

Optimiranje i modeliranje enzimatske sinteze nanočestica kalcijevog karbonata

Bućan, Željka

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:149:231112>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Željka Bućan

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Željka Bućan

OPTIMIRANJE I MODELIRANJE ENZIMATSKE SINTEZE
NANOČESTICA KALCIJEVOG KARBONATA

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki
2. prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum
3. prof. dr. sc. Ana Lončarić Božić

Zagreb, srpanj 2018.

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki na stručnom vodstvu, strpljenju i pomoći prilikom izrade i pisanja diplomskog rada

Veliko hvala asistentici Leli Pintarić na velikoj pomoći te na brojnim savjetima i uputama kako u eksperimentalnom radu tako i tijekom pisanja ovog rada. Također, hvala i ostalim asistentima na ugodnoj i pozitivnoj radnoj atmosferi u laboratoriju.

Želim se zahvaliti i svojim kolegama koji su mi vrijeme provedeno na fakultetu uljepšali svojim prisutstvom.

Posebno se želim zahvaliti svojim roditeljima koji su me uvijek usmjeravali na pravi put, ali i podupirali u svemu. I na kraju, najveće hvala mojem mužu Dejanu što je uvijek bio uz mene i nesebično mi pomagao u svemu.

SAŽETAK

Nanočestice kalcijevog karbonata se zbog svojih svojstava primjenjuju u medicini, tekstilnoj, prehrambenoj i ambalažnoj industriji zbog čega je nužan razvoj ekološki, energetski i ekonomski prihvatljivijih metoda njihove sinteze.

U ovom radu provedena je optimizacija procesa biokatalitičke sinteze nanočestica kalcijevog karbonata uz enzim ureazu korištenjem statističke metode Dizajna eksperimenata. Ispitana je kinetika enzima ureaze u reakciji hidrolize uree te je određen utjecaj kalcijevih iona na aktivnost enzima. Reakcije su provedene u redestiliranoj vodi pri temperaturama $T = 25\text{ °C}$, $T = 32,5\text{ °C}$ i $T = 40\text{ °C}$.

U svrhu optimizacije procesa sinteze nanočestica varirane su ulazne varijable, temperatura ($25 - 40\text{ °C}$) i koncentracija enzima ureaze ($0,1 - 2\text{ mg mL}^{-1}$), uz konstantnu koncentraciju uree i kalcijevog klorida. Ispitivanje kinetike enzima ureaze provedeno je mjerenjem početne brzine reakcije hidrolize uree pri različitim koncentracijama uree, uz konstantnu koncentraciju enzima. Kinetika reakcije hidrolize uree opisana je jednosupstratnom Michaelis – Mentenovom kinetikom. Utjecaj kalcijevih iona na aktivnost enzima ispitan je mjerenjem specifične aktivnosti ureaze u ovisnosti o različitim koncentracijama kalcijeva klorida uz konstantnu koncentraciju uree i ureaze. Utvrđeno je da kalcijevi ioni inhibiraju ureazu nekompetitivnom inhibicijom. Pretpostavljeni matematički model procesa validiran je provođenjem reakcije u kotlastom reaktoru uz stalno miješanje na termostatiranoj tresilici.

Nanočestice kalcijevog karbonata nastale reakcijom kalcijevih iona s produktima hidrolize uree karakterizirane su pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa uz energetsko disperzivnu spektroskopiju i NTA metodom.

Ključne riječi: nanočestice, kalcijev karbonat, urea, enzim, ureaza

ABSTRACT

Because of their properties, nanoparticles of calcium carbonate have found application in medicine, textiles, food and packaging industries, which is why the development of ecologically, energetically and economically more acceptable methods of their synthesis is necessary.

In this work, the optimization of biocatalytic synthesis of calcium carbonate nanoparticles by enzyme urease was carried out by using the statistical methods of Design of Experiments. The kinetics of urease were studied in the reaction of urea hydrolysis and the influence of calcium ions on the enzyme activity was determined. The reactions were carried out in redistilled water at a temperature of $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T = 32,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

For the optimisation of the nanoparticle synthesis process, the input variables such as the temperature ($25 - 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) and urease concentration ($0,1 - 2\text{ mg mL}^{-1}$) were varied within the certain ranges with constant concentrations of urea and calcium chloride. Reaction kinetics was experimentally determined using the initial reaction rate method at different concentrations of urea and with constant concentration of the enzyme. Kinetics of the reaction was described with Michaelis – Menten kinetic model. Influence of calcium ions on the enzyme activity was tested by measuring the specific activity of urease as a function of various concentrations of calcium chloride with a constant concentration of urea and urease. It was found that calcium ions inhibit urease by non – competitive inhibition. The assumed mathematical model of the process was validated in the batch reactor with constant mixing on the thermostatic shaker.

Synthesized nanoparticles of calcium carbonate were analyzed by a scanning electron microscope with energy dispersive spectroscopy and nanoparticle tracking analysis.

Keywords: nanoparticles, calcium carbonate, urea, enzyme, urease

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	OPĆI DIO.....	2
2.1.	Nanotehnologija i nanočestice.....	2
2.1.1.	Kalcijev karbonat	5
2.2.	Biokatalizatori	6
2.2.1.	Ureaza.....	9
2.2.2.	Kinetika enzimski kataliziranih reakcija	9
2.3.	Metoda Dizajna eksperimenata	12
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
3.1.	APARATURA.....	15
3.1.1.	Kotlasti reaktor	15
3.1.2.	Spektrofotometar	15
3.1.3.	Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC)	16
3.1.4.	Malvern Nanosight LM10	17
3.1.5.	Centrifuga.....	18
3.1.6.	Liofilizator.....	19
3.1.7.	Pretražni elektronski mikroskop s energetske disperzivnom rendgenskom spektroskopijom	19
3.2.	ANALITIČKE METODE	20
3.2.1.	Određivanje koncentracije amonijevih iona	20
3.2.2.	Određivanje koncentracije uree	21
3.2.3.	Određivanje aktivnosti enzima ureaze.....	22
3.2.4.	Utjecaj kalcijevih iona na aktivnost enzima ureaze.....	24
3.2.5.	NTA metoda	25
3.3.	REAKTORSKI EKSPERIMENTI.....	25
3.3.1.	Optimiranje sinteze nanočestica kalcijevog karbonata.....	25
3.3.2.	Hidroliza uree u kotlastom reaktoru	27
3.3.3.	Sinteza nanočestica kalcijevog karbonata u kotlastom reaktoru	28
4.	MODELIRANJE SINTEZE NANOČESTICA KALCIJEVOG KARBONATA.....	30
4.1.	KINETIČKI MODEL.....	30

4.2. REAKTORSKI MODEL	31
5. REZULTATI I RASPRAVA	33
5.1. OPTIMIZACIJA PROCESA BOKATALITIČKE SINTEZE NANOČESTICA KALCIJEVOG KARBONATA	33
5.2. KINETIKA ENZIMA UREAZE.....	36
5.2.1. Kinetika enzima ureaze u redestiliranoj vodi	36
5.2.2. Utjecaj kalcijevih iona na aktivnost enzima ureaze.....	38
5.3. HIDROLIZA UREE U KOTLASTOM REAKTORU.....	41
5.4. SINTEZA NANOČESTICA KALCIJEVOG KARBONATA U KOTLASTOM REAKTORU	43
5.5. KARAKTERIZACIJA DOBIVENIH NANOČESTICA KALCIJEVOG KARBONATA POMOĆU PRETRAŽNOG ELEKTRONSKOG MIKROSKOPA S ENERGETSKI DISPERZIVNOM RENDGENSKOM SPEKTROSKOPIJOM	45
6. ZAKLJUČAK	49
7. POPIS SIMBOLA I KRATICA	50
8. LITERATURA.....	52
9. PRILOZI.....	54
10. ŽIVOTOPIS	56

1. UVOD

Razvoj nanotehnologije omogućio je stvaranje novih funkcionalnih materijala, inovativnih proizvoda te značajan napredak u medicini. Prednost tih proizvoda je što su minijturni i što imaju nova funkcionalna svojstva.¹ Konvencionalne mehaničke i fizikalno kemijske metode sinteze nanočestica postale su zastarjele, komplicirane, skupe i štetne za okoliš i ljudsko zdravlje.³ Nanočestice koje dopiju u okoliš podložne su fizikalno kemijskim transformacijama, a veliki problem predstavlja njihova citotoksičnost i genotoksičnost.²

Kako bi se proizvele sintetizirale nanočestice koje nisu opasne za okoliš i čovjeka razvijaju se biokatalitičke metode njihove sinteze uz korištenje mikroorganizama, odnosno enzima. Biokatalizatori ili enzimi su proteinske makromolekule koje ubrzavaju biokemijske reakcije u živim organizmima. Glavne karakteristike koje ih čine nezamjenjivima su njihova netoksičnost, obnovljivost, visoka specifičnost i selektivnost čime se povećava produktivnost reakcije i smanjuje opterećenje okoliša. Također, mogućnost djelovanja enzima pod umjerenim uvjetima tlaka, temperature i pH čini proces ekološki i energetski povoljnim. Ograničenja u njihovoj primjeni predstavljaju visoka cijena, otežana separacija iz reakcijske smjese na kraju katalitičkog procesa te nestabilnost pri višim vrijednostima temperature i pH.³

Za biokatalitičku sintezu nanočestica u ovom radu korišten je enzim ureaza koji katalizira reakciju hidrolize uree. Produkti koji nastaju tom reakcijom su amonijak i karbamat, koji se spontano raspada na još jednu molekulu amonijaka i karbonatnu kiselinu.⁴ Dodatkom kalcijevog klorida u otopinu u kojoj se odvija ureazom katalizirana reakcija hidrolize uree, moguće je dobiti polimorfe kalcijevog karbonata različitih veličina i oblika.⁵

Cilj ovog rada je odrediti uvjete prikladne za sintezu nanočestica kalcijevog karbonata što manjih veličina i što veće koncentracije. U tu svrhu provedena je optimizacija procesa biokatalitičke sinteze nanočestica kalcijevog karbonata uz enzim ureazu korištenjem statističke metode Dizajna eksperimenata, odnosno određen je utjecaj parametara, koncentracije enzima ureaze i temperature, na proces. U svrhu opisivanja reakcije sinteze kalcijevog karbonata matematičkim modelom, ispitana je kinetika enzima ureaze pri različitim temperaturama, a dobiveni model validiran je u kotlastom reaktoru.

2. OPĆI DIO

2.1. Nanotehnologija i nanočestice

Nanotehnologija je namjerna i kontrolirana manipulacija, modeliranje i proizvodnja materijala na nanoskali u svrhu stvaranja materijala i uređaja s novim svojstvima i funkcijama. Glavni motiv razvoja nanotehnologije je činjenica da čestice materijala veličine manje od 100 nm imaju drugačija svojstva od makročestica istog materijala te zbog toga nanomaterijali koje izgrađuju dobivaju nova svojstva i različite nove primjene.¹

Nekoliko međunarodnih i nacionalnih organizacija predložilo je definicije za nanopodručje i nanomaterijale. U većini predloženih definicija veličina se odnosi na jednu ili više vanjskih dimenzija ili unutarnju strukturu unutar određenog raspona veličine. Najčešće se koristi gornja granica od 100 nm ili približno 100 nm. Međutim, ne postoje znanstveni dokazi za kvalificiranje prikladnosti ove vrijednosti ili bilo koje druge gornje granice. Treba napomenuti da je u metričkom sustavu nanopodručje raspon ispod 1 mikrometara (μm) i iznad 999 pikometara (pm). Stoga se smatra da bi diferencijalni pristup u određivanju gornje granice za nanomaterijale trebao biti prikladniji. Ovim pristupom nanomaterijali se prema veličini dijele u tri kategorije (manje od 100 nm, između 100 i 500 nm te veće od 500 nm).⁶

Nanočestice mogu biti monokristalne ili polikristalne strukture. Smanjenjem dimenzija čestica u nanopodručje dolazi do promjene u apsorpcijskom spektru, talištu, strukturi, kemijskoj reaktivnosti i drugim svojstvima, a glavni razlog tomu je promjena omjera površine i volumena, odnosno broja atoma na površini i u unutrašnjosti čestice. Na makrorazini se većina atoma nalazi u unutrašnjosti čestice pa je taj odnos malen, dok se na nanorazini većina atoma nalazi na površini, tj. odnos između atoma na površini čestice i atoma u unutrašnjosti je vrlo velik. Atomi u unutrašnjosti kristalne rešetke ostvaruju sve potencijalno moguće kemijske veze, dok atomi na površini imaju nezasićene veze te višu energiju od atoma u unutrašnjosti. Prema tome, moglo bi se reći da su svojstva i ponašanje čestica određeni atomima koji se nalaze na površini. Veća energija ima značajne posljedice na brojna kemijska i fizikalna svojstva materijala, primjerice kemijsku reaktivnost, katalitičku aktivnost, topljivost, temperaturu taljenja i sl.¹ Ovaj efekt utječe na čestice promatrane zasebno i na njihovu interakciju s drugim materijalima.⁷

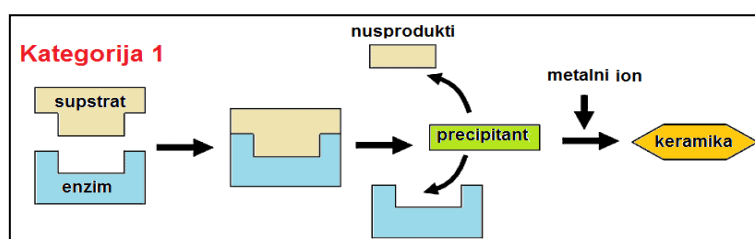
Nanočestice imaju široku mogućnost primjene u području medicine i farmacije, elektroničke, računalne i građevinske industrije, u proizvodnji kompozitnih materijala kao punilo i ojačavalo, u proizvodnji visoke tehnologije, hrane, tekstila i sl. Za njihovo dobivanje najčešće se koriste mehaničke i fizikalno kemijske metode kojima se mogu proizvesti velike količine nanočestica različitih oblika i veličina u kratkom vremenskom roku. Međutim, one su postale zastarjele, skupe i komplicirane, koriste toksične kemikalije te proizvode velike količine opasnog otpada.⁸

S obzirom da se nanočestice danas sve više proizvode i primjenjuju u raznim granama industrije i medicine, njihova sinteza predstavlja rizik za okoliš i ljudsko zdravlje. Nanočestice koje dospiju u okoliš podložne su fizikalno kemijskim transformacijama, a veliki problem predstavlja njihova citotoksičnost i genotoksičnost. U vodenom okolišu imaju tendenciju da smanje svoju visoku površinsku energiju procesima agregiranja i aglomeriranja, a zbog svoje visoke reaktivnosti mogu se vrlo lako i transformirati otapanjem, modifikacijom površine, interakcijom s organskom tvari, transformacijom pod utjecajem bakterijske aktivnosti te procesima adsorpcije – desorpcije na površini nanočestice.²

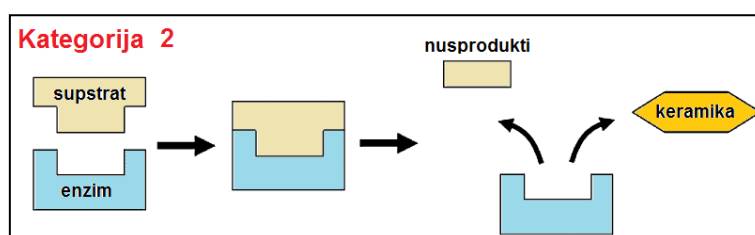
Kako bi se proizvele nanočestice koje nisu opasne za okoliš i čovjeka razvijene su biokatalitičke metode uz korištenje mikroorganizama. Za reakcije sinteze mogu se koristiti cijele stanice ili izolirani enzimi (biokatalizatori) koje su po kemijskom sastavu proteini te su potpuno razgradivi. Na taj način eliminira se upotreba štetnih kemikalija i organskih otapala te se smanjuje negativan utjecaj na okoliš. Velika prednost biokatalitičkih metoda su blagi procesni uvjeti pri kojima su enzimi aktivni (sobna temperatura, atmosferski tlak i neutralni pH) zbog čega se smanjuje potrošnja energije i troškovi procesne opreme. Također, dobra selektivnost enzima pridonosi smanjenju nastajanja neželjenih nusprodukata i povećava produktivnost reakcije. Uz navedene prednosti biokatalizatora, u odnosu na klasične/kemijske katalizatore, važno je spomenuti i njihove nedostatke od kojih se ističu visoka cijena enzima, njihova zahtjevna i skupa separacija na kraju procesa te nestabilnost pri višim temperaturama i ekstremnim pH vrijednostima.⁹ Jedna od prvih primjena enzimski kataliziranih reakcija bila je sinteza keramike, odnosno ugljikovog apatita pomoću ugljikove anhidraze. Međutim, prednosti enzimski posredovane sinteze keramike prepoznate su tek otkrićem enzima silikateina čime je omogućena sinteza silicijevog i titanijevog dioksida. Najznačajnije prednosti korištenja enzima prilikom sinteze keramike su mogućnost sinteze na željenom

mjestu, sinteza pri niskim temperaturama, mogućnost kontrole brzine precipitacije keramičkih nanočestica te kombiniranje keramičkih dijelova s materijalima osjetljivim na toplinu.

