

# Optimiranje i modeliranje enzimatske sinteze nanočestica željezovih oksida

---

**Burštinski, Martina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*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:149:252134>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-03**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

**Martina Burštinski**

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, studeni 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

**Martina Burštinski**

**OPTIMIRANJE I MODELIRANJE ENZIMATSKE SINTEZE**  
**NANOČESTICA ŽELJEZOVIH OKSIDA**

**DIPLOMSKI RAD**

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki
2. dr. sc. Martina Sudar
3. izv. prof. dr. sc. Hrvoje Kušić

Zagreb, studeni 2018.

*Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki na uloženom trudu i vremenu, strpljenju, stručnom vodstvu i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada. Iznimno sam zahvalna na svom prenesenom znanju i bila mi je čast biti vaša diplomantica.*

*Veliko hvala mag. ing. oecoing. Leli Pintarić na nesebičnoj pomoći, predanosti, savjetima i detaljnim uputama u laboratoriju i prilikom pisanja ovog rada. Također se zahvaljujem svim asistentima i kolegama u laboratoriju na domišljatim idejama i smijehom ispunjenoj atmosferi.*

*Zahvaljujem se svim prijateljima na neprospavanim noćima uoči ispita, pomoći i potpori na svakom koraku i kvalitetno provedenim pauzama, obogatili ste mi život i uljepšali studentske dane. Posebice hvala Miji što si uvijek bila tu za mene, iznimno cijenim svu tvoju pomoć i podršku.*

*Duboko se zahvaljujem svojoj obitelji i roditeljima na razumijevanju, vjeri te na neizmjerne podršci i kontinuiranom poticanju tijekom studiranja, ovo dostignuće ne bi bilo moguće bez vas. Hvala vam.*

## SAŽETAK

U ovom radu provedena je biokatalitička sinteza nanočestica željezovih oksida hidrolizom uree uz enzim ureazu, te uz dodatak željezova (II) klorida. Provedena je optimizacija procesa korištenjem statističke metode Dizajna eksperimenata u svrhu određivanja optimalnih uvjeta sinteze nanočestica najmanje veličine i najveće koncentracije. Ispitivan je utjecaj promjene temperature ( $25^{\circ}\text{C}$  –  $40^{\circ}\text{C}$ ) i koncentracije enzima ureaze ( $0,5$  –  $3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) uz konstantnu koncentraciju uree i željezovog (II) klorida.

Ispitana je kinetika enzima ureaze u reakciji hidrolize uree praćenjem porasta koncentracije amonijevih iona pri različitim koncentracijama uree, uz stalnu koncentraciju enzima ureaze. Kinetika reakcije opisana je jednosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom.

Ispitan je utjecaj željezovih iona na aktivnost enzima mjerenjem specifične aktivnosti ureaze u ovisnosti o različitim koncentracijama željezova (II) klorida te pri konstantnim koncentracijama uree i ureaze. Ustanovljeno je da željezovi ioni inhibiraju enzim nekompetitivnom inhibicijom, te da se inhibicija povećava porastom temperature. Validacija pretpostavljenog matematičkog modela provedena je u kotlastom reaktoru. Sva ispitivanja provedena su u redestiliranoj vodi pri temperaturama  $T = 25^{\circ}\text{C}$ ,  $T = 32,5^{\circ}\text{C}$  i  $T = 40^{\circ}\text{C}$ .

Sintetizirane nanočestice željezovih oksida karakterizirane su analizom na pretražnom elektronskom mikroskopu s energetski disperzivnom rendgenskom spektroskopijom i NTA metodom.

**Ključne riječi:** nanočestice, željezovi oksidi, urea, ureaza, biokatalitička sinteza

## **ABSTRACT**

In this study, biocatalytic synthesis of iron oxide nanoparticles was carried out by urea hydrolysis catalyzed by enzyme urease and with the addition of iron (II) chloride. Optimization of the process using a statistical method of Design of Experiments was performed in order to determine optimal conditions for the synthesis of nanoparticles with the smallest size and the highest concentration. Influence of temperature change (25°C – 40°C) and concentration of urease (0,5 – 3 mg mL<sup>-1</sup>) with constant concentration of urea and iron (II) chloride was examined.

Kinetics of enzyme urease was studied in the reaction of urea hydrolysis by measuring the concentration of ammonium ions at different concentrations of urea with constant concentration of urease. Kinetics of the reaction was described with Michaelis – Menten kinetic model.

Influence of iron ions on enzymatic activity was examined by measuring the specific activity of urease at different concentrations of iron (II) chloride and at constant concentrations of urea and urease. It has been found that iron ions inhibit urease by non-competitive inhibition and that the inhibition is increased with temperature increase. Assumed mathematical model of the process was validated in a batch reactor. All experiments were carried out in redistilled water at temperatures  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T = 32,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Synthesized iron oxide nanoparticles were characterized with a scanning electron microscope with energy dispersive spectroscopy and nanoparticle tracking analysis.

**Keywords:** nanoparticles, iron oxides, urea, urease, biocatalytic synthesis

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	2
2.1. Nanotehnologija, nanočestice i biokataliza .....	2
2.1.1. Željezovi oksidi .....	3
2.2. Biokatalizatori .....	4
2.2.1. Ureaza .....	5
2.2.2. Kinetika enzimski kataliziranih reakcija .....	6
2.3. Metode optimiranja DOE .....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	11
3.1. APARATURA .....	11
3.1.1. Kotlasti reaktor .....	11
3.1.2. Spektrofotometar .....	12
3.1.3. Centrifuga .....	12
3.1.4. Liofilizator .....	13
3.1.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) .....	14
3.1.6. Pretražni elektronski mikroskop (SEM) .....	14
3.1.7. Malvern Nanosight LM10 .....	15
3.2. ANALITIČKE METODE .....	16
3.2.1. Određivanje koncentracije amonijevih iona .....	16
3.2.2. Određivanje koncentracije uree .....	17
3.2.3. Određivanje aktivnosti enzima ureaze .....	17
3.2.4. Utjecaj željezovih iona na aktivnost enzima ureaze .....	18
3.2.5. NTA metoda .....	19
3.3. REKTORSKI EKSPERIMENTI .....	20
3.3.1. Optimiranje sinteze nanočestica željezovih oksida .....	20
3.3.2. Hidroliza uree u kotlastom reaktoru .....	21
3.3.3. Sintaza nanočestica željezovih oksida u kotlastom reaktoru .....	22
4. MODELIRANJE SINTEZE NANOČESTICA ŽELJEZOVIH OKSIDA .....	23

4.1. KINETIČKI MODEL.....	23
4.2. REAKTORSKI MODEL .....	24
5. REZULTATI I RASPRAVA .....	25
5.1. OPTIMIZACIJA PROCESA BOKATALITIČKE SINTEZE NANOČESTICA ŽELJEZOVIH OKSIDA.....	25
5.2. KINETIKA ENZIMA UREAZE.....	28
5.2.1. Kinetika enzima ureaze u redestiliranoj vodi .....	28
5.2.2. Utjecaj željezovih iona na aktivnost enzima ureaze.....	30
5.3. HIDROLIZA UREE U KOTLASTOM REAKTORU.....	32
5.4. SINTEZA NANOČESTICA ŽELJEZOVIH OKSIDA U KOTLASTOM REAKTORU .....	34
5.5. KARAKTERIZACIJA DOBIVENIH NANOČESTICA ŽELJEZOVIH OKSIDA POMOĆU PRETRAŽNOG ELEKTRONSKOG MIKROSKOPA S ENERGETSKI DISPERZIVNOM RENDGENSKOM SPEKTROSKOPIJOM.....	36
6. ZAKLJUČAK .....	39
7. POPIS SIMBOLA I KRATICA .....	40
8. LITERATURA.....	42
9. PRILOZI.....	44
10. ŽIVOTOPIS .....	46



## 1. UVOD

Nanotehnologija predstavlja kolektivnu definiciju koja se odnosi na svaku tehnologiju i znanost koja djeluje na nano skali čime uključuje nova znanstvena načela i svojstva materijala. Nanotehnologija ima velik potencijal u mnogim područjima primjene i istraživanja, te stoga privlači mnogo pozornosti od strane raznih grana poslovnog sektora.<sup>1</sup> Napredak u području nanotehnologije rezultiralo je brojim mogućnostima primjene u svakodnevnom životu, te se nanomaterijali danas sve više primjenjuju u različitim potrošačkim proizvodima i uređajima. Unatoč velikim prednostima, istraživanja su i dalje u tijeku zbog potencijalnih učinaka na okoliš i ljudsko zdravlje.<sup>2</sup> Istovremeno prepoznato je da njena primjena može izazvati nove izazove u sigurnosnim, regulatornim i etičkim područjima.<sup>1</sup>

Nanočestice se trenutno naširoko upotrebljavaju u optoelektroničkim uređajima, biokemijskim senzorima, pročišćavanju vode te katalizatorima. Također se očekuje da će nanomaterijali imati sve veću ulogu u kemoterapijama, liječenju te u prehrambenoj industriji.<sup>3</sup> U proteklih nekoliko godina sve veću pozornost poprimaju metalne nanočestice zbog njihove mogućnosti primjene u mikroelektronici, katalizi i optici jer za razliku od većih čestica imaju jedinstvena svojstva zahvaljujući svojoj osebujnoj strukturi i izuzetno velikoj površini s visokim postotkom atoma na površini.<sup>4</sup>

Ovo povećanje potražnje zahtjeva zelene metode sinteze nanočestica. U globalnim nastojanjima da se smanji generiranje opasnog otpada, zelena kemija i kemijski procesi progresivno se integriraju modernim razvojem u znanost i industriju.<sup>5</sup> Korištenje netoksičnih kemikalija, ekološki prihvatljivih otapala i obnovljivih materijala neka su od ključnih smjernica za provođenje ekološki prihvatljivih kemijskih procesa. U pripremi nanočestica iz perspektive zelene kemije pažnju treba obratiti na izbor otapala koji se koristi za sintezu, ekološki prihvatljivi reducirajući agens, netoksični materijali za stabilizaciju nanočestica te blagi reakcijski uvjeti sinteze.<sup>6</sup>

U ovom radu provedena je biokatalitička sinteza nanočestica reakcijom hidrolize uree uz enzim ureazu. Dodatkom željezovog (II) klorida dolazi do njegove reakcije s hidroksidnim ionima koji su nastali kao produkt hidrolize uree uz enzim ureazu, pri čemu dolazi do nastajanja nanočestica raznih željezovih oksida u otopini.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Nanotehnologija, nanočestice i biokataliza

Nanotehnologija je hibridna znanost koja kombinira inženjerstvo s kemijom odnosno može se definirati kao sastavnica znanosti i tehnologije koja karakterizira strukturu materijala između 1 nm i 100 nm. Nanotehnologija omogućuje razvijanje materijala s poboljšanim ili potpuno novim svojstvima. Nanomaterijali imaju velike prednosti, imaju veću specifičnu površinu i time postižu veću kemijsku reaktivnost (neki materijali koji se obično koriste na većoj skali postanu reaktivni na nano skali). Osim toga kvantna mehanika ima dominantu ulogu u svojstvima materijala na nano skali tako što utječe na optička i magnetska svojstva materijala. Nanomaterijali se mogu proizvoditi u jednoj dimenziji (površinski premazi), u dvije dimenzije (nanovodi i nanocijevi) i u tri dimenzije (nanočestice).<sup>7</sup>

Razna fizikalno-kemijska svojstva nanočestica kao što su veća specifična površina, mehanička čvrstoća, optička aktivnost, magnetska svojstva i kemijska reaktivnost čine ih jedinstvenim i prikladnim za različite primjene. Stoga se primjenjuju u proizvodnji lijekova i materijala, uklanjanju onečišćenja u otpadnim vodama, elektroničkoj i mehaničkoj industriji, za generiranje energije fotoelektrokemijskim i elektrokemijskim cijepanjem molekule vode te u mnogim drugim područjima.<sup>8</sup>

Razne fizikalne i kemijske metode opsežno se koriste za proizvodnju nanočestica. Međutim ovakvi putevi sinteze zahtijevaju upotrebu vrlo reaktivnih i otrovnih redukcijskih sredstava kao što su natrijev borohidrid i hidrazin hidrat koji uzrokuju štetne utjecaje na okoliš. Stoga znanstvenici pronalaze nove jednostavne, učinkovite i pouzdane procese proizvodnje nanomaterijala. Razni organizmi djeluju kao čisti, ekološki prihvatljivi i održivi prekursori za proizvodnju stabilnih i funkcionalnih nanočestica. To može uključivati enzime, ekstrakte biljaka, bakterije, gljivice, kvasce, viruse itd. Stoga je istraživanje pouzdanijih i održivih procesa sinteze nanočestica od vitalnog značaja.<sup>9</sup> Prednost dobivanja nanočestica pomoću enzima jeftiniji je postupak jer se ne koriste skupe kemikalije, potrebna je manja količina energije, postupak se provodi pri blagim uvjetima temperature i postupak je prihvatljiv za okoliš. Osim toga nanočestice dobivene enzimski provođenim reakcijama ponekad imaju drugačija fizikalna i kemijska svojstva od onih dobivenih drugim metodama.<sup>10</sup>

### 2.1.1. Željezovi oksidi

Željezovi oksidi imaju široku primjenu zbog njihove niske cijene te imaju važnu ulogu u mnogim biološkim i geološkim procesima. Također se primjenjuju u legurama s aluminijem, katalizatorima, premazima i bojama.<sup>11</sup> Željezovi oksidi postoje u mnogim oblicima u prirodi, no najčešći su magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) i hematit ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Hematit je najstariji poznati oblik željezovih oksida i široko je rasprostranjen u stijenama i tlima. Hematit je crvene boje ako je fino usitnjen i crni ili sivi ako je grubo kristalan. Izuzetno je stabilan pri sobnim uvjetima i često je krajnji proizvod transformacija ostalih željezovih oksida. Magnetit je sivo-crne boje i pokazuje najjača magnetna svojstva od bilo kojeg prijelaznog metalnog oksida. Maghemit se javlja u tlima i nastaje iz magnetita s vremenom ili kao produkt zagrijavanja ostalih željezovih oksida. Metastabilan je s obzirom na hematit i formira čvrste otopine s magnetitom.<sup>12</sup>

Nanočestice željezovih oksida kao što je magnetit i njegov oksidirani oblik maghemit najčešće se koriste za biomedicinske primjene. Superparamagnetske nanočestice željezovih oksida s odgovarajućom površinom mogu se koristiti za brojne *in vivo* primjene kao što su poboljšanje MR kontrasta, popravak tkiva i imunotest, detoksikacija tekućina pri hipertermiji, odvajanje stanica i u kemoterapiji. Za sve ove primjene nanočestice moraju imati visoku vrijednost magnetizacije, veličinu manju od 100 nm i usku raspodjelu veličine čestica.<sup>8</sup> Nanočestice željezovih oksida imaju primjenu i u obradi otpadnih voda zbog svoje niske cijene, jake sposobnosti adsorpcije, jednostavne separacije i dobre stabilnosti. Njihova sposobnost uklanjanja onečišćenja dokazana je na laboratorijskoj i industrijskoj skali. Trenutne primjene u obradi voda mogu se podijeliti u dvije skupine: tehnologije koje koriste navedene nanočestice kao vrstu sorbensa ili nosača za povećanje učinkovitosti uklanjanja (adsorpcijske tehnologije imobilizacije) ili one koje ih koriste kao fotokatalizatore kako bi se onečišćujućim tvarima smanjila veličina ili ih prevela u manje toksičan oblik (fotokatalitičke tehnologije).<sup>13</sup>

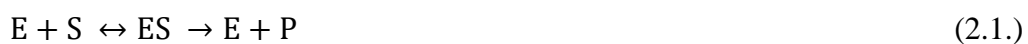
U posljednjih par godina puno istraživanja bilo je usmjereno na sintezu nanočestica željezovih oksida i opisana su mnoga izvješća o učinkovitim putevima sinteze za dobivanje stabilnih, biokompatibilnih i monodisperznih nanočestica. Najčešće metode su su taloženje, termičko razlaganje, hidrotermalna sinteza i sonokemijska sinteza. Osim navedenih nanočestice također mogu biti pripremljene drugim metodama kao što su elektrokemijska sinteza, laserska piroliza i biokatalitička sinteza.<sup>14</sup>

