

# Imobilizacija aldolaze na mezoporoznu siliku funkcionaliziranu (3-aminopropil)trimetoksisilanom

---

Terihaj, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:149:353792>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Lucija Terihaj  
DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja **Lucija Terihaj**

Predala je izrađen diplomski rad dana: 11. srpnja 2022.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu  
Prof. dr. sc. Ana Lončarić Božić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu  
Izv. prof. dr. sc. Vanja Kosar, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu  
Prof. dr. sc. Hrvoje Kušić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 14. srpnja 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Lucija Terihaj

IMOBILIZACIJA ALDOLAZE NA MEZOPOROZNU SILIKU FUNKCIONALIZIRANU (3-  
AMINOPROPIL)TRIMETOSKISILANOM

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

prof. dr. sc. Ana Lončarić Božić

izv. prof. dr. sc. Vanja Kosar

Zagreb, srpanj 2022.

*Zahvala!*

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki na svom prenesom znanju i pomoći u izradi ovog rada! Također zahvaljujem asistentu Dini Skendroviću na velikoj pomoći oko izrade eksperimentalnog dijela te pomoći u izradi rada! Zahvaljujem roditeljima, braći i prijateljima na svojoj podršci tijekom studiranja!*

## **SAŽETAK:**

### **IMOBILIZACIJA ALDOLAZE NA MEZOPOROZNU SILIKU FUNKCIONALIZIRANU (3-AMINOPROPIL)TRIMETOSKISILANOM**

U ovom radu provedena je imobilizacija enzima DERA na mezoporoznu siliku MCF funkcionaliziranu s (3-aminopropil)trimetoskisilanom u svrhu povećanja njegove stabilnosti u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida pri čemu nastaje prekursor u proizvodnji statina. Određivao se utjecaj procesa aktivacije nosioca na uspješnost imobilizacije korištenjem različitih aktivacijskih agenasa pri različitim koncentracijama: benzokinon (1,5, 3 i 4,5 mM), sukcinski anhidrid (5, 10 i 15 %) i glutaraldehid (10, 15 i 20 %). Najviša vrijednost parametara uspješnosti imobilizacije je zabilježena korištenjem 10 % sukcinskog anhidrida te je nosioc u daljnjim ispitivanjima aktiviran na taj način. Ispitan je utjecaj pH u području 6-8, te temperature u području 20-35°C na proces imobilizacije. Kao optimalni uvjeti su se pokazali pH 6 i temperatura od 30 °C. Pri tim uvjetima je provedena imobilizacija enzima te je praćena njegova aktivnost kroz pet ciklusa u reakciji sinteze bočnog lanca statina. Rezultati su pokazali kako imobilizirani enzim zadržava 43 % svoje aktivnosti nakon petog ciklusa dok je kod slobodnog enzima prisutan potpuni gubitak aktivnosti već nakon drugog ciklusa.

**Ključne riječi:** enzimi, DERA, imobilizacija, mezoporozna silika, statin, aldolna adicija

**ABSTRACT:****IMMOBILIZATION OF ALDOLASE ON MESOPOROUS SILICA FUNCTIONALIZED BY (3-AMINOPROPYL)TRIMTHOXYSILANE**

In this work, the enzyme DERA was immobilized on MCF mesoporous silica functionalized by (3-aminopropyl)trimethoxysilane to increase its stability in the reaction of double aldol addition of acetaldehyde and chloroacetaldehyde which results in the production of the statin precursor. The influence of the carrier activation process on the success of immobilization was determined using different activating agents at different concentrations: benzoquinone (1.5, 3 and 4.5 mM), succinic anhydride (5, 10 and 15 %) and glutaraldehyde (10, 15 and 20 %). The best parameters of immobilization success were achieved when the carrier was activated with 10% succinic anhydride, so it was used in further experiments. The influence of pH in the range of 6-8 and temperature in the range of 20-35°C on the immobilization process was tested. A pH of 6 and temperature of 30 °C proved to be optimal. Under these conditions, the reusability of enzyme in the reaction of statin side chain synthesis was tested. The results showed that the immobilized enzyme retained 43 % of its activity after the fifth cycle, while the free enzyme completely lost its activity after the second cycle.

**Key words:** enzymes, DERA, immobilization, mesoporous silica, statin, aldol addition

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1 Enzimi .....	2
2.1.1. Imenovanje i klasifikacija enzima.....	2
2.1.2. Struktura enzima .....	3
2.1.3. Djelovanje enzima.....	4
2.1.4. Primjena enzima.....	6
2.2. Aldolaze .....	7
2.2.1. DERA (2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza) .....	8
2.3. Imobilizacija enzima .....	9
2.3.1. Metode imobilizacije enzima .....	9
2.4. Vrste nosioca za imobilizirani enzim .....	12
2.4.1. Mezoporozna silika .....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. Aparatura.....	16
3.1.1. Analitička vaga.....	16
3.1.2. Spektrofotometar.....	16
3.1.3. Centrifuga.....	17
3.1.4. HPLC.....	18
3.1.6. Homogenizator .....	19
3.1.7. Ostala aparatura.....	19
3.2. Sinteza MCF mezoporozne silike sol – gel metodom.....	19
3.3. Imobilizacija biokatalizatora DERA na mezoporoznu siliku.....	20
3.3.1. Funkcionalizacija mezoporozne silike pomoću (3-aminopropil)trimetoksisilana .....	20



3.3.2. Aktivacija mezoporozne silike .....	20
3.3.3. Imobilizacija enzima DERA na mezoporoznu siliku .....	20
3.3.4. Upotreba biokatalizatora u više ciklusa .....	21
3.4. Analitičke metode .....	21
3.4.1. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu .....	21
3.4.2. Određivanje aktivnosti enzima DERA .....	22
3.4.3. Određivanje koncentracije supstrata i produkata reakcije aldolne adicije pomoću HPLC uređaja .....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	25
4.1. Optimiranje nosioca .....	26
4.1.1. Benzokinon.....	26
4.1.2. Glutaraldehid.....	28
4.1.3. Sukcinski anhidrid.....	30
4.2. Optimiranje uvjeta reakcije imobilizacije .....	33
4.3. Upotreba biokatalizatora u više ciklusa .....	37
5. ZAKLJUČAK .....	39
6. LITERATURA .....	40
7. SIMBOLI I SKRAĆENICE .....	42
8. PRILOZI.....	44
9. ŽIVOTOPIS .....	47

## 1. UVOD

Enzimi kao katalizatori su našli široku primjenu kroz zadnjih par desetljeća, kako u organskoj sintezi tako i u razvoju analitičkih procesa. Enzimi su biološki katalizatori koji se nalaze u svim živim organizmima te imaju visoku katalitičku aktivnost, rade pri blagim atmosferskim uvjetima uz mali utrošak energije. Klasični katalizatori korišteni u organskoj sintezi često zahtijevaju grube uvjete i procese u više koraka što za posljedicu ima veliku potrošnju energije i stvara velike količine otpada. Iz tog razloga je primjena enzima u raznim granama industrija sve učestalija.<sup>1</sup> Korištenje enzima kao biokatalizatora nudi prednosti kao što su blagi uvjeti reakcije, biorazgradnja i katalitička efikasnost. Grubi uvjeti industrijskih procesa mogu dovesti do destabilizacije enzima i skraćivanja njihovog vijeka korištenja. Kako bi povećali otpornost enzima na zahtjeve industrijskih procesa, moguće je provesti njihovu imobilizaciju na razne načine.<sup>2</sup>

DERA je enzim koji spada u skupinu aldolaza. Aldolaze kataliziraju stereoselektivne reakcije formiranja C – C veze koje se formiraju između acetaldehida, kloroacetaldehida i brojnih drugih aldehida. Primjena je ograničena zbog loše tolerancije prema većim koncentracijama aldehida. Imobilizaciju enzima provodimo kako bi dobili željena svojstva enzima.<sup>3</sup>

Jedan od načina imobilizacije enzima je njegovo vezanje na čvrsti nosioc kako bi mu se poboljšala svojstva i produžilo vrijeme upotrebe.<sup>4</sup> Postoji više tehnika koje se koriste za imobilizaciju enzima na nosioc od reverzibilne fizikalne adsorpcije do ireverzibilnog kovalentnog vezanja enzima.<sup>2</sup> Izbor najprikladnije tehnike ovisi o prirodi enzima i nosioca.<sup>4</sup>

Mezoporozna silika je jedan od najučestalijih materijala korištenih za izradu nosioca za imobilizaciju. Odlikuje se velikom specifičnom površinom, rasporedom pora te mogućnošću prilagođavanja veličine pora što ju čini idealnom za procese imobilizacije. Uz navedeno, mezoporozna silika je stabilna u širokom području pH i temperature što olakšava njenu upotrebu u različitim tipovima reakcija.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1 Enzimi

Enzimi su biološke makromolekule koje ubrzavaju vitalne reakcije živih organizma. Tvore ih lanci aminokiselina čiji broj, položaj i interakcije utječu na veličinu, oblik i funkciju enzima.<sup>5</sup> Glavni izvor enzima su stanice različitih živih organizama, a oni mogu biti proizvedeni unutar stanice ili ih stanice tijekom svoj metabolizma mogu izlučivati u prostor oko stanice.<sup>6</sup>

Fridrich Wilhelm Kuehne je prvi upotrijebio naziv "*enzyme*" koji potječe od grčke riječi "*enzyme*" što znači u kvascu. Prva uporaba enzima za ljudske potrebe datira još od vremena prije starog Egipta. Prvi enzim u čistom stanju izolirao je Sumner 1926. godine, te je dobio ureazu u kristalnom obliku prvi put izvan žive stanice. Za svoj rad dobio je Nobelovu nagradu 1946. Enzimi su sve više istraživani te danas postoji čitav niz različitih izoliranih enzima.<sup>7</sup>

#### 2.1.1. Imenovanje i klasifikacija enzima

Enzimi se imenuju dodavanjem sufiksa -aza na ime supstrata koji modificiraju, primjer tome je amilaza, ureaza, tirozinaza. Određeni enzimi su iznimka od ovog pravila, a najpoznatiji su enzimi koji spadaju u skupinu proteolitičkih enzima čija imena završavaju sa sufiksom -in kao što su pepsin, tripsin i kimotripsin.<sup>8</sup> Enzimi se imenuju i prema vrsti reakcije koju kataliziraju naprimjer dehidrogenaza i dekarboksilaza koje kataliziraju uklanjanje vodika i ugljikova dioksida s različitih supstrata.<sup>8</sup>

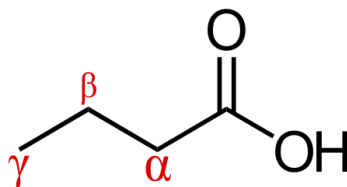
Odbor za nomenklaturu Međunarodne unije za biokemiju i molekularnu biologiju (IUBMB) je predložio sistem klasifikacije kako bi se svakom enzimu dodijelio naziv i broj koji omogućuju njegovu nedvosmislenu identifikaciju. Prema ovoj podjeli postoji šest glavnih grupa prema tipu reakcije koju enzimi kataliziraju, svaka grupa je zatim podijeljena u podgrupe koje su još dodatno podijeljene. Brojčani kod koji se dodjeljuje enzimu sastoji se od četiri broja. Prvi broj govori kojoj glavnoj skupini pripada, drugi kojoj podgrupi pripada, treći o podgrupi podgrupe, a četvrti koji je redni broj enzima u podgrupi podgrupe. Kako bi nedvosmisleno opisali vrstu katalizirane reakcije uz naziv enzima mora biti naveden i njegov klasifikacijski broj.<sup>8</sup>

Grupe u koje dijelimo enzime su:

1. Oksidoreduktaze → enzimi koji kataliziraju redoks reakcije. Povezani su s koenzimima i uključuju dehidrogenaze, oksidaze, peroksidaze i oksigenaze.<sup>8</sup>
2. Transferaze → enzimi koji kataliziraju prijenos atoma ili skupine atoma između dvije molekule. Primjer je prijenos amino, karboksilne, metilne i drugih skupina sa supstrata koji je donor na supstrat akceptor.<sup>8</sup>
3. Hidrolaze → enzimi koji kataliziraju reakciju hidrolize.<sup>8</sup>
4. Liaze → enzimi koji kataliziraju reakcije cijepanja kovalentnih veza reakcijama eliminacije funkcionalnih skupina uz nastanak dvostruke veze, odnosno adicije funkcionalnih skupina na dvostruku vezu.<sup>8</sup>
5. Izomeraze → enzimi koji kataliziraju reakciju izomerizacije.<sup>8</sup>
6. Ligaze → kataliziraju reakcije povezivanja dvije molekule. Rezultat ovih reakcije su formirane CC, CS, CO ili CN veze.<sup>8</sup>

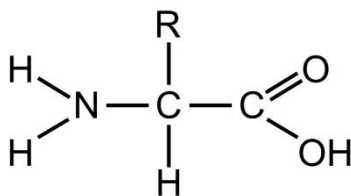
### 2.1.2. Struktura enzima

Kao i svi proteini enzimi se uglavnom sastoje od 20 prirodnih aminokiselina.<sup>9</sup> Aminokiseline su organski spojevi koji unutar molekule imaju amino i karboksilnu skupinu. Amino skupina je primarna u svima osim jedne od 20 aminokiselina, a ta iznimka je prolin. Atomi ugljika u organskim molekulama koje sadrže karboksilnu skupinu mogu se okarakterizirati grčkim slovima  $\alpha$  i  $\beta$  (Slika 1).<sup>10</sup>



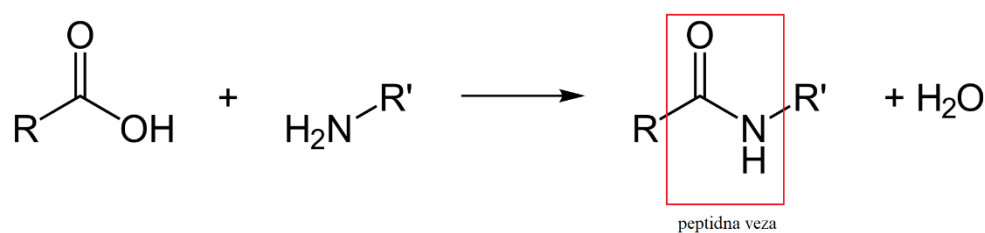
**Slika 1.** Prikaz  $\alpha$  i  $\beta$  ugljika u organskoj molekuli.<sup>10</sup>

Sve aminokiseline nađene u proteinima su  $\alpha$ -aminokiseline jer je amino grupa na  $\alpha$ - atomu ugljika. To je opća struktura aminokiselina i ona je prikazana na slici 2.<sup>10</sup>



**Slika 2.** Struktura aminokiseline.<sup>10</sup>

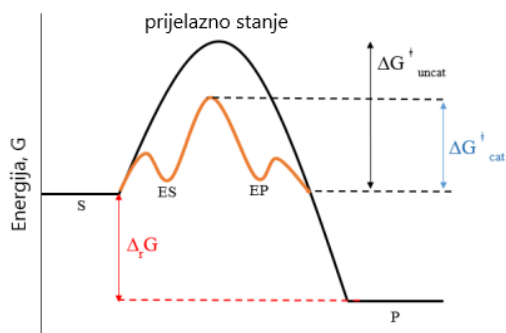
Simbol R predstavlja bočne lance molekule. Amino i karboksilna grupa u lancu se nazivaju  $\alpha$ -amino i  $\alpha$ -karboksilna skupina kako bi se razlikovale od ostalih sličnih skupina vezanih za bočni lanac molekule.<sup>10</sup> Po skupinama vezanim za bočni lanac razlikujemo aminokiseline.  $\alpha$ -ugljik je kiralni centar pa sve prirodne aminokiseline postoje u dva izomerna oblika, L i D izomer. Prirodni proteini građeni su od L – izomera aminokiseline. Većina aminokiselina u prirodi neutraliziraju naboj od amino i karboksilne skupine stvaranjem peptidne veze. Peptidna veza je primarna strukturna jedinica lanca proteina.<sup>9</sup> Ona nastaje kada se karboksilna skupina jedne aminokiseline poveže s amino skupinom druge aminokiseline (Slika 3.) pri čemu nastaje dipeptid i taj proces se ponavlja kako bi lanac rastao pri čemu dobijemo polipeptid ili protein.<sup>11,9</sup> Struktura nastalih proteina može se podijeliti na četiri razine, a to su primarna, sekundarna, tercijarna i kvartarna.<sup>9</sup>



**Slika 3.** Nastanak peptidne veze.<sup>9</sup>

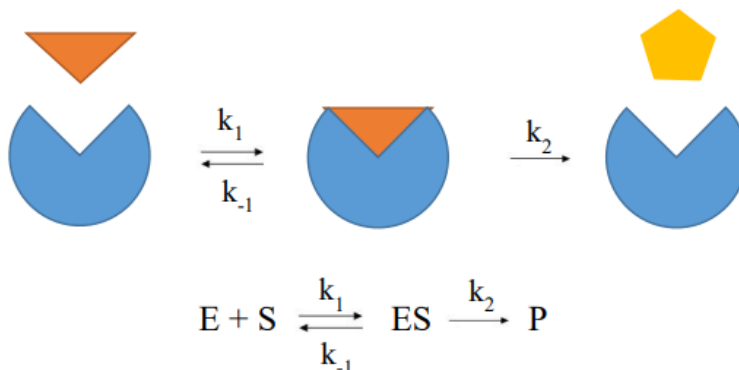
### 2.1.3. Djelovanje enzima

Enzimi se ponašaju kao katalizatori te slično homogenim i heterogenim kemijskim katalizatorima mogu ubrzati reakciju bez ikakvih trajnih promjena. Enzimi ubrzavaju kemijsku reakciju na način da smanjuju energiju aktivacije reakcije.<sup>5</sup> Prilikom toga više molekula dostiže energije prijelaznog stanja i kemijska reakcija je ubrzana.<sup>9</sup> Reakcija je ubrzana no njezina termodinamička ravnoteža ostaje nepromijenjena.<sup>5</sup> (Slika 4.)



