

Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Dino Skendrović

IMOBILIZACIJA ALDOLAZE ZA ODRŽIVU PROIZVODNJU PREKURSORA BOČNOG LANCA STATINA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Dino Skendrović

ALDOLASE IMMOBILIZATION FOR SUSTAINABLE PRODUCTION OF STATIN SIDE-CHAIN PRECURSOR

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Dino Skendrović

IMOBILIZACIJA ALDOLAZE ZA ODRŽIVU PROIZVODNJU PREKURSORA BOČNOG LANCA STATINA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



University of Zagreb
FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Dino Skendrović

ALDOLASE IMMOBILIZATION FOR SUSTAINABLE PRODUCTION OF STATIN SIDE-CHAIN PRECURSOR

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.

Bibliografski podatci

UDK:
Znanstveno područje: Tehničke znanosti
Znanstveno polje: Kemijsko inženjerstvo
Znanstvena grana: Reakcijsko inženjerstvo
Institucija: Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za reakcijsko inženjerstvo i katalizu
Voditelj rada: Prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki
Broj stranica:
Broj slika:
Broj tablica:
Broj priloga:
Broj literaturnih referenci:
Datum obrane:
Sastav povjerenstva za obranu:

Rad je pohranjen u:
Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb;
Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Marulićev trg 20.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Sveučilišta u Zagrebu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, održanoj dana 24. travnja 2023., te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu 20. lipnja 2023.

Podatci o mentoru

Prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki
Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Ana Vrsalović Presečki diplomirala je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu 1999. godine. Tijekom studija dva puta (1994. i 1996.) je dobila Rektorovu nagradu za studentski rad. Zaposlila se 2000. u Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Magistrirala je 2003. godine, a doktorirala 2006. godine. 2006 je godine dobila Nagradu "Vera Johanides" Akademije tehničkih znanosti Hrvatske. U prosincu 2018. potvrđen je njezin izbor u znanstveno-nastavno zvanje redovite profesorice, a u veljači 2023. izabrana je u znanstveno zvanje znanstveni savjetnik u trajnom zvanju.

Od dolaska na Fakultet do danas boravila je na nekoliko inozemnih institucija. U srpnju i kolovozu 2001. bila je dva mjeseca, a u rujnu 2007. jedan mjesec na studijskom boravku u Forschungszentrum Jülich, Institute für Biotechnologie 2, Njemačka. U ožujku 2004. boravila je dva tjedna na Fakultetu kemijskog inženjerstva u Mariboru. U veljači 2008. i 2010. boravila je po dva tjedna u Veszpremu, Mađarska na Research Institute of Chemical and Process Engineering.

Njezino područje znanstvenog i stručnog rada je primjena inženjerske metodologije pri razvoju bioprocesa. Rezultate svojih istraživanja objavila je u 36 radova u časopisima koje indeksiraju CC i SCI baze i dva znanstvena rada citirana u sekundarnim publikacijama. U Zbornicima s međunarodnih znanstvenih skupova objavila je četiri rada, u zbornicima s ostalih znanstvenih skupova i domaćih skupova sedam radova. Na međunarodnim i domaćim skupovima sudjelovala je s osamdeset i dva priopćenja. Objavila je jedno poglavlje u knjizi. Bila je voditeljica dva bilateralna projekta, te projekta zaklade HAZU. Suradnica je na pet domaćih i sedam međunarodnih projekata.

ZAHVALA

SAŽETAK

Statini su učestalo korišteni lijekovi za sniženje kolesterola niske gustoće u krvi. Zajednička karakteristika svim statinima je (3*R*, 5*R/S*)-dihidroksiheksanoatski bočni lanac koji sadrži dva kiralna centra, čija sinteza predstavlja izazov za konvencionalne kemijske metode. Iz tog razloga, sve se više razvijaju alternativne metode sinteze korištenjem biokatalizatora, koji omogućuju dobivanje čistog stereoizomera korištenjem jeftinih akiralnih supstrata. Glavni nedostatak ove metode je niska stabilnost enzima, te sklonost deaktivaciji pri višim koncentracijama supstrata.

Iz tog razloga je u ovom doktorskom radu detaljno ispitana kovalentna imobilizacija enzima 2-deoksi-D-riboza 5-fosfat aldolaza ($DERA^{024}$) na različite tipove nosioca u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida, s obzirom da imobilizacija može značajno povećati stabilnost enzima uz zadržavanje njegove aktivnosti. U tu svrhu prvo je izvršena sinteza dvije vrste nosioca, mezoporozne silike (engl. *mesostructured celluar foam,* MCF) i magnetskih nanočestica (engl. *magnetic nanoparticles,* MNP), koji su idealni kandidati za ovaj tip imobilizacije s obzirom na svoju mehaničku i kemijsku čvrstoću, biokompatabilnost i inertnost. Nakon izvršene sinteze napravljena je detaljna karakterizacija oba nosioca kako bi se utvrdile karakteristike materijala koje uključuju morfologiju, veličinu čestica i promjer pora.

Kako bi kovalentna imobilizacija enzima na sintetizirane nosioce bila moguća, potrebno je na nosioce vezati reaktivne skupine. U tu svrhu ispitane su različite kombinacije i koncentracije funkcionalizacijskih (3-aminopropiltrietoksilan (APTES), (3-metilaminopropil)trimetoksilan (APTMS) i (3-glicidiloksipropil)trimetoksilan (GPTMS)) i aktivacijskih (glutaraldehid, benzokinon, anhidrid jantarne kiseline) agensa pri čemu je praćen njihov utjecaj na procesne pokazatelje procesa imobilizacije, a to su uspješnost imobilizacije, očuvanost aktivnosti enzima te procesna stabilnost enzima. Nakon definiranja najučinkovitije kombinacije ispitivanih agensa, ispitan je utjecaj temperature i pH na proces imobilizacije. Kotlasti reaktor je u praksi jedna od najčešće korištenih izvedbi reaktora u reakcijama aldolne adicije ovog tipa. Stoga je stabilnost MCF/MNP-imobiliziranog enzima ispitana u kotlastom reaktoru kroz više ciklusa, a dobiveni rezultati uspoređeni su s rezultatima praćenja stabilnosti slobodnog enzima. S obzirom da je mezoporozna silika porozna te da to svojstvo može utjecati na procesne pokazatelje imobilizacije, a posljedično na karakteristike enzima i samu reakciju, dodatno je ispitan utjecaj veličine pora. Na ovaj način dobiveni su važni zaključci o utjecaju poroznosti na ovdje ispitivanu reakciju.

Za izradu matematičkog modela procesa s obje vrste nosioca, provedena su kinetička mjerenja pri čemu je promatran utjecaj oba supstrata i međuprodukta na specifičnu aktivnost enzima koristeći metodu početnih brzina. Iz dobivenih podataka procijenjeni su parametri Michaelis-Menteničine kinetike primjenom nelinearne regresijske analize dostupne u programskom paketu Scientist (MicroMath). Korištenjem procijenjenih kinetičkih parametara te bilančnih jednadžbi, razvijen je matematički model procesa s oba nosioca. Dobiveni rezultati uspoređeni su s onima slobodnog enzima kako bi se dobio detaljniji uvid u promjene i ponašanje procesa s imobiliziranim enzimom. Ocjena valjanosti razvijenog matematičkog modela provedena je na nezavisnom setu eksperimentalnih podataka dobivenih provedbom procesa u kotlastom reaktoru (primjena MCF i MNP), te u kotlastom reaktoru s dotokom (primjena MNP).

U zadnjem dijelu, u svrhu intenzifikacije procesa, reakcija sinteze prekursora statina provedena je u cijevnom reaktoru primjenom imobiliziranog enzima. U slučaju MCF ispitan je cijevni reaktor s nasutim slojem katalizatora, dok je kod MNP ispitan cijevni reaktor s fluidiziranim slojem katalizatora u promjenjivom magnetskom polju. Tijekom procesa praćen je utjecaj različitih protoka i vremena zadržavanja na procesne pokazatelje, konverziju, produktivnost, selektivnost i iskorištenje. Na osnovu dobivenih rezultata izvučeni su zaključci o učinkovitosti primjene oba nosioca u kontinuiranim reaktorskim sustavima.

Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju, može se zaključiti da je kovalentna imobilizacija vrlo učinkovita metoda za stabilizaciju enzima DERA^{024} korištene u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida s ciljem proizvodnje prekursora statina. Osim toga, postignuta su značajna poboljšanja aktivnosti i stabilnosti enzima za oba ispitana nosioca. Ovdje razvijeni i ocjenjeni matematički modeli predstavljaju dobre temelje za daljnju optimizaciju i primjenu ovakvog tipa imobilizacije za poboljšanje procesa enzimatske sinteze prekursora statina.

Ključne riječi: imobilizacija, aldolaza, statini, mezoporozna silika, magnetske nanočestice, matematičko modeliranje, reaktorski sustavi

ABSTRACT

Statins are the most commonly used drugs for lowering low-density cholesterol levels in the blood. Common to all statins is the (3*R*, 5*R/S*)-dihydroxyhexanoate side chain, which contains two chiral centers, the synthesis od which is a challenge for conventional chemical synthesis methods. For this reason, alternative synthesis methods using biocatalysts are increasingly being developed, which enable the production of pure stereoisomers with usage of inexpensive achiral substrates. The main drawback of this method is the low stability of the enzymes and their tendency to deactivate at higher substrate concentrations.

For this reason, the covalent immobilization of the enzyme 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase (DERA^{024}) on different types of supports in the reaction of double aldol addition of acetaldehyde and chloroacetaldehyde was investigated in detail in this thesis, with assumption that immobilization can significantly increase the stability of the enzyme while maintaining its activity. The synthesis of two types of carriers, mesoporous silica (MCF) and magnetic nanoparticles (MNP), which are ideal candidates for this type of immobilization due to their mechanical and chemical robustness, biocompatibility and inertness, was first carried out. A detailed characterization of the two carriers was performed with several methods to confirm the obtained material properties such as morphology, particle size and pore size.

