

Sveučilište u Zagrebu

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Marija Filip

Milica Stevanović

Emerik Leaković

IMOBILIZACIJA AMILAZE NA NANOČESTICE ŽELJEZOVOG (III) OKSIDA

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Vrsalović Presečki i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2015./2016.

POPIS SIMBOLA I KRATICA KORIŠTENIH U RADU

Simboli

V	volumen [dm^3]
T	temperatura [$^{\circ}\text{C}$]
K	ravnotežna konstanta brzine reakcije
r_d	brzina inaktivacije enzima
A_V	volumna aktivnost enzima
k_d	inaktivacijska konstanta prvog reda [min^{-1}]
k_{d1}	inaktivacijska konstanta troparametarskog modela [min^{-1}]
k_{d2}	inaktivacijska konstanta troparametarskog modela [min^{-1}]
ε	molarni apsorpcijski koeficijent [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
b	duljina puta svjetlosti [cm]
c	koncentracija [mol dm^{-3}]
t	vrijeme [min]
λ	valna duljina [nm]
E_a	energija aktivacije [J mol^{-1}]

Kratice

ABS apsorbancija

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. ENZIMI	2
2.1.1. Struktura enzima	2
2.1.2. Podjela enzima	3
2.1.3. Mehanizam djelovanja enzima i specifičnost	3
2.1.4. Stabilizacija enzima	4
2.1.2. Amilaza	6
2.2. IMOBILIZACIJA ENZIMA	8
2.2.1. Imobilizacija enzima na nanočestice.....	10
2.3. MODELIRANJE INAKTIVACIJE ENZIMA	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
3.1. APARATURA.....	15
3.1.1. Aparatura za ispitivanje aktivnosti enzima	15
3.1.2. Aparatura za postupak sinteze nanočestica i imobilizacije enzima	16
3.1.3. Spektrofotometar.....	17
3.1.4. Centrifuga	18
3.2. POSTUPAK SINTEZE NANOČESTICA I IMOBILIZACIJE ENZIMA	19
3.3. ANALITIČKE METODE	19
3.3.1. Određivanje koncentracije škroba.....	19
3.3.2. Određivanje aktivnosti amilaze.....	20
3.3.3. Određivanje koncentracije proteina tijekom procesa imobilizacije.....	20
3.3.4. Obrada rezultata	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. ISPITIVANJE AKTIVNOSTI AMILAZE PRIJE POSTUPKA IMOBILIZACIJE.....	22

4.1.1. Kinetički model inaktivacije enzima.....	24
4.2. POSTUPAK SINTEZE NANOČESTICA I IMOBILIZACIJA AMILAZE	26
4.2.1. Praćenje stupnja imobilizacije u vremenu	26
4.2.2. Određivanje stabilnosti amilaze nakon imobilizacije na Fe ₂ O ₃ nanočestice	30
4.2.3. Imobilizacija amilaze nakon sinteze nanočestica.....	31
5. ZAKLJUČAK	33
ZAHVALA.....	34
LITERATURA.....	35
PRILOZI.....	37
SAŽETAK.....	38
SUMMARY	39
ŽIVOTOPISI.....	40

1. UVOD

Kemijska industrija je jedna od najvećih industrija u svijetu, ali uz to jedan od najvećih zagađivača okoliša. Svakodnevno se razvijaju nove tehnologije kako bi se smanjio štetan utjecaj na okoliš. Iz tog razloga neke konvencionalne tehnologije mijenjaju se modernim kao što je na primjer zamjena kemijskih katalizatora biokatalizatorima. Uporaba biokatalizatora ili enzima u kemijskoj i drugim industrijama smatra se jednom od „čistijih tehnologija“.

Naime, enzimi su proteini i s time su biorazgradivi što dovodi do toga da postoji jako puno prednosti korištenja enzima. Jedna od toga je da se eliminira mogućnost stvaranja nepoželjnih produkata jer enzim katalizira isključivo odabranu reakciju te se na taj način povećava produktivnost. S obzirom da se dobiva vrlo čisti produkt troškovi su smanjeni jer se ne mora dodatno ulagati u izolaciju. Velika prednost enzima je i ta što za razliku od kemijskih katalizatora kataliziraju reakcije u blagim uvjetima (sobna temperatura, atmosferski tlak i neutralni pH) pa se u većinu procesa kataliziranih enzimima ulaže malo energije, što dovodi do manjih financijski ulaganja. Enzimi su zbog svoje selektivnosti, specifičnosti, stereospecifičnosti, netoksičnosti, obnovljivosti i mogućnosti razgradnje toksičnih tvari postali nezamjenjivi u svim područjima industrije i znanosti.

Međutim postoji jako puno nedostataka i ograničenja. Cijena izoliranih enzima dosta je visoka te je dostupnost mala. Jedan od najvećih problema je taj što su enzimi relativno nestabilni odnosno brzo se inaktiviraju. Kao što će biti detaljno obrađeno u daljnjem tekstu, jedan od načina stabilizacije je imobilizacija enzima na nanočestice.

2. OPĆI DIO

2.1. ENZIMI

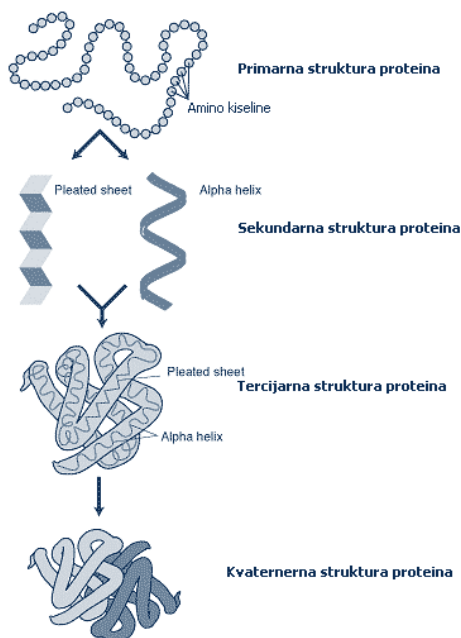
Enzimi ili kako se često nazivaju biokatalizatori su globularni proteini nastali u živoj stanici u kojoj kataliziraju biokemijske reakcije vezane za život.¹ Navedene makromolekule u prošlosti su zvali fermentima te su bili poznati već u Antici (alkoholno vrenje, kiseljenje mlijeka, pravljenje sira). Znanstvena istraživanja o enzimima su počela u prvoj polovici 19. stoljeća. G.S.C. Kirchoff 1811. pokušao je objasniti enzimske reakcije i svojstva enzima. J.J Berzelius je 1838. dao tumačenje fermentacije alkohola kao katalitičkog procesa. Naziv enzim potječe od grčke riječi en-zyme što znači u kvascu, a to je predložio 1878. R. Kuhne. E. Fischer 1897. daje poznatu teoriju "brave i ključa". 1897. E. Buchner otkriva alkoholno vrenje in vitro što daje veliki povod za daljnjim nastavkom istraživanja enzima. Treba spomenuti prvi enzim izoliran u kristalnom obliku, a to je bila ureaza, a izolirao ju je Sumner 1926. Jedan od najbitnijih događaja u biokatalizi se desio 1897. kada su B. Gutte i R. Hirschman izveli prvu sintezu enzima.²

Danas je broj pronađenih, izoliranih i pročišćenih enzima jako veliki te su se njihova svojstva kako kemijska tako i fizikalna jako dobro istražila. Pretpostavlja se da u prirodi postoji oko 25000 enzima, a poznato ih je preko 3000. Enzimi se mogu pronaći u životinjskom i biljnom svijetu te u vlaknastim gljivama, kvascima i bakterijama. Primjena enzima je vrlo velika. Upotrebljavaju se u farmaceutskoj, tekstilnoj, kožnoj, mesnoj, pekarskoj, papirnoj industriji. Također se koriste za proizvodnju deterdženata, sredstava za čišćenje, šećera, kave, piva, vina, sokova, alkohola, škroba, antibiotika...³

2.1.1. Struktura enzima

S obzirom da je enzim protein, definiran je jedinstvenim slijedom aminokiselina, a taj slijed je definiran DNA kodom organizma unutar stanica (primarna struktura). Promjenom slijeda aminokiselina mijenja se i funkcija enzima. Ovisno o broju aminokiselina postoje enzimi molekulske masa od nekoliko tisuća do nekoliko milijuna. Nastali peptidni lanci međusobno se savijaju u spirale pri čemu dolazi do povezivanja karbonilnih i amidnih grupa vodikovim vezama te se na taj način čitav sustav stabilizira. Nastanak ovih spiralnih lanaca tj. uzvojnica naziva se sekundarna struktura. Također pod sekundarnom strukturom se podrazumijevaju i nabrane strukture koje nastaju međusobnim nabiranjem peptidnih lanaca u ravnini pri čemu također nastaju vodikove veze. Daljnjim povezivanjem uzvojnica

kovalentnim vezama nastaje tercijarna struktura. Naposljetku spajanjem lanaca u veće aglomerate disulfidnim mostovima nastaju globularni proteini te proteini ovakve strukture čine najbolje katalizatore (Slika 1.).^{1,4}



Slika 1. Slikoviti prikaz strukture proteina/enzima

2.1.2. Podjela enzima

Struktura enzima određuje njihovu funkciju te se po strukturi dijele na monomerne i oligomerne enzime (razlika u broju peptidnih lanaca). Nadalje, najčešća podjela je prema vrsti reakcije koju kataliziraju. U Tablici 1. vidi se ova vrsta podjele.⁵

Tablica 1. Podjela enzima prema reakciji koju kataliziraju

NAZIV	VRSTA REAKCIJE
Oksidoreduktaze	Oksidacija-redukcija
Transferaze	Prijenos funkcionalnih skupina
Hidrolaze	Hidroliza
Liaze	Adicija ili eliminacija skupina radi stvaranja/uklanjanja dvostruke veze
Izomeraze	Izomerizacija (intramolekulski prijenos skupina)
Ligaze	Vežanje dvaju supstrata na teret hidrolize ATP

2.1.3. Mehanizam djelovanja enzima i specifičnost

Osnovna svrha enzima je ta da povećavaju brzinu reakcije bez da utječu na kemijsku ravnotežu. Oni sudjeluju u izmjeni energije između stanice i okoliša u kojem se stanica nalazi.

Djelovanje enzima se temelji na tome da se snižava energija aktivacije (E_a) kemijske reakcije. Naime E_a je energija koju je potrebno dovesti molekulama u promatranju reakciji kako bi te molekule izreagirale. Reakcija je sporija u slučaju kada je E_a velika zbog toga što je potrebna veća uložena energija za prelazak energijske barijere. Smanjivanjem E_a reakcija se ubrzava. Svrha enzima je ubrzavanje reakcije pri čemu se ne mijenja način odvijanja reakcija. Treba napomenuti da enzimi izlaze nepromijenjeni iz određene reakcije u kojoj su sudjelovali.

Za razliku od mnogih anorganskih katalizatora enzimi pokazuju svojstvo specifičnosti. Ako enzim katalizira samo sa jednim određenim supstratom kaže se da pokazuje apsolutnu specifičnost. U slučaju da katalizira reakciju u kojoj se supstrat pojavljuje sa određenom atomskom skupinom, radi se o grupnoj specifičnosti.¹

2.1.4. Stabilizacija enzima

Za postizanje velike volumne produktivnosti jedan od najbitnijih parametara je stabilnost enzima. Svi enzimi su podložni inaktivaciji koja ovisi o vrsti enzima i reakcijskim uvjetima. Unutar enzima postoje pet tipova veza (vodikove veze između polarnih aminokiselina, vodikove veze između peptidnih veza, hidrofobne interakcije između nepolarnih aminokiselina, ionske veze između suprotno nabijenih pokrajnjih lanaca te kovalentne veze između molekula cisteina-disulfidni mostovi) koje su osim kovalentne jako slabe. Iz toga se može zaključiti da su enzimi s takvim vezama osjetljivi na promjene pH, temperature, ionske jakosti itd. i da s njima treba pažljivo postupati. Pri uvjetima optimalnim za rad aktivna konformacija enzima posjeduje minimalnu slobodnu entalpiju. Stabilnost i aktivnost ispravne konformacije enzima jako ovisi o okolišnim faktorima. Često se događa da enzime koristimo pri uvjetima različitim od optimalnih zbog njihove stabilnosti i aktivnosti. Međutim pojava inaktivacije enzima je neizbježna, događa se uvijek, brže ili sporije. Nažalost postoji mnoštvo potencijalnih primjena enzima koji su zbog inaktivacije spriječeni da budu realizirani u praktičnoj primjeni. Zbog toga je veliki broj istraživanja usmjeren na povećanje stabilnosti enzima, odnosno na metode njegove stabilizacije.⁶

Nestabilnost enzima uzrokuju fizički, kemijski i biološki denaturanti. U tablicama 2, 3 i 4 prikazana su svojstva navedenih denaturanata.⁷

Tablica 2. Fizički denaturanti enzima

DENATURANT	CILJ	POKRETAČKA SILA	KONAČNI PRODUKT
toplina	vodikove veze	povećanje denaturirane strukture zbog jačeg titranja atoma, ireverzibilna modifikacija kovalentne veze	neuređena konformacija, agregati
hladnoća	hidrofobne veze i solvatirane grupe	promjena struktura otapala, te dehidracija	agregati, neaktivni monomeri
mehaničke sile	solvatirane grupe i praznine u strukturi	promjene u solvataciji i volumenu praznina, te naprezanje	neuređena konformacija, neaktivni monomeri
zračenje	funkcionalne skupine	smanjenje strukturno stabilizirajućih interakcija nakon fotooksidacije ili napada radikala	neuređena konformacija, agregati

