

# Imobilizacija aldolaze na magnetske nanočestice

---

Rimac, Tomislav

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:106823>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-26**



Repository / Repozitorij:

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



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

Tomislav Rimac

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, srpanj 2019.

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

Tomislav Rimac

Imobilizacija aldolaze na magnetske nanočestice

DIPLOMSKI RAD

Mentor:

Prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

Članovi ispitnog povjerenstva: Prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

Prof. dr. sc. Ana Lončarić Božić

Doc. dr. sc. Marin Kovačić

Zagreb, srpanj 2019.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki na velikoj pomoći, vremenu, susretljivosti i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala asistentu mag. ing. oecoing. Dini Skendroviću za njegov angažman u eksperimentalnom dijelu ovog rada i ugodnoj atmosferi u laboratoriju.*

*Zahvaljujem i svojim prijateljima što su bili uz mene za ovo dugo vrijeme studiranja i što su ga učinili nezaboravnim.*

*Hvala mojoj obitelji za svu pomoć oko studiranja.*

## SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
2.	OPĆI DIO.....	2
2.1	Statini.....	2
2.2.	Enzimi.....	2
2.2.1.	Aldolaze .....	5
2.2.2.	DERA .....	6
2.3.	Metode stabilizacije.....	7
2.3.1.	Metode imobilizacije.....	7
2.3.2.	Kovalentna imobilizacija.....	8
2.4.	Sinteza i vrste nosioca .....	8
2.4.1.	Magnetske nanočestice.....	9
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
3.1	Aparatura .....	12
3.1.1	Centrifuga.....	12
3.1.2	Tresilica.....	12
3.1.3	Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) .....	13
3.1.4	Spektrofotometar .....	14
3.2	Imobilizacija enzima na magnetske nanočestice .....	15
3.2.1	Sinteza magnetskih nanočestica obloženih neporoznom silikom .....	15
3.2.2	Sinteza magnetskih nanočestica obloženih mezoporoznom silikom .....	15
3.2.3	Funkcionalizacija, aktivacija nosioca i imobilizacija enzima .....	16
3.3	Analitičke metode.....	18
3.3.1	Određivanje koncentracije proteina .....	18
3.3.2	Određivanje aktivnosti enzima.....	18
3.3.3	Određivanje koncentracije reaktanata i produkata pomoću HPLC uređaja .....	19
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	20
4.1	Imobilizacija DERA-e na magnetske nanočestice obložene neporoznom silikom ...	21
4.2	Imobilizacija DERA-e na magnetske nanočestice obložene mezoporoznom silikom	
	30	
5.	ZAKLJUČAK .....	38
6.	LITERATURA.....	39

7.	PRILOZI.....	41
8.	POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA .....	43
9.	ŽIVOTOPIS .....	45

## SAŽETAK

Enzim Deoksiriboza-5-fosfat aldolaza (DERA) katalizira reakciju sinteze (3R,5R)-6-kloro-3,5- dihidroksi heksanala (laktol) dvostrukom aldolnom adicijom dvije molekule acetaldehida i jedne molekule kloroacetaldehida. Visoka koncentracija aldehida u DERA reakciji ima izrazito negativan utjecaj na stabilnost enzima. Cilj ovog rada bio je provesti imobilizaciju enzima DERA-e na magnetske nosioce u svrhu povećavanja njegove stabilnosti. Kao nosioci za imobilizaciju korištene su magnetske nanočestice obložene neporoznom i mezoporoznom silikom. Nosioci su aktivirani s benzokinonom, glutaraldehydom i epoksi skupinom. Najveća stabilnost i aktivnost dobivena je imobilizacijom enzima DERA-e na magnetske nanočestice obložene neporoznom silikom aktivirane benzokinonom.

**Ključne riječi:** *deoksiriboza-5-fosfat aldolaza, imobilizacija enzima, aldolna adicija, deaktivacija enzima, silika, magnetske nanočestice*

## ABSTRACT

Deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA) catalyses the synthesis of (3R,5R) -6-chloro-3,5-dihydroxyhexanal (lactol) by double aldol addition of two molecules of acetaldehyde and one molecule of chloroacetaldehyde. High aldehyde concentrations in DERA reaction have significant negative impact on enzyme stability. The aim of this paper was to carry out the immobilization of DERA enzyme on magnetic carriers in order to increase its stability. Magnetic nanoparticles coated with mesoporous and nonporous silica were used as the immobilisation carriers. Carriers were activated by benzoquinone, glutaraldehyde and epoxy group. The highest stability and activity was achieved by immobilising DERA enzyme onto nanomagnetic particles coated with nonporous silica and activated by benzoquinone.

**Key words:** *deoxyribose-5-phosphate aldolase, enzyme immobilisation, aldol addition, enzyme deactivation, silica, magnetic nanoparticles*



## 1. UVOD

Enzimi su biološki katalizatori, po strukturi proteini, neophodni za život zbog svojeg utjecaja na kemijske procese u stanicama. Slično kemijskim katalizatorima enzimi smanjuju energiju aktivacije, ali posebni su po svojoj visokoj aktivnosti, specifičnosti i selektivnosti u usporedbi sa klasičnim katalizatorima. Ne mijenjaju se prilikom reakcije tako da se mogu ponovno upotrijebiti u uzastopnim reakcijama. Provođenjem biotransformacija žele se postići visoke koncentracije produkta, visoka volumna produktivnost i dobro iskoristiti biokatalizator, pa ga stoga izlažu uvjetima koji su različiti od onih u živoj stanici te kao posljedica toga dolazi do pada aktivnosti biokatalizatora njegovom produljenom upotrebom. Ta promjena može biti uzrokovana miješanjem, prisustvom veće koncentracije supstrata, malom promjenom pH vrijednosti ili prisustvom stranih molekula koje uzrokuju promjene na strukturi proteina. Ukoliko dođe do promjene strukture enzim gubi funkciju i prestaje djelovati, zato je važno stabilizirati enzim kako bi se mogao adekvatno primjenjivati u industrijskim procesima. <sup>[1]</sup>

Enzimi su relativno skupi katalizatori, kako bi se mogli koristiti iznova iz reakcije u reakciju potrebno ih je stabilizirati. Imobilizacija enzima je najjednostavnije rješenje za topive biokatalizatore. <sup>[2]</sup>

Enzim DERA (2-deoksi-D-riboza-5-fosfat aldolaza) prirodno katalizira kemijsku reakciju raspada 2-deoksi-D-riboza-5-fosfata na D-gliceraldehid-3-fosfat i acetaldehid. Najveći problem u korištenju DERA-e je slaba otpornost na visoke koncentracije acetaldehida u industrijskim procesima. DERA izolirana iz hipertermofilnih bakterija ima bolju otpornosti na acetaldehid. <sup>[3]</sup>

Dvostrukom aldolnom adicijom acetaldehida i kloroacetaldehida dobiva se produkt (3R, 5S)-6-kloro-3,5-dihidroksi heksanal (laktol) koji je prekursor u dobivanju statina koji se koristi u procesima proizvodnje lijekova protiv kolesterola. <sup>[4]</sup>

Cilj ovog rada je bio povećati stabilnost DERA-e u prisustvu aldehida imobilizacijom enzima na magnetske nosioce.

## **2. OPĆIDIO**

### **2.1 Statini**

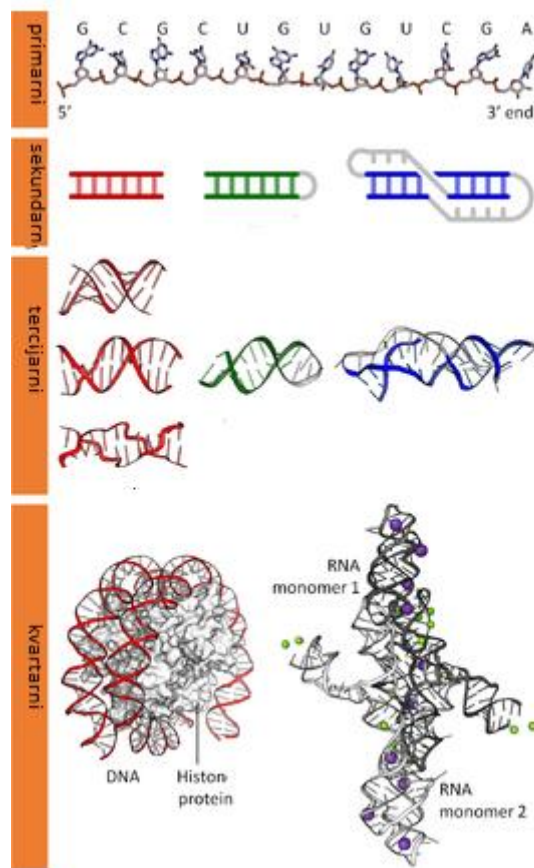
Statini, odnosno HMG-CoA inhibitori reduktaze su skupina lijekova koji se koriste za snižavanje kolesterola u krvi. Smanjivanje LDL (low density lipoprotein) kolesterola znatno umanjuje mogućnost miokardijalnog infarkta, srčanog udara i kardiovaskularnog zastoja.

Neke vrste statina mogu se naći u nekim gljivama i crvenoj fermentiranoj riži. Zbog isteka patenta od 2012. godine većina oblika lijeka je generička, uključujući i atorvastatin koji je najprodavaniji oblik.

Statin djeluje na način da inhibira 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktazu, enzim koji sudjeluje u biosintezi kolesterola. Uzimanjem statina smanjuje se proizvodnja kolesterola u jetri i smanjuje se njegova koncentracija u krvotoku. Statini također imaju protuupalno djelovanje, smanjuju stvaranje trombova i poboljšavaju endotelijalnu funkciju. Efekt lijeka vidi se pri svim dobnim skupinama, kod muškaraca i žena te prema nekim podacima smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti za 27%. Strukturno gledajući, svi statini imaju zajednički 3,5,-dihidroksi lanac kiseline koji sadrži dva kiralna centra. <sup>[5],[6]</sup>

### **2.2. Enzimi**

Enzimi su biološki katalizatori (biokatalizatori) te po strukturi odgovaraju proteinima. U prirodi postoji 20 aminokiselina koje sadrže samo 5 elemenata periodnog sustava: C, N, H, O, S. Najbitnija funkcionalna skupina je peptidna zbog toga jer kondenzacijom amino i karbonilne skupine nastaju peptidne veze. Struktura proteina podijeljena je u četiri strukturna nivoa: primarni, sekundarni, tercijarni te kvartarni (Slika 1). Peptidni lanci su niz aminokiselina povezani određenim redoslijedom. Promjenom tog redoslijeda mijenja se struktura i funkcija biokatalizatora. <sup>[1]</sup>



Slika 1. Shematski prikaz struktura enzima (en.wikipedia.org 28.6.2019.)

Primarna struktura proteina određena je genima koji određuju aminokiseline, sekundarna struktura se sastoji od  $\alpha$ -uzvojnice i  $\beta$ -naboranih listova, tercijska struktura opisuje ukupnu trodimenzionalnu strukturu, a kvartarna struktura opisuje interakciju podjedinica multimernog proteina. Tercijarne i sekundarne strukture osjetljive su na promjenu pH i temperature što utječe na katalitičku aktivnost enzima. Mnogim enzimima potreban je kofaktor kako bi djelovali. Kofaktori mogu biti metali ili male organske molekule koje se nazivaju koenzimi. <sup>[7]</sup>

Nazivi enzima temelje se na supstratima s kojima reagiraju ili na reakciji koju kataliziraju. Oko 1950. enzimolozi počinju rad na novoj klasifikaciji koji se bazira na njihovoj funkciji. Otto Hoffman-Ostenhof predložio je tri glavne skupine enzima:

- hidrolaze, transferaze i oksidoreduktaze (reakcija tipa  $A + B = C + D$ );
- liaze i sintaze ( $A = B + C$ ); i
- racemaze ( $A=B$ ).

Druga podjela temeljila se također na tri glavne skupine: hidrolizirajući enzimi, transferirajući enzimi te ostali enzimi. Većina enzima spada u prve dvije skupine. To je bio početak moderne klasifikacije enzima. Godine 1956. osnovano je povjerenstvo za nomenklature NC-IUBMB ( Nomenclature Committee - International Union of Biochemistry and Molecular Biology) koje je u 1964. godini, uz neke dopune, donijelo klasifikaciju enzima<sup>[8]</sup>.

Od prve klasifikacije do 2010. broj identificiranih enzima porastao je na preko 5000. Prema zadnjoj klasifikaciji enzime dijelimo na:

1. Oksidoreduktaze – enzimi koji kataliziraju oksidoredukcijske reakcije koje uključuju prijenos elektrona ili vodikovih i kisikovih atoma. Sadrže 22 podskupine te zahtijevaju koenzime.

2. Transferaze – enzimi koji kataliziraju prijenos funkcionalne skupine od donora do prikladnog akceptora. Postoji 9 podskupina, ovisno o kemijskoj prirode funkcionalne skupine koja se prenosi. Ovi enzimi imaju ključnu ulogu u staničnom metabolizmu.

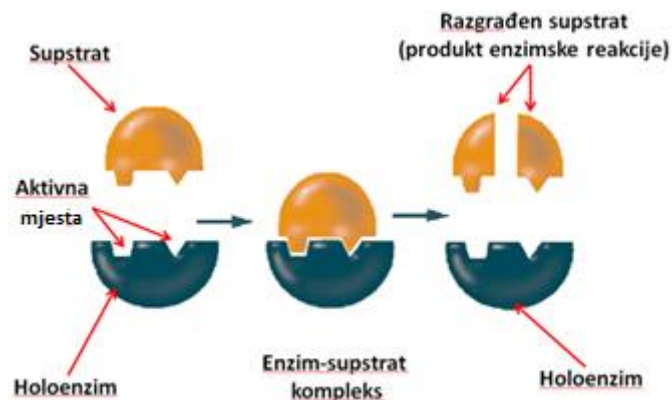
3. Hidrolaze – enzimi koji kataliziraju reakcije hidrolize. Postoji 12 podskupina ovisno o tipu veze prisutnom u reakciji hidrolize. Ključne su za stanični katabolizam.

4. Liaze – enzimi koji kataliziraju reakcije ne-hidrolitičkog i ne-oksidativnog cijepanja kemijske veze. Dije se u 7 podskupina, ovisno o tipu prihvatljive kemijske veze koja se cijepa. Sve češća je njihova primjena u industriji.

5. Izomeraze – enzimi koji kataliziraju reakciju konverzije supstrata u izomer. Postoji 6 podskupina, ovisno o tome koji tip izomera nastaje u reakciji. Često nisu tehnološki iskoristive, izuzev glukoza izomeraze.

6. Ligaze – enzimi koji kataliziraju reakcije kovalentnog povezivanja molekula. Dije se u 6 podskupina, ovisno o tome koji tip kovalentne veze nastaje. Zaslužne su za stanični anabolizam.