## 2.2. Biokatalizatori

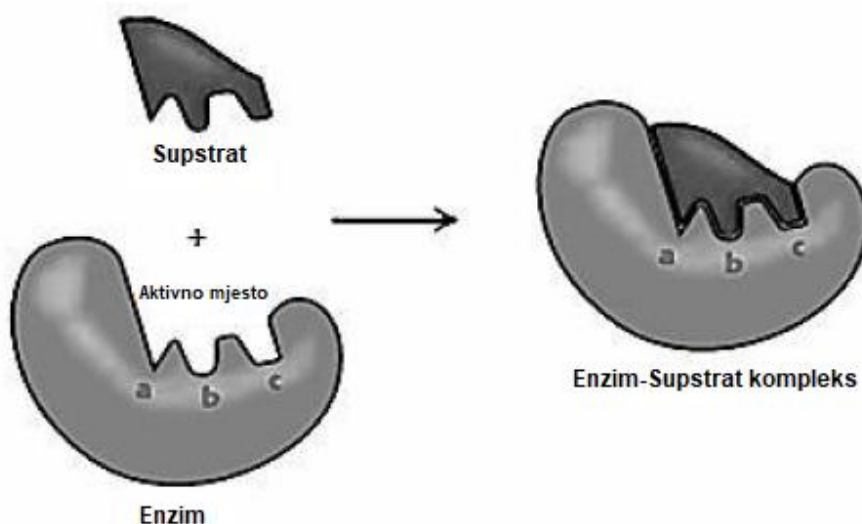
Biokatalizatori ili enzimi su proteini visoke molekulske mase sastavljeni prvenstveno od lanaca aminokiselina povezanih peptidnim vezama.<sup>15</sup> Dobivaju se iz bakterija, kvasaca, gljiva, biljaka i plijesni. Zadnjih godina su pridobili pozornost zbog njihove regio, stereo i enantioselektivnosti. Zbog ovih svojstava enzimi se koriste u širokom rasponu organske sinteze, osobito u asimetričnoj sintezi i kinetičkoj rezoluciji kako bi se dobili čisti enantiomeri. Sve skupine enzima su proizvedene iz obnovljivih sirovina, biorazgradivi su i pokazuju različita svojstva uključujući stabilnost, aktivnost i specifičnost. Biokatalizatori su posebno primjenjivi u zelenoj kemiji zbog blagih reakcijskih uvjeta enzimskih procesa, koje se mogu provoditi korištenjem relativno jednostavne opreme te se mogu lako kontrolirati. Biokatalizatori mogu katalizirati promjenu točno određenog dijela molekule, proizvesti čisti produkt i ponoviti reakciju mnogo puta u uvjetima atmosferskog tlaka, neutralne pH vrijednosti u vodenim sustavima i temperaturama ispod 37°C. Glavni nedostatak enzimskih procesa su njihova niska stabilnost i/ili aktivnost u određenim radnim uvjetima, no mogu se pojaviti i drugi razni nedostaci koji mogu umanjiti efikasnost enzima poput inhibicije zbog prisutnosti određenih supstrata ili produkata reakcije, što smanjuje i ekonomsku upotrebu odgovarajućeg enzima.<sup>16</sup>

Enzimi funkcioniraju kao katalizatori tako što ubrzavaju kemijske reakcije snižavanjem energije aktivacije. Tijekom reakcija enzimi ne mijenjaju trajno svoju strukturu. Enzimi reguliraju strukturu i funkciju stanica i organizama, kataliziraju sintezu i razgradnju biokemijskih građevnih blokova i makromolekula, prijenos genetičkih informacija, transport spojeva preko membrana i pretvorbu kemijske energije. Enzimska kataliza je neophodna za provedbu biokemijskih reakcija u fiziološkim uvjetima odgovarajućom brzinom. Jedna od važnijih značajki enzima je njihova specifičnost stoga je svaka reakcija u stanici katalizirana vlastitim enzimom. Tvari na koje djeluju enzimi su supstrati. Supstrat može biti manja molekula ili makromolekula poput samog enzima.<sup>17</sup>

Postoji barem dvadesetak različitih teorija o tome kako enzimi mogu katalizirati kemijske reakcije. Svim tim teorijama zajedničko je da enzimski procesi započinju nastajanjem enzim-supstrat kompleksa.<sup>16</sup> Takav kompleks ima vrlo kratak životni ciklus, nakon njegovog raspada iz reakcije izlaze produkt i nepromijenjeni enzim. Navedena reakcija se može prikazati u dva koraka(jedn. 2.1.):<sup>17</sup>



Jedan od poznatih primjera enzimske katalize je princip ključ-brava (slika 2.1.). Aktivno mjesto je hidrofilna šupljina koja sadrži niz lanaca aminokiselina koje se vežu na supstrat i provode enzimsku reakciju. Postoje četiri vrste veza koje se mogu javiti između supstrata i enzima: elektrostatske, van der Waalsove, kovalentne i vodikove veze. Nakon vezanja supstrata enzim otpušta gotov produkt u otopinu i slobodan je za katalizu sljedeće reakcije.<sup>18</sup>



Slika 2.1. „Ključ-brava“ model vezanja enzima i supstrata<sup>16</sup>

Mnogi enzimi zahtijevaju prisutnost drugih spojeva, kofaktora, prije njihovog katalitičkog djelovanja. Kofaktor može biti: koenzim, prostetska skupina ili metalni ion (npr.  $K^+$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mo^{3+}$ ).<sup>15</sup>

### 2.2.1. Ureaza

James B. Sumner je 1926. godine prvi izolirao enzim ureazu kao kristalni protein dokazujući time proteinsku prirodu enzima.<sup>19</sup> Ureaza pripada skupini amidohidrolaza i fosfotriesteraza. Primarna karakteristika enzima je prisutnost metalnog centra, odnosno Ni(II) iona u aktivnom mjestu čiji je zadatak aktivirati vodu i supstrat za reakciju.<sup>20</sup> Ureaza je jedina hidrolaza za koju je poznato da sadrži nikal po aktivnom mjestu. Ioni nikla čvrsto su vezani na proteine što je opaženo retencijom metalnog iona tijekom izolacije enzima u puferskim otopinama koje sadrže 1 mM EDTA. Međutim nikal se može osloboditi iz ureaze u kiselim uvjetima, što dovodi do nepovratnog gubitka aktivnosti enzima.<sup>19</sup>

Reakcija hidrolize uree uz ureazu je otprilike  $10^{14}$  puta brža od reakcije bez ureaze.<sup>20</sup> Hidrolizom uree nastaje amonijak i karbamat koji se potom spontano raspada na ugljičnu kiselinu i drugu molekulu amonijaka (jednadžba 2.2. i 2.3.).<sup>21</sup>



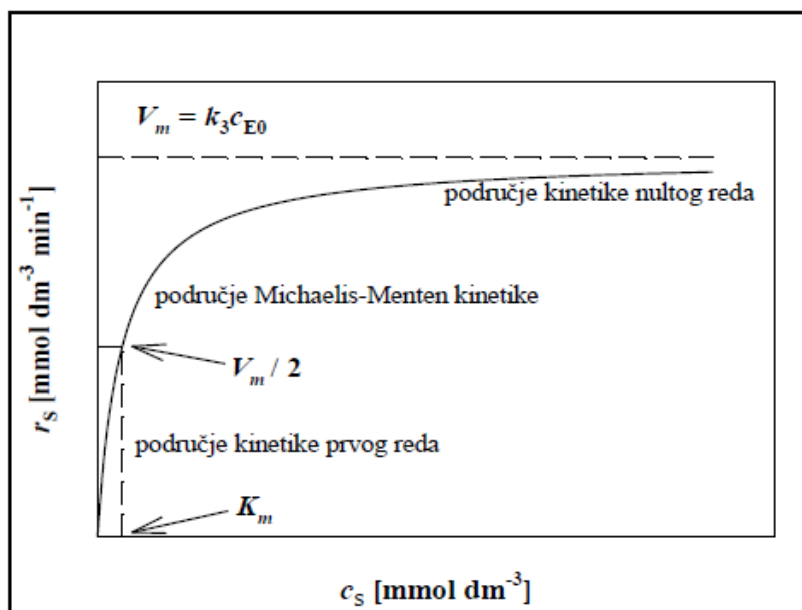
Ureaza je široko rasprostranjen enzim, te se može pronaći kod bakterija, alga, gljiva i viših biljaka.<sup>22</sup> U tlu ureaza je vezana za organske i anorganske komponente tla (glina i humusne tvari).<sup>23</sup> Primarna uloga ureaze je dopustiti organizmu da koristi ureu kao izvor dušika. U biljkama ureaza sudjeluje u sustavnim putevima za transport dušika, dok kod ljudi i životinja može uzrokovati infekcije urinarnog i gastrointestinalnog trakta i bubrežne kamence.<sup>19</sup>

Imobilizirana ureaza ima primjenu u određivanju iona teških metala u pitkim, površinskim, podzemnim i otpadnim vodama, u medicini u uklanjanju uree iz organizama pacijenata sa zatajenjem bubrega, za uklanjanje uree kao dušičnog gnojiva iz otpadnih voda u kombinaciji sa smanjenjem pH vrijednosti te u raznim drugim područjima.<sup>19</sup>

### 2.2.2. Kinetika enzimski kataliziranih reakcija

Kinetika enzimski kataliziranih reakcija može se opisati odgovarajućim matematičkim modelima koji ovise o karakteristikama promatrane reakcije kao što su broj prisutnih supstrata, prisutnost inhibicije sa supstratom i/ili produktom i deaktivacija enzima.<sup>24</sup> Brzina reakcije katalizirane enzimom je općenito izravno proporcionalan ukupnoj koncentraciji enzima. Ovisnost brzine o koncentraciji supstrata je znatno složenija.

U slučaju jednosupstratnih enzimskih reakcija koje se mogu opisati Michaelis-Menteničinim modelom javlja se hiperbolična ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata. Pri niskoj koncentraciji supstrata reakcija je prvog reda, no povećanjem koncentracije red reakcije se smanjuje do područja kinetike nultog reda pri čemu brzina reakcije poprima maksimalnu vrijednost  $V_{max}$  [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$ ] (slika 2.2.).



Slika 2.2. Ovisnost brzine reakcije o početnoj koncentraciji supstrata kod Michaelis-Menteničine kinetike

Navedeni model može se opisati izrazom (jedn. 2.4.):



Jednadžba 2.4. prikazuje kako se enzim E spaja sa supstratom S pri čemu nastaje kompleks enzim-supstrat ES ( $k_1$ ) koji se zatim može disocirati na enzim E i supstrat S ( $k_2$ ) ili mogu nastati produkt P i enzim E ( $k_3$ ).

Parametar  $V_{max}$  ovisi o koncentraciji enzima  $E_0$  i konstanti brzine reakcije nastajanja produkta  $k_3$  prema jednadžbi 2.5., a Michaelis-Menteničina konstanta  $K_m^S$  [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ] predstavlja koncentraciju supstrata potrebnu da se ostvari polovina vrijednosti maksimalne brzine reakcije tj.  $V_{max}/2$  i govori o afinitetu enzima prema supstratu prema izrazu 2.6.

$$V_m = k_3 \cdot E_0 \quad (2.5.)$$

$$K_m^S = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (2.6.)$$

Također je važno pretpostaviti da je koncentracija supstrata u odnosu na koncentraciju enzima u početku reakcije znatno veća, te da ne dolazi do bitne promjene u njoj vrijednosti tijekom određivanja početne brzine reakcije ( $c_s \approx c_{s0}$ ).

Prema tome u slučaju jednosupstratne enzimске reakcije početna brzina reakcije odnosno početna brzina potrošnje supstrata se može opisati izrazom 2.7. pri čemu je  $r_S$  brzina potrošnje supstrata [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$ ] a  $c_S$  koncentracija supstrata [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ].

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m^S + c_S} \quad (2.7.)$$

U slučaju niske koncentracije supstrata kada je  $c_S \ll K_m$  ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata je linearna i vrijedi (jedm. 2.8.):

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m^S} \quad (2.8.)$$

Pri visokoj koncentraciji supstrata kada je  $c_S \gg K_m$  brzina reakcije je maksimalna i ne ovisi o koncentraciji supstrata, tada vrijedi (jedm.2.9.)<sup>25</sup>:

$$r_S = V_m \quad (2.9.)$$

Kada se radi o dvosupstratnoj enzimskoj kinetici Michaelis-Menteničin model se prikazuje jednadžbom 2.10. pri čemu  $c_{S2}$  [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ] predstavlja koncentraciju drugog supstrata. Drugi supstrat je najčešće koenzim.

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_{S1} \cdot c_{S2}}{(K_{m1} + c_{S1}) \cdot (K_{m2} + c_{S2})} \quad (2.10.)$$

### 2.3. Metode optimiranja DOE

Eksperimenti se danas provode u mnogim proizvodnim organizacijama kako bi se poboljšalo razumijevanje različitih proizvodnih procesa. Eksperimenti se često provode u nizu pokusa ili testova koji daju kvantificirane ishode. Za kontinuirano poboljšanje kvalitete proizvoda i procesa potrebno je razumjeti ponašanje procesa, varijable koje na njih utječu te načine na koji one utječu. U proizvodnim procesima često je od primarnog interesa istražiti odnose između ključnih varijabli unosa ili čimbenika procesa i karakteristika izvršenja ili svojstva kvalitete. U uslužnim procesima teže je razumjeti što treba izmjeriti, osim toga varijabilnost procesa u kontekstu usluga može se pripisati ljudskim čimbenicima što je teško kontrolirati. Nadalje isporuka kvalitete usluge jako ovisi o situacijskim utjecajima osobe koja pruža uslugu.

Statističko razmišljanje i statističke metode igraju važnu ulogu u planiranju, provođenju, analizi i tumačenju eksperimentalnih podataka. Statističko razmišljanje govori o tome kako se



nositi s varijabilnošću te kako prikupljati i koristiti podatke kako bi se mogle donositi učinkovite odluke o procesima ili sustavima. Kada nekoliko varijabli utječe na određena svojstva proizvoda, najbolje je izraditi ekonomičan i učinkovit eksperiment kako bi se dobili valjani i pouzdani zaključci. U dizajniranim eksperimentima namjerno se mijenjaju ulazne varijable kako bi se odredilo ponašanje rezultata, s time da na izvedbu ne utječu sve varijable na isti način. Stoga je cilj pažljivo planiranog eksperimenta razumjeti koji skup varijabli u procesu najviše utječe na izvedbu, a zatim odrediti najbolju kombinaciju kako bi se postigao zadovoljavajući funkcionalni učinak na proizvod ili proces. Također tako se na manje važnim varijablama može financijski uštediti i poboljšati ekonomski status tvrtke.

Metoda dizajna eksperimenta je funkcionalni statistički alat koji pomaže u planiranju, dizajniranju i analizi eksperimenata na temelju kojih se mogu dobiti vrijedni zaključci, a kojom se smanjuje broj ispitivanja, vrijeme provođenja eksperimenata a time i troškovi potrebni za njihovo provođenje. Koristi se u istraživanju novih procesa, za stjecanje novih saznanja te za optimizaciju postojećih za dodatno poboljšavanje proizvoda i procesa. Cilj ove metode je razumjeti kako različite varijable utječu na proizvod ili proces i time modelirati što manji broj eksperimenata, nakon toga traži se model kojim se kvantitativno opisuje željeni utjecaj te konačno mogu se definirati i optimalne vrijednosti odnosno vrijednosti koje daju najbolje karakteristike željenog procesa ili proizvoda.

Dizajn eksperimenata (DOE) razvijen je početkom 1920. godine od strane sir Ronalda Fishera u Rothamstedovom poljoprivrednom istraživačkom centru u Londonu, Engleskoj. Njegovi početni eksperimenti bili su vezani za određivanje učinka različitih vrsta gnojiva na različitim parcelama zemljišta. Od tada, DOE je široko prihvaćen i primijenjen alat u biološkom i poljoprivrednom području. Brojne uspješne primjene DOE su zabilježene od mnogih Američkih i Europskih tvrtki u zadnjih 15 godina.

Metoda dizajna eksperimenta analizira tri aspekta procesa: faktore (ulazne varijable), razine faktora i odzive (izlazne varijable). Faktori mogu biti varijable na koje je moguće utjecati i one na koje nije moguće utjecati (npr. ljudi, više istih strojeva i sl.). Varijable na koje nije moguće utjecati mogu prouzročiti različite varijacije stoga je potrebno odrediti faktore i njihove razine kako bi se takve varijacije svele na minimum. U kontekstu dizajna eksperimenta u proizvodnji, faktori mogu biti kvalitativni i kvantitativni. Za kvantitativne čimbenike potrebno je odrediti raspon postavki, način njihovog mjerenja i kontrole tijekom eksperimenta. Primjer kvantitativnih čimbenika su brzina uvijanja, temperatura plijesni i slično. Kvalitativni

čimbenici su diskretne prirode. Vrsta sirovine, vrsta katalizatora itd. su primjeri kvalitativnih čimbenika.