Tablica 3. Kemijski denaturanti enzima

DENATURANT	CILJ	POKRETAČKA SILA	KONAČNI PRODUKT
kiseline	skriveno nenabijene skupine	smanjenje ionskih interakcija koje stabiliziraju strukturu	potpuno denaturirani protein
lužine	skriveno nenabijene skupine	smanjenje ionskih interakcija koje stabiliziraju strukturu	potpuno denaturirani protein
soli	polarne i nepolarne skupine		neuređena konformacija
otapala	nepolarne skupine	solvatacija nepolarnih grupa	peptidni lanci visoke organiziranosti
površinski aktivne tvari	hidrofobne domene i nabijene skupine	stvaranje odmotanih struktura	gotovo potpuno neuređena konformacija
oksidacijska sredstva	funkcionalne skupine	smanjenje interakcija među funkcionalnim skupinama	deaktivirani enzim
teški metali	funkcionalne skupine	maskiranje funkcionalnih skupina relevantnih za strukturu ili funkcionalnost proteina	deaktivirani enzim
kelatirajući agensi	kationi važni za strukturu ili funkciju	zamjena liganda ili uklanjanje kationa	deaktivirani enzim

Tablica 4. Biološki denaturanti enzima

DENATURANT	CILJ	POKRETAČKA SILA	KONAČNI PRODUKT
proteaze	peptidne veze	hidroliza peptidnih veza	oligopeptidi, aminokiseline

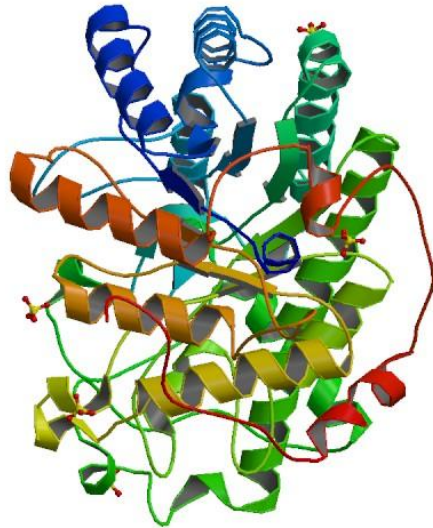
Postoji nekoliko kategorija metoda stabilizacije enzima, a to su imobilizacija, međumolekulska povezivanje, kemijska modifikacija, dodatak metalnih iona, primjena visokih koncentracija neutralnih soli, dodatak liganda (supstrata ili inhibitora), dodatak polihidridnih alkohola, zamjena vodenog s organskim reakcijskim medijem i proteinsko inženjerstvo.

Stabilnost enzima se definira kao ostatak enzimske aktivnosti nakon određenog vremena. Postoje dvije vrste stabilnosti, a to su operacijska stabilnost enzima i stabilnost enzima u uvjetima skladištenja. Bilo kakve promjene prethodno navedenih interakcija uzrokuju promjene enzimske aktivnosti i stabilnosti koja ovisi o postojanosti aktivne enzimske konformacije. Operacijska stabilnost je najbitniji parametar u provedbi procesa. Predstavlja stabilnost enzima tijekom kontinuirane uporabe koja se često izražava kao vrijeme poluraspada enzima ($t_{1/2}$). To je vrijeme potrebno da se njegova početna aktivnost snizi na polovinu početne vrijednosti. Također, za definiranje operacijske stabilnosti postoji i procjenjivanje vrijednosti konstante inaktivacije, k_d . Inaktivacijska konstanta se može procijeniti na temelju eksperimentalnih podataka ovisnosti koncentracije reaktanata i produkata o vremenu ukoliko je poznat kinetički model reakcije.⁶

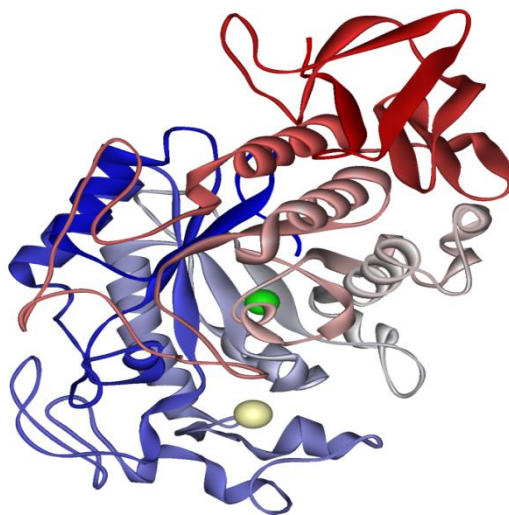
2.1.2. Amilaza

Amilaze su enzimi koji imaju važnu ulogu u području biotehnologije. Mogu se izolirati iz različitih izvora, od bakterija do biljaka. Kod ljudi se nalaze u gušterači i slini, gdje kataliziraju razgradnju viših ugljikovodika na ugljikovodike niže molekulske mase. Pokazuju veliku katalitičku sposobnost hidrolize glikozidnih veza koje se nalaze u škrobu. Ovisno na kojem mjestu u polisaharidu hidroliziraju α -1,4-glikozidnu vezu razlikujemo endoamilaze i egzoamilaze. β -amilaze (Slika 2.) i glukoamilaze (γ -amilaze, amiloglukozidaze) spadaju u skupinu egzomilaza te one hidroliziraju α -1,4-glikozidne veze samo sa kraja polisaharidnog lanca. Endoamilaze kataliziraju hidrolizu unutrašnjih α -(1,4) glikozidnih veza polisaharida koji sadrže 3 ili više α -(1,4) povezanih D-glukoza, a pritom nastaju dekstrin, oligosaharidi, maltoza i D-glukoza. U endoamilaze spada α -amilaza (Slika 3.) koja ima veliku industrijsku

primjenu u hidrolizi škroba. Zbog topivosti škroba pri višim temperaturama (oko 100° C), važno je da α -amilaza bude termostabilna.⁸ Jedna od takvih α -amilaza je *Termamyl*. *Termamyl* je izoliran iz genetski modificirane bakterije *Bacillus licheniformis*. Pokazuje optimalnu aktivnost kod pH 7 i 90° C. Pošto spada u grupu metaloenzima, može se stabilizirati dodatkom malih količina kalcijevih iona.⁹



Slika 2. Struktura β -amilaze



Slika 3. Struktura α -amilaze

2.2. IMOBILIZACIJA ENZIMA

U metode imobilizacije enzima ubrajaju se: imobilizacija enzima uklapanjem u gel, imobilizacija enzima kapsuliranjem, umrežavanje enzima, imobilizacija enzima kovalentnim vezanjem te imobilizacija enzima adsorpcijom.¹⁰

Imobilizacijom enzima uklapanjem u strukturu gela, ne ostvaraju se ni fizikalne ni kemijske veze između enzima i nosioca. Pore gela moraju omogućiti kretanje supstrata i produkta kroz strukturu gela te onemogućiti „izlazak“ enzima iz gela, stoga je važno kontrolirati poroznost gela. Uklapanje enzima u gel može se ostvariti miješanjem enzima s polimernim materijalom, zatim temperaturnim izazivanjem geliranja, organskom polimerizacijom i miješanjem enzima s kemijskim monomerima koji se zatim polimeriziraju i tvore mrežu u koju se enzim uklopi. Nedostaci ovako pripremljenih enzima su: nemogućnost korištenja u organskim otapalima iz razloga što gel nije topljiv u njima, zbog ne postojanja kemijskih ili fizikalnih veza, može doći do „izlaska“ enzima iz gela, stvaranje otpora prijenosu tvari difuzijom. Prednosti ove metode nalaze se u njezinoj jednostavnosti, niskoj cijeni te brzini. Gel koji se najviše koristi u praksi je kalcijev alginat.

Kod imobilizacije enzima kapsuliranjem enzim se smješta unutar polupropusne kapsule ili polimerne membrane. Kapsula sadrži tekuću jezgru u kojoj plivaju enzimi, a struktura membrane onemogućuje izlazak enzima iz gela, a omogućuje ulaz i izlaz supstrata i produkta. Kao kapsule se mogu koristiti celuloza nitrat, najlon, polilizin te eritrociti. Nedostaci metode kapsuliranjem su u tome što je otpor prijenosu tvari kroz membranu veći u odnosu na ostale metode te zbog toga može doći do prebrzog nakupljanja produkta unutar kapsule i pucanja membrane. Nadalje, enzimi nisu stabilizirani unutar membrane te zbog sličnosti u gustoći enzima i reakcijske otopine može doći do problema s dinamikom fluida i izvedbom reaktora. Iz ovih razloga metoda imobilizacije kapsuliranjem najmanje se koristi u industriji.

Metoda umrežavanja ne koristi nosioca te dolazi do spajanja molekula enzima u trodimenzionalnu strukturu. Spajanje molekula enzima postiže se kemijskom ili fizikalnom metodom. Kod kemijske metode stvaraju se kovalentne veze između molekula enzima, a to omogućuju reagensi kao što su glutaraldehid i toluen diizocijanat. Dodatkom želatina i albumina povećava se učinkovitost imobilizacije i aktivnost dobivenog enzima. Flokulacija je fizikalna metoda umrežavanja. Kao flokulanti se koriste polistiren sulfonati, poliamini,

polietilenamini. Metoda umrežavanja najčešće se u koristi u kombinaciji s drugim metodama imobilizacije enzima.

Kod imobilizacije enzima kovalentnim vezanjem stvara se kovalentna veza između aktivnih skupina enzima i funkcionalnih grupa na površini nosioca. Veze koje pritom nastaju su: diazo veza, izourea veza, peptidna veza, veza koja nastaje reakcijom alkilacije itd. Nastankom ovih veza mijenja se kemijska i fizikalna priroda enzima, što može dovesti do inaktivacije enzima jer mu aktivno mjesto nije više funkcionalno. Kao posljedica toga, dolazi do značajnog pada aktivnosti imobiliziranog enzima u odnosu na njegov slobodni oblik, a u nekim slučajevima i do potpunog gubitka aktivnosti. Za provedbu kovalentne imobilizacije bitno je odabrati povoljan medij i vrstu nosioca jer će o njegovoj kemijskoj strukturi ovisiti kvaliteta imobiliziranog enzima. Neki od nosioca koji se upotrebljavaju su: Sepabeads, Eurpegit, Sephadex, Sepharose, škrob, zatim porozni silikati, staklo i drugi materijali. Nedostaci imobilizacije enzima kovalentnim vezanjem su: otpor prijenosu tvari, velik gubitak aktivnosti enzima u odnosu na njegov slobodni oblik, nemogućnost regeneracije nosioca nakon što enzim izgubi aktivnost te visoka cijena. Prednost ove metode je u tome što ne može doći do kontaminacije produkta s enzimom i u iznimnoj čvrstoći kovalentne veze.

Kod imobilizacije enzima adsorpcijom dolazi do miješanja enzima i nosioca pri optimalnim uvjetima pH, temperature, ionske jakosti itd kroz određeni vremenski period nakon kojeg slijedi izdvajanje imobiliziranog enzima. Između enzima i nosioca dolazi do stvaranja slabih veza koje je lako pokidati desorpcijskim silama, što za posljedicu može imati „curenje“ enzima s nosioca. Da bi se riješio ovaj problem, metoda imobilizacije adsorpcijom često se kombinira s drugim metodama kao što su kemijska modifikacija enzima, umrežavanje, selektivna adsorpcija uz kovalentnu vezu itd. Imobilizacija adsorpcijom dijeli se na: biospecifičnu adsorpciju, nespecifičnu fizikalnu adsorpciju, afinitetnu adsorpciju, elektrostatske interakcije i hidrofobne interakcije. Ovisno o tome kako je enzim raspoređen na nosiocu ovisi njegova aktivnost, stabilnost i kinetika. Nedostaci ovakve imobilizacije su: „curenje“ enzima s nosioca te kao posljedica toga dolazi do kontaminacije produkta enzimom, ako se imobilizira velika količina enzima dovodi do manje aktivnosti enzima jer mu se zaklanjaju aktivna mjesta. Prednosti imobilizacije adsorpcijom su: visok stupanj aktivnosti enzima nakon imobilizacije, regeneracija nosioca, jednostavan i brz postupak te niska cijena.

