



Univerza v Mariboru

---

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

Doktorska disertacija

# **VEZAVA ENCIMOV NA POVRŠINSKO MODIFICIRANE MAGNETNE NOSILCE**

marec, 2020

Katja Vasić





Univerza v Mariboru

---

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

Katja Vasić

**VEZAVA ENCIMOV NA POVRŠINSKO MODIFICIRANE  
MAGNETNE NOSILCE**

Doktorska disertacija

Maribor, 2020







Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

# **Vezava encimov na površinsko modificirane magnetne nosilce**

Doktorska disertacija

Študentka:	Katja Vasić, univ. dipl. inž. kem. tehnol.
Študijski program:	doktorski študijski program III. stopnje Kemija in kemijska tehnika
Študijska smer:	Kemijska tehnika
Predvideni znanstveni naslov:	doktorica znanosti
Mentorica:	red. prof. dr. Maja Leitgeb
Komentorica:	doc. dr. Mateja Primožič

Maribor, 2020



## Kazalo

<b>Kazalo</b> .....	<b>I</b>
<b>Zahvala</b> .....	<b>V</b>
<b>Povzetek</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>IX</b>
<b>Seznam tabel</b> .....	<b>XI</b>
<b>Seznam slik</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Uporabljeni simboli in kratice</b> .....	<b>XIX</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1    Opredelevitev problema .....	2
1.2    Doktorska teza .....	3
1.3    Namen in cilji .....	4
<b>2 SINTEZA MAGNETNIH NANODELCEV</b> .....	<b>5</b>
2.1    Kemijske lastnosti MNPs .....	5
2.2    Sinteza MNPs .....	9
2.2.1    Kemijska koprecipitacija .....	10
2.3    Površinska funkcionalizacija MNPs .....	11
2.3.1    Površinska funkcionalizacija z organskimi materiali .....	13
2.3.1.1    Molekule in surfaktanti .....	14
2.3.1.1.1    Aminosilan .....	15
2.3.1.1.2    Polimeri .....	16
2.3.1.1.2.1    Dekstran .....	17
2.3.1.1.2.2    Hitozan .....	18
2.3.2    Površinska funkcionalizacija z anorganskimi materiali .....	19
2.4    Uporaba MNPs .....	21
2.4.1 <i>In vivo</i> .....	21
2.4.2 <i>In vitro</i> .....	22
2.5    Toksičnost MNPs .....	23
2.5.1    Inhibitorne lastnosti MNPs .....	23
2.6    Eksperimentalni del .....	24
2.6.1    Materiali in reagenti .....	24
2.6.2    Laboratorijska oprema in aparature .....	25
2.6.3    Eksperimentalne metode .....	26
2.6.3.1    Priprava CMD raztopin .....	26
2.6.3.2    Sinteza CMD-MNPs .....	26
2.6.3.3    Sinteza HIT-MNPs .....	27
2.6.3.4    Sinteza AMS-MNPs .....	27

2.6.4	Analizne metode .....	27
2.6.4.1	Fourier-transformirana infrardeča spektroskopija (FT-IR) .....	27
2.6.4.2	Termogravimetrična analiza (TGA) .....	27
2.6.4.3	Vrstična elektronska mikroskopija (SEM) .....	28
2.6.4.4	Energijsko disperzijska spektroskopija (EDS) .....	28
2.6.4.5	Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) .....	28
2.6.4.6	Meritve dinamičnega sipanja svetlobe (DLS) .....	28
2.6.4.7	Elektronska paramagnetna resonanca (EPR).....	28
2.6.4.8	Magnetne meritve .....	29
2.6.5	Določevanje inhibitornih lastnosti .....	29
2.6.5.1	Določevanje inhibitornih lastnosti CMD-MNPs .....	29
2.6.5.1.1	Določevanje začetnih koncentracij mikrobnih kultur .....	30
2.6.5.2	Določevanje inhibitornih lastnosti HIT-MNPs.....	32
2.7	Rezultati in diskusija.....	33
2.7.1	Sinteza CMD-MNPs .....	33
2.7.2	Karakterizacija CMD-MNPs.....	33
2.7.2.1	FT-IR .....	33
2.7.2.2	TGA .....	34
2.7.2.3	SEM in EDS .....	36
2.7.2.4	TEM.....	38
2.7.2.5	DLS meritve (hidrodinamični premer, polidisperzni indeks (PdI) in ζ-potencial (ZP)).....	39
2.7.2.6	EPR.....	41
2.7.2.7	VSM.....	43
2.7.3	Določevanje inhibitornih lastnosti .....	44
2.7.3.1	CMD-MNPs.....	44
2.7.3.2	HIT-MNPs .....	46
2.8	Zaključek študije karakterizacije različnih CMD-MNPs.....	49
<b>3</b>	<b>IMOBILIZACIJA ENCIMOV NA MAGNETNE NANODELCE.....</b>	<b>51</b>
3.1	Metode imobilizacije.....	51
3.1.1	Adsorpcija .....	52
3.1.2	Zamreženje.....	52
3.1.3	Ujetje.....	53
3.1.4	Kovalentna vezava .....	54
3.1.4.1	ECIH .....	56
3.1.4.2	GA.....	57

3.2	Encimi.....	58
3.2.1	ADH.....	58
3.2.2	$\beta$ -GAL.....	60
3.2.3	Encimska kinetika.....	62
3.3	Eksperimentalni del .....	64
3.3.1	Materiali in reagenti.....	64
3.3.2	Laboratorijska oprema in aparature .....	65
3.3.3	Eksperimentalne metode.....	65
3.3.3.1	Priprava epoksi-zamreževalca ECIH.....	65
3.3.3.2	Imobilizacija ADH na CMD3-MNPs.....	66
3.3.3.3	Koimobilizacija ADH in $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs.....	66
3.3.3.4	Termična stabilnost .....	67
3.3.3.4.1	Termična stabilnost imobilizirane ADH.....	67
3.3.3.4.2	Termična stabilnost koimobilizirane ADH.....	67
3.3.3.5	Stabilnost imobilizirane in koimobilizirane ADH pri 4 °C.....	67
3.3.3.5.1	Stabilnost imobilizirane ADH.....	68
3.3.3.5.2	Stabilnost koimobilizirane ADH.....	68
3.3.3.6	Eksperimentalna določitev $K_M$ in $v_{max}$ prosti, imobilizirani in koimobilizirani ADH.....	68
3.3.3.7	Imobilizacija $\beta$ -GAL na HIT-MNPs in AMS-MNPs.....	68
3.3.4	Analizne metode .....	69
3.3.4.1	Aktivnostni test za ADH .....	69
3.3.4.2	Aktivnostni test za $\beta$ -GAL .....	72
3.3.4.3	Določevanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi za izračun učinkovitosti imobilizacije.....	74
3.4	Rezultati in diskusija.....	76
3.4.1	Površinska funkcionalizacija modificiranega nosilca CMD3-MNPs za vezavo encima ADH.....	76
3.4.1.1	Vpliv koncentracije epoksi-zamreževalca ECIH.....	76
3.4.2	Vpliv procesnih parametrov na imobilizacijo ADH na CMD3-MNPs .....	78
3.4.2.1	Vpliv temperature.....	78
3.4.2.2	Vpliv rotacijske hitrosti .....	79
3.4.2.3	Vpliv pH vrednosti medija .....	80
3.4.2.4	Vpliv časa imobilizacije .....	81
3.4.2.5	Vpliv koncentracije encima.....	82

3.4.3	Vpliv procesnih parametrov na koimobilizacijo ADH in $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs	84
3.4.3.1	Vpliv mase CMD3-MNPs	84
3.4.3.2	Zaporedje koimobilizacije	85
3.4.3.3	Vpliv koncentracije kofaktorja $\beta$ -NAD	87
3.4.3.4	Vpliv časa koimobilizacije	88
3.4.3.5	Vpliv temperature koimobilizacije	89
3.4.3.6	Vpliv časa funkcionalizacije CMD3-MNPs	90
3.4.3.7	Vpliv koncentracije ADH	91
3.4.3.8	Vpliv mase CMD3-MNPs pri optimalni koncentraciji encima ADH	92
3.4.4	Termična stabilnost imobilizirane in koimobilizirane ADH	93
3.4.4.1	Termična stabilnost imobilizirane ADH	94
3.4.4.2	Termična stabilnost koimobilizirane ADH	95
3.4.5	Stabilnost imobilizirane in koimobilizirane ADH pri 4 °C	96
3.4.5.1	Stabilnost imobilizirane ADH	96
3.4.5.2	Stabilnost koimobilizirane ADH	97
3.4.5.3	Določevanje encimskih kinetičnih parametrov $K_M$ in $v_{max}$	98
3.4.6	Imobilizacija $\beta$ -GAL na HIT-MNPs in AMS-MNPs	99
3.4.6.1	Imobilizacija $\beta$ -GAL na HIT-MNPs	99
3.4.6.2	Imobilizacija $\beta$ -GAL na AMS-MNPs	102
3.5	Zaključek študije imobilizacije encimov na magnetne nosilce	106
<b>4</b>	<b>ZAKLJUČEK</b>	<b>109</b>
<b>5</b>	<b>Literatura</b>	<b>115</b>
<b>6</b>	<b>Priloge</b>	<b>134</b>
6.1	Priloga 1	134
6.2	Priloga 2	135
6.3	Priloga 3	136
6.4	Priloga 4	137
6.5	Priloga 5	142
6.6	Priloga 6	146
<b>7</b>	<b>Življenjepis</b>	<b>148</b>
	<b>Izjava doktorskega kandidata</b>	<b>151</b>
	<b>Bibliografija kandidata</b>	<b>152</b>
	<b>Izjava o avtorstvu in istovetnosti tiskane in elektronske oblike doktorske disertacije</b>	<b>161</b>

“Kar se naučimo iz življenja v znanosti, je prostranost naše nevednosti.”

David Eagleman

## Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici, red. prof. dr. Maji Leitgeb, in somentorici, doc. dr. Mateji Primožič, za vso strokovno pomoč, vodenje in koristne nasvete v času raziskovalnega dela in nastajanja doktorskega dela kot tudi za vso podporo in vzpodbude.

Najlepše se zahvaljujem tudi red. prof. dr. Željku Knezu in vsem sodelavcem Laboratorija za separacijske procese in produktno tehniko Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru za pomoč, nasvete ter prijetne trenutke.

Nenazadnje se zahvaljujem mami in očetu, ki sta mi omogočila študij, me vseskozi podpirala in me s svojim zgledom še vedno učita, kaj je v življenju zares pomembno. Hvala tudi celotni širši družini za vse vzpodbude in pomoč. Hvala možu in najinemu malemu čudežu za ljubezen, podporo, predvsem pa potrpežljivost.

Vsem iskrena hvala.

Katja





## Povzetek

Doktorska disertacija zajema dva sklopa. V prvem sklopu smo se osredotočili na sintezo magnetnega nosilca, modificiranega z organskim polimerom karboksimetil dekstranom (CMD). V sintezni postopek smo vpeljali tri različne koncentracije CMD (0,25 g/mL, 0,40 g/mL in 0,50 g/mL CMD) ter na osnovi koncentracij sintetizirali tri vrste različnih modificiranih magnetnih nanodelcev (CMD1-MNPs, CMD2-MNPs in CMD3-MNPs). Sintetizirane CMD-MNPs smo okarakterizirali z različnimi analiznimi metodami: Fourier-transformirano infrardečo spektroskopijo (FT-IR), termogravimetrično analizo (TGA), vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM), energijsko disperzijsko spektroskopijo (EDS), transmisijsko elektronsko mikroskopijo (TEM) in z meritvami dinamičnega sipanja svetlobe (DLS). Magnetne lastnosti smo določili z elektronsko paramagnetno resonanco (EPR) in vibracijskim magnetometrom (VSM). Karakterizacijo smo izvedli tudi za neprevlečene magnetne nanodelce (neprevlečeni MNPs). Uspešno smo sintetizirali magnetne nosilce CMD-MNPs z ozkimi porazdelitvami nanovelikosti od 27 nm do 30 nm. S FT-IR analizo smo določili prisotnost karboksilnih in hidroksilnih skupin na površini CMD-MNPs, kar potrjuje prisotnost polimerne prevleke CMD na sintetiziranih MNPs. Z meritvami EPR in VSM smo dokazali, da imajo sintetizirani CMD-MNPs magnetne lastnosti ter feromagnetni sistem. Določili smo inhibitorne lastnosti CMD-MNPs na rast dveh bakterijskih kultur, *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*. Inhibitorne učinke na rast testnih mikroorganizmov smo zaznali pri CMD3-MNPs, medtem ko ostali CMD-MNPs in neprevlečeni MNPs ne izkazujejo antimikrobne učinkovitosti. Proučevali smo tudi inhibitorne lastnosti MNPs, modificiranih s hitozanom (HIT-MNPs) in aminosilanom (AMS-MNPs) na petih različnih bakterijskih kulturah, *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* in *Klebsiella pneumoniae*. Pri nobenem testiranem vzorcu nismo zaznali inhibiornega učinka na rast izbranih mikroorganizmov. Na osnovi dobljenih rezultatov smo za nadaljnje raziskave izbrali CMD3-MNPs. Nanj smo vezali encim alkohol dehidrogenazo (ADH) iz kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.

V drugem sklopu doktorske disertacije smo nosilec CMD3-MNPs površinsko funkcionalizirali z epiklorohidrinom (ECH). Aktivne epoksi skupine na površini CMD3-MNPs so služile za kovalentno vezavo ADH. Optimalna koncentracija ECH, pri kateri smo dosegli najvišjo aktivnost imobilizirane ADH, je znašala 4 % (v/v). Prav tako smo proučevali vpliv različnih procesnih parametrov (temperature, rotacijske hitrosti, pH vrednosti medija, časa imobilizacije in koncentracije encima) na aktivnost in učinkovitost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs. Pri optimalnih pogojih imobilizacije ADH na CMD3-MNPs smo dosegli 89,6 % preostalo aktivnost imobilizirane ADH in 99,5 % učinkovitost imobilizacije. Nadaljevali smo s postopkom koimobilizacije, pri čemer smo na funkcionaliziran nosilec CMD3-MNPs koimobilizirali encim ADH in kofaktor  $\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotid ( $\beta$ -NAD). S spreminjanjem procesnih parametrov (mase CMD3-MNPs, zaporedja koimobilizacije, koncentracije kofaktorja, vpliva časa in temperature imobilizacije, časa funkcionalizacije CMD3-MNPs ter koncentracije encima ADH) smo proučevali njihov vpliv na aktivnost koimobilizirane ADH s kofaktorjem  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs in učinkovitost koimobilizacije. Pri optimalnih pogojih koimobilizacije

ADH in  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs smo dosegli 73,3 % preostalo aktivnost ADH ter 93,8 % učinkovitost imobilizacije.

Izvedli smo tudi študijo termične stabilnosti proste ADH, ADH imobilizirane na CMD3-MNPs in ADH koimobilizirane z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs pri različnih temperaturah. V primerjavi s prosto ADH je ADH imobilizirana na CMD3-MNPs ohranila skoraj 60 % svoje začetne aktivnosti po 24 urah inkubacije pri temperaturah 20 °C in 40 °C. Aktivnost proste ADH se je po 24 urah inkubacije pri 20 °C znižala za polovico, pri 40 °C pa je bila dosežena popolna inkativacija proste ADH že po 5 urah. ADH, koimobilizirana z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs je pri temperaturi 30 °C ohranila 75,4 % začetne aktivnosti po 5 urah inkubacije, pri 50 °C in 5 urah inkubacije pa je ohranila 66,5 % začetne aktivnosti. Aktivnost proste ADH je po 5 urah inkubacije pri 50 °C znašala le 6 %. Proučili smo tudi stabilnost ADH imobilizirane na CMD3-MNPs in ADH koimobilizirane z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs, ki smo ju skladiščili pri 4 °C. Po treh tednih sta obe obliki imobilizirane ADH ohranili kar 60 % svoje začetne aktivnosti. Z uspešno imobilizacijo in koimobilizacijo encimov na ustrezno modificirane in visoko funkcionalizirane MNPs smo zagotovili stabilnost visoko aktivnega encima. Prosti, imobilizirani in koimobilizirani ADH smo določili kinetične parametre, Michaelis-Mentenovo konstanto ( $K_M$ ) in maksimalno reakcijsko hitrost ( $v_{max}$ ).

Nadaljevali smo s postopkom imobilizacije, tokrat na izbrane magnetne nosilce, modificirane s hitozanom (HIT-MNPs) in aminosilanom (AMS-MNPs) na katere smo imobilizirali encim  $\beta$ -galaktozidazo ( $\beta$ -GAL). Magnetne nosilce HIT-MNPs in AMS-MNPs smo funkcionalizirali z mrežnim povezovalcem glutaraldehidom (GA) in amino-donorjem pentaetilenheksaminom (PEHA), s katerima smo dosegli visoko funkcionalno površino izbranih MNPs. Na tako funkcionalizirane MNPs smo imobilizirali encim  $\beta$ -GAL iz glive *Aspergillus oryzae* ter optimirali koncentraciji GA in PEHA. Pri funkcionalizaciji HIT-MNPs z 1 % (v/v) GA smo dosegli le 42,9 % preostale aktivnosti  $\beta$ -GAL, pri 40 % (v/v) PEHA pa kar 98,2 % preostale aktivnosti  $\beta$ -GAL. Pri kombinaciji obeh, GA in PEHA, smo dosegli hiperaktivacijo encima (128,9 %), do katere pride zaradi konformacijskih sprememb encima. Hiperaktivacijo smo dosegli tudi pri imobilizaciji  $\beta$ -GAL na AMS-MNPs. Najvišjo preostalo aktivnost  $\beta$ -GAL smo dosegli, kadar smo kot mrežni povezovalec uporabili 20 % (v/v) PEHA (154,4 %). Visoko preostalo aktivnost  $\beta$ -GAL smo dosegli tudi ob dodatku 2,5 % (v/v) GA (137,7 %) ter pri kombinaciji 2 % (v/v) GA in 30 % (v/v) PEHA (124,5 %).

**Ključne besede:** magnetni nanodelci, karboksimetil dekstran, karakterizacijska analiza, funkcionalizacija, epoksi zamreževanje, epiklorohidrin, glutaraldehid, encimi, imobilizacija, koimobilizacija, alkohol dehidrogenaza, kinetični parametri,  $\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotid,  $\beta$ -galaktozidaza

**UDK:** 543.645.4620.3(043.3)

## Abstract

Doctoral thesis consists of two parts, in the first part synthesis of magnetic carrier and modification with organic polymer carboxymethyl dextran (CMD) was performed. Three different CMD concentrations were applied into the synthesis process (0,25 g/mL, 0,40 g/mL in 0,50 g/mL CMD), which resulted in three different modified magnetic carriers (CMD1-MNPs, CMD2-MNPs and CMD3-MNPs). All CMD-MNPs were characterized with various analytical methods: Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), thermogravimetric analysis (TGA), scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive x-ray spectroscopy (EDX), transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS). Magnetic properties were analyzed with electron paramagnetic resonance (EPR) and magnetization measurements with vibrating sample magnetization (VSM) and compared to uncoated magnetic nanoparticles (uncoated MNPs). Based on characterization results, CMD-MNPs were successfully synthesized with average diameters from 27 nm to 30 nm and size distribution revealed the most consistent sizes of CMD3-MNPs. Hydroxyl and carboxyl groups were confirmed on the CMD-MNPs surface, which corresponds to hydroxy and carboxyl groups of CMD, therefore confirms the presence of CMD layer on the surface of synthesized CMD-MNPs. EPR and VSM measurements confirmed magnetic properties of all CMD-MNPs and a ferromagnetic system. Later on, inhibition properties were determined of all CMD-MNPs on two different bacterial cultures, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, where CMD3-MNPs displayed inhibition zone, confirming antimicrobial properties, whereas with other CMD-MNPs no inhibition was detected. Toxicity was also determined on MNPs coated with chitosan (HIT-MNPs) and aminosilane (AMS-MNPs) on five different bacterial cultures, *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Klebsiella pneumoniae*, where no inhibition was detected. After detailed characterization and investigation of inhibition properties, modified CMD-MNPs were successfully synthesized as nano-carriers, and CMD3-MNPs was chosen for further investigation of enzyme immobilization in the second part of doctoral thesis, because of its most favourable properties.

In second part of doctoral thesis nano-carrier CMD3-MNPs was surface functionalized with epoxy cross-linking, where epoxy cross-linker epichlorohydrin (ECH) was used to provide additional functional epoxy groups to covalently bind enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) from *Saccharomyces cerevisiae*. With optimization of process parameters ECH with 4 % (v/v) was used, which resulted in the highest residual activity of immobilized ADH. Epoxy-functionalized CMD3-MNPs were used in immobilization protocol, where effect of process parameters was investigated on residual activity and immobilization efficiency of ADH. Effect of immobilization temperature, rotation speed, pH of medium, time of immobilization and enzyme concentration were investigated. After successful optimization ADH immobilized onto CMD3-MNPs managed to obtain 89,6 % of residual activity and 99,5 % of immobilization efficiency. Further on, co-immobilization of enzyme ADH and cofactor  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide ( $\beta$ -NAD) was performed. Again, effect of process parameters (amount of CMD3-MNPs, sequence of co-immobilization, cofactor

concentration, time and temperature of co-immobilization. time of functionalization of CMD3-MNPs and enzyme concentration) on residual activity and immobilization efficiency of co-immobilization were investigated. After successful optimization, ADH co-immobilized with  $\beta$ -NAD onto CMD3-MNPs managed to obtain 73,3 % of residual activity and 93,8 % of immobilization efficiency.

With detailed immobilization and co-immobilization protocol of enzymes onto properly modified and functionalized CMD3-MNPs highly stable and active ADH was achieved and further investigated for its thermal stability at different temperatures. Compared to free ADH, ADH immobilized onto CMD3-MNPs obtained almost 60 % of its initial activity after 24 hours at 20 °C and 40 °C, while free ADH at 20 °C lost almost half of its initial activity and was completely inactive at 40 °C after just 5 hours. ADH co-immobilized with  $\beta$ -NAD onto CMD3-MNPs managed to obtain 75,4 % of its initial activity after 5 hours at 30 °C and 66,5 % of its initial activity after 5 hours at 50 °C. Free ADH obtained only 6 % of its initial activity after 5 hours at both temperatures. Storage stability of ADH immobilized onto CMD3-MNPs and ADH co-immobilized with  $\beta$ -NAD onto CMD3-MNPs were investigated at 4 °C, where both obtained almost 60 % of its initial activity after three weeks. Kinetic parameters Michaelis-Menten constant ( $K_M$ ) and maximum reaction velocity ( $v_{max}$ ) were determined for free, immobilized and co-immobilized ADH.

Immobilization protocols were continued, where enzyme  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -GAL) was immobilized onto selected magnetic carriers, modified with chitosan (HIT-MNPs) and aminosilane (AMS-MNPs). Magnetic carriers HIT-MNPs and AMS-MNPs were functionalized with cross-linker glutaraldehyde (GA) and amino-donor pentaethylenehexamine (PEHA), with which highly functionalized MNPs were obtained. So functionalized HIT-MNPs and AMS-MNPs were immobilized with enzyme  $\beta$ -GAL from fungus *Aspergillus oryzae* and residual activities and immobilization efficiencies were determined. After optimization of GA and PEHA concentrations, 42,9 % of residual activity was achieved when immobilizing  $\beta$ -GAL onto HIT-MNPs functionalized with 1 % (v/v) GA. With 20 % (v/v) PEHA 98,2 % of residual activity was achieved. When using combination of 0,5 % (v/v) GA and 30 % (v/v) PEHA 128,9 % of residual activity was achieved, which resulted in hyper-activation of enzyme due to its conformational changes. Hyper-activation was achieved also with immobilizing  $\beta$ -GAL onto AMS-MNPs and the highest residual activities were obtained with 2,5 % (v/v) of GA (137,7 %), with 20 % (v/v) of PEHA (154,4 %) and with combination of 2 % (v/v) of GA and 30 % (v/v) of PEHA (124,5).

**Keywords:** magnetic nanoparticles, modification, carboxymethyl dextran, characterization analysis, functionalization, epoxy cross-linking, epichlorohydrin, glutaraldehyde, enzyme, immobilization, co-immobilization, alcohol dehydrogenase, kinetic parameters,  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide,  $\beta$ -galactosidase

**UDK:** 543.645.4620.3(043.3)

## Seznam tabel

Tabela 2-1: Nekatere fizikalne in magnetne lastnosti železovih oksidov [50].....	5
Tabela 2-2: Različni postopki za pripravo in površinsko modifikacijo MNPs glede na velikost delcev [96].....	12
Tabela 2-3: Organske makromolekule in njihove prednosti pri funkcionalizaciji MNPs [67] .....	16
Tabela 2-4: Hranilni medij za gojenje <i>E. coli</i> .....	29
Tabela 2-5: Hranilni medij za gojenje <i>S. aureus</i> .....	29
Tabela 2-6: EDS analiza vzorca CMD3-MNPs.....	37
Tabela 2-7: Hidrodinamična velikost in PdI vseh CMD-MNPs in neprevlečenih MNPs.....	39
Tabela 2-8: EPR parametri vzorcev.....	43
Tabela 2-9: Inhibicija rasti <i>E. coli</i> in <i>S. aureus</i> .....	46
Tabela 3-1: Prednosti in slabosti imobilizacijskih metod [214].....	51
Tabela 3-2: Aktivatorji pri kovalentni aktivaciji hidroksilnih skupin nosilca [214].....	55
Tabela 3-3: Polimeri za aktivacijo funkcionalnih skupin [214] .....	55
Tabela 3-4: Koncentracije GA, PEHA in GA/PEHA pri imobilizaciji $\beta$ -GAL na HIT-MNPs .....	68
Tabela 3-5: Koncentracije GA, PEHA in GA/PEHA pri imobilizaciji $\beta$ -GAL na AMS-MNPs .....	69
Tabela 3-6: Zaporedje in količina dodanih reagentov za izvedno aktivnostnega testa za ADH .....	71
Tabela 3-7: Zaporedje in količina dodanih reagentov za izvedno aktivnostnega testa za $\beta$ -GAL .....	73
Tabela 3-8: Kinetični parametri za prosto, imobilizirano in koimobilizirano ADH .....	99
Tabela 4-1: Optimalni procesni parametri pri imobilizaciji encima ADH.....	110
Tabela 4-2: Preostala aktivnost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs pred in po optimizaciji procesnih parametrov.....	110
Tabela 4-3: Optimalni procesni parametri pri koimobilizaciji encima ADH in kofaktorja $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs .....	111
Tabela 4-4: Preostala aktivnost ADH koimobilizirane z $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs pred in po optimiranju procesnih parametrov .....	111
Tabela 4-5: Termična stabilnost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs po 24 urah inkubacije pri različnih temperaturah in imobilizirane ADHs koencimom $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs po 5 urah inkubacije pri različnih temperaturah .....	112
Tabela 4-6: Kinetični parametri za prosto, imobilizirano in koimobilizirano ADH .....	112

Tabela 4-7: Najvišje preostale aktivnosti po optimiranih volumskih deležih GA in PEHA pri imobilizaciji  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs in AMS-MNPs .....113

## Seznam slik

Slika 2-1: Kristalna struktura hematita, magnetita in maghemita [52].....	6
Slika 2-2: <i>M-H</i> krivulje za feromagnetni material [58] .....	7
Slika 2-3: Poravnava magnetnih momentov posameznih ionov v železu .....	8
Slika 2-4: Shematski prikaz sinteznih metod MNPs [96].....	10
Slika 2-5: Funkcionalne skupine na površini MNPs za vezavo različnih biomolekul [112]..	12
Slika 2-6: Različne strukture MNPs funkcionaliziranih z organskimi materiali [67] .....	13
Slika 2-7: Kemijska struktura oleinske in citronske kisline .....	14
Slika 2-8: Stabilizacija MNPs z adsorpcijo surfaktanta (citronske ali oleinske kisline) .....	15
Slika 2-9: Strukturna formula APTES in APTMS [128].....	15
Slika 2-10: Fizikalno-kemijski mehanizem modifikacije MNPs s silanom [67].....	16
Slika 2-11: Struktura dekstrana (a) in ponavljajoča se enota polimerne verige dekstrana (b)	17
Slika 2-12: Reakcija hidroksilnih skupin dekstrana z monokloroocetno kislino, pri čemer nastane CMD [112].....	18
Slika 2-13: Struktura hitozana pri različnih pH [23] .....	19
Slika 2-14: Funkcionalizirani silika delci z APTS [128].....	20
Slika 2-15: Tarčna dostava učinkovin [172].....	21
Slika 2-16: Poenostavljen shematski prikaz magnetne separacije [170] .....	22
Slika 2-17: Postopek priprave CMD-MNPs v trivratnem reaktoru pod N <sub>2</sub> atmosfero.....	26
Slika 2-18: Pripravljeni neprevlečeni MNPs (a), CMD1-MNPs (b), CMD2-MNPs (c) in CMD3-MNPs (d) na bakterijski kulturi <i>E. coli</i> pred inkubacijo .....	31
Slika 2-19: Pripravljeni neprevlečeni MNPs (a), CMD1-MNPs (b), CMD2-MNPs (c) in CMD3-MNPs (d) na bakterijski kulturi <i>S. aureus</i> pred inkubacijo.....	31
Slika 2-20: Neprevlečeni MNPs (a), HIT-MNPs po postopku mikroemulzije (b), HIT-MNPs po postopku suspenzijske zamreževalne tehnike (c) in HIT-MNPs po postopku kovalentne vezave (d) na bakterijski kulturi <i>E. coli</i> pred inkubacijo.....	32
Slika 2-21: FT-IR spektri vzorcev CMD1-MNPs, CMD2-MNPs, CMD3-MNPs, neprevlečenih MNPs in čistega polimera CMD .....	34
Slika 2-22: TGA krivulje CMD1-MNPs (a), CMD2-MNPs (b), CMD3-MNPs (c), CMD (d) .....	35
Slika 2-23: SEM vzorcev CMD1-MNPs (a), CMD2-MNPs (b), CMD3-MNPs (c), neprevlečenih MNPs (d).....	36
Slika 2-24: Porazdelitev velikosti delcev CMD1-MNPs (a), CMD2-MNPs (b), CMD3-MNPs (c) in neprevlečenih MNPs (d) .....	37
Slika 2-25: EDS elementarna analiza vzorca CMD3-MNPs.....	38

Slika 2-26: TEM posnetki neprevlečenih MNPs (a) in CMD3-MNPs (b). Izseki posameznega TEM posnetka so visoko ločljive resolucije posameznih MNPs.....	38
Slika 2-27: Hidrodinamični premer vseh CMD-MNPs in neprevlečenih MNPs, izražen z razmerjem velikost/število delcev.....	40
Slika 2-28: $\zeta$ -potencial neprevlečenih MNPs, CMD1-MNPs, CMD2-MNPs in CMD3-MNPs predstavljen v grafu (a) in kot povprečna vrednost treh zaporednih meritev .....	41
Slika 2-29: EPR spekter vseh CMD1-MNPs (1), CMD2-MNPs (2), CMD3-MNPs (3) in naprevlečenih MNPs (4) pri 25 °C (prekinjena linija) in pri -196 °C (neprekinjena linija) ..	42
Slika 2-30: Magnetizacijske krivulje izmerjene pri sobni temperaturi vzorcev CMD1-MNPs, CMD2-MNPs, CMD3-MNPs in neprevlečenih MNPs.....	44
Slika 2-31: Neprevlečeni MNPs (a), CMD1-MNPs (b), CMD2-MNPs (c) in CMD3-MNPs (d) na bakterijski kulturi <i>E. coli</i> po inkubaciji. Inhibicijska cona prikazana na vzorcu CMD3-MNPs (d).....	45
Slika 2-32: Neprevlečeni MNPs (a), CMD1-MNPs (b), CMD2-MNPs (c) in CMD3-MNPs (d) na bakterijski kulturi <i>S. aureus</i> po inkubaciji. Inhibicijska cona prikazana na vzorcu CMD3-MNPs (d) .....	45
Slika 2-33: Neprevlečeni MNPs (a), HIT-MNPs po postopku mikroemulzije (b), HIT-MNPs po postopku suspenzijske zamreževalne tehnike (c) in HIT-MNPs po postopku kovalentne vezave (d) na bakterijski kulturi <i>E. coli</i> po inkubaciji .....	47
Slika 2-34: Neprevlečeni MNPs (1), HIT-MNPs po postopku mikroemulzije (2), HIT-MNPs po postopku suspenzijske zamreževalne tehnike (3) in HIT-MNPs po postopku kovalentne vezave (4) na bakterijskih kulturah <i>S. aureus</i> (a), <i>P. aeruginosa</i> (b), <i>E. faecalis</i> (c) in <i>K. pneumoniae</i> (d) na krvnem agarju po inkubaciji .....	48
Slika 3-1: Shematski prikaz adsorpcije encima na nosilec .....	52
Slika 3-2: Shematski prikaz zamreženja encimskih skupkov .....	53
Slika 3-3: Shematski prikaz ujetja (a) in enkapsulacije (b) encima .....	54
Slika 3-4: Shematski prikaz kovalentne vezave encima na nosilec .....	54
Slika 3-5: Mehanizem imobilizacije encimov na epoksi aktivirane nosilce [226] .....	56
Slika 3-6: Večtočkovna imobilizacija encimov na amino-epoksi funkcionalizirane nosilce [226].....	57
Slika 3-7: Zamreženje GA z encimi [214] .....	58
Slika 3-8: 3D struktura encima ADH.....	59
Slika 3-9: Reakcijski shemi oksidacije primarnega alkohola in redukcije aldehida (a) in sekundarnega alkohola in redukcije ketona (b), ki ju katalizira ADH.....	60
Slika 3-10: Hidroliza $\beta$ -D-galaktozida do galaktoze.....	60
Slika 3-11: 3D struktura encima $\beta$ -GAL.....	61
Slika 3-12: Graf hitrosti encimsko katalizirane reakcije v odvisnosti od koncentracije substrata .....	62



Slika 3-13: Lineweaver-Burkov diagram .....	63
Slika 3-14: Pretvorba etanola v acetaldehid ob prisotnosti encima ADH .....	69
Slika 3-15: Pretvorba ONPG v ONP ob prisotnosti encima $\beta$ -GAL .....	72
Slika 3-16: Shematski prikaz reakcije določevanja koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi [243].....	74
Slika 3-17: Vpliv koncentracije epoksi zamreževalca ECIH na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs (pri pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 1 ura funkcionalizacije, 2 uri imobilizacije, pH 7,5, 22 °C, 300 rpm, 0,02 mg/mL ADH).....	77
Slika 3-18: Vpliv temperature imobilizacije na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs (pri pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 2 uri imobilizacije, pH 7,5, 300 rpm, 0,02 mg/mL ADH) .....	78
Slika 3-19: Vpliv rotacijske hitrosti na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs (pri pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 2 uri imobilizacije, pH 7,5, 4 °C, 0,02 mg/mL ADH) .....	79
Slika 3-20: Vpliv pH na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs (pri pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 2 uri imobilizacije, 4 °C, 500 rpm, 0,02 mg/mL ADH).....	81
Slika 3-21: Vpliv časa imobilizacije na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs (pri pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 4 °C, pH 7,5, 500 rpm, 0,02 mg/mL ADH) .....	82
Slika 3-22: Vpliv koncentracije encima na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs (pri pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 2 uri imobilizacije, 4 °C, pH 7,5, 500 rpm).....	83
Slika 3-23: Vpliv mase CMD3-MNPs na preostalo aktivnost in učinkovitost koimobilizirane ADH z $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri pogojih: 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 15 mM $\beta$ -NAD, 0,02 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm) .....	85
Slika 3-24: Vpliv zaporedja koimobilizacije na preostalo aktivnost in učinkovitost koimobilizirane ADH z $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri pogojih: 40 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 15 mM $\beta$ -NAD, 0,02 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm)..	86
Slika 3-25: Vpliv koncentracije $\beta$ -NAD na preostalo aktivnost in učinkovitost koimobilizirane ADH z $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri pogojih: 40 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 0,02 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm) .....	87
Slika 3-26: Vpliv časa koimobilizacije na preostalo aktivnost in učinkovitost koimobilizirane ADH z $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri pogojih 40 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 20 mM $\beta$ -NAD, 0,02 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm).....	89
Slika 3-27: Vpliv temperature koimobilizacije na preostalo aktivnost in učinkovitost koimobilizirane ADH z $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri pogojih 40 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 20 mM $\beta$ -NAD, 0,02 mg/mL ADH, 350 rpm).....	90

Slika 3-28: Vpliv časa aktivacije CMD3-MNPs na preostalo aktivnost in učinkovitost koimobilizirane ADH z $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri pogojih: 40 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 20 mM $\beta$ -NAD, 0,02 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm).....	91
Slika 3-29: Vpliv koncentracije ADH na preostalo aktivnost in učinkovitost koimobilizirane ADH z $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri pogojih: 40 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 2 uri funkcionalizacije, 20 mM $\beta$ -NAD, 22 °C, 350 rpm) .....	92
Slika 3-30: Vpliv mase CMD3-MNPs pri 0,01 mg/mL ADH na preostalo aktivnost in učinkovitost koimobilizirane ADH z $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri pogojih: 40 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 2 uri funkcionalizacije, 20 mM $\beta$ -NAD, 0,01 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm).....	93
Slika 3-31: Termična stabilnost proste in imobilizirane ADH na CMD3-MNPs (pri optimiranih pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 1 ura funkcionalizacije s 4 % (v/v) ECIH, 0,02 mg/mL ADH, pH 7,5, 4 °C, 500 rpm) .....	94
Slika 3-32: Termična stabilnost proste in koimobilizirane ADH z $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri optimiranih pogojih: 40 mg CMD3-MNPs, 2 uri funkcionalizacije s 4 % (v/v) ECIH, 20 mM $\beta$ -NAD, 0,01 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm) .....	95
Slika 3-33: Vpliv časa skladiščenja imobilizirane ADH na CMD3-MNPs (pri optimiranih pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 1 ura funkcionalizacije s 4 % (v/v) ECIH, 0,02 mg/mL ADH, pH 7,5, 4 °C, 500 rpm) pri 4 °C na njeno stabilnost.....	96
Slika 3-34: Vpliv časa skladiščenja ADH koimobilizirane z $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri optimiranih pogojih: 40 mg CMD3-MNPs, 2 uri funkcionalizacije s 4 % (v/v) ECIH, 20 mM $\beta$ -NAD, 0,01 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm) pri 4 °C na stabilnost ADH.....	97
Slika 3-35: Lineweaver-Burkov diagram za prosto, imobilizirano in koimobilizirano ADH	98
Slika 3-36: Vpliv GA na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane $\beta$ -GAL na HIT-MNPs (pri pogojih: 5 mg HIT-MNPs, 2 uri funkcionalizacije, 50 mg/mL $\beta$ -GAL, pH 6, 24 ur imobilizacije, 22 °C, 350 rpm).....	100
Slika 3-37: Vpliv koncentracije dodanega PEHA na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane $\beta$ -GAL na HIT-MNPs (pri pogojih: 5 mg HIT-MNPs, 2 uri funkcionalizacije, 50 mg/mL $\beta$ -GAL, pH 6, 24 ur imobilizacije, 22 °C, 350 rpm) .....	101
Slika 3-38: Vpliv razmerja GA/PEHA na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane $\beta$ -GAL na HIT-MNPs (pri pogojih: 5 mg HIT-MNPs, 2 uri funkcionalizacije, 50 mg/mL $\beta$ -GAL, pH 6, 24 ur imobilizacije, 22 °C, 350 rpm) .....	102
Slika 3-39: Vpliv GA na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane $\beta$ -GAL na AMS-MNPs (pri pogojih: 5 mg HIT-MNPs, 2 uri funkcionalizacije, 50 mg/mL $\beta$ -GAL, pH 6, 24 ur imobilizacije, 22 °C, 350 rpm).....	103
Slika 3-40: Vpliv koncentracije PEHA na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane $\beta$ -GAL na AMS-MNPs (pri pogojih: 5 mg HIT-MNPs, 2 uri funkcionalizacije, 50 mg/mL $\beta$ -GAL, pH 6, 24 ur imobilizacije, 22 °C, 350 rpm) .....	104

Slika 3-41: Vpliv razmerja GA/PEHA na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane  $\beta$ -GAL na AMS-MNPs (pri pogojih: 5 mg HIT-MNPs, 2 uri funkcionalizacije, 50 mg/mL  $\beta$ -GAL, pH 6, 24 ur imobilizacije, 22 °C, 350 rpm)..... 105



## Uporabljeni simboli in kratice

### Simboli

$A$	absorbanca
$c$	koncentracija proteinov (mg/mL)
$c_p$	koncentracija prostega encima (mg/mL)
$c_s$	koncentracija encima v spiranjih (mg/mL)
$df$	redčitveni faktor (-)
$g$	faktor za karakterizacijo interakcij med spini neparnih elektronov z zunanjim magnetnim poljem (-)
$H$	magnetno polje (Oe)
$k$	naklon premice
$M$	magnetizacija (H)
$t$	čas (min)
$T$	temperatura (°C)
$T_c$	Curie-jeva temperatura (K)
$V_e$	volumen raztopine encima (mL)
$V_k$	končni volumen reakcijske zmesi (mL)

### Grški simboli

$\alpha$	alfa (-)
$\beta$	beta (-)
$\gamma$	gama (-)
$\sigma$	masna magnetizacija (emu/g)
$\epsilon_{o\text{-Nitro}}$	milimolarni ekstinkcijski koeficient <i>o</i> -Nitrofenola pri 405 nm (-)
$\epsilon_{\beta\text{-NADH}}$	milimolarni ekstinkcijski koeficient $\beta$ -NADH pri 340 nm (-)
$\rho$	relativna učinkovitost imobilizacije (%)

$\chi$	magnetna susceptibilnost ( $\text{m}^3/\text{kg}$ )
$\zeta$	zeta (-)

## Kratice

<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
ADH	alkohol dehidrogenaza
AMS-MNPs	magnetni nanodelci modificirani z aminosilanom
APTES	3-aminopropiltrioksisilan
APTMS	3-aminopropiltrimetoksisilan
ATCC	Ameriška zbirka mikroorganizmov
-CH <sub>3</sub>	metilna skupina
CLEs	zamreženi encimi
CLEAs	zamreženi encimski skupki
CLECs	zamreženi encimski kristali
CMD	karboksimetil dekstran
CMD1-MNPs	magnetni nanodelci modificirani z 0,25 g/mL CMD
CMD2-MNPs	magnetni nanodelci modificirani z 0,40 g/mL CMD
CMD3-MNPs	magnetni nanodelci modificirani z 0,50 g/mL CMD
CMD-MNPs	magnetni nanodelci modificirani s CMD
COO <sup>-</sup>	karboksilna skupina
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	bakrov klorid dihidrat
DLS	dinamično sipanje svetlobe
DNK	deoksiribonukleinska kislina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
ECIH	epiklorohidrin

EDS	energijska disperzijska spektroskopija
emu	elektromagnetna enota
EPR	elektronska paramagnetna resonanca
Fe <sup>2+</sup>	železovi (II) ioni
Fe <sup>3+</sup>	železovi (III) ioni
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	magnetit
FeCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	železov (VI) klorid tetra hidrat
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	železov (III) klorid heksahidrat
FT-IR	Fourierjeva transformirajoča infrardeča spektroskopija
GA	glutaraldehid
HIT-MNPs	magnetni nanodelci modificirani s hitozanom
HNO <sub>3</sub>	dušikova (V) kislina
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MCA	monokloroocetna kislina
MNPs	magnetni nanodelci
MRI	slikanje z magnetno resonanco
MSPE	magnetna separacija na trdni fazi
N <sub>2</sub>	dušik
NAD(H)	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
NAD <sup>+</sup>	oksidirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
NADP(H)	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NADP <sup>+</sup>	oksidirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NaOH	natrijev hidroksid
-NH <sub>2</sub>	amino skupina
NH <sub>4</sub> OH	amonijev hidroksid
-OH	hidroksilna skupina

PAA	poliakrilna kislina
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PdI	polidisperzni indeks
PEG	polietilen glikol
PEHA	pentaetilenheksamin
PEI	polietilen imin
PLA	polimlečna kislina
PMMA	polimetil metakrilna kislina
PVA	polivinil alkohol
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SEM	vrstična elektronska mikroskopija
-SH	tiolna skupina
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija
TGA	termogravimetrična analiza
U	enota za encimsko aktivnost ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )
VSM	magnetometer z vibrirajočo glavo
ZP	zeta potencial
$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	hematit
$\beta\text{-GAL}$	$\beta$ -galaktozidaza
$\beta\text{-NAD}$	$\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotid
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	maghemit



Doktorsko delo temelji na naslednjih objavljenih člankih kandidatke:

VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko, KONSTANTINOVA, Elizaveta A., KOKORIN, Alexander, GYERGYEK, Sašo, LEITGEB, Maja. Structural and magnetic characteristics of carboxymethyl dextran coated magnetic nanoparticles : from characterization to immobilization application. *Reactive & functional polymers*. March 2020, vol. 148, str. 1-13. ISSN 1381-5148. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104481.

GAJŠEK, Marjetka, JANČIČ, Urška, VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. *Enhanced activity of immobilized transglutaminase for cleaner production technologies*. *Journal of cleaner production*. 10 Dec. 2019, vol. 240, str. 1-11. ISSN 0959-6526. DOI: 10.1016/j.jclepro.2019.118218.

KRIŽNIK, Lucija, VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. *Hyper-activation of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immobilization onto amino-silane and chitosan magnetic maghemite nanoparticles*. *Journal of cleaner production*. April 2018, vol. 179, str. 225-234. ISSN 0959-6526. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.01.117.

LEITGEB, Maja, VASIĆ, Katja, HOJNIK PODREPŠEK, Gordana, HOJSKI, Aljaž, CRNJAC, Anton, KNEZ, Željko. *Toxicity of magnetic chitosan micro and nanoparticles as carriers for biologically active substances*. *Acta chimica slovenica*. 2014, vol. 61, no. 1, str. 145-152, ilustr. ISSN 1318-0207.

PRIMOŽIČ, Mateja, VASIĆ, Katja, KRAVANJA, Gregor, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. *Immobilized laccase for sustainable technological processes*. *Chemical engineering transactions*. 2019, vol. 76, str. 91-96. ISSN 2283-9216. DOI: 10.3303/CET1976016.

VASIĆ, Katja, HOJNIK PODREPŠEK, Gordana, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. *Biodiesel production using solid acid catalysts based on metal oxides*. *Catalysts*, vol. 10, no. 2, str. 1-20. ISSN 2073-4344. <https://www.mdpi.com/2073-4344/10/2/237>, DOI: 10.3390/catal10020237.



## 1 UVOD

Načela »zelene« ali »trajnostne« kemije zajemajo koncept kemije in kemijskega inženirstva, ki spodbuja k razvoju procesov, ki zmanjšujejo ali odpravljajo uporabo nevarnih snovi pri načrtovanju, proizvodnji in uporabi kemičnih izdelkov. V ta namen se na znanstvenem področju obračamo k iskanju učinkovitih načinov ločevanja homogenih in heterogenih katalizatorjev od reakcijskih snovi in njihovega nadaljnjega recikliranja.

Nanoznanost predstavlja najpomembnejše raziskovalno področje modernega sveta, kjer interdisciplinarno področje nanotehnologije omogoča pomembne napredke v življenjskih znanostih in zdravstvu na molekularni ravni. Tako sta hitra rast in vzpon nanotehnologije v zadnjem desetletju omogočila razcvet številnih novih tehnologij na področju inženirstva in znanosti, predvsem v biomedicini in biotehnologiji z razvojem uporabe sintetičnih struktur, imenovanih nanostrukturirani materiali (kot npr. nanodelci, nanovlakna, nanocevke, nanožičke, nanofilmi itd.) [1].

Pomemben razred nanostrukturiranih materialov za vezavo biološko aktivnih substanc predstavljajo nanodelci iz magnetnega anorganskega jedra, oblečeni z večslojno funkcionalno prevleko [2–4]. Modificirani magnetni nanodelci so s svojo aplikativnostjo in uporabnostjo v različnih znanstvenih disciplinah zanimivo področje predvsem zaradi številnih prednosti v vezavi na biološko aktivne substance. Magnetni nanodelci (MNPs) se zaradi močnega magnetnega dipola združujejo v skupke, kar omogoča velike površine, na katere se lahko vežejo biološke komponente [5,6]. Kljub temu ostaja največji izziv v uporabi sintetičnega nanodelca, ki se lahko manifestira na različne nepredvidljive načine [7–10]. V izogib takšnim oviram je najpomembnejši korak pri sintezi MNPs vezava naravnih, bioloških, biorazgradljivih in netoksičnih materialov, ki povečujejo možnosti potencialnih aplikacij in uporabe MNPs v številnih biomedicinskih znanostih. Takšni materiali imajo številne prednosti, kot so primerna površinska kemija, primerne velikosti v nanomerilu, ozka porazdelitev velikosti delcev ter kar je najpomembnejše, so biokompatibilni in imajo netoksične lastnosti [11–16].

Lastnosti MNPs določa veliko faktorjev, kot so velikost delcev, kemijska razgradnja in interakcije z materiali oz. funkcionalnimi prevlekami, ki nanodelec obdajajo [17]. Največji izziv pri sintezi MNPs predstavlja njihova težnja k agregiranju oz. k združevanju v skupke, saj posedujejo veliko razmerje med površino in prostornino. Manjši kot je delec, večji je relativni delež atomov, ki so na površini glede na število vseh atomov, ki sestavljajo delec [18]. Prav tako je pomembno, da se pri sintezi MNPs obdrži monodisperznost delcev ter primerna nano-velikost [19]. Za doseg takšnih kriterijev moramo MNPs prevleči s primernimi funkcionalnimi prevlekami, ki zagotavljajo netoksične in biokompatibilne lastnosti, hkrati pa omogočajo ciljno dostavo za prenos učinkovin na željeno mesto v določenem biološkem sistemu [20–22].

Encimi so biološki katalizatorji, ki uravnavajo kemijske reakcije v živih organizmih. Encimi lahko zaradi svojih izjemnih funkcionalnih lastnosti (aktivnosti, selektivnosti in specifičnosti) katalizirajo najkompleksnejše kemijske procese pod milim pogoji. Zato so encimi odlični industrijski katalizatorji na številnih področjih v kemični industriji. Kljub odličnim lastnostim prostih encimov so njihove široke možnosti uporabe v industriji velikokrat omejene s pomanjklivostmi, kot so kratkoročna operativna stabilnost in skladiščenje ter omejena ponovna uporaba. Takšne pomanjkljivosti prostih encimov pa lahko premagamo z imobilizacijo le-teh. V primerjavi s prostimi encimi so imobilizirani encimi bolj vzdržljivi ter odporni na okoljske spremembe, postopek imobilizacije encimov pa omogoča njihovo enostavno ponovno uporabo, večkratnost uporabe v industrijskih procesih, nadzorovan reakcijski proces ter ohrani ali izboljša njihovo aktivnost in stabilnost.

## 1.1 Opredelitev problema

V zadnjih letih je bilo raziskanih veliko polimerov, ki ustrezajo kriterijem primernih funkcionalnih prevlek, saj so dokazano učinkoviti materiali za pripravo MNPs. Mednje spadajo hitozan [23], škrob [24], albumin [25], alginat [26], polietilen glikol (PEG) [27], polivinil alkohol (PPVA) [28] ter različni polioksamini [29] in dekstrani [30]. Eden izmed takšnih materialov je karboksimetil dekstran (CMD), s katerim bomo modificirali magnetni nosilec za imobilizacijo encima. CMD je biokompatibilni hidrofilni polimer, ki je sestavljen iz glukoze z večinoma  $\alpha$ -1,6 glikozidnimi povezavami, ki se v alkalnih raztopinah z nekovalentnimi interakcijami močno fizikalno absorbirajo na MNPs. Hidroksilne in karboksilne skupine na CMD se z lahkoto zamrežijo in funkcionalizirajo s primarnimi amini za vezavo različnih tarčnih ligandov, peptidov itd. [31]. CMD je biorazgradljiv in netoksičen ter lahko dokazano izboljša lastnosti MNPs za ciljno dostavo učinkovin, kot tudi koloidno stabilnost, ki je pomembna lastnost pri sintezi MNPs [12,32].

Ker so prosti encimi dokaj nestabilni, bomo z imobilizacijo izboljšali njihovo operativno stabilnost in aktivnost [33–38]. Z imobilizacijo bomo tako poleg aktivnosti povečali tudi življenjsko dobo imobiliziranega encima in zagotovili večkratnost uporabe. Prednosti imobiliziranih encimov so enostavna separacija iz reakcijskega medija, ki jo lahko uvedemo v različne »real-life« tehnologije. Encim ADH iz *S. cerevisiae* ima kot pomemben biološki katalizator, ki katalizira oksidacijo alkoholov in redukcijo aldehydov ali ketonov, pomembno vlogo v različnih aplikacijah v farmacevtski, živilski in prehrabeni industriji ter pri sintezi različnih intermediatov v kemijski industriji. Prav tako ima ADH dobro katalitično kapaciteto kot redoks biokatalizator v stereoselektivnih redukcijah in pri regeneraciji koencimov NAD(P)H in NAD(P)H. Prav tako pa številne prednosti predstavlja v razvoju raznih biosenzorjev [39–42]. Kljub širokemu spektru aplikativnosti ima ADH nekaj slabosti, kot so slaba stabilnost v vodnih medijih, težja separacija od produkta ter slaba ponovna uporaba, ki omejuje samo aplikativnost encima [43]. Encim  $\beta$ -galaktozidaza ( $\beta$ -GAL) iz *A. oryzae* predstavlja velik potencial tudi na številnih drugih področjih industrije, kot so prehrabna industrija, biosenzorji, diagnostika in zdravljenje raznih prehranskih motenj [44].

Epoksi funkcionalne skupine so zelo aktivne funkcionalne skupine, ki reagirajo z različnimi biomolekulami, kot so encimi, proteini, nukleinske kisline. ECIH je epoksid z bifunkcionalno alkilirajočo aktivnostjo, ki se uporablja za proizvodnjo sintetičnih materialov, kot so epoksi, fenoksi in poliamidne smole, politiole, zamrežene škrobe, surfaktante in farmacevtske produkte. Kot epoksid lahko ECIH kovalentno veže amino (-NH<sub>2</sub>), tiolne (-SH) in hidroksilne (-OH) skupine na proteine, kar tvori zamrežen matriks proteinov [45].

## 1.2 Doktorska teza

V okviru sinteze funkcionaliziranih CMD-MNPs za imobilizacijo biokatalizatorja ADH so bile postavljene naslednje teze:

- magnetni nanodelci so primerni nosilci za imobilizacijo biokatalizatorjev;
- funkcionalizacija magnetnih nanodelcev, prevlečenih s CMD, omogoča primerno nanokompozitno strukturo, ki zagotavlja netoksičnost, biokompatibilnost in biorazgradljivost;
- uvedba različnih koncentracij CMD v sintezni postopek CMD-MNPs vpliva na strukturne in magnetne lastnosti CMD-MNPs;
- sintetizirani CMD-MNPs imajo magnetne lastnosti.

V okviru določevanja inhibitornih lastnosti sintetiziranih CMD-MNPs in pripravljenih HIT-MNPs so bile postavljene naslednje teze:

- pripravljene CMD-MNPs in HIT-MNPs ne inhibirajo izbranih bakterijskih kultur;
- uporaba naravnih polimerov (CMD in HIT) v sinteznem postopku priprave CMD-MNPs in HIT-MNPs zagotavlja netoksičnost in biokompatibilnost magnetnih nanonosilcev.

V okviru imobilizacije encima ADH na CMD-MNPs in encima  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs so bile postavljene naslednje teze:

- funkcionalizirani CMD-MNPs preko epoksi-zamreževanja zagotavljajo uspešno imobilizacijo biokatalizatorja ADH;
- funkcionalizirani CMD-MNPs z epoksi-zamreženjem biokatalizatorja ADH zagotavljajo večjo stabilnost v vodnih medijih, lažjo separacijo ter ponovno uporabo, ki omogočajo široko aplikativnost imobiliziranega biokatalizatorja ADH predvsem v razvoju raznih biosenzorjev;
- z optimiranjem procesnih parametrov v postopku imobilizacije biokatalizatorja ADH na CMD-MNPs zagotovimo visoko aktivnost imobiliziranega ADH;
- imobilizacija encima  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs zagotavlja visoko aktivnost imobiliziranega encima;
- z optimiranjem koncentracij mrežnega povezovalca GA in amino-donorja PEHA pri postopku imobilizacije encima  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs zagotovimo široko aplikativnost imobiliziranega nanonosilca v različnih industrijah čiščenja, saj zagotavlja enostavnost separacije;

- imobilizacija encima  $\beta$ -GAL predstavlja velik potencial na številnih področjih industrije, kot so prehrabena industrija in diagnostika.

### 1.3 Namen in cilji

V prvem sklopu doktorske disertacije se bomo osredotočili na sintezo ter karakterizacijo MNPs in določevanje njihovih inhibitornih lastnosti. Inhibitorne lastnosti MNPs bomo proučevali na različnih bakterijskih kulturah ter tako pridobili pomembne podatke o biokompatibilnosti in netoksičnosti magnetnih struktur prevlečenih s CMD in HIT. Razvili bomo sintezni postopek priprave MNPs na osnovi CMD z uvedbo različnih koncentracij CMD ter tako določevali vpliv koncentracije na še neraziskane strukturne in magnetne lastnosti tako pripravljenih MNPs, prevlečenih s CMD (CMD-MNPs). V sklopu študije inhibitornih lastnosti na hitozanskih MNPs (HIT-MNPs) bomo uporabili že vnaprej pripravljene HIT-MNPs, sintetizirane po treh različnih postopkih vezave hitozana, in sicer s procesom mikroemulzije, s tehniko suspenzijskega zamreževanja in z metodo kovalentne vezave [46].

Drugi sklop doktorske disertacije bo zajemal imobilizacijo različnih encimov na sintetizirane CMD-MNPs in HIT-MNPs. Sintetizirane CMD-MNPs bomo uporabili za imobilizacijo encima ADH iz *S. cerevisiae* preko novega, še neraziskanega načina epoksi-zamreženja ter preučevali vpliv različnih procesnih parametrov imobilizacije na učinkovitost imobilizacije ter preostalo aktivnost imobiliziranega ADH. Preučevane CMD-MNPs bomo nato uporabili tudi pri koimobilizaciji encima ADH in kofaktorja  $\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotida ( $\beta$ -NAD) ter določevali preostalo aktivnost in učinkovitost koimobilizacije. Določili bomo kinetične parametre prosti, imobilizirani in koimobilizirani ADH. Nadaljevali bomo z imobilizacijo encima  $\beta$ -GAL iz *A. oryzae* na že pripravljene HIT-MNPs, kjer bomo pri imobilizacijskem postopku uporabili različne koncentracije mrežnega povezovalca GA in različne koncentracije amino-donorja PEHA, ki zagotavlja proste amino skupine, na katere se encim lahko veže.

## 2 SINTEZA MAGNETNIH NANODELCEV

Napredki zadnjih let so v znanosti obrodili številne nove aplikacije uporabe MNPs na najrazličnejših področjih tehnologije (predvsem v biomedicini, biotehnologiji in biokemiji) in ponujajo številne možnosti vpeljave novih metod v tehnološke procese na področju nanotehnologije. Superparamagnetni nanodelci železovega oksida (predvsem magnetit ali maghemit) so najpogosteje uporabljeni nanodelci zaradi svojih številnih prednosti v vezavi biološko aktivnih substanc. Najpomembnejša prednost nanodelcev je njihovo veliko razmerje med površino in volumnom, kar omogoča višjo površinsko energijo in odlične magnetne lastnosti.

### 2.1 Kemijske lastnosti MNPs

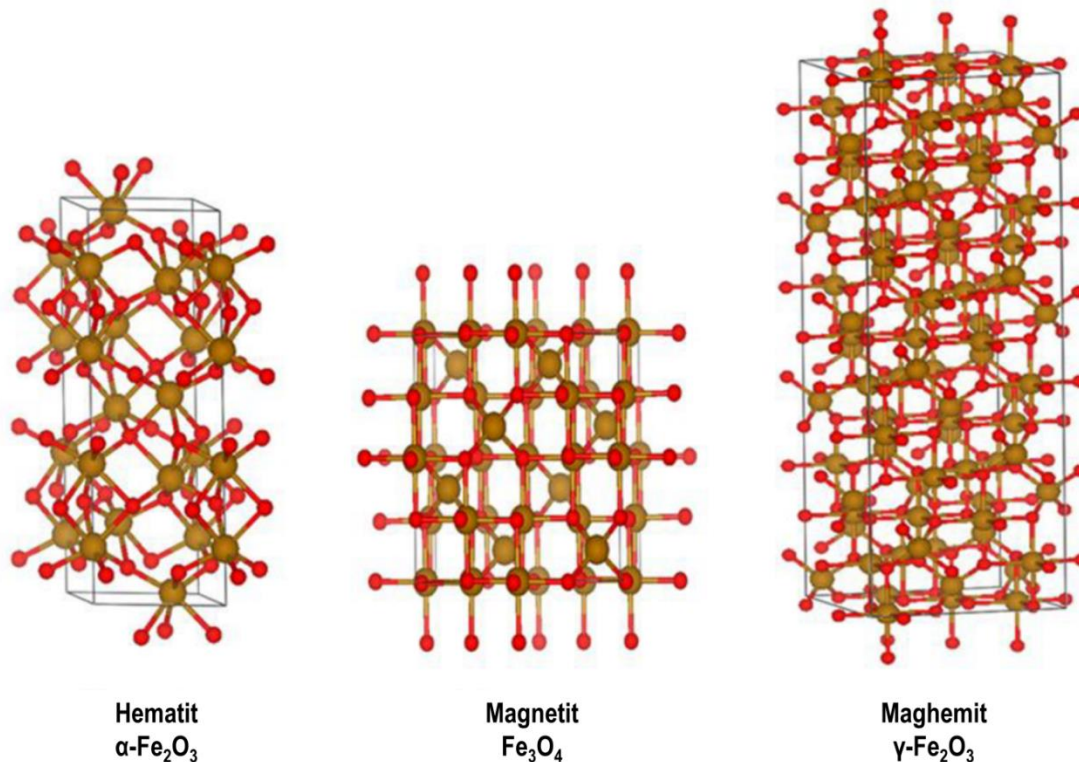
Železo in kisik se kemijsko vežeta v železove okside (spojine), med katerimi je splošno znanih 16 železovih oksidov, ki jih lahko razdelimo na okside, mešane okside, hidrokside in oksihidrokside. V naravi se železov (III) oksid nahaja v obliki rje, medtem ko so vsi železovi oksidi zelo razširjeni, saj so cenovno ugodni in imajo pomembno vlogo v bioloških in geoloških procesih [46]. Železovi oksidi v naravi obstajajo v večih oblikah, najpogostejše pa so magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) in hematit ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), ki so tehnološko tudi najpomembnejše. Vse tri železove oblike se razlikujejo v različnih fizikalno-kemijskih lastnostih, ki izvirajo iz njihovih različnih oksidacijskih stanj železa [47–49]. Nekatere lastnosti magnetita, maghemita in hematita opisuje Tabela 2-1.

Tabela 2-1: Nekatere fizikalne in magnetne lastnosti železovih oksidov [50]

Lastnost	Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )	Maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ )	Hematit ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ )
gostota ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	5,18	4,87	5,26
$T_{\text{tališča}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	1583-1597	-	1350
trdota	5,5	5	6,5
magnetizem	feromagneten	ferimagneten	šibko feromagneten, antiferomagneten
$T_{\text{Curie}}$ (K)	580	820-986	956
kristalografski sistem	kubični	kubčni ali tetraedrični	romboedrični, heksagonalni

Kristalna struktura vseh treh železovih oksidov je sestavljena iz kisikovih anionov, skupaj z železovimi kationi v oktaedralni ali tetraedralni intersticijski stranici. Kisikovi ioni so v

hematitu v heksagonalni razporeditvi, medtem ko se železovi (III) ioni nahajajo na oktaedralnih stranicah (Slika 2-1a). Kisikovi ioni so pri magnetitu in maghemitu v kubični razporeditvi (Slika 2-1b), pri čemer ima magnetit inverzno spinelno strukturo z železovimi (III) ioni, ki so naključno razporejeni med oktaedralnimi in tetraedralnimi stranicami, in železovimi (II) ioni na oktaedralnih stranicah [48,51].



Slika 2-1: Kristalna struktura hematita, magnetita in maghemita [52]

Vsi materiali so do neke mere magnetni, stopnja magnetnosti pa je odvisna od njihove atomske strukture in temperature. Elektroni, ki krožijo okoli atomskega jedra, elektroni, ki se vrtijo okoli svoje osi in rotirajoča pozitivno nabita atomska jedra so magnetni dipoli. Ti dipoli se lahko medseboj izključujejo, kar lahko povzroči, da določen atom izgubi magnetni dipol. V primeru, da se dipoli ne izključujejo, ima atom permanentni magnetni dipol, kot na primer železovi ioni. Moč magnetnega dipola imenujemo magnetni dipolni moment, kar pomeni merilo oz. kapaciteta nekega dipola, da se poravna s zunanjim magnetnim poljem.

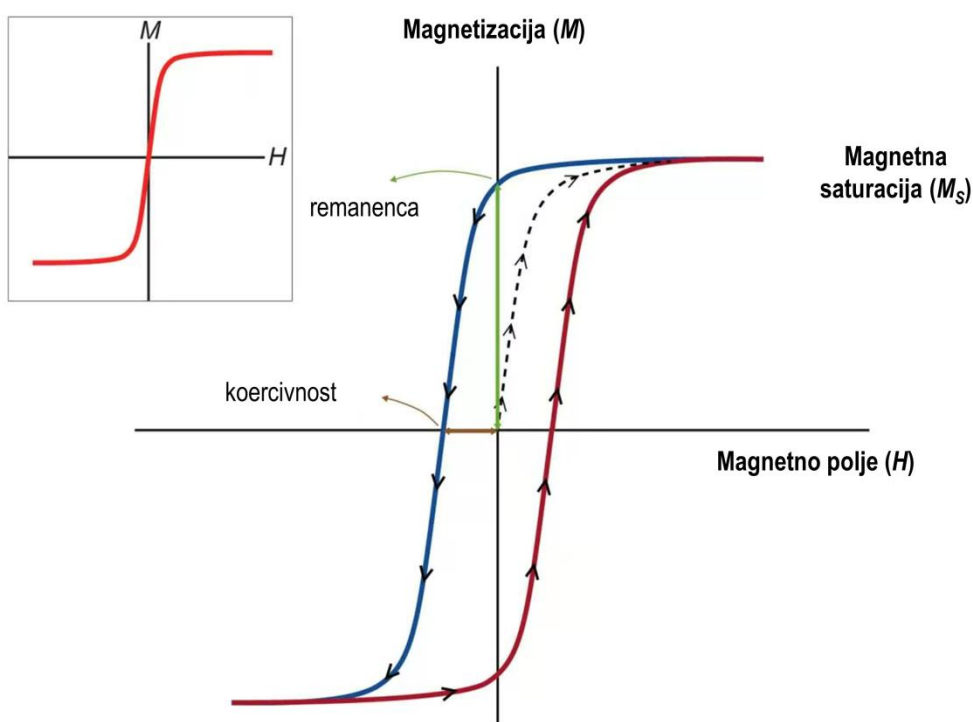
Ko nek material izpostavimo magnetnemu polju ( $H$ ), se atomski dipoli poravnajo s poljem, kar povzroči magnetni moment materiala. Količino magnetnega momenta na enoto volumna imenujemo magnetizacija ( $M$ ). Razmerje med magnetizacijo in magnetnim poljem definiramo:

$$M = \chi H$$

pri čemer je  $\chi$  volumetrična magnetna susceptibilnost, ki je brez enot, medtem ko sta  $M$  in  $H$  izražena v A/m. Magnetne materiale klasificiramo glede na njihovo susceptibilnost ( $\chi$ ). Če



imajo materiali šibke odbijajoče sile in negativno susceptibilnost ( $\chi < 0$ ), so materiali diamagnetni. Če imajo materiali majhno pozitivno susceptibilnost ( $\chi > 0$ ), katere sestavljajo atomi z lastnim magnetnim momentom, so materiali paramagnetni, medtem ko imajo feromagnetni materiali pozitivno susceptibilnost. Diamagnetni in paramagnetni materiali izgubijo magnetne lastnosti, če odstranimo vpliv zunanjega magnetnega polja, medtem ko imajo feromagnetni materiali stabilne magnetne lastnosti tudi po odstranitvi vpliva zunanjega magnetnega polja. Feromagnetni material (Slika 2-2) postane paramagnetni nad temperaturo, imenovano Curiejeva temperatura ( $T_C$ ).  $T_C$  je temperatura, nad katero magnetni momenti posameznih delcev niso več vzporedni, material pa postane paramagnetni [14,53–58].

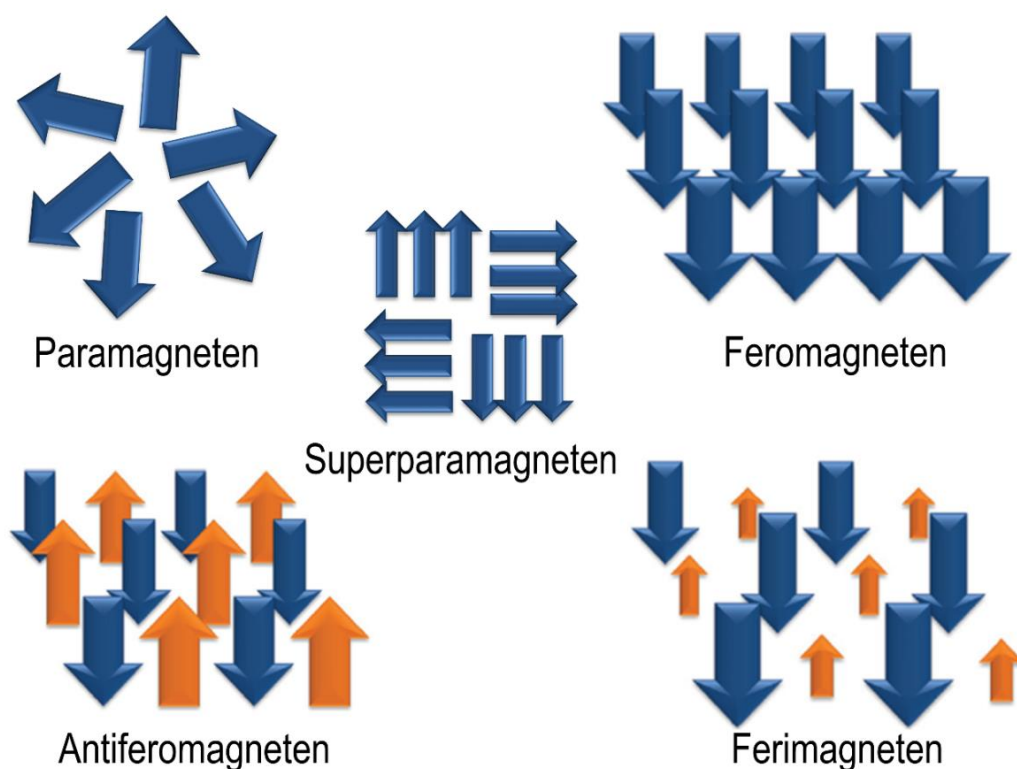


Slika 2-2:  $M$ - $H$  krivulje za feromagnetni material [58]

Materiale lahko nasplošno razvrstimo v pet kategorij: diamagnetne, paramagnetne, feromagnetne, ferimagnetne in superparamagnetne. Človeško telo sestavljajo samo diamagnetni (kosti in tkiva) ter paramagnetni materiali (kri). Slika 2-3 prikazuje različna magnetna stanja, ki se pojavijo v procesu kristalizacije železa [50,59]. Paramagnetni kristal tvori naključno razporejene magnetne momente, tako ima celotna struktura neto ničelni magnetni moment. Ko kristal v paramagnetnem stanju izpostavimo zunanjemu magnetnemu polju, se magnetni momenti razporedijo tako, da kristal dobi majhen neto magnetni moment. V feromagnetnem in antiferomagnetnem stanju se posamezni momenti naključno poravnajo brez vpliva zunanjega magnetnega polja. Feromagnetni materiali vsebujejo več magnetnih domen, v katerih obstajajo enakomerne magnetizacije. Vsaka od teh domen je ločena z neenakomerno magnetizacijsko razporeditvijo, z različnimi magnetizacijskimi vektorji. Ker

so vektorji v domeni neporavnani, je tudi neto magnetizacija nizka. Superparamagnetizem se pojavi, ko je feromagnetni ali ferimagnetni material tako majhne velikosti, da se smer magnetizma naključno spreminja pod vplivom temperature. Takšne lastnosti imajo pri sobni temperaturi delci magnetnega materiala, manjši od neke kritične velikosti, ki je navadno manjša od 15 nm. Z zmanjševanjem velikosti delcev se izredno poveča njihova površina. Superparamagnetni delci zunaj magnetnega polja ne kažejo spontane magnetne polarizacije, med njimi ni magnetnih interakcij, ki bi povzročale magnetno aglomeracijo [60,61].

Magnetizem materiala izvira iz magnetnega momenta, ki ga kažejo nekateri magnetni atomi oz. ioni. Material kot celota ne bo kazal magnetnega momenta, če so magnetni momenti posameznih atomov v materialu naključno urejeni. Taka snov bo torej nemagnetna oz. paramagnetna.



