

# Biokatalitička sinteza nanočestica

---

**Breković, Filip**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2015**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:084636>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Filip Brleković

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Filip Brleković

BIOKATALITIČKA SINTEZA NANOČESTICA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada:

izv. prof. dr.sc. Ana Vrsalović Presečki, FKIT

Članovi ispitnog povjerenstva:

izv. prof. dr.sc. Ana Vrsalović Presečki, FKIT

prof. dr. sc. Đurđa Vasić-Rački, FKIT

izv. prof. dr. sc. Nenad Bolf

Zagreb, rujan 2015.

## SAŽETAK

### BIOKATALITIČKA SINTEZA NANOČESTICA

Biokatalitička sinteza nanočestica je proces nastanka čestica reda veličine 100nm ili manje, u reakcijama u kojima kao katalizator služi enzim (biokatalizator).

U ovome radu sintetizirane su nanočestice kalcijevog karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ) pomoću produkta biokatalitičke hidrolize uree uz enzim ureazu. Sinteza nanočestica provedena je u redestiliranoj vodi pri temperaturi od  $T = 30^\circ\text{C}$  i  $T = 40^\circ\text{C}$  dodavanjem soli kalcijevog klorida u otopinu u kojoj se provodi reakcija hidrolize uree uz enzim ureazu. Ispitana je kinetika hidrolize uree uz ureazu pri temperaturi od  $T = 30^\circ\text{C}$  i  $T = 40^\circ\text{C}$  u redestiliranoj vodi te je opisana Michealis-Menteničinim kinetičkim modelom s uključenom nekompetitivnom inhibicijom kalcijevim ionima. Postavljen je matematički model sinteze nanočestica, te je validiran u kotlastom reaktoru.

Sintetizirane nanočestice karakterizirane su pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa. Na temelju snimljenih prikaza određene su njihove prosječne veličine.

**Ključne riječi:** urea ,ureaza, nanočestice, modeliranje

**ABSTRACT**

**BIOCATALYTICAL SYNTHESIS OF NANOPARTICLES**

Biocatalytic synthesis of nanoparticles is the formation of particles having one or more dimensions of the order of 100nm or less, in the reaction in which an enzyme is used as catalyst (biocatalyst).

In this work the synthesis of nanoparticles of calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) was carried out using the products of biocatalytic hydrolysis of urea in the presence of an enzyme urease. Synthesis of nanoparticles was carried out in redistilled water at a temperature of  $T = 30^\circ \text{C}$  and  $T = 40^\circ \text{C}$  by adding calcium chloride salt in a solution in which hydrolysis reaction of urea with a urease enzyme was conducted. The kinetics of the hydrolysis of urea with urease at a temperature of  $T = 30^\circ \text{C}$  and  $T = 40^\circ \text{C}$  in redistilled water is described by one-substrate Michaelis-Menten kinetic model with non-competitive inhibition of calcium ions. Mathematical model of the process was proposed and it was validated by the experimental results gathered in the batch reactor.

The synthesized nanoparticles were characterized by SEM (scanning electron microscope). Based on the pictures taken by the SEM the average size of particles was determined.

**Key words:** urea, urease, nanoparticles, modelling

**SADRŽAJ**

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	3
2.1. BOKATALIZATORI .....	3
2.1.1. Enzimi i njihova svojstva .....	4
2.1.2. Podjela enzima .....	5
2.1.3. Prednosti i nedostaci biokatalize .....	6
2.1.4. Ureaza .....	6
2.2. NANOČESTICE .....	7
2.2.1. Sinteza i svojstva nanočestica .....	7
2.2.3. Podjela i vrste nanočestica .....	8
2.2.4. Kalcijev karbonat $\text{CaCO}_3$ .....	9
2.3. KINETIKA ENZIMSKI KATALIZIRANIH REAKCIJA .....	9
2.3.1. Kinetički model – Michaelis - Menteničina kinetika .....	9
2.4. REKTORI ZA PROVEDBU BIOTRANSFORMACIJA .....	11
2.4.1. Kotlasti reaktor .....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	13
3.1. APARATURA .....	13
3.1.1. Spektrofotometar .....	13
3.1.2. Kotlasti reaktor .....	13
3.1.3. Centrifuga .....	14
3.1.4. Atomiški apsorpcijski spektrometar .....	15
3.1.5. Liofilizator .....	16
3.1.6. Pretražni elektronski mikroskop .....	17
3.2. ANALITIČKE METODE .....	18
3.2.1. Određivanje koncentracije amonijevih iona .....	18
3.2.2. Određivanje koncentracije kalcijevih iona .....	19
3.2.3. Određivanje aktivnosti enzima ureaze .....	20
3.2.4. Utjecaj kalcijevih iona na aktivnost enzima ureaze .....	21
3.2.5. Hidroliza uree u kotlastom reaktoru i sinteza nanočestica kalcijeva karbonata .....	22
3.2.6. Obrada rezultata .....	23
4. MATEMATIČKI MODEL .....	24
4.1. KINETIČKI MODEL .....	24

4.2. REAKTORSKI MODEL.....	25
5. REZULTATI I RASPRAVA .....	26
5.1. KINETIKA ENZIMA UREAZE.....	26
5.1.1 Kinetika enzima ureaze u redestiliranoj vodi.....	26
5.1.2 Utjecaj kalcijevih iona na kinetiku enzima ureaze.....	27
5.2. HIDROLIZA UREE U KOTLASTOM REAKTORU.....	29
5.3. SINTEZA NANOČESTICA KALCIJEVOG KARBONATA .....	30
5.4. KARAKTERIZACIJA DOBIVENIH NANOČESTICA PRETRAŽNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM .....	32
6. ZAKLJUČAK .....	35
7. LITERATURA.....	36
POPIS OZNAKA .....	38
ŽIVOTOPIS .....	39

## 1.UVOD

Mnoge kemijske reakcije mogu se odvijati spontano dok druge zahtijevaju katalizator kako bi se provodile pri određenim brzinama. Katalizatori su molekule koje smanjuju energetska barijeru koja je potrebna kako bi se određena tvar pretvorila kroz kemijsku reakciju u neku drugu. Katalizator se ne troši niti mijenja tokom reakcije stoga bi se teorijski mogao koristiti bezbroj puta u kemijskoj reakciji, no u praksi upotreba katalizatora je ograničena njegovom stabilnošću odnosno njegovom sposobnošću održavanja svoje aktivne strukture konstantnom kroz vrijeme u reakcijskim uvjetima.

Enzimi ili biokatalizatori su proteinske molekule koje su nastale evolucijom kako bi katalizirale pri blagim okolnim uvjetima koji su potrebni u biološkim sustavima, zato se mogu smatrati katalizatorima koji su se prilagodili evolucijom da bi izvršavali svoj fiziološki zadatak o kojem ovisi sav život. Biokatalizatori služe kao katalizatori za reakcije koje se provode pri ljudski kontroliranim odnosno umjetnim uvjetima (in vitro) te zbog toga je najveći zadatak na području biokatalize prilagoditi enzime iz fiziološkog okruženja, kako bi mogli djelovati, na grubim industrijskim okruženjima. Sva ta svojstva proizlaze iz kompleksne strukture enzima kao proteina koji se sastoje od aminokiselina čiji broj seže od 100 do više tisuća. Iako enzimi nisu idealni procesni katalizatori zbog visokih cijena, nestabilnosti izvan prirodnog okruženja te podložnosti deaktivaciji i inhibiciji, i zbog njihove velike selektivnosti, specifičnosti, stereospecifičnosti, netoksičnosti, obnovljivosti, mogućnosti razgradnje toksične tvari te mogućnosti kataliziranja pri blagim i za okoliš prihvatljivim uvjetima su veoma favorizirani u različitim granama proizvodnje. (Illanes, 2008.)

Ureaza kao enzim katalizira reakciju hidrolize uree čime dolazi do oslobađanja amonijaka i karbamata, koji se zatim spontano raspadaju u amonijak i karbonsku kiselinu. (Modolo et al., 2015.) u prisustvu kalcijevih iona sa porastom pH vrijednosti dolazi do zasićenja kalcijevim karbonatom što u krajnosti dovodi do precipitacije kalcita. (Mobley et al., 1989)

Nanočestice su čestice koje su reda veličine 100nm ili manje, zbog svojih izuzetnih svojstava i mogućnosti primjene privlače sve više pozornosti. Postoje različite metode (kemijske, biološke i kombinirane) sintetiziranja različitih vrsta nanočestica. Iako su kemijske i fizikalne metode sinteze zastupljenije u proizvodnji nanočestica, zbog upotrebe toksičnih kemikalija ograničena je njihova upotreba u području biomedicine. Zbog tih ograničenja razvoj netoksičnih, pouzdanih i ekološki prihvatljivih metoda za sintezu nanočestica je vrlo važno kako bi se omogućila veća biokemijska primjena. Jedan od načina približavanja ovome cilju je korištenje mikroorganizama kao izvora enzima za sintezu nanočestica. Nanočestice proizvedene biogenim enzimatskim procesima su neizmjereno bolje od onih proizvedenih kemijskim metodama. Jedan od razloga koji podupiru biogenu sintezu nanočestica je to da se ona provodi u uvjetima u kojima obitavaju mikroorganizmi sa blago varirajućim uvjetima kao što su temperatura, pH i tlak. Čestice nastale ovakvim procesima imaju veću reaktivnost,



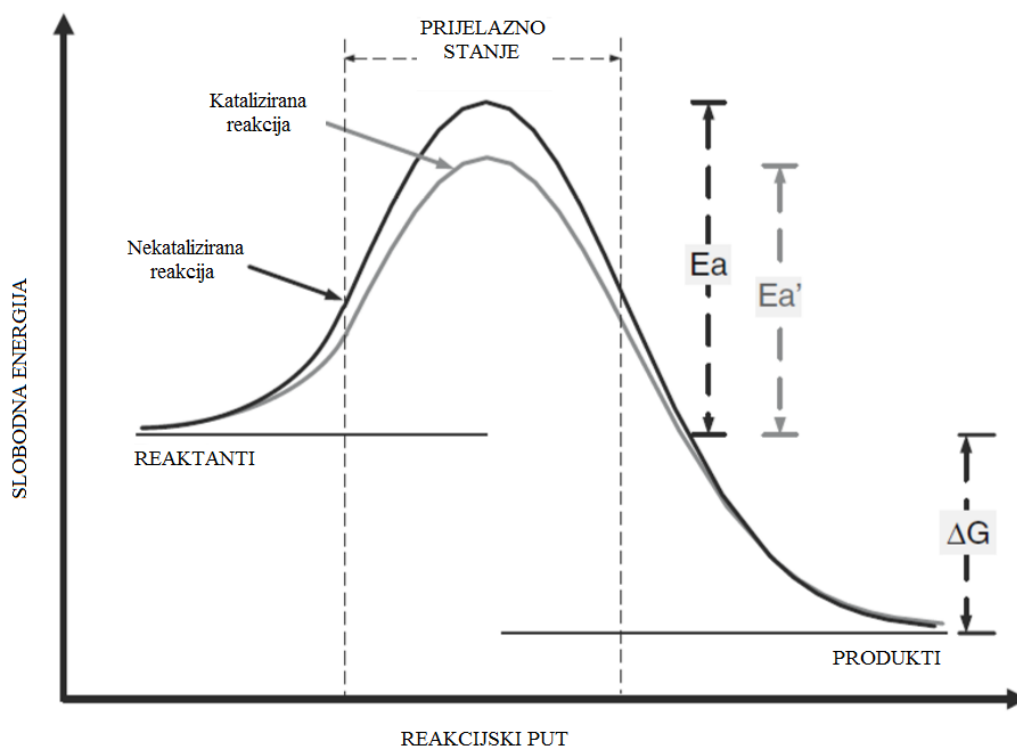
specifičnu površinu i poboljšani kontakt između enzima i metalne soli. Sinteza se provodi tako da mikroorganizmi uzimaju ione iz okoline i reduciraju ih u elementarne metale uz pomoć enzima. (*Li et al.,2011*)

Kalcij karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) je poznat kao najrašireniji kalcijev spoj u prirodi, prisutan kroz čitav niz različitih organizama od mikroba pa sve do kralježnjaka. Klacit, aragonit i vaterit su najčešće kristalne strukture koje se javljaju u živim organizmima i dio su raznolikih i važnih bioloških funkcija. (*Anderson et al.,1992*)

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. BIODOKATALIZATORI

Mnoge kemijske reakcije mogu se odvijati spontano dok druge zahtijevaju katalizator kako bi se provodile pri određenim brzinama. Katalizatori su molekule koje smanjuju energetska barijeru koja je potrebna kako bi se određena tvar pretvorila kroz kemijsku reakciju u neku drugu. Sa stajališta termodinamike veličine navedene energetske barijere se može izraziti kao promjena slobodne energije kao što je prikazano na slici 2.1. Smanjenje energetske barijere katalizatori postižu stvaranjem aktiviranog kompleksa iz kojeg nastaje konačni produkt i oslobađa se nepromijenjeni katalizator. Katalizator se ne troši niti mijenja tokom reakcije stoga bi se teoretski mogao koristiti neograničen broj puta u kemijskoj reakciji, no u praksi upotreba katalizatora je ograničena njegovom stabilnošću odnosno njegovom sposobnošću održavanja svoje aktivne strukture konstantnom kroz vrijeme u reakcijskim uvjetima. (Illanes, 2008.)



