

Sinteza mezoprozne silike

Stražičić, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:713501>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

KARLA STRAŽIČIĆ

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Karla Stražičić

SINTEZA MEZOPOROZNE SILIKE

ZAVRŠNI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:
prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki
doc. dr. sc. Zvonimir Katančić
prof. dr. sc. Ana Lončarić Božić

Zagreb, rujan 2023.

SAŽETAK

Sinteza mezoporozne silike

Tijekom 20. i početkom 21. stoljeća došlo je do značajnog razvoja znanosti u području nanotehnologije i istraživanja nanostrukturiranih materijala, uključujući mezoporozne materijale i mezoporoznu siliku. Mezoporozni materijali posjeduju poroznu strukturu i veliku specifičnu površinu koja im omogućuje široku primjenu u raznim područjima znanosti i tehnologije. Klasificiraju se prema veličini i strukturi pora. Mezoporozne SiO_2 čestice različitih struktura i morfologije, a time i različitih svojstava moguće je pripremiti promjenom uvjeta sinteze. Mezoporozni materijali predstavljaju važan materijal s velikim potencijalom za primjenu u različitim područjima znanosti i tehnologije, što ovo područje čini zanimljivim za daljnja istraživanja. Ključna primjena mezoporozne silike je imobilizacija enzima koja omogućava vezanje na stabilan nosač. Imobilizirani enzimi imaju široku primjenu u industrijskim i biotehnoškim procesima, a katalitička aktivnost ostaje im očuvana te omogućuje neprestanu i višekratnu upotrebu. Cilj ovog rada bio je sintetizirati i karakterizirati čestice mezoporozne silike s različitim veličinama pora, mijenjajući omjer komponenata koje sudjeluju u stvaranju mezoporozne strukture.

Ključne riječi: nanotehnologija, mezoporozni SiO_2 , porozna struktura, specifična površina, sinteza, imobilizacija

ABSTRACT

Synthesis of Mesoporous Silica

During the 20th and early 21st century, there have been significant scientific development in the field of nanotechnology and the research on nanostructured materials, including mesoporous materials and mesoporous silica. Mesoporous materials have a porous structure and a high specific surface area that enables their wide application in various fields of science and technology. They are classified based on their pore size and structure. Mesoporous SiO₂ particles of various structures, morphologies and thus properties, can be prepared by altering synthesis conditions. Mesoporous materials represent an important material with significant potential for application in various fields of science and technology, rendering this field interesting for further research. The important application of mesoporous silica is in enzyme immobilization where is used as carrier. Immobilized enzymes are widely used in industrial and biotechnological processes, because they retain their catalytic activity and can be used continuously and repeatedly. The aim of this study was to synthesize and characterize mesoporous silica particles with different pore sizes by adjusting the ratio of components involved in the formation of the mesoporous structure.

Keywords: nanotechnology, mesoporous SiO₂, porous structure, specific pore volume, synthesis, immobilization

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Nanoporozni materijali	2
2.2. Mezoporozna silika	3
2.2.1. Svojstva mezoporoznih materijala.....	5
2.3. Vrste mezoporozne silike	5
2.3.1. M41S.....	6
2.3.2. SBA.....	7
2.3.3. Ostale skupine mezoporozne silike.....	8
2.4. Sinteza mezoporozne silike	8
2.4.1. Sol-gel metoda	9
2.4.2. Metoda predloška.....	9
2.4.3. Metoda mikrovalnog zračenja.....	10
2.4.4. Metoda kemijskog nagrizanja.....	11
2.5. Imobilizacija	11
2.6. Funkcionalizacija	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	14
3.1. Kemikalije	14
3.2. Aparatura	14
3.2.1. Magnetska miješalica.....	14
3.2.2. Centrifuga	15
3.2.3. Tresilica	15
3.2.4. Analitička vaga.....	16
3.2.5. Peć za žarenje	17
3.2.6. Spektrofotometar	18
3.2.7. BET fiziosorpcija	19
3.2.8. Skenirajući elektronski mikroskop (SEM).....	19

3.2.9. FTIR	20
3.3. Sinteza mezoporozne silike	21
3.4. Funkcionalizacija, aktivacija i imobilizacija enzima.....	22
3.5. Analitičke metode	24
3.5.1. Bradford metoda za određivanje koncentracije proteina	24
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	25
4.1. BET analiza	25
4.2. SEM karakterizacija	28
4.3. FTIR analiza	30
4.4. Usporedba parametara imobilizacije	30
5. ZAKLJUČAK.....	32
POPIS KRATICA I SIMBOLA	33
LITERATURA	35

1. UVOD

Porozni materijali su materijali koji u svojoj strukturi sadrže pore ili šupljine, a svojstva im ovise o veličini, rasporedu i strukturi pora. Porozna struktura nastaje u procesu pripreme materijala oblikovanjem pora različitim metodama i termičkom obradom. Nanoporozni materijali, koje karakteriziraju pore čije su veličine u nanometarskom rasponu (1 – 100 nm), posebno su zanimljivi zbog poroznosti i velike specifične površine koja je uzrok karakterističnih svojstava i učinkovitosti u interakciji s okolinom [1,2].

Mezoporozni materijali vrsta su nanoporoznih materijala s porama veličine između dva i 50 nm. Njihove karakteristike su velika specifična površina, uska raspodjela veličine pora te kemijska i toplinska stabilnost. Najčešći materijali koji posjeduju mezoporoznu strukturu su silika, metalni oksidi, metalne soli i ugljične strukture [1]. Budući da imaju raznoliku primjenu, sinteza mezoporoznih materijala postala je područje intenzivnog istraživanja.

Različite metode sinteze, poput sol-gel metode, metode predloška, metode mikrovalnog zračenja i metode kemijskog nagrizanja, omogućuju kontroliranje veličine i oblika čestica i pora te kemijskog sastava. Spomenute metode osiguravaju prilagođavanje svojstva materijala potrebama različitih znanstvenih i tehnoloških područja poput katalize, biomedicine, optike i elektrokemije [1].

Među mezoporoznim materijalima ističe se mezoporozna silika, a osobito materijali iz M41S (eng. *Molecular 41 Sieves family*) i SBA (eng. *Santa Barbara Amorphous*) skupine velikih specifičnih površina te termokemijske i mehaničke stabilnosti. Sinteza ovih materijala može se regulirati uzimajući u obzir veličinu pora i čestica, površinska svojstva, metode i načine pripreme, a funkcionalizacijom površine dodatno im se prilagođavaju svojstva željenoj primjeni.

Imobilizacija enzima na mezoporoznom nosaču predstavlja ključni postupak za proizvodnju heterogenih biokatalizatora. Nosači moraju imati veliku specifičnu površinu, mehaničku čvrstoću i kemijsku stabilnost [3]. Dvije najčešće metode za vezanje enzima na nosač su kovalentno vezanje i adsorpcija. Te metode omogućuju poboljšanu stabilnost i dugotrajnost enzima koje su važne za primjenu u industrijskim procesima, farmaceutskoj industriji i drugim područjima.

2. OPĆI DIO

2.1. Nanoporozni materijali

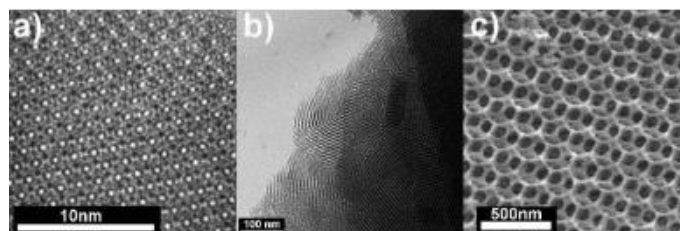
Glavna svojstva poroznih materijala proizlaze iz praznina unutar pora zbog čega se klasificiraju prema veličini i strukturi (*slika 1.*). Porozna struktura oblikuje se procesima formiranja samog materijala i oblikovanjem pora različitim modifikacijama, nerijetko i termičkom obradom [4,5]. Nanoporozni materijali su materijali porozne strukture, pora veličine u nanometarskom rasponu (1 – 100 nm).



Slika 1. Struktura poroznih materijala [1]

Prema IUPAC-ovoj klasifikaciji, ovisno o veličini pora, nanoporozni materijali dijele se u tri skupine:

- (I.) mikroporozni materijali čije su pore veličine manje od 2 nm;
- (II.) mezoporozni materijali s porama veličine između 2 i 50 nm;
- (III.) makroporozni materijali kojima su pore radijusa veće od 50 nm (*slika 2.*) [1].



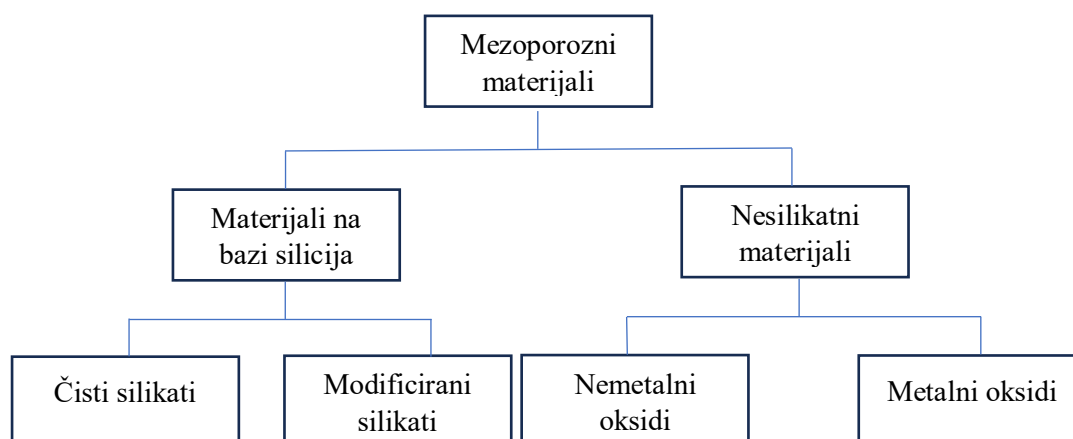
Slika 2. Tri različita tipa nanoporoznih materijala (silika): A) mikroporozni materijal, zeolit Y B) mezoporozni materijal C) makroporozni materijal [2]

Nanoporozni materijali posjeduju praznine nanometarskih veličina, a time i veliku specifičnu površinu, zbog koje jednostavno i učinkovito stupaju u interakcije s tvarima u svojoj okolini. Kemijska, fizikalna i mehanička svojstva tih materijala mogu se lako prilagoditi zahtjevima raznih područja znanosti i tehnologije. Imaju naročito visok potencijal u farmaceutskoj industriji, specifično za sintezu lijekova i dostavu istih u organizmu, kao i u područjima katalize, biosenzora i imobilizaciju enzima. Kako bi primjena nanoporoznih materijala bila uspješna, važno je postići željenu strukturu, oblik i veličinu čestica/pora te precizni kemijski sastav. Spomenuto se regulira različitim tehnikama sinteze pod kontroliranim uvjetima: taloženjem, reakcijom u čvrstom stanju, sol-gel metodom, hidrotermalnim i solvotermalnim postupcima [6–8].