U svrhu poboljšanja provođenja eksperimenata, dizajn eksperimenata se koristi trima principima:

- slučajnost – koristi se kako bi se smanjio efekt eksperimentalnih pogrešaka i kako bi se osigurao jednak utjecaj na sve razine faktora;
- ponovljivost – odnosi se na provođenje eksperimenata slučajnim redoslijedom kako bi se smanjila eksperimentalna pogreška i povećala preciznost;
- *blocking* – odnosi se na uklanjanje učinaka nebitnih varijacija a time i na poboljšanje učinkovitosti dizajna eksperimenta.

Potencijalne primjene DOE u proizvodnim procesima uključuje:

- poboljšani prinos i stabilnost procesa;
- poboljšana dobit i povrat ulaganja;
- poboljšana procesna sposobnost;
- smanjenje varijabilnosti procesa i stoga bolja konzistencija izvedbe proizvoda;
- smanjenje troškova proizvodnje;
- smanjenje procesa izrade i vremena razvoja;
- povećano razumijevanje odnosa između ključnih procesnih ulaza i izlaza;
- povećanje profitabilnosti poslovanja smanjenjem stope otpadaka, stope kvara, prerade, ponovnog testiranja itd.<sup>27</sup>

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

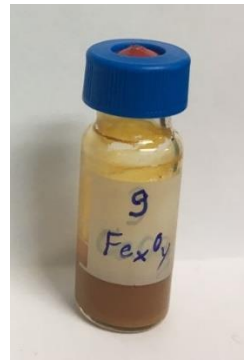
#### 3.1. APARATURA

##### 3.1.1. Kotlasti reaktor

Kotlasti reaktor je zatvoren sustav što znači da se s okolinom ne izmjenjuje reakcijska masa za vrijeme reakcije. Uvijek je u nestacionarnom načinu rada te se u reaktoru ostvaruje približno idealno miješanje što znači da su u bilo kojoj točki reaktorskog prostora vrijednosti svih parametara približno iste. U ovom radu korišten je kotlasti reaktor u kombinaciji s termostatiranom tresilicom (slika 3.3.) za određivanje kinetike i sintezu nanočestica željezovih oksida. Za određivanje kinetike korišten je stakleni kotlasti reaktor volumena  $5\text{ cm}^3$  (slika 3.1.), dok je za sintezu nanočestica korišten stakleni kotlasti reaktor volumena  $1,5\text{ cm}^3$  (slika 3.2.) pri temperaturama  $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $32,5^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$  uz lagano miješanje (200 rpm).



Slika 3.1. Kotlasti reaktor  $V = 5\text{ cm}^3$



Slika 3.2. Kotlasti reaktor  $V = 1,5\text{ cm}^3$



Slika 3.3. Termostatirana tresilica

### 3.1.2. Spektrofotometar

Spektrofotometar je mjerni uređaj za analizu spektra elektromagnetskog zračenja. Apsorpcija svjetlosti kroz otopine opisuje se Lambert-Beer-ovim zakonom (jedn. 3.1.) pri čemu je  $ABS$  apsorbancija pri određenoj valnoj duljini svjetlosti,  $c$  koncentracija tvari u otopini [ $\text{mol dm}^{-3}$ ],  $b$  duljina puta svjetlosti kroz uzorak [ $\text{cm}$ ] i  $\epsilon$  molarni apsorpcijski koeficijent [ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ] svojstven svakoj molekulskoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti.

$$ABS = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (3.1.)$$

U ovom radu korišten je spektrofotometar za određivanje koncentracije amonijevih iona Willisovom metodom pri valnoj duljini  $\lambda = 685 \text{ nm}$ . Korišten je uređaj *Shimadzu UV-1800* (slika 3.4.).



Slika 3.4.. Spektrofotometar *Shimadzu UV-1800*

### 3.1.3 Centrifuga

Centrifuga je korištena za pripremu uzoraka za sušenje te za njihovu daljnju analizu na pretražnom elektronskom mikroskopu i Nanosight-u. Uzorci su centrifugirani na 4500 okr/min u trajanju od  $t = 5 \text{ min}$  nakon čega su isprani redestiliranom vodom i ponovno centrifugirani na isti način, postupak ispiranja proveden je tri puta. Korišten je uređaj *Hettich Universal 320R* (Slika 3.5.).



Slika 3.5. Centrifuga *Hettich Universal 320R*

### 3.1.4. Liofilizator

Liofilizator je uređaj koji služi za provođenje postupka liofilizacije odnosno sušenja u vakuumu pri nižim temperaturama kojim se iz prethodno zamrznutog uzorka voda uklanja sublimacijom leda. Tijekom sušenja uzorak prolazi kroz dvije faze: fazu primarnog i fazu sekundarnog sušenja. Primarno je sušenje iz zamrznutog stanja (od  $-15^{\circ}\text{C}$  do  $-70^{\circ}\text{C}$ ) tijekom kojeg se u uzorak dovodi toplina pri čemu se izdvaja tzv. slobodna voda. Sekundarno sušenje je ono iz „tekućeg“ stanja i njime se nastoji ukloniti tzv. vezana voda.

Liofilizator je korišten za sušenje nanočestica za njihovu daljnju analizu na pretražnom elektronskom mikroskopu i Nanosight-u. Korišten je uređaj *LABCONCO Free Zone* (slika 3.6.).



Slika 3.6. Liofilizator *LABCONCO Free Zone*

### 3.1.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je kromatografska tehnika za analizu i separaciju smjese molekula. Otopina uzorka se injektira u mobilnu fazu i putuje kroz kolonu punjenu stacionarnom fazom pod visokim pritiskom. Interakcija uzorka i mobilne faze sa stacionarnom fazom određuje brzinu eluiranja i separaciju molekula u uzorku stoga se komponente eluiraju s kolone različitom brzinom. Eluat protječe kroz UV/Vis detektor koji mjeri apsorpciju svjetla određene valne duljine u eluatu. Učinkovitost separacije ovisna je o primjeni odgovarajuće stacionarne i mobilne faze, kao i o brzini protoka mobilne faze kroz kolonu.

HPLC uređaj korišten je za određivanje koncentracije uree u uzorcima. Korišten je *Shimadzu* modularni sustav (slika 3.7.) s *cosmosil* kolonom duljine  $l= 25$  cm i temperaturi  $T= 30^{\circ}\text{C}$  kao stacionarnom fazom te acetonitrilom i vodom kao mobilnom fazom.



Slika 3.7. HPLC *Shimadzu* modularni sustav

### 3.1.6. Pretražni elektronski mikroskop (SEM)

Pretražni elektronski mikroskop (SEM) je vrsta elektronskog mikroskopa koji omogućuje promatranje i karakterizaciju heterogenih organskih i anorganskih materijala na nanometarskoj i mikrometarskoj razini. Površina ispitivanog uzorka se skenira s vrlo precizno fokusiranim snopom elektrona. Upadni elektronski snop izbija elektrone iz atoma uzorka koji se detektiraju na fotomultiplikacijskom detektoru. Pomoću mikroprocesora na ekranu nastaje realna trodimenzionalna slika površine uzorka. Elementna mikroanaliza se zasniva na principu da su X-zrake emitirane iz uzorka karakteristične za svaki kemijski element prisutan u uzorku što omogućuje kvalitativnu kemijsku analizu. Intenzitet karakterističnog X-zračenja

proporcionalan je udjelu svakog pojedinog kemijskog elementa u uzorku što upućuje na kvantitativnu kemijsku analizu.

U ovom radu SEM *Tescan Vega 5136 MM* (slika 3.8.) je korišten za analizu odnosno karakterizaciju dobivenih nanočestica.



Slika 3.8. SEM uređaj *Tescan Vega 5136 MM*

### 3.1.7. Malvern Nanosight LM10

*Malvern Nanosight LM10* (slika 3.9.) je jednostavan uređaj koji se zasniva na NTA metodi (engl. *Nanoparticle Tracking Analysis*, NTA) čime omogućuje brzu i točnu analizu raspodjele veličine i koncentracije svih vrsta nanočestica promjera 10 nm do 2000 nm ovisno o konfiguraciji instrumenta i tipu uzorka. Ova tehnologija se koristi svojstvima svjetlosnog raspršivanja i Brownovog gibanja kako bi se odredila veličina i koncentracija čestica u otopini uzorka tako što laserska zraka prolazi kroz komoru s uzorkom, a čestice u otopini na putu ove zrake raspršuju svjetlost na takav način da se lako mogu vidjeti pomoću mikroskopa s povećanjem od 20 puta. Na temelju praćene putanje pojedine nanočestice u dvije dimenzije te na osnovu srednje kvadratne udaljenosti koju nanočestica prijeđe, primjenom Stoke-Einsteinove jednadžbe određuje se hidrodinamički promjer nanočestica, dok se koncentracija mjeri po broju čestica u mililitru otopine.



Slika 3.9.. Uređaj *Malvern Nanosight LM10*

## 3.2. ANALITIČKE METODE

### 3.2.1. Određivanje koncentracije amonijevih iona

Koncentracija amonijevih iona određivana je spektrofotometrijski, Willisovom metodom koja je jednostavna, pouzdana i ekološki prihvatljiva. Navedena metoda koristi reagens koji je otopina natrijeva salicilata, fosfata i nitroprusida (u daljnjem tekstu: reagens), otopinu hipoklorita i otopinu amonijevog klorida koja služi kao standard. Otopina reagensa pripravljena je otapanjem 8,0 g natrijeva salicilata bezvodnog ( $C_6H_4(OH)COONa$ ), 10,0 g natrijeva fosfata tribazičnog dodekahidrata ( $Na_3PO_4 \cdot 12 H_2O$ ) i 0,125 g natrijeva nitroprusida ( $Na_2[Fe(NO)(CN)_5]$ ) u 250 mL redestilirane vode. Otopina hipoklorita pripravljena je razrjeđivanjem 12,5 mL izbjeljivača *Domestos* koji sadrži ~ 4,8% natrijeva hipoklorita, u 237,5 mL vode. Temeljna otopina amonijevog klorida ( $NH_4Cl$ ) koncentracije  $c(NH_4Cl, t.o.) = 10$  mM pripravljena je otapanjem 1,07 mg  $NH_4Cl$  u 2 mL redestilirane vode. Za izradu baždarnog dijagrama pripravljene su otopine  $NH_4Cl$  u rasponu koncentracija 0 – 2,0 mM.

Uzorci za mjerenje apsorbancije na spektrofotometru, odnosno za određivanje koncentracije amonijevih iona pripravljeni su miješanjem 50  $\mu L$  otopine  $NH_4Cl$  zadane koncentracije s 1000  $\mu L$  pripravljenog reagensa i 250  $\mu L$  otopine hipoklorita nakon čega su uzorci dobro homogenizirani. U trenutku dodavanja otopine hipoklorita započeto je mjerenje vremena te su uzorci inkubirani 15 minuta. Nakon 15 minuta izmjerena je apsorbancija uzoraka na spektrofotometru pri valnoj duljini  $\lambda = 685$  nm.



Baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji amonijevog klorida dan je u prilogu 1 na slici 9.1.

### 3.2.2. Određivanje koncentracije uree

Koncentracija uree određivana je na HPLC uređaju. Za stacionarnu fazu korištena je *cosmosil* kolona duljine  $l = 25$  cm pri temperaturi  $T = 30^{\circ}\text{C}$ , a za mobilnu fazu korišteni su acetonitril protoka  $q$  (eluent A)  $= 1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  i voda protoka  $q$  (eluent B)  $= 0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ . Mjerenja su provedena na valnoj duljini  $\lambda = 210$  nm.

Temeljna otopina uree koncentracije  $c$  (urea, t.o.)  $= 100$  mM pripravljena je otapanjem 0,0603 g uree u 10,04 mL redestilirane vode. Uzorci za mjerenje koncentracije uree na HPLC uređaju pripremljeni su u staklenim vialama volumena  $V = 1$  mL miješanjem određenog volumena temeljne otopine uree i redestilirane vode čime su pripravljene otopine uree različitih koncentracija u rasponu od 0,5 – 10 mM. Analizom na HPLC uređaju za svaki uzorak dobiven je kromatogram te su integriranjem dobivenih pikova dobivene vrijednosti površine za svaku koncentraciju uree. Rezultati su prikazani baždarnim dijagramom koji prikazuje ovisnost koncentracije uree o površini pika na kromatogramu (Prilog 2 slika 9.2.)

### 3.2.3. Određivanje aktivnosti enzima ureaze

Aktivnost enzima ureaze određivana je spektrofotometrijski pri temperaturama  $T = 25^{\circ}\text{C}$ ,  $T = 32,5^{\circ}\text{C}$  i  $T = 40^{\circ}\text{C}$ . Eksperimenti su provedeni u redestiliranoj vodi u staklenim kotlastim reaktorima volumena 3 i 5 mL uz konstantnu koncentraciju enzima ureaze  $c(\text{ureaza}) = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  i različitim koncentracijama uree u rasponu  $c(\text{urea}) = 1-100$  mM pri konstantnoj brzini miješanja (200 rpm) u termostatiranoj tresilici. Praćenjem porasta koncentracije amonijevih iona mjerenjem apsorbancije prema Willisovoj metodi mjerena je početna brzina reakcije hidrolize uree uz dodatak enzima ureaze.

Temeljna otopina uree  $c$  (urea, t.o.)  $= 200$  mM pripravljena je otapanjem 96,1 mg uree u 8 mL redestilirane vode, otopina  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  koncentracije  $c(\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 1$  mM koja je korištena za zaustavljanje reakcije hidrolize uree pripravljena je otapanjem 1,5 mg bakrova klorida dihidrata ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) u 9 mL redestilirane vode i temeljna otopina enzima ureaze koncentracije  $c$  (ureaza, t.o.)  $= 5 \text{ mg mL}^{-1}$ , pripravljena je otapanjem 7,5 mg ureaze u 1,5 mL redestilirane vode.

Iz temeljnih otopina su u staklenim reaktorima pripravljene otopine s odgovarajućom koncentracijom uree u rasponu od 1 – 100 mM te s koncentracijom ureaze  $c$  (ureaza) = 0,1 mg mL<sup>-1</sup>, dodatkom enzima ureaze započinje reakcija hidrolize uree te je započeto i mjerenje vremena. Reaktori su stavljeni u termostatiranu tresilicu pri konstantnoj brzini miješanja od 200 rpm. Za svaki eksperiment iz reaktora je uzimano 7 uzoraka u pravilnim vremenskim razmacima kroz prvih 6 minuta reakcije tako što je 200 μL uzorka pomiješano s 200 μL otopine CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O za zaustavljanje reakcije te potom profiltrirano. Kod koncentracija uree većih od 10 mM uzimano je po 80 μL uzorka i pomiješano sa 80 μL otopine CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O te razrijeđeno s 240 μL redestilirane vode te profiltrirano. Potom je od profiltriranih uzoraka uzeto 50 μL čemu je prema Willisovoj metodi dodano 1000 μL reagensa i 250 μL otopine hipoklorita za određivanje amonijevih iona, tako pripremljeni uzorci inkubirani su 15 minuta nakon čega je na spektrofotometru izmjerena apsorbancija pri  $\lambda = 685$  nm. Postupak provođenja eksperimenata analogan je za sve tri temperature.

Dobiveni rezultati su prikazani kao promjena koncentracije amonijevih iona u vremenu. U prilogu 3 na slici 9.3 dan je primjer rezultata za otopinu uree u redestiliranoj vodi početne koncentracije  $c$  (urea) = 10 mM, pri temperaturi  $T = 25$  °C.

Korištenjem promjene apsorbancije u ovisnosti o vremenu reakcije prema izrazu (3.1.) izračunate su specifične aktivnosti enzima,  $A_s$  [U mg<sup>-1</sup>] te je pomoću toga prikazana kinetika enzima.

$$A_s = \frac{dABS}{dt} \cdot \frac{1}{2 \cdot \epsilon_{NH_3} \cdot c_{ureaza}} \quad (3.1.)$$

### 3.2.4. Utjecaj željezovih iona na aktivnost enzima ureaze

Utjecaj željezovih iona na aktivnost enzima ureaze ispitan je spektrofotometrijski u redestiliranoj vodi na tri temperature  $T = 25$ °C,  $T = 32,5$ °C i  $T = 40$ °C uz različite početne koncentracije željezovog (II) klorida u rasponu od 2 – 100 mM. Eksperimenti su provedeni u staklenim kotlastim reaktorima volumena 3 mL u termostatiranoj tresilici pri konstantnoj brzini miješanja (200 rpm). Eksperimenti su provedeni na jednak način na sve tri navedene temperature.

