

Optimiranje uvjeta imobilizacije aldolaze na mezoporoznu siliku

Kolić, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:269554>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Barbara Kolić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Barbara Kolić

OPTIMIRANJE UVJETA IMOBILIZACIJE ALDOLAZE NA MEZOPOROZNU SILIKU

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: 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 2020.

Zahvala!

Od srca zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki na svom prenesom znanju i pomoći u izradi ovog rada! Također zahvaljujem asistentu mag. ing. oecoing. Dini Skendroviću na pomoći u izradi rada! Zahvaljujem roditeljima, sestri i prijateljima na svojoj podršci tijekom studiranja!

SAŽETAK

OPTIMIRANJE UVJETA IMOBILIZACIJE ALDOLAZE NA MEZOPOROZNU SILIKU

U ovom radu provedena je imobilizacija enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku u puferima koncentracija 0,05, 0,1 i 0,2 M pri pH vrijednostima 6, 6,5, 7, 7,5 i 8. MCF mezoporozna silika sintetizirana je sol-gel procesom. Aktivnost enzima ispitana je u reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida. Ovom reakcijom nastaje laktol, prekursor za sintezu bočnog lanca statina. Usporedbom parametara uspješnosti za navedene pufere odabrani su optimalni uvjeti za imobilizaciju enzima koji su odgovarali puferu koncentracije 0,05 M i pH vrijednosti 6,5. Imobilizacija enzima DERA potom je ispitana za nosioc većih pora u odabranom puferu. Usporedbom parametara uspješnosti oba nosioca, za nosioc većih pora dobivene su više vrijednosti efikasnosti i preostale aktivnosti.

Ključne riječi:

imobilizacija, enzim DERA, mezoporozna silika, sol-gel proces, aldolna adicija, statini, optimiranje uvjeta

ABSTRACT

OPTIMISATION OF ALDOLASE IMMOBILIZATION ON MESOPOROUS SILICA

In this work enzyme DERA was immobilized on MCF mesoporous silica in various immobilization buffers. Buffers with different ionic strength, i.e. concentration (0.05, 0.1 and 0.2 M) and pH (6, 6.5, 7, 7.5 and 8) were used. MCF mesoporous silica was synthesized by sol-gel process. Enzyme activity was measured in the reaction of aldol addition of acetaldehyde and chloroacetaldehyde. The product of this reaction is lactol, the precursor in synthesis of a statin side chain. Based on the measure of success of immobilization process, optimal immobilization buffer was the one with concentration of 0.5 M and pH 6.5. Further, the enzyme DERA was immobilized on the MCF carrier with larger pores in the optimal buffer. Higher values of immobilization efficiency and remaining activity were obtained for the carrier with larger pores.

Key words:

immobilization, enzyme DERA, mesoporous silica, sol-gel process, aldol addition, statin, optimisation

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Enzimi	2
2.1.1. Struktura enzima	2
2.1.2. Djelovanje enzima	3
2.1.3. Primjena enzima	7
2.1.4. Imenovanje i klasifikacija enzima	7
2.2. Aldolaze.....	9
2.2.1. DERA (2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza).....	10
2.3. Imobilizacija enzima	12
2.3.1. Metode imobilizacije enzima	12
2.4. Vrste nosioca za imobilizaciju enzima	15
2.4.1. Mezoporozna silika	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	20
3.1. Aparatura.....	20
3.2. Sinteza MCF mezoporozne silike sol-gel metodom.....	24
3.3. Imobilizacija enzima DERA na mezoporoznu siliku	25
3.3.1. Funkcionalizacija mezoporozne silike pomoću 3-aminopropiltrioksisilana	25
3.3.2. Aktivacija mezoporozne silike.....	26
3.3.3. Optimiranje uvjeta imobilizacija enzima DERA na mezoporoznu siliku	27
3.4. Analitičke metode	28
3.4.1. BET (Brunauer, Emmet i Teller) metoda	28
3.4.2. SEM (Skenirajući elektronski mikroskop).....	29
3.4.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	29
3.4.4. Određivanje aktivnosti enzima DERA	30
3.4.5. Određivanje koncentracije supstrata i produkata reakcije aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida pomoću HPLC uređaja.....	32
4. REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1. Rezultati BET i SEM analize.....	35
4.2. Optimiranje uvjeta imobilizacije enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku.....	36
4.2.1. MCF mezoporozna silika manjih pora.....	37
4.2.2. MCF silika većih pora	44

4.2.3. Reakcija aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida u kotlastom reaktoru katalizirana imobiliziranim enzimom DERA na MCF mezoporoznu siliku manjih i većih pora.	46
5. ZAKLJUČAK	51
6. LITERATURA.....	52
7. SIMBOLI I SKRAĆENICE.....	57
8. PRILOZI.....	59

1. UVOD

Od davnina je poznato da su određeni procesi kao što su kiseljenje mlijeka ili fermentacija šećera mogući samo uz aktivnost određenih mikroorganizama, odnosno enzima koje ti mikroorganizmi proizvode. [1] Enzimi su danas od velike važnosti u industriji sa rastućom mogućnosti njihove primjene. Dobra svojstva enzima kao katalizatora pogoduju njihovoj širokoj primjeni. [2]

Enzimi su prirodni proizvod živih organizama i stoga evolucijski nisu predodređeni da djeluju kao katalizatori u industrijskim procesima. U većini slučajeva njihova svojstva se moraju poboljšati kako bi mogli djelovati u uvjetima različitim od njihovog prirodnog okruženja. Imobilizacija enzima je jedna od metoda kojom se povećava njihova stabilnost te omogućuje primjena u kontinuiranim procesima. [3]

Katalitički procesi mogu se podijeliti na homogene i heterogene. U homogenoj katalizi katalizator i reaktanti se nalaze u istoj fazi, dok su u heterogenoj katalizi katalizator i reaktanti u različitim fazama. Heterogeni katalizatori imaju mnoge prednosti kao što su mogućnost lakog izdvajanja iz smjese reaktanata i produkata te njihova ponovna uporaba. [4] Imobilizirani enzimi svrstavaju se u heterogene katalizatore. [3]

Postoje različite metode imobilizacije enzima. Metoda imobilizacije enzima kovalentnim vezanjem zahtijeva prisutnost čvrstog nosioca na koji se enzim veže kovalentnim vezama. [3] Mezoporozna silika se pokazala kao dobar nosioc obzirom na njena svojstva kao što su velika specifična površina, kemijska, mehanička i termalna stabilnost te ujednačena raspodjela pora i njihova prilagodljiva veličina. [5] U ovom radu optimirani su uvjeti imobilizacije enzima DERA na mezoporoznu siliku.

Enzim DERA pripada skupini aldolaza te se koristi u proizvodnji kiralnih laktola, prekursora za proizvodnju bočnog lanca statina. Statini pripadaju vrsti lijeka za snižavanje kolestrola u krvi. Sve veća potražnja tržišta za ovim lijekom zahtijeva i sve veću proizvodnju ovog lijeka, a upravo proizvodnja pomoću enzima osigurava proizvodnju ovog lijeka sa visokom stereokemijskom čistoćom produkta obzirom da su enzimi stereoselektivni za razliku od kemijskih katalizatora. [6]

2. OPĆI DIO

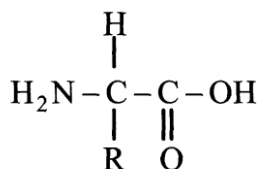
2.1. Enzimi

Enzimi su katalizatori koji djeluju u živim organizmima i prema tome nazivaju se i biokatalizatorima. Ubrzavaju reakcije u stanicama živih organizama do milijun puta i više te iz njih izlaze nepromijenjeni. Svaki enzim je specifičan te stoga djeluje na određeni supstrat. [1, 7] Moguće ih je izolirati iz biljaka, životinjskog tkiva te mikroorganizama. [8]

Naziv „enzim“ potječe iz grčke riječi „*enzumē*“ što znači „u kvascu“, a predložio ga je Wilhelm Kühne 1878. godine. [1] Kemičari Anselme Payen i Jean-Francois Persoz 1833. godine izolirali su prvi enzim diastazu iz otopine slada. Danas je poznato više od 2000 različitih enzima. [2]

2.1.1. Struktura enzima

Enzimi su globularni proteini, topivi u vodi i time imaju funkcijsku ulogu u organizmima za razliku od vlaknastih proteina koji su netopivi u vodi i imaju strukturnu ulogu u organizmima. Proteini su sastavljeni od niza aminokiselina čiji je redoslijed određen strukturom genetičkog materijala u stanici što svakom enzimu daje specifična svojstva. Aminokiseline su organske molekule koje sadrže amino (-NH₂ ili >NH) i karboksilnu (-COOH) skupinu zbog kojih ove molekule imaju bazna i kisela svojstva. Većina aminokiselina prisutna u proteinima je primarne strukture. Amino i karboksilna skupina vezane za primarni ugljikov atom nazivaju se α-amino i α-karboksilna skupina kako bi se razlikovale od ostalih sličnih skupina vezanih za bočni lanac aminokiseline. α-aminokiseline mogu sadržavati bočne lance polarnog ili nepolarnog karaktera koji određuju hidrofilnost, odnosno hidrofobnost molekule. Općenita struktura aminokiselina prikazana je na slici 1. [1]

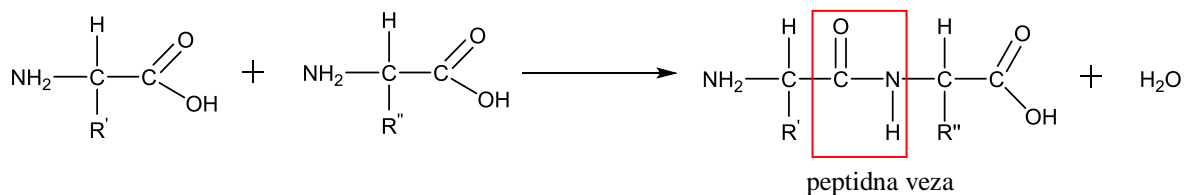


Slika 1. Općenita struktura aminokiseline [1]

R označava ostatak molekule, odnosno njen bočni lanac. Enzimi mogu biti jednostavni ili konjugirani proteini. Jednostavni proteini građeni su samo od aminokiselina, dok konjugirani proteini sadrže i dodatne materijale kao nukleinske kiseline, lipide, oligosaharide i dr.. [1]

α -ugljikov atom kovalentno je vezan za četiri različite skupine atoma i stoga je α -ugljik kiralno središte. Gotovo sve aminokiseline (osim glicina koji ima dva atoma vodika vezana za α -ugljik) imaju optički aktivne izomere. Većina prirodnih aminokiselina građena je u L-izomernom obliku obzirom da u njihovoj sintezi sudjeluju enzimi koji su specifični za određeni izomerni oblik supstrata. [1]

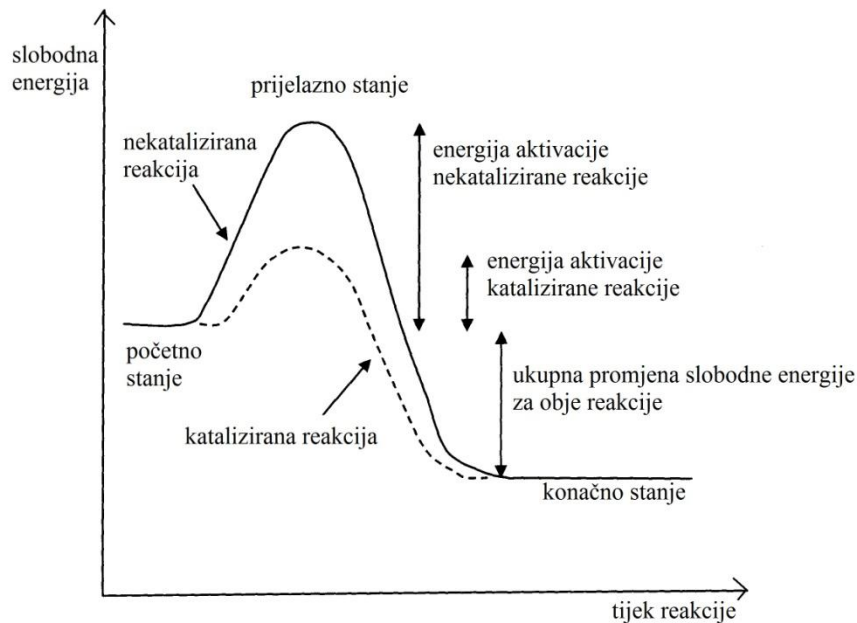
Građa proteina može se klasificirati u četiri razine: primarna, sekundarna, tercijarna i kvartarna struktura. Primarna struktura proteina je niz aminokiselina povezanih peptidnom vezom (Slika 2.) između α -karboksilne skupine jedne aminokiseline sa α -amino skupinom druge aminokiseline. [1] U molekuli proteina vodikova veza nastaje kao posljedica položaja kisikovih i dušikovih atoma te takvim vezanjem nastaje sekundarna struktura proteina. [9] Molekule polipeptida mogu rotirati oko kovalentnih veza i time rezultirati različitim prostornim strukturama, no većina polipeptida ima jedinstvenu trodimenzionalnu strukturu koja se naziva tercijarnom strukturom. Ova struktura stabilizirana je vezama između aminokiselina koje se nalaze blizu jedna druge što je posljedica rotacije oko kovalentne veze. Više međusobno povezanih peptidnih lanaca tvori kvartarnu strukturu. [1]



Slika 2. Shema nastanka peptidne veze

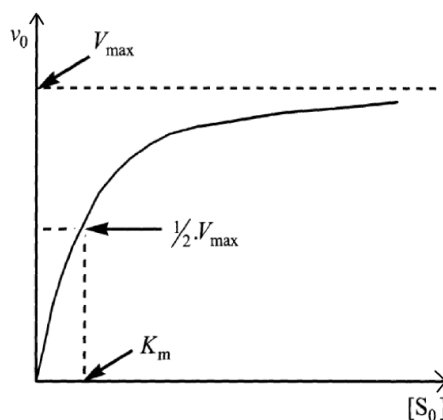
2.1.2. Djelovanje enzima

Enzimi djeluju kao i svaki drugi katalizator tako što snižavaju energiju aktivacije. Energija aktivacije je energija potrebna molekulama za stupanje u kemijsku reakciju. Samo molekule koje imaju dovoljno energije moći će stupiti u kemijsku reakciju. Ovo pravilo vrijedi za svaku kemijsku reakciju, kataliziranu i nekataliziranu. Energija aktivacije potrebna je kako bi supstrati mogli stupiti u prijelazno stanje pri čemu nastaje nestabilan intermedijer koji se brzo raspada na produkte. U kataliziranoj reakciji formira se stabilniji intermedijer (niže energije) za razliku od nekatalizirane reakcije kako je prikazano na slici 3. Ukupna promjena slobodne energije jednaka je za obje reakcije obzirom da su početno i konačno stanje na istom energetsom nivou u oba slučaja.



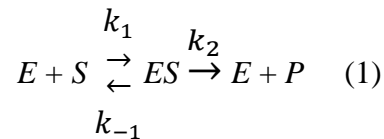
Slika 3. Prikaz energetskeg tijeka katalizirane i nekatalizirane reakcije [1]

Ludwig Wilhelmy je 1850. godine dokazao da je brzina reakcije hidrolize saharoze u prisutnosti kiseline proporcionalna koncentraciji saharoze uz konstantnu koncentraciju kiseline (reakcija prvog reda). Adrian Brown je 1902. godine za istu reakciju kataliziranu enzimom invertaza dokazao da je reakcija prvog reda pri niskim koncentracijama saharoze, dok je pri visokim koncentracijama reakcija nultog reda. Ovo vrijedi za sve reakcije katalizirane enzimom sa jednim supstratom ili više supstrata uz varijaciju koncentracije jednog supstrata. Graf ovisnosti početne brzine reakcije o početnoj koncentraciji supstrata pri konstantnoj koncentraciji enzima u ovom slučaju daje oblik hiperbole kako je prikazano na slici 4. [1]



Slika 4. Graf ovisnosti početne brzine reakcije v_0 o početnoj koncentraciji supstrata S_0 pri konstantnoj koncentraciji enzima prema kinetičkom modelu Michaelisa i Mentena [1]

U reakciji kataliziranoj enzimom nastaje relativno stabilan enzim-supstrat kompleks. Nastali kompleks se potom raspada na produkt i enzim koji tijekom reakcije ostaje nepromijenjen. Reakcija sa jednim supstratom katalizirana enzimom prikazana je sljedećom jednadžbom: [1]



U ovoj reakciji k_1 je konstanta brzine nastanka kompleksa enzim-supstrat (ES), k_{-1} je konstanta brzine raspada kompleksa (ES) na enzim (E) i supstrat (S), a k_2 konstanta brzine raspada kompleksa (ES) na enzim (E) i produkt (P). [1]

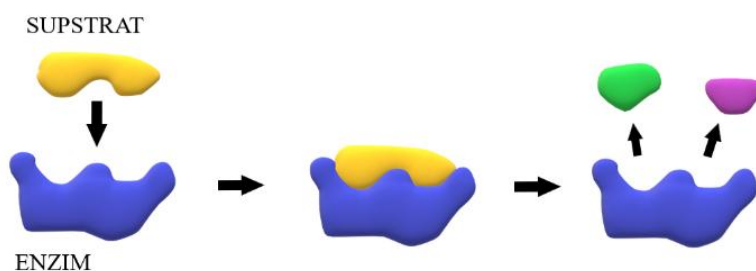
Prisutnost nastalog kompleksa potvrdila su različita istraživanja korištenjem kristalografije te rendgenske i Ramanove spektroskopije. Interakcije između enzima i supstrata u kompleksu uzrokovane su nekovalentim vezama među kojima su elektrostatske interakcije, van der Waalsove sile, vodikove veze te hidrofobne sile. [2]

Kinetički model navedene reakcije (jedm.1) definirali su Michaelis i Menten 1913. godine prema sljedećem izrazu:

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S_0]}{[S_0] + K_m} \quad \text{pri konstantnoj koncentraciji enzima} \quad (2)$$

V_{max} je maksimalna početna brzina reakcije, a K_m je Michaelisova konstanta koja ima vrijednost koncentracije supstrata pri polovini maksimalne brzine reakcije kako je prikazano na slici 4. U različitim slučajevima kao npr. inhibicija supstratom ili produktom te u slučaju reakcije sa više supstrata Michaelis-Menteničin izraz za kinetiku reakcije postaje složeniji. [1]

Mjesto na kojem se odvija kataliza na enzimu naziva se aktivno mjesto. Aktivno mjesto je mali dio enzima sa aminokiselinskim ostacima gdje se veže supstrat i uslijed kemijske reakcije prelazi u produkt koji se potom odvajaju od enzima. Enzim poslije reakcije ostaje nepromijenjen te je spreman za sljedeću reakciju. [3] Aktivno mjesto zauzima mali dio enzima i obično se nalazi blizu površine kako bi bio lako dostupan supstratu. [1] Ovako katalizirana reakcija se odvija prema modelu ključ-brava (Slika 5.) kojeg je prikazao Emil Fischer 1894. godine. Prema ovom modelu aktivno mjesto na enzimu ima određeni oblik te će moći reagirati samo sa supstratom koji oblikom pristaje aktivnom mjestu. [3]



Slika 5. Shema modela ključ-brava

Aktivnost enzima uvelike ovisi o njegovoj strukturi. Aminokiselinski ostaci koji tvore aktivno mjesto u trodimenzionalnoj strukturi enzima su blizu jedni drugima dok su u primarnoj strukturi enzima oni udaljeni jedni od drugoga. Svaka tvar koja će razoriti trodimenzionalnu strukturu enzima smanjit će ili potpuno uništiti njegovu katalitičku aktivnost. Ovaj proces se naziva denaturacija. Proces denaturacije može biti povrativ u slučaju kada je uzrok denaturacije uklonjen dok nisu nastale promjene u strukturi enzima. U slučaju kada nastanu kemijske promjene u strukturi enzima tada dolazi do nepovrativog gubitka katalitičke aktivnosti što se naziva deaktivacija. [3]