In order to achieve covalent immobilization, it is necessary to bind reactive groups to the carriers that are able to form a covalent bond with the enzyme. For this purpose, different combinations and concentrations of functionalizing ((3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES), ((3-aminopropyl)trimethoxysilane (APTMS), ((3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GPTMS)) and activating (benzoquinone, glutaraldehyde, succinic anhydride) agents were tested for both carriers to determine their effects on the process indicators of immobilization, which include yield, retained activity and stability. Once the ideal combination of tested agents was found, the influence of temperature and pH on the immobilization process itself was investigated. Since a batch reactor is one of the most commonly used reactor design for reactions of this type, the stability of the MCF/MNP-immobilized enzyme in a batch reactor was tested over several cycles and compared with the stability of the free enzyme. Due to the porosity of mesoporous silica and its ability to influence the properties of the enzyme and the reaction, the effect of pore size was further investigated and relevant conclusions were drawn on the effects of porosity.

To develop a mathematical model of the reaction with both types of support, kinetic measurements were performed in which the effects of the substrates and intermediates on the

specific activity of the enzyme were observed using the initial rate method. From the data obtained, the parameters of Michaelis-Menten kinetics were determined using the nonlinear regression analysis available in the Scientist software package (MicroMath). Using the obtained parameters and reactor equations, a mathematical model of the process with both carriers was developed. The calculated parameters and the developed models were compared with those of the free enzyme to gain a more detailed insight into the changes caused by immobilization and potential process improvements. The developed models were experimentally validated in a batch reactor for both carriers and in a fed-batch reactor for magnetic nanoparticles.

In the last part of the research work, the effects of different flow rates and residence times on process indicators of conversion, productivity, selectivity and yield were investigated in a continous tubular reactor. In the case of mesoporous silica, a tubular reactor with a catalyst packed bed was tested, while for magnetic nanoparticles a tubular reactor with a catalyst fluidized bed in a variable magnetic field was investigated. Based on these results, conclusions were drawn about the efficiency of using both carriers in continuous reactor systems.

All results of this investigation suggest that covalent immobilization is a very effective choice for the stabilization of DERA^{024} enzyme in the double aldol addition reaction of acetaldehyde and chloroacetaldehyde for the production of statin precursors, and that significant improvements of enzyme activity and stability were achieved for both tested carriers. The mathematical models developed and validated here represent an important basis for the further optimization and application of this type of immobilization to improve the enzymatic synthesis process of statin precursors.

Key words: immobilization, aldolase, statins, mesoporous silica, magnetic nanoparticles, mathematical modeling, reactor systems

Sadržaj

1. Uvod 1
2. Pregled literature 3
2.1. Enzimi kao biokatalizatori 3
2.1.1. Aldolaze 4
2.2. Biokataliza u proizvodnji statina 6
2.3. Imobilizacija enzima 9
2.3.1. Metode imobilizacije 11
2.4. Mezoporozna silika 15
2.4.1. Metode sinteze mezoporozne silike 15
2.4.2. SBA materijali 18
2.5. Magnetske nanočestice 20
2.5.1. Magnetizam 21
2.5.2. Metode sinteze 23
2.5.3. Metode oblaganja 26
2.6. Matematičko modeliranje enzimatskih reakcija 28
2.6.1. Reaktorski dizajn 31
3. Eksperimentalni dio 33
3.1. Kemikalije i uređaji 34
3.2. Analitičke metode 36
3.2.1. Određivanja koncentracije supstrata i produkata HPLC analizom 36
3.2.2. Određivanje koncentracije proteina 36
3.2.3. Mjerenje aktivnosti enzima DERA^{024} 36
3.3. Mezoporozna silika 37
3.3.1. Sinteza mezoporozne silike 37
3.3.2. Karakterizacija mezoporozne silike 37
3.4. Magnetske nanočestice 38
3.4.1. Sinteza magnetskih nanočestica obloženih silikom 38
3.4.2. Karakterizacija magnetskih nanočestica 38
3.5. Funkcionalizacija i aktivacija nosilaca 39
3.6. Imobilizacija enzima na nosioce 40
3.7. Mjerenja očuvane aktivnosti i stabilnosti 41
3.8. Utjecaj pH i temperature na proces imobilizacije 41
3.9. Praćenje stabilnosti enzima DERA^{024} kod ponovne upotrebe 42
3.10. Kinetička karakterizacija enzima DERA^{024} 42
3.10.1. Kinetika u prvom stupnju reakcije 42

3.10.2. Kinetika u drugom stupnju reakcije 42
3.11. Matematičko modeliranje 43
3.11.1. Kinetički i reaktorski model 43
3.11.2. Obrada podataka 44
3.12. Sinteza prekursora statina u cijevnim reaktorima 45
3.12.1. Sinteza prekursora statina u cijevnom reaktoru s nasutim slojem katalizatora 45
3.12.2. Sinteza prekursora statina u cijevnom reaktoru s fluidiziranim slojem katalizatora 47
4. Rezultati i rasprava 48
4.1. Mezoporozna silika 49
4.1.1. MCF karakterizacija 49
4.1.2. Utjecaj funkcionalizacije i aktivacije površine nosioca na procesne pokazatelje imobilizacije na MCF nosiocu 52
4.1.3. Utjecaj pH i temperature na proces MCF imobilizacije 57
4.1.4. Utjecaj veličine pora na uspješnost imobilizacije 57
4.1.5. Praćenje stabilnosti enzima DERA^{024} kod ponovne upotrebe prilikom imobilizacije na MCF 59
4.1.6. Procjena kinetičkih parametara i razvoj matematičkog modela MCF-imobiliziranog enzima DERA^{024} 59
4.1.7. Sinteza prekursora statina u cijevnom reaktoru s nasutim slojem katalizatora 62
4.2. Magnetske nanočestice 67
4.2.1. MNP karakterizacija 67
4.2.2. Utjecaj funkcionalizacije i aktivacije površine na procesne pokazatelje imobilizacije na MNP nosiocu 69
4.2.3. Utjecaj pH i temperature na proces imobilizacije na MNP 73
4.2.4. Praćenje stabilnosti enzima DERA^{024} kod ponovne upotrebe prilikom imobilizacije na MNP 73
4.2.5. Kinetika i matematički model MNP-imobiliziranog DERA^{024} enzima 74
4.2.6. Sinteza prekursora statina u cijevnom reaktoru s fluidiziranim slojem katalizatora 78
4.3. Usporedba rezultata 82
5. Zaključak 83
6. Literatura 86
7. Prilozi 104
8. Skraćenice i simboli 106
8.1. Skraćenice 106
8.2. Simboli 107
9. Životopis 108

1. Uvod

Biokataliza, kao metoda ubrzavanja kemijskih reakcija, sve više se koristi u različitim industrijskim procesima. Korištenje prirodnih katalizatora, odnosno enzima, donosi značajne prednosti u odnosu na kemijske katalizatore, uključujući provedbu visoko stereoselektivnih reakcija pri blagim uvjetima temperature, tlaka i pH vrijednosti. Osim toga, biokataliza je usklađena s načelima zelene kemije, koja su u posljednjih nekoliko desetljeća postala ključni okvir za različite procese u kemijskoj industriji [1,2].

Specifično, u području farmaceutske industrije, sinteza statina, lijeka od posebnog značaja u farmakološkom liječenju visoke razine kolesterola niske gustoće (LDL-kolesterola) te s time povezanih kardiovaskularnih bolesti od iznimne je važnosti [3–5]. Uobičajene metode sinteze statina uključuju kemijske reakcije, kroz dugotrajan višestupnjeviti proces pri ekstremnim uvjetima tlaka i temperature, a sinteza je dodatno otežana prisutnošću dva kiralna centra u molekularnoj strukturi statina [5,6].

Zbog navedenih razloga, postoji potreba za razvojem ekološki prihvatljivih i ekonomski prihvatljivih metoda proizvodnje statina. Kao održivo rješenje nameću se različite biokatalitičke sintetske metode koje iskorištavaju već spomenute prednosti biokatalize, rad pri blagim reakcijskim uvjetima te visoka stereokemijska čistoća produkta [5,7]. U tim procesima mogu se primijeniti različiti enzimi, ali kao najperspektivniji se pokazao enzim 2-deoksi-D-riboza 5-fosfat aldolaza (DERA, EC 4.1.2.4). Enzim DERA katalizira sekvencijalnu aldolnu adiciju između kloroacetaldehida i acetaldehida, pri čemu dolazi do sinteze međuprodukta laktola s dva kiralna centra koji se onda u daljnjim koracima koristi za sintezu farmaceutika Atorvastatina i Rosuvastatina [8,9]. Usprkos tim prednostima, postoje značajni problemi koji sprječavaju širu primjenu enzima DERA, a to su ponajprije visoki troškovi proizvodnje enzima te njegova osjetljivost na visoke koncentracije supstrata i međuprodukta reakcije koji dovode do pojave inhibicije i deaktivacije [10,11].

Kako bi se pronašla rješenja za navedene probleme, trenutno se provode razna istraživanja koja uključuju intervencije na samom enzimu pri čemu se stabilnost i aktivnost enzima pokušava povećati primjenom tehnika mutageneze i direktne evolucije, pa sve do istraživanja novih reakcijskih uvjeta s naglaskom na ispitivanje različitih metoda imobilizacije [11–14]. Imobilizacijom enzima na čvrsti nosilac, tj. pretvorbom enzima iz topivog u netopivi oblik, može se poboljšati procesna i skladišna stabilnost enzima, olakšano je izdvajanje iz reakcijske smjese te je shodno tome omogućena i višestruka upotreba samog enzima [15,16]. Među raznim tehnikama imobilizacije na čvrsti nosilac, kovalentna imobilizacija se izdvaja zbog prednosti

koje pruža čvrsta kemijska veza između enzima i nosioca. Ova veza sprječava odvajanje enzima s podloge nosioca pod djelovanjem snažnih mehaničkih sila prisutnih u svim vrstama kemijskih reaktora, što je poglavito izraženo u industrijskim procesima [17].

Pri izboru nosioca koji će biti korišteni kao podloga za kovalentnu imobilizaciju, važno je uzeti u obzir cijenu, termičku i mehaničku stabilnost materijala, kao i na nužnost visoke specifične površine koja se može lako kemijski modificirati raznim aktivacijskim agensima na koje će se naknadno vezati sam enzim. Ovim zahtjevima odgovaraju materijali anorganske strukture, poput različitih oblika silike i metalnih oksida [15–17].