Postoje dvije osnovne metode sinteze keramičkih nanočestica pomoću enzima. U prvoj metodi precipitanti metalnih iona nastaju djelovanjem enzimskih reakcija pri čemu metalni ioni u otopini precipitiraju u obliku oksida, hidroksida, karbonata ili fosfata (Slika 2.1.). U drugoj metodi enzimi direktno reagiraju sa supstratom koji sadrži metalne ione pri čemu nastaju keramičke čestice (Slika 2.2.).⁵



Slika 2.1. Shematski prikaz metode dobivanja nanočestica uz pomoć enzima pri čemu nastaju precipitanti metalnih iona



Slika 2.2. Shematski prikaz metode dobivanja nanočestica u kojoj enzimi direktno reagiraju sa supstratom koji sadrži metalne ione pri čemu nastaju keramičke čestice

S obzirom da se enzimski katalizirane reakcije sinteze keramičkih nanočestica odvijaju pri niskim temperaturama, tako dobivene nanočestice se mogu bez prethodne obrade kombinirati s organskim ili toplinski osjetljivim tvarima, kao što su proteini. Također, takve nanočestice mogu imati različitu kristalnu strukturu u odnosu na nanočestice sintetizirane konvencionalnim putem bez korištenja enzima, a njihova morfologija se može kontrolirati imobilizacijom enzima na različite nosače.⁵

2.1.1. Kalcijev karbonat

Kalcijev karbonat, CaCO_3 predstavlja jednu od najznačajnijih nemetalnih mineralnih sirovina i najrašireniji je biomineral uopće. Glavni je sastojak sedimentnih stijena te je gradivni element skeleta, ljuštura, oklopa, kod organizama kao što su koralji, rakovi, mekušci, ptice i dr. U ljudskom tijelu sastavna je komponenta kostiju. U prirodi se može pronaći u obliku tri polimorfa: kalcit, aragonit i vaterit.¹⁰

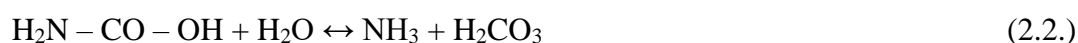
Najzastupljenija modifikacija kalcijevog karbonata je kalcit koji najčešće kristalizira u trigonskom i heksagonskom kristalnom sustavu. Primarna je mineralna sastavnica vapnenaca i mramora, a nalazi se i kao važna komponenta drugih sedimenata, npr. lapora. Kalcit je bezbojan ili bijel, izvanredne kalavosti kristala te je osjetljiv na oštećenja i lako puca pri slabijim udarcima. Aragonit je modifikacija kalcijevog karbonata koja kristalizira u rompskom polimorfnom obliku, a kristali aragonita se u prirodi najčešće pojavljuju u obliku štapićastih, granastih, sigastih i vlaknastih agregata. Najčešće je bezbojan ili bijel, no moguće ga je pronaći u drugim bojama. U odnosu na kalcit, znatno je rjeđe zastupljen u prirodi.¹¹ Vaterit je najnestabilnija kristalna modifikacija kalcijeva karbonata, najčešće kristalizira u heksagonalnoj strukturi i najmanje je zastupljen u prirodi. U dodiru s vodom pri niskim temperaturama prelazi u kalcit, a pri višim temperaturama prelazi u aragonit.

Kalcijev karbonat ima široku primjenu, a najviše se koristi u građevinskoj industriji, industriji boja i lakova, proizvodnji plastike i guma te u papirnoj industriji. Zbog činjenice da je kao biomineral prisutan gotovo svugdje u prirodi te zbog mogućnosti njegove široke primjene, istraživači diljem svijeta fokusiraju se na iskorištavanje tehničkih karakteristika i primjenu tog biominerala u različitim granama industrije.

Prema definiciji, biominerali su tvari, krutine, koje odgovaraju mineralima po kemijskom sastavu i kristalnoj strukturi, ali ih proizvode živi organizmi u svojim stanicama, između stanica, između tkiva ili na površini tijela u procesu koji se naziva biomineralizacija. Tim procesom mikroorganizmi prirodno proizvode anorganske tvari kao dio svojih uobičajenih metaboličkih aktivnosti. Postoje dva načina sinteze biominerala pomoću mikroorganizama. Kod biološki kontrolirane mineralizacije minerali se sintetiziraju na specifičnoj lokaciji unutar ili na stanici i to pod određenim uvjetima, dok kod biološki inducirane mineralizacije minerali nastaju ekstracelularno kao rezultat metaboličkih

aktivnosti. Polimorfi kalcijevog karbonata dobiveni pomoću mikroorganizama imaju drugačija morfološka, mehanička i fizikalno kemijska svojstva te veoma sofisticirani dizajn u usporedbi s njihovim abiotskim analogima. Također, velika prednost je što se procesi odvijaju pri atmosferskom tlaku i temperaturi na ekološki prihvatljivi način.

Polimorfi kalcijevog karbonata različitih veličina i oblika mogu se dobiti reakcijom hidrolize uree enzimatski kataliziranom ureazom na sobnoj temperaturi. U otopini u kojoj su prethodno otopljeni kalcijev klorid i urea, dodatkom ureaze dolazi do hidrolize uree na amonijak i karbamat (jedn. 2.1.). Karbamat se zatim spontano hidrolizira pri čemu nastaje još jedna molekula amonijaka i karbonatna kiselina (jedn. 2.2.). Karbonatni ioni, nastali disocijacijom kiseline (jedn. 2.3. i 2.4.), reagiraju s ionima kalcija iz otopine te dolazi do precipitacije kalcijevog karbonata (jedn. 2.5.). Također, amonijak u vodi disocira na amonijev i hidroksidni ion (jedn. 2.6.).⁵



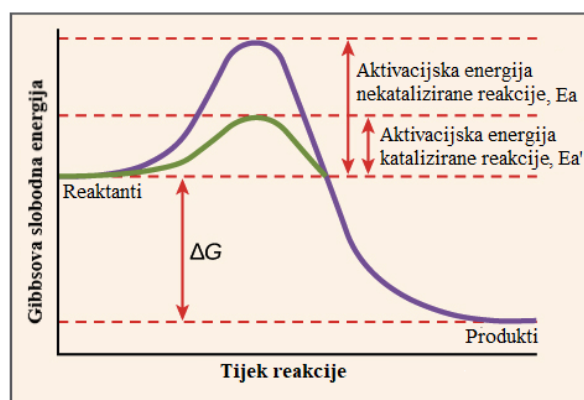
Nanočestice kalcijevog karbonata predmet su velikog broja istraživanja i zbog njihovog svojstva hidrofobnosti, pojačavanja barijernih svojstava te činjenice da mogu poboljšati toplinska svojstva i biorazgradivost polimljične kiseline (PLA).^{12,13} Zbog ovih svojstava našle su primjenu u medicini, tekstilnoj, prehrambenoj i ambalažnoj industriji.¹⁴

2.2. Biokatalizatori

Biokatalizatori ili enzimi su proteinske makromolekule koje kataliziraju biokemijske reakcije u živim organizmima. Djeluju na način da snižavaju energiju aktivacije pojedine reakcije te je tako znatno ubrzavaju. S obzirom na mehanizam djelovanja mogu se podijeliti u

šest osnovnih skupina: oksidoreduktaze (sudjeluju u redoks reakcijama), transferaze (prenose funkcionalne skupine s jednog supstrata na drugi), hidrolaze (cijepaju molekulske veze dodatkom vode), liaze (dodaju ili oduzimaju skupine zbog stvaranja dvostruke veze), izomeraze (mijenjaju supstrat u njegov izomer) te ligaze (vežu dva supstrata na teret hidrolize ATP – a).³

Mehanizam djelovanja enzima opisuje se principom „ključ – brava“, pri čemu se enzim veže na molekulu supstrata točno određenog oblika. Interakcijom sa supstratom dolazi do formiranja aktiviranog prijelaznog kompleksa i smanjenja veličine energetske barijere. U kompleksu je enzim vezan uz supstrat Van der Waalsovima silama, elektrostatskim privlačenjem, vodikovom vezom ili rjeđe, kovalentnom vezom, što omogućava lakše razdvajanje po završetku reakcije. To je vrlo bitno jer kompleksiranje mora biti brzo i reverzibilno kako bi se produkt mogao odvojiti od enzima odmah nakon reakcije i osloboditi ga za daljnje katalitičko djelovanje.¹⁵ Slika 2.3. prikazuje energetske promjene koje se javljaju pri prijelazu reaktanata u produkte sa i bez katalizatora, gdje E_a i E_a' predstavljaju energije aktivacije nekatalizirane i katalizirane reakcije, a ΔG je izmjena slobodne energije reakcije.



Slika 2.3. Prikaz energetske promjene pri prijelazu reaktanata u produkte sa i bez katalizatora

Enzimski katalizirane reakcije se u prirodi odvijaju u živim organizmima, međutim razvojem tehnologije ovakve reakcije je moguće provoditi i u laboratorijima, unutar bioreaktora. Glavna karakteristika i velika prednost biokatalizatora je njihova ekstremno visoka specifičnost na supstrat odnosno selektivnost. Biokatalizatori mogu ubrzati samo jednu od mogućih reakcija i tako smanjuju nastajanje nepoželjnih sporednih produkata.¹⁶ Na taj način povećavaju produktivnost reakcije i smanjuju opterećenje okoliša. Enzimi najčešće

djeluju pod umjerenim uvjetima, tj. pri sobnoj temperaturi, atmosferskom tlaku i neutralnom pH zbog čega su energetske troškovi mali pa je i sam proces jeftiniji. Također, brzina enzimski kataliziranih reakcija je 10^6 do 10^{12} puta veća od nekataliziranih i barem tisuću puta veća od reakcija kataliziranih kemijskim katalizatorima. Navedene karakteristike i prednosti enzime čine sve više cjenjenim u različitim proizvodnim sektorima, posebice u farmaceutskoj i kemijskoj industriji.³

Međutim, s obzirom da su enzimi prirodno prilagođeni da djeluju u fiziološkim uvjetima, najveći izazov je transformirati ih i osposobiti za rad u umjetno stvorenim uvjetima u industrijskim procesima. Upravo je to jedan od zadataka biokatalize. Upotreba enzima može biti ograničena njegovom stabilnošću odnosno sposobnosti da zadrži aktivnu strukturu u uvjetima pod kojim se reakcija odvija. Na aktivnost enzima mogu utjecati razne tvari koje mogu usporiti njihovo djelovanje, a nazivaju se inhibitorima. Njihovo međudjelovanje s enzimom je reverzibilno, a katalitički potencijal enzima pri tome opada. Inhibitor može biti i supstrat ili produkt neke kemijske reakcije. S obzirom na katalitički korak u kojem djeluju postoje tri vrste inhibitora. Kompetitivni inhibitori su oni koji utječu na prvi korak katalize, odnosno to su tvari koje se natječu sa supstratom za aktivno mjesto enzima. Nekompetitivni inhibitori utječu na drugi korak katalize, odnosno na kemijsku reakciju između enzima i supstrata vezanog na aktivno mjesto enzima. Oni se reverzibilno vežu za aktivno mjesto enzima i time sprečavaju vezanje supstrata. Treća vrsta inhibitora su antikompetitivni inhibitori, a njihovo djelovanje je mješavina kompetitivne i nekompetitivne inhibicije. Inhibitori se također mogu podijeliti na kovalentne i nekovalentne. Kovalentni inhibitor veže se za enzim trajnom kovalentnom vezom, najčešće na njegovo aktivno mjesto na koje se veže supstrat, a nekovalentni inhibitor se veže na enzim nekovalentnim vodikovim, ionskim vezama ili van der Waalsovima silama.³

Ograničenja u primjeni enzima predstavljaju visoka cijena njihove nabave te njihova teška separacija iz reakcijske smjese na kraju katalitičkog procesa s obzirom na dobru topljivost enzima u vodi.³ Enzimi su u prirodi prisutni u svim živim organizmima, biljkama, vlaknastim gljivama, kvascima i bakterijama, a postoji ih oko 25000 od čega ih je identificirano oko 3000. Mogu se koristiti kao izolirani i pročišćeni ili u obliku cijelih stanica.¹⁷

2.2.1. Ureaza

Nakon dugogodišnjeg istraživanja 1926. godine James B. Sumner uspio je iz biljke graha (*Canavalia ensiformis*) iskristalizirati protein – ureazu koja ima sposobnost razgradnje uree. Ureaza je time postala značajna u povijesti enzimologije kao prvi enzim ikada iskristaliziran. Ovo otkriće je pokazalo da čisti proteini mogu funkcionirati kao katalizatori te da su većina enzima proteini.¹⁸

Ureaza je enzim visoke specifičnosti koji katalizira reakciju hidrolize uree na amonijak i karbonatnu kiselinu (jedn. 2.2.) te tako omogućuje organizmima da koriste ureu kao izvor dušika. Katalizirana reakcija hidrolize uree odvija se 10^{14} puta brže nego hidroliza uree bez ureaze, a poznato je da njezinu aktivnost mogu inhibirati teški metali poput olova. Struktura enzima se mijenja s obzirom na podrijetlo ureaze, bilo da je riječ o biljkama, bakterijama ili dr., ali struktura aktivnog centra ostaje slična i uvijek sadrži dva niklova (II) iona. Metalni centar im omogućuje aktivaciju supstrata i vode u reakcijama.

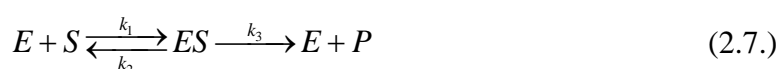
Ureaza se smatra važnim i učinkovitim enzimom zbog velikog broja reakcija u kojima sudjeluje, a u prirodi se može naći u bakterijama, gljivama, algama, višim biljkama i u tlu. Bakterijska ureaza je faktor virulentnosti u probavnom i mokraćnom sustavu pa se detekcijom ureaze može otkriti prisutnost uzročnika bolesti.¹⁹ U medicini se ureaza koristi kao dijalizat u uređajima za hemodijalizu krvi, u analitičkim uređajima za detekciju i kvantifikaciju uree te za određivanje tvari koje su inhibitori ureaze, što omogućuje praćenje onečišćujućih tvari (npr. teških metalnih iona ili pesticida) u okolišu. Ureaza ima svoju primjenu i u poljoprivredi gdje razlaže ureu iz dušičnih gnojiva do amonijaka kojeg koriste biljke i mikroorganizmi u tlu. Također, sve se češće primjenjuje i za dobivanje nanočestica iz produkata biokatalitičke hidrolize uree.⁴

2.2.2. Kinetika enzimski kataliziranih reakcija

Pojam kinetički model reakcije podrazumijeva matematičku jednadžbu kojom se opisuje zavisnost brzine reakcije o reakcijskim veličinama stanja i parametrima.²⁰ Da bi opisali kinetiku enzimski kataliziranih reakcija dvojje znanstvenika, L. Michaelis i M. Menten su 1913. godine predložili izraz koji opisuje ovisnost početne brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata i enzima. Michaelis – Mentenov model se zasniva na pretpostavci da

se enzimski kataliza odvija u dva međusobno slijedna koraka: reverzibilno formiranje kompleksa enzim – supstrat (ES) te nastanak produkta uz oslobađanje enzima koji je ireverzibilan proces.

Katalitička reakcija započinje vezanjem supstrata S na aktivno mjesto na enzimu E pri čemu nastaje kompleks enzim – supstrat ES . Ukoliko reakcija napreduje do kraja nastat će produkt P , a enzim će izaći nepromijenjen. Isto tako, moguće je da se reakcija ne odvijet do kraja već da kompleks disocira ponovno na enzim i supstrat. Svaka od ovih reakcija se odvija određenom brzinom koja se opisuje konstantom k (jedn. 2.7.).



Početna brzina enzimski reakcije može se odrediti iz Michaelis – Mentenovog izraza (jedn. 2.8.) uz pretpostavku da se koncentracija supstrata tijekom perioda u kojem se eksperimentalno određuje početna brzina reakcije ne mijenja bitno u odnosu na početnu vrijednost ($c_s \sim c_{s0}$).