Mnogi enzimi nemaju aktivnost bez prisutnosti određenih molekula zvanih koenzimi, odnosno kofaktori. Koenzimi su organske molekule male molekulske mase koje se reverzibilno vežu za enzim, tj. nisu sastavni dio enzima, a sudjeluju u prijenosu elektrona, atoma ili funkcionalnih skupina tijekom reakcije. Kofaktori su metalni ioni koji se također reverzibilno vežu za enzim, ali kemijski ne mijenjaju svoju strukturu. [3] U slučaju kada enzim zahtijeva prisutnost kofaktora, neaktivna komponenta enzima se naziva apoenzim, a aktivni enzim uključujući i kofaktor se naziva holoenzim. Kada je kofaktor čvrsto vezan za enzim, ponekad se naziva i protetskom skupinom. [1] Koenzimi mogu biti NAD, FAD, CoA ili neki vitamini, a kofaktori mogu biti Mg, Zn, Mn te Fe. [2] Obzirom zahtijevaju li enzimi prisutnost određene neproteinske molekule da bi bili katalitički aktivni možemo ih svrstati u tri skupine:

- enzimi koji ne zahtijevaju prisutnost određene molekule u procesu biokatalize
- enzimi koji zahtijevaju prisutnost kofaktora koji ostaje nepromijenjen tijekom biokatalitičke reakcije te ostaje čvrsto vezan za enzim
- enzimi koji zahtijevaju prisutnost koenzima koji se mijenja tijekom reakcije i na kraju reakcije se odvaja od enzima. [3]

Važno svojstvo enzima je specifičnost što znači da djeluju samo na određene supstrate. Specifičnost može biti prema grupi supstrata sa istom kemijskom skupinom (npr. alkoholi) ili samo prema jednom supstratu (apsolutna specifičnost). Djelovanjem na određene supstrate nastaju i određeni produkti za razliku od nekataliziranih reakcija gdje nastaje više različitih produkata. Enzimi su također i stereospecifični što znači da djeluju na određeni stereoizomer molekule supstrata. [1] Enzimi mogu proizvesti kiralne produkte iz supstrata koji imaju barem jedan prokiralan ugljikov atom. [2] Različiti enzimi koji kataliziraju istu vrstu reakcije nazivaju se izoenzimima. [2]

2.1.3. Primjena enzima

Neka od tradicionalnih područja primjene enzima su proizvodnja hrane (pekarstvo, pivarstvo, vinarstvo, mljekarstvo), prerada tekstila i kože te pranje rublja, a nedavno se primjena proširila i u farmaceutsku industriju, proizvodnju kemikalija i biogoriva te papirnu industriju. Početak korištenja enzima u industrijskim procesima zabilježen je pred kraj 19. stoljeća kada je Takamine dobio prvi patent za enzimatski proces u kojem je korištena dijastaza iz plijesni. Primjena enzima u industrijskim procesima doživjela je vrhunac nakon Drugog svjetskog rata s razvojem industrijske mikrobiologije i biokemijskog inženjerstva. Prvi potpuno enzimatski insdustrijski proces razvijen je sredinom 1960-ih za konverziju škroba u glukozni sirup. Danas se velika važnost pridaje primjeni enzima u organskoj sintezi. Razvoj genetičkog i proteinskog inženjerstva otvorio je nove mogućnosti njihove primjene. Osim u industriji enzimi se sve više koriste i u kemijskim i kliničkim analizama, biomedicini te u istraživanjima. [3]

Enzimi su brzo postali alternativa klasičnim kemijskim katalizatorima u području održive tehnologije i zelene kemije. Njihove prednosti u odnosu na klasične katalizatore su biorazgradivost, specifičnost, provođenje reakcija u blagim uvjetima (pH vrijednost blizu neutralne, temperature ispod 100 °C) te mogućnost kontrole procesa jer aktivnost enzima ovisi o operacijskim uvjetima. Zahtjevi za blagim operacijskim uvjetima ne zahtijeva veliku potrošnju energije čime se smanjuje onečišćenje okoliša i ekonomski je isplativije. U enzimatskim procesima rijetko nastaju nusprodukti te nastaju minimalne količine otpada i stoga su problemi zbrinjavanja otpada minimizirani. [8]

2.1.4. Imenovanje i klasifikacija enzima

Enzimi se imenuju tako da im se doda sufiks „-aza“. Jedina veća iznimka od ovog načina imenovanja su proteolitički enzimi (sudjeluju u razgradnji enzima) kojima se dodaje

sufiks „-in“, npr. tripsin. Naziv enzima obično ukazuje na koji supstrat enzim djeluje. Npr. enzim laktaza katalizira reakciju hidrolize disaharida laktoze na monomere glukozu i galaktozu dok enzim fumaraza katalizira reakciju hidratacije fumarata pri čemu nastaje malat što znači da iz imena pojedinih enzima nije moguće zaključiti o tipu reakcije koju kataliziraju. Naziv enzima kao transkarboksilaza govori samo o tipu reakcije koju katalizira taj enzim, ali ne i o supstratu na koji djeluje. Neki nazivi enzima kao katalaza ne ukazuju niti na vrstu supstrata niti tip reakcije. Kako je popis poznatih enzima brzo rastao bilo je potrebno pronaći sustavan način imenovanja i klasifikacije enzima. [1]

Odbor za nomenklaturu Međunarodne unije za biokemiju i molekularnu biologiju (IUBMB) podijelio je enzime u šest glavnih skupina prema tipu reakcije koju kataliziraju (Tablica 1.). Svakom enzimu dodijeljena su četiri broja. Prvi broj govori kojoj glavnoj skupini enzim pripada. [1, 3]

Tablica 1. Klasifikacija enzima prema vrsti reakcije [1, 3]

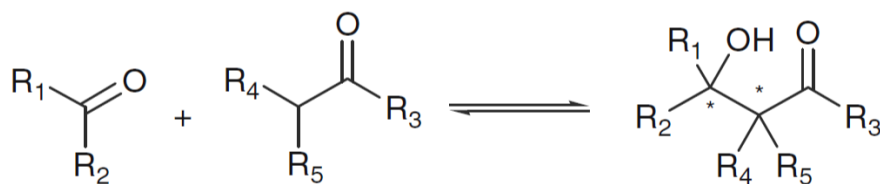
Prvi broj u klasifikaciji enzima	Grupa enzima	Vrsta reakcije koju kataliziraju
1	oksidoreduktaze	oksidacija/redukcija
2	transferaze	prijenos atoma ili skupine između dvije molekule
3	hidrolaze	hidroliza
4	liaze	reakcije nehidrolitičkog i neoksidativnog cijepanja kemijske veze
5	izomeraze	izomerizacija
6	ligaze	reakcije kovalentnog povezivanja molekula

Pri istraživanju enzima u izvješćima se koriste sustavni nazivi enzima sa klasifikacijskim brojevima uz izvor enzima jer takvi nazivi nedvosmisleno opisuju vrstu katalizirane reakcije dok u svakodnevnom govoru koristimo njihova trivijalna imena. [1]

2.2. Aldolaze

Aldolaze su skupina enzima koja pripada grupi liaza, jednoj od šest glavnih grupa enzima. Liaze su podijeljene u sedam podgrupa ovisno o vrsti veze na koju djeluju: C–C, C–O, C–N, C–S, C–X, P–O i ostale, a sudjeluju u kataboličkim reakcijama te u reakcijama biosinteze. Osim aldolaza, među istaknutim skupinama enzima koje pripada grupi liaza su i karboksilaze, dekarboksilaze, hidrataze i dehidrataze. Većina liaza su vanstanični enzimi te poneki enzimi ove grupe ne zahtijevaju prisutnost koenzima. Ove karakteristike liaza čine ih prihvatljivima za tehnološku primjenu. [3]

Aldolaze sudjeluju u reakciji aldolne adicije. Reakcija formiranja C–C veze je jedna od najvažnijih reakcija u organskoj sintezi među kojima je aldolna adicija jedan od najjednostavnijih i najučinkovitih načina. [3] Vežanjem dva atoma ugljika nastaju dva nova kiralna središta što daje mogućnost sinteze velikog broja prirodnih i novih sintetskih spojeva. [10] Stereoselektivnost enzima omogućuje kontrolu nad stereokemijom novonastalih spojeva. Općenita reakcija katalizirana aldolazom prikazana je na slici 6. [3]



Slika 6. Shema reakcije katalizirane aldolazom [3]

U prikazanoj shemi reakcije deprotonirani α -ugljik molekule aldehida ili ketona napada ugljik karbonilne skupine druge molekule aldehida ili ketona pri čemu nastaje β -hidroksialdehid, odnosno β -hidroksiketon. Aldolaze su specifične prema donorskim supstratima dok akceptorski supstrati mogu varirati. [3]

Prema mehanizmu reakcije aldolaze su podijeljene u dvije skupine. Aldolaze prve skupine aktiviraju donorski supstrat formiranjem Shiffove baze na aktivnom mjestu enzima. Aldolaze druge skupine vežu metalni kofaktor (najčešće Zn^{2+}) na aktivno mjesto koji djeluje kao Lewisova kiselina koja aktivira donorski supstrat. Aldolaze vežu točno određene donorske supstrate te su prema njima podijeljene u odgovarajuće skupine. [3, 10] Donorski supstrati prema kojima su aldolaze podijeljene u skupine su DHAP (dihidroxiacetonfosfat), piruvat i fosfoenolpiruvat, glicin te aldehid u čiju skupinu pripada enzim DERA. Aldolaze ne

zahtijevaju prisutnost kofaktora za katalitičku aktivnost uz iznimku aldolaza specifičnih prema glicinu koje zahtijevaju prisutnost piridoksal-fosfata kao kofaktora. [11]

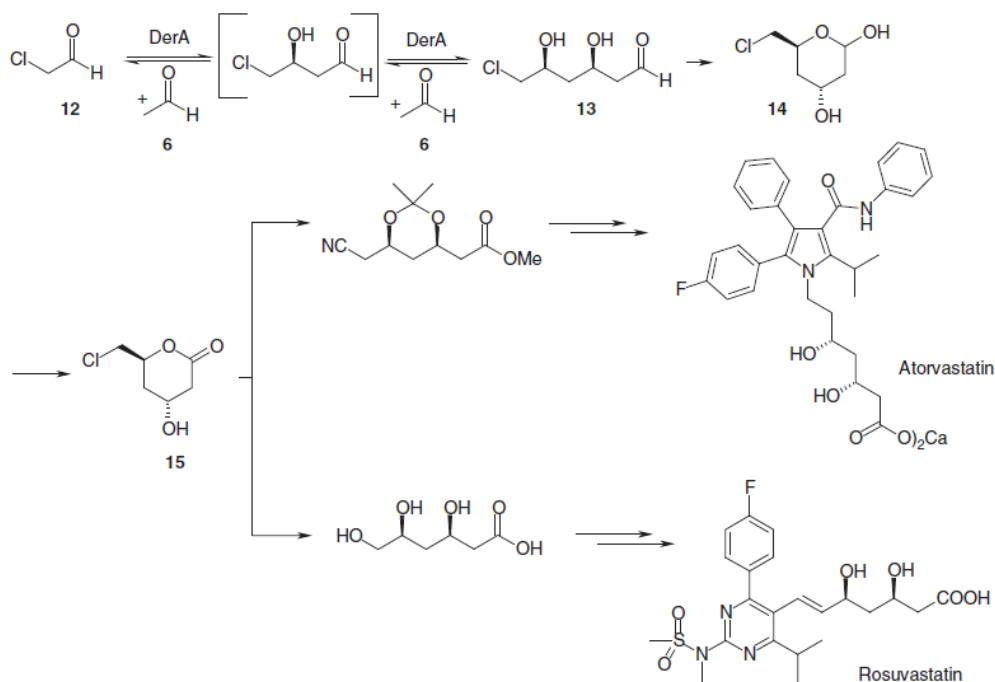
2.2.1. DERA (2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza)

Enzim DERA je jedini poznati enzim skupine aldolaza koji zahtijeva prisutnost acetaldehida kao supstrata [3] te prema mehanizmu reakcije pripada prvoj skupini aldolaza. [11, 6] Ovaj enzim nije strogo specifičan prema donorskim i akceptorskim supstratima kao enzimi ostalih skupina aldolaza pa tako može reagirati i sa donorskim skupinama kao što su aceton, fluoraceton i propanal te sa još većim rasponom akceptorskih skupina (aldehidi, aldozni šećeri i njihovi fosfati). [11, 6]

Ovaj enzim sudjeluje u metabolizmu živih organizama katalizirajući povratnu aldolnu reakciju acetaldehida (donor) i D-gliceraldehid-3-fosfata (akceptor) pri čemu nastaje D-2-deoksiriboza-5-fosfat. DERA je jedini poznati enzim koji sudjeluje u visoko selektivnoj reakciji aldolne kondenzacije dvaju aldehida pri čemu nastaje laktol sa dva kiralna središta, važan prekursor u proizvodnji bočnog lanca statina. [11, 6, 12]

Statini pripadaju vrsti lijeka za snižavanje razine kolesterola u krvi, a sastoje se od kiralnog diolnog lanca pričvršćenog na ciklički fragment. Prvotno su otkriveni kao mikrobnji metaboliti, a kasnije su sintetskim putem dobiveni i njihovi sintetski analozi sa djelomično izmijenjenom strukturom. Obzirom da bočni lanac statina predstavlja važan dio strukture statina mnogi su naponi u istraživanju usmjereni upravo njihovoj sintezi. Zbog velike potražnje ovog lijeka važno je razviti jednostavnu i ekološki prihvatljivu metodu za industrijsku proizvodnju, a enzimatska sinteza je privukla veliku pažnju za istraživanja u ovu svrhu, a posebice one u kojima se koristi enzim DERA obzirom na visoku stereokemijsku čistoću produkta te visoko iskorištenje. [6]

Wong i suradnici 1990-ih godina proveli su reakciju aldolne kondenzacije acetaldehida i kloroacetaldehida kataliziranu enzimom DERA kako bi dobili produkt (3R, 5S)-6-kloro-2,4,6-trideoksiheksozu (Slika 7.). Produkt druge adicije (13) se ciklizira u stabilan hemiacetal pomičući ravnotežu u smjeru nastanka produkta kako bi se spriječila daljna adicija. Oksidacijom hemiacetala nastaje lakton (15). U daljnim koracima sinteze nastaju konačni produkti statini (atorvastatin i rosuvastatin). Ovim jednostavnim postupkom statini su dobiveni iz akiralnih neskupocjenih sirovina. [11]



Slika 7. Shema slijedne aldolne reakcije i daljnih koraka za dobivanje bočnog lanca statina i konačno dobivanje statina [11]

Postoji nekoliko nedostataka u primjeni enzima DERA-e u procesima sinteze. Zbog deaktivacije enzima potrebne su velike količine enzima u procesu kako bi se povećala produktivnost. Deaktivacija enzima uzrokovana je vezanjem aldehida za lizine čime se ometa aktivno mjesto enzima. [6] Mnoga istraživanja su provedena u svrhu stabilizacije enzima DERA pri visokoj koncentraciji aldehida, a jedan od načina je imobilizacija enzima na čvrsti nosioc. [13]

Kako su prirodni uvjeti djelovanja enzima drugačiji od uvjeta u industrijskim procesima, neka svojstva enzima nisu pogodna za industrijsku primjenu kao što su topljivost u vodi, nestabilnost u uvjetima različitim od fizioloških, inhibicija supstratima i produktima reakcije te uzak raspon specifičnosti prema supstratima. [3] Obzirom da su uvjeti u kojima se koriste enzimi sve ekstremniji (visoke temperature, visoke koncentracije supstrata i ionska jakost otopine), traže se načini kako bi se poboljšala svojstva enzima tako da mogu djelovati u takvim uvjetima. Najvažnije metode stabilizacije enzima su proteinsko inženjerstvo, kemijska modifikacija, dodavanje aditiva za stabilizaciju i imobilizacija enzima. [14]

2.3. Imobilizacija enzima

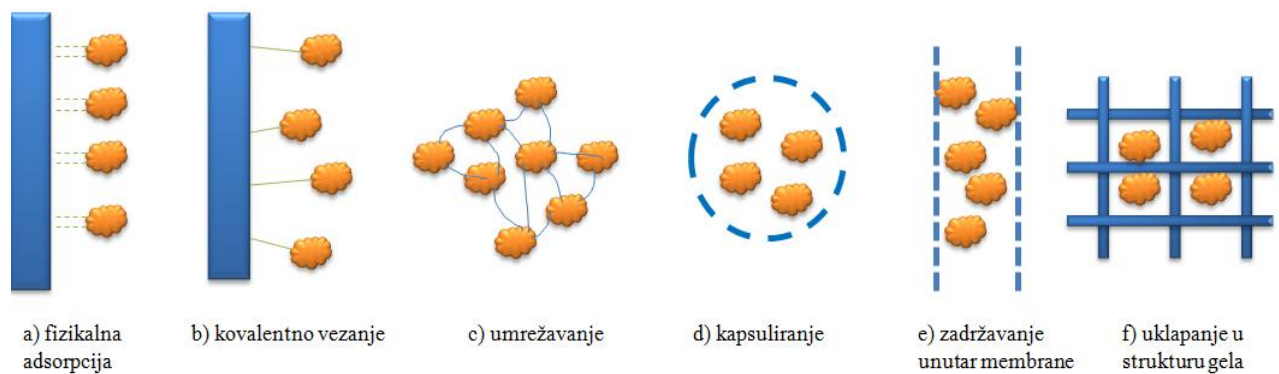
Imobilizacija je proces kojim se enzim veže na površinu ili uklopljuje u strukturu čvrstog nosioca, ili se molekule enzima međusobno umrežavaju u svrhu zadržavanja katalitičke aktivnosti enzima. [1] Ova metoda stabilizacije enzima ne zahtijeva visoke troškove i vrlo je jednostavna te daje mogućnost ponovne uporabe katalizatora i njegovu primjenu u kontinuiranim procesima. [3] Imobilizirani enzim je moguće lako izdvojiti iz reakcijske smjese i odvojiti od produkta [8] čime se sprječava njegova kontaminacija. [15] Enzimi u organskom mediju stvaraju agregate jer nisu topivi u nevedenom mediju. Zbog agregata koje tvore razmotrena je njihova primjena u svrhu lakšeg izdvajanja iz reakcijske smjese umjesto primjene imobiliziranih enzima. No mora se uzeti u obzir da se agregati nekih enzima ne mogu koristiti ponovo u procesu, da njihova fizička otpornost i veličina agregata ovise o ekstraktu enzima te da agregati smanjuju difuziju tvari. [16] Primjena imobiliziranih enzima u procesima daje visoke produktivnosti i time posljedično niže troškove. Osim mnogih prednosti primjene imobiliziranih enzima u procesima postoje i nedostaci kao što su cijena nosioca, gubitak katalitičke aktivnosti prilikom procesa imobilizacije te otežana difuzija tvari. [15] Prva imobilizacija enzima provedena je 1916. godine kada su J. M. Nelson i Edward Griffin imobilizirali invertazu na aktivni ugljen. [1]

Pri odabiru metode imobilizacije enzima potrebno je uzeti u obzir mnogo faktora uključujući toleranciju enzima na kemijske i fizikalne uvjete imobilizacije, funkcionalne skupine na enzimu, veličinu enzima, naboj enzima, polarnost enzima (hidrofilnost i hidrofobnost) te potrebe transporta supstrata i produkta. [14] Nakon imobilizacije enzima njegova svojstva poput stabilnosti te otpornosti na različite uvjete temperature i pH vrijednosti su poboljšana i stoga je omogućena njegova primjena u različitim industrijama kao što su farmaceutska, prehrambena, tekstilna te pri obradi voda. Imobilizirani enzim je ekonomski povoljniji za primjenu jer je moguća njegova ponovna uporaba u procesu. [17]

2.3.1. Metode imobilizacije enzima

Metode imobilizacija možemo podijeliti na metode koje uključuju stvaranje kemijske veze (fizikalna adsorpcija, kovalentno vezanje na nosioc i umrežavanje) i na metode u kojima se enzim prostorno ograničava bez stvaranja kemijske veze (kapsuliranje, zadržavanje unutar membrane i uklapanje u strukturu gela) (Slika 8.). Metode fizikalne adsorpcije i kovalentnog vezanja zahtijevaju prisutnost nosioca. [3] Nijedna metoda imobilizacije ili nosioc korišten za

imobilizaciju enzima nisu univerzalni što znači da se metoda i nosioc moraju optimirati u svrhu svake njihove primjene. [18]



Slika 8. Shematski prikaz metoda imobilizacije enzima

Fizikalna adsorpcija je metoda imobilizacije enzima pri kojoj se enzim fizikalnim vezama (van der Waalsovima ili vodikovim vezama) veže za nosioc. Ove veze su vrlo slabe što rezultira desorpcijom enzima sa površine nosioca čiji uzrok može biti promjena pH vrijednosti, temperature, ionske jakosti otopine ili koncentracija supstrata. Proces adsorpcije je nespecifičan što znači da se osim enzima za nosioc mogu vezati i druge molekule. [1] Ova metoda imobilizacije je vrlo jednostavna te je njena prednost mogućnost oporavka nosača nakon ispiranja enzima s njegove površine za razliku od metode kovalentnog vezanja (opisana u poglavlju 2.3.1.1.) kod koje nosač nije moguće ponovno upotrijebiti nakon gubitka katalitičke aktivnosti enzima. [3]

