2 = +0,6 \text{ V}$, potencialo skleidimo greitis -50 mV s^{-1} .

Nagrinėdami 33 paveiksle pateiktus rezultatus galime pastebėti, kad ilgėjant inkubacijos laikui ciklinių voltamperogramų plotai mažėja. Tai gali būti dėl to, kad elektrodo paviršiuje didėja fermento sluoksnis. Taigi, nagrinėjant 32 ir 33 paveikslus galima daryti išvadą, kad optimalus Pt/PPy elektrodo inkubavimo 40 mg mL^{-1} koncentracijos GOx tirpale laikas yra 30 min. Tačiau, nagrinėjant 32 paveiksle pateiktas kalibracines kreives galima pastebėti, kad tiriamoms gliukozės koncentracijoms nuo $0,1$ iki 100 mmol L^{-1} intervale analizinio signalo reikšmės yra labai mažos. Todėl galima daryti išvadą, kad Pt elektrodo sistemą su elektrochemiškai susintetintu PPy

sluoksniu ir adsorbuota GOx galima naudoti gliukozės nustatyme, nors jos efektyvumas nėra didelis.

4.7 Gliukozės oksidazių išskirtų iš skirtingų pelėsinių grybelių bei įvairių elektronų pernašos tarpininkų atranka efektyviam gliukozės amperometriniam nustatymui

Šiame tyrimų etape buvo ištirtos gliukozės oksidazės išskirtos iš *Penicillium adametzii* (GOx_{P.adametzii}), *Penicillium funiculosum* (GOx_{P.funiculosum}) ir *Aspergillus niger* (GOx_{A.niger}) pelėsinių grybelių bei kelių elektronų pernašos tarpininkų – feroceno (FC), α -metilferocenmetanolio (α -MF), ferocenkarboksialdehido (FCAld) bei ferocenkarboksi rūgšties (FCA) įtaka analiziniam signalui. Kaip ir ankstesniuose darbo etapuose, fermentai buvo imobilizuojami indikatorinio elektrodo paviršiuje naudojant surišėją – glutaro aldehidą. Šiame eksperimente EPT buvo adsorbuojami elektrodo paviršiuje prieš imobilizuojant GOx. Modifikuoto biologinio jutiklio amperometrinis atsakas į skirtingas substrato koncentracijas buvo registruojamas 0,05 mol L⁻¹ acetatiniame-fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 6,0) su 0,1 mol L⁻¹ KCl ir indikatoriniam elektrodui suteikus + 600 mV potencialą lyginamojo Ag/AgCl/KCl_{3M} elektrodo atžvilgiu.

Kadangi gauti fermentų tirpalai pasižymėjo nevienodu aktyvumu, pirmiausia buvo apskaičiuotas toks imobilizuojamų elektrodo paviršiuje fermentų tūris, kad aktyvių vienetų kiekis elektrodo paviršiuje būtų vienodas. GOx aktyvumas buvo nustatomas spektrofotometriškai. Fermento aktyvumo nustatymo metodo esmė yra benzochinono fermentine konversija į hidrochinoną ir hidrochinono susidarymo greičio matavimas esant 290 nm bangos ilgiui. Fermento aktyvumas (U mL⁻¹) apskaičiuojamas pagal formulę:

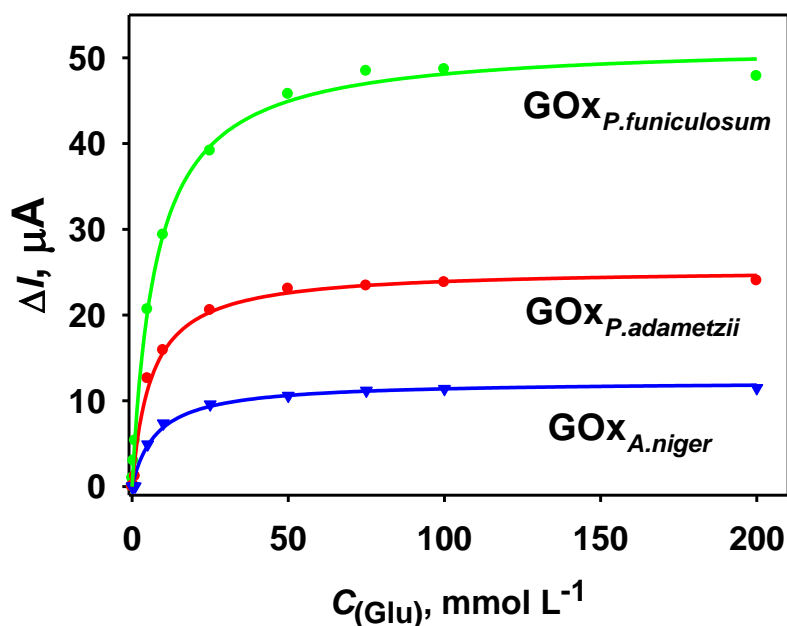
$$\text{fermento aktyvumas} = \frac{\Delta A_{290} \times V_1 \times P}{l \times V_2 \times \varepsilon \times t}$$

ΔA_{290} – optinio tankio pokytis laike, esant 290 nm bangos ilgiui,

V_1 – viso tirpalo tūris kiuvetėje (mL),

V_2 – fermento tirpalo tūris kiuvetėje (mL),
 P – fermentinio tirpalo praskiedimo laipsnis,
 l – optinio kelio ilgis (cm),
 ε – molinis absorbcijos koeficientas ($2,21 \cdot 10^{-4} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$),
 t – reakcijos laikas (min.) per kurį apskaičiuojamas optinio tankio pokytis, prie 290 nm bangos ilgiui.

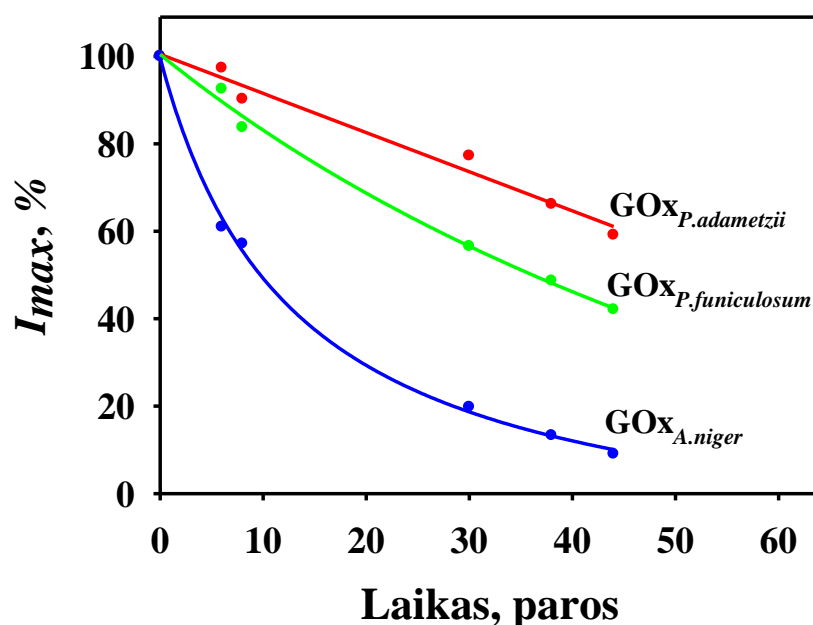
Pradinis fermento išskirto iš *Aspergillus niger* aktyvumas buvo $1055,5 \text{ U mL}^{-1}$, o iš *Penicillium funiculosum* ir *Penicillium adametzii* atitinkamai $1660,1 \text{ U mL}^{-1}$ ir $1017,9 \text{ U mL}^{-1}$. Įvertinus rezultatus nustatyta, kad $\text{GOx}_{P.adametzii}$ tūris elektrodo modifikavimui yra $9,3 \text{ }\mu\text{L}$, $\text{GOx}_{P.funiculosum}$ – $5,7 \text{ }\mu\text{L}$, o $\text{GOx}_{A.niger}$ $9,0 \text{ }\mu\text{L}$, kad aktyvių vienetų kiekis elektrodo darbiniam paviršiuje būtų vienodas.



34 pav. Skirtingomis GOx modifikuotų grafito elektrodų srovės stiprio pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos. Sąlygos: $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ acetatinis-fosfatinis buferinis tirpalas (pH 6,0) su $0,1 \text{ mol/L}$ KCl ir 2 mmol/L FMS, $E = +0,6 \text{ V}$.

