Enzimatska sinteza metalnih nanočestica

Braičić, Saša

Master's thesis / Diplomski 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:149:669687

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Saša Braičić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Saša Braičić

ENZIMATSKA SINTEZA METALNIH NANOČESTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:
izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki
prof. dr. sc. Đurđa Vsić-Rački
prof. dr. sc. Sanja Lučić Blagojević

Zagreb, srpanj 2016.



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

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki na strpljenju, ljubaznosti, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Srdačno se zahvaljujem Leli Pintarić na pomoći i strpljenju prilikom izrade eksperimentalnog djela diplomskog rada.

Najveće hvala mojoj obitelji i Sari na razumjevanju, vjeri i podršci tjekom studiranja.

SAŽETAK

U ovom radu provedena je sinteza nanočestica s ljuskom od zlata, srebra i cinka, te jezgrom od enzima ureaze

Sinteza nanočestica zlata i srebra provedena su u dušificiranoj redestiliranoj vodi, sa različitim koncentracijama zlata i srebra pri temperaturi T = 37 ^{o}C uz istu koncentraciju ureaze. Sinteza nanočestica cinka se provodila s različitim koncentracijama cinka i uree pri temperaturi T = 25 ^{o}C također uz istu koncentraciju ureaze. Tokom eksperimenata praćena je promjena koncentracije proteina koja je proporcionalna koncentraciji enzima, te određivao apsorpcijski spektar zlata i srebra. Kinetika brzine taloženja enzima ureaze opisana je kinetikom prvog reda za koju je utvrđeno da dobro opisuje gotovo sve reakcije.

Istaložene nanočestice zlata i cinka su karakterizirane pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa.

Ključne riječi: enzimi, ureaza, nanočestice, zlato, srebro, cink

ABSTRACT

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

Synthesis were carried out in water without oxygen, with different concentrations of gold and silver at a temperature T = 37 °C with the same concentration of urease. The synthesis of zinc nanoparticles was carried out with different concentrations of zinc and urea at temperature T = 25 °C, and also with the same concentration of urease. During experiments the protein concentration of protein that is proportional to the enzyme concentration was measured. Also the absorption spectrum of gold and silver nanoparticles was followed. The rate of enzyme precipitation was described by the first order kinetics. This kinetic described well almost all experiments.

Synthesized gold and zinc nanoparticles were characterized using the scanning electron microscope.

Keywords: enzyme, urease, nanoparticles, gold, silver, zinc

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1

2. OPĆI DIO ... 2

2.1. NANOČESTICE ... 2

2.2. CORE-SHELL NANOČESTICE (CSNs) ... 3

2.2.1. Organske CSNs ... 4

2.2.2. Anorganske CSNs ... 4

2.3. CORE-SHELL NANOČESTICE SA JEZGROM OD ENZIMA ... 5

2.4. NANOČESTICE ZLATA ... 6

2.5. NANOČESTICE SREBRA ... 7

2.6. NANOČESTICE CINKA ... 8

2.7. ENZIMI ... 9

2.7.1. Ureaza ... 11

3. EKSPERIMENTALNI DIO ... 13

3.1 APARATURA ... 13

3.1.1. Kotlasti reaktor ... 13

3.1.2. Spektrofotometar ... 13

3.1.3. Centrifuga ... 14

3.1.4. Pretražni elektronski mikroskop (SEM) ... 15

3.2. ANALITIČKE METODE ... 15

3.2.1. Određivanje koncentracije proteina ... 15

3.2.2. Određivanje apsorpcijskog spektra Au, Ag i Zn nanočestica ... 17

3.2.3. Određivanje koncentracije amonijevih iona ... 17

3.3. SINTEZA NANOČESTICA ... 18

3.3.1. Sinteza nanočestica zlata ... 18

3.3.2. Sinteza nanočestica srebra ... 19

3.3.3. Sinteza nanočestica cinka ... 20

3.4. MODELIRANJE SINTEZE NANOČESTICA ... 21

4. REZULTATI I RASPRAVA ... 22

4.1 UTJECAJ RAZLIČITIH KONCENTRACIJA $HAuCl_4$ NA SINTEZU NANOČESTICA ZLATA ... 22

4.2. SINTEZA NANOČESTICA ZLATA ... 23

4.3. UTJECAJ RAZLIČITIH KONCENTRACIJA $AgNO_3$ NA SINTEZU NANOČESTICA SREBRA ... 28

4.4. SINTEZA NANOČESTICA SREBRA ... 29

4.5. SINTEZA NANOČESTICA CINKA ... 34

4.6. KARAKTERIZACIJA NANOČESTICA POMOĆU ELEKTRONSKOG PRETRAŽNOG MIKROSKOPA ... 38

5. ZAKLJUČAK ... 41

6. POPIS SIMBOLA I KRATICA ... 42

7. LITERATURA ... 43

8. PRILOZI ... 45

9. ŽIVOTOPIS ... 46

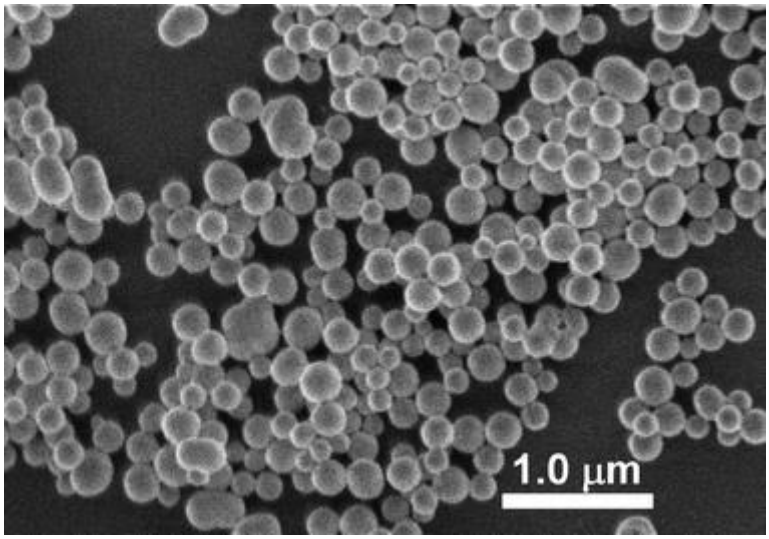
1. UVOD

Nanočestice i nanotehnologija je područje koje se intenzivno istražuje posljednjih dvadesetak godina. Istraživanja su usmjerena na dobivanje nanočestica metala i otkrivanje novih jednostavnijih načina za njihovu sintezu i primjenu. Istraživanjem ove vrste nanočestica moguće je ponuditi nova rješenja za postojeće probleme u visokoj tehnologiji, građevini, medicini, kozmetici, tekstilnoj industriji, zaštiti okoliša… Nanočestice metala ili metalnih oksida mogu uspješno zamijeniti neke od tradicionalnih materijala koji se koriste za oplemenjivanje drugih materijala zbog svojih specifičnih optičkih, električnih, kemijskih i katalitičkih svojstava. Upravo ta svojstva ih razlikuju od odgovarajućih svojstava makroskopskih kristala ili sustava izoliranih atoma, što ih čini interesantnim za proučavanje kao pojedinačnih materijala ili u kombinaciji sa drugim materijalima. Jedan od problema koji prati sintezu nanočestica je upotreba toksičnih kemikalija pri čemu nastaju nusprodukti koji su štetni za okoliš. Kako bi se izbjegao taj problem u sintezi nanočestica koriste se enzimi. Enzimi su kompleksni proteini koji djeluju kao biokatalizatori i ubrzavaju biokemijske reakcije. Upotrebom enzimatske sinteze nanočestica eliminira se nastajanje velike količine nusprodukta, a takva sinteza je i energetski manje zahtjevna pa je s time i ekološki prihvatljivija za okoliš i ljudsko zdravlje. Takve nanočestice svoju primjenu mogu imati u biomedicini. Nanočestice sintetizirane pomoću enzima imaju veću specifičnu površinu, katalitički su reaktivnije, a brzina njihovog nastajanja kao i veličina ovise o procesnim parametrima (temperatura, pH, koncentracija supstrata).[1] Nanočestice pojedinih elemenata, prvenstveno zlata, srebra i bakra, počele su se primjenjivati gotovo u svim aspektima proizvodnje. Nanočestice zlata najčešće se primjenjuju u optici i elektronici zbog svojih izrazito dobrih optičkih svojstava poznatih od davnina i svoje odlične električne provodljivosti. Nanočestice srebra i bakra najviše se koriste u tekstilnoj industriji i medicini jer imaju antibakterijska svojstva koja uništavaju određene bakterije, gljivice i viruse.

2. OPĆI DIO

2.1. NANOČESTICE

Nanočestice (slika 1) su čestice koje imaju jednu ili više dimenzija reda veličine 100 nm ili manje. Postoji veliki broj fizičkih, kemijskih, bioloških i kombiniranih (hibridnih) metoda za sintezu različitih vrsta nanočestica. Iako su fizičke i kemijske metode sinteze nanočestica zastupljenije, upotrebom štetnih i opasnih kemikalija uvelike ograničavaju primjenu takvih nanočestica u biomedicini. Fizičkim i kemijskim metodama sinteze mogu se proizvesti velike količine nanočestica različitih oblika i veličina u relativno kratkom roku. Takve metode su komplicirane, zastarjele, skupe i neučinkovite, te proizvode velike količine opasnog otpada koji može biti štetan ne samo za okoliš nego i za ljudsko zdravlje.[1]



Slika 1. Nanočestice

Da bi se proizvele nanočestice koje nisu opasne za okoliš i čovjeka koristi se metoda enzimatske sinteze koja je uvelike superiornija od fizikalnih i kemijskih metoda. Enzimatskom sintezom eliminirana je upotreba kemikalija, energetski je manje zahtjevna i okolišno prihvatljiva. Nanočestice dobivene na ovaj način imaju veću specifičnu površinu i katalitički su aktivnije, a brzina njihovog nastajanja i veličina ovise o procesnim parametrima kao što su pH, temperatura koncentracija supstrata.[1] Vrlo važna karakteristika enzimski provođenih reakcija dobivanja nanočestica je činjenica da se kemijska i fizikalna svojstva ovako dobivenih materijala ponekad razlikuju od svojstava nanočestica koje se priređuju drugim metodama. Tako se pomoću enzima mogu uspješno sintetizirati nanočestice u obliku tankih filmova, šupljih mikro- i nanosfera, nanocijevčica, dvodimenzionalnih uzoraka, trodimenzionalnih uzoraka te biominerala. Ova činjenica ide u prilog argumentu da su

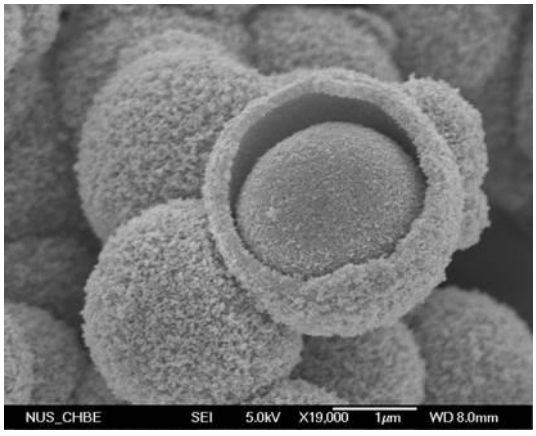
enzimski provođene reakcije dobivanja nanočestica izuzetno atraktivno znanstveno istraživačko područje koje otvara mogućnosti novih načina primjene nanočestica (primjerice u terapiji i liječenju raka, dobivanju materijala posebnih fizikalnih i kemijskih svojstava i sl.).

Sinteza nanočestica korištenjem cijelih stanica može biti unutarstanična ili izvanstanična ovisno gdje su nanočestice nastale. Unutarstanična metoda se sastoji od prijenosa metalnih iona unutar mikrobiološke stanice gdje nastaju nanočestice u prisutnosti enzima. Izvanstanična sinteza nanočestica uključuje nakupljanje metalnih iona na površini stanice i njihovu redukciju do metala uz pomoć enzima.[1]

2.2. CORE-SHELL NANOČESTICE (CSNs)

Core-shell nanočestice (slika 2) su vrsta nanomaterijala koji poprimaju sve veću pozornost zbog svojih zanimljivih svojstava i širokog raspona primjena u katalizi, biologiji, kemiji.

Kompozitni nanomaterijali koji se sastoji od jezgre (unutarnjeg materijala) i ljuske (vanjskog materijala) oboje na nanoskali nazivaju se core-shell nanočestice.[2]



Slika 2. Core-shell nanočestice

Korištenjem različite vrste materijala za jezgru odnosno ljusku može se proizvesti veliki broj različitih vrsta CSNs-a svaki sa svojim specifičnim svojstvima. Specifična svojstva svake vrste ovise o interakcijama jezgra-ljuska. Zbog takve mogućnosti takav materijal će imati ključnu ulogu u katalitičkim procesima i održivim rješenjima za trenutne energetske problem. Core-shell nanomaterijali imaju široku primjenu u bionanotehnologiji, naprednim optičkim i magnetskim uređajima, energetskim uređajima za pohranu podataka, gorivim ćelijama, genetskom inženjeringu i mnogim drugim tehnologijama. Obzirom na materijale koji se

koriste za jezgru odnosno ljusku takve nanomaterijale možemo podijeliti na anorgansko-organske, anorganske-anorganske, organsko-anorganske i organsko-organske. [3] Prema Paria-u CSNs obzirom na vrstu materijala se može podijeliti u dvije glavne skupine: organske i anorganske. Organski materijali se baziraju na ugljičnim materijalina (najčešće polimeri), dok se anorganski baziraju na metalima, metalnim oksidima i metalnim solima.[4]

2.2.1. Organske CSNs

Iako je ova vrsta nanočestica relativno nova u usporedbi sa konvencionalnim, prednost korištenja ugljikovih spojeva, posebno obzirom na veliku stabilnost i biokompatibilnost stvorili su veliki interes za njihovo daljnje istraživanje i svakodnevnu primjenu.[5]

Sinteza takvih materijala se uglavnom oslanja na proces polimerizacije za pripremu jezgre ili ljuske ili oboje. Osnovni cilj polimerizacije uključuje stvaranje 3D mrežne strukture sa dodatkom nekoliko odgovarajućih monomernih jedinica koje imaju ključnu funkciju. Iako se organske jezgre najčešće prve sintetiziraju, postoji mogućnost sinteze ljuske prije jezgre. Također se modifikacijom površine uz pomoć površinski aktivnih tvari može poboljšati učinkovitost i stabilnost ljuske. Neki od materijala koji se koriste za sintentiziranje organskih CSNs-a su fuleren, polianilin, ugljikove nanočestice (s jednom ili više stjenki).[6]

2.2.2. Anorganske CSNs

Anorganske CSNs se mogu podijeliti u dvije skupine, jednoj je polazna baza silicij a drugoj skupini metal.

Gotovi sve nanočestice na bazi silicija sintetizirane su pomoću sol-gel postupka. Kemijska metoda uključuje hidrolizu naknadne kondenzacije silicijeva alkoksida ili silicijeva halogenida u alkoholu, vodi ili njihovoj smjesi u prisutnosti bazičnog katalizatora kao što je amonijak, radi dobivanja jedinstvene koloidne mikrokuglice. Zbog jednostavnosti, ponovljivosti ova metoda se koristi za sintetiziranje brojnih nanočestica sa silicijevom jezgrom. Većina na ovakav način sintetiziranih CSNs-a uključuju kruti, neporozni SiO_2 iako nova istraživanja uključuju razvoj poroznih materijala primjenom kalupa ili post-sintetske modifikacije. Ovi postupci ne omogućavaju samo povećanje površine nanočestica nego i bolju dostupnost jezgre i vanjske ljuske. Veća poroznost se može dobiti i promjenama funkcionalnih skupina. Ovakve nanočestice svoju primjenu su našle u različitim katalitičkim procesima.

