

# Matematički model biokatalitičke sinteze nanočestica

---

Jovičić, Mirna

Master's thesis / Diplomski 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:149:759585>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-25**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Mirna Jovičić**

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, srpanj 2015.

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

**Mirna Jovičić**

**MATEMATIČKI MODEL BOKATALITIČKE SINTEZE NANOČESTICA**

**DIPLOMSKI RAD**

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki
2. izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević
3. dr. sc. Fabio Faraguna, poslijedoktorand

Zagreb, srpanj 2015.

*Veliko hvala mojoj mentorici dr.sc. Ani Vrsalović Presečki na pruženom stručnom znanju, velikom strpljenju i pomoći prilikom izrade ovog rada.*

*Također zahvaljujem dr.sc. Fabiu Faraguni na pruženoj pomoći kod analize nanočestica.*

*Najveće hvala mojoj obitelji i Goranu što su mi uvijek bili podrška i vjerovali u mene.*

## SAŽETAK

U ovom radu provedena je sinteza nanočestica kalcijevog karbonata pomoću produkata biokatalitičke hidrolize uree i enzima ureaze. Uz to ispitivana je kinetika hidrolize uree uz enzim ureazu te je promatran utjecaj kalcijevih ( $\text{Ca}^{2+}$ ) iona na aktivnost enzima. Reakcije su provedene u dva medija – redestiliranoj vodi i 10%-tnoj otopini Tritona x-100, pri dvije temperature,  $T = 30^\circ\text{C}$  i  $T = 20^\circ\text{C}$ .

Ispitivanje kinetike reakcije provedeno je mjerenjem početne brzine reakcije pri različitim koncentracijama uree, uz stalnu koncentraciju enzima ureaze. Kinetika reakcije opisana je jednosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom. Utjecaj kalcijevih iona ( $\text{Ca}^{2+}$ ) na aktivnost enzima ispitan je mjerenjem specifične aktivnosti ureaze u ovisnosti o različitim koncentracijama kalcijeva klorida,  $\text{CaCl}_2$ , uz stalnu koncentraciju uree i ureaze. Utvrđeno je da kalcijevi ioni inhibiraju ureazu nekompetitivnom inhibicijom. Razvijen je matematički model procesa koji je validiran provođenjem reakcije u kotlastom reaktoru uz stalno miješanje na termostatu tresilici.

Reakcijom kalcijevih iona s produktima hidrolize uree istaložene su nanočestice kalcijevog karbonata koje su karakterizirane pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa.

**Ključne riječi:** enzimi, urea, ureaza, nanočestice, kalcijev karbonat

## ABSTRACT

In this study synthesis of calcium carbonate nanoparticles was carried out using products of biocatalytical hydrolysis of urea catalyzed by enzyme urease. Kinetics of the urease-catalyzed hydrolysis of urea and the influence of  $\text{Ca}^{2+}$  ions on enzyme activity was tested. Reactions were carried out in two different media – redistilled water and 10% Triton x-100 solution at two temperatures,  $T = 30^\circ\text{C}$  and  $T = 20^\circ\text{C}$ .

Reaction kinetics was experimentally determined using the initial reaction rate method. Reaction kinetics was described with Michaelis – Menten kinetic model. Influence of calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) on the enzyme activity was tested by measuring the specific activity of urease as a function of various concentrations of calcium chloride,  $\text{CaCl}_2$ , with a constant concentration of urea and urease. It was found that  $\text{Ca}^{2+}$  ions inhibit urease with non – competitive inhibition. Mathematical model of the process was developed and validated in a batch reactor.

Nanoparticle synthesis was carried out by adding calcium chloride into a solution of urea and enzyme urease. In the reaction of calcium ions and urea hydrolysis products, calcium carbonate nanoparticles were precipitated. Synthesized nanoparticles were characterized with scanning electron microscope.

**Keywords:** enzymes, urea, urease, nanoparticles, calcium carbonate

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO.....	3
2.1. NANOČESTICE .....	3
2.1.1. Kalcijev karbonat.....	4
2.2. BOKATALIZATORI.....	6
2.2.1. Ureaza.....	8
2.3. KINETIKA ENZIMSKI KATALIZIRANIH REAKCIJA .....	9
2.4. REAKTORI ZA PROVEDBU BIOTRANSFORMACIJA.....	11
2.4.1. Kotlasti reaktor .....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	13
3.1. APARATURA.....	13
3.1.1. Kotlasti reaktor .....	13
3.1.2. Spektrofotometar .....	14
3.1.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	14
3.1.4. Atamski apsorpcijski spektrometar .....	15
3.1.5. Centrifuga .....	16
3.1.6. Liofilizator .....	17
3.1.7. Pretražni elektronski mikroskop (SEM) .....	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 koncentracije uree .....	19
3.2.4. Određivanje kinetike enzima ureaze.....	20
3.2.5. Sinteza nanočestica kalcijevog karbonata .....	21
3.2.6. Obrada rezultata.....	22

4. MATEMATIČKI MODEL .....	23
4.1. KINETIČKI MODEL.....	23
4.2. REAKTORSKI MODEL.....	24
5. REZULTATI I RASPRAVA .....	25
5.1. KINETIKA ENZIMA UREAZE.....	25
5.1.1. Kinetika enzima ureaze u vodi i 10%-tnoj otopini Tritona x-100.....	25
5.1.2. Utjecaj kalcijevih iona na kinetiku enzima ureaze .....	28
5.2. HIDROLIZA UREE U KOTLASTOM REAKTORU I SINTEZA NANOČESTICA KALCIJEVOG KARBONATA .....	31
5.3. KARAKTERIZACIJA DOBIVENIH NANOČESTICA KALCIJEVOG KARBONATA.....	39
5.3.1. Analiza nanočestica pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa.....	39
6. ZAKLJUČAK .....	43
7. POPIS SIMBOLA I KRATICA .....	44
8. LITERATURA.....	46
9. PRILOZI.....	48
10. ŽIVOTOPIS .....	51



## 1. UVOD

Enzimi ili biološki katalizatori su tvari koje ubrzavaju kemijske reakcije i kao takvi su nezamjenjivi zbog svoje selektivnosti, specifičnosti, stereospecifičnosti, netoksičnosti, obnovljivosti, mogućnosti razgradnje toksične tvari te mogućnosti kataliziranja pri blagim i za okoliš prihvatljivim uvjetima. Kao njihovi nedostaci ističu se visoka cijena, nestabilnost izvan prirodnog okruženja te podložnost deaktivaciji i inhibiciji. Primjena i karakterizacija novih enzima koji mogu katalizirati reakcije znatno će proširiti spektar industrijske biokatalize.

Za upotrebu u industrijskom mjerilu svaki biokatalizator potrebno je ispitati u realnim reaktorskim uvjetima, kinetički ga karakterizirati te pronaći metodu njegove stabilizacije. Kako bi se odabrao adekvatan reaktor za provedbu biokatalitičke reakcije potrebno je razviti matematički model procesa. Matematički modeli pokazali su se veoma učinkovitim u traženju optimalnih radnih uvjeta i stvaranju optimalnog mikrookoliša za biokatalizator s ciljem optimiranja produktivnosti i konverzije susprata.

Enzimski provođene reakcije dobivanja nanočestica su izuzetno atraktivno znanstveno istraživačko područje koje otvara mogućnosti novih načina primjene nanočestica, primjerice u terapiji i liječenju raka, dobivanju materijala posebnih fizikalnih i kemijskih svojstava i slično. Do sada su pomoću ureaze izolirane iz raznih mikroorganizama (*Aspergillus niger*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis* ili *Aerobacter aerogenes*) uspješno priređene nanočestice u obliku tankih filmova, šupljih mikro i nanosfera, nanocijevčica, dvodimenzionalnih uzoraka, trodimenzionalnih uzoraka te biominerala. Vrlo važna karakteristika enzimski provođenih reakcija dobivanja nanočestica je činjenica da se kemijska i fizikalna svojstva ovako dobivenih materijala ponekad razlikuju od svojstava nanočestica koje se priređuju reakcijama bez prisutnosti enzima.<sup>[1]</sup>

Ureaza je enzim koji katalizira hidrolizu uree dajući produkte amonijak i karbamat, koji se potom spontano raspadaju na amonijak i karbonatnu kiselinu.<sup>[8]</sup>

Cilj ovog rada je ispitati kinetiku reakcije hidrolize uree te pomoću produkata hidrolize sintetizirati nanočestice kalcijevog karbonata. Prednosti dobivanja nanočestica enzimskim reakcijama su što se takve reakcije odvijaju pri sobnoj temperaturi, pH reakcija je neutralan, a reakcije se mogu lako kontrolirati.<sup>[14]</sup>

Kalcijev karbonat,  $\text{CaCO}_3$ , je mineral široko rasprostranjen u prirodi, a može se pojaviti u tri različite kristalne modifikacije – kalcit, aragonit i vaterit. Ima veoma širok

spektar primjene zbog čega se javila potreba za pripremom karbonatnih materijala s točno definiranim fizičkim i kemijskim značajkama, pri sobnoj temperaturi i na ekološki prihvatljiv način. Jedan od takvih, prihvatljivih načina pripreme, su upravo enzimске reakcije.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. NANOČESTICE

Nanočestice su superfine čestice čija je barem jedna dimenzija manja od 100 nm. Smanjenjem veličine zrna, raste njegova ukupna energija, odnosno, što su čestice manje, imaju veću vanjsku efektivnu površinu i samim time su reaktivnije. Promjenom veličine nanočestica mijenjaju se njihova magnetska, optička i električna svojstva.

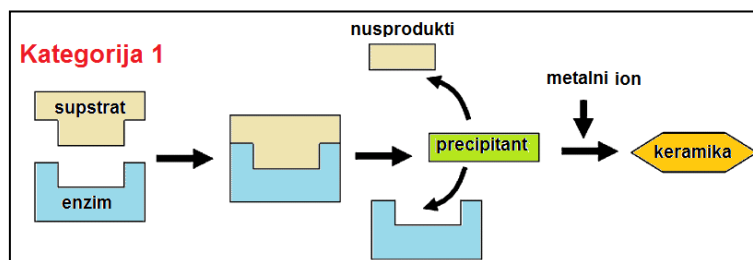
Nanočestice imaju širok spektar primjene u raznim industrijama, visokoj tehnologiji, medicini, farmaciji te proizvodnji raznih proizvoda – od hrane i lijekova do kućanskih aparata, mobitela, tekstila. Njihovim dodavanjem materijalima poboljšavaju im se čvrstoća, tvrdoća te druga mehanička svojstva.<sup>[2]</sup>

Za sintezu nanočestica razvijen je veliki broj različitih fizičkih, kemijskih i bioloških metoda. Najviše se koriste fizičke i kemijske metode, no njihova je upotreba ograničena, osobito u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj tehnologiji, zbog korištenja toksičnih kemikalija nužnih za njihovu provedbu. Zbog toga korištenje mikroorganizama predstavlja pouzdan i ekološki prihvatljiv način za sintetiziranje nanočestica. Za takvu vrstu reakcija mogu se koristiti izolirani enzimi ili cijele stanice. Osim što se na ovaj način izbjegava upotreba skupih i štetnih kemikalija, ostvaruju se i energetske uštede, te nema negativnog utjecaja na okoliš. Mnoge biljke, gljive, alge, bakterije i virusi mogu se koristiti za sintezu nanočestica bilo unutarstaničnim ili izvanstaničnim putem. Unutarstanična metoda sastoji se od transporta iona u mikrobnu stanicu gdje se uz prisutnost enzima formira nanočestica. Izvanstanična sinteza nanočestica uključuje adsorpciju metalnih iona na površini stanice i redukciju do metala u prisustvu enzima.<sup>[18]</sup>

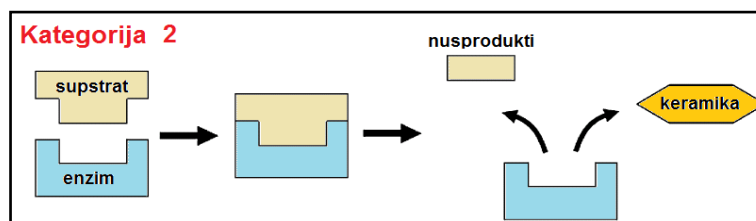
Brzina unutarstaničnog formiranja čestica, a time i veličina nanočestica može se, u određenoj mjeri, manipulirati kontroliranjem parametara kao što su pH, temperatura, koncentracija supstrata, i vrijeme izloženosti supstratu.

Zbog prirode enzimskih reakcija, moguća je sinteza keramičkih nanočestica na željenom mjestu, pri niskim temperaturama te uz mogućnost kombiniranja keramičkih dijelova s materijalima osjetljivim na toplinu. Dvije osnovne metode sinteze keramičkih nanočestica pomoću enzima su:

1. dobivanje nanočestica pomoću enzima reakcijama kojima nastaju precipitanti metalnih iona koji zatim dodatkom metalnih iona u otopinama precipitiraju u keramičke produkte (Slika 2.1);
2. dobivanje nanočestica pomoću enzima reakcijama kod kojih enzimi direktno reagiraju s tvarima koje sadrže metale kako bi nastale keramičke nanočestice (Slika 2.2).



Slika 2.1 Dobivanje nanočestica pomoću enzima reakcijama kojima nastaju precipitanti metalnih iona



Slika 2.2 Dobivanje nanočestica pomoću enzima reakcijama kod kojih enzimi direktno reagiraju s tvarima koje sadrže metale kako bi nastale keramičke čestice

Enzimskim putem dobivene nanočestice mogu se kombinirati s organskim ili toplinski osjetljivim tvarima (npr. proteinima), mogu imati različite kristalinične faze od nanočestica koje se priređuju konvencionalnim metodama, morfologija nastalih čestica može se kontrolirati imobilizacijom enzima na različite oblike podloga, a njihova kemijska i fizikalna svojstva mogu se razlikovati od svojstava nanočestica koje se priređuju reakcijama bez prisutnosti enzima.<sup>[14]</sup>

### 2.1.1. Kalcijev karbonat

Kalcijev karbonat,  $\text{CaCO}_3$ , je mineral široko rasprostranjen u prirodi. Glavni je mineralni sastojak sedimentnih stijena te se kao anorganska komponenta nalazi u kostima i tkivima mnogih organizama, te predstavlja jednu od najznačajnijih nemetalnih mineralnih

sirovina.<sup>[12]</sup> Drugi je mineral (iza kremenca, SiO<sub>2</sub>) po rasprostranjenosti u Zemljinoj kori. Može se pojaviti u obliku tri različite kristalne modifikacije – kalcit, aragonit i vaterit.

Kalcit je najčešća modifikacija kalcijevog karbonata u prirodi. Javlja se u više od 600 kristalnih formi koje čine oko 2000 različitih kombinacija. Najčešći su romboedarski, skelnoedarski i šesterostrani prizmatični kristali. Kalcit je najčešće bezbojan ili bijel, a kristali su uglavnom prozirni. S obzirom na izvanrednu kalavost kristala kalcita, jako su osjetljivi na oštećenja, odnosno mogu puknuti već pri slabijem udarcu. Važno je paziti i da kalcit ne dođe u dodir s kiselim otopinama koje ga lako nagriza i otapaju. Primjena kalcita ovisi o načinu njegova pojavljivanja. U građevinarstvu i kparstvu upotrebljavaju se vapnenci i mramori, dok se posve čisti kristali kalcita koriste za priređivanje prizmi za optičke instrumente.<sup>[13]</sup>

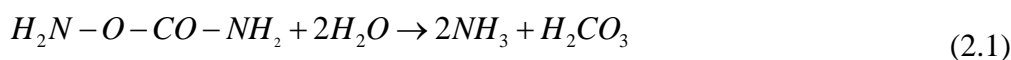
Aragonit je rompska polimorfna modifikacija kalcijeva karbonata i u određenim uvjetima nastoji prijeći u stabilniju trigonsku modifikaciju – kalcit. Kristali aragonita najčešće su štapičasti te granasti, sigasti ili vlaknasti agregati, a često se pojavljuju kao sraslaci trojci koji simuliraju heksagonsku simetriju. Aragonit je najčešće bezbojan ili bijel, no može ga se naći i žućkastog, nježno zelenkastog, ružičastog i nježno ljubičastog obojenja. Za razliku od kalcita, aragonit je mnogo rjeđi u prirodi, te ima zanemarivo mali udio u izgradnji golemih masa karbonatnih stijena.<sup>[13]</sup>

Vaterit, poznat i kao  $\mu$ -CaCO<sub>3</sub>, rijetko se pojavljuje u prirodi. To je termodinamički najnestabilnija kristalna modifikacija kalcijeva karbonata te u vodenim otopinama vrlo brzo prelazi u kalcit ili aragonit. Kristali vaterita smjesa su nekoliko kristalnih struktura pri čemu je glavna struktura heksagonalna, dok su ostale uglavnom nepoznate.

Kalcijev karbonat važan je mineral s veoma širokim spektrom primjene te se koristi u industriji boja, plastike i gume te u papirnoj industriji. Upravo zbog te široke primjene javila se potreba za pripremom karbonatnih materijala s točno definiranim fizičkim i kemijskim značajkama, pri sobnoj temperaturi i na ekološki prihvatljiv način.<sup>[3]</sup> Mnogi mineralizirajući organizmi selektivno proizvode intra- i ekstracelularne polimorfe kalcijevog karbonata s neuobičajenim morfološkim, mehaničkim i fizikalno – kemijskim svojstvima. Takve molekule kalcijevog karbonata imaju veoma sofisticirani dizajn u usporedbi s njihovim abiotskim analogima, posebice ako uzmemo u obzir činjenicu da se svi procesi odvijaju na atmosferskom tlaku i temperaturi. Stvaranje biogenih struktura kalcijevog karbonata je kontrolirano organskim makromolekulama, uglavnom peptidima i proteinima. Mineralizirajući organizmi koriste sposobnosti makromolekula da stvaraju interakcije s

površinom rastućih kristala te na taj način direktno reguliraju nukleaciju, rast i morfologiju, tj. strukturu i fizička svojstva precipitata.<sup>[16]</sup>

Polimorfi kalcijevog karbonata različitih veličina i oblika mogu se dobiti homogenim taloženjem u otopini kalcijevih soli uz enzimski kataliziranu razgradnju uree na sobnoj temperaturi.<sup>[12]</sup> Potrebno je otopiti malu količinu ureaze u otopini u kojoj se nalaze kalcijev klorid i urea, pri čemu će ureaza hidrolizirati ureu u amonijak, a nastat će i karbonatna kiselina (2.1). Istovremeno će karbonatni ioni (2.2) reagirati s ionima kalcija iz otopine te će pri sobnoj temperaturi precipitacijom nastati kalcijev karbonat (2.3). Disocijacijom amonijaka u vodi nastaju amonijevi i hidroksidni ioni (2.4).<sup>[14]</sup>

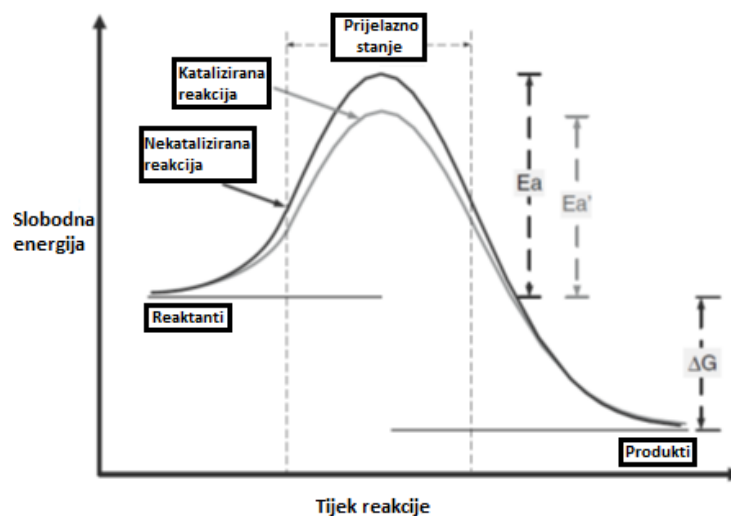


## 2.2. BIODOKATALIZATORI

Biokatalizatori ili enzimi su proteinski katalizatori koji kataliziraju specifične kemijske reakcije, uključujući hidrolizu, reakcije oksidacije i redukcije, strukturalni transfer, eliminaciju specifičnih funkcionalnih grupa, izomerizaciju i stvaranje veza (uglavnom kod organskih spojeva). Iako se u prirodi enzimski katalizirane reakcije odvijaju u živim organizmima, razvojem tehnologije ovakve reakcije mogu se provoditi i u laboratorijima, unutar bioreaktora. Na supstrat djeluju povezivanjem molekula stvarajući kompleks, na principu ključ – brava.

Djeluju tako da snižavaju energiju aktivacije pojedine reakcije te je na taj način ubrzavaju, čak do nekoliko milijuna puta. Veličina energetske barijere smanjuje se interakcijom sa supstratom, odnosno reaktantom pri čemu se formira aktivirani prijelazni kompleks. U tom je kompleksu enzim vezan uz supstrat van der Waalsovom i elektrostatskim privlačenjem, vodikovom vezom ili rjeđe, kovalentnom vezom, što omogućava lagano razdvajanje po završetku reakcije. Kompleksiranje mora biti brzo i reverzibilno, tako da se produkt odvaja od enzima odmah nakon reakcije i oslobađa enzim za daljnje katalitičko

djelovanje. Mehanizam katalize prikazan je na Slici 2.3, gdje  $E_a$  i  $E_a'$  predstavljaju energije aktivacije nekatalizirane i katalizirane reakcije, a  $\Delta G$  je izmjena slobodne energije reakcije.



Slika 2.3 Mehanizam katalize

Velike prednosti biokatalizatora su njihova specifičnost na supstrat i selektivnost. Razlikujemo četiri vrste selektivnosti – selektivnost na supstrat, stereoselektivnost, regioselektivnost i selektivnost na funkcionalnu grupu. Visoka selektivnost biokatalizatorima omogućava učinkovite reakcije uz nastajanje vrlo malo nusprodukata što ih čini prihvatljivijima za okoliš. S obzirom na to da su po strukturi proteini, u potpunosti su biorazgradivi.<sup>[10]</sup>

Ipak, njihova upotreba je ograničena njegovom stabilnošću odnosno sposobnosti da zadrže aktivnu strukturu u uvjetima pod kojima se reakcija odvija. Njihovo djelovanje i aktivnost mogu biti izloženi utjecaju raznih tvari koje mogu usporiti enzimsku reakciju, a nazivamo ih inhibitorima. S obzirom na mjesto na enzimu na koje se inhibitor veže, razlikujemo tri vrste inhibitora. Kompetitivni inhibitori natječu se sa supstratom za vezanje na aktivno mjesto enzima, dok se antikompetitivni i nekompetitivni inhibitori vežu na neko drugo mjesto na enzimu. Također, inhibitore možemo podijeliti na kovalentne i nekovalentne. Kovalentni inhibitori vežu se za enzim trajnom kovalentnom vezom, najčešće na njegovo aktivno mjesto, tj. mjesto na koje se veže supstrat. Nekovalentni inhibitori vežu se na enzim nekovalentnim vezama: vodikovim mostovima, ionskim vezama ili van der Waalsovima silama.<sup>[7]</sup>

Biokatalizatori najčešće djeluju pri sobnoj temperaturi, neutralnom pH i atmosferskom tlaku. S obzirom da zahtijevaju blage reakcijske uvjete, u većinu enzimatskih procesa se ulaže malo energije, što znači i nižu cijenu takvih procesa. Međutim, njihova primjena u industriji je ipak ograničena, a glavni razlozi za to su visoka cijena samih enzima, njihova nestabilnost i mala volumna produktivnost. Također, mnogi enzimi su nestabilni pri visokim temperaturama ili ekstremnim pH vrijednostima. Zbog činjenice da su topljivi u vodi teško ih je separirati iz reakcijske smjese na kraju katalitičkog procesa.

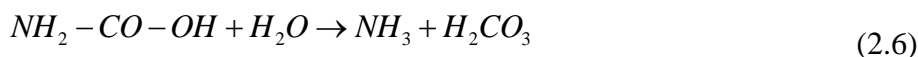
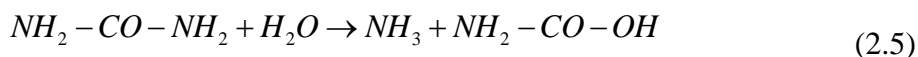
U prirodi postoji oko 25.000 različitih enzima, a do sada ih je identificirano preko 3.000. Prisutni su u biljnom i životinjskom svijetu, ali i u vlaknastim gljivama, kvascima i bakterijama.

Prvi pokušaji enzimski posredovane sinteze keramike datiraju iz 1961. godine kada je karbonatni apatit sintetiziran pomoću karbonske anhidraze, dok je sintezu silicijeva i titanijeva oksida omogućilo otkriće silikateina (enzima sinteze silikata).<sup>[10]</sup>

### 2.2.1. Ureaza

Ureaza je prvi ikada kristalizirani enzim. Njezinim proučavanjem bavio se kemičar James B. Sumner te ju je 1925. godine uspio kristalizirati iz graha (*lat. Canvalia ensiformis*), za što je nekoliko godina kasnije dobio i Nobelovu nagradu.

Ureaza je enzim koji katalizira hidrolizu uree te na taj način omogućava organizmima da koriste ureu kao izvor dušika. Hidrolizom uree nastaje amonijak i karbamat (2.5), koji se potom spontano raspada na amonijak i ugljični dioksid (2.6).



Kao široko rasprostranjeni enzim u prirodi, ureaza se može naći u bakterijama, gljivama, algama i višim biljkama te u tlu. U biljkama je uključena u sistemske puteve prijenosa dušika te se smatra da djeluje kao obrambeni protein. Kod ljudi, bakterijske ureaze su važni faktori virulencije u brojnim bolestima urinarnog trakta i probavnog sustava, uključujući i rak.

Iako enzimi ureaze dobiveni iz različitih izvora imaju različite proteinske strukturne podjedinice, dokazano je da su to sve oblici istog enzima s jednakom osnovnom strukturom i



katalitičkim mehanizmom. Pokazalo se da različitim putem dobiveni enzimi ureaze koriste jednaka aktivna mjesta, koja uvijek sadrže dva niklova (II) iona. Unatoč opsežnim istraživanjima, katalitički mehanizam ureaze još uvijek nije u potpunosti razjašnjen.

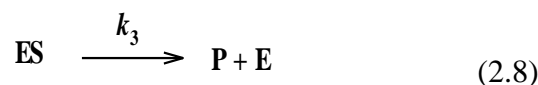
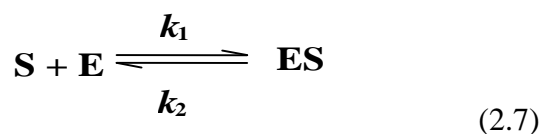
Ureaza ima značajnu ulogu i u agronomiji. U tlu služi za oslobađanje amonijaka iz gnojiva na bazi uree. Osim u agronomiji, primjenjuje se i u medicini, npr. u uređajima za uklanjanje uree iz krvi ili dijalizata, u analitičkim uređajima za određivanje uree ili određivanje tvari koje su inhibitori ureaze, što omogućuje praćenje onečišćujućih tvari (npr. teških metalnih iona ili pesticida) u okolišu. Također, sve se više koristi i za dobivanje nanočestica iz produkata biokatalitičke hidrolize uree.<sup>[8]</sup>

Neki mikroorganizmi mogu svojim staničnim metabolizmom proizvesti ureazu, enzim pomoću kojega se precipitacijom s amonijakom i karbonatima mogu dobiti različite nanočestice, primjerice magnetit, željezov hidroksid, aluminijev sulfat, kalcijev karbonat, stroncijev ili barijev karbonat, kalcijev fosfat, itrijev hidroksid ili cinkov oksid.<sup>[14]</sup>

### 2.3. KINETIKA ENZIMSKI KATALIZIRANIH REAKCIJA

Kinetički model reakcije je matematički izraz koji opisuje ovisnost brzine reakcije o reakcijskim parametrima. Kinetika enzimski kataliziranih reakcija može se opisati pomoću odgovarajućih matematičkih modela. Njihova složenost ovisi o karakteristikama promatrane enzimske reakcije i uključuje broj prisutnih supstrata, prisutnost inhibicije supstratom i/ili produktom te deaktivaciju enzima.<sup>[4]</sup>

U ovom radu riječ je o jednosupstratnoj enzimskoj reakciji koja se može opisati Michaelis – Menteničinim izrazom koji opisuje ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata i enzima. Enzim E spaja se sa supstratom S čime nastaje kompleks ES (2.7), koji može disocirati na enzim E i supstrat S (reverzibilna reakcija) ili se može prevesti u produkt P i enzim E (2.8).



Početna brzina reakcije tj. početna brzina potrošnje supstrata ( $r_s$ ) može se odrediti iz Michaelis – Menteničinog izraza (2.9), temeljenog na pretpostavci da je koncentracija supstrata dovoljno visoka da ne dolazi do bitne promjene u njoj početnoj vrijednosti tijekom perioda u kojem se eksperimentalno određuje početna brzina reakcije ( $c_s \sim c_{s0}$ ).

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^S + c_s} \quad (2.9)$$

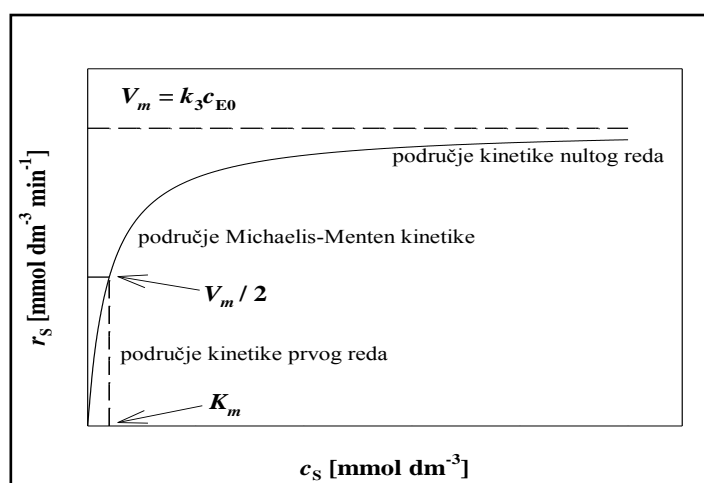
U danom izrazu,  $r_s$  je brzina potrošnje supstrata [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ],  $c_s$  koncentracija supstrata [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ],  $V_m$  predstavlja maksimalnu brzinu reakcije [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ], a  $K_m^S$  Michaelis – Menteničinu konstantu [ $\text{mmol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

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 (2.10) i (2.11).

$$V_m = k_3 \cdot E_0 \quad (2.10)$$

$$K_m^S = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (2.11)$$

Za jednosupstratne enzimске reakcije, koje slijede Michaelis – Menteničinu kinetiku karakteristična je hiperbolična ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata (Slika 2.4).



Slika 2.4 Ovisnost reakcijske brzine o početnoj koncentraciji supstrata kod Michaelis – Menteničine kinetike

Vidljiva su tri različita područja brzine reakcija: 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,  $c_s$ , je linearna. Područje niskih koncentracija supstrata ( $c_s \gg K_m^S$ ) 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.

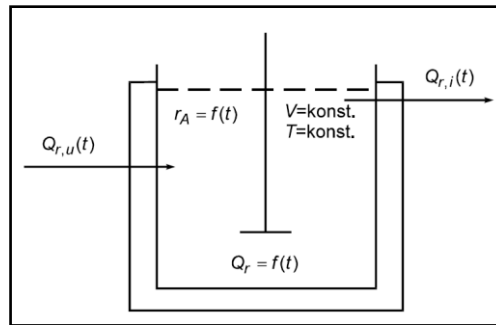
## 2.4. REAKTORI ZA PROVEDBU BIOTRANSFORMACIJA

Bioreaktori su vrsta kemijskih reaktora u kojima se odvijaju bioprocеси. Koriste se za proizvodnju biomase ili bioproducta pomoću mikroorganizama ili životinjskih stanica te za biotransformacije pomoću enzima. S obzirom na to mora li proces biti kataliziran biokatalizatorima ili se neke tvari proizvode samo pomoću mikroorganizama, bioreaktore dijelimo na fermentore i enzimске reaktore. Fermentori su bioreaktori u kojima se reakcije odvijaju uz pomoć živih mikroorganizama ili njihovih dijelova (stanica). Enzimski reaktori su bioreaktori u kojima se odvijaju procesi katalizirani biokatalizatorima. Postoji više različitih izvedbi bioreaktora, a tri osnovna tipa su: kotlasti (šaržni) reaktor, protočno kotlasti i cijevni reaktor.

Osnovni kriteriji na temelju kojih se odabire tip bioreaktora su tip reakcijskog medija, tip kinetike i oblik biokatalizatora. Cilj je postići što veću produktivnost, odnosno dobiti što više produkta po jedinici reaktorskog volumena, jedinici enzimске aktivnosti biokatalizatora i jedinici vremena.<sup>[15]</sup>

### 2.4.1. Kotlasti reaktor

U ovom radu korišten je kotlasti (šaržni, *batch*) reaktor s miješanjem (Slika 2.5). To je zatvoreni sustav u kojem za vrijeme reakcije ne dolazi do izmjene tvari s okolinom. Reakcijska smjesa je homogena, tj. njen sastav je, uz pretpostavku idealnog miješanja, u svakoj točki isti. 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.<sup>[6]</sup>



Slika 2.5 Shematski prikaz kotlastog reaktora

Bilanca tvari za kotlasti reaktor može se opisati jednadžbom (2.12):

$$r_A V = -\frac{dn_A}{dt} \quad (2.12)$$

pri čemu je  $r_A$  brzina potrošnje komponente A [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ],  $V$  je volumen reakcijske smjese u bioreaktoru [ $\text{dm}^3$ ],  $n_A$  je množina komponente A [ $\text{mmol}$ ] i  $t$  je vrijeme [ $\text{min}$ ]. Količina tvari A nestala kemijskom reakcijom u reaktorskom volumenu jednaka je akumulaciji tvari A u reaktorskom volumenu. Uz pretpostavku da je volumen reakcijske smjese stalan i neovisan o vremenu, tj. nema promjene gustoće, ova jednadžba zapisuje se kao izraz (2.13) gdje je  $c_A$  koncentracija komponente A [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ].

$$r_A = -\frac{dc_A}{dt} \quad (2.13)$$

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Svi eksperimenti provedeni su u kotlastim reaktorima uz konstantno miješanje korištenjem magnetske miješalice odnosno termostatirane tresilice, kako bi se održala homogenost reakcijske smjese. Mjerenje kinetike reakcije hidrolize uree uz enzim ureazu, te utjecaj kalcijevih iona na nju određen je spektrofotometrijskim praćenjem koncentracija amonijevih iona. Koncentracije kalcijevih iona određene su pomoću atomskog apsorpcijskog spektrometra (AAS; *engl. Atomic absorption spectroscopy*), a koncentracije uree pomoću HPLC uređaja (HPLC; *engl. High performance liquid chromatography*). Dobiveni uzorci nanočestica nakon centrifugiranja sušeni su u liofilizatoru tijekom 48 sati, a potom su analizirani pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM; *engl. Scanning electron microscope*).

#### 3.1. APARATURA

##### 3.1.1. Kotlasti reaktor

U ovom radu kotlasti reaktor korišten je za sintezu nanočestica kalcijevog karbonata te za mjerenje kinetike enzima ureaze. Eksperimenti su provedeni u staklenim kotlastim reaktorima volumena 10 mL. Dobivanje nanočestica provedeno je u termostatiranoj tresilici (Slika 3.2). Pri mjerenju kinetike 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  $T = 20^{\circ}\text{C}$ , a miješanje je vršeno pomoću magnetske miješalice (Slika 3.1).



Slika 3.1 Kotlasti reaktor u termostatiranoj kupelji na magnetskoj mješalici



Slika 3.2 Termostatirana tresilica

### 3.1.2. Spektrofotometar

Spektrofotometar je mjerni uređaj kojim se mjeri količina svjetla koju apsorbira uzorak. Apsorpcija svjetlosti kroz otopine matematički se opisuje Beer - Lambertovim zakonom (3.1.) pri čemu  $ABS$  predstavlja apsorbanciju na određenoj valnoj duljini svjetlosti,  $\varepsilon$  molarni apsorpcijski (ekstincijski) koeficijent [ $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ], svojstven svakoj molekulskoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti,  $b$  duljinu puta svjetlosti kroz uzorak [ $\text{cm}$ ], 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 određivanje koncentracije amonijevih iona Willisovom metodom <sup>[17]</sup>. Korišten je uređaj Shimadzu UV-1800 (Slika 3.3).



Slika 3.3 Spektrofotometar Shimadzu UV-1800

### 3.1.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je oblik kromatografije na stupcu često korišten u analitičkoj kemiji za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu. Princip rada temelji se na injektiranju male količine uzorka u mobilnu fazu, koja potom putuje pod visokim tlakom kroz kolonu punjenu stacionarnom fazom. Interakcije uzorka i mobilne faze sa stacionarnom fazom određuju brzinu eluiranja i separaciju komponenata uzorka, pa se komponente eluiraju s kolone različitom brzinom, tj. imaju različita vremena zadržavanja. Vrijeme zadržavanja, odnosno vrijeme u kojem tvar dolazi do kraja stupca, ovisi o vrsti tvari koja se analizira, stacionarnoj i mobilnoj fazi. Korištenjem visokog tlaka, povećava se linearna brzina te se komponentama daje manje vremena za zadržavanje čime se poboljšava

rezolucija kromatograma. Uzorak nakon kolone ulazi u UV-detektor koji mjeri apsorpciju svjetla kod određene valne duljine, ili pak RI-detektor, koji mjeri razliku indeksa loma otopine s analitom i reference, što rezultira karakterističnim signalom u kromatogramu. Učinkovitost separacije spojeva ovisi o primjeni odgovarajuće stacionarne i mobilne faze, te o brzini eluiranja.<sup>[19]</sup>

U ovom radu pomoću HPLC uređaja određivana koncentracije uree. Korištena je Shimadzu modularni sustav (Slika 3.4), s *cosmosil* kolonom duljine  $l = 25$  cm pri temperaturi  $T = 30^{\circ}\text{C}$  kao stacionarnom fazom, te acetonitrilom i vodom kao eluentima, tj. mobilnom fazom.



Slika 3.4 HPLC Shimadzu modularni sustav

#### **3.1.4. Atomski apsorpcijski spektrometar**

Atomski apsorpcijski spektrometar je uređaj za kvantitativnu analizu, tj. određivanje pojedinih metala u otopini. Njegov rad se zasniva na apsorpciji vidljivog ili ultraljubičastog zračenja, valnih duljina  $\lambda = 190 - 860$  nm, koje prolazi kroz sloj slobodnih atoma u nepobuđenom, osnovnom 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.

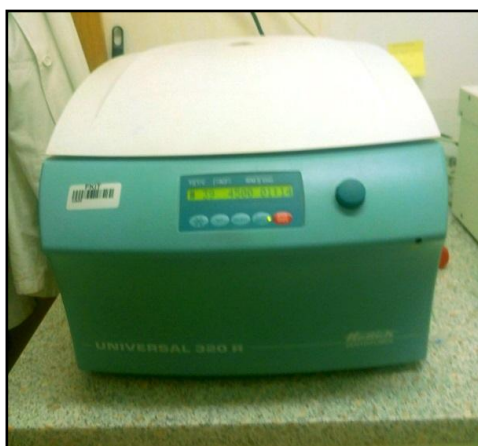
U ovom radu atomski apsorpcijski spektrometar korišten je za određivanje koncentracije kalcijevih iona. Korišten je uređaj Shimadzu AA – 6300 (Slika 3.5).



Slika 3.5 Atomski apsorpcijski spektrometar Shimadzu AA-6300

### **3.1.5. Centrifuga**

Centrifuga je korištena za pripremu uzoraka za sušenje, odnosno njihovu 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 puta). Korišten je uređaj Hettich Universal 320R (Slika 3.6).



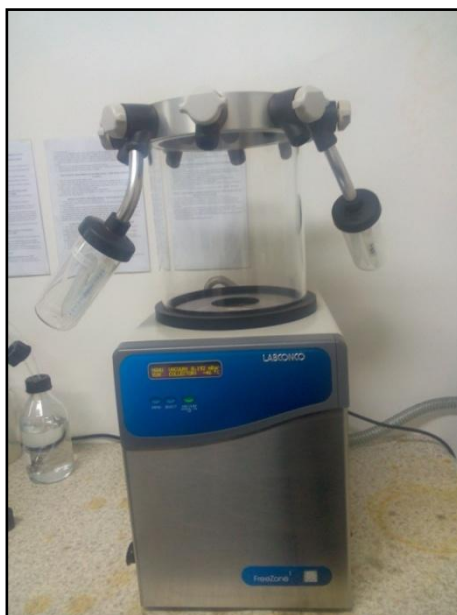
Slika 3.6 Centrifuga Hettich Universal 320R



### **3.1.6. Liofilizator**

Liofilizator je uređaj koji se koristi za sušenje, prilikom čega 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.

Liofilizator LABCONCO Free Zone (Slika 3.7) korišten je za sušenje sintetiziranih nanočestica, odnosno njihovu pripremu za analizu na pretražnom elektronskom mikroskopu.



Slika 3.7 Liofilizator LABCONCO Free Zone

### **3.1.7. Pretražni elektronski mikroskop (SEM)**

Pretražni elektronski mikroskop omogućava istraživanje mikrostrukture 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. Korišten je uređaj Tescan Vega III Easyprobe (Slika 3.8).



Slika 3.8 SEM Tescan Vega III Easyprobe

## 3.2. ANALITIČKE METODE

### 3.2.1. Određivanje koncentracije amonijevih iona

Koncentracija amonijevih iona određivana je spektrofotometrijski, Willisovom metodom, koja je jednostavna, vrlo pouzdana i ekološki prihvatljiva. Točnost ove metode potvrđena je na dva načina; analizirajući uzorke određenog supstrata prema trima standardima američkog Nacionalnog ureda za standarde (NBS; *engl. National Bureau of Standards*) te uspoređujući rezultate s NBS dopuštenom vrijednoću i analizirajući uzorke određenog supstrata te usporedbom dobivenih rezultata s onima dobivenim pomoću dvije druge kolorimetrijske metode. <sup>[17]</sup>

Willisova metoda koristi reagens koji je otopina natrijeva salicilata, fosfata i nitroprusida (u daljnjem tekstu: reagens), otopinu hipoklorita te otopinu amonijeva klorida koja služi kao standard. Otopina reagensa pripravljena je otapanjem 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 pripravljena je razrjeđivanjem 13,9 mL izbjeljivača *Domestos* koji sadrži ~ 4,8% natrijeva hipoklorita, u 250 mL vode. Otopina amonijevog klorida ( $NH_4Cl$ ) temeljne koncentracije  $c(NH_4Cl, t.o.) = 10 \text{ mM}$  pripravljena je otapanjem 5,3 mg  $NH_4Cl$  u 10 mL redestilirane vode. Za izradu baždarnog dijagrama, pripravljene su otopine  $NH_4Cl$  u rasponu koncentracija od 0 – 2,0 mM.

Uzorci za mjerenje apsorbanije na spektrofotometru, odnosno za određivanje koncentracije amonijevih iona pripremljeni su miješanjem 50  $\mu\text{L}$  otopine  $\text{NH}_4\text{Cl}$  određene koncentracije s po 1.000  $\mu\text{L}$  pripremljenog reagensa i 250  $\mu\text{L}$  otopine hipoklorita nakon čega je sve dobro homogenizirano. U trenutku dodavanja otopine hipoklorita započeto je mjerenje vremena te su uzorci inkubirani 15 minuta. Nakon 15 minuta izmjerena je apsorbanija uzoraka na spektrofotometru pri valnoj duljini  $\lambda = 685 \text{ nm}$ .

Rezultati su prikazani kao baždarni dijagram (Prilog 1) koji daje ovisnost apsorbanije o koncentraciji amonijevog klorida.

### **3.2.2. Određivanje koncentracije kalcijevih iona**

Koncentracija kalcijevih iona određena je na atomskom apsorpcijskom spektrometru, korištenjem kalcijeve lampe kao izvora radijacije pri valnoj duljini  $\lambda = 422,67 \text{ nm}$ . Temeljna otopina kalcijevog klorida koncentracije  $c(\text{CaCl}_2, \text{t.o.}) = 25 \text{ mM}$  pripremljena je otapanjem 366,9 mg  $\text{CaCl}_2$  u 100 ml redestilirane vode, te su potom pripremljene otopine  $\text{CaCl}_2$  u rasponu koncentracija od 0,02 – 0,25 mM.

U tako pripremljenim otopinama pomoću AAS je određena koncentracija kalcijevih iona, a dobiveni rezultati su prikazani na baždarnom dijagramu koji prikazuje ovisnost apsorbanije o koncentraciji kalcijevih iona (Prilog 2).

Za određivanju koncentracije kalcijevih iona u uzorcima prikupljenim tijekom provođenja sinteze nanočestica kalcijevog karbonata, uzorci su razrijeđeni 1000 puta te im je potom izmjerena apsorbanija pomoću AAS.

### **3.2.3. Određivanje koncentracije uree**

Koncentracija uree određivana je na HPLC uređaju. Korištena je *cosmosil* kolona duljine  $l = 25 \text{ cm}$  pri temperaturi  $T = 30^\circ\text{C}$  kao stacionarna faza. Kao eluenti, tj. mobilne faze korišteni su acetonitril protoka  $q$  (eluent A) =  $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  i voda protoka  $q$  (eluent B) =  $0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ . Mjerenja su provedena na valnoj duljini  $\lambda = 210 \text{ nm}$ .

Kao rezultat dobiven je baždarni dijagram prikazan kao ovisnost koncentracije uree o površini pika na kromatogramu (A) (Prilog 3).

### 3.2.4. Određivanje kinetike enzima ureaze

Kinetika enzima ureaze ispitana je u redestiliranoj vodi, te u 10%-tnoj otopini Tritona x-100 pri temperaturama  $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Mjerenja su provedena u kotlastom reaktoru volumena 5 mL, pri konstantnoj koncentraciji enzima ureaze od  $0,1\text{ mg mL}^{-1}$ . Mjerila se početna brzina reakcije pri različitim početnim koncentracijama uree u rasponu koncentracija od 0 - 100 mM. Za svaku koncentraciju je uzimano 6 uzoraka tijekom 5 – 6 minuta trajanja reakcije. Reakcija je zaustavljena dodatkom 1 mM otopine bakrovog klorida. U uzorcima je određena koncentracija amonijevih iona prema Willisovoj metodi. Također je ispitan i utjecaj kalcijevih iona na aktivnost enzima ureaze. U tu svrhu koncentracija uree bila je konstantna (100 mM), kao i koncentracija enzima ureaze ( $0,1\text{ mg mL}^{-1}$ ), te se mjerila početna brzina reakcije pri različitim početnim koncentracijama kalcijevog klorida, u rasponu od 0 - 500 mM.

Dobiveni rezultati prikazani su kao promjena apsorbancije u vremenu. Kao primjer dan je prikaz za otopinu uree u redestiliranoj vodi, početne koncentracije  $c(\text{urea}) = 2\text{ mM}$ , pri temperaturi  $T = 30^{\circ}\text{C}$  u Prilogu 4, te za otopinu kalcijevog klorida u 10%-tnoj otopini Tritona x-100, početne koncentracije  $c(\text{CaCl}_2) = 200\text{ mM}$  pri temperaturi  $T = 20^{\circ}\text{C}$  u Prilogu 5.

Korištenjem izraza za promjenu apsorbancije u ovisnosti o vremenu reakcije (3.2) izračunata je specifična aktivnost enzima,  $A_s [\text{U mg}^{-1}]$  pomoću koje su procijenjeni parametri reakcijske kinetike.

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

### 3.2.5. Sinteza nanočestica kalcijevog karbonata

U kotlastim reaktorima volumena 10 mL, pri temperaturama  $T = 30^{\circ}\text{C}$  i  $T = 20^{\circ}\text{C}$  provedeno je po šest eksperimenata na svakoj temperaturi (Tablica 3.1).

Tablica 3.1 Popis provedenih eksperimenata sinteze nanočestica

TEMPERATURA [ $^{\circ}\text{C}$ ]	MEDIJ	KONCENTRACIJA UREAZE [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]
30	Redestilirana voda	0,2
		0,1
		0,05
	10%-tna otopina Tritona x-100	0,2
		0,1
		0,05
20	Redestilirana voda	0,2
		0,1
		0,05
	10%-tna otopina Tritona x-100	0,2
		0,1
		0,05

Sve reakcije provedene su uz istu početnu koncentraciju uree i kalcijevog klorida u reaktorima, koja je za obje komponente iznosila 200 mM.

Dodatkom enzima ureaze u reaktor aproksimiran je početak svake reakcije. Uzorci su uzimani tijekom 24 sata trajanja reakcija. 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, koncentracija kalcijevih iona na AAS-u, te koncentracija uree na HPLC-u.

Nakon završene reakcije, reakcijska smjesa je centrifugirana na 4500 okr/min u trajanju 5 minuta nakon čega su dobivene nanočestice isprane s redestiliranom vodom i

ponovno centrifugirane na isti način, te je taj postupak ponovljen je dva puta. Nakon pranja čestice su sušene u liofilizatoru i potom analizirane su na SEM-u.

### **3.2.6. Obrada rezultata**

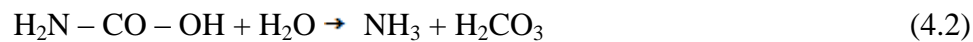
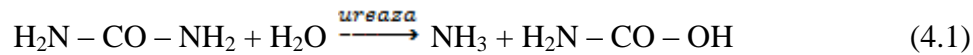
Eksperimentalni podaci obrađeni su u programskom paketu *Scientist*. Simulacija je provedena na temelju napisanog modela i eksperimentalnih podataka. Nelinearnom regresijom pomoću metode najmanjih kvadrata i simpleks metode procijenjeni su kinetički parametri. Metode procjene parametara imaju za cilj pronaći minimalni zbroj kvadrata greške između seta eksperimentalnih podataka i seta podataka izračunatih pomoću modela.

Simpleks metoda se koristi kada je velika razlika između početne vrijednosti parametra i njegove prave vrijednosti. Dobra je za određivanje približne vrijednosti parametara. Na temelju napisanog modela i procijenjenih parametara provodi se simulacija rješavanjem diferencijalnih jednadžbi određenog modela. Numeričke metode za rješavanje seta diferencijalnih jednadžbi koje koristi *Scientist* su: Euler-ova metoda, metoda Runge Kutta IV, Bulirsch – Stoer metoda i Episode algoritam.

Parametri kao što su maksimalna brzina reakcije, Michaelis – Menteničina konstanta, konstanta otapanja i konstanta inhibicije procijenjeni su iz kinetičkih mjerenja, tj. ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji. Ovi parametri su korišteni za simulacije pomoću modela, odnosno za predviđanje promjena koncentracija produkata i reaktanata s vremenom u različitim reaktorskim sustavima.

## 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):



Uz reakcije hidrolize uree provodile su se i reakcije sinteze 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 za reakciju hidrolize uree uz dodatak kalcijevog opisan je Michaelis – Menteničinom kinetikom s nekompetitivnom inhibicijom kalcijevim ionima (4.6):

$$r_1 = \frac{V_m \cdot c_{urea}}{\left(1 + \frac{c_{Ca^{2+}}}{K_i}\right) \cdot (K_m + c_{urea})} \quad (4.6)$$

Kinetika nastajanja kalcijevog karbonata je opisana kinetikom drugog reda obzirom da se radi o dvosupstratnoj reakciji (4.7):

$$r_2 = k \cdot c_{Ca^{2+}} \cdot c_{CO_3^{2-}} \quad (4.7)$$

## 4.2. REAKTORSKI MODEL

Za reakciju hidrolize uree u prisustvu kalcijevih iona prilikom čega nastaju nanočestice kalcijevog karbonata reaktorski model se sastoji od bilancnih jednadžbi za ureu (4.8), amonijak (4.9), karbonatne ione (4.10) te kalcij (4.11). Pretpostavljeno je da je brzina nastajanja karbonatnih iona jednaka brzini nastajanja karbonatne kiseline.

$$\frac{dc_{urea}}{dt} = -r_1 \quad (4.8)$$

$$\frac{dc_{NH_4^+}}{dt} = 2 \cdot r_1 \quad (4.9)$$

$$\frac{dc_{CO_3^{2-}}}{dt} = r_1 - r_2 \quad (4.10)$$

$$\frac{dc_{Ca^{2+}}}{dt} = -r_2 \quad (4.11)$$

Deaktivacija enzima ureaze koja je uočena u nekim od provedenih eksperimenata opisana je kinetikom 1. reda i dana je izrazom (4.12):

$$\frac{dV_m}{dt} = -k_d \cdot V_m \quad (4.12)$$



## **5. REZULTATI I RASPRAVA**

U ovom radu provedena je sinteza nanočestica kalcijevog karbonata korištenjem produkta hidrolize uree uz dodatak kalcijevih iona. Hidroliza uree je bila katalizirana uz enzim ureazu. Svrha istraživanja je bila ispitati utjecaj koncentracije enzima ureaze i temperature na veličinu dobivenih kristala kalcijevog karbonata.<sup>[11]</sup> Ispitivan je i utjecaj površinski aktivne tvari, 10%-tne otopine Tritona x-100, koji se upotrebljava kao sredstvo za sprečavanje aglomeracije nanočestica<sup>[5]</sup> na konačnu veličinu nanočestica. Cilj rada je također bilo opisati matematičkim modelom reakciju sinteze kalcijevog karbonata te je u tu svrhu ispitana kinetika enzima ureaze pri različitim temperaturama, te u različitim medijima (voda, 10%-tna otopina Tritona x-100).

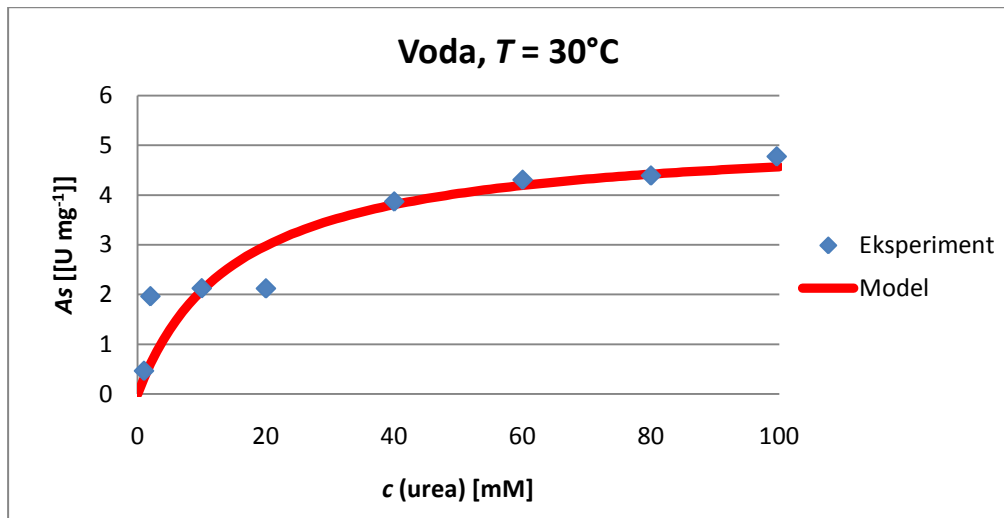
### **5.1. KINETIKA ENZIMA UREAZE**

#### **5.1.1. Kinetika enzima ureaze u vodi i 10%-tnoj otopini Tritona x-100**

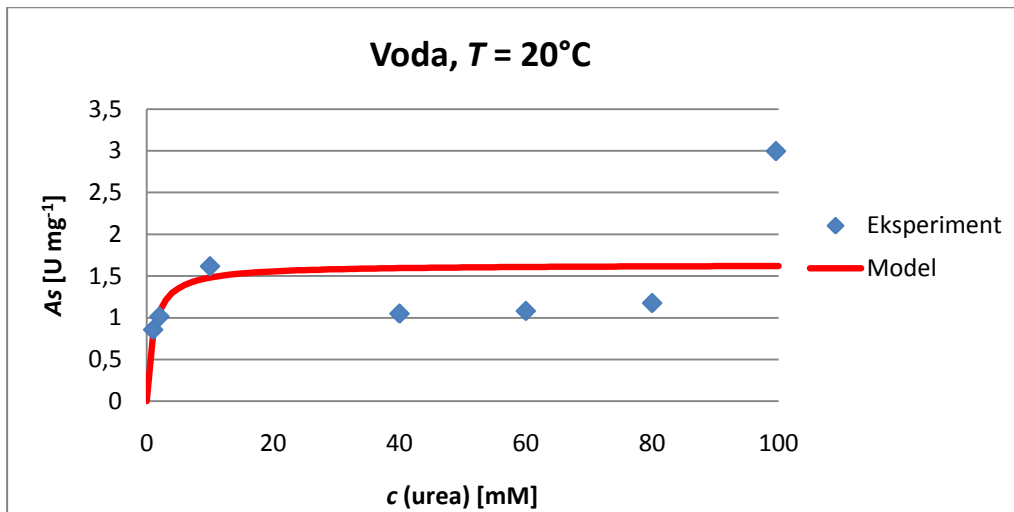
Kinetika enzima ureaze ispitana je u redestiliranoj vodi i 10%-tnoj otopini Tritona x-100 pri temperaturama  $T = 30^{\circ}\text{C}$  i  $T = 20^{\circ}\text{C}$ .

Kinetika je mjerena na način da se određuju početne brzine raspada uree uz dodatak enzima ureaze, pri različitim početnim koncentracijama uree, te je praćen porast koncentracije amonijevih iona. Dobiveni rezultati prikazani su kao ovisnost promjene apsorbancije o vremenu trajanja reakcije. Pomoću izraza (3.2) određena je specifična aktivnost enzima,  $A_s$  [ $\text{U mg}^{-1}$ ] za otopine uree u rasponu koncentracija 0 – 100 mM u oba medija i pri obje temperature. Reakcijska kinetika na kraju je prikazana kao ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentracijama uree u pojedinom mediju i na određenoj temperaturi, a rezultati su dani Slikom 5.1 a – d.

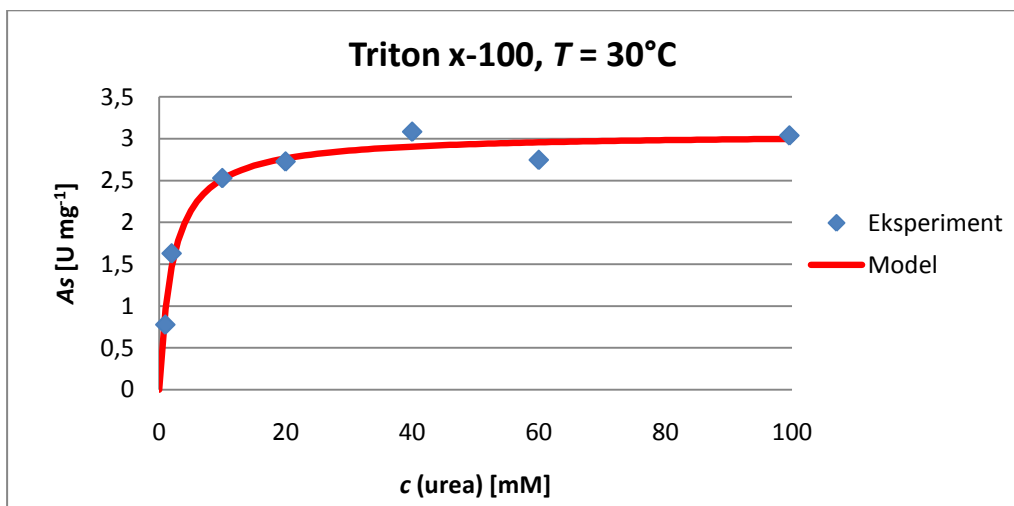
a)



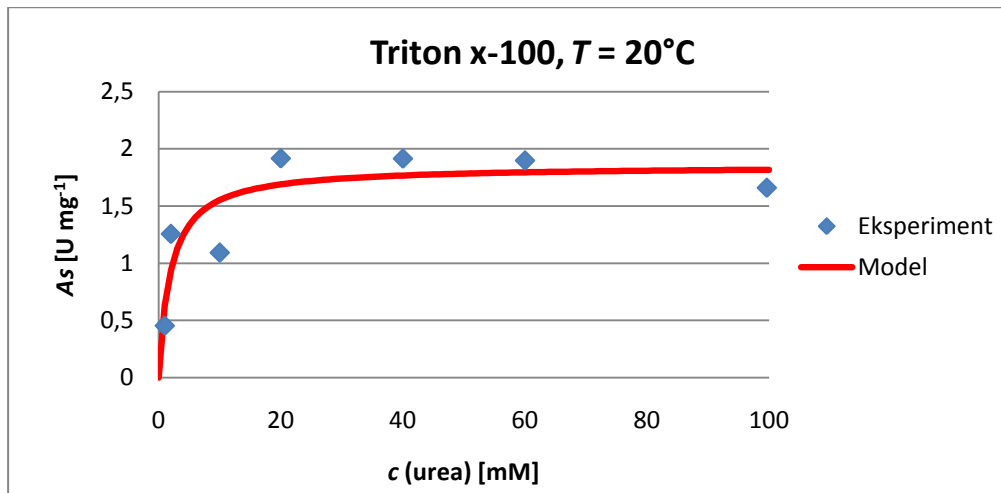
b)



c)



d)



Slika 5.1 Ovisnost specifične aktivnosti enzima ureaze o koncentracijama uree u: redestiliranoj vodi pri a)  $T = 30^{\circ}\text{C}$  i b)  $T = 20^{\circ}\text{C}$ ; 10%-tnoj otopini Tritona x-100 pri c)  $T = 30^{\circ}\text{C}$  i d)  $T = 20^{\circ}\text{C}$ ; ( $c(\text{urea}) = 1 - 100 \text{ mM}$ ;  $c(\text{ureaza}) = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ )

Eksperimentalno dobiveni podaci za specifičnu aktivnost enzima ureaze u oba medija i pri obje temperature se vrlo dobro slažu s podacima dobivenim simulacijom u programskom paketu *Scientist* korištenjem Michaelis – Menteničine kinetike (jednadžba 4.6), stoga možemo zaključiti da pretpostavljena Michaelis – Menteničina kinetika vrlo dobro opisuje ove reakcije. U *Scientist*-u su nelinearnom regresijom procijenjeni i parametri Michaelis – Menteničine kinetike te su dani u Tablici 5.1.

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

Procijenjeni parametri	$T = 30^{\circ}\text{C}$		$T = 20^{\circ}\text{C}$	
	Voda	10%-tnoj otopini Tritona x-100	Voda	10%-tnoj otopini Tritona x-100
$V_m [\text{U mg}^{-1}]$	5,26441	3,063296	1,636507	1,852734
$K_m^s [\text{mmol dm}^{-3}]$	15,3256	2,167819	1,049383	1,934037

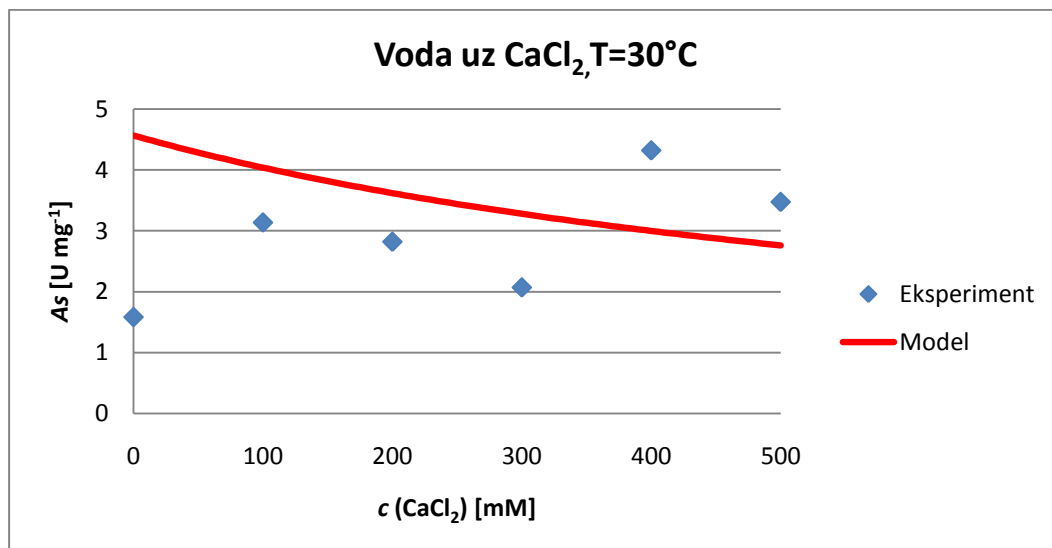
Vrijednosti maksimalne brzine reakcije,  $V_m$ , veće su pri višoj temperaturi, stoga se može zaključiti da porastom temperature raste aktivnost enzima, tj. raste brzina reakcije.

Vrijednost Michaelis – Menteničine konstante,  $K_m^S$ , opisuje afinitet enzima prema supstratu. Što je niža vrijednost  $K_m^S$  enzim će biti specifičniji za određeni supstrat. U provedenim eksperimentima specifičnost enzima ureaze bila je veća prilikom provođenja reakcije hidrolize uree pri nižoj temperaturi i to je posebno izraženo u reakcijama koje su se provodile u redestiliranoj vodi.

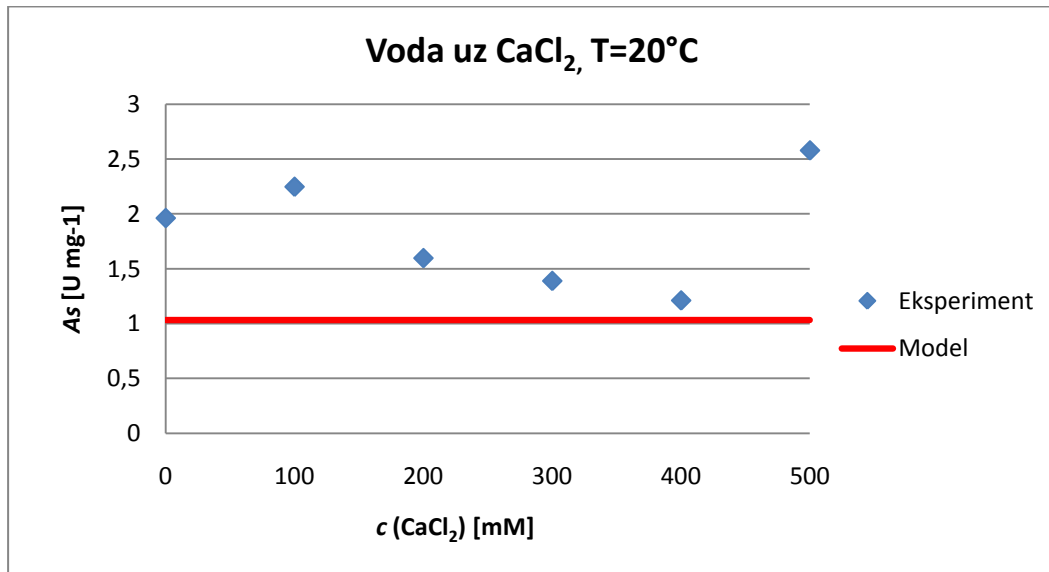
### 5.1.2. Utjecaj kalcijevih iona na kinetiku enzima ureaze

Utjecaj kalcijevih iona na aktivnost enzima ureaze, odnosno na početnu reakcijsku brzinu u reakciji hidrolize uree određen je mjerenjem specifične aktivnosti enzima ureaze u ovisnosti o različitim koncentracijama  $\text{Ca}^{2+}$  iona. Mjerenja su također provedena u redestiliranoj vodi i 10%-tnoj otopini Tritona x-100 pri temperaturama  $T = 30^\circ\text{C}$  i  $T = 20^\circ\text{C}$ , uz stalnu koncentraciju ureaze  $c(\text{ureaza}) = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ , stalnu koncentraciju uree  $c(\text{urea}) = 100 \text{ mM}$ , te koncentraciju kalcijevog klorida u rasponu od 0 – 500 mM. Dobiveni rezultati iskazani su kao ovisnost specifične aktivnosti enzima ureaze o koncentraciji  $\text{CaCl}_2$  te su prikazani Slikom 5.2 a – d.

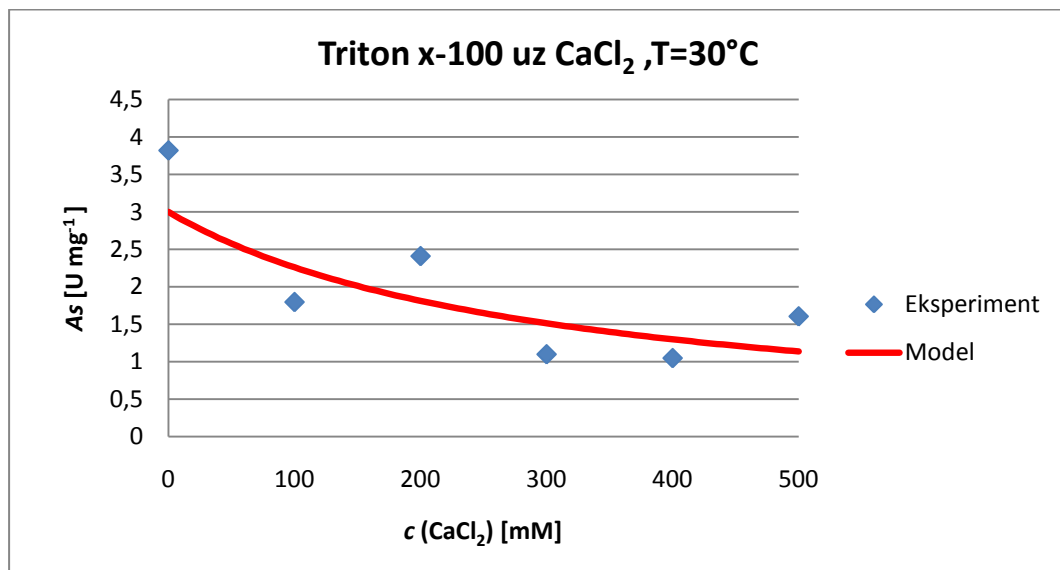
a)



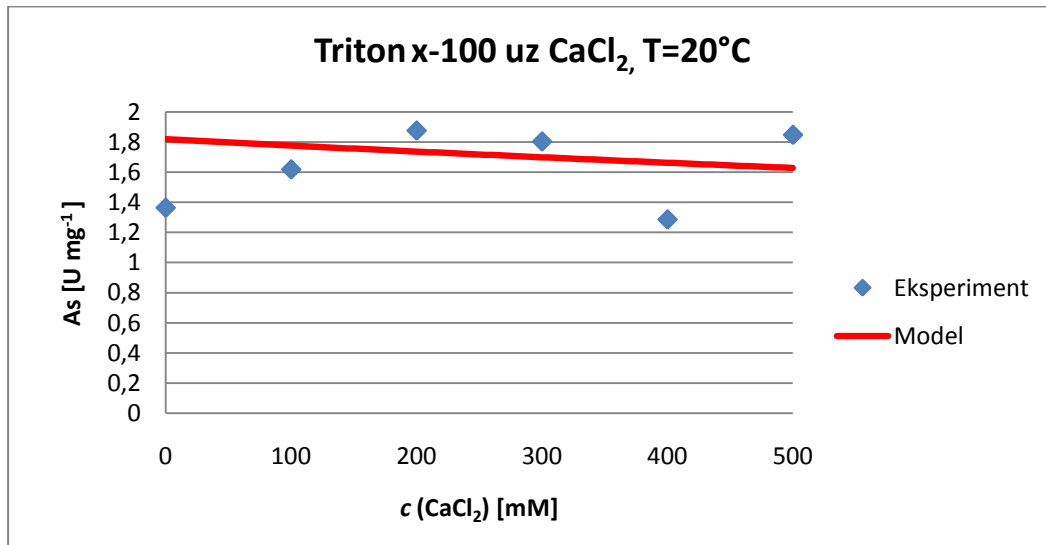
b)



c)



d)



Slika 5.2 Ovisnost specifične aktivnosti enzima ureaze o koncentracijama  $\text{CaCl}_2$  u: redestiliranoj vodi pri a)  $T = 30^\circ\text{C}$  i b)  $T = 20^\circ\text{C}$ ; 10%-tnoj otopini Tritona x-100 pri c)  $T = 30^\circ\text{C}$  i d)  $T = 20^\circ$ , uz  $c(\text{ureaza}) = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $c(\text{urea}) = 100 \text{ mM}$ ;  $c(\text{CaCl}_2) = 0 - 500 \text{ mM}$

Može se vidjeti da su prisutna određena odstupanja eksperimentalnih podataka od onih dobivenih simulacijom u *Scientist*-u. Odstupanja su nešto veća kod eksperimenata provedenih u vodi. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da kalcijevi ioni inhibiraju aktivnost enzima ureaze u slučaju provođenja reakcije na temperaturi  $T = 30^\circ\text{C}$  u oba medija, dok je na temperaturi  $T = 20^\circ\text{C}$  inhibicija prisutna samo u slučaju provođenja reakcije u 10%-tnoj otopini Tritona x-100, a u vodi je nema. Na temelju literaturnih podataka<sup>[9]</sup> zaključeno je da se radi o nekompetitivnoj inhibiciji. Konstante inhibicije su, prema izrazu (4.6), 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  $\text{Ca}^{2+}$  ioni ne inhibiraju značajno reakciju hidrolize uree uz ureazu.

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

Procijenjeni parametar	T = 30 °C		T = 20 °C	
	Voda	10%-tna otopina Tritona x-100	Voda	10%-tna otopina Tritona x-100
$K_i$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	765,2271	305,3214	$3,59 \times 10^{17}$	4274,705

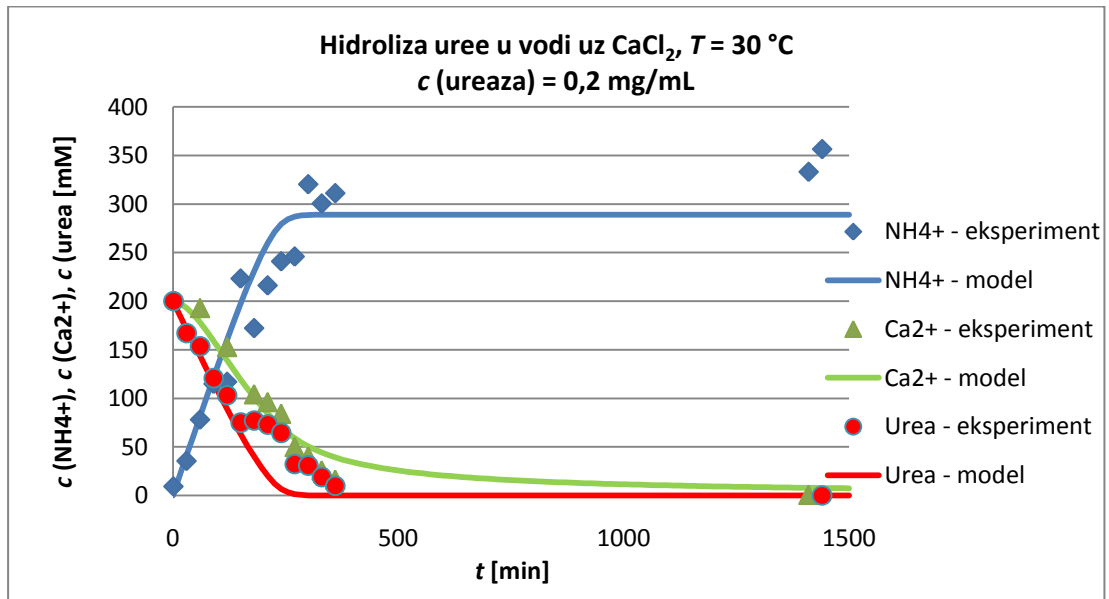
## 5.2. HIDROLIZA UREE U KOTLASTOM REAKTORU I SINTEZA NANOČESTICA KALCIJEVOG KARBONATA

Reakcije hidrolize uree uz dodatak kalcijevog klorida u kotlastom reaktoru provedene su u redestiliranoj vodi i 10%-tnoj otopini Tritona x-100 pri dvjema temperaturama,  $T = 30^\circ\text{C}$  i  $T = 20^\circ\text{C}$ . Eksperimenti su provedeni kako bi se potvrdio matematički model pretpostavljen izrazima 4.6 – 4.11.

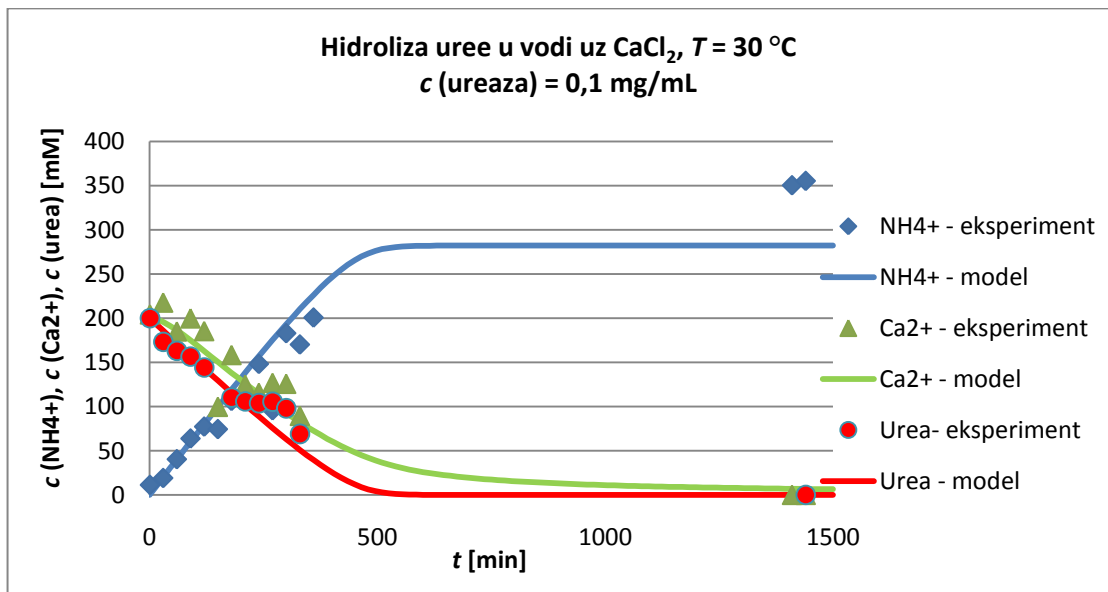
Dobiveni rezultati prikazani su kao ovisnost koncentracije amonijevih iona izmjerenih spektrofotometrijski, koncentracije kalcijevih iona određenih atomskim apsorpcijskim spektrometrom, te koncentracije uree određene pomoću HPLC-a, o vremenu trajanja reakcije (Slike 5.3 a - f i 5.4 a - f). Prikazana je usporedba eksperimentalno dobivenih vrijednosti i podataka dobivenih simulacijom pomoću programskog paketa *Scientist*.

Slike 5.3 a-c prikazuju rezultate dobivene sintezom nanočestica u redestiliranoj vodi, dok Slike 5.3 d-f prikazuju rezultate dobivene u 10%-toj otopini Tritona x-100 pri temperaturi  $T = 30^\circ\text{C}$ , uz različite koncentracije enzima ureaze.

a)

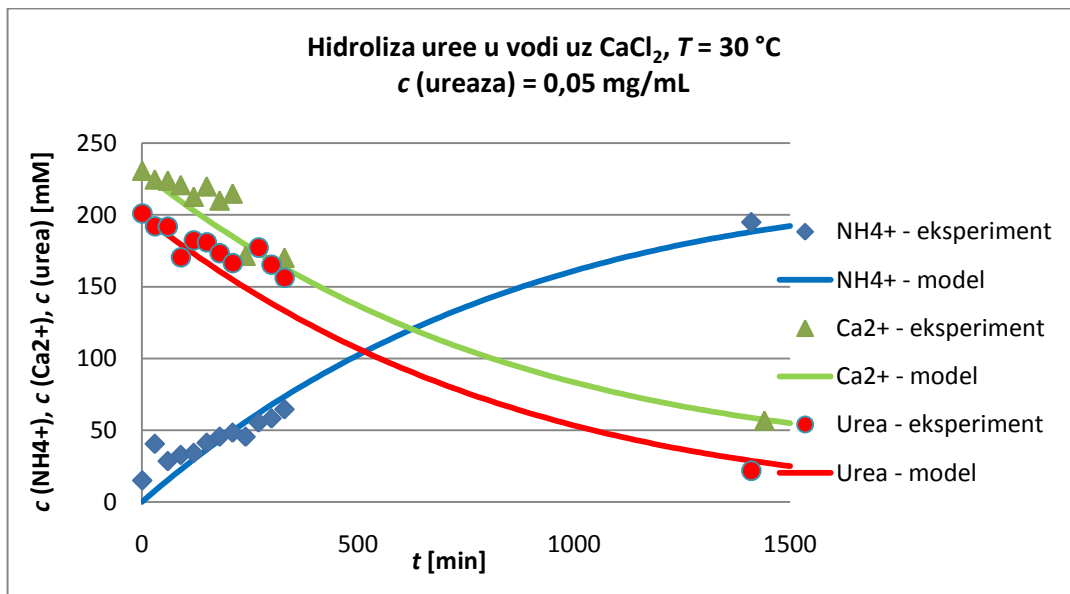


b)

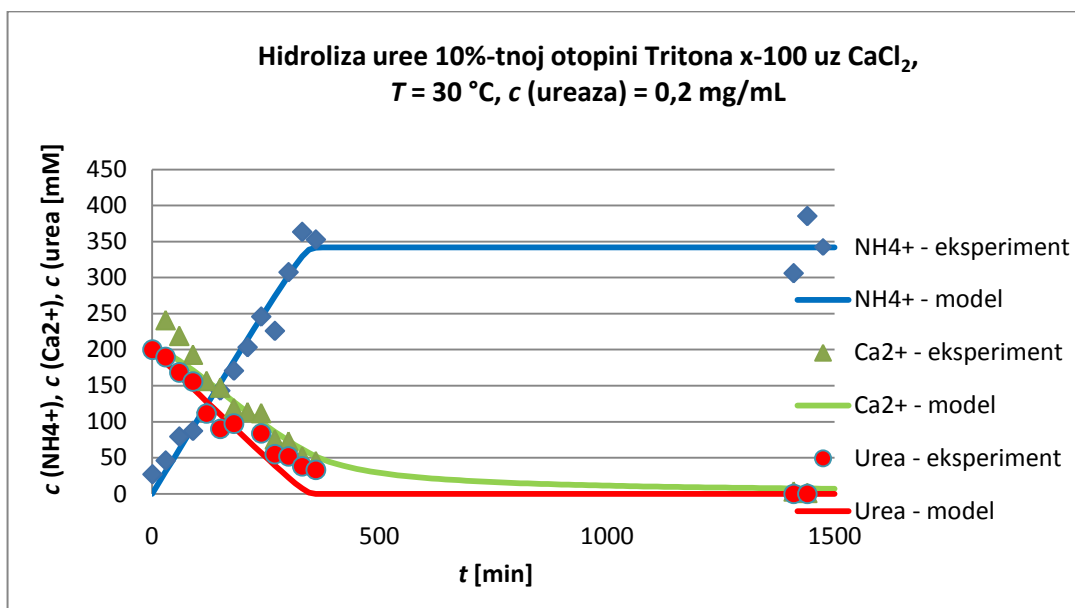




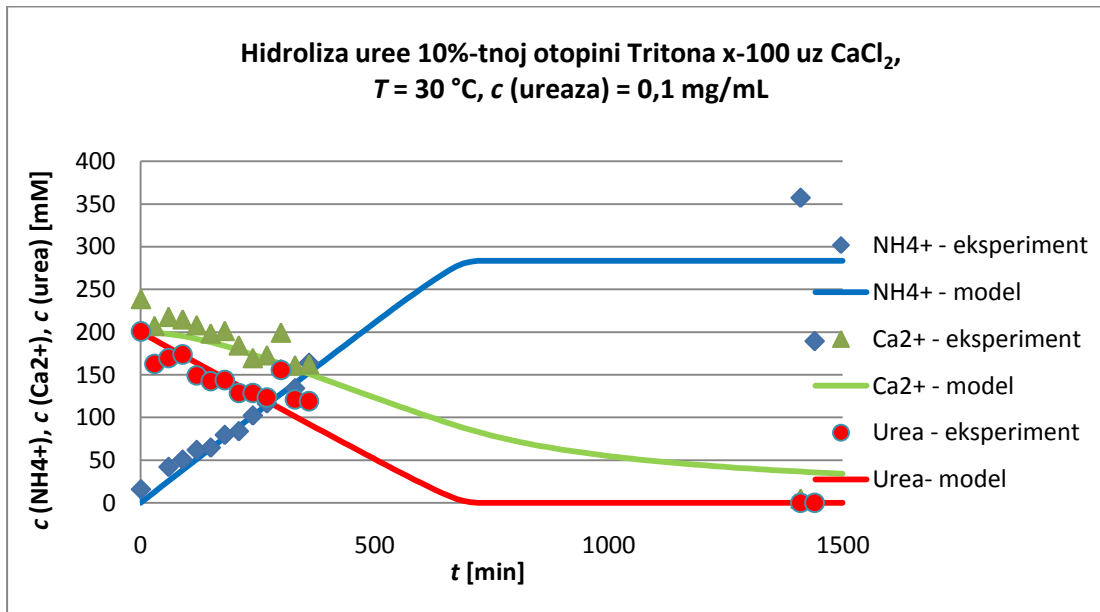
c)



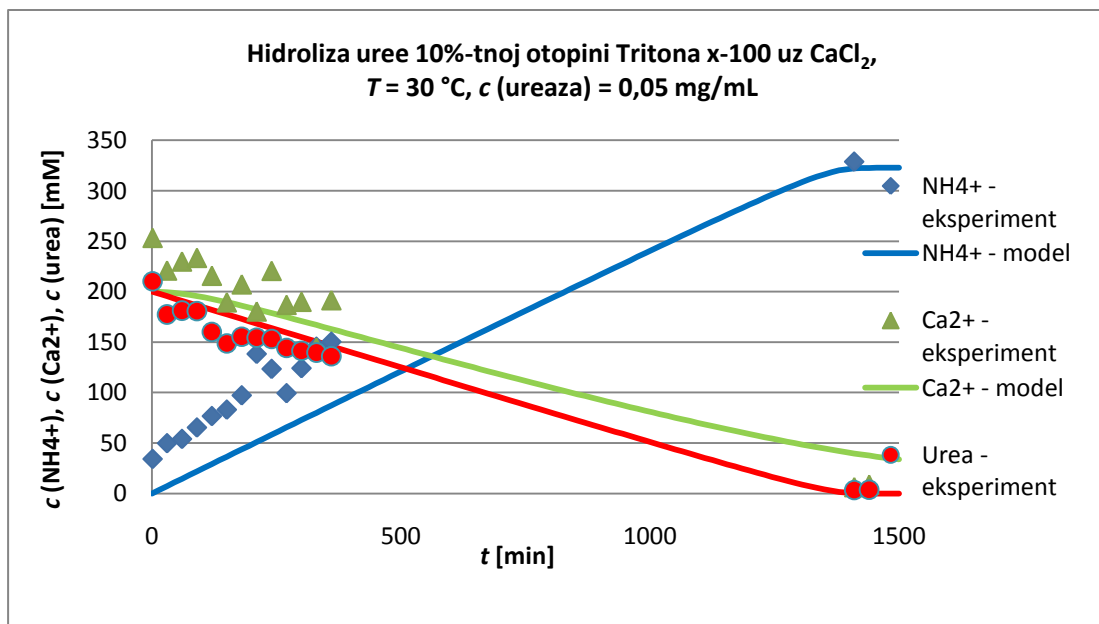
d)



e)



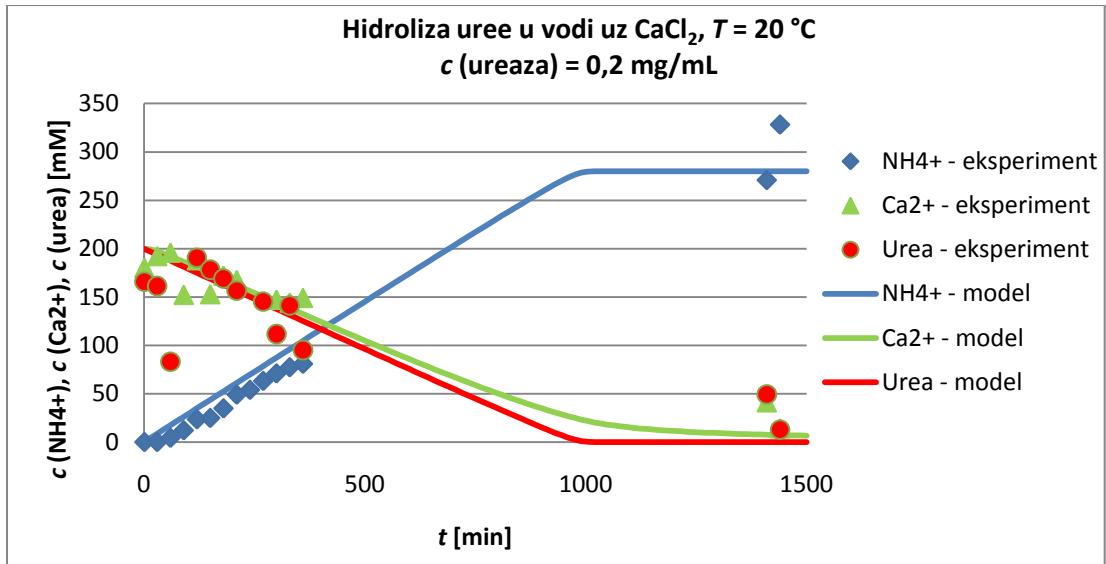
f)



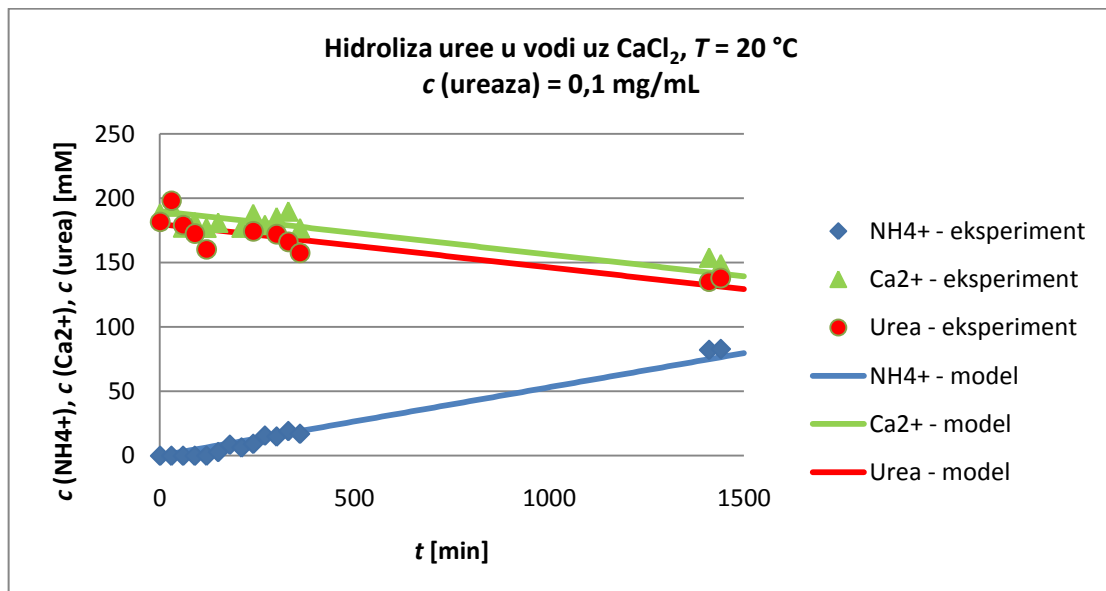
Slika 5.3 Rezultati dobiveni sintezom nanočestica kalcijevog karbonata pri temperaturi  $T = 30^\circ\text{C}$  u redistiranoj vodi pri koncentraciji ureaze a)  $c(\text{ureaza}) = 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ; b)  $c(\text{ureaza}) = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ; c)  $c(\text{ureaza}) = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ; 10%-tnoj otopini Tritona x-100 pri koncentraciji ureaze d)  $c(\text{ureaza}) = 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ; e)  $c(\text{ureaza}) = 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ; f)  $c(\text{ureaza}) = 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $c(\text{urea}) = 200 \text{ mM}$ ,  $c(\text{CaCl}_2) = 200 \text{ mM}$ )

Slike 5.4 a-c prikazuju rezultate dobivene sintezom nanočestica u redestiliranoj vodi, dok Slike 5.4 d-f prikazuju rezultate dobivene u 10%-toj otopini Tritona x-100 pri temperaturi  $T = 20^{\circ}\text{C}$ , uz različite koncentracije enzima ureaze.

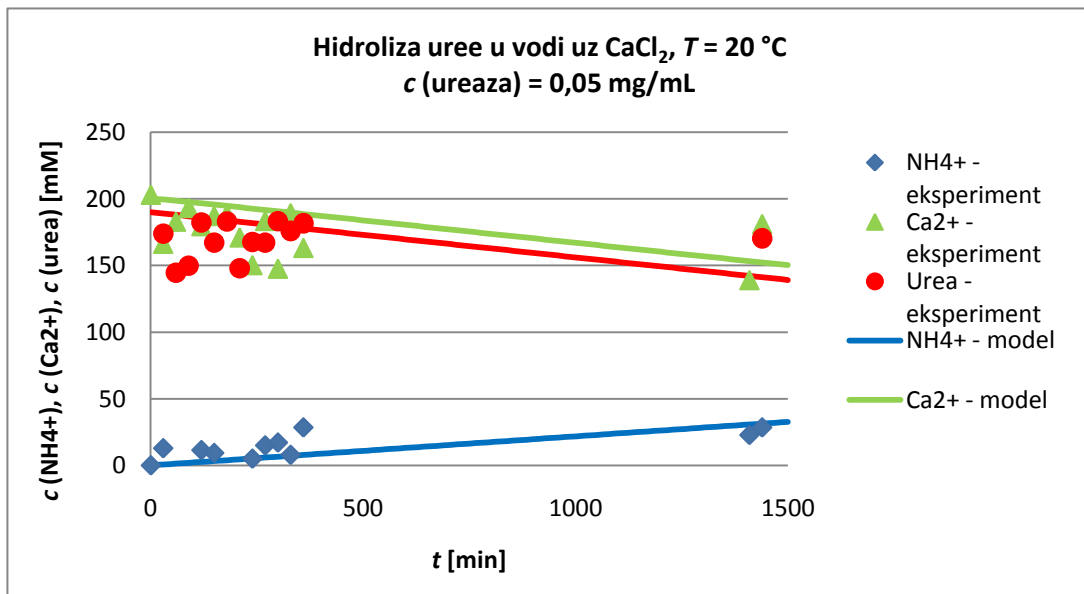
a)



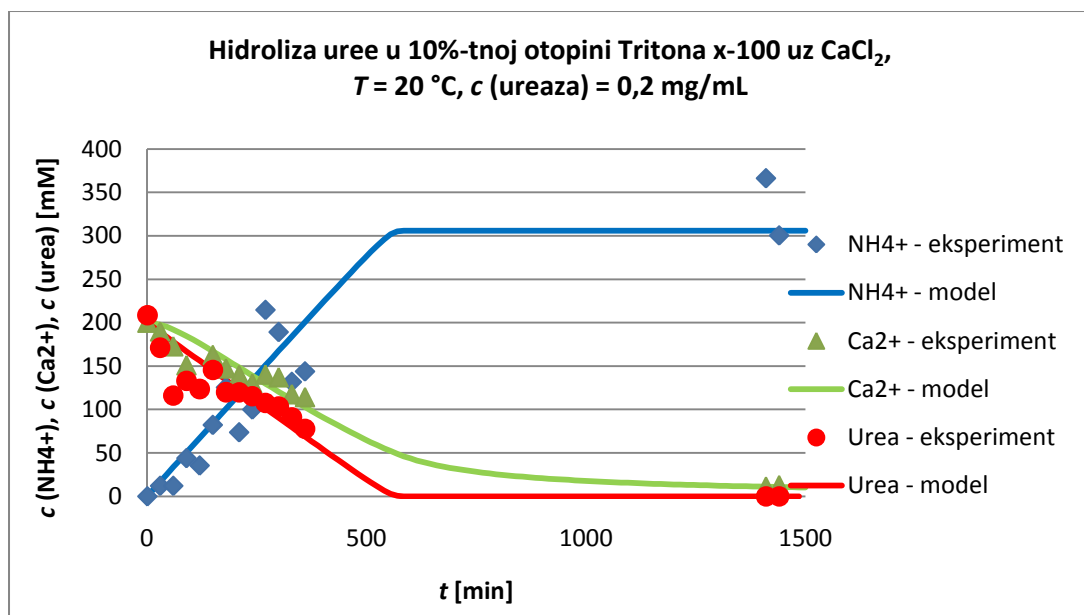
b)



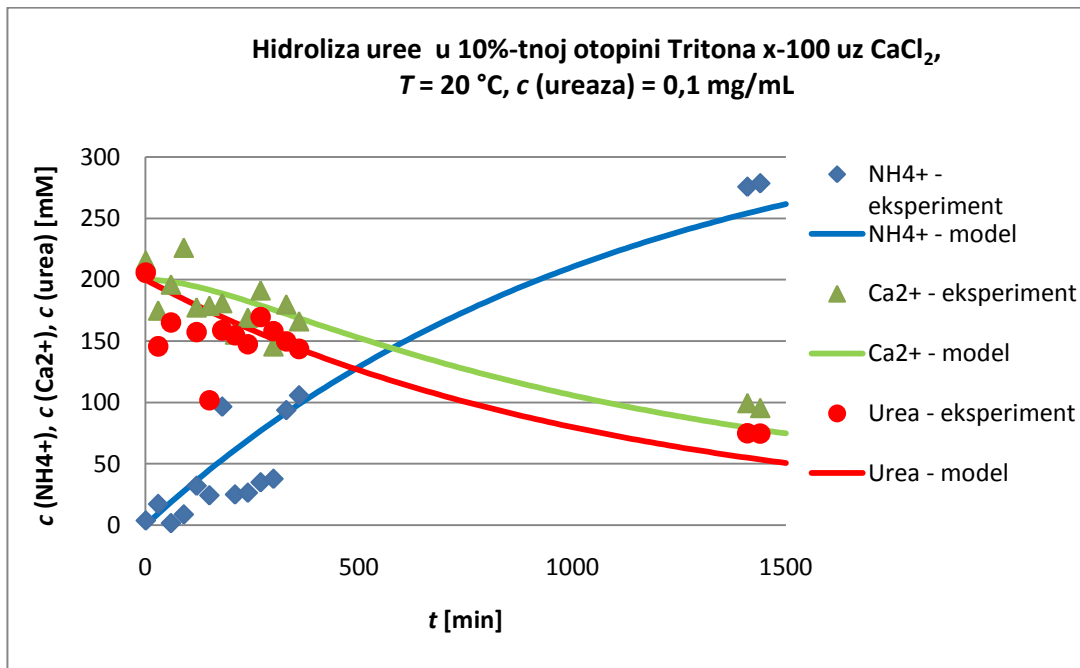
c)



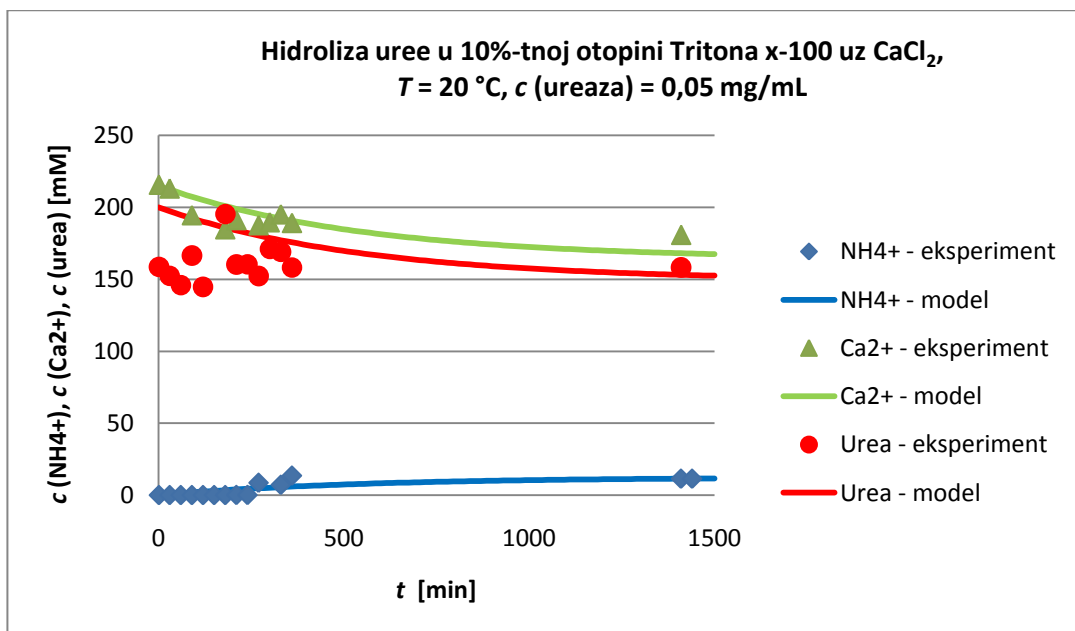
d)



e)



f)



Slika 5.4 Rezultati dobiveni sintezom nanočestica kalcijevog karbonata pri temperaturi  $T = 20^\circ\text{C}$  u redestiliranoj vodi pri koncentraciji ureaze a)  $c(\text{ureaza}) = 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ; b)  $c(\text{ureaza}) = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ; c)  $c(\text{ureaza}) = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ; 10%-tnoj otopini Tritona x-100 pri koncentraciji ureaze d)  $c(\text{ureaza}) = 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ; e)  $c(\text{ureaza}) = 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ; f)  $c(\text{ureaza}) = 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $c(\text{urea}) = 200 \text{ mM}$ ,  $c(\text{CaCl}_2) = 200 \text{ mM}$ )

Prema prikazanim rezultatima možemo zaključiti da se pretpostavljeni matematički model za sintezu nanočestica kalcijevog karbonata iz produkata reakcije hidrolize uree uz enzim ureazu i prisustvo  $\text{CaCl}_2$  vrlo dobro slaže s eksperimentalnim podacima dobivenim prilikom provođenja eksperimenata pri temperaturi  $T = 30^\circ\text{C}$ .

Prisutna su određena odstupanja eksperimentalno dobivenih vrijednosti u odnosu na vrijednosti predviđene modelom. Do navedenog dolazi zbog nedovoljno brzog otapanja amonijaka u otopini, odnosno zbog njegovog djelomičnog isparavanja tijekom reakcije. Isparavanje je nešto manje kod reakcija koje su se provodile u 10%-tnoj otopini Tritona x-100 zbog njegove bolje topljivosti u navedenom mediju nego u vodi. Udio isparenog amonijaka tijekom sinteze nanočestica kalcijevog karbonata prikazan je u Tablici 5.3.

Tablica 5.3 Udio isparenog amonijaka

Procijenjeni parametri	$T = 30^\circ\text{C}$					
	Redestilirana voda			10%-tna otopina Tritona x-100		
<i>Koncentracija enzima</i> [mg mL <sup>-1</sup> ]	0,2	0,1	0,05	0,2	0,1	0,05
<i>Udio isparenog amonijaka</i> [%]	27,72	29,48	53,45	14,54	29,10	19,31
Procijenjeni parametri	$T = 20^\circ\text{C}$					
	Redestilirana voda			10%-tna otopina Tritona x-100		
<i>Koncentracija enzima</i> [mg mL <sup>-1</sup> ]	0,2	0,1	0,05	0,2	0,1	0,05
<i>Udio isparenog amonijaka</i> [%]	30	21,20	30	23,51	12,4	85,73

Također je uočeno da pri provođenju reakcija pri temperaturi  $T = 30^{\circ}\text{C}$  u redestiliranoj vodi pri koncentraciji enzima  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ , te pri temperaturi  $T = 20^{\circ}\text{C}$  u 10%-tnoj otopini Tritona x-100 pri koncentracijama enzima  $0,1$  i  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$  dolazi do deaktivacije enzima. Konstante deaktivacije dane su u Tablici 5.4.

Tablica 5.4 Konstante deaktivacije enzima

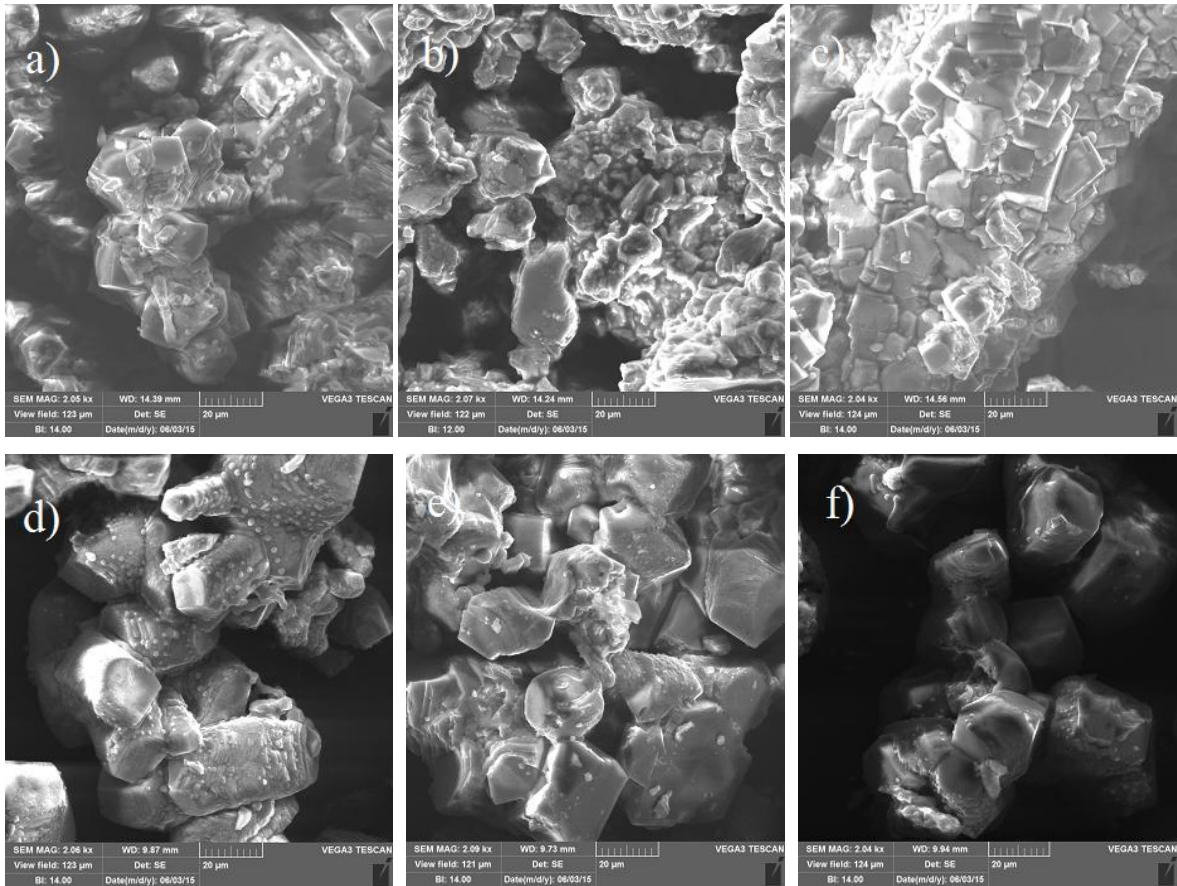
Procijenjeni parametar	$T = 30^{\circ}\text{C}$	$T = 20^{\circ}\text{C}$	
	Redestilirana voda	10%-tna otopina Tritona x-100	
Koncentracija enzima [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]	0,05	0,1	0,05
$k_d$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	0,00094	0,000904	0,002317

Brzina sinteze nanočestica (4.7) ne može se točno odrediti s obzirom na to da je brzina hidrolize uree limitirajući faktor. Stoga na temelju dobivenih rezultata se može zaključiti da je brzina nastajanja nanočestica kalcijevog karbonata određena brzinom hidrolize uree uz enzim ureazu.

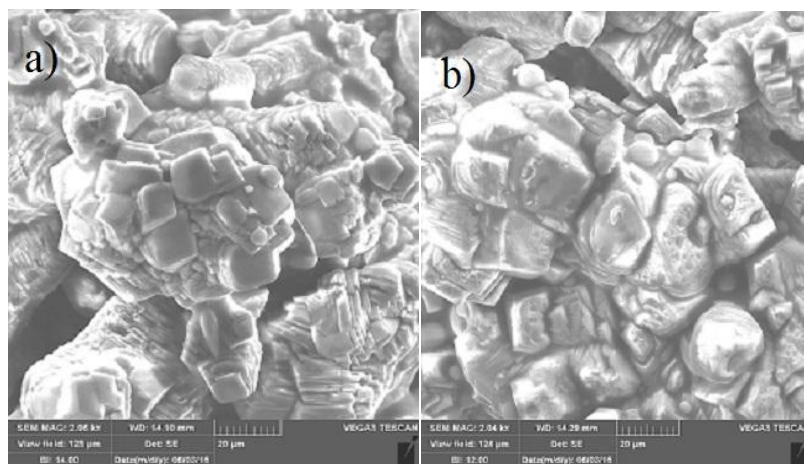
### 5.3. KARAKTERIZACIJA DOBIVENIH NANOČESTICA KALCIJEVOG KARBONATA

#### 5.3.1. Analiza nanočestica pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa

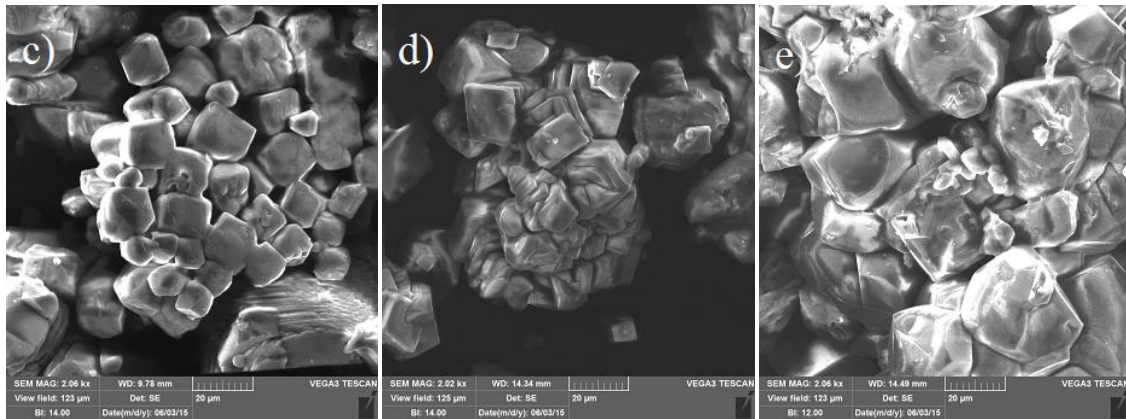
Analizom pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa dobiveni su prikazi nanočestica sintetiziranih u redestiliranoj vodi i 10%-tnoj otopini Tritona x-100 na temperaturama  $T = 30^{\circ}\text{C}$  i  $T = 20^{\circ}\text{C}$ , uz različite koncentracije enzima ureze. U slučaju provođenja reakcije pri temperaturi  $T = 20^{\circ}\text{C}$  u 10%-tnoj otopini Tritona x-100 uz koncentraciju ureaze  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$  u radoblju od 24 sata koliko su trajali eksperimenti, nije došlo do sinteze nanočestica zbog male brzine reakcije i deaktivacije enzima. Nanočestice su snimane pri različitim povećanjima od 90 do 2060 puta. Na Slici 5.5 a – f i Slici 5.6 a - f prikazane su nanočestice snimljene pri povećanju od približno 2060 puta, na temelju čega su određene njihove prosječne veličine, a dobiveni rezultati prikazani u Tablici 5.6.



Slika 5.5 Prikaz nanočestica snimljenih pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa; nanočestice sintetizirane u redestiliranoj vodi pri  $T = 20^{\circ}\text{C}$  i koncentraciji enzima a)  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ; b)  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ; c)  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $T = 30^{\circ}\text{C}$  i koncentraciji enzima d)  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  e)  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  f)  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$







Slika 5.6 Prikaz nanočestica snimljenih pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa; nanočestice sintetizirane u 10%-tnoj otopini Tritona x-100 pri  $T = 20^{\circ}\text{C}$  i koncentraciji enzima a)  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ; b)  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $T = 30^{\circ}\text{C}$  i koncentraciji enzima c)  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  d)  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  e)  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$

Tablica 5.5 Prosječne veličine sintetiziranih nanočestica

TEMPERATURA, [ $^{\circ}\text{C}$ ]	MEDIJ	KONCENTRACIJA UREAZE [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]	RASPON VELIČINA, [ $\mu\text{m}$ ]	PROSJEČNA VELIČINA, $\bar{d}$ [ $\mu\text{m}$ ]
30	Redestilirana voda	0,2	6,371-31,327	15,363
		0,1	3,894-29,026	11,917
		0,05	7,079-25,664	13,274
	10%-tna otopina Tritona x- 100	0,2	7,964-19,646	12,625
		0,1	4,425-17,876	10,147
		0,05	6,018-21,947	11,711
20	Redestilirana voda	0,2	2,478-6,548	5,461
		0,1	4,425-9,911	6,313
		0,05	4,071-13,982	9,439
	10%-tna otopina Tritona x- 100	0,2	9,380-18,230	11,575
		0,1	5,309-19,292	13,156

Na temelju Tablice 5.6. može se zaključiti da su u eksperimentima provedenim u redestiliranoj vodi pri nižim temperaturama sintetizirane čestice manjih dimenzija u odnosu na čestice sintetizirane pri višim temperaturama. Navedeno je vjerojatno posljedica veće brzine reakcije u eksperimentima provedenim na višim temperaturama, odnosno brže sinteze kalcijeva karbonata. <sup>[10]</sup>. Dakle, možemo pretpostaviti da eksperimentima provedenim na višim temperaturama dolazi do formiranja agregata, te su zbog toga čestice većih dimenzija. Kod reakcija koje su se provodile u 10%-tnoj otopini Tritona x-100 pri obje temperature nastale su nanočestice otprilike jednakih veličina. Koncentracija enzima pri kojoj se odvija sinteza nanočestica nema značajniji utjecaj na njihovu veličinu. Prisutnost površinski aktivne tvari, 10%-tne otopine Tritona x-100 također u ovoj koncentraciji nema utjecaj na veličinu nastalih nanočestica. U budućem radu, sinteza nanočestica trebala bi se provesti pri većoj koncentraciji Tritona x-100, da bi se utvrdilo da li njegova prisutnost utječe na veličinu nastalih nanočestica.

## 6. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitivana je kinetika enzima ureaze, odnosno specifična aktivnost enzima ureaze u dva medija, redestiliranoj vodi i 10%-tnoj otopini Tritona x-100 pri temperaturama  $T = 30^{\circ}\text{C}$  i  $T = 20^{\circ}\text{C}$ .

Kinetika hidrolize uree opisana je Michaelis – Menteničinom kinetičkim modelom te su procijenjeni kinetički parametri,  $V_m$  i  $K_m^S$ . Na temelju vrijednosti maksimalne brzine reakcije,  $V_m$ , zaključeno je da porastom temperature raste brzina reakcije u oba medija. Prema procijenjenim vrijednostima Michaelis – Menteničine konstante,  $K_m^S$ , zaključeno je da enzim ureaza pokazuje veći afinitet prema supstratu prilikom provođenja reakcije pri nižoj temperaturi.

Kalcijevi ioni inhibiraju enzim ureazu, i to nekompetitivnom inhibicijom, a u slučaju provođenja reakcije u redestiliranoj vodi pri temperaturi  $T = 20^{\circ}\text{C}$  inhibicije uopće nije prisutna. S obzirom na vrijednosti procijenjenih konstanti inhibicije reakcije kalcijem,  $K_i$ , koje su dosta visoke, zaključeno je kako kalcij ne utječe značajno na brzinu reakcije.

Pretpostavljeni matematički model vrlo dobro je opisao sintezu nanočestica kalcijevog karbonata iz produkata reakcije hidrolize uree uz enzim ureazu te prisustvo  $\text{CaCl}_2$ . Također, uočeno je da pri provođenju reakcija pri temperaturi  $T = 30^{\circ}\text{C}$  u redestiliranoj vodi, te  $T = 20^{\circ}\text{C}$  u 10%-tnoj otopini Tritona x-100 pri niskim koncentracijama enzima, dolazi do njegove deaktivacije.

Brzina sinteze nanočestica kalcijevog karbonata određena je brzinom hidrolize uree uz enzim ureazu.

Sintetizirane nanočestice analizirane su pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa te je zaključeno da su u eksperimentima provedenim pri nižim temperaturama sintetizirane čestice manjih dimenzija u odnosu na čestice sintetizirane pri višim temperaturama. To je posljedica veće brzine reakcije pri većoj temperaturi, zbog čega dolazi do stvaranja agregata.

## 7. POPIS SIMBOLA I KRATICA

### Simboli

$A$	površina pika kromatograma
$A_s$	specifična aktivnost enzima [ $\text{U mg}^{-1}$ ]
$b$	duljina puta svjetlosti [cm]
$c$	koncentracija [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]
$\varepsilon$	molarni apsorpcijski (ekstincijski) koeficijent [ $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]
$k$	konstanta brzine reakcije [ $\text{min}^{-1}$ ]
$k_d$	konstanta deaktivacije enzima [ $\text{min}^{-1}$ ]
$K_i$	konstanta inhibicije [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]
$K_m$	Michaelis – Menteničina konstanta [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]
$\lambda$	valna duljina zračenja [nm]
$n$	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 [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$ , $\text{U mg}^{-1}$ ]

**Kratice**

AAS	atomski apsorpcijski spektrometar ( <i>engl. Atomic absorption spectroscopy</i> )
ABS	apsorbancija
E	enzim
ES	kompleks enzim – supstrat
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ( <i>engl. High performance liquid chromatography</i> )
NBS	Nacionalni ured za standarde ( <i>engl. National Bureau of Standards</i> )
P	produkt
S	supstrat
SEM	pretražni elektronski mikroskop ( <i>engl. Scanning electron microscope</i> )

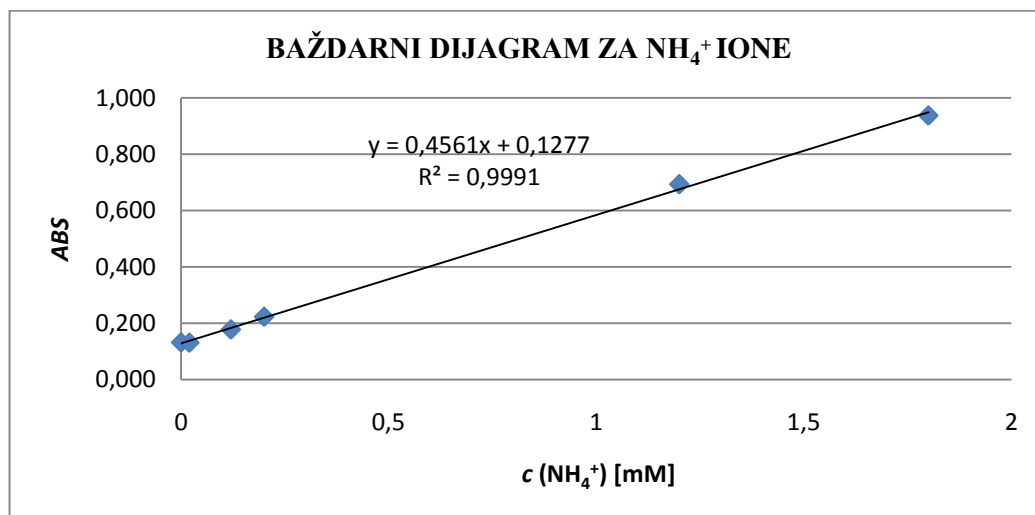
## 8. LITERATURA

1. Chen L., Shen Y., Xie A., Huang B., Jia R., Guo R., Tang W., Bacteria-Mediated Synthesis of Metal Carbonate Minerals with Unusual Morphologies and Structures, *Crystal Growth & Design* 9 (2009) 743 – 754
2. Daniel M.C., Astruc D., Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, *Chem. Rev.* 104 (2004) 293 – 346
3. Davis S.A., Dujardin E., Mann S., Biomolecular inorganic materials chemistry, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 7 (2003) 273 – 281
4. 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
5. Farahmandjou M., Effects of LABS and Triton x-100 surfactants on the particle size of nanocrystalline ITO powder, *Optoelectronics Adv.Mat. Vol. 4, No.7* (2010) 986-988
6. Gomzi Z., Kemijski reaktori, *HINUS, Zagreb*, (1998) 36 – 55, 124 – 125
7. Illanes A., Altamirano C., Wilson L., Enzyme biocatalysis: principles and application, Homogeneous enzyme kinetics, *Springer* 2008, 107-112, 133-140
8. Krajewska B., Chudy M., Drozdek M., Brzozka Z., Potentiometric Study of Ureas Kinetics over pH 5,36 – 8,21, *Electroanalysis* 2003, 15 , No 5 – 6 (2002) 460 – 461
9. 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
10. Schmid A., Dordick J.S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Without B. Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature*, 409 (2001) 258 – 268
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, *Langmuir* 21 (2005) 8876 – 8882

13. Šoufek M., Svijet minerala, *Školska knjiga*, Zagreb (1991) 74 – 76
14. Unuma H., Matsushima Y., Kawai T., Enzyme-mediated synthesis of ceramic materials, *J Ceram Soc Japan* 119 [8] (2011) 623 – 630
15. Vasić-Rački Đ., Biokemijsko inženjerstvo, *Kem Ind*, 39 (1990) 459 – 467
16. Wang T., Colfen H., Antonietti M., Nonclassical crystallization: mesocrystals and morphology change of CaCO<sub>3</sub> crystals in the presence of a polyelectrolyte additive, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 3246 – 3247
17. 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
18. Zhang X., Yan S., Tyagi R.D., Surampalli R.Y., Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates, 2011, 489–494
19. [https://www.fkit.unizg.hr/images/50010643/KATALOG\\_FKIT.pdf](https://www.fkit.unizg.hr/images/50010643/KATALOG_FKIT.pdf)

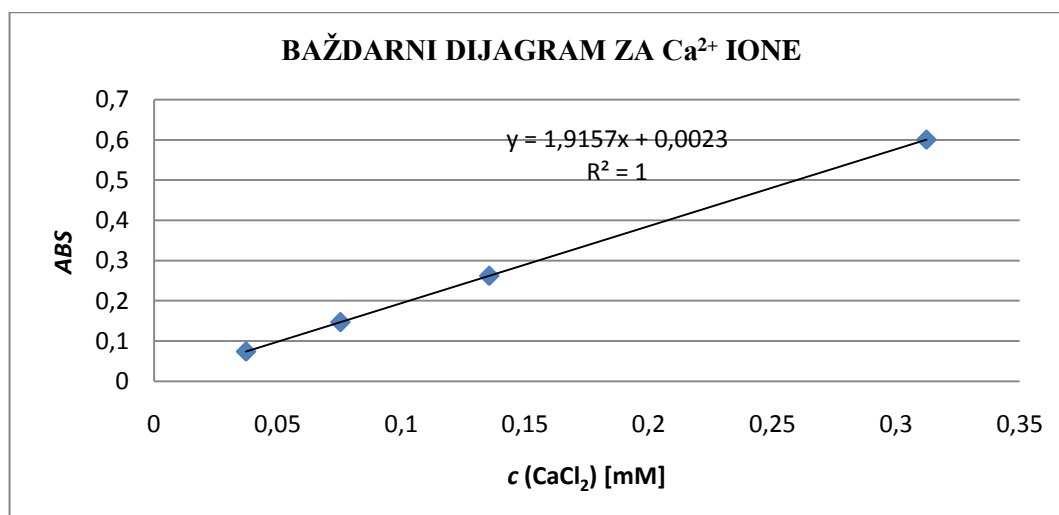
## 9. PRILOZI

## Prilog 1



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

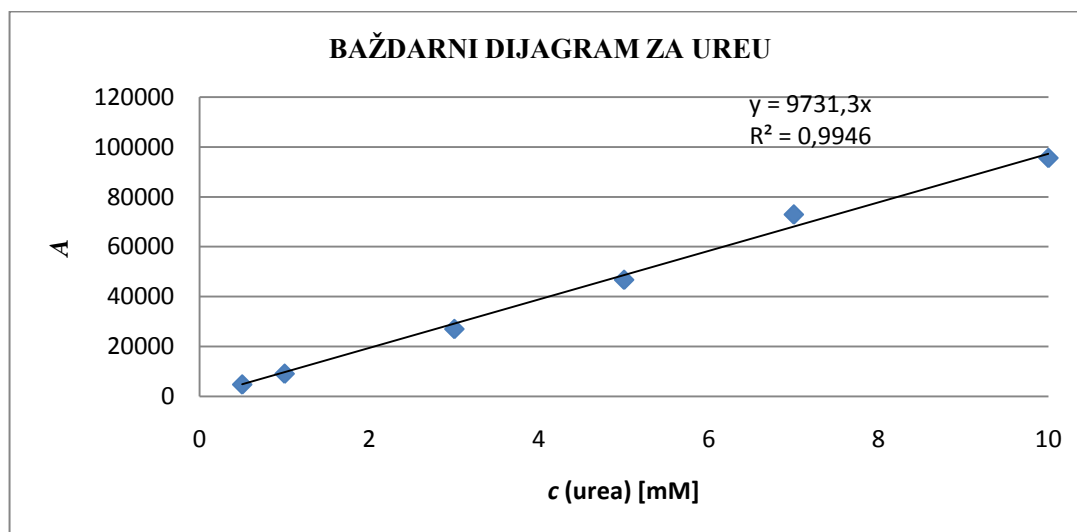
## Prilog 2



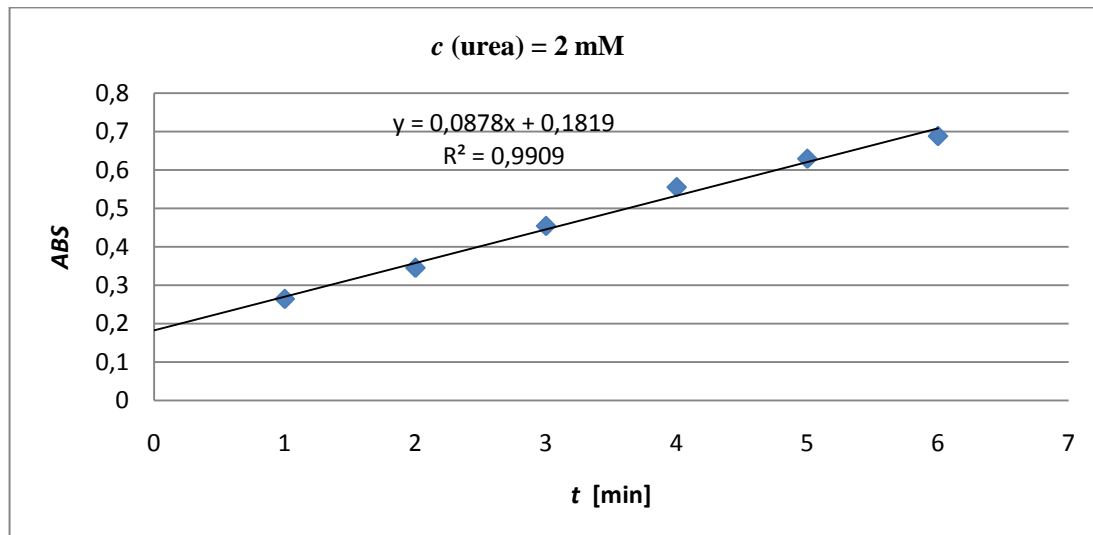
Slika 9.2 Baždarni dijagram za određivanje koncentracije kalcijevih iona ( $c(\text{CaCl}_2) = 0,02 - 0,25$  mM)



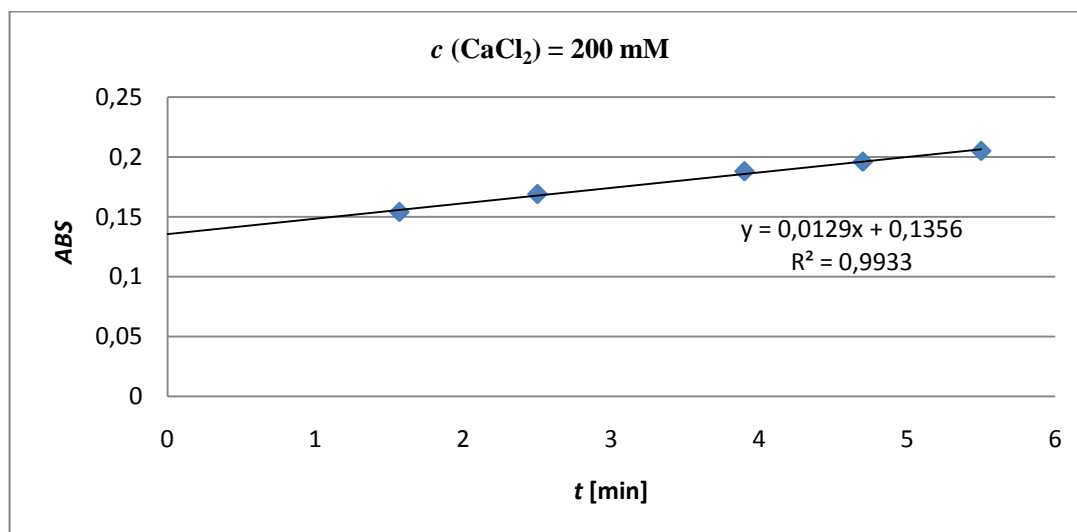
## Prilog 3

Slika 9.3 Baždarni dijagram za određivanje koncentracije uree ( $c(\text{urea}) = 0,5 - 10 \text{ mM}$ )

## Prilog 4

Slika 9.4 Prikaz promjene apsorbancije u vremenu za početnu koncentraciju uree  $c(\text{urea}) = 2 \text{ mM}$  ( $T = 30^\circ\text{C}$ ,  $c(\text{ureaza}) = 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ )

## Prilog 5



Slika 9.5 Prikaz promjene apsorbancije u vremenu za početnu koncentraciju kalcijeva klorida  $c(\text{CaCl}_2) = 200 \text{ mM}$  ( $T = 20^\circ\text{C}$ ,  $c(\text{ureaza}) = 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ )

## **10. ŽIVOTOPIS**

Mirna Jovičić rođena je 28. studenog 1989. g. u Koprivnici, gdje 2004. g. završava osnovnu školu te upisuje Gimnaziju „Fran Galović“, smjer opća gimnazija. Maturirala je s odličnim uspjehom 2008. g. Iste godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije gdje 2013. g. završava preddiplomski studij, smjer Ekoinženjerstvo. Nakon toga nastavlja obrazovanje na diplomskom studiju Ekoinženjerstva. Stručnu praksu odradila je u Komunalcu d.o.o. Koprivnica, na pročištaću otpadnih voda.