Imobilizacija enzima umrežavanjem je metoda koja ne zahtijeva prisutnost nosioca. Enzimi se međusobno povezuju, a ovisno o prekursoru za umrežavanje postoji nekoliko načina umrežavanja: umrežavanje otopljenog enzima CLE (eng. *cross-linked enzyme*), kristaliziranog enzima CLEC (eng. *cross-linked enzyme crystal*) te agregata enzima CLEA (eng. *cross-linked enzyme aggregate*). [3]

Uklapanje je metoda imobilizacije kod koje se enzim prostorno ograničava uklapanjem u strukturu polimernog gela. Proces imobilizacije enzima ovom metodom se provodi polimerizacijom otopine monomera u kojoj su otopljeni enzimi. Ova metoda imobilizacije se većinom provodi za cijele stanice jer se enzimi zbog svoje veličine lako ispiru iz strukture gela. Ispiranje enzima moguće je spriječiti samo povećavanjem čvrstoće polimera što uzrokuje otežan prijenos tvari kroz masu. [3]

Mikrokapsule enzima nastaju polimerizacijom površine kapljica enzima otopljenih u vodi koje su disperzirane u organskom mediju sa dodatkom surfaktanta. Kapsulu mogu tvoriti miceli ili liposomi. Kada kapsulu tvore miceli tada je hidrofilni dio molekule surfaktanta okrenut prema unutarnjem vodenom mediju sa otopljenim enzimom, a hidrofobni dio molekule prema organskom mediju. Liposomi se sastoje od dvostrukog sloja surfaktanta. [3]

Zadržavanje enzima unutar polupropusne membrane također je jedan od načina imobilizacije enzima. Polupropusna membrana omogućava prolaz supstrata i produkata uz zadržavanje enzima unutar membrane. [3]

2.3.1.1. Imobilizacija enzima kovalentnim vezanjem za nosioc

Pri imobilizaciji enzima kovalentnim vezanjem enzim se veže za čvrstu površinu ili nosioc kovalentnim vezama. Površina za koju se veže može biti unutarnja površina bioreaktora ili stakleni ili polimerni nosioci u obliku kuglica za primjenu u reaktoru u industrijskom procesu. [14] Funkcionalne skupine enzima koje sudjeluju u stvaranju kovalentne veze sa nosiocem su $-NH_2$, $-OH$, $-SH$, $-COOH$. [3] Kako bi se enzim mogao imobilizirati važno je da nosioc sadrži funkcionalne skupine koje će se vezati za enzim ili da je nosioc moguće funkcionalizirati. [19] Nakon imobilizacije može doći do smanjenja katalitičke aktivnosti u slučaju inaktivacije aktivnog mjesta enzima tijekom imobilizacije. [17] Za uvjete provođenja imobilizacije je važno da su blagi kako bi se sačuvala katalitička aktivnost enzima i njegova trodimenzionalna struktura, no potpuno očuvanje aktivnosti nije moguće. [1]

Kovalentne veze su jake kemijske veze za razliku od fizikalnih i stoga ne dolazi do lakog ispiranja enzima sa površine nosioca kako je to slučaj kod imobilizacije enzima fizikalnim vezama. [1] Kod ove metode nije moguća ponovna uporaba nosioca nakon što enzim izgubi svoju aktivnost. [3]

Proces imobilizacije enzima kovalentnim vezanjem sastoji se od tri koraka. Prvi korak je funkcionalizacija površine nosioca amino ili karboksilnim skupinama. Drugi korak uključuje aktivaciju nosioca glutaraldehydom, u slučaju ovog rada benzokinonom, te je posljednji korak imobilizacija enzima. [5]

2.4. Vrste nosioca za imobilizaciju enzima

Općenito, nosioci za imobilizaciju moraju sadržavati neke karakteristike kao što su dostupnost, inertnost, čvrstoća, stabilnost, mogućnost regeneracije, sposobnost povećanja specifičnosti i aktivnosti enzima, smanjenje inhibicije produktom te smanjenje nespecifične adsorpcije i mikrobne kontaminacije. [20] Poželjne karakteristike nosioca su i velika specifična površina ili porozna struktura materijala kako bi se povećala količina imobiliziranog enzima te da se površina nosioca može modificirati kako bi se prilagodila u svrhu imobilizacije enzima. [21] Pri imobilizaciji enzima vezanjem na podlogu koriste se nosioci koji su netopivi u vodi kao što su derivati polisaharida, sintetički polimeri te anorganski materijali. [20] Od prirodnih polimera koriste se celuloza, agaroz i kitozan, a od sintetičkih polimera to su akrilne smole, stiren-divinilbenzen te polipropilen. Od anorganskih materijala koriste se silika, porozno staklo te dijatomejska zemlja. [15] Imobilizirani enzimi na čvrstim nosiocima se danas koriste u raznim područjima kao što su biotehnologija, biokataliza, transport proteina te biološki senzori.

Nanomaterijali su se pokazali kao mogući idealni nosioci za imobilizaciju enzima zahvaljujući velikoj specifičnoj površini, dobrim kemijskim, mehaničkim i termalnim svojstvima, ekonomskoj isplativnosti te mogućnosti modifikacije površine radi olakšanja imobilizacije enzima. Enzimi imobilizirani na ovakvim nosiocima su stabilni te ih je lako ponovno iskoristiti. Neki od nanomaterijala koji se često koriste za imobilizaciju enzima su zlato, metalni oksidi (Fe_3O_4 , TiO_2 , ZnO) te ugljikovi materijali (ugljkove nanocijevi, grafen i njegovi derivati - grafenovi oksidi i reducirani grafenovi oksidi). [21] Većina nanomaterijala nije porozna i stoga su enzimi imobilizirani na površini nosioca izloženi uvjetima u otopini koji mogu smanjiti njegovu aktivnost i stabilnost. [15]

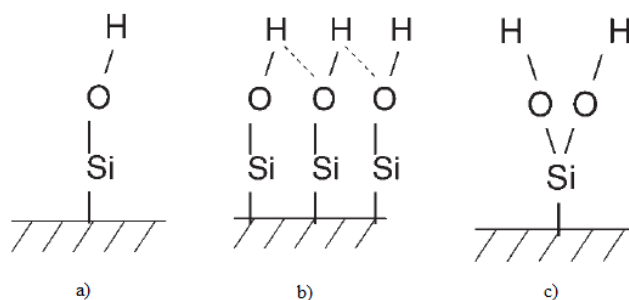
Porozni materijali se vrlo često koriste u imobilizaciji enzima. Osim velike specifične površine, prednost ovih materijala je i sprječavanje inaktivacije enzima smještenih u unutrašnjosti nosioca organskim otapalima iz reakcijske smjese. Imobilizacijom enzima unutar porozne strukture moguće je stvoriti mikro-uvjete koji stabiliziraju enzim tijekom operacijskih uvjeta. U usporedbi sa slobodnim enzimima, kod imobiliziranih enzima u porama nosioca smanjena je difuzija tvari što smanjuje brzinu reakcije. Prijenos tvari ovisi o promjeru pora, količini enzima unutar pora, topivosti supstrata te prirodi nosioca. [15] Porozni materijali za primjenu u biokatalizi podijeljeni su u tri skupine prema veličini pora: mikropore (< 2 nm), mezopore (2 – 50 nm) i makropore (> 50 nm). [22] Mezoporozni

materijali mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: materijale bazirane na siliciju te ostale materijale koji ne sadrže silicij kao što su oksidi titanija, aluminijska, mangana, magnezija, kositra i niobija. [23]

Većina materijala za imobilizaciju enzima zahtijeva prethodnu modifikaciju površine koja može uključivati uvođenje skupina radi povećanja hidrofobnosti, dodavanja ili izmjene površinskog naboja ili uvođenje skupina za kovalentno vezanje enzima. Osim površine nosioca enzimi se također mogu kemijski modificirati polimerima, malim molekulama, peptidima ili genetičkim inženjerstvom. [15]

2.4.1. Mezoporozna silika

Vrlo često korišten nanomaterijal u imobilizaciji enzima je mezoporozna silika. [5] Na površini mezoporozne silike prisutna su tri tipa silanolnih skupina (Slika 9.): pojedinačne silanolne skupine, silanolne skupine međusobno povezane vodikovim vezama te geminalne skupine (dvije –OH skupine na jednom silicijevom atomu). Sadržaj skupina na površini silike ovisi o načinu uklanjanja surfaktanta u procesu sinteze čestica te se može modulirati određenim postupcima nakon sinteze. [24]



Slika 9. Shematski prikaz silanolnih skupina na površini mezoporozne silike: pojedinačne silanolne skupine (a), silanolne skupine međusobno povezane vodikovim vezama (b), geminalne skupine (c) [24]

Silanolne skupine na površini se mogu funkcionalizirati pomoću određenih reagensa koji sadrže funkcionalne skupine kao što su amino, epoksi, karboksilne i tiolne skupine u svrhu imobilizacije enzima kovalentnim ili nekovalentnim vezanjem. Za imobilizaciju kovalentnim vezanjem koriste se amino i karboksilne skupine. [21]

Svojstva silike, koja ju čine vrlo prihvatljivom za imobilizaciju enzima su ujednačena raspodjela pora te njihov prilagodljiv promjer, visoka sposobnost adsorpcije, uređena porozna

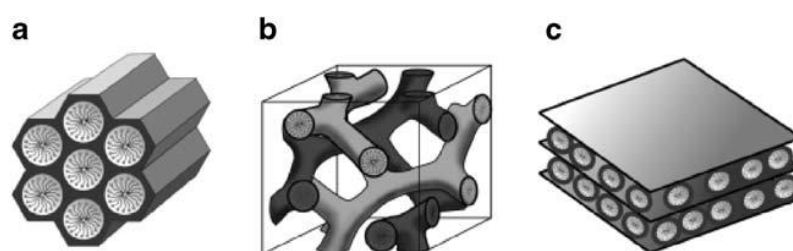
mreža za slobodnu difuziju supstrata i produkata reakcije, netoksičnost materijala te kemijska, termalna i mehanička stabilnost materijala. Od njenog otkrića 1992. godine sintetizirani su različiti oblici monomera silike kao što su tanki filmovi, sferični, zakrivljeni, cjevasti, štapićasti te vlaknasti oblici. Ovakvi oblici monomera odgovaraju imobilizaciji enzima jer sadrže pore promjera 2 – 40 nm, veliki volumen pora (otprilike $1,5 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) te veliku specifičnu površinu od do $1500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Usporedno sa slobodnim enzimima, imobilizirani enzimi na ovakvim nosiocima podnose ekstremne operacijske uvjete kao što su visoka temperatura, denaturirajuća sredstva i organska otapala te ih je moguće ponovno koristiti. [5]

Prilikom sinteze silika čestica moguće je kontrolirati njihova morfološka i strukturna svojstva uključujući veličinu pora, prisutnost funkcionalnih skupina te specifičnu površinu. Poželjno je postići što veću povezanost pora kako bi se omogućio nesmetan transport supstrata i produkata. Veličinu pora moguće je kontrolirati odabirom različitih sintetskih metoda i operacijskih uvjeta kao što su uporaba različitih surfaktanata, odabir temperature, dodavanje organskog materijala za vrijeme kristalizacijskog procesa sinteze čestica te termalna obrada nakon sinteze. Mogućnost ulaska enzima u pore ovisna je o samoj veličini pora, što znači da ukoliko je veličina pore manja od veličine enzima on će se moći vezati samo za vanjsku površinu čestice silike (što znači da je iskorištenje vezanja malo). Ukoliko je veličina pora mnogo veća od veličine enzima posljedica će biti ispiranje enzima sa površine nosioca. Kako bi se spriječilo ispiranje enzima, provodi se funkcionalizacija amino ili karboksilnim skupinama u svrhu vezanja enzima kovalentim vezama čime se sprječava njihovo ispiranje. Ovisno o odabranoj metodi sinteze čestica silike funkcionalizacija može biti provedena za vrijeme ili poslije sinteze. [5]

Struktura čestice nosioca utječe na očuvanje operacijske stabilnosti enzima. [25] Za sintezu čestica koriste se različiti surfaktanti kao predlošci za kondenzaciju silika čestica koje se formiraju iz različitih izvora kao što su natrijev silikat, tetraetilortosilikat (TEOS) i tetrametilortosilikat (TMOS). Uvjeti sinteze kao što su izvor silika čestica, vrsta surfaktanta, ionska jakost, pH, udio komponenti, temperatura i vrijeme provedbe sinteze utječu na proces kondenzacije čestica silike što određuje karakteristiku porozne strukture i makroskopsku morfologiju čestica. [24]

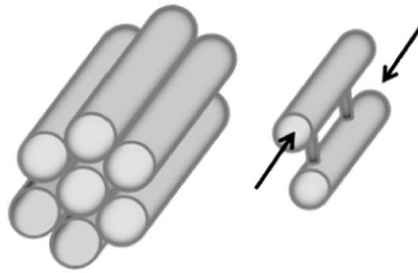
2.4.1.1. Tipovi mezoporozne silike

Tipove silika čestica možemo podijeliti u nekoliko skupina među kojima su MCM (eng. *Mobile Crystalline Material*), SBA (eng. *Santa Barbara Amorphous*) i MCF (eng. *Mesosructured Celllar Foams*). Najpoznatiji tip silika čestica iz skupine MCM je MCM-41 kojeg karakteriziraju uske pore raspoređene u obliku šesterokuta (Slika 10. a). Pore se pružaju u jednoj dimenziji što znači da je prolazak enzima prostorno ograničen. Ostali tipovi iz ove skupine su MCM-48 sa kubičnim strukturom (Slika 10. b) te MCM-50 sa laminarnom strukturom (Slika 10. c). MCM skupinu mezoporozne silike karakteriziraju uske pore promjera 2 – 10 nm. [5]



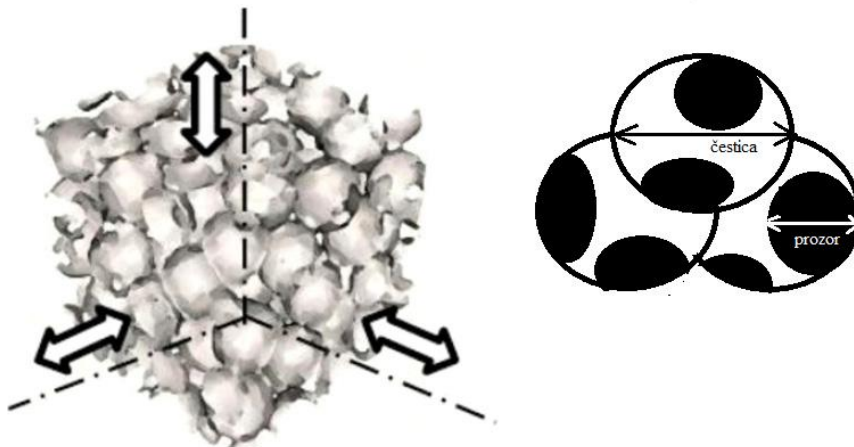
Slika 10. Strukture silika čestica: heksagonalna struktura MCM-41 (a), kubična struktura MCM-48 (b), laminarna struktura MCM-50 (c) [5]

Pore većeg promjera u rasponu 5 – 30 nm karakteristične su za tip silike SBA-15. Cjevaste pore raspoređene su paralelno sa poprječnim presjekom u obliku šesterokuta pružajući se u dvije dimenzije (Slika 11.). [5] Zbog većih pora omogućen je pristup molekula unutarnjim šupljinama čestica. [26] Volumen pora moguće je kontrolirati tijekom sinteze temperaturom te omjerom Si i surfaktanta u mediju. [27] Moguće je sintetizirati čestice SBA-15 različitih morfologija kao što su štapićasti, vlaknasti, sferični te oblici diska. Istraživanja su pokazala da su čestice štapićastog oblika pokazale bolje rezultate od sferičnih oblika u adsorpciji enzima. Postoji nekoliko metoda za sintezu mezoporozne silike SBA-15, a sol-gel metoda je najviše istraživana i ima mnoge prednosti kao što su dostupnost sirovina visoke čistoće te provedba sinteze pri blagim temperaturama za razliku od konvencionalnih metoda. Ovom jednostavnom metodom moguće je dobiti određenu strukturu pora te veličinu i oblik čestica silike SBA-15. [28] Ovaj tip silike sintetiziran je prvi put 1998. godine. Zbog dobrih svojstava pronalazi primjenu u katalizi, adsorpciji, imobilizaciji te kromatografiji. [29]



Slika 11. Shematski prikaz rasporeda pora u SBA-15 [29]

Silika čestice tipa MCF imaju pore promjera 10 – 50 nm raspoređene u tri dimenzije i međusobno povezane prozorima (Slika 12.). [5] Silika ovog tipa pokazala je veliki adsorpcijski kapacitet za biomolekule. [29] Istraživanja su pokazala da je specifična aktivnost imobiliziranog enzima veća u slučaju ovog tipa silike za razliku od MCM-41 i SBA-15. U slučaju MCM-41 i SBA-15 enzim će se vezati samo na vanjsku površinu čestice silike za razliku od MCF koji ima veće pore i stoga je omogućeno vezanje enzima i unutar strukture čestice. [30] Velike pore koje su međusobno povezane u strukturi čestice omogućuju nesmetan prolaz supstrata i produkata. [31] Prosječna specifična površina MCF silike je $550 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. [32]



Slika 12. Trodimenzionalna struktura MCF silika čestica [31]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Aparatura

Analitička vaga

Za vaganje uzoraka korištena je analitička vaga *Shimadzu* (Slika 13.).



Slika 13. Analitička vaga *Shimadzu*

Liofilizator

Za proces sušenja uzoraka MCF mezoporozne silike nakon sinteze korišten je liofilizator *Labconco Free Zone* (Slika 14.).



Slika 14. Liofilizator *Labconco Free Zone*

Liofilizacija uključuje dva glavna procesa: proces zamrzavanja otapala, u kojem se do 95% otapala pretvori u krutinu, i proces sušenja u kojem se uklanja većina zamrznutog i nezamrznutog otapala. Proces sušenja može se podijeliti u dva koraka: primarno sušenje (sublimacija) i sekundarno sušenje (isparavanje). Tijekom procesa zamrzavanja većina otapala (80 – 95 %) prelazi u krutu fazu, dok ostatak otapala (5 – 20 %) zaostaje u

koncentriranoj otopini tvari. Ukoliko ne dođe do razdvajanja ove dvije faze, provođenje procesa liofilizacije nije moguće. Nakon zamrzavanja slijedi proces sušenja u kojem zamrznuto otapalo sublimira zbog niskog tlaka u posudi koji je puno niži od tlaka pare krutog otapala pri zadanoj temperaturi. U drugom koraku sušenja isparava preostalo otapalo iz otopine tvari, uzrokovano razlikom temperatura pri zadanom tlaku. [33]

Spektrofotometar

Spektroskopija je grana znanosti koja proučava interakciju tvari i elektromagnetskog zračenja. UV-VIS spektroskopija mjeri zračenje u ultraljubičastom (180 – 480 nm) i vidljivom (400 – 780 nm) dijelu spektra. UV-VIS spektroskopska tehnika naziva se i spektrofotometrija. UV-VIS spektrofotometar se koristi za mjerenje količine zračenja koju je tvar apsorbirala, emitirala ili reflektirala pri određenoj valnoj duljini te se time određuje kvantitativan sastav mjenenog analita u otopini. Količina apsorbiranog zračenja, A , raste s povećanjem koncentracije analita, c , i povećanjem puta prolaska zračenja, L . Navedene veličine međusobno su povezane jednadžbom 3. [34]

$$A = \alpha * c * L \quad (3)$$

U prikazanoj jednadžbi oznaka A je apsorbancija, α je apsorpcijski koeficijent, c je koncentracija analita, a L je duljina puta prolaska zračenja. Apsorpcijski koeficijent neke tvari ovisi o valnoj duljini zračenja. Njegova vrijednost se uzima za valnu duljinu pri kojoj je apsorpcija zračenja najveća. Molarni apsorpcijski koeficijent, ε , je apsorpcijski koeficijent za koncentraciju analita od 1 mol L⁻¹ i duljini puta zračenja od 1 cm. Kada apsorpcijski koeficijent, α , u jednadžbi 3 zamijenimo molarnim apsorpcijskim koeficijentom, ε , dobivamo jednadžbu 4 koja se naziva Lambert Beerov zakon. [34]

$$A = \varepsilon * c * L \quad (4)$$

Transmitacija, T , je dio zračenja koji je prošao kroz uzorak i prikazuje se kao omjer intenziteta izlaznog, I , i ulaznog zračenja, I_0 . (jedn. 5). [34]

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (5)$$

U prikazanoj jednadžbi 5 pretpostavlja se da se količina raspšene i reflektirane svjetlosti približava vrijednosti nula. Za otopine, transmitacija, T , je povezana sa apsorbancijom, A , kako je prikazano u jednadžbi 6. [34]

$$A = - \log \frac{I}{I_0} \quad (6)$$

U ovom radu za određivanje koncentracije proteina u otopini korišten je UV-VIS spektrofotometar *Shimadzu UV-1601*.