2.2. Mezoporozna silika

Mezoporozni su materijali opisani kao kemijski i termodinamički stabilni nanomaterijali definirane i kontrolirane morfologije i struktura. Prema IUPAC-ovoj klasifikaciji mezoporozni materijal definira se kao materijal koji posjeduje pore veličina između dva i 50 nanometara te veliku specifičnu površinu [1,6].

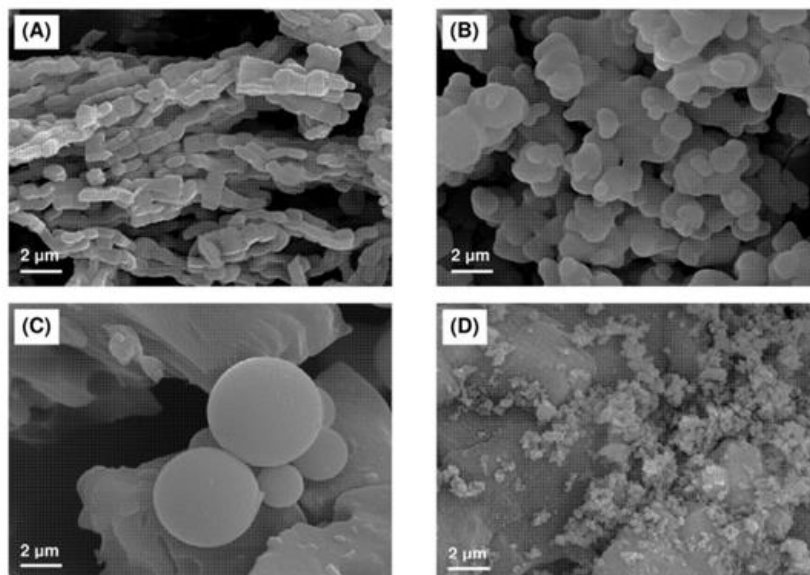
Skupinu mezoporoznih materijala čine silika, metalni oksidi (SiO_2 , TiO_2 , Fe_2O_3), metalni hidroksidi, metalne soli, ugljične strukture, hibridni materijali, organske strukture i mnogi drugi. Prema sastavu, mezoporozni materijali mogu se podijeliti u dvije kategorije (*slika 3.*): materijale na bazi silicija i nesilikatne materijale.



Slika 3. Shematski prikaz podjele mezoporozne silike prema sastavu

Silikatni materijali se dalje dijele na čiste silikate i modificirane silikate. Čisti silikati predstavljaju grupu silikata MCM, SBA, HMS, dok se nesilikatni mezoporozni materijali sastoje od oksida prijelaznih metala (TiO_2 , PbO_2 , MnO) ili nemetalnih oksida (fosfati, sulfati i mezoporozni ugljik). Nesilikatni mezoporozni materijali nisu stabilni jer se mogu raspasti tijekom sinteze. Stoga se više važnosti daje silikatnim mezoporoznim materijalima. Porozna silika i porozno staklo zbog svojih širokih raspodjela pora i neuređene strukture pora ubrajaju se u neuređene mezoporozne materijale. Mezoporozni silikati uglavnom posjeduju amorfni anorganski okvir. Građevni blokovi mezoporoznog silicija su složeni i sastoje se od organskih predložaka (surfaktanata) i silikatnih spojeva [1,7,8,9].

Mezoporozni materijali dolaze u različitim oblicima kao što su lanci, sfere, šuplje sfere, vlakna, spirale, domene nalik užetu, i nepravilni oblici, što je prikazano na *slici 4*.



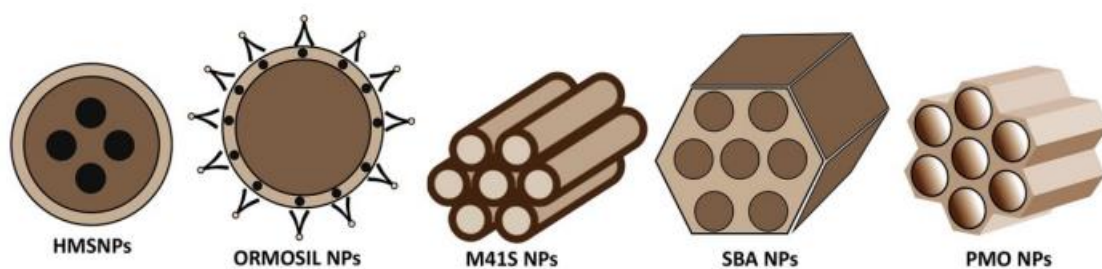
Slika 4. Sintetizirane mezoporozne strukture prikazane pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM): A) lančana (SBA-15) B), gotovo sferična (MCF), C) idealno sferična (SBA-16), D) nepravilna (SBA-16) [8]

2.2.1. Svojstva mezoporoznih materijala

- I) Imaju uređenu poroznu strukturu.
- II) Posjeduju usku raspodjelu veličine pora.
- III) Veličina pora im može varirati od dva do 50 nm (a ovisi o korištenim prekursorima kemijske reakcije i korištenim surfaktantima).
- IV) Imaju veliku specifičnu površinu, što omogućuje sorpcijske procese.
- V) Strukture materijala ovise o surfaktantima primijenjenim prilikom sinteze.
- VI) Posjeduju veliku toplinsku i hidrotermalnu stabilnost.
- VII) Posjeduju fluorescentna, magnetna i električna svojstva [1,8].

2.3. Vrste mezoporozne silike

Mezoporozna silika se, uzimajući u obzir veličinu pora i čestica, površinska svojstva, metode i načine pripreme, dijeli na M41S (eng. *Molecular 41 sieves*), SBA (eng. *Santa Barbara Amorphous*), ORMOSIL (eng. *Organically modified silica*), HMSNPs (eng. *Hollow-type MSNPs*) i PMO (eng. *Periodic mesoporous organosilica*) (slika 5.).

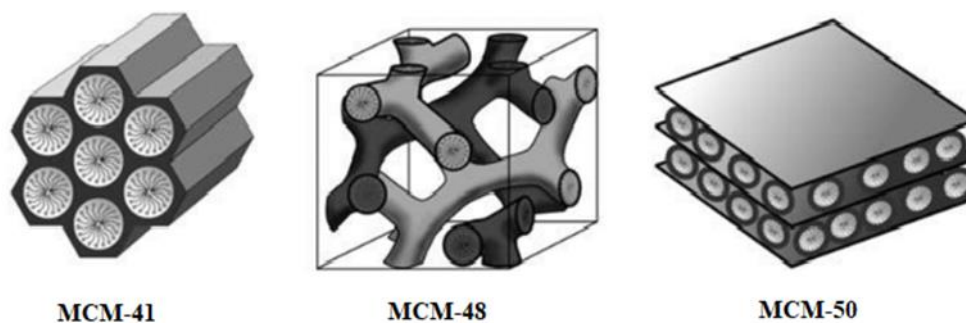


Slika 5. Vrsta mezoporozne silike [10]

2.3.1. M41S

Problem nedostatka stabilnih materijala precizno definiranih pora između mikroporoznog (<2 nm) i makroporoznog (>50 nm) sustava prvi su put riješili istraživači tvrtke *Mobil Oil Company* 1992. godine sintezom M41S materijala. Navedena skupina mezoporozne silike, poznata i kao *Molecular 41 sieves Family* (M41S), odlikuje se porama promjera od dva do deset nanometara, uređenom strukturom i uskom raspodjelom pora. Ono po čemu se ovi materijali posebno ističu je iznimno visoka specifična površina, što ih čini pogodnima za primjenu u različitim znanstvenim i tehničkim područjima, poput katalize, adsorpcije te nosača lijekova [9,10].

M41S skupina se dijeli na tri različite geometrijske strukture: MCM-41, MCM-48 i MCM-50 (slika 6.).



Slika 6. Prikaz struktura različitih tipova M41S materijala [1]

MCM-41, jedan od najčešće korištenih tipova mezoporozne silike, posjeduje veliku specifičnu površinu i usku raspodjelu veličina pora čija se veličina kontrolira u procesu pripreme materijala, visoku toplinsku i hidrotermalnu stabilnost te hidrofobnost i kiselost. Njegova pravilna porozna struktura sadrži cilindrične pore koje su raspoređene u dvodimenzionalnu rešetku. Zahvaljujući tim svojstvima, MCM-41 ističe se kao idealan nosač lijekova [9]. Popova i suradnici koristili su mezoporoznu siliku MCM-41 kao nosač antikancerogenog lijeka bikalutamida (BLT) kako bi smanjili toksičnost lijeka te su dokazali da je nosač od silicijevog dioksida povećao bioraspoloživost lijeka i umanjio toksičnost lijeka na organizam. Kapacitet ugradnje lijekova izravno ovisi o specifičnoj površini materijala-veća specifična površina rezultira većim kapacitetom ugradnje lijekova [11].

U M41S skupinu mezoporozne silike ubraja se i MCM-48, koja se odlikuje trodimenzionalnim poroznim sustavom i kubičnom strukturom. Karakteriziraju je specifična površina veća od specifične površine MCM-41 materijala. Spleteni i razgranati sustav pora povećava toplinsku stabilnost i poboljšava kinetiku prijenosa tvari. Mezoporozna silika ove vrste koristi se kao potpora katalizatoru čineći ga stabilnijim i učinkovitijim. Upotrebljava se i u procesima adsorpcije [9]. Yu i suradnici pripremili su funkcionalizirani materijal MCM-48 na čiju je površinu adsorbiran toluen, tako pripremljen materijal potencijalnu primjenu pronalazi u uklanjanju hlapivih organskih spojeva iz okoliša čime smanjuje njihove negativne utjecaje [12].