Silika, posebno u svojem mezoporoznom obliku koju karakterizira veličina pora od 2 nm do 50 nm, idealan je kandidat i široko se koristi u industriji. Ova vrsta silike ima veliku specifičnu površinu i volumen pora, mogućnost lakog definiranja veličine pora i strukture tijekom sinteze, a njena površina se lako modificira zbog visoke koncentracije silanolnih skupina [18–20].

Kod metalnih oksida, kao što je magnetit Fe_3O_4, najvažnija karakteristika je njihova paramagnetičnost, koja značajno olakšava manipulaciju česticama pomoću vanjskog magnetskog polja, što je od iznimne koristi tijekom procesa separacije i izdvajanja čestica iz reakcijske smjese. S obzirom da je magnetit sklon oksidaciji i aglomeraciji, potrebno ga je obložiti zaštitnim slojem pri čemu se najčešće koristi silika, pa time magnetit također dobiva površinu pogodnu za vezanje raznih aktivacijskih skupina [21–24].

Enzimske reakcije su iznimno kompleksni procesi, koje je moguće kvalitativno i kvantitativno pojednostaviti korištenjem matematičkog modeliranja. Ono nam omogućuje lakše predviđanje ponašanja sustava, što može doprinijeti izbjegavanju inhibicija i deaktivacija enzima, izboru početnih reakcijskih uvjeta te određivanju idealnog tipa reaktora za promatranu reakciju [25].

U ovom radu provedena je optimizacija imobilizacije enzima $DERA^{024}$ na mezoporoznu siliku i magnetske nanočestice, kako bi se razvila ekonomski i okolišno prihvatljiva metoda imobilizacije enzima $DERA^{024}$ za provedbu reakcije dvostruke aldolne adicije u svrhu proizvodnje prekursora bočnog lanca statina, uz povećanje stabilnosti te zadržavanje aktivnosti enzima $DERA^{024}$. Hipoteze ovog istraživanja bile su sljedeće:

H1 – Kovalentnom imobilizacijom moguće je povećati stabilnost te zadržati aktivnost enzima DERA u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida.

H2 – Izrada matematičkog modela omogućit će izbor optimalnih reakcijskih uvjeta i tipa reaktora za provedbu sinteze prekursora bočnog lanca statina katalizirane imobiliziranom DERA-om.

2. Pregled literature

2.1. Enzimi kao biokatalizatori

Katalizator je tvar koja povećava brzinu kemijske reakcije, a da se sam ne troši ili mijenja svoju strukturu. Enzimi, definirani kao biološki katalizatori, visoko su selektivni te imaju ključnu ulogu u ubrzavanju i regulaciji metaboličkih reakcija u živim stanicama. Bez pomoći enzima vitalni procesi poput probave hrane i sinteze DNK trajali bi iznimno dugo. Velika prednost enzima, naročito u njihovoj primjeni u industrijskim procesima, je djelovanje pri blagim uvjetima pH i temperature. Sama enzimska reakcija odvija se na aktivnom mjestu, specifičnoj regiji enzima koja se sastoji od bočnih lanaca aminokiselina koji se vežu na molekulu supstrata čime se značajno ubrzava kemijska pretvorba supstrata u željeni produkt [26].

Selektivnost enzima prema supstratu temelji se na interakcijama između enzima i supstrata. Korištenjem međumolekularnih sila kao što su vodikove veze, van der Waalsove sile te polarne i hidrofobne veze, aminokiseline na aktivnom mjestu enzima postižu optimalnu interakciju sa supstratom za provođenje reakcije. Po pitanju selektivnosti, najveća prednost korištenja enzima u farmaceutskoj industriji je njihova regio-, stereo- i enantioselektivnost, tj. mogućnost proizvodnje samo jednog enantiomera u stereoselektivnoj reakciji [27]. Kao katalizatori, enzimi ubrzavaju reakcije smanjujući energiju aktivacije, bez utjecaja na ravnotežu reakcije. Svaki enzim ima optimalnu pH vrijednost pri kojoj postiže maksimalnu katalitičku aktivnost, na što utječu ionizacijska stanja bočnih lanaca aminokiselina pri različitim pH vrijednostima. U proizvodnji enzima, mikroorganizmi, poput bakterija, najčešće se koriste zbog lakoće rukovanja, sposobnosti proizvodnje u velikim količinama te brzog rasta. Nakon pročišćavanja, takvi enzimi se mogu koristiti u raznim industrijama i proizvodima kao što su biogorivne ćelije, formulacije deterdženata, biosenzori te proizvodnja hrane i farmaceutika [28,29].

Enzimi se dijele prema tipu reakcije i specifičnosti enzima prema supstratu. Kategoriziraju se prema tzv. komisijskom broju enzima (engl. *enzyme commision number,* EC) koji se sastoji od četiri broja koji predstavljaju hijerarhiju enzimatske aktivnosti, od glavne skupine pa sve do podskupina koje daju specifičniji uvid u ulogu pojedinog enzima te olakšavaju njegovu kategorizaciju. Postoji šest glavnih skupina enzima [30]:

- Oksidoreduktaze – kataliziraju prijenos elektrona iz jednog redoks sustava u drugi. Zahtijevaju koenzime.

- Transferaze – kataliziraju prijenos funkcionalnih skupina u reakcijama. Također zahtijevaju koenzime.
- Hidrolaze – imaju istu ulogu kao transferaze, pri čemu akceptor mora biti molekula vode (reakcije hidrolize).
- Liaze – kataliziraju reakcije cijepanja ili stvaranja kemijskih veza.
- Izomeraze – kataliziraju reakcije konverzije supstrata u izomer.
- Ligaze – kataliziraju reakcije povezivanja molekula stvaranjem nove kemijske veze.

2.1.1. Aldolaze

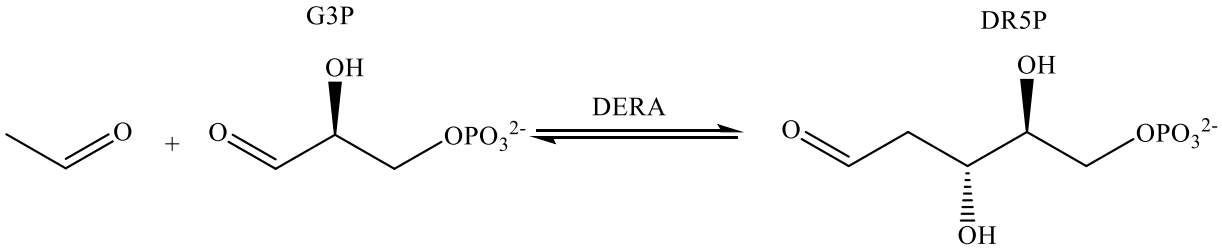
Aldolaze su enzimi koji kataliziraju aldolne reakcije ključne za različite metaboličke procese, te pripadaju skupini liaza. Ovi enzimi omogućuju reverzibilno cijepanje i stvaranje ugljik-ugljik veza reakcijom aldolne adicije nukleofilnog donora na elektrofilni akceptor, te u prirodi imaju glavnu ulogu u metabolizmu ugljikohidrata, uključujući glikolizu i glukoneogenezu. U industrijskoj primjeni je od velikog značaja njihova stereoselektivnost te se često koriste za sintezu kiralnih molekula u farmaceutskoj industriji. S obzirom na njihovu potrebu za koenzimom te specifičnosti prema supstratu, aldolaze su kategorizirane u dvije skupine na temelju svojih katalitičkih mehanizama i strukturnih značajki [31]:

- Aldolaze tipa I – uglavnom se nalaze u višim organizmima, što uključuje životinje, biljke i neke bakterije. Mehanizam njihova djelovanja temelji se na stvaranju Schiffove baze između supstrata i lizina prisutnog na aktivnom mjestu enzima, čime se olakšava cijepanje ugljik-ugljik veze kroz stvaranje enaminskog intermedijera. U metabolizmu živih organizama, fruktoza-bisfosfat aldolaza ima najvažniju ulogu u procesu glikolize, tj. pretvorbi fruktoze 1,6-bisfosfata u dihidroksiaceton fosfat i gliceraldehid-3-fosfat [32].
- Aldolaze tipa II – uglavnom se nalaze u bakterijama, gljivama i algama. Njihova specifičnost je korištenje dvovalentnog metalnog iona, najčešće cinka ili magnezija, kao kofaktora za stabilizaciju enolatnog intermedijera tijekom reakcija. Za razliku od aldolaze tipa I, ne stvaraju Schiffovu bazu već koordiniraju metalne ione direktno do supstrata kako bi katalizirali reakciju [33].

2.1.1.1. Deoksiriboza-fosfat aldolaza (EC 4.1.2.4)

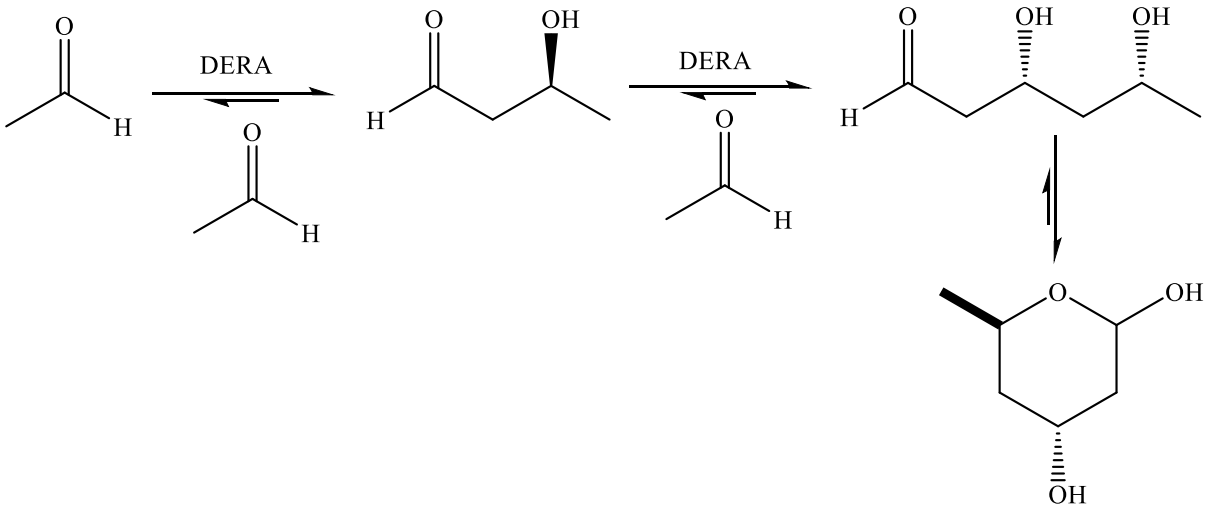
Enzim 2-deoksi-D-riboza-5-fosfat aldolaza (DERA) pripada aldolazama tipa I. Sastoji se od 259 aminokiselina s molekulskom težinom od 27.7 kDa. Aminokiselina koji reagira s supstratom na aktivnom mjestu stvarajući Schiffovu bazu je lizin na poziciji 167, Liz167 [34,35].