**Slika 4.** Reakcijski dijagram usporedbe nekatalizirane i katalizirane reakcije.<sup>5</sup>

Za vrijeme reakcije enzim se veže za supstrat formirajući prijelazni kompleks. Pri završetku reakcije enzim izlazi zajedno s produktom no on ostaje nepromijenjen.<sup>9</sup> (Slika 5.)



**Slika 5.** Kinetika ireverzibilne enzimске reakcije.<sup>9</sup>

Na slici je enzim označen sa E, supstrat sa S, kompleks enzim supstrat s ES, a produkt s P. Oznake  $k_1, k_{-1}$  i  $k_2$  su brzine reakcija u odgovarajućim koracima reakcije. Ako enzim E katalizira reakciju supstrata S u produkt P, enzim i supstrat tvore kompleks ES koji se na kraju razdvaja na enzim i produkt. Kako bi se stvorio ES kompleks supstrat je vezan na određeno mjesto u enzimu. Enzim je na kraju reakcije nepromijenjen i može se vezati za drugi supstrat.<sup>9</sup>

Uzevši u obzir da je koncentracija ES konstantna kroz vrijeme može se pisati jednadžba:

$$\frac{d[ES]}{dt} = ([E] \cdot [S]) \cdot k_1 - [ES] \cdot (k_{-1} + k_2) = 0 \quad (1)$$

Ova jednadžba se može pisati kao:

$$\frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \quad (2)$$

$K_m$  je Michaelis – Mantenova konstanta čija vrijednost pokazuje afinitet enzima prema supstratu.

Sporni stupanj u jednadžbi 1 je konverzija kompleksa ES u produkt pa se brzina može izračunati prema jednadžbi:

$$v = k_2 \cdot [E_T] \quad (3)$$

Maksimalna brzina se postiže kada svi enzimi formiraju kompleks ES:

$$v_{max} = k_2 \cdot [E_T] \quad (4)$$

$$[E_T] = E + [ES] \quad (5)$$

Michaelis – Mentenova jednadžba se dobije iz prethodno napisanih jednadžba 2, 3, 4 i 5.

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (6)$$

$K_m$  je koncentracija supstrata pri kojoj se postiže polovica maksimalne brzine. Male vrijednosti  $K_m$  pokazuju visok afinitet enzima prema supstratu te su potrebne male koncentracije supstrata da bi se postigla maksimalna brzina. Suprotno od toga visoke vrijednosti  $K_m$  pokazuju da se maksimalna brzina postiže samo uz visoke koncentracije supstrata.<sup>9</sup>

Na aktivnost enzima utječe više parametra od kojih su neki koncentracija enzima i supstrata, inhibitori, pH i temperatura.<sup>9</sup>

#### 2.1.4. Primjena enzima

Enzimi su bitne komponente biljaka, životinja i mikroorganizama jer kataliziraju i koordiniraju reakcije unutar staničnog organizma. Takva obilježja daju im i veliku primjenu u industriji jer su prepoznate njihove mnoge prednosti. Do 1970. većinom su se koristili samo enzimi biljnog i životinjskog porijekla jer su se sintetski enzimi smatrali nečistima.<sup>12</sup> Za široku upotrebu u industriji i medicinu su postali zanimljivi zbog svoje visoke stabilnosti, katalitičke aktivnosti te jednostavnosti proizvodnje i optimizacije.<sup>13</sup>

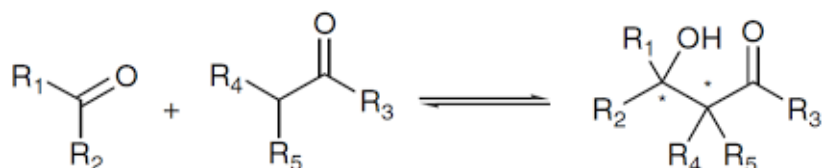
Najveća primjena enzima je u prehrambenoj industriji kod proizvodnje hrane i pivarstva. Njihova velika primjena je povezana s rastom populacije jer je potražnja za hranom sve veća. Enzimi osiguravaju kvalitetnu opskrbu hranom jer su uključeni u proces njezine proizvodnje i dovode do poboljšavanja komponenata kao što su okus, aroma, boja, tekstura, izgled i nutritivna vrijednost. U pivarstvu su s druge strane važni jer se dodaju kako bi se kontrolirao proces vrenja i dobilo visokokvalitetno pivo.<sup>13</sup>

Koriste se i u drugim industrijama kao što su farmaceutska i tekstilna industrija. Koriste se kao terapijski lijekovi u liječenju probavnih smetnji i u procesima dijagnostike bolesti kao što je dijabetes.<sup>13</sup>

Uporaba enzima i dalje raste te se u budućnosti očekuje još veći rast zbog velikog potencijala koji enzimi nude za mnoge industrije.<sup>13</sup>

## 2.2. Aldolaze

Aldolaze su grupa enzima koji formiraju C-C veze te spadaju u grupu liaza. Reakcija formiranja C-C veze je jedna od najvažnijih u organskoj kemiji.<sup>6</sup>



**Slika 6.** Shema reakcije katalizirana aldolazama.<sup>6</sup>

Na slici 6. je prikazana reakcija katalizirana aldolazama. To je reakcija aldehida ili ketona koji djeluju kao nukleofil (donor) s drugim aldehydom ili ketonom koji djeluju kao elektrophil (akceptor). Postoje dva ključna problema ove reakcije i oba su povezana sa selektivnošću. Prvi je selektivnost supstrata gdje treba odrediti koji se od dva aldehida ili ketona ponaša kao donor, a koji kao akceptor kako bi se dobio odgovarajući produkt. Mogu se odviti dvije aldolne reakcije ili dvije unakrsne aldolne reakcije ali je samo jedna od njih poželjna. Drugi problem je što je aldolna reakcija često praćena kondenzacijom samo jednog od korištenog aldehida koji se može ponašati i kao donor i kao akceptor čime nastaje neželjeni produkt.<sup>3</sup>

Aldolna reakcija je važan biokemijski proces za proizvodnju ugljikohidrata koji se prirodno pojavljuju. Enzimatske aldolne reakcije su poželjne za sintezu biološki važnih organskih spojeva kao što su aminokiseline. Aldolaze su stereoselektivne i u ovim reakcijama dobivamo produkt koji ima kiralni centar.

Postoji više podjela aldolaza. Jedan od načina podjele je prema katalitičkom mehanizmu reakcije prema kojem su aldolaze podijeljene u dvije grupe:

- a) Grupa 1 → aldolaze koje tvore međuprodukt Shiffove baze sa supstratom na aktivnom mjestu.<sup>6</sup>
- b) Grupa 2 → enzimi koji koriste dvovalentni metalni ion kao koenzim koji se ponaša kao Lewisova kiselina u aktivnom mjestu. Ovi enzimi obično su stabilniji nego enzimi prve grupe.<sup>6</sup>

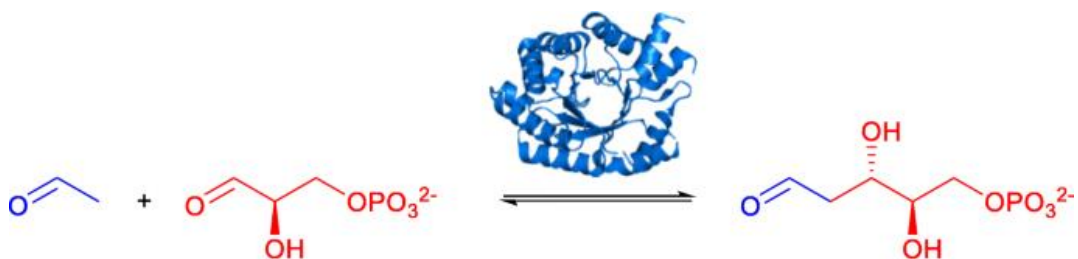


Druga podjela aldolaza je na temelju njihove izvrsne selektivnosti za donore prema čemu su grupirane s obzirom na četiri donora koji se mogu koristiti:

- a) Acetaldehid-ovisni
- b) Dihidroksiaceton fosfat – ovisni
- c) Piruvat – ovisni
- d) Glicin – ovisni

### 2.2.1. DERA (2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza)

2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza (DERA) je jedini poznati član acetaldehid ovisnih aldolaza.<sup>6</sup> DERA katalizira aldolnu reakciju između dva aldehida. Primjer reakcije katalizirane DERA-om korištenje gliceraldehid-3-fosfata (G3P) i acetaldehida (AA) je prikazana na slici 7.<sup>3</sup>



**Slika 7.** Reakcija katalizirana enzimom DERA.<sup>3</sup>

Rana istraživanja enzima DERA su se većinom fokusirana na identifikaciju osnovnih svojstava enzima i prema razumijevanju prirodnih reakcija koje katalizira. Specifičnost enzima je prvi put proučavana 1960. i zaključeno je da acetaldehid u reakciji s enzimom DERA može biti zamijenjen s drugim aldehydom ili ketonom i reakcija će i dalje biti uspješna.. Enzim DERA prihvaća širok spektar supstrata kao molekule akceptora u reakcijama aldolne kondenzacije.<sup>3</sup> Kao donore također možemo koristiti više aldehida i ketona kao npr. aceton, fluoraceton i propanal.<sup>14</sup> Upravo je mogućnost korištenja različitih supstrata kao donora i akceptora velika prednost enzima DERA. Uz spomenute prednosti enzim DERA ima i loših strana. Glavni problem je velika kemijska reaktivnost aldehida koja smanjuje aktivnost enzima dok ne postane neaktivan.<sup>3</sup> Procesom imobilizacije se želi poboljšati stabilnost enzima DERA.<sup>14</sup>

Enzim DERA se u industriji primjenjuje primarno za proizvodnju statina.<sup>15</sup> Statini imaju mogućnost snižavanja razine kolesterola i zato su vrlo cijenjeni. Imaju kiralni bočni lanac koji je vezan za ciklički fragment.<sup>14</sup> Enzimom DERA se sintetizira kiralni bočni lanac statinu te je to jedna od njezinih glavnih upotreba.<sup>15</sup>

### **2.3. Imobilizacija enzima**

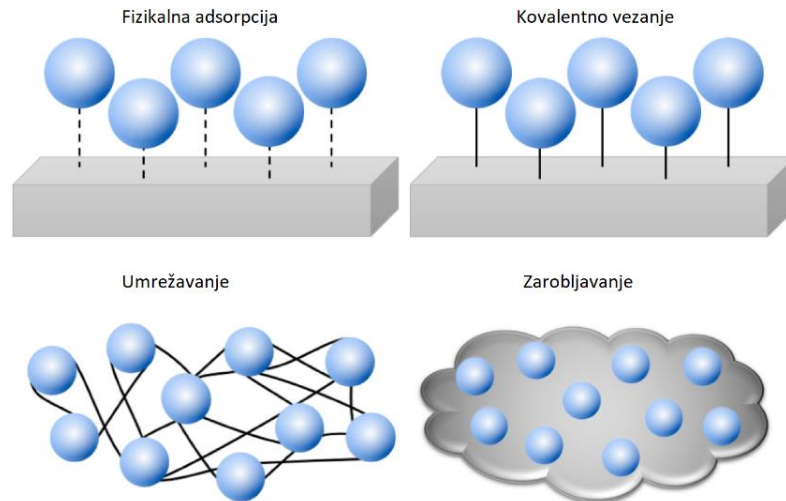
Biokatalitički proces u industriji može biti primijenjen na mnoga polja kao što je proizvodnja finih kemikalija, goriva, farmaceutika i hrane. Bez obzira na prednosti korištenja enzima umjesto kemijskih katalizatora njihova primjena je ograničena zbog visokog troška proizvodnje, nestabilnosti i poteškoć kod ponovnog korištenja. Ovi problemi mogu biti smanjeni provedbom imobilizacije enzima na inertnoj matrici. Imobilizacija enzima može poboljšati stabilnost enzima jer postaje manje osjetljiv na inhibitore u reakciji te je zaštićen od ekstremnih uvjeta. Mogu biti lako reciklirani što vodi do financijske uštede, a imobilizacija može voditi i do veće katalitičke aktivnosti.<sup>5,12</sup>

Prva upotreba imobiliziranih enzima je bila 1966.g kad je provedena imobilizacija *Aspergillus oryzae* za razlučivanje sintetičke D-L aminokiseline. Druge veće primjene imobiliziranih enzima su u industrijskoj proizvodnji šećera, aminokiselina i lijekova. U nekim industrijskim procesima imobilizirane su cijele stanice koje sadrže enzim te korištene kao katalizatori. Osim upotrebe u industrijskim procesima tehnike imobilizacije su baza za dobivanje brojnih produkta biotehnologije sa primjenom u dijagnostici, kromatografiji i kod biosenzora.<sup>4</sup>

#### **2.3.1. Metode imobilizacije enzima**

Postoje mnoge metode korištene za imobilizaciju enzima, kao što su kovalentno vezanje enzima za nosioc, fizikalna adsorpcija, imobilizacija enzima umrežavanjem, zarobljavanje enzima. Svaka od tih metoda je pokazala prednosti i nedostatke.<sup>5</sup> Metode imobilizacije se mogu klasificirati na više načina. Jedan od glavnih načina klasifikacije različitih procesa imobilizacije je podjela na ireverzibilne i reverzibilne metode.<sup>4,2</sup> Odabir najprikladnije tehnike ovisi o prirodi enzima i o nosiocu. Interakcije između enzima i nosioca osigurava imobilizirani enzim s određenim

biokemijskim i fizikalno-kemijskim svojstvima koja određuju njihovu primjenjivost za specifične procese.<sup>4</sup> Na slici 8. su prikazane metode imobilizacije enzima.



