

UNIVERZA V MARIBORU
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

Doktorska disertacija

**NANOSTRUKTURIRANI MATERIALI ZA
IMOBILIZACIJO BOKATALIZATORJA**

April, 2011

FRANJA ŠULEK



Univerza v Mariboru

*Fakulteta za kemijo in
kemijsko tehnologijo*

Na osnovi 330. člena Statuta Univerze v Mariboru (Ur. l. RS, št. 1/2010) in sklepa Senata 39. redne seje Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru z dne 28. 3. 2011

izdajam

SKLEP O IMENOVANJU KOMISIJE ZA ZAGOVOR DOKTORSKE DISERTACIJE

z naslovom

Nanostrukturirani materiali za imobilizacijo biokatalizatorja,

ki jo je predložila Franja ŠULEK, univ. dipl. inž. kem. tehnol.

V komisijo imenujem naslednje člane:

izr. prof. dr. Peter Krajnc, predsednik
red. prof. dr. Maja Habulin, mentorica
red. prof. dr. Željko Knez, somentor
red. prof. dr. Đurđa Vasić Rački, članica
red. prof. dr. Miha Drogenik, član

Zagovor je v četrtek, 21. aprila 2011 ob 13.30 uri v sejni sobi B-305.

Če imenovani član komisije zavrne sodelovanje v komisiji za zagovor doktorske disertacije, mora o tem v roku 5 delovnih dni po prejemu tega sklepa pisno obvestiti dekana članice.

Pravni pouk: Zoper ta sklep je možna pritožba na senat članice univerze v roku 5 delovnih dni.

Datum: 5. 4. 2011

Kraj: Maribor

Dekan:
red. prof. dr. Željko Knez

Obvestiti:

- člane komisije,
- kandidata-tko,
- arhiv.



Univerza v Mariboru

*Fakulteta za kemijo in
kemijsko tehnologijo*

Doktorska disertacija

NANOSTRUKTURIRANI MATERIALI ZA IMOBILIZACIJO BOKATALIZATORJA

Avtor: Franja ŠULEK, univ.dipl.inž.

Mentor: red. prof. dr. Maja HABULIN

UDK: 544.473:577.15(043.3)

April, 2011

Doktorska disertacija je bila opravljena na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Laboratoriju za separacijske procese in produktno tehniko, Maribor, ob financiranju podiplomskega raziskovalnega usposabljanja mladega raziskovalca s strani Agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) za obdobje od novembra 2006 do aprila 2011 (Št. pogodbe: 1000-06-310211). Del doktorskega dela je bil opravljen na Fakulteti za naravoslovne vede (Univerza v Delftu, Nizozemska) v Laboratoriju za organsko kemijo in biokatalizo pod mentorstvom rednega profesorja dr. Roger A. Sheldon-a ob sofinanciranju raziskovalnega sodelovanja slovenskih doktorskih študentov v tujini s strani Javnega sklada Republike Slovenije za razvoj kadrov in štipendije (Št. pogodbe: 2007/532-025).

ZAHVALA

Doktorsko delo sem opravljala v obdobju od novembra 2006 do aprila 2011 na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo na Univerzi v Mariboru iz področja imobilizacije biokatalizatorjev na nosilce iz nanostrukturiranih materialov pod mentorstvom red. prof. dr. Maje Habulin, ki se ji najlepše zahvaljujem za vso mentorsko pomoč ter za številne strokovne in znanstvene nasvete in diskusije tekom mojega podiplomskega študija.

Posebna zahvala gre red. prof. dr. Željku Knezu in prof. dr. Roger A. Sheldon-u (Univerza na Nizozemskem, TUDelft) za konstruktivne znanstvene razprave tekom priprave doktorske disertacije, kajti njihovi komentarji so pripomogli tudi k izboljšanju kvalitete tega doktorskega dela. Prof. Dr. Roger A. Sheldon-u bi se rada še posebej zahvalila za gostoljuben sprejem v svojo raziskovalno skupino na Univerzi v Delftu (Nizozemska) med podiplomskim študijskim izpopolnjevanjem na področju tako imenovane tehnike zamreženih encimskih skupkov, uporabljene za imobilizacijo biokatalizatorja, v katero me je tudi sam vpeljal. Rednemu profesorju dr. Mihi Drofeniku se prav tako zahvaljujem za pomoč in plodne nasvete pri delu z magnetnimi tekočinami.

Posebna zahvala velja celotni raziskovalni skupini Laboratorija za separacijske procese in produktno tehniko za vzajemno pomoč pri organizaciji in delu v prijaznem znanstveno-pedagoškem kolektivu ter za štiri letno prijetno druženje. Še posebej bi rada izpostavila prijetno prijateljevanje s svojimi ožjimi kolegicami Matejo Primožič, Majo Ajtnik, Sabino Kavčič, Gordano Hojnik in Muzafero Paljevac. Srčno se zahvaljujem tudi našemu računalniškemu mojstru Samu Simoniču, univ.dipl.inž., za vso tehnično pomoč z računalniki.

Posebno zahvalo posvečam tudi svojemu neutrudljivemu plesalcu in fantu Mihi, ki ga občudujem. Hvala Ti za vse lepo preživete večere, ki sva jih odlično odplesala v pravem plesnem vzdušju, navkljub napornim delovnim dnevom, ki so za nami. Za neskončno voljo do ustvarjalnega življenja Ti podarjam naslednje posvetilo: "Si quelqu'an sait comment trouver l'amour est vrainal, ne peut être hereux".

Na koncu bi se rada zahvalila svoji mami za vso ljubezen in podporo, ki sem ju bila deležna v celotnem študijskem obdobju.

KAZALO

POVZETEK	XIV
ABSTRACT	XVI
1 UVOD	- 1 -
2 TEORETSKE OSNOVE	- 5 -
2.1 NANOMATERIALI. INTELIGENTNI MATERIALI PRIHODNOSTI.	- 5 -
2.2 PREDNOSTI UVAJANJA NANOTEHNOLOGIJE NA PODROČJU IMOBILIZACIJE BOKATALIZATORJA	- 6 -
2.3 ENCIMSKI NOSILCI NA OSNOVI NANOSTRUKTURIRANIH MATERIALOV	- 7 -
2.3.1 MAGNETNI NANODELCI	- 7 -
2.3.2 NANOPOROZNI MATERIALI	- 8 -
2.3.3 ENOJNI ENCIMSKI NANODELCI	- 10 -
2.3.4 ZAMREŽENI ENCIMSKI SKUPKI	- 11 -
2.4 LASTNOSTI NOSILCA ZA IMOBILIZACIJO BOKATALIZATORJA	- 13 -
2.5 PRIPRAVA MAGNETNEGA NOSILCA	- 14 -
2.5.1. Priprava stabilne magnetne tekočine na osnovi γ-Fe₂O₃ nanodelcev v vodi	- 14 -
2.5.1.1 Sinteza γ -Fe ₂ O ₃ nanodelcev	- 14 -
2.5.1.2 Stabilizacija sintetiziranih γ -Fe ₂ O ₃ nanodelcev	- 17 -
2.5.1.3 Površinska funkcionalizacija magnetnih nanodelcev	- 20 -
2.5.1.3.1 Primarna površinska funkcionalizacija magnetnih nanodelcev	- 20 -
2.5.1.3.2 Sekundarna površinska funkcionalizacija γ -Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ nanodelcev	- 22 -
2.5.2 Imobilizacija ChOx z adsorpcijo	- 24 -
2.5.3 Imobilizacija ChOx z ujetjem	- 25 -
2.5.4 Imobilizacija ChOx s pomočjo mrežnih povezovalcev	- 25 -
2.6 IMOBILIZACIJA BOKATALIZATORJA BREZ NOSILCA	- 25 -
2.6.1 CLEAs - Zamreženi encimski skupki (ang.: Cross-linked enzyme aggregates)	- 26 -
2.6.2 Reakcija obarjanja	- 27 -
2.6.3 Zamreženje encimskih skupkov	- 28 -
2.6.4 Aplikativna vrednost zamreženih encimskih skupkov	- 29 -
2.6.5 Imobilizacija hrenove peroksidaze	- 29 -
3 MATERIALI IN METODE	- 31 -
3.1. MATERIALI	- 31 -
3.2. ANALIZNE METODE	- 32 -
3.2.1 PRIPRAVA MAGNETNEGA NOSILCA	- 32 -
3.2.1.1 MERJENJE SPECIFIČNE MAGNETIZACIJE	- 32 -
3.2.1.2 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (XRD)	- 33 -
3.2.1.3 PRESEVNA (TEM) IN VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (SEM)	- 34 -
3.2.1.4 ENERGIJSKA DISPERZIJSKA SPEKTROSKOPIJA RENTGENSKIH ŽARKOV (EDS)	- 34 -
3.2.1.5 PLAMENSKA ATOMSKA ABSORPCIJSKA SPEKTROSKOPIJA (FAAS)	- 34 -
3.2.1.6 DOLOČANJE ŽELEZOVEGA OKSIDA (FeO) V MAGHEMITNIH (Fe ₂ O ₃) NANODELCIH	- 35 -
3.2.1.7 INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA	- 35 -
3.2.1.8 DOLOČANJE PROSTIH AMINO SKUPIN NA POVRŠINI MAGNETNEGA NANOKOMPOZITA	- 35 -

3.2.1.9 MERJENJE PH	- 36 -
3.3 IMOBILIZACIJA BOKATALIZATORJA NA POVRŠINSKO SPREMENJEN MAGNETNI NOSILEC	- 36 -
3.3.1 DOLOČANJE UČINKOVITOSTI IMOBILIZACIJE	- 36 -
3.3.2 MERJENJE SPECIFIČNE AKTIVNOSTI BOKATALIZATORJA	- 37 -
3.3.3 ENCIMSKI TEST ZA BOKATALIZATOR HOLESTEROL OKSIDAZO (CHOX, EC 1.1.3.6)	- 37 -
3.3.4 ENCIMSKI TEST ZA BOKATALIZATOR HRENOVO PEROKSIDAZO (HRP, EC 1.11.1.7)	- 38 -
3.3.4.1 AKTIVNOSTNI TEST NA OSNOVI REAKCIJE OKSIDACIJE O-DIANISIDIN-A	- 39 -
3.3.4.2 AKTIVNOSTNI TEST NA OSNOVI REAKCIJE OKSIDACIJE 4-AMINOANTIPIRINA	- 39 -
3.4 EKSPERIMENTALNE METODE	- 42 -
3.4.1 PRIPRAVA NANOKOMPOZITA ZA IMOBILIZACIJO BOKATALIZATORJA	- 42 -
3.4.1.1 Sinteza stabilne magnetne tekočine iz maghemitnih (γ-Fe₂O₃) nanodelcev	- 42 -
3.4.1.1.1 Sinteza maghemitnih nanodelcev	- 42 -
3.4.1.1.2 Površinska stabilizacija nanodelcev s citronsko kislino	- 43 -
3.4.1.1.3 Priprava magnetne tekočine	- 44 -
3.4.1.2 Kemijsko spreminjanje površine γ -Fe ₂ O ₃ nanodelcev	- 45 -
3.4.1.2.1 Primarna površinska funkcionalizacija γ -Fe ₂ O ₃ nanodelcev	- 45 -
3.4.1.2.2 Sekundarna površinska funkcionalizacija γ -Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ nanodelcev	- 48 -
3.4.2 IMOBILIZACIJA BOKATALIZATORJA NA NOSILEC	- 53 -
3.4.3 IMOBILIZACIJA BOKATALIZATORJA BREZ NOSILCA - PRIPRAVA ZAMREŽENIH ENCIMSKIH SKUPKOV	- 53 -
3.4.3.1 Postopek obarjanja proteina	- 54 -
3.4.3.2 Postopek zamreženja encimskih skupkov	- 55 -
3.4.4 STABILNOST ENCIMSKEGA PREPARATA	- 55 -
3.4.4.1 Termična stabilnost encima	- 55 -
3.4.4.2 Vpliv pH medija na aktivnost encima	- 56 -
3.4.4.3 Vpliv skladiščenja na aktivnost encima	- 56 -
3.4.4.4 Vpliv večkratne uporabe imobiliziranega encima na aktivnost encima	- 56 -
4 REZULTATI	- 57 -
4.1 IMOBILIZACIJA BOKATALIZATORJA NA NOSILEC	- 57 -
4.1.1 SINTEZA IN KARAKTERIZACIJA MAGNETNIH NANODELCEV	- 57 -
4.1.1.1 OBLIKA IN MORFOLOGIJA Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ NANODELCEV	- 57 -
4.1.1.2 PORAZDELITEV VELIKOSTI Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ IN Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ – AEAPTS NANODELCEV	- 61 -
4.1.1.3 RENTGENSKA PRAŠKOVNA ANALIZA (XRD)	- 61 -
4.1.1.4 ELEMENTARNA (EDS) ANALIZA MAGNETNEGA Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ NANODELCA	- 63 -
4.1.1.5 MAGNETNE LASTNOSTI Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ - AEAPTS NANODELCEV	- 64 -
4.1.1.6 KVALITATIVNO DOLOČANJE VEZANEGA AMINO SILANA	- 66 -
4.1.1.7 KVANTITATIVNO DOLOČANJE VEZANEGA AMINO SILANA	- 66 -
4.1.2 IMOBILIZACIJA HOLESTEROL OKSIDAZE NA MAGNETNI NOSILEC	- 68 -
4.1.2.1 OPTIMIZACIJA REAKCIJE AKTIVACIJE POVRŠINE Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ – AEAPTS NANODELCEV	- 68 -
4.1.2.5 IMOBILIZACIJA CHOX NA POVRŠINO Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ – AEAPTS NANODELCEV	- 75 -
4.1.2.6 OBLIKA IN MORFOLOGIJA Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ – AEAPTS/CHOX NANODELCEV	- 76 -
4.1.2.7 PORAZDELITEV VELIKOSTI Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ – AEAPTS/CHOX NANODELCEV	- 77 -
4.1.2.8 RENTGENSKA PRAŠKOVNA ANALIZA (XRD).	- 79 -
4.1.2.9 VEZAVA CHOX NA Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ – AEAPTS NOSILEC	- 79 -
4.1.2.10 VPLIV KONCENTRACIJE CHOX NA UČINKOVITOST IMOBILIZACIJE	- 82 -
4.1.3 LASTNOSTI IMOBILIZIRANE CHOX NA POVRŠINO Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ – AEAPTS NANODELCEV	- 84 -
4.1.3.1 VPLIV PH MEDIJA NA STABILNOST ENCIMSKEGA PREPARATA	- 84 -
4.1.3.2 TERMIČNA STABILNOST ENCIMSKEGA PREPARATA	- 85 -
4.1.3.3 VPLIV ČASA SKLADIŠČENJA NA STABILNOST ENCIMSKEGA PREPARATA	- 86 -
4.1.3.4 STABILNOST ENCIMSKEGA PREPARATA PRI PONOVI UPORABI	- 87 -
4.2 IMOBILIZACIJA BOKATALIZATORJA BREZ UPORABE NOSILCA	- 89 -
4.2.1 PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA CLEAS - HRP	- 89 -
4.2.1.7 IMOBILIZACIJA HRENOVE PEROKSIDAZE V OBLIKI ZAMREŽENIH ENCIMSKIH SKUPKOV	- 102 -

5 – ZAKLJUČKI	- 103 -
6 – PERSPEKTIVA ZA NADALJNJE DELO	- 105 -
7 - VIRI IN LITERATURA	- 107 -
8 – PRILOGE	- 117 -
9 - ŽIVLJENJEPIŠ	- 127 -
10 – OSEBNA BIBLIOGRAFIJA	- 129 -

KAZALO SLIK

SLIKA 2 – 1: ENCIMSKI NOSILCI IZ NANOSTRUKTURIRANIH MATERIALOV: A) NANOPOROZNI POLIMERNI NOSILEC; B) POVRŠINSKO SPREMENJENA NANOMEMBRANA; C) NANOREAKTOR Z UJETIM ENCIMOM; D) NANOCEVKA Z VEZANIM ENCIMOM.	7 -
SLIKA 2 – 2: POVRŠINSKO SPREMENJENI NANODELEC ZA IMOBILIZACIJO SUBSTANCE (NAVODNIK, 2007).....	8 -
SLIKA 2 – 3: POROZNI POLIMERNI MATERIAL KOT NOSILEC ZA BIOKATALIZATOR.	9 -
SLIKA 2 – 4: SINTEZA ENOJNIH ENCIMSKIH NANODELCEV (KIM IN GRATE, 2003).....	10 -
SLIKA 2 – 5: ENCIMSKI PREPARAT IZ ZAMREŽENIH ENCIMSKIH SKUPKOV.	12 -
SLIKA 2 – 6: PRIKAZ KOVALENTNE VEZAVE BIOKATALIZATORJA (E) NA NOSILEC: (A) – PREOSTANEK AKTIVNE PROSTE AMINOKISLINE; (B) – FUNKCIONALNA ENTITETA NA POVRŠINI NOSILCA; (C) – NOSILEC; (D) – DISTANČNIK.	13 -
SLIKA 2 – 7: SINTEZA Fe_2O_3 NANODELCEV.	16 -
SLIKA 2 – 8: MAGNETNA TEKOČINA (ODENBACH, 2003).....	18 -
SLIKA 2 – 9: MAGNETNI NANODELCI Z ADSORBIRANIMI MOLEKULAMI SURFAKTANTA (GUPTA IDR., 2001).	18 -
SLIKA 2 – 10: POVRŠINSKA STABILIZACIJA MAGNETNEGA NANODELCA (NAVODNIK, 2007).....	19 -
SLIKA 2 – 11: ELEKTROSTERIČNA STABILIZACIJA Fe_2O_3 NANODELCEV.....	20 -
SLIKA 2 – 12: PRIMARNA POVRŠINSKA FUNKCIONALIZACIJA Fe_2O_3 NANODELCEV.	22 -
SLIKA 2 – 13: RAZLIČNE TEHNIKE ZA PRIPRAVO IMOBILIZIRANEGA ENCIMA BREZ NOSILCA; A) KRISTALIZACIJA (CLEC), B) OBARJANJE (CLEA), C) SUŠENJE (CSDE), D) DIREKTNO ZAMREŽENJE (CLE)(CAO IDR., 2003).	26 -
SLIKA 3 – 1: POTEK REAKCIJE OKSIDACIJE HOLESTEROLA S CH_3Ox	38 -
SLIKA 3 – 2: POTEK SPECIFIČNE REAKCIJE S HRP.....	40 -
SLIKA 3 – 3: SHEMA REAKTORJA ZA SINTEZO MAGNETNIH NANODELCEV.	42 -
SLIKA 3 – 4: PRIKAZ SINTEZE MAGHEMITNIH MAGNETNIH NANODELCEV Z OBARJANJEM.	43 -
SLIKA 3 – 5: OBNAŠANJE MAGNETNE TEKOČINE POD VPLIVOM MAGNETNEGA POLJA.....	44 -
SLIKA 3 – 6: NATRIJEV SILIKAT.	45 -
SLIKA 3 – 7: AEAPTS.	49 -
SLIKA 3 – 8: REAKCIJA HIDROLIZE ZAČETNE RAZTOPINE AMINOSILANA OB DODATKU VODE IN KISLINSKEGA KATALIZATORJA (METANOJSKE ALI MRAVLJIČNE KISLINE). REAKCIJA JE IZRAZITO EKSO-TERMNA, PRI KATERI PRIDE DO SPREMEMBE BARVE ZAČETNE RAZTOPINE AMINOSILANA IZ SVETLO RUMENE V TEMNO ORANŽNO BARVO.	49 -
SLIKA 3 – 9: SHEMA PRIPRAVE ZAMREŽENIH ENCIMSKIH SKUPKOV (CLEAS): RAZTAPLJANJE, OBARJANJE IN ZAMREŽENJE.....	54 -
SLIKA 4 – 1: TEM POSNETKI – A, C, D) MAGHEMITNIH (Fe_2O_3/SiO_2) NANODELCEV PREVLEČENIH S PLASTJO AMORFNE SILIKE PRI RAZLIČNIH POVEČAVAH; B) IZOLIRANI Fe_2O_3/SiO_2 NANODELEC, UJET V SILIKATNO MATRICO S PREMEROM SILIKATNE PREVLEKE ~ 3 NM.	58 -
SLIKA 4 – 2: SEM POSNETKI – A, B, C, D) Fe_2O_3/SiO_2 – AEAPTS NANODELCEV IN PO AKTIVACIJI NANODELCEV Z MREŽNIM POVEZOVALCEM GLUTARALDEHIDOM. SEM SLIKE SO BILE NAREJENE PRI RAZLIČNIH POVEČAVAH V VELIKOSTNEM OBMOČJU DELCEV OD 50 DO 500 NM.	59 -
SLIKA 4 – 3: SEM POSNETKI – A, B, C, D) Fe_2O_3/SiO_2 – AEAPTS NANODELCEV IN PO AKTIVACIJI NANODELCEV Z MREŽNIM POVEZOVALCEM GLUTARALDEHIDOM. SEM SLIKE SO BILE NAREJENE PRI RAZLIČNIH POVEČAVAH V VELIKOSTNEM OBMOČJU DELCEV OD 500 NM DO 1 μ M.....	60 -
SLIKA 4 – 4: PORAZDELITEV VELIKOSTI A) Fe_2O_3/SiO_2 IN B) Fe_2O_3/SiO_2 – AEAPTS MAGNETNIH NANODELCEV. POVRŠINSKO SPREMENJENI Fe_2O_3/SiO_2 – AEAPTS MAGNETNI NANODELCI SO BILI AKTIVIRANI Z GLUTARALDEHIDOM, KI PREDSTAVLJA VEZALNO SPOJINO MED POVRŠINO DELCA IN MOLEKULO ENCIMA.	61 -

SLIKA 4 – 5: XRD SPEKTER ČISTIH MAGHEMITNIH Fe_2O_3 NANODELCEV S PRIPADAJOČO ELEKTRONSKO DIFRAKCIJO (DESNO ZGORAJ). SPEKTER JE INDEKSIRAN V SKLADU S SPINELNO STRUKTURO MAGHEMITA.	- 62 -
SLIKA 4 – 6: XRD SPEKTER POVRŠINSKO SPREMENJENIH Fe_2O_3/SiO_2 - AEAPTS NANODELCEV.	- 63 -
SLIKA 4 – 7: SEM-EDS ELEMENTARNA ANALIZA Fe_2O_3/SiO_2 NANODELCEV NA ZLATI PODLAGI.	- 64 -
SLIKA 4 – 8: MAGNETILNE KRIVULJE ČISTIH IN KEMIJSKO SPREMENJENIH MAGHEMITNIH NANODELCEV.	- 65 -
SLIKA 4 – 9: FT-IR SPEKTER Fe_2O_3/SiO_2 - AEAPTS NANODELCEV (SPODNJI SPEKTER) IN FT-IR SPEKTER ČISTE RAZTOPINE AMINO SILANA AEAPTS (ZGORNJI SPEKTER).	- 66 -
SLIKA 4 – 10: VPLIV PH-VREDNOSTI MEDIJA NA REAKCIJO ZAMREŽENJA POVRŠINE Fe_2O_3/SiO_2 - AEAPTS NANODELCEV NA IMOBILIZACIJO CHOx.	- 70 -
SLIKA 4 – 11: VPLIV KONCENTRACIJE MREŽNEGA POVEZOVALCA NA REAKCIJO ZAMREŽENJA POVRŠINE Fe_2O_3/SiO_2 - AEAPTS NANODELCEV NA IMOBILIZACIJO CHOx.	- 71 -
SLIKA 4 – 12: VPLIV ČASA REAKCIJE ZAMREŽENJA POVRŠINE Fe_2O_3/SiO_2 - AEAPTS NANODELCEV NA IMOBILIZACIJO CHOx.	- 72 -
SLIKA 4 – 13: VPLIV REAKCIJE AKTIVACIJE POVRŠINE MAGNETNEGA NOSILCA NA KONČNO UČINKOVITOST IMOBILIZACIJE CHOx.	- 74 -
SLIKA 4 – 14: SHEMAJSKI PRIKAZ PRIPRAVLJENEGA MAGNETNEGA NOSILCA.	- 75 -
SLIKA 4 – 15: TRIDIMENZIONALNA (3D) STRUKTURA ENCI MA CHOx Z RAZPOLOŽLJIVIMI AMINOKISLINSKIMI OSTANKI LIZINA (LYS). ENCI MA CHOx IMA 15 RAZPOLOŽLJIVIH OSTANKOV LIZINA (TORABI IDR., 2007).	- 76 -
SLIKA 4 – 16: TEM POSNETKI - A, B) MAGHEMITNIH (Fe_2O_3/SiO_2 - AEAPTS) NANODELCEV PREVLEČENIH S PLASTJO AMORFNE SILIKE Z IMOBILIZIRANO CHOx. CHOx/ Fe_2O_3/SiO_2 - AEAPTS = 1/100 w/w (UPORABLJENO MASNO RAZMERJE MED ENCI MAM IN MAGNETNIM NOSILCEM).	- 77 -
SLIKA 4 – 17: PORAZDELITEV VELIKOSTI Fe_2O_3/SiO_2 - AEAPTS MAGNETNIH NANODELCEV Z IMOBILIZIRANO CHOx.	- 78 -
SLIKA 4 – 18: XRD SPEKTER POVRŠINSKO SPREMENJENIH Fe_2O_3/SiO_2 - AEAPTS/CHOx NANODELCEV.	- 79 -
SLIKA 4 – 19: FT-IR SPEKTRA ČISTE RAZTOPINE ENCI MA CHOx (A) PRIPRAVLJENE V FOSFATNEM PUFRU (PBS, 10 mM, pH 7,3) IN SUSPENZIJE Fe_2O_3/SiO_2 - AEAPTS/CHOx NANODELCEV (B) HOMOGENO DISPERGIRANIH V PBS PUFRU. V PRIMERU (B) JE PROTEINSKI ABSORPCIJSKI VRH PRIKAZAN KOT RAZŠIRJENI VRH ZARADI KOMPLEKSNE TRUKTURE PROTEINA. V OBEH SPEKTRIH SO PRIKAZANI KARAKTERISTIČNI VRHOVI PRI VALOVNIH ŠTEVILIH 1550, 1400 IN 1650 cm^{-1} , ZNAČILNI ZA AMID I IN AMID II.	- 81 -
SLIKA 4 – 20: VPLIV PH NA STABILNOST PROSTE IN IMOBILIZIRANE CHOx PRI RAZLIČNIH PH-VREDNOSTIH.	- 84 -
SLIKA 4 – 21: TERMIČNA STABILNOST PROSTE IN IMOBILIZIRANE CHOx. VZORCE S PROSTO IN IMOBILIZIRANO CHOx SMO IZPOSTAVILI PRI RAZLIČNIH TEMPERATURAH IN ČASIH V PUFERSKI RAZTOPINI S PH-VREDNOSTJO 7,3.	- 85 -
SLIKA 4 – 22: STABILNOST ENCI MSKEGA PREPARATA PRI TEMPERATURAH 4°C IN 25°C. MERJENJE AKTIVNOSTI PROSTE IN IMOBILIZIRANE CHOx JE POTEKALO PRI PH 5 IN TEMPERATURI 37°C.	- 87 -
SLIKA 4 – 23: STABILNOST IMOBILIZIRANE CHOx PRI PONOVI UPORABI. REAKCIJA OKSIDACIJE HOLESTEROLA JE POTEKALA PRI TEMPERATURI 37°C IN KONCENTRACIJI HOLESTEROLA 0,2 mM.	- 88 -
SLIKA 4 – 24: A) SEM POSNETEK CLEAs-HRP; B) SEM POSNETEK POSAMEZNIH ZAMREŽENIH ENCI MSKIH SKUPKOV - EN SKUPEK VSEBUJE TUDI DO VEČ TISOČ MOLEKUL ENCI MA.	- 89 -
SLIKA 4 – 25: OBARJANJE HRP V ETANOLU (PODOBNO V METANOLU, 7-BUTANOLU IN NASIČENI AMONIJEVI SOLI).	- 91 -
SLIKA 4 – 26: OBARJANJE HRP V TETRAHIDROFURANU.	- 91 -
SLIKA 4 – 27: OBARJANJE HRP V ACETONU (PODOBNO V ACETONITRILU, 2-PROPANOLU IN DMETOH).	- 92 -
SLIKA 4 – 28: RELATIVNA AKTIVNOST RESUSPENDIRANIH SKUPKOV PO OBARJANJU ENCI MA HRP (4 MG mL^{-1}) Z IZBRANIMI OBARJALNIMI REAGENTI IN OB DODATKU STABILIZACIJSKEGA PROTEINA ALBUMINA (EA, 4 MG mL^{-1}). AKTIVNOST ENCI MA SMO PREVERILI Z ENCI MSKIM TESTOM NA OSNOVI OKSIDACIJE O-DIANISIDINA.	- 93 -
SLIKA 4 – 29: RELATIVNA AKTIVNOST ENCI MA HRP V ODVISNOSTI OD POSAMEZNIH ČASOVNIH INTERVALIH PRI SINTEZI CLEAs-HRP PRI SOBNI TEMPERATURI. KONCENTRACIJA GA JE BILA 1 % (v/v).	- 95 -
SLIKA 4 – 30: RELATIVNA AKTIVNOST CLEAs-HRP V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE GLUTARALDEHIDA. CLEAs SMO SINTETIZIRALI PRI NASLEDNJIH POGOJIH: 4 MG mL^{-1} HRP, 4 MG mL^{-1} EA IN 90 % (v/v) ACETON KOT OBARJALNI REAGENT. AKTIVNOST SMO MERILI Z ENCI MSKIM TESTOM NA OSNOVI REAKCIJE OKSIDACIJE O-DIANISIDINA.	- 96 -
SLIKA 4 – 31: FUNKCIONALIZACIJA POVRŠINE CLEAs Z RAZLIČNIMI FUNKCIONALNIMI ADITIVI: PROTEIN ALBUMIN (EA); RAZTOPINA POLI-L-LIZIN HIDROBROMINA (POLYLYS); POLIETILENIMINI (PEI 60 IN 600 kDA); PENTAETILENHEKSANAMIN (PEHA).	- 97 -

SLIKA 4 – 32: TRIDIMENZIONALNA (3D) STRUKTURA ENCIMA HRP Z RAZPOLOŽLJIVIMI AMINOKISLINSKIMI OSTANKI LIZINA (LYS) (TORABI IDR., 2007).....	- 98 -
SLIKA 4 – 33: SUSPENZIJA CLEAS-HRP.....	- 100 -
SLIKA 4 – 34: OPTIMIZACIJA KONCENTRACIJE ENCIMA HRP ZA SINTEZO CLEAS-HRP.	- 101 -

KAZALO TABEL

TABELA 2 – 1: FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI MAGNETITA IN MAGHEMITA (CORNELL IN SCHWERTMANN, 2003).....	- 17 -
TABELA 2 – 2: FIZIKALNO – KEMIJSKE LASTNOSTI TOPIL ZA OBARJANJE.	- 28 -
TABELA 3 – 1: ENCIMSKI TEST ZA HRP.....	- 40 -
TABELA 3 – 2: FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI NATRIJEVEGA SILIKATA.....	- 45 -
TABELA 3 – 3: FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI AMINOSILANA AEAPTS.	- 49 -
TABELA 4 – 1: POVRŠINSKA KONCENTRACIJA AMINOSKUPIN NA POVRŠINI NANODELCEV.....	- 67 -
TABELA 4 – 2: OPTIMALNI POGOJI ZA VEZAVO GA NA POVRŠINO Fe_2O_3/SiO_2 – AEAPTS NANODELCEV	- 73 -
TABELA 4 – 3: UČINKOVITOST IMOBILIZACIJE IN AKTIVNOST IMOBILIZIRANE CHOx.	- 82 -
TABELA 4 – 4: TERMIČNE KONSTANTE HITROSTI DEAKTIVACIJE PROSTE IN IMOBILIZIRANE CHOx.....	- 86 -
TABELA 4 – 5: OBARJANJE PROTEINA Z RAZLIČNIMI OBARJALNIMI REAGENTI.	- 90 -
TABELA 4 – 6: RELATIVNA AKTIVNOST CLEAS-HRP Z DODATKOM POLI-L-LIZIN IN PEI ADITIVOV.	- 98 -
TABELA 4 – 7: AKTIVNOST CLEAS-HRP Z DODATKOM PEHA PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH GLUTARALDEHIDA.	- 99 -
TABELA 4 – 8: CLEAS-HRP PREPARATI Z RAZLIČNIMI REDUCENTI.	- 100 -
TABELA 4 – 9: PRIMERJAVA AKTIVNOSTI POSAMEZNIH ENCIMSKIH PREPARATOV IZ IMOBILIZIRANE HRP.....	- 102 -

UPORABLJENE KRATICE

Au	Elementarno zlato
AEAPTS	3-(2-aminoetilamino)-propil-dimetoksimetilsilana, vrsta organosilana
4-AAP	4-aminoantipirin
BSA	Albumin iz govejega seruma
CH ₃ CH ₂ OCH ₂ CH ₃	Dietileter
CHCl ₃	Kloroform
C ₄ H ₈ O	Tetrahidrofuran
C ₄ H ₁₀ O	<i>t</i> -butanol
C ₃ H ₈ O	2-propanol
C ₃ H ₆ O	Aceton
C ₂ H ₆ O	Etanol
CH ₃ OH	Metanol
CH ₃ CN	Acetonitril
C ₃ H ₇ NO	DMF
C ₂ H ₆ OS	DMSO
- CO	Ketonska funkcionalna skupina
ChOx	Holesterol oksidaza
ChE	Holesterol esteraza
CLEAs	Zamreženi encimski skupki
CLEAs-HRP	Zamreženi encimski skupki iz hrenove peroksidaze
CLECs	Zamreženi encimski kristali
CSDEs	Zamreženi posušeni encimi
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
DMEtOH	Di-metoksietanol
EA	Albumin iz kokošjih jajc
EC	Indeks encimske klasifikacije
EDS	Energijska disperzijska spektroskopija rentgenskih žarkov
FAD	Kofaktor, flavin adenine dinukleotid
FAAS	Plamenska atomska absorpcijska spektroskopija
FeO	Železov oksid
FT-IR	Fourierjeva infrardeča spektroskopija
Fe ²⁺	Železovi II ioni
Fe ³⁺	Železovi III ioni
FeCl ₃ ·6H ₂ O	Železov klorid heksahidrat
FeCl ₂ ·4H ₂ O	Železov klorid tetrahidrat
Fe(OH) ₃	Železov hidroksid
Fe ₃ O ₄	Magnetit
γ-Fe ₂ O ₃	Maghemit
γ-Fe ₂ O ₃ /SiO ₂	Maghemitni nanodelci prevlečeni s tanko plastjo silikatne prevleke
γ-Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ - AEAPTS	Maghemitni nanodelci funkcionalizirani z molekulami aminosilana
γ-Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ - AEAPTS/ChOx	Visoko funkcionalni magnetni nanodelci z imobilizirano holesterol oksidazo
GA	Glutaraldehyd, mrežni povezovalac
HCl _(aq)	Razredčena klorovodikova kislina
HRP	Hrenova peroksidaza
HRSEM	Posnetki z visoko ločljivo vrstično mikroskopijo
HRTEM	Posnetki z visoko ločljivo presevno mikroskopijo
H ₂ O ₂	Vodikov peroksid
H ₂ SO ₄	Žveplova (IV) kislina
H ₃ PO ₄	Fosforjeva (V) kislina
- H ⁺	Oksonijev ion v raztopini

KOH	Kalijev hidroksid
K ₂ Cr ₂ O ₇	Kalijev bikromat, oksidant
K ₂ HPO ₄	Dikalijev hidrogen fosfat
KH ₂ PO ₄	Kalijev dihidrogen fosfat
Lys	Aminokislina Lizin
NaOH	Natrijev hidroksid
NaHCO ₃	Natrijev-hidrogenkarbonat
NaBH ₃ CN	Natrijev cianoborohidrid
NaBH ₄	Natrijev borohidrid
NH ₄ (OH) ₃	Amonijeva baza
Na ₂ SiO ₃	Natrijev silikat
NaCl _(aq)	Raztopina natrijevega klorida
-NH=CO -	Funkcionalna amidna skupina v molekuli proteina
-N = CH-	Schiffova baza
-NH ₂	Prosta funkcionalna amino skupina
-NH ₃ ⁺	Aminijev ion
-O	Kisikovi atomi
-OH	Hidroksilna funkcionalna skupina
PBS	Vodna raztopina na osnovi fosfatnega pufru
PEHA	Penta-etilen-heksanamin
PolyLys	Raztopina Poli-L-Lizina
PEG	Polietilenglikol
PEI	Polietilenimin
RNA	Ribosomalna nukleinska kislina
SENs	Enojni encimski nanodelci
-Si	Elementarni silicij
-Si-OH	Silanolna funkcionalna skupina
-Si-O-Si	Siloksanaska vez
-SiO ₂	Silikatna prevleka ali silicijev dioksid
TMOS	Tetrametil-ortosilikat
TEOS	Tetraetilortosilikat
XRD	Rentgenska praškovna difrakcija

UPORABLJENI SIMBOLI

\AA	Angstrom	$[10^{-10} \text{ m}]$
A_{243}	Absorbanca	/
A	Preostala aktivnost encimskega preparata po določenem $(t, T)_{\text{izpostavitve}}$	$[\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}]$
A_0	Začetna aktivnost encimskega preparata	$[\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}]$
a	Specifična površina maghemitnega nanodelca	$[\text{m}^2 \text{ g}^{-1}]$
C_{AMINO}	Površinska koncentracija prostih aminoskupin na površini magnetnega nosilca	$[\mu\text{mol}/\text{m}^2]$
$C_{\text{HCl, aq}}$	Množinska koncentracija klorovodikove kisline	$[\text{mol L}^{-1}]$
df	Dilucijski faktor za razredčevanje vzorca	/
d_{SiO_2}	Debelina silikatne prevleke	$[\text{nm}]$
$D_{\text{nanodelca}}$	Premer nanodelca	$[\text{nm}]$
$E/\text{mg}_{\text{encimski preparat}}$	Specifična aktivnost encima peroksidaze (HRP)	$[\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}]$
H	Jakost magnetnega polja	$[\text{kOe}]$
k_i	Termična konstanta hitrosti deaktivacije	$[\text{min}^{-1}]$
M	Magnetizacija	$[\text{emu g}^{-1}]$
M	Molska masa določene komponente	$[\text{g mol}^{-1}]$
$m_{\text{magnetni nosilec}}$	Masa magnetnega nosilca	$[\text{g}]$
m_{ChOx}	Masa encima ChOx	$[\mu\text{g}]$
m_w	Masno razmerje med ChOx in magnetnim nosilcem	/
$m_{\text{Fe}^{2+}}$	Masa železovih II ionov	$[\text{g}]$
$m_{\text{Fe}^{3+}}$	Masa železovih III ionov	$[\text{g}]$
$m_{\text{nanodelci}}$	Masa vseh maghemitnih nanodelcev	$[\text{g}]$
m	Masa določene komponente	$[\text{g}]$
$m_{\text{Na}_2\text{SiO}_3}$	Masa Na - silikata	$[\text{g}]$
$m_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2}$	Celokupna masa $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelcev	$[\text{g}]$
$M_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$	Molska masa maghemita	$[\text{g mol}^{-1}]$
M_{AEAPS}	Molska masa aminosilana	$[\text{g mol}^{-1}]$
N_{AEAPS}	Število prostih aminoskupin na površini magnetnega nosilca	$[\text{c}/\text{nm}^2]$
N_{atomi}	Število SiO_2 atomov v osnovni celici	/
N_A	Avogadrovo število	$[\text{mol}^{-1}]$
N_{Fe}	Število železovih atomov v nanodelcu	/
N_{AEAPS}	Število molekul aminosilana	/
N_{Fe}	Število atomov železa, Fe	/
N_{AEAPS}	Število molekul aminosilana	/
$N_{\text{AEAPS, celokupno}}$	Celokupno število molekul aminosilana	/
$n_{\text{Fe}^{2+}}$	Množina železovih II ionov	$[\text{mol}]$
$n_{\text{Fe}^{3+}}$	Množina železovih III ionov	$[\text{mol}]$
n_{SiO_2}	Množina SiO_2 atomov	$[\text{mol}]$
n	Množina določene komponente	$[\text{mol}]$
n_{AEAPS}	Množina aminosilana	$[\text{mol}]$
pK_a	Kislinska konstanta	/
r	Polmer magnetnega nanodelca	$[\text{nm}]$
R	Polmer maghemitnega nanodelca	$[\text{nm}]$
$R_{\text{Fe}/\text{AEAPS}}$	Atomsko razmerje	/
S	Celotna površina maghemitnih nanodelcev	$[\text{m}^2]$
$S_{\text{nanodelci}}$	Celotna površina maghemitnih nanodelcev	$[\text{m}^2]$
S_{SiO_2}	1/6 površina osnovne celice silicijevega dioksida	$[\text{m}^2]$

$S_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2}$	Površina $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelca	[nm ²]
S_{AEAPS}	Ploskovna površina ene molekule aminosilana	[nm ²]
$S_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2}$	Celokupna površina $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelcev	[nm ²]
T	Transmitanca	[%]
t	Čas	[min]
$t_{\text{reakcijski čas}}$	Čas reakcije	[min]
$t_{\text{Zamreženja}}$	Čas trajanja reakcije aktivacije površine magnetnega nosilca	[h]
t_{CLEAs}	Čas za pripravo CLEAs	[h]
V_{HCl}	Volumen klorovodikove kisline	[μL]
$V_{\text{Na}_2\text{SiO}_3}$	Volumen Na - silikata	[mL]
$V_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$	Molski volumen maghemitnih nanodelcev	[m ³ mol ⁻¹]
$V_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$	Molski volumen maghemitnih nanodelcev	[m ³ mol ⁻¹]
V_{TITRANT}	Volumen porabljene klorovodikove kisline	[mL]
V_{AEAPS}	Volumen aminosilana	[mL]
$V_{\text{reakcijska zmes}}$	Volumen reakcijske zmesi za encimsko reakcijo	mL
V_{Reaktor}	Volumen reaktorja za sintezo magnetnih nanodelcev	[mL]
$V_{\text{Citronska kislina}}$	Volumen citronske kisline	[mL]
V_{vzorec}	Volumen proste ali imobilizirane holesterol oksidaza	[mL]
W_{Fe}	Masni delež železa v magnetnem nosilcu	[%]
W_{Ferit}	Masni delež železovega oksida v magnetnem nosilcu	[%]
ω_{GA}	Koncentracija mrežnega povezovalca	[%]
ρ	Gostota magnetnega materiala, maghemita	[g cm ⁻³]
$\rho_{\text{Na}_2\text{SiO}_3}$	Gostota Na - silikata	[g cm ⁻³]
ρ_{AEAPS}	Gostota aminosilana	[g mL ⁻¹]
$\rho_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$	Gostota maghemita	[g mL ⁻¹]
2θ	Kot za merjenje širine uklonov pri tehniki XRD	[$^\circ$]
λ	Valovna dolžina	[cm ⁻¹]
γ_{ChOx}	Masna koncentracija encima ChOx	[$\mu\text{g mL}^{-1}$]
$\gamma_{\text{Citronska kislina}}$	Masna koncentracija citronske kisline	[g mL ⁻¹]
$\phi_{\text{Imobilizacije}}$	Učinkovitost imobilizacije	[%]
ϵ	Molarni ekstinkcijski koeficient	[M ⁻¹ cm ⁻¹]

NANOSTRUKTURIRANI MATERIALI ZA IMOBILIZACIJO BOKATALIZATORJA

Povzetek

V doktorski nalogi je nazorno predstavljen postopek sinteze magnetnih nanodelcev iz železovega oksida maghemita, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, za vezavo biokatalizatorja. Magnetni nanodelci, ki v zadnjih letih vse bolj pridobivajo na vrednosti kot potencialni encimski nosilci, so bili najprej sintetizirani z metodo obarjanja ali koprecipitacije železovih (II, Fe^{2+}) in železovih (III, Fe^{3+}) ionov v alkalnem mediju pri hitrem mešanju in visoki temperaturi. Površinska funkcionalizacija magnetnih nanodelcev je bila izvedena v dveh stopnjah. Primarna funkcionalna prevleka iz silicijevega dioksida (SiO_2), ki delcem daje predvsem višjo stabilnost, je bila sintetizirana pri striktno kontroliranih reakcijskih pogojih iz natrijevega silikata ali Na_2SiO_3 . Sekundarni funkcionalni sloj za doseganje višje funkcionalnosti in reaktivnosti površine nanodelcev je bil sintetiziran iz organskih molekul aminosilana ali 3-(2-aminoetilamino)-propil-dimetoksietilsilana v kislem mediju. V nadaljnjem so bili tako površinsko spremenjeni magnetni nanodelci uporabljeni za imobilizacijo specifičnega biokatalizatorja holesterol oksidaze (ChOx, EC 1.1.3.6) iz *Corynebacterium sp.* Analiza magnetnih nanodelcev z imobilizirano ChOx je pokazala, da so imeli nanodelci značilno obliko kroglice ali sfere s povprečnim premerom 50,2 nm. Vezava holesterol oksidaze je bila uspešno potrjena tudi s FT-IR tehniko. Učinkovitost imobilizacije na magnetni nosilec je znašala 92 % pri uporabljeni koncentraciji encima $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Aktivnost imobilizirane ChOx na magnetne nanodelce, prevlečene s tanko plastjo silikatne prevleke premera 3 nm, je bila 57 % v primerjavi z aktivnostjo ChOx. Študija vpliva pH-vrednosti in temperature na aktivnost in stabilnost encimskega preparata je pokazala, da ima imobilizirana ChOx višjo toleranco na spremembo pH-vrednosti okolja in višjo termično stabilnost. Prav tako je bila stabilnost imobilizirane ChOx pri ponovni uporabi dobra.

V drugem delu doktorske disertacije je opisana priprava aktivnih encimskih skupkov iz encima peroksidaze (HRP, EC 1.11.1.7), pridobljenega iz navadnega hrena (*lat.: Armoracia rusticana or Cochlearia armoracia*), in postopek zamreženja le-teh z glutaralhidom za pripravo končne oblike stabilnih zamreženih encimskih skupkov ali na kratko CLEAs. Postopek priprave CLEAs je bil razdeljen na dva ključna dela, in sicer, na obarjanje topnega ali nativnega encima s pomočjo ustreznega obarjalnega reagenta, in na nadaljnjo zamreženje tako izoborjenega encima s pomočjo mrežnega povezovalca. Končni videz CLEAs je podoben motni suspenziji, v kateri so jasno vidni skupki encimov, značilne sferične oblike in premera okrog 250 nm. Uspešno smo sintetizirali zamrežene encimske skupke iz hrenove peroksidaze pod različnimi testnimi pogoji. Končna aktivnost encimskih skupkov iz HRP je bila 83 %. Zamrežene encimske skupke smo sintetizirali v prisotnosti encima albumina iz kokošjih jajc in funkcionalnega aditiva, penta-etilenheksanamina (PEHA). Encim albumin poveča stabilnost encimskih skupkov, medtem ko

PEHA poveča število prostih amino skupin (-NH₂) na zunanji površini encima HRP, kar poenostavi postopek zamreženja encimskih delcev z mrežnim povezovalcem.

Ključne besede: imobilizacija biokatalizatorja, encimski nosilci, nanostrukturirani materiali, magnetni nanodelci, površinska funkcionalizacija, zamreženi encimski skupki, stabilizacija biokatalizatorja, holesterol oksidaza, hrenova peroksidaza.

UDK klasifikacija: 544.473:577.15(043.3)

NANOSTRUCTURED MATERIALS FOR ENZYME IMMOBILIZATION

Abstract

The research work offers a concise guide of the synthesis of maghemite magnetic nanoparticles, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, for immobilization of a biocatalyst. Magnetic nanoparticles, that are gaining an exceptionally increased attention as potential enzyme support in the recent years, were synthesized by the coprecipitation technique of ferrous (II, Fe^{2+}) and ferric (III, Fe^{3+}) ions in alkaline medium at harsh stirring and high temperature, respectively. Surface functionalization of magnetic nanoparticles was carried out stepwise and divided into two major steps. Primary functional layer of silica (SiO_2) that enhanced the stability of magnetic nanoparticles was synthesized under strictly regulated reaction conditions from sodium silicate. Next, the secondary functional layer formed of organic molecules of amino silane or 3-(2-Aminoethylamino)-propyl-dimethoxymethylsilane in order to achieve higher functionality and reactivity of the surface of magnetic nanoparticles was synthesized in acidic reaction medium. Furthermore, the prepared magnetic nanocomposites were used for the immobilization of a specific biocatalyst cholesterol oxidase (ChOx, EC 1.1.3.6) from *Corynebacterium sp.* The analysis of the magnetic nanoparticles with immobilized ChOx showed that the nanoparticles adopted a typical spherical shape with a mean diameter of 50,2 nm. The binding of ChOx was successfully confirmed by FT-IR technique. The binding efficiency was 92 % and was maximally achieved at enzyme concentration of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. The activity of immobilized ChOx onto magnetic nanoparticles, coated with a thin functional layer of silica with a thickness of 3 nm, was estimated to be 57 % in comparison to its native ChOx. The effects of pH and temperature also indicated the bound ChOx had better pH-tolerance and exhibited higher thermal stability. Furthermore, the immobilized system revealed also good reusable stability.

The second part of the PhD work was focused on the synthesis of active enzyme aggregates of peroxidase (HRP, EC 1.11.1.7) from horse radish roots (*lat.: Armoracia rusticana or Cochlearia armoracia*), further cross-linked with glutaraldehyde in order to obtain the final form of stable cross-linked enzyme aggregates or CLEAs. The procedure to prepare CLEAs was divided into two major steps, that involves first the precipitation of the soluble enzyme with a suitable precipitant such and second the crosslinking step with an appropriate cross-linker. The final suspension of CLEAs obtained was moderately turbid and enzyme particles could be normally observed with an average diameter of 250 nm. The CLEAs of HRP were successfully produced under different testing conditions afterwards. The final recovery activity of the CLEAs attained was 83 % compared to the activity of native enzyme. The synthesised CLEAs were prepared in the presence of egg albumin and functional additive as pentaethylenehexamine (PEHA). The role of albumin in

CLEAs preparation plays a significant role as a stabilizing agent of CLEAs particles, whereas the addition of PEHA was fundamental to obtain fully cross-linked HRP aggregates. For, the HRP possesses only 6 Lys (lysine) amino residues, that substantially impedes the cross-linking of the enzyme to completion, the addition of PEHA increased the free amino groups (-NH₂) on the outer surface of the enzyme, making the cross-linking more feasible.

Key words: immobilization of biocatalyst, enzyme supports, nanostructured materials, magnetic nanoparticles, surface functionalization, cross-linked enzyme aggregates, stabilization, cholesterol oxidase, horse radish peroxidase.

UDK Classification: 544.473:577.15(043.3)

1 UVOD

Encimi so katalizatorji in so zanimivi predvsem zaradi svoje visoke specifičnosti in učinkovitosti delovanja v naravnem okolju. Največji problem je njihova postopna izguba aktivnosti s časom. Znanost se je v zadnjih štirih desetletjih zato osredotočila na razumevanje delovanja deaktivacije encima, kot tudi na razvoj učinkovitih metod za stabilizacijo encima. Ker je stanje encima v njegovi naravni obliki zelo krhko, se nativna oblika encima pod zunanjimi pogoji okolja, kot so visok tlak in temperatura, organska topila, sušenje in oksidacija, hitro omaje. To vodi do konformacijskih sprememb v sekundarni strukturi molekule encima in zato do deaktivacije encima. Eden izmed načinov za uspešno preprečevanje deaktivacije encima je v spremembi okolja delovanja encima, na primer z dodatki različnih topnih aditivov kot so kovinski ioni, površinsko aktivnih snovi, poliolov, PEG polimerov in sladkorjev. Stabilizacijski učinek se največkrat doseže v primeru encimov, ki so ujeti v trdnem nosilcu ali adsorbirani na nosilec. Pojem imobilizacija se navezuje na pripravo netopnega biokatalitičnega preparata, ki združuje encim kot biokatalizator in trden anorganski ali organski nosilec v celovito enoto. Metoda imobilizacije, ki je osnovana samo na večtočkovnih kovalentnih povezavah med molekulami encima in nosilcem je najbolj zaželjena, kajti preprečuje nepravilno zvijanje molekule encima, kar vodi v doseganje višje stabilnosti encimske strukture. Kovalentna vezava poteče med funkcionalnimi mesti na površini nosilca, ki so visoko reaktivna, in aminokislinskimi preostanki verig na površini encima (Fernandez-Lorente in drugi, 2001; Fernandez-Lafuente in drugi, 1995).

Dandanes postaja bionanotehnologija vse močnejše orodje za proizvodnjo sintetičnih struktur, imenovanih nanostrukturirani materiali, na ravni molekule s pomočjo povezovanja lastnosti bioloških materialov z osnovnimi načeli fizike in kemije. Zaradi sposobnosti proizvodnje visoko funkcionalnih sistemov na nanometrski skali so se v zadnjih letih aplikacije bionanotehnologije dobesedno razmahnile na različna področja inženirstva in znanosti. Prednosti nanostrukturiranih materialov je veliko in prav te opravičujejo veliko povpraševanje po vse večji proizvodnji nanomaterialov. Prioritetne lastnosti, povezane s povečano površinsko reaktivnostjo nanomaterialov, so zelo dobrodošle v njihovih aplikacijah v industriji in znanosti nasploh. Znatno zmanjšana velikost nanomaterialov prinaša še druge pomembne lastnosti, ki so povezane z njihovo preprosto in poceni proizvodnjo. Poleg tega so nanomateriali neprimerljivo lažji od ostalih masivnih materialov (Jungbae in drugi, 2006). Dodatna dobra lastnost nanomaterialov je tudi ta, da je možno njihove lastnosti kontrolirati, odvisno od željene aplikacije in postopka njihove priprave. Merilo za opredelitev nanomaterialov je določeno s številom nanodimenzij. Nanomaterial je opredeljen kot nanoprodukt, ki ima vsaj eno dimenzijo pod 200 nm, čeprav so zaželjene še manjše velikosti. Obstajajo trije tipi nanostrukturiranih materialov, s tremi, dvema in eno nanodimenzijo. Tako ločimo tri-nanodimenzijske nanodelce, nanosisteme z dvema nanodimenzijama, kamor spadajo nanovlakna, nanožičke in nanocevice in nanostrukture z eno nanodimenzijo, kot so nanofilmi in laminirani materiali. Nanostrukturirane materiale pridobivamo z različnimi proizvodnimi tehnikami, ki se delijo na razgradne in generativne postopke. Najpogosteje se uporabljajo razgradni postopki, pri katerih izdelava nanomateriala sledi načrtovani in postopni

razgradnji večjega, masivnega materiala kot so litografija in sol-gel tehnologija za proizvodnjo nanodelcev. V nasprotnem primeru, generativni postopki predstavljajo samoizdelavo nanomateriala iz osnovnih gradnikov na molekularni ravni kot je primer avtoformacije nanodelcev z obarjanjem iz fluida (Kelsall in drugi, 2005).

Nanostrukturirani materiali, ki obstajajo v različnih oblikah so še kako dobrodošli, predvsem v zadnjih letih je njihov prodor na področju imobilizacije biokatalizatorjev vnesel veliko prednostnih lastnosti le-teh. Dandanes je pozornost še posebej usmerjena na izdelavo visoko funkcionalnih magnetnih nanodelcev z velikostjo premera od 50 do 200 nm. Magnetni nanonosilci so dobro zastopani na področjih bioseparacij in biomedicine za imobilizacijo proteinov in biokatalizatorjev, za imunске teste, za RNA in DNA ločevanje RNA, izolacijo celic in ciljano doziranje bioaktivnih učinkovin (Kouassi in Irudayaraj, 2004). Uporaba magnetnih nanonosilcev v tehnikah imobilizacije temelji na vezavi specifičnega liganda na površinsko spremenjen magnetni nanonosilec in uporaba nastalega kompozita ali konjugata v procesih ločevanja in koncentriranja biomakromolekul in celic. Na magnetne nanonosilce lahko kovalentno vežemo različne ligande kot so proteini, encimi in protitelesa. Interakcije med ligandom in magnetnim nanonosilcem še niso v celoti raziskane in študija vezave proteina na magnetni nanonosilec je pomembna za optimizacijo postopka priprave magnetnega nanokompozita za vezavo specifičnih ligandov in encimov (Berry in Curtis, 2003). Sinteza modificiranih superparamagnetnih nanodelcev z molekulami amino silana za imobilizacijo encima sloni na enostavni in poceni kemijski metodi obarjanja železovih ionov v amonijakalni raztopini. Visoko funkcionalizirani magnetni nanodelci nastanejo s postopno funkcionalizacijo železovih nanodelcev z nanosom silike in molekul amino silana na površino nanodelcev. Na takšen način dobimo visoko robusten magnetni nanokompozit s posebnimi strukturnimi lastnostmi za imobilizacijo encima. Med posebne lastnosti spadajo tudi mehanska stabilnost ali rigidnost, odpornost na topila in zaradi magnetnega značaja je možno nastale delce preprosto ločiti z uporabo zunanega magnetnega polja (Xiao in drugi, 2006). Slednja sposobnost vplivanja na magnetne nanodelce z magnetnim poljem je še posebej zanimiva, kajti delcem lahko tako preprosto sledimo ali z njimi manipuliramo na daljavo, kar bistveno poenostavi uporabo nanodelcev v diagnostiki in različnih zdravilnih terapijah, kot sta na primer magnetna hipertermija in ciljani vnos zdravilnih učinkovin. Velika specifična površina nanodelcev pripomore k učinkoviti vezavi katerekoli bioaktivne učinkovine (Makovec in drugi, 2008). Proizvodnja neaglomeriranih nanodelcev z željeno velikostjo in visoko vsebnostjo magnetnega materiala je pomembna pridobitev v tehnikah za imobilizacijo. Ena izmed poleg nekaterih že navedenih lastnosti za uporabo nanodelcev kot nosilnih medijev za bioaktivno učinkovino in biokatalizator je tudi lastnost, ki jo imenujemo superparamagnetizem. Superparamagnetne lastnosti nanodelcem dajejo posebno prednost, in sicer omogočajo lažje vodenje nanodelcev pod vplivom zunanega magnetnega polja (permanentni magnet). Delci kažejo superparamagnetni značaj pri določeni kritični velikosti, ki je običajno pod 15 nm. Superparamagnetni nanodelci izven magnetnega polja ne kažejo spontane magnetne polarizacije. Med njimi ni magnetnih interakcij, ki bi povzročale magnetno aglomeracijo ali spontano zlepljanje med delci. Stabilni koloidni superparamagnetni nanodelci, ki nastanejo, so uporabni za površinsko funkcionalizacijo ali kemijsko spreminjanje površine delcev za vezavo različnih bioloških učinkovin (Gupta, 2005). Dokazali so, da so superparamagnetni nanodelci, oblečeni z enojno plastjo silike in dodatno spremenjeni z molekulami amino silana, primerni encimski nosilci zaradi višje kemijske stabilnosti in zato predstavljajo obetavno obliko encimskih nanonosilcev nasploh (Ichiyanagi in drugi, 2007; Jeong in drugi, 2005).

Zamreženi encimski skupki (CLEAs) so posebna oblika imobiliziranega encima, pri kateri je trdni nosilec nepotreben. Predstavljajo primerno obliko imobilizacije encima predvsem za potrebe v proizvodnji v povečanem merilu (scale-up procesi) in biotransformacijah, tudi

na industrijski ravni (Sheldon, 2001). Tehnologija zamreženih encimskih agregatov je strogo prednostna v industrijskih aplikacijah. Metoda za pripravo stabilnih zamreženih encimskih agregatov je enostavna in zato nagnjena k hitri optimizaciji same priprave imobiliziranega encima. Poleg tega metodo spremljajo nizki stroški za pripravo zamreženih encimskih agregatov in neposredno implementacijo imobiliziranega encima v biokatalitični proces. Dobra lastnost metode je, da je uporabna za široko paleto encimov in tudi surovih celičnih ekstraktov. Zamreženi encimski agregati so robustne encimske strukture z visoko aktivnostjo in toleranco do organskih topil. Dodatna prednost tehnologije za pripravo zamreženih encimskih agregatov je priprava imobiliziranih dveh ali več encimov hkrati (combi-CLEAs), ki prinaša mnogo dobrih lastnosti: zmanjšan volumen reaktorja, manj procesnih enot (procesne enote za reakcijo in ločevanje produktov so združene v eno samo, zaradi učinkovitega ločevanja tako pripravljene imobiliziranega encima neposredno iz reakcijske zmesi), visoka volumetrična aktivnost in aktivnost imobiliziranega encima glede na čas reakcije, zmanjšan čas obratovanja reaktorja in minimizirana proizvodnja stranskih produktov (Schoevaart in drugi, 2004). Nedvomno je pomembnost uporabe tehnologije, ki temelji na zamreženih encimskih agregatih velika in vse kaže, da kot takšna igra pomembno vlogo v industrijskih biotransformacijah in ostalih vejah encimske tehnologije, kjer se uporablja izključno le imobilizirani encim.

Vsebina doktorske disertacije vsebuje opis dveh pristopov priprave imobiliziranega encima. V sklopu priprave različnih oblik vezanega encima je bil encim imobiliziran na funkcionalizirane magnetne nanodelce in v obliki zamreženih encimskih agregatov ali skupkov (CLEAs – *cross-linked enzyme aggregates*). Obe metodi za pripravo imobiliziranega encima sta bili uporabljeni na primeru različnih encimov. Poudarek je bil predvsem na encimih, s katerimi se najpogosteje srečujemo v bioloških in kliničnih aplikacijah (iz družine encimov oksidoreduktaz).

Raziskovalno delo, zajeto v doktorski disertaciji, je vsebinsko razdeljeno na dva tematska sklopa. Prvi del doktorske disertacije se nanaša na sintezo magnetnih nanodelcev iz magnetnega materiala maghemita, njihovo površinsko obdelavo ali funkcionalizacijo za lažjo manipulacijo z nanodelci in njihovo celovito karakterizacijo ter na poskus imobilizacije specifičnega biokatalizatorja, holesterol oksidaze, na visoko funkcionalne magnetne nanonosilce. Kemijska modifikacija površine $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanodelcev iz maghemita je potekala v dveh stopnjah. Najprej smo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanodelce prevlekli s polimerno siliko (SiO_2) in šele nato smo izvedli reakcijo silanizacije z amino silanom za sintezo visoko funkcionaliziranih $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanodelcev, pripravljenih za nadaljnjo površinsko obdelavo. Izbrani amino silan, ki smo ga uporabili za pripenjanje amino skupin na površino maghemitnih, s siliko oblečenih nanodelcev, je 3-(2-aminoetilamino)-propil-dimetoksimetilsilan, ki spada v široko družino organosilanov. Za karakterizacijo površinsko spremenjenih magnetnih nanodelcev smo uporabili različne metode. Visoko ločljivi transmisijski elektronski mikroskop smo uporabili za določitev razpona velikosti delcev, morfologijo in še drugih strukturnih lastnosti nanodelcev kot je prisotnost plašča silike, ki obdaja železovo jedro nanodelcev. Strukturno nanodelcev smo še dodatno določili z infrardečo spektroskopijo. Nanodelce smo karakterizirali tudi z uporabo rentgenske praškovne difrakcije. Z energijsko disperzijsko spektroskopijo rentgenskih žarkov smo določili kemijsko sestavo vzorca nanokompozita iz magnetnih nanodelcev prevlečenih s funkcionalno plastjo amorfne silike. Študijo vezave biokatalizatorja na magnetni nosilec smo preučevali z infrardečo spektroskopijo in s pomočjo UV-vis spektrofotometra. Po uspešno izvedeni vezavi biokatalizatorja smo testirali še stabilnost tako pripravljene nanokompozita glede na temperaturo in časovno uporabnost encimskega preparata.