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m + c_s} \quad (2.8.)$$

Ova jednadžba predstavlja kinetički model kojim se opisuje jednosupstratna reakcija, odnosno reakcija u kojoj reakcijska brzina ovisi o koncentraciji jednog supstrata, gdje je r_s brzina potrošnje supstrata ($\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$), c_s je koncentracija supstrata (mmol dm^{-3}), V_m je maksimalna brzina reakcije ($\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$), a K_m je Michaelisova konstanta (mmol dm^{-3}). Parametar V_m je maksimalna brzina reakcije koja se može postići pri određenoj koncentraciji enzima E_0 (jedn. 2.9.), a K_m predstavlja koncentraciju supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine reakcije.

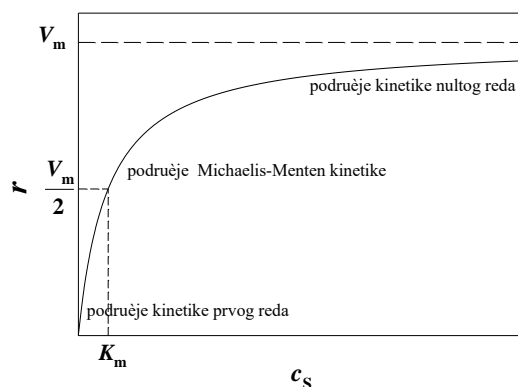
$$V_m = k_3 \cdot E_0 \quad (2.9.)$$

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (2.10.)$$

U izrazu za Michaelisovu konstantu (jedn. 2.10.) k_2 i k_3 su konstante brzine reakcija raspada kompleksa enzim – supstrat, dok je k_1 konstanta brzine nastajanja kompleksa. Prema

tome, može se reći da K_m vrijednost ukazuje na to koliko jako se enzim veže na supstrat. Velika K_m vrijednost znači da je supstrat slabo vezan na enzim te je vjerojatnije da će kompleks disocirati, a za postizanje maksimalne brzine reakcije biti će potrebna velika količina supstrata. Mala K_m vrijednost znači da je supstrat jače vezan na enzim pa je vjerojatnost da će kompleks disocirati mala, a za postizanje maksimalne brzine reakcije potrebna je mala količina supstrata.²¹ Ako su za određenu reakciju poznati K_m i V_m , prema Michaelis – Mentenovom izrazu (jedn. 2.8.) moguće je odrediti brzinu enzimski katalizirane reakcije pri bilo kojoj koncentraciji supstrata.

Krivulja koja opisuje Michaelis – Mentenovu jednadžbu je hiperbola (Slika 2.4.). Većina enzima za koje se određuje ovisnost brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata pokazuje upravo ovakav oblik krivulje.



Slika 2.4. Ovisnost brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata

Na krivulji su vidljiva tri različita područja brzine reakcije: područje kinetike prvog reda, područje Michaelis – Mentenove kinetike i područje kinetike nultog reda. Pri niskim koncentracijama supstrata ($c_s \ll K_m$) ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata je linearna i to područje se može aproksimirati kinetikom prvog reda. Povećanjem koncentracije supstrata povećava se i brzina reakcije sve do određene točke gdje dolazi do zasićenja enzima supstratom odnosno do postizanja maksimalne brzine reakcije. To područje visokih koncentracija ($c_s \gg K_m$) može se aproksimirati kinetikom reakcije nultog reda. Područje između navedenih je područje Michaelis – Mentenove kinetike.

Na brzinu enzimske reakcije, tj. na katalitički potencijal enzima, osim koncentracije supstrata i enzima utječe još nekoliko faktora od kojih su najvažniji temperatura, pH te prisutnost inhibitora.³

2.3. Metoda Dizajna eksperimenata

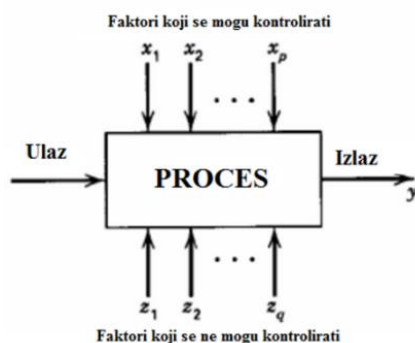
U današnje vrijeme kada su ekonomska konkurentnost i globalizacija glavni pokretači svih gospodarskih sektora, većini organizacija cilj je poboljšati kvalitetu svojih procesa i proizvoda uz minimalne troškove njihove provedbe i proizvodnje u što kraćem vremenskom roku. Ovakvi zahtjevi mogu se postići primjenom statističke metode Dizajna eksperimenta (engl. *Design of experiments*, DOE). Glavni cilj metode je određivanje varijabli (faktora) koje utječu na ispitivani proces ili proizvod (odaziv) te pronalaženje veze između njih uz što manji broj eksperimenata i što veću financijsku uštedu. Informacije o tim vezama služe kako bi se upravljalo s ulaznim varijablama na način da se optimizira izlaz, odnosno rezultat procesa. Da bi se odredili navedeni utjecaji uz što manji broj ispitivanja potrebno je napraviti strukturirani plan provedbe serije eksperimenata s varijacijom ulaznih varijabli. Upravo je zato razvijen funkcionalni statistički alat, odnosno metoda Dizajna eksperimenta koja pomaže u planiranju, dizajniranju i analizi određenih eksperimenata.

Razvoj ove metode započeo je Sir Ronald Fisher početkom 20. stoljeća, postavivši temelje za statistiku, a time i za planiranje eksperimenata. Ova metoda se može koristiti u istraživanju novih procesa ili za optimizaciju postojećih u raznim djelatnostima kao što su: inženjerstvo, znanost, poljoprivreda, nutricionizam i dr.²² Dakle, ova metoda može pomoći u određivanju koji faktori i u kojoj mjeri utječu na odzive te u definiranju vrijednosti faktora koje daju najbolje karakteristike procesa ili proizvoda (optimalne vrijednosti faktora).

Najčešće korišteni pojmovi u postupku planiranja procesa su faktori, razina faktora te odaziv. Faktori mogu biti primarni i nepoželjni. Primarni su faktori oni čiji se utjecaj želi proučiti, a nepoželjni faktori su oni čiji se utjecaj ne može izbjeći. Nepoželjni faktori još se nazivaju „blokirani faktori“, jer ih se blokira s ciljem da se smanji njihov utjecaj na rezultate eksperimenta. Druga podjela faktora je na eksperimentalne i klasifikacijske. Eksperimentalni faktori se mogu kontrolirati i njihova razina se može podesiti. To su primjerice temperatura, udio vlage, izloženost svjetlosti i dr. Klasifikacijski faktori ostaju nepromijenjeni tijekom procesa i ne mogu se podešavati, primjerice spol i starost sudionika u eksperimentu. Zato je bitno pomoću dizajna eksperimenta odrediti njihove razine i tako moguće varijacije svesti na minimum. Treća podjela faktora je na kvantitativne i kvalitativne. Kvantitativni faktori mogu

imati bilo koju razinu faktora, primjerice pH vrijednost, dok kvalitativni faktori sadržavaju u sebi kategorije koje su različite vrste, kao npr. vrste biljaka i životinja.

Model bilo kojeg procesa se sastoji od ulaznih faktora koji se mogu ili ne mogu kontrolirati te izlaznih faktora. Izlazni faktori nastaju kao odaziv na ulaz i predstavljaju rezultat procesa.²³ Shematski prikaz modela nekog procesa prikazan je na slici 2.5.



Slika 2.5. Shematski prikaz modela procesa

Kod planiranja i provođenja eksperimenta prvi korak je definirati problem. Zatim je potrebno odabrati faktore koji utječu na proces, njihove razine i raspone te odabrati odzivne varijable. Nakon toga, potrebno je izabrati dizajn metode i provesti eksperimente. Konačno se provodi statistička analiza te se donosi zaključak i daje preporuka o optimalnim vrijednostima promatranih varijabli.

Najvažnija načela u procesu planiranja pokusa su:

- slučajnost (engl. *randomization*) – ključna komponenta da bi eksperiment bio valjan, a odnosi se na redoslijed kojim se izvode pojedini pokusi kako bi se eliminirao utjecaj nepoznatih faktora koji se ne mogu kontrolirati;
- ponovljivost (engl. *replication*) – cilj je omogućiti procjenu i upravljanje preciznostima rezultata prilikom ponavljanja određenog pokusa;
- blokiranje (engl. *blocking*) – predstavlja komponentu kojom se u eksperiment uključuju nepoželjni faktori koji doprinose nepoželjnim varijacijama te se na taj način upravlja izvorom varijacija i povećava učinkovitost dizajna eksperimenta.

Osim smanjenih troškova i vremena potrebnog za istraživanje, planiranjem eksperimenata unaprjeđuju se i prilagođavaju mnogi aspekti procesa:

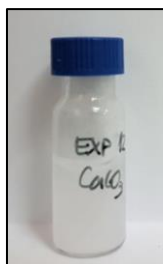
- određivanje ključnih faktora i njihove vrijednosti koje će rezultirati najmanjim rasponom varijacija u izlazu, odnosno rezultatu;
- veća razina kontrole nad pogreškama i nepravilnostima;
- poboljšanje pouzdanosti procesa i proizvoda;
- postizanje optimalnih rezultata i poboljšanje učinkovitosti postojećih i novih procesa;
- pronalaženje alternativnih rješenja;
- postizanje robusnosti proizvoda i same proizvodnje.²³

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. APARATURA

3.1.1. Kotlasti reaktor

U ovom radu korišten je kotlasti reaktor za provedbu eksperimenata dizajniranih DOE metodom u svrhu optimiranja biokatalitičke sinteze nanočestica kalcijevog karbonata te za mjerenje kinetike enzima ureaze. Sinteza nanočestica provedena je u staklenim kotlastim reaktorima volumena 1 mL (Slika 3.1.), a za mjerenje kinetike korišteni su reaktori volumena 5 i 3 mL. Svi eksperimenti provedeni su pri konstantnoj brzini miješanja u termostatiranoj tresilici (Slika 3.2.).



Slika 3.1. Kotlasti reaktor za provedbu sinteze nanočestica kalcijevog karbonata



Slika 3.2. Termostatirana tresilica

3.1.2. Spektrofotometar

Spektrofotometar je instrument koji mjeri količinu svjetla koju apsorbira određena vrsta molekula u otopini u vidljivom i UV području. Zraka svjetlosti propušta se kroz uzorak te se mjeri intenzitet svjetla koje je prošlo kroz analizirani uzorak (I) i uspoređuje sa intenzitetom ulaznog svjetla (I_0). Intenzitet apsorbiranog zračenja u uzorku je proporcionalan koncentraciji tvari koja se određuje. Osnovne komponente sustava su volframova i UV lampa kao izvori svjetlosti, monokromator, nosač kivete s uzorkom i detektor. Apsorpcija svjetlosti kroz otopinu matematički se opisuje Lambert – Beerovim zakonom (jedn. 3.1.) pri čemu ABS predstavlja apsorbanciju na određenoj valnoj duljini svjetlosti, ϵ molarni apsorpcijski (ekstincijski) koeficijent [$L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$], svojstven svakoj molekulskoj vrsti i ovisan o valnoj

duljini svjetlosti, b duljinu puta svjetlosti kroz uzorak [cm], a c koncentraciju tvari u otopini [mol L^{-1}].

$$\log \frac{I_0}{I} = ABS = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (3.1.)$$

U ovom radu korišteni su UV/Vis spektrofotometri *Shimadzu UV – 1601* i *Shimadzu UV – 1800* (Slike 3.3. i 3.4.) za određivanje koncentracije amonijevih iona po Willisovoj metodi. Praćenjem porasta koncentracije amonijevih iona određivana je početna brzina hidrolize uree katalizirane enzimom ureazom pri različitim koncentracijama uree te je ispitan utjecaj kalcijevih iona na početnu brzinu iste reakcije.



Slika 3.3. Spektrofotometar *Shimadzu UV – 1601*



Slika 3.4. Spektrofotometar *Shimadzu UV – 1800*

3.1.3. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je kromatografska tehnika koja se koristi za analizu i separaciju komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze. Mala količina otopine uzorka se injektira u mobilnu fazu, koja potom putuje kroz kolonu, punjenu stacionarnom fazom, pod visokim tlakom.

Brzina eluiranja i separacija komponenti ovise o interakciji uzorka i mobilne faze sa stacionarnom fazom. Zbog toga se komponente eluiraju s kolone različitim brzinom, odnosno imaju različita vremena zadržavanja. Vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme) je vrijeme potrebno da tvar eluira, tj. da dođe do kraja stupca, te je karakteristično za određenu tvar. Vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi tvari koja se analizira, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze. Primjenom visokog tlaka povećava se linearna brzina komponenti, kraće je vrijeme zadržavanja, a rezolucija kromatograma se poboljšava. Dakle, učinkovitost separacije spojeva ovisna je o primjeni odgovarajuće stacionarne i mobilne faze, kao i o brzini eluiranja. Nakon što uzorak prođe kroz kolonu, 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. U oba slučaja rezultat je karakteristični signal u kromatogramu.

U ovom radu, za određivanje koncentracije uree, korišten je *Shimadzu* modularni sustav (Slika 3.5.) s *cosmosil* kolonom duljine $l = 25$ cm pri temperaturi $T = 30$ °C kao stacionarnom fazom, te acetonitrilom i vodom kao eluentima, tj. mobilnom fazom.

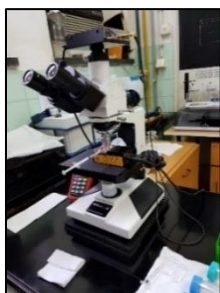


Slika 3.5. HPLC *Shimadzu* modularni sustav

3.1.4. Malvern Nanosight LM10

Malvern Nanosight LM10 (Slika 3.6.) je uređaj kojim se određuje veličina i koncentracija nanočestica (broj nanočestica po mililitru otopine) primjenom analize praćenja, odnosno NTA metodom (engl. *Nanoparticle Tracking Analysis*, NTA). Ova metoda temelji se na praćenju pojedinačnih nanočestica u otopini (raspon veličina od 10 nm do 2000 nm) koje se kreću pod utjecajem Brownovog gibanja, na način da se na njih usmjerava laserska zraka, a

pri tome nastaje svjetlost na površini otopine koja se raspršuje ovisno o veličini nanočestica i indeksu refrakcije. Raspršena svjetlost i kretanje nanočestica detektira se pomoću mikroskopa i kamere u dvije dimenzije u stvarnom vremenu. (Slike 3.6. i 3.7.). Hidrodinamički radijus nanočestica određuje se primjenom Stoke – Einsteinove jednadžbe, praćenjem putanje pojedine nanočestice u dvije dimenzije te na temelju kvadratne udaljenosti koju nanočestica prijeđe. Ovom metodom se mogu karakterizirati nanočestice u rasponu od 10 nm do 2000 nm (ovisno o prirodi uzorka).



Slika 3.6. Uređaj *Malvern Nanosight LM10*



Slika 3.7. Praćenje gibanja nanočestica

3.1.5. Centrifuga

Centrifuga je korištena za pripremu uzoraka za sušenje na liofilizatoru, odnosno njihovu daljnju analizu na pretražnom elektronskom mikroskopu. Kako bi se sintetizirane nanočestice odvojile od supernatanta uzorci su centrifugirani na 4500 rpm u trajanju od $t = 5$ min nakon čega je supernatant uklonjen, a čestice su isprane redestiliranom vodom te ponovo centrifugirane. Postupak ispiranja ponovljen je dva puta. Korišten je uređaj *Hettich Universal 320R* (Slika 3.8.).



Slika 3.8. Centrifuga *Hettich Universal 320R*

3.1.6. Liofilizator

Liofilizator je uređaj koji se koristi za sušenje i koncentriranje uzorka, a dobiveni proizvod se tako može čuvati kroz duži vremenski period. Pripravak, koji se suši liofilizacijom, tijekom sušenja prolazi kroz dvije faze: fazu primarnog sušenja i fazu sekundarnog sušenja. Primarno je sušenje iz zamrznutog stanja (od $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$), tijekom kojeg se u pripravak dovodi toplina, a smatra se da je završeno kad je u pripravku preostalo još 6 – 8 % vode. Može se reći da se primarnim sušenjem iz pripravka izdvaja tzv. slobodna voda. Sekundarno sušenje je sušenje iz "tekućeg" stanja i njime se nastoji ukloniti tzv. vezana voda, jer je ona čimbenik koji može spriječiti uspješno čuvanje liofiliziranog pripravka, osobito kod sobne temperature. Za sušenje sintetiziranih nanočestica, odnosno njihovu pripremu za analizu na pretražnom elektronskom mikroskopu korišten je liofilizator *LABCONCO Free Zone* (Slika 3.9.).