In vivo, enzim DERA katalizira reakciju aldolne adicije acetaldehida i gliceraldehid-3-fosfata (G3P) kako bi se formirao 2-deoksi aldehid s novim stereogenim centrom, 2-deoksiriboza-5-fosfat (DR5P) (Slika 1). Ono što izdvaja enzim DERA-u u usporedbi s ostalim aldolazama (izuzev fruktoza-6-fosfat aldolaze, FSA) je mogućnost korištenja različitih aldehida kao supstrata, koji mogu sadržavati i do četiri ugljika [11,13,36,37].



Slika 1. *In vivo* reakcija stvaranja 2-deoksiriboza-5-fosfata katalizirana enzimom DERA [37].

Najveća prednost korištenja enzima DERA u industrijskoj primjeni je kataliziranje reakcije stvaranja stereo-selektivnih ugljik-ugljik veza, bez upotrebe koenzima [38–40]. Najznačajniju primjenu otkrili su 1994. godine Gijsen i sur. [38] (Slika 2) koji su primjenom reakcije tri akiralna C2 aldehida katalizirane enzimom DERA postigli stvaranje 2,4-dideoksiheksoze koja je prekursor inhibitora HMG-CoA reduktaze, to jest statina.

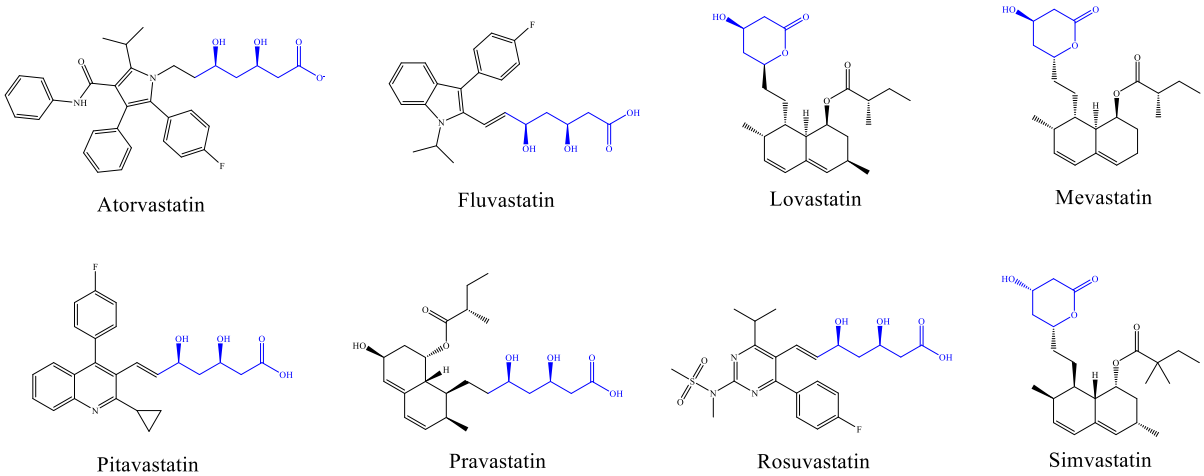


Slika 2. Reakcija dvostruke aldolne adicije tri acetaldehida katalizirana enzimom DERA [38].

2.2. Biokataliza u proizvodnji statina

Statini su skupina lijekova za snižavanje lipida koji se često propisuju za liječenje i prevenciju kardiovaskularnih bolesti. Inhibicijom enzima 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktaze statini učinkovito snižavaju razinu kolesterola u krvi, posebice kolesterola niske gustoće (engl. *low density lipoprotein*, LDL), koji se često pretpostavlja "lošim" kolesterolom. Smanjenje LDL kolesterola za posljedicu ima manji rizik od razvoja ateroskleroze i posljedičnih snažnih simptoma kardiovaskularnih bolesti kao što su srčani i moždani udar [3,4,41,42]. Statini zauzimaju iznimno visok udio na tržištu farmaceutika, naročito atorvastatin poznat pod komercijalnim imenom Lipitor™, koji je od svojeg dolaska na tržište 1996. pa sve do danas generirao više od 125 milijardi USD profita [43].

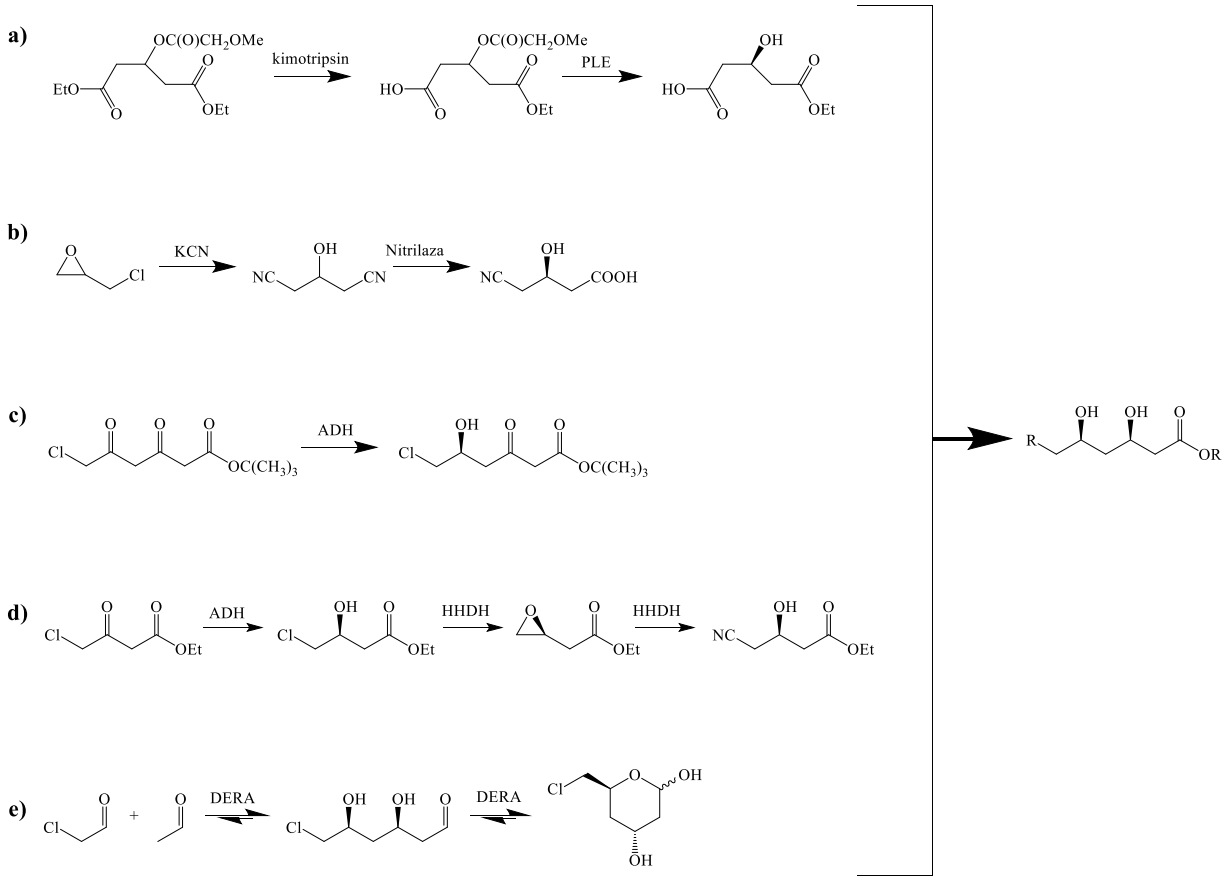
Na tržištu je uz atorvastatin trenutno dostupno još sedam varijanti statina (fluvastatin, lovastatin, mevastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin i simvastatin) od kojih svaki posjeduje isti farmakofor, a to je *syn*-3,5-dihidroksi karboskilat bočni lanac [44] (Slika 3). S obzirom na strukturnu sličnost tog farmakofora i HMG-CoA, statini rade na principu kompetitivne inhibicije HMG-CoA reduktaze, te posljedično blokiraju pristup HMG-CoA prema aktivnom mjestu reduktaze. Time se prekida sinteza kolesterola u jetri, aktiviraju se LDL receptori na površini stanice te dolazi do smanjenja LDL kolesterola u krvi za 20 % do 55 % [45–47]. Prva poznata sinteza statina provedena je 1971., kad su Endo i sur. [48] izolirali molekulu mevastatina iz plijesni *Penicillium citrinum*. Napredak u sintezi statina od te godine pa do danas bio je vrlo brz i učinkovit, te su statini koji se danas najviše koriste (fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin i pitavastatin) potpuno sintetske molekule poznate i pod nazivom super-statini zbog svoje iznimne kliničke učinkovitosti [49].



Slika 3. Struktura svih tržišno dostupnih statina s označenim farmakoforom [43].

Sinteza prekursora statina kemijskim putem je iznimno zahtjevan, skup i okolišno nepovoljan proces. Većina sinteza provodi se u organskim otapalima uz korištenje katalizatora od plemenitih metala. Procesi su energetski vrlo zahtjevni jer reakcijske temperature moraju biti vrlo niske, a tlakovi visoki. Na kraju procesa nastaju produkti koji nisu optički čisti što predstavlja problem u separaciji željenih, konačnih produkata [49–51]. Uzimajući u obzir spomenute izazove, zadnjih trideset godina intenzivno se radi na razvoju ekonomski i okolišno povoljnijih metoda za proizvodnju bočnog lanca statina, pri čemu je glavni fokus sve više na biokatalitičkim i kemoenzimatskim postupcima [8,36,43,51–53].