Centrifuga

Za separaciju uzoraka korištena je centrifuga *Hettich Universal 320R* (Slika 15.).

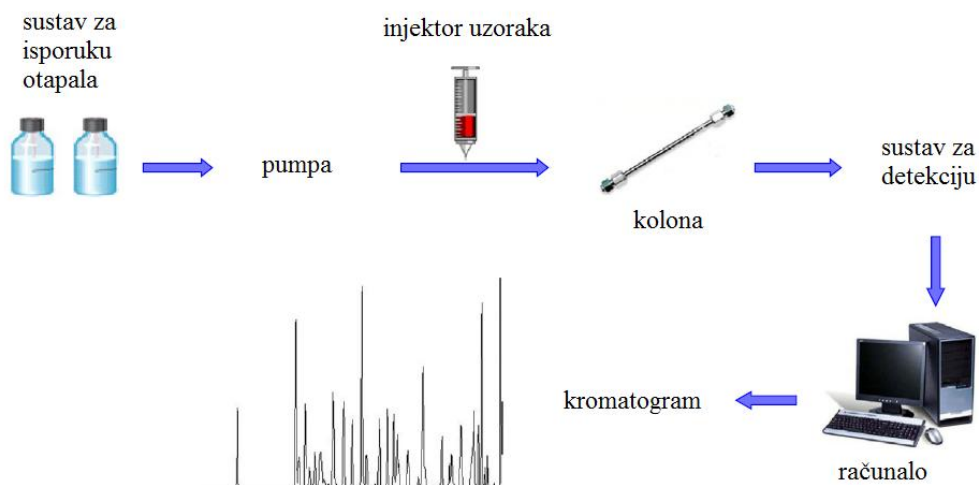


Slika 15. Centrifuga *Hettich Universal 320R*

HPLC uređaj

HPLC (eng. *high-performance liquid chromatography*) uređaj se može koristiti za preparativnu ili analitičku svrhu. Kao preparativna tehnika koristi se za pročišćavanje jedne komponente iz smjese različitih komponenti. Različite komponente izlaze u različitim frakcijama te se odvojeno prikupljaju. Za razliku od preparativne tehnike, u analitičkoj tehnici eluent se ne prikuplja nego ulazi u detektor za analizu koji može biti sastavni dio uređaja, ili se eluent usmjerava u drugi uređaj kao npr. maseni spektrometar. [35]

HPLC uređaj se sastoji od sustava za isporuku otapala, pumpe, injektora uzoraka, kolone, sustava za detekciju te računala za obradu podataka (Slika 16.). [36]



Slika 16. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) [36]

HPLC analiza se temelji na putovanju komponenti različitim brzinama kroz stacionarnu fazu nošenih mobilnom fazom kako je opisano u poglavlju 3.4.7. Za mobilnu fazu najčešće se koriste dva otapala, voda i organsko otapalo (npr. acetonitril ili metanol). Ako su komponente uzorka stabilne pri niskoj pH vrijednosti, tada se u mobilnu fazu može dodati i 0,1% otopine mravlje ili trifluor octene kiseline (TFA). Kiselina se dodaje jer je većina organskih molekula stabilnija u skroz protoniranom stanju. Tijekom procesa kromatografije u HPLC uređaju izmjenjuje se sastav mobilne faze od one u kojoj udjelom dominira voda, do faze u kojoj dominira organsko otapalo. Gradijentnom izmjenom otapala u mobilnoj fazi moduliraju se interakcije molekula analita sa stacionarnom fazom. [35]

Stacionarna faza nalazi se u koloni duljine 10 – 30 cm i promjera 2 – 5 mm. Kolona može biti punjena krutinom, gelom ili poroznim česticama. [36]. Uobičajena stacionarna faza za analizu organskih molekula se sastoji od nerazgranatih alkana sa 18 ugljikovih atoma vezanih za sferične čestice promjera 2,5 – 10 μm . [35] Detektor za HPLC analizu mora biti odabran prema vrsti analita koji će se detektirati. Najčešći detektori koji se koriste u HPLC analizi su spektrofotometar, UV-detektor, fluorescentni detektor, detektor indeksa loma, maseni detektor te detektor za raspršenu svjetlost u uparenom uzorku. [36]

U ovom radu korišten je *Shimadzu* HPLC uređaj sa *LiChrospher kolonom C18* i UV detektorom. Eluenti koji su korišteni su acetonitril (ACN) sa 0,1 % TFA i voda sa 0,1 % TFA. U HPLC uređaju analizirani su uzorci reaktanata i produkata reakcije aldole adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane enzimom DERA.

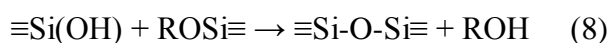
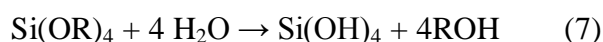
Ostala aparatura

Za žarenje uzoraka MCF mezoporozne silike korištena je peć za žarenje *Nabertherm*. Za homogenizaciju uzoraka korišteni su: homogenizator *MS2 Minishaker IKA*, tresilica *Tehtnica Vibromix 203EVT* te magnetska mješalica *IKA-COMBIMAG RCT*.

3.2. Sinteza MCF mezoporozne silike sol-gel metodom

Sol-gel metoda se temelji na polikondenzaciji otopine soli te se sastoji od dva koraka. U prvom koraku se formira suspenzija krutine u tekućini hidrolizom i polikondenzacijom prekursora, a u drugom koraku dolazi do stvaranja gela. [37]

Sol-gel proces započinje stvaranjem otopine koja sadrži komponente s metalom (npr. metalni alkoksidi), vodu (sredstvo za hidrolizu), alkohol (otapalo) te kiselinu ili bazu kao katalizator. Komponente s metalom podliježu reakciji hidrolize (jedn. 7) i polikondenzacije (jedn. 8) pri temperaturi blizu sobne pri čemu nastaje sol. [38] Sol je koloidna suspenzija krutina dispergiranih u tekućoj fazi koje mogu kondenzirati. [39]



U sljedećem koraku čestice se povezuju u strukturu gela koji sadrži vodu i otapala. Isparavanjem vode i otapala nastaje suhi gel koji pri visokim temperaturama prelazi u okside kao konačan produkt sinteze. [38] U ovom radu sol-gel metodom sintetizirana je MCF mezoporozna silika manjih i većih pora.

Postupak:

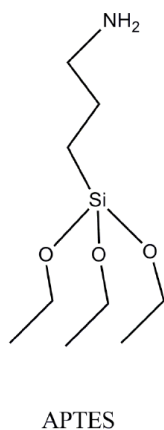
Za sintezu mezoporozne silike korišten je Pluronic-123 kao predložak za stvaranje jednolike raspodjele pora. 1 g Pluronic-123 otopljeno je u 75 mL otopine HCl-a koncentracije 1,6 M na magnetnoj mješalici pri sobnoj temperaturi. Trimetilbenzen (TMB) se dodaje kako bi se postiglo stvaranje pora (veća količina TMB u odnosu na Pluronic-123 daje veće pore). U otopinu je zatim dodano 2 g TMB za sintezu MCF silike manjih pora, odnosno 3 g TMB-a za sintezu MCF silike većih pora. Potom su dodana 23 mg NH₄F za povećanje prozora koji povezuju pore, ali bez utjecaja na samu veličinu pora. Otopina je miješana 45 min na magnetnoj mješalici pri temperaturi 37 °C. Kao izvor silicija korišten je tetraetoksisilan

(TEOS). U otopinu je dodano 4,731 mL TEOS-a prilikom čega dolazi do kondenzacije, rasta i povezivanja čestica SiO₂ u trodimenzionalnu strukturu. Otopina je miješana na magnetnoj mješalici 20 h na 37 °C. Nakon miješanja, zamućena smjesa je držana u zatvorenoj tikvici 24 h na 110 °C u kupelji silikonskog ulja bez miješanja. Smjesa je potom centrifugirana 20 min. Talog je ispran vodom te osušen u liofilizatoru. Konačno, predložak je uklonjen žarenjem na zraku 6 h do 350 °C i zatim 4 h na 350 °C.

3.3. Imobilizacija enzima DERA na mezoporoznu siliku

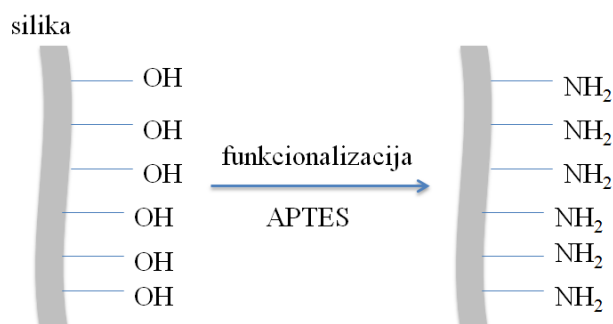
3.3.1. Funkcionalizacija mezoporožne silike pomoću 3-aminopropiltrioksisilana

Radi poboljšanja primjene nanočestica često se provodi funkcionalizacija površine kako bi se uvele nove skupine, a najčešće se koristi 3-aminopropiltrioksisilan (APTES) (Slika 17.) kojim se uvode amino skupine. U mnogo svrha potrebna je visoka pokrivenost nanočestica aminoskupinama kako bi se povećao broj aktivnih mjesta na površini. Amino skupine reagiraju sa proteinima te se stoga u svrhu imobilizacije enzima koristi silika funkcionalizirana amino skupinama. Funkcionalizacija površine silike se može provoditi u tekućoj ili plinskoj fazi. Funkcionalizacijom u tekućoj fazi kao što su otopine etanol/voda, aceton/voda ili samo voda, prvo hidroliziraju etoksi skupine APTES-a te potom formiraju Si-O-Si veze sa silanolnim skupinama na nosiocu. Proces formiranja sloja APTES-a na površini silike se sastoji od više koraka te je osjetljiv na procesne uvjete. Funkcionalizirani sloj uključuje silane vezane kovalentnim te slabim vezama na površini nosioca. Samo kovalentno vezan APTES ostaje vezan na površini silike dok silani vezani slabim vezama dalje reagiraju ili se desorbiraju. [40]



Slika 17. Strukturni prikaz APTES-a [41]

U ovom radu provedena je funkcionalizacija površine obje sintetizirane MCF mezoporozne silike pomoću 3-aminopropiltrietoksisilana (APTES) u etanolu (Slika 18.) čime su uvedene amino skupine na površinu nosioca u svrhu kovalentnog vezanja enzima DERA.



Slika 18. Shema funkcionalizacije površine silike pomoću APTES-a

Postupak:

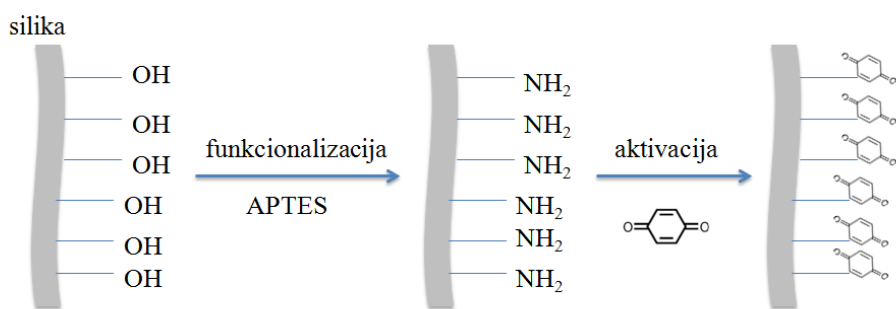
Na 0,5 g mezoporozne silike dodano je 50 mL 99 % etanola te 3,3 mL APTES-a. Smjesa je stavljena na miješanje 24 h u inertoj atmosferi dušika pri 80 °C uz refluks (Slika 19). Nakon funkcionalizacije uzorak silike je sušen u sušioniku na 60 °C.



Slika 19. Aparatura za funkcionalizaciju površine mezoporozne silike u inertoj atmosferi dušika uz refluks

3.3.2. Aktivacija mezoporozne silike

Nakon funkcionalizacije površine MCF mezoporozne silike APTES-om provedena je aktivacija pomoću benzokinona. Benzokinon se kovalentnim vezama veže za amino skupine nosioca te služi kao molekula na koju će se kovalentno vezati enzim (Slika 20.).



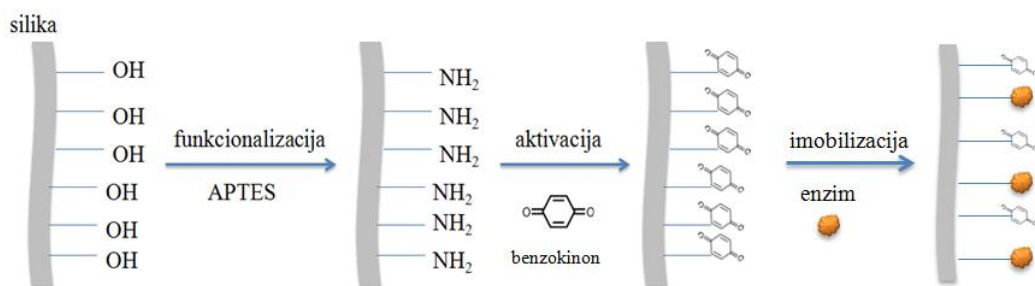
Slika 20. Shematski prikaz aktivacije površine silike pomoću benzokinona

Postupak:

Za aktivaciju funkcionalizirane mezoporozne silike pripravljena je otopina benzokinona koncentracije 1,5 mM u fosfatnom puferu (pH = 6, $c = 0,1$ M). 1 mL pripravljene otopine benzokinona dodano je na 25 mg funkcionaliziranog nosioca. Pripravljena suspenzija je miješana 1 h na tresilici pri sobnoj temperaturi. Nakon miješanja suspenzija je centrifugirana te je nosioc ispran puferom tri puta kako bi se uklonio neizreagirani benzokinon. Prije imobilizacije enzima nosioc je ispran imobilizacijskim puferom.

3.3.3. Optimiranje uvjeta imobilizacija enzima DERA na mezoporoznu siliku

Nakon provedene funkcionalizacije i aktivacije nosioca slijedi postupak imobilizacije enzima DERA kovalentnim vezanjem za nosioc. Imobilizacija enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku manjih pora provedena je u puferima koncentracija 0,05, 0,1 i 0,2 M pri pH vrijednostima 6, 6,5, 7, 7,5 i 8 u svrhu optimiranja uvjeta imobilizacije. Za imobilizaciju enzima DERA na MCF siliku većih pora odabran je pufer koji je pokazao optimalne rezultate pri imobilizaciji enzima na mezoporoznu siliku manjih pora. Enzim DERA se kovalentno veže za prethodno aktivirani nosioc (Slika 21.).



Slika 21. Shematski prikaz imobilizacije enzima na siliku

Postupak:

Imobilizacija enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku provedena je miješanjem 100 μL otopine enzima koncentracije 25 mg mL^{-1} i 1000 μL pufera. Puferi koji su korišteni za imobilizaciju enzima na MCF siliku manjih pora su puferi koncentracija 0,05, 0,1 i 0,2 M te pH vrijednosti 6, 6,5, 7, 7,5 i 8. Korišten pufer za imobilizaciju enzima na siliku većih pora je pufer pH vrijednosti 6,5 i koncentracije 0,05 M. Suspenzija je miješana 2,5 h na tresilici pri sobnoj temperaturi. Nakon miješanja nosioc je ispran fosfatnim puferom ($\text{pH} = 6$, $c = 0,1 \text{ M}$). Koncentracija enzima u temeljnoj otopini enzima i otopini enzima nakon imobilizacije određena je Bradford metodom kako je opisano u poglavlju 3.4.3.

3.4. Analitičke metode

3.4.1. BET (Brunauer, Emmet i Teller) metoda

Bitna karakteristika nanomaterijala je velika specifična površina koja može utjecati na način primjene takvih materijala. Specifična površina materijala, SP , definira se kao omjer ukupne površine, P , i ukupne mase materijala, M . (jedm. 9) [42]

$$SP = \frac{P}{M} \quad (9)$$

Na specifičnu površinu materijala utječe veličina čestica i poroznost materijala (smanjenjem veličine čestica i povećanjem poroznosti raste specifična površina). Specifična površina materijala određuje se fizikalnom adsorpcijom plina na površinu materijala [43], a najčešće se koristi BET (Brunauer, Emmet i Teller) metoda koja se temelji na adsorpciji dušika pri niskoj temperaturi na svu dostupnu unutarnju i vanjsku površinu materijala. [42] Pomoću ove metode procjenjuje se prekrivenost površine (količina plina ili veličina i broj molekula) monoslojem adsorbiranih molekula pomoću čega se računa specifična površina. Na adsorpciju molekula utječe tlak plina, temperatura te jačina međumolekulskih interakcija. [43] U ovom radu uzorak MCF mezoporožne silike (manjih pora) analiziran je BET metodom te su dobivene vrijednosti specifične površine, specifičnog volumena pora te veličina pora.

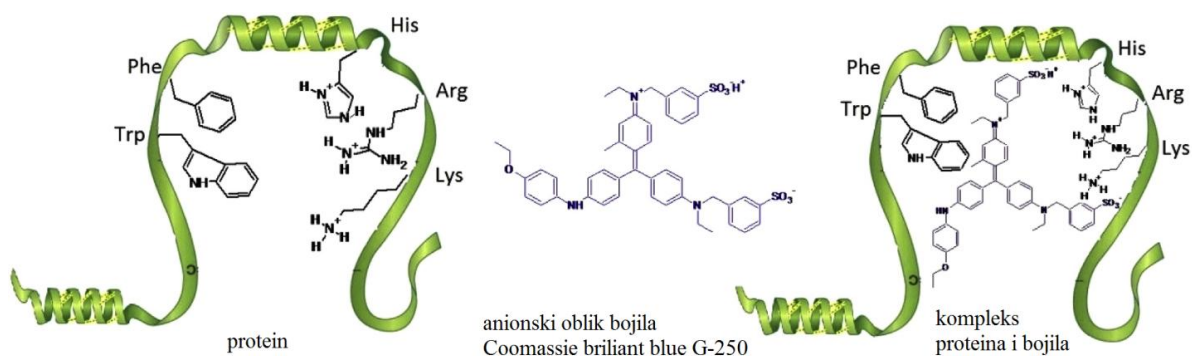
3.4.2. SEM (Skenirajući elektronski mikroskop)

Mikroskopija je tehnika koja se koristi za vizualizacija objekata koji nisu vidljivi golim okom. [44] Za karakterizaciju veličine i oblika nanočestica koristi se skenirajući elektronski mikroskop (SEM). Pomoću SEM uređaja analizom čestica dobiva se njihov 2D slikoviti prikaz te određeni broj informacija vezanih uz morfologiju čestica. [45]

SEM uređaj se sastoji od dva glavna dijela. U koloni se emitiraju elektroni koji putuju do uzorka, a potom detektor hvata signal koji je nastao kao rezultat interakcije elektrona sa uzorkom. Detektori su uređaji koji pretvaraju jedan tip signala u električni signal. Drugi dio uređaja je elektronički sistem koji kvantificira električni signal iz detektora i pretvara ga u sliku ili graf. [44] U ovom radu pomoću SEM uređaja analizirana je MCF mezoporozna silika manjih pora.