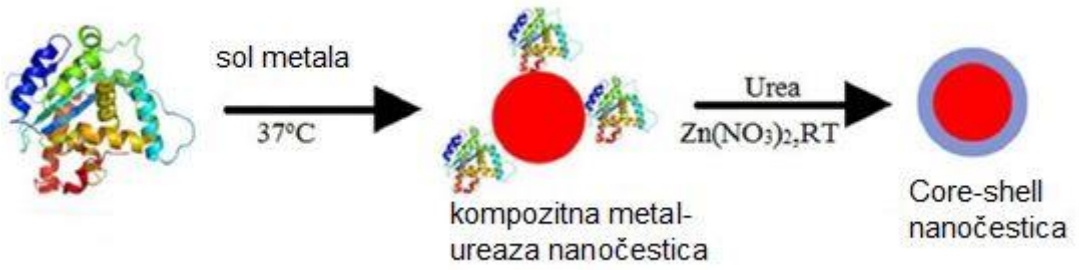
CSNs na bazi metala obuhvaćaju čitav spektar metala, metalnih oksida, metalnih legura, metalnih soli itd. te se mogu dodatno podijeliti u nekoliko skupina: metalne CSNs, metalni oksidi i soli metala.

Općenito metalne CSNs su sintetizirane putem njihovih odgovarajućih metalnih soli ili pomoću redukcijskog sredstva (kao što je $NaBH_4$, hidrazin itd.) ili putem trans-metilacije korištenjem redoks svojstava metalnih perkursora. Reakcijski medij, temperatura i vrsta sredstva za redukciju mogu utjecati na kinetiku reakcije.Ako dođe do poremećaja kinetike dolazi do značajnih razlika u rastu čestica, veličini, obliku, a time i do različitih kemijskih, fizikalnih, optičkih i bioloških svojstava.[7]

CSNs na bazi metalnih oksida (najčešće TiO_2) najčešće se sintetiziraju sol-gel postupkom. Ovakve nanočestice posjeduju široki raspon različitih kemijskih, fizičkih i optičkih svojstava koja im omogućuju primjenu u foto-, bio-, energetskim aplikacijama. Dodatnom termičkom obradom može se mijenjat struktura, fizikalna svojstva i poroznost nanostrukture.[8] CSNs na bazi metalnih soli sintetiziraju se taloženjem soli metala iz smjese metalnih prekursora i protuiona u prisutnosti stabilizatora. Različite interakcije metalnih soli sa vanjskim utjecajima (npr. kisik ili temperatura) mogu imati važnu ulogu kod daljnjih modifikacija nanostruktura. CSNs na bazi metalnih soli svoju primjenu su našli u bioslikama i poluvodičima.[9]

2.3. CORE-SHELL NANOČESTICE SA JEZGROM OD ENZIMA

Biomineralizacija je iznimno učinkovit biološki proces koji omogućuje razvoj nano-bio integriranih materijala. Kao glavni pokretači živog svijeta enzimi imaju vodeću ulogu u biogenom rastu anorganskih nanostruktura. Kemijske ili elektrostatske veze enzima sa nanočesticama rezultiraju pojačanom i stabilnijom katalitičkom aktivnosti ili pak inhibiciju katalitičke aktivnosti enzima, a ti rezultati su omogućili su provedbu ideje o enzimatskim biosenzorima. S druge strane prostorno ograničena okolina enzima olakšava kristalizaciju anorganskih materijal sa nanometarskom preciznošću. Postoji nekoliko izvještaja koji govore kako su enzimi stimuliraju nastanak metalnih i metal oksid nanočestica. Jedan od primjera su oksidaze tj. glukoz oksidaza koja katalizira oksidaciju glukoze pri čemu nastaje H_2O_2 koji djeluje kao redukcijsko sredstvo za sintezu nanočestica zlata. [10] U ovom radu se koristila ureaza kao redukcijsko sredstvo ali i kao stabilizator. Katalitička aktivnost enzima koristila se za sintezu metalnih nanočestica sa jezgrom od enzima i ljuskom metala (slika 3).



Slika 3. Nastanak Core-shell nanočestica sa jezgrom od enzima

2.4. NANOČESTICE ZLATA

Nanočestice zlata (slika 4) spadaju među najčešće ispitivane nanočestice, jer predstavljaju idealne modelne sustave za ispitivanje fizičkih i kemijskih svojstava metalnih čestica nanometarskih dimenzija, uslijed čega su i najčešće korištene strukture u različitim područjima nanotehnologije. Osim toga njihova se površina kemijski vrlo lako modificira. Nanočestice zlata korištene su još od davnih vremena, kada je slučajno došlo do njihove sinteze u antičko doba, u 5. i 4. stoljeću prije nove ere i započela njihova upotreba za bojenje stakla i keramike. Najpoznatiji primjer je Likurgov kalež (slika 5) koji, zavisno od načinu izlaganja svjetlosti, pokazuje različito obojenje. Kada se promatra u transmisiji, pehar je crvene boje, dok u slučaju refleksije boja pehara postaje zelena. Do srednjeg vijeka koloidno zlato se koristilo i u medicinske svrhe, za liječenje raznih bolesti poput srčanih i venskih problema, epilepsije i tumora.



Slika 4. Nanočestice zlata



Slika 5. Likurgov kalež promatran u refleksiji i transmisiji

U novije vrijeme zbog jedinstvenih optičkih svojstava nanočestice zlata koriste se u visokim tehnologijama kao što su organski fotonaponski sustavi, senzorske sonde, električnim vodičima, medicinskim uređajima. Optička i električna svojstva nanočestica zlata mogu se mijenjati promjenom veličine, oblika, površine i agregatnog stanja.[11]

2.5. NANOČESTICE SREBRA

Srebrene nanočestice (slika 6) bile su poznate još u 4. stoljeću zbog svojih paraboličnih svojstava koja su se primjenjivala u izradi ogledala. Temeljni srebreni spojevi stoljećima su se koristili kao netoksične anorganske i antibakterijske tvari, zahvaljujući svojim antibakterijskim svojstvima koristili su se za konzerviranje drveta ili pročišćavanje vode u bolnicama. Nanomaterijali posjeduju jedinstvena kemijska i fizikalna svojstva za razliku od materijala na makroskali. Iz toga razloga antibakterijska svojstva srebrenih nanočestica se intenzivno istražuju, svoju primjenu su našli za liječenje rana, sterilizaciju, antibakterijskim tkaninama. U novije vrijeme počele su se koristiti i kao nosači lijekova. Također znanstvenici proučavaju integraciju nanočestica srebra sa drugim materijalima ako bi se proširila njihova primjena i poboljšala svojstva prvobitnih materijala. Tako se nanočestice koriste u solarnim ćelijama kao tanki film koji ima svojstvo vezivanja svijetla tj. fotona te se time poboljšava iskorištenje solarnih ćelija. Ova svojstva ih čine vrijednima i u drugim proizvodima poput tinte, mikroelektronike, uređajima za medicinsku dijagnostiku.



Slika 6. Nanočestice srebra

Uobičajen način proizvodnje ovih nanočestica je fizikalnim postupcima kao što je ionsko prskanje i kemijskim sol-gel metoda. Međutim u novije vrijeme razvijene su okolišno prihvatljivije metode sinteze jedna od njih je enzimatska sinteze nanočestica pri kojoj se koriste enzimi kao nosači srebra. „ Zelenom sintezom“ nanočestice se mogu proizvesti uz pomoć gljiva, kvasaca, bakterija i biljnih ekstrakata. Ovisno o odabranoj metodi mogu se dobiti srebrene nanočestice različite morfologije, oblika i veličine.[12]

2.6. NANOČESTICE CINKA

Nanočestice cinka korištene kao primjesa bakru još u 9. stoljeću u Mezapotaniji za bojanje stakla i keramike.[13]

Karakterizira ih visoka toplinska vodljivost, velika površina u omjeru na volumen, niska cijena proizvodnje, antibakterijska svojstva, dobra magnetska i optička svojstva te velika katalitička aktivnost. Glavna poteškoća u njihovoj sintezi je očuvanje jer pri izloženosti zraku odmah oksidiraju. Znanstvenici su koristili različite inertne medije poput argona i dušika da bi riješili ovaj problem, također su koristili različita kemijska sredstva da spriječe redukciju cinkove soli. Neka kemijska sredstva su vrlo skupa i imaju štetan utjecaj na okoliš, a neka su toksična za čovjeka.



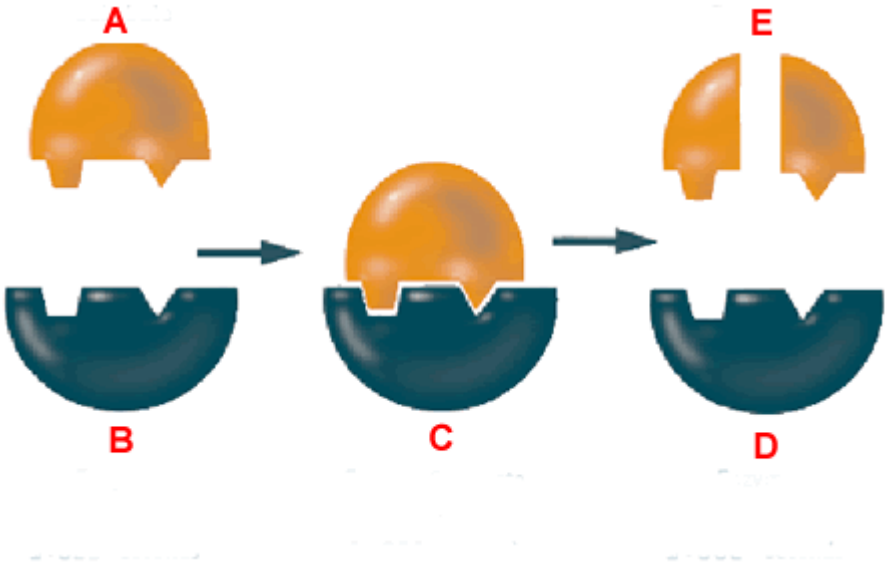
Slika 7.Cinkove nanočestice

Fizičke i kemijske metode su dva osnovna načina pripreme nanočestica cinka. Vakum naparivanje, mehaničko mljevenje su neke fizičke tehnike, dok kemijska redukcija, mikroemulzijska tehnika, elektrokemijska tehnika su kemijski postupci za sintezu nanočestica cinka. Biološka ili biosinteza također se smatra kemijskom tehnikom. Proizvodnja nanočestica kemijskom redukcijom daje dobre rezultate, ali zbog upotrebe toksičnih kemikalija ne može se svrstati u biosintezu. Da bi se izbjegla toksičnost nanočestice se sintentiziraju u zelenom okruženju uz pomoć askorbinske kiseline (vitamina C). Askorbinska kiselina ima dvostruki učinak, djeluje kao redukcijsko sredstvo i kao zaštitno sredstvo, što proces čini netoksičnim, ekonomski isplativim i što je važno ekološki prihvatljivim.

Cinkove nanočestice (slika 7) primjenu imaju u biosenzorima, elektrokemijskim senzorima, medicinskim uređajima, kremama za sunčanje.[14]

2.7. ENZIMI

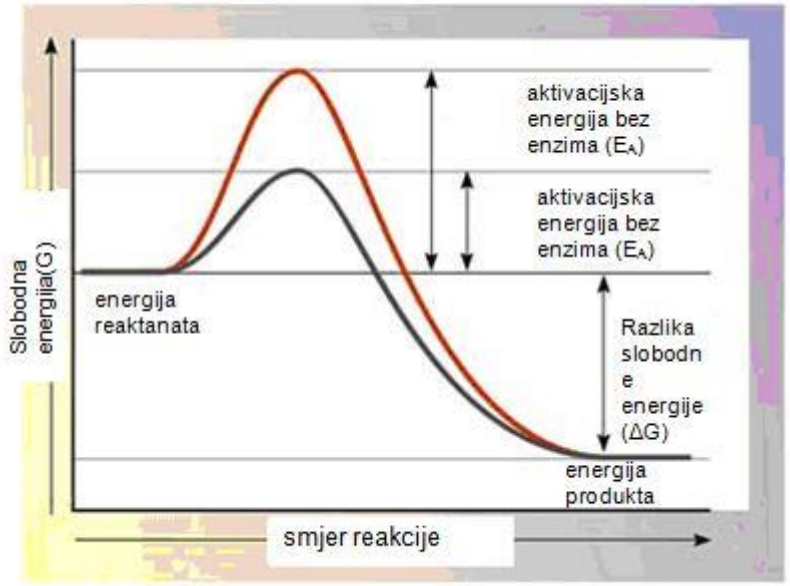
Enzimi su biokatalizatori koji ubrzavaju biokemijske reakcije. Biokatalizator se sastoji od "katalitičkog džepa" u kojem su smještene funkcionalne skupine za katalizu, ograničene proteinskom ljuskom. U prirodi postoji preko 25 tisuća enzima ali svega 4 tisuće su priznate od strane međunarodne unije za biokemiju i molekularnu biologiju (IUBMB). Enzimi su prisutni u vlaknastim gljivama, kvascima i bakterijama. Prvi enzimi su izolirani 1914. godine, a 1926. godine dokazano je da su enzimi proteini te se 60-tih godina počelo sa većom proizvodnjom enzima pomoću mikroorganizama. Industrija enzima se ubrzano razvija zbog otkrivanja novih načina primjene enzima. Širok raspon korisnih enzima sa razlikama u specifičnom supstratu, brzini reakcije, toplinskom stabilnošću, pH vrijednosti proizvedeni su pomoću nativnih i rekombinantnih mikroorganizama.[15]



Slika 8. Teorija enzimske katalize na principu "ključ-brava" (A - supstrat, B i D - enzim, C - kompleks enzim supstrat, E – produkt)

Biokatalizatori se koriste za transformaciju makromaterijala u nove materijale i energiju. Enzimi kao biokatalizatori posjeduju slična svojstva kao i drugi kemijski katalizatori, ali uz znatno veći stupanj specifičnosti prema reakciji koju ubrzavaju. Jedan od najvažnijih faktora u enzimatskim kataliziranim reakcijama je izbor vrste enzima. S obzorom na različit izvor enzima bilo to da su izoliran iz bakterije, biljaka, pljesni, pokazuju i različita svojstva kao što su stabilnost, aktivnost i druge specifičnosti koje se moraju uzeti u obzir kod izbora enzima.

Postoji barem 21 teorija na koji način enzimi kataliziraju tj. ubrzavaju reakcije. Jedan od najčešćih je princip ključ-brava koju je iznio Brown 1902. godine (slika 8). Enzim (B) je brava u koju supstrat (A) može stati. Enzimi ubrzavaju reakcije tako da snižavaju energiju aktivacije. Što je niža energija aktivacije to reakcija teče brže. Međusobna interakcija supstrat enzim omogućuje stvaranje aktivnog prijelaznog kompleksa što dovodi do niže energije aktivacije. Supstrat u kompleksu se veže slabim van der Waalsovim i elektrostatskim privlačnim silama, vodikovom vezom ili rjeđe, kovalentnom vezom, što omogućava lagano razdvajanje po završetku reakcije. Cijeli proces kompleksiranja mora teći brzo i reverzibilno da bi se omogućilo brzo odvajanje novo nastalog produkta i enzima. Nakon odvajanja enzim nastavlja katalitičko djelovanje. Mehanizam katalize prikazan je na slici 9.