**Slika 2.1.** Mehanizam katalize.  $E_a$  i  $E_{a'}$  su energije aktivacije reakcije bez i sa katalizatorom.  $\Delta G$  je promjena slobodne energije reakcije

### 2.1.1. Enzimi i njihova svojstva

Enzimi ili biokatalizatori su proteinske molekule koje su nastale evolucijom kako bi katalizirale reakcije pri blagim okolnim uvjetima koji su potrebni u biološkim sustavima. Možemo pretpostaviti kako svaka već opisana kemijska reakcija ima i svoj komplementarni enzim kojim ju je moguće katalizirati. Biokatalizatorima nazivamo enzime koji služe kao katalizatori za reakcije koje se provode pri kontroliranim odnosno definiranim uvjetima (in vitro). Stoga je najveći zadatak na području biokatalize prilagoditi enzime iz fiziološkog okruženja, kako bi mogli djelovati, na grubim industrijskim okruženjima. Enzimi pokazuju značajno različita svojstva u usporedbi sa kemijskim katalizatorima.

Enzimi su kompleksne prirode i samim time imaju veoma labilnu strukturu i njihova proizvodnja je skupa što je jedan od razloga njihovog ograničenog korištenja u usporedbi s kemijskim katalizatorima. Zbog te kompleksne strukture proteina koji se sastoji od 100 pa do više tisuća aminokiselina enzimi pokazuju visoku selektivnost i aktivnost u blagim okolnim uvjetima varirajućih vrijednosti pH, temperature i tlaka.

Katalitički proces na enzimima se provodi na malom dijelicu enzima nazvan aktivnim dijelom, koji je sačinjen najčešće od malog broja aminokiselina dok je ostatak proteina u ulozi nosioca. Supstrat je vezan na enzim na aktivnom mjestu na kojem se provodi izmjena elektrona u vezama što dovodi do stvaranja produkta i na kraju oslobađanja istog čime je enzim slobodan da nastavi daljnji ciklus kataliziranja reakcije.

Emil Fischer je 1894. predložio model ključa i brave koji bi opisivao aktivni dio enzima kao geometrijski specifičan oblik koji je komplementaran onome supstrata. Iako je model ključa i brave potvrđen sa ponekim dokazima, model nije zadovoljavajući kao dokaz za mnoge biokatalitičke reakcije. Kasnije je predložena teorija induciranog prijanjanja prema kojoj supstrat inducira promjenu u konformaciji enzima kako bi katalitičke skupine mogle sudjelovati u daljnjim slijednim reakcijama.

Mnogi, ali ne i svi enzimi zahtijevaju male molekule kako bi mogli katalizirati reakciju. Te molekule se nazivaju koenzimi ili kofaktori. Koenzimi su male organske molekule koje definira mala molekulaska masa i vežu se reverzibilno na enzim i nisu dio njegove strukture. Koenzimi sudjeluju u reakciji i zbog svoje stehiometrijske prirode se nazivaju i kosupstrati. Oni su najčešće kao intermedijarni nosači elektrona, specifičnih atoma ili funkcionalnih skupina koje se prenose tokom reakcije. Kofaktorima se nazivaju metalni ioni koji se vežu reverzibilno na enzima i u većini slučajeva nisu kemijski promjenjeni nakon reakcije, vezani su jakim vezama uz strukturu enzima što omogućava njihovu stabilnost i nemogućnost disocijacije tokom reakcije.

S obzirom na koezime i kofaktore enzimi se mogu podijeliti na:

a) one kojima nije potreban koenzim ili kofaktor kako bi katalizirali reakciju

b) one koji zahtijevaju koenzim ili kofaktor koji ostaje čvrsto vezan na molekulu enzima i kao takav ostaje ne promjenjen tokom reakcije

c) one koji zahtijevaju koenzim ili kofaktor koji se tokom kemijske reakcije disocira i mijenja, te koji ima stehiometrijsku prirodu (kosubstrat)

Aktivnost enzima je njegova sposobnost da katalizira reakciju i ona se temelji na njegovoj molekularnoj strukturi. Ako enzim ima određenu strukturu aktivnog mjesta kojeg sačinjavaju aminokiseline raspoređene u prostoru on će katalizirati reakciju kojoj pogoduje taj raspored aminokiselina. Jedan od ključnih svojstava uz aktivnost je i stabilnost enzima. Ona je određena stabilnošću određenih dijelova strukture enzima najčešće na površini enzima koji su sklони lokalni promjenama u strukturi. Ti dijelovi površine se nazivaju slabe točke, te je zbog toga sama površina enzima bitna za njegovu stabilnost. Promjena u uvjetima okoline tj. temperature, pH ili otapala, prisutnost različitih supstanci, teških metala itd. utječu na stabilnost enzima, te na taj način i na njegovu aktivnost. Selektivnost je jedno od tri najbitnijih svojstava enzima. Zbog svojeg usmjerenju u prostoru i strukturi enzimi su jako selektivni katalizatori. Konfiguracija aktivnog mjesta osigurava nastajanje određenog produkta kemijske reakcije. (Illanes, 2008.)

### 2.1.2. Podjela enzima

Enzimi se razvrstavaju prema uputama Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) u šest skupina prema vrsti reakcije koju kataliziraju:

1. Oksidoreduktaze - enzimi koji kataliziraju oksidacijsko/redukcijske reakcije u kojima dolazi do prijenosa elektrona, vodikovih ili kisikovih atoma. Postoje 22 podskupine oksidoreduktaza. Dio su centralnog metabolizma stanice, zahtijevaju prisustvo koenzima i isključivo su unutarstanični katalizatori.
2. Transferaze - enzimi koji kataliziraju reakcije u kojima dolazi do prijenosa funkcionalne skupine od donora do akceptora. Postoji 9 podskupina transferaza. Transferaze su isključivo unutarstanični enzimi i zahtijevaju prisustvo koenzima.
3. Hidrolaze – enzimi koji kataliziraju reakcije hidrolize, odnosno sudjeluju u reakcijama cijepanja veze dodavanjem molekula vode. Postoje 12 podskupina hidrolaza. Većina tehnološki bitnih enzima su iz ove skupine. Uglavnom ne zahtijevaju prisustvo koenzima, a velika većina je vanstanična i dovoljno robusna da bi mogle provoditi reakcije pri definiranim reakcijskim uvjetima.
4. Liaze – enzimi koji sudjeluju u reakcijama u kojima se dodaju i oduzimaju skupine u svrhu stvaranja dvostruke veze. Postoje 7 podskupina liaza većina liaza zahtijevaju prisustvo koenzima te su vanstanični enzimi.
5. Izomeraze – enzimi koji kataliziraju reakcije promjene supstrata u njegov izomer. Postoji 6 podskupina izomeraza u koji se razvrstavaju prema izomeru koji nastaje. Mali broj izomeraza

se iskorištava tehnološki, neke zahtijevaju prisustvo kofaktora, ali ne i organske koenzime, većina ih je unutarstanično.

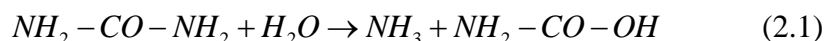
6. Ligaze – enzimi koji kataliziraju reakcije vezanja dva supstrata na teret hidrolize ATP-a. Postoji 6 podskupina ligaza. Ligaze su isključivo unutarstanični kompleksni enzimi. (Illanes, 2008.)

### 2.1.3. Prednosti i nedostaci biokatalize

Enzimi kao katalizatori su veoma favorizirani u današnjoj industriji i istraživanjima. Kataliziraju reakcije pri blagim uvjetima pH, temperature i tlaka što omogućava manje troškove zbog ekološke prihvatljivosti i netoksičnosti, što je velika prednost kod proizvodnje kozmetike i hrane. Od 6 skupina enzima samo hidrolaze imaju tehnološku važnost zbog svoje robusnosti i mogućnosti vanstaničnog djelovanja te zbog kataliziranja reakcija sa definiranim okolišnim uvjetima. Zbog svoje kompleksnosti enzimi su veoma selektivni, ali zbog te činjenice su i vrlo nestabilni u težim uvjetima i njihova proizvodnja je izrazito skupa. Zbog te činjenice često genetskim modificiranjem pokušavaju ugraditi u ekstremofilne mikroorganizme geni za stvaranje enzima koji bi mogli opstati u težim uvjetima od okolišnih. Enzimi nisu savršeni katalizatori ali zbog svoje visoke aktivnosti i selektivnosti u blagim okolišnim uvjetima su favorizirani u različitim granama proizvodnje. (Illanes, 2008.)

### 2.1.4. Ureaza

Ureaza je ključni enzim za kruženje dušika u prirodi, pojavljuje se u biljkama, gljivama i bakterijama. Ureaza kao hidrolaza katalizira hidrolizu uree do amonijaka i karbamata (2.1), koji se zatim spontano raspada na amonijak i ugljični dioksid (2.2)



Nakon otkrića ureaze u biljkama (*lat. Canvalia ensiformis*) počelo je iscrpno istraživanje ureaze što je i dovelo do njenog kristaliziranja i dokazivanja kako su niklovi ioni ( $\text{Ni}^{2+}$ ) kofaktori u procesima katalize. Prvi ju je kristalizirao kemičar James B. Sumner 1925. godine, za što je nekoliko godina kasnije dobio i Nobelovu nagradu. (Modolo et al., 2015.)

Uspoređivanjem enzima ureaze dobivenih iz različitih izvora utvrđeno je da imaju različite strukture, no dokazano je da je jedina razlika u strukturi proteina dok je osnovna struktura i katalitički mehanizam isti. Uvijek se koristi isto aktivno mjesto koje sadrži dva niklova ( $\text{Ni}^{2+}$ ) iona. Ureaza se koristi u agronomiji medicini, analitičkim uređajima, sintezi nanočestica itd. (Moblely et al., 1989.)

## 2.2. NANOČESTICE

Japanski znanstvenik Norio Taniguchi je prvi predstavio nanotehnologiju koja je kroz vrijeme postala bitan dio raznih područja kao što su elektronika, materijalne znanosti i biotehnologija. Od raznih oblika i vrsta nanočestica metalne nanočestice imaju najveću primjenu zbog svojeg velikog omjera površine i volumena. Promjena veličine čestice izrazito utječe na fizikalna i kemijska svojstva čestice. U posljednje vrijeme primjena nanočestica se je povećala u različitim granama kako znanosti i industriji zbog njihove mogućnosti primjene u različitim procesima. Električna, kemijska i fizikalna svojstva nanočestica se mijenjaju kako se mijenja i njihova veličina u rasponu od 1 do 100nm (*Khodashenas & Ghorbani, 2014.*)

### 2.2.1. Sinteza i svojstva nanočestica

Nanočestice se mogu sintetizirati korištenjem kemijskih, fizičkih, bioloških metoda ili njihovom kombinacijom. Iako su kemijske i fizikalne metode sinteze zastupljenije u proizvodnji nanočestica, zbog upotrebe toksičnih kemikalija ograničena je njihova upotreba u području biomedicine. Zbog tih ograničenja razvoj netoksičnih, pouzdanih i ekološki prihvatljivih metoda za sintezu nanočestica je vrlo važan kako bi se omogućila veća primjena nanočestica. Jedan od načina približavanja ovome cilju je korištenje mikroorganizama kao izvora nanočestica. Nanočestice proizvedene enzimatskim procesima su bolje od onih proizvedenih kemijskim metodama. Jedan od razloga koji podupiru biogenu sintezu nanočestica je to da se ona provodi u uvjetima u kojima obitavaju mikroorganizmi pri blagim uvjetima temperature, pH i tlaka. (*Li et al., 2011*)

Ekološki prihvatljiva nanotehnologija koristeći živuće organizme biomasu biljaka ili njihov ekstrakt je uzeta u obzir kao alternativa konvencionalnim metodama kemijske i fizikalne sinteze nanočestica. Upotreba biljaka u procesima sinteze nanočestica mogla bi biti još naprednija od korištenja mikroorganizama jer ne zahtjeva opsežne procese kao što zahtijevaju biomolekule poput proteina, fenola i flavonoida. Posljednjih nekoliko godina nekoliko vrsta biljaka je uspješno korišteno za efikasnu i brzu vanstaničnu sintezu nanočestica zlata i srebra. (*Ul Islam et al., 2015*)

Iako kemijske metode sinteze imaju mogućnosti proizvodnje velikih količina čestica određenih veličina i oblika u kratkom vremenu smatraju se zaostalima, skupima i neefikasima te proizvode toksični otpad koji je štetan kako za okoliš tako i za ljudsko zdravlje. Sa upotrebom biokatalitičke sinteze u procesima izbjegava se upotreba skupih kemikalija i manji su energetske troškovi samoga procesa..

Sinteza nanočestica se provodi tako da mikroorganizmi uzimaju metalne ione iz okoline te ih uz pomoć enzima reduciraju do elementarnog metala. Takva sinteza se može podijeliti u vanstaničnu i unutarstaničnu s obzirom gdje se provodi. Različiti mikroorganizmi imaju različite mehanizme sinteze nanočestica. Mehanizam vanstanične sinteze se temelji na vezanju metalnih iona na površini stanice i reduciranja istih uz prisustvo enzima dok

unutarstanična sinteza se temelji na difuziji metalnih iona u samu česticu te zatim dolazi do redukcije iona uz pomoć enzima.

