

Imobilizacija enzima na silanizirane magnetske nanočestice funkcionalizirane (3-aminopropil)trimetoksisilanom

Mutak, Doroteja

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:149:752653>

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

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



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Doroteja Mutak

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Doroteja Mutak

IMOBILIZACIJA ENZIMA NA SILANIZIRANE MAGNETSKE NANOČESTICE
FUNKCIONALIZIRANE (3-AMINOPROPIL)TRIMETOKSISILANOM/(3-
GLICIDILOKSIPROPIL)TRIMETOKSISILANOM

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof.dr.sc. Ana Vrsalović Presečki
2. prof.dr.sc Ana Lončarić Božić
3. doc.dr.sc Anita Šalić

Zagreb, rujan 2022.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki, koja mi je svojim stručnim savjetima, sugestijama i podrškom pomogla pri izradi ovoga rada.

Također se zahvaljujem asistentu Dini Skendroviću na stručnim sugestijama i pruženoj pomoći u laboratoriju tokom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.

Posebno hvala mojoj obitelji, prijateljima te svima koji su mi bili podrška tijekom studija.

Sažetak

Enzim deoksiriboza-5-fosfat aldolaza (DERA) katalizira reakciju dvostruke aldolne adicije dvije molekule acetaldehida i jedne molekule kloracetaldehida. Spomenuta reakcija koristi se , prilikom sinteze prekursora u proizvodnji statina. Visoka koncentracija aldehida u DERA kataliziranoj reakciji negativno utječe na stabilnost enzima.

Cilj ovog rada bio je provesti imobilizaciju enzima DERA-e na magnetske nanočestice u svrhu povećanja njegove stabilnosti. Magnetske nanočestice obložene su silikom po Stöberovom procesu te funkcionalizirane APTMS-om ((3-aminpropil)trimetoksisilanom)). Za aktivaciju su korištena tri aktivacijska sredstva: benzokinon, glutaraldehid i sukcinski anhidrid različitih koncentracija. Najbolji parametri uspješnosti procesa imobilizacije dobiveni su prilikom korištenja nosica aktiviranim s 15 %-tnim sukcinским anhidridom kao aktivacijskog sredstva, te je taj korišteno u daljnjim ispitivanjima.

Isto tako, poznato je da pH vrijednost pufera i temperatura prilikom procesa imobilizacije enzima mogu imati veliki utjecaj na aktivnost enzima, pa tako i na uspješnost procesa imobilizacije. Stoga, ispitan je utjecaj pH i temperature prilikom procesa imobilizacije enzima DERA-e. Najveća efikasnost i iskorištenje postignuti su pri temperaturi od 30 °C i pH 6.

Ključne riječi: deoksiriboza-5-fosfat aldolaza, DERA, imobilizacija enzima, magnetske nanočestice, silanizacija, benzokinon, glutaraldehid, sukcinski anhidrid

Abstract

Deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA) catalyzes the reaction of the double aldol addition of two acetaldehyde molecules and one chloroacetaldehyde molecule. The mentioned reaction is used in the synthesis of precursors for the production of statins. The high concentration of aldehyde in the DERA catalyzed reaction negatively affects the stability of the enzyme.

The aim of this work was to immobilize the DERA enzyme on magnetic nanoparticles to increase its stability. Magnetic nanoparticles were coated with silica using the Stöber method and functionalized with APTMS ((3-aminopropyl)trimethoxysilane)). Three activation agents were used: benzoquinone, glutaraldehyde and succinic anhydride at different concentrations. The highest efficiency for the immobilization process were obtained when the carrier was activated with 15 % succinic anhydride, so this carrier was used in further tests.

It is known that the pH of buffers and temperature during the process of enzyme immobilization can have an impact not only on the activity of enzymes, but also on the success of the immobilization process. Therefore, the influence of pH and temperature during the immobilization process of DERA enzyme was also investigated. The highest efficiency and yield were achieved at a temperature of 25 °C and a pH of 6.

Keywords: deoxyribose-5-phosphate aldolase, DERA, enzyme immobilization, magnetic nanoparticles, silanization, benzoquinone, glutaraldehyde, succinic anhydride

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Enzimi	3
2.1.1. Aldolaze	7
2.1.2. 2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza (DERA)	8
2.2. Imobilizacija enzima	10
2.2.1. Metode imobilizacije	11
2.2.2. Kovalentna imobilizacija	14
2.2.3. Aktivacija i funkcionalizacija nosioca	15
2.2. Nosioci za imobilizaciju	16
2.3.1. Magnetske nanočestice	18
2.3.1. Stöberov proces	19
3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1. Aparatura	21
3.1.1. Centrifuga	21
3.1.2. Tresilica	21
3.1.3. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC)	22
3.1.4. Spektrofotometar	23
3.1.5. Magnetska miješalica	24
3.2. Analitičke metode	25
3.2.1. Određivanje koncentracije proteina Bradfordovom metodom	25
3.2.2. Određivanje aktivnosti enzima DERA-e	26
3.2.3. Određivanje koncentracije reaktanata i produkata pomoću HPLC-a	26
3.3. Sinteza nanočestica i oblaganje silikom po Stöber procesu	27
3.4. Funkcionalizacija, aktivacija i imobilizacija enzima	27

4.	REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1.	Ispitivanje aktivnosti slobodnog enzima	30
4.2.	Sinteza magnetskih nanočestica	30
4.3.	Utjecaj reagensa za aktivaciju na uspješnost procesa imobilizacije.....	31
4.4.	Rezultati ispitivanja utjecaja pH pufera na uspješnost imobilizacije enzima.....	35
4.5.	Ispitivanje utjecaja temperature na uspješnost imobilizacije enzima	37
5.	ZAKLJUČAK	39
6.	LITERATURA.....	40
7.	PRILOZI.....	44
8.	POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA	46

1. UVOD

Enzimi su biološki katalizatori (poznati i kao biokatalizatori) koji ubrzavaju biokemijske reakcije u živim organizmima. Također se mogu ekstrahirati iz stanica, pa zatim koristiti za katalitičke reakcije širokog raspona komercijalno važnih procesa. Krajem devetnaestog stoljeća i početkom dvadesetog stoljeća napravljen je značajan napredak u ekstrakciji, karakterizaciji i komercijalnoj eksploataciji mnogih enzima, ali tek su 1920-ih kristalizirani enzimi, otkrivajući da je katalitička aktivnost povezana s molekulama proteina. Kao katalizatori, enzimi su potrebni samo u vrlo niskim koncentracijama, a ubrzavaju reakcije bez da se troše tijekom reakcije.¹ Kao što je spomenuto, enzimi mogu biti aktivni i izvan stanica, međutim važno je održavati uvjete što sličnije onima u stanici. Takvi se uvjeti odnose na pH vrijednosti koje su neutralne ili blizu neutralnih, temperature koje su blizu sobnih 20-50 °C i razrijeđene vodene otopine, a nazivaju se fiziološki uvjeti. Inženjeri, prilikom provođenja biotransformacija, žele postići visoke koncentracije produkta, visoku volumnu produktivnost te dobro iskorištenje biokatalizatora, stoga ga izlažu uvjetima koji su ipak različiti od onih u stanici. Posljedično, dolazi do pada aktivnosti biokatalizatora njegovom produljenom upotrebom. Kako bi se biokatalizator mogao koristiti u industrijskom procesu, treba ga prevesti u oblik u kojem će imati veću stabilnost. Jedan od načina da se to postigne je postupak imobilizacije.²

Posljednjih godina pozornost privlači enzim DERA (2-deoksiroboza-5-fosfat aldolaza), iz obitelji aldolaza, koji katalizira reakciju dvostruke aldolne adicije dvije molekule acetaldehida i jedne molekule kloroacetaldehida. Ova reakcija se koristi za sintezu ključnog prekursora za proizvodnju statinskih lijekova, kao što je atorvastatin. Međutim, u prisutnosti većih koncentracija aldehida dolazi do inaktivacije enzima DERA-e, pa je njegova praktična primjena ograničena na laboratorijsko mjerilo. Obzirom na lošiju stabilnost enzima u prisutnosti aldehida, nužan je razvoj metoda za povećanje njegove stabilnosti i isplativosti za industrijski proces.

Imobilizirani enzimski sustavi 'fiksiraju' enzim tako da se može višestruko ponovno koristiti, što ima značajan utjecaj na troškove proizvodnje. Ova prednost jednostavnosti ponovne uporabe imobiliziranih biokatalizatora jedan je od glavnih razloga zašto se takvi sustavi komercijalno preferiraju. Također imobilizacijom se povećati stabilnosti biokatalizatora, što se manifestira kao: povećana brzina reakcije, produljeno trajanje katalize, veća operativna

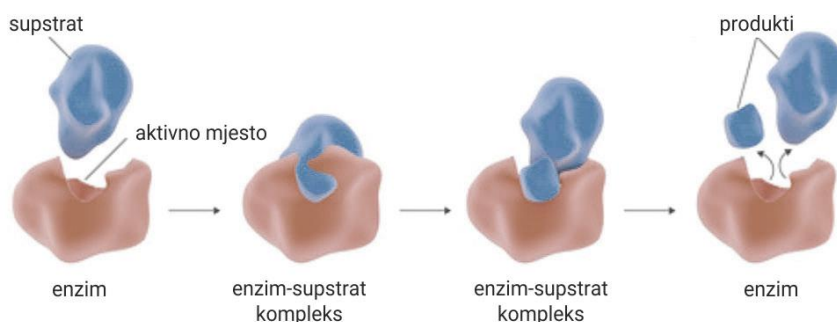
stabilnost pri ekstremnim pH vrijednostima i temperature. Nakon što je biokatalizator imobiliziran, također se može staviti u niz reaktora kontinuiranog načina rada. Kontrola takvih reaktora s kontinuiranim protokom može biti visoko automatizirana, što dovodi do znatnih ušteda u troškovima proizvodnje.¹ Metoda imobilizacije primijenjena u ovom radu jest kovalentna imobilizacija, a kao nosioci sintetizirane su magnetske nanočestice. Enzimi imobilizirani na magnetske nanočestice pokazuju visoku aktivnost i povoljna svojstva, što je rezultat velike specifične površine, visokog omjera površine i volumena te lakoće razdvajanja magnetskih čestica.³

2. OPĆI DIO

2.1. Enzimi

Enzimi su organske makromolekule, točnije aminokiseline koje su kovalentno povezane peptidnim vezama. Nastaju u svakoj živoj stanici te tamo djeluju kao katalizatori, odnosno snižavaju energiju aktivacije i tako povećavaju brzinu biokemijskih reakcija u organizmima koje su od velike važnosti za normalno funkcioniranje organizma.¹ Enzimi su aktivni u stanicama, ali također mogu djelovati i izvan njih. Unutarstanični enzimi su enzimi koji kataliziraju biokemijske reakcije unutar stanice, a vanstanični one reakcije izvan stanice. Međutim, važno je održavati uvjete što sličnije onima u stanici: pH vrijednosti koje su neutralne ili blizu neutralnih, temperature blizu sobnih (20-50 °C) i provoditi reakcije u vodenim otopinama.. Do danas je razvijen čitav niz bioprocasa u kojima se iz relativno jeftinog supstrata korištenjem cijelih stanica ili enzima proizvode skupe kemikalije kao što su antibiotici, terapijski proteini ili cjepiva. Prilikom provođenja biotransformacija inženjeri žele postići visoke koncentracije produkta, visoku volumnu produktivnost te dobro iskorištenje biokatalizatora. Enzim kao biokatalizator u ovim procesima biva podvrgnut uvjetima koji su različiti od onih u živoj stanici, stoga neizbježno dolazi do pada njegove aktivnosti. Zadaća inženjera je da definiira optimalne uvjete za provedbu takvog bioprocasa.²

Specifičnost prema supstratu je jedno od važnijih svojstava enzima te im omogućuje vezanje samo s određenim supstratima. Dakle, enzim mora posjedovati točno određene funkcionalne skupine koje će moći učvrstiti supstrat na aktivnom mjestu, kako bi se reakcija mogla odvijati. Supstrat se veže na aktivno mjesto enzima pri čemu si odgovaraju kao ključ i brava, nastaje međuprodukt, nakon čega se nastali produkt odvaja od enzima te tako oslobađa enzim koji nastavlja svoje katalitičko djelovanje na ostale molekule (slika 2.1).^{3,4}

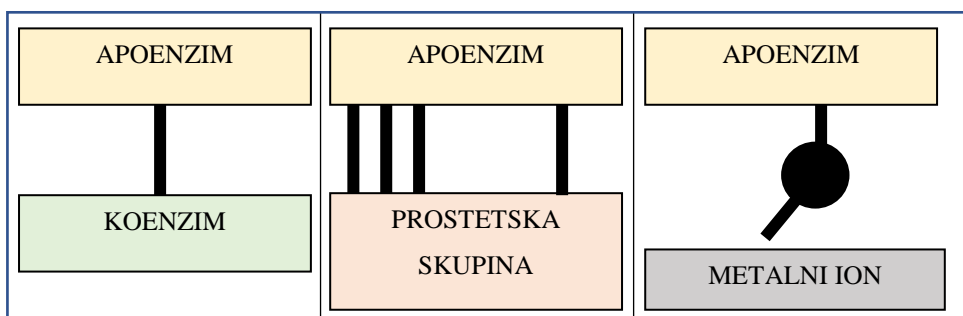


Slika 2.1. Mehanizam djelovanja enzima na supstrat⁵

Potrebno je napomenuti da iako se velik broj enzima sastoji isključivo od proteina, mnogi također sadrže ne-proteinsku komponentu, poznatu kao kofaktor, koja je neophodna za katalitičku aktivnost pojedinog enzima. Kofaktor može biti organska molekula i u tom slučaju se naziva koenzim, ili može biti anorganska molekula, obično metalni ion kao što su željezo, mangan, bakar ili cink. Koenzim koji se čvrsto i trajno veže za protein naziva se prostetska skupina enzima. Kada enzim zahtijeva kofaktor za svoju aktivnost, neaktivnu proteinsku komponentu obično nazivamo apoenzim, a apoenzim i kofaktor zajedno čine holoenzim (slika 2.2.).¹