MCM-50 materijal vrsta je mezoporozne silike koja se ističe po svojoj slojevitoj poroznoj strukturi. Kompleksna, slojevita struktura rezultat je modifikacije M41S mezoporozne silike. MCM-50 materijal odlikuje se visokom katalitičkom i sorbentskom aktivnošću, zbog čega je vrlo koristan za pripravu drugih mezoporoznih tvari koje se koriste u biomedicinske svrhe, primjerice konstruiranju biosenzora [9].

2.3.2. SBA

SBA materijali, slično MCM-41 materijalima, posjeduju heksagonalnu mezoporoznu strukturu pora raspoređenim u dvodimenzionalnu rešetku. Struktura pora SBA-15 materijala nešto je pravilnija u usporedbi s MCM-41 materijalima. Debljina stjenke, koja se kreće od 3,1 do 6,4 nanometara, pruža veću termokemijsku i mehaničku stabilnost u usporedbi s MCM-41 mezoporoznim materijalima. SBA-15 materijali ističu se iznimnom homogenošću i stabilnošću, što ih čini izvrsnim nosačima katalizatora i lijekova [9]. SBA-15 materijal modificirana nanočesticama grafenskog/željezovog oksida te odgovarajućim punilima pogodan je materijal za uklanjanje organskih i anorganskih onečišćujućih tvari iz industrijskih otpadnih voda čime smanjuje nakupljanje otpada i smanjuje troškove pročišćavanja otpadnih voda [13].

Nadalje, SBA-16 mezoporozni je materijal trodimenzionalne, kubične i slojevite strukture pora. Svaka mezopora povezana je s osam najbližih susjednih mezopora. Pokazalo se da su SBA materijali izgrađeni od velikog broja mikropora i malih mezopora koje se povezuju u veće mezopore. Dvostruka poroznost ovih sustava čini SBA materijale pogodnim za primjenu

u adsorpciji i katalizi [14]. Primjerice, Chaudhuri i suradnici pokazali su da je materijal SBA-16 dobar adsorbens neutralnih, kationskih i anionskih boja iz vodenog medija jer ne utječu na poroznu strukturu SBA-16 materijala [15].

2.3.3. Ostale skupine mezoporozne silike

Uz MCM i SBA mezoporozne materijale, postoje još tri skupine mezoporoznih silika koje se ističu jedinstvenim karakteristikama:

ORMOSIL (eng. *Organically modified silica*) skupina mezoporozne silike odlikuje se inertnošću i optičkom prozirnošću. Biorazgradljivi su, razgrađuju se pucanjem Si-C veze. Svojstvena im je robusnost i stabilnost pri pohranjivanju, što ih čini dugotrajnima.

HMSNPs (eng. *Hollow-type MSNPs*) nanočestice posjeduju šuplju jezgru i mezoporoznu ljusku. Izvrsni su nosači lijekova, ali i korisni u područjima katalize i biološkog slikanja.

PMO (eng. *Periodic mesoporous organosilica*) je novi tip nanočestica mezoporozne silike s jednoliko raspoređenim organsko-anorganskim komponentama kroz cijeli svoj sastav. Formula PMO-a je $O_{15}Si-R-SiO_{15}$ gdje Si-O-Si veze grade porozni okvir, a R je organska skupina koja ima ulogu mosta između dva anorganska okvira. Unutar okvira PMO-a može doći do umrežavanja heteroatomima i metalnim kompleksima. PMO ima različite primjene u katalizi i optici, a fizikalna svojstva mogu se regulirati uvjetima sinteze [9].

2.4. Sinteza mezoporozne silike

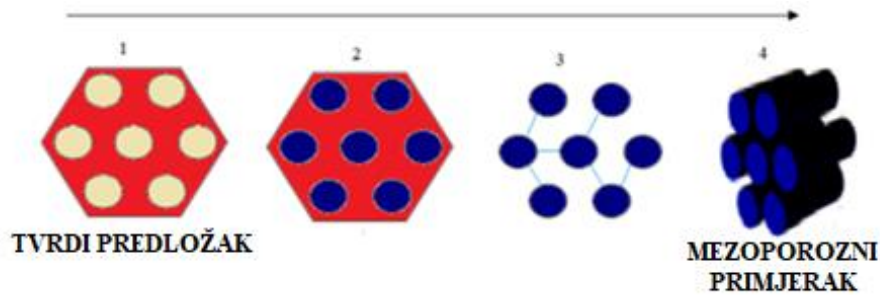
Mezoporozni materijali mogu se sintetizirati sljedećim metodama: sol-gel metoda, metoda predloška, metoda mikrovalnog zračenja, metoda kemijskog nagrizanja.

2.4.1. Sol-gel metoda

Sol-gel metoda ima široku primjenu u proizvodnji silike, stakla i keramičkih materijala, a koristi se i prilikom sinteze homogenih anorganskih metalnih oksida izuzetne tvrdoće, optičke prozirnosti te kemijske i toplinske stabilnosti. Na početku procesa priprema se sol koji predstavlja koloidnu suspenziju krutina dispergiranih u tekućoj fazi. Ona služi za rast anorganske mreže. Zatim dolazi do geliranja sola kako bi se formirala mreža u kontinuiranoj tekućoj fazi, gel fazi. Nadalje, za sintezu sol-gel metodom upotrebljavaju se prekursori koji se sastoje od metalnog ili metaloidnog elementa okruženog različitim reaktivnim ligandima. Početni materijal se obrađuje kako bi se dobio disperzni oksid. U dodiru s vodom ili razrijeđenom kiselinom stvara se sol. Gel se dobije tako da se ukloni tekućina iz soli, a veličina i oblik kontroliraju se prijelazom iz soli u gel. Reakcijama kalcinacije, hidrolize i kondenzacije metalnih alkoksida nastaju odgovarajući oksidi i mješoviti oksidi s različitom stehiometrijom u prisutnosti mineralne kiseline ili baze kao katalizatora. Koristeći se ovom tehnikom sinteze, upotrebljavaju se različiti predlošci kao agensi za usmjeravanje strukture, primjerice kationski surfaktanti, triblok kopolimeri i organske molekule malih masa [1,7].

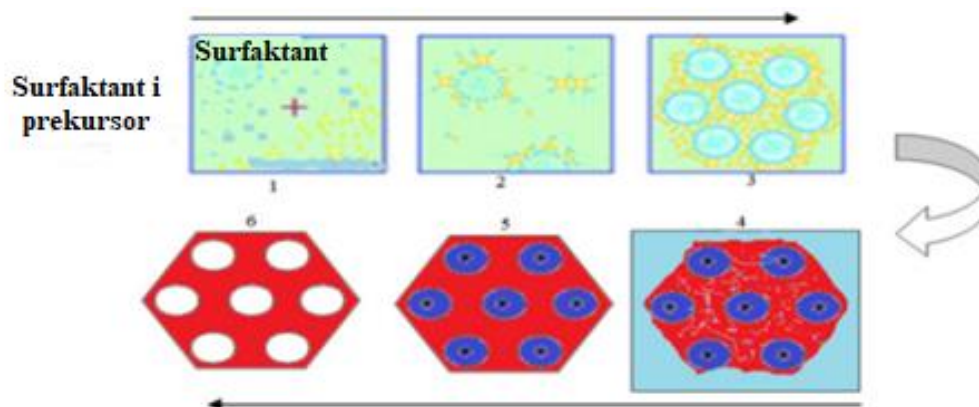
2.4.2. Metoda predloška

Metoda predloška poznata je kao jeftina metoda kojom se sintetiziraju uređeni mezoporozni materijali. Sinteza metodom predloška može se provesti na dva načina: metoda tvrdog predloška (eng. *egzotemplate method*) i metoda mekog predloška (eng. *endotemplate method*). Exotemplate metoda (*slika 7.*) za sintezu koristi kruti i porozni predložak. Ispunjavanjem šupljeg predloška prekursorom dolazi do nastanka mezofaze, a uklanjanjem predloška kalcinacijom ili ekstrakcijom stvara se uređena mezoporozna struktura velike specifične površine. Veličine mezopora prilagođavaju se pomoću različitih surfaktanata koji imaju ulogu predložaka [1].



Slika 7. Metoda tvrdog predloška [1]

Druga metoda, *endotemplate* metoda, primjenjuje se za sintezu mezoporoznih ugljika (*slika 8.*). Mezoporozni predložak puni se organskim prekursorima i karbonizira u vakuumu. Karbonatni okvir mezoporoznog ugljika dobiva se otapanjem silikatne ljuske natrijevim hidroksidom ili fluorovodičnom kiselinom [1,8].



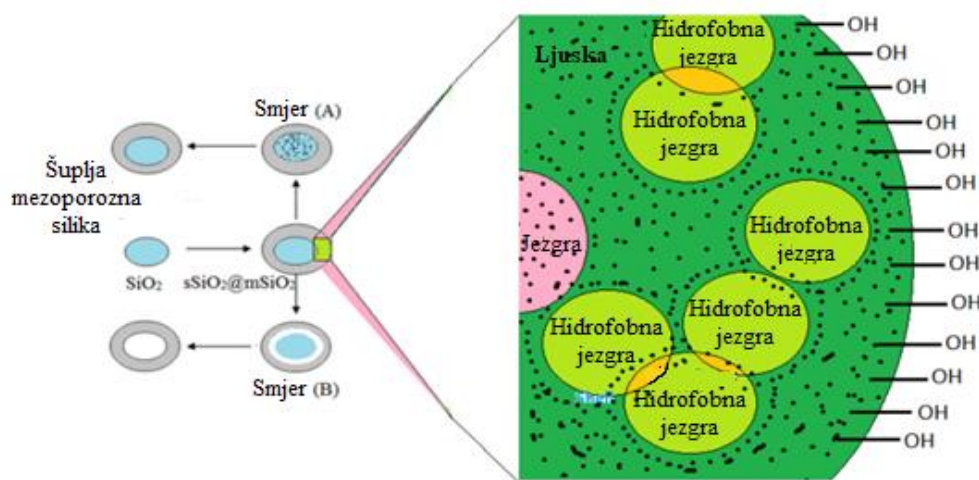
Slika 8. Metoda mekog predloška [1]

2.4.3. Metoda mikrovalnog zračenja

Metoda mikrovalnog zračenja pogodna je za brzu sintezu keramičkih oksida, hidroksiliranih faza, poroznih materijala i metalnih prašaka. Ovim procesom mogu se proizvesti mnoge vrste zeolita (zeolit A, Y, MCM-41). Prednosti ove metode su brže postizanje temperature kristalizacije i kraće vrijeme kristalizacije produkta [1].