Enzim i supstrat reagiraju po principu „ključ – brava“ pri čemu se molekula supstrata veže na aktivno mjesto enzima te nastaje kompleks enzim – supstrat (slika 2). Nakon nastajanja kompleksa enzim – supstrata (ES) enzim pretvara supstrat u konačni produkt pri čemu on sam ostaje nepromijenjen. <sup>[1]</sup>

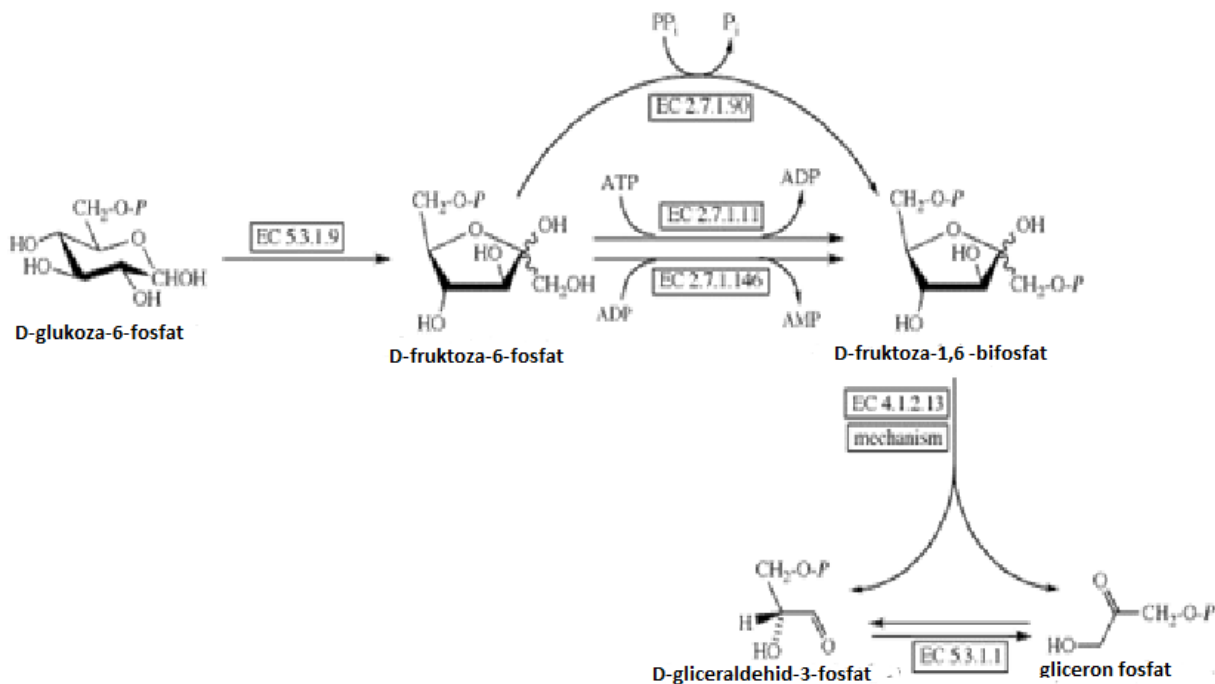


Slika 2. Shematski prikaz mehanizma djelovanja enzima (<https://images.nigms.nih.gov> pristupljeno 28.6.2019.)

### 2.2.1. Aldolaze

Aldolaze su dobile ime prema aldolnoj reakciji odnosno prema povratnoj reakciji cijepanja aldola.

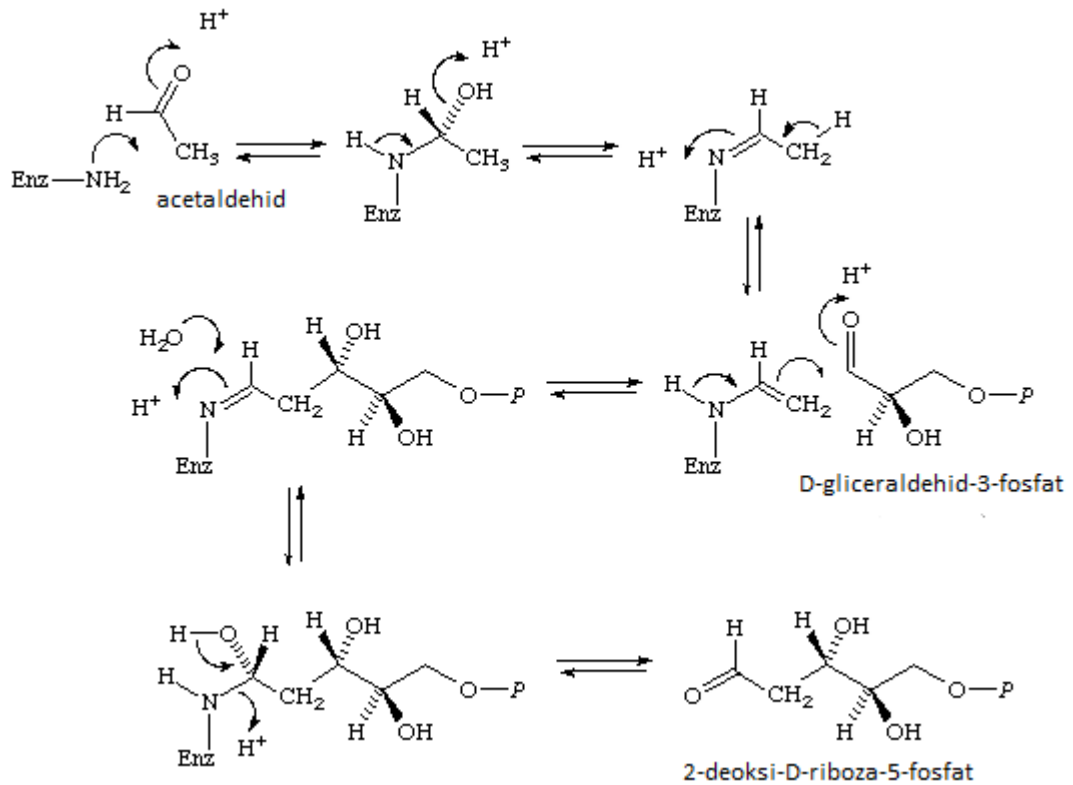
Primjer aldolaze je fruktoza—bifosfat aldolaza (EC 4.1.2.13.) koji sudjeluje u stanici u procesu glikolize i Calvinovom ciklusu kako je prikazano na slici 3.



Slika 3. Prikaz djelovanja EC 4.1.2.13 u glikolizi

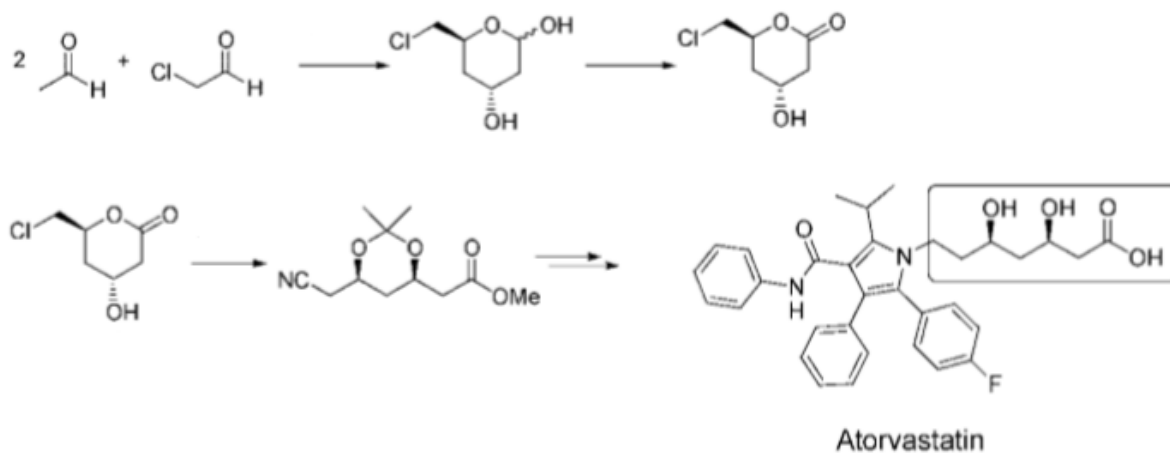
### 2.2.2. DERA

Enzim 2-deoksi-D-riboza-5-fosfat acetaldehid liaza označena je brojem EC 4.1.2.4. U prirodi cijepa 2-deoksi-D-riboza-5-fosfat (DRP) u D-gliceraldehid-3-fosfat i acetaldehid. (slika 4).



Slika 4. Mehanizam reakcije DERA-e

Kataliziranom aldolnom kondenzacijom 2 mola acetaldehida i 1 mol kloroacetaldehida uz DERA-u kao biokatalizator nastaje (3R,5S)-6-kloro-2,4,6-trideoksiheksapiranozid, prekursor u sintezi atorvastatina, lijeka koji se uzima kod povišenog kolesterola. Shema reakcije je prikazana na slici 5. <sup>[4]</sup>



Slika 5. Shema sinteze atorvastatina pomoću enzima DERA <sup>[14]</sup>

Kako je kondenzacijska reakcija sinteze atorvastatina različita od prirodne reakcije cijepanja 2-deoksiriboze-5-fosfata smanjena je aktivnost biokatalizatora. Osim toga, DERA nema veliku otpornost na visoke koncentracije aldehida i acetaldehida što smanjuje njenu stabilnost. <sup>[3]</sup>

### 2.3. Metode stabilizacije

Korištenjem enzima *in vitro* njegova aktivnost tijekom vremena opada. Neki od uzroka su: miješanje, visoka koncentracija supstrata, prisustvo stranih molekula koje utječu na strukturu proteina, pH, ionska jakost i drugi. Za industrijsku primjenu važno je da je biokatalizator dovoljno stabilan, da se može višekratno upotrijebiti te da se lako izdvaja iz reakcijske otopine. U tu svrhu razvijene su metode stabilizacije enzima koje uključuju: imobilizaciju, međumolekulske povezivanje, kemijsku modifikaciju, dodatak metalnih iona, promjenu visoke koncentracije neutralnih soli. <sup>[1]</sup>

#### 2.3.1. Metode imobilizacije

Zahtjevi za visokom produktivnosti enzima doveli su do razvijanja raznih metoda stabilizacije, od kojih je najjednostavnija metoda imobilizacije. Pomoću imobilizacije moguće je postići kontinuiran ekonomičan proces, automatizaciju procesa te je moguće dobiti produkt visoke čistoće. Imobilizirani enzimi se lakše izdvajaju iz smjese i ponovno koriste, stabilniji su

od slobodnih biokatalizatora u širokom području temperature i pH. Osim u proizvodnji mogu se koristiti i u analitičke svrhe kao biosenzori. Također je važno napomenuti kako je često potrebno napraviti kompromis između aktivnosti i stabilnosti jer najbolja metoda imobilizacije za stabilnost ne mora odgovarati najboljoj aktivnosti.

Kao nosioci za imobilizaciju obično se koriste inertni polimeri i anorganski materijali. Metode imobilizacije možemo podijeliti na adsorpciju, kovalentno vezanje, imobilizacija umrežavanjem te imobilizacija uklapanjem u gel. [2]

### **2.3.2. Kovalentna imobilizacija**

Kovalentna imobilizacija uključuje stvaranje kovalentnih veza između enzima i nosača, te je jedna od najčešće korištenih metoda za ireverzibilnu imobilizaciju enzima. Funkcionalne skupine koje sudjeluju u vezanju enzima na nosioc su obično bočni lanci lizina (ε-amino skupina), cisteina (tiolna skupina) i aspartanske i glutaminske kiseline (karboksilne skupine, imidazolne i fenolne skupine koje nisu bitne za katalitičku aktivnost enzima). Aktivnost kovalentno vezanog enzima ovisi o veličini i obliku nosioca, prirodi metode vezanja, sastavu nosioca i specifičnim uvjetima tijekom spajanja. Reakcija vezanja se mora provoditi pod uvjetima koji ne uzrokuju gubitak aktivnosti enzima niti utječu na aktivna mjesta. [10] [11]

### **2.4. Sinteza i vrste nosioca**

Kao nosioci mogu se koristiti prirodni, umjetni polimeri i anorganski materijali. Od prirodnih materijala mogu se izdvojiti alginati koji su Ca, Mg i Na soli alginske kiseline. U širokoj su upotrebi za imobilizaciju u obliku alginat-polikrilamid gelova, kalcij-alginat zrnaca te ksantan-alginat zrnaca. Osim toga koriste se i prirodni polimeri poput hitina i hitosana. Kolagen je prirodni polimer, koristi se uglavnom za imobilizaciju katalaze koristeći kolagen vlakna za potporu. Ima znatnu aktivnost i nakon 26 upotreba. Želatine su hidrokoloide; mogu vezati na sebe deset puta veću masu vode. Koriste se u miješanim sustavima nosača u tandemu sa polikrilamidima. Najzastupljeniji prirodni polimer je celuloza a koristi se za imobilizaciju penicilin G acilaze, glukoamilaze, α-amilaze, lipaze te β-galaktosidaze i drugih. α-amilaze imobilizirane na magnetske čestice obložene sa celulozom našle su primjenu u razgradnji škroba. Pektin je po strukturi heteropolisaharid sa dodatkom 0,2 – 0,7 % glicerola koji mu daje



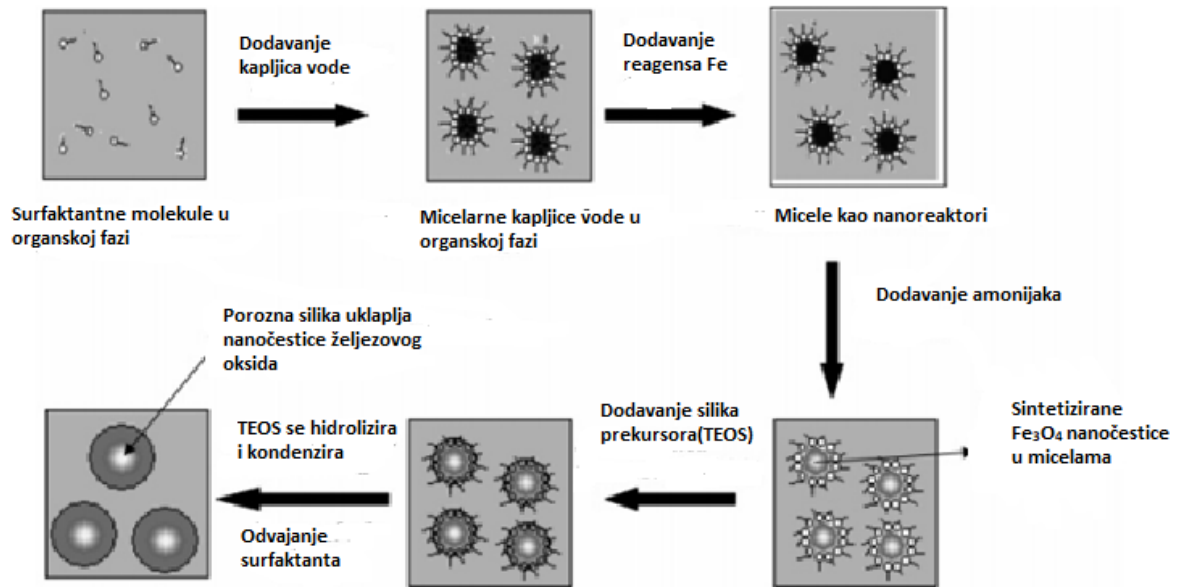
plastična svojstva. Koristi se za imobilizaciju papina i za razvoj novih materijala za liječenje ozljeda kože. Kombinacija pektin-hitin te pektin-kalcij alginat pokazuju povećanu otpornost na termalne stresove i denaturaciju. također imaju povećana katalitička svojstva zbog vrlo stabilnih polielektrolitičkih kompleksa između enzima i nosača pokrivenim pektinom.

Sintetički polimeri su netopivi porozni nosači. Neki polimeri koji se koriste kao nosači za enzime su: polivinil klorid koji sprječava ciklodekstrin glukosiltransferazu od termalne inaktivacije; poliuretanske mikročestice od polivinilnog alkohola i heksametnog disocijanata; glutaraldehidom aktivirani najlon za imobilizaciju lipaze i UV-om aktivirani polietilen glikol. Zeoliti su anorganski nosači, zovu se još i molekularnim sitima. To su mikroporozne kristalne krutine i često se koriste za adsorpciju enzima. Keramički nosači sadrže makro i mikropore te su učinkoviti u smanjivanju brzine dok povećavaju specifičnu površinu. Nosači od silike na kojima je imobiliziran enzim  $\alpha$ -amilaza poboljšava funkciju detergenata. koriste se zbog svoje velike specifične površine, uređene strukture i visoke stabilnosti na kemijske i mehaničke sile. Staklo je našlo primjenu kod imobilizacije  $\alpha$ -amilaze. Ftalni klorid koji sadržava amino skupinu upotrebljava se za funkcionalizaciju staklenih zrna. Drugi primjer je nitrit reduktaza; enzim koji je imobiliziran na staklena zrnca te je služio kao biosenzor. Ugljen se također može koristiti kao anorganski nosač. Kemijski modificiran dodavanjem papina sa sulfihidrilnim skupinama povećan je broj aktivnih mjesta te je našao primjenu u obradi otpadnih voda. <sup>[11]</sup>

#### **2.4.1. Magnetske nanočestice**

Magnetske nanočestice imaju promjer od 1 do 100 nm, iako postoje primjeri nanočestica kojima promjer iznosi nekoliko stotina nm. Enzimi vezani na nosače poput sol-gel silike, mezoporozne silike i zeolitskih poroznih struktura olakšavaju separaciju ali zato smanjuju specifičnu aktivnost enzima zbog difuzije. Brzina difuzije iz vanjskog medija do aktivnog mjesta na enzimu je proporcionalna  $1/L^2$ , gdje je L duljina koju molekula mora prijeći da bi došla do aktivnog mjesta. Kao posljedica toga enzimsku aktivnost možemo povećati koristeći manje nosače jer time povećavamo specifičnu površinu. Nosači na nanoskali poželjni su iz razloga što su otporniji na mehanička oštećenja međutim tako male nosače teško je izdvojiti iz reakcijske smjese. Magnetske čestice su iz tog razloga zanimljive jer ih je korištenjem magnetskog polja lako odvojiti od reakcijske smjese.