2.2.1. Imobilizacija enzima na nanočestice

Kako je već spomenuto, enzimi su katalizatori mnogobrojnih biokemijskih i kemijskih reakcija, i svoju široku primjenu nalaze u industriji. Amilaza je protein koji katalizira hidrolizu škroba i koji svoju primjenu pronalazi u velikom spektru industrijskih proizvodnih postupaka i to najčešće u pekarskoj i prehrambenoj industriji u proizvodnji kruha, raznih sirupa i u procesima proizvodnje glukoze. Osim u prehrambenoj, svoju primjenu nalazi i u industriji papira, tekstilnoj industriji, farmaceutske industriji u proizvodima za poticanje probave i drugo.^{3,11} Upravo je široka primjena amilaze, ali i enzima općenito, bila motivacija ka istraživanju koje bi omogućilo veću stabilnost enzima odnosno njegovu sporiju deaktivaciju što bi produžilo uporabljivost takvog enzima i u konačnici rezultiralo većom isplativošću određenih biokatalitičkih industrijskih postupaka. Jedan od postupaka optimiziranja radnog učinka enzima za industrijsku primjenu jeste proces imobilizacije enzima otkriven 1916.¹² Tada je dokazano da je aktivnost invertaze, nakon imobilizacije na čvrstu podlogu, znatno manje otežana nego dok protein nije imobiliziran. To otkriće potaknulo je veliki broj daljnjih istraživanja brojnih drugih enzima na različite podloge, a kao jedan od obećavajućih pokušaja jeste imobilizacija enzima na podlogu koju predstavljaju nanočestice. Nanočestice su se pokazale kao vrlo učinkovita podloga za imobilizaciju enzima jer utječu na faktore koji određuju biokatalitičku učinkovitost, a u koje spadaju: specifična površina enzima, otpor prijenosu tvari.¹³ Prema definiciji, nanočestice predstavljaju male objekte čiji je barem jedan parametar između 1 i 100 nanometara, i čija svojstva upravo određuje dimenzionalnost.¹⁴

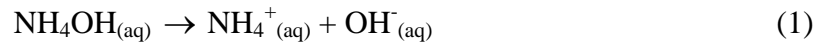
Postoje četiri pristupa kojima je moguće povezati protein ili enzim s nanočesticom tj. imobilizirati ga:¹³

- elektrostatskom adsorpcijom
- kovalentnim vezivanjem na nanočestice preko liganda
- spajanjem preko specifične veze
- direktnim spajanjem na površinu nanočestice

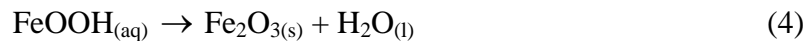
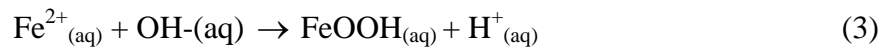
Imobilizaciju amilaze na nanočestice željeznog (III) oksida istražili su M.G. Bellino i A.E. Regazzoni.¹⁵ Pokazano je da aktivnost amilaze poraste nakon imobilizacije. Osim te činjenice, jednostavna sinteza nanočestica, kao i jednostavan postupak imobilizacije, bili su motivacija ovog rada.

3.2.1.1. Sinteza željezo (III) oksidnih nanočestica

Sinteza Fe₂O₃ nanočestica jednostavan je proces za koji su potrebne urea i ureaza te željezov (III) klorid. U pravilu se koristiti željezov (II) klorid jer ukoliko je koncentracija ureaze dovoljno mala, dolazi do oksidacije Fe²⁺ u Fe³⁺. Ureaza hidrolizira ureu pri čemu nastaje bazična otopina amonijevih iona:



Otopljeni željezni ioni reagiraju s OH⁻ ionima tvoreći jedan od hidroksidnih oblika željeza, FeOOH. Konačno, nastali hidroksidni oblik disocira stvarajući nukleuse željezovog (III) oksida koji će poslužiti kao temelji izgradnje i inicijatori rasta željenih nanočestica:¹⁴



2.3. MODELIRANJE INAKTIVACIJE ENZIMA

Kako bi se mogla provesti simulacija reakcije ili dizajnirati reaktor, vrlo je važno poznavati kinetiku biokatalitičke reakcije jer se na temelju toga može prikazati egzaktni matematički model. Osim same kinetike reakcije, bitno je znati i kinetiku inaktivacije biokatalizatora. Inaktivacija enzima može biti ireverzibilna ili reverzibilna.¹¹

Ireverzibilna inaktivacija enzima može biti kinetički ili termodinamički kontrolirana. Kod termodinamički kontrolirane inaktivacije enzima, aktivni oblik enzima je u ravnoteži s nekim oblikom denaturiranog proteina ali koji se može ponovno aktivirati, dakle, u ravnoteži je s reverzibilno denaturiranim oblikom enzima, ali taj denaturirani oblik enzima može se i ireverzibilno denaturirati što je prikazano jednadžbom (5). U toj jednadžbi K predstavlja ravnotežnu konstantu, a k_d inaktivacijsku konstantu prvog reda. S druge strane, kod kinetički kontrolirane inaktivacije enzima, aktivni oblik ireverzibilno se transformira u denaturirani protein (6).^{11,16}



Brzina inaktivacije se kod najjednostavnijeg inaktivacijskog modela opisuje kinetikom prvog reda:

$$r_d = k_d \cdot A_v \quad (7)$$

gdje r_d predstavlja brzinu inaktivacije enzima, k_d konstantu brzine inaktivacije, te A_v aktivnost enzima po volumenu. U zatvorenom homogenom sustavu u kojem nema supstrata, produkata, inhibitora ili modulatora, promjena aktivnosti enzima u vremenu može se prikazati sljedećom diferencijalnom jednačinom:

$$\frac{dA_v}{dt} = -k_d \cdot A_v \quad (8)$$

Derivacijom navedene jednačine dobije se funkcija ovisnosti (9) volumne aktivnosti enzima (A_v) o vremenu inkubacije enzima (t), uz određenu početnu volumnu aktivnost enzima (A_v^0) i eksperimentalno određenu konstantu brzine inaktivacije (k_d). Takav oblik jednačine predstavlja eksplicitni matematički model kinetike inaktivacije enzima.

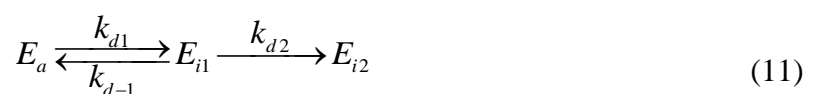
$$A_v = A_v^0 \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (9)$$

Iako je prikazani model 1. reda najjednostavniji i najčešći model, postoji i cijeli niz drugih modela koji opisuju inaktivaciju enzima. Postoje različiti oblici enzima koji se inaktiviraju različitim brzinama pa su tako C. Aymard i A. Belarbi predstavili neke od njih:¹⁷

- **paralelni model** pretpostavlja da je enzim smjesa dvaju aktivnih oblika (izoenzimi) koji se denaturiraju različitim brzinama inaktivacije



- **serijski model** kod kojeg se do inaktivnog oblika enzima dolazi iz niza slijednih reakcija koje mogu biti reverzibilne i ireverzibilne



- **kompetitivni (simultani) model** u kojem se aktivni enzim inaktivira putem dvije nezavisne reakcije



Postoje još i kombinacije navedenih modela, ali poslije modela 1. reda, najprimjenjiviji je paralelni model. Paralelni model se može primarno prikazati kao model prvog reda prema jednadžbi (9), ali u obzir treba uzeti pretpostavku da je enzim smjesa dvaju oblika tog enzima:¹⁷

$$A_v^0 = A_{v1}^0 + A_{v2}^0, \quad (13)$$

koji se deaktiviraju različitim brzinama što znači da su prisutne dvije konstante brzine inaktivacije pa jednadžba (9) poprima oblik:

$$A_v = A_{v1}^0 \cdot e^{-k_{d1}t} + A_{v2}^0 \cdot e^{-k_{d2}t} \quad (14)$$

Osim ta dva parametra (k_{d1} i k_{d2}), potrebno je uvesti parametar (α) koji će označavati udio jednog oblika enzima, odnosno udio drugog oblika. Pa je prema tome:

$$A_{v1}^0 = \alpha A_v^0 \quad (15)$$

$$A_{v2}^0 = \beta A_v^0 \quad (16)$$

$$\alpha + \beta = 1 \quad (17)$$

$$A_{v2}^0 = (1 - \alpha) A_v^0 \quad (18)$$

Uvrštavanjem izraza (15) i (18) u jednadžbu (14) dobije se konačni troparametarski model brzine inaktivacije enzima:

$$A_v = A_v^0 \left[\alpha \cdot e^{-k_{d1} \cdot t} + (1 - \alpha) \cdot e^{-k_{d2} \cdot t} \right] \quad (19)$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Ekperimenti su provedeni u kotlastom reaktoru, a homogenost reakcijske smjese održavana je miješanjem uz korištenje magnetske miješalice ili termostirane tresilice, ili na miješalici na koju je postavljena posuda s dvostrukim dnom kroz koju je prolazila voda termostirana u termostatu. Koncentracija škroba, koncentracija proteina, a indirektno i aktivnost enzima određivani su spektrofotometrijski.

3.1. APARATURA

3.1.1. Aparatura za ispitivanje aktivnosti enzima

Za ispitivanje aktivnosti amilaze korištena su dva kotlasta reaktora. Kotlasti reaktor (engl. *batch reactor*) je zatvoreni sustav u kojem se provodi reakcija i u kojem nema izmjene tvari s okolinom. Reakcijska smjesa je homogena tj. sastav u svakoj točki reakcijske smjese je jednak, uz pretpostavku idealnog miješanja. Kotlasti reaktor radi u nestacionarnom stanju, drugim riječima, sve veličine stanja (sastav reakcijske smjese, količina utrošene ili oslobođene topline, brzina kemijske reakcije) ovise o vremenu. Jedina veličina u reaktoru koja ne podliježe ovisnosti o vremenu jeste temperatura, a također je potrebno pretpostaviti da je volumen reakcijske smjese stalan i neovisan o vremenu, odnosno da ne dolazi do promjene gustoće.

U prvom reaktoru provedene su inkubacije amilaze ($V = 5 \text{ cm}^3$) na tri temperature ($T_1 = 60 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_2 = 70 \text{ }^\circ\text{C}$ i $T_3 = 80 \text{ }^\circ\text{C}$). Zadane temperature postignute su termostatom na koji je spojena posuda s dvostrukim dnom u koju su uronjeni reaktori. U drugom reaktoru provedeno je termostatiranje otopine škroba koncentracije 20 g dm^{-3} na temperaturi $T = 80 \text{ }^\circ\text{C}$. U oba reaktora homogeniziranje je postignuto pomoću magnetske miješalice. (Slika 4.)



Slika 4. Termostatirani kotlasti reaktor

3.1.2. Aparatura za postupak sinteze nanočestica i imobilizacije enzima

Za postupak imobilizacije korišten je također kotlasti reaktor s volumenom reakcijske smjese $V = 10 \text{ cm}^3$. Dvije aparature su korištene za ovaj eksperiment. U prvom slučaju upotrebljena je tresilica (CRUX 2251) termostatirana na $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ (Slika 5.). U drugom slučaju, postupak imobilizacije proveden je uz konstantan dotok zraka što je postignuto zračnom pumpom (kompresorom), dok se kotlasti reaktor nalazio u posudi s dvostrukim dnom kroz koju je strujala voda iz termostata jednake temperature kao kod termostatirane tresilice. Posuda s dvostrukim dnom pričvršćena je na miješalicu kako bi se omogućilo što idealnije miješanje. (Slika 6.)



Slika 5. Tresilica CRUX 2251



Slika 6. Aparatura za postupak sinteze nanočestica i imobilizacije enzima, uz konstantan dotok zraka

3.1.3. Spektrofotometar

Spektrofotometar je instrument koji mjeri količinu svjetla koju apsorbira uzorak. Koristi se za određivanje koncentracije uzorka, a apsorpcija svjetlosti kroz otopine matematički se opisuje Beer – Lambertovim zakonom danim izrazom (20), u kojem *ABS* predstavlja apsorbanciju na određenoj, zadanoj valnoj duljini svjetlosti, ϵ molarni apsorpcijski (ekstincijski) koeficijent [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$], svojstven svakoj molekulskoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti, *b* duljinu puta svjetlosti kroz uzorak [cm], a *c* koncentraciju tvari u otopini [mol dm^{-3}].

$$ABS = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (20)$$

U ovom radu, spektrofotometar SHIMADZU UV-1601 (Slika 7.) korišten je za određivanje koncentracije škroba jodnim reagensom **Pogreška! Izvor reference nije pronađen.**¹⁹ e koncentracije proteina Bradfordovom metodom²⁰.



Slika 7. Spektrofotometar SHIMADZU UV-1601

3.1.4. Centrifuga

U eksperimentu je korištena centrifuga, Hettich Universal 320R (Slika 8.). Primijenjena je za odvajanje produkata (amilaza imobilizirana na sintetizirane nanočestice) od reakcijske smjese kako bi se mogli pripremiti uzorci za ispitivanje aktivnosti imobilizirane amilaze. Također je korišten u praćenju koncentracije proteina tijekom procesa imobilizacije kako bi se iz supernatanta mogla odrediti konverzija imobilizacije u određenom trenutku. Uzorci su centrifugirani 5 min na 4500 okr/min nakon čega su ispirani redestiliranom vodom i ponovno centrifugirani na isti način.