Pirmiausia buvo ištirti elektrodų modifikuotų skirtingomis GOx amperometriniai signalai tirpale esant gliukozės ir EPT – N-metilfenazino metosulfato. Visų GOx modifikuotų elektrodų atveju buvo stebima hiperbolinė

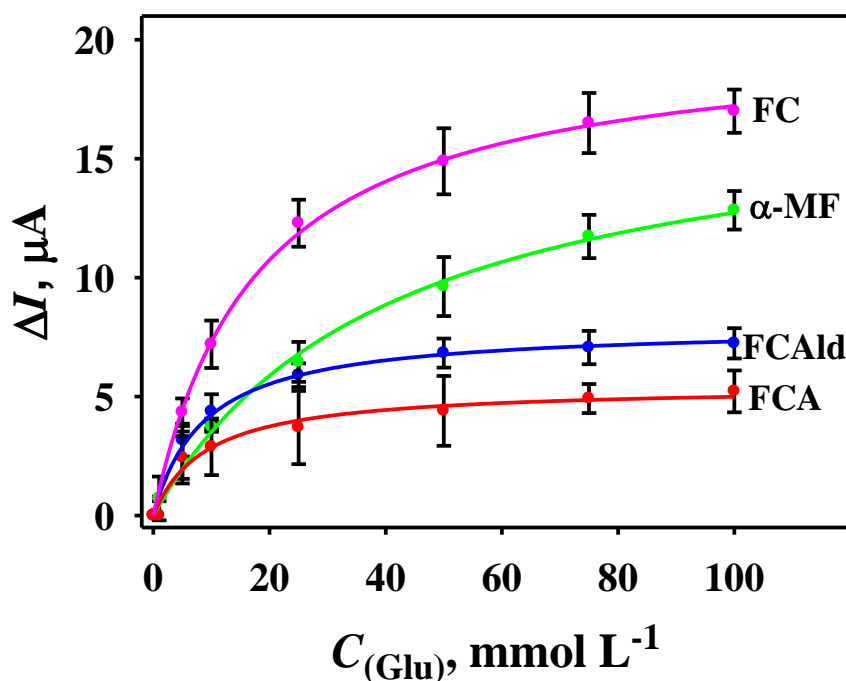
analizinio signalo priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos (34 pav.). Didžiausia I_{\max} reikšmė pastebėta dirbant su elektrodu modifikuotu fermentu išskirtu iš *P. funiculosum* (51,76 μA). Elektrodo modifikuotų GOx išskirtomis iš *P. adametzii* ir *A. niger* I_{\max} reikšmės yra atitinkamai 25,39 μA ir 12,29 μA . Taigi, naudojant FMS, elektrodo modifikuotų $\text{GOx}_{P.funiculosum}$ ir $\text{GOx}_{P.adametzii}$ fermentais amperometrinių signalai yra atitinkamai 4,2 ir 2,1 karto didesni lyginant su komerciniu fermentu $\text{GOx}_{A.niger}$ modifikuoto elektrodo amperometriniais signalais. Michaelis konstantos $K_{M(\text{tar.})}$ reikšmė $\text{GOx}_{P.adametzii}$ ir $\text{GOx}_{A.niger}$ modifikuotiems elektrodams yra panaši – 7,6 ir 7,8 mmol L^{-1} atitinkamai. Elektrodo, modifikuoto fermentu $\text{GOx}_{P.adametzii}$ $K_{M(\text{tar.})}$ yra lygi 6,2 mmol L^{-1} .



35 pav. Skirtingomis GOx modifikuotų grafito elektrodų stabilumas. Sąlygos: 0,05 mol/L acetatinis-fosfatinis buferinis tirpalas (pH 6,0) su 0,1 mol/L KCl ir 2 mmol/L FMS, $E = +0.6 \text{ V}$.

Kitame darbo etape buvo įvertintas skirtingais fermentais modifikuotų elektrodų stabilumo laike charakteristikos. Akivaizdu, kad fermentai išskirti iš skirtingų pelėsinų grybelių pasižymi skirtingu stabilumu (35 pav.). Nustatyta, kad fermentai $\text{GOx}_{P.adametzii}$ ir $\text{GOx}_{P.funiculosum}$ yra stabilesni, lyginant su

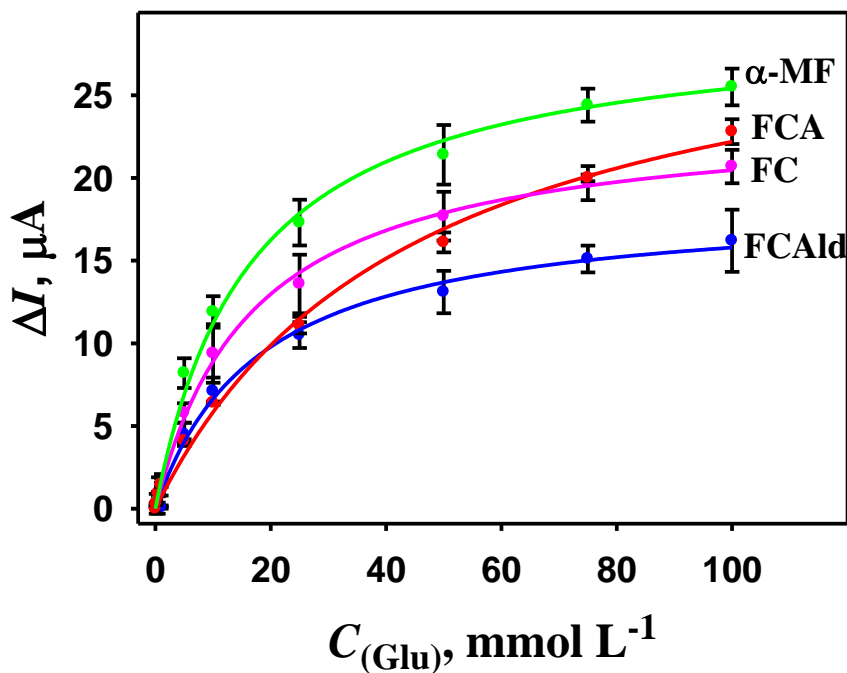
GOx_{A.niger}. Po 7-ių parų GR/GOx_{A.niger} elektrodo amperometriniai signalai sumažėjo 40 %, o GR/GOx_{P.adametzii} ir GR/GOx_{P.funiculosum} elektrodams sumažėjo atitinkamai 4,1 ir 9,5 %. Taip pat, iš pateiktų 35 paveiksle priklausomybių galima pastebėti, kad po 30 parų GR/GOx_{A.niger} elektrodo I_{\max} reikšmė sumažėja 80 %, o GR/GOx_{P.adametzii} ir GR/GOx_{P.funiculosum} – 21 ir 42 % atitinkamai. Žymiai didesnis fermentų, išskirtų iš *P. funiculosum* ir *P. adametzii* pelėsinų grybelių stabilumas leidžia elektrodus naudoti ilgesnį laiko tarpą.



36 pav. GR/GOx_{P.adametzii} elektrodo srovės stiprio pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos, naudojant skirtingus ant elektrodo imobilizuotus EPT. Sąlygos: 0,05 mol L⁻¹ acetatinis-fosfatinis buferinis tirpalas (pH 6,0) su 0,1 mol L⁻¹ KCl, E = + 0,6 V.

Biologinio jutiklio efektyvumas priklauso ne tik nuo specifinių fermento savybių (pvz., stabilumo ar aktyvumo), bet ir nuo naudojamo elektronų pernašos tarpininko, kuris užtikrina elektronų pernašą nuo fermento aktyviojo centro elektrodo. Šiuo tikslu buvo ištirtas keturių elektrodo paviršiuje imobilizuotų elektronų pernašos tarpininkų – FC, $\alpha\text{-MF}$, FCAld ir FCA,

efektyvumas su skirtingomis GOx. Modifikuoti grafito elektrodai buvo ruošiami pirmiausiai ant elektrodo paviršiaus adsorbuojant EPT, po to GOx, bei panaudojant glutaro aldehido garus stabilaus sluoksnio elektrodo paviršiuje suformavimui. Rezultatai gauti elektrodą modifikavus $GOx_{P.adametzii}$, $GOx_{P.funiculosum}$ ir $GOx_{A.niger}$ atitinkamai pateikti 36, 37 ir 38 paveiksluose.



37 pav. GR/ $GOx_{P.funiculosum}$ elektrodo srovės stiprio pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos, naudojant skirtingus ant elektrodo imobilizuotus EPT. Sąlygos: 0,05 mol L⁻¹ acetatinis-fosfatinis buferinis tirpalas (pH 6,0) su 0,1 mol L⁻¹ KCl, E = +0,6 V.

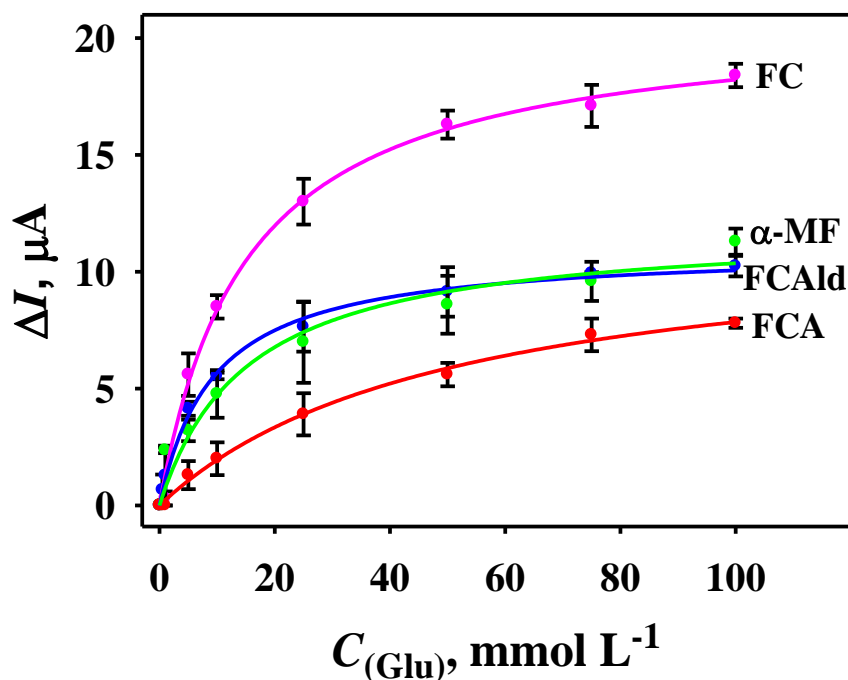
Kalibracinės kreivės, pateiktos 36 paveiksle leidžia daryti išvadą, kad naudojant $GOx_{P.adametzii}$ efektyviausiai veikia FC – I_{max} reikšmė yra didžiausia – 20,27 μA, o $K_{M(tar.)}$ yra 17,74 mmol L⁻¹. Naudojant α-MF I_{max} yra 15,29 μA, o $K_{M(tar.)}$ – 26,07 mmol L⁻¹. FCAld bei FCA atveju maksimalaus analizinio signalo reikšmės yra dar mažesnės – 7,96 μA ir 5,44 μA. Fermento giminingumas substratui gali būti įvertinamas pagal the $I_{max}/K_{M(tar.)}$ santykį [141]. Kuo didesnis šis santykis, tuo efektyviau vyksta amperometriniis gliukozės nustatymas biologiniu jutikliu. Naudojant FC yra stebimas didžiausias