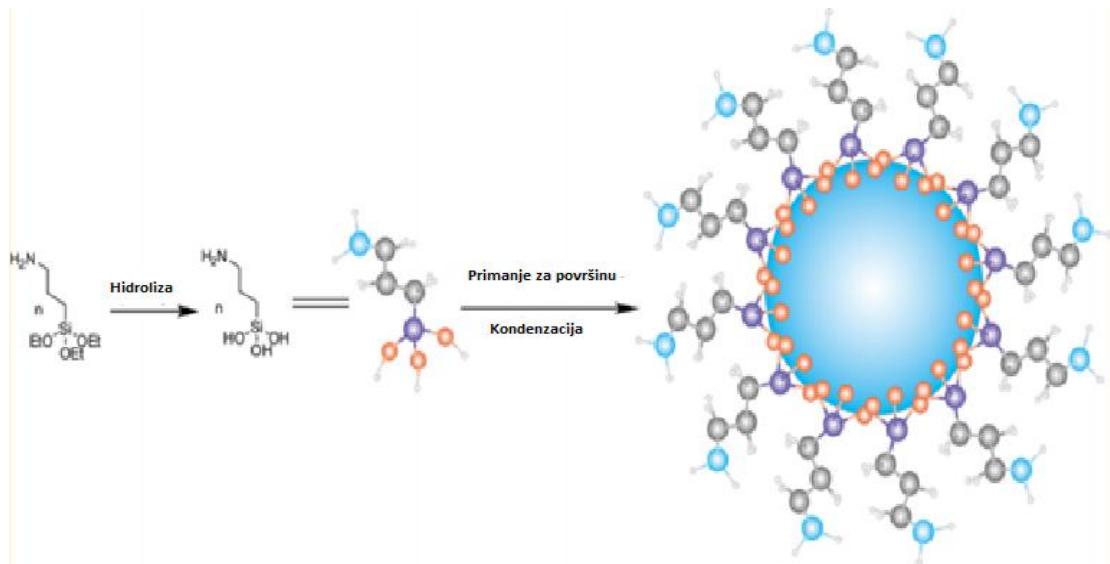
Magnetske čestice na nanoskali pokazuju znakove superparamagnetizma, što znači da nakon izlaganja magnetskom polju ne magnetiziraju. Iz tog razloga magnetske nanočestice možemo magnetski izdvojiti iz smjese a da ne tvore aglomerate nakon što prestanu biti izložene magnetskom polju. [13]



Slika 6. Postupak pripreme magnetskih nanočestica obloženih silikom. [12]

Na slici 6 shematski je prikazan postupak dobivanja magnetskih nanočestica tehnikom mikroemulzije. Smjesa  $\text{FeCl}_3 \times \text{H}_2\text{O}$  i  $\text{FeCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$  u deioniziranoj vodi dodaje se u suspenziju surfaktanta CTAB u toluenu. Dodavanjem amonijaka željezove nanočestice sintetiziraju se u micelama. Nakon toga dodaje se prekursor za siliku (TEOS) koji oblaže micle. Dodavanjem amonijaka mikroemulzija prelazi u dvofazno stanje u kojem se centrifugiranjem precipitat jednostavno odvaja od supernatanta.

Jedan od postupaka funkcionalizacije magnetskih nanočestica je kondicioniranje nosača sa (3-aminopropil) trietoksilanom (APTES). Mehanizam vezanja se objašnjava formiranjem Fe-O-Si veze između nanočestice i silana. [13]



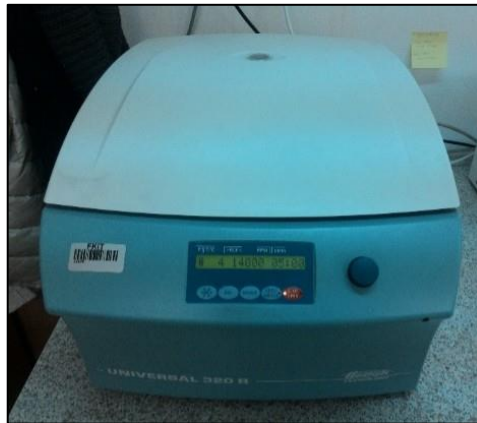
Slika 7. Shema funkcionalizacije magnetskih nanočestica APTES-om <sup>[13]</sup>

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1 Aparatura

##### 3.1.1 Centrifuga

Centrifuga je korištena nakon procesa imobilizacije enzima kako bi se uklonio nevezani enzim. Uzorci su centrifugirani na 14000 okr/min pri temperaturi  $T = 4^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 5 min. Korištena je centrifuga Hettich Universal 320R prikazana na slici 8.



Slika 8. Centrifuga *Hettich Universal 320R*

##### 3.1.2 Tresilica

Kod provođenja reakcije s enzimom, aktivacije nosioca i imobilizacije enzima na nosioce korištena je tresilica *Tehtnica Vibromix 203EVT* prikazana na slici 9.



Slika 9. Tresilica *Technica Vibromix 203EVT*

Homogenizacija uzorka provedena je pomoću tresilice *Ika Vortex Genius 3* prikazanoj na slici 10.



Slika 10. Tresilica *Ika Vortex Genius 3*

### 3.1.3 Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC)

Nakon zaustavljanja reakcije i derivatiziranja uzorka analiza sastava smjese rađena tehnikom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC). Pripremljena otopina uzorka injektira se u mobilnu fazu koja putuje kroz stacionarnu fazu (kolonu) pod visokim tlakom. Ovisno o stupnju interakcije uzorka sa stacionarnom fazom sastavnice uzorka kreću se različitom brzinom te dolaze do detektora u različito vrijeme. Uzorak ulazi u RI-detektor koji

mjeri razliku indeksa loma između uzorka i reference ili UV detektor koji mjeri apsorpciju svjetla kod određene valne duljine. Za određivanje koncentracije reaktanata i produkata te određivanje aktivnosti enzima korišten je HPLC uređaj proizvođača *Shimadzu*.(slika 11)



Slika 11. HPLC uređaj *Shimadzu*

### 3.1.4 Spektrofotometar

Spektrofotometar koristi elektromagnetsko zračenje za analizu spektra. Apsorpcija svjetlosti kroz otopine može se opisati Lambert-Beerovim zakonom (jednadžba 1) gdje je  $ABS$  absorbancija određene valne duljine,  $\varepsilon$  je molarni apsorpcijski koeficijent [ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ],  $b$  je duljina puta svjetlosti kroz uzorak [ $\text{cm}$ ] a  $c$  predstavlja koncentraciju tvari u otopini [ $\text{mol dm}^{-3}$ ].

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

Pomoću spektrofotometra *Shimadzu UV-1601* prikazanog na slici 12. određivana je koncentracija proteina korištenjem Bradfordove metode.



Slika 12. UV/Vis spektrofotometar *Shimadzu UV-1601*

## **3.2 Imobilizacija enzima na magnetske nanočestice**

### **3.2.1 Sinteza magnetskih nanočestica obloženih neporoznom silikom**

Sinteza magnetskih nanočestica provodila se otapanjem 0,68 g  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  u 20 mL etilenglikola. Potom se smjesi dodalo 0,9 g natrijevog acetata i 0,5 g polietilen glikola (PEG 6000MW), te se miješalo tijekom pola sata. Zatim se smjesa prebacila u autoklav reaktor koji se stavio u peć za žarenje. Reakcija se odvijala na 200 °C tijekom 8 sati. Nakon hlađenja reaktora, čestice su se odvojile magnetom i ispirale etanolom tri puta.

Oblaganje silikom odvijalo se po Stober procesu; pripremom 100 mL 75% otopine etanola u koji se dispergiralo 164 mg magnetskih nanočestica. Dodalo se 1,5 mL tetraetil ortosilikata (TEOS) i 2 mL  $\text{NH}_3$ , te se lagano miješalo na sobnoj temperaturi tijekom 3h. Nakon toga precipitat se odvajao magnetom, ispirao tri puta etanolom te se sušio 6 sati u vakuum sušioniku na 60 °C.

### **3.2.2 Sinteza magnetskih nanočestica obloženih mezoporoznom silikom**

Sinteza mezoporoznih nanočestica provodila se otapanjem 0,6 g  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  u 20 mL etilen glikola. Zatim se postepeno dodalo 1,6 g natrijevog acetata, te se sve skupa 30 minuta miješalo na sobnoj temperaturi. Potom se smjesa u teflonskom reaktoru grijala 12 sati na 200°C. Dobivene čestice su se odvajale magnetom, ispirale 6 puta s etanolom, i sušile 5-6 sati u vakuum sušioniku. 160 mg tako dobivenih magnetskih nanočestica se miješalo s 0,8 g heksadeciltrimetilamonij-bromida (CTAB) i 23 mL ultračiste vode korištenjem ultrazvučne igle tijekom 30 minuta. Tako pripremljena otopina se prenijela u 144 mL otopine NaOH (1 mM) i

miješala korištenjem ultrazvučne igle 20 minuta. Zatim se otopina miješala 30 minuta na tresilici pri 60 °C. Potom se dokapavalo 4 mL otopine TEOS/etanol (1/4, v/v), miješalo 3 minute, te se inkubiralo tijekom 12 sati na 60 °C.

Nakon toga čestice su se odvojile magnetom, ispirale etanolom i ultračistom vodom te se stavile žariti 5 sati pri temperaturi od 500 °C.

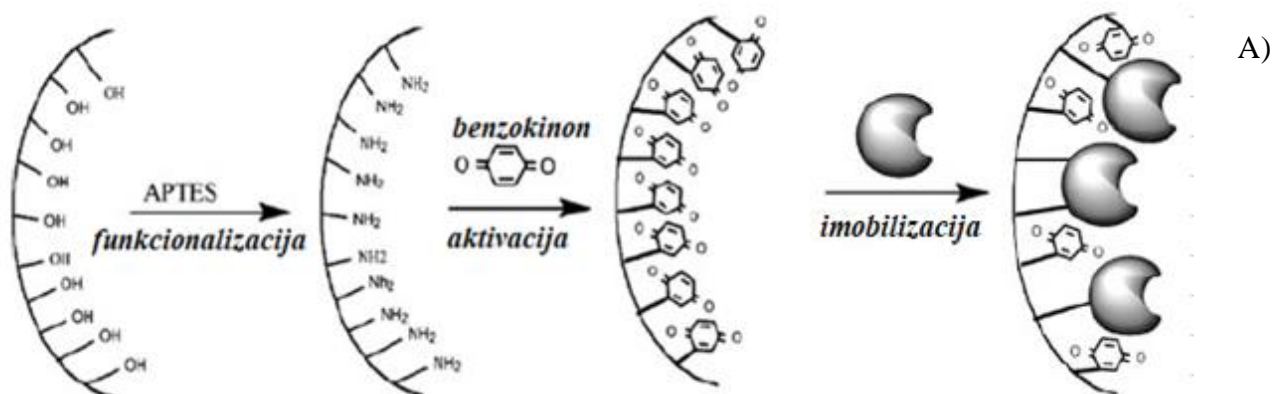
### 3.2.3 Funkcionalizacija, aktivacija nosioca i imobilizacija enzima

Funkcionalizacija nosioca se provodila miješanjem 25 mg nosioca s 0,9 mL 99% etanola i 0,1 mL (3-aminopropil)trietoksisilana (APTES) tijekom 10 minuta.

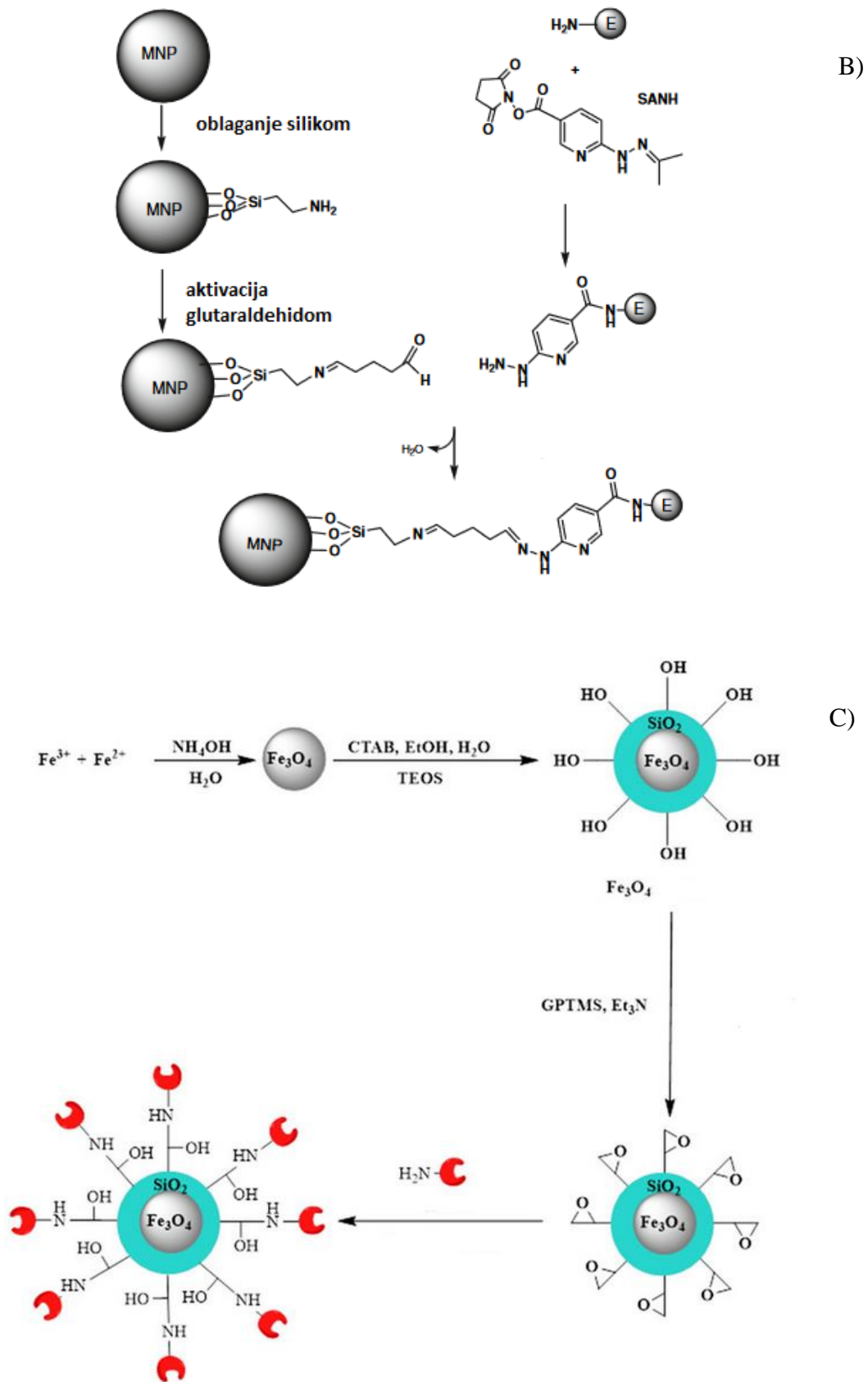
Nakon funkcionalizacije s APTES-om nosioc se aktivirao miješanjem 1 mL 1.5/3 mM otopine benzokinona ili 1 mL 20% otopine glutaraldehida na funkcionalizirani nosioc tijekom 1 h.

Za aktivaciju epoksi skupinom nije potrebna prethodna funkcionalizacija, već se 25 mg nosioca miješa s 1 mL 50% otopine 3-glicidiloksipropil trimetoksisilana (GPTMS) / u etanolu tijekom 1 h.

Za imobilizaciju na 25 mg nosioca dodavalo se 50 (250)μL otopine enzima (10mg/mL otopina) te 1 mL pufera. Imobilizacija je trajala otprilike 20 h na sobnoj temperaturi. Tijekom imobilizacije uzimali su se povremeno uzorci za određivanje koncentracije proteina. Nakon završenog procesa imobilizirani se katalizator ispirao s puferom.