Slika 3.9. Liofilizator *LABCONCO Free Zone*

3.1.7. Pretražni elektronski mikroskop s energetski disperzivnom rendgenskom spektroskopijom

Pretražni elektronski mikroskop (engl. *Scanning electron microscope*, SEM) omogućava proučavanje mikrostruktura uvećanjem i do sto tisuća puta. Način rada se temelji na usmjeravanju pomičnog snopa elektrona na uzorak te se njegovim pomicanjem pretražuje površina uzorka. Pri tome može doći do raspršivanja elektrona na uzorku ili stvaranja tzv. sekundarnih elektrona koji se emitiraju s površine uzorka. Takvi raspršeni i sekundarni elektroni se zatim sakupljaju i detektiraju pomoću posebnog elektroničkog uređaja.

Prelaženjem snopa elektrona preko uzorka, na ekranu se stvara slika predmeta sastavljena od mnoštva točaka. Što je veći broj elektrona koje uređaj detektira, slika je svjetlija. U ovom radu pretražnim elektronskim mikroskopom uz energetske disperzivnu spektroskopiju (SEM – EDS) analizirani su morfologija i elementarni sastav kalcijevog karbonata, a korišten je uređaj *Tescan Vega 5136 MM* (Slika 3.10.).



Slika 3.10. SEM – EDS *Tescan Vega 5136 MM*

3.2. ANALITIČKE METODE

3.2.1. Određivanje koncentracije amonijevih iona

Koncentracija amonijevih iona određivana je spektrofotometrijski Willisovom metodom, koja je ekološki prihvatljiva, vrlo jednostavna i pouzdana. Metoda koristi reagens koji je otopina natrijeva salicilata, fosfata i nitroprusida (u daljnjem tekstu: reagens), otopinu hipoklorita te otopinu amonijeva klorida koja služi kao standard. Otopina reagensa 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 $c(NH_4Cl, t.o.) = 10 \text{ mM}$ pripravljena je otapanjem 1,07 mg NH_4Cl u 2 mL redestilirane vode. Za dobivanje baždarnog dijagrama iz temeljne otopine su pripravljene otopine NH_4Cl u rasponu koncentracija od 0 – 2,0 mM prema Tablici 3.1.

Tablica 3.1. Priprema otopina NH₄Cl za baždarni dijagram

Uzorci	V (10 mM otopine) / μL	V (vode) / μL	c / mM
1	0	1000	0
2	20	980	0,2
3	70	930	0,7
4	120	880	1,2
5	180	820	1,8
10 x razrjeđenje			
6	20	980	0,02
7	50	950	0,05
8	120	880	0,12
9	200	800	2

Uzorci za mjerenje apsorbancije na spektrofotometru, odnosno za određivanje koncentracije amonijevih iona pripremljeni su na slijedeći način:

- u svaku kivetu stavljeno je 50 μL otopine NH₄Cl određene koncentracije;
- dodano je 1000 μL pripremljenog reagensa i 250 μL otopine hipoklorita te je sve dobro homogenizirano;
- u trenutku dodavanja otopine hipoklorita započeto je mjerenje vremena inkubacije u trajanju od 15 minuta;
- nakon inkubacije uzorcima je spektrofotometrom izmjerena apsorbancija na valnoj duljini $\lambda = 685 \text{ nm}$.

Kao rezultat mjerenja dobiven je baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji amonijevog klorida (Prilog 1).

3.2.2. Određivanje koncentracije uree

Koncentracija uree određivana je na HPLC uređaju korištenjem *cosmosil* kolone duljine $l = 25 \text{ cm}$ kao stacionarne faze pri temperaturi $T = 30^\circ\text{C}$. Kao eluenti, tj. mobilne faze 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 $\lambda = 210 \text{ nm}$.

Uzorci za mjerenje koncentracije uree na HPLC – u pripremljeni su na slijedeći način:

- otapanjem 0,0603 g uree u 10,04 mL redestilirane vode pripravljena je temeljna otopina uree, $c(\text{urea, t.o.}) = 100 \text{ mM}$;
- zatim su u staklenim vialama volumena 1 mL miješanjem određenog volumena temeljne otopine uree i redestilirane vode pripravljene otopine uree različitih koncentracija u rasponu od 0,5 – 10 mM ;
- analizom na HPLC uređaju, za svaku koncentraciju uree dobiven je kromatogram;
- integriranjem dobivenih pikova dobivene su vrijednosti površine za svaku koncentraciju uree.

Rezultati su prikazani baždarnim dijagramom koji prikazuje ovisnost koncentracije uree o površini pika na kromatogramu (A) (Prilog 2).

3.2.3. Određivanje aktivnosti enzima ureaze

Aktivnost enzima ureaze određivana je spektrofotometrijski u redestiliranoj vodi pri temperaturama $T = 25 \text{ °C}$, $T = 32,5 \text{ °C}$ i $T = 40 \text{ °C}$. Eksperimenti su provedeni u staklenim kotlastim reaktorima volumena 3 ili 5 mL uz konstantnu koncentraciju enzima ureaze od $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ te pri konstantnoj brzini miješanja (200 rpm) u termostatiranoj tresilici. Mjerena je početna brzina reakcije hidrolize uree uz dodatak enzima ureaze praćenjem porasta koncentracije amonijevih iona. Koncentracija amonijevih iona određena je mjerenjem apsorpcije prema Willisovoj metodi.

Aktivnost enzima ureaze određivana je pri različitim početnim koncentracijama uree, a postupak je analogan na sve tri temperature:

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

- zatim su iz temeljnih otopina u staklenim reaktorima pripremljene otopine s odgovarajućom koncentracijom uree u rasponu koncentracija 1 – 100 mM;
- dodatkom enzima ureaze započinje sama reakcija hidrolize uree te je započeto mjerenje vremena (koncentracija enzima ureaze u reaktoru je $c(\text{ureaza}) = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$);
- reaktori su stavljeni u termostatiranu tresilicu pri konstantnoj brzini miješanja od 200 rpm;
- za svaki eksperiment iz reaktora je uzimano 7 uzoraka tijekom prvih 6 minuta reakcije, na način da je 200 μL uzorka pomiješano s 200 μL otopine $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ za zaustavljanje reakcije te profiltrirano; kod koncentracije $c(\text{urea}) = 10 \text{ mM}$ i većih uzeto je po 80 μL uzorka, miješano s po 80 μL otopine $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ za zaustavljanje reakcije, razrijeđeno s 240 μL redestilirane vode te profiltrirano;
- od profiltriranih uzoraka uzeto je po 50 μL čemu je dodano (prema Willisovoj metodi) po 1000 μL reagensa i 250 μL otopine hipoklorita za određivanje amonijevih iona;
- u trenutku dodavanja otopine hipoklorita započeto je mjerenje vremena te su uzorci inkubirani 15 minuta nakon čega je na spektrofotometru izmjerena apsorbancija na $\lambda = 685 \text{ nm}$.

Dobiveni rezultati prikazani su kao promjena koncentracije amonijevih iona u vremenu. Kao primjer rezultata, dan je prikaz za otopinu uree u redestiliranoj vodi početne koncentracije $c(\text{urea}) = 10 \text{ mM}$, pri temperaturi $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ u Prilogu 3.

Korištenjem promjene apsorbancije u ovisnosti o vremenu reakcije, prema izrazu (3.2.) izračunate su specifične aktivnosti enzima, $A_s [\text{U mg}^{-1}]$ i pomoću njih je prikazana kinetika enzima.

$$A_s = \frac{\frac{dABS}{dt}}{2 \cdot \epsilon_{\text{NH}_3} \cdot c_{\text{ureaza}}} \quad (3.2.)$$

3.2.4. Utjecaj kalcijevih iona na aktivnost enzima ureaze

Utjecaj kalcijevih iona na aktivnost enzima ureaze ispitan je spektrofotometrijski, također u redestiliranoj vodi na tri temperature ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T = 32,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) uz različite početne koncentracije kalcijevog klorida na sljedeći način:

- otapanjem 108,1 g uree u 9 mL redestilirane vode pripravljena je temeljna otopina uree, $c(\text{urea, t.o.}) = 200\text{ mM}$;
- temeljna otopina enzima ureaze koncentracije $c(\text{ureaza, t.o.}) = 5\text{ mg mL}^{-1}$, pripravljena je otapanjem 3 mg ureaze u 0,6 mL redestilirane vode;
- otapanjem 1,1762 g kalcijeva klorida (CaCl_2) u 4 mL redestilirane vode pripravljena je njegova temeljna otopina koncentracije $c(\text{CaCl}_2, \text{t.o.}) = 2\text{ M}$;
- zatim su, iz temeljnih otopina, u staklenim reaktorima volumena $V = 3\text{ mL}$ pripravljene otopine konstantne koncentracije uree (40 mM) i ureaze ($0,1\text{ mg mL}^{-1}$) te CaCl_2 u rasponu koncentracija 0 – 500 mM u redestiliranoj vodi, kako bi se odredio utjecaj kalcijevih iona na aktivnost enzima ureaze;
- dodatkom enzima ureaze započeta je reakcija hidrolize uree te je započeto mjerenje vremena trajanja reakcije;
- reaktori su stavljani u termostatiranu tresilicu pri konstantnoj brzini miješanja od 200 rpm;
- za pojedini eksperiment iz reaktora je uzimano 7 uzoraka u pravilnim vremenskim razmacima tijekom prvih 6 minuta reakcije, na način da je po 80 μL uzorka uzetih iz reaktora pomiješano s 80 μL otopine $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ za zaustavljanje reakcije, razrijeđeno s 240 μL vode te profiltrirano;
- od profiltriranih uzoraka uzeto je po 50 μL čemu je dodano (prema Willisovoj metodi) po 1000 μL reagensa i 250 μL otopine hipoklorita za određivanje amonijevih iona;
- u trenutku dodavanja otopine hipoklorita započeto je mjerenje vremena te su uzorci inkubirani 15 minuta nakon čega je na spektrofotometru izmjerena apsorbancija na $\lambda = 685\text{ nm}$.

Primjer dobivenih rezultata prikazanih kao promjena koncentracije amonijevih iona u vremenu za otopinu kalcijeva klorida u redestiliranoj vodi početne koncentracije $c(\text{CaCl}_2) = 100 \text{ mM}$ pri temperaturi $T = 32,5 \text{ }^\circ\text{C}$ dan je u Prilogu 4.

Uvrštavanjem dobivenih rezultata u izraz (jedn. 3.2.) izračunate su specifične aktivnosti enzima, $A_s [\text{U mg}^{-1}]$ koje su korištene i za prikaz utjecaja kalcija na aktivnost enzima

3.2.5. NTA metoda

Za analizu sintetiziranih nanočestica, odnosno za određivanje njihove veličine i koncentracije korištena je NTA metoda, odnosno uređaj *Malvern Nanosight LM10*.

Pripremljena su odgovarajuća razrjeđenja za svaki uzorak uzet iz reaktora (10x /100x /1000x) nakon čega se uzorci plastičnom injekcijom injektiraju 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 refrakcije.

3.3. REAKTORSKI EKSPERIMENTI

3.3.1. Optimiranje sinteze nanočestica kalcijevog karbonata

Ulazne varijable, temperatura i koncentracija enzima ureaze, odabrani su kao parametri značajni za proces biokatalitičke sinteze nanočestica kalcijevog karbonata uz konstantnu koncentraciju uree ($c(\text{urea}) = 200 \text{ mM}$) i kalcijevog klorida ($c(\text{CaCl}_2) = 200 \text{ mM}$) te pri konstantnoj brzini miješanja od 200 rpm. Navedeni parametri varirani su unutar određenih raspona vrijednosti ($T = 25 - 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{ureaza}) = 0,1 - 2 \text{ mg mL}^{-1}$) unutar kojih se želi provesti optimizacija procesa. Definirani rasponi vrijednosti uneseni su u računalni program *Design – Expert*[®] verzija 6.0.6. te je odabrana prikladna vrsta dizajna (*D optimal* dizajn). Kao izlazne varijable, na temelju unesenih vrijednosti, dobiveno je 12 eksperimenata (Tablica 3.2.). Njihovim provođenjem dobivena su tražena rješenja, odnosno uvjeti prikladni za proces sinteze nanočestica kalcijevog karbonata najmanje veličine i najveće koncentracije.

Tablica 3.2. Eksperimenti dizajnirani DOE metodom

Eksperimenti	c (ureaza) [mg mL⁻¹]	T [°C]
1	1,05	32,5
2	0,1	25
3	2	25
4	0,1	40
5	2	40
6	0,1	25
7	2	40
8	1,05	40
9	2	25
10	0,1	32,5
11	1,05	25
12	2	32,5

Eksperimenti su provedeni na sljedeći način:

- otapanjem 0,0961 g uree u 2 mL redestilirane vode pripravljena je temeljna otopina uree, c (urea, t.o.) = 800 mM;
- temeljna otopina enzima ureaze koncentracije c (ureaza, t.o.) = 5 mg mL⁻¹, pripravljena je otapanjem 10 mg ureaze u 2 mL redestilirane vode;
- otapanjem 0,3551 g kalcijeva klorida (CaCl₂) u 4 mL redestilirane vode pripravljena je temeljna otopina koncentracije c (CaCl₂, t.o.) = 800 mM;
- otapanjem 0,0020 g bakrovog klorida dihidrata (CuCl₂ · 2H₂O) u 12 mL redestilirane vode pripravljena je temeljna otopina koncentracije c (CuCl₂ · 2H₂O, t.o.) = 1 mM;
- dizajnirani eksperimenti provedeni su na način da je u staklene reaktore volumena 1 mL stavljen točno određen volumen temeljne otopine uree i CaCl₂ te je dodan određeni volumen temeljne otopine enzima ureaze;
- dodatkom enzima ureaze započeta je hidroliza uree i sinteza nanočestica trajanju od 24 sata reakcije;
- reakcijska smjesa miješana je u termostatiranoj tresilici na 200 rpm na odgovarajućoj temperaturi;
- uzorci su uzimani nakon 3h, 6h i 24h, na način da je po 200 μL uzorka uzetih iz reaktora pomiješano s 200 μL otopine CuCl₂ · 2H₂O za zaustavljanje reakcije;

- od dobivenih 400 μL uzorka, 200 μL uzeto je za analizu na *Nanosight* – u;
- nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je centrifugirana na 4500 rpm u trajanju od $t = 5$ min nakon čega su dobivene nanočestice isprane s redestiliranom vodom i ponovno centrifugirane na isti način (postupak ispiranja ponovljen je dva puta);
- nakon pranja, čestice su sušene u liofilizatoru, a zatim su analizirane na SEM – u.

3.3.2. Hidroliza uree u kotlastom reaktoru

Reakcija hidrolize uree provedena je u kotlastim reaktorima volumena V (reaktora) = 5 mL pri temperaturama $T = 25$ °C, $T = 32,5$ °C i $T = 40$ °C. Provedeni eksperimenti i njihovi početni uvjeti dani su u Tablici 3.3.

Tablica 3.3. Početni uvjeti provedenih eksperimenata

EKSPERIMENT	T [°C]	c (urea), [mM]	c (ureaza), [mg mL ⁻¹]
1	25	200	0,3
2	32,5		
3	40		

Hidroliza uree uz enzim ureazu u redestiliranoj vodi provedena je na sljedeći način, a postupak je analogan na sve tri temperature:

- temeljna otopina uree koncentracije c (urea, t.o.) = 800 mM, pripravljena je otapanjem 0,1201 mg uree u 2,5 mL redestilirane vode;
- otapanjem 0,005 g ureaze u 1 mL redestilirane vode pripravljena je temeljna otopina ureaze, c (ureaza, t.o.) = 5 mg mL⁻¹;
- u reaktorima je najprije stavljeno po 1,25 mL temeljne otopine uree i pomiješano s po 3,45 mL redestilirane vode;
- zatim je dodano po 300 μL temeljne otopine ureaze čime je aproksimiran početak eksperimenta;
- reakcijska smjesa miješana je u termostatiranoj tresilici na 200 rpm na odgovarajućoj temperaturi;

- tijekom 24h reakcije, u pravilnim vremenskim intervalima (11 uzoraka), iz reaktora je uzimano po 100 μL uzoraka koji su miješani s po 100 μL $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ za zaustavljanje reakcije i s po 800 μL redestilirane vode za razrjeđivanje uzoraka;
- uzorci su zatim profiltrirani te im je određivana koncentracija amonijevih iona prema Willisovoj metodi na spektrofotometru;
- od preostalog volumena uzetog iz reaktora uzeti su uzorci za određivanje koncentracije uree na HPLC – u;
- za pripremu prvih šest uzoraka, početnog razrjeđenja 20x, u stakle viala je stavljeno po 400 μL uzorka;
- preostalih pet uzoraka (početno razrjeđenje 20x) razrjeđeni su dodatno dva puta (ukupno razrjeđenje 10x) miješanjem 200 μL uzorka s 200 μL redestilirane vode;
- analizom uzoraka na HPLC – a dobiveni su pikovi, a njihove površine određene su integriranjem.