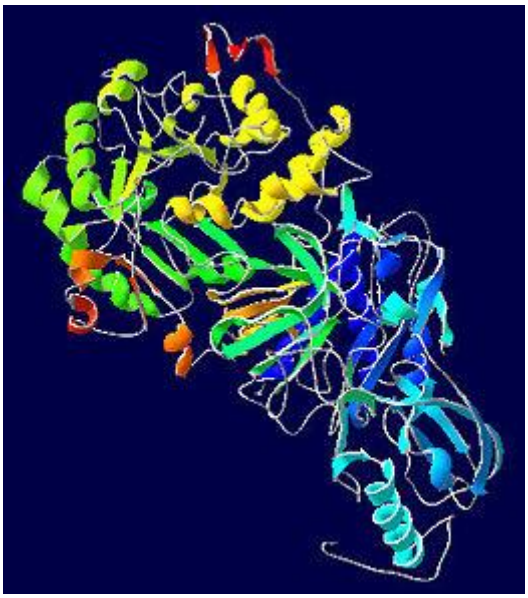


Slika 9. Mehanizam katalize

Enzimi se koriste u mnogim područjima uključujući organsku sintezu, proizvodnju lijekova, vrlo čistih kemikalija, hrane, deterdženata, a sudjeluju i u procesima fermentacije. Biokataliza omogućuje proizvodnju čistog produkta uz ponovljivost reakcije uz uvjete kao što je atmosferski tlak, približna neutralna vrijednost pH za vodene otopine i temperaturu blizu atmosferskim. Pri radu sa enzimima mogu se pojaviti određeni problemi kao što su niska aktivnost i stabilnost. Jedna od velikih prednosti enzima u usporedbi sa drugim katalizatorima je visoka selektivnost što dovodi do nastanak malih količina nusprodukta te njegova prirodna proteinska struktura koja mu omogućuje biorazgradljivost što ih čini prihvatljivim za okoliš.

2.7.1. Ureaza

James B. Sumner 1925. godine uspio je kristalizirati ureazu iz graha i svojim radom je dokazao da se radi o enzimu. Nekoliko godina poslije svoga uspjeha dobitnik je Nobelove nagrade (1946.). Ureaza je prvi kristalizirani enzim, a urea prva organska molekula sintetizirana u laboratoriju (slika 10). Pripada skupini amidohidrolaza i fosfotriesteraza i smatra se najučinkovitijim i najvažnijim enzimom od svih zbog velikog broja procesa u kojima sudjeluje. Primarna zajednička karakteristika enzima ureaze je prisutnost metalnog centra (niklov (II) ion) na njihovom aktivnom mjestu, metalni centar im omogućuje aktivaciju supstrata i vode u reakcijama. S obzirom na podrijetlo ureaze (bakterije ili biljke) mijenja se struktura enzima ali ostaje slična struktura aktivnog centra koja uvijek sadrži dva niklova (II) iona.



Slika 10. 3D struktura ureaze

Ureaza je enzim koji katalizira hidrolizu uree pri čemu nastaju amonijak i amonijev karbonat koji zatim sporo hidrolizira na ugljičnu kiselinu i još jednu molekulu amonijaka (jedn. 1). Reakcija hidrolize uree uz ureazu odvija se 10^{14} puta brže nego hidroliza uree bez ureaze.

$$H_2N\text{-}CO\text{-}NH_2 + H_2O \rightarrow CO_2 + 2NH_3 \qquad (1)$$

Ureaza je široko rasprostranjena u okolišu, mogu je sintentizirati bakterije, alge, biljke ali ne i životinje. Ima ključnu ulogu u pretvorbama dušičnih spojeva u okolišu pri čemu nastaje amonijak kojeg koriste biljke te mikrobi u tlu, a u biotransformacijama je značajna jer ubrzava reakciju hidrolize uree. Enzimi ureaza primjenjuju se u različitim područjima znanosti i industrije zbog njihove mogućnosti detektiranja uree. Kvantifikacija uree pomoću enzima ureaze jedna je od prvih klinički analiza. Točno određivanje koncentracije uree također je važno u postrojenjima za obradu otpadne vode, poljoprivredi i prehranbenoj industriji. Imobilizirana ureaza se se upotrebljava za kvantifikaciju uree, kreatina, arginina i teških metala. Biosenzori koji sadrže ureazu mogli bi se koristiti za razvoj umjetnih bubrega, a činjenica koja je još zanimljivija je upotreba imobilizirane ureaze u svemirskom programu za recikliranje vode.[16] Također, sve se više koristi i za dobivanje nanočestica tj. kao enzim tvori jezgru nanočestice.

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 (Au, Ag, Zn) određeno je spektrofotometrijski. Dobiveni uzorci nanočestica nakon centrifugiranja sušeni su, a potom su analizirani pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM; *engl. Scanning electron microscope*).

3.1 APARATURA

3.1.1. Kotlasti reaktor

U ovom radu kotlasti reaktor korišten je za sintezu nanočestica zlata, srebra i cinka. Eksperimenti su provedeni u staklenim kotlastim reaktorima volumena 10 cm^3 (slika 11). Dobivanje nanočestica provedeno je u termostatiranoj tresilici (slika 12) pri T = 37°C uz lagano miješanje (150-200 rpm).



Slika 12. Kotlasti reaktor



Slika 11.Termostatirana tresilica

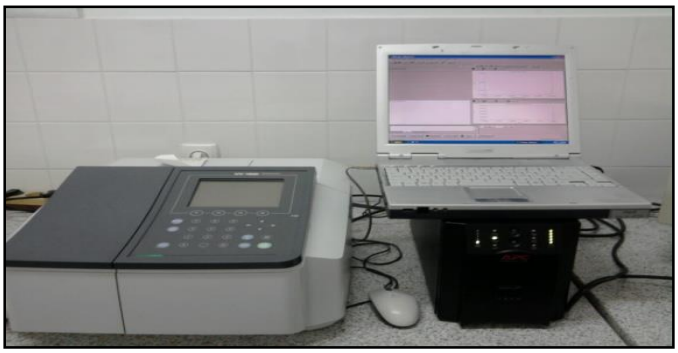
3.1.2. Spektrofotometar

Spektrofotometar je mjerni uređaj kojim se mjeri količina svijetla koju apsorbira uzorak. Apsorpcija svjetlosti kroz otopine matematički se opisuje Beer - Lambertovim zakonom (jedn. 2) pri čemu *ABS* predstavlja apsorbanciju na određenoj valnoj duljini svjetlosti, ε molarni apsorpcijski (ekstincijski) koeficijent [$dm^3\ mol^{-1}\ cm^{-1}$], svojstven svakoj molekulskoj

vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti, *b* duljinu puta svjetlosti kroz uzorak [cm], a *c* koncentraciju tvari u otopini [mol dm^{-3}].

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

U ovom radu, spektrofotometar je korišten za određivanje koncentracije proteina koja je direktno proporcionalna koncentraciji enzima Bradford metodom. Korišten je uređaj Shimadzu UV-1800 (slika 13).



Slika 13. 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 pretražnom elektronskom mikroskopu. Uzorci su centrifugirani na 14000 okr/min pri temperaturi T = 4°C u trajanju od t = 5 min. Korišten je uređaj Hettich Universal 320R (slika 14).



Slika 14. Centrifuga Hettich Universal 320R

3.1.4. Pretražni elektronski mikroskop (SEM)

Pretražni elektronski mikroskopomogućava istraživanje mikrostruktura uvećanjem i do 100.000 puta, a radi na način da se na uzorak usmjeri pomični snop elektrona čijim pomicanjem se pretražuje površina uzorka. Pri tome može doći do raspršivanja elektrona na uzorku ili stvaranja tzv. sekundarnih elektrona koji se emitiraju s površine uzorka. Takvi raspršeni i sekundarni elektroni se potom sakupljaju i detektiraju pomoću posebnog elektroničkog uređaja. Kako snop elektrona prelazi preko uzorka, na ekranu se stvara slika predmeta sastavljena od mnoštva točaka. Što veći broj elektrona uređaj detektira, točke su, tj. slika je svjetlija.

U ovom radu, SEM Tescan Vega 5136 MM (slika15) je korišten za analizu, odnosno karakterizaciju dobivenih nanočestica.



Slika 15. SEM Tescan Vega 5136 MM

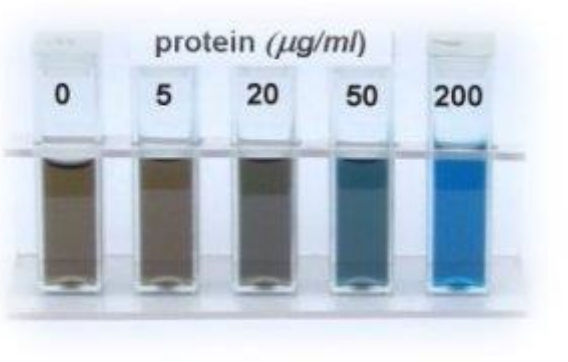
3.2. ANALITIČKE METODE

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 bluena protein. Što je koncentracija proteina u uzorku viša to će se više boje vezati na protein tj. boja postaje tamnija (slika 16). 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, 50ml 95% etanola te 100 ml 85% fosforne kiseline i 850 ml redestilirane vode.



Slika 16. Bradfordov test

Uzorci za mjerenje apsorbancije na spektrofotometru, odnosno za određivanje koncentracije proteina pripremani sun a slijedeći način: uzimano je po 20 μL uzorka iz reaktora i razrijeđeno u 980 μL redestilirane vode; sve se dobro promiješloa i centrifugiralo na 14.000 rpm, *T*= 4°C, 5 min zatim je supernatant dodatno razrijeđen 10x (100 μL supernatanta + 900 μL redestilirane vode). Ptom se u 800 μL supernatanta dodaloe 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 λ = 595 nm.

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

Rezultati su prikazani kao baždarni dijagram (Prilog, slika 32) koji daje ovisnost apsorbancije o koncentraciji proteina.

3.2.2. Određivanje apsorpcijskog spektra Au, Ag i Zn nanočestica

Uzorci volumena 1 cm^3 za apsorpcijski spektar uzeti su svaki 30-120 min, te prebačeni u kvarcnu kivetu, te je korištenjem spektrofotometra pri valnoj duljini λ = 400-700 nm mjeren spektar.

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 pripremljena 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 pripremljena 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 mM pripremljena je otapanjem 5,3 mg NH_4Cl u 10 mL redestilirane vode. Za izradu baždarnog dijagrama, pripremljene su otopine NH_4Cl u rasponu koncentracija od 0 – 2,0 mM.

Uzorci za mjerenje apsorbancije na spektrofotometru, odnosno za određivanje koncentracije amonijevih iona pripremljeni su miješanjem 50 μL otopine NH_4Cl određene koncentracije s po 1.000 μL pripremljenog 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 λ = 685 nm.

Baždarni dijagram koji daje ovisnost apsorbancije o koncentraciji amonijevog klorida dan je u prilogu na slici 35.

3.3. SINTEZA NANOČESTICA

3.3.1. Sinteza nanočestica zlata

Eksperimenti su provedeni u kotlastom reaktoru volumena 10 cm^3 pri temperaturi T=37ºC uz lagano mješanje (150 rpm). Ukupno je provedeno četiri eksperimenta sinteze nanočestica zlata (tablica 1) te jedan eksperiment u kojem se pratio utjecaj različitih koncentracija zlata na sintezu nanočestica (tablica 2), koji je proveden u staklenim vialama od 2 cm^3 također pri temperaturi T = 37ºC uz lagano mješanje (150 rpm) tijekom 24 sata.

Tablica1. Uvjeti u eksperimentima u kojima je provedena sinteze nanočestica zlata

TEMPERATURA [°C]	MEDIJ	KONCENTRACIJA $HAuCl_4$ [mM]
37	Redestilirana dušificirana voda	0,6
		1,2
		2,54
		4

Tablica 2. Uvjeti u eksperimentima u kojima se pratio utjecaj različitih koncentracija zlata na sintezu nanočestica

TEMPERATURA [°C]	MEDIJ	KONCENTRACIJA $HAuCl_4$[mM]
37	Redestilirana dušificirana voda	0,2
		0,5
		1
		2
		4
		10

Sve reakcije provedene su uz istu početnu koncentraciju ureaze (2 mg cm^{-3}) i kalijeva karbonata (1 mg cm^{-3}) u reaktorima.

Dodatkom $HAuCl_4$ u reaktor aproksimiran je početak svake reakcije. Uzorci za određivanje koncentracije proteina uzimani su svakih pola sata tjekom 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 °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 apsorpcijskog spektra uzimani su u različitim vremenskim intervalima od 30 minuta do 2 sata. Uzorci volumena 1 ml izuzimani su iz reaktora te se mjerio spektar na spekrofotometru. Uzorak se po završetku mjerenja uzorak se vraćao u rekator kako ne bi došlo značajne promjene reakcijskog volumena.

Prije pokretanja eksperimenta i nakon svakog uzimanja i vraćanja uzorka reakcijska smjesa se dušificirala radi uklanjanja kisika.

Nakon završene reakcije, reakcijska smjesa je centrifugirana na 14000 okr/min u trajanju 5 minuta pri temperaturi T = 4^{o}C nakon čega su dobivene nanočestice su sušene i potom analizirane su na SEM-u.

3.3.2. Sinteza nanočestica srebra

Eksperimenti su provedeni u kotlastom reaktoru volumena 10 cm^3 pri temperature T = 37 ^{o}C uz lagano mješanje (150 rpm). Ukupno je provedeno četiri eksperimenta sinteze nanočestica srebra (tablica 3), te jedan eksperiment u kojem se pratio utjecaj različitih koncentracija srebra na sintezu nanočestica (tablica 4), koji je proveden u staklenim vialama od 2 cm^3 također pri temperaturi T = 37 ^{o}C uz lagano mješanje (150 rpm).

Tablica 3. Uvjeti u eksperimentima u kojima je provedena sinteze nanočestica srebra

TEMPERATURA [°C]	MEDIJ	KONCENTRACIJA $AgNO_3$[mM]
37	Redestilirana dušificirana voda	0,34
		1
		4
		4,47

Tablica 4. Uvjeti u eksperimentima u kojima se pratio utjecaj različitih koncentracija srebra na sintezu nanočestica

TEMPERATURA [°C]	MEDIJ	KONCENTRACIJA $AgNO_3$[mM]
37	Redestilirana dušificirana voda	0,076
		0,152
		0,76
		3,04
		6,08

Sve reakcije provedene su uz istu početnu koncentraciju ureaze (2 mg cm^{-3}) i kalijeva karbonata (0,43 mg cm^{-3}) u reaktorima.

Dodatkom $AgNO_3$ u reaktor aproksimiran je početak svake reakcije. Daljnji koraci analize su identični kao i kod zlata.

Prije pokretanja eksperimenta i nakon svakog uzimanja i vraćanja uzorka reakcijska smjesa se dušificirala radi uklanjanja kisika.

3.3.3. Sinteza nanočestica cinka

Eksperimenti su provedeni u kotlastom reaktoru volumena 10 cm^3 pri sobnoj temperaturi T = 25 °C uz lagano mješanje (150 rpm). Ukupno je provedeno tri eksperimenta sinteze nanočestica cinka (tablica 5).

Tablica 5. Uvjeti u eksperimentima u kojima je provedena sinteze nanočestica cinka

TEMPERATURA [°C]	MEDIJ	KONCENTRACIJA uree [mM]	KONCENTRACIJA $Zn(NO_3)_2$ [mM]
25	0,1M $NaNO_3$	3,33	1
		3,33	2
		10	1
		10	2
		10	3,36

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

Dodatkom $Zn(NO_3)_2$ u reaktor aproksimiran je početak svake reakcije. Postupak analize proteina tj. mjerenje koncentracije proteina i uzimanje uzorka isti su kao i kod zlata.

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.