Drugi del doktorske disertacije se navezuje na pripravo druge stabilne oblike imobiliziranega encima, v obliki zamreženih encimskih skupkov. Sinteza zamreženih encimskih skupkov je bila narejena na primeru encima hrenove peroksidaze. Strukturne lastnosti tako sintetiziranih zamreženih encimskih skupkov smo določili s pomočjo elektronske mikroskopije. Katalitične lastnosti končnega encimskega preparata v obliki zamreženih encimskih skupkov smo prav tako določili z UV-vis spektroskopijo.

2 TEORETSKE OSNOVE

2.1 Nanomateriali. Inteligentni materiali prihodnosti.

Nanodelci, nanofilmi, nanožice, nanocevkice, nanokapsule, nanočipi in inteligentni polimeri na osnovi nanostrukturiranih materialov, in še bi lahko naštevali, so temeljni pojmi prihodnosti razvojnih tehnologij in znanosti nasploh, katerih skupni imenovalac le-teh je preprosto predpona *nano*. Po pripovedih znanstvenikov nanoznanost ne predstavlja nič novega, ampak gre pravzaprav za koristno združitev bazičnih znanstvenih disciplin kot so fizika, kemija in biologija z uporabnimi vedami, začevši z informacijsko tehnologijo, kemijsko tehnologijo, elektro-inženirstvom ter strojništvom. Nenazadnje so v tovrstno interdisciplinarnost upravičeno vpleteni še medicina, sociologija in ekonomija. Znanstveniki, ki se z nanotehnologijami ukvarjajo, soglasno zatrjujejo, da bo nanosvet neizmerno izboljšal družbeno in ekonomsko blaginjo človeka, s postopnim razvojem nanomedicine pa tudi zdravstveno sliko celotnega človeštva. Čeprav je nanotehnologija v Evropi še vedno v zametkih, je gospodarska politika mnogih evropskih držav enoznačno usmerjena v spodbujanje razvijanja nanotehnologij, s ciljem, da bo nanotehnologija v prihodnosti, ne prva, temveč najboljša znanstvena disciplina za sintezo in proizvodnjo novih materialov, čigar vrednost bo neprecenljiva čisto na vseh področjih življenja. Zmožnost manipuliranja, priprave in uporabe funkcionalnih struktur ali nanostrukturiranih materialov na ravni molekule ali atoma pomeni zato začetek novega pogleda na pridobivanje že obstoječih, izboljšanih ali celo novih lastnosti materialov, ki so nenadomestljivi v našem življenju (Navodnik, 2007).

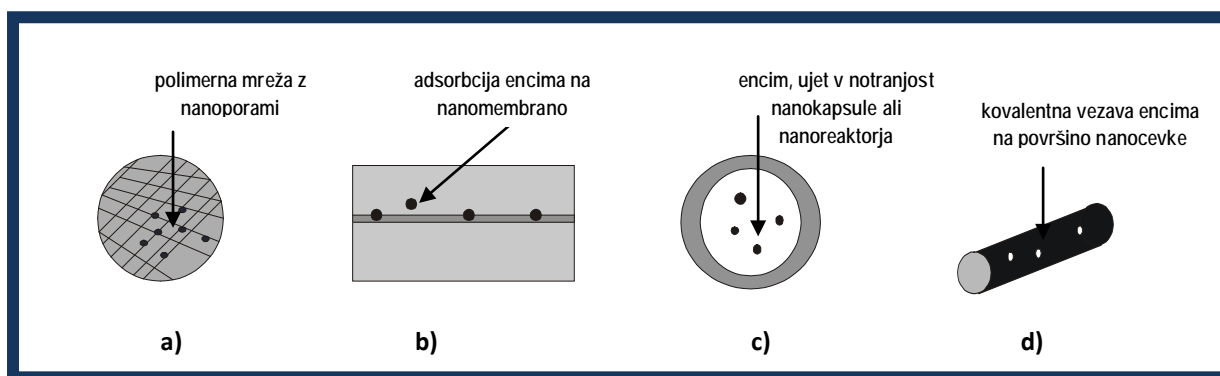
Obstaja možnost, da bi z nanotehnologijo lahko omilili pereče vprašanje o varčevanju z energijo, ki je prva prioriteta direktive Evropske unije o racionalni rabi in alternativnih virih energije. Solarne in vodikove celice bodo v prihodnosti primerne za proizvodnjo in skladiščenje energije, ne nazadnje bo razvoj novih energetskih materialov neizpodbitno doprinesel k bolj varčni potrošnji energije. Mednje spadajo novi hibridni nanomateriali za superizolacije, konzerviranje, shranjevanje in prenos energije. Potencialne možnosti uporabe nanotehnologij se odražajo tudi v medicini in farmaciji. S postopnim razvojem biočipov bi se znatno izboljšala diagnostika, kot na primer za odkrivanje rakastih celic. Nanomateriali v medicini predstavljajo dodaten vir za boljše preiskovanje tarčnih celic in njihovo sortiranje tudi v že zelo majhnem organskem vzorcu. Vsekakor ni moč prezreti ambiciozne napovedi o uporabi nanomaterialov za ciljano doziranje zdravil v človeškem telesu kot tudi v tkivnem inženiringu za nadomeščanje poškodovanih tkiv brez bojazni o zavrnitvi vstavljenega nanovsadka. V ta sklop nanomaterialov pridejo v poštev bipolarne liposomske nanosfere, ki v svoji hidrofobni notranjosti zadržujejo zdravilno učinkovino, navzven pa so zaradi hidrofilnega značaja biokompatibilni z gostiteljsko tekočino, v kateri potuje liposomska kapsula. Na točno določenem mestu se učinkovina sprosti s postopno razgraditvijo liposoma, ki je za gostiteljski organizem povsem neškodljiva. V tovrstne namene je tudi zanimiva uporaba magnetnih nanodelcev, na katere je z razliko od liposomov zdravilna učinkovina kemijsko pritrjena nanje. Prednostna lastnost teh delcev je prav njihova sposobnost premikanja pod vplivom zunanega magnetnega polja. S kontroliranim vodenjem `oboroženih` magnetnih delcev do tarčnega mesta v človeškem

telesu pomeni popolno opustitev klasičnih postopkov za zdravljenje težkih bolezni, pri katerih je uporaba škodljivih kemoterapevtikov in drugih invazivnih prijemov neizogibna. Mogoče se sliši kot znanstvena fantastika, a vendar začetni poskusi o doziranju zdravil na točno določeno mesto v človeškem telesu so že v polnem teku. Seveda je potrebno omeniti, da se tovrstni poskusi izvajajo v simuliranih, umetnih sistemih, ki spominjajo na človeški pretočni sistem. Res je, da je pred popolno vpeljavo nanostrukturiranih materialov za bio-aplikacije potrebno nanomateriale dobro testirati in preizkusiti njihovo netoksičnost, biokompatibilnost in biorazgradljivost (Navodnik, 2007).

Nanotehnologija je dobesedno preplavila naša življenja in vse kaže da bo v prihodnosti vodilna tehnologija v pridobivanju življenjskih potrebščin za bolj kvalitetno in zdravo življenje tako pri nas kot drugod po svetu (Navodnik, 2007).

2.2 Prednosti uvajanja nanotehnologije na področju imobilizacije biokatalizatorja

Tehnike za imobilizacijo ali vezavo encimov dobivajo v zadnjih letih nove razsežnosti. Neposredno z vpeljavo in spodbujanjem razvoja nanotehnologij na področju biokatalitičnih procesov, kjer encim v vlogi biokatalizatorja spreminja vhodne reaktante v uporabne produkte, se razvijajo tudi novi pristopi pri načrtovanju primernih encimskih nosilcev, ki bi zagotovili neoporečno delovanje samega encima. Vezani oziroma imobilizirani encim ima neprimerno več prednosti pred nevezanim encimom, zato bo število bioprosesov z imobiliziranim encimom v prihodnosti zagotovo narastlo. Višja stabilnost, daljša življenska doba encima, enostavno ločevanje encima iz reakcijske zmesi in večkratna uporabnost encima ter zmanjšana kontaminacija produktov med procesom so odločilni faktorji, ki vzpodbudno dokazujejo upravičenost uporabe imobiliziranih encimov pred prostimi, neimobiliziranimi encimi v biokatalizi. Ker pa so stroški postopka imobilizacije in encimskega nosilca višji, je v zadnjih letih vpeljava encimskih nosilcev na osnovi nanostrukturiranih materialov še kako dobrodošla, saj je proizvodnja le-teh poenostavljena in bolj ekonomična. Nanostrukturni encimski nosilec v velikostnem razredu od 0,1 do 100 nm predstavlja novost med že utečenimi tehnikami za imobilizacijo encima, vendar se njihova prednost kaže v neprimerno večji razpoložljivi specifični površini za stabilno vezavo encima, ki izboljšuje prileganje molekul encima zaradi nanodimenzij, hkrati pa povečuje njegovo stabilnost in aktivnost. Morfološke značilnosti encimskih nosilcev iz nanostrukturiranih materialov so prikazane na sliki 2 – 1.



Slika 2 – 1: Encimski nosilci iz nanostrukturiranih materialov: a) nanoporozni polimerni nosilec; b) površinsko spremenjena nanomembrana; c) nanoreaktor z ujetim encimom; d) nanocevka z vezanim encimom.

Največkrat uporabljeni encimski nosilci na osnovi nanostrukturiranih materialov so nanodelci, nanovlakna, polporozne polimerne matrice ali kar zamreženi stabilni encimski skupki. Velikost in oblika nanostrukturiranih materialov ter strukturiranost por v polimernih nosilcih pa odločajo o primernosti uporabe posameznega nosilca, kot tudi njegovo aplikacijo (Jungbae idr., 2006). V zadnjih letih znanost o materialih pridobiva vedno bolj na teži, predvsem znanost o nanomaterialih. Proizvodnja novejših, inteligentnih nanomaterialov s točno določenimi lastnostmi, je glavna prioriteta raziskav na področju materialov.

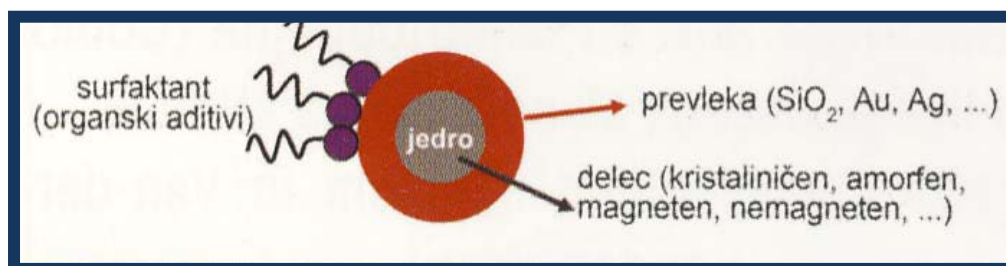
2.3 Encimski nosilci na osnovi nanostrukturiranih materialov

2.3.1 Magnetni nanodelci

Magnetni nanodelci iz železovega oksida kot sta maghemit in magnetit postajajo vse bolj uporabljeni v biotehnologiji, biomedicini, v postopkih ločevanja in imobilizaciji encimov, navsezadnje tudi na področju ciljanega doziranja zdravil na točno določeno mesto ter za izolacijo dednega materiala ali DNA. Nedavno so dokazali, da so magnetni nanodelci lahko uporabni tudi za vezavo in neposredno sproščanje različnih virusov s površine funkcionalnih magnetnih nanodelcev (Salata; Liu idr., 2004).

Na splošno so funkcionalni magnetni nanodelci zgrajeni iz železovega jedra in prevlečeni s tanko, funkcionalno plastjo različnega izvora, organskega ali anorganskega. Največkrat so organske prevleke iz različnih polimerov kot so polistiren, polimetilmetakrilat in hitozan. V skupini anorganskih prevlek je daleč najbolj uporabljen silicijev dioksid ali trivialno silika (SiO_2) tudi zaradi njegovih prednostnih lastnosti, ki so dobro izkoriščene za potrebe v biomedicini. Še več, magnetni nanodelci, prevlečeni s plastjo silike, imajo visoko mehansko trdnost, se ne zlepjajo ali aglomerirajo ter so biokompatibilni, kar jih naredi še posebno privlačne za ločevanje različnih bioaktivnih učinkovin, živih celic ali proteinov. V literaturi navajajo različne primere kovalentne vezave večjih encimov na kemijsko spremenjene magnetne nanodelce in vse kaže, da zanimanje za le-te zaradi njihovih enkratnih magnetnih lastnosti konstantno narašča. Ključni parametri magnetnih nanodelcev, prevlečenih s plastjo silike za uspešno vezavo biokatalizatorja so velikost, primerna površinska funkcionalizacija delcev z visokim deležem reaktivnih skupin in

nenazadnje tudi superparamagnetne lastnosti samih nanodelcev. Na voljo je več metod za pripravo visoko funkcionalnih nanokompozitov. Med drugimi je spreminjanje površine magnetnih nanodelcev z molekulami amino silana najpogosteje uporabljena metoda za funkcionalizacijo delcev. V tem primeru molekule amino silana delujejo kot reaktivni sloj, vezan na plast anorganske silike na magnetnih nanodelcih. Molekule amino silana zagotovijo visok delež prostih amino skupin ($-NH_3$) na zunanji površini magnetnih nanodelcev, kar omogoča nadaljnjo kemijsko spreminjanje površine nanodelcev. Funkcionalni plašč, ki magnetne delce obdaja, ima več prednosti. Na primer, velikost delcev se opazno poveča, za posledico, se prekomerna reaktivnost "neoblečenih" magnetnih nanodelcev znatno zmanjša in je problem o zlepljanju ali aglomeraciji delcev tako odpravljen (Chen in Liao, 2002; Berry in Curtis, 2003). Površinsko spremenjeni nanodelec, primeren za vezavo bioaktivne učinkovine, je prikazan na sliki 2 – 2.



Slika 2 – 2: Površinsko spremenjen nanodelec za imobilizacijo substance (Navodnik, 2007).

2.3.2 Nanoporozni materiali

Nanoporozni polimerni materiali so zaradi povezane, odprte strukture v veliki meri uporabljeni kot nosilci heterogenih reagentov, katalizatorjev in encimov. Pravimo, da je encim ali biokatalizator ujet v porozni polimerni material. Postopku imobilizacije biokatalizatorja v tovrstni nosilec pravimo ujetje ali inkapsulacija. Inkapsulacijo ali ujetje encima s "sol-gel" tehnologijo so prvič izvedli leta 1994 (Avnir, 1994). Tehnika je preprosta in temelji najprej na hidrolizi tetrametil- in tetraetilortosilikata (TMOS, TEOS) v "sol" in šele nato z dodatkom raztopine encima, ki deluje kot iniciator reakcije kondenzacije, se tvori gel, v katerem postane encim ujet v silikatno matrico. Med postopkom priprave poroznega materiala nastane veliko število por in kanalov, v razponu velikosti od 0,1 do 500 nm. Postopek mora biti opravljen dosledno, saj obstaja verjetnost, da encim, ujet v porah polimerne mreže, uhaja.

Z metodo inkapsulacije ali ujetja biokatalizatorja v polimerno matrico je bilo imobiliziranih že veliko encimov. Prednost metode ujetja encima s sol-gel postopkom v nanoporozni polimerni material, je predvsem ta, da je dodatek encima, ki ga želimo imobilizirati, izveden v zgodnji fazi priprave nanoporoznega polimernega materiala, kar omogoča višjo mehansko stabilnost imobiliziranega ali ujetega encima (Lucarift idr., 2004).

Vezava biokatalizatorja v nanoporozne polimerne materiale je odvisna od velikosti in razporeditve por v nosilcu, oziroma od tega ali so pore enakomerno ali neenakomerno porazdeljene po polimerni matrici. Nekateri encimi se težko vežejo na polimerni nosilec zaradi neujemanja v velikosti encima in por polimernega nosilca. Učinkovitost vezave biokatalizatorja je v tem primeru zelo nizka. Velja splošno pravilo, da so nosilci iz nanoporoznih polimernih materialov primerni predvsem za vezavo manjših biokatalizatorjev (Diaz idr., 1996).

Nanoporozni polimerni nosilci predstavljajo na področju razvoja nanomaterialov za potrebe imobilizacije biokatalizatorjev prednost. Lastnosti, ki upravičujejo njihovo vse pogostejšo rabo prav na področju encimskih tehnologij, so velika specifična površina nosilca, velik razpon in volumen por ter organizirana strukturiranost por v poroznem nosilcu.

Na stabilnost adsorbiranih molekul encima v pore polimernih materialov vplivajo še drugi faktorji. Poleg velikosti pore poroznega polimernega materiala ima velik vpliv na stabilnost ujetega encima tudi hitrost adsorpcije in uhajanja encima iz pore. Ujemanje velikosti pore z velikostjo molekul encima igra odločilno vlogo pri doseganju zaželjene stabilnosti encima. Porozni materiali z večjimi premeri por ne vežejo zadostne količine encima, da bi encim dolgoročno ostal v pori. Pri adsorpciji encima je potrebno upoštevati tudi nabojne interakcije med molekulo encima in notranjo površino pore. Privlačne sile, ki nastanejo zaradi nasprotnih si nabojev med molekulo encima in notranjo površino pore, pospešujejo adsorpcijo encima, obratno pa je vezava encima otežena ali celo onemogočena. Narava naboja med posamezno molekulo encima in notranjo površino pore je kontrolirana s pH puferske raztopine ali pa s površinsko funkcionalizacijo poroznih polimernih materialov z amino ali karboksilno funkcionalno skupino (Takahashi idr., 2001).

Pri metodi adsorpcije ali ujetja encima v porozni polimerni material je problem uhajanja encima iz pore materiala neprestano prisoten in ga je skoraj nemogoče odmisлити. Eden izmed načinov, da se prepreči uhajanje encima, je kovalentna vezava encima v prisotnosti mrežnega povezovalca glutaraldehida. Rezultati so pokazali višjo stabilnost, in zato tudi višjo aktivnost kovalentno vezanega encima v primerjavi z metodo fizikalne adsorpcije. Imobiliziran encim je bil v primerjavi z nevezanim ali prostim encim stabilnejši za 1000-krat (Lei idr., 2002).

Obstajajo še drugi porozni polimerni materiali za imobilizacijo encima. Med vsemi so monoliti na osnovi polimetakrilata (PolyHIPE) zelo priljubljeni za uporabo v tovrstne namene. V Sloveniji se z množično proizvodnjo in prodajo monolitov ukvarja podjetje BIA Separations (Ljubljana). Med poroznimi polimernimi materiali kot nosilci za biokatalizator se uporabljajo še aerogeli na osnovi silike (Paljevac in drugi, 2007).

Primer poroznega polimernega materiala je ponazorjen na sliki 2 – 3.



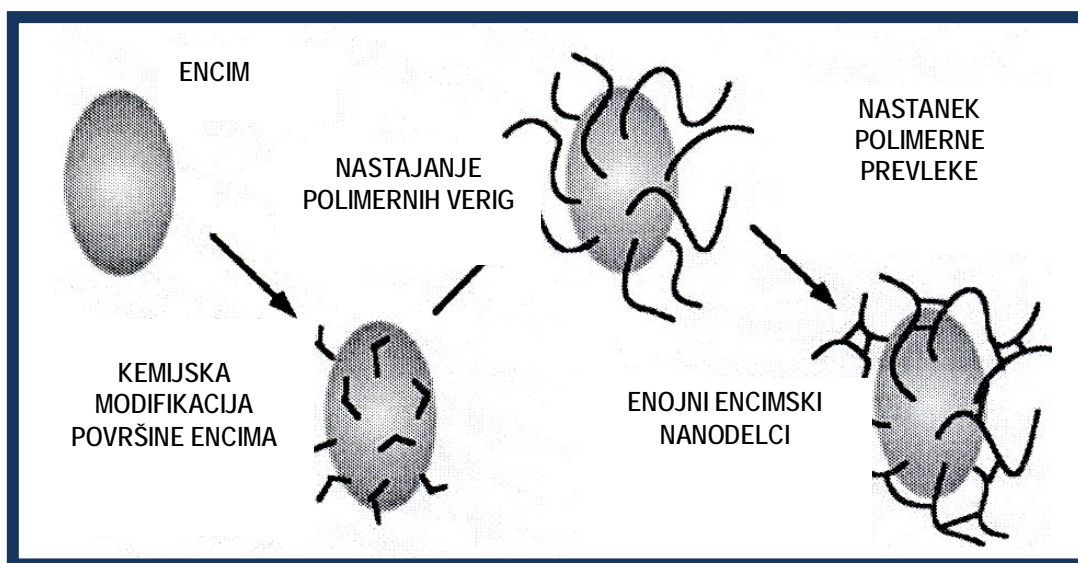
Slika 2 – 3: Porozni polimerni material kot nosilec za biokatalizator.

2.3.3 Enojni encimski nanodelci

Novejšo, bolj inovativno obliko na področju stabilizacije biokatalizatorja predstavljajo tako imenovani enojni encimski nanodelci ali okrajšano SENS (*ang.: Single Enzyme Nanoparticles*). To so encimski kompoziti, ki ne presegajo velikosti 10 nm in so sestavljeni iz molekule encima in funkcionalnega plašča različnega izvora, ki obdaja encim. Tako je molekula encima prevlečena ali funkcionalizirana s porozno organsko ali anorgansko prevleko, ki tvori stabilno funkcionalno mrežo velikosti le nekaj nanometrov.

Priprava enojnih encimskih nanodelcev predstavlja nov pristop k imobilizaciji biokatalizatorjev, ki je drugačna od ostalih že poznanih metod imobilizacije kot so vezava encima v porozno polimerno in anorgansko matrico ter ujetje encima v »sol-gel«. Sinteza enojnih encimskih nanodelcev je enostavna in zagotavlja visoko katalitično aktivnost encimskih nanodelcev, hkrati pa ne otežuje prenosa snovi med biokatalitično reakcijo. Enojni encimski nanodelci, ki delujejo kot samostojna biokatalitična enota, so izredno stabilni in visoko aktivni (Kim in Grate, 2003).

Sinteza enojnih encimskih nanodelcev se začne na površini nativnega proteina in je sestavljena iz treh faz: a) pripenjanja funkcionalnih molekul na površino encima, b) njihove postopne rasti in c) medsebojnega zamreženja funkcionalnih molekul na površini encima (slika 2 – 4).



Slika 2 – 4: Sinteza enojnih encimskih nanodelcev (Kim in Grate, 2003).

Funkcionalizacija površine molecule encima navadno poteče s kovalentnim pripenjanjem organskih molekul, ki postopno rastejo med polimerizirajo na površini encima, z namenom, da se tvori trdna funkcionalna prevleka, enakomerno porazdeljena po površini encima. Takšen primer pripenjanja funkcionalnih molekul na površino encima predstavlja kemijska modifikacija površine encima z vinilnimi funkcionalnimi skupinami, ki se nato kovalentno povežejo z aminokislinskimi preostanki na površini molecule encima, kot je lizin, z dodatkom površinsko aktivne snovi (*npr.:* z akril-oil kloridom). Z dodatkom ustrezne površinsko aktivne snovi ali surfaktanta so se tako nastali encimski nanodelci sposobni raztopiti v organskem topilu, na primer v heksanu. V tej fazi priprave dokončne oblike

enojnih encimskih nanodelcev poteče proces raztapljanja encimskih nanodelcev, ker postane površina encima neposredno obdana z molekulami topila. Nato se prične naslednja stopnja, to je stopnja polimerizacije ali kontinuirane rasti pripetih verig iz organskih molekul iz površine molekule encima. Začetek radikalne polimerizacije s prostimi vinilnimi funkcionalnimi skupinami, s katerimi je spremenjena površina encima, sproži podaljšanje polimernih verig iz organskih molekul, ki vejejo iz površine encima. To je prva stopnja v procesu polimerizacije organskih molekul, sledi še druga. V reakcijsko zmes se neposredno dodajo še monomeri organosilana, ki vsebujejo tudi vinilne in trimetoksi-silanske funkcionalne skupine. Monomeri organosilana služijo kot iniciator pri verižni reakciji nastajanja polimernih verig iz organskih molekul na površini encima. Med prvo stopnjo polimerizacije nastanejo kompozitni delci iz encima in organske prevleke, ki se med seboj ločijo in prenesejo v vodno fazo, kjer polimerni repki iz tri-metoksi silana hidrolizirajo in medsebojno kondenzirajo. Tako nastane organska prevleka, ki ostane visoko zamrežena po celotni površini encimske molekule. Reakcija polimerizacije organosilana v funkcionalni plašč je pri nastajanju enojnih encimskih nanodelcev zelo občutljiva faza, saj je od pogojev in hitrosti reakcije polimerizacije odvisna debelina polimernega plašča na površini encima. Obenem je potrebno paziti, da se encimski nanodelci med seboj ne zamrežijo. Poskus priprave enojnih encimskih nanodelcev je bil narejen z encimom proteazo, imenovano SEN-CT (Mozhaev, 2002).

Enojni encimski nanodelci predstavljajo stabilno kompozitno strukturo, v kateri je molekula encima zamrežena s polimerom po celotni površini, ki encimu daje določeno stabilnost in funkcionalnost. Debelina prevleke ali funkcionalnega plašča šteje le nekaj nanometrov. Navkljub rigidni sestavi polimerne prevleke, je le-ta dovolj prepustna za prehajanje molekul substratov in produktov do aktivnega mesta encima in obratno. Različne študije so pokazale, da so enojni encimski nanodelci v primerjavi s prostim encimom izredno stabilni. Upad aktivnosti v enojnih encimskih nanodelcih na osnovi proteaze je bil opažen šele po štirih mesecih, seveda je tukaj potrebno poudariti, da je dolgoživost encimskega preparata odvisna tudi od vrste uporabljenega encima. Enojni encimski nanodelci tako veljajo za stabilne encimske nanokompozite, sestavljene iz večih večtočkovnih kovalentnih povezav med encimom in polimerno prevleko, ki preprečuje njegovo deaktivacijo. Študije kinetike z enojnimi encimskimi nanodelci so pokazale, da polimerna mreža, ki encim obdaja, bistveno ne vpliva na prenos snovi med zunanjim in notranjim mikrookoljem encima. Oviran prenos snovi nastane šele pri porah velikosti od 20 do 250 μm .

Enojni encimski nanodelci, kot aktivna in stabilna oblika encimskega preparata, so lahko še dodatno imobilizirani v polporozne materiale z metodo ujetja. Polporozni materiali so primerni nosilci predvsem zato, ker nudijo visoko specifično površino za vezavo encima, prednost imobilizacije encimskih nanodelcev v polporozno matrico pa se kaže v izboljšani volumetrični encimski aktivnosti. Ko-imobilizacija enojnih encimskih nanodelcev v polporozne materiale predstavlja idealen biokatalitični sistem za uporabo v bioremediaciji, na področju biosenzorjev in ostalih biokatalitičnih procesih. Enojni encimski nanodelci zato predstavljajo inovativno obliko imobilizacije encima v nanometrskem merilu (Cesar, 2007).

2.3.4 Zamreženi encimski skupki

Tehnika zamreženja encimskih skupkov ali na kratko CLEAs je splošno priznana kot potencialno orodje za imobilizacijo različnih biokatalizatorjev. Zamreženje encimskih molekul predstavlja eno od osnovnih metod za vezavo encima, pri kateri je uporaba sintetičnega encimskega nosilca praktično nepotrebna. Zamreženi encimski skupki so znani kot stabilna oblika imobiliziranega encima brez prisotnosti trdnega nosilca kot so

delci silike, anorgnaske in organske matrice, silika geli,...itd. Razvoj robustnih biokatalizatorjev z neprimerno daljšo operativnostjo in stabilnostjo v širokem pH in temperaturnem območju ter višjo toleranco na organska topila postaja čedalje večji izziv na področju encimskih tehnologij (Sheldon, 2003). Tehnika zamreženih encimskih skupkov je osnovana izključno na medmolekularnem zamreženju molekul encima in kot takšna predstavlja prednostno obliko imobiliziranega encima pred ostalimi načini vezave encima. Pri metodi zamreženih encimskih skupkov uporaba trdnega nosilca za vezavo encima ni potrebna, kar omogoči doseganje višje aktivnosti imobilizirane oblike encima. V primerjavi z drugimi oblikami imobilizacije encima je metoda CLEAs neprimerljivo cenejša in bolj enostavna, sestavljena izključno le iz postopka obarjanja (*ang.*: precipitation) in zamreženja (*ang.*: cross-linking) encimskih skupkov. Obliko imobilizacije biokatalizatorja brez uporabe trdnega nosilca spremljajo številne prednosti, kot so večja aktivna površina vezanega encima, višja volumetrična produktivnost procesa in zmanjšani proizvodni stroški (Sheldon, 2003).

Postopek za pripravo CLEAs je preprost, sestavljen iz dveh ključnih stopenj: obarjanja in zamreženja. Med reakcijo obarjanja ali precipitacije, encim neposredno izoborimo iz vodne raztopine z dodatkom ustrezne soli ali organskega topila (aceton, 2-propanol, *t*-butil alkohol,...itd.) ali celo s polimerom kot je polietilenglikol (PEG). V nadaljevanju encimske skupke, ki nastanejo med obarjanjem zamrežimo s primernim bifunkcionalnim reagentom, kot je glutaraldehid. V rabi so še drugi mrežni povezovalci, ki se razlikujejo po velikosti in funkcionalnosti. V to vrsto mrežnih povezovalcev spadajo različni derivati ogljikovih hidratov kot so saharoza, laktoza in derivati visoko zamreženega dekstrana. Polifunkcionalni polimeri z molsko maso nad 10 in 20 kDa so lahko prav tako učinkoviti mrežni povezovalci, ker imajo visoko vsebnost aldehydskih funkcionalnih skupin, ki pripomorejo k temu, da se molekule encima učinkovito medsebojno povežejo v trdno polimerno mrežo. Končni produkt so t.i. klastri ali skupki molekul encima, ki so mehansko stabilni in jih lahko neposredno uporabimo za specifično biokatalitično reakcijo.

Tehnika za pripravo CLEAs je vsestranska in usmerjena v načrtovanje robustne in stabilne oblike imobiliziranega encima tako za vodne kot nevodne medije. Metoda za pripravo zamreženih encimskih skupkov je prav tako primerna za sintezo CLEAs iz surovega proteinskega ekstrakta in nečistih encimskih preparatov, kar je velika prednost, saj je postopek očiščevanja encimov relativno drag in zahteven. Do sedaj je bil postopek za pripravo zamreženih encimskih skupkov uporabljen iz različnih encimov: penicilin acilaza, lipaze, lakaze,... itd. Izgled CLEAs ponazarja slika 2 – 5.



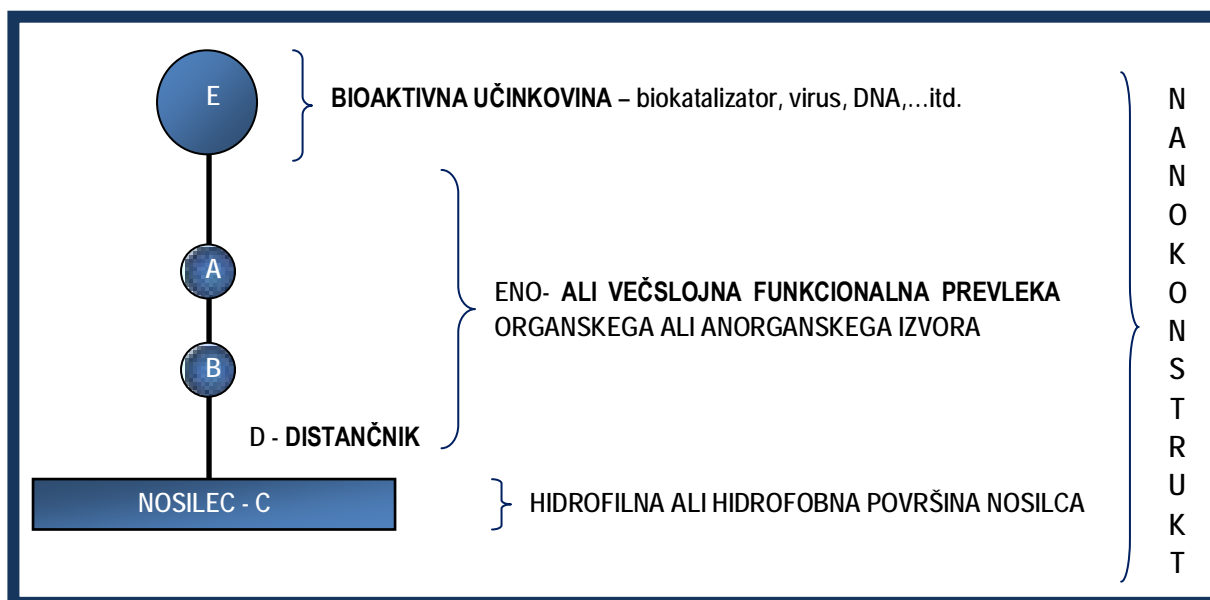
Slika 2 – 5: Encimski preparat iz zamreženih encimskih skupkov.

Prednost uporabe tehnike CLEAS je ta, da metoda omogoča imobilizacijo dveh ali več encimov (ang.: *combi-CLEAs*) hkrati za katalizo zaporednih ali kaskadnih reakcij z določenimi prednostmi: nastane manj stranskih, nepotrebnih produktov, katerih ni potrebno posebej ločevati, volumen reaktorja je manjši in volumetrična proizvodnost je večja. Primeri, v katerih je bila uporabljena oblika *combi-CLEAs* za katalizo večstopenjskih, zaporednih reakcij, pričajo o prednostni uporabi takšne oblike vezanega encima (Cao, 2003).

2.4 Lastnosti nosilca za imobilizacijo biokatalizatorja

Pomemben dejavnik, ki ga moramo upoštevati pri načrtovanju encimskega nosilca, je pravilna izbira načina vezave biokatalizatorja na nosilec, saj ta bistveno vpliva na stabilizacijo biokatalizatorja. Nepravilna izbira načina vezave biokatalizatorja lahko vodi do nepovratnih strukturnih sprememb biokatalizatorja, ki povzročijo okrnitev njegove native aktivnosti. Zato sta izbira tipa nosilca in postopek imobilizacije biokatalizatorja na nosilec ključna faktorja za doseganje višje stabilnosti imobiliziranega encima. V primerjavi z drugimi načini imobilizacije biokatalizatorja, med katere uvrščamo adsorpcijo in ujetje encima v nosilec, je kovalentna vezava encima najpogosteje uporabljena metoda, saj je edina, ki omogoča močno vez med encimom in nosilcem (Zarbosky, 1973).

Kovalentna vezava ali imobilizacija biokatalizatorja na površino nosilca je osnovana na nastanku kemijske vezi med preostanki aktivnih prostih aminokislin na površini encima in prostimi funkcionalnimi skupinami ali entitetami, ki so pripete na površino nosilca, kot kaže slika 2 – 6.



Slika 2 – 6: Prikaz kovalentne vezave biokatalizatorja (E) na nosilec: (A) – preostanek aktivne proste aminokisliline; (B) – funkcionalna entiteta na površini nosilca; (C) – nosilec; (D) – **distančnik**.

Da poteče reakcija med funkcionalnimi entitetami med nosilcem in biokatalizatorjem, se morajo funkcionalne skupine nosilca ali biokatalizatorja pred procesom imobilizacije najprej kemijsko aktivirati. Najpogosteje poteče kemijska aktivacija površine nosilca (Gemeiner, 1992).

Kovalentno vezani encim predstavlja kompozit, sestavljen iz trdnega nosilca, distančnika, kovalentne (nepovratne) vezi med funkcionalnimi entitetami encima in nosilca ter encima ali biokatalizatorja, ki je nepovratno vezan na nosilec. Izbrani nosilec deluje kot opora za vezani encim in zato tudi narekuje njegovo stabilnost in aktivnost ter uporabo imobiliziranega encima. Dejavniki, ki vplivajo na kovalentno vezani encim, so:

- fizikalne lastnosti nosilca (npr.: velikost por, velikost nosilca, poroznost, oblika,..itd) (Kotha idr., 1996; Mujawar idr., 1999; Woodley, 1992);
- kemijske lastnosti nosilca (npr.: kemijska sestava nosilca, gostota aktivnih in neaktivnih funkcionalnih entitet na površini nosilca) (Voivodov idr., 1992);
- kemija vezave (enojna ali multipla kovalentna vez) med nosilcem in encimom (Tao in Furusaki, 1995; Varian in Sansen, 1996; Chikere idr., 2001; Chae in Kim, 1998);
- strukturne spremembe encima v času imobilizacije in po njej (Kondo idr., 1997; Fernandez-Lafuente idr., 1998, 2001; Goncalves idr., 1997; Marcovic in Machova, 1985);
- orientacija encima (Martin idr., 2002, 2003; Steighardt in Kleine, 1993);
- lastnosti in dolžina distančnika (Bulmus idr., 1997; Hayashi idr., 1991; Wu idr., 1998; Penzol idr., 1998; Toshifumi idr., 1995; Martin idr., 2002);
- lastnosti medija med imobilizacijo encima (Gianfreda idr., 1991);
- število vezi, ki nastanejo med encimom in nosilcem (Mozhaev idr., 1990; Blanco idr.; 1988) in
- porazdelitev molekul encima (način prileganja) na/v nosilec (Pashova idr., 1992; Goldstein, 1972).

2.5 Priprava magnetnega nosilca

2.5.1. Priprava stabilne magnetne tekočine na osnovi γ -Fe₂O₃ nanodelcev v vodi

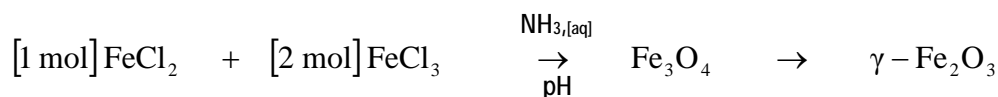
2.5.1.1 Sinteza γ -Fe₂O₃ nanodelcev

Superparamagnetni nanodelci (Superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs) se v zadnjih letih vedno pogosteje uporabljajo za številne in vivo aplikacije kot so magnetna resonanca, za ciljno doziranje bioloških učinkovin, separacijo različnih substanc in še bi lahko naštevali. Za uporabo magnetnih nanodelcev v biomedicinski in biotehnološke aplikacije sta odločilna predvsem dva ključna faktorja, visoka magnetizacija in velikost delcev do 100 nm ter ozka porazdelitev velikosti delcev v mediju. Do danes je bilo narejenih le nekaj študij za izboljšanje tako fizikalno-kemijskih lastnosti magnetnih nanodelcev kot tudi morfoloških značilnosti nanodelcev, predvsem oblike in velikosti delcev. Dandanes so raziskave usmerjene predvsem v sintezo in pripravo visoko

funkcionalnih magnetnih nanodelcev, ki so biokompatibilni in netoksični za biološke sisteme (Gupta, 2005).

V rabi so številni postopki za sintezo magnetnih nanodelcev; termični razkroj, mikroemulzija, sonokemijska in elektrokemična sinteza. Najpogosteje pa se uporablja tako imenovana metoda obarjanja (ali *koprecipitacija*, ang.: *thermal coprecipitation*) magnetnih nanodelcev iz raztopine železovih ionov. Metoda obarjanja je osnovana na mešanju raztopin železovih Fe^{2+} in Fe^{3+} ionov v molskem razmerju 1:2 v močno bazičnem reakcijskem mediju pri sobni temperaturi. Reakcija obarjanja se izvaja tudi pri visokih temperaturah. Na velikost in obliko železovih delcev vpliva izbira soli ali začetnega substrata, iz katerega obarjamo nanodelce. Kot izhodni substrat lahko uporabimo železov klorid, sulfat, nitrat, perklorat,...itd.). Poleg tega je možno velikost in obliko nanodelcev kontrolirati tudi z atomskim razmerjem železovih ionov, z reakcijsko temperaturo, pH-vrednostjo in ionsko močjo reakcijskega medija, s hitrostjo mešanja reakcijske zmesi in nenazadnje tudi s frekvenco dodajanja alkalne raztopine (npr.: amonijaka ali natrijevega hidroksida), ki deluje kot katalizator obarjanja železovih ionov iz raztopine (Wu in drugi, 2007).

Maghemitni ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nanodelci so lahko pripravljene s kemijsko metodo obarjanja Fe^{2+} in Fe^{3+} ionov v alkalnem mediju, v katerem poteče sledeča reakcija (Jeong idr., 2005):

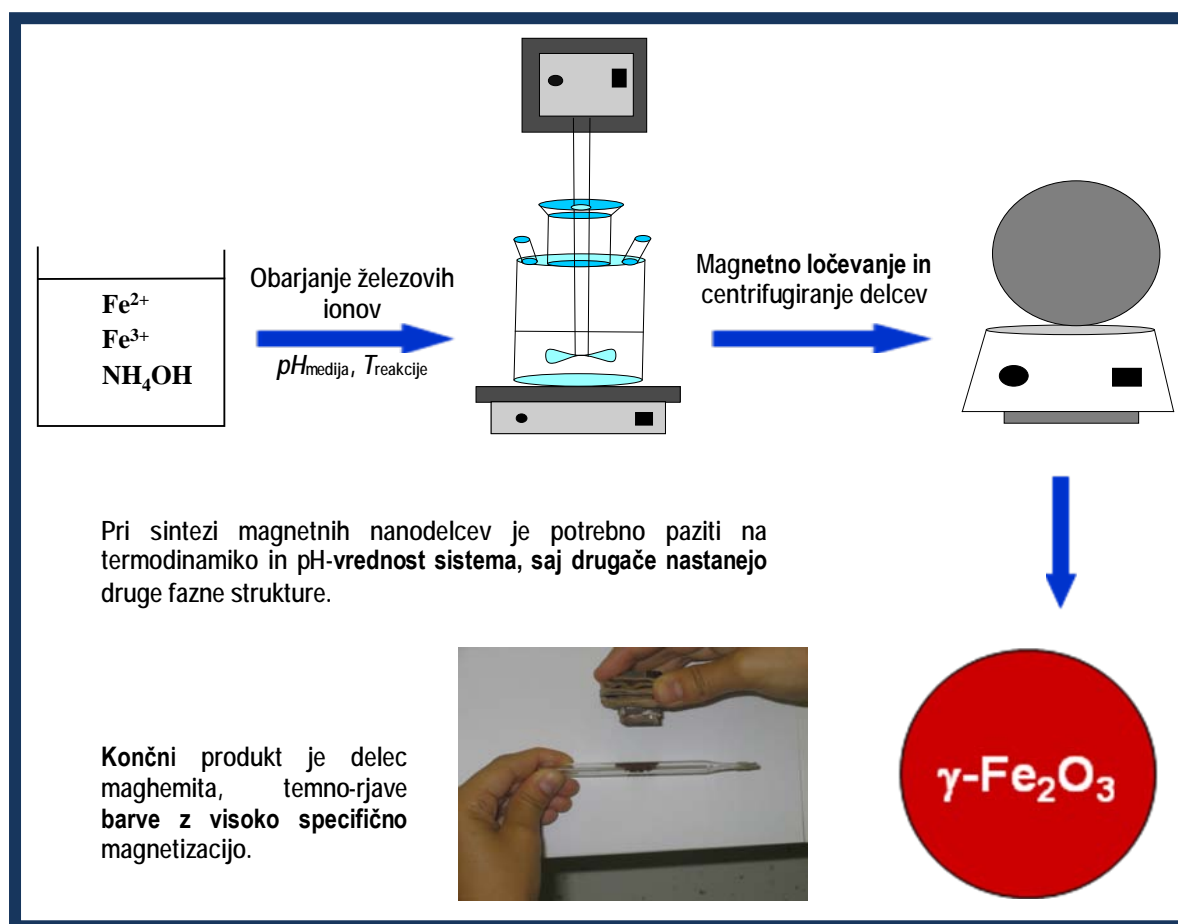


OBARJANJE ŽELEZOVIH IONOV

MAGNETIT [INTERMEDIAT] PREIDE V MAGHEMIT

Na nastanek maghemitnih nanodelcev odločilno vplivata dva reakcijska parametra, in sicer temperatura in pH-vrednost reakcijskega medija. Začetna pH-vrednost medija in temperatura pred začetkom reakcije obarjanja sta ključna faktorja, ki vplivata na sestavo in velikost formiranih nanodelcev. Stroga kontrola začetne pH-vrednosti medija in temperature je pomembna, saj lahko med reakcijo obarjanja nastanejo še vmesne strukturne faze, ki delujejo kot nečistote ali primesi, kot so hematit, magnetit, geotit. Nastanek vmesnih faz lahko bistveno omajejo magnetne lastnosti, predvsem specifično magnetizacijo, magnetnega materiala maghemita.

Za sintezo čistih maghemitnih nanodelcev je pomembno tudi razmerje med Fe^{2+} in Fe^{3+} , ki mora biti do konca reakcije obarjanja konstantno. Idealno razmerje med Fe^{2+} in Fe^{3+} je 0.5 (Berger in drugi, 1999). V primeru, da je razmerje $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} < 0.5$, nastanejo nečistote, ki nimajo magnetnega značaja, zaradi oksidacije Fe^{2+} v Fe^{3+} ione. Če raztopino Fe^{3+} ionov hranimo pri višji pH-vrednosti za dalj časa, nastane geotit. Vsekakor med reakcijo obarjanja nastanejo dodatne nemagnetne primesi, ki jih je težko odstraniti tudi s strogo kontrolo začetnih reakcijskih parametrov. Namreč težko je doseči termodinamsko stabilnost celotnega sistema (Gribanov idr., 1990). Shematski prikaz sinteze $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanodelcev je prikazan na sliki 2 – 7.

Slika 2 – 7: Sinteza $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanodelcev.

Najpogosteje uporabljena magnetna materiala za biotehnološke aplikacije sta maghemit in magnetit. Obe vrsti magnetnega materiala sta netoksični, biokompatibilni in biorazgradljivi, hkrati pa imata obe visoko specifično magnetizacijo.

Maghemit ali $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ je vrsta železovega oksida (ferita), značilne rdeče-rjave barve. S tehnološkega vidika je zelo uporaben material. Nahaja se v tleh in v naravnih procesih nastane kot stranski produkt oksidacije magnetita ali pod vplivom segrevanja drugih oblik železovih oksidov ali feritov. Po kemijski strukturi je najbolj podoben magnetitu, prav tako zelo razširjene oblike železovega oksida v naravnem okolju. Od magnetita se razlikuje po tem, da so skoraj vsi železovi (Fe) atomi v trivalentnem stanju (Fe^{3+}). Osnovna celica maghemita je kubična z osnovno stranico celice (a) velikosti 0,834 nm (Hägg, 1935).

Magnetit ali Fe_3O_4 je črn feromagnetni material, ki vsebuje dvo- in tri-valentne železove (Fe^{2+} , Fe^{3+}) atome. Ima inverzno spinelno kemijsko strukturo. Je pomemben tehnološki material, ki se nahaja v skalnatem kamenju. Magnetit ima centrirano kubično celico z velikostjo stranice osnovne celice 0,839 nm. Od ostalih feritov se razlikuje predvsem v tem, da vsebuje Fe^{2+} in Fe^{3+} ione (Bragg, 1915).

V tabeli 2 – 1 so podane osnovne fizikalno-kemijske lastnosti magnetita in maghemita.

Tabela 2 – 1: Fizikalno-kemijske lastnosti magnetita in maghemita (Cornell in Schwertmann, 2003).

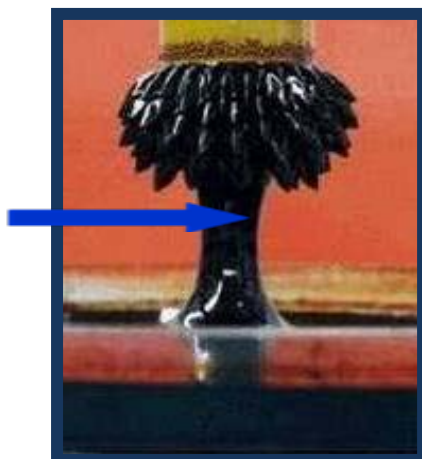
	Osnovna celica	Velikost celice [nm]	Gostota ρ [g cm ⁻³]	Barva	Vrsta magnetizma	Gibsova energija nastajanja, ΔG°_f [kJ mol ⁻¹]
MAGHEMIT	kubična	a = 0,83474	4,87	rjava	feromagnetizem	-711,1
MAGNETIT	kubična	a = 0,8396	5,18	črna	feromagnetizem	-1012,6

2.5.1.2 Stabilizacija sintetiziranih γ -Fe₂O₃ nanodelcev

Kemijska stabilizacija nanodelcev v nosilni tekočini se navezuje na pripravo stabilne magnetne tekočine. Nanodelcev po sintezi ni možno neposredno dispergirati v nepolarnih nosilnih tekočinah. Za doseganje stabilnosti magnetnih tekočin je zato potrebno zagotoviti zadosten sterični odboj med delci, ki ga je možno doseči z adsorpcijo molekul surfaktanta ali disperzanta na površini delcev. Površinska koncentracija adsorbiranih molekul surfaktanta ne sme biti prevelika, saj odvečen surfaktant znižuje specifično magnetizacijo magnetne tekočine. Zato je treba izbrati takšne pogoje prevlečenja nanodelcev, pri katerih dobimo optimalno površinsko koncentracijo adsorbiranih molekul surfaktanta (Košak idr., 2005).

Makroskopsko je magnetna tekočina dvofazni sistem, v katerem nosilna tekočina določa kemijske in mehanske lastnosti sistema, medtem ko določajo nanodelci v disperznem stanju magnetne lastnosti istega sistema. Delci morajo imeti ozko porazdelitev velikosti okoli 10 nm in velik magnetni moment, zato se za pripravo magnetnih tekočin navadno uporabljajo kovinski delci ali delci feritov. Priprava magnetnih tekočin sestoji iz sinteze magnetnih nanodelcev, adsorpcije surfaktanta na njihovi površini in suspendiranja prevlečenih nanodelcev v nosilni tekočini (slika 2 – 8).

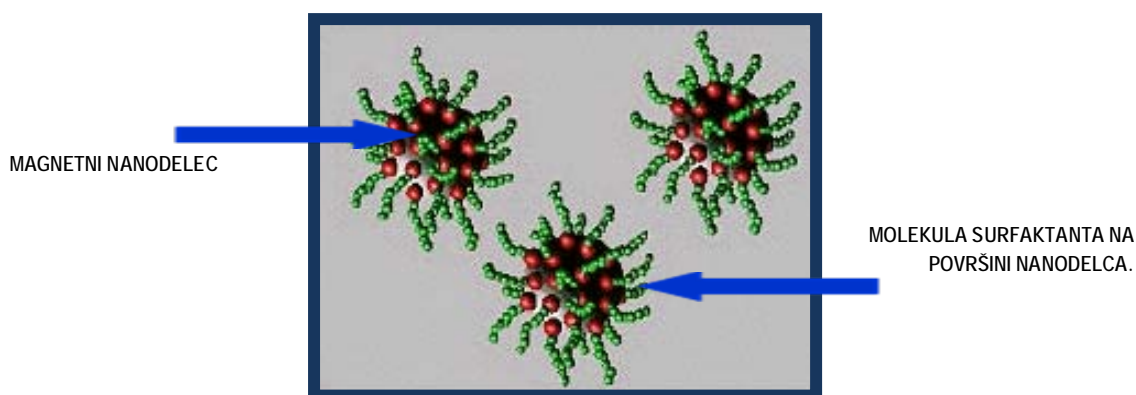
VISOK DELEŽ
MAGNETNIH
NANODELCEV V
MAGNETNI TEKOČINI.



Slika 2 – 8: Magnetna tekočina (Odenbach, 2003).

Stabilnost magnetnih nanodelcev v nosilnem mediju je ena od osnovnih zahtev za praktično uporabnost magnetnih tekočin. Odvisna je od faktorjev, ki so pogojeni z velikostjo nanodelcev in naravo njihove površine, naravo nosilne tekočine ter stabilizacijskim mehanizmom, ki se nanaša na funkcionalizacijo ali kemijsko modifikacijo površine nanodelcev. Stabilnost magnetnih nanodelcev je torej možno doseči z adsorpcijo molekul surfaktanta/disperzanta (t.i.: površinsko aktivna snov) na površino delcev. Adsorpcijska plast tvori potencialno zaščitno plast ali funkcionalni sloj, ki preprečuje medsebojni kontakt delcev. Širina funkcionalne prevleke ima to vlogo, da zadrži delce na ustrezni medsebojni oddaljenosti, ko pridejo do izraza Van-der-Waalsove in dipolne interakcije. Druga pomembna lastnost površinskega disperzanta je ta, da adsorbirane molekule surfaktanta ali disperzanta zagotavljajo tudi ustrezno omočljivost površine delcev in s tem disperzibilnost v ustreznem mediju (Berkovski, 1996).

Beseda surfaktant ali disperzant izhaja iz termina »surface active agent« oziroma površinsko aktivna snov. To so amfilne molekule, ki kažejo afiniteto do obeh faz. Sestavljajo jih nepolarni rep, kateremu pripada hidrofobni del, ki ima afiniteto do oljne faze oz. nepolarnega topila in plarna glava, kateremu pripada hidrofilni del, ki ima afiniteto do vodne faze ali polarnega topila/medija. Molekula surfaktanta je prikazana na sliki 2 – 9.

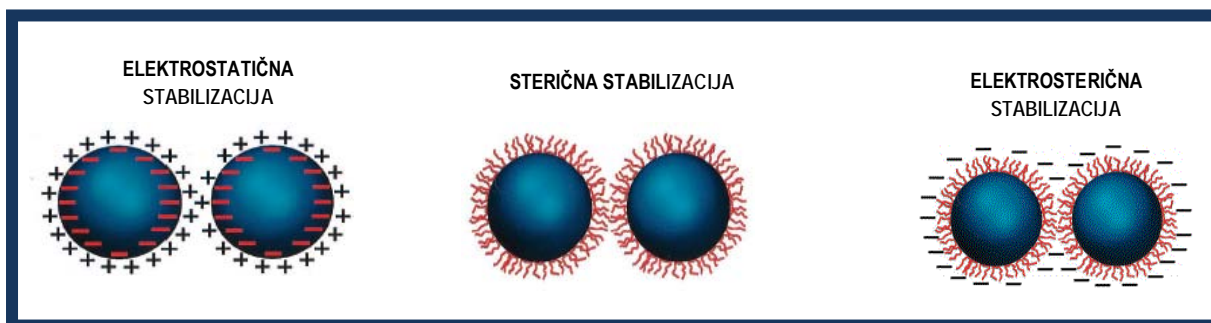


Slika 2 – 9: Magnetni nanodelci z adsobiranimi molekulami surfaktanta (Gupta idr., 2001).

Razvrščanje surfaktantov je usklajeno z njihovo strukturo. Glede na naboj jih delimo na ionske, neionske in diionske. Splošno jih označimo s formulo RX , kjer je R veriga ogljikovodika in X polarna skupina. Veriga ogljikovodika (R) je v molekuli surfaktanta reda velikosti C_8 ali več; lahko je nasičena ali nenasičena, razvejana ali nerazvejana. Polarna skupina (X) v molekuli surfaktanta je ionska ali neionska. Neionska skupina je relativno kratka veriga poli-oksi etilenskih enot, $-[C_2H_4O]_x-$, v katerih se x spreminja od 3- do 20- ali več. Možne ionske skupine so sulfati $[-SO_4^-]$, sulfonati $[-SO_3^-]$, karboksilati $[CO_2^-]$ in drugi. Med najpomembnejše kationske skupine spadajo kvarterne amonijeve skupine $[-NR_3^+]$. Diionski surfaktanti vsebujejo tako pozitiven kot negativen naboj, kot npr.: sulfobetaini $[N^+(CH_3)_2CH_2CH_2SO_3^-]$.

Med kationske surfaktante prištevamo tudi n- heksadecil- tri- metil amonijev bromid (CTAB), n- heksadecil- tri- metil amonijev klorid (CTAC). Med anionske surfaktante spadata natrijev di-2-etilheksil- sulfosucinat (AOT) in natrijev dodecil sulfat (SDS); med diionske lecitin in med neionske surfaktante etre in estre (Branzoi in Baibarac, 2000) .

Ovisno od načina stabilizacije tako ločimo nepolarne magnetne tekočine v primeru sterične stabilizacije in ionske (anionske in kationske) magnetne tekočine v primeru elektrosterične ali elektrosterične stabilizacije. Molekule disperzantov, ki se običajno uporabljajo za sterično stabilizacijo nanodelcev, so navadno sestavljene iz hidrofilne glave, ki kaže afiniteto do površine delcev, in dolgega hidrofobnega repa, ki ima afiniteto do nepolarne nosilne tekočine. Najpogosteje se uporabljajo različne mono- ali di-karboksilne kisline (npr.: citronska ali oleinska kislina). Vrste površinske stabilizacije so prikazane na sliki 2 – 10.

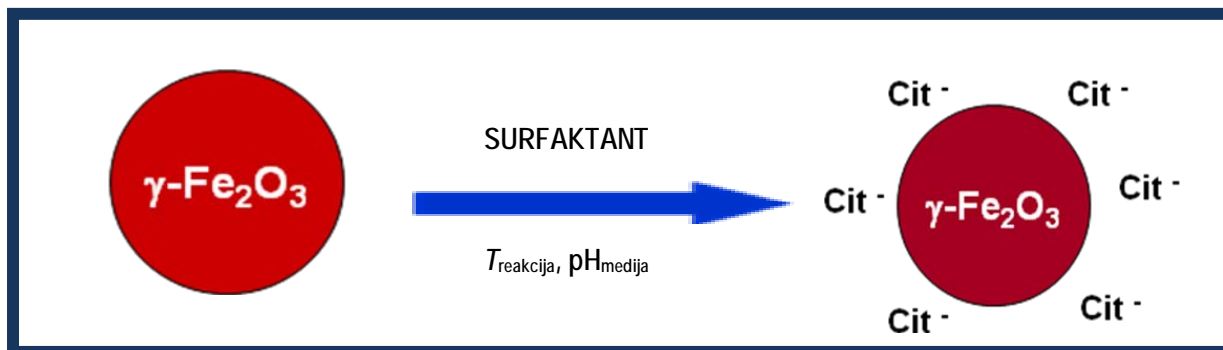


Slika 2 – 10: Površinska stabilizacija magnetnega nanodelca (Navodnik, 2007).

Vsebnost magnetnih delcev, stabilno suspendiranih v nosilni tekočini, in s tem njena magnetizacija sta v veliki meri odvisna od učinkovitosti adsorpcije molekul surfaktanta na površini delcev. Za pripravo stabilnih magnetnih tekočin visoke magnetizacije sta predvsem potrebni izbira in optimalna količina surfaktanta, adsorbiranega na površini delcev. V postopkih, ki so v uporabi za pripravo magnetnih tekočin, se primerna količina surfaktanta uravnava preprosto s spreminjanjem njenega razmerja do magnetnih delcev (Navodnik, 2007).

Eden izmed načinov elektrosterične stabilizacije magnetnih nanodelcev je disperzija maghemitnih magnetnih nanodelcev z adsorpcijo molekul citronske kisline na površino nanodelca v vodnem mediju. Voda kot nosilni medij je primerna za biomedicinske kot tehnološke aplikacije. Njene glavne prednosti so netoksičnost in visoka toplotna kapaciteta; stabilnost nanodelcev v vodi je strogo pogojeno s pH-vrednostjo medija in koncentracijo soli, prisotne v mediju. Zato mora biti površina delca v primeru vode kot nosilne tekočine hidrofilna ali pozitivno/negativno nabita. Kot surfaktant za polarne tekočine

se uporablja citronska kislina, ki v vodni raztopini disociira na COO^- in H^+ ione. Ob razpadu citronske kisline se karboksilni ioni (COO^-) vežejo na površino delcev in jih stabilizirajo v vodi. Nastane homogena koloidna suspenzija ali magnetna tekočina, v kateri so magnetni nanodelci enakomerno porazdeljeni po celotnem vodnem volumnu. Shema, ki prikazuje stabilizacijo magnetnih nanodelcev s citronsko kislino, je prikazana na sliki 2 – 11.



Slika 2 – 11: Elektrosterična stabilizacija $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanodelcev.

2.5.1.3 Površinska funkcionalizacija magnetnih nanodelcev

2.5.1.3.1 Primarna površinska funkcionalizacija magnetnih nanodelcev

Primarna površinska funkcionalizacija $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemitnih) nanodelcev je prvi korak v sintezi visoko funkcionalnih magnetnih nanodelcev in se navezuje na sintezo tanke silikatne prevleke (SiO_2) na površini magnetnega nanodelca. Funkcionalni plašč iz silikatne prevleke imenujemo trivialno tudi silika, ki nastane med reakcijo polimerizacije natrijevega silikata. Nanos silike na površino magnetnega nanodelca navadno poteče s Stöberjevimi postopkom (»sol-gel tehnologija«) (Tan in drugi, 2004).

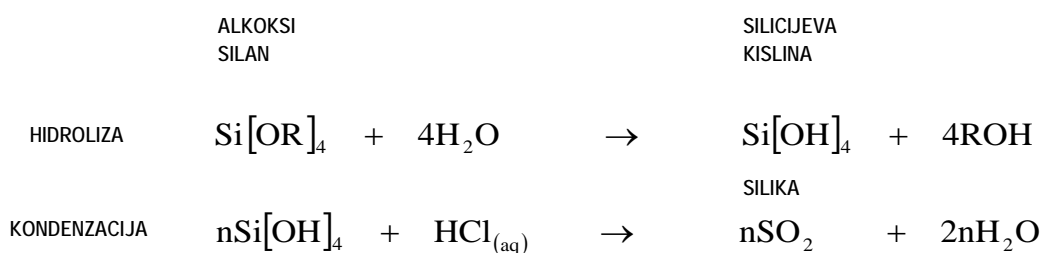
Na splošno so funkcionalni magnetni nanodelci zgrajeni iz železovega jedra in prevlečeni s tanko, funkcionalno plastjo različnega izvora, organskega ali anorganskega (Liu in drugi, 2004). V literaturi navajajo različne primere kovalentne vezave več encimov na kemijsko spremenjene magnetne nanodelce in vse kaže, da zanimanje le-teh zaradi njihovih enkratnih magnetnih lastnosti konstantno narašča (Xiao idr., Shaw idr., 2006; Chen idr., 2001). Ključni parametri magnetnih nanodelcev, prevlečenih s plastjo silike, za uspešno vezavo biokatalizatorja so velikost, primerna površinska funkcionalizacija delcev z visokim deležem reaktivnih skupin in nenazadnje tudi ohranitev superparamagnetnih lastnosti samih nanodelcev. Funkcionalni plašč, ki magnetne delce obdaja, ima več prednosti. Na primer, velikost delcev se opazno poveča, za posledico, se prekomerna reaktivnost »neoblečenih« magnetnih nanodelcev znatno zmanjša in je problem o zlepljanju ali aglomeraciji delcev tako odpravljen. Dokazali so, da so superparamagnetni nanodelci, prevlečeni z enojno plastjo silike in dodatno spremenjeni z molekulami aminosilana, primerni encimski nosilci (Lee in drugi, 2008).

Adsorpcija ali precipitacija (proces nanosa ali prevlečenja) silike na površino nosilca je močno pogojena tako s kemijskimi lastnostmi silike kot tudi z njeno geometrijo. Hofman s sodelavci (Hofman in drugi, 1936) je prvi, ki je dokazal prisotnost silanolskih (-OH) funkcionalnih skupin na površini silike. Ugotovljeno je, da atomi na površini silike tvorijo

značilno tetraedrično konfiguracijo, med drugim prosti atomi na površini silike postanejo nasičeni s hidroksilnimi skupinami v vodnem mediju. Silanolne skupine lahko, če so reakcijski pogoji ugodni, kondenzirajo (polimerizirajo) v siloksanske vezi (Si-O-Si). Tako nastane polimerna matrika iz silike, ki je po zgradbi amorfna. Nastanek silanolnih in siloksanskih funkcionalnih skupin vidno vpliva na kemijsko-fizikalne lastnosti polimerizirane silike. Površina silike ima 5 – 6 silanolnih skupin na nm^2 , kar pomeni, da je površina silike izrazito hidrofilna. Ker so siloksanske vezi kemijsko inertne, je reaktivnost silike odvisna od prisotnosti silanolnih funkcionalnih skupin, ki omogočajo nadaljnjo predelavo površine silike (Plueddemann, 1982; Jesionowski in Krysztafkiewicz, 1999). Za nastanek reaktivne površine silike se najpogosteje uporablja modifikacija površine silike z organosilanom (ali aminosilanom), kar vodi v nastanek hidrofobne površine površinsko spremenjene silike (Kraus, 1952; Scholberg, 1954; Mittal, 1992). Hidrofilna površina silike po kemijski modifikaciji površine silike z organosilanom omogoča nastanek vodikovih vezi med primarno ali sekundarno amino skupino organosilana in hidroksi (silanolno) skupino na površini silike ali silanolno ($-\text{Si-OH}$) skupino v molekuli hidroliziranega organosilana.