**Slika 8.** Metode imobilizacije enzima.<sup>4</sup>

#### a) Zarobljavanje enzima

U ovoj metodi enzim je dodan tijekom sinteze nosioca što rezultira time da ostaje zarobljen u njegovoj strukturi. Glavni nedostatak ove metode je deaktivacija enzima zbog uvjeta potrebnih kod sinteze nosioca. Procedura mora biti modificirana kako bi se izbjegli ekstremni uvjeti kao što je visoka temperatura i nizak pH. Međutim čak i ako je imobilizacija napravljena kod blagih uvjeta enzim može imati nižu aktivnost u usporedbi sa slobodnim enzimom zbog problema povezanih sa prijenosom masa.<sup>5</sup> Ova metoda imobilizacije je ireverzibilna jer enzim zarobljen unutar vlakna nosioca.<sup>2</sup>

#### b) Imobilizacija enzima umrežavanjem

Imobilizacija enzima može biti provedena intermolekularnim umrežavanjem pri čemu se formira enzim agregat (CLEAS). U ovoj metodi ne koristi se pomoćni materijal nosioc. Enzimi iz agregata su taloženi dodatkom soli, organskih otapala, kiselina ili neionskih polimera. Mnogi enzimi su osjetljivi na reagens za umrežavanje koji je potreban za formiranje enzimskog agregata. Zbog toga uvjeti moraju biti pažljivo birani i optimirani kako bi se izbjegao gubitak aktivnosti enzima. Upotreba ove metode se pokazala korisnom uglavnom kada se enzimska reakcija odvija u organskim medijima.<sup>5</sup> Ova metoda spada u ireverzibilne metode imobilizacije.<sup>4</sup>

### c) Fizikalna adsorpcija

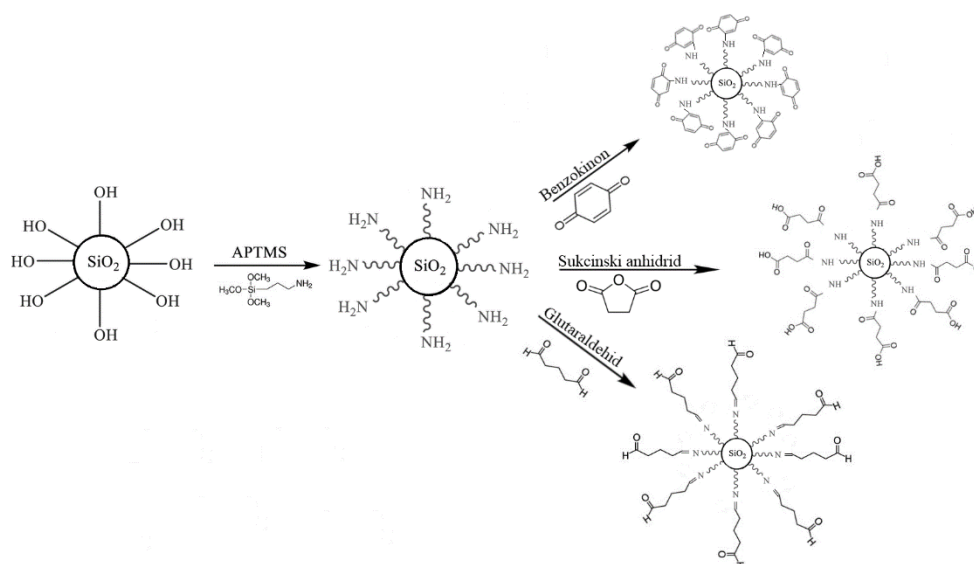
Enzimi mogu biti imobilizirani fizikalnom adsorpcijom na nosioc. Ova metoda se smatra jednom od najjednostavnijih metoda imobilizacije. Do imobilizacije dolazi zbog van der Waalsovih sila, vodikovih veza te ionskih ili hidrofobnih reakcija između enzima i nosioca. Ako enzim reagira sa nosiocem kroz van der Waalsove sile očekivano je da će se zbog slabih interakcija enzim desorbirati s nosioca. Elektrostatske interakcije s druge strane su najjače sile koje mogu biti uključene u fizikalnu adsorpciju enzima kako bi se izbjeglo curenje enzima s nosioca. Kako nema kemijske veze između enzima i nosioca obično ne uzrokuje nikakvu promjenu u konformaciji enzima i njegova se aktivnost zadržava ili čak povećava nakon imobilizacije. Glavni nedostatak ove metode je činjenica da se enzimi mogu lakše desorbirati od nosioca. To zahtjeva ispravan odabir nosioca za adsorpciju kako bi enzim bio stabilan i izbjeglo se njegovo curenje.<sup>5</sup> Ovo je reverzibilna metoda imobilizacije jer enzim može biti uklonjen s nosioca pri blagim uvjetima. Prednost ove metode je mogućnost regeneracije nosioca, odnosno ponovno vezanje novog enzima na isti nakon što aktivnost enzima padne.<sup>2</sup>

#### 2.3.1.1 Kovalentno vezanje enzima

Kovalentno vezanje omogućuje vezanje enzima na površinu ili na drugi enzim kovalentnim vezama. Površine mogu biti unutarnje stijenke bioreaktora ili stakleni ili polimerni nosioci u obliku kuglica za primjenu u reaktoru u industrijskom procesu. Kovalentna imobilizacija uključuje vezanje reaktivne grupe na enzimu za kemijski aktivnu podlogu ili molekulu.<sup>1</sup> Materijal nosioc je odabran ovisno o svojstvima topljivosti, mehaničke stabilnosti, hidrofilnosti odnosno hidrofobnosti, površina i funkcionalne skupine.<sup>12</sup> U ovoj metodi imobilizacije materijal nosioc je modificiran s reaktivnim grupama koje se vežu na specifične funkcionalne skupine prisutne u aminokiselinama. Aktivna strana enzima mora ostati slobodna od kovalentnih veze te se u tu svrhu dodaju supstrati tijekom procesa imobilizacije. Funkcionalne skupine enzima koje sudjeluju u stvaranju kovalentne veze sa nosiocem su  $-NH_2$ ,  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $-COOH$ .<sup>10</sup> Imobilizacija se mora provesti pod uvjetima koji ne vode do denaturacije enzima. Kod ove metode postoji rizik da struktura enzima postane kruta i da vezanje inducira konformacijske promjene koje izravno smanjuju aktivnost enzima.<sup>5</sup>

Enzimi imobilizirani kovalentnim vezanjem su jako vezani za nosioc i teško se od njega odvajaju. Zbog toga je ova metoda ireverzibilna i potrebno je mijenjati i nosioc i enzim kad isti prestane biti aktivan što može rezultirati većim troškovima.<sup>12</sup>

Kako bi mogli provesti postupak imobilizacije enzima kovalentnim vezanjem prvo je potrebno provesti funkcionalizaciju površine kako bi nosioc imao skupine potrebne za stvaranje kovalentne veze te zatim aktivaciju nosioca.<sup>5</sup> U ovom radu provedena je funkcionalizacija površine (3-aminopropil)trimetoskisanom (APTMS), a aktivacija benzokinonom, sukcinjskim anhidridom i glutaraldehidom. (Slika 9.)



**Slika 9.** Funkcionalizacija mezoporozne silike APTMS-om i aktivacija aktivacijskim agensima

#### 2.4. Vrste nosioca za imobilizirani enzim

Karakteristike matrice su najvažnije za određivanje efikasnosti sistema s imobiliziranim enzimom. Odabir optimalnog nosioca može utjecati na proces imobilizacije pri čemu svojstva i enzima i nosioca određuju svojstva pripremljenog imobiliziranog enzima. Interakcije između njih daju imobilizirani enzim sa specifičnim mehaničkim, kemijskim, biološkim i kinetičkim

svojstvima. Idealna svojstva nosioca uključuju hidrofilnost, inertnost prema enzimu, biokompatibilnost, otpornost na napad mikroba, otpornost na kompresiju, dostupnost i nisku cijenu.<sup>2,4</sup>

Iako nema univerzalnog nosioca za sve enzime i primjene neka od svojstva nosioca se pojavljuju kod svih, a to su velik afinitet za proteine, dostupnost reaktivne funkcionalne grupe, mehanička stabilnost, krutost, izvedivost regeneracije, netoksičnost i biorazgradivost. Uobičajeni materijali za imobilizaciju enzima kao što su materijali na bazi silike, akrilne smole i sintetički polimeri suočavaju se s nedostacima kao što su visoka cijena materijala i tehnologija potrebnih za primjenu metoda fiksacije što povećava troškove biokatalizatora.<sup>2</sup>

Mnogo metoda imobilizacije je razvijeno kako bi se poboljšala aktivnost enzima. Odabir nosioca može biti velik problem jer ovisi o tipu enzima, reaktivnosti medija i uvjetima reakcije. Različiti nosioci nude različita fizikalna i kemijska svojstva za vezani enzim. Razlika u morfologiji i fizikalnim karakteristikama može utjecati na imobilizaciju i katalitička svojstva jer je nosioc u direktnom kontaktu s enzimom.<sup>2</sup>

Nosioce možemo podijeliti na organske i anorganske ovisno o njihovom kemijskom sastavu, a organski se mogu dodatno podijeliti na prirodne i sintetičke polimere. Najčešće korišteni nosioci su karboksimetil-celuloza, škrob, kolagen, modificirana sefaroza, aktivni ugljen, silika, aluminijev oksid, titan, keramika, hidroksiapatit i agaroza.<sup>2</sup> Poželjno je da matrica nosioca bude materijal velike površine s velikim brojem pora jer to dovodi do većeg vezanja enzima po jedinici mase. Porozni nosioci su preferirani jer je moguće veće vezanje enzima i vezani enzim je bolje zaštićen od okoliša. Parametri pora i veličina čestica nosioca rade ukupnu površinu, a time utječu na sposobnost vezanja enzima.<sup>2,4</sup>

Nanomaterijali mogu biti izvrsni nosioci za imobilizaciju enzima jer nude idealne karakteristike za balansiranje glavnih faktora koji određuju efikasnost biokatalizatora: površina, otpornost prijenosu masa i veliko vezanje enzima.<sup>4</sup> Svojstva nanočestica omogućuju lako odvajanje jednostavnom filtracijom ili korištenjem magneta što omogućuje ponovno korištenje. U usporedni s običnim metodama imobilizacije, imobilizacija temeljena na nanočesticama nudi tri glavne prednosti a to su laka sinteza čestica nanoenzima s visokim sadržajem krutih tvari bez upotrebe toksičnih reagensa, moguće je prilagođavanje veličine čestica te postizanje homogenih i dobro definiranih nanočestica s vezanim enzimom.<sup>4,2</sup>

### 2.4.1. Mezoporozna silika

Mezoporozni materijali su odlični za imobilizaciju enzima. Mezoporoznu siliku je lako sintetizirati iz jeftine silike te uz prilagođavanje određenih parametara sinteze može se dobiti veliki izbor mezostrukture.<sup>5</sup> Mezoporozna silika prvi put je sintetizirana 1992.

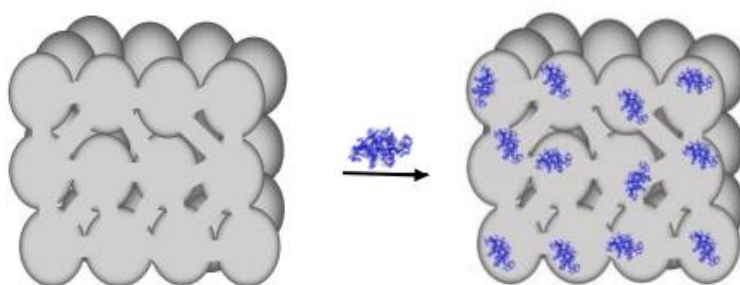
Mezoporozna silika se sastoji od nanočestica silike s promjerom pora od 2 do 50 nm. Na površini mezoporozne silike nalazi se više vrsta silanolnih skupina (pojedinačne silanolne skupine, silanolne skupine međusobno povezane vodikovim vezama te geminalne skupine) koje omogućuju funkcionalizaciju materijala s organskim grupama (amino, epoksi, karboksilne i tiolne skupine) u svrhu imobilizacije enzima kovalentnim ili nekovalentim vezanjem. Uvođenjem organskih funkcionalnih skupina mijenjaju se svojstva površine čime se postiže učinkovitije vezanje i smanjuje se curenje enzima tijekom reakcije. Interakcije enzim-supstrat mogu uključivati aminokiselinske ostatke na površini enzima i na aktivnoj strani što direktno utječe na aktivnost i stabilnost enzima. Može doći i do promjene orijentacije enzima unutar pora na način da aktivna mjesta postanu dostupnija za reaktante. Funkcionalizacija površine može se koristiti za modificiranje hidrofilnog karaktera nosioca.<sup>5</sup>

Jedan od najvažnijih razloga zašto je mezoporozna silika dobar materijal za nosioc je taj što veličina i struktura pora i čestica može biti modificirana s visokim stupnjem preciznosti. Imaju veliku površinu i volumen pora što dovodi do vezanje velike količine enzima. Tako vezani enzim može podnijeti ekstremniji pH, povećanu temperaturu denaturirajuća sredstva i organska otapala.<sup>1</sup> Fizikalna svojstva materijala mogu biti precizno prilagođena na način da odgovaraju specifičnom enzimu.<sup>5</sup>

Veličina pora i morfologija su važan fizikalni parametar mezoporozne silike koji može utjecati na imobilizaciju enzima. Male promjene veličina pora mogu rezultirati ili povećanjem ili smanjenjem aktivnosti i stabilnosti enzima. Pretpostavlja se da pore moraju biti dovoljno velike da enzimi difundiraju unutar njih, ali ne smije biti tako velike da bi se povećala vjerojatnost curenja enzima tijekom katalize. Pore ne smiju biti preuske kako enzim ne bi izgubio svoju mobilnost i fleksibilnost unutar njih. Morfologija pora može utjecati na prostornu raspodjelu enzima kroz česticu i difuziju supstrata i produkta. Postoji mezoporozna silika s heksagonskom, kubičnom i pjenastom strukturom i one su proučavane za imobilizaciju enzima. Kubična i pjenasta struktura

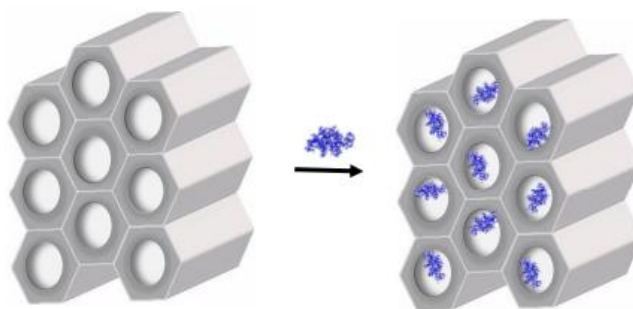
imaju prednost kod imobilizacije jer je kod njih lakša dostupnost pora. U heksagonskoj strukturi difuzija proteina u duge jednodimenzionalne pore može biti ometana zbog enzima koji se adsorbiraju na ulazu u pore i tako ih blokiraju.<sup>5</sup>

Pjenasta mezoporozna silika (MCF) sastoji se od jako velikih mezopora do 40nm u promjeru koje su povezane malim prozorima veličine 10 do 20nm. Ova struktura MCF može biti dobra za imobilizaciju enzima jer su pore velike pa mogu primiti veliku količinu enzima uz to je ulaz u pore je uži pa se može izbjeći curenje enzima.<sup>5</sup> (Slika 10.)