Zbog imanentnih karakteristika enzima koje uključuju optimalnu aktivnost pri niskim temperaturama (<50 °C) i neutralnom pH u vodenom mediju, te izraženu enantio-, regio- i stereoselektivnost, njihova upotreba se nameće kao najbolji način rješavanja problema kemosinteze bočnog lanca statina. Mnoge farmaceutske tvrtke kao što su Pfizer, Lek, Diversa, Dow i Codexis već godinama istražuju i aktivno primjenjuju biokemijske načine sinteze bočnog lanca statina, a na Slici 4. prikazane su najučestalije metode [52,54–57].



Slika 4. Biokatalitički putevi sinteze bočnog lanca statina [51].

Prva metoda (Slika 4a) temelji se na reakcijama enzimatske desimetrizacije, gdje se pomoću kimotripsina i enzima esteraze iz svinjske jetre (engl. *pig-liver esterase*, PLA) dolazi do konačnog produkta acetonida [58]. Druga metoda (Slika 4b) se također temelji na reakciji desimetrizacije uz primjenu enzima nitrilaze kako bi se dobio prekursor atorvastatina, etil-6-cijano-(3*R*, 5*R*)-dihidroksiheksanoat visoke optičke čistoće [59,60]. Metoda na Slici 4c temelji se na principu enantioselektivne redukcije prokiralnih ketona koristeći enzim alkohol dehidrogenazu (ADH) [61,62]. Kombinacijom enzima ADH i halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH) (Slika 4d) postiže se enantioselektivna redukcija kloro-acetoacetata s enzimom ADH u prvom koraku, da bi se u iduća dva koraka klorna skupina zamijenila nitrilnom skupinom uz primjenu enzima HHDH [63,64]. Posljednja metoda (Slika 4e), koja je ujedno i najperspektivnija, je upotreba enzima DERA koji katalizira reakciju dvostruke aldolne adicije akiralnih supstrata acetaldehida i kloroacetaldehida kako bi se dobio derivat laktola. Potencijal ove metode leži u činjenici da je moguće dobiti optički čistu molekulu s dva kiralna centra u samo jednom koraku, polazeći od vrlo jeftinih i lako dostupnih supstrata [8,9,37,65–67].

Unatoč navedenim prednostima, praktična primjena enzima DERA za sintezu intermedijera statina ima i nekoliko nedostataka. Najistaknutiji među njima su značajna osjetljivost na visoke koncentracije supstrata, što dovodi do njegove deaktivacije i, posljedično, potrebe za primjenom vrlo visokih količina enzima kako bi se zadovoljili zahtjevi industrijske produktivnosti, te niski afinitet prema kloroacetaldehidu [9,12,57,68]. Zbog toga se kontinuirano razvijaju nove strategije poboljšanja stabilnosti DERA-e, kombinacijom tehnika genetičkog i enzimskog inženjerstva (usmjerena evolucija, racionalni dizajn) [9,12,66,69] kako bi se promijenila sama proteinska struktura enzima i tako povećala njegova otpornost prema inaktivaciji, potom imobilizacija [11,67,70,71] koja može poboljšati stabilnost te omogućiti recikliranje enzima te konačno primjena cijelih stanica (engl. *whole-cell*) [68,72,73] koja značajno snižava cijenu i pojednostavljuje cjelokupni proces.

Greenberg i sur. [9] poboljšali su enzim DERA iz *Escherichia coli* (*E. coli*) korištenjem genskih knjižnica (engl. *gene library*). Genske knjižnice sadrže DNA sekvence enzima prisutnih u prirodnim staništima diljem svijeta. Korištenjem brze i visoko propusne (engl. *high-throughput*) fluoroscentne analize, pronašli su petnaest DERA enzima s potencijalnom aktivnošću u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida. Nakon ekspresije u *E. coli*, svi enzimi testirani su u navedenoj reakciji pri čemu je u jednoj od reakcija dobiven konačni produkt laktol optičke čistoće od 99,9 %, a volumetrijska produktivnost je poboljšana s 0,08 g L^{-1} h^{-1} na čak 30,6 g L^{-1} h^{-1}.

Jiao i sur. [74] koristili su metodu nasumične mutageneze kako bi poboljšali aktivnost enzima DERA iz *Levilactobacillus brevis* (*L. brevis*). Ispitali su 2,000 klonova u reakciji acetaldehida i kloroacetaldehida, pri čemu su suzili izbor na dva mutanta Thr29Val i Thr29Leu. Nakon detaljne vizualne karakterizacija strukture enzima, enzimi su dodatno poboljšani ciljanom mutagenezom na specifičnim mjestima (engl. *site-directed mutagenesis*). Dobiveni mutirani enzimi bili su sedam puta aktivniji u reakciji dvostruke aldolne adicije u usporedbi s početnim prirodnim tipom enzima.

U području imobilizacije Subrizi i sur. [71] ispitali su više vrsta nekovalentne fizikalne imobilizacije DERA iz *E. coli* na višestjenčane ugljične nanocijevi (engl. *multi-walled carbon nanotubes*, MWCNT). Najboljom se pokazala direktna ionska izmjena s oksidiranim MWCNT, i s tom metodom postignuta je povećana stabilnost enzima kroz više ciklusa reakcije dvostruke aldolne adicije, te bolja tolerancija na visoke koncentracije acetaldehida. Nara i sur. [75] također su ispitali fizikalnu adsorpciju DERA iz *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumonia*), koristeći mezoporoznu siliku kao nosilac. Iako je imobilizirani enzim pokazao puno manju aktivnost u *in vivo* reakciji cijepanja DR5P, postignuta je puno bolja otpornost na acetaldehid te nešto bolja aktivnost u reakciji dvostruke aldolne adicije. Zhang i sur. [76] fokusirali su se na imobilizaciju postignutu konjugacijom i umrežavanjem (engl. *crosslinking*) DERA na polimernu membranu. Iako je postignuta povećana tolerancija prema acetaldehidu, aktivnost imobiliziranog enzima bila je značajno smanjena.

Ošlaj i sur. [68] su ispitali aktivnost DERA dobivenih fermentacijom iz *E. coli* u procesu sinteze prekursora bočnog lanca statina. Po pitanju osjetljivosti na acetaldehid, nisu postignute značajne promjene, ali optimizacijom procesa u kotlastom reaktoru s dotokom postignuta je vrlo visoka volumetrijska produktivnost od 50 g L^{-1} h^{-1} kroz dva sata, uz optičku čistoću produkta od 99,9 %.

2.3. Imobilizacija enzima

Imobilizacija enzima u osnovi je samo prijelaz enzima iz homogenog u heterogeni oblik, to jest zatvaranje i lokalizacija enzima u definirane prostorne granice uz zadržavanje njegove katalitičke aktivnosti [77].

Heterogenizacija enzima u pravilu ima dvije glavne svrhe, a to su zadržavanje enzima u prostoru te njegova stabilizacija. Ove prednosti moraju se odvagnuti u odnosu na nedostatke kao što su troškovi imobilizacije i potencijalno smanjenje katalitičke učinkovitosti. Glavne prednosti imobiliziranog enzima uključuju jednostavnost ponovne upotrebe, poboljšanu pH i toplinsku stabilnost te olakšano odvajanje od reakcijske smjese. Osim toga, imobilizacija

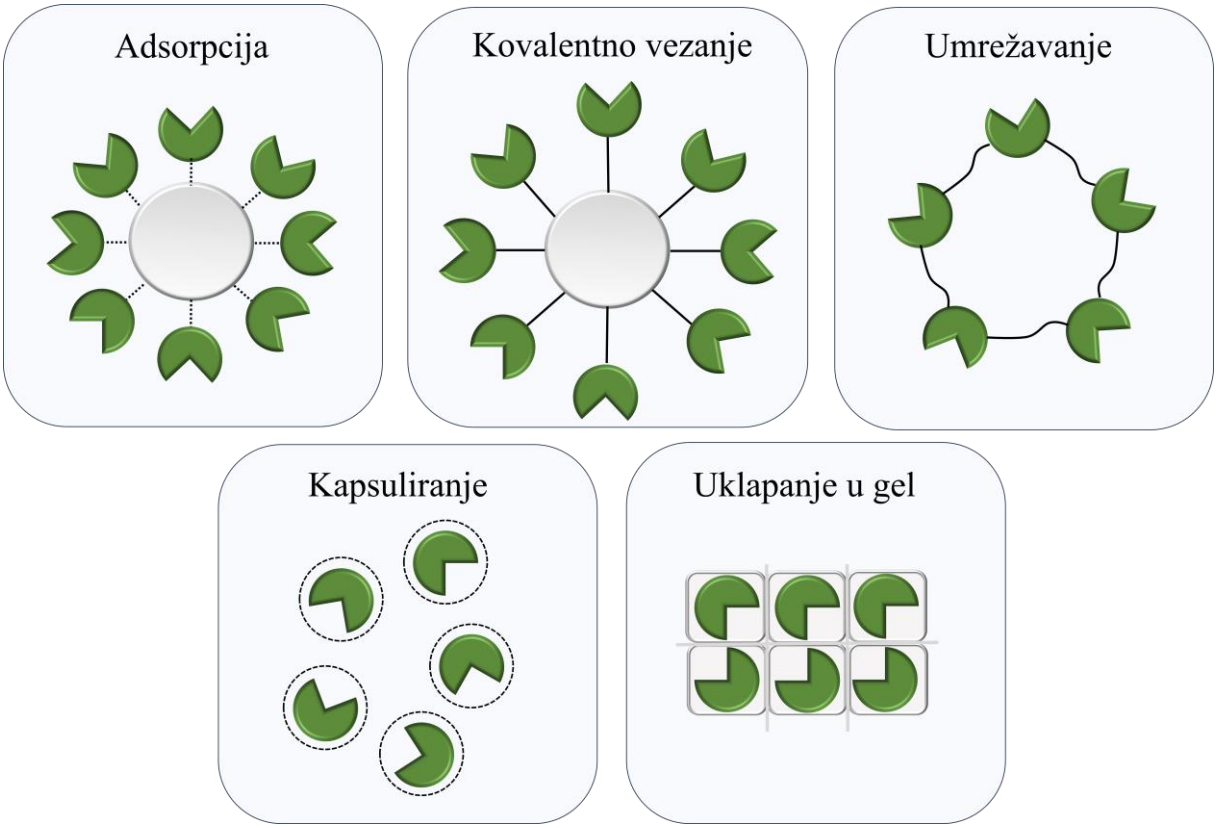
pomaže u održavanju konstantnih uvjeta bliske okoline enzima te ih štiti od promjena u pH, temperaturi ili ionskoj jakosti, što općenito rezultira povećanom stabilnošću. Imobilizacija enzima sa sobom nosi određene troškove, koji su uzrokovani troškovima korištenih materijala i vremena provedenog na izradu/nabavu tih materijala i samu imobilizaciju. Kako je u industrijskim procesima primarni cilj smanjiti jedinične troškove i povećati proizvodnju po jedinici vremena, imobilizacija ima ekonomskog smisla samo ako se enzim može ponovno upotrijebiti kroz više ciklusa, čime se značajno smanjuju jedinični troškovi proizvodnje. Uz to, imobilizirani enzimi omogućuju pakiranje u kolone za provođenje kontinuiranih procesa, čime je izuzetno olakšano izdvajanje imobiliziranog enzima iz reakcije nakon završetka procesa [16,78–81].

