

Ispitivanje utjecaja procesa aktivacije nosioca na efikasnost imobilizacije

Punčec, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:149:832279>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marina Punčec

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marina Punčec

ISPITIVANJE UTJECAJA PROCESA AKTIVACIJE NOSIOCA NA
EFIKASNOST IMOBILIZACIJE

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof.dr.sc. Ana Vrsalović Presečki
2. prof.dr.sc. Ana Lončarić Božić
3. doc.dr.sc. Marin Kovačić

Zagreb, srpanj 2020.

Veliko hvala mentorici, prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki na pomoći, vremenu i susretljivosti prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Također zahvaljujem asistentu mag. ing. oecoing. Dini Skendroviću za mnogo uloženo vremena, savjeta i strpljenja kako bi eksperimentalni dio bio što bolje odrađen.

Najveće hvala mojim roditeljima, Biserki i Željku, koji su me uvijek bezuvjetno podupirali i suosjećali samnom.

Zahvaljujem se i svojim najbližim kolegama i prijateljima, koji su skupa samnom proživljavali sve sretne i ponekad teške trenutke tokom studiranja.

ISPITIVANJE UTJECAJA PROCESA AKTIVACIJE NOSIOCA NA EFIKASNOST IMOBILIZACIJE

Sažetak

DERA (deoksiriboza-5-fosfat aldolaza) je enzim iz skupine aldolaza, izoliran iz životinjskog tkiva i mikroorganizama. Katalizira reakciju sinteze (3R, 5R)-6-kloro-3,5-dihidroksi heksanala (laktola), prekursora u proizvodnji statina, aldolnom adicijom dvije molekule acetaldehida i jedne molekule kloroacetaldehida. U navedenoj reakciji, znatno je izražena deaktivacija enzima, uzrokovana visokim koncentracijama aldehida u sustavu.

Cilj ovog rada bio je imobilizirati enzim DERA-u na magnetske nanočestice obložene silikom u svrhu povećanja njezine stabilnosti u prisustvu aldehida, a zatim ispitati utjecaj procesa aktivacije nosioca na efikasnost imobilizacije. Ispitan je utjecaj dvaju reagensa za aktivaciju nosioca: benzokinona i sukcinid anhidrida, te temperature i pH - parametara koji imaju znatan utjecaj na proces imobilizacije. Prilikom imobilizacije, kao najbolje sredstvo za aktivaciju pokazao se benzokinon, a najveća efikasnost imobilizacije enzima DERA-e je postignuta pri temperaturi od 20 °C i pH 6.

Ključne riječi: deoksiriboza-5-fosfat aldolaza, DERA, imobilizacija enzima, magnetske nanočestice, benzokinon, sukcinid anhidrid, deaktivacija enzima

INVESTIGATION OF CARRIER ACTIVATION ON THE IMMOBILISATION EFFICIENCY

Abstract

DERA (deoxyribose-5-phosphate aldolase) is an enzyme from the aldolase group, isolated from animal tissue and microorganisms. It catalyses the synthesis of statin precursor, (3R, 5R) -6-chloro-3,5-dihydroxy hexanal (lactol) in the reaction of the aldol addition of two acetaldehyde and one chloroacetaldehyde. In this reaction, enzyme deactivation is significant and it's caused by high concentrations of aldehydes in the system.

The aim of this work was to immobilise the enzyme DERA on silica-coated magnetic nanoparticles in order to increase its stability in the presence of aldehydes, and to examine the impact of the carrier activation process on the immobilisation efficiency. The influence of two activation agents was investigated: benzoquinone and succinic anhydride, as well as temperature and pH, which have a significant impact on immobilisation process. During immobilisation, benzoquinone proved to be the best activation agent, and the the highest efficiency of immobilisation process was achieved at the temperature of 20 °C and pH 6.

Key words: *deoxyribose-5-phosphate aldolase, DERA, enzyme immobilisation, magnetic nanoparticles, benzoquinone, succinic anhydride, enzyme deactivation*

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO.....	3
2.1. Enzimi.....	3
2.1.1. Aldolaze.....	6
2.1.2. DERA (2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza).....	7
2.2. Imobilizacija enzima.....	10
2.2.1. Metode imobilizacije.....	11
2.2.2. Kovalentna imobilizacija.....	13
2.2.3. Aktivacija i funkcionalizacija nosioca.....	14
2.3. Nosioci za imobilizaciju.....	16
2.3.1. Magnetske nanočestice.....	17
2.3.2. Stöberov proces.....	19
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	20
3.1. Aparatura.....	20
3.1.1. Centrifuga.....	20
3.1.2. Tresilica.....	20
3.1.3. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC).....	22
3.1.4. Spektrofotometar.....	23
3.1.5. Magnetska miješalica s grijačem.....	24
3.2. Analitičke metode.....	25
3.2.1. Određivanje koncentracije proteina Bradfordovom metodom.....	25
3.2.2. Određivanje aktivnosti enzima DERA-e.....	26
3.2.3. Određivanje koncentracije reaktanata i produkata na HPLC uređaju.....	26
3.3. Sinteza nanočestica i oblaganje silikom po Stöber procesu.....	27
3.4. Funkcionalizacija, aktivacija i imobilizacija enzima.....	28
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	29
4.1. Ispitivanje aktivnosti slobodnog enzima.....	31
4.2. Sinteza magnetskih nanočestica.....	32
4.3. Utjecaj reagensa za aktivaciju na uspješnost procesa imobilizacije.....	33
4.3.1. Imobilizacija enzima DERA-e na nosiocu, aktiviranim s benzokinonom.....	33
4.3.2. Imobilizacija enzima DERA-e na nosiocu, aktiviranim sukcinid anhidridom.....	36

4.3.3. Usporedba utjecaja agensa za aktivaciju nosioca na uspješnost imobilizacije enzima DERA.....	39
4.4. Rezultati ispitivanja utjecaja pH i koncentracije pufera na uspješnost imobilizacije enzima	43
4.5. Ispitivanje utjecaja temperature na uspješnost imobilizacije enzima.....	50
5. ZAKLJUČAK.....	53
6. LITERATURA	54
7. PRILOZI.....	56
8. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA	58
9. ŽIVOTOPIS.....	60

1. UVOD

Od davnina, izrada prehrambenih i alkoholnih proizvoda ovisi o mikroorganizmima koji su opisani u drevnim tekstovima Babilona, Grčke, Egipta, Kine i Indije.¹ Važni dijelovi mikroorganizama su enzimi, biološki katalizatori koji ubrzavaju reakcije u živim organizmima.² Međutim, drevni načini proizvodnje su se oslanjali na opažanja i opetovana iskustva, a ne na znanstvena i tehnološka istraživanja. Početkom devetnaestog stoljeća znanstvenici su počeli istraživati enzime na sistematičniji način. Došlo je do presudnih otkrića u znanosti: princip „ključa i brave“ kojeg je 1890. godine predložio Fisher, definiranje pojma katalizatora (Ostwald, 1893.), Buchner je 1897. objasnio kako enzimi mogu obitavati i izvan stanice, 1926. godine je Sumner dokazao da su enzimi proteini.¹

Dvadeseto stoljeće je donijelo velike napretke u enzimskoj tehnologiji. Najveće tehnološko postignuće među njima jest izolacija enzima iz mikroorganizama, a nakon tog otkrića uslijedila je imobilizacija enzima, korištenje enzima u nekonvencionalnim medijima i rekombinantna DNA tehnologija.¹ Razvoj enzimске tehnologije omogućio je da se enzimi koriste i proizvode naveliko, ne samo u prehrambene svrhe, već da zadovolje i mnoge druge ljudske potrebe. Proizvodnja finih kemikalija (npr. aminokiselina, vitamina) i lijekova je ovisna o enzimima, a koriste se i kao pomoćna sredstva u procesu pranja, zaštiti okoliša ili u analitičke i dijagnostičke svrhe.³

Statini su lijekovi koji su revolucionirali liječenje hiperkolesterolemije, odnosno stanja povišene koncentracije kolesterola u organizmu. Najčešće su propisana sredstva za liječenje ove bolesti, zbog svoje učinkovitosti u smanjenju koncentracije lipoproteina male gustoće (LDL - *low density lipoproteins*).⁴ Visoka razina LDL kolesterola povezana je s aterosklerozom, tj. nakupljanjem masnih naslaga bogatih kolesterolom u arterijama. To može dovesti do sužavanja ili blokiranja arterija, usporavanja ili zaustavljanja protoka krvi do vitalnih organa, posebno srca i mozga. Ateroskleroza koja zahvaća srce naziva se koronarna bolest arterija i može izazvati srčani udar. Kad ateroskleroza blokira arterije koje opskrbljuju mozak krvlju, može uzrokovati i moždani udar.⁵

Posljednjih godina pozornost privlači enzim DERA (2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza), iz obitelji aldolaza, koja katalizira sintezu ključnog fragmenta za dobivanje statinskih lijekova poput atorvastatina (Lipitor).^{6,7,8,9} DERA katalizira slijednu reakciju dvije molekule acetaldehida na

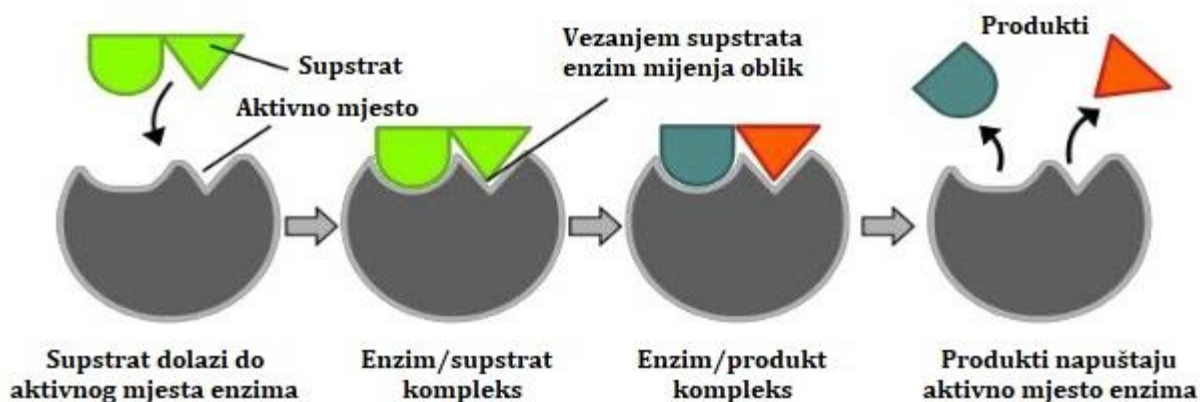
akceptor aldehid i omogućuje uvođenje dva stereo-centra u jednom koraku što ju čini vrlo atraktivnom za sintezu statina.⁸ Međutim, praktična primjena DERA-e ograničena je njenom slabom tolerancijom prema industrijski relevantnim koncentracijama aldehida, posebno acetaldehida.^{6,8} Stoga je nužan razvoj eksperimentalnih metoda koji bi enzim učinili stabilnim i isplativim za industrijski proces.

Imobilizacija enzima je učestalo korištena metoda u posljednja četiri desetljeća za poboljšanje aktivnosti, stabilnosti i specifičnosti enzima u svrhu njihovog uspješnog korištenja u industrijskim procesima.¹⁰ Imobilizacijom se enzimi fiksiraju na čvrstim nosiocima ili unutar njih, stvarajući heterogeni reakcijski enzimski sustav.¹¹ Metoda imobilizacije primijenjena u ovom radu jest kovalentna imobilizacija, a kao nosioci sintetizirane su magnetske nanočestice, zbog svoje velike površine, visokog omjera površine i volumena te lakoće razdvajanja pod utjecajem vanjskog magnetskog polja.¹⁰

2. OPĆI DIO

2.1. Enzimi

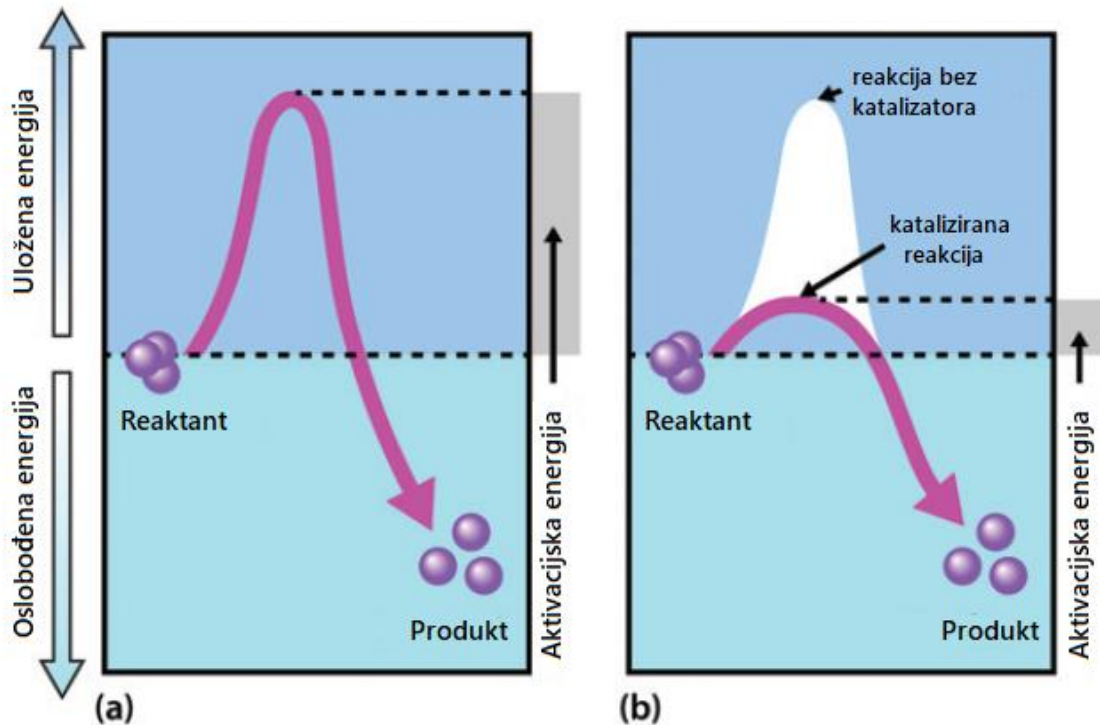
Enzimi su biološki katalizatori (tzv. biokatalizatori) koji ubrzavaju biokemijske reakcije u živim organizmima. Mogu se izolirati iz stanica i zatim koristiti za kataliziranje širokog raspona komercijalno važnih procesa. Imaju široki spektar primjene, te na primjer, imaju važnu ulogu u proizvodnji zaslađivača i pri modifikaciji antibiotika, koriste se u prašcima za pranje odjeće i raznim proizvodima za čišćenje, a igraju ključnu ulogu u analitičkim uređajima i testovima koji imaju kliničku, forenzičku i ekološku primjenu. Kao katalizatori, enzimi su potrebni u vrlo niskim koncentracijama, a iz reakcije izlaze nepromijenjeni. Osim što su vrlo učinkoviti katalizatori, enzimi su također specifični po tome što općenito kataliziraju pretvorbu samo jednog tipa (ili nekoliko sličnih tipova) molekula supstrata u molekule produkta.¹²



Slika 1. Mehanizam enzimske reakcije.¹³

Princip djelovanja enzima kao katalizatora prikazan je na Slici 1. Nakon što supstrat dođe do aktivnog mjesta enzima, dolazi do nastanka enzim/supstrat kompleksa. Kompleks predstavlja položaj u kojem je supstrat vezan za enzim. Tijekom ovog postupka supstrat se pretvara u srednji oblik (koji se često naziva prijelazno stanje), a zatim u produkt. Točan mehanizam pomoću kojeg enzim djeluje na reakcijski put razlikuje se ovisno o reakciji koju enzim katalizira. Međutim, opće

načelo je da vezanjem na enzim, reakcija koja uključuje supstrat postaje povoljnija jer se smanjuje energija aktivacije potrebna za pokretanje reakcije,¹² što je shematski prikazano Slikom 2.



Slika 2. Razlika u energiji aktivacije potrebnoj za pokretanje reakcije između (a) nekatalizirane reakcije i (b) katalizirane reakcije.¹²

Neki enzimi pokazuju grupnu specifičnost, npr. alkalna fosfataza može ukloniti fosfatnu skupinu iz različitih supstrata. Drugi enzimi pokazuju apsolutnu specifičnost npr. glukoza oksidaza pokazuje gotovo ukupnu specifičnost za svoj supstrat, β -D-glukozu, i praktički bez aktivnosti s bilo kojim drugim monosaharidima.¹²

Iako se veliki broj enzima sastoji isključivo od proteina, mnogi također sadrže ne-proteinsku komponentu, poznatu kao kofaktor, koja je potrebna za katalitičku aktivnost enzima. Kofaktor može biti druga organska molekula, odnosno koenzim, ili anorganska molekula, tipično metalni ion poput željeza, mangana, kobalta, bakra ili cinka. Kada enzim zahtijeva kofaktor za svoju aktivnost, inaktivna proteinska komponenta se općenito naziva apoenzim, a apoenzim plus

kofaktor (tj. aktivni enzim) naziva se holoenzim. Potreba za mineralima i vitaminima u ljudskoj prehrani dijelom se može pripisati njihovoj ulozi unutar metabolizma kao kofaktora i koenzima.¹²

Mala količina enzima koja se može proizvesti u kratkom vremenu u malom proizvodnom pogonu naveliko pogoduje uporabi mikroorganizama kao izvora enzima. Iako su mnogi industrijski procesi (npr. proizvodnja sira) tradicionalno koristili nečiste izvore enzima, često od životinja ili biljaka, razvoj moderne industrijske enzimologije išao je u korak s komercijalnim iskorištavanjem mikrobnih enzima.¹²

Trenutno se enzimi koriste u četiri različita područja trgovine i tehnologije:

- kao industrijski katalizatori
- kao terapijska sredstva
- kao analitički reagensi
- kao alat za manipulaciju (npr. u genetici)

Od tisuća različitih vrsta enzima, oko 95% je dostupno od dobavljača u količinama u rasponu od µg do kg, koje se uglavnom daju u istraživačke svrhe. Oko 40-50 enzima proizvodi se u industrijskim razmjerima (tj. u rasponu od više kilograma do tona godišnje). Na globalnom tržištu enzima trenutno dominiraju hidrolaze, proteaze, zajedno s amilazama, celulazama i lipazama koje se isporučuju ili kao tekući koncentracije ili kao prašci ili granule koje oslobađaju topive enzime.¹² Tablica 1 prikazuje neke konkretne industrijske primjene enzima.