3.4.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Bradford metoda je kolorimetrijska metoda kojom se određuje koncentracija proteina u otopini. Ovu metodu karakterizira osjetljivost, lakoća korištenja te brza analiza uzorka. Bradford metoda temelji se na interakciji bojila *Coomassie brilliant blue G-250* i proteinskih skupina (arginina, lizina, histidina) u kiselom mediju pri čemu nastaje kompleks između bojila i proteina (Slika 22.). Vezanje proteina i bojila u kompleks je ravnotežna reakcija. [46] Njihovo povezivanje pripisuje se van der Waalsovima silama i hidrofobnim interakcijama. [47] Valna duljina za apsorpcijski maksimum nastalog kompleksa je 595 nm. [46] Vezanjem proteina i bojila apsorpcijski maksimum se pomiče sa 465 nm na 595 nm zbog stabiliziranja anionskog oblika bojila. [48]



Slika 22. Shematski prikaz nastanka kompleksa između proteina i bojila *Coomassie brilliant blue G-250* [46]

Izrada baždarnog dijagrama:

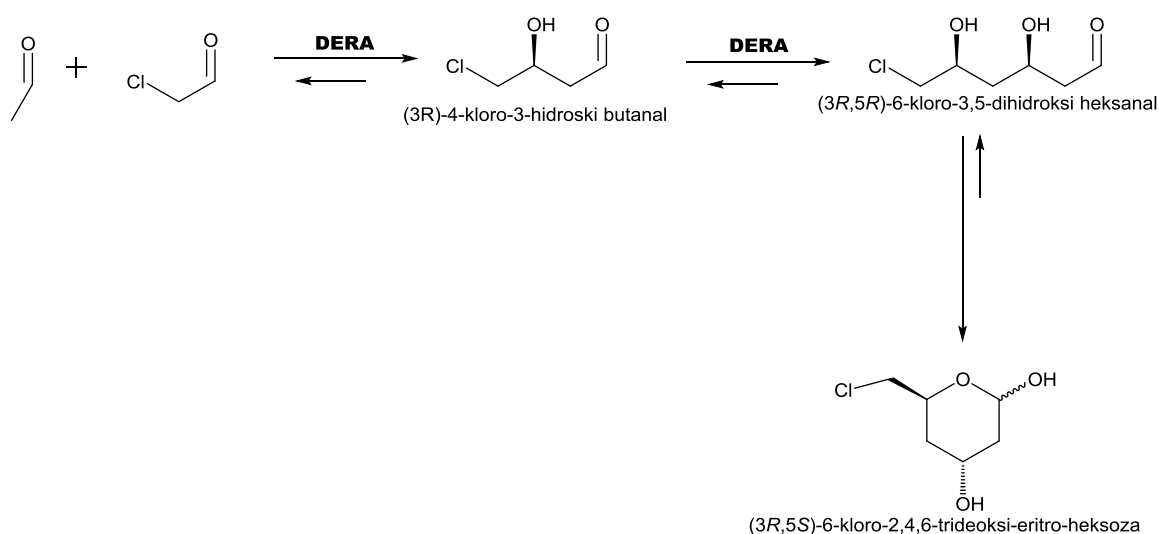
Kako bi se odredila nepoznata koncentracija proteina u uzorku potrebno je izraditi baždarni dijagram. Za izradu baždarnog dijagrama pripremljene su standardne otopine albumina (BSA) koncentracija $1 \mu\text{g L}^{-1}$, $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$, $5 \mu\text{g L}^{-1}$ i $7 \mu\text{g L}^{-1}$. Pripremljena su po tri uzorka od $800 \mu\text{L}$ otopine albumina svake koncentracije te je dodano $200 \mu\text{L}$ Bradfordovog reagensa. Bradfordov reagens se sastoji od 100 mg bojila *Coomassie brilliant blue G-250*, 50 mL 95% etanola, 100 mL 85 % fosforne kiseline i 850 mL redestilirane vode. 4 minute nakon pripreme uzorka izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini 595 nm . Za svaku vrijednost koncentracije albumina od tri uzorka uzeta je srednja vrijednost apsorbancije. Dobiven je baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina (Prilog, Slika 36.).

Postupak određivanja koncentracije enzima u uzorku:

U ovom radu Bradford metodom određivana je koncentracija enzima u temeljnoj otopini i otopini poslije imobilizacije. Uzorku otopine enzima od $800 \mu\text{L}$ dodano je $200 \mu\text{L}$ Bradfordovog reagensa. Nakon 4 min od pripreme uzorka izmjerena je apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini 595 nm . Koncentracija enzima u uzorku izračunata je pomoću baždarnog dijagrama (Prilog, Slika 36.).

3.4.4. Određivanje aktivnosti enzima DERA

Aktivnost enzima je ispitana provedbom reakcije aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida (Slika 23.).



Slika 23. Reakcija aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane enzimom DERA

Reakcijom jedne molekule acetaldehida i kloroacetaldehida nastaje međuprodukt 4-kloro-3-hidroksibutanal koji potom reagira sa još jednom molekulom acetaldehida pri čemu nastaje produkt 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal koji s vremenom ciklizira u stabilniji oblik.

Određivanje aktivnosti enzima DERA u temeljnoj otopini enzima

Reakcijom aldolne adicije određena je aktivnost slobodnog enzima.

Postupak:

Pripremljena je otopina aldehida (acetaldehida i kloroacetaldehida) koncentracije $c_{\text{acetaldehid}} = 200 \text{ mM}$ i $c_{\text{kloroacetaldehid}} = 100 \text{ mM}$ u fosfatnom puferu ($\text{pH} = 6$, $c = 0,1 \text{ M}$). Reakcija aldolne adicije pokrenuta je miješanjem $100 \mu\text{L}$ otopine aldehida i $100 \mu\text{L}$ otopine enzima ($\gamma_{\text{enzim}} = 25 \text{ mg mL}^{-1}$). Reakcijska smjesa je homogenizirana te miješana na tresilici. Aktivnost enzima u reakciji aldolne adicije praćena je u vremenskom intervalu od 1,5 minute od početka reakcije. Za vrijeme praćenja aktivnosti uzimani su uzorci u određenim vremenskim intervalima te su analizirani na HPLC uređaju kako je opisano u poglavlju 3.4.7. Aktivnost enzima određena je iz promjene koncentracije međuprodukta i produkta s vremenom.

Određivanje aktivnosti imobiliziranog enzima DERA u reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida

Aktivnost imobiliziranog enzima DERA određena je provedbom reakcije aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida.

Postupak:

Reakcija aldolne adicije pokrenuta je dodavanjem $100 \mu\text{L}$ otopine aldehida ($c_{\text{acetaldehid}} = 200 \text{ mM}$, $c_{\text{kloroacetaldehid}} = 100 \text{ mM}$) na 25 mg nosioca sa imobiliziranim enzimom DERA. Smjesa je homogenizirana te stavljena na tresilicu na miješanje. Aktivnost imobiliziranog enzima praćena je u vremenskom intervalu od 1 h od početka reakcije. Za vrijeme praćenja aktivnosti imobiliziranog enzima uzimani su uzorci u pravilnim vremenskim intervalima te analizirani na HPLC uređaju kako je opisano u poglavlju 3.4.7. Aktivnost imobiliziranog enzima je određena iz promjene koncentracije međuprodukta i produkta s vremenom. Nakon provedene reakcije aldolne adicije nosioc je ispran fosfatnim puferom ($\text{pH} = 6$, $c = 0,1 \text{ M}$).

Određivanje aktivnosti imobiliziranog enzima DERA u ponovljenoj reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida

Preostala aktivnost imobiliziranog enzima DERA ispitana je ponovljenom reakcijom aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida.

Postupak:

Druga reakcija aldolne adicije pokrenuta je dodavanjem 100 μ L otopine aldehida ($C_{\text{acetaldehid}} = 200 \text{ mM}$, $C_{\text{kloroacetaldehid}} = 100 \text{ mM}$) na 25 mg nosioca sa imobiliziranim enzimom DERA. Smjesa je homogenizirana te stavljena na tresilicu na miješanje. Aktivnost imobiliziranog enzima u ponovljenoj reakciji praćena je u vremenskom intervalu od 15 min od početka reakcije. Za vrijeme praćenja uzimani su uzorci u pravilnim vremenskim intervalima te analizirani na HPLC uređaju kako je opisano u poglavlju 3.4.7. Aktivnost imobiliziranog enzima u ponovljenoj reakciji je određena iz promjene međuprodukta i produkta s vremenom.

3.4.5. Određivanje koncentracije supstrata i produkata reakcije aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida pomoću HPLC uređaja

HPLC (eng. *high-performance liquid chromatography*) je separacijska tehnika u kojoj se komponente razdvajaju na temelju različitih interakcija sa pokretnom i stacionarnom fazom. Različite komponente uzorka su nošene pokretnom fazom, koja je tekuća, te putuju kroz stacionarnu fazu. Pokretna i stacionarna faza su međusobno nemješive. Različiti analiti imaju različite interakcije sa pokretnom i stacionarnom fazom. Ako analit ima jaku interakciju sa stacionarnom fazom, u tom slučaju će se duže zadržavati na stacionarnoj fazi za razliku od analita koji ima slabe interakcije sa stacionarnom fazom i time će brže putovati kolonom. Ovisno o jačini interakcija sa fazama svaki analit ima određeno vrijeme zadržavanja te stoga komponente do detektora dolaze u različito vrijeme. Vrijeme koje je potrebno da analit dođe do detektora od trenutka inokulacije naziva se vrijeme zadržavanja, t_R .

Rezultat analize uzoraka na HPLC uređaju je kromatogram. Na x-osi kromatograma je prikazano vrijeme, a na y-osi jačina odaziva signala detektora. Položaj svakog pika na kromatogramu ukazuje na vrijeme zadržavanja komponente, t_R , a površina ispod pika direktno je proporcionalna koncentraciji komponente u analitu. [35]

U ovom radu analizirani su uzorci reaktanata i produkata reakcije aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane enzimom DERA (Slika 23.). Prije analize uzorci su derivatizirani s o-benzilhidroksiaminom. Postupak derivatizacije se provodio na načina da je 5 μL uzorka pomiješano s 50 μL derivatizacijske otopine koja se sastoji od 0,1 g o-benzilhidroksiamina, 3,3 mL piridina, 1,5 mL metanola te 0,2 mL H_2O . Smjesa je miješana 20 min na tresilici. Nakon miješanja dodano je 450 mL metanola za zaustavljanje postupka derivatizacije. Smjesa je potom centrifugirana 5 min na 14000 rpm , te se supernatant koristiona za analizu na HPLC-u. Analiza uzoraka na HPLC uređaju provedena je pri temperaturi 30 $^{\circ}\text{C}$ s protokom mobilne faze 1,2 mL min^{-1} kroz kolonu. Mobilna faza se sastojala od dva otapala: A (0,1 % TFA u vodi) i B (0,1 % TFA u acetonitrilu). Mobilna faza je tijekom analize mijenjala sastav tako što je prve 22 min gradijent eluenta B padao sa 90% na 28,4%, a od 22 do 25 min gradijent eluenta B je rastao od 28,4% do 90%. Detekcija je provedena pri valnoj duljini 215 nm u UV-detektoru.

Kao rezultat analize dobiven je kromatogram sa vremenima zadržavanja supstrata (acetaldehida i kloroacetaldehida), međuprodukta (4-kloro-3-hidroksibutanala) i produkta (6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala). Primjer kromatograma nalazi se u prilogu (Slika 39.). Vremena zadržavanja su: za acetaldehid (AA) 10,9 min, za kloroacetaldehid (CAA) 12,7 min, za 4-kloro-3-hidroksibutanal (4C-Cl) 10,3 min i za 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal (6C-Cl) 9,1 min.

Baždarni dijagrami napravljeni su analizom uzoraka poznatih koncentracija acetaldehida i kloroacetaldehida čime je dobiven odnos površine ispod grafa i koncentracije navedenih komponenti. Analizom uzoraka nepoznatih koncentracija acetaldehida i kloroacetaldehida određene su površine ispod grafa te su potom izračunate koncentracije pomoću baždarnog dijagrama (Prilog, Slika 37.-38.).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je optimirati uvjete imobilizacije aldolaze na mezoporoznu siliku. Metoda korištena za imobilizaciju enzima DERA je kovalentno vezanje enzima na čvrsti nosioc. U ovu svrhu sintetizirana je MCF mezoporozna silika većih i manjih pora sol-gel metodom. MCF silika funkcionalizirana je APTES-om te aktivirana benzokinonom. U trećem koraku imobiliziran je enzim DERA kovalentnim vezanjem.

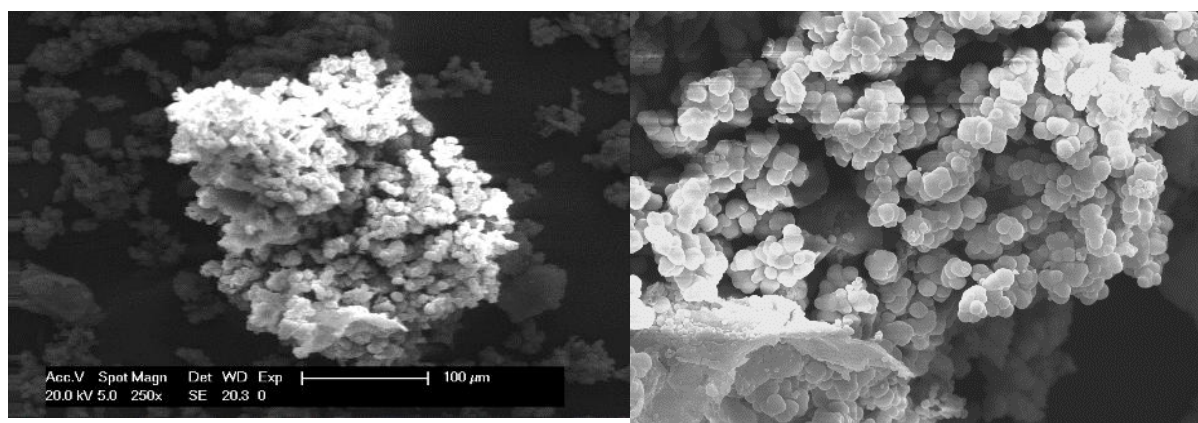
U svrhu optimiranja uvjeta imobilizacije aldolaze na mezoporoznu siliku proces imobilizacije enzima DERA proveden je u puferima različitih koncentracija i pH vrijednosti. Uspješnost imobilizacije određena je parametrima iskorištenja, efikasnosti i preostale aktivnosti. Prema vrijednostima parametara uspješnosti, za optimalne uvjete imobilizacije odabran je pufer koncentracije 0,05 M i pH vrijednosti 6,5. Za odabrani pufer ispitana je uspješnost imobilizacije enzima DERA na MCF siliku većih pora.

4.1. Rezultati BET i SEM analize

Sol-gel procesom sintetizirana je MCF mezoporozna silika manjih i većih pora. Uzorak MCF silike manjih pora analiziran je BET i SEM metodom. Pomoću BET metode određena je specifična površina, specifični volumen pora te veličina pora (Tablica 2.), a pomoću SEM analize dobiven je 2D slikoviti prikaz strukture čestica (Slika 24.).

Tablica 2. Rezultati BET analize za MCF mezoporoznu siliku manjih pora

Specifična površina/ $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	Specifični volumen pora/ $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	Veličina pora/ nm
171	0,48	15,52 nm



Slika 24. 2D slikoviti prikaz strukture MCF mezoporozne silike manjih pora kao rezultat SEM analize

4.2. Optimiranje uvjeta imobilizacije enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku

U svrhu optimiranja uvjeta imobilizacije aldolaze provedena je imobilizacija enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku manjih pora u puferima koncentracija 0,05, 0,1 i 0,2 M pri pH vrijednostima 6, 6,5, 7, 7,5 i 8. Izračunati su parametri uspješnosti (iskorištenje, efikasnost i preostala aktivnost) prema kojima su odabrani optimalni uvjeti. Optimalni uvjeti su potom ispitani za imobilizaciju enzima DERA na MCF siliku većih pora.

Bradford metodom određena je koncentracija enzima u temeljnoj otopini, γ_0 , i otopini nakon imobilizacije, γ . Iz dobivenih vrijednosti koncentracija enzima u temeljnoj otopini i otopini nakon imobilizacije enzima izračunata je imobilizacijska aktivnost prema jednadžbi 10.

$$\text{imobilizacijska aktivnost} = \gamma_0(\text{enzim}) - \gamma(\text{enzim}) \quad (10)$$

Reakcijom aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida (Slika 23.) ispitane su aktivnosti:

- enzima DERA u temeljnoj otopini enzima
- imobiliziranog enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku
- imobiliziranog enzima DERA u ponovljenoj reakciji

U reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane enzimom DERA nastaje međuprodukt 4-kloro-3-hidroksibutanal koji potom reagira sa još jednom molekulom acetaldehida te nastaje produkt 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal koji s vremenom ciklizira u stabilniji oblik, 6-kloro-2,4,6-trideoksi-eritroheksozu. Aktivnost enzima dobivena je iz ovisnosti koncentracije međuprodukta (4-kloro-3-hidroksibutanal) i produkta (6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal) o vremenu. Iz ovisnosti koncentracije o vremenu dobiven je pravac čiji nagib odgovara aktivnosti enzima.

Uspješnost imobilizacije enzima određena je parametrima iskorištenja, efikasnosti i preostale aktivnosti prikazane jednadžbama:

$$\text{Iskorištenje} = \frac{\text{koncentracija enzima u temeljnoj otopini} - \text{koncentracija enzima nakon imobilizacije}}{\text{koncentracija enzima u temeljnoj otopini}} \quad (11)$$

$$\text{Efikasnost} = \frac{\text{aktivnost imobiliziranog enzima u prvoj reakciji}}{\text{iskorištenje} * \text{aktivnost slobodnog enzima}} \quad (12)$$

$$\text{Preostala aktivnost} = \frac{\text{aktivnost imobiliziranog enzima u ponovljenoj reakciji}}{\text{aktivnost imobiliziranog enzima u prvoj reakciji}} \quad (13)$$

4.2.1. MCF mezoporozna silika manjih pora

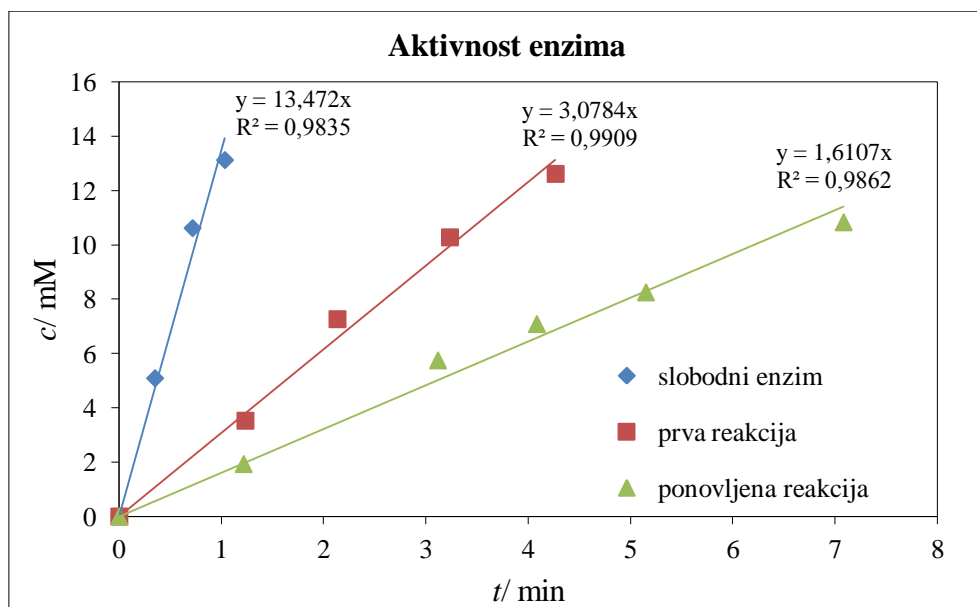
U tablici 3. su dani rezultati Bradford metode za imobilizaciju enzima DERA na MCF mezoporozi siliku manjih pora u puferima koncentracija 0,05, 0,1 i 0,2 M pri pH vrijednostima 6, 6,5, 7, 7,5 i 8. Izračunata je imobilizacijska aktivnost prema jednadžbi 10.