$I_{\max}/K_{M(\text{tar.})}$ santykis ($1,14 \mu\text{A mmol}^{-1}$) lyginant su kitais EPT. Koreliacijos koeficiento (R) reikšmė visais atvejais yra $0,9905 - 0,9986$ intervale, tai reiškia, kad tiriami biocheminiai procesai gali būti aprašomi dviejų kintamųjų hiperbolinėmis lygtimis, kurio yra suderinamos su Michaelis-Menten kinetika. Taigi, galima daryti išvadą, kad su fermentu išskirtu iš *P. adametzii* ferocenas yra efektyviausiai veikiantis elektronų pernašos tarpininkas, kadangi stebimi dideli analiziniai signalai bei giminingumas fermentui.

Kiti tyrimai buvo atlikta su GOx išskirta iš *P. funiculosum*. Šiuo atveju yra nustatytos labai panašios maksimalaus analizinio signalo vertės naudojant du mediatorius: $\alpha\text{-MF} - I_{\max}$ yra $31,37 \mu\text{A}$ ir $\text{FCA} - I_{\max}$ yra $32,22 \mu\text{A}$. Tačiau, šiose sistemose labai skiriasi apskaičiuotos $K_{M(\text{tar.})}$ reikšmės – $18,84 \text{ mmol L}^{-1}$ ir $45,19 \text{ mmol L}^{-1}$. Pagal šiuos rezultatus galime daryti išvadą, kad efektyviausiai su $\text{GOx}_{P.funiculosum}$ veikia $\alpha\text{-MF}$, kadangi stebimas maksimalus analizinis signalas ir minimalūs difuziniai apribojimai. Ši tendencija taip pat buvo pastebėta spektrofotometriškai ir spektrofluorimetriškai tiriant $\text{GOx}_{P.funiculosum}$ su skirtingais EPT, siekiant įvertinti fermento aktyvumą [142]. Naudojant fermentą išskirtą iš *P.funiculosum* ir kitus EPT gautos mažesnės I_{\max} reikšmės, pvz. naudojant sistemoje FC I_{\max} buvo $23,92 \mu\text{A}$, o naudojant FCald – $18,64 \mu\text{A}$. Taigi, didžiausias $I_{\max}/K_{M(\text{tar.})}$ santykis ($1,67 \mu\text{A mmol}^{-1}$) stebimas sistemoje su $\alpha\text{-MF}$. Su FC šis santykis yra labai panašus – $1,42 \mu\text{A mmol}^{-1}$. Todėl galima daryti prielaidą, kad $\alpha\text{-MF}$ yra tinkamiausias elektronų pernašos tarpininkas sistemai su GOx iš *P. funiculosum*, tačiau naudojant FC taip pat yra gaunami geri rezultatai. Spektrofotometriniai ir spektrofluorimetriniai rezultatai atlikti sistemose su $\text{GOx}_{P.funiculosum}$ tiriant fermento aktyvumą parodė, kad tiek su FC, tiek su $\alpha\text{-MF}$ tendencijos yra panašios, t.y. registruojami panašūs analiziniai signalai [143].

Elektrodais, modifikuotais skirtingais EPT ir $\text{GOx}_{A.niger}$, registruojame panašias analizinio signalo priklausomybes nuo gliukozės koncentracijos, kaip ir $\text{GOx}_{P.adametzii}$ modifikuotais elektrodais (38 pav.). Kai elektrodas yra

modifikuotas FC ir fermentu, I_{\max} yra 20,96 μA . $\alpha\text{-MF}$, FCA ir FCAld atvejais I_{\max} reikšmės yra panašios – 11,95 μA , 11,68 μA ir 11,0 μA , atitinkamai.



38 pav. GR/ $\text{GOx}_{A.niger}$ elektrodo srovės stiprio pokyčio priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos, naudojant skirtingus ant elektrodo imobilizuotus EPT. Sąlygos: 0,05 mol L⁻¹ acetatinis-fosfatinis buferinis tirpalas (pH 6,0) su 0,1 mol L⁻¹ KCl, $E = +0,6 \text{ V}$.

Tačiau, $K_{M(\text{tar.})}$ reikšmės skiriasi net kelis kartus – naudojant $\alpha\text{-MF}$ $K_{M(\text{tar.})}$ yra 15,29, FCA – 49,11, o FCAld – 9,37 mmol L⁻¹. Taigi, FC modifikuotų elektrodo I_{\max} yra vidutiniškai 1,8 – 1,9 karto didesnė, nei elektrodus modifikavus $\alpha\text{-MF}$, FCA ir FCAld. Taip pat, didžiausias $I_{\max}/K_{M(\text{tar.})}$ santykis lygus 1,40 $\mu\text{A mmol}^{-1}$ gaunamas naudojant FC, R visais atvejais yra 0,9965 – 0,9988 intervale. Taigi, FC buvo parinktas kaip geriausiai tinkantis EPT $\text{GOx}_{A.niger}$. Elektrodui, modifikuotam šiuo EPT registruojamas didelis I_{\max} ir maža $K_{M(\text{tar.})}$.

Nagrinėjant 36, 37 ir 38 paveikslus bei 7 lentelėje patektus rezultatus galima daryti išvadą, kad I_{\max} ir $K_{M(\text{tar.})}$ priklauso ne tik nuo naudojamos GOx,

bet ir nuo EPT. Didžiausi analiziniai signalai buvo gauti sistemose su fermentu $GOx_{P.funiculosum}$ ir su visais naudotais EPT. Tai pat pastebėta, kad analizinių signalų priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos dirbant su $GOx_{P.adametzii}$ ir $GOx_{A.niger}$ fermentais bei nurodytais mediatoriais yra panašios, o naudojant $GOx_{P.funiculosum}$ galioja kita tendencija. Skirtingos $K_{M(tar.)}$ konstantų reikšmės biologiniuose jutikliuose su skirtingais fermentais, bet tuo pačiu elektronų pernašos tarpininku gali būti paaiškintos skirtingu EPT sąveikos su fermentu efektyvumu bei elektronų pernašos greičiu.

7 lentelė. I_{max} reikšmės gliukozės biologiniams jutikliams naudojant skirtingas GOx ir skirtingus EPT.

$I_{max}, \mu A$			
EPT	$GOx_{A.niger}$	$GOx_{P.adametzii}$	$GOx_{P.funiculosum}$
FC	$20,96 \pm 0,79$	$20,27 \pm 0,40$	$23,92 \pm 1,22$
α -MF	$11,95 \pm 0,45$	$15,29 \pm 0,48$	$31,37 \pm 1,48$
FCAld	$11,68 \pm 0,31$	$7,96 \pm 0,51$	$18,64 \pm 1,30$
FCA	$11,00 \pm 0,88$	$5,44 \pm 0,16$	$32,22 \pm 1,72$

Sąlygos: $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ acetatinis-fosfatinis buferinis tirpalas (pH 6,0), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, 2 mmol L^{-1} FMS, $E = + 0.6 \text{ V}$.

Atlikus visus matavimus nustatyta, kad srovės stiprio priklausomybės nuo gliukozės koncentracijos atitinka Michaelis-Menten kinetiką (34 pav., 36 – 38 pav.). Apskaičiuota $K_{M(tar.)}$ daugeliu atveju yra mažesnė nei $GOx_{A.niger}$ buferiniame tirpale (27 mmol L^{-1} [144]). Mūsų rezultatai dera su kitų autorių pateiktomis $K_{M(tar.)}$ panašiose sistemose, kuriose buvo naudojama GOx išskirta iš *A.niger* ir imobilizuota paviršiuje – 10 [145], 10,8 [146], 14,9 [147], 15,19 [148] ir 8,5 mmol L^{-1} [149]. Verta paminėti, kad aptartuose biologiniuose jutikliuose naudojami skirtingi EPT, bet GOx elektrokatalizinis aktyvumas koreliuoja su mūsų gautais duomenimis.

Lyginant rezultatus gautus naudojant elektronų pernašos tarpininką tiriamajame tirpale bei elektrodo paviršiuje imobilizuotus EPT, didžiausias analizinis signalas, kai grafito elektrodas yra modifikuotas fermentu $GOx_{P.adametzii}$, yra registruojamas naudojant FC imobilizuotą elektrodo paviršiuje ir FMS ištirpintą acetatiniame-fosfatiniame buferiniame tirpale. I_{max} reikšmės atitinkamai lygios 20,27 ir 25,39 μA . Fermento $GOx_{P.funiculosum}$ atveju maksimalus srovės stipris lygus 51,76 μA yra registruojamas naudojant FMS, ir I_{max} yra 1,65 karto didesnis, nei naudojant α -MF. Tačiau $GOx_{A.niger}$ atveju didžiausias I_{max} lygus 20,96 μA registruojamas naudojant elektrodo paviršiuje imobilizuotą ferocena. Atsižvelgiant į šiuos rezultatus, galima daryti išvada, kad efektyviausia biologinių jutiklių modifikavimui yra $GOx_{P.funiculosum}$.