Tablica 1. Industrijska primjena enzima.¹

PROIZVOD	ENZIM
Glukozno-fruktozni sirup (HFCS)	Glukoza izomeraza
Mlijeko bez laktoze	Laktaza
Akrilamid	Nitrilaza
Kakao maslac	Lipaza (CRL)
Aspartam (zaslađivač)	Termolizin
Nikotinamid	Nitrilaza
Ampicilin (antibiotik)	Penicilin amidaza
(S)-metoksiizopropilamin	Lipaza

2.1.1. Aldolaze

Aldolaze pripadaju liazama, skupini enzima koji kataliziraju reakcije adicije skupina na dvostruku vezu, kao što je prikazano Tablicom 2.

Tablica 2. Klasifikacija liaze.¹

Vrsta	Podvrsta	Vrsta reakcije	Primjer – aldolaza (ramnuloza fosfat aldolaza) ¹⁷
Liaza	Dekarboksilaza	Adicija skupine na dvostruku vezu.	
	Aldolaza		
	Ketolaza		
	Hidrataza		
	Dehidrataza		
	Polisaharid liaza		
	Amonijak liaza		

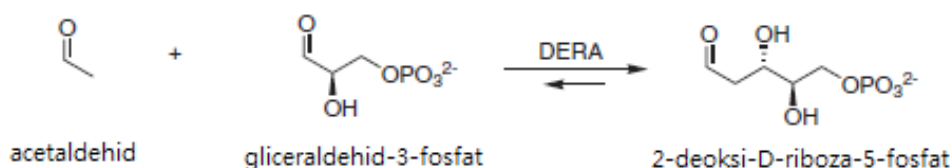
Aldolna kondenzacija je središnja vrsta reakcije u sintetskoj kemiji i kemiji staničnog metabolizma, a najčešće se primjenjuje za sintezu polihidroksiliranih spojeva s novim kiralnim centrima. Alhidi su posebno važni kao donorske molekule za ove adicijske reakcije, zbog činjenice da formiraju druge aldehide kao produkte. Dobiveni produkti se mogu lako podvrgnuti daljnjim reakcijama adicije koje dovode do sve složenije strukture. Do danas je istraženo više od 30 različitih aldolaza, koje su razvrstane u dvije glavne klase.¹⁴

Aldolaze klase I aktiviraju svoje donorske supstrate formiranjem Schiff-ovih baza sa strogo očuvanim aktivnim mjestima lizina. Enamin tautomer nastaje na aktivnom mjestu i zatim napada, s velikom selektivnošću, odgovarajuću stranu vezanog akceptora aldehida. Enzim vezan na iminu se zatim hidrolizira i oslobađa produkt.⁷

Kod aldolaza klase II, metalni kofaktor je vezan na aktivno mjesto enzima. Ovaj vezani metalni ion, obično Zn^{2+} (ponekad Co^{2+} ili Fe^{2+}), djeluje kao Lewisova kiselina koja aktivira vezani donorski supstrat. Aldolaze vežu svoje donorske supstrate s visokom specifičnošću i općenito neće prihvatiti druge donore, čak i ako su njihove strukture slične. Ova stroga specifičnost donora predstavlja funkcionalnu osnovu za klasificiranje aldolaza.⁷

2.1.2. DERA (2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza)

2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza (DERA) je aldolaza klase I, monomer od 28 kDa, protein koji se sastoji od 259 aminokiselina. Ključni je enzim u pentoza fosfatnom putu *E. coli*, budući da katalizira reverzibilno cijepanje 2-deoksi-D-riboze-5-fosfata u gliceraldehid-3-fosfat i acetaldehid, kao što prikazuje Slika 3.¹⁴



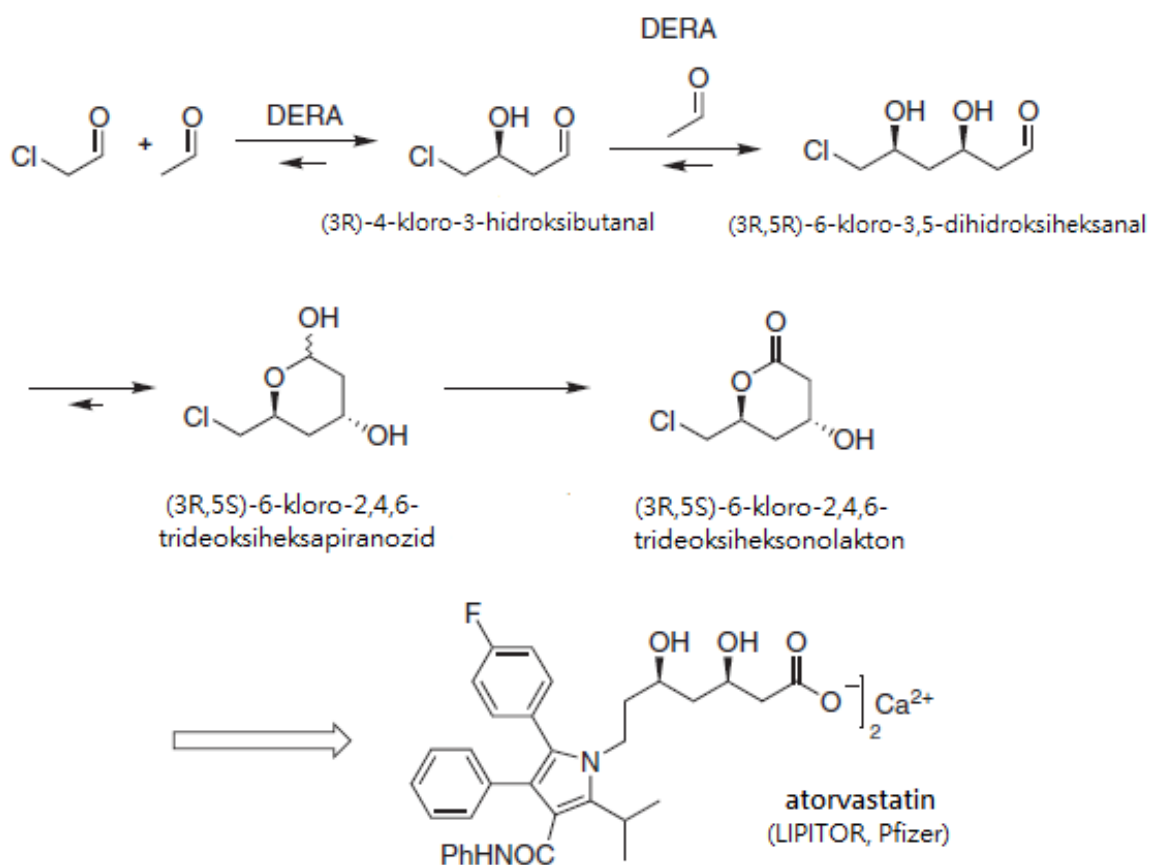
Slika 3. Konverzija 2-deoksi-D-riboze-5-fosfata, *in vivo* reakcija katalizirana DERA-om.⁹

Tijekom godina DERA je identificirana u širokom rasponu biljnih i životinjskih tkiva, a kod ljudi je najizraženija u stanicama pluća i jetre gdje je uključena u odgađanje ili minimiziranje oštećenja uzrokovanog stresom unutar stanice. Rendgenske strukture DERA-e pokazale su da ovaj enzim postoji kao dimer unutar kristala. Uspoređivane su kristalne strukture DERA-e od različitih organizama i opaženo je da je molekula vode prisutna u svim kristalnim strukturama, što ukazuje na važnost vode u njenom katalitičkom mehanizmu.⁶

DERA je jedini poznati član obitelji aldolaze koji koristi acetaldehid kao nukleofil te jedina aldolaza za koju se zna da prihvaća tri aldehida na sekvencijski i stereoselektivni način za kaskadnu reakciju aldola bez upotrebe bilo kojeg kofaktora. Također, DERA prihvaća široki raspon akceptorskih aldehida, ima vrlo visoku donorsku toleranciju na molekule koje sadrže do četiri ugljikova atoma i u reakcijama stvara (*R*)-konfigurirane kiralne centre.⁸

Korištenjem DERA-e postignuta je sinteza kiralnih trideoksiheksoza koje postižu izuzetno visoke tržišne cijene i zahtijevaju visoku kemijsku i stereokemijsku čistoću. Također, DERA omogućuje uvođenje dva stereo-centra u jednom koraku što ju čini izuzetno povoljnom za primjenu.⁸ Dobiveni kiralni spoj 2,4,6-trideoksiheksoza predstavlja vrijedni kiralni intermedijer u proizvodnji važnih skupina farmaceutika koji se koriste za snižavanje kolesterola.^{8,9}

Reakcijski mehanizam kataliziran DERA-om se odvija tako da jedna molekula kloroacetaldehida reagira s jednom molekulom acetaldehida pri kojoj nastaje međuprodukt (3*R*)-4-kloro-3-hidroksibutanal. Međuprodukt reagira s još jednom molekulom acetaldehida pri čemu nastaje (3*R*,5*R*)-6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal, kao što je prikazano Slikom 4. (3*R*,5*R*)-6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal ciklizira u (3*R*,5*S*)-6-kloro-2,4,6-trideoksiheksapiranozid, ključnu kiralnu molekulu za dobivanje statinskih lijekova poput atorvastatina (Lipitor).^{6,8,9}



Slika 4. Kaskadna reakcija katalizirana DERA-om, kojom nastaje (3*R*,5*S*)-6-kloro-2,4,6-trideoksiheksapiranozid, ključna kiralna molekula za statinske lijekove poput atorvastatina (Lipitor).⁹

U ovom radu proveden je dio prikazanih sljedova reakcija (dobivanje (3*R*,5*R*)-6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala), koji je kataliziran enzimom DERA-e, uz slobodni i imobilizirani enzim.

Iako reakcije katalizirane DERA-om nude privlačnu alternativu kemijskih metoda za sintezu prekursora bočnog lanaca statina, praktična primjena DERA-e kao biokatalizatora ograničena je njegovom slabom tolerancijom prema industrijski relevantnim koncentracijama aldehida, posebno acetaldehida.^{6,18} Kako bi dobili koncentraciju produkta koja je industrijski prihvatljiva, minimalna koncentracija koja bi se trebala proizvesti je 50 g L⁻¹. Visoke koncentracije aldehida i kloroacetaldehida koje se trebaju koristiti za proizvodnju (otprilike 600 mM odnosno 300 mM) jako destabiliziraju DERA-u.

Radi toga je poboljšavanje svojstava enzima kao što su aktivnost i stabilnost jedan od glavnih zadataka znanstvenika i enzimske tehnologije. Prijeko je potreban razvoj ispravnih eksperimentalnih uvjeta, poput imobilizacije na odgovarajućim nosiocima.⁶

2.2. Imobilizacija enzima

Pri provedbi enzimskih procesa važno je održavati fiziološke uvjete - što sličnije onima u živoj stanici: temperature blizu sobne, atmosferski tlak, fiziološki pH i razrijeđene vodene otopine. Međutim, pri takvim uvjetima može se postići samo niska produktivnost, a većina kemijskih procesa zahtijeva provođenje reakcija u uvjetima koji su različiti od fizioloških (visoki tlakovi i temperature). Uz to, inženjeri žele dobro iskoristiti biokatalizator i postići visoku produktivnost. Kao posljedica promjene reakcijskih uvjeta dolazi do pada aktivnosti biokatalizatora.² Radi toga su nužna poboljšanja stabilnosti enzima, koja rješavaju problem pada aktivnosti i povećavaju njihovu praktičnu primjenu. Jedna od metoda kojom se to postiže jest imobilizacija enzima, kojom se enzimi fiksiraju na čvrstim nosiocima ili unutar njih, stvarajući heterogeni imobilizirani enzimski sustav.¹¹ Tablica 3 ukazuje na glavne razlike između korištenja slobodnog i imobiliziranog enzima.

Tablica 3. Usporedba korištenja slobodnog i imobiliziranog enzima.¹

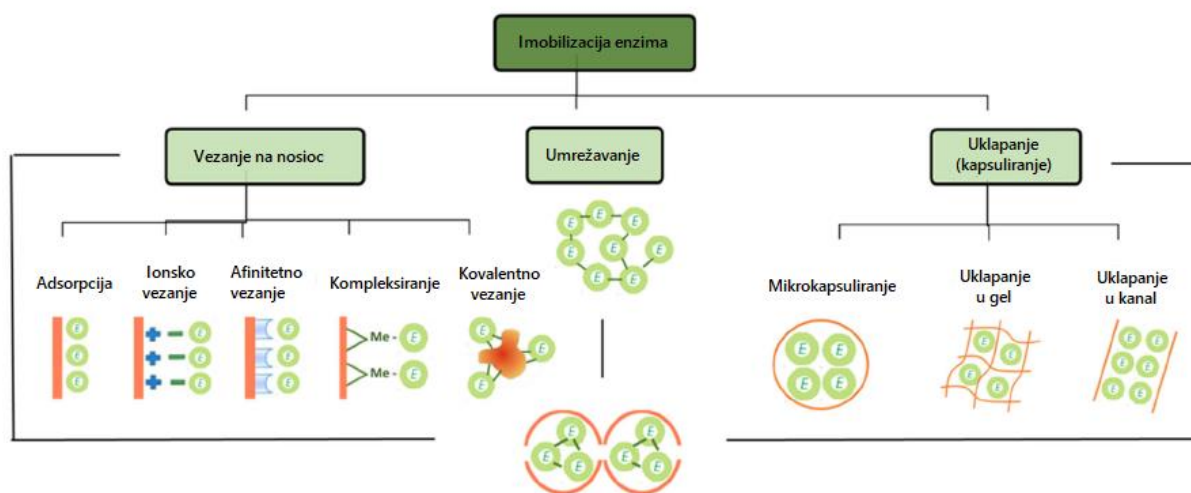
Slobodni enzim	Imobilizirani enzim
Otežana separacija i ponovno korištenje.	Nije potrebna separacija od produkta.
Cijena enzima je uglavnom visoka.	Mogu se koristiti više puta, što ih čini isplativijima.
Na aktivnost utječu pH, temperatura i ostali radni uvjeti.	Mogućnost mijenjanja svojstava: aktivnosti, temperaturnog intervala, optimalnog pH.

Postoji nekoliko čimbenika koje treba uzeti u obzir pri odabiru metode enzimske imobilizacije:

- Tolerancija enzima prema kemijskoj i fizičkoj imobilizacijskoj okolini.
- Vrsta površinskih funkcionalnih skupina na proteinu.
- Veličina enzima.
- Naboj proteina i izoelektična točka.
- Polaritet proteina (hidrofobne / hidofilne regije).
- Potrebe prijenosa supstrata / produkta.¹⁵

2.2.1. Metode imobilizacije

Metode imobilizacije enzima se ugrubo mogu svrstati u dvije skupine: fizikalne metode i kemijske metode, ovisno o tome dolazi li do stvaranja kemijskih veza tokom postupka imobilizacije. Slika 5 shematski prikazuje metode imobilizacije enzima: vezanje na nosioc, umrežavanje te uklapanje (kapsuliranje).



Slika 5. Shematski prikaz metoda imobilizacije.¹⁰

Vezanje na nosioc fizikalnim metodama prodrumijeva adsorpciju, ionsko vezanje i afinitetno vezanje. Postiže se međumolekularnim silama kao što su van der Waalove sile, vodikove veze, hidrofilne, hidrofobne i elektostatske interakcije. Rezultat je nakupljanje biokatalizatora na čvrstu površinu (nositel). Adsorpcija ovisi o međumolekularnim interakcijama između nosioca i enzima, pa su svojstva poput naboja enzima i polariteta presudne da bi se osigurala visoka pokrivenost enzima na nosiocu i ponovljivost imobilizacije. Međutim, kod adsorpcije se često javlja ispiranje enzima s površine tokom vremena i to predstavlja nedostatak ove metode.¹⁵ Adsorpcija je i dalje široko primijenjena naspram drugih metoda zbog mnogih prednosti kao što su blagi uvjeti pripreme, niski troškovi, visoka aktivnost te nema kemijske reakcije.¹

Umrežavanje biokatalizatora je način imobilizacije bez nosioca te uključuje udruživanje stanica mikroorganizama ili enzima bliže jedno drugome kako bi naposljetku formirali

trodimenzionalnu strukturu. To se može postići fizikalnom ili kemijskom metodom. Kemijske metode uključuju stvaranje kovalentne veze između stanica pomoću bifunkcionalnih ili multifunkcionalnih reagensa kao što su glutaraldehid ili toluen diizocijanat. Navedeni su reagensi skupi i toksični za žive stanice, čime im se uporaba ograničava.² Kombiniranjem drugih metoda s umrežavanjem mogu se poboljšati mehanička stabilnost i jednostavnost rukovanja, npr. umrežavanjem enzima u gel matrici ili na nosiocu. Međutim, upotreba nosioca dovodi do nepovratnog „razrjeđivanja aktivnosti“, zbog uvođenja velikog dijela nekatalitičkog materijala, što rezultira manjom učinkovitosti imobilizacije.¹⁰

Uklapanjem se enzimi skupljaju u šupljinama matrice ili mikrokapsule načinjene od polimera. Koriste se sintetički polimeri kao što su poliakrilamid i polivinil alkohol ili prirodni polimeri poput kalcijevog alginata i karagenana. U posljednje vrijeme u tu se svrhu upotrebljava sol-gel polimerizacija gdje se koriste anorganski materijali. Ova metoda obično smanjuje „curenje“ enzima i poboljšava stabilizaciju, ali rezultira ograničenjem prijenosa mase supstrata i produkta.¹