Poznato je kako je biokatalitička sinteza vrlo spor proces u usporedbi sa kemijskom ili fizikalnom sintezom nanočestica, smanjenjem te razlike pogodovalo bi se daljnjoj upotrebi biokatalitičke sinteze. Veličina i raspodjela veličina nanočestica su dva najbitnija svojstva kod ocjenjivanja efikasnosti sinteze, te je zbog toga kontrola tih svojstava prilikom sinteze od velike važnosti. Još jedan od svojstava nanočestica koje su nastale biogenim putem, koji bi se trebao ispitati daljnjim istraživanjima je stabilnost jer je pokazano kako se nanočestice nastale biogenim putem mogu razgraditi nakon nekog vremena. (Li et al.,2011)

### 2.2.3. Podjela i vrste nanočestica

Nanočestice se mogu podijeliti u 4 veće skupine: metalne nanočestice, nanočestice oksida, sulfidne nanočestice i ostale nanočestice

a) Nanočestice metala – elementarne nanočestice metala, najpoznatije su nanočestice zlata ( poznate još iz doba starog Rima gdje su bile upotrebljavane u pozlaćivanju dekorativnog stakla te u upotrebi kao ljekovito sredstvo), nanočestice srebra ( pokazuju veliko antimikrobno djelovanje protiv gram pozitivnih i gram negativnih bakterija uključujući visokootporne štapičaste bakterije), čestice različitih legura ( sve veća pažnja se daje nanočesticama legura zbog primjene u katalitičkim procesima, elektrotehnici mogućnost primjene kao optički materijala i kao obloga) i nanočestice ostalih metala ( nanočestice različitih metala, teški metali se mogu sintetizirati u mikroorganizmima iako su štetni za njih. Jedne od bitnijih nanočestica iz ove grupe su nanočestice platine koje se sintetiziraju pomoću bakterije lat. *Shewanella algae*).

b) Nanočestice oksida – mogu se podijeliti prema tome da li imaju dipolni moment ili nemaju. Nemagnetični oksidi koji su istraživani su  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{BaTiO}_3$  i  $\text{ZrO}_2$ . Nanočestice sa magnetnim svojstvima su nedavno razvijen materijal koji zbog svoje mikrokonfiguracije i svojstava kao što je super paramagnetičnost i velike privlačne sile imaju sve veću primjenu u procesima biološke separacije i biomedicine

c) Sulfidne nanočestice – Nanočestice koje privlače podosta pažnje zbog mogućnosti primjene kao fluorescentni biomarkeri i označivači stanica zbog njihovih interesantnih elektronskih i optičkih svojstava.

d) Ostale nanočestice - raznovrsne nanočestice sintetizirane u biološkim sistemima, neke od njih su  $\text{PbCO}_3$ ,  $\text{CdCO}_3$ ,  $\text{SrCO}_3$ , PHB,  $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$  i  $\text{CdS}$ .

Dispergirane nanočestice se koriste u području nanobiomedicine kao fluorescentni markeri, dostavljači lijekova i gena, u biodetekciji patogena, inženjerstvu tkiva, uništavanju tumora zagrijavanje (hipotermija), fagokinetička istraživanja. (Li et al.,2011)

### 2.2.4. Kalcijev karbonat $\text{CaCO}_3$

Kalcij karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) je poznat kao najrašireniji kalcijev spoj u prirodi, prisutan kroz čitav niz različitih organizama od mikroba pa sve do kralježnjaka. Kalcit, aragonit i vaterit su najčešće kristalne strukture koje se javljaju u živim organizmima i dio su raznolikih i važnih bioloških funkcija. (Anderson et al., 1992)

Zbog svojih povoljnih svojstava kalcij karbonat ima široku primjenu u mnogim granama industrije (građevinarstvo, kiparstvo, kemijska industrija, proizvodnja papira i plastike, industrija boja i lakova, farmacija). Kalcij karbonat stvoren u živom organizmu spada pod biominerale. Biominerali su isto što i minerali samo su proizvedeni od strane živih organizama u njihovim stanicama ili između, na površini tijela ili između tkiva.

Kao jedan od najrasprostranjenijih biominerala kalcij karbonat je produkt mnogih mikroorganizama kako unutarstanično tako i vanstanično. Kao takav ima puno kompleksnija morfološka, mehanička i fizikalno-kemijska svojstva i sofisticiraniji dizajn od nebiogenog minerala zbog toga što se proces sinteze provodi pri blagim okolnim uvjetima. (Sondi & Salopek-Sondi, 2005)

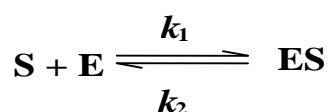
## 2.3. KINETIKA ENZIMSKI KATALIZIRANIH REAKCIJA

Proučavanje kinetike enzimski kataliziranih reakcija je bitno zbog toga što omogućava razvoj molekularnih modela enzimskih reakcija i zbog tehnoloških razloga jer dopušta kreiranje kinetičkih modela za dizajniranje i ocjenjivanje rada reaktora. Kinetika enzimski katalizirane reakcije je kvantitativna analiza svih faktora koji utječu na katalitički potencijal enzima. (Illanes, 2008)

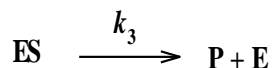
### 2.3.1. Kinetički model – Michaelis - Menteničina kinetika

1913. godine Michaelis i Menten su predložili prvu hipotezu enzimatске katalize temeljenu na dva koraka. U prvom koraku supstrat se veže na aktivno mjesto na enzimu, a u drugom koraku dolazi do kemijske pretvorbe supstrata u produkt te oslobađanja konačnog produkta. (Illanes, 2008.) Ovom jednadžbom se određuje brzina kemijske reakcije katalizirane otopljenim enzimom. Izvodi se iz Briggs-Haldane mehanizma za jednostavnu enzimatsku reakciju koja je slična onoj za kemijsku heterogenu katalitičku reakciju. (Dunn et al., 1992.)

Enzim E spaja se sa supstratom S čime nastaje kompleks ES, koji može disocirati na enzim E i supstrat S (reverzibilna reakcija) ili se može prevesti u produkt P i enzim E.







Prema Michealis-Menteničinom modelu brzina reakcije odnosno potrošnje supstrat ( $r_s$ ) se određuje prema izrazu (2.3). Izraz se temelji na pretpostavci da je koncentracija supstrata na dovoljno visokoj razini i da se ne mijenja u vremenu ukojem se eksperimentalno određuje početna brzina reakcije ( $c_s \sim c_{s0}$ ).

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s + c_s} \quad (2.3)$$

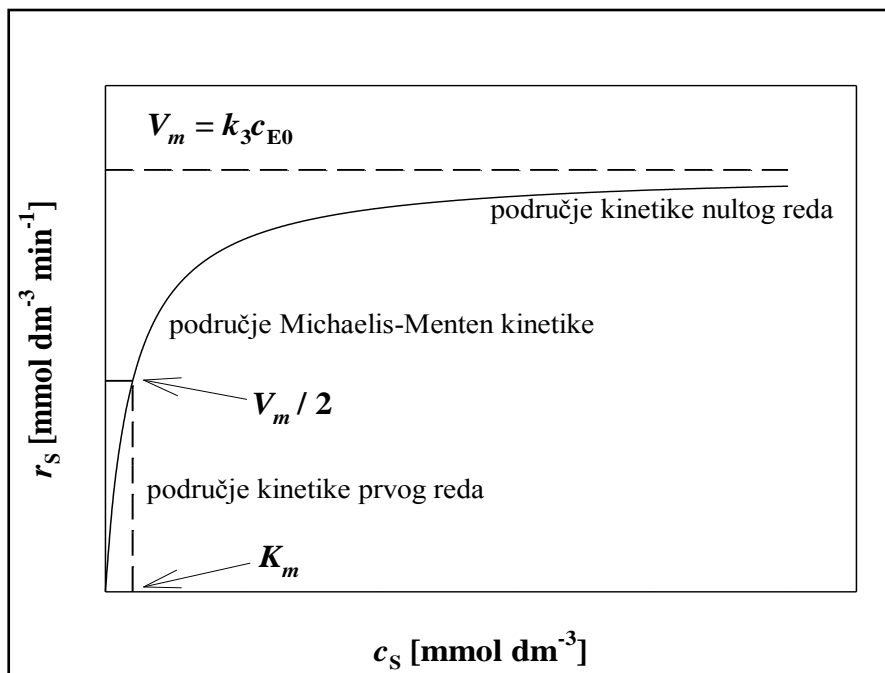
U danom izrazu  $r_s$  je brzina potrošnje supstrata [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$ ],  $c_s$  koncentracija supstrata [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ],  $V_m$  predstavlja maksimalnu brzinu reakcije [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$ ], a  $K_m^s$  Michaelis – Menteničinu konstantu [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ].

Parametar  $V_m$  ovisi o koncentraciji enzima ( $E_0$ ), a  $K_m^s$  ovisi o konstantama brzina reakcije ( $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ) prema izrazima (2.4) i (2.5).

$$V_m = k_3 \cdot E_0 \quad (2.4)$$

$$K_m^s = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (2.5)$$

Jednosupstratne enzimске reakcije, koje slijede Michaelis – Menteničinu kinetiku opisane su karakterističnom hiperbolom, odnosno hiperboličnom ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata (Slika 2.3).



**Slika 2.2.** Ovisnost reakcijske brzine o početnoj koncentraciji supstrata kod Michaelis – Menteničine kinetike

Na slici su tri karakteristična područja kinetike reakcije: područje kinetike prvog reda, područje Michaelis – Menteničine kinetike i područje kinetike nultog reda.

Pri vrlo niskim koncentracijama supstrata, ovisnost reakcijske brzine,  $r_S$ , o koncentraciji supstrata,  $c_S$ , pokazuje linearnu ovisnost. Područje niskih koncentracija supstrata ( $c_S \ll K_m^S$ ) se može aproksimirati kinetikom reakcije prvog reda, a područje visokih koncentracija supstrata ( $c_S \gg K_m^S$ ) se može aproksimirati kinetikom reakcije nultog reda.

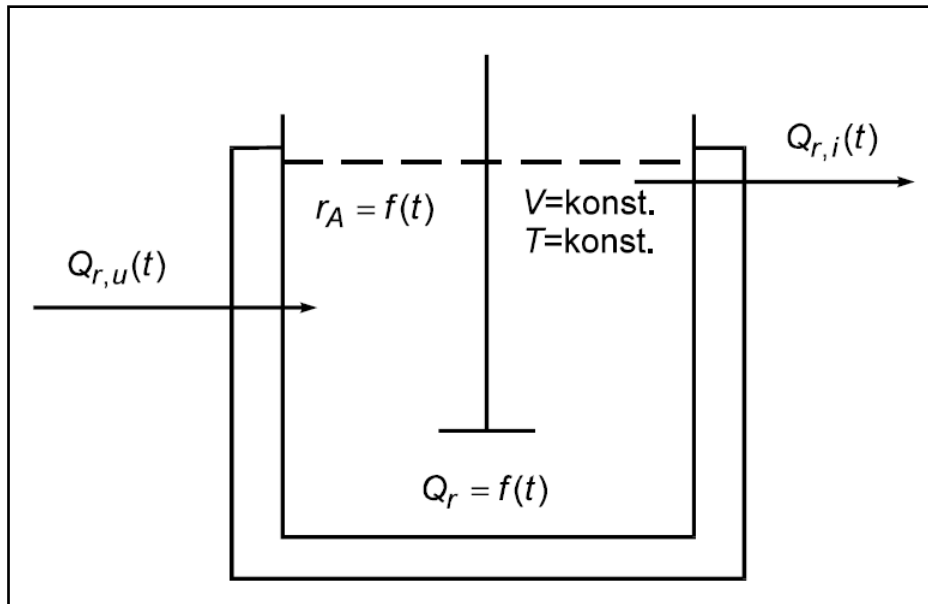
## 2.4. REAKTORI ZA PROVEDBU BIOTRANSFORMACIJA

Bioreaktor je isto što i kemijski reaktor, odnosno procesni aparat u kojem se provodi kemijska reakcija sa ciljem dobivanja produkta, no u bioreaktorima se provode reakcije uz pomoć enzima odnosno biokatalitičke reakcije. Osnovni tipovi kemijskih reaktora su: kotlasti (šaržni, s punilom), protočno-kotlasti i cijevni. Još ih se može podijeliti na način rada odnosno na zatvorene (KR) i otvorene (PKR i CR) sustave. Mogu i biti stacionarni ili nestacionarni. (*Illanes & Altamirano, 2008*)

### 2.4.1. Kotlasti reaktor

U ovom radu korišten je kotlasti (šaržni, *batch*) reaktor s miješanjem (Slika 2.3). To je zatvoreni sustav u kojem za vrijeme reakcije ne dolazi do izmjene tvari s okolinom. Sastav reakcijske smjese je, uz pretpostavku idealnog miješanja, u svakoj točki isti, tj. reakcijska smjesa je homogena. U kotlastom reaktoru sve veličine stanja – sastav reakcijske smjese, brzina kemijske reakcije i količina oslobođene ili utrošene topline, ovise o vremenu te možemo reći da on uvijek radi u nestacionarnom stanju. Jedino se temperatura u reaktoru ne mijenja s vremenom jer se pretpostavlja izotermni rad. Također se pretpostavlja da je volumen reakcijske smjese stalan i nezavisan o vremenu, tj. da nema promjene gustoće. (*Gomzi, 1998.*)

Osnovni element čini miješalica kojom se postiže dobra izmiješanost reakcijske smjese te se poboljšava prijenos topline kroz reakcijski medij i stijenke uređaja. Osnovna stijenka reaktora obavijena je plaštem koji ima funkciju izmjenjivača topline. U reaktoru se ostvaruje približno idealno miješanje pa su vrijednosti svih parametara približno iste u bilo kojoj točki reaktorskog prostora. (*Illanes & Altamirano, 2008*)



**Slika 2.3** Shematski prikaz kotlastog reaktora

Za postavljanje bilance množine tvari i topline kao matematičkog modela reaktora potrebno je pretpostaviti ideale uvjete

U jednadžbi 2.6. prikazana je bilanca tvari za kotlasti reaktor

$$\frac{dn_A}{dt} = r_A * V \quad (2.6.)$$

$r_A$  je brzina nastajanja komponente A [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ],  $V$  volumen reakcijske smjese [ $\text{dm}^3$ ],  $n_A$  množina komponente A [ $\text{mmol}$ ] i  $t$  vrijeme [ $\text{min}$ ].