Većina metoda imobilizacije zahtijeva primjenu nosioca, a karakteristike izabranog nosioca imaju značajan utjecaj na katalitičke mogućnosti enzima. Izbor samog nosioca, bez obzira radi li se o organskom ili anorganskom nosiocu, se u pravilu uvijek svodi na slijedeće faktore [82]:

- Specifična površina i poroznost – idealno je da specifična površina bude veća od 100 $m^2\ g^{-1}$ te u slučaju postojanja pora, da su veličine tih pora općenito >30 nm, iako ovaj faktor najviše ovisi o tipu enzima i provođenoj reakciji.
- Prisutnost funkcionalnih skupina – način aktivacije nosioca, te prisutnost, raspodjela i gustoća funkcionalnih skupina na enzimu određuju razinu očuvane aktivnosti imobiliziranog enzima, kao i njegovu operacijsku stabilnost.
- Veličina i oblik – kako bi se pojednostavilo rukovanje imobiliziranim enzimom tijekom procesa kao što su miješanje i filtracija, idealno je koristiti čestice nosioca ujednačenog oblika i veličina. Poželjno je da čestice budu sferične da se smanji utjecaj povratnog tlaka u protočnim reaktorima te da je čestice lakše karakterizirati.
- Hidrofilnost/hidrofobnost – kompatibilnost nosioca s tekućom fazom reakcije je ključna kako bi se omogućila slobodna izmjena supstrata i produkta između korištene otopine i enzima. Također ima utjecaj na životni vijek nosioca.
- Mehanička stabilnost – kako se većina industrijskih procesa s imobiliziranim enzimom provodi u reaktorima s miješanjem ili nasutim slojem katalizatora, nužno je da nosilac bude dovoljno mehanički stabilan kako bi izdržao smična naprezanja i povratne tlakove prisutne u reaktorima takvog tipa.
- Mikrobna rezistentnost – trajnost nosioca često je određena s njegovom otpornošću prema mikrobnoj degradaciji.

2.3.1. Metode imobilizacije

Metode imobilizacije u pravilu se dijele na metode koje zahtijevaju stvaranje određenog tipa veze (kovalentno vezanje, fizikalna adsorpcija, umrežavanje) te na metode fizičkog uklapanja enzima (kapsuliranje, uklapanje u gel strukturu) [81]. Navedene metode vizualno su prikazane na Slici 5.



Slika 5. Metode imobilizacije enzima.

Fizikalna adsorpcija općenito je gledajući najjednostavnija imobilizacijska metoda i stoga se često koristi u industrijskoj proizvodnji. Metoda se temelji na stvaranju slabih fizikalnih veza (vodikove veze, kiselinsko-bazne i van der Waals interakcije) između enzima i nosioca. Najveće prednosti ove metode su vrlo mali rizik od denaturacije enzima u samom procesu vezanja, te jednostavnost imobilizacije s obzirom da nosilac nije potrebno dodatno tretirati ni aktivirati funkcionalnim skupinama. Glavni nedostatak ove metode je što su postignute interakcije između enzima i nosioca često preslabe da bi spriječile istjecanje/odvajanje (engl. *leaching*) enzima s podloge nosioca. Kako bi se odvajanje svelo na najmanju moguću mjeru, važno je prilagoditi materijal (veličina pora, morfologija i tome slično) te pronaći optimalne imobilizacijske uvjete za korišteni enzim. Ionska jakost otopine, pH vrijednost i temperatura su parametri koji najviše utječu na adsorpciju enzima [81,83,84].

Umrežavanje je način imobilizacije enzima koji ne zahtjeva prisutnost nosioca, a temelji se na principu stvaranja kompleksnih trodimenzionalnih enzimskih struktura povezivanjem amino ili karboksilnih skupina na enzimu s bifunkcionalnim ili multifunkcionalnim reagensima, tj. molekulama umreživala. Takvim vezanjem stvaraju se nove makromolekularne strukture koje često imaju drugačija fizikalno kemijska svojstva od početnih spojeva, te enzimi postaju hidrofobni što omogućuje lako izdvajanje iz reakcijske otopine. Kemijski spojevi koji se koriste kao umreživala za povezivanje enzima mogu imati jednu, dvije ili više reaktivnih skupina koje reagiraju s funkcionalnim skupinama na enzimu [85]. Glutaraldehid je najviše korišteno i ispitano umreživalo [86]. Prednosti ove metode su jednostavnost i povećana stabilnost enzima, a nedostaci su vrlo slaba mehanička stabilnost što ograničava njihovu upotrebu na niskotlačne reakcijske sustave te mogućnost značajnog pada aktivnosti zbog kompleksnosti interakcija između enzima i umreživala [85,87].

Kapsuliranje i uklapanje u gel su metode imobilizacije koje se zasnivaju na zadržavanju enzima u većinski polimernim nosiocima sa strukturom rešetke ili polu-propusne membrane, čime je kretanje enzima strogo definirano u granicama imobilizacijskog materijala, kroz koje supstrati i produkti mogu slobodno prolaziti. Budući da ne dolazi do stvaranja kovalentnih veza između enzima i nosioca, promjene u konformaciji ovako imobiliziranih enzima su relativno male ili nepostojeće, što rezultira relativno visokom katalitičkom aktivnošću. Ova metoda imobilizacije često ima visok prinos imobilizacije i može se koristiti za ko-imobilizaciju enzima. Glavni nedostatak ove metode je difuzija između membrane/rešetke i reakcijske otopine koja ima značajan utjecaj na prolazak makromolekularnih supstrata kroz mrežu. Iz tog razloga ova metoda prikladna je samo za enzime i supstrate čija je molekulska veličina manja od veličine pora membrane/rešetke. Drugi značajan nedostatak vezan uz difuziju je taj što u slučaju vrlo brzog odvijanja reakcije dolazi do nakupljanja značajne količine produkta unutar pora kapsule/gela, što ima negativan utjecaj na brzinu reakcije te može dovesti i do puknuća same strukture nosioca [88–90].

2.3.1.1. Kovalentno vezanje

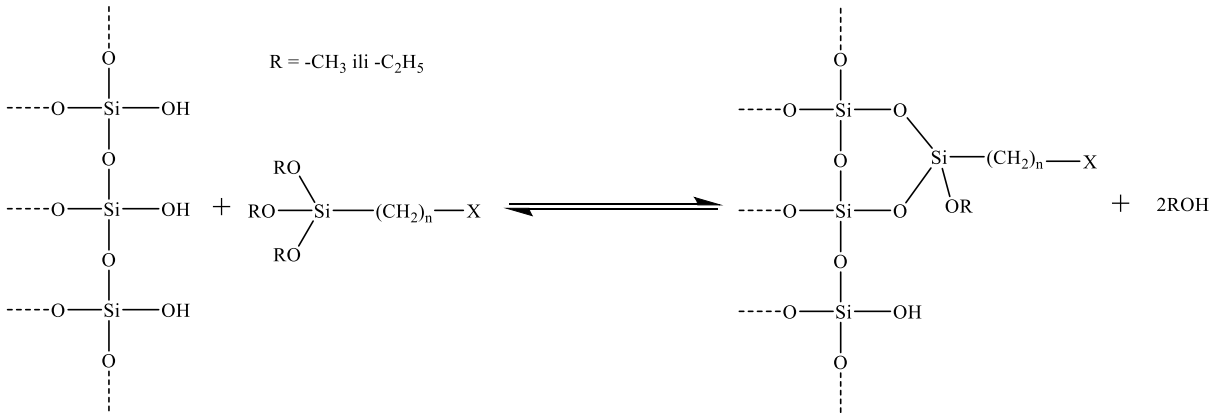
Metoda kovalentnog vezanja je tradicionalni i učestalo korišteni pristup za imobilizaciju enzima u kojem se enzimski bočni lanci aminokiselina vežu na specifične funkcionalne skupine nosioca preko kovalentnih veza. Nužno je da funkcionalne skupine na enzimu koji sudjeluju u kovalentnoj vezi, kao što je ε-amino skupina lizina, tiolna skupina cisteina i karboksilna skupina asparaginske kiseline, nisu bitne za katalitičku aktivnost enzima u reakciji. Za primjenu ove

imobilizacije, nosilac mora posjedovati reaktivne kemijske skupine kao što su epoksi, amino, alkilne ili karboksilne skupine, ili se mora moći lako modificirati istima [82,91,92].

Imobilizacija obično uključuje nekoliko koraka za povećanje stabilnosti kovalentne veze. Ključno je odabrati prikladan nosilac prema kriterijima navedenim u poglavlju 2.3. Odabrani nosilac zatim se aktivira uvođenjem funkcionalnih skupina na njegovu površinu koje omogućuju kovalentno vezanje s enzimom. U zadnjem koraku reaktivni bočni lanci aminokiselina na enzimu reagiraju s funkcionalnim skupinama na nosiocu pri čemu dolazi do stvaranja kovalentne veze nizom kemijskih reakcija kao što su kondenzacija, alkilacija i aciliranje [93].