Mikrokapsuliranje je proces u kojem se biokatalizatori smještaju unutar sferične polupropusne kapsule ili polimerne membrane. U tom je smislu slično uklapanju u gel, jer su biokatalizatori slobodni u otopini, ali ograničeni kretanjem u prostoru. Kapsula ima tekuću jezgru unutar koje plivaju enzimi ili cijele stanice. Struktura membrane je takva da sprječava izlaz biokatalizatora iz kapsule, a omogućava ulaz i izlaz supstrata i produkta. Prednost ovog načina imobilizacije jest u činjenici da biokatalizator praktički ostaje u svom prirodnom okruženju, te ukoliko je u takvom okruženju stabilan, bit će stabilan i unutar membrane.²

2.2.2. Kovalentna imobilizacija

Kovalentne veze obično osiguravaju najčvršće veze između enzima i nosioca, u usporedbi s drugim vrstama imobilizacije enzima kao što je npr. adsorpcija. Kovalentno vezanje enzima na nosioc zasniva se na kemijskoj reakciji između aktivnih funkcionalnih grupa aminokiselina koji se nalaze na površini enzima i aktivnih funkcionalnih grupa koje su pričvršćene na nosivu površinu.¹⁶ Najčešće funkcionalne grupe enzima koje reagiraju su: amino-skupina lizina ili arginina, karboksilna grupa aspartatne kiseline ili glutamične kiseline, hidroksilna skupina serina ili treonina i sulfhidrilna grupa cisteina. Preko navedenih aktivnih grupa i funkcionalnih grupa na površini nosioca, moguće je stvoriti jaku vezu s čvrstom površinom pri čemu kasnije ne dolazi do odvajanja enzima od podloge.²

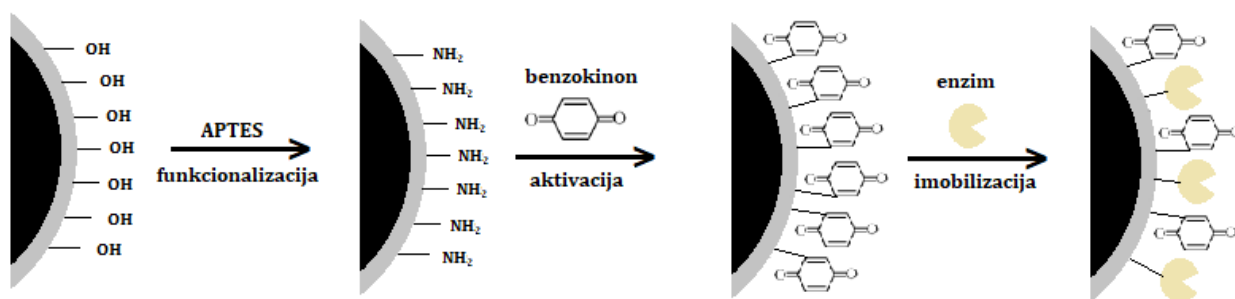
Svojstva koja utječu na uspješnost primjene kovalentno imobiliziranog enzima na nosiocu:

- Fizička priroda nosioca (npr. veličina pora, veličina čestica, poroznost, oblik itd.).
- Kemijska priroda nosioca (kemijski sastav temelja nosioca, aktivna funkcionalnost, ostale neaktivne funkcionalnosti).
- Priroda kemije vezanja.
- Konformacija enzima u trenutku kad je imobiliziran ili nakon imobilizacije.
- Orijentacija enzima.
- Svojstva medija koji se koristi za vezanje enzima.
- Broj veza formiranih između enzima i nosioca.
- Raspodjela enzima na ili unutar nosioca.¹⁶

2.2.3. Aktivacija i funkcionalizacija nosioca

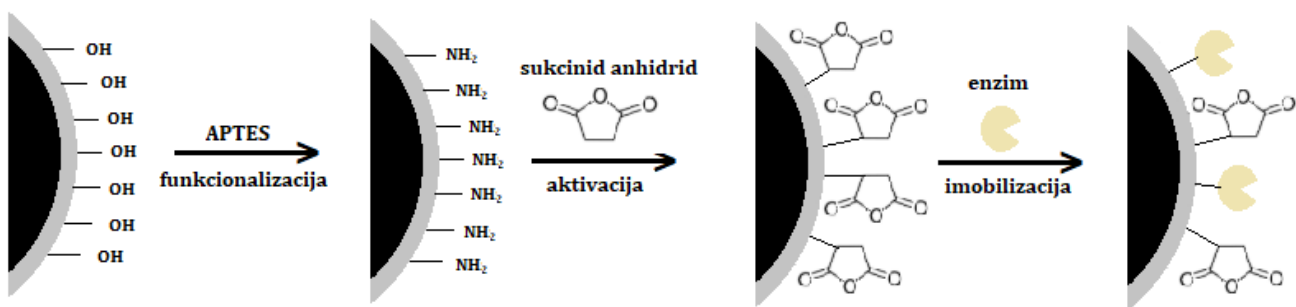
Kako bi čvrsta podloga imala funkcionalne skupine potrebne za osiguravanje kovalentne veze, potrebno ju je predaktivirati kemijskim reagensima za predaktivaciju (glutaraldehid, cijanogen bromid, tionil klorid itd.) koji su jako elektrofilni (siromašni elektronima), pa reagiraju s jakim nukleofilom poput amino-skupine. Najvažniji tipovi veze koji nastaju između enzima i nosioca su: izourea veza, diazo veza, peptidna veza, veza koja nastaje reakcijom alkilacije itd.²

U ovom radu primjenjena je funkcionalizacija površine magnetskih nanočestica obloženih silikom s APTES-om, odnosno (3-aminopropil)trietoksisilanom, koji se često koristi za stabilizaciju nanočestica silicijevog dioksida ili metalnog oksida time što uvodi amino skupine.¹⁸ Nakon vezanja amino skupina na silanol skupine, uslijedila je aktivacija benzokinonom pomoću kojeg se odvija kemisorpcija enzima na površinu silike, kao što je shematski prikazano Slikom 6.



Slika 6. Shematski prikaz funkcionalizacije, aktivacije benzokinonom i imobilizacije enzima na MNČ.

U svrhu usporedbe utjecaja reagensa za aktivaciju korišten je i sukcinid anhidrid (eng. succinic anhydride), odnosno dihidro-2,5-furandion. Nakon funkcionalizacije APTES-om, sukcinid anhidrid aktivira površinu silike kemisorpcijom poput benzokinona te na kraju slijedi imobilizacija enzima. Princip je shematski prikazan Slikom 7.



Slika 7. Shematski prikaz funkcionalizacije, aktivacije sukcinid anhidridom i imobilizacije enzima na MNČ.

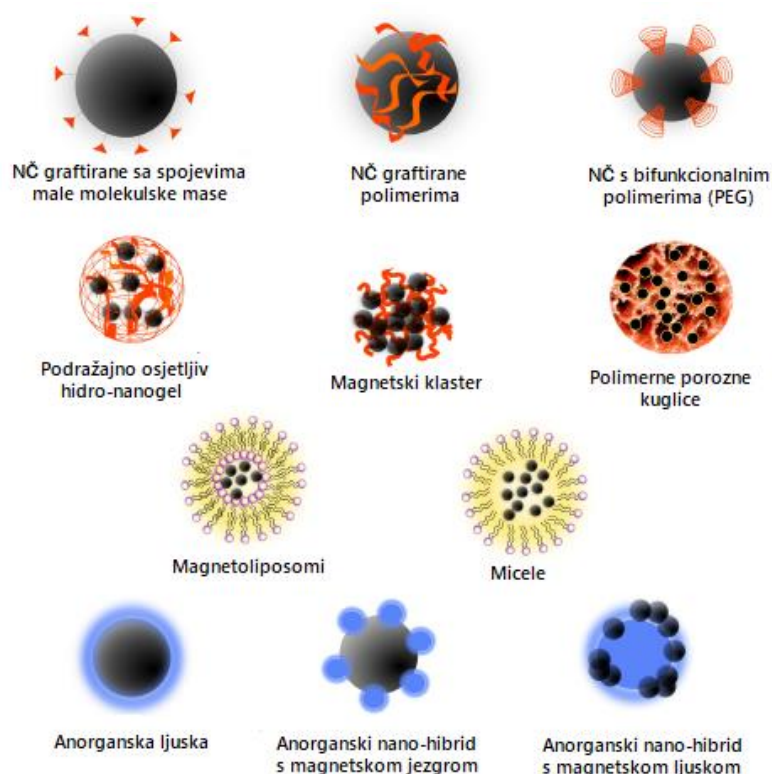
2.3. Nosioći za imobilizaciju

Nosioći za imobilizaciju obično se dijele u dvije glavne skupine: organski i anorganski. Organski nosioći mogu biti prirodnog podrijetla, kao što su polisaharidi (celuloza, škrob, agaroz i hitozan) te proteini poput želatine i albumina.¹⁹ Sintetički organski polimeri koji su u upotrebi uključuju vinilne i akrilne polimere, kao što su poliakrilamid i polivinilni alkohol. Poliamidi, kao što je najlon, također nalaze primjenu u ovom području.²⁰ Anorganski nosioći koji se primjenjuju su silika, mezoporozna silika i zeoliti,¹⁹ metalni oksidi (Al_2O_3 , TiO_2 , ZrO_2) i magnetski nosioći.²⁰ Materijali za nosioce moraju zadovoljavati određene kriterije kako bi bili prikladni: potpuna netopljivost u vodi, mehanička čvrstoća i kemijska otpornost u radnim uvjetima, sposobnost stvaranja čestica velike površine, reaktivnost prema agensima za derivatizaciju/ funkcionalizaciju. Nosioć treba biti u stanju nositi značajnu količinu enzima po jedinici mase.²⁰ Poroznost je također jako korisna karakteristika, ali promjer pora mora ostati unutar odgovarajućeg raspona. Promjer pora mora biti širi od prosječnog promjera proteina, jer u manje pore protein ne može ući,²¹ a prevelike pore će uzrokovati značajan pad aktivne površine.²⁰ Poželjno je da su čestice nosioca pravilnog oblika (sferične) te da imaju usku raspodjelu veličina čestica, jer ti parametri mogu utjecati na pad tlaka i protok unutar reaktora.²¹ Anorganski nosioći se općenito više primjenjuju jer imaju visoku toplinsku i mehaničku otpornost te izraženiju krutost i poroznost. Krutost anorganskih nosioca osigurava stalni promjer/volumen pora, što jamči stalni volumen i oblik nosioca. Organski materijali se također mogu dobiti sa strogo kontroliranom poroznošću, ali obično su vrlo osjetljivi na tlak ili pH.²⁰

Vrlo perspektivni nosioći su mezoporozne nanočestice, čija je veličina pora između 2 i 50 nm, a specifična površina od $300 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ do $500 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, a u nekim slučajevima čak i do $1500 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$. Veličina pora mezoporoznih materijala je približna prosječnim promjerima proteina te se smatraju vrlo pogodnima za efikasnu imobilizaciju enzima.²⁰ Ovisno o njihovoj kemijskoj prirodi, mezoporozni materijali mogu posjedovati fluorescentna, magnetska ili vodljiva svojstva, što ih čini vrlo atraktivnim za širok raspon primjena u tehničkim znanostima kao što su kataliza, elektronika, proizvodnja fotokatalitičkog vodika, solarnih ćelija i komponenta baterija.²²

2.3.1. Magnetske nanočestice

Posebno korisna skupina nano-nosioca su magnetske nanočestice (MNČ ili eng. *magnetic nanoparticles*, MNP). Najčešće korištene magnetske čestice su magnetit (Fe_3O_4) i maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). MNČ imaju jedinstvena svojstva poput superparamagnetizma, velike površine, niske toksičnosti, velikog odnosa površine naspram volumena, lakog odvajanja pod utjecajem vanjskog magnetskog polja, poboljšanog kapaciteta ugradnje i smanjenog ograničenja difuzije.¹⁰ Sintetski postupci za dobivanje MNČ koji se najčešće primjenjuju su usporedno taloženje iz pogodnih mješavina metalnih soli i termičko raspadanje prekursora željeza (1. u organskim otapalima, 2. iz krutog stanja pri kontroliranim uvjetima).²³ Magnetske nanočestice sastoje se od tri funkcionalna dijela: magnetske jezgre, površinskog premaza koji štiti magnetsku jezgru i funkcionalnog vanjskog premaza.¹⁰ Slika 8 prikazuje strukture MNČ s različitim rasporedom jezgre i ljuske. Veličina MNČ može varirati od nekoliko nm do nekoliko stotina nm.²³



Slika 8. Strukturni oblici MNČ ukomponiranih s polimerima, molekulama i anorganskim nanočesticama.¹⁰

Magnetski nanosustavi koji kombiniraju enzime i MNČ putem imobilizacije su brzorastuće područje biotehnološkog istraživanja. Primjer vrlo isplative industrijske implementacije jest imobilizacija enzima laktaze na MNČ, a koristi se pri uklanjanju laktoze iz mlijeka kako bi ga mogle konzumirati osobe koje ne podnose laktozu.²³ MNČ nalaze široku primjenu *in vitro* kao i *in vivo*, npr. kao magnetski biosenzori, pri odvajanju stanica, pojačavanju kontrasta pri snimanju magnetskom rezonancom. U tijeku je i razvoj tehnika kao što je popravljjanje tkiva, liječenje magnetskom hipertermijom, ciljana implikacija lijeka i označavanje stanica.²⁴

Proteini, enzimi, pa čak i antitijela sadrže više funkcionalnih skupina kao što su aminske, karboksilne, tiolne ili pak hidroksilne skupine u slučaju glikoproteina. Općenito, bilo koja od ovih funkcionalnih skupina može se koristiti za pričvršćivanje na površinu MNČ. Postoje tri pristupa kovalentne imobilizacije bioaktivnih tvari na MNČ. Prvi uključuje kemijsku modifikaciju funkcionalne skupine na površini MNČ-a, nakon čega slijedi njegovo pričvršćivanje na određenu funkcionalnu skupinu bioaktivne tvari. Drugi pristup koristi aktivaciju funkcionalnih skupina MNČ-a i treća strategija uključuje kemijsku modifikaciju bioaktivne tvari.²³

2.3.2. Stöberov proces

Organske skupine se ne vežu kovalentno za površinu magnetita, stoga treba imati na umu da čak i ako dođe do adsorpcije enzima na površinu, oni se vrlo lako mogu desorbirati. Kada se površina MNČ obloži slojem silike, silanol skupine koje silika sadrži mogu reagirati sa alkoholima ili spojevima za funkcionalizaciju.²⁵ Stöberovom metodom moguće je izraditi ljuske od silicijevog dioksida na površini NČ lakom hidrolizom pomoću tetraetil ortosilikata (TEOS).²⁶ Silicijev dioksid se smatra najboljim anorganskim materijalom za oblaganje radi sprječavanja aglomeracije i poboljšanja kemijske stabilnosti.¹⁸ APTES, (3-aminopropil)trietoksisilan, često se koristi za stabilizaciju nanočestica silicijevog dioksida ili metalnog oksida zbog toga što uvodi amino skupine za naknadnu kemijsku funkcionalizaciju. Otkriveno je da kondenzacija APTES-a na MNČ rezultira aglomeracijom čestice u male nakupine i zato su se mnoga istraživanja usredotočila na pristup u dva koraka. MNČ se prvo oblažu silicijem upotrebom tetraetil ortosilikata (TEOS), nakon čega slijedi drugi korak hidrolize/kondenzacije pomoću APTES-a.¹⁸

Stöberova metoda je široko korištena metoda za oblaganje silike zbog svojih prednosti poput relativno blagih reakcijskih uvjeta, niskih troškova i širokog raspona mogućih veličina čestica (desetine do stotine nm). Oblaganje silikom također se može izvesti jednostavnom mikroemulzijom, međutim neki od nedostataka takve metode su združivanje proizvedenih MNČ nakon dugotrajnog skladištenja, neponovljivost metode i stvaranje čestica bez jezgre.²⁷

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Aparatura

3.1.1. Centrifuga

Centrifuga je korištena za separaciju i ispiranje magnetskih nanočestica nakon sinteze, uklanjanje enzima koji se nije vezao na nanočestice i odvajanje imobiliziranih nanočestica od reakcijske otopine. Uzorci su centrifugirani na 14000 okr/min pri temperaturi $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 5 minuta. Korišten je uređaj *Hettich Universal 320R* prikazan na Slici 9.



Slika 9. Centrifuga *Hettich Universal 320R*.

3.1.2. Tresilica

Tresilica je korištena za miješanje suspenzije pri aktivaciji nosioca, imobilizaciju enzima te za provođenje reakcija pri 850 okr/min. Korištena je termostatirana tresilica *Eppendorf ThermoMixer C*, prikazana na Slici 10.



Slika 10. Termostatirana tresilica *Eppendorf ThermoMixer C*.

Pri funkcionalizaciji nosioca korištena je *BioLAB* termostatirana tresilica pri 160 okr/min koja je prikazana na Slici 11.



Slika 11. Termostatirana tresilica *BioLAB*.

Homogenizator *MS2 Minishaker IKA* korišten za homogenizaciju uzoraka prikazan je na Slici 12.



Slika 12. Homogenizator *MS2 Minishaker IKA*.

3.1.3. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti kromatografska je tehnika za analizu i separaciju pojedinih sastojaka smjese. Otopina uzorka injektira se u mobilnu fazu koja zatim putuje kroz kolonu punjenu stacionarnom fazom pod visokim tlakom. Zbog različite jačine vezanja uzorka i mobilne faze sa stacionarnom fazom, komponente eluiraju s kolone različitim brzinama, odnosno imaju različita vremena zadržavanja. Uzorak potom ulazi u UV-detektor koji mjeri apsorpciju svjetla kod određene valne duljine, ili u RI-detektor koji mjeri razliku indeksa loma otopine s analitom i reference, što rezultira karakterističnim signalom u kromatogramu.²⁸ Korišten je HPLC uređaj proizvođača *Shimadzu* (Slika 13) za određivanje koncentracije reaktanata i produkata glavne i sporedne reakcije te za određivanje aktivnosti enzima DERA.



Slika 13. HPLC uređaj *SHIMADZU*.

3.1.4. Spektrofotometar

Spektrofotometar mjerni je uređaj koji se koristi za analizu spektra elektromagnetskog zračenja. Apsorpcija svjetlosti kroz otopine matematički se opisuje Lambert-Beerovim zakonom (jedn. 1), gdje je *ABS* apsorbancija pri određenoj valnoj duljini svjetlosti, ε je molarni apsorpcijski koeficijent [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$], *b* je duljina puta svjetlosti kroz uzorak [cm] i *c* predstavlja koncentraciju tvari u otopini [mol dm^{-3}].²⁸

$$ABS = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (1)$$

UV/VIS spektrofotometar *Shimadzu UV-1601* prikazan na Slici 14 korišten je za određivanje koncentracije proteina prema Bradfordovoj metodi.