Slika 8. Centrifuga Hettich Universal 320R

3.2. POSTUPAK SINTEZE NANOČESTICA I IMOBILIZACIJE ENZIMA

U reaktoru je prvo pripremljena otopina željezovog klorida koncentracije $c(\text{FeCl}_2) = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ i uree koncentracije $c(\text{urea}) = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$. Potom je dodana 2 g dm^{-3} otopina *Termamyla*, uzet uzorak kako bi se odredila točna koncentracija proteina, te je smjesa stavljena na hlađenje u ledenu kupku. Naposljetku je u reaktor dodana otopina ureaze $c(\text{ureaze}) = 0,5 \text{ g dm}^{-3}$ ili $c(\text{ureaze}) = 0,1 \text{ g dm}^{-3}$ tako da ukupni volumen otopine bude $V = 10 \text{ cm}^3$. Ako reakcija nije provođena uz konstantan dotok zraka, potrebno je reakcijsku smjesu zasititi kisikom. Reaktor je potrebno dobro zatvoriti i sve jako miješati na $T = 37 \text{ °C}$. Prvotno vrijeme reakcije je $t = 180 \text{ min}$, ali povremenim uzimanjem uzoraka treba pronaći kada je iskorištenje imobilizacije optimalno. Po završetku reakcije, talog je odvojen centrifugiranjem, ispran redestiliranom vodom i potom suspendiran u fosfatnom puferu kako bi se mogla odrediti aktivnost enzima vezanog na nanočestice željezovog (III) klorida.

Za postupak sinteze samih nanočestica potrebno je pripremiti otopinu željezovog klorida koncentracije $c(\text{FeCl}_2) = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, uree koncentracije $c(\text{urea}) = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ i ureaze $c(\text{ureaze}) = 0,5 \text{ g dm}^{-3}$. Reakcija je provođena na $T = 37 \text{ °C}$ i to za $t = 180 \text{ min}$ jer se na taj način potroši sva urea koja možda može utjecati na stabilnost amilaze (postupak korišten za naknadnu imobilizaciju amilaze).

3.3. ANALITIČKE METODE

3.3.1. Određivanje koncentracije škroba

Određivanje koncentracije škroba poslužilo je kao alat u određivanju aktivnosti ispitivane α -amilaze. Iz reaktora u kojem se odvijala inkubacija enzima na određenoj temperaturi, uzimao se uzorak od $50 \text{ }\mu\text{L}$ i dodavao u otopinu škroba $V = 4,95 \text{ mL}$ inkubirane uvijek na $T = 80 \text{ °C}$. Sljedeći korak u postupku ispitivanja jeste praćenje pada koncentracije škroba koji se razgrađuje dodanim enzimom, i to kroz $t = 5 \text{ min}$. Način na koji se određuje koncentracija škroba jeste taj da se uzima $100 \text{ }\mu\text{L}$ uzorka (škrob + α -amilaza) i dodaje u $900 \text{ }\mu\text{L}$ jednog reagensa koji je prethodno stavljen u kvarcne kivete. Tako pripremljenom uzorku je potom spektrofotometrijski izmjerena apsorbanacija pri valnoj duljini $\lambda = 580 \text{ nm}$. Isti postupak proveden je nekoliko puta za isti uzorak inkubirane α -amilaze u pravilnim vremenskim razmacima, s time da je svaki puta uzimano novih $4,95 \text{ mL}$ otopine škroba.

Prije samog postupka praćenja tj. određivanja pada koncentracije škroba potrebno je izraditi baždarni dijagram odnosno pravac koji govori o odnosu koncentracije škroba i apsorbancije dobivene za točno poznatu koncentraciju. Pripremljene su standardne otopine škroba koncentracija $0,4 \text{ g dm}^{-3}$, $1,2 \text{ g dm}^{-3}$, 2 g dm^{-3} , 4 g dm^{-3} , 8 g dm^{-3} , 16 g dm^{-3} , 20 g dm^{-3} i izmjerena je njihova apsorbancija prema opisanom postupku (Prilog 1, Slika 24.).

Bitno je naglasiti da su sva razrjeđenja i otopine za određivanje koncentracije škroba i ispitivanje aktivnosti pripremane u fosfatnom puferu $\text{pH} = 7$ jer je za proces ispitivanja važna fiksirana vrijednost pH . pH također može utjecati na aktivnost enzima, ali to u ovom slučaju nije bilo predmet istraživanja.

Jodni reagens pripremljen je otapanjem $0,42 \text{ g}$ kalijevog jodida (KI) i $0,63 \text{ g}$ joda (I_2) u $0,5 \text{ dm}^3$ redestilirane vode.^{18,19}

3.3.2. Određivanje aktivnosti amilaze

Aktivnost amilaze određivana je indirektno praćenjem pada koncentracije škroba nakon dodavanja enzima u termostatiranu otopinu. Pad koncentracije očitovao se kao promjena apsorbancije u vremenu $\left(\frac{\Delta \text{ABS}}{\Delta t} \right)$ odnosno kao nagib dobivenog pravca ovisnosti apsorbancije o vremenu. Kako je isti postupak praćenja pada koncentracije škroba proveden nekoliko puta za isti uzorak inkubirane α -amilaze u pravilnim vremenskim razmacima, moguće je odrediti kako se mijenja aktivnost enzima u vremenu na točno određenoj temperaturi. Volumna aktivnost (A_V) se naposljetku određujem dijeljenjem dobivenih nagiba s nagibom baždarnog pravca za škrob.

3.3.3. Određivanje koncentracije proteina tijekom procesa imobilizacije

Tijekom provedbe reakcije imobilizacije jako je bitno provjeravati koliko je iskorištenje imobilizacije kako bi se provjerila učinkovitost procesa. Prvotno je određivana koncentracija proteina na početku i na kraju postupka, ali je također i praćena tijekom samog postupka uzimanjem uzoraka u određenim vremenskim razmacima.

Prije samog početka praćenja bilo je potrebno načiniti baždarni pravac koji kazuje odnos proteina poznatih koncentracija i apsorbancije te iz kojeg se pomoću dobivene jednadžbe pravca ($y = ax + b$ gdje je y apsorbancija, a x koncentracija proteina) izračunava nepoznata koncentracija proteina u uzorku (Prilog 2, Slika 25.).

Prije dodatka ureaze uzima se uzorak iz kojeg se izračunala početna koncentracija proteina. Dodatkom ureaze počinje reakcija imobilizacije. Uzorci su se uzimali tijekom trajanja imobilizacije. Nakon uzimanja uzorka rađena su razrjeđenja od 200 i 400 puta te se u plastične kivete stavljalo 800 μL razrijeđenog uzorka i 200 μL reagensa. Nakon 5 minuta inkubacije pri sobnoj temperaturi mjerene su apsorbancije uzoraka pri $\lambda = 595 \text{ nm}$ iz čega se računala koncentracija proteina i naposljetku iskorištenje reakcije. Na ovaj način je određivana koncentracija i za baždarni dijagram.

Postoji više metoda određivanja proteina u uzorku. U ovom radu se odabrala metoda po Bradford-u. Metoda se bazira na reakciji proteina sa bojom Coomassie Blue G-250 (CBB) u kiselom mediju. Navedena boja se na proteine veže hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama što stabilizira boju u anionskom obliku i dovodi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu. Anionska boja se veže za NH_3 skupine proteina. Pri ovom procesu apsorpcijski maksimum boje se pomiče sa 465 nm na 595 nm što se prati spektrofotometrijski. Metoda po Bradford-u je u velikoj uporabi jer je jako jednostavna, brza i velik je opseg proporcionalnosti intenziteta obojenja i koncentracije proteina.

Bradford-ov reagens se pripravlja od 100 mL Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL 95% EtOH, 100 mL 85% fosfatne kiseline i vode do 1000 mL.²⁰

3.3.4. Obrada rezultata

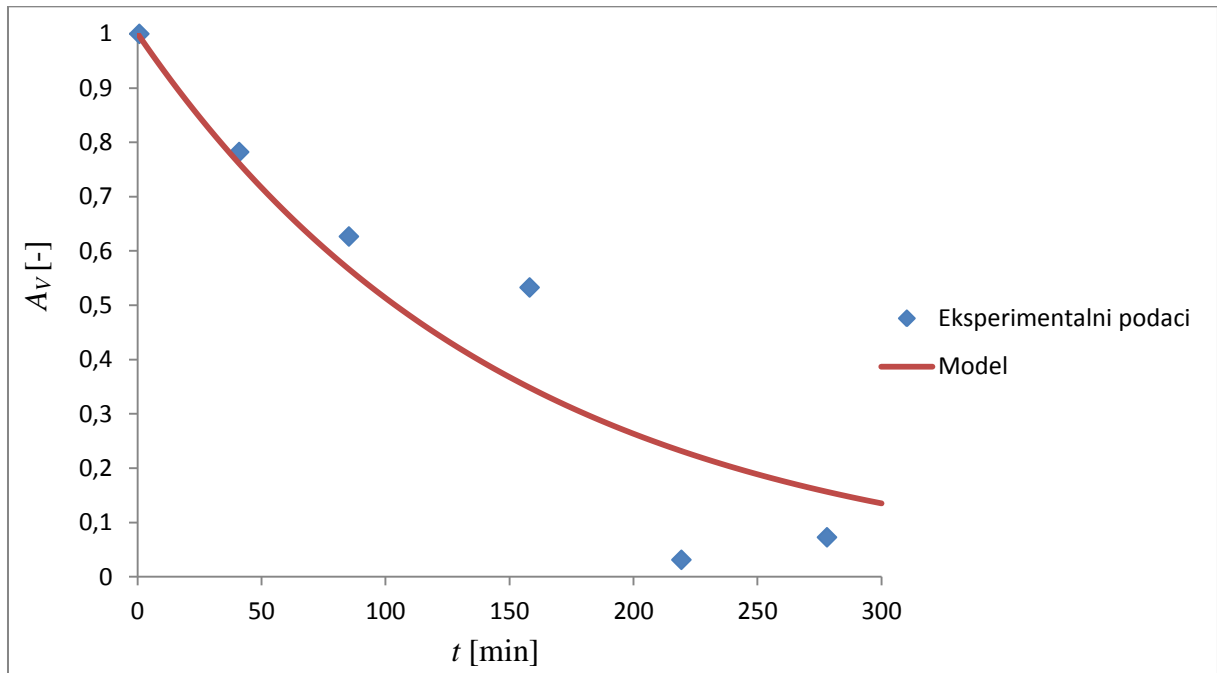
Obrada eksperimentalnih podataka izvršena je u programskom paketu Scientist. Napravljena je simulacija na temelju eksperimentalnih podataka i pretpostavljenog modela. Potrebni parametri su se procijenili nelinearnom regresijom i simpleks metodom. Metode procjene parametara pronalaze minimalni zbroj kvadrata greške između eksperimentalnih podataka i izračunatih pomoću modela.

Simpleks metoda se koristi u slučaju kada je velika razlika između početne vrijednosti parametra i njegove prave vrijednosti. Navedena metoda je jako dobra prilikom određivanja približne vrijednosti parametara. Nakon procijenjenih parametara i napisanog modela provodi se simulacija rješavanjem diferencijalnih jednadžbi određenog modela. Za rješavanje diferencijalnih jednadžbi Scientist se koristi slijedećim metodama: Eulerova metoda, metoda Runge Kutta IV, Bulirsch - Stoer metoda i Episode algoritam.

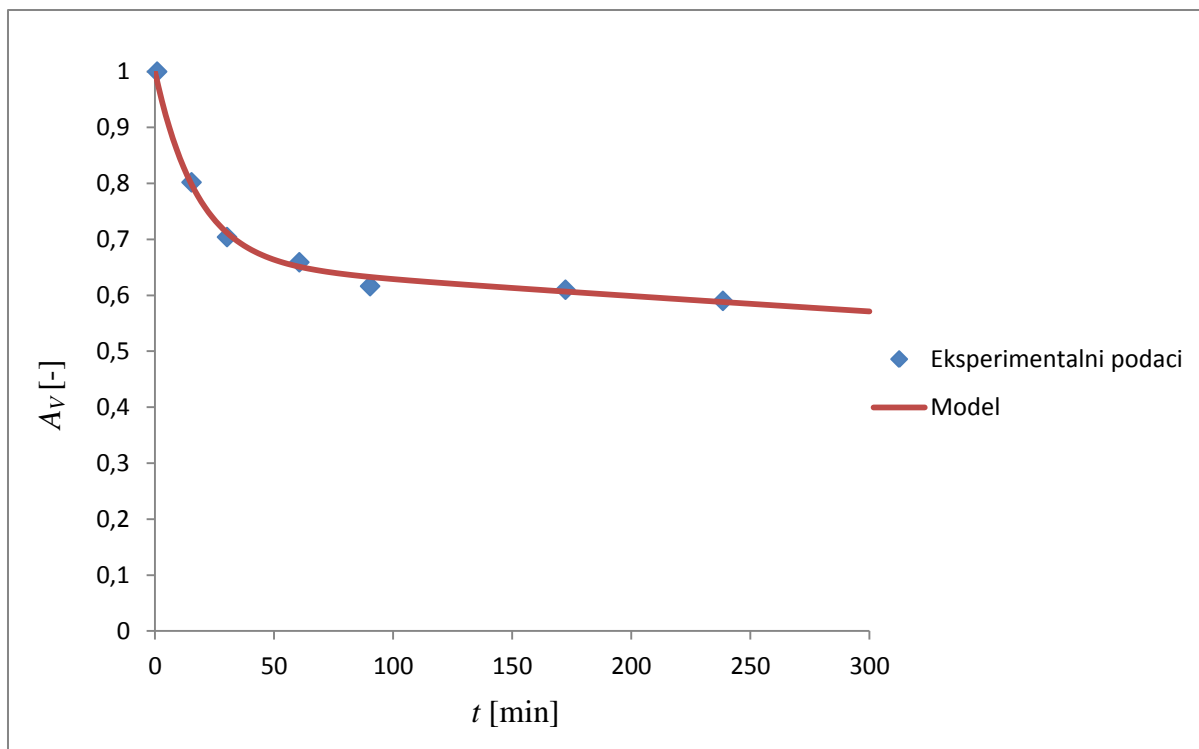
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ISPITIVANJE AKTIVNOSTI AMILAZE PRIJE POSTUPKA IMOBILIZACIJE