Iš literatūros duomenų žinoma, kad ferocenas katalizuoja daugelio oksidoreduktazių oksidacijos reakcijas, įskaitant ir GOx [150]. Tačiau, ferocenas ir jo dariniai su GOx išskirtomis iš skirtingų pelesinių grybelių sąveikauja skirtingai ir fiksuojami skirtingo dydžio analiziniai signalai. Taigi, atsižvelgiant į skirtingomis GOx bei EPT modifikuotų elektrodų apskaičiuotus kinetinius parametrus, stabilumo charakteristikas bei pritaikomumą biologinių jutiklių kūrime, GOx išskirta iš *P. funiculosum* yra labiausiai tinkama bereagentinių biologinių jutiklių kūrimui gliukozės nustatymui.

IŠVADOS

- ✓ Aukso nanodalelės imobilizuotos grafito elektrodo paviršiuje kartu su tirpiu elektronų pernašos tarpininku užtikrina efektyvesnę elektronų pernašą nuo gliukozės oksidazės aktyvaus centro elektrodui fermentinės gliukozės oksidacijos metu. Aukso nanodalelėms esant tarp elektrodo ir fermento nustatytas 1,42 karto didesnis maksimalus analizinis signalas lyginant su elektrodu be nanodalelių.
- ✓ Naudojant 3,5, 6,0 ir 13,0 nm nanodalelėmis modifikuotus elektrodus amperometriniais biologiniais jutikliais yra nustatomas 2,14 (3,5 nm), 2,07 (6,0 nm) ir 1,84 (13,0 nm) karto didesnis maksimalus analizinis signalas lyginant su elektrodu be aukso nanodalelių. Biologinių jutiklių tiesinės priklausomybės nuo substrato koncentracijos intervalas yra iki 10 mmol L⁻¹ gliukozės, o analizės aptikimo riba – 0,08 mmol L⁻¹.
- ✓ Elektrodas modifikuotas 13,0 nm aukso nanodalelėmis ir gliukozės oksidaze yra mažiau stabilus, nei elektrodas be nanodalelių: elektrodo modifikuoto tik gliukozės oksidaze 50 % maksimalaus signalo registruojama po 49,3 parų tuo tarpu elektrodo modifikuoto aukso nanodalelėmis ir fermentu – po 19,5 parų.
- ✓ Aukso nanodalelės esančios tiriamajame tirpale užtikrina efektyvesnę elektronų pernašą nuo gliukozės oksidazės aktyviojo centro elektrodui, kai jų koncentracija yra nuo 0,01 iki 0,60 nmol L⁻¹ ir tiriamajame tirpale yra N-metilfenazino metosulfato. Naudojant 13,0 nm skersmens aukso nanodaleles, biologinio jutiklio aptikimo riba yra 0,05 mmol L⁻¹ gliukozės, o tiesiškumo intervalas nuo 0,1 iki 10 mmol L⁻¹ substrato. Didėjant aukso nanodalelių koncentracijai tirpale (virš 0,60 nmol L⁻¹), mažėja elektronų pernašos tarp gliukozės oksidazės ir elektrodo paviršiaus efektyvumas.
- ✓ Polipirolo sintezė ant elektrodo įtakoja gliukozės biologinio jutiklio su ir be aukso nanodalelių analizinio signalo tiesinės priklausomybės nuo

gliukozės intervalą – po 3 val. polimerizacijos visiems elektrodams tiesinės priklausomybės intervalas padidėjo iki 20 mmol L^{-1} , o analizės aptikimo riba yra $0,07 \text{ mmol L}^{-1}$. Naudojant mažiausias $3,5 \text{ nm}$ aukso nanodaleles didžiausias analizinis signalas yra registruojamas prieš ir po polipirolo sintezės.

- ✓ Įvertinus gliukozės oksidazių išskirtų iš skirtingų pelėsinių grybelių bei elektronų pernašos tarpininkų imobilizuotų elektrodo paviršiuje efektyvumą nustatyta, kad labiausiai biologinių jutiklių elektrodų modifikavimui bei elektrocheminiam gliukozės nustatymui tinka fermentas išskirtas iš *Penicillium funiculosum* bei elektronų pernašos tarpininkai - ferocenkaboksilinė rūgštis ir α -metilferocenmetanolis. Elektrodu modifikuotu šiuo fermentu registruojame didesnius analizinius signalus, bei galime elektrodą naudoti ilgesnį laiko tarpą.

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

1. N. German, A. Ramanaviciene, **J. Voronovic**, A. Ramanavicius. Glucose biosensor based on graphite electrodes modified with glucose oxidase and colloidal gold nanoparticles, *Microchimica Acta* 2010, 168, 221-229.
2. N. German, A. Ramanavicius, **J. Voronovic**, Y. Oztekin, A. Ramanaviciene. The effect of colloidal solutions of gold nanoparticles on the performance of a glucose oxidase modified carbon electrode, *Microchimica Acta* 2011, 172, 185-191.
3. N. German, A. Ramanavicius, **J. Voronovic**, A. Ramanaviciene. Glucose biosensor based on glucose oxidase and gold nanoparticles of different sizes covered by polypyrrole layer, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2012, 413, 224-230.
4. N. German, **J. Voronovic**, A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene. Gold nanoparticles and polypyrrole for glucose biosensor design, *Procedia Engineering* 2012, 47, 482-485.

KITOS AUTORIAUS PUBLIKACIJOS NEĮTRAUKTOS Į DISERTACIJĄ

1. A. Ramanaviciene, A. Kausaite-Minkstimiene, Y. Oztekin, G. Carac, **J. Voronovic**, N. German, A. Ramanavicius. Visualization of red-ox proteins on the gold surface using enzymatic polypyrrole formation, *Microchimica Acta* 2011, 175, 79-86.
2. M. Stoica, L. Mikoliūnaitė, A. Ramanavičienė, P. Alexe, G. Carac, R. Dinica, **J. Voronovič**, A. Ramanavičius. Corrosion study of stainless steel incubated in solutions consisting of biocide (Oxonia-Active®) and *Aspergillus niger* suspension, *Chemija* 2012, 23, 180-186.
3. A. Ramanaviciene, N. German, A. Kausaite-Minkstimiene, **J. Voronovic**, J. Kirlyte, A. Ramanavicius. Comparative study of surface plasmon resonance, electrochemical and electroassisted chemiluminescence methods based immunosensor for the determination of antibodies against human growth hormone, *Biosensors and Bioelectronics* 2012, 36, 48-55.
4. 5. V. Ratautaite, A. Ramanaviciene, Y. Oztekin, **J. Voronovic**, Z. Balevicius, L. Mikoliunaite, A. Ramanavicius. Electrochemical stability and repulsion of polypyrrole film. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2013, 418, 16-21.

5. A. Vaitkuvienė, V. Kasetė, **J. Voronovic**, G. Ramanauskaitė, G. Bizulevičienė, A. Ramanavičienė, A. Ramanavicius. Evaluation of cytotoxicity of polypyrrole nanoparticles synthesized by oxidative polymerization, *Journal of Hazardous Materials* 2013, 250-251, 167-174.

6. U. Bubniene, M. Ocwieja, B. Bugelyte, Z. Adamczyk, M. Nattich-Rak, **J. Voronovic**, A. Ramanavičienė, A. Ramanavicius. Deposition of gold nanoparticles on mica modified by poly(allylamine hydrochloride) monolayers, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2014, 441, 204-210.

PRANEŠIMŲ MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE TEZĖS

1. **J. Voronovič**, A. Ramanavicius, A. Ramanavičienė, N. German, A. Suchodolskis, Gliukozės biosensorių kūrimas naudojant skirtingo dydžio aukso nanodalelės. 9-oji *Lietuvos chemikų konferencija CHEMIJA 2009*, Vilnius, ChI, spalio 16, 2009. (http://193.219.48.71/index.php?s_id=268&lang=lt)

2. **J. Voronovič**, A. Ramanavicius, A. Ramanavičienė, N. German, A. Suchodolskis, Skirtingo dydžio aukso nanodalelių taikymas gliukozės bioanalizėje. *Neorganinių Junginių chemija ir technologija*. KTU, balandžio 21 – balandžio 22, 2010. Konferencijos pranešimų medžiaga. Kaunas, Technologija, 2010, p. 78-81.

3. **J. Voronovič**, N. German, A. Ramanavičienė, A. Ramanavicius, The Influence of Gold Nanoparticles for Detection of Glucose Using GOx Modified Biosensors. The 12-th International Conference – School “Advanced Materials and Technologies”. Palanga, rugpjūčio 27 – rugpjūčio 31, 2010. Book of abstracts. Kaunas, Technologija, 2010, p. 51.

4. **J. Voronovič**, N. German, A. Ramanavicius, A. Ramanavičienė, Glucose biosensors based on gold nanoparticles and polypyrrole. *5th International Conference THE VITAL NATURE SIGN 2011*. Birštonas, Kaunas, 2011 gegužės 19 – gegužės 21, Konferencijos pranešimų medžiaga. Kaunas, Technologija, 2011, p. 78-81.

5. **J. Voronovič**, L. Bogdiun, A. Ramanavičienė, A. Ramanavicius, Analysis of Interaction between Electrochemically Synthesized Polypyrrole Layer and Glucose Oxidase. The 13-th International Conference – School “Advanced Materials and Technologies”. Palanga, rugpjūčio 27 – rugpjūčio 31, 2011. Book of abstracts. Kaunas, Technologija, 2011, p. 136.