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 proprcionalna brzini taloženje proteina. Ova brzina je opisana kinetikom 1. reda (jedn.3).

$$\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{protein}}}{\mathrm{d}t} = -k \cdot c_{\mathrm{protein}} \qquad (3)$$

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

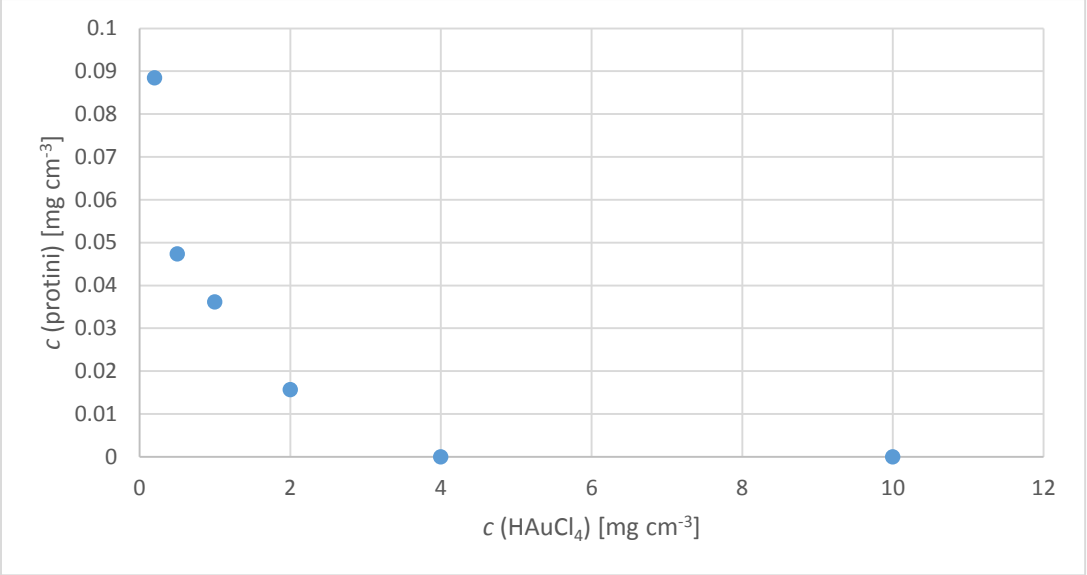
U ovom radu provedena je sinteza nanočestica zlata, srebra i cinka na jezgru od proteina korištenjem enzima ureaze te metalnih soli $HAuCl_4$, $AgNO_3$ i $Zn(NO_3)_2$. Svrha istraživanja je bila pratiti nastanak nanočestica sa proteinskom jezgrom i ljuskom od metala na način da se pratila koncentracija proteina (enzima), snimao apsorpcijski spektar u eksperimentima nastanka nanočestica zlata i srebra, te pratila koncentracija NH_4^+ iona prilikom sinteze nanočestica zinka. Cilj rada je bio također i utvrditi veličinu nanočestica pomoću elektronskog pretražnog mikroskopa.

4.1 UTJECAJ RAZLIČITIH KONCENTRACIJA $HAuCl_4$ NA SINTEZU NANOČESTICA ZLATA

Utjecaj različitih koncentracija $HAuCl_4$ na sintezu nanočestica zlata sa jezgrom od ureaze ispitan je na način da su pripremljene reakcijske smijese sa različitom koncentracijom $HAuCl_4$ (tablica 2) uz iste koncentracije ureaze i kalijeva karbonata te se mjerila koncentracija proteina na kraju eksperimenta. Rezultati su prikazani u tablici 6. te grafički na slici 17.

Tablica 6. Koncentracija proteina nakon 24 sata u eksperimentima koji su se provodili pri različitim početnim koncentracijama $HAuCl_4$

EKSPERIMENT	KONCENTRACIJA $HAuCl_4$ [mM]	KONCENTRACIJA proteina [mg cm^{-3}]
Au_1	0,2	0,0884
Au_2	0,5	0,0473
Au_3	1	0,0361
Au_4	2	0,0156
Au_5	4	0
Au_6	10	0



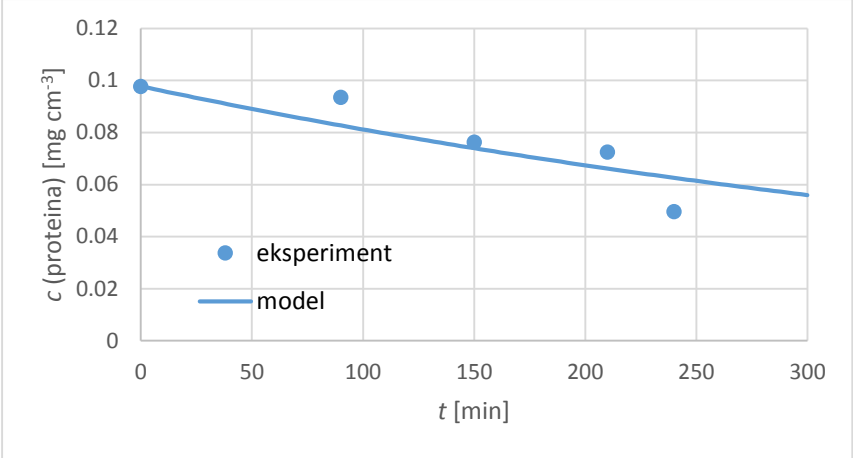
Slika 17. Utjecaj različitih koncentracija $HAuCl_4$ na sintezu nanočestica (redestilirana voda, c (K_2CO_3) = 1 mM, T = 37 °C, 150 rpm, c_{ureaze} = 2 mg cm^{-3}, t = 24 h, V = 10 cm^3)

Iz tablice 6. i slike 17. može se zaključiti da pri najnižim koncentracijama $HAuCl_4$ (0,2 mM) nastaje najmanje nanočestica jer je u tom slučaju najveća koncentracija proteina, što znači da se najmanja količa enzima ureaze istaložila. Kako se povećava koncentracija $HAuCl_4$ dolazi do nastanka više nanočestica na što ukazuje smanjenje koncentracije proteina. Kod koncentracija $HAuCl_4$ u eksperimentima Au_1-Au_4 nije potrošen sav protein. Navedeno ukazuje da je potrebna veća koncentracija $HAuCl_4$ kako bi se preostali protein potrošio odnosno na sebe vezao Au i tako formirao nanočestice. Pri većim koncentracijama $HAuCl_4$ (4 i 10 mg cm^{-3}) potrošen je sav protein tj, sva aktivna mjesta na proteinu su zauzele molekule zlata što je omogućilo formiranje nanočestica.

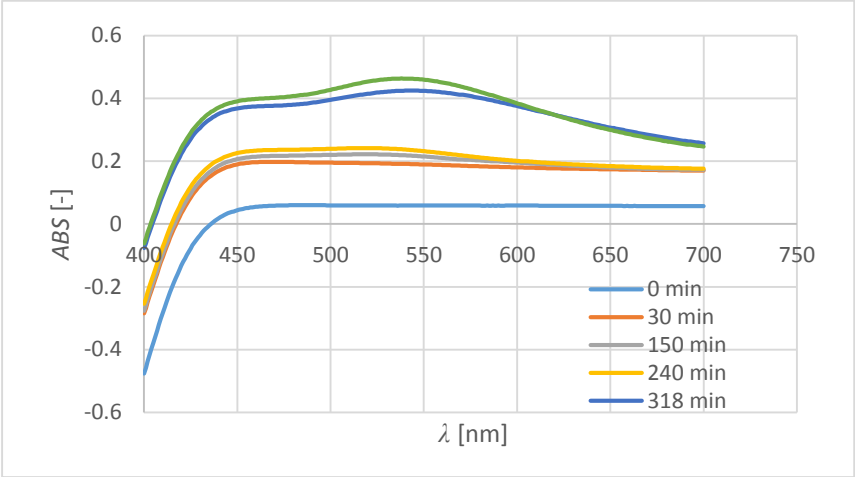
4.2. SINTEZA NANOČESTICA ZLATA

Nanočestice zlata sa jezgrom od ureaze sintentizirane su korištenjem hidrogen tetra klor aurata i enzima ureaze. U reaktoru volumena 10 cm^3 priređena je reakcijska smjesa koja se sastoji od redestilirane dušificirane vode, ureaze, kalijeva karbonata i $HAuCl_4$. Dodatak $HAuCl_4$ označava vrijeme pokretanja eksperimenta. Tokom eksperimenta u određenim vremenskim intervalima mjerena je koncentracija proteina te se snimao spektar nanočestica zlata. Rezultati eksperimenta su prikazani kao ovisnost koncentracije enzima o vremenu trajanja reakcije (slika 18 A-21A) kao apsorpcijski spektar u funkciji vremena trajanja reakcije (slika18B-21B) i ovisnost apsorbancije dobivenog pika na UV spektru u vremenu trajanja reakcije (slika 18C-21C).

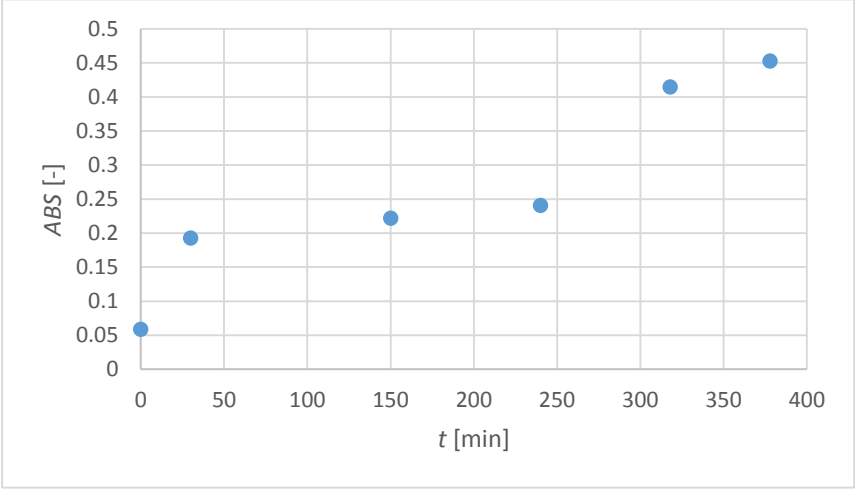
A)



B)

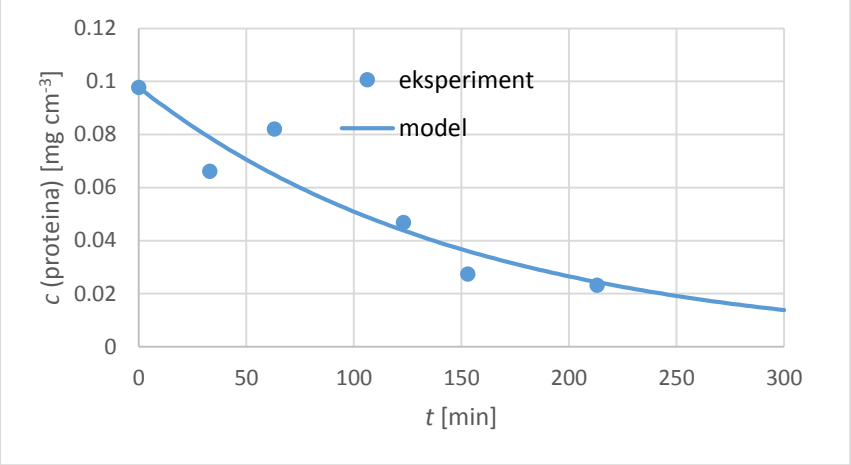


C)

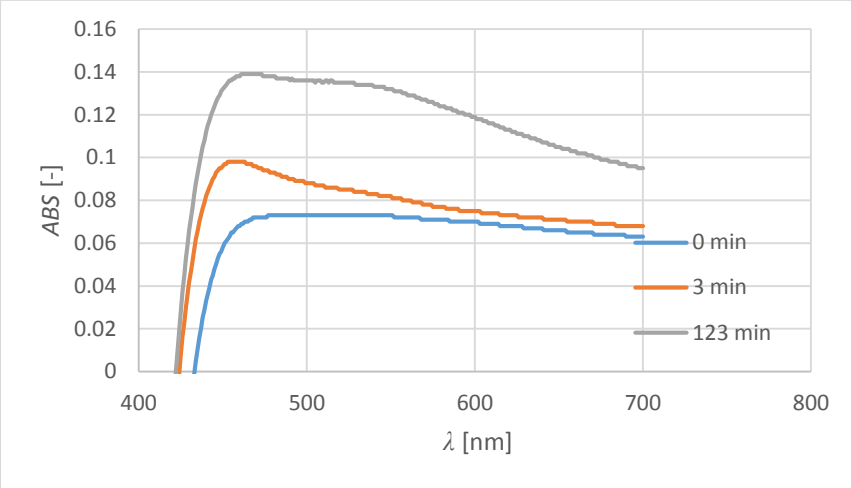


Slika 18. Sinteza Au nanočestica (redestilirana voda, c (K_2CO_3) = 1 mM, T = 37 °C, 150 rpm, c_{ureaze} = 2 mg cm^{-3}, c ($HAuCl_4$) = 0,6 mM, V = 10 cm^3) , A) vremenska promjena koncentracije proteina, B) UV spektar, C) vremeska promjena apsorbancije dobivenog pika na UV spektru (520 nm)

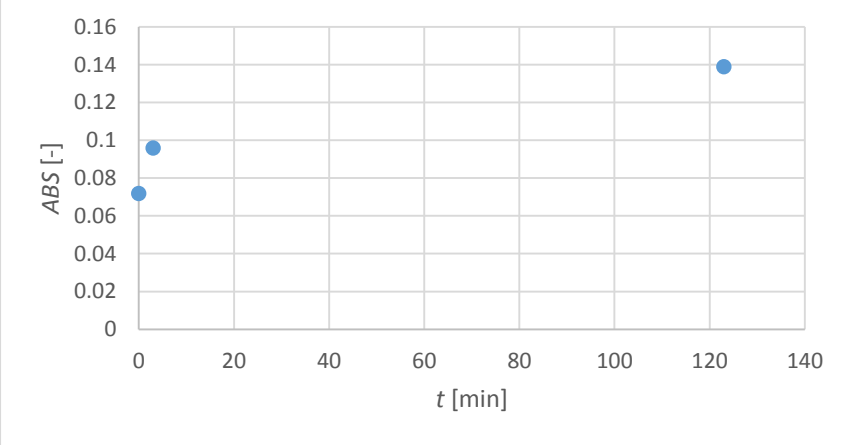
A)



B)

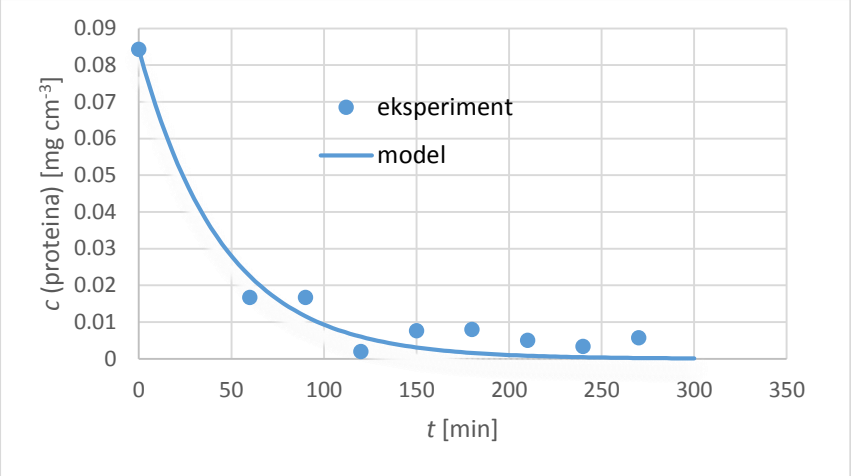


C)

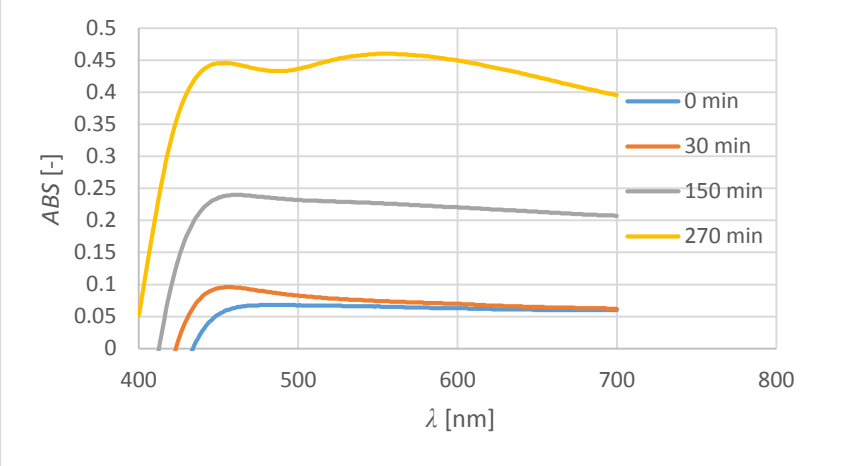


Slika 19. Sinteza Au nanočestica (redestilirana voda, c (K_2CO_3) = 1 mM, T = 37 °C, 150 rpm, c_{ureaze} = 2 mg cm^{-3}, c ($HAuCl_4$) = 1,2 mM, V = 10 cm^3) , A) vremenska promjena koncentracije proteina, B) UV spektar, C) vremeska promjena apsorbancije dobivenog pika na UV spektru (470 nm)