Prevlečenje površine magnetnega nanodelca z monodisperzno silikatno prevleko poteče z neposredno polimerizacijo natrijevega silikata v raztopini ob dodatku kisline. Ob dodatku kisline nastane postopoma silicijeva kislina (intermediat), ki nato polimerizira. Silanolne funkcionalne skupine (Si-OH) se postopoma spremenijo v siloksanske kovalentne vezi (Si-O-Si) med reakcijo kondenzacije in tako nastanejo polimerne prevleke iz silike (Arriagada idr., 1999). Obstaja predpostavka, da se molekule silicijeve kisline povežejo z delci $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ s kovalentnimi vezmi med reakcijo kondenzacije vode. Nato silicijeva kislina polimerizira, da nastanejo robustni funkcionalni sloji polimerne silike, ki je po kemijski strukturi amorfna.

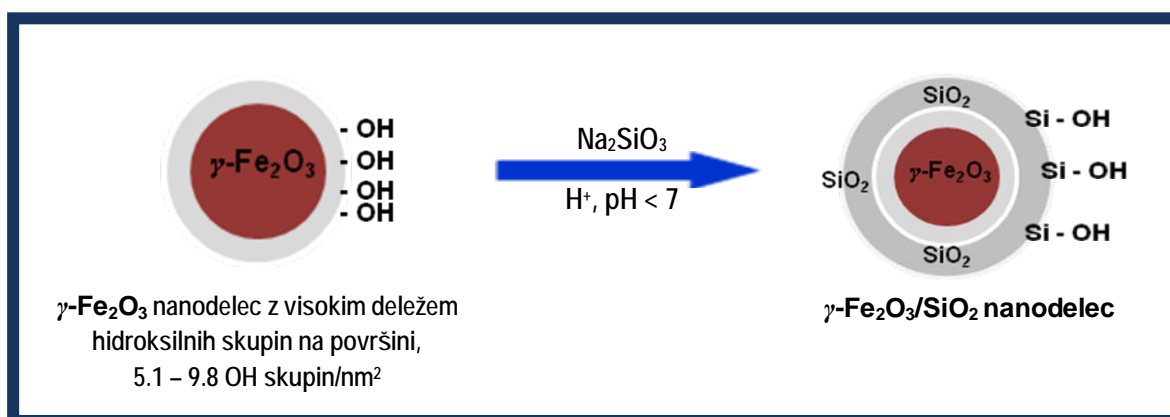
Nastanek silikatne prevleke je pogojen z dvema reakcijama; reakcijo hidrolize alkoksi silana (npr., natrijev silikat) in kondenzacijo silicijeve kisline (Tan in drugi, 2004):



Silikatna prevleka, ki obdaja magnetni nanodelec, tako prepreči zlepljanje ali aglomeracijo med delci. Hkrati so magnetni nanodelci, prevlečeni s siliko, odporni na proces biorazgradljivosti (biodegradacijo), ko so enkrat izpostavljeni v biološkem sistemu. Neprevlečeni delci lahko poškodujejo biološko aktivnost substance.

V primerjavi z ostalimi metodami za sintezo magnetnih nanodelcev prevlečenih s siliko, kot sta metodi mikroemulzije in »sol-gel« tehnologija, je metoda neposredne polimerizacije alkoksi silana enostavnejša, poleg tega ta metoda omogoča boljšo kontrolo velikosti delcev med samo sintezo (Santra idr., Cannas idr., 2001). Tako je možno dobiti nanodelce velikosti od 10 do 100 nm samo s spreminjanjem razmerja med SiO_2 in $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ali pa z večkratno ponovitvijo postopka površinske funkcionalizacije. Na velikost in porazdelitev delcev v suspenziji vpliva več faktorjev hkrati, kot pH-vrednost, koncentracija

reagenta in atomsko razmerje Si/Fe. pH-vrednost ima neposreden vpliv na [+/-] naboj na površini delca maghemita in na jakost dispergiranja maghemitnih nanodelcev v raztopini natrijevega silikata. Temperatura vpliva predvsem na hitrost reakcije kondenzacije dimera silicijeve kisline v polimerno matrico. Oba faktorja, pH-vrednost in temperatura, sta od vseh odločilna reakcijska faktorja za sintezo enakomerno dispergiranih $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelcev. Na sliki 2 – 12 je shematsko prikazana sinteza primarne površinske funkcionalizacije $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanodelca.



Slika 2 – 12: Primarna površinska funkcionalizacija $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanodelcev.

2.5.1.3.2 Sekundarna površinska funkcionalizacija $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelcev

Sekundarna funkcionalizacija magnetnih $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelcev se navezuje na pripenjanje molekul izbranega organosilana na magnetne nanodelce prevlečene s primarnim funkcionalnim plaščem iz silikatne prevleke. Sekundarno kemijsko spreminjanje površine maghemitnih nanodelcev s pomočjo reakcije silanizacije organosilana je s kemijskega stališča zelo kompleksna modifikacija. Na voljo je več metod za pripravo visoko funkcionalnih nanokompozitov (Santra in drugi, 2001; Sun in drugi, 2005). Med drugimi je spreminjanje površine magnetnih nanodelcev z molekulami aminosilana najpogosteje uporabljena metoda za funkcionalizacijo delcev. V tem primeru molekule aminosilana delujejo kot reaktivni sloj, vezan na plast anorganske silike na magnetnih nanodelcih. Molekule amino silana zagotovijo visok delež prostih amino skupin ($-\text{NH}_2$) na zunanji površini magnetnih nanodelcev, kar omogoča nadaljnjo kemijsko spreminjanje površine nanodelcev.

Organosilani (aminosilani) reagirajo s silanolnimi skupinami na površini silike na različne načine; z vodikovimi vezmi, s prenosom protonov ali s kondenzacijo silanolnih skupin (Van der Voort in Vansant, 1997; Krysztafkiewicz in Binkowski, 1999). Organosilani imajo splošno formulo (Guliński in Maciejewski, 1998):



kjer so:

$$n = 0 - 2,$$

$$m = 0 - 3; Y = \text{NH}_2, \text{NHR}, \text{NH}[\text{CH}_2]_2\text{NH}_2, \text{NCO}, \text{Cl}, \text{S};$$

$$X = \text{RO}, \text{RC}[\text{O}]\text{O}, \text{Cl};$$

$$R = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2.$$

Med organosilani so največkrat uporabljeni aminosilani in njihovi derivati (Urbaniak in Marcinić, 1998; Domla idr., 1996). To so: 3-aminopropiltrimetoksisilan ali APTMS ($\text{H}_2\text{N}[\text{CH}_2]_3\text{Si}[\text{OCH}_3]_3$); 3-aminopropiltrioksisilan ali APTS ($\text{H}_2\text{N}[\text{CH}_2]_3\text{Si}[\text{OC}_2\text{H}_5]_3$); N-2-(aminoetil)-3-aminopropilmetildimetoksisilan ali AEAPTS ($\text{H}_2\text{N}[\text{CH}_2]_2\text{NH}[\text{CH}_2]_3\text{Si}[\text{OCH}_3]_3$ -N-2-[aminoetil]-3-aminopropiltrimetoksisilan). Največji proizvajalci silanov se nahajajo v Evropi, med katere spadajo naslednji: Witco, Dow Corning, Degussa in UniSil Company (Domka idr., 1997).

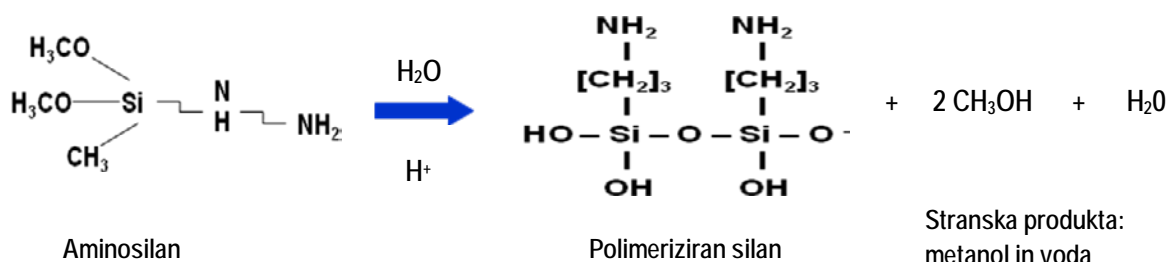
Reaktivnost organosilana na površini anorganskega nosilca je močno pogojena od reakcijskih parametrov, kot so reakcijski čas, temperatura, koncentracija in funkcionalnost oziroma reaktivnost organosilana. V reakciji, ki poteče med organosilanom in trdno površino iz anorganskega materiala, je vpletenih več reakcijskih mehanizmov; ni enostopenjski proces in zato se lahko zgodi, da med reakcijo silanizacije nastane več vmesnih produktov (Golub in drugi, 1996; Caravajal in drugi., 1988). Poenostavljeno, za celovit potek reakcije silanizacije sta potrebni dve stopnji: a) hidroliza in kondenzacija molekul aminosilana v odgovarjajoči polimer in b) reakcija silanizacije ali pripenjanje polimeriziranega aminosilana na površino magnetnega nosilca.

Prva stopnja polimerizacije, ki vključuje stopnjo hidrolize in kondenzacije organosilana, poteče v kislinski raztopini, ki deluje kot katalizator ali iniciator reakcije polimerizacije molekul aminosilana v ustrezen polimer. Najprej poteče hidroliza organosilana v prisotnosti kislinskega katalizatorja in nato še kondenzacija, med katero se formira polimer med odcepom alkohola in vode. Med reakcijo hidrolize se alkoksidne skupine organosilana zamenjajo s hidroksilnimi funkcionalnimi skupinami (OH) na površini delca, da nastanejo reaktivne silanolne skupine (-Si-OH). V nadaljevanju, se novonastale silanolne skupine med reakcijo kondenzacije, ki sledi, spremenijo v siloksanse vezi (Si-O-Si). Med reakcijo kondenzacije nastane kot stranski produkt še alkohol (metilni alkohol, CH_3OH) in voda.

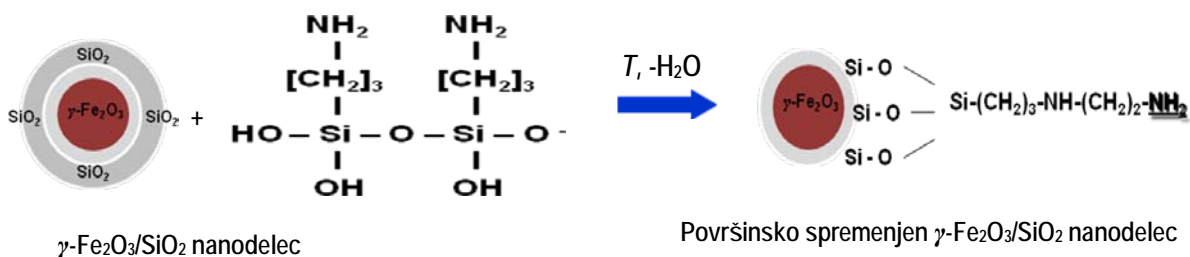
V drugi stopnji reakcije silanizacije se nastali polimeri iz organosilana pripenjajo na površino magnetnih kristalitov, da nastane močna kovalentna vez s prostimi hidroksilnimi skupinami na površini maghemitnih nanodelcev, prevlečenih s silikatno prevleko. Tako potečeta obe stopnji dehidracije in adsorpcije organosilana na površino anorganskega delca. Končni produkt, ki nastane med postopkom priprave visoko funkcionalnega magnetnega nosilca, je magnetni prah visoke gostote in temnorjave barve ter izkazuje močan magnetni privlak pod vplivom magnetnega polja.

Reakcija silanizacije je razdeljena na dva kemijska procesa (White in Tripp; Heiney in drugi, 2000):

a) polimerizacijo aminosilana za nastanek polimerov aminosilana:



b) kovalentno vezavo polimeriziranega aminosilana na površino γ -Fe₂O₃/SiO₂ nanodelca:



Reakcija silanizacije se ponavadi izvaja v prisotnosti higroskopične snovi, ki je topna tako v vodi kot v organskem topilu. Glicerol, ki ima temperaturo vrelišča pri temperaturi 290 °C, je idealen kot dodatek pri reakciji silanizacije, ki poteka v temperaturnem območju od 80 °C do 90 °C. Prednosti dodajanja glicerola so naslednje: a) zagotavlja, da se iz reakcijske zmesi izloči voda in sledi organskega topila, b) preprečuje zlepljanje ali aglomeracijo (agregacijo) delcev v večje skupke in navsezadnje c) preprečuje zamreženje nanodelcev med reakcijo silanizacije ali polimerizacije molekul silana v polimere, ki otežuje proces silanizacije in preprečuje, da bi reakcija silanizacije potekla do konca (Liu in drugi, 2004).

2.5.2 Imobilizacija ChOx z adsorpcijo. Adsorpcija biokatalizatorja kot oblika imobilizacije encima je med vsemi metodami najenostavnejša oblika vezave biokatalizatorja in je osnovana na neposredni fizični adsorpciji molekul encima na površino nosilca (matrice). Vezava encima na nosilec ni trdna, ampak je encim pritrjen na nosilec z nastankom Van der Waalsovih sil, ionskih ali hidrofobnih sil, ki se oblikujejo na površini encima in nosilca. Glavna prednost metode adsorpcije je ta, da je postopek enostaven in poteče pri zelo blagih pogojih. Metoda adsorpcije ne povzroči velikih strukturnih sprememb v molekuli biokatalizatorja, predvsem v aktivnem centru encima, zato je metoda z ozirom na ostale kemijske metode imobilizacije biokatalizatorja prednostna. Glavna pomanjkljivost adsorpcije je ta, da encim, ki je adsorbiran na nosilec, uhaja s površine nosilca med uporabo zaradi spremembe v temperaturi, pH-vrednosti, ionski moči ali prisotnosti drugih primesi v mediju.

Obstaja več primerov poskusa imobilizacije holesterol oksidaze z metodo adsorpcije (Li idr., 2005; Zhou idr., 2006; Parra idr., 2007; Motonka in Faulkner, 1993). Kumar s sodelavci (Kumar idr., 2001) je imobiliziral ChOx z metodo adsorpcije na polimerni film na osnovi dodecilbenzen-sulfonatn-polipirola. Začetne študije imobilizacije ChOx so pokazale, da je bil delež uhajanja encima zelo visok, približno 40%. Poskusi imobilizacije ChOx z adsorpcijo so bili uspešno izvedeni tudi pod vplivom električnega toka (Wang in Mu, 1999). V tem primeru, s souporabo elektrokemijskega toka, so najprej polianilinski film zreducirali in ga šele nato potopili v vodno raztopino s ChOx, da so izvedli adsorpcijo encima pod vplivom električnega toka. Ugotovili so, da je bil tako imobiliziran encim znatno stabilnejši, tudi odzivni čas je bil krajši. Metoda adsorpcije je bila uporabljena tudi za imobilizacijo ChOx in kofaktorja encima ChOx (kofaktor FAD) na stekleno elektrodo za načrtovanje biosenzorja (Solanki idr., 2007). Dokazano je bilo, da je imobilizirani encim detektiral že zelo nizke koncentracije holesterola.

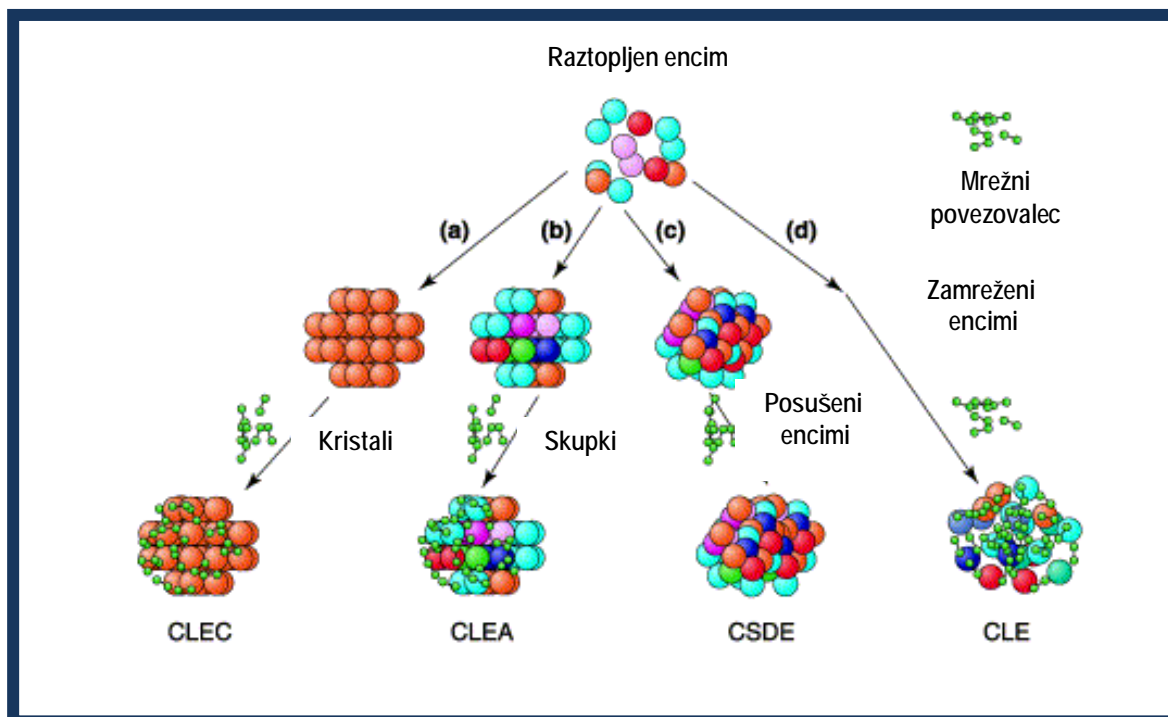
2.5.3 Imobilizacija ChOx z ujetjem. Imobilizacija ChOx s tehniko ujetja je zelo razširjena metoda, ki je bila na primeru imobilizacije ChOx že tudi večkrat uporabljena in se nanaša na ujetje ali lokalizacijo encima v polimerno ali membransko matrico (Vidal idr., 1999, 2000, 2001). To je bilo narejeno tako, da navkljub imobilizaciji encima v notranjost poroznega polimera ali membrane je omogočen prenos substratov do mesta encima v nosilcu. Ujetje encima v polimerno matrico je bilo večkrat narejeno s »sol-gel« tehnologijo, ki omogoča imobilizacijo encima že med pripravo polimernega nosilca med procesom geliranja (Brahim idr., 2001 in 2002; Singh idr., 2007; Tan idr., 2005; Li idr., 2003). Drugi načini ujetja encima v polimerni nosilec se navezujejo na tako imenovano več- plastno ali slojno deponiranje polimera in encima (Ram idr., 2001; Gobi in Mizutani, 2001) hkrati ali elektrokemično polimerizacijo polimera iz raztopine, ki vsebuje monomer polimera in encim, katerega želimo imobilizirati (Singh idr., 2004; Ruiz idr., 2004; Trettnak idr., 1993). Uspešno je bila izvedena tudi imobilizacija ChOx na »sol-gel« filme, narejene iz tetraetil ortosilikata (TEOS). Nosilec je bil uspešno uporabljen za imobilizacijo dveh encimov, ChOx in HRP, pri načrtovanju biosenzorja za določevanje holesterola (Kumar idr., 2000). Encimski nosilec na osnovi hidrogela iz materiala hidroksietil karboksimetil celuloze je bil uporabljen za imobilizacijo ChOx in HRP za določevanje holesterola v hidrofobnih organskih topilih (Wu in Choi, 2003). V polimerni nosilec na osnovi filma ali ploščice iz polipirola so uspešno imobilizirali ChOx in encimski mediator iz ferocen monokarboksilne kisline. Imobilizacija obeh snovi tako encima kot mediatorja je privedla do vidnega izboljšanja selektivnosti in senzitivnosti biosenzorja (Vidal idr., 2002). Guo s sodelavci (2004) je izvedel ujetje ChOx s pomočjo večplastnega nanašanja sledečih snovi, kationskega polielektrolita, poli(dialildimetilaluminijevega) klorida (PDDA) in encima ChOx.

2.5.4 Imobilizacija ChOx s pomočjo mrežnih povezovalcev. Kovalentna vezava biomolekule na površino nosilca je ena izmed metod imobilizacije biokatalizatorja (Aravamudhan idr., 2007; Yang idr., 2006; Solanki idr., 2007) in je osnovana na medsebojni, kovalentni vezavi funkcionalnih skupin med encimom in nosilcem.

2.6 Imobilizacija biokatalizatorja brez nosilca

Imobilizirani encimi brez uporabe nosilca so večinoma pripravljene direktno z zamreženjem različnih encimskih preparatov, kot so na primer zamreženi raztopljeni encim (CLEs), zamreženi encimski kristali (CLECs), zamreženi posušeni encimi (CSDEs) in zamreženi encimski skupki ali agregati (CLEAs). Ti se med seboj razlikujejo le v

uporabi vrste mrežnega povezovalca, ki se uporabljajo v procesu zamreženja encimskih molekul (slika 2 – 13).



Slika 2 – 13: Različne tehnike za pripravo imobiliziranega encima brez nosilca; a) kristalizacija (CLEC), b) obarvanje (CLEA), c) sušenje (CSDE), d) direktno zamreženje (CLE) (Cao idr., 2003).

2.6.1 CLEAs - Zamreženi encimski skupki (ang.: Cross-linked enzyme aggregates)

Načrtovanje primerne oblike imobiliziranega encima je ponavadi dolgotrajno in dosledno delo, tako da ne obstaja nobeno splošno pravilo za strategijo imobilizacije encima. V splošnem izbrana metoda za imobilizacijo mora združevati oboje, glede na zahteve encimskega preparata, kot so produktivnost, časovna produktivnost, stabilnost in selektivnost in praktičnost samega preparata kot so ločevanje, nadzor in procesi za koncentriranje in očiščevanje imobiliziranega encima iz reakcijske zmesi. Imobilizirani encim velja za robustno strukturo, v kateri združuje katalitično in nekatalitično funkcijo za potrebe določene aplikacije. V zadnjih letih so CLEAs vzbudili posebno pozornost zaradi enostavne priprave, široke uporabe, visoke stabilnosti in volumetrične produktivnosti na volumen reaktorja. CLEAs se pripravijo s kemijskim medmolekularnim zamreženjem encimskih agregatov, ki se sintetizirajo z uporabo obarjalnih agensov, ki ne poškodujejo ali denaturirajo encim. Potrebno je poiskati primeren izbor obarjalnih agensov za obarvanje proteina in izvesti optimizacijo koncentracije le-teh ter poiskati optimalno koncentracijo mrežnega povezovalca in nazadnje še koncentracijo proteina za učinkovito pripravo CLEAs (Roy in Abraham, 2004; Rossel idr., 2010).

2.6.2 Reakcija obarjanja

Reakcija obarjanja ali precipitacije, ki navadno poteka s pomočjo anorganskih soli, organskih topil, neionskih polimerov ali kislin in vodnih raztopin, je splošno uporabljena metoda za postopek očiščevanja ali izolacije proteinov. Skupki, ki se med reakcijo obarjanja formirajo so supermolekularne strukture, povezane z nekovalentnimi vezmi in se z dodatkom vodne raztopine ustrezne pH vrednosti ponovno suspendirajo. Šele reakcija zamreženja generira končno obliko CLEAs, ki ohrani katalitično aktivnost posameznega encima. V nekaterih primerih pride do pojavnosti hiperaktivacije, pomeni, da je aktivnost v primerjavi s prostim encimom neprimerljivo višja. Ta fenomen hiperaktivacije je najverjetneje posledica konformacijskih sprememb v proteinu v obliki skupkov ali agregatov (Bommarius in Riebel, 2006).

Priprava CLEAs je razdeljena v dva dela: 1) izbiro obarjalnega agensa in optimizacijo koncentracije obarjalnega agensa in 2) optimizacijo koncentracije mrežnega povezovalca in koncentracije encima. Še pred začetkom reakcije zamreženja se določi aktivnost encimskih skupkov, da se določi ali je reakcija obarjanja encim poškodovala ali deaktivirala. Začetno iskanje primerne obarjalnega agensa se izvede s 90 % (v/v) deležem obarjalnega agensa. V literaturi je navedeni delež obarjalnega agensa, tudi najbolj polarnega, primeren za kompletno agregacijo encima, saj ne pušča sledi prostega encima v raztopini (Schoevaart, 2004). Izbira obarjalnega reagenta vpliva tudi na končno obliko in velikost skupkov, na poroznost in ne nazadnje tudi na mehansko stabilnost zamreženih encimskih skupkov.

Optimalni postopek obarjanja proteina je nato določen na podlagi testiranja različnih obarjalnih agensov, kot npr.: metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, *tert*-butilni alkohol, aceton, acetonitril, dimetil dioksan etanol (DMEtOH), etil laktat, *nas.* amonijeva sol ((NH₄)₂SO₄), dimetil formamid (DMF), dimetil sulfoksid (DMSO) and polietilenglikol različnih molskih mas (PEG). Obarjalni agens, ki je dal najvišjo aktivnost encima je izbran za nadaljnji korak pri pripravi zamreženih encimskih agregatov, to je reakcija zamreženja. V tabeli 2 – 2 so podane nekatere ključne fizikalno-kemijske lastnosti topil za obarjanje proteinov.

Tabela 2 – 2: Fizikalno – kemijske lastnosti topil za obarjanje.

Topilo	Kemijska formula	Dielektrična konstanta	Polarnost	pH-vrednost
DIETILETER	CH ₃ CH ₂ OCH ₂ CH ₃	4,34	2,8	6,97
KLOROFORM	CHCl ₃	-	4,1	7,18
TETRAHIDROFURAN	C ₄ H ₈ O	7,52	4	8,70
t-BUTANOL	C ₄ H ₁₀ O	17,8	4	6,37
2-PROPANOL	C ₃ H ₈ O	20,1	3,9	5,82
ACETON	C ₃ H ₆ O	20,7	5,1	9,70
ETANOL	C ₂ H ₆ O	24,3	5,2	7,37
METANOL	CH ₃ OH	33,0	5,1	7,35
ACETONITRIL	CH ₃ CN	36,6	5,8	9,20
DMF	C ₃ H ₇ NO	38,3	6,4	9,50
DMSO	C ₂ H ₆ OS	47,2	7,2	10,50

P
O
L
A
R
N
O
S
T

Legenda: DMF – N,N – dimetilformamid; DMSO – dimetilsulfoksid.

2.6.3 Zamreženje encimskih skupkov

Naslednja faza za pripravo CLEAs je zamreženje encimskih skupkov, ki nastanejo med reakcijo obarjanja. V tem obziru je obvezen dodatek mrežnega povezovalca po postopku mikro-obarjanja. Obstaja možnost, da se mrežni povezovalec doda še pred začetkom reakcije obarjanja kot je že bilo navedeno v literaturi (Aytar in Bakir, 2008). Po končani reakciji zamreženja, se sintetizirani CLEAs ločijo iz reakcijske zmesi s preprostim centrifugiranjem. Molekule encima v obliki CLEAs so povezane s kovalentnimi, medmolekularnimi vezmi, nastalih z dodatkom mrežnega povezovalca. Nato se vzorcu imobiliziranega encima iz suspenzije CLEAs določi aktivnost. Reakcija zamreženja traja približno tri ure. Za reakcijo zamreženja se uporablja glutaraldehid, ki je prepoznan kot univerzalni bifunkcionalni mrežni povezovalec. V splošni rabi je tudi zato, ker je poceni in vsestranski agens. Za zamreženje encimskih skupkov se lahko uporabijo tudi različni analogi glutaraldehida, kot je polialdehid dekstrana z molsko maso 100 – 200 kDa. Zaradi možnosti deaktivacije encima z glutaraldehidom, je nujno potrebna optimizacija koncentracije glutaraldehida nujno potrebna. V primeru uporabljene previsoke

koncentracije mrežnega povezovalca se pojavi kemijska modifikacija esencialnih aminokislin za normalno delovanje encima. Zato se tudi največkrat pri samem postopku za pripravo CLEAS uporabijo različni funkcionalni aditivi, ki zaščitijo encim (Cabana, 2007). Po izboru najboljšega obarjalnega agensa in koncentracije prečnega povezovalca se lahko sintetizirajo zamreženi encimski skupki iz določenih encimov v povečanem merilu za potrebe v biokatalizi (Dalal idr., 2007).

2.6.4 Aplikativna vrednost zamreženih encimskih skupkov

CLEAs so posebna oblika imobiliziranega encima, pri kateri je trdni nosilec nepotreben. Predstavljajo primerno obliko imobilizacije encima predvsem za potrebe v proizvodnji v povečanem merilu (scale-up procesi) in biotransformacijah, tudi na industrijski ravni. Poudarek uporabe nanostrukturiranih materialov z biomimetskimi lastnostmi je predvsem na področjih biomedicine in njej sorodnih vedah, kot sta ciljano doziranje zdravil na točno pravem mestu in v biosenzorjih. Zato je tehnologija zamreženih encimskih skupkov strogo prednostna v industrijskih aplikacijah. CLEAs so robustne encimske strukture z visoko aktivnostjo in toleranco do organskih topil. Dodatna prednost tehnologije za pripravo CLEAs je priprava imobiliziranih dveh ali več encimov hkrati (combi-CLEAs), ki prinaša mnogo dobrih lastnosti: zmanjšan volumen reaktorja, manj procesnih enot (procesne enote za reakcijo in ločevanje produktov so združene v eno samo, zaradi učinkovitega ločevanja tako pripravljene imobiliziranega encima neposredno iz reakcijske zmesi), visoka volumetrična aktivnost in aktivnost imobiliziranega encima glede na čas reakcije, zmanjšan čas obratovanja reaktorja in minimizirana proizvodnja stranskih produktov. Nedvomno je pomembnost uporabe tehnologije, ki temelji na CLEAs velika in vse kaže, da kot takšna igra pomembno vlogo v industrijskih biotransformacijah in ostalih vejah encimske tehnologije, kjer se uporablja izključno le imobilizirani encim (Mateo idr., 2004, Lopez-Serrano idr., 2002; Kubac idr., 2008).

2.6.5 Imobilizacija hrenove peroksidaze

HRP (EC 1.11.1.7) je encim, ki spada v družino oksidoreduktaz in za svoje neokrnjeno fiziološko delovanje potrebuje hem prostetično skupino (Welinder in drugi, 1992). V povezavi z encimom holesterol oksidazo (ChOx; EC 1.1.3.6) predstavlja idealen sistem za določanje prostega holesterola v raztopini. V prisotnosti še tretjega encima, holesterol esteraze (ChE; EC 3.1.1.13), je mogoče kvantitativno določiti še esterificirani holesterol. Vsekakor zanimanje za uporabo peroksidaze iz hrena narašča, predvsem zaradi njene neprecenljive vrednosti za uporabo v farmacevtski in kemijski industriji za preučevanje naravnih oksido-redukcijskih procesov. V tej smeri je encim HRP pomemben za raziskovalna področja iz biotehnologije in klinične diagnostike (Hamid in Rehman, 2009).

Imobilizacija biokatalizatorja predstavlja idealen način za doseganje višje stabilnosti biokatalizatorja. Veliko metod je že bilo uporabljenih za imobilizacijo HRP na različne nosilce. Primer imobilizacije HRP na celulozni filter papir se je izkazal kot uspešen način vezave biokatalizatorja za uspešno odstranjevanje škodljivih snovi kot je 4-klorofenol iz odpadnih voda (Siddique in drugi, 1992). Imobilizirana HRP na površino predhodno aktiviranih delcev iz polporozne silike je bila prav tako uspešno uporabljena za dekontaminacijo odpadnih snovi, predvsem v procesih dekolorizacije odpada, pri katerih je imobilizirani encim pokazal visoko stabilnost pri daljšem času uporabe v postopku čiščenja odpadnega materiala (Dezotti, 1995). Podobno, HRP imobilizirana na osnovi predelane nosilce iz aluminija in hitozana je bila zelo učinkovita v procesih oksidacije različnih klorofenolov v odpadnih vodah in tleh (Vasudevan; Ganjidoust in drugi, 1996). V

literaturi je evidentiran uspešen primer vezave hrenove peroksidaze na magnetni material magnetit s pomočjo fizikalne adsorpcije, ki se je izkazal kot bolj učinkovit način imobilizacije biokatalizatorja v primerjavi z zamreženjem HRP na površino nosilca (Tatsumi, 1996). V procesih za zmanjševanje koncentracije fenola v predelavi papirja je bil izkoristek procesa z imobilizirano HRP na porozni keramični material iz litijeve in titanijeve zlitine bistveno boljši kot s prosto, neimobilizirano HRP (Peralta-Zamora, 1998). Biosensor za določanje fenola in njemu podobnih spojin je bil sintetiziran s pomočjo sol-gel tehnologije, v katerem je bil biokatalizator HRP ujet v prevodni porozni polimer, ki je služil kot encimski nosilec, pritrjen na stekleno ogljikovo elektrodo (Kane, 1998). Kljub zmanjšani delovni sposobnosti biosensorja, je pokazal hiter odzivni čas in visoko občutljivost za določanje različnih fenolnih spojin v mikromolarnem koncentracijskem območju. Podoben primer je bilo zaslediti na primeru načrtovanja biosensorja z imobilizirano HRP in koimobilizirano ChOx na sol-gel tanke filme prevlečene s polimerno matrico iz tetraetilortosilikata (TEOS). Takšen biosensor je pokazal visoko stabilnost in ponovljivost ali reproducibilnost (Kumar, 2000). Na podoben način, je bila uspešno izvedena imobilizacija treh komplementarnih encimov hkrati, in sicer HRP, ChOx in holesterol esteraze (ChE) na osnovi kemije zamreženja z mrežnim povezovalcem glutaraldehydom. Relativna aktivnost imobilizirane HRP je bila ocenjena na vrednost 76% v primerjavi z aktivnostjo proste HRP. Encimski preparat, sestavljen iz imobilizirane HRP in koimobilizirane ChOx, ima velik potencial za uporabo pri načrtovanju biosensorja za določanje celokupne koncentracije holesterola v klinični diagnostiki, ki je neobčutljiv na primesi kot so razne soli in druge plazemske substance kot kreatinin, albumin in estrogen. Biosenzorji, ki uporabljajo nosilno matrico za imobilizacijo bioaktivne učinkovine na osnovi prevodnih polimerov iz polianilina (PANI), so v zadnjih časih vzbudili veliko pozornosti. Takšen primer biosensorja je razvil Singh s sodelavci (2006). Biosensor je vključeval imobilizacijo treh različnih biokatalizatorjev ChOx, ChE in HRP kot tretji zaporedni encim in je pokazal dobro odzivnost na določanje vsebnosti esterificiranega in prostega holesterola v biološkem vzorcu ter dobro termično stabilnost. Bolj sodobne raziskave na področju imobilizacije HRP pričajo o uspelem poskusu imobilizacije HRP v prisotnosti koimobiliziranega encima ChOx na perlitne nanodelce, ki so funkcionalizirani z organosilanom in glutaraldehydom (Torabi in drugi, 2007). Oba biokatalizatorja, tako HRP kot ChOx, sta pokazala visoko stabilnost pri različnih reakcijskih pogojih v primerjavi z nativno obliko encima.

Posebna oblika imobiliziranega encima, ki za pridržanje biokatalizatorja ne potrebuje trdnega nosilca, tako imenovana metoda CLEAs, ponuja številne prednosti (Lopez-Serrano in drugi 2002; Cao in drugi, 2003). S kemijskega gledišča je metoda, ki vključuje medsebojno povezovanje molekul encima v dveh stopnjah, osnovana na večtočkovnem intermolekularnem zamreženju molekul encima. Ker oblika sama po sebi ne vključuje nosilca, je upad katalitične aktivnosti zaradi odsotnosti nekatalitične mase v obliki trdnega nosilca preprečen, poleg tega je finančni strošek, ki je dodeljen za pripravo trdnega nosilca, pri metodi zamreženih encimskih skupkov tako izključen. Tehnika CLEAs dovoljuje tudi možnost koimobilizacije encima HRP z drugimi, komplementarnimi encimi v encimski preparat, ki se imenuje combi-CLEAs. S tehniko zamreženih encimskih skupkov je bilo imobiliziranih več različnih encimov, vključujoč penicilin acilazo, lipaze in lakaze (Cao idr., 2000; Yu idr., 2006; Kaul idr., Cabana idr., 2007), vendar imobilizacija HRP v obliki zamreženih encimskih skupkov do sedaj še ni bila opisana ali izvedena. V delu je opisan poskus postopka optimizacije priprave zamreženih encimskih skupkov iz hrenove peroksidaze.

3 MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

Materiali in reagenti pri imobilizaciji holesterol oksidaze na magnetni nanonosilec.

Vse kemikalije in reagenti so bili uporabljeni v preparativne namene. Kemikalije, vključujoč železov klorid tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), železov klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), amonijak (25 % (w/w)), natrijev silikat (Na_2SiO_3), glicerol (87 %) in organosilan ((3-(2-aminoetilamino)-propil-dimetoksietilsilan ali AEAPTS)) so bili kupljeni od Sigm-Aldrich (Nemčija). Klorovodikova kislina (37 %), metanojska kislina (98-100%), metanol in natrijev klorid so bili kupljeni od podjetja Merck (Nemčija). Encim Holesterol oksidaza (ChOx, EC 1.1.3.6; 30.1 U/mg) je bil kupljen od podjetja Biozyme Laboratories (Velika Britanija), medtem ko je bil encimski preparat albumin iz govejega seruma (BSA) kupljen od podjetja Sigma-Aldrich (Nemčija). Dušikova (65 % (w/w)) in mravljična (98-100 %, brezvodna) kislina sta bili kupljeni od Kemike (Hrvaška). Bazična reagentna, kalijev (KOH) in natrijev hidroksid (NaOH) sta bila nabavljena pri podjetju Merck (Nemčija), puferska raztopina Buffer solution for HPCE (pH 11) je bila kupljena pri Biochemica - Fluka (Nemčija) in holesterol v prahu z visoko čistostjo (95 % (w/w)) je bil nabavljen pri Sigm - Aldrich (Nemčija). Za pripravo Bradfordovega reagentna smo uporabili barvilo Coomassie Brilliant Blue in orto-fosforno kislino (88 %), ki smo ju nabavili pri Merck-u (Nemčija).

Materiali in reagenti pri sintezi zamreženih encimskih skupkov iz hrenove

peroksidaze. Vse kemikalije in reagenti so bili uporabljeni v preparativne namene. Kemikalije, vključujoč albumin iz kokošjih jajc (EA), glutaraldehid (25 %) in cianoborohidrid, so bile kupljene od Sigm-Aldrich (Nemčija). Pentaetilenheksanamin (PEHA), dikalijev hidrogen fosfat (K_2HPO_4), kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) in amonijev sulfat so bili kupljeni od podjetja Acros Organics (Nemčija). Skupina funkcionalnih amino aditivov, v katero se uvrščajo raztopina aminokislina lizin (Poly-L-Lysine), polietileniminov z molsko maso 60 in 600 kDa (PEI), je bila dobavljena pri podjetju Acros Organics (Nemčija). Topila aceton, 2-propanol, acetonitril, metanol in dimetoksietanol (DMEtOH) so bili dobavljeni od podjetja Merck (Nemčija). Encim peroksidaza iz navadnega hrena (HRP, EC 1.11.1.7; 291 U/mg) je bil kupljen od podjetja Biozyme Laboratories (Velika Britanija), medtem ko je bil encimski preparat albumin iz kokošjih jajc (EA) kupljen od podjetja Acros Organics (Nemčija). Vse raztopine reagentov so bile dnevno pripravljene z deionizirano miliQ vodo. Reagenti, o-dianisidine, vodikov peroksid (H_2O_2 , 30 % (v/v)), 4-amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazdin-5-on (4-aminoantipirin) ali 4-aminoantipirin (4-AAP, 99 %) in fenol so bili kupljeni pri podjetju Sigma - Aldrich (Nemčija). Vse raztopine reagentov so bile dnevno pripravljene z deionizirano miliQ vodo.

3.2. Analizne metode

3.2.1 Priprava magnetnega nosilca

Za karakterizacijo površinsko spremenjenih magnetnih nanodelcev iz maghemita smo uporabili naslednje analizne metode.

3.2.1.1 Merjenje specifične magnetizacije

Magnetne lastnosti smo določevali z vibracijskim magnetometrom (VSM). Magneto/susceptometer je popolnoma računalniško kontroliran sistem za merjenje permanentnega oz. inducirane magnetnega momenta različnih majhnih vzorcev pri različnih temperaturah. Magnetne lastnosti vzorcev merimo tako, da jih pritrdimo v teflonske ali kvarčne lončke na konec nihajoče palice. Z enosmernim tokom vzpostavimo magnetno polje elektromagneta. Konec palice z vzorcem iz mirovne lege zaniha. Na drugem koncu palice je pritrjen ozek trak, prekinjevalec žarka, ki pada na fotocelice. Ko se vzorec odmakne za določeno razdaljo iz mirovne lege, se tudi trak odmakne za določeno razdaljo. Računalnik signal izmeri in v času obdelave podatkov (procesiranja) izračuna magnetizacijo.

Specifično magnetizacijo vzorcev, neprevlečenih maghemitnih nanodelcev, površinsko spremenjenih maghemitnih nanodelcev in magnetnih nanodelcev z imobiliziranim biokatalizatorjem, smo izmerili z instrumentom VSM – 4179 (Oxford Instruments) v enosmernem magnetnem polju z gostoto magnetnega pretoka med -1,8 T in 1,8 T.

Magnetometer sestavljajo naslednji elementi:

- mehanski del ali merilna glava (Drusch),
- kontrolna enota, ki sestoji iz računalnika in vmesne enote (Manics);
- merilec magnetne gostote s Hallovo sondo (Buker),
- kriostat (TBT) s kontrolorjem (Oxford) in
- peč (Manics) s kotrolorjem (Eurotherm).

Sistem deluje tako, da se lahko meritve opravljajo v brezračnem prostoru ali vakuumu ali v pretoku različnih plinov v širokem temperaturnem območju (1,5 – 1050 K). Merjenje specifične magnetizacije temelji na principu ničelne pozicije vzorca in je različna od klasičnega Faradeyevskega principa (Ref). Vzorec v kvarčnem ali teflonskem lončku ($V \sim 0,6 \text{ cm}^3$) je pritrjen na konec toge palice dolžine 1 m, ki je izpostavljena nehomogenemu magnetnemu polju v smeri x . Gradient polja je pravokoten na os nosilca vzorca, tako da si horizontalna sila F_x prizadeva potisniti vzorec stran od začetne lege. Odvisno od narave vzorca (feromagnetna, paramagnetna ali diamagnetna) kaže sila F_x v smeri zmanjšanja ali povečanja gradienta magnetnega polja dH_x/dx . Merjeni signal je premosorazmeren kompenzacijski sili F_c , ki vzdržuje drog z nosilcem v ničelni legi. Magnetizacija M in masna susceptibilnost λ sta povezani s kompenzacijsko silo F_c z enačbami:

$$F_c = K \cdot \frac{d(M \cdot H)}{dx} = K \cdot \frac{M}{H} \cdot \frac{HdH_x}{dx} = K \cdot X \cdot \frac{HdH_x}{dx}, \quad [3.1]$$

kjer je K oznaka za konstanto.

Za natančno meritev mora biti vzorec postavljen v cono, kjer je produkt $H \cdot dH_x/dx$ konstanten ($\pm 1\%$). Dejansko polje na mestu vzorca se določi z uporabo standardnega feromagnetnega materiala znane koercitivnosti. Kalibracijo signala se enostavno določi s kontrolo remanentne magnetizacije standarda ali z uporabo standardnega paramagnetnega materiala.

Ko je vzorec v ravnotežni legi, so vrtilni momenti v ravnovesju:

$$F_x \cdot R = F_C \cdot r$$

$$F_C = F_x \cdot \frac{R}{r} \quad [3.2]$$

Kompensacijsko silo, ki drži merilni drog v ravnovesni legi zagotavlja trajni magnet:

$$F_C = B_{pm} \cdot N_C \cdot L_C \cdot I_C = K_2 \cdot I_C \quad [3.3]$$

Instrument nato izmeri kompensacijski tok I_C , ki je odvisen od kompensacijske sile F_C in signal S , ki je premosorazmeren susceptibilnosti in velja naslednja zveza:

$$S = K_2 \cdot I_C \quad [3.4]$$

Poleg susceptibilnosti lahko z aparaturo merimo tudi magnetno anizotropijo vzorcev z enostavnim rotiranjem merilnega droga okoli osi, na katerem je pritrjen vzorec. Masno magnetizacijo ($A \cdot m^2 \cdot kg^{-1}$) izračunamo iz susceptibilnosti, ki jo izmeri instrument. Z magnetometrom VSM - 4179 (Oxford Instruments) smo izmerili specifično magnetizacijo vzorcev v odvisnosti od jakosti magnetnega polja pri sobni temperaturi.

3.2.1.2 Rentgenska praškovna difrakcija (XRD)

Rentgenska praškovna analiza je direktna metoda za kvalitativno in kvantitativno fazno analizo zrnatih kristaliničnih materialov, prav tako pa se lahko uporablja za analize grobih materialov. Je ena najpomembnejših metod za karakterizacijo v kemiji trdnega stanja. Rentgenska praškovna difrakcija vključuje fazno identifikacijo, karakterizacijo materialov z metodo prstnega odtisa, meritve dimenzij osnovne celice (indeksiranje), določitev velikosti kristalitov (delcev) v praškastem vzorcu s pomočjo Sherrerjeve enačbe. Iz širjenja uklonov XRD lahko določimo povprečno velikost kristalitov ali delcev.

Rentgenska praškovna difrakcijska analiza je bila uporabljena za karakterizacijo sintetiziranih magnetnih nanokompozitov, to so površinsko spremenjeni magnetni nanodelci iz maghemita z in brez imobiliziranega biokatalizatorja. Rentgenska praškovna difrakcija je bila uporabljena za kvalitativno karakterizacijo vzorcev in za ocenitev velikosti nanodelcev, pripravljenih s koprecipitacijo iz homogenih raztopin železovih ionov in funkcionaliziranih z večslojnim funkcionalnim plaščem iz silicijevega dioksida in molekul aminosilana.

Vzorci so bili analizirani na D4 Endeavor difraktometru (XRD, AXS, Bruker, D5005) z Ni filtriranim $CuK\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) sevanjem pri 45 kV in 30 mA. Snemanje vzorcev je potekalo v območju $2\theta = 20 - 70^\circ$ s korakom $0,02^\circ/\text{min}$ 10 minut. Pri večjih delcih širina uklonov doseže običajno vrednost, pri zelo majhnih delcih pa ukloni praktično izginejo v ozadju. Ukloni rentgenske difrakcije majhnih delcev so širši od običajnih in razširitev narašča z manjšanjem njihove velikosti. Ocenitev velikosti feritnih nanodelcev je potekala

na osnovi širitve uklonov rentgenskih praškovnih difraktogramov s programskim paketom *Diffra^{plus} TOPASTM*.

Instrumentalna širina uklona idealnega monokristala (brez defektov) pri difrakcijskem kotu, ki je čim bližje kotu opazovanemu uklonu vzorca se jo običajno določi pred meritvami.

3.2.1.3 Presevna (TEM) in vrstična elektronska mikroskopija (SEM)

S transmisijsko (HRTEM, JEOL 2110F) in presevno elektronsko mikroskopijo (FE SEM SIRION, 400 NC, FEI) smo proučevali morfologijo sintetiziranih magnetnih nanodelcev iz maghemita. Visoko ločljivi transmisijski elektronski mikroskop smo uporabili za določitev razpona velikosti delcev, morfologijo in še druge strukturne lastnosti nanodelcev, kot je prisotnost plašča silike, ki obdaja železovo jedro magnetnih nanodelcev. Mikroskop je opremljen z LaB₆ izvorom elektronov s termično emisijo in CCD kamero za digitalni prenos slik. Magnetni material za TEM analizo smo dispergirali v deionizirani vodi in položili na perforirani amorfni ogljikovi foliji nosilne bakrene mrežice, da se posušijo pri sobni temperaturi do suhe mase.

Morfologijo nanokompozitov smo opazovali tudi z vrstično elektronsko mikroskopijo. Vzorci so bili pripravljene v obliki nanosa prahu nanokompozitov na ogljikovo pasto, pritrjeno na kovinski nosilec. Nanosi magnetnega prahu so bili napršeni z zlatom (Au). Vrstična elektronska mikroskopija je bila uporabljena tudi za določanje velikosti in oblike delcev iz zamreženih encimskih skupkov.

3.2.1.4 Energijska disperzijska spektroskopija rentgenskih žarkov (EDS)

Energijska disperzijska spektroskopija rentgenskih žarkov (EDS analiza) sodi med metode elektronske mikroanalize, primerna za kvalitativno karakterizacijo trdnega materiala in je relativno hitra in zanesljiva metoda. EDS analizo, lahko jo izvajamo tako v vrstičnem (SEM) kot tudi v presevnem elektronskem mikroskopu (TEM), bomo uporabili za identifikacijo in kvantitativno ugotovitev kemijskih elementov v izbranem področju (nanoobmočje) nanokompozita iz magnetnih nanodelcev, prevlečenih s funkcionalno plastjo amorfnе silike. Za ugotovitev koncentracijskega profila izbranega elementa se večinoma uporablja analiza brez standardov. Možno je tudi na mikroskopu posneti lastne standarde posameznih elementov na vzorcih z znano sestavo. S to metodo lahko zanesljivo ugotovimo, ali je katerega elementa veliko (masni delež > 10 %), ali je prisoten v manjših količinah (1 – 10 %) ali je v sledovih (< 1%). Analiza EDS je zelo uporabna pri raziskavi tehničnih materialov. Z opisano metodo smo določevali prisotnost naslednjih elementov v magnetnem nanokompozitu ali površinsko spremenjenih magnetnih nanodelcih prevlečenih s plastjo silicijevega dioksida: prisotnost dvo- in tri- valentnih železovih (Fe), silicijevih (Si) in kisikovih (O) atomov.

3.2.1.5 Plamenska atomska absorpcijska spektroskopija (FAAS)

Vsebnost železovih (Fe) kationov v vzorcih smo določevali s plamensko atomsko absorpcijsko spektrometrijo (FAAS) z instrumentom Varian Spectra AA 110.

Črpalka črpa raztopino vzorca preko razpršilnika v plamen, kjer poteka atomizacija elementov. Pri določevanju Fe je bila uporabljena zmes plinov diduškovega oksida in acetilena. Skozi plamen teče žarek svetlobe karakteristične valovne dolžine in pada na fotopomnoževalko. Ko atomi merjenega elementa vstopijo v plamen, absorbirajo svetlobo karakteristične valovne dolžine in s tem zmanjšajo intenziteto žarka, ki pade na fotopomnoževalko. Tako se zmanjša absorbanca, ki je linearno odvisna od koncentracije

elementa. S pomočjo standardnih raztopin se določi koncentracija elementov v raztopini. Absorpcije železovih ionov smo merili na absorpcijski črti Fe 248,3 nm. Nespecifična absorpcija je bila odšteta z devterijevo žarnico.

3.2.1.6 Določanje železovega oksida (FeO) v maghemitnih (γ -Fe₂O₃) nanodelcih

V 250 mL erlenmajerico smo zatehtali 200 mg fino zdrobljenega feritnega vzorca in dodali 20 mL nasičene raztopine NaHCO₃ in 60 mL raztopine HCl 1:1. Vzorec smo nato segrevali toliko časa, dokler se ni le-ta popolnoma raztopil. Nato smo vzorec ohladili, erlenmajerico ohladili in vanjo dodali 15 mL H₃PO₄, 10 mL H₂SO₄ in indikator (raztopina Ba-difenilamin sulfonata). Nato smo vzorec titrirali z 0.02 N raztopino KMnO₄ do preskoka rumeno-zelene v vijolično barvo. Vsebnost Fe²⁺ v obliki FeO in γ -Fe₂O₃ smo izračunali preko stehiometrijskega razmerja iz volumna porabljenega titranta KMnO₄.

3.2.1.7 Infrardeča spektroskopija

Vezavo primarne in sekundarne funkcionalne prevleke iz silicijevega dioksida in molekul silana smo opazovali s Fourier transformirano infrardečo spektroskopijo (FT-IR, Perkin Elmer 1600). Dodatno smo prisotnost vezave encima na magnetne nanodelce določili z infrardečo spektroskopijo.

3.2.1.8 Določanje prostih amino skupin na površini magnetnega nanokompozita

Število prostih amino skupin (-NH₂) na površini magnetnega nanonosilca po zaključeni sekundarni površinski funkcionalizaciji smo določili s konduktometričnim merilnikom (Seven Multi, Mettler Toledo) z vgrajeno elektrodo (Electrode Mettler Toledo InLab 730, Seven Multi) za določanje prevodnosti vzorca. Število prostih amino skupin na enoto mase vzorca iz funkcionaliziranih magnetnih nanodelcev smo določili s konduktometrično titracijo suspenzije funkcionaliziranih magnetnih nanodelcev s klorovodikovo kislino (HCl, $c_{\text{HCl}} = 0,001 \text{ mol L}^{-1}$, $V_{\text{HCl}} = 100 \text{ }\mu\text{L}$). Titracijo smo izvedli tako, da smo spremljali spreminjanje prevodnosti sistema ob počasnem dodajanju pripravljene raztopine titranta znane molarnosti. Pred pričetkom titracije smo suspenzijo funkcionaliziranih magnetnih nanodelcev homogeno mešali v posodi za titracijo. Konduktometrično titracijo smo izvedli v nespremenjenem pH območju.

Elektrodo smo umerili s standardno raztopino kalijevega klorida (KCl) znane molarnosti $c_{\text{KCl}} = 0,02 \text{ mol L}^{-1}$. Specifična prevodnost (χ) standardne raztopine pri sobni temperaturi (25°C) znaša 27,68 S cm⁻¹ ali 2,768 mS cm⁻¹. Prevodnost vzorca suspenzije funkcionaliziranih magnetnih nanodelcev smo merili v območju prevodnosti od 0 do 1000 mS cm⁻¹.

Potek konduktometrične titracije. Površinsko koncentracijo prostih aminoskupin na površini nanokompozitnih delcev smo določili s konduktometrično titracijo. Suspenzijo spranih nanokompozitnih delcev, prevlečenih s silicijevim dioksidom in aminosilanom AEAPTS, smo titrirali z razredčeno raztopino klorovodikove kisline. Prevodnost suspenzije je odvisna od količine raztopljenih ionov v nosilni tekočini (vodi). Na začetku imamo v raztopini le amonijeve ione (-NH₃⁺) vezane na površini nanodelcev in hidroksilne ione (-OH⁻) v vodi. Med titracijo poteče reakcija med klorovodikovo kislino in aminoskupino. Pri tem nastaja nedisociirana molekula vode, ki ne prispeva k prevodnosti raztopine, zato so spremembe v prevodnosti neznatne. Ko v raztopini ni več površinskih aminoskupin, ki bi bile razpoložljive za reakcijo s klorovodikovo kislino, se količina ionov z vsakim dodatkom kisline zelo poveča. Posledica je znatno povečanje prevodnosti raztopine. Ekvivalentna točka se določi iz ostre spremembe v naklonu premice odvisnosti prevodnosti od koncentracije dodane HCl. Število prostih amino skupin na površini nanodelcev je sorazmerna koncentraciji oksonijeveih ali H₃O⁺ ionov, pri kateri, z

nadaljnjim dodajanjem kisline, prevodnost raztopine raste hitreje kot v začetnem delu krivulje (Čampelj in drugi, 2008).

3.2.1.9 Merjenje pH

Kislost/bazičnost pripravljenih raztopin smo preverjali s pH metrom (Cheker, žepni pH meter z nastavljivo elektrodo, Hanna Instruments), ki smo ga pred vsakim merjenjem tudi ustrezno umerili s standardnimi pH raztopinami, pH 4, 7 in 10. Encimske preparate, prosto holesterol oksidazo in hrenovo peroksidazo, smo hranili pri temperaturi -15 °C, drugače, pred potekom eksperimentov, smo vse encimske preparate, vključno z imobilizirano holesterol oksidazo in hrenovo peroksidazo, hranili na ledeni kopeli.

3.3 Imobilizacija biokatalizatorja na površinsko spremenjen magnetni nosilec

Za določanje učinkovitosti imobilizacije biokatalizatorja na površinsko spremenjeni magnetni nanonosilec in v obliki CLEAs smo uporabili kolorimetrične metode za določanje izkoristka imobilizacije biokatalizatorja na ali v nanonosilec in specifične encimske teste.

3.3.1 Določanje učinkovitosti imobilizacije

Učinkovitost imobilizacije biokatalizatorja je bila določena z neposrednim merjenjem koncentracije proteinov (mg mL^{-1}) v izvorni raztopini encima in v tekoči ali odpadni fazi supernatanta. V primeru imobilizacije biokatalizatorja v obliki zamreženih encimskih skupkov smo še dodatno določevali koncentracijo proteinov v posameznih odpadnih tekočih fazah po postopku izpiranja imobiliziranega biokatalizatorja. Koncentracija imobiliziranega biokatalizatorja je bila določena s kolorimetrično metodo po Bradfordu (Bradford, 1977), ki uporablja barvni reagent Coomassie Brilliant Blue za detekcijo proteinov v vzorcu. Valovna dolžina, pri kateri smo merili koncentracijo proteinov, je bila $\lambda = 595 \text{ nm}$. Za konstrukcijo umeritvene krivulje, ki je služila za izračunavanje koncentracije proteinov v neznanem vzorcu, smo uporabili standardni protein albumin iz govejega seruma (Bovine Serum Albumin ali BSA) z znanimi koncentracijami. Koncentracijo imobiliziranega biokatalizatorja smo izračunali s pomočjo enačbe:

$$\varphi \left[\frac{\text{mg}_{\text{encim}}}{\text{g}_{\text{nosilec}}} \right] = \frac{[c_i - c_s] \cdot V_{\text{vzorec}}}{W_{\text{nosilec}}}, \quad [3.5]$$

kjer je φ koncentracija imobiliziranega biokatalizatorja; c_i in c_s sta oznaki za začetno koncentracijo biokatalizatorja in koncentracijo proteinov v odpadni fazi supernatanta po zaključenem postopku imobilizacije (mg mL^{-1}); V je volumen vzorca iz reakcijskega medija v volumskih enotah [mL] in W je dejanska masa nosilca (npr.: magnetnega nanonosilca) v masnih enotah [mg].

Priprava Bradfordovega reagenta. Bradfordov reagent smo pripravili tako, da smo raztopili 100 mg barvnega reagenta Coomassie Brilliant Blue v 100 ml fosforne kisline (85 % (v/v)) in v 50 mL etanola (95 % (v/v)) ter celotno zmes razredčili z miliQ vodo na volumen 1 L.

3.3.2 Merjenje specifične aktivnosti biokatalizatorja

Za določanje specifične aktivnosti biokatalizatorja, tako prostega kot imobiliziranega, smo uporabili Uv – vis spektrofotometer (UV – vis spektrofotometer, Varian – Cary 50 Probe), na katerem smo merili spremembo absorbance med potekom specifične encimske reakcije za biokatalizator ChOx in HRP. Aktivnostni test za posamezni biokatalizator smo izvajali v kvarčnih kivetah, katere smo predhodno dobro sprali z acetonom. Pred vsakim merjenjem smo spektrofotometer umerili s slepim vzorcem.

3.3.3 Encimski test za biokatalizator holesterol oksidazo (ChOx, EC 1.1.3.6)

Aktivnost proste ali imobilizirane ChOx smo določevali spektrofotometrično z določevanjem začetnih hitrosti oksidacije holesterola. Aktivnost proste ali imobilizirane ChOx smo določevali v reakcijski zmesi, ki je vsebovala vodno raztopino natrijevega acetata (100 mM, pH 5) in raztopino holesterola (0,5 %, (w/v)) kot substrata za biokatalizator ChOx. Reakcijsko zmes smo najprej rahlo stresali in segreti na temperaturo $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nato smo dodali 500 μL suspenzije imobiliziranega biokatalizatorja na magnetnem nanonosilcu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{ChOx}$) neposredno v reakcijsko zmes. Pri temperaturi $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo nastalo zmes segrevali 30 min. Pred pričetkom merjenja koncentracije nastalega produkta ketona 4-holesten-3-on, ki se sprosti med reakcijo oksidacije holesterola, smo v reakcijsko zmes dodali 3 mL etilnega alkohola za zaustavitev reakcije. Suspenzijo z nanokompozitom $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{ChOx}$ smo nato centrifugirali (Centrifuga 5415 R, Eppendorf) in tekočo fazo supernatanta uporabili za določitev koncentracije produkta pri valovni dolžini $\lambda = 242\text{ nm}$. Aktivnost imobiliziranega biokatalizatorja je bila podana v obliki relativne aktivnosti, izražena v odstotnih točkah (%), in določena na osnovi primerjave aktivnosti prostega encima ChOx. Vsi eksperimenti so bili ponovljeni trikrat.

Ena encimska enota ($\text{U/mL}_{\text{encim}}$) je definirana kot količina encima ali biokatalizatorja (ChOx), ki pretvori med katalitsko reakcijo 1 μmol holesterola v ketonski produkt 4-holesten-3-on pri pH vrednosti 5 in temperaturi $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter času 30 min.

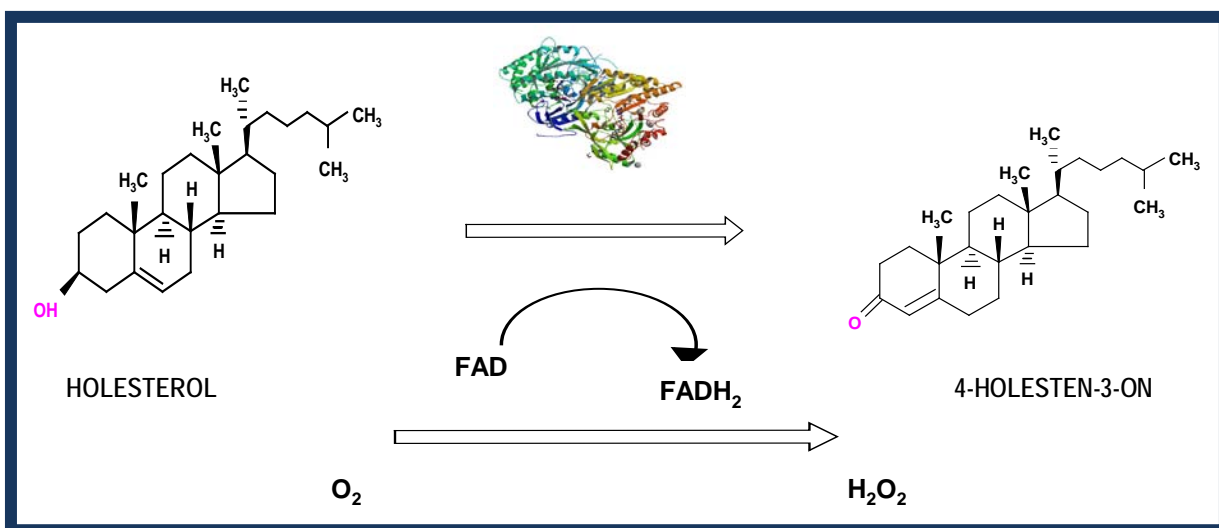
Specifična aktivnost proste in imobilizirane holesterol oksidaze je bila izračunana po naslednji enačbi (Allain, 1974):

$$\text{U/mL}_{\text{encim}} = \frac{[A_{243} \text{ vzorec} - A_{243} \text{ slepi vzorec}] \cdot V_{\text{reakcijska zmes}} \cdot df}{t_{\text{reakcijski čas}} \cdot \epsilon \cdot V_{\text{vzorec}}} \quad [3.6]$$

kjer so:

A_{243}	izmerjena absorbanca vzorca	[/]
df	dilucijski faktor, ki smo ga uporabili za razredčevanje vzorca	[/]
$V_{\text{reakcijska zmes}}$	volumen reakcijske zmesi za encimsko reakcijo	[mL]
$t_{\text{reakcijski čas}}$	čas reakcije	[min]
ϵ	ekstinkcijski koeficient za produkt 4-holesten-3-on	[$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
V_{vzorec}	volumen dodanega vzorca (proste ali imobilizirane holesterol oksidaza)	[mL]

Kemizem reakcije oksidacije holesterola v ketonski produkt 4-holesten-3-on je prikazan na sliki 3 – 1.