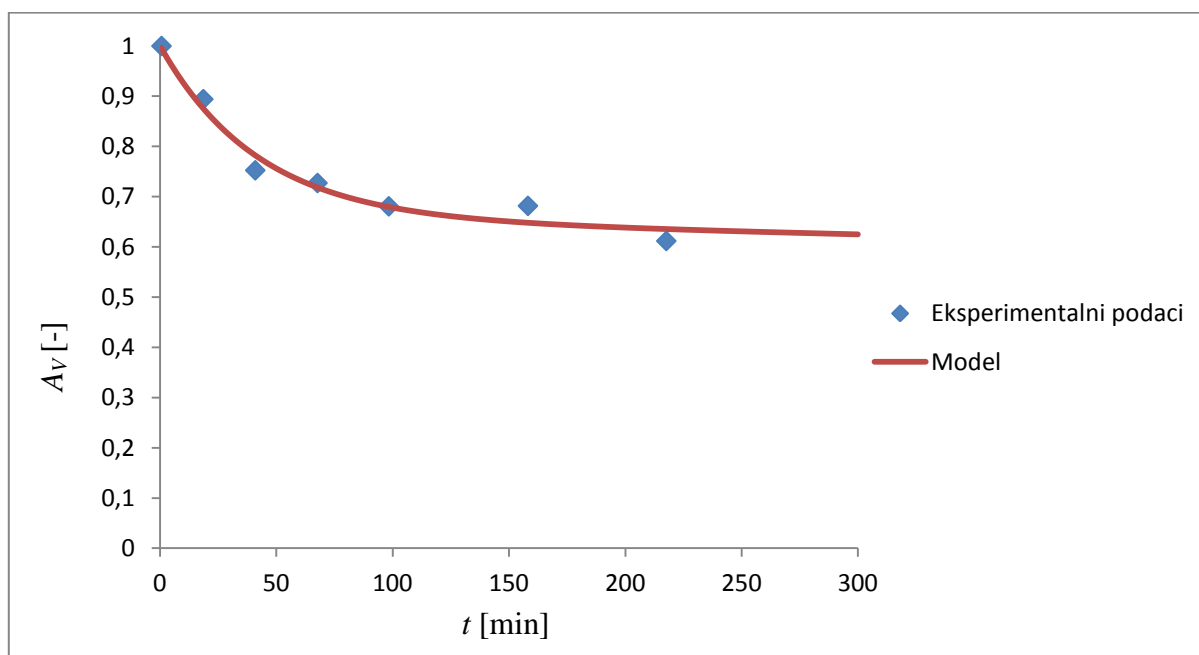
Kako bi se utvrdila aktivnost imobilizirane amilaze, za usporedbu je bilo potrebno ispitati njezinu aktivnost prije samog postupka imobilizacije. Prema prethodno opisanom postupku ispitivanja aktivnosti (Poglavlja 3.3.1. i 3.3.2.) dobiveni su rezultati prikazani na Slikama 9, 10 i 11.



Slika 9. Grafički prikaz ovisnosti volumne aktivnosti amilaze u vremenu, $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$

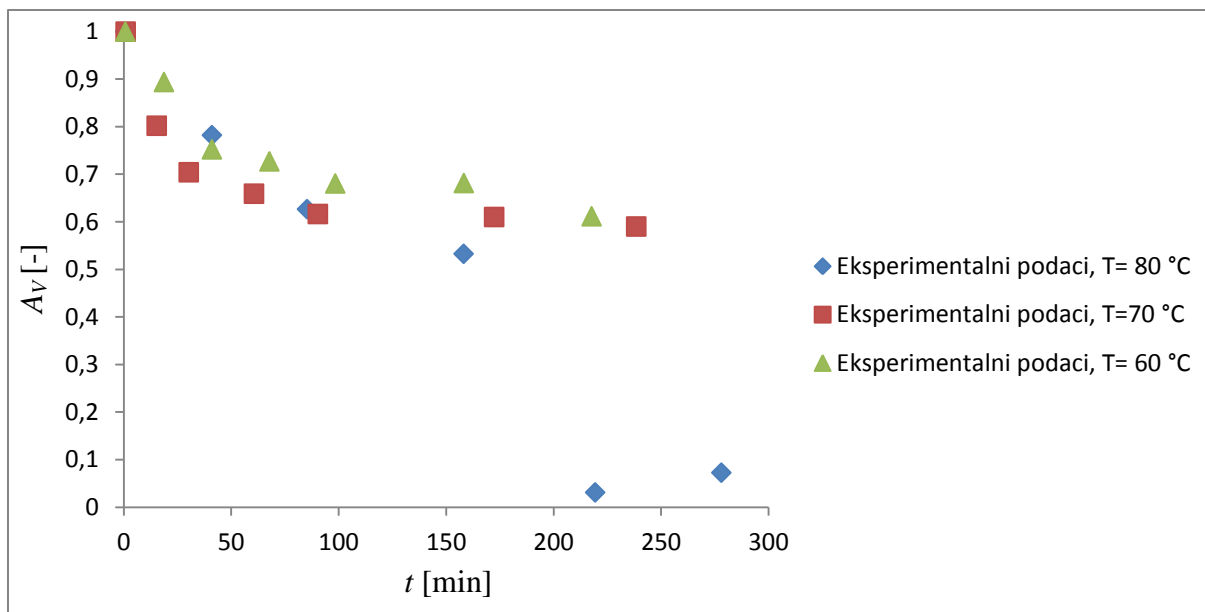


Slika 10. Grafički prikaz ovisnosti volumne aktivnosti amilaze u vremenu, $T = 70\text{ °C}$



Slika 11. Grafički prikaz ovisnosti volumne aktivnosti amilaze u vremenu, $T = 60\text{ °C}$

Rezultati su prikazani kao omjer volumne aktivnosti u vremenu i početne volumne aktivnosti u ovisnosti u vremenu. S ciljem boljeg uočavanja trenda aktivnosti pri različitim temperaturama, svi podaci su prikazani na Slici 12.



Slika 12. Grafički prikaz ovisnosti volumne aktivnosti amilaze u vremenu pri temperaturama 80 °C, 70 °C i 60 °C

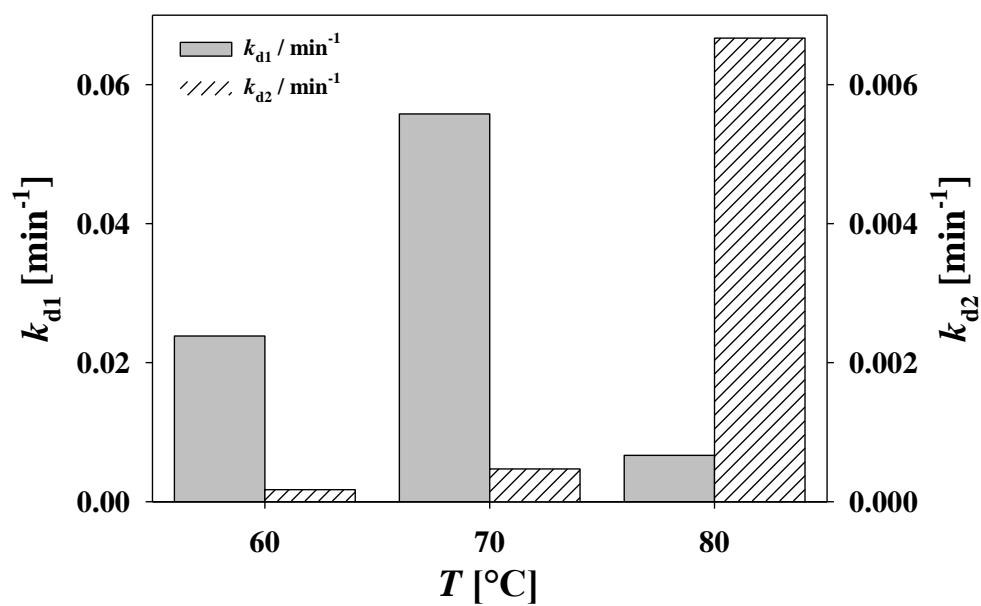
Iz slike 12 je vidljivo da je u određenom trenutku, na primjer $t = 150$ min, volumna aktivnost na 80 °C znatno manja u odnosu na aktivnost pri ostale dvije temperature. Isto tako, volumna aktivnost na 70 °C je manja od aktivnosti na 60 °C u istom trenutku. Temeljem tih činjenica može se zaključiti da se brzina inaktivacije povećava povećanjem temperature.

4.1.1. Kinetički model inaktivacije enzima

Volumna aktivnost vremenom opada određenim trendom što se opisuje kinetičkim modelom inaktivacije. Na početku se pretpostavilo da je model koji opisuje eksperimentalne podatke model 1. reda, međutim, pokazalo se da je model koji najbolje opisuje podatke troparametarski paralelni model opisan u poglavlju 2.3. (Jednadžba 19) Nakon provedene simulacije u programu SCIENTIST, procijenjeni su parametri modela k_{d1} , k_{d2} i α te su prikazani u tablično (Tablica 5.) i grafički (Slika 13.).

Tablica 5. Tablični prikaz procijenjenih parametara inaktivacijskog modela amilaze

TEMPERATURA / °C	k_{d1} / min^{-1}	k_{d2} / min^{-1}	α
80	0,006674	0,00667	0,341966
70	0,055787	0,000472	
60	0,023847	0,000172	



Slika 13. Grafički prikaz dobivenih parametara modela inaktivacije

Konačni modeli u eksplicitnom obliku prikazani su izrazima (21) za $T = 80$ °C, (22) za $T = 70$ °C i (23) za $T = 60$ °C.

$$A_v = A_v^0 \left(0.341966 \cdot e^{-0.006674 \cdot t} + 0.658034 \cdot e^{-0.00667 \cdot t} \right) \quad (21)$$

$$A_v = A_v^0 \left(0.341966 \cdot e^{-0.055787 \cdot t} + 0.658034 \cdot e^{-0.000472 \cdot t} \right) \quad (22)$$

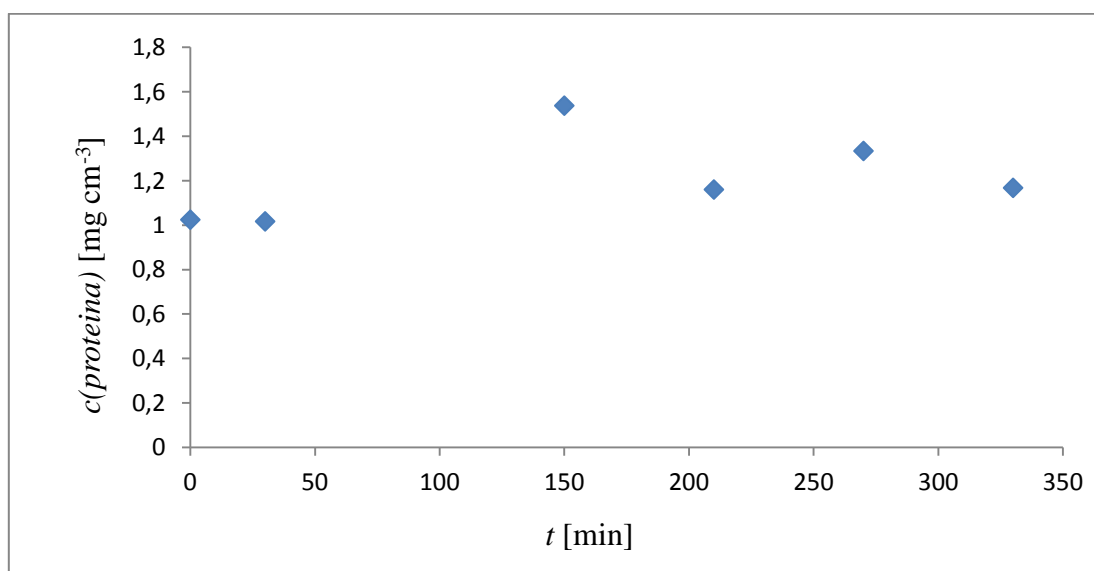
$$A_v = A_v^0 \left(0.341966 \cdot e^{-0.023847 \cdot t} + 0.658034 \cdot e^{-0.000172 \cdot t} \right) \quad (23)$$