**Slika 10.** Shema imobilizacije enzima na pjenastu mezoporožnu siliku.<sup>5</sup>

Kod heksagonske mezoporožne silike (SBA-15) veličina čestica i promjer pora može biti povećan za imobilizaciju enzima. Proces proizvodnje SBA-15 proizvodi čestice u obliku štapa. Međutim metoda se može modificirati kao bi se dobio drugi oblik i veličina čestica. Veličina pora je većinom između 2 – 10nm i povećava se mijenjanjem temperature za vrijeme hidrotermalnog tretmana.<sup>5</sup> (Slika 11)



**Slika 11.** Shema imobilizacije enzima na heksagonsku mezoporožnu siliku.<sup>5</sup>



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Aparatura

##### 3.1.1. Analitička vaga

Vaga *Shimadzu* je korištena za vaganje svih uzoraka.(slika 12.)



**Slika 12.**Analitička vaga *Shimadzu*.

##### 3.1.2. Spektrofotometar

Spektrofotometrija je metoda određivanja koncentracije tvari u uzorku mjerenjem količine apsorbirane svjetlosti. Spektrofotometar je uređaj za analizu spektra elektromagnetskog zračenja. Apsorpcija se matematički opisuje Beer – Lambertovim zakonom. Beer-Lambertov zakon govori da postoji linearna ovisnost između apsorpcije i koncentracije uzorka. Zbog toga on može biti primijenjen samo kad postoji linearni odnos. Jednadžba Beer -Lambertovog zakona je:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (7)$$

Gdje je  $A$  apsorpcija koja nema mjernu jedinicu,  $\varepsilon$  je molarni apsorpcijski koeficijent,  $l$  je duljina puta, a  $c$  je koncentracija. Molarni koeficijent je dan kao konstanta i različit je za svaku molekulu.<sup>16</sup>

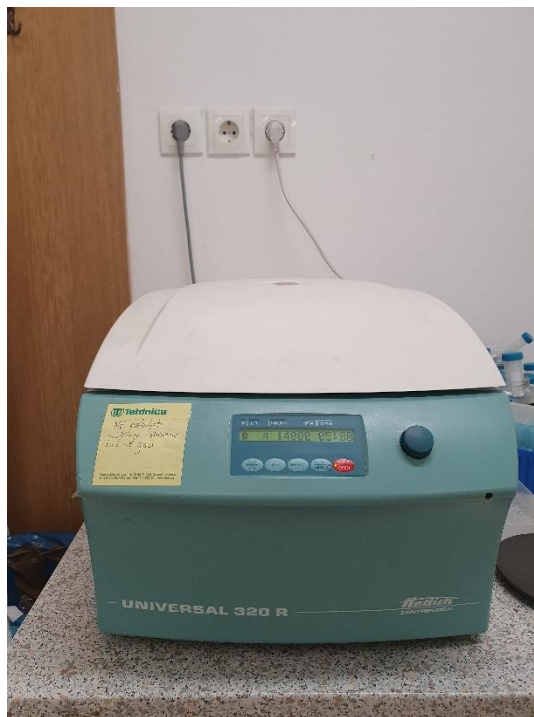
Korišten je *Shimadzu UV 1800* spektrofotometar koji je prikazan na slici 13.



**Slika 13.** Spektrofotometar.

### 3.1.3. Centrifuga

U eksperimentu smo za separaciju uzoraka koristili centrifugu *Hettich Universal 320R* koja je prikazana na slici 14.



**Slika 14.** Centrifuga Hettich Universal 320R.

### 3.1.4. HPLC

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je vrsta kromatografije u koloni koja se najviše koristi u biokemiji kako bi se odvojili i identificirali aktivni spojevi.<sup>17</sup> Pod visokim tlakom se pumpa uzorak otopljen u otapalu koje je mobilna faza kroz kolonu sa stacionarnom fazom.

Svojstva uzorka, otapala te svojstva stacionarne faze određuju vrijeme zadržavanja analita i koliko brzo prolazi kroz kolonu. Kako uzorak prolazi kroz kolonu analiti koji imaju najjače interakcije sa stacionarnom fazom izlaze najsporije jer imaju najveće vrijeme zadržavanja. U odnosu na to uzorci sa najslabijim interakcijama imaju kratko vrijeme zadržavanja. Nakon izlaska iz kolone mobilna faza prolazi kroz detektor kao što je fluorimetar ili UV detektor. Odabir odgovarajućeg detektora i valnih duljina za praćenje je važan za optimizaciju osjetljivosti HPLC detekcije. Detektor generira signal koji odgovara količini analita koji izlazi iz kolone, signal se zatim bilježi u HPLC kontrolnom računalnom programu te imamo podatke dostupne za daljnju analizu.<sup>18</sup>

Za eksperiment u ovom radu je korišten HPLC uređaj *Shimadzu* sa *LiChrospher* kolonom *C18* i UV detektorom.

### 3.1.5. Termostatska tresilica



**Slika 15.** Termostatska tresilica *Eppendorf ThermoMixer C*.

Na tresilici *Eppendorf thermoMixer C* su termostatirani reaktori u kojima su provedene reakcije.(slika 15)

### 3.1.6. Homogenizator



**Slika 16.** Homogenizator *DLAB MX-S*.

Homogenizatorom *DLAB MX-S* (Slika 16.) su homogenizirani uzorci.

### 3.1.7. Ostala aparatura

Od ostale aparature korišteni su: mini centrifuga *FVL-2400N Combi-Spin*, magnetna miješalica te peć za žarenje *Nabertherm*.

## 3.2. Sinteza MCF mezoporožne silike sol – gel metodom

Za sintezu mezoporožne silike 2 g Pluronic-a 123 otopljeno je u 75 mL HCl-a koncentracije 1,6 M pri sobnoj temperaturi na magnetskoj miješalici. Dodano je 2,95 g trimetilbenzen-a (TMB). Omjer Pluronic 123 prema TMB se može modificirati i time mijenjamo veličinu pora. Kod pripreme silike s većim porama dodano je 3,5 g TMB. Nakon toga je dodano 23,46 mg  $\text{NH}_4\text{F}$  koji povećava kanale koji povezuju pore bez utjecaja na samu veličinu pora. Miješano je 45 minuta na 37 °C te je nakon toga dodano 4,731 g tetraetoksisilana. Otopina je potom miješana tijekom 20 sati na 37 °C, te je potom premještena u teflonskim reaktor koji je stavljen u peći na 110 °C (24 h). Nakon toga talog se filtrirao te centrifugirao 5 minuta nakon čega se isprao etanolom i vodom te

sušio u peći. Nakon toga slijedi žarenje taloga 6 sati dok temperatura ne naraste na 350 °C te zatim 4 sata na temperaturi 350 °C. Postupkom je dobiven 1 g silike.

### **3.3. Imobilizacija biokatalizatora DERA na mezoporoznu siliku**

#### *3.3.1. Funkcionalizacija mezoporožne silike pomoću (3-aminopropil)trimetoksisilana*

Za funkcionalizaciju nosioca na 1,0 g mezoporožne silike dodano je 50 mL etanola i 3 mL (3-aminopropil)trimetoksisilana (APTMS-a). Smjesa je miješana brzinom 160 o min<sup>-1</sup> 24 sata na 30 °C u inertnoj atmosferi argona.

#### *3.3.2. Aktivacija mezoporožne silike*

Nakon funkcionalizacije APTMS-om provedena je aktivacija pomoću benzokinona, sukcinog anhidrida i glutaraldehida (GA). Aktivacija benzokinonom je provedena pripremom otopine benzokinona koncentracije 1,5 mM u fosfatnom puferu. 1 mL otopine dodano je na 20mg nosioca te miješano 1 sat na tresilici pri sobnoj temperaturi. Korišten je pufer pH 6 te je proces proveden s koncentracijama benzokinona 1,5, 3 i 4,5 mM. Za aktivaciju sukcinim anhidridom je pripravljena otopina sukcinog anhidrida u fosfatnom puferu. Na 20 mg nosioca je dodano 1 mL DMF te određena masa sukcinog anhidrida ovisno o ispitivanoj koncentraciji. Otopina je miješana 2 sata na tresilici pri sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Korišten je pufer pH 6 te je proces proveden s koncentracijama sukcinog anhidrida 5, 10 i 15%. Za aktivaciju glutaraldehydom pripravljena je otopina GA u fosfatnom puferu. 1 mL pripravljene otopine GA dodano je na 20 mg nosioca te je miješano 15 sati na tresilici pri sobnoj temperaturi. Korišten je pufer pH 6 te je proces proveden s koncentracijama GA 10, 15 i 20%. Nakon svake aktivacije nosioc je ispran fosfatnim puferom šest puta kako bi se uklonio neizreagirani aktivacijski agens.

#### *3.3.3. Imobilizacija enzima DERA na mezoporoznu siliku*

Aktiviranom nosiocu dodano je 100 µL otopine enzima koncentracije 6 mg mL<sup>-1</sup> i 900 µL fosfatnog pufera koncentracije 0,1M pH vrijednosti 6, 6,5, 7, 7,5 i 8. Imobilizacija je provedena tijekom 1,5 h na tresilici pri 900 o min<sup>-1</sup> i temperaturama 20, 25, 30 i 35°C. Metodom po Bradfordu

je određena koncentracija enzima u temeljnoj otopini i u otopini enzima nakon provedbe imobilizacije.

#### *3.3.4. Upotreba biokatalizatora u više ciklusa*

Nakon aktivacije nosioca i optimiranja uvjeta imobilizacije ispitana je upotreba biokatalizatora u reakciji u više ciklusa. Enzim je imobiliziran na silici većih pora.

Kako bi mogli usporediti rezultate izmjerena je aktivnost slobodnog enzima u ponovljenim reakcijama. Enzim je između ciklusa izdvajan od reakcijske smjese centrifugiranjem 5 min na 14000 o min<sup>-1</sup> korištenjem ultrafiltracijske kivete (engl. *Amicon Ultracentrifugal filter Device*) te je ispiran tri puta 0,1M fosfatnim puferom pH 6. Reakcija je započeta na način da je dodatno 100 μL enzima koncentracije 6 mg mL<sup>-1</sup>, 50 μL 0,1M fosfatnog pufera pH 6 te 50 μL aldehida koncentracije 400 mM acetaldehida i 200 mM kloroacetaldehida (konc. u reaktoru:  $c_{enzim} = 3 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{acetaldehid} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{kloroacetaldehid} = 50 \text{ mM}$ ). Za praćenje aktivnosti enzima uzimani su uzorci u pravilnim vremenskim intervalima te analizirani na HPLC uređaju.

Za ispitivanje upotrebe imobiliziranog biokatalizatora u više ciklusa koncentracija enzima koja se imobilizirala na silici većih pora iznosila je 6 mg mL<sup>-1</sup>. Reakcija je započeta dodatkom otopine 100 μL aldehida ( $c_{acetaldehid} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{kloroacetaldehid} = 50 \text{ mM}$ , 0,1 M fosfatni pufer pH 6) imobiliziranom enzimu. Nakon ciklusa enzim je centrifugiran 5 min na 14000 o min<sup>-1</sup> i ispran tri puta 0,1 M fosfatnim puferom pH 6. Za praćenje aktivnosti enzima uzimani su uzorci u pravilnim vremenskim intervalima te analizirani na HPLC uređaju.

### **3.4. Analitičke metode**

#### *3.4.1 Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu*

Metoda po Bradfordu je metoda za određivanje koncentracije proteina u uzorku.<sup>19</sup> Brzina reakcije, visoka stabilnost kompleksa protein – boja te mala osjetljivost na interferencije s reagensima su prednosti metode po Bradfordu.<sup>20</sup> Bradfordova reakcija se zasniva na reakciji vezanja boje Comassie Blue G250 na proteinsku skupinu u kiselom mediju.<sup>19</sup> Kada je Bradfordov reagens dodan u otopinu proteina, boja se veže za protein, stvara se kompleks boja – protein te

dolazi do promjene boje od crveno smeđe do plave, apsorpcijski maksimum pomiče se od 465 do 595 nm.<sup>20</sup> (Slika 17.)



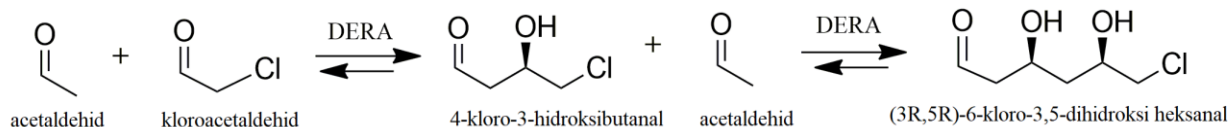
**Slika 17.** Metoda po Bradfordu.

Kako bi odredili koncentraciju proteina potrebno je prvo izraditi baždarni dijagram. Pripremljeno je 10 mL temeljne otopine albumina koncentracije 0,1 mg mL<sup>-1</sup>. U kivetama su pripremljene otopine koncentracije 1, 5, 10, 15, 20 mg L<sup>-1</sup>, za svaku koncentraciju pripremljene su tri kivete. Dodano je 500 µL Bradfordova reagensa u svaku te su otopine homogenizirane. Nakon 10 minuta je izmjerena apsorbancija uzorka na spektrofotometru pri valnim duljinama 450 i 595 nm. Za svaku vrijednost koncentracije albumina od tri uzorka uzeta je srednja vrijednost apsorbancije. Dobiven je baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina. (Prilog 1.). Bradfordov reagens je pripremljen otapanjem bojila Comassie Blue G250.

Metodom po Bradfordu je određena koncentracija enzima u temeljnoj otopini i u otopini enzima nakon provedbe imobilizacije.

### 3.4.2. Određivanje aktivnosti enzima DERA

Aktivnost enzima DERA ispitana je u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida (slika 18.)



**Slika 18.** Aldolna adicija katalizirana enzimom DERA.

Reakcija se odvija u dva koraka. Reakcijom acetaldehida i kloroacetaldehida nastaje međuprodukt 4-kloro-3-hidroksibutanal koji reagira s još jednom molekulom acetaldehida čime

nastaje konačni produkt 6-kloro-3,5-dihidroksi heksanal koji zbog povećanja stabilnosti ciklizira u stabilniji oblik.

Aktivnost enzima DERA određivana je u temeljnoj otopini enzima, otopini nakon provedene imobilizacije enzima te u ponovljenoj reakciji imobiliziranog enzima. Temeljna otopina aldehida (acetaldehid i kloroacetaldehid) sadržavala je 400 mM acetaldehida i 200 mM kloroacetaldehida u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6. Koncentracija u reaktoru je bila 100 mM acetaldehida i 50 mM kloroacetaldehida (pomiješano je 50  $\mu\text{L}$  temeljne otopine aldehida s 150  $\mu\text{L}$  pufera/enzima). Temeljna otopina enzima koncentracije je 6 mg  $\text{mL}^{-1}$  u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6.

Za praćenje aktivnosti enzima uzimani su uzorci u pravilnim vremenskim intervalima te analizirani na HPLC uređaju. Aktivnost imobiliziranog enzima je određena iz promjene koncentracije međuprodukta i produkta s vremenom. (Prilog 2.)

### *3.4.3. Određivanje koncentracije supstrata i produkata reakcije aldolne adicije pomoću HPLC uređaja*

Analizirani su uzorci reaktanta i produkta aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane enzimom DERA. Prije analize uzorci su derivatizirani kako bi bili vidljivi na UV detektoru. Postupak derivatizacije se provodio na načina da je 5  $\mu\text{L}$  uzorka pomiješano s 50  $\mu\text{L}$  derivatizacijske otopine koja se sastoji od 0.02 g  $\text{mL}^{-1}$  o-benzil hidroksilamina u otopini piridina, metanola i vode u omjeru 33:15:2. Smjesa je miješana 20 min na tresilici pri 900  $\text{min}^{-1}$  i sobnoj temperaturi. Nakon miješanja dodano je 350  $\mu\text{L}$  metanola za zaustavljanje postupka derivatizacije. Smjesa je potom centrifugirana 5 min na 14000  $\text{min}^{-1}$ , te se supernatant koristio za analizu na HPLC-u. Analiza uzoraka na HPLC uređaju provedena je pri temperaturi 30 °C s protokom mobilne faze 1,5  $\text{mL min}^{-1}$  kroz kolonu *LiChrospher C18* (Phenomenex, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4 mm). Mobilna faza se sastojala od dva otapala: A (0,1 % TFA u vodi) i B (0,1 % TFA u acetonitrilu). Mobilna faza je tijekom analize mijenjala sastav tako što je prve 10 min gradijent eluenta B padao sa 90% na 28,4%, a od 14 do 16 min gradijent eluenta B je rastao od 28,4% do 90%. Detekcija je provedena pri valnoj duljini od 215 nm na UV-detektoru.