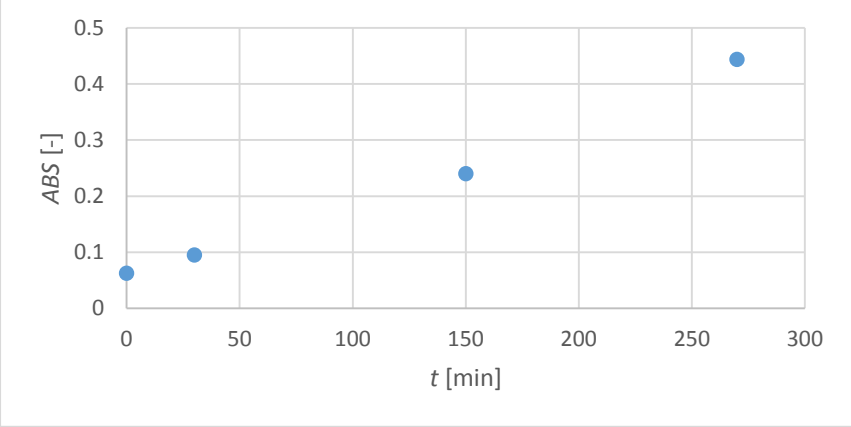
A)



B)

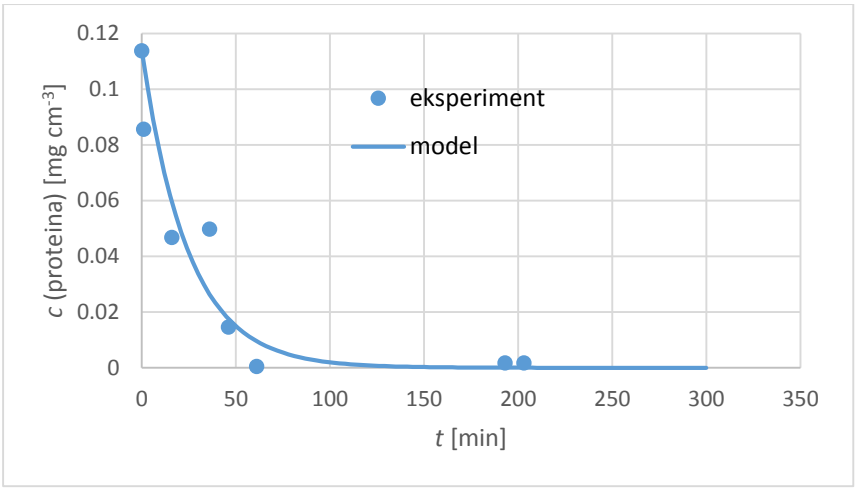


C)

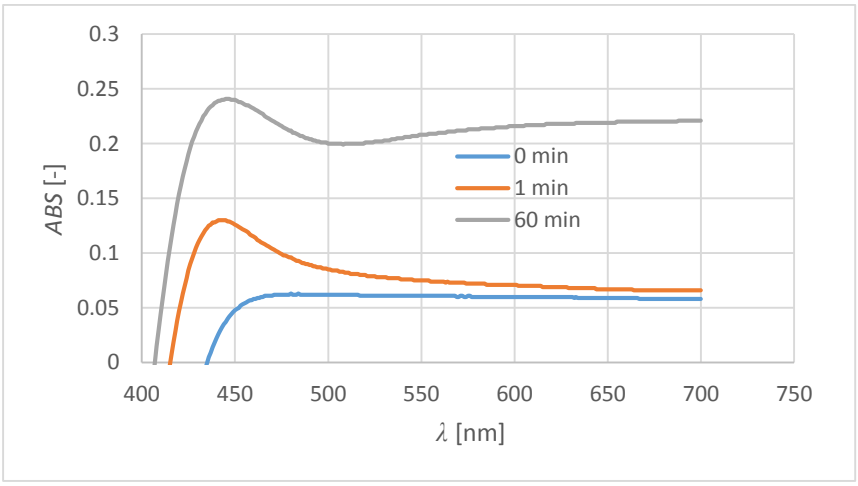


Slika 20. Sinteza Au nanočestica (redestilirana voda, *c* (K_2CO_3) = 1 mM, *T* = 37 °C, 150 rpm, c_{ureaze} = 2 mg cm^{-3}, *c* ($HAuCl_4$) = 2,54 mM, *V* = 10 cm^3) , A) vremenska promjena koncentracije proteina, B) UV spektar, C) vremeska promjena apsorbancije dobivenog pika na UV spektru (460 nm)

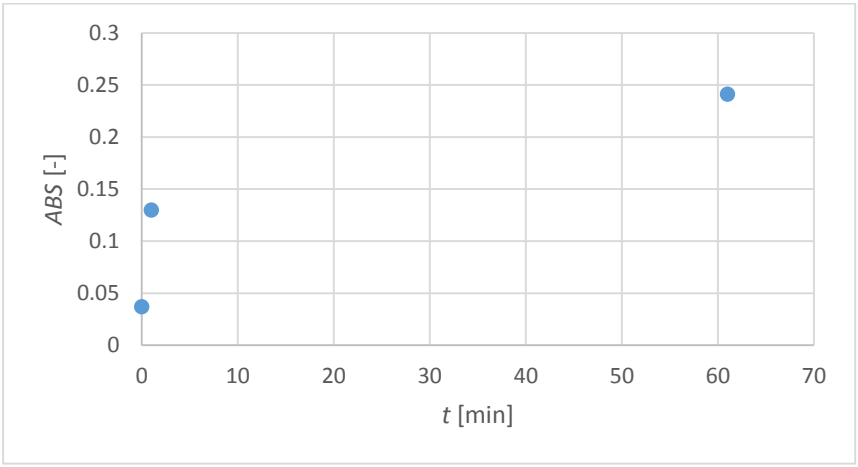
A)



B)



C)



Slika 21. Sinteza Au nanočestica (redestilirana voda, c (K_2CO_3) = 1 mM, T = 37 °C, 150 rpm, c_{ureaze} = 2 mg cm^{-3}, c ($HAuCl_4$) = 4 mM, V = 10 cm^3) , A) vremenska promjena koncentracije proteina, B) UV spektar, C) vremeska promjena apsorbancije dobivenog pika na UV spektru (455 nm)

Eksperimentalno dobiveni podaci za vremensku ovisnost koncentracije proteina u svim eksperimentima tj. pri svim koncentracijama $HAuCl_4$ se vrlo dobro slažu s podacima dobivenim simulacijom u programskom paketu *Scientist* (slika 18 B-21B) korištenjem kinetike prvog

reda (jedn. 3). Stoga možemo zaključiti da pretpostavljena kinetika prvog reda vrlo dobro opisuje ove reakcije. U *Scientist*-u su procijenjene i konstante brzine reakcije u min^{-1} te su dane u tablici 7.

Tablica 7. Parametri kinetike prvog reda procijenjeni u *Scientist*-u za brzinu taloženja enzima ureaze prilikom sinteze zlatnih nanočestica

KONCENTRACIJA $HAuCl_4$ [mM]	k (min^{-1})
0,6	0,001858
1,2	0,006518
2,54	0,02202
4	0,040555

Vrijednosti konstante brzine reakcije se povećavaju povećanjem koncentracije $HAuCl_4$. Stoga se može zaključiti da porastom početne koncentracije $HAuCl_4$ raste brzina reakcije što dovodi do bržeg stvaranja nanočestica.

Iz slika UV spektra nanočestica zlata (slika 18 B-21B) uočeno je da se valna duljina primjećenih pikova mijenja odnosno smanjuje s porastom početne koncentracije. U literaturi[10] je za nanočestice zlata naveden pik na 522 nm, ali isto tako je naglašeno da vrijednosti valnih duljina pikova mogu ovisiti o pH otopine. Apsorbancije dobivenog pika na UV spektru se povećavaju s vremenom (slika 18 C-21C) u svim eksperimentima, te su ujedno i dokaz da je dobivena apsorbancija proporcionalna koncentraciji nanočestica zlata.

4.3. UTJECAJ RAZLIČITIH KONCENTRACIJA $AgNO_3$ NA SINTEZU NANOČESTICA SREBRA

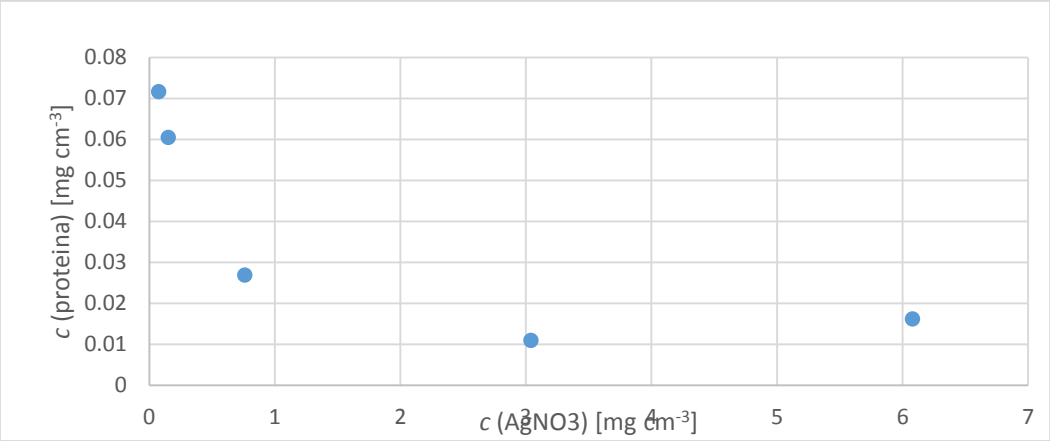
Utjecaj različitih koncentracija $AgNO_3$ na sintezu nanočestica srebrasa jezgrom od ureaze ispitan je na način da su pripremljene reakcijske smijese sa različitom koncentracijom $AgNO_3$ (Tablica 4) uz iste koncentracije ureaze i kalijeva karbonata te se mjerila koncentracija proteina na kraju eksperimenta. Rezultati su prikazani u tablici 8. te grafički na slici 21.

Iz tablice 8 i slike 21 može se zaključiti da pri najnižim koncentracijama $AgNO_3$ (0,076 mg cm^{-3}) nastaje najmanje nanočestica jer je u tom slučaju najveća koncentracija proteina. Kako se povećava koncentracija $AgNO_3$ dolazi do nastanka više nanočestica na što ukazuje smanjenje koncentracije proteina.

Tablica 8. Koncentracija proteina nakon 24 sata u eksperimentima koji su se provodili pri različitim početnim koncentracijama $AgNO_3$

EKSPERIMENT	KONCENTRACIJA $HAuCl_4$ [mM]	KONCENTRACIJA proteina [mg cm^{-3}]
Ag_1	0,076	0,0716
Ag_2	0,152	0,0604
Ag_3	0,76	0,0268
Ag_4	3,04	0,0109
Ag_5	6,08	0,0161

Kod koncentracija $AgNO_3$ u eksperimentima Ag_1-Ag_5 nije potrošen sav protein što znači da je potrebna veća koncentracija $AgNO_3$ kako bi se preostali protein potrošio odnosno na sebe vezao Ag i tako formirao nanočestice.

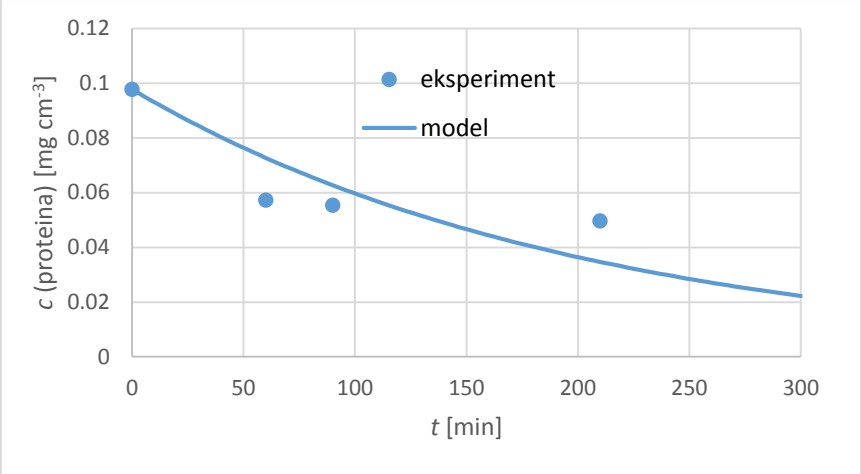


Slika 21. Utjecaj različitih koncentracija $AgNO_3$ na sintezu nanočestica (redestilirana voda, c (K_2CO_3) = 0,43 mM, T = 37 °C, 150 rpm, c_{ureaze} = 2 mg cm^{-3}, t = 24 h, V = 10 cm^3)

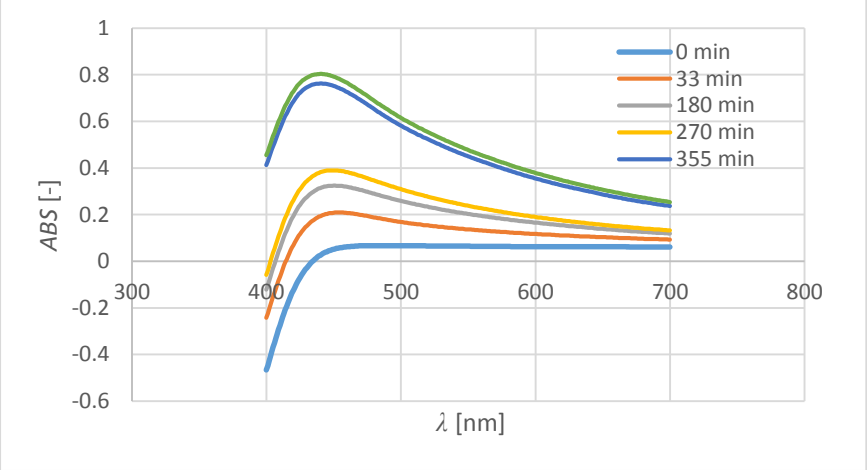
4.4. SINTEZA NANOČESTICA SREBRA

Nanočestice srebra sa jezgrom od ureaze sintentizirane korištenej soli srebrenog nitrata I enzima ureaze. U reaktoru volumena 10 cm^3 priređena je reakcijska smjesa koja se sastoji od redestilirane dušificirane vode, ureaze, kalijeva karbonata i $AgNO_3$. Dodatak $AgNO_3$ označava vrijeme pokretanja eksperimenta. Tokom eksperimenta u određenim vremenskim intervalima mjerena je koncentracija enzima te se snimao spektar nanočestica srebra. Rezultati eksperimenta su prikazani kao ovisnost koncentracije proteina o vremenu trajanja reakcije (slika 22A – 25A) kao apsorpcijski spektar u funkciji vremena trajanja reakcije (slika 22B-25B) i ovisnost apsorbancije dobivenog pika na UV spektru u vremenu trajanja reakcije (slika 22C-25C).