Slika 13. Shema postupaka funkcionalizacije i aktivacije  $\text{SiO}_2$  te imobilizacije enzima za: A) benzokinon, B) glutaralhid i C) epoksi skupinu (GPTMS)

### 3.3 Analitičke metode

#### 3.3.1 Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određivala se spektrofotometrijski, Bradfordovom metodom. To je jednostavna i brza metoda kojom se određuje ukupna koncentracija proteina u uzorku. Metoda se bazira na reakciji proteina sa bojom Coomassie Brilliant Blue u kiselom mediju. Boja se na proteine veže hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama što stabilizira boju u anionskom obliku i dovodi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu. Što je koncentracija proteina u uzorku viša to će se više boje vezati na protein odnosno boja će postati tamnija. Bradfordov reagens se sastoji od 100 mg boje Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL 95% etanola, 100 mL 85% fosforne kiseline i 850 mL redestilirane vode. Prije mjerenja koncentracija proteina u uzorcima pripremljene su standardne otopine proteina (albumin; BSA) koncentracija 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 7,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  i 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Miješalo se 0,8 ml uzorka s 0,2 ml reagensa, inkubacija je trajala 5 minuta pri sobnoj temperaturi te se potom mjerila apsorbancija uzoraka na spektrofotometru pri valnoj duljini  $\lambda = 595 \text{ nm}$ . Iz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina dobiven je baždarni dijagram odnosno jednadžba pravca potrebna za izračun koncentracije proteina u uzorcima koji sadrže nepoznatu koncentraciju proteina (Prilog, slika 1). Koncentracija proteina određivana je u temeljnoj otopini enzima i otopini nakon završenog procesa imobilizacije.

#### 3.3.2 Određivanje aktivnosti enzima

Određivana je aktivnost enzima DERA u temeljnoj otopini enzima i u otopini nakon provedene imobilizacije enzima, te u ponovljenoj reakciji imobiliziranog enzima.

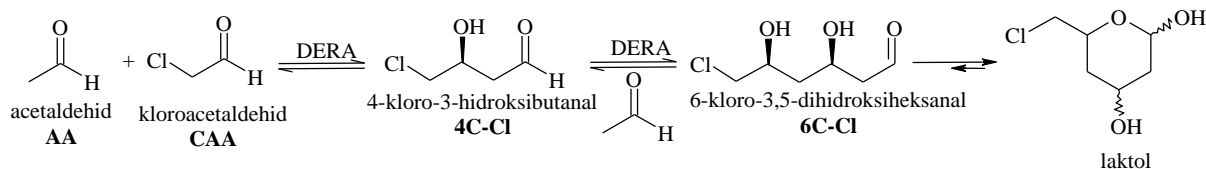
Aktivnost enzima se određivala u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida. Reakcija se provela miješanjem 100  $\mu\text{l}$  otopine aldehida ( $c_{\text{acetaldehid}} = 200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{kloroacetaldehid}} = 100 \text{ mM}$ ) i 100  $\mu\text{l}$  otopine enzima. u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6.. Uzorci su uzimani u pravilnim vremenskim intervalima tijekom prvih 15 minuta od pokretanja reakcije te su uzorci derivatizirani prije analize na HPLC uređaju jer se u suprotnom ne bi mogli detektirati. Iz promjene koncentracije međuprodukta 4-klor-3-hidroksibutanala i produkta 6-kloro-3,5-dihidroksi heksanala u vremenu je izračunavana aktivnost enzima.

### 3.3.3 Određivanje koncentracije reaktanata i produkata pomoću HPLC uređaja

Koncentracija aldehida je određivana na HPLC uređaju. Prije analize uzorci su derivatizirani. Otopina za derivatizaciju je pripravljena miješanjem 0,1 g o-benzilhidroksi amina sa 3,3 ml piridina, 1,5 ml metanola i 0,2 ml redestilirane vode. 5  $\mu$ l uzorka se pomiješalo sa 50  $\mu$ l otopine za derivatizaciju, nakon inkubacije od 20 minuta na tresilici dodalo se 450  $\mu$ l metanola, uzorci su potom centrifugirani te analizirani na HPLC-u. Analiza se provodila pri  $T=30^{\circ}\text{C}$  i valnoj duljini  $\lambda=215\text{ nm}$  s protokom od  $1,2\text{ ml min}^{-1}$  na koloni LiChrospher C18 (Phenomenex,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ,  $250\text{ x }4\text{ mm}$ ). Mobilna faza se sastojala od otapala A (0,1 %-tna trifluorocetna kiselina u vodi) i otapala B (0,1 %-tna trifluorocetna kiselina u acetonitrilu). Prvih 22 minuta gradijent eluenta B je padao sa 90 % na 28,4 %, a od 22 do 25 minute gradijent eluenta B je rastao od 28,4 % na 90 %. Iz kromatograma s pikovima (Prilog, slika 4) pojedinih tvari računanjem površine ispod pika za pojedinu tvar možemo izračunati nepoznatu koncentraciju te tvari pomoću baždarnih pravaca. Iz dobivenog kromatograma odnosno iz vrijednosti površina ispod pikova pojedinih komponenti pomoću baždarnih pravaca za acetaldehid i kloroacetaldehid (Prilog slika 2 i 3) izračunala se nepoznata koncentracija acetaldehida i kloroacetaldehida.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome radu provedena je kovalentna imobilizacija enzima deoksiriboza-5-fosfat aldolaze (DERA). DERA je enzim koji katalizira reakciju dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida pri čemu nastaje laktol (slika 14), spoj koji se koristi kao prekursor u proizvodnji statina.



Slika 14. Shema dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane DERA-om

Iako je ova reakcija obećavajuća zbog sinteze dva kiralna centra u jednom koraku primjena ovog enzima je ograničena zbog male stabilnosti DERA-e u prisustvu aldehida. Stoga je cilj rada bila imobilizirati enzim DERA-u u svrhu njegove stabilizacije. Kao nosioc za imobilizaciju sintetizirane su magnetske nanočestice. Iako se magnetske nanočestice mogu koristiti za imobilizaciju enzima, one se obično oblažu drugim materijalima kao npr. silicijevim oksidima koji imaju bolje značajke za imobilizaciju enzima. U ovom radu magnetske nanočestice su obložene sa mezoporoznom i neporoznom silikom. Sintetizirani nosioci su funkcionalizirani i aktivirani korištenjem različitih metoda. Ispitivale su se tri metode za obje vrste nosioca kako je dano u tablici 1.

Tablica 1. Reagensi korišteni za funkcionalizaciju i aktivaciju magnetskih nanočestica obloženim neporoznom i mezoporoznom silikom

Metoda	Funkcionalizacija	Aktivacija
1.	APTES	Benzokinon
2.	APTES	glutaraldehid
3.	GPTMS	

Nakon imobilizacije enzima na različite nosioce provedeni su eksperimenti te su izračunati parametri uspješnosti imobilizacije koji su prikazani jednadžbama 4-7.

$$\text{Iskorištenje} = \frac{\text{imobilizacijska aktivnost}}{c_{\text{protein},0}} \quad (4)$$

$$\text{Imobilizacijska aktivnost} = c_{\text{protein},0} - c_{\text{protein,konačna}} \quad (5)$$

$$\text{Efikasnost} = \frac{A_{\text{imobilizirani enzim}}}{\text{iskorištenje} \times A_{\text{slobodni enzim}}} \quad (6)$$

$$\text{Očuvana aktivnost} = \frac{A_{\text{imobilizirani enzim}}}{A_{\text{slobodni enzim}}} \quad (7)$$

Koncentracija proteina određivala se Bradfordovom metodom u otopini slobodnog enzima prije procesa imobilizacije ( $c_{\text{protein},0}$ ) i nakon završenog procesa imobilizacije ( $c_{\text{protein,konačna}}$ ).

Iz izmjerenih koncentracija proteina izračunavalo se iskorištenje i imobilizacijska aktivnost (jedn. 4 i 5). Aktivnost enzima je mjerena u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida, te je izmjerena aktivnost slobodnog enzima u otopini prije imobilizacije ( $A_{\text{slobodni enzim}}$ ), te aktivnost imobiliziranog enzima ( $A_{\text{imobilizirani enzim}}$ ). Korištenjem izmjerenih aktivnosti računala se efikasnost i očuvana aktivnost (jedn. 6 i 7).

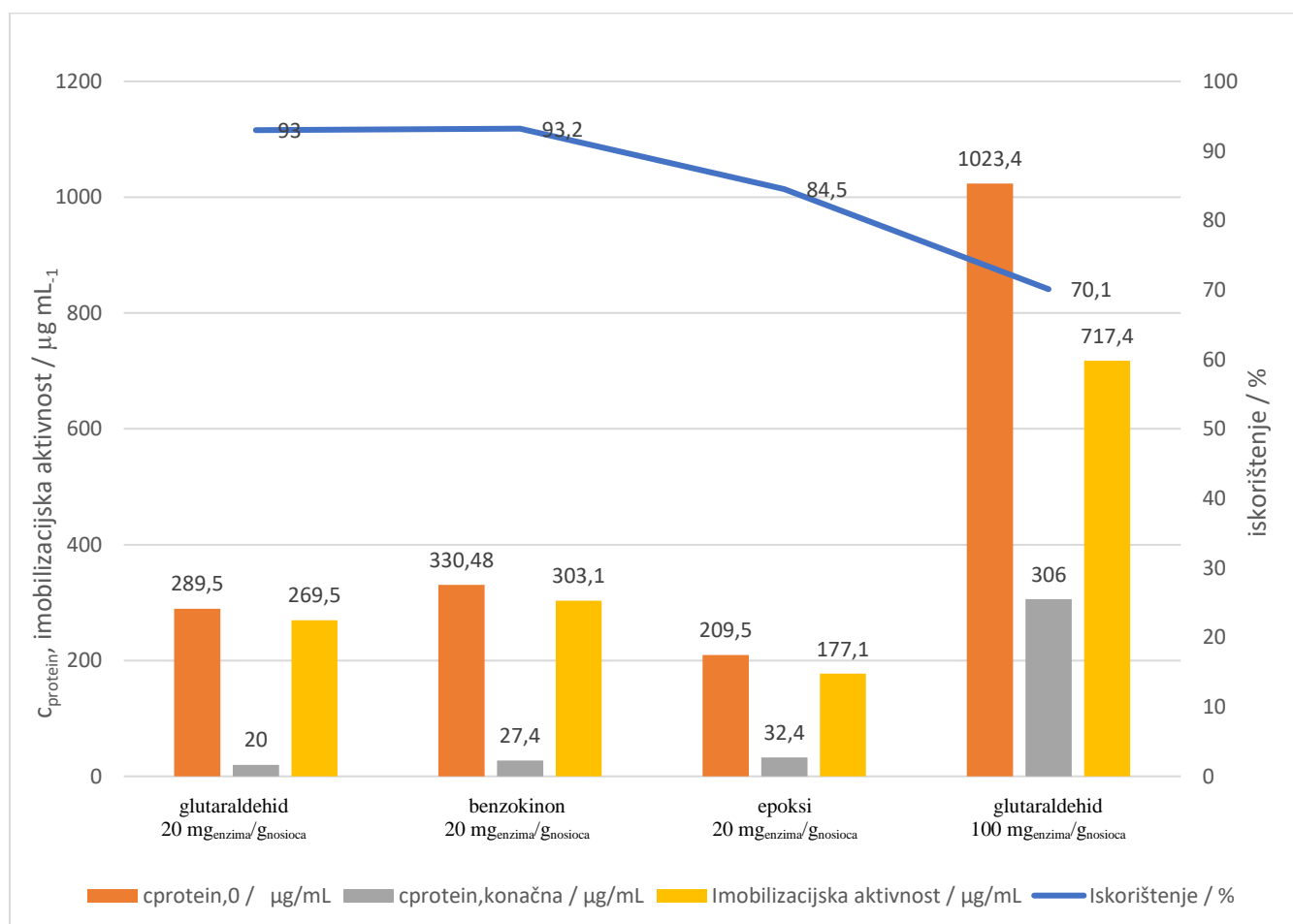
U okviru rada je također s imobiliziranim enzimom na svim nosiocima provedena reakcija dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida u kotlastom reaktoru tijekom koje su se pratile koncentracije supstrata i produkta reakcije. Nakon tri sata provođenja reakcije ista je zaustavljena te se mjerila preostala aktivnost imobiliziranog enzima ( $A_{\text{imobilizirani enzim, 2. reakcija}}$ ). Ovaj podatak ujedno govori i o uspješnosti stabilizacije enzima metodom imobilizacije, te se korištenjem njega izračunavao postotak preostale aktivnosti imobiliziranog enzima kako omjer aktivnosti imobiliziranog enzima i preostale aktivnosti imobiliziranog enzima ( $A_{\text{imobilizirani enzim}} / A_{\text{imobilizirani enzim, 2. reakcija}} \times 100$ )

#### **4.1 Imobilizacija DERA-e na magnetske nanočestice obložene neporoznom silikom**

Za nanočestice obložene neporoznom silikom funkcionalizacija i aktivacija se provela korištenjem tri metode kako je prikazano u tablici 1. Za sve nosioce imobilizacija se provela korištenjem omjera enzim/nosioč od 20 mg<sub>enzima</sub>/g<sub>nosioča</sub>. Pored navedenog za nosioč aktiviran s benzokinonom koristio se i omjer od 100 mg<sub>enzima</sub>/g<sub>nosioča</sub>. Rezultati izmjerenih koncentracija proteina i iz njih izračunatih iskorištenja (jedn.4) i imobilizacijske aktivnosti (jedn. 5) dani su u tablici 2 i prikazani grafički na slici 15.

Tablica 2. Izmjerene koncentracije proteina te izračunati parametri uspješnosti imobilizacije DERA na magnetske nanočestice obložene neporoznom silikom funkcionalizirane i aktivirane različitim metodama.

Aktivacija	glutaraldehid	benzokinon	GPTMS	benzokinon
(enzim/ nosioc)/ mg <sub>enzim</sub> /g <sub>nosioc</sub>	20	20	20	100
$C_{\text{protein},0}$ / $\mu\text{g/mL}$	289,5	330,48	209,5	1023,4
$C_{\text{protein,konačna}}$ / $\mu\text{g/mL}$	20	27,4	32,4	306
Imobilizacijska aktivnost / $\mu\text{g/mL}$	269,5	303,1	177,1	717,4
Iskorištenje / %	93	93,2	84,5	70,1

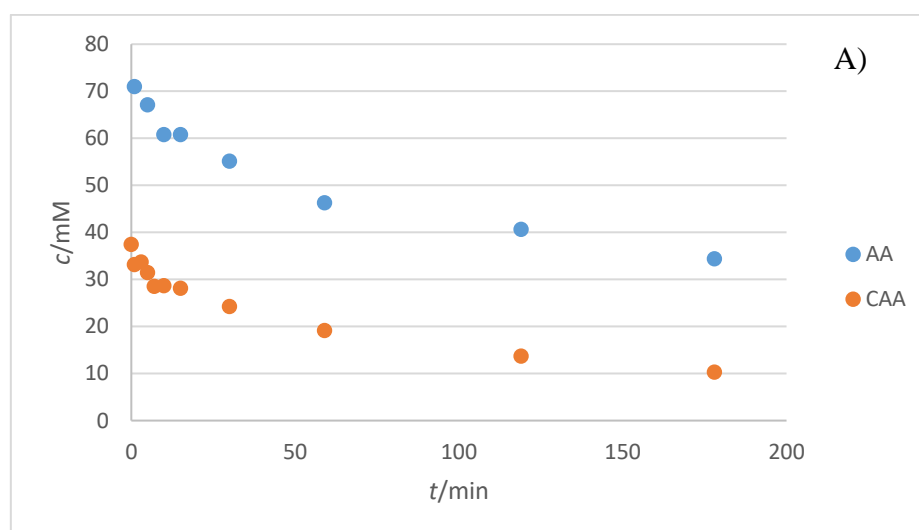


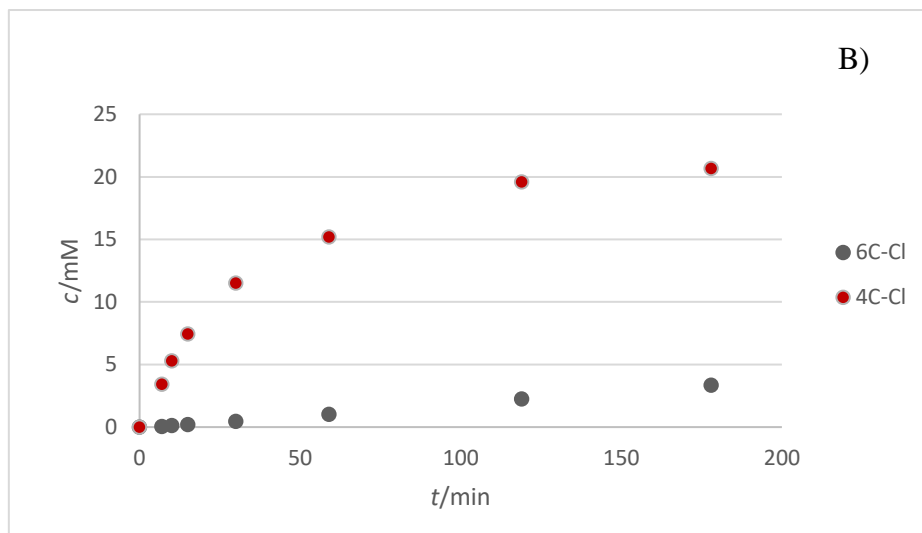
Slika 15. Usporedni prikaz izmjerenih koncentracija proteina te izračunatih parametara uspješnosti imobilizacije DERA na magnetske nanočestice obložene neporoznom silikom funkcionalizirane i aktivirane različitim metodama.