2.4.4. Metoda kemijskog nagrivanja

Metoda kemijskog nagrivanja (*slika 9.*) koristi strukturne razlike između jezgre i ljuske jezgre za stvaranje šupljine unutar mezoporožne silike. Anorganski nanokristali (Au, Fe₂O₃, Fe₃O₄) čine jezgru, dok mezoporožna silika izgrađuje ljusku. Upotrebom pogodnog sredstva, selektivno nagrivanje odvija se u unutrašnjosti, a vanjska ljuska ostaje netaknuta što u konačnici rezultira nastankom šuplje strukture [1].



Slika 9. Metoda kemijskog nagrivanja [1]

2.5. Imobilizacija

Imobilizacija enzima na nosaču jednostavna je i jeftina metoda kojom se enzim fizikalno ili kemijski veže na čvrsti i stabilni nosač pri čemu iz topivog prelazi u netopivi oblik. Isto tako, molekule enzima mogu se međusobno umrežavati čime zadržavaju svoju katalitičku aktivnost. Imobilizacija omogućuje višekratnu uporabu katalizatora u kontinuiranim procesima što njihovu primjenu čini efikasnijom i financijski isplativijom. Proces imobilizacije provodi se kako bi se osigurala otpornost enzima na inhibitore te smanjila osjetljivost na promjenu temperature i pH vrijednosti. Upotrebljava se u industrijskim i biotehnološkim procesima, a imobilizirani enzimi nalaze široku primjenu u različitim

područjima, industrijskoj primjeni za proizvodnju biogoriva, prehrambenoj proizvodnji, farmaceutskoj industriji, kemijskoj sintezi i okolišnoj tehnologiji [3,16-19].

Odabir odgovarajućeg nosača ima ključnu ulogu u imobilizaciji enzima. Prirodni materijali poput agaroze, silike, celuloze, kao i sintetski materijali poput polimera i nanomaterijala, često se koriste kao nosači. Nosač treba imati veliku specifičnu površinu, mehaničku čvrstoću i kemijsku stabilnost. Uz odabir nosača, važno je odabrati i odgovarajuću metodu vezanja i procijeniti stabilnost i naboj enzima, te njegovu polarnost i veličinu. Mora se odrediti tolerancija enzima na kemijske i fizikalne uvjete imobilizacije te potrebe transporta supstrata i produkta. Metode koje se koriste za imobilizaciju enzima su kovalentno vezanje enzima na nosač, fizikalna adsorpcija, imobilizacija enzima umrežavanjem i zarobljavanje enzima [19-22].

2.5.1. Kovalentno vezanje enzima na nosač

Kovalentno vezanje enzima na nosač metoda je vezanja enzima na površinu nosača ili na drugi enzim stvaranjem kovalentnih veza prilikom kemijskih reakcija. Mjesta vezanja mogu biti unutrašnjost bioreaktora te stakleni ili polimerni nosači. Kovalentno vezanje poboljšava stabilnost enzima na nosaču i sprječava gubitak aktivnosti. Zbog jakih kovalentnih veza ne može doći do razdvajanja enzima od površine nosača. Prilikom imobilizacije enzima dolazi do vezanja reaktivne grupe na enzimu za kemijski aktivnu podlogu ili molekulu. Materijal nosača modificiran je reaktivnim grupama koje se vežu za specifične funkcionalne skupine prisutne u aminokiselinama koje grade enzime. Funkcionalne skupine enzima koje sudjeluju u procesu imobilizacije su $-NH_2$, $-OH$, $-SH$, $-COOH$. Nedostatak ove metode je mogućnost smanjena aktivnosti enzima uslijed skrtnjavanja strukture koje prilikom vezanja dovodi do promjene konformacije, te nemogućnost ponovne upotrebe nosača nakon imobilizacije [16,18-23].

2.6. Funkcionalizacija

Kako bi se postupak imobilizacije mogao provesti potrebno je funkcionalizirati površinu materijala kovalentnim vezanjem odgovarajućih funkcionalnih skupina.

Za funkcionalizaciju mezoporoznih materijala uobičajene su tri metode: presađivanje ili post-sintetska modifikacija, ko-kondenzacija ili izravna sinteza i metode povezivanja s periodičnim mezoporoznim organskim silikatima. Izravnom sintezom stvaraju se mezoporozni materijali ko-kondenzacijom tetraalkoksisilana s organskim trialkoksisilanima. Ovom metodom lakše se kontroliraju površinska svojstva, ali ponekad može doći do stvaranja nepravilno strukturiranih pora. Drugi način modifikacije mezoporoznih materijala je post-sintetska metoda funkcionalizacije ili presađivanje. Predložak mezoporozne silike, koji ima silanolne grupe, reagira s modifikacijskim sredstvom u nevodenom otapalu. Dobivaju se materijali manje veličine i volumena pora. Materijal dobiven post-sintetskom metodom posjeduje uređeniju strukturu pora, za razliku od materijala koji je sintetiziran ko-kondenzacijom. Poslije funkcionalizacije slijedi aktivacija nosača [8,24].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Kemikalije korištene u ovoj sintezi su:

- (I) PEG-PPG-PEG, PLURONIC P-123
- (II) tetraetoksisilan
- (III) amonijev fluorid
- (IV) trimetilbenzen (C_9H_{12})
- (V) HCl
- (VI) APTMS, (3-aminopropil)trimetoksisilan
- (VII) etanol
- (VIII) sukcinski anhidrid
- (IX) dimetilformamid

3.2. Aparatura

3.2.1. Magnetska miješalica

Magnetska je miješalica instrument korišten za miješanje suspenzija. Koristi se magnetskim poljem za rotaciju magnetskog stalka u posudi za miješanje. Time je osigurana homogenizacija tekućeg uzorka Pluronic 123 sa HCl (*slika 10.*).



Slika 10. Magnetska miješalica

3.2.2. Centrifuga

Centrifuga je uređaj koji za odvajanje komponenata homogene smjese na temelju razlika u gustoći koristi centrifugalnu silu (*slika 11.*). U ovom radu je korišten za razdvajanje nosača i otopine enzima pri brzini okretaja od 14000 rpm, na temperaturi $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 5 minuta.



Slika 11. Centrifuga Hettich Universal 320R

3.2.3. Tresilica

Tresilica je uređaj koji se koristi za miješanje uzoraka i održavanje homogenosti reakcijske smjese. Koristi se vibracijskim ili orbitalnim kretanjem za miješanje uzoraka u posudi ili epruveti. Uvjeti pri kojima je tresilica radila bili su 900 rpm i sobna temperatura, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na *slici 12.* prikazana je termostatirana tresilica Eppendorf ThermoMixer C koja je korištena za održavanje homogenosti prilikom svih reakcija sinteze.



Slika 12. Termostatirana tresilica Eppendorf ThermoMixer C

3.2.4. Analitička vaga

Analitička vaga precizni je laboratorijski instrument koji se koristi za mjerenje mase tvari. Kako bi se što preciznije odredila masa tvari, korištena je analitička vaga osjetljivosti 0,1 mg (*slika 13.*).



Slika 13. Analitička vaga

3.2.5. Peć za žarenje

Peć se upotrebljava za žarenje zamućene smjesa (postavljena u teflonskom reaktoru), pri visokim temperaturama (110 °C) bez miješanja (*slika 14.*, *slika 15.*).



Slika 14. Smjesa postavljena u zdjelice



Slika 15. Peć za žarenje

3.2.6. Spektrofotometar

Spektrofotometar je uređaj koji mjeri apsorpciju ili transmisiju svjetlosti pri različitim valnim duljinama u spektru elektromagnetskog zračenja (*slika 16.*). Princip rada zasniva se na prolasku svjetlosti kroz uzorak, a zatim mjerenje promjene intenziteta svjetlosti pri različitim valnim duljinama. Apsorpcija svjetlosti opisuje se Lambert-Beerovim zakonom (1), a predstavlja apsorpciju svjetlosti pri nekoj valnoj duljini, ϵ je molarni apsorpcijski koeficijent koji je karakterističan za pojedinu tvar [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$], c je koncentracija tvari [mol/L], a b izražava duljinu puta svjetlosti [cm].

$$A = \epsilon * c * b \quad (1)$$



Slika 16. UV/VIS spektrofotometar

3.2.7. BET fiziosorpcija

Metoda BET fiziosorpcije koristi se za mjerenje površine i poroznosti nosača materijala. Temelji se na adsorpciji plina na površinu nosača, a mjeri se količina plina adsorbirana pri različitim tlakovima. Iz dobivenih rezultata računa se raspodjela veličina pora, specifična površina pora, volumen pora, volumen mikropora (<2 nm) te srednji promjera pora (*slika 17.*).



Slika 17. Aparatura za BET fiziosorpciju

3.2.8. Skenirajući elektronski mikroskop (SEM)

SEM je tehnika mikroskopije u kojoj se pomoću snopa elektrona stvara sliku uzorka s nanometarskom razlučivošću. SEM mikroskop je prikazan na *slici 18.* Omogućuje visoku razlučivost, detaljno prikazivanje i proučavanje površine materijala, morfologije i sastava materijala. Snop elektrona usmjerava se prema uzorku, a interakcija između snopa elektrona i uzorka rezultira stvaranjem različitih signala koji se pretvaraju u sliku. Uzorak mora biti vodljiv ili prekriven tankim filmom provodljivog materijala.



Slika 18. Skenirajući elektronski mikroskop

3.2.9. FTIR

FTIR spektroskopija je metoda analize koja se koristi za identifikaciju molekula na temelju njihove interakcije s infracrvenim zračenjem. Infracrveno zračenje apsorbira se i emitira s molekula što daje informacije o kemijskoj strukturi uzorka (*slika 19.*).