6. N. German, A. Suchodolskis, A. Ramanavičienė, A. Ramanavicius, **J. Voronovic**, Catalytic effect of glucose oxidase and gold nanoparticles on biocorrosion processes, *Final Workshop of COST Action D33 "Nanoscale electrochemical and bioprocesses (corrosion) at solid-aqueous interfaces of industrial materials"*, Babeş-Bolyai University, Cluj-Napoca, Romania, May 2 – May 4, 2009.

7. T. Romaskevicius, **J. Voronovic**, A. Ramanavičienė, A. Ramanavicius, Construction of biosensors by tethering of enzyme-gold nanoparticles to polymer-based matrix. *PITTCON*

Conference & Expo 2009. Chicago, March 8 – March 13, 2009. Konferencijos pranešimų medžiaga, abstracts.

8. A. Ramanaviciene, A. Suchodolskis, A. Kausaite, N. German, L. Mikoliunaite, **J. Voronovic**, Y. Oztekin, A. Ramanavicius, Enzymatic synthesis of polypyrrole nanostructures vs. electrochemical synthesis of this conducting polymer. *8th International Electrochemistry meeting in Turkey*. Antalya, October 8 – October 11, 2009. Abstract book.

9. A. Suchodolskis, Z. Balevicius, R. Drevinskas, L. Mikoliunaite, **J. Voronovic**, A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene, AFM study of enzymatic formation of Au nanoparticles. *8th International Electrochemistry meeting in Turkey*. Antalya, October 8 – October 11, 2009. Abstract book.

10. N. German, **J. Voronovic**, A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene, Glucose biosensor based on graphite electrodes modified by glucose oxidase and colloidal gold nanoparticles of different size. Pittcon Conference & Expo 2010, February 28 – March 5, 2010, Orlando, Florida, USA.

11. A. Ramanaviciene, N. German, **J. Voronovic**, Y. Oztekin, A. Ramanavicius, The effect of gold nanoparticle colloidal solution on performance of glucose oxidase based biosensor. 24th conference of the European Colloid and Interface Society “ECIS 2010”. Prague, September 5 – September 10, 2010. Abstract book.

12. N. German, **J. Voronovic**, Y. Oztekin, A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene, The effect of enzymatically synthesized polymer layer for amperometric glucose biosensor. 25th conference of the European Colloid and Interface Society “ECIS 2011”. Berlin, September 4 – September 9, 2011. Abstract book.

13. **J. Voronovič**, M. Tok, E. Bilici, Y. Oztekin, A. Ramanavičienė, Z. Yazicigil, A. Ramanavičius. Evaluation of Nanostructures in the Design of Biosensors. The 14-th International Conference – School “Advanced Materials and Technologies”. Palanga, September 27 – September 31, 2012. *Book of abstracts*. Kaunas, Technologija, 2012, p. 69.

14. N. German, A. Kaušaitė-Minkštienė, **J. Voronovič**, J. Kirlytė, A. Ramanavičius, A. Ramanavičienė. The creation of immunosensors based on antigen-antibodies against human growth hormone interaction and the application for the analysis in real samples. European Congress of Immunology, Glasgow, Škotija, September 05 – September 08, 2012. *Immunology*, 137, p. 652-653.

15. N. German, **J. Voronovič**, A. Ramanavičius, A. Ramanavičienė. Gold nanoparticles and polypyrrole for glucose biosensor design. Eurosensors XXVI. Krokva, September 9 – September 12, 2012. Book of abstracts. USB laikmena.

16. **J. Voronovič**, L. Butko, L. Mikoliūnaitė, T.V. Semashko, R.V. Mikhailova, A. Ramanavičius, A. Ramanavičienė. Glucose oxidases from different species in glucose biosensor design. The International Conference of Young Chemists “Nanochemistry and Nanomaterials”. Palanga, December 7 – December 9, 2012. *Book of abstracts*. Elektroninė laikmena, p. 52.

17. L. Butko, **J. Voronovič**, L. Mikoliūnaitė, T.V. Semashko, R.V. Mikhailova, A. Ramanavičius, A. Ramanavičienė. A comparative study of enzymatic properties of glucose oxidases extracted from various fungi. The International Conference of Young Chemists

“Nanochemistry and Nanomaterials”. Palanga, December 7 – December 9, 2012. *Book of abstracts*. Elektroninė laikmena, p. 19.

18. J. Kirlytė, N. German, A. Kaušaitė-Minkštimienė, **J. Voronovič**, A. Ramanavičius, A. Ramanavičienė. A comparative study of different techniques for anti-HGH determination. The International Conference of Young Chemists “Nanochemistry and Nanomaterials”. Palanga, December 7 – December 9, 2012. *Book of abstracts*. Elektroninė laikmena, p. 30.

19. U.S. Bubnienė, B. Bugelytė, M. Ocwieja, Z. Adamczyk, M. Nattich, **J. Voronovič**, A. Ramanavičius. Metal nanoparticle characteristic study for fluorescence applications. The International Conference of Young Chemists “Nanochemistry and Nanomaterials”. Palanga, December 7 – December 9, 2012. *Book of abstracts*. Elektroninė laikmena, p. 42.

20. B. Bugelytė, U.S. Bubnienė, M. Ocwieja, Z. Adamczyk, M. Nattich, **J. Voronovič**, A. Ramanavičius. Gold nanoparticles study of absorption kinetics. The International Conference of Young Chemists “Nanochemistry and Nanomaterials”. Palanga, December 7 – December 9, 2012. *Book of abstracts*. Elektroninė laikmena, p. 18.

21. N. German, A. Kaušaitė-Minkštimienė, **J. Voronovič**, J. Kirlytė, A. Ramanavičius, A. Ramanavičienė. The creation of immunosensors based on antigen-antibodies against human growth hormone interaction and the application for the analysis in real samples, *Immunology*, 2013, 137, 652-653.

LITERATŪRA

1. F. Wang, S. Hu, Electrochemical sensors based on metal and semiconductor nanoparticles, *Microchimica Acta* 165 (2009) 1–22.
2. E. Bakker, Y. Qin, Electrochemical sensors, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 3965.
3. H.M. Kalisz, H.J. Hecht, D. Schomburg, R.D. Schmid, Effects of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1080(2), (1991) 138–142.
4. D.G. Hatzinikolaou, O.C. Hansen, B.J. Macris, A. Tingey, D. Kekos, P. Goodenough, P. Stougaard, A new glucose oxidase from *Aspergillus niger*: characterization and regulation studies of enzyme and gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46 (1996) 371–81.
5. A.N. Eryomin, A.P. Droshdenyuk, G.K. Zhavnerko, T.V. Semashko, R.V. Mikhailova, Quartz sand as an adsorbent for purification of extracellular glucose oxidase from *Penicillium funiculosum* 46.1, *Applied Biochemistry and Microbiology* 40(2) (2004) 178–85.
6. M.V. Sukhacheva, M.E. Davydova, A.I. Netrusov, Production of *Penicillium funiculosum* 433 glucose oxidase and its properties, *Applied Biochemistry and Microbiology* 40(1) (2004) 25–9.
7. F. Ahmad, A. P. Md Yusof, M. Bainbridge, S. Ab Ghani, The application of glucose biosensor in studying the effects of insulin and anti-hypertensive drugs towards glucose level in brain striatum, *Biosensors and Bioelectronics* 23 (2008) 1862–1868.
8. Internetinė nuoroda: <http://diabetes.niddk.nih.gov/dm/pubs/glucosemonitor/> (žiūrėta 2014 06 15).
9. Internetinė nuoroda: <http://www.sciencedaily.com/releases/2012/08/120823143745.htm> (žiūrėta 2014 06 16).
- 10 V. Mazeiko, A. Kausaite-Minkstiniene, A. Ramanaviciene, Z. Balevicius, A. Ramanavicius, Gold nanoparticle and conducting polymer-polyaniline-based nanocomposites for glucose biosensor design, *Sensors and Actuators B: Chemical* 189 (2013) 187–193.
11. M. Pumera, S. Sánchez, I. Ichinose, J. Tang, Electrochemical nanobiosensors, *Sensors and Actuators B* 123 (2007) 1195–1205.

-
12. G.Y. Kim, J. Shim, M.S. Kang, S.H. Moon, Optimized coverage of gold nanoparticles at tyrosinase electrode for measurement of a pesticide in various water samples, *Journal of Hazardous Materials* 156 (2008) 141–147.
 13. X. Ma, Y. Xia, L. Ni, L. Song, Z. Wang, Preparation of gold nanoparticles–agarose gel composite and its application in SERS detection, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 121 (2014) 657–661.
 14. H.H. Deng, G.W. Li, L. Hong, A.L. Liu, W. Chen, X.H. Lin, X.H. Xia, Colorimetric sensor based on dual-functional gold nanoparticles: Analyte-recognition and peroxidase-like activity, *Food Chemistry* 147 (2014) 257–261.
 15. X. Liu, W.J. Li, L. Li, Y. Yang, L.G. Mao, Z. Peng, A label-free electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles for direct detection of atrazine, *Sensors and Actuators B* 191 (2014) 408–414.
 16. Z. Ma, T. Ding, Bioconjugates of glucose oxidase and gold nanorods based on electrostatic interaction with enhanced thermostability. *Nanoscale Research Letters* 4 (2009) 1236–1240.
 17. X. Cui, J. Wiler, M. Dzaman, R.A. Altschuler, D.C. Martin, In vivo studies of polypyrrole/peptide coated neutral probes, *Biomaterials* 24 (2003) 777–787.
 18. A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Affinity sensors based on nanostructured π - π conjugated polymer polypyrrole, D.W. Thomas (Ed.), *Advanced Biomaterials for Medical Applications*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands (2004) 111–125.
 19. A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Molecularly imprinted polypyrrole-based synthetic receptor for direct detection of bovine leukemia virus glycoproteins, *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2004) 076–1082.
 20. J. Njagi, S. Andreescu, Stable enzyme biosensors based on chemically synthesized Au-polypyrrole nanocomposites, *Biosensors and Bioelectronics* 23 (2007) 168–175.
 21. Z. Wang, S. Liu, P. Wu, C. Cai, Detection of Glucose Based on Direct Electron Transfer Reaction of Glucose Oxidase Immobilized on Highly Ordered Polyaniline Nanotubes, *Analytical Chemistry* 81 (2009), 1638–1645.
 22. Egdins B. R. *Chemical sensors and biosensors*. John Wiley & Sons, LTD (2008) 2-4

-
23. F.G Bănică, *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*. Chichester, John Wiley & Sons. ISBN 9781118354230. (2012) 576.
 24. V. Laurinavičius, *Biocheminiai analizės metodai*, Vilniaus universiteto leidykla (2012) 340.
 25. Internetinis puslapis http://www.diabetes.co.uk/diabetes_care/blood-sugar-level-ranges.html (žiūrėta 2014 05 11).
 26. V. Scognamiglio, *Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years*, *Biosensors and Bioelectronics* 47 (2013) 12–25.
 27. L.C. Clark, J.C. Lyons, *Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery*, *Annals of the New York Academy of Sciences* 102 (1) (1962) 29–45.
 28. Internetinis puslapis <http://www.crec.ifas.ufl.edu/academics/faculty/reyes/PDF/BiosensorsEAFBE.pdf> (žiūrėta 2014 05 13).
 29. Internetinės puslapis <http://www.icmfg.com/crystalfaq.html#q4> (žiūrėta 2014 05 13).
 30. E. Kress-Rogers, *Chemosensors, Biosensors and Immunosensors*. In *Instrumentation and Sensors for the Food Industry*, Kress-Rogers, E., Ed.; Woodhead Publishing Lmtd.: Cambridge, England (1998) 599–639.
 31. R. Vargas-Bernal, E. Rodríguez-Miranda, G. Herrera-Pérez, *Evolution and Expectations of Enzymatic Biosensors for Pesticides*, *Pesticides - Advances in Chemical and Botanical Pesticides*, Dr. R.P. Soundararajan (Ed.), ISBN: 978-953-51-0680-7, InTech, DOI: 10.5772/46227 (2012).
 32. Internetinis puslapis <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/amperometric.html> (žiūrėta 2014 02 24).
 33. Internetinis puslapis <http://www.springerreference.com/docs/html/chapterdbid/66260.html> (žiūrėta 2014 05 16)
 34. Internetinis puslapis <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/amperometric.html> (žiūrėta 2014 05 16)
 35. D. Mickevičius, *Cheminės analizės metodai (1 dalis)*, Vilnius, Žiburio leidykla (1999) 56–59.
 36. M. Pravda, *Part II Biosensors*, Ph.D. Thesis (1998) 22–32, 56–58.

-
37. Internetinis puslapis:http://www.wsi.tum.de/Portals/0/Media/Lectures/20082/98f31639-f453-466d-bbc2-a76a95d8dead/BiosensorsBioelectronics_lecture6.pdf (žiūrėta 2014 05 19).
38. M. Worsfold, M. J. Marshall, E. B. Ellis, Enzyme detection using phenazine methosulphate and tetrazolium salts: Interference by oxygen, *Analytical Biochemistry*, 79 (1-2) (1977) 152–156.
39. H. Liu, Z. Zhanen, Z. Xiaolin, Q. Deyao, Y. Liu, T. Yu, J. Deng, A phenazine methosulphate-mediated sensor sensitive to lactate based on entrapment of lactate oxidase and horseradish peroxidase in composite membrane of poly(vinyl alcohol) and regenerated silk fibroin, *Electrochimica Acta* 42(3) (1997) 349–355.
40. A. F. Neto, A. C. Pelegrino, V. A. Darin, Ferrocene: 50 Years of Transition Metal Organometallic Chemistry – From Organic and Inorganic to Supramolecular Chemistry, *ChemInform* 35 (43) (2004).
41. D. Sung, S. Yang, Facile method for constructing an effective electron transfer mediating layer using ferrocene-containing multifunctional redox copolymer, *Electrochimica Acta* 133 (2014) 40–48.
42. O. Karagollua, M. Gorurb, F. Godea, B. Sennikb, F. Yilmaz, Phosphate ion sensors based on triazole connected ferrocene moieties, *Sensors and Actuators B* 193 (2014) 788–798.
43. J. H. Pazur, K. Kleppe, The oxidation of glucose and related compounds by glucose oxidase from *Aspergillus niger*, *Biochemistry* 3 (1964) 578–583.
44. G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Third Edition (2013) 955.
45. R.A. Sheldon, R. Schoevaart, L. van Langen, A novel method for enzyme immobilization, *Biocatalysis and Biotransformation* 23(3/4) (2005) 141–147.
46. R.A. Sheldon, M.J. Sorgedraeger, M.H.A. Janssen, Use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) for performing biotransformations, *Chemistry Today* 25 (2007) 62–67.
47. M.F. Cardosi, A.P.F. Turner, The realization of electron transfer from biological molecules to electrodes, in *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, New York, 1987, 257–269.
48. J. Voronovič, Skirtingo dydžio aukso nanodalelių ir polipirolo taikymas gliukozės biologiniuose jutikliuose, *Baigiamasis darbas magistro laipsniui įgyti*, Vilnius (2009).

-
49. M. Zelzer, *Smart Polymers and their Applications, Enzyme-responsive polymers: properties, synthesis and applications*, Woodhead Publishing Limited, ISBN: 978-0-85709-695-1 (2014) 166–203.
50. M. Amounas, Ch. Innocent, S. Cosnier, P. Seta, A membrane based reactor with an enzyme immobilized by an avidin–biotin molecular recognition in a polymer matrix, *Journal of Membrane Science* 176(2) (2000) 169–176.
51. S.D. Uzun, N.A. Unlu, M. Sendur, F.E. Kanik, S. Timur, L. Toppare, A novel promising biomolecule immobilization matrix: Synthesis of functional benzimidazole containing conducting polymer and its biosensor applications, *Colloids and Surfaces B: Biosurfaces* 112 (2013) 74–80.
52. F. Scholz, *Conducting Polymers: A New Era in Electrochemistry. Monographs in Electrochemistry*. Springer. ISBN 978-3-540-75929-4 (2008) 1-6.
53. M.G. Loudon, *Chemistry of Naphthalene and the Aromatic Heterocycles. Organic Chemistry (Fourth ed.)*. New York: Oxford University Press. ISBN 0-19-511999-1 (2002) 1135–1136.
54. T.V. Vernitskaya, O.N. Efimov, Polypyrrole: a conducting polymer; its synthesis, properties and applications, *Russian Chemical Reviews* 66 (5) (1997) 443.
55. R. McNeill, R. Siudak, J.H. Wardlaw, D.E. Weiss, Electronic Conduction in Polymers - I. The Chemical Structure of Polypyrrole, *Australian Journal of Chemistry* 16 (1963) 1056–1075.
56. E. H. Yu, K. Sundmacher, Enzyme Electrodes for Glucose Oxidation by Electropolymerization of Pyrrole, *Process Safety and Environmental Protection* 85(5) (2007) 489–493.
57. B. Ding, X. Lu, Ch. Yuan, S. Yang, Y. Han, X. Zhang, Q. Che, One-step electrochemical composite polymerization of polypyrrole integrated with functionalized graphene/carbon nanotubes nanostructured composite film for electrochemical capacitors, *Electrochimica Acta* 62 (2012) 132–139.
58. X. Du, X. Hao, Zh. Wang, X. Ma, G. Guan, A. Abuliti, G. Ma, Sh. Liu, Highly stable polypyrrole film prepared by unipolar pulse electropolymerization method as electrode for electrochemical supercapacitor, *Synthetic Metals*, 175 (2013) 138–145.
59. A.G. MacDiarmid, Synthetic metals: A novel role for organic polymers (Nobel Lecture), *Angew. Chem., Int. Ed.* 40 (2001) 2581–2590.

-
60. H.C. Kang, K.E. Geckeler, Enhanced electrical conductivity of polypyrrole prepared by chemical oxidative polymerization: effect of the preparation technique and polymer additive, *Polymer*, 41(18) (2000) 6931–6934.
61. R.H. Baughman, Playing Nature's Game with Artificial Muscles, *Science* 308 (2005) 63–65.
62. W. Zheng, J.M. Razal, G.M. Spinks, V.T. Truong, P.G. Whitten, G.G. Wallace, The role of unbound oligomers in the nucleation and growth of electrodeposited polypyrrole and method for preparing high strength, high conductivity films, *Langmuir* 28 (2012), 10891–10897.
63. R.J. Mortimer, Electrochromic Materials, *Annual Review of Materials Research* 41 (2011) 241–268.
64. internetinė svetainė - <http://condutiva.com.br/en/index.php?sec=07> (žiūrėta 2014 04 03)
65. M. Takakubo, Molecular orbital study of the initial processes in the electrochemical polymerizations of pyrrole, thiophene and furan, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 258 (1989) 303–311.
66. A. A. Kariakin, O. A. Bobrova, L. V. Lukachova, E. E. Karyakina, Potentiometric biosensors based on polyaniline semiconductor films, *Sensors and Actuators B* 33 (1996) 33–39.
67. J. Zhou, J. Ralston, R. Sedev, D.A. Beattie, Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability, *Journal of Colloid and Interface Science* 331 (2009) 251–262.
68. Internetinis puslapis - <http://www.sciencedaily.com/articles/n/nanoparticle.htm> (žiūrėta 2014 05 10)
69. Internetinis puslapis - <http://www.news-medical.net/health/Nanoparticles-What-are-Nanoparticles.aspx> (žiūrėta 2014 05 10)
70. D.A. Handley, *Colloidal Gold. Principles, Methods, and Applications*, vol. 1, Academic Press, New York (1989).
71. E. Gaffet, M. Tachikart, O. ElKedim, R. Rahouadj, Nanostructural materials formation by mechanical alloying: Morphologic analysis based on transmission and scanning electron microscopic observations, *Materials Characterization* 36 (1996) 185–190.
72. R. C. Jaeger, *Introduction to Microelectronic Fabrication* (2nd ed.), Film Deposition, Upper Saddle River: Prentice Hall (2002).

-
73. N. Toshima, T. Yonezawa, Bimetallic nanoparticles-novel materials for chemical and physical applications, *New Journal of Chemistry* 22 (1998) 1179–1201.
74. J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of the Faraday Society*, 11 (1951) 55–75.
75. G. Frens, Particle size and sol stability in metal colloids, *Colloid & Polymer Science*, 250 (1972) 736–741.
76. J. Rothe, J. Hormes, H. Bonnemann, W. Brijoux, K. Siepen, In situ X-ray absorption spectroscopy investigation during the formation of colloidal copper, *Journal of the American Chemical Society* 120 (1998) 6019–6023.
77. M. Hostetler, J. Wingate, C. Zhong, J. Harris, R. Vachet, N. Evans, R. Murray, Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size, *Langmuir* 14 (1998) 17–30.
78. M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. Schiffrin, R. Whyman, Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* (1994) 801–802.
79. H. Bonnemann, R.M. Richards, Nanoscopic Metal Particles – Synthetic Methods and Potential Applications, *European Journal of Inorganic Chemistry* (2001) 2455–2480.
80. S.D. Perrault, W.C.W. Chan, Synthesis and surface modification of highly monodispersed, spherical gold nanoparticles of 50-200 nm, *Journal of American Chemical Society*, 131(47) (2009) 17042–17043.
81. J.R. Navarro, F. Lerouge, C. Cepraga, G. Micouin, A. Favier, D. Chateau, M.T. Charreyre, P.H. Lanoë, C. Monnereau, F. Chaput, S. Marotte, Y. Leverrier, J. Marvel, K. Kamada, C. Andraud, P.L. Baldeck, S. Parola, Nanocarriers with ultrahigh chromophore loading for fluorescence bio-imaging and photodynamic therapy, *Nanomaterials* 34(33) (2013) 8344–8351.
82. J. Zhang, J. Du, B. Han, Zh. Liu, T. Jiang, Zh. Zhang, Sonochemical formation of single-crystalline gold nanobelts, *Angewandte Chemie* 118(7) (2006) 1134–1137.
83. N.A. Shipway, E. Katz, I. Willner, Nanoparticle arrays on surfaces for Electronics, optical and sensors application, *ChemPhysChem* 1 (2000) 18–52.

-
84. P.C. Hiemenz, R. Rajagopalan, Principles of Colloid and Surface Chemistry, third ed., Marcel Dekker, New York (1997) 123–125.
85. J. Israelachvili, Intermolecular & Surface Forces, Second Edition, Academic Press Limited, London, (1991) 86–89.
86. J.H. Lyklema, Fundamentals of Interface and Colloid Science, in: Particulate Colloids, vol. IV, Elsevier/Academic Press, Amsterdam (2005) 56–57.
87. T. Cosgrove, Colloid Science: Principles, Methods and Applications, Blackwell Publishing, Oxford, ISBN-10: 1-4051-2673-6 (2005), 36-45, 111-117.
88. E. Ruckenstein, M. Manciu, Specific ion effects via ion hydration: II. Double layer interaction, Advances in Colloid and Interface Science 105 (2003) 177–200.
89. Y.H. Jang, L.C. Sowers, T. Cagin, W.A. Goddard, First principles calculation of pKa values for 5-substituted uracils, Journal of Physical Chemistry A 105 (2001) 274–280.
90. J. Zhou, D. Beattie, J. Ralston, R. Sedev, Colloid Stability of Thymine Functionalized Gold Nanoparticles, Langmuir 23 (24) (2007) 12096–12103.
91. J. H. Lyklema, Fundamentals of Interface and Colloid Science, in: Particulate Colloids, vol. IV, Elsevier/Academic Press, Amsterdam (2005) 15–17.
92. K. K. Jain, Applications of Nanobiotechnology in Clinical Diagnostics, Clinical Chemistry 53 (2007) 2002–2009.
93. X. Zhang, Q. Guo, D. Cui, Recent Advances in Nanotechnology Applied to Biosensors Sensors 9(2) (2009) 1033–1053.
94. R. Rotomskis, V. Karabanovas, V. Poderys, S. Bagdonas, J. Didžiapetrienė, Įvadas į nanomediciną, Mokomoji knyga, VU Onkologijos institutas (2008) 214–280.
95. S. Zhang, N. Wang, H. Yu, Y. Niu, C. Sun, Covalent attachment of glucose oxidase to an Au electrode modified with gold nanoparticles for use as glucose biosensor, Bioelectrochemistry 67(1) (2005) 15–22.
96. W. Shi, Y. Sahoo, M.T. Swihart, Gold nanoparticles surface-terminated with bifunctional ligands, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 246 (2004) 109–113.

-
97. J.I. Yeh, M.B. Zimmt, A.L. Zimmerman, Nanowiring of a redox enzyme by metallized peptides, *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2005) 973–978.
98. A. Kaushik, R. Khan, P.R. Solanki, P. Pandey, J. Alam, S. Ahmad, B.D. Malhotra, Iron oxide nanoparticles–chitosan composite based glucose biosensor, *Biosensors and Bioelectronics* 24(4) (2008) 676–683.
99. W. Noura, A. Maaref, H. Elaissari, F. Vocanson, M. Siadat, N. Jaffrezic-Renault, Comparative study of conductometric glucose biosensor based on gold and on magnetic nanoparticles, *Materials Science and Engineering C* 33 (2013) 298–303.
100. K.K. Jain, Current status of molecular biosensors, *Medical Device Technology* 14 (2003) 10–15.
101. Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J.F. Hainfeld, I. Willner, "Plugging into Enzymes": nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle, *Science* 299 (2003) 1877–1881.
102. M. Schierhorn, S.J. Lee, S.W. Boettcher, G.D. Stucky, M. Moskovits, Metal–Silica Hybrid Nanostructures for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Advanced Materials* 18 (2006) 2829–2832.
103. H. Cai, Y. Xu, N. Zhu, P. He, Y. Fang, An electrochemical DNA hybridization detection assay based on a silver nanoparticle label, *Analyst* 127 (2002) 803–808.
104. X. Luo, A. Morrin, A.J. Killard, M.R. Smyth, The application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors, *Electroanalysis* 18 (2006) 319–326.
105. L. He, M.D. Musick, S.R. Nicewarner, F.G. Salinas, S.J. Benkovic, M.J. Natan, C.D. Keating, Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of DNA hybridization, *Journal of the American Chemical Society* 122 (2000) 9071–9077.
106. T. Liu, J. Tang, L. Jiang, The enhancement effect of gold nanoparticles as a surface modifier on DNA sensor sensitivity, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313 (2004) 3–7.
107. S. Bharathi, M. Nogami, A glucose biosensor based on electrodeposited biocomposites of gold nanoparticles and glucose oxidase enzyme, *Analyst* 126 (2001) 1919–1922.

-
108. X.L. Luo, J.J. Xu, Y. Du, H.Y. Chen, A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition, *Analytical Biochemistry* 334 (2004) 284–289.
109. W. Yang, J. Wang, Sh. Zhao, Y. Sun, Ch. Sun, Multilayered construction of glucose oxidase and gold nanoparticles on Au electrodes based on layer-by-layer covalent attachment, *Electrochemistry Communications* 8 (2008) 665–672.
110. Y. Lia, H.J. Schluesenerb, S. Xua, Gold nanoparticle-based biosensors, *Gold Bulletin* 43(1) (2010) 29–41.
111. R. Rotomskis, V. Karabanovas, V. Poderys, S. Bagdonas, J. Didžiapetrienė, Įvadas į nanomediciną, *Biofotonika ir Nanofotonika, VU Onkologijos institutas* (2008) 97–98.
112. D. Guo, G. Xie, J. Luo, Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications 47 (2014) doi:10.1088/0022-3727/47/1/013001.
113. A. Curulli, G. Palleschi, Electropolymerization of Pyrrole-2-Carboxylic Acid and 4,4'-Dihydroxybenzophenone on Platinum Electrodes. Applications to Assemble Novel Glucose Sensors, *Electroanalysis* 9(14) (1997) 1107–1111.
114. H. H. Denga, Ch. L. Wuc, A. L. Liua, G. W. Li, W. Chen, X. H. Lina, Colorimetric sensor for thiocyanate based on anti-aggregation of citrate-capped gold nanoparticles, *Sensors and Actuators B: Chemical* 191 (2014) 479–484.
115. X. Luo, A. Morrin, A.J. Killard, M.R. Smyth, Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors, *Electroanalysis* 18 (2006) 319–326.
116. Y. G. Zhou, S. Yang, Q. Y. Qian, X. H. Xia, Gold nanoparticles integrated in a nanotube array for electrochemical detection of glucose, *Electrochemical Communications* 11 (2009) 216–219.
117. T. Hoshi, N. Sagae, K. Daikuhara, K. Takahara, J. Anzai, Multilayer membranes via layer-by-layer deposition of glucose oxidase and Au nanoparticles on a Pt electrode for glucose sensing, *Materials Science and Engineering: C* 27 (2007) 890–894.
118. S. Zhao, K. Zhang, Y. Bai, W. Yang, C. Sun, Glucose oxidase/colloidal gold nanoparticles immobilized in Nafion film on glassy carbon electrode: direct electron transfer and electrocatalysis, *Bioelectrochemistry* 69 (2006) 158–163.