Ova metoda imobilizacije rezultira stvaranjem snažnih veza između enzima i nosioca, s minimalnom mogućnošću za odvajanje enzima s površine nosioca kao što je slučaj kod adsorpcije te posljedično dovodi do povećane stabilnosti i robusnosti imobiliziranog enzima što često ima i pozitivan utjecaj na termostabilnost. Glavni nedostatci ove metode su kompleksnost funkcionalizacije i aktivacije nosioca te naknadnog vezanja enzima, primjena ograničena samo na inherentno stabilne enzime zbog intenziteta kemijske modifikacije te konformacijske promjene na enzimu koje ponekad mogu smanjiti njegovu aktivnost [16,90,94].

Po pitanju funkcionalizacije anorganskih nosioca, najčešće se primjenjuje postupak silanizacije koji podrazumijevanje uvođenje raznih oblika organosilana na površinu nosioca pri čemu dolazi do stvaranja kovalentne veze između organosilana i -OH skupina na površini nosioca (Slika 6). Trialkoksiorganisilani koje se najviše primjenjuju za ovaj postupak imaju općenitu formulu $(RO)_3Si\text{-}(CH_2)_n\text{-}X$, gdje X predstavlja reaktivnu skupinu na koju se enzim može vezati direktno, kao što je to recimo primjer kod epoksi skupine prisutne na (3-glicidiloksipropil)trimetoksilanu (GPTMS), ili skupinu na koju je još potrebno dodati aktivacijsku molekulu koja će omogućiti vezanje s enzimom, kao što je to slučaj s npr. 3-aminopropiltrietoksilanom (APTES) [17,95].



Slika 6. Generalna shema organosilanizacije trialkoksiorganosilanima [17].

Aktivacija ovako funkcionaliziranog nosioca podrazumijeva uvođenje elektrofilnih skupina na njegovu površinu, uzimajući u obzir nukleofilnost reaktivnih skupina na enzimu. Najčešće korištene metode aktivacije i njihove karakteristike prikazane su u Tablici 1. Iz tablice je vidljivo i kako većina ovih aktivacijskih molekula regira s -NH_2 skupinama na enzimu, to jest s lizinskim ε-amino skupinama enzima, kao što je slučaj kod aldolaza i DERA enzima [37], te α-amino skupinama s *N*-kraja aminokiseline. Razlog tome je što je lizin posjeduje optimalnu reaktivnost te često ne sudjeluje u katalitičkoj aktivnosti enzima [96]. Faktor koji ovdje najviše utječe na katalitičku aktivnost enzima duljina je molekulske razmaknice (engl. *molecular spacer*). Kratka razmaknica može dovesti do ukrućivanja strukture enzima, što ima pozitivan utjecaj na stabilnost, dok duga razmaknica ima puno manji utjecaj na strukturu, što može biti korisno ako je cilj zadržati početnu konformaciju enzima [17,97].

Tablica 1. Učestalo korištene metode aktivacije nosioca [17].

Aktivacijska molekula	**Reaktivna skupina nosioca**	**Reaktivna skupina enzima**	**Stabilnost veze**	**Cijena reagensa**	**Duljina molekulske razmaknice**
Cijanogen bromid	-OH -NH_2	-NH_2	Niska	Srednja	Vrlo kratka
Cijanogen klorid	-OH -NH_2	-NH_2	Visoka	Niska	Srednja
Tionil klorid	-COOH	-NH_2 -SH	Visoka	Niska	Nema
Acil halid	-OH	-NH_2	Visoka	Srednja/ Visoka	Vrlo kratka
Glutaraldehid	-NH_2	-NH_2	Visoka	Niska	Duga
Karbodiimid	-COOH/ NH_2	- NH_2/ COOH	Visoka	Visoka	Nema
Benzokinon	-OH -NH_2	-NH_2 -SH	Visoka	Niska	Srednja
Karbonil diimidazol	-OH	-NH_2	Srednja	Niska	Vrlo kratka
Epiklorohidrin	-OH -NH_2	-NH_2	Visoka	Niska	Kratka

2.4. Mezoporozna silika

Nanoporozni materijali su materijali s unikatnim površinskim i strukturnim karakteristikama koji primjenu nalaze u raznovrsnim područjima kao što su kataliza, solarne ćelije, senzori i izrada raznih elektroničkih komponenti [98]. Takvu vrstu materijala možemo prema IUPAC klasificirati [99] u tri vrste prema veličini pora, a to su mikroporozni materijali (veličina pora <2 nm), mezoporozni materijali (veličina pora 2-50 nm), te makroporozni materijali (veličina pora >50 nm).

U domeni mezoporoznih materijala posebno se ističe mezoporozna silika. Od kada je prvi puta komercijalno sintetizirana 1992. od strane Mobil Oil Company [100], pa sve do danas, predmet je brojnih istraživanja, unapređenja i raznolikih primjena u znanosti i industriji [18,19,101–103]. Karakteristike koje dijeli s ostalim mezoporoznim materijalima su velika specifična površina (u rasponu od nekoliko stotina pa do tisuća $m^2\ g^{-1}$), veliki volumen pora, mogućnost preciznog definiranja veličine pora prilikom sinteze, kemijska stabilnost te mogućnost naknadne modifikacije površine [20]. Uz navedene prednosti i karakteristike, pruža relativno nezahtjevne načine sinteze te je uz iste početne kemikalije moguće dobiti osjetno različite strukture pomoću mjenjanja uvjeta sinteze (npr. temperatura i vrijeme), omjera korištenih kemikalija te korištene aparature prilikom pojedinih koraka sinteze [104].

2.4.1. Metode sinteze mezoporozne silike

Većina tehnika sinteze anorganskog mezoporoznog materijala bazira se na korištenju određene organske molekule kao predloška oko kojeg anorganski prekursor kondenzira. Taj oblik sinteze koristi se i za najučestalije korištene vrste mezoporozne silike, a to su materijali tipa MCM (engl. *Mobil Composition of Matter*) i SBA (engl. *Santa Barbara Amorphous*). Za druge oblike sinteze anorganskih mezoporoznih materijala mogu se koristiti i tehnike koje ne uključuju predložak, već koriste tzv. nano-građevne blokove ili nanocijevi [104].

S obzirom da svi modeli sinteze uključuju međusobno organiziranje hidrofobnih i hidrofilnih skupina u bifazno sučelje, Huo i sur. [105] predložili su idući termodinamički model za stvaranje mezostrukture:

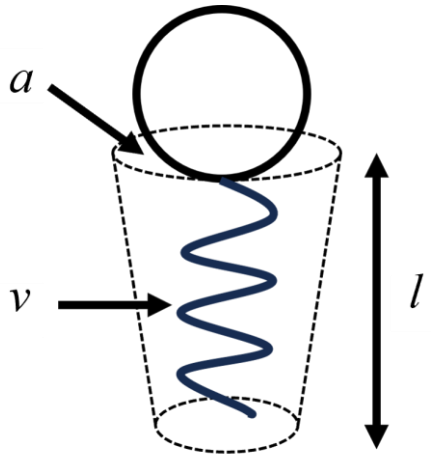
$$\Delta G_{\mathrm{sm}} = \Delta G_{\mathrm{suč.}} + \Delta G_{\mathrm{org.}} + \Delta G_{\mathrm{anorg.}} + \Delta G_{\mathrm{ot.}} \qquad (1)$$

gdje ΔG_{sm} predstavlja slobodnu Gibbsovu energiju stvaranje mezostrukture, $\Delta G_{\mathrm{suč.}}$ sučelje između organske i anorganske faze, $\Delta G_{\mathrm{org.}}$ samo-organiziranje organskih molekula, $\Delta G_{\mathrm{anorg.}}$ anorganski predložak a $\Delta G_{\mathrm{ot.}}$ utjecaj okolne otopine tijekom sinteze. Za klasični put sinteze šabloniziranja tekućih kristala prevladava utjecaj amfifilnih molekula, dok je kod puta

sinteze koji se bazira na samo-organiziranju i kooperativnom samo-organiziranju ključan $\Delta G_{\text{suč.}}$ kako bi se dobila uređena sruktura s traženom zakrivljenošću [106].

Za razumijevanje procesa sinteze MCM i SBA tipova mezoporozne silike nužno je poznavanje molekularne geometrije micelarnih agregata koji nastaju kad se predložak otopi u vodenoj otopini. Zbog amfifilnosti predloška i prelaženja tzv. kritične micelarne koncentracije (CMC) dolazi do stvaranja micelarnih agregata s izraženim hidrofobnim ili hidrofilnim karakterom. Ti agregati se potom pod utjecajem svoje geometrije i među-molekulskih sila samo-organiziraju u različite strukture tipa sferična, cilindrična, planarna itd. [107].

Model za ovakvo ponašanje predložen je od strane Israelchvili i sur. [108], a pretpostavlja strukturu amfifilne molekule koja se sastoji od konusnog hidrofobnog lanca koji je povezan s hidrofilnom glavom, prikazano na Slici 7., gdje *v* predstavlja volumen hidrofobnog dijela, *l* visinu hidrofobnog lanca, *a* površinu hidrofilnog dijela.