Tablica 3. Koncentracija enzima u temeljnoj otopini i otopini enzima nakon imobilizacije te izračunata imobilizacijska aktivnost za imobilizirani enzim DERA na MCF siliku manjih pora u puferima koncentracija 0,05, 0,1 i 0,2 M pri pH vrijednostima 6, 6,5, 7, 7,5 i 8

$c(\text{fosfatni pufer})/\text{M}$	pH	$\gamma_0(\text{enzim})/\mu\text{g L}^{-1}$	$\gamma(\text{enzim})/\mu\text{g L}^{-1}$	Imobilizacijska aktivnost $(\gamma_0 - \gamma)/\mu\text{g L}^{-1}$
0,05	6	1225,00	100,00	1125,00
	6,5	1236,00	127,00	1109,00
	7	995,00	135,00	860,00
0,1	6	772,72	70,00	702,72
	6,5	1006,00	132,00	874,00
	7	904,00	138,00	766,00
	7,5	824,00	150,00	674,00
	8	800,00	245,50	554,50
0,2	6	838,00	164,00	674,00
	6,5	1026,00	231,00	795,00
	7	586,00	145,00	441,00
	7,5	694,00	218,55	475,45
	8	940,00	285,00	655,00

Na slici 25. prikazana je grafička usporedba aktivnosti slobodnog enzima DERA, aktivnosti imobiliziranog enzima na MCF mezoporozi siliku u prvoj reakciji te u ponovljenoj reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida za ispitani imobilizacijski pufer koncentracije 0,1 M i pH vrijednosti 6 za MCF mezoporozi siliku manjih pora. Vrijednost aktivnosti enzima u reakciji sa slobodnim enzimom iznosi 13,47 U mL⁻¹, vrijednost aktivnosti imobiliziranog enzima u prvoj reakciji iznosi 3,08 U mL⁻¹, a vrijednost aktivnosti u ponovljenoj reakciji sa imobiliziranim enzimom iznosi 1,61 U mL⁻¹.

Aktivnost enzima DERA se smanjila imobilizacijom enzima na MCF mezoporoznu siliku te ponavljanjem reakcije sa imobiliziranim enzimom.



Slika 25. Grafički prikaz aktivnosti slobodnog enzima, imobiliziranog enzima u prvoj reakciji te ponovljenoj reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida (imobilizacijski pufer: $c = 0,1$ M, pH = 6; nosioc MCF mezoporozna silika manjih pora)

U tablici 4. su prikazane aktivnosti slobodnog enzima DERA, imobiliziranog enzima u prvoj te ponovljenoj reakciji aldolne adicije za imobilizirani enzim DERA na MCF siliku manjih pora u puferima koncentracija 0,05, 0,1 i 0,2 M pri pH vrijednostima 6, 6,5, 7, 7,5 i 8. Izračunata je očuvana aktivnost koja se definira kao omjer aktivnosti imobiliziranog enzima u prvoj reakciji i aktivnosti slobodnog enzima (jedn 14.).

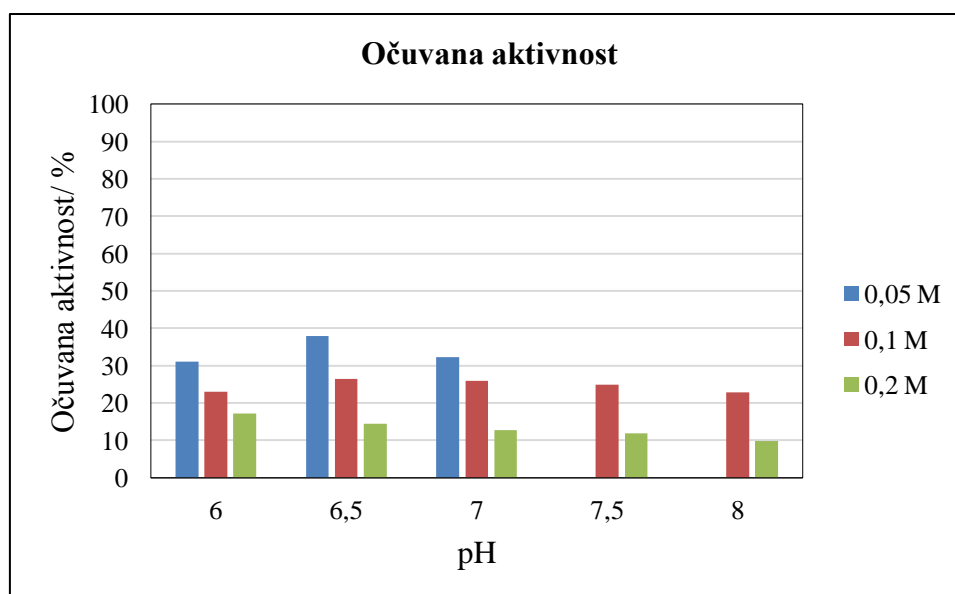
$$\text{Očuvana aktivnost} = \frac{\text{aktivnost imobiliziranog enzima u prvoj reakciji}}{\text{aktivnost slobodnog enzima}} \quad (14)$$

Tablica 4. Aktivnosti slobodnog enzima DERA, imobiliziranog enzima u prvoj reakciji te ponovljenoj reakciji aldolne adicije za MCF siliku manjih pora za imobilizirani enzim DERA na MCF siliku manjih pora u puferima koncentracija 0,05, 0,1 i 0,2 M pri pH vrijednostima 6, 6,5, 7, 7,5 i 8 te očuvana aktivnost

c (fosfatni pufer)/ M	pH	Aktivnost slobodnog enzima/ U mL ⁻¹	Aktivnost imobiliziranog enzima (prva reakcija)/ U mL ⁻¹	Aktivnost imobiliziranog enzima (ponovljena reakcija)/ U mL ⁻¹	Očuvana aktivnost/ %
0,05	6	17,14	5,32	3,41	31,03

	6,5	17,00	6,44	4,10	37,88
	7	18,20	5,87	4,77	32,25
0,1	6	13,40	3,08	1,61	22,98
	6,5	12,30	3,26	2,28	26,50
	7	12,90	3,35	2,14	25,97
	7,5	13,00	3,24	2,03	24,92
	8	13,00	2,98	1,84	22,92
0,2	6	14,40	2,47	1,80	17,15
	6,5	12,80	1,85	1,00	14,45
	7	11,55	1,46	1,00	12,64
	7,5	11,80	1,41	0,70	11,94
	8	12,97	1,28	0,80	14,16

Na slici 26. prikazan je graf ovisnosti očuvane aktivnosti o koncentraciji i pH vrijednosti imobilizacijskog pufera za MCF mezoporoznu siliku manjih pora. Povećanjem koncentracije imobilizacijskog pufera smanjuje se vrijednost očuvane aktivnosti.



Slika 26. Graf ovisnosti očuvane aktivnosti o koncentraciji ($c = 0,05, 0,1, 0,2$ M) i pH vrijednosti ($\text{pH} = 6, 6,5, 7, 7,5, 8$) imobilizacijskog pufera za imobilizirani enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku manjih pora

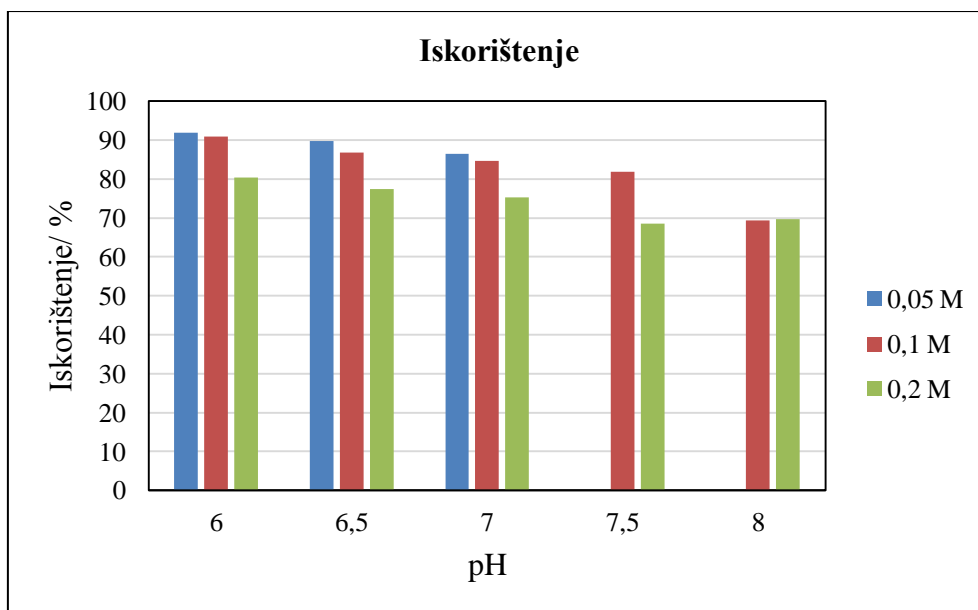
U svrhu određivanja uspješnosti imobilizacije enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku manjih pora izračunati su parametri uspješnosti prema jednažbama 11, 12, i 13 za

imobilizacijske puferne koncentracije 0,05, 0,1 i 0,2 M i pH vrijednosti 6, 6,5, 7, 7,5 i 8 (Tablica 5.)

Tablica 5. Parametri uspješnosti imobilizacije za imobilizirani enzim DERA na MCF siliku manjih pora u puferima koncentracija 0,05, 0,1 i 0,2 M pri pH vrijednostima 6, 6,5, 7, 7,5 i 8

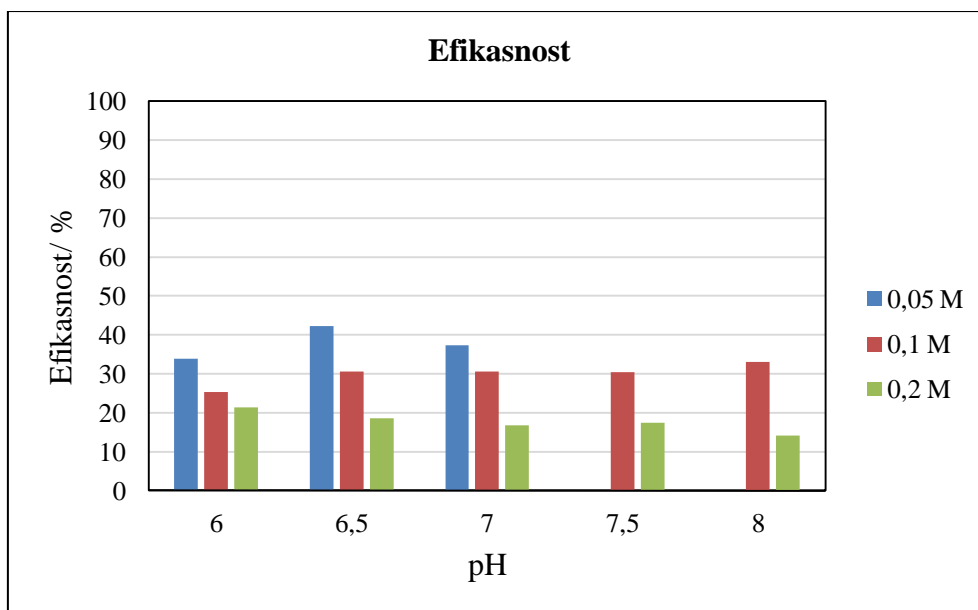
c(fosfatni pufer)/ M	pH	Iskorištenje/ %	Efikasnost/ %	Preostala aktivnost/ %
0,05	6	91,84	33,79	64,10
	6,5	89,72	42,22	63,66
	7	86,43	37,31	81,26
0,1	6	90,94	25,28	52,27
	6,5	86,88	30,51	69,94
	7	84,74	30,65	63,88
	7,5	81,80	30,47	62,65
	8	69,31	33,07	61,75
0,2	6	80,43	21,33	72,87
	6,5	77,49	18,65	54,05
	7	75,26	16,80	68,49
	7,5	68,51	17,44	49,65
	8	69,68	14,16	62,50

Iskorištenje imobilizacije enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku izračunato je prema jednadžbi 11. Na slici 27. prikazan je graf ovisnosti iskorištenja imobilizacije enzima o koncentracijama (0,05, 0,1 i 0,2 M) i pH vrijednostima (6, 6,5, 7, 7,5 i 8) imobilizacijskog pufera. Povećanjem koncentracije i pH vrijednosti imobilizacijskog pufera vrijednost iskorištenja opada. Najviša vrijednost iskorištenja imobilizacije je pri koncentraciji 0,05 M i pH vrijednosti 6 koja iznosi 91,84 %.



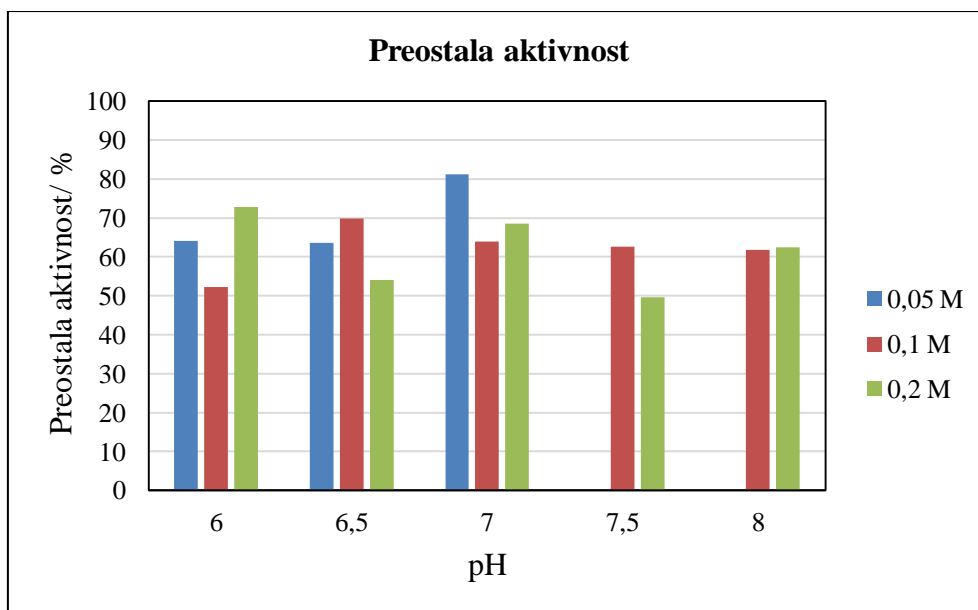
Slika 27. Graf ovisnosti iskorištenja o koncentraciji ($c = 0,05, 0,1, 0,2$ M) i pH vrijednosti (pH = 6, 6,5, 7, 7,5, 8) imobilizacijskog pufera za imobilizirani enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku manjih pora

Efikasnost imobilizacije enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku manjih pora izračunata je prema jednadžbi 12. Na slici 28. prikazan je graf ovisnosti efikasnosti imobilizacije enzima o koncentracijama (0,05, 0,1 i 0,2 M) i pH vrijednostima (6, 6,5, 7, 7,5 i 8) imobilizacijskog pufera. Povećanjem koncentracije imobilizacijskog pufera opada vrijednost efikasnosti. Najviša vrijednost efikasnosti dobivena je pri koncentraciji 0,05 M i pH vrijednosti 6,5 koja iznosi 42,22 %.



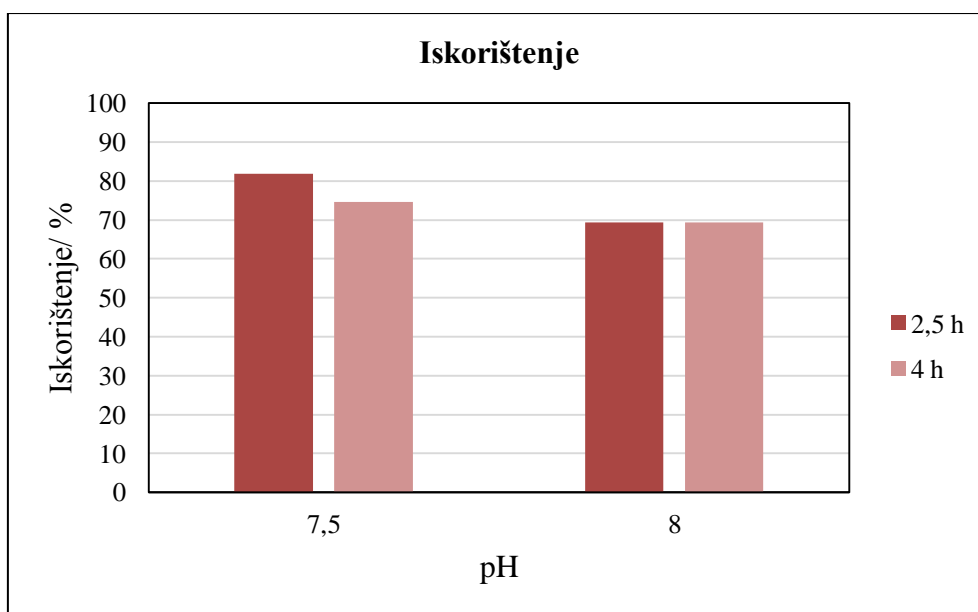
Slika 28. Graf ovisnosti efikasnosti o koncentraciji ($c = 0,05, 0,1, 0,2$ M) i pH vrijednosti (pH = 6, 6,5, 7, 7,5, 8) imobilizacijskog pufera za imobilizirani enzim DERA na MCF mezoporoznu siliku manjih pora

Preostala aktivnost izračunata je prema jednadžbi 13. Na slici 29. prikazan je graf ovisnosti preostale aktivnosti o koncentracijama (0,05, 0,1 i 0,2 M) i pH vrijednostima (6, 6,5, 7, 7,5 i 8) imobilizacijskog pufera. Za vrijednost preostale aktivnosti nije uočen određeni trend (pad ili rast vrijednosti preostale aktivnosti) u ovisnosti o koncentraciji ili pH vrijednosti imobilizacijskog pufera. Najviša vrijednost preostale aktivnosti dobivena je pri koncentraciji 0,05 M i pH vrijednosti 7 imobilizacijskog pufera koja iznosi 81,26 %, a najmanja vrijednost pri koncentraciji 0,02 M i pH vrijednosti 7,5 koja iznosi 49,65 %.



Slika 29. Graf ovisnosti preostale aktivnosti o koncentraciji ($c = 0,05, 0,1, 0,2$ M) i pH vrijednosti (pH = 6, 6,5, 7, 7,5, 8) imobilizacijskog pufera za imobilizirani enzim DERA na MCF mezoporoznu siliku manjih pora

Obzirom na uočen pad iskorištenja imobilizacije enzima povećanjem pH vrijednosti imobilizacijskog pufera proveden je test imobilizacije enzima u trajanju od 4 h. Na slici 30. prikazane su vrijednosti iskorištenja imobilizacije enzima DERA za trajanje procesa imobilizacije od 2,5 i 4 h pri koncentraciji pufera 0,1 M i pH vrijednostima 7,5 i 8. Produljenjem trajanja procesa imobilizacije za 1,5 h nije uočeno povećanje vrijednosti iskorištenja te je stoga imobilizacija enzima provedena u trajanju od 2,5 h za sva ispitivanja.



Slika 30. Grafički prikaz usporedbe iskorištenja imobilizacije za trajanje procesa imobilizacije od 2,5 i 4 h (imobilizacijski pufer: $c = 0,1$ M, pH = 7,5; 8, MCF silika manjih pora)

Uvjeti za imobilizaciju enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku koji su pokazali optimalne rezultate parametara iskorištenja, efikasnosti i preostale aktivnosti odgovaraju koncentraciji 0,05 M i pH vrijednosti 6,5 imobilizacijskog pufera. Ovaj imobilizacijski pufer ispitan je za proces imobilizacije enzima DERA na mezoporoznu siliku većih pora.

4.2.2. MCF silika većih pora

Enzim DERA imobiliziran je na MCF siliku većih pora pri koncentraciji 0,05 M i pH vrijednosti 6,5 imobilizacijskog pufera. Bradford metodom određena je koncentracija enzima u temeljnoj otopini te otopini nakon imobilizacije te je iz ovih vrijednosti izračunata imobilizacijska aktivnost (Tablica 6.).