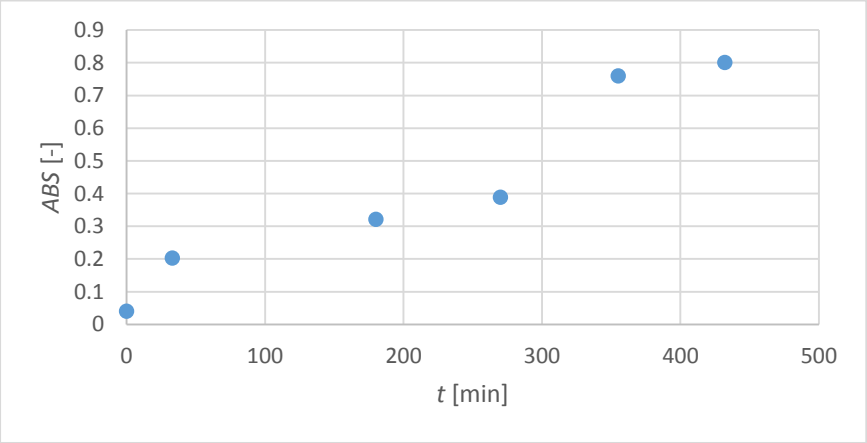
A)



B)

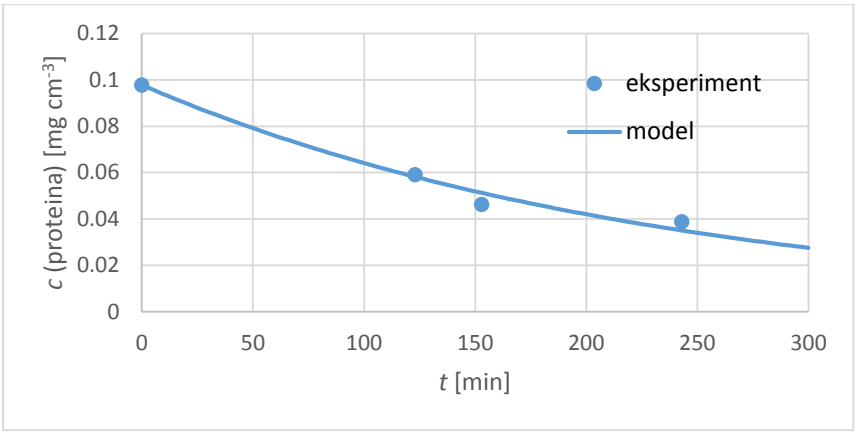


C)

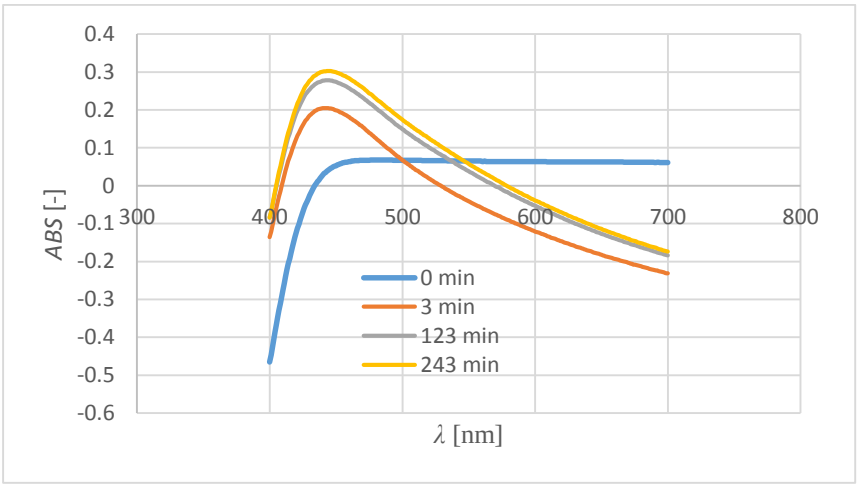


Slika 22. Sinteza Ag nanočestica (redestilirana voda, c (K_2CO_3) = 0,43 mM, T = 37 °C, 150 rpm, c_{ureaze} = 2 mg cm^{-3}, c ($AgNO_3$) = 0,34 mM, V = 10 cm^3) , A) vremenska promjena koncentracije proteina, B) UV spektar, C) vremeska promjena apsorbancije dobivenog pika na UV spektru (445 nm)

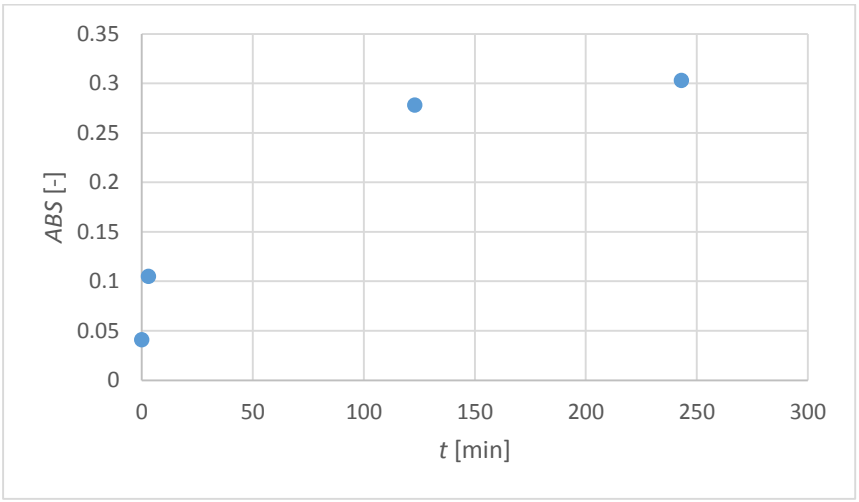
A)



B)

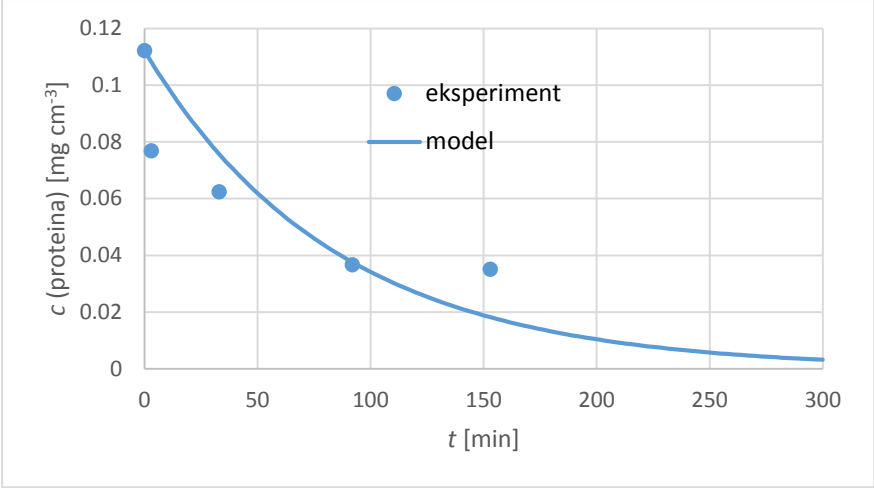


C)

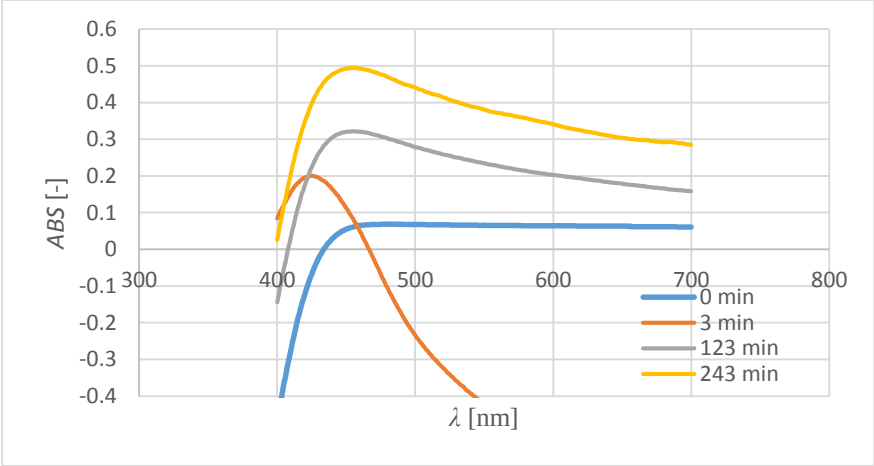


Slika 23. Sinteza Ag nanočestica (redestilirana voda, c (K_2CO_3) = 0,43 mM, T = 37 °C, 150 rpm, c_{ureaze} = 2 mg cm^{-3}, c ($AgNO_3$) = 1 mM, V = 10 cm^3) , A) vremenska promjena koncentracije proteina, B) UV spektar, C) vremeska promjena apsorbancije dobivenog pika na UV spektru (444 nm)

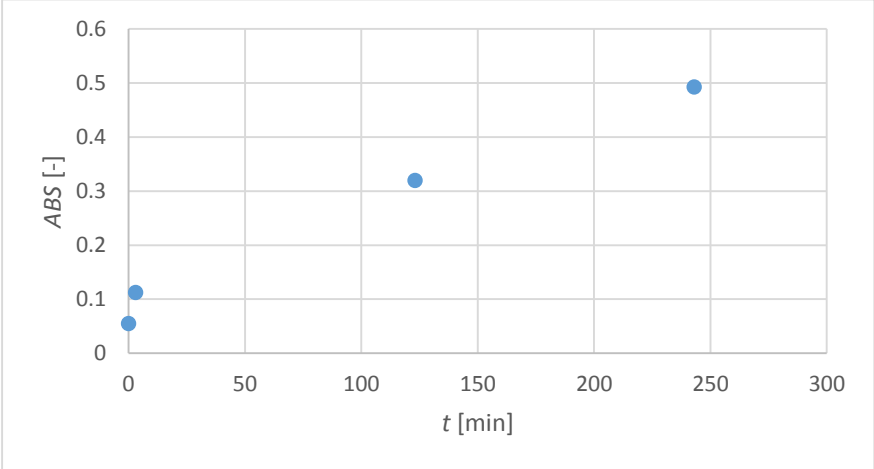
A)



B)

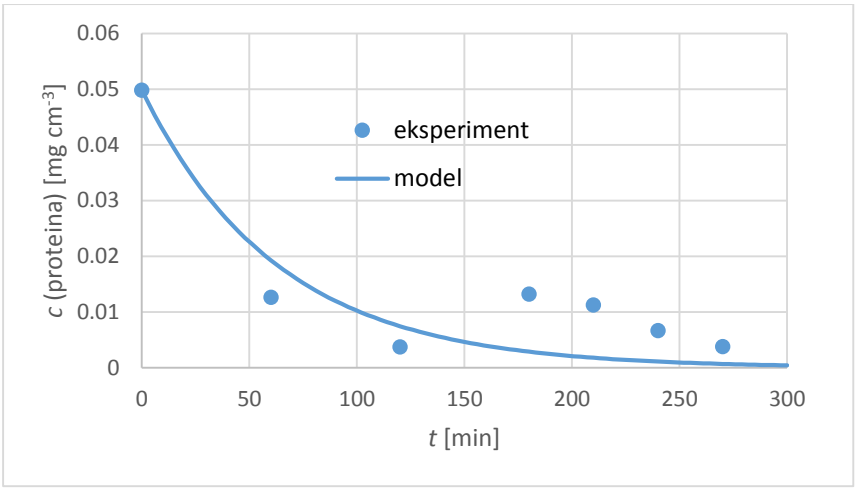


C)

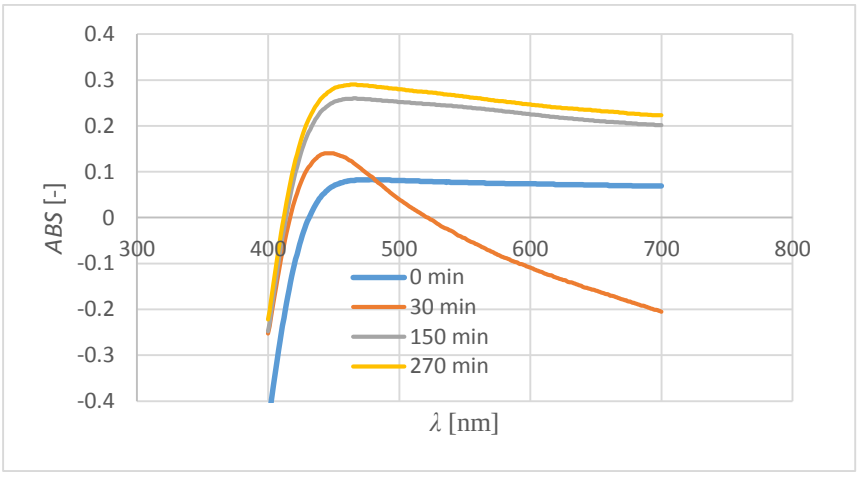


Slika 24. Sinteza Ag nanočestica (redestilirana voda, c (K_2CO_3) = 0,43 mM, T = 37 °C, 150 rpm, c_{ureaze} = 2 mg cm^{-3}, c ($AgNO_3$) = 4 mM, V = 10 cm^3) , A) vremenska promjena koncentracije proteina, B) UV spektar, C) vremeska promjena apsorbancije dobivenog pika na UV spektru (458 nm)

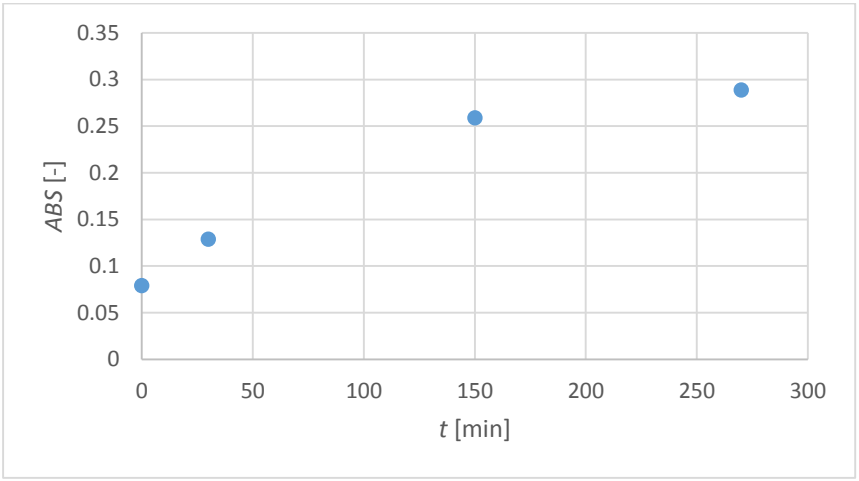
A)



B)



C)



Slika 25. Sinteza Ag nanočestica (redestilirana voda, c (K_2CO_3) = 0,43 mM, T = 37 °C, 150 rpm, c_{ureaze} = 2 mg cm^{-3}, c ($AgNO_3$) = 4,47 mM, V = 10 cm^3) , A) vremenska promjena koncentracije proteina, B) UV spektar, C) vremeska promjena apsorbancije dobivenog pika na UV spektru (460 nm)

Kao i kod sinteze nanočestica zlata promjena koncentracije proteina u vremenu (slika 22A – 25A) koja je proporcionalna brzini taloženja enzima ureaze opisana je kinetikom prvog reda (jedn.3). Usporedbom eksperimentalnih podataka i podataka dobivenih simulacijom pomoću modela može se zaključiti da model dobro opisuje eksperimente. Procijenjene konstante brzine kinetike prvog reda dane su u tablici 9.