4.2. POSTUPAK SINTEZE NANOČESTICA I IMOBILIZACIJA AMILAZE

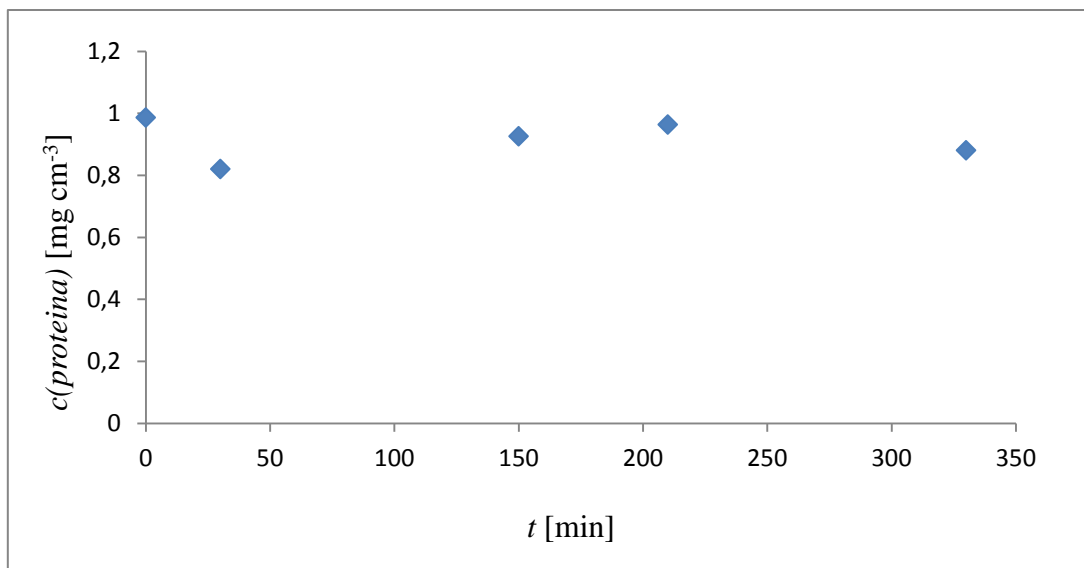
Pri početnim uvjetima preuzetim iz rada M.G. Bellinoa i A.E. Regazzonia¹⁵ dobivena je konverzija imobilizacije približno 20%. Kako je primijećeno da je u reaktor slučajno ubačen magnet, eksperiment je ponovljen bez magneta jer je smatrano da je to uzrokovalo relativno malo iskorištenje. No rezultati novog eksperimenta pokazali su iskorištenje od približno 7%. Iz tog razloga odlučeno je pratiti iskorištenje imobilizacije (sa i bez magnet) u vremenu kako bi se procijenilo u kojem trenutku je postignut najveći stupanj iskorištenja.

4.2.1. Praćenje stupnja imobilizacije u vremenu

Stupanj imobilizacije je praćen određivanjem koncentracije proteina prije postupka imobilizacije i iz supernatanta dobivenog centrifugiranjem nakon određenog vremena. Dobiveni rezultati prikazani su grafički (Slika 14. i 15.)

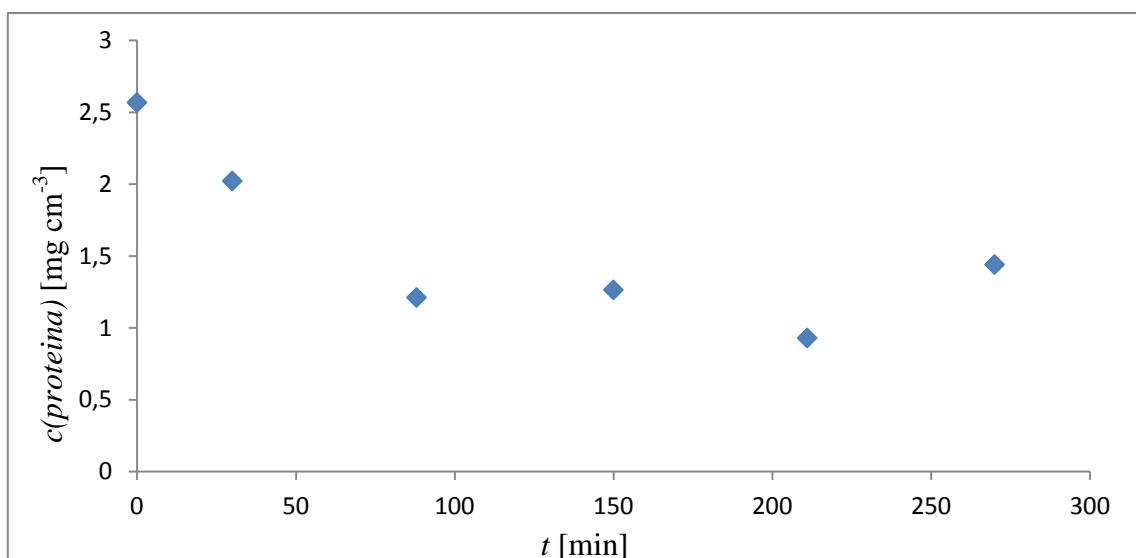


Slika 14. Grafički prikaz praćenja koncentracije proteina u vremenu u reaktoru s magnetom, $c(\text{ureaze}) = 0,5 \text{ mg cm}^{-3}$

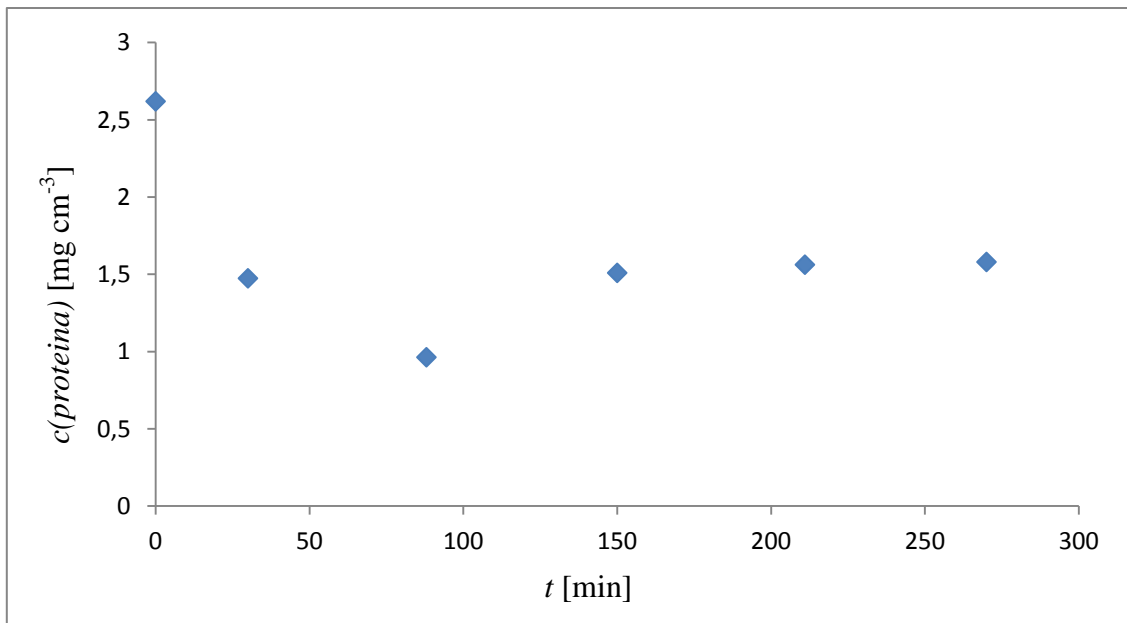


Slika 15. Grafički prikaz praćenja koncentracije proteina u vremenu u reaktoru bez magneta, $c(\text{ureaze}) = 0,5 \text{ mg cm}^{-3}$

Iz navedenih grafova vidi se da je iskorištenje imobilizacije konstantno vrlo nisko te je iz tog razloga smanjena koncentracija ureaze s $0,5 \text{ mg cm}^{-3}$ na $0,1 \text{ mg cm}^{-3}$. Pretpostavljeno je da se na taj način sinteza nanočestica odvija sporije što omogućava molekulama amilaze da se kroz duži period efikasnije vežu za nanočestice. Drugim riječima, u slučaju brzog formiranja nanočestica amilaza nema dovoljno vremena kako bi se u većoj mjeri vezala za formirane nanočestice željezovog (III) oksida. Na temelju tih zaključaka provedena je imobilizacija u reaktoru s koncentracijom ureaze od $0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ te je praćen stupanj iskorištenja kao u prethodnom eksperimentu. Dobiveni rezultati su prikazani na slikama 16 i 17.



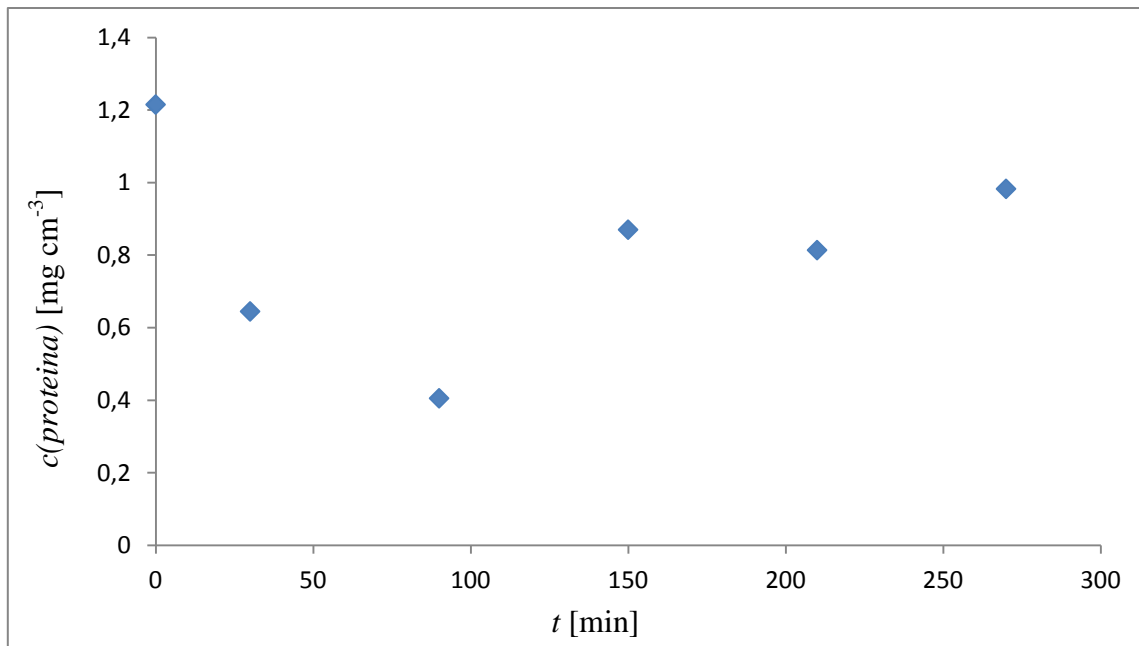
Slika 16. Grafički prikaz praćenja koncentracije proteina u vremenu u reaktoru s magnetom, $c(\text{ureaze}) = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$



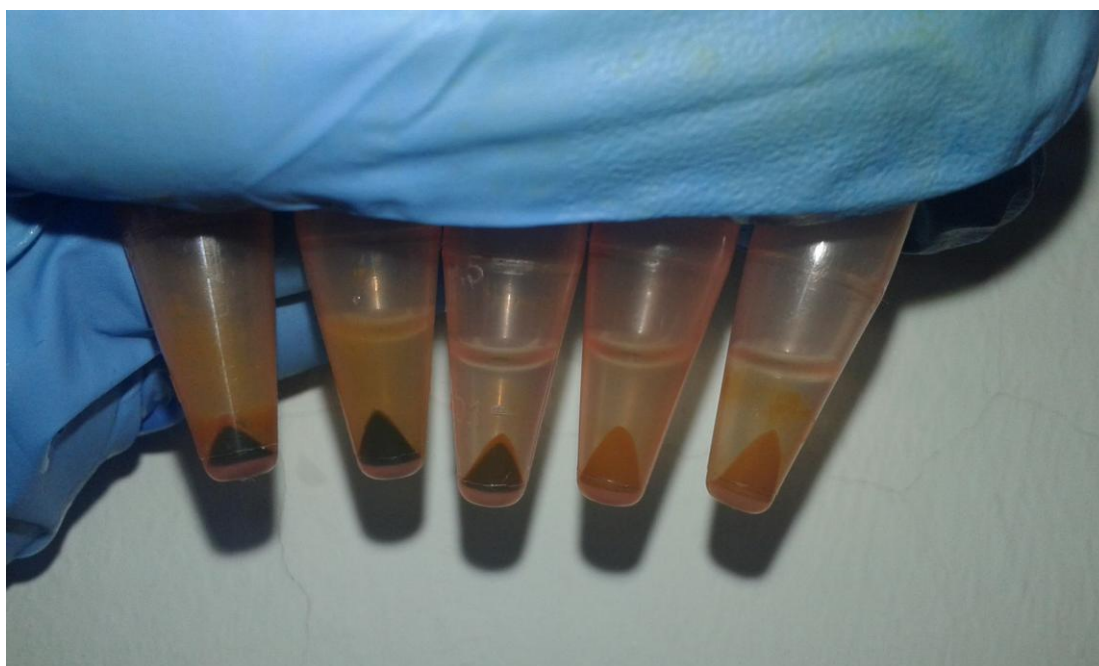
Slika 17. Grafički prikaz praćenja koncentracije proteina u vremenu u reaktoru bez magneta, $c(\text{ureaze}) = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$

Pošto su promjene u koncentraciji ureaze polučile dobre rezultate, sljedeći korak je provođenje reakcije u kojoj je korištena otopina ureaze smanjene koncentracije ($0,1 \text{ mg cm}^{-3}$) tijekom 210 minuta, bez uzimanja uzoraka. Međutim, iskorištenje je bilo poražavajuće (4%). Naime tijekom tog eksperimenta se uzorci nisu uzimali.