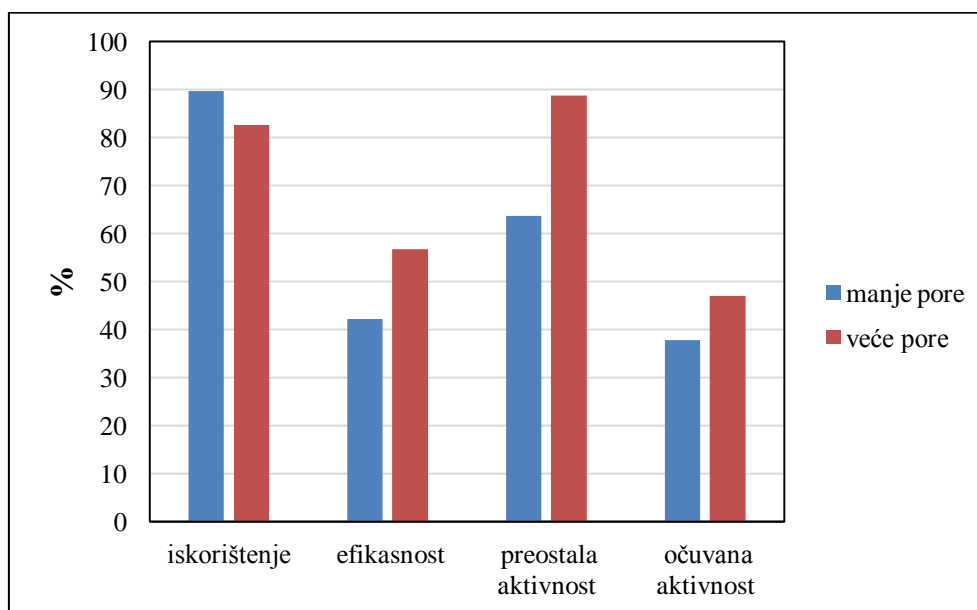
Tablica 6. Koncentracija enzima u temeljnoj otopini i otopini enzima nakon imobilizacije te izračunata imobilizacijska aktivnost za imobilizirani enzim DERA na MCF siliku većih pora u puferu koncentracije 0,05 M pri pH vrijednosti 6,5

$c(\text{fosfatni pufer})/$ M	pH	$\gamma_0(\text{enzim})/$ $\mu\text{g L}^{-1}$	$\gamma(\text{enzim})/$ $\mu\text{g L}^{-1}$	Imobilizacijska aktivnost/ $\mu\text{g L}^{-1}$
0,05	6,5	1848,00	320,00	1528,00

Reakcijom aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida određene su aktivnosti slobodnog enzima, imobiliziranog enzima u prvoj reakciji te aktivnost imobiliziranog enzima u ponovljenoj reakciji. Izračunati su parametri uspješnosti imobilizacije. U tablici 7. i slici 31. je dana usporedba parametara za imobilizirani enzim DERA na MCF siliku manjih i većih pora u puferu koncentracije 0,05 M pri pH vrijednosti 6,5.

Tablica 7. Vrijednosti parametara za imobilizirani enzim DERA na MCF siliku manjih i većih pora u puferu koncentracije 0,05 M pri pH vrijednosti 6,5.

MCF mezoporozna silika	Iskorištenje/ %	Efikasnost/ %	Očuvana aktivnost/ %	Preostala aktivnost/ %
Manje pore	89,72	42,22	37,88	63,66
Veće pore	82,68	56,81	46,97	88,77



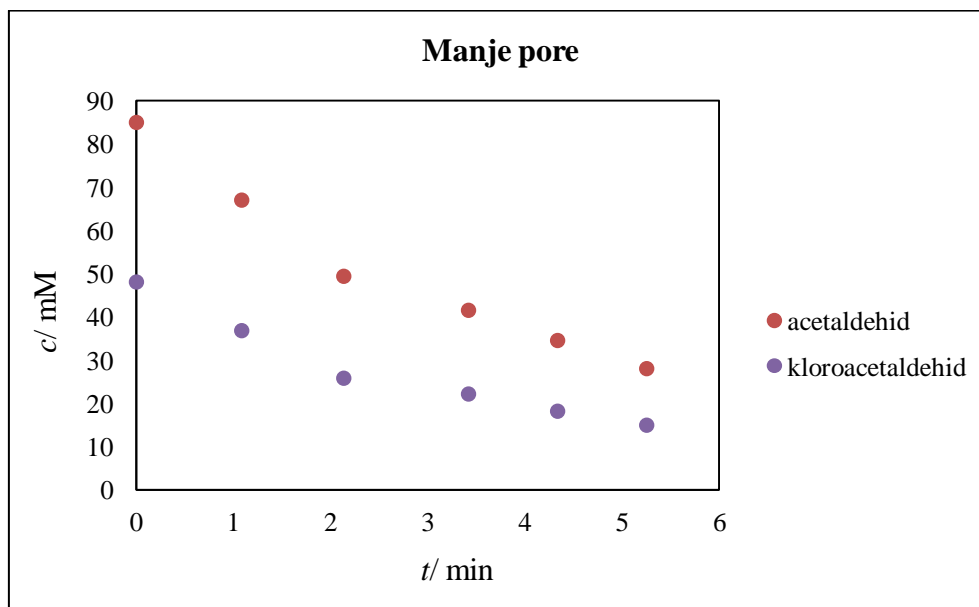
Slika 31. Grafički prikaz vrijednosti parametara za imobilizirani enzim DERA na MCF siliku manjih i većih pora u puferu koncentracije 0,05 M pri pH vrijednosti 6,5

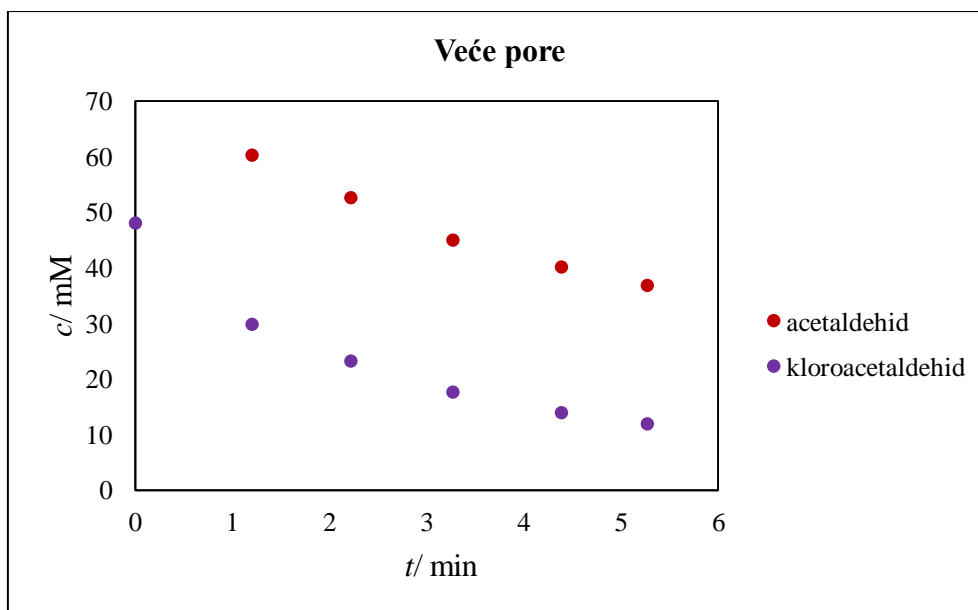
Iskorištenje imobilizacije enzima DERA veće je u slučaju MCF mezoporozne silike manjih pora, što je i očekivano obzirom da MCF s manjim porama ima veću površinu, pa je samim time i veća mogućnost za vezanje enzima. Unatoč manjem iskorištenju efikasnost, preostala aktivnost te očuvana aktivnost je veća u slučaju MCF mezoporozne silike većih pora.

4.2.3. Reakcija aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida u kotlastom reaktoru katalizirana imobiliziranim enzimom DERA na MCF mezoporoznu siliku manjih i većih pora

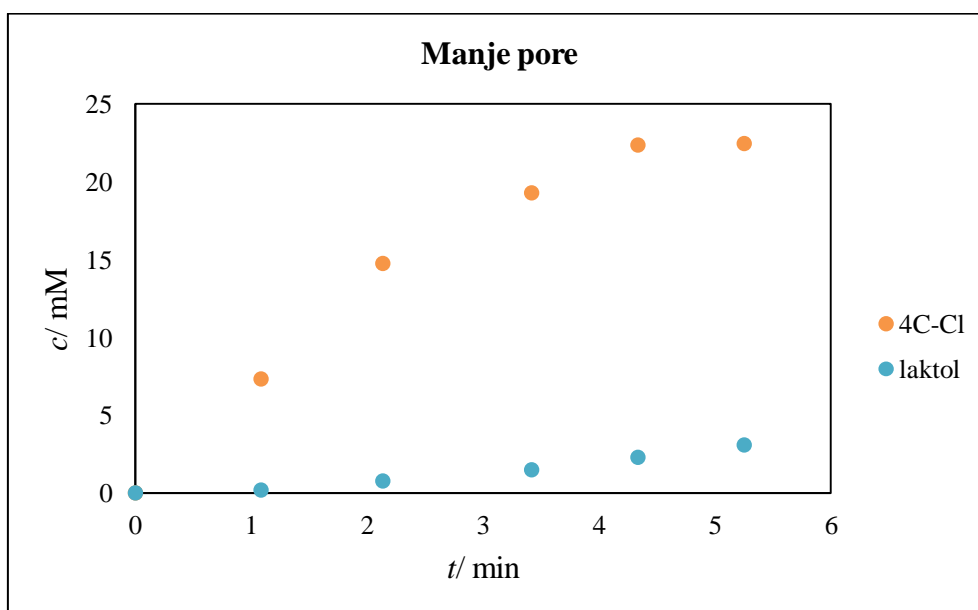
Na slikama 32.-35. prikazan je tijek reakcije sa imobiliziranim enzimom DERA na MCF mezoporoznu siliku manjih i većih pora za prvu i ponovljenu reakciju aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida za prvih 5 min reakcije u kotlastom reaktoru. Prikazani su grafovi ovisnosti koncentracije supstrata acetaldehida i kloroacetaldehida te međuprodukta 4-kloro-3-hidroksibutanala i produkta 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala o vremenu.

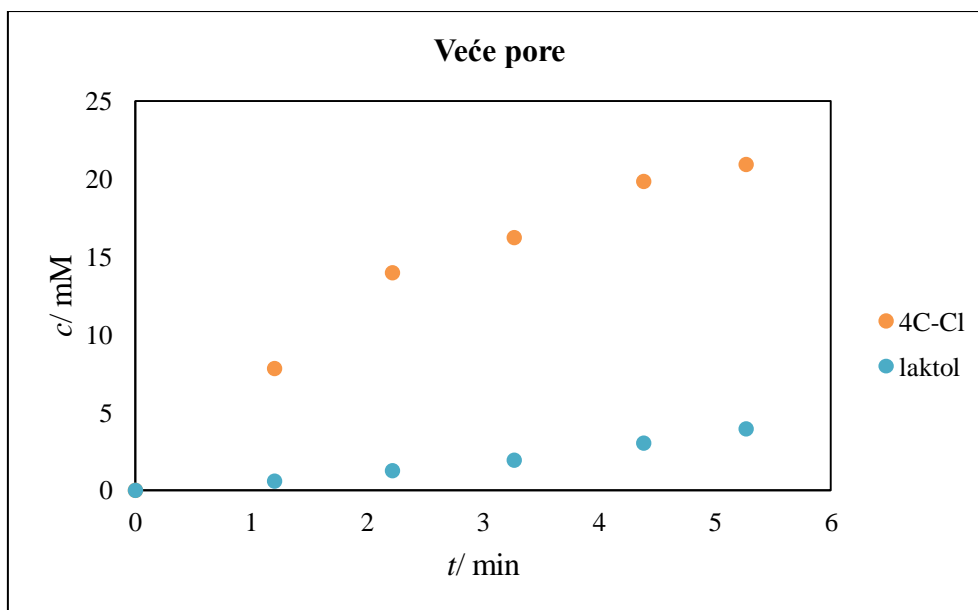
Na slici 32. je prikazan graf ovisnosti koncentracije supstrata o vremenu, a na slici 33. graf ovisnosti koncentracije međuprodukta i produkta o vremenu za prvu reakciju aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida s imobiliziranim enzimom DERA na MCF siliku manjih i većih pora. Koncentracija supstrata acetaldehida i kloroacetaldehida s vremenom opada dok koncentracija međuprodukta 4-kloro-3-hidroksibutanala i produkta 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala s vremenom raste. Brzina nastanka međuprodukta je veća od nastanka produkta.





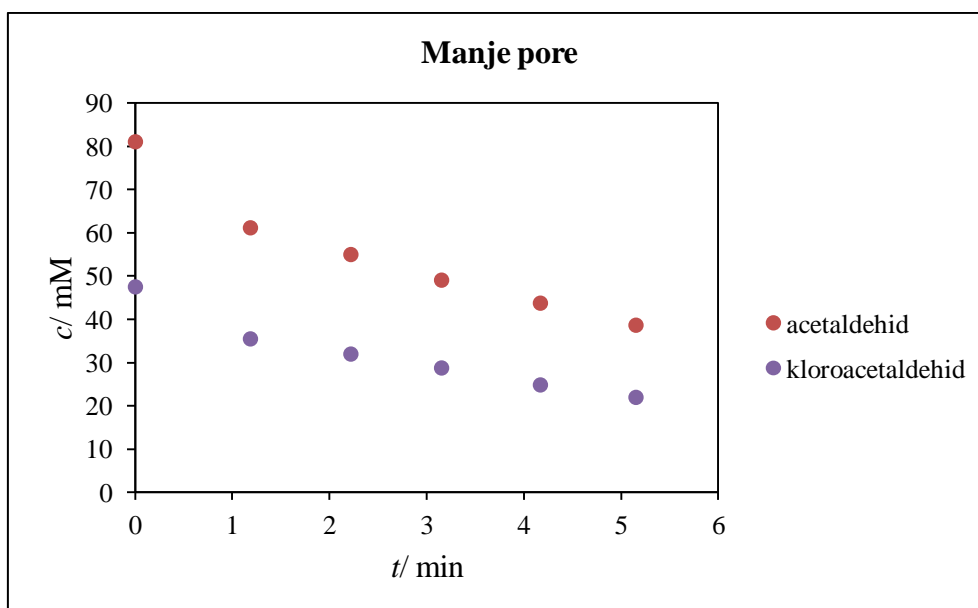
Slika 32. Ovisnost koncentracije supstrata o vremenu u prvoj reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane imobiliziranim enzimom DERA na MCF mezoporoznu siliku manjih i većih pora

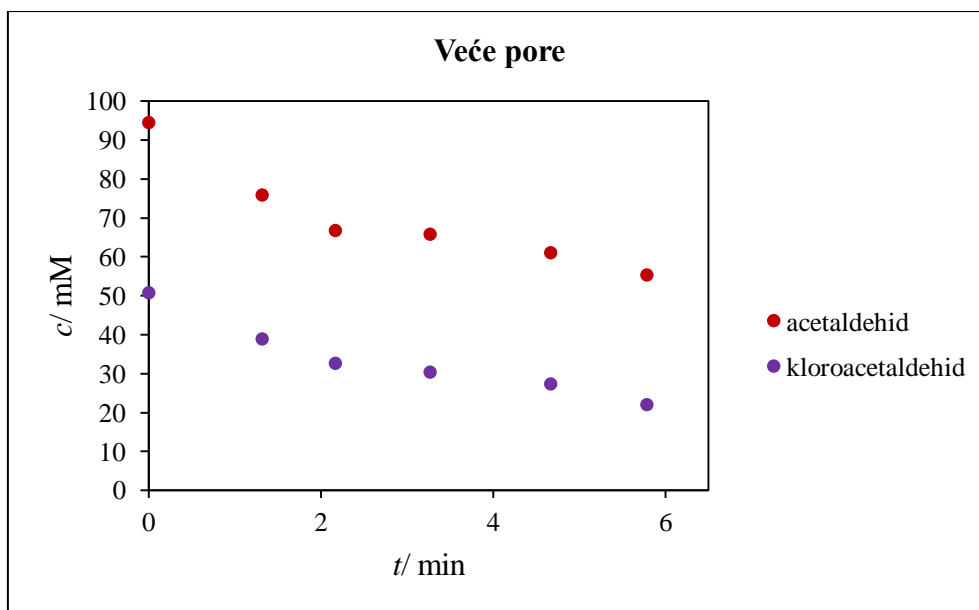




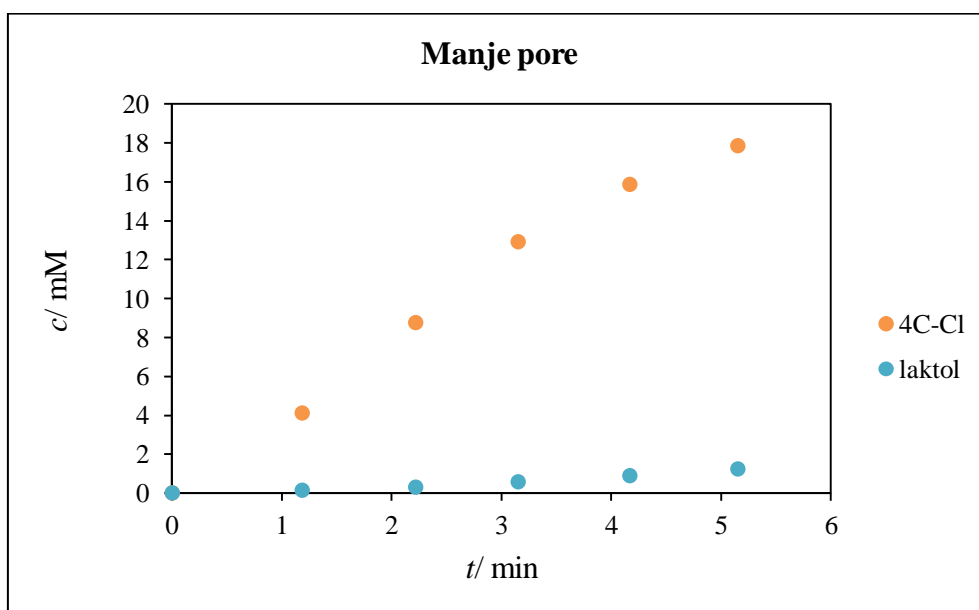
Slika 33. Ovisnost koncentracije međuprodukta i produkta o vremenu u reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane imobiliziranim enzimom DERA na MCF mezoporoznu siliku manjih i većih pora

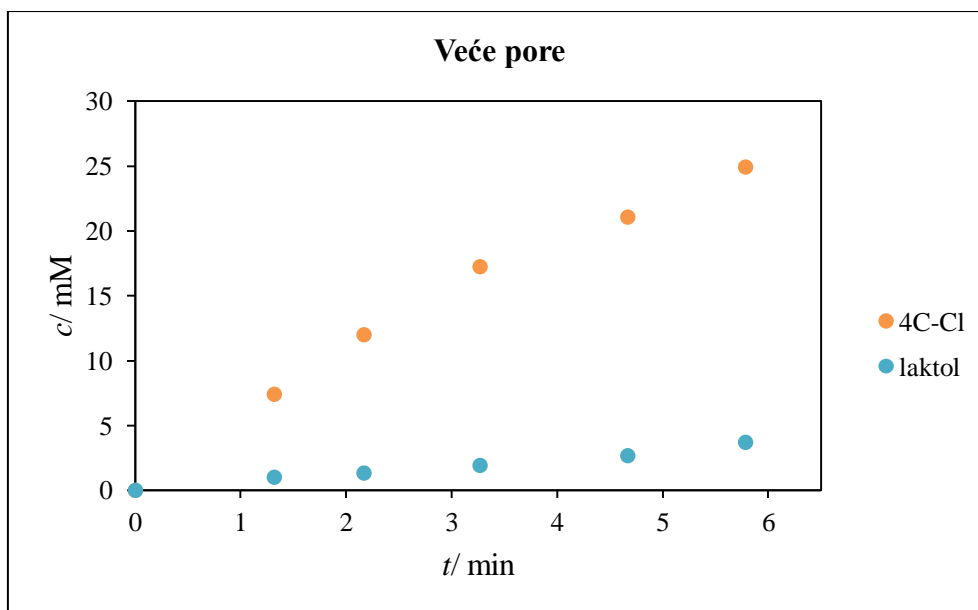
Na slici 34. je prikazan graf ovisnosti koncentracije supstrata o vremenu, a na slici 35. graf ovisnosti koncentracije međuprodukta i produkta o vremenu za ponovljenu reakciju aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida s imobiliziranim enzimom DERA na MCF siliku manjih i većih pora. Koncentracija supstrata acetaldehida i kloroacetaldehida s vremenom opada dok koncentracija međuprodukta 4-kloro-3-hidroksibutanala i produkta 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala s vremenom raste. Brzina nastanka međuprodukta je veća od nastanka produkta.





Slika 34. Ovisnost koncentracije supstrata o vremenu u ponovljenoj reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane imobiliziranim enzimom DERA na MCF mezoporoznu siliku manjih i većih pora





Slika 35. Ovisnost koncentracije međuprodukta i produkta o vremenu u ponovljenoj reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane imobiliziranim enzimom DERA na MCF mezoporoznu siliku majih i većih pora

5. ZAKLJUČAK

Sol-gel procesom sintetizirana je MCF mezoporozna silika manjih i većih pora. Neke od prednosti ove metode su sinteza pri blagim temperaturama te mogućnost kontroliranja morfoloških svojstava silike. U ovom radu omjerom 2:1 (TMB: Pluronic-123) sintetizirali smo MCF siliku manjih pora, a omjerom 3:1 siliku većih pora. Obzirom da je BET analiza provedena samo za MCF siliku manjih pora, pretpostavljeno je da su pore MCF mezoporozne silike veće u drugom slučaju.

Prije imobilizacije enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku provedena je funkcionalizacija površine silike pomoću APTES-a te aktivacija benzokinonom. U trećem koraku slijedila je imobilizacija enzima DERA kovalentnim vezanjema na nosioc. U svrhu optimiranja uvjeta imobilizacije enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku proces imobilizacije enzima proveden je u puferima koncentracija 0,05, 0,1 i 0,2 M pri pH vrijednostima 6, 6,5, 7, 7,5 i 8. Aktivnosti enzima ispitane su reakcijom aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida. Uspješnost imobilizacije određena je parametrima iskorištenja, efikasnosti i preostale aktivnosti prema kojima su odabrani optimalni uvjeti za proces imobilizacije. Optimalni uvjeti za imobilizaciju enzima odgovaraju puferu koncentracije 0,05 M i pH vrijednost 6,5. Vrijednost parametara uspješnosti za odabrani pufer su bile 89,72 % za iskorištenje, 42,22 % za efikasnost te 63,66 % za preostalu aktivnost. Optimalni uvjeti potom su ispitani za imobilizaciju enzima DERA na MCF mezoporoznu siliku većih pora. Vrijednost iskorištenja veća je u slučaju MCF mezoporozne silike manjih pora, dok su vrijednosti efikasnosti i preostale aktivnosti veće u slučaju silike većih pora. Usporedbom parametara uspješnosti za MCF siliku manjih i većih pora može se zaključiti da veličina pora MCF mezoporozne silike utječe na uspješnost imobilizacije enzima DERA, te da povećanjem pora rastu i vrijednosti parametara uspješnosti.

6. LITERATURA

- [1] Palmer, T., Bonner, P. L., *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry*, Second Edition, Woodhead Publishing Limited (2007).
- [2] Liu, D., Dong, C., Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications, *Process Biochemistry* **92** (2020) 464-475.
- [3] Illanes, A. , *Enzyme Biocatalysis: Principle and Applications*, Springer (2008).
- [4] Unnikrishnan, P., Srinivas, D., *Heterogeneous Catalysis in Industrial Catalytic Processes for Fine and Specialty Chemicals* (Ur: Joshi, S.S., Ranade, V.), Elsevier (2016) 41-111.
- [5] Ispas, C., Sokolov, I., Andreescu, S., Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393** (2) (2009) 543-554.
- [6] Ošljaj, M., Cluzeau, J., Orkić, D., Kopitar, G., Mrak, P., Casar, Z., A highly productive, whole-cell DERA chemoenzymatic process for production of key lactonized side-chain intermediates in statin synthesis, *PLoS One* **8** (5) (2013) 62250.
- [7] Ho, R. J. Y., Gibaldi, M., *Biotechnology and Biopharmaceuticals: Transforming Proteins and Genes into Drugs*, John Wiley & Sons (2003).
- [8] Kumar, A., Choudhury, R., *Introduction to Enzymes in Sustainable Technologies for Fashion and Textiles* (Ur: Nayak, R.), Woodhead Publishing (2020) 75-90.
- [9] Rossmann, M. G., Argos, P., Protein folding, *Annual Review of Biochemistry* **50** (1981) 497-532.
- [10] Dean, S. M., Greenberg, W. A., Recent Advances in Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis, *Advances Synthesis & Catalysis* **349** (2007) 1308-1320.
- [11] Breuer, M., Bonnekessel, M., Schneider, N., Industrial Applications Of Asymmetric Biocatalytic C-C Bond Forming Reactions, *Comprehensive Chirality* **9** (2012) 342-352.
- [12] Salleron, L., Magistrelli, G., Mary, C., Fischer, N., Bairoch, A., Lane, L., DERA is the human deoxyribose phosphate aldolase and is involved in stress response, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1863** (12) (2014) 2913-2925.

- [13] Fei, H., Zheng, C., Liu, X., Li, Q., An industrially applied biocatalyst: 2-Deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase, *Process Biochemistry* **63** (2017) 55-59.
- [14] Minteer, S. D., Introduction to the Field of Enzyme Immobilization and Stabilization, Enzyme Stabilization and Immobilization, Methods and Protocols, Humana Press (2011).
- [15] Gutarra, M.L.E., Miranda, L.S.M., Souza, R.O.M.A., Enzyme Immobilization for Organic Synthesis in Organic Synthesis Using Biocatalysis (Ur: Goswami, A., Stewart, J.D.), Elsevier, (2016) 99-126.
- [16] Boudrant, J., Woodley, J. M., Fernandez-Lafuente, R., Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation, *Process Biochemistry* **90** (2020) 66-80.
- [17] Liu, D., Chen, J., Shi, Y., Advances in methods and easy separated support materials for enzymes immobilization, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **102** (2018) 332-342.
- [18] Nara, T. Y., Togashi, H., Ono, S., Egami, M., Sekikawa, C., Suzuki, Y., Masuda, I., Ogawa, J., Horinouchi, N., Shimizu, S., Mizukami, F., Tsunoda, T., Improvement of aldehyde tolerance and sequential aldol condensation activity of deoxyriboaldolase via immobilization on interparticle pore type mesoporous silica, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **68** (2) (2011) 181-186.
- [19] Guisan, J. M., Immobilization of Enzymes and Cells, Humana Press (2006).
- [20] Datta, S., Christena, L.R., Rajaram, Y. R. S., Enzyme immobilization; an overview on techniques and support materials, *3 Biotech.* **3** (1) (2012) 1-9.
- [21] Liu, D., Dong, C., Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications, *Process Biochemistry* **92** (2020) 464-475.
- [22] Fan, X., Jiao, Y., Porous Materials for Catalysis: Toward Sustainable Synthesis and Applications of Zeolites in Sustainable Nanoscale Engineering: From Materials Design to Chemical Processing (Ur: Szekely, G., Livingston, A.), Elsevier (2020) 115-137.
- [23] Trindade, F., Politi, M. J., Sol-Gel Chemistry – Deals With Sol-Gel Processes in Nano Design for Smart Gels: Micro and Nano Technologies (Ur: Bacani, R., Trindade, F., Triboni, E.R.), Elsevier, (2019) 15-34.

- [24] Giraldo, L. F., Lopez, B. L., Perez, L., Urrego, S., Sierra, L., Mesa, M., Mesoporous Silica Applications, *Macromolecular Symposia* **258** (1) (2007) 129-141.
- [25] Zhou, Z., Hartmann, M., Recent Progress in Biocatalysis with Enzymes Immobilized on Mesoporous Hosts, *Topics in Catalysis* **55** (2012) 1081-1100.
- [26] Zhao, H., Han, H., Synthesis and characterization of functionalized SBA-15 silica through template removal, *Journal of Solid State Chemistry* **282** (2020) 121074.
- [27] Miyazawa, K., Inagaki, S., Control of the microporosity within the pore walls of ordered mesoporous silica SBA-15, *Chemical Communications* (2000) 2121-2122.
- [28] Koh, M. H., Haji Azaman, S. A., Hameed, B. H., Mohd Din, A. T., Surface morphology and physicochemical properties of ordered mesoporous silica SBA-15 synthesized at low temperature, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* **206** (2017) 012056.
- [29] Lopes dos Santos, S. M., Barros Nogueira, K. A., Gama, M., Lima, J.D.F., da Silva Junior, I. J., Azevedo, D. C. S., Synthesis and characterization of order mesoporous silica (SBA-15 and SBA-16) for adsorption of biomolecules, *Microporous and Mesoporous Materials* **180** (2013) 284-292.
- [30] Pandya, P.H., Jasra, R.V., Newalkar, B.L., Bhatt, P.N., Studies on the activity and stability of immobilized α -amylase in ordered mesoporous silicas, *Microporous and Mesoporous Materials* **77** (1) (2005) 67-77.
- [31] Hermida, L., Agustian, J., Abdullah, A.Z., Mohamed, A.R., Review of large-pore mesostructured cellular foam (MCF) silica and its applications, *Open Chemistry* **17** (2019) 1000-1016.
- [32] Zdarta, J., Feliczak-Guzik, A., Siwińska-Ciesielczyk, K., Nowak, I., Jesionowski, T., Mesostructured cellular foam silica materials for laccase immobilization and tetracycline removal: A comprehensive study, *Microporous and Mesoporous Materials* **291** (2020) 109688.
- [33] Assegehegn, G., Fuente, E. B., Franco, J.M., Gallegos, C., Freeze-drying: A relevant unit operation in the manufacture of foods, nutritional products, and pharmaceuticals, *Advances in Food and Nutrition Research* (2020).

- [34] Kafle, B. P., *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry*, Elsevier (2019).
- [35] Crowley, T. E., *High-performance liquid chromatography, Purification and Characterization of Secondary Metabolites*, Academic Press (2020) 49-58.
- [36] Lozano-Sánchez, L., Borrás-Linares, I., Sass-Kiss, A., Seguera-Carretero, A., *Chromatographic technique: High-performance liquid chromatography (HPLC) in Modern Techniques for Food Authentication, Second Edition (Ur: Sun, D.W.)*, Academic Press (2018) 459-526.
- [37] Unnikrishnan, P., Srinivas, D., *Heterogeneous catalysis in Industrial Catalytic Processes for Fine and Specialty Chemicals (Ur: Joshi, S.S., Ranade, V.V.)*, Elsevier (2016) 41-111.
- [38] Sakka, S., *Sol-gel processes and applications in Handbook of advances ceramics, Materials, Applications, Processing and Properties, Second Edition (Ur: Somiya, S.)*, Academic Press (2013) 883-910.
- [39] Trindade, F., Politi, M. J., *Sol-gel chemistry- Deals with sol-gel processes in Nano Design for Smart Gels, Micro and Nano Technologies (Ur: Bacani, R., Trindade, F., Triboni, E.R.)*, Elsevier (2019) 15-34.
- [40] Qiao, B., Wang, T., Gao, H., Jin, Y., High density silanization of nano-silica particles using γ -aminopropyltriethoxysilane (APTES), *Applied Surface Science* **351** (2015) 646-654.
- [41] Terracciano, M., Rea, I., Politi, J., Stefano, L., Optical characterization of aminosilane-modified silicon dioxide surface for biosensing, *Journal of the European Optical Society Rapid Publications* **8** (2013) 13075.
- [42] Gibson, N., Kuchenbecker, P., Rasmussen, K., Hodoroaba, V., Rauscher, H., Volume-specific surface area by gas adsorption analysis with the BET method in Characterization of Nanoparticles; Measurement Processes for Nanoparticles; Micro and Nano Technologies (Ur: Hodoroaba, V.D., Unger, W.E.S., Shard, A.G.), Elsevier (2020) 265-294.
- [43] Naderi, M., *Surface Area: Brunauer-Emmett-Teller (BET) in Progress in Filtration and Separation (Ur: Tarleton, S.)*, Academic Press (2015) 585-608.

- [44] Pereira-da-Silva, M., Ferri, F.A., Scanning electron microscopy in Nanocharacterization Techniques, Micro and Nano Technologies (Ur: Roz, A.L.D., Ferreira, M., Oliveira, O.N.), William Andrew (2017) 1-35.
- [45] Vldar, A. E., Hodoroaba, V., Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy in Characterization of Nanoparticles, Measurement Processes for Nanoparticles, Micro and Nano technologies (Ur: Hodoroaba, V.D., Unger, W.E.S., Shard, A.G.), Elsevier (2020) 7-27.
- [46] Sherovski, P., Stojković, G., Ristovska, N., Development validation and application of first derivate spectroscopy ratio method for estimation of Bradford assay, *Analytical Biochemistry* **558** (2018) 35-40.
- [47] Compton, S. J., Jones, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, *Analytical Biochemistry* **151** (2) (1985) 369-374.
- [48] Noble, J. E., Bailey, M. J. A., Quantitation of Protein, *Methods in Enzymology* **463** (2009) 73-95.

7. SIMBOLI I SKRAĆENICE

Simboli

A – površina, apsorbancija

ABS – apsorbancija

c – koncentracija

L – put zračenja

M – ukupna masa materijala

P – ukupna površina

SP – specifična površina

t - vrijeme

T – transmitacija

I – intenzitet zračenja

Grči simboli

α – apsorpcijski koeficijent

γ – masena koncentracija

ε – molarni apsorpcijski koeficijent

λ – valna duljina

Skraćenice

ACN – acetonitril

APTES – 3-aminopropiltriethoxysilan

BET – Brunauer, Emmett i Teller

DERA – 2-deoksiriboza-5-fosfataldolaza

HPLC – tekućiska kromaografija visoke djelotvornosti

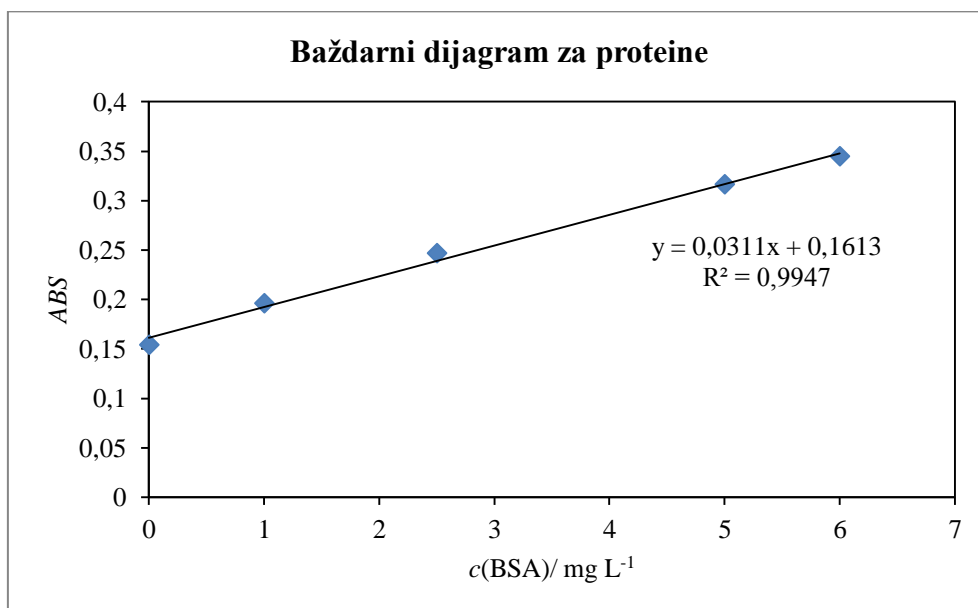
SEM – skenirajući elektronski mikroskop

TEOS – tetraetoksisilan

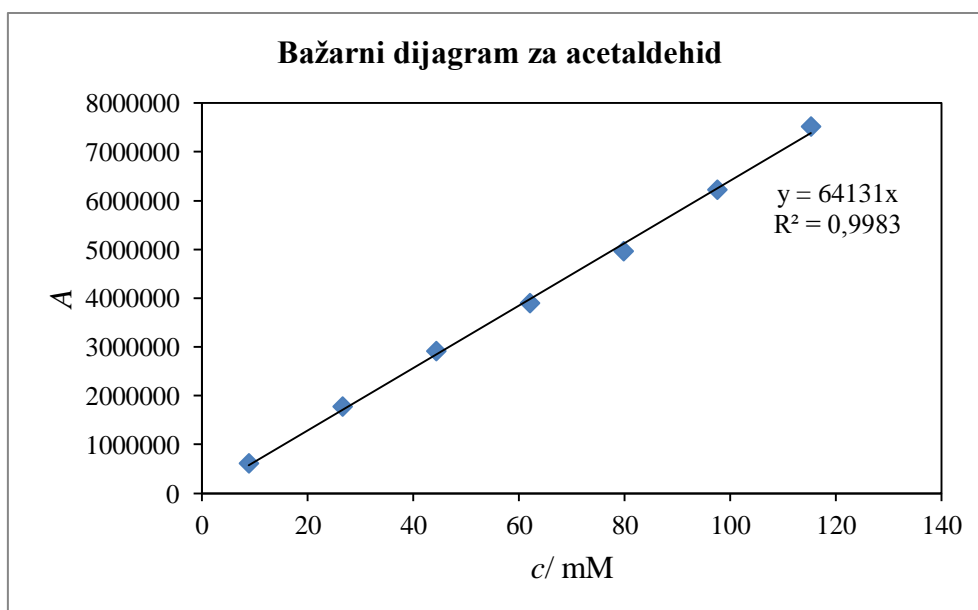
TFA – trfluorocena kiselina

TMB – trimetilbenzen

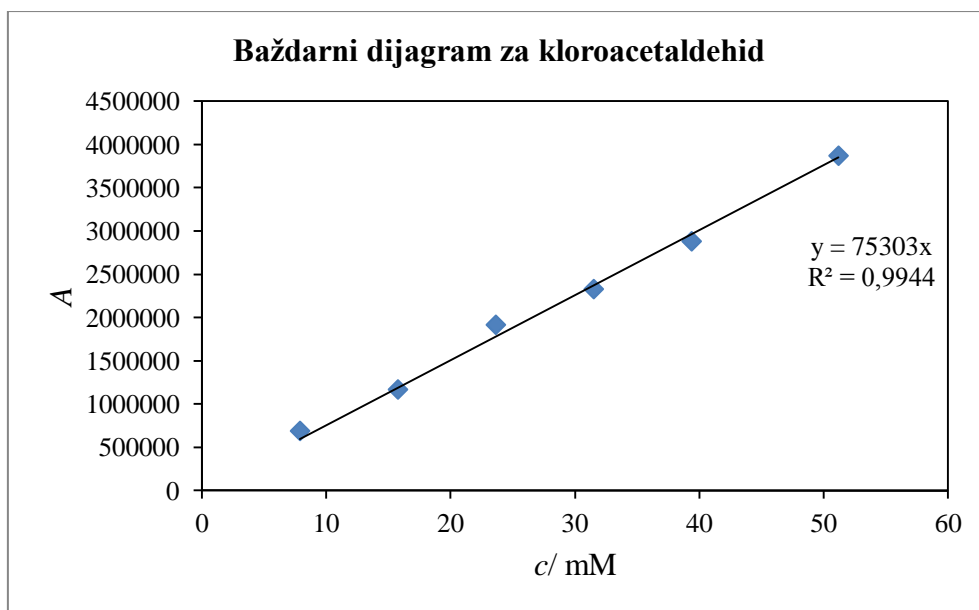
8. PRILOZI



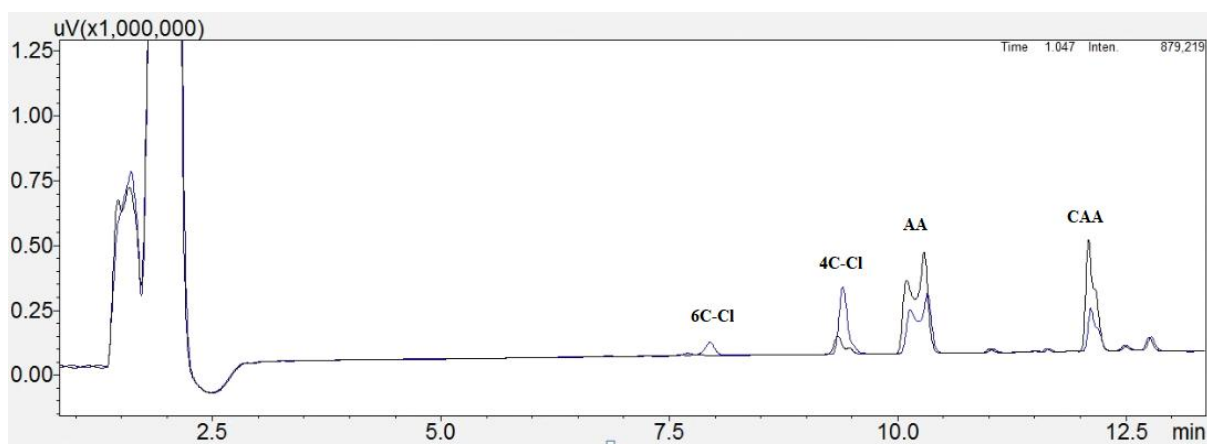
Slika 36. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina



Slika 37. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije acetaldehida



Slika 38. Baždarni dijagram za kloroacetaldehid



Slika 39. Kromatogram