Tablica 9. Parametri kinetike prvog reda procijenjeni u *Scientist*-u za brzinu taloženja enzima ureaze prilikom sinteze srebrenih nanočestica

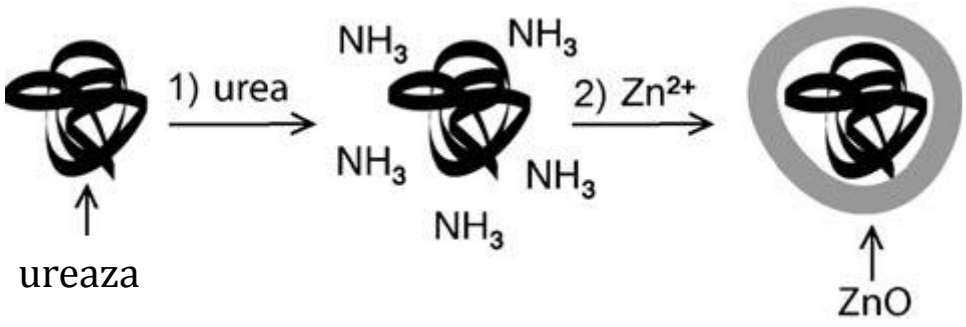
KONCENTRACIJA $AgNO_3$ [mM]	k (min^{-1})
0,34	0,004219
1	0,004937
4	0,011896
4,47	0,015815

Vrijednosti konstante brzine reakcije se povećavaju povećanjem koncentracije $AgNO_3$. Navedeno upućuje da povećanje koncentracija srebra utječe na povećanje brzine taloženja enzima ureaze, a samim tim i na brzinu stvaranja nanočestica.

Pikovi nanočestica srebra imaju svoj maksimum na UV spektru u području valnih duljina od 445-460 nm (slika 22B-25B). Valne duljine maksimuma pikova srebra rastu s povećanjem početne koncentracije $AgNO_3$ u eksperimentima. U literaturi[10] je navedeno maksimum pika na 412 nm za nanočestice srebra sa jezgorm od enzima ureaze. Apsorbancije dobivenog pika na UV spektru se povećavaju s vremenom (slika 22C-25C) u svim eksperimentima. Iz navedenog se može zaključiti da se dobivena apsorbancija može koristiti kao mjera nastajanja nanočestica srebra.

4.5. SINTEZA NANOČESTICA CINKA

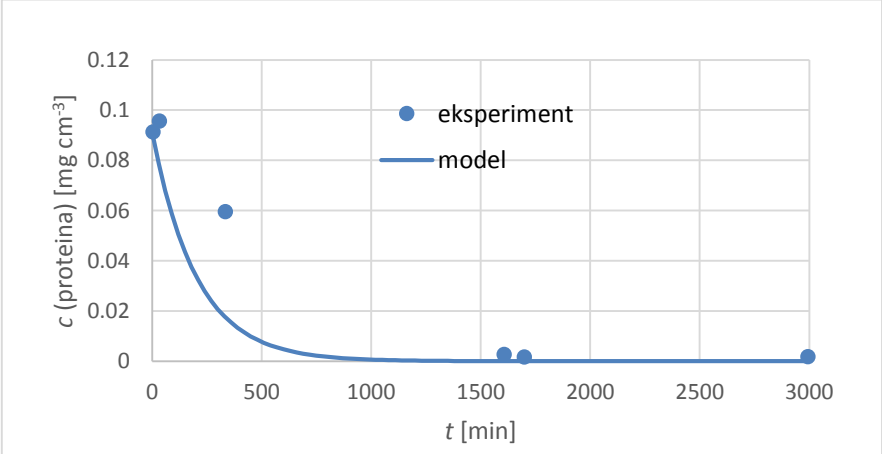
Nanočestice cinka s jezgrom od ureaze sintentizirane su korištenjem soli cinkovog nitrata, uree i enzima ureaze. Sinteza se provodila u 0,1 M otopini $NaNO_3$ prema shemi prikazanoj na slici 26[17]. U reaktor se prvo dodala dodala urea i ureaza. Hidrolizom uree uz ureazu nastaju amonijevi i hidroksid ioni. Amonijevi ioni podešavaju pH vrijednost u okružju enzima. Nakon dvije minute u reaktor su se dodao cink nitrat. Dodatkom cinka formira se ljuska od cinkovih oksida koja je katalizirana lokalnom pH vrijednošću u neposrednoj blizini enzima.



Slika 26. Shematski prikaz sinteze nanočestica cinkovih oksida s jezgrom od ureaze[17]

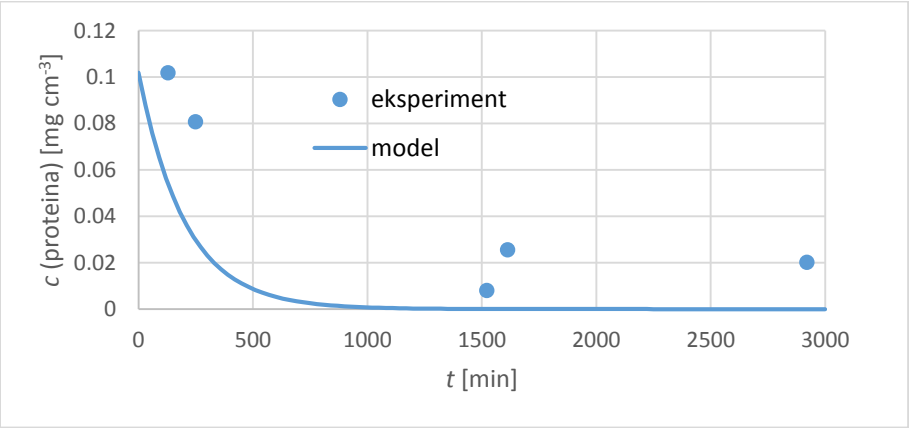
Dodatak cinkovih iona u otopinui smatra se početkom provedbe reakcije. Tijekom eksperimenta mjerila se koncentracija proteina u otopini koja je proprcionala koncentraciji ureaze. Proveden je jedan eksperiment sa nižom početnom koncentracijom uree (3,33 mM), te tri početna eksperimenta sa početnom koncentracijom 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. Cinkovih ioni značajno inhibiraju reakciju hidrolize uree, te je njihovim dodatkom u otopinu reakcija zaustavljena.

Eksperiment proveden sa nižom koncentracijom uree prikazan je na slici 27. 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 *Scientis*t, te iznosi k = 0,000594 min^{-1}.

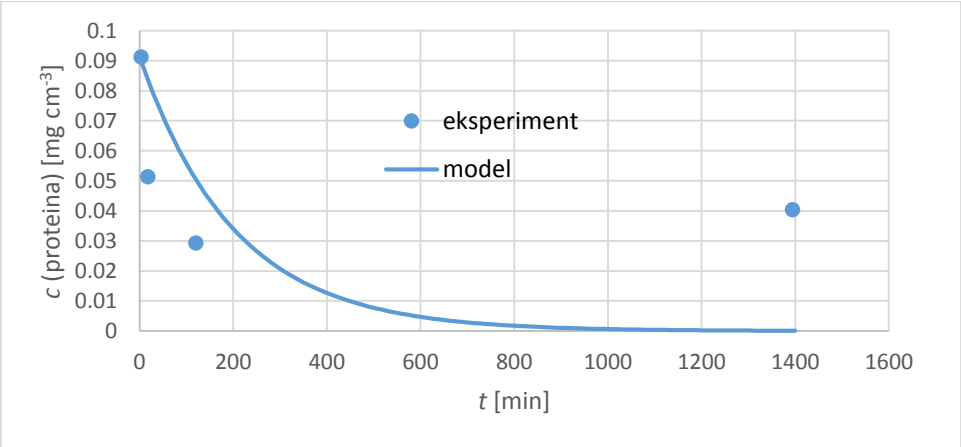


Slika 27. Sinteza Zn nanočestica (redestilirana voda, c ($NaNO_3$) = 0,1 M, T = 25°C, 150 rpm, c_{ureaze} = 1 mg cm^{-3}, c_{uree} = 3,33 mM, c ($Zn(NO_3)_2$) = 1 mM, V = 5 cm^3) , vremenska ovisnost koncentracije proteina

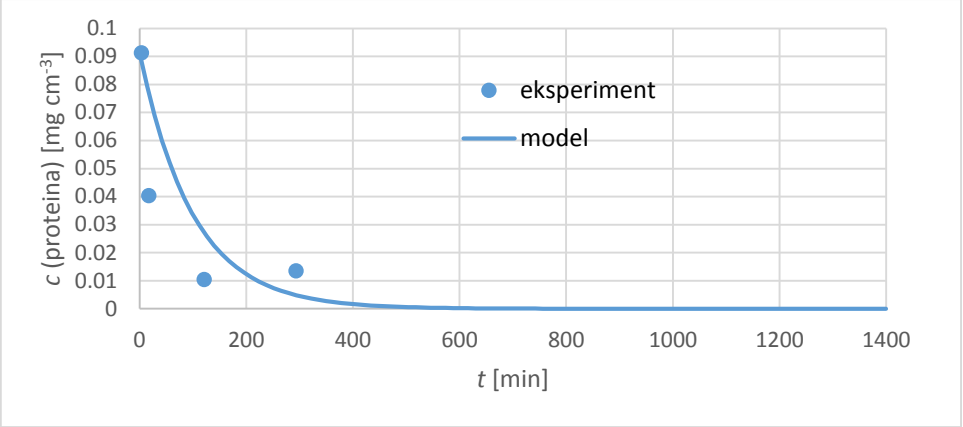
Na slikama 28- 30 prikazani su rezultati sinteze nanočestica cinka sa jezgrom od ureaze pri početnoj koncentraciji uree od 10 mM, te različitim koncentracijama zinkovih iona,



Slika 28. Sinteza Zn nanočestica (redestilirana voda, c ($NaNO_3$) = 0,1 M, T = 25°C, 150 rpm, c_{ureaze} = 1 mg cm^{-3}, c_{uree} = 10 mM, c ($Zn(NO_3)_2$) = 1 mM, V = 5 cm^3) , vremenska ovisnost koncentracije proteina



Slika 29. Sinteza Zn nanočestica (redestilirana voda, c ($NaNO_3$) = 0,1 M, T = 25°C, 150 rpm, c_{ureaze} = 1 mg cm^{-3}, c_{uree} = 10 mM, c ($Zn(NO_3)_2$) = 2 mM, V = 5 cm^3) , vremenska ovisnost koncentracije proteina



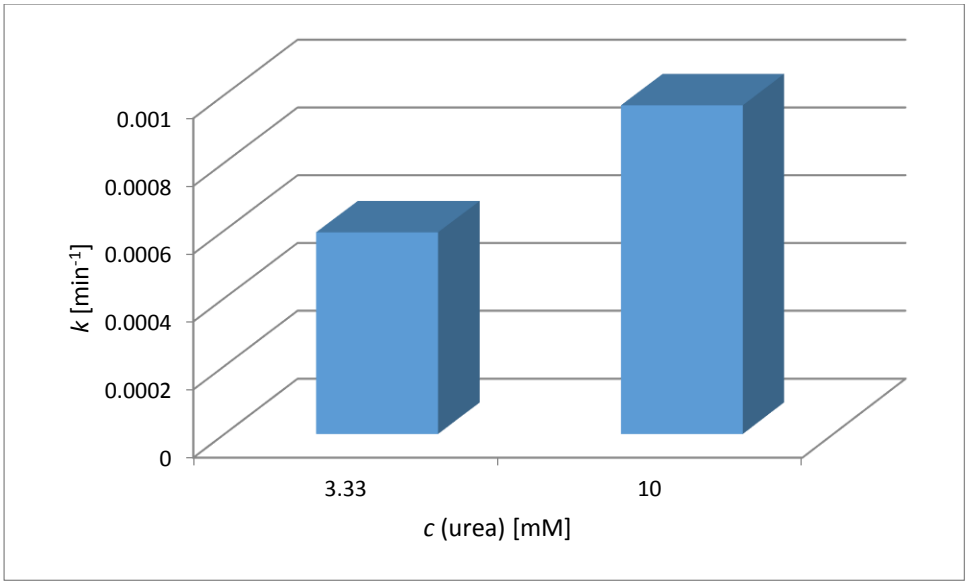
Slika 30. Sinteza Zn nanočestica (redestilirana voda, *c* ($NaNO_3$) = 0,1 M, *T* = 25°C, 150 rpm, c_{ureaze} = 1 mg cm^{-3}, c_{uree} = 10 mM, *c* ($Zn(NO_3)_2$) = 3,36 mM, *V* = 5 cm^3) , vremenska ovisnost koncentracije proteina

Podaci su u svim eksperimetima 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 $Zn(NO_3)_2$ (*c* = 1 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 10. Kako i kod sinteze ostalih metalnih nanočestica (tablica 7 i 9) procijenjena konstanta taloženja se povećava sa početnom koncentracijom cinkovih iona u otopini, te dolazi do bržeg stvaranja nanočestica

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

KONCENTRACIJA $Zn(NO_3)_2$ [mM]	*k* (min^{-1})
1	0.000969
2	0,013701
3,36	0,042017

Na slici 31 je prikazana usporedba procijenjene konstante brzine taloženja provedene sa istom početnom koncentracijom cinkovih iona, ali različitom početnom koncetracijom uree.

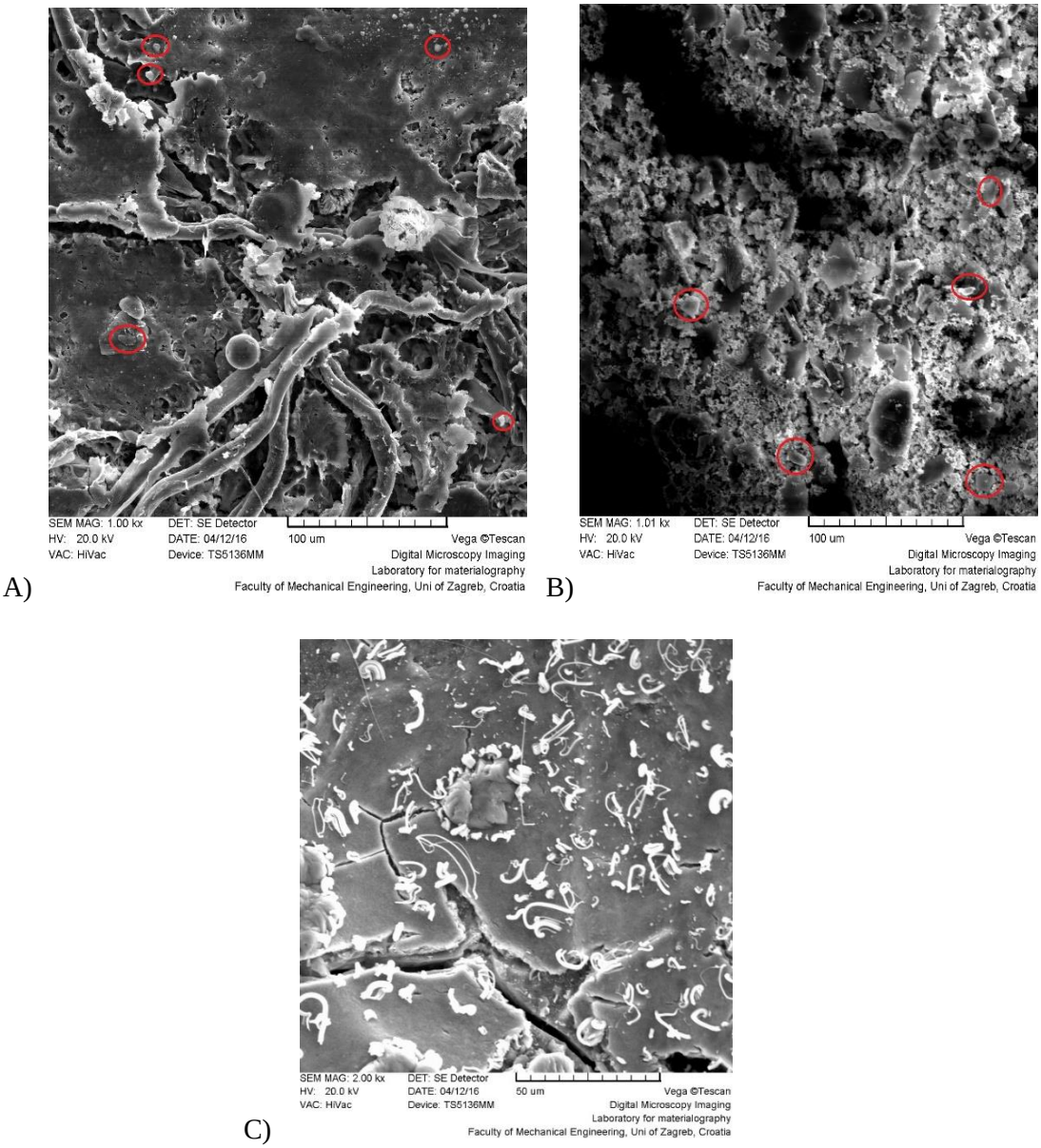


Slika 31. Utjecaj početne koncentracije uree na konstantu brzine taloženja enzima ureaze prilikom sinteze cinkovih nanočestica za jezgrom od ureaze (redestilirana voda, c ($NaNO_3$) = 0,1 M, T = 25°C, 150 rpm, c_{ureaze} = 1 mg cm^{-3}, c ($Zn(NO_3)_2$) = 1 mM, V = 5 cm^3)

Može se vidjeti (slika 31) da i povećana koncentracija iona amonijaka, odnosno hidroksid iona u okružju oko enzima povećavaju njegovu brzinu taloženja.