Temeljna otopina uree  $c$  (urea, t.o.) = 200 mM pripravljena je otapanjem 90,09 mg uree u 7,5 mL redestilirane vode, temeljna otopina enzima ureaze koncentracije  $c$  (ureaza, t.o.) = 5

mg mL<sup>-1</sup> pripravljena je otapanjem 1,5 mg ureaze u 0,3 mL redestilirane vode, te otapanjem 99,6 mg željezovog (II) klorida u 1,002 mL redestilirane vode pripravljena je njegovala temeljna otopina koncentracije  $c(\text{FeCl}_2 \text{ t.o.}) = 0,5 \text{ M}$ .

Iz temeljnih otopina su u staklenim reaktorima pripravljene otopine za provedbu eksperimenata konstantne koncentracije uree  $c(\text{urea}) = 100 \text{ mM}$  i ureaze  $c(\text{ureaza}) = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  i različitih koncentracija  $\text{FeCl}_2$  u rasponu 2 – 100 mM u redestiliranoj vodi kako bi se odredio utjecaj željezovih iona na aktivnost enzima ureaze.

Dodatkom enzima ureaze započinje reakcija hidrolize uree, reaktori su stavljeni u termostatiranu tresilicu na odgovarajuću temperaturu pri konstantnoj brzini miješanja od 200 rpm. Iz reaktora je uzimano 7 uzoraka po 80  $\mu\text{L}$  u pravilnim vremenskim intervalima tijekom prvih 6 minuta reakcije, pomiješano s 80  $\mu\text{L}$  otopine  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  za zaustavljanje reakcije, razrijeđeno s 240  $\mu\text{L}$  redestilirane vode te potom profiltrirano. Potom je od profiltriranih uzoraka uzeto 50  $\mu\text{L}$  čemu je prema Willisovoj metodi dodano 1000  $\mu\text{L}$  reagensa i 250  $\mu\text{L}$  otopine hipoklorita za određivanje amonijevih iona, tako pripravljene uzorci inkubirani su 15 minuta nakon čega je na spektrofotometru izmjerena apsorbancija pri  $\lambda = 685 \text{ nm}$ .

Dobiveni rezultati prikazani su kao promjena koncentracije amonijevih iona u vremenu za otopinu željezovog (II) klorida u redestiliranoj vodi. U prilogu 4 na slici 9.4 dan je primjer rezultata početne koncentracije  $c(\text{FeCl}_2) = 2 \text{ mM}$ , pri temperaturi  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Uvrštavanjem dobivenih rezultata u izraz (jedn. 3.1.) izračunate su specifične aktivnosti enzima,  $A_s [\text{U mg}^{-1}]$  koje su korištene i za prikaz utjecaja željeza na aktivnost enzima.

### 3.2.5. NTA metoda

Za određivanje veličine i koncentracije sintetiziranih nanočestica korištena je NTA metoda pomoću uređaja *Malvern Nanosight LM10*.

Pripravljena su odgovarajuća razrjeđenja za svaki uzorak (10x/ 100x/ 1000x) nakon čega su uzorci plastičnom injekcijom injektirani u komoru uređaja. Na uzorak se usmjerava laserska zraka pri čemu nastaje svjetlost na površini otopine koja se raspršuje ovisno o veličini nanočestica i indeksu refleksije.

### 3.3. REAKTORSKI EKSPERIMENTI

#### 3.3.1. Optimiranje sinteze nanočestica željezovih oksida

U svrhu optimiranja procesa biokatalitičke sinteze nanočestica željezovih oksida korišten je računalni program *Design – Expert*<sup>®</sup> verzija 6.0.6. i vrsta dizajna *D optimal* dizajn. Temperatura i koncentracija enzima ureaze su odabrane kao značajni parametri odnosno ulazne varijable uz konstantnu koncentraciju uree  $c(\text{urea}) = 800 \text{ mM}$ , željezovog (II) klorida  $c(\text{FeCl}_2) = 100 \text{ mM}$  te pri konstantnoj brzini miješanja od 200 rpm. Temperatura je varirana u rasponu vrijednosti  $T = 25 - 40^\circ\text{C}$  i koncentracija enzima ureaze u rasponu vrijednosti  $c(\text{ureaza}) = 0,5 - 3 \text{ mg mL}^{-1}$ . Na temelju unesenih varijabli dobiveno je 12 eksperimenata (tablica 3.1.) čijim su provođenjem dobiveni optimalni uvjeti za proces sinteze nanočestica željezovih oksida najmanje veličine i najveće koncentracije.

Tablica 3.1. Eksperimenti dizajnirani DOE metodom

Eksperimenti	$c(\text{ureaza}) [\text{mg mL}^{-1}]$	$T [^\circ\text{C}]$
1	1,75	25
2	1,75	40
3	0,5	40
4	0,5	40
5	3	40
6	3	32,5
7	0,5	32,5
8	3	25
9	1,75	32,5
10	3	40
11	0,5	25
12	0,5	25

Za provedbu eksperimenata pripravljena je temeljna otopina uree  $c(\text{urea, t.o.}) = 800 \text{ mM}$  otapanjem 0,0961 g uree u 2 mL redestilirane vode, temeljna otopina enzima ureaze  $c(\text{ureaza, t.o.}) = 5 \text{ mg mL}^{-1}$  pripravljena je otapanjem 10 mg ureaze u 2 mL redestilirane vode, otapanjem 0,0795 g željezovog (II) klorida u 0,4 mL redestilirane vode pripravljena je temeljna

otopina koncentracije  $c$  ( $\text{FeCl}_2$ , t.o.) = 1 M i otapanjem 0,0020 g bakrovog klorida dihidrata ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) u 12 mL redistirane vode pripravljena je temeljna otopina koncentracije  $c$  ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , t.o.) = 1 mM.

Eksperimenti su provedeni u staklenim kotlastim reaktorima volumena 1 mL dodatkom odgovarajućih volumena temeljne otopine uree, željezovog (II) klorida, enzima ureaze i redistirane vode. Dodatkom enzima ureaze započeta je hidroliza uree i sinteza nanočestica, reakcije su se provodile 24 sata na termostiranoj tresilici na 200 rpm na odgovarajućoj temperaturi. Nakon 3h, 6h i 24h trajanja reakcije uzimano je po 200  $\mu\text{L}$  uzorka te pomiješano s 200  $\mu\text{L}$  otopine  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  za zaustavljanje reakcije, od čega je uzeto 200  $\mu\text{L}$  za analizu na *Nanosight*-u. Od preostalih 200  $\mu\text{L}$  uzorka uzeto je 100  $\mu\text{L}$  uzorka te pomiješano s 900  $\mu\text{L}$  redistirane vode u svrhu razrjeđenja uzorka, zatim filtrirano te od filtrata uzeto 50  $\mu\text{L}$  i pomiješano s 1000  $\mu\text{L}$  reagensa i 250  $\mu\text{L}$  otopine hipoklorita u svrhu određivanja koncentracije amonijevih iona prema Willisovoj metodi. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani 15 minuta nakon čega je na spektrofotometru izmjerena apsorbanacija pri  $\lambda = 685$  nm. Nakon završetka reakcije reakcijska smjesa je centrifugirana na 4500 rpm u trajanju od 5 min nakon čega su dobivene nanočestice isprane s redistiranom vodom i ponovno centrifugirane na isti način (postupak ispiranja ponovljen je dva puta). Nakon pranja, čestice su sušene u liofilizatoru, a zatim su analizirane NTA metodom na uređaju *Malvern Nanosight* LM10.

### 3.3.2. Hidroliza uree u kotlastom reaktoru

Provedena su tri eksperimenata hidrolize uree uz enzim ureazu u redistiranoj vodi pri temperaturama  $T = 25$  °C,  $T = 32,5$  °C i  $T = 40$  °C. Korišteni su stakleni kotlasti reaktori volumena 5 mL i reakcije su vođene 24 h u termostiranoj tresilici pri 200 rpm. Početni uvjeti provedenih eksperimenata navedeni su u tablici 3.2.

Tablica 3.2. Početni uvjeti provedenih eksperimenata hidrolize uree

Eksperiment	$T$ [°C]	$c$ (urea) [mM]	$c$ (ureaza) [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]
1	25	200	0,3
2	32,5		
3	40		

Postupak provedbe eksperimenata analogan je za sve tri temperature, prvotno su pripravljene temeljne otopine; otapanjem 0,18 g uree u 3,75 mL redistirane vode

pripremljena je temeljna otopina uree koncentracije  $c$  (urea, t.o.) = 800 mM i temeljna otopina ureaze koncentracije  $c$  (ureaza, t.o.) = 5 mg mL<sup>-1</sup> pripremljena je otapanjem 4,5 mg ureaze u 0,9 mL redestilirane vode.

Prvo je u reaktore stavljeno 1,25 mL temeljne otopine uree i pomiješano s 3,45 mL redestilirane vode, zatim je dodano 300 µL temeljne otopine ureaze čime započinje reakcija. Tijekom 24 h reakcije uzimano je po 11 uzoraka iz reaktora u pravilnim vremenskim intervalima tako što je uzimano 100 µL uzorka koji su potom miješani sa 100 µL CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O za zaustavljanje reakcije i 800 µL redestilirane vode za razrjeđivanje uzorka, uzorci su zatim profiltrirani te im je određivana koncentracija amonijevih iona prema Willisovoj metodi na spektrofotometru. Preostali volumen uzorka korišten je za određivanje koncentracije uree na HPLC-u. Od prvih 6 uzoraka početnog razrjeđenja 20x u staklene vialje je stavljeno 400 µL uzorka, a preostalih 5 uzoraka razrjeđeni su dodatno do ukupnog razrjeđenja od 10x miješanjem 200 µL uzorka s 200 µL redestilirane vode. Analizom uzoraka na HPLC-u dobiveni su pikovi na kromatogramu te su njihove površine određene integriranjem.

### 3.3.3. Sinteza nanočestica željezovih oksida u kotlastom reaktoru

Nanočestice željezovih oksida sintetizirane su reakcijom hidrolize uree u redestiliranoj vodi uz enzim ureazu dodatkom željezovog (II) klorida. Provedena su tri eksperimenta u staklenim kotlastim reaktorima volumena 5 mL na tri temperature  $T = 25$  °C,  $T = 32,5$  °C i  $T = 40$  °C u termostatiranoj tresilici pri 200 rpm, reakcije su vođene 24 h. Početni uvjeti provedenih eksperimenata navedeni su u tablici 3.3.

Tablica 3.3. Početni uvjeti provedenih eksperimenata sinteze nanočestica željezovih oksida

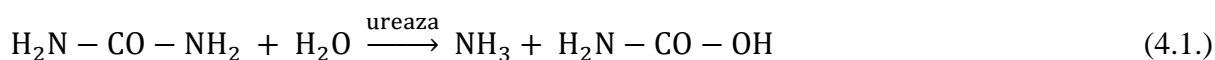
Eksperiment	$T$ [°C]	$c$ (urea) [mM]	$c$ (ureaza) [mg mL <sup>-1</sup> ]	$c$ (FeCl <sub>2</sub> ) [mM]
1	25	200	3	100
2	32,5			
3	40			

Postupak provedbe eksperimenata analogan je za sve tri temperature, prvotno su pripremljene temeljne otopine; otapanjem 0,18 g uree u 3,75 mL redestilirane vode pripremljena je temeljna otopina uree koncentracije  $c$  (urea, t.o.) = 800 mM, temeljna otopina ureaze koncentracije  $c$  (ureaza, t.o.) = 5 mg mL<sup>-1</sup> pripremljena je otapanjem 0,045 g ureaze u 9 mL redestilirane vode i temeljna otopina željezovog (II) klorida koncentracije  $c$  (FeCl<sub>2</sub>) = 1 M pripremljena je otapanjem 0,298 g željezovog (II) klorida u 1,5 mL redestilirane vode.

U reaktore je prvotno stavljeno 1,25 mL temeljne otopine uree i pomiješano s 250  $\mu\text{L}$  redestilirane vode i 500  $\mu\text{L}$  temeljne otopine željezovog (II) klorida, zatim je dodano 3000  $\mu\text{L}$  temeljne otopine ureaze čime započinje reakcija. Tijekom 24 h reakcije uzimano je po 11 uzoraka iz reaktora u pravilnim vremenskim intervalima tako što je uzimano 100  $\mu\text{L}$  uzorka koji su potom miješani sa 100  $\mu\text{L}$   $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  za zaustavljanje reakcije i 800  $\mu\text{L}$  redestilirane vode za razrjeđivanje uzorka, uzorci su zatim profiltrirani te im je određivana koncentracija amonijevih iona prema Willisovoj metodi na spektrofotometru. Preostali volumen uzorka korišten je za određivanje koncentracije uree na HPLC-u. Od prvih 6 uzoraka početnog razrjeđenja 20x u staklene vialje je stavljeno 400  $\mu\text{L}$  uzorka, a preostalih 5 uzoraka razrijeđeni su dodatno do ukupnog razrjeđenja od 10x miješanjem 200  $\mu\text{L}$  uzorka s 200  $\mu\text{L}$  redestilirane vode. Analizom uzoraka na HPLC-u dobiveni su pikovi na kromatogramu te su njihove površine određene integriranjem.

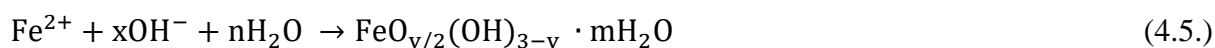
#### 4. MODELIRANJE SINTEZE NANOČESTICA ŽELJEZOVIH OKSIDA

Matematički model hidrolize uree uz enzim ureazu se sastoji od kinetičkih i bilancnih jednadžbi te se temelji na sljedećim jednadžbama (jedn. 4.1. – 4.4.):



U ovom radu, uz reakciju hidrolize uree, provodila se i reakcija dobivanja nanočestica željezovih oksida korištenjem produkta hidrolize uree, odnosno hidroksid iona.

Dodatkom željezovog (II) klorida u reaktor u kojemu se odvija hidroliza uree dolazi do nastajanja nanočestica željezovih oksida prema sljedećoj reakciji (jedn. 4.5.):



##### 4.1. KINETIČKI MODEL

Kinetički model hidrolize uree u kotlastom reaktoru opisan je Michaelis–Menteničinom kinetikom za jednosupstratne reakcije te je dan izrazom 4.6. Pri višim temperaturama uočena je inhibicija supstratom, te je ista uključena i Michaelis-Menteničinu kinetiku (jedn. 4.6.)

$$r_1 = \frac{V_m \cdot c_{urea}}{K_m + c_{urea} + \frac{c_{urea}^2}{K_{IS}}} \quad (4.6.)$$

Kada se dobivaju nanočestice željezovih oksida u reaktoru se nalaze željezovi ioni koji usporavaju hidrolizu uree. Stoga je u ovom slučaju kinetika hidrolize uree opisana Michaelis-Menteničinom kinetikom s nekompetitivnom inhibicijom željezovim ionima (jedn.4.7.):

$$r_2 = \frac{V_m \cdot c_{urea}}{\left(1 + \frac{c_{Fe}}{K_i^{Fe}}\right) \cdot \left(K_m + c_{urea} + \frac{c_{urea}^2}{K_{iS}}\right)} \quad (4.7.)$$

Kinetika nastajanja željezovih oksida opisana je kinetikom (x+1) reda obzirom da točan mehanizam njegovog nastajanja u ovoj reakciji nije poznat (jedn. 4.8.):

$$r_3 = k \cdot c_{Fe} \cdot c_{OH^-}^{x+1} \quad (4.8.)$$

## 4.2. REAKTORSKI MODEL

Reaktorski model se u kotlastom reaktoru za reakciju hidrolize sastoji od bilancne jednadžbe za ureu (jedn.4.9.) i jednadžbe za nastajanje amonijevog iona (jedn. 4.10.). Obzirom da je amonijak lako hlapiva komponenta, u bilancu amonijevog iona uvedena je i brzina isparavanja.

$$\frac{dc_{urea}}{dt} = -r_1 \quad (4.9.)$$

$$\frac{dc_{NH_3^+}}{dt} = 2 \cdot r_1 - k_{isp} \cdot c_{NH_3^+} \quad (4.10.)$$

Reaktorski model u kotlastom reaktoru u procesu nastajanja nanočestica željezovih oksida korištenjem hidroksid iona kao produkta reakcije hidrolize uree katalizirane ureazom sastoji se od bilancnih jednadžbi za ureu (jedn.4.11.), amonijak (jedn.4.12.), hidroksid ione (jedn.4.13.) te željezove ione (jedn.4.14.). Pretpostavljeno je da hidroksid ioni nastaju jednakom brzinom kao i amonijevi ioni.

$$\frac{dc_{urea}}{dt} = -r_1 \quad (4.11.)$$

$$\frac{dc_{NH_3^+}}{dt} = 2 \cdot r_1 - k_{isp} \cdot c_{NH_3^+} \quad (4.12.)$$

$$\frac{dc_{OH^-}}{dt} = 2 \cdot r_2 - r_3 \quad (4.13.)$$

$$\frac{dc_{Fe}}{dt} = -r_3 \quad (4.14.)$$

Deaktivacija enzima ureaze koja je uočena prilikom hidrolize uree uz enzim ureazu opisana je kinetikom 1. reda (jedn.4.15.):

$$\frac{dV_m}{dt} = -k_d \cdot V_m \quad (4.15.)$$



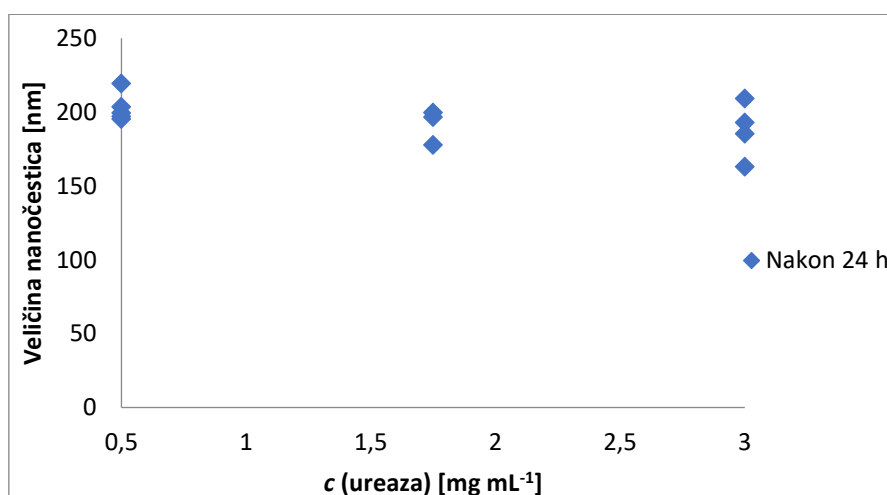
## 5. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je biokatalitička sinteza nanočestica željezovih oksida korištenjem produkata hidrolize uree uz enzim ureazu. Cilj je bio odrediti optimalne uvijete sinteze nanočestica, odnosno optimirati proces korištenjem statističke metode Dizajna eksperimenata kako bi se sintetizirale nanočestice što manjih veličina i što veće koncentracije određivanjem utjecaja temperature i koncentracije enzima ureaze. Da bi se reakcija sinteze nanočestica željezovih oksida opisala matematičkim modelom ispitivana je kinetika enzima ureaze pri različitim temperaturama i provedena je validacija modela u kotlastom reaktoru. Sintetizirane nanočestice su potom karakterizirane analizom na pretražnom elektronskom mikroskopu s energetski disperzivnom rendgenskom spektroskopijom.

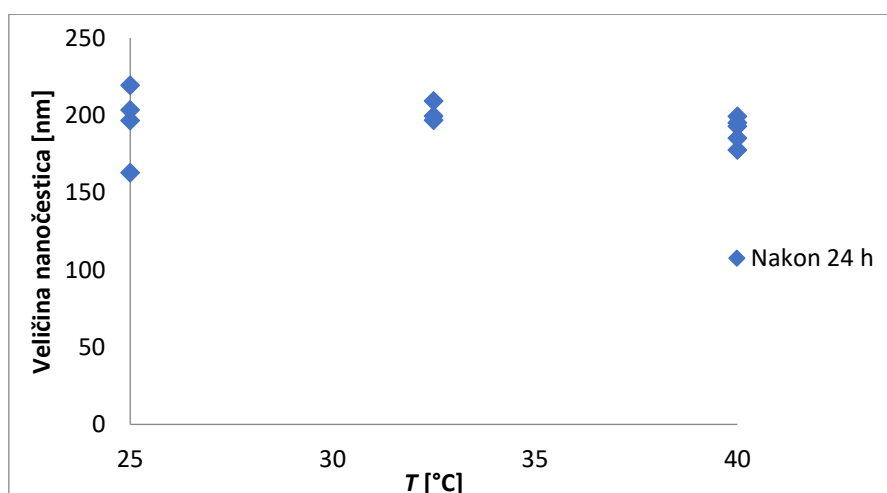
### 5.1. OPTIMIZACIJA PROCESA BIOKATALITIČKE SINTEZE NANOČESTICA ŽELJEZOVIH OKSIDA

U svrhu optimizacije sinteze nanočestica željezovih oksida provedeno je 12 eksperimenata (tablica 3.1.) dobivenih metodom Dizajna eksperimenata, te su dobivene nanočestice analizirane NTA metodom na uređaju *Malvern Nanosight LM10*. Rezultati nakon 24 h prikazani su grafički (Slika 5.1. a – b) te su na temelju njih procijenjeni uvjeti koji pogoduju biokatalitičkoj sintezi nanočestica željezovih oksida što veće koncentracije i što manjih veličina nanočestica. Koncentracija i veličina nanočestica određivana je nakon 3h, 6h i 24h NTA metodom na uređaju *Malvern Nanosight LM10*.

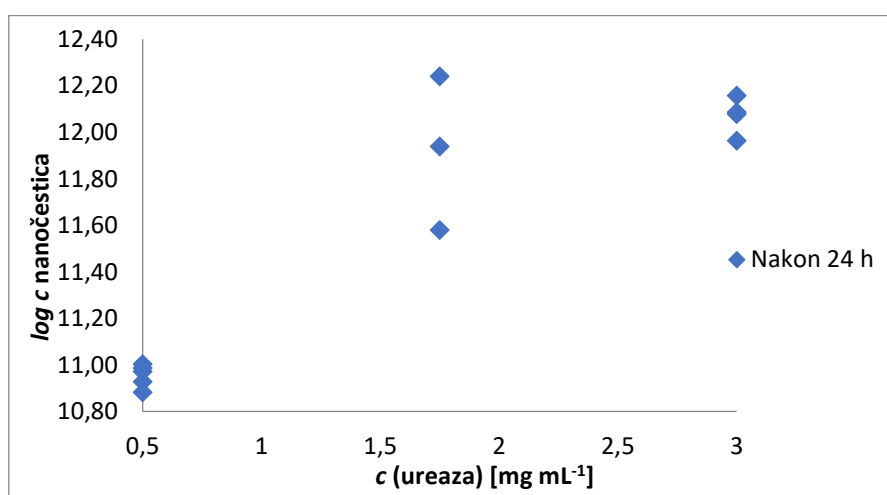
a)



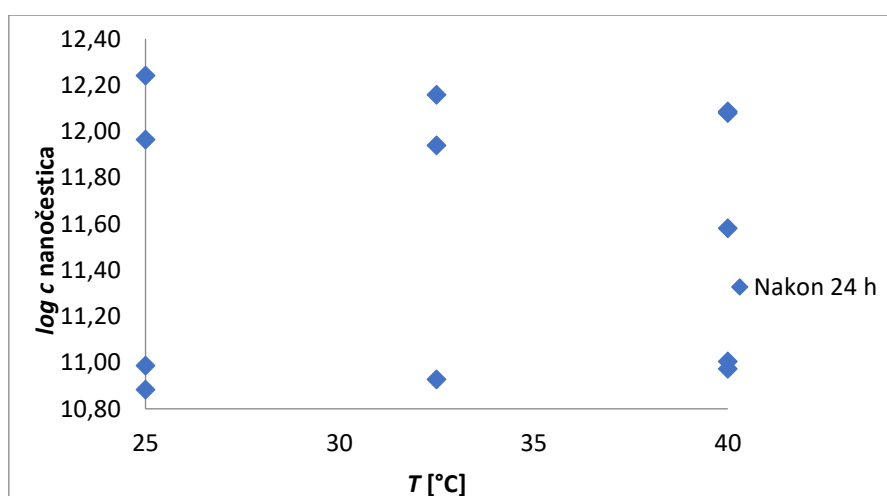
b)



c)

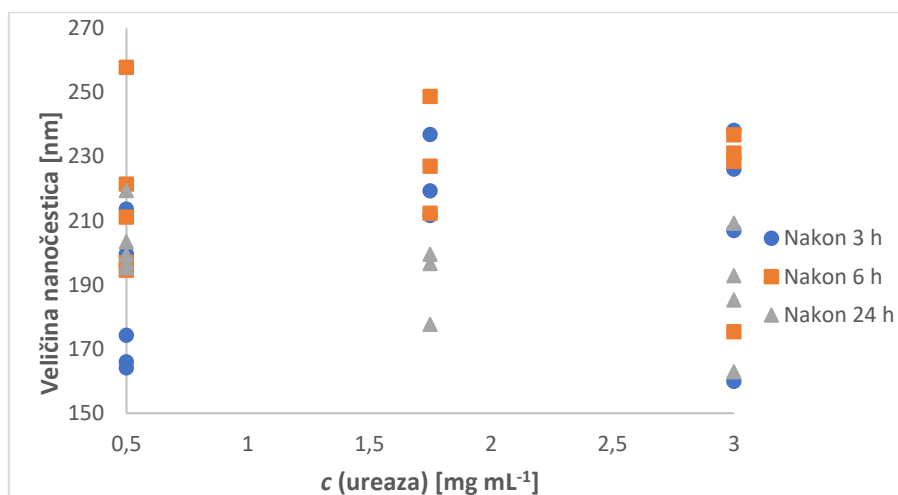


d)

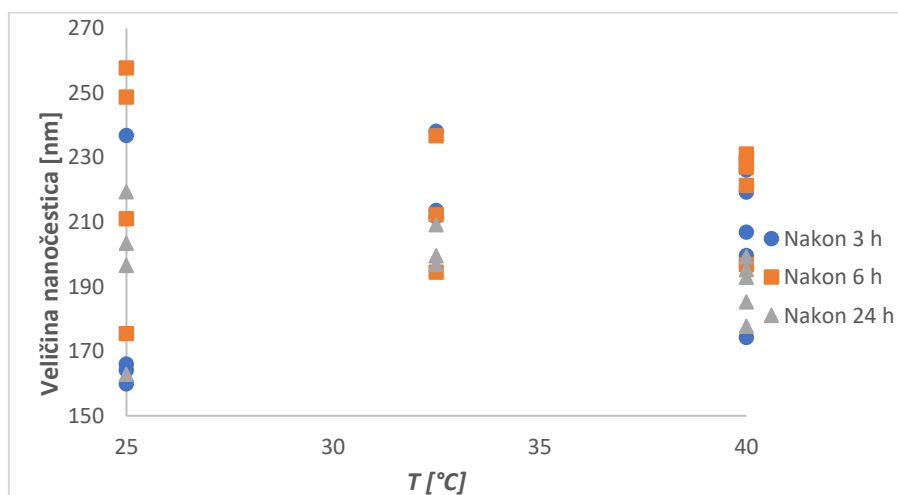


Slika 5.1. Utjecaj koncentracije enzima ureaze i temperature na veličinu (a – b) i koncentraciju (c – d) nastalih nanočestica

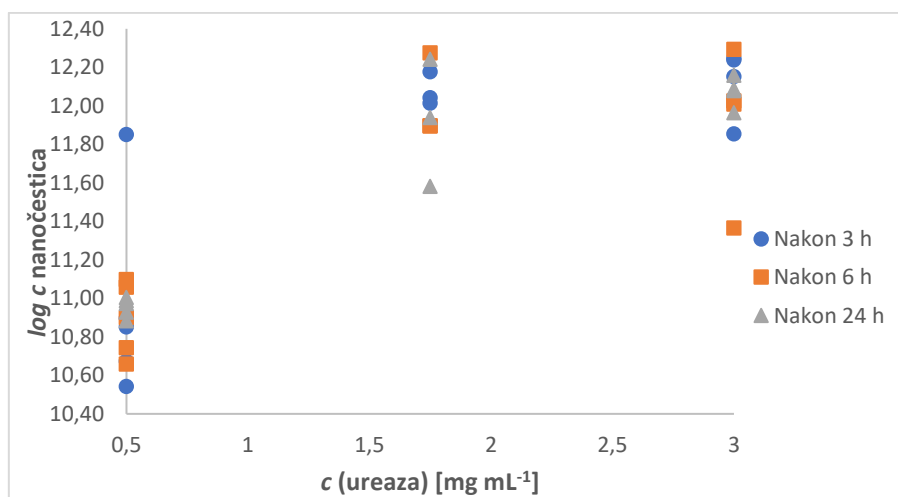
a)



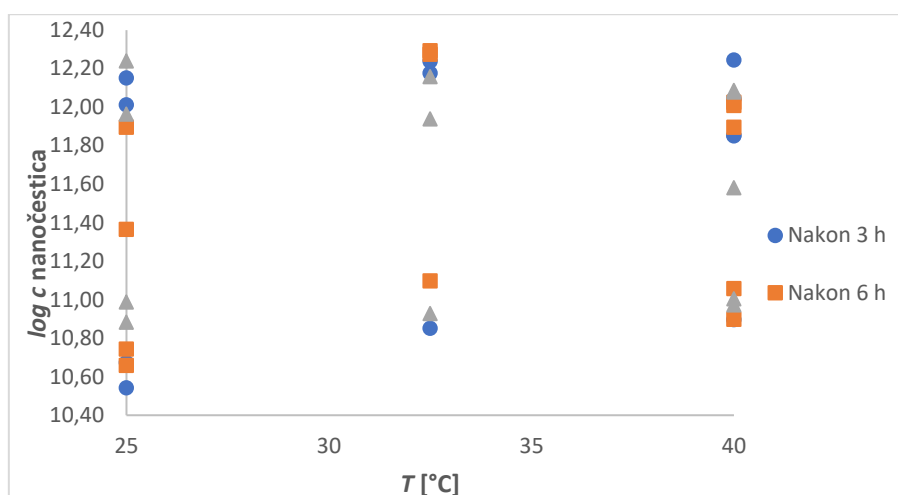
b)



c)



d)



Slika 5.2. Prikaz ukupnih rezultata nakon 3h, 6h i 24h; utjecaj koncentracije enzima ureaze i temperature na veličinu (a – b) i koncentraciju (c – d) nastalih nanočestica

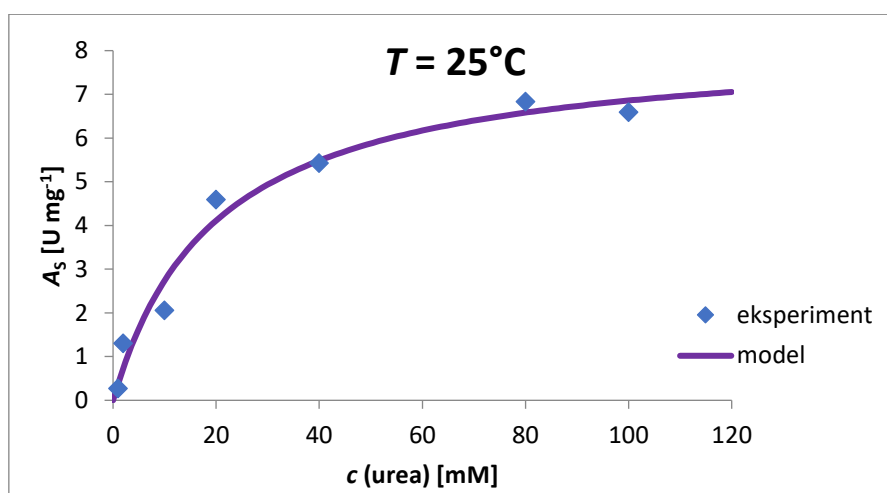
Iz slika 5.1. i 5.2. vidljivo je da nakon 24 h vođenja reakcije veličina nanočestica pada porastom koncentracije enzima ureaze i porastom temperature, dok koncentracija nanočestica također raste porastom koncentracije enzima ureaze, no promjenom temperature ne dolazi do značajnog utjecaja. Iz slike 5.2. se može zaključiti da je reakciju sinteze optimalno voditi 24 h za dobivanje nanočestica najveće koncentracije i najmanjih veličina.

## 5.2. KINETIKA ENZIMA UREAZE

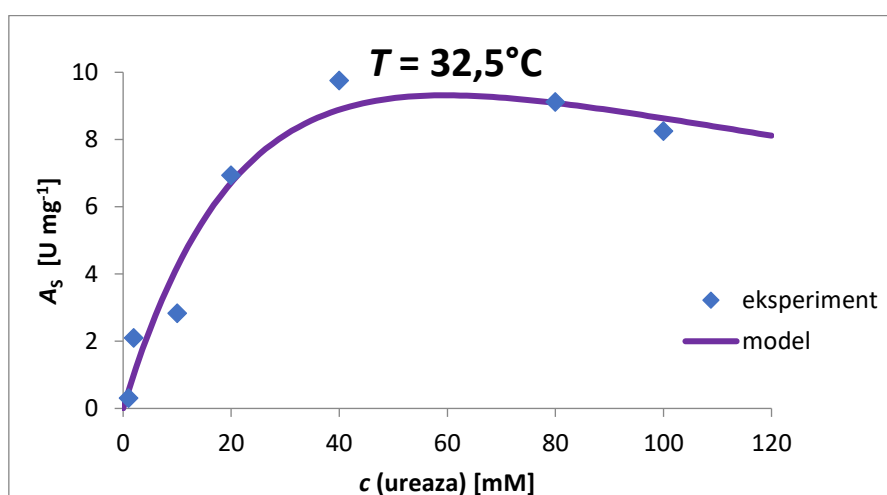
### 5.2.1. Kinetika enzima ureaze u redestiliranoj vodi

Kinetika enzima ureaze, odnosno početna brzina raspada uree uz dodatak enzima ureaze pri različitim početnim koncentracijama uree ( $c(\text{urea}) = 0 - 100 \text{ mM}$ ) ispitana je spektrofotometrijski praćenjem porasta koncentracije amonijevih iona. Hidroliza uree provodila se u redestiliranoj vodi pri temperaturama  $T = 25 \text{ °C}$ ,  $T = 32,5 \text{ °C}$  i  $T = 40 \text{ °C}$ . Na temelju promjene apsorbancije u ovisnosti o vremenu prema izrazu (3.1.) određena je specifična aktivnost enzima,  $A_s [\text{U mg}^{-1}]$  za svaki provedeni eksperiment na sve tri temperature. Reakcijska kinetika je na kraju prikazana kao ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentracijama uree u redestiliranoj vodi na pojedinoj temperaturi.

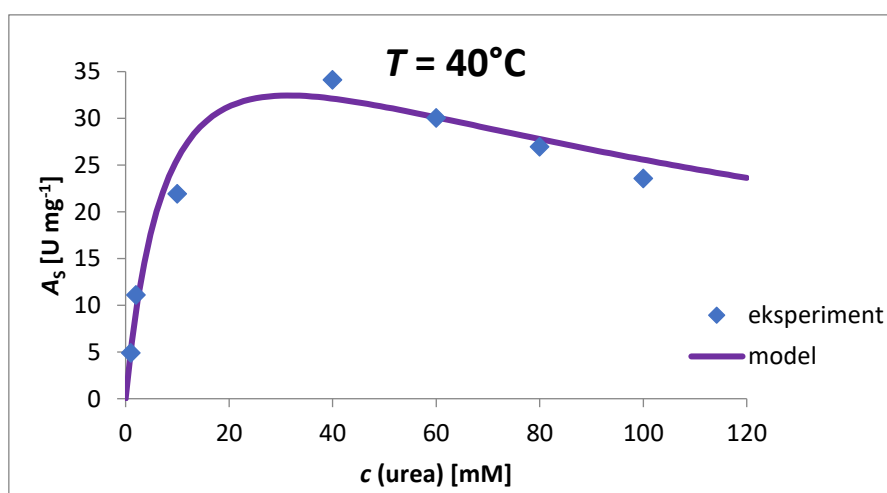
a)



b)



c)



Slika 5.3. Kinetika enzima ureaze u reakciji hidrolize uree – ovisnost početne reakcijske brzine o koncentraciji uree ( $c(\text{ureaza}) = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) pri različitim temperaturama: a)  $T = 25$  °C, b)  $T = 32,5$  °C, c)  $T = 40$  °C.

Na slici 5.3. a – c prikazani su podaci za specifičnu aktivnost enzima ureaze u redestiliranoj vodi dobiveni eksperimentalno i simulacijom u programskom paketu *Scientist* korištenjem Michaelis – Menteničine kinetike (jedn. 4.6.). Eksperimentalni podaci se dobro slažu s onima dobivenim modeliranjem na sve tri temperature. Stoga se unatoč minimalnom odstupanju može zaključiti da pretpostavljena Michaelis – Menteničina kinetika dobro opisuje reakciju hidrolize uree.

U *Scientist*-u su nelinearnom regresijom procijenjeni parametri Michaelis – Menteničine kinetike i konstanta inhibicije supstratom, te su navedeni u tablici 5.1.

Tablica 5.1. Procijenjeni kinetički parametri hidrolize uree uz enzim ureazu

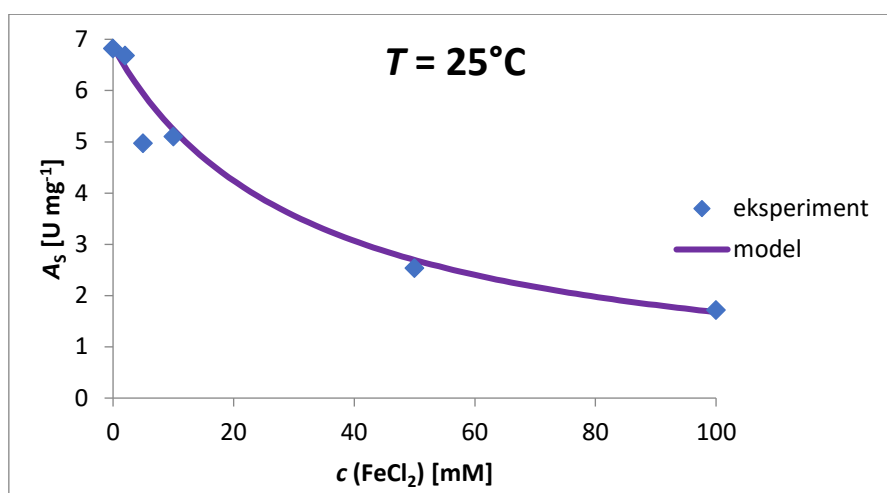
Parametri	25 °C	32,5 °C	40 °C
$V_m$ [U mg <sup>-1</sup> ]	8,23 ± 0,69	22,47 ± 1,06	50,68 ± 6,98
$K_m$ [mM]	20,03 ± 2,38	42,20 ± 6,37	8,85 ± 0,90
$K_{is}$ [mM]	-	84,64 ± 16,34	112,01 ± 11,24

Vrijednosti maksimalne brzine reakcije  $V_m$  veće su pri višoj temperaturi stoga se može zaključiti da porastom temperature raste aktivnost enzima, odnosno raste brzina reakcije. Vrijednost Michaelis – Menteničine konstante  $K_m$  opisuje afinitet enzima prema supstratu, što je niža vrijednost  $K_m$  enzim je specifičniji, odnosno jače je vezan na određeni supstrat. U provedenim eksperimentima  $K_m$  ima najnižu vrijednost pri reakciji hidrolize uree na  $T = 40^\circ\text{C}$ . Prema vrijednostima konstante inhibicije supstratom  $K_i^S$  može se zaključiti da porastom temperature dolazi do manje inhibicije supstratom.

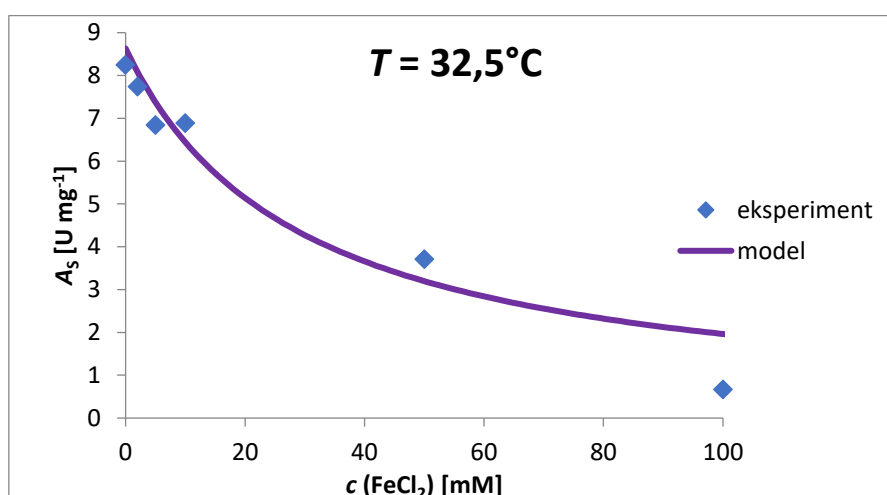
### 5.2.2. Utjecaj željezovih iona na aktivnost enzima ureaze

Utjecaj željezovih iona na aktivnost enzima ureaze, odnosno na početnu brzinu reakcije hidrolize uree određen je mjerenjem specifične aktivnosti enzima ureaze u ovisnosti o različitim koncentracijama željezovog (II) klorida ( $c(\text{FeCl}_2) = 0 - 100$  mM) te pri konstantnim koncentracijama ureaze ( $c(\text{ureaza}) = 0,1$  mg mL<sup>-1</sup>) i uree ( $c(\text{urea}) = 100$  mM). Provedeni eksperimenti su također vođeni pri temperaturama  $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $T = 32,5^\circ\text{C}$  i  $T = 40^\circ\text{C}$ . Dobiveni rezultati prikazani su kao ovisnost specifične aktivnosti enzima ureaze o koncentraciji željezovog (II) klorida te su prikazani na slici 5.4. a – c.

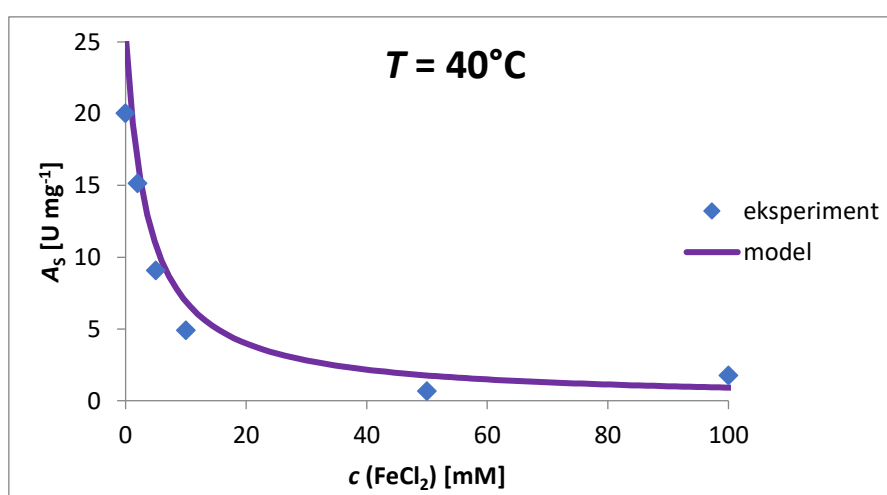
a)



b)



c)



Slika 5.4. Kinetika ureaze u reakciji hidrolize uree – utjecaj željeza na početnu reakcijsku brzinu ( $c(\text{urea}) = 100 \text{ mM}$ ,  $c(\text{ureaza}) = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) pri različitim temperaturama: a)  $T = 25^{\circ}\text{C}$ , b)  $T = 32,5^{\circ}\text{C}$ , c)  $T = 40^{\circ}\text{C}$

Na slici 5.4. a – c prikazani su eksperimentalno dobiveni podaci za specifičnu aktivnost enzima ureaze uz dodatak željezovog (II) klorida te podaci dobiveni simulacijom u programskom paketu *Scientist* korištenjem Michaelis – Menteničine kinetike. Uz minimalno odstupanje može se zaključiti da se dobiveni podaci dobro slažu na svim trima temperaturama. Također je vidljivo da željezovi ioni usporavaju reakciju hidrolize uree, odnosno inhibiraju aktivnost enzima ureaze. Na temelju literaturnih podataka<sup>20</sup> zaključeno je da se radi o nekompetitivnoj inhibiciji. Konstante inhibicije su procijenjene nelinearnom regresijom u *Scientist*-u te su njihove vrijednosti dane u Tablici 5.2.

Tablica 5.2. Procijenjene konstante inhibicije željezovim ionima u reakciji hidrolize uree

Parametri	25 °C	32,5 °C	40 °C
$K_i^{Fe}$ [mM]	32,39 ± 3,56	29,43 ± 2,10	3,70 ± 0,49

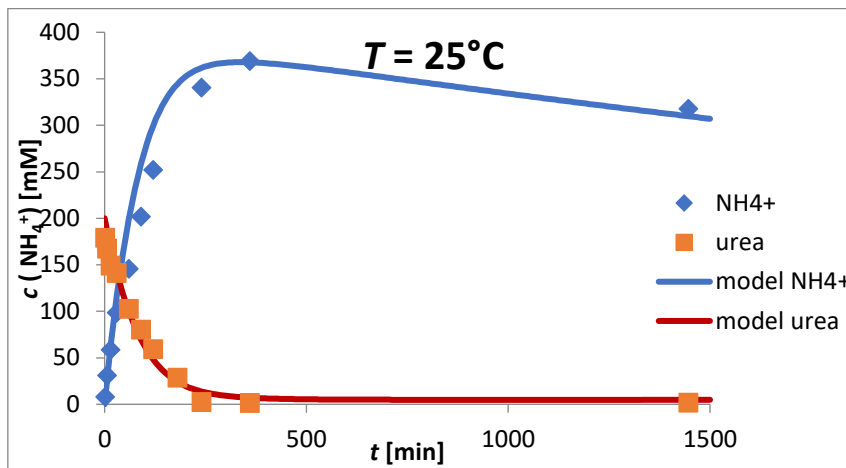
Prema procijenjenim vrijednostima konstanti inhibicije vidljivo je da željezovi ioni inhibiraju djelovanje enzima ureaze pri čemu dolazi do značajne inhibicije porastom temperature.

### 5.3. HIDROLIZA UREE U KOTLASTOM REAKTORU

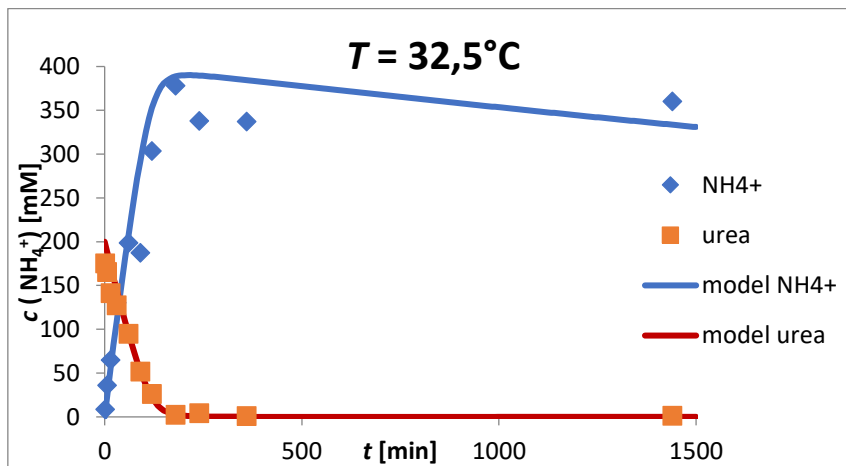
Reakcije hidrolize uree ( $c$  (urea) = 200 mM) uz enzim ureazu ( $c$  (ureaza) = 0,3 mg mL<sup>-1</sup>) u redistiranoj vodi provedene su na temperaturama  $T = 25$  °C,  $T = 32,5$  °C i  $T = 40$  °C u staklenom kotlastom reaktoru. Spektrofotometrijski je praćena koncentracija amonijevih iona tijekom reakcija te su na HPLC-u izmjerene koncentracije uree i dobiveni rezultati su prikazani kao ovisnost koncentracije amonijevih iona i koncentracije uree o vremenu trajanja reakcije pri određenoj temperaturi. Eksperimenti su provedeni kako bi se validirao model pretpostavljen izrazima 4.6., 4.9. i 4.10. Na slici 5.5. a – c grafički su prikazani eksperimentalno dobiveni podaci i podaci dobiveni simulacijom procesa u *Scientist*-u pri različitim temperaturama.



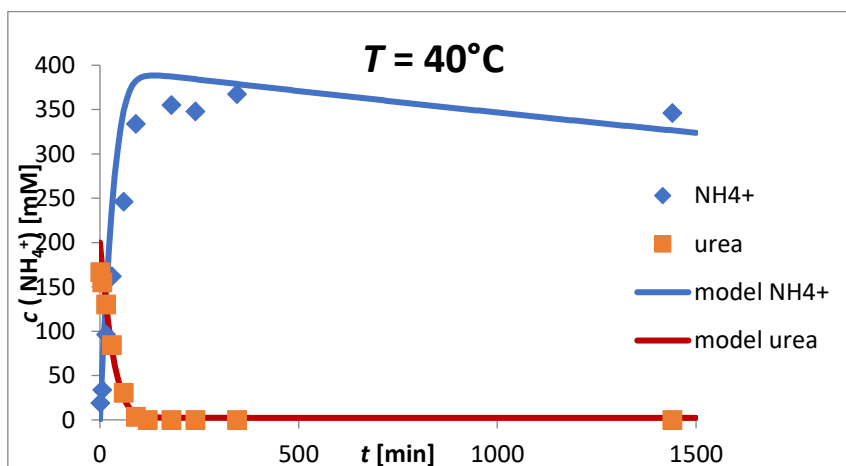
a)



b)



c)



Slika 5.5. a – c Hidroliza uree u kotlastom reaktoru pri različitim temperaturama ( $c(\text{ureaza}) = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ ); a)  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ , b)  $T = 32,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , c)  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$

Tijekom provedbe eksperimenta uočeno je smanjenje koncentracije amonijaka, koja je posljedica njegovog isparavanja. Stoga je u bilancu za amonijak uključena brzina isparavanja istog koja je opisana kinetikom prvog reda (jedn. 4.12.). Deaktivacija enzima ureaze koja je uočena tijekom eksperimenta je opisana kinetikom prvog reda (jedn. 4.15.). Konstante deaktivacije enzima i konstante isparavanja amonijaka za sve tri temperature procijenjene su pomoću programskog paketa *Scientist* i prikazane su u tablici 5.3.

Tablica 5.3. Procijenjene konstante deaktivacije enzima ureaze i konstante isparavanja amonijaka

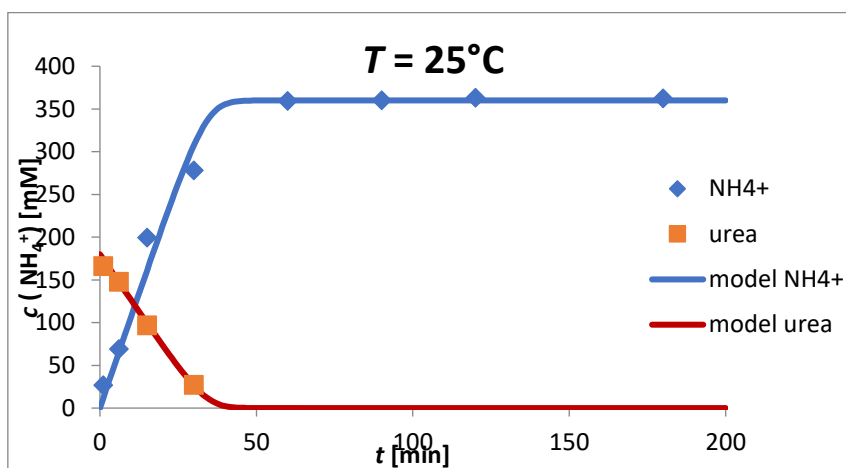
Parametri	25 °C	32,5 °C	40 °C
$k_d$ [min <sup>-1</sup> ]	0,009	0,009	0,037
$k_{isp}$ [min <sup>-1</sup> ]	0,00015	0,00015	0,0015

Što je veća vrijednost konstante deaktivacije to je veća brzina gubitka aktivnosti enzima, te je prema procijenjenim parametrima ta brzina najviša pri temperaturi od 40°C. Brzina isparavanja amonijaka povećava se porastom temperature. Iz usporedbe eksperimentalnih rezultata i rezultata dobivenih simulacijom pomoću modela može se zaključiti da model dobro opisuje eksperimentalne rezultate.

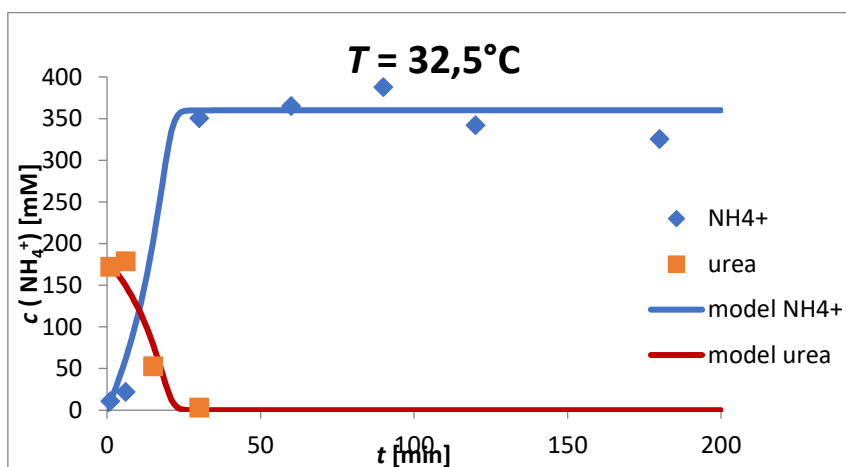
#### 5.4. SINTEZA NANOČESTICA ŽELJEZOVIH OKSIDA U KOTLASTOM REAKTORU

Sinteza nanočestica željezovih oksida provedena je reakcijom hidrolize uree ( $c$  (urea) = 200 mM) uz enzim ureazu ( $c$  (ureaza) = 3 mg mL<sup>-1</sup>) dodatkom željezova (II) klorida ( $c$  (FeCl<sub>2</sub>) = 100 mM) u redestiliranoj vodi pri temperaturama  $T = 25$  °C,  $T = 32,5$  °C i  $T = 40$  °C. Također je spektrofotometrijski praćena koncentracija amonijevih iona tijekom reakcija, potom su koncentracije uree izmjerene na HPLC-u. Eksperimentalno dobiveni podaci i podaci dobiveni simulacijom procesa u *Scientist*-u grafički su prikazani na slici 5.6. a – c. Eksperimenti su provedeni kako bi se potvrdio matematički model pretpostavljen izrazima 4.7., 4.8. i 4.11. – 4.15.

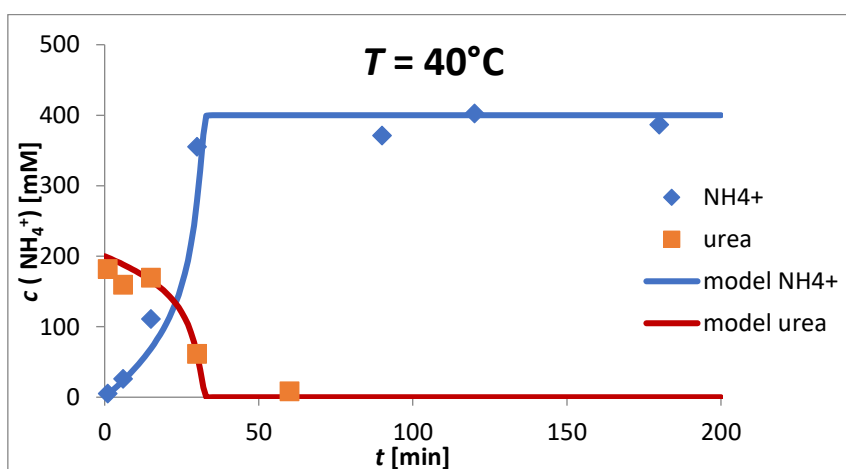
a)



b)



c)

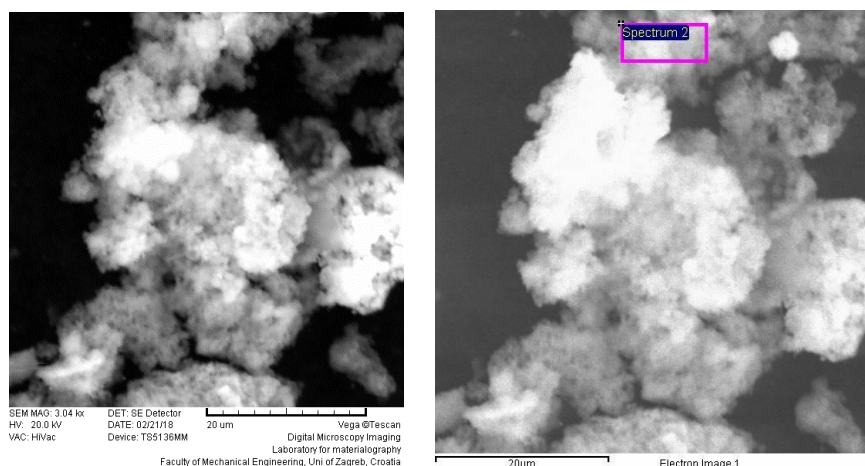


Slika 5.6. a – c Sinteza nanočestica željezovih oksida u reakciji hidrolize uree uz enzim ureazu u kotlastom reaktoru pri različitim temperaturama ( $c(\text{urea}) = 200 \text{ mM}$ ,  $c(\text{CaCl}_2) = 100 \text{ mM}$ ,  $c(\text{ureaza}) = 3 \text{ mg mL}^{-1}$ ): a)  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ , b)  $T = 32,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , c)  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$

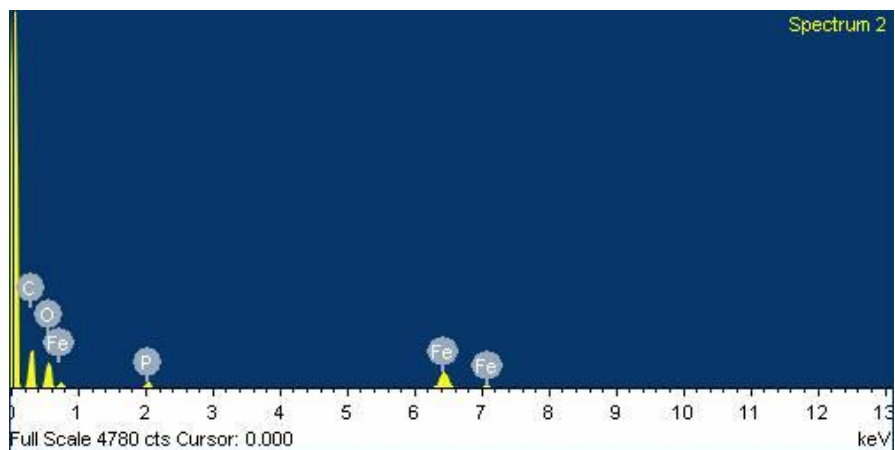
Na temelju navedenih rezultata može se zaključiti da se eksperimentalni podaci dobiveni tijekom provođenja eksperimenata vrlo dobro slažu s podacima dobivenim simulacijom procesa i time možemo potvrditi pretpostavljeni matematički model. Kod eksperimenata provedenih pri temperaturama od 32,5°C i 40°C vidljiva su minimalna odstupanja eksperimentalno dobivenih vrijednosti koncentracije amonijevih iona u odnosu na vrijednosti predviđene modelom. Prilikom sinteze nanočestica željezovih oksida uz hidrolizu uree uz enzim ureazu u kotlastom reaktoru nije uočena deaktivacija enzima, a isparavanje amonijaka bilo je zanemarivo.

## 5.5. KARAKTERIZACIJA DOBIVENIH NANOČESTICA ŽELJEZOVIH OKSIDA POMOĆU PRETRAŽNOG ELEKTRONSKOG MIKROSKOPA S ENERGETSKI DISPERZIVNOM RENDGENSKOM SPEKTROSKOPIJOM

Analizom na pretražnom elektronskom mikroskopu s energetski disperzivnom rendgenskom spektroskopijom dobiveni su prikazi nanočestica željezovih oksida (Slike 5.7. i 5.19.), te njihov elementarni sastav (Slike 5.8. i 5.10.). Snimljene su nanočestice pri koncentraciji enzima ureaze ( $c$  (ureaza) = 3 mg mL<sup>-1</sup>) i temperaturama  $T = 25^{\circ}\text{C}$   $T = 40^{\circ}\text{C}$  (Tablica 3.1., eksperiment 8 i 10) pri povećanju od približno 3000 puta (Slika 5.7. i 5.9.), a maseni udio pojedinih elemenata dan je u tablicama 5.4. i 5.5.



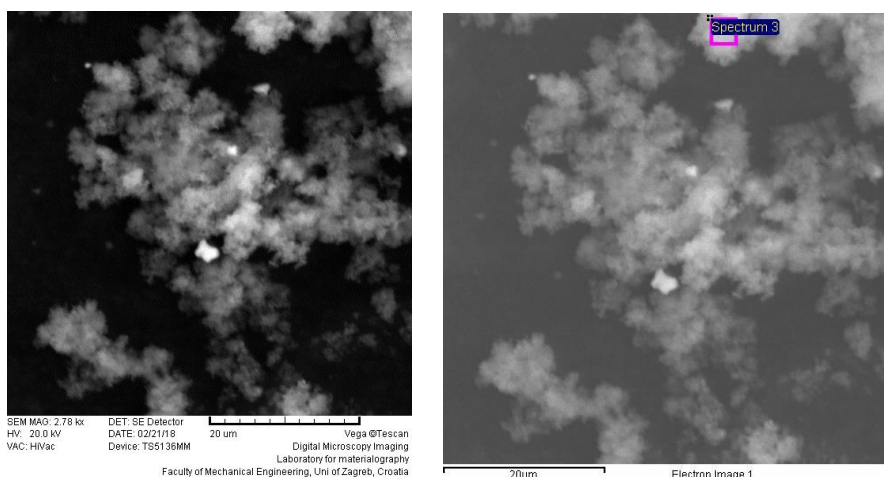
Slika 5.7. SEM snimke čestica željezovih oksida sintetiziranih u redestiliranoj vodi pri  $T = 40^{\circ}\text{C}$  i koncentraciji enzima ureaze  $c$  (ureaza) = 3 mg mL<sup>-1</sup>) (eksperiment 10)



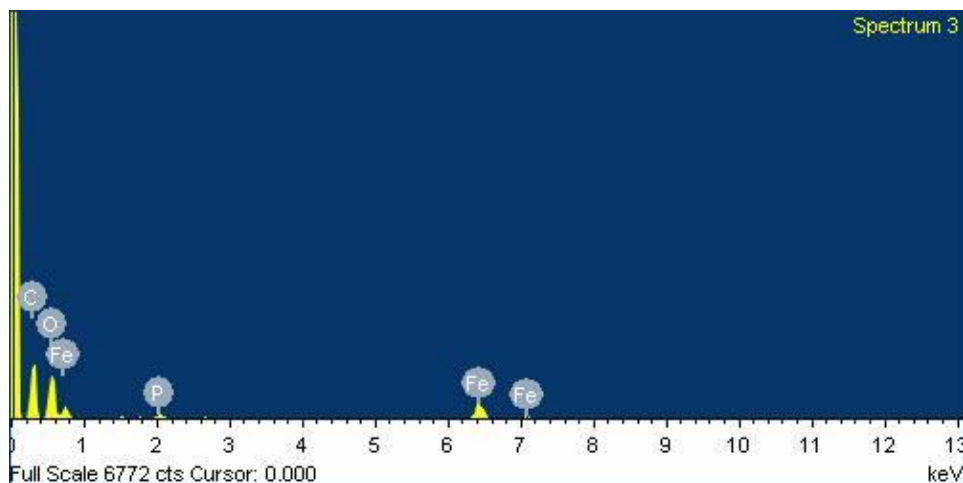
Slika 5.8. EDS spektar površine uzorka čestica željezovih oksida sintetiziranih pri  $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  uz koncentraciju enzima ureaze  $c(\text{ureaza}) = 3\text{ mg mL}^{-1}$  (eksperiment 10)

Tablica 5.4. Maseni udjeli pojedinih elemenata prisutnih u uzorku čestica željezovih oksida (eksperiment 10)

Element	Maseni udio [%]
C	45,25
N	2,50
O	33,48
P	1,50
Cl	0,10
Fe	17,16



Slika 5.9. SEM snimke čestica željezovih oksida sintetiziranih u redestiliranoj vodi pri  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  i koncentraciji enzima ureaze  $c(\text{ureaza}) = 3\text{ mg mL}^{-1}$  (eksperiment 8)



Slika 5.10. EDS spektar površine uzorka čestica željezovih oksida sintetiziranih pri  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  uz koncentraciju enzima ureaze  $c(\text{ureaza}) = 3\text{ mg mL}^{-1}$  (eksperiment 8)

Tablica 5.5. Maseni udjeli pojedinih elemenata prisutnih u uzorku čestica željezovih oksida (eksperiment 8)

Element	Maseni udio [%]
C	45,83
O	41,16
P	0,84
Cl	0,21
Fe	11,96

Unatoč elementima prisutnim u navedenim uzorcima čestica željezovih oksida koji se mogu pripisati eksperimentalnoj pogrešci, može se zaključiti da viša temperatura pogoduje sintezi čestica sa većim udjelom željeza.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju eksperimenata provedenih u svrhu optimizacije sinteze nanočestica željezovih oksida ustanovljeno je da veličina nanočestica pada porastom koncentracije enzima ureaze i porastom temperature. Stoga su nanočestice najmanje veličine dobivene pri  $T = 40^{\circ}\text{C}$  i  $c$  (ureaza) = 3 mg mL<sup>-1</sup>. Koncentracija nanočestica raste porastom koncentracije enzima ureaze, dok promjena temperature nema značajnog utjecaja.

Kod ispitivanja kinetike enzima ureaze potvrđena je pretpostavljena Michaelis – Menteničina kinetika te su u programskom paketu *Scientist* nelinearnom regresijom procijenjeni parametri. Zaključeno je da su vrijednosti maksimalne brzine reakcije  $V_m$  veće pri višoj temperature. Vrijednost Michaelis – Menteničine konstante  $K_m$  ima najnižu vrijednost pri reakciji hidrolize uree na  $T = 40^{\circ}\text{C}$ .. Prema vrijednostima konstante inhibicije supstratom  $K_i^S$  ustanovljeno je da do inhibicije supstratom dolazi povećanjem temperature, te da daljnjim porastom temperature ista se smanjuje.

Ispitivanjem utjecaja željezovih iona na aktivnost enzima ureaze.dobiveno je da željezovi ioni usporavaju reakciju hidrolize uree, odnosno inhibiraju djelovanje enzima ureaze, te je inhibicija opisana kao nekompetitivna. Inhibicija željezovih iona raste porastom temperature.

Prema podacima dobivenim praćenjem hidrolize uree u kotlastom reaktoru nakon potvrđene pretpostavljene Michaelis – Menteničine kinetike zaključeno je da pri  $T = 40^{\circ}\text{C}$  dolazi do smanjenja aktivnosti enzima i veće brzine isparavanja amonijaka, dok se pri temperaturama  $T = 25^{\circ}\text{C}$  i  $T = 32,5^{\circ}\text{C}$  navedeni parametri nisu mijenjali. Prilikom sinteze nanočestica željezovih oksida uz hidrolizu uree uz enzim ureazu u kotlastom reaktoru nije uočena deaktivacija enzima, a isparavanje amonijaka bilo je zanemarivo.

Analizom sintetiziranih čestica željezovih oksida na pretražnom elektronskom mikroskopu s energetski disperzivnom rendgenskom spektroskopijom ustanovljeno je da u eksperimentu vođenim pri  $T = 40^{\circ}\text{C}$  čestice sadrže veći udio željeza u odnosu na eksperiment vođen pri  $T = 25^{\circ}\text{C}$ .

## 7. POPIS SIMBOLA I KRATICA

### Simboli

$V_m$	Maksimalna brzina reakcije [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ]
$k$	konstanta brzine reakcije [ $\text{min}^{-1}$ ]
$K_m$	Michaelis – Menteničina konstanta [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]
$c_s$	koncentracija supstrata [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]
$c_{s0}$	početna koncentracija supstrata [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]
$r_s$	brzina potrošnje supstrata [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ]
$r$	brzina reakcije [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ]
$T$	Temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ]
$V$	Volumen [ $\text{dm}^3$ ]
$c$	koncentracija tvari [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]
$b$	duljina puta svjetlosti kroz uzorak [ $\text{cm}$ ]
$\varepsilon$	molarni apsorpcijski koeficijent [ $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]
$\lambda$	valna duljina zračenja [ $\text{nm}$ ]
$t$	vrijeme [ $\text{min}$ ]
$l$	duljina kolone [ $\text{cm}$ ]
$q$	volumni protok [ $\text{cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ]
$A$	površina pika kromatograma
$A_s$	specifična aktivnost enzima [ $\text{U mg}^{-1}$ ]
rpm	brzina okretaja [okr/min]
$k_{\text{isp}}$	konstanta isparavanja [ $\text{min}^{-1}$ ]
$k_d$	konstanta deaktivacije enzima [ $\text{min}^{-1}$ ]
$k_i^S$	konstanta inhibicije supstratom [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]
$k_i^{\text{Fe}}$	konstanta inhibicije željezovim ionima [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]



## **Kratice**

*E<sub>a</sub>* energija aktivacije katalizirane reakcije

ES kompleks enzim – supstrat

E enzim

S supstrat

P produkt

DOE metoda dizajna eksperimenta (engl. *Design of Experiments*)

ABS apsorbancija

HPLC tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)

NTA metoda praćenja nanočestica (engl. *Nanoparticle Tracking Analysis*)

SEM pretražni elektronski mikroskop (engl. *Scanning Electron Microscope*)

SEM – EDS pretražni elektronski mikroskop uz energetska disperzivnu spektroskopiju

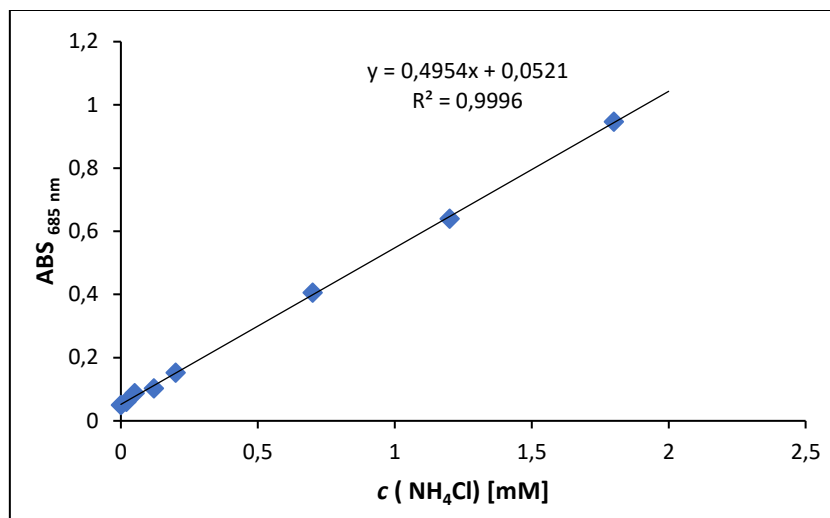
## 8. LITERATURA

- [1] Helland, A., Kastenholz, H., Development of nanotechnology in light of sustainability, *Journal of Cleaner Production*, 16 (2008) 885 – 888.
- [2] Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella Jr, M. F., Rejeski, D., Hull, M. S., Nanotechnology in the real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6 (2015) 1769 – 1780.
- [3] Dwivedi, A. D., Ma, L. Q., Biocatalytic synthesis pathways, transformation, and toxicity of nanoparticles in the environment, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44 (2014) 1679 – 1739.
- [4] Lee, K. J., Jun, B. H., Choi, J., Il Lee, Y., Joung, J., Soo Oh, Y., Environmentally friendly synthesis of organic – soluble silver nanoparticles for printed electronics, *Nanotechnology*, 18 (2007) 1 – 6.
- [5] Sharma, V. K., Yngard, R. A., Lin, Y., Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities, *Advances in Colloid and Interface Science*, 145 (2009) 83 – 96.
- [6] Raveendran, P., Fu, J., Wallen, S. L., Completely „green“ synthesis of metal nanoparticles, *American Chemical Society*, 125 (2003) 13940 – 13941.
- [7] Zubair Awan, I., Hussain, S. B., ul Haq, A., Khan, A. Q., Wondrous nanotechnology, *Chemical Society of Pakistan*, 38 (2016) 1026 – 1055.
- [8] Khan, I., Saeed, K., Khan, I., Nanoparticles: properties, applications and toxicities, *Arabian Journal of Chemistry*, 10 (2017) 439 – 582.
- [9] Saif, S., Tahir, A., Chen, Y., Green synthesis of iron nanoparticles and their environmental applications and implications, *Nanomaterials*, 6 (2016) 209 – 235.
- [10] Li, X., Xu, H., Chen, Z. S., Chen, G., Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications, *Journal of Nanomaterials*, 2011 (2011) 1 – 16.
- [11] Ali, A., Zafar, H., Zia, M., Haq, I. U., Phull, A. R., Ali, J. S., Hussain, A., Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles, *Nanotechnology, Science and Applications*, 9 (2016) 49 – 67.
- [12] Teja, A. S., Koh, P. Y., Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 55 (2009) 22 - 45.

- [13] Xu, P., Zeng, G. M., Huang, D. L., Feng, C. L., Hu, S., Zhao, M. H., Lai, C., Wei, Z., Huang, C., Xie, G. X., Liu, Z. F., Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: a review, *Science of the Total Environment*, 424 (2012) 1 – 10.
- [14] Wu, W., He, Q., Jiang, C., Magnetic iron oxide nanoparticles, synthesis and surface functionalization strategies, *Nanoscale Research Letters*, 3 (2008) 397 – 415.
- [15] Worthington Biochemical Corporation, Manual of clinical enzyme measurements, New Jersey, Worthington Diagnostics, (1972) 1 – 56.
- [16] Eslahi, H., Ghaffari-Moghaddam, M., Khajeh, M., Omay, D., Zakipour-Rahimabadi, E., Motalleb, G., General biography, structure and classification of enzymes, *Research and Reviews in Materials Science and Chemistry*, 3 (2014) 1 – 83.
- [17] Mantsala, P., Niemi, J., Enzymes: the biological catalysts of life, *Physiology and Maintenance*, 2 (2002) 1 – 9.
- [18] Bugg, T.D.H., Introduction to enzyme and coenzyme chemistry - second edition, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, (2004)1 – 20.
- [19] Qin, Y., Cabral, J. M. S., Review properties and applications of urease, *Biocatalysis and Biotransformation*, 20 (2002) 1 – 14.
- [20] Krajewska, B., Ureases I. functional, catalytic and kinetic properties: a review, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59 (2009) 9 – 21.
- [21] Mobley, H. L. T., Hausinger, R. P., Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization, *Microbiological Reviews*, 53 (1989) 85 – 108.
- [22] Muralidhar, K., Khurana, J., Sharma, V., Urease (EC3,5,1,5):a perspective, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (2014) 923 – 948.
- [23] Ciurli, S., Marzadori, C., Benini, S., Deiana, S., Gessa, C., Urease from the soil bacterium *Bacillus pasteurii*: immobilization on capolygalacturonate, *Soil Biology and Biochemistry*, 28 (1996) 811 – 817.
- [24] Dunn, I.J., Heinzle, E., Ingham, J., Prenosil, J.E., Principles, Applications and Modelling with PC Simulations, *Biological Reaction Engineering*, Weinheim 113 (1992) 25 – 31.
- [25] Shaw, W. H. R., The kinetics of enzyme catalyzed reactions, *Journal of Chemical Education*, 34 (1957) 22 – 25.
- [26] Qin, Y., Cabral, J. M. S., Kinetic studies of the urease-catalyzed hydrolysis of urea in a buffer-free system, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 49 (1994) 217 – 239.
- [27] Anthony, J., Design of Experiments for engineers and scientists, Elsevier Science & Technology Books, Waltham (2014) 1 – 49.

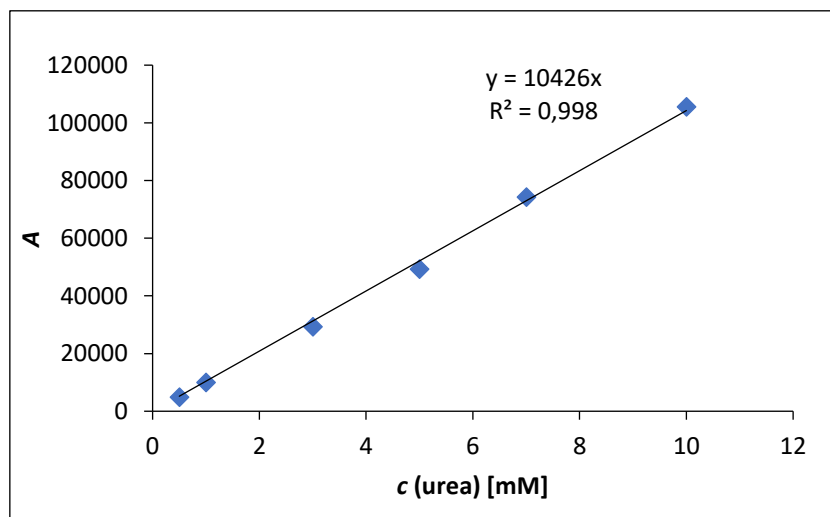
## 9. PRILOZI

### Prilog 1



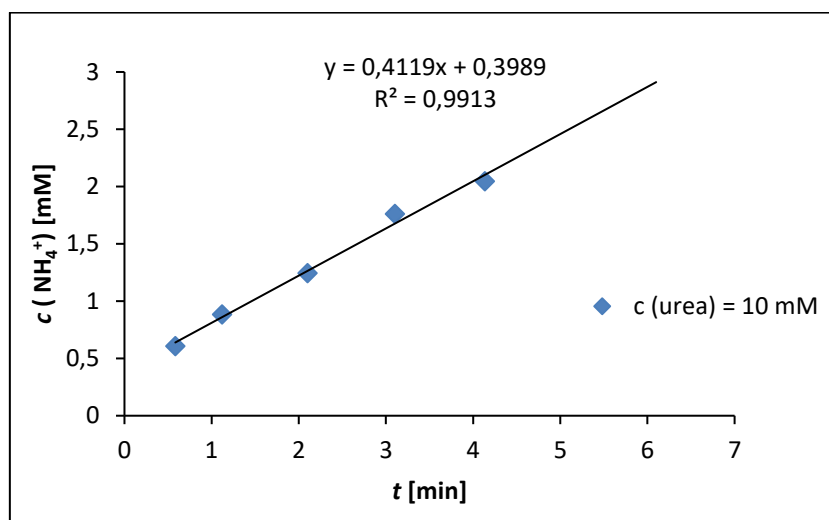
Slika 9.1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije amonijevih iona ( $c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 0 - 2,0 \text{ mM}$ ,  $\lambda = 685 \text{ nm}$ )

### Prilog 2



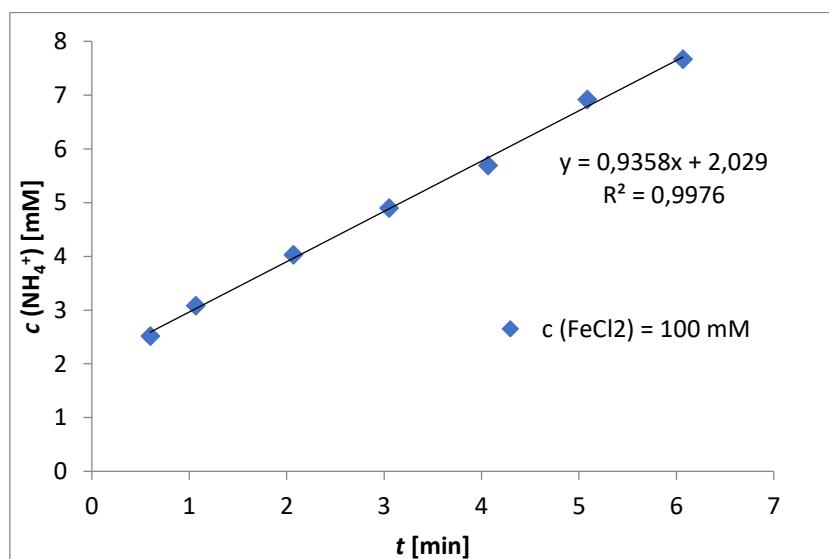
Slika 9.2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije uree ( $c(\text{urea}) = 0,5 - 10 \text{ mM}$ )

### Prilog 3



Slika 9.3. Grafički prikaz promjene koncentracije amonijevih iona u vremenu za početnu koncentraciju uree  $c(\text{urea}) = 10 \text{ mM}$  pri temperaturi  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $c(\text{ureaza}) = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ )

### Prilog 4



Slika 9.4. Grafički prikaz promjene koncentracije amonijevih iona u vremenu za početnu koncentraciju željezovog (II) klorida  $c(\text{FeCl}_2) = 2 \text{ mM}$  pri temperaturi  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $c(\text{ureaza}) = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ )

## 10. ŽIVOTOPIS

Martina Burštinski ██████ ■ ██████ ██████ ██████ ■ ██████ Svoje osnovnoškolsko obrazovanje završava 2007. godine te upisuje Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga u Zagrebu za smjer kozmetičar. Maturirala je 2011. godine s odličnim uspjehom te 2012. godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Ekoinženjerstvo. Stručnu praksu je odradila 2016. godine u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ na odjelu za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu voda. Preddiplomski studij završava 2016. godine i nastavlja obrazovanje na diplomskom studiju Ekoinženjerstvo. Tijekom diplomskog studija provodila je istraživanje u području primjene biokatalize na temu „Optimizacija biokatalitičke sinteze nanočestica cinkovog oksida“, rezultati su objavljeni u zborniku radova 11. znanstveno – stručnog savjetovanja Tekstilna znanost i gospodarstvo u 2018. godini. U sklopu diplomskog rada dobivene rezultate prezentirala je na XII: susretu mladih kemijskih inženjera 2018. godine u Zagrebu.