HOLOENZIM

=

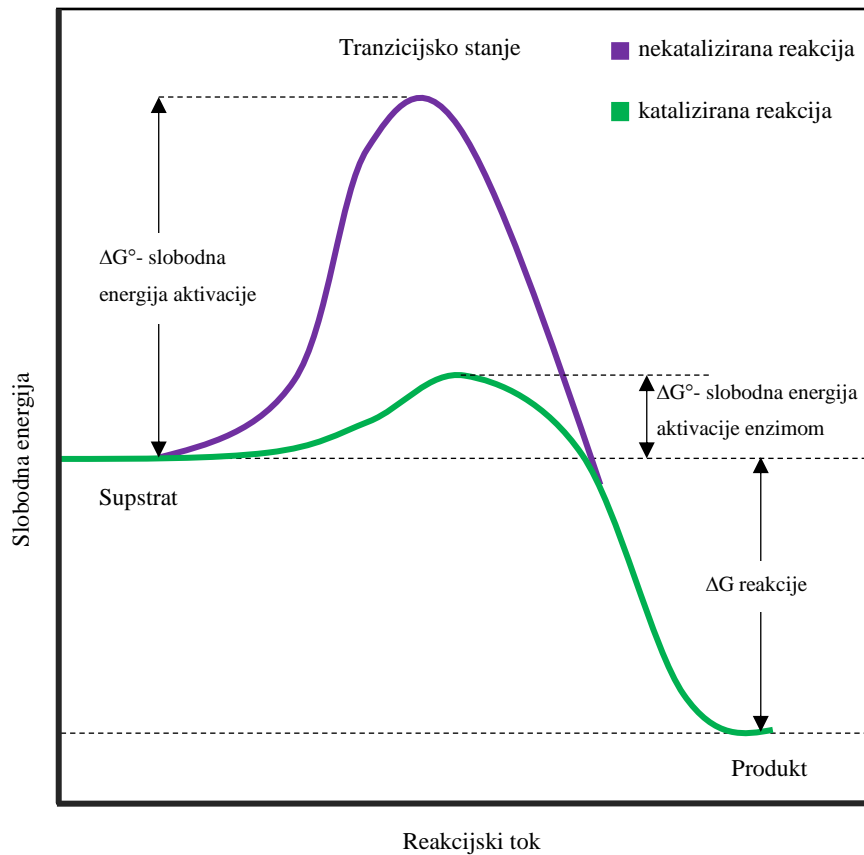


Slika 2.2. Komponente holoenzima¹

Biokatalizatori imaju čitav niz prednosti pred klasičnim kemijskim katalizatorima. *In vivo*, enzimski katalizirane reakcije odvijaju se pri blagim reakcijskim uvjetima: pri nižoj temperaturi, pri približno neutralnim pH vrijednostima, pod normalnim tlakom i sl. Brzina ovih reakcija je vrlo visoka i sve reakcije katalizirane enzimima odvijaju se pod visokom reakcijskom selektivnošću. Iste prednosti javljaju se i kod *in vitro* reakcija kataliziranih enzimima, tj. imaju visoku kemo-, regio-, enantio- i stereoselektivnost.⁶ Također, enzimi su prihvatljivi za okoliš jer su biorazgradivi. Proces koji kataliziraju stvaraju malo otpada, troše manje sirovine, vode i obično imaju manji broj procesnih stupnjeva. Iako enzimski katalizirane reakcije imaju brojne prednosti, pojavljuju se i određeni nedostaci. Neki od nedostataka su: potreba za kofaktorom, nestabilnost izvan prirodnog okruženja, pad aktivnosti i/ili stabilnosti porastom temperature, česte inhibicije reaktantima i produktima reakcije.⁷

Točan mehanizam kojim enzim djeluje na povećanje brzine reakcije razlikuje se od jednog sustava do drugog. Međutim, opći princip je da vezanjem supstrata na enzim, reakcija koja

uključuje supstrat postaje povoljnija zbog snižavanja energije aktivacije. Kako je i prikazano na slici 2.3., enzimi snižavaju energiju aktivacije sustava tako da omogućavaju lakši energetski prijelaz u tranzicijsko stanje (stanje intermedijera).¹



Slika 2.3. Razlika u energiji aktivacije potrebnoj za pokretanje reakcije između nekatalizirane i katalizirane reakcije

U prisutnosti enzima kao biokatalizatora, tranzicijsko stanje je energetski povoljnije, stoga dolazi do ubrzanja same reakcije, ali ne mora nužno doći do promjene energetskih razina reaktanata ili produkata.¹

Najčešća podjela enzima je prema vrsti reakcije koju kataliziraju. Takav način podjele prikazan je u tablici 2.1.

Tablica 2.1. Podjela enzima prema reakciji koju kataliziraju⁴

NAZIV	VRSTA REAKCIJE	PRIMJERI ENZIMA	ULOGA
Oksidoreduktaze	Oksidacija-redukcija	Peroksidaze, lakaze, tirozinaze, glukoza oksidaze	Za industriju su najznačajnije dehidrogenaze koje oksidiraju supstrat prijenosom vodikovih atoma na koenzim (NAD ⁺ , NADP ⁺ , FAD ⁺ , FMN) koji se ponaša kao akceptor. Zahtijevaju koenzime za rad te su isključivo unutarstanični.
Transferaze	Prijenos funkcionalnih skupina	Fosforilaze, glikoziltransferaze, aciltransferaze	Ovi enzimi čine ključnu ulogu u staničnom metabolizmu. Kao i oksidoreduktaze, i ovi enzimi zahtijevaju koenzime za rad te su isključivo unutarstanični.
Hidrolaze	Hidroliza	Glikozidaze,, lipaze, proteaze, peptidaze	Većina enzima koji imaju tehnološku primjenu pripadaju ovoj skupini. Većina za rad ne zahtijeva koenzime.
Liaze	Adicija ili eliminacija skupina radi stvaranja/uklanjanja dvostruke veze	Dekarboksilaze, aldolaze, dehidrataze,	Postoji 7 podvrsta ovih enzima, ovisno o tipu prihvatljive veze. Većina je unutarstanična, a neki ne zahtijevaju koenzime za rad.
Izomeraze	Izomerizacija (intramolekulski prijenos skupina)	Racemaze, epimeraze,	Postoji 6 podvrsta, ovisno o tipu izomera koji se proizvodi.
Ligaze	Vezanje dvaju supstrata na teret hidrolize ATP	Ligaze, sintaze, acil CoA sintaze	Postoji 6 podvrsta, ovisno o tipu veze koja se formira.

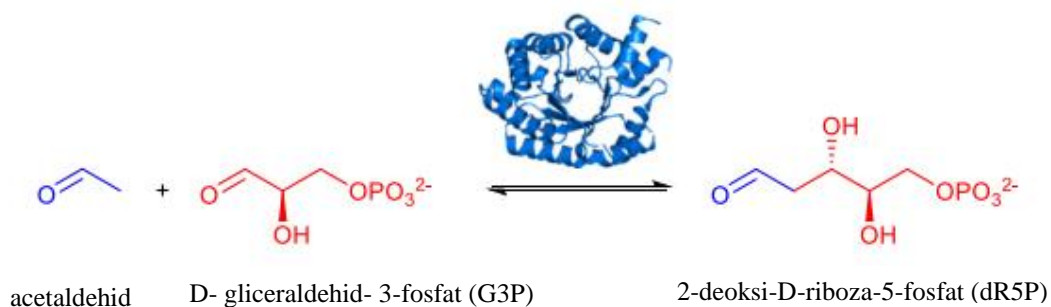
2.1.1. Aldolaze

Aldolna adicija je središnji tip reakcije u sintetskoj kemiji i kemiji staničnog metabolizma, te je najčešće korištena za sintezu polihidroksiliranih komponenti s novim kiralnim središtima. Aldehidi su od velike važnosti u reakcijama aldolne adicije zbog činjenice da formiraju druge aldehide kao produkte. Nadalje, nastali aldehidi se mogu koristiti za reakcije adicije u tvorbi komponenti složenijih struktura. *In vivo*, aldolaze kataliziraju stereoselektivnu aldolnu adiciju aldehida i ketona ili cijepanje odgovarajućih aldola. Do danas je otkriveno više od 30 različitih aldolaza koje se dijele na dvije glavne klase prema njihovom katalitičkom mehanizmu:⁸

- I.klasa- aktiviraju svoje donorske supstrate formiranjem Schiff-ovih baza sa strogo očuvanim aktivnim mjestima lizina. Enamin tautomer koji je stvoren na aktivnom mjestu zatim napada, sa visokom selektivnošću, prikladnu stranu vezanog akceptora aldehida. Enzim vezan na imin se tada hidrolizira i oslobađa produkt.
- II.klasa- metalni kofaktor se veže na aktivnom mjesto enzima sa ostacima histadina. Ovaj vezani metalni ion, najčešće Zn^{2+} (iako Co^{2+} i Fe^{2+} isto mogu biti aktivni), ponaša se kao Lewisova kiselina te aktivira vezani donorski supstrat. Aldolaze vežu dotične donorske supstrate s visokom specifičnošću i generalno neće prihvatiti ostale donore, iako su im strukture slične originalnim donorima. Ova stroga specifičnost donora osigurava funkcionalne temelje za klasificiranje aldolaza.⁹

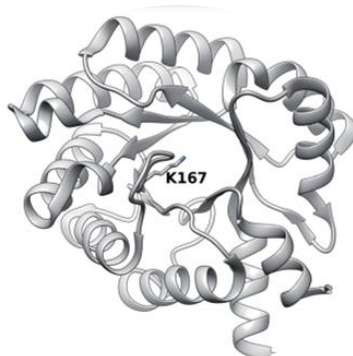
2.1.2. 2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza (DERA)

Među aldolazama koje su se pokazale kao korisne za organske sinteze je 2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza (DERA). *In vivo*, katalizira reverzibilnu aldolnu reakciju 2-deoksi-D-riboze-5-fosfata (dR5P), degradaciju produkta deoksiribonukleinske kiseline, u D-gliceraldehid-3-fosfat (G3P) i acetaldehid (slika 2.4.).⁹



Slika 2.4. Reverzibilna aldolna reakcija koju katalizira DERA⁹

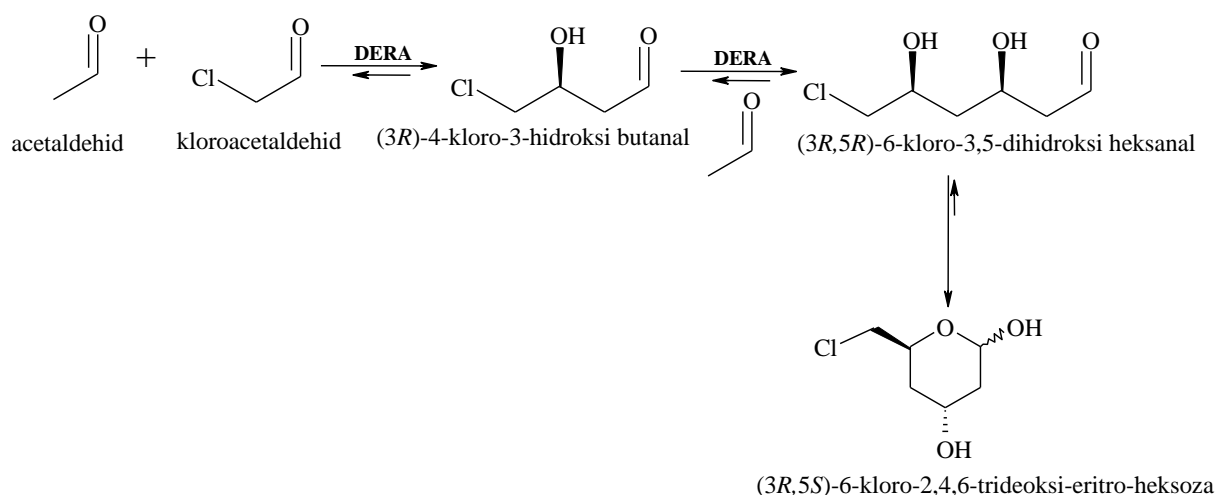
DERA je monomer molekulske težine 28 kDa, protein koji se sastoji od 259 bočnih lanaca aminokiselina.⁷ Tijekom godina DERA je identificirana u velikom broju biljnih i životinjskih tkiva. U ljudskom organizmu je najviše ima u plućnim i jetrenim stanicama, te je uključena u odgovor na stres u stanicama odgađanjem ili smanjenjem oštećenja.¹⁰ DERA prikazuje tipično TIM (α/β) bačvasto preklapanje, što je uobičajena strukturna karakteristika aldolaza klase I. (slika 2.5). Nukleofilni ϵ -amin koji se nalazi na β_6 niti napada aldehidnu funkcionalnost ulaznog supstrata (acetaldehida ili dR5P), tvoreći odgovarajuću iminsku Schiffovu bazu. Ako je supstrat dR5P, reakcija će se odvijati kao što je prikazano na slici 2.4. razbijanjem C-C veze i otpuštanjem produkata G3P i acetaldehida.⁸



Slika 2.5. Alfa/beta TIM bačvasta struktura 2-deoksiriboze-5-fosfat aldolaze (DERA)⁸

DERA prihvaća brojne aldehide sa dugim lancima, čak i do četiri ugljikova atoma, i stvara (S)- konfiguirani stereogeni centar na G3P i ekvivalentu stereokemiju na drugim

molekulama. Još jedno zanimljivo svojstvo DERA-e je činjenica da može katalizirati sekvencijalne aldolne reakcije kojima nastaju 2,4,6-trideoksiheksoze, koje mogu biti važni intermedijeri za proizvodnju atorvastatina i lijekova za snižavanje kolesterola.^{10,11} Zanimljiva primjena za DERA- kataliziranu sekvencijalnu aldolnu reakciju je u proizvodnji MHG-CoA inhibitora reduktaza, koji se zovu statini. Statini su važni lijekovi koji se koriste za snižavanje kolesterola, a DERA omogućuje jednostavan put do uobičajenih poliolskih uzoraka u tim lijekovima, u jednom koraku, koristeći akiralne supstrate kao npr. acetaldehid.¹² Reakcijski mehanizam odvija se tako da jedna molekula kloroacetaldehida reagira s jednom molekulom acetaldehida pri kojoj nastaje međuprodukt (3*R*)-4-kloro-3-hidroksi butanal. Nastali međuprodukt reagira s još jednom molekulom acetaldehida pri čemu nastaje (3*R*,5*R*)-6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal, koji ciklizira u (3*R*,5*S*)-6-kloro-2,4,6-trideoksi-eritro-heksozu. (slika 2.6.)¹²



Slika 2.6. Shema DERA katalizirane aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida¹²

Osim industrijskog procesa dobivanja bočnog lanca statina, nema puno istraživanja o komercijalnim procesima koji koriste ovaj enzim. Glavni razlog je činjenica da se enzim inaktivira u prisutnosti acetaldehida. Nadalje, potrošnja katalizatora i samo vrijeme reakcije potrebno za proizvodnju industrijski relevantnih količina produkta su i dalje preveliki. Potrebno je nastaviti istraživanja u proteinskom inženjerstvu, zajedno s reaktorskim inženjerstvom te različite pristupe imobilizaciji enzima kako bi se postigle visoke aktivnosti i količine produkta u manjem vremenu s nižom stopom deaktivacije.¹³ U ovom radu provedena je dvostruka aldolna adicija acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirana enzimom DERA, uz slobodni i imobilizirani enzim.

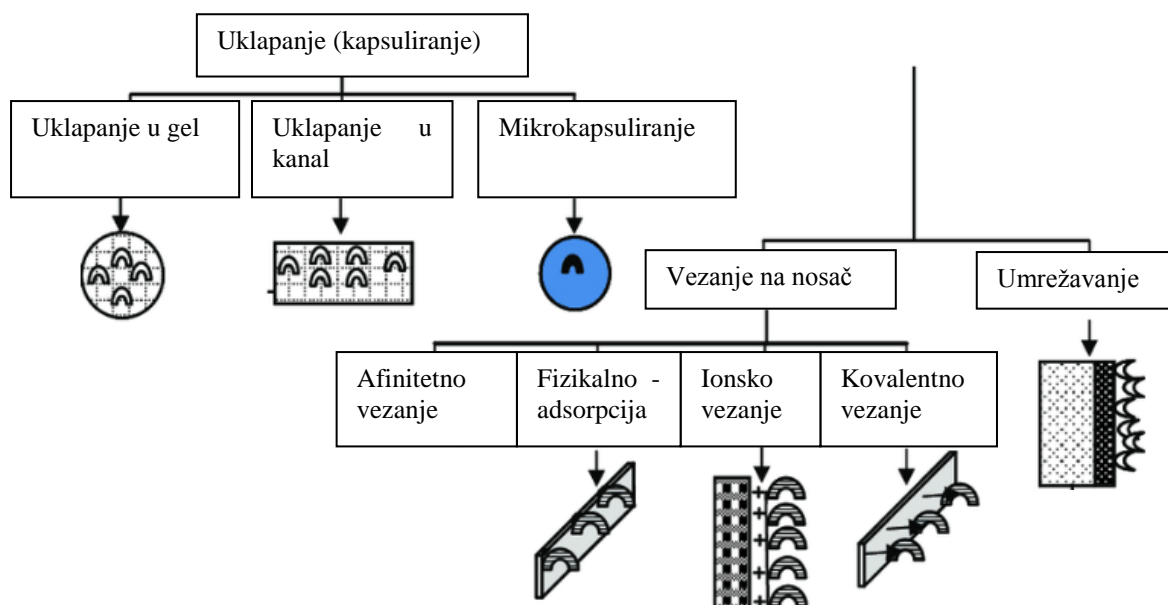
2.2. Imobilizacija enzima

Imobilizacija enzima na čvrstim nosiocima naširoko se koristi u brojnim primjenama, uključujući biosenzore, materijale za pakiranje hrane, proizvodnja biogoriva itd.^{14,15} Ova se tehnologija koristi za postizanje stabilnijeg i aktivnijeg enzima na potpunoj površini. Također je bitno napomenuti da je imobilizirani enzim lakše regenerirati odnosno ponovno upotrijebiti. Stabilizacija se često pripisuje kao rezultat međusobne prostorne fiksacije naspram autolize, proteolize i agregacije zbog povećanja konformacijske čvrstoće.¹⁶ Ograničeni stupnjevi slobode imobiliziranog proteina mogu dovesti do veće zaštite od inaktivatora, pa tako pridonose dobivanju kontroliranih industrijskih biokatalizatora otpornih na denaturaciju. Stoga je ovo uspješna strategija za postizanje visokih prinosa reakcije uz niske troškove, što omogućuje raznoliku primjenu enzima u kemijskoj sintezi.¹⁷

Metode imobilizacije moraju biti optimizirane za svaku specifičnu biokatalitičku reakciju jer imaju velik utjecaj na katalitičko ponašanje enzima.¹⁸ Postoji niz faktora koji se moraju uzeti u obzir prilikom izbora metode imobilizacije enzima: toleranciju enzima na kemijsku i fizikalnu imobilizaciju, površinske funkcionalne skupine na proteinu, veličinu enzima, naboj proteina i izoelektričnu točku, polarnost proteina (hidrofobne/hidrofilne regije) i potrebe prijenosa supstrata/produkta. Svako od ovih svojstava odnosi se na različit izbor metode za imobilizaciju enzima. Primjena enzima u bioprocima zahtijeva enzim imobiliziran na unutarnjoj strani reaktora ili na nosiocu. Tako imobilizirani enzimi se koriste u prehrambenoj industriji (npr. upotreba glukoze izomeraze u proizvodnji kukuruznog sirupa), za farmaceutske primjene (npr. enzim za osiguravanje kiralnosti proizvedenog lijeka), enzimska proizvodnja butanola i dr. Druge uobičajene primjene imobiliziranih enzima su biosenzori i biogorivne ćelije.¹⁹

2.2.1. Metode imobilizacije

Enzime možemo imobilizirati različitim metodama, kao što je prikazano na slici 2.7. Metode imobilizacije enzima dijelimo na fizikalne, gdje postoje slabe interakcije između nosioca i enzima te kemijske stvaranjem kovalentnih veza s enzimom.^{21,22,23}



Slika 2.7. Shematski prikaz metoda imobilizacije enzima²⁰

Fizikalne metode uključuju zadržavanje enzima unutar membranskog reaktora, adsorpciju (fizikalna ili ionska) na matrici netopljivoj u vodi, uklapanje (ili uklapanje u gel); mikrokapsulacija s čvrstom membranom; mikrokapsulacija s tekućom membranom i stvaranje enzimskih Langmuir-Blodgett filmova. Metode kemijske imobilizacije uobičajeno sadrže kovalentnu vezu s matricom netopljivom u vodi, umrežavanje s reagensom koji ima malu molekulsku masu i ko-umrežavanje s ostalim neutralnim tvarima npr. proteinima.²⁰

Adsorpcija je najjednostavnija tehnika imobilizacije enzima na membranu ili nosioc. Proces adsorpcije se obično događa zbog razlike u površinskom naboju membrane/nosioca i naboja enzima koji posljedično mogu stvoriti interakciju.²⁹ Mehanizmi adsorpcije temelje se na slabim vezama kao što su Van der Waalsove i elektrostatske i hidrofobne interakcije između enzima i nosioca.²⁰ Adsorpcija ima tendenciju slabe interakcije između enzima i nosioca, što je povoljno jer se enzim može obnoviti nakon reakcije. Međutim, nedostatak je što aktivnost imobiliziranog enzima pada zbog desorpcije.

Metoda imobilizacije uklapanjem temelji se na lokalizaciji enzima unutar membrane. Enzim može biti zarobljen u spužvastom sloju filtracijom s poprečnim protokom (veličina pora u gustom sloju mora zadržati enzim, a supstratu omogućiti prolaz).²⁴ Korištena količina katalizatora, njegova distribucija, aktivnost i vrijeme poluraspada su jako važni parametri koji omogućuju odgovarajuću orijentaciju razvoja takvih sustava. Jedna od prednosti uklapanja u usporedbi s procesom adsorpcije je optimizacija vanjske površine membrane, na kojoj se kod adsorpcije može nalaziti enzim. Uklapanje u membranu može se provoditi i za vrijeme pripreme same membrane, te se ova tehnika može koristiti sa čvrstim membranama, ali i sa tekućim. Membrane koje su već korištene za ove namjene su polivinilalkohol (PVA), tetrametoksisilan (TMOS), PVA- dimetildimetoksisilan (DMDMOS), PVA- TMOS- DMDMOS, polistiren, celulozni acetat (CA)- politetrafluoroetilen (PTFE), PSF, PAN i PMMA. Nekoliko je enzima imobilizirano ovim tehnikama: lipaze, b- glukozidaze, glukoza oksidaze, peroksidaze i esteraze.^{25,26}

Jedan od načina imobilizacije bez nosioca je umrežavanje biokatalizatora te uključuje udruživanje stanica mikroorganizama ili enzima bliže jedno drugome kako bi naposljetku formirali trodimenzionalnu strukturu. Postoje fizikalne i kemijske metode umrežavanja biokatalizatora. Kemijske metode uključuju stvaranje kovalentne veze između stanica pomoću bifunkcionalnih ili multifunkcionalnih reagensa kao što su glutaraldehid ili toluen diizocijanat. Spomenuti reagensi su skupi i toksični za žive stanice, čime im se uporaba ograničava.²

Metoda imobilizacije umrežavanjem se također može postići intermolekularnim umrežavanjem proteina, bilo na drugi protein ili na funkcionalne skupine na netopljivom nosaču matrice.²⁷ Umrežavanje enzima sa samim sobom je i skupo i nedostatno, jer će neki od proteina djelovati samo kao potpora, što kao posljedicu ima manju enzimsku aktivnost. Budući da je enzim kovalentno vezan za potpurnu matricu, ovom metodom vjerojatno će doći do vrlo male desorpcije. Spomenuta metoda je atraktivna zbog svoje jednostavnosti i snažnog kemijskog vezanja postignutog između biomolekula. Glavni nedostatak je mogućnost gubitka aktivnosti zbog narušavanja konformacije aktivnog enzima i kemijske promjene aktivnog mjesta tijekom procesa umrežavanja.²⁸ Metoda kovalentne imobilizacije na nosioc biti će detaljnije opisana u sljedećem poglavlju.

Afinitetno vezanje je metoda imobilizacije enzima koja ovisi o specifičnom mjestu skupine biomolekula, pa tako omogućuje kontrolu orijentacije biomolekula. Stoga, postizanjem

određene orijentacije biomolekula može se izbjeći deaktivacija enzima i/ili blokiranje aktivnog mjesta na enzimu.²⁰

2.2.2. Kovalentna imobilizacija

Kovalentno vezanje podrazumijeva stvaranje kovalentne veze između biokatalizatora i nosioca i to je ujedno najjača veza između enzima i nosioca. Veza se stvara između funkcionalne grupe na površini nosioca i funkcionalne grupe aminokiseline na površini biokatalizatora. Najčešće funkcionalne grupe su:

- amino skupina lizina ili arginina
- karboksilna skupina aspartatne kiseline ili glutamatne kiseline
- hidroksilna skupina serina ili treonina
- sulfhidrilna skupina cisteina

Najvažnije svojstvo nosioca je hidrofilnost radi očuvanja enzimске aktivnosti. Nosioči koji se najčešće koriste su: celuloza (AE-, CM-, DEAE-) i dekstran (Sephadex), škrob, agaroz (Sepharese). Tipovi reakcija koji se pojavljuju kod nastanka kovalentne veze između enzima i nosioca, a važno ih je istaknuti su: izourea veza, diazo veza, peptidna veza i reakcija alkilacije.

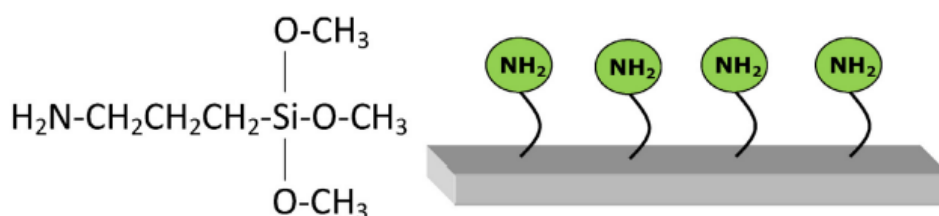
Parametri koji mogu utjecati na kovalentno vezanje enzima, te ih je potrebno proučiti prije same imobilizacije su: odabir nosioca te njegova fizička i kemijska priroda (veličina pora, veličina čestica, poroznost, kemijski sastav, funkcionalne skupine, neaktivne skupine, broj veza između enzima i nosioca te priroda njihove kemijske veze), konformacija enzima u trenutku nastajanja veze, svojstva medija koji se koristi za vezanje. Nadalje, važno je odabrati metodu imobilizacije koja neće dovesti do deaktivacije biokatalizatora zbog stvaranja kovalentne veze između amino skupine na aktivnom mjestu biokatalizatora i nosioca.²

Imobilizacija enzima kovalentnim vezanjem omogućuje veću stabilnost enzima te otpornost na ekstremne uvjete.³⁰

2.2.3. Aktivacija i funkcionalizacija nosioca

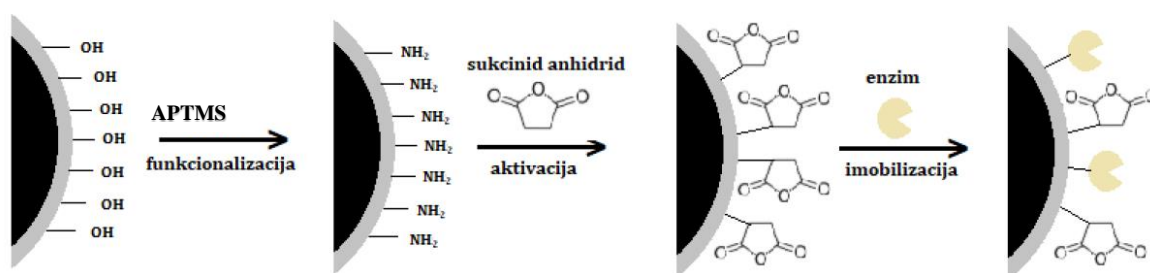
Kako bi čvrsta podloga imala funkcionalne skupine potrebne za osiguravanje kovalentne veze, potrebno ju je predaktivirati kemijskim reagensima za predaktivaciju (glutaraldehyd, cijanogen bromid, tionil klorid itd.). Spomenuti reagensi su jaki elektrofilni (siromašni elektronima), pa reagiraju s jakim nukleofilom poput amino-skupine.²

U ovom radu primjenjena je funkcionalizacija površine magnetskih nanočestica obloženih silikom s APTMS-om, odnosno (3-aminopropil)trimetoksisilanom, koji se često koristi za stabilizaciju nanočestica silicijevog dioksida ili metalnog oksida time što uvodi amino skupine.³⁰ Katalitička aktivnost aminosilana uvjetovana je amino skupinom koja olakšava stvaranje siloksanjskih veza (R-Si-O-Si) s površinskim silanolima (Si-OH).³²



Slika 2.8. Uvođenje amino skupina APTMS-om na nosioc³²

Nakon vezanja amino skupina na silanol skupine, slijedi aktivacija određenim reagensom pomoću koje se odvija kemisorpcija enzima na površinu silike. U svrhu usporedbe utjecaja reagensa ispitana je aktivacija pomoću tri reagensa benzokinona, glutaraldehyda i sukcinjskog anhidrida. Slika 2.9 prikazuje aktivaciju pomoću sukcinjskog anhidrida.



Slika 2.9. Shematski prikaz funkcionalizacije, aktivacije sukcinjskim anhidridom i imobilizacije enzima na magnetske nanočestice³³

2.2. Nosioi za imobilizaciju

Karakteristike enzima imobiliziranih na nosiocu ovise o svojstvima i enzima i nosioca. Njihova interakcija omogućuje unaprjeđenje imobiliziranog enzima, pa tako enzim poprima specifična kemijska, biokemijska, mehanička i kinetička svojstva. Nosioc može biti sintetski organski polimer, bipolimer ili anorganski materijali.³⁴

I organski (uglavnom polisaharidi, poliakrilni i polivinilni materijali) i anorganski nosioci (uglavnom silika ili drugi metalni oksidi) opisani su kao učinkoviti nosači za imobilizaciju enzima. Kao organski nosioci koriste se polisaharidi kao što su modificirana celuloza, dekstran, citozan i agaroz, a vinilni i akrilni polimeri koji se najčešće koriste su poliakrilamidi, polivinil alkoholi i neki poliamidi poput najlona. Anorganski nosioci su materijali najčešćeg izbora u ovom području jer su dostupni u širokom rasponu poroznosti i cijena. Isto tako, moguće je kemijski modificirati njihovu površinu te tako omogućiti korištenje različitih metoda imobilizacije enzima. Anorganski nosioci također pokazuju izvrsnu toplinsku, mehaničku i mikrobnu otpornost.³⁵

Odabir odgovarajućeg nosioca uvelike utječe na cjelokupnu izvedivost industrijske primjene za imobilizirani enzim. Odabrani nosioc mora ispunjavati neke ključne zahtjeve da bi bio prikladan za kovalentnu imobilizaciju:

- Nosioc bi trebao biti relativno jeftin i ekološki bezopasan, svodeći na minimum ekonomski učinak na proces.
- Nosioc bi trebao imati što veći kapacitet, odnosno mogućnost vezanja što veće količine enzima. Prema tome, poroznost bi mogla biti ključna, ali promjer pora bi trebao ostati unutar odgovarajućeg raspona (širi od prosječnog promjera proteina) budući da će manje pore biti nepropusne za protein, a prevelike će uzrokovati značajan pad aktivne površine. U oba slučaja veličina pora negativno utječe na kapacitet opterećenja. Veća aktivna površina i odgovarajuća veličina čestica moraju se uzeti u obzir prilikom izbora nosioca.
- Hidrofobnost površine obično treba svesti na najmanju moguću mjeru, budući da pogoduje neželjenoj adsorpciji i denaturaciji proteina. Suprotno ponašanje javlja se jedino kod vrlo poznatih hidrofobnih enzima, kao što su lipaze. Općenito govoreći, nosioc bi trebao predstavljati optimalno mikrokruženje za poboljšanje katalitičkih svojstava imobiliziranih enzima.

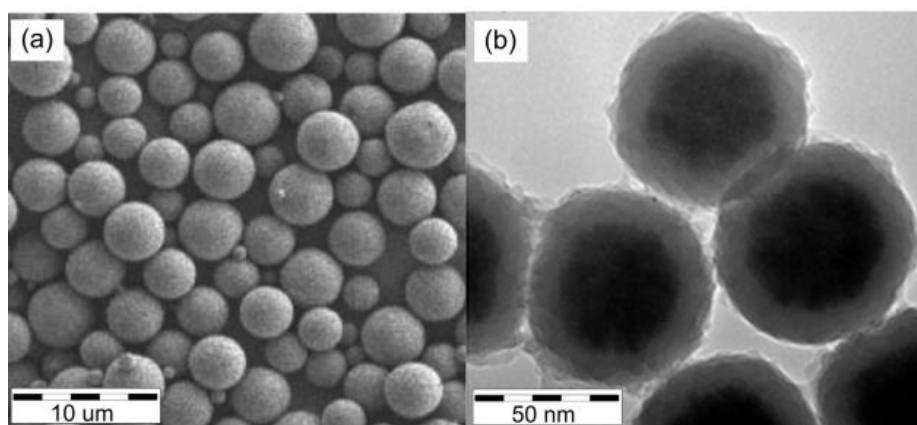
- Funkcionalizacija i aktivacija zahtijevaju reaktivne kemijske funkcionalne skupine na površini nosioca. Ove skupine trebaju predstavljati minimalnu steričku smetnju i visoku površinsku gustoću.
- Nakon imobilizacije nosioc bi trebao biti potpuno inertan u radnim operacijskim uvjetima enzima, ne ometajući željenu reakciju.
- Interferencije nespecifičnim interakcijama proteina i nosioca (tj. adsorpcija, ionska izmjena) trebaju se minimalizirati, osim u slučaju posebno željene multifunkcionalne imobilizacije.
- Otpornost na mikrobe obavezna je za komercijalno održiv enzim.
- Toplinska i mehanička otpornost također su važne, što omogućuje korištenje imobiliziranog enzima pod različitim radnim uvjetima. Osobito treba paziti na otpornost na abraziju (za šaržne reaktore) i tlak protoka (za kontinuirane reaktore).
- Bitno je uzeti u obzir i kemijsku otpornost. Npr., pH vrijednosti daleko od neutralnosti mogu značajno utjecati na stabilnost anorganskih nosioca.³⁵

Organski nosioci mogu se proizvesti sa strogo kontroliranom poroznošću, ali su obično vrlo osjetljivi na tlak ili pH, ili u mnogim slučajevima na oboje. Naprotiv, tipična krutost anorganskih nosioca osigurava nepromjenjivost promjera pora/volumena pora, što jamči konstantan volumen i oblik nosioca. Komercijalno su dostupni anorganski nosioci različitih volumena pora. Najprikladniji su mezoporozni nosioci s porama veličine između 2 i 50 nm i površinama od $300 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ do $1500 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$. Ovakav raspon veličina promjera (oko reda veličina promjera proteina) trebao bi omogućiti najveći kapacitet vezanja proteina tijekom imobilizacije.³⁶

2.3.1. Magnetske nanočestice

U razvoju katalizatora imobiliziranih na magnetske nanonosioce je ostvaren značajan napredak. U usporedbi s magnetitom, magnetske nanočestice (MNČ) imaju značajan superparamagnetizam, veliku specifičnu površinu i volumen, čime se uvelike poboljšava kapacitet opterećenja i smanjenja difuzijskog limita. Još jedan ključni čimbenik za maksimalno iskorištenje prednosti MNČ jest potpuna regulacija orijentacije enzima na nosiocima. U usporedbi s polimernim nosiocima, neporozne MNČ nemaju vanjske probleme difuzije, što ih čini konkurentnijima za široku industrijsku upotrebu u čvrsto-tekućim sustavima.³

Nadalje, enzimi imobilizirani na MNČ pokazuju visoku aktivnost i povoljna svojstva. Najčešće korištene magnetske čestice su magnetit (Fe_3O_4) i maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) zbog niske toksičnosti i biokompatibilnosti. Nedavni napredak u nano- i hibridnoj tehnologiji učinio je različite materijale pristupačnijim domaćinima za imobilizaciju enzima. Kao rezultat toga, različiti nanostrukturirani materijali (slika 2.10a) na bazi kombiniranih organskih i anorganskih vrsta privukli su pozornost kao nosioci za imobilizaciju zbog svojih velikih unutarnjih površina i fizikalno-kemijskih svojstava kao što su veličina pora, hidrofilna/hidrofobna ravnoteža, akvafilnost i površinska kemija. MNČ se sastoje od tri funkcionalna dijela: magnetske jezgre, površinskog premaza za zaštitu magnetske jezgre i funkcionaliziranog vanjskog premaza.³



Slika 2.10. (a) Magnetske mikrosfere (SEM) i (b) magnetske nanočestice s površinskim premazom silikata (TEM)³⁷

MNČ mogu poslužiti kao vrlo korisna podrška katalizatoru koja omogućuje imobilizaciju enzima i regeneraciju katalizatora korištenjem magnetskog polja. Općenito gledajući, vezanje

katalizatora na MNČ omogućuje njegovo jednostavno ponovno korištenje. Time se sprječava potreba za dodatnim tehnikama pročišćavanja kako bi se katalizator uklonio iz toka otpada što ga čini "zelenim" katalizatorom. Postoji nekoliko tehnoloških prednosti za imobilizaciju enzima na MNČ. Prije svega, magnetska regeneracija aktivnog materijala smanjuje troškove proizvodnje. Nadalje, imobilizirani enzimi često pokazuju bolju temperaturnu stabilnost, pH stabilnost i veću aktivnost u usporedbi s proteinima bez nosioca.³⁶ U posljednjih nekoliko godina postignut je značajan napredak u razvoju novih anorganskih katalitičkih sustava koji su imobilizirani na magnetske nanonosioce. Uobičajeno, za zaštitu magnetske jezgre i zadržavanje magnetskih svojstava jezgra je obložena nekom nemagnetskom relativno inertnom ljuskom kao što je silicijev dioksid. Ljuska silicija vrlo je jednostavna za funkcionalizaciju i dobra je za vezanje različitih katalitičkih vrsta, uključujući komplekse prijelaznih metala.³⁸ (slika 2.10 b).

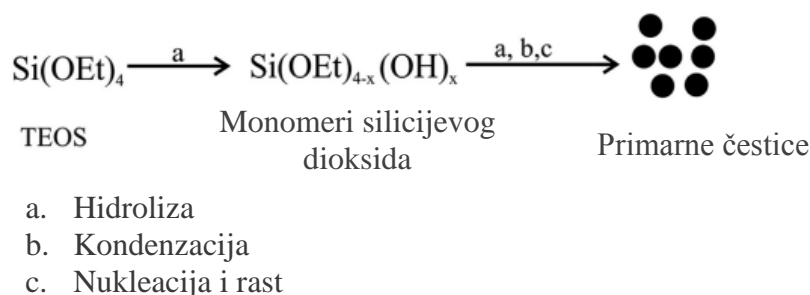
2.3.1. Stöberov proces

Čestice u magnetskim fluidima moraju se stabilizirati protiv agregacije površinskim nabojem, a posebno u bezvodnim otapalima i to organskim površinskim slojem. Od mnogo površinskih slojeva spominju se laurinska kiselina, oleinska kiselina, polivinilamin i takozvani dvostruki površinski slojevi. Organske skupine nisu kovalentno vezane za čestice magnetita. Stoga uvijek treba biti svjestan desorpcije organskih skupina. Jednom kada je sloj silicijevog dioksida prisutan oko magnetita, površinske silanolne skupine mogu reagirati s alkoholima ili silanskim vezivnim sredstvima kako bi proizvele stabilne disperzije u bezvodnim otapalima bez rizika od desorpcije sada kemijski omeđenog površinskog sloja.³⁹

Stöberova metoda koristi se za pripremu monodisperznih silikatnih koloida pomoću hidrolize alkil silikata i naknadne kondenzacije silicijske kiseline u alkoholnim otopinama koje koriste amonijak kao katalizator. Za sve primjene uvijek je poželjno koristiti čestice silicija s određenom veličinom čestica i izuzetno uskom raspodjelom. Promjer čestica silicija iz Stöberove metode kontrolira se relativnim doprinosom procesa nukleacije i rasta.⁴⁰

Kemijske reakcije koje čine Stöberovu metodu su hidroliza i kondenzacija (slika 2.11a,b). Primarna reakcija tijekom sinteze čestica silicija Stöberovom metodom je hidroliza (slika 2.11a) tetraetilortioxisilikata (TEOS), najčešćeg prekursora silicijevog dioksida. Uključuje

nukleofilnu supstituciju etoksidne skupine (SiAOR) silanolnim skupinama (ASiAOH) putem prijelaznog stanja pentakompleksacije.⁴¹



Slika 2.11. Prikaz stvaranja koloidnih čestica silicijevog dioksida⁴¹

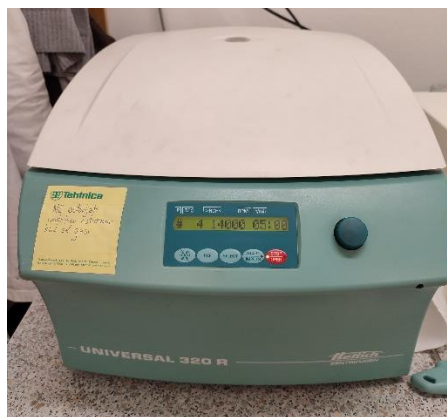
Općenito, hidroliza se javlja u prisutnosti vode, ali se može učinkovito katalizirati kiselinom ili bazom. U tipičnoj Stöberovoj sintezi amonijak se koristi kao katalizator za ubrzavanje reakcija hidrolize i kondenzacije. Nakon hidrolize slijedi kondenzacija (slika 2.11b) gdje se silanolne skupine (ASiAOH) silikatnih monomera ili oligomera kondenziraju u siloksan (SiAOASi). Poput reakcije hidrolize, uključuje nukleofilnu reakciju supstitucije. Međutim, brzina kondenzacije mnogo je brža od brzine hidrolize jer se silanolne skupine lakše deprotoniraju od molekula vode kako bi se povećala pozitivna gustoća naboja na atomu silicija za povoljan nukleofilni napad. To je također razlog zašto se silanol monomeri radije pričvršćuju na veće klastere siloksanske mreže, a ne na druge monomere ili male oligomere. U određenim istraživanjima korištena su dva modela za rast koloidnih čestica silicija, adicija monomera i kontrolirana agregacija. Ovi modeli dijele stvaranje nanosfera silicija na dva primarna događaja: nukleaciju i rast. Suprotno modelu adicije monomera, kontrolirani model agregacije pretpostavlja kontinuiranu nukleaciju tijekom cijelog procesa sve dok koncentracija monomera ne bude ispod praga nukleacije. Osim toga, rast čestica silicija počinje površinskim pričvršćivanjem silanol monomera ili oligomera.⁴¹

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Aparatura

3.1.1. Centrifuga

Za separaciju i ispiranje magnetskih nanočestica nakon sinteze, uklanjanje enzima koji se nije vezao na nanočestice i odvajanje imobiliziranih nanočestica od reakcijske otopine, korištena je centrifuga. Uzorci su centrifugirani na 14000 okr/min pri temperaturi $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 5 minuta. Korišten je uređaj *Hettich Universal 320R* prikazan na slici 3.1.



Slika 3.1. Centrifuga *Hettich Universal 320R*

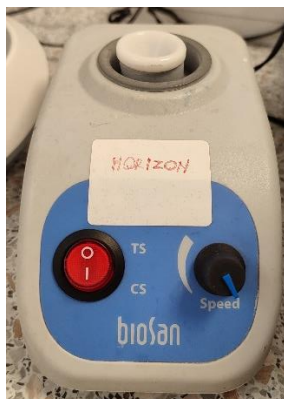
3.1.2. Tresilica

Tresilica je korištena za miješanje suspenzije pri aktivaciji nosioca, imobilizaciju enzima te za provođenje reakcija pri 900 okr/min. Korištena je termostatirana tresilica *Eppendorf ThermoMixer C*, prikazana na slici 3.2.



Slika 3.2. Termostatirana tresilica *Eppendorf ThermoMixer C*

Homogenizator *V-1 plus Vortex Biosan* korišten za homogenizaciju uzoraka prikazan je na slici 3.3.



Slika 3.3. Homogenizator *V-1 plus Vortex Biosan*

3.1.3. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC)

HPLC je kratica za tekuću kromatografiju visoke djelotvornosti. "Kromatografija" je tehnika razdvajanja, "kromatogram" je rezultat kromatografije, a "kromatograf" je instrument koji se koristi za provođenje kromatografije. Samo spojevi otopljeni u otapalima mogu se analizirati pomoću HPLC-a. HPLC razdvaja spojeve otopljene u tekućem uzorku i omogućuje kvalitativnu i kvantitativnu analizu komponenti i daje informaciju koliko je svake komponente sadržano u uzorku. Određena količina uzorka injektira se u kolonu pod visokim tlakom i spojevi sadržani u uzorku se odvajaju. Spojevi odvojeni u koloni detektiraju se detektorom nizvodno od kolone i svaki spoj je identificiran i kvantificiran. HPLC može odvojiti i identificirati svaki spoj pomoću razlike brzine prolaza svakog spoja kroz kolonu. Postoje dvije faze za HPLC: mobilna faza i stacionarna faza. Mobilna faza je tekućina koja otapa spoj. Stacionarna faza je dio kolone koji uzajamno djeluje s spojem. U koloni, što je jači afinitet (npr. Van der Waals sila) između komponente i mobilne faze, to se komponenta brže kreće kroz kolonu zajedno s mobilnom fazom. S druge strane, što je jači afinitet prema stacionarnoj fazi, to se sporije kreće kroz kolonu.⁴²

Korišten je HPLC uređaj proizvođača *Shimadzu* (slika 3.4.) za određivanje koncentracije reaktanata i produkata glavne i sporedne reakcije te za određivanje aktivnosti enzima DERA.



Slika 3.4. HPLC instrument *SHIMADZU*

3.1.4. Spektrofotometar

Apsorpcijski spektrofotometar je uređaj koji se koristi za mjerenje apsorbiranog intenziteta svjetlosti kao funkcije valne duljine. U UV-vidljivim spektrofotometrima zraka svjetlosti iz odgovarajućeg UV i/ili vidljivog izvora svjetlosti prolazi kroz prizmu ili difrakcijski monokromator. Svjetlost zatim prolazi kroz uzorak koji treba analizirati prije dolaska do detektora. UV-vidljivi spektrofotometri imaju pet glavnih komponenti: izvor svjetlosti, monokromator, držač uzorka (kiveta), detektor i prevoditelj. Standardni izvor svjetlosti sastoji se od deuterijskog luka (190–330 nm) i volframove žarulje sa žarnom niti (330–800 nm), koja zajedno stvara svjetlosni snop preko spektralnog raspona od 190–800 nm. Monokromator proizvodi kompaktan optički put i smanjuje optičke aberacije. Moderni instrumenti koriste monokromatore u reflektirajućem načinu rada kao element za raspršivanje svjetlosti.⁴³ Apsorpcija svjetlosti kroz otopine matematički se opisuje Lambert-Beerovim zakonom (jedn. 1), gdje je *ABS* apsorbancija pri određenoj valnoj duljini svjetlosti, ϵ je molarni apsorpcijski koeficijent [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$], *b* je duljina puta svjetlosti kroz uzorak [cm] i *c* predstavlja koncentraciju tvari u otopini [mol dm^{-3}].⁴⁴

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

UV/VIS spektrofotometar *Shimadzu UV-1800* prikazan na slici 3.5 korišten je za određivanje koncentracije proteina prema Bradfordovoj metodi.



Slika 3.5. Spektrofotometar *Shimadzu UV-1800*

3.1.5. Magnetska miješalica

Na slici 3.6. prikazana je magnetska miješalica *EcoStir DLab*. Miješalica je korištena za miješanje Bradfordovog reagensa prilikom izrade baždarnog dijagrama za određivanje proteina te pri određivanju proteina prije i nakon imobilizacije.

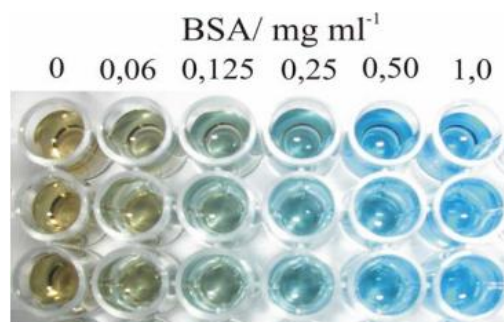


Slika 3.6. Magnetska miješalica *EcoStir DLab*

3.2. Analitičke metode

3.2.1. Određivanje koncentracije proteina Bradfordovom metodom

Jedna od metoda za kvantitativno određivanje staničnih proteina je kolorimetrijska metoda po Bradford-u. Metoda se temelji na obojenju otopljenih proteina s reagensom Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) pri čemu dolazi do vezanja anionske boje za NH_3 skupine proteina, što je praćeno promjenom boje reagensa (smeđa u plavu) i pojavom apsorpcijskog maksimuma pri određenoj valnoj duljini. Na temelju linearne ovisnosti apsorpcije o sadržaju proteina, kvantitativno se određuje koncentracija proteina. Nepoznate koncentracije proteina u uzorcima staničnog citosola se očitavaju iz kalibracijskog pravca načinjenog nizom razrjeđenja otopine albumina goveđeg seruma (BSA) i izražavaju kao mg proteina u ml citosola.⁴⁵



Slika 3.7. Promjena boje tokom Bradfordovog ispitivanja⁴⁵

Bradfordov reagens sastoji se od 100 mg bojila *Coomassie Brilliant Blue G-250*, 50 ml 95 %-tnog etanola, 100 ml 85 %-tne ortofosforne kiseline i 850 mL ultra čiste vode. Prije mjerenja koncentracija proteina u uzorcima pripremljen je baždarni pravac pomoću standardnih otopina proteina (albumin; BSA) koncentracija 1 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹, 15 mg L⁻¹ i 20 mg L⁻¹. Pomiješalo se 500 μL uzorka s 500 μL reagensa pomoću *Vortex*-a, inkubacija je trajala 10 minuta pri sobnoj temperaturi te se potom mjerila apsorpcija uzoraka na spektrofotometru *Shimadzu UV-1601* pri valnim duljinama $\lambda_1=595$ nm i $\lambda_2=450$ nm. Iz ovisnosti apsorpcije o koncentraciji proteina dobiven je baždarni dijagram (Prilog 1), odnosno jednadžba pravca potrebna za izračun koncentracije proteina u uzorcima koji sadrže nepoznatu koncentraciju proteina. Koncentracija proteina određivana je u temeljnoj otopini enzima i otopini nakon imobilizacije enzima na nosioc.

3.2.2. Određivanje aktivnosti enzima DERA-e

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

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

3.2.3. Određivanje koncentracije reaktanata i produkata pomoću HPLC-a

Koncentracije reaktanata i produkata određivane su na HPLC instrumentu, a uzorci su prije analize derivatizirani kako bi ih bilo moguće detektirati. Otopina za derivatizaciju je pripravljena miješanjem 0,1 g o-benzilhidroksi amina sa 3,3 mL piridina, 1,5 mL metanola i 0,2 mL ultra čiste vode. Derivatizacija se provodila na način da je 5 μL uzorka pomiješano s 50 μL derivatizacijske otopine te inkubirano 20 minuta pri 900 okr/min. Reakcija se nakon 20 min zaustavljala dodatkom 350 μL metanola, uzorci su centrifugirani, a supernatant se analizirao na HPLC-u.

Analiza se provodila na koloni *LiChrospher C18* (Phenomenex, 5 μm , 250 x 4 mm) pri $T=30^\circ\text{C}$ spojenoj na UV detektor ($\lambda=215\text{ nm}$) s protokom od 1,5 mL min^{-1} . Mobilna faza sastojala se od otapala A (0,1 %-tna trifluorocetna kiselina u vodi) i otapala B (0,1 %-tna trifluorocetna kiselina u acetonitrilu). Iz dobivenog kromatograma s pikovima identificirane su pojedine komponente na temelju njihovih retencijskih vremena (Prilog 4). Iz vrijednosti površina ispod pikova pojedinih komponenti pomoću baždarnih pravaca za acetaldehid (Prilog 2) i kloroacetaldehid (Prilog 3), izračunata je nepoznata koncentracija acetaldehida i kloroacetaldehida.

3.3. Sinteza nanočestica i oblaganje silikom po Stöber procesu

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

Nanočestice su obložene silikom po Stöber procesu. Pripremljeno je 100 mL 75% otopine etanola u kojoj su dispergirane nanočestice. Potom je dodan tetraetil ortosilikat (TEOS, 10 % v/v) i amonijak (NH_3 , 4 % v/v), te je smjesa miješana pri 160 okr/min na sobnoj temperaturi tijekom 12h. Nakon miješanja precipitat se odvojio magnetom, isprao tri puta etanolom te se preko noći sušio na 55 °C.

3.4. Funkcionalizacija, aktivacija i imobilizacija enzima

943 mg sintetiziranih MNC funkcionalizirano je dodatkom 50 mL etanola i 3 mL APTMS-a ((3-aminopropil)trimetoksisilana). Pripremljena suspenzija se zatim miješala u inertnoj atmosferi argona pri 30 °C i 160 okr/min tokom 24 sata.

Funkcionalizirane MNC su aktivirane s tri aktivacijska sredstva: benzokinon, sukcinski anhidrid i glutaraldehid.

Aktivacija benzokinonom se odvijala dodatkom 1 mL pripremljene otopine benzokinona (1,5, 3 ili 4,5 mM) na 20 mg funkcionaliziranog nosioca. Suspenzija se miješala tokom 1 h na sobnoj temperaturi.

Aktivacija sukcinским anhidridom se odvijala dodatkom 1 mL dimetil formamida i sukcinškog anhidrida (5, 10 ili 15 %) na 20 mg nosioca. Suspenzija se miješala 2 h na sobnoj temperaturi u inertnoj atmosferi dušika.

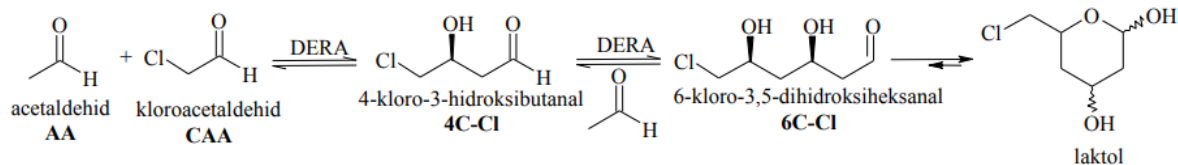
Aktivacija glutaraldehidom odvijala se dodatkom 1 ml 10, 15 ili 20 otopine glutaraldehida na 20 mg nosioca. Suspenzija se miješala 15 h na sobnoj temperaturi.

Nakon aktivacije, nosioc se centrifugirao i oprao puferom nekoliko puta. Aktiviranom nosiocu dodano je 100 μL otopine enzima koncentracije 20 mg mL^{-1} i 900 μL fosfatnog pufera pH:

6,0, 6,5 , 7,0 i 7,5 koncentracija 0,1. Imobilizacija se provodila 2 h u tresilici pri 900 okr/min pri temperaturama: 20 °C, 25 °C, 30 °C i 35 °C.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Reakciju dvostruke aldolne adicije acetaldehida (AA) i kloroacetaldehida (CAA) katalizira enzim DERA. Ovom reakcijom nastaju međuprodukti (3R)-4-kloro-3-hidroksibutanal (4C-Cl) i (3R,5R)-6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal (6C-Cl), tj. laktol, spoj koji se koristi kao prekursor u proizvodnji statina (slika 4.1).



Slika 4.1. Shema dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane DERA-om⁴⁶

Međutim, primjena ovog enzima je ograničena zbog male stabilnosti DERA-e u prisustvu aldehida, koji su ujedno i reaktanti. Cilj istraživanja bio je imobilizirati enzim DERA-u kemijskom imobilizacijom kovalentnim vezanjem na magnetske nanočestice i ispitati utjecaj procesa aktivacije nosioca na efikasnost imobilizacije. Ispitan je utjecaj tri reagensa za aktivaciju nosioca: benzokinon, glutaraldehid i sukcinski anhidrid. Isto tako, provedena su i ispitivanja utjecaja pH i temperature na proces imobilizacije enzima.

Uspješnost imobilizacije određivana je pomoću slijedećih parametara:

- iskorištenje,
- efikasnost,
- imobilizacijska aktivnost i
- preostala aktivnost imobiliziranog enzima.

Iskorištenje jest omjer imobilizacijske aktivnosti i početne aktivnosti (jedn. 2). Govori nam o količini enzima koji je uspješno imobiliziran na površinu nosioca.

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

Efikasnost nam govori u kojoj mjeri je imobilizirani enzim aktivan u usporedbi sa slobodnim enzimom, a matematički predstavlja omjer aktivnosti imobiliziranog enzima te slobodnog enzima i iskorištenja (jedn. 3).

$$Efikasnost = \frac{A_{\text{imobilizirani enzim}}}{Iskorištenje \times A_{\text{slobodni enzim}}} \quad (3)$$

Preostala aktivnost imobiliziranog enzima (jedn. 4) ujedno govori i o uspješnosti stabilizacije enzima metodom imobilizacije, a računa se kao omjer aktivnosti imobiliziranog enzima i preostale aktivnosti imobiliziranog enzima te se izražava u postocima.

$$Preostala aktivnost imobiliziranog enzima = \frac{A_{\text{imobilizirani enzim, 2. reakcija}}}{A_{\text{imobilizirani enzim}}} \quad (4)$$

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

Aktivnost enzima je mjerena u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida. Izmjerena je aktivnost slobodnog enzima u otopini prije imobilizacije ($A_{\text{slobodni enzim}}$), te aktivnosti imobiliziranog enzima prilikom dvije reakcije: $A_{\text{imobilizirani enzim}}$ prilikom provođenja prve reakcije i $A_{\text{imobilizirani enzim, 2. reakcija}}$ prilikom provođenja ponovljene reakcije. Korištenjem izmjerenih aktivnosti računala se efikasnost (jedn. 3.) i preostala aktivnost imobiliziranog enzima (jedn. 4).

4.1. Ispitivanje aktivnosti slobodnog enzima

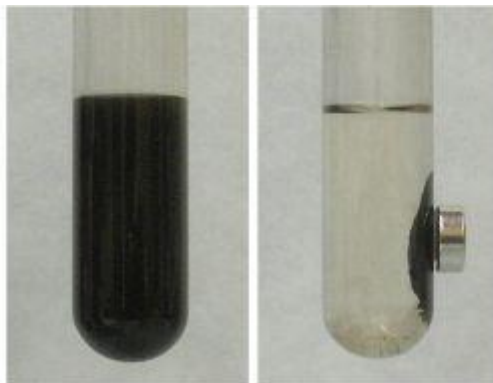
Za usporedbu stabilnosti slobodnog i imobiliziranog enzima izmjerena je aktivnost slobodnog enzima ($A_{\text{slobodni enzim}}$), te aktivnost istog tog enzima u ponovljenoj reakciji ($A_{\text{slobodni enzim, 2. reakcija}}$). Mjerenja su provedena pri temperaturi od 25 °C u 0,1 M fosfatnom puferu pH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

Preostala aktivnost (stabilnost) slobodnog enzima iznosi 37 %, stoga je bitno pronaći učinkovite metode stabilizacije enzima za primjenu enzima DERA-e u većem (industrijskom) mjerilu. Nadalje, ključno je i osigurati enzimu povoljne uvjete pH i temperature.

4.2. Sinteza magnetskih nanočestica

Kao rezultat sinteze magnetskih nanočestica dobiveno je 943 mg čestica. Kako bi se čestice mogle obložiti funkcionalnom skupinom, ključnom za sam proces imobilizacije enzima, one su nakon sinteze obložene silikom (poglavlje 3.3.). Nakon oblaganja silikom dobiveno je 1100

mg čestica, što i potvrđuje uspješnost oblaganja. Magnetska svojstva nanočestica prikazana su na slici 4.2.



Slika 4.2. Magnetske nanočestice u prisutnosti magneta (magnetskog polja)⁴⁷

4.3. Utjecaj reagensa za aktivaciju na uspješnost procesa imobilizacije

Nakon Stöberovog procesa (poglavlje 2.3.1.) oblaganja MNČ silikom (poglavlje 3.3.), slijedi aktivacija i funkcionalizacija površine. Ti procesi omogućuju vezu između površine MNČ i enzima, a sam oblik veze ovisi o izboru reagensa za funkcionalizaciju i aktivaciju. Izbor odgovarajućeg reagensa i njegove koncentracije nam isto tako omogućuje bolju uspješnost procesa imobilizacije.

Površina sintetiziranih magnetskih nanočestica funkcionalizirana je APTMS-om ((3-aminopropil)trimetoksisilanom). Nakon vezanja amino skupina na silanol skupine, slijedi aktivacija određenim reagensom pomoću koje se odvija kemisorpcija enzima na površinu silike. Aktivacija se provodila pomoću tri reagensa: benzokinona, glutaraldehida i sukcinog anhidrida. Za svaki pojedini reagens ispitane su tri koncentracije. Nakon aktivacije enzima slijedila je imobilizacija enzima na MNČ te ispitivanje aktivnosti enzima nakon imobilizacije. Reakcija tokom koje su se provodila navedena ispitivanja aktivnosti enzima je reakcija aldolne adicije. Sve reakcije su provedene u fosfatnom puferu 0.1 M, pH 6 pri 25 °C.

4.3.1. Usporedba utjecaja reagensa za aktivaciju nosioca na uspješnost imobilizacije enzima DERA-e

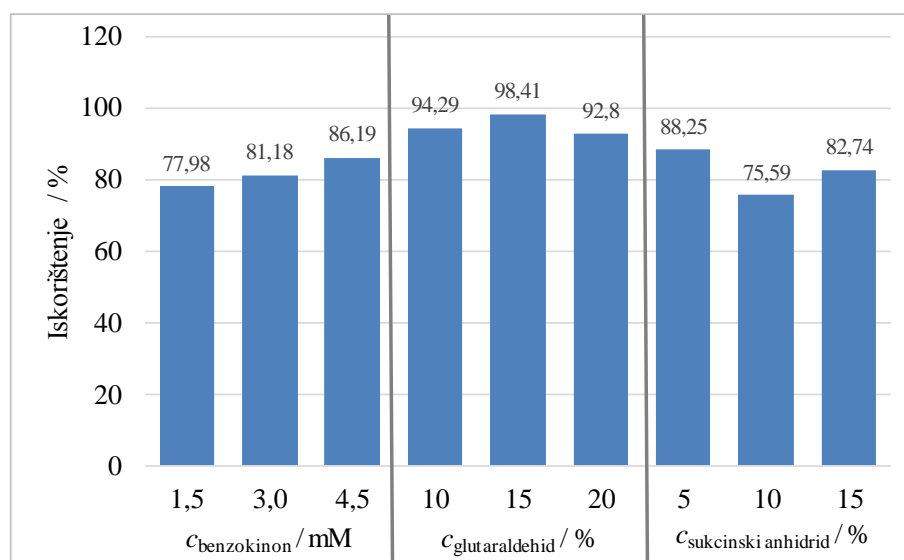
Usporedni rezultati dobiveni korištenjem enzima imobiliziranih na MNČ aktiviranih s različitim vrstama i koncentracijama aktivacijskih reagensa prikazani su u tablici 4.1. Iz

izmjerenih vrijednosti izračunati su parametri uspješnosti imobilizacije: iskorištenje, efikasnost i preostala aktivnost imobiliziranog enzima.

Tablica 4.1. Izračunati parametri uspješnosti imobilizacije enzima DERA na magnetske nanočestice obložene silikom, aktivirane različitim vrstama i koncentracijama aktivacijskih reagensa.

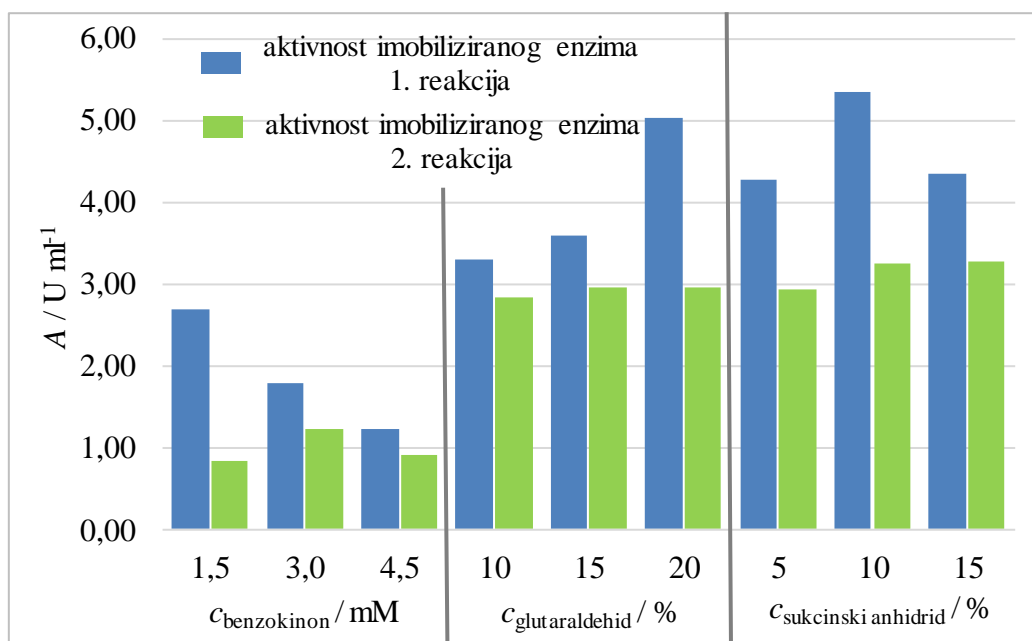
Aktivacija	Benzokinon			Glutaralhid			Sukcinski anhidrid		
Koncentracija/ Maseni udio	1,5 mM	3 mM	4,5 mM	10%	15%	20%	5%	10%	15%
Iskorištenje / %	77,98	81,18	86,19	94,29	98,41	92,80	88,25	75,59	82,74
Efikasnost (očuvana aktivnost) / %	71,12	37,26	27,66	64,38	67,49	106,28	99,35	151,55	124,28
Preostala aktivnost imob. enzima (stabilnost) / %	30,86	68,89	74,80	86,02	81,94	58,53	68,85	60,56	75,00

Slika 4.3 prikazuje usporedni prikaz izračunatih iskorištenja (jedn. 2), te rezultati pokazuju da imobilizirani enzimi prethodno aktivirani 15 %-tnim (w/v) glutaralhidom postižu najveće iskorištenje (98,41 %), što znači da je došlo do imobilizacije najveće količine enzima, međutim enzim se znatno deaktivirao prilikom imobilizacije. Najmanje iskorištenje postižu imobilizirani enzimi prethodno aktivirani 10 %-tnim (w/v) sukcinim anhidridom (75,59 %).



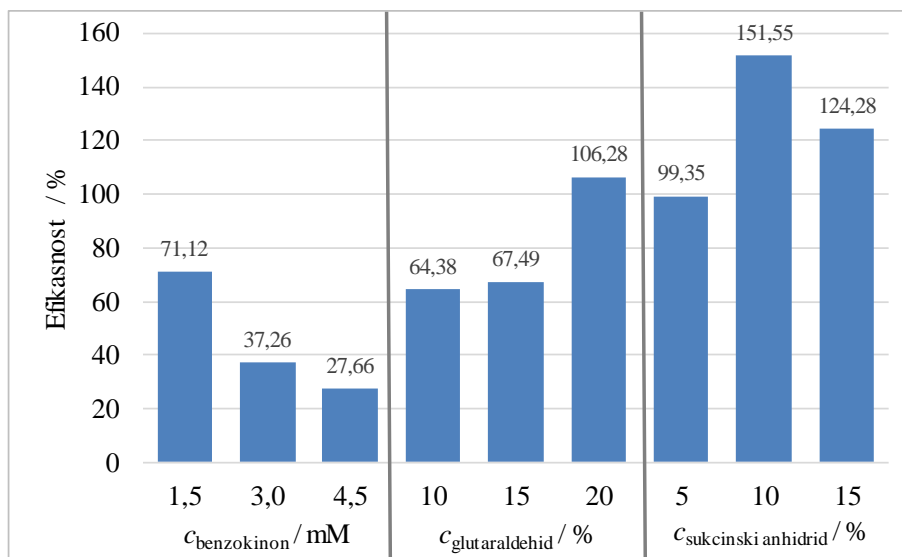
Slika 4.3. Usporedni prikaz izračunatih iskorištenja za enzim imobiliziran na nosiocima aktiviranim različitim metodama.

Slika 4.4. prikazuje usporedni prikaz izmjerenih aktivnosti imobiliziranih enzima prilikom provođenja dvije uzastopne reakcije. Imobilizirani enzimi na nosiocu aktivirani s 10 %-tnim (w/v) sukcinским anhidridom pokazuju najveću aktivnost u prvoj ($5,35 \text{ U mL}^{-1}$) reakciji, a u drugoj reakciji s 15 %-tnim (w/v) sukcinским anhidridom ($3,27 \text{ U mL}^{-1}$).

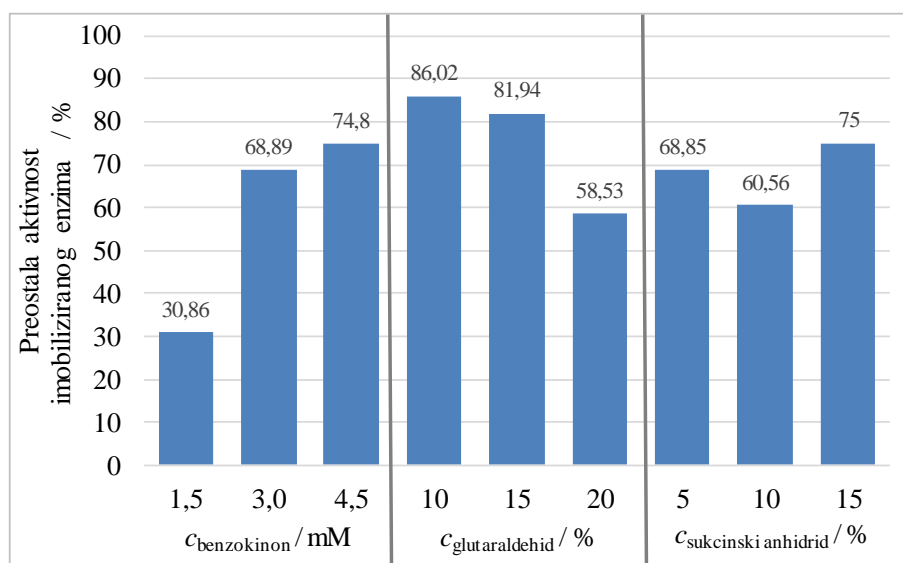


Slika 4.4. Usporedni prikaz izmjerenih aktivnosti imobiliziranog enzima na nosiocima aktiviranim različitim metodama u prvoj i drugoj reakciji.

Slika 4.5. i slika 4.6. prikazuju usporedni prikaz izračunatih parametara uspješnosti imobilizacije enzima DERA-e na magnetske nanočestice obložene silikom, aktivirane različitim metodama. Najveću efikasnost (151,55 %) pokazuje 10 %-tni (w/v) sukcinški anhidrid, najveću preostalu aktivnost imobiliziranog enzima (86,02 %) pokazuje imobilizirani enzim na nosiocu aktiviranim s 10 %-tnim (w/v) glutaraldehidom. Također, može se primijetiti da su preostale aktivnosti imobiliziranog enzima veće od preostale aktivnosti čistog enzima (37 %), što upućuje na to da je imobilizacijom poboljšana stabilnost enzima DERA-e.



Slika 4.5. Usporedni prikaz efikasnosti enzima DERA-e na magnetske nanočestice obložene silikom, aktivirane različitim metodama.



Slika 4.6. Usporedni prikaz preostale aktivnosti enzima DERA-e aktivirane različitim metodama.

Obzirom da je imobilizirani enzim na nosiocu aktiviranom s 15 %-tnim (w/v) sukcinom pokazao visoku efikasnost i preostalu aktivnost, odnosno stabilnost, taj način aktivacije nosioca je korišten u daljnjim istraživanjima optimiranja uvjeta procesa imobilizacije.

4.4. Rezultati ispitivanja utjecaja pH pufera na uspješnost imobilizacije enzima

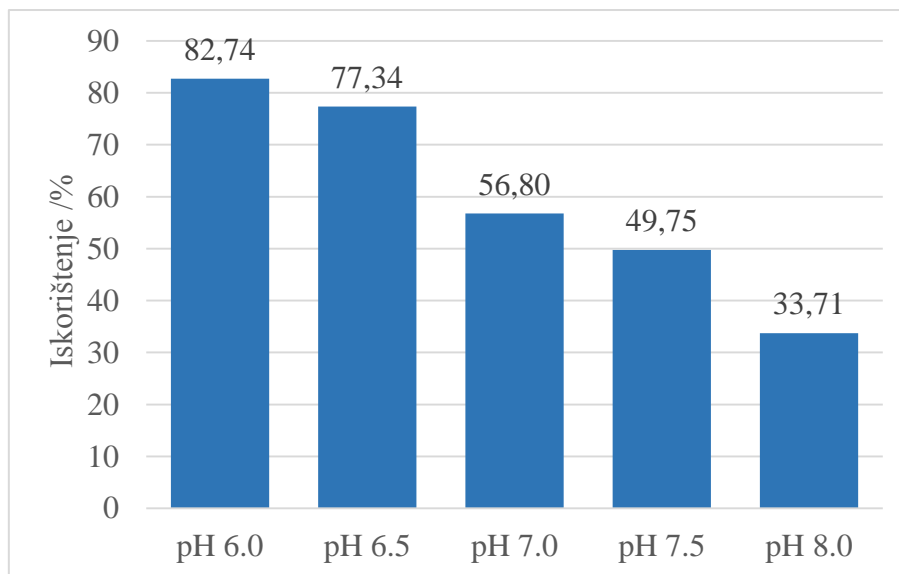
Sastav imobilizacijskog pufera može imati značajan utjecaj na uspješnost procesa imobilizacije. Stoga se pristupilo istraživanju koje se sastojalo u ispitivanjima ishoda procesa korištenjem imobilizacijskih pufera različitih pH vrijednosti u rasponu 6 - 8 pri 0.1 M koncentraciji pufera. U ovim istraživanjima kao nosioc koristile su se MNČ koje su aktivirane s 15 %-tnim (w/v) sukcinjskim anhidridom.

Izračunati parametri uspješnosti procesa imobilizacije DERA-e na MNČ aktivirane s 15 %-tnim (w/v) sukcinjskim anhidridom, u fosfatnom puferu koncentracije 0,1 M na temperaturi od 25 °C, te pri različitim pH vrijednostima dani su u tablici 4.2.

Tablica 4.2. Izračunati parametri uspješnosti imobilizacije enzima DERA na magnetske nanočestice obložene silikom, te aktivirane s 15 %-tnim sukcinjskim anhidridom u fosfatnom puferu koncentracije 0,1 M na temperaturi od 25 °C, te pri različitim pH vrijednostima.

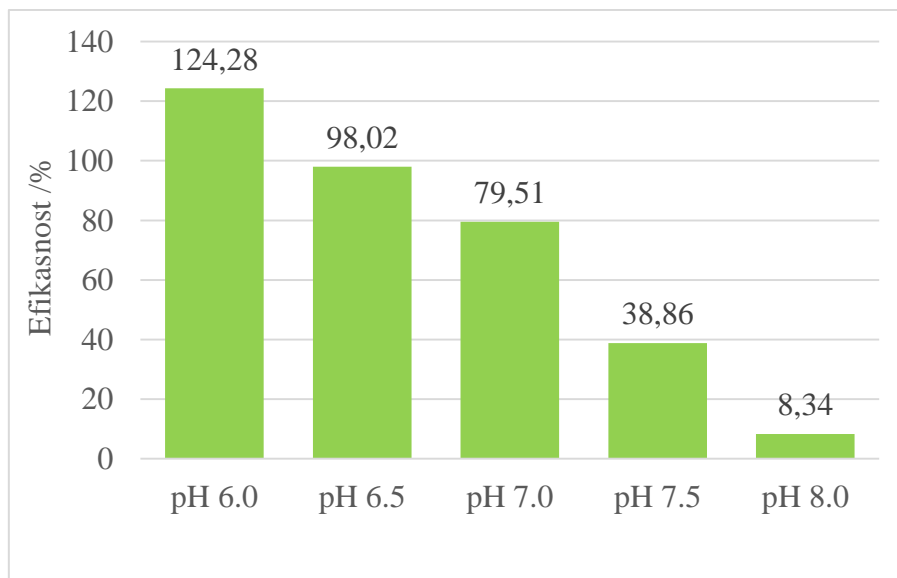
pH / -	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
Iskorištenje / %	82,74	77,34	56,80	49,75	33,71
Efikasnost (očuvana aktivnost) / %	124,28	98,02	79,51	38,86	8,34

Slika 4.7. prikazuje usporedni prikaz izračunatih vrijednosti iskorištenja pri različitim pH vrijednostima. Najveće iskorištenje (82,74 %) pokazuju enzimi imobilizirani pri pH 6, a najmanje iskorištenje (33,71 %) enzimi imobilizirani pri pH 8.



Slika 4.7. Usporedni prikaz iskorištenja pri različitim pH vrijednostima fosfatnog pufera 0.1 M ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Slika 4.8. prikazuje usporedni prikaz efikasnosti procesa imobilizacije pri različitim pH vrijednostima. Može se vidjeti da najveću efikasnost pokazuju enzimi imobilizirani pri pH 6 (124.28 %), a najmanju enzimi imobilizirani pri pH 8 (8.34 %) što nam govori da viši pH ne pogoduje procesu imobilizacije enzima DERA-e.



Slika 4.8. Usporedni prikaz izračunatih efikasnosti procesa imobilizacije enzima DERA-e pri različitim pH vrijednostima fosfatnog pufera 0.1 M ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Rezultati pokazuju da korištenjem pufera koncentracije 0,1 M imobilizaciji najviše pogoduje pH 6, te da se povećanjem pH značajno smanjuju iskorištenje i efikasnost imobilizacije.

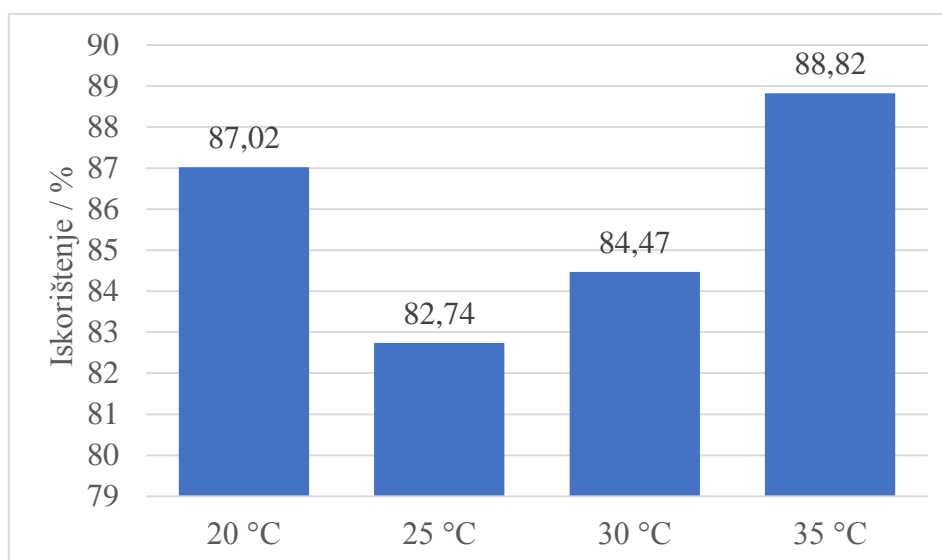
4.5. Ispitivanje utjecaja temperature na uspješnost imobilizacije enzima

Nadalje, značajan utjecaj na sam proces imobilizacije može imati i temperatura. Stoga, provedena su ispitivanja utjecaja temperature na uspješnost procesa imobilizacije enzima DERA-e. Imobilizacija se provodila na MNC obložene silikom, te aktivirane s 15 %-tnim (w/v) sukcinjskim anhidridom u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6 u temperaturnom rasponu od 20-35 °C. U Tablici 4.3. prikazani su izračunati parametri uspješnosti imobilizacije: iskorištenje, efikasnost i imobilizacijska aktivnost.

Tablica 4.3. Izračunati parametri uspješnosti imobilizacije enzima DERA na magnetske nanočestice obložene silikom, te aktivirane s 15 %-tnim sukcinjskim anhidridom u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6 pri temperaturama u rasponu od 20 °C do 35 °C.

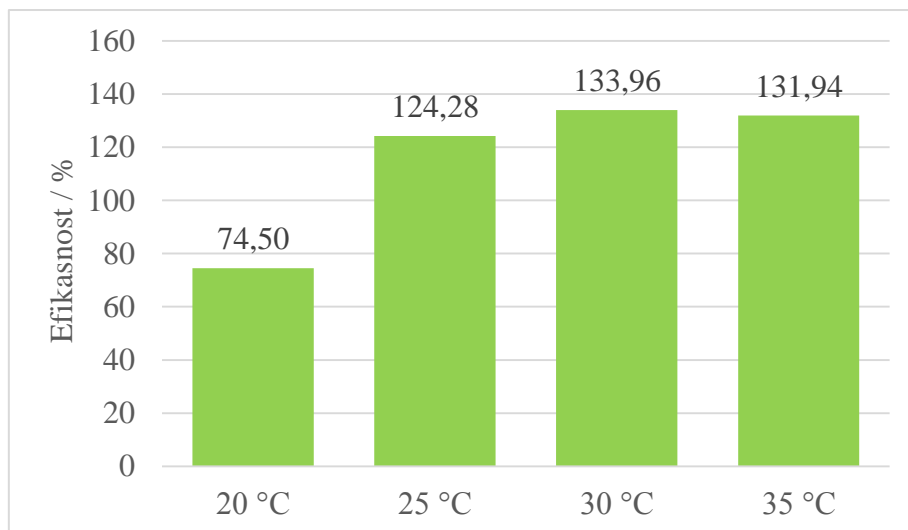
Temperatura / °C	20	25	30	35
Iskorištenje / %	87,02	82,74	84,47	88,82
Efikasnost (očuvana aktivnost) / %	74,5	124,28	133,96	131,94

Slika 4.9. prikazuje usporedni prikaz izračunatih iskorištenja pri različitim temperaturama provedbe procesa imobilizacije enzima DERA-e. Najveće iskorištenje (88,82 %) pokazuju enzimi imobilizirani pri 35 °C.



Slika 4.9. Usporedni prikaz izračunatih iskorištenja za proces imobilizacije enzima DERA-e pri različitim temperaturama (pH 6).

Slika 4.10. prikazuje usporedni prikaz efikasnosti enzima DERA-e za proces imobilizacije proveden u temperaturnom intervalu od 20 °C do 35 °C.



Slika 4.10. Usporedni prikaz izračunatih efikasnosti za enzim DERA-u pri različitim temperaturama (pH 6).

Rezultati pokazuju da imobilizaciji najviše pogoduje temperatura od 30 °C te da smanjenjem temperature na 20 °C dolazi do značajnog pada aktivnosti imobiliziranog enzima. Također vidljivo je da pri temperaturama višim od 25 °C dolazi do hiperaktivacije enzima.

5. ZAKLJUČAK

Hidrotermalnom sintezom te procesom Stöber oblaganja uspješno je sintetizirano 1100 mg magnetskih nanočestica obloženih silikom.

Kao najbolji reagens za aktivaciju pokazao se 15 %-tni (v/w) sukcinski anhidrid jer su eksperimentalni rezultati pokazivali najbolje parametre uspješnosti procesa imobilizacije. Iako je 10 %-tni sukcinski anhidrid imao veću efikasnost, njegovo iskorištenje i preostala aktivnost imobiliziranog enzima manji su u odnosu na 15 %-tni sukcinski anhidrid.

Preostala aktivnost slobodnog enzima iznosi 37 % i manja je od postignutih preostalih aktivnosti imobiliziranog enzima. Stoga se metoda imobilizacije enzima pokazala kao korisna metoda za povećanje stabilnosti enzima DERA-e.

Obzirom da se 15 %-tni sukcinski anhidrid pokazao kao optimalno sredstvo za aktivaciju, uz njegovu primjenu ispitivani su utjecaj pH i temperature. Zaključno, vrijednosti iskorištenja i efikasnosti pokazuju da je najbolji proces imobilizacije onaj koji je proveden pri temperaturi od 30 °C i vrijednosti pH 6 0,1 M fosfatnog pufera.

6. LITERATURA

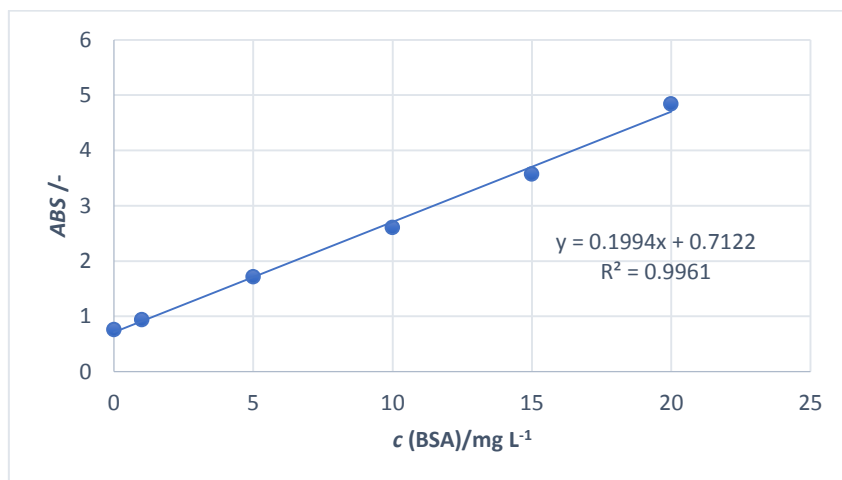
1. P.K. Robinson, *Enzymes: principles and biotechnological applications*, Portland Press Limited, 59 (2015), 1-41.
2. Z. Findrik Blažević, *Bioreakcijska tehnika I*, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu (2012).
3. H. Vaghari, H. Jafarizadeh-Malmiri, M. Mohammadlou, A. Berenjian, N. Anarjan, N. Jafari, S. Nasiri, Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization, *Biotechnol. Lett.* 38 (2016), 223–233.
4. A. Illanes, *Enzyme Biocatalysis - Principles and Applications*, Springer Verlag, (2008), 1-29.
5. https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/15cf791a-4c97-4f29-84d9-17c1b47ceccc/content/uploads/kemija-2/m03/j02/ilustracije-3.dio4_.jpg (pristup ožujak 2022.).
6. S. Shoda, H. Uyama, J. Kadokawa, S. Kimura, S. Kobayashi, Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis, *Chem. Rev.*, 116 (2016), 2307-2413.
7. T. Johannes, M. R. Simurdiak, H. Zhao, Biocatalysis, *Encyclopedia of Chemical Processing*, Taylor & Francis, New York (2006), 101-109.
8. H. Ma, K. Szeler, S. C. L. Kamerlin, M. Widersten, Linking coupled motions and entropic effects to the catalytic activity of 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA), *Chem. Sci.*, 7 (2016), 1415–1421.
9. S. M. Dean, W. A. Greenberg, C. H. Wonga, Recent Advances in Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis, *Adv. Synth. Catal.* 349 (2007), 1308 – 1320.
10. S. Jennewein, M. Schürmann, M. Wolberg, I. Hilker, R. Luiten, M. Wubbolts, D. Mink, Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase, *Biotechnol. J.* , 1 (2006), 537–548.
11. M. Haridas, E. M. M. Abdelraheem, U. Hanefeld, 2-Deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase (DERA): applications and modifications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102 (2018), 9959–9971.
12. A. Švarc, Z. F. Blažević, Đ. Vasić-Rački, A. Szekrenyi, W. D. Fessner, S. J Charnockc, A. Vrsalović Presečki, 2-Deoxyribose-5-phosphate aldolase from *Thermotoga maritima* in the synthesis of a statin side-chain precursor:

- characterization, modeling and optimization, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 94 (2019), 1832–1842.
13. H. J. M. Gijzen, C. H. Wong, Unprecedented asymmetric aldol reactions with three aldehyde substrates catalyzed by 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase, *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994), 8422–8423.
 14. A. A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevanato, Enzyme immobilization: An update. *J. Chem. Biology*, 6(4) (2013), 185–205.
 15. Y. Liu, C. Guo, X. T. Sun, C. Z. Liu, Improved performance of *Yarrowia lipolytica* lipase-catalyzed kinetic resolution of (*R,S*)-2-octanol by an integrated strategy of interfacial activation, bioimprinting and immobilization, *Bioresource Tech.*, 142 (2013), 415–419.
 16. S. D. Minter, Cell-free biotechnologies. In C. A. Eckert & C. T. Trinh (Eds.), *Biotechnology for biofuel production and optimization*, Amsterdam: Elsevier, (2016), 433–448.
 17. S. T. Janecek, Strategies for obtaining stable enzymes, *Process Biochem.*, 28 (1993), 435–445.
 18. D. E. Sastre, E. A. Reis, C. G. C. Marques Netto, Chapter Four - Strategies to rationalize enzyme immobilization procedures, *Methods in Enzymology*, Academic Press, 630 (2020), 81-110.
 19. M. J. Moehlenbrock, S. D. Minter, Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, 679 (2010), 1–7.
 20. S. Chakraborty, H. Rusli, A. Nath, J. Sikder, C. Bhattacharjee, S. Curcio, E. Drioli, Immobilized biocatalytic process development and potential application in membrane separation: a review, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 36(1) (2014), 43–58.
 21. Y. Jung, J. Y. Jeong, B. H. Chung, Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports, *Analyst*, 133 (2008), 697–701.
 22. D. Samanta, A. Sarkar, Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: methods and sensor applications, *Chem. Soc. Rev.*, 40 (2011), 2567–92.
 23. W. Tischer, F. Wedekind, Immobilized enzymes: methods and application, In: Fessner W-D, ed. *Biocatalysis: from discovery to application*, Berlin Heidelberg: Springer, (2000), 95–126.
 24. L. Giorno, R. Molinari, E. Drioli, Performance of a biphasic organic/aqueous hollow fibre reactor using immobilized lipase, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 64 (1995), 345–52.

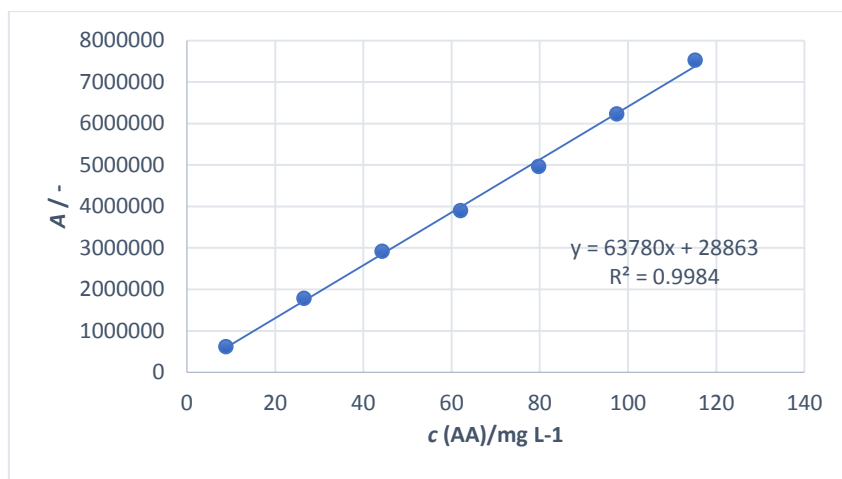
25. M. Ebrahimi, L. Placido, L. Engel, A novel ceramic membrane reactor system for the continuous enzymatic synthesis of oligosaccharides, *Desalination*, 250 (2010), 1105–8.
26. P. Pal, S. Datta, P. Bhattacharya, Multi-enzyme immobilization in eco-friendly emulsion liquid membrane reactor — a new approach to membrane formulation, *Sep. Purif. Technol.*, 27 (2002), 145–54.
27. M. Eldin, E. Seuror, M. Nasr, H. Tieama, Affinity covalent immobilization of glucoamylase onto-benzoquinone-activated alginate beads: II. Enzyme immobilization and characterization, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 164 (2011), 45–57.
28. R. A. Sheldon, Enzyme immobilization: the quest for optimum performance, *Adv. Synth. Catal.*, 349 (2007), 1289–307.
29. T. Godjevargova, V. Konsulov, A. Dimov, N. Vasileva, Behavior of glucose oxidase immobilized on ultrafiltration membranes obtained by copolymerizing acrylonitrile and N-vinylimidazol, *J. Membr. Sci.*, 172 (2000), 279–85.
30. K. Sakai-Kato, M. Kato, K. Ishihara, T. Toyo'oka, An enzymeimmobilization method for integration of biofunctions on a microchip using a water-soluble amphiphilic phospholipid polymer having a reacting group, *Lab. Chip.*, 4 (2004), 4–6.
31. R. G. Digigow, J. F. Dechézelles, H. Dietsch, I. Geissbühler, D. Vanhecke, C. Geers, A. M. Hirt, B. Rothen-Rutishauser, A. Petri-Fink, Preparation and characterization of functional silica hybrid magnetic nanoparticles, *J. Magn. Magn. Mater.*, 362 (2014), 72–79.
32. M. E. Marques, A. A. P. Mansur, H. S. Mansur, Chemical functionalization of surfaces for building three-dimensional engineered biosensors, *App. Surf. Sci.*, 275 (2013), 347–360.
33. M. Punčec, Ispitivanje utjecaja procesa aktivacije nosioca na efikasnost imobilizacije, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, (2020), 15.
34. R. A. Sheldon, S. van Pelt, Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chem. Soc. Rev.*, 42 (2013), 6223-6235.
35. P. Zucca, E. Sanjust, Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms, *Molecules* 19 (2014), 14139-14194.
36. Z. Q. Liu, S. N. Li, Q. S. Zeng, Y. J. Liu, J. M. You, A. G. Ying, Alkene-modified Fe₃O₄ nanoparticle-mediated construction of functionalized mesoporous poly(ionic liquid)s: Synergistic catalysis of mesoporous confinement effect and hydrogen proton for organic transformations, *Mol. Catal.*, 504 (2021), 111437.

37. K. Hola, Z. Markova, G. Zoppellaro, J. Tucek, R. Zboril, Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances, *Biotechnol Adv.*, 33 (6) (2015) , 1162-1176.
38. J. Govan, Y. K. Gun'ko, Recent advances in the application of magnetic nanoparticles as a support for homogeneous catalysts, *J. Nanomater*, 4 (2014), 222–241.
39. A. P. Philipse, M. P. B. van Bruggen, C. Pathmamanoharan, Magnetic Silica Dispersions: Preparation and Stability of Surface-Modified Silica Particles with a Magnetic Core, *Langmuir*, 10 (1994), 92-99.
40. A. M. Ismail, Ibrahim, A. A. F. Zikry, A. S. Mohamed, Preparation of spherical silica nanoparticles: Stober silica, *J. Amer. Sci.*, 6 (11) (2010), 985-989.
41. P. P. Ghimire, M. Jaroniec, Renaissance of Stöber Method for Synthesis of Colloidal Particles: New Developments and Opportunities, *J. Coll. & Interface Sci.*, 584 (2020), 838-865.
42. https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html (pristup kolovoz 2022.).
43. S. M. Nilapwar, M. Nardelli, H. V. Westerhoff, M. Verma, Chapter four - Absorption Spectroscopy, *Methods in Enzymology*, Academic Press, 500 (2011), 59-75.
44. D. A. Skoog, D. M., West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb (1999).
45. https://www.irb.hr/content/download/13455/270196/file/Odredjivanje_proteina_kolorimetrijskom_metodom.pdf (pristup kolovoz 2022.).
46. S. Jennewein, M. Schürmann, M. Wolberg, I. Hilker, R. Luiten, M. Wubbolts, D. Mink, Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase, *Biotechnol. J.*, 1 (2006), 537–548.
47. <https://nanociencia.imdea.org/es/magnetic-nanoparticles/group-gallery> (pristup rujan 2022.).

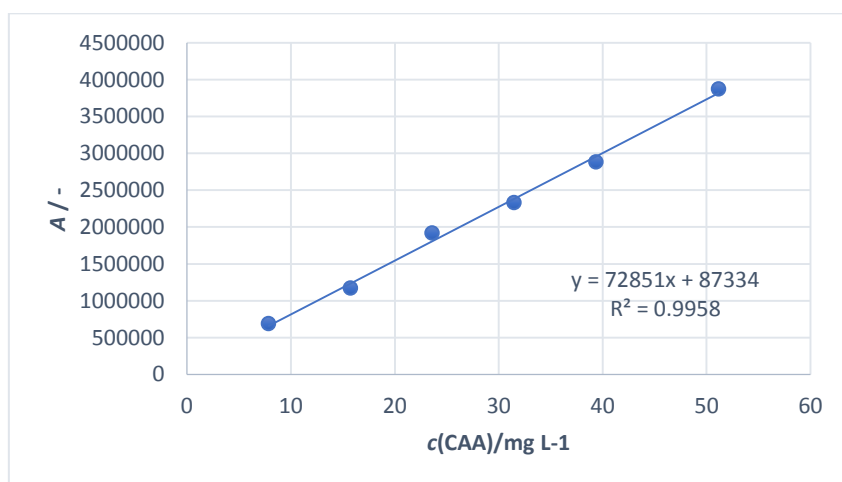
7. PRILOZI



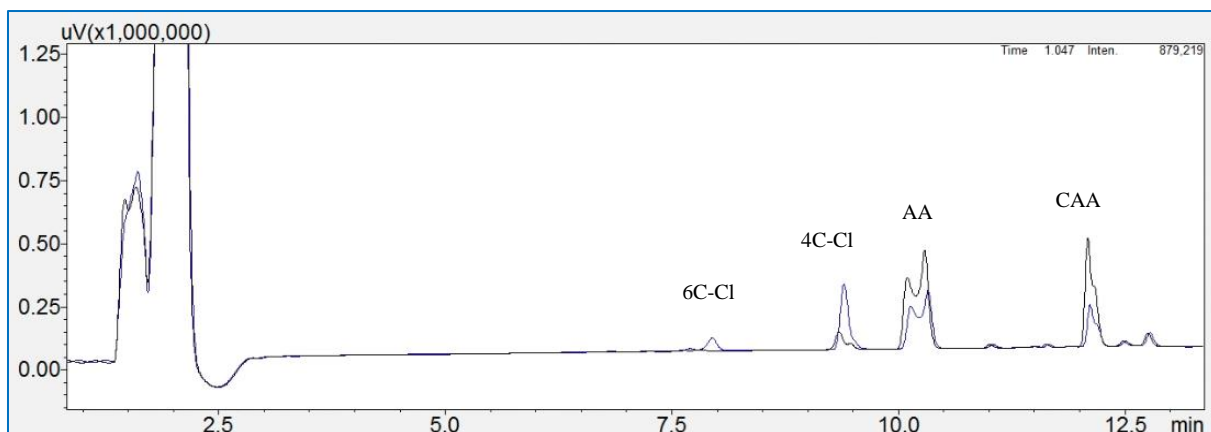
Prilog 1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina



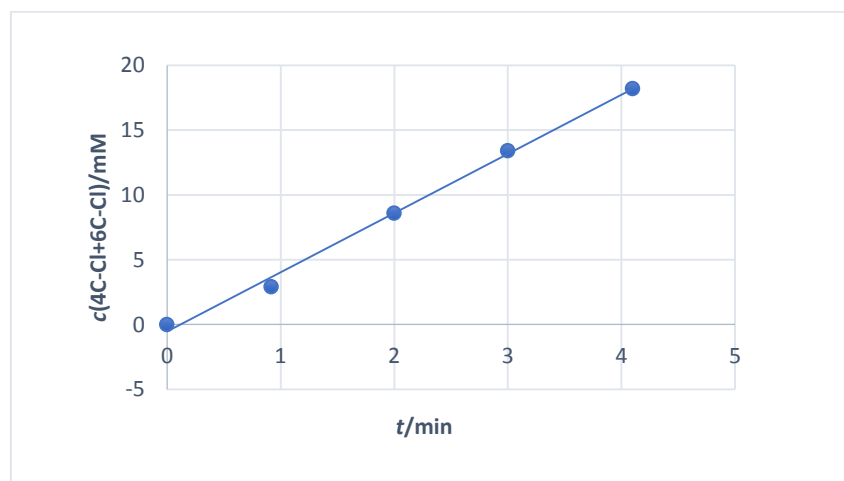
Prilog 2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije acetaldehida



Prilog 3. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije kloroacetaldehida



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



Prilog 5. Grafički prikaz promjene koncentracije međuprodukta 4C-Cl i produkta 6C-Cl reakcije s vremenom za imobilizaciju enzima DERA-e prethodno aktiviranim s 10 %-tnim sukcinjskim anhidridom

8. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA

Grčki simboli

Δ – promjena [-]

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

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

λ – valna duljina [nm]

Simboli

$A_{\text{imobilizirani enzim}}$ – aktivnost imobiliziranog enzima [Uml^{-1}]

$A_{\text{slobodni enzim}}$ – aktivnost slobodnog enzima

$A_{\text{imobilizirani enzim, 2. reakcija}}$ – aktivnost imobiliziranog enzima u drugoj reakciji

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

b – duljina puta svjetlosti [cm]

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

$c_{\text{protein,0}}$ – početna koncentracija proteina [mg ml^{-1}]

$c_{\text{protein, konačno}}$ – koncentracija proteina na kraju imobilizacije [mg ml^{-1}]

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

d – promjer [cm]

m – masa [mg]

T – temperatura [$^{\circ}\text{C}$]

t – vrijeme [s]

V – volumen [μl]

V_{DERA} – volumen dodanog enzima [ml]

Skraćenice

4C-Cl – (3*R*)-4-kloro-3-hidroksibutanal; međuprodukt DERA katalizirane aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida

6C-Cl – (3*R*,5*R*)-6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal; produkt DERA katalizirane aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida

ABS – apsorbanacija na određenoj valnoj duljini svjetlosti

APTMS - 3-aminopropil-trimetoksisilan

BSA - albumin goveđeg seruma

CBB - Coomassie Brilliant Blue G-250

CTAB - heksadeciltrimetilamonij-bromida

DERA – deoksiriboza-5-fosfat aldolaza

DR5P – 2-deoksiriboza-5-fosfat

GA- glutaraldehyd

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

SA- sukcinski anhidrid

TEOS - tetraetil ortosilikat

ŽIVOTOPIS

Doroteja Mutak [REDACTED] Nakon završetka osnovne škole Ivane Brlić Mažuranić upisuje gimnaziju Lucijana Vranjanina koju završava 2014. godine s vrlo dobrim uspjehom. 2014. godine upisuje preddiplomski studij Ekoinženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2016. na istom fakultetu upisuje preddiplomski studij na smjeru Kemijsko inženjerstvo kojeg završava 2020. godine. Iste godine upisuje Diplomski studij Kemijskog inženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.