Slika 19. Uređaj za FTIR, Perkins Elmer Spectrum One

3.3. Sinteza mezoporozne silike

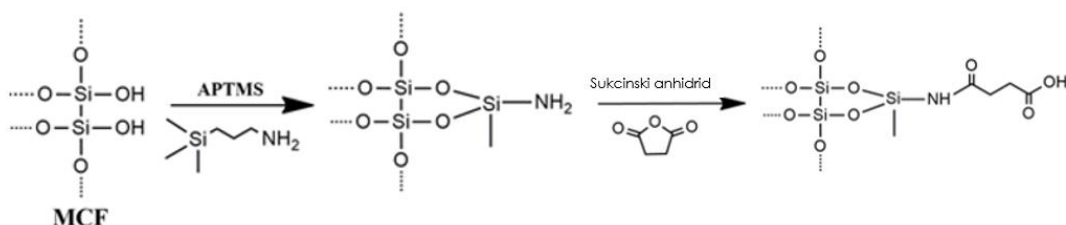
Sinteza mezoporozne silike provodila se sol-gel metodom te je cilj bio dobiti MCF siliku (eng. *Mesostructured cellular foam*) različitih veličina pora.

Otopljeno je 2 g (0,4 mmol) Pluronic 123 u 75 ml HCL, koncentracije 1,6 M, pri sobnoj temperaturi na magnetskoj miješalici. Dodana je odgovarajuća količina trimetilbenzena (TMB) (2/5/10 g) s prilagođenim masenim omjerom Pluronic/TMB kako bi se dobile čestice željenih veličina (10, 20, 30 nm). TMB se u sintezi dodaje kako bi se na lancima supstituirala reaktivnija skupina koja bi na sebe mogla vezati silikat ili neku drugu skupinu. Pluronic 123 simetrični je d-blok kopolimer u obliku guste i ljepljive smjese. Važan je za sintezu mezoporoznih materijala jer otopljen tvori micelle sa više kvadratnih slagalina koje su temelj za izradu strukturiranih mezoporoznih materijala. U smjesu Pluronic 123 i TMB-a dodano je 23 mg (0,6 mmol) NH_4F radi povećanja 'prozora'/ kanala koji povezuju pore, ali bez utjecaja na veličinu pora. Postavljeno je miješanje 45 minuta pri 37 °C, a u tu smjesu dodano je 4,4 g

tetraetoksilana. Tetraetoksilan organski je kemijski spoj uzet za izvor silicija u sintezi koji u reakciji s Pluronic-om 123 ispunjava prostor oko njegovih kvadratnih slagalina i stvara atmosferu. Otopina se nastavila miješati 20 sati na 37 °C. Nakon 20 sati, zamućena smjesa u teflonskom reaktoru ostavljena je da stoji bez miješanja 28/24/96 sati na 110 °C u peći. Nakon toga talog je filtriran, centrifugiran 5 minuta, ispran s etanolom i vodom te sušen u liofilizatoru. Dalje je provedeno žarenje na zraku 10 sati na 500 °C. Žarenjem se razgrađuje Pluronic 123, što rezultira dobivanjem pora. Sintezom je dobiveno 1,2 g silike.

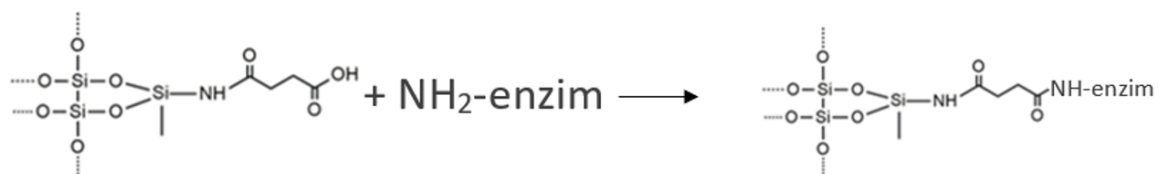
3.4. Funkcionalizacija, aktivacija i imobilizacija enzima

Funkcionalizacija 1,2g čestica mezoporozne silike provodila se uz dodatak 50 ml etanola i 3 ml APTMS-a. Miješanje se provodilo na 30°C, brzinom od 160 rpm tijekom 24 h u inertnoj atmosferi argona (*slika 22.*). Nakon funkcionalizacije provodila se i aktivacija. Aktivacija započinje dodatkom 10 % v/v sukcinog anhidrida u 1 ml dimetilformamida (DMF). Dobivena suspenzija se miješala u periodu od 2 sata na sobnoj temperaturi u inertnoj atmosferi (*slika 20.*). Zatim je slijedilo centrifuganje i ispiranje nosača.



Slika 20. Funkcionalizacija i aktivacija mezoporozne silike

Nakon funkcionalizacije i aktivacije slijedi imobilizacija miješanjem 20 mg nosača i 1000 μ l otopine enzima 2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaze (DERA), koncentracije 0.6 mg/mL, pri temperaturi od 25C te uz fosfatni pufer, pH 6, koncentracije 0.1M (*slika 21.*).



Slika 21. Imobilizacija enzima DERA

Uspješnost imobilizacije se provjerava mjerenjem koncentracije proteina ,pomoću koje se određuje kapacitet nosača te je izračunata preko parametra iskorištenja (2).

$$\text{iskorištenje} = \frac{\text{početna koncentracija} - \text{koncentracija nakon imobilizacije}}{\text{početna koncentracija u otopini}} \quad (2)$$

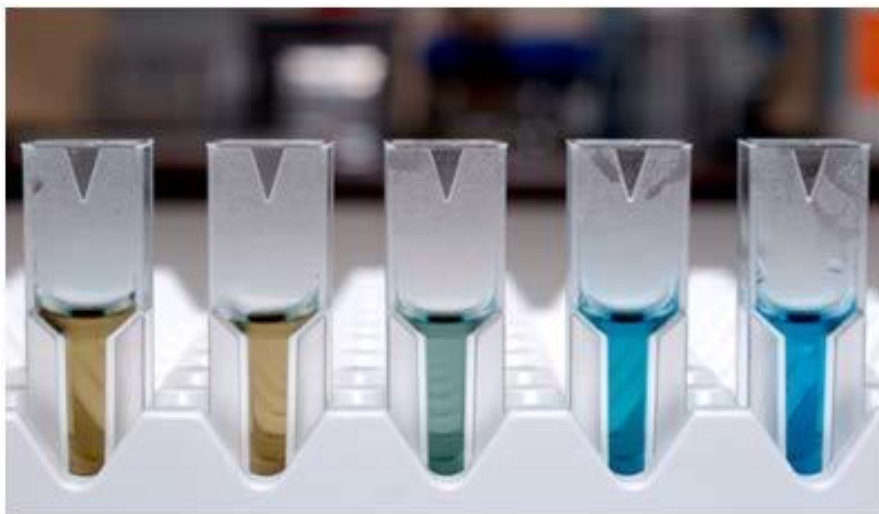


Slika 22. Proces funkcionalizacije

3.5. Analitičke metode

3.5.1. Bradford metoda za određivanje koncentracije proteina

Za kvantifikaciju koncentracije proteina u otopini i procjenu iskorištenja imobilizacije (2) upotrijebljena je Bradfordova metoda prikazana na *slici 23*. Ova metoda temelji se na reakciji proteina u kiselom mediju s bojilom Coomassie Brilliant Blue koje mijenja boju otopine iz smeđe u plavu u prisutnosti proteina. Intenzitet plave boje je proporcionalan je koncentraciji proteina i može se točno izračunati pomoću spektrofotometra. Baždarna krivulja, potrebna za određivanje koncentracije proteina u uzorcima, izrađena je mjerenjem apsorbancije standardnih otopina proteina (npr. Albumin; BSA). Koncentracije standardnih otopina iznosile su 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L i 20 mg/L. Uzorak (500 mikrolitara) je pomiješan s 500 mikrolitara Bradfordova reagensa u tresilici, nakon čega je inkubiran 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Apsorbancija uzorka je zatim izmjerena pomoću spektrofotometra Shimadzu UV- 1601 pri valnim duljinama $\lambda_1 = 595 \text{ nm}$ i $\lambda_2 = 450 \text{ nm}$. Iz dobivenih podataka o ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina, izrađena je baždarna krivulja (*prilog 1*) te je određena jednadžba pravca koja se koristi za izračun koncentracije proteina u uzorcima nepoznate koncentracije. Koncentracija proteina je određena u temeljnoj otopini enzima i otopini nakon imobilizacije enzima na nosač. Bradfordov reagens sastoji se od 100 mg bojila Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml 95 postotnog etanola, 100 ml 85 postotne ortofosforne kiseline i 850 ml ultra čiste vode.



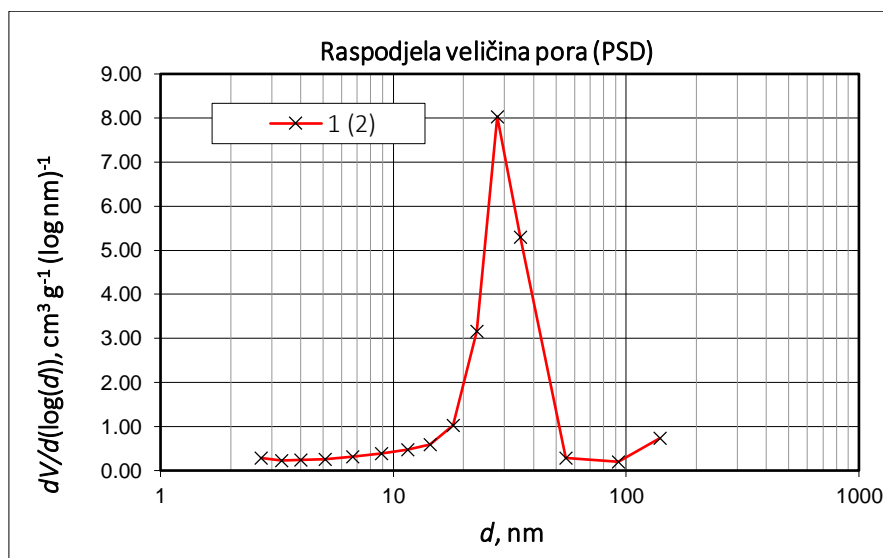
Slika 23. Bradford metoda određivanja koncentracije proteina

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kao što je već navedeno, cilj je bio sintetizirati tri vrste mezoprozne MCF silike (eng. *Mesostructured cellular foam*) s različitim promjerom pora od 10 nm, 20 nm, 30 nm. Različiti promjeri pora pokušali su se ostvariti mijenjanjem omjera prekursora silike (TMB) i predloška (Pluronic 123) te mijenjanjem vremena starenja od 28h, 24h, 96h.