Kao rezultat analize dobiven je kromatogram sa vremenima zadržavanja supstrata (acetaldehida i kloroacetaldehida), međuprodukta (4-kloro-3-hidroksibutanala) i produkta (6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala) (Prilog 3.). Baždarni dijagrami napravljeni su analizom uzoraka poznatih koncentracija acetaldehida i kloroacetaldehida čime je dobiven odnos površine ispod grafa i koncentracije navedenih komponenti. Analizom uzoraka nepoznatih koncentracija acetaldehida i kloroacetaldehida određene su površine ispod grafa te su potom izračunate koncentracije pomoću baždarnog dijagrama (Prilog 4. i Prilog 5.).

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bila je imobilizacija enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku u svrhu povećanja njegove stabilnosti. Sintetizirana je mezoporozna silika manjih i većih pora koja je funkcionalizirana APTMS-om te je nakon toga provedena aktivacija. Mezoporozna silika manjih korištena je za optimiranje nosioca i optimiranje uvjeta imobilizacije, a mezoporozna silika većih pora za ispitivanje upotrebe enzima u više ciklusa. Za aktivaciju su korišteni benzokinon, sukcinski anhidrid i glutaraldehid u različitim koncentracijama te su praćeni parametri uspješnosti (parametri iskorištenja, efikasnosti i stabilnosti).

Uvjeti imobilizacije enzima na mezoporoznu siliku su optimirani na način da je ispitan utjecaj promjene pH i temperature na proces imobilizacije.

Uspješnost imobilizacije enzima određena je parametrima iskorištenja, efikasnosti i stabilnosti.

Iskorištenje predstavlja omjer razlike koncentracije enzima u temeljnoj otopini i koncentracije enzima nakon imobilizacije sa koncentracijom enzima u temeljnoj otopini. Govori nam o količini enzima koja se uspješno imobilizirala na nosioc.

$$\text{Iskorištenje} = \frac{\text{koncentracija enzima u temeljnoj otopini} - \text{koncentracija enzima nakon imobilizacije}}{\text{koncentracija enzima u temeljnoj otopini}} \quad (8)$$

Efikasnost predstavlja omjer aktivnosti imobiliziranog enzima u prvoj reakciji te iskorištenja i aktivnosti slobodnog enzima. Govori nam kolika je aktivnost imobiliziranog enzima u odnosu na slobodni.

$$\text{Efikasnost} = \frac{\text{aktivnost imobiliziranog enzima u prvoj reakciji}}{\text{iskorištenje} \times \text{aktivnost slobodnog enzima}} \quad (9)$$

Stabilnost predstavlja omjer aktivnosti imobiliziranog enzima u ponovljenoj reakciji te aktivnosti imobiliziranog enzima u prvoj reakciji. Govori nam o uspješnosti stabilizacije enzima.

$$\text{Stabilnost} = \frac{\text{aktivnost imobiliziranog enzima u ponovljenoj reakciji}}{\text{aktivnost imobiliziranog enzima u prvoj reakciji}} \quad (10)$$

Metodom po Bradfordu određivana je koncentracija enzima u temeljnoj otopini i otopini nakon provedene imobilizacije te je iz dobivenih vrijednosti izračunata imobilizacijska aktivnost

enzima. Aktivnosti enzima DERA u temeljnoj otopini, imobiliziranog enzima i imobiliziranog enzima u ponovljenoj reakciji ispitane su reakcijom aldolne adicije acetaldehida (AA) i kloroacetaldehida (CAA).

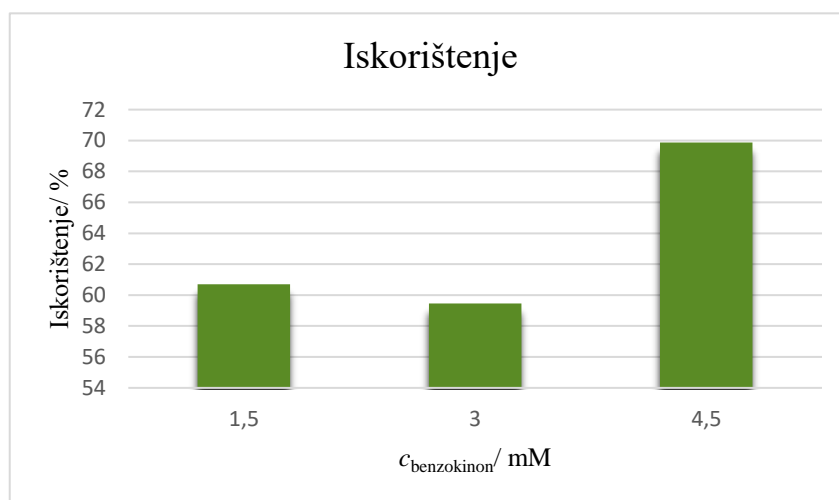
#### 4.1. Optimiranje nosioca

U svrhu optimiranja uvjeta imobilizacije provedena je aktivacija nosioca benzokinonom, sukcininskim anhidridom i glutaraldehidom. Određene su aktivnosti slobodnog enzima, imobiliziranog enzima i imobiliziranog enzima u ponovljenoj reakciji te su izračunati parametri uspješnosti reakcije imobilizacije.

##### 4.1.1. Benzokinon

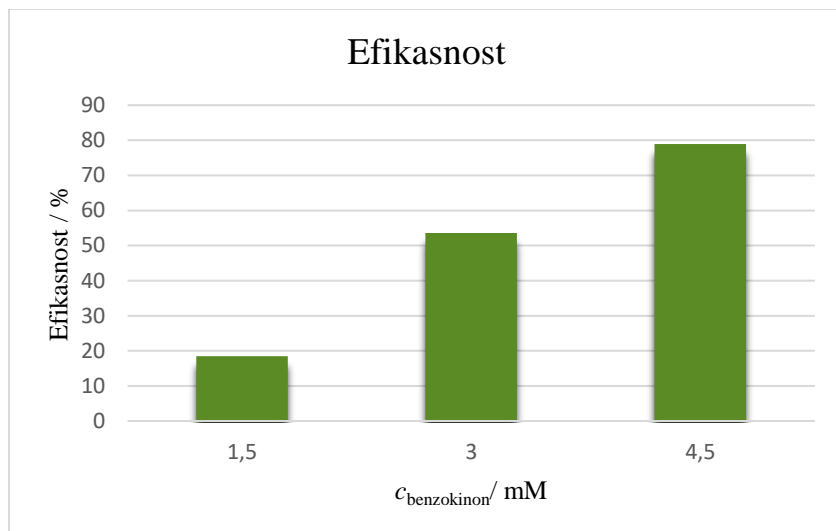
Mezoporozna silika funkcionalizirana APTMS-om je aktivirana korištenjem tri različite koncentracije benzokinona (1,5, 3 i 4,5 mM). U svrhu usporedbe imobilizacije enzima DERA na ovako pripremljene nosioce izračunati su parametri uspješnosti.

Na slici 19. je prikazan graf ovisnosti iskorištenja imobilizacije o koncentracijama benzokinona korištenih za aktivaciju. Iskorištenje je izračunato prema jednadžbi 8. Može se vidjeti da iskorištenje raste s povećanjem koncentracije, a najviša vrijednost iskorištenja je kod koncentracije benzokinona od 4,5 mM i iznosi 69,88 %.



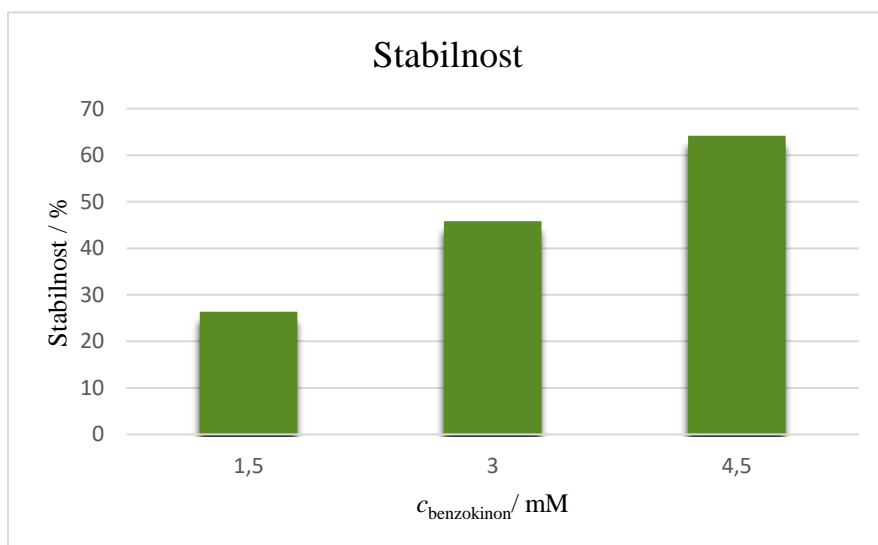
**Slika 19.** Ovisnost iskorištenja imobilizacije o koncentraciji benzokinona korištenog za aktivaciju mezoprozne silike funkcionalizirane APTMS-om.

Na slici 20. prikazan je graf ovisnosti efikasnosti (jedn. 9) o koncentraciji benzokinona koja je korištena u procesu aktivacije. Efikasnost raste s povećanjem koncentracije benzokinona, a najviši postotak iznosi 78,96 % za nosioc aktiviran s benzokinonom koncentracije 4,5 mM.



**Slika 20.** Ovisnost efikasnosti procesa imobilizacije o koncentraciji benzokinona korištenog za aktivaciju mezoprozne silike funkcionalizirane APTMS-om.

Stabilnost je izračunata prema jednadžbi 10. i prikazana je na slici 21. Stabilnost raste s povećanjem koncentracije benzokinona, najviša je za koncentraciju 4,5 mM za koju iznosi 64,19 %.



**Slika 21.** Ovisnost stabilnosti imobilizirane DERA-e o koncentraciji benzokinona korištenog za aktivaciju mezoprozne silike funkcionalizirane APTMS-om.

U tablici 1. prikazane su vrijednosti parametara uspješnosti za benzokinon.

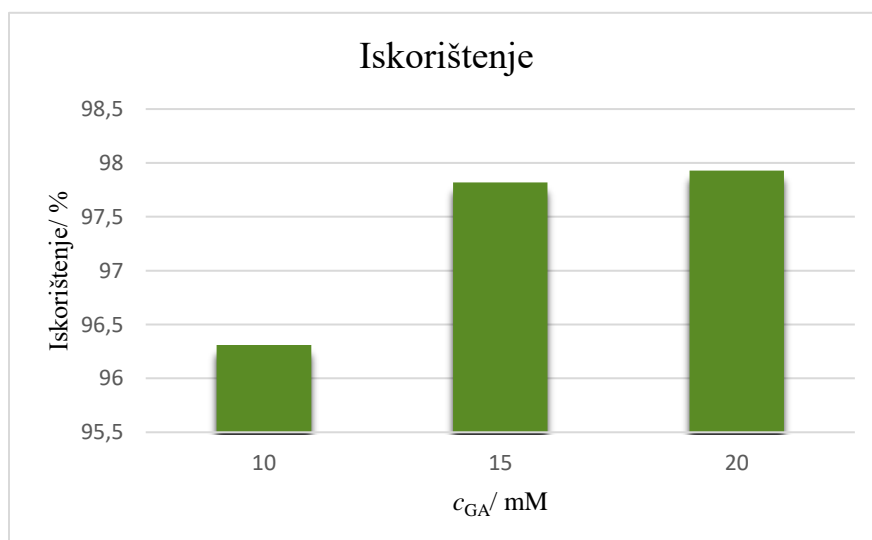
**Tablica 1.** Parametri uspješnosti imobilizacije za enzim imobiliziran na nosioc aktiviran benzokinonom

$c_{\text{benzokinon}}/ \text{mM}$	Iskorištenje/ %	Efikasnost/ %	Stabilnost/ %
1,5	60,71	18,46	26,32
3,0	59,46	53,55	45,81
4,5	69,88	78,96	64,19

Na osnovu dobivenih parametara uspješnosti kao najbolji nosioc za imobilizaciju se pokazao onaj aktiviran s benzokinonom koncentracije 4,5 mM.

#### 4.1.2. Glutaraldehyd

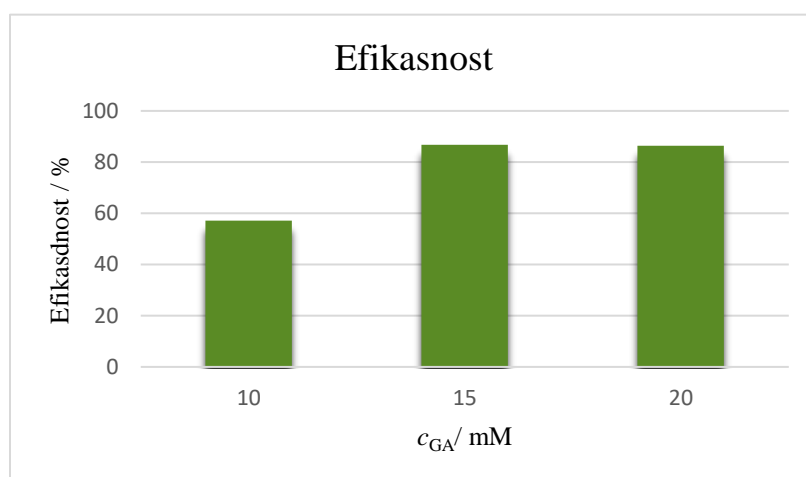
Određeni su parametri uspješnosti imobilizacije enzima DERA na mezoporoznu siliku funkcionaliziranu APTMS-om i aktiviranu korištenjem tri različite koncentracije glutaraldehyda (10, 15 i 20 %).



**Slika 22.** Ovisnost iskorištenja imobilizacije o koncentraciji GA korištenog za aktivaciju mezoprozne silike funkcionalizirane APTMS-om.

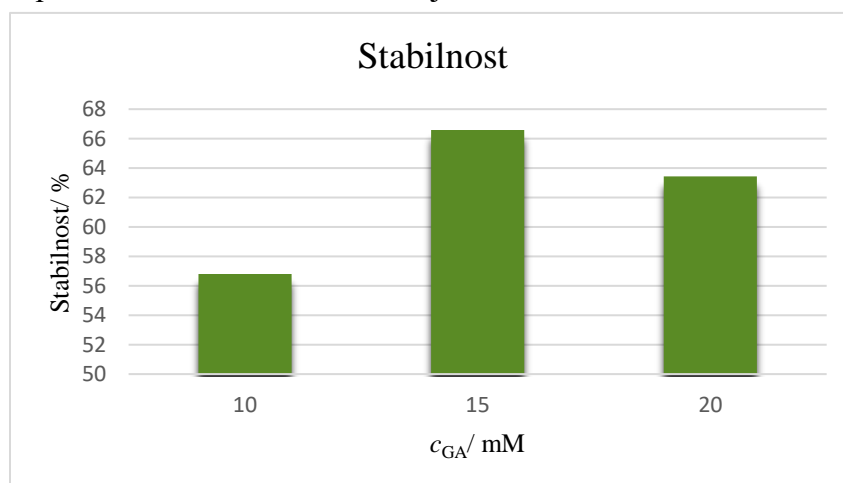
Na slici 22. je prikazan graf ovisnosti iskorištenja imobilizacije enzima o koncentracijama GA korištenih za aktivaciju nosioca (jedn. 8). Iskorištenje neznatno raste s povećanjem koncentracije, te je kod 15 i 20 % GA je gotovo isto. Najviše iskorištenje dobiveno je korištenje 15 % GA i ono iznosi 97,93 %.