Ako je  $n_A = V * c_A$  onda dobivamo izraz 2.7.

$$\frac{d(V * c_A)}{dt} = r_A * V \quad (2.7.)$$

I na kraju pošto je volumen u kotlastom reaktoru konstantan vrijedi izraz 2.8.

$$\frac{dc_A}{dt} = r_A \quad (2.8.)$$

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. APARATURA

##### 3.1.1. Spektrofotometar

Spektrofotometar (Slika 3.1.) je mjerni uređaj kojim se mjeri količina svjetla koju apsorbira uzorak. Apsorpcija svjetlosti kroz otopine matematički se opisuje Beer – Lambertovim zakonom danim izrazom (3.1) pri čemu *ABS* predstavlja apsorbanciju na određenoj valnoj duljini svjetlosti,  $\varepsilon$  molarni apsorpcijski koeficijent [ $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ], svojstven svakoj molekulskoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti, *b* duljinu puta svjetlosti kroz uzorak [cm], a *c* koncentraciju tvari u otopini [ $\text{mol L}^{-1}$ ].

$$ABS = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (3.1)$$

U ovom radu, spektrofotometar je korišten za mjerenje koncentracije amonijevih iona Willisovom metodom. (Willis *et al.*, 1996.)



**Slika 3.1.** *Spektrofotometar*

##### 3.1.2. Kotlasti reaktor

U ovom radu kotlasti reaktor korišten je za mjerenje kinetike te za dobivanje nanočestica. Eksperimenti su provedeni u staklenim kotlastim reaktorima volumena  $V$  (reaktor) = 5 mL. Stalna temperatura u reaktoru ostvarena je njegovim držanjem u posudi s dvostrukom stijenkom kroz koju je protjecala voda iz termostata temperature  $T = 30^\circ\text{C}$ , odnosno  $T = 40^\circ\text{C}$  dok je miješanje vršeno pomoću magnetske miješalice (Slika 3.2.) sa svrhom mjerenja kinetike. Termostatirana tresilica ( Slika 3.3.) korištena je za dobivanje nanočestica.



**Slika 3.2.** *Kotlasti reaktor u termostatiranoj kupelji na magnetskoj miješalici*



**Slika 3.3.** *Termostatirana tresilica*

### 3.1.3. Centrifuga

Centrifuga Hettich Universal 320R (Slika 3.4.) korištena je pri pripremi uzoraka za njihovo sušenje, odnosno daljnju analizu na pretražnom elektronskom mikroskopu. Uzorci su centrifugirani na 4.500 okr/min u trajanju od  $t = 5$  min nakon čega su isprani s redestiliranom vodom i ponovno centrifugirani na isti način (postupak ispiranja ponovljen je dva put



Slika 3.4. Centrifuga Hettich Universal 320R

### 3.1.4. Atomski apsorpcijski spektrometar

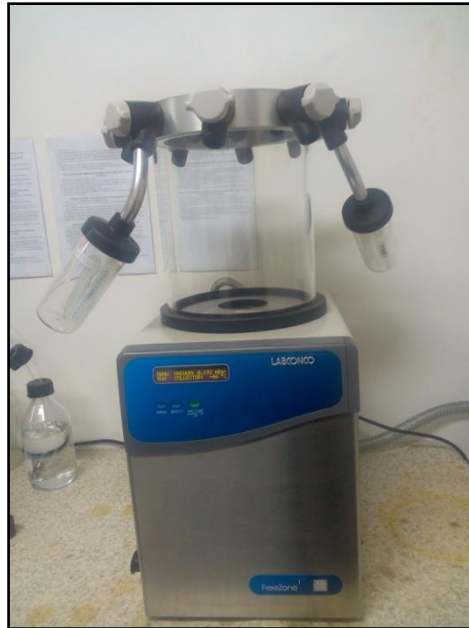
Atomski apsorpcijski spektrometar, AAS Shimadzu AA – 6300 (Slika 3.5.) je uređaj za kvantitativnu analizu, tj. određivanje pojedinih metala u otopini. Oslobađanjem elektromagnetskog zračenja na valnim duljinama  $\lambda = 190 - 860$  nm u spektru ultraljubičastog i vidljivog zračenja mjeri količinu apsorbiranog zračenja kojeg je apsorbirao sloj slobodnih atoma u nepobuđenom stanju. Slobodni atomi tvore tzv. atomsku paru. Za atomiziranje uzorka najčešće se koristi plamen, iako su u upotrebi i druge metode, npr. grafitna peć. Izvor zračenja je šuplja katoda koja daje linijski spektar elementa od kojega je načinjena površina elektrode. Atomi metala u katodi pobuđuju se visokim naponom te emitiraju svjetlost točno određenog spektra. Prolaskom elektromagnetskog zračenja karakterističnog za prijelaze elektrona u vanjskim atomskim orbitalama nekog elementa, kroz atomsku paru, dio zračenja određenih frekvencija se apsorbira, što daje prepoznatljiv spektar tog elementa. Elektroni analiziranog metala mogu se pobuditi apsorpiranjem samo točno određenih kvantata energije karakterističnih za pojedine elektronske prijelaze. Količina energije koja ulazi u plamen je poznata, a na izlasku se bilježi pomoću detektora te se na temelju toga može izračunati koliko se elektronskih prijelaza dogodilo pri prolasku kroz analizirani uzorak, tj. kolika je koncentracija analiziranog metala. U ovom radu atomski apsorpcijski spektrometar korišten je za određivanje koncentracije kalcijevih iona



Slika 3.5. Atomski apsorpcijski spektrometar Shimadzu AA – 6300

### 3.1.5. Liofilizator

Liofilizator LABCONCO Free Zone (Slika 3.6.) korišten je za sušenje uzoraka, odnosno njihovu pripremu za analizu na pretražnom elektronskom mikroskopu. Tijekom sušenja na liofilizatoru, uzorak prolazi kroz dvije faze; fazu primarnog i fazu sekundarnog sušenja. Primarno je sušenje iz zamrznutog stanja (od  $-15^{\circ}\text{C}$  do  $-70^{\circ}\text{C}$ ) tijekom kojeg se u pripravak dovodi toplina i tijekom njega se iz uzorka izdvaja tzv. slobodna voda. Sekundarno sušenje je sušenje iz „tekućeg“ stanja i njime se uklanja tzv. vezana voda.



**Slika 3.6.** *Liofilizator LABCONCO Free Zone*

### 3.1.6. Pretražni elektronski mikroskop

Pretražni elektronski mikroskop, SEM Tescan Vega III Easyprobe (Slika 3.7) omogućava istraživanje mikrostruktura uvećanjem i do 100.000 puta, a radi na način da se na uzorak usmjeri pomični snop elektrona čijim pomicanjem se pretražuje površina uzorka. Pri tome može doći do raspršivanja elektrona na uzorku ili stvaranja tzv. sekundarnih elektrona koji se emitiraju s površine uzorka. Takvi raspršeni i sekundarni elektroni se potom sakupljaju i detektiraju pomoću posebnog elektroničkog uređaja. Kako snop elektrona prelazi preko uzorka, na ekranu se stvara slika predmeta sastavljena od mnoštva točaka. Što veći broj elektrona uređaj detektira, točke su, tj. slika je svjetlija. U ovom radu, SEM je korišten za analizu, odnosno karakterizaciju dobivenih nanočestica.



**Slika 3.7.** *Pretražni elektronski mikroskop SEM Tescan Vega III Easyprobe*



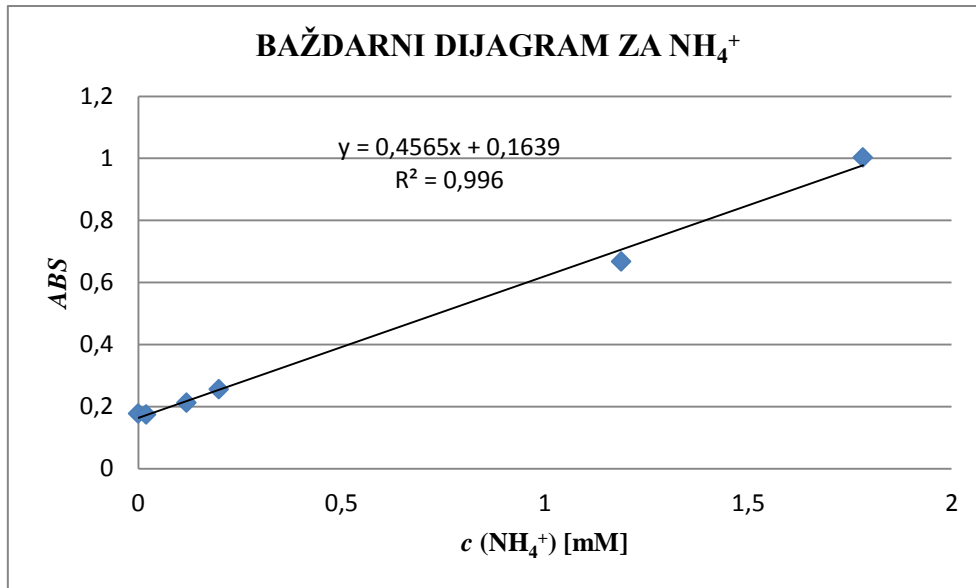
## 3.2. ANALITIČKE METODE

### 3.2.1. Određivanje koncentracije amonijevih iona

Spektrofotometrom je određena koncentracija amonijevih iona Willisovom metodom. Uz to što je metoda vrlo jednostavna i jako pouzdana ona je i ekološki prihvatljiva zbog korištenja alternativnog kolorimetrijskog reagensa. Točnost metode potvrđena je na dva načina; analizirajući uzorke određenog supstrata prema trima standardima američkog Nacionalnog ureda za standarde (NBS; engl. National Bureau of Standards) i uspoređujući rezultate s NBS dopuštenom vrijednošću ili analizirajući uzorke određenog supstrata te usporedbom dobivenih rezultata s onima dobivenim pomoću dvije druge kolorimetrijske metode. (*Willis et al., 1996.*)

Za Willisovu metodu potrebno je pripremiti reagens koji se sastoji od otopine natrijeva salicilata, fosfata i nitroprusida, otopine hipoklorita te standarda odnosno otopine amonijeva klorida koja služi kao standard. Otopina reagensa pripremljena je otapanjem 32,0 g natrijeva salicilata bezvodnog ( $C_6H_4(OH)COONa$ ), 40,0 g natrijeva fosfata tribazičnog dodekahidrata ( $Na_3PO_4 \cdot 12 H_2O$ ) i 0,5 g natrijeva nitroprusida ( $Na_2[Fe(NO)(CN)_5]$ ) u 1.000 mL redestilirane vode. Otopina hipoklorita pripremljena je razrjeđivanjem 13,9 mL izbjeljivača *Domestos* koji sadrži ~ 4,8% natrijeva hipoklorita, u 250 mL vode. Otopina amonijevog klorida ( $NH_4Cl$ ) temeljne koncentracije  $c(NH_4Cl, t.o.) = 10 \text{ mM}$  pripremljena je otapanjem 5,3 mg  $NH_4Cl$  u 10 mL redestilirane vode. Za izradu baždarnog dijagrama, pripremljene su otopine  $NH_4Cl$  u rasponu koncentracija od 0 – 2,0 mM.

Pripremanje uzoraka za određivanje apsorbancije odnosno koncentracije amonijevih iona na spektrofotometru se provodi se dodavanjem 50  $\mu\text{L}$  otopine  $NH_4Cl$  određene koncentracije, zatim je dodano dodano po 1.000  $\mu\text{L}$  pripremljenog reagensa i 250  $\mu\text{L}$  otopine hipoklorita te je sve dobro homogenizirano (miješanjem). U trenutku dodavanja otopine hipoklorita započeto je mjerenje vremena te su uzorci inkubirani 15 minuta, nakon inkubacije spektrofotometrom je izmjerena apsorbancija uzoraka na  $\lambda = 685 \text{ nm}$ . Dobiveni rezultati daju baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji amonijevog klorida Slika 3.8.

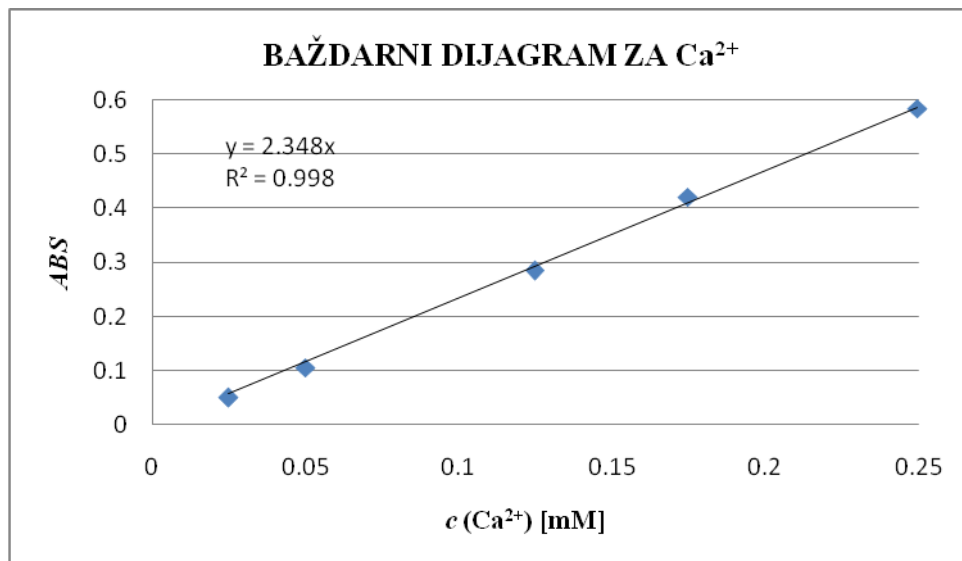


**Slika 3.8.** Baždarni dijagram za određivanje amonijevih iona ( $c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 0 - 2,0 \text{ mM}$ ,  $T = 30^\circ\text{C}$ ;  $\lambda = 685 \text{ nm}$ )

### 3.2.2. Određivanje koncentracije kalcijevih iona

Atomskom apsorpcijskom spektrofotometrijom je određena koncentracija kalcijevih iona, u spektrofotometru kao izvor zračenja na  $\lambda = 422,67 \text{ nm}$  korištena je kalcijeva lampa. Otapanjem 366,9 mg  $\text{CaCl}_2$  u 100 ml redestilirane vode pripravljena je temeljna otopina kalcijeva klorida koncentracije  $c(\text{CaCl}_2, \text{t.o.}) = 25 \text{ mM}$ . Za dobivanje baždarnog dijagrama pripravljene su otopine  $\text{CaCl}_2$  u rasponu koncentracija od 0,02 – 0,25 mM.