4.1. BET analiza

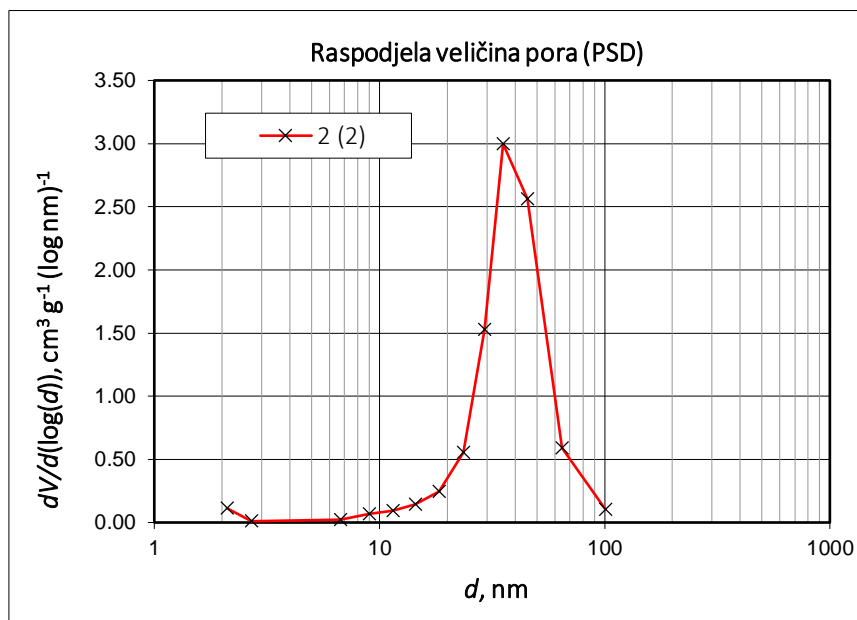
Sintetizirane čestice mezoporozne silike koje su trebale imati promjer pora 10 nm, prema analizi BET fiziosorpcije (*slika 24.*) dobiven je najveći broj čestica s promjerom pora 28 nm, a srednji promjer pora svih čestica iznosio je 17 nm. Za ove čestice volumen mikropora iznosio je 0,00388 cm³/g, volumen pora 2,405 cm³/g. Specifična površina je bila 556,2 m²/g.



Slika 24. Rezultati BET fiziosorpcije za čestice 10 nm

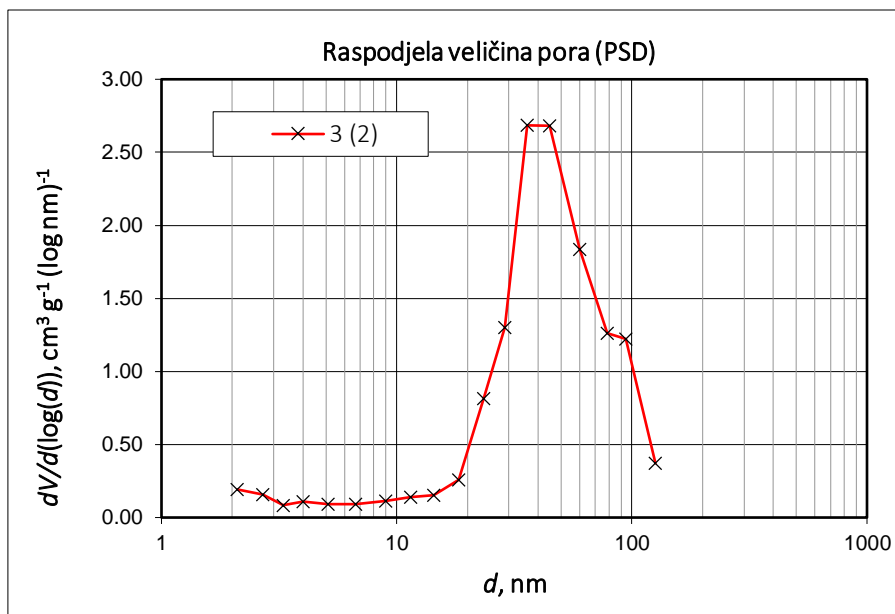
Za sintetizirane čestice mezoporozne silike koje su trebale imati promjer pora 20 nm, prema analizi BET fiziosorpcije (*slika 25.*), dobiven je najveći broj čestica s promjerom pora 35,5

nm, a srednji promjer pora svih čestica iznosio je 20 nm. Za ovu skupinu čestica volumen mikropora iznosio je 0,00856 cm³/g, a volumen pora 1,05986 cm³/g. Dobivena specifična površina je 216,0 m²/g.



Slika 25. Rezultati BET fiziosorpcije za čestice 20 nm

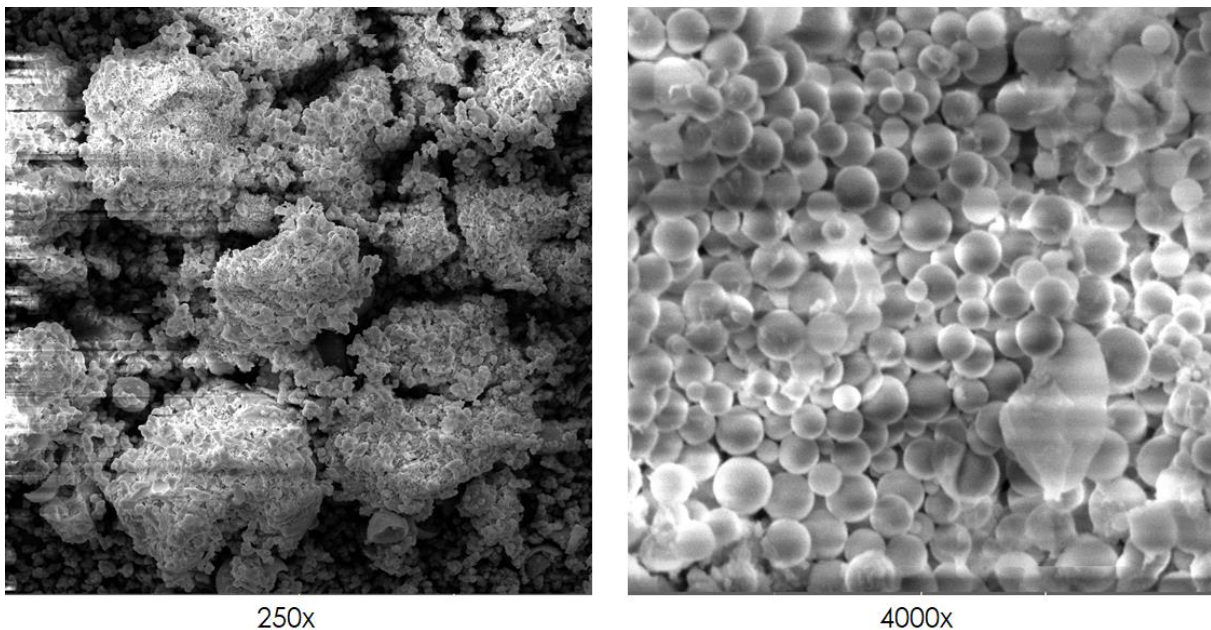
Sintetizirane čestice, koje su trebale imati promjer pora od 30 nm, rezultatima BET fiziosorpcije (*slika 26.*) pokazale su da na grafu postoji plato s najviše dobivenih čestica s promjerom pora od 35,8 i 44,7 nm. Srednji promjer pora svih čestica iznosio je 20,3 nm. Volumen mikropora iznosio je 0,00801cm³/g, dok je volumena pora 1,53736 cm³/g. Specifična površina je 285,7 m²/g.



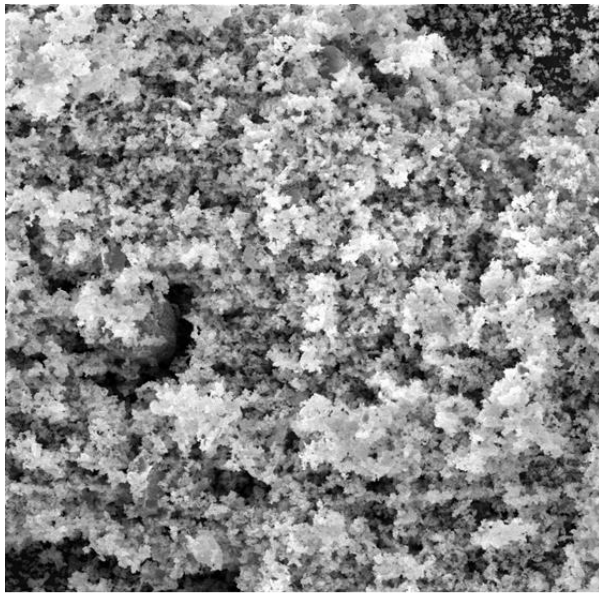
Slika 26. Rezultati BET fiziosorpcije za čestice 30 nm

4.2. SEM karakterizacija

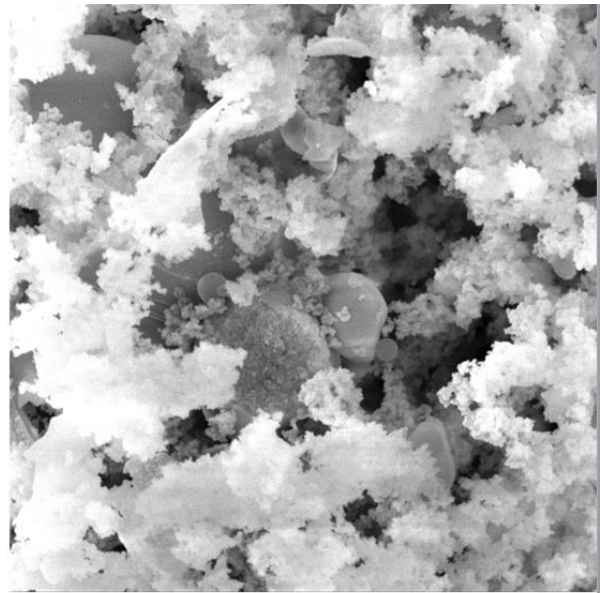
Karakterizacija nosača pomoću SEM mikroskopa dala je jasno vidljivu sliku granulaste strukture čestica mezoporozne silike u prvom slučaju sinteze čestica sa srednjim promjerom pora od 17 nm (*slika 27.*). U drugom slučaju, prilikom SEM karakterizacije čestica mezoporozne silike sa srednjim promjerom pora od 20,0 i 20,3, vidljiva je pjenasta struktura mezoporozne silike (*slika 28., slika 29.*).