Na slici 23. prikazan je graf ovisnosti efikasnosti procesa imobilizacije o koncentraciji GA (jedn. 9). Efikasnosti neznatno raste s povećanjem koncentracije GA, te je gotovo identičan kod 15 i 20 % GA. Najviša efikasnost od 86,73 % postignuta je aktivacijom nosioca s 15 % GA.



**Slika 23.** Ovisnost efikasnosti procesa imobilizacije o koncentraciji GA korištenog za aktivaciju mezoprozne silike funkcionalizirane APTMS-om.

Stabilnost (jedn. 10) je prikazana na slici 24. te se može vidjeti da se najviša stabilnost 66,59 % postiže upotrebom 15 % GA za aktivaciju nosioca



**Slika 24.** Ovisnost stabilnosti imobilizirane DERA-e o koncentraciji GA korištenog za aktivaciju mezoprozne silike funkcionalizirane APTMS-om.

Vrijednosti parametara uspješnosti za GA prikazane su u tablici 2.

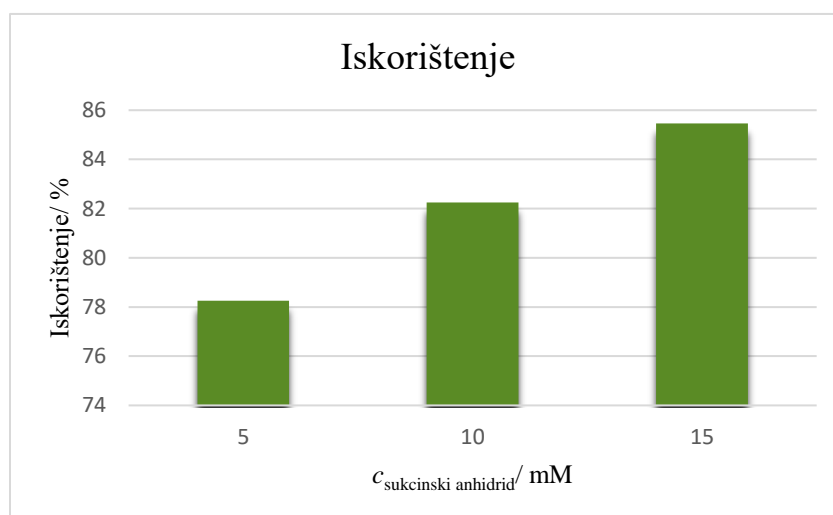
**Tablica 2.** Parametri uspješnosti imobilizacije za enzim imobiliziran na nosioc aktiviran GA

$c_{GA}$ / mM	Iskorištenje/ %	Efikasnost/ %	Stabilnost/ %
10	96,31	57,11	56,80
15	97,82	86,73	66,59
20	97,93	86,43	63,43

Iz dobivenih parametra uspješnosti može se zaključiti da nosioci aktivirani s 15 i 20 % GA su otprilike jednaki, te da je nosioc aktiviran s 15 %-tni GA neznatno bolji za imobilizaciju enzima DERA.

#### 4.1.3. Sukcinski anhidrid

Određeni su parametri uspješnosti imobilizacije enzima DERA na nosioc aktiviranim s sukciniskim anhidridom pri čemu su korištene tri različite koncentracije istog (5, 10 i 15 mM).

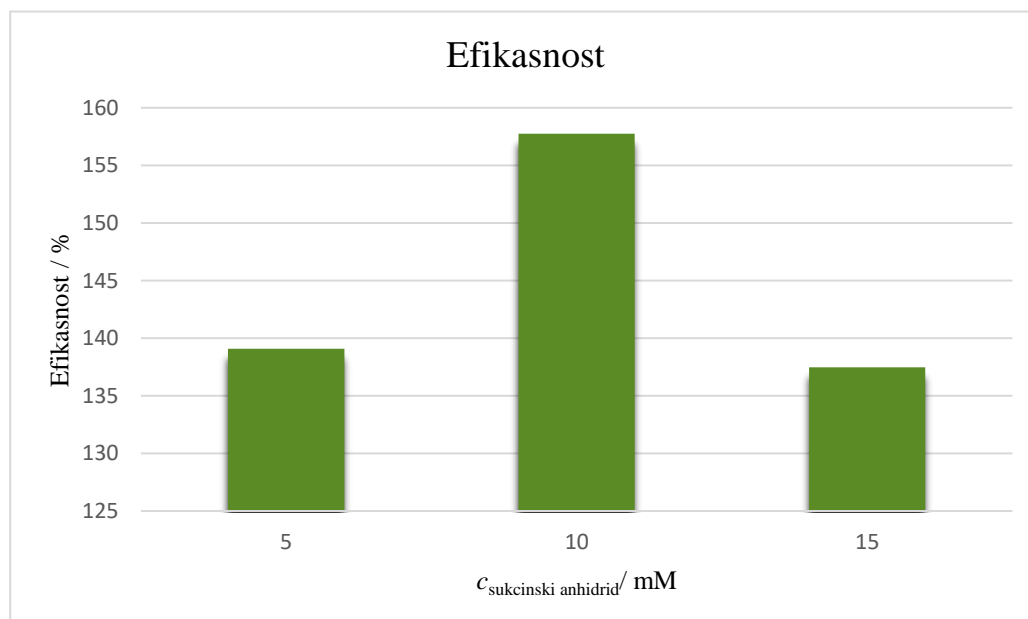


**Slika 25.** Ovisnost iskorištenja imobilizacije o koncentraciji sukciniskog anhidrida korištenog za aktivaciju mezopropzne silike funkcionalizirane APTMS-om.

Na slici 25. je prikazan graf ovisnosti iskorištenja imobilizirane reakcije na nosioc aktiviran s različitim koncentracijama sukciniskog anhidrida (jedn. 8). Iskorištenje raste s povećanjem

koncentracije, te je najveće iskorištenje postignuto korištenjem 15 %-tnog sukcinog anhidrida i ono iznosi 85,46 %.

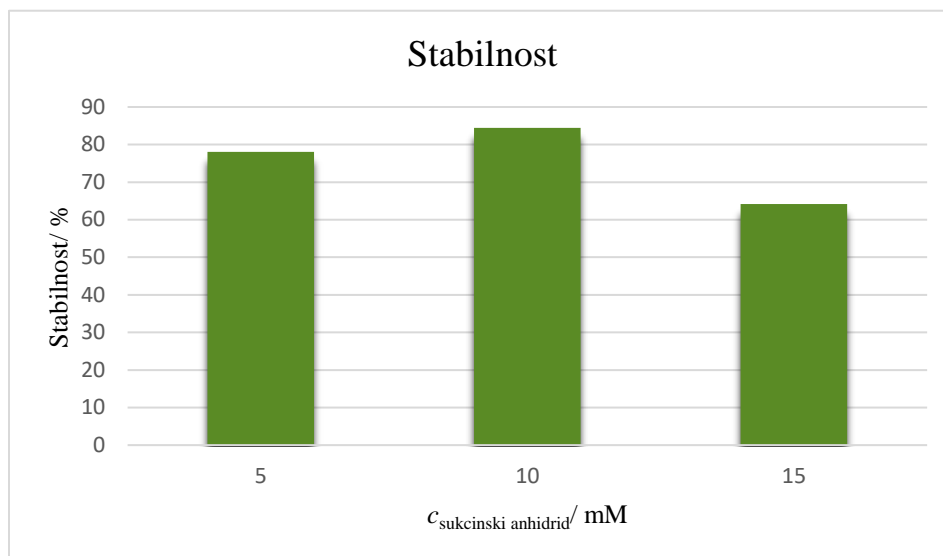
Na slici 26. prikazan je graf ovisnosti efikasnosti o koncentraciji sukcinog anhidrida (jedin. 9), te se može vidjeti da je najviša efikasnost od 157,75 % postignuta korištenjem 10 %-tnog sukcinog anhidrida za aktivaciju. Također može se uočiti da je u svim slučajevima došlo do hiperaktivacije enzima. Naime enzim uspostavlja kovalentne veze s aktivacijskim agensom može djelomično promijeniti i svoju tercijarnu strukturu, što u konačnici može rezultirati smanjenjem ili povećanjem dostupnosti aktivnog mjesta. U slučaju aktivacije sa sukcinim anhidridom enzim očito poprima povoljniju strukturu za reakciju dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida.



**Slika 26.** Ovisnost efikasnosti procesa imobilizacije o koncentraciji sukcinog anhidrida korištenog za aktivaciju mezoprozne silike funkcionalizirane APTMS-om.

Stabilnost imobiliziranog enzima je prikazana na slici 27. (jedin. 10). Najviša stabilnost postiže se aktivacijom mezoprozne silike funkcionalizirane APTMS-om s 10 % sukcinim anhidridom i iznosi 84,44 %.





**Slika 27.** Ovisnost stabilnosti imobilizirane DERA-e o koncentraciji sukcinog anhidrida korištenog za aktivaciju mezoprozne silike funkcionalizirane APTMS-om.

Vrijednosti parametara uspješnosti za 5, 10 i 15 mM sukcinog anhidrid prikazane su u tablici 3.

**Tablica 3.** Parametri uspješnosti imobilizacije za enzim imobiliziran na nosioc aktiviran sukcinog anhidridom.

c <sub>sukcinski anhidrid</sub> / mM	Iskorištenje / %	Efikasnost / %	Stabilnost / %
5	78,26	139,08	78,09
10	82,25	157,75	84,44
15	85,46	137,48	64,14

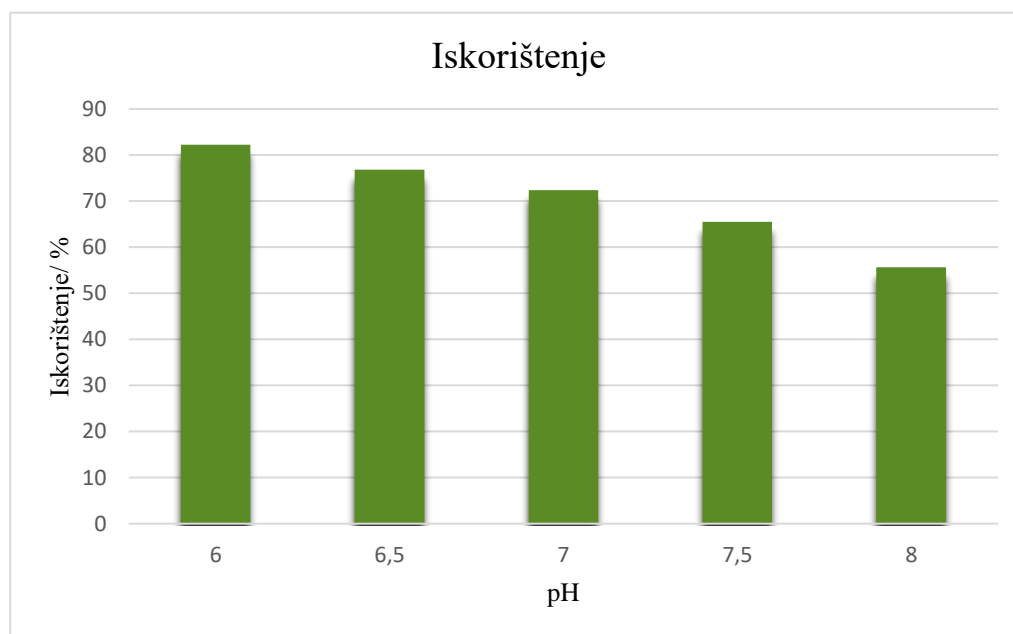
Najbolji pokazatelj u procesu imobilizacije enzima DERA-e postižu se s nosiocom aktiviranim s 10 mM sukcinog anhidridom. Ovaj nosioc je pokazao značajno bolje rezultate i u usporedbi s nosiocima aktiviranim s bezokinonom i GA (tablice 1 i 2) te je stoga isti korišten prilikom optimiranja uvjeta imobilizacije.

#### 4.2. Optimiranje uvjeta reakcije imobilizacije

Po parametrima uspješnosti najbolji se pokazao 10 % sukcinski anhidrid koji je shodno tome odabran za daljnje optimiranje pH i temperature tijekom imobilizacije. Imobilizacija je provedena s pet različitih pH vrijednosti 0.1 M fosfatnog pufera kako bi ispitao utjecaj pH na uspješnost procesa imobilizacije. Također je ispitan utjecaj temperature na način da je imobilizacija provedena pri četiri različite temperatura.

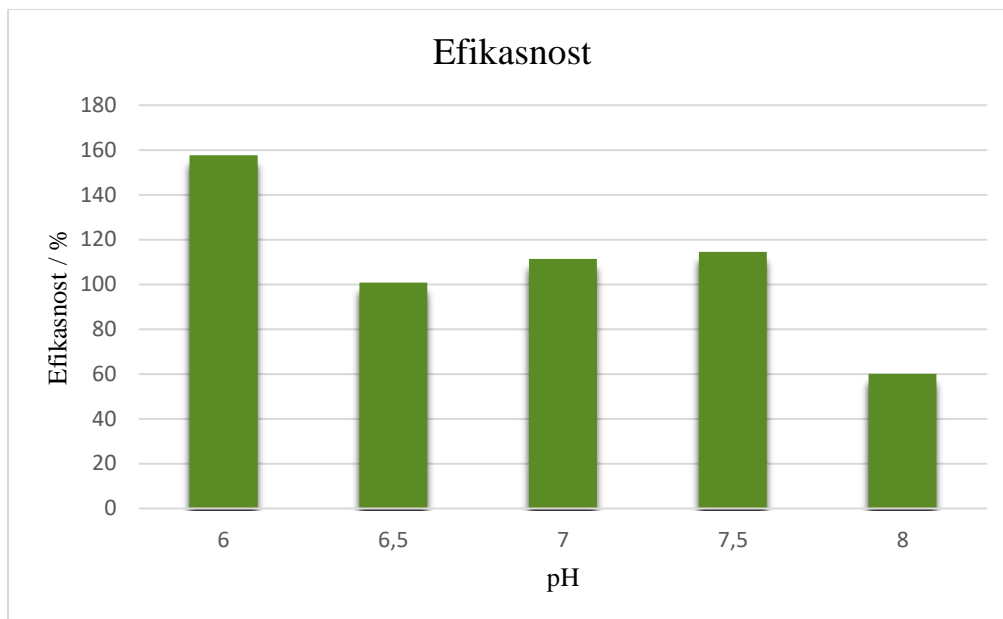
Ispitan je utjecaj pH na u uspješnost procesa imobilizacije enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku funkcionaliziranu APTMS-om koja je prethodno aktivirana 10 % sukcinским anhidridom.

Na slici 28. je prikazan graf ovisnosti iskorištenja imobilizirane reakcije za imobilizirani enzim DERA na MCF siliku o puferima različitih pH vrijednosti 6, 6,5, 7, 7,5, 8. Može se vidjeti da iskorištenje pada s povećanjem pH vrijednosti. Najveće iskorištenje je postignuto kod pH 6 i ono iznosi 82,25 %



**Slika 28** Ovisnost iskorištenja imobilizacije o pH.

Na slici 29. prikazan je graf ovisnosti efikasnosti imobilizirane reakcije za imobilizirani enzim DERA na MCF siliku o puferima različitih pH vrijednosti. Postotak efikasnosti pada s povećanjem pH vrijednosti. Najveća efikasnost je postignuta pri pH 6 i iznosi 157,75 %.