Iz dobivenih vrijednosti može se vidjeti da se najveće iskorištenje postiže prilikom imobilizacije  $20 \text{ mg}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{nosioca}}$  na nosioce koju su aktivirani benokinonom i glutaraldehydom. Najmanje iskorištenje je postignuto imobilizacijom  $100 \text{ mg}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{nosioca}}$  na nosioc aktiviran benzokinonom. Navedeni rezultat upućuje na ograničeni kapacitet nosioca te se iz dobivenog rezultata može zaključiti da isti iznosi  $70 \text{ mg}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{nosioca}}$

Korištenjem imobiliziranih biokatalizatora napravljeni su eksperimenti u kotlastom reaktoru. Na slici 16 su dani rezultati eksperimenta dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane DERA-om imobiliziranom na magnetskim nanočesticama obloženih neporoznom silikom, te aktiviranog glutaraldehydom.

Prikazana je promjena koncentracije supstrata i produkata kroz vrijeme od 180 minuta. Koncentracija acetaldehida se smanjuje od  $70,9 \text{ mM}$  do  $34,34 \text{ mM}$  dok se koncentracija kloroacetaldehida smanjuje od  $37,4 \text{ mM}$  do  $10,25 \text{ mM}$ . Produktima se koncentracija mijenja od  $0 \text{ mM}$  do  $3,36 \text{ mM}$  za 6C-Cl te od  $0$  do  $20,67 \text{ mM}$  za 4C-Cl.

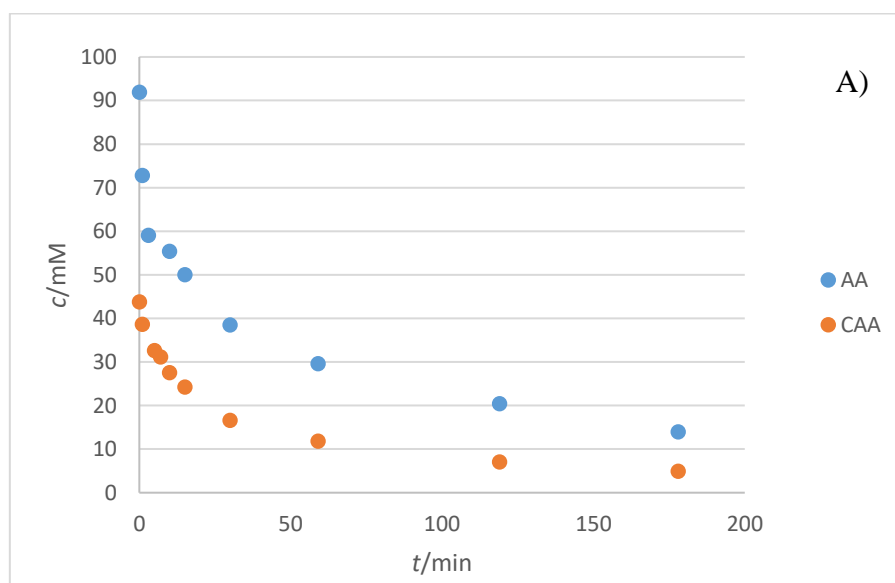




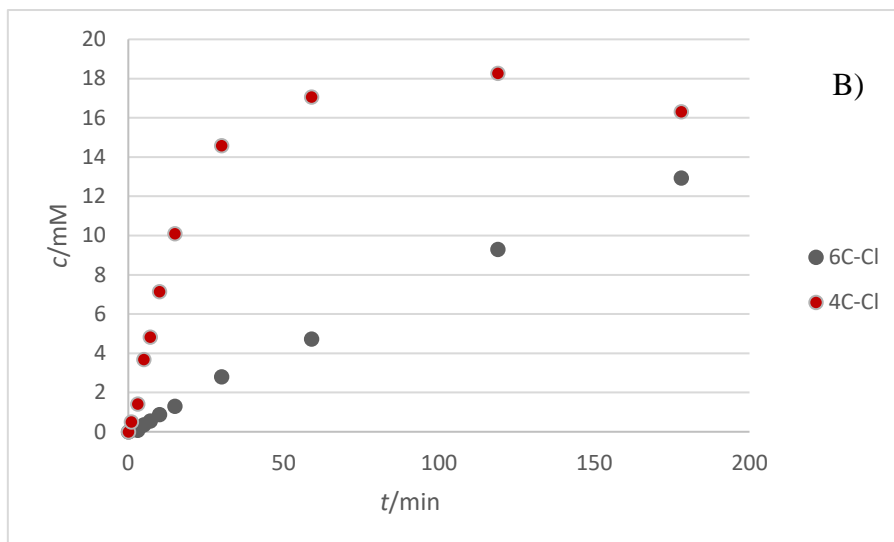
Slika 16. Promjena koncentracije supstrata (A) i produkata (B) u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane DERA-om imobilizirane na magnetskim nanočesticama obloženih neporoznom silikom, te aktivirane glutaraldehydom. ( $V = 0,2$  mL,  $20$   $m_{enzima}/g_{nosioca}$ ,  $m_{nosioca} = 25$  mg,  $0,1$  M fosfatni pufer pH 6)

Kod nosioca aktiviranih sa benzokinonom koncentracija acetaldehida smanjuje se od  $91,88$  mM do  $13,93$  mM dok se koncentracija kloroacetaldehida smanjuje od  $43,76$  mM do  $4,89$  mM. Koncentracija 4C-Cl povećava se od  $0$  do  $16,32$  mM dok se koncentracija 6C-Cl povećava od  $0$  do  $12,93$  mM.

Mjerenja su prikazana na slici 17.

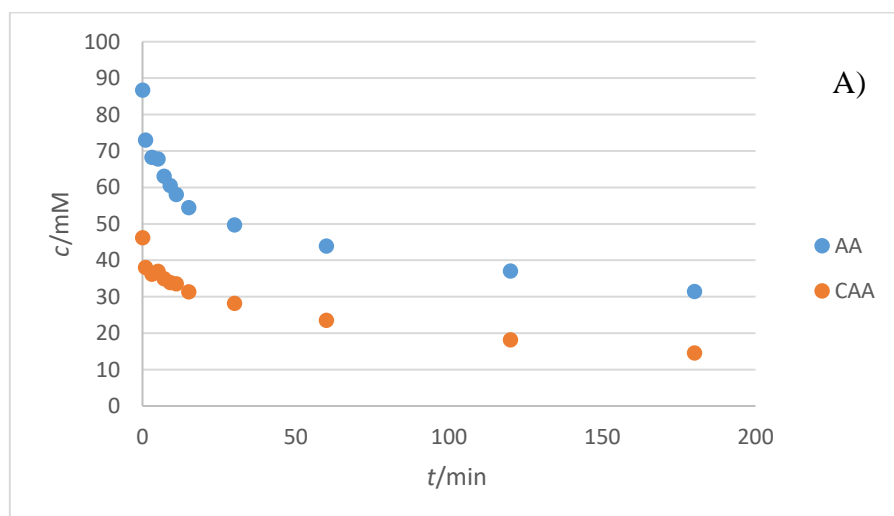


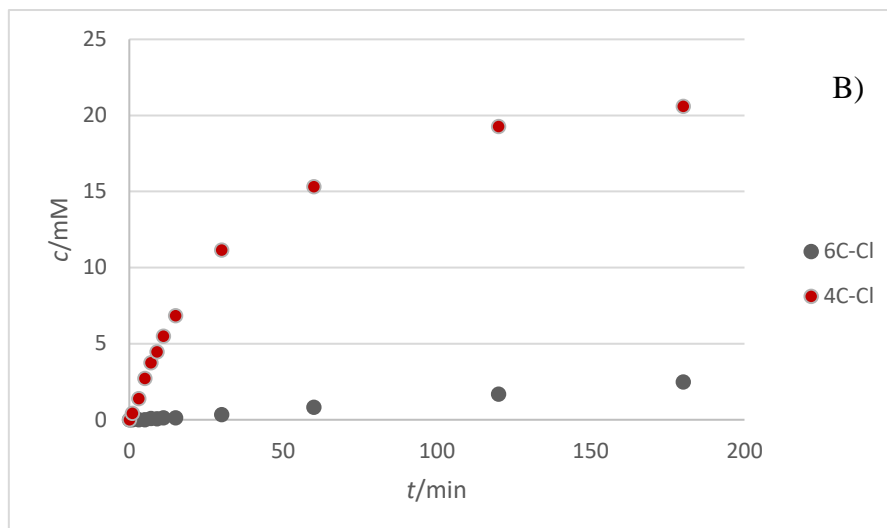




Slika 17. Promjena koncentracije supstrata (A) i produkata (B) u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane DERA-om imobilizirane na magnetskim nanočesticama obloženih neporoznom silikom, te aktivirane benzokinonom. ( $V = 0,2 \text{ mL}$ ,  $20 \text{ mg}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{nosioca}}$ ,  $m_{\text{nosioca}} = 25 \text{ mg}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 6)

Kod provođenja reakcije sa nosiocima aktiviranim sa epoksi skupinom (GPTMS) koncentracija acetaldehida smanjuje se od  $86,71 \text{ mM}$  do  $31,45 \text{ mM}$  dok se koncentracija kloroacetaldehida smanjuje od  $46,16 \text{ mM}$  do  $14,55 \text{ mM}$ . Što se tiče produkata koncentracija 4C-Cl povećava se od 0 do  $20,59 \text{ mM}$  dok se koncentracija laktola povećava od 0 do  $2,49 \text{ mM}$ . To je najmanja dobivena koncentracija produkta uz enzim imobiliziran na magnetske nanočestice obloženih neporoznom silikom. Rezultati su prikazani grafovima na slici 18.

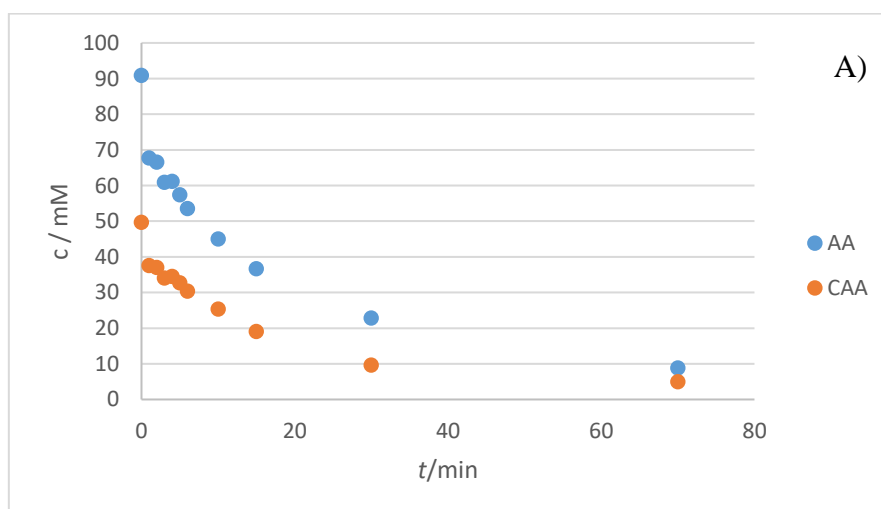


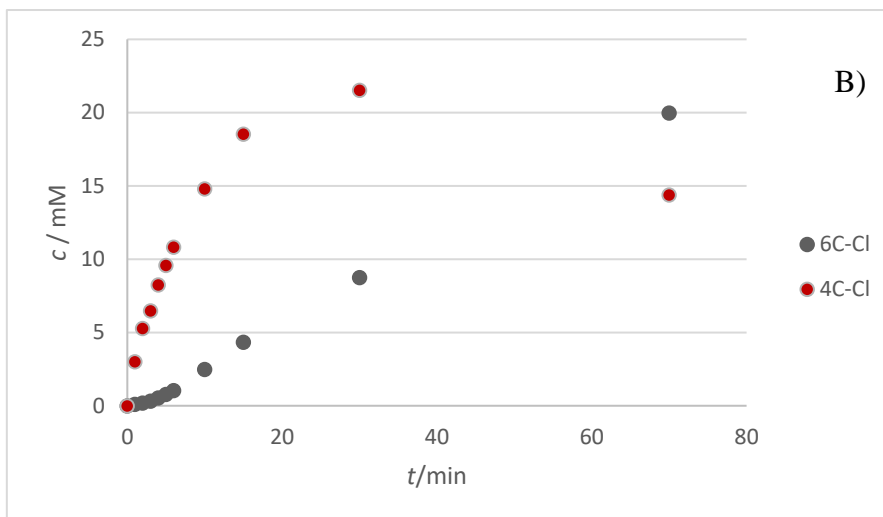


Slika 18. Promjena koncentracije supstrata (A) i produkata (B) u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane DERA-om imobilizirane na magnetskim nanočesticama obloženih neporoznom silikom, te aktivirane GPTMS. ( $V = 0,2 \text{ mL}$ ,  $20 \text{ mg}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{nosioca}}$ ,  $m_{\text{nosioca}} = 25 \text{ mg}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 6)

Obzirom da je iz prethodnih eksperimenata vidljivo da je najveća koncentracija produkta dobivena prilikom aktivacije nosioca benzokinonom, napravljena je imobilizacija enzima na način da se pet puta povećala masa enzima u odnosu na masu nosioca ( $100 \text{ mg}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{nosioca}}$ ).

Rezultati ovog eksperimenata prikazani su na slici 19. Koncentracija acetaldehida smanjivala se od  $90,86 \text{ mM}$  do  $8,78 \text{ mM}$  dok se koncentracija kloroacetaldehida smanjivala od  $49,67 \text{ mM}$  do  $5 \text{ mM}$ . Kod laktola je zabilježen porast koncentracije od 0 do  $19,97 \text{ mM}$  dok je koncentracija 4C-Cl rasla od 0 do  $14,39 \text{ mM}$ .





Slika 19. Promjena koncentracije supstrata (A) i produkata (B) u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane DERA-om imobilizirane na magnetskim nanočesticama obloženih neporoznom silikom, te aktivirane benzokinonom. ( $V = 0,2$  mL,  $100$  mg<sub>enzima</sub>/g<sub>nosioica</sub>,  $m_{nosioica} = 25$  mg,  $0,1$  M fosfatni pufer pH 6)

Tablica 3. Konačne koncentracije produkta dobivene u eksperimentima dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane DERA-om imobiliziranom na magnetskim nanočesticama obloženim neporoznom silikom.