Slika 27. SEM slika MCF silike srednjeg promjera pora 17,0 nm pri povećanju od 250 i 4000 puta

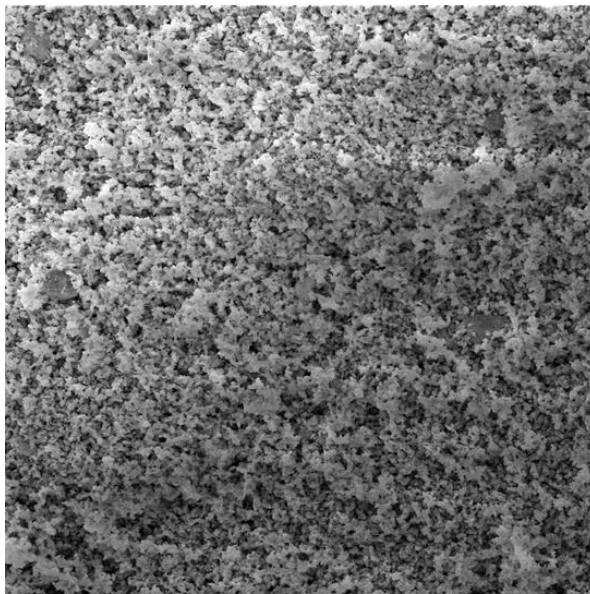


250x

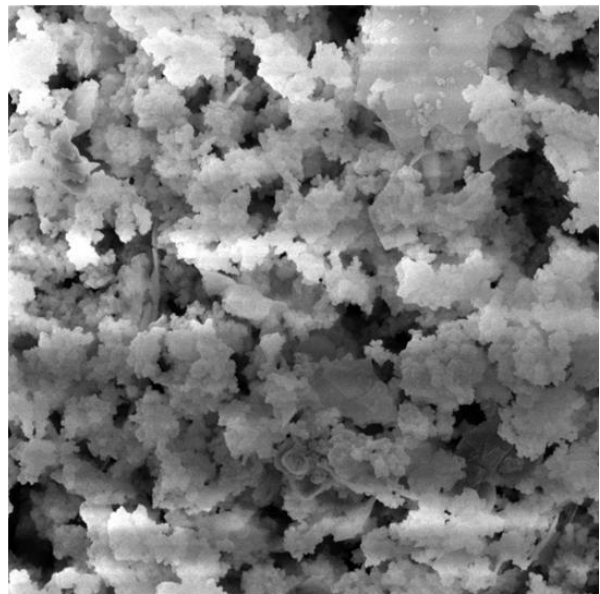


2000x

Slika 28. SEM slika MCF silike srednjeg promjera pora 20,0 nm pri povećanju od 250 i 2000 puta



250x

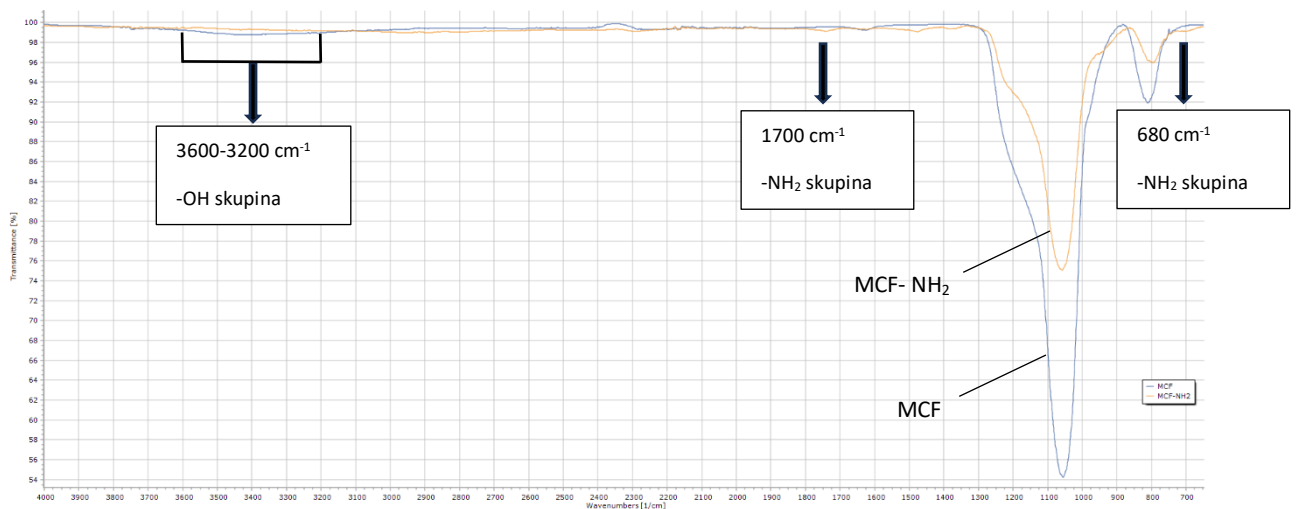


2000x

Slika 29. SEM slika MCF silike srednjeg promjera pora 20,3 nm pri povećanju od 250 i 2000 puta

4.3. FTIR analiza

Pomoću FTIR analize (*slika 30.*) nefunkcionaliziranih (MCF) i funkcionaliziranih čestica (MCF-NH₂) mezoporožne silike možemo dokazati da na krivulji funkcionalizirane čestice postoje pikovi koji se nalaze na valnim brojevima na 1700 i 680 cm⁻¹. Pikovi prikazuju prisutnost -NH₂ skupine koja je uvedena funkcionalizacijom mezoporožne silike APTMS-om. Na valnom broju 3300 cm⁻¹ vidi se da funkcionalizirane čestice nemaju prisutne -OH skupine zbog funkcionalizacije MCF mezoporožne silike pomoću (3-aminopropil)-trimetoksisilana čime je došlo do zamjene -OH skupine, prisutnim na površinama mezoporožnog materijala, sa -NH₂ skupinom.

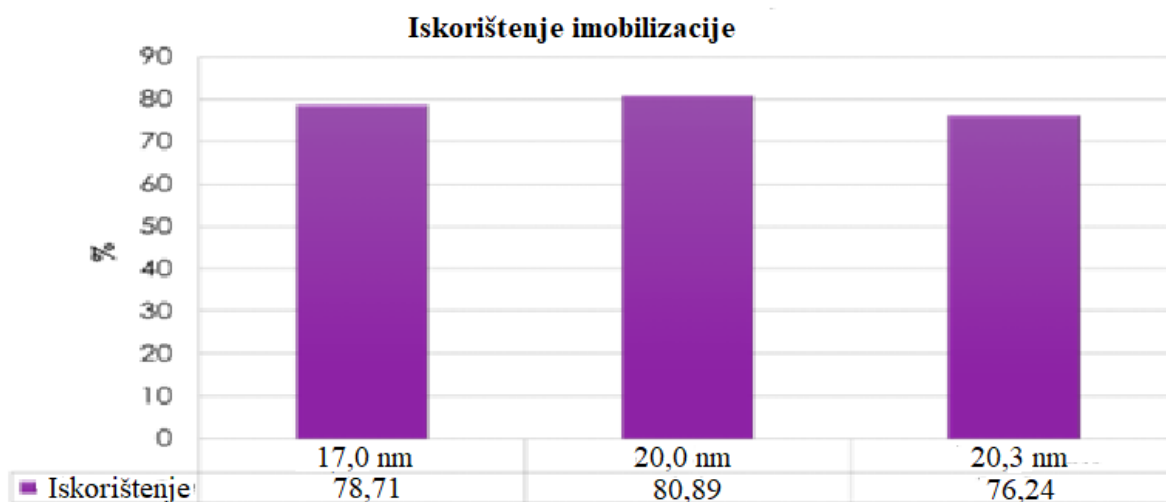


Slika 30. FTIR spektrogram funkcionalizirane i aktivirane te nefunkcionalizirane mezoporožne silike

4.4. Usporedba parametara imobilizacije

Kako bi se utvrdila kakvu funkciju imaju sintetizirane čestice mezoporožne silike kao nosači za imobilizaciju sintetizirane čestice su funkcionalizirane (3-aminopropil)trimetoksisilanom, te potom aktivirane sukcininskim anhidridom. Nakon toga je slijedila imobilizacija enzima DERA. Kako bi se odredila uspješnost procesa izmjerena je koncentracija proteina u otopini enzima prije imobilizacije, te poslije imobilizacije. Naime

smanjenje koncentracije proteina je direktni pokazatelj koliko se enzima vezalo za nosač. Potom je prema jednadžbi (2) izračunato iskorištenje. Rezultati (*slika 31.*) su pokazali da sve tri vrste sintetiziranih čestice imaju slične vrijednosti iskorištenja, s tim da se kao najbolja pokazala mezoprozna silika sa srednjim promjerom pora od 20 nm.



Slika 31. Prikaz iskorištenja imobilizacije enzima za sve tri vrste sintetizirane MCF silike

5. ZAKLJUČAK

U sintezi mezoporozne silike sol-gel metodom cilj je bio sintetizirati čestice mezoporozne MCF silike različitih promjera pora (10 nm, 20 nm i 30 nm) što se postiglo promjenom uvjeta sinteze, tj. mijenjanjem masenog omjera Pluronic 123/TMB. Iz dobivenih mjerenja može se zaključiti da nije došlo do željenih rezultata- sinteze tri različita razreda čestica određenih veličina pora. BET fiziosorpcijom određene su karakteristike tih čestica kao što su promjer pora najvećeg broja čestica, srednji promjer pora, volumen mikropora, volumen pora i specifična površina. Rezultati su pokazali da dva razreda čestica imaju vrlo sličan srednji promjer pora (20,0 nm i 20,3 nm), ali se pokazalo da tri vrste čestica imaju različiti promjer pora najvećeg broja čestica koji je veći od željenog, ali i dalje imaju značajne površine i volumene pora.