**Slika 29.** Ovisnost efikasnosti procesa imobilizacije o pH.

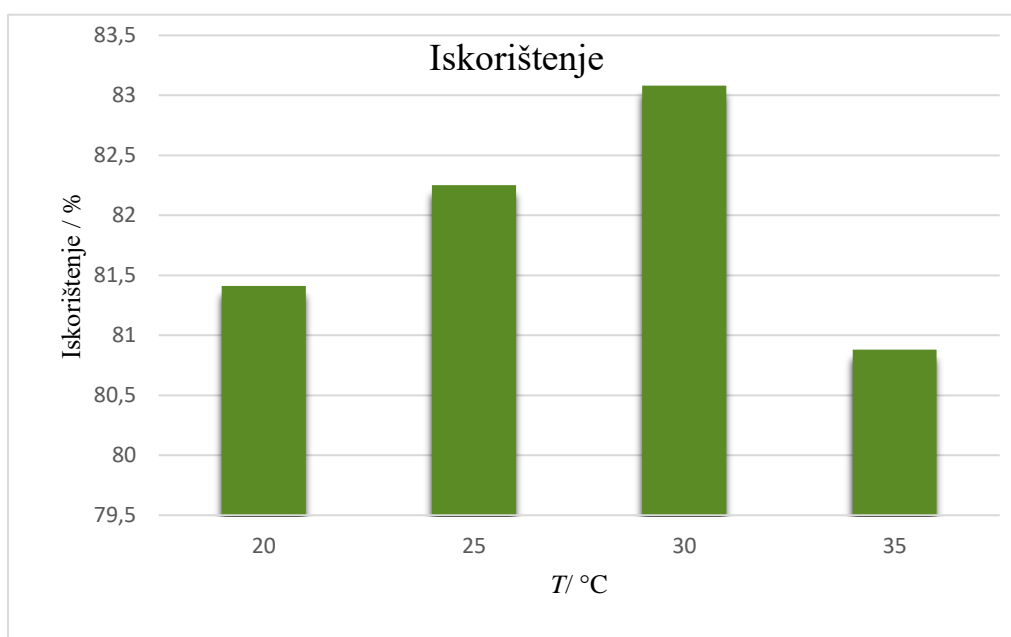
Parametri uspješnosti procesa imobilizacije u ovisnosti o pH vrijednostima su prikazani u tablici 4.

**Tablica 4.** Parametri uspješnosti imobilizacije za imobilizirani enzim u puferima s različitim pH vrijednostima

pH	Iskorištenje/ %	Efikasnost/ %
6	82,25	157,75
6,5	76,85	100,77
7	72,41	111,33
7,5	65,53	114,60
8	55,68	60,15

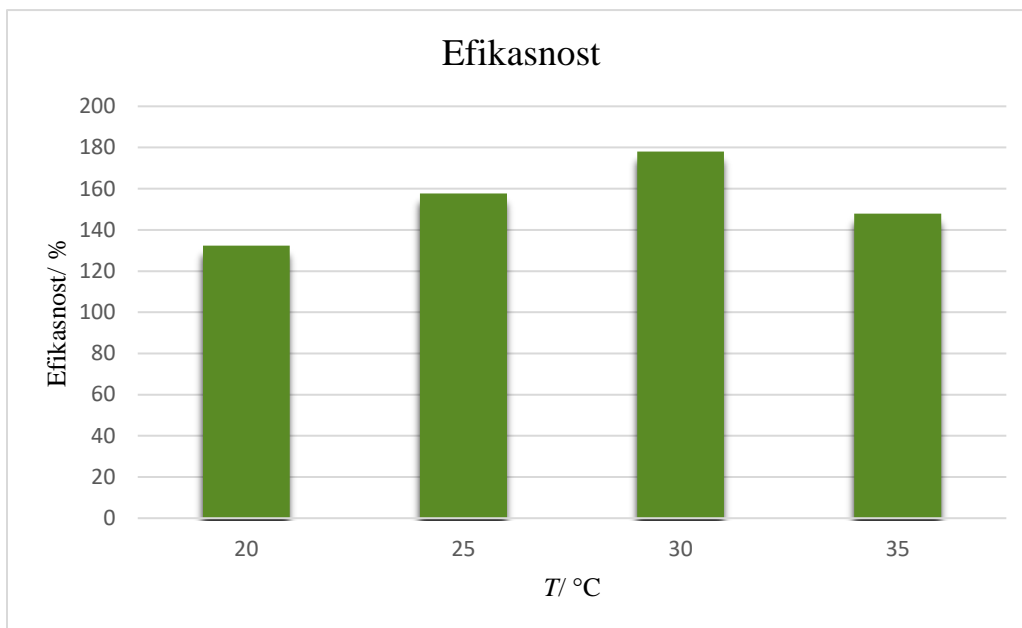
Iz tablice 4. može se vidjeti da iskorištenje kao i efikasnost padaju s porastom pH. Iskorištenje i efikasnost su najviši kada je imobilizacija provedena s puferom pH vrijednosti 6 gdje iskorištenje iznosi 82,25%, a efikasnost 157,75%. Prema dobivenih rezultatima pufer pH 6 je odabran za daljnja ispitivanja.

Na slici 30. je prikazan graf ovisnosti iskorištenja imobilizirane reakcije za imobilizirani enzim DERA na MCF siliku o temperaturama 20, 25, 30 i 35 °C. Iskorištenje prvo raste s povećanjem temperature do 30 °C, a nakon toga pada. Najveće iskorištenje od 83,08 % je postignuto pri temperaturi od 30 °C.



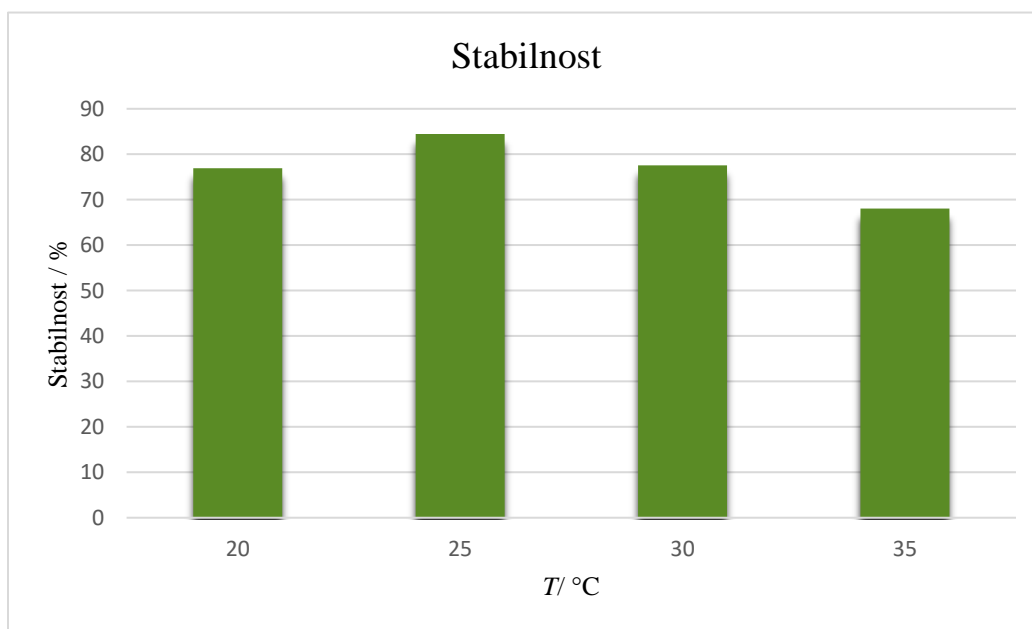
**Slika 30.** Ovisnost iskorištenja imobilizacije o temperaturi

Na slici 31. prikazan je graf ovisnosti efikasnosti procesa imobilizacije za imobilizirani enzim DERA na MCF siliku o temperaturama 20, 25, 30 i 35 °C. Postotak efikasnosti pada s povećanjem pH vrijednosti. prvo raste s povećanjem temperature do 30 °C, nakon toga pada. Najveće iskorištenje je 177,98 % kod 30 °C.



**Slika 31.** Ovisnosti efikasnosti procesa imobilizacije o temperature.

Stabilnost prvo raste s povećanjem temperature imobilizacije, a zatim pada s daljnjim povećanjem temperature (Slici 32). Najveća stabilnost imobiliziranog enzima je dobivena prilikom provedbe procesa imobilizacije na 25 °C.



**Slika 32.** Ovisnosti stabilnosti imobilizirane DERA-e o temperaturi imobilizacije.

Parametri uspješnosti za ovisnost imobilizacije enzima na mezoporoznu siliku u ovisnosti o temperaturi su prikazani u tablici 5.

**Tablica 5.** Parametri uspješnosti imobilizacije za imobilizirani enzim kod temperature 20, 25, 30 i 35°C.

<i>T/ °C</i>	Iskorištenje/ %	Efikasnost/ %	Stabilnost/ %
20	81,41	132,34	76,92
25	82,25	157,75	84,44
30	83,08	177,98	77,52
35	80,88	147,94	68,02

Iz tablice 5. vidimo da iskorištenje, efikasnost i stabilnost prvo rastu s porastom temperature, a zatim padaju. Najbolje parametre uspješnosti je pokazala temperatura 30 °C te je ona korištena za daljnja ispitivanja.

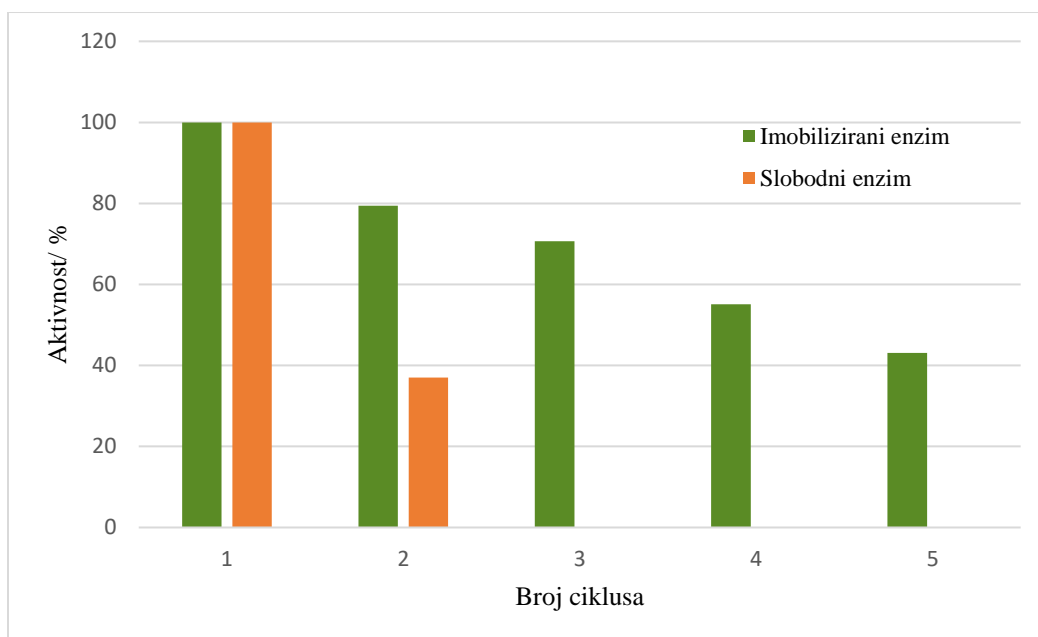
#### **4.3. Upotreba biokatalizatora u više ciklusa**

Za usporedbu stabilnosti slobodnog i imobiliziranog enzima izmjerena je aktivnost slobodnog enzima, te aktivnost istog tog enzima u ponovljenim reakcijama. Kao nosioc za imobilizirani enzim korištena je mezoporna silika većih pora koja ima kapacitet vezanja 0.05 mg enzima/mg nosioca dok silika manjih pora ima kapacitet 0.025mg enzima /mg nosioca. Što znači da silika s većim porama ima duplo veći kapacitet jer može vezati više enzima.

Prije reakcije imobilizacije provedena je aktivacija nosioca 10 % sukcinjskim anhidridom. Imobilizacija je provedena u puferu pH 6 na temperaturi od 30 °C. Reakcija je provedena kroz pet ciklusa te je određena aktivnost za ponovljene reakcije (tablica 17, slika 33).

**Tablica 1.** Vrijednosti aktivnosti imobiliziranog i slobodnog enzima u ponovljenoj reakciji .

	Aktivnost imobiliziranog enzima / %	Aktivnost čistog enzima/%
1. reakcija	100,00	100,00
2. reakcija	79,40	37,00
3. reakcija	70,66	0
4. reakcija	55,09	-
5. reakcija	43,11	-



**Slika 33.** Usporedba aktivnosti imobiliziranog enzima i slobodnog enzima u ponovljivom reaktoru.

Aktivnost se smanjuje kako broj ciklusa raste jer dolazi do deaktivacije. Imobilizirani enzim zadržava aktivnost i nakon četiri ciklusa dok slobodni enzim već nakon druge reakcije u potpunosti gubi svoju aktivnost. Iz dobivenih rezultata se može zaključiti da je imobilizacija enzima znatno doprinijela povećanju njegove stabilnosti.

## 5. ZAKLJUČAK

Sintetizirana je mezoporozna silika sol – gel procesom. Sintetizirana je silika manjih pora na kojoj smo vršili optimiranje uvjeta imobilizacije i silika većih pora s kojom je provedena ponovljiva reakciju u više ciklusa. Silika s većim porama imam duplo veći kapacitet za vezanje enzima od silike s manjim porama.

Prije imobilizacije enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku provedena je funkcionalizacija površine s APTMS-om te aktivacija površine benzokinonom, sukcinom anhidridom i glutaraldehidom. Parametara uspješnosti procesa imobilizacije pokazalo su da je nosioc aktiviran s 10% sukcinom anhidrid optimalan za imobilizaciju enzima DERA.

Za optimiranje uvjeta imobilizacije ispitani su parametri uspješnosti imobilizacije o pH i temperaturi provedbe reakcije imobilizacije. Kao optimalni parametri su se pokazali pH 6 i temperatura od 30 °C.

Za usporedbu stabilnosti slobodnog i imobiliziranog enzima izmjerena je aktivnost slobodnog enzima i imobiliziranog enzima u ponovljenim reakcijama. Kod imobiliziranog enzima u petoj reakcija aktivnost iznosi 43,11 % početne aktivnosti dok je slobodni enzim nakon drugog ciklusa potpuno deaktiviran. Zaključeno je da se imobilizacijom enzima DERA značajno poboljšava njegova svojstva te se on može koristiti kroz duži period.