4.6. KARAKTERIZACIJA NANOČESTICA POMOĆU ELEKTRONSKOG PRETRAŽNOG MIKROSKOPA

Analizom pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa dobiveni su prikazi nanočestica zlata i cinka. Na slici 32 prikazane su snimljene nanočestice zlata sintetizirane u dušificiranoj redestiliranoj vodi pri različitim koncentracijama zlata (tablica 1), Nanočestice su snimane povećanjima od 1000 do 2000 puta. Na temelju dobivenih slika su određene njihove prosječne veličine, a dobiveni rezultati prikazani u tablici 11.



Slika 32. Prikaz nanočestica Au snimljenih pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa; nanočestice sintetizirane u redestiliranoj vodi pri T = 37°C, c_{ureze} = 2 mg cm^{-3}, c(K_2CO_3) = 1 mM i c($HAuCl_4$) =: A) 0,6 mM (uvećanje 1000 x), B) 2,54 mM (uvećanje 1000 x) i C) 4mM (uvećanje 2000 x)

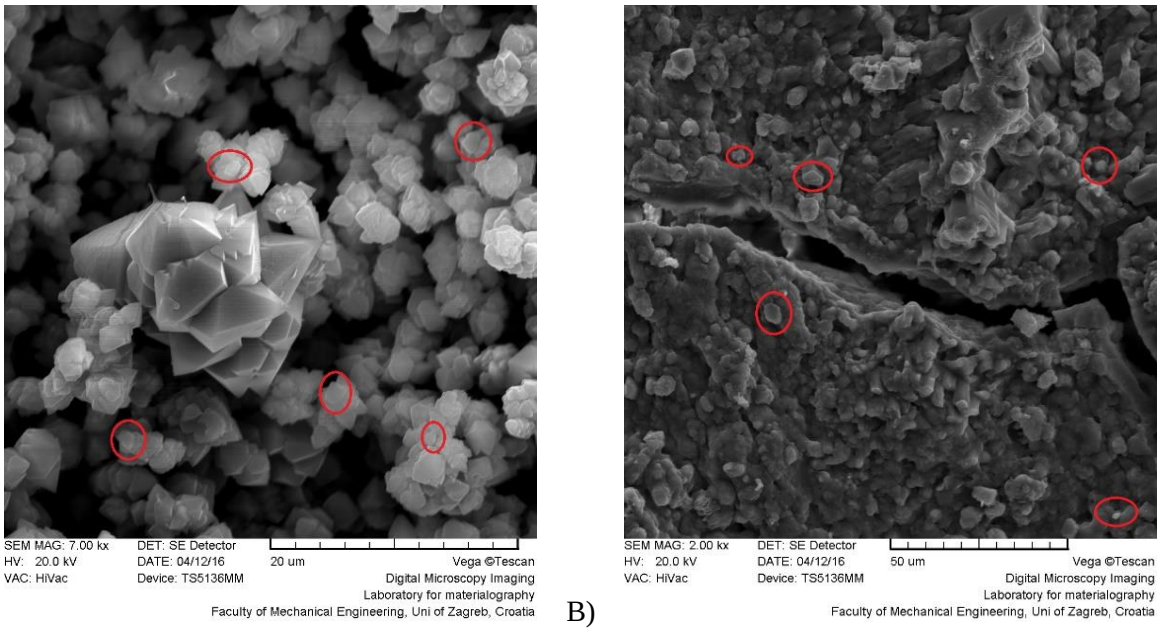
Tablica 11. Prosječne veličine sintetiziranih nanočestica Au

TEMPERATURA, [°C]	MEDIJ	KONCENTRACIJA $HAuCl_4$ [mM]	RASPON VELIČINA, [µm]	PROSJEČNA VELIČINA, [µm]
37	Redestilirana voda	0,6	3,627-5,909	5,861
		2,54	11,627-10,7209	10,521
		4	-	-

Na temelju tablice 11 može se zaključiti da veličina čestica raste s povećanje koncentracije $HAuCl_4$. Navedeno upučuje da veća brzina sinteze ujedno doprinosi povećanju veličine

nanočestice. Rezultati za koncentraciju $HAuCl_4$ od4 mM nedostaju radi nemogućnosti mjerenja zbog gustih nanočestica.

Na slici 33 prikazane su nanočestice cinka snimljene na elektronskom pretražnom mikroskopu pri različtitim početnim koncentracijama uree, te pri istoj početnoj koncentraciji cinka (1 mM)



Slika 33. Prikaz nanočestica Zn snimljenih pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa; nanočestice sintetizirane u redestiliranoj vodi pri T = 25°C, c_{ureze} = 1 mg cm^{-3}, $c(NaNO_3)$= 0,1 M, $c(Zn(NO_3)_2)$= 1 mM i c_{uree} :A) 3,33 mM i B) 10 mM

U tablici 12 prikazane su veličine nanočestica cinka određene korištenjem slika prikazanim na slici 33.

Tablica 12. Prosječne veličine sintetiziranih nanočestica Zn

TEMPERATURA, [°C]	MEDIJ	KONCENTRACIJA uree [mM]	RASPON VELIČINA, [µm]	PROSJEČNA VELIČINA [µm]
25	Redestilirana voda	3,33	1,383-1,556	1,404
		10	2,310-5,582	4,0455

Iz tablice 12 može se zaključiti da veličina čestica ovisi o koncentraciji uree i pri većoj koncentraciji nastaju i nanočestice. Obzirom da je brzina taloženja ureaze pri većoj početnoj koncentraciji uree veća (slika 31) može se zaključiti da i u slučaju nanočestica cinka kao i kod zlata dolazi veća brzina taloženja rezultira većim nanočesticama.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu sintetizirane su nanočestice zlata, srebra i cinka sa jezgrom od enzima ureaze u redestiliranoj vodi pri temperaturi T = 37oC (zlato i srebro) i T = 25oC (cink).

Prilikom sinteze nanočestica zlata i srebra voda se dušificirala jer se uočilo da kisik zaustavlja njihovu sintezu.

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

Sintetizirane nanočestice zlata i cinka analizirane su pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa. Zaključeno je da su u eksperimentima provedenim pri nižim koncentracijama zlata, odnosno prilikom sinteze nanočestica cinka, pri nižoj koncentraciji uree, sintetizirane čestice manjih dimenzija u odnosu na čestice sintetizirane pri višim koncentracijama. To je posljedica veće brine 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 [dm^3 mol^{-1} cm^{-1}]
k	konstanta brzine reakcije [min^{-1}]
λ	valna duljina zračenja [nm]
t	vrijeme [min]
T	temperatura [°C]
V	volumen [cm^3]

Kratice

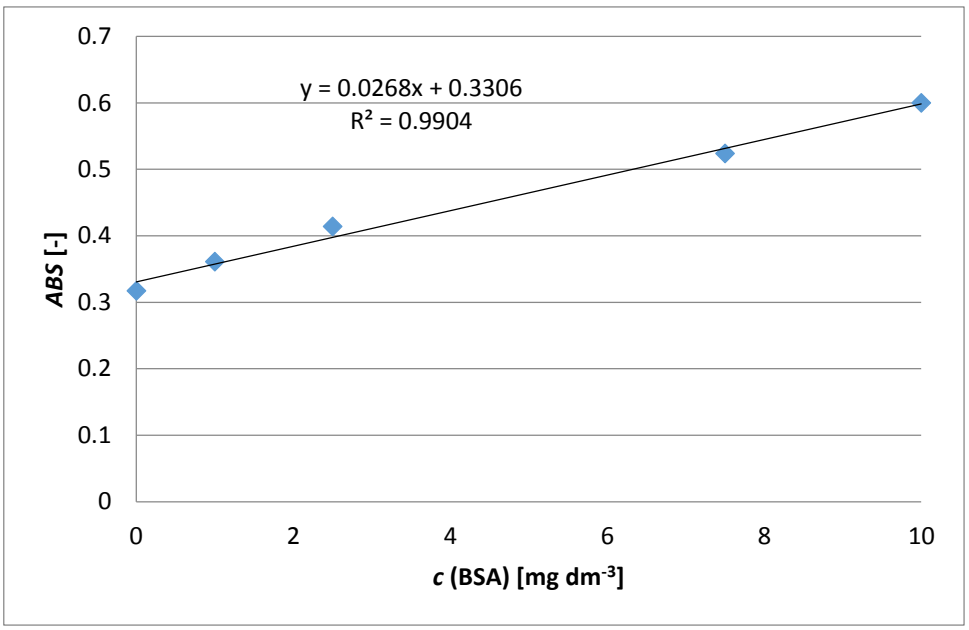
ABS	apsorbancija
SEM	pretražni elektronski mikroskop (*engl. Scanning electron microscope*)

7. LITERATURA

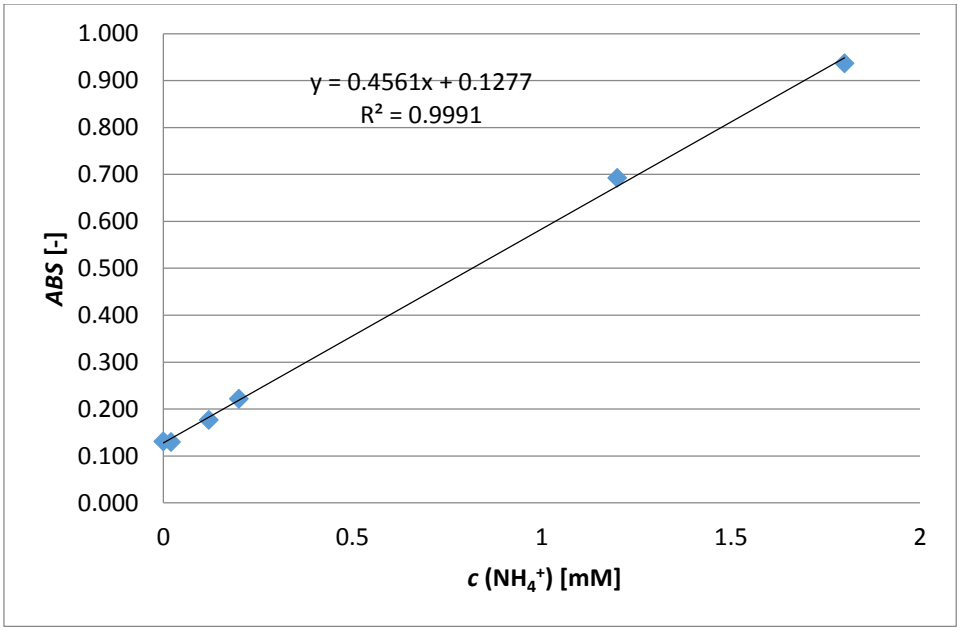
1. Li X, Xu H, Chen ZS, Chen G, Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications, J. Nanomater. (2011) 2011:1-16.
2. Wang H, Chen LY, Feng YH ,Chen HY, Exploiting core-shell synergy for nanosynthesis and mechanistic investigation, Acc. Chem. Res. (2013) 46:1636-1646
3. Lauhon LJ, Gudiksen MS, Wang D, Lieber CM, Epitaxial core–shell and core–multishell nanowire heterostructures, Nature (2002) 420:57–61.
4. Ghosh Chaudhuri R, Paria S, Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications, Chem. Rev. (2012) 112:2373–2433.
5. Kumar KS, Kumar VB, Paik P, Recent Advancement in Functional Core-Shell Nanoparticles of Polymers: Synthesis, Physical Properties, and Applications in Medical Biotechnology, J. Nanopart. (2013) 2014:1-24.
6. Chen Y, Chen H, Zeng D, Tian Y, Chen F, Feng J, Shi J, Core/shell structured hollow mesoporous nanocapsules: a potential platform for simultaneous cell imaging and anticancer drug delivery., ACS Nano (2010) 4:6001–6013.
7. Gawande MB, Goswami A, Asefa T, Guo H, Biradar AV, Peng DP, Zboril R, Varma RS, Core-shell nanoparticles: synthesis and application in catalysis and elektrocatalysis, Chem. Soc. Rev. (2015) 44:7431–7920
8. Li W, Zhao D, Extension of the Stöber Method to Construct Mesoporous SiO_2 and TiO_2 Shells for Uniform Multifunctional Core–Shell StructuresAdv. Mater. (2013) 25:142–149.
9. Su H, Xu H, Gao S, Dixon JD, Aguilar ZP, Wang AY, Xu J Wang J, Microwave Synthesis of Nearly Monodisperse Core/Multishell Quantum Dots with Cell Imaging Applications Nanoscale Res. Lett. (2010) 5:625–630.
10. Sharma B. Mandani S, Sarma TK, Biogenic Growth of Alloys and Core-Shell Nanostructures Using Urease as a Nanoreactor at Ambient Conditions, Sci. Rep. (2013) 3:2601.
11. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA, Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy, Nanomed. (2007)2:681–693.

12. Rauwel P, Rauwel E, Ferdov S, Singh MP, Silver Nanoparticles: Synthesis, Properties and, Applications, Adv. Mater. Sci. Eng. (2015) 2015:1-2.
13. Khan FA,. Biotechnology fundamentals. Boca Raton, Florida: CRC Press, Taylor and Francis Group. (2011) pp: 245
14. Umer A, Naveed S, Ramzan N, Rafique MS, Imran M, A green method for the synthesis of Copper Nanoparticles using L-ascorbic acid, Matéria (Rio de Janeiro) (2014) 19:197-203
15. Eslahi H, Ghaffari-Moghaddam M, Khajeh M, Omay D, Zakipour-Rahimabadi E, Motalleb G, General biography, structure and classification of enzymes, Research and Reviews in Materials Science and Chemistry (2014) :1-83.
16. Muralidhar K, Khurana J, Sharma V, Urease (EC3.5.1.5):a perspective, World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (2014) 3:923-948
17. de la Rica R, Matsui H, Urease as a Nanoreactor for Growing Crystalline ZnO Nanoshells at Room TemperatureAngew. Chem. Int. Ed. (2008) 47:5415 –5417

8. PRILOZI



Slika 34. Baždarni diagram za određivanje koncentracije proteina (c (BSA) = 0-10 mg dm^{-3}), λ = 595nm)



Slika 35 Baždarni dijagram za određivanje koncentracije amonijevih iona (*c* (NH_4Cl) = 0 -2,0 mM; λ = 685 nm)

9. ŽIVOTOPIS

Saša Braičić rođen je u Bosanskoj Dubici (BiH) 18. ožujka 1988. godine. Svoje obrazovanje započinje 1995. godine u Zagrebu u OŠ Augusta Šenoe. Zbog promjene mjesta boravka 1988. godine svoje obrazovanje nastavlja u OŠ Jasenovac u Jasenovcu. 2003. godine u Tehničkoj školi Kutina u Kutini započinjem svoje srednjoškolsko obrazovanje. Maturirao je 2007. godine sa vrlo dobrim uspjehom te iste godine upisao prediplomski studi Ekoinženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu. Nakon toga nastavlja obrazovanje na diplomskom studiju Ekoinženjerstva. Stručnu praksu odradio je u JKP " Jasenovačka voda" d.o.o.