Nadalje, SEM karakterizacija je omogućila vizualizaciju strukture čestica. Čestice srednjeg promjera pora od 17 nm pokazuju granulastu strukturu, dok su čestice srednjeg promjera pora od 20,0 nm i 20,3 nm imale pjenastu strukturu.

FTIR analiza je potvrdila prisutnost $-NH_2$ skupine na česticama, ali nije pokazala prisutnost $-OH$ skupine.

Konačno, rezultati iskorištenja imobilizacije enzima na različitim veličinama čestica MCF silike pokazali su da sve tri veličine čestica imaju slične vrijednosti iskorištenja, a najbolje iskorištenje je dobiveno za čestice MCF silike koje imaju srednji promjer pora 20,0 nm.

POPIS KRATICA I SIMBOLA

APTMS	3-aminopropiltrimetoksisilan
Au	zlato
BET	eng. <i>Brunauer-Emmett-Teller</i>
BLT	bikalutamid
BSA	eng. <i>Bovine Serum Albumin</i>
C ₉ H ₁₂	trimetilbenzen
DMF	dimetilformamid
Fe ₂ O ₃	željezov (III)oksid
Fe ₃ O ₄	željezov (II,III) oksid
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama
HCL	klorovodična kiselina
HMS	heksagonalna mezoporozna silika
HMSNPs	eng. <i>Hollow-type MSNPs</i>
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
IUPAC	Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju
M41S	eng. <i>Molecular 41 sieves</i>
MCF	eng. <i>Mesostructured cellular foam</i>
MCM	eng. <i>Mobil Crystalline Materials</i>
MnO	manganov oksid
MSNP	mezoporozna nanočestica silicijevog dioksida
-NH ₂	amino skupina
NH ₄ F	amonijev flourid

-OH	hidroksilna skupina
ORMOSIL	eng. <i>Organically modified silica</i>
PbO ₂	olovov dioksid
PEG-PPG-PEG	poli(etilen glikol)-blok-poli(propilen glikol)-blok-poli(etilen glikol)
PMO	eng. <i>Periodic mesoporous organosilica</i>
RI	eng. <i>refractive indeks detector</i>
rpm	okretaji u minuti
SBA	eng. <i>Santa Barbara Amorphous</i>
SEM	skenirajući elektronski mikroskop
SiO ₂	silicijev (IV)oksid
TEOS	tetraetilortosilikat
TiO ₂	titanijev (IV)oksid
TMB	trimetilbenzen
UV	ultraljubičasto zračenje
UV/VIS	ultraljubičasta i vidljiva svjetlost
<i>A</i>	apsorpcija svjetlosti, /
<i>b</i>	duljina puta svjetlosti, cm
<i>c</i>	koncentracija tvari u otopini, mol/L
<i>ε</i>	molarni apsorpcijski koeficijent, dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹
<i>T</i>	temperatura, K
<i>λ</i>	valna duljina, nm

LITERATURA

- [1] Kumar, S., Malik, M. M., Purhit, R., Synthesis Methods of Mesoporous Silica Materials, *Materials Today: Proceedings*, **4** (2017) 350–357.
- [2] Polarz, S., Smarsly, B., Nanoporous Materials, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **2** (2002) 581–612.
- [3] Z. Findrik Blažević, „Bioreakcijska tehnika I, Interna skripta“ Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, (2012.).
- [4] Lu, G., Zhao, X., Nanoporous Materials: Science and Engineering, *Series on Chemical Engineering*, **4** (2004)1-13.
- [5] Boucher, E.A., Porous material: structure, properties and capillar phenomena, *Journal of Materials Science*, **11** (1976) 1734–1750.
- [6] Ameen S., Akhtar M.S., Godbole R., Hyung-Shik S., An Introduction to Nanoporous Materials, u: Kandelousi, Sheikholeslami, M., Ameen, S., Akhtar, Shaheer, M., Hyung-Shik, S., *Nanofluid Flow in Porous Media*, London, IntechOpen, 2020., str. 1-5
- [7] Jibowu, T., A Review on Nanoporous Metals, *Front Nanosci Nanotech*, **2** (2016) 165-168.
- [8] Moritz, M., Geszke-Moritz, M., Mesoporous materials as multifunctional tools in biosciences: Principles and applications, *Mater. Sci. Eng. C*, **49** (2015) 114-151.
- [9] Lettow, J. S. *et al.* Hexagonal to Mesocellular Foam Phase Transition in Polymer-Templated Mesoporous Silicas. *Langmuir*, **16** (2000) 8291–8295.
- [10] Ghaferi, M., Esfahani, M. K. M., Raza, A., Al Harthi, S., Shahmabadi, H. E., Alavi, S.E., Mesoporous silica nanoparticles: synthesis methods and their therapeutic use-recent advances, *Journal of Drug Targeting*, **2** (2021) 131–154.
- [11] Popova, T., Tzankov, B. *et al.* Mesoporous silica MCM-41 and HMS as advanced drug delivery carriers for bicalutamide, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **62** (2021) 102340.
- [12] Yu, Q., Zhuang, R., Yi, H., Gao, W., Zhang, Y., Tang, Y., Application of MCM-48 with large specific surface area for VOC elimination: synthesis and hydrophobic

functionalization for highly efficient adsorption, *Environmental Science and Pollution Research*, **29** (2022) 33595-33608.

[13] Aboelfetoh, E.,F., Elabedien, M.,E., Z., Ebeid, M., Effective treatment of industrial wastewater applying SBA-15 mesoporous silica modified with graphene oxide and hematite nanoparticles, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **9** (2021) 104817.

[14] Stevens, W. J. J. *et al.* Investigation of the Morphology of the Mesoporous SBA-16 and SBA-15 Materials. *J. Phys. Chem. B*, **110** (2006) 9183–9187.

[15] Chaudhuri, H., Dash, S., Ghorai, S., Pal, S., Sarkar, A., SBA-16: Application for the removal of neutral, cationic, and anionic dyes from aqueous medium, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **4** (2016) 157-166.

[16] Palmer, T., Bonner, P. L., *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry*, vol.2, *Woodhead Publishing Limited*, 2007, str. 1-14.

[17] Illanes, A. , *Enzyme Biocatalysis: Principle and Applications*, Springer , 2008, str. 205-251.

[18] Do Valle Gomes, M., Immobilization of Enzymes in Mesoporous Silica for the Conversion of CO₂ to Methanol, [Immobilization of Enzymes in Mesoporous Silica for the Conversion of CO₂ to Methanol \(chalmers.se\)](#) (pristup 27.8.2023.)

[19] Cao, L., *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*, Wiley, Weinheim, 2005., 169-172.

[20] Minteer, S. D., *Introduction to the Field of Enzyme Immobilization and Stabilization, Enzyme Stabilization and Immobilization, Methods and Protocols*, Humana Press (2011).

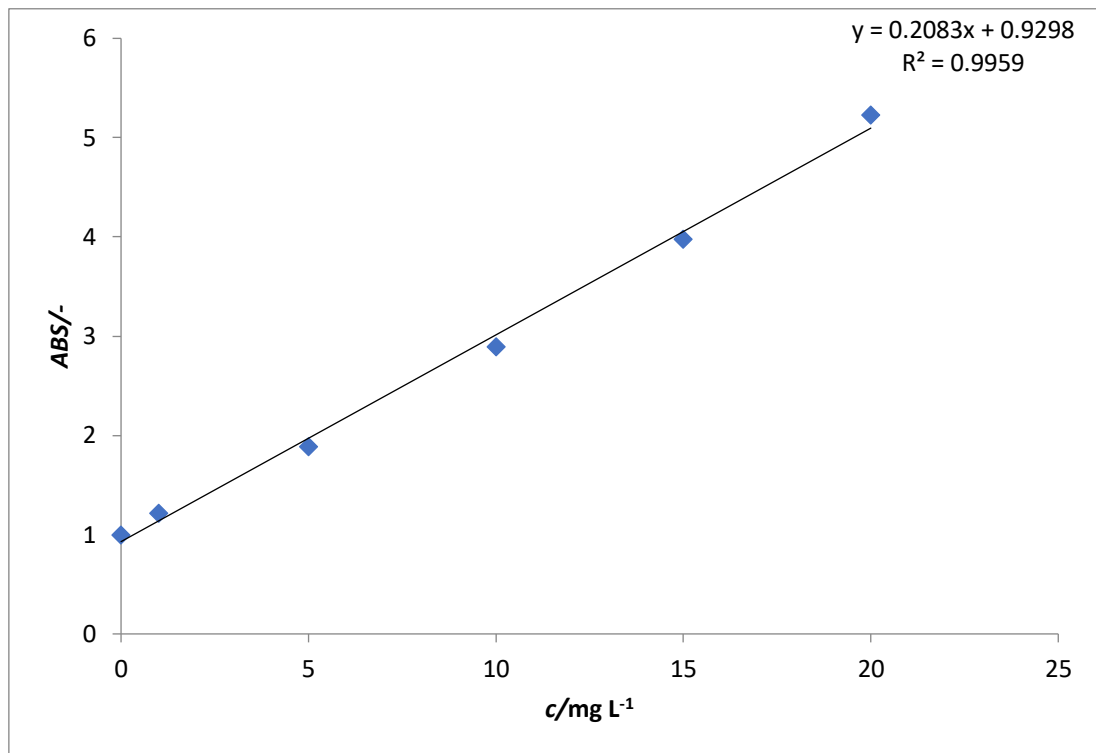
[21] Hassan M.E., Tamer Tamer M., Omer A.M., *Methods of Enzyme Immobilization, International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, **7** (2016) 385–392.

[22] Brena, B., Gonzalez-Pombo, P., Batista-Viera, F., Immobilization of enzymes, *Methods Mol Biol.* **1051** (2013) 15-31.

[23] Gustafsson, H., Carlsson, N., Thorn, C., Olsson, K., Holmberg, K., Akerman, B., Enzymes immobilized in mesoporous silica: A physical- chemical perspective, *Advances in Colloid and Interface Science*, **205** (2013) 339-360.

[24] Barczak, M., Functionalization of mesoporous silica surface with carboxylic groups by Meldrum's acid and its application for sorption of proteins, *Journal of Porous Materials*, **26** (2019) 291-300.

PRILOZI



Prilog 1. Baždarni dijagram za mjerenje koncentracije proteina Bradford-ovom metodom