Rezultat određivanja kalcijevih iona u ovako pripremljenim otopinama pomoću AAS-a je baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji kalcijevih iona (slika 3.9.)



**Slika 3.9.** Baždarni dijagram za određivanje kalcijevih iona ( $c(\text{CaCl}_2) = 0,02 - 0,25 \text{ mM}$ )

Uzorci za određivanje koncentracije iona uzorkovanih tijekom sinteze nanočestica su razrijeđeni do konačnog razrjeđenja od 1.000 puta te im je izmjerena apsorbancija pomoću AAS-a.

### 3.2.3 Određivanje aktivnosti enzima ureaze

Određivanjem početne brzine hidrolize uree određujemo aktivnost enzima ureaze u redestiliranoj vodi kao mediju i temperaturama od  $T = 30^\circ\text{C}$  i  $T = 40^\circ\text{C}$ . Aktivnost određujemo pomoću spektrofotometra na valnoj duljini od  $\lambda = 685 \text{ nm}$ , praćenjem porasta koncentracije amonijevih iona prema Willisovoj metodi. Iz dobivenih rezultata ovisnosti apsorbancije o vremenu je uz pomoć izraza 3.2. računata aktivnost enzima,  $A_s [\text{U mg}^{-1}]$  pomoću koje su procijenjeni parametri reakcijske kinetike.

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

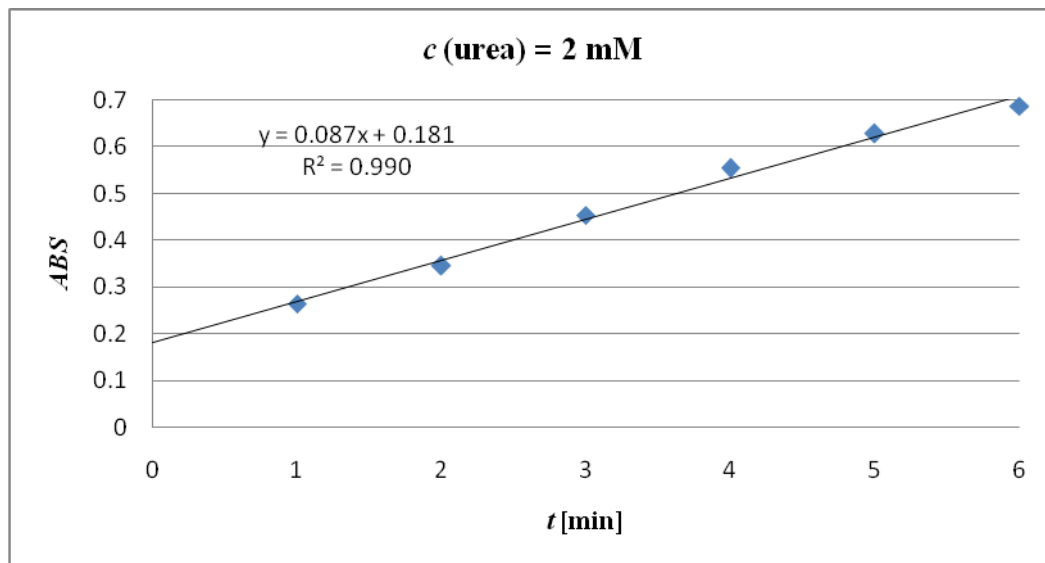
Određivanje aktivnosti enzima u redestiliranoj vodi pri temperaturi  $T = 30^\circ\text{C}$  (analogan je za vrijednost temperature pri  $T = 40^\circ\text{C}$ ) se provodilo na slijedeći način.

Prvo je otapanjem 300,9 mg uree u 50 mL redestilirane vode pripravljena temeljna otopina uree,  $c(\text{urea, t.o.}) = 100 \text{ mM}$ . Zatim je pripravljena otopina, otapanjem 17,2 mg bakrova klorida dihidrata ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) u 100 mL vode,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  koncentracije  $c(\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 1 \text{ mM}$  koja je korištena za zaustavljanje reakcije hidrolize uree

Temeljna otopina enzima ureaze koncentracije  $c$  (ureaza, t.o.) = 25 mg mL<sup>-1</sup>, pripremljena je otapanjem 25,4 mg ureaze u 1 mL redestilirane vode, a otopine uree u redestiliranoj vodi su pripremljene u rasponu koncentracija 1 – 100 mM.

Otopina uree u redestiliranoj vodi određene početne koncentracije stavljena je u kotlasti reaktor volumena  $V$  (reaktor) = 5 mL te je termostatirana oko 2 minute na  $T = 30^\circ\text{C}$  uz stalno miješanje magnetskom miješalicom, zatim je u reaktor, nakon uzimanja prvog uzorka u svakoj seriji mjerenja, dodano 20  $\mu\text{L}$  enzima ureaze čime je započeta reakcija hidrolize uree (koncentracija enzima ureaze u reaktoru je  $c$  (ureaza) = 0,1 mg mL<sup>-1</sup>) čime je započeto mjerenje vremena.

Uzorci su uzimani iz reaktora tijekom 5 – 6 minuta reakcije, na način da je 200  $\mu\text{L}$  uzorka pomiješano s 200  $\mu\text{L}$  otopine  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  za zaustavljanje reakcije te profiltrirano; kod koncentracija  $c$  (urea) = 10 mM i većih uzeto je po 40  $\mu\text{L}$  uzorka, miješano s po 40  $\mu\text{L}$  otopine  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  za zaustavljanje reakcije, razrijeđeno s 360  $\mu\text{L}$  redestilirane vode te profiltrirano, od profiltriranih uzoraka uzeto je po 50  $\mu\text{L}$  čemu je dodano (prema Willisovoj metodi) po 1.000  $\mu\text{L}$  reagensa i 250  $\mu\text{L}$  otopine hipoklorita za određivanje amonijevih iona. U trenutku dodavanja otopine hipoklorita započeto je mjerenje vremena te su uzorci inkubirani 15 minuta nakon čega im je spektrofotometrom izmjerena apsorbancija na  $\lambda = 685 \text{ nm}$ , promjena apsorbancije u vremenu je prikazana grafički (slika 3.10.)



**Slika 3.10.** Grafički prikaz promjene apsorbancije u vremenu za početnu koncentraciju uree  $c$  (urea) = 2 mM ( $T = 30^\circ\text{C}$ ,  $c$  (ureaza) = 0,1 mg L<sup>-1</sup>)

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

Spektrofotometrijskom metodom je određen utjecaj kalcijevih iona na aktivnost enzima ureaze u redestiliranoj vodi kao mediju te na temperaturama od  $T = 30^\circ\text{C}$  i  $T = 40^\circ\text{C}$

Temeljem promjene apsorbancije u ovisnosti o vremenu reakcije prema izrazu (3.2.) izračunate su specifične aktivnosti enzima,  $A_s$  [ $\text{U mg}^{-1}$ ] pomoću kojih je procijenjena konstanta inhibicije enzima ureaze sa kalcijevim ionima.

### 3.2.5. Hidroliza uree u kotlastom reaktoru i sinteza nanočestica kalcijeva karbonata

U kotlastim reaktorima volumena  $V$  (reaktora) = 5 mL na temperaturama  $T = 30^\circ\text{C}$  i  $T = 40^\circ\text{C}$  provedeno je po 2 eksperimenata na svakoj temperaturi:

- hidroliza uree uz enzim ureazu u redestiliranoj vodi
- sinteza nanočestica kalcijevog karbonata u reakciji hidrolize uree uz enzim ureazu i dodatak kalcijevog klorida u redestiliranoj vodi.

Početni uvjeti eksperimenata dani su u tablici 3.1.

**Tablica 3.1.** Početni uvjeti eksperimenata

EKSPERIMENT	T=30°C			T=40°C		
	$c$ (urea), [mM]	$c$ (ureaza), [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]	$c$ ( $\text{CaCl}_2$ ), [mM]	$c$ (urea), [mM]	$c$ (ureaza), [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]	$c$ ( $\text{CaCl}_2$ ), [mM]
<b>a</b>	201,47	0,44	/	200,79	0,4	/
<b>b</b>	199,8	0,42	199,43	200,47	0,42	199,97

Hidroliza uree u redestiliranoj vodi (mediju) provedena je na dvije temperature,  $T = 30^\circ\text{C}$  i  $T = 40^\circ\text{C}$ . Točno određena masa uree otopljena je u 0,5 mL redestilirane vode te pomiješana s još 4,0 mL medija u reaktoru volumena  $V$  (reaktor) = 5 mL. U reaktor je zatim dodana i određena količina ureaze otopljena u 0,5 mL medija čime je aproksimiran početak eksperimenta. Nakon toga, u pravilnim vremenskim intervalima tijekom tri sata reakcije uzimano je po 100  $\mu\text{L}$  uzoraka koji su miješani s po 100  $\mu\text{L}$   $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  za zaustavljanje reakcije i s po 800  $\mu\text{L}$  redestilirane vode za razrjeđivanje uzoraka. Uzorci su zatim profiltrirani te im je određivana koncentracija amonijevih iona na spektrofotometru prema Willisovoj metodi.

Sinteza nanočestica kalcijevog karbonata u reakciji hidrolize uree u navedenom mediju uz enzim ureazu provedena je uz dodatak kalcijevog klorida također na dvije temperature,  $T = 30^\circ\text{C}$  i  $T = 40^\circ\text{C}$ . Točno određena masa uree otopljena je u 0,5 mL medija te pomiješana s određenom masom  $\text{CaCl}_2$  otopljenog u 0,5 mL medija te s još 3,5 mL medija u reaktoru volumena  $V$  (reaktor) = 5 mL. U reaktor je zatim dodana i određena količina ureaze otopljena u 0,5 mL medija čime je aproksimiran početak eksperimenta. Nakon toga, u pravilnim vremenskim intervalima tijekom 3,5 sata reakcije uzimano je po 100  $\mu\text{L}$  uzoraka koji su miješani s po 100  $\mu\text{L}$   $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  za zaustavljanje reakcije i s po 800  $\mu\text{L}$  redestilirane vode za razrjeđivanje uzoraka. Uzorci su zatim profiltrirani te im je određivana koncentracija amonijevih iona na spektrofotometru i koncentracija kalcijevih iona na atomskom

apsorpcijskom spektrometru. Nakon završene reakcije, reakcijska smjesa je centrifugirana na 4.500 okr/min u trajanju od  $t = 5$  min nakon čega su dobivene nanočestice isprane s redestiliranom vodom i ponovno centrifugirane na isti način (postupak ispiranja ponovljen je dva puta). Nakon pranja čestice su sušene u liofilizatoru. Dobivene nanočestice analizirane su na pretražnom elektronskom mikroskopu (SEM).

#### 3.2.6. Obrada rezultata

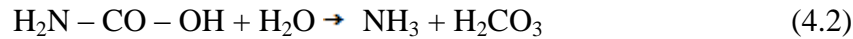
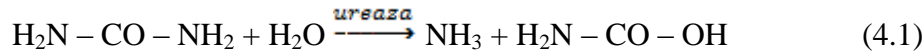
Programskim paketom *Scientist* su obrađeni eksperimentalni podaci i provedena je simulacija na temelju napisanog modela i eksperimentalnih podataka. Nelinearnom regresijom uz upotrebu metode najmanjih kvadrata i simpleks metode procjenjeni su traženi parametri. Procjena parametara različitim metodama ima cilj pronaći minimalni zbroj kvadrata greške između seta eksperimentalnih podataka i seta podataka izračunatih pomoću modela.

Kada postoji velika razlika između početne vrijednosti parametara i njegove prave vrijednosti koristi se simpleks metoda, ona je dobra za određivanje približne vrijednosti parametara. Simulaciju provodimo na temelju napisanog modela i procjenjenih parametara rješavanjem niza diferencijalnih jednadžbi određenog modela. Numeričke metode za rješavanje seta diferencijalnih jednadžbi koje se koriste u programskom paketu *Scientist* su: Euler-ova metoda, metoda Runge Kutta IV, Bulirsch-Stoer metoda te Episode algoritam.

Kinetičkim mjerenjima odnosnom iz ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji su određeni parametri kao što su maksimalna brzina reakcije, Michaelis – Menteničina konstanta, konstanta otapanja i konstanta inhibicije. Dobiveni parametri su koristili za simulacije pomoću modela, odnosno za predviđanje promjene koncentracija produkata i reaktanata s vremenom u reaktorskom sustavu.

#### 4. MATEMATIČKI MODEL

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



U radu su se pored reakcije hidrolize uree provodile i reakcije dobivanja nanočestica korištenjem produkata hidrolize uree, odnosno hidroksid i karbonatnih iona. Dodatkom kalcijevog klorida u reaktor u kojem se odvija hidroliza uree nastaju nanočestice kalcijevog karbonata prema jednadžbi (4.5):



#### 4.1. KINETIČKI MODEL

Kinetički model hidrolize uree u kotlastom reaktoru opisan je Michaelis – Menteničinom kinetikom za jednosupstratne reakcije te je dan izrazom (4.6).

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

Prilikom dobivanja kalcijevog karbonata u sustavu se nalaze kalcijevi ioni koji inhibiraju reakciju hidrolize uree te je kinetika hidrolize uree u tom slučaju opisana Michaelis – Menteničinom kinetikom s nekompetitivnom inhibicijom kalcijevim ionima (4.7).

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

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

$$r_3 = k \cdot c_{\text{Ca}^{2+}} \cdot c_{\text{CO}_3^{2-}} \quad (4.8)$$

## 4.2. REKTORSKI MODEL

Rektorski model u kotlastom reaktoru za reakciju hidrolize uree sastoji se od bilancne jednačbe za ureu (4.9) te jednačbe za nastajanje amonijevog iona (4.10).