Došlo se do zaključka da na stupanj iskorištenja utječe zrak koji je ulazio u reaktor prilikom uzimanja uzorka. Zbog toga se prelazi na postupak imobilizacije s konstantnim dotokom zraka (Slika 6.). Dobiveni su rezultati prikazani grafovima na slici 18. dok su centrifugirane nanočestice u pojedinom trenutku prikazane na slici 19.



Slika 18. Grafički prikaz praćenja koncentracije proteina u vremenu uz konstantan dotok zraka u reaktoru s magnetom, $c(\text{ureaze}) = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$



Slika 19. Centrifugirane nanočestice tijekom procesa imobilizacije

Provođenje imobilizacije u ovim uvjetima dalo je dosad najbolje rezultate. Iz grafičkog prikaza vidljivo je da se najveći pad koncentracije proteina dogodio nakon 90 minuta provođenja reakcije. Iskorištenje u tome trenutku iznosi 66.6%.

4.2.2. Određivanje stabilnosti amilaze nakon imobilizacije na Fe₂O₃ nanočestice

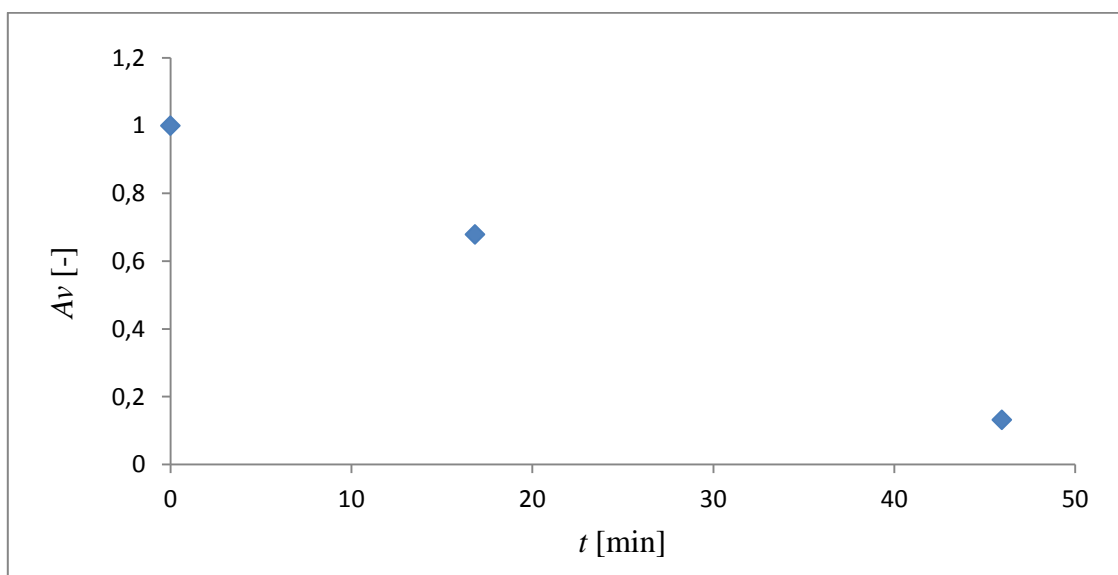
Nakon nađenih optimalnih uvjeta za proces imobilizacije krenulo se na određivanje aktivnosti imobilizirane amilaze već opisanim postupkom.

Prvi rezultati su pokazali da je aktivnost imobilizirane amilaze izuzetno mala u odnosu na neimobiliziranu pri sobnoj temperaturi što se može vidjeti iz dobivenih rezultata u priloženoj Tablici 6.

Tablica 6. Rezultati mjerenja aktivnosti imobilizirane amilaze

VRIJEME [min]	ABS
0,55	2,74
1,97	2,59
4,97	2,27
10,08	2,18
20,1	2,02

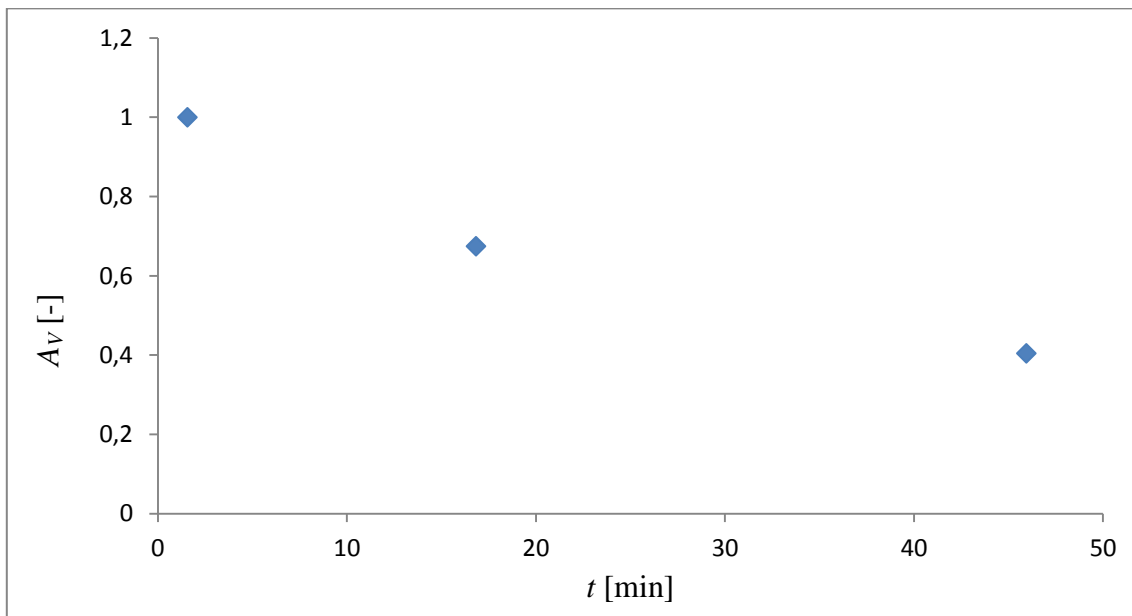
Bez obzira na loše rezultate pri sobnoj temperaturi pokrenuto je ispitivanje aktivnosti pri 80°C.



Slika 20. Grafički prikaz ovisnosti volumne aktivnosti imobilizirane amilaze u vremenu, $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$

Priloženi rezultati na 80 °C (Slika 20.) su potvrdili to da se amilaza izrazito brzo deaktivira čemu u prilog ide činjenica da je vrijeme poluraspada već na približno 30 minuta (prije imobilizacije, vrijeme poluraspada bilo je otprilike 150 min (Slika 9.)).

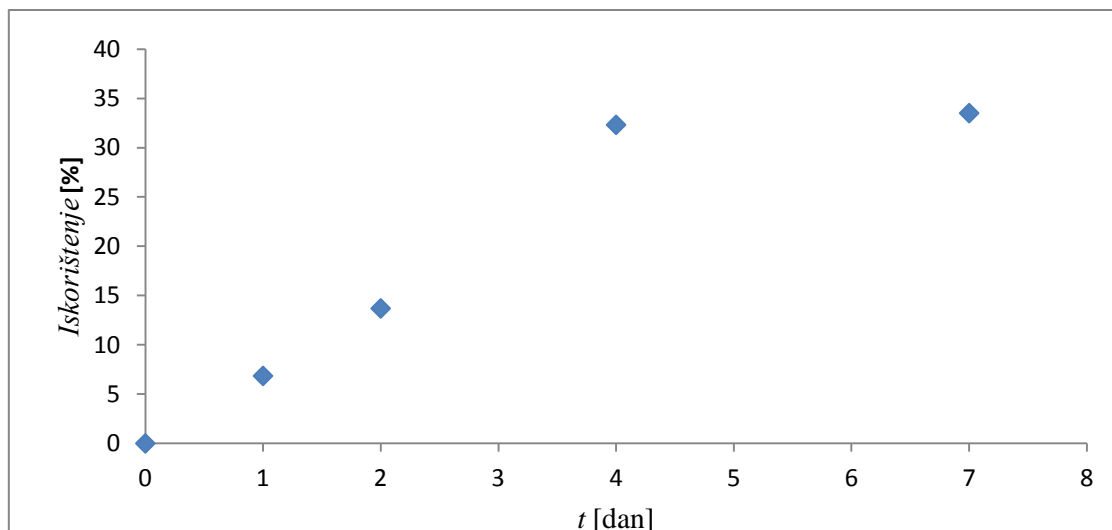
Kao razlog brze deaktivacije enzima smatrao se konstantan dovod zraka koji zbog kisika (oksidirajuće sredstvo) može dovesti do promjene u konformaciji proteina. Stoga je odlučeno da će se provesti imobilizacija bez dovoda zraka. Nakon provedene reakcije bez dotoka zraka provedeno je ispitivanje aktivnosti, a dobiveni su rezultati prikazani na slici 21. Vrijeme poluraspada enzima je oko 40 minuta što je i dalje značajno manje uspoređujući rezultate dobivene prije imobilizacije.



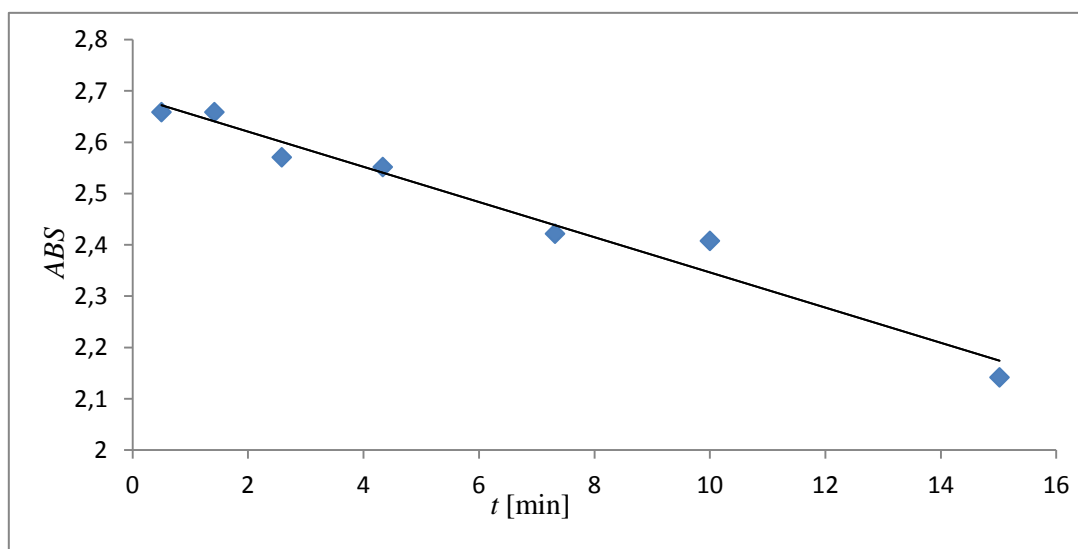
Slika 21. Grafički prikaz ovisnosti volumne aktivnosti imobilizirane amilaze u vremenu, $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, imobilizacija bez dotoka zraka

4.2.3. Imobilizacija amilaze nakon sinteze nanočestica

Zbog dobivenih loših rezultata mjerenjem aktivnosti amilaze prvim postupkom imobilizacije, odlučeno je da se prvo sintetiziraju nanočestice (prema postupku opisanom u Poglavlju 3.2.), a zatim provede postupak imobilizacije. Pretpostavljeno je da je u prvom postupku prisutnost uree u reaktoru utjecala na bržu inaktivaciju amilaze. Dakle, nakon sinteze, nanočestice su isprane te je dodana amilaza otopljena u puferu. Imobilizacija je provedena na $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kroz sedam dana, što je prikazano grafom ovisnosti iskorištenja imobilizacije o vremenu. (Slika 22.) vidljivo je da se već nakon četiri dana postigne maksimalno iskorištenje. Daljnji postupak je ispitivanje aktivnosti tako imobilizirane amilaze (Slika 23.).



Slika 22. Grafički prikaz iskorištenja imobilizacije kroz 7 dana



Slika 23. Ovisnost apsorbancije škroba hidroliziranog imobiliziranom amilazom u vremenu

No bez obzira što je amilaza imobilizirana na željezne nanočestice pokazala relativno visoku aktivnost, njezinom inkubacijom na 80 °C došlo je do vrlo brze inaktivacije. Enzim je potpuno izgubio aktivnost nakon 10 minuta.

5. ZAKLJUČAK

Ispitivana je stabilnost α -amilaze na tri visoke temperature (60 °C, 70 °C, i 80 °C) zbog topljivosti škroba kao supstrata. Kinetika inaktivacije amilaze je opisana troparametarskim modelom. Pretpostavljeni model dobro je opisao eksperimentalne podatke te su procijenjeni parametri pokazali da je najveća stabilnost amilaze pri 60 °C. Ova činjenica potvrđuje teorijske pretpostavke da se enzimi koji su po svom kemijskom sastavu proteini denaturiraju i gube svoju aktivnost pri visokim temperaturama.