Slika 14. UV/VIS spektrofotometar *Shimadzu UV-1601*.

3.1.5. Magnetska miješalica s grijačem

Magnetska miješalica s grijačem *IKA – COMBIMAG RCT* korištena je za miješanje Bradfordovog reagensa prilikom izrade baždarnog dijagrama za određivanje proteina te pri određivanju proteina prije i nakon imobilizacije. Prikazana je na Slici 15.

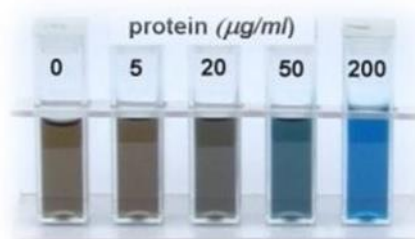


Slika 15. Magnetska miješalica s grijačem *IKA – COMBIMAG RCT*.

3.2. Analitičke metode

3.2.1. Određivanje koncentracije proteina Bradfordovom metodom

Bradfordova metoda je spektrofotometrijska metoda za određivanje koncentracije proteina, temeljena na reakciji proteina s bojom *Coomassie Brilliant Blue* u kiselom mediju. Boja se na proteine veže hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama, što stabilizira boju u anionskom obliku i dovodi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu. Što je koncentracija proteina u uzorku viša, to će se više boje vezati na protein, odnosno boja će postati tamnija (Slika 16).



Slika 16. Promjena boje tokom Bradfordovog testa.

Bradfordov reagens sastoji se od 100 mg boje *Coomassie Brilliant Blue G-250*, 50 ml 95 %-tnog etanola, 100 ml 85 %-tne fosforne kiseline i 850 mL redestilirane vode. Prije mjerenja koncentracija proteina u uzorcima pripremljen je baždarni pravac pomoću standardnih otopina proteina (albumin; BSA) koncentracija $1 \mu\text{g L}^{-1}$, $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$, $5 \mu\text{g L}^{-1}$, i $7 \mu\text{g L}^{-1}$. Pomiješalo se 800 μL uzorka s 200 μL reagensa, inkubacija je trajala 5 minuta pri sobnoj temperaturi te se potom mjerila apsorbancija uzoraka na spektrofotometru *Shimadzu UV-1601* pri valnoj duljini $\lambda = 595$ nm. Iz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina dobiven je baždarni dijagram (Prilog 1), odnosno jednadžba pravca potrebna za izračun koncentracije proteina u uzorcima koji sadrže nepoznatu koncentraciju proteina. Koncentracija proteina određivana je u temeljnoj otopini enzima i otopini nakon imobilizacije enzima na nosioc.

3.2.2. Određivanje aktivnosti enzima DERA-e

Aktivnost enzima DERA-e određivala se u temeljnoj otopini enzima, otopini nakon provedene imobilizacije enzima te u ponovljenoj reakciji imobiliziranog enzima. Aktivnost se određivala u reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida. Reakcija se provela miješanjem 100 μL otopine aldehida i 100 μL otopine enzima. Temeljna otopina aldehida sadržavala je 200 mM acetaldehida i 100 mM kloroacetaldehida u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6. Temeljna otopina enzima je koncentracije 25 mg mL^{-1} u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6.

Nakon pokretanja reakcije, uzorci su uzimani u pravilnim vremenskim razmacima, te analizirani na HPLC-u. Iz promjene koncentracije međuprodukta 4-klor-3-hidroksibutanala i produkta 6-kloro-3,5-dihidroksi heksanala u vremenu izračunata je aktivnost enzima.

3.2.3. Određivanje koncentracije reaktanata i produkata na HPLC uređaju

Koncentracije reaktanata i produkata određivane su na HPLC uređaju, a uzorci su prije analize derivatizirani kako bi ih bilo moguće detektirati. Otopina za derivatizaciju je pripremljena miješanjem 0,1 g o-benzilhidroksi amina sa 3,3 mL piridina, 1,5 mL metanola i 0,2 mL redestilirane vode. Derivatizacija se provodila na način da je 5 μL uzorka pomiješano s 50 μL derivatizacijske otopine te inkubirano 20 minuta pri 850 okr/min. Reakcija se nakon 20 min zaustavljala dodatkom 350 μL metanola, uzorci su centrifugirani, a supernatant se analizirao na HPLC-u.

Analiza se provodila na koloni *LiChrospher C18* (Phenomenex, 5 μm , 250 x 4 mm) pri $T=30^{\circ}\text{C}$ spojenoj na UV detektor ($\lambda=215\text{ nm}$) s protokom od 1,2 mL min^{-1} . Mobilna faza sastojala se od otapala A (0,1 %-tna trifluorocetna kiselina u vodi) i otapala B (0,1 %-tna trifluorocetna kiselina u acetonitrilu). Iz dobivenog kromatograma s pikovima identificirane su pojedine

komponente na temelju njihovih retencijskih vremena (Prilog 4). Iz vrijednosti površina ispod pikova pojedinih komponenti pomoću baždarnih pravaca za acetaldehid (Prilog 2) i kloroacetaldehid (Prilog 3), izračunata je nepoznata koncentracija acetaldehida i kloroacetaldehida.

3.3. Sinteza nanočestica i oblaganje silikom po Stöber procesu

3,375 g željezovog (III) klorida heksahidrata ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) otopljeno je u 100 mL etilen glikola. Otopini se zatim polako dodalo 4,5 g natrijevog acetata i 2,5 g polietilen glikola (PEG 6000 MW). Smjesa se miješala 30 min, a nakon toga je prenesena u autoklav na žarenje tijekom 3 h do 200 °C. Nakon dosegnutih 200 °C, smjesa se zagrijava 8 h pri konstantnoj temperaturi. Nakon zagrijavanja precipitat se odvojio etanolom i magnetom, te par puta isprao etanolom. Nakon ispiranja uslijedilo je sušenje pri 60 °C.

Nanočestice su obložene silikom po Stöber procesu. Pripremljeno je 100 mL 75% otopine etanola u kojoj su dispergirane nanočestice. Potom se dodao tetraetil ortosilikat (TEOS, 10 % v/v) i amonijak (NH_3 , 4 % v/v), te se lagano miješalo na sobnoj temperaturi tijekom 3h. Nakon miješanja precipitat se odvojio magnetom, isprao tri puta etanolom te se preko noći sušio na 55 °C.

3.4. Funkcionalizacija, aktivacija i imobilizacija enzima

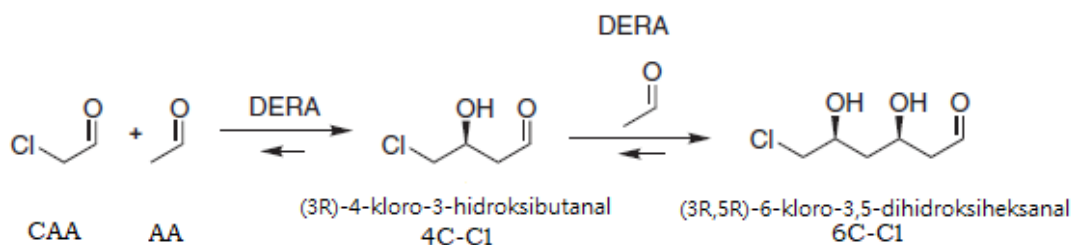
MNČ su funkcionalizirane dodatkom 50 mL etanola i 3 mL APTES-a ((3-aminopropil)trietoksisilana). Pripremljena suspenzija se zatim miješala u inertoj atmosferi dušika pri 30 °C i 160 okr/min tokom 24 sata.

Aktivacija benzokinom se odvijala dodatkom 1 mL pripremljene 1,5 mM / 3 mM otopine benzokinona na 25 mg funkcionaliziranog nosioca. Suspenzija se miješala tokom 1 h na sobnoj temperaturi. Aktivacija sukcinid anhidridom se odvijala dodatkom 1 mL dimetil formamida i 10 % / 5 % sukcinid anhidrida na 25 mg nosioca. Suspenzija se miješala 2 h na sobnoj temperaturi u inertoj atmosferi dušika. Nakon aktivacije, nosioc se centrifugirao i oprao puferom nekoliko puta.

Aktiviranom nosiocu dodano je 100 µL otopine enzima koncentracije 25 mg mL⁻¹ i 1 mL fosfatnog pufera pH: 6,0 , 6,5 , 7,0 i 7,5 koncentracija 0,1 M ili 0,05 M. Imobilizacija se provodila 2 h u tresilici pri 800-850 okr/min pri temperaturama: 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C i 40 °C.

4. REZULTATI I RASPRAVA

DERA je enzim koji katalizira reakciju dvostruke aldolne adicije acetaldehida (AA) i kloroacetaldehida (CAA). Reakcijom nastaju međuprodukt (3R)-4-kloro-3-hidroksibutanal (4C-Cl) i produkt (3R,5R)-6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal (6C-Cl), tj. laktol, spoj koji se koristi kao prekursor u proizvodnji statina (Slika 17). Primjena ovog enzima je ograničena zbog male stabilnosti DERA-e u prisustvu aldehida, koji su ujedno i reaktanti. Cilj istraživanja bio je imobilizirati enzim DERA-u kemijskom imobilizacijom kovalentnim vezanjem na magnetske nanočestice i ispitati utjecaj procesa aktivacije nosioca na efikasnost imobilizacije. Ispitan je utjecaj dvaju reagensa za aktivaciju nosioca: benzokinon i sukcinid anhidrid te zatim temperatura i pH, parametri koji imaju znatan utjecaj na aktivnost enzima.



Slika 17. Shema dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane DERA-om.⁹

Uspješnost imobilizacije određivana je pomoću slijedećih parametara: iskorištenje, efikasnost, imobilizacijska aktivnost i preostala aktivnost imobiliziranog enzima. Iskorištenje jest omjer imobilizacijske aktivnosti i početne aktivnosti (jedn. 2). Govori nam o količini enzima koji je uspješno imobiliziran na površinu nosioca.

$$\text{Iskorištenje} = \frac{\text{imobilizacijska aktivnost}}{\text{početna aktivnost}} = \frac{c_{\text{protein},0} - c_{\text{protein,konačno}}}{c_{\text{protein},0}} \quad (2)$$

Imobilizacijska aktivnost računa se iz razlike početne koncentracije proteina i koncentracije proteina u otopini nakon imobilizacije enzima. (jedn. 3).

$$\text{Imobilizacijska aktivnost} = C_{\text{protein},0} - C_{\text{protein,konačno}} \quad (3)$$

Efikasnost je omjer aktivnosti imobiliziranog enzima te slobodnog enzima i iskorištenja (jedn. 4). Govori nam u kojoj mjeri je imobilizirani enzim aktivan u usporedbi sa slobodnim enzimom.

$$\text{Efikasnost} = \frac{A_{\text{imobilizirani enzim}}}{\text{Iskorištenje} \times A_{\text{slobodni enzim}}} \quad (4)$$

Preostala aktivnost imobiliziranog enzima (jedn. 5) ujedno govori i o uspješnosti stabilizacije enzima metodom imobilizacije, a računa se kao omjer aktivnosti imobiliziranog enzima i preostale aktivnosti imobiliziranog enzima te se izražava u postocima.

$$\text{Preostala aktivnost imobiliziranog enzima} = \frac{A_{\text{imobilizirani enzim,2.reakcija}}}{A_{\text{imobilizirani enzim}}} \quad (5)$$

Koncentracija proteina određivala se Bradfordovom metodom u otopini slobodnog enzima prije procesa imobilizacije ($C_{\text{protein},0}$) i nakon završenog procesa imobilizacije ($C_{\text{protein,konačno}}$). Iz izmjerenih koncentracija proteina izračunavalo se iskorištenje (jedn. 2) i imobilizacijska aktivnost (jedn. 3).

Aktivnost enzima je mjerena u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida. Izmjerena je aktivnost slobodnog enzima u otopini prije imobilizacije ($A_{\text{slobodni enzim}}$), te aktivnosti imobiliziranog enzima prilikom dvije reakcije: $A_{\text{imobilizirani enzim}}$ prilikom privođenja prve reakcije i $A_{\text{imobilizirani enzim, 2. reakcija}}$ prilikom provođenja ponovljene reakcije. Korištenjem izmjerenih aktivnosti računala se efikasnost (jedn. 4.) i preostala aktivnost imobiliziranog enzima (jedn. 5).

4.1. Ispitivanje aktivnosti slobodnog enzima

Za usporedbu stabilnosti slobodnog i imobiliziranog enzima izmjerena je aktivnost slobodnog enzima ($A_{\text{slobodni enzim}}$), te aktivnost istog tog enzima u ponovljenoj reakciji ($A_{\text{slobodni enzim, 2. reakcija}}$). Rezultati su prikazani u Tablici 4. Mjerenja su provedena pri temperaturi od 25 °C u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6. Preostala aktivnost slobodnog enzima izračunata je kao omjer $\frac{A_{\text{slobodni enzim, 2. reakcija}}}{A_{\text{slobodni enzim}}}$.

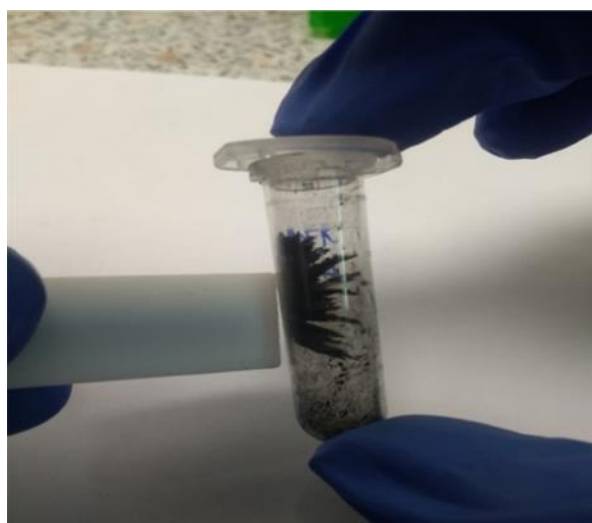
Tablica 4. Prikaz rezultata mjerenja aktivnosti slobodnog enzima u dvije reakcije i izračunata preostala aktivnost slobodnog enzima.

$A_{\text{slobodni enzim}} / \text{U mL}^{-1}$	12,63
$A_{\text{slobodni enzim, 2. reakcija}} / \text{U mL}^{-1}$	4,36
Preostala aktivnost slobodnog enzima / %	34,52

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je u drugoj reakciji aktivnost slobodnog enzima pala za 65 %. Iz navedenog proizlazi da je nalaženje učinkovite metode stabilizacije enzima nužno za primjenu enzima DERA-e u većem mjerilu.

4.2. Sinteza magnetskih nanočestica

Magnetske nanočestice koje su korištene kao nosioc za imobilizaciju enzima DERA, sintetizirane su metodom opisanom u poglavlju 3.3., te su potom obložene silikom (poglavlje 3.3.) kako bi se dobila reaktivna grupa nužna za proces imobilizacije. Ukupno je dobiveno 943 mg magnetskih nanočestica obloženih silikom. Nanočestice imaju magnetska svojstva što je prikazano na Slici 18 na kojoj je vidljivo da reagiraju na prisutnost magneta, odnosno magnetskog polja.



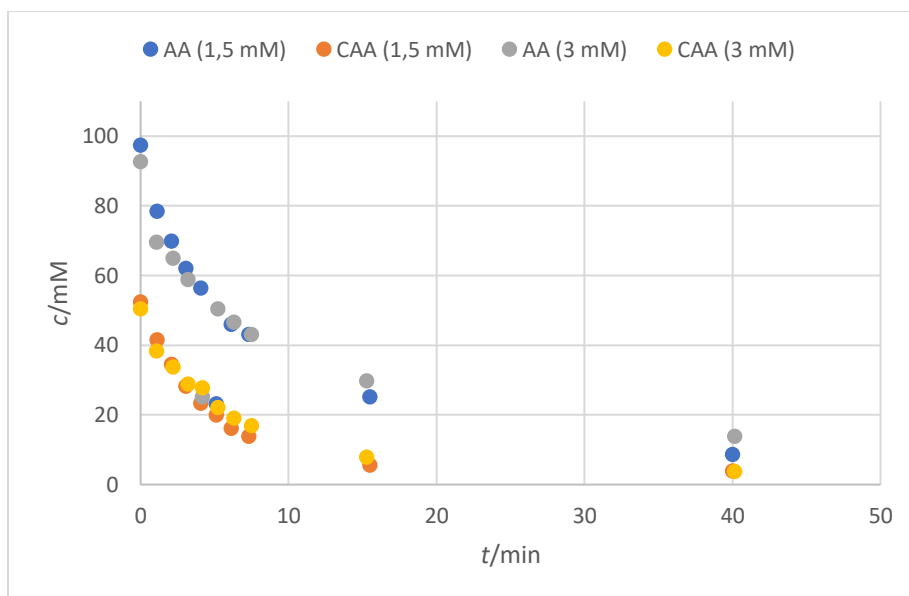
Slika 18. Prikaz sintetiziranih magnetskih nanočestica.

4.3. Utjecaj reagensa za aktivaciju na uspješnost procesa imobilizacije

Proces imobilizacije enzima na nosioc uključuje nekoliko koraka koji se sastoje od promocije reaktivne grupe na nosiocu, što je u ovom radu napravljeno oblaganjem MNČ sa silikom, nakon čega slijede funkcionalizacija i aktivacija, a zatim reakcija s enzimom. Aktivacija i funkcionalizacija površine omogućuju vezu između površine i enzima. Oblik veze ovisi o agensima za funkcionalizaciju i aktivaciju. Također, uspješnost imobilizacije ovisi o korištenim agensima i njihovim koncentracijama. U ovom radu površina sintetiziranih magnetskih nanočestica je funkcionalizirana APTES-om, te aktivirana pomoću dvaju reagensa: benzokinonom i sukcinid anhidridom. Za svaki pojedini agens ispitane su dvije koncentracije. Nakon aktivacije uslijedila je imobilizacija enzima te ispitivanje aktivnosti nakon imobilizacije. Aktivnost je ispitivana provođenjem reakcije aldolne adicije, na temelju koje nam je cilj bio utvrditi optimalne uvjete za imobilizaciju enzima DERA-e. Sve reakcije su provedene u fosfatnom puferu pH 6 pri 25 °C.

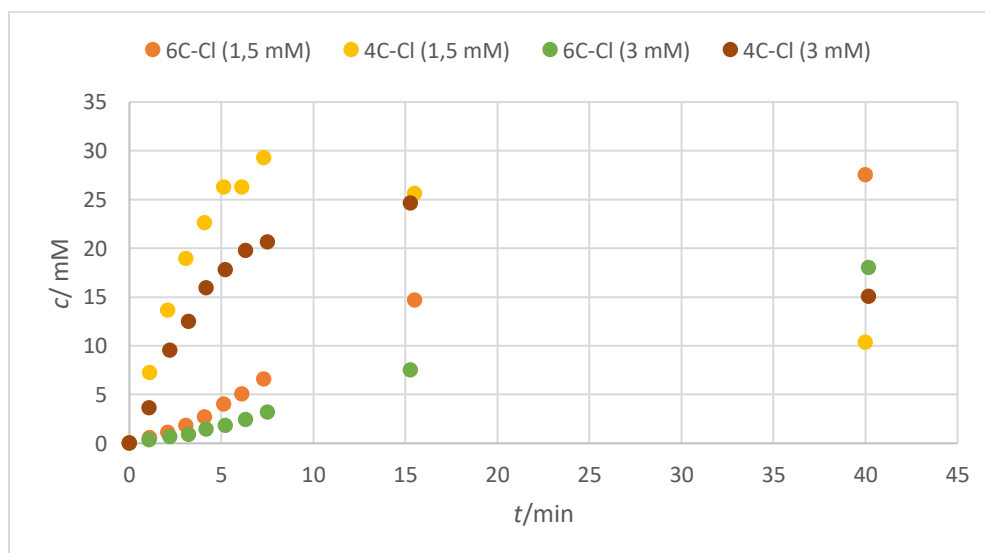
4.3.1. Imobilizacija enzima DERA-e na nosiocu, aktiviranim s benzokinonom

U nastavku su prikazani rezultati provedenog eksperimenta reakcije aldolne adicije acetaldehida i kloracetaldehida katalizirane DERA-om imobiliziranom na magnetskim nanočesticama obloženih silikom, funkcionaliziranih s APTES-om te aktiviranih s 1,5 i 3 mM otopinom benzokinona pri 25 °C u fosfatnom puferu pH 6. Rezultati su prikazani kao dijagrami ovisnosti koncentracije o vremenu. Može se primjetiti da se koncentracije reaktanata AA i CAA smanjuju (Slika 19), a međuprodukta (4C-Cl) i produkta (6C-Cl) povećavaju (Slika 20).



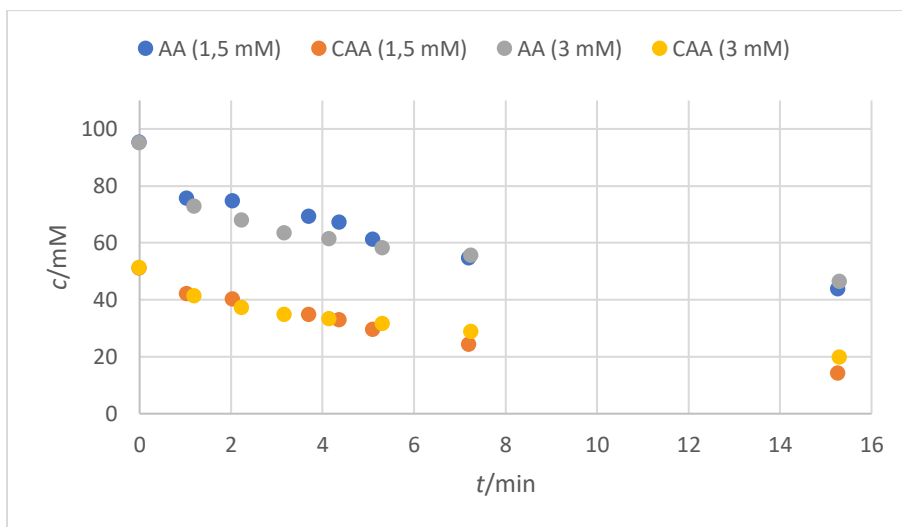
Slika 19. Dijagram usporednog prikaza ovisnosti koncentracije reaktanata o vremenu tijekom provedbe reakcije s imobiliziranim enzimom na MNČ, prethodno aktivirane s 1,5 mM i 3 mM benzokinona.

Korištenjem 1,5 mM benzokinona za aktivaciju nosioca na koje je poslije imobiliziran enzim, 40 min nakon početka reakcije nastaje 10,32 mM međuprodukta (4C-Cl) i 27,53 mM produkta (6C-Cl). Pri korištenju 3 mM benzokinona nastaje 15,06 mM međuprodukta (4C-Cl) i 17,99 mM produkta (6C-Cl).

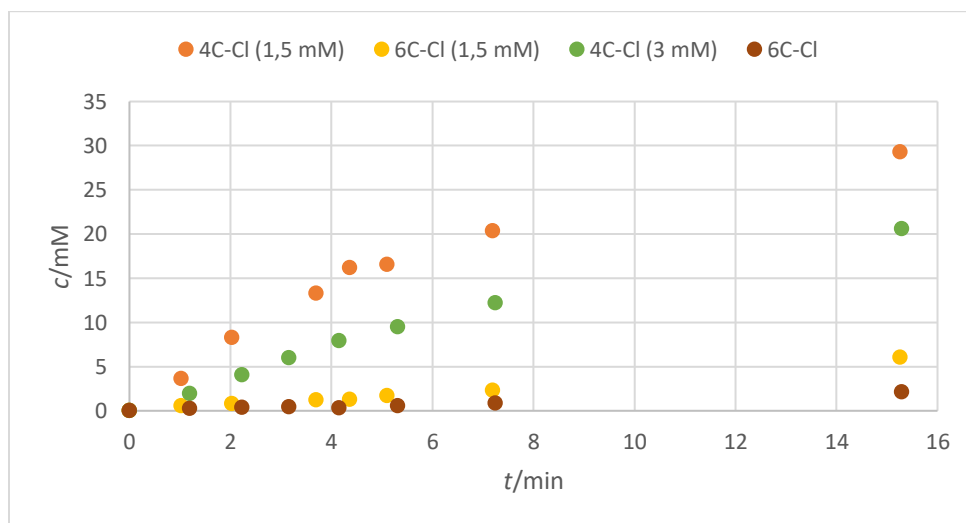


Slika 20. Dijagram usporednog prikaza ovisnosti koncentracije produkata o vremenu tijekom provedbe reakcije s imobiliziranim enzimom na MNČ, prethodno aktivirane s 1,5 mM i 3 mM benzokinona.

U ponovljenoj reakciji za nosioc aktiviran s 1,5 mM benzokinona nakon 15 min nastaje 29,33 mM međuprodukta (4C-Cl) i 6,05 mM produkta (6C-Cl). Pri korištenju 3 mM benzokinona nastaje 20,58 mM međuprodukta (4C-Cl) i 2,17 mM produkta (6C-Cl). Rezultati su prikazani na Slikama 21 i 22.



Slika 21. Dijagram usporednog prikaza ovisnosti koncentracije reaktanata o vremenu tijekom provedbe ponovljene reakcije s imobiliziranim enzimom na MNČ, prethodno aktivirane s 1,5 mM i 3 mM benzokinona.

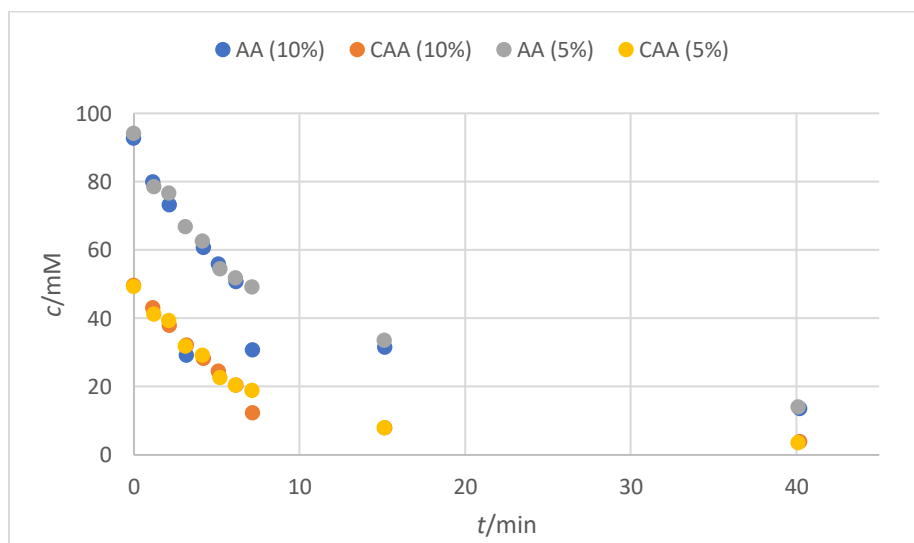


Slika 22. Dijagram usporednog prikaza ovisnosti koncentracije produkata o vremenu tijekom provedbe ponovljene reakcije s imobiliziranim enzimom na MNČ, prethodno aktivirane s 1,5 mM i 3 mM benzokinona.

Pri korištenju 1,5 mM benzokinona nastaje više produkta (6C-Cl) u obje reakcije (27,53 mM u prvoj reakciji i 6,05 mM u drugoj reakciji) nego pri korištenju 3,0 mM benzokinona (17,99 mM u prvoj reakciji i 2,17 mM u drugoj reakciji). Korištenjem veće koncentracije benzokinona prilikom aktivacije nosioca nastaje više aktivnih mjesta na njegovoj površini. U nekim slučajevima više takvih mjesta mogu uzrokovati stvaranje veza između enzima i površine nosioca koje negativno utječu na njegovu aktivnost.

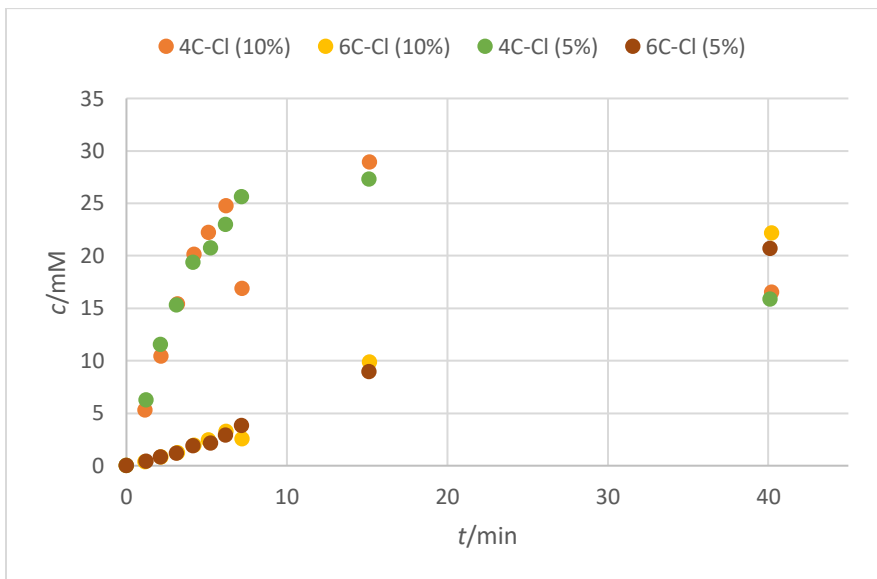
4.3.2. Imobilizacija enzima DERA-e na nosiocu, aktiviranim sukcinid anhidridom

Na slikama 23 i 24 prikazani su rezultati eksperimenta provođenja reakcije aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane DERA-om imobiliziranom na magnetskim nanočesticama obloženih silikom, funkcionaliziranih s APTES-om, te aktiviranog otopinom 5 % i 10 %-tnog (w/v) sukcinid anhidrida pri 25 °C u fosfatnom puferu pH 6. Rezultati su prikazani kao dijagrami ovisnosti koncentracije o vremenu.



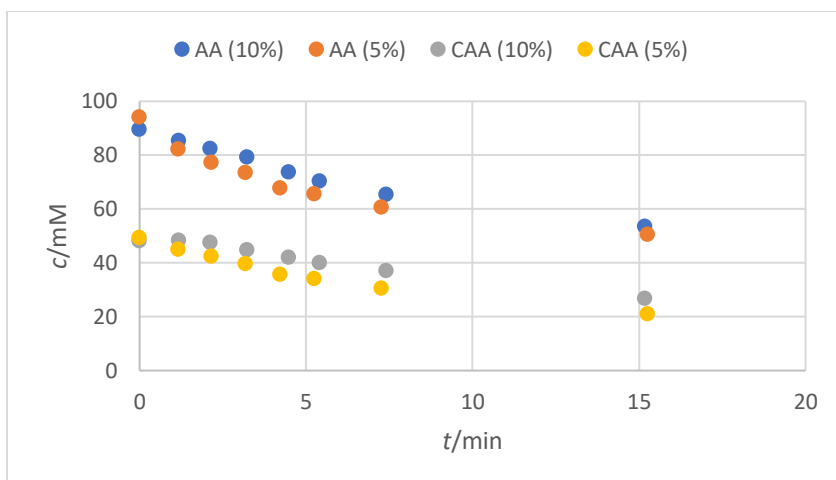
Slika 23. Dijagram usporednog prikaza ovisnosti koncentracije reaktanata o vremenu tijekom provedbe reakcije s imobiliziranim enzimom na MNČ, prethodno aktivirane s 5% i 10% sukcinid anhidrida.

Korištenjem 5 % (w/v) sukcinid anhidrida, 40 min nakon početka reakcije nastaje 15,88 mM međuprodukta (4C-Cl) i 20,68 mM produkta (6C-Cl). Pri korištenju 10% (w/v) sukcinid anhidrida, 40 min nakon početka reakcije nastaje 16,54 mM međuprodukta (4C-Cl) i 22,16 mM produkta (6C-Cl).

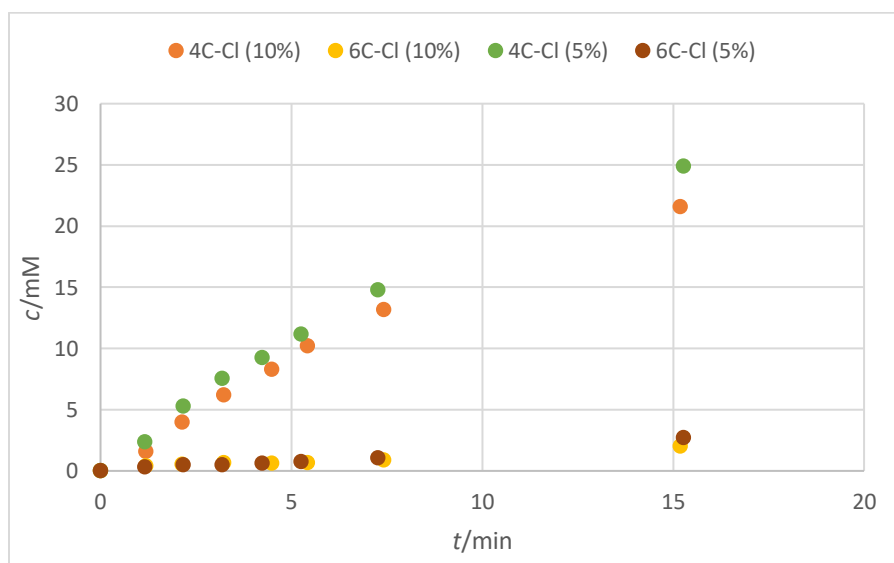


Slika 24. Dijagram usporednog prikaza ovisnosti koncentracije produkata o vremenu tijekom provedbe reakcije s imobiliziranim enzimom na MNČ, prethodno aktivirane s 5% i 10% sukcinid anhidrida.

U ponovljenoj reakciji pri 5 % (w/v) sukcinid anhidrida, 15 min nakon početka reakcije nastaje 24,85 mM međuprodukta (4C-Cl) i 2,70 mM produkta (6C-Cl). Pri korištenju 10 %-tnog (w/v) sukcinid anhidrida, 15 min nakon početka reakcije nastaje 21,56 mM međuprodukta (4C-Cl) i 1,98 mM produkta (6C-Cl). Rezultati su prikazani na Slikama 25 i 26.



Slika 25. Dijagram usporednog prikaza ovisnosti koncentracije reaktanata o vremenu tijekom provedbe ponovljene reakcije s imobiliziranim enzimom na MNČ, prethodno aktivirane s 5% i 10% sukcinid anhidrida.



Slika 26. Dijagram usporednog prikaza ovisnosti koncentracije produkata o vremenu tijekom provedbe ponovljene reakcije s imobiliziranim enzimom na MNČ, prethodno aktivirane s 5% i 10% sukcinid anhidrida.

Pri korištenju 10% (w/v) sukcinid anhidrida u prvoj reakciji nastaje više produkta (22,16 mM), nego pri korištenju 5 % (w/v) (20,68 mM). U ponovljenoj reakciji više produkta nastaje korištenjem 5 % (w/v) sukcinid anhidrida (2,70 mM), nego pri korištenju 10 % (w/v) (1,98 mM). Iz navedenog se zaključuje da je veća koncentracija aktivacijskog agensa prilikom aktivacije nosioca pridonijela povećanju aktivnih mjesta za vezanje enzima. Samim time i količina enzima koja se vezala je bila viša, pa je imobilizirani enzim bio aktivniji. Unatoč tome, više aktivnih mjesta na površini enzima je utjecalo na stabilnost enzima, te je tijekom ponovljene reakcije aktivnost enzima imobiliziranog na nosiocu aktiviranog s višom koncentracijom sukcinid anhidrida bila značajno niža.

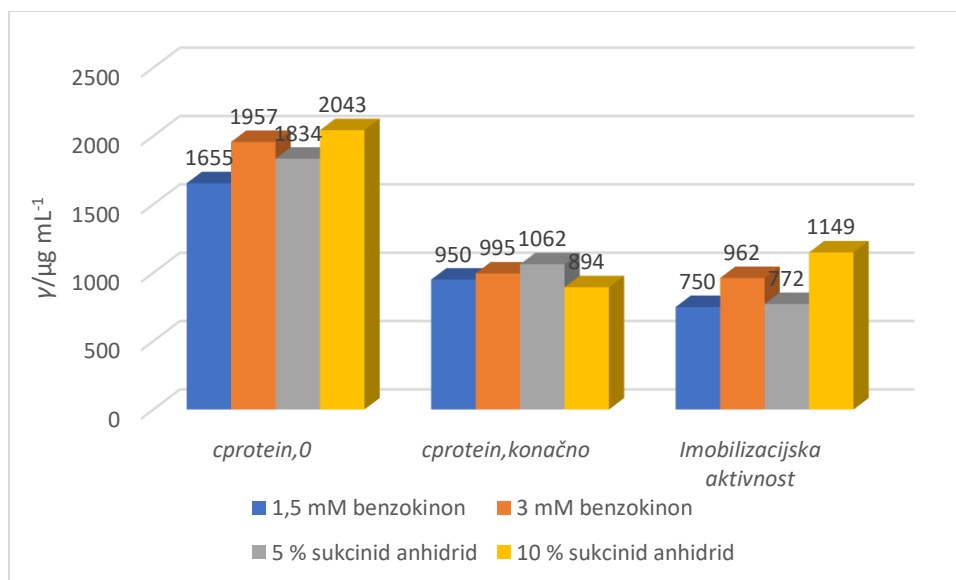
4.3.3. Usporedba utjecaja agensa za aktivaciju nosioca na uspješnost imobilizacije enzima DERA

Usporedni rezultati dobiveni korištenjem enzima imobiliziranih na MNC aktiviranih s različitim vrstama i koncentracijama aktivacijskih agensa prikazani su u Tablici 5. Prikazani su rezultati mjerenja koncentracija proteina Bradfordovom metodom u otopini slobodnog enzima prije procesa imobilizacije ($C_{protein,0}$) i nakon završenog procesa imobilizacije ($C_{protein,konačno}$), aktivnost slobodnog enzima u otopini prije imobilizacije ($A_{slobodni\ enzim}$), aktivnosti imobiliziranog enzima prilikom provođenja prve ($A_{imobilizirani\ enzim}$) i ponovljene reakcije ($A_{imobilizirani\ enzim, 2. reakcija}$). Iz izmjerenih vrijednosti izračunati su parametri uspješnosti imobilizacije: iskorištenje, efikasnost, imobilizacijska aktivnost i preostala aktivnost imobiliziranog enzima.

Tablica 5. Izmjerene koncentracije proteina i aktivnosti enzima, izračunati parametri uspješnosti imobilizacije enzima DERA na magnetske nanočestice obložene silikom, aktivirane različitim vrstama i koncentracijama aktivacijskih agensa.

Aktivacija	Benzokinon		Sukcinid anhidrid	
	1,5 mM	3 mM	5 %	10 %
Koncentracija / maseni udio	1,5 mM	3 mM	5 %	10 %
$C_{protein,0} / \mu\text{g mL}^{-1}$	1655	1957	1834	2043
$C_{protein,konačno} / \mu\text{g mL}^{-1}$	950	995	1062	894
$A_{slobodni\ enzim} / \text{U mL}^{-1}$	11,78	13,40	12,70	11,14
$A_{imobilizirani\ enzim} / \text{U mL}^{-1}$	5,19	4,19	4,20	5,19
$A_{imobilizirani\ enzim, 2. reakcija} / \text{U mL}^{-1}$	4,02	1,95	2,22	2,00
Iskorištenje / %	45,32	49,16	42,09	56,24
Efikasnost / %	97,22	63,61	78,56	82,83
Imobilizacijska aktivnost / $\mu\text{g mL}^{-1}$	750	962	772	1149
Preostala aktivnost imobiliziranog enzima / %	77,46	46,54	52,85	38,54

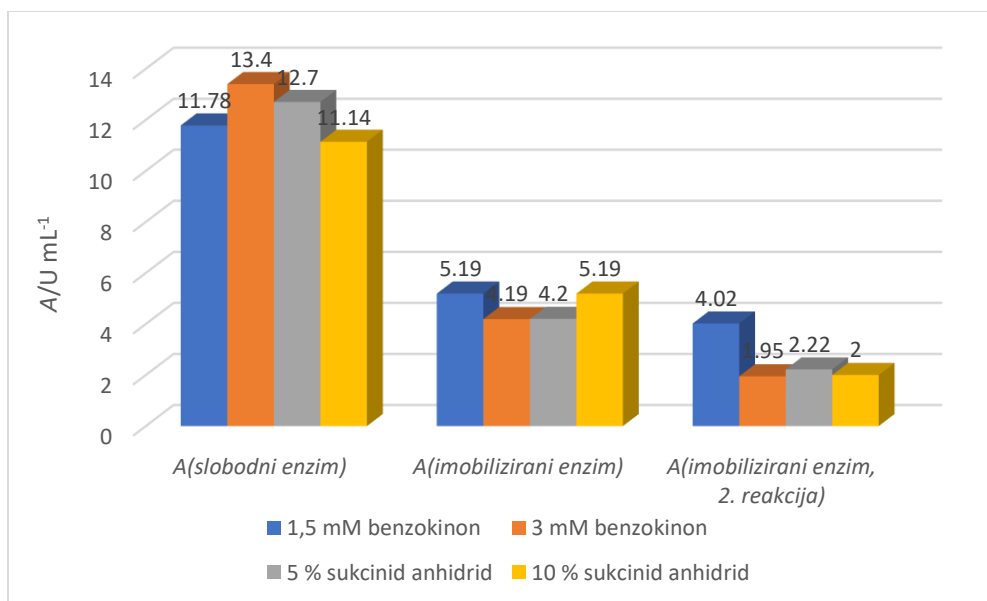
Slika 27 prikazuje usporedni prikaz izmjerenih koncentracija proteina i izračunatih imobilizacijskih aktivnosti, te rezultati pokazuju da imobilizirani enzimi prethodno aktivirani 10 %-tnim (w/v) sukcinid anhidrida postižu najveću imobilizacijsku aktivnost ($1149 \mu\text{g mL}^{-1}$). Navedeno upućuje da tako aktivirani nosioc ima najveći kapacitet, odnosno na njega se može vezati najviše enzima. Najmanju imobilizacijsku aktivnost postižu imobilizirani enzimi prethodno aktivirani benzokinonom koncentracije 1,5 mM ($750 \mu\text{g mL}^{-1}$).



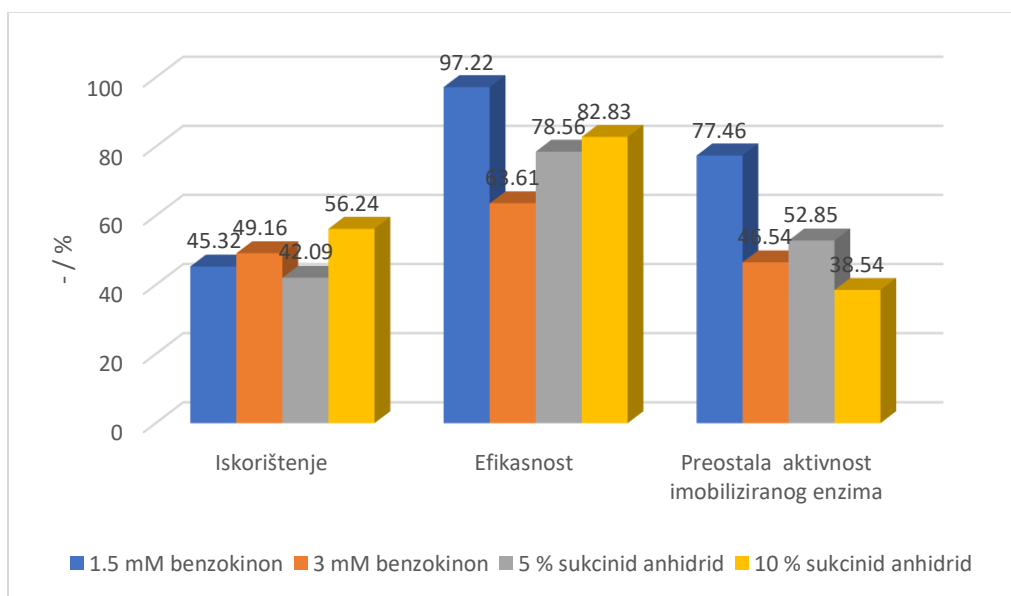
Slika 27. Usporedni prikaz izmjerenih koncentracija proteina i izračunatih imobilizacijskih aktivnosti za enzim imobiliziran na nosiocima aktiviranim različitim metodama.

Slika 28 prikazuje usporedni prikaz izmjerenih aktivnosti slobodnog enzima i imobiliziranog enzima prilikom provođenja dvije uzastopne reakcije. Imobilizirani enzimi na nosiocu aktivirani s 1,5 mM otopinom benzokinona pokazuju najveću aktivnost u prvoj (5,19 U mL⁻¹) i drugoj reakciji (4,02 U mL⁻¹). Imobilizirani enzimi prethodno aktivirani 10 %-tnim (w/v) sukcinid anhidrida također pokazuju aktivnost od 5,19 U mL⁻¹ u prvoj reakciji, međutim u drugoj reakciji aktivnost pada na 2,00 U mL⁻¹.

Slika 29 prikazuje usporedni prikaz izračunatih parametara uspješnosti imobilizacije enzima DERA na magnetske nanočestice obložene silikom, aktivirane različitim metodama. Najveću efikasnost (97,22 %) i preostalu aktivnost imobiliziranog enzima (77,46 %) pokazuju imobilizirani enzimi na nosiocu aktiviranim s 1,5 mM otopinom benzokinona. Najveće iskorištenje (56,24 %) pokazuju imobilizirani enzimi prethodno aktivirani 10 %-tnim (w/v) sukcinid anhidrida, što znači da je došlo do imobilizacije najveće količine enzima, međutim enzim se znatno deaktivirao prilikom imobilizacije. Također, primjetno je da su preostale aktivnosti imobiliziranog enzima veće od preostale aktivnosti čistog enzima (35,52 %), što upućuje na to da je imobilizacijom poboljšana stabilnost enzima DERA-e.



Slika 28. Usporedni prikaz izmjerenih aktivnosti slobodnog i imobiliziranog enzima na nosiocima aktiviranim različitim metodama (tokom dvije reakcije).



Slika 29. Usporedni prikaz izračunatih parametara uspješnosti imobilizacije enzima DERA-e na magnetske nanočestice obložene silikom, aktivirane različitim metodama.

Obzirom da je imobilizirani enzim na nosiocu aktiviranom s 1,5 mM otopinom bezokinona pokazao najveću efikasnost i preostalu aktivnost, odnosno stabilnost, taj način aktivacije nosioca je korišten u daljim istraživanjima optimiranja procesa imobilizacije.

4.4. Rezultati ispitivanja utjecaja pH i koncentracije pufera na uspješnost imobilizacije enzima

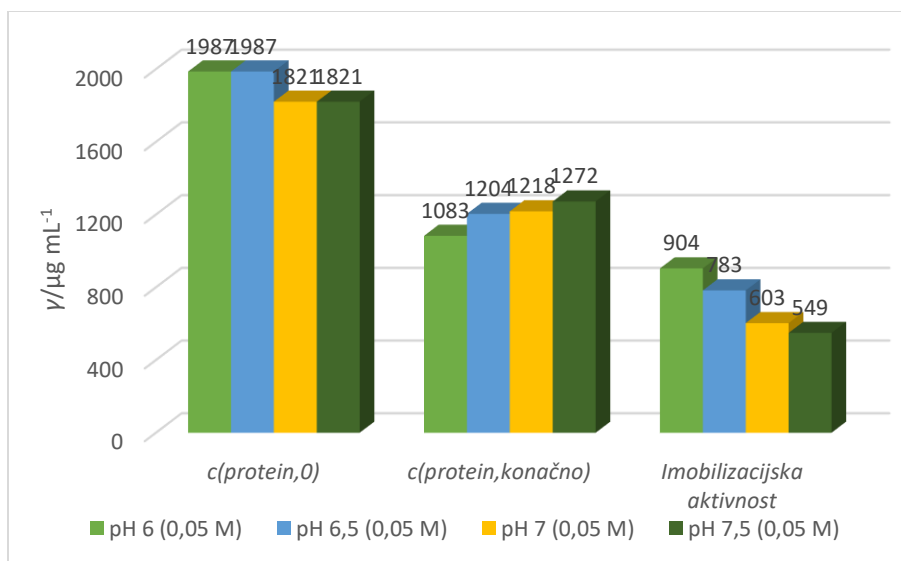
Sastav imobilizacijskog pufera koji uključuje koncentraciju i pH također može imati značajan utjecaj na uspješnost procesa imobilizacije. Stoga se pristupilo istraživanju koje se sastojalo u ispitivanjima ishoda procesa korištenjem imobilizacijskih pufera različitih pH vrijednosti u rasponu 6 - 7,5 pri dvije koncentracije fosfatnog pufera (0,05 M i 1,0 M). U ovim istraživanjima kao nosioc koristile su se MNČ koje su aktivirane s 1,5 mM otopinom benzokinona.

Rezultati mjerenja koncentracija proteina dobiveni prilikom imobilizacije DERA-e na MNČ aktivirane s 1,5 mM otopinom benzokinona, u fosfatnom puferu koncentracije 0,05 M na temperaturi od 25 °C, te pri različitim pH vrijednostima dani su u Tablici 6. Prikazani su rezultati mjerenja koncentracija proteina Bradfordovom metodom u otopini slobodnog enzima prije procesa imobilizacije ($C_{protein,0}$) i nakon završenog procesa imobilizacije ($C_{protein,konačno}$), te aktivnost slobodnog enzima u otopini prije imobilizacije ($A_{slobodni\ enzim}$) i aktivnost imobiliziranog enzima ($A_{imobilizirani\ enzim}$). Pomoću izmjerenih vrijednosti izračunati su parametri uspješnosti imobilizacije: iskorištenje, efikasnost i imobilizacijska aktivnost. Svi rezultati su prikazani u Tablici 6.

Tablica 6. Izmjerene koncentracije proteina i aktivnosti enzima, izračunati parametri uspješnosti imobilizacije enzima DERA na magnetske nanočestice obložene silikom, te aktivirane s 1,5 mM otopinom benzokinona u fosfatnom puferu koncentracije 0,05 M na temperaturi od 25 °C, te pri različitim pH vrijednostima.

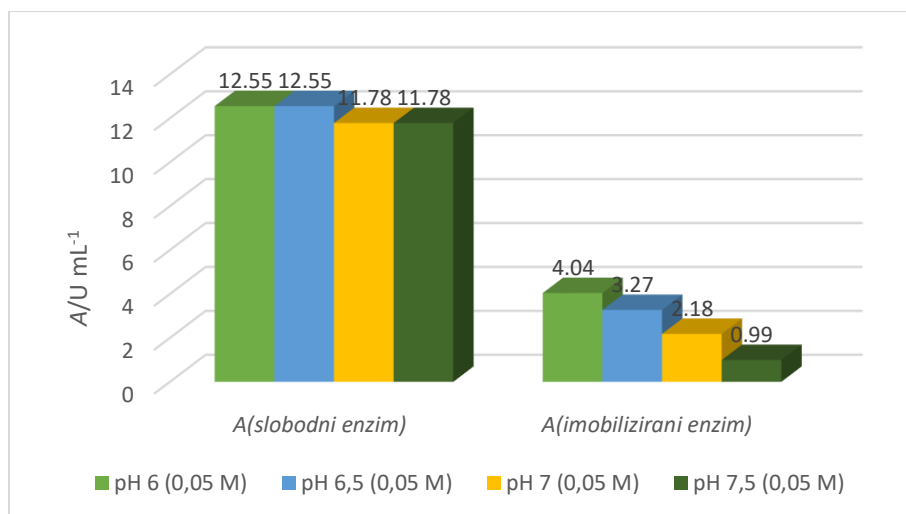
Fosfatni pufer koncentracije 0,05 M				
pH	6,0	6,5	7,0	7,5
<i>C_{protein,0}</i> / $\mu\text{g mL}^{-1}$	1987	1987	1821	1821
<i>C_{protein,konačno}</i> / $\mu\text{g mL}^{-1}$	1083	1204	1218	1272
<i>A_{slobodni enzim}</i> / U mL^{-1}	12,55	12,55	11,78	11,78
<i>A_{imobilizirani enzim}</i> / U mL^{-1}	4,04	3,27	2,18	0,99
Iskorištenje / %	45,50	39,41	33,11	30,15
Efikasnost / %	70,67	66,12	55,89	27,88
Imobilizacijska aktivnost / $\mu\text{g mL}^{-1}$	904	783	603	549

Slika 30 prikazuje usporedni prikaz izmjerenih koncentracija proteina i izračunatih imobilizacijskih aktivnosti pri različitim pH vrijednostima. Enzimi imobilizirani pri pH 6 postižu najveću imobilizacijsku aktivnost ($904 \mu\text{g mL}^{-1}$). Najmanju imobilizacijsku aktivnost postižu enzimi imobilizirani pri pH 7,5 ($549 \mu\text{g mL}^{-1}$).



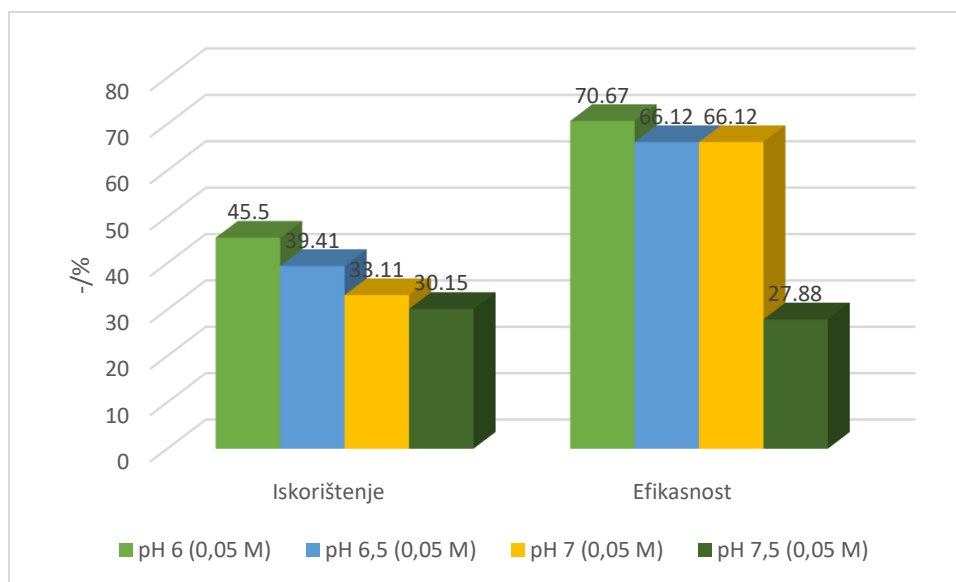
Slika 30. Usporedni prikaz izmjerenih koncentracija proteina i izračunatih imobilizacijskih aktivnosti enzima DERA-e pri različitim pH vrijednostima.

Slika 31 prikazuje usporedni prikaz izmjerenih aktivnosti slobodnog enzima i imobiliziranog enzima pri različitim pH vrijednostima. Imobilizirani enzimi pri pH 6 pokazuju najveću aktivnost ($4,04 \text{ U mL}^{-1}$). Najveću deaktivaciju pokazuju enzimi imobilizirani pri pH 7,5, čija aktivnost iznosi $0,99 \text{ U mL}^{-1}$.



Slika 31. Usporedni prikaz izmjerenih aktivnosti slobodnog enzima i imobiliziranog enzima DERA-e pri različitim pH vrijednostima.

Slika 32 prikazuje usporedni prikaz izračunatih parametara uspješnosti imobilizacije pri različitim pH vrijednostima. Najveće iskorištenje (45,5 %) i efikasnost (70,67 %) pokazuju enzimi imobilizirani pri pH 6. Najmanje iskorištenje (30,15 %) i efikasnost (27,88 %) pokazuju enzimi imobilizirani pri pH 7,5. Rezultati pokazuju da korištenjem pufera koncentracije 0,05 M imobilizaciji najviše pogoduje pH 6, te da se povećanjem pH smanjuju iskorištenje i efikasnost imobilizacije.



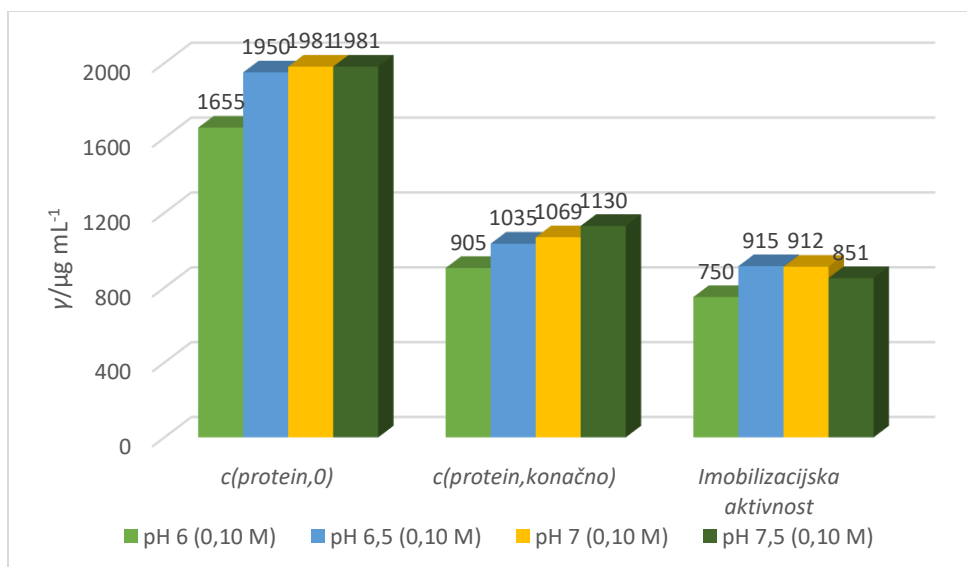
Slika 32. Usporedni prikaz izračunatih parametara uspješnosti imobilizacije enzima DERA-e pri različitim pH vrijednostima.

Na isti način napravljena su mjerenja u puferu više koncentracije, odnosno 1,0 M. U Tablici 7 prikazani su rezultati mjerenja koncentracija proteina Bradfordovom metodom u otopini slobodnog enzima prije procesa imobilizacije ($C_{protein,0}$) i nakon završenog procesa imobilizacije ($C_{protein,konačno}$), te aktivnost slobodnog enzima u otopini prije imobilizacije ($A_{slobodni\ enzim}$) i aktivnost imobiliziranog enzima ($A_{imobilizirani\ enzim}$). Pomoću izmjerenih vrijednosti izračunati su parametri uspješnosti imobilizacije: iskorištenje, efikasnost i imobilizacijska aktivnost.

Tablica 7. Izmjerene koncentracije proteina i aktivnosti enzima, izračunati parametri uspješnosti imobilizacije enzima DERA na magnetske nanočestice obložene silikom, te aktivirane s 1,5 mM otopinom benzokinona u fosfatnom puferu koncentracije 0,10 M na temperaturi od 25 °C, te pri različitim pH vrijednostima.

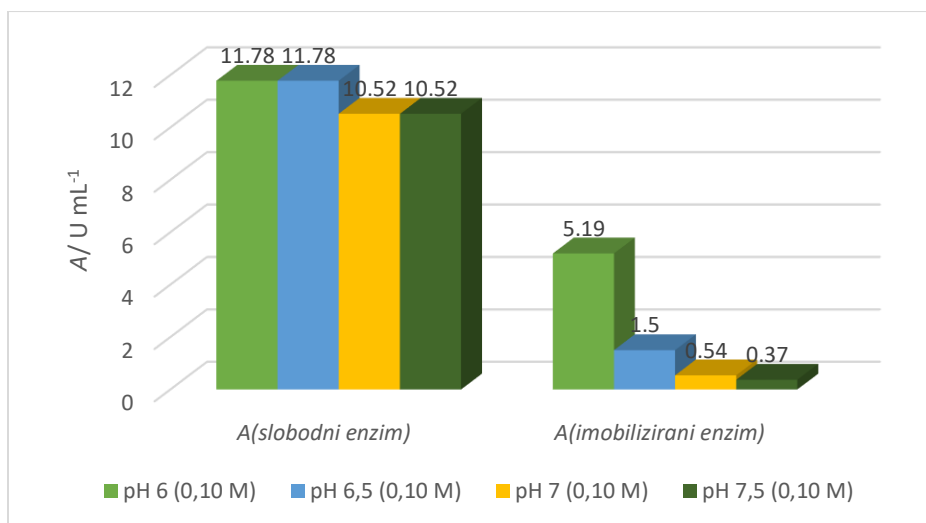
Fosfatni pufer koncentracije 0,10 M				
pH	6,0	6,5	7,0	7,5
$C_{protein,0} / \mu\text{g mL}^{-1}$	1655	1950	1981	1981
$C_{protein,konačno} / \mu\text{g mL}^{-1}$	905	1035	1069	1130
$A_{slobodni\ enzim} / \text{U mL}^{-1}$	11,78	11,78	10,52	10,52
$A_{imobilizirani\ enzim} / \text{U mL}^{-1}$	5,19	1,50	0,54	0,37
Iskorištenje / %	45,32	46,92	46,04	42,96
Efikasnost / %	97,22	27,14	11,07	8,19
Imobilizacijska aktivnost / $\mu\text{g mL}^{-1}$	750	915	912	851

Slika 33 prikazuje usporedni prikaz izmjerenih koncentracija proteina i izračunatih imobilizacijskih aktivnosti pri različitim pH vrijednostima. Enzimi imobilizirani pri pH 6,5 postižu najveću imobilizacijsku aktivnost ($915 \mu\text{g mL}^{-1}$). Najmanju imobilizacijsku aktivnost postižu enzimi imobilizirani pri pH 6 ($750 \mu\text{g mL}^{-1}$).



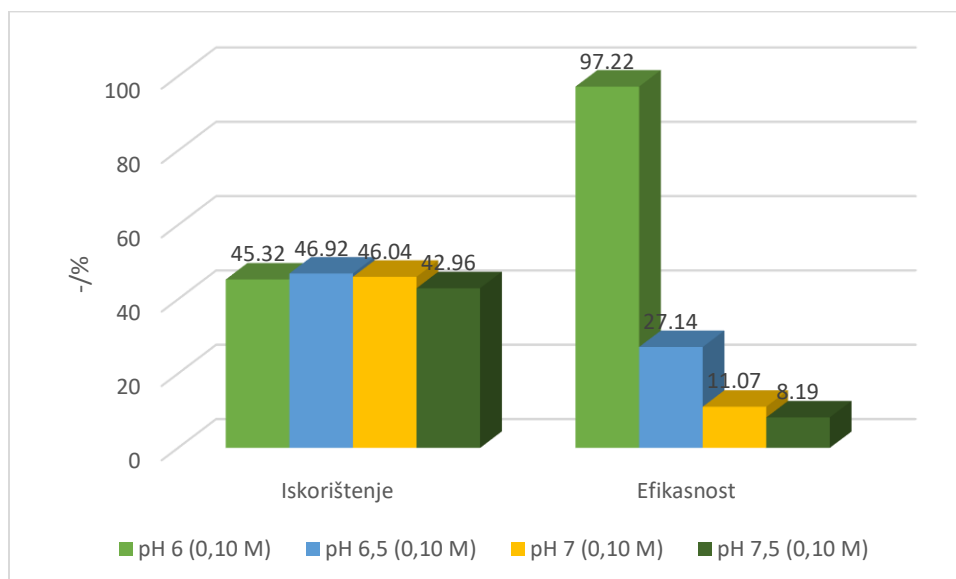
Slika 33. Usporedni prikaz izmjerenih koncentracija proteina i izračunatih imobilizacijskih aktivnosti enzima DERA-e pri različitim pH vrijednostima.

Slika 34 prikazuje usporedni prikaz izmjerenih aktivnosti slobodnog enzima i imobiliziranog enzima pri različitim vrijednostima pH. Enzimi imobilizirani pri pH 6 pokazuju najveću aktivnost ($5,19 \text{ U mL}^{-1}$). Najveću deaktivaciju pokazuju enzimi imobilizirani pri pH 7,5, čija aktivnost iznosi $0,37 \text{ U mL}^{-1}$.



Slika 34. Usporedni prikaz izmjerenih aktivnosti slobodnog enzima i imobiliziranog enzima DERA-e pri različitim pH vrijednostima.

Slika 35 prikazuje usporedni prikaz izračunatih parametara uspješnosti imobilizacije pri različitim vrijednostima pH. Najveće iskorištenje (46,92 %) pokazuju imobilizirani enzimi pri pH 6,5. Najveću efikasnost (97,22 %) pokazuju imobilizirani enzimi pri pH 6. Najmanje iskorištenje (42,96 %) i efikasnost (8,19 %) pokazuju imobilizirani enzimi pri pH 7,5. Rezultati pokazuju da korištenjem fosfatnog pufera koncentracije 0,10 M imobilizaciji najviše pogoduje pH 6, jer imobilizirani enzimi zadržavaju gotovo svu aktivnost nakon imobilizacije, bez obzira na nešto manje iskorištenje (45,32 %). Povećanje pH pri 0,10 M koncentraciji fosfatnog pufera vrlo nepovoljno utječe na aktivnost, tj. dolazi do velikog pada aktivnosti imobiliziranog enzima.



Slika 35. Usporedni prikaz izračunatih parametara uspješnosti imobilizacije enzima DERA-e pri različitim pH vrijednostima.

Na temelju dobivenih parametara uspješnosti procesa zaključeno je da je optimalni imobilizacijski pufer 0,1 M fosfatni pufer pH 6.

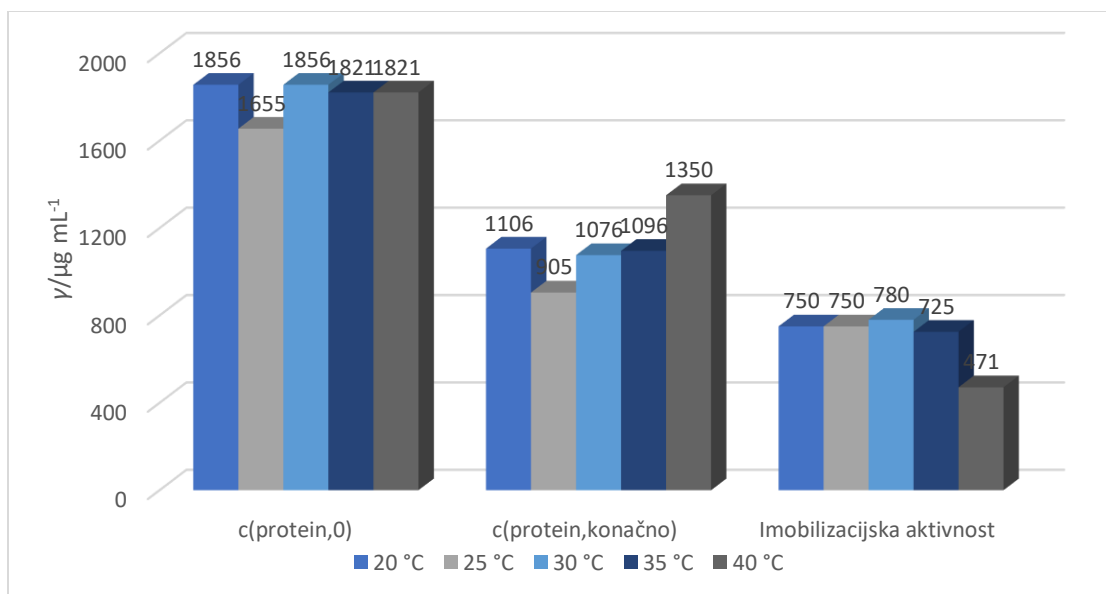
4.5. Ispitivanje utjecaja temperature na uspješnost imobilizacije enzima

Pored sastava imobilizacijskog pufera, i temperatura može imati značajan utjecaj na proces imobilizacije. Stoga je istraživana utjecaj temperature na uspješnost procesa imobilizacije enzima DERA-e. Imobilizacija se provodila na MNC obložene silikom, te aktivirane s 1,5 mM otopinom benzokinona u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6 u temperaturnom rasponu od 20-40 °C. U Tablici 8. prikazani su rezultati mjerenja koncentracija proteina Bradfordovom metodom u otopini slobodnog enzima prije procesa imobilizacije ($C_{protein,0}$) i nakon završenog procesa imobilizacije ($C_{protein,konačno}$), te aktivnost slobodnog enzima u otopini prije imobilizacije ($A_{slobodni\ enzim}$) i aktivnost imobiliziranog enzima ($A_{imobilizirani\ enzim}$). Iz izmjerenih vrijednosti izračunati su parametri uspješnosti imobilizacije: iskorištenje, efikasnost i imobilizacijska aktivnost.

Tablica 8. Izmjerene koncentracije proteina i aktivnosti enzima, izračunati parametri uspješnosti imobilizacije enzima DERA na magnetske nanočestice obložene silikom, te aktivirane s 1,5 mM otopinom benzokinona u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6 pri temperaturama u rasponu od 20 °C do 40 °C.

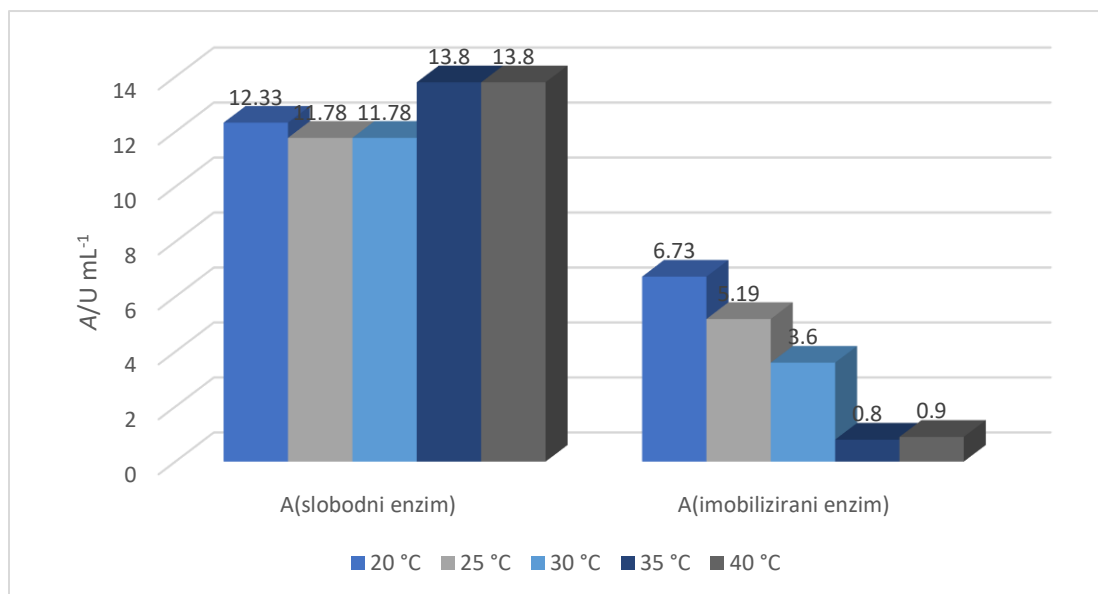
Temperatura	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
$C_{protein,0} / \mu\text{g mL}^{-1}$	1856	1655	1856	1821	1821
$C_{protein,konačno} / \mu\text{g mL}^{-1}$	1106	905	1076	1096	1350
$A_{slobodni\ enzim} / \text{U mL}^{-1}$	12,33	11,78	11,78	13,80	13,80
$A_{imobilizirani\ enzim} / \text{U mL}^{-1}$	6,73	5,19	3,60	0,80	0,90
Iskorištenje / %	40,41	45,32	42,03	39,81	25,86
Efikasnost / %	135,07	97,22	72,72	14,56	25,21
Imobilizacijska aktivnost / $\mu\text{g mL}^{-1}$	750	750	780	725	471

Slika 36 prikazuje usporedni prikaz izmjerenih koncentracija proteina i izračunatih imobilizacijskih aktivnosti pri različitim temperaturama. Enzimi imobilizirani pri 30 °C postižu najveću imobilizacijsku aktivnost (780 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Najmanja imobilizacijska aktivnost postignuta je prilikom provedbe imobilizacije pri 40 °C (471 $\mu\text{g mL}^{-1}$).



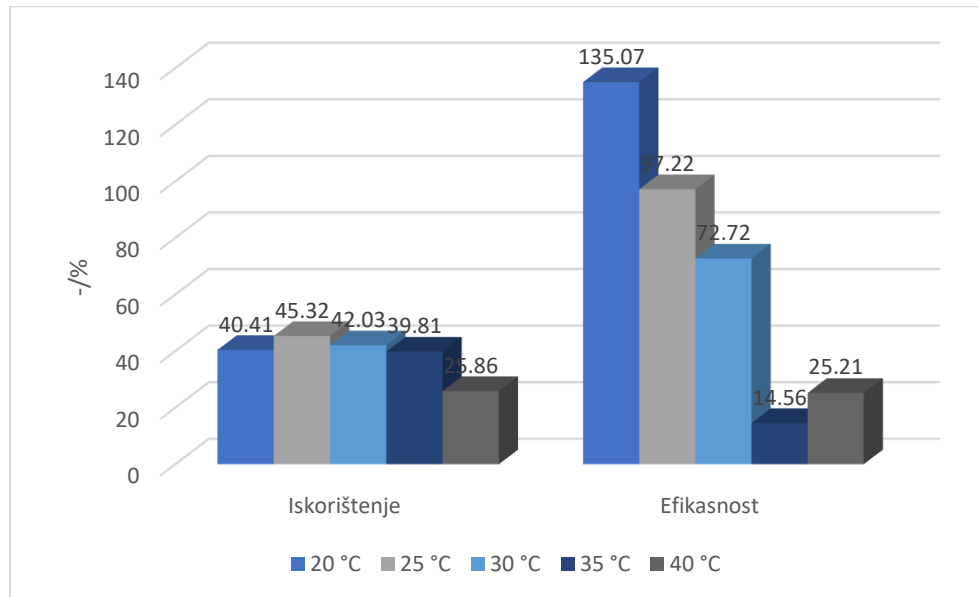
Slika 36. Usporedni prikaz izmjerenih koncentracija proteina i izračunatih imobilizacijskih aktivnosti enzima DERA-e pri različitim temperaturama.

Slika 37 prikazuje usporedni prikaz izmjerenih aktivnosti slobodnog enzima i imobiliziranog enzima pri različitim temperaturama. Imobilizirani enzimi pri 20 °C pokazuju najveću aktivnost ($6,73 \text{ U mL}^{-1}$). Najmanje aktivnosti pokazuju enzimi imobilizirani pri temperaturama od 35 °C i 40 °C koje iznose $0,80 \text{ U mL}^{-1}$ i $0,90 \text{ U mL}^{-1}$.



Slika 37. Usporedni prikaz izmjerenih aktivnosti slobodnog enzima i imobiliziranog enzima DERA-e pri različitim temperaturama.

Slika 38 prikazuje usporedni prikaz izračunatih parametara uspješnosti imobilizacije pri različitim temperaturama. Najveću efikasnost (135,07 %) pokazuju enzimi imobilizirani pri 20 °C. Najveće iskorištenje (45,32 %) pokazuju enzimi imobilizirani pri 25 °C. Rezultati pokazuju da imobilizaciji najviše pogoduje temperatura od 20 °C, pri kojoj je ujedno došlo i do hiperaktivacije, te da povećanjem temperature dolazi do pada aktivnosti imobiliziranog enzima.



Slika 38. Usporedni prikaz izračunatih parametara uspješnosti imobilizacije enzima DERA-e pri različitim temperaturama.

5. ZAKLJUČAK

Magnetske nanočestice obložene silikom uspješno su sintetizirane po Stöber procesu. Uslijedila je funkcionalizacija APTES-om, aktivacija benzokinonom i sukcinid anhidridom, te zatim imobilizacija enzimom DERA. Imobilizacija je provedena pri različitim vrijednostima pH fosfatnog pufera i temperature. Izračunati su parametri koji su pokazatelji uspješnosti imobilizacije: iskorištenje, efikasnost, imobilizacijska aktivnost i preostala aktivnost imobiliziranog enzima.

Rezultati su pokazali da je preostala aktivnost slobodnog enzima manja od postignutih preostalih aktivnosti imobiliziranog enzima, što opravdava korištenje imobilizacije kao metode stabilizacije enzima DERA-e.

Iz izračunatih parametra uspješnosti procesa imobilizacije može se zaključiti da se prilikom imobilizacije kao najbolje sredstvo za aktivaciju pokazao benzokinon pri koncentraciji od 1,5 mM, jer je eksperimentalnim ispitivanjem postignuta najveća efikasnost i najveća preostala aktivnost imobiliziranog enzima.

Najveće iskorištenje je postignuto prilikom ispitivanja enzima imobiliziranih na nosioc aktivirani 10 %-tnim sukcinid anhidridom, međutim pokazuju manju efikasnost i preostalu aktivnost imobiliziranog enzima.

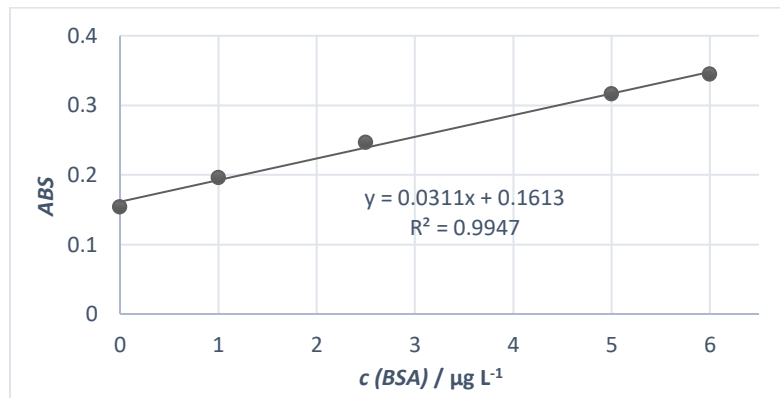
Budući da se benzokinon pokazao kao optimalno sredstvo za aktivaciju, uz njegovu primjenu su ispitivani utjecaji pH i temperature, značajnih parametara koji utječu na uspješnost imobilizacije. Rezultati pokazuju da se najveća efikasnost imobilizacije postiže pri temperaturi od 20 °C i primjenom fosfatnog pufera koncentracije 0,10 M i vrijednosti pH 6 kao imobilizacijskog pufera.

6. LITERATURA

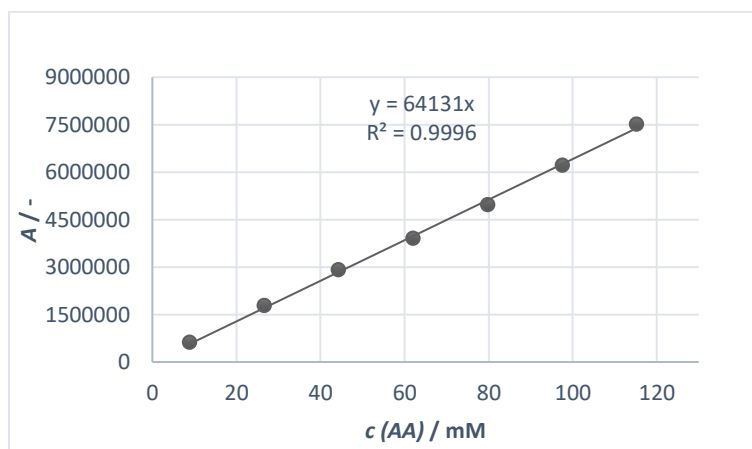
1. Y.J. Yoo, Y. Feng, Y.-H. Kim, C.F.J. Yagonia, „Fundamentals of Enzyme Engineering, Springer Netherlands (2017) 8-62.
2. Z. Fridrik Blažević, „Bioreakcijska tehnika I, Interna skripta“ Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (2012).
3. K. Buchholz, V. Kasche, U. T. Bornscheuer, “Biocatalysts and Enzyme Technology 2nd Edition” Wiley-Blackwell (2012) 1.
4. D. J. Maron, S. Fazio, M. F. Linton, „Current Perspectives on Statins“, *Circulation* 101 (2000) 207-213.
5. https://www.health.harvard.edu/a_to_z/high-cholesterol-hypercholesterolemia-a-to-z (pristup 06.04.2020.).
6. M. Haridas, E. M. M. Abdelraheem, U. Hanefeld „2-Deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase (DERA): applications and modifications“ *Appl Microbiol Biotechnol* 102 (2018) 9959–9971.
7. S. M. Dean, W. A. Greenberg, C.-H. Wonga, „Recent Advances in Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis“ *Adv. Synth. Catal.* 349 (2007), 1308 – 1320.
8. A. Švarc, Z. F. Blažević, Đ. Vasić-Rački, A. Szekrenyi, W.-D. Fessner, S. J Charnockc, A. Vrsalović Presečki, „2-Deoxyribose-5-phosphate aldolase from *Thermotogamaritima* in the synthesis of a statin side-chain precursor: characterization, modeling and optimization“ *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 94 (2019) 1832–1842.
9. S. Jennewein, M. Schürmann, M. Wolberg, I. Hilker, R. Luiten, M. Wubbolts, D. Mink „Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase“, *Biotechnol. J.* 1 (2006) 537–548.
10. H. Vaghari, H. Jafarizadeh-Malmiri, M. Mohammadlou, A. Berenjian, N. Anarjan, N. Jafari, S. Nasiri, „Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization“ *Biotechnol. Lett.* 38 (2016) 223–233.
11. A. Abolpour Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevanato, „Enzyme immobilization: an update“ *J. Chem. Biol.* 6 (2013) 185–205.
12. P.K. Robinson, „Enzymes: principles and biotechnological applications“, Portland Press Limited (2015).
13. <http://botanystudies.com/mechanism-of-enzyme-action/> (pristup 21.03.2020.).
14. H. Ma, K. Szeler, S. C. L. Kamerlin, M. Widersten, „Linking coupled motions and entropic effects to the catalytic activity of 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA)“ *Chem. Sci.* 7, (2016) 1415–1421.

15. S.D. Minter „ Enzyme stabilization and immobilization – Methods and protocols“, Humana Press (2017) 4.
16. L. Cao, „Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design “ WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2005) 169.
17. C. L. Windle, M. Muller, A. Nelson, A. Berry, „Engineering aldolases as biocatalysts“ Curr. Opin. Chem. Biol. 19 (2014) 25–33.
18. R. G. Digigow, J.-F. Dechézelles, H. Dietsch, I. Geissbühler, D. Vanhecke, C. Geers, A. M. Hirt, B. Rothen-Rutishauser, A. Petri-Fink, „Preparation and characterization of functional silica hybrid magnetic nanoparticles“ J. Magn. Mater. 362 (2014) 72–79.
19. R. A. Sheldon, S. van Pelt, „Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how“ Chem. Soc. Rev. 42 (2013) 6223-6235.
20. P. Zucca, E. Sanjust, „Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms“ Molecules 19 (2014) 14139-14194.
21. K. Buchholz, V. Kasche, U. T. Bornscheuer, “Biocatalysts and Enzyme Technology 2nd Edition” Wiley-Blackwell (2012) 320.
22. M. Moritz, M. Geszke-Moritz, „Mesoporous materials as multifunctional tools in bioscience: Principles and applications“, Mater. Sci. Eng. C 49 (2015) 114-151.
23. K. Hola, Z. Markova, G. Zoppellaro, J. Tucek, R. Zboril, „Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances“ Biotechnol. Adv. 33 (2015) 1162-1176.
24. M. A. Gonzalez-Fernandez, T. E. Torres, M. Andres-Verges, R. Costo, P. de la Presa, C. J. Serna, M. P. Morales, C. Marquina, M. R. Ibarra, G. F. Goya, „Magnetic nanoparticles for power absorption: Optimizing size, shape and magnetic properties“ J. Solid State Chem. 182 (2009) 2779–2784.
25. A. P. Philipse, M. P. B. van Bruggen, C. Pathmamanoharan, „Magnetic Silica Dispersions: Preparation and Stability of Surface-Modified Silica Particles with a Magnetic Core“ Langmuir 10 (1994) 92-99.
26. Y. J. Wong, L. Zhu, W. S. Teo, Y. W. Tan, Y. Yang, C. Wang, H. Chen, „Revisiting the Stöber Method: Inhomogeneity in Silica Shells“ J. Am. Chem. Soc. 133 (2011) 11422–11425.
27. W.-Y. Rho, H.-M. Kim, S. Kyeong, Y.-L. Kang, D.-H. Kim, H. Kang, C. Jeong, D.-E. Kim, Y.-S. Lee, B.-H. Jun, „Facile synthesis of monodispersed silica-coated magnetic nanoparticles“ J. Ind. Eng. Chem. 20 (2014) 2646-2649.
28. , D. A. Skoog, D. M., West, F. J. Holler: Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb (1999).

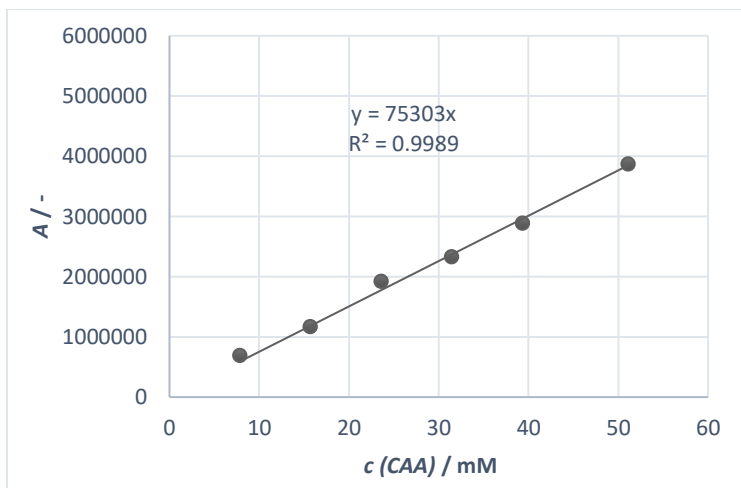
7. PRILOZI



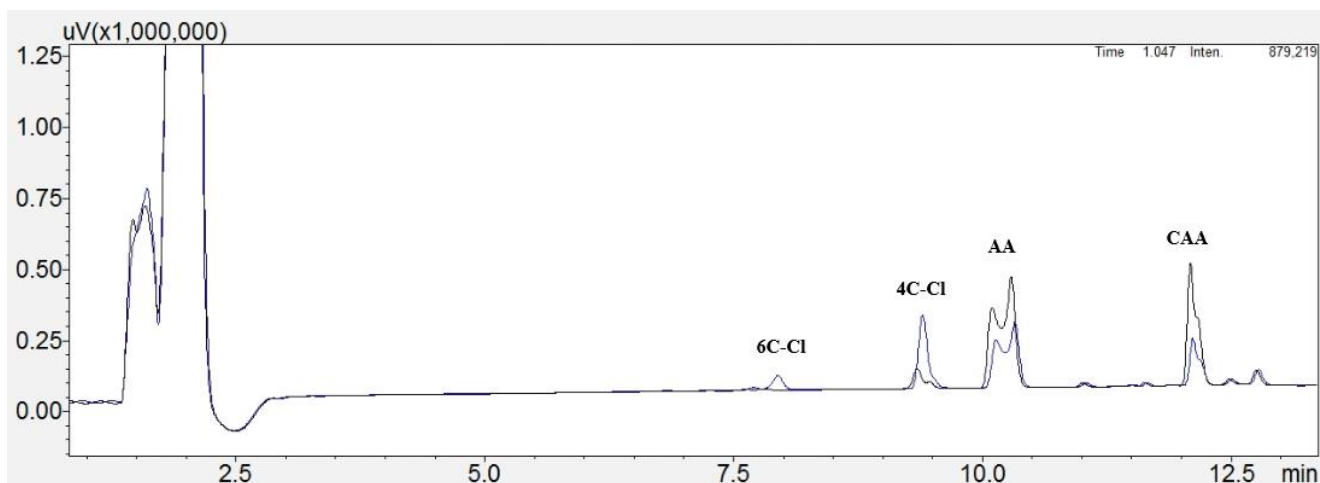
Prilog 1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina.



Prilog 2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije acetaldehida.



Prilog 3. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije kloroacetaldehida.



Prilog 4. Kromatogram dobiven na HPLC-u uz prikazana retencijska vremena pojedinih spojeva.

8. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA

Grčki simboli

Δ – promjena [-]

ε – molarni apsorpcijski koeficijent [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]

λ – valna duljina [nm]

γ – masena koncentracija tvari u otopini [mg mL^{-1}]

Simboli

A – površina, eng. *area* [-]

A_s – specifična aktivnost enzima [U mg^{-1}]

b – duljina puta svjetlosti [cm]

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

d – promjer [cm]

T – temperatura [$^{\circ}\text{C}$]

t – vrijeme [s]

Skraćenice

4C-Cl - (3R)-4-kloro-3-hidroksibutanal

6C-Cl - (3R,5R)-6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal

AA - acetaldehid

ABS – apsorpcija na određenoj valnoj duljini svjetlosti

APTES – (3-aminopropil)trietoksisilan

BSA - albumin goveđeg seruma, eng. *bovine serum albumin*

CAA - kloroacetaldehid

DERA – deoksiriboza-5-fosfat aldolaza

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

NČ – nanočestica

MNČ – magnetska nanočestica

PEG – polietilen glikol

TEOS – tetraetil ortosilikat

9. ŽIVOTOPIS

Marina Punčec, [REDACTED] Nakon završetka osnovne škole Dragutina Domjanića upisuje gimnaziju Tituša Brezovačkog koju završava 2011. godine s vrlo dobrim uspjehom. 2013. godine upisuje preddiplomski studij Ekoinženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2015. na istom fakultetu upisuje preddiplomski studij na smjeru Kemijsko inženjerstvo kojeg završava 2018. godine. Iste godine upisuje Diplomski studij Kemijskog inženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.