3.3.3. Sinteza nanočestica kalcijevog karbonata u kotlastom reaktoru

Nanočestice kalcijevog karbonata sintetizirane su reakcijom hidrolize uree u redestiliranoj vodi uz enzim ureazu uz dodatak kalcijevog klorida. Eksperimenti su provedeni u kotlastim reaktorima V (reaktora) = 5 mL također na tri temperature, $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$, $T = 32,5\text{ }^\circ\text{C}$ i $T = 40\text{ }^\circ\text{C}$. Popis provedenih eksperimenata i njihovi početni uvjeti dani su u Tablici 3.4.

Tablica 3.4. Početni uvjeti provedenih eksperimenata

EKSPERIMENT	T [$^\circ\text{C}$]	c (urea), [mM]	c (ureaza), [mg mL ⁻¹]	c (CaCl ₂), [mM]
1	25	200	2	200
2	32,5			
3	40			

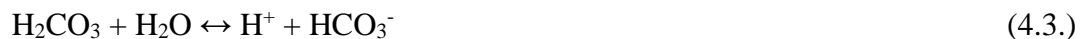
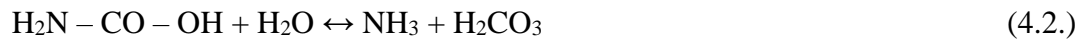
Sinteza nanočestica kalcijevog karbonata u redestiliranoj vodi provedena je na sljedeći način, a postupak je analogan na sve tri temperature:

- temeljna otopina uree koncentracije c (urea, t.o.) = 800 mM, pripremljena je otapanjem 0,1201 mg uree u 2,5 mL redestilirane vode;

- otapanjem 0,005 g ureaze u 1 mL redestilirane vode pripravljena je temeljna otopina ureaze, c (ureaza, t.o.) = 5 mg mL⁻¹;
- otapanjem 0,4705 g kalcijeva klorida (CaCl₂) u 4 mL redestilirane vode pripravljena je temeljna otopina koncentracije c (CaCl₂, t.o.) = 800 mM;
- u reaktore je prvo stavljeno po 1,25 mL temeljne otopine uree, 0,5 mL redestilirane vode i 1,25 mL temeljne otopine kalcijevog klorida;
- zatim je dodano po 2 mL temeljne otopine ureaze čime je aproksimiran početak eksperimenta;
- reakcijska smjesa miješana je u termostatiranoj tresilici na 200 rpm na odgovarajućoj temperaturi;
- tijekom 24h reakcije, u pravilnim vremenskim intervalima (11 uzoraka), iz reaktora je uzimano po 100 μL uzoraka koji su miješani s po 100 μL CuCl₂ · 2H₂O za zaustavljanje reakcije i s po 800 μL redestilirane vode za razrjeđivanje uzoraka;
- uzorci su zatim profiltrirani te im je određivana koncentracija amonijevih iona prema Willisovoj metodi na spektrofotometru;
- od preostalog volumena uzetog iz reaktora uzeti su uzorci za određivanje koncentracije uree na HPLC - u;
- za pripremu prvih šest uzoraka, početnog razrjeđenja 20x, u stakle vialje je stavljeno po 400 μL uzorka;
- preostalih pet uzoraka (početno razrjeđenje 20x) razrjeđeni su dodatno dva puta (ukupno razrjeđenje 10x) miješanjem 200 μL uzorka s 200 μL redestilirane vode;
- analizom uzoraka na HPLC – a dobiveni su pikovi, a njihove površine određene su integriranjem.

4. MODELIRANJE SINTEZE NANOČESTICA KALCIJEVOG KARBONATA

Matematički model hidrolize uree uz enzim ureazu sastoji se od kinetičkih i bilancnih jednažbi i temelji se na jednažbama (jedm. 4.1. – 4.4.):



U ovom radu, uz reakciju hidrolize uree, provedena je i reakcija dobivanja nanočestica CaCO_3 korištenjem produkta hidrolize uree, karbonatnih iona.

Dodatkom kalcijevog klorida u reaktor u kojem se odvija hidroliza uree nastaju nanočestice kalcijevog karbonata prema reakciji (jedm. 4.5.).



4.1. KINETIČKI MODEL

Kinetički model hidrolize uree u kotlastom reaktoru opisan je Michaelis – Mentenovom kinetikom za jednosupstratne reakcije te je dan jednažbom 4.6.

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

Kada se dobivaju nanočestice kalcijevog karbonata u reaktoru se nalaze kalcijevi ioni koji usporavaju reakciju hidrolize uree. Stoga je u ovom slučaju kinetika hidrolize uree opisana Michaelis – Mentenovom kinetikom s nekompetitivnom inhibicijom kalcijevim ionima (jedm. 4.7.).

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

Kinetika nastajanja kalcijevog karbonata je opisana kinetikom drugog reda obzirom da se radi o dvosupstratnoj reakciji (jedn. 4.8.).

$$r_3 = k \cdot c_{Ca^{2+}} \cdot c_{CO_3^{2-}} \quad (4.8.)$$

4.2. REAKTORSKI MODEL

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

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

$$\frac{dc_{NH_4^+}}{dt} = 2 \cdot r_1 - k_{isp} \cdot c_{NH_4^+} \quad (4.10.)$$

Reaktorski model procesa nastajanja nanočestica kalcijevog karbonata u kotlastom reaktoru korištenjem karbonatnog iona kao produkta reakcije hidrolize uree katalizirane ureazom, sastoji se od bilancnih jednadžbi za ureu (jedn. 4.11.), amonijak (jedn. 4.12.), karbonatne (jedn. 4.13.) te kalcijeve ione (jedn. 4.14.). Pretpostavljeno je da karbonatni ioni nastaju istom brzinom kojom urea hidrolizira.

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

$$\frac{dc_{NH_4^+}}{dt} = 2 \cdot r_1 - k_{isp} \cdot c_{NH_4^+} \quad (4.12.)$$

$$\frac{dc_{CO_3^{2-}}}{dt} = r_2 - r_3 \quad (4.13.)$$

$$\frac{dc_{Ca^{2+}}}{dt} = -r_3 \quad (4.14.)$$

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

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

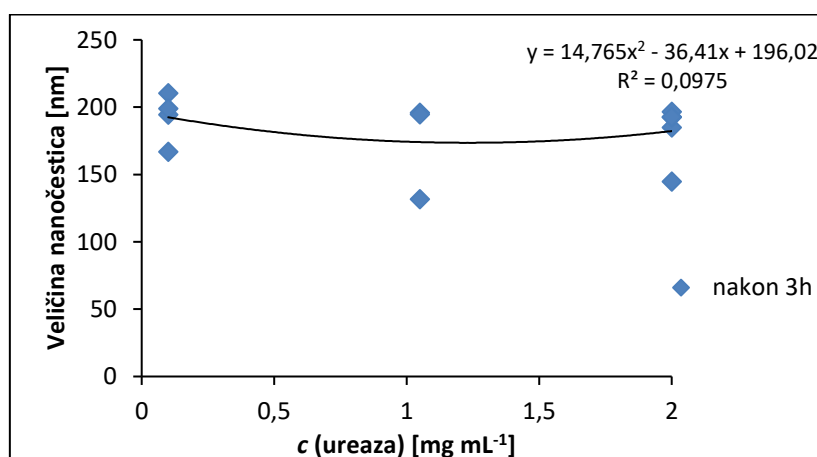
5. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je optimizacija procesa biokatalitičke sinteze nanočestica kalcijevog karbonata uz enzim ureazu korištenjem statističke metode Dizajna eksperimenata. Cilj optimizacije bio je odrediti utjecaj parametara, koncentracije enzima ureaze i temperature, na proces te odrediti uvjete prikladne za sintezu nanočestica što manjih veličina i što veće koncentracije. Da bi se reakcija sinteze kalcijevog karbonata opisala matematičkim modelom provedeni su ispitivanja kinetike enzima ureaze pri različitim temperaturama i validacija modela u kotlastom reaktoru.

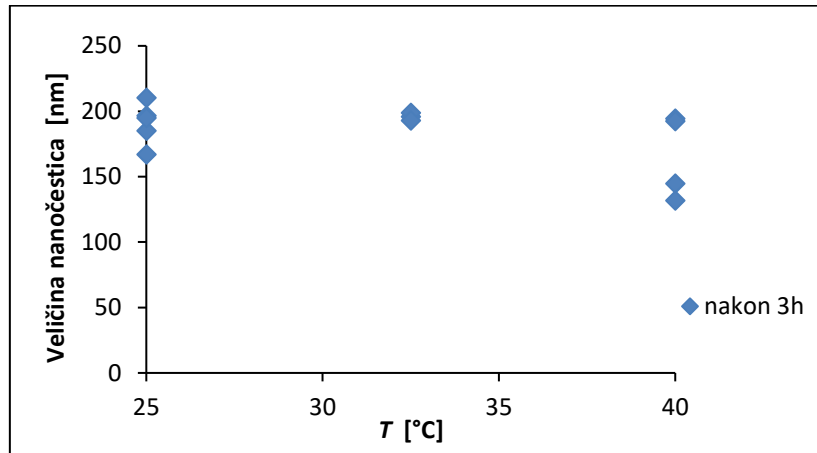
5.1. OPTIMIZACIJA PROCESA BOKATALITIČKE SINTEZE NANOČESTICA KALCIJEVOG KARBONATA

Provođenjem 12 eksperimenata (Tablica 3.2.) dobivenih metodom DOE sintetizirane su nanočestice kalcijevog karbonata te su analizirane NTA metodom na uređaju *Malvern Nanosight LM10* u svrhu određivanja njihove veličine i koncentracije. Rezultati za uzorke nakon 3h i 6h prikazani su grafički (Slika 5.1. a – d) te su temeljem njih procijenjeni uvjeti koji pogoduju biokatalitičkoj sintezi nanočestica kalcijevog karbonata s ciljem dobivanja što veće koncentracije nanočestica što manjih veličina. Veličina i koncentracija nanočestica određivana je NTA metodom na uređaju *Malvern Nanosight LM10* nakon 3h, 6h i 24h.

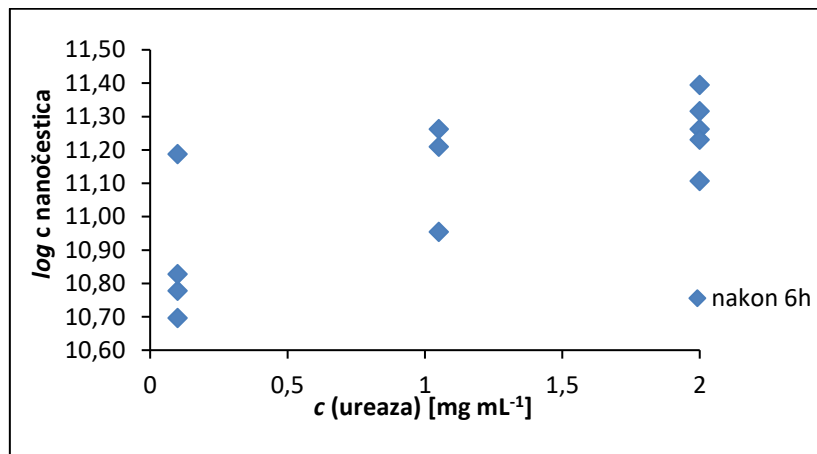
a)



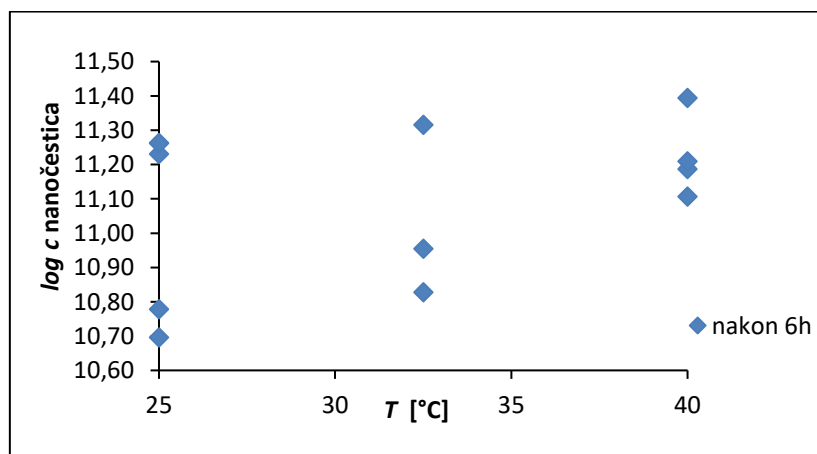
b)



c)

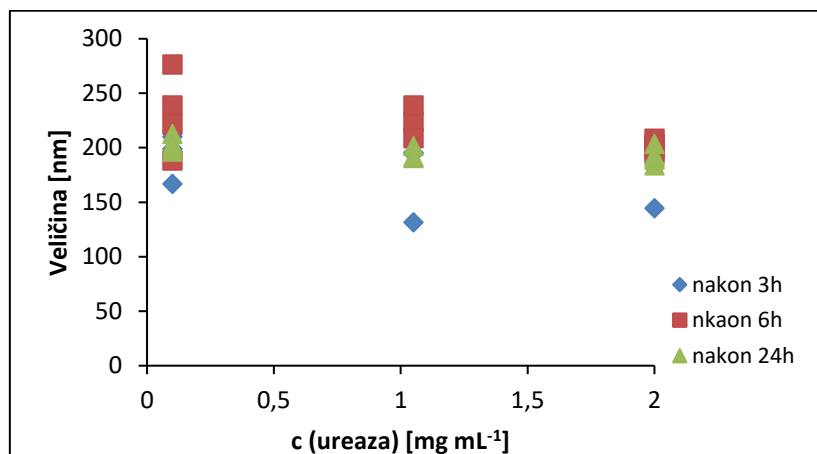


d)

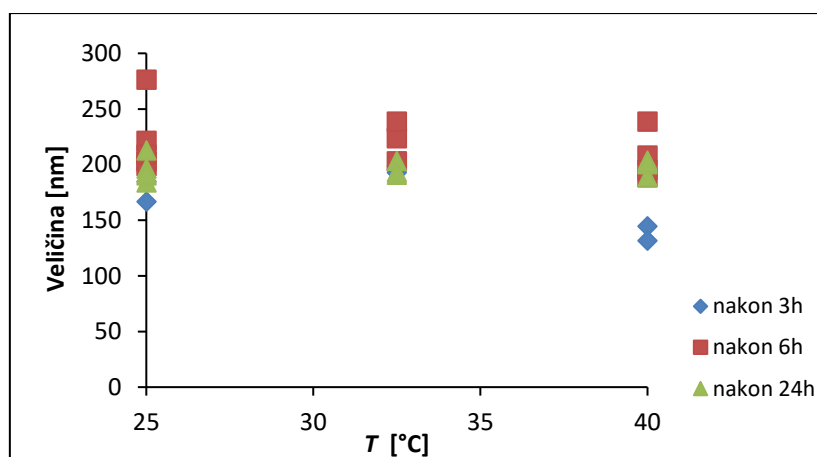


Slika 5.1. Utjecaj parametara, koncentracije enzima ureaze i temperature, na veličinu (a – b) i koncentraciju (c – d) nastalih nanočestica.

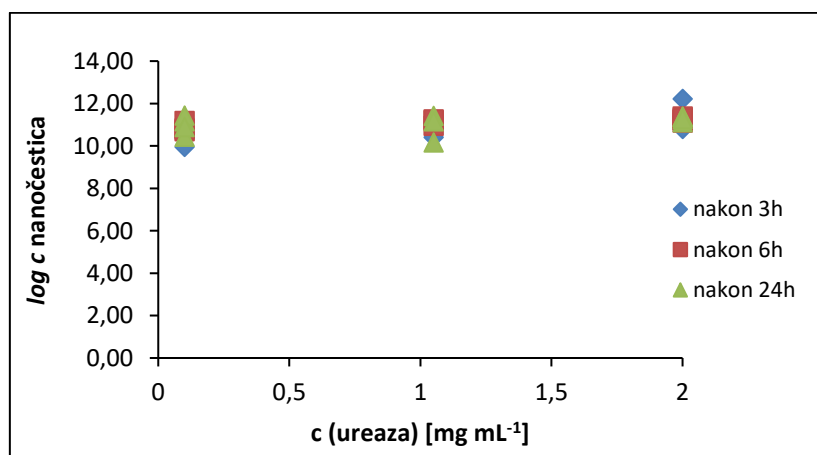
a)



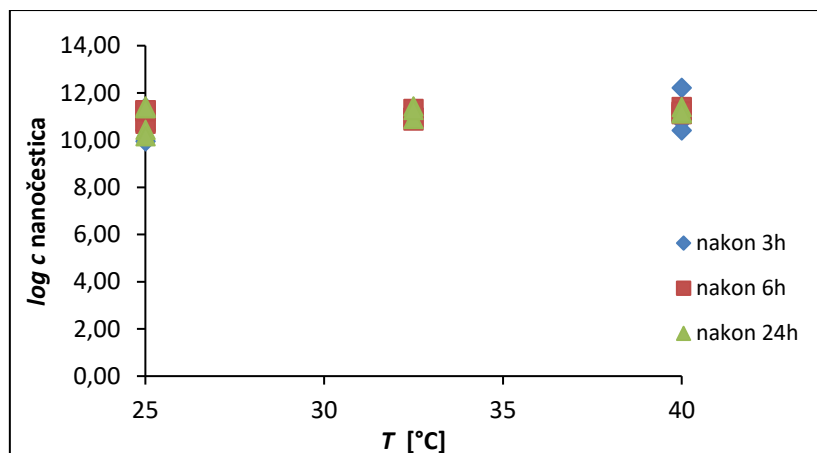
b)



c)



d)



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

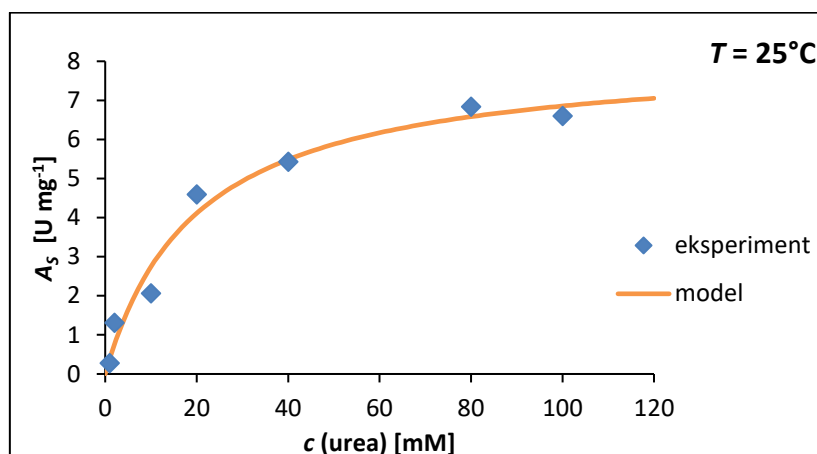
Iz Slike 5.1. i 5.2. vidljivo je da nastanku nanočestica manjih veličina pogoduju srednje vrijednosti koncentracije enzima ureaze i više temperature. Također, veća koncentracija nanočestica sintetizirana je pri višim koncentracijama enzima i nešto višim temperaturama. Na Slici 5.2. d vidljivo je da je u uzorcima nakon 3h, 6h i 24h pri istoj temperaturi koncentracija čestica ista, pa se može zaključiti da koncentracija čestica ne ovisi o vremenu trajanja reakcije. Prema tome, dulje vrijeme trajanje reakcije ne doprinosi formiranju većeg broja čestica.

5.2. KINETIKA ENZIMA UREAZE

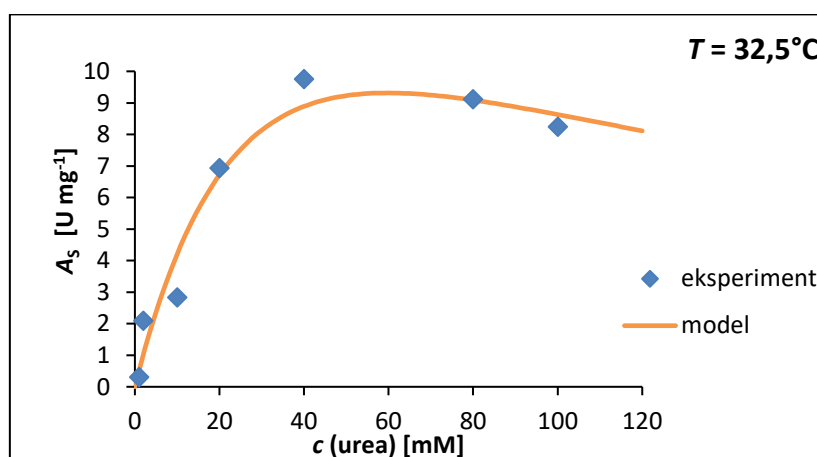
5.2.1. Kinetika enzima ureaze u redestiliranoj vodi

Kinetika enzima ureaze ispitana je spektrofotometrijski u redestiliranoj vodi pri temperaturama $T = 25\text{ °C}$, $T = 32,5\text{ °C}$ i $T = 40\text{ °C}$. Određivane su početne brzine raspada uree uz dodatak enzima ureaze, pri različitim početnim koncentracijama uree ($c(\text{urea}) = 0 - 100\text{ mM}$) praćenjem porasta koncentracije amonijevih iona. Iz dobivenih rezultata ovisnosti promjene apsorbancije o vremenu trajanja reakcije, pomoću izraza (3.2.) određena je specifična aktivnost enzima, $A_s [\text{U mg}^{-1}]$ za svaki provedeni eksperiment na sve tri temperature. Reakcijska kinetika na kraju je prikazana kao ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentracijama uree u redestiliranoj vodi na pojedinoj temperaturi.

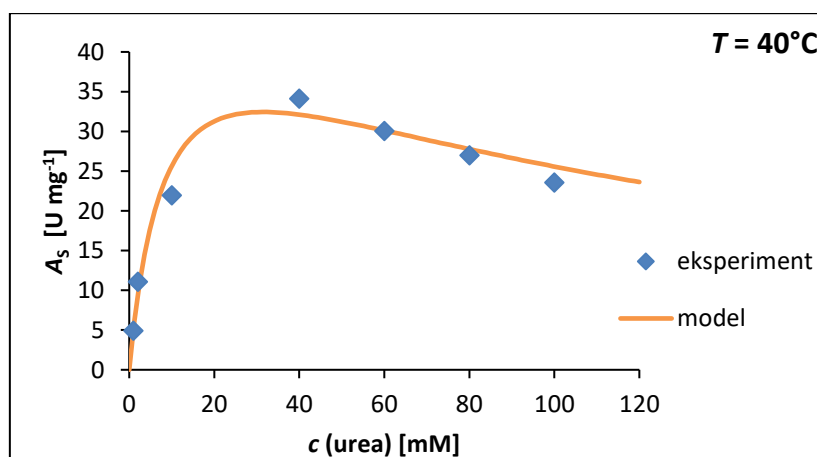
a)



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) $T = 25 \text{ °C}$, b) $T = 32,5 \text{ °C}$, c) $T = 40 \text{ °C}$.

Na Slici 5.3. a – c prikazani su eksperimentalno dobiveni podaci za specifičnu aktivnost enzima ureaze u redestiliranoj vodi te podaci dobiveni simulacijom u programskom paketu *Scientist* korištenjem Michaelis – Mentenove kinetike (jedn. 4.6.). Iako postoji manje odstupanje, uočava se dobro slaganje eksperimentalnih podataka s onima dobivenim modeliranjem na sve tri temperature te se može zaključiti da pretpostavljena Michaelis – Mentenova kinetika dobro opisuje reakciju hidrolize uree.

U *Scientist* – u su nelinearnom regresijom procijenjeni parametri Michaelis – Mentenove kinetike i konstanta inhibicije supstratom te su dani 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 ⁻¹]	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_i^S [mM]	–	84.64 ± 16.34	112.01 ± 11.24

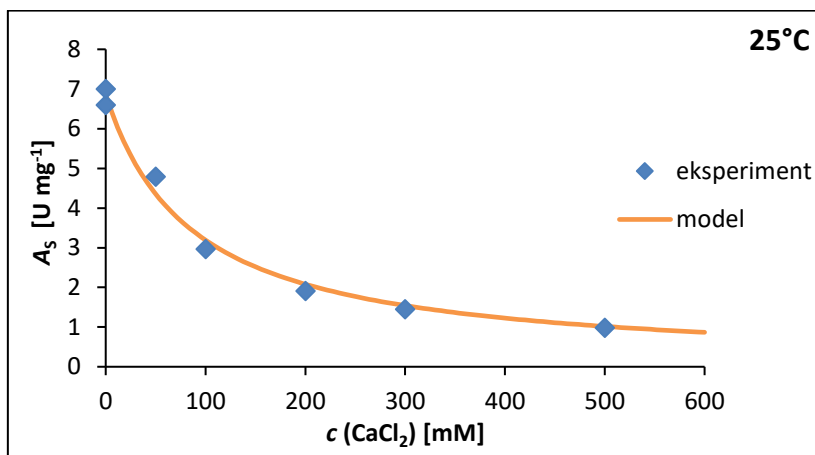
Na temelju procijenjenih vrijednosti maksimalne brzine reakcije, V_m , može se zaključiti da porastom temperature raste aktivnost enzima, odnosno raste brzina reakcije. Vrijednost Michaelis – Mentenove konstante, K_m , opisuje afinitet enzima prema supstratu. Što je niža vrijednost K_m enzim je specifičniji, tj. jače je vezan na određeni supstrat. U provedenim eksperimentima specifičnost enzima ureaze bila je najveća prilikom provođenja reakcije hidrolize uree pri $T = 40$ °C. Prema procijenjenim vrijednostima konstante inhibicije supstratom, K_i^S , može se zaključiti da pri višim temperaturama dolazi do pojave inhibicije supstratom koja se smanjuje daljnjim porastom temperature.

5.2.2. Utjecaj kalcijevih iona na aktivnost enzima ureaze

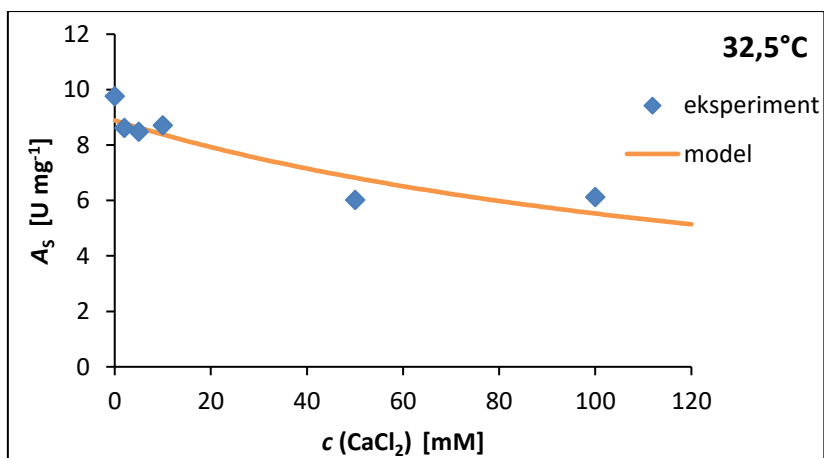
Utjecaj kalcijevih iona na aktivnost enzima ureaze, odnosno na početnu brzinu reakcije hidrolize uree određen je mjerenjem specifične aktivnosti enzima ureaze, provođenjem eksperimenata s različitim koncentracijama kalcijevog klorida (c (CaCl₂) = 0 – 500 mM) te konstantim koncentracijama ureaze (c (ureaza) = 0,1 mg mL⁻¹) i uree (c (urea) = 40 mM) u

reaktoru. Rezultati mjerenja iskazani su kao ovisnost specifične aktivnosti enzima ureaze o koncentraciji kalcijevog klorida, a prikazani su na Slici 5.4. a – c.

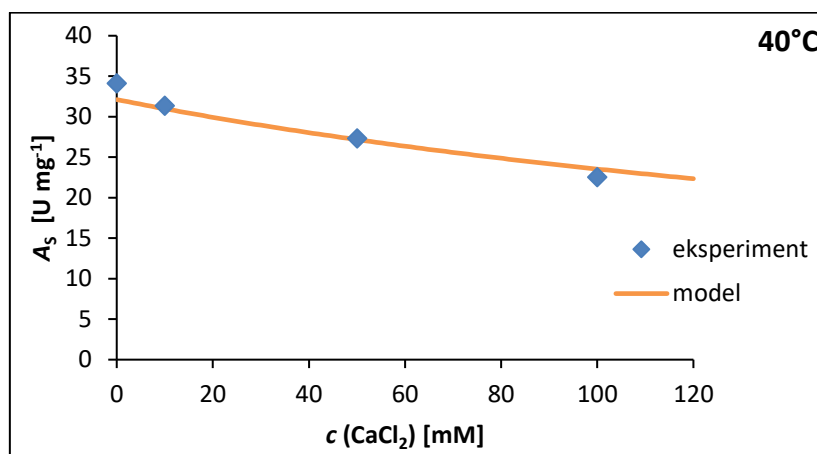
a)



b)



c)



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

Iz grafičkih prikaza se može vidjeti dobro slaganje eksperimentalno dobivenih vrijednosti s podacima dobivenim simulacijom u *Scientist* – u na sve tri temperature. Također, vidljivo je da kalcijevi ioni usporavaju reakciju hidrolize uree, tj. inhibiraju aktivnost enzima ureaze. Na temelju literaturnih podataka²⁴ zaključeno je da se radi o nekompetitivnoj inhibiciji, a konstante inhibicije procijenjene su nelinearnom regresijom u *Scientist* – u, a njihove vrijednosti dane su u Tablici 5.2.

Tablica 5.2. Konstante inhibicije kalcijevim ionima u reakciji hidrolize uree procijenjene u *Scientist* – u

Parametri	25 °C	32,5 °C	40 °C
K_i^{Ca} [mM]	87.06 ± 8.54	164.65 ± 23.27	274.58 ± 28.03

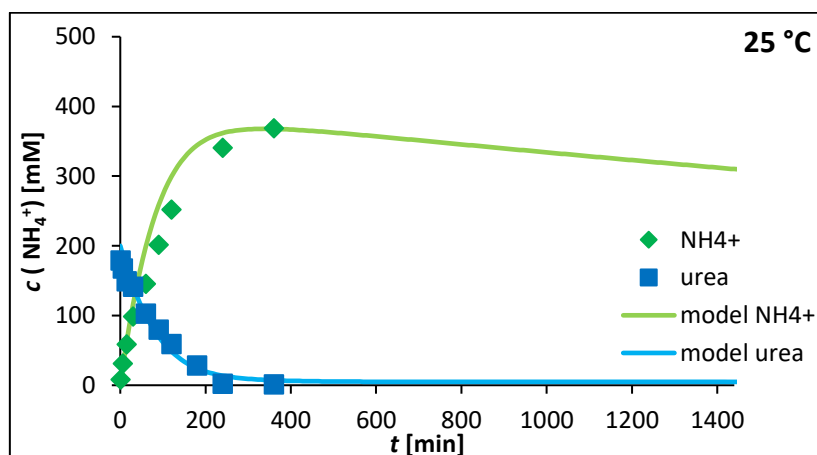
Prema procijenjenim vrijednostima konstanti inhibicije može se zaključiti da kalcijevi ioni inhibiraju djelovanje enzima ureaze, no inhibicija nije značajna i opada s porastom temperature.

5.3. HIDROLIZA UREE U KOTLASTOM REAKTORU

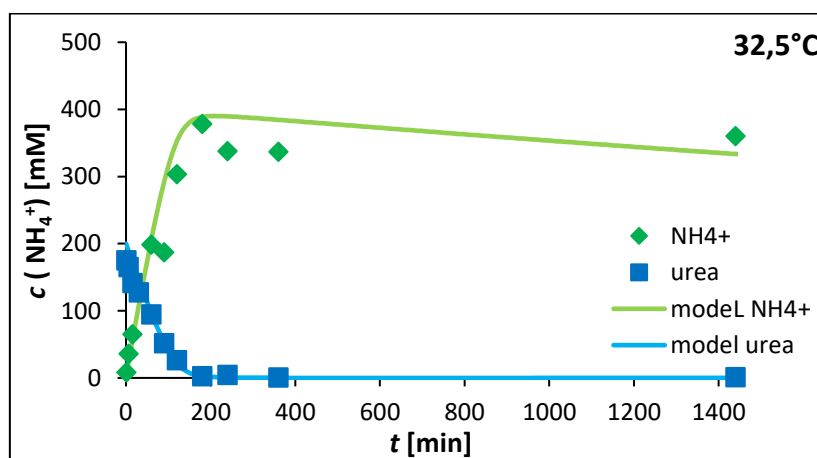
Reakcije hidrolize uree ($c(\text{urea}) = 200 \text{ mM}$) u kotlastom reaktoru provedene su u redestiliranoj vodi na temperaturama $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $T = 32,5 \text{ }^\circ\text{C}$ i $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ uz enzim ureazu ($c(\text{ureaza}) = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$). Eksperimenti su provedeni kako bi se validirao model pretpostavljen izrazima 4.6., 4.9., i 4.10.

Tijekom reakcije spektrofotometrijski je praćena koncentracija amonijevih iona, a na HPLC – u je izmjerena koncentracija uree te su dobiveni rezultati prikazani kao ovisnost koncentracije amonijevih iona i uree o vremenu trajanja reakcije pri određenoj temperaturi. Na Slici 5.5. a – c grafički su prikazani eksperimentalno dobiveni podaci i podaci dobiveni simulacijom procesa u *Scientist* – u.

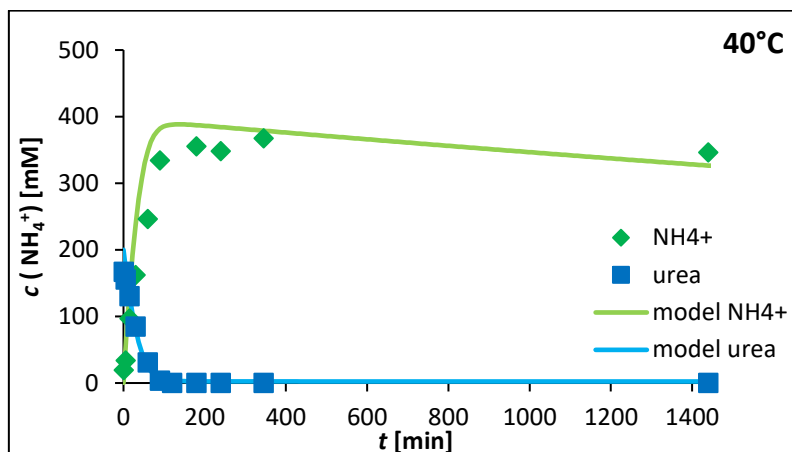
a)



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) $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Iz prikazanih rezultata zaključeno je da pretpostavljeni model (jednadžbe 4.6., 4.9., 4.10.) dobro opisuje reakciju hidrolize uree. Nakon određenog vremena reakcije vidljiva su manja odstupanja u koncentracijama amonijaka, odnosno eksperimentalno dobivene vrijednosti niže su od koncentracija dobivenih pomoću modela. Navedena odstupanja mogu se objasniti djelomičnim isparavanjem amonijaka tijekom reakcije i deaktivacijom enzima ureaze. Konstante deaktivacije enzima i konstante isparavanja amonijaka procijenjene su pomoću programskog paketa *Scientist*, a prikazane su u Tablici 5.3.

Tablica 5.3. Procijenjene konstante deaktivacije enzima i konstante isparavanja amonijaka

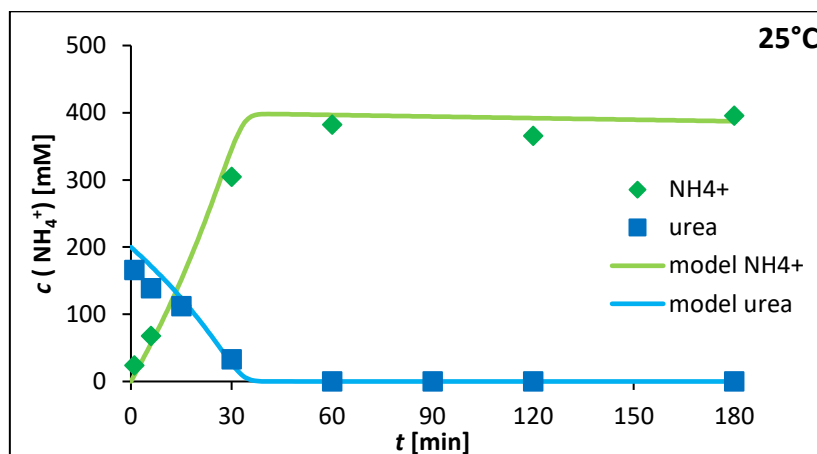
Parametri	25 °C	32,5 °C	40 °C
k_d [min^{-1}]	0.009	0.009	0.037
k_{isp} [min^{-1}]	0.00015	0.00015	0.0015

Veća vrijednost konstante deaktivacije ukazuje na smanjenje aktivnosti enzima pri višim temperaturama. Brzina isparavanja amonijaka se povećava s porastom temperature pa je i koncentracija amonijevih iona u otopini manja.

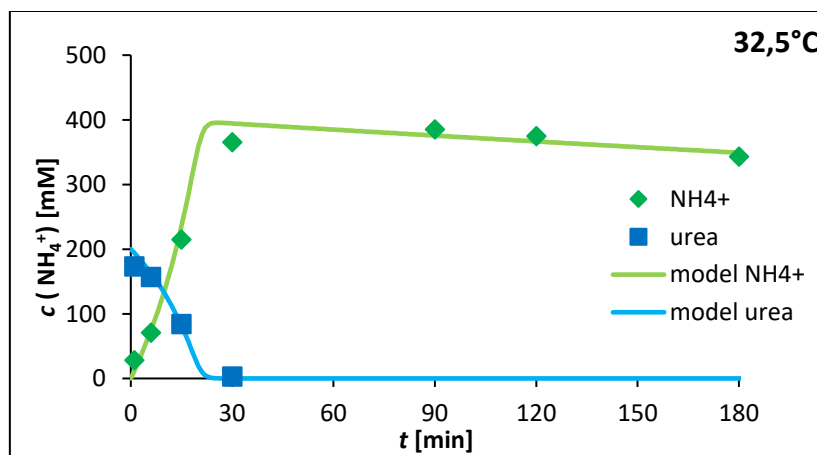
5.4. SINTEZA NANOČESTICA KALCIJEVOG KARBONATA U KOTLASTOM REAKTORU

Sinteza nanočestica kalcijevog karbonata provedena je u redestiliranoj vodi pri temperaturama $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T = 32,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ na način da je u otopine u kojima su provođene i reakcije hidrolize uree u kotlastom reaktoru dodan kalcijev klorid. Eksperimenti su provedeni kako bi se potvrdio matematički model pretpostavljen izrazima 4.7., 4.8., 4.11. – 4.15. Eksperimentalno dobiveni rezultati i rezultati dobiveni simulacijom procesa u *Scientist* – u prikazani su kao ovisnost koncentracije amonijevih iona izmjenjenih spektrofotometrijski o vremenu trajanja reakcije (Slika 5.6. a – c).

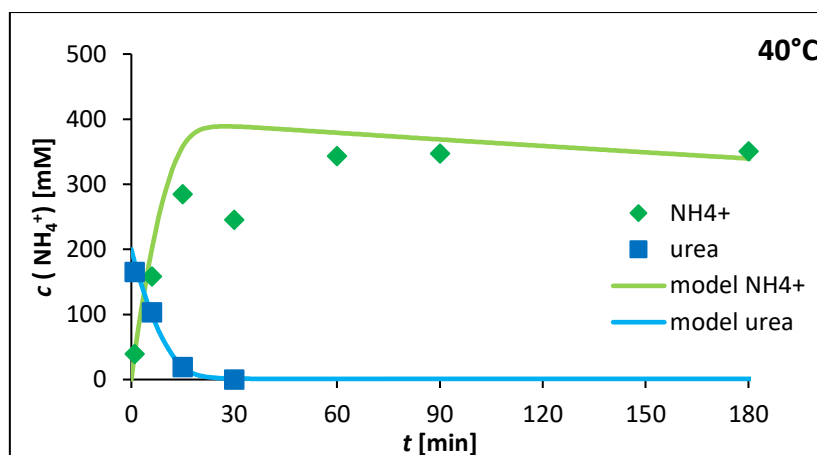
a)



b)



c)



Slika 5.6. a – c Sinteza nanočestica kalcijevog karbonata u reakciji hidrolize uree uz enzim ureazu u kotlastom reaktoru pri različitim temperaturama ($c(\text{urea}) = 200 \text{ mM}$, $c(\text{CaCl}_2) = 200 \text{ mM}$, $c(\text{ureaza}) = 2 \text{ mg mL}^{-1}$): a) $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, b) $T = 32,5 \text{ }^\circ\text{C}$, c) $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$

Iz prikazanih rezultata zaključeno je da se pretpostavljeni matematički model vrlo dobro slaže s eksperimentalnim podacima dobivenim prilikom provođenja eksperimenata, tj. reakcije sinteze nanočestica kalcijevog karbonata iz produkata reakcije hidrolize uree uz enzim ureazu te prisustvo CaCl_2 . Kod eksperimenata provedenih pri temperaturi $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ mogu se uočiti određena odstupanja eksperimentalno dobivenih vrijednosti koncentracija amonijevih iona u odnosu na vrijednosti predviđene modelom. Pretpostavlja se da do navedenog dolazi zbog nedovoljno brzog otapanja amonijaka u otopini, odnosno zbog njegovog djelomičnog isparavanja tijekom reakcije te uslijed deaktivacije enzima ureaze. Konstante deaktivacije enzima i konstante isparavanja amonijaka procijenjene su pomoću programskog paketa *Scientist*, a prikazane su u Tablici 5.4.

Tablica 5.4 Procijenjene konstante deaktivacije enzima i konstante isparavanja

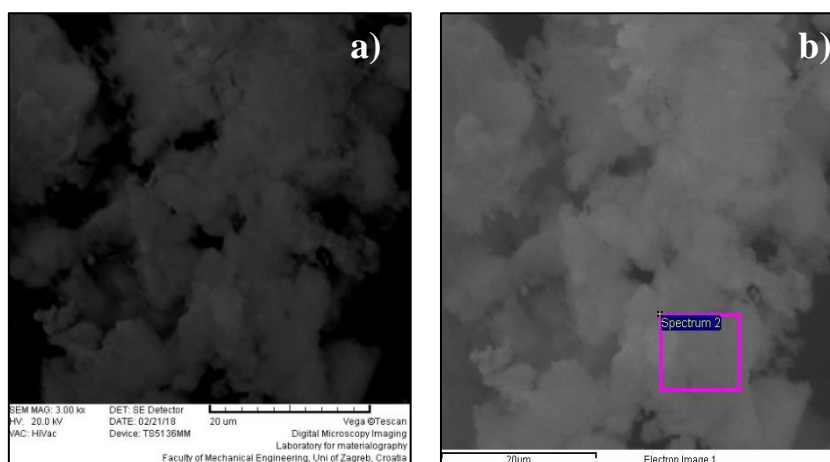
Parametri	25 °C	32,5 °C	40 °C
$k_d [\text{min}^{-1}]$	0	0.009	0.167
$k_{isp} [\text{min}^{-1}]$	0.0002	0.00081	0.00091

Može se reći da su konstante deaktivacije enzima prilikom sinteze nanočestica kalcijevog karbonata veće u odnosu na konstante procijenjene za reakciju hidrolize uree kao i

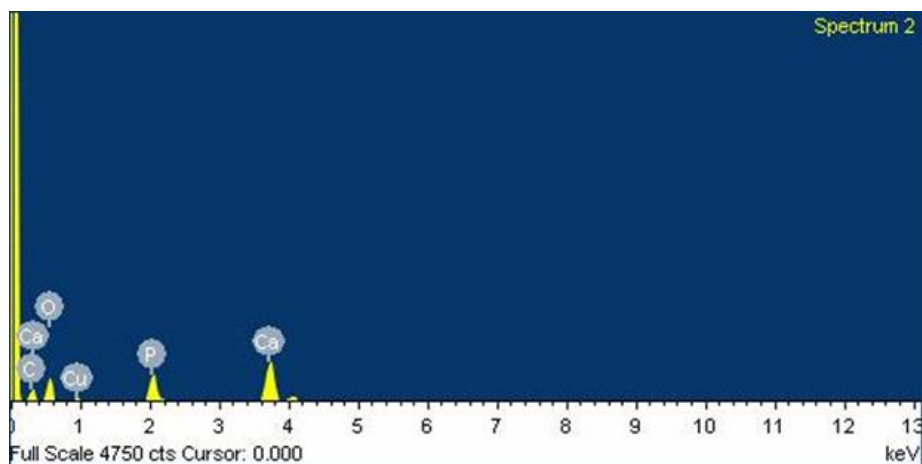
da rastu s porastom temperature. Drugim riječima, aktivnost enzima ureaze u slučaju provođenja reakcije sinteze nanočestica kalcijevog karbonata puno je manja zbog prisutnosti kalcijevih iona koji inhibiraju njezino djelovanje. Isparavanje amonijaka tijekom sinteze nanočestica je sporije u odnosu na brzinu isparavanja prilikom hidrolize uree što je posljedica prisutnosti kalcijevih iona koji povećavaju topljivost amonijaka.

5.5. KARAKTERIZACIJA DOBIVENIH NANOČESTICA KALCIJEVOG KARBONATA POMOĆU PRETRAŽNOG ELEKTRONSKOG MIKROSKOPA S ENERGETSKI DISPERZIVNOM RENDGENSKOM SPEKTROSKOPIJOM

Nanočestice kalcijevog karbonata sintetizirane provođenjem eksperimenata uz različite koncentracije enzima ureaze i na temperaturi $T = 25\text{ °C}$ i $T = 40\text{ °C}$ (Tablica 3.2., eksperimenti 5 i 11), analizirane su pretražnim elektronskim mikroskopom s energetski disperzivnom rendgenskom spektroskopijom. Dobiveni su prikazi nanočestica te njihov elementarni sastav. Na Slici 5.7. a – b i 5.9. a – c prikazane su nanočestice snimljene pri povećanju od približno 3000 puta, a maseni udio pojedinih elementa dan je u Tablicama 5.5. i 5.6.



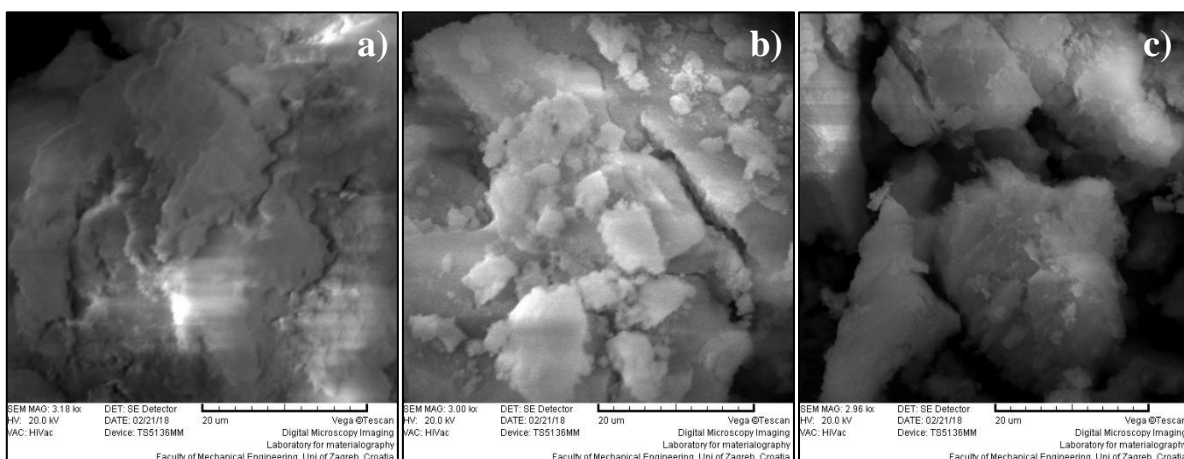
Slika 5.7. a i b SEM snimke kristala kalcijevog klorida sintetiziranih u redistiranoj vodi pri $T = 40\text{ °C}$ uz koncentraciju enzima 2 mg mL^{-1} snimljenih pri povećanju 3000 puta (eksperiment 5).



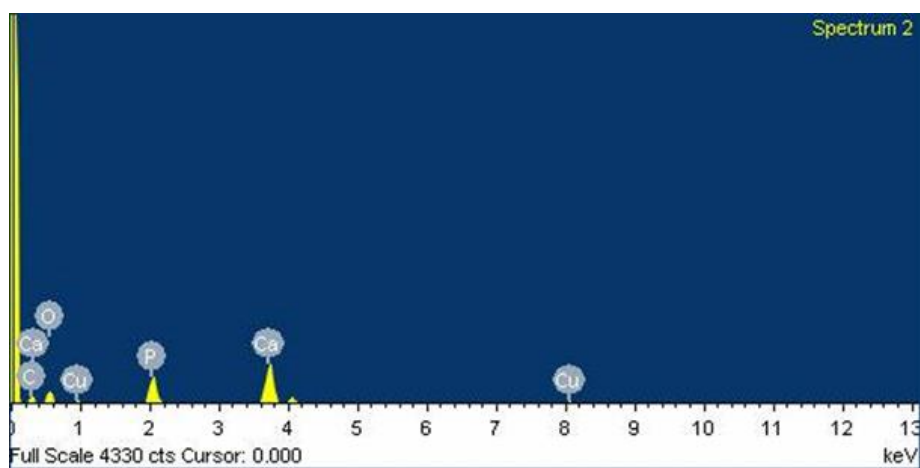
Slika 5.8. EDS spektar površine uzorka čestica kalcijevog karbonata sintetiziranih pri $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz koncentraciju enzima $c(\text{ureaza}) = 2\text{ mg mL}^{-1}$ (eksperiment 5).

Tablica 5.5. Rezultati mikroanalize iskazani u maseni udjelima za eksperiment 5.

Element	Maseni udio [%]
C	24,76
O	45,71
P	8,82
Cl	0,29
Ca	18,91
Cu	1,52



Slika 5.9. a – c SEM snimke kristala kalcijevog klorida sintetiziranih u redestiliranoj vodi pri $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz koncentraciju enzima ureaze $c(\text{ureaza}) = 1,05\text{ mg mL}^{-1}$ snimljenih pri povećanju 3000 puta (eksperiment 11).



Slika 5.10. EDS spektar površine uzorka čestica kalcijevog karbonata sintetiziranih pri $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz koncentraciju enzima $c(\text{ureaza}) = 1,05\text{ mg mL}^{-1}$ (eksperiment 11).

Tablica 5.6. Rezultati mikroanalize iskazani u maseni udjelima za eksperiment 11.

Element	Maseni udio [%]
C	21,47
O	37,04
P	11,69
Ca	23,41
Cu	6,39

Na temelju elementarne analize uzoraka (Tablice 5.5. i 5.6.) može se zaključiti da su u eksperimentima provedenim pri nižim temperaturama sintetizirane čestice koje sadržavaju veći udio kalcija u odnosu na udio kod čestica sintetiziranih pri višim temperaturama.

6. ZAKLJUČAK

Nanočestice manjih veličina nastaju pri koncentraciji ureaze od 1 mg mL^{-1} , te pri višoj temperaturi ($40 \text{ }^\circ\text{C}$).

Veće koncentracije nanočestica sintetizirane su pri višim koncentracijama ureaze (1 mg mL^{-1}) i nešto višim temperaturama ($> 32,5 \text{ }^\circ\text{C}$).

Kinetika hidrolize uree opisana je Michaelis – Mentenovim kinetičkim modelom te su procijenjeni kinetički parametri. Na temelju procijenjenih vrijednosti maksimalne brzine reakcije, V_m , zaključeno je da porastom temperature raste aktivnost enzima, odnosno raste brzina reakcije. Prema vrijednostima Michaelis – Mentenove konstante, K_m , zaključeno je da je enzim ureaza specifičniji, tj. jače je vezan na supstrat prilikom provođenja reakcije hidrolize uree na $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$. Pri višim temperaturama dolazi do pojave inhibicije supstratom koja se daljnjim porastom temperature smanjuje.

Kalcijevi ioni inhibiraju aktivnost enzima ureaze nekompetitivnom inhibicijom, a prema procijenjenim vrijednostima konstanti inhibicije, K_i^{Ca} zaključeno je da utjecaj kalcijevih iona nije značajan te da opada s porastom temperature.

Pretpostavljeni matematički model dobro opisuje reakciju sinteze nanočestica kalcijevog karbonata iz produkata reakcije hidrolize uree uz enzim ureazu i prisustvo CaCl_2 . Prema procijenjenim vrijednostima konstante deaktivacije enzima ureaze, k_d uočeno da je pri višim temperaturama dolazi do pada aktivnosti enzima.

Na temelju elementarne analize uzoraka pretražnim elektronskim mikroskopom s energetski disperzivnom rendgenskom spektroskopijom zaključeno je da su u eksperimentima provedenim pri nižim temperaturama sintetizirane čestice koje sadržavaju veći udio kalcija u odnosu na udio kod čestica sintetiziranih pri višim temperaturama.

7. POPIS SIMBOLA I KRATICA

Simboli

k	konstanta brzine reakcije [min^{-1}]
c_s	koncentracija supstrata [mmol dm^{-3}]
c_{s0}	početna koncentracija supstrata [mmol dm^{-3}]
r_s	reakcijska brzina [$\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$]
V_m	maksimalna brzina reakcije [$\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$, U mg^{-1}]
K_m	Michaelis – Mentenova konstanta [mmol dm^{-3}]
I	intenzitet izlaznog svjetla
I_0	intenzitet ulaznog svjetla
ε	molarni apsorpcijski (ekstincijski) koeficijent [$\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
b	duljina puta svjetlosti [cm]
λ	valna duljina zračenja [nm]
V	volumen [dm^3]
T	temperatura [$^{\circ}\text{C}$]
q	volumni protok [$\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$]
A	površina pika kromatograma
rpm	brzina okretaja [okr./min]
A_s	specifična aktivnost enzima [U mg^{-1}]
t	vrijeme [min]
K_i	konstanta inhibicije [mmol dm^{-3}]
K_i^S	konstanta inhibicije supstratom [mmol dm^{-3}]
$K_i^{\text{Ca}^{2+}}$	konstanta inhibicije kalcijevim ionima [mmol dm^{-3}]
k_{isp}	konstanta isparavanja amonijaka [min^{-1}]
k_d	konstanta deaktivacije enzima [min^{-1}]

Kratice

<i>E_a</i>	energije aktivacije katalizirane reakcije
<i>E_a'</i>	kompleks enzim – supstrat
<i>ES</i>	kompleks enzim – supstrat
<i>S</i>	supstrat
<i>E</i>	enzim
<i>P</i>	produkt
DOE	metoda dizajna eksperimenta (engl. <i>Design of experiments</i>)
ABS	apsorbancija
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High performance liquid chromatography</i>)
NTA	metoda praćenja nanočestica (engl. <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>)
SEM	pretražni elektronski mikroskop (engl. <i>Scanning electron microscope</i>)
SEM – EDS	pretražni elektronski mikroskopom uz energetska disperzivnu spektroskopiju

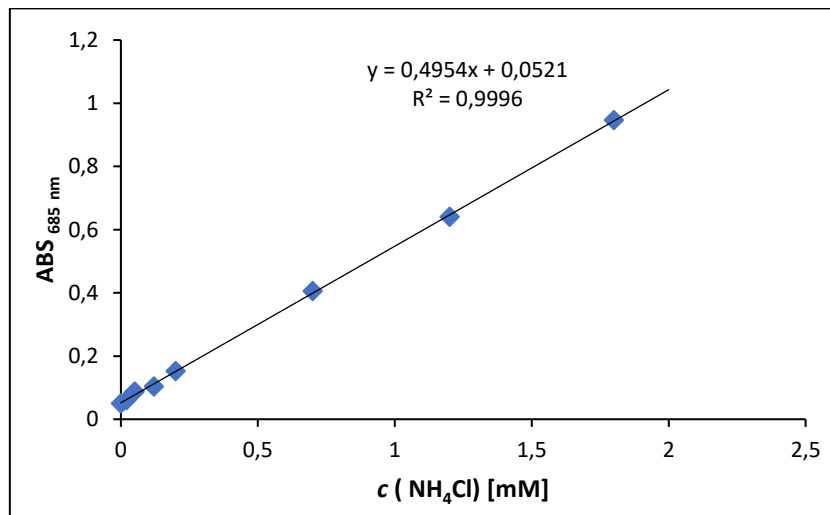
8. LITERATURA

1. Kurajica, S., Lučić Blagojević, S., Uvod u nanotehnologiju, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Zagreb (2017) 2 – 10, 32 – 33, 44 – 47.
2. Lead, J.R., Wilkinson, K.J., Environmental Colloids and Particles: Behaviour, Separation and Characterisation, *IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems*, Wiley, Chichester (2016) 17 – 95
3. Illanes, A., Enzyme Biocatalysis, Principles and Applications Homogeneous enzyme kinetics, Springer, Valparaiso (2008) 1 – 39, 107 – 120
4. Jingjing, S., Mijia, Z., Xiaoqia, Y., Chi, Z., Jun, Y., Microbial, Urease Activities and Organic Matter Responses to Nitrogen Rate in Cultivated Soil, *The Open Biotechnology Journal*, **9** (2015) 14 – 20
5. Unuma, H., Matsushima, Y., Kawai, T., Enzyme – mediated synthesis of ceramic materials, *Journal of Ceramic Society of Japan*, **119** (2011) 623 – 630
6. Jong, W., Bridges, J., Dawson, K., Jung, T., Proykova, A., Opinion on the scientific basis for the definition of the term “nanomaterial”, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (2010) 6 – 10, 28 – 30
7. Saidur, R., Leong, K.Y., Mohammad, H.A., A review on applications and challenges of nanofluids, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **15** (2011) 1646 – 1668
8. Li, X., Xu, H., Chen, Z.S., Chen, G., Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications, *Journal of Nanomaterials*, **11** (2011) 1 – 16
9. D'Souza, S.F., Immobilized enzymes in bioprocess, *Current Science in India*, **77** (1999) 69 – 79
10. Ropp, R.C, Encyclopedia of the alkaline earth compounds, Elsevier, Oxford (2013) 12 – 15, 359 – 371
11. Šoufek M., Svijet minerala, Školska knjiga, Zagreb (1991) 74 – 76
12. Ramaratnam, K., Iyer, K.I., Kinnan, M.K., Chumanov, G., Brown, P.J., Luzinov, I., Ultrahydrophobic Textiles Using Nanoparticles: Lotus Approach, *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, **3** (2008) 1 – 14

13. Mohammadi Aframehr, W., Molki, B., Heidarian, P., Behzad, T., Sadeghi, M., Bagheri, R., Effect of Calcium Carbonate Nanoparticles on Barrier Properties and Biodegradability of Polylactic Acid, *Fibers and Polymers*, **18** (2017) 2041 – 2048
14. Smolander, M., Chaudhry, Q., Nanotechnologies in Food, Royal society of chemistry, Cambridge (2010) 86 – 89
15. Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., Microbiology, McGraw – Hill, New York, (2000) 161, 554, 1006
16. Zrnčević, S., Kataliza i katalizatori, Hinus, Zagreb (2005) 8 – 12
17. Schmid A., Dordick J.S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Withoult B., Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature* **409** (2001) 258 – 268
18. Sumner, J.B., The isolation and crystallization of the enzyme urease, *The Journal of Biological Chemistry*, **69** (1926) 435 – 441
19. Boer, J.L., Mulrooney, S.B., Hausinger, R.P., Nickel – dependent metalloenzymes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **544** (2014) 142 – 152
20. Gomzi Z., Kemijski reaktori, Hinus, Zagreb (1998) 92
21. Bugg, T., Introduction to enzyme and coenzyme chemistry, Blackwell, Gosport (2004) 54 – 59
22. Anthony, J. (2014) Design of Experiments for Engineers and Scientists, Elsevier Science & Technology Books, Waltham (2003) 1 – 2, 6 – 10
23. <https://onlinecourses.science.psu.edu/stat503/node/6/>, pristupljeno 16.05.2018.
24. 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 – 240

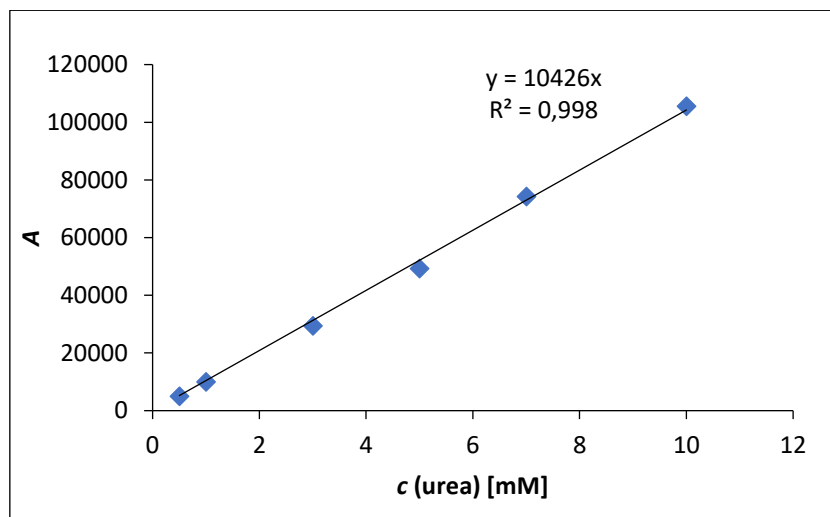
9. PRILOZI

Prilog 1



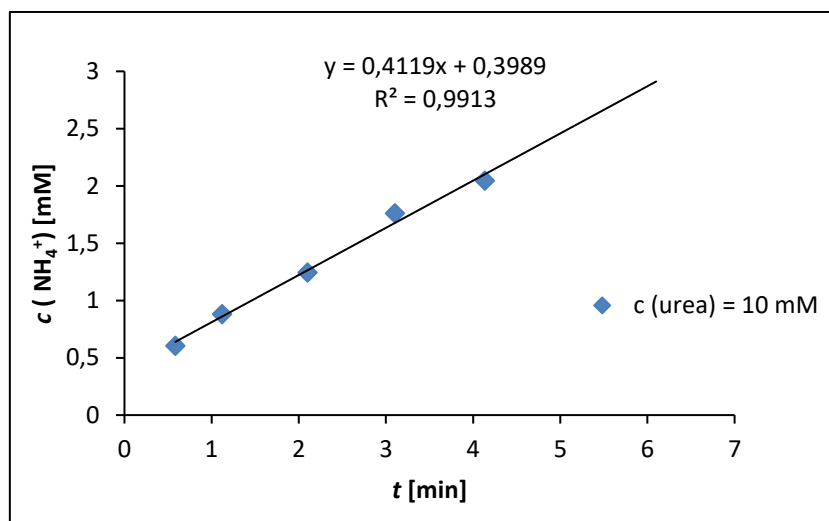
Slika 9.1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije amonijevih iona ($c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 0 - 2,0 \text{ mM}$, $\lambda = 685 \text{ nm}$)

Prilog 2



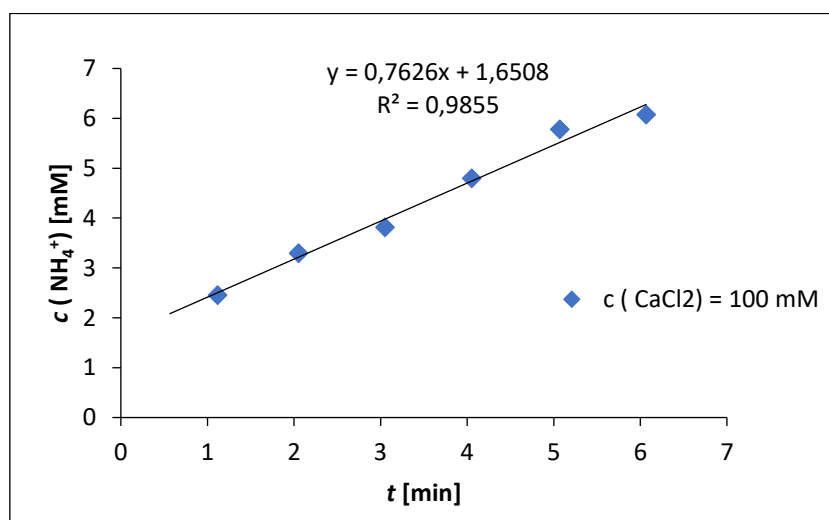
Slika 9.2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije uree ($c(\text{urea}) = 0,5 - 10 \text{ mM}$)

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 $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{ureaza}) = 0,1 \text{ mg L}^{-1}$

Prilog 4



Slika 9.4. Grafički prikaz promjene koncentracije amonijevih iona u vremenu za početnu koncentraciju kalcijeva klorida $c(\text{CaCl}_2) = 100 \text{ mM}$ pri temperaturi $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{ureaza}) = 0,1 \text{ mg L}^{-1}$

10. ŽIVOTOPIS

Željka Bućan, rođ. Marjanović [REDACTED] Osnovno školsko obrazovanje završava 2007. godine u Slatini te upisuje opću gimnaziju u Srednjoj školi Marka Marulića. Maturirala je s odličnim uspjehom 2011. godine, nakon čega upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Ekoinženjerstvo. Preddiplomski studij završava 2016. godine i nastavlja obrazovanje na diplomskom studiju Ekoinženjerstvo. Stručnu praksu odradila je u Zagrebačkoj pivovari u mikrobiološkom i fizikalno kemijskom laboratoriju. Tijekom diplomskog studija provodila je istraživanje u području primjenjene biokatalize na temu „Optimizacija biokatalitičke sinteze nanočestica cinkovog oksida“. Rezultate je objavila u zborniku radova 11. znanstveno – stručnog savjetovanja Tekstilna znanost i gospodarstvo u 2018. godini. Nastavak rada u području biokatalize je ujedno i tema njezinog diplomskog rada, a rezultate je prezentirala na XII. susretu mladih kemijskih inženjera 2018. u Zagrebu.