## 6. LITERATURA

1. *H. Gustafsson*, Enzyme Immobilization in Mesoporous Silica, Göteborg, Sweden, (2013)
2. *N. R. Mohamad, N. H. Marzuki, N. A. Buang, F. Huyop, R. Abdul Wahab*, An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnology, biotechnological equipment*, **29(2)** (2015) 205 – 220, doi:10.1080/13102818.2015.1008192 .
3. *M. Haridas, E. M. M Abdelraheem, U. Hanefeld*, 2-Deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase (DERA): applications and modifications, *Appl Microbiol Biotechnol.* **102(23)** (2018) 9959-9971, doi:10.1007/s00253-018-9392-8.
4. *B. Brena, P. González-Pombo, F. Batista-Viera*, Immobilization of enzymes: a literature survey, *Methods Mol Biol.* **1051** (2013) 15-31, doi:10.1007/978-1-62703-550-7\_2.
5. *M. Z. de Valle Gomes*, Immobilization of Enzymes in Mesoporous Silica for the Conversion of CO<sub>2</sub> to Methanol, Sweden, (2019)
6. *A. Illanes*, Enzyme Biocatalysis: Principle and Applications, Springer, (2008)
7. *S. Duraković*, Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, (1996), 231-232.
8. *A. Blanco, G. Blanco*, Medical Biochemistry, Academic Press (2017) 153 – 175.
9. *R. A. Clepland*, Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis (2004)
10. *T. Palmer, P. L. Bonner*, Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry, Second Edition, Woodhead Publishing Limited (2007)
11. *C. I. Braden, J. Tooze*, Introduction to Protein Structure (2nd ed.), Garland Science, (1998) doi: <https://doi.org/10.1201/9781136969898>
12. *P. K. Robinson*, Enzymes: principles and biotechnological applications, *Essays Biochem*, **59** (2015) 1 – 41, doi:10.1042/bse0590001
13. *R. Singh, M. Kumar, A. Mittal, P. K. Mehta*, Microbial enzymes: industrial progress in 21st century, *3 Biotech.* **6(2)** (2016) doi: <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>
14. *M. Ošljaj, J. Clauzeau, D. Orkić, G. Kopitar, P. Mrak, Z. Časar*, Productive, Whole-Cell DERA Chemoenzymatic Process for Production of Key Lactonized Side-Chain Intermediates in Statin Synthesis, *PLoS One.* **8(5)** (2013) doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062250>

15. A. Wang, M. Wang, Q. Wang, F. Chen, F- Chen, F. Zhang, H. Li, Z. Zeng, T. Xie, Stable and efficient immobilization technique of aldolase under consecutive microwave irradiation at low temperature, *Bioresour Technol.* **102(2)** (2011) 469-474, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.048> .
16. C. Burgess, Chapter 1 The basics of spectrophotometric measurement, u O. Thomas, C. Burgess (ur.) *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, Elsevier **27** (2007) 1 – 19, doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(07\)80003-5](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(07)80003-5) .
17. R. Malviya, V. Bansal, O. P. Pal, P.Sharma, High performance liquid chromatography: A short review, *Journal of Global Pharma Technology* **2** (2010) 22 – 26.
18. O. E. Petrova, K. Sauer, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Based Detection and Quantitation of Cellular c-di-GMP, *Methods Mol Biol* **1657** (2017.) 33-43, doi: [https://doi.org/10.1007%2F978-1-4939-7240-1\\_4](https://doi.org/10.1007%2F978-1-4939-7240-1_4).
19. N. J. Kruger, The Bradford Method For Protein Quantitation, u J. M. Walker (ur.) *The Protein Protocols Handbook*, Springer Protocols Handbooks, Humana Press, Totowa, (2009). [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4)
20. N. P. Bonjoch, P. R. Tamayo, Protein Content Quantification by Bradford Method, u M. J. Reigosa Roger (ur.) *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*, Springer, Dordrecht. (2001). [https://doi.org/10.1007/0-306-48057-3\\_19](https://doi.org/10.1007/0-306-48057-3_19).

## 7. SIMBOLI I SKRAĆENICE

### Skraćenice

AA - acetaldehid

CAA – kloroacetaldehid

APTMS – 3-aminopropil-3-metoksi silan

DERA – 2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza

G3P – gliceraldehid-3-fosfat

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

MCF – *Mesoporous Silica Foam*

SBA – *Santa Barbara Amorphous*

TEOS

TFA – trifluoroctena kiselina

TMB – trimetil benzen

UV – ultraljubičasto zračenje

CLEAS – agregat enzima

IUBMB – *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry*

GA – glutaraldehid

DMF – dimetilformamid

### Grčki simboli

$\mathcal{E}$  – molarni apsorpcijski koeficijent [ $\text{dm}^2 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]

$\lambda$  – valna duljina [nm]

## **Simboli**

$A$  – površina pora [ $\text{m}^2$ ]

$c$  – koncentracija tvari u otopini [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]

$E$  – efikasnost [%]

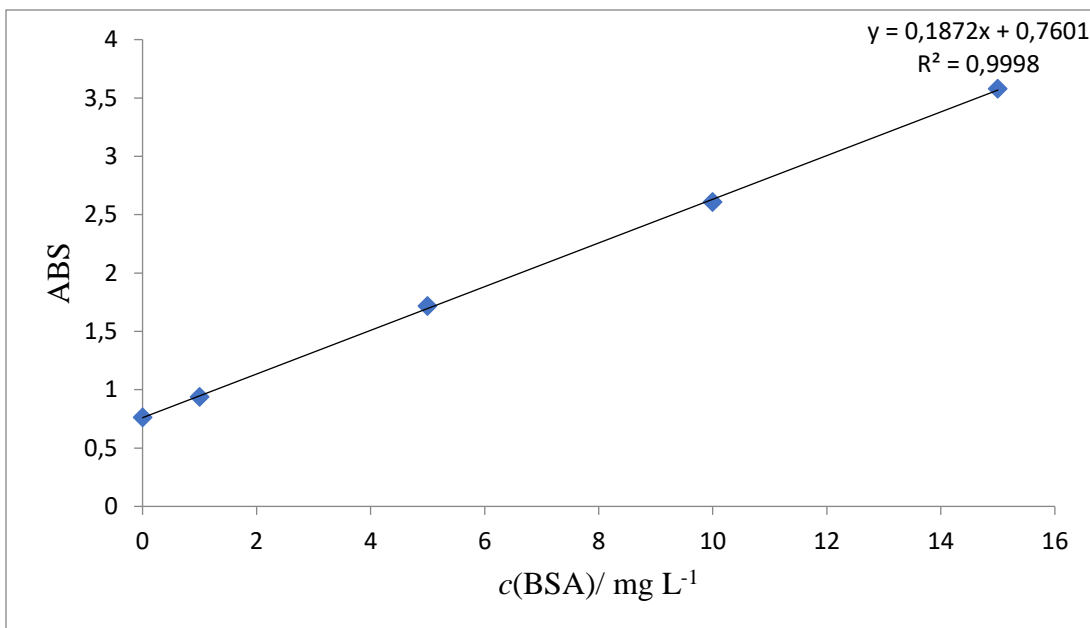
$I$  – iskorištenje [%]

$t$  – vrijeme [min]

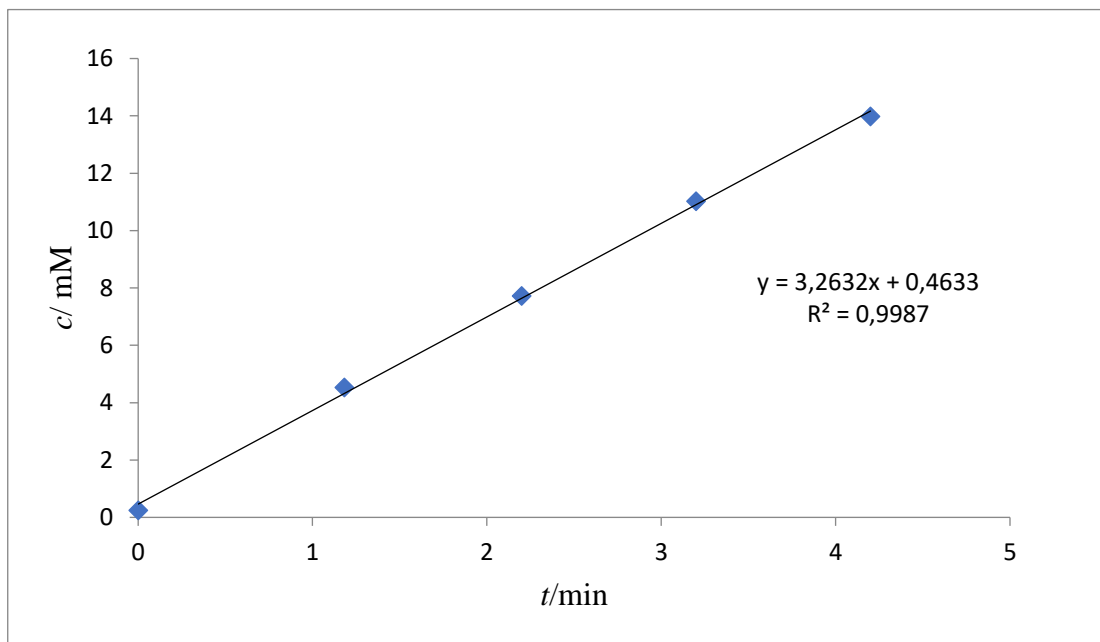
$T$  – temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ]

$V$  – volumen [ $\mu\text{L}$ ]

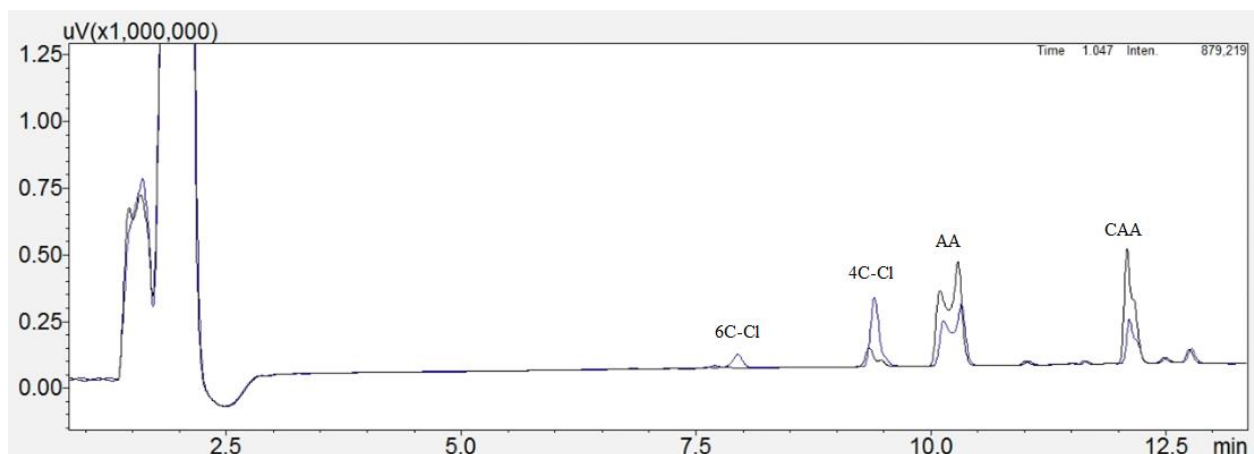
## 8. PRILOZI



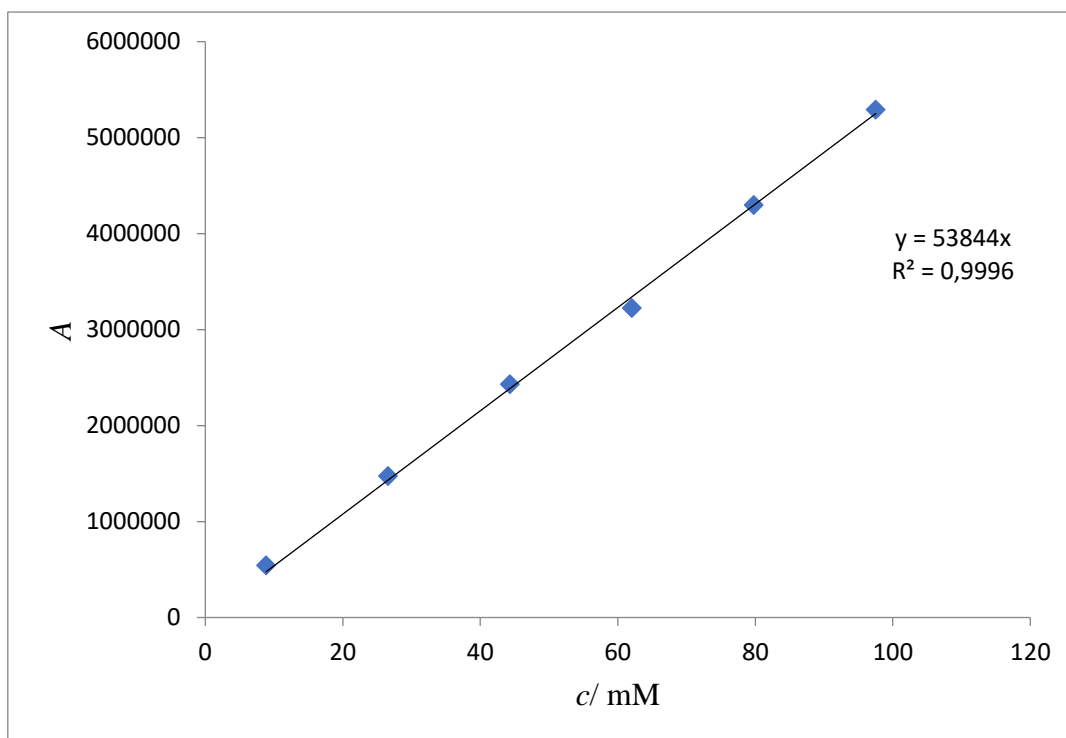
**Prilog 1.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina



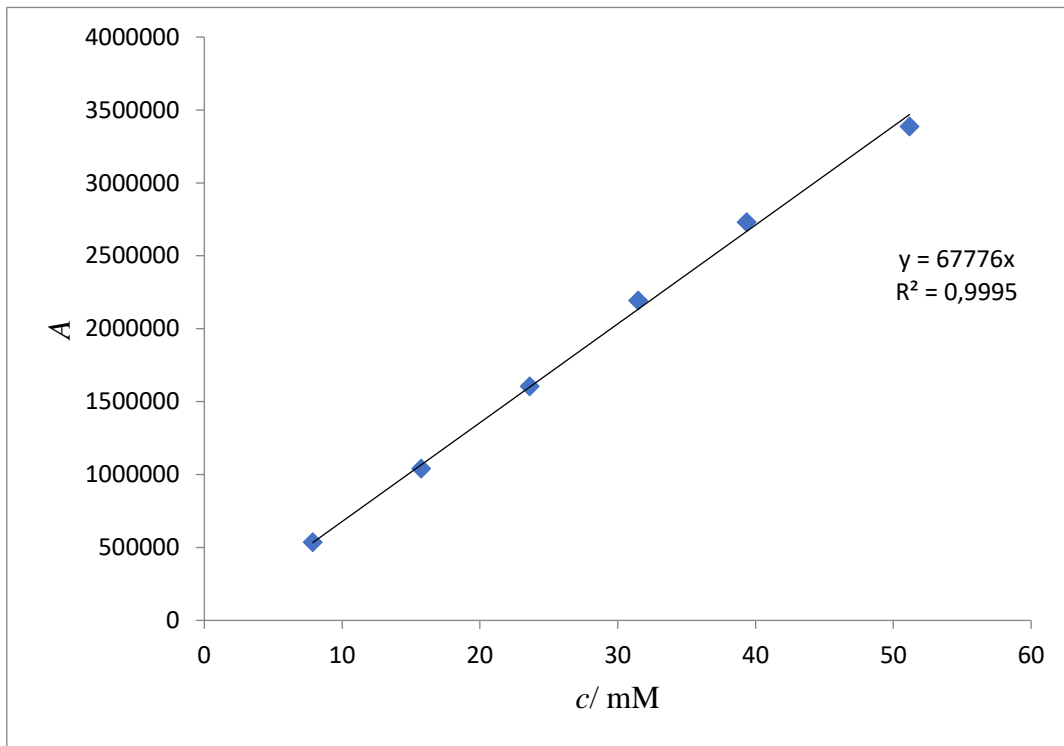
**Prilog 2.** Primjer određivanja aktivnosti enzima iz ovisnosti koncentracije produkta o vremenu.



**Prilog 3.** Kromatogram dobiven HPLC analizom



**Prilog 4.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije acetaldehida (AA) na HPLC-u



**Prilog 5.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije kloroacetaldehida na HPLC-u

## 9. ŽIVOTOPIS

Lucija Terihaj [REDACTED] Osnovno obrazovanje stječe u osnovnoj školi Bogumila Tonija u Samoboru te se potom upisuje u Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga, smjer kemijski tehničar. 2015. godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu. Stručnu praksu odradila je u Glavnom vodoopskrbnom laboratoriju hrvatskih voda na odjelu za ispitivanje metala. Preddiplomski studij završava 2020. godine obranom završnog rada na temu „Hitin – priprava i primjena. Iste godine upisuje diplomski studij Kemije i inženjerstva materijala na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije na Sveučilištu u Zagrebu.