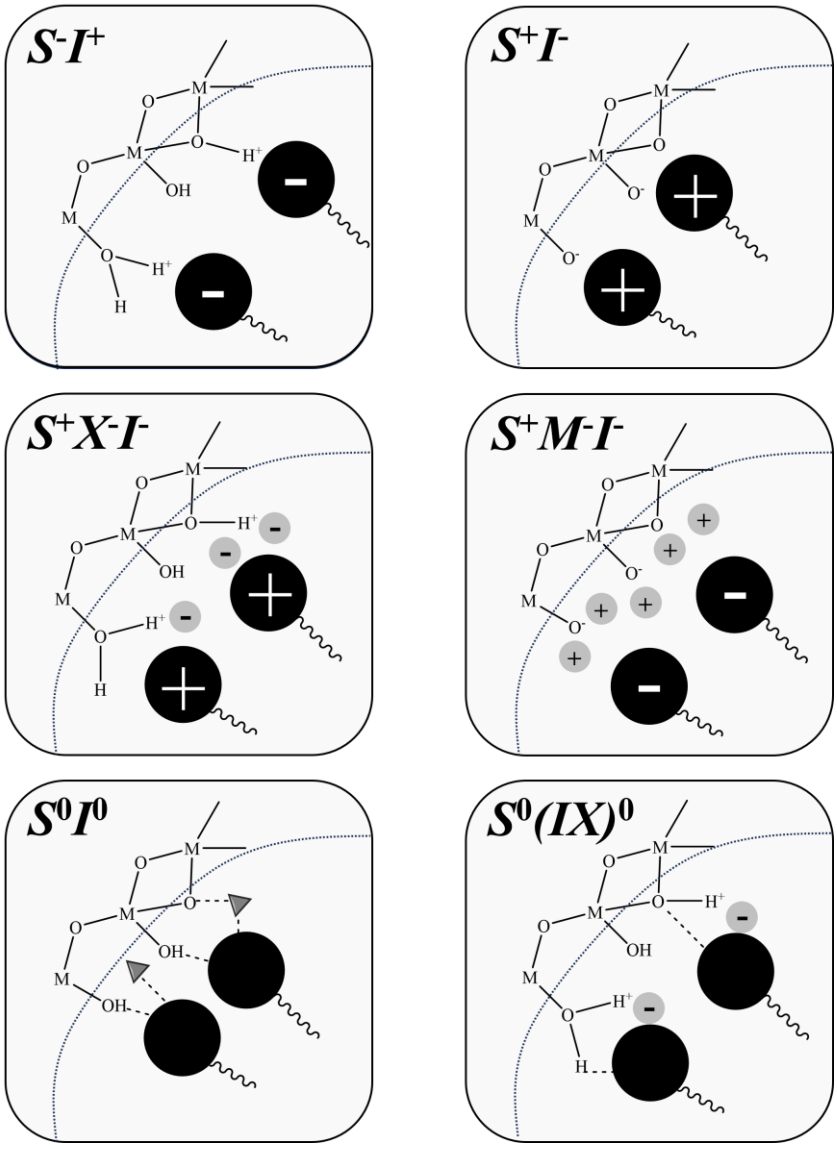
Slika 7. Struktura amfifilne molekule predloška [106].

Struktura amfifilnog agregata koji nastaje prelaženjem kritične micelarne koncentracije određena je s tzv. kritičnim parametrom pakiranja (engl. *critical packing parameter*, CPP) (Jednadžba 2). Brojka ukazuje na to kakav će oblik strukture imati nastali agregat, tj. posljedično dobivena mezoporozna silika. Porastom CPP-a od < 0,35 do > 1,15 struktura se mijenja idućim redoslijedom: sferična, cilindrična, lameralna, kubična te reverzno micelarna [109].

$$\text{CPP} = \frac{v}{l \cdot a} \tag{2}$$

Strukturiranje samog mezopornog materijala bazira se na elektrostatskim interakcijama prikazanima na Slici 8., između od molekula predloška nastalog micelarnog agregata (*S*) te molekula anorganskog prekursora (*I*) kao što je silika. Takav direktan način sinteze, na kojem

se bazira sinteza MCM tipa materijala, uključuje interakcije S^-I^+ te S^+I^-. Indirektni načini sinteze ($S^+X^-I^-$ i $S^+M^-I^-$), kakve su na primjer sinteze SBA i MCF materijala, uključuju kiseli ili bazni medij, gdje su X^- halogenidni anioni (Cl^-, Br^-), a M^+ alkalni kationi (Na^+, K^+). Moguć je i neutralan put karakteriziran vodikovim vezama i dipolarnim interakcijama, na slici prikazan kao S^0I^0 te $S^0(IX)^0$ [20,104,110].



Slika 8. Prikaz različitih oblika elektrostatskih interakcija u sučelju predložak-prekursor. *S* je predložak, odnosno surfaktant, *I* je anorganski prekursor (silika), a M^+ i X^- su bazni, odnosno kiseli ioni.

Sumarno govoreći, proces pripreme i sinteze različitih tipova mezoporoznih materijala od silike uvijek prati iduće korake:

1. Otapanje predloška/surfaktanta u otapalu (ionski ili polimerni surfaktanti, uz kontrolu temperature i pH vrijednosti otapala).

2. Dodavanje silika prekursora (najčešće alkoksid kao što je tetraortosilikat (TEOS) ili anorganska sol, naprimjer natrij silikat) te eventualnih ko-otapala i aditiva.
3. Miješanja tijekom kojeg se odvijaju procesi hidrolize i kondenzacije.

$$\text{Si-OR} + H_2O \leftrightarrow \text{Si-OH} + \text{ROH} \quad (3)$$

$$\text{Si-OR} + \text{Si-OH} \leftrightarrow \text{Si-O-Si} + \text{ROH} \quad (4)$$

$$\text{Si-OH} + \text{OH-Si} \leftrightarrow \text{Si-O-Si} + H_2O \quad (5)$$

4. Starenja materijala pri povišenoj temperaturi, pri kojem se odvija naknadna kondenzacija i polimerizacija, te omogućuje kontrolu veličine čestica i pora.
5. Uklanjanje predloška/surfaktanta, bilo ekstrakcijom ili žarenjem. Ekstrakcija je blaža i po okoliš povoljnija metoda ali njen nedostatak je mogući zaostatak materijala unutar pora, te nije primjenjiva za sve tipove predloška.

   Žarenje s druge strane omogućuje kompletno uklanjanje cjelokupnog organskog materijala uz veći energetski trošak procesa te naknadnu kondenzaciju koja se odvija tijekom procesa žarenja gdje silanol Si-OH skupine prelaze u siloksan Si-O-Si skupine. To predstavlja problem iz razloga što naknadna funkcionalizacija i aktivacija materijala ovisi isključivo o količini hidrofilnih silanol Si-OH skupina [20,104,110].

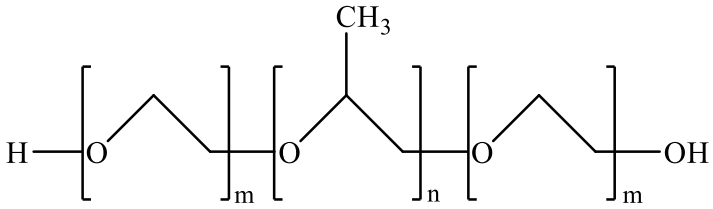
S obzirom da je interakcija između surfaktanta i anorganskog prekursora ključna za usmjeravanje sinteze mezoporozne silike prema produktima željenih karakteristika, nužno je poznavati mehanizme koji se odvijaju u svim koracima reakcije. Sinteza se može ugrubo podijeliti na tri stadija, prvi koji sadrži interakcije u otopini, drugi koji se odvija na granici krutine i tekućine te treći koji predstavlja kruti završni materijal. Od tri stadija, različite tehnike karakterizacije je najlakše primijeniti na gotovom materijalu zbog kompleksnih termodinamičkih i kinetičkih procesa koji se odvijaju tijekom prva dva stadija. Zbog toga se karakterizacija i sinteza u praktičnom smislu većinski izvode prema metodi pokušaja i pogrešaka, karakterizirajući gotov materijal nakon svake sinteze i prema tim rezultatima se modificiraju naknadne sinteze kako bi se došlo do materijala s željenim karakteristikama [106].

2.4.2. SBA materijali

Za razliku od ionskih surfaktanata, većinski manjih molekula, koji se koriste u sintezi MCM materijala, sinteza SBA materijala koristi diblok ili triblok kopolimere koji zbog svojih duljih hidrofobnih lanaca omogućuju sintezu materijala s osjetno većim porama. Poznato je više varijanti koji uključuju SBA-2 (kubična struktura), SBA-12 (3D heksagonalna struktura),

SBA-14 (lameralna struktura), SBA-15 (2D heksagonalna struktura) i SBA-16 (kubična struktura) [104,111,112].

Od svih navedenih, najčešću praktičnu primjenu ima SBA-15. Sinteza se vrši pri kiselim uvjetima koristeći ne-ionski triblok kopolimer, npr. Pluronic P123 prikazan na Slici 9., koji se na krajevima sastoji od dva hidrofilna poli(etilen-oksid) (PEO) lanca, a između njih se nalazi lanac hidrofobnog poli(propilen-oksida) (PPO).



Slika 9. Prikaz strukture triblok kopolimera P123.

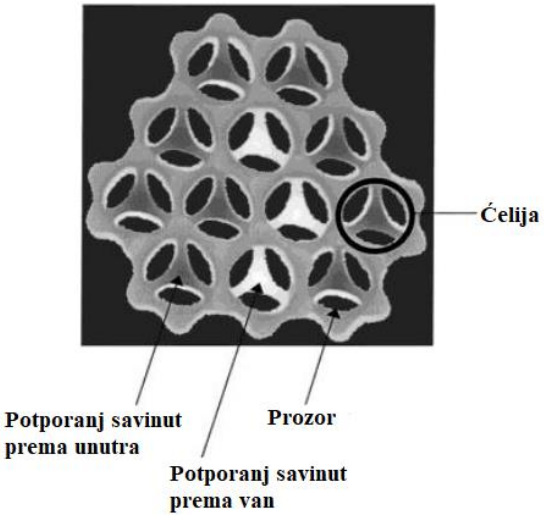
Prilikom formiranja micela u prvoj fazi otapanja surfaktanta u otapalu, PPO skupina se nalazi u središte micelarnog agregata, okružena lancima PEO molekula koji su orijentirani prema otopini. Ti PEO lanci su ujedno i uzrok mikropora veličine 0,5-3 nm u zidovima SBA-15 pora, dok su PPO molekule odgovorne za unutarnju strukturu mezopora [113,114].

Uz prisutne mikropore u zidovima, SBA-15 posjeduje i puno deblje zidove od MCM materijala, u rasponu od 3 nm do 6 nm, što ga čini veoma hidrotermalno stabilnim. Debljina zidova, kao i veličina pora, može se regulirati temperaturom i vremenskim trajanjem sinteze. Masena koncentracija triblok kopolimera ima značajan utjecaj na morfologiju, gdje se ispod 0,5 wt. % dobiva samo amorfna silika, dok pri koncentracijama većim od 6 wt. % uopće ne dolazi do precipitacije silