

Sinteza nanočestica cinkovih oksida korištenjem enzima ureaze kao katalizatora

Burštinski, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:484262>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Martina Burštinski

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Martina Burštinski

**SINTEZA NANOČESTICA CINKOVIH OKSIDA KORIŠTENJEM ENZIMA
UREAZE KAO KATALIZATORA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

Članovi ispitnog povjerenstva:

izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

dr. sc. Martina Sudar, znanstveni suradnik

izv. prof. dr. sc. Jelena Macan

Zagreb, rujan 2016.



Završni rad Martine Burštinski financirala je Hrvatska zaklada za znanost u okviru uspostavne istraživačke potpore: UIP-2014-09-1534 Sinteza i ciljana primjena metalnih nanočestica.

Srdačno zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki na pomoći, strpljenju, ljubaznosti i uloženom trudu prilikom izrade ovog rada. Također se posebno zahvaljujem Leli Pintarić na savjetima i velikodušnoj pomoći prilikom provođenja eksperimentalnog dijela i izrade ovog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i Ernestu na neizmjenoj podršci, razumijevanju i susretljivosti tijekom studiranja.

SAŽETAK

U ovom radu provedena je sinteza nanočestica s ljuskom od cinkovog oksida i jezgrom od enzima ureaze.

Sinteza nanočestica cinkovih oksida se provodila se u redestiliranoj vodi pri različitim koncentracijama cinka i uree pri temperaturi $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ uz istu koncentraciju ureaze. Kinetika brzine taloženja enzima ureaze opisana je kinetikom prvog reda za koju je utvrđeno da dobro opisuje gotovo sve reakcije.

Istaložene nanočestice cinkovog oksida su karakterizirane pomoću optičkog mikroskopa.

Ključne riječi: enzimi, ureaza, nanočestice, cink, cinkov oksid

ABSTRACT

In this study synthesis of core shell nanoparticles with the core of enzyme urease and the shell of zinc was carried out.

The synthesis of zinc oxide nanoparticles was carried out in redistilled water with different concentrations of zinc and urea at temperature $T = 25^{\circ}\text{C}$, and with the same concentration of urease. The rate of enzyme precipitation was described by the first order kinetics. This kinetic described well almost all experiments.

Synthesized zinc oxide nanoparticles were characterized using the optical microscope.

Keywords: enzyme, urease, nanoparticles, zinc

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. NANOČESTICE.....	2
2.2. CORE-SHELL NANOČESTICE.....	3
2.2.1. Anorganske core-shell nanočestice	4
2.2.2. Organske core-shell nanočestice	4
2.5. ENZIMI.....	7
2.5.1. Ureaza.....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. APARATURA.....	11
3.1.1. Kotlasti reaktor.....	11
3.1.2. Spektrofotometar.....	11
3.1.3. Centrifuga	12
3.1.4. Optički mikroskop.....	13
3.2. ANALITIČKE METODE	13
3.2.1. Određivanje koncentracije proteina.....	13
3.2.3. Određivanje koncentracije amonijevih iona.....	14
3.3. SINTEZA NANOČESTICA.....	15
3.3.1. Sintaza nanočestica cinka.....	15
3.4. MODELIRANJE SINTEZE NANOČESTICA	16
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	18
4.1. SINTEZA NANOČESTICA CINKA.....	18
4.2. KARAKTERIZACIJA NANOČESTICA POMOĆU OPTIČKOG MIKROSKOPA.....	22
5. ZAKLJUČAK.....	24
6. POPIS SIMBOLA I KRATICA.....	25
7. LITERATURA	26
8. PRILOZI	28
9. ŽIVOTOPIS.....	29

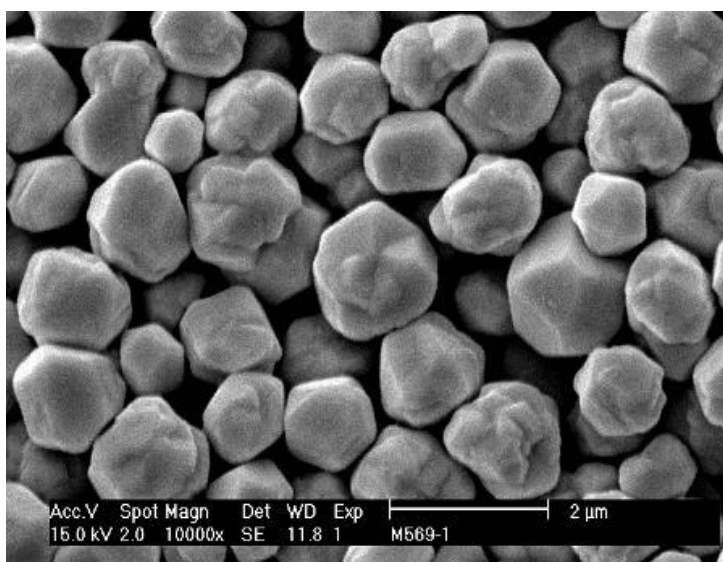
1. UVOD

Nanoznanost i nanotehnologija se bave istraživanjem sinteze i primjenom materijala izuzetno malih dimenzija, te manipulacijom njihovih atoma i molekula na atomskoj i molekularnoj razini. Takvi materijali se mogu koristiti u svim drugim znanstvenim područjima kao što su kemija, biologija, fizika, znanost o materijalima i inženjerstvu. Osim toga nanočestice se koriste i u dijagnostici, kremama za sunčanje, dezinficijensima, procesima koji smanjuju količinu otpadnih materijala i slično. Nanočesticama se smatraju sve čestice promjera 1-100 nm. Nanočestice često imaju neočekivana optička svojstva s obzirom da su dovoljno malene da zadrže svoje elektrone i proizvedu kvantne efekte. Postoje razne vrste nanočestica kao što su metalne, dielektrične, nanočestice poluvodiča, core-shell nanočestice pri kojima je jezgra enzim a vanjski omotač metal, oksid ili neki drugi organski ili anorganski spoj, polučvrste i mekane nanočestice te nanočestice kojima je jedna polovica hidrofilna a druga hidrofobna, koje se nazivaju Janus čestice i posebno su učinkovite za stabiliziranje emulzija. U ovom radu govorimo o core-shell nanočesticama cinkovog oksida čija je jezgra enzim ureaza. Cinkov oksid je zanimljiv poluvodič sa svojim jedinstvenim kemijskim i fizičkim svojstvima, kao što su visoka kemijska stabilnost, širok spektar apsorpcije zračenja i visoke fotostabilnosti zbog čega se često koristi za solarne ćelije, senzore plina, kao katalizator, u kozmetici, otpornicima i tako dalje. Nanočestice cinkovog oksida su dobile široku pozornost zbog njihove izvanredne koristi u elektronici, optici i mehanici i kao takve su postale ključni tehnološki materijal. Zbog nedostatka asimetrije u strukturi u kombinaciji s velikom mogućnošću transformacije električnih impulsa u mehanički rad, nanočestice imaju velika piezoelektrična i piroelektrična svojstva. Možemo očekivati da će se u budućnosti nanotehnologija vrlo brzo razvijati. Znanstvenici provode sve više istraživanja oko toga kako nam novi materijali i dostignuća mogu pomoći u očuvanju energije, prevenciji onečišćenja i sanaciji, prevenciji i ranom otkrivanju bolesti, liječenju i u mnogim drugim područjima osim u medicini i zaštiti okoliša. Osim toga znanstvenici provode istraživanja o tome koliko negativno nanočestice mogu utjecati na ljudsko zdravlje, točnije na bolesti pluća i kako to spriječiti.

2. OPĆI DIO

2.1. NANOČESTICE

Nanočestice (slika 1) su dio nanomaterijala koje se definiraju kao pojedinačne čestice promjera 1-100 nm. U zadnjih par godina nanočestice su se koristile za izradu najnovije tehnologije u komunikaciji, skladištenju energije, sensorima, pohrani podataka, optici, zaštiti okoliša, kozmetici, biologiji i medicini uslijed njihovih važnih optičkih, električnih i magnetskih svojstava. Jedinstvena svojstva i korist nanočestica proizlaze iz različitih karakteristika, uključujući i sličnost veličina nanočestica i biomolekula kao što su proteini i polinukleinske kiseline.



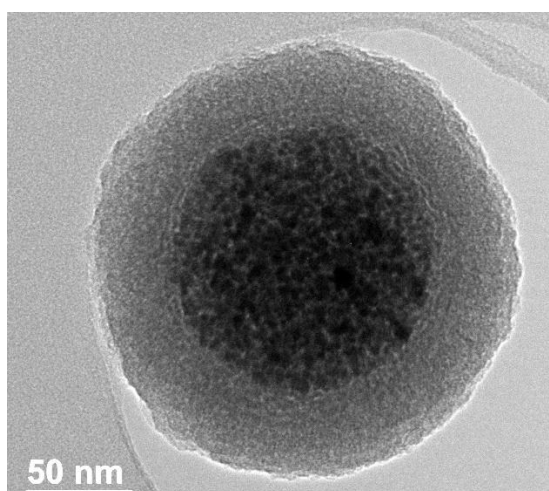
Slika 1. Nanočestice

Nanočestice mogu biti sintetizirane s velikim izborom metala i core-shell poluprovodnih materijala koji omogućuju korisna svojstva kao što su fluorescencija i magnetska svojstva. Povrh toga, za razliku od drugih nanomaterijala, nanočestice imaju umanjenu veličinu povezanu s visokim omjerom površine i volumena koji raste kako se njihova veličina smanjuje. Kad se veličina nanočestice smanji do određene mjere, velik broj drugih atoma se može naći uz površinu nanočestice, što nanočesticu čini vrlo reaktivnom s istaknutim fizičkim svojstvima. Zbog toga što nanočestice pojedinih materijala pokazuju jedinstvena svojstva, manipulacija i kontrola tih svojstava je nužno potrebna. Sinteza nanočestica pomoću jednostavnih sintetskih načina uzrokuje probleme u rastu nanočestica zbog njihovih jednoličnih oblika i veličina. U posljednjih desetak godina, znanstvenici su bili uključeni u razvoj novih sintetskih puteva koji

omogućuju preciznu kontrolu morfologije i veličine nanočestica. Sinteza nanočestica je moguća putem kapljevito (kemijskim postupkom), čvrstog i plinovitog medija, no zbog nekoliko prednosti nad drugim metodama, kemijski postupak je najpopularniji zbog svoje niske cijene, pouzdanosti i ekološke prihvatljivosti, a ta metoda omogućuje i strogu kontrolu veličine i oblika nanočestica. Prilikom sinteze nanočestima, malih dimenzija, s velikim omjerom površine i volumena javlja se aglomeracija malih čestica u otopini ukoliko nedostaje stabilizator. U tom pogledu sinteza stabilnih koloida je važna za rast nanočestica. Nanočestice se općenito stabiliziraju steričkim odbijanjima između čestica u prisutnosti surfaktanata, polimernih molekula ili organskih molekula vezanih na površini nanočestica. Ponekad i van der Waalsovo elektrostatičko odbijanje igra važnu ulogu u stabilizaciji nanočestica. Postoje razne vrste nanočestica kao što su metalne nanočestice, nanočestice metalnih oksida i polimerne nanočestice. Među njima nanočestice metalnih oksida se ističu kao jedan od najsvestranijih materijala zbog svojih različitih svojstava i funkcionalnosti.[2]

2.2. CORE-SHELL NANOČESTICE

Core-shell nanočestice (slika 2) se sastoje od jezgre (core) odnosno unutarnjeg materijala i ljuske (shell) odnosno vanjskog materijala. Mogu se sastojati od širokog raspona različitih kombinacija u neposrednoj interakciji kao što su anorganski/anorganski, anorganski/organski, organski/anorganski i organski/organski materijali. Izbor materijala za ljusku ovisi o primjeni i korištenju gotovog materijala.[4]



Slika 2. Core-shell nanočestica

Core-shell nanočestice su postale sve popularnije zbog svojih zanimljivih elektronskih svojstava. Ljuska pruža dodatnu promjenjivu varijablu i dopušta mogućnost kontrolirane promjene složenih svojstava čestica.[3] Core-shell nanočestice su vrlo funkcionalni materijali s modificiranim svojstvima. Ponekad svojstva koja proizlaze iz materijala jezgre ili ljuske mogu biti vrlo različita. Svojstva se mogu modificirati zamjenom materijala ili promjenom omjera jezgre i ljuske. Zbog ljuske svojstva jezgre kao što su reaktivnost ili toplinska stabilnost se mogu mijenjati, tako da se stabilnost nanočestice i disperzibilnost jezgre povećaju. Svrha ljuske na jezgri nanočestice je raznovrsna, sposobnost da se poveća funkcionalnost, stabilnost i mogućnost disperzije, kontrolirano oslobađanje jezgre, smanjenje potrošnje vrijednih materijala i slično.[4]

2.2.1. Anorganske core-shell nanočestice

Najčešće se primjenjuju anorganske core-shell nanočestice koje imaju ljusku od silicija. Osnovne prednosti silicij ljuske u usporedbi s drugim anorganskim premazima su smanjenje skupne vodljivosti i povećana stabilnost jezgre. Dodatno, silicij je kemijski inertan materijal, te može blokirati površinu jezgre bez uplitanja u reakciju. Silicij ljuska se također može koristiti za modulaciju položaja i intenziteta apsorpcije jer je silicij optički proziran. Kao rezultat toga, reakcije na jezgri površini se mogu spektroskopski proučavati. Osim silicija ljuske mogu biti i od metala, binarnih anorganskih kompozita, metalnih oksida i metalnih soli. Tehnike karakterizacije koje se koriste za ove core-shell nanočestice su SEM, TEM, AFM, XPS i UV spektroskopija.

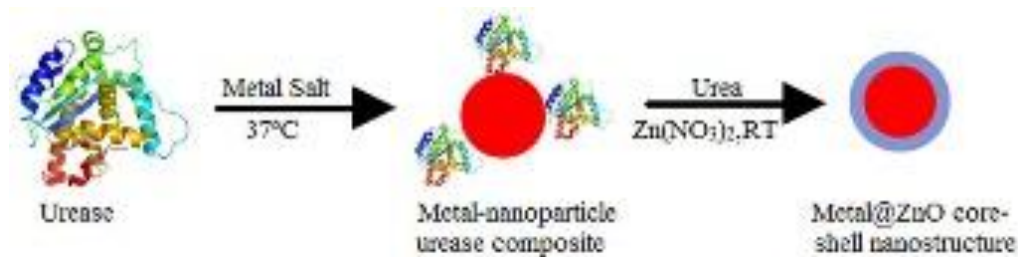
2.2.2. Organske core-shell nanočestice

U ovoj kategoriji, jezgra i ljuska čestice mogu biti sastavljeni od polimera ili nekog drugog organskog materijala. Ove nanočestice su poznate kao “pametne čestice” i imaju širok raspon primjene u različitim područjima kao što su biosenzori, ciljano dostavljane lijeka u organizmu, u procesima kemijskog razdvajanja, biomineralima i reakcijama katalize. Prednosti nanočestica s polimernom ljuskom je mijenjanje fizičkih svojstava cjelokupnog materijala kao što je žilavost i mehanička čvrstoća. Kad temperatura materijala prelazi temperaturu staklastog prijelaza mijenjaju se mehanička svojstva polimera od krtoeg prema elastičnom. Kod visokih

temperatura staklastog prijelaza jezgre materijala povećava mehaničku stabilnost dok pri nižim temperaturama poboljšava se sposobnost za formiranje filma.[4] Takvi materijali se obično sintetiziraju reakcijom polimerizacije za pripremu ljuske i/ili jezgre nanočestice. Osnovna strategija polimerizacije uključuje stvaranje trodimenzionalne mrežaste strukture dodatkom nekoliko monomernih jedinica s ključnim funkcijama. Iako se najčešće prvo sintetiziraju jezgre čestica, organske ljuske mogu biti pripremljene *in situ*. Dodatno, površinski aktivne tvari kao što su surfaktanti i polielektroliti se mogu koristiti za poboljšanje učinkovitosti i stabilnosti ljuske nanočestice.[12]

2.3. CORE SHELL NANOČESTICE S JEZGROM OD ENZIMA

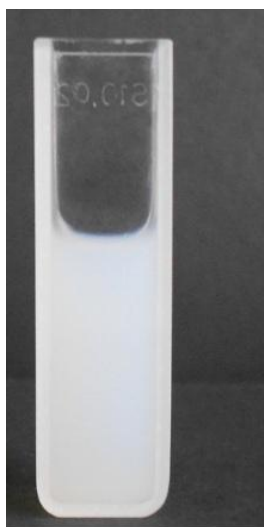
Core shell nanočestice s jezgrom od enzima su donedavno privukle veliki interes u bionanotehnologiji. Nanočestice s jezgrom od enzima se mogu sintetizirati enzimatskim procesom koji je daleko bolji od ostalih metoda sinteze, iako se kod ostalih metoda mogu dobiti velike količine nanočestica različitih veličina i oblika u relativno kratkom vremenu, takve metode su obično komplicirane, zastarjele, skupe, slabo učinkovite i proizvode opasni toksični otpad koji je štetan ne samo za okoliš, već i za ljudsko zdravlje. S enzimatskom sintezom smanjena je uporaba skupih kemikalija i ne troši toliko energije zbog čega je i ekološki prihvatljivija. Osim toga, zbog uvjeta u kojima bakterije žive, takve nanočestice imaju veću katalitičku aktivnost, specifičnu površinu i poboljšani kontakt između enzima kao jezgre i metala kao ljuske nanočestice.[13] Na slici 3 je prikazana sinteza cinkove core shell nanočestice s jezgrom od enzima ureaze. Takve nanočestice koriste se kao oznake za optičke senzore i kao katalitičke oznake za pojačane električne, elektrokemijske i mikrogravimetrijske analize. Osim toga, nedavni razvoj sinteze i karakterizacije core shell nanočestica je dovelo do većeg interesa za moguću uporabu nanočestica kao nositelja lijekova. Enzimi bi se mogli koristiti u terapijske svrhe zbog svoje jedinstvene specifičnosti i visoke razine aktivnosti, no enzimatski lijekovi su rjeđi od konvencionalnih zbog siromašne stabilnosti, potencijalne imunogenosti i sustavne toksičnosti. U određenim slučajevima uporaba enzima u obliku core shell nanočestica bi mogla pomoći u prevladavanju navedenih problema i poboljšati izgled za kliničku primjenu enzimskih lijekova.[14]



Slika 3. Sinteza cinkove core-shell nanočestice s jezgrom od enzima ureaze

2.4. NANOČESTICE CINKOVOG OKSIDA

Među različitim metalnim nanočesticama, nanočestice cinkovog oksida (slika 4) su važne zbog velikog područja primjene kao što su senzori za plin, kemijski i bio-senzori, kozmetika, skladištenje, optički i električni uređaji, materijali za zaslone, solarne ćelije itd.[2] Nanočestice cinkovog oksida se mogu sintetizirati kroz razne metode kontrolom parametara sinteze. Odabrana metoda ovisi o željenoj primjeni zbog toga što različite metode rezultiraju različitim morfologijama i veličinama nanočestica. Prema tome kemijski i fizikalni parametri poput vrste otapala, prekursora, pH i temperature se obavezno uzimaju u obzir.



Slika 4. Nanočestice cinkovog oksida

Svaka nanostruktura cinkovih nanočestica ima specifična strukturalna, optička, električna i fizikalno-kemijska svojstva koje omogućuju izvanredne primjene. Te nanostrukture su sintetizirane koristeći različite fizikalne i kemijske tehnike, međutim kemijske tehnike omogućuju bolje kontroliranje veličine čestica i morfologiju. Najviše usvojene metode sinteze su termičko isparavanje cinkovog praha na 1400°C, hidrotermalna sinteza, sol-gel tehnika,

jednostavna termalna sublimacija, samozapaljenje i složena metoda polimerizacije. Najčešće se primjenjuje sol-gel metoda (metoda otopinom) jer predstavlja jeftin i ekološki prikladan način sinteze. Različitim eksperimentima se dokazalo da oblik, veličina i homogenost nanočestica ovise o raznim uvjetima reakcija odnosno priroda liganda, relativna koncentracija reagensa, otapalo, ukupna koncentracija reagensa, vrijeme reakcije, vrijeme isparavanja i temperatura reakcije i isparavanja. Općenito, mehanizam sinteze cinkovih nanočestica uključuje tri koraka, nukleacija, rast i sazrijevanje. Molekule vode mogle bi biti odgovorne za fazu nukleacije reagiranjem s prekursorom pri čemu se formira jezgra. U procesu, većina prekursora ostane netaknuta nakon ove faze, a rast čestica se može dogoditi kad je otopina izložena vlazi i zraku. Kada se slična reakcija odvija u suhom zraku dolazi do aglomeracije cinkovih nanočestica pri čemu nemaju definirani oblik i veličinu.[1]

2.5. ENZIMI

Enzimi su molekule koje mogu smanjiti energiju aktivacije i na taj način ubrzati biokemijske reakcije (slika 5).[5] Enzimi pripadaju većoj biokemijskoj grani makromolekula koji se zovu proteini. Zajedno obilježje proteina je to da su oni polipeptidi: njihova struktura se sastoji od linearnog slijeda aminokiselina povezanih peptidnim vezama. Takav linearni polipeptidni lanac se zatim presavija pri čemu nastaje jedinstvena trodimenzionalna struktura.

Povijesno gledano, ljudi su koristili enzime prije tisuće godina, sve otkako je otkrivena fermentacija u starom Egiptu.[6] No uloga enzima u procesu fermentacije se otkrila prije manje od 200 godina. U pedesetim godinama prethodnog stoljeća Louis Pasteur je predstavio teoriju da se šećer pretvara u etanol u kvascu zbog "fermenata". Također je zaključio da se ti fermenti ne mogu odvojiti od živih stanica kvasca.[7] Izvanredna selektivnost enzimatske katalize je prepoznata 1894. godine, Emil Fischer je pokazao da enzim koji hidrolizira saharozu, kojeg je nazvao invertin, djeluje samo na α -D-glukozide, dok drugi enzim emulzin djeluje samo na β -D-glukozide. Zaključio je da se ta dva enzima moraju sastojati od asimetrično izgrađenih molekula i da enzim i glukozid moraju pristajati jedan drugome kao ključ i brava kako bi se reakcija uspješno provela.[6]

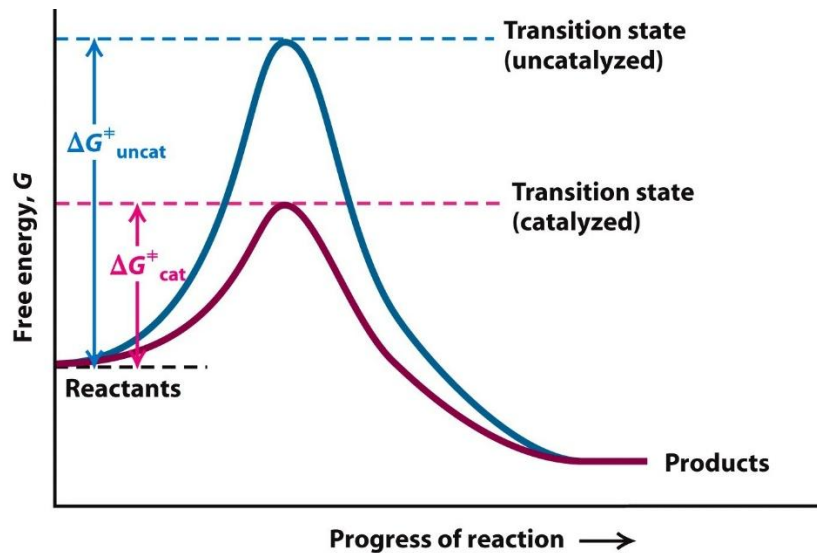
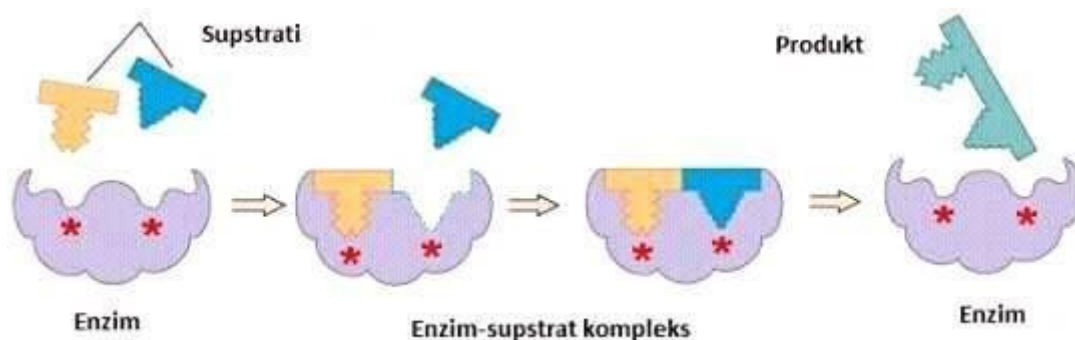


Figure 3-20
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Slika 5. Mehanizam reakcije

Općenito, porast temperature povećava aktivnost enzima. S obzirom da enzimi funkcioniraju u stanicama, najoptimalniji uvjeti za većinu enzima su umjerene temperature. Pri povišenim temperaturama, u određenom trenutku aktivnost se dramatično smanji kad se enzim denaturira. Inkubacija enzima kroz vrlo dug period također može uzrokovati denaturaciju enzima.

Većina enzima je jako osjetljiva na promjene u pH, samo par njih mogu optimalno funkcionirati kad je pH manji od 5 ili veći od 9.[7]



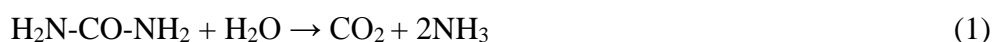
Slika 6. Teorija enzimske katalize na principu “ključ-brava”

Najpoznatiji primjer enzimske katalize je na principu ključ-brava (slika 6). Aktivno mjesto je obično hidrofilni rascjep ili šupljina koja sadrži niz bočnih lanaca aminokiselina koje se vežu na supstrat i provode enzimatsku reakciju. U nekim slučajevima enzim veže i jedan ili više kofaktora koji pomažu katalizirati posebne enzimatske reakcije. Postoje 4 vrste veza između enzima i supstrata: elektrostatske, vodikove, van der Waalsove i kovalentne veze. Nakon

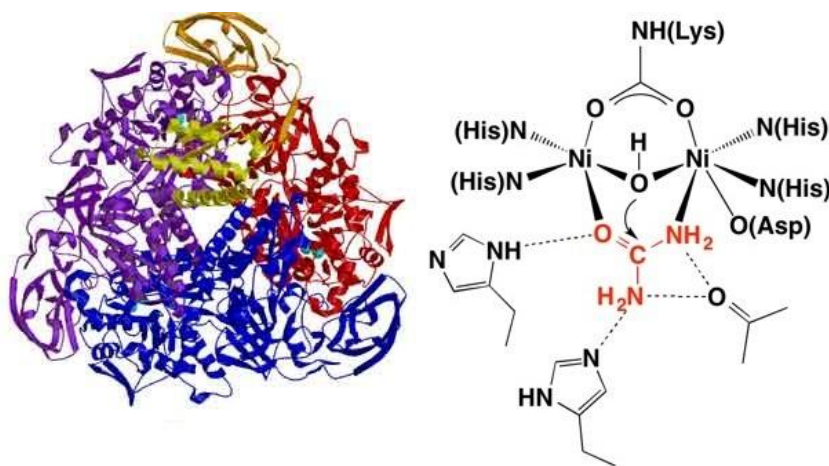
vezanja supstrata, enzim otpušta gotov produkt natrag u otopinu i može nastaviti svoje katalitičko djelovanje.[6]

2.5.1. Ureaza

Ureaza (slika 7) je enzim rasprostranjen u prirodi među biljkama, bakterijama, gljivicama, algama i beskraljčnjacima kojoj je funkcija hidroliza uree, pri čemu su gotovi produkti amonijak i ugljikov dioksid (jedin.1).[8] Reakcija hidrolize uree uz ureazu je otprilike 10^{14} puta brža od reakcije bez uree.



James B. Sumner je prvi izolirao ureazu kao kristalni protein iz graha 1926. godine što je odigralo ključnu ulogu u dokazivanju proteinske prirode enzima.[9] Ureaze pripadaju skupini amidohidrolaza i fosfotriestraza, njihovo zajedničko obilježje je prisutnost metalnog centra (niklov (II) ion) u njihovim aktivnim mjestima čiji je zadatak aktivirati substrat i vodu za reakciju.[8] Ioni nikla su čvrsto vezani na protein, međutim nikal može biti oslobođen od ureaze u kiselim uvjetima što dovodi do nepovratnog gubitka aktivnosti.



Slika 7. Trodimenzionalni i strukturni prikaz ureaze

Mnogi mehanizmi su predloženi za katalizu ureazom, najšire prihvaćen mehanizam se temelji na tome da se jedan niklov ion se veže i aktivira ureu dok se drugi veže i aktivira vodu. Nedavno S. L. Ciurli je 1999. godine predložio noviji mehanizam pri kojem urea ulazi u aktivno mjesto i zamjenjuje tri molekule vode tako da mjesto odgovara obliku i dimenzijama uree. Urea veže više elektrofilan nikal karbonilnom skupinom i približava se drugom niklu svojim amino

skupinama.[9] Imobilizirana ureaza se rutinski koristi u medicini za dijagnozu i liječenje različitih bolesti. Procijenjeno je da nastali amonijak toksično djeluje na stanice tumora, također smanjuje hipertenziju i koristi se kao antigen u cjepivima protiv bakterije *H. pylori* koja uzrokuje gastritis i tumor želuca. Osim u medicini, koristi se i za obradu otpadnih voda, u poljoprivredi i prehrambenoj industriji.[10]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Svi eksperimenti provedeni su u kotlastim reaktorima uz konstantno miješanje korištenjem termostatirane tresilice kako bi se održala homogenost reakcijske smjese. Mjerenje koncentracije proteina koja je proporcionalna koncentraciji enzima (ureaza) te apsorpcijskog spektra (Zn) određeno je spektrofotometrijski. Dobiveni uzorci nanočestica nakon centrifugiranja su sušeni, a potom su analizirani pomoću optičkog mikroskopa.

3.1. APARATURA

3.1.1. Kotlasti reaktor

U ovom radu se koristio kotlasti reaktor za sintezu nanočestica cinka. Eksperimenti su provedeni u staklenim kotlastim reaktorima volumena 10 cm³ (slika 8). Dobivanje nanočestica provedeno je u termostatiranoj tresilici (slika 9) pri $T = 37^{\circ}\text{C}$ uz lagano miješanje (150-200 rpm).



Slika 8. Kotlasti reaktor



Slika 9. Termostatirana tresilica

3.1.2. Spektrofotometar

Spektrofotometar je mjerni uređaj za analizu spektra elektromagnetskog zračenja. ApSORpcija svjetlosti kroz otopine se matematički opisuje Lambert-Beer-ovim zakonom (jedn. 2) pri čemu je ABS apsorbancija pri određenoj valnoj duljini svjetlosti, ϵ molarni apsorpcijski

koeficijent [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$] ovisan o valnoj duljini svjetlosti i svojstven svakoj molekulskoj vrsti, b duljina puta svjetlosti kroz uzorak [cm], i c koncentracija tvari u otopini [mol dm^{-3}].

$$ABS = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (2)$$

U ovom radu spektrofotometar je korišten za određivanje koncentracije proteina Bradford metodom pri čemu je koncentracija proteina direktno proporcionalna koncentraciji enzima. Korišten je uređaj Shimadzu UV-1800 (slika 10).



Slika 10. Spektrofotometar Shimadzu UV-1800

3.1.3. Centrifuga

Centrifuga je korištena za pripremu uzoraka za mjerenje koncentracije enzima spektrofotometrijski te za pripremu uzoraka nanočestica, odnosno njihovu daljnju analizu na svjetlosnom mikroskopu. Uzorci su centrifugirani na 14000 okr/min pri temperaturi $T = 4^\circ\text{C}$ u trajanju od $t = 5$ min. Korišten je uređaj Hettich Universal 320R (slika 11).



Slika 11. Centrifuga Hettich Universal 320R

3.1.4. Optički mikroskop

Na čisto predmetno stakalce smo nanjeli dobivene nanočestice pomoću mikrobiološke ušice s par kapi redestilirane vode i poklopili čistim pokrovnim stakalcem tako da nije ostalo zarobljenih mjehurića zraka između predmetnog i pokrovnog stakalca. Analizirali smo i određivali veličinu dobivenih nanočestica cinkovog oksida pod uvećanjem od 40, 100 i 400x pomoću mikroskopa Motic B1-220A (slika 12).



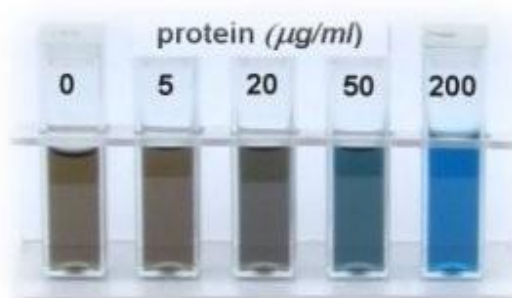
Slika 12. Optički mikroskop Motic B1-220A

3.2. ANALITIČKE METODE

3.2.1. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određivana je spektrofotometrijski, Bradfordovom metodom. To je jednostavna metoda koja se koristi za određivanje ukupne koncentracije proteina u uzorku. Metoda se temelji na vezivanju boje Coomassie bluea na protein. Što je koncentracija proteina u uzorku viša to će se više boje vezati na protein tj. boja postaje tamnija (slika 13). Test po Bradfordu mnogo je osjetljiviji na imunoglobulin G (IgG), nego goveđi serum albumin (BSA). Test je manje precizan za bazične ili kisele proteine. Za razliku od mnogih drugih testova, uključujući i postupak Lowry, test po Bradfordu nije osjetljiv na smetnje od različitih kemikalija prisutnih u uzorcima. Iznimkom je visokim koncentracijama detergenata.

Bradfordov reagens sastoji se od 100 mg boje Coomassie brilliant blue G-250, 50 ml 95% etanola te 100 ml 85% fosforne kiseline i 850 ml redestilirane vode.



Slika 13. Bradfordov test

Uzorci za mjerenje apsorbancije na spektrofotometru, odnosno za određivanje koncentracije proteina pripremani su a slijedeći način: uzimano je po 20 µL uzorka iz reaktora koje je razrijeđeno u 980 µL redestilirane vode; sve se dobro promiješalo i centrifugiralo na 14.000 rpm, $T = 4^{\circ}\text{C}$, 5 min, zatim je supernatant dodatno razrijeđen 10x (100 µL supernatanta + 900 µL redestilirane vode). Potom se u 800 µL supernatanta dodalo 200 µL Bradfordova reagensa nakon čega je sve dobro homogenizirano. U trenutku dodavanja Bradfordova reagensa započeto je mjerenje vremena te su uzorci inkubirani 5 minuta. Nakon 5 minuta izmjerena je apsorbancija uzoraka na spektrofotometru pri valnoj duljini $\lambda = 595 \text{ nm}$.

Prije mjerenja samih uzoraka izuzetih iz reaktora pripremljene su standardne otopine proteina (albumin; BSA) koncentracija $1 \mu\text{g cm}^{-3}$, $2.5 \mu\text{g cm}^{-3}$, $5 \mu\text{g cm}^{-3}$, $7.5 \mu\text{g cm}^{-3}$ i $10 \mu\text{g cm}^{-3}$. Mjerenje je izvedeno na isti način kao i mjerenje proteina u uzorku iz reaktora. Iz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji enzima dobivena je jednačba pravca potrebna za preračunavanje koncentracije proteina u uzorcima.

Rezultati su prikazani kao baždarni dijagram (Prilog, slika 22) koji daje ovisnost apsorbancije o koncentraciji proteina.

3.2.3. Određivanje koncentracije amonijevih iona

Koncentracija amonijevih iona određivana je spektrofotometrijski, Willisovom metodom koja je jednostavna, vrlo pouzdana i ekološki prihvatljiva. Navedena metoda koristi reagens koji je otopina natrijeva salicilata, fosfata i nitroprusida (u daljnjem tekstu: reagens),

otopinu hipoklorita te otopinu amonijeva klorida koja služi kao standard. Otopina reagensa pripravljena je otapanjem 32,0 g natrijeva salicilata bezvodnog ($C_6H_4(OH)COONa$), 40,0 g natrijeva fosfata tribazičnog dodekahidrata ($Na_3PO_4 \cdot 12 H_2O$) i 0,5 g natrijeva nitroprusida ($Na_2[Fe(NO)(CN)_5]$) u 1.000 mL redestilirane vode. Otopina hipoklorita pripravljena je razrjeđivanjem 13,9 mL izbjeljivača *Domestos* koji sadrži ~ 4,8% natrijeva hipoklorita, u 250 mL vode. Otopina amonijevog klorida (NH_4Cl) temeljne koncentracije $c(NH_4Cl, t.o.) = 10 \text{ mM}$ pripravljena je otapanjem 5,3 mg NH_4Cl u 10 mL redestilirane vode. Za izradu baždarnog dijagrama, pripravljene su otopine NH_4Cl u rasponu koncentracija od 0 – 2,0 mM.

Uzorci za mjerenje apsorbancije na spektrofotometru, odnosno za određivanje koncentracije amonijevih iona pripravljeni su miješanjem 50 μL otopine NH_4Cl određene koncentracije s po 1.000 μL pripravljenog reagensa i 250 μL otopine hipoklorita nakon čega je sve dobro homogenizirano. U trenutku dodavanja otopine hipoklorita započeto je mjerenje vremena te su uzorci inkubirani 15 minuta. Nakon 15 minuta izmjerena je apsorbancija uzoraka na spektrofotometru pri valnoj duljini $\lambda = 685 \text{ nm}$.

Baždarni dijagram koji daje ovisnost apsorbancije o koncentraciji amonijevog klorida dan je u prilogu na slici 23.

3.3. SINTEZA NANOČESTICA

3.3.1. Sinteza nanočestica cinka

Ekperimenti su provedeni u kotlastom reaktoru volumena 10 cm^3 pri sobnoj temperaturi $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ uz lagano mješanje (150 rpm). Ukupno je provedeno pet eksperimenata sinteze nanočestica cinka (tablica 1).

Sve reakcije provedene su uz istu početnu koncentraciju ureaze (1 mg cm^{-3}) u reaktorimana na slijedeći način: u $4,5 \text{ cm}^3$ 0,1 M natrij nitrata otopljeno je 5 mg ureaze i određena koncentracija uree; miješano je 2 minute, kako bi se formirali hidroksid ioni koji su odgovorni za nastajanje cinkovog oksida. Zatim je dodana određena koncentracija cink nitrat heksahidrata otopljenog u $0,5 \text{ cm}^3$ 0,1 M natrij nitrata.

Tablica 1. Uvjeti u eksperimentima u kojima je provedena sinteze nanočestica cinka

TEMPERATURA [°C]	MEDIJ	KONCENTRACIJA	KONCENTRACIJA
		uree [mM]	Zn(NO ₃) ₂ [mM]
25	0,1M NaNO ₃	3,33	1
		3,33	2
		10	1
		10	2
		10	3,36

Dodatkom Zn(NO₃)₂ u reaktor aproksimiran je početak svake reakcije. Uzorci za određivanje koncentracije proteina uzimani su svakih pola sata tijekom trajanja eksperimenta. Uzimano je po 20 μL uzorka iz reaktora i razrijeđeno u 980 μL redestilirane vode; sve je dobro promiješano i centrifugirano na 14.000 rpm, $T = 4\text{ °C}$, 5 min, a zatim je supernatant dodatno razrijeđen 10x (100 μL supernatanta + 900 μL redestilirane vode). Tako pripremljen uzorak se koristio za određivanje proteina. Koncentracija proteina je bila proporcionalna koncentraciji enzima u reaktoru.

Uzorci za mjerenje koncentracije amonijevih iona uzimani su svakih 30-60 minuta tijekom trajanja eksperimenta. Uzimano je po 100 μL uzorka iz reaktora i razrijeđeno u 900 μL redestilirane vode. Uzorci su potom profiltrirani kako bi se iz njih uklonile nanočestice, te enzim koji bi mogli uzrokovati pogreške prilikom analize. Nakon završene reakcije, reakcijska smjesa je centrifugirana na 14000 okr/min u trajanju 5 minuta pri temperaturi $T = 4\text{ °C}$ nakon čega su dobivene nanočestice sušene i potom analizirane na optičkom mikroskopu.

3.4. MODELIRANJE SINTEZE NANOČESTICA

Nanočestice metala u ovom radu su se dobivale taloženjem metala na jezgru od enzima ureaze. Tijekom sinteze nanočestica pratila se koncentracija proteina u reaktoru koja je proporcionalna koncentraciji enzima. Stoga je prepostavljeno da je brzina nastajanja nanočestica proporcionalna brzini taloženje proteina. Ova brzina je opisana kinetikom 1. reda (jedn.3).

$$\frac{dc_{\text{protein}}}{dt} = -k \cdot c_{\text{protein}} \quad (3)$$

Konstanta brzine reakcije procijenjena je iz eksperimentalnih podataka nelinearnom regresijom u programskom paketu *Scientist* pomoću metode najmanjih kvadrata i simpleks metode

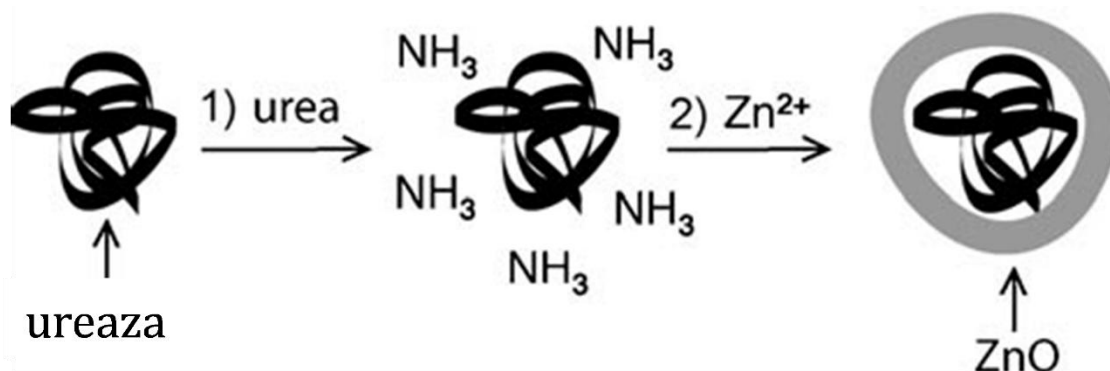
Na temelju napisanog modela i procijenjenih parametara napravila se simulacija rješavanjem diferencijalnih jednadžbi korištenjem numeričke metode (Episode algoritam).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je sinteza nanočestica cinka na jezgru od proteina korištenjem enzima ureaze te metalne soli $Zn(NO_3)_2$. Svrha istraživanja je bila pratiti nastanak nanočestica sa proteinskom jezgrom i ljuskom od metala na način da se pratila koncentracija proteina (enzima) i koncentracija NH_4^+ iona prilikom sinteze nanočestica cinka. Cilj rada je bio također i utvrditi veličinu nanočestica pomoću optičkog mikroskopa.

4.1. SINTEZA NANOČESTICA CINKA

Nanočestice cinka s jezgrom od enzima pripravljene su upotrebom soli cinkovog nitrata, uree i enzima ureaze prema shemi na slici 14.[11] Sinteza je provedena u 0,1 M otopini natrijevog nitrata tako da je u reaktor prvo dodana urea i enzim ureaza. Pri tome dolazi do hidrolize uree katalizirane enzimom ureaza. Produkti hidrolize su amonijevi i hidroksid ioni koji podešavaju pH u okolini enzima. Potom su nakon dvije minute u reaktor dodani ioni cinka. Njihovim dodatkom dolazi do polaganog nastajanja ljuske cinkovih oksida oko enzima ureaze. Nastajanje ljuske je katalizirano lokalnom pH vrijednosti koja se nalazi oko enzima.

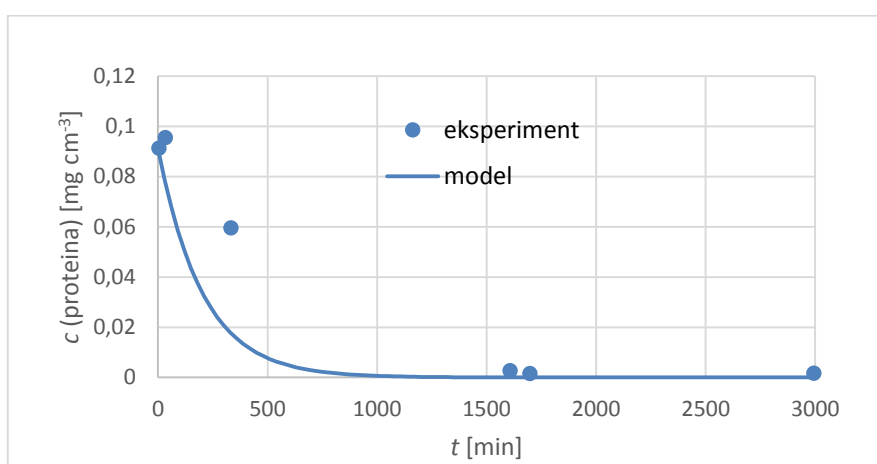


Slika 14. Shematski prikaz sinteze nanočestica cinkovih oksida s jezgrom od ureaze [11]

Dodatak cinkovih iona u otopinu smatra se početkom provedbe reakcije. Tijekom eksperimenta mjerila se koncentracija proteina u otopini koja je proporcionala koncentraciji ureaze. Naime brzina smanjenja koncentracije proteina ujedno je i pokazatelj taloženja enzima ureaze, odnosno brzine stvaranja nanočestica. Proveden je jedan eksperiment sa nižom početnom koncentracijom uree (3,33 mM), te tri početna eksperimenta sa početnom

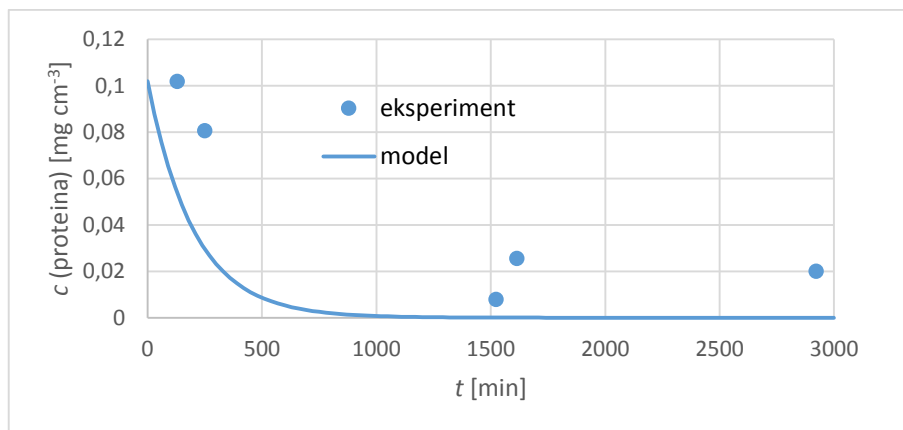
koncentracijom uree od 10 mM i različitim početnim koncentracijama cinka. U dvije minute prije dodavanja cinkovih iona hidroliziralo je otprilike 10 % uree, te je koncentracija amonijevih iona bila 0,33 mM u eksperimentu sa nižom početnom koncentracijom uree odnosno 1 mM u onima sa višom koncentracijom. Cinkovi ioni značajno inhibiraju reakciju hidrolize uree, te je njihovim dodatkom u otopinu reakcija zaustavljena.

Eksperiment proveden s nižom koncentracijom uree prikazan je na slici 15. Koncentracija proteina se smanjuje s vremenom, te je brzina taloženja ureaze opisana kinetikom prvog reda (jedn. 3). Konstanta brzine taloženja procijenjena je u programskom paketu *Scientist*, te iznosi $k = 0,000594 \text{ min}^{-1}$.

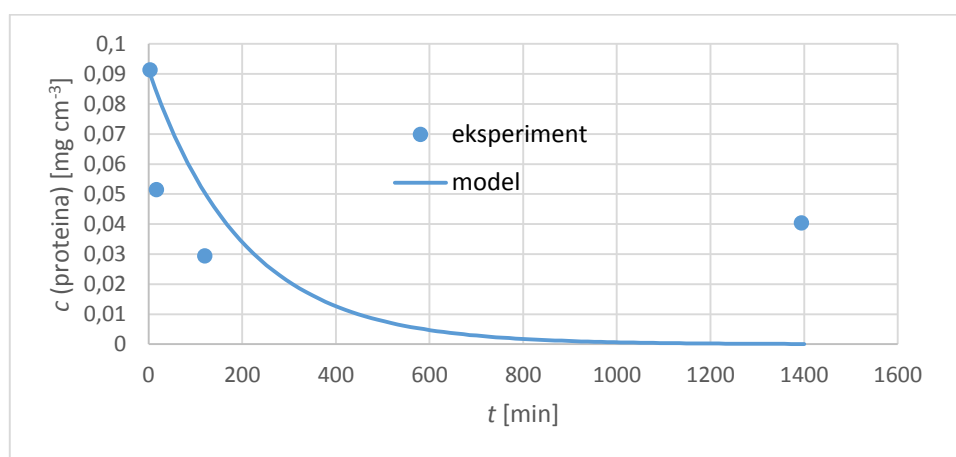


Slika 15. Sinteza Zn nanočestica (redistirana voda, $c(\text{NaNO}_3) = 0,1 \text{ M}$, $T = 25^\circ\text{C}$, 150 rpm, $c_{\text{ureaze}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{\text{uree}} = 3,33 \text{ mM}$, $c(\text{Zn}(\text{NO}_3)_2) = 1 \text{ mM}$, $V = 5 \text{ cm}^3$), vremenska ovisnost koncentracije proteina

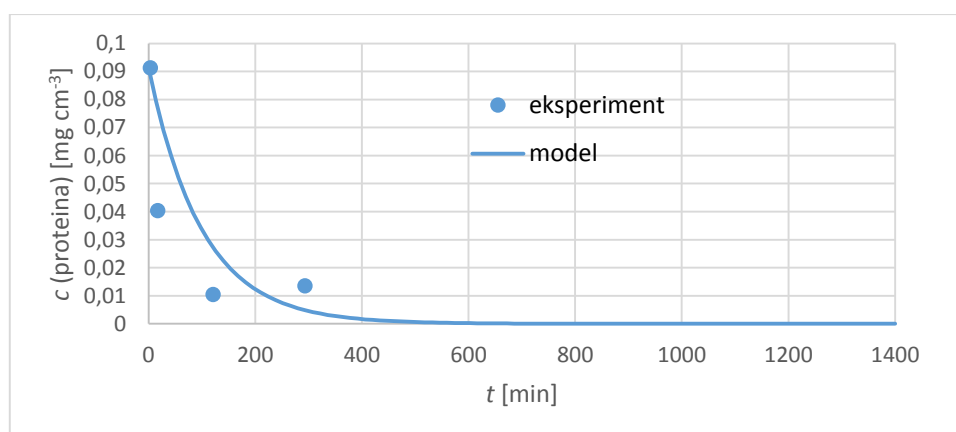
Na slikama 16 - 18 prikazani su rezultati sinteze nanočestica cinka s jezgrom od ureaze pri početnoj koncentraciji uree od 10 mM, te različitim koncentracijama cinkovih iona.



Slika 16. Sinteza Zn nanočestica (redistirana voda, $c(\text{NaNO}_3) = 0,1 \text{ M}$, $T = 25^\circ\text{C}$, 150 rpm , $c_{\text{ureaze}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{\text{uree}} = 10 \text{ mM}$, $c(\text{Zn}(\text{NO}_3)_2) = 1 \text{ mM}$, $V = 5 \text{ cm}^3$), vremenska ovisnost koncentracije proteina



Slika 17. Sinteza Zn nanočestica (redistirana voda, $c(\text{NaNO}_3) = 0,1 \text{ M}$, $T = 25^\circ\text{C}$, 150 rpm , $c_{\text{ureaze}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{\text{uree}} = 10 \text{ mM}$, $c(\text{Zn}(\text{NO}_3)_2) = 2 \text{ mM}$, $V = 5 \text{ cm}^3$), vremenska ovisnost koncentracije proteina



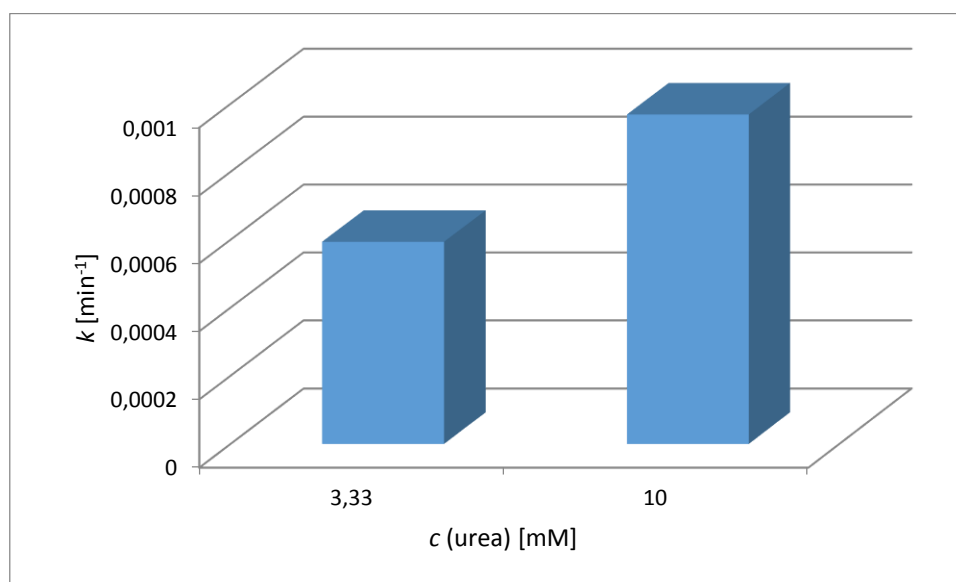
Slika 18. Sinteza Zn nanočestica (redistirana voda, $c(\text{NaNO}_3) = 0,1 \text{ M}$, $T = 25^\circ\text{C}$, 150 rpm , $c_{\text{ureaze}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{\text{uree}} = 10 \text{ mM}$, $c(\text{Zn}(\text{NO}_3)_2) = 3,36 \text{ mM}$, $V = 5 \text{ cm}^3$), vremenska ovisnost koncentracije proteina

Podaci su u svim eksperimentima opisani kinetikom prvog reda. Može se vidjeti da su prisutna određena odstupanja eksperimentalnih podataka od onih dobivenih simulacijom u *Scientist*-u. Odstupanja su kod eksperimenata provedenih pri nižim koncentracijama $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ($c = 1 \text{ mM}$), dok se ostali eksperimenti dobro slažu sa modelom stoga možemo zaključiti da pretpostavljena kinetika 1. reda vrlo dobro opisuje ovaj proces. U *Scientist*-u su procijenjene i konstante brzine taloženja ureaze te su dane u tablici 2. Procijenjena konstanta taloženja se povećava s početnom koncentracijom cinkovih iona u otopini, te dolazi do bržeg stvaranja nanočestica.

Tablica 2. Parametri kinetike prvog reda procijenjeni u *Scientist*-u za brzinu taloženja enzima ureaze prilikom sinteze cinkovih nanočestica ($c_{\text{uree}} = 10 \text{ mM}$)

KONCENTRACIJA $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ [mM]	k (min^{-1})
1	0,000969
2	0,013701
3,36	0,042017

Na slici 19 je prikazana usporedba procijenjene konstante brzine taloženja provedene sa istom početnom koncentracijom cinkovih iona, ali različitom početnom koncentracijom uree.

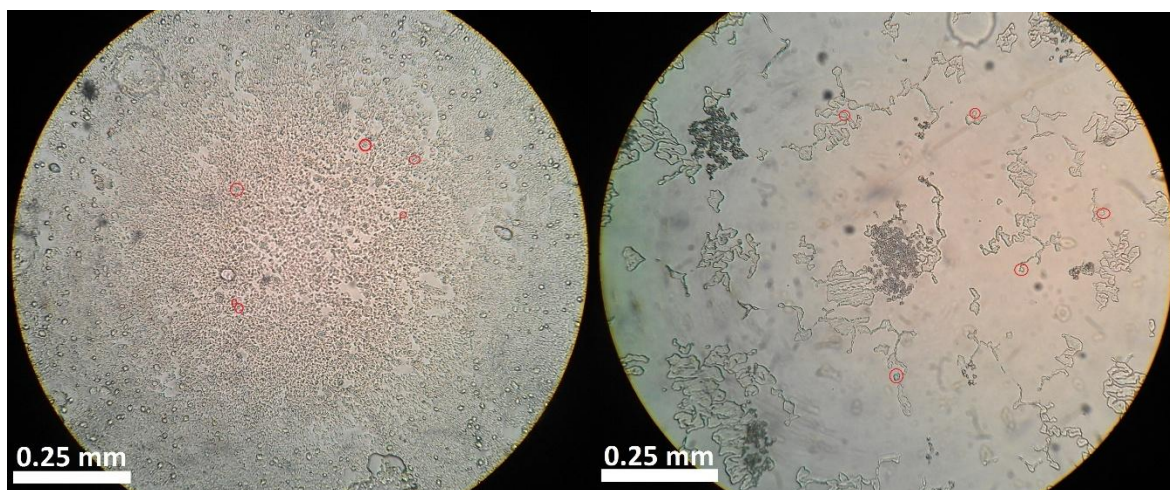


Slika 19. Utjecaj početne koncentracije uree na konstantu brzine taloženja enzima ureaze prilikom sinteze cinkovih nanočestica za jezgrom od ureaze (redistirana voda, $c(\text{NaNO}_3) = 0,1 \text{ M}$, $T = 25^\circ\text{C}$, 150 rpm, $c_{\text{ureaze}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$, $c(\text{Zn}(\text{NO}_3)_2) = 1 \text{ mM}$, $V = 5 \text{ cm}^3$)

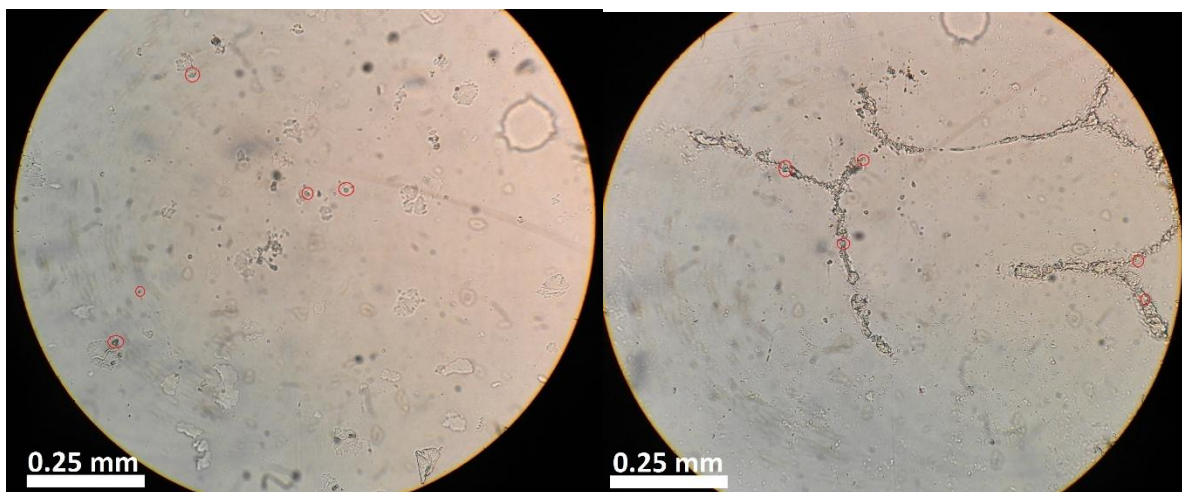
Može se vidjeti (slika 19) da i povećana koncentracija iona amonijaka, odnosno hidroksid iona u okruženju oko enzima povećavaju njegovu brzinu taloženja, odnosno brzinu nastajanja nanočestica.

4.2. KARAKTERIZACIJA NANOČESTICA POMOĆU OPTIČKOG MIKROSKOPA

Analizom pomoću optičkog mikroskopa dobiveni su prikazi nanočestica cinkovog oksida. Na slikama 20 i 21 prikazane su snimljene nanočestice sintetizirane u redestiliranoj vodi pri različitim koncentracijama cinka i uree (tablica 1). Nanočestice su snimane povećanjem od 400 puta. Na temelju dobivenih slika su određene njihove prosječne veličine, a dobiveni rezultati prikazani u tablici 3.



Slika 20. Prikaz nanočestica Zn snimljenih pomoću optičkog mikroskopa; nanočestice sintetizirane u redestiliranoj vodi pri $T = 25^{\circ}\text{C}$, $c_{\text{uree}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$, $c(\text{NaNO}_3) = 0,1 \text{ M}$, $c_{\text{uree}} = 3,33 \text{ mM}$, $c(\text{Zn}(\text{NO}_3)_2) = 1 \text{ mM}$ (lijevo) i $c(\text{Zn}(\text{NO}_3)_2) = 3,33 \text{ mM}$ (desno)



Slika 21. Prikaz nanočestica Zn snimljenih pomoću optičkog mikroskopa; nanočestice sintetizirane u redestiliranoj vodi pri $T = 25^{\circ}\text{C}$, $c_{\text{ureze}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$, $c(\text{NaNO}_3) = 0,1 \text{ M}$, $c_{\text{uree}} = 10 \text{ mM}$, $c(\text{Zn}(\text{NO}_3)_2) = 2 \text{ mM}$ (lijevo) i $c(\text{Zn}(\text{NO}_3)_2) = 3,36 \text{ mM}$ (desno)

U tablici 3 prikazane su veličine nanočestica cinka određene korištenjem slika prikazanim na slikama 20 i 21, nanočestice su sintetizirane u redestiliranoj vodi i snimane pri temperaturi od 25°C .

Tablica 3. Prosječne veličine sintetiziranih nanočestica Zn

KONCENTRACIJA uree [mM]	KONCENTRACIJA $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ [mM]	RASPON VELIČINA, [μm]	PROSJEČNA VELIČINA [μm]
3,33	1	0,509-2,291	1,5274
3,33	2	3,055-3,564	3,3606
10	2	3,055-4,328	3,717
10	3,36	3,564-6,110	4,5824

Iz tablice 3 može se zaključiti da veličina čestica ovisi o koncentraciji uree i pri većoj koncentraciji nastaju i veće nanočestice. Obzirom da je brzina taloženja ureaze pri većoj početnoj koncentraciji uree veća (slika 16) može se zaključiti da u slučaju nanočestica cinka pri većoj brzini taloženja nastaju veće nanočestice.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu sintetizirane su nanočestice cinkovog oksida s jezgrom od enzima ureaze u redestiliranoj vodi pri temperaturi od 25°C.