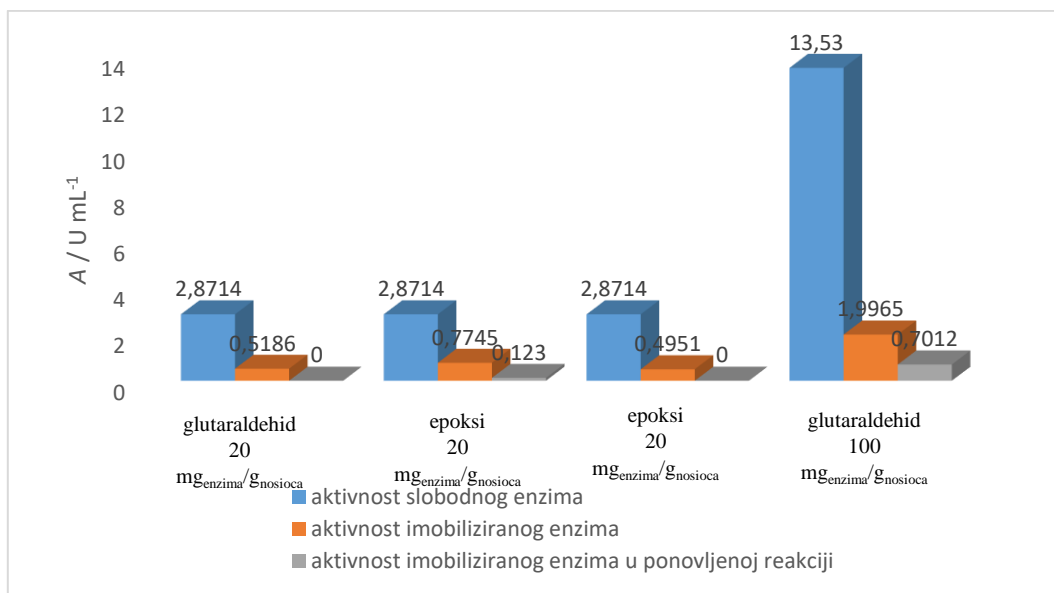
Aktivacija	$c(\text{Laktol}) / \text{mM}$	$c(4\text{C-Cl}) / \text{mM}$
Glutaralhid ( $20$ mg <sub>enzima</sub> / g <sub>nosioica</sub> )	3,36	20,67
Benzokinon( $20$ mg <sub>enzima</sub> / g <sub>nosioica</sub> )	12,94	16,32
Epoksi ( $20$ mg <sub>enzima</sub> / g <sub>nosioica</sub> )	2,50	20,59
Benzokinon ( $100$ mg <sub>enzima</sub> / g <sub>nosioica</sub> )	19,97	14,39

U tablici 3 prikazane su konačne koncentracije produkta za eksperimente provedene uz DERA-u imobiliziranu na neporoznoj silici. Vidljivo je kako su najveće koncentracije željenog produkta laktola postignute kod aktivacije benzokinonom. Kod aktivacije epoksi smolom dobivena je najmanja koncentracija produkta 6C-Cl, kod aktivacije glutaralhidom nešto veća ali i dalje nezadovoljavajuća. Također je vidljivo da je prilikom aktivacije benzokinonom dobivena najmanja koncentracija međuprodukta 4C-Cl.

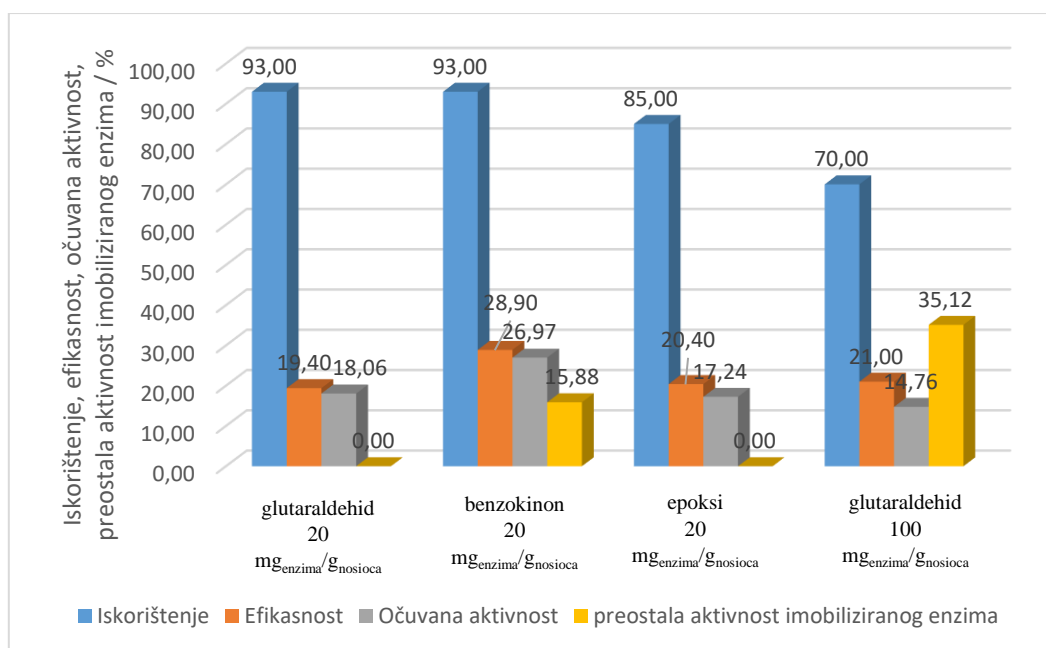
Tablica 4. Izmjerene aktivnosti te izračunati parametri uspješnosti imobilizacije DERA na magnetske nanočestice obložene neporoznom silikom funkcionalizirane i aktivirane različitim metodama.

Aktivacija	glutaraldehid	benzokinon	GPTMS	benzokinon
(enzim/ nosioc)/ $\text{mg}_{\text{enzim}}/\text{g}_{\text{nosioc}}$	20	20	20	100
$A_{\text{slobodni enzim}} / \text{U mL}^{-1}$	2,8714	2,8714	2,8714	13,53
$A_{\text{imobilizirani enzim}} / \text{U mL}^{-1}$	0,5186	0,7745	0,4951	1,9965
$A_{\text{imobilizirani enzim, 2. reakcija}} / \text{U mL}^{-1}$	0	0,123	0	0,7012
Efikasnost / %	19,4	28,9	20,4	21
Očuvana aktivnost / %	18,06	26,97	17,24	14,76
Preostala aktivnost slobodni enzim / %	0	0	0	0
Preostala aktivnost imobiliziranog enzima / %	0	15,88	0	35,12

U tablici 4 su dane usporedbe aktivnosti slobodnog enzima u otopini prije imobilizacije ( $A_{\text{slobodni enzim}}$ ), aktivnosti imobiliziranog enzima ( $A_{\text{imobilizirani enzim}}$ ) i preostale aktivnost imobiliziranog enzima ( $A_{\text{imobilizirani enzim, 2. reakcija}}$ ) za imobilizaciju DERA-e na sve ispitane nosioce. Također je dan prikaz izračunatih parametara uspješnosti imobilizacije izračunatih iz izmjerenih aktivnosti, efikasnost i očuvana aktivnost (jedn. 6 i 7), te preostala aktivnost u %. Usporedbe navedenih podataka dane su i grafički na slikama 20 i 21.



Slika 20. Usporedni prikaz izmjerenih aktivnosti slobodnog enzima, te aktivnosti imobilizirane DERA-e na magnetske nanočestice obložene neporoznom silikom funkcionalizirane i aktivirane različitim metodama kao i aktivnosti iste u ponovljenoj reakciji.



Slika 21. Usporedni prikaz izračunatih parametara uspješnosti imobilizacije DERA na magnetske nanočestice nanočestice obložene neporoznom silikom funkcionalizirane i aktivirane različitim metodama.

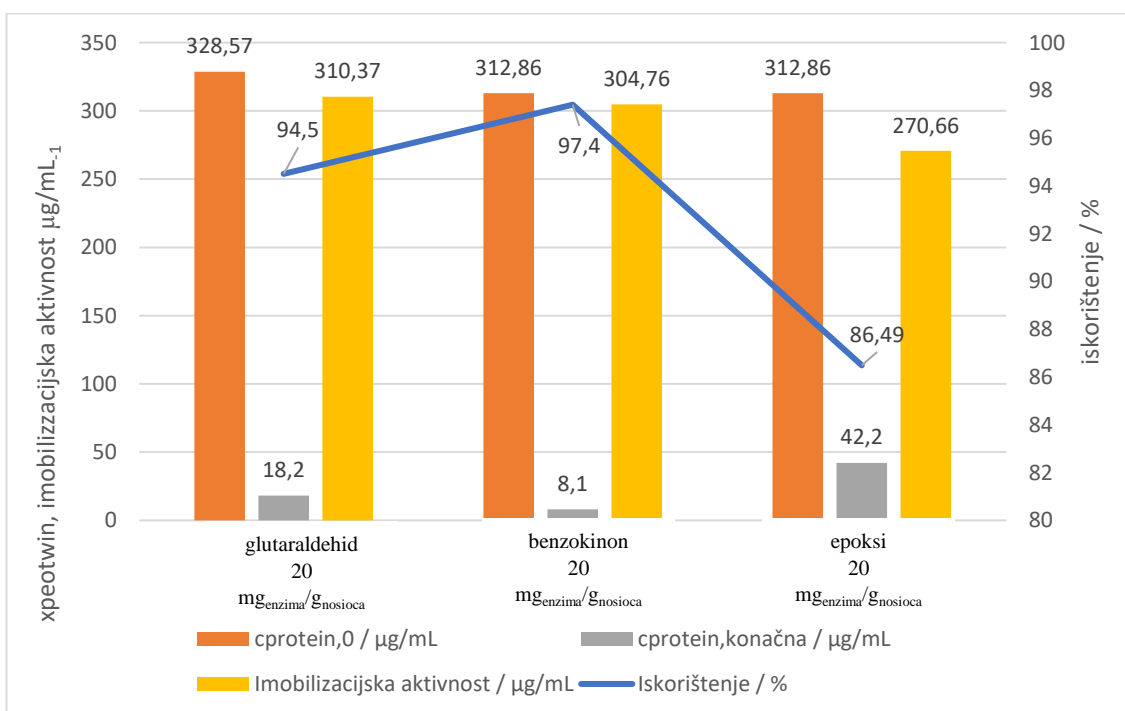
Na osnovu izračunatih parametara uspješnosti procesa može se zaključiti da je aktivacija benzokinonom bila najuspješnija, te se pokazala stoga kao najbolja metoda aktivacije nosioca. Parametri su nešto niži prilikom imobilizacije veće količine enzima (100 mg<sub>enzim</sub>/g<sub>nosioc</sub>). Razlog niže očuvane aktivnosti leži u ograničenom kapacitetu nosioca zbog čega se skoro 30 % početne količine enzima nije imobiliziralo. Efikasnost je niža vjerojatno zbog veće gustoće enzima na površini nosioca i time ograničene dostupnosti aktivnih mjesta. Imobilizacijom enzima na nosioce aktivirane glutaraldehidom i GPTMS-om dobivena aktivnost enzima u ponovljenoj reakciji je 0. Navedeno upućuje da vrlo vjerojatno i sami korišteni aktivacijski agensi destabiliziraju enzim, te time nisu dobri za njegovu imobilizaciju. Za očuvanje stabilnosti najbolja se pokazala metoda imobilizacije u kojoj je veća količina enzima (100 mg<sub>enzim</sub>/g<sub>nosioc</sub>) imobilizirana na nosioc aktiviran benzokinonom. Razlog navedenom je manja nastala koncentracija 4C-Cl u odnosu na koncentracije dostupnog enzima. Naime prijašnja istraživanja su pokazala da isti značajno deaktivira enzim, te je u reakcijama u kojoj je bila manja koncentracija enzima deaktivacija istoga bila znatno brža.

## **4.2 Imobilizacija DERA-e na magnetske nanočestice obložene mezoporoznom silikom**

Za nanočestice obložene mezoporoznom silikom funkcionalizacija i aktivacija se provela korištenjem tri metode kako je prikazano u tablici 1. Za sve nosioce imobilizacija se provela korištenjem omjera enzim/nosioč od 20 mg<sub>enzima</sub>/g<sub>nosioča</sub>. Rezultati izmjerenih koncentracija proteina i iz njih izračunatih iskorištenja (jedn.4) i imobilizacijske aktivnosti (jedn. 5) dani su u tablici 5 i prikazani grafički na slici 22.

Tablica 5. Izmjerene koncentracije proteina te izračunati parametri uspješnosti imobilizacije DERA na magnetske nanočestice obložene mezoporoznom silikom funkcionalizirane i aktivirane različitim metodama.

Aktivacija	glutaraldehid	benzokinon	GPTMS
(enzim/ nosioc)/ mg <sub>enzim</sub> /g <sub>nosioc</sub>	20	20	20
$c_{\text{protein},0}$ / $\mu\text{g/mL}$	328,57	312,86	312,86
$c_{\text{protein,konačna}}$ / $\mu\text{g/mL}$	18,2	8,1	42,2
Imobilizacijska aktivnost / $\mu\text{g/mL}$	310,37	304,76	270,66
Iskorištenje / %	94,5	97,4	86,49

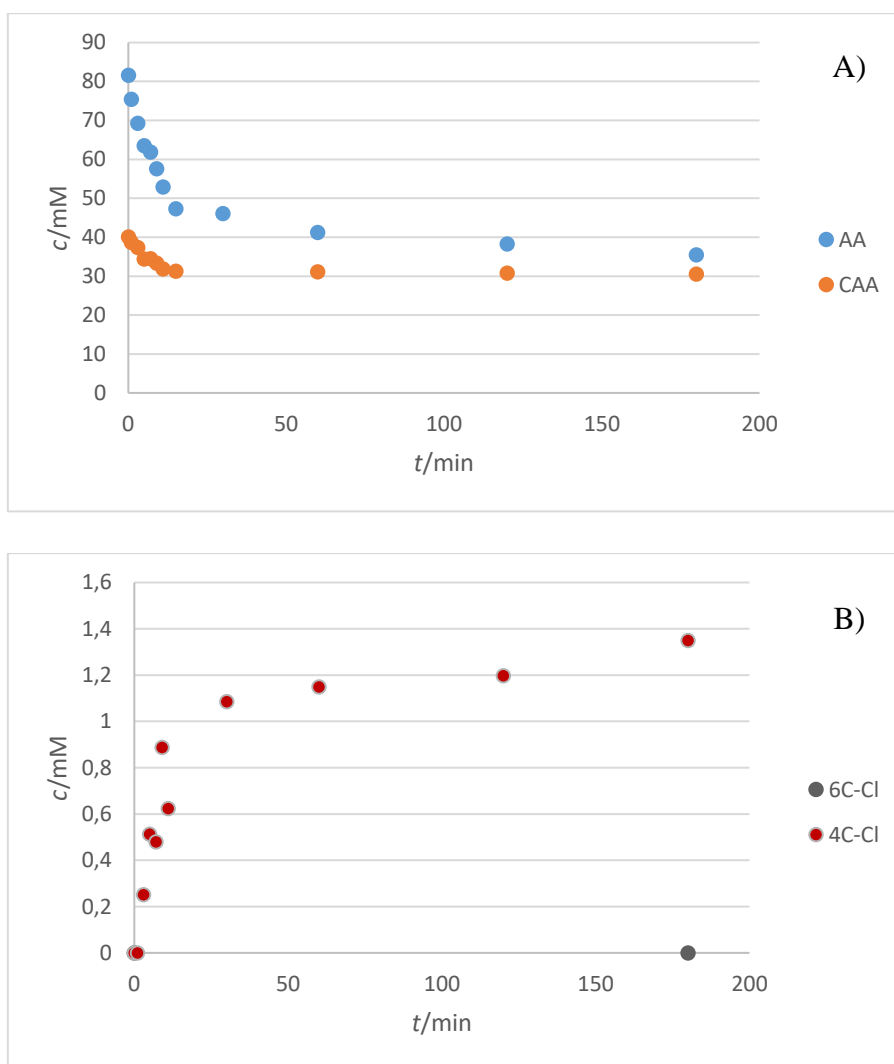


Slika 22 Usporedni prikaz izmjerenih koncentracija proteina te izračunatih parametara uspješnosti imobilizacije DERA na magnetske nanočestice obložene mezoporoznom silikom funkcionalizirane i aktivirane različitim metodama.

Iz prikazanih rezultata može se vidjeti da se najveće iskorištenje postiže prilikom imobilizacije enzima na nosioc aktiviran benokinonom. Kao najbolji nosioc pokazao se onaj koji je bio aktiviran s epoksi skupinom. Dobivena iskorištenja za nosioce obložene mezoporoznom silikom su viša od onih dobivenih prilikom imobilizacije DERA-e na nosioce obložene

neporoznom silikom (tablica 2 i slika 15). Razlog navedenom je veća specifična površina nosioca .

Korištenjem biokatalizatora imobiliziranih na magnetskim nanočesticama obloženim mezoproznom silikom napravljeni su eksperimenti u kotlastom reaktoru. Na slici 23 su dani rezultati eksperimenta dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane DERA-om imobiliziranom na magnetskim nanočesticama obloženih poroznom silikom, te aktiviranog glutaraldehydom.



Slika 23. Promjena koncentracije supstrata (A) i produkata (B) u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane DERA-om imobilizirane na magnetskim nanočesticama obloženih mezoporoznom silikom, te aktivirane glutaraldehydom. ( $V = 0,2 \text{ mL}$ ,  $20 \text{ mg}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{nosioca}}$ ,  $m_{\text{nosioca}} = 25 \text{ mg}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 6)

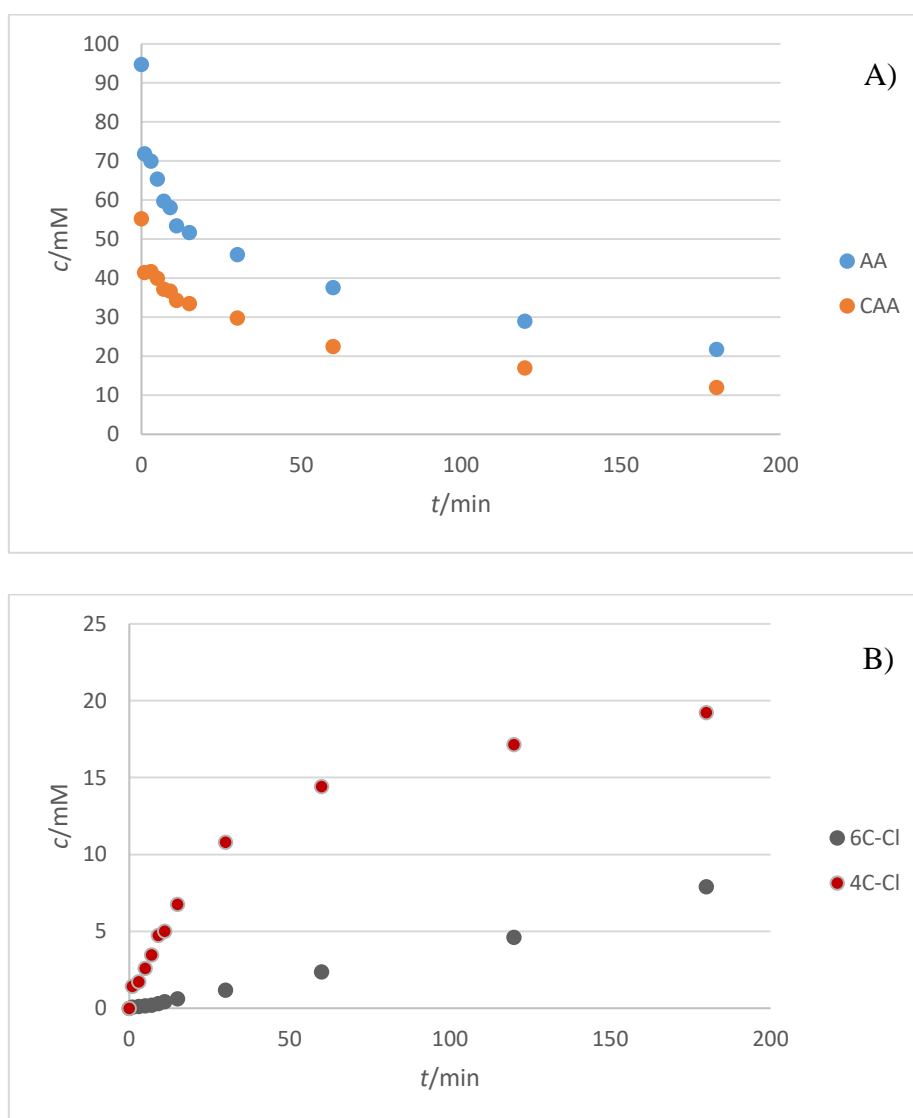
Početna koncentracija acetaldehida iznosila je  $81,58 \text{ mM}$ , a završna  $35,47 \text{ mM}$  dok je početna koncentracija kloroacetaldehida bila  $40,07 \text{ mM}$ , a konačna  $30,52 \text{ mM}$ . Koncentracija laktola



ostala je 0 tijekom cijele reakcije, a koncentracija 4C-Cl povećala se do 1,35 mM. Možemo zaključiti da je ovako imobiliziran enzim iznimno nepovoljan za dobivanje laktola.

U eksperimentu u kojemu je nosioc bio aktiviran benzokinonom koncentracija kloroacetaldehida je od početne od 55,18 mM pala na 11,94 mM na kraju reakcije dok se koncentracija acetaldehida smanjila sa 93,68 mM na 21,72 mM. Što se tiče koncentracije laktola ona je rasla od 0 do 7,91 mM dok je koncentracija 4C-Cl rasla od 0 do 19,23 mM.

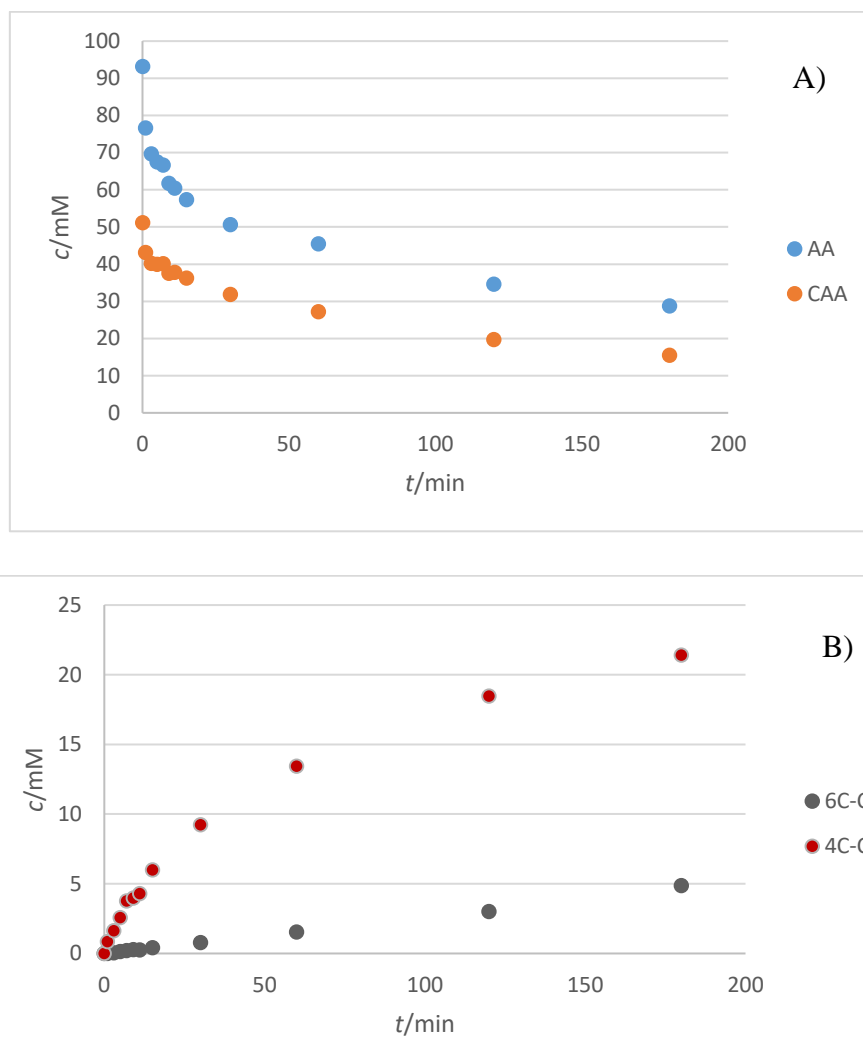
Rezultati su grafički prikazani na slici 24.



Slika 24. Promjena koncentracije supstrata (A) i produkata (B) u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane DERA-om imobilizirane na magnetskim nanočesticama obloženih mezoporoznom silikom, te aktivirane benzokinonom. ( $V = 0,2$  mL,  $20 \text{ mg}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{nosioca}}$ ,  $m_{\text{nosioca}} = 25$  mg,  $0,1$  M fosfatni pufer pH 6)

Kod nosioca aktiviranih sa GPTMS koncentracija laktola je porasla do 4,87 mM a koncentracija 4C-Cl kretala do 21,4 mM. Početna koncentracija acetaldehida iznosila je 93,15 mM dok je konačna iznosila 28,77 mM. Koncentracija kloroacetaldehida iznosila je 51,13 mM na početku reakcije i padala je do 15,54 mM.

Rezultati su grafički prikazani na slici 25.



Slika 25. Promjena koncentracije supstrata (A) i produkata (B) u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane DERA-om imobilizirane na magnetskim nanočesticama obloženih mezoporoznom silikom, te aktivirane epoksi smolom. ( $V = 0,2$  mL,  $20 \text{ mg}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{nosioca}}$ ,  $m_{\text{nosioca}} = 25$  mg,  $0,1$  M fosfatni pufer pH 6)

Tablica 6. Konačne koncentracije produkta dobivene u eksperimentima dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane DERA-om imobiliziranom na magnetskim nanočesticama obloženim mezoporoznom silikom.

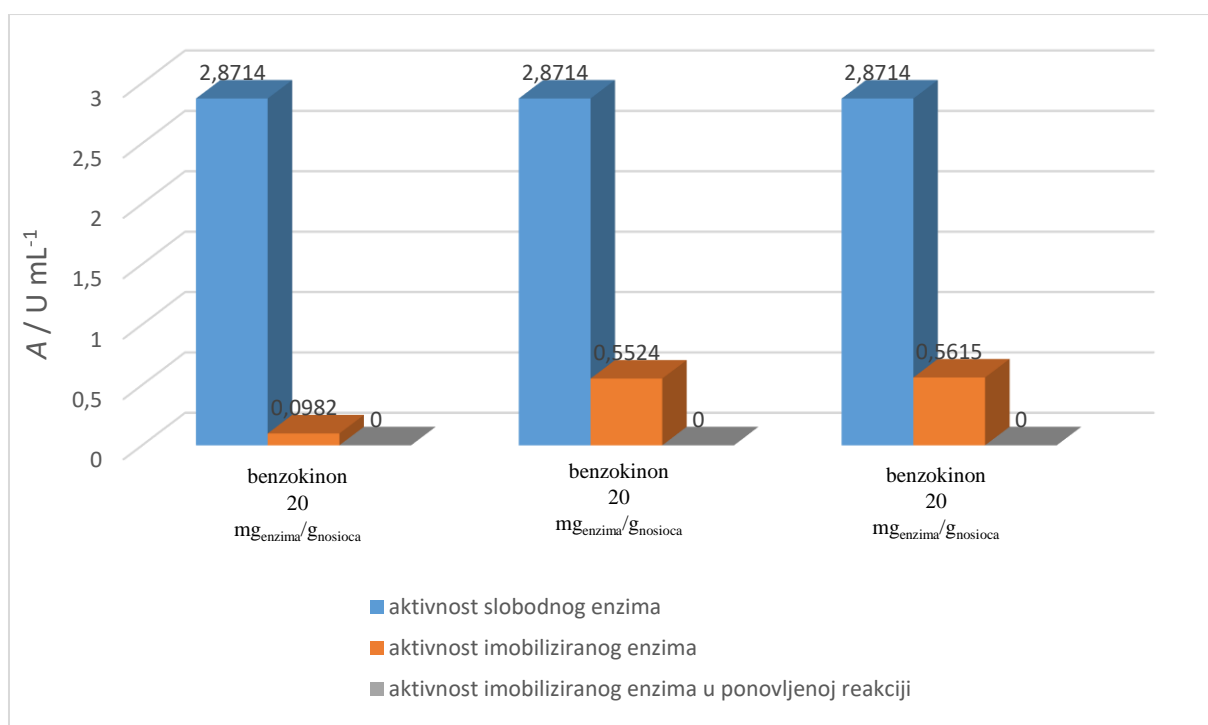
Aktivacija	$c(\text{laktol}) / \text{mM}$	$c(4\text{C-Cl}) / \text{mM}$
Glutaraldehyd ( $20 \text{ mg}_{\text{enzima}} / \text{g}_{\text{nosioca}}$ )	0	1,349662
Benzokinon ( $20 \text{ mg}_{\text{enzima}} / \text{g}_{\text{nosioca}}$ )	7,915346	19,22892
Epoksi ( $20 \text{ mg}_{\text{enzima}} / \text{g}_{\text{nosioca}}$ )	4,873677	21,40027

Iz tablice 6 može se vidjeti kako kod aktivacije glutaraldehydom nije nastalo ništa laktola i vrlo malo 4C-Cl međuprodukta što ukazuje na malu aktivnost enzima. Kod aktivacije benzokinonom koncentracija laktola bila je gotovo dvostruko veća nego kod aktivacije epoksi skupinom, dok je koncentracija međuprodukta 4C-Cl u ova dva slučaja bila gotovo ista. Usporedbom ovih rezultata s rezultatima prikazanim u tablici 3 dobivenih imobilizacijom DERA-e na magnetske nanočestice obložene neporoznom silikom možemo zaključiti da je neporozna silika bolji izbor u slučaju aktivacije benzokinonom i glutaraldehydom. Prilikom aktivacije epoksi skupinom više produkta je dobiveno uz enzim imobiliziran na nosiocu obloženom mezoporoznom silikom..

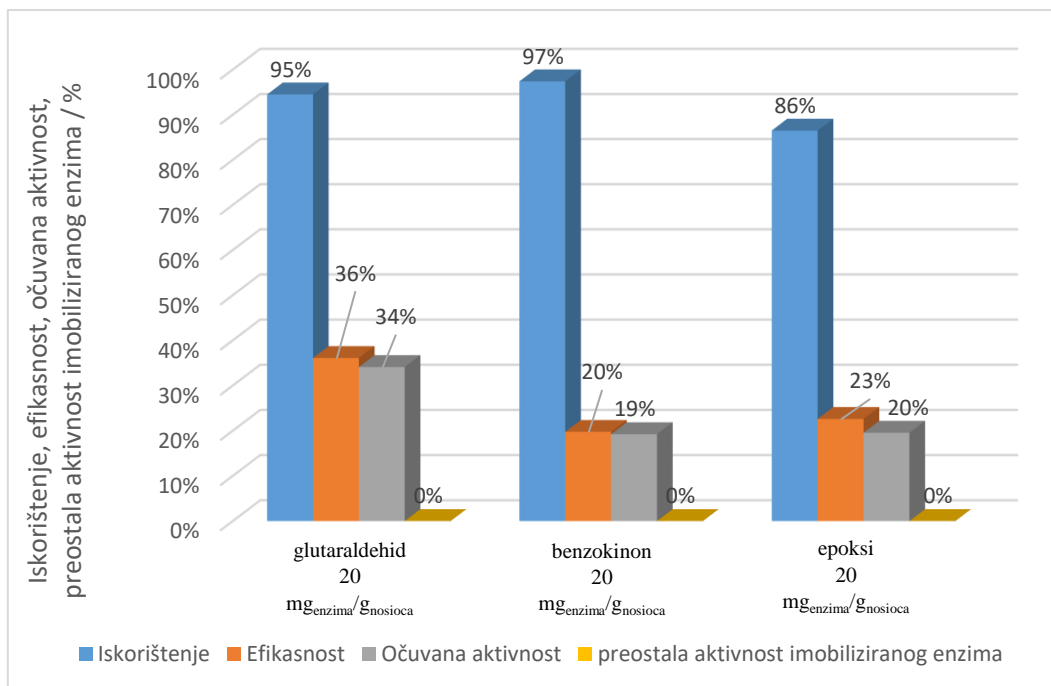
U tablici 7 su dane usporedbe aktivnosti slobodnog enzima u otopini prije imobilizacije ( $A_{\text{slobodni enzim}}$ ), aktivnosti imobiliziranog enzima ( $A_{\text{imobilizirani enzim}}$ ) i preostala aktivnost imobiliziranog enzima ( $A_{\text{imobilizirani enzim 2. reakcija}}$ ) za imobilizaciju DERA-e na nosioce obložene mezoporoznom silikom. Također je dan prikaz izračunatih parametara uspješnosti imobilizacije izračunatih iz izmjerenih aktivnosti, efikasnost i očuvana aktivnost (jedn. 6 i 7), te preostala aktivnost u %. Usporedbe navedenih podataka dane su grafički na slikama 26 i 27.

Tablica 7. Izmjerene aktivnosti te izračunati parametri uspješnosti imobilizacije DERA na mezoporožne magnetske nanočestice funkcionalizirane i aktivirane različitim metodama.

Aktivacija	glutaraldehid	benzokinon	GPTMS
(enzim/nosioc)/ $\text{mg}_{\text{enzim}}/\text{g}_{\text{nosioc}}$	20	20	20
$A_{\text{slobodni enzim}} / \text{U mL}^{-1}$	2,8714	2,8714	2,8714
$A_{\text{imobilizirani enzim}} / \text{U mL}^{-1}$	0,0982	0,5524	0,5615
$A_{\text{imobilizirani enzim, 2. reakcija}} / \text{U mL}^{-1}$	0	0	0
Efikasnost / %	3,61	19,75	22,6
Očuvana aktivnost / %	3,41	19,24	19,55
Preostala aktivnost slobodni enzim / %	0	0	0
Preostala aktivnost imobiliziranog enzima / %	0	0	0



Slika 26. Usporedni prikaz izmjerenih aktivnosti slobodnog enzima, te aktivnosti imobilizirane DERA-e na magnetske nanočestice obložene mezoporožnom silikom funkcionalizirane i aktivirane različitim metodama kao i aktivnosti iste u ponovljenoj reakciji.



Slika 27. Usporedni prikaz izračunatih parametara uspješnosti imobilizacije DERA na magnetske nanočestice obložene mezoporoznom silikom funkcionalizirane i aktivirane različitim metodama

Na osnovu izračunatih parametara uspješnosti vidljivo je kako je glutaraldehyd pokazao puno slabiju efikasnost i aktivnost enzima. Imobilizacijom enzima na sva tri načina dobivena aktivnost enzima u ponovljenoj reakciji je 0 tako da nijedan način imobilizacije nije zadovoljio. Objašnjenje za slabu aktivnost i stabilnost je moguće destabilizirajuće djelovanje agensa za aktivaciju ali i postojanje pora koje onemogućavaju kontakt aktivnog mjesta i supstrata.

## 5. ZAKLJUČAK

Provedena je imobilizacija enzima DERA na magnetske nanočestice obložene poroznom i mezoporoznom silikom te aktivirane glutaraldehydom, benzokinonom i epoksi skupinom.

Iskorištenje imobilizacije je bilo veće prilikom imobilizacije DERA-e na nosioce obložene mezoporoznom silikom.

Iz izračunatih parametra uspješnosti procesa imobilizacije može se zaključiti da se prilikom imobilizacije na neporoznu siliku kao najbolje sredstvo za aktivaciju pokazao benzokinon, a kao najlošija se pokazala aktivacija epoksi skupinom. Kod imobilizacije na nosioce obložene mezoporoznom silikom najbolji aktivator je također bio benzokinon, a najlošiji glutaraldehyd.

Preostala aktivnost imobiliziranog enzima, parametra koji ukazuje na stabilnost katalizatora, je bila najviša prilikom imobilizacije veće mase enzima ( $100 \text{ mg}_{\text{enzima}} / \text{g}_{\text{nosioca}}$ ) na nosioce obložene neporoznom silikom i aktivirane benzokinonom. Prilikom aktivacije glutaraldehydom i epoksi skupinom na obje vrste nosioca imobilizirani biokatalizator nije pokazao nikakvu aktivnost u ponovljenoj reakciji.

Na temelju svega zaključeno je kako je najuspješniji način imobilizacije enzima na magnetske nanočestice obložene neporoznom silikom uz aktivaciju benzokinonom.

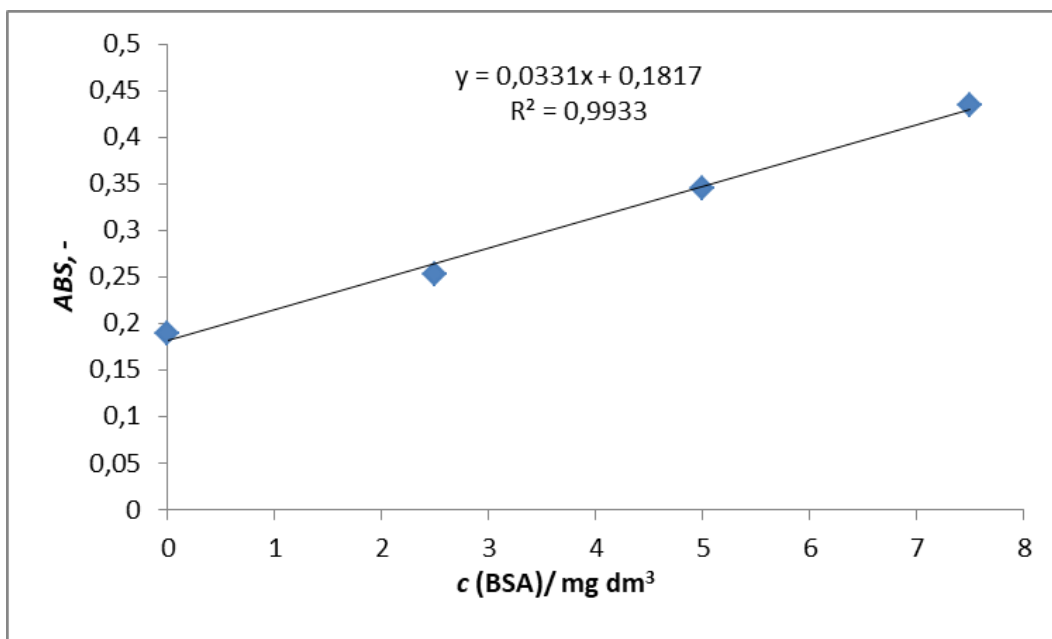
## 6. LITERATURA

1. Findrik Blažević, Z., Bioremedijacijska tehnika 1, interna skripta , Zagreb, lipanj 2013
2. Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme and Microbial technology* 40, 2007, str. 1451-1463.
3. Sakuraba, H., Yoneda, K., Yoshihara, K., Satoh, K., Kawakami, R., Uto, Y., Tsuge, H., Takahashi, K., Hori, H., Ohshima T., Sequential Aldol Condensation Catalyzed by Hyperthermophilic 2-Deoxy-D-Ribose-5-Phosphate Aldolase, *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2007, 7427-7434
4. Jiao, X., Pan, J., Xu, G., Kong, X., Chen, Q., Zhang, Z., Xu, J., Efficient synthesis of a statin precursor in high space-time yield by a new aldehyde-tolerant aldolase identified from *Lactobacillus brevis*, *Catalysis Science & Technology* 5, 2015. 4048-4054
5. Alenghat, Francis J.; Davis, Andrew M.. Management of Blood Cholesterol. *JAMA* 321, 2019. 719-812
6. Taylor F., Huffman M.D., Macedo A.F., Moore T.H., Burke M., Davey Smith G., Ward K., Ebrahim S. Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 1 2013. 1-58
7. Duraković, S., Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.
8. Andrew G. McDonald, Keith F. Tipton School of Biochemistry and Immunology, Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties, *FEBS Journal* 281, 2014, 583–592
9. <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme> (25.6. 2016.)
10. Ahmad R., Sardar M. Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix. *Biochemistry and Analytical Biochemistry* 4 2, 2015, 1-8
11. Datta, S., Christena, L.R. & Rajaram, Y.R.S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials *Biotech* 3, 2013,1-9
12. Tsang, S. C., Yu, C. H., Gao, X., & Tam, K.. Silica-Encapsulated Nanomagnetic Particle as a New Recoverable Biocatalyst Carrier. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110, 2006. 16914–16922.
13. Yue L., Yueming L., Xue-Mei L., Tao H., Kinetics of (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES) Silanization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles, *Langmuir* 29, 2013., 15275-15282.

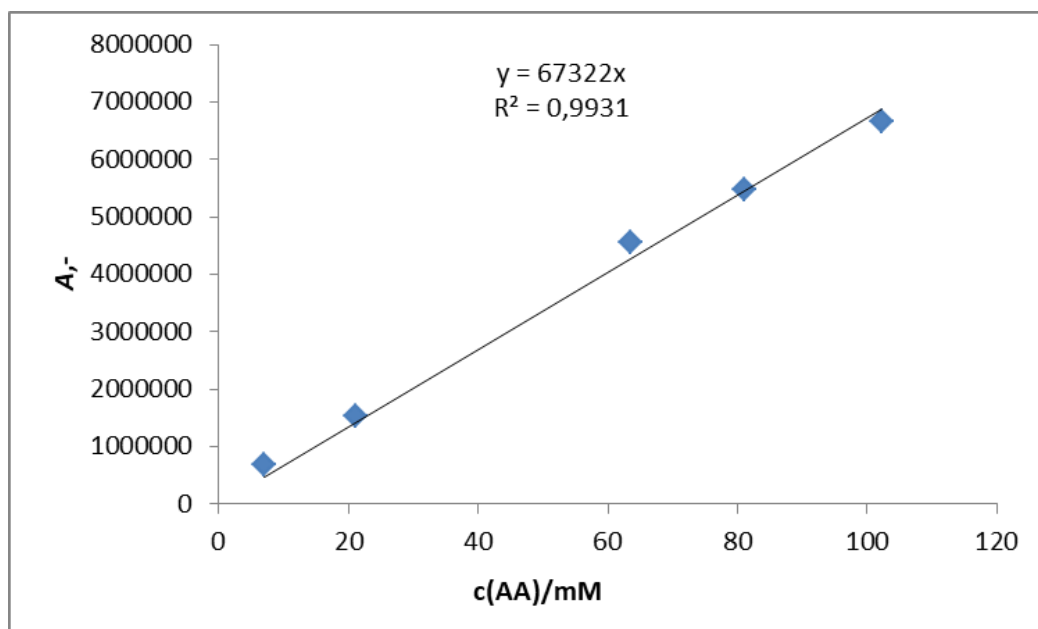
14. Greenberg W. A., Varvak A., Hanson S. R., Wong K. Huang H., Chen P., Burk M. J..  
Development of an efficient, scalable, aldolase-catalyzed process for enantioselective  
synthesis of statin intermediates. PNAS 101, 16, 2004., 5788-5793



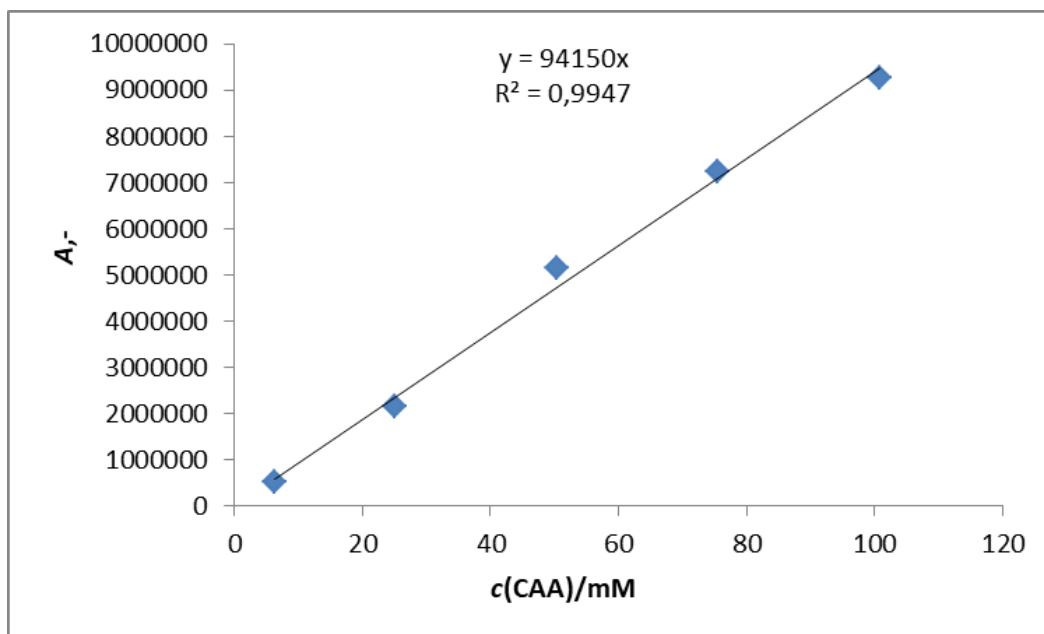
## 7. PRILOZI



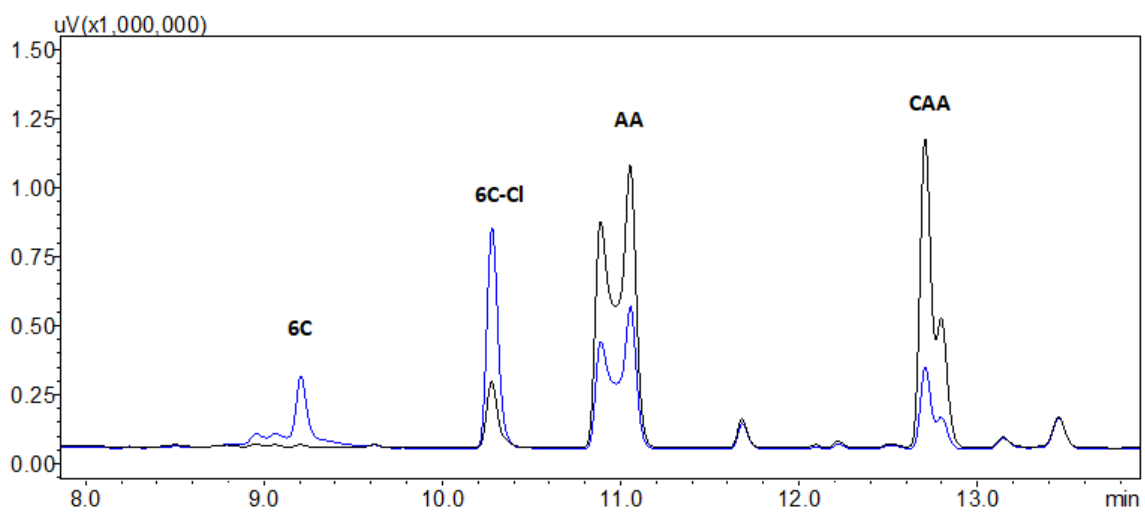
Prilog 1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina



Prilog 2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije acetaldehida



Prilog 3. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije kloroacetaldehida



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

## 8. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA

### Grčki simboli

$\Delta$  – promjena [-]

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

$\varepsilon_{340}$  – ekstinkcijski koeficijent [ $\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ]

$\lambda$  – valna duljina [nm]

### Simboli

$A_S$  – specifična aktivnost enzima [ $\text{U mg}^{-1}$ ]

$b$  – duljina puta svjetlosti [cm]

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

$c_{\text{DERA}}$  – koncentracija enzima [ $\text{mg ml}^{-1}$ ]

$d$  – promjer [cm]

$m$  – masa [mg]

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

$t$  – vrijeme [s]

$V$  – volumen [ $\mu\text{l}$ ]

$V_{\text{DERA}}$  – volumen dodanog enzima [ml]

## **Skraćenice**

ABS – apsorbancija na određenoj valnoj duljini svjetlosti

DERA – deoksiriboza-5-fosfat aldolaza

DRP – 2-deoksiriboza-5-fosfat

ES – kompleks enzim-supstrat

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

GPTMS - 3-glicidiloksiopropil trimetoksisilan

APTES - 3-aminopropil trietoksisilan

TEOS - tetraetil ortosilikat

CTAB - heksadeciltrimetilamonij-bromida

## 9. ŽIVOTOPIS

Tomislav Rimac [REDACTED] Osnovnu školu završava 2004. godine u Rugvici. Nakon završene srednje Prirodoslovne škole Vladimira Preloga 2009. godine upisuje se na preddiplomski studij Fakulteta za kemijsko inženjerstvo i tehnologiju, smjer kemijsko inženjerstvo. Godine 2012. nastavlja preddiplomski studij na smjeru ekoinženjerstvo kojeg i završava 2016 godine. Stručnu praksu odradio je u Plivi u GASL diviziji.