Slika 3 – 1: Potek reakcije oksidacije holesterola s ChOx.

3.3.4 Encimski test za biokatalizator hrenovo peroksidazo (HRP, EC 1.11.1.7)

Za testiranje specifične encimske aktivnosti prostega in imobiliziranega biokatalizatorja (HRP) smo uporabili dva različna aktivnostna testa, in sicer:

- Aktivnostni test na osnovi reakcije oksidacije *o-dianisidin-a* in
- Aktivnostni test na osnovi reakcije oksidacije *4-aminoantipirin-a* (4-AAP).

Aktivnostni test na osnovi reakcije oksidacije *o-dianisidina* smo uporabili za določevanje aktivnosti resuspendiranih skupkov iz HRP po zaključeni reakciji obarjanja pri pripravi imobiliziranega biokatalizatorja v obliki CLEAs.

Aktivnostni test na osnovi reakcije sulfoksidacije *o-dianisidina* smo uporabili pri začetnem merjenju dejanske aktivnosti zamreženih encimskih skupkov iz biokatalizatorja HRP. V nadaljevanju smo test opustili in uporabili drugi, bolj specifičen test na osnovi reakcije oksidacije *4-aminoantipirin-a*, ki je dal boljše rezultate. Pri aktivnostnem testu na osnovi reakcije sulfoksidacije *o-dianisidina* je prišlo do vpliva oviranega prenosa snovi, zato je bilo težko določiti dejansko aktivnost imobiliziranega encima v obliki CLEAs. Aktivnostni test na osnovi reakcije oksidacije *4-aminoantipirin-a* smo uporabili tudi za določevanje preostale v tekočih odpadnih fazah supernatanta (frakcija S) in posameznih izpiranj CLEAs (frakcije Izpiranje I, II in III).

3.3.4.1 Aktivnostni test na osnovi reakcije oksidacije o-dianisidin-a

Aktivnost proste in imobilizirane HRP je bila določena na osnovi reakcije oksidacije reducirnega substrata o-dianisidina v prisotnosti oksidirajočega substrata ali vodikovega peroksida (H₂O₂). Aktivnost HRP smo določevali spektrofotometrično pri valovni dolžini $\lambda = 440$ nm. Reakcijska zmes znanega volumna (3 mL) je vsebovala naslednje reagente: 2 mL raztopine fosfatnega pufru (PBS, 100 mM, pH 7), 25 μ L substrata o-dianisidina (3,2 mg mL⁻¹), 500 μ L H₂O₂ (56 mM) in 100 μ L raztopine encima (4 mg mL⁻¹). Reakcijsko zmes smo nato razredčili z dodatkom vodne raztopine PBS na volumen 3 mL. Aktivnost smo merili v kvarčni kiveti pri temperaturi 25 °C. Pri navedenih pogojih smo zasledovali hitrost nastajanja barvnega produkta, ki absorbira svetlobo pri specifični valovni dolžini 440 nm.

Ena encimska enota (U/mL_{encim HRP}) je definirana kot količina encima ali biokatalizatorja (HRP), ki pretvori med katalitsko reakcijo 1 μ mol reducirane oblike o-dianisidina v oksidirano obliko o-dianisidina pri pH vrednosti 7, temperaturi 25 °C in času 5 min.

Aktivnost imobiliziranega biokatalizatorja je bila podana v obliki relativne aktivnosti, izražena v odstotnih točkah (%), in določena na osnovi primerjave aktivnosti prostega encima HRP. Vsi eksperimenti so bili ponovljeni trikrat.

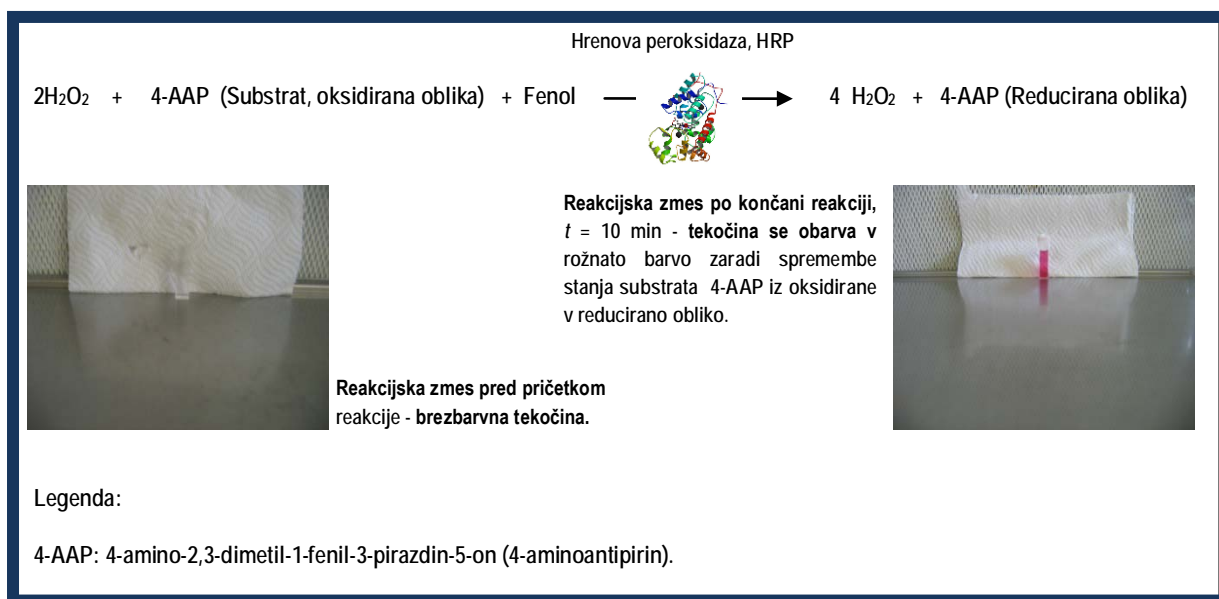
Relativno aktivnost zamreženih encimskih skupkov smo izračunali po enačbi (Aytar in Bakir, 2008):

$$A/A_0, [\%] = \frac{\text{Aktivnost zamreženih encimskih skupkov iz HRP}}{\text{Aktivnost proste HRP}} \cdot 100 \quad [3.7]$$

3.3.4.2 Aktivnostni test na osnovi reakcije oksidacije 4-aminoantipirina

Dejanska aktivnost encima, prostega in v obliki CLEAs, je bila določena z reakcijo oksidacije 4-amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazdin-5-ona ali 4 - aminoantipirina (4-AAP) v prisotnosti vodikovega peroksida. Aktivnost encima smo zasledovali spektrofotometrično pri valovni dolžini $\lambda = 510$ nm. Začetni ali linearni del kinetične krivulje $\Delta A_{510}/\text{min}$ smo odčitali iz izrisanega grafa. Naklon premice $\Delta A_{510}/\text{min}$ smo uporabili za izračun specifične aktivnosti encima peroksidaze. Ena katalitična enota encima je določena z razgradnjo enega μ M vodikovega peroksida v eni minuti pri temperaturi 25 °C in v vodni raztopini na osnovi fosfatnega pufru pH 7. Aktivnost CLEAs je bila podana v obliki relativne aktivnosti in določena na osnovi primerjave aktivnosti prostega encima HRP. Relativna aktivnost CLEAs je bila izračunana po enačbi 3.8. Vsi eksperimenti so bili ponovljeni trikrat.

Princip reakcije oksidacije 4-AAP za HRP je prikazan na sliki 3 – 2:



Slika 3 – 2: Potek reakcije oksidacije 4-AAP s HRP.

Aktivnostni test je bil sestavljen iz naslednjih reagentov, ki so bili dodani v sledečem vrstnem redu:

Tabela 3 – 1: Encimski test za HRP.

Reagent	Koncentracija [mol mL^{-1}]	Volumen [mL]
Fenol/4-AAP	0,0025	1,4
H ₂ O ₂	0,0017	1,5
PBS vodna raztopina [pH 7]	0,2	0,1
Vzorec	/	0,5

Opomba: Slepi vzorec je bil pripravljen na enak način, le da smo namesto vzorca, ki je vseboval prosto ali imobilizirano HRP, v reakcijsko zmes dodali pufersko raztopino (PBS, pH 7, 0,5 mL).

Enačba za računanje specifične aktivnosti encima (U/mg_{encim}):

$$U/mg_{\text{encimski preparat}} = \frac{\Delta A/\text{min}}{[\epsilon \cdot m_{\text{encim}}] V_{\text{reakcijska zmes}}} \quad [3.8]$$

kjer so:

$U/mg_{\text{encimski preparat}}$	Specifična aktivnost encima peroksidaze [HRP]	$[\mu\text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}]$
$\Delta A/\text{min}$	Začetna hitrost reakcije oksidacije z encimom HRP ali naklon kinetične krivulje reakcije oksidacije z encimom HRP	$[\text{min}^{-1}]$
ϵ	Molski ekstinkcijski koeficient; $6,58 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$[\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$
m_{encim}	Masa encima (prostega ali imobiliziranega) v vzorcu	$[\text{mg}]$
$V_{\text{reakcijska zmes}}$	Volumen reakcijske zmesi za aktivnostni test, $V_{\text{reakcijska zmes}} = 3,5 \text{ mL}$	$[\text{mL}]$

3.4 Eksperimentalne metode

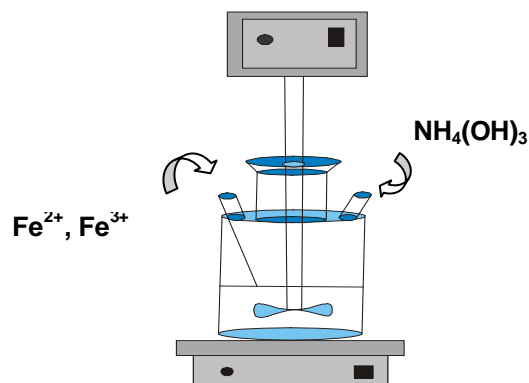
3.4.1 Priprava nanokompozita za imobilizacijo biokatalizatorja

Priprava nanokompozita za imobilizacijo biokatalizatorja v obliki visoko funkcionalnih magnetnih nanodelcev iz maghemita je obsegala sintezo magnetnih nanodelcev in njihovo površinsko funkcionalizacijo. Maghemitni nanodelci so bili sintetizirani s preprosto metodo obarjanja železovih (II) in železovih (III) ionov z dodatkom primerne obarjalnega agensa. Obarjanje ali koprecipitacija je zelo priljubljena metoda za sintezo magnetnih nanodelcev, ker velja za enostavno in relativno poceni metodo. Čeprav je metoda sama po sebi enostavna, je potrebno temperaturo in pH medija, v katerem se magnetni nanodelci pripravljajo, dosledno nadzirati z namenom, da se sintetizirajo delci zelene kemijske sestave in velikosti (Gnanaprakash in drugi, 2007). V postopku površinske funkcionalizacije lahko modifikacijo površine nanodelcev dosežemo na več načinov, in sicer bodisi z anorganskimi ali organskimi dodatki z ustreznimi funkcionalnimi skupinami. V našem primeru je potekalo kemijsko spreminjanje površine maghemitnih (γ - Fe_2O_3) nanodelcev v dveh stopnjah. Najprej, so bili maghemitni nanodelci prevlečeni z amorfno plastjo silicijevega dioksida ali silike (SiO_2) med reakcijo polimerizacije natrijevega silikata. Temu je sledilo kovalentno pripenjanje molekul organosilana (aminosilana) na stabilne maghemitne nanodelce med eksotermno reakcijo silanizacije specifičnega aminosilana. Na koncu so bili tako sintetizirani visoko funkcionalni magnetni nanodelci iz maghemita uporabljeni za poskus vezave biokatalizatorja ChOx.

3.4.1.1 Sinteza stabilne magnetne tekočine iz maghemitnih (γ - Fe_2O_3) nanodelcev

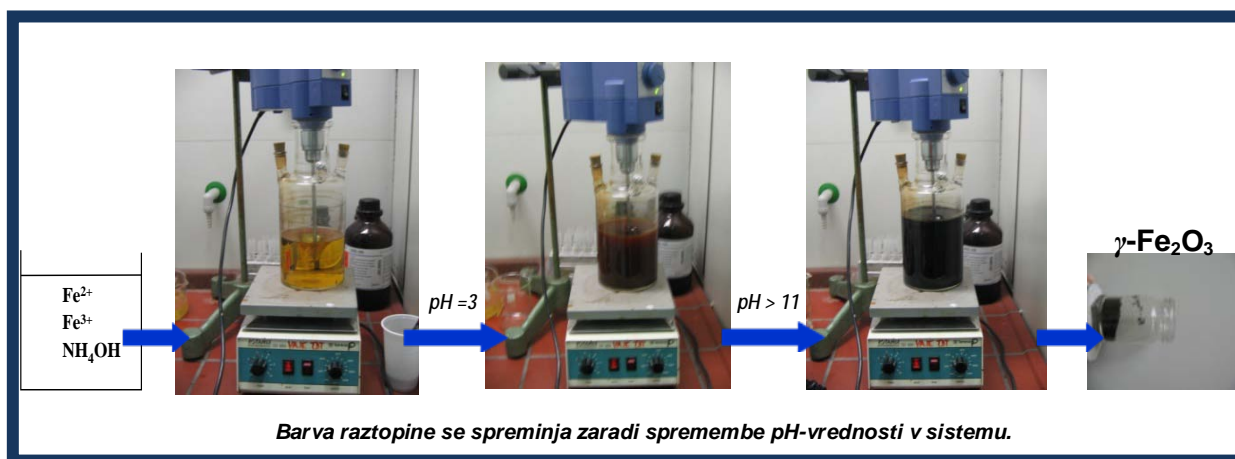
3.4.1.1.1 Sinteza maghemitnih nanodelcev

Maghemitne nanodelce smo sintetizirali z obarjalno reakcijo ali koprecipitacijo železovih dvo- in tri- valentnih ionov, Fe^{2+} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $m_{\text{Fe}^{2+}}=6,22$ g; $n_{\text{Fe}^{2+}}=0,027$ mol L^{-1}) in Fe^{3+} ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $m_{\text{Fe}^{3+}}=5,37$ g; $n_{\text{Fe}^{3+}}=0,023$ mol L^{-1}) z raztopino amonijaka (25 %). Sinteza maghemitnih nanodelcev je potekala v 1-literskem reaktorju s tremi pokončnimi vratovi in dodatno opremljenim z mehanskim mešalom. Reaktor smo ustrezno zaščitili pred atmosferskim kisikom, da ne poteče vzporedna reakcija oksidacije maghemitnega magnetnega materiala v neželjen produkt, kot na primer hematit itd. Reaktor za sintezo maghemitnih nanodelcev je shematsko prikazan na sliki 3 – 3.



Slika 3 – 3: Shema reaktorja za sintezo magnetnih nanodelcev.

Postopek je potekal v dveh stopnjah. V prvi stopnji smo s počasnim dodajanjem amonijakalne raztopine (3 mL (25 %) amonijaka/150 mL miliQ vode) pri sobni temperaturi v tako pripravljeno raztopino železovih ionov ($\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+} = 1:1$; $V_{\text{Reaktor}} = 500 \text{ mL}$) dvignili pH-vrednost raztopine železovih ionov na $\text{pH} = 3$ in vzdrževali to pH-vrednost konstantno 30 minut. V prvi stopnji se tako obori železov hidroksid ali $\text{Fe}(\text{OH})_3$. V drugi stopnji smo pH-vrednost raztopine dvignili na vrednost $\text{pH} > 11$ s hitrim dodatkom koncentriranega amonijaka (250 mL) in pustili, da se nova pH-vrednost vzdržuje 30 minut pri stalnem mešanju in sobni temperaturi. V tej stopnji se železov hidroksid oksidira z zračnim kisikom in nastane spinelni produkt iz maghemita. Tako sintetizirane magnetne nanodelce smo nato ločili z magnetom in jih trikrat sprali z amonijakalno raztopino s $\text{pH} > 10,5$. Pri tej pH-vrednosti imajo delci na površini visok negativni naboj, kar se odraža v visoki vrednosti (zeta) ξ -potenciala, ki preprečuje njihovo močno agregiranje (Makovec in drugi, 2009). Površinsko neobdelane magnetne nanodelce iz maghemita smo nato uporabili v naslednji stopnji, to je prevlečenje delcev s površinsko aktivno snovjo ali surfaktantom (disperzantom). Ključne stopnje sinteze maghemitnih nanodelcev so prikazane na sliki 3 – 4.



Slika 3 – 4: Prikaz sinteze maghemitnih magnetnih nanodelcev z obarjanjem.

Med sintezo nanodelcev se je barva prvotne raztopine železovih ionov postopno spreminjala, in sicer, začetna oranžna barva raztopine je prehajala v vedno bolj temno barvo. Po zaključeni reakciji obarjanja nanodelcev in njihovi sedimentaciji na dno reaktorja pod vplivom magnetnega polja je nastala oborina aglomeriranih delcev značilne črne barve.

3.4.1.1.2 Površinska stabilizacija nanodelcev s citronsko kislino

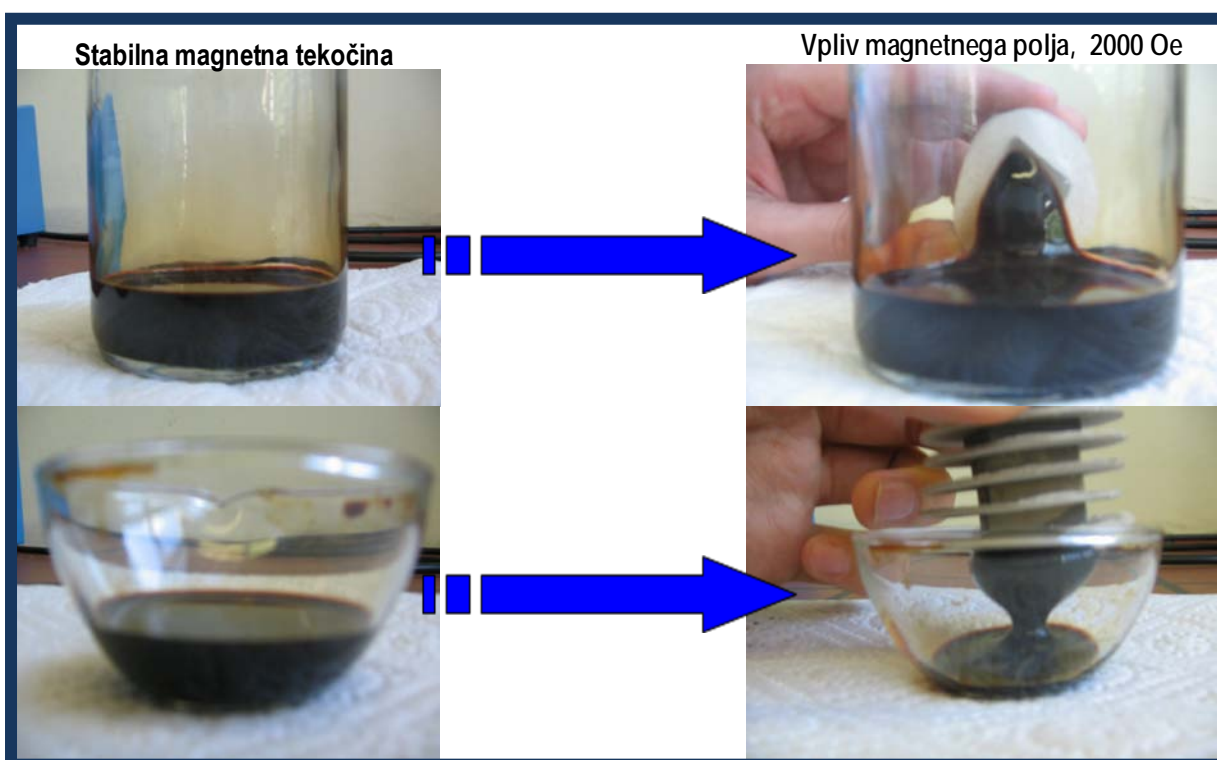
Delci so po sintezi aglomerirani. Aglomeracijo delcev smo preprečili tako, da smo pripravili stabilno suspenzijo maghemitnih delcev dispergiranih v vodi. V našem primeru smo aglomeracijo preprečili z vezavo citronske kisline na površino delca. Kislina, vezana na površini, sterično preprečuje aglomeracijo nanodelcev, hkrati pa zagotovi na njihovi površini visok naboj, ki prispeva k elektrostatski stabilizaciji suspenzije (gre za primer elektrosterične stabilizacije delcev v mediju). Uspešnost vezave citronske kisline na površino delcev je razvidna iz premika izoelektrične točke. Izoelektrična točka neprevlečenih delcev je pri $\text{pH} = 7,2$, izoelektrična točka delcev po prekritju s citronsko kislino pa se premakne v kislno območje $\text{pH} = 2$. Premik izoelektrične točke nastane zaradi spremembe na površini delcev. Pri sintetiziranih delcih so na površini kisikovi ioni, v primeru stabiliziranih delcev s površinskim disperzantom pa hidroksilne skupine citronske

kislina. Za stabilno magnetno tekočino moramo zagotoviti na površini nanodelcev optimalno količino vezane citronske kisline (Čampelj idr., 2006).

Pred površinsko funkcionalizacijo maghemitnih nanodelcev smo tako sprane delce dispergirali v vodi (60 mL), da smo omogočili s funkcionalnimi sloji prekritje posameznih delcev, in ne njihovih aglomeratov ali skupkov. Za dispergiranje v vodi smo delce prevlekli s citronsko kislino (Sahoo in drugi, 2005), z namenom, da smo dobili homogeno suspenzijo iz stabilnih maghemitnih nanodelcev, enakomerno porazdeljenih v vodnem mediju. V mešanico vode in maghemitnih nanodelcev smo dodali raztopino citronske kisline ($V = 2,5 \text{ mL}$; $\gamma = 0,5 \text{ g mL}^{-1}$) in uravnavali pH-vrednost sistema z dodatkom koncentriranega amonijaka (25 %), in sicer na pH-vrednost 5,2. Tako pripravljeno suspenzijo smo segreli na $75 \text{ }^\circ\text{C}$ in jo intenzivno mešali 90 minut. V tem času se je citronska kislina, ki deluje kot disperzant za uspešno dispergiranje magnetnih nanodelcev v vodnem nosilnem mediju, kemijsko vezala na površino nanodelcev.

3.4.1.1.3 Priprava magnetne tekočine

Homogeno zmes iz maghemitnih nanodelcev, dispergiranih v vodi, smo nato ohladili na sobno temperaturo. Tako mešanico šibko aglomeriranih delcev smo med intenzivnim mešanjem dispergirali s hkratno spremembo pH-vrednosti, na pH-vrednost 10,1. Velja, da so neaglomerirani (nezlepljeni) delci v suspenziji dolgoročno stabilni in se ne posedajo niti v zmernem gradientu magnetnega polja. Aglomerate ali nestabilne delce smo iz suspenzije izločili s centrifugiranjem (Centrifuga Eppendorf, 5804 R) na 5000 r/min za 5 minut. Tekočino smo nato previdno odlili, da delcev, ki so se med centrifugiranjem posedli, ponovno ne dispergiramo. Suspenzija po centrifugiranju je stabilna magnetna tekočina (slika 3 – 5).



Slika 3 – 5: Obnašanje magnetne tekočine pod vplivom magnetnega polja.

3.4.1.2 Kemijsko spreminjanje površine γ -Fe₂O₃ nanodelcev

Kemijska modifikacija površine γ -Fe₂O₃ nanodelcev je potekala v dveh stopnjah. Najprej smo γ -Fe₂O₃ nanodelce prevlekli s tanko funkcionalno plastjo iz polimerne silike (SiO₂) in šele nato izvedli reakcijo silanizacije z aminosilanom za sintezo visoko funkcionalnih γ -Fe₂O₃ nanodelcev, pripravljenih za nadaljnjo površinsko obdelavo. Izbrani aminosilan, ki smo ga uporabili za pripenjanje aminoskupin na površino maghemitnih, s siliko prevlečenih nanodelcev, je 3-(2-aminoetilamino)-propil-dimetoksimetilsilan ali na kratko AEAPTS, ki spada v široko družino silanov.

3.4.1.2.1 Primarna površinska funkcionalizacija γ -Fe₂O₃ nanodelcev

Primarna površinska kemijska predelava γ -Fe₂O₃ nanodelcev je obsegala prevlečenje nanodelcev s tankim funkcionalizacijskim slojem iz silike (SiO₂). Prekritje delcev s siliko smo izvedli v šaržno-mešalnem reaktorju pri temperaturi 90 °C in intenzivnem mešanju. Kot izvorni material za nastanek funkcionalnega plašča iz silikatne prevleke smo izbrali natrijev silikat (Na₂SiO₃).

V stabilno magnetno tekočino, pripravljeno po navodilih v podpoglavju 3.4.1.1, smo dodali določeno količino natrijevega silikata (slika 3 – 6). V tabeli 3 – 2 so podane osnovne fizikalno-kemijske lastnosti natrijevega silikata.

Tabela 3 – 2: Fizikalno-kemijske lastnosti natrijevega silikata.

Molekulska formula	Molska masa [g mol ⁻¹]	Gostota [g cm ⁻³]	Izgled in topnost
Na ₂ SiO ₃	122,06	2,40	Beli prah



Slika 3 – 6: Natrijev silikat.

Po dodatku natrijevega silikata v magnetno tekočino smo pH-vrednost suspenzije dvignili na vrednost med 12 in 13 s koncentriranim amonijakom. Celotno suspenzijo smo nato začeli segrevati pri temperaturi 90 °C in intenzivnem mešanju za čas 3 h. Nato smo suspenzijo odstavili in ohladili na sobno temperaturo. V tako ohlajeno suspenzijo magnetne tekočine smo začeli počasi dodajati razredčeno klorovodikovo kislino (HCl, $c_{\text{HCl, aq}} = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), da smo dosegli pH-vrednost sistema 6. Celotno suspenzijo smo centrifugirali in precipitirane delce (aglomerate), prevlečene s silikatno prevleko, smo nato izločili iz sistema in večkrat sprali z deionizirano (miliQ) vodo. Na koncu smo γ -Fe₂O₃/SiO₂ delce posušili na zraku pri sobni temperaturi. Sintetizirani delci so bili temno rjave barve.

Količino Na-silikata, ki smo ga dodali v stabilno magnetno tekočino, smo določili na osnovi teoretične velikosti premera enega nanodelca ($D_{\text{nanodelec}} \sim 20 \text{ nm}$) in dejanske mase maghemitnih (γ -Fe₂O₃) nanodelcev, ki smo jih uspešno dispergirali v stabilni magnetni tekočini. Matematične zveze, ki smo jih uporabili za izračun potrebne količine natrijevega silikata, so naslednje:

a) izračun specifične površine magnetnega nanodelca:

$$r = \left[\frac{\rho \cdot a}{3} \right]^{-1} \Rightarrow a \quad [3.9]$$

kjer so:

r	- polmer magnetnega nanodelca	[nm]
ρ	- gostota magnetnega materiala, maghemita	[g cm ⁻³]
a	- specifična površina maghemitnega nanodelca	[m ² g ⁻¹]

b) izračun celotne površine maghemitnih nanodelce

$$S = a \cdot m_{\text{nanodelci}} \quad [3.10]$$

kjer so:

S	- celotna površina maghemitnih nanodelcev	[m ²]
a	- specifična površina maghemitnega nanodelca	[m ² g ⁻¹]
$m_{\text{nanodelci}}$	- masa vseh maghemitnih nanodelcev	[g]

c) pri izračunu površine osnovne celice silicijevega dioksida, ki sestavlja silikatno prevleko (SiO₂), smo upoštevali, da je osnovna celica SiO₂ kubična, in velikost stranice osnovne celice SiO₂ je 0,716 nm:

$$S_{\text{SiO}_2} = \frac{1}{6} \cdot 6 \cdot a^2 \quad [3.11]$$

kjer so:

S_{SiO_2} - 1/6 površina osnovne celice silicijevega dioksida [m²]

a - velikost stranice osnovne celice [nm]

d) izračun števila atomov v osnovni celici SiO₂:

$$N_{\text{atomi}} = \frac{S_{\text{nanodelci}}}{S_{\text{SiO}_2}} \quad [3.12]$$

kjer so:

N_{atomi} - število SiO₂ atomov v osnovni celici [/]

$S_{\text{nanodelci}}$ - celotna površina maghemitnih nanodelcev [m²]

S_{SiO_2} - 1/6 površina osnovne celice silicijevega dioksida [m²]

e) izračun množine SiO₂ atomov:

$$N_{\text{atomi}} = n_{\text{SiO}_2} \cdot N_{\text{A}} \quad \Rightarrow \quad n_{\text{SiO}_2} \quad [3.13]$$

kjer so:

N_{atomi} - število SiO₂ atomov v osnovni celici [/]

n_{SiO_2} - množina SiO₂ atomov [mol]

N_{A} - Avogadrovo število [mol⁻¹]

f) izračun mase natrijevega silikata za nanos silike na površino maghemitnih nanodelcev:

$$n[\text{Na}_2\text{SiO}_3] : n[\text{SiO}_2] = 2 : 1$$

$$2n[\text{SiO}_2] = n[\text{Na}_2\text{SiO}_3] \quad [3.14]$$

$$2 \frac{m[\text{SiO}_2]}{M[\text{SiO}_2]} = \frac{m[\text{Na}_2\text{SiO}_3]}{M[\text{Na}_2\text{SiO}_3]} \Rightarrow m[\text{SiO}_2]$$

kjer so:

n	- množina določene komponente	[mol]
m	- masa določene komponente	[g]
M	- molska masa določene komponente	[g mol ⁻¹]

g) izračun volumna natrijevega silikata za nanos silike na površino maghemitnih nanodelcev:

$$\rho_{\text{Na}_2\text{SiO}_3} = \frac{m_{\text{Na}_2\text{SiO}_3}}{V_{\text{Na}_2\text{SiO}_3}} \Rightarrow V_{\text{Na}_2\text{SiO}_3} \quad [3.15]$$

kjer so:

$\rho_{\text{Na}_2\text{SiO}_3}$	- gostota Na - silikata	[g cm ⁻³]
$m_{\text{Na}_2\text{SiO}_3}$	- masa Na - silikata	[g]
$V_{\text{Na}_2\text{SiO}_3}$	- volumen Na - silikata	[mL]

3.4.1.2.2 Sekundarna površinska funkcionalizacija $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelcev

Sekundarna površinska funkcionalizacija $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelcev je potekala v šaržno-mešalnem reaktorju pri temperaturi 90 °C in intenzivnem mešanju. Reakcija silanizacije, ki se nanaša na kovalentno pripenjanje molekul polimera silana na površino nanodelcev, je potekala 3 h. Po zaključeni reakciji silanizacije smo delce izločili iz reakcijske zmesi z

magnetom. Delce smo nato večkrat sprali z metanolom in jih posušili na zraku. Na koncu smo dobili delce črno-rjave barve in z močno magnetno odzivnostjo.

Pripravili smo si suspenzijo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelcev v metanolu (20 mL) in suspenzijo rahlo stresali, da so se delci v metanolu enakomerno porazdelili. Nato smo v suspenzijo dodali še ekvivalentno količino glicerola (20 mL). Pred začetkom reakcije silanizacije smo si pripravili kislno raztopino aminosilana iz 3,2-aminoetilpropil-dimetoksietilsilan ali AEAPTS (tabela 3 – 3). Čista raztopina aminosilana je prikazana na sliki 3 – 7.

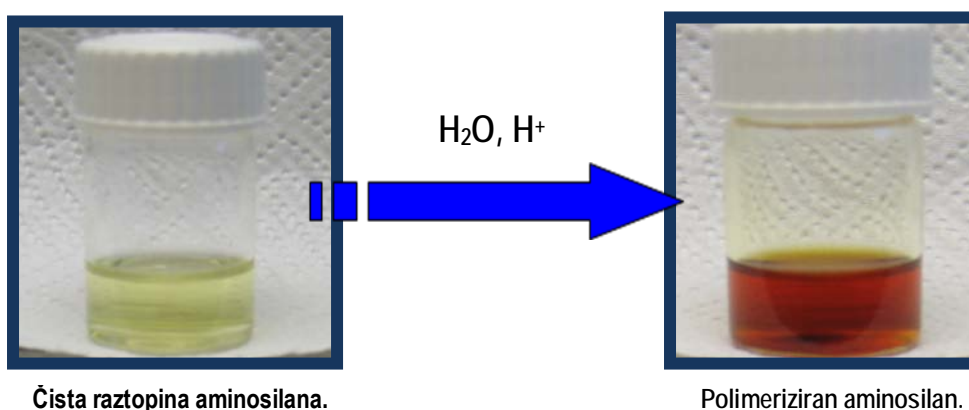
Tabela 3 – 3: Fizikalno-kemijske lastnosti aminosilana AEAPTS.

Molekulska formula	Molska masa [g mol ⁻¹]	Gostota [g cm ⁻³]	Izgled
C ₈ H ₂₂ N ₂ O ₂ Si	206,36	0,968	Viskozna tekoča snov, rahlo rumene barve.



Slika 3 – 7: AEAPTS.

V čisto raztopino aminosilana smo dodali najprej deionizirano vodo ($c_{\text{AEAPTS}} = 0,008 \text{ mol mL}^{-1}$) in naravnali pH-vrednost raztopine na vrednost 4 s počasnim dodajanjem mravljične kisline (brezvodna, 98 – 100 %) Po dodatku kislinskega katalizatorja je sledil preskok v barvi aminosilana iz svetlo rumene v značilno rjavo-oranžno barvo (slika 3 – 8). Tako pripravljeno raztopino aminosilana smo dodali neposredno v suspenzijo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelcev, da je poteklo kovalentno pripenjanje sintetičnega polimera AEAPTS na površino $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$. Po zaključeni reakciji smo suspenzijo ohladili in centrifugirali, da smo izločili površinsko funkcionalizirane delce. Delce smo večkrat sprali z metanolom in jih nato posušili na zraku. Delce smo nato hranili v zaprti posodi do njihove uporabe.



Slika 3 – 8: Reakcija hidrolize začetne raztopine aminosilana ob dodatku vode in kislinskega katalizatorja (metanojske ali mravljične kisline). Reakcija je izrazito eksotermna, pri kateri pride do spremembe barve začetne raztopine aminosilana iz svetlo rumene v temno oranžno barvo.

Pri izračunu potrebne količine aminosilana za nanos polimeriziranega aminosilana na površino maghemitnih nanodelcev, prevlečenih s tanko plastjo silike, smo upoštevali podatek iz literature (Boerio in drugi, 1980), da ena molekula polimera iz aminosilana prekriva ploskovno površino nanodelca v velikosti 40 \AA^2 . Za izračun potrebne količine aminosilana za nanos sintetičnega polimera na površino $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelca s premerom 26 nm smo uporabili naslednje matematične zveze:

a) izračun števila Fe atomov v enem $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelcu:

$$N_{\text{Fe}} = \frac{\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot R^3 \cdot N_A}{\bar{V}_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}} \cdot 2 \quad [3.16]$$

kjer so:

N_{Fe}	- število železovih atomov v nanodelcu	[/]
R	- polmer maghemitnega nanodelca	[nm]
N_A	- Avogadrovo število	[mol ⁻¹]
$\bar{V}_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$	- molski volumen maghemitnih nanodelcev	[m ³ mol ⁻¹]

b) izračun molskega volumna maghemitnih nanodelcev:

$$\bar{V}_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3} = \frac{M_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}}{\rho_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}} \quad [3.17]$$

kjer so:

$\bar{V}_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$	- molski volumen maghemitnih nanodelcev	[m ³ mol ⁻¹]
$M_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$	- molska masa maghemita	[g mol ⁻¹]
$\rho_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$	- gostota maghemita	[g mL ⁻¹]

c) matematična zveza za izračun teoretičnega števila molekul aminosilana na nanodelec:

$$N_{\text{AEAPTS}} = \frac{S_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2}}{S_{\text{AEAPTS}}} \quad [3.18]$$

$$S_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2} = 4\pi \cdot R^2 \quad [3.19]$$

kjer so:

N_{AEAPTS}	- število molekul aminosilana	[/]
$S_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2}$	- površina $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelca	[nm ²]
S_{AEAPTS}	- ploskovna površina ene molekule aminosilana	[nm ²]

Ploskovna površina, ki jo zavzame ena molekula aminosilana, znaša 40 Å².

d) izračun atomskega razmerja $N_{\text{Fe}}/N_{\text{AEAPTS}}$:

$$R_{N_{\text{Fe}}/N_{\text{AEAPTS}}} = \frac{N_{\text{Fe}}}{N_{\text{AEAPTS}}} \quad [3.20]$$

kjer so:

N_{Fe}	- število atomov železa, Fe	[/]
N_{AEAPTS}	- število molekul aminosilana	[/]

e) izračun množine aminosilana:

$$n_{\text{AEAPTS}} = \frac{N_{\text{AEAPTS celokupno}} \cdot R_{N_{\text{Fe}}/N_{\text{AEAPTS}}}}{N_{\text{A}}} \quad [3.21]$$

kjer so:

n_{AEAPTS}	- množina aminosilana	[mol]
$N_{\text{AEAPTS}_{\text{celokupno}}}$	- število molekul aminosilana	[/]
$R_{N_{\text{Fe}}/N_{\text{AEAPTS}}}$	- atomsko razmerje	[/]

Celokupno število molekul aminosilana dobimo tako, da določimo število molekul aminosilana, ki prekrivajo celokupno površino $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelcev in jo določimo z modificirano enačbo 3.10:

$$S_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2} = a \cdot m_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2} \quad [3.22]$$

kjer so:

$S_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2}$	- celokupna površina $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelcev	[nm ²]
a	- specifična površina maghemitnega nanodelca	[m ² g ⁻¹]
$m_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2}$	- celokupna masa $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelcev	[g]

f) izračun volumna aminosilana:

$$V_{\text{AEAPTS}} = \frac{m_{\text{AEAPTS}}}{\rho_{\text{AEAPTS}}} = \frac{n_{\text{AEAPTS}} \cdot M_{\text{AEAPTS}}}{\rho_{\text{AEAPTS}}} \quad [3.23]$$

kjer so:

V_{AEAPTS}	- volumen aminosilana	[mL]
M_{AEAPTS}	- molska masa aminosilana	[g mol ⁻¹]
ρ_{AEAPTS}	- gostota aminosilana	[g mL ⁻¹]
n_{AEAPTS}	- množina aminosilana	[mol]

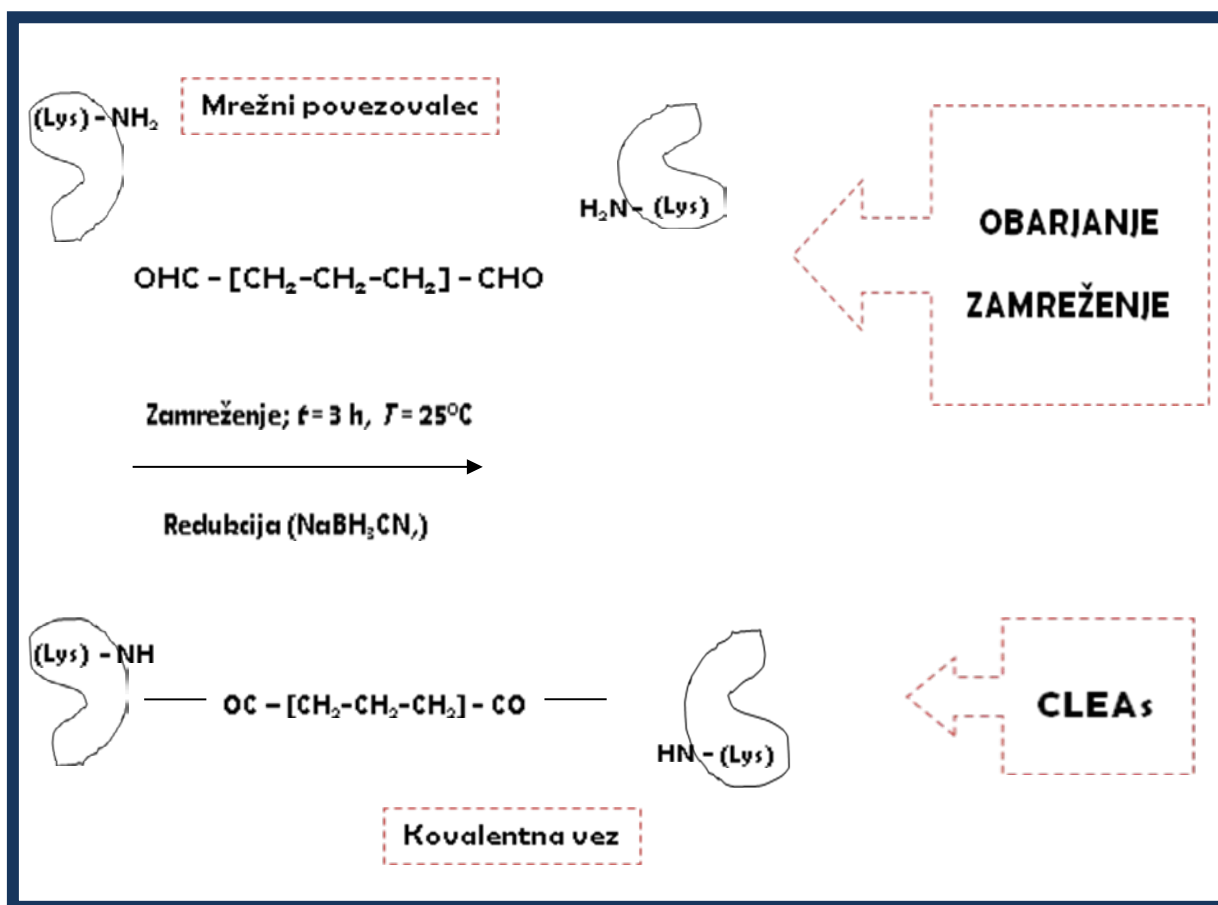
3.4.2 Imobilizacija biokatalizatorja na nosilec

Pred vezavo biokatalizatorja je bilo potrebno encimski nosilec v obliki visoko funkcionalnih $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$, dodatno površinsko predelanih z molekulami aminosilana, aktivirati z mrežnim povezovalcem, GA. Po aktivaciji površine magnetnega nosilca smo izvedli še imobilizacijo ChOx na pripravljeni magnetni nosilec.

Magnetni nosilec določene mase smo dispergirali v pripravljeno raztopino mrežnega povezovalca glutaraldehida (2,9 % (v/v)) na osnovi fosfatnega pufra (PBS, 100 mM, pH 8) in pustili zmes mešati dve uri pri sobni temperaturi. Aktivacijo površine magnetnega nosilca smo izvedli s pomočjo stresalnika (Heidolph Unimax 1010) pri blagem stresanju. Aktivirani magnetni nosilec smo izločili s pomočjo trajnega magneta in nato ga še večkrat sprali z deionizirano (miliQ) vodo, da smo odstranili odvečni glutaraldehyd. V nadaljevanju smo magnetni nosilec v obliki magnetnih nanodelcev posušili na čisti površini na zraku. Aktivirani magnetni nosilec smo nato dodali v vodno raztopino (PBS, 10 mM, pH 7,3), ki je vsebovala določeno koncentracijo biokatalizatorja ChOx. Suspenzijo smo nato rahlo stresali pri sobni temperaturi (20 °C) čez noč. Po zaključeni imobilizaciji biokatalizatorja smo magnetni nanokompozit z imobilizirano ChOx centrifugirali (3000 rpm, 5 min) in oborino, ki je nastala, nato še sprali s pufersko raztopino pH 7,3 in z raztopino natrijevega klorida (NaCl, $c_{\text{NaCl}} = 0,02 \text{ mol L}^{-1}$). Vodno raztopino $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ smo uporabili za spiranje magnetnih nanodelcev, da se je s površine magnetnega nosilca odstranil nespecifično vezan encim in da se je ojačila ali pospešila separacija magnetnih nanodelcev iz suspenzije (Liao s sodelavci, 2001). V odpadni, tekoče faze supernatanta smo izmerili koncentracijo nevezanega proteina. Magnetnemu nanokompozitu z imobiliziranim encimom smo nato izmerili aktivnost. Količino imobiliziranega encima ali učinkovitost imobilizacije smo izračunali na podlagi razlike v koncentraciji proteinov, in sicer, iz začetne raztopine encima pred pričetkom postopka imobilizacije in preostale raztopine (supernatanta) encima po zaključenem postopku imobilizacije biokatalizatorja.

3.4.3 Imobilizacija biokatalizatorja brez nosilca - Priprava zamreženih encimskih skupkov

Postopek za pripravo CLEAs je bil sestavljen iz dveh delov, obarjanja ali precipitacije encima in zamreženja encimskih molekul s primernim mrežnim povezovalcem. Po zaključku reakcije zamreženja je sledil še dodatek reducenta, cianoborohidrida. Vse reakcije za sintezo CLEAs so potekale pri temperaturi 25 °C. Postopek sinteze CLEAs je prikazan na sliki 3 – 9.



Slika 3 – 9: Shema priprave CLEAs: raztapljanje, obarjanje in zamreženje.

3.4.3.1 Postopek obarjanja proteina

Postopek obarjanja proteina smo izvedli z naslednjimi obarjalnimi reagenti: metanolom, etanolom, 1-propanolom, 2-propanolom, tert-butilnim alkoholom, acetonom, acetonitrilom, DMEtOH, etil laktatom, *nas.* $(NH_4)_2SO_4$, DMF, DMSO in PEG polimeri različnih molskih mas. Volumsko razmerje med encimom HRP in obarjalnim reagentom je bilo 1:9. Reakcija obarjanja je potekala tako, da smo najprej pripravili čisto raztopino encima iz HRP določene koncentracije v vodni raztopini (PBS – fosfatni pufer, 100 mM, pH 6,4). Izbrani obarjalni reagent (0,9 mL) smo odpipetirali v mikrocentrifugirko in počasi začeli dodajati raztopino encima (HRP, 0,1 mL). V centrifugirko smo dodali še mešalo in pustili, da se reakcijska zmes intenzivno meša 40 min. Po zaključeni obarjalni reakciji smo reakcijsko zmes 10 min centrifugirali (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) pri vrtilni hitrosti 13000 rpm. Oborina, sestavljena iz posedenih encimskih skupkov na dnu mikrocentrifugirke, je bila dobro opazna s prostim očesom. Odpadno tekočo fazo supernatanta smo oddekantirali in oborino ponovno resuspendirali v vodni raztopini (PBS, 100 mM, pH 6,4, 1 mL). Nato smo izmerili vsebnost proteinov in encimsko aktivnost v obeh frakcijah, v tekoči fazi supernatanta in v frakciji z resuspendiranim encimom. V ta namen smo uporabili aktivnostni test za HRP na osnovi reakcije oksidacije *o*-dianisidina.

3.4.3.2 Postopek zamreženja encimskih skupkov

Naslednja faza za pripravo CLEAs je zamreženje encimskih skupkov, katerih postopek je opisan zgoraj. V tem obziru je obvezen dodatek mrežnega povezovalca po postopku mikro-obarjanja. Obstaja možnost, da se mrežni povezovalac doda še pred začetkom reakcije obarjanja kot je že bilo navedeno v literaturi. CLEAs-HRP so bili pripravljene tako, da smo encim HRP določene koncentracije (0,1 mL) neposredno obarjali v izbranem obarjalnem reagentu (0,9 mL) (celokupni volumen reakcijske zmesi je znašal 1 mL). Obarjanje je trajalo 40 min. Po zaključenem mikro-obarjanju smo v reakcijsko zmes dodali mrežni povezovalac GA določene koncentracije. Reakcija zamreženja je potekala v isti reakcijski zmesi kot reakcija obarjanja. Mrežni povezovalac smo dodali neposredno v suspenzijo tako izoborjenih encimskih skupkov in pustili, da se suspenzija intenzivno meša za 3 ure. Po zaključenem postopku zamreženja smo v suspenzijo tako nastalih CLEAs dodali reducent, to je hladna raztopina natrijevega cianoborohidrida (NaBH_3CN) s stalno koncentracijo (100 mM). Nato smo CLEAs suspenzijo še dodatno intenzivno mešali 40 minut. Na koncu smo zamrežene encimske skupke 10 min centrifugirali (13000 rpm) in supernatant odlili ter zamrežene encimske skupke ponovno dispergirali v vodni raztopini (PBS pufer, 100 mM, pH 6,4). CLEAs smo tri-krat sprali z vodno raztopino (PBS pufer, 100 mM, pH 6,4) z namenom, da smo odstranili preostanke nezreagirane GA in nezamreženega encima. Pred pričetkom merjenja aktivnosti CLEAs smo zamrežene encimske skupke hranili pri temperaturi 4 °C. Aktivnost CLEAs-HRP smo izmerili spektrofotometrično pri temperaturi 25 °C z merjenjem začetnih reakcijskih hitrosti reakcije oksidacije 4-aminoantipirina (4-AAP) v prisotnosti vodikovega peroksida. Encimsko aktivnost smo določili za prosti in v obliki zamreženih encimskih skupkov imobilizirani encim.

3.4.4 Stabilnost encimskega preparata

V okviru študije stabilnosti imobilizirane ChOx na visoko funkcionalne magnetne nanodelce ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2\text{-ChOx}$) smo določevali termično stabilnost ter vpliv temperature in pH-medija na aktivnost proste in imobilizirane ChOx. Izvedli smo tudi kratko študijo vpliva skladiščenja na stabilnost encimskega preparata pri različnih temperaturah in časih skladiščenja. Na primeru imobiliziranega encima na magnetne nanodelce smo študirali vpliv večkratne uporabe imobilizirane ChOx na magnetne nanodelce na končno aktivnost imobilizirane ChOx.

3.4.4.1 Termična stabilnost encima

Termična stabilnost prostega in imobiliziranega encima je bila določena z merjenjem preostale aktivnosti po končani izpostavitvi prostega ali imobiliziranega encima za določen čas pri določeni temperaturi in v odsotnosti substratov. Nato smo izvedli encimski test za posamezni encim in določili preostalo aktivnost kot logaritmično funkcijo preostale aktivnosti encimskega preparata ($\text{Ln} [\text{Preostala aktivnost, \%}]$) v odvisnosti od časa. Na koncu smo izračunali še konstante hitrosti deaktivacije I. reda iz Arrheniusove enačbe:

$$\frac{A}{A_0} = e^{-k_i \cdot t} \quad \Rightarrow \quad k_i \quad [3.24]$$

kjer so:

A	- preostala aktivnost encimskega preparata po določenem (t, T) izpostavitve	[$\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$]
A ₀	- začetna aktivnost encimskega preparata	[$\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$]
t	- čas	[min]
k _i	- termična konstanta hitrosti deaktivacije I. reda	[min ⁻¹]

3.4.4.2 Vpliv pH medija na aktivnost encima

Vpliv pH medija na aktivnost prostega in imobiliziranega encima smo določevali v izbranem pH območju delovanja encima. Aktivnost prostega in imobiliziranega encima smo določili pri različnih pH medija.

3.4.4.3 Vpliv skladiščenja na aktivnost encima

Vpliv skladiščenja na aktivnost prostega in imobiliziranega encima smo določevali tako, da smo izmerili preostalo aktivnost prostega in imobiliziranega encima po določenem času skladiščenja encimskega preparata. Testno tubico, ki je vsebovala prosti ali imobilizirani encim, smo skladiščili pri temperaturah 4 °C in 25 °C za določeno časovno obdobje (28 dni). Preostalo aktivnost encimskega preparata v času skladiščenja smo določevali v rednih časovnih intervalih, to je enkrat na teden.

3.4.4.4 Vpliv večkratne uporabe imobiliziranega encima na aktivnost encima

Za vpliv večkratne uporabe imobilizirane ChOx na magnetni nosilec smo uporabili semi-kontinuirni način poteka reakcije oksidacije holesterola z imobilizirano $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2\text{-ChOx}$. Večkratno uporabo encimskega preparata $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2\text{-ChOx}$ smo preverili tako, da smo določevali koncentracijo nastalega produkta 4-holesten-3-ona v rednih časovnih intervalih ali ciklih pri temperaturi 37 °C. En cikel reakcije oksidacije holesterola z imobilizirano ChOx je trajal 3 ure. Po vsakem zaključenem ciklu smo v reakcijsko zmes z imobilizirano ChOx dodali svežo raztopino holesterola (1 mg mL⁻¹, 100 μL).

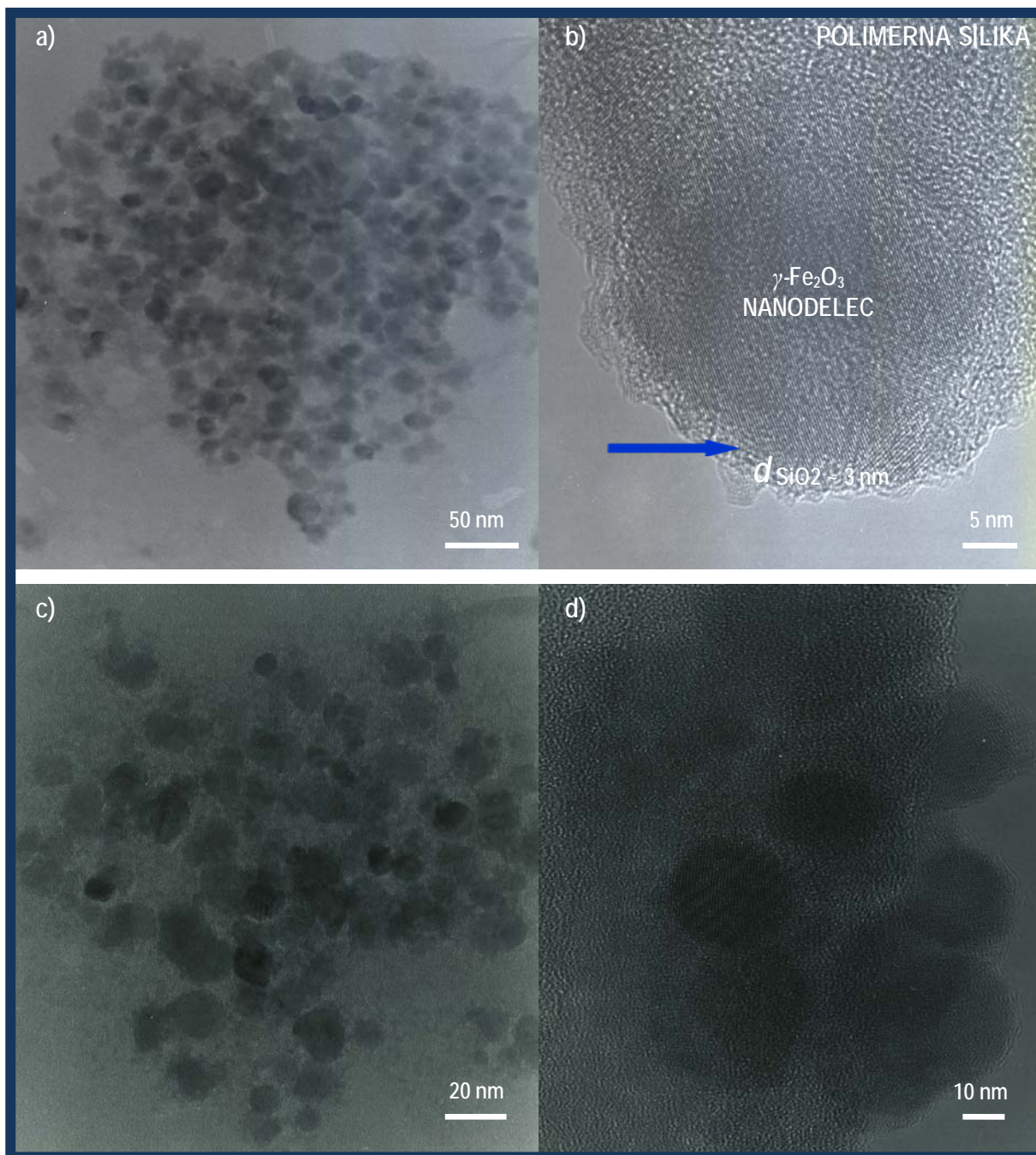
4 REZULTATI

4.1 Imobilizacija biokatalizatorja na nosilec

4.1.1 Sinteza in karakterizacija magnetnih nanodelcev

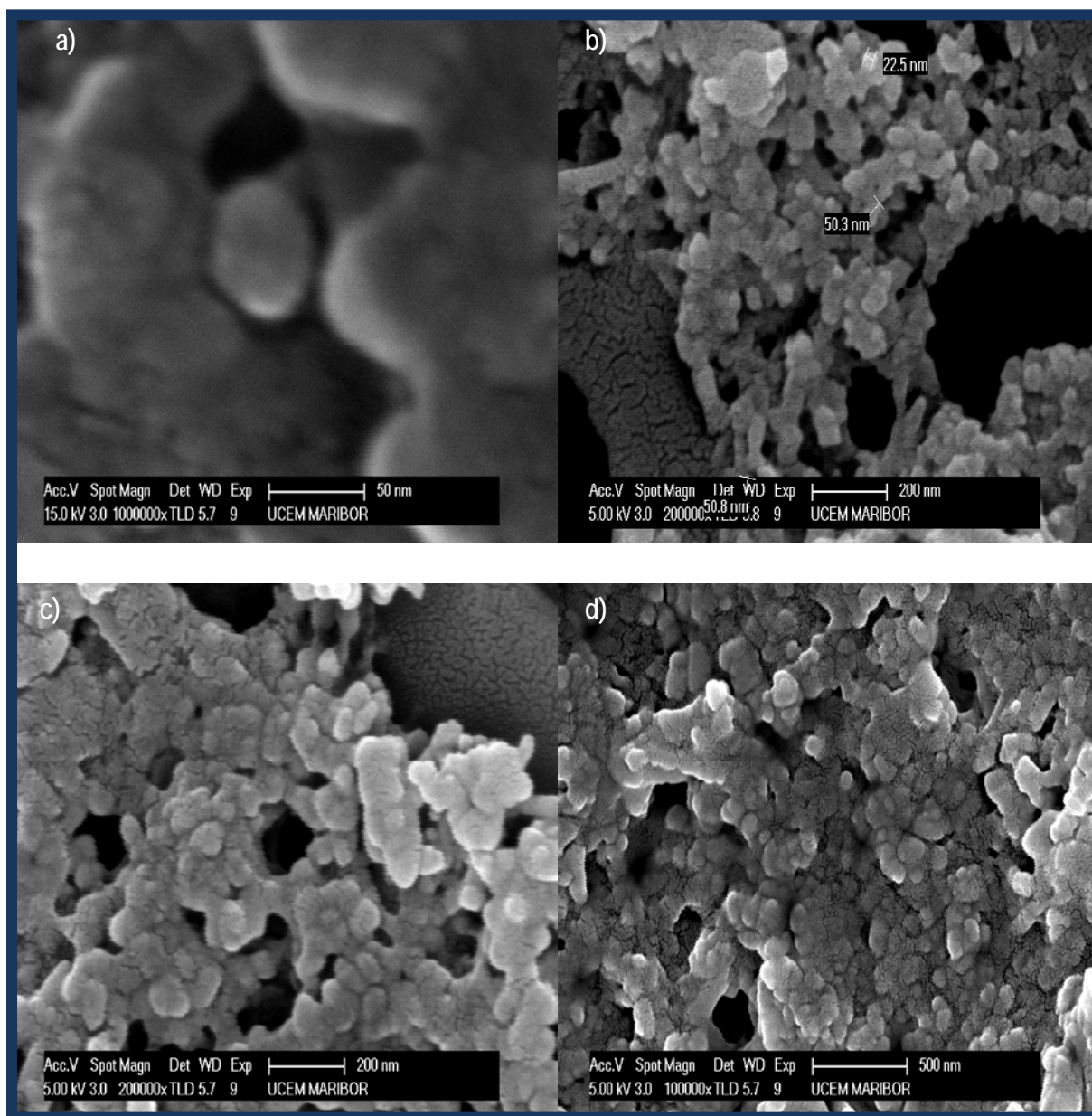
Sintetizirani so bili superparamagnetni nanodelci iz maghemita, prevlečeni s plastjo silike in dodatno funkcionalizirani z molekulami aminosilana za vezavo biokatalizatorja. Prvotno so bili maghemitni nanodelci sintetizirani z metodo obarjanja železovih (II) in železovih (III) ionov v alkalnem mediju in nato obdani s funkcionalnim slojem silike, ki je nastal direktno iz raztopine natrijevega silikata. Primarni sloj iz silike daje maghemitnim nanodelcem predvsem biokompatibilnost in povečano stabilnost. Ker je zunanja površina maghemitnih nanodelcev oblečenih s siliko prekrita s hidroksilnimi funkcionalnimi skupinami, je sekundarna površinska funkcionalizacija delcev z molekulami aminosilana možna. V nadaljevanju so bili visoko funkcionalni maghemitni nanodelci aktivirani z molekulami GA, ki omogoča kovalentno vezavo biokatalizatorja na magnetne nanodelce.

4.1.1.1 Oblika in morfologija $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelcev. Maghemitni ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nanodelci so bili pripravljene z obarjanjem raztopin Fe^{2+} in Fe^{3+} ionov v stehiometrijskem razmerju 1:1. Visok delež hidroksilnih skupin (-OH) na zunanji površini golih maghemitnih nanodelcev predstavlja pomemben vir funkcioniranih skupin za nadaljnjo kemijsko spreminjanje površine delcev. Z dodatkom natrijevega silikata, ki polimerizira v prisotnosti klorovodikove kisline, je nastala silicijeva kislina, katere molekule reagirajo s hidroksilnimi skupinami na površini magnetnih nanodelcev, kar vodi v nastanek močnih silanolnih (Si-OH) funkcionalnih skupin med molekulami silicijeve kisline in površino magnetnih nanodelcev. V nadaljevanju so bile nastale silanolne vezi spremenjene v močne kovalentne siloksanske (Si-O-Si) vezi, kar je vodilo do nastanka tankega funkcionalnega sloja amorfnе silike ali SiO_2 okrog železovega jedra magnetnih nanodelcev. Tako pripravljene magnetni nanokompoziti so stabilni in ne kažejo nobene tendence k medsebojnemu aglomeriranju ali zlepljanju. Na sliki 4 – 1 so podani elektronski posnetki sintetiziranih magnetnih nanodelcev obdanih s tanko prevleko silike ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$). Povprečni premer magnetnih nanokompozitov je ocenjen na 26 nm. Na sliki 4 - 1b je razvidna tanka prevleka iz SiO_2 , ki je enakomerno porazdeljena okrog magnetnega nanodelca. Debelina funkcionalnega sloja polimerizirane silike znaša okrog 3 nm. Na osnovi dobljenih rezultatov je zato nadaljnja površinska funkcionalizacija maghemitnih delcev z molekulami aminosilana poenostavljena. V ta namen je bil izbran AEAPTS ali 3-(2-aminoetilamino)-propil-dimetoksimetilsilan.