Procesom imobilizacije nastojalo se povećati stabilnost enzima. Podešavanjem uvjeta samog procesa došlo se do optimalnih reakcijskih parametara imobilizacije kod kojih je došlo do maksimalnog iskorištenja:

- $c(FeCl_2) = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$
- $c(urea) = 0.2 \text{ mol dm}^{-3}$
- $c(amilaza) = 2 \text{ g dm}^{-3}$
- $c(ureaza) = 0.1 \text{ g dm}^{-3}$
- $T = 37 \text{ °C}$
- $t = 90 \text{ min}$
- konstantan dotok zraka

Postignuto maksimalno iskorištenje imobilizacije je 66.6% što bi značilo da se gotovo dvije trećine enzima vezalo za nanočestice.

Očekivalo se da će stabilnost amilaze biti bolja ili ista kao kod neimobilizirane. Međutim nisu dobiveni željeni rezultati. Rezultati su dokazali da aktivnosti enzima na višim temperaturama gotovo i nema. Iz tog razloga istraživanje ide dalje kako bi se otkrio uzrok tako brze inaktivacije i ostvario prvotni cilj stabiliziranja enzima.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki na pruženoj prilici za ostvarivanje ovog istraživanja. Prije svega zahvaljujemo joj se na iskazanoj strpljivosti, korisnim savjetima, pruženoj mogućnosti samostalnog rada i stjecanja iskustva u realnim istraživačkim uvjetima.

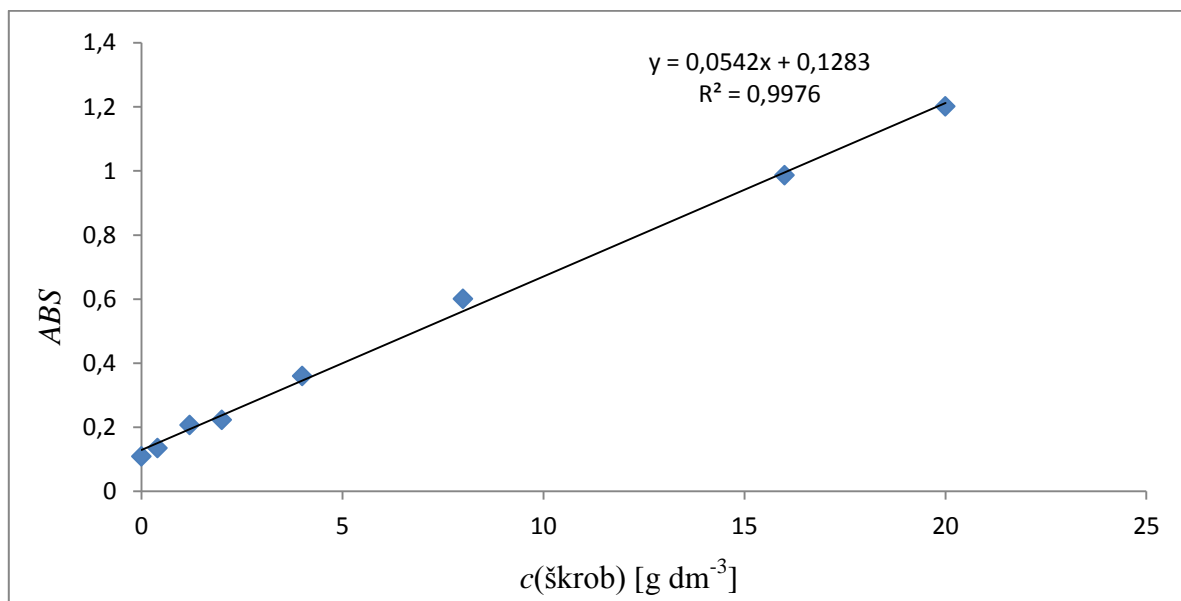
LITERATURA

1. R.A. Copeland: *Enzymes: Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Dana Analysis*; 2nd Ed, Wiley-VCH (2000)
2. P. Karlson: *Biokemija*; Školska knjiga, Zagreb (1984)
3. T. Godfrey, S. West: *Industrial Enzymology*; Stockton Press, New York (1996)
4. H.W. Blanch, D.C. Clark: *Biochemical Engineering*; Taylor & Francis (1997)
5. W.A. Louglin: *Biotransformation in organic syntesis*; Bioresource Technology **74** (2000) 49-62
6. U. Kragl, Đ. Vasić-Rački, C. Wandrey: *Continuous processes with soluble enzymes*; Indian Journal of Chemistry **32B** (1993) 103-117
7. W.D. Fessner, T. Anthonsen: *Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*; Wiley-VCH (2009)
8. V. Bravo Rodriguez, E. Jurado Alameda, F. Martinez Gallegos, A. Reyes Requena, A.I. Garcia Lopez: *Enzymatic Hydrolysis of Soluble Starch with an α -Amylase from Bacillus licheniformis*, Biotechnol.Prog **22** (2006) 718-722
9. D. Tanyolac, B. Isik Yürükosy, A.R. Özdural: *Immobilization of thermostable α -amylase, Termamyl[®], onto nitrocellulose membrane by Cibacron Blue F3GA dye binding*; Biochemical Engineering Journal **2** (1998) 179-186
10. G.F. Bickerstaff: *Immobilization of Enzymes and Cells*; Humana Press (1997)
11. A.S. Bommarius, B.R. Riebel: *Bicatalysis*; Wiley-VCH, Weinheim (2004)
12. J.M. Nelson, E.G. Griffin: *Adsorption of Invertase*; Journal of the American Chemical Society **38** (1916) 1109-1115
13. R. Ahmad, M. Sardar: *Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix*; Biochemistry & Analytical Biochemistry **4** (2015) 1-8
14. M.M. Rahman, S.B. Khan, A. Jamal, M. Faisal, A.M. Aisiri: *Iron Oxide Nanoparticles*; Nanomaterials (2011)
<http://www.intechopen.com/books/nanomaterials/iron-oxide-nanoparticles>
15. M.G. Bellino, A.E. Regazzoni: *Immobilization of enzymes into self-assembled iron(III) hydrous oxide nano-scaffolds: A bio-inspired one-pot approach to hybrid catalysis*; Applied Catalysis A: General **408** (2011) 73-77

16. D.K. Apar, B. Özbek: *Estimation of Kinetic Parameters for Rice Starch Hydrolysis Inhibited by Added Materials*; Chemical Engineering Communications **194** (2007) 334-344
17. C. Aymard, A. Belarbi: *Kinetics of thermal deactivation of enzymes; a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism*; Enzyme and Microbial Technology **27** (2000) 612-618
18. B.W. Smith, J.H. Roe: *A photometric method for the determination of α -amylase in blood and urine, with use of the starch-iodine color*; The Journal of Biological Chemistry **179** (1949) 53-59
19. B.W. Smith, J.H. Roe: *A micromodification of the smith and roe method for the determination of amylase in body fluids*; The Journal of Biological Chemistry **227** (1957) 357-362
20. M.M. Bradford: *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding*; Analytical Biochemistry **72** (1976) 248-254

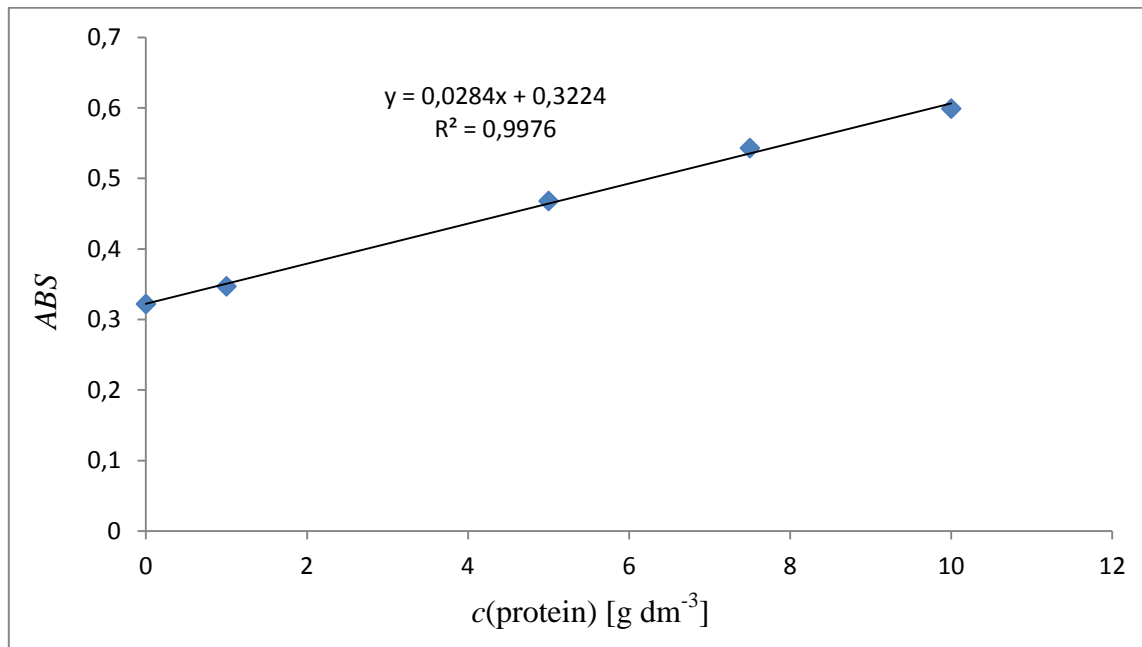
PRILOZI

Prilog 1



Slika 24. Baždarni pravac za određivanje koncentracije škroba

Prilog 2



Slika 25. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina

SAŽETAK

Cilj istraživanja bilo je poboljšanje stabilnosti α -amilaze procesom imobilizacije na nanočestice željezovog (III) oksida. U tu svrhu ispitala se kinetika inaktivacije enzima α -amilaze iz *Bacillus licheniformis*, komercijalnog naziva *Termamyl* uz škrob kao supstrat te uz optimalne uvjete pH (pH = 7) i na tri temperature (60 °C, 70 °C i 80 °C). Inaktivacija enzima je opisana troparametarskim kinetičkim modelom. Nakon toga proveden je postupak imobilizacije te su na temelju praćenja iskorištenja postupka imobilizacije utvrđeni optimalni uvjeti provođenja navedene reakcije uz postignuto maksimalno iskorištenje od 66,6%. Imobilizirana α -amilaza testirana je na navedenim temperaturama kako bi se utvrdila njezina stabilnost poslije imobilizacije.

Ključne riječi: α -amilaza, željezove (III) oksidne nanočestice, inaktivacija, imobilizacija

SUMMARY

The aim of the research was the improvement of stability of α -amylase by immobilization on iron (III) oxide nanoparticles. The kinetics of inactivation of free α -amylase from *Bacillus licheniformis*, commercially named Termamyl, was examined with the starch as a substrate and under optimal conditions of pH (pH=7) at three temperatures (60 °C, 70 °C and 80 °C). The inactivation of the enzyme was described with the three-parameter kinetic model. Afterwards, the immobilization process was carried out and based on the observation of utilization of the immobilization process, the optimal conditions for carrying out the above mentioned reaction were established with the maximum accomplishment of 66,6%. The immobilized α -amylase was tested on the above mentioned temperatures in order to identify its stability after the immobilization.

Key words: α -amylase, iron (III) oxide nanoparticles, inactivation, immobilization

ŽIVOTOPISI

Milica Stevanović rođena je 30. siječnja 1994. u Sarajevu, BiH. Završava Opću realnu gimnaziju Sv. Josip u Sarajevu 2012. godine te upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, studij Primijenjena kemija. 2015. postaje prvostupnica Primijenjene kemije obranom Završnog rada teme "Utjecaj primarnog i sekundarnog katalizatora na emisiju N_2O u proizvodnji HNO_3 " pod mentorstvom dr.sc. Ljubice Matijašević te upisuje diplomski studij na istom fakultetu, modul Specifični materijali i napredne tehnologije. Trenutno je prva godina diplomskog studija. Uz redovno obavljanje studentskih obveza, radi razne studentske poslove te je demonstrirala na Zavodu za fizikalnu kemiju.

Marija Filip rođena je 15. kolovoza 1993. godine u Koprivnici. Završava Gimnaziju dr. Ivana Kranjčeva u Đurđevcu 2012. godine, opći smjer. Te iste godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, studij Primijenjena kemija. Trenutno je treća godina preddiplomskog studija. Aktivno trenira tajlandski boks, mali nogomet i rukomet te je sudjelovala na brojnim sportskim natjecanjima i postigla respektabilne rezultate.

Emerik Leaković rođen je 28. srpnja 1993. godine u Vinkovcima. Osnovnu školu fra Bernardina Tome Leakovića u Bošnjacima završava 2008. Potom upisuje Gimnaziju Županja, u kojoj 2012. godine odličnim uspjehom završava opći smjer. Po završetku srednjoškolskog obrazovanja sudjeluje na projektu razmjene mladih, naziva "Creating better world through connecting our diversities", a iste godine upisuje i preddiplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Nakon druge godine studija dobiva priliku odraditi stručnu praksu u tvrtki Zagrebačke otpadne vode – upravljanje i pogon d.o.o u kojoj stječe iskustvo u radu i snalaženju u poslovnom okruženju, a godinu dana nakon toga odobreno mu je i stručno usavršavanje u istoj tvrtki. 2015. godine obranom završnog rada naziva „Umjetna inteligencija u zaštiti okoliša“ postaje prvostupnik primijenjene kemije, te iste godine upisuje diplomski studij na istom fakultetu.