Brzina taloženja ureaze tijekom sinteze nanočestica je opisana kinetikom prvog reda. Model dobro opisuje gotovo sve eksperimente osim eksperiment kod niže koncentracije cinka ($c = 1$ mM) gdje su vidljiva manja odstupanja. Procjenom konstante brzine zaključeno je da se ona povećava s povećanjem koncentracije cinka. Također brzina taloženja prilikom sinteze cinka se povećava i povećanjem koncentracije uree.

Sintetizirane nanočestice cinkovog oksida su analizirane pomoću optičkog mikroskopa. Zaključeno je da su u eksperimentima provedenim pri nižim koncentracijama cinka i pri nižoj koncentraciji uree sintetizirane čestice manjih dimenzija u odnosu na čestice sintetizirane pri višim koncentracijama. To je posljedica veće brzine reakcije pri višim koncentracijama pri čemu dolazi do većeg nakupljanja čestica.

6. POPIS SIMBOLA I KRATICA

Simboli

G	slobodna energija [kJmol^{-1}]
ΔG	razlika slobodne enrgije [kJmol^{-1}]
b	duljina puta svjetlosti [cm]
c	koncentracija [mmol dm^{-3} , mg cm^{-3}]
ε	molarni apsorpcijski (ekstincijski) koeficijent [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
k	konstanta brzine reakcije [min^{-1}]
λ	valna duljina zračenja [nm]
t	vrijeme [min]
T	temperatura [$^{\circ}\text{C}$]
V	volumen [cm^3]

Kratice

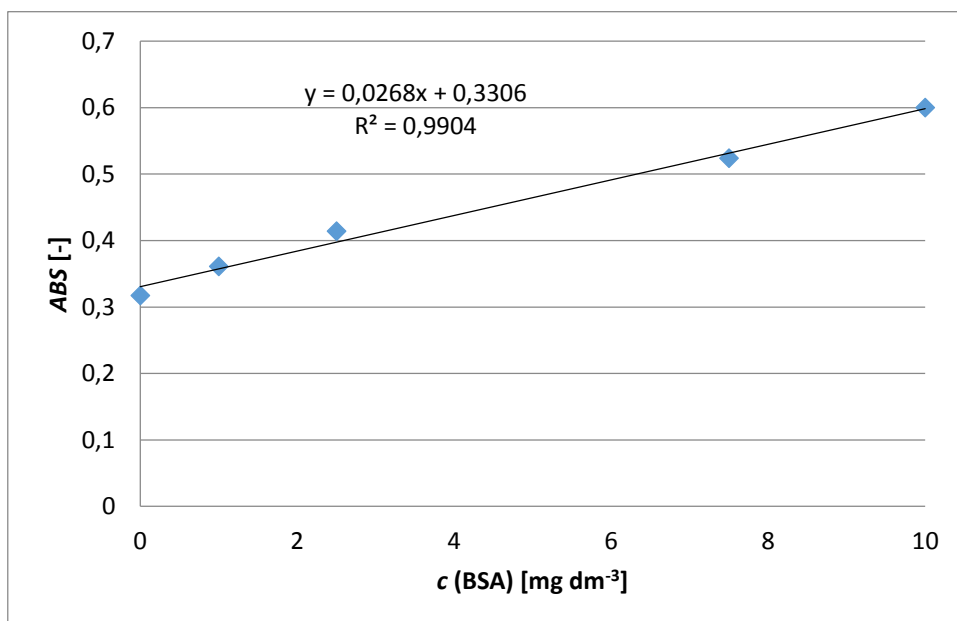
ABS	apsorbancija
-----	--------------

7. LITERATURA

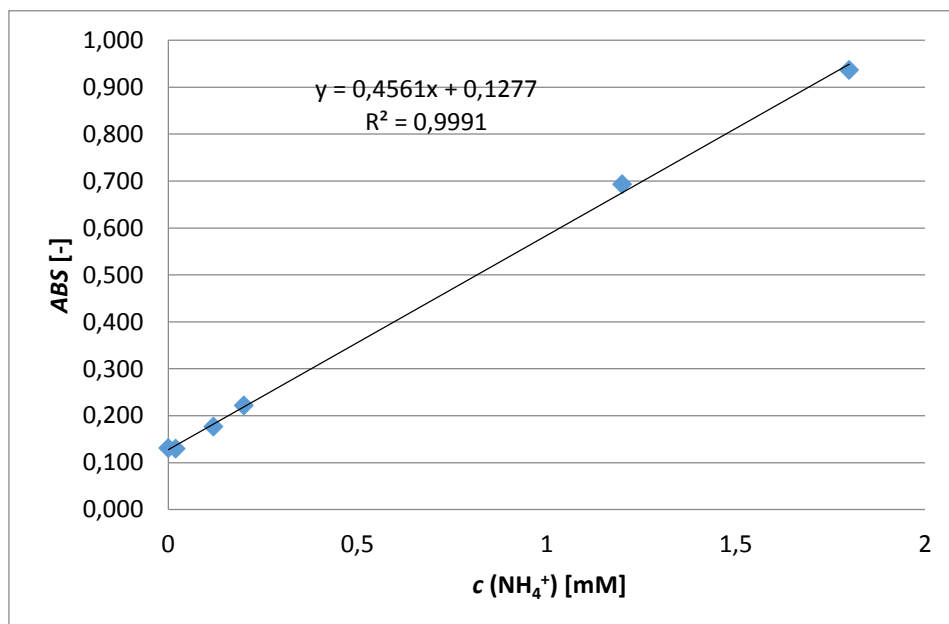
1. Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., Hasan, H., Mohamad, D., Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism, *Nano-Micro Letters*, 7 (2015) 219-242.
2. Vaseem, M., Umar, A., Hahn, Y. B., ZnO nanoparticles: growth, properties, and applications, u: Umar, A., Hahn, Y. B., *Metal oxide nanostructures and their applications*, volume 5, California, American Scientific Publishers, 4 (2010) 1-36.
3. Feldheim, D. L., Foss C. A. Jr., *Metal nanoparticles synthesis, characterization, and applications*, Marcel Dekker Incorporated, New York, 2002., str.161.
4. Chaudhuri, R. G., Paria, S., *Core/shell nanoparticles: classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications*, *Chemical Reviews*, 112 (2012) 2373-2433.
5. Saibi, W., Abdeljalil, S., Masmoudi, K., Gargouri, A., *Biocatalysts: beautiful creatures*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 426 (2012) 289-293.
6. Bugg, T. D. H., *Introduction to enzyme and coenzyme chemistry - second edition*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2004., str.1.,20.
7. Mäntsälä, P., Niemi, J., *Enzymes: the biological catalysts of life*, u: Hänninen O., *Physiology and maintenance – volume 2*, Paris, Eolss Publishers, 2 (2002) 1-3.
8. Krajewska, B., *Ureases I. functional, catalytic and kinetic properties: a review*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 59 (2009) 9-11.
9. Qin, Y., Cabral, J. M. S., *Review properties and applications of urease, biocatalysis and biotransformation* 20 (2002) 1-14.
10. Sujoy, B., Aparna, A., *Enzymology, immobilization and applications of urease enzyme*, *International Research Journal of Biological Sciences* 2 (2013) 51-56.
11. de la Rica, R., Matsui, H., *Urease as a nanoreactor for growing crystalline ZnO nanoshells at room temperature*, *Bio-Nanoreactors*, *Angewandte Chemie International Edition*, 47 (2008) 5415-5417.

12. Gawande, M. B., Goswami, A., Asefa, T., Guo, H., Biradar, A. V., Peng, D. L., Zboril, R., Varma, R. S., Core-shell nanoparticles: synthesis and applications in catalysis and electrocatalysis, *Chemical Society Reviews*, 44 (2015) 7540-7590
13. Li, X., Xu, H., Chen, Z. S., Chen, G., Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications, *Journal of Nanomaterials* (2011) 1-16
14. Vertegel, A. A., Reukov, V., Maximov, V., Enzyme-nanoparticle conjugates for biomedical applications, *Methods in Molecular Biology* 679 (2010) 165-182

8. PRILOZI



Slika 22. Baždarni diagram za određivanje koncentracije proteina ($c(\text{BSA}) = 0-10 \text{ mg dm}^{-3}$), $\lambda = 595\text{nm}$)



Slika 23. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije amonijevih iona ($c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 0-2,0 \text{ mM}$; $\lambda = 685 \text{ nm}$)

9. ŽIVOTOPIS

Martina Burštinski rođena je 30. siječnja 1993. godine u Zagrebu gdje započinje svoje obrazovanje 1999. godine u OŠ Vjenceslava Novaka. Godine 2007. započinje svoje srednjoškolsko obrazovanje u Prirodoslovnoj školi Vladimira Preloga za smjer kozmetičar. Maturirala je 2011. godine te je 2012. godine upisala preddiplomski studij Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.