Slika 2-3: Poravnava magnetnih momentov posameznih ionov v železu

Magnetizacija superparamagnetnih delcev je podobna magnetizaciji feromagnetnih, vendar veliko večja kot pri paramagnetnih delcih. Zato lahko superparamagnetne nanomateriale z lahkoto zasledujemo v magnetnem polju, brez da bi ob tem dobili manj stabilno koloidno suspenzijo. Veliko aplikacij MNPs temelji na uporabi magnetnega polja za manipulacijo lastnosti, katere so odvisne od učinkovitosti magnetnega momenta delca in magnetnega polja [62]. Jakost enojedrnih superparamagnetnih nanodelcev je zaradi majhnega premera in magnetnega momenta manj učinkovita. Pri večjedrnih kompozitih so magnetna polja toliko močnejša, da omogočajo magnetno ciljanje z nižjimi vrednostmi poljske jakosti in gradienta [63,64]. Prav ta zanemarljiva magnetizacija superparamagnetnih delcev je prednostna lastnost, ki preprečuje agregacijo materialov, kot tudi pri uporabi le-teh. Ob zmanjšanju

magnetnega polja delci ne kažejo več magnetnih interakcij, zato se tudi agregaciji izognemo [64,65].

## 2.2 Sinteza MNPs

Feritna koloida, magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) in maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), sta najpogosteje uporabljena nanonosilca na medicinskem in farmacevtskem področju predvsem zaradi svoje biokompatibilnosti in biorazgradljivosti [66,67]. Glavne sintezne postopke za pripravo MNPs, ki jih shematsko prikazuje Slika 2-4, lahko razdelimo na tri poglavitne skupine:

- **kemijske metode:**

so enostavne, sledljive in zelo učinkovite metode, pri katerih lahko nadzorujemo velikost, sestavo in obliko nanodelcev. Med kemijske metode spadajo:

- kemijska koprecipitacija [68–70]
- mikroemulzija [71–74]
- hidrotermalna reakcija [75]
- elektrokemijska metoda [76]
- sonokemijska metoda [77]
- sol-gel sinteza [78]
- oksidacijska metoda [79]
- sinteza z injekcijskim tokom [80]
- metoda s superkritičnimi fluidi [81]
- sinteza z uporabo nanoreaktorja [82].

- **fizikalne metode:**

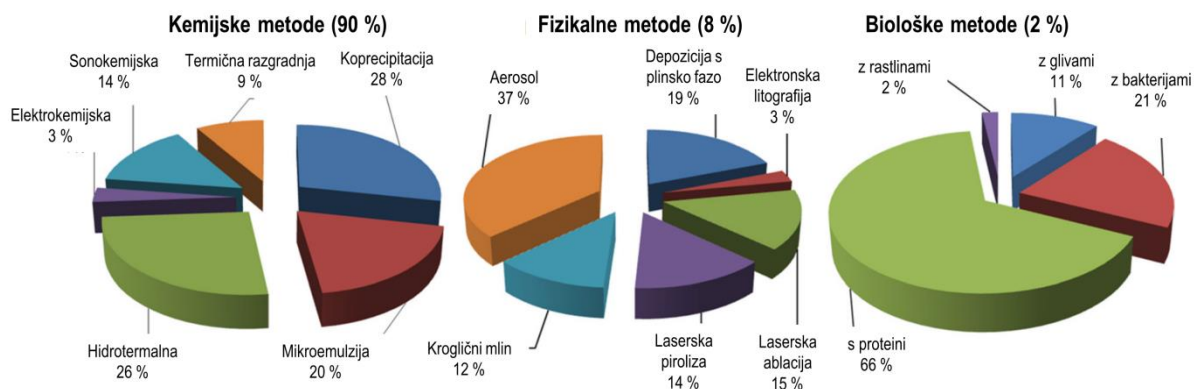
so sicer natančni postopki, pri katerih ni možnosti nadzorovati velikosti delcev v nanomerilu. Med fizikalne metode spadata:

- elektronska litografija [83–85]
- depozicija s plinsko fazo [86,87]
- laserska piroliza [88]
- laserska ablacija [89]
- metoda s krogličnim mlinom [90]
- metoda z aerosol/parno fazo [91].

- **biološke metode**

metode z dobro ponovljivostjo in visokim izplenom, cenovno ugodne. Mednje spada biološke metode s/z:

- proteini [92]
- mikrobnno inkubacijo [93]
- glivami [94]
- rastlinami [95].



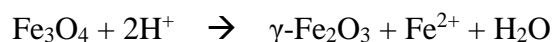
Slika 2-4: Shematski prikaz sinteznih metod MNPs [96]

### 2.2.1 Kemijska koprecipitacija

Med najpreprostejše in najučinkovitejše metode za sintezo MNPs spada kemijska koprecipitacija, ki temelji na kemijski reakciji v vodni raztopini. Sinteza je sestavljena iz obarjanja železovih (III) in železovih (II) ionov v molarnem razmerju 2:1 ob prisotnosti baze ( $\text{NH}_4\text{OH}$  ali  $\text{NaOH}$ ). Obarjen železov hidroksid nato ločimo z magnetno dekantacijo ali centrifugiranjem ter stabiliziramo z dodatkom koncentrirane baze ali kisline za elektrostatično stabilizacijo magnetne tekočine [97]. Kemijsko enačbo nastanka magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) lahko opišemo z enačbo:



Glede na termodinamske pogoje reakcije bi popolno obarjanje magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) pričakovali v pH območju med 8-14 s stehiometričnim razmerjem železovih ionov 2:1 ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ) v neoksidirajoči kislovi atmosferi [98]. Ker pa je magnetit zelo nestabilen in na kisiku oksidira, se ob prisotnosti kisika pretvori v maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Reakcijo lahko opišemo z enačbo:



Oksidacija pa ni edini način pretvorbe magnetita v maghemit. Pri tem sodeluje več elektronskih ali ionskih prenosov, v veliki meri odvisnih od pH vrednosti suspenzije. Pri anaerobnih pogojih v kislem okolju se  $\text{Fe}^{2+}$  ioni desorbirajo kot heksa-vodni kompleksi v raztopini, medtem ko oksidacija magnetita v bazičnem okolju na površju magnetita poteka kot oksidacija-redukcija. Oksidacija  $\text{Fe}^{2+}$  ionov je povezana s premikom kationa po kristalni mreži, kar ustvarja kationske praznine za obstoj naboja magnetitne stehiometrije, pri čemer dobimo delce homogene v velikosti in sestavi [99].

Na sintezo MNPs vpliva več faktorjev, med katerimi so najpomembnejši molarno razmerje  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ , pri čemer povprečni premer delca narašča z naraščajočim  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  molarnim

razmerjem, učinkovitost precipitacije pa pada [86]. Prav tako na sintezo vpliva koncentracija železa. Povprečni premeri delca so močno odvisni tudi od kislosti in ionske moči obarjalnega medija. Višji kot je pH in ionska moč, manjši bodo delci in ožja porazdelitev velikosti, saj ti parametri določajo kemijsko zgradbo in posledično tudi elektrostatični naboj površine delca [70,100]. Na velikost delca vpliva tudi hitrost mešanja, saj se z naraščanjem hitrosti mešanja premer delca manjša. Prav tako se s pristnostjo baze v sintezni reakciji velikost delca manjša [101]. Sinteza MNPs pod  $N_2$  atmosfero varuje pred oksidacijo in tudi zmanjšuje velikost delcev v primerjavi z delci, sintetiziranimi v postopkih brez  $N_2$  atmosfere [102–104].

## 2.3 Površinska funkcionalizacija MNPs

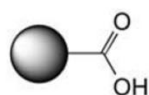
Železovi oksidi z neprevlečeno površino so nagnjeni k aglomeriranju zaradi močne magnetne privlačnosti med delci, van der Waalsovih sil in visoke površinske energije [105]. Takšni neprevlečeni delci imajo visoko koncentracijo železovih ionov, ki je toksična za organizem, tudi sicer pa jih zaradi aglomeriranja le-ta lahko zavrne [13,106]. Temu se lahko izognemo s postopkom modificiranja, ki delce naredi hidrofilne, biokompatibilne in visoko funkcionalne [107]. Primerna površinska prevleka omogoča netoksičnost in biokompatibilnost delcev, prav tako pa omogoča tarčno dostavo učinkovine na specifičnem mestu, kar je uporabno predvsem v medicini. Večina raziskav se osredotoča na izboljšanje biokompatibilnosti nanodelca, kot tudi magnetnih lastnosti, porazdelitve velikosti in oblike. Narava površinske prevleke nanodelca pomembno vpliva tudi na biokinetiko in biodistribucijo nanodelcev v telesu [108,109]. Vrsta površinske prevleke je v veliki meri odvisna od vrste aplikacije, kateri bo nanodelec služil (protivnetni učinek ali protirakav učinek). Na MNPs lahko vežemo različne biomolekule kot so učinkovine, proteini, encimi, protitelesa ali nukleotidi. Zaradi bioloških prevlek imajo takšni delci ozko porazdelitev velikosti in so vodotopni, kar jim da ogromno možnosti uporabe v biomedicini [104,109].

Neprevlečeni MNPs imajo zaradi velikega razmerja med površino in volumnom hidrofobno površino, aglomerirajo in se združujejo v velike skupke, kar nasplošno povečuje velikost nanodelcev. Med takšnimi aglomeriranimi delci se pojavijo močne magnetne interakcije, ki se feromagnetno izražajo. Ko se dva velika skupka približujeta, drug drugemu posegata v magnetno polje, kar sproža dodatno magnetizacijo [110], takšna vzajemna magnetizacija pa povečuje agregacijo [111]. Ob magnetni privlačnosti in močnih van der Waalsovih silah je modifikacija površine nanodelcev neizogibna, saj zagotavlja visokofunkcionalne nanodelce in omogoča stabilizacijo le-teh. Za preprečevanje agregacije nanodelcev zato v postopku sinteze uporabimo stabilizatorje, kot so surfaktanti ali polimeri. Tabela 2-2 prikazuje različne postopke za pripravo in površinsko modifikacijo MNPs glede na velikost nanodelca. Materiale, s katerimi modificiramo površino nanodelcev, lahko razdelimo na organske in anorganske.

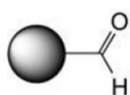
Tabela 2-2: Različni postopki za pripravo in površinsko modifikacijo MNPs glede na velikost delcev [96]

Premer [nm]	Postopek za pripravo in površinsko modifikacijo MNPs
1-20	obarjanje MNPs v vodni raztopini ali oljni mikroemulziji (zagotavlja visoko magnetne MNPs pod N <sub>2</sub> atmosfero z nizkimi T)
20-30 (do 50)	obarjanje MNPs v prisotnosti polimerov ali surfaktantov (zagotavlja monodisperzne in stabilne MNPs v raztopini)
50-100	površinska modifikacija s polimeri ali surfaktanti (magnetne tekočine stabilne v <i>in vivo</i> in <i>in vitro</i> pogojih)

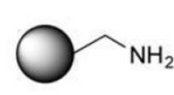
Izbira aktivne substance za modifikacijo površine MNPs je odvisna od funkcionalnosti modificiranega nanomateriala. Primarne funkcionalne skupine preprečujejo agregacijo delcev in zagotavljajo primerna mesta za nadaljno vezavo biomolekul. Primarne funkcionalne skupine se na površino MNPs lahko vežejo z adsorpcijo polimera ali manjših molekul ali pa se kovalentno vežejo s polimerizacijo silanskih struktur s pritrjenimi funkcionalnimi skupinami (primer je amino skupina preko APTES/APTS). Običajne funkcionalne skupine, ki se uporabljajo za primarno funkcionalizacijo MNPs so hidroksilne skupine (polisaharidi, PEG), amino skupine (hitozan, PEI), karboksilne skupine (poliakrilna kislina, alginat, citrat). Za specifično vezavo se uporabljajo druge funkcionalne skupine, kot so epoksi, tiolne, alkilne, azidne in karbonilne (Slika 2-5).



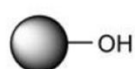
karboksilna



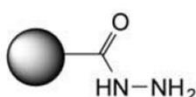
aldehydna



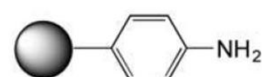
amino



hidroksilna



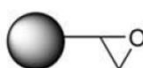
hidrazidna



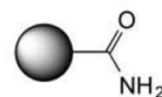
amino z aromatskim obročem



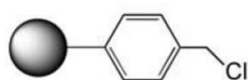
tiolna



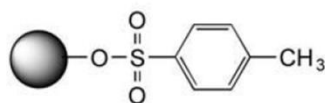
epoksi



amidna



klorometilna



toluensulfonilna

Slika 2-5: Funkcionalne skupine na površini MNPs za vezavo različnih biomolekul [112]

### 2.3.1 Površinska funkcionalizacija z organskimi materiali

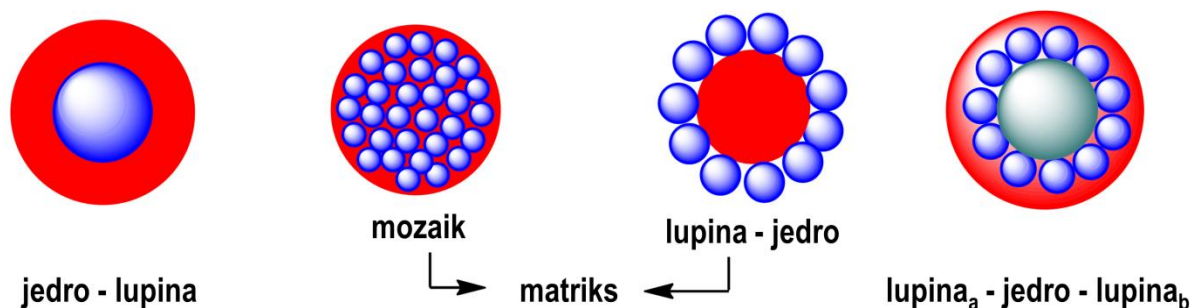
Pri pripravi magnetnih tekočin je najpomembnejša njihova stabilnost, katero v obliki prevlek zagotavljajo organske spojine. Prav tako je prednost organskih prevlek zagotavljanje biokompatibilnosti nanodelcev. Strukturo MNPs, funkcionaliziranih z organskimi spojinami lahko glede na lastnosti delimo na dve skupini:

- takšne, ki ohranjajo magnetne lastnosti magnetnih delcev;
- takšne, ki ohranjajo lastnosti organskih spojin.

MNPs lahko delimo na tri tipe nanostruktur:

- **jedro - lupina**  
več nanodelcev prevlečenih z organsko spojino, pri čemer je jedro lahko katerikoli železov oksid, npr.: magnetit ali maghemit;
- **matriks**  
delimo na dve skupini:
  - **mozaik**: lupino sestavljajo organske molekule, ki obdajajo več neenakih MNPs
  - **lupina - jedro**: jedro sestavlja organska molekula, ki jo obdaja lupina MNPs
- **lupina<sub>a</sub> - jedro - lupina<sub>b</sub>**  
MNPs sintetizirani po postopku »layer-by-layer«, kjer lupino sestavljajo organske molekule, ki obdajajo funkcionalizirane MNPs, pri čemer je lupina<sub>a</sub> polimer ali biomolekula, lupina<sub>b</sub> pa drug funkcionalni material.

Slika 2-6 prikazuje različne tipe struktur MNPs prevlečenih z organskimi materiali. S funkcionalizacijo površine MNPs z organskimi spojinami zagotovimo biorazgradljivost nanomaterialov, hkrati pa organske spojine na površini nanodelca zagotovijo dodatne funkcionalne skupine, kot so aldehydne, hidroksilne, karboksilne in amino, na katere lahko vezemo različne biološko aktivne molekule (protitelesa, proteine, DNK, encime itd.).



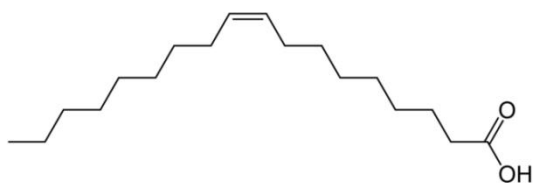
Slika 2-6: Različne strukture MNPs funkcionaliziranih z organskimi materiali [67]

### 2.3.1.1 Molekule in surfaktanti

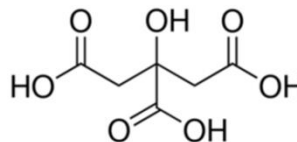
Primerna površinska modifikacija v obliki funkcionalizacije in izbira topila so ključni dejavniki za doseg zadostnih odbijajočih interakcij, ki preprečujejo aglomeriranje delcev ter zagotavljajo stabilnost koloidne raztopine. Glede na površinske karakteristike funkcionaliziranih MNPs delimo MNPs, funkcionalizirane z majhnimi molekulami ali surfaktanti na tri skupine:

- lipofilne (nepolarne)
- hidrofilne (polarne)
- amfifilne (polarne in nepolarne)

Med lipofilne molekule, ki sestavljajo organske spojine funkcionaliziranih MNPs spadajo hidrofobne spojine, kot npr. maščobne kisline, alkilfenol (linearni ali razvejan), med hidrofilne molekule pa amonijeva sol, poliol, licin. Če funkcionalno prevleko MNPs sestavljajo amfifilne molekule, vsebujejo tako hidrofilne kot lipofilne kemijske skupine (npr. žveplov licin) [67]. Pri funkcionalizaciji MNPs z lipofilnimi molekulami se uporabljajo oleinska kislina, lavrična kislina, dodecil fosfanat, heksadecil fosfonat, diheksadecil fosfonat in drugi [111,113–115]. Pri funkcionalizaciji MNPs s hidrofilnimi molekulami pa amino kisline [116], citronska kislina [113,117], vitamini [118,119], ciklodekstrin [120–122].



Oleinska kislina

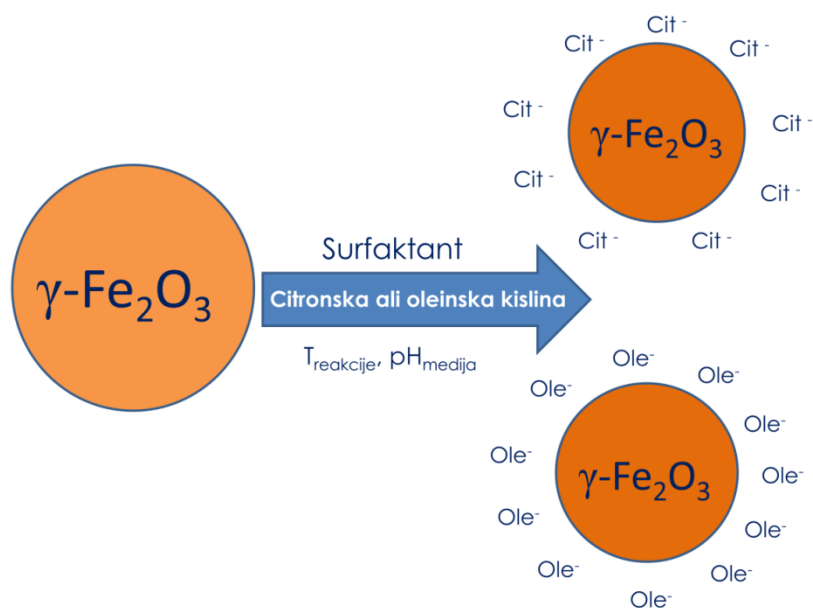


Citronska kislina

Slika 2-7: Kemijska struktura oleinske in citronske kisline

Stabilnost MNPs lahko zagotovimo tudi z adsorpcijo surfaktantov na površino nanodelca, ki preprečuje stikanje le-teh. Med najpogostejšimi surfaktanti so različne mono- ali dikarboksilne kisline (citronska ali oleinska). Citronska kislina v vodi disociira, karboksilni ioni ( $\text{COO}^-$ ) pa se vežejo na površino nanodelca in ga stabilizirajo v vodni raztopini (Slika 2-8) [113]. Oleinska kislina se uporablja v sintezi feritnih nanodelcev, saj zagotavlja debelo zaščitno plast, ki zagotavlja monodisperznost delcev [123,124]. Vpliv oleinske in citronske kisline v sinteznem postopku MNPs za imobilizacijo encima transglutaminaze smo objavili v delu Gajšek in ostali [125].

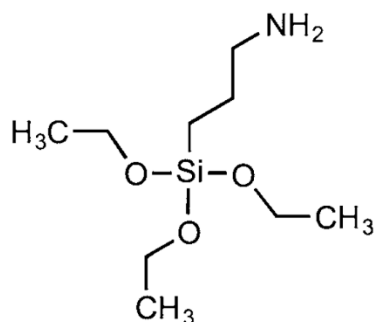




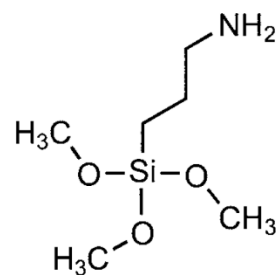
Slika 2-8: Stabilizacija MNPs z adsorpcijo surfaktanta (citronske ali oleinske kisline)

#### 2.3.1.1.1 Aminosilan

Za modifikacijo površine nanodelca se velikokrat uporablja tudi silan predvsem zaradi svoje biokompatibilnosti kot tudi funkcionalnih skupin za vezavo različnih kovin, polimerov ali biomolekul [22,126,127]. Delci, prevlečeni s silanom imajo fizikalne lastnosti neprevlečenih MNPs, a z visoko magnetno saturacijo. V sinteznem postopku najpogosteje uporabljena silana sta 3-aminopropiltrioksisilan (APTES) in 3-aminopropiltrimetoksisilan (APTMS) za zagotavljanje amino (-NH<sub>2</sub>) in tiolnih (-SH) skupin.



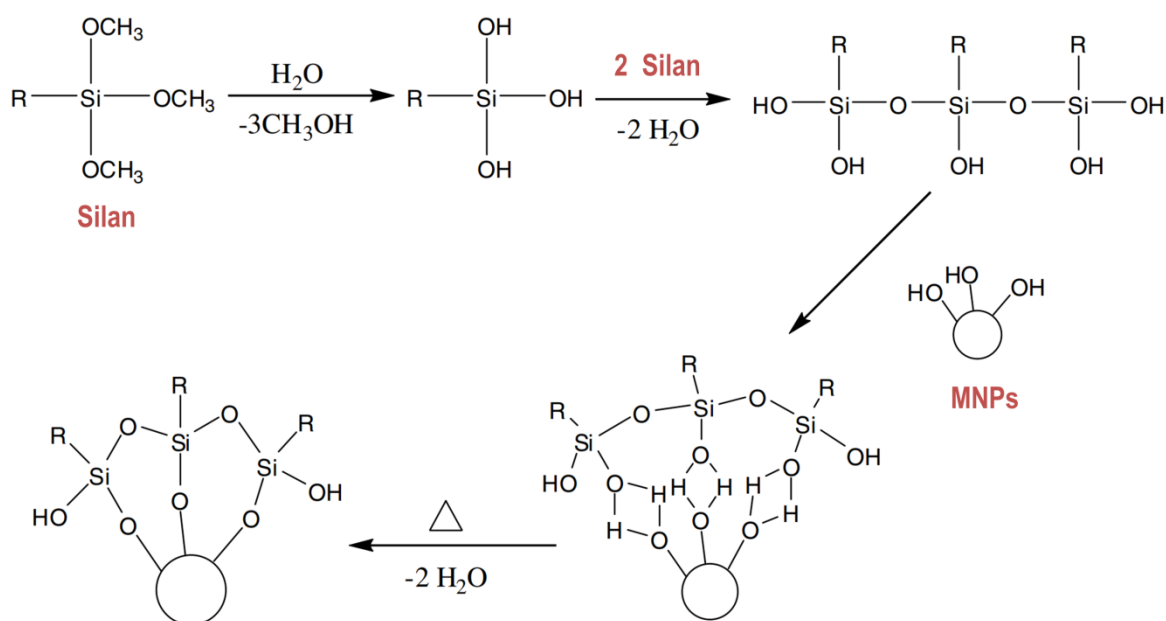
3-aminopropiltrioksisilan  
(APTES)



3-aminopropiltrimetoksisilan  
(APTMS)

Slika 2-9: Strukturna formula APTES in APTMS [128]

Hidroksilne skupine na površini MNPs reagirajo z metoksi skupinami silanskih molekul, kar vodi v nastanek Si-O vezi, medtem ko terminalne funkcionalne skupine ostajajo proste za vezavo drugih biomolekul. Fizikalno-kemijski mehanizem modificiranja površine MNPs s silanom predstavlja Slika 2-10.



Slika 2-10: Fizikalno-kemijski mehanizem modifikacije MNPs s silanom [67]

### 2.3.1.2 Polimeri

MNPs, funkcionalizirani z različnimi polimeri imajo številne prednosti, saj zmanjšujejo odbijajoče sile in tako izenačujejo magnetne interakcije in Van der Waalsove sile na površini MNPs, prav tako pa omogočajo edinstvene fizikalne in kemijske lastnosti. Z izbiro primerne polimera za funkcionalizacijo MNPs zagotovimo sintezo MNPs s točno določenimi, želenimi lastnostmi. Prevleke s polimeri lahko razvrstimo med sintetične in naravne polimere, vsaka skupina pa ima svoje prednosti. Te prikazuje Tabela 2-3.

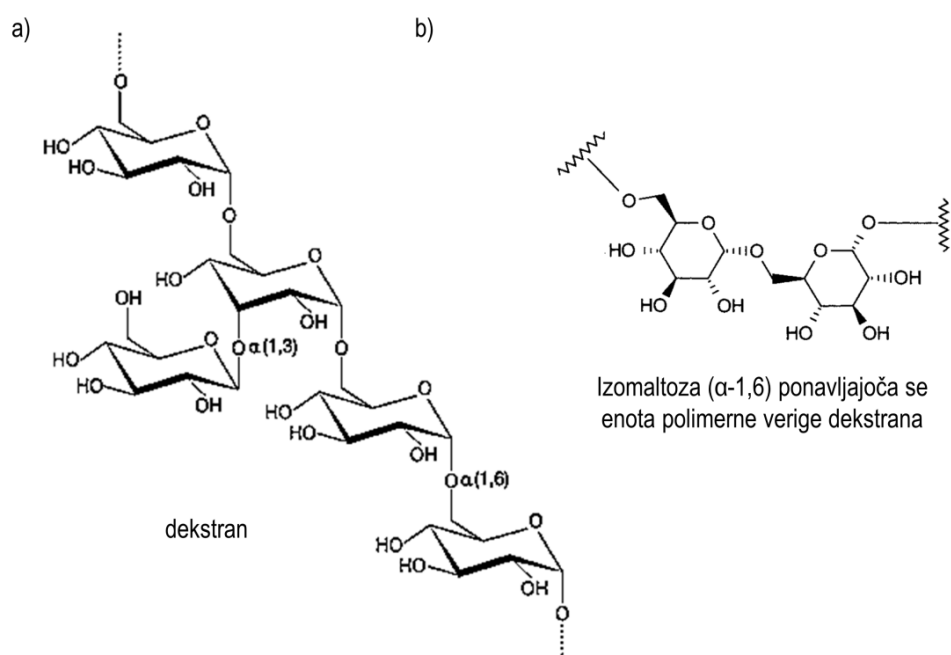
Tabela 2-3: Organske makromolekule in njihove prednosti pri funkcionalizaciji MNPs [67]

Polimer	Prednosti	Referenca
naravni	<b>dekstran</b>	izboljšuje biokompatibilnost in stabilnost [2,12,27,32,129–131]
	škrob	izboljšuje biokompatibilnost, uporaben za MRI in tarčno dostavo učinkovin [24,132]
	želatina	kot želirni agent, hidrofilni emulgator, biokompatibilen [133,134]
	<b>hitozan</b>	netoksičen, alkalen, hidrofilen, biokompatibilen [10,11,23,135,136]
sintetični	PEG	izboljšuje hidrofilnost, vodotopnost, biokompatibilnost [27,137–139]
	PVA	preprečuje aglomeracijo, povečuje monodisperznost [140–142]
	PLA	izboljšuje biokompatibilnost, biorazgradljivost, zmanjšuje toksičnost [63,75]

alginat	izboljšuje stabilnost in biokompatibilnost	[26,143,144]
PMMA	termoobčutljiv	[145]
PAA	izboljšuje stabilnost in biokompatibilnost	[146,147]

### 2.3.1.2.1 Dekstran

Dekstran, s kemijsko formulo  $H(C_6H_{10}O_5)_nOH$ , je vodotopen hidrofilni polimer, sestavljen iz ponavljajočih se enot *D*-glukoze, povezanih z  $\alpha$ -1,6 glikozidnimi vezmi (Slika 2-11). Poleg vode je topen še v metil sulfoksidu, formamidu, etilen glikolu, glicerolu, 4-metilmorfolin-4-oksidu in heksametil fosforamidu. Povprečna molska masa dekstrana znaša med  $9 \times 10^6$  in  $500 \times 10^6$  g/mol. Pridobivanje dekstrana poteka iz saharoze s pomočjo bakterije *Leuconostoc mesenteroides*, prav tako pa tudi iz dekstrina s pomočjo drugih bakterij (*Penicillium funiculosum*, *Streptococcus mitis*) [148]. Kot organska prevleka se uporablja predvsem zaradi svoje biokompatibilnosti [129,149,150]. Pri izbiri dekstrana ima pomembno vlogo dolžina dekstranskih verig, ki omogoča optimalne polarne interakcije s površino MNPs. Čeprav so vodikove vezi relativno šibke, je celokupna energije vezave vsake vodikove vezi po celotni polisaharidni verigi visoka zaradi velikega števila hidroksilnih skupin na vsaki molekuli [151–153].

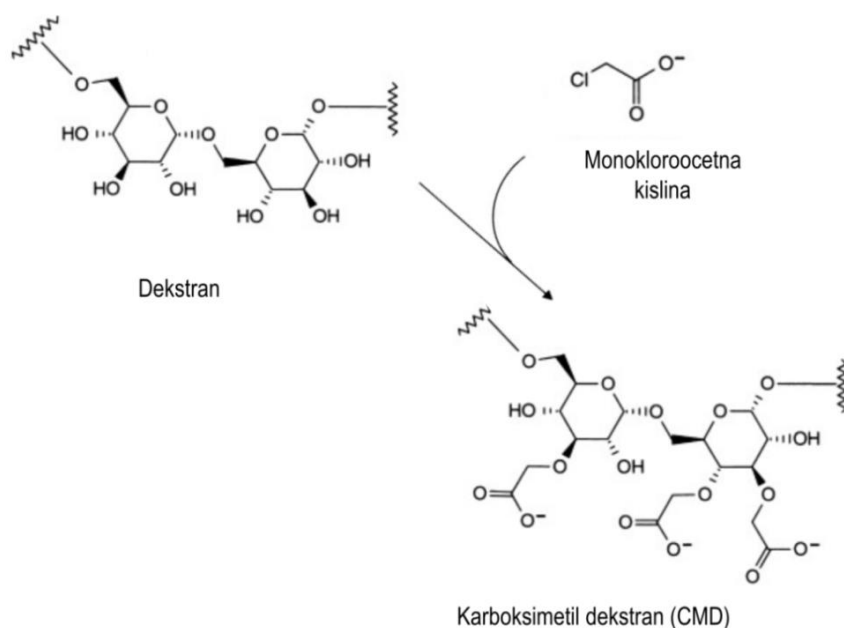


Slika 2-11: Struktura dekstrana (a) in ponavljajoča se enota polimerne verige dekstrana (b)

Prvi ogljikov atom (C-1) enega monomera je povezan s hidroksilno skupino na zadnjem ogljikovem atomu (C-6) drugega monomera. Takšno konfiguracijo najdemo tudi v  $\alpha$ -1,6 disaharidni izomaltozi, glikogenu in amilopektinu (Slika 2-11). Poleg glavne verige vsebuje tudi razvejitve z  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 in  $\alpha$ -1,4 glikozidnimi vezmi. Zaradi hidroksilne skupine je dekstran hidrofilen, hkrati pa omogoča enostavno vezavo drugih molekul, saj je hidroksilna

skupina prisotna na vsakem monomeru v verigi. Monomer vsebuje vsaj 3 hidroksile, ki se lahko derivatizirajo. Takšna multivalentna struktura dekstrana omogoča vezavo različnih molekul na številnih mestih v polimerni verigi. Topen dekstran se uporablja za modifikacijo ali kot mrežni povezovalac proteinov in drugih molekul [112]. Prav tako se upravlja v medicini kot antitrombotik, zdravilo za preprečevanje krvnih strdkov, kot tudi razširjevalec pri hipovolemiji [154–156].

Karboksimetil dekstran (CMD) je derivat dekstrana, ki poleg hidroksilnih vsebuje še karboksilne skupine. Nastane pri reakciji z monokloroocetno kislino (MCA,  $\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ) pri alkalnih pogojih. Reakcijo dekstrana z MCA prikazuje Slika 2-12. Vsebnost karboksilnih skupin pri CMD znaša med 3 % in 10 %, tj. ena karboksilna skupina na vsaki 2,5 enoti glukoze [112].

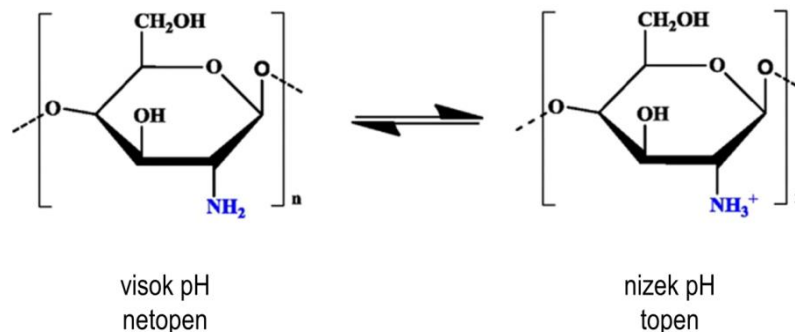


Slika 2-12: Reakcija hidroksilnih skupin dekstrana z monokloroocetno kislino, pri čemer nastane CMD [112]

### 2.3.1.2.2 Hitozan

Hitozan je alkalni, netoksičen, hidrofilni, biokompatibilni in biorazgradljivi polimer. Aktivne amino skupine na površini hitozana lahko v blagih reakcijskih pogojih vežejo različne molekule. Strukturno je sestavljen iz kopolimera *N*-acetil-*D*-glukozamin in *D*-glukozaminskih enot povezanih z  $\beta$ -1,4-glukozidno vezjo z eno amino ( $-\text{NH}_2$ ) skupino in dvema hidroksilnima ( $-\text{OH}$ ) skupinama na vsaki ponavljajoči glikozidni enoti [157]. Pri nižjih pH vrednostih (Slika 2-13) so lastnosti hitozana polikationske, njegova topnost pa je višja zaradi protonacije amino skupine. S sulfonacijo postanejo kationske lastnosti hitozana reverzibilne oz. anionske, ki izboljšajo fluidnost, hitozan pa pridobi tudi antikoagulantne lastnosti [158,159]. Molska masa hitozana znaša med 300 in 1000 kD, s stopnjo deacetilacije med 30 % in 95 % [160]. Hitozan se uporablja v medicinskih aplikacijah pri tkivnem inženiringu, predvsem pa v sintezni postopkih za tarčno dostavo učinkovin. Poleg izjemne

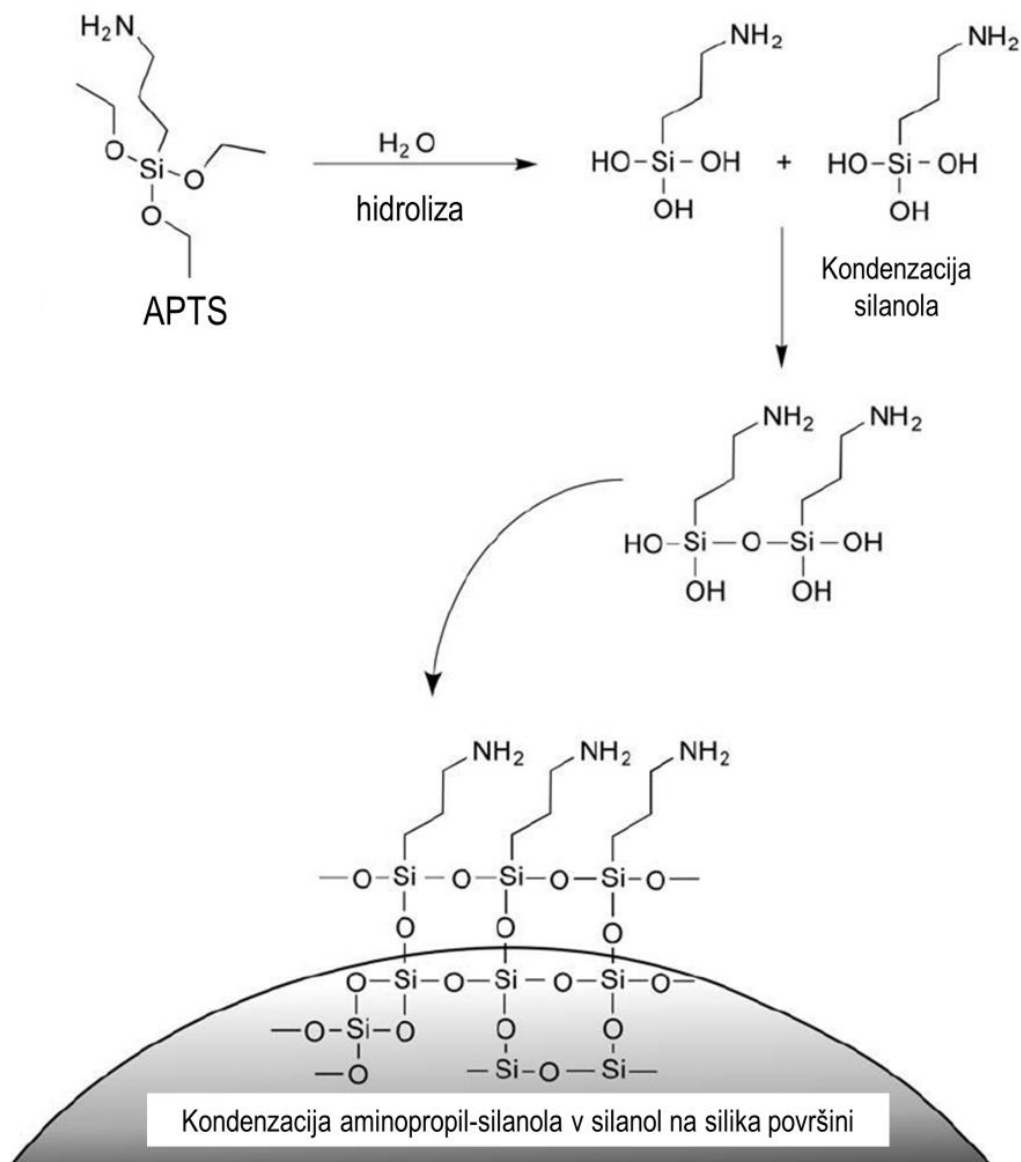
biokompatibilnosti in biorazgradljivosti je hitozan zanimiv za medicinske aplikacije tudi zaradi primarne aminske funkcionalne skupine [161,162], in sicer v ortopediji, dentalni medicini, oftalmologiji in kirurgiji [163,164].



Slika 2-13: Struktura hitozana pri različnih pH [23]

### 2.3.2 Površinska funkcionalizacija z anorganskimi materiali

Alternativa organskim materialom za prevlečenje MNPs so anorganski materiali, ki izboljšujejo antioksidativne lastnosti neprevlečenim MNPs. MNPs prevlečeni z anorganskimi materiali nudijo prednosti v katalizi, biooznačevanju in bioseparacijah. Med anorganske materiale spadajo silika, kovine, nekovine, kovinski oksidi in sulfidi. Silika je najpogostejši anorganski material, ki se uporablja za prevlečenje MNPs, saj izboljšuje stabilnost, preprečuje interakcije med delci in agregacijo, izboljšuje biokompatibilnost in hidrofilnost. Na MNPs, prevlečene s siliko se lahko vežejo različne biološke molekule ali ligandi [22,61,165–167]. Modifikacijo MNPs prevlečenih s siliko lahko dosežemo tudi s kovalentno derivatizacijo površine MNPs s funkcionaliziranim silanom. Pri reakciji APTS s silika delci dobimo površino delcev prevlečeno s primarnimi amino skupinami z elektrofilnimi skupinami (Slika 2-14). Prednosti uporabe silike pred organskimi polimeri so v višji gostoti delcev, zato lahko le-te spiramo s centrifugiranjem, četudi ti merijo v povprečju 30-40 nm. Lažja separacija delcev omogoča enostavnejše procesiranje v primerjavi s polimernimi delci istih velikosti. Prednost uporabe anorganskih materialov za prevlečenje MNPs je tudi zmožnost nespreminjanja oblike le-teh pri izpostavljanju v vodnih ali nevodnih topilih.



Slika 2-14: Funkcionalizirani silika delci z APTS [128]

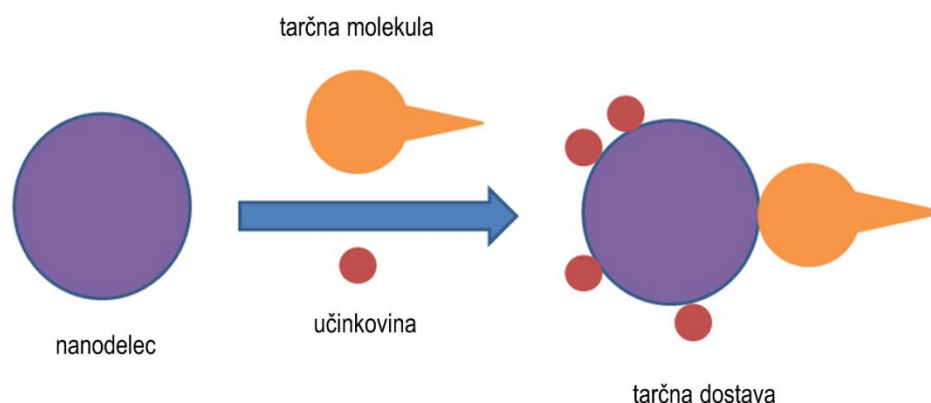
## 2.4 Uporaba MNPs

Napredki zadnjih desetletij so omogočili uporabo MNPs na različnih področjih, tako v bioznanosti kot biotehnologiji. MNPs so uporabljeni v številnih *in vivo* aplikacijah, kot so tarčna dostava učinkovin, MRI in tumorska terapija z magnetno hipertermijo. Pri *in vitro* aplikacijah so uporabni pri separaciji celic in biomolekul ter imobilizaciji različnih bioaktivnih učinkovin.

### 2.4.1 *In vivo*

MNPs so prvotno bili uporabljeni v medicini za magnetno separacijo bioloških produktov in celic, kot tudi za tarčno dostavo učinkovin [58,168], vedno bolj pa rastejo tudi klinične aplikacije MNPs, saj dobivajo le-ti vedno večjo vlogo v diagnostiki [21,49,107,157,169].

Zaradi odličnih magnetnih lastnosti se MNPs uporabljajo kot kontrastni agenti za MRI in za tarčno dostavo učinkovin (Slika 2-15), predvsem za dostavo kemoterapevtskih in protivnetnih učinkovin ter za gensko terapijo [170,171]. Zaradi možnosti vezave različnih polimerov omogočajo biokompatibilnost in netoksičnost kot tudi podaljšan čas cirkulacije določene učinkovine. Ko je učinkovina z nanodelcem koncentrirana na željeni specifični lokaciji v tkivu, se učinkovina lahko sprosti z nosilca, bodisi z encimsko aktivnostjo ali pa s spreminjanjem fizioloških pogojev, npr. temperature ali pH vrednosti [172]. Edina klinična uporaba komercialnih MNPs je uporaba le-teh kot kontrastnih agentov za MRI. MRI je najučinkovitejša neinvaziva tehnika v klinični medicini. Glede na velikost MNPs se za MRI uporabljajo standardni MNPs (50-180 nm), ultramajhni MNPs (10-50 nm) in zelo majhni MNPs (< 10 nm), med katerimi so ultramajhni MNPs najpogosteje uporabljeni MNPs.



Slika 2-15: Tarčna dostava učinkovin [172]

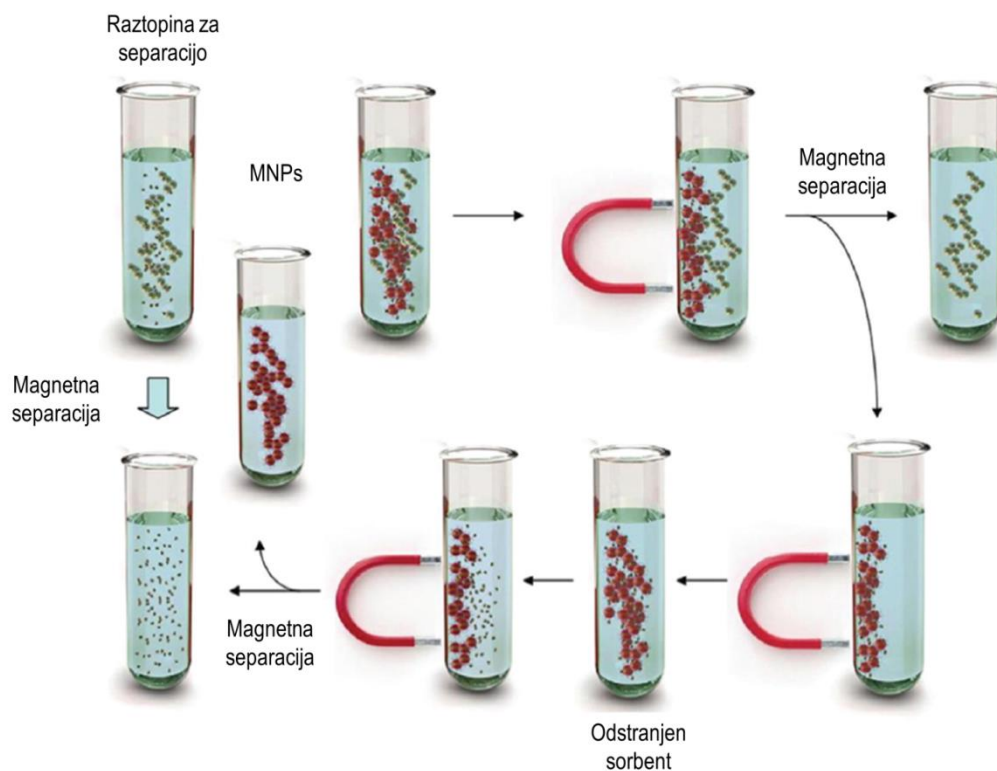
Kemoterapevtski agenti povzročajo ogromno stranskih učinkov predvsem zaradi slabe tarčne natančnosti, medtem ko imajo MNPs sposobnost dostave protirakavih učinkovin na točno specifično mesto v malignih celicah, pri tem pa ne škodujejo zdravim. Ker je z metodo tarčne dostave učinkovin z MNPs učinkovina dostavljena direktno na željeno lokacijo v tkivu, je tudi potreben odmerek veliko nižji kot pri kemoterapevtikih. V sistem tarčne dostave z MNPs je bilo vpeljanih že več protirakavih učinkovin, s čemer se je izboljšala tudi njihova tarčna specifičnost [173].

Magnetna hipertermija je postopek, kjer MNPs generirajo toplotno energijo, s katero uničujejo rakave celice. MNPs skupaj s celicami potujejo po endocitotskih poteh ter se koncentrirajo v intracelularnih endosomnih veziklih. Ko se pojavi visokofrekvenčno magnetno polje, se MNPs segrejejo, kar je posledica Neelove in Brownove relaksacije, ter lokalno uničijo prisotne celice [174,175].

## 2.4.2 *In vitro*

*In vitro* aplikacije zajemajo imobilizacijo encimov, encimskih inhibitorjev, oligonukleotidov ter drugih najrazličnejših biološko aktivnih učinkovin. Imobilizacija omogoča enostavno ponovno uporabo biomolekul iz reakcijskih sistemov s pomočjo zunanega magnetnega polja, s katerim imobilizirane biomolekule magnetno ločujemo. Prav tako lahko imobilizirano biomolekulo tarčno dostavljamo na želena specifično lokacijo [33].

Izolacija, separacija in čiščenje biološko aktivnih molekul (proteinov, peptidov, nukleinskih kislin in drugih specifičnih biomolekul) se uporablja v vseh vejah biotehnologije. Magnetna separacija ponuja številne prednosti v primerjavi z običajnimi separacijskimi postopki. Postopek je enostaven in kratek, saj lahko vsi koraki separacijskega postopka potekajo v eni reagenčni epruveti. Pri magnetni separaciji ne potrebujemo opreme visoke cenovne vrednosti, saj lahko uporabimo komercialno dostopne magnetne separatorje. Učinkovitost magnetne separacije še posebej koristi pri velikih in obsežnih industrijskih procesih. Magnetna separacija (Slika 2-16) predstavlja osnovo različnih avtomatiziranih procesov, predvsem pri imunoesejih z magnetnimi nanodelci, ki se upoabljajo za določevanje različnih analitov, proteinov in peptidov [176,177].



Slika 2-16: Poenostavljen shematski prikaz magnetne separacije [170]



Magnetna separacija na trdni fazi (MSPE) je postopek separacije na trdni fazi z uporabo magnetnih nanodelcev oz. magnetnih adsorbentov. Magnetni adsorbent dodamo raztopini ali suspenziji, ki vsebuje analit, katerega želimo adsorbirati na magnetni adsorbent. Odstranimo ga z uporabo magnetnega separatorja in nadaljno analiziramo [178]. Magnetno lahko separiramo tudi različne evkariontske in prokariontske celice iz najrazličnejših tkivnih ali krvnih raztopin [171,179]. Prav tako so v uporabi številni nanofertilizatorji, nanofungicidi in nanopesticidi na osnovi magnetnih nanodelcev za obdelavo različnih semen in rastlin [180–182]. MNPs se uporabljajo tudi na okoljevarstvenih področjih predvsem za preprečevanje onesnaževanja (detekcija, monitoring, remediacija) in obdelavi odpadnih vod (membranska filtracija, adsorpcija) [183,184].

## 2.5 Toksičnost MNPs

Različne študije MNPs potrjujejo visoko biokompatibilnost nanomaterialov brez toksičnih ali pa z zelo majhnimi učinki, ki ne povzročajo resnejših negativnih vplivov na organizem. Odzivnost imunskega sistema na dostavo učinkovine kot tudi sama toksičnost nanonosilca je v veliki meri odvisna od same biokompatibilnosti in biorazgradljivosti modificiranega nanonosilca, na katerem učinkovino prenašamo. Ko nanodelec modificiramo, se njegova toksičnost lahko ali zmanjša ali poveča. Toksičnost MNPs je odvisna od številnih faktorjev; od doziranja, kemijske sestave, velikosti, strukture, površinske kemije, biorazgradljivosti, farmakokinetike in biodistribucije. Velik vpliv na toksičnost MNPs imajo funkcionalne prevleke, ki delce naredijo biokompatibilne. K temu prispevajo različni polimeri, kot so dekstran ali hitozan. Nekatere raziskave kažejo, da delci, ki so neprevlečeni zmanjšujejo celično adhezijo fibroblastov, medtem ko prevlečeni delci ne povzročajo večjih sprememb. Neprevlečeni delci povzročajo membranske nepravilnosti, medtem ko prevlečeni delci ne povzročajo sprememb citoskeleto fibroblastov [185].

### 2.5.1 Inhibitorne lastnosti MNPs

Nanodelci z velikostjo 1-10 nm imajo dokazano izjemne antimikrobne lastnosti predvsem zaradi velike kontaktne površine z bakterijo [186]. Nanodelci z zelo majhnimi dimenzijami in antimikrobnimi komponentami, kot so srebro, bakrov oksid, titanov dioksid ter MNPs z vezanimi polimeri, kot so hitozan ali dekstran, posedujejo določene antimikrobne lastnosti. Nanodelci z antimikrobnimi lastnostmi lahko inhibirajo rast nekaterih mikroorganizmov tako, da prekinejo njihovo rast, v nekaterih primerih celo uničujejo patogene [187].

Bakterije klasificiramo na Gram-pozitivne in Gram-negativne. Gram-pozitivne bakterije imajo debelejšo celično steno peptidoglikanov kot Gram-negativne. Gram-negativne bakterije pa imajo zunanjo membrano lipopolisaharidov, ki je Gram-pozitivne bakterije nimajo. Gram-negativne bakterije imajo dodatno periplazmično plast med zunanjo steno in membrano. Ker je ta plast tanjša od plasti pri Gram-pozitivnih bakterijah, je pri izpostavitvi nanodelcem z antimikrobinimi lastnostmi bolj dovzetna za poškodbe celične stene [188,189].

## 2.6 Eksperimentalni del

### 2.6.1 Materiali in reagenti

Za sintezo magnetnih nanodelcev, modificiranih s CMD smo uporabili:

- železov (III) klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), Merck, Nemčija
- železov (II) klorid tetrahidrat ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), Merck, Nemčija
- CMD natrijevo sol, MW=10000-20000 Da, Sigma Aldrich, Nemčija
- amonijakalno raztopino (25 %  $\text{NH}_3$ ), Chem-Lab, Belgija
- etanol (96 %  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), Sigma Aldrich, Nemčija
- dušik ( $\text{N}_2$ , 99,5 %), Messer, Slovenija
- milliQ vodo

Za sintezo hitozanskih magnetnih nanodelcev smo uporabili:

- železov (III) klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), Merck, Nemčija
- železov (II) klorid tetrahidrat ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), Merck, Nemčija
- amonijakalno raztopino (25 %  $\text{NH}_3$ ), Chem-Lab, Belgija
- citrsko kislino, Merck, Nemčija
- hitozan, Sigma Aldrich, Nemčija
- parafinsko olje, Pharmachem, Slovenija
- emulgator Span-80, Sigma-Aldrich, Nemčija
- glutaraldehyd, 25 %, Sigma Aldrich, Nemčija
- natrijev hidroksid ( $\text{NaOH}$ ), Merck, Nemčija
- očetno kislino ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), Merck, Nemčija
- klorovodikovo kislino ( $\text{HCl}$ ), Merck, Nemčija
- milliQ vodo

Za sintezo aminosilanskih magnetnih nanodelcev smo uporabili:

- železov (III) klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), Merck Nemčija
- železov (II) klorid tetrahidrat ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), Merck, Nemčija
- amonijakalno raztopino (25 %  $\text{NH}_3$ ), Chem-Lab, Belgija
- citrsko kislino ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_3$ ), Merck, Nemčija
- natrijev silikat ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ), Sigma Aldrich, Nemčija
- klorovodikovo kislino ( $\text{HCl}$ ), Merck, Nemčija
- 3-aminopropil-trimetoksisilan (97 % APTMS), Sigma Aldrich, Nemčija
- metanojsko kislino ( $\text{HCOOH}$ ), Merck, Nemčija
- metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), Merck, Nemčija
- glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ), Kemika, Slovenija
- natrijev klorid ( $\text{NaCl}$ ), Merck, Nemčija
- milliQ vodo

Za določevanje inhibitornih lastnosti smo uporabili:

- triptični soja bujon, Merck, Nemčija
- goveji krvni serum, Sigma-Aldrich, Nemčija
- mesni pepton, Merck, Nemčija
- mesni ekstrakt, Merck, Nemčija
- kvasni ekstrakt, Sigma-Aldrich, Nemčija
- agar, Sigma-Aldrich, Nemčija
- natrijev klorid (NaCl), Merck, Nemčija
- bakterijske kulture za študijo inhibitornega učinka HIT-MNPs (Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Maribor):
  - *Escherichia coli*
  - *Klebsiella pneumoniae*
  - *Pseudomonas aeruginosa*
  - *Staphylococcus aureus*
  - *Enterococcus faecalis*
- bakterijske kulture za študijo inhibitornega učinka CMD-MNPs (DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH):
  - *Escherichia coli*
  - *Staphylococcus aureus*

## 2.6.2 Laboratorijska oprema in aparature

Pri laboratorijskem delu smo uporabili naslednjo opremo in aparature:

- merilni valji (10 mL, 50 mL, 100 mL, 1 L)
- steklene čaše (5 mL, 20 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500, mL)
- steklene bučke (100 mL, 200 mL)
- mikrocentrifugirke (1500  $\mu$ L, 2000  $\mu$ L)
- centrifugirke (50 mL)
- stekleni trivratni reaktor
- mehansko mešalo
- magnetno mešalo
- magnet
- mikropipete
- pH meter
- termometer
- tehnica
- ultrazvočna kopel
- stresalnik in inkubator (Heidolph Unimax 1010)
- centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5804 R)

## 2.6.3 Eksperimentalne metode

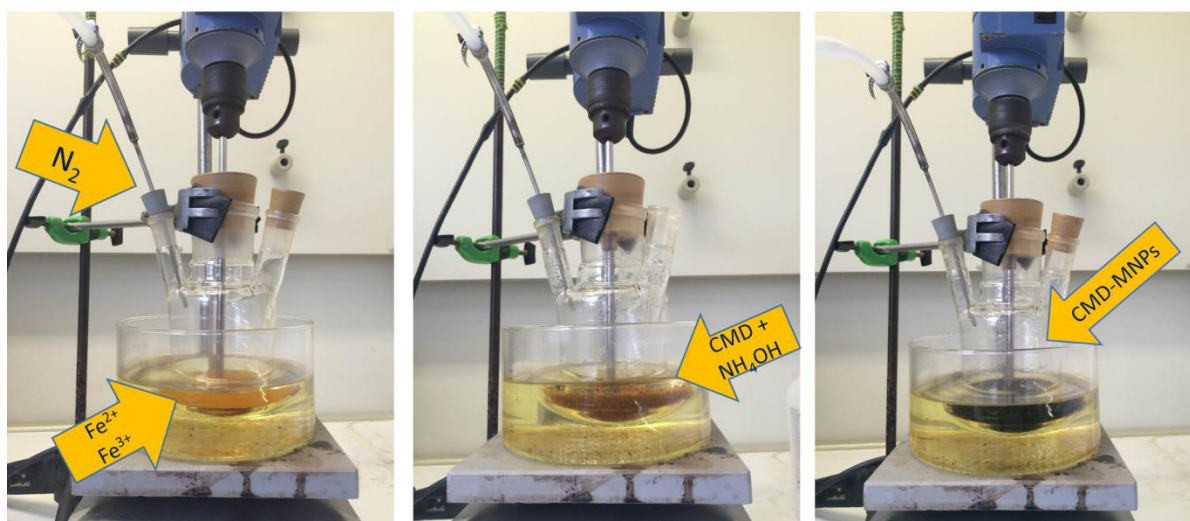
### 2.6.3.1 Priprava CMD raztopin

Za pripravo CMD raztopin smo uporabili CMD natrijevo sol, ki smo jo raztopili v vodnem mediju. Pripravili smo 20 mL vsake raztopine CMD s končnimi koncentracijami 0,25 g/mL, 0,40 g/mL in 0,50 g/mL. CMD raztopine smo segreli na 40 °C in jih mešali 30 min, da smo dobili homogeno raztopino.

### 2.6.3.2 Sinteza CMD-MNPs

Sintezo magnetnih nanodelcev smo pripravili z metodo koprecipitacije ali obarjalno reakcijo železovih (III) ionov in železovih (II) ionov v ustreznem stehiometričnem razmerju 2:1 ob dodatku baze ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) in močnem mehanskem mešanju. Glavna prednost takšne sinteze je velika količina nanodelcev na ekonomičen in preprost način. Ker imajo magnetni nanodelci težnjo po agregiranju oz. združevanju v skupke, je potrebno le-te prevleči z ustreznimi funkcionalnimi prevlekami, s čemer zagotovimo netoksičnost, biokompatibilnost in biorazgradljivost nanonosilca. V našem primeru smo kot prevleko uporabili polimer CMD.

CMD-MNPs smo pripravili tako, da smo 4,4 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  in 1,6 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  raztopili v 40 mL milliQ vode. Raztopino smo za 5 min postavili na ultrazvočno kopel. Po 5 min na ultrazvočni kopeli smo raztopino prelili v trivratni reaktor potopljen v parafinsko kopel, opremljen z mehanskim mešalom ter močno mešali na 500 rpm pod inertno dušikovo atmosfero (Slika 2-17). Predhodno pripravljene CMD raztopine z določeno koncentracijo (iz poglavja 2.2.3.1) smo dodali 5 mL 25 % amonijakalne raztopine. Ko je raztopina železovih ionov dosegla 85 °C, smo pripravljeno raztopino CMD in amonijakalno raztopino po kapljicah dodajali raztopini železovih ionov in nadaljno mešali 1 uro na 85 °C.



Slika 2-17: Postopek priprave CMD-MNPs v trivratnem reaktoru pod  $\text{N}_2$  atmosfero.

Nastanek CMD-MNPs smo zaznali s preskokom barve iz rjave v črno, kar smo dosegli z obarjanjem železovih ionov ob prisotnosti dodane baze, v našem primeru 25 % amonijakane raztopine ob dodatku pripravljene CMD raztopine. Preskok barve raztopine in

pripravo CMD-MNPs v trivratnem reaktorju z mešanjem z mehanskim mešalom pod inertno dušikovo atmosfero prikazuje Slika 2-17.

Ohlajeno in obarjeno suspenzijo CMD-MNPs smo prenesli v manjšo čašo ter delce posedali in jih magnetno dekantirali s spiranjem s 150 mL milliQ vode. Postopek smo ponovili dvakrat. Pripravljene CMD-MNPs smo nato liofilizirali.

Opravili smo 3 postopke sinteze CMD-MNPs s tremi različnimi koncentracijami CMD natrijeve soli. Glede na uporabljeno koncentracijo CMD natrijeve soli smo dobili vzorce z naslednjimi oznakami:

- CMD1-MNPs (CMD s koncentracijo 0,25 g/mL)
- CMD2-MNPs (CMD s koncentracijo 0,40 g/mL)
- CMD3-MNPs (CMD s koncentracijo 0,50 g/mL)

### **2.6.3.3 Sinteza HIT-MNPs**

HIT-MNPs smo pripravili po postopkih opisanih v delu Hojnik in ostali [190] in jih uporabili za določevanje inhibitornih lastnosti.

### **2.6.3.4 Sinteza AMS-MNPs**

AMS-MNPs smo pripravili po postopkih opisanih v delu Šulek in ostali [22] in jih uporabili za določevanje inhibitornih lastnosti.

## **2.6.4 Analizne metode**

Za karakterizacijo pripravljenih magnetnih nanodelcev, prevlečenih s CMD (CMD1-MNPs, CMD2-MNPs in CMD3-MNPs) smo uporabili naslednje analizne metode.

### **2.6.4.1 Fourier-transformirana infrardeča spektroskopija (FT-IR)**

S FT-IR smo preučevali vezavo med sintetiziranimi magnetnimi nanodelci in prevlekami CMD različnih koncentracij. FT-IR analizo smo opravili tako, da smo pripravljene suhe vzorce CMD-MNPs zmešali s suhim KBr v razmerju 1:10, nato pa s tlačno prešo naredili tabletko. Analizo smo opravili na FT-IR spektrofotometru Perkin Elmer 1600 Fourier transform infrared spectroscopy z območjem snemanja  $500\text{ cm}^{-1}$  do  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

### **2.6.4.2 Termogravimetrična analiza (TGA)**

S TGA pripravljenih vzorcev CMD-MNPs smo merili fizikalne spremembe pripravljenih vzorcev CMD-MNPs, in sicer spremembo mase vzorca v kontrolirani atmosferi v odvisnosti od temperature. TGA analizo smo opravili na aparaturi TGA/DSC1 (Schmadzu, IRAffinity-1, Mettler Toledo). Vzorce smo segrevali od sobne temperature do  $600\text{ °C}$  pod  $\text{N}_2$  atmosfero. Z inertno atmosfero smo preprečili oksidacijo vzorcev. Temperaturni korak TGA analize je znašal  $10\text{ °C/min}$ , z natančnostjo  $\pm 0,3\text{ °C}$  in temperaturno točnostjo  $\pm 0,5\text{ °C}$ .

#### **2.6.4.3 Vrstična elektronska mikroskopija (SEM)**

S SEM smo preučevali morfologijo in velikosti sintetiziranih magnetnih nanodelcev prevlečenih s CMD. Analizo smo opravili na vrstičnem elektronskem mikroskopu FE, SEM Sirion, 400 NC, FEI. Vzorce smo pripravili v obliki nanosa magnetnega prahu na ogljikovo pasto, ko smo jo napršili z zlatom (Au).

#### **2.6.4.4 Energijsko disperzijska spektroskopija (EDS)**

Za identifikacijo in kvalitativno določitev kemijskih elementov v sintetiziranih vzorcih CMD-MNPs smo uporabili analizo EDS, ki smo jo izvedli na vrstičnem elektronskem mikroskopu (SEM), FE SEM Sirion, 400 NC, FEI. Z EDS metodo zanesljivo kvantitativno določimo masni delež elementa (>10%), manjše količine elementa (1-10%) ter elemente v sledovih (<1%).

#### **2.6.4.5 Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM)**

S TEM smo proučevali morfologijo in strukturne lastnosti sintetiziranih magnetnih nanodelcev, prevlečenih s CMD ter določevali razpon velikosti le-teh in debelino prevleke CMD. Meritve TEM pripravljenih vzorcev CMD-MNPs so bile opravljene na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani na presevnem elektronskem mikroskopu JEOL 2010F s pospeševalno napetostjo elektronov 200 kV. Vzorce smo nanесли na bakreno presevno mrežico z nanešeno amorfnoplastjo ogljika.

#### **2.6.4.6 Meritve dinamičnega sipanja svetlobe (DLS)**

S pomočjo dinamičnega sipanja svetlobe smo določevali porazdelitev velikosti, hidrodinamični premer ter  $\zeta$ -potencial sintetiziranih CMD-MNPs s pomočjo Brownovega gibanja v suspenzijah. DLS vzorcev smo opravili na aparatu Zetasized Nano ZS, kjer smo vzorce sintetiziranih CMD-MNPs, dispergiranih v vodnem mediju z nevtralnimi pH pri sobni temperaturi, nalili v steklene kivete, gibanje delcev pa posneli s pomočjo laserja. Po Brownu se manjši delci gibljejo hitreje, večji pa počasneje.

#### **2.6.4.7 Elektronska paramagnetna resonanca (EPR)**

Z EPR smo sintetiziranim vzorcem CMD-MNPs izmerili prehode elektronskih spinov med energijskimi nivoji. Prehod inducira elektromagnetno valovanje z ustrešno frekvenco (mikrovalovi), s katerim vzorec obsevamo. EPR spektri sintetiziranih CMD-MNPs so bili posneti na Državni univerzi M. V. Lomonosov v Moskvi, Rusija, na instrumentu Bruker ELEXSYS-500 X-band EPR spektrometer (frekvenca 100 kHz pri temperaturi 25 °C v kvarčnih kivetah premera 1,0 mm. EPR spekter pri -196 °C je bil posnet na X-band Bruker EMX-8 spektrometru. Za natančno kalibracijo magnetnega polja smo uporabili standard DPPH ( $g_0 = 2,0036$ ) in manganove ione ( $Mn^{2+}$ ) v matriksu magnezijevega oksida (MgO). Za izračun  $g$ -vrednosti iz eksperimentalnega EPR spektra smo uporabili vrednost magnetnega polja v sredini amplitude spektralne linije. Masa vzorca je znašala 0,3 – 0,7 mg.

### 2.6.4.8 Magnetne meritve

Z magnetometrom z vibrirajočo glavo (VSM) smo določevali odvisnot magnetizacije od zunanega magnetnega polja. Meritve smo izvajali pri sobni temperaturi na Lake Shore 7307 VSM magnetometru.

### 2.6.5 Določevanje inhibitornih lastnosti

Študijo toksičnosti oz. stopnje, do katere lahko neka substanca poškoduje organizem smo izvajali na petih različnih bakterijskih kulturah, in sicer *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* in *K. pneumoniae*. Za določevanje stopnje toksičnosti HIT-MNPs smo za vseh pet bakterijskih kultur uporabili pripravljene ATCC standarde. Za določevanje stopnje toksičnosti CMD-MNPs smo pripravili hranilna medija za gojenje *E. coli* in *S. aureus*.

#### 2.6.5.1 Določevanje inhibitornih lastnosti CMD-MNPs

Najprej smo pripravili hranilne medije za gojenje posameznih bakterijskih kultur. Sestavo posameznega medija prikazujeta Tabela 3-6 in Tabela 3-7.

- *E. coli*

Tabela 2-4: Hranilni medij za gojenje *E. coli*

Mesni pepton	5 g
Mesni ekstrakt	3 g
Agar (za trdi medij)	15 g
Destilirana voda	1 L

- *S. aureus*

Tabela 2-5: Hranilni medij za gojenje *S. aureus*

Triptičen sojin bujon	30 g
Kvasni ekstrakt	3 g
Agar (za trdi medij)	15 g
Destilirana voda	1 L

Postopek priprave obeh hranilnih medijev je sledil naslednjim navodilom:

- posamezne sestavine zatehtamo v stekleno čašo na navoj;
- stekleno čašo dopolnimo s potrebno količino destilirane vode;
- stekleno čašo postavimo v vrelo vodno kopel ter z magnetnim mešalčkom raztopimo mešamo ob segrevanju dokler ne dosežemo homogenosti raztopine;
- tekoči medij v stekleni čaši steriliziramo v avtoklavu;
- po končani sterilizaciji medij aseptično prelijemo v petrijevke (19 mL);

- medij v petrijevkah pustimo, da se ob ohlajanju strdi.

Ko se gojišča v petrijevkah strdijo, so pripravljena za uporabo.

#### 2.6.5.1.1 Določevanje začetnih koncentracij mikrobnih kultur

Za pripravo mikrobnih kultur smo pripravili 0,9 % fiziološko raztopino:

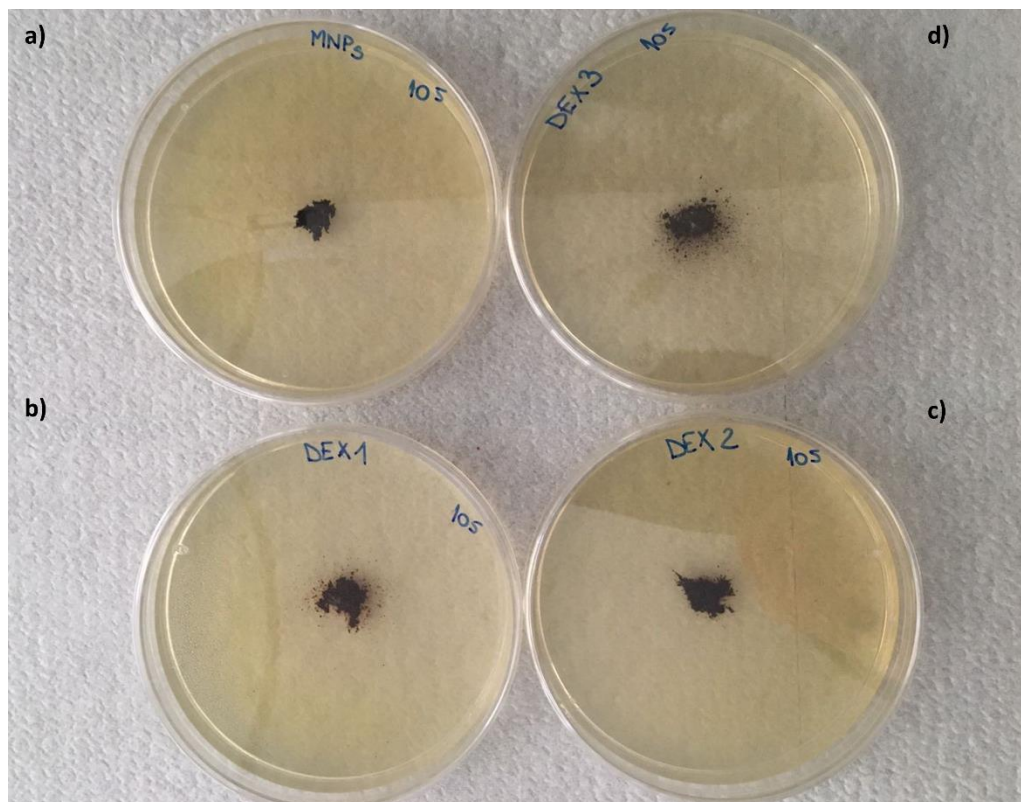
- 9 g natrijevega klorida (NaCl) raztopimo v 1 L destilirane vode;
- v steklene epruvete odpipetiramo 9 mL fiziološke raztopine;
- steklene epruvete s fiziološko raztopino steriliziramo v avtoklavu po postopku sterilizacije z vlažno toploto;
- po končani sterilizaciji epruvete s sterilno fiziološko raztopino ohladimo na sobno temperaturo;
- ohlajena sterilna fiziološka raztopina v stekleni epruveti je pripravljena za uporabo.

Za pripravo začetne koncentracije mikrobne kulture smo pripravili redčine posamezne bakterijske kulture:

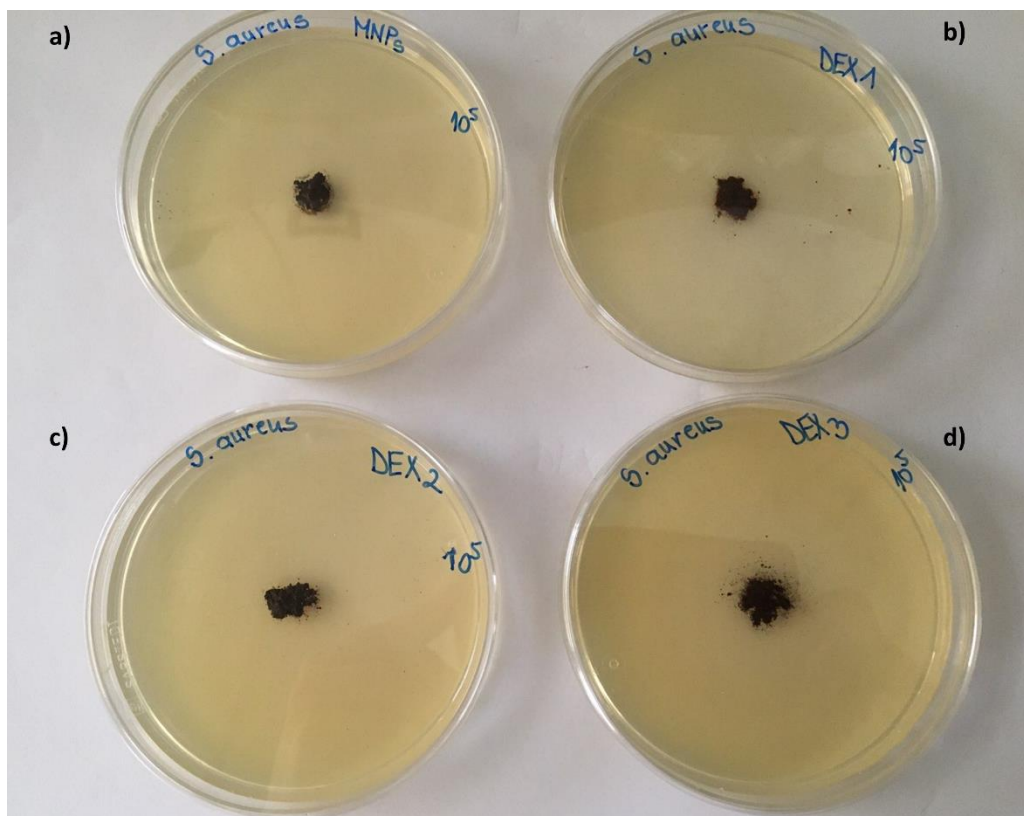
- v aseptičnem okolju smo v sterilne steklene epruvete s fiziološko raztopino s cepilno zanko prenesli posamezno bakterijsko kulturo;
- dobljeno suspenzijo smo dobro premešali na vorteksu;
- pripravili smo redčine  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  mikrobnih kultur.

Ko so redčine bile pripravljene, smo na petrijevke s trdnim hranilnim gojiščem nanesti 100  $\mu$ L pripravljene bakterijske kulture *E. coli* in *S. aureus* z začetno koncentracijo  $10^5$  CFU/mL. Bakterijsko kulturo smo v aseptičnem okolju razmazali z Drigalski spatulo po gojišču. Nato smo na gojišče z bakterijsko kulturo prenesli 10-30 mg posameznih MNPs (neprevlečenih MNPs, CMD1-MNPs, CMD2-MNPs in CMD3-MNPs) ter jih inkubirali 24 ur na temperaturi 37 °C. Po 24 urah smo na hranilnem gojišču kvalitativno določili, ali je v primeru katerih MNPs prišlo do nastanka inhibicijske cone. Pripravo posameznih MNPs nanešenih na hranilna gojišča z bakterijsko kulturo *E. coli* pred inkubacijo prikazuje Slika 2-18, na hranilna gojišča z bakterijsko kulturo *S. aureus* pred inkubacijo pa Slika 2-19.





Slika 2-18: Pripravljeni neprevlečeni MNPs (a), CMD1-MNPs (b), CMD2-MNPs (c) in CMD3-MNPs (d) na bakterijski kulturi *E. coli* pred inkubacijo

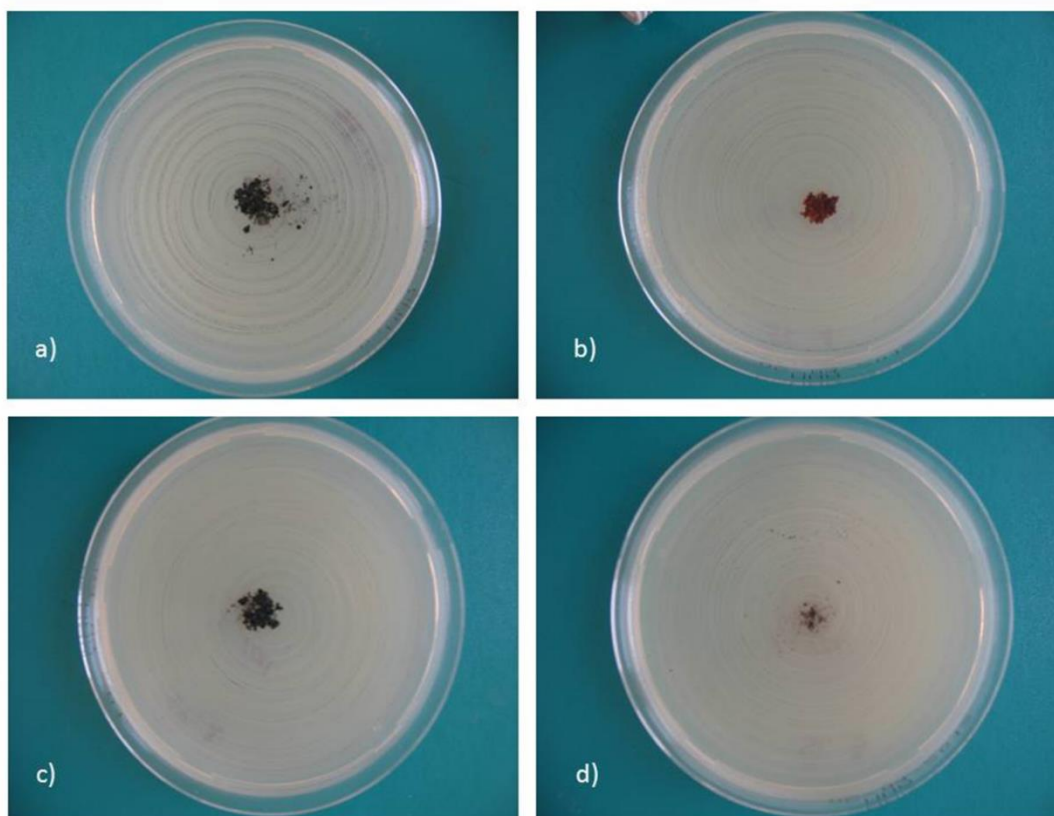


Slika 2-19: Pripravljeni neprevlečeni MNPs (a), CMD1-MNPs (b), CMD2-MNPs (c) in CMD3-MNPs (d) na bakterijski kulturi *S. aureus* pred inkubacijo

### 2.6.5.2 Določevanje inhibitornih lastnosti HIT-MNPs

Pri študiji toksičnosti HIT-MNPs na bakterijski kulturi *E. coli*, smo 10-30 mg magnetnih nanodelcev nanесли direktno na pripravljen Hinton-Muellerjev agar skupaj s suspenzijo bakterijske kulture *E. coli*. Pri tem smo uporabili 0,5 McFarland raztopine *E. coli*. Bakterijsko rast smo opazovali po 96 urah na 37 °C.

Pri študiji toksičnosti HIT-MNPs na bakterijskih kulturah *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* in *K. pneumoniae* smo 10-30 mg magnetnih nanodelcev skupaj s 400 CFU posamezne bakterijske kulture prenesli v tekoči medij sojinega agarja (TSB). Tako pripravljen agar smo inkubirali na 35 °C. Po enem dnevu smo 0,5 mL inkubirane suspenzije razmazali na petrijevko s krvnim agarjem. Postopek smo ponovili in po 10. dneh inkubiranja ponovno nanесли 0,5 mL inkubirane suspenzije na petrijevko s krvnim agarjem. Bakterijsko rast smo opazovali po 24 urah. Pripravljene neprevlečene MNPs in HIT-MNPs na bakterijski kulturi *E. coli* pred inkubacijo prikazuje Slika 2-20.



Slika 2-20: Neprevlečeni MNPs (a), HIT-MNPs po postopku mikroemulzije (b), HIT-MNPs po postopku suspenzijske zamreževalne tehnike (c) in HIT-MNPs po postopku kovalentne vezave (d) na bakterijski kulturi *E. coli* pred inkubacijo

## 2.7 Rezultati in diskusija

V prvem sklopu doktorskega dela smo sintetizirali tri vrste različnih CMD-MNPs (CMD1-MNPs, CMD2-MNPs in CMD3-MNPs). Tako sintetizirane delce smo okarakterizirali s 7 analiznimi metodami ter jim določili inhibitorne lastnosti, pri čemer smo uporabili dve bakterijski kulturi, Gram negativno *E. coli* in Gram pozitivno *S. aureus*. Prav tako smo inhibitorne lastnosti določili pripravljenim HIT-MNPs in AMS-MNPs, ki smo jih pripravili po že objavljenih postopkih, pri čemer smo za določevanje stopnje inhibicije uporabili 5 različnih bakterijskih kultur, in sicer tri Gram negativne bakterije (*E. coli*, *K. pneumoniae* in *P. aeruginosa*) in dve Gram pozitivni bakteriji (*S. aureus* in *E. faecalis*).

### 2.7.1 Sinteza CMD-MNPs

Najprej smo pripravili magnetne nanonosilce, modificirane z CMD, katere smo v postopek sinteze uvedli s tremi različnimi koncentracijami, in sicer 0,25 g/mL, 0,4 g/mL in 0,5 g/mL, ter tako dobili tri različne nanonosilce z oznakami CMD1-MNPs, CMD2-MNPs in CMD3-MNPs. Vse tri pripravljene nanonosilce smo okarakterizirali z analiznimi metodami.

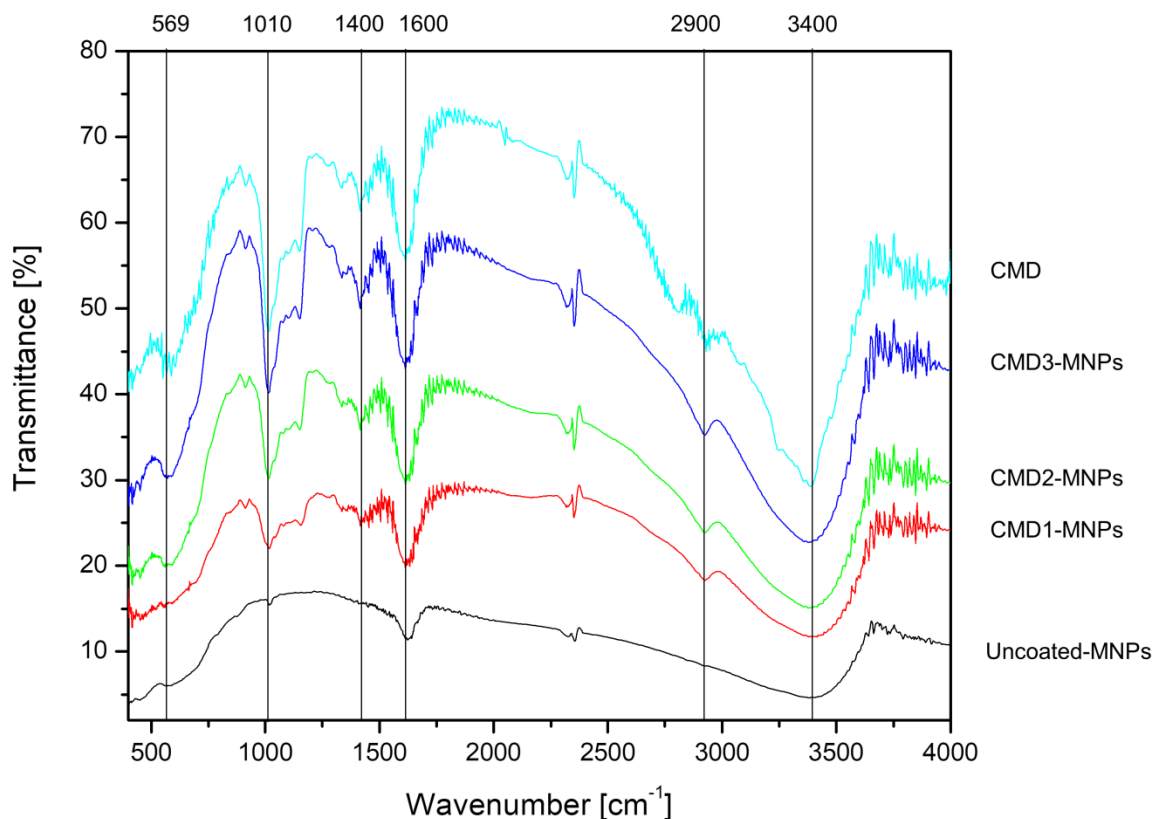
### 2.7.2 Karakterizacija CMD-MNPs

Po zaključeni sintezi CMD-MNPs smo prisotnost polimera CMD na površini pripravljenih CMD-MNPs določili ter potrdili z različnimi analiznimi metodami. Vezavo CMD na površino MNPs smo potrdili z metodama FT-IR in TGA, morfologijo in velikosti pripravljenih CMD-MNPs smo določili z metodami SEM, TEM in DLS. Z metodo EPR smo preučili paramagnetne centre, z VSM metodo pa magnetne lastnosti CMD-MNPs.

#### 2.7.2.1 FT-IR

Za kvalitativno določanje prisotnosti vezanega polimera CMD v sintetiziranih CMD-MNPs je bila uporabljena FT-IR. S tem namenom smo posneli IR spekter sintetiziranih CMD1-MNPs, CMD2-MNPs, CMD3-MNPs, neprevlečenih MNPs in čistega polimera CMD ter na podlagi dobljenih spektrov primerjali absorpcijske vrhove pri določenih valovnih številih. Slika 2-21 prikazuje spektre sintetiziranih vzorcev CMD1-MNPs, CMD2-MNPs, CMD3-MNPs, neprevlečenih MNPs in čistega polimera CMD. Iz spektra neprevlečenih MNPs lahko opazimo karakteristične absorpcijske vrhove pri valovnem številu  $569\text{ cm}^{-1}$  in  $682\text{ cm}^{-1}$ , ki pripadajo raztezajočim vibracijam Fe-O vezi. Prav tako lahko absorpcijski vrh pri valovnem številu  $1624\text{ cm}^{-1}$  pripišemo zvijanju vezi H-O-H, ki je adsorbirana na površini železovega oksida  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Ko smo neprevlečene MNPs modificirali s polimerom CMD, sta se jakosti absorpcijskih vrhov pri valovnem številu  $569\text{ cm}^{-1}$  in  $682\text{ cm}^{-1}$  nekoliko zmanjšali. Iz spektra CMD1-MNPs lahko opazimo močan absorpcijski vrh pri valovnem številu  $2900\text{ cm}^{-1}$ , ki pripada polimeru CMD, in sicer vibracijam  $\nu\text{C-H}$  in  $\delta\text{C-H}$ , prav tako absorpcijski vrhovi pri valovnem številu  $1375\text{-}1460\text{ cm}^{-1}$ . Absorpcijski vrh pri valovnem številu  $1600\text{ cm}^{-1}$  pripada karboksilnim skupinam, absorpcijski vrh pri valovnem številu  $3417\text{ cm}^{-1}$  pa hidroksilnim skupinam polimera CMD, kjer lahko le-te jasneje opazimo pri spektru čistega

CMD. Vibracije vezi  $\nu\text{C-O}$  polimera CMD lahko opazimo pri vseh CMD-MNPs in se kažejo v absorpcijskem vrhu pri valovnem številu približno  $1010\text{-}1012\text{ cm}^{-1}$ . Širok absorpcijski vrh pri valovnem številu  $3408\text{ cm}^{-1}$  pa ustreza karakterističnemu raztezanju vezi  $\nu\text{O-H}$  in  $\delta\text{O-H}$  hidroksilnih skupin polimera CMD, prav tako vidnih v vseh CMD-MNPs.



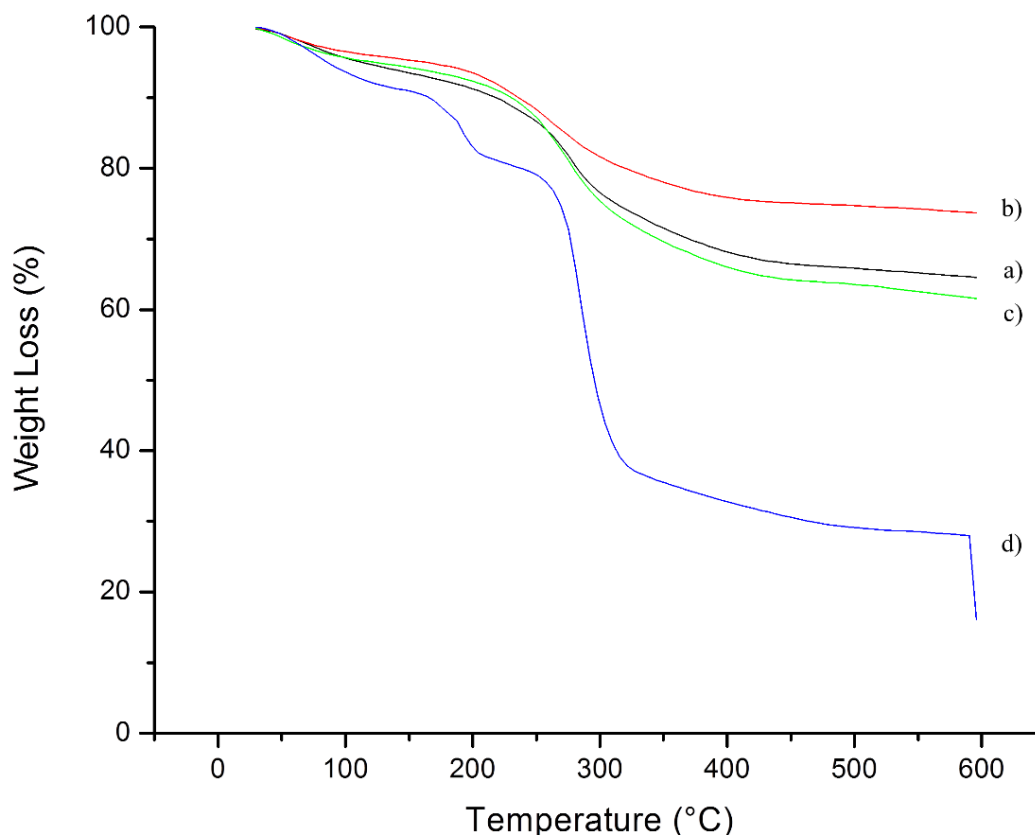
Slika 2-21: FT-IR spektri vzorcev CMD1-MNPs, CMD2-MNPs, CMD3-MNPs, neprevlečenih MNPs in čistega polimera CMD

Vsi CMD1-MNPs, CMD2-MNPs in CMD3-MNPs imajo podobne FT-IR spektre, ki se razlikujejo le v jakosti absorpcijskih vrhov. Prisotnost vezanega polimera CMD opazimo v vseh treh vzorcih, saj prikazujejo absorpcijske vrhove, značilne za hidroksilne skupine (pri valovnem številu približno  $3400\text{ cm}^{-1}$ ) in karboksilne skupine (pri valovnem številu približno  $1600\text{ cm}^{-1}$ ), ki so prisotne v verigah polimera CMD. Te značilne absorpcijske vrhove opazimo pri spektru čistega polimera CMD, ki ga pri spektru neprevlečenih MNPs ne opazimo oz. je intenziteta zelo zmanjšana. Zato lahko iz analize FT-IR sklepamo, da smo uspešno sintetizirali vse tri CMD-MNPs, saj nam spektri vseh treh sintetiziranih CMD-MNPs prikazujejo značilne absorpcijske vrhove CMD.

### 2.7.2.2 TGA

Za kvantitativno določanje prisotnosti vezanega polimera CMD v vseh treh sintetiziranih vzorcih je bila uporabljena TGA. TGA smo opravili za vzorce CMD1-MNPs, CMD2-MNPs,

CMD3-MNPs in čisti polimer CMD ter tako primerjali njihove termogravimetrične krivulje (Slika 2-22).



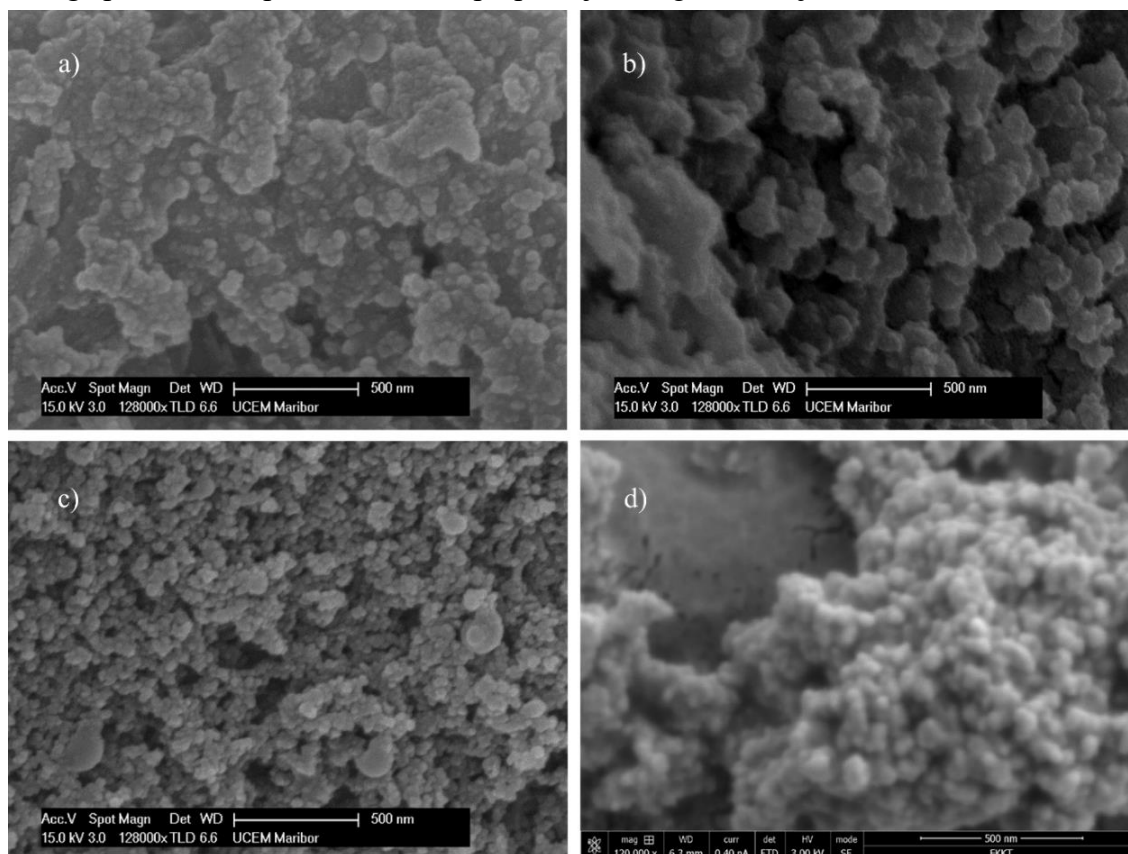
Slika 2-22: TGA krivulje CMD1-MNPs (a), CMD2-MNPs (b), CMD3-MNPs (c), CMD (d)

Krivulje razpada, ki prikazuje izgube mase posameznih vzorcev prikazuje Slika 2-22. Začetna oz. prva stopnja izguba mase pri vseh vzorcih se začne v temperaturnem območju od 70 °C do 150 °C, ki je posledica adsorbirane vode na površini delcev. Druga nekoliko večja stopnja izgube mase se pojavi v temperaturnem območju od 150 °C do 300 °C, ki je značilna temperatura za razgradnjo enostavnih polimerov. Razpad v drugi stopnji, ki se pojavi v sintetiziranih vzorcih CMD-MNPs (a, b, c) sovpada s krivuljo razpada čistega CMD (d), iz katere je razvidna termična razgradnja CMD v temperaturnem območju od 250 °C do 350 °C, iz česar lahko sklepamo, da izguba mase v drugi stopnji krivulje razpada vzorcev pripada polimeru CMD vezanem na MNPs. S tem smo kvantitativno potrdili prisotnost in uspešno vezavo CMD v kompleksu vseh CMD-MNPs, saj je za razgradnjo kovalentnih vezi na površini nanodelca potrebno več energije [191–194]. Ostanek, ki se pojavi, ko se CMD popolnoma razgradi, so predvsem železovi MNPs. Iz rezultatov, ki smo jih pridobili iz TGA analize lahko ocenimo delež polimera CMD v vsakem od sintetiziranih CMD-MNPs, ki znaša 34,8 % za CMD1-MNPs, 25,6 % za CMD2-MNPs in 37,8 % za CMD3-MNPs. Največjo vsebnost polimera CMD pričakovano opazimo v vzorcu CMD3-MNPs, saj je v slednjem tudi najvišja kocnetracija CMD vezanega v postopku sinteze. Z višjo koncentracijo dobimo večjo vsebnost polimera CMD in posledično več možnosti polimera v stiku s površjem MNPs. S povečevanjem koncentracije CMD dobimo bolj zapletene verige CMD, kar omogoča več polimera na voljo za kovalentno vezavo na površino MNPs.



### 2.7.2.3 SEM in EDS

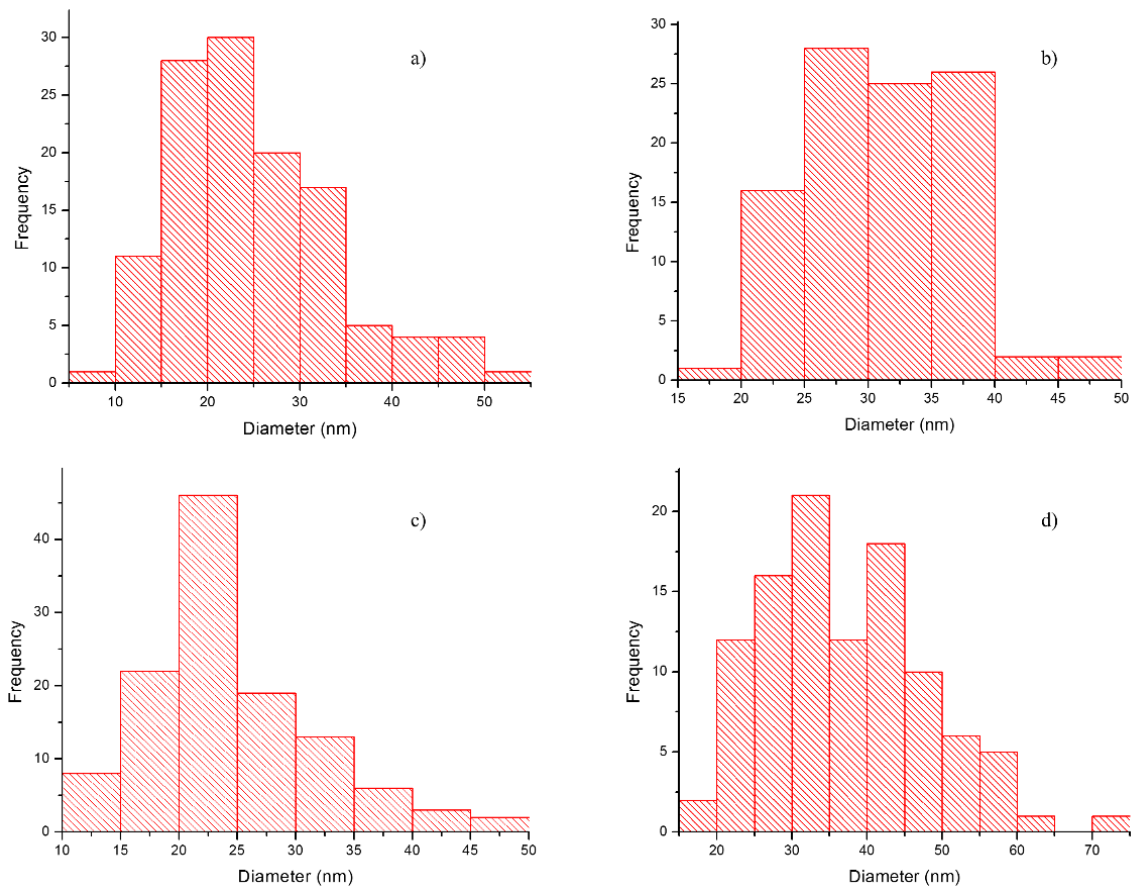
Površinsko morfologijo in velikost delcev CMD-MNPs smo določili s SEM. Slika 2-23 prikazuje vse tri sintetizirane CMD-MNPs in neprevlečene MNPs. Iz SEM posnetkov je razvidno, da je večina sintetiziranih delcev CMD-MNPs značilne sferične oblike s povprečnimi premeri 27 nm (CMD1-MNPs), 30 nm (CMD2-MNPs) in 28 nm (CMD3-MNPs), premer neprevlečenih MNPs pa 37 nm. Ker imajo MNPs v splošnem veliko specifično površino in visoko površinsko energijo, se radi združujejo v skupke oz. aglomerirajo. Zato je iz SEM posnetkov mogoče opaziti tudi aglomerirane skupke. Iz povprečnih premerov posameznih delcev je mogoče opaziti tudi zmanjšanje premera sintetiziranih MNPs, kateri so prevlečeni s polimerom CMD v primerjavi z neprevlečenimi. Tako smo iz povprečnega premera neprevlečenih MNPs, ki je znašal 37 nm, uspeli zmanjšati premer v vseh treh primerih, ko smo MNPs modificirali s CMD v sinteznem postopku priprave CMD-MNPs. Razlike v povprečnih velikosti posameznih nanodelcev so posledica različnih koncentracij CMD, saj z večanjem koncentracije in s tem količine vezane polimera na površino MNPs preprečujemo aglomeracijo nanodelcev [195–199].



Slika 2-23: SEM vzorcev CMD1-MNPs (a), CMD2-MNPs (b), CMD3-MNPs (c), neprevlečenih MNPs (d)

V nadaljevanju smo opravili še statistično analizo porazdelitve velikosti posameznih CMD-MNPs, kar prikazuje Slika 2-24. V primeru CMD1-MNPs velikost delcev variira od 10-60 nm s povprečno velikostjo nanodelcev 27 nm, v primeru CMD2-MNPs velikost delcev variira od 15-50 nm s povprečno velikostjo nanodelcev 30 nm in v primeru CMD3-MNPs velikost nanodelcev variira od 10-50 nm s povprečno velikostjo 28 nm. Najvišjo skladnost

velikosti nanodelcev opazimo v primeru CMD3-MNPs, kar smo potrdili tudi z meritvami polidisperznega indeksa.

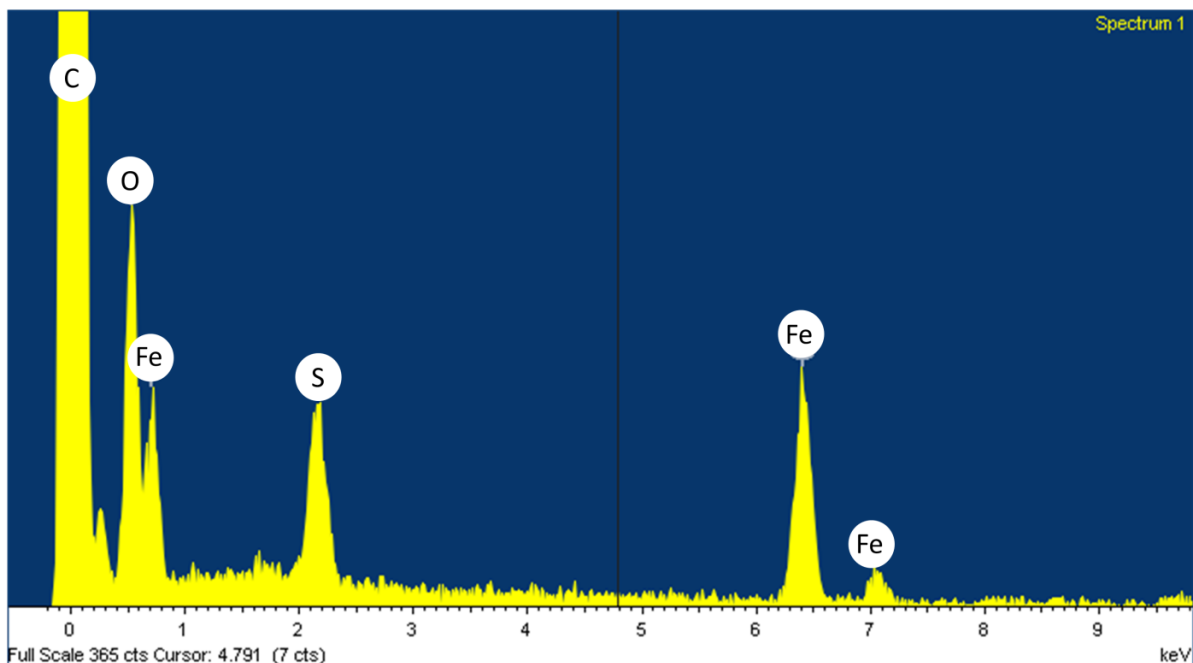


Slika 2-24: Porazdelitev velikosti delcev CMD1-MNPs (a), CMD2-MNPs (b), CMD3-MNPs (c) in neprevlečenih MNPs (d)

Dodatno analizo elementarne sestave CMD3-MNPs smo opravili z elementarno disperzijsko spektroskopijo rentgenskih žarkov (EDS) za boljše razumevanje distribucije elementov v vzorcu CMD3-MNPs. Z EDS analizo smo določili prisotnost ogljika in kisika ter dvo- in tri-valentnega železa, ki sestavlja železov oksid ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). Slika 2-25 prikazuje EDS spekter analiziranega vzorca CMD3-MNPs. V sestavi CMD3-MNPs opazimo vse elemente, ki sestavljajo nanonosilec, kar lahko vidimo na EDS spektru, kjer so izraženi in dobro vidni vrhovi iskanih elementov. Opazimo visok delež železa, ki je osnova nanonosilca, ter kisika in visoko izraženega ogljika, ki sestavljata spojino CMD. Rezultate masnega in atomskega % prikazuje Tabela 2-6.

Tabela 2-6: EDS analiza vzorca CMD3-MNPs

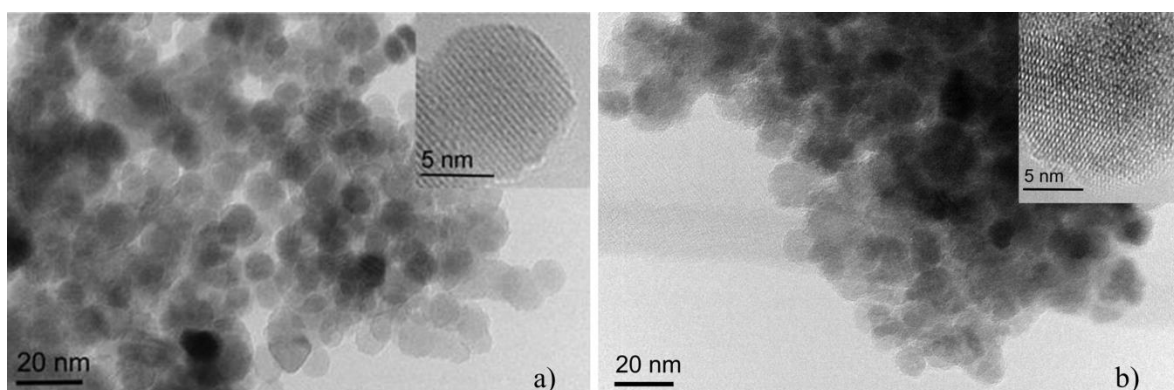
Element	Masni %	Atomski %
C	15	31
O	29	45
Fe	56	24



Slika 2-25: EDS elementarna analiza vzorca CMD3-MNPs

#### 2.7.2.4 TEM

Strukturo in velikost pripravljenih CMD3-MNPs in neprevlečenih MNPs smo dodatno analizirali s pomočjo TEM. Nanodelci v obeh pripravljenih vzorcih so aglomerirani oz. združeni v skupke, kar je otežilo natančno oceno porazdelitve velikosti. Kljub temu pa lahko na robovih aglomeratov zaznamo nižjo gostoto nanodelcev ter tako opazujemo porazdelitev velikosti na določenem mestu. Po dodatnem analiziranju večjega števila TEM posnetkov lahko sklepamo, da spada večina nanodelcev v velikostni razred med 8 in 38 nm. Prav tako smo z visokoločljivim slikanjem potrdili monokristaliničnost nanodelcev v obeh primerih CMD3-MNPs in neprevlečenih MNPs, kar nam prikazuje Slika 2-26.



Slika 2-26: TEM posnetki neprevlečenih MNPs (a) in CMD3-MNPs (b). Izseki posameznega TEM posnetka so visoko ločljive resolucije posameznih MNPs



### 2.7.2.5 DLS meritve (hidrodinamični premer, polidisperzni indeks (PdI) in $\zeta$ -potencial (ZP))

S pomočjo DLS smo pripravljenim vzorcev določili porazdelitev velikosti, polidisperzni indeks (PdI) in  $\zeta$ -potencial (ZP) (Tabela 2-7). Poznavanje velikosti nanodelcev in PdI pomembno vplivata na učinkovitost samih nanodelcev, saj je velikost nanodelcev dober indikator njihove stabilnosti. Porazdelitev velikost nanodelcev je izražena s PdI, ki kaže širino velikostne porazdelitve. Nanodelci, ki imajo širši razpon velikosti posameznega delca so heterogeni oz. so delci povečini neenakih velikosti in imajo zato višji PdI, medtem ko so nanodelci z ožjim razponom velikosti delcev homogeni, bolj podobni v svojih velikostih in imajo zato nižji PdI. Vrednosti PdI se izražajo v razponu od 0,1 do 1. Delci z nižjim PdI kažejo na večjo homogenost vzorca in ozko porazdelitev velikosti MNPs, medtem ko vrednosti z višjim PdI kažejo na večjo heterogenost MNPs [19].

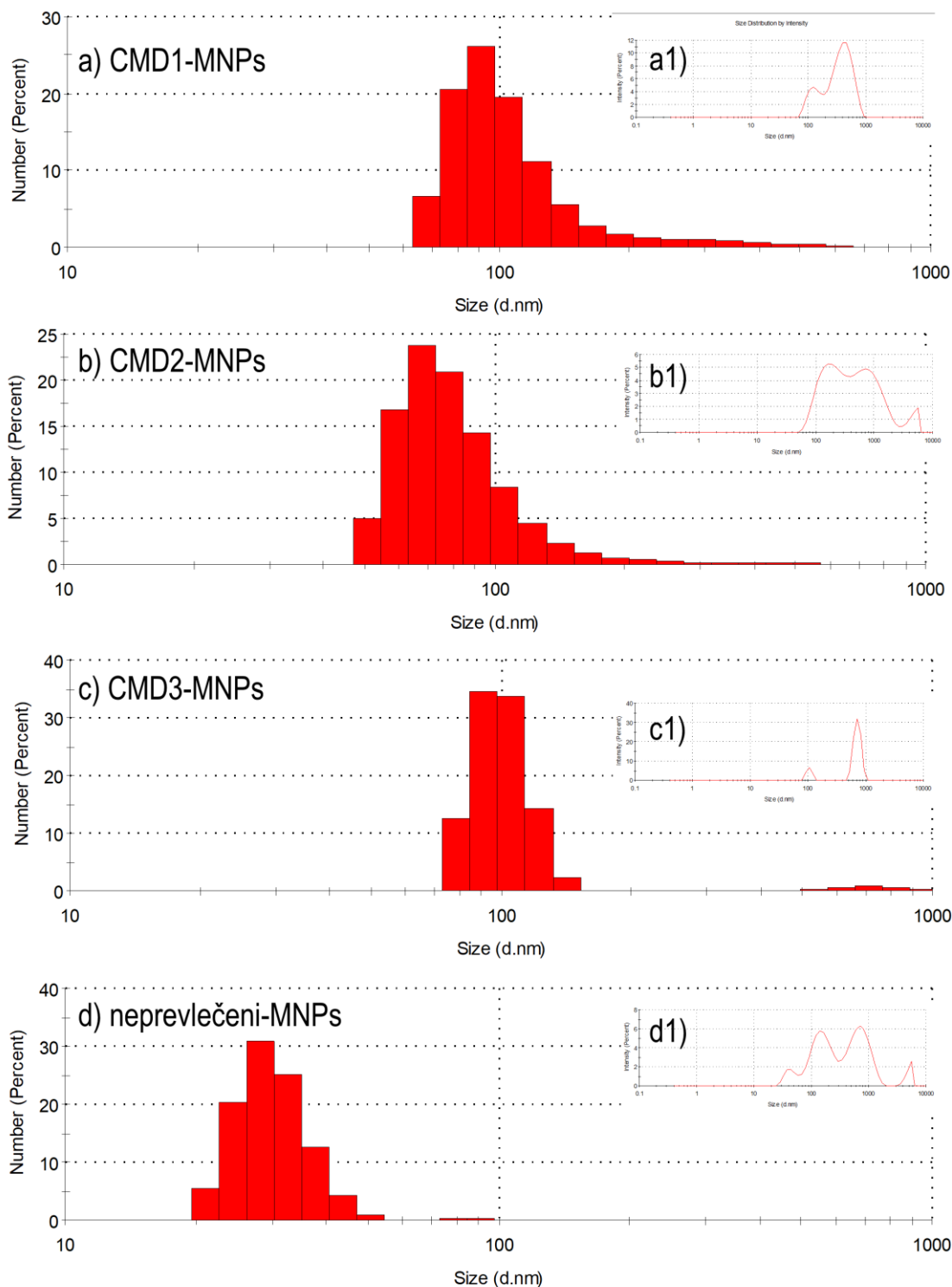
Tabela 2-7: Hidrodinamična velikost in PdI vseh CMD-MNPs in neprevlečenih MNPs

Vzorec	Premer <sub>povp.</sub> (nm)	PdI
CMD1-MNPs	369 ± 33	0,49
CMD2-MNPs	307 ± 95	0,47
CMD3-MNPs	290 ± 26	0,31
neprevlečeni MNPs	225 ± 61	0,72

Meritve velikosti analiziranih delcev s pomočjo DLS so meritve delcev, ki imajo nase vezano vodo oz. jim po metodi DLS merimo hidrodinamični premer, medtem ko nanodelce pri analizi metodi SEM ali TEM opazujemo v suhem oz. posušenem stanju. S tem razlogom meritve velikosti, ki ji pridobimo po metodi DLS ne moremo primerjati z meritvami, ki jih dobimo pri metodah SEM ali TEM, saj nam le-te podajo veliko manjše vrednosti premerov. Glavna razlika je v merjenju hidrodinamičnega premera nanodelca, ki ima nase vezano vodo (in zato izgleda večji) in delca v posušenem stanju, kateremu merimo dejanski premer. Drug razlog za razliko v izmerjenem premeru nanodelcev lahko pripišemo nanodelcem, ki imajo jedro železovega oksida, kar pomeni, da imajo veliko razmerje površine proti volumnu, kar se kaže v težnji po agregaciji oz. združevanju v skupke z namenom, da se njihova površinska energija zmanjša. Takšne razlike v povprečnih premerih pomejenih po metodah DLS in SEM ali TEM so bile zabeležene že v velikem številu raziskav [12,135,200,201]. Rezultate velikosti vseh CMD-MNPs in neprevlečenih MNPs prikazuje Tabela 2-7.

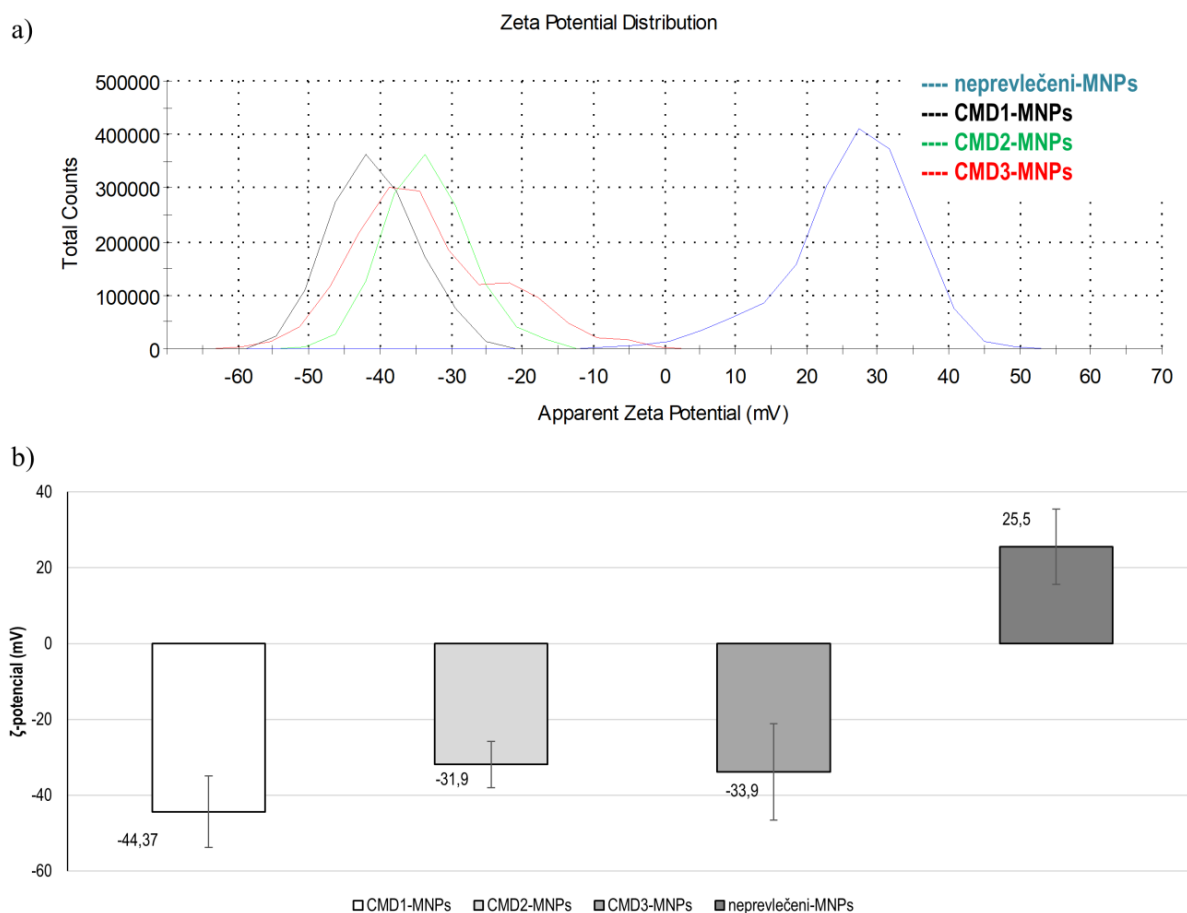
Najvišji PdI (0,72) imajo neprevlečeni MNPs, kar se sklada s teorijo o magnetnih nanodelcih, ki imajo veliko razmerje površine proti volumnu in težnjo po agregaciji. Višji PdI nakazuje najbolj heterogen vzorec z širšim razponom velikosti. Medtem ko ostali CMD-MNPs nakazujejo nižje PdI vrednosti, imajo CMD3-MNPs najnižji PdI (0,31), kar nakazuje na najbolj homogen vzorec in na najbolj ozko porazdelitev velikosti. Delci v vzorcu CMD3-MNPs so glede na pomejene vrednosti bolj monodisperzni in zato bolj stabilni kot CMD1-

MNPs (0,49) in CMD2-MNPs (0,47), katerih PDI je višji. S povečevanjem koncentracije CMD v sinteznem postopku CMD-MNPs povečamo interakcije med delci ter posledično njihovo težnjo po agregaciji. Naša opazovanja so v skladu z rezultati, dobljenimi z analiznimi metodami SEM, TEM in TGA. Hidrodinamični premer vseh CMD-MNPs in neprevlečenih MNPs smo izrazili z grafom velikost (nm) proti številu (%) in ga prikazuje Slika 2-27.



Slika 2-27: Hidrodinamični premer vseh CMD-MNPs in neprevlečenih MNPs, izražen z razmerjem velikost/število delcev

Površinski naboj posameznih MNPs, stabiliziranih z elektrostatično metodo smo določili z merjenjem ZP. Slika 2-28 prikazuje izmerjene ZP neprevlečenih MNPs, CMD1-MNPs, CMD2-MNPs in CMD3-MNPs. ZP neprevlečenih MNPs znaša 25,5 mV, kar je posledica molekul vode, ki so absorbirane na površini maghemita in povzročijo protonacijo na površini neprevlečenih MNPs in s tem majhen pozitiven naboj. Modificiranim MNPs smo izmerili negativen ZP, in sicer -44,37 mV za CMD1-MNPs, -31,9 mV za CMD2-MNPs in -33,9 mV za CMD3-MNPs. Negativen naboj je posledica negativno nabitih hidroksilnih in karboksilnih skupin, ki je prisoten v obliki CMD na površini modificiranega nanodelca. S tem, ko smo v postopku sinteze nanodelce modificirali z različnimi koncentracijami CMD, se na površju nanodelca tvori večji elektronski »oblak«, ki je posledica negativno nabitih hidroksilnih in karboksilnih skupin. Ta negativen naboj se zato izrazi tudi v negativnih vrednostih ZP, s čemer lahko potrdimo prisotnost CMD na naših MNPs.

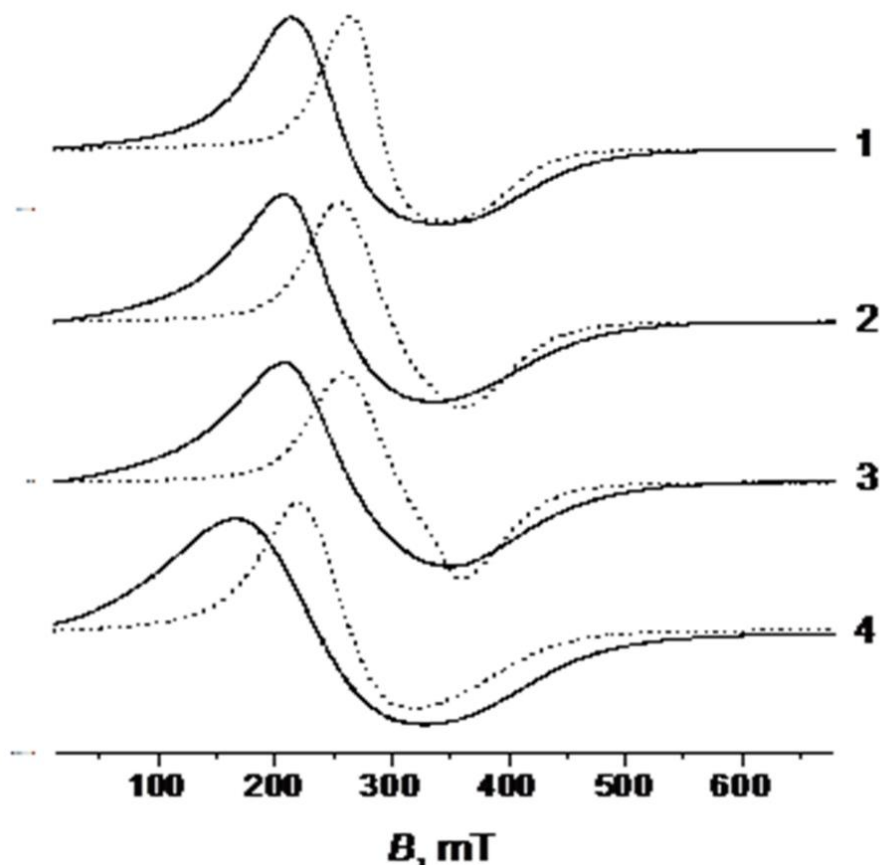


Slika 2-28:  $\zeta$ -potencial neprevlečenih MNPs, CMD1-MNPs, CMD2-MNPs in CMD3-MNPs predstavljen v grafu (a) in kot povprečna vrednost treh zaporednih meritev

### 2.7.2.6 EPR

Tipične EPR spektre vseh vzorcev, ki vsebujejo železo, posnetih pri temperaturah 25 °C in -196 °C, prikazuje Slika 2-29. Zabeleženi spektri so zelo široke asimetrične enojne črte, kar nam omogoča, da predpostavimo anizotropijo teh spektrov, tj. superponiranje spektrov EPR, ki pripadajo vrtljajem obeh paramagnetnih centrov, ki se nahajajo v enem nanodelcu kot tudi

v različnih. Skupno količino teh paramagnetnih centrov v vzorcih smo ocenili z dvojno integracijo spektrov in njihovo primerjavo s standardnim EPR spektrom monokristala  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  z znano količino vrtljajev (spinov). Poudariti moramo, da ta ocena ni natančna, ker so EPR črte zelo široke in v nizkih poljih ne dosegajo ničelne črte, in ker so spin-prehodi  $\text{Fe}^{3+}$  ionov zelo kompleksni glede njihovega elektronskega ( $S = 5/2$ ) in jedrskega ( $I = 5/2$ ) vrtljaja (spina). Iz rezultatov dvojne integracije lahko sklepamo, da praktično vsi železovi ioni prispevajo k EPR spektrom.



Slika 2-29: EPR spekter vseh CMD1-MNPs (1), CMD2-MNPs (2), CMD3-MNPs (3) in naprevlečenih MNPs (4) pri 25 °C (prekinjena linija) in pri -196 °C (neprekinjena linija)

Iz Slika 2-29 je razvidno, da se EPR spektri vzorcev močno razlikujejo glede na temperaturne spremembe in se pri različnih paramagnetnih centrih pri določeni temperaturi opazno razlikujejo. Te razlike opazimo tudi iz parametrov, ki jih prikazuje Tabela 2-8. Takšni EPR spektri in njihove temperaturne spremembe so značilni za številne sisteme feromagnetnega magnetita, kot tudi anorganskih in različnih organskih molekul, makromolekul, vključno z biopolimeri [202–208].

Tabela 2-8: EPR parametri vzorcev

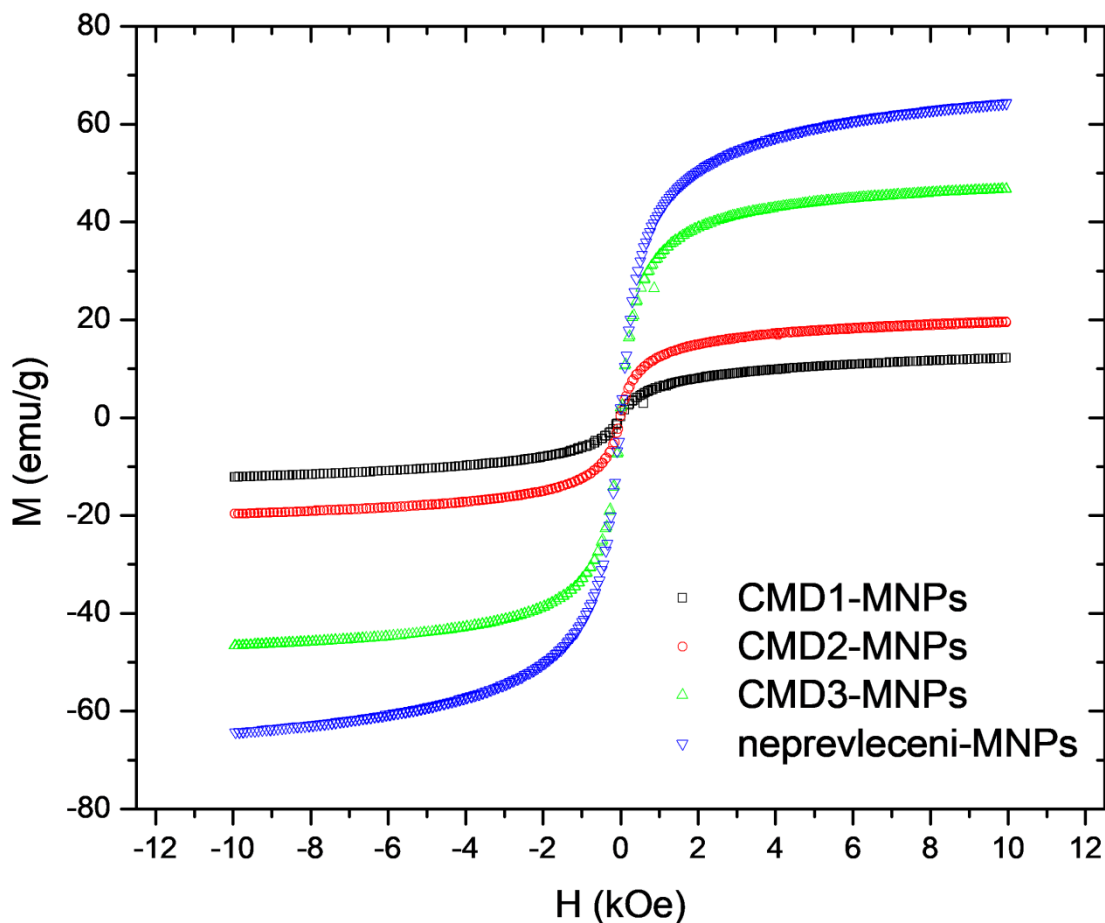
Vzorec	25 °C		-196 °C	
	$\Delta H \pm, G$	$g \pm 0,01^a)$	$\Delta H, G$	$g \pm 0,01^a)$
neprevlečeni MNPs	$960 \pm 40$	2,01	$1600 \pm 60$	2,91
CMD1-MNPs	$790 \pm 30$	2,02	$1240 \pm 50$	2,65
CMD2-MNPs	$1040 \pm 40$	1,98	$1270 \pm 50$	2,70
CMD3-MNPs	$1020 \pm 40$	1,92	$1400 \pm 55$	2,63

<sup>a)</sup> g-vrednost je pomerjena pri  $\frac{1}{2}$  višine EPR linije

Spremembe v EPR spektrih CMD1-MNP, CMD2-MNP in CMD3-MNPs in neprevlečenih MNPs so analogne tistim, opaženim v spojinah, ki vsebujejo železov oksid [202–206]. V primeru CMD1-MNPs, CMD2-MNPs in CMD3-MNPs se širine linij  $\Delta H$  povečujejo s povečevanjem koncentracije CMD pri obeh temperaturah in so pri nižji temperaturi vedno izrazito širše (Tabela 2-8). Prav tako se položaj teh linij v magnetnem polju spreminja, kar odraža opazno znižanje vrednosti  $g$  v vzorcih CMD1-MNPs, CMD2-MNPs in CMD3-MNPs pri temperaturi 25 °C. Da bi razumeli naravo teh sprememb in zagotovili pravilen opis, moramo izvesti natančne EPR meritve pri temperaturi helija od -263 °C do 77-87 °C, pri čemer merimo tudi magnetno občutljivost v istem temperaturnem intervalu. Teoretični pristopi takšnih izračunov so bili objavljeni v [209,210].

### 2.7.2.7 VSM

Magnetne lastnosti MNPs predstavljajo pomembno karakteristično lastnost in so bistvene za njihovo uporabo v industrijskih aplikacijah. Pri sobni temperaturi izmerjene krivulje magnetizacije vseh vzorcev CMD1-MNPs, CMD2-MNPs, CMD3-MNPs in neprevlečenih MNPs prikazuje Slika 2-30. Nasičena magnetizacija neprevlečenih MNPs znaša 64 emu/g, kar je tipična nasičena magnetizacija za nanodelce železovega oksida [47,59,211]. Izmerjena koercitivnost, ki znaša 13 Oe, je nizka, vendar nad mejo napake meritve (približno 2 Oe), kar nakazuje na prisotnost male količine večjih ferimagnetnih nanodelcev, kar sovпада z rezultati dobljenimi pri meritvah EPR. Prav tako tudi TEM analiza nakazuje na prisotnost nanodelcev, večjih od 15 nm, kar je tudi približna velikostna mera, nad katero nanodelci postanejo ferimagnetni pri sobni temperaturi [212]. Vrednosti koercitivnosti vzorcev CMD1-MNPs (62 Oe), CMD2-MNPs (4 Oe), in CMD3-MNPs (11 Oe) so nizke, vendar spremenljive, kar nakazuje na razlike v porazdelitvi velikosti med vzorci. Nasičene magnetizacije CMD-MNPs znašajo 19,7 emu/g za CMD1-MNPs, 12,2 emu/g za CMD2-MNPs in 47,0 emu/g za CMD3-MNPs. Vrednosti nasičene magnetizacije so nižje od neprevlečenih MNPs zaradi redčitve magnetne faze z diamagnetnim CMD.



Slika 2-30: Magnetizacijske krivulje izmerjene pri sobni temepraturi vzorcev CMD1-MNPs, CMD2-MNPs, CMD3-MNPs in neprevlečenih MNPs

## 2.7.3 Določevanje inhibitornih lastnosti

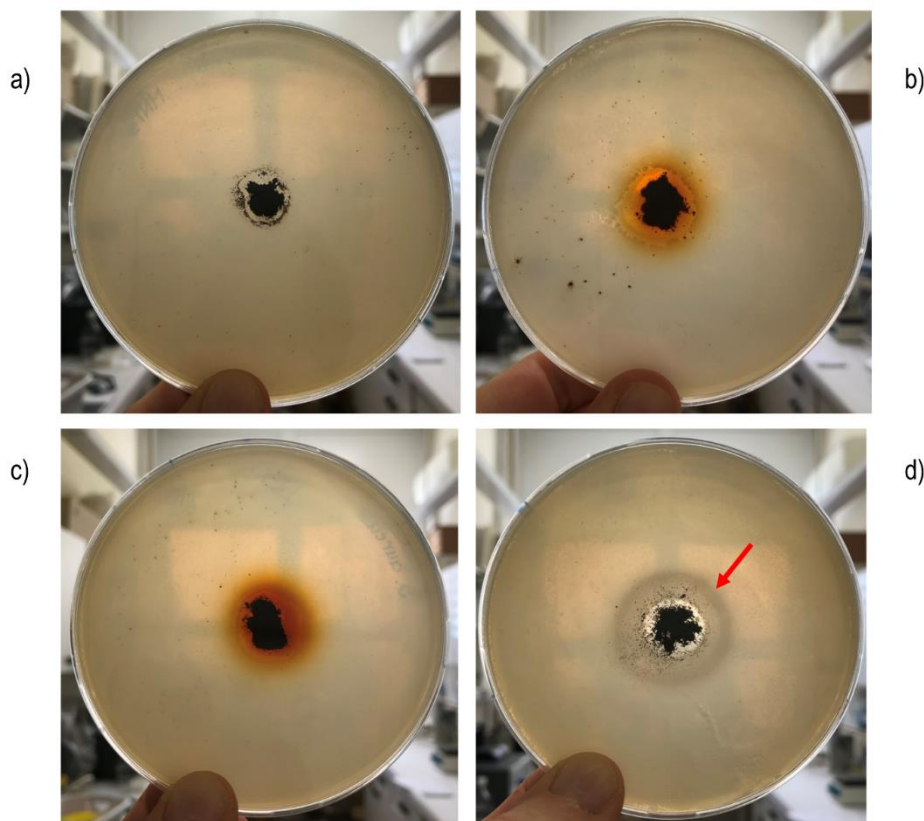
### 2.7.3.1 CMD-MNPs

Proučevali smo inhibitorne lastnosti neprevlečenih MNPs, CMD1-MNPs, CMD2-MNPs in CMD3-MNPs na rast bakterijskih kultur *E. coli* in *S. aureus*. Po inkubaciji (24 ur na 37 °C) posameznih MNPs smo na trdnih hranilnih gojiščih kvalitativno določili inhibitorne lastnosti posameznih MNPs. V primeru, da smo pri vzorcu opazili cono inhibicije, smo jo še kvantitativno določili, tako da smo izmerili cono inhibicije oz. zaviralno cono rasti mikroorganizma v mm.

Slika 2-31 prikazuje posamezne MNPs na bakterijski kulturi *E. coli* po inkubaciji, kjer lahko opazimo prikaz inhibicijske cone pri CMD3-MNPs, katere premer znaša v povprečju 19,7 mm. Pri ostalih MNPs (neprevlečeni, CMD1-MNPs in CMD2-MNPs) inhibicijske cone rasti nismo zaznali. Slika 2-32 prikazuje posamezne MNPs na bakterijski kulturi *S. aureus* po inkubaciji. Prav tako lahko opazimo nastalo inhibicijsko cono pri CMD3-MNPs, premer znaša v povprečju 19 mm. Pri ostalih MNPs cone inhibicije nismo zaznali. Rezultate prikazuje Tabela 2-9.



Slika 2-31: Neprevlečeni MNPs (a), CMD1-MNPs (b), CMD2-MNPs (c) in CMD3-MNPs (d) na bakterijski kulturi *E. coli* po inkubaciji. Inhibicijska cona prikazana na vzorcu CMD3-MNPs (d)



Slika 2-32: Neprevlečeni MNPs (a), CMD1-MNPs (b), CMD2-MNPs (c) in CMD3-MNPs (d) na bakterijski kulturi *S. aureus* po inkubaciji. Inhibicijska cona prikazana na vzorcu CMD3-MNPs (d)



Tabela 2-9: Inhibicija rasti *E. coli* in *S. aureus*

Vzorec	Premer inhibicijske cone rasti mikroorganizma [mm] 10 <sup>5</sup> CFU/mL	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
neprevlečeni MNPs	-	-
CMD1-MNPs	-	-
CMD2-MNPs	-	-
CMD3-MNPs	22, 20, 21	20, 18, 19

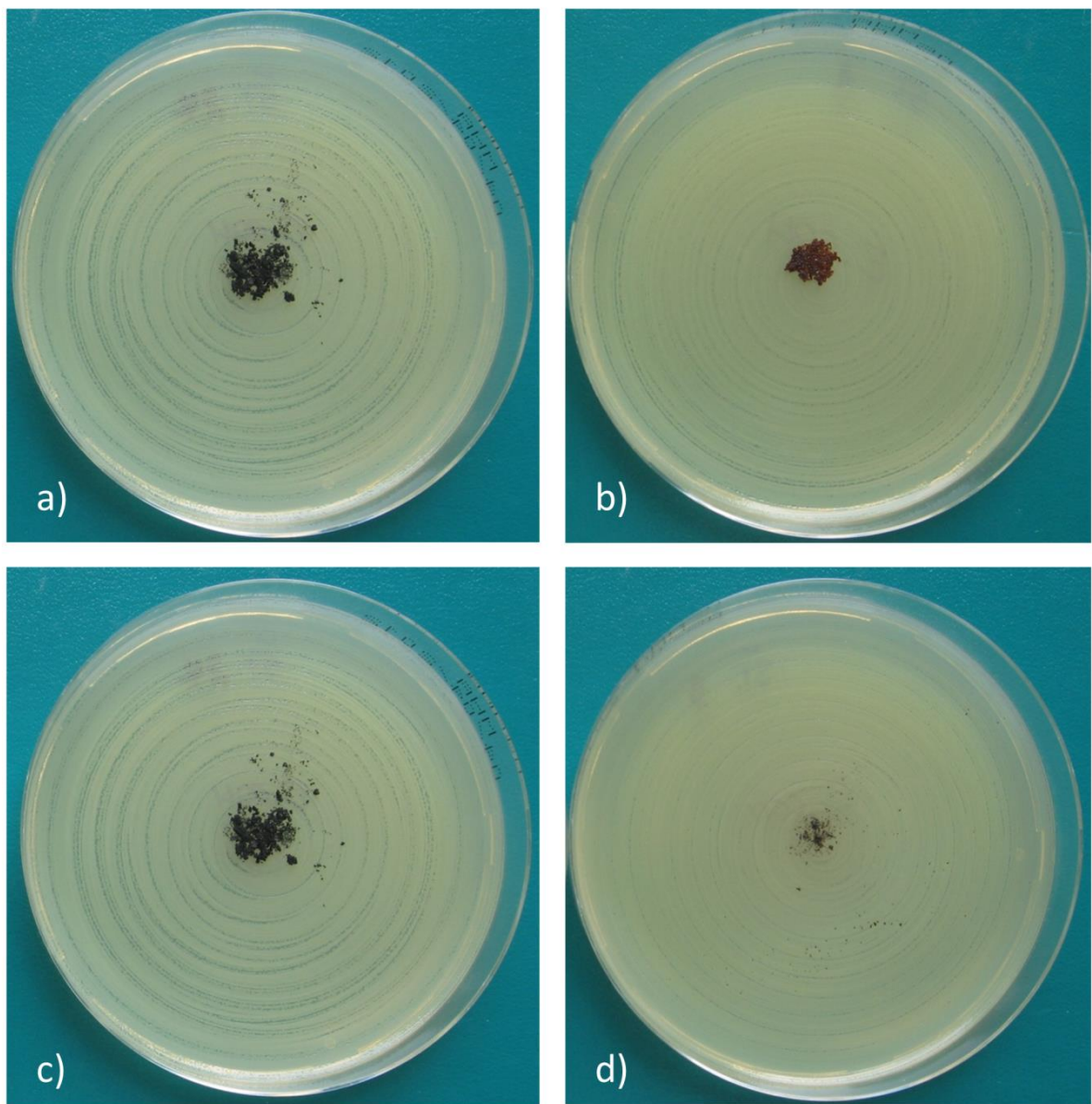
Iz prikazanih rezultatov smo ugotovili, da imajo najboljše inhibitorne lastnosti delci CMD3-MNPs, katerim smo v postopku sinteze vpeljali CMD z najvišjo koncentracijo (0,5 g/mL), medtem ko pri ostalih CMD-MNPs, ki vsebujejo CMD z nižjimi koncentracijami, in pri neprevlečenih MNPs, ki polimera CMD ne vsebujejo, cone inhibicije nismo zaznali. Cono inhibicije smo pri CMD3-MNPs zaznali na obeh bakterijskih kulturah *E. coli* in *S. aureus*. Prav tako lahko iz dobljenih kvantitativnih rezultatov sklepamo, da CMD3-MNPs bolje zavirajo rast bakterijske kulture *E. coli* kot bakterijske kulture *S. aureus*. V sinteznem postopku smo tako z uvedbo najvišje koncentracije polimerne prevleke, ki znaša 0,5 g/mL CMD, uspeli sintetizirati delce (CMD3-MNPs), ki izkazujejo antimikrobne lastnosti in zavirajo rast tako Gram negativnih kot Gram pozitivnih bakterij.

### 2.7.3.2 HIT-MNPs

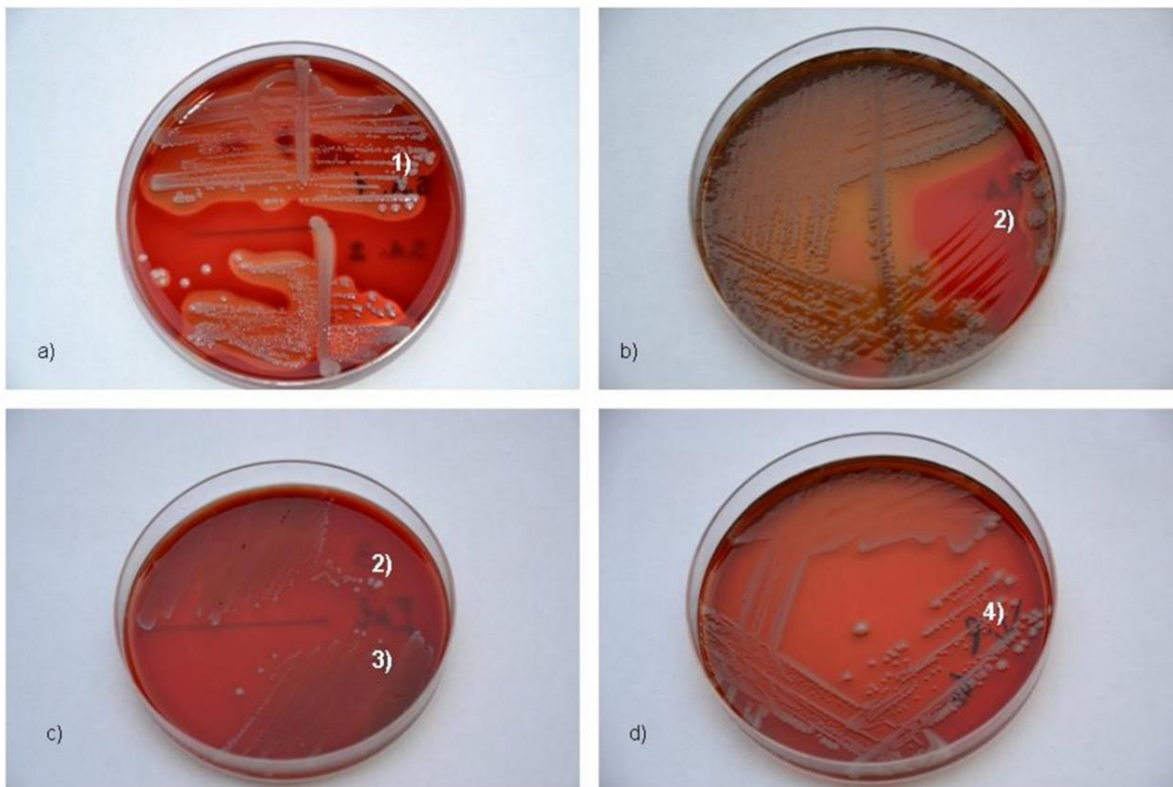
Proučevali smo tudi inhibitorne lastnosti neprevlečenih MNPs ter HIT-MNPs, pripravljenih po postopkih mikroemulzije, suspenzijske zamreževalne tehnike in kovalentne vezave na petih različnih bakterijskih kulturah. V prvem delu testiranj smo proučevali inhibitorne lastnosti posameznih delcev na bakterijski kulturi *E. coli*, in sicer smo cono inhibicije kvalitativno preverjali po 96 urah na 37 °C. V drugem delu testiranj smo proučevali inhibitorne lastnosti na bakterijskih kulturah *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* in *K. pneumoniae*, in sicer smo cono inhibicije rasti prav tako kvalitativno preverjali po 24 urah pri temperaturi 35 °C, potem ko smo suspenzijo bakterijske kulture in delcev inkubirali 1 dan ali 10 dni pri temperaturi 35 °C.

Slika 2-33 prikazuje nanešene neprevlečene MNPs in HIT-MNPs pripravljene po različnih postopkih po inkubaciji na bakterijski kulturi *E. coli*, kjer ne opazimo cone inhibicije rasti testnega mikroorganizma. Ko smo inhibitorne lastnosti preverjali na ostalih bakterijskih kulturah, po inkubaciji prav tako nismo zaznali cone inhibicij rasti mikroorganizmov (Slika 2-34). Rezultate smo objavili v delu Leitgeb in ostali [11].





Slika 2-33: Neprevlečeni MNPs (a), HIT-MNPs po postopku mikroemulzije (b), HIT-MNPs po postopku suspenzijske zamreževalne tehnike (c) in HIT-MNPs po postopku kovalentne vezave (d) na bakterijski kulturi *E. coli* po inkubaciji



Slika 2-34: Neprevlečeni MNPs (1), HIT-MNPs po postopku mikroemulzije (2), HIT-MNPs po postopku suspenzijske zamreževalne tehnike (3) in HIT-MNPs po postopku kovalentne vezave (4) na bakterijskih kulturah *S. aureus* (a), *P. aeruginosa* (b), *E. faecalis* (c) in *K. pneumoniae* (d) na krvnem agarju po inkubaciji

## 2.8 Zaključek študije karakterizacije različnih CMD-MNPs

K aplikativni uporabi nanodelcev največ prispeva njihova biokompatibilnost in netoksičnost, le-to pa lahko zagotovimo z modificiranjem površine nanodelcev. V ta namen smo v prvem sklopu doktorske disertacije sintetizirali magnetne nanodelce s postopkom ko-precipitacije železovih (II) in (III) ionov. V nadaljevanju sinteznega postopka smo modificirali površino nanodelcev z uporabo organskega polimera CMD različnih koncentracij, 0,25 g/mL, 0,40 g/mL in 0,50 g/mL. S tremi različnimi koncentracijami CMD smo sintetizirali tri vrste različnih CMD-MNPs, in sicer CMD1-MNPs, CMD2-MNPs in CMD3-MNPs. Vse sintetizirane CMD-MNPs smo okarakterizirali z različnimi analiznimi metodami, prav tako smo določili njihove inhibitorne lastnosti.

S FT-IR analizo smo potrdili prisotnost hidroksilnih in karboksilnih skupin na površini CMD-MNPs, ki ustrezajo hidroksilnim in karboksilnim skupinam polimera CMD. S TGA analizo smo določili delež vezanega CMD na površino nanodelca ter ugotovili, da največji delež (37,8 %) pričakovano vsebujejo CMD3-MNPs, saj smo v tem primeru dodali CMD z najvišjo koncentracijo. Izguba mase iz TGA krivulj razpada razkriva plast, ki ustreza polimeru CMD, saj se le-ta razgradi med 250 °C in 350 °C. Pri vseh delcih smo s TGA analizo tako potrdili plast CMD na površini sintetiziranih nanodelcev. Morfologijo vseh CMD-MNPs smo analizirali s SEM in določili povprečne vrednosti delcev, ki znašajo 27 nm, 30 nm in 28 nm za CMD1-MNPs, CMD2-MNPs in CMD3-MNPs. S TEM analizo smo dodatno proučili povprečne velikosti CMD3-MNPs, ki razkrivajo velikosti v povprečju od 8 nm do 38 nm. Z meritvami DLS smo določili hidrodinamični premer ter ZP vseh CMD-MNPs. Najbolj homogen vzorec z najožjo porazdelitvijo velikosti ima vzorec CMD3-MNPs, ki ima tudi najnižji PdI, ki znaša 0,31. Delci CMD3-MNPs so bolj monodisperzni in zato bolj stabilni. Meritve ZP so na vseh CMD-MNPs potrdile prisotnost negativno nabitih hidroksilnih in karboksilnih skupin, ki so prisotne na površini modificiranih nanodelcev s CMD prevleko. Meritve EPR in VSM so potrdile feromagnetni sistem in tako prisotnost feromagnetnih nanodelcev. Rezultate smo objavili v delu Vasić in ostali [213].

Inhibitorne lastnosti vseh CMD-MNPs smo proučili na dveh bakterijah, Gram negativni *E. coli* in Gram pozitivni *S. aureus*. Pri CMD3-MNPs smo zaznali cono inhibicije, ki znaša v povprečju 19,7 mm, medtem ko pri ostalih delcih inhibicije na rast testnega mikroorganizma nismo zaznali. CMD3-MNPs tako posedujejo antimikrobne lastnosti, kar je dodatna prednostna lastnost pri uporabi le-teh v bioloških procesih. Prav tako smo proučili inhibitorne lastnosti HIT-MNPs, in sicer na rast petih različnih bakterijskih kultur, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* in *K. pneumoniae*. Pri nobenih od testiranih HIT-MNPs inhibicije rasti nismo zaznali. Rezultate smo objavili v delu Leitgeb in ostali [11].

Glede na dobljene rezultate opravljenih analiz in toksikoloških testiranj vseh CMD-MNPs lahko sklepamo, da so vsi sintetizirani nanodelci prevlečeni s polimerno prevleko iz CMD. Najmanjše povprečne velikosti delcev kot tudi najožjo porazdelitev velikosti in monodisperznost pa imajo CMD3-MNPs. Prav tako smo pri CMD3-MNPs ugotovili, da izkazujejo inhibitorne lastnosti na rast Gram negativne in Gram pozitivne bakterije. V ta namen smo za nadaljnje raziskave uporabili CMD3-MNPs. Le-te smo uporabili kot nosilec v postopku imobilizacije encimov, opisanem v drugem sklopu doktorske disertacije.



### 3 IMOBILIZACIJA ENCIMOV NA MAGNETNE NANODELCE

Pri uporabi encimov kot katalizatorjev moramo upoštevati nekaj zahtev, če želimo naš proces narediti ekonomsko izvedljiv in ugoden. To je predvsem ponovna uporaba in regeneracija encima, ki omogočata enostavnost kontroliranega procesa. Da lahko encime uspešno uporabimo kot industrijske biokatalizatorje, je potrebna imobilizacija le-teh. Ponovna uporaba encima zahteva njegovo stabilnost, zato mora encim imeti izjemne lastnosti stabilnosti ali pa ga moramo stabilizirati, kar lahko dosežemo s procesom imobilizacije. Čeprav je na voljo veliko imobilizacijskih metod, je glavni cilj vsake imobilizacije izboljšanje lastnosti encima, kot so stabilnost, aktivnost, specifičnost in selektivnost, prav tako pa zagotovimo netopnost biokatalizatorja. Pri tem pa mora biti načrt imobilizacijskega postopka ustrezen, saj lahko neprimerna izbira imobilizacijskega postopka vodi tudi do izgube aktivnosti ali stabilnosti encima.

#### 3.1 Metode imobilizacije

Encime lahko na nosilce vežemo z različnimi interakcijami; od reverzibilne fizikalne adsorpcije in ionskih vezav do stabilnih kovalentnih vezi. Metode imobilizacije lahko razdelimo v dve široki kategoriji: ireverzibilne in reverzibilne metode imobilizacije, pri čemer je jakost vezave imobilizacije odvisna od njene reverzibilnosti. Večina ustaljenih imobilizacijskih postopkov teži po čim bolj močni vezavi, čeprav se pri tem izgubi reverzibilnost vezave. Na izbiro imobilizacijske metode vpliva predvsem vrsta in narava encima kot tudi nosilec, na katerega se le-ta imobilizira. Imobilizacijske metode lahko delimo tudi glede na vrsto kemijske reakcije, ki poteče med vezavo encima na nosilec, pri čemer pa ima vsaka imobilizacijska metoda svoje prednosti in slabosti (Tabela 3-1).

Tabela 3-1: Prednosti in slabosti imobilizacijskih metod [214]

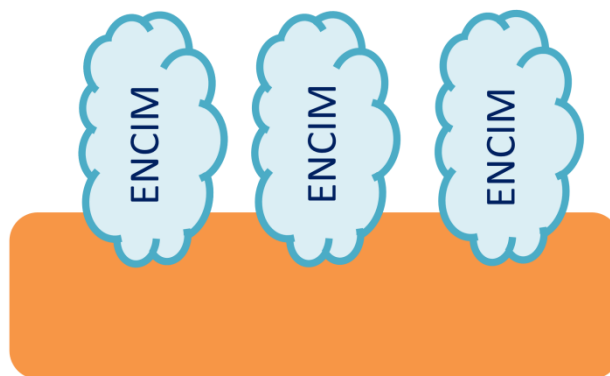
<b>Metoda in način vezave</b>	<b>Prednosti</b>	<b>Slabosti</b>
<i>Kovalentna vezava</i> Kemijska vezava med funkcionalnimi skupinami encima in nosilca	brez uhajanja encima, encimska stabilnost	velika izguba aktivnosti
<i>Ujetje/Enkapsulacija</i> ujetje encima v polimerni matriks	široka uporabnost	omejen prenos snovi, uhajanje encima

Zamreženje zamreženje encima z mrežnimi povezovalci	stabilnost biokatalizatorja	izguba aktivnosti, omejen prenos snovi
<i>Fizikalna adsorpcija</i> šibke vezi: hidrofobne, Van der Waalsove ali ionske interakcije	enostavna in cenovno ugodna, majhne konformacijske spremembe encima	desorpcija, nespecifična adsorpcija

Adsorpcija je reverzibilna metoda imobilizacije, med ireverzibilne metode imobilizacije spadajo kovalentna vezava, ujetje ali enkapsulacija in zamreženje.

### 3.1.1 Adsorpcija

Adsorpcija je najpreprostejša imobilizacijska metoda, ki temelji na fizikalni adsorpciji ali ionski vezavi. Pri fizikalni adsorpciji se encim veže na nosilec z vodikovimi vezmi, van der Waalsovimi silami ali hidrofobnimi interakcijami. Sile, ki delujejo pri nekovalentni imobilizaciji, so s spreminjanjem pogojev, ki vplivajo na jakost interakcij (pH, ionska moč, temperatura, polarnost topila) reverzibilne. Adsorpcija je enostavna metoda, ki ohranja katalitsko aktivnost encima, zato je tudi ekonomsko privlačna [215].



Slika 3-1: Shematski prikaz adsorpcije encima na nosilec

### 3.1.2 Zamreženje

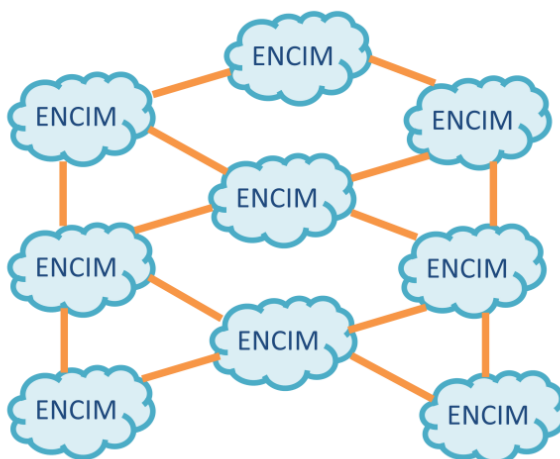
Zamreženje je metoda imobilizacije brez nosilca, pri čemer dobimo zamrežene encime (CLEs), zamrežene encimske kristale (CLECs) ali zamrežene encimske skupke (CLEAs).

Raziskovalni začetki zamreženih struktur so bili objavljeni v delih Quiocha in Richardsa [216], ki sta ugotovila, da lahko netopno vezavo med proteini dosežemo z uporabo bifunkcionalnih zamreževalnih kemijskih spojin, kot je npr. GA. Takšne zamrežene strukture so zamreženi encimi (CLEs), ki lahko obdržijo svojo katalitično aktivnost. CLEs so sestavljeni iz proteinov v raztopini, ki so med seboj povezani z mrežnim povezovalcem. V primerjavi s prostimi encimi imajo CLEs izboljšano termično stabilnost, čeprav je njihova aktivnost v veliki meri odvisna od primerne pH, količine mrežnega povezovalca, ionske

moči in temperature. Zato imajo CLEs nekaj slabosti, ki se kažejo v nižji aktivnosti (ki ponavadi znaša manj kot 50 %), slabi reproduktivnosti in nižji mehanski stabilnosti [217]. Ko vezava med proteini v strukturi temelji na čistih encimih, takšne zamrežene encime imenujemo zamreženi encimski kristali (CLECs) [218].

CLECs so kristalni proteini, povezani z mrežnim povezovalcem, ki so primerni za aplikacije v biotransformacijah v vodnih raztopinah, saj so zelo stabilni pod neoptimalnimi pogoji. Zaradi svoje strukture imajo izboljšano mehansko stabilnost in so zelo obstojni pri različnih temperaturah, pH ter organskih topilih [219–221].

V primerjavi z metodo CLECs je enostavnejša in cenejša metoda sinteza CLEAs, ki temelji na obarjanju encima. Postopek zamreženja je tako sestavljen iz dveh delov: obarjanja in zamreženja. Encim se v vodni raztopini ob dodatku soli ali organskih topil obori, pri čemer nastanejo zamreženi encimski skupki, povezani z nekovalentnimi vezmi. Ker je oborjen encim ob dodatku vodne raztopine topen, s postopkom zamreženja zagotovimo netopnost skupkom, pri čemer ne spremenimo strukture encima. Zamreženje poteka z bifunkcionalnim reagentom, najpogosteje uporabljen bifunkcionalni reagent je GA. Pri zamreženju (Slika 3-2) proste amino skupine lizinskih ostankov na površini encima reagirajo z aktivnimi aldehidnimi skupinami glutaraldehida [222–224].

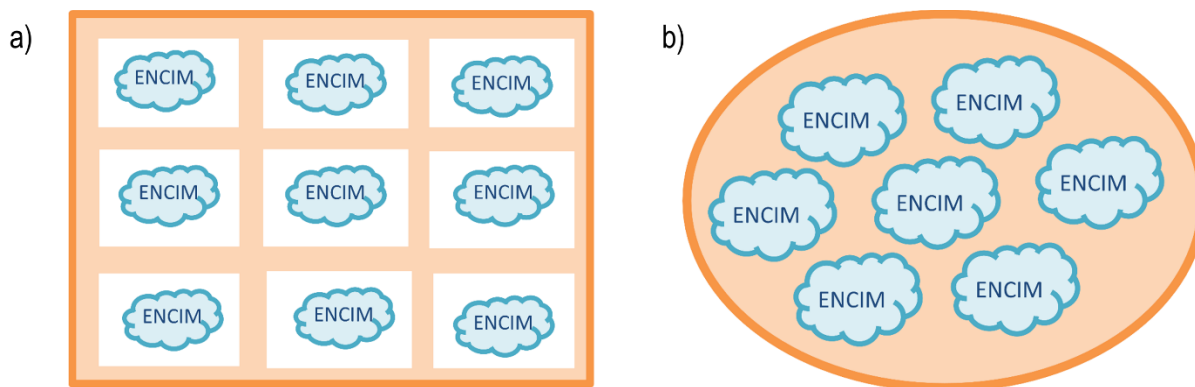


Slika 3-2: Shematski prikaz zamreženja encimskih skupkov

### 3.1.3 Ujetje

Ujetje je imobilizacijska metoda (Slika 3-3), pri kateri je encim ujet ali zamrežen znotraj polimerne mreže. Encim v polimerno mrežo ni vezan, ne pride do kemijske modifikacije encima, zato se njegove lastnosti ne spremenijo. Metode ujetja so enostavne metode, pri katerih se encim ujame ali v gel ali v vlakna, najbolj razširjena pa je mikroenkapsulacija, kjer so encimi imobilizirani v semipermeabilni membrani v mikrokapsulah. Ker pri ujetju ne pride do modifikacije encima, se med imobilizacijskim procesom encimska aktivnost ohrani. Biosenzorji, ki temeljijo na imobilizacijski metodi ujetja, imajo povišano operativno in skladiščno stabilnost [43].

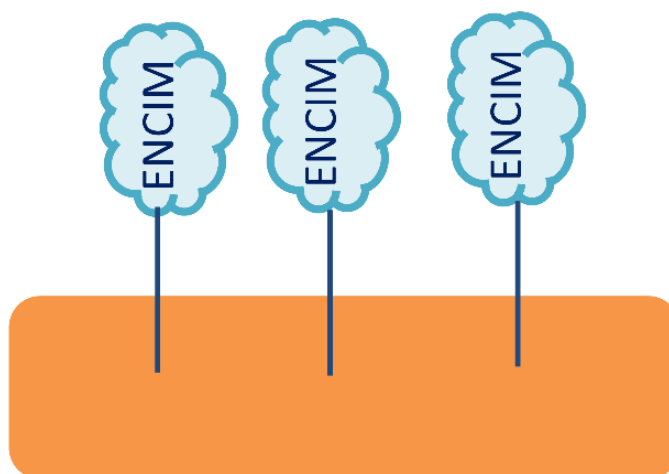




Slika 3-3: Shematski prikaz ujetja (a) in enkapsulacije (b) encima

### 3.1.4 Kovalentna vezava

Kovalentna vezava je najpogosteje uporabljena imobilizacijska metoda (Slika 3-4). Zaradi močne vezi med funkcionalnimi skupinami encima in nosilcem ne prihaja do uhajanja encima, kar je ena od prednosti kovalentne vezave. Poznamo različne reakcije za vezavo encima na nosilec, ki so odvisne od proste funkcionalne skupine na površini encima. Prosta funkcionalna skupina na površini encima, s katero se vzpostavi kovalentna vezava z nosilcem na encimsko aktivnost ne vpliva, vključuje pa vezavo preko stranskih verig lizina, pri čemer se veže s prosto amino skupino, preko cisteina, pri čemer se veže s prosto tiolno skupino ter preko aspartinske in glutaminske kisline, pri čemer se veže preko proste karboksilne skupine. Encimske funkcionalne skupine, preko katerih se kovalentna vezava lahko vzpostavi so amino, karboksilne, fenolne, sulfhidrilne, tiolne, imidazolne, indolne in hidroksilne skupine. Vezava encima na trdni nosilec poteka v dveh delih: 1) aktivacija površine z uporabo mrežnega povezovalca, kot npr. GA ali karbodiimid in 2) kovalentna vezava encima na aktivirano površino.



Slika 3-4: Shematski prikaz kovalentne vezave encima na nosilec

Mrežni povezovalci so lahko multifunkcionalni reagenti (GA ali karbodiimid), ki delujejo kot most med površino nosilca in encima preko kovalentne vezave.



Kovalentna vezava je močna vezava med encimom in površino nosilca, kar preprečuje uhajanje encima s površine nosilca. Kljub temu lahko pri kovalentni vezavi pride do denaturacije encima, saj se encim kemijsko modificira z namenom, da poseduje določeno funkcionalno skupino. Takšen imobilizacijski postopek (preko kovalentne vezave) zelo izboljša stabilnost encima, lahko pa zniža aktivnost le-tega. Najpogostejše kovalentne vezave v postopkih imobilizacije encima potekajo preko aktivacije karboksilnih ali amino skupin. Pri aktivaciji preko karboksilne skupine se prosta karboksilna skupina na površini nosilca veže s prosto amino skupino na površini encima. Pri aktivaciji preko amino skupine pa se prosta amino skupina na površini nosilca veže s karboksilno skupino na površini encima [225]. Pri procesih aktivacije aktiviramo elektrofilne skupine na nosilcu, ki v procesu vezave reagirajo z močnimi nukleofilnimi skupinami na proteinu. Aktivatorje, ki aktivirajo hidroksilne skupine prikazuje Tabela 3-2. Za kovalentno modifikacijo proteina se najpogosteje uporabljajo reakcije s stranskimi verigami aminokislin: lizin (amino skupina), cistein (tiolna skupina), glutamska kislina (karboksilna skupina). Polimere, ki aktivirajo različne funkcionalne skupine prikazuje Tabela 3-3. Komercialno dostopnih je veliko nosilcev, izbirati pa jih moramo glede na lastnosti in uporabo katalizatorja.

Tabela 3-2: Aktivatorji pri kovalentni aktivaciji hidroksilnih skupin nosilca [214]

<b>Aktivatorji</b>	<b>Skupina, ki reagira (z aktiviranim nosilcem)</b>
tresilklorid, sulfonilklorid	tiolna, aminska
cianogen bromid	aminska
epoksidi	tiolna, aminska
epiklorohidrin	tiolna, aminska
glutaraldehyd	aminska
glicidol-glioksil	aminska
<i>N</i> -hidroksi-sukcinimidil	aminska

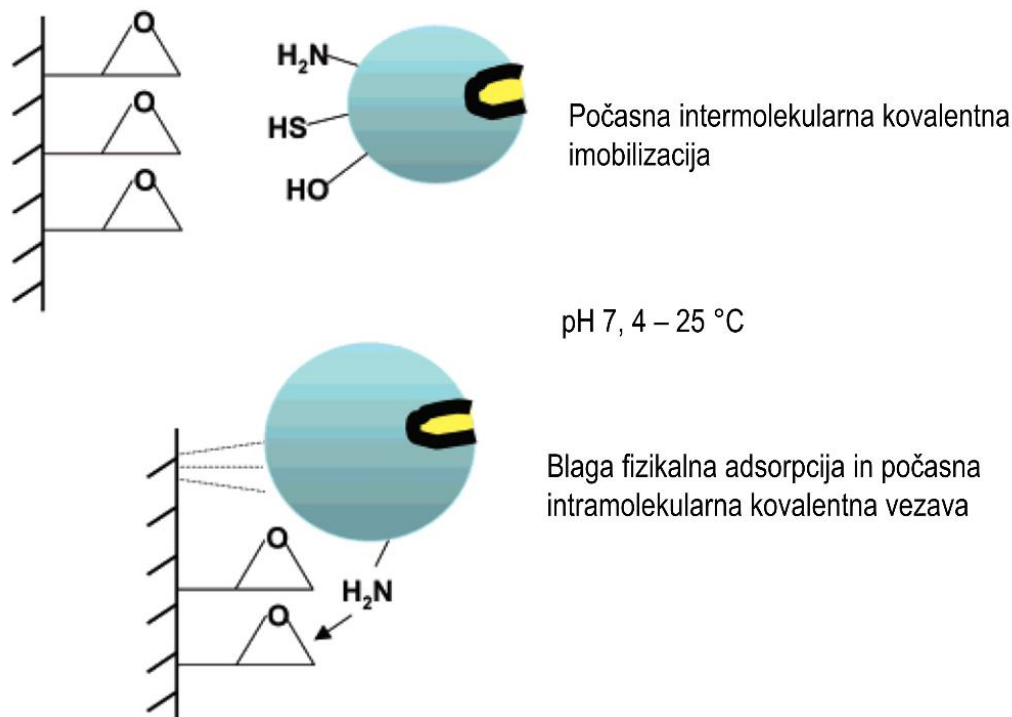
Tabela 3-3: Polimeri za aktivacijo funkcionalnih skupin [214]

<b>Polimer</b>	<b>Skupina, ki reagira</b>	<b>Reagent</b>	<b>Aktivirana skupina, ki nastane</b>	<b>Skupina, ki reagira (z aktiviranim matriksom)</b>
celuloza agarozna	diol	perodiat	aldehid	aminska
hitozan	amino ali hidroksilna	acil	aldehid ali amid	iminska
dekstran	hidroksilna	karbonildiimidazol ali etilendiamin	karboksilna skupina	aminska

poliakrilamid	amid	hidrazin	hidrazid	aminska
poliakrilamid	amid	kisel pH	karboksilna skupina	aminska
poliester	ester	kisel pH	karboksilna skupina + alkohol	aminska
polietilen	-CH <sub>2</sub>	konc. HNO <sub>3</sub>	karboksilna skupina	aminska
polistiren		konc. HNO <sub>3</sub>	nitiran aromatski obroč	histidin, tirozin
najlon	amid	hidrazin	hidrazid	aminska

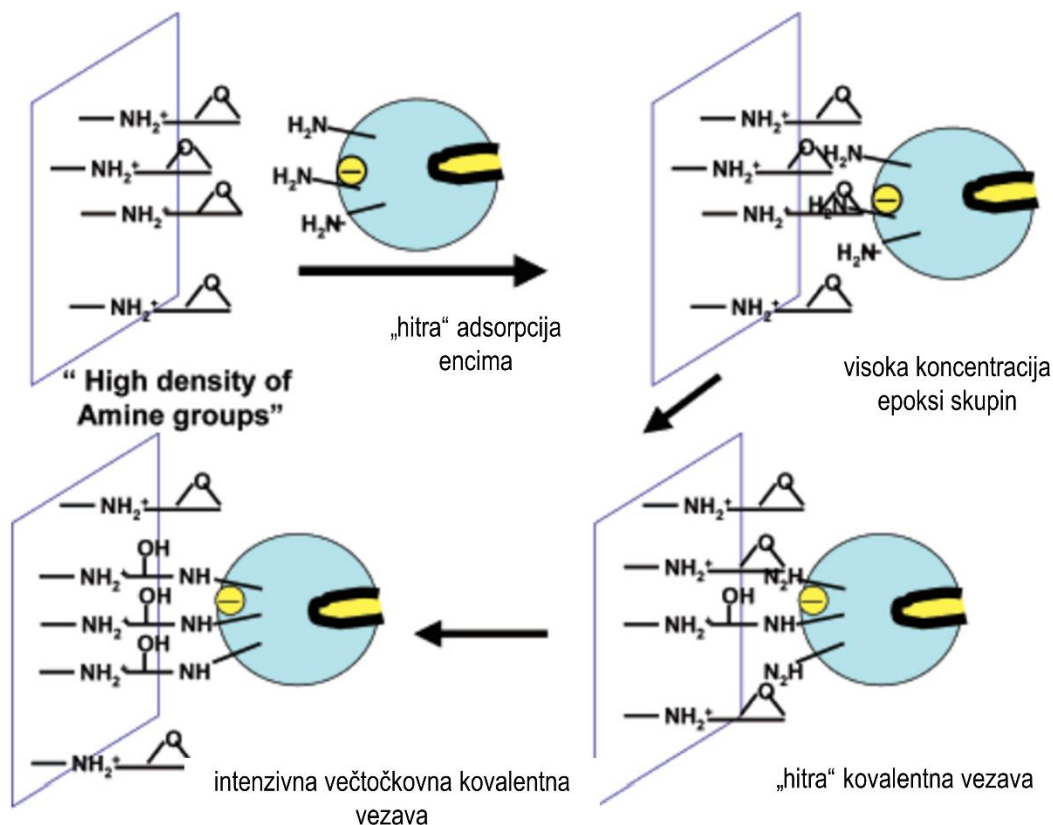
### 3.1.4.1 ECIH

Epoksi aktivirani nosilci so idealni sistemi za enostavne postopke imobilizacije encimov. Ker so epoksi skupine stabilne pri nevtralnem pH, lahko tako aktivirane nosilce skladiščimo v daljšem časovnem razponu. Epoksi aktivirani nosilci reagirajo z različnimi nukleofilnimi skupinami na površini encima (amino, hidroksi ali tiolnimi), s katerimi tvorijo močne vezi (sekundarne amino, etrne in tioetrne vezi), pri tem pa minimalno modificirajo encimsko strukturo. Mehanizem imobilizacije na epoksi aktivirane nosilce poteka v dveh delih: najprej se encim hidrofobno adsorbira na površino nosilca, nato se nukleofilne skupine encima (amino, tiolne ali hidroksilne skupine) kovalentno vežejo na epoksi skupine nosilca (Slika 3-5).



Slika 3-5: Mehanizem imobilizacije encimov na epoksi aktivirane nosilce [226]

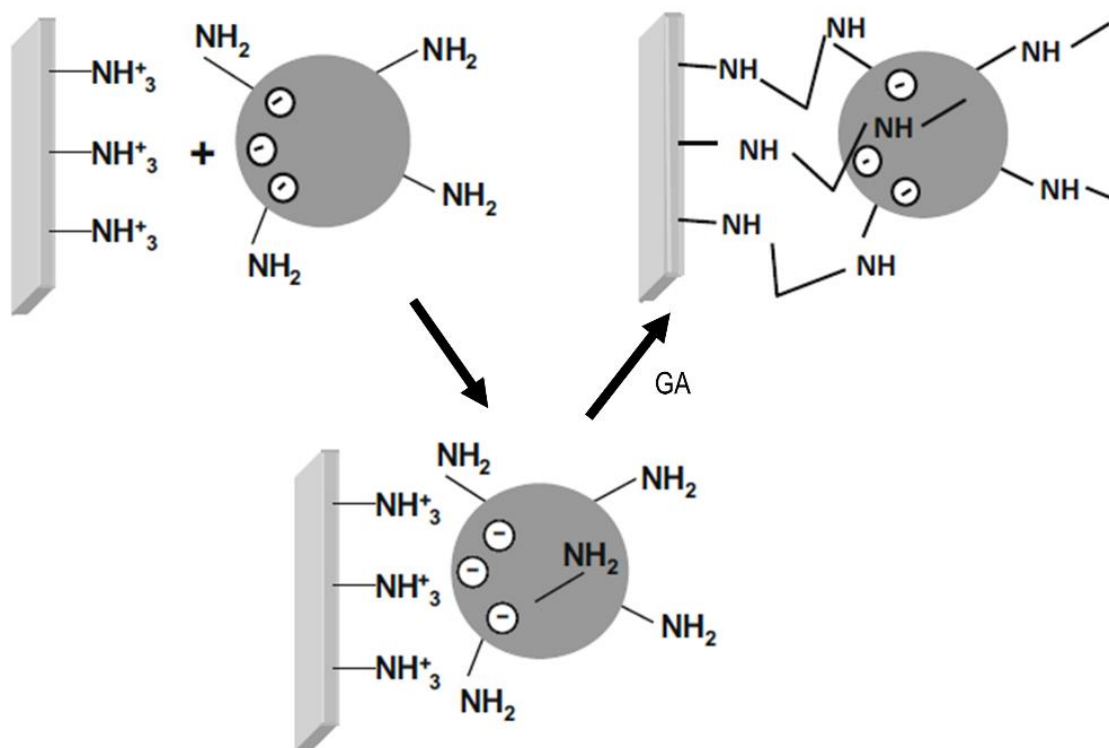
Sinteza heterofunkcionalnih nosilcev zahteva substitucijo nekaterih epoksi skupin z drugimi, ki lahko adsorbirajo encime. Zaradi tega se število prostih epoksi skupin, ki lahko kovalentno vežejo adsorbiran encim, zmanjša. V ta namen nosilci, ki so modificirani z ECIH, zagotovijo dodatne epoksi skupine, na katere se encim lahko adsorbira (Slika 3-6). Razmerje med adsorbentom in epoksi skupinami je 1:1. Takšni nosilci lahko hitro adsorbirajo encime z močno večtočkovno kovalentno vezavo [45,226].



Slika 3-6: Večtočkovna imobilizacija encimov na amino-epoksi funkcionalizirane nosilce [226]

### 3.1.4.2 GA

GA reagira z lizinskimi ostanki proteinov in ga uporabljamo pri imobilizaciji encimov s kovalentno vezavo. Površinska funkcionalizacija z GA zahteva proste aminske skupine nosilca, na katere se GA lahko veže (Slika 3-7). GA je bifunkcionalni reagent, ki reagira z dvema primarnima amino kislinama. V večini primerov se biomolekule ionsko adsorbirajo na površine aktivirane s pozitivno nabitimi primarnimi aminskimi skupinami, pri čemer se kasneje kovalentno zamrežijo z uporabo raztopine GA pod milimi pogoji. V tem primeru se ena molekula GA poveže z dvema primarnima amino skupinama, idealno z eno amino skupino z biomolekule in z drugo z nosilca. GA lahko povzroči inter-molekularno zamreženje med dvema primarnima amino skupinama na sosednjih biomolekulah. Intra- ali inter-molekularno naravo zamreženja lahko nadzorujemo z nadzorovanjem gostote proteina, pri čemer pri višji gostoti proteina nastane več intra-molekularnega zamreženja [227].



Slika 3-7: Zamreženje GA z encimi [214]

## 3.2 Encimi

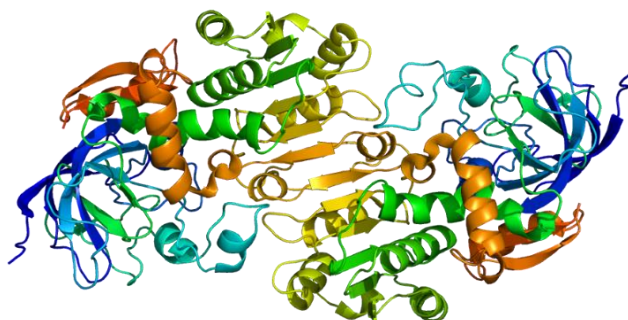
Encimi so biološki katalizatorji, ki uravnavajo kemijske reakcije v živih organizmih. Encimi lahko zaradi svojih izjemnih funkcionalnih lastnosti (aktivnosti, selektivnosti in specifičnosti) katalizirajo najkompleksnejše kemijske procese pod milim pogoji. Zato so encimi odlični industrijski katalizatorji na številnih področjih v kemični industriji.

### 3.2.1 ADH

*S. cerevisiae* je najpomembnejši mikroorganizem, ki ga človek izkorišča za dobrobit človeštva predvsem zaradi zmožnosti etanolne fermentacije ogljikovih hidratov. V organizmu *S. cerevisiae* potekata dve glavni metabolni poti, to sta glikoliza in celično dihanje. Pri tem je etanol glavni metabolit v energijskem metabolizmu, saj je končni produkt glikolize in etanolne fermentacije. Skupaj z ADH, ki katalizira presnovo acetaldehida in etanola, služi tudi kot ogljikov substrat med celičnim dihanjem.

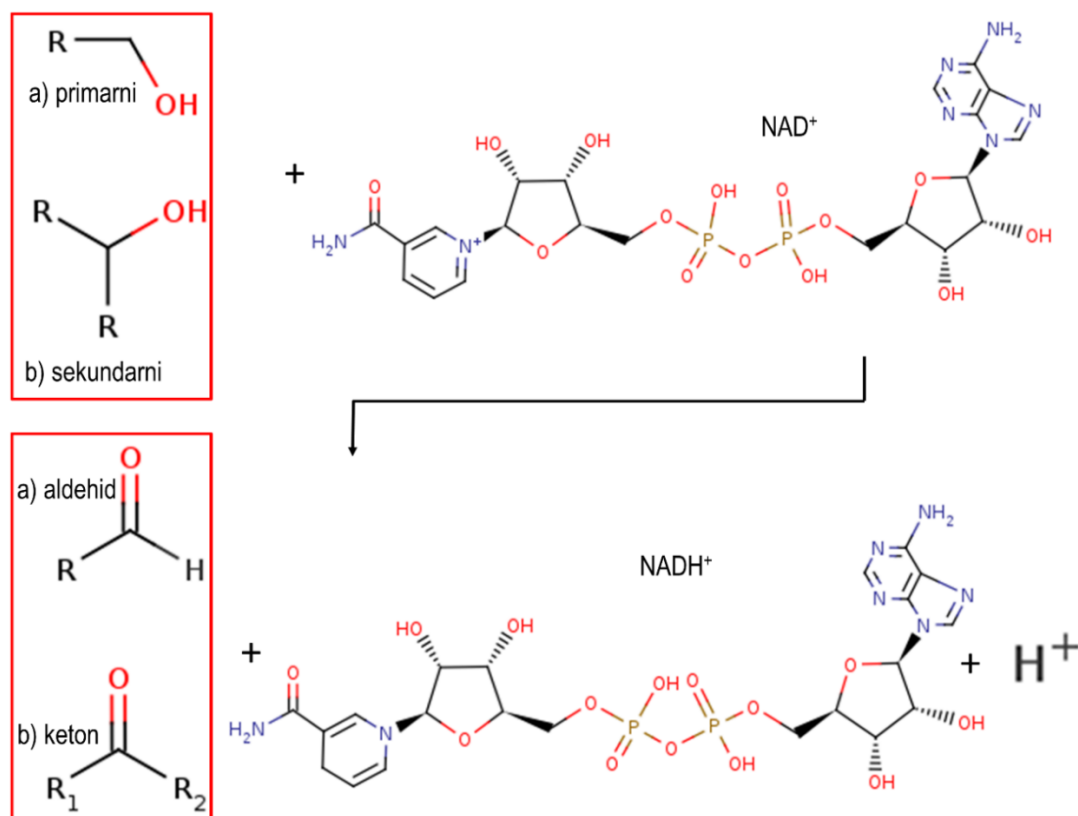
ADH iz *S. cerevisiae* (Slika 3-8) spada v družino oksidoreduktaz oz. alkoholnih dehidrogenaz, ki vsebujejo cink. ADH iz *S. cerevisiae* spada v tretjo skupino dehidrogenaz, ki vsebuje tri izoencime ADH: Tip I (YADH1) je dehidrogenaza s srednjo verigo, ki vsebuje cinkov ion. Sestavlja jo približno 370 aminokislin na podenoto v obliki dimetrov (v višjih eukariontih) in v obliki tetramerov (v bakterijah); Tip, II (YADH2) je dehidrogenaza s kratko verigo, ki prav tako vsebuje cinkov ion, izražena pa je v citoplazemski obliki, glukoza

pa jo zavira. Sestavlja pa jo približno 250 aminokislin na podenoto; Tip III, ki je dehidrogenaza z dolgo verigo in vsebuje železo, najdemo jo v mitohondrijih, sestavlja pa jo približno 385 do 900 aminokislin na podenoto [228,229].



Slika 3-8: 3D struktura encima ADH

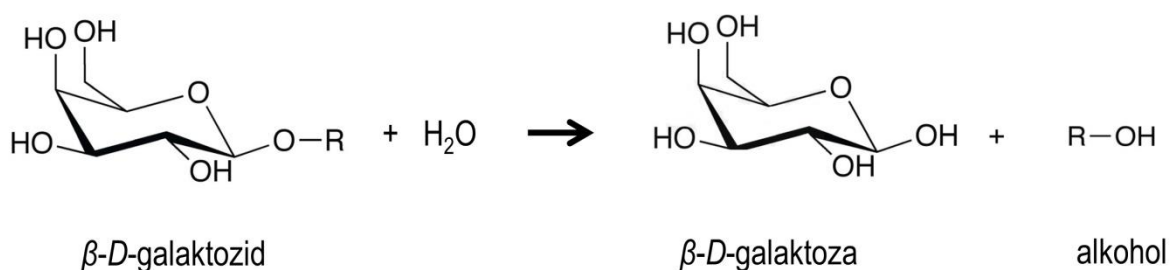
ADH katalizira oksidacijo alkoholov in redukcijo aldehydov in ketonov, pri čemer sta  $\text{NAD}^+$  ali  $\text{NADP}^+$  elektronska akceptorja (Slika 3-9). Reakcija je reverzibilna, substrati pa so lahko različni primarni ali sekundarni alkoholi. Etanol je najboljši najprimernejši in substrat za ADH, prav tako pa so dobri substrati tudi alil alkohol in kinamil alkohol. Slabši substrati so metanol, glicerol, gliceraldehid, acetol, benzil alkohol in benzaldehid. Kofaktor NAD je sestavljen iz dveh nukleotidov, adenina in nikotinamida, lahko pa se pojavi v oksidirani ( $\text{NAD}^+$ ) ali reducirani obliki (NADH).  $\text{NAD}^+$  sprejema elektrone drugih molekul in se reducira, pri tem pa nastane NADH, ki lahko elektrone donira.  $\text{NAD}^+$  se lahko veže v dveh orientacijah, zato obstaja v dveh diastereomerih ( $\alpha$ -NAD in  $\beta$ -NAD), pri čemer je  $\beta$ -NAD najbolj razširjen, saj ga najdemo v različnih organizimih. Podenote ADH iz *S. cerevisiae* so sestavljene iz dveh domen: katalitske domene in domene, ki veže koencim. Domeni po velikosti nista enaki, saj katalitska domena vsebuje 3 od vseh 5 aminokislin, domena, ki veže koencim pa 2 aminokislini. Domeni sta med seboj ločeni s prostorom, kjer se zbirata substrat in nikotinadmid koencima. Ena domena veže koencim, druga domena pa priskrbi ligande za katalitski cink, kot tudi za večino skupin, ki vzdržujejo specifičnost substrata. Aktivno mesto ADH veže molekulo substrata in molekulo koencima, da lahko poteče kataliza [230]. Ker je ADH pomemben biološki katalizator, temelji na njeni uporabi veliko aplikacij v različnih industrijskih panogah, kot na primer v farmacevtski ali živilski. Zaradi svoje enantioselektivnosti je odličen katalizator v farmaciji, ki omogoča proizvodnjo zelo čistih učinkovin [231]. Prav tako se uporablja za proizvodnjo različnih intermediatov, sintezo kiralnih komponent, predvsem pa za regeneracijo koencimov  $\text{NAD(P)}$  in  $\text{NAD(P)H}$ . Uporablja se tudi v tehnologiji biosenzorjev [40].



Slika 3-9: Reakcijski shemi oksidacije primarnega alkohola in redukcije aldehida (a) in sekundarnega alkohola in redukcije ketona (b), ki ju katalizira ADH

### 3.2.2 $\beta$ -GAL

$\beta$ -GAL katalizira hidrolizo  $\beta$ -D-galaktozida v prisotnosti vode do galaktoze in alkohola (Slika 3-10). Sestavljena je iz štirih identičnih podenot, vsaka pa ima svoj aktivno mesto.  $\beta$ -GAL ima kofaktorje, ki so divalentne kovine z magnezijevimi ioni, kateri so potrebni za vzdrževanje konformacije aktivnega mesta. Komercialna  $\beta$ -GAL je izolirana iz *E. coli* in ima optimalni pH med 7 in 7,5.



Slika 3-10: Hidroliza  $\beta$ -D-galaktozida do galaktoze

Večina industrijskih aplikacij  $\beta$ -GAL se nanaša na hidrolizo laktoze, zato se je je prijelo komercialno ime laktaza. Vendar njena biološka aktivnost ni omejena samo na hidrolizo laktoze, saj veliko  $\beta$ -GAL ni sposobnih katalizirati hidrolize laktoze. Tako se uporablja v različnih industrijskih panogah, v živilski, industriji biosenzorjev, diagnostike in zdravljenja

različnih motenj. Encim najdemo v večini mikroorganizmov, rastlin in živali, a le mikroba  $\beta$ -GAL je tehnološko pomembna, saj jo je mogoče proizvesti z nizkimi stroški pri intenzivnem delovanju fermentacije z visokim izkoristkom in produktivnostjo [232].  $\beta$ -GAL (Slika 3-11) se je uporabljala tudi kot model za preučevanje genetske regulacije, v zadnjem času pa je tehnološko pomembna predvsem, ker katalizira pretvorbo laktoze v monosaharide. Tako se uporablja za proizvodnjo izdelkov z zmanjšano vsebnostjo ali brez laktoze zaradi vse bolj naraščajoče netolerance prebivalstva na laktozo. Novi industrijski procesi uporabe  $\beta$ -GAL tako omogočajo katalizo sinteze probiotičnih oligosaharidov, kot naprimer galakto-oligosaharidov s kinetičnim nadzorovanjem reakcije laktozne transgalaktozilacije [233].

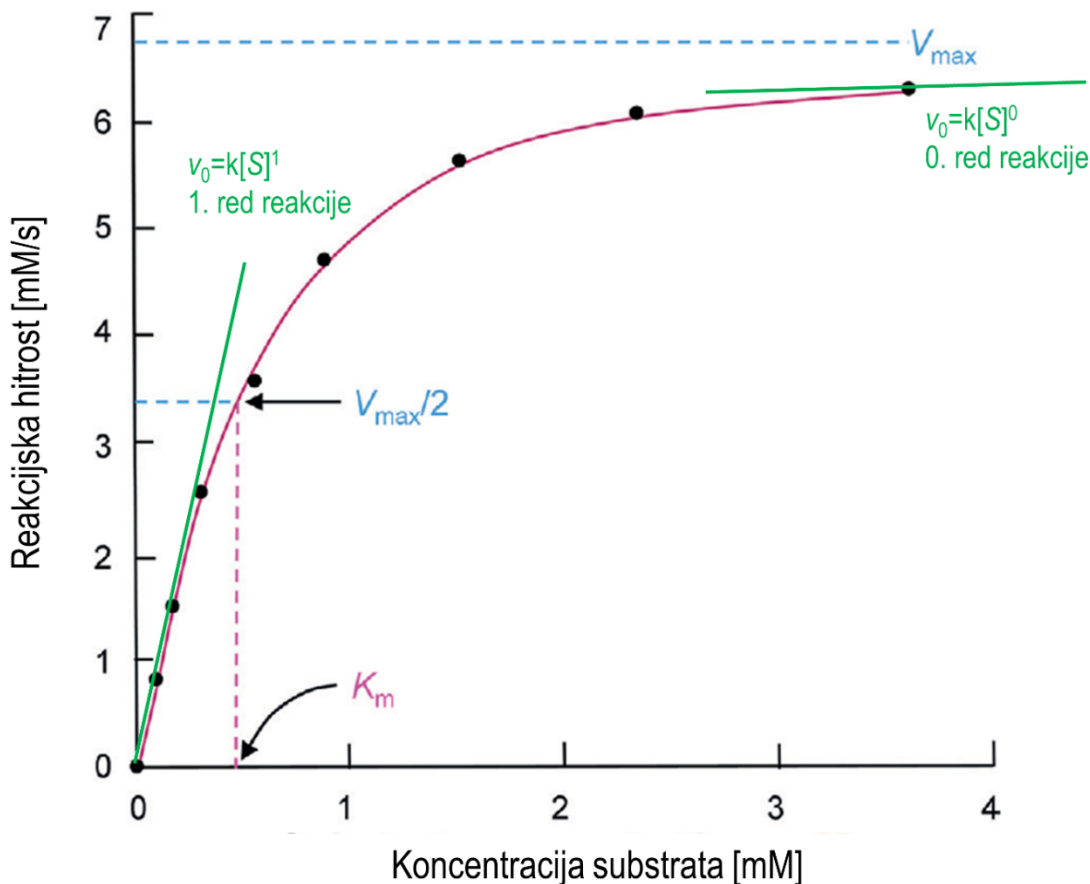


Slika 3-11: 3D struktura encima  $\beta$ -GAL



### 3.2.3 Encimska kinetika

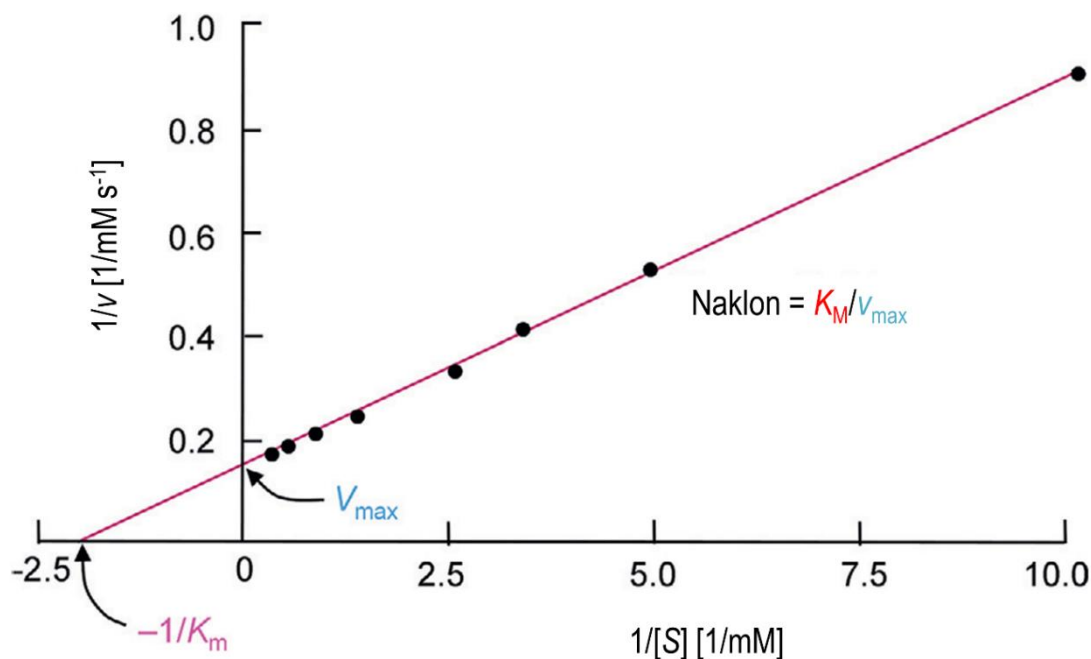
Encimska kinetika preučuje hitrosti encimsko kataliziranih reakcij. Tipičen graf ima obliko hiperbole in prikazuje odvisnost začetnih hitrosti od koncentracije substrata (Slika 3-12). Z naraščanjem koncentracije substrata se vse več encima nahaja v obliki kompleksa encim-substrat (ES), encim pa tako postaja nasičen s substratom (saturacijska kinetika). Pri nizkih koncentracijah substrata je hitrost reakcije sorazmerna s koncentracijo substrata in se približuje reakciji 1. reda. Pri visokih koncentracijah substrata pa hitrost reakcije ni odvisna od koncentracije substrata in se približuje reakciji 0. reda [234].



Slika 3-12: Graf hitrosti encimsko katalizirane reakcije v odvisnosti od koncentracije substrata

Leonor Michaelis in Maud Menten sta leta 1913 s svojim pristopom predvidevala, da sta encim in substrat med katalizo v ravnotežju, ter da hitrost nastanka produkta ne moti nastalega ravnotežja [235]. Michaelis-Mentenina enačba povezuje hitrost encimsko katalizirane reakcije z dvema kinetičnima konstantama, Michaelis-Mentenino konstanto ( $K_M$ ) in maksimalno reakcijsko hitrostjo ( $v_{max}$ ). Michaelis-Mentenova konstanta ( $K_M$ ) je karakteristična kinetična konstanta, ki se uporablja za ocenjevanje interakcije med encimom in substratom ter ustreza koncentraciji substrata, pri kateri hitrost reakcije doseže vrednost, ki je enaka polovici maksimalne reakcijske hitrosti ( $v_{max}/2$ ). Ker je  $v_{max}$  encima težko določiti natančno, je težko določiti tudi njegovo  $K_M$ . V ta namen poznamo več linearnih korelacij, s katerimi Michaelis-Mentenino enačbo preoblikujemo v linearno obliko: Eadie-Hofsteejev diagram, Langmuirov diagram, med najpogostejšimi diagrami pa je Lineweaver-Burkova metoda za analizo encimske kinetike (Slika 3-13).





Slika 3-13: Lineweaver-Burkov diagram

$K_M$  konstanto lahko izračunamo s pomočjo Lineweaver-Burkove metode pod optimalnimi pogoji, ki jo prikazuje enačba (1):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max}[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (1)$$

kjer je:

- $v$  - začetna reakcijska hitrost
- $v_{max}$  - najvišja reakcijska hitrost
- $[S]$  - koncentracija substrata
- $K_M$  - Michaelis-Mentenova konstanta

Lineweaver-Burkova enačba prikazuje recipročno vrednost Michaelis-Mentenine enačbe, kjer  $K_M/v_{max}$  ustreza naklonu,  $1/v_{max}$  ustreza presečišču z ordinatno osjo,  $-1/K_M$  pa ustreza presečišču z abscisno osjo. Z meritvami encimske aktivnosti pri različnih koncentracijah substrata nam dvojno recipročni diagram omogoča določitev konstant  $K_M$  in  $v_{max}$ . S konstanto  $K_M$  določimo, kako dobro substrat tvori kompleks z danim encimom oz. ovrednotimo vezavno afiniteto encima do substrata. Pri nižjih vrednostih  $K_M$ , reakcija hitreje doseže  $v_{max}$ , zato ima encim večjo vezavno afiniteto do substrata, saj se učinkoviteje veže. Obratno pa višje vrednosti  $K_M$  pomenijo nižjo vezavno afiniteto encima do substrata.

### 3.3 Eksperimentalni del

#### 3.3.1 Materiali in reagenti

Za površinsko modifikacijo CMD-MNPs smo uporabili:

- 0,5 M epiklorohidrin (1-kloro-2,3-epoksipropan), Sigma-Aldrich, Nemčija
- etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, 95 %), Sigma-Aldrich, Nemčija

Za imobilizacijo encima ADH in kofaktorja  $\beta$ -NAD na površinsko modificirane CMD-MNPs smo uporabili:

- encim alkohol dehidrogenazo iz kvasovk *S. cerevisiae*, Sigma-Aldrich, Nemčija
- $\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotid (C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub>·xH<sub>2</sub>O), Sigma-Aldrich, Nemčija
- etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, 95 %), Sigma-Aldrich, Nemčija
- dinatrijev hidrogenfosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Merck, Nemčija
- natrijev dihidrogen fosfat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Merck, Nemčija
- milliQ vodo

Za imobilizacijo encima  $\beta$ -GAL na HIT-MNP in AMS-MNPs smo uporabili:

- encim  $\beta$ -galaktozidazo iz *Aspergillus oryzae*, Sigma-Aldrich, Nemčija
- natrijev acetat (CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O), Sigma-Aldrich, Nemčija
- glutaraldehid (OHC(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CHO, 25 %), Sigma-Aldrich, Nemčija
- pentaetilenheksamin, Sigma-Aldrich, Nemčija
- milliQ vodo

Za določevanje aktivnosti in učinkovitosti imobilizacije ADH smo uporabili:

- natrijev pirofosfat dekahidrat, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich, Nemčija
- etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, 95 %), Sigma-Aldrich, Nemčija
- $\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotid (C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub>·xH<sub>2</sub>O), Sigma-Aldrich, Nemčija
- natrijev dihidrogen fosfat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Merck, Nemčija
- dinatrijev hidrogenfosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Merck, Nemčija
- goveji serumski albumin (BSA), Sigma-Aldrich, Nemčija
- Bradfordov reagent
- milliQ vodo

Za določevanje aktivnosti in učinkovitosti imobilizacije  $\beta$ -GAL smo uporabili:

- natrijev acetat trihidrat (CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O), Sigma-Aldrich, Nemčija
- *o*-nitrofenil  $\beta$ -D-galaktopiranozid (ONPG, C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>8</sub>), Sigma-Aldrich, Nemčija
- goveji serumski albumin (BSA), Sigma-Aldrich, Nemčija
- natrijev karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), Sigma-Aldrich, Nemčija
- Bradfordov reagent

- milliQ vodo

Za pripravo Bradfordovega reagenta ter umeritvene krivulje smo uporabili:

- Coomassie Brilliant Blue G-250 ( $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$ ), Merck, Nemčija
- etanol ( $C_2H_5OH$ , 95 %), Sigma-Aldrich, Nemčija
- fosforno (V) kislino ( $H_3PO_4$ , 85 %), Merck, Nemčija
- goveji serumski albumin (BSA), Sigma-Aldrich, Nemčija
- milliQ vodo

### 3.3.2 Laboratorijska oprema in aparature

Pri laboratorijskem delu smo uporabili naslednjo opremo in aparature:

- merilne valje (10 mL, 50 mL, 100 mL, 1 L)
- steklene čaše (5 mL, 20 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500, mL)
- steklene bučke (100 mL, 200 mL)
- mikrocentrifugirke (1500  $\mu$ L, 2000  $\mu$ L)
- magnetni mešalček
- magnetno mešalo
- magnet
- mikropipete
- pH meter
- termometer
- tehtnico
- stresalnik in inkubator (Heidolph Unimax 1010)
- centrifugo (Eppendorf Centrifuge 5804 R)
- električni grelnik z magnetnim mešalom
- UV-VIS spektrofotometer (Varian Cary 50 Probe)
- vorteks

### 3.3.3 Eksperimentalne metode

#### 3.3.3.1 Priprava epoksi-zamreževalca ECIH

Za površinsko modifikacijo nosilca CMD3-MNPs v postopku imobilizacije ADH smo pripravili raztopino mrežnega epoksi-zamreževalca ECIH v etanolu s koncentracijo 0,5 M.

### 3.3.3.2 Imobilizacija ADH na CMD3-MNPs

Predhodno sintetizirane CMD3-MNPs smo najprej aktivirali tako, da smo njihovo površino modificirali z raztopino epoksi-zamreževalca ECIH. V epruveto smo zatehtali 20 mg CMD3-MNPs, dodali določen volumski delež epoksi-zamreževalca ECIH (0,5 M) ter dopolnili z 10 mM natrijevim fosfatnim pufrom (pH 7,5), tako da je končni volumen zmesi znašal 1 mL. Epruveto z zmesjo smo postavili na stresalnik ter stresali 1 uro na sobni temperaturi pri 300 rpm. Po končani aktivaciji smo delce ločili z magnetno separacijo, supernatant pa oddekantirali. Aktiviranim delcem smo dodali 100  $\mu$ L encima ADH (7,42 U/mL) ter 900  $\mu$ L 10 mM natrijevega fosfatnega pufra, tako da je končna koncentracija encima ADH znašala 0,02 mg/mL. Tako pripravljeno zmes smo prenesli na stresalnik ter pričeli s postopkom imobilizacije, ki je trajala 2 uri. V nadaljevanju smo spreminjali pogoje in proučevali vpliv različnih procesnih parametrov, in sicer koncentracijo zamreževalca ECIH (2 (v/v) %, 4 (v/v) %, 6 (v/v) %, 8 (v/v) %, 10 (v/v) %), temperaturo imobilizacije (4 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C), hitrost stresanja v postopku imobilizacije (200 rpm, 300 rpm, 400 rpm, 500 rpm), pH imobilizacijskega medija (5, 6, 7, 7,5, 8, 8,5, 9), čas imobilizacije (2 uri, 3 ure, 4 ure, 5 ur, 8 ur, 12 ur, 24 ur) in koncentracijo encima (0,02 mg/mL, 0,03 mg/mL, 0,04 mg/mL). Po končani imobilizaciji smo delce ločili z magnetno separacijo in oddekantirali supernatant. V supernatantih smo določili koncentracijo proteinov po Bradfordu ter tako določili, koliko encima je ostalo nevezanega, da smo lahko določili učinkovitost imobilizacije. Prav tako smo določili aktivnost imobiliziranega encima.

### 3.3.3.3 Koimobilizacija ADH in $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs

Predhodno sintetizirane CMD3-MNPs smo najprej aktivirali tako, da smo njihovo površino modificirali z raztopino zamreževalca ECIH. V epruveto smo zatehtali 20 mg CMD3-MNPs, dodali 4 (v/v) % ECIH ter dopolnili z 10 mM natrijevim fosfatnim pufrom (pH 7,5), tako da je končni volumen zmesi znašal 1 mL. Epruveto z zmesjo smo postavili na stresalnik ter stresali 2 uri na sobni temperaturi pri obratih 350 rpm. Po končani aktivaciji smo delce ločili z magnetno separacijo, supernatant oddekantirali ter na nanodelce nanесли 750  $\mu$ L  $\beta$ -NAD s koncentracijo 15 mM. Tako pripravljeno zmes smo ponovno prenesli na stresalnik in pričeli s postopkom imobilizacije  $\beta$ -NAD. Zmes smo stresali 2 uri pri sobni temperaturi in obratih 350 rpm. Po končani imobilizaciji smo delce ločili z magnetno separacijo s pomočjo magneta ter oddekantirali supernatant. Na nanodelce smo nato dodali 100  $\mu$ L encima ADH in 900  $\mu$ L natrijevega fosfatnega pufra (10 mM), tako da je končna koncentracija encima znašala 0,02 mg/mL. Nato smo zmes stresali na stresalniku pri 22 °C in 350 rpm ter proučevali vpliv različnih procesnih parametrov, kot so masa CMD3-MNPs (20 mg, 40 mg, 50 mg), zaporedje koimobilizacije ADH in  $\beta$ -NAD, koncentracija  $\beta$ -NAD (10 mM, 15 mM, 20 mM), čas koimobilizacije ADH in  $\beta$ -NAD, temperaturo (22 °C in 10 °C), čas aktivacije CMD3-MNPs (1 ura in 2 uri), koncentracijo ADH (0,01 mg/mL, 0,02 mg/mL, 0,03 mg/mL, 0,04 mg/mL) na potek imobilizacije. Po končani imobilizaciji smo delce ločili z magnetno separacijo in oddekantirali supernatant. V supernatantih smo določili koncentracijo proteinov po Bradfordu ter tako določili učinkovitost imobilizacije. Prav tako smo določili preostalo aktivnost imobiliziranega encima.

### 3.3.3.4 Termična stabilnost

Prosti encimi so velikokrat termično nestabilni pri visokih temperaturah. Eden od načinov stabilizacije encima je imobilizacija le-tega na nosilec. Imobilizacija encima zagotavlja višjo termično stabilnost, pri čemer je glavna prednost termično stabilnih encimov njihova zmožnost izogniti se ireverzibilni denaturaciji oz. kinetični nestabilnosti [236]. Preostalo aktivnost ADH imobilizirane na CMD3-MNPs in ADH koimobilizirane z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs po izpostavitvi pri določeni temperaturi smo določili po sledeči enačbi (2):

$$\text{Preostala aktivnost (\%)} = \frac{\text{aktivnost imobilizirane ADH}_{\text{po inkubaciji}}}{\text{aktivnost imobilizirane ADH}_{\text{pred inkubacijo}}} * 100 \quad (2)$$

#### 3.3.3.4.1 Termična stabilnost imobilizirane ADH

Študijo termične stabilnosti ADH, imobilizirane na CMD3-MNPs smo izvedli pri 20 °C in 40 °C, pri čemer smo imobilizirani encim pri določeni temperaturi inkubirali 3 h, 5 h ali 24 h.

#### 3.3.3.4.2 Termična stabilnost koimobilizirane ADH

Študijo termične stabilnosti ADH, koimobilizirane z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs smo izvedli pri 30 °C in 50 °C pri čemer smo imobilizirani encim pri določeni temperaturi inkubirali 3 h ali 5 h.

### 3.3.3.5 Stabilnost imobilizirane in koimobilizirane ADH pri 4 °C

Sladiščenje encimov na sobni temperaturi pogosto vodi v njihovo degradacijo in inaktivacijo, zato je skladiščenje encimov najprimernejše v hlajenem prostoru s temperaturo  $\leq 4$  °C v sterilnih steklenih ali polipropilenskih epruveh. Pri kratkotrajnem skladiščenju (od enega dneva do več tednov) zadošča skladiščenje v enostavnih pufrih pri 4 °C, medtem ko se za dolgotrajna skladiščenja (od enega meseca do enega leta) uporabljajo skladiščenja v čistih plastičnih posodah v tekočem dušiku [237]. Stabilnost ADH, imobilizirane na CMD3-MNPs in ADH, koimobilizirane z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs smo določili na osnovi njihovih preostalih aktivnosti po skladiščenju pri 4 °C (enačba (3)):

$$\text{Preostala aktivnost (\%)} = \frac{\text{aktivnost imobilizirane ADH}_{\text{po skladiščenju}}}{\text{aktivnost imobilizirane ADH}_{\text{pred skladiščenjem}}} * 100 \quad (3)$$

### 3.3.3.5.1 Stabilnost imobilizirane ADH

ADH imobilizirano na CMD3-MNPs smo skladiščili v hladilniku pri temperaturi 4 °C. Preostalo aktivnost skladiščene ADH imobilizirane na CMD3-MNPs smo v različnih časovnih intervalih določevali 21 dni.

### 3.3.3.5.2 Stabilnost koimobilizirane ADH

ADH koimobilizirano z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs smo skladiščili v hladilniku pri temperaturi 4 °C. Preostalo aktivnost skladiščene ADH koimobilizirane z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs smo določevali po 7, 14, in 21 dneh skladiščenja.

### 3.3.3.6 Eksperimentalna določitev $K_M$ in $v_{max}$ prosti, imobilizirani in koimobilizirani ADH

Za eksperimentalno določitev kinetičnih parametrov  $K_M$  in  $v_{max}$  smo aktivnost proste, imobilizirane in koimobilizirane ADH določili pri 4 različnih koncentracijah substrata, in sicer pri 0,3 M, 0,6 M, 0,7 M in 0,8 M etanolu.

### 3.3.3.7 Imobilizacija $\beta$ -GAL na HIT-MNPs in AMS-MNPs

V imobilizacijskem postopku smo uporabili sintetizirane HIT-MNPs, ki smo jih sintetizirali po postopku opisanem v delu Hojnik in ostali [238] ter sintetizirane AMS-MNPs po postopku, opisanem v delu Šulek in ostali [22]. Na pripravljene HIT-MNPs ali AMS-MNPs smo imobilizirali encim  $\beta$ -GAL tako, da smo HIT-MNPs ali AMS-MNPs aktivirali s funkcionalnimi skupinami, pri čemer smo uporabili zamreževalec GA in amino-donor PEHA. V mikrocentrifugirko smo zatehtali 5 mg pripravljenih HIT-MNPs ali AMS-MNPs ter dodali 1 mL acetatnega pufra (pH 6) ter ustrezno količino GA in/ali PEHA. Tabela 3-4 in Tabela 3-5 prikazujeta koncentracije mrežnega povezovalca GA in amino-donorja PEHA, ki smo ju uvedli v postopek imobilizacije  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs ali AMS-MNPs.

Tabela 3-4: Koncentracije GA, PEHA in GA/PEHA pri imobilizaciji  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs

	Volumski delež GA in/ali PEHA [% (v/v)]			
GA	1	1,5	2	
PEHA	10	30	40	
GA/PEHA	0,5/30	1/30	1,5/30	0,5/40



absorbanco, ki smo jo uporabili za izračune aktivnosti encima ADH [239]. Za določevanje aktivnosti ADH smo potrebovali 7 reagentov:

- Reagent A

*50 mM natrijev pirofosfatni pufer, pH 8,8 pri 25 °C*

Zatehtali smo 2,23 g natrijevega pirofosfata in ga raztopili v 100 mL destilirane vode. Z 8 % (v/v) fosforno kislino smo umerili pH raztopine na 8,8 pri 25 °C.

- Reagent B

*95 % (v/v) etanol*

V 100 mL bučko smo dali 95 mL etanola ter dopolnili do oznake z destilirano vodo.

- Reagent C

*15 mM  $\beta$ -NAD raztopina*

Za vsako določevanje aktivnosti ADH smo dnevno pripravili svežo raztopino  $\beta$ -NAD. Zatehtali smo 0,149 g  $\beta$ -NAD ter ga raztopili v 15 mL destilirane vode.

- Reagent D

*10 mM natrijev fosfat*

Zatehtali smo 0,137 g natrijevega dihidrogen fosfata ter ga raztopili v 100 mL destilirane vode.

- Reagent E

*10 mM natrijev fosfatni pufer, pH 7,5 pri 25 °C*

Zatehtali smo 0,141 g dinatrijevega hidrogen fosfata in ga raztopili v 100 mL destilirane vode. Z reagentom D smo umerili pH raztopine na 7,5 pri 25 °C.

- Reagent F

*10 mM natrijev fosfatni pufer z 0,1 % (w/v) BSA, pH 7,5 pri 25 °C*

Zatehtali smo 0,025 g BSA ter ga raztopili v 25 mL Reagenta E.

- Reagent G

*Encim ADH*

Encim ADH z določeno koncentracijo smo pripravili v raztopini reagenta E.



- Postopek določevanja aktivnosti ADH

V dve epruveti smo odpipetirali reagente A, B, C ter jih premešali. V prvo epruveto (slepi vzorec) smo odpipetirali reagent F, premešali ter po 1 minuti takoj pomerili absorbanco na UV-VIS spektrofotometru pri valovni dolžini 340 nm. Prav tako smo v drugo epruveto odpipetirali reagent G (vzorec oz. encim ADH), premešali ter po 1 minuti takoj izmerili absorbanco na UV-VIS spektrofotometru pri valovni dolžini 340 nm. Tabela 3-6 prikazuje količino ter zaporedje dodajanja reagentov za slepi vzorec ter vzorec proste ADH.

Tabela 3-6: Zaporedje in količina dodanih reagentov za izvedno aktivnostnega testa za ADH

	Slepi vzorec (μL)	Vzorec (μL)
Reagent A	650	650
Reagent B	50	50
Reagent C	750	750
Premešamo reagente na sobni temperaturi		
Reagent F	50	/
Reagent G	/	50

- Izračun aktivnost encima ADH

Aktivnost proste ter imobilizirane ADH smo določili po enačbi (4), kjer je 1 Enota (Unit) izražena kot količina (mg) ADH, ki pretvori 1 μmol etanola v acetaldehid na minuto pri pH 8,8 in temperaturi 25 °C.

$$U = \frac{((\Delta A_{340 \text{ nm}} / \text{min}_{\text{vzorca}}) - (A_{340 \text{ nm}} / \text{min}_{\text{slepega vzorca}})) \times V_k \times df}{\epsilon_{\beta\text{-NADH}} \times V_e} \quad (4)$$

kjer je:

U - aktivnost ADH (U/mL)

$V_k$  - končni volumen reakcijske zmesi (1,5 mL)

df - redčitveni faktor (1)

$\epsilon_{\beta\text{-NADH}}$  - milimolarni ekstinkcijski koeficient za  $\beta\text{-NADH}$  pri 340 nm (6,22)

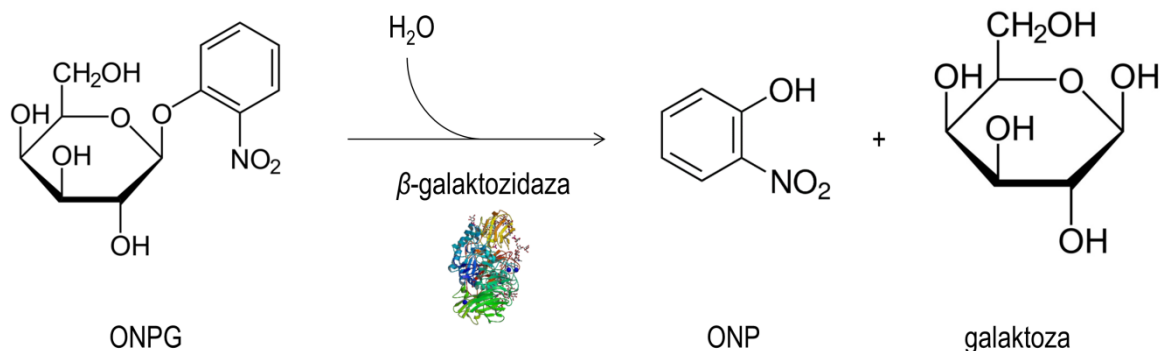
$V_e$  - volumen dodanega encima (0,05 mL)

Preostalo aktivnost imobiliziranega encima ADH smo določili kot delež (%) iz razmerja med aktivnostjo prostega encima in aktivnostjo imobiliziranega encima po enačbi (5), in sicer:

$$\text{Preostala aktivnost (\%)} = \frac{\text{aktivnost}_{\text{proste ADH}}}{\text{aktivnost}_{\text{imobilizirane ADH}}} * 100 \quad (5)$$

### 3.3.4.2 Aktivnostni test za $\beta$ -GAL

Aktivnost encima  $\beta$ -GAL smo določevali z aktivnostnim testom, ki temelji na reakciji hidrolize, ki jo prikazuje Slika 3-15. Orto-nitrofenol- $\beta$ -galaktozid (ONPG) je substrat za določevanje aktivnosti  $\beta$ -GAL. ONPG je brezbarvna spojina, ki ob prisotnosti z encimom  $\beta$ -GAL hidrolizira molekulo v orto-nitrofenol (ONP) in galaktozo. ONP se obarva rumeno barvo, ki jo pri valovni dolžini 405 nm lahko spektrofotometrično določimo.



Slika 3-15: Pretvorba ONPG v ONP ob prisotnosti encima  $\beta$ -GAL

Aktivnostni test za  $\beta$ -GAL smo izvajali pri temperaturi 37 °C. Encim smo raztopili v natrijevem acetatnem pufru (pH 6). Z UV-VIS spektrofotometrom smo pri valovni dolžini 405 nm izmerili absorbanco, ki smo jo uporabili za izračune aktivnosti encima  $\beta$ -GAL [240,241]. Za določevanje aktivnosti  $\beta$ -GAL smo potrebovali 4 reagente:

- Reagent A

100 mM natrijev acetatni pufer, pH 6 pri 37 °C

Zatehtali smo 0,82 g natrijevega acetata in ga raztopili v 100 mL destilirane vode. Z 1 M očetno kislino smo umerili pH raztopine na 6 pri 37 °C.

- Reagent B

2 mM *o*-Nitrofenil  $\beta$ -D-galaktozid z 0,01% (w/v) BSA, pH 6

Zatehtali smo 0,06 g *o*-nitrofenil  $\beta$ -D-galaktopiranozida ter 0,01 g BSA ter ju raztopili v 100 mL reagenta A. Z 1 M očetno kislino smo umerili pH raztopine na 6 pri 30 °C.

- Reagent C

1 M natrijev karbonat

Zatehtali smo 10,6 g natrijevega karbonata ter ga raztopili v 100 mL destilirane vode.

- Reagent D

Encim  $\beta$ -GAL

Pripravili smo vodno raztopino encima  $\beta$ -GAL s koncentracijo 50 mg/mL.

- Postopek določevanja aktivnosti  $\beta$ -GAL

V dve epruveti smo odpipetirali reagent B in destilirano vodo. Raztopino smo premešali in inkubirali 2 min pri temperaturi 37 °C. Po 2 min smo v eno epruveto dodali 200  $\mu$ L reagenta D (vzorca oz. encima  $\beta$ -GAL), v drugo epruveto pa nismo dodali ničesar (slepi vzorec). Sledila je 10 min inkubacija pri temperaturi 37 °C. Po končani inkubaciji smo v obe epruveti dodali 4 mL reagenta C, v slepi vzorec pa še 200  $\mu$ L reagenta D. Vzorca smo zvorteksirali ter jima izmerili abosrbanco na UV-VIS spektrofotometru pri valovni dolžini 405 nm.

Tabela 3-6 prikazuje količino ter zaporedje dodajanja reagentov za slepi vzorec ter vzorec pri določevanju aktivnosti proste  $\beta$ -GAL.

Tabela 3-7: Zaporedje in količina dodanih reagentov za izvedno aktivnostnega testa za  $\beta$ -GAL

	Slepi vzorec (mL)	Vzorec (mL)
Reagent B	0,50	0,50
destilirana voda	0,30	0,30
Stresamo 2 min na temperaturi 37 °C		
Reagent D	/	0,20
Stresamo 10 min na temperaturi 37 °C		
Reagent C	4,00	4,00
Reagnet D	0,20	/

- Izračun aktivnosti encima  $\beta$ -GAL

Aktivnost proste ter imobilizirane  $\beta$ -GAL smo določili po enačbi (6). 1 Enota (Unit) je izražena kot količina (mg)  $\beta$ -GAL, ki hidrolizira 1  $\mu$ mol *o*-nitrofenil  $\beta$ -*D*-galaktozida v *o*-nitrofenol in *D*-galaktozo na minuto pri pH 6 in 37 °C.

$$U = \frac{(A_{405\text{ nm}}\text{vzorca} - A_{405\text{ nm}}\text{slepega vzorca}) \times V_k \times df}{t \times \epsilon_{o\text{-Nitro}} \times V_e} \quad (6)$$

kjer je:

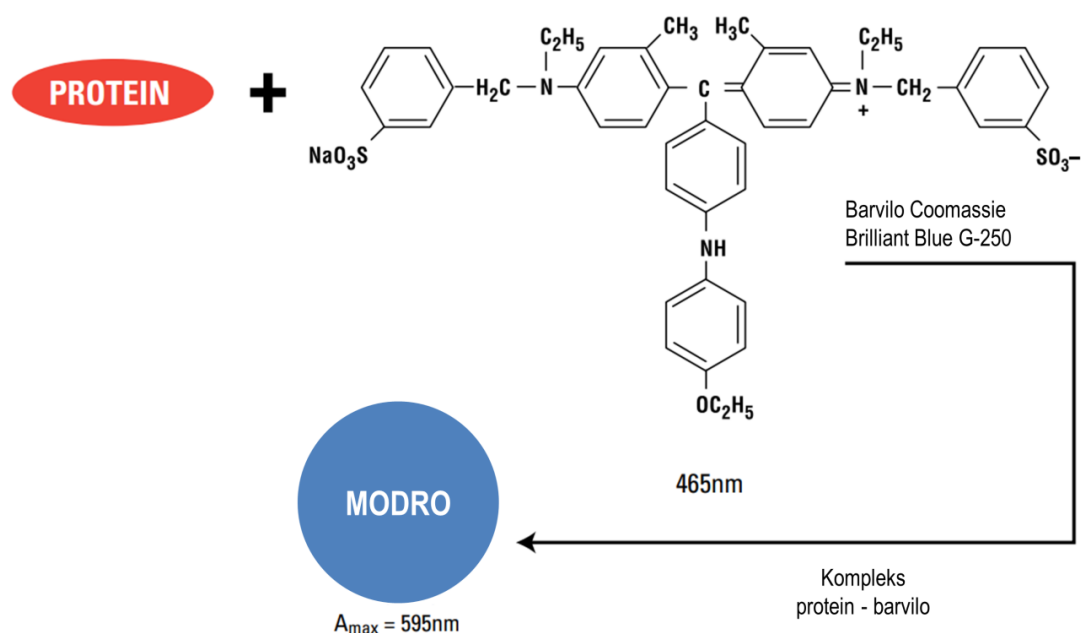
- U - aktivnost  $\beta$ -GAL (U/mL)
- $V_k$  - končni volumen reakcijske zmesi (5 mL)
- df - redčitveni faktor (1)
- $t$  - čas trajanja reakcije (10 min)
- $\epsilon_{o\text{-Nitro}}$  - milimolarni ekstinkcijski koeficient *o*-Nitrofenola pri 405 nm (4,6)
- $V_e$  - volumen dodanega encima (0,2 mL)

Preostalo aktivnost imobiliziranega encima  $\beta$ -GAL smo določili kot delež (%) iz razmerja med aktivnostjo prostega encima in aktivnostjo imobiliziranega encima po enačbi (7), in sicer:

$$\text{Preostala aktivnost (\%)} = \frac{\text{aktivnost}_{\text{proste } \beta\text{-GAL}}}{\text{aktivnost}_{\text{imobilizirane } \beta\text{-GAL}}} * 100 \quad (7)$$

### 3.3.4.3 Določevanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi za izračun učinkovitosti imobilizacije

Učinkovitost imobilizacije smo določili na osnovi znane koncentracije encima, ki smo ga dodali v postopek imobilizacije ter koncentracije proteinov v supernatantih po spiranju imobiliziranega encima po posameznem imobilizacijskem postopku. Za določevanje koncentracije proteinov smo uporabili Bradfordovo metodo [242], ki temelji na vezavi barvila na protein v kisli raztopini, kar povzroči premik absorpcijskega maksimuma barvila iz 465 nm na 595 nm. Kadar se barvilo veže na proteine, se pretvori v stabilno modro neprotonirano obliko z absorpcijskim maksimumom pri 595 nm (Slika 3-16) [243].



Slika 3-16: Shematski prikaz reakcije določevanja koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi [243]

- Bradfordov reagent

Bradfordov reagent smo pripravili tako, da smo 100 mg barvila Coomassie Brilliant Blue raztopili v 50 mL 95 % etanola ter raztopino nato prenesli v 1 L bučko. Dodali smo 100 mL 85 % fosforne kisline ter razredčili z milliQ vodo do oznake. Tako pripravljen Bradfordov reagent smo intenzivno mešali pri 22 °C ter ga na koncu prefiltrirali. Bradfordov reagent

smo zaradi njegove občutljivosti na svetlobo prenesli v steklenico ovito z alufolijo ter hranili v hladilniku pri 4 °C.

- Umeritvena krivulja

Za pripravo umeritvene krivulje smo kot standard uporabili protein BSA v območju koncentracij od 0,0 mg/mL do 1,0 mg/mL, in sicer s koncentracijami 0,2 mg/ml, 0,4 mg, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL in 1,0 mg/mL. Različne koncentracije proteina BSA smo pripravili v mikrocentrifugirkah ter ga redčili z milliQ vodo.

V šest mikrocentrifugirk smo odpipetirali 1 mL pripravljenega Bradfordovega reagenta, ter dodali 20 µL posamezne raztopine proteina BSA z odgovarjajočo koncentracijo. Prav tako smo pripravili slepi vzorec, kamor smo dodali 20 µL milliQ vode. Zmesi v mikrocentrifugirkah smo vorteksirali ter inkubirali 15 min pri 22 °C. Po inkubaciji smo vzorcem izmerili absorbanco na UV-VIS spektrofotometru pri valovni dolžini 595 nm. Za vsak vzorec smo opravili tri meritve ter kot vrednost za nadaljnje določevanje koncentracije proteinov uporabili povprečno vrednost vseh treh meritev. Umeritvene krivulje za določevanje koncentracije proteinov po Bradfordu so prikazane v prilogah 6.1, 6.2, in 6.3.

- Izračun koncentracije proteinov po Bradfordu

Koncentracijo proteinov (mg/mL) po Bradfordu določimo iz umeritvene krivulje po enačbi (8):

$$c = \frac{A_{\text{povprečna}}}{k} \quad (8)$$

kjer je:

$c$	- koncentracija proteinov (mg/mL)
$A$	- absorbanca vzorca pri 595 nm
$k$	- naklon premice iz enačbe umeritvene krivulje

- Izračun učinkovitosti imobilizacije

Učinkovitost imobilizacije encima smo izračunali po enačbi (9) in tako določili delež encima, ki se je vezal na površinsko modificirane magnetne nanodelce.

$$\rho = \frac{(c_p - c_s) \cdot 100}{c_p} \quad (9)$$

kjer je:

$\rho$	- relativna učinkovitost imobilizacije (%),
$c_p$	- koncentracija prostega encima (mg/mL),
$c_s$	- koncentracija encima v spiranjih (mg/mL).

### 3.4 Rezultati in diskusija

V drugem sklopu doktorskega dela smo modificirane CMD3-MNPs funkcionalizirali z aktivnimi epoksi skupinami z uporabo epoksi zamreževalca ECIH. Nato smo s spreminjanjem procesnih parametrov optimirali najprej postopek imobilizacije encima ADH, nato pa še postopek koimobilizacije encima ADH in kofaktorja  $\beta$ -NAD na modificiran CMD3-MNPs. CMD3-MNPs je bil izbran kot najprimernejši nanonosilec glede na opravljene analize metode iz prvega sklopa doktorskega dela.

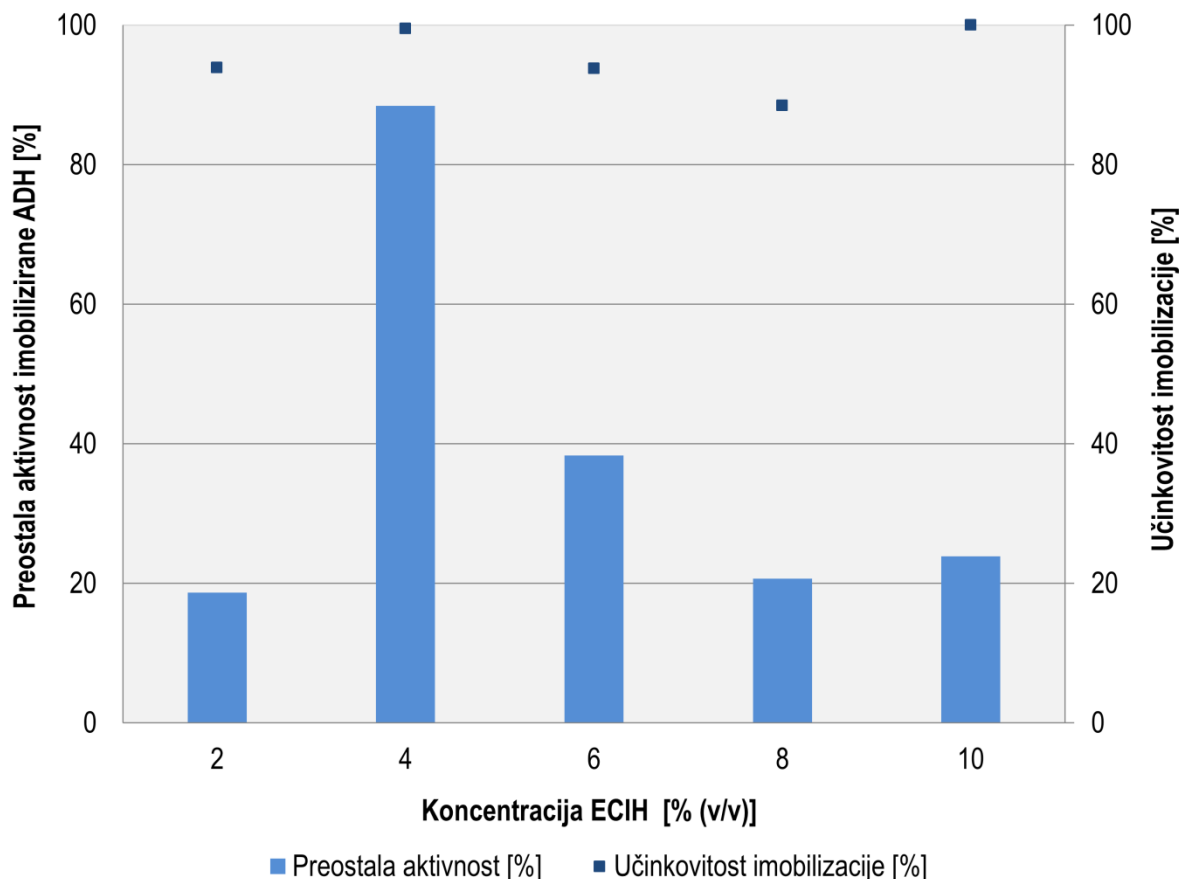
Nadaljevali smo z optimiranjem koncentracij mrežnega povezovalca GA in amino-donorja PEHA v postopku imobilizacije  $\beta$ -GAL na pripravljene HIT-MNPs in AMS-MNPs. Imobiliziranima encimoma ADH in  $\beta$ -GAL smo določili preostalo aktivnost z aktivnostnim encimskim testom za posamezen encim ter učinkovitost imobilizacije.

#### 3.4.1 Površinska funkcionalizacija modificiranega nosilca CMD3-MNPs za vezavo encima ADH

##### 3.4.1.1 Vpliv koncentracije epoksi-zamreževalca ECIH

V procesu imobilizacije encima ADH na sintetizirane CMD3-MNPs smo se najprej lotili površinske funkcionalizacije modificiranih CMD3-MNPs, ki smo jo dosegli z optimiranjem dodane količine epoksi-zamreževalca ECIH. Epoksi aktivne skupine, ki jih zagotovimo z ECIH reagirajo s hidroksilnimi skupinami na površini CMD3-MNPs in z njimi tvorijo močne vezi. Pri tem se ADH hidrofobno adsorbira na površino CMD3-MNPs, nato pa se hidroksilne skupine ADH kovalentno vežejo na epoksi skupine nosilca. Uporabili smo 0,5 M ECIH v različnih volumskih razmerjih (od 2 % (v/v) do 10 % (v/v)). Ko smo za imobilizacijo uporabili 2 % (v/v) ECIH je bila preostala aktivnost zelo nizka (18,6 %). Iz rezultata lahko sklepamo, da s prenizko koncentracijo zamreževalca ne dosegamo dovolj močnega mehanizma med encimom in nosilcem, kar lahko privede do uhajanja encima iz nanonosilca, to pa se odraža v nizki preostali aktivnosti encima. S povečevanjem koncentracije epoksi zamreževalca ECIH na 4 % (v/v) smo dosegli višjo preostalo aktivnost encima, in sicer 88,4 %, kar se je izkazalo za optimalno koncentracijo epoksi zamreževalca ECIH. S povečevanjem koncentracije zamreževalca se število prostih aktivnih skupin na površini CMD3-MNPs povečuje, s tem pa se povečuje tudi količina vezane ADH, ki se na ta mesta lahko kovalentno veže, kar se kaže v višji preostali aktivnosti imobilizirane ADH. Prav tako smo dosegli tudi visoko učinkovitost imobilizacije, ki je znašala 99,5 %. Z nadaljnjim poviševanjem koncentracije dodanega epoksi zamreževalca ECIH, se je preostala aktivnost imobiliziranega ADH začela zmanjševati. Pri dodatku 6 % (v/v) je preostala aktivnost encima znašala 38,3 %, pri dodatku 8 % (v/v) in 10 % (v/v) pa se je še dodatno znižala na 20,7 % in 23,9 %. Učinkovitost imobilizacije pri dodatku 2 % (v/v), 6 % (v/v), 8 % (v/v) in 10 % (v/v) ECIH je znašala 93,9 %, 93,8 %, 88,5 % in 100 %. Rezultate prikazuje Slika 3-17, iz katere je razvidno, da z dodatkom 4 % (v/v) ECIH, kot mrežnega povezovalca, dosežemo najvišjo preostalo aktivnost imobilizirane ADH, medtem ko lahko z dodatkom previsokih koncentracij mrežnega povezovalca blokiramo aktivne skupine, na katere bi se

encim lahko vezal, kar se posledično odraža v izgubi aktivnosti imobiliziranega encima [227]. Prav tako lahko previsoke koncentracije mrežnega povezovalca znatno modificirajo strukturo encima, kar prav tako znižuje aktivnost le-tega. Po drugi strani pa prenizke koncentracije mrežnega povezovalca ne zagotavljajo ustreznega učinkovitega zamreženja encima, saj ne zagotavljajo dovolj prostih funkcionalnih skupin, na katere bi se encim lahko vezal, kar vodi v izgubo encimskih molekul v reakcijski medij, saj se le-ta neučinkovito veže z nosilcem [244].



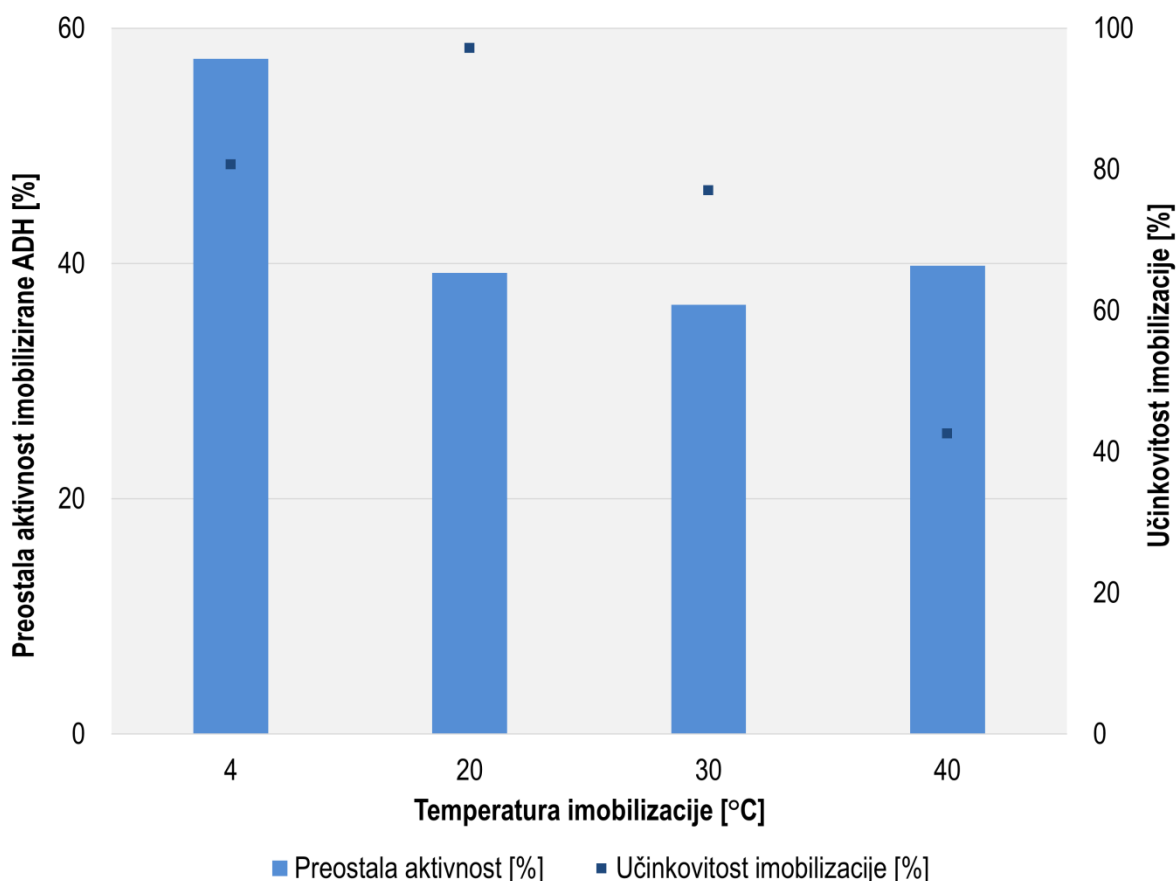
Slika 3-17: Vpliv koncentracije epoksi zamreževalca ECIH na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs (pri pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 1 ura funkcionalizacije, 2 uri imobilizacije, pH 7,5, 22 °C, 300 rpm, 0,02 mg/mL ADH)

Tako smo na podlagi rezultatov, dobljenih pri optimiranju koncentracije epoksi zamreževalca, v nadaljnjih študijah vpliva procesnih parametrov na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizacije uporabljali koncentracijo ECIH, ki je znašala 4 % (v/v). Tako funkcionalizirane CMD3-MNPs, na katere smo kovalentno vezali ADH, smo v nadaljevanju uporabili za proučevanje vpliva ostalih procesnih parametrov na aktivnost imobilizirane ADH.

### 3.4.2 Vpliv procesnih parametrov na imobilizacijo ADH na CMD3-MNPs

#### 3.4.2.1 Vpliv temperature

Pomembno vlogo pri imobilizacijskem postopku ima temperatura, pri kateri se izvaja imobilizacija, saj vpliva na preostalo aktivnost imobiliziranega encima kot tudi na učinkovitost imobilizacije, prav tako pa na operativno naravo samega imobiliziranega encima. Slika 3-18 prikazuje rezultate vpliva temperature na učinkovitost imobilizacije ter preostalo aktivnost imobiliziranega encima, iz katere je razvidno, da smo najvišjo preostalo aktivnost imobiliziranega encima dosegli pri 4 °C (57,4 %). Učinkovitost imobilizacije je znašala 80,7 %. Pri izvajanju postopka imobilizacije pri nižjih temperaturah je encim stabilnejši, kar se odraža v višji preostali aktivnosti encima in višji učinkovitosti imobilizacije encima, kar smo uporabili v nadaljnjih študijah. Nižja temperatura pa nudi tudi večje možnosti uporabe v najrazličnejših biokatalitičnih aplikacijah. Imobilizacijo smo izvedli tudi pri temperaturah, 20 °C, 30 °C in 40 °C kjer pa so bile dosežene sledeče preostale aktivnosti imobiliziranega encima: 39,2 %, 36,5 % in 39,8 % ter učinkovitosti imobilizacije 97,2 %, 77,0 % in 42,5 %.



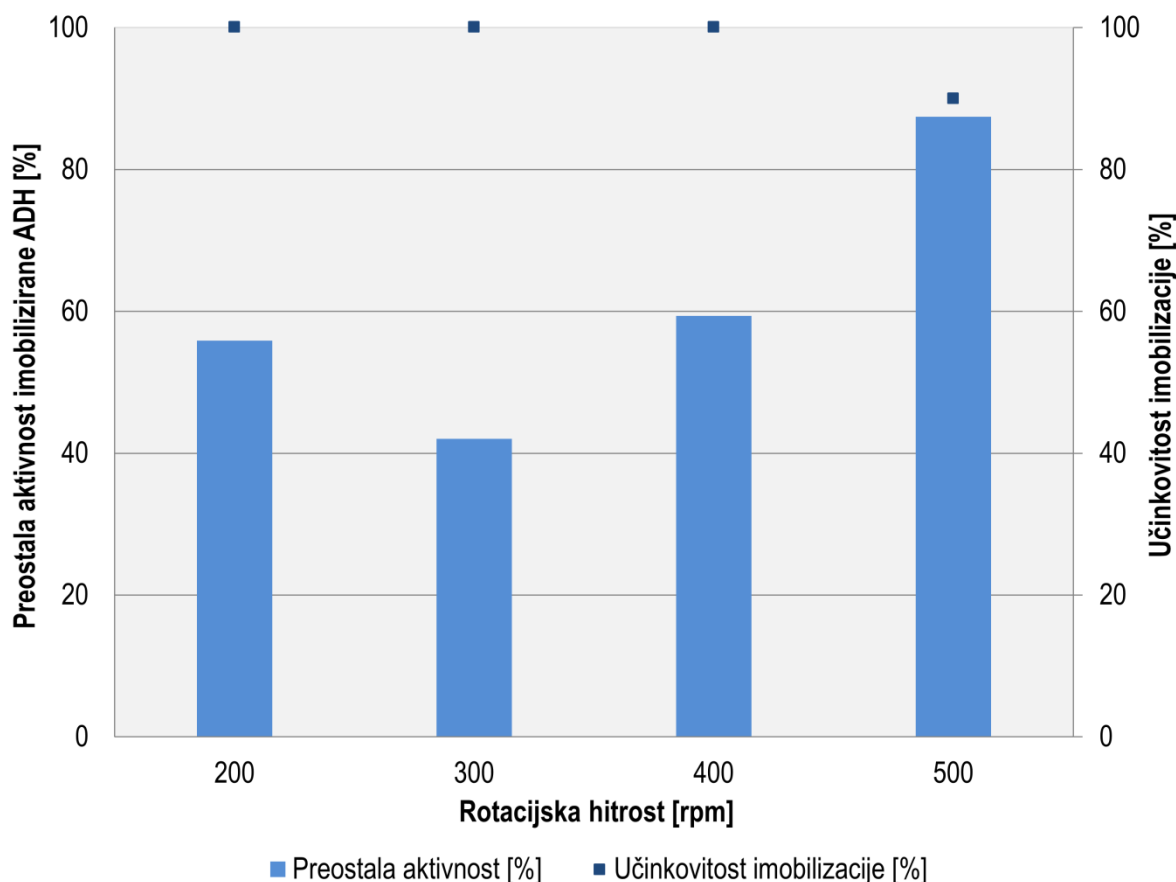
Slika 3-18: Vpliv temperature imobilizacije na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs (pri pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 2 uri imobilizacije, pH 7,5, 300 rpm, 0,02 mg/mL ADH)

V nadaljevanju smo na podlagi dobljenih rezultatov postopek imobilizacije ADH izvajali pri temperaturi 4 °C.



### 3.4.2.2 Vpliv rotacijske hitrosti

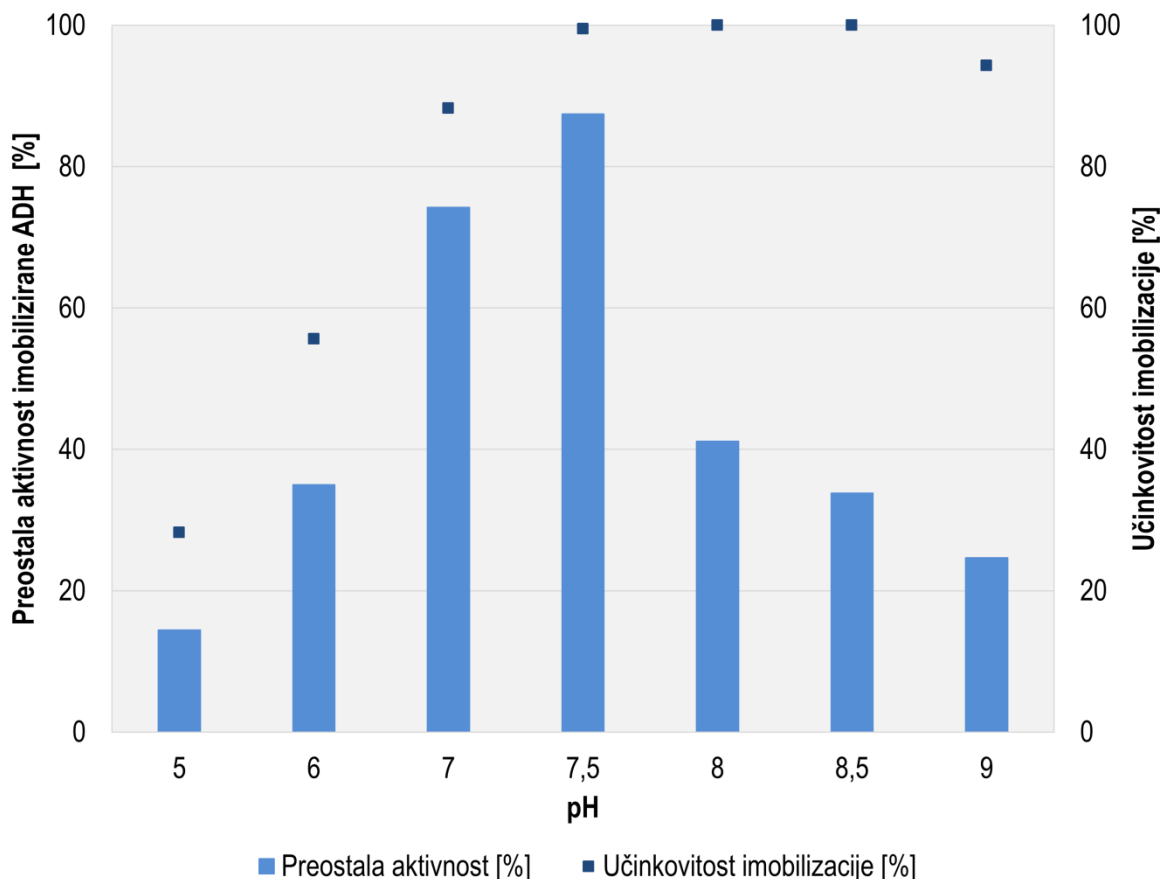
Pomemben faktor, ki vpliva na preostalo aktivnost encima in učinkovitost imobilizacije je rotacijska hitrost v samem postopku imobilizacije. Pri nižji rotacijski hitrosti imajo delci z encimom manj stika, zato imobilizacija ni učinkovita, saj se encim neučinkovito veže. Medtem ko lahko pri višjih rotacijskih hitrostih dosežemo bolj učinkovito vezavo encima z delci, obstaja možnost izgube aktivnosti encima ali celo njegova denaturacija zaradi delujočih strižnih sil [245]. Slika 3-19 prikazuje rezultate preostale aktivnosti encima in učinkovitosti imobilizacije pri štirih proučevanih rotacijskih hitrostih 200 rpm, 300 rpm, 400 rpm in 500 rpm. Iz rezultatov lahko opazimo, da je z naraščanjem rotacijske hitrosti naraščala tudi preostala aktivnost imobiliziranega encima. Najvišjo preostalo aktivnost imobiliziranega encima (87,5 %) smo dosegli pri najvišji rotacijski hitrosti, tj. 500 rpm, saj smo z dovolj visoko rotacijsko hitrostjo uvedli boljši stik med delci in encimom, kar se kaže v višji preostali aktivnosti imobilizirane ADH. Pri nižjih rotacijskih hitrostih so bile preostale aktivnosti imobiliziranega encima nižje in so znašale 55,9 % pri 200 rpm, 42,4 % pri 300 rpm in 59,4 % pri 400 rpm. Učinkovitost imobilizacije je za vse tri nižje rotacijske hitrosti znašala 100 %, medtem ko se je pri rotacijski hitrosti 500 rpm le-ta znašala 89,9 %. Manjši padec v učinkovitosti imobilizacije lahko pripišemo močnejšim strižnim silam, ki se pojavijo v postopku imobilizacije pri višjih rotacijskih hitrostih [246,247]. Pri nadaljnjem delu smo glede na dobljene rezultate imobilizacijo izvajali pri 500 rpm.



Slika 3-19: Vpliv rotacijske hitrosti na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs (pri pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 2 uri imobilizacije, pH 7,5, 4 °C, 0,02 mg/mL ADH)

### 3.4.2.3 Vpliv pH vrednosti medija

Obnašanje encima kot tudi lastnosti imobiliziranega encima so v veliki meri odvisne od mikro-okolja, v katerem imobilizacijski postopek poteka. To mikro-okolje imobiliziranega encima predstavlja pH imobilizacijskega medija. S spreminjanjem pH imobilizacijskega medija se spreminjajo tudi elektrostatske lastnosti nanonosilca, kar določa, koliko encima se na površino nanonosilca lahko veže [248,249]. Prav tako ima vsak encim svoj optimalni pH. ADH iz *S. cerevisiae* ima, glede na različne imobilizacijske pogoje, svoj optimalni pH v območju med 5 do 9 [250]. ADH smo imobilizirali pri različnih pH, in sicer v omenjenem območju (pH 5-9). Slika 3-20 prikazuje vpliv pH na preostale aktivnosti ADH imobilizirane na CMD3-MNPs in učinkovitosti imobilizacije. Opazimo, da smo najvišjo preostalo aktivnost imobiliziranega encima dosegli pri pH vrednosti 7,5, in sicer 87,4 %. Z nižanjem pH vrednosti od 7 do 5 se tudi preostale aktivnosti imobiliziranega encima znižujejo. Prav tako se preostale aktivnosti imobiliziranega encima znižujejo z zviševanjem pH vrednosti medija od 8 do 9. Preostale aktivnosti imobiliziranega encima se tako znižujejo, ko se pH vrednosti približujejo bolj kislim in bolj alkalnim (bazičnim) stanjem imobilizacijskega medija. Do denaturacije proteinov lahko pride, kadar se le-ta nahaja v kisljih ali preveč alkalnih mikro-okoljih [251], zato je pomembno, da za encim in njegovo uspešno imobilizacijo uporabimo primeren pH imobilizacijskega medija. Rezultate prikazuje Slika 3-20, iz katere je razvidno, da smo najnižjo preostalo aktivnost imobiliziranega encima (14,4 %) dosegli v najbolj kislem območju pH medija, tj. pH vrednost 5, učinkovitost imobilizacije pa je znašala 28,2 %. Z nadaljnjim naraščanjem pH medija od 5 do 7,5 sta preostala aktivnost imobiliziranega encima in učinkovitost imobilizacije naraščali. Z nadaljnjim naraščanjem pH medija pa je prišlo do intenzivnega upada v preostali aktivnosti encima, medtem ko ni bilo zaznati večjega upada v učinkovitosti imobilizacije. Nizko preostalo aktivnost imobiliziranega encima smo dosegli tudi, kadar smo imobilizacijo izvajali v alkalnem območju, tj. pH vrednost 9, in je znašala 24,7 %, učinkovitost imobilizacije pa 94,3 %. Mikro-okolje, ki ga določa pH, lahko vpliva tudi na samo strukturo imobiliziranega encima, kar lahko vodi v deaktivacijo encima. Prav tako pa sprememba pH vrednosti medija spreminja elektrostatske lastnosti nosilca, kar se lahko kaže v izgubi aktivnosti imobiliziranega encima v bolj kisljih oz. bolj bazičnih stanjih imobilizacijskega medija. Pri nadaljnjih študijah smo imobilizacijo izvajali pri pH 7,5.

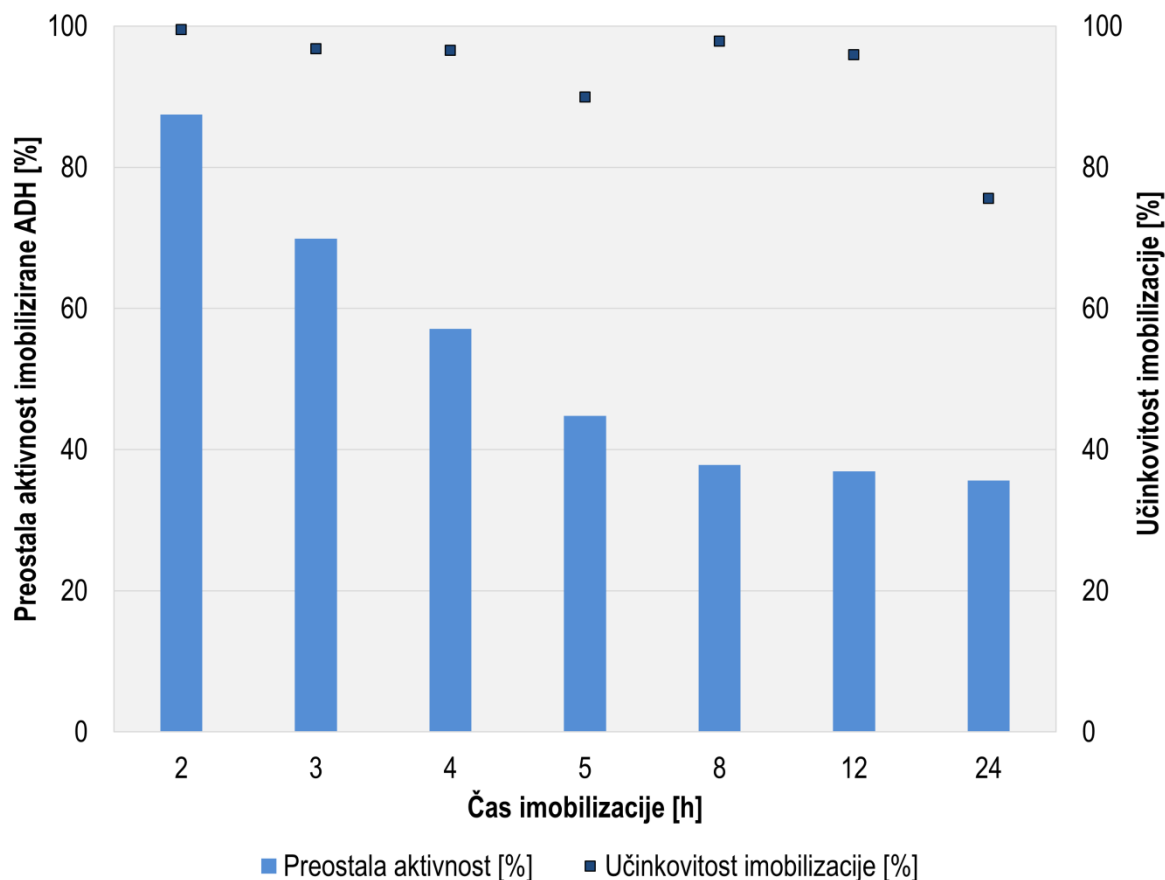


Slika 3-20: Vpliv pH na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs (pri pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 2 uri imobilizacije, 4 °C, 500 rpm, 0,02 mg/mL ADH)

#### 3.4.2.4 Vpliv časa imobilizacije

Pomemben pogoj za uspešno imobilizacijo encima predstavlja tudi primerna časovna dolžina samega imobilizacijskega postopka oz. čas imobilizacije. Vpliv časa imobilizacije na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizacije encima smo proučevali po 2, 3, 4, 5, 8, 12 in 24 urah imobilizacije. Najvišjo preostalo aktivnost smo dosegli po 2 urah imobilizacije, in sicer 87,3 %, učinkovitost imobilizacije pa je znašala 99,5 % (Slika 3-21). S povečevanjem časa imobilizacije opazimo, da se preostala aktivnost imobiliziranega encima postopoma znižuje prvih 5 ur. Tako po 3 urah imobilizacije dosežemo preostalo aktivnost imobiliziranega encima 69,9 %, po 4 urah se ponovno nekoliko zniža in znaša 57,1 %, medtem ko učinkovitost imobilizacije po 3 in 4 urah znaša 96,8 % in 96,6 %. Po 5 urah se preostala aktivnost imobiliziranega encima še dodatno zniža in znaša 44,8 %, prav tako pa se zniža tudi učinkovitost imobilizacije (89,9 %). Pri nadaljnjem podaljševanju časa imobilizacije se preostala aktivnost imobiliziranega encima ni bistveno spremenila, po 8 urah imobilizacije znaša 37,8 %, po 12 urah 36,9 % in po 24 urah 35,6 %. Po 24 urah se je učinkovitost imobilizacije znižala na 75,6 %. Iz rezultatov ugotovimo, da smo najvišjo preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizacije dosegli, ko smo imobilizacijski postopek izvajali 2 uri. Prav tako lahko iz rezultatov sklepamo, da ima čas imobilizacije pomembno vlogo in vpliv na uspešnost imobilizacije, saj ima vsak encim svojo specifično vezavo na

nosilec preko prostih funkcionalnih skupin, ki vezavo tudi omogočajo. Ko je nosilec nasičen z encimom in je omejeno število aktivnih mest zasedeno, se vezava encima na nosilec ustavi [252].

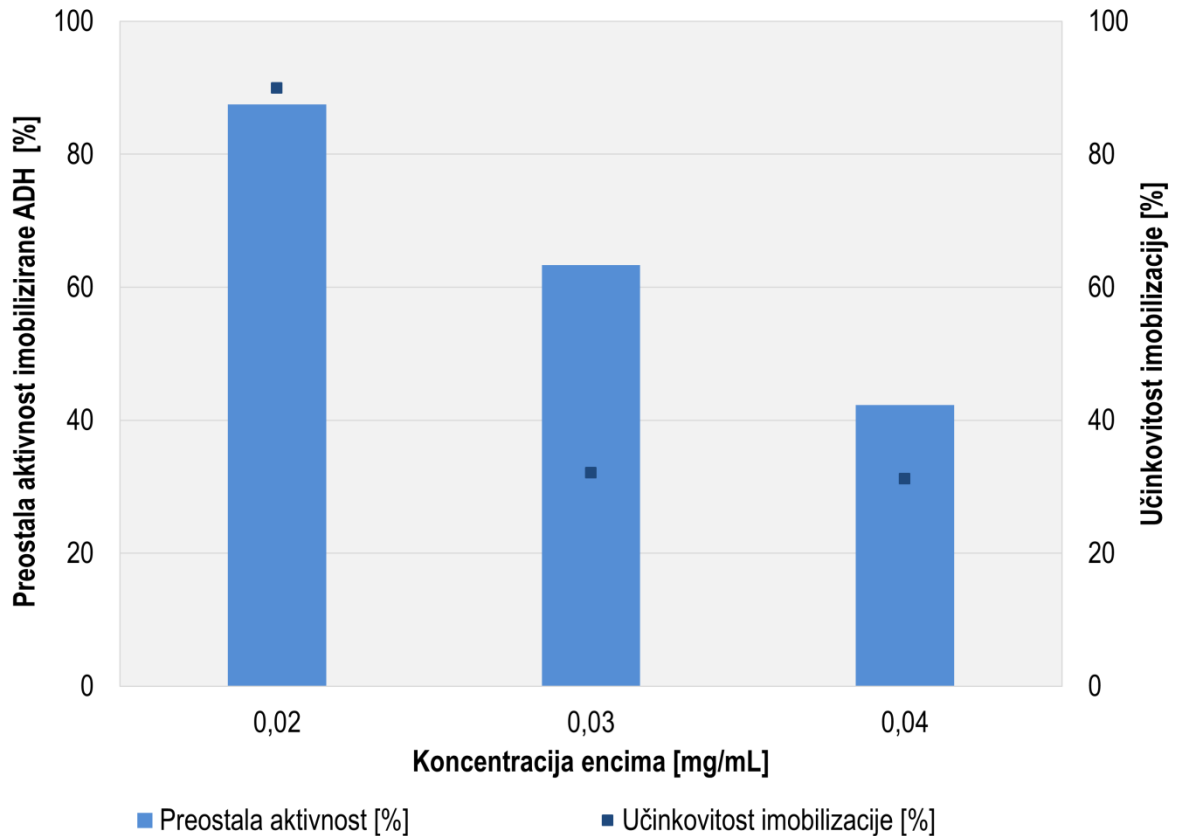


Slika 3-21: Vpliv časa imobilizacije na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs (pri pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 4 °C, pH 7,5, 500 rpm, 0,02 mg/mL ADH)

### 3.4.2.5 Vpliv koncentracije encima

Proučevali smo tudi vpliv koncentracije ADH na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs. Koncentracijo encima smo optimirali v območju od 0,02 mg/mL do 0,04 mg/mL. Z naraščanjem koncentracije dodanega encima se je preostala aktivnost imobiliziranega encima zniževala (Slika 3-22). Ko smo koncentracijo ADH zvišali iz 0,02 mg/mL na 0,03 mg/mL, se je preostala aktivnost encima znižala iz 89,6 % na 63,3 %, učinkovitost imobilizacije pa se je znižala iz 89,9 % na 32,1 %. Ko smo koncentracijo encima ADH povišali na 0,04 mg/mL, se je preostala aktivnost imobiliziranega encima znižala na 42,3 %, učinkovitost imobilizacije pa na 31,2 %. Z optimalno koncentracijo encima smo dosegli, da se je encim učinkovito vezal na nosilec CMD3-MNPs. Do upada v preostali aktivnosti imobiliziranega encima z naraščanjem koncentracije encima v postopku imobilizacije lahko pride zaradi prenasíčenja površine nanonosilca z encimom, pri čemer je posledično otežen dostop substrata do aktivnega mesta encima. Prav tako lahko prenasíčenje encima na površini nosilca znižuje aktivnost imobiliziranega encima, zaradi prostorske oviranosti na površini nosilca ali pa denaturacije encima. Omenjene omejitve, ki nastanejo

zaradi prevelike koncentracije encima v imobilizacijskem postopku, katerih posledica je zniževanje aktivnosti imobiliziranega encima, so opisane tudi v drugih raziskovalnih člankih [253–256].



Slika 3-22: Vpliv koncentracije encima na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs (pri pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 2 uri imobilizacije, 4 °C, pH 7,5, 500 rpm)

### 3.4.3 Vpliv procesnih parametrov na koimobilizacijo ADH in $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs

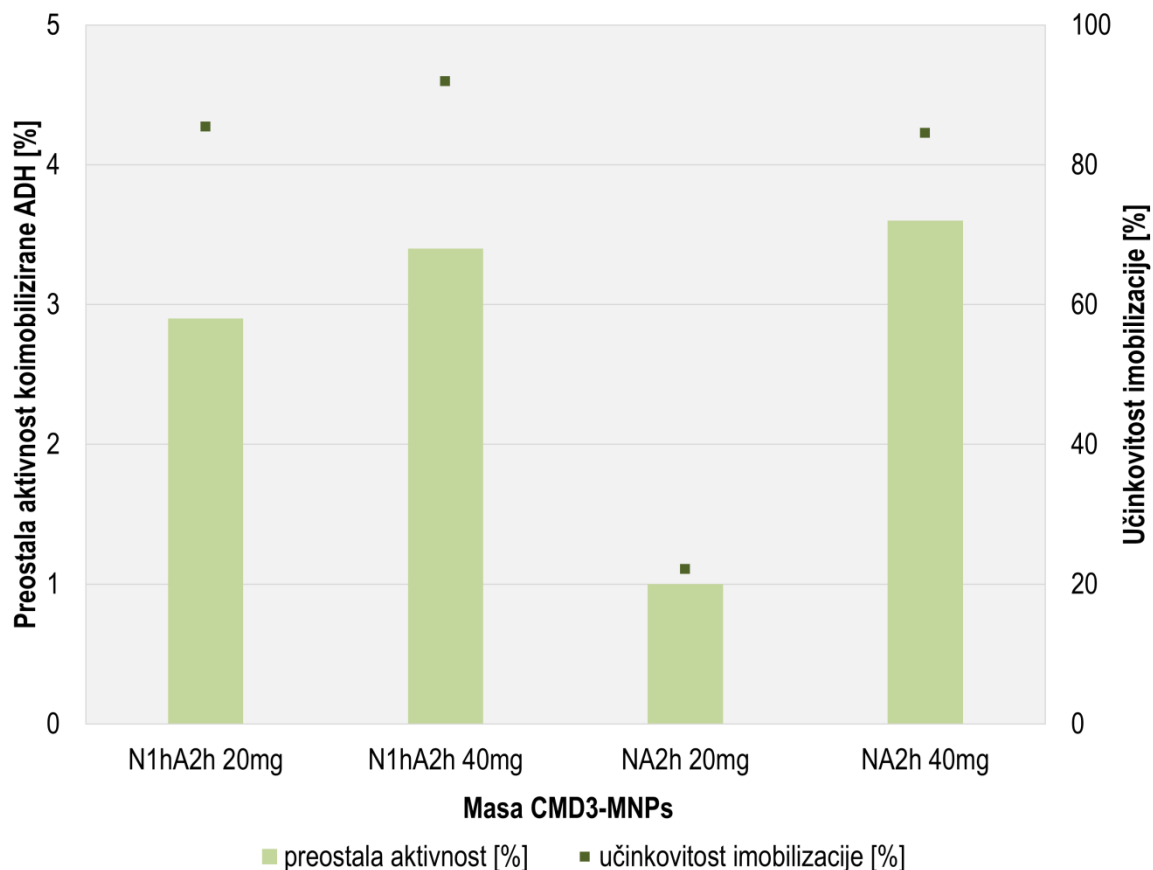
Raziskovalno delo smo nadaljevali s postopkom imobilizacije encima ADH, pri čemer smo encim koimobilizirali s kofaktorjem  $\beta$ -NAD na nosilec CMD3-MNPs. V postopku koimobilizacije smo najprej optimirali količino nosilca CMD3-MNPs za koimobilizacijo ADH s kofaktorjem  $\beta$ -NAD ter določili vpliv na preostalo aktivnost koimobilizirane ADH. Nadaljevali smo s proučevanjem vpliva zaporedja koimobilizacije, vpliva koncentracije kofaktorja  $\beta$ -NAD, vpliva časa in temperature koimobilizacije ter vpliva časa funkcionalizacije površine CMD3-MNPs z epoksi zamreževalcem ECIH na preostalo aktivnost koimobilizirane ADH. Nazadnje smo proučili še vpliv koncentracije ADH ter vpliv mase nosilca CMD3-MNPs pri optimalni koncentraciji encima ADH na preostalo aktivnost koimobilizirane ADH.

#### 3.4.3.1 Vpliv mase CMD3-MNPs

Pri koimobilizaciji encima ADH in kofaktorja  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs smo v prvem koraku proučili vpliv mase CMD3-MNPs na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizacije encima. V dveh različnih postopkih smo koimobilizacijo izvedli z 20 mg in 40 mg CMD3-MNPs. Aktivacijo CMD3-MNPs, ki je trajala 2 uri pri 22 °C in rotacijski hitrosti 350 rpm, smo izvedli s 4 % (v/v) ECIH.

Prvi postopek koimobilizacije (N1hA2h<sub>20mg</sub> in N1hA2h<sub>40mg</sub>) smo izvedli tako, da smo najprej 1 uro imobilizirali kofaktor  $\beta$ -NAD (15 mM), nato smo 2 uri imobilizirali ADH (0,02 mg/mL) na 20 mg oz. 40 mg CMD3-MNPs. Imobilizacija kofaktorja in encima je potekala pri 22 °C in rotacijski hitrosti 350 rpm.

Drugi postopek koimobilizacije (NA2h<sub>20mg</sub> in NA2h<sub>40mg</sub>) smo izvedli tako, da smo hkrati 2 uri koimobilizirali  $\beta$ -NAD (15 mM) in ADH (0,2 mg/mL) na 20 mg oz. 40 mg CMD3-MNPs. Hkratna koimobilizacija je prav tako potekala pri 22 °C in rotacijski hitrosti 350 rpm. Rezultati so prikazani na Slika 3-23.



Slika 3-23: Vpliv mase CMD3-MNPs na preostalo aktivnost in učinkovitost koimobilizirane ADH z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri pogojih: 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 15 mM  $\beta$ -NAD, 0,02 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm)

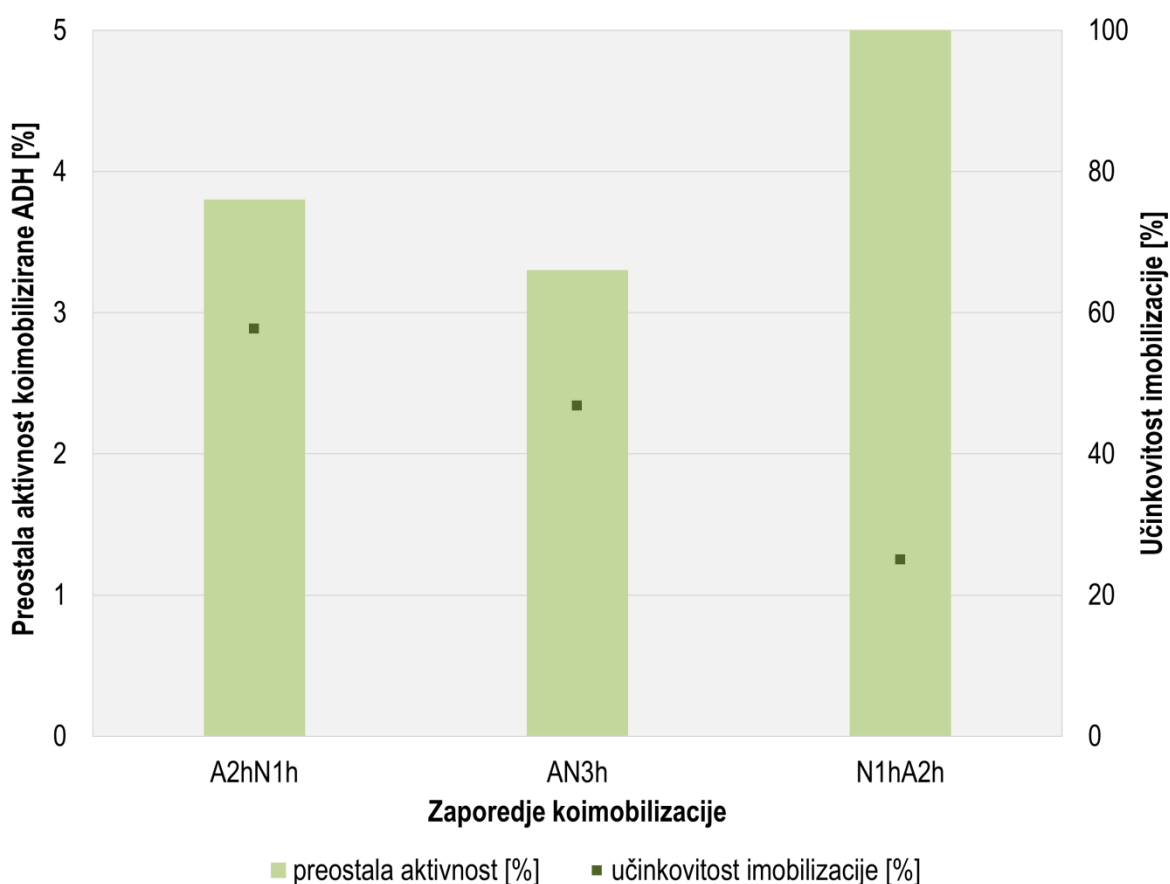
Najvišjo preostalo aktivnost ADH koimobilizirane z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs smo dosegli s postopkom, pri katerem smo uporabili 40 mg CMD3-MNPs in hkrati izvedli koimobilizacijo ADH in  $\beta$ -NAD, ki je trajala 2 uri (NA2h<sub>40mg</sub>), in sicer je le-ta znašala samo 3,6 %. Najvišjo učinkovitost imobilizacije smo prav tako dosegli, ko smo za imobilizacijo uporabili večjo maso CMD3-MNPs, tj. 40 mg. Učinkovitost imobilizacije za postopek N1hA2h<sub>40mg</sub> je znašala 91,9 % in za NA2h<sub>40mg</sub> 84,5 %. Iz rezultatov lahko sklepamo, da z večjo maso nosilca dobimo na voljo večjo površino le-tega za vezavo encima in kofaktorja. Kljub temu je preostala aktivnost koimobilizirane ADH bila zelo nizka, saj je znašala samo 3,6 %. Na podlagi dobljenih rezultatov smo v nadaljevanju kot optimalno maso delcev za koimobilizacijo ADH in  $\beta$ -NAD uporabljali večjo maso nosilca, tj. 40 mg. Nadaljevali smo z optimiranjem preostalih procesnih parametrov, da bi dosegli zvišanje preostale aktivnosti koimobilizirane ADH.

### 3.4.3.2 Zaporedje koimobilizacije

Nadaljevali smo s proučevanjem vpliva zaporedja koimobilizacije encima ADH in kofaktorja  $\beta$ -NAD na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizacije koimobilizirane ADH. Tako smo študijo izvedli s tremi različnimi postopki koimobilizacije ADH in  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs:

- imobilizacija ADH - 2 uri, sledila je imobilizacija  $\beta$ -NAD - 1 uro (A2hN1h)
- hkratna koimobilizacija ADH in  $\beta$ -NAD - 3 ure (AN3h)
- imobilizacija  $\beta$ -NAD - 1 ura, sledila je imobilizacija ADH - 2 uri (N1hA2h)

Pri tem so bili ostali pogoji koimobilizacije nespremenjeni (masa CMD3-MNPs je znašala 40 mg, 1 ura aktivacije s 4 % (v/v) ECIH pri 22 °C in rotacijski hitrosti 350 rpm ter koncentracija encima 0,02 mg/mL). Iz rezultatov, ki jih prikazuje Slika 3-24 vidimo, da smo zvišanje preostale aktivnosti koimobilizirane ADH na CMD3-MNPs dosegli pri postopku N1hA2h, ko smo najprej 1 uro imobilizirali kofaktor  $\beta$ -NAD, nato je sledila 2 uri imobilizacija ADH. Preostala aktivnost koimobilizirane ADH smo zvišali iz 3,6 % na 5,0 %. Pri postopku A2hN1h se je preostala aktivnost imobilizirane ADH nekoliko znižala, in sicer je znašala samo 3,8 %. Še nižjo preostalo aktivnost imobilizirane ADH smo dosegli, ko smo koimobilizacijo izvajali po postopku AN3h (3,3 %). Učinkovitost imobilizacije je za N1hA2h znašala le 25,0 %, medtem ko je za postopek A2hN1h znašala 57,7 % in za postopek AN3h 46,8 %.



Slika 3-24: Vpliv zaporedja koimobilizacije na preostalo aktivnost in učinkovitost koimobilizirane ADH z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri pogojih: 40 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 15 mM  $\beta$ -NAD, 0,02 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm)

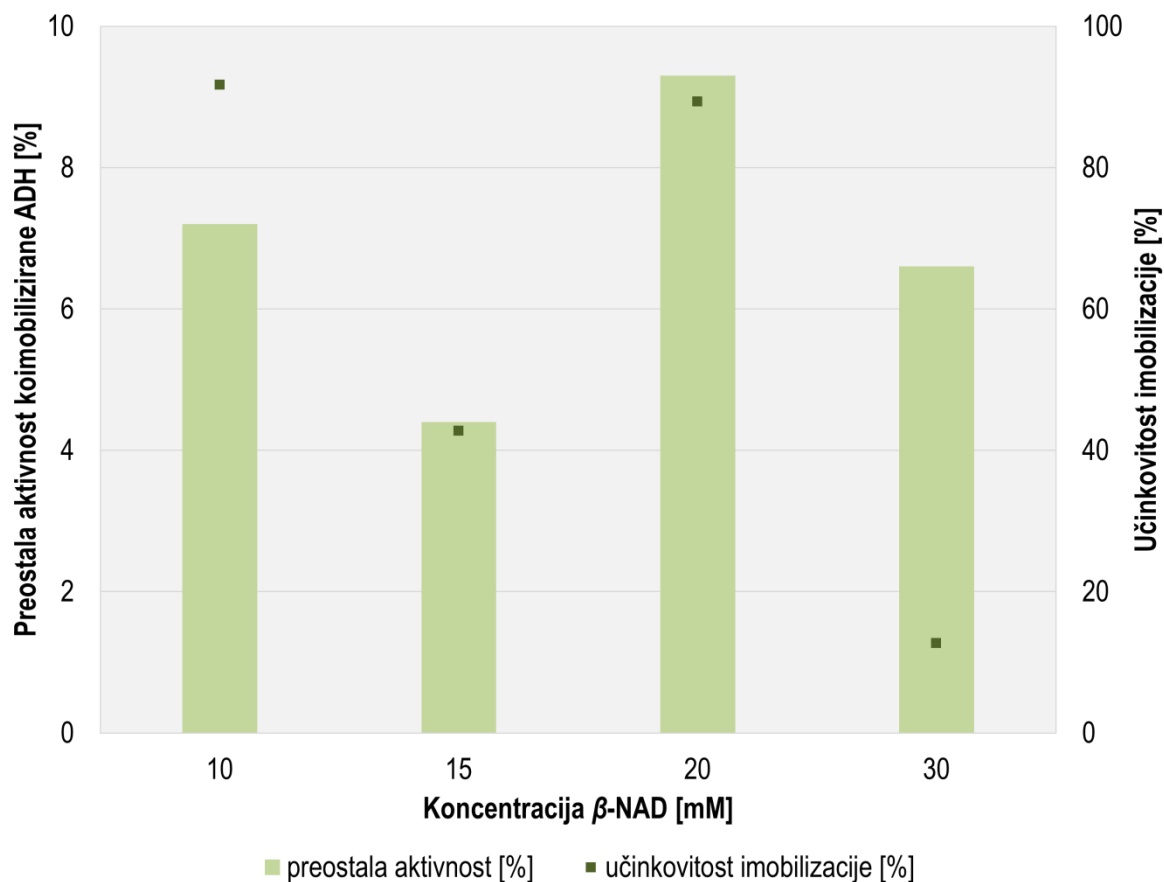
Iz rezultatov lahko sklepamo, da posamezna imobilizacija encima in kofaktorja boljše vpliva na doseganje zvišanja preostale aktivnosti koimobilizirane ADH, saj s posamezno imobilizacijo encima in kofaktorja zagotovimo večje možnosti učinkovite vezave tako



encima ADH kot kofaktorja  $\beta$ -NAD. Ker je kofaktor kemijska komponenta, ki pripomore k boljši vezavi encima in zagotavlja boljšo vezavo le-tega s substratom, lahko opazimo zvišanje preostale aktivnosti koimobilizirane ADH (5,0 %) na nosilec CMD3-MNPs pri postopku, ko smo najprej imobilizirali kofaktor  $\beta$ -NAD, nato pa encim ADH. Pri hkratni imobilizaciji encima in kofaktorja smo dosegli najnižjo preostalo aktivnost koimobilizirane ADH, znašala je le 3,3 % in s tem potrdili, da pri hkratni imobilizaciji encima in kofaktorja ne zagotovimo učinkovite vezave obeh hkrati na nosilec.

### 3.4.3.3 Vpliv koncentracije kofaktorja $\beta$ -NAD

V naslednjem koraku smo izvedli študijo vpliva koncentracije kofaktorja  $\beta$ -NAD (15 mM, 10 mM, 20 mM in 30 mM) na preostalo aktivnost koimobilizirane ADH in učinkovitost koimobilizacije. Ostali pogoji koimobilizacije ostajajo nespremenjeni. Rezultati so prikazani na Slika 3-25. Preostala aktivnost ADH pri koimobilizaciji s 15 mM  $\beta$ -NAD je znašala 4,4 %, učinkovitost imobilizacije pa 42,7 %. Ko smo koncentracijo  $\beta$ -NAD povišali na 20 mM se zviša tudi preostala aktivnost imobilizirane ADH in je znašala 9,3 %, učinkovitost imobilizacije pa 89,3 %. Z nadaljnim naraščanjem koncentracije  $\beta$ -NAD (30 mM), se preostala aktivnost encima in učinkovitost imobilizacije znižata, na 6,6 % in 12,7 %. Nižjo preostalo aktivnost encima (7,2 %) in učinkovitost imobilizacije (60,4 %) smo dosegli, ko smo dodali nižjo koncentracijo  $\beta$ -NAD (10 mM).



Slika 3-25: Vpliv koncentracije  $\beta$ -NAD na preostalo aktivnost in učinkovitost koimobilizirane ADH z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri pogojih: 40 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 0,02 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm)

Encimski kofaktorji imajo pomembno vlogo v biokatalizi, saj jih veliko encimov potrebuje za katalizo različnih reakcij v organski sintezi. Sprememba koncentracije kofaktorja vpliva na spremembe v reakcijski shemi, saj zviševanje ali zniževanje koncentracije kofaktorja vpliva na učinkovitost imobilizacije encima. Z zadostno koncentracijo kofaktorja  $\beta$ -NAD, ki je znašala 20 mM, smo dosegli zvišanje preostale aktivnosti koimobilizirane ADH na 9,3 %. Zato smo na podlagi dobljenih rezultatov za nadaljne študije uporabljali  $\beta$ -NAD s koncentracijo 20 mM.

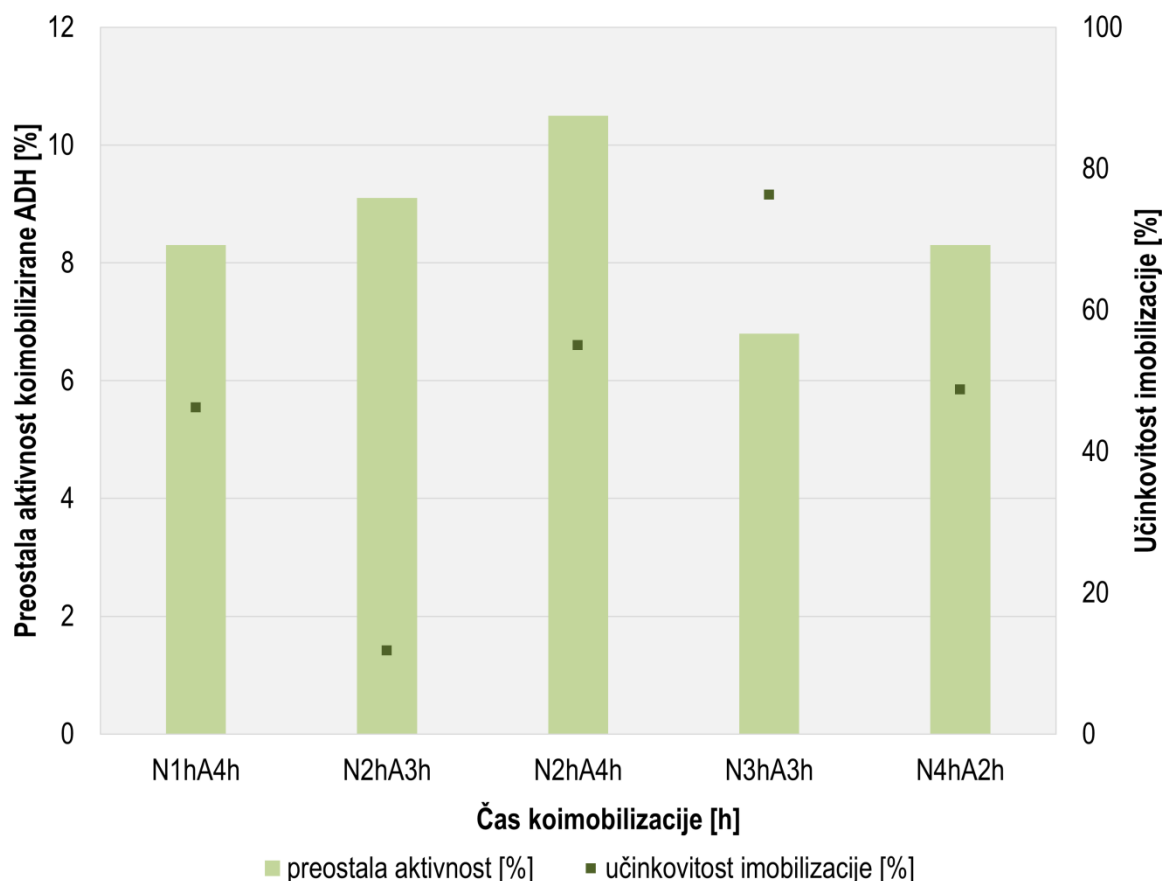
#### 3.4.3.4 Vpliv časa koimobilizacije

Na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizacije vpliva tudi trajanje imobilizacijskega postopka, zato smo v naslednjem koraku proučili vpliv časa koimobilizacije encima ADH in kofaktorja  $\beta$ -NAD na preostalo aktivnost imobilizirane ADH in učinkovitost imobilizacije. V ta namen smo izvedli pet različnih postopkov koimobilizacije:

- imobilizacija  $\beta$ -NAD - 1 ura, sledi imobilizacija ADH - 4 ure (N1hA4h)
- imobilizacija  $\beta$ -NAD - 2 uri, sledi imobilizacija ADH - 3 ure (N2hA3h)
- imobilizacija  $\beta$ -NAD - 2 uri, sledi imobilizacija ADH - 4 ure (N2hA4h)
- imobilizacija  $\beta$ -NAD - 3 ure, sledi imobilizacija ADH - 3 ure (N3hA3h)
- imobilizacija  $\beta$ -NAD - 4 ure, sledi imobilizacija ADH - 2 uri (N4hA2h)

Ostali imobilizacijski pogoji so ostali nespremenjeni (masa CMD3-MNPs 40 mg, 1 ura aktivacije s 4 % (v/v) ECIH pri 22 °C in rotacijski hitrosti 350 rpm,  $\beta$ -NAD s koncentracijo 20 mM in koncentracija encima 0,02 mg/mL). Rezultate prikazuje Slika 3-26. Najvišjo kot tudi zvišanje preostale aktivnosti koimobilizirane ADH (10,5 %) smo dosegli, ko smo postopek koimobilizacije izvedli najprej z 2-urno imobilizacijo kofaktorja  $\beta$ -NAD, nadaljevali pa s 4-urno imobilizacijo encima ADH (N2hA4h). Učinkovitost imobilizacije je znašala 55,0 %. Ponovno smo potrdili, da je koimobilizacija učinkovitejša, ko se na nosilec najprej imobilizira kofaktor, nato pa encim, saj kofaktor pripomemore k boljši vezavi encima, le-ta pa ima na voljo dovolj časa, da se lahko učinkovito veže na nosilec. Iz literature je znano, da se encim učinkoviteje veže na nosilec, ko ima na razpolago več časa za imobilizacijo, zato lahko iz rezultatov sklepamo, da smo imobilizacijski čas optimirali tako, da smo zagotovili najučinkovitejšo vezavo encima na nosilec [225].

Pri postopku N1hA4h smo dosegli učinkovitost imobilizacije 46,2 %, medtem ko je preostala aktivnost znašala 8,3 %. Pri postopku N2hA3h je preostala aktivnost znašala 9,1 %, učinkovitost imobilizacije pa 11,8 %. Pri postopku N3hA3h je preostala aktivnost znašala 6,8 %, učinkovitost imobilizacije pa 76,3 %. Pri postopku N4hA2h je preostala aktivnost znašala 8,3 %, učinkovitost imobilizacije pa 48,7 %. V nadaljnjih študijah smo uporabili sledeči postopek koimobilizacije encima in kofaktorja - N2hA4h.



Slika 3-26: Vpliv časa koimobilizacije na preostalo aktivnost in učinkovitost koimobilizirane ADH z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri pogojih 40 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 20 mM  $\beta$ -NAD, 0,02 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm)

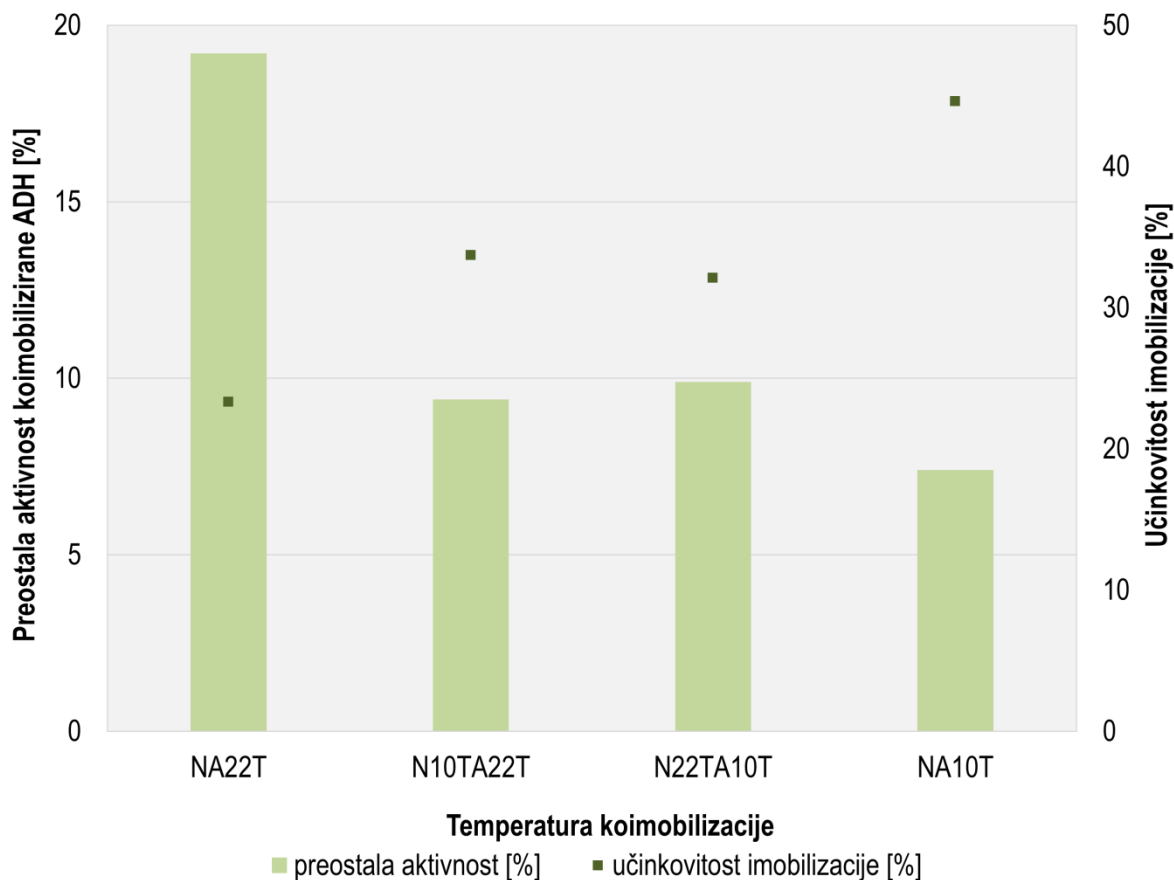
### 3.4.3.5 Vpliv temperature koimobilizacije

Ključen dejavnik, ki vpliva na operativno naravo imobiliziranega encima, je temperatura imobilizacije. V ta namen smo koimobilizacijo izvedli pri dveh temperaturah, pri 22 °C in 10 °C. Delce smo aktivirali 1 uro s 4 % (v/v) ECIH pri 22 °C in rotacijski hitrosti 350 rpm ter ostalimi nespremenjenimi imobilizacijskimi pogoji koimobilizacije, sam potek koimobilizacije pri različnih temperaturah pa smo izvedli na štiri različne načine:

- imobilizacija  $\beta$ -NAD in imobilizacija ADH pri 22 °C (NAsT)
- imobilizacija  $\beta$ -NAD pri 10 °C, imobilizacija ADH pri 22 °C (N10TAsT)
- imobilizacija  $\beta$ -NAD pri 22 °C, imobilizacija ADH pri 10 °C (NsTA10T)
- imobilizacija  $\beta$ -NAD in imobilizacija ADH pri 10 °C (NA10T)

Najvišjo in ponovno zvišanje preostale aktivnosti koimobilizirane ADH smo dosegli, ko smo celoten potek koimobilizacije izvajali pri 22 °C, znašala je 19,2 %, učinkovitost imobilizacije pa 23,3 %. Najnižjo preostalo aktivnost imobilizirane ADH smo dosegli, ko smo celoten potek koimobilizacije izvajali pri temperaturi 10 °C, znašala je 7,4 %, učinkovitost imobilizacije pa 44,6 %. Rezultate prikazuje Slika 3-27, iz katerih lahko

sklepamo, da je najugodnejša temperatura za koimobilizacijo encima ADH in kofaktorja  $\beta$ -NAD 22 °C. Vse nadaljnje študije smo izvajali pri temperaturi koimobilizacije 22 °C.

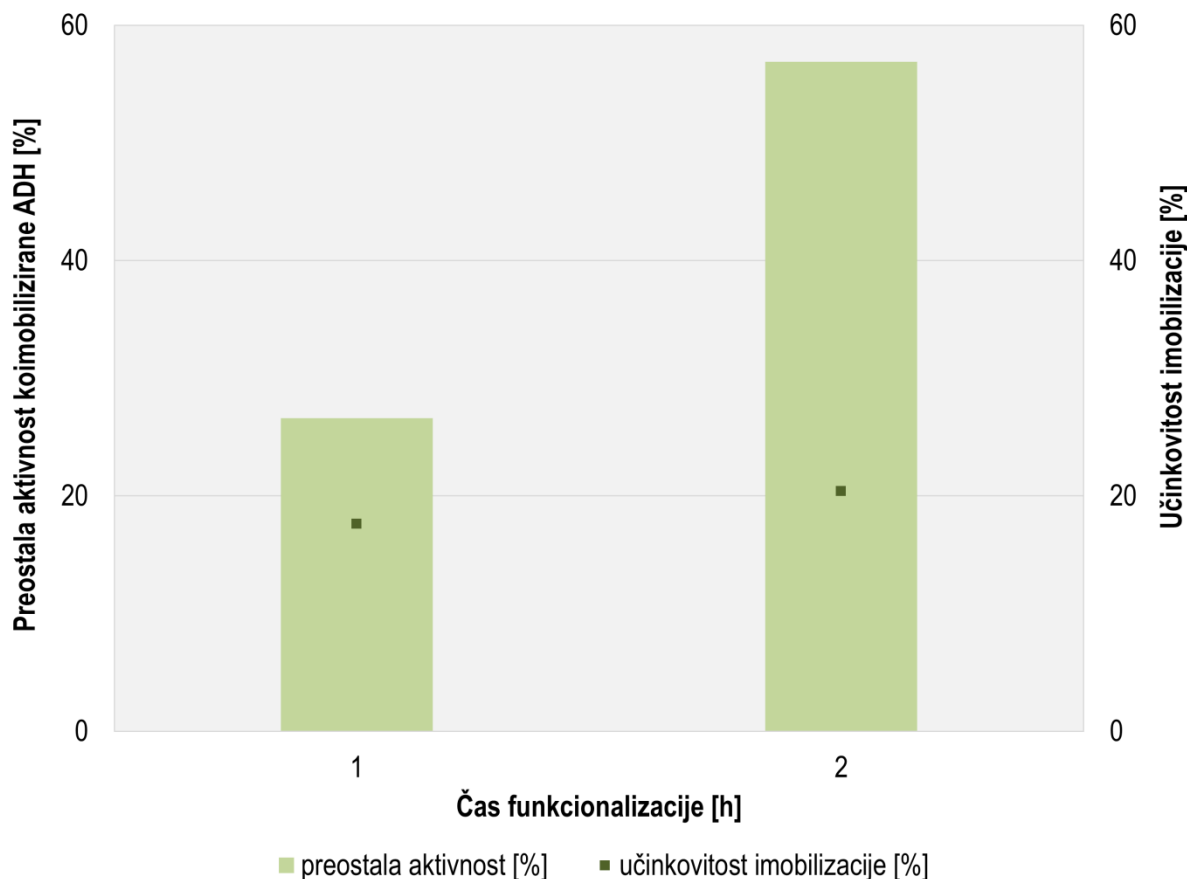


Slika 3-27: Vpliv temperature koimobilizacije na preostalo aktivnost in učinkovitost koimobilizirane ADH z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri pogojih 40 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 1 ura funkcionalizacije, 20 mM  $\beta$ -NAD, 0,02 mg/mL ADH, 350 rpm)

#### 3.4.3.6 Vpliv časa funkcionalizacije CMD3-MNPs

Pomembno vlogo pri vezavi encima na nosilec ima aktivacija same površine in število funkcionalnih skupin, ki so na površini nosilca na voljo, na katere se encim lahko veže. Eden izmed dejavnikov, ki vplivajo na uspešno aktivacijo je čas le-te. V ta namen smo v naslednjem koraku proučili vpliv časa aktivacije CMD3-MNPs s 4 % (v/v) ECIH na preostalo aktivnost koimobilizirane ADH in učinkovitost koimobilizacije. V postopek smo uvedli enourno in dvourno aktivacijo. Rezultate prikazuje Slika 3-28. Iz rezultatov vidimo, da pride po 2 urah aktivacije površine nosilca CMD3-MNPs s 4 % (v/v) ECIH do opazne razlike v preostali aktivnosti koimobilizirane ADH. Po dveh urah aktivacije znaša preostala aktivnost koimobilizirane ADH 56,9 %, medtem ko smo z 1 urno aktivacijo dosegli le 26,6 % preostalo aktivnost koimobilizirane ADH. Prav tako se je zvišala tudi učinkovitost imobilizacije, ki je znašala 20,4 %, pri 1 urni aktivaciji pa 17,6 %. S tem smo potrdili, da vpliv časa funkcionalizacije vpliva na preostalo aktivnost koimobilizirane ADH, saj z optimalnim časom aktivacije omogočimo, da se površina nosilca funkcionalizira in zagotovi zadostno število prostih funkcionalnih skupin, na katere se encim lahko veže. Z zadostnim številom funkcionalnih skupin in s tem učinkovito vezavo encima na površino nosilca, se

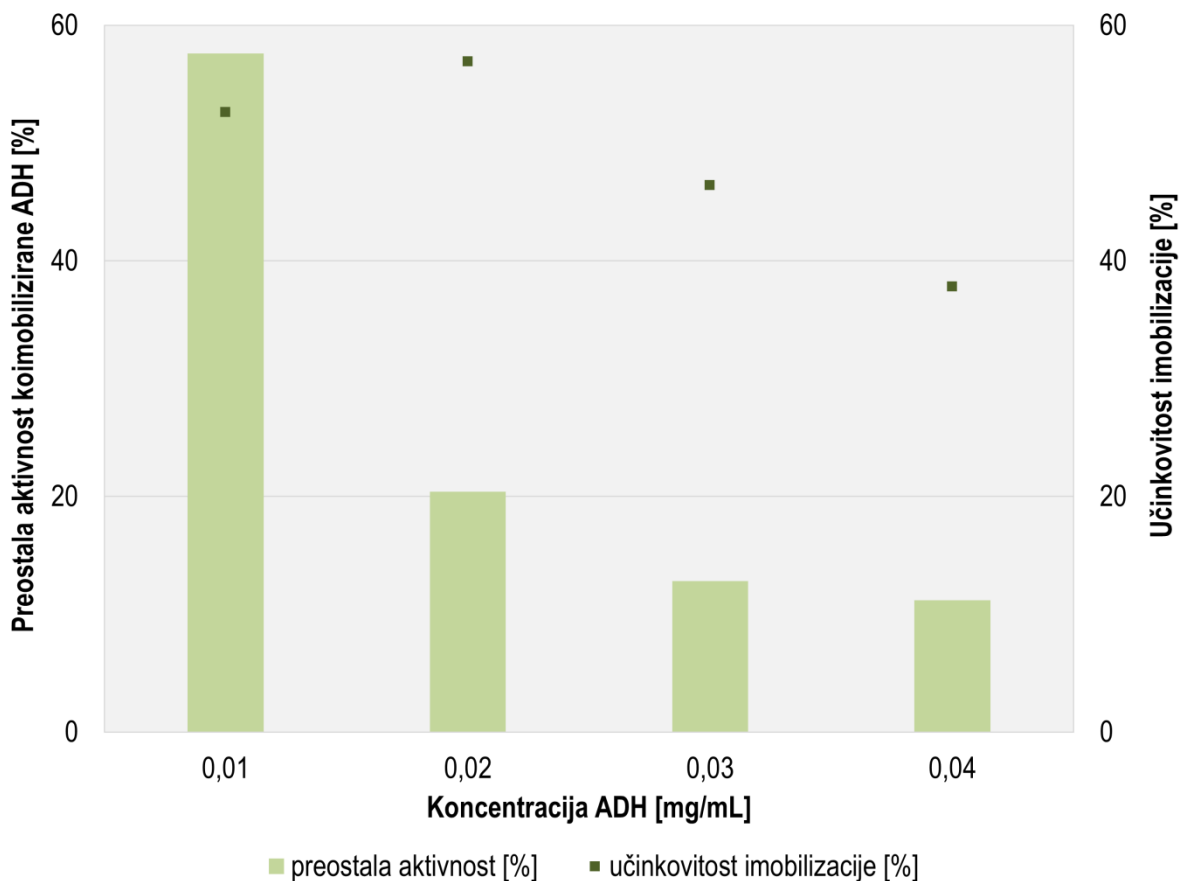
tudi preostala aktivnost koimobilizirane ADH zviša. V nadaljevanju smo za funkcionalizacijo površine CMD3-MNPs uvedli 2 urno aktivacijo, ostali imobilizacijski pogoji so ostali nespremenjeni.



Slika 3-28: Vpliv časa aktivacije CMD3-MNPs na preostalo aktivnost in učinkovitost koimobilizirane ADH z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri pogojih: 40 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 20 mM  $\beta$ -NAD, 0,02 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm)

### 3.4.3.7 Vpliv koncentracije ADH

Proučili smo tudi vpliv koncentracije encima ADH na preostalo aktivnost imobilizirane ADH in učinkovitost imobilizacije. Študijo smo izvajali pri 4 različnih koncentracijah ADH (0,01 mg/mL, 0,02 mg/mL, 0,03 mg/mL in 0,04 mg/mL). Iz rezultatov, ki jih prikazuje Slika 3-29 je razvidno, da z naraščanjem koncentracije encima preostala aktivnost koimobilizirane ADH pada. Tako smo ponovno zvišanje preostale aktivnosti koimobilizirane ADH dosegli, ko smo koimobilizacijo izvedli s koncentracijo ADH 0,01 mg/mL (57,6 %), najnižjo preostalo aktivnost ADH pa pri najvišji koncentraciji 0,04 mg/mL (11,2 %). Učinkovitost imobilizacije je pri najnižji koncentraciji ADH znašala 52,6 %, pri najvišji koncentraciji ADH pa 37,8 %.

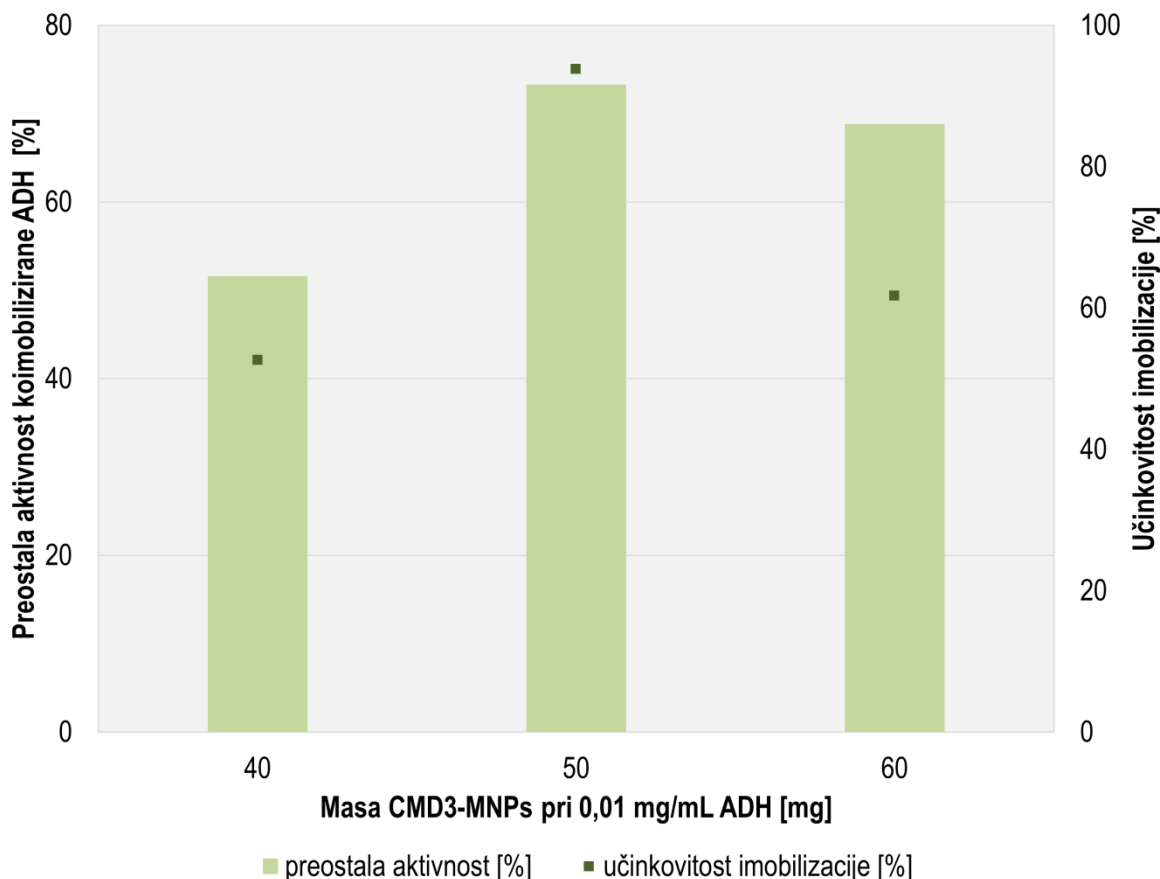


Slika 3-29: Vpliv koncentracije ADH na preostalo aktivnost in učinkovitost koimobilizirane ADH z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri pogojih: 40 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 2 uri funkcionalizacije, 20 mM  $\beta$ -NAD, 22 °C, 350 rpm)

Kot smo ugotovili že pri imobilizaciji ADH, pride do upada v preostali aktivnosti imobiliziranega encima z naraščanjem koncentracije encima v postopku imobilizacije zaradi prenasitja površine nosilca z encimom, pri čemer je posledično otežen dostop substrata do aktivnega mesta encima. Prav tako lahko prenasitje encima na površini nosilca znižuje aktivnost imobiliziranega encima, zaradi prostorske oviranosti na površini nosilca ali pa denaturacije encima. Omenjene omejitve, ki povzročajo zniževanje preostale aktivnosti encima najdemo tudi v drugih raziskovalnih člankih [253–256].

#### 3.4.3.8 Vpliv mase CMD3-MNPs pri optimalni koncentraciji encima ADH

V zadnjem koraku smo izvedli študijo vpliva mase CMD3-MNPs na preostalo aktivnost koimobilizirane ADH in učinkovitost imobilizacije pri najnižji koncentraciji encima ADH, tj. 0,01 mg/mL. Mase CMD3-MNPs so bile sledeče; 40 mg, 50 mg in 60 mg. Rezultate prikazuje Slika 3-30. Najvišjo in ponovno zvišanje preostale aktivnosti koimobilizirane ADH smo dosegli, ko je bila masa CMD3-MNPs 50 mg. Le-ta je znašala 73,3 %, učinkovitost imobilizacije pa 93,8 %. Pri povišanju mase CMD3-MNPs na 60 mg pride do upada v preostali aktivnosti ADH (68,8 %), učinkovitost imobilizacije pa je znašala 61,7 %.



Slika 3-30: Vpliv mase CMD3-MNPs pri 0,01 mg/mL ADH na preostalo aktivnost in učinkovitost koimobilizirane ADH z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri pogojih: 40 mg CMD3-MNPs, 4 % (v/v) ECIH, 2 uri funkcionalizacije, 20 mM  $\beta$ -NAD, 0,01 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm)

Večje količine nosilca omogočajo večjo površino za vezavo encima, pri čemer pa lahko prevelika površina vodi v zniževanje preostale aktivnosti imobiliziranega encima, saj je za vezavo encima na voljo preveč površine nosilca. Zato je potrebno najti optimalno količino nosilca, da zagotovimo najučinkovitejšo vezavo encima na nosilec. Iz rezultatov sklepamo, da je 50 mg nosilca CMD3-MNPs optimalna količina, ki omogoča učinkovito vezavo ADH na nosilec ter s tem zagotavlja najvišjo preostalo aktivnost koimobilizirane ADH.

### 3.4.4 Termična stabilnost imobilizirane in koimobilizirane ADH

Termična stabilnost encima ima ključno vlogo pri pogojevanju uporabnosti le-tega v različnih industrijskih aplikacijah. Prosta ADH je kljub visoki aktivnosti zelo nestabilen encim [257]. Z imobilizacijskim postopkom, v katerega smo vpeljali nosilec CMD3-MNPs aktiviran z epoksi zamreževanjem, lahko izrazito izboljšamo njegovo termično stabilnost.

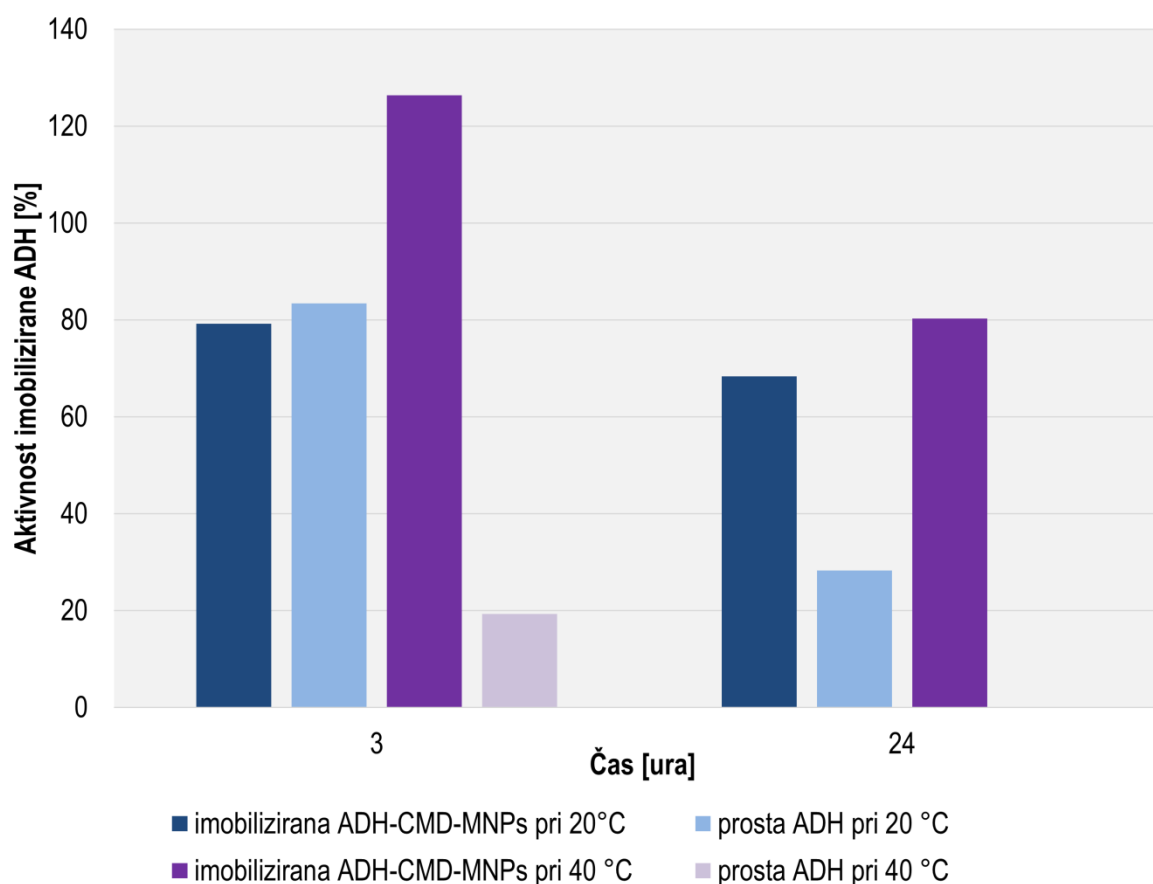
Termično stabilnost smo določili imobilizirani ADH na CMD3-MNPs (pri optimiranih pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 1 ura funkcionalizacije s 4 % (v/v) ECIH, 0,02 mg/mL ADH, pH 7,5, 4 °C, 500 rpm) ter jo primerjali s termično stabilnostjo proste ADH, in sicer pri temperaturah 20 °C in 40 °C, po 3 urah in 24 urah izpostavitve.

Študijo termične stabilnosti smo izvedli tudi za ADH, koimobilizirano z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri optimiranih pogojih: 40 mg CMD3-MNPs, 2 uri funkcionalizacije s 4 % (v/v)

ECIH, 20 mM  $\beta$ -NAD, 0,01 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm) in jo primerjali s termično stabilnostjo proste ADH, in sicer pri temperaturah 30 °C in 50 °C, pri čemer je izpostavitve trajala 3 ure ali 5 ur.

### 3.4.4.1 Termična stabilnost imobilizirane ADH

Rezultate prikazuje Slika 3-31. Po 3 urah inkubacije ADH, imobilizirane na CMD3-MNPs pri 20 °C opazimo, da se začetna aktivnost zniža za 20 %, in tako znaša 79,3 %, medtem ko začetna aktivnost proste ADH znaša 83,4 %. Ko čas inkubacije pri 20 °C podaljšamo na 24 ur, se aktivnost proste ADH ponovno zniža in znaša le še 28,3 %, medtem ko se aktivnost imobilizirane ADH zniža na 68,4 % in tako obdrži skoraj 70 % svoje začetne aktivnosti pred inkubacijo. Z naraščanjem temperature na 40 °C je aktivnost imobilizirane ADH po 3 urah inkubacije znašala 126,4 %. Ko smo čas inkubacije podaljšali na 24 ur, se je aktivnost imobilizirane ADH znižala, in sicer na 80,3 %. Pri inkubaciji proste ADH pri 40 °C je aktivnost po 3 urah, kot pričakovano, znašala le 19,3 %, medtem ko smo inaktivacijo encima dosegli že po 5 urah. Rezultati nakazujejo, da smo z epoksi zamreževanjem in imobilizacijo uspeli izboljšati termično stabilnost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs po 24 urah inkubacije pri 20 °C in 40 °C.

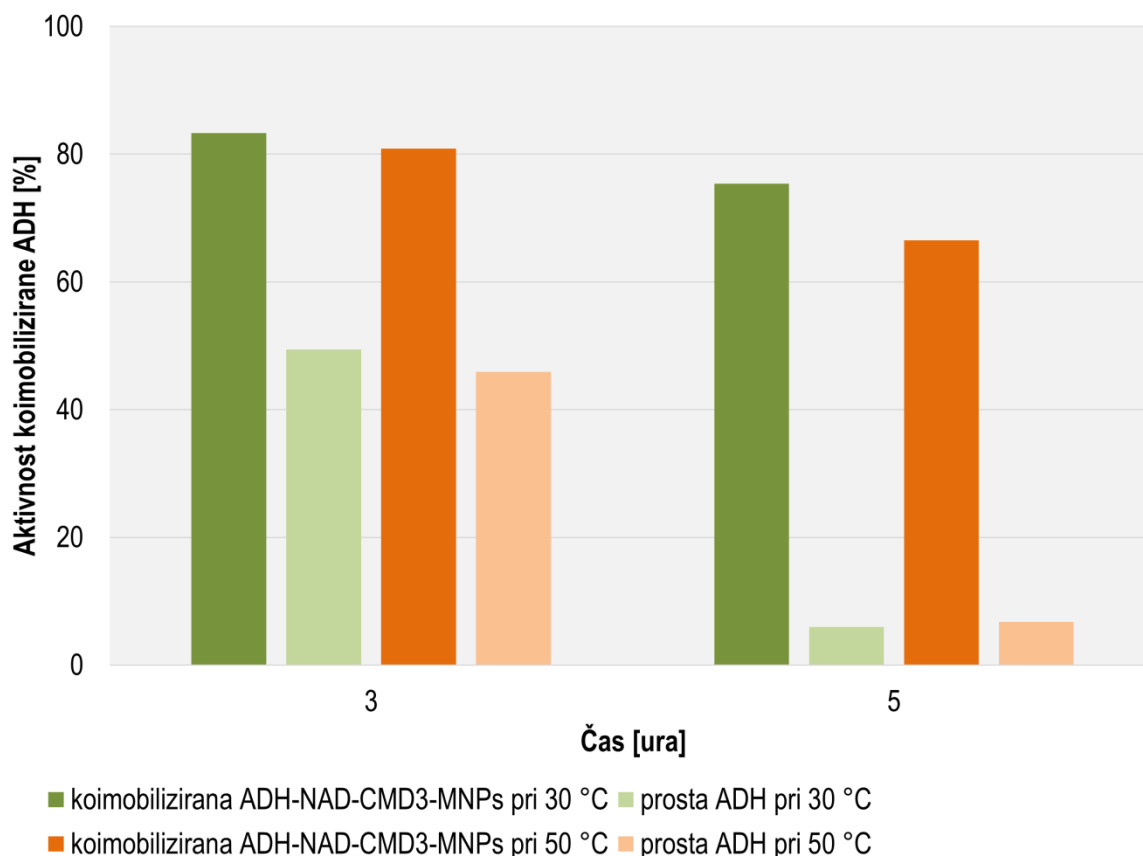


Slika 3-31: Termična stabilnost proste in imobilizirane ADH na CMD3-MNPs (pri optimiranih pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 1 ura funkcionalizacije s 4 % (v/v) ECIH, 0,02 mg/mL ADH, pH 7,5, 4 °C, 500 rpm)



### 3.4.4.2 Termična stabilnost koimobilizirane ADH

Proučili smo tudi termično stabilnost ADH, koimobilizirane z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs. Rezultate prikazuje Slika 3-32. Po 3 urah inkubacije pri 30 °C se aktivnost imobilizirani ADH zniža na 83,8 %, prosti ADH pa na 49,4 %. Ko čas inkubacije podaljšamo na 5 ur, znaša aktivnost imobilizirane ADH 75,4 %, medtem ko se aktivnost proste ADH drastično zniža in znaša le še 6,0 %. Ko temperaturo inkubacije povišamo na 50 °C, se aktivnost imobilizirane ADH po 3 urah inkubacije zniža na 80,9 %, aktivnost proste ADH pa se zniža na 45,9 %. Ko čas inkubacije podaljšamo na 5 ur, se aktivnost imobilizirane ADH zniža na 66,5 %, medtem ko aktivnost proste ADH znaša le še 6,8 %. Iz rezultatov lahko sklepamo, da smo z imobilizacijo dosegli boljšo termično stabilnost encima, saj ADH v prosti obliki izgubi skoraj vso začetno aktivnost, medtem ko imobilizirana ADH po 5 urah inkubacije ohrani dobrih 75 % svoje začetne aktivnosti pred inkubacijo pri 30 °C in slabih 70 % svoje začetne aktivnosti pred inkubacijo pri 50 °C. Prav tako lahko opazimo, da ima tako imobilizirana ADH kot prosta ADH višjo aktivnost pri inkubaciji pri 30 °C, kar pomeni, da se termična stabilnost z naraščanjem temperature znižuje, kljub temu pa se imobilizirani ADH znižuje počasneje kot prosti ADH.



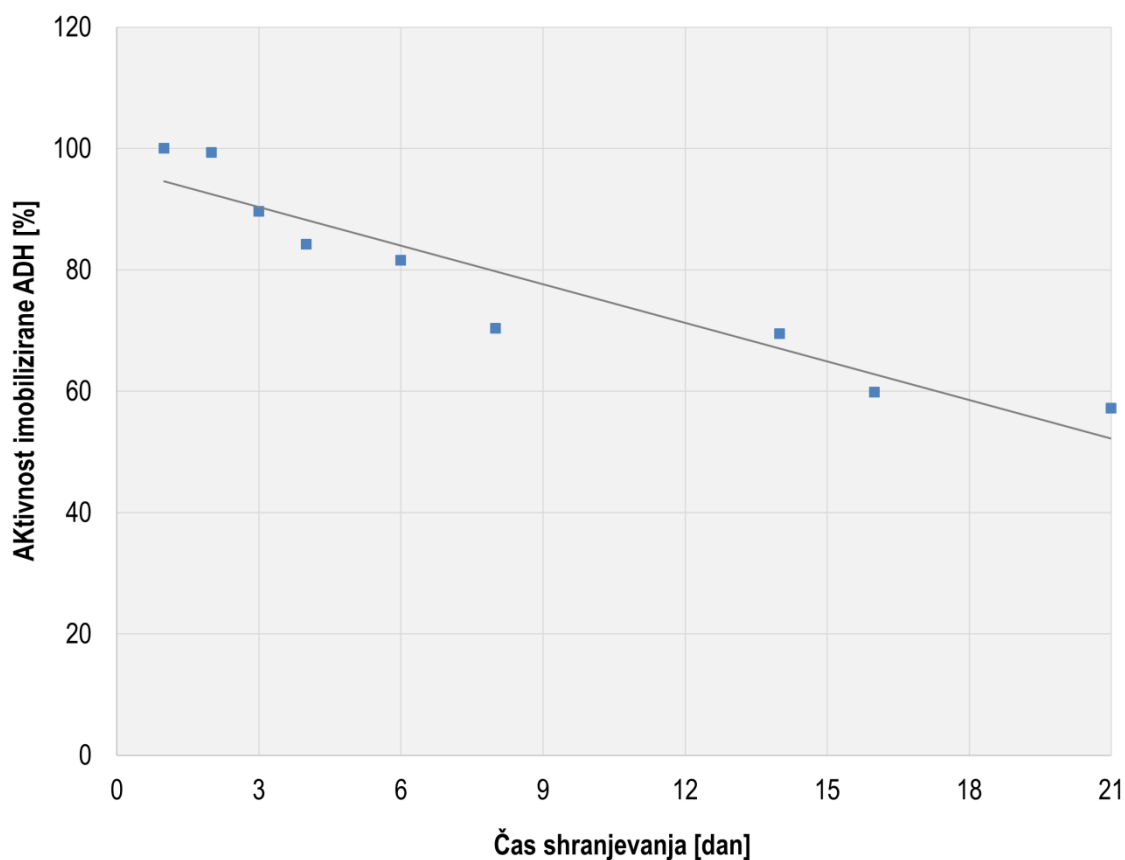
Slika 3-32: Termična stabilnost proste in koimobilizirane ADH z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri optimiranih pogojih: 40 mg CMD3-MNPs, 2 uri funkcionalizacije s 4 % (v/v) ECIH, 20 mM  $\beta$ -NAD, 0,01 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm)

### 3.4.5 Stabilnost imobilizirane in koimobilizirane ADH pri 4 °C

Proučili smo, kako skladiščenje imobilizirane ADH pri 4 °C vpliva na njeno preostalo aktivnost. ADH, imobilizirano na CMD3-MNPs (pri optimiranih pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 1 ura funkcionalizacije s 4 % (v/v) ECIH, 0,02 mg/mL ADH, pH 7,5, 4 °C, 500 rpm) smo skladiščili v natrijevem acetatnem pufru (pH 7,5) pri temperaturi 4 °C 22 dni. ADH, koimobilizirano z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri optimiranih pogojih: 40 mg CMD3-MNPs, 2 uri funkcionalizacije s 4 % (v/v) ECIH, 20 mM  $\beta$ -NAD, 0,01 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm) smo prav tako skladiščili v natrijevem acetatnem pufru (pH 7,5) pri temperaturi 4 °C 21 dni. Aktivnost obeh imobiliziranih ADH smo določili pred začetkom skladiščenja in predstavljata 100 %.

#### 3.4.5.1 Stabilnost imobilizirane ADH

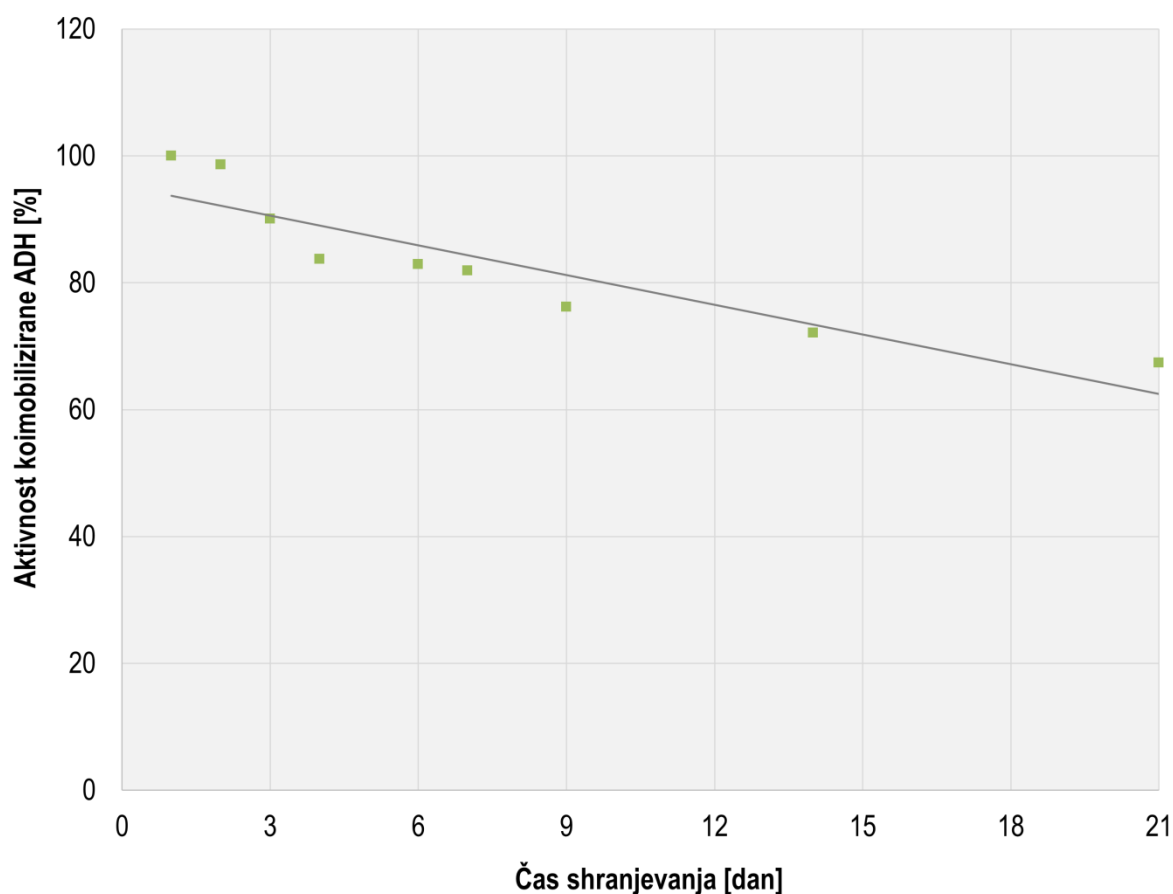
Rezultate študije stabilnosti ADH, imobilizirane na CMD3-MNPs pri 4 °C prikazuje Slika 3-33. Imobilizirana ADH je po 6 dnevih skladiščenja pri 4 °C ohranila skoraj 80 % svoje začetne aktivnosti (81,6 %). Po 8 dnevih se preostala aktivnost imobilizirane ADH zniža na 70,4 %, ter s podaljševanjem časa skladiščenja pri 4°C upada ter tako doseže 69,5 % po 14 dneh, 59,8 % po 16 dneh in 57,2 % po 22 dneh. Iz rezultatov sklepamo, da je imobilizirana ADH na CMD3-MNPs pri 4 °C stabilna, saj je ohranila skoraj 60 % svoje začetne aktivnosti po 21 dneh skladiščenja pri 4 °C.



Slika 3-33: Vpliv časa skladiščenja imobilizirane ADH na CMD3-MNPs (pri optimiranih pogojih: 20 mg CMD3-MNPs, 1 ura funkcionalizacije s 4 % (v/v) ECIH, 0,02 mg/mL ADH, pH 7,5, 4 °C, 500 rpm) pri 4 °C na njeno stabilnost

### 3.4.5.2 Stabilnost koimobilizirane ADH

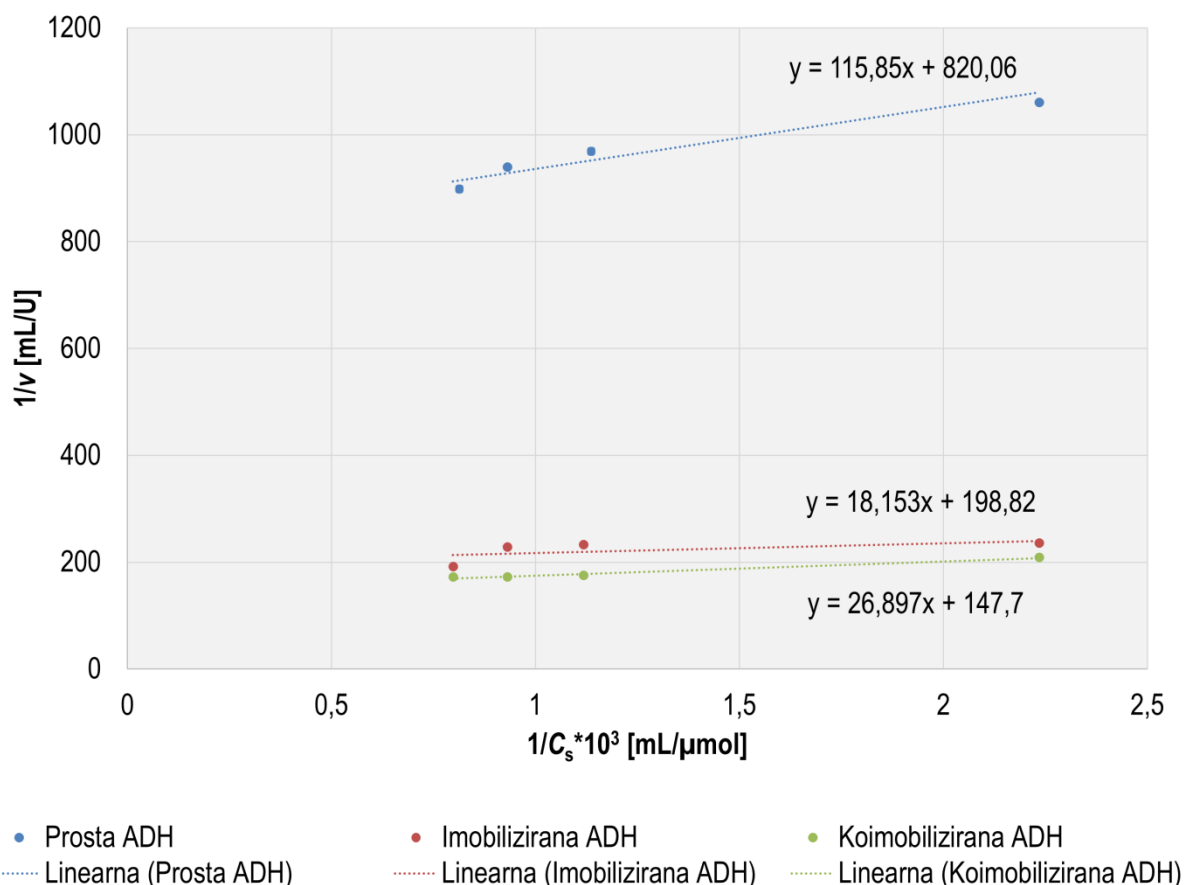
Rezultate študije stabilnosti ADH, koimobilizirane z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs pri 4 °C prikazuje Slika 3-34. Koimobilizirana ADH je po 7 dnevih skladiščenja pri 4 °C ohranila kar 80,0 % svoje začetne aktivnosti, nato pa se je s podaljševanjem časa skladiščenja njena aktivnost zniževala. Tako je po 14 dnevih ohranila 70,6 % svoje začetne aktivnosti, po 21 dnevih skladiščenja pri 4 °C pa je njena preostala aktivnost znašala 67,0 %. Na osnovi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je ADH, koimobilizirana z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs ohranila tudi po 22 dneh skladiščena pri 4 °C več kot pol svoje začetne aktivnosti in izkazuje dobro stabilnost pri danih pogojih.



Slika 3-34: Vpliv časa skladiščenja ADH koimobilizirane z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs (pri optimiranih pogojih: 40 mg CMD3-MNPs, 2 uri funkcionalizacije s 4 % (v/v) ECIH, 20 mM  $\beta$ -NAD, 0,01 mg/mL ADH, 22 °C, 350 rpm) pri 4 °C na stabilnost ADH

### 3.4.5.3 Določevanje encimskih kinetičnih parametrov $K_M$ in $v_{max}$

Določitev kinetičnih parametrov  $K_M$  in  $v_{max}$  smo izvedli s pomočjo Lineweaver-Burkove linearizacije z spreminjanjem koncentracij substrata etanola v območju od 0,3 M do 0,8 M. Glede na enačbo (1) smo linearno regresijo za prosto, imobilizirano in koimobilizirano ADH določili iz naklona premice ter maksimalne začetne hitrosti reakcije, pri čemer absicna os predstavlja recipročne vrednosti koncentracije substrata  $1/[S]$ , ordinatna os pa recipročne vrednosti izmerjenih začetnih hitrosti.



Slika 3-35: Lineweaver-Burkov diagram za prosto, imobilizirano in koimobilizirano ADH

Slika 3-35 prikazuje Lineweaver-Burkov diagram za prosto, imobilizirano in koimobilizirano ADH, iz katerega smo določili kinetična parametra  $K_M$  in  $v_{max}$ , ki sta za prosto ADH znašala 141,3 mM in 1,22  $\mu$ mol/min, za imobilizirano ADH 91,3 mM in 5,03  $\mu$ mol/min ter za koimobilizirano ADH 182,1 mM in 6,77  $\mu$ mol/min. Nižja  $K_M$  vrednost za imobilizirano ADH v primerjavi s prosto ADH nakazuje njeno večjo afiniteto do substrata, kar je lahko posledica manjših velikosti pripravljenih delcev CMD3-MNPs, ki zmanjšujejo sterično oviranost ter tako povečujejo dostopnost aktivnih mest encima do substrata [45]. Koimobilizirana ADH ima v primerjavi s prosto ADH višjo vrednost  $K_M$ , kar nakazuje, da je njena afiniteta do substrata manjša. Razlog za to lahko predstavljajo konformacijske spremembe encima ADH, do katerih pride med postopkom koimobilizacije encima ADH in kofaktorja  $\beta$ -NAD ter njuni vezavi na delce CMD3-MNPs, kar se lahko kaže tudi v manjši dostopnosti substrata do aktivnega mesta encima. Rezultate prikazuje Tabela 3-8.

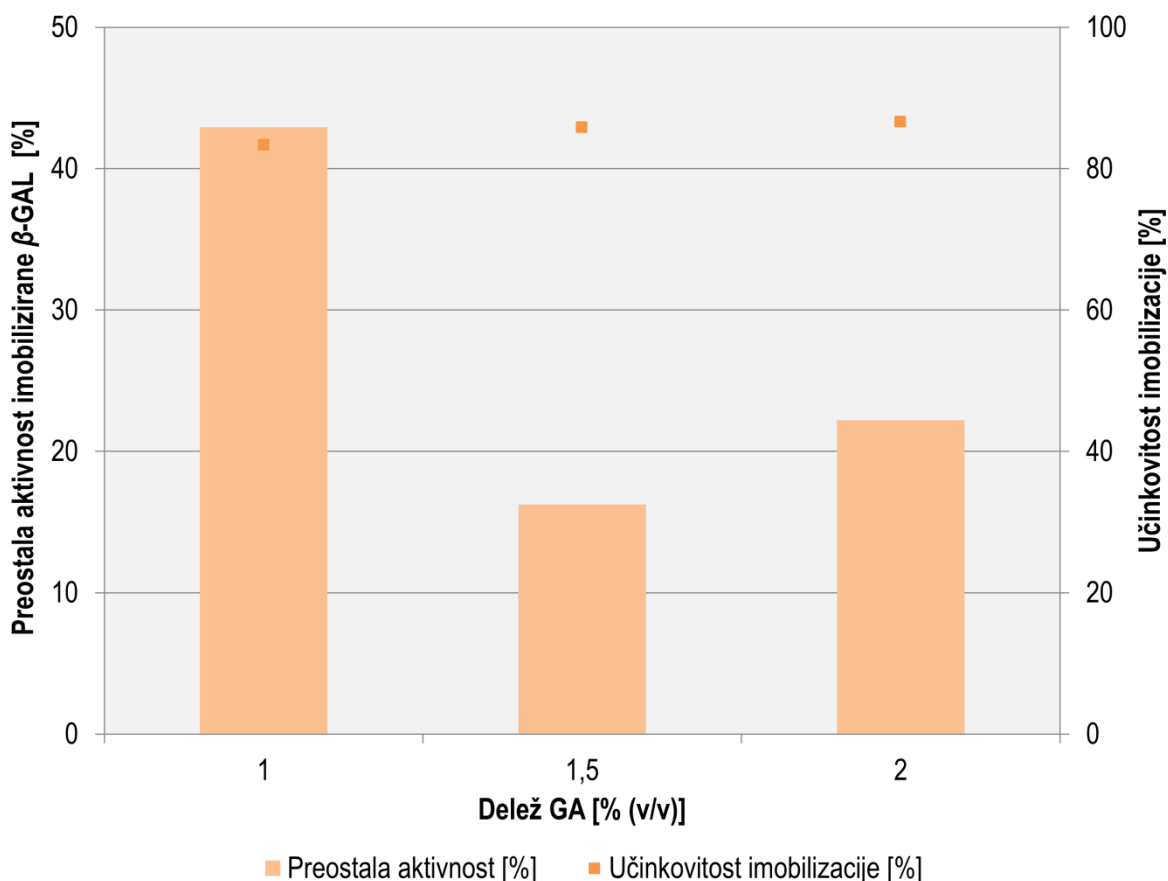
Tabela 3-8: Kinetični parametri za prosto, imobilizirano in koimobilizirano ADH

ADH	$K_M$ [mM]	$v_{max}$ [ $\mu\text{mol}/\text{min}$ ]
Prosta	141,3	1,22
Imobilizirana	91,3	5,03
Koimobilizirana	182,1	6,77

### 3.4.6 Imobilizacija $\beta$ -GAL na HIT-MNPs in AMS-MNPs

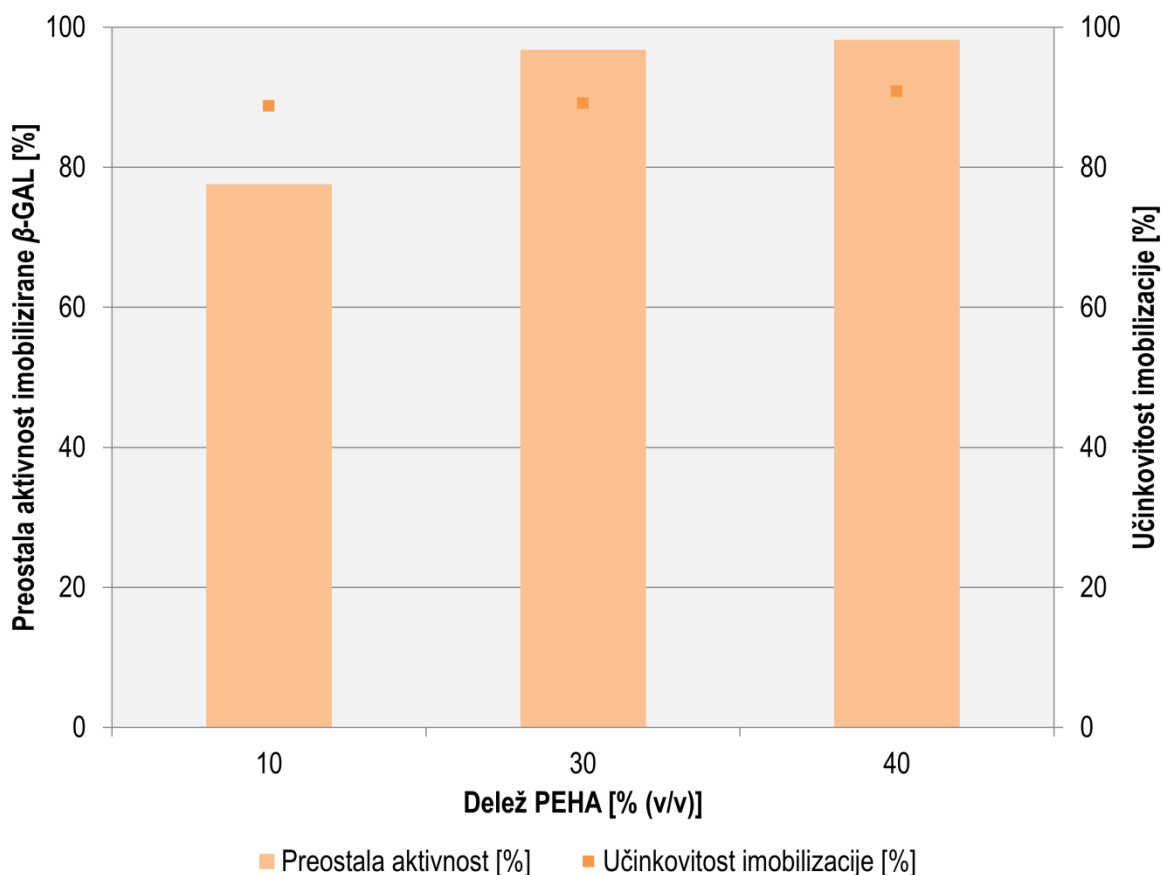
#### 3.4.6.1 Imobilizacija $\beta$ -GAL na HIT-MNPs

Pri imobilizaciji encima  $\beta$ -GAL smo proučevali vpliv mrežnega povezovalca GA in aminodonorja PEHA ter vpliv kombinacije obeh na preostalo aktivnost  $\beta$ -GAL in učinkovitost imobilizacije. Z višanjem koncentracije mrežnega povezovalca aktiviramo površino nanodelca in tako zagotovimo več prostih aktivnih mest, na katera se encim lahko kovalentno veže. Če pa so koncentracije zamreževalca previsoke, lahko le-ta blokira aktivna mesta, na katera se encim več ne more vezati. To lahko vodi v znižano aktivnost imobiliziranega encima, kot tudi zmanjšano učinkovitost imobilizacije. Imobilizacijo encima  $\beta$ -GAL smo izvedli na dveh nosilcih, in sicer na HIT-MNPs in AMS-MNPs. Encim  $\beta$ -GAL smo imobilizirali na HIT-MNPs, pripravljene po postopku kovalentne vezave hitozana, pri tem pa smo proučevali vpliv zamreževalca GA na preostalo aktivnost  $\beta$ -GAL in učinkovitost imobilizacije. Rezultate prikazuje Slika 3-36. Najprej smo kot mrežni povezovalec uporabili 1 % (v/v) GA, pri čemer je preostala aktivnost imobilizirane  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs znašala 42,9 %, učinkovitost imobilizacije pa 83,3 %. Ko smo koncentracijo GA povišali na 1,5 % (v/v) se je preostala aktivnost  $\beta$ -GAL znižala na 16,3 %, medtem ko je učinkovitost imobilizacije narastla na 85,8 %. Ob ponovnem povišanju koncentracije GA na 2 % (v/v) se je preostala aktivnost  $\beta$ -GAL zvišala na 22,2 %, učinkovitost pa je prav tako narasla za 1 % in je znašala 86,6 %. Tako smo najvišjo preostalo aktivnost  $\beta$ -GAL dosegli z najnižjo koncentracijo GA (1 % (v/v)). Z višanjem koncentracije GA aktiviramo površino nanodelca, kamor se encim kovalentno veže, kar zagotavlja boljšo učinkovitost imobilizacije. Kljub temu pa previsoke koncentracije mrežnega povezovalca zavirajo dostop substrata do aktivnih mest encima, kar vodi do nižje presnove v encimsko kataliziranem procesu [258,259]. Rezultate prikazuje Slika 3-36.



Slika 3-36: Vpliv GA na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs (pri pogojih: 5 mg HIT-MNPs, 2 uri funkcionalizacije, 50 mg/mL  $\beta$ -GAL, pH 6, 24 ur imobilizacije, 22 °C, 350 rpm)

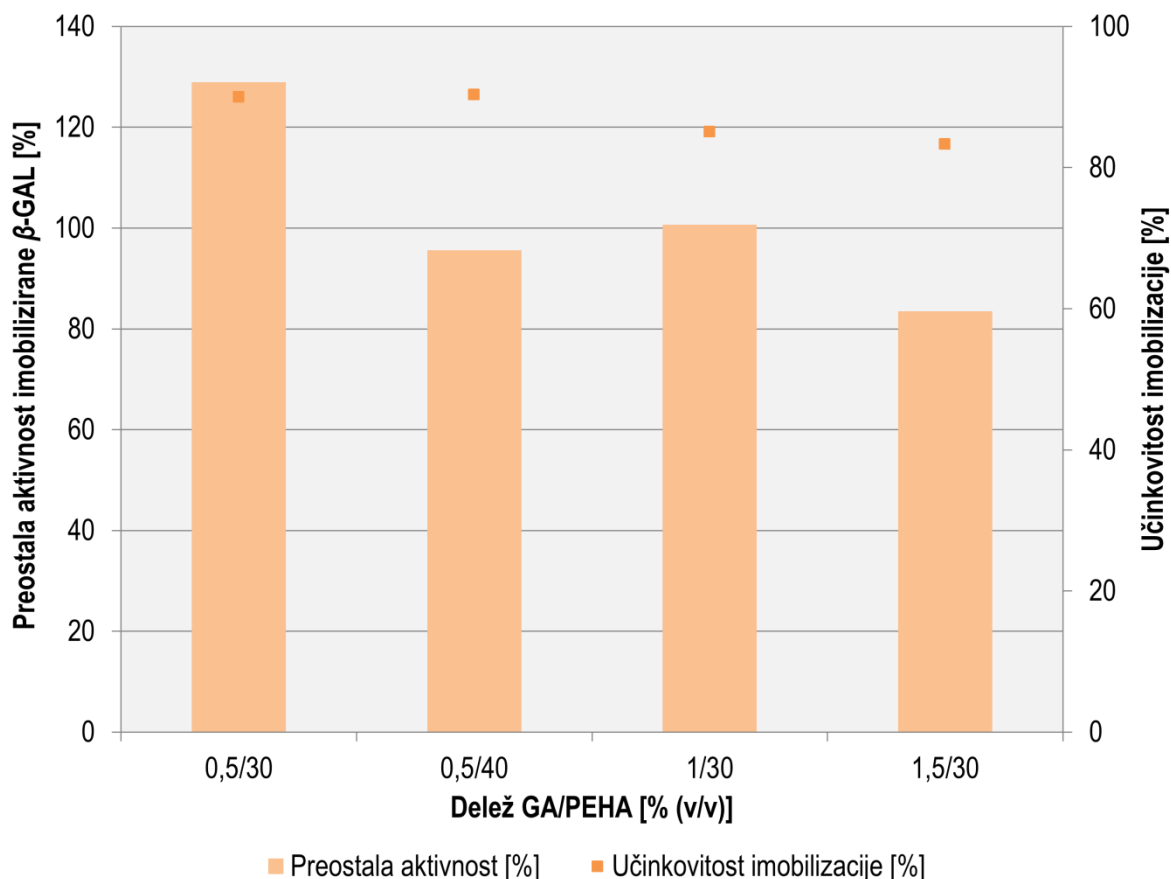
Prav tako smo izvedli študijo vpliva koncentracije dodanega amino-donorja PEHA. Uporabili smo sledeče koncentracije PEHA: 10 % (v/v), 30 % (v/v) in 40 % (v/v). Rezultate prikazuje Slika 3-37. Najvišjo preostalo aktivnost  $\beta$ -GAL smo dosegli, ko smo uporabili 40 % (v/v) PEHA, in sicer je le-ta znašala 98,2 %, prav tako je bila pri teh pogojih dosežena tudi najvišja učinkovitost imobilizacije (90,8 %). Preostala aktivnost  $\beta$ -GAL se je rahlo znižala pri dodatku 30 % (v/v) PEHA in je znašala 96,8 %, prav tako se je znižala učinkovitost imobilizacije (89,1 %). Najnižjo preostalo aktivnost  $\beta$ -GAL pa smo dosegli pri uporabi 10 % (v/v) PEHA, in sicer je le-ta znašala 77,6 %, učinkovitost imobilizacije pa se je dodatno znižala na 88,7 %. Z amino-donorjem PEHA zagotovimo dodatne proste amino skupine na površini nanodelca, na katere se encim lahko veže, kar se posledično kaže v višji preostali aktivnosti imobiliziranega encima. V primerjavi z mrežnim povezovalcem GA, smo ob dodatku amino-donorja PEHA v imobilizacijski postopek  $\beta$ -GAL dosegli veliko višje preostale aktivnosti imobiliziranega encima. Najvišja preostala aktivnost imobiliziranega encima z mrežnim povezovalcem GA je znašala 42,9 %, medtem ko se je ob dodatku amino-donorja PEHA preostala aktivnost imobiliziranega encima skoraj podvojila (98,2 %). Zato smo v nadaljevanju želeli proučiti vpliv kombinacije optimalnih volumskih deležev mrežnega povezovalca GA in amino-donorja PEHA na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane  $\beta$ -GAL.



Slika 3-37: Vpliv koncentracije dodanega PEHA na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs (pri pogojih: 5 mg HIT-MNPs, 2 uri funkcionalizacije, 50 mg/mL  $\beta$ -GAL, pH 6, 24 ur imobilizacije, 22 °C, 350 rpm)

Nadalje smo proučili vpliv kombinacije mrežnega povezovalca GA, z optimalnim volumskim deležem (0,5 % (v/v)) in amino-donorja PEHA s 30 % (v/v) in 40 % (v/v). Rezultate prikazuje Slika 3-38, iz katere je razvidno, da smo najvišjo preostalo aktivnost  $\beta$ -GAL dosegli, ko smo uporabili 0,5 % (v/v) GA v kombinaciji s 30 % (v/v) PEHA. Pri tem smo dosegli hiperaktivacijo encima, saj je preostala aktivnost  $\beta$ -GAL znašala 128,9 %, učinkovitost imobilizacije pa 89,9 %. Do hiperaktivacije encima najverjetneje pride zaradi konformacijskih sprememb encima, ki nastanejo zaradi tvorbe skupkov. Pri kombinaciji 0,5 % (v/v) GA in 40 % (v/v) PEHA se je preostala aktivnost  $\beta$ -GAL znižala na 95,6 %, učinkovitost imobilizacije pa ostaja približno enaka, in sicer 90,3 %.

V nadaljevanju smo optimirali še koncentracijo GA (1 % (v/v) in 1,5 % (v/v)) pri konstantni koncentraciji PEHA (30 % (v/v)). Rezultate prav tako prikazuje Slika 3-38. Ko smo 30 % (v/v) PEHA kombinirali z 1 % (v/v) GA, je preostala aktivnost  $\beta$ -GAL znašala 100,7 %, ob kombinaciji s 1,5 % (v/v) GA pa je prišlo do upada v preostali aktivnosti  $\beta$ -GAL (83,5 %). Preostali aktivnosti  $\beta$ -GAL sta visoki vendar hiperaktivacije nismo dosegli. Visoki sta tudi učinkovitosti imobilizacije, ki znašata 85,1 % in 83,3 %.

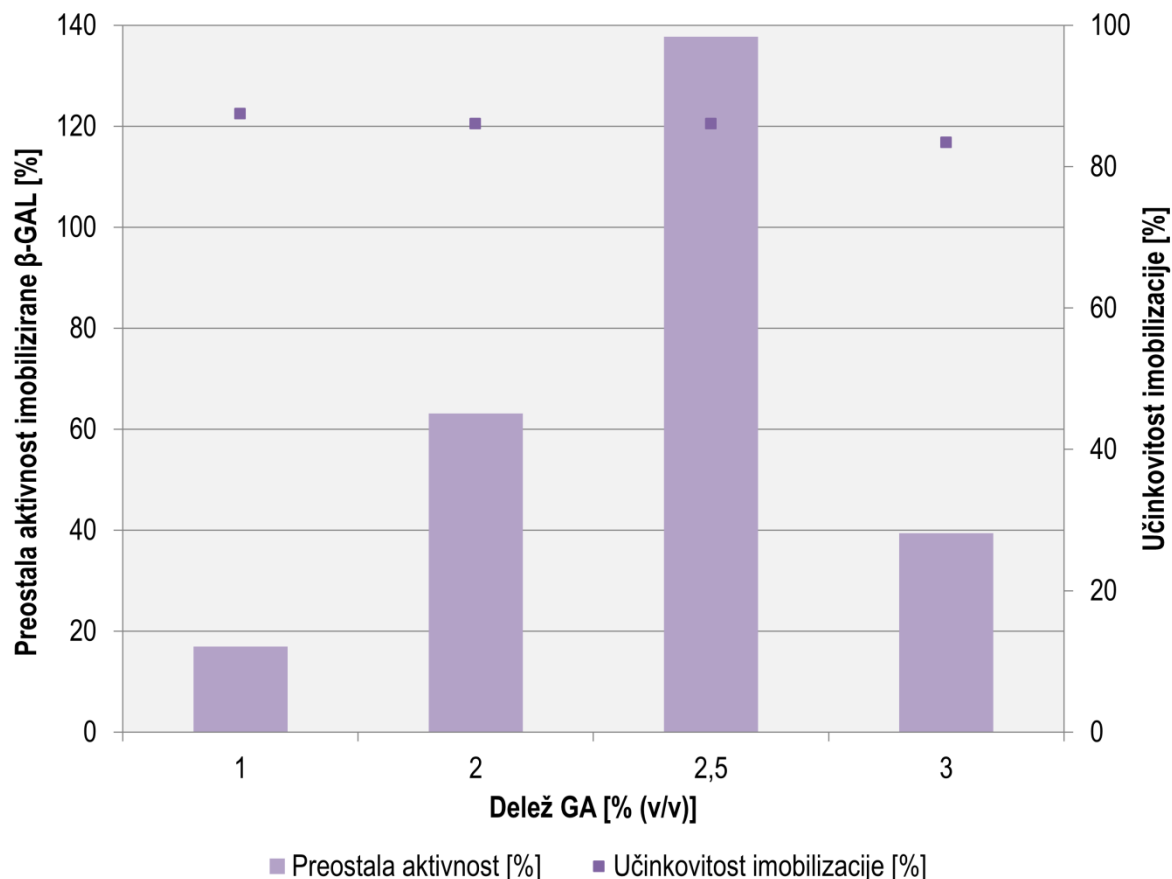


Slika 3-38: Vpliv razmerja GA/PEHA na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs (pri pogojih: 5 mg HIT-MNPs, 2 uri funkcionalizacije, 50 mg/mL  $\beta$ -GAL, pH 6, 24 ur imobilizacije, 22 °C, 350 rpm)

### 3.4.6.2 Imobilizacija $\beta$ -GAL na AMS-MNPs

Proučevali smo tudi vpliv različnih koncentracij GA in PEHA na preostalo aktivnost in učinkovitost  $\beta$ -GAL, vezane na AMS-MNPs. Rezultate prikazuje Slika 3-39. Najprej smo optimirali koncentracijo dodanega GA (1 % (v/v), 2 % (v/v), 2,5 % (v/v) in 3 % (v/v)). Kljub visoki učinkovitosti imobilizacije (87,5 %) smo najnižjo preostalo aktivnost  $\beta$ -GAL dosegli pri koncentraciji 1 % (v/v) GA, znašala je 16,9 %. Ko smo koncentracijo GA povišali na 2 % (v/v), se je preostala aktivnost  $\beta$ -GAL zvišala na 63,1 %, učinkovitost imobilizacije pa je znašala 86,0 %. Pri uporabi 2,5 % (v/v) GA je preostala aktivnost encima močno narastla, saj je ponovno prišlo do hiperaktivacije encima, in je le-ta znašala 137,7 %. Do hiperaktivacije encima lahko pride zaradi konformacijskih sprememb encima. Pri povišanju koncentracije GA na 3 % (v/v) se je preostala aktivnost  $\beta$ -GAL ponovno znižala na 39,4 %, učinkovitost imobilizacije pa je znašala 83,4 %. Tako smo najvišjo učinkovitost imobilizacije dosegli z najnižjo koncentracijo dodanega GA, ta pa se je zmanjševala z naraščanjem koncentracije GA. Pri visokih koncentracijah GA pride do aglomeriranja molekul, kar vodi v znižanje učinkovitosti imobilizacije.

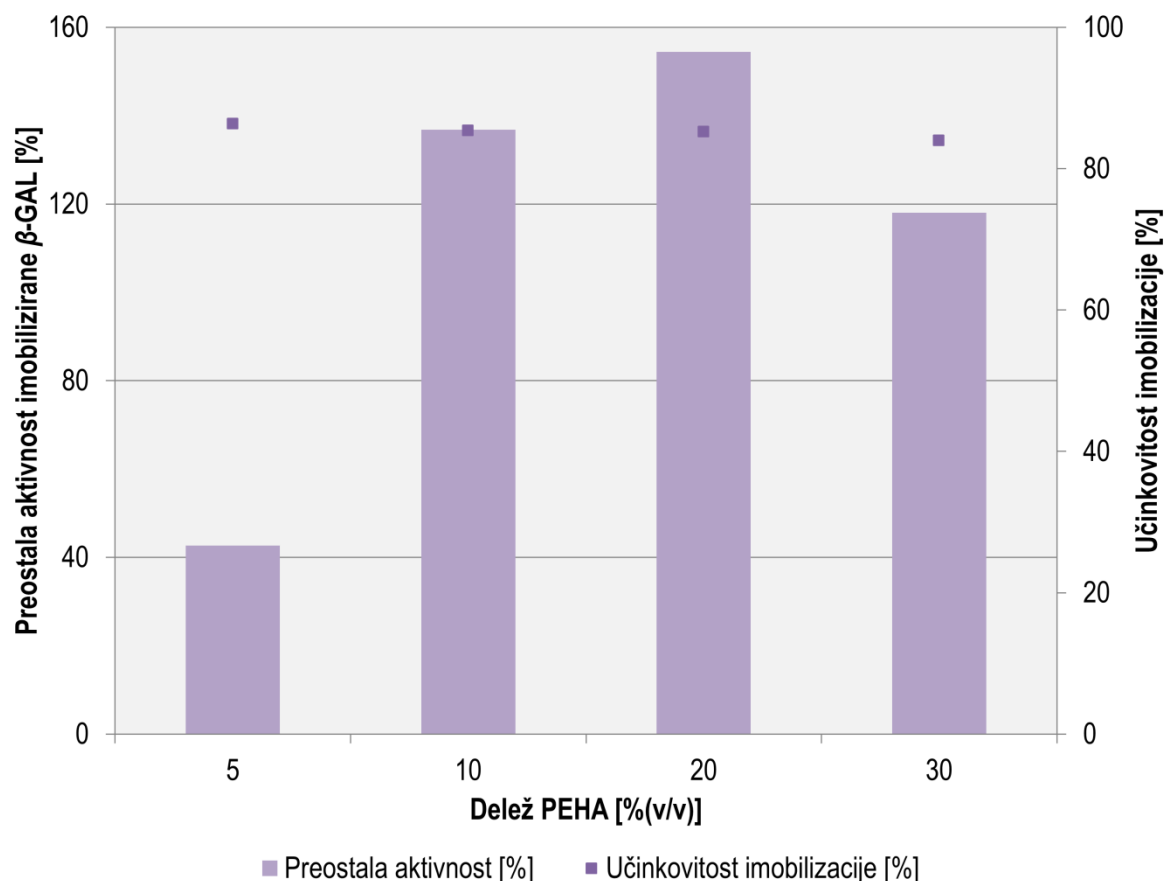




Slika 3-39: Vpliv GA na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane  $\beta$ -GAL na AMS-MNPs (pri pogojih: 5 mg HIT-MNPs, 2 uri funkcionalizacije, 50 mg/mL  $\beta$ -GAL, pH 6, 24 ur imobilizacije, 22 °C, 350 rpm)

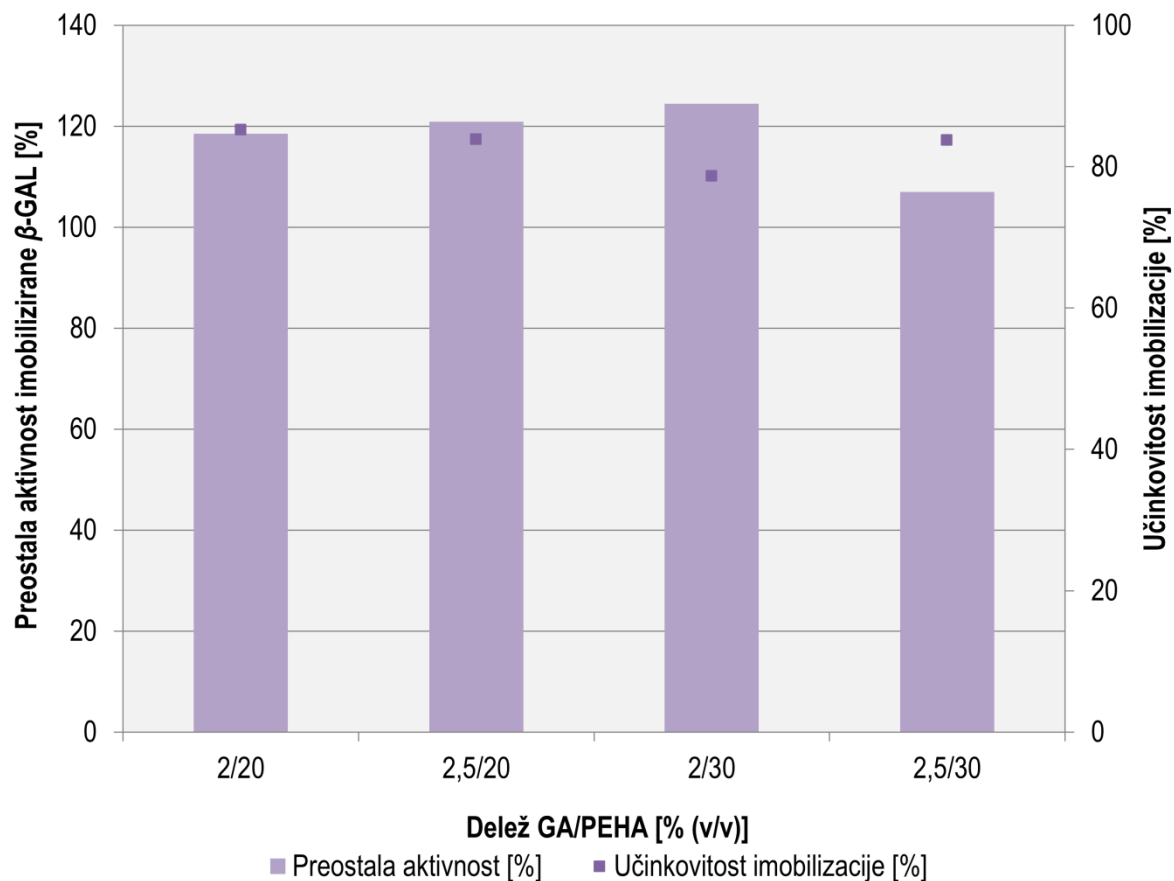
Nadaljevali smo s študijo vpliva amino-donorja PEHA na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizacije encima  $\beta$ -GAL na AMS-MNPs. Rezultate prikazuje Slika 3-40.

Najnižjo preostalo aktivnost  $\beta$ -GAL smo dosegli s koncentracijo 5 % (v/v) PEHA, znašala je samo 42,7 %, učinkovitost imobilizacije pa je bila 86,3 %. Ko smo koncentracije PEHA povišali, so preostale aktivnosti močno narastle. Ponovno je bila dosežena hiperaktivacija encima. Preostala aktivnost  $\beta$ -GAL je ob dodatku 10 % (v/v) PEHA znašala 136,8 %. Z nadaljnjim naraščanjem koncentracije dodanega PEHA na 20 % (v/v) je naraščala tudi preostala aktivnost  $\beta$ -GAL (154,4 %). Ob dodatku 30 % (v/v) PEHA se je preostala aktivnost  $\beta$ -GAL znižala, vendar smo še kljub temu dosegli hiperaktivacijo encima, saj je preostala aktivnost  $\beta$ -GAL znašala 118,0 %. Učinkovitost imobilizacije je bila najvišja pri najnižji dodani koncentraciji PEHA, znašala je 86,3 %, ter se je z naraščanjem koncentracije dodanega PEHA zniževala, dokler ni pri najvišji koncentraciji dodanega PEHA znašala 84,0 %.



Slika 3-40: Vpliv koncentracije PEHA na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane  $\beta$ -GAL na AMS-MNPs (pri pogojih: 5 mg HIT-MNPs, 2 uri funkcionalizacije, 50 mg/mL  $\beta$ -GAL, pH 6, 24 ur imobilizacije, 22 °C, 350 rpm)

Izvedli smo še študijo vpliva kombinacije dodanega mreženega povezovalca GA in amino-donorja PEHA na preostalo aktivnost  $\beta$ -GAL in učinkovitost imobilizacije. Uporabili smo 2 % (v/v) in 2,5 % (v/v) GA ter 20 % (v/v) in 30 % (v/v) PEHA. Rezultate prikazuje Slika 3-41. Kot je razvidno iz Slika 3-41 smo hiperaktivacijo encima dosegli pri vseh izbranih kombinacijah koncentracij dodanega GA in PEHA. Najvišjo preostalo aktivnost  $\beta$ -GAL smo dosegli s kombinacijo 2 % (v/v) GA in 30 % (v/v) PEHA, in sicer je le-ta znašala 124,5 %. Ko smo koncentracijo GA zvišali na 2,5 % (v/v) v kombinaciji s 30 % (v/v) PEHA, se je preostala aktivnost nekoliko znižala in je znašala 106,9 %. Ko smo za imobilizacijo  $\beta$ -GAL na AMS-MNPs uporabili kombinacijo 2,5 % (v/v) GA in 20 % (v/v) PEHA, je preostala aktivnost  $\beta$ -GAL znašala 120,9 %. Z nižanjem koncentracije GA na 2 % (v/v) pa se je v kombinaciji s 20 % (v/v) PEHA ponovno nekoliko znižala tudi preostala aktivnost  $\beta$ -GAL (118,9 %). Učinkovitosti imobilizacije so bile prav tako visoke in so znašale 85,2 % (razmerje GA/PEHA=2/20 (v/v)), 83,9 % (razmerje GA/PEHA=2,5/20 (v/v)), 78,7 % (razmerje GA/PEHA=2/30 (v/v)) in 83,7 % (razmerje GA/PEHA=2,5/30 (v/v)). Rezultate smo objavili v delu Križnik in ostali [260].



Slika 3-41: Vpliv razmerja GA/PEHA na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizirane  $\beta$ -GAL na AMS-MNPs (pri pogojih: 5 mg HIT-MNPs, 2 uri funkcionalizacije, 50 mg/mL  $\beta$ -GAL, pH 6, 24 ur imobilizacije, 22 °C, 350 rpm)

### 3.5 Zaključek študije imobilizacije encimov na magnetne nosilce

V drugem sklopu doktorske disertacije smo na modificiran nanonosilec CMD3-MNPs imobilizirali encim ADH. Prav tako smo na nosilce HIT-MNPs in AMS-MNPs imobilizirali encim  $\beta$ -GAL.

Pripravljen in modificiran nanonosilec CMD3-MNPs iz prvega sklopa doktorskega dela smo površinsko funkcionalizirali z uporabo epoksi zamreževalca ECIH (0,5 M). Epoksi skupine vežejo hidroksilne skupine CMD in tako pri nevtralnem pH tvorijo močne vezi. S tem postopkom smo funkcionalizirali modificirano površino nosilca CMD3-MNPs, na katerega smo vezali encim ADH. Izvedli smo študijo vpliva koncentracije dodanega epoksi zamreževalca ECIH na preostalo aktivnost ADH in učinkovitost imobilizacije. Najvišjo preostalo aktivnost ADH (88,4 %) smo dosegli, ko smo površino CMD3-MNPs funkcionalizirali s 4 % (v/v) ECIH, učinkovitost imobilizacije pa je znašala 99,5 %. Sledilo je optimiranje preostalih procesnih parametrov. Najprej smo proučili vpliv temperature imobilizacije na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizacije ADH. Optimalna temperatura imobilizacije je bila 4 °C, preostala aktivnost ADH je znašala 57,4 %, učinkovitost imobilizacije pa 80,7 %. Optimalna rotacijska hitrost je bila določena pri 500 rpm, kjer smo dosegli 87,5 % preostalo aktivnost ADH, učinkovitost imobilizacije pa je znašala 89,9 %. V nadaljevanju smo najvišjo preostalo aktivnost ADH dosegli v nevtralnem pH območju, in sicer pri pH 7,5 in je znašala 87,4 %, učinkovitost imobilizacije pa je bila 99,5 %. Naslednja parametra, ki smo ju optimirali sta bila čas imobilizacije in koncentracija encima. Najvišjo preostalo aktivnost ADH smo dosegli, ko smo imobilizacijski postopek izvajali dve uri (87,3 %) in s koncentracijo encima 0,02 mg/mL (89,6 %). Učinkovitost imobilizacije je bila v obeh primerih visoka, znašala je 99,5 % in 89,9 %.

Izvedli smo tudi študijo vpliva različnih procesnih parametrov na preostalo aktivnost ADH, ki smo jo skupaj s kofaktorjem  $\beta$ -NAD koimobilizirali na CMD3-MNPs. Najprej smo optimirali maso CMD3-MNPs (20 mg in 40 mg) pri enourni imobilizaciji kofaktorja  $\beta$ -NAD, ki ji je sledila dveurna imobilizacija encima ADH, in pri dveurni koimobilizaciji kofaktorja in encima. Kljub zelo nizkim preostalim aktivnostim imobilizirane ADH, smo najvišjo preostalo aktivnost ADH dosegli pri višji masi CMD3-MNPs (40 mg) po končani dveurni koimobilizaciji encima in kofaktorja (3,6 %), učinkovitost imobilizacije pa je znašala 84,5 %. Nadaljevali smo s spreminjanjem zaporedja vezave encima in kofaktorja in ugotovili, da smo najvišjo preostalo aktivnost ADH dosegli, če smo najprej kofaktor  $\beta$ -NAD imobilizirali eno uro, nato je sledila dveurna imobilizacija encima ADH. V tem primeru smo dosegli 5,0 % preostalo aktivnost ADH, učinkovitost imobilizacije pa je znašala 25,0 %. Nadaljevali smo s študijo vpliva koncentracije kofaktorja na koimobilizacijo encima ADH. Najvišjo preostalo aktivnost ADH, ki je znašala 9,3 %, smo dosegli pri naslednjih pogojih: dveurna imobilizacija  $\beta$ -NAD, kateri sledi dveurna imobilizacija ADH. Učinkovitost imobilizacije je znašala 89,3 %. Prav tako nas je zanimalo, kako vplivata čas in temperatura koimobilizacije ADH in kofaktorja na preostalo aktivnost koimobilizirane ADH in učinkovitost koimobilizacije. Najvišjo preostalo aktivnost ADH (10,5 %) smo dosegli, ko smo postopek koimobilizacije izvedli tako, da smo najprej dve uri imobilizirali kofaktor, nato pa

nadaljevali s štiriurno imobilizacijo ADH. Učinkovitost imobilizacije je znašala 55,0 %. Za optimalno temperaturo za izvajanje koimobilizacije se je izkazala temperatura 22 °C, kjer smo dosegli 19,2 % preostale aktivnosti ADH, učinkovitost imobilizacije pa je bila 23,3 %. Sledila je študija vpliva časa funkcionalizacije CMD3-MNPs na preostalo aktivnost imobiliziranega encima in na učinkovitost koimobilizacije. Z 2 urno aktivacijo površine CMD3-MNPs z epoksi zamreževalcem ECIH smo dosegli bistveno zvišanje preostale aktivnosti koimobilizirane ADH, saj je le-ta znašala 56,9 %. Postopek koimobilizacije smo tako v nadaljevanju izvajali z 2 urno aktivacijo površine CMD3-MNPs. Nadalje smo optimirali koncentracijo encima ADH z namenom dosega čim višje preostale aktivnosti encima in učinkovitosti imobilizacije. Pri nižji koncentraciji dodanega encima ADH (0,01 mg/mL), smo dosegli višjo preostalo aktivnost, le-ta je znašala 57,6 %, učinkovitost imobilizacije pa 37,8 %. Sledila je optimizacija mase nosilca CMD3-MNPs v kombinaciji z optimalno koncentracijo encima ADH (0,01 mg/mL). Uporabili smo sledeče mase nosilca: 40 mg, 50 mg in 60 mg. S povišanjem mase nosilca smo tudi izboljšali preostalo aktivnost encima, ter dosegli 73,3 % preostale aktivnosti ADH in 93,8 % učinkovitosti imobilizacije.

Izvedli smo tudi študijo termične stabilnosti ADH imobilizirane na CMD3-MNPs in ADH koimobilizirane z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs. Z imobilizacijo ADH na CMD3-MNPs pri optimalnih pogojih smo izboljšali njeno termično stabilnost pri 20 °C kot tudi pri 40 °C. Medtem ko je prosta ADH pri 20 °C izgubila več kot 70 % svoje začetne aktivnosti, je ADH imobilizirana na CMD3-MNPs ohranila 68,4 % svoje začetne aktivnosti po 24 urah inkubacije. Ko smo temperaturo povišali na 40 °C, se prosta ADH že po 5 urah inkubacije inaktivira, imobilizirana ADH pa je ohranila 80,3 % začetne aktivnosti. Kadar smo na CMD3-MNPs izvedli koimobilizacijo encima ADH in kofaktorja  $\beta$ -NAD smo termično stabilnost imobilizirane ADH proučevali pri 30 °C in 50 °C. Pri obeh temperaturah je prosta ADH ohranila le približno 6 % začetne aktivnosti po 5 urah inkubacije, medtem ko je imobilizirana ADH po 5 urah inkubacije pri 30 °C ohranila 75,4 % začetne aktivnosti, pri 50 °C pa 66,5 % začetne aktivnosti.

Termično stabilni ADH imobilizirano na CMD3-MNPs in ADH koimobilizirano z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs smo skladiščili 21 oz. 22 dni pri temperaturi 4 °C. Obe, imobilizirana ADH in koimobilizirana ADH, sta po 6 dneh skladiščenja pri 4 °C ohranili kar 80 % svoje začetne aktivnosti, nato se je aktivnost postopoma zniževala. Po 14 dneh skladiščenja pri 4 °C sta obe ohranili približno 70 % svoje začetne aktivnosti, po 21 dneh pa sta ohranili 60 % začetne aktivnosti.

V drugem delu drugega sklopa smo proučevali vpliv mrežnega povezovalca GA in amino-donorja PEHA ter kombinacije obeh na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizacije  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs in AMS-MNPs. Najprej smo encim  $\beta$ -GAL imobilizirali na HIT-MNPs z uporabo 1 % (v/v), 1,5 % (v/v) in 2 % (v/v) GA, pri čemer smo najvišjo preostalo aktivnost dosegli pri dodatku 1 % (v/v) GA, le-ta je znašala 42,9 %, učinkovitost imobilizacije pa 83,3 %. Kadar smo pri postopku imobilizacije  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs uporabili amino-donor PEHA za funkcionalizacijo površine nosilca HIT-MNPs, smo najvišjo preostalo aktivnost dosegli pri dodatku 40 % (v/v) PEHA, znašala je 98,2 %, učinkovitost imobilizacije pa 90,8

% . Pri kombinaciji obeh, mrežnega povezovalca GA in amino-donorja PEHA, smo najvišjo preostalo aktivnost imobilizirane  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs dosegli, ko smo dodali 0,5 % (v/v) GA in 30 % (v/v) PEHA. S tem smo dosegli tudi hiperaktivacijo encima, saj je preostala aktivnost imobilizirane  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs znašala kar 128,9 %, učinkovitost imobilizacije pa 89,9 %.

Sledila je študija vpliva dodanega GA in PEHA ter njune kombinacije pri postopku imobilizacije na preostalo aktivnost in učinkovitost imobilizacije  $\beta$ -GAL na AMS-MNPs. Najvišjo preostalo aktivnost smo dosegli z uporabo 2,5 % (v/v) GA (137,7 %). Tudi v tem primeru smo dosegli hiperaktivacijo encima. Učinkovitost imobilizacije je znašala 86,0 %. Do hiperaktivacije encima pride tudi, ko površino AMS-MNPs funkcionaliziramo z amino-donorjem PEHA, pri dodatku 20 % (v/v) dosežemo najvišjo preostalo aktivnost imobilizirane  $\beta$ -GAL na AMS-MNPs (154,4 %), pri dodatku 10 % (v/v) in 30 % (v/v) pa sta preostali aktivnosti  $\beta$ -GAL znašali 136,8 % in 118,0 %. Učinkovitost imobilizacije se ne spreminja veliko, ostaja med 84 % in 86 %. Sledila je imobilizacija encima  $\beta$ -GAL na AMS-MNPs z uporabo kombinacije mrežnega povezovalca in amino-donorja. Nosilec AMS-MNPs smo zamrežili z mrežnim povezovalcem GA, nato pa še funkcionalizirali površino le-tega z dodatnimi amino skupinami (PEHA) ter pri kombinaciji obeh v vseh primerih dosegli hiperaktivacijo imobiliziranega encima  $\beta$ -GAL. Najvišja preostala aktivnost  $\beta$ -GAL je znašala 124,5 % s kombinacijo 2 % (v/v) GA in 30 % (v/v) PEHA, najnižja pa 106,9 % (2,5 % (v/v) v kombinaciji s 30 % (v/v) PEHA)). Učinkovitosti imobilizacije so znašale med 78,7 % in 85,2 %.

## 4 ZAKLJUČEK

Kataliza je osnova vsakega tehnološkega kemijskega procesa, pri čemer so encimi pomembni visoko učinkoviti katalizatorji. Kljub izjemnim katalitičnim lastnostim encimov pa moramo le-te včasih izboljšati, preden so vpeljeni v industrijski proces. Ker industrijski procesi zahtevajo ponovno in večkratno uporabo encimov, lahko z imobilizacijo izboljšamo njihove najpomembnejše lastnosti, kot so stabilnost, aktivnost, selektivnost in specifičnost. Pri večini imobilizacijskih metod encime vežemo na ustrezen nosilec, pri čemer pa k aplikativnosti uporabe nosilca v veliki meri prispeva njegova biokompatibilnost, biorazgradljivost in netoksičnost.

Tako smo v prvem sklopu doktorske disertacije sintetizirali magnetne nanonosilce ter jih modificirali z ustrežno polimerno prevleko iz CMD (CMD-MNPs), ki zagotavlja njihovo biokompatibilnost. Z različnimi analiznimi metodami smo modificirane MNPs karakterizirali. Z analizama FT-IR in TGA smo potrdili prisotnost polimerne prevleke CMD, s SEM in TEM analizo smo določili povprečne velikosti in morfologijo modificiranih CMD-MNPs. Z analizo DLS smo določili povprečne velikosti, porazdelitev velikosti ter hidrodinamični premer in ZP pripravljenih CMD3-MNPs. Z magnetnimi meritvami (EPR in VSM) smo potrdili feromagnetni sistem oz. prisotnost feromagnetnih nanodelcev. Vse karakterizirane lastnosti smo primerjali z neprevlečenimi MNPs. Po zaključeni karakterizaciji smo modificiranim CMD-MNPs določili tudi inhibitorne lastnosti, pri čemer CMD3-MNPs, posedujejo antimikrobne lastnosti, saj je v postopek sinteze dodan organski polimer CMD z najvišjo koncentracijo (0,5 g/mL), ki omogoča biokompatibilnost nanonosilca. Nadalje smo proučili inhibitorne lastnosti še drugim sintetiziranim nanonosilcem, in sicer HIT-MNPs in AMS-MNPs, pri čemer smo inhibitorne učinke na rast mikroorganizmov preverjali na različnih bakterijskih kulturah. Glede na opravljene karakterizacijske analize, kot tudi glede na določene antimikrobne lastnosti, smo za drugi del doktorske disertacije izbrali CMD3-MNPs kot nosilec za imobilizacijo encima ADH.

Drugi sklop doktorske disertacije je zajemal imobilizacijo različnih encimov na modificirane magnetne nosilce. Izvedli smo štiri različne postopke imobilizacije, in sicer: imobilizacijo encima ADH na CMD3-MNPs, koimobilizacijo encima ADH in kofaktorja  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs ter imobilizacijo encima  $\beta$ -GAL na sintetizirane HIT-MNPs in AMS-MNPs.

Pri imobilizaciji encima ADH na CMD3-MNPs smo se najprej lotili funkcionalizacije modificiranih CMD3-MNPs, pri čemer smo uporabili epoksi zamreževalec ECIH, ki zagotavlja aktivne epoksi skupine, na katere se encim ADH lahko veže. Epoksi skupine vežejo hidroksilne skupine na površini modificiranega CMD3-MNPs, s katerim tvorijo močne vezi. Ob tem se encim ADH adsorbira na površino CMD3-MNPs, nato pa se s

hidroksilnimi skupinami encima ADH kovalentno veže na epoksi funkcionalizirano površino CMD3-MNPs. Na tako funkcionalizirane CMD-MNPs smo imobilizirali encim ADH in dosegli 88,4 % preostale aktivnosti imobilizirane ADH na CMD3-MNPs. Nadaljevali smo s študijo vpliva procesnih parametrov na imobilizacijo ADH na CMD3-MNPs. Končne optimirane procesne parametre predstavlja Tabela 4-1.

Tabela 4-1: Optimalni procesni parametri pri imobilizaciji encima ADH

<b>Procesni parameter</b>	<b>Optimalna vrednost procesnega parametra</b>
koncentracija ECIH	4 % (v/v)
temperatura	4 °C
rotacijska hitrost	500 rpm
pH	7,5
čas imobilizacije	2 uri
koncentracija ADH	0,02 mg/mL

Pred optimizacijo procesnih parametrov je imobilizirana ADH na CMD3-MNPs dosegla le 18,2 % preostale aktivnosti. Z ustrezno modifikacijo nosilca, ki zagotavlja najboljšo operativnost imobiliziranega encima smo po končanem optimiranju procesnih parametrov dosegli 89,6 % preostale aktivnosti ADH, kar je dobrih 70 % višja preostala aktivnost kot pred začetkom optimiranja procesnih parametrov za imobilizacijo ADH na CMD3-MNPs (Tabela 4-2).

Tabela 4-2: Preostala aktivnost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs pred in po optimizaciji procesnih parametrov

<b>Preostala aktivnost [%] (pred optimiranjem procesnih parametrov)</b>	<b>Preostala aktivnost [%] (po optimiranju procesnih parametrov)</b>
18,2	89,6

V nadaljevanju smo vpliv procesnih parametrov proučevali še v postopku koimobilizacije encima ADH in kofaktorja  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs, kjer smo s spreminjanjem procesnih parametrov dosegli najvišje preostale aktivnosti imobilizirane ADH. Končne optimalne parametre pri postopku koimobilizacije ADH in  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs prikazuje Tabela 4-3.



Tabela 4-3: Optimalni procesni parametri pri koimobilizaciji encima ADH in kofaktorja  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs

Procesni parameter	Optimalna vrednost procesnega parametra
masa CMD3-MNPs	50 mg
čas funkcionalizacije CMD3-MNPs	2 uri
zaporedje koimobilizacije	kofaktor, encim
čas imobilizacije $\beta$ -NAD	2 uri
koncentracija $\beta$ -NAD	20 mM
čas imobilizacije ADH	4 ure
koncentracija ADH	0,01 mg/mL
temperatura koimobilizacije	22 °C

Pred začetkom optimiranja procesnih parametrov je ADH koimobilizirana z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs dosegla le 3,6 % preostale aktivnosti. Z ustreznimi imobilizacijskimi pogoji smo uspeli preostalo aktivnost koimobilizirane ADH z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs zvišati na 73,3 %. Tudi v procesu optimiranja procesa koimobilizacije nam je preostalo aktivnost ADH uspelo izboljšati za približno 70 % (Tabela 4-4).

Tabela 4-4: Preostala aktivnost ADH koimobilizirane z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs pred in po optimiranju procesnih parametrov

Preostala aktivnost [%] (pred optimiranjem procesnih parametrov)	Preostala aktivnost [%] (po optimiranju procesnih parametrov)
3,6	73,3

S postopkoma imobilizacije in koimobilizacije smo izboljšali operativnost imobiliziranega encima ADH ter pri tem bistveno zvišali preostale aktivnosti imobilizirane ADH in ohranili visoke učinkovitosti imobilizacije. S tem smo dosegli večjo stabilnost imobiliziranega encima v primerjavi s prostim ADH, ki je kljub visoki aktivnosti zelo nestabilen encim, na kar nakazujejo podatki predstavljeni v tabelah Tabela 4-2 in Tabela 4-4. Stabilnejši encim ima tako večjo možnost uporabe v industrijskih procesih. Ključno vlogo pri tem pa ima tudi termična stabilnost encima, zato smo imobilizirano ADH na CMD3-MNPs in

koimobilizirano ADH z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs izpostavili različnim temperaturam in proučili vpliv temperature na preostale aktivnost imobilizirane ADH in učinkovitosti imobilizacije. V primerjavi s prostim encimom ADH je imobilizirana ADH na CMD3-MNPs pri temperaturah 20 °C in 40 °C ohranila kar 80 % svoje začetne aktivnosti po 24 urah inkubacije, koimobilizirana ADH z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs pa približno 75,4 % pri temperaturi 30 °C in 66,5 % pri temperaturi 50 °C po 5 urah inkubacije (Tabela 4-5). Da je imobilizacija bistveno izboljšala stabilnost encima ADH smo dokazali tudi z določenimi preostalimi aktivnostmi imobilizirane in koimobilizirane ADH po skladiščenju pri 4 °C, pri čemer sta obe imobilizirani ADH ohranili slabih 60 % začetne aktivnosti po približno treh tednih skladiščenja pri 4 °C.

Tabela 4-5: Termična stabilnost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs po 24 urah inkubacije pri različnih temperaturah in imobilizirane ADHs koencimom  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs po 5 urah inkubacije pri različnih temperaturah

Vzorec	Preostala aktivnost [%]	
	20 °C (po 24 h)	40 °C (po 24 h)
<b>ADH imobilizirana na CMD3-MNPs</b>	68,4	80,3
prosta ADH	28,3	0,0
	30 °C (po 5 h)	50 °C (po 5 h)
<b>ADH koimobilizirana z <math>\beta</math>-NAD na CMD3-MNPs</b>	75,4	66,5
prosta ADH	6,0	6,8

Prav tako smo prosti, imobilizirani in koimobilizirani ADH določili kinetične parametre, ki jih prikazuje Tabela 4-6.

Tabela 4-6: Kinetični parametri za prosto, imobilizirano in koimobilizirano ADH

ADH	$K_M$ [mM]	$v_{max}$ [ $\mu$ mol/min]
Prosta	141,3	1,22
Imobilizirana	91,3	5,03
Koimobilizirana	182,1	6,77

Nižja vrednost  $K_M$  imobilizirane ADH v primerjavi s prosto in koimobilizirano ADH nakazuje njeno večjo afiniteto do substrata kar pomeni, da smo z optimiziranim imobilizacijskim postopkom, v katerem smo nosilec epoksi funkcionalizirali ter optimirali

procesne parametre, dosegli njeno optimalno vezavno afiniteto do substrata ter tako zagotovili njeno višjo preostalo aktivnost.

Sledila je študija parametrov za imobilizacijo encima  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs in AMS-MNPs. Pri tem smo površino nosilca funkcionalizirali z mrežnim povezovalcem GA in amino-donorjem PEHA. Proučevali smo vpliv posameznega reagenta (GA ali PEHA) ter kombinacijo obeh na preostalo aktivnost imobilizirane  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs in AMS-MNPs. Ker z GA aktiviramo površino nosilca, se encim nanj lahko kovalentno veže. Pri prevelikih koncentracijah pa odvečne količine mrežnega povezovalca blokirajo aktivna prosta mesta na nosilcu, kamor se posledično encim ne more vezati, kar se kaže v zniževanju preostale aktivnosti imobilizirane  $\beta$ -GAL. Tako tudi pri aktiviranju površine nanodelca s PEHA zagotovimo dodatne amino skupine na površini, kamor se encim lahko veže. Optimirane vrednosti dodanega GA in PEHA prikazuje Tabela 4-7.

Tabela 4-7: Najvišje preostale aktivnosti po optimiranih volumskih deležih GA in PEHA pri imobilizaciji  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs in AMS-MNPs

<b>nosilec</b>	<b>GA ali PEHA [v/v]</b>	<b>Preostala aktivnost [%]</b>
<b>HIT-MNPs</b>	1 % GA	42,9
	40 % PEHA	98,2
	0,5 % GA/30 % PEHA	128,9
<b>AMS-MNPs</b>	2,5 % GA	137,7
	20 % PEHA	154,4
	2 % GA/30 % PEHA	124,5

V doktorski disertaciji smo s skrbno načrtovanim procesom sinteze in modifikacije magnetnega nosilca uspeli sintetizirati primeren nanonosilec (CMD3-MNPs), ki zaradi primerne polimerne prevleke CMD poseduje tudi antimikrobne lastnosti, ter ga uporabili za uspešno imobilizacijo encima ADH. Tako modificiran nanodnosilec smo površinsko funkcionalizirali s primernim mrežnim povezovalcem, z epoksidom ECIH, ki zagotavlja uspešno kovalentno vezavo encima ADH na nosilec za dosego najvišje preostale aktivnosti encima. Način imobilizacije na modificiran in funkcionaliziran nanonosilec zagotavlja tudi termično stabilnost imobiliziranega encima pri različnih temperaturah, prav tako se izboljša stabilnost imobilizirane ADH na CMD3-MNPs oz. ADH koimobilizirane z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs pri skladiščenju na 4 °C. Delci CMD3-MNPs izkazujejo inhibitorne lastnosti na rast nekaterih mikroorganizmov, kar nakazuje na antimikrobne lastnosti visoko funkcionaliziranega CMD3-MNPs, medtem ko pri ostalih CMD1-MNPs, CMD2-MNPs, HIT-MNPs in AMS-MNPs inhibicije nismo zaznali.

Z ustreznim optimiranjem volumskih deležev mrežnega povezovalca GA in amino-donorja PEHA smo dosegli hiperaktivacijo imobiliziranega encima, pri čemer smo dosegli visoko aktivni in stabilni imobilizirani obliki  $\beta$ -GAL ( $\beta$ -GAL na HIT-MNPs in  $\beta$ -GAL na AMS-MNPs).

V sklopu doktorske disertacije smo sintetizirali in modificirali nanonosilec, ki je visoko funkcionalen in izkazuje antimikrobne lastnosti. Prav tako smo optimirali imobilizacijske postope različnih nosilcev z različnimi encimi (ADH imobilizirano na CMD3-MNPs, ADH koimobilizirano z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs,  $\beta$ -GAL imobilizirano na HIT-MNPs in  $\beta$ -GAL imobilizirano na AMS-MNPs) ter jih tako stabilizirali, da dosegajo visoko aktivnost in učinkovitost imobilizacije in so primerni za uporabo v najrazličnejših industrijskih procesih.

## 5 Literatura

- [1] L. Zhang, T.J. Webster, Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration, *Nano Today*. 4 (2009) 66–80. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2008.10.014>.
- [2] A. Banerjee, R. Bandopadhyay, Use of dextran nanoparticle: A paradigm shift in bacterial exopolysaccharide based biomedical applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 87 (2016) 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.059>.
- [3] A. Akbarzadeh, M. Samiei, S. Davaran, Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine, *Nanoscale Res. Lett.* 7 (2012) 144. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-144>.
- [4] S. Behrens, I. Appel, Magnetic nanocomposites, *Curr. Opin. Biotechnol.* 39 (2016) 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.005>.
- [5] M. Koneracká, P. Kopčanský, M. Timko, C.N. Ramchand, A. de Sequeira, M. Trevan, Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 18 (2002) 13–18. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00016-4](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00016-4).
- [6] R.V. Mehta, R.V. Upadhyay, S.W. Charles, C.N. Ramchand, Direct binding of protein to magnetic particles, *Biotechnol. Tech.* 11 (1997) 493–496. <https://doi.org/10.1023/A:1018457915380>.
- [7] V. Binhi, Do naturally occurring magnetic nanoparticles in the human body mediate increased risk of childhood leukaemia with EMF exposure?, *Int. J. Radiat. Biol.* 84 (2008) 569–579. <https://doi.org/10.1080/09553000802195323>.
- [8] V. Valdiglesias, N. Fernández-Bertólez, G. Kiliç, C. Costa, S. Costa, S. Fraga, M.J. Bessa, E. Pávaro, J.P. Teixeira, B. Laffon, Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 38 (2016) 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.03.017>.
- [9] D. Yarosh, J. Klein, J. Kibitel, L. Alas, A. O'Connor, B. Cummings, D. Grob, D. Gerstein, B.A. Gilchrest, M. Ichihashi, M. Ogoshi, M. Ueda, V. Fernandez, C. Chadwick, C.S. Potten, C.M. Proby, A.R. Young, J.L. Hawk, Enzyme therapy of xeroderma pigmentosum: safety and efficacy testing of T4N5 liposome lotion containing a prokaryotic DNA repair enzyme, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 12 (1996) 122–130.
- [10] J.W. Loh, G. Yeoh, M. Saunders, L.-Y. Lim, Uptake and cytotoxicity of chitosan nanoparticles in human liver cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 249 (2010) 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.08.029>.
- [11] M. Leitgeb, K. Heržič, G.H. Podrepšek, A. Hojski, A. Crnjac, Z. Knez, Toxicity of magnetic chitosan micro and nanoparticles as carriers for biologically active substances, *Acta Chim. Slov.* 61 (2014) 145–152.
- [12] N.S. Remya, S. Syama, A. Sabareeswaran, P.V. Mohanan, Toxicity, toxicokinetics and biodistribution of dextran stabilized Iron oxide Nanoparticles for biomedical applications, *Int. J. Pharm.* 511 (2016) 586–598. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.119>.
- [13] T.K. Jain, M.K. Reddy, M.A. Morales, D.L. Leslie-Pelecky, V. Labhasetwar, Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Rats, *Mol. Pharm.* 5 (2008) 316–327. <https://doi.org/10.1021/mp7001285>.

- [14] L.H. Reddy, J.L. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur, Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications, *Chem. Rev.* 112 (2012) 5818–5878. <https://doi.org/10.1021/cr300068p>.
- [15] H. Markides, M. Rotherham, A.J. El Haj, Biocompatibility and Toxicity of Magnetic Nanoparticles in Regenerative Medicine, *J. Nanomater.* 2012 (2012) 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/614094>.
- [16] G. Liu, J. Gao, H. Ai, X. Chen, Applications and Potential Toxicity of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles, *Small.* 9 (2013) 1533–1545. <https://doi.org/10.1002/sml.201201531>.
- [17] S. Mallakpour, M. Madani, A review of current coupling agents for modification of metal oxide nanoparticles, *Prog. Org. Coat.* 86 (2015) 194–207. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2015.05.023>.
- [18] T. Marín, P. Montoya, O. Arnache, J. Calderón, Influence of Surface Treatment on Magnetic Properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Synthesized by Electrochemical Method, *J. Phys. Chem. B.* 120 (2016) 6634–6645. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b01796>.
- [19] M.J. Masarudin, S.M. Cutts, B.J. Evison, D.R. Phillips, P.J. Pigram, Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer drug delivery: application to the passive encapsulation of [<sup>14</sup>C]-doxorubicin, *Nanotechnol. Sci. Appl.* 8 (2015) 67–80. <https://doi.org/10.2147/NSA.S91785>.
- [20] B. Issa, I.M. Obaidat, B.A. Albiss, Y. Haik, Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 21266–21305. <https://doi.org/10.3390/ijms141121266>.
- [21] C. Barrera, A. Herrera, Y. Zayas, C. Rinaldi, Surface modification of magnetite nanoparticles for biomedical applications, *J. Magn. Magn. Mater.* 321 (2009) 1397–1399. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2009.02.046>.
- [22] F. Šulek, M. Drofenik, M. Habulin, Ž. Knez, Surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles for covalent attachment of cholesterol oxidase, *J. Magn. Magn. Mater.* 322 (2010) 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2009.07.075>.
- [23] A. Ali, S. Ahmed, A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery, *Int. J. Biol. Macromol.* 109 (2018) 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078>.
- [24] C. Saikia, A. Hussain, A. Ramteke, H.K. Sharma, T.K. Maji, Crosslinked thiolated starch coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles: Effect of montmorillonite and crosslinking density on drug delivery properties, *Starch - Stärke.* 66 (2014) 760–771. <https://doi.org/10.1002/star.201300277>.
- [25] S. Shah, A. Sharma, M.N. Gupta, Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder, *Anal. Biochem.* 351 (2006) 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.028>.
- [26] A. Bar-Shir, L. Avram, S. Yariv-Shoushan, D. Anaby, S. Cohen, N. Segev-Amzaleg, D. Frenkel, O. Sadan, D. Offen, Y. Cohen, Alginate-coated magnetic nanoparticles for noninvasive MRI of extracellular calcium, *NMR Biomed.* 27 (2014) 774–783. <https://doi.org/10.1002/nbm.3117>.
- [27] M. Yu, S. Huang, K.J. Yu, A.M. Clyne, Dextran and polymer polyethylene glycol (PEG) coating reduce both 5 and 30 nm iron oxide nanoparticle cytotoxicity in 2D and 3D cell culture, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 5554–5570. <https://doi.org/10.3390/ijms13055554>.
- [28] J.C. Santos, A.V. Paula, G.F.M. Nunes, H.F. de Castro, Pseudomonas fluorescens lipase immobilization on polysiloxane–polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 52–53 (2008) 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.11.005>.

- [29] Y. Zhang, N. Kohler, M. Zhang, Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake, *Biomaterials*. 23 (2002) 1553–1561. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00267-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00267-8).
- [30] H. Bai, Z. Liu, D.D. Sun, Highly water soluble and recovered dextran coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for brackish water desalination, *Sep. Purif. Technol.* 81 (2011) 392–399. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.08.007>.
- [31] K. Siposova, K. Pospiskova, Z. Bednarikova, I. Safarik, M. Safarikova, M. Kubovcikova, P. Kopcansky, Z. Gazova, The molecular mass of dextran used to modify magnetite nanoparticles affects insulin amyloid aggregation, *J. Magn. Mater.* 427 (2017) 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.10.083>.
- [32] M. Creixell, A.P. Herrera, M. Latorre-Esteves, V. Ayala, M. Torres-Lugo, C. Rinaldi, The effect of grafting method on the colloidal stability and in vitro cytotoxicity of carboxymethyl dextran coated magnetic nanoparticles, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 8539–8547. <https://doi.org/10.1039/C0JM01504K>.
- [33] V.L. Sirisha, A. Jain, A. Jain, Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes, in: B.-A. in F. and N. Research (Ed.), Academic Press, n.d. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043452616300377> (accessed September 9, 2016).
- [34] F. Hildebrand, S. Lütz, Immobilisation of alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* and its application in a plug-flow reactor, *Tetrahedron Asymmetry*. 17 (2006) 3219–3225. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2006.11.013>.
- [35] C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>.
- [36] V. Ayala, A.P. Herrera, M. Latorre-Esteves, M. Torres-Lugo, C. Rinaldi, Effect of surface charge on the colloidal stability and in vitro uptake of carboxymethyl dextran-coated iron oxide nanoparticles, *J. Nanoparticle Res.* 15 (2013) 1874–1898. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1874-0>.
- [37] R. DiCosimo, J. McAuliffe, A.J. Poulouse, G. Bohlmann, Industrial use of immobilized enzymes, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6437–6474. <https://doi.org/10.1039/c3cs35506c>.
- [38] R.C. Rodrigues, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernández-Lafuente, Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6290–6307. <https://doi.org/10.1039/c2cs35231a>.
- [39] M.M. Barsan, C.M.A. Brett, Recent advances in layer-by-layer strategies for biosensors incorporating metal nanoparticles, *TrAC Trends Anal. Chem.* 79 (2016) 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.019>.
- [40] M. Bilgi, E. Ayranci, Biosensor application of screen-printed carbon electrodes modified with nanomaterials and a conducting polymer: Ethanol biosensors based on alcohol dehydrogenase, *Sens. Actuators B Chem.* 237 (2016) 849–855. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.06.164>.
- [41] P.-J. Chien, T. Suzuki, M. Tsujii, M. Ye, K. Toma, T. Arakawa, Y. Iwasaki, K. Mitsubayashi, Bio-sniffer (gas-phase biosensor) with secondary alcohol dehydrogenase (S-ADH) for determination of isopropanol in exhaled air as a potential volatile biomarker, *Biosens. Bioelectron.* 91 (2017) 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.050>.
- [42] F. Campanhã Vicentini, L.L.C. Garcia, L.C.S. Figueiredo-Filho, B.C. Janegitz, O. Fatibello-Filho, A biosensor based on gold nanoparticles, dihexadecylphosphate, and

- tyrosinase for the determination of catechol in natural water, *Enzyme Microb. Technol.* 84 (2016) 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.12.004>.
- [43] T. Iype, J. Thomas, S. Mohan, K.K. Johnson, L.E. George, L.A. Ambattu, A. Bhati, K. Ailsworth, B. Menon, S.M. Rayabandla, R.A. Jesudasan, S. Santhosh, C.N. Ramchand, A novel method for immobilization of proteins via entrapment of magnetic nanoparticles through epoxy cross-linking, *Anal. Biochem.* 519 (2017) 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.007>.
- [44] P. Torres, F. Batista-Viera, Improved biocatalysts based on *Bacillus circulans*  $\beta$ -galactosidase immobilized onto epoxy-activated acrylic supports: Applications in whey processing, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 83 (2012) 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.07.004>.
- [45] X.-P. Jiang, T.-T. Lu, C.-H. Liu, X.-M. Ling, M.-Y. Zhuang, J.-X. Zhang, Y.-W. Zhang, Immobilization of dehydrogenase onto epoxy-functionalized nanoparticles for synthesis of (R)-mandelic acid, *Int. J. Biol. Macromol.* 88 (2016) 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.031>.
- [46] R.M. Cornell, U. Schwertmann, *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, John Wiley & Sons, 2003.
- [47] Introduction to the Iron Oxides, in: *Iron Oxides*, Wiley-Blackwell, 2004: pp. 1–7. <https://doi.org/10.1002/3527602097.ch1>.
- [48] *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, 2nd, Completely Revised and Extended Edition, Wiley.Com. (n.d.). <https://www.wiley.com/en-us/The+Iron+Oxides%3A+Structure%2C+Properties%2C+Reactions%2C+Occurrences+and+Uses%2C+2nd%2C+Completely+Revised+and+Extended+Edition-p-9783527606443> (accessed September 11, 2018).
- [49] L. Mohammed, H.G. Goma, D. Ragab, J. Zhu, Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review, *Particuology.* (n.d.). <https://doi.org/10.1016/j.partic.2016.06.001>.
- [50] A.S. Teja, P.-Y. Koh, Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* 55 (2009) 22–45. <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2008.08.003>.
- [51] K. Haneda, A.H. Morrish, Vacancy ordering in  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> small particles, *Solid State Commun.* 22 (1977) 779–782. [https://doi.org/10.1016/0038-1098\(77\)90067-9](https://doi.org/10.1016/0038-1098(77)90067-9).
- [52] E. Kuchma, S. Kubrin, A. Soldatov, The Local Atomic Structure of Colloidal Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Theranostics in Oncology, *Biomedicines.* 6 (2018) 78. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6030078>.
- [53] J.D.G. Durán, J.L. Arias, V. Gallardo, A.V. Delgado, Magnetic Colloids As Drug Vehicles, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2948–2983. <https://doi.org/10.1002/jps.21249>.
- [54] J.L. Arias, V. Gallardo, F. Linares-Moliner, A.V. Delgado, Preparation and characterization of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) core/shell nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.* 299 (2006) 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.03.005>.
- [55] J.L. Arias, V. Gallardo, S.A. Gómez-Lopera, A.V. Delgado, Loading of 5-Fluorouracil to Poly(ethyl-2-cyanoacrylate) Nanoparticles with a Magnetic Core, (2005). <https://doi.org/info:doi/10.1166/jbn.2005.029>.
- [56] J.L. Arias, V. Gallardo, M.A. Ruiz, Á.V. Delgado, Magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles as 5-Fluorouracil delivery systems for active targeting, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.11.002>.



- [57] J.L. Arias, L.H. Reddy, P. Couvreur, Magneto-responsive Squalenoyl Gemcitabine Composite Nanoparticles for Cancer Active Targeting, *Langmuir*. 24 (2008) 7512–7519. <https://doi.org/10.1021/la800547s>.
- [58] J. Estelrich, E. Escribano, J. Queralto, M.A. Busquets, Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically-Guided and Magnetically-Responsive Drug Delivery, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 8070–8101. <https://doi.org/10.3390/ijms16048070>.
- [59] R.H. Kodama, Magnetic nanoparticles, *J. Magn. Magn. Mater.* 200 (1999) 359–372. [https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(99\)00347-9](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(99)00347-9).
- [60] R.V. Mehta, Synthesis of magnetic nanoparticles and their dispersions with special reference to applications in biomedicine and biotechnology, *Mater. Sci. Eng. C*. 79 (2017) 901–916. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.135>.
- [61] M. Bele, G. Hribar, S. Čampelj, D. Makovec, V. Gaberc-Porekar, M. Zorko, M. Gaberšček, J. Jamnik, P. Venturini, Zinc-decorated silica-coated magnetic nanoparticles for protein binding and controlled release, *J. Chromatogr. B*. 867 (2008) 160–164. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.03.019>.
- [62] A.K. Andriola Silva, R. Di Corato, F. Gazeau, T. Pellegrino, C. Wilhelm, Magnetophoresis at the nanoscale: tracking the magnetic targeting efficiency of nanovectors, *Nanomed.* 7 (2012) 1713–1727. <https://doi.org/10.2217/nmm.12.40>.
- [63] B.F. Grzeškowiak, Y. Sánchez-Antequera, E. Hammerschmid, M. Döblinger, D. Eberbeck, A. Woźniak, R. Słomski, C. Plank, O. Mykhaylyk, Nanomagnetic activation as a way to control the efficacy of nucleic acid delivery, *Pharm. Res.* 32 (2015) 103–121. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1448-6>.
- [64] E. Tombácz, R. Turcu, V. Socoliuc, L. Vékás, Magnetic iron oxide nanoparticles: Recent trends in design and synthesis of magneto-responsive nanosystems, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 468 (2015) 442–453. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.030>.
- [65] V. Socoliuc, L. Vékás, R. Turcu, Magnetically induced phase condensation in an aqueous dispersion of magnetic nanogels, *Soft Matter*. 9 (2013) 3098–3105. <https://doi.org/10.1039/C2SM27262H>.
- [66] C. Sun, J.S.H. Lee, M. Zhang, Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1252–1265. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.018>.
- [67] W. Wu, Q. He, C. Jiang, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies, *Nanoscale Res. Lett.* 3 (2008) 397–415. <https://doi.org/10.1007/s11671-008-9174-9>.
- [68] R. Massart, Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media, *IEEE Trans. Magn.* 17 (1981) 1247–1248. <https://doi.org/10.1109/TMAG.1981.1061188>.
- [69] J.-H. Wu, S.P. Ko, H.-L. Liu, S. Kim, J.-S. Ju, Y.K. Kim, Sub 5 nm magnetite nanoparticles: Synthesis, microstructure, and magnetic properties, *Mater. Lett.* 61 (2007) 3124–3129. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.11.032>.
- [70] L. Vayssières, C. Chanéac, E. Tronc, J.P. Jolivet, Size Tailoring of Magnetite Particles Formed by Aqueous Precipitation: An Example of Thermodynamic Stability of Nanometric Oxide Particles, *J. Colloid Interface Sci.* 205 (1998) 205–212. <https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5614>.
- [71] H. Beygi, A. Babakhani, Microemulsion synthesis and magnetic properties of Fe<sub>x</sub>Ni<sub>(1-x)</sub> alloy nanoparticles, *J. Magn. Magn. Mater.* 421 (2017) 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.07.071>.

- [72] A.B. Chin, I.I. Yaacob, Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure, *J. Mater. Process. Technol.* 191 (2007) 235–237. <https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2007.03.011>.
- [73] B. Demirkurt, G. Cakan-Akdogan, Y. Akdogan, Preparation of albumin nanoparticles in water-in-ionic liquid microemulsions, *J. Mol. Liq.* 295 (2019) 111713. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111713>.
- [74] G.H. Podrepšek, Ž. Knez, M. Leitgeb, Different preparation methods and characterization of magnetic maghemite coated with chitosan, *J. Nanoparticle Res.* 15 (2013) 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1751-x>.
- [75] F. Chen, Q. Gao, G. Hong, J. Ni, Synthesis and characterization of magnetite dodecahedron nanostructure by hydrothermal method, *J. Magn. Mater.* 320 (2008) 1775–1780. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2008.02.117>.
- [76] L. Cabrera, S. Gutierrez, N. Menendez, M.P. Morales, P. Herrasti, Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization, *Electrochimica Acta.* 53 (2008) 3436–3441. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.12.006>.
- [77] N. Enomoto, J. Akagi, Z. Nakagawa, Sonochemical powder processing of iron hydroxides, *Ultrason. Sonochem.* 3 (1996) S97–S103. [https://doi.org/10.1016/1350-1477\(96\)00009-3](https://doi.org/10.1016/1350-1477(96)00009-3).
- [78] H. Itoh, T. Sugimoto, Systematic control of size, shape, structure, and magnetic properties of uniform magnetite and maghemite particles, *J. Colloid Interface Sci.* 265 (2003) 283–295. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00511-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00511-3).
- [79] Y. Amemiya, A. Arakaki, S.S. Staniland, T. Tanaka, T. Matsunaga, Controlled formation of magnetite crystal by partial oxidation of ferrous hydroxide in the presence of recombinant magnetotactic bacterial protein Mms6, *Biomaterials.* 28 (2007) 5381–5389. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.051>.
- [80] G. Salazar-Alvarez, M. Muhammed, A.A. Zagorodni, Novel flow injection synthesis of iron oxide nanoparticles with narrow size distribution, *Chem. Eng. Sci.* 61 (2006) 4625–4633. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2006.02.032>.
- [81] U.T. Lam, R. Mammucari, K. Suzuki, N.R. Foster, Processing of Iron Oxide Nanoparticles by Supercritical Fluids, *Ind. Eng. Chem. Res.* 47 (2008) 599–614. <https://doi.org/10.1021/ie070494+>.
- [82] M. Abu Bakar, W.L. Tan, N.H.H. Abu Bakar, A simple synthesis of size-reduce magnetite nano-crystals via aqueous to toluene phase-transfer method, *J. Magn. Mater.* 314 (2007) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2007.01.018>.
- [83] J.G. King, W. Williams, C.D.W. Wilkinson, S. McVitie, J.N. Chapman, Magnetic properties of magnetite arrays produced by the method of electron beam lithography, *Geophys. Res. Lett.* 23 (1996) 2847–2850. <https://doi.org/10.1029/96GL01371>.
- [84] S.A. Rishton, Y. Lu, R.A. Altman, A.C. Marley, X.P. Bian, C. Jahnes, R. Viswanathan, G. Xiao, W.J. Gallagher, S.S.P. Parkin, Magnetic tunnel junctions fabricated at tenth-micron dimensions by electron beam lithography, *Microelectron. Eng.* 35 (1997) 249–252. [https://doi.org/10.1016/S0167-9317\(96\)00107-4](https://doi.org/10.1016/S0167-9317(96)00107-4).
- [85] C.S. Lee, H. Lee, R.M. Westervelt, Microelectromagnets for the control of magnetic nanoparticles, *Appl. Phys. Lett.* 79 (2001) 3308–3310. <https://doi.org/10.1063/1.1419049>.
- [86] S. Mathur, S. Barth, U. Werner, F. Hernandez-Ramirez, A. Romano-Rodriguez, Chemical Vapor Growth of One-dimensional Magnetite Nanostructures, *Adv. Mater.* 20 (2008) 1550–1554. <https://doi.org/10.1002/adma.200701448>.
- [87] B.R. Cuenya, Synthesis and catalytic properties of metal nanoparticles: Size, shape, support, composition, and oxidation state effects, *Thin Solid Films.* 518 (2010) 3127–3150. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2010.01.018>.

- [88] C.T. Fleaca, M. Scarisoreanu, I. Morjan, R. Alexandrescu, F. Dumitrache, C. Luculescu, I.P. Morjan, R. Birjega, A.-M. Niculescu, G. Filoti, V. Kuncser, E. Vasile, V. Danciu, M. Popa, Recent progress in the synthesis of magnetic titania/iron-based, composite nanoparticles manufactured by laser pyrolysis, *Appl. Surf. Sci.* 302 (2014) 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.10.138>.
- [89] L. Franzel, M.F. Bertino, Z.J. Huba, E.E. Carpenter, Synthesis of magnetic nanoparticles by pulsed laser ablation, *Appl. Surf. Sci.* 261 (2012) 332–336. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.08.010>.
- [90] G. Han, D. Chen, X. Li, Synthesis and catalytic performance of antimony trioxide nanoparticles by ultrasonic-assisted solid-liquid reaction ball milling, *Adv. Powder Technol.* 28 (2017) 1136–1140. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2017.01.019>.
- [91] T. González-Carreño, M.P. Morales, M. Gracia, C.J. Serna, Preparation of uniform  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles with nanometer size by spray pyrolysis, *Mater. Lett.* 18 (1993) 151–155. [https://doi.org/10.1016/0167-577X\(93\)90116-F](https://doi.org/10.1016/0167-577X(93)90116-F).
- [92] M.A. Quinteros, J.O. Bonilla, S.V. Alborés, L.B. Villegas, P.L. Páez, Biogenic nanoparticles: Synthesis, stability and biocompatibility mediated by proteins of *Pseudomonas aeruginosa*, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 184 (2019) 110517. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110517>.
- [93] K.B. Narayanan, N. Sakthivel, Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes, *Adv. Colloid Interface Sci.* 156 (2010) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.02.001>.
- [94] S. Mahanty, M. Bakshi, S. Ghosh, T. Gaine, S. Chatterjee, S. Bhattacharyya, S. Das, P. Das, P. Chaudhuri, Mycosynthesis of iron oxide nanoparticles using manglicolous fungi isolated from Indian sundarbans and its application for the treatment of chromium containing solution: Synthesis, adsorption isotherm, kinetics and thermodynamics study, *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.* 12 (2019) 100276. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2019.100276>.
- [95] A.F.V. da Silva, A.P. Fagundes, D.L.P. Macuvele, E.F.U. de Carvalho, M. Durazzo, N. Padoin, C. Soares, H.G. Riella, Green synthesis of zirconia nanoparticles based on *Euclea natalensis* plant extract: Optimization of reaction conditions and evaluation of adsorptive properties, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 583 (2019) 123915. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123915>.
- [96] A. Ali, H. Zafar, M. Zia, I. Ul Haq, A.R. Phull, J.S. Ali, A. Hussain, Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles, *Nanotechnol. Sci. Appl.* 9 (2016) 49–67. <https://doi.org/10.2147/NSA.S99986>.
- [97] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R.N. Muller, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2064–2110. <https://doi.org/10.1021/cr068445e>.
- [98] J.L. Gunjekar, A.M. More, V.R. Shinde, C.D. Lokhande, Synthesis of nanocrystalline nickel ferrite (NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) thin films using low temperature modified chemical method, *J. Alloys Compd.* 465 (2008) 468–473. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2007.10.130>.
- [99] C. Sangregorio, J.K. Wiemann, C.J. O'Connor, Z. Rosenzweig, A new method for the synthesis of magnetoliposomes, *J. Appl. Phys.* 85 (1999) 5699–5701. <https://doi.org/10.1063/1.370256>.
- [100] W. Jiang, H.C. Yang, S.Y. Yang, H.E. Horng, J.C. Hung, Y.C. Chen, C.-Y. Hong, Preparation and properties of superparamagnetic nanoparticles with narrow size distribution and biocompatible, *J. Magn. Mater.* 283 (2004) 210–214. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2004.05.022>.

- [101] M. Tajabadi, M.E. Khosroshahi, Effect of Alkaline Media Concentration and Modification of Temperature on Magnetite Synthesis Method Using FeSO<sub>4</sub>/NH<sub>4</sub>OH, *Int. J. Chem. Eng. Appl.* (2012) 206–210. <https://doi.org/10.7763/IJCEA.2012.V3.187>.
- [102] A.K. Gupta, S. Wells, Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies, *IEEE Trans. NanoBioscience.* 3 (2004) 66–73. <https://doi.org/10.1109/TNB.2003.820277>.
- [103] D. Maity, D.C. Agrawal, Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media, *J. Magn. Mater.* 308 (2007) 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.05.001>.
- [104] S.J.H. Soenen, U. Himmelreich, N. Nuytten, T.R. Pisanic, A. Ferrari, M. De Cuyper, Intracellular nanoparticle coating stability determines nanoparticle diagnostics efficacy and cell functionality, *Small* 6 (2010) 2136–2145. <https://doi.org/10.1002/sml.201000763>.
- [105] T. Xia, J. Wang, C. Wu, F. Meng, Z. Shi, J. Lian, J. Feng, J. Meng, Novel complex-coprecipitation route to form high quality triethanolamine-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocrystals: Their high saturation magnetizations and excellent water treatment properties, *CrystEngComm.* 14 (2012) 5741–5744. <https://doi.org/10.1039/C2CE25813G>.
- [106] C. Hui, C. Shen, J. Tian, L. Bao, H. Ding, C. Li, Y. Tian, X. Shi, H.-J. Gao, Core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> nanoparticles synthesized with well-dispersed hydrophilic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> seeds, *Nanoscale.* 3 (2011) 701–705. <https://doi.org/10.1039/c0nr00497a>.
- [107] S.-N. Sun, C. Wei, Z.-Z. Zhu, Y.-L. Hou, S.S. Venkatraman, Z.-C. Xu, Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications, *Chin. Phys. B.* 23 (2014) 037503. <https://doi.org/10.1088/1674-1056/23/3/037503>.
- [108] K. Petcharoen, A. Sirivat, Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method, *Mater. Sci. Eng. B.* 177 (2012) 421–427. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2012.01.003>.
- [109] S.J.H. Soenen, A.R. Brisson, M. De Cuyper, Addressing the problem of cationic lipid-mediated toxicity: the magnetoliposome model, *Biomaterials.* 30 (2009) 3691–3701. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.03.040>.
- [110] T. Tepper, F. Ilievski, C.A. Ross, T.R. Zaman, R.J. Ram, S.Y. Sung, B.J.H. Stadler, Magneto-optical properties of iron oxide films, *J. Appl. Phys.* 93 (2003) 6948–6950. <https://doi.org/10.1063/1.1540033>.
- [111] A.K. Gupta, M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials.* 26 (2005) 3995–4021. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012>.
- [112] Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Third Edition, Elsevier Inc., Oxford, UK, n.d. <https://www.elsevier.com/books/bioconjugate-techniques/hermanson/978-0-12-382239-0> (accessed October 31, 2019).
- [113] Y. Sahoo, A. Goodarzi, M.T. Swihart, T.Y. Ohulchanskyy, N. Kaur, E.P. Furlani, P.N. Prasad, Aqueous ferrofluid of magnetite nanoparticles: Fluorescence labeling and magnetophoretic control, *J. Phys. Chem. B.* 109 (2005) 3879–3885. <https://doi.org/10.1021/jp045402y>.
- [114] R.E. Rosensweig, R. Kaiser, G. Miskolczy, Viscosity of magnetic fluid in a magnetic field, *J. Colloid Interface Sci.* 29 (1969) 680–686. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(69\)90220-3](https://doi.org/10.1016/0021-9797(69)90220-3).
- [115] R. Tadmor, R.E. Rosensweig, J. Frey, J. Klein, Resolving the Puzzle of Ferrofluid Dispersants, *Langmuir.* 16 (2000) 9117–9120. <https://doi.org/10.1021/la0009137>.
- [116] M.H. Sousa, J.C. Rubim, P.G. Sobrinho, F.A. Tourinho, Biocompatible magnetic fluid precursors based on aspartic and glutamic acid modified maghemite nanostructures,

- J. Magn. Mater. 225 (2001) 67–72. [https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(00\)01229-4](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(00)01229-4).
- [117] P.C. Morais, A.C. Oliveira, A.L. Tronconi, T. Goetze, N. Buske, Photoacoustic spectroscopy: a promising technique to investigate magnetic fluids, *IEEE Trans. Magn.* 39 (2003) 2654–2656. <https://doi.org/10.1109/TMAG.2003.815544>.
- [118] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, E. Duguet, Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 2161–2175. <https://doi.org/10.1039/B402025A>.
- [119] J. Xie, C.-H. Wang, Self-assembled biodegradable nanoparticles developed by direct dialysis for the delivery of paclitaxel, *Pharm. Res.* 22 (2005) 2079–2090. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-7782-y>.
- [120] S.S. Banerjee, D.-H. Chen, Magnetic Nanoparticles Grafted with Cyclodextrin for Hydrophobic Drug Delivery, *Chem. Mater.* 19 (2007) 6345–6349. <https://doi.org/10.1021/cm702278u>.
- [121] Y. Hou, H. Kondoh, M. Shimojo, E.O. Sako, N. Ozaki, T. Kogure, T. Ohta, Inorganic nanocrystal self-assembly via the inclusion interaction of beta-cyclodextrins: toward 3D spherical magnetite, *J. Phys. Chem. B.* 109 (2005) 4845–4852. <https://doi.org/10.1021/jp0476646>.
- [122] D. Bonacchi, A. Caneschi, D. Dorignac, A. Falqui, D. Gatteschi, D. Rovai, C. Sangregorio, R. Sessoli, Nanosized Iron Oxide Particles Entrapped in Pseudo-Single Crystals of  $\gamma$ -Cyclodextrin, *Chem. Mater.* 16 (2004) 2016–2020. <https://doi.org/10.1021/cm034948e>.
- [123] M. Polichetti, M. Modestino, A. Galluzzi, S. Pace, M. Iuliano, P. Ciambelli, M. Sarno, Influence of citric acid and oleic acid coating on the dc magnetic properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles, *Mater. Today Proc.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.08.152>.
- [124] M.S.A. Darwish, Effect of carriers on heating efficiency of oleic acid-stabilized magnetite nanoparticles, *J. Mol. Liq.* 231 (2017) 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.01.094>.
- [125] M. Gajšek, U. Jančič, K. Vasić, Ž. Knez, M. Leitgeb, Enhanced activity of immobilized transglutaminase for cleaner production technologies, *J. Clean. Prod.* 240 (2019) 118218. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118218>.
- [126] X.-C. Shen, X.-Z. Fang, Y.-H. Zhou, H. Liang, Synthesis and Characterization of 3-Aminopropyltriethoxysilane-Modified Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles, *Chem. Lett.* 33 (2004) 1468–1469. <https://doi.org/10.1246/cl.2004.1468>.
- [127] M. Ma, Y. Zhang, W. Yu, H. Shen, H. Zhang, N. Gu, Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 212 (2003) 219–226. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00305-9](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00305-9).
- [128] Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2nd Edition, Elsevier Inc., Oxford, UK, n.d. <https://www.elsevier.com/books/bioconjugate-techniques/hermanson/978-0-12-370501-3> (accessed November 2, 2019).
- [129] C.C. Berry, S. Wells, S. Charles, A.S.G. Curtis, Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro, *Biomaterials.* 24 (2003) 4551–4557. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00237-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00237-0).
- [130] M. Mikhaylova, D.K. Kim, N. Bobrysheva, M. Osmolowsky, V. Semenov, T. Tsakalakos, M. Muhammed, Superparamagnetism of magnetite nanoparticles: dependence on surface modification, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids.* 20 (2004) 2472–2477. <https://doi.org/10.1021/la035648e>.

- [131] M. Carmen Bautista, O. Bomati-Miguel, M. del Puerto Morales, C.J. Serna, S. Veintemillas-Verdaguer, Surface characterisation of dextran-coated iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis and coprecipitation, *J. Magn. Mater.* 293 (2005) 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.01.038>.
- [132] D.K. Kim, M. Mikhaylova, F.H. Wang, J. Kehr, B. Bjelke, Y. Zhang, T. Tsakalakos, M. Muhammed, Starch-Coated Superparamagnetic Nanoparticles as MR Contrast Agents, *Chem. Mater.* 15 (2003) 4343–4351. <https://doi.org/10.1021/cm031104m>.
- [133] B. Gaihre, S. Aryal, M.S. Khil, H.Y. Kim, Encapsulation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> in gelatin nanoparticles: effect of different parameters on size and stability of the colloidal dispersion, *J. Microencapsul.* 25 (2008) 21–30. <https://doi.org/10.1080/02652040701737697>.
- [134] T. Yonezawa, K. Kamoshita, M. Tanaka, T. Kinoshita, Easy Preparation of Stable Iron Oxide Nanoparticles Using Gelatin as Stabilizing Molecules, *Jpn. J. Appl. Phys.* 47 (2008) 1389. <https://doi.org/10.1143/JJAP.47.1389>.
- [135] L. Barbosa-Barros, S. García-Jimeno, J. Estelrich, Formation and characterization of biobased magnetic nanoparticles double coated with dextran and chitosan by layer-by-layer deposition, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 450 (2014) 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.03.004>.
- [136] H.-J. Chen, Z.-H. Zhang, L.-J. Luo, S.-Z. Yao, Surface-imprinted chitosan-coated magnetic nanoparticles modified multi-walled carbon nanotubes biosensor for detection of bovine serum albumin, *Sens. Actuators B Chem.* 163 (2012) 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.01.010>.
- [137] S. Mondini, S. Cenedese, G. Marinoni, G. Molteni, N. Santo, C.L. Bianchi, A. Ponti, One-step synthesis and functionalization of hydroxyl-decorated magnetite nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.* 322 (2008) 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.03.008>.
- [138] K.G. Paul, T.B. Frigo, J.Y. Groman, E.V. Groman, Synthesis of Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides Using Reduced Polysaccharides, *Bioconjug. Chem.* 15 (2004) 394–401. <https://doi.org/10.1021/bc034194u>.
- [139] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, J.C. Murray, Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice, *Pharmacol. Rev.* 53 (2001) 283–318.
- [140] H. Pardoe, W. Chua-anusorn, T.G. St. Pierre, J. Dobson, Structural and magnetic properties of nanoscale iron oxide particles synthesized in the presence of dextran or polyvinyl alcohol, *J. Magn. Mater.* 225 (2001) 41–46. [https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(00\)01226-9](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(00)01226-9).
- [141] M. Chastellain, A. Petri, H. Hofmann, Particle size investigations of a multistep synthesis of PVA coated superparamagnetic nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.* 278 (2004) 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.06.025>.
- [142] A.J.M. D'Souza, R.L. Schowen, E.M. Topp, Polyvinylpyrrolidone-drug conjugate: synthesis and release mechanism, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 94 (2004) 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.09.014>.
- [143] H.L. Ma, Y.F. Xu, X.R. Qi, Y. Maitani, T. Nagai, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate: pharmacokinetics, tissue distribution, and applications in detecting liver cancers, *Int. J. Pharm.* 354 (2008) 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.036>.
- [144] M.A. Morales, P.V. Finotelli, J.A.H. Coaquira, M.H.M. Rocha-Leão, C. Diaz-Aguila, E.M. Baggio-Saitovitch, A.M. Rossi, In situ synthesis and magnetic studies of iron oxide nanoparticles in calcium-alginate matrix for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 28 (2008) 253–257. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.12.016>.
- [145] H. Singh, P.E. Laibinis, T.A. Hatton, Rigid, superparamagnetic chains of permanently linked beads coated with magnetic nanoparticles. Synthesis and rotational

- dynamics under applied magnetic fields, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids.* 21 (2005) 11500–11509. <https://doi.org/10.1021/la0517843>.
- [146] G.-B. Shan, J.-M. Xing, M.-F. Luo, H.-Z. Liu, J.-Y. Chen, Immobilization of *Pseudomonas delafieldii* with magnetic polyvinyl alcohol beads and its application in biodesulfurization, *Biotechnol. Lett.* 25 (2003) 1977–1981.
- [147] A.S. Arbab, L.A. Bashaw, B.R. Miller, E.K. Jordan, B.K. Lewis, H. Kalish, J.A. Frank, Characterization of Biophysical and Metabolic Properties of Cells Labeled with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles and Transfection Agent for Cellular MR Imaging, *Radiology.* 229 (2003) 838–846. <https://doi.org/10.1148/radiol.2293021215>.
- [148] A.N. de Belder, Dextran, in: *Ullmanns Encycl. Ind. Chem.*, American Cancer Society, 2008. [https://doi.org/10.1002/14356007.a08\\_449.pub2](https://doi.org/10.1002/14356007.a08_449.pub2).
- [149] K.M. Lee, S.-G. Kim, W.-S. Kim, S.S. Kim, Properties of iron oxide particles prepared in the presence of dextran, *Korean J. Chem. Eng.* 19 (2002) 480–485. <https://doi.org/10.1007/BF02697160>.
- [150] L.F. Gamarra, G.E.S. Brito, W.M. Pontuschka, E. Amaro, A.H.C. Parma, G.F. Goya, Biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for contrast agents: a structural and magnetic study, *J. Magn. Magn. Mater.* 289 (2005) 439–441. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2004.11.123>.
- [151] C. Fournier, M. Leonard, I. Le Coq-Leonard, E. Dellacherie, Coating Polystyrene Particles by Adsorption of Hydrophobically Modified Dextran, *Langmuir.* 11 (1995) 2344–2347. <https://doi.org/10.1021/la00007a004>.
- [152] V. Cabuil, Phase behavior of magnetic nanoparticles dispersions in bulk and confined geometries, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 5 (2000) 44–48. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(00\)00036-4](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(00)00036-4).
- [153] H. Holthoff, A. Schmitt, A. Fernández-Barbero, M. Borkovec, M. ángel Cabrerizo-Vílchez, P. Schurtenberger, R. Hidalgo-álvarez, Measurement of Absolute Coagulation Rate Constants for Colloidal Particles: Comparison of Single and Multiparticle Light Scattering Techniques, *J. Colloid Interface Sci.* 192 (1997) 463–470. <https://doi.org/10.1006/jcis.1997.5022>.
- [154] K. Takagi, R. Ioroi, T. Uchimura, M. Kozaki, K. Komagata, Purification and some properties of dextransucrase from *Streptococcus bovis* 148, *J. Ferment. Bioeng.* 77 (1994) 551–553. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(94\)90127-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(94)90127-9).
- [155] J.F. Robyt, T.F. Walseth, Production, purification, and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, *Carbohydr. Res.* 68 (1979) 95–111. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)84059-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84059-8).
- [156] M. Nácher-Vázquez, N. Ballesteros, Á. Canales, S. Rodríguez Saint-Jean, S.I. Pérez-Prieto, A. Prieto, R. Aznar, P. López, Dextrans produced by lactic acid bacteria exhibit antiviral and immunomodulatory activity against salmonid viruses, *Carbohydr. Polym.* 124 (2015) 292–301. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.020>.
- [157] M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini, Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>.
- [158] R. Jayakumar, N. Nwe, S. Tokura, H. Tamura, Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials, *Int. J. Biol. Macromol.* 40 (2007) 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.06.021>.
- [159] S. Lv, J. Liu, Q. Zhou, L. Huang, T. Sun, Synthesis of Modified Chitosan Superplasticizer by Amidation and Sulfonation and Its Application Performance and Working Mechanism, *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014) 3908–3916. <https://doi.org/10.1021/ie403786q>.

- [160] T.J. Gutiérrez, Chitosan Applications for the Food Industry, in: Chitosan, John Wiley & Sons, Ltd, 2017: pp. 183–232. <https://doi.org/10.1002/9781119364849.ch8>.
- [161] I. Bravo-Osuna, C. Vauthier, A. Farabollini, G.F. Palmieri, G. Ponchel, Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles, *Biomaterials*. 28 (2007) 2233–2243. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.01.005>.
- [162] S. Dünnhaupt, J. Barthelmes, D. Rahmat, K. Leithner, C.C. Thurner, H. Friedl, A. Bernkop-Schnürch, S-Protected Thiolated Chitosan for Oral Delivery of Hydrophilic Macromolecules: Evaluation of Permeation Enhancing and Efflux Pump Inhibitory Properties, *Mol. Pharm.* 9 (2012) 1331–1341. <https://doi.org/10.1021/mp200598j>.
- [163] R. Magetsari, PhD, P. Dewo, PhD, B. Saputro, MD., Z. Lanodiyu, MD, Cinnamon Oil and Chitosan Coating on Orthopaedic Implant Surface for Prevention of Staphylococcus Epidermidis Biofilm Formation, *Malays. Orthop. J.* 8 (2014) 11–14. <https://doi.org/10.5704/MOJ.1411.003>.
- [164] O. Felt, P. Furrer, J.M. Mayer, B. Plazonnet, P. Buri, R. Gurny, Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention, *Int. J. Pharm.* 180 (1999) 185–193. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00003-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00003-4).
- [165] R. Han-Yi Chang, J. Jang, K. C.-W. Wu, Cellulase immobilized mesoporous silica nanocatalysts for efficient cellulose-to- glucose conversion, *Green Chem.* 13 (2011) 2844–2850. <https://doi.org/10.1039/C1GC15563F>.
- [166] M.P. Herrling, S. Lackner, O. Tatti, G. Guthausen, M. Delay, M. Franzreb, H. Horn, Short and long term biosorption of silica-coated iron oxide nanoparticles in heterotrophic biofilms, *Sci. Total Environ.* 544 (2016) 722–729. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.174>.
- [167] W.-Y. Rho, H.-M. Kim, S. Kyeong, Y.-L. Kang, D.-H. Kim, H. Kang, C. Jeong, D.-E. Kim, Y.-S. Lee, B.-H. Jun, Facile synthesis of monodispersed silica-coated magnetic nanoparticles, *J. Ind. Eng. Chem.* 20 (2014) 2646–2649. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.12.014>.
- [168] J.A. Lemire, J.J. Harrison, R.J. Turner, Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications, *Nat. Rev. Microbiol.* 11 (2013) 371–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>.
- [169] M. Khalkhali, S. Sadighian, K. Rostamizadeh, F. Khoeini, M. Naghibi, N. Bayat, M. Habibzadeh, M. Hamidi, Synthesis and characterization of dextran coated magnetite nanoparticles for diagnostics and therapy, *BioImpacts BI.* 5 (2015) 141–150. <https://doi.org/10.15171/bi.2015.19>.
- [170] Nguyen TK Thanh, *Magnetic Nanoparticles: From Fabrication to Clinical Applications*, CRC Press, n.d. <https://www.crcpress.com/Magnetic-Nanoparticles-From-Fabrication-to-Clinical-Applications/Thanh/p/book/9781439869321> (accessed November 3, 2019).
- [171] M. Apel, U.A.O. Heinlein, S. Miltenyi, J. Schmitz, J.D.M. Campbell, *Magnetic Cell Separation for Research and Clinical Applications*, in: *Magn. Med.*, John Wiley & Sons, Ltd, 2007: pp. 571–595. <https://doi.org/10.1002/9783527610174.ch4g>.
- [172] M. Leitgeb, Ž. Knez, K. Vasić, *Micro- and Nanocarriers for Immobilization of Enzymes*, in: S.G. Stanciu (Ed.), *Micro Nanotechnologies Biotechnol.*, InTech, 2016. <http://www.intechopen.com/books/micro-and-nanotechnologies-for-biotechnology/micro-and-nanocarriers-for-immobilization-of-enzymes> (accessed September 9, 2016).
- [173] N.S. Elbially, M.M. Fathy, W.M. Khalil, Doxorubicin loaded magnetic gold nanoparticles for in vivo targeted drug delivery, *Int. J. Pharm.* 490 (2015) 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.032>.



- [174] A.Yu. Zubarev, L.Yu. Iskakova, To the theory of magnetic hyperthermia in a system of single-domain ferromagnetic particles, *Phys. Stat. Mech. Its Appl.* 528 (2019) 121500. <https://doi.org/10.1016/j.physa.2019.121500>.
- [175] O. Veiseh, J.W. Gunn, M. Zhang, Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 284–304. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.002>.
- [176] I. Safarik, M. Safarikova, Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides, *Biomagn. Res. Technol.* 2 (2004) 7. <https://doi.org/10.1186/1477-044X-2-7>.
- [177] I. Safarik, M. Safarikova, F. Weyda, E. Mosiniewicz-Szablewska, A. Slawska-Waniewska, Ferrofluid-modified plant-based materials as adsorbents for batch separation of selected biologically active compounds and xenobiotics, *J. Magn. Magn. Mater.* 293 (2005) 371–376. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.02.033>.
- [178] M. Safarikova, Magnetic solid-phase extraction, *J. Magn. Magn. Mater.* 194 (1999) 108–112.
- [179] I. Safarik, M. Safariková, Use of magnetic techniques for the isolation of cells, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 722 (1999) 33–53.
- [180] N. Srivastava, Iron Nanoparticles Induced Toxicity in *Sesbania cannabina*: A Morphological Aspect, (2014). <https://doi.org/info:doi/10.1166/asfo.2014.1088>.
- [181] F. Aslani, S. Bagheri, N. Muhd Julkapli, A.S. Juraimi, F.S.G. Hashemi, A. Baghdadi, Effects of engineered nanomaterials on plants growth: an overview, *ScientificWorldJournal*. 2014 (2014) 641759. <https://doi.org/10.1155/2014/641759>.
- [182] A. Servin, W. Elmer, A. Mukherjee, R. De la Torre-Roche, H. Hamdi, J.C. White, P. Bindraban, C. Dimkpa, A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield, *J. Nanoparticle Res.* 17 (2015) 92. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-2907-7>.
- [183] W. Zhang, Nanoscale Iron Particles for Environmental Remediation: An Overview, *J. Nanoparticle Res.* 5 (2003) 323–332. <https://doi.org/10.1023/A:1025520116015>.
- [184] G. Bystrzejewska-Piotrowska, J. Golimowski, P.L. Urban, Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management, *Waste Manag.* 29 (2009) 2587–2595. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.04.001>.
- [185] C.C. Berry, S. Wells, S. Charles, G. Aitchison, A.S.G. Curtis, Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation, *Biomaterials*. 25 (2004) 5405–5413. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.12.046>.
- [186] J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramírez, M.J. Yacaman, The bactericidal effect of silver nanoparticles, *Nanotechnology*. 16 (2005) 2346–2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>.
- [187] E.O. Ogunsona, R. Muthuraj, E. Ojogbo, O. Valero, T.H. Mekonnen, Engineered nanomaterials for antimicrobial applications: A review, *Appl. Mater. Today*. (2019) 100473. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.100473>.
- [188] Iu.P. Mukha, A.M. Eremenko, N.P. Smirnova, A.I. Mikhienkova, G.I. Korchak, V.F. Gorchev, A.Yu. Chunikhin, Antimicrobial activity of stable silver nanoparticles of a certain size, *Appl. Biochem. Microbiol.* 49 (2013) 199–206. <https://doi.org/10.1134/S0003683813020117>.
- [189] T.-H. Kim, M. Kim, H.-S. Park, U.S. Shin, M.-S. Gong, H.-W. Kim, Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles, *J. Biomed. Mater. Res. A*. 100A (2012) 1033–1043. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34053>.
- [190] G. Hojnik Podrepšek, Synthesis comparison and characterization of chitosan-coated magnetic nanoparticles prepared with different methods, *Mater. Technol.* 48 (2014) 689–692.