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

$$\frac{dc_{NH_4^+}}{dt} = 2 \cdot r_1 \quad (4.10)$$

Za reakciju hidrolize uree u prisustvu kalcijevih iona prilikom čega nastaju nanočestice kalcijevog karbonata rektorski model se sastoji od bilancnih jednačbi za ureu (4.11), amonijak (4.12), karbonatne ione (4.13) te kalcij (4.14). Pretpostavljeno je da je brzina nastajanja karbonatnih iona jednaka brzini nastajanja karbonatne kiseline.

$$\frac{dc_{urea}}{dt} = -r_2 \quad (4.11)$$

$$\frac{dc_{NH_4^+}}{dt} = 2 \cdot r_2 \quad (4.12)$$

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

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



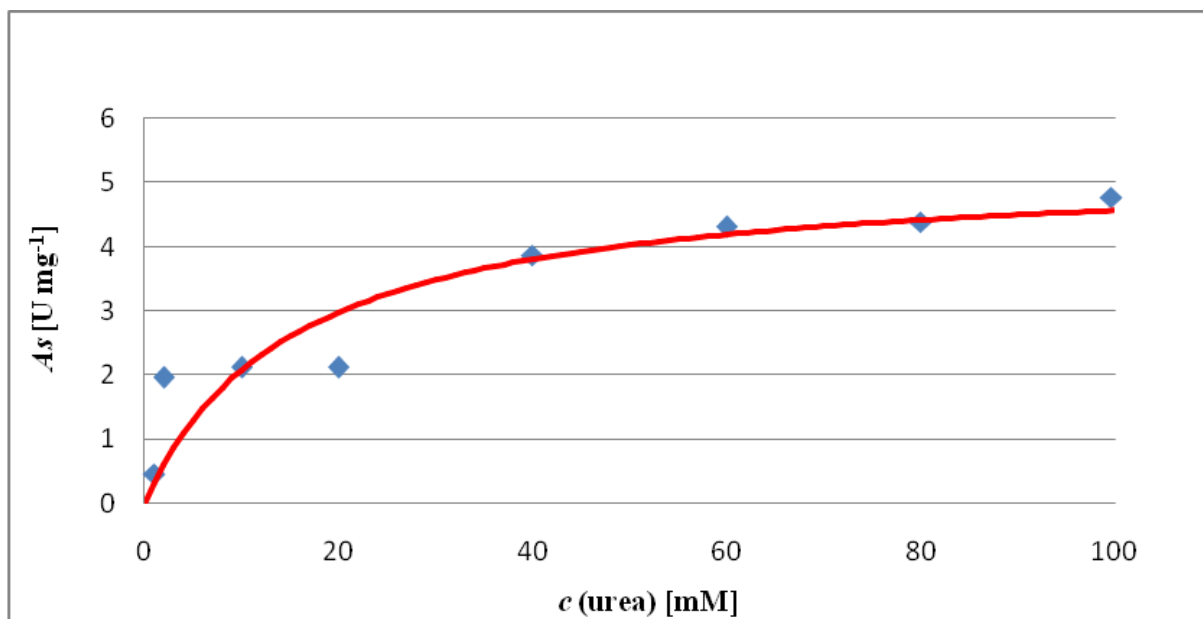
## 5. REZULTATI I RASPRAVA

### 5.1. KINETIKA ENZIMA UREAZE

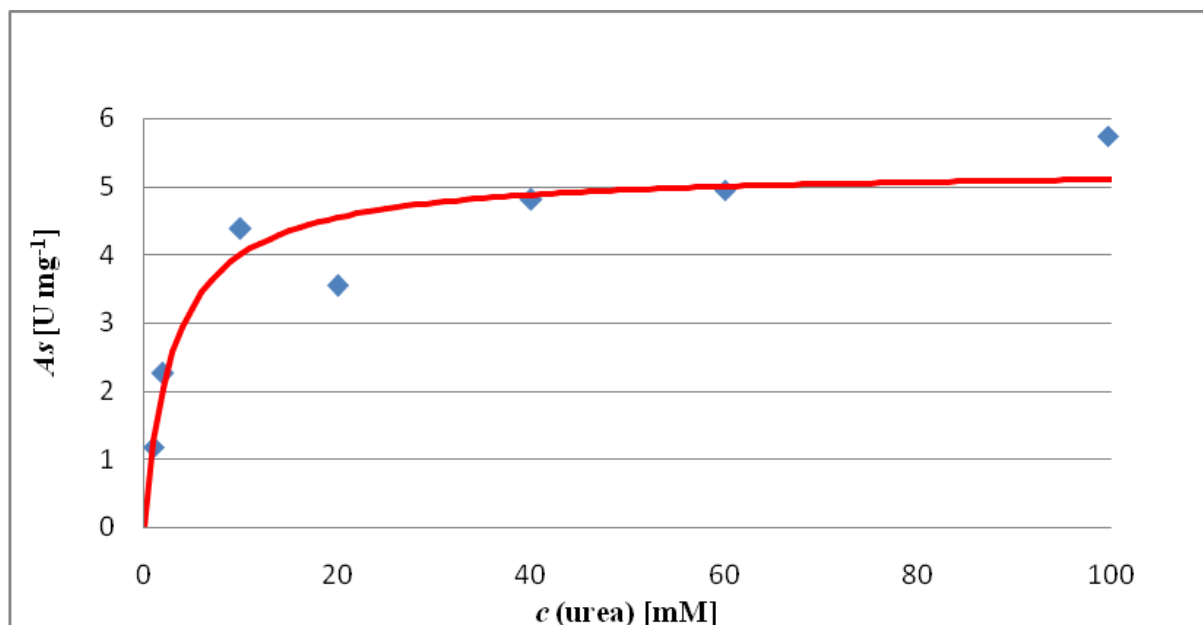
#### 5.1.1 Kinetika enzima ureaze u redestiliranoj vodi

Spektrofotometrijskom metodom je određena kinetika enzima ureaze u redestiliranoj vodi pri temperaturama  $T = 30^{\circ}\text{C}$  i  $T = 40^{\circ}\text{C}$ .

Određivanjem početne brzine raspada uree uz dodatak enzima ureaze pri različitim koncentracijama uree određivana je kinetika enzima ureaze. Spektrofotometrom je praćen porast koncentracije amonijevih iona. Dobiveni rezultati prikazani su kao ovisnost promjene apsorbancije o vremenu trajanja reakcije te je pomoću izraza (3.2) određena specifična aktivnost enzima,  $A_s$  [ $\text{U mg}^{-1}$ ] za otopine uree na dvije temperature u redestiliranoj vodi. Kinetika reakcije je prikazana kao ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentracijama uree. rezultati su dani slikama 5.1.i 5.2.



**Slika 5.1.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ureaze o koncentracijama uree u redestiliranoj vodi na  $T=30^{\circ}\text{C}$



**Slika 5.2.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ureaze o koncentracijama uree u redestiliranoj vodi na  $T=40^{\circ}\text{C}$

Prikazani podaci za specifičnu aktivnost enzima ureaze u redestiliranoj vodi pri obje temperature se vrlo dobro slažu s podacima dobivenim simulacijom u programskom paketu *Scientist* korištenjem Michaelis – Menteničine kinetike (jednadžba 4.6), odnosno možemo zaključiti da pretpostavljena Michaelis – Menteničina kinetika vrlo dobro opisuje reakcije. Pri svim uvjetima u *Scientist*-u su nelinearnom regresijom procijenjeni parametri Michaelis – Menteničine kinetike te su dani u tablici 5.1.

**Tablica 5.1.** Parametri Michaelis – Menteničine kinetike procijenjeni u *Scientist*-u

Procijenjeni parametri	$T = 30^{\circ}\text{C}$	$T = 40^{\circ}\text{C}$
	Redestilirana voda	
$V_m$ [U mg <sup>-1</sup> ]	5,264	5,26
$K_m^S$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	15,326	3,15

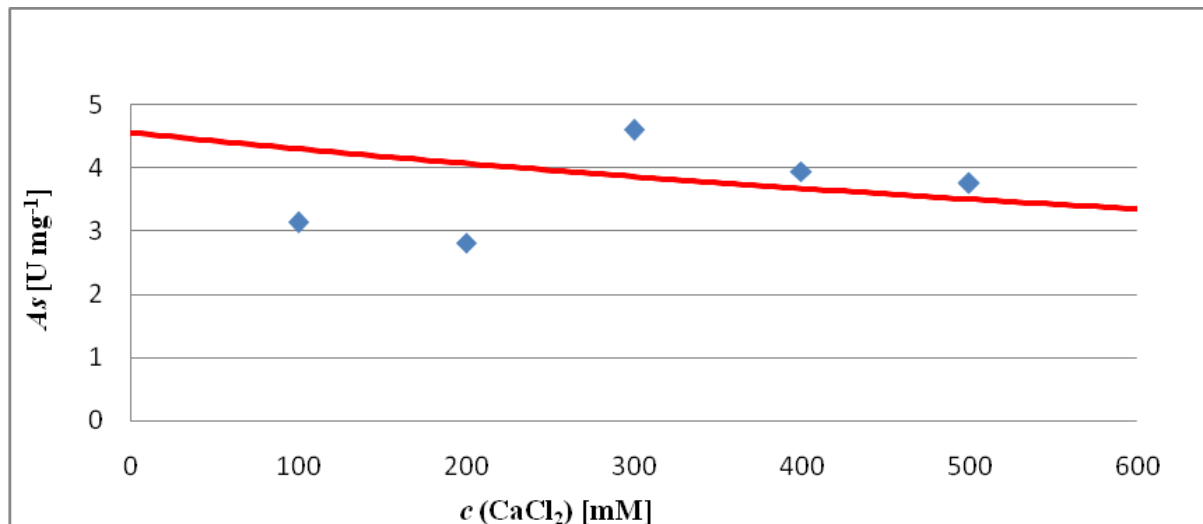
Vrijednost maksimalne brzine reakcije  $V_m$  je podjednaka u oba uvjeta temperature te ne pokazuje veliko odstupanje.

Vrijednost Michaelis – Menteničine konstante,  $K_m^S$ , opisuje afinitet enzima prema supstratu. Odnosno, što je niža vrijednost  $K_m^S$  enzim će biti specifičniji za određeni supstrat. Iz vrijednosti iz tablice vidimo da je specifičnost enzima ureaze veća pri višoj temperaturi što pokazuje da će brzina hidrolize uree biti veća pri višoj temperaturi.

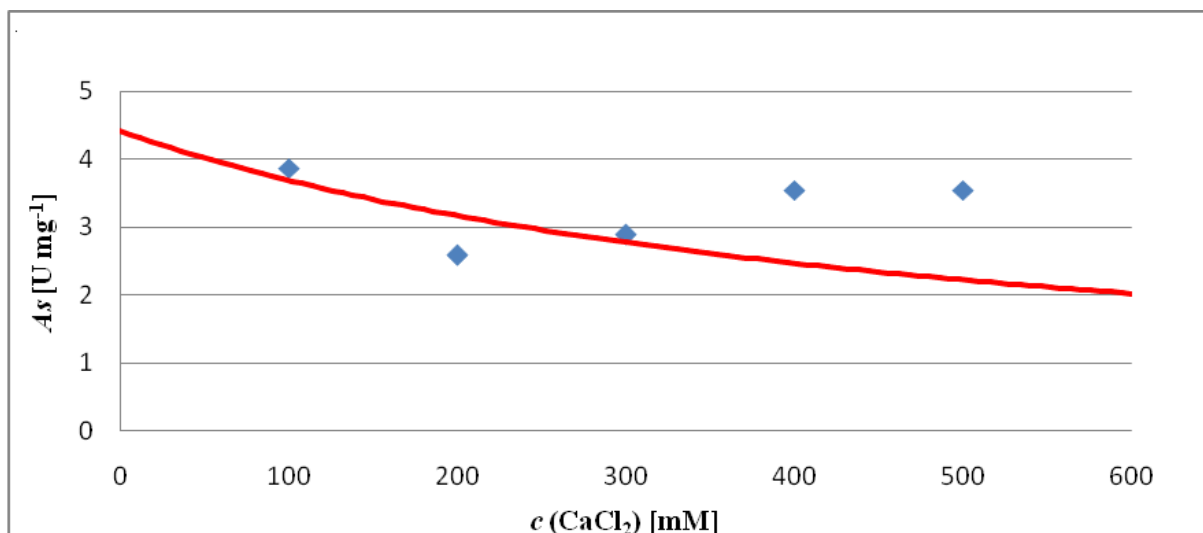
### 5.1.2 Utjecaj kalcijevih iona na kinetiku enzima ureaze

Mjerenjem specifične aktivnosti enzima ureaze određivali smo utjecaj različitih koncentracija kalcijevih iona na aktivnost ureaze, odnosno na početnu reakcijsku brzinu u reakciji hidrolize uree. Mjerenje je provedeno u mediju odnosno redestiliranoj vodi na dvije različite

temperature  $T = 30^{\circ}\text{C}$  i  $T = 40^{\circ}\text{C}$ , uz stalnu koncentraciju ureaze  $c$  (ureaza) =  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  te uz stalnu koncentraciju uree  $c$  (urea) =  $100 \text{ mM}$ . Dobiveni rezultati iskazani su kao ovisnost specifične aktivnosti enzima ureaze o koncentraciji  $\text{CaCl}_2$  te su prikazani Slikom 5.3. i 5.4.



**Slika 5.3.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ureaze o koncentracijama  $\text{CaCl}_2$  u redestiliranoj vodi na temperaturi  $T=30^{\circ}\text{C}$



**Slika 5.4.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ureaze o koncentracijama  $\text{CaCl}_2$  u redestiliranoj vodi na temperaturi  $T=40^{\circ}\text{C}$

Iako se rezultati dobiveni eksperimentalno ne slažu u potpunosti sa onim dobivenim iz simulacije može se reći da su zadovoljavajući. Prema dobivenim rezultatima može se

zaključiti da kalcijevi ioni inhibiraju aktivnost enzima ureaze, a na temelju literaturnih podataka (Qin & Cabral, 1994.) zaključeno je da se radi o nekompetitivnoj inhibiciji. Konstante inhibicije su, prema izrazu (4.7), procijenjene nelinearnom regresijom u *Scientist-u*, a njihove vrijednosti dane su u Tablici 5.2. Vidljivo je da su te vrijednosti dosta visoke, posebno u odnosu na vrijednosti Michaelis – Menteničine konstante,  $Km^S$ , (Tablica 5.1.), što ukazuje na to da  $Ca^{2+}$  ioni ne inhibiraju značajno reakciju hidrolize uree uz ureazu.

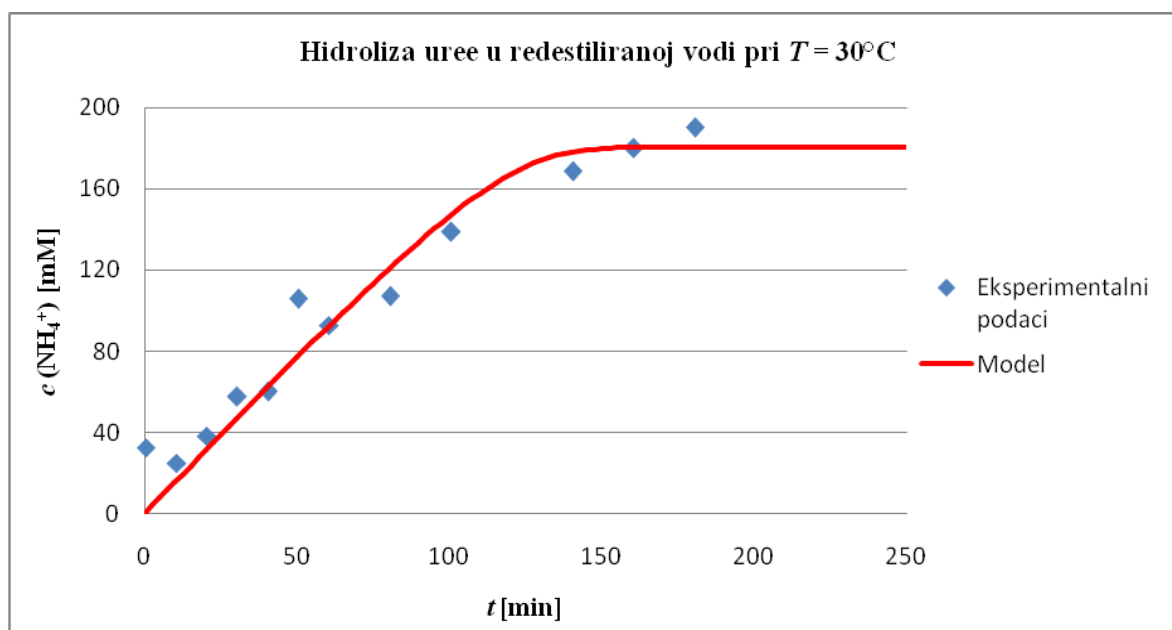
**Tablica 5.2.** Konstante inhibicije kalcijevim ionima u reakciji hidrolize uree procijenjene u *Scientist-u*

Procjenjeni parametar	$T = 30^{\circ}C$	$T = 40^{\circ}C$
	Redestilirana voda	
$K_i$ [mM]	1660,315	507,689

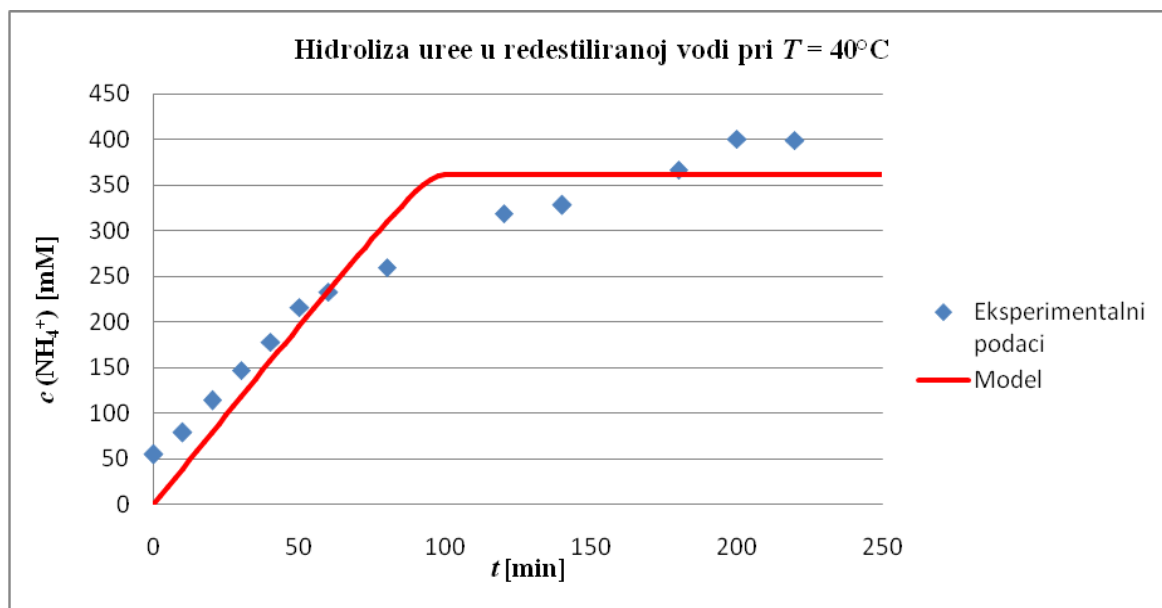
## 5.2. HIDROLIZA UREE U KOTLASTOM REAKTORU

Kako bi smo potvrdili model pretpostavljen izrazima 4.6, 4.9 i 4.10. provedena je hidroliza uree u kotlastom reaktoru i redestiliranoj vodi kao mediju na temperaturama  $T = 30^{\circ}C$  i  $T = 40^{\circ}C$ .

Na grafičkim prikazima prikazani su dobiveni rezultati ispitivanja reakcije hidrolize uree u redestiliranoj vodi i na dvjema temperaturama  $T = 30^{\circ}C$  i  $T = 40^{\circ}C$  i prikazani su kao ovisnost koncentracije amonijevih iona o vremenu trajanja reakcije. Na slikama 5.5. i 5.6. uspoređeni su dobiveni eksperimentalni podaci sa podacima dobivenim simuliranjem u programskom paketu *Scientist*.



**Slika 5.5.** Rezultati hidrolize uree u redestiliranoj vodi pri temperaturi  $T = 30^{\circ}C$  ( $c(\text{urea}) = 201,47 \text{ mM}$ ;  $c(\text{ureaza}) = 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $V(\text{reaktor}) = 5 \text{ mL}$ )



**Slika 5.6.** Rezultati hidrolize uree u redestiliranoj vodi pri temperaturi  $T = 40^{\circ}\text{C}$  ( $c(\text{urea}) = 200,79 \text{ mM}$ ;  $c(\text{ureaza}) = 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $V(\text{reaktor}) = 5 \text{ mL}$ )

Iz priloženih grafičkih prikaza može se vidjeti kako se slažu eksperimentalni i simuliranjem dobiveni podaci, dok se neka odstupanja eksperimenta od modela mogu objasniti isparavanjem amonijaka iz otopine. Koncentracija amonijevih iona na višoj temperaturi od  $T = 40^{\circ}\text{C}$  ima veće vrijednosti zbog bolje topivosti amonijaka na višim temperaturama dok u eksperimentu na temperaturi od  $T = 30^{\circ}\text{C}$  imamo manju koncentraciju amonijevih iona zbog manje topivosti što u konačnici rezultira većim isparavanjem amonijaka. U tablici 5.3. prikazan je udio isparenog amonijaka.

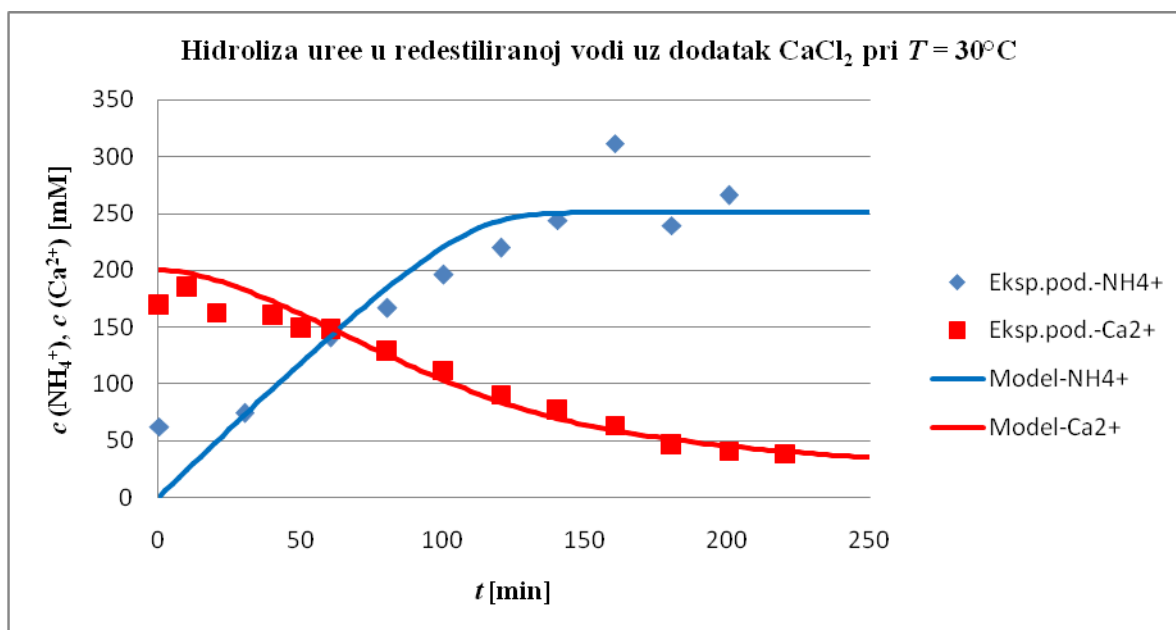
**Tablica 5.3.** Udio isparenog amonijaka tijekom reakcije hidrolize uree uz enzim ureazu

Procjenjeni parametar	$T = 30^{\circ}\text{C}$	$T = 40^{\circ}\text{C}$
	Redestilirana voda	
udio isparenog amonijaka[%]	55	9,5

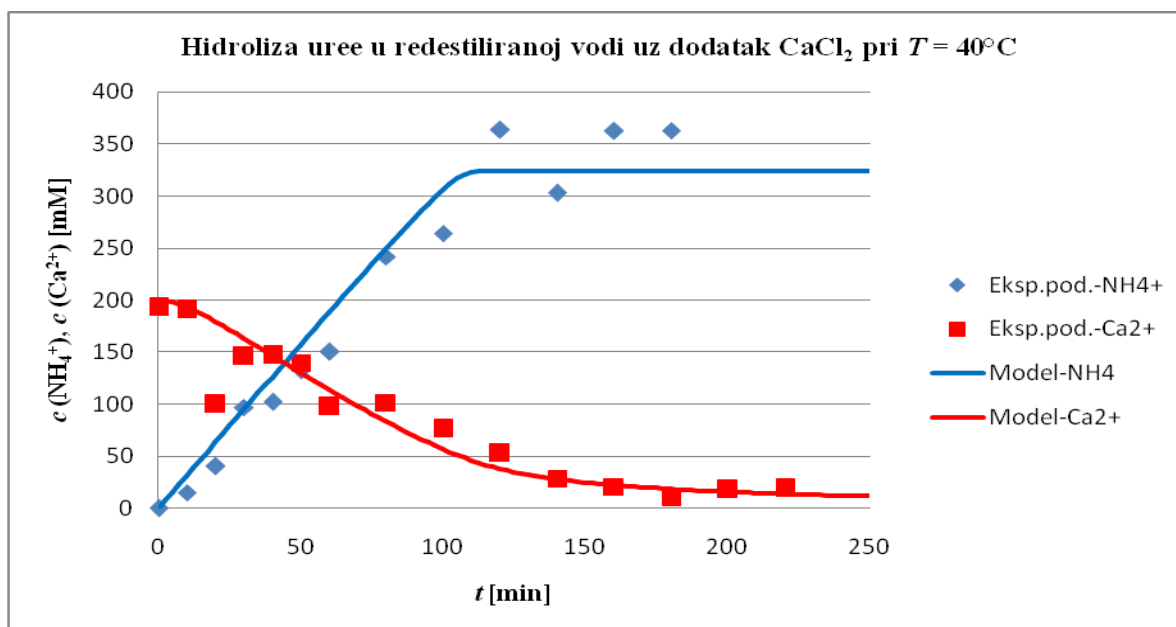
### 5.3. SINTEZA NANOČESTICA KALCIJEVOG KARBONATA

Pri već navedenim uvjetima u redestiliranoj vodi i dvije temperature  $T = 30^{\circ}\text{C}$  i  $T = 40^{\circ}\text{C}$  provedena je sinteza nanočestica kalcijevog karbonata, tako da je u otopine u kojima je provedena reakcija hidrolize uree dodan kalcijev klorid. Na grafičkim prikazima su prikazani rezultati dobiveni spektrofotometrijskim mjerenjima kao ovisnost koncentracije amonijevih iona, odnosno koncentracije kalcijevih iona određenih atomskim apsorpcijskim

spektrometrom u ovisnosti o vremenu trajanja reakcije. Slike 5.7. i 5.8. prikazuju i usporedbu eksperimentalnih podataka i podatka dobivenih iz simulacije programskim paketom *Scientist*.



**Slika 5.7.** Rezultati dobiveni sintezom nanočestica kalcijevog karbonata u redestiliranoj vodi uz dodatak  $\text{CaCl}_2$  pri temperaturi  $T = 30^\circ\text{C}$  ( $c(\text{urea}) = 199,8 \text{ mM}$ ;  $c(\text{ureaza}) = 0,42 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $c(\text{CaCl}_2) = 199,43 \text{ mM}$ ;  $V(\text{reaktor}) = 5 \text{ mL}$ )



**Slika 5.8.** Rezultati dobiveni sintezom nanočestica kalcijevog karbonata u redestiliranoj vodi uz dodatak  $\text{CaCl}_2$  pri temperaturi  $T = 40^\circ\text{C}$  ( $c(\text{urea}) = 200,47 \text{ mM}$ ;  $c(\text{ureaza}) = 0,42 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $c(\text{CaCl}_2) = 199,97 \text{ mM}$ ;  $V(\text{reaktor}) = 5 \text{ mL}$ )

Na grafičkim prikazima (5.7. i 5.8.) dobro vidimo kako se eksperimentalni podaci slažu vrlo dobro sa podacima iz matematičkog modela pretpostavljenog za sintezu nanočestica kalcijevog karbonata iz produkata reakcije hidrolize uree uz enzim ureazu te prisustvo  $\text{CaCl}_2$ .

Zbog nedovoljno brzog otapanja amonijaka, odnosno njegovog isparavanja iz otopine prisutna su određena odstupanja eksperimentalnih od teorijskih podataka. Iz tablice 5.4. je vidljivo kako je udio isparenog amonijaka tokom sinteze nanočestica manji od onog tokom reakcije hidrolize uree što se događa zbog pristnosti kalcijevih iona u reakcijskoj smjesi što povećava topjivost amonijaka.

**Tablica 5.4.** Udio isparenog amonijaka tijekom sinteze nanočestica kalcijevog karbonata

Procjenjeni parametar	$T = 30^\circ\text{C}$	$T = 40^\circ\text{C}$
	Redestilirana voda	
<i>udio isparenog amonijaka</i> [%]	37,5	19

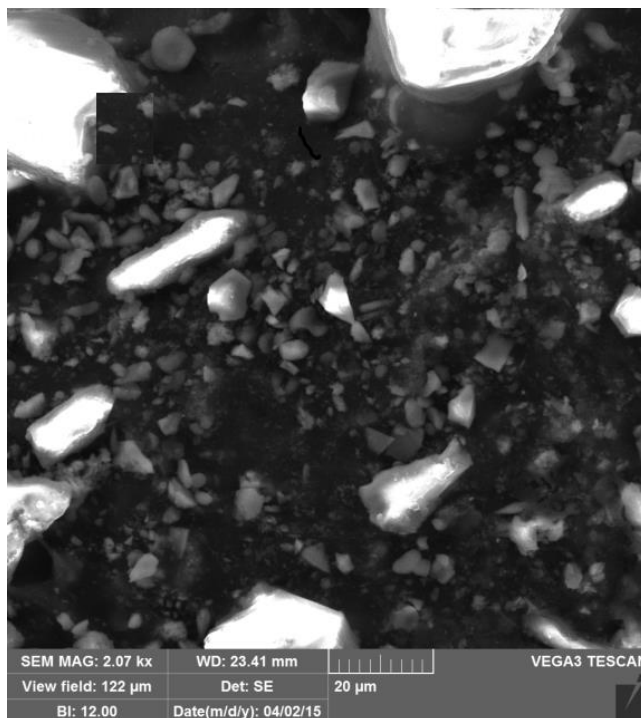
U tablici 5.5. prikazane su konstante brzine nastajanja nanočestica (jedn. 4.8.) koja je određena iz grafičkih prikaza 5.7. i 5.8. prema njima se može zaključiti kako je brzina nastajanja manja na nižoj temperaturi ( $T = 30^\circ\text{C}$ ). Brzina nastajanja nanočestica proporcionalna je brzini hidrolize uree, odnosno nastajanju karbonatnog iona te je u skladu s procjenjenim kinetičkim parametrima hidrolize uree (Tablica 5.1).

**Tablica 5.5.** Brzina nastajanja nanočestica kalcijevog karbonata

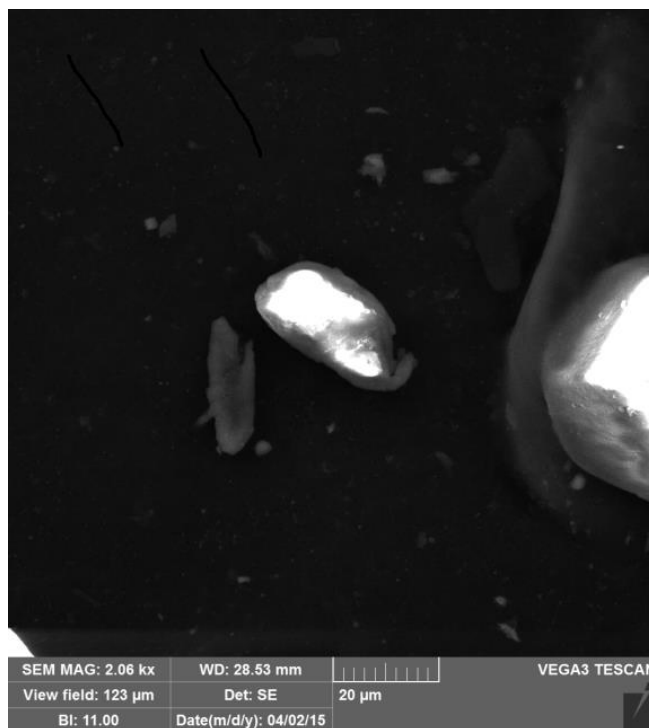
Procjenjeni parametar	$T = 30^\circ\text{C}$	$T = 40^\circ\text{C}$
	Redestilirana voda	
<i>k</i> [ $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$ ]	0,5777	1,1707

#### 5.4. KARAKTERIZACIJA DOBIVENIH NANOČESTICA PRETRAŽNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM

Sintetizirane nanočestice u redestiliranoj vodi kao mediju i na dvije temperature  $T = 30^\circ\text{C}$  i  $T = 40^\circ\text{C}$  analizirane su pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa pri različitim povećanjima (između 50 i 8.800 puta). Na slikama 5.9. i 5.10. prikazane su dobivene nanočestice, a u tablici 5.6. dobiveni rezultati.



**Slika 5.9.** Prikaz nanočestica snimljenih pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa:redestilirana voda i  $T=30^{\circ}\text{C}$  (uvećanje 2.070x)



**Slika 5.10.** Prikaz nanočestica snimljenih pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa:redestilirana voda i  $T=40^{\circ}\text{C}$  (uvećanje 2.060x)



Tablica 5.6. Prosječne veličine sintetiziranih nanočestica

Parametri	T=30°C	T=40°C
	Redestilirana voda	
Raspon veličina [ $\mu\text{m}$ ]	3,809 - 5,555	7,096 - 32,903
Prisječna veličina $\bar{d}$ [ $\mu\text{m}$ ]	4,696	20,581

Na temelju podataka iz tablice 5.6. vidljivo je da su čestice koje su sintetizirane na višim temperaturama većih dimenziju u odnosu na one sintetizirane na nižoj temperaturi. Navedeno može biti i posljedica veće brzine reakcije u eksperimentima provedenim na višim temperaturama, odnosno brže sinteze kalcijeva karbonata. (*Sondi & Matijević, 2001.*) Dakle, možemo pretpostaviti da je u eksperimentima provedenim na višim temperaturama došlo do formiranja agregata, što objašnjava veće dimenzije čestica.

## 6. ZAKLJUČAK

U redestiliranoj vodi kao mediju pri dvjema različitim temperaturama  $T = 30^{\circ}\text{C}$  i  $T = 40^{\circ}\text{C}$  ispitali smo kinetiku enzima ureaze, odnosno specifičnu aktivnost enzima ureaze.

Michaelis – Menteničinom kinetikom opisana je kinetika hidrolize uree te su procijenjeni parametri  $V_m$  i  $K_m^S$ . Vrijednost maksimalne brzine reakcije,  $V_m$ , pokazuje da se porastom temperature ne mijenja maksimalna brzina reakcije. Procijenjene vrijednosti Michaelis – Menteničine konstante,  $K_m^S$ , pokazuju kako ureaza pokazuje veći afinitet prema supstratu (urei) na višoj temperaturi. Dodavanjem kalcijeva klorida dolazi do blagog smanjenja brzine reakcije te je zaključeno kako kalcijevi ioni inhibiraju enzim ureazu nekompetitivnom inhibicijom. Procijenjene konstante inhibicije,  $K_i$ , ukazuju kako kalcij ne utječe značajno na brzinu reakcije.

Matematički model koji je pretpostavljen vrlo dobro opisuje sintezu nanočestice kalcijevog karbonata iz produkata reakcije hidrolize uree uz enzim ureazu te prisustvo  $\text{CaCl}_2$ . Zbog djelomičnog isparavanja amonijaka tokom reakcije dolazi do odstupanja eksperimentalnih podataka koncentracije amonijevih iona od onih predviđenih programskim paketom. Ova odstupanja su manja pri višim temperaturama i tokom sinteze nanočestica, zbog veće topivosti amonijaka pri višim temperaturama i u prisustvu kalcijevih iona. Iz procijenjene konstante brzina nastajanja nanočestica kalcijevog karbonata te je zaključeno da je ona manja na nižoj temperaturi ( $T = 30^{\circ}\text{C}$ ).

Pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa analizirane su sintetizirane nanočestice te se dobio uvid u njihove dimenzije. Dobiveni rezultati pokazali su kako čestice sintetizirane pri nižim temperaturama imaju manje dimenzije u odnosu na one sintetizirane pri višim temperaturama, i time se može zaključiti da bi za sintezu manjih nanočestica trebalo provoditi proces pri uvjetima nižih temperatura odnosno pri nižim brzinama.

**7. LITERATURA**

1. Anderson, S.; Vasu D. A.; Huanga, J.; Viswanatha, T., A novel role for calcite in calcium homeostasis, Federation of European Biochemical Societies, 1992, 94-96.
2. Dunn I.J., Heinzle E., Ingham J., Prenosil J.E., Principles, Applications and Modelling with PC Simulations, Biol React Eng, Wiley-VCH, Weinheim (1992) 25 – 31, 113.
3. Gomzi Z., Kemijski reaktori, HINUS, Zagreb, (1998) 36 – 55, 124 – 125.
4. Illanes, A., Enzyme biocatalysis: principles and application, Introduction, Springer 2008, 1-4,16-18.
5. Illanes,A. ; Altamirano,C. Enzyme biocatalysis: principles and application, Homogeneous enzyme kinetics, Springer 2008,205-207,209.
6. Khodashenas Bahareh; Ghorbani, Hamid Reza, Synthesis of silver nanoparticles with different shapes, Arabian Journal of Chemistry, 2014.
7. Li, X.; Xu, H.; Chen, Z.S.; Chen, G.,Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications, Journal of nanomaterials, Hindawi publishing corporation, 2011, 1, 3, 9.
8. Mobley, H.L.T.; Hausinger, R.P. Microbial Ureases:Significance, regulation and molecular characterization, American society for microbiology, 1989, 86-90,98-100.
9. Modolo, L. V.; De Souza A. X.; Horta L. P. ; Araujo D. P.; de Fatima A.: An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review, Journal of Advanced Research, 2015, 35-44.
10. Qin Y., Cabral J.M.S., Kinetic studies of the urease-catalyzed hydrolysis of urea in a buffer-free system, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 49 (1994) 217 – 240.
11. Sondi I., Matijević E., Homogeneous precipitation of calcium carbonates by enzyme catalyzed reaction, Journal of Colloid and Interface Science 238 (2001) 208 – 214.
12. Sondi I., Salopek-Sondi B., Influence of the primary structure of enzymes on the formation of CaCO<sub>3</sub> polymorphs: A comparison of plant (*Canavalia ensiformis*) and bacterial (*Bacillus pasteurii*) ureases, 2005, 8876-8882.
- 13.. Ul Islam Nazar; K. Jalil; M. Shahid; A. Rauf; N. Muhammad; A. Khan; M. Raza Shah; M. Atif Khan, Green synthesis and biological activities of gold nanoparticles functionalized with *Salix alba*, Arabian Journal of Chemistry, 2015.

14. Willis R.B., Montgomery M.E., Allen P.R., Improved Method for Manual, Colorimetric Determination of Total Kjeldahl Nitrogen Using Salicylate, J.Agric Food Chem. (1996) 1804 – 1807.

**POPIS OZNAKA**

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

$b$  - duljina puta svjetlosti [cm]

$c$  - koncentracija [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]

$k$  - konstanta brzine reakcije [ $\text{min}^{-1}$ ]

$K_i$  - konstanta inhibicije [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]

$K_m$  - Michaelis – Menteničina konstanta [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]

$n$  - množina tvari [mmol]

$r$  - reakcijska brzina [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$ ]

$t$  - vrijeme [min]

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

$V$  - volumen [ $\text{dm}^3$ ]

$V_m$  - maksimalna brzina reakcije [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$ ,  $\text{U mg}^{-1}$ ]

$\varepsilon$  - molarni apsorpcijski (ekstincijski) koeficijent [ $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]

$\lambda$  - valna duljina zračenja [nm]

## **ŽIVOTOPIS**

Rođen sam 30. lipnja 1993. godine u Sisku. U razdoblju od 2000. do 2008. godine pohađao sam osnovnu školu *Sunja* u Sunji. Srednjoškolsko obrazovanje nastavio sam u gimnaziji *Sisak* u Sisku. *Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije* upisao sam 2012. godine na preddiplomskom studiju *Kemijsko inženjerstvo*. Studentsku praksu odradio sam u laboratoriju zavoda za javno zdravstvo sisačko-moslavačke županije.