-
119. Y. Xiao, H. X. Ju, H. Y. Chen, Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase-labeled Au colloids immobilized on gold electrode surface by cysteamine monolayer, *Analytica Chimica Acta* 391 (1999) 73–82.
120. A. Ramanaviciene, G. Nastajute, V. Snitka, A. Kausaite, N. German, D. Barauskas-Memenas, A. Ramanavicius, Spectrophotometric evaluation of gold nanoparticles as red-ox mediator for glucose oxidase, *Sensors and Actuators B* 137 (2009) 483–489.
121. A. Ramanavicius, Amperometric biosensor for the determination of creatine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (2007) 1899–1906.
122. A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene, Hemoproteins in design of biofuel cells, *Fuel Cells* 9 (2009) 25–36.
123. Ch. Bunte, L. Hussein, G. A. Urban, Performance of non-compartmentalized enzymatic biofuel cell based on buckypaper cathode and ferrocene-containing redox polymer anode, *Journal of Power Sources* 247 (2014) 579–586.
124. M. Onda, Y. Lvov, K. Ariga, T. Kunitake, Sequential actions of glucose oxidase and peroxidase in molecular films assembled by layer-by-layer alternate adsorption, *Biotechnology and Bioengineering* 51 (1996) 163–167.
125. S. Liu, H. Ju, Reagentless glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase immobilized on colloidal gold modified carbon paste electrode, *Biosensors and Bioelectronics* 19 (2003) 177–183.
126. D. Li, Q. He, Y. Cui, L. Duan, J. Li, Immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles with enhanced thermostability, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 355 (2007) 488–493.
127. S. Thibault, H. Aubriet, C. Arnoult, D. Ruch, Gold nanoparticles and a glucose oxidase based biosensor an attempt to follow-up aging by XPS, *Microchimica Acta* 63 (2008) 211–217.
128. H. Wang, X. Wang, X. Zhang, X. Qin, Z. Zhao, Z. Miao, N. Huang, Q. Chen, A novel glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles-modified Pb nanowires, *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2009) 142–146.
129. A. Ramanavicius, A. Kausaite, A. Ramanaviciene, J. Acaite, A. Malinauskas, Redox enzyme – glucose oxidase – initiated synthesis of polypyrrole, *Synthetic Metals* 156 (2006) 409–413.

-
130. C. Ozdemir, F. Yeni, D. Odaci, S. Timur, Electrochemical glucose biosensing by pyranose oxidase immobilized in gold nanoparticle-polyaniline/AgCl/gelatin nanocomposite matrix, *Food Chemistry* 119 (2010) 380–385.
131. J. Wang, Nanomaterials-based electrochemical biosensors, *Analyst* 130 (2005) 421–426.
132. Y. Du, X.L. Luo, J.J. Xu, H.Y. Chen, A simple method to fabricate a chitosan-gold nanoparticles film and its application in glucose biosensor, *Bioelectrochemistry* 70 (2007) 342–347.
133. J. Wang, L. Wang, J. Di, Y. Tu, Disposable biosensor based on immobilization of glucose oxidase at gold nanoparticles electrodeposited on indium tin oxide electrode, *Sensors and Actuators B* 135 (2008) 283–288.
134. X. Chu, D. X Duan, G.L. Shen, R. Q. Yu, Amperometric glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto covalently immobilized carbon nanotube electrode, *Talanta* 71 (2007) 2040–2047.
135. M. L. Mena, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, A comparison of different strategies for the construction of amperometric enzyme biosensors using gold nanoparticle-modified electrodes, *Analytical Biochemistry* 336 (2005) 20–27.
136. Q. Wana, H. Songa, H. Shua, Zh. Wanga, J. Zoua, N. Yangb, In situ synthesized gold nanoparticles for direct electrochemistry of horseradish peroxidase, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 104 (2013) 181–185.
137. B. Wang, X. Ji, H. Zhao, N. Wang, X. Li, R. Ni, Y. Liu, An amperometric β -glucan biosensor based on the immobilization of bi-enzyme on Prussian blue–chitosan and gold nanoparticles–chitosan nanocomposite films, *Biosensors and Bioelectronics* 55 (2014) 113–119.
138. X. Cui, J. Wiler, M. Dzaman, R.A. Altschuler, D.C. Martin, In vivo studies of polypyrrole/peptide coated neutral probes, *Biomaterials* 24 (2003) 777–787.
139. E.J. Oh, K.S. Jang, A.G. MacDiarmid, High molecular weight soluble polypyrrole, *Synthetic Metals* 125 (2002) 267–272.
140. S. Zhang, N. Wang, H. Yu, Y. Niu, C. Sun, Covalent attachment of glucose oxidase to an Au electrode modified with gold nanoparticles for use as glucose biosensor, *Bioelectrochemistry* 67 (2005) 15–22.

-
141. C. Fernandez-Sanchez, T. Tzanov, G.M. Gubitz, A. Cavaco-Paulo, Voltammetric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions, *Bioelectrochemistry* 58 (2002) 149–156.
142. T. Semashko, R. Mikhailova, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Specificity of glucose oxidase from *Penicillium funiculosum* 46.1 towards some redox mediators, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171(7) (2013) 1739–1749.
143. T. Semashko, R. Mikhailova, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Specificity of glucose oxidase from *Penicillium funiculosum* 46.1 towards some redox mediators, *Analytical Biochemistry and Biotechnology* 171 (2013) 1739–1749.
144. M.J. Rogers, K.G. Brandt, Multiple inhibition analysis of *Aspergillus niger* glucose oxidase by D-glucal and halide ions, *Biochemistry* 10(25) (1971) 4624–4630.
145. B. Wang, B. Li, Q. Deng, S. Dong, Amperometric glucose biosensor based on Sol-Gel organic-inorganic hybrid material, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 3170–3174.
146. J. Yu, D. Yu, T. Zhao, B. Zeng, Development of amperometric glucose biosensor through immobilizing enzyme in a Pt nanoparticles/mesoporous carbon matrix, *Talanta* 74 (2008) 1586–1591.
147. B.Y. Wu, S.H. Hou, F. Yin, Z.X. Zhao, Y.Y. Wang, X.S. Wang, Q. Chen, Amperometric glucose biosensor based on multilayer films via layer-by-layer self-assembly of multi-wall carbon nanotubes, gold nanoparticles and glucose oxidase on the Pt electrode, *Biosensors and Bioelectronics* 22(12) (2007) 2854–2860.
148. X. Chin, J. Chen, C. Deng, C. Xiao, Y. Yang, Z. Nie, S. Yao, Amperometric glucose biosensor based on boron-doped carbon nanotubes modified electrode, *Talanta* 76(4) (2008) 763–767.
149. X. Liu, L. Shi, W. Niu, H. Li, G. Xu, Amperometric glucose biosensor based on single-walled carbon nanohorns, *Biosensors and Bioelectronics* 23(12) (2008) 1887–1890.
150. M.J. Green, H.A. Hill, Amperometric enzyme electrodes, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 82 (1986) 1237–1243.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo moksliniams vadovams doc. dr. Almirai Ramanavičienei ir prof. habil. dr. Arūnui Ramanavičiui už suteiktas žinias, visokeriopą paramą ir pagalbą ruošiant disertacinį darbą bei atliekant eksperimentus studijų doktorantūroje metu.

Dėkoju dr. Natalijai German už pagalbą atliekant amperometrinius eksperimentus bei patarimus interpretuojant duomenis.

Dėkoju dokt. Linai Mikoliūnaitei už pagalbą atliekant eksperimentus su atominių jėgų mikroskopu bei patarimus interpretuojant gautus duomenis.

Nuoširdžiai dėkoju visiems Vilniaus Universiteto Chemijos fakulteto Analizinės ir aplinkos chemijos katedros Nanotechnologijų ir medžiagotyros centro „NanoTechnas“ kolegoms už visokeriopą pagalbą, kantrybę, supratingumą ir darbinę atmosferą.

Esu dėkingas visiems VMTI Inovatyvios medicinos centro kolegoms už pagalbą bei patarimus atliekant eksperimentus, o taip pat už suteiktą galimybę atliktį dalį eksperimentų.

Dalis tyrimų buvo atliekama dalyvaujant pagal tarptautinę sutartį vykdomame Lietuvos Mokslo Tarybos finansuojamame projekte “Redoks fermentų taikymas naujuose biokuro elementuose“ su Baltarusijos Mikrobiologijos institutu. Dėkoju kolegoms iš Baltarusijos už mokslines diskusijas bei pagalbą atliekant tyrimus ir interpretuojant duomenis.

Taip pat, esu dėkingas Lietuvos Mokslo Tarybai už finansinę paramą.

Nuoširdžiai dėkoju tėvams ir visiems artimiesiems už paramą ir didžiulę kantrybę. Be jų palaikymo šio disertacinio darbo iš vis nebūtų.