- [191] P.H. Linh, N.X. Phuc, L.V. Hong, L.L. Uyen, N.V. Chien, P.H. Nam, N.T. Quy, H.T.M. Nhung, P.T. Phong, I.-J. Lee, Dextran coated magnetite high susceptibility nanoparticles for hyperthermia applications, *J. Magn. Magn. Mater.* 460 (2018) 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2018.03.065>.
- [192] R.D. Piazza, E. da S. Nunes, W.R. Viali, S.W. da Silva, F.H. Aragón, J.A.H. Coaquira, P.C. de Moraes, R.F.C. Marques, M. Jafellici, Magnetic nanohydrogel obtained by miniemulsion polymerization of poly(acrylic acid) grafted onto derivatized dextran, *Carbohydr. Polym.* 178 (2017) 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.019>.
- [193] O. Carp, L. Patron, D.C. Culita, P. Budrugaec, M. Feder, L. Diamandescu, Thermal analysis of two types of dextran-coated magnetite, *J. Therm. Anal. Calorim.* 101 (2009) 181–187. <https://doi.org/10.1007/s10973-009-0593-3>.
- [194] A. Juríková, K. Csach, J. Miškuf, M. Koneracká, V. Závíšová, M. Kubovčíková, P. Kopčanský, Thermal Analysis of Magnetic Nanoparticles Modified with Dextran, *Acta Phys. Pol. A.* 121 (2012) 1296–1298. <https://doi.org/10.12693/APhysPolA.121.1296>.
- [195] B. Gilbert, F. Huang, H. Zhang, G.A. Waychunas, J.F. Banfield, Nanoparticles: Strained and Stiff, *Science.* 305 (2004) 651–654. <https://doi.org/10.1126/science.1098454>.
- [196] J.S. Gebauer, M. Malissek, S. Simon, S.K. Knauer, M. Maskos, R.H. Stauber, W. Peukert, L. Treuel, Impact of the Nanoparticle–Protein Corona on Colloidal Stability and Protein Structure, *Langmuir.* 28 (2012) 9673–9679. <https://doi.org/10.1021/la301104a>.
- [197] Y. Min, M. Akbulut, K. Kristiansen, Y. Golan, J. Israelachvili, The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly, *Nat. Mater.* 7 (2008) 527–538. <https://doi.org/10.1038/nmat2206>.
- [198] J.M. Zook, M.D. Halter, D. Cleveland, S.E. Long, Disentangling the effects of polymer coatings on silver nanoparticle agglomeration, dissolution, and toxicity to determine mechanisms of nanotoxicity, *J. Nanoparticle Res.* 14 (2012) 1165. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1165-1>.
- [199] D.D. Jurašin, M. Čurlin, I. Capjak, T. Crnković, M. Lovrić, M. Babič, D. Horák, I. Vinković Vrček, S. Gajović, Surface coating affects behavior of metallic nanoparticles in a biological environment, *Beilstein J. Nanotechnol.* 7 (2016) 246–262. <https://doi.org/10.3762/bjnano.7.23>.
- [200] J. Hradil, A. Pisarev, M. Babič, D. Horák, Dextran-modified iron oxide nanoparticles, *China Particuology.* 5 (2007) 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.cpart.2007.01.003>.
- [201] A. Bootz, V. Vogel, D. Schubert, J. Kreuter, Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 369–375. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00193-0](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00193-0).
- [202] N. Noginova, F. Chen, T. Weaver, E.P. Giannelis, A.B. Bourlinos, V.A. Atsarkin, Magnetic resonance in nanoparticles: between ferro- and paramagnetism, *J. Phys. Condens. Matter.* 19 (2007) 246208. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/19/24/246208>.
- [203] G. Vázquez-Victorio, U.A.-S. and R. Valenzuela, Microwave Absorption in Nanostructured Spinel Ferrites, (2013). <https://doi.org/10.5772/56058>.
- [204] S. Watanabe, S. Akutagawa, K. Sawada, T. Iwasa, Y. Shimoyama, A Ferromagnetic Resonance Study of Iron Complexes as Biologically Synthesized in Magnetic Bacteria, *Mater. Trans.* 50 (2009) 2187–2191. <https://doi.org/10.2320/matertrans.M2009177>.
- [205] S.V. Yurtaeva, V.N. Efimov, G.G. Yafarova, A.A. Ereemeev, V.S. Iyudin, A.A. Rodionov, K.L. Gainutdinov, I.V. Yatsyk, EPR Detection of Iron Storage in Rat Tissues

- After Simulated Microgravity Model, *Appl. Magn. Reson.* 47 (2016) 555–565. <https://doi.org/10.1007/s00723-016-0779-3>.
- [206] L.G. Contreras, Ferromagnetic resonance for the quantification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biological materials, *Int. J. Nanomedicine.* (2010). <https://www.dovepress.com/ferromagnetic-resonance-for-the-quantification-of-superparamagnetic-ir-peer-reviewed-article-IJN> (accessed December 8, 2016).
- [207] N. Guskos, G. Zolnierkiewicz, J. Typek, A. Guskos, D. Petridis, Influence of concentration of free radicals/magnetic agglomerates on magnetic resonance spectrum in organic matrix, *Rev Adv Mater Sci.* 2010 (2009) 164–168.
- [208] N. Guskos, J. Typek, G. Zolnierkiewicz, A. Blonska-Tabero, W. Kempinski, Effects of thermal treatment on magnetic properties of Ni<sub>2</sub>FeV<sub>3</sub>O<sub>11</sub>- $\delta$  compound, *Mater. Sci.-Pol.* 2006 (n.d.) 983–990.
- [209] O. Yaln, ed., *Ferromagnetic Resonance - Theory and Applications*, InTech, 2013. <http://www.intechopen.com/books/ferromagnetic-resonance-theory-and-applications> (accessed December 8, 2016).
- [210] M.M. Noginov, N. Noginova, O. Amponsah, R. Bah, R. Rakhimov, V.A. Atsarkin, Magnetic resonance in iron oxide nanoparticles: quantum features and effect of size, *J. Magn. Magn. Mater.* 320 (2008) 2228–2232. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2008.04.154>.
- [211] S. Gyergyek, D. Makovec, M. Jagodič, M. Drogenik, K. Schenk, O. Jordan, J. Kovač, G. Dražič, H. Hofmann, Hydrothermal growth of iron oxide NPs with a uniform size distribution for magnetically induced hyperthermia: Structural, colloidal and magnetic properties, *J. Alloys Compd. C* (2017) 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.09.238>.
- [212] T. Hyeon, S.S. Lee, J. Park, Y. Chung, H.B. Na, Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 12798–12801.
- [213] K. Vasić, Ž. Knez, E.A. Konstantinova, A.I. Kokorin, S. Gyergyek, M. Leitgeb, Structural and magnetic characteristics of carboxymethyl dextran coated magnetic nanoparticles: From characterization to immobilization application, *React. Funct. Polym.* 148 (2020) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104481>.
- [214] Jose M. Guisan, ed., *Immobilization of Enzymes and Cells*, Third Edition, Springer Science+Business Media, New York, n.d. <https://www.springer.com/gp/book/9781627035491> (accessed November 7, 2019).
- [215] E.Z. Ramos, R.H.M. Júnior, P.F. de Castro, Paulo.W. Tardioli, A.A. Mendes, R. Fernández-Lafuente, D.B. Hirata, Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 118 (2015) 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.05.009>.
- [216] F.A. Quijcho, F.M. Richards, The Enzymic Behavior of Carboxypeptidase-A in the Solid State\*, *Biochemistry.* 5 (1966) 4062–4076. <https://doi.org/10.1021/bi00876a041>.
- [217] L. Cao, L. van Langen, R.A. Sheldon, Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?, *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (2003) 387–394. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(03\)00096-x](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(03)00096-x).
- [218] F.A. Quijcho, F.M. Richards, Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: Carboxypeptidase-A, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 52 (1964) 833–839. <https://doi.org/10.1073/pnas.52.3.833>.
- [219] N.L. St. Clair, M.A. Navia, Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 7314–7316. <https://doi.org/10.1021/ja00044a064>.

- [220] P. Gogoi, S. Hazarika, N.N. Dutta, P.G. Rao, Kinetics and mechanism on laccase catalyzed synthesis of poly(allylamine)–catechin conjugate, *Chem. Eng. J.* 163 (2010) 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.07.020>.
- [221] J.J. Roy, T.E. Abraham, Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 38 (2006) 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2005.11.001>.
- [222] R.A. Sheldon, Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts, *Org. Process Res. Dev.* 15 (2011) 213–223. <https://doi.org/10.1021/op100289f>.
- [223] L. Cao, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase, *Org. Lett.* 2 (2000) 1361–1364. <https://doi.org/10.1021/ol005593x>.
- [224] R.A. Sheldon, Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 1583–1587. <https://doi.org/10.1042/BST0351583>.
- [225] H.H. Nguyen, and M. Kim, An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization, *Appl. Sci. Converg. Technol.* 26 (2017) 157–163. <https://doi.org/10.5757/ASCT.2017.26.6.157>.
- [226] C. Mateo, R. Torres, G. Fernández-Lorente, C. Ortiz, M. Fuentes, A. Hidalgo, F. López-Gallego, O. Abian, J.M. Palomo, L. Betancor, B.C.C. Pessela, J.M. Guisan, R. Fernández-Lafuente, Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method, *Biomacromolecules.* 4 (2003) 772–777. <https://doi.org/10.1021/bm0257661>.
- [227] H. Chen, Q. Zhang, Y. Dang, S. Guowei, The effect of glutaraldehyde cross-linking on the enzyme activity of immobilized  $\beta$ -galactosidase on chitosan bead, *Adv. J. Food Sci. Technol.* 5 (2013) 932–935. <https://doi.org/10.19026/ajfst.5.3185>.
- [228] O. de Smidt, J.C. du Preez, J. Albertyn, The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review, *FEMS Yeast Res.* 8 (2008) 967–978. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00387.x>.
- [229] N. Wang, H. Shi, Q. Yao, Y. Zhou, L. Kang, H. Chen, K. Chen, Cloning, expression and characterization of alcohol dehydrogenases in the silkworm *Bombyx mori*, *Genet. Mol. Biol.* 34 (2011) 240–243. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572011000200013>.
- [230] V. Leskovac, S. Trivić, D. Pericin, The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.* 2 (2002) 481–494. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00116.x>.
- [231] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Kessler, R. Stürmer, T. Zelinski, Industrial methods for the production of optically active intermediates, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 43 (2004) 788–824. <https://doi.org/10.1002/anie.200300599>.
- [232] C. Vera, C. Guerrero, C. Aburto, A. Cordova, A. Illanes, Conventional and non-conventional applications of  $\beta$ -galactosidases, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics.* 1868 (2020) 140271. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140271>.
- [233] C. Guerrero, C. Vera, R. Conejeros, A. Illanes, Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of  $\beta$ -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates, *Enzyme Microb. Technol.* 70 (2015) 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>.
- [234] R. Roskoski, Michaelis-Menten Kinetics☆, in: *Ref. Module Biomed. Sci.*, Elsevier, 2015: pp. 1–9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05143-6>.
- [235] L. Michaelis, M. Menten, Die Kinetik der Invertinwirkung, *Biochem Z.* 49 (1913) 333–369.

- [236] K.M. Polizzi, A.S. Bommarius, J.M. Broering, J.F. Chaparro-Riggers, Stability of biocatalysts, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11 (2007) 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.685>.
- [237] C. Silva, M. Martins, S. Jing, J. Fu, A. Cavaco-Paulo, Practical insights on enzyme stabilization, *Crit. Rev. Biotechnol.* 38 (2018) 335–350. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1355294>.
- [238] Gordana Hojnik Podrepšek, Different preparation methods and characterization of magnetic maghemite coated with chitosan, *J. Nanoparticle Res.* 15 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1751-x>.
- [239] J.H.R. Kägi, B.L. Vallee, The Role of Zinc in Alcohol Dehydrogenase V. THE EFFECT OF METAL-BINDING AGENTS ON THE STRUCTURE OF THE YEAST ALCOHOL DEHYDROGENASE MOLECULE, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 3188–3192.
- [240] S.A. Kuby, H.A. Lardy, Purification and Kinetics of  $\beta$ -D-Galactosidase from *Escherichia coli*, Strain K-121,2, *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) 890–896. <https://doi.org/10.1021/ja01100a035>.
- [241] J. Borooh, D.H. Leaback, P.G. Walker, Studies on glucosaminidase. 2. Substrates for N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase, *Biochem. J.* 78 (1961) 106–110.
- [242] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [243] Thermo Fisher Scientific, Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook, [Http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602063-Protein-Assay-Handbook.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602063-Protein-Assay-Handbook.pdf). (n.d.). <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/global/forms/life-science/protein-assay-technical-handbook-download.html> (accessed October 8, 2019).
- [244] M.J. Rojas, M. Amaral-Fonseca, G.M. Zanin, R. Fernandez-Lafuente, R. de L.C. Giordano, P.W. Tardioli, Preparation of Crosslinked Enzyme Aggregates of a Thermostable Cyclodextrin Glucosyltransferase from *Thermoanaerobacter* sp. Critical Effect of the Crosslinking Agent, *Catalysts.* 9 (2019) 120. <https://doi.org/10.3390/catal9020120>.
- [245] A. Hamzah, G.E.K. P., D. Ramadhani, N. Maziyah, L.N. Rahmah, Soeprijanto, A. Widjaja, Effect of temperature and mixing speed on immobilization of crude enzyme from *Aspergillus niger* on chitosan for hydrolyzing cellulose, *AIP Conf. Proc.* 1840 (2017) 030006. <https://doi.org/10.1063/1.4982266>.
- [246] T.J. Harrington, J.L. Gainer, D.J. Kirwan, Effects of fluid shear on immobilized enzyme kinetics, *Enzyme Microb. Technol.* 13 (1991) 610–616. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(91\)90073-J](https://doi.org/10.1016/0141-0229(91)90073-J).
- [247] M. Munir, M. Nadeem, T.M. Qureshi, T.S.H. Leong, C.J. Gamlath, G.J.O. Martin, M. Ashokkumar, Effects of high pressure, microwave and ultrasound processing on proteins and enzyme activity in dairy systems — A review, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 57 (2019) 102192. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102192>.
- [248] Q.Z.K. Zhou, X.D. Chen, Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, *Biochem. Eng. J.* 9 (2001) 33–40. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00118-8).
- [249] J. da N. Schöffner, C.R. Matte, D.S. Charqueiro, E.W. de Menezes, T.M.H. Costa, E.V. Benvenuti, R.C. Rodrigues, P.F. Hertz, Effects of immobilization, pH and reaction time in the modulation of  $\alpha$ -,  $\beta$ - or  $\gamma$ -cyclodextrins production by cyclodextrin glycosyltransferase: Batch and continuous process, *Carbohydr. Polym.* 169 (2017) 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.005>.
- [250] Q. Zhao, Y. Hou, G.-H. Gong, M.-A. Yu, L. Jiang, F. Liao, Characterization of Alcohol Dehydrogenase from Permeabilized Brewer's Yeast Cells Immobilized on the

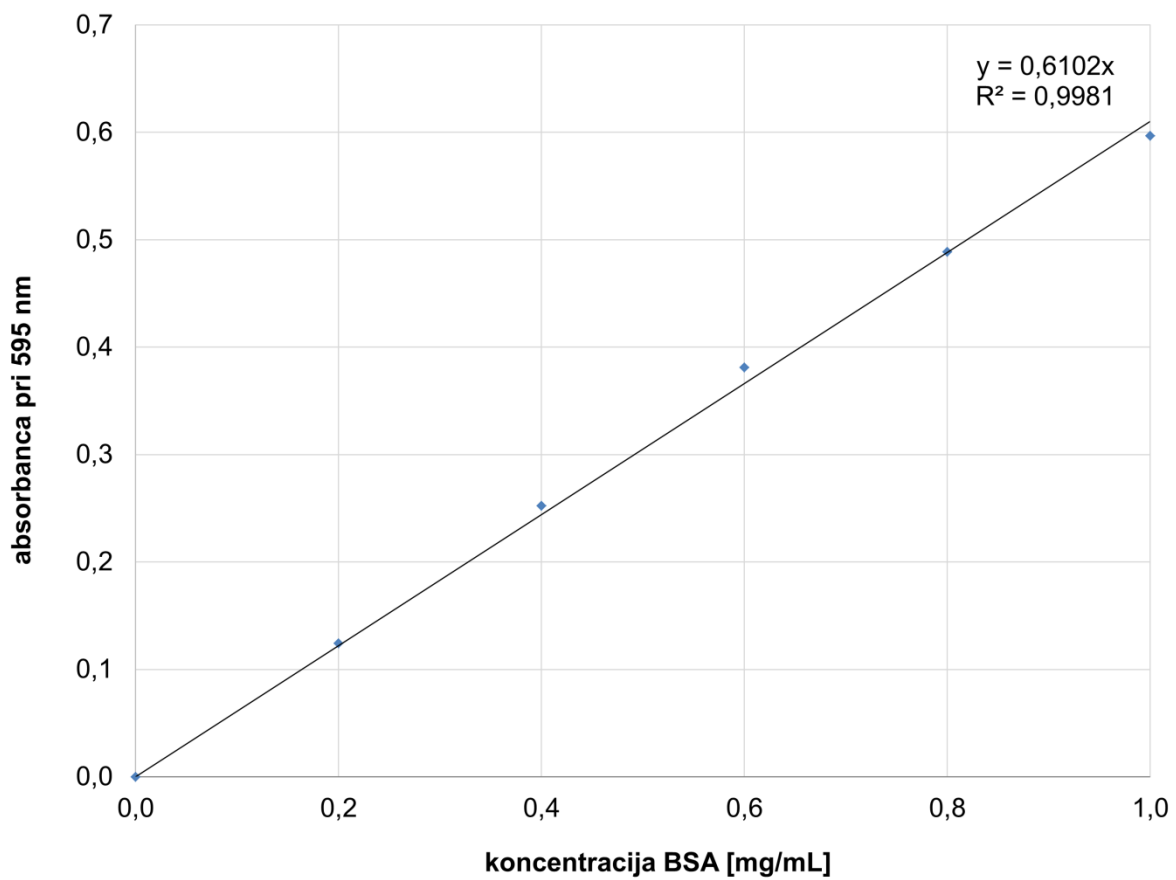
- Derived Attapulgite Nanofibers, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160 (2010) 2287–2299. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8692-y>.
- [251] G. Bayramoğlu, S. Kiralp, M. Yilmaz, L. Toppare, M.Y. Arıca, Covalent immobilization of chloroperoxidase onto magnetic beads: Catalytic properties and stability, *Biochem. Eng. J.* 38 (2008) 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.06.018>.
- [252] M.J. Cooney, Kinetic Measurements for Enzyme Immobilization, in: S.D. Minter (Ed.), *Enzyme Stab. Immobil. Methods Protoc.*, Springer New York, New York, NY, 2017: pp. 215–232. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6499-4\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6499-4_17).
- [253] N. Jamil, R. Che Man, S. Suhaimi, S. Md Shaarani, Z. Iffah Mohd Arshad, S. Kholijah Abdul Mudalip, S. Zubaidah Sulaiman, Effect of enzyme concentration and temperature on the immobilization of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) on hollow fiber membrane, *Mater. Today Proc.* 5 (2018) 22036–22042. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.07.065>.
- [254] D.-S. Jiang, S.-Y. Long, J. Huang, H.-Y. Xiao, J.-Y. Zhou, Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres, *Biochem. Eng. J.* 25 (2005) 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.03.007>.
- [255] M.H. Prousoontorn, S. Pantatan, Production of 2-O- $\alpha$ -glucopyranosyl l-ascorbic acid from ascorbic acid and  $\beta$ -cyclodextrin using immobilized cyclodextrin glycosyltransferase, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 57 (2007) 39–46. <https://doi.org/10.1007/s10847-006-9163-5>.
- [256] J.N. Talbert, J.M. Goddard, Enzymes on material surfaces, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 93 (2012) 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.003>.
- [257] J.M. Bolivar, J. Rocha-Martín, C. Mateo, J.M. Guisan, Stabilization of a highly active but unstable alcohol dehydrogenase from yeast using immobilization and post-immobilization techniques, *Process Biochem.* 47 (2012) 679–686. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.012>.
- [258] I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron, Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *BioTechniques.* 37 (2004) 790–796, 798–802.
- [259] F. López-Gallego, L. Betancor, C. Mateo, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G. Dellamora-Ortiz, J.M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports, *J. Biotechnol.* 119 (2005) 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.05.021>.
- [260] L. Križnik, K. Vasić, Ž. Knez, M. Leitgeb, Hyper-activation of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immobilization onto amino-silane and chitosan magnetic maghemite nanoparticles, *J. Clean. Prod.* 179 (2018) 225–234. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.117>.



## 6 Priloge

### 6.1 Priloga 1

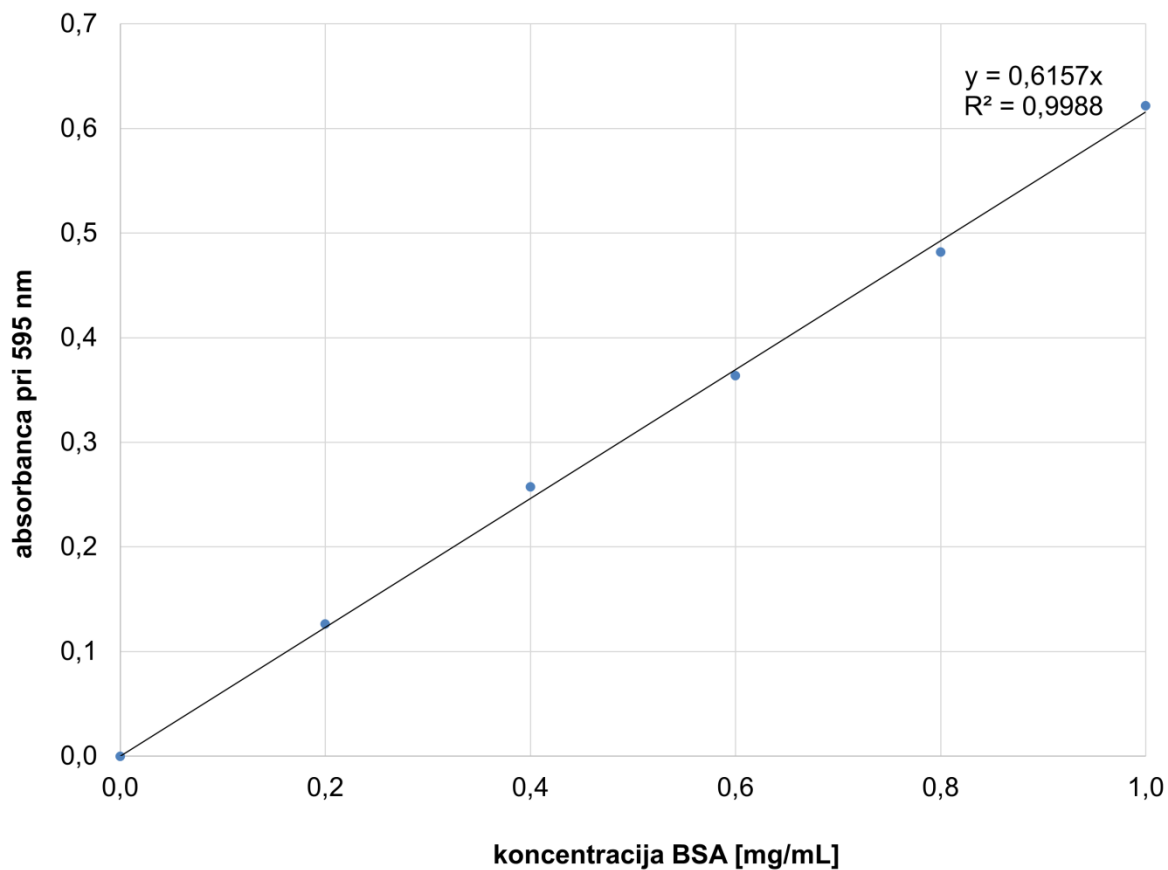
Umeritvena krivulja za določevanje koncentracije proteinov po Bradfordu v postopku imobilizacije ADH





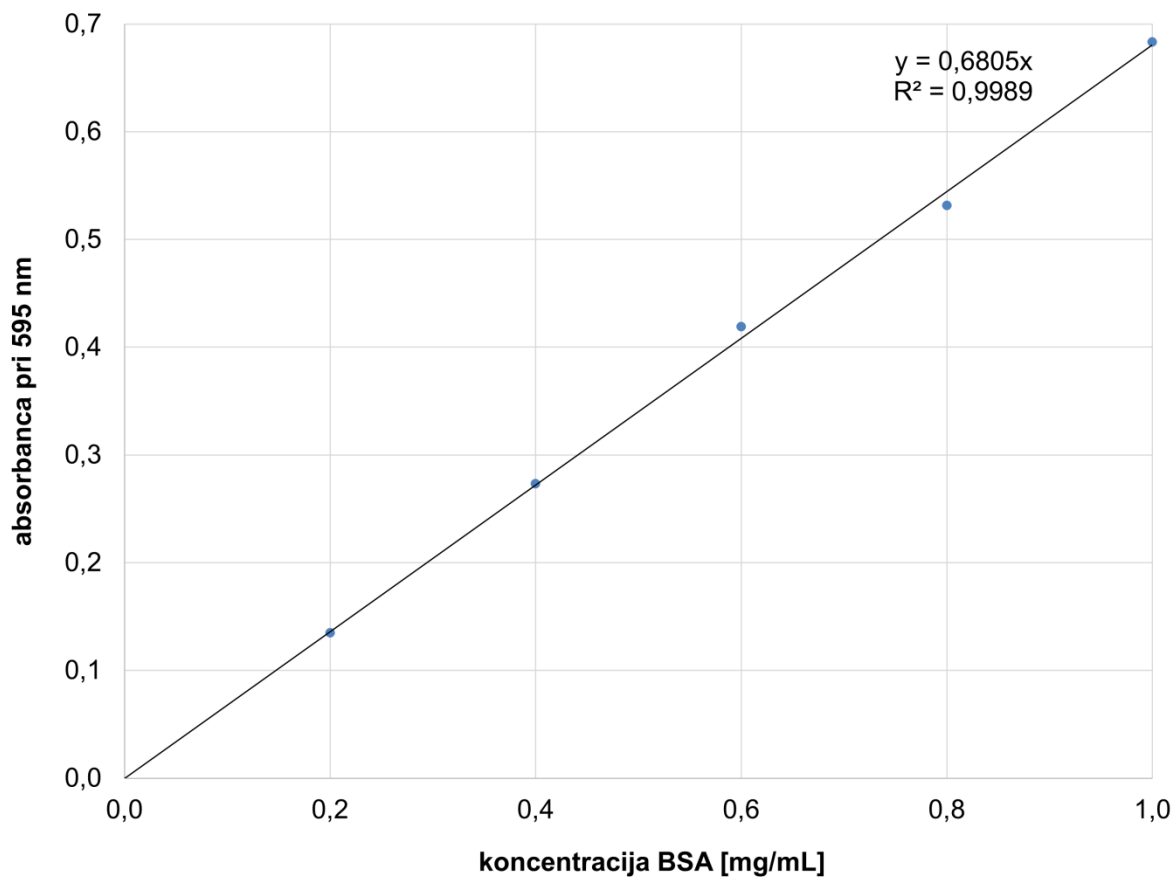
## 6.2 Priloga 2

Umeritvena krivulja za določevanje koncentracije proteinov po Bradfordu v postopku imobilizacije ADH in kofaktorja  $\beta$ -NAD



### 6.3 Priloga 3

Umeritvena krivulja za določevanje koncentracije proteinov po Bradfordu v postopku imobilizacije  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs in AMS-MNPs



## 6.4 Priloga 4

Tabele z rezultati preostalih aktivnosti in učinkovitosti imobilizacije pri postopku imobilizacije ADH in preučevanju vpliva procesnih parametrov na preostalo aktivnost ADH imobilizirane na CMD3-MNPs

- Vpliv koncentracije ECIH

Imobilizacija ADH (0,02 mg/mL) na CMD3-MNPs, zamreženje s 0,5 M ECIH, pH 7,5, 2 uri

	Masa CMD3-MNPS [mg]	<i>T</i> [°C]	Rotacijska hitrost [rpm]	Koncentracija proteinov [mg/mL]	Učinkovitost imobilizacije [%]	Aktivnost encima U/mg]	Preostala aktivnost [%]
0,02 mg/mL ADH	20	22	300			0,3060	
<b>2 % (v/v) ECIH</b>	20	22	300	0,1327	93,89	0,0570	18,6
<b>4 % (v/v) ECIH</b>	20	22	300	0,1407	99,49	0,2706	88,4
<b>6 % (v/v) ECIH</b>	20	22	300	0,1326	93,78	0,1172	38,3
<b>8 % (v/v) ECIH</b>	20	22	300	0,1251	88,46	0,0632	20,7
<b>10 % (v/v) ECIH</b>	20	22	300	0,1414	100,00	0,0730	23,8

- Vpliv temperature

Imobilizacija ADH (0,02 mg/mL) na CMD3-MNPs s 4 % (v/v) ECIH, 2 uri

	Masa CMD3-MNPS [mg]	<i>T</i> [°C]	Rotacijska hitrost [rpm]	Koncentracija proteinov [mg/mL]	Učinkovitost imobilizacije [%]	Aktivnost encima [U/mg]	Preostala aktivnost [%]
0,02 mg/mL ADH				0,0158		0,3101	
	20	<b>4</b>	300	0,0127	80,7	0,1780	57,4
	20	<b>20</b>	300	0,0153	97,2	0,1216	39,2
	20	<b>30</b>	300	0,0122	77,0	0,0915	34,5
	20	<b>40</b>	300	0,0067	42,5	0,1234	39,8

- Vpliv rotacijske hitrosti

**Imobilizacija ADH (0,02 mg/mL) na CMD3-MNPs s 4 % (v/v) ECIH pri 4 °C, 2 uri**

	Masa CMD3-MNPS [mg]	T [°C]	Rotacijska hitrost [rpm]	Koncentracija proteinov [mg/mL]	Učinkovitost imobilizacije [%]	Aktivnost encima [U/mg]	Preostala aktivnost [%]
0,02 mg/mL				0,0158		0,2941	
ADH	20	4	<b>200</b>	0,0158	100	0,1644	55,9
	20	4	<b>300</b>	0,0158	100	0,1246	42,4
	20	4	<b>400</b>	0,0158	100	0,1747	59,4
	20	4	<b>500</b>	0,0142	89,9	0,2574	87,5

- Vpliv pH medija

**Imobilizacija ADH (0,02 mg/mL) na CMD3-MNPs s 4 % (v/v) ECIH pri 4 °C in 500 rpm, 2 uri**

	Masa CMD3-MNPS [mg]	T [°C]	pH medija [/]	Koncentracija proteinov [mg/mL]	Učinkovitost imobilizacije [%]	Aktivnost encima [U/mL]	Preostala aktivnost [%]
0,02 mg/mL				0,0170		0,3953	
ADH	20	4	<b>5</b>		28,2	0,0569	14,4
	20	4	<b>6</b>		55,60	0,1383	35,0
	20	4	<b>7</b>		88,23	0,2935	74,3
	20	4	<b>7,5</b>		99,49	0,3455	87,4
	20	4	<b>8</b>		100	0,1627	41,2
	20	4	<b>8,5</b>		100	0,1337	33,8
	20	4	<b>9</b>		94,3	0,0976	24,7

- Vpliv časa imobilizacije

Imobilizacija ADH (0,02 mg/mL) na CMD3-MNPs s 4 % (v/v) ECIH, pH 7,5 pri 4 °C, 500 rpm

	Masa CMD3-MNPS [mg]	T [°C]	Čas imobilizacije [h]	Koncentracija proteinov [mg/mL]	Učinkovitost imobilizacije [%]	Aktivnost encima [U/mL]	Preostala aktivnost [%]
0,02 mg/mL ADH				0,0150		0,3553	
	20	4	<b>2</b>	0,0149	99,49	0,3107	87,3
	20	4	<b>3</b>	0,0145	96,79	0,2483	69,9
	20	4	<b>4</b>	0,0145	96,55	0,2030	57,1
	20	4	<b>5</b>	0,0135	89,93	0,1328	44,8
	20	4	<b>8</b>	0,0147	97,84	0,1263	37,8
	20	4	<b>12</b>	0,0144	95,89	0,1311	36,9
	20	4	<b>24</b>	0,0113	75,58	0,1342	35,6

- Vpliv koncentracije ADH

Imobilizacija ADH na CMD3-MNPs s 4 % (v/v) ECIH, pH 7,5 pri 4 °C, 500 rpm, 2 uri

	Masa CMD3-MNPS [mg]	T [°C]	Masa ADH [mg/mL]	Koncentracija proteinov [mg/mL]	Učinkovitost imobilizacije [%]	Aktivnost encima [U/mL]	Preostala aktivnost [%]
0,02 mg/mL ADH				0,0518		0,3552	
	20	4	<b>0,02</b>	0,0466	89,9	0,3183	89,6
	20	4	<b>0,03</b>	0,0166	32,1	0,2248	63,3
	20	4	<b>0,04</b>	0,0162	31,2	0,1502	42,3

- Termična stabilnost

**Termična stabilnost imobilizirane ADH pri optimiranih pogojih:**

**Imobilizacija ADH (s koncentracijo 0,02 mg/mL) na CMD3-MNPs s 4 % (v/v) ECIH, pH 7,5 pri 4 °C, 500 rpm, 2 uri**

	Masa CMD3-MNPS [mg]	T [°C]	Čas [h]	Rotacijska hitrost [rpm]	pH medija [l]	Aktivnost encima [U/mL]	Preostala aktivnost [%]
0,02 mg/mL ADH						0,0675	
	20	20	3	500	7,5	0,0462	79,3
	20	20	24	500	7,5	0,0535	68,4
	20	40	3	500	7,5	0,0853	126,4
	20	40	24	500	7,5	0,0542	80,3

**Termična stabilnost proste ADH**

T [°C]	Čas [h]	Aktivnost encima [U/mL]	Preostala aktivnost [%]
		0,3151	
20	3	0,2927	83,4
20	24	0,0892	28,3
40	3	0,0608	19,3
40	5	0,0000	0
40	24	0,0000	0

- Skladiščenje

Termična stabilnost imobilizirane ADH pri optimiranih pogojih:

Imobilizacija ADH (s koncentracijo 0,02 mg/mL) na CMD3-MNPs s 4 % (v/v) ECIH, pH 7,5 pri 4 °C, 500 rpm, 2 uri

$T$ [°C]	Čas [dan]	Aktivnost encima [U/mL]	Preostala aktivnost [%]
	0	0,0758	100
4	1	0,0758	100
4	2	0,0753	99,3
4	3	0,0679	89,6
4	4	0,0638	84,2
4	6	0,0619	81,6
4	8	0,0534	70,4
4	14	0,0527	69,5
4	16	0,0453	59,8
4	22	0,0434	57,2

## 6.5 Priloga 5

Tabele z rezultati preostalih aktivnosti in učinkovitosti imobilizacije pri postopku koimobilizacije ADH in preučevanju vpliva procesnih parametrov na preostalo aktivnost ADH koimobilizirane z  $\beta$ -NAD na CMD3-MNPs

- Vpliv mase CMD3-MNPs

Imobilizacija na CMD3-MNPs + 4 % (v/v) 0,5 M ECIH (1 ura): ADH (0,02 mg/mL) +  $\beta$ -NAD (15 mM), 350 rpm

	Masa CMD3-MNPs [mg]	Koncentracija $\beta$ -NAD [mM]	$T$ [°C]	Rotacijska hitrost [rpm]	Čas koimobilizacije [h]	Učinkovitost imobilizacije [%]	Preostala aktivnost [%]
N1hA2h 20 mg	20	15	22	350	3	84,5	2,9
NA2h 20 mg	20	15	22	350	2	22,1	1,0
N1hA2h 40 mg	40	15	22	350	3	91,9	3,4
NA2h 40 mg	40	15	22	350	2	84,5	3,6

- Vpliv zaporedja koimobilizacije

Imobilizacija na CMD3-MNPs + 4 % (v/v) 0,5 M ECIH (1 ura): ADH (0,02 mg/mL) +  $\beta$ -NAD (15 mM), 350 rpm

zaporedje	Masa CMD3-MNPs [mg]	Koncentracija $\beta$ -NAD [mM]	$T$ [°C]	Rotacijska hitrost [rpm]	Čas koimobilizacije [h]	Učinkovitost imobilizacije [%]	Preostala aktivnost [%]
A2hN1h	40	15	22	350	3	57,7	3,8
AN3h	40	15	22	350	3	46,8	3,3
N1hA2h	40	15	22	350	3	25,0	5,0

- Vpliv koncentracije  $\beta$ -NAD

Imobilizacija na CMD3-MNPs + 4 % (v/v) 0,5 M ECIH (1 ura):  $\beta$ -NAD, 2 uri + ADH (0,02 mg/mL), 2 uri, 350 rpm

Masa CMD3-MNPs [mg]	Koncentracija $\beta$ -NAD [mM]	$T$ [°C]	Rotacijska hitrost [rpm]	Čas koimobilizacije [h]	Učinkovitost imobilizacije [%]	Preostala aktivnost [%]
40	10	22	350	4	91,7	7,2
40	15	22	350	4	42,7	4,4
40	20	22	350	4	89,3	9,3
40	30	22	350	4	12,7	6,6



- Vpliv časa koimobilizacije

**Imobilizacija na CMD3-MNPs + 4 % (v/v) 0,5 M ECIH (1 ura):  $\beta$ -NAD (20 mM) + ADH (0,02 mg/mL), 350 rpm**

Masa CMD3-MNPs [mg]	Koncentracija $\beta$ -NAD	$T$ [°C]	Rotacijska hitrost [rpm]	Čas imobilizacije $\beta$ -NAD [h]	Čas imobilizacije ADH [h]	Učinkovitost imobilizacije [%]	Preostala aktivnost [%]
40	20	22	350	1	4	46,2	8,3
40	20	22	350	2	3	11,8	9,1
40	20	22	350	2	4	55,0	10,5
40	20	22	350	3	3	76,3	6,8
40	20	22	350	4	2	48,7	8,3

- Vpliv temperature koimobilizacije

**Imobilizacija na CMD3-MNPs + 4 % (v/v) 0,5 M ECIH (1 ura):  $\beta$ -NAD (20 mM), 2 uri + ADH (0,02 mg/mL), 4 ure, 350 rpm**

Masa CMD3-MNPs [mg]	Koncentracija $\beta$ -NAD [mM]	Čas imobilizacije $\beta$ -NAD [h]	$T$ imobilizacije $\beta$ -NAD [°C]	Čas imobilizacije ADH [h]	$T$ imobilizacije ADH [°C]	Učinkovitost imobilizacije [%]	Preostala aktivnost [%]
40	20	2	22	4	22	23,3	19,2
40	20	2	22	4	10	32,1	9,9
40	20	2	10	4	10	44,6	7,4
40	20	2	10	4	sobna	33,7	9,4

- Vpliv čas funkcionalizacije CMD3-MNPs

**Imobilizacija na CMD3-MNPs + 4 % (v/v) 0,5 M ECIH:  $\beta$ -NAD (20 mM), 2 uri + ADH (0,02 mg/mL), 4 ure, 350 rpm**

Masa CMD3-MNPs [mg]	Koncentracija $\beta$ -NAD [mM]	Čas funkcionalizacije ECIH [h]	$T$ koimobilizacije [°C]	Čas imobilizacije $\beta$ -NAD [h]	Čas imobilizacije ADH [h]	Učinkovitost imobilizacije [%]	Preostala aktivnost [%]
40	20	1	22	2	4	17,6	26,6
40	20	2	22	2	4	20,4	56,9

- Vpliv koncentracije ADH

Imobilizacija na CMD3-MNPs + 4 % (v/v) 0,5 M ECIH (2 uri):  $\beta$ -NAD (20 mM), 2 uri + ADH (0,02 mg/mL), 4 ure, 350 rpm

Masa CMD3-MNPs [mg]	Koncentracija $\beta$ -NAD [mM]	Koncentracija ADH [mg/mL]	$T$ koimobilizacije [°C]	Čas imobilizacije $\beta$ -NAD [h]	Čas imobilizacije ADH [h]	Učinkovitost imobilizacije [%]	Preostala aktivnost [%]
40	20	0,01	22	2	4	52,6	57,6
40	20	0,02	22	2	4	56,9	20,4
40	20	0,03	22	2	4	46,4	12,8
40	20	0,04	22	2	4	37,8	11,2

- Vpliv mase CMD3-MNPs pri 0,01 mg/mL ADH

Imobilizacija na CMD3-MNPs + 4 % (v/v) 0,5 M ECIH (2 uri):  $\beta$ -NAD (20 mM), 2 uri + ADH (0,01 mg/mL), 4 ure, 350 rpm

Masa CMD3-MNPs [mg]	Koncentracija $\beta$ -NAD [mM]	Koncentracija ADH [mg/mL]	$T$ koimobilizacije [°C]	Čas imobilizacije $\beta$ -NAD [h]	Čas imobilizacije ADH [h]	Učinkovitost imobilizacije [%]	Preostala aktivnost [%]
40	20	0,01	22	2	4	52,6	51,6
50	20	0,01	22	2	4	93,8	73,3
60	20	0,01	22	2	4	61,7	68,8

- Termična stabilnost

Pri optimiranih pogojih: Imobilizacija na CMD3-MNPs (50 mg) + 4 % (v/v) 0,5 M ECIH (2 uri):  $\beta$ -NAD (20 mM), 2 uri + ADH (0,01 mg/mL), 4 ure, 350 rpm

Masa CMD3-MNPs [mg]	$T$ [°C]	čas [h]	Aktivnost encima [U/mL]	Preostala aktivnost [%]
			0,0045	
50	30	0	0,0045	100
50	30	3	0,0022	83,8
50	30	5	0,0002	75,4
50	50	0	0,0045	100
50	50	3	0,0021	80,9
50	50	5	0,0003	66,5

## Termična stabilnost proste ADH

Masa CMD3-MNPs [mg]	T [°C] in	čas [h]	Aktivnost encima [U/mL]	Preostala aktivnost [%]
			0,0183	
50	30	0	0,0183	100
50	30	3	0,0090	49,4
50	30	5	0,0011	6,0
50	50	0	0,0183	100
50	50	3	0,0084	45,9
50	50	5	0,0012	6,8

- Skladiščenje

Pri optimiranih pogojih: Imobilizacija na CMD3-MNPs (50 mg) + 4 % (v/v) 0,5 M ECIH (2 uri):  $\beta$ -NAD (20 mM), 2 uri + ADH (0,01 mg/mL), 4 ure, 350 rpm

T [°C]	čas [dan]	Aktivnost encima [U/mL]	Preostala aktivnost [%]
	0	0,0057	100
4	1	0,0057	100
4	2	0,0056	98,6
4	3	0,0051	90,1
4	4	0,0048	83,7
4	6	0,0047	82,9
4	8	0,0047	81,9
4	14	0,0043	76,2
4	16	0,0041	72,1
4	22	0,0038	67,4

## 6.6 Priloga 6

Tabele z rezultati preostalih aktivnosti in učinkovitosti imobilizacije pri postopku imobilizacije  $\beta$ -GAL na HIT-MNPs in AMS-MNPs

- $\beta$ -GAL na HIT-MNPs

### Optimiranje koncentracije GA [% (v/v)]

GA	Učinkovitost imobilizacije [%]	Aktivnost encima [U/mL]	Preostala aktivnost [%]
1	83,3	0,4972	42,9
1,5	85,8	0,0810	16,3
2	86,6	0,1103	22,2

### Optimiranje koncentracije PEHA [% (v/v)]

PEHA	Učinkovitost imobilizacije [%]	Aktivnost encima [U/mL]	Preostala aktivnost [%]
10	88,7	0,4972	77,6
30	89,1	0,4813	96,8
40	90,8	0,4883	98,2

### Optimiranje kombinacije koncentracij GA/PEHA [% (v/v)]

GA/PEHA	Učinkovitost imobilizacije [%]	Aktivnost encima [U/mL]	Preostala aktivnost [%]
0,5/30	90,0	0,4905	129,0
0,5/40	90,3	0,6327	95,6
1/30	85,1	0,4939	100,7
1,5/30	83,3	0,4096	83,5

- $\beta$ -GAL na AMS-MNPs

#### Optimiranje koncentracije GA [% (v/v)]

GA	Učinkovitost imobilizacije [%]	Aktivnost encima [U/mL]	Preostala aktivnost [%]
1	87,5	0,4905	17,0
2	86,0	0,3095	63,1
2,5	86,0	0,6754	137,7
3	83,4	0,1933	39,4

#### Optimiranje koncentracije PEHA [% (v/v)]

PEHA	Učinkovitost imobilizacije [%]	Aktivnost encima [U/mL]	Preostala aktivnost [%]
5	86,3	0,4905	42,7
10	85,4	0,1805	136,8
20	85,2	0,7573	154,4
30	84,0	0,5788	118,0

#### Optimiranje kombinacije koncentracij GA/PEHA [% (v/v)]

GA/PEHA	Učinkovitost imobilizacije [%]	Aktivnost encima [U/mL]	Preostala aktivnost [%]
2/20	85,2	0,4712	118,5
2,5/20	83,9	0,5697	120,9
2/30	78,7	0,5866	124,5
2,5/30	83,7	0,5042	107,0

## 7 Življenjepis

### PERSONAL INFORMATION

Katja Vasić



Hotinjska cesta 45, 2312 Orehova vas (Slovenia)



00386 41 881928



katja.herzic@gmail.com

Sex Female | Date of birth 16/02/1985 | Nationality Slovenian

### PREFERRED JOB

Chemical engineer

### WORK EXPERIENCE

05/08/2011–Present

#### Chemical engineer

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor  
Smetanova ulica 17, SI-2000 Maribor (Slovenia)

- Performing enzyme catalyzed reactions in conventional media and in supercritical carbon dioxide, e.g. esterification of lactic acid at atmospheric pressure and in supercritical carbon dioxide (with ionic liquid or without it) in a high-pressure reactor at different conditions;
- Synthesis of magnetic nanoparticles, surface functionalization for attachment of biologically active compounds;
- Enzyme immobilization.

28/09/2012–28/05/2013

#### PhD exchange student

Delft University of Technology, Faculty of Applied Sciences  
Julianalaan 136, 2628 BL Delft (Netherlands)

- Investigate *Saccharomyces cerevisiae* Transketolase (TK) and report on TK-catalyzed reactions using different aliphatic aldehydes and non-phosphorylated substrates to form  $\alpha,\alpha'$ -dihydroxyketones;
- Cultivation of wild type TK and its mutant;
- Measuring protein concentration and specific activity of TK;
- Purification technique using Ni-NTA spin columns;
- Immobilization of wild type TK using different carrier supports.

01/10/2010–31/05/2011

#### Chemical engineer

PoliMaT Centre of Excellence  
Tehnološki park 24, SI-1000 Ljubljana (Slovenia)

- Research on polymers for health care and medicine;
- Development of multi-functional materials for surgical use and speedy post-operative treatment of surface wounds;
- Functional polymer surfaces with specific antithrombogenic properties for vascular implant production;
- Biodegradable and biocompatible drug carriers;
- Chromatographic macroporous polymer materials for purification of biological macromolecules.

15/09/2009–15/06/2010

**Diploma student**

Graz University of Technology, Institute of Biotechnology and Biochemical Engineering  
Petersgasse 12/I, A-8010 Graz (Austria)

## Working fields:

- genetics:
- site directed mutagenesis (two stage PCR), agarose gel electrophoresis, minipreparation of
- plasmids, subcloning including various restriction enzyme digestions, ligation, electrotransformation of plasmids and evaluation of transformants;
- biotechnology and microbiology:
- working in a sterile environment, different microbiological working techniques, cultivation of different E. coli strains with and without selection markers on solid and in liquid media, preparation of electrocompetent E. coli cells, overexpression of recombinant proteins, harvesting of cells, cell disruption (french pressure cell press), purification of a strep-tagged protein using: gravity flow columns; general protein purification using a BioLogic DuoFlow System (strep-tag purification, ion exchange and size exclusion chromatography), SDS-Gel-Electrophoresis;
- enzymology:
- determination of protein concentration, activity determination of a recombinant glycosyltransferase using a continuous coupled activity assay and various continuous assays, determination of kinetic constants

01/10/2007–30/11/2007

**practical work of study student**

Center for human molecular genetics and pharmacogenomics  
Slomškov trg 15, SI-2000 Maribor (Slovenia)

Performing practical work of study, DNA extraction, agarose gel electrophoresis, two stage PCR

**EDUCATION AND TRAINING**

---

01/10/2011–Present

**PhD**

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor, Maribor (Slovenia)

Chemical engineering, Biochemical engineering

01/10/2004–30/09/2010

**Chemical engineer**

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Maribor  
Smetanova ulica 17, SI-2000 Maribor (Slovenia)

Chemical engineering, Biochemical engineering

01/09/2000–24/06/2004

**Secondary school graduate**

Prva gimnazija Maribor  
Trg generala Maistra 1, SI-2000 Maribor (Slovenia)

High school

PERSONAL SKILLS

---

Mother tongue(s) Slovenian

Foreign language(s)

	UNDERSTANDING		SPEAKING		WRITING
	Listening	Reading	Spoken interaction	Spoken production	
English	C1	C1	C1	C1	C1
German	B1	B1	B1	B1	B1

Levels: A1 and A2: Basic user - B1 and B2: Independent user - C1 and C2: Proficient user  
[Common European Framework of Reference for Languages](#)

Communication skills

- Good ability to adapt to multicultural environments, gained through my work experiences abroad;
- Team spirit;
- Adaptable, reliable, honest

Digital skills

Windows, MS Word, MS Outlook, MS PowerPoint, SigmaPlot, Vector NTI, ChemDraw

Driving licence

B



UNIVERZA V MARIBORU  
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

**Izjava doktorskega kandidata**

Podpisani-a **Katja Vasić**, vpisna številka **K3000452**

**izjavljam,**

da je doktorska disertacija z naslovom **Vezava encimov na površinsko modificirane magnetne nosilce**

- rezultat lastnega raziskovalnega dela,
- da predložena disertacija v celoti ali v delih ni bila predložena za pridobitev kakršnekoli izobrazbe po študijskih programih drugih fakultet ali univerz,
- da so rezultati korektno navedeni in
- da nisem kršil-a avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Podpis doktorskega kandidata

## Bibliografija kandidata

### v neposredni zvezi z doktorsko disertacijo

#### 1.01 Izvirni znanstveni članek

1. VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko, KONSTANTINOVA, Elizaveta A., KOKORIN, Alexander, GYERGYEK, Sašo, LEITGEB, Maja. Structural and magnetic characteristics of carboxymethyl dextran coated magnetic nanoparticles : from characterization to immobilization application. *Reactive & functional polymers*. [Print ed.]. March 2020, vol. 148, str. 1-13. ISSN 1381-5148. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104481. [COBISS.SI-ID 22930198], [JCR, SNIP]
2. PRIMOŽIČ, Mateja, VASIĆ, Katja, KRAVANJA, Gregor, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Immobilized laccase for sustainable technological processes. *Chemical engineering transactions*. [Online ed.]. 2019, vol. 76, str. 91-96. ISSN 2283-9216. DOI: 10.3303/CET1976016. [COBISS.SI-ID 22737942], [SNIP]
3. GAJŠEK, Marjetka, JANČIČ, Urška, VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Enhanced activity of immobilized transglutaminase for cleaner production technologies. *Journal of cleaner production*. [Print ed.]. 10 Dec. 2019, vol. 240, str. 1-11. ISSN 0959-6526. DOI: 10.1016/j.jclepro.2019.118218. [COBISS.SI-ID 22565910], [JCR, SNIP, WoS do 3. 12. 2019: št. citatov (TC): 1, čistih citatov (CI): 1, Scopus do 3. 12. 2019: št. citatov (TC): 1, čistih citatov (CI): 1]
4. KRIŽNIK, Lucija, VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Hyper-activation of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immobilization onto amino-silane and chitosan magnetic maghemite nanoparticles. *Journal of cleaner production*. [Print ed.]. April 2018, vol. 179, str. 225-234. ISSN 0959-6526. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.01.117. [COBISS.SI-ID 21111062], [JCR, SNIP, WoS do 3. 12. 2019: št. citatov (TC): 3, čistih citatov (CI): 3, Scopus do 3. 12. 2019: št. citatov (TC): 4, čistih citatov (CI): 4]
5. LEITGEB, Maja, VASIĆ, Katja, HOJNIK PODREPŠEK, Gordana, HOJSKI, Aljaž, CRNJAC, Anton, KNEZ, Željko. Toxicity of magnetic chitosan micro and nanoparticles as carriers for biologically active substances. *Acta chimica slovenica*. [Tiskana izd.]. 2014, vol. 61, no. 1, str. 145-152, ilustr. ISSN 1318-0207. [COBISS.SI-ID 4955199], [JCR, SNIP, WoS do 3. 12. 2019: št. citatov (TC): 8, čistih citatov (CI): 6, Scopus do 27. 1. 2020: št. citatov (TC): 9, čistih citatov (CI): 6]

## 1.02 Pregledni znanstveni članek

6. VASIĆ, Katja, HOJNIK PODREPŠEK, Gordana, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Biodiesel production using solid acid catalysts based on metal oxides. *Catalysts*. Published: 17 February 2020, vol. 10, no. 2, str. 1-20. ISSN 2073-4344. <https://www.mdpi.com/2073-4344/10/2/237>, DOI: 10.3390/catal10020237. [COBISS.SI-ID 23006998], [JCR, SNIP]

## 1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci

7. VASIĆ, Katja, LEITGEB, Maja, KNEZ, Željko, HANEFELD, Ulf. Encimska aktivnost transketolaze z različnimi alifatskimi aldehidi in nefosforiliranimi substrati. V: KRAVANJA, Zdravko (ur.), BRODNJAK-VONČINA, Darinka (ur.), BOGATAJ, Miloš (ur.). Slovenski kemijski dnevi 2013, Maribor, 10.-12. september 2013. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2013. Str. 1-4. ISBN 978-961-248-403-3. [COBISS.SI-ID 17155862]

8. VASIĆ, Katja, HOJNIK PODREPŠEK, Gordana, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Priprava magnetnih hitozanskih nanodelcev za vezavo biološko aktivnih substanc ter njihov toksikološki vpliv. V: KRAVANJA, Zdravko (ur.), BRODNJAK-VONČINA, Darinka (ur.), BOGATAJ, Miloš (ur.). Slovenski kemijski dnevi 2012, Portorož, 12.-14. september 2012 = Slovenian Chemical Days 2012, Portorož, September 12-14, 2012. Maribor: FKKT, 2012. Str. 1-6. ISBN 978-961-248-353-1. [COBISS.SI-ID 16285462]

9. VASIĆ, Katja, PRIMOŽIČ, Mateja, SUDAR, Martina, FINDRIK, Zvezdana, VASIĆ-RAČKI, Đurđa, BÉLAFI-BAKÓ, Katalin, GUBICZA, László, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Lactic acid esterification - an overview. V: LEITGEB, Maja (ur.), PRIMOŽIČ, Mateja (ur.). 2nd Conference on "Applied Biocatalysis" and 7th Meeting of Students and University Professors from Maribor and Zagreb, November 7th and 8th 2011, Maribor, Slovenia. 2nd Conference on Applied Biocatalysis and 7th Meeting of Students and University Professors from Maribor and Zagreb, November 7th and 8th 2011, Maribor, Slovenia. Maribor: Faculty of Chemistry and Chemical Engineering; Zagreb: Faculty of Chemical Engineering and Technology, 2011. 5 str. ISBN 978-961-248-299-2. [COBISS.SI-ID 15530774]

10. MAVER, Tina, PERŠIN, Zdenka, VASIĆ, Katja, SMRKE, Dragica, STANA-KLEINSCHEK, Karin. Novel wound dressings for controlled release of NSAID. V: Fibrous products in medical and health care : papers and poster abstracts. International Conference on Fibrous Products in Medical and Health Care, FiberMed11, June 28-30, 2011, Tampere Hall, Finland. Tampere: University of Technology, 2011. 7 str. [COBISS.SI-ID 15146262]

11. PERŠIN, Zdenka, MAVER, Tina, VASIĆ, Katja, STANA-KLEINSCHEK, Karin. Študij optimalnih parametrov plazemske obdelave za doseg inducirane super-hidrofilnosti regeneriranih celuloznih vlaken = The study of optimal plasma parameters for induced superhydrophilicity of the regenerated cellulose fibres. V: KRAVANJA, Zdravko (ur.), BRODNJAK-VONČINA, Darinka (ur.), BOGATAJ, Miloš (ur.). Slovenski kemijski dnevi

2011, Portorož, 14-16 september 2011. Maribor: FKKT, 2011. 7 str. ISBN 978-961-248-289-3. [COBISS.SI-ID 15341590]

12. MAVER, Tina, PERŠIN, Zdenka, PIVEC, Tanja, VASIĆ, Katja, KOLAR, Mitja, STANA-KLEINSCHEK, Karin. Zagotavljanje varnega protimikrobnega učinka pri oskrbi okuženih ran = Assurance of safe antimicrobial effect in wound treatment. V: KRAVANJA, Zdravko (ur.), BRODNJAK-VONČINA, Darinka (ur.), BOGATAJ, Miloš (ur.). Slovenski kemijski dnevi 2011, Portorož, 14-16 september 2011. Maribor: FKKT, 2011. Str. 1-7. ISBN 978-961-248-289-3. [COBISS.SI-ID 15342614]

### **1.10 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (vabljen predavanje)**

13. LEITGEB, Maja, VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko. Immobilized enzymes as bionanocatalysts. V: Abstract book. [S. l.: s. n., 2017]. 1 str. [COBISS.SI-ID 21188886]

14. LEITGEB, Maja, VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko. Synthesis of magnetic cross-linked enzyme aggregates. V: BIT's 7th Annual Global Congress of Catalysis-2016, June 30-July 2, 2016, Goyang City, South Korea : conference abstract book. [Dalian: BIT Congress, 2016]. Str. 72. [COBISS.SI-ID 19678742]

### **1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci**

15. PRIMOŽIČ, Mateja, VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Stability of immobilized laccase in SC CO<sub>2</sub>. V: 17th European meeting on Supercritical fluids [and] 7th European meeting on high pressure technology, 8-11 April, 2019, Ciudad Real, Spain : programme. [S. l.: s. n., 2019]. Str. 113-114. ISBN 978-84-09-10848-0. [COBISS.SI-ID 22589462]

16. PRIMOŽIČ, Mateja, VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Activity of extracellular enzymes from *Pleurotus ostreatus* fungi. V: Bridging science with technology : a renaissance in chemical engineering : book of abstracts. [S. l.: s. n.], 2019. Str. 1482-1483. ISBN 978-88-95608-75-4. [COBISS.SI-ID 22686998]

17. VASIĆ, Katja, PRIMOŽIČ, Mateja, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Structural characterization of magnetic nanoparticles coated with dextran. V: PINTAR, Albin (ur.), GANTAR ALBREHT, Marjana (ur.). Book of abstracts : plenary lectures, keynote lectures, section lectures, poster session. 24th Annual Meeting of the Slovenian Chemical Society, 19-21 September 2018, Portorož - Portorose, Slovenia. Ljubljana: Slovenian Chemical Society, 2018. Str. [1]. ISBN 978-961-93849-4-7. [COBISS.SI-ID 21762070]

18. VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Effects of process parameters on ADH immobilization onto dextran coated magnetic nanoparticles. V: VRSALJKO, Domagoj (ur.), DEJANOVIĆ, Igor (ur.), ŽIŽEK, Krunoslav (ur.). Knjiga sažetaka = Book of abstracts. XII.

susret mladih kemijskih inženjera, Zagreb, 22. i 23. veljače 2018. Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa: = Croatian Society of Chemical Engineers, 2018. Str. 131, ilustr. ISBN 978-953-6894-62-8. [COBISS.SI-ID 21210390]

nagrada: 2. nagrada za najboljši poster na srečanju

19. LEITGEB, Maja, VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko. Structural characterization of dextran coated magnetic nanoparticles. V: Abstract book. 10th World Congress of Chemical Engineering [and] 11th European Congress of Chemical Engineering [and] 4th European Congress of Applied Biotechnology, Barcelona, Spain, 1st-5th October, 2017. Barcelona: [s. n.], 2017. Str. 1269. ISBN 978-84-697-8629-1. [COBISS.SI-ID 21148694]

20. PUNDIR, Meenakshi, KUMAR, Sanjay, VASIĆ, Katja, LEITGEB, Maja, KNEZ, Željko, PANDEY, Jitendra K, SINGH RAWAT, Devender. Gree synthesis of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles using Iota and Kappa-carrageenan. V: Abstract book. [S. l.: s. n., 2017]. Str. 96. [COBISS.SI-ID 21190422]

21. VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Imobilizacija alkohol dehidrogenaze na epoksi-funkcionalizirane dekstranove nanodelce. V: KAUČIČ, Venčeslav (ur.). Zbornik referatov in povzetkov. Slovenski kemijski dnevi 2017, 20.-22. september 2017, Portorož. Ljubljana: Slovensko kemijsko društvo, 2017. Str. [1]. ISBN 978-961-93849-3-0. [COBISS.SI-ID 20807702]

22. VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Preparation of dextran modified magnetic nanoparticles. V: 22nd International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2016 [and] 19th Conference PRES 2016, 27 - 31 August 2016, Praha, Czech Republic. Praha: [s. n.], 2016. 1 str. [COBISS.SI-ID 19772182]

23. VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Magnetic nanoparticles modified with dextran and their preparation = Magnetske nanočestice modificirane s dekstranom i njihova priprema. V: Knjiga sažetaka = Book of abstracts. XI. Susret mladih kemijskih inženjera, 18. i. 19. veljače 2016, Zagreb. Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, 2016. Str. 41. ISBN 978-953-6894-55-0. [COBISS.SI-ID 19382550]

24. VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Vpliv stabilizacijskih proteinov na zamrežene agregatne skupke encima beta-galaktozidaze. V: KAUČIČ, Venčeslav (ur.), BEŠTER-ROGAČ, Marija (ur.), GANTAR ALBREHT, Marjana (ur.). Zbornik referatov in povzetkov. 22. Slovenski kemijski dnevi, Portorož, 28.-30. september 2016 = 22. Slovenian Chemical Days Portorož, September 28-30, 2016. Ljubljana: Slovensko kemijsko društvo, 2016. Str. [1], ilustr. ISBN 978-961-93849-2-3. [COBISS.SI-ID 19880470]

25. VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Priprava magnetnih nanodelcev modificiranih z dekstranom in alginatom. V: KAUČIČ, Venčeslav (ur.), et al. Zbornik referatov in povzetkov. Slovenski kemijski dnevi 2015, Ljubljana, 24. - 25. september 2015 = Slovenian Chemical Days 2015, Ljubljana, September 24 - 25, 2015. Ljubljana: Slovensko kemijsko društvo, 2015. Str. [1]. ISBN 978-961-93849-1-6. [COBISS.SI-ID 18986006]

26. VASIĆ, Katja, HOJNIK PODREPŠEK, Gordana, LEITGEB, Maja, KNEZ, Željko. Chitosan-based magnetic micro and nanoparticles as carriers for bioactive substances and their toxicity. V: 21st International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2014 [and] 17th Conference PRES 2014, 23 - 27 August 2014, Praha, Czech Republic. Praha: [s. n.], 2014. 1 str. ISBN 978-80-02-02555-9. [COBISS.SI-ID 18096150]
27. LEITGEB, Maja, VASIĆ, Katja, HOJNIK PODREPŠEK, Gordana, HOJSKI, Aljaž, CRNJAC, Anton, KNEZ, Željko. Toxicity of magnetic chitosan micro and nanoparticles as carriers for biologically active substances. V: Book of abstracts. Dresden: [s. n.], 2014. Str. 108. [COBISS.SI-ID 17911574]
28. VASIĆ, Katja, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Toksikološka testiranja pripravljenih magnetnih hitozanskih nanodelcev za vezavo biološko aktivnih substanc. V: KRAVANJA, Zdravko (ur.), BOGATAJ, Miloš (ur.), NOVAK-PINTARIČ, Zorka (ur.). Zbornik povzetkov referatov s posvetovanja. Slovenski kemijski dnevi 2014, Maribor, 11.-12. september 2014. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2014. Str. 100. ISBN 978-961-248-454-5. [COBISS.SI-ID 18071574]
29. VASIĆ, Katja, RANOUX, Adeline, LEITGEB, Maja, HANEFELD, Ulf. Transketolase activity with a variety of aliphatic aldehydes and nonphosphorylated substrates. V: Book of abstracts. XIVth Netherlands catalysis and chemistry conference, March 11 - March 13, 2013, Noordwijkerhout, The Netherlands. [S. l.: s. n., 2013]. Str. 217. [COBISS.SI-ID 16919830]

### 1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji

30. LEITGEB, Maja, KNEZ, Željko, VASIĆ, Katja. Enzyme-based biomass catalyzed reactions in Supercritical CO<sub>2</sub>. V: ŁUKASIK, Rafał M. (ur.). High pressure technologies in biomass conversion. London: Royal Society of Chemistry, cop. 2017. Str. 66-82, ilustr. Green chemistry series, no. 48. ISBN 978-1-78262-485-1, ISBN 978-1-78262-676-3, ISBN 978-1-78801-129-7. ISSN 1757-7039. <http://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781782624851-00066/978-1-78262-485-1>. [COBISS.SI-ID 20818198], [WoS do 15. 12. 2019: št. citatov (TC): 2, čistih citatov (CI): 0, Scopus do 27. 10. 2019: št. citatov (TC): 2, čistih citatov (CI): 0]
31. LEITGEB, Maja, KNEZ, Željko, VASIĆ, Katja. Micro- and nanocarriers for immobilization of enzymes. V: STANCIU, Stefan G. (ur.). Micro and nanotechnologies for biotechnology. Rijeka: InTech, 2016. Str. 22-58, ilustr. ISBN 978-953-51-2531-0, ISBN 978-953-51-2530-3. <http://www.intechopen.com/books/micro-and-nanotechnologies-for-biotechnology/micro-and-nanocarriers-for-immobilization-of-enzymes>, DOI: 10.5772/63129. [COBISS.SI-ID 19755798]

## MONOGRAFIJE IN DRUGA ZAKLJUČENA DELA

### 2.05 Drugo učno gradivo

32. LEITGEB, Maja, PRIMOŽIČ, Mateja, VASIĆ, Katja, ČOLNIK, Maja. Bioseparation processes and biocalatysis : laboratory exercises. [Maribor: UM FKKT, 2016]. 35 str., ilustr. <https://www.fkkt.um.si/egradiva/egradiva.php>, <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=73327>. [COBISS.SI-ID 22220566]

33. LEITGEB, Maja, PRIMOŽIČ, Mateja, VASIĆ, Katja. Industrial microbiology : laboratory exercises 2016/2017. [Maribor: UM FKKT, 2016]. 5 str., ilustr. <https://www.fkkt.um.si/egradiva/egradiva.php>, <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=73326>. [COBISS.SI-ID 22220310]

### 2.11 Diplomsko delo

34. VASIĆ, Katja. Purification and characterization of schizophyllum commune trehalose phosphorylase = Čiščenje in karakterizacija encima trehaloze fosforilaze iz glive Schizophyllum commune. Maribor: [K. Heržič], 2010. V, 65 f., ilustr. <http://dkum.uni-mb.si/Dokument.php?id=18032>. [COBISS.SI-ID 14725654]

### 2.12 Končno poročilo o rezultatih raziskav

35. PERŠIN, Zdenka, STANA-KLEINSCHEK, Karin, MAVER, Uroš, PIVEC, Tanja, MAVER, Tina, KUREČIČ, Manja, SFILIGOJ-SMOLE, Majda, DOLIŠKA, Aleš, VASIĆ, Katja, KOS, Tanja, TOMPA, Jasna, HRIBERNIK, Silvo, OJSTRŠEK, Alenka, SPINDLER, Lea, et al. Final project report : RPP4 project Multilayer medical materials : project period: April 2010 - December 2013. [Ljubljana]: Center odličnosti polimerni materiali in tehnologije: = PoliMat; Maribor: University of Maribor, Faculty of Mechanical Engineering, Laboratory for Characterisation and Processing of Polymers, 2014. 27 f. [COBISS.SI-ID 17950742]

### 2.13 Elaborat, predstudija, študija

36. LEITGEB, Maja, PRIMOŽIČ, Mateja, VASIĆ, Katja. Poročilo o študiji prisotnosti mikroorganizmov na danem vzorcu. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2018. 4 f., ilustr. [COBISS.SI-ID 21171734]

## **IZVEDENA DELA (DOGODKI)**

### **3.15 Prispevek na konferenci brez natisa**

37. LEITGEB, Maja, KNEZ, Željko, VASIĆ, Katja. Cell treatment with supercritical carbon dioxide : lecture at ISSF 2015, 11th International symposium on supercritical fluids, October 11-14 2015, Seoul, Korea. [COBISS.SI-ID 20010518]

38. VASIĆ, Katja, HOJSKI, Aljaž, CRNJAC, Anton, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Toxicity of chitosan magnetic nanoparticles as carriers for biologicaly active substances : lecture presented at the European congress of chemical engineering and applied biotechnology ECCE9 - ECAB2, World Forum, The Haag, The Netherlands, 21-25 April, 2013. 2013. [COBISS.SI-ID 16878614]

39. VASIĆ, Katja, HOJNIK PODREPŠEK, Gordana, KNEZ, Željko, LEITGEB, Maja. Toxic effects of magnetic chitosan nanoparticles as carriers for biologicaly active substances : lecture presented at Applied Biocatalysis - 8th meeting of student and university profesors, September 19th, 2012, University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology, Croatia. 2012. [COBISS.SI-ID 16331798]

## **SEKUNDARNO AVTORSTVO**

### **Mentor - drugo**

40. VÖRÖŠ, Katja. Inhibicija rasti plesni : raziskovalna naloga na področju biologije. Ljutomer: Gimnazija Franca Miklošiča, 2017. 41 f., ilustr., graf. prikazi. [COBISS.SI-ID 6099428]

41. VÖRÖŠ, Katja. Inhibicija rasti plesni : raziskovalna naloga na področju biologije. Ljutomer: Gimnazija Franca Miklošiča, 2017. 38 f., ilustr., tabele. [COBISS.SI-ID 17109811]

### **Somentor pri magistrskih delih (bolonjski študij)**

42. OPREŠNIK, Tina. Koimobilizacija alkohol dehidrogenaze in nikotinamid adenin dinukleotida na magnetne nanodelce : magistrsko delo. [T. Oprešnik]; Maribor, 2019. XI, 50 str., ilustr. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=73836>. [COBISS.SI-ID 22487830]

### **Somentor pri diplomskih delih (bolonjski študij 1. stopnje)**

43. JURGEC, Ana. Funkcionalizirani magnetni nanodelci za odstranjevanje težkih kovin iz odpadnih vod : diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. stopnje. Maribor: [A.



Jurgec], 2019. VIII, 43 str., ilustr. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=74201>. [COBISS.SI-ID 22612502]

44. PINTAR, Ela. Imobilizacija encima alkohol dehidrogenaze na dekstranske magnetne nanodelce : diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. stopnje. [E. Pintar]; Maribor, 2019. IX, 27 str., ilustr. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=73256>. [COBISS.SI-ID 22263318]

45. TALJAN, Mihaela. Aktivnost lakaze in celulaze v glivi *Pleurotus ostreatus* : diplomsko delo visokošolskega strokovnega študijskega programa I. stopnje. Maribor: [M. Taljan], 2018. XIII, 41 str., ilustr. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=71023>. [COBISS.SI-ID 21606678]

46. KOBALÉ, Tamara. Določevanje aktivnosti nekaterih encimov v granatnem jabolku : diplomsko delo visokošolskega strokovnega študijskega programa I. stopnje. Maribor: [T. Kobale], 2018. IX, 42 str., ilustr. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=71774>. [COBISS.SI-ID 21982486]

47. KOGELNIK, Rebeka. Določevanje prisotnosti proteinov in aktivnosti nekaterih encimov v figah : diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. stopnje. Maribor: [R. Kogelnik], 2018. IX, 45 str., ilustr. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=71536>. [COBISS.SI-ID 21975574]

48. DOKL, Monika. Izolacija mikro in nanoceluloze iz rastlinskih materialov : diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. stopnje. Maribor: [M. Dokl], 2018. VII, 31 str., ilustr. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=71797>. [COBISS.SI-ID 21967894]

49. ARGUEDAS MATEO, Davinia. Stability of immobilized laccase : bachelor thesis. Maribor: [D. Arguedas Mateo], 2018. [VII], 38 f., ilustr. [COBISS.SI-ID 21982998]

50. BANDUR, Patricija. Študija aktivnosti nekaterih encimov v gelu aloe vere : diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. stopnje. Maribor: [P. Bandur], 2018. X, 49 f., ilustr. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=71589>. [COBISS.SI-ID 21935382]

51. ŠENEKAR, Nina. Imobilizacija lakaze v magnetne zamrežene encimske skupke (mCLEAs) : diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. stopnje. Maribor: [N. Šenekar], 2017. X, 32 str., ilustr. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=67715>. [COBISS.SI-ID 21051414]

52. PETEK, Mihaela. Imobilizacija lakaze v zamrežene encimske skupke (CLEAs) : diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. stopnje. Maribor: [M. Petek], 2017. IX, 44 f., ilustr. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=68276>. [COBISS.SI-ID 21062166]

53. STRADOVNIK, Urša. Izolacija nanoceluloze iz biološkega materiala : diplomsko delo visokošolskega strokovnega študijskega programa I. stopnje. Maribor: [U. Stradovnik], 2017. X, 35 str., ilustr. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=66175>. [COBISS.SI-ID 20691734]

54. BÜDEFELD, Natalija. Priprava magnetnih zamreženih encimskih skupkov iz transglutaminaze : diplomsko delo visokošolskega strokovnega študijskega programa I. stopnje. Maribor: [N. Büdefeld], 2017. X, 41 str., ilustr. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=68212>. [COBISS.SI-ID 21062678]
55. LESIČAR, Špela. Sinteza zamreženih encimskih skupkov iz encima transglutaminaze : diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. stopnje. Maribor: [Š. Lesičar], 2017. XII, 40 str., ilustr. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=67603>. [COBISS.SI-ID 21033494]
56. CAMBRA OBACH, Anna. Stability of immobilized beta-galactosidase in supercritical CO<sub>2</sub> : bachelor thesis. Maribor: [A. Cambra Obach], 2017. XIV, 34 f., ilustr. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=67157>. [COBISS.SI-ID 20693526]
57. ŠIMENKO, Nastja. Imobilizacija  $\beta$ -galaktozidaze na magnetne maghemitne nanodelce in zamreženje le-teh v encimske skupke : diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. stopnje. Maribor: [N. Šimenko], 2016. XII, 40 str., ilustr. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=61506>. [COBISS.SI-ID 20442646]
58. JEROMEL, Kaja. Priprava magnetnih zamreženih encimskih skupkov iz  $\beta$ -galaktozidaze : diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. stopnje. Maribor: [K. Jeromel], 2016. IX, 37 str., ilustr. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=62410>. [COBISS.SI-ID 20367638]

Izjava o avtorstvu in istovetnosti tiskane in elektronske oblike doktorske disertacije