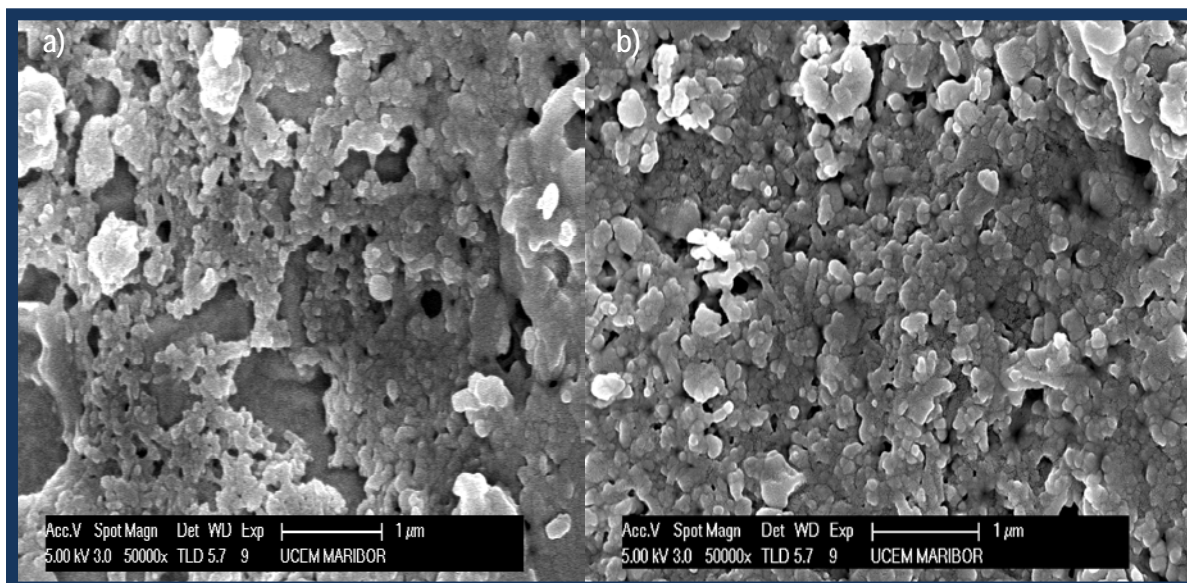


Slika 4 – 1: TEM posnetki – a, c, d) maghemitnih (γ -Fe₂O₃/SiO₂) nanodelcev prevlečenih s plastjo amorfne silike pri različnih povečavah; b) izolirani γ -Fe₂O₃/SiO₂ nanodelec, ujet v silikatno matrico s premerom silikatne prevleke ~ 3 nm.

Nanostrukturiranost magnetnih nanokompozitov smo opazovali tudi z visoko ločljivo vrstično elektronsko mikroskopijo (HRSEM). Vzorec za SEM analizo, sestavljen iz posušenih funkcionalnih nanodelcev, aktiviranih z GA, smo postavili na bakreno mrežico in jih posuli z zlatom. SEM posnetki $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ - AEAPTS nanodelcev, aktiviranih z GA, so pri različnih povečavah prikazani na slikah 4 – 2 in 4 – 3.



Slika 4 – 2: SEM posnetki – a, b, c, d) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ - AEAPTS nanodelcev in po aktivaciji nanodelcev z mrežnim povezovalcem GA. SEM slike so bile narejene pri različnih povečavah v velikostnem območju delcev od 50 do 500 nm.

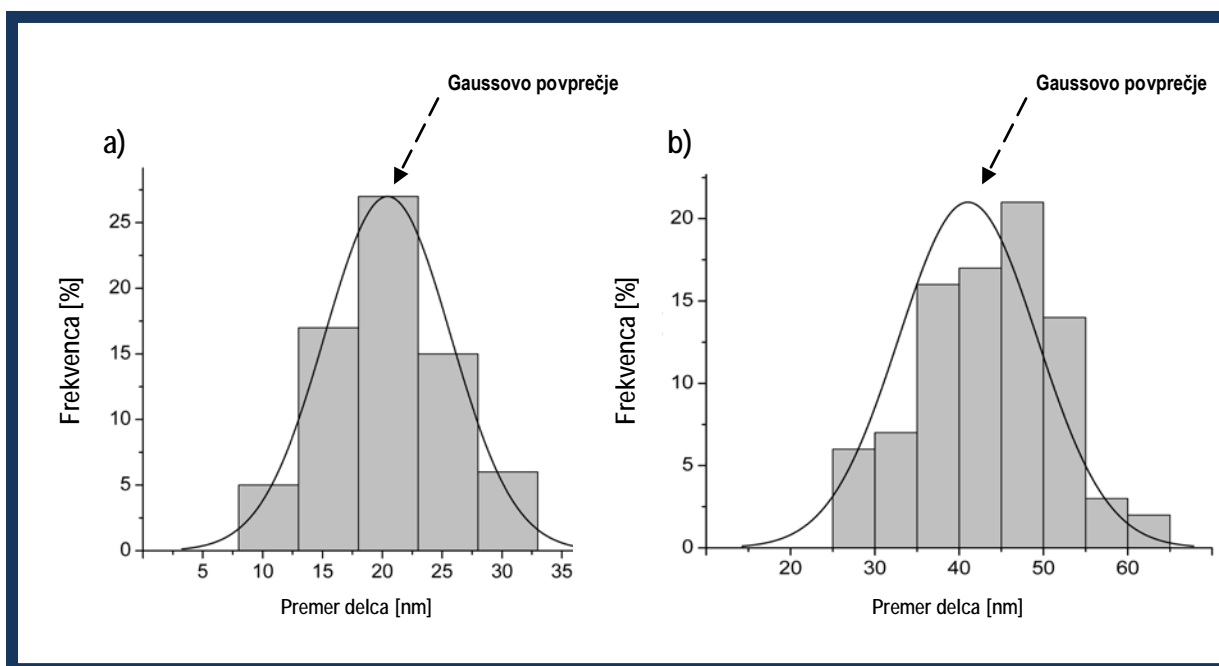


Slika 4 – 3: SEM posnetki – a, b) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev in po aktivaciji nanodelcev z mrežnim povezovalcem GA. SEM slike so bile narejene pri povečavi v velikostnem območju delcev od 500 nm do 1 μm .

Iz posnetkov je razvidno, da imajo magnetni nanokompoziti značilno sferično obliko. Meritev velikosti na SEM posnetkih je pokazala relativno ozko porazdelitev velikosti. Nanokompoziti, prikazani na slikah, so dobro kristalizirani. Razpon velikosti nanodelcev, določen s sliko 4 – 3 je v velikostnem območju od 22,5 do 50,8 nm. Povprečen premer nanodelca je bil izmerjen na 26 nm. Velikost nanodelca na SEM slikah se dobro sklada z velikostjo, določeno s TEM analizo in iz XRD- spektrov, kar dokazuje dobro kristaliničnost površinsko spremenjenih nanodelcev.

Po skladiščenju nanodelcev v vodni raztopini (PBS pufer, 10 mM, pH 7,3) je bilo opaziti rahlo povečanje velikosti nanodelcev. Nastali so skupki iz aglomeriranih ali zlepljenih površinsko funkcionaliziranih nanodelcev. Najverjetnejša razlaga za povečanje velikosti nanodelcev je v tem, da je površina površinsko spremenjenih magnetnih nanodelcev izrazito reaktivna in dovzetna za potek površinskih reakcij v njihovem mikro-okolju v času skladiščenja nanodelcev. Med skladiščenjem magnetnih nanokompozitov v nevtralnem mediju je prišlo do adsorpcije OH^- in H^+ ionov, prisotnih v vodni raztopini, na reaktivno površino $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev, kar je vodilo do znatnega povečanja velikosti nanodelcev. Magnetni nanodelci $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ so bili uspešno funkcionalizirani z aminosilanom in aktivirani z GA za nadaljnjo vezavo bioaktivne molekule na površinsko spremenjene nanodelce.

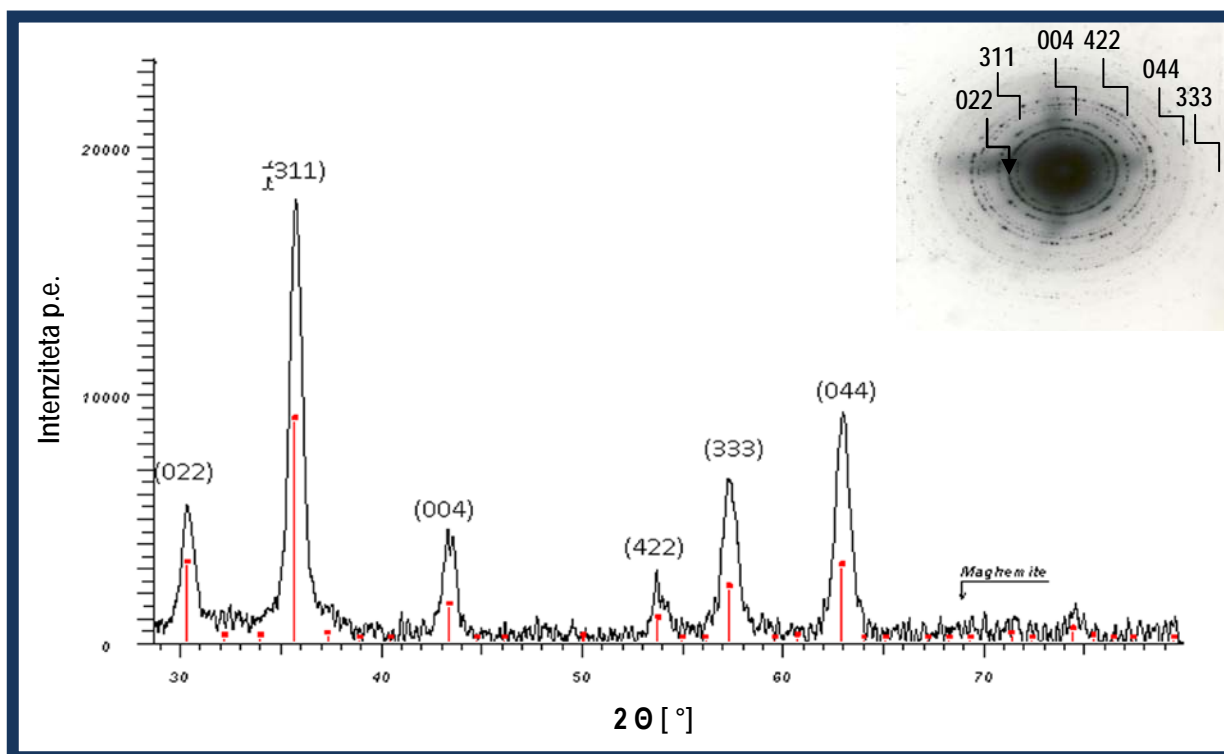
4.1.1.2 Porazdelitev velikosti $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ in $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev. Porazdelitev velikosti $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ in $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev je prikazana na sliki 4 – 4.



Slika 4 – 4: Porazdelitev velikosti a) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ in b) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS magnetnih nanodelcev. Površinsko spremenjeni $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS magnetni nanodelci so bili aktivirani z GA, ki predstavlja vezalno spojino med površino delca in molekulo encima.

Porazdelitev velikosti $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ in $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev je bila določena s pomočjo TEM/SEM elektronske mikroskopije. Delci so bili monodisperzni, le pri $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS je bilo opaziti povečanje njihove velikosti. Povprečen premer $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ delcev je bil 22,5 nm, medtem ko je bil povprečen premer $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS delcev ocenjen na 42,5 nm. V obeh primerih gre za ozko porazdelitev velikosti delcev.

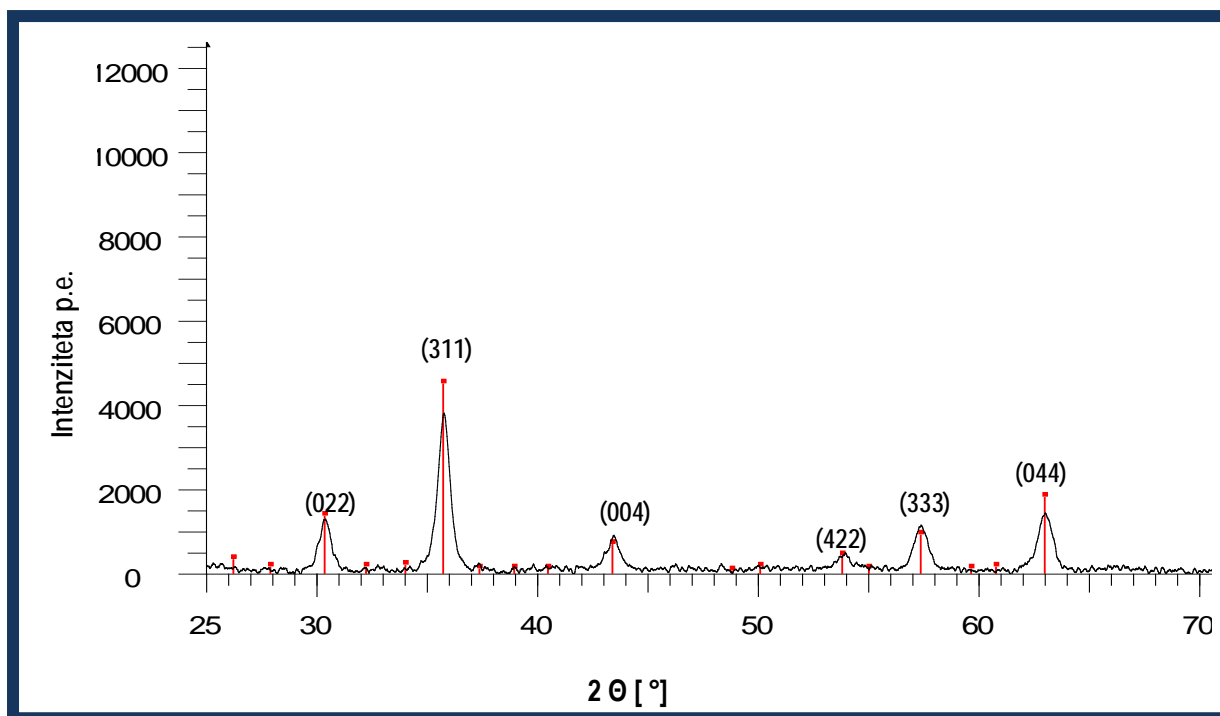
4.1.1.3 Rentgenska praškovna analiza (XRD). Praškovna rentgenska analiza je bila uporabljena za identifikacijo čistih maghemitnih magnetnih nanodelcev. Produkt sinteze so kristalinični spinelni nanodelci iz maghemita, kar je razvidno iz XRD – spektrov. Na sliki 4 – 5 je prikazan spekter rentgenske praškovne analize sintetiziranih nanodelcev. Iz slike je razvidno, da se spekter maghemitnih nanodelcev popolnoma ujema z vzorcem standarda maghemita, na sliki označenega z rdečimi črtami. Iz tega sledi zaključek, da so sintetizirani maghemitni nanodelci, pripravljani z opisano metodo, iz čistega maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) z značilno spinelno kristalno strukturo. Morebitnih nečistot v vzorcu ni bilo. Delci v vzorcu so sferične oblike z ozko porazdelitvijo velikosti. Velikost nanodelcev, ugotovljena na TEM-slikah, se dobro ujema z velikostjo, določeno iz XRD-spektrov, kar dokazuje dobro kristaliničnost nanodelcev.



Slika 4 – 5: XRD spekter čistih maghemitnih γ -Fe₂O₃ nanodelcev s pripadajočo elektronsko difrakcijo (desno zgoraj). Spekter je indeksiran v skladu s spinelno strukturo maghemita.

Pripadajoča elektronska difrakcija prikazuje ostre obroče refleksov, katerih oddaljenost od centralnega premena ustreza spinelni strukturi maghemita. Na sliki je jasno viden enakomeren kontrast, to je, manjša področja z urejeno periodičnostjo se menjajo z večjimi področji, ki jih prav tako odraža urejena periodičnost razširjenih obročev refleksov. Elektronska difrakcija se sklada z dobro urejeno kristalno strukturo maghemitnih nanodelcev. Na osnovi podrobne analize TEM smo ugotovili, da se širina refleksov popolnoma sklada z velikostjo nanodelcev ($D_{\text{nanodelec}} \sim 20$ nm). Vsak nanodelec je sestavljen iz domen urejenega materiala, ki se nekoliko razlikujejo v svoji orientaciji.

Produkt površinske modifikacije maghemitnih nanodelcev so kristalinični spinelni nanodelci, kar je razvidno iz difraktograma na sliki 4 – 6.

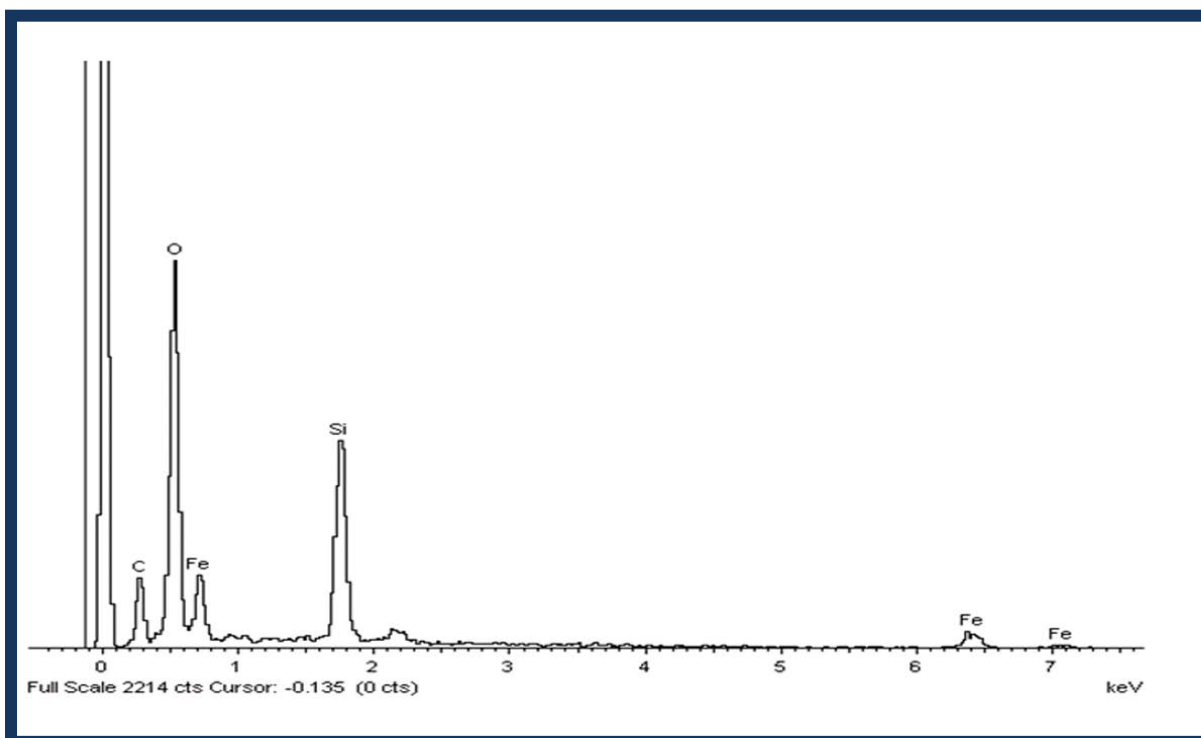


Slika 4 – 6: XRD spekter površinsko spremenjenih γ -Fe₂O₃/SiO₂ – AEAPTS nanodelcev.

XRD spekter površinsko spremenjenih magnetnih nanodelcev prikazuje široke uklone, ki jih lahko pripišemo spinelni fazi, tj. maghemitu. Spekter je indeksiran v skladu s spinelno strukturo maghemita. Širjenje uklonov je posledica majhnosti kristalitov. Iz širjenja XRD-uklonov je bila določena povprečna velikost kristalitov v obliki γ -Fe₂O₃/SiO₂ - AEAPTS nanodelcev, to je 20 nm.

Ugotovili smo, da površinsko spremenjene magnetne nanodelce, karakterizirane z uporabo rentgenske praškovne difrakcije, gradi osnovni magnetni material iz maghemita. Med površinsko modifikacijo maghemitnih nanodelcev ni prišlo do nastanka druge kompozitne strukture, npr. magnetita.

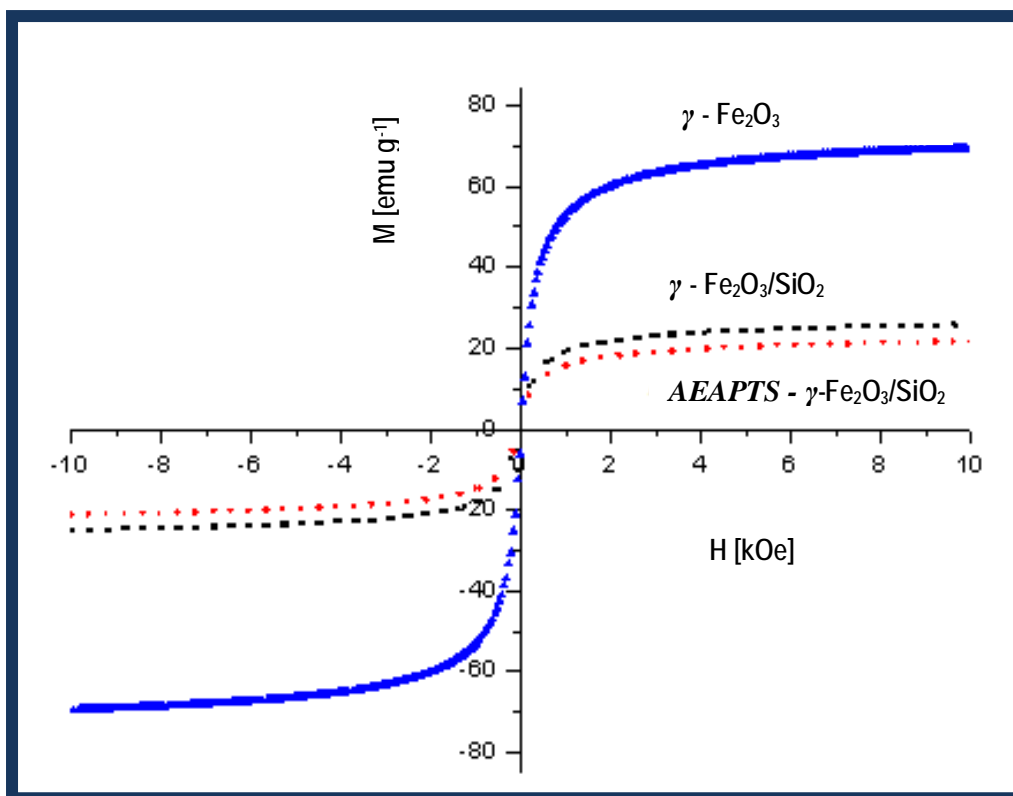
4.1.1.4 Elementarna (EDS) analiza magnetnega γ -Fe₂O₃/SiO₂ nanodelca. Energijska disperzijska spektroskopija rentgenskih žarkov (EDS) je bila uporabljena za natančno elementarno analizo vzorca iz γ -Fe₂O₃/SiO₂ nanodelcev. S SEM-EDS analizo smo preverili prisotnost naslednjih elementov: dvo- in tri- valentno železo in kisik, ki gradijo železov oksid ali ferit, maghemit, ter silicij (Si), ki gradi primarni funkcionalni sloj iz silikatnega plašča. Slika 4 – 7 kaže rezultate SEM-EDS analize. Na SEM-EDS spektru so dobro razvidni vrhovi vseh iskanih elementov, ki smo jih želeli dokazati v vzorcu iz γ -Fe₂O₃/SiO₂ nanodelcev. Vrh ali signal, ki pripada atomom silicija, je zelo močno izražen, kar nakazuje na homogeno prevlečenje γ -Fe₂O₃ nanodelcev s silikatno prevlečko ali SiO₂.



Slika 4 – 7: SEM-EDS elementarna analiza γ -Fe₂O₃/SiO₂ nanodelcev na zlati podlagi.

4.1.1.5 Magnetne lastnosti γ -Fe₂O₃/SiO₂ - AEAPTS nanodelcev. Povprečna velikost nanodelcev ima ključen vpliv na magnetne lastnosti materiala. Z zmanjšanjem povprečne velikosti nanodelcev se zmanjšujejo tudi magnetizacija, remanenca in koercitivnost. Zaradi velikega razmerja med površino in volumnom nanodelcev je znaten delež atomov na površini nanodelca. Ker je sloj površinskih atomov neurejen, ne prispeva k magnetnemu momentu nanodelca. Delež površinskih atomov raste z manjšanjem povprečne velikosti nanodelcev, kar se izraža z manjšanjem nasičene magnetizacije z manjšanjem povprečne velikosti nanodelcev. Prav tako se z zmanjševanjem povprečne velikosti nanodelcev večja delež funkcionalnega sloja, ki prekriva površino nanodelca in redči magnetno fazo. Energija magnetne anizotropije se manjša z volumnom nanodelca, kar se izraža z manjšanjem remanence in koercitivnosti (Sugimoto, 2001).

Magnetilne krivulje čistih in površinsko spremenjenih maghemitnih nanodelcev prikazuje slika 4 – 8.



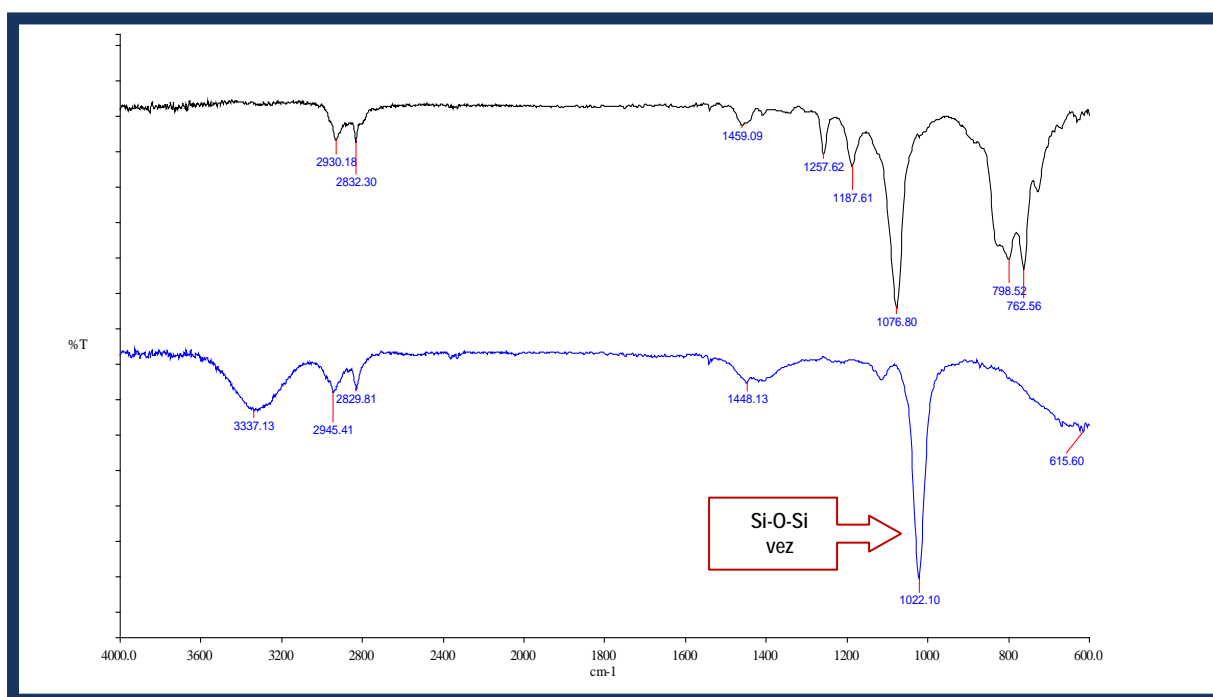
Slika 4 – 8: Magnetilne krivulje čistih in kemijsko spremenjenih maghemitnih nanodelcev.

Magnetilna krivulja čistih $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanodelcev kaže značilno nasičeno magnetizacijo železovega oksida, maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), ki znaša približno 60 emu/g . Nasičeni magnetizaciji površinsko spremenjenih maghemitnih nanodelcev, prevlečenih s siliko in z vezanim amino silanom, sta bili ocenjeni na vrednosti 19 in 21 emu/g . Na osnovi izmerjenih vrednosti nasičenih magnetizacij vseh treh vrst maghemitnih nanodelcev se lahko zaključi, da je primarna funkcionalizacija čistih maghemitnih nanodelcev v celoti uspela, saj je razlika v magnetizaciji čistih maghemitnih nanodelcev in delcev obdanih s tankim slojem silike velika, približno 40 emu/g . Nasprotno, nasičena magnetizacija maghemitnih nanodelcev, funkcionaliziranih z molekulami aminosilana, je blizu vrednosti magnetizacije magnetnih nanodelcev obdanih s siliko. Ker je bila razlika v nasičeni magnetizaciji zelo majhna, je moč sklepati, da se je na magnetne nanokompozite iz maghemita in funkcionalnega sloja silike vezalo majhno število molekul amino silana. V vseh treh primerih so magnetni nanodelci kazali značilno superparamagnetno obnašanje pod vplivom magnetnega polja.

Magnetne lastnosti se ujemajo z velikostjo delcev, opaženih s TEM in SEM elektronsko spektroskopijo. Analiza XRD-spektra vzorcev iz čistih in površinsko spremenjenih maghemitnih nanodelcev prav tako potrjuje prisotnost maghemita kot osnovnega magnetnega materiala.

4.1.1.6 **Kvalitativno določanje vezanega amino silana.** Aminosilan 3-(2-aminoetilamino)-propil-dimetoksimetilsilan ali skrajšano AEAPTS je bil uporabljen pri sekundarni površinski funkcionalizaciji maghemitnih nanodelcev. Kovalentna vezava molekul amino silana na površino delcev pripomore k večji reaktivnosti samih delcev, saj se med dvostopenjsko reakcijo silanizacije tvorijo pomožne amino funkcionalne skupine (-NH₂) na površini magnetnih nanodelcev (Yamura idr., 2004).

Za določitev prisotnosti vezanega aminosilana je bila uporabljena Fourierjeva infrardeča spektroskopija (FT-IR). V ta namen je bil posnet IR spekter maghemitnih delcev funkcionaliziranih z molekulami amino silana. Nato je bil dobljeni spekter primerjan s posnetim spektrom čistega amino silana, kot kaže slika 4 – 9. Sledila je primerjava absorpcijskih vrhov na posnetih spektrih čistega aminosilana in delcev z vezanim aminosilanom. Na IR spektru delcev z vezanim aminosilanom je bila prisotnost siloksanskih vezi (Si-O-Si) določena z absorpcijskim vrhom pri 1022 cm⁻¹, kar potrjuje kovalentno vezavo molekul amino silana na površino maghemitnih delcev obdanih s siliko. Absorpcijski maksimum v območju od 4000 cm⁻¹ do 3000 cm⁻¹ potrjuje prisotnost silanolnih skupin (Si-OH) in molekul vode na površini delcev. Absorpciji pri 2945 cm⁻¹ in 2829 cm⁻¹ sta povezani z vibriranjem C-H vezi v molekuli aminosilana, medtem ko je absorpcijski vrh pri 1448 cm⁻¹ povezan s prisotnostjo prostih amino skupin (-NH₂) na površini delcev (Xu idr., 1997; White in Tripp, 2002).



Slika 4 – 9: FT-IR spekter γ -Fe₂O₃/SiO₂ – AEAPTS nanodelcev (spodnji spekter) in FT-IR spekter čiste raztopine amino silana AEAPTS (zgornji spekter).

4.1.1.7 **Kvantitativno določanje vezanega amino silana.** Število reaktivnih mest v obliki prostih amino skupin (-NH₂) na površini γ -Fe₂O₃/SiO₂ – AEAPTS nanodelca, ki nastanejo v procesu sekundarne površinske funkcionalizacije, smo določili s konduktometrično titracijo. Amino silan AEAPTS ima na koncu alkilne verige prosto primarno amino skupino,

ki je po naravi bazična. To pomeni, da je v območju visokih pH-vrednostih nedisociirana in ima negativen naboj. Med dodajanjem titranta (razredčene $\text{HCl}_{(\text{aq})}$) se aminoskupina hidrogenira ali protonira in posledično dobimo pozitivno nabito skupino na koncu alkilne verige ($-\text{NH}_3^+$). Rezultati konduktometričnih meritev so podani v tabeli 4 – 1.

Tabela 4 – 1: Površinska koncentracija aminoskupin na površini nanodelcev.

	m magnetni nosilec [g]	W_{Fe} [%]	W_{Ferit} [%]	V_{TITRANT} [mL]	C_{AMINO} [$\mu\text{mol}/\text{m}^2$]	N_{AEAPTS} [N/nm^2]
γ - $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS	0,100	40,40	57,76	0,8	10,38	5,7

Legenda: C_{AMINO} – Izmerjena površinska koncentracija aminoskupin; N_{AEAPTS} – Število molekul AEAPTS na površini delcev.

Izmerjena površinska koncentracija AEAPTS aminosilana na površini $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelcev je bila 0,01038 mol, kar se navezuje na množino prostih amino skupin na m^2 magnetnih nanodelcev. Število amino skupin je bilo približno 5,7 amino skupin na nm^2 nanodelcev. Določena površinska koncentracija aminosilana na površini nanodelcev je enakovredna 40 % - deležu prekritju površine z amino skupinami. V površinsko spremenjenih magnetnih nanodelcih smo določili še vsebnost železa (Fe) in ferita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

Ugotovili smo, da med sekundarno površinsko funkcionalizacijo nanodelcev ni prišlo do popolnega prekritja površine delcev z aminosilanom. Število amino skupin, pripetih na površino nanodelcev, ni absolutno število. Za določanje števila prostih amino skupin na površini magnetnih nanodelcev obstajajo še druge, kolorimetrične metode, ki so bolj zanesljive (Campo idr., 2005).

Maghemitni magnetni nanodelci, prekriti s funkcionalnim slojem silike in aminosilana, so bili uspešno sintetizirani z metodo obarjanja železovih ionov v alkalnem mediju. Sintetizirani magnetni nanodelci so pokazali superparamagnetne lastnosti v prisotnosti magnetnega polja. Elektronska mikroskopija je pokazala značilno sferično obliko sintetiziranih nanodelcev s povprečnim premerom 26 nm. Še več, na TEM posnetkih je bil razviden tanek sloj amorfne silike, sintetiziran med polimerizacijo natrijevega silikata. Debelina funkcionalnega sloja anorganske silike okrog magnetnih nanodelcev meri 3 nm. Pripenjanje organskih molekul amino silana na površino predhodno kemijsko spremenjenih maghemitnih nanodelcev je bilo prav tako uspešno, čeprav ni prišlo do maksimalnega prekritja površine magnetnih nanodelcev z aminosilanom. FT-IR posnetek funkcionaliziranih magnetnih nanodelcev dokazuje prisotnost amino silana. V nadaljevanju so bili funkcionalni maghemitni nanodelci uporabljeni za vezavo biokatalizatorja ChOx.

4.1.2 Imobilizacija holesterol oksidaze na magnetni nosilec

Pomemben dejavnik, ki ga moramo upoštevati pri načrtovanju imobiliziranega biokatalizatorja, je pravilna izbira načina vezave biokatalizatorja na nosilec, saj ta bistveno vpliva na stabilizacijo biokatalizatorja. Nepravilna izbira načina imobilizacije biokatalizatorja lahko vodi do nepovratnih strukturnih sprememb biokatalizatorja, ki povzročijo okrnitev njegove nativne aktivnosti. Zato sta način in postopek imobilizacije biokatalizatorja ključna za doseganje višje stabilnosti z ohranjeno aktivnostjo biokatalizatorja.

Metod za imobilizacijo biokatalizatorja je več; med njimi so najpogostejše v rabi adsorpcija, ujetje biokatalizatorja v porozni nosilec in kovalentna vezava encima na trdni nosilec s pomočjo mrežnih povezovalcev ali kemičnih aktivatorjev. Postopek imobilizacije je pogojen z večjim številom dejavnikov, med katerimi sta najpomembnejša biokompatibilnost ali kemijsko ujemanje nosilca z bioaktivno učinkovino, ki jo želimo imobilizirati. Tako imobilizirana bioaktivna učinkovina ohrani svojo biološko aktivnost, ostane trdno vezana na ali v nosilec in se med praktično rabo ne desorbira ali uhaja s površine ali iz notranjosti nosilca. Poleg tega bioaktivna učinkovina ohrani svojo prvotno strukturo in funkcijo in je stabilnejša daljše časovno obdobje.

4.1.2.1 Optimizacija reakcije aktivacije površine $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev

Imobilizacija biokatalizatorja ChOx na površinsko spremenjene $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelce je potekala s predhodno aktivacijo magnetnih nanodelcev z mrežnim povezovalcem GA. Kemijska aktivacija površine nosilca, na katero so pripete primarne amino skupine, je ena izmed najbolj uporabljenih tehnik za imobilizacijo biokatalizatorja na osnovi takoimenovane večtočkovne kovalentne vezave encima s površino nosilca (Betancor idr., 2006; Mateo idr., 2007). Proces imobilizacije s tehniko kemijske aktivacije površine nosilca z GA navadno poteče med nukleofilnimi funkcionalnimi skupinami encima in nosilca. Nukleofilne funkcionalne skupine, ki so udeležene v procesu kovalentne vezave encima na nosilec, se nanašajo na proste primarne amino skupine ($-\text{NH}_2$). Na površinsko spremenjenem magnetnem nanodelcu je prosta $-\text{NH}_2$ skupina nastala med procesom pripenjanja amino silana AEAPTS-ja v sekundarni površinski funkcionalizaciji, ki vsebuje prosto, terminalno primarno amino skupino. Encim ChOx ima na svoji površini 16 prostih aminokislinskih preostankov Lizina, ki reagirajo s površinsko spremenjenimi $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelci po zaključeni reakciji aktivacije površine nanodelcev z GA. V tem primeru GA kot homobifunkcionalna reaktivna molekula, ki vsebuje eno ketonsko skupino ($-\text{CO}$) na obeh koncih molekule, tvori kemijsko vez ali Schiffovo bazo ($-\text{N}=\text{CH}-$) s površino magnetnega nosilca na eni strani in s površino encima na drugi strani.

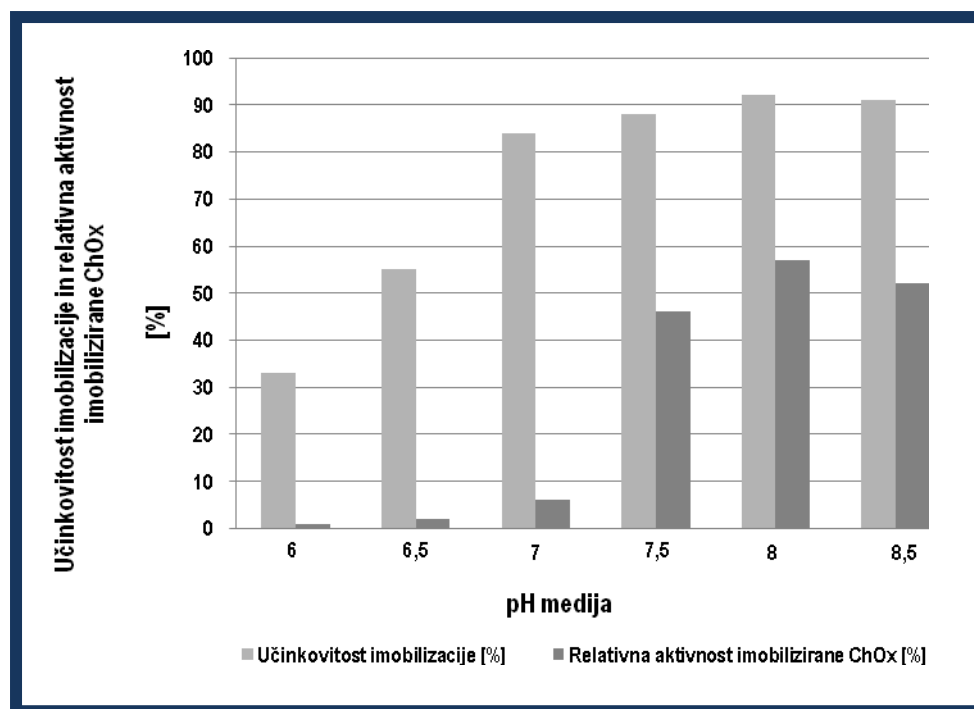
Imobilizacija biokatalizatorja z GA je ena izmed najbolj razširjenih tehnik, ki se uporabljajo za stabilizacijo biokatalizatorja (Betancor idr., 2006). Uporaba GA je vsestranska in enostavna, poleg tega se GA kot oligomer lahko uporabi neposredno za zamreženje površine nosilca ali encima, v obliki mono- ali dimera pa se lahko uporabi za kemijsko aktivacijo površine nosilca, pri čemer GA predstavlja vezalno spojino med nosilcem in encimom (Migneault idr., 2004).

V okviru raziskovalnega dela imobilizacije ChOx na površino kemijsko modificiranih magnetnih nanodelcev smo se osredotočili na preučevanje vpliva koncentracije mrežnega povezovalca med reakcijo aktivacije površine nosilca z GA; pH uporabljenega medija za

aktivacijo površine visoko funkcionalnih nanodelcev z GA in časa trajanja reakcije aktivacije površine $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev.

Za določitev vpliva koncentracije mrežnega povezovalca GA na reakcijo zamreženja ali aktivacije površine $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev smo uporabili GA v koncentracijskem območju od 2 % do 25 % (v/v); za preučitev vpliva pH medija za reakcijo zamreženja smo upoštevali pH območje od 6 do 8 in za določevanje vpliva časa trajanja reakcije zamreženja smo upoštevali reakcijske čase od 1 h do 16 h. Optimalni reakcijski pogoji za reakcijo zamreženja površine magnetnih nanodelcev so bili tisti, pri katerih smo dosegli najvišjo učinkovitost imobilizacije ChOx na površinsko spremenjene $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelce. Za primerjavo smo izvedli nekaj poskusov imobilizacije istoimenskega biokatalizatorja na $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanodelce, ki niso bili aktivirani z GA.

Reakcija zamreženja površine $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev, ki se navezuje na aktivacijo površine magnetnega nosilca za pripravo visoko funkcionalnih površinsko spremenjenih magnetnih nanodelcev, je dvostopenjski proces. Reakcija zamreženja površine nosilca z GA vključuje kemijsko reakcijo nukleofilne adicije med prosto amino skupino na površini $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS in karbonilno skupino na molekuli glutaraldehyda, ki je strogo pogojena od pH medija. Protonacija karbonilnega kisika ($\text{O}=\text{CH}-\text{R}$) v molekuli GA povzroči, da postane karbonilni ogljik v taisti molekuli GA izrazito nukleofilen. To pomeni, da je za reakcijo nukleofilne adicije primarnega amina na karbonilno skupino najprimernejše okolje, ki je rahlo kislo. Prosta amino skupina na površini nosilca se istočasno protonira, da nastane $^+\text{H}_3\text{N}$ ion, kateremu primanjkujejo nevezani elektroni in zato ni več nukleofilen (Hai-yan idr., 2006). V danem primeru je najprimernejše, da poteče nukleofilna adicija v rahlo alkalnem okolju. Zato je optimalna pH okolja za potek nukleofilne adicije oziroma za potek aktivacije površine nosilca odvisna od ravnotežja zgoraj opisanih kemijskih stanj. Iskanje optimalnega pH medija za aktivacijo površine $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev je zato eden izmed ključnih faktorjev za pripravo visoko funkcionalne površine z aktiviranimi prostimi amino skupinami magnetnega nosilca. Rezultati optimizacije pH medija za aktivacijo površine magnetnih nanodelcev so prikazani na sliki 4 – 10.



Slika 4 – 10: Vpliv pH medija med reakcijo zamreženja površine $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev na imobilizacijo ChOx.

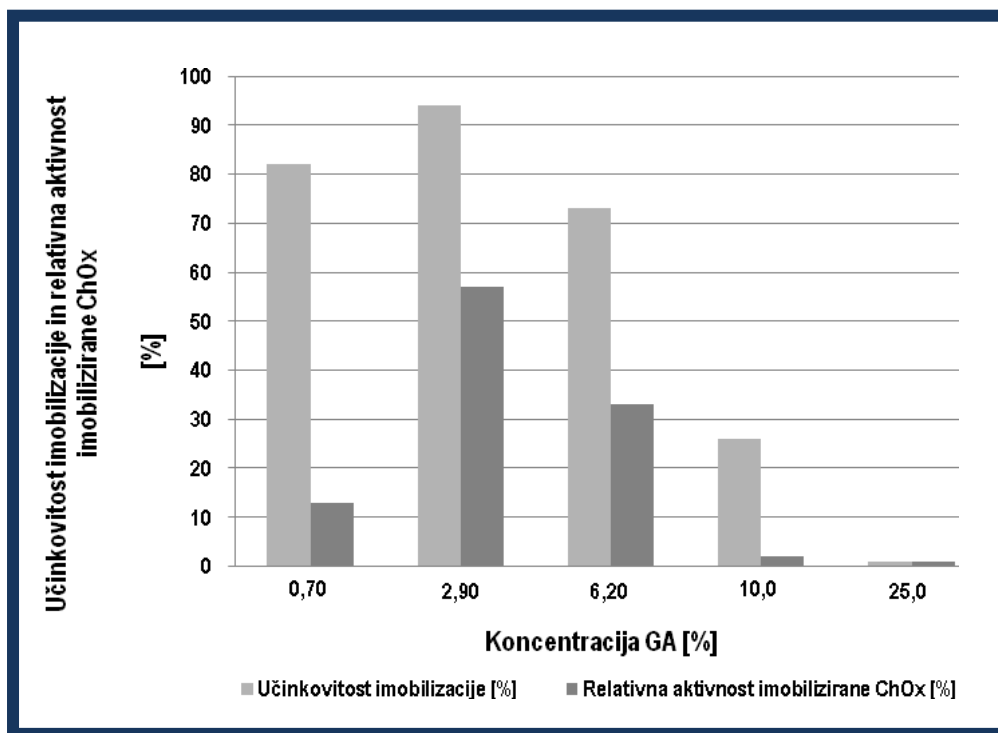
Optimizacijo pH medija za reakcijo zamreženja smo zasledovali v pH območju od 6 do 8,5. Reakcijo zamreženja smo preizkusili tako v alkalnem kot tudi rahlo kislem okolju. Površino $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev smo izpostavili raztopini mrežnega povezovalca GA (2,90 % (v/v)) za določen čas ($t_{\text{zamreženja}} \sim 24$ h) pri določenem pH medija (PBS vodna raztopina določene pH vrednosti). Po zaključeni reakciji zamreženja magnetnega nosilca smo izvedli imobilizacijo encima ChOx (100 μg). Nato smo **učilo** učinkovitost imobilizacije in relativno aktivnost imobilizirane ChOx.

V območju pH od 6 do 8,5 smo ugotovili, da je optimalna vrednost pH medija za aktivacijo površine $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev pH 8. Pri pH-vrednosti 8 smo dobili najvišjo vrednost učinkovitosti imobilizacije, ki je znašala 92 % (850 $\mu\text{g}_{\text{ChOx}}/\text{g}_{\text{nosilec}}$). Relativna aktivnost imobilizirane ChOx pri pH 8 je bila prav tako najvišja in je znašala 57 % v primerjavi z aktivnostjo proste ChOx. Pri pH 8,5 je bila učinkovitost imobilizacije 91 %, medtem ko je aktivnost imobilizirane ChOx upadla za 5 %. Pri nižjih pH-vrednostih, torej v rahlo kislem okolju, v katerem smo izvedli aktivacijo površine $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev, je bila učinkovitost imobilizacije nižja in je rastle z višanjem pH medija. Relativna aktivnost imobilizirane ChOx pri nižjih pH je bila v primerjavi z alkalnim medijem prav tako nižja in ni presegla niti 10 % aktivnosti prostega encima. Najnižja učinkovitost imobilizacije je bila ugotovljena pri pH mediju 6 in je znašala 33 % (329 $\mu\text{g}_{\text{ChOx}}/\text{g}_{\text{nosilec}}$). Relativna aktivnost imobilizirane ChOx pri danem pH je bila ocenjena na 1%.

Ugotovili smo, da je pH medija 8 najbolj primerna za aktivacijo prostih amino skupin na površini magnetnega nosilca, saj so pri tej vrednosti proste amino skupine najbolj reaktivne za nukleofilni napad na aldehidno funkcionalno skupino v molekuli glutaraldehida, da nastane imin ali Schiffova baza v obliki močne dvojne vezi med dušikom amino skupine na površini magnetnega nosilca in ogljikom v molekuli GA.

V večini primerov, odvisno od vrste funkcionalnih skupin pripetih na nosilec in mrežnega povezovalca, poteka aktivacija površine nosilca v nevtralnem pH mediju, čeprav je aktivacija v alkalnem mediju bolj zaželena, saj favorizira višjo reaktivnost nukleofilnih skupin na nosilcu. Navadno imajo proste amino skupine pK_a vrednost med 7 in 8 (Mateo idr., 2007).

Za določitev vpliva koncentracije mrežnega povezovalca GA smo izvedli reakcijo zamreženja površine $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev z različnimi koncentracijami GA v območju od 0,70 do 25 % (v/v). Rezultati optimizacije koncentracije GA so prikazani na sliki 4 – 11.

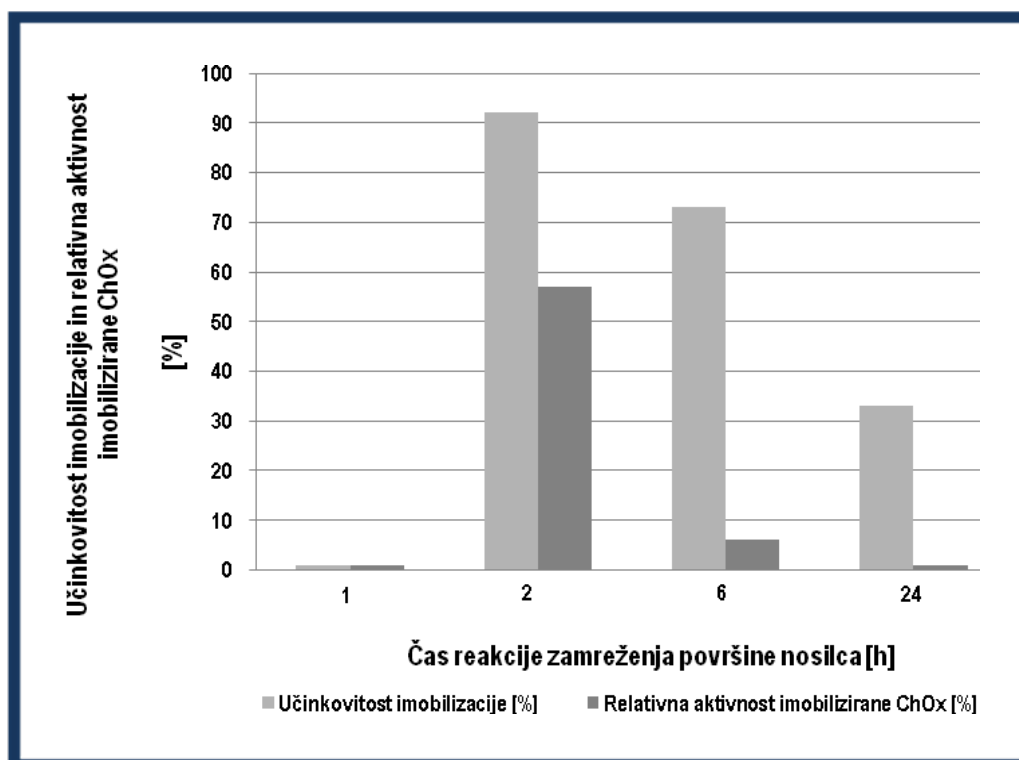


Slika 4 – 11: Vpliv koncentracije mrežnega povezovalca med reakcijo zamreženja površine $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev na imobilizacijo ChOx.

Rezultati so pokazali, da je optimalna koncentracija GA za aktivacijo površine $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev 2,90 %. Učinkovitost imobilizacije ChOx na površinsko spremenjeni magnetni nosilec je bila pri dani koncentraciji GA najvišja, in sicer je le-ta znašala 92 %. Aktivnost imobilizirane ChOx v primerjavi s prosto ChOx je bila tudi najvišja, 57 %. Pri nižji koncentraciji GA (0,70 %) smo prav tako dosegli visoko učinkovitost imobilizacije, ta je znašala 82 % ($779 \mu\text{g}_{\text{ChOx}}/\text{g}_{\text{nosilec}}$). Pri nižji koncentraciji GA je hitrost reakcije zamreženja površine nosilca z GA nižja, pri višjih uporabljenih koncentracijah mrežnega povezovalca pa je prišlo do povečanega zamreženja površine nosilca in je bila zato imobilizacija ChOx na nosilec neučinkovita. Na sliki 4 – 12, ki nazorno prikazuje vpliv koncentracije GA na zamreženje površine nosilca, je razvidno, da z višanjem koncentracije GA učinkovitost imobilizacije encima vidno upada, prav tako upada aktivnost imobilizirane ChOx. Glutaraldehyd v alkalnem mediju polimerizira po principu aldolne kondenzacije in tvori α,β -nenasičene molekule polimeriziranega GA, ki se v primeru višjih koncentracij uporabljenega GA lahko še medsebojno zamrežijo in zato

nezadostno reagirajo s funkcionalnimi skupinami na površini nosilca. V skrajnem primeru lahko višje koncentracije mrežnega povezovalca trajno poškodujejo encim, ki se veže na nosilec.

Čas trajanja reakcije zamreženja ali aktivacije površine magnetnega nosilca z mrežnim povezovalcem ima neposreden vpliv na učinkovitost imobilizacije biokatalizatorja na površinsko spremenjen nosilec. Da smo določili vpliv časa trajanja aktivacije na imobilizacijo ChOx po izpostavitvi površine nosilca pri optimalni koncentraciji GA in optimalnem pH mediju, smo v ta namen preizkusili tri različne čase trajanja reakcije aktivacije z GA: 2 h, 6 h in 24 h. Rezultati so prikazani na sliki 4 – 12.



Slika 4 – 12: Vpliv časa reakcije zamreženja površine γ -Fe₂O₃/SiO₂ – AEAPTS nanodelcev na imobilizacijo ChOx.

Po 2 h izpostavitve magnetnega nosilca v raztopini mrežnega povezovalca pri optimalni koncentraciji glutaraldehida (2,90 %) smo dobili najvišjo učinkovitost imobilizacije ChOx, ki je bila 92 % (858 $\mu\text{g}_{\text{ChOx}}/\text{g}_{\text{nosilec}}$). Pri ostalih časih trajanja zamreženja površine magnetnega nosilca je bila učinkovitost imobilizacije nižja, in sicer pri 6 h izpostavitve je le-ta znašala 73 %, kar ustreza 680 $\mu\text{g}_{\text{ChOx}}/\text{g}_{\text{nosilec}}$, pri 24 h izpostavitve je bila učinkovitost imobilizacije najnižja in je bila ocenjena na 33 % ali 329 $\mu\text{g}_{\text{ChOx}}/\text{g}_{\text{nosilec}}$. Iz rezultatov na sliki 4 – 13 je možno opaziti tudi upadanje aktivnosti encima ChOx s povečevanjem časa trajanja reakcije zamreženja/aktivacije površine magnetnega nosilca. Relativna aktivnost imobilizirane ChOx pri času izpostavitve 2 h je bila najvišja, 57 %. Pri najdaljšem času trajanja reakcije zamreženja, pri 24 h, je bila aktivnost imobilizirane ChOx najnižja in ni presegla 3 % aktivnosti proste ChOx. Ugotovili smo, da je s povečevanjem časa trajanja reakcije aktivacije površine magnetnega nosilca učinkovitost imobilizacije začela upadati na enoto mase nosilca se je vezalo manjše število molekul encima ChOx iste koncentracije ($\gamma_{\text{ChOx}} = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Poizkusili smo aktivirati površino magnetnega nosilca

po času 1 h, vendar neuspešno, saj je bila učinkovitost imobilizacije nična. Prav tako nismo zasledili nobene aktivnosti encimskega preparata po imobilizaciji ChOx.

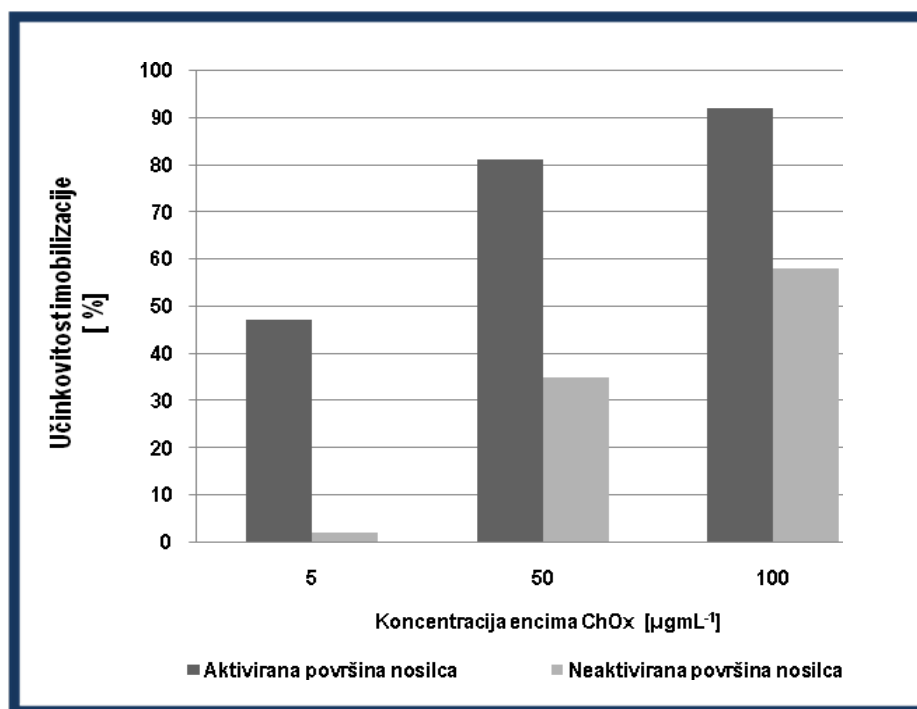
Najverjetneje, da se zaradi velike specifične površine in visoke reaktivnosti same površine, ki jo poseduje kemijsko spremenjeni magnetni nosilec, pri daljši izpostavitvi površine magnetnega nosilca nepravilno veže več molekul GA, kar privede do neučinkovitega zamreženja površine nosilca in celo do prekinitve ali inhibicije aldehydskih skupin zaradi medsebojnega zamreženja molekul glutaraldehida na površini nosilca. V prvem delu raziskave imobilizacije ChOx na površinsko spremenjen magnetni nosilec je bilo potrebno najti optimalne pogoje reakcije zamreženja ali aktivacije funkcionalnih amino skupin na površini nosilca z mrežnim povezovalcem GA. Optimalni pogoji za vezavo GA na površino $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev so povzeti v tabeli 4 – 2.

Tabela 4 – 2: Optimalni pogoji za vezavo GA na površino $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev.

	m_{nosilec}	m_{ChOx}	ω_{GA}	pH	$t_{\text{Zamreženja}}$	$\varphi_{\text{Imobilizacije}}$	$A/A_0, \text{ChOx}$
	[g]	[μg]	[v/v, %]	[l]	[h]	[%]	[%]
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS/ChOx	0,1	100	2,90	8,0	2	92	57

Legenda: ω_{GA} – volumska koncentracija raztopine GA ((v/v),%); $t_{\text{Zamreženja}}$ – čas trajanja reakcije aktivacije površine magnetnega nosilca z GA; $\varphi_{\text{Imobilizacije}}$ – učinkovitost imobilizacije in $A/A_0, \text{ChOx, imobilizirana}$ – relativna aktivnost imobilizirane ChOx v primerjavi s prosto ChOx.

Imobilizacijo ChOx smo izvedli tudi z magnetnimi nanodelci, kateri niso bili aktivirani ali zamreženi z GA. Poskus vezave ChOx na neaktivirane nanodelce smo naredili z namenom, da potrdimo predpostavko o teoriji kovalentne vezave encima ChOx na površinsko spremenjene $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS magnetne nanodelce, predhodno aktivirane z mrežnim povezovalcem GA. Iz rezultatov, ki so prikazani na sliki 4 – 13, je razvidno, da se je količina vezanega encima ChOx znatno zvišala v primeru, ko je bil magnetni nosilec primerno aktiviran.



Slika 4 – 13: Vpliv reakcije aktivacije površine magnetnega nosilca na končno učinkovitost imobilizacije ChOx.

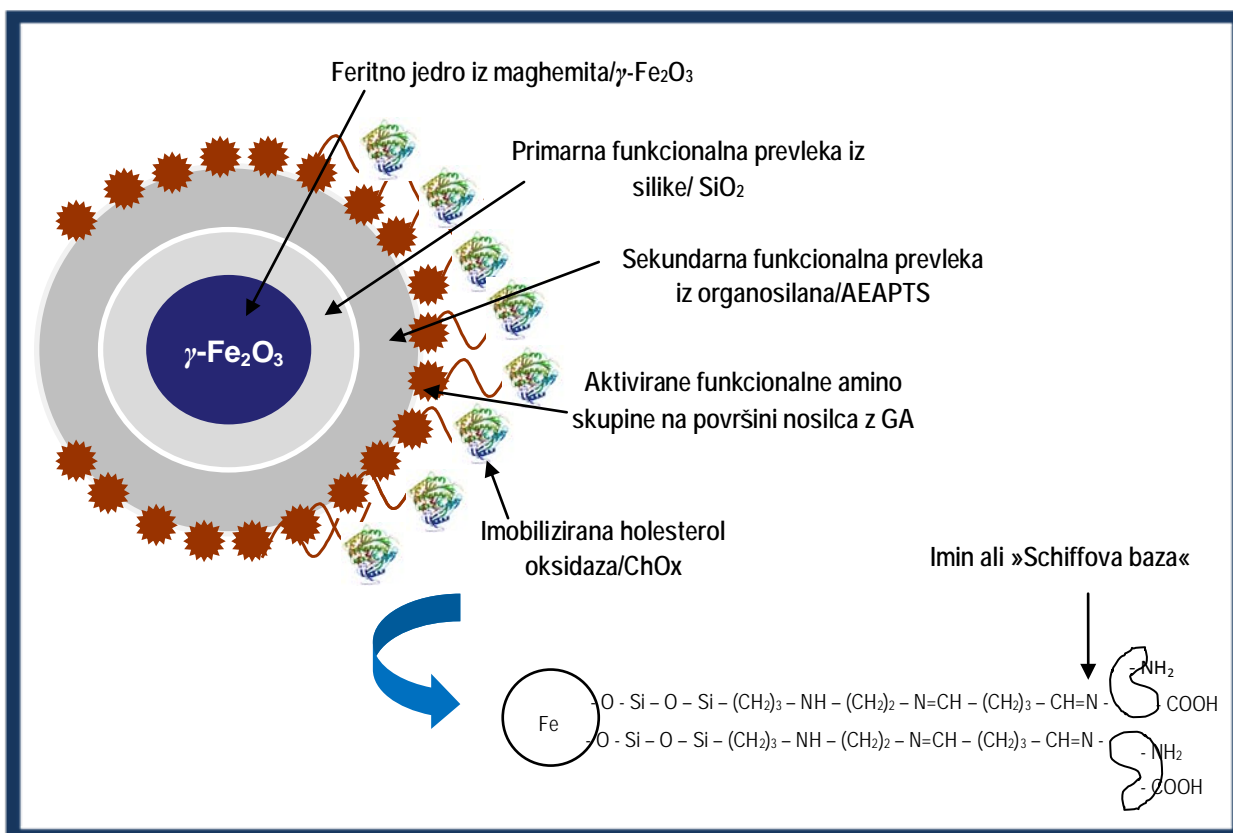
Na magnetni nosilec smo za primerjavo imobilizirali različne koncentracije encima ChOx, in sicer, 5, 50 in 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ v ustrezni puferški raztopini. Ugotovili smo, da je bila količina imobilizirane ChOx na aktivirane magnetne $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelce višja za faktor 1,6 v primeru uporabljene koncentracije encima 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Učinkovitost imobilizacije holesterol oksidaze je bila 92 % v primeru uporabe aktiviranega magnetnega nosilca, medtem ko je bila učinkovitost imobilizacije istoimenskega encima na neaktivirane magnetne nanodelce le 58 %, kar dokazuje močan vpliv reakcije zamreženja površine nosilca z GA na proces kovalentne vezave biokatalizatorja na nosilec. Pri uporabi koncentracije encima 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za vezavo na magnetni nosilec smo opazili zmanjšanje učinkovitosti imobilizacije encima tako na aktivirane ($\varphi_{\text{imobilizacije}} = 81\%$) kot na neaktivirane ($\varphi_{\text{imobilizacije}} = 35\%$) magnetne nanodelce, s tem, da je bil izkoristek vezave ChOx na neaktivirane nanodelce spet nižji, za faktor 2,3. V primeru najnižje uporabljene koncentracije encima ChOx, to je 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, je bila učinkovitost imobilizacije najnižja in je le-ta znašala 47 % za aktivirane magnetne nanodelce, medtem ko je bila v primeru neaktiviranih magnetnih nanodelcev komaj opazna. Iz rezultatov ne moremo neposredno razbrati zveze med koncentracijo encima za vezavo na nosilec in postopkom aktivacije ali zamreženja površine nosilca z mrežnim povezovalcem, kajti učinkovitost imobilizacije za različne koncentracije encima ChOx je nesorazmerna z uporabo ali aktiviranih ali neaktiviranih magnetnih nanodelcev. Vsekakor pa smo opazili, da je bil izkoristek vezave ChOx na magnetni nosilec višji v primeru uporabe aktiviranih $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev.

Vzrok za opazno povečanje učinkovitosti imobilizacije v primeru uporabe aktiviranih magnetnih nanodelcev je v posedovanju prostih amino ($-\text{NH}_2$) skupin na površini nosilca, ki so projicirane navzven in se v stiku z molekulo GA spremenijo v aldehidne funkcionalne skupine, primerne za nastanek »Schiffove« vezi ob vezavi encima (Liu idr., 2004). Ker neaktivirani magnetni nanodelci ne vsebujejo vezalne spojine GA, se najverjetneje na

površino neaktiviranih magnetnih nanodelcev veže encim le z adsorpcijo, ki predstavlja šibko vezavo encima na nosilec. Vezava encima na neaktivirane magnetne nanodelce je šibka in zato tudi podvržena k uhajanju encima z nosilca med spiranjem površine $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev z raztopino soli ($\text{NaCl}_{(\text{aq})}$, 0,02 M).

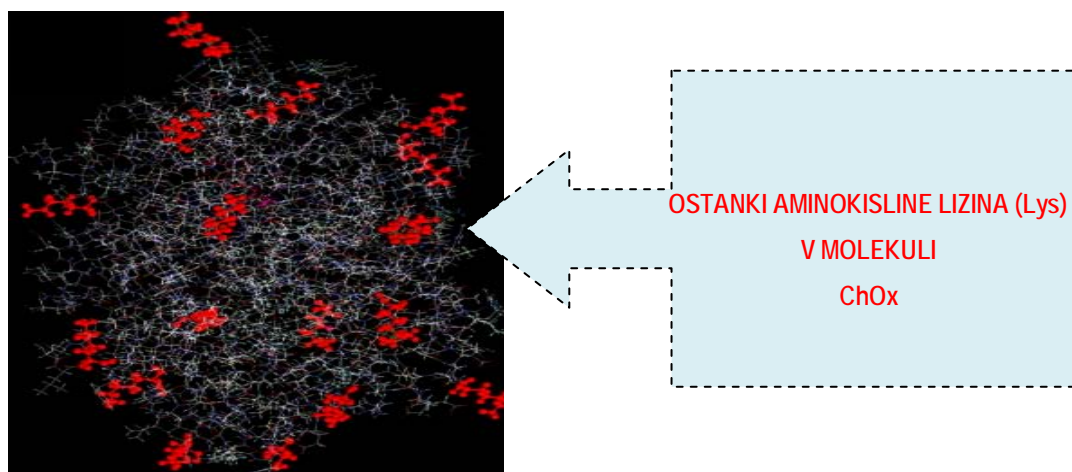
Različne metode za imobilizacijo biokatalizatorja, ki jih spodaj navajam, se navezujejo izključno na primer imobilizacije encima ChOx. Na kratko je podan opis do sedaj uporabljenih metod za imobilizacijo ChOx na principu adsorpcije, ujetja encima in kovalentne vezave ChOx na različne nosilce.

4.1.2.5 Imobilizacija ChOx na površino $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev. Visoko funkcionalni magnetni nanodelci $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS, opisani v poglavju 2.1, so bili uporabljeni za študij imobilizacije specifičnega biokatalizatorja ChOx. Postopek imobilizacije, uporabljen na primeru encima ChOx, je podrobneje opisan v poglavju Materiali in metode. V okviru imobilizacije ChOx smo proučevali: a) učinkovitost imobilizacije ChOx na površino magnetnih nanodelcev v odvisnosti od uporabljene koncentracije biokatalizatorja, b) kvalitativno določevanje imobilizacije ChOx na površino magnetnih nanodelcev z infrardečo spektroskopijo, c) morfološke in strukturne lastnosti magnetnega nanokompozita z imobiliziranim biokatalizatorjem in d) aktivnost in stabilnost visoko funkcionalnih nanodelcev z imobiliziranim biokatalizatorjem ChOx. Površinsko spremenjeni magnetni nosilec z imobilizirano ChOx je nazorno prikazan na sliki 4 – 14.



Slika 4 – 14: Shematski prikaz pripravljenega magnetnega nosilca.

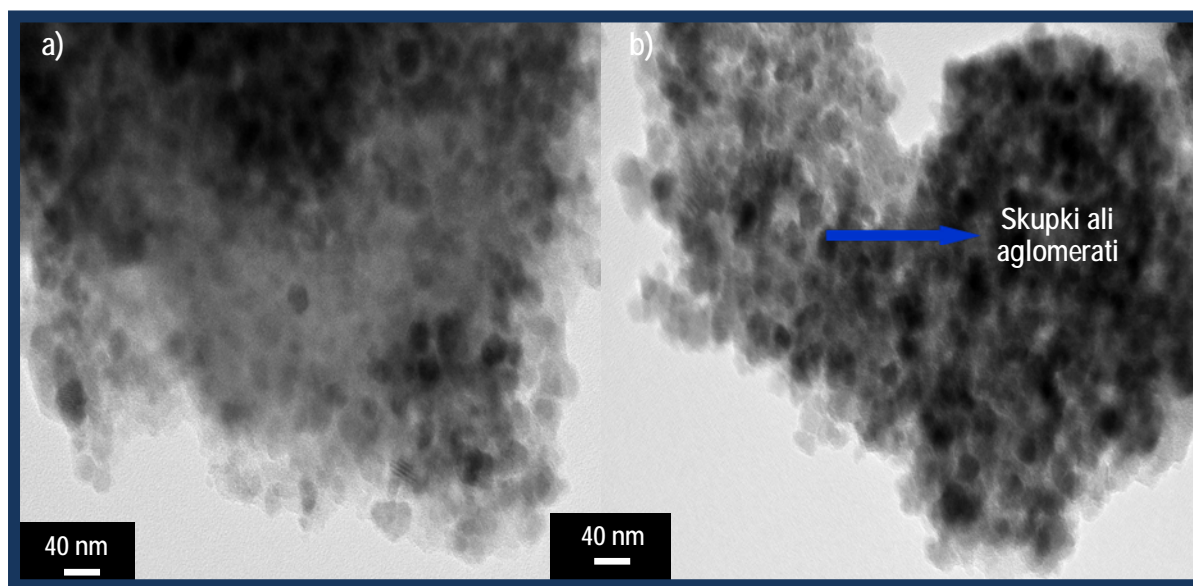
Kristalna struktura encima ChOx je prikazana na sliki 4 – 15.



Slika 4 – 15: Tridimenzionalna (3D) struktura encima ChOx z razpoložljivimi aminokislinskimi preostanki lizina (LYS). Encim ChOx ima 15 razpoložljivih preostankov Lizina (Torabi idr., 2007).

Iz slike 4 – 15 je razvidno, da je površina encima ChOx obogatena z aminokislinskimi preostanki Lizina za uspešno reakcijo med lizinskimi ostanki na površini encima in mrežnim povezovalcem GA na površini nosilca. Iz kristalne strukture je razvidno, da ima encim ChOx 16 aminokislinskih preostankov lizina. To je tudi eden od pglavitnih razlogov, zakaj je bila imobilizacija encima uspešna, saj je bilo na razpolago dovolj aminokislinskih preostankov za vezavo encima na nosilec. Potrebno je izpostaviti način vezave encima na nosilec, saj ta pomembno vpliva na končno aktivnost encimskega preparata. Imobilizacija encima na osnovi kovalentne vezave encima na nosilec neposredno spremeni konformacijo encima, kar privede do nepravilnega prileganja molekul encima na površino nosilca. Aktivna mesta na encimu ostanejo prikrita, kar ovira prehod molekul substrata iz raztopine do aktivnega mesta na encimu. Vzrok za zmanjšanje aktivnosti imobiliziranega encima je v postopku imobilizacije, ki povzroči strukturne spremembe v molekuli encima in spremembe v neposredni bližini delovanja samega imobiliziranega encima. Za posledico se zmanjša tudi aktivnost imobiliziranega encima (Torabi idr., 2007).

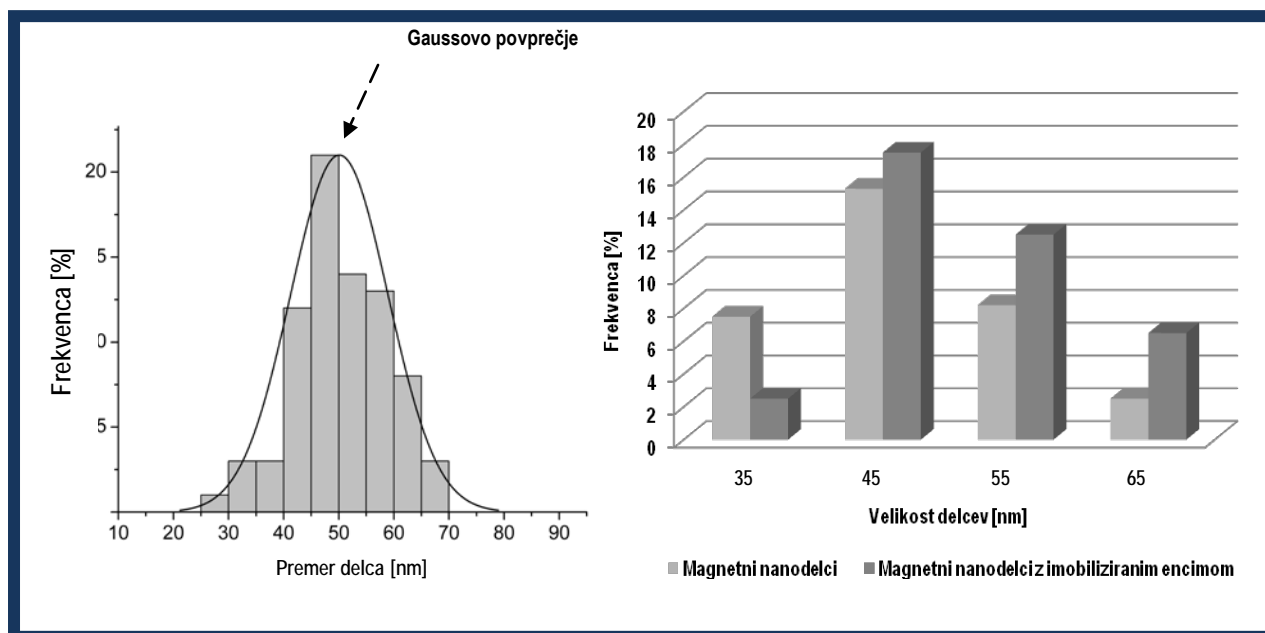
4.1.2.6 Oblika in morfologija $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS/ChOx nanodelcev. Posnetek $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS/ChOx nanodelcev s TEM analizo je prikazan na sliki 4 – 16. Površinsko spremenjeni magnetni nanodelci z imobilizirano ChOx imajo obliko kroglice ali nanosfere in se po morfoloških značilnostih ne razlikujejo bistveno od nanodelcev brez vezanega biokatalizatorja. Tudi v tem primeru, za površinsko spremenjene magnetne nanodelce z imobilizirano ChOx, obvelja ozka porazdelitev velikosti nanodelcev s povprečnim premerom 50 nm.



Slika 4 – 16: TEM posnetki – a, b) maghemitnih ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ - AEAPTS) nanodelcev prevlečenih s plastjo amorfne silike z imobilizirano ChOx. ChOx/ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ - AEAPTS = 1/100 w/w (uporabljeno masno razmerje med encimom in magnetnim nosilcem).

Iz slike 4 – 17 je razvidno, da so delci v določenih področjih zbrani v skupke, ki so vidni. Nastali aglomerati delcev so povzročili rahlo povečanje povprečne velikosti delca ali nanokompozita. Kljub povečanju velikosti delca, najverjetneje zaradi procesa površinske funkcionalizacije in imobilizacije biokatalizatorja, so delci ohranili nanovelikost. V povprečju se je velikost nanokompozita po procesu imobilizacije povečala za približno ± 10 nm. Predvidevamo, da je povečanje velikosti delca neposredno povezano s procesom imobilizacije ChOx. To je povezano z dejstvom, da proces imobilizacije ChOx na magnetni nanokompozit ni mono-molekularen proces, ampak je v proces imobilizacije vključenih več molekul encima ChOx, ki se vežejo na površino enega delca. Ker proces imobilizacije poteka izključno le na površini magnetnega nanokompozita, obstaja možnost, da se na površinsko aktivirane visoko funkcionalne magnetne nanodelce veže več molekul encima naenkrat. Ker je aktivacija površine nanokompozita povezana s polimerizacijo GA na površini nanodelca, sklepamo, da GA na površini $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ - AEAPTS delca proizvede velik delež reaktivnih (Schiffova baza) skupin, ki se povežejo z molekulami encima (Migneault idr., 2004; Wine idr., 2007). Posledično nastanejo skupki molekul encima, vezanih na površino magnetnega nanodelca.

4.1.2.7 Porazdelitev velikosti $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS/ChOx nanodelcev. Porazdelitev velikosti $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS/ChOx nanodelcev je prikazana na sliki 4 – 17.

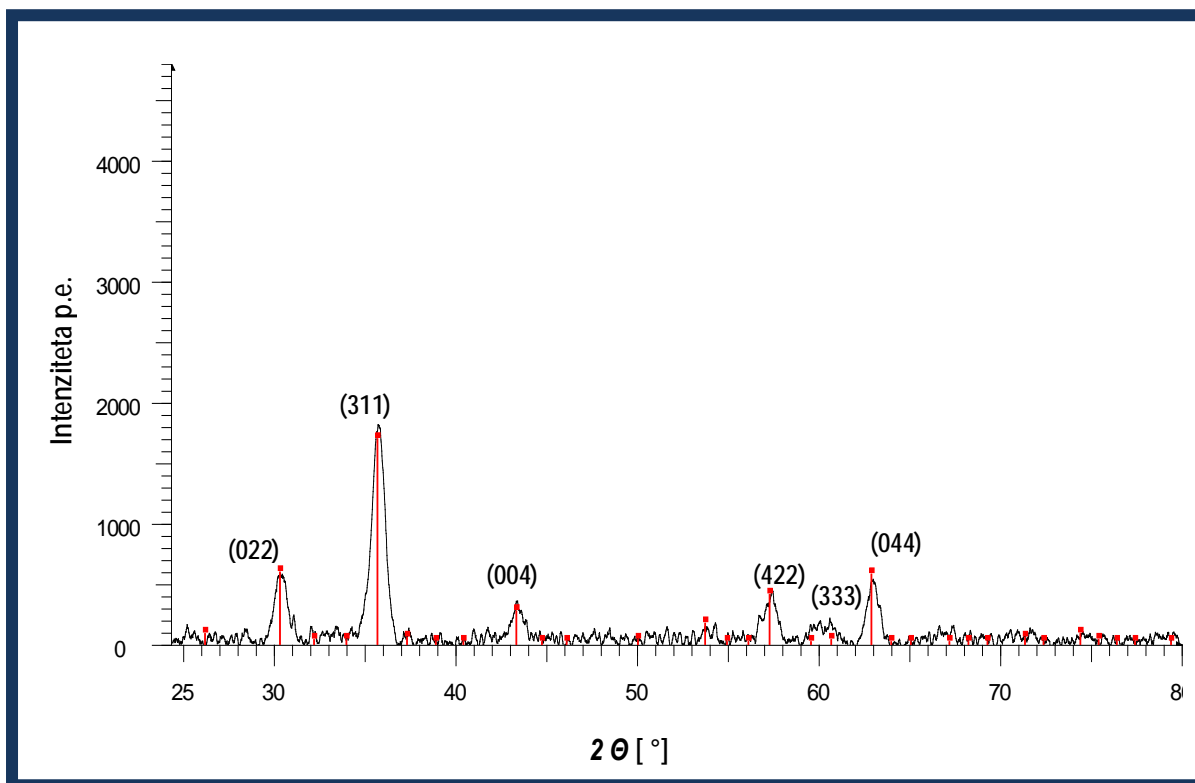


Slika 4 – 17: Porazdelitev velikosti γ -Fe₂O₃/SiO₂ – AEAPTS magnetnih nanodelcev z imobilizirano ChOx.

Krivulja porazdelitve velikosti γ -Fe₂O₃/SiO₂ – AEAPTS/ChOx je pokazala povečanje premera delcev, na katere smo vezali encim ChOx. Zaradi procesa imobilizacije encima na površino magnetnega nosilca se je povečal delež (frekvenca) delcev v območju velikosti od 45 do 70 nm. Povprečna velikost delca z imobilizirano ChOx je bila ocenjena na 50 nm. Magnetni nanodelci z imobiliziranim encimom so pokazali širši razpon velikosti, ki se razteza v velikostnem območju od 25 do 70 nm. Kljub povečanju velikosti delcev, le – ti kažejo ozko porazdelitev velikosti.

Iz grafa na sliki 4 – 17 je razvidno, da je delež v velikostnem razredu od 45 do 65 nm narasel za delce z imobilizirano ChOx, in sicer delež delcev s premerom 45 nm je večji za delce z imobilizirano ChOx (18 %) kot za površinsko spremenjene nanodelce (15 %). Z naraščanjem premera delcev je očitno, da prevladuje delež delcev z imobilizirano ChOx. Delež delcev z imobilizirano ChOx in s premerom 55 nm je bil ocenjen na vrednost 12 %, medtem ko, tistih s premerom 65 nm na vrednost 8 %. Opažen je upad deleža površinsko spremenjenih nanodelcev brez imobilizirane ChOx pri večjih premerih nanodelcev.

4.1.2.8 Rentgenska praškovna analiza (XRD). Slika 4 – 18 prikazuje rentgenski praškovni difraktogram γ -Fe₂O₃/SiO₂ – AEAPTS/ChOx sintetiziranega nanokompozita.



Slika 4 – 18: XRD spekter površinsko spremenjenih γ -Fe₂O₃/SiO₂ – AEAPTS/ChOx nanodelcev.

Vrhovi, določeni iz širjenja uklonov XRD, so značilni za spinelno fazo maghemita. Vrhove, ki karakterizirajo maghemit, smo dobili pri naslednjih kotih $2\theta = 30,1^\circ, 35,5^\circ, 43,1^\circ, 53,4^\circ, 57,0^\circ$ in $62,6^\circ$. Vrhovi so indeksirani v skladu s spinelno fazo maghemita; (022), (311), (004), (422), (333) in (044). Sintetizirani magnetni nanokompozit, γ -Fe₂O₃/SiO₂ – AEAPTS/ChOx, je zgrajen iz čistega maghemita kot osnovni gradbeni magnetni material. Iz tega sledi, da proces imobilizacije biokatalizatorja ni vplival na spremembo strukturne faze maghemita ali γ -Fe₂O₃.

4.1.2.9 Vezava ChOx na γ -Fe₂O₃/SiO₂ – AEAPTS nosilec. Postopek imobilizacije ChOx je podrobneje opisan v poglavju Eksperimentalni postopki. Za imobilizacijo smo uporabili 10 mg γ -Fe₂O₃/SiO₂ – AEAPTS nanodelcev, dispergiranih v vodni raztopini (PBS, 10 mM, pH 7,3) in predhodno aktiviranih z GA. Masno razmerje med encimom in magnetnim nosilcem je bilo 0,01. Uspešnost vezave holesterol oksidaze na magnetni nosilec smo preverili s FT-IR spektroskopijo. V ta namen smo magnetni nosilec z imobiliziranim biokatalizatorjem sprali z miliQ vodo ter ga posušili do suhe mase.

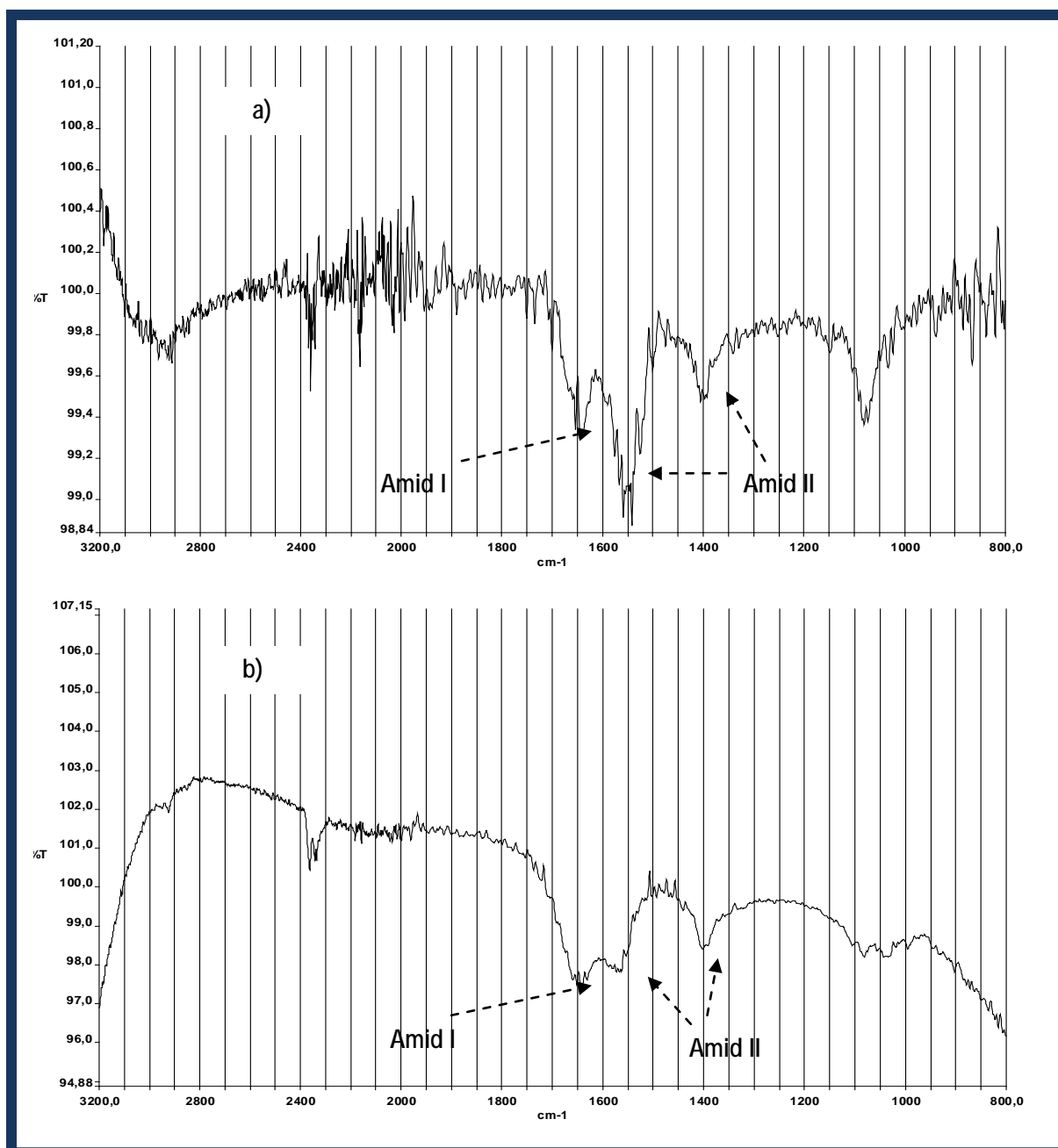
Z metodo FT-IR analize je možno dobiti dober vpogled v strukturo in gibanje molekul (molekulska mehanika ali dinamika) (Merzel in Janežič, 2007). S FT-IR analizo razpolagamo z informacijo o sekundarni strukturi proteinov, ki se navezuje na FT-IR spekter s karakterističnimi vrhovi proteinov. Iz FT-IR spektra je možno tako identificirati karakteristične vrhove, ki pripadajo značilni amidni funkcionalni skupini (NH=CO) v strukturi proteina. S FT-IR analizo določujemo predvsem Amid I in Amid II. Obe amidni skupini namreč izhajata iz peptidne vezi, ki povezujejo aminokislino v primarno strukturo

proteina. Absorpcijski vrh, povezan z Amidom I, nastane iz krčenja in raztezanja C = O vezi, medtem ko je absorpcijski vrh za Amid II povezan z upogibanjem N–H vezi v peptidni vezi. V FT-IR spektru se absorpcijska vrhova za Amid I in II pokažeta kot razširjena uklona nepravilne oblike.

Uspešnost vezave ChOx na magnetni nosilec smo določili s FT-IR spektroskopijo. Slika 4 – 19 prikazuje spekter čistega in imobiliziranega encima na magnetni nosilec. Vzorec čistega in imobiliziranega encima smo pripravili v vodni raztopini (PBS fosfatni pufer, 10 mM, pH 7,3). Isto pufersko raztopino smo uporabili za posnemanje/izničenje ozadja spektra.

V spektrih za čisti in imobilizirani encim ChOx sta razvidna karakteristična vrhova za Amid I in Amid II, in sicer pri valovnih številih 1650 in 1550 cm^{-1} . Absorpcijski vrh pri valovnem številu 1400 cm^{-1} je značilen za karboksilatno funkcionalno skupino proteina. Alternativno, je absorpcijski vrh v območju 1400 – 1448 cm^{-1} asociiran z raztezanjem in krčenjem N–H interakcijske vezi in upogibanjem NH_2 molekule v prosti NH_2 skupini molekule proteina. Oslabljeni absorpcijski vrh pri 1900 cm^{-1} , prikazan v spektru čistega encima, najverjetneje pripada interakcijski C–O vezi v molekuli encima. Isti absorpcijski vrh ni bil zasleden v spektru z imobilizirano ChOx, nakazujoč na možnost nezadostne vezave encima na magnetni nosilec. V območju od 1100 do 1000 cm^{-1} je prikazan značilen absorpcijski vrh za fosfatni ion, ki je viden v obeh spektrih. Absorpcijski vrh za fosfatni ion je posledica uporabe fosfatnega pufera za pripravo vzorca. Vsekakor karakteristični vrhovi za proteine v spektru z imobiliziranim encimom niso tako izraženi kot v spektru s čistim encimom, pripravljenem v fosfatnem pufru. Šibka izraženost vrhov v spektru z imobilizirano ChOx na magnetni nosilec je najverjetneje posledica omejene količine vezanega encima na nosilec, in ni primerljiva s količino encima v čisti raztopini. Imobilizacija ChOx na magnetni nosilec je bila dosežena z reakcijo med karbonilno skupino na površini nosilca po aktivaciji z GA in prosto amino skupino, ki je projicirana navzven iz površine molekule encima (Colthup idr., 1964; Ballester idr., 1995).

Visoko funkcionalni magnetni nosilci na osnovi $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS nanodelcev so bili uspešno uporabljeni za kovalentno vezavo ChOx. Vezava encima na površino nosilca je bila prav tako uspešno preverjena s FT-IR metodo. Imobilizirani encim je pokazal tudi aktivnost.



Slika 4 – 19: FT- IR spektra čiste raztopine encima ChOx (a) pripravljene v fosfatnem pufru (PBS, 10 mM, pH 7,3) in suspenzije γ -Fe₂O₃/SiO₂ – AEAPTS/ChOx nanodelcev (b) homogeno dispergiranih v PBS pufru. V primeru (b) je proteinski absorpcijski vrh prikazan kot razširjeni vrh zaradi kompleksne strukture proteina. V obeh spektrih so prikazani karakteristični vrhovi pri valovnih številih 1550, 1400 in 1650 cm⁻¹, značilni za Amid I in Amid II.

4.1.2.10 Vpliv koncentracije ChOx na učinkovitost imobilizacije

Biokatalizator ChOx je bil imobiliziran na površinsko spremenjene magnetne nanodelce, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ – AEAPTS, z relativno veliko specifično površino ($61,60 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). Uporabili smo naslednje koncentracije encima, in sicer 5, 50, 100, 150, 180, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Po vsakem postopku imobilizacije smo določili učinkovitost imobilizacije in nato še preverili aktivnost imobilizirane ChOx. Rezultati vpliva koncentracije encima ChOx na učinkovitost imobilizacije so pregledno podani v tabeli 4 – 3. Določili smo še maso imobilizirane ChOx na dejansko uporabljeno maso nosilca, ki je znašala 100 mg suhega magnetnega prahu, da določimo optimalno funkcionalno površino nosilca za imobilizacijo. Aktivnost samih magnetnih nanodelcev brez imobilizirane ChOx je bila prav tako preverjena in je bila nična.

Tabela 4 – 3: Učinkovitost imobilizacije in aktivnost imobilizirane ChOx.

Koncentracija ChOx [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Masno razmerje med ChOx in nosilcem [$[\]$]	Učinkovitost imobilizacije [%]	Masa imobilizirane ChOx na maso nosilca [$\mu\text{g ChOx/g nosilec}$]	Relativna aktivnost ChOx [%]
5	0,00005	3	15	3
50	0,0005	81	416	10
100	0,001	92	920	57
150	0,0015	85	1275	49
180	0,0018	61	1098	30
200	0,002	29	580	13

Iz rezultatov je razvidno, da je imobilizirana ChOx izgubila del aktivnosti v primerjavi s prostim encimom. Masa magnetnega nosilca je bila v vseh primerih konstantna in je znašala 100 mg. Izkoristek imobilizacije je bil v razponu od 3 % do 92 % in aktivnost imobilizirane ChOx pa v razponu od 3 % do 57 %. Najvišjo učinkovitost imobilizacije (92 %) smo dosegli, ko smo uporabili koncentracijo encima 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Optimalno masno razmerje med encimom in nosilcem je bilo 0,001. Masa imobilizirane ChOx na maso nosilca je v danem primeru znašala 920 $\mu\text{g ChOx/g nosilec}$. Koncentracijo encima, pri kateri smo dobili najvišji izkoristek imobilizacije, smo vzeli za optimalno vrednost količine encima ChOx za vezavo na visoko funkcionalne magnetne nanodelce.

V nobenem primeru nismo dosegli 100 % vezave encima na magnetni nosilec. Pri koncentraciji encima 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ je bila učinkovitost vezave komaj zaznavna, preostalo koncentracijo nevezanega encima smo zaznali v odpadni frakciji supernatanta. Zelo možno, da se je med spiranjem nosilca, po postopku imobilizacije, večji del encima spral

s površine nosilca. Z večanjem koncentracije encima je začela učinkovitost imobilizacije naraščati, in sicer do koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, in nato je spet začela upadati. Pri optimalni vrednosti koncentracije encima smo dobili tudi najvišjo aktivnost celotnega encimskega preparata, ki je znašala 57 %. Z nadaljnjim naraščanjem koncentracije encima sta bila izkoristek vezave in aktivnost encimskega preparata nižja. Pri koncentraciji encima $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ je bila učinkovitost imobilizacije 29 % in relativna aktivnost encimskega preparata v primerjavi s prostim encimom le 13 %. Najverjetneje zaradi prenasičenosti površine nosilca z molekulami encima ni prišlo do kovalentne vezave encima z nosilcem in je zato med spiranjem nosilca večji del encima prešel v tekočo frakcijo supernatanta. Zaradi nepopolne vezave molekul aminosilana med sekundarno površinsko funkcionalizacijo, te so prekriale komaj 40 % celotne površine nosilca, je bilo na površini nosilca manj razpoložljivih funkcionalnih mest za imobilizacijo večje količine encima ChOx. Na osnovi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je postopek imobilizacije povzročil upad aktivnosti imobiliziranega encima. Potrebno je poudariti, da je način vezave, uporabljen v postopku imobilizacije, kovalenten in zato odgovoren za konformacijske spremembe v strukturi encima, kar je povzročilo zmanjšanje aktivnosti imobilizirane ChOx. Zaradi omejenega gibanja encima, vezanega na nosilec, se posledično zmanjša tudi sposobnost učinkovitega prenosa substratov do aktivnega mesta na encimu (Zhao, 2004), kar je možno zaznati tudi v zmanjšani aktivnosti imobilizirane ChOx. Strukturne spremembe v molekuli encima po postopku imobilizacije so spodbudile nastanek specifičnega mikro-okolja v neposredni bližini delovanja encima, ki je drugačno od okolja, v katerem se nahaja prosti encim. V takšnem novem mikro-okolju se najpogosteje pojavi omejen prenos snovi, ki močno omaje delovanje encima (Krajewska, 2004).

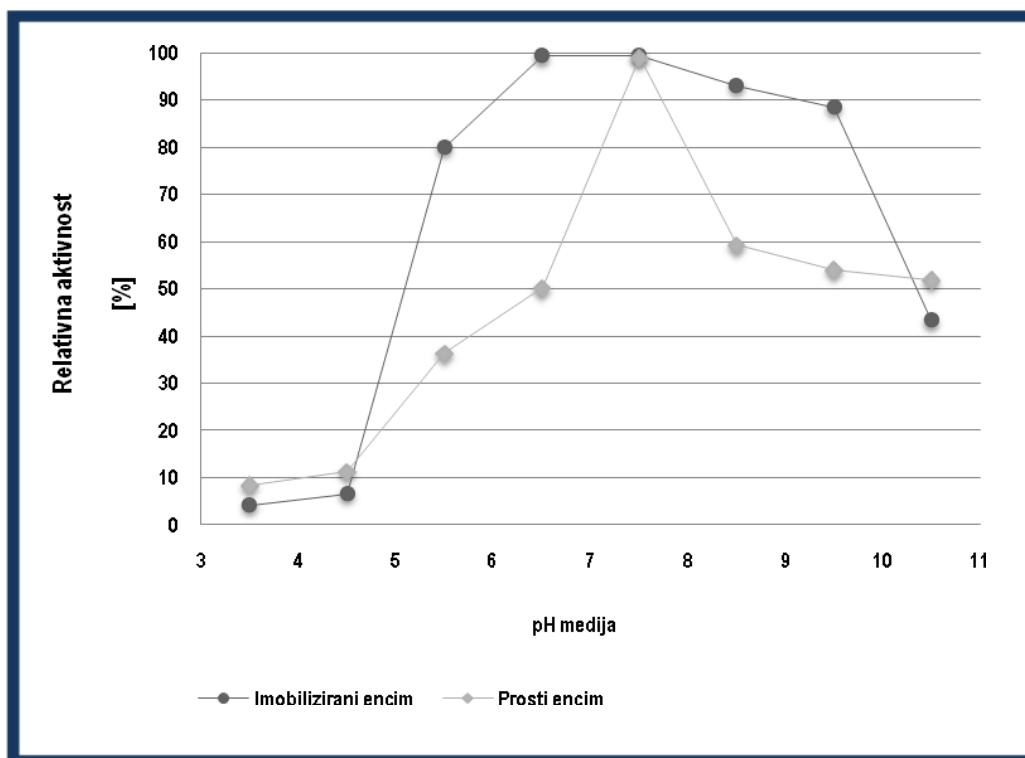
Ker sta gostota maghemitnih nanodelcev $4,87 \text{ g cm}^{-3}$ in molska masa ChOx 45 kDa (Pollegioni idr., 2004), lahko določimo število vezanih molekul ChOx na površino enega magnetnega nanodelca, ob dejstvu, da so delci značilne sferične oblike premera 26 nm (podpoglavje 4.1.1.1). Ugotovili smo, da se pri masnem razmerju med ChOx in nosilcem 0,001, na površino enega magnetnega nanodelca lahko veže več molekul encima ChOx, kar še dodatno potrjuje rezultate s presežno elektronsko mikroskopijo iz podpoglavja 4.1.2.6, da vezava ChOx na površinsko spremenjene magnetne nanodelce ni monomolekularen proces.

Znano je, da so spremenjene lastnosti imobiliziranih encimov, kot so zmanjšana specifična aktivnost encima in/ali povečana termična stabilnost encimskega preparata, v primerjavi z lastnostmi prostega encima, posledica vpliva strukturnih sprememb in omejenega prenosa snovi na delovanje encima v makro- in mikro-okolju eksternih (Tardioli idr., 2006) kot tudi nepravilne orientacije encima, ki je neproduktivno in nastane med postopkom imobilizacije (Gottschalk in Jaenicke, 1991). Zaradi omejene fleksibilnosti encima kot posledica večtočkovne vezave encima na nosilec in/ali zaradi medsebojnega zamreženja molekul encima na površini nosilca je močno okrnjeno tudi delovanje encimskega preparata (Clark, 1994).

4.1.3 Lastnosti imobilizirane ChOx na površino γ -Fe₂O₃/SiO₂ – AEAPTS nanodelcev

4.1.3.1 Vpliv pH medija na stabilnost encimskega preparata

Vpliv pH medija na stabilnost encimskega preparata smo raziskovali v pH območju od 3,5 do 10,5. Vpliv pH medija smo določili tako za prosto kot za ChOx. Postopek določevanja vpliva pH medija je podrobno opisan v poglavju 3.4.4.2. Slika 4 – 20 prikazuje rezultate relativnih aktivnosti proste in imobilizirane ChOx pri različnih pH uporabljenega medija (PBS, 50 mM).



Slika 4 – 20: Vpliv pH medija na aktivnost imobilizirane ChOx.

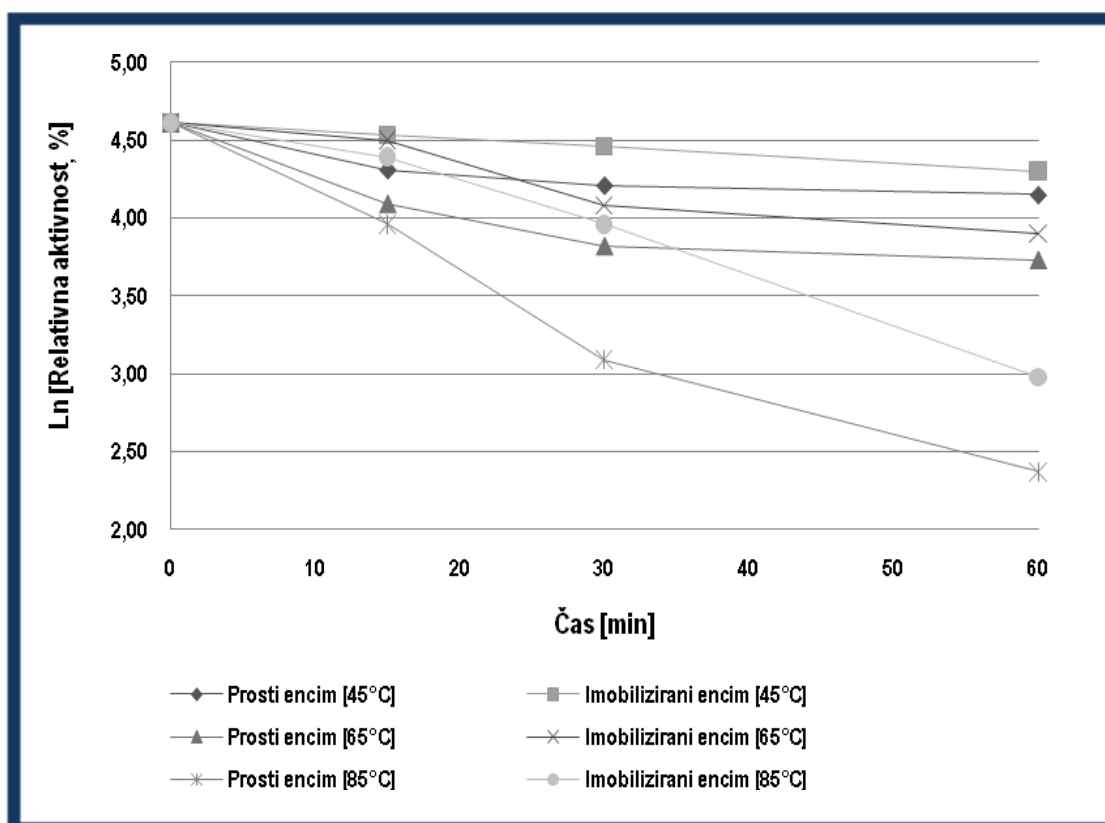
Za obe obliki encima ChOx je značilna konveksna oblika krivulje, vrh krivulje pa predstavlja optimalni pH medija, pri kateri je bila aktivnost encima, proste ali imobilizirane ChOx, najvišja. V območju pH od 3,5 do 4,5 so bile izmerjene aktivnosti obeh encimskih preparatov podobne in se bistveno niso razlikovale. V obeh primerih so bile aktivnosti obeh encimskih preparatov v danem pH območju nizke. Optimalni pH za prosti encim smo zasledili pri pH-vrednosti medija 7,5, medtem ko je imobilizirana ChOx pokazala najvišjo aktivnost pri pH med 6,5 in 7,5. Zato sklepamo, da je optimalno pH območje delovanja za imobilizirano ChOx med 6,5 in 7,5. Rezultati prav tako prikazujejo, da je aktivnost kovalentno vezane ChOx višja od aktivnosti proste ChOx. Aktivnost imobilizirane ChOx v pH območju med 5,5 do 7,5 je narastla iz 80 % na 99 %.

Sposobnost aminokislin, ki se nahajajo v aktivnem mestu, da reagirajo z molekulami substrata v času reakcije, je odvisno predvsem od njihovega elektrostatičnega stanja. V bolj alkalnem pH območju je bilo zaslediti deaktivacijo tako proste kot imobilizirane ChOx. Zaradi spremembe pH-vrednosti medija, iz bolj kislega v alkalno območje, se posledično

spremeni tudi naboj na eni ali več aminokislinah v aktivnem mestu, zaradi katerih se tudi poslabša delovanje encima. V tem primeru se holesterol kot substrat ni mogel vezati ali reagirati s potrebnimi aminokislinami, da nastane produkt 4-holesten-3-on.

4.1.3.2 Termična stabilnost encimskega preparata

Prav tako smo izvedli termične aktivnosti proste in imobilizirane ChOx pri temperaturah 45 °C, 65 °C in 85 °C pri različnih časih izpostavitve encimskega preparata (slika 4 – 21).



Slika 4 – 21: Termična stabilnost proste in imobilizirane ChOx. Vzorce s prosto in imobilizirano ChOx smo izpostavili pri različnih temperaturah in časih v puferski raztopini s pH 7,4.

Profil termične stabilnosti prikazuje, da se je pojavila termična deaktivacija pri vseh temperaturah in časih izpostavitve encimskih preparatov, tako proste kot imobilizirane ChOx. Pri temperaturi 45 °C in času izpostavitve 60 min je bila preostala aktivnost prostega encima 63 %, v primeru imobilizirane ChOx, pri enakih pogojih izpostavitve, pa 73 %. Pri višjih temperaturah (65 °C in 85 °C) in času izpostavitve 60 min je bilo opaziti znatno izgubo aktivnosti pri obeh oblikah encima, vendar je imobilizirana ChOx pokazala višjo termično stabilnost v primerjavi s prosto ChOx. Navedene ugotovitve dokazujejo, da se je termična stabilnost encima izboljšala zaradi imobilizacije ChOx na magnetni nosilec. Vsekakor je imobilizirana ChOx dosegla višjo termično stabilnost v preučevanem temperaturnem območju od proste ChOx. Preostala aktivnost imobilizirane ChOx pri

temperaturi 85 °C in času izpostavitve 60 min je bila višja od aktivnosti proste ChOx za faktor 2.

Začetne termične konstante hitrosti deaktivacije so bile izračunane iz Arrheniusove enačbe [3.24] za prosto in imobilizirano ChOx. V tabeli 4 – 4 so prikazane konstante hitrosti deaktivacije (k_i) pri izbranih temperaturah 45 °C, 65 °C in 85 °C.

Tabela 4 – 4: Termične konstante hitrosti deaktivacije proste in imobilizirane ChOx.

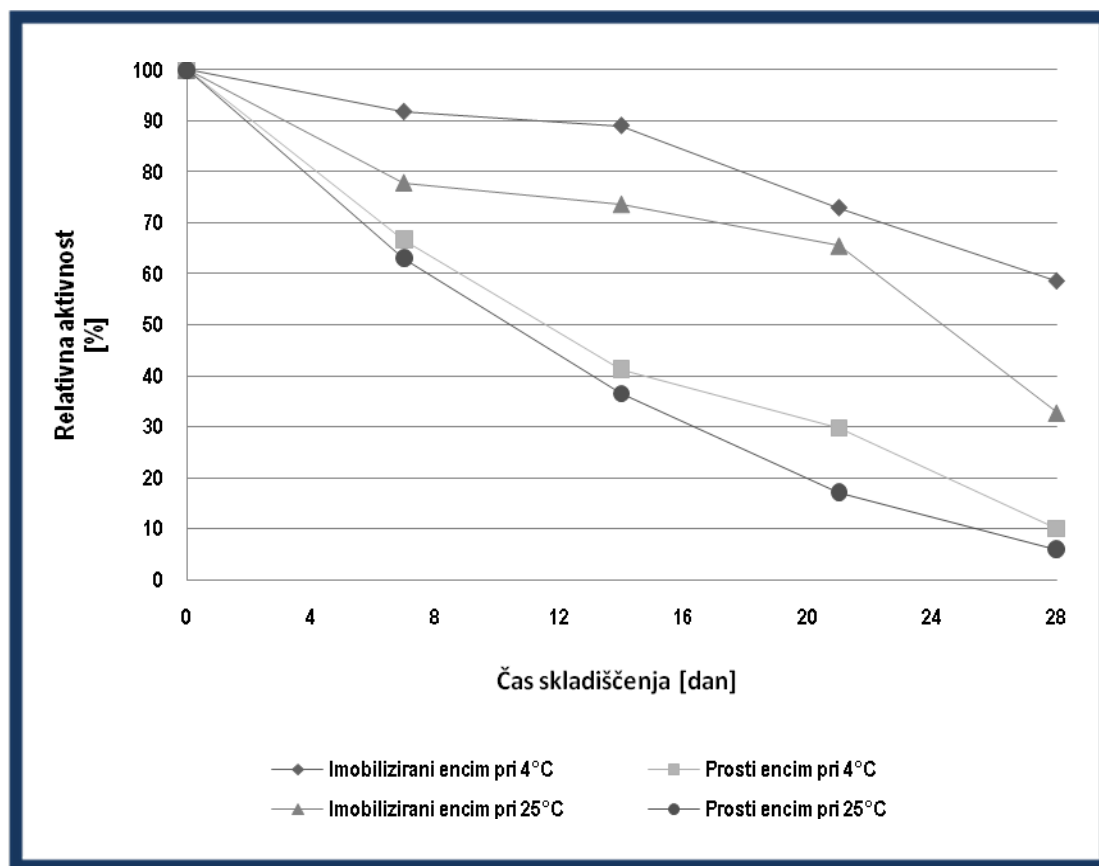
Temperatura [°C]	Imobilizirana ChOx	Prosta ChOx
	k_i [min ⁻¹] *10 ⁻³	k_i [min ⁻¹] *10 ⁻³
45	24,3	102,9
65	33,3	159,7
85	68,1	169,4

Legenda: k_i (min⁻¹) – termična konstanta hitrosti deaktivacije.

Izračuni prikazujejo, da vrednosti termičnih konstant hitrosti deaktivacije naraščajo z naraščanjem temperature in so bile višje za prosto ChOx. Kot že omenjeno, proces vezave encima na površino nosilca omogoči, da postane encim bolj odporen na visoke temperature. Predlagamo, da imobilizirani encim, najverjetneje zaradi načina vezave, podleže strukturni spremembi, ki je zanj energetsko tudi bolj ugodna. Zaradi prestrukturiranosti v molekuli encima po imobilizaciji se upočasni tudi proces denaturacije encima, zato je preostala aktivnost imobilizirane ChOx višja v primerjavi s prosto ChOx (Kouassi idr., 2005). Rezultati prikazujejo vidno izboljšanje termične stabilnosti s procesom imobilizacije encima.

4.1.3.3 Vpliv časa skladiščenja na stabilnost encimskega preparata

V splošnem velja, da stabilnost in aktivnost encimskega preparata upada s časom skladiščenja. Slika 4 – 22 prikazuje vpliv skladiščenja proste in imobilizirane ChOx pri dveh različnih temperaturah, 25 °C in 4 °C v puferski raztopini s pH 7,3. Čas skladiščenja encimskega preparata smo omejili na 28 dni.



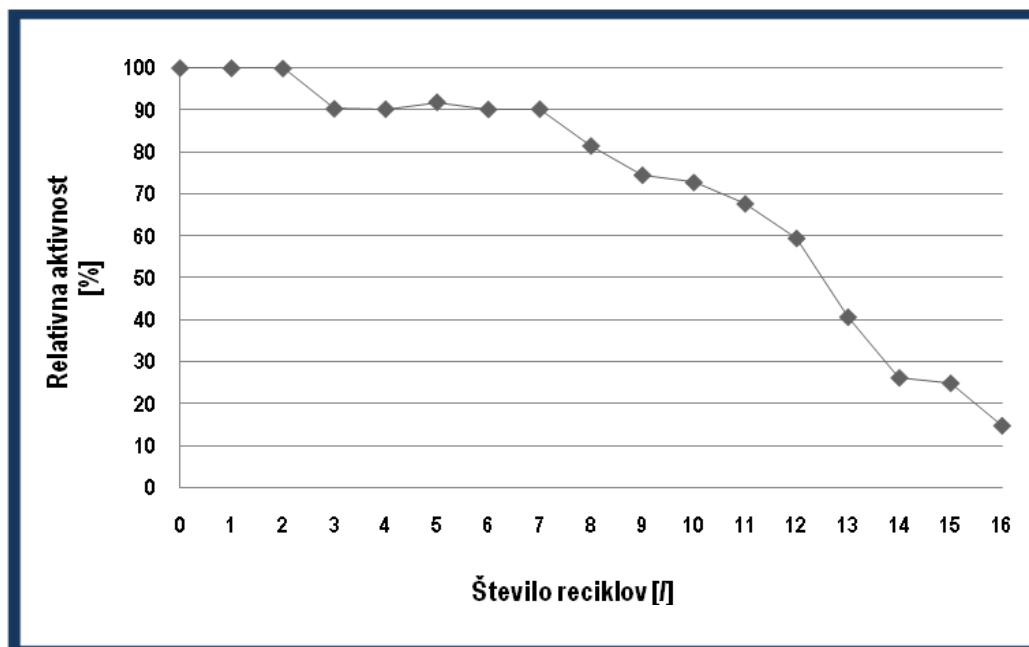
Slika 4 – 22: Vpliv časa skladiščenja na preostalo aktivnost encimskega preparata pri temperaturah 4 °C in 25 °C. Merjenje aktivnosti proste in imobilizirane ChOx je potekalo pri pH 5 in temperaturi 37 °C.

Znaten padec v relativni aktivnosti smo opazili na primeru proste ChOx pri obeh temperaturah skladiščenja in pri času skladiščenja 15 dni. V istem časovnem obdobju skladiščenja je bila preostala aktivnost imobilizirane ChOx pri temperaturi skladiščenja 25 °C 80 % in 90 % pri 4 °C. Preostala aktivnost istega encimskega preparata pri času skladiščenja 28 dni je bila 58 % pri 4 °C in 32 % pri 25 °C, kar dokazuje vidno izboljšanje stabilnosti encimskega preparata s časom. Višja stabilnost imobilizirane ChOx je najverjetneje posledica imobilizacije encima na površino magnetnega nosilca v obliki nanodelcev, ki je preprečilo termično deaktivacijo ChOx. Drugi razlog zakaj je imobilizirana ChOx pokazala višjo stabilnost pri različnih časih skladiščenja je ta, da je proces vezave encima na nosilec spodbudil, da si encim ChOx prisvoji boljše prostorsko prerazporeditev prostetične skupine FAD in stranskih verig v molekuli ChOx, kar je vodilo v izboljšanje stabilnosti encimskega preparata.

4.1.3.4 Stabilnost encimskega preparata pri ponovni uporabi

S praktičnega vidika uporabe imobiliziranih biokatalizatorjev je stabilnost encimskega preparata pri ponovni uporabi pomembna lastnost pri načrtovanju različnih nosilcev za imobilizacijo biokatalizatorjev za točno določene namene, kajti postopna deaktivacija in uhajanje encima iz sistema sta najpogostejša problema, ki krepko spodbujata načrtovanje prav imobiliziranih encimov za njihovo ponovno uporabo v procesu.

Stabilnost encimskega preparata v obliki imobilizirane ChOx na površino kemijsko spremenjenih magnetnih nanodelcev je prikazana na sliki 4 – 23. Slika prikazuje odvisnost relativne aktivnosti encimskega preparata od števila reciklov imobilizirane ChOx.



Slika 4 – 23: Stabilnost imobilizirane ChOx pri ponovni uporabi. Reakcija oksidacije holesterola je potekala pri temperaturi 37 °C in koncentraciji holesterola 0,2 mM.

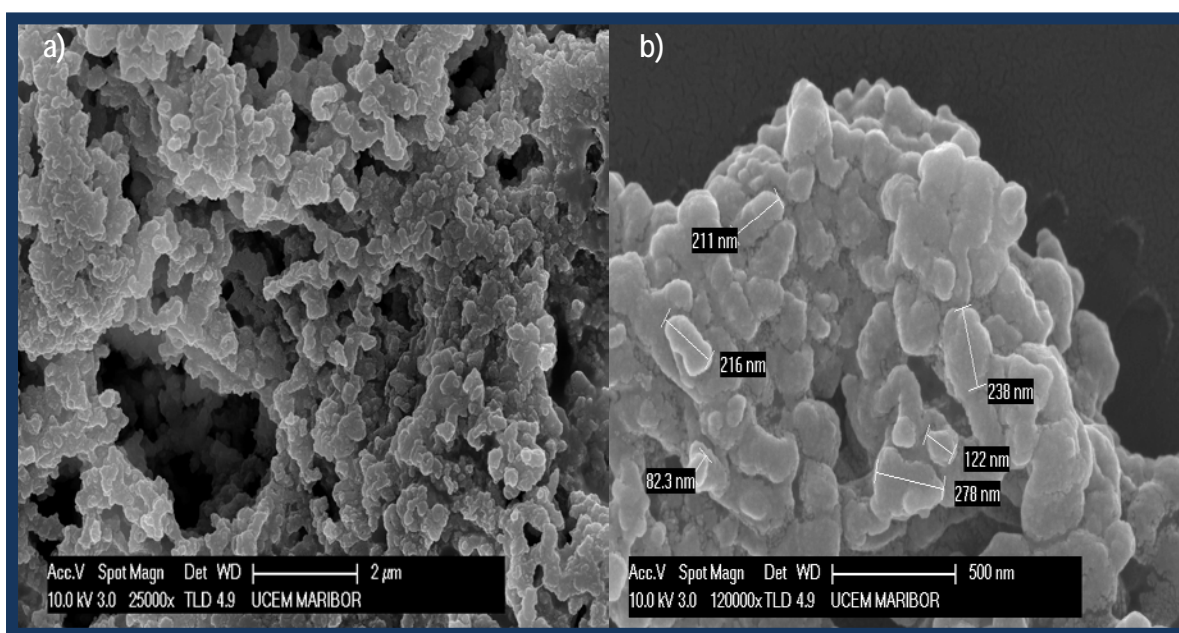
Iz grafa na sliki 4 – 24 je razvidno, da relativna aktivnost encimskega preparata vidno upada z naraščanjem števila reciklov. ChOx, imobilizirana na magnetni nosilec, je bila uporabljena 16-krat v obdobju dveh dni. Po dveh uporabah istega encimskega preparata je imobilizirana ChOx obdržala kar 99 % svoje prvotne aktivnosti. Bolj opazno zmanjšanje relativne aktivnosti imobilizirane ChOx je bilo šele po 13-kratni uporabi encimskega preparata. Pri 14-kratni uporabi je bila relativna aktivnost imobilizirane ChOx 26 %. Razpolovna doba encimskega preparata je bila dosežena pri 12 reciklih. Rezultati so pokazali, da aktivnost imobilizirane ChOx pri ponovni uporabi pada s številom reciklov.

4.2 Imobilizacija biokatalizatorja brez uporabe nosilca

4.2.1 Priprava in karakterizacija CLEAs - HRP

V delu je opisan postopek za pripravo CLEAS za imobilizacijo HRP in njihova karakterizacija. Prvi del študije za CLEAS-HRP je obsegal iskanje optimalnega obarjalnega reagenta za obarjanje encima. V nadaljevanju je bil dodan še mrežni povezovalac GA. Po zaključeni reakciji zamreženja encimskih skupkov je bil dodan še reducent. Aktivnost zamreženih encimskih skupkov smo določili spektrofotometrično. Aktivnost končne oblike imobilizirane peroksidaze v obliki CLEAs je bila tako določena. Obliko in morfologijo CLEAs delcev smo opazovali z elektronsko mikroskopijo.

4.2.1.1 Strukturno-morfološke značilnosti CLEAs-HRP. Posnetki CLEAs-HRP, narejeni s presewno elektronsko mikroskopijo (FE SEM SIRION 4000NC FEI), so prikazani na sliki 4 – 24. Iz posnetkov je razvidno, da so CLEAs-HRP po velikosti in obliki uniformni. Povprečen premer enega skupka, ki predstavlja konglomerat medsebojno zamreženih molekul encima, je bil ocenjen na 250 nm.



Slika 4 – 24: a) SEM posnetek imobilizirane HRP v obliki CLEAs; b) SEM posnetek posameznih CLEAs - en skupek vsebuje tudi do več tisoč molekul encima.

Strukturne lastnosti kot so velikost, specifična površina in poroznost so pomembne predvsem za mehansko stabilnost CLEAs in so največkrat odvisne od pogojev obarjanja proteina iz raztopine, saj se prav v začetni fazi priprave CLEAs oblikujejo skupki določene oblike in velikosti. Priporočljivo je, da so si skupki po velikosti in obliki čim bolj podobni, saj kot takšni posedujejo dovolj veliko specifično površino. Število molekul encima v skupku in način, kako so molekule encima v skupku medsebojno povezane ima močan vpliv na končno aktivnost posameznega skupka. S poznavanjem ključnih dejavnikov vpliva na oblikovanje CLEAs delcev je tako mogoče CLEAs delce preoblikovati v visoko katalitične delce. Skupki v CLEAs se lahko povežejo tudi v večje delce, pri katerih lahko opazimo pojav omejenega prenosa snovi. Velikost tako povečanih delcev lahko naraste

tudi do 100 μm , ki so dobro vidni tudi s prostim očesom (Shah idr., 2006). Končni videz CLEAs je podoben motni suspenziji, v kateri so jasno vidni encimski skupki značilne sferične oblike.

4.2.1.2 Reakcija obarjanja. V prvi stopnji priprave CLEAs smo encim HRP izločili iz raztopine z obarjalno reakcijo. Različna organska topila so bila izbrana in preizkušena za obarjanje ali precipitacijo encima HRP. Čeprav skupki v prvi stopnji še niso dobro izoblikovani in vidni, je njihov nastanek možno zaznati iz povečane motnosti suspenzije, ki je rahlo obarvana v oranžno barvo. CLEAs-HRP so bili sintetizirani po postopku navedenem v podpoglavju 3.4.3, ki zajema reakcijo obarjanja in zamreženja encimskih skupkov. Izvedli smo obarjanje z naslednjimi obarjalnimi reagenti: aceton, acetonitril, etanol, metanol, *t*-butanol, 2-propanol, nasičena amonijeva sol, DMEtOH, DMSO, DMF, kloroform in tetrahidrofuran. V tej stopnji še ni bilo vidnih skupkov, vendar smo v nekaterih primerih lahko zasledili motnost reakcijske zmesi.

V tabeli 4 – 5 so predstavljeni kvalitativni rezultati obarjanja encima HRP, ki smo jih dobili tako, da smo 100 μL začetne raztopine encima oborili z 90 % volumskim deležem obarjalnega reagenta. Na osnovi kvalitativne ocene smo se prepričali, v katerem topilu se je encim HRP izoboril.

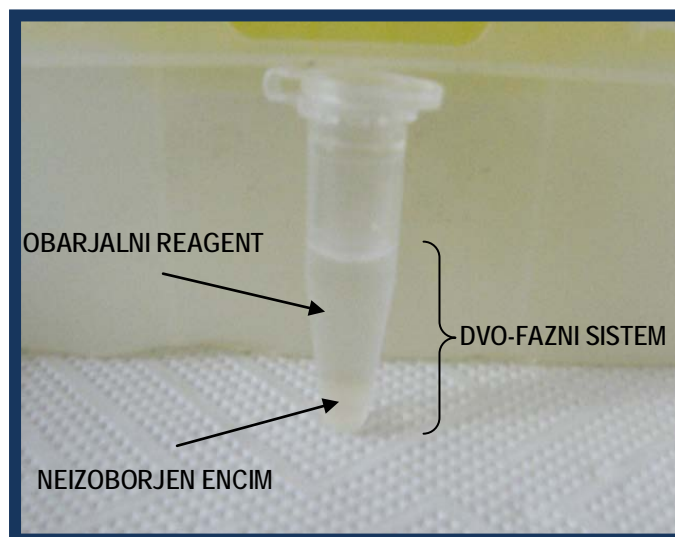
Tabela 4 – 5: Obarjanje proteina z različnimi obarjalnimi reagenti.

Obarjalni reagent	Kvalitativna ocena reakcije obarjanja	Dielektrična konstanta
Aceton	Uspešno	20,7
Acetonitril	Uspešno	36,6
Etanol	Neuspešno	24,3
Metanol	Neuspešno	33,0
<i>t</i> -butanol	Neuspešno	17,8
2 - propanol	Uspešno	20,1
DMEtOH	Uspešno	23,1
Tetrahidrofuran	Neuspešno	7,52
Nasičena amonijeva sol	Neuspešno	-

Legenda: DMEtOH – dimetoksietanol. Uspešno obarjanje pomeni nastanek motne suspenzije. Neuspešno obarjanje predstavlja dvofazen sistem, sestavljen iz dveh tekočih faz, iz raztopljenega encima in topila ali zakrknjen encim v topilu.

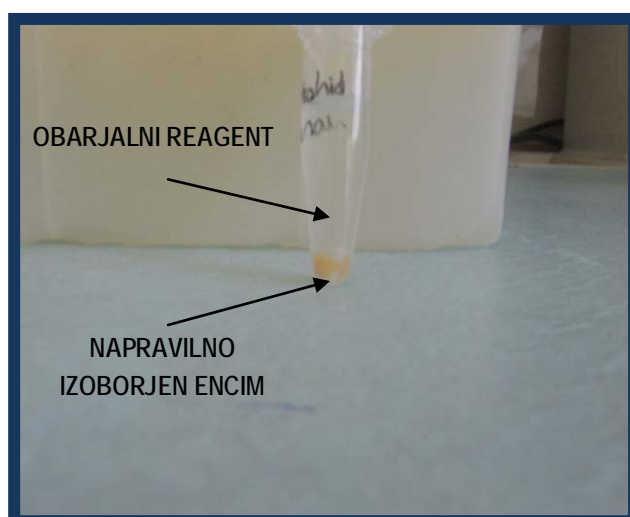
Obarjanje smo podali z oceno uspešno ali neuspešno. Uspešno obarjanje pomeni, da smo dobili motno suspenzijo, v kateri so rahlo vidni skupki izoborjenega encima. V primeru neuspešnega obarjanja, nastane sistem iz dveh tekočih faz, sestavljen iz raztopljenega (neizoborjenega) encima in obarjalnega reagenta. Neuspešno obarjanje pomeni tudi, da se encim izobori v energetsko manj ugodno konformacijo, ki povzroči znatno izgubo encimske aktivnosti. Pravimo, da encim koagulira ali zakrknje. Koagulacija encima je največkrat ireverzibilen ali nepovraten proces. Tako smo uspešno obarjanje zasledili pri acetonu, 2-propanolu, acetonitrilu in DMEtOH. Obarjanje je bilo z nasičeno amonijevo soljo, tetrahidrofuranom, z metanolom in etanolom ter *t*-butanolom neuspešno. Pri obarjanju z etanolom, metanolom in tetrahidrofuranom je prišlo do zakrknjenosti encima. Pri obarjanju je pomembno tudi dejstvo, da uporabljeni pogoji za obarjanje ne povzročijo ireverzibilne izgube encimske aktivnosti. Najboljši obarjalni reagent ima najvišjo zmožnost vrnitve začetne aktivnosti encima.

Slike 4 – 25 do 4 – 27 prikazujejo tri različne stopnje obarjanja proteina ob dodatku različnih obarjalnih reagentov. Iz njih je razvidna intenzivnost obarjanja encima ob dodatku različnih topil. Slika 4 – 25 prikazuje primer obarjalnega reagenta, ki ne povzroči obarjanja proteina. Po centrifugiranju namreč ostaneta dve tekoči fazi neizoborjenega encima in topila, ki se med seboj ne mešata.



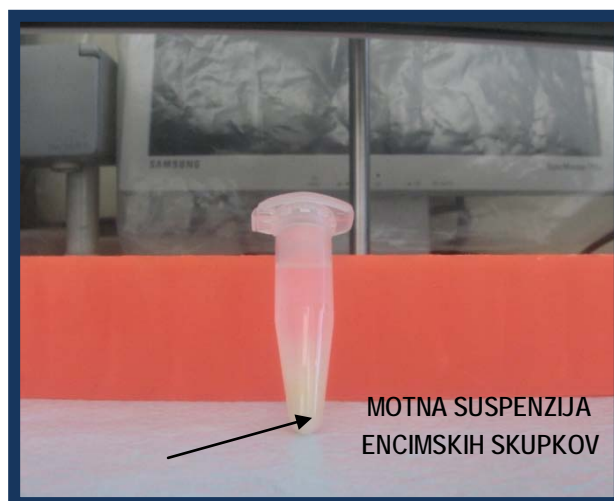
Slika 4 – 25: Obarjanje HRP v etanolu (podobno v metanolu, *t*-butanolu in nasičeni amonijevi soli).

Slika 4 – 26 prav tako kaže primer obarjalnega reagenta, ki ne povzroči pravega obarjanja. V tem primeru je prišlo do konformacijske spremembe v strukturi encima, ki je največkrat nepovraten proces. Encim v stiku s tovrstnim obarjalnim reagentom koagulira.



Slika 4 – 26: Obarjanje HRP v tetrahidrofuranu.

Na sliki 4 – 27 je prikazan primer pravega obarjanja proteina ob dodatku ustreznega obarjalnega reagenta. Pri tem nastane motna suspenzija. Po ločevanju encimskih skupkov s centrifugiranjem nastane oborina agregiranega ali izoborjenega encima, nad njo pa ostane tekoča faza supernatanta.

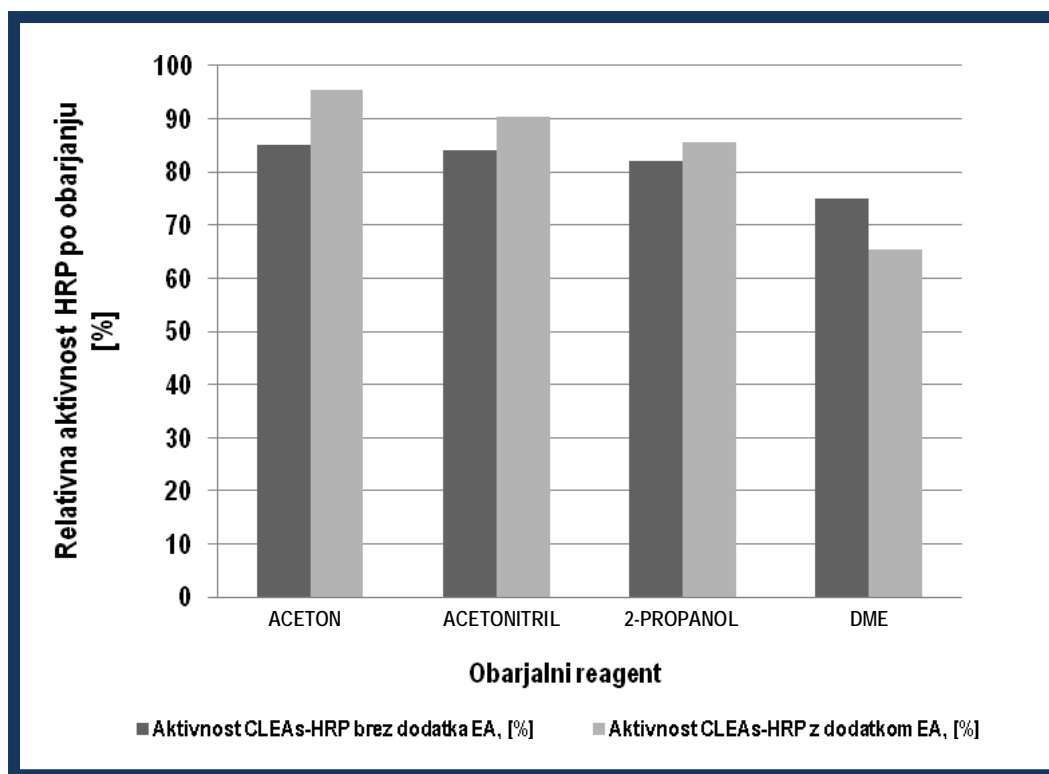


Slika 4 – 27: Obarjanje HRP v acetonu (podobno v acetonitrilu, 2-propanolu in DMEtOH).

Na osnovi kvalitativne ocene obarjalne reakcije smo ugotovili, da se je encim HRP uspešno izoboril v naslednjih obarjalnih reagentih: acetonu, 2-propanolu, acetonitrilu in DMEtOH. Navedeni obarjalni reagenti so bili izbrani za kvantitativno oceno obarjanja encima HRP. V našem primeru smo izbrali naslednja organska topila: aceton, acetonitril, DMEtOH in 2-propanol. Količina obarjalnega reagenta je ostala vedno nespremenjena. Med reakcijo obarjanja se je encim HRP počasi izločeval iz suspenzije, kar se je odražalo v povečani motnosti ali turbidnosti suspenzije. Tako izoborjeni encim v obliki skupkov smo ponovno resuspendirali s fosfatnim pufrom in mu določili aktivnost. S preverjanjem aktivnosti resuspendiranega encima smo ugotovili, kateri obarjalni reagent je optimalen za popolno obarjanje encima brez pojava deaktivacije encima. Pri tem je potrebno poudariti dejstvo, da se med reakcijo obarjanja encim vedno ne obori v aktivno obliko. Obstaja velika verjetnost, da encim precipitira v neaktivno obliko, katera postane ponovno aktivna šele po resuspenziji skupkov z ustrezno pufersko raztopino.

Reakcija obarjanja encima HRP je bila ponovljena tudi v prisotnosti stabilizacijskega proteina, albumina iz kokošjih jajc (EA). V splošnem je znano, da obarjanje encima v prisotnosti inertnega, stabilizacijskega proteina izboljša stabilnost encima. Dodatek proteina albumina olajša proces nastajanja encimskih skupkov, še posebno v tistih primerih, pri katerih je koncentracija encima zelo nizka ali je aktivnost encima občutljiva na količino GA, ki je potrebna za zamreženje encimskih skupkov.

Rezultati, ki ponazarjajo relativne aktivnosti resuspendiranih skupkov, so podani na sliki 4 – 28.



Slika 4 – 28: Relativna aktivnost resuspendiranih skupkov po obarjanju encima HRP (4 mg mL^{-1}) z izbranimi obarjalnimi reagenti in ob dodatku stabilizacijskega proteina albumina (EA, 4 mg mL^{-1}). Aktivnost encima smo preverili z encimskim testom na osnovi oksidacije o-dianisidina.

Ugotovljeno je bilo, da je bila aktivnost resuspendiranega encima, predhodno oborjenega v acetonu, acetonitrilu in 2-propanolu najvišja. V primeru uporabe topila DMEtOH je bila zabeležena nižja aktivnost encima HRP (75 %). Relativna aktivnost encima HRP po resuspenziji skupkov, v primeru obarjanja HRP v acetonu, je bila 85 %. V primeru obarjanja HRP v acetonitrilu je bila relativna aktivnost resuspendiranih skupkov 84 %, v 2-propanolu pa 82 %. Na osnovi rezultatov lahko sklepamo, da je med reakcijo obarjanja prišlo do delne izgube aktivnosti ali denaturacije encima HRP, kajti aktivnost resuspendiranega encima ni bila v nobenem primeru 100 %.

Zato smo proučevali vpliv dodatka stabilizacijskega proteina EA na aktivnost encima HRP. V ta namen smo pred začetkom reakcije obarjanja koimobilizirali albumin EA z encimom HRP v razmerju 1:1. V predhodni študiji vpliva koimobilizacije inertnega proteina albumina, ki jo je izvedel Perez s sodelavci (2009), so dokazali, da je prav to razmerje optimalno za izboljšanje stabilnosti CLEAs. Študija je bila narejena na primeru encima kloroperoksidaze. Kloroperoksidaza je strukturno zelo podobna encimu HRP, sploh pa v razporeditvi in gostoti reaktivnih aminokislinskih preostankov Lizina, ki so ključni v procesu zamreženja molekul HRP encima v končno obliko CLEAs (Gajhede idr., 1997).

Obarjanje encima v prisotnosti EA je bilo narejeno z naslednjimi obarjalnimi reagenti: aceton, acetonitril, DMEtOH in 2-propanol. Po zaključeni reakciji obarjanja je bila izmerjena aktivnost resuspendiranih skupkov.

Medtem ko je bila aktivnost resuspendiranih skupkov v odsotnosti stabilizacijskega proteina EA 85 %, je bila aktivnost resuspendiranih skupkov v prisotnosti EA 96 %. To velja v primeru izbire acetona kot obarjalnega reagenta. Za ostala topila je bila aktivnost resuspendiranih skupkov nižja, v primeru acetonitrila je bila 90 %, 2-propanola 86 % in DMEtOH pa 66 %.

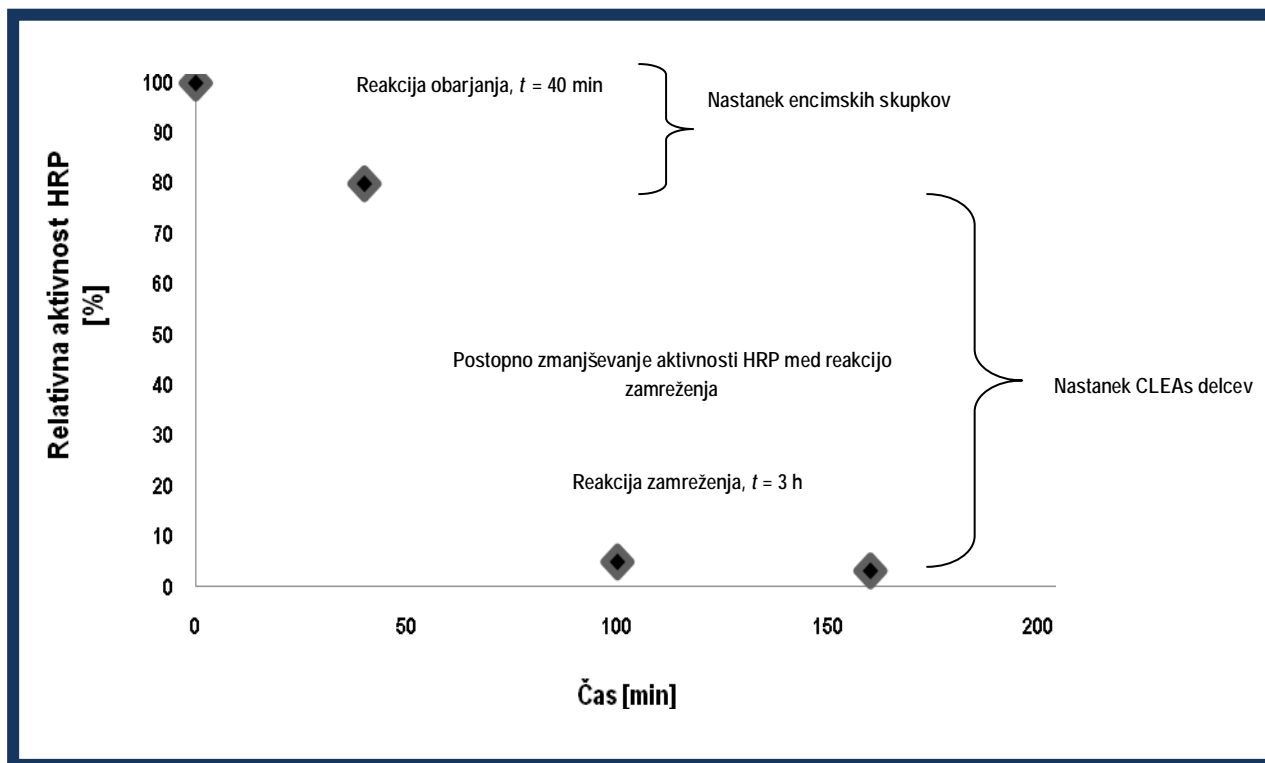
Namesto proteina EA se lahko uporabi tudi albumin iz govejega seruma (BSA) kot ogrodni protein za izboljšanje stabilnosti CLEAs (Shah idr., 2006). Z dodatkom proteina BSA se poveča gostota aminokislinskih preostankov Lizina, koncentracija proteina in posledično tudi koncentracija prostih amino skupin za popolno zamreženje molekul encima (Shah idr., 2006; Tyagi idr., 1999).

4.2.1.3 Reakcija zamreženja. Naslednji korak pri pripravi CLEAs je reakcija zamreženja encimskih skupkov, izoblikovanih v predhodni stopnji obarjanja proteina iz raztopine ob dodatku optimalnega reagenta. V našem primeru, sta si obe stopnji, obarjanje in zamreženje, sledili zaporedno. Pomeni, da smo najprej encim HRP izoborili v obarjalnem reagentu in pustili, da reakcija obarjanja traja 40 min pri intenzivnem mešanju. Po navedenem času smo v nastalo suspenzijo encimskih skupkov neposredno dodali še določeno količino mrežnega povezovalca GA (Migneault idr., 2004; Fernandez-Lafuente idr., 1995). V nedavni študiji so bile navedene ugotovitve glede zaporedja poteka obeh stopenj, obarjanja in zamreženja. Ugotovljeno je bilo, da zaporedje dodajanja ustreznega obarjalnega reagenta in mrežnega povezovalca nima večjega vpliva na končno aktivnost CLEAs (Aytar in Bakir, 2008). Najverjetneje zato, ker je reakcija obarjanja hitrejša od reakcije zamreženja. Podobno velja tudi za vpliv temperature poteka priprave CLEAs, in sicer, da temperatura, pri kateri so sintetizirani CLEAs delci nima nobenega vpliva na aktivnost CLEAs (Schoevaart idr., 2004).

Po dodatku mrežnega povezovalca, GA, v suspenzijo encima nastanejo netopni in katalitično aktivni CLEAs delci zaradi prisotnosti zadostnega števila prostih amino skupin za uspešno CLEAs. Zadostno število prostih amino skupin na površini molekule encima ima dodatno vlogo pri zaščiti strukture encima v času reakcije zamreženja, saj so mrežni povezovalci v večini primerov za encim toksični (Shah idr., 2006; Tyagi idr., 1999). Po zaključeni reakciji zamreženja je bilo potrebno dodati še reducent borohidrid (NaBH_3CN), ki je zagotovil, da kovalentna vez, ki nastane med posamezno molekulo encima in mrežnim povezovalcem, ni razpadla v obratnem procesu od reakcije zamreženja, to je reakcija hidrolize (Walt in Agayn, 1994).

V CLEAs-HRP so molekule encima medsebojno tesno povezane z inter- in intramolekularnimi vezmi, zaradi katerih nastane omejen prenos snovi znotraj CLEAs delcev. Proučevanje vpliva koncentracije GA v vlogi mrežnega povezovalca na končno aktivnost CLEAs smo izvedli z naslednjimi koncentracijami GA: 0,2 %, 0,5 %, 1 %, 1,2 %, 1,4 %, 1,6 %, 1,8 % in 2 % (v/v). Aktivnost smo prvotno preverili z encimskim testom na osnovi reakcije oksidacije o-dianisidina. V danem primeru CLEAs – HRP delci niso pokazali prave aktivnosti. Predvidevali smo, da je prišlo do oviranega prenosa snovi, zato je tudi aktivnost v CLEA preparatu s hitrim encimskim testom bila težko določena ali izmerljiva. Obstajala je tudi možnost, da so CLEAs delci med reakcijo zamreženja izgubili aktivnost zaradi škodljivega vpliva GA na molekule encima HRP. V ta namen smo izdelali časovno krivuljo poteka priprave CLEAs. Aktivnost HRP v posameznih stopnjah priprave CLEAs (tj. obarjanja in zamreženja) smo zasledovali s hitrim encimskim testom na osnovi reakcije o-dianisidina. Da smo preverili neaktivnost CLEAs delcev, morebiti zaradi denaturacije encima ali prisotnosti omejenega prenosa snovi, smo določili aktivnost HRP po zaključku vsake posamezne stopnje pri pripravi CLEAs. Slika 4 – 29 prikazuje aktivnost HRP v posameznih stopnjah priprave CLEAs. Pred pričetkom merjenja

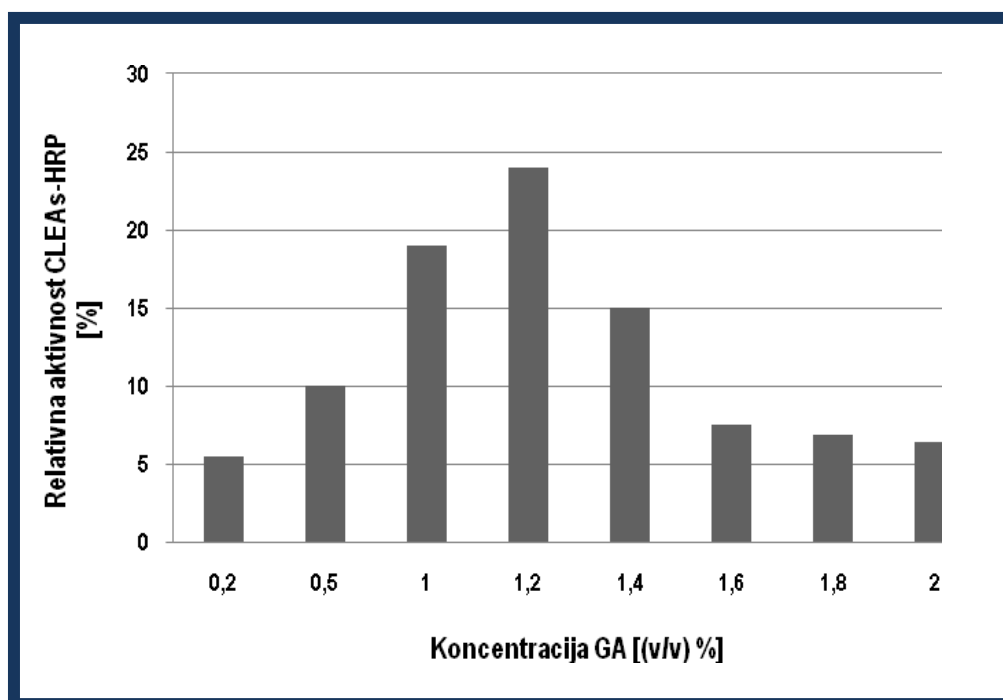
aktivnosti encima, smo delce v obliki skupkov, ki so nastali med reakcijo zamreženja, še dodatno razbili z intenzivnim mehanskim mešanjem. Na sliki je dobro razvidno, da aktivnost HRP s časom upada.



Slika 4 – 29: Relativna aktivnost encima HRP v odvisnosti od posameznih časovnih intervalov pri sintezi CLEAs-HRP pri sobni temperaturi. Koncentracija GA je bila 1 % (v/v).

Znatno zmanjšanje aktivnosti CLEAs delcev je bilo zaslediti po zaključeni reakciji zamreženja kot prikazuje slika 4 – 29. Pojav deaktivacije encima HRP v obliki CLEAs delcev je lahko posledica izgube fleksibilnosti encima zaradi poškodbe aminokislinskih preostankov v aktivnem mestu encima po dodatku mrežnega povezovalca ali zaradi pojava oviranega prenosa snovi po daljšem času reakcije zamreženja. V tem primeru je uporaba hitrega encimskega testa za določanje aktivnosti encima neučinkovita, kajti hitri encimski testi ne pokažejo dejanske aktivnosti v CLEAs delcih.

Aktivnost CLEAs je močno pogojena s koncentracijo mrežnega povezovalca (slika 4 – 30). Prikazano je, da z naraščanjem koncentracije GA aktivnost CLEAs prav tako narašča do določene koncentracije mrežnega povezovalca. Dejstvo je, da z naraščanjem koncentracije GA nastane večje število CLEAs delcev med zamreženjem iz enake količine encima. Ugotovljeno je bilo, da so pri višji uporabljeni koncentraciji mrežnega povezovalca CLEAs delci bolj strukturirani in imajo bolj enakomerno obliko in velikost. Pri nižjih koncentracijah mrežnega povezovalca so CLEAs delci po velikosti in obliki neenakomerno izoblikovani in zato neurejeni (Aytar in Bakir, 2008). Z naraščanjem koncentracije mrežnega povezovalca se poroznost CLEAs delcev prav tako povečuje, kar vodi v izboljšanje prenosa snovi (substratov in produktov) v CLEAs delcih.



Slika 4 – 30: Relativna aktivnost CLEAs-HRP v odvisnosti od koncentracije GA. CLEAs smo sintetizirali pri naslednjih pogojih: 4 mg mL⁻¹ HRP, 4 mg mL⁻¹ EA in 90 % (v/v) aceton kot obarjalni reagent. Aktivnost smo merili z encimskim testom na osnovi reakcije oksidacije o-dianisidina.

Na osnovi dobljenih rezultatov je bila relativna aktivnost CLEAs pri koncentraciji GA 1,2 % (v/v) le 24 %. Aktivnost, v tem primeru, je bila izmerjena s hitrim encimskim testom na osnovi reakcije o-dianisidina. Pri nižjih koncentracijah GA smo zabeležili še nižjo aktivnost v CLEAs, in sicer pri koncentraciji GA 1 % (v/v) je bila aktivnost 19 %; pri GA 0,5 % (v/v) je bila 10 % (v/v) in pri GA 0,2 % (v/v) le 5,5 %.

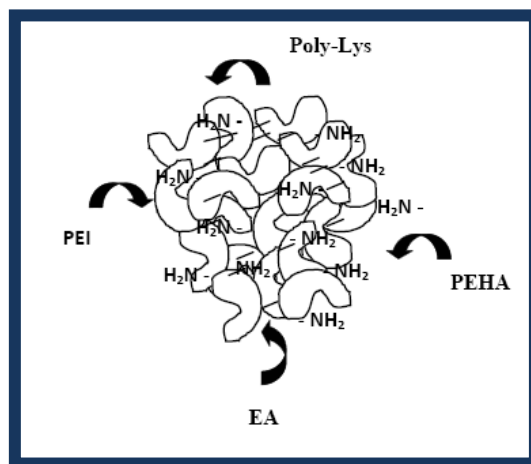
Višje koncentracije mrežnega povezovalca omogočajo hitrejši potek reakcije zamreženja encimskih skupkov, istočasno lahko visoke koncentracije mreženega povezovalca poškodujejo encim tako, da mu zmanjšajo aktivnost. Do koncentracije GA 1,2 % (v/v) je aktivnost CLEAs-HRP naraščala in nato začela upadati z nadaljnjim naraščanjem koncentracije mrežnega povezovalca. Pri koncentraciji GA 2 % (v/v) je bila relativna aktivnost CLEAs-HRP nižja v primerjavi s CLEAs aktivnostjo pri nižjih koncentracijah GA.

Potrebno je izpostaviti tudi sledeče dejstvo, da je zmanjšanje aktivnosti encima po postopku imobilizacije posledica izgube ali zmanjšane reaktivnosti ključnih funkcionalnih skupin za aktivno delovanje encima. Zmanjšana aktivnost je lahko posledica tudi pojava oviranega prenosa snovi med delci CLEAs-HRP (Tardioli idr., 2006). V tem primeru je izguba aktivnosti odvisna od hitrosti reakcije v encimskem testu. Z zelo hitrimi (npr.: kolorimetričnimi testi) je navidezna izguba aktivnosti v CLEAs delcih lahko zelo velika. V nasprotnem primeru, ko se meri aktivnost s počasnejšim encimskim testom, se navidezni pojav oviranega prenosa snovi zmanjša ali celo izgubi, zato je aktivnost CLEAs delcev višja.

Optimizacijo koncentracije mrežnega povezovalca GA smo zato ponovno izvedli pri naslednjih koncentracijah GA: 0,2 %; 0,5 %; 1 %; 1,2 %; 1,4 %; 1,6 %; 1,8 % in 2 % (v/v). Tokrat smo aktivnost CLEAs-HRP delcev izmerili z encimskim testom na osnovi reakcije

oksidacije 4 – AAP, ki je počasnejša od reakcije na osnovi o-dianisidina. Želeli smo preveriti ali je encimski test na osnovi 4-AAP bolj primeren za določevanje aktivnosti v CLEAs-HRP (podpoglavje 3.3.4.2, tabela 3 – 1).

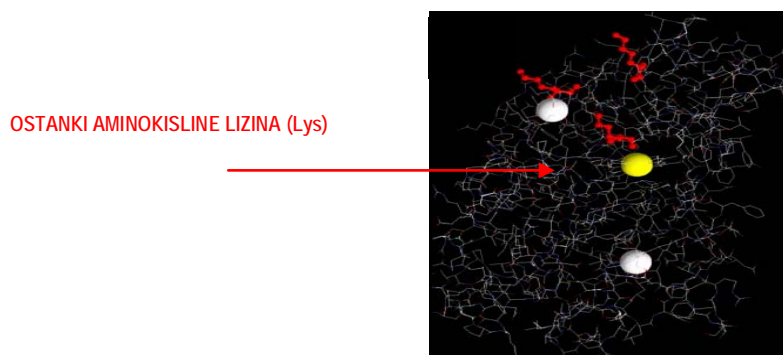
4.2.1.4 Funkcionalizacija površine encima HRP s poliamino funkcionalnimi aditivi. Površinska predelava ali funkcionalizacija površine encima z dodatnimi funkcionalnimi skupinami (slika 4 – 31) je pomembna predstopnja pri sintezi stabilnih in visoko katalitično aktivnih CLEAs.



Slika 4 – 31: Funkcionalizacija površine CLEAs z različnimi funkcionalnimi aditivi: protein albumin (EA); raztopina Poli-L-Lizin hidrobromina (PolyLys); polietilenimini (PEI 60 in 600 kDa); pentaetilenheksanamin (PEHA).

Metoda priprave CLEAs dovoljuje koimobilizacijo različnih inertnih proteinov in sintetičnih polimerov, predvsem v vlogi donorjev prostih amino skupin za površinsko funkcionalizacijo encima v CLEAs delcih.

Encim HRP ima samo pet prostih amino skupin, od teh so tri proste amino skupine, ki se nahajajo neposredno na površini encima (slika 4 – 32).



Slika 4 – 32: Tridimenzionalna (3D) struktura encima HRP z razpoložljivimi aminokislinskimi preostanki Lizina (LYS) (Torabi idr., 2007).

V ta namen smo izvedli študijo vpliva različnih funkcionalnih aditivov kot so raztopina poli-L-Lizin hidrobromida (PolyLys), polietileniminov dveh različnih molskih mas (PEI 60 in 600 kDa) in pentaetilenheksanamina (PEHA). V primeru uporabe raztopine poli-L-Lizin hidrobromida in PEI 60 je bila aktivnost CLEAs-HRP zelo podobna, medtem ko je bila z dodatkom PEI 600 med procesom koimobilizacije encima HRP v času reakcije obarjanja končna aktivnost CLEAs-HRP višja (tabela 4 – 6).

Tabela 4 – 6: Relativna aktivnost CLEAs-HRP z dodatkom poli-L-Lizin in PEI aditivov.

Donor amino skupine	Relativna aktivnost v CLEAs, [%]	Aktivnost v supernatantu, [%]	Aktivnost po tretjem spiranju CLEAs, [%]
/	1	71	8
Poli-L-Lizin	7	50	1
PEI (60 kDa)	7,5	11	2
PEI (600 kDa)	14	13	4

Opomba: Poli-L-Lizin (52 nmol); PEI (16 nmol); EA (46 nmol); aceton (900 μ L); GA (58 μ L); NaBH₃CN (100 mM). Encimski test na osnovi oksidacije 4-AAP.

Nezadostno število prostih amino skupin z dodatkom Poli-L-Lizin raztopine in PEI aditivov med koagregacijo je pripomoglo k temu, da je bila reakcija zamreženja neučinkovita. Iz virov je znano, da dodatek Poli-L-Lizin raztopine poenostavi nastajanje CLEAs skupkov predvsem na primeru bolj elektronegativnih encimov, to je encimov z nizko izoelektrično točko. Sinteza CLEAs iz encima proteaze V8 je bila s koimobilizacijo poli-L-Lizina zelo učinkovita (Honda idr., 2006). Koprecipitacija encima HRP s PEI funkcionalnimi aditivi, ki vsebujejo veliko število primarnih amino skupin, je prav tako že bila preizkušena pri sintezi CLEAs s proteini z omejenim številom aminokislinskih preostankov iz Lizina (Gallego-Lopez idr., 2005).

Postopek imobilizacije encima HRP je povzročil zmanjšano delovanje encima HRP tudi s souporabo različnih funkcionalnih stabilizatorjev. Potrebno je poudariti, da proces imobilizacije encima na podlagi kovalentne vezave spremeni nativno strukturo encima, kar vodi v okrnjeno delovanje imobilizirane oblike encima (Zhao, 2004).

V vseh primerih so bile relativne aktivnosti med 7 % in 14 %. Uhajanje encima iz CLEAs strukture med posameznim spiranjem nakazuje na dejstvo, da encim pri uporabljeni koncentraciji GA in v prisotnosti funkcionalnih aditivov ni bil učinkovito zamrežen. V primeru, ko encim HRP ni bil koagregiran s poli amino aditivom, je bila aktivnost CLEAs-HRP komaj zaznavna. Skoraj vsa aktivnost je prešla v tekočo fazo supernatanta po spiranju nastalih CLEAs delcev. Tudi z zviševanjem koncentracije GA od 1,2 % do 2 % (v/v) nismo dosegli višje aktivnosti v CLEAs delcih, čeprav je bilo uhajanje encima v posamezne tekoče faze spiranja zmanjšano. Navedene ugotovitve so nas privedle do zaključka, da uporabljeni funkcionalni aditivi za funkcionalizacijo površine HRP encima s primarnimi amino skupinami niso primerni za pripravo visoko stabilnih CLEAs-HRP delcev. Zato smo preizkusili še koagregacijo encima HRP z molekulami PEHA, za katerega je znano, da izboljša stabilnost končne oblike CLEAs (Schoevaart idr., 2006). Tudi v našem primeru je bila končna aktivnost CLEAs-HRP s koagregacijo molekul PEHA med reakcijo obarjanja, v primerjavi z drugimi funkcionalnimi aditivi, višja.

Sintezo CLEAs-HRP smo izvedli v prisotnosti PEHA pri naslednjih koncentracijah mrežnega povezovalca od 0,2 % do 2 % (v/v). Rezultati so predstavljeni v tabeli 4 – 7.

Tabela 4 – 7: Aktivnost CLEAs-HRP z dodatkom PEHA pri različnih koncentracijah GA.

Koncentracija GA [% (v/v)]	Relativna aktivnost v CLEAs [%]	Aktivnost v supernatantu [%]	Aktivnost po tretjem spiranju CLEAs [%]
0,2	5	14	5
0,5	19	11	0
1,0	62	9	0
1,2	83	1	0
1,4	36	0	0
1,6	16	0	0
1,8	5	0	0
2,0	2	0	0

Opomba: HRP (4 mg mL⁻¹, 100 µL); PEHA (100 mM, 200 µL); EA (46 nmol, 100 µL); aceton (900 µL); NaBH₃CN (100 mM). Encimski test na osnovi oksidacije 4-AAP.

Pričakovati je bilo, da bo z naraščanjem koncentracije GA encim HRP prenehal uhajati v posamezne faze spiranja (Schoevaart idr., 2004). V posameznih tekočih frakcijah izpiranj pri različnih koncentracijah GA zato nismo določili nobene sledi aktivnosti neimobiliziranega encima HRP, izjemoma v primeru koncentracije GA 0,2 % (v/v), kjer je bila aktivnost po tretjem spiranju CLEAs-HRP le 5 %. Aktivnost v frakciji supernatanta pri različnih koncentracijah GA je znašala od 0 do 14 %. Najnižjo aktivnost v supernatantu smo zasledili pri uporabi koncentracije GA 1,2 % in je bila ocenjena na vrednost 1 %. V supernatantu po tretjem spiranju CLEAs-HRP delcev pri isti koncentraciji GA ni bilo zaslediti nobene aktivnosti preostanka encima HRP, ki se ni vezal v CLEAs strukturo. Pri koncentraciji GA od 1,4 do 2 % (v/v) nismo določili nobene aktivnosti v supernatantu po prvem in tretjem spiranju CLEAs-HRP delcev, za kar sklepamo, da je bilo zamreženje encimskih skupkov zelo intenzivno, saj ni bilo zaslediti nobenega uhajanja encima. Pri višjih koncentracijah GA je bila aktivnost CLEAs-HRP nižja. Na osnovi rezultatov smo

ugotovili, da je optimalna koncentracija GA 1,2 % (v/v). Aktivnost smo tokrat izmerili z encimskim testom na osnovi reakcije oksidacije 4-AAP, ki je bolj primeren za določevanje aktivnosti imobilizirane HRP. Aktivnost CLEAs-HRP pri koncentraciji 1,2 % (v/v) in z dodatkom PEHA je bila 83 %. Zato sledi zaključek, da je koprecipitacija encima HRP s funkcionalnim aditivom PEHA najboljša, saj so bili v danem primeru delci CLEAs-HRP najbolj stabilni in visoko aktivni.

4.2.1.5 Vpliv dodatka reducenta na pripravo CLEAs-HRP. Proučevali smo tudi vpliv dodatka reducenta po zaključeni reakciji zamreženja na končno aktivnost CLEAs-HRP preparatov. V ta namen smo si pripravili več različnih CLEAs-HRP preparatov, ki so vsebovali naslednja dva reducenta, raztopino NaBH_3CN ali NaBH_4 . Za primerjavo smo pripravili tudi CLEAs-HRP brez dodatka reducenta. Rezultati so primerjani v tabeli 4 – 8.

Tabela 4 – 8: Aktivnost CLEAs-HRP preparatov z različnimi reducenti.

Reducent	Relativna aktivnost v CLEAs, [%]	Aktivnost v supernatantu, [%]	Aktivnost po tretjem spiranju CLEAs, [%]
-	16	14	0
NaBH_3CN	83	1	0
NaBH_4	46	0	0

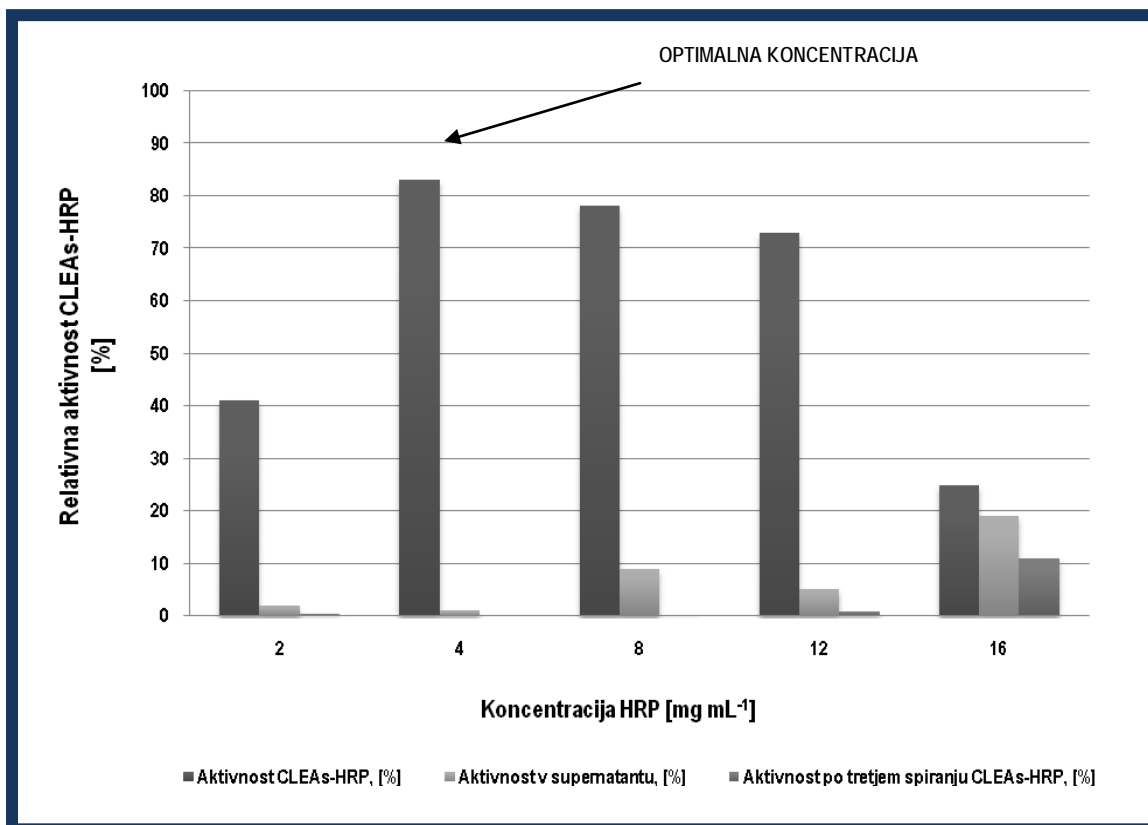
Opomba: HRP (4 mg mL^{-1} , $100 \text{ } \mu\text{L}$); PEHA (100 mM , $200 \text{ } \mu\text{L}$); EA (46 nmol , $100 \text{ } \mu\text{L}$); aceton ($900 \text{ } \mu\text{L}$); GA 1,2 % (v/v); NaBH_3CN ($126 \text{ } \mu\text{L}$, 100 mM); NaBH_4 ($126 \text{ } \mu\text{L}$, 20 mM). Encimski test na osnovi oksidacije 4-AAP.

V primeru sinteze CLEAs-HRP brez dodatka reducenta je bila aktivnost encimskega preparata komaj 16 %, prav tako delež neimobiliziranega encima je bil po spiranju CLEAs-HRP najvišji. Aktivnost v supernatantu je bila 14 %. V poskusih sinteze CLEAs-HRP z dodatkom dveh različnih reducentov, od katerih je NaBH_4 najmočnejši, nismo zasledili nobene aktivnosti encima po spiranju CLEAs-HRP. Le v frakciji supernatanta, ko smo uporabili raztopino NaBH_3CN je bila aktivnost 1 % in aktivnost CLEAs-HRP 83 %. Četudi dodatek reducenta NaBH_4 ni povzročil uhajanja encima v frakcijo supernatanta, je bila aktivnost CLEAs-HRP nižja v primerjavi z uporabo reducenta NaBH_3CN ; le-ta je znašala 46 %. Optimalen reducent je torej NaBH_3CN . Tudi suspenzija CLEAs postane z dodatkom mrežnega povezovalca in reducenta po barvi temnejša, kot prikazuje slika 4 – 33.



Slika 4 – 33: Suspenzija CLEAs-HRP.

4.2.1.6 Vpliv koncentracije encima na CLEAs-HRP. Zadnji optimizacijski parameter za sintezo CLEAs je iskanje optimalne koncentracije encima HRP. CLEAs smo pripravili iz encima HRP z naslednjimi začetnimi koncentracijami 2 mg mL⁻¹, 4 mg mL⁻¹, 8 mg mL⁻¹, 12 mg mL⁻¹ in 16 mg mL⁻¹. Sinteza CLEAs preparatov je potekala pri optimalnih pogojih reakcije obarjanja in zamreženja: v acetonu (900 µL), koncentraciji GA 1,2 % (v/v), z dodatkom proteina albumina (100 µL) in z dodatkom PEHA (100 mM, 200 µL). Na koncu zamreženja smo dodali še reducent NaBH₃CN. Rezultati vpliva koncentracije encima HRP na sintezo CLEAs so prikazani na sliki 4 – 34.



Slika 4 – 34: Optimizacija koncentracije encima za sintezo CLEAs-HRP.

Rezultati prikazujejo relativno aktivnost CLEAs v odvisnosti od koncentracije encima HRP. Najvišjo relativno aktivnost CLEAs-HRP smo dobili pri koncentraciji encima HRP 4 mg mL⁻¹, in sicer je ta znašala 83 %. Z naraščanjem koncentracije encima HRP je začela aktivnost upadati in znaten del encima, ki se ni imobiliziral, je ostal v supernatantu po spiranju CLEAs preparatov. Aktivnost CLEAs je bila najnižja pri koncentraciji encima 16 mg mL⁻¹ in je bila 25 %. Pri dani koncentraciji je bil zabeležen največji delež encima v posameznih spiranjih CLEAs preparata, in sicer v supernatantu po ločevanju CLEAs je bila aktivnost 19 % ter v supernatantu po tretjem spiranju pa 11 %. Pri koncentraciji encima 2 mg mL⁻¹ je bila aktivnost v frakcijah po ločevanju CLEAs prav tako nizka in aktivnost CLEAs-HRP preparata pa 41 %. Sledi zaključek, da je optimalna koncentracija za pripravo CLEAs-HRP 8 mg mL⁻¹.

4.2.1.7 Imobilizacija hrenove peroksidaze v obliki zamreženih encimskih skupkov. CLEAs so bili pripravljene iz HRP z zamreženjem encimskih skupkov z GA. V tabeli 4 – 9 so prikazani najnovejši primeri imobilizacije HRP na različne nosilce s souporabo mrežnega povezovalca GA. Aktivnost imobilizirane HRP v obliki CLEAs smo primerjali z ostalimi encimskimi preparati iz imobilizirane HRP. Iz tabele je razvidno, da so CLEAs-HRP najbolj aktivni.

Tabela 4 – 9: Primerjava aktivnosti posameznih encimskih preparatov iz imobilizirane HRP.

Encimski nosilec	Aktivnost [%]	Referenca
Steklene kroglice	78	Gómez et al., 2006
Nosilec iz perlita	11	Torabi et al., 2007
Magnetni nosilec	79	Bayramoğlu, 2008
CLEAs-HRP	83	Šulek idr., 2010

5 – ZAKLJUČKI

Nanostrukturirani materiali predstavljajo med sodobnimi materiali pomembno pridobitev, saj predstavljajo idealen substrat za imobilizacijo ene ali večih bioaktivnih učinkovin, kot je npr. biokatalizator. Biokatalitični sistem, sestavljen iz imobiliziranega biokatalizatorja in nosilca na osnovi nanomateriala, je osnovni element pri izdelavi učinkovite biosenzorske naprave. Največkrat uporabljeni encimski nosilci na osnovi nanostrukturiranih materialov so nanodelci, nanovlakna, polporozne polimerne matrice ali kar zamreženi stabilni encimski skupki. Velikost in oblika nanostrukturiranih materialov ter strukturiranost por v polimernih nosilcih pa odločajo o primernosti uporabe posameznega nosilca kot tudi njegovo aplikacijo.

Obstajajo različni nosilci za imobilizacijo encima. V zadnjih letih je bilo veliko pozornosti usmerjene v študij in razvoj različnih nosilcev, med katerimi je skupina kemijsko modificiranih anorganskih nosilcev najbolj obetajoča, ker kažejo nizko toksičnost in posedujejo optimalne lastnosti kot so visoka funkcionalnost in dobra biokompatibilnost. Uporaba magnetnih nosilcev za neposredno ločevanje različnih biomolekul iz medija se je v zadnjih letih drastično povečala. Praktična raba superparamagnetnih nanodelcev iz železovega oksida s primerno površinsko funkcionalizacijo je dobro zastopana v številnih aplikacijah. Dandanes je pozornost še posebej usmerjena v izdelavo visoko funkcionalnih magnetnih nanodelcev z velikostjo premera od 50 do 200 nm. Praktična uporabnost magnetnih nanodelcev je določena z njihovo nano velikostjo, ki prav tako pogojuje stabilnost in visoko specifično magnetizacijo nanodelcev. Ohranitev visoke stabilnosti in magnetnih lastnosti omogočata magnetnim nanodelcem široko področje uporabe v biomedicini in za postopke ločevanja različnih proteinov. Tehnika CLEAs je splošno priznana kot potencialno orodje za imobilizacijo različnih biokatalizatorjev. Zamreženje encimskih molekul predstavlja eno od osnovnih metod za vezavo encima, pri kateri je uporaba sintetičnega encimskega nosilca praktično nepotrebna.

Površinsko spremenjeni magnetni nanodelci, γ -Fe₂O₃/SiO₂ – AEAPTS, so bili uporabljeni kot potencialni nosilec za imobilizacijo specifičnega biokatalizatorja ChOx. Tovrstni magnetni nosilec, ki spada v skupino nanostrukturiranih materialov, je bil prvič uporabljen za imobilizacijo ChOx. Encim je bil uspešno kovalentno vezan na površino kemijsko spremenjenih magnetnih nanodelcev, predhodno aktiviranih z glutaraldehydom. Površinska funkcionalizacija magnetnih nanodelcev je potekala v dveh stopnjah pri striktno reguliranih termodinamskih pogojih. Pri primarni površinski funkcionalizaciji nanodelcev s silikatno prevleko smo dosegli popoln nanos silike na površino nanodelcev, medtem ko smo pri sekundarni funkcionalizaciji, v reakciji silanizacije, dosegli le 40 % prekritje površine magnetnih nanodelcev z izbranim aminosilanom. Aktivacijo površine magnetnih nanodelcev smo izvedli s pomočjo glutaraldehyda. Optimalni pogoji za reakcijo zamreženja površine magnetnih nanodelcev z glutaraldehydom so bili pri pH medija 8, času zamreženja 2 h in koncentraciji GA 2,9 % (v/v). Pri danih optimalnih pogojih smo dosegli najvišjo učinkovitost imobilizacije ChOx na nosilec, ki je znašala 92 %. Koncentracija encima je bila 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Imobilizirana ChOx je pokazala dobro aktivnost, ta je bila ocenjena na 57 %. Ugotovili smo, da masa uporabljenega magnetnega nosilca

za imobilizacijo ni imela nobenega neposrednega vpliva na postopek ali učinkovitost imobilizacije. Zato sklepamo, da so imeli delci, ne glede na uporabljeno maso, zadostno število razpoložljivih funkcionalnih skupin za uspešno vezavo encima. Imobilizirana ChOx je pokazala tudi dobro stabilnost pri različnih testnih pogojih, kot sta variacija pH medija in temperature. Encimski preparat je pokazal tudi dobro večkratno uporabnost pri večjem številu zaporednih reakcij, ki se lahko dobro izkoristi v biomedicinske namene za določanje koncentracije holesterola.

CLEAs, kot alternativna oblika imobiliziranega encima, so bili uspešno pripravljene iz biokatalizatorja HRP. Obarjanje encima, kot prva stopnja v sintezi CLEAs, je potekalo v acetonu, ki je bil izbran kot optimalen obarjalni reagent. Optimizacija reakcije zamreženja je potekala z iskanjem optimalne koncentracije mrežnega povezovalca, GA, ki je znašala 1,2 % (v/v). Priprava CLEAs je potekala tudi z dodatkom dveh funkcionalnih aditivov, EA in PEHA. Končna aktivnost CLEAs-HRP je bila 83 %. V primerjavi s podatki iz literature je bila navedena oblika imobilizacije prvič uporabljena na primeru encima HRP, in kot takšna se je v primerjavi z drugimi uporabljenimi nosilci za vezavo HRP pokazala kot najbolj primerna, saj je bila aktivnost HRP v obliki CLEAs najvišja. CLEAs-HRP se lahko uporabijo kot potencialno orodje v biosenzorskih tehnologijah.

Obe metodi predstavljata način za imobilizacijo biokatalizatorja, čeprav oba načina imobilizacije nista vedno primerna za vsak encim. Priprava imobiliziranega encima, z ali brez nosilca, je odvisna od lastnosti encima, narave nosilca in možnosti uporabe tako pripravljene oblike imobiliziranega encima. V primeru uporabe funkcionalnih magnetnih nanodelcev, kot nosilcev za biokatalizator, predstavljajo nanokompozitni delci nebiokatalitično maso, ki ni aktivna, medtem ko so CLEAs delci sestavljeni izključno iz molekul encima, ki ohranijo svojo aktivnost. V tem primeru se trden nosilec šteje kot dodaten strošek, saj je potrebno dosledno načrtovanje posameznih stopenj za pripravo magnetnega nanokompozitnega nosilca. Metoda CLEAs je v primerjavi z metodo imobilizacije biokatalizatorja na nosilec enostavnejša. Pri metodi CLEAs predstavlja glavni strošek sam encim, saj je nemogoče zamrežiti majhne količine encima. Zato je CLEAs tehnologija primerna izključno za pripravo imobiliziranega encima s koncentracijo nad 1 mg mL⁻¹. Pri imobilizaciji biokatalizatorja na magnetni nosilec pa je možno uporabiti zelo nizke koncentracije encima, tudi pod 1 mg mL⁻¹. Obe metodi uporabljata mrežni povezovalce za zamreženje površine nosilca in encima, s to razliko, da pri metodi CLEAs mora biti uporaba mrežnega povezovalca smotrna, saj previsoka koncentracija mrežnega povezovalca lahko poškoduje encim. V primeru imobilizacije biokatalizatorja na nosilec je potrebno zamrežiti le površino nosilca, zato je površina encima podvržena manjšim strukturnim spremembam, ki bi povzročile postopno deaktivacijo encima. Podobnost med obema metodama je ta, da je potrebno pri obeh načinih imobilizacije vnesti funkcionalne aditive, ki ojačijo funkcionalnost ali reaktivnost tako CLEAs delcev kot nanokompozitnih delcev za imobilizacijo biokatalizatorja. V primeru CLEAs je potrebno v CLEAs delce koimobilizirati še inerten protein za pripravo robustnega biokatalizatorja. V primeru imobilizacije biokatalizatorja na nosilec je potrebno predelati površino nosilca z večslojnim funkcionalnim plaščem, ki nosilcu daje višjo mehansko stabilnost in biokompatibilno površino za uspešno vezavo biokatalizatorja na površinsko spremenjen nanokompozitni nosilec.

6 – PERSPEKTIVA ZA NADALJNJE DELO

V zadnjem času je na področju načrtovanja nosilcev za različne bioaktivne učinkovine, med drugim tudi biokatalizatorje, razvoj usmerjen predvsem v sintezo in pripravo nanostrukturiranih materialov ali nanomaterialov. Nanomateriali imajo posebne optične in električne lastnosti, zaradi katerih postajajo vse bolj priljubljeni materiali za imobilizacijo bioaktivne substance oziroma za izboljšanje njihove stabilnosti. Poleg tega predstavljajo alternativno obliko materialov kot nosilcev bioučinkovine pri načrtovanju biosenzorja. Nanostrukturirani materiali posedujejo veliko specifično površino za boljše prileganje molekul substance, ki se veže, poleg tega se tvori posebno mikro-okolje, ki pomaga obdržati naravno aktivnost imobilizirane bioučinkovine (Zhou idr., 2006).

V nadaljevanju bi bilo smiselno razviti visoko katalitični sistem, sestavljen iz imobilizirane in koimobilizirane ChOx ter HRP. Ko-imobilizacija dveh ali več encimov za sintezo visoko aktivnega encimskega preparata je ugodna iz različnih razlogov. Zaradi neposredne bližine imobiliziranega in koimobiliziranega encima je difuzijska pot med obema encimoma krajša, kar ustvari v bližini delovanja koimobiliziranega encima ugodno mikro-okolje, obogateno s substratom. Kot posledica je difuzijski čas prehajanja substrata do aktivnega mesta ko-imobiliziranega encima krajši in je zato sistem bolj občutljiv za določevanje nizkih koncentracij substrata kot v primeru ločenih, neimobiliziranih encimov. Na takšen način bi lahko preverili potencialno vrednost obeh imobiliziranih encimov, seveda v različnih oblikah, za zaznavanje različnih ravni holesterola, prostega ali vezanega, v pravih bioloških vzorcih. Namreč oba encima igrata pomembno vlogo prav v klinični diagnostiki za kvantifikacijo holesterola. V tem primeru bi bilo vredno poizkusiti imobilizirati in koimobilizirati oba encima ali na površino magnetnih nanodelcev ali v obliki zamreženih encimskih skupkov. Smiselno bi bilo tudi preveriti stabilnost in kinetiko tako sestavljenega encimskega preparata.

7 - VIRI IN LITERATURA

Akkaya B, Sahin F, Demirel G, Tümtürk H, Functional polymeric supports for immobilization of cholesterol oxidase, *Biochemical Engineering Journal*, 43, 2009, 333 – 337.

Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC, Enzymatic determination of total serum cholesterol, *Clinical Chemistry*, 1974, 20, 470 – 475.

Arya SK, Datta M, Malhotra DB, Recent advances in cholesterol biosensor, *Biosensors and Bioelectronics* 23, 2008, 1083-1100.

Aytar BS, Bakir U, 2008, Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. *Process Biochemistry*, 43, 125-131.

Aono R, Doukyo N, Kobayashi H, Nakajima H, Horikoshi K, Oxidative bioconversion of cholesterol by *Pseudomonas* sp. strain ST-200 in a water-organic solvent two-phase system, *Applied Environmental Microbiology*, 1994, 60, 2518 – 2523.

Avnir D, Braun S, Lev O, Ottolenghi M, Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials. *Chemistry of Materials*, 6, 1994, 1605 – 1614.

Bornscheuer UT, Immobilized enzymes: how to create more suitable biocatalyst, *Angewante Chemie International Edition*, 42, 2003, 3336 – 3337.

Bayramoğlu G, Arica Yakup M, Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads, *Journal of Hazardous Materials*, 156, 2008, 148 – 155.

Berry CC, Curtis ASG, Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36, 2003, 198 – 206.

Betancor L, Lopez-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Dellamora Ortiz G, Guisan JM, Preparation of a very stable immobilized biocatalyst of glucose oxidase from *Aspergillus niger*, *Journal of Biotechnology*, 121, 2006, 284 – 289.

Bilkova Z, Slovakova M, Horak D, Lenfeld J, Churaček J, Enzymes immobilized on magnetic carriers: efficient and selective system for protein modification, *Journal of Chromatography B*, 770, 2002, 177 – 181.

Bradford MM, A Rapid and Sensitive Method for the quantitation of Microgram quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 1976, 248 – 254.

Brahim S, Narinesingh D, Elie AG, *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 2002, 973 – 981.

Branzoi V, Branzoi F, Baibarac M, The inhibition of the corrosion of armco iron in HCl solutions in the presence of surfactants of the type of n-alkyl quaternary ammonium salts, *Journal of Material Chemistry and Physics*, 65, 2000, 288 – 297.

Bulmus V, Ayhan H, Piskin E, Modified PMMA monosize Microbeads for glucose oxidase immobilization, *Chemical Engineering Journal*, 65, 1997, 71 – 76.

Cabana H, Jones JP, Agathos SN, Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals, *Journal of Biotechnology*, 132, 2007, 23 – 31.

Can K, Ozmen M, Ersoz M, Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71, 2009, 154 – 159.

Cao L, Van Rantwijk F, Sheldon RA, Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilisation of Penicillin Acylase, *Organic Letters*, 10, 2000, 1361 – 1364.

Cao L, Van Langen L, Sheldon RA, Immobilised Enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 2003, 387 – 394.

Campo A, Sen T, Lellouche J, Bruce I, Multifunctional magnetite and silica-magnetite nanoparticles: Synthesis, surface activation and applications in life sciences, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293, 2005, 33 – 40.

Caruso F, Schuler C, Enzyme multilayers on colloid particles: assembly, stability, and enzymatic activity, *Langmuir*, 16, 2000, 9595 – 9603.

Chakrabarti A, Basak S, Structural alterations of horseradish peroxidase in the presence of low concentrations of guanidinium chloride, *European Journal of Biochemistry*, 241, 1996, 462 – 467.

Chae HJ, Kim EY, In M, Improved immobilization yields by addition of protecting agents in glutaraldehyde-induced immobilization of protease, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89, 2000, 377 – 379.

Chen Z, Hsu FC, Battigelli D, Chang HC, Capture and release of viruses using amino-functionalized silica particles, *Analytica Chimica Acta*, 569, 2006, 76 – 82.

Chen D, Liao M, Preparation and characterization of YADH-bound magnetic nanoparticles, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16, 2002, 283 – 291.

Chen JP, Su DR, Latex particles with thermo-flocculation and magnetic properties for immobilization of α -chymotrypsin, *Biotechnology Progress*, 17, 2001, 369 – 375.

Chikere AC, Galunsky B, Schuhlnemann V, Kasche V, Stability of immobilized soybean lipoxygenases: influence of coupling conditions on the ionization state of the active site Fe, *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 2001, 168 – 175.

Colthup NB, Daly LH, Wiberley SE, *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, Academic Press Inc, New York, 1964.

Cornell RM, Schwertmann U, The Iron Oxides, Structures, Properties, Reactions, Occurrences and Uses, II. Izdaja, Wiley-VCH, Weinheim, 2003.

Dezotti M, Innocentini-Mei LH, Durán N, Silica immobilized enzyme catalyzed removal of chlorolignin from eucalyptus kraft effluent. *Journal of Biotechnology*, 43, 1995, 161 – 165.

Diaz JF, Balkus KJJ, Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2, 1996, 115 – 126.

Dyal A, Loos K, Noto M, Chang SW, Spagnoli C, Shafi K, Ulman A, Cowman M, Gross RA, Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on γ -Fe₂O₃ magnetic nanoparticles, *Journal of American Chemical Society*, 125, 2003, 1684 – 1685.

Fernandez-Lafuente R, Rosell CM, Rodriguez V, Guisan JM, Strategies for enzyme stabilization by intermolecular crosslinking with bifunctional reagents, *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 1995, 517 – 523.

Fernandez-Lorente G, Terreni M, Mateo C, Bastida A, Fernandez-Lafuente R, Dalmases P, Huhuet J, Guisan JM, Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: enantioselective hydrolysis of a chiral ester by immobilized *Pseudomonas* lipase, *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 2001, 389 – 386.

Fernandez-Ballester G, Gavilanes F, Albar JP, Criado M, Ferragut JA, Gonzalez-Ros JM, Adoption of β Structure by the Inactivating "Ball" Peptide of the Shaker B Potassium Channel, *Biophysical Journal*, 68, 1995, 858 – 865.

Fucks – Godec R, Površinsko aktivne snovi – surfaktanti, Strokovni članek, *Kemija v šoli*, 19, 2007, 19 – 27.

Gallego-Lopez F, Betancor L, Hidalgo A, Alonso N, Lafuente-Fernandez R, Guisan JM, *Biomacromolecules*, 6, 2005, 1839 – 1842.

Ganjidoust H, Tatsumi K, Wada S, Kawase M, Role of peroxidase and chitosan in removing chlorophenols from aqueous solution. *Water Science Technology*, 34, 1996, 151 – 155.

Gemeiner P, Materials for enzyme engineering. In: Gemeiner P (Ed) *Enzyme Engineering*. Ellis Horwood, New York, 1992, 13 – 19.

Glazer AN, Bar-Eli A, Katchaski E: Preparation and characterization of polystyrosyl trypsin. *Journal of Biological Chemistry*, 237, 1962, 1832 – 1838.

Gnanaprakash G, Mahadevan S, Jayakumar T, Kalyanasundaram P, Philip J, Raj B, Effect of initial pH and temperature of iron salt solutions on formation of magnetite nanoparticles, *Materials Chemistry and Physics*, 103, 2007, 168 – 175.

Gómez JL, Bódalo A, Gómez E, Bastida J, Hidalgo AM, Gómez M, Immobilization of peroxidase on glass beads: An improved alternative for phenol removal. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 2006, 1016 – 1022.

Gobi KV, Mizutani F, *Sensors and Actuators B*, 80, 2001, 272 – 277.

Gupta A, Kumar, Gupta M, Syntehsis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Review, Biomaterials* 26, 2005, 3995 – 4021.

Hamid M, Rehman K, Potential applications of peroxidises. *Food Chemistry*. 115, 2009, 1177 – 1186.

Honda T, Miyazaki M, Nakamura H, Maeda H, *Advanced Synthesis and Catalysis*, 348, 2006, 2163 – 2171.

Huang SH, Liao MH, Chen DH, Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles, *Biotechnology Progress*, 19, 2003, 1095 – 1100.

Ichianagi Y, Shinji M, Shu T, Mitsutoshi S, Functional magnetic nanoparticles for medical application, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 310, 2007, 2877 – 2879.

Iler R, *The Chemistry of Silica, Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry*, John Wiley&Sons, Inc., New York, 1979.

Jeong JR, Sung-Chul S, Seung-Jun L, Jong-Duk K, Magnetic properties of superparamagnetic γ -Fe₂O₃ nanoparticles prepared by coprecipitation technique, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 286, 2005, 5 – 9.

Jia H, Guangyu Z, Wang P, Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility, *Biotechnology and Bioengineering*, 84, 2003, 407 – 413.

Joshi M, Pinto R, Rao Ramgopal V, Mukherji S, Silanization and antibody immobilization on SU-8, *Applied Surface Science*, 253, 2007, 3127 – 3132.

Jungbae K, Grate JW, Wang P, Nanostructures for enzyme stabilization, *Chemical Engineering Science*, 61, 2006, 1017 – 1026 .

Kane SA, Iwuoba EI, Smyth MR, Development of a sol-gel based amperometric biosensor for the determination of phenolics, *Analyst*, 123, 1998, 2001 - 2006.

Kaul P, Stolz A, Banerjee UC, Cross-Linked Amorphous Nitrilase Aggregates for Enantioselective Nitrile Hydrolysis, *Advanced Synthesis and Catalysis*, 349, 2007, 2167 – 2176.

Kelsall R, Hamley I, Geoghegan M, *Nanoscale Science and Technology*, Wiley-VCH, 2005, Weinheim, Germany.

Kim J, Grate JW, Single-enzyme nanoparticles armored by a nanometer-scale organic/inorganic network, *Nano Letters*, 3, 2003, 1219 – 1222.

Kondo A, Murakami F, Kawagoe M, Hagashitani K, Kinetic and circular dichroism studies of enzymes adsorbed on ultrafine silica particles, *Applied and Microbial Biotechnology*, 39, 1993, 726 – 731.

Kouassi GK, Irudayaraj J, A nanoparticle-based immobilization assay for prion-kinetics study, *Journal of Nanobiotechnology*, 4, 2004, 1 – 8.

Kotha A, Raman RC, Ponrathnam S, Kumar KK, Shewale JG, Beaded reactive polymers, 2. Immobilization of penicilin G acylase on glycidyl methacrylate-divinyl benzene

copolymers of differing pore size and its distribution, *Reactive and Functional Polymers*, 28, 1996, 235 – 242.

Kubac D, Biotransformation of nitriles to amides using soluble and immobilized nitrile hydratase from *Rhodococcus erythropolis* A4, *Journal of Molecular Catalysis B*, 50, 2008, 107 – 113.

Kumar HK, Malhotra RBD, Grover SK, Co-immobilization of cholesterol oxidase and horseradish peroxidase in a sol-gel film, *Analytica Chimica Acta*, 414, 2000, 43 – 50.

Kumar A, Rajesh, Chaubey A, Grover S, Malhotra BD, Immobilization of cholesterol oxidase and potassium ferricyanide on dodecylbenzene sulfonate ion-doped polypyrrole film, *Journal of Applied Polymer Science*, 82, 2001, 3486 – 3491.

Kreit J, Lefebvre G, Germain P, Membrane-bound cholesterol oxidase from *Rhodococcus* sp. cells; production and extraction, *Journal of Biotechnology*, 1994, 33, 271 – 282.

Lario PI, Sampson N, Vrieling A, Sub-atomic Resolution Crystal Structure of Cholesterol Oxidase: What Atomic Resolution Crystallography Reveals about Enzyme Mechanism and the Role of the FAD Cofactor in Redox Activity, *Journal of Molecular Biology*, 326, 2003, 1635 – 1650.

Lee J, Lee Y, Youn J, Na H, Yu T, Kim H, Lee S, Koo Y, Kwak J, Park H, Chang H, Hwang M, Park J, Kim J, Hyeon T, Simple Synthesis of Functionalized Superparamagnetic Magnetite/Silica Core/Shell Nanoparticles and their Application as Magnetically Separable High-Performance Biocatalysts, *Biocompatible materials*, 1, 2008, 143 – 152.

Lei C, Shin Y, Liu J, Ackerman EJ, Entrapping enzyme in a functionalized nanoporous support, *Journal of the American Chemical Society*, 124, 2002, 11242 – 11243.

Li G, Liao JM, Hu GQ, Ma NZ, Wu PJ, Study of nanotube carbon modified biosensor for monitoring total cholesterol in blood, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2005, 2140 – 2144.

Li J, Peng T, Peng Y, A cholesterol biosensor based on entrapment of cholesterol oxidase in a silicic sol-gel matrix at a Prussian blue modified electrode, *Electroanalysis*, 15, 2003, 1031 – 1037.

Liao MH, Chen DH, Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability, *Biotechnology Letters*, 23, 2001, 1723 – 1727.

Liu X, Xing J, Guan Y, Shan G, Liu H, Synthesis of amino-silane modified superparamagnetic silica supports and their use for protein immobilization, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 238, 2004, 127 – 131.

Liu X, Ma Z, Xing J, Liu H, Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 270, 2004, 1 – 6.

Lopez-Serrano P, Cao L, Van Rantwijk F, Sheldon RA, Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnology Letters*, 24, 2002, 1379 – 1383.

Lucarift HR, Spain JC, Naik RR, Stone MO, Enzyme immobilization in a biomimetic silica support, *Nature Biotechnology*, 22, 2004, 211 – 213.

Martin MT, Plou FJ, Alcade M, Ballesteros AM, Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyl-transferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21, 2003, 299 – 308.

Martin MT, Plou FJ, Alcade M, Ballesteros AM, Covalent immobilization of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) in activated silica and Sepharose, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 39, 2002, 229 – 234.

Ming Ma, Yu Zhang, Wei Yu, Hao-ying Shen, Hai-qian Zhang, Ning Gu, Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 212, 2003, 219 – 226.

Makovec D, Čampelj S, Bele M, Maver U, Zorko M, Drogenik M, Jamnik J, Gaberšček M, Nanocomposites containing embedded superparamagnetic iron oxide nanoparticles and Rhodamine 6G, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 334, 2008, 74 – 79.

Mateo C, A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates, *Biotechnology and Bioengineering*, 86, 2004, 273 – 276.

MacLachlan J, Wotherspoon ATL, Ansell RO, Brooks CJW, Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications, Review, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 72, 2000, 169 – 195.

Merzel F, Janežič D, Z računalnikom do vpogleda v strukturo in gibanje molekul, Strokovni članek, *Kemija v šoli*, 19/2, 2007, 12 – 15.

Migneault I, Dartiguenave C, Vinh J, Bertrand MJ, Waldron KC, Comparison of two glutaraldehyde immobilization techniques for solid-phase tryptic peptide mapping of human hemoglobin by capillary zone electrophoresis of adsorbed proteins on aminated supports, *Electrophoresis*, 25, 2004, 1367 – 1378.

Motonka J, Faulkner LR, *Analytical Chemistry*, 65, 1993, 3258 – 3261.

Mujawar SK, Kotha A, Rajan CR, Ponrathnam S, Shewale JG, Development of tailor-made glycidyl methacrylate-divinyl benzene copolymer for immobilization of d-amino acid oxidase from *Aspergillus* species strain 020 and its application in the bioconversion of cephalosporin C, *Journal of Biotechnology*, 75, 1999, 11 – 22.

Navodnik J, Slovenija je ustvarjena za nanotehnologije, Izdelki in tehnologije prihodnosti, Navodnik, Celje, 2007.

Odenbach S, Ferrofluids – magnetically controlled suspensions, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 217, 2003, 171 – 178.

O'Fagain C, Enzyme stabilization – recent experimental progress, Review, *Enzyme and Microbial Technology* 33, 2003, 137 – 149.

Paljevac M, Primožič M, Habulin M, Novak Z, Knez Ž, Hydrolysis of carboxymethyl cellulose catalyzed by cellulose immobilized on silica gels at low and high pressures, *Journal of Supercritical Fluids*, 43, 2007, 74 – 80.

Peralta-Zamora P, Esposito E, Pelegrini R, Groto R, Reyes J, Durán N, Effluent treatment of pulp and paper, and textile industries using immobilized horseradish peroxidase. *Environmental Technology*, 19, 1998, 55 – 61.

Perez ID, Rantwijk van F, Sheldon RA, Cross-Linked Enzyme Aggregates of Chloroperoxidase: Synthesis, Optimization and Characterization, *Advanced Synthesis and Catalysis*, 351, 2009, 2133 – 2139.

Pollegioni L, Gadda G, Ambrosius D, Ghisla S, Pilone MS, Cholesterol oxidase from *Streptomyces hygroscopicus* and *Brevibacterium sterolicum*: effect of surfactants and organic solvents on activity, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1999, 30, 27 – 33.

Ram MK, Bertoncello P, Ding H, Paddeu S, Nicolini C, Cholesterol biosensor prepared by layer-by-layer technique, *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 2001, 849 – 856.

Roessl U, Carrier-free immobilized enzymes for biocatalysis, *Biotechnological Letters*, 32, 2010, 341 – 350.

Rossi LM, Quach AD, Rosenzweig Z, Glucose oxidase-magnetite nanoparticle bioconjugate for glucose sensing, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380, 2004, 606 – 613.

Solanki PR, Singh S, Prabhakar N, Pandey MK, Malhotra BD, Application of conducting poly(aniline-co-pyrrole) film cholesterol biosensor, *Journal of Applied Polymer Science*, 105, 2007, 3211 – 3219.

Salata OV, Applications of nanoparticles in biology and medicine, Review, *Journal of Nanobiotechnology*, 2, 2004, 1 – 6.

Santra S, Tapeç R, Theodoropoulou N, Dobson J, Hebard A, Tan W, Synthesis and Characterization of Silica-Coated Iron Oxide Nanoparticles in Microemulsion: The Effect of Nonionic Surfactants, *Langmuir*, 17, 2001, 2900 – 2906.

Schoevaart R, Wolbers MW, Golubovic M, Ottens M, Kieboom APG, van Rantwijk F, van der Wielen LAM, Sheldon RA, Preparation, Optimisation, and Structures of Cross-linked Enzyme Aggregates (CLEAs). *Biotechnology and Bioengineering*, 87, 2004, 754 – 762.

Schoevaart R, Siebum A, van Rantwijk F, Sheldon R, Kieboom T, Glutaraldehyde Cross-link Analogues from Carbohydrates, *Starch/Stärke*, 57, 2005, 161 – 165.

Schoevaart WRK, Langen van LM, Dool van den RTM, Boumans JWJ, International Patent Application WO 2006/046865 A2, 2006.

Shah SSA, Gupta MN, Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder, *Analytical Biochemistry*, 351, 2006, 207 – 213.

Sheldon RA, Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?, *Current opinion in Biotechnology*, 14, 2003, 188 – 201.

Sheldon RA, Cross-linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of β -lactam antibiotics, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11, 2001, 665 – 670.

Siddique MH, Pierre CC, Biswas N, Bewtra JK, Taylor KE, Immobilized enzyme catalyzed removal of 4-chlorophenol from aqueous solution. *Water Research*, 27, 1993, 883 – 887.

Singh S, Solanki RP, Pandey MK, Malhotra BD, Cholesterol biosensor based on cholesterol esterase, cholesterol oxidase and peroxidase immobilized onto conducting polyaniline films, *Sensors and Actuators*, 115, 2006, 534 – 541.

Shaw S, Chen Y, Ou J, Ho L, Preparation and characterization of *Pseudomonas putida* esterase immobilized on magnetic nanoparticles, *Enzyme and Microbial Technology* 39, 2006, 1089 – 1095.

Smith AG, Brooks CJW, Cholesterol oxidase: properties and applications, *Journal of Steroid Biochemistry*, 1976, 7, 705 – 713.

Steighardt J, Kleine R, Production and immobilization of a proteinase-reduced cyclodextrin glycosyltransferase preparation, *Applied Microbial Biotechnology*, 39, 1993, 63 – 68.

Subramanian A, Kennel SJ, Oden PI, Jacobson KB, Woodward J, Doktycz M, Comparison of techniques for enzyme immobilization on silicon supports, *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 1999, 26 – 34.

Šulek F, Perez DI, Habulin M, Knez Ž, Sheldon RA, Immobilization of horseradish peroxidase as cross-linked enzyme aggregates (CLEAs), *Process Biochemistry*, 46, 2010, 765 – 769.

Sun Y, Duan L, Guo Z, Duan Mu Y, Ma M, Xu L, Zhang Y, Gu N, An improved way to prepare superparamagnetic magnetite-silica core-shell nanoparticles for possible biological application, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 285, 2005, 65 – 70.

Sumar Pundir, CS, Co-immobilization of cholesterol esterase, cholesterol oxidase and peroxidase onto alkylamine glass beads for measurement of total cholesterol in serum, *Current Applied Physics*, 3, 2003, 129 – 133.

Tan X, Li M, Cai P, Luo L, Zou X, An amperometric cholesterol biosensor based on multiwalled carbon nanotubes and organically modified sol-gel/chitosan hybrid composite film, *Analytical Biochemistry*, 337, 2005, 111 – 120.

Tao GL, Furusaki S, Synthesis of porous polymer carrier and immobilization of α -chymotrypsin, *Polymer Journal*, 27, 1995, 111 – 121.

Takahashi H, Li B, Sasaki T, Miyazaki C, Kajino T, Inagaki S, Immobilized enzymes in ordered mesoporous silica materials and improvement of their stability and catalytic activity in an organic solvent, *Microporous and Mesoporous Materials*, 44-45, 2001, 755 – 762.

Tartaj P, González-Carreño T, Serna CJ, Single-step nanoengineering of silica coated maghemite hollow spheres with tunable magnetic properties, *Advanced Materials*, 13, 2001, 1640 – 1644.

Tardioli PW, Zanin GM, de Moraes FF, Characterization of Thermoanaerobacter cyclomaltodextrin glucotransferase immobilized on glyoxyl-agarose, *Enzyme Microbial Technology*, 39, 2006, 1270 – 1278.

Tatsumi K, Wada S, Ichikawa H, Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase, *Biotechnological Bioengineering*, 51, 1996, 126 – 130.

Tyagi R, Batra R, Gupta MN, Amorphous enzyme aggregates: stability toward heat and aqueous-organic cosolvent mixtures, *Enzyme Microbial Technology*, 24, 1999, 348 – 354.

Torabi SF, Khosro-Khajeh, Salehe G, Nasser G, Seyed-Omid RS, Covalent attachment of cholesterol oxidase and horseradish peroxidase on perlite through silanization: Activity, stability and co-immobilization, *Journal of Biotechnology* 131, 2007, 111 – 120.

Toshifumi S, Enzyme immobilization on thermosensitive hydrogel microsphere, *Colloid Surfaces B: Biointerfaces*, 4, 1995, 267 – 274.

Xiao H, Huang J, Liu C, Jiang D, Immobilization of laccase on amine-terminated magnetic nano-composite by glutaraldehyde crosslinking method, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 2006, 414 – 418.

Xu Z, Liu Q, Finch JA, Silanation and stability of 3-aminopropyl triethoxy silane nanosized superparamagnetic particles: I. Direct silanation, *Applied Surface Science* 120, 1997, 269 – 278.

Xu L, Kim MJ, Kim KD, Choa YH, Kim HT, Surface modified Fe₃O₄ nanoparticles as protein delivery vehicle, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 350, 2009, 8 – 12.

Yamura M, Camilo RL, Sampaio LC, Macedo MA, Nakamura M, Toma HE, Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 279, 2004, 210 – 217.

Yu HW, Chen H, Wang X, Yang YY, Ching CB, Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles: Applications to *Candida rugosa* lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43, 2006, 124 – 127.

Varian AR, Sansen W, Covalent enzyme immobilization on paramagnetic polyacrolein beads, *Biosensors and Bioelectronics*, 11, 1996, 443 – 448.

Vasudevan PT, Li LO, Peroxidase catalyzed polymerization of phenol, *Applied Biochemical Biotechnology*, 60, 1996, 73 – 78.

Van Langen LM, Cross-Linked Aggregates of (R)-Oxynitrilase: A Stable, Recycle Biocatalyst for Enantioselective Hydrocyanation, *Organic Letters*, 7, 2005, 327 – 329.

Vidal JC, Garcia E, Castillo JR, *Analytical Sciences*, 18, 2002, 537 – 542.

Voivodov K, Chan WH, Scouten W, Chemical approaches to oriented protein immobilization, *Macromolecule Chemistry, Macromoleculare Chemie, Macromolecular Symposia*, 1992, 275 – 283.

Welinder KG, Mauro JM, Norskov-Lauritsen L, Structure of plant and fungal peroxidises. *Biochemical Society Transactions*, 20, 1992, 337 – 340.

Walt DR, Agayn VI, The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *Trends in Analytical Chemistry*, 13, 1994, 425 – 430.

White LD, Tripp CP, Reaction (3-Aminopropyl)dimethylethoxysilane with Amine Catalysts on Silica Surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, 232, 2002, 400 – 407.

Williams Darryl N, Sheryl HE, Pulliam Holoman TR, Evaluation of the microbial growth response to inorganic nanoparticles, *Journal of Nanobiotechnology*, 2006, 4, 1 – 8.

Woodley JM, Immobilized biocatalysts. In: K. Smith (Ed.) *Solid supports and catalysts in organic synthesis*, Ellis Horwood, 1992.

Wu CW, Lee JG, Lee WC, Protein and enzyme immobilization on non-porous microspheres of polystyrene, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 27, 1998, 225 – 230.

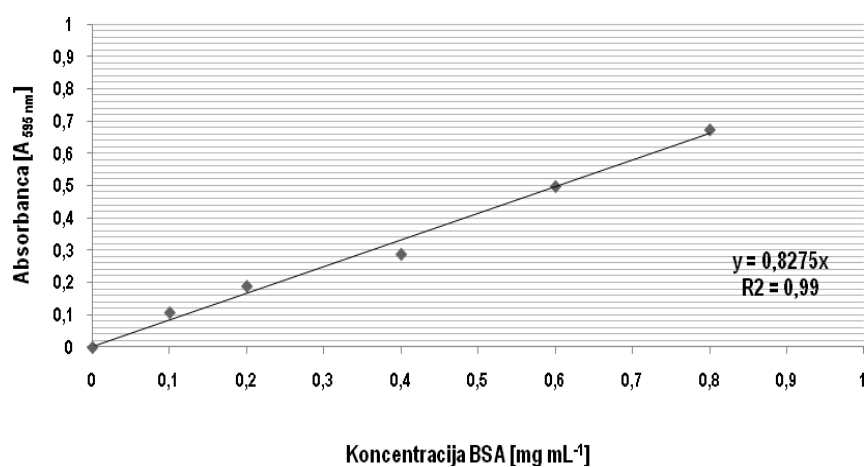
Zarbosky O., *Immobilized enzymes*, CRC Press, Cleveland, 1973.

Zhao, ASMCAXS, Design of large-pore mesoporous materials for immobilization of penicillin G acylase biocatalyst, *Catalysis Today*, 2004, 293 – 299.

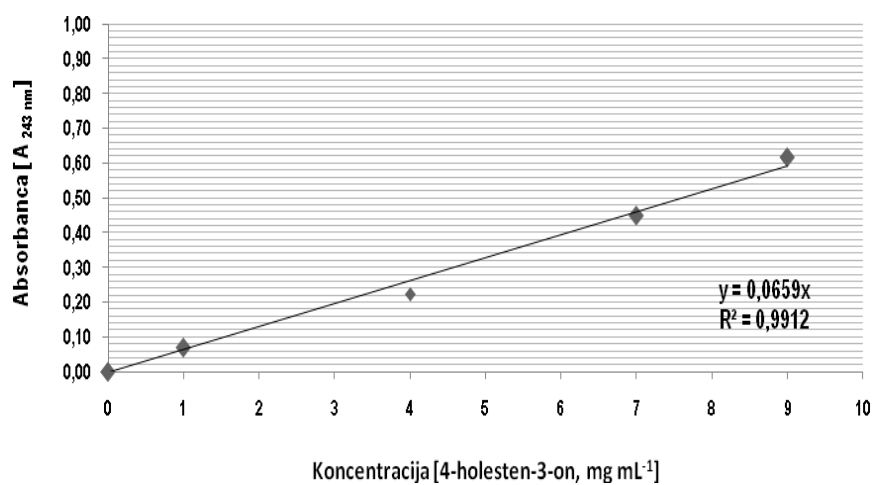
8 – PRILOGE

8.1 Umeritvene krivulje

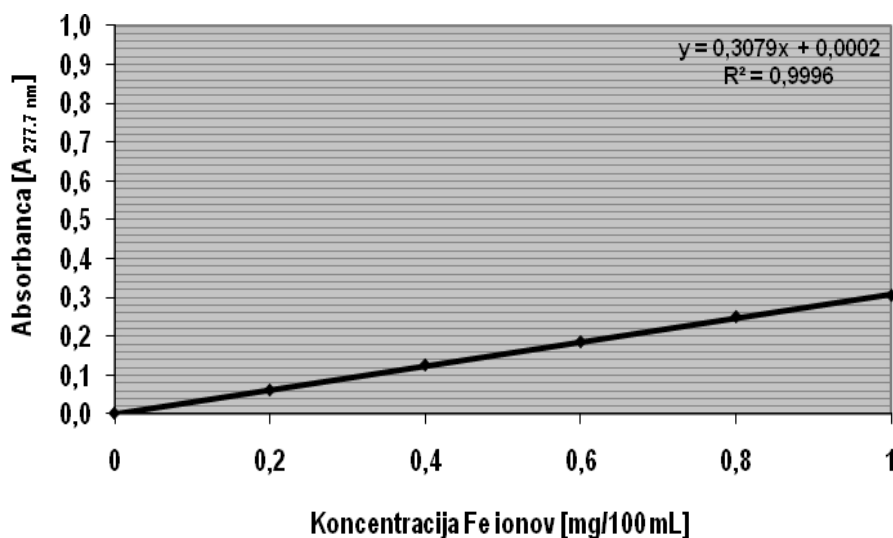
8.1.1 Umeritvena krivulja za določevanje koncentracije proteinov po Bradfordu.



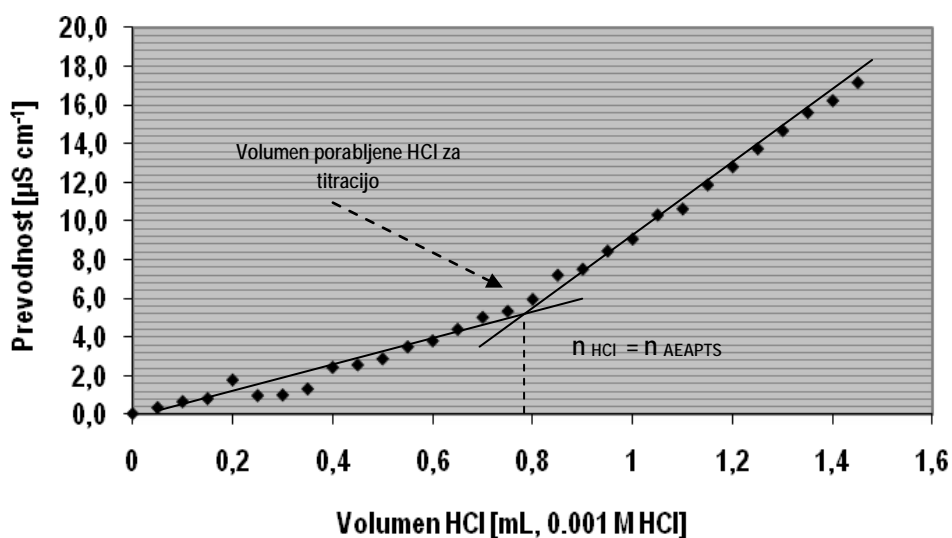
8.1.2 Umeritvena krivulja za določevanje koncentracije 4-holesten-3-ona.



8.1.3 Umeritvena krivulja za določevanje vsebnosti Fe v Fe oksidu (Plamenska spektroskopija).



8.1.4 Konduktometrična krivulja za določevanje površinske koncentracije amino skupin.



8.2 Določanje železa v maghemitnih nanodelcih s KMnO_4 (Oksido-redukcijska titracija).

m_{Vzorec} [g]	V_{KMnO_4} [mL]	ω_{Fe} [%]	$\omega_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$ [%]
~ 0,100	7,10	39,65	56,69
~ 0,100	7,20	40,21	57,49
~ 0,100	7,40	41,33	59,09

Legenda: m_{Vzorec} - celokupna masa nanodelcev; V_{KMnO_4} – volumen porabljenega titranta za titracijo; ω – masni delež železa ali oksida v maghemitnih nanodelcih.

8.3 Tabele z rezultati

8.3.1 Imobilizacija biokatalizatorja na magnetni nosilec

8.3.1.1 Vpliv pH medija

pH [/]	C ChOx, začetna [mg mL ⁻¹]	C ChOx, vezana [mg mL ⁻¹]	C ChOx, supernatant [mg mL ⁻¹]	U.I. [%]	ΔA [min ⁻¹]	R.A. [%]
6,0	0,0978	0,0322	0,0556	33	0,0004	1
6,5	0,0999	0,0549	0,0390	55	0,0007	2
7,0	0,1001	0,0841	0,0161	84	0,0021	6
7,5	0,0976	0,0859	0,0112	88	0,0164	46
8,0	0,0999	0,0919	0,0062	92	0,0203	57
8,5	0,0989	0,0899	0,0091	91	0,0185	52
<i>ChOx, prosta</i>					0,0356	100

Opomba: R.A. – relativna aktivnost encimskega preparata; U.I. – učinkovitost imobilizacije.

8.3.1.2 Vpliv koncentracije mrežnega povezovalca

ω_{GA} [% (v/v)]	C ChOx, začetna [mg mL ⁻¹]	C ChOx, vezana [mg mL ⁻¹]	C ChOx, supernatant [mg mL ⁻¹]	U.I. [%]	ΔA [min ⁻¹]	R.A. [%]
0,7	0,1002	0,0822	0,0110	82	0,0046	13
2,9	0,0995	0,0915	0,0081	92	0,0203	57
6,2	0,0996	0,0728	0,0254	73	0,0110	31
10,0	0,0999	0,0259	0,0711	26	0,0011	3
25,0	0,0989	0,0009	0,0899	1	0,0004	1
<i>ChOx, prosta</i>					0,0356	100

Opomba: R.A. – relativna aktivnost encimskega preparata; U.I. – učinkovitost imobilizacije.

8.3.1.3 Vpliv časa reakcije aktivacije nosilca

t Zamreženja [h]	C ChOx, začetna [mg mL ⁻¹]	C ChOx, vezana [mg mL ⁻¹]	C ChOx, supernatant [mg mL ⁻¹]	U.I. [%]	ΔA [min ⁻¹]	R.A. [%]	
1	0,1001	0,0010	0,0091	1	0,0004	1	
2	0,0998	0,0912	0,0086	92	0,0203	57	
6	0,0988	0,0701	0,0278	73	0,0025	7	
24	0,0999	0,0291	0,0609	33	0,0018	3	
<i>ChOx, prosta</i>						0,0356	100

Opomba: R.A. – relativna aktivnost encimskega preparata; U.I. – učinkovitost imobilizacije.

8.3.1.4 Vpliv aktivacije encimskega nosilca na učinkovitost imobilizacije

γ ChOx [mg mL ⁻¹]	C ChOx, začetna [mg mL ⁻¹]	C ChOx, vezana [mg mL ⁻¹]	C ChOx, supernatant [mg mL ⁻¹]	U.I. [%]	ΔA [min ⁻¹]	R.A. [%]	
5	0,0051	0,0002	0,0040	3	0,0001	3	
50	0,0493	0,0399	0,0007	81	0,0017	10	
100	0,0956	0,0880	0,0009	92	0,0203	57	
<i>ChOx, prosta, 5 μg mL⁻¹</i>						0,0018	100
<i>ChOx, prosta, 50 μg mL⁻¹</i>						0,0179	100
<i>ChOx, prosta, 100 μg mL⁻¹</i>						0,0356	100

Legenda: R.A. – relativna aktivnost encimskega preparata; U.I. – učinkovitost imobilizacije. Opomba: Delci so bili aktivirani.

γ ChOx [mg mL ⁻¹]	C ChOx, začetna [mg mL ⁻¹]	C ChOx, vezana [mg mL ⁻¹]	C ChOx, supernatant [mg mL ⁻¹]	U.I. [%]	ΔA [min ⁻¹]	R.A. [%]
5	0,0049	0,0028	0,0021	58	0,0054	30
50	0,0501	0,0175	0,0316	35	0,0045	25
100	0,0978	0,0009	0,0869	1	0,0000	0

Legenda: R.A. – relativna aktivnost encimskega preparata; U.I. – učinkovitost imobilizacije. Opomba: Delci niso bili aktivirani.

8.3.1.5 Vpliv masne koncentracije magnetnega nosilca

γ Nanodelcev [mg mL ⁻¹]	C ChOx, začetna [mg mL ⁻¹]	C ChOx, vezana [mg mL ⁻¹]	C ChOx, supernatant [mg mL ⁻¹]	U.I. [%]
2	0,091	0,0823	0,0080	90
4	0,094	0,0799	0,0139	85
6	0,095	0,0839	0,0113	88
8	0,095	0,0876	0,0061	92
10	0,096	0,0886	0,0072	92
20	0,096	0,0859	0,0071	89
50	0,095	0,0877	0,0072	92
100	0,096	0,0886	0,0074	92

Opomba: R.A. – relativna aktivnost encimskega preparata; U.I. – učinkovitost imobilizacije.

8.3.1.6 Vpliv koncentracije biokatalizatorja

γ ChOx [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	C ChOx, začetna [mg mL^{-1}]	C ChOx, vezana [mg mL^{-1}]	C ChOx, supernatant [mg mL^{-1}]	U.I. [%]	ΔA [min^{-1}]	R.A. [%]
5	0,0051	0,0002	0,0039	3	0,0001	3
50	0,0493	0,0399	0,0005	81	0,0017	10
100	0,0956	0,0880	0,0007	92	0,0203	57
150	0,1481	0,1258	0,0012	85	0,0262	49
180	0,1795	0,1094	0,0326	61	0,0193	30
200	0,2011	0,0583	0,1387	29	0,0093	13
ChOx, prosta, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$					0,0018	100
ChOx, prosta, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$					0,0179	100
ChOx, prosta, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$					0,0356	100
ChOx, prosta, 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$					0,0534	100
ChOx, prosta, 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$					0,0641	100
ChOx, prosta, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$					0,0712	100

Opomba: R.A. – relativna aktivnost encimskega preparata; U.I. – učinkovitost imobilizacije.

8.3.1.7 Vpliv pH medija na stabilnost encimskega preparata

pH vrednost [l]	ΔA [min^{-1}]	R.A. [%]	ΔA [min^{-1}]	R.A. [%]
	Imobilizirana ChOx		Prosta ChOx	
3,5	0,0015	4	0,0030	8
4,5	0,0024	7	0,0040	11
5,5	0,0285	80	0,0130	36
6,5	0,0361	99	0,0179	50
7,5	0,0368	99	0,0352	99
8,5	0,0331	93	0,0211	59
9,5	0,0315	88	0,0192	54
10,5	0,0154	43	0,0185	52
Prosti encim, ChOx			0,0356	100

8.3.1.8 Termična stabilnost encimskega preparata

T [$^{\circ}\text{C}$]	$t_{\text{izpostavitve}}$ [min]	ΔA [min^{-1}]	$\text{Ln } \Delta A \text{ min}^{-1}$ [l]	$\text{Ln } R.A.$ [%]	ΔA [min^{-1}]	$\text{Ln } \Delta A \text{ min}^{-1}$ [l]	$\text{Ln } R.A.$ [%]
		Imobilizirana ChOx			Prosta ChOx		
45	0	0,0000	0,00	4,61	0,0000	0,00	4,61
	15	0,0134	4,90	4,53	0,0076	4,33	4,31
	30	0,0094	4,54	4,46	0,0050	3,91	4,21
	60	0,0049	3,89	4,30	0,0039	3,67	4,15
65	0	0,0000	0,00	4,61	0,0000	0,00	4,61
	15	0,0117	4,77	4,50	0,0032	3,48	4,09
	30	0,0022	3,11	4,08	0,0014	2,63	3,82
	60	0,0013	2,59	3,90	0,0011	2,41	3,73
85	0	0,0000	0,00	4,61	0,0000	0,00	4,61
	15	0,0069	4,24	4,39	0,0028	3,33	3,96
	30	0,0052	3,96	3,96	0,0004	1,28	3,09
	60	0,0003	1,03	2,98	0,0002	0,62	2,37
Prosta ChOx, neizpostavljena			0,0356		5,80		100

8.3.1.9 Termične konstante hitrosti deaktivacije

a) Imobilizirana ChOx

T [°C]	A_0	$A_{t=15 \text{ min}}$	$\frac{A_0}{A_{t=15 \text{ min}}}$	$\frac{\ln A_0/A_{t=15 \text{ min}}}{t_{15 \text{ min}}}$	$\frac{\ln A_0/A_{t=15 \text{ min}}}{t_{15 \text{ min}}} \cdot 10^3$
Imobilizirana ChOx					
45	0,0194	0,0134	1,44	0,37	0,0243
65	0,0194	0,0117	1,65	0,50	0,0333
85	0,0194	0,0070	2,78	1,02	0,0681

Legenda: k_i (min^{-1}) – konstanta hitrosti deaktivacije.

b) Prosta ChOx

T [°C]	A_0	$A_{t=15 \text{ min}}$	$\frac{A_0}{A_{t=15 \text{ min}}}$	$\frac{\ln A_0/A_{t=15 \text{ min}}}{t_{15 \text{ min}}}$	$\frac{\ln A_0/A_{t=15 \text{ min}}}{t_{15 \text{ min}}} \cdot 10^3$
Prosta ChOx					
45	0,0356	0,0076	4,69	1,54	0,1030
65	0,0356	0,0032	10,97	2,39	0,1597
85	0,0356	0,0028	12,70	2,54	0,1694

Legenda: k_i (min^{-1}) – konstanta hitrosti deaktivacije.

8.3.1.10 Vpliv dolgoročnega skladiščenja encimskega preparata

a) Imobilizirana ChOx

Čas skladiščenja [dni]	ΔA [min^{-1}]	R.A. [%]	ΔA [min^{-1}]	R.A. [%]
Imobilizirana ChOx				
4 °C		25 °C		
7	0,0033	91	0,0028	77
14	0,0032	89	0,0026	73
21	0,0026	72	0,0023	65
28	0,0021	58	0,0012	32
Prosti encim, ChOx			0,0356	100

b) Prosta ChOx

Čas skladičenja [dni]	ΔA [min ⁻¹]	R.A. [%]	ΔA [min ⁻¹]	R.A. [%]
Prosta ChOx				
4 °C			25 °C	
7	0,0013	67	0,0023	65
14	0,0011	41	0,0013	36
21	0,0011	30	0,0006	17
28	0,0002	11	0,0004	11
<i>Prosti encim, ChOx</i>			0,0356	100

8.3.1.11 Stabilnost encimskega preparata pri večkratni uporabi

Število ciklov [l]	Koncentracija [4-holesten-3-on, mg mL ⁻¹]	Presnova reakcije [%]	R.A. [%]
1	2,0182	52	99
2	2,0162	52	99
3	1,8225	47	90
4	1,8209	47	90
5	1,8543	48	91
6	1,8194	47	90
7	1,8209	46	90
8	1,6434	42	81
9	1,5023	39	74
10	1,4674	39	73
11	1,3642	35	68
12	1,1973	31	59
13	0,8179	21	41
14	0,5250	14	26
15	0,4992	13	24
16	0,2944	8	15

Opomba: Čas enega cikla reakcije oksidacije holesterola je bil 3 ure. Koncentracija produkta, holestena, s prosto holesterol oksidazo v času 3 h je bila 478 µg mL⁻¹.

8.3.2 Priprava zamreženih encimskih skupkov

8.3.2.1 Reakcija obarjanja brez dodatka EA

Obarjalni reagent	Aceton	Acetonitril	2-propanol	Dimetoksietanol, DME
<i>Encimski skupki</i>				
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,4116	0,4067	0,3970	0,3632
Relativna aktivnost, %	85	84	82	75
<i>Supernatant</i>				
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0000	0,0001	0,0484	0,0021
Relativna aktivnost, %	0	0,01	10	0,43
<i>Prosti encim</i>				
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,4842			
Relativna aktivnost, %	100			

Legenda: $\Delta A \text{ min}^{-1}$ - začetna hitrost encimskega preparata. Opomba: Relativna aktivnost encimskega preparata je podana v odstotnih točkah in je izračunana v primerjavi z aktivnostjo prostega encima, HRP.

8.3.2.2 Reakcija obarjanja z dodatkom EA

Obarjalni reagent	Aceton	Acetonitril	2-propanol	Dimetoksietanol, DME
<i>Encimski skupki</i>				
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,4624	0,4372	0,4139	0,3172
Relativna aktivnost, %	95,5	90,3	85,5	65,5
<i>Supernatant</i>				
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0019	0,0003	0,0088	0,0033
Relativna aktivnost, %	0,41	0,07	1,81	0,69
<i>Prosti encim</i>				
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,4842			
Relativna aktivnost, %	100			

Legenda: $\Delta A \text{ min}^{-1}$ - začetna hitrost encimskega preparata. Opomba: Relativna aktivnost encimskega preparata je podana v odstotnih točkah in je izračunana v primerjavi z aktivnostjo prostega encima, HRP.

8.3.2.3 Reakcija zamreženja – vpliv koncentracije mrežnega povezovalca

GA [% (v/v)]	0,2	0,5	1	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
<i>CLEAs</i>								
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0266	0,0484	0,0919	0,1162	0,0726	0,0218	0,0334	0,0309
Relativna aktivnost, %	5,5	10	19	24	15	4,5	6,9	6,4
<i>Supernatant</i>								
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,1017	0,1792	0,0436	0,0581	0,0416	0,0649	0,0639	0,0683
Relativna aktivnost, %	21	37	9	12	8,6	13,4	13,2	14,1
<i>Spiranje I</i>								
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0058	0,0121	0,0305	0,0051	0,0469	0,0227	0,0246	0,0237
Relativna aktivnost, %	1,2	2,49	6,3	1,05	9,7	4,7	5,1	4,9
<i>Spiranje II</i>								
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0045	0,0042	0,0019	0,0000	0,0031	0,0036	0,0000	0,0000
Relativna aktivnost, %	0,92	0,86	0,40	0	0,63	0,74	0	0
<i>Spiranje III</i>								
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Relativna aktivnost, %	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: GA – glutaraldehid. Opomba: encimski test je potekal na osnovi reakcije oksidacije o-dianisidina.

8.3.2.4 Reakcija zamreženja – vpliv koncentracije mrežnega povezovalca z dodatkom PEHA

GA [% (v/v)]	0,2	0,5	1	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
<i>CLEAs</i>								
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0091	0,0345	0,1127	0,1425	0,0618	0,0274	0,0086	0,0034
Relativna aktivnost, %	5	19	62	83	36	16	5	2
<i>Supernatant</i>								
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0241	0,0189	0,0155	0,0017	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000
Relativna aktivnost, %	14	11	9	1	0,2	0	0	0
<i>Spiranje I</i>								
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0017	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Relativna aktivnost, %	1	1	1	0	0	0	0	0
<i>Spiranje II</i>								
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0017	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Relativna aktivnost, %	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Spiranje III</i>								
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0091	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Relativna aktivnost, %	5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Prosti encim</i>								
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,1817							
Relativna aktivnost, %	100							

Opomba: Priprava CLEAs je potekala z dodatkom naslednjih aditivov - PEHA (100 mM, 200 μL) in EA (46 nmol, 100 μL). Encimski test je potekal na osnovi reakcije oksidacije 4-AAP.

8.3.2.5 Predpriprava površine encima in vpliv reducenta

Amino donor	/	Poli-L-Lizin	PEI [60 kDa]	PEI [600 kDa]	Reducent	NaBH ₃ CN	NaBH ₄
<i>CLEAs</i>							
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0017	0,0120	0,0129	0,0241		0,1426	0,0790
Relativna aktivnost, %	1	7	7,5	14		83	46
<i>Supernatant</i>							
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,1219	0,0859	0,0189	0,0223		0,0017	0,0003
Relativna aktivnost, %	71	50	11	13		1	0,2
<i>Spiranje I</i>							
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0086	0,0014	0,0006	0,0012		0,0000	0,0000
Relativna aktivnost, %	5	0,84	0,34	0,7		0	0
<i>Spiranje II</i>							
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0069	0,0005	0,0015	0,0005			
Relativna aktivnost, %	4	0,30	0,86	0,32		0	0
<i>Spiranje III</i>							
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0137	0,0017	0,0034	0,0069		0,0000	0,0000
Relativna aktivnost, %	8	1	2	4		0	0

Opomba: Encimski test je potekal na osnovi reakcije oksidacije 4-AAP.

8.3.2.6 Vpliv koncentracije encima

Koncentracija HRP [mg mL ⁻¹]	2	4	8	12	16
<i>CLEAs</i>					
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0713	0,1425	0,0383	0,3714	0,1283
Relativna aktivnost, %	41	83	78,2	72,8	24,8
<i>Supernatant</i>					
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0009	0,0017	0,0044	0,0075	0,0983
Relativna aktivnost, %	2	1	9	5	19
<i>Spiranje I</i>					
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0007	0,0000	0,0087	0,0095	0,0150
Relativna aktivnost, %	0,3	0	17,7	6,3	2,9
<i>Spiranje II</i>					
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0002	0,0000	0,0030	0,0041	0,0055
Relativna aktivnost, %	0,1	0	6,1	2,7	1,1
<i>Spiranje III</i>					
Aktivnost, $\Delta A \text{ min}^{-1}$	0,0061	0,0000	0,0001	0,0014	0,0569
Relativna aktivnost, %	0,4	0	0,2	0,9	11

Opomba: Encimski test je potekal na osnovi reakcije oksidacije 4-AAP.

9 - ŽIVLJENJEPIS

Europass življenjepis je priložen.

Europass življenjepis



Osební podatki

Ime / Priimek

Naslov

Telefon

E-pošta

Državljanstvo

Datum rojstva

Spol

Franja ŠULEK

MARIONOVA ul. 8, SI-2000 MARIBOR, SLOVENIJA (Začasni naslov)

TUMOVA ul. 7, SI-6000 KOPER-CAPODISTRIA, SLOVENIJA (Stalni naslov)

Mobitel: 00386 31 637 140

franja.sulek@uni-mb.si; sulekf@gmail.com

Slovensko.

23.03.1982

Ženski.

Delovne izkušnje

Obdobje

Zaposlitev ali delovno mesto

Glavne naloge in pristojnosti

Naziv in naslov delodajalca

01/11/2006 - 30/04/2011

Študentka podiplomskega študija kemije in kemijske tehnike/Mlada raziskovalka/Asistentka.

Raziskovalno delo v okviru podiplomskega študija/Priprava doktorske disertacije pod mentorstvom Prof.Dr. Maje HABULIN in Prof.Dr. Mihe DROFENIKA ter Prof.Dr. Željka Kneza.

Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Laboratorij za separacijske procese in produktno tehniko, Smetanova ul. 17, SI-2000 Maribor, Slovenija.

Obdobje

Zaposlitev ali delovno mesto

Glavne naloge in pristojnosti

Naziv in naslov delodajalca

01/04/2008 - 31/07/2008

Študentka podiplomskega študija/Raziskovalka v okviru 32. razpisa za sofinanciranje raziskovalnega sodelovanja slovenskih doktorskih študentov v tujini na Univerzi v Delftu (Nizozemska).

Raziskovalno delo v okviru podiplomskega študija (pod mentorstvom Prof.Dr.Roger A.SHELDON-a).

Univerza gostiteljica: Univerza v Delftu, Fakulteta za naravoslovne vede, Odsek za biotehnologijo, Laboratorij za biokatalizo in organsko kemijo, Julianalaan 136, 2628 BL Delft, Nizozemska.

Delft University of Technology, Faculty of Natural Sciences, Department of Biotechnology, Laboratory for Organic Chemistry and Biocatalysis, Julianalaan 136, 2628 BL Delft, The Netherlands.

Vir sofinanciranja: Javni sklad RS za razvoj kadrov in štipendije, Vilharjeva 27, SI-1000 Ljubljana, Slovenija; št. pogodbe: 2007/532-025.

Obdobje 25/02/2006 - 25/06/2006
 Zaposlitev ali delovno mesto Socrates/Erasmus študentka v okviru študijske izmenjave študentov na dodiplomskem študiju.
 Glavne naloge in pristojnosti Raziskovalno delo za pripravo diplomske naloge (pod mentorstvom dr. Luciano PIUBELLI-ja, PhD).
 Naziv in naslov delodajalca Univerza gostiteljica: Univerza Insubria, Fakulteta za matematiko, fiziko in naravoslovne vede, Odsek za biotehnologijo in molekularne znanosti, Laboratorij za funkcijsko post-genomiko in proteinski inženiring, Via H.J.Dunant, 3-21100 Varese, Italija.
 University of Insubria, Faculty of Mathematics, Physics and Natural Sciences, Department for Biotechnologies and Molecular Sciences, Laboratory of Functional Post-genomics and Protein Engineering, Via H.J. Dunant, 3-21100 Varese, Italy.
 Vir sofinanciranja: Univerza v Mariboru, Služba za mednarodno in meduniverzitetno sodelovanje, Slomškov trg 15, SI-2000 Maribor, Slovenija (Bilateralni sporazum za akademsko leto 2006/2007 po programu Socrates/Erasmus).

Obdobje 01/06/2005 - 01/09/2005
 Zaposlitev ali delovno mesto Laboratorijsko delo v okviru obvezne študijske prakse.
 Glavne naloge in pristojnosti Praktično delo v laboratoriju.
 Naziv in naslov delodajalca Splošna bolnišnica Maribor, Laboratorij za humano genetiko (pod mentorstvom mag. Borisa ZAGRADIŠNIK-a, dr. med.), Ljubljanska ul. 5, SI-2000 Maribor, Slovenija.

Obdobje Junij - Avgust (2001 - 2003)
 Zaposlitev ali delovno mesto Administrativno delo.
 Glavne naloge in pristojnosti Pisarniško delo/Urejanje dokumentov.
 Naziv in naslov delodajalca Banka Koper, Pristaniška 14, SI-6000 Koper, Slovenija.

Obdobje 01/09/1997 - 01/09/1999.
 Zaposlitev ali delovno mesto Radijski moderator.
 Glavne naloge in pristojnosti Vodenje radijskega programa na Radiu Capris.
 Naziv in naslov delodajalca Radio Capris, Ulica 15. maja 10b, SI-6000 Koper, Slovenija.

Izobraževanje in usposabljanje

Obdobje 2001 - 2006
 Naziv izobrazbe in/ali nacionalne poklicne kvalifikacije Univerzitetna diplomirana inženirka kemijske tehnologije.
 Glavni predmeti/pridobljeno znanje in kompetence Področje kemijske tehnologije in biokemijske tehnike.
 Naziv in status ustanove, ki je podelila diplomu, spričevalo ali certifikat Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Smetanova ul. 17, SI-2000 Maribor, Slovenija.
 Stopnja izobrazbe po nacionalni ali mednarodni klasifikacijski lestvici Sedma stopnja izobrazbe po nacionalni lestvici; po mednarodni klasifikacijski lestvici: Bachelor of Science in Chemical Engineering (B.Sc.)

Obdobje 23/08/2009 - 30/08/2009
 Glavni predmeti/pridobljeno znanje in kompetence V okviru Nemške akademske službe za izmenjavo DAAD (German Academic Exchange Service, Südosteuropa (Stabilitätspakt)) sem se udeležila poletne strokovne šole za pridobitev osnovnih znanj iz Uporabne spektroskopije (Center of Applied Spectroscopy, International Summer Schools 2009, IR ans AAS Application). Ob zaključku poletne šole sem pridobila certifikat za udeležbo na vseh aktivnostih in za opravljen zaključni izpit iz predpisane tematike.
 Naziv in status ustanove, ki je Univerza v Sofiji, "St. Kl. Ohridski" Fakulteta za kemijo, Sofija, Bolgarija.

Stran 2 - Življenjepis Za dodatne informacije o Europass-u: <http://europass.cedefop.eu.int>

Ime Priimek © Evropske skupnosti, 2003

podelila diplomo, spričevalo ali certifikat	University of Sofia, "St. Kl. Ohridski" Faculty of Chemistry, Sofia, Bulgaria.
Obdobje	08/07/2007 - 22/07/2007
Glavni predmeti/pridobljeno znanje in kompetence	Udeležba s pridobitvijo certifikata na intenzivni Socrates/Erasmus delavnici na temo Visokotlačne tehnologije (Basics, Developments, Research and Industrial Applications in High Pressure Chemical Engineering Processes).
Naziv in status ustanove, ki je podelila diplomo, spričevalo ali certifikat	Socrates/Erasmus Intensive Course 2007, Ecole des Mines D' Albi-Carmaux, France.
Obdobje	1997 - 2001
Naziv izobrazbe in/ali nacionalne poklicne kvalifikacije	Gimnazijska maturantka.
Glavni predmeti/pridobljeno znanje in kompetence	Po učnem programu za splošno gimnazijo.
Naziv in status ustanove, ki je podelila diplomo, spričevalo ali certifikat	Gimnazija Koper, Cankarjeva 2, SI-6000 Koper - Capodistria, Slovenija.
Obdobje	1989 - 1997
Naziv izobrazbe in/ali nacionalne poklicne kvalifikacije	Končana Osnovna šola z zaključenim izpitom iz male mature.
Glavni predmeti/pridobljeno znanje in kompetence	Po učnem programu za osnovno šolo.
Naziv in status ustanove, ki je podelila diplomo, spričevalo ali certifikat	Osnovna šola Janka Premrla Vojka Koper, Muzejski trg 5, SI-6000 Koper, Slovenija.

Druga znanja in kompetence

Materni jezik(i)

Slovenščina.

Drug(i) jezik(i)

Samovrednotenje

Evropska raven^(*)

Angleščina

Italijanščina

Španščina

Razumevanje		Govorjenje		Pisanje
Slušno razumevanje	Bralno razumevanje	Govorno sporazumevanje	Govorno sporočanje	
C2	C2	C2	C2	C2
C2	C2	C2	C2	C2
C1	C1	B2	B2	C1

^(*) Skupni evropski referenčni okvir za jezike

Socialna znanja in kompetence

Pridobljen certifikat iz mednarodne delavnice na temo "Intercultural Competence and Communication" (Munih, 15/01/2010, Tehnična univerza v Münihu, Nemčija). Pridobila sem osnovna znanja za delo v mednarodnem okolju, tako v delovnem kot tudi v vsakodnevnem življenju.

Organizacijska znanja in kompetence

Članica gimnazijskega parlamenta v letih 1997-2001; izvoljena v predsednico svojega razreda od leta 1997 do 2001; aktivno sem sodelovala v Društvu Kemik na matični fakulteti in pri nastajanju nove izdaje študentskega časopisa Radikal.

Računalniška znanja in kompetence

Microsoft Office računalniški paket, Kaleidagraph, IsisDraw, CorrelDraw13, SuperProDesigner (osnove), Aspen Plus, MatLab.

Umetniška znanja in kompetence

Končana glasbena šola (violina, 6 let) v Kopru (Gallusova 2, SI-6000 Koper-Capodistria); član šolskega godalnega orkestra v letih 1996-1998; članica gimnazijskega pevskega zbora v letih 1999-

Vozniško dovoljenje

2001; zaključen tečaj iz orientalskih, latisko-ameriških in modernih plesov v letih 2008-2010.

B-kategorije.

Dodatni podatki

Postala sem članica naslednjih društev:

Slovensko kemijsko društvo (od leta 2006),

Slovensko biokemijsko društvo (od leta 2007) in

Društvo univerzitetnih profesorjev v Mariboru (od leta 2009) ter

Nemška organizacija Alumni (KontaktTUM, The International Network at the Technical University of Munich, od leta 2010).

Študentka Nemške akademske službe za izmenjavo DAAD (German Academic Exchange Service) za obdobje od 10. do 30. januarja 2010 na Tehnični univerzi v Münihu, Nemčija. Udeležila sem se Zimske šole – Winter University na temo "Culture and Technology in Germany 2010, kjer sem se udeležila različnih delavnic na temo spoznavanje osnove nemške kulture; udeležila sem se tudi intenzivnega tečaja iz nemškega jezika. Ob zaključku šole sem opravila izpit iz nemškega jezika in uradno tudi pridobila certifikat.

Udeležba na 32. Posvetovanju z naslovom "Izzivi uspešnega planiranja in vodenja organizacij" (Društvo ekonomistov Maribor, 23. - 24. Maj 2007, Hotel Piramida Maribor) s pridobljenim certifikatom o udeležbi.

Pedagoško udejstvovanje: v akademskem letu 2010/2011 sem bila drugič izvoljena v naziv asistenta za predmetno področje Kemijska tehnika in tehnična kemija na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Maribor.

Znanstveno-raziskovalno udejstvovanje z osebno bibliografijo [Šifra raziskovalke: 28413 za področje "Kemijsko inženirstvo"] iz naslednjih področij:

- nanotehnologije, nanokompoziti, nanodelci;
- površinska obdelava nanokompozitov;
- imobilizacija/stabilizacija biokatalizatorja.

<http://izumbib.izum.si/bibliografije/Y20100714122651-28413.html>

<http://sicris.izum.si/search/rsr.aspx?opt=1&lang=slv&id=21257>

10 – OSEBNA BIBLIOGRAFIJA

COBISS Kooperativni online bibliografski sistem in servisi COBISS

FRANJA ŠULEK [28413]

Osebna bibliografija za obdobje 2003 – 2011

ČLANKI IN DRUGI SESTAVNI DELI

1.01 Izvirni znanstveni članek

1. ŠULEK, Franja, KNEZ, Željko, HABULIN, Maja. Immobilization of cholesterol oxidase to finely dispersed silica-coated maghemite nanoparticles based magnetic fluid. *Appl. surf. sci.* [Print ed.], May 2010, vol. 256, iss. 14, str. 4596-4600. [COBISS.SI-ID [14055446](#)]
2. ŠULEK, Franja, DROFENIK, Mihael, HABULIN, Maja, KNEZ, Željko. Surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles for covalent attachment of cholesterol oxidase. *J. magn. magn. mater.* [Print ed.], Jan. 2010, vol. 322, iss. 2, str. 179-185, doi: [10.1016/j.jmmm.2009.07.075](#). [COBISS.SI-ID [13418262](#)]
3. ŠULEK, Franja, PÉREZ FERNÁNDEZ, Daniel, KNEZ, Željko, HABULIN, Maja, SHELDON, Roger A. Immobilization of horseradish peroxidase as crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). *Process biochem. (1991)*, 2011, vol. 46, iss. 3, str. 765-769, doi: [10.1016/j.procbio.2010.12.001](#). [COBISS.SI-ID [14712598](#)]

1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci

4. ŠULEK, Franja, HABULIN, Maja, KNEZ, Željko, DROFENIK, Mihael. Enzyme carriers based on modified inorganic supports. V: 18th International Congress of Chemical and Process Engineering, 24-28 August 2008, Praha, Czech Republic. *CHISA 2008 : CD-ROM of full texts*. Praha: Czech Society of Chemical Engineering, 2008, 9 str. [COBISS.SI-ID [12555542](#)]

5. ŠULEK, Franja, HABULIN, Maja, KNEZ, Željko, DROFENIK, Mihael. Nanostrukture za imobilizacijo encimov. V: GLAVIČ, Peter (ur.), BRODNJAK-VONČINA, Darinka (ur.). *Slovenski kemijski dnevi 2008, Maribor, 25. in 26. september 2008 : [zbornik referatov]*. Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2008, 8 str. [COBISS.SI-ID [12619798](#)]
6. ŠULEK, Franja, HABULIN, Maja, KNEZ, Željko, PLANINŠIČ, Peter. Motivation for studying bionanotech as future production technology. V: KATIČ, Vladimir (ur.). *Zbornik radova*. Novi Sad: Fakultet tehničkih nauka, 2008, str. 227-230. [COBISS.SI-ID [12115478](#)]
7. KAVČIČ, Sabina, ŠULEK, Franja, KNEZ, Željko, HABULIN, Maja. Immobilization of enzymes on magnetic nanoparticles. V: *1st Conference on "Applied Biocatalysis" and 5th Meeting of Students and University Professors from Maribor and Zagreb : May 26th and 27th 2009, Maribor, Slovenia*. Maribor: Faculty of Chemistry and Chemical Engineering; Zagreb: Faculty of Chemical Engineering and Technology, 2009, 4 str. [COBISS.SI-ID [13343766](#)]
8. ŠULEK, Franja, KNEZ, Željko, HABULIN, Maja. Preparation of cross-linked enzyme aggregates as a form of enzyme immobilization. V: *1st Conference on "Applied Biocatalysis" and 5th Meeting of Students and University Professors from Maribor and Zagreb : May 26th and 27th 2009, Maribor, Slovenia*. Maribor: Faculty of Chemistry and Chemical Engineering; Zagreb: Faculty of Chemical Engineering and Technology, 2009, 4 str. [COBISS.SI-ID [13345558](#)]
9. KAVČIČ, Sabina, ŠULEK, Franja, HABULIN, Maja, KNEZ, Željko. Magnetni nanodelci kot nosilci biokatalizatorja. V: *Slovenski kemijski dnevi 2009, Maribor, 24. in 25. september 2009*. [Maribor]: FKKT, [2009], 6 str. [COBISS.SI-ID [13486614](#)]
10. ŠULEK, Franja, HABULIN, Maja, KNEZ, Željko. Priprava zamreženih encimskih skupkov za stabilizacijo biokatalizatorja. V: *Slovenski kemijski dnevi 2009, Maribor, 24. in 25. september 2009*. [Maribor]: FKKT, [2009], 6 str. [COBISS.SI-ID [13488150](#)]
11. ŠULEK, Franja, KNEZ, Željko, HABULIN, Maja. Enzyme immobilization onto nanostructured materials. V: *CHISA 2010 : CD-ROM of full texts*. Praha: Czech Society of Chemical Engineering, 2010, 6 f. [COBISS.SI-ID [14370070](#)]
12. ŠULEK, Franja, KNEZ, Željko, BÉLAFI-BAKÓ, Katalin, GUBICZA, László, HABULIN, Maja. Vpliv KO-imobilizacije na katalitične lastnosti encimskega preparata = Effect of co-immobilization on the catalytic properties of the enzyme system. V: *Slovenski kemijski dnevi 2010, Maribor, 23. in 24. september 2010*. [Maribor]: FKKT, [2010], 7 str. [COBISS.SI-ID [14423830](#)]
13. ŠULEK, Franja, KNEZ, Željko, BÉLAFI-BAKÓ, Katalin, GUBICZA, László, HABULIN, Maja. Zamreženi encimski skupki iz oksidoreduktaze: sinteza, optimizacija in karakterizacija = Cross-linked enzyme aggregates of oxidoreductase: synthesis, optimization and characterization. V: *Slovenski kemijski dnevi 2010, Maribor, 23. in 24. september 2010*. [Maribor]: FKKT, [2010], 8 str. [COBISS.SI-ID [14425110](#)]

1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci

14. ŠULEK, Franja, HABULIN, Maja, KNEZ, Željko, DROFENIK, Mihael. Magnetic fluids: a brief introduction. V: *12. Österreichische Chemietage : September 10-13, 2007, Klagenfurt, Austria : book*

of abstracts. [Vienna]: Gesellschaft Österreichische Chemiker, 2007, str. OP-33. [COBISS.SI-ID [11643670](#)]

15. ŠULEK, Franja, POLLEGIONI, Loredano, PIUBELLI, Luciano, KNEZ, Željko, HABULIN, Maja. Recombinant protein cholesterol oxidase production: from gene planning towards computer-aided process simulation. V: POKLAR ULRIH, Nataša (ur.), ABRAM, Veronika (ur.), CIGIČ, Blaž (ur.). 7. srečanje Slovenskega biokemijskega društva z mednarodno udeležbo, 26.-29. september 2007 = 7th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with International Participation, Maribor, September 26th to 29th, 2007. *Zbornik povzetkov*. Ljubljana: Slovensko biokemijsko društvo: = Slovenian Biochemical Society, 2007, str. 40. [COBISS.SI-ID [11709974](#)]

16. KAVČIČ, Sabina, ŠULEK, Franja, KNEZ, Željko, DROFENIK, Mihael, HABULIN, Maja. Sinteza magnetnih nanodelcev za imobilizacijo biokatalizatorja = Synthesis of magnetic nanoparticles for immobilization of biocatalyst. V: VASIČ-RAČKI, Đurđa (ur.), ZELIČ, Bruno (ur.). 4th Meeting of students and university professors, May 28th 2008, Zagreb, Croatia. *Applied biocatalysis : book of abstracts*. Zagreb: Faculty of Chemical Engineering and Technology; Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2008, str. 3. [COBISS.SI-ID [12338198](#)]

17. ŠULEK, Franja, KNEZ, Željko, HABULIN, Maja. Magnetic fluid based on functional magnetic nanoparticles for biomedical applications. V: BAVEC, Aljoša (ur.). 4th CFGBC Symposium, June 17, 2009, Ljubljana, Slovenia. *From arrays to understanding diseases*. Ljubljana: Faculty of Medicine, 2009, str. 63. [COBISS.SI-ID [13253398](#)]

18. ŠULEK, Franja, PÉREZ FERNÁNDEZ, D., KNEZ, Željko, SHELDON, Roger A., HABULIN, Maja. An immobilization approach for horseradish peroxidase based on crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). V: 8th International Conference on Protein Stabilization, April 14-17, 2009, Graz University of Technology. *ProStab2009 : programme and abstract book*. Graz: [S. n.], 2009, str. 54. [COBISS.SI-ID [13256214](#)]

19. ŠULEK, Franja, KNEZ, Željko, BÉLAFI-BAKÓ, Katalin, GUBICZA, László, HABULIN, Maja. Immobilized enzymes. V: VASIČ-RAČKI, Đurđa (ur.), VRŠALOVIĆ PRESEČKI, Ana (ur.). *Applied biocatalysis : book of abstracts*. Zagreb: Faculty of Chemistry and Chemical Engineering; Maribor: Faculty of Chemical Engineering and Technology, [2010], str. 7. [COBISS.SI-ID [14168342](#)]

20. ŠULEK, Franja, KNEZ, Željko, HABULIN, Maja. Different forms of immobilized cholesterol oxidase for potential use in biosensor technologies. V: JUVAN, Peter (ur.). 5th CFGBC Symposium, June 16th, 2010, Ljubljana, Slovenia. *From arrays to understanding diseases*. Ljubljana: Faculty of Medicine, 2010, str. 37. [COBISS.SI-ID [14200342](#)]

21. HABULIN, Maja, ŠULEK, Franja, KNEZ, Željko. Activity of cholesterol oxidase immobilized onto magnetic nanoparticles. V: *8th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers : conference program & abstract booklet, May 25-29, 2010, Rostock, Germany*. [S. l.: s. n., 2010], str. 105. [COBISS.SI-ID [14144278](#)]

1.13 Objavljeni povzetek strokovnega prispevka na konferenci

22. ŠULEK, Franja, KNEZ, Željko, DROFENIK, Mihael, HABULIN, Maja. Nanotechnologies: introduction to features, synthesis and applicability of magnetic fluids = Nanotehnologije: uvod v lastnosti, sintezo in aplikativnost magnetnih tekočin. V: 3rd Meeting of Students and University Professors Applied Biocatalysis, Mar 28th 2007, Maribor, Slovenia. *Applied biocatalysis : book of abstracts*. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo; Zagreb: Faculty of Chemical Engineering and Technology, 2007, str. 7. [COBISS.SI-ID [11465494](#)]

1.25 Drugi članki ali sestavki

23. ŠULEK, Franja. Ozon - nastanek in razkroj. *Radikal*, maj 2003, letn. 1, št. 2, str. 19-20. [COBISS.SI-ID [11605014](#)]

MONOGRAFIJE IN DRUGA ZAKLJUČENA DELA

2.11 Diplomsko delo

24. ŠULEK, Franja. *Expression optimization in Escherichia coli of wild type Cholesterol oxidase from Brevibacterium sterolicum and of its Arg477 mutants : diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa*, (Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Biokemijska tehnika, Diplomsko dela univerzitetnega študija). Maribor: [F. Šulek], 2006. XII, 57 f., ilustr. [COBISS.SI-ID [10710294](#)]

2.12 Končno poročilo o rezultatih raziskav

25. KNEZ, Željko, HABULIN, Maja, ŠKERGET, Mojca, NOVAK, Zoran, KROPE, Jurij, GORIČANEC, Darko, SINKOVIČ, Andreja, PRIMOŽIČ, Mateja, PERVA-UZUNALIĆ, Amra, ČREPINŠEK-LIPUŠ, Lucija, ŠABEDER, Saša, ŠTANDEKER, Suzana, PALJEVAC, Muzafera, MANDŽUKA, Zoran, ŠULEK, Franja, MAKOVŠEK, Katja, VERONOVSKI, Anja, MAJHENIČ, Lucija, BOŠKOSKI, Nina, KRAINER, Marko, KRME LJ, Igor. *Separacijski procesi in produktna tehnika : poročilo o rezultatih raziskovalnega programa za obdobje 2004-2008 (usposobljenost)*. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: Medicinska fakulteta: Univerzitetni klinični center, 2008. 1 zv. (loč. pag.), ilustr. [COBISS.SI-ID [13085206](#)]

Vir bibliografskih zapisov: Vzajemna baza podatkov COBISS.SI/COBIB.SI, 11. 2. 2011.

UNIVERZA V MARIBORU
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

IZJAVA DOKTORSKEGA KANDIDATA

Podpisani-a FRANJA ŠULEK, vpisna številka 95020805

izjavljam,

da je doktorska disertacija z naslovom

»NANOSTRUKTURIRANI MATERIALI ZA IMOBILIZACIJO BIKATALIZATORJ«

- rezultat lastnega raziskovalnega dela,
- da predložena disertacija v celoti ali v delih ni bila predložena za pridobitev kakršnekol izobrazbe po študijskem programu druge fakultete ali univerze,
- da so rezultati korektno navedeni in
- da nisem kršil-a avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Podpis doktorskega-e kandidata-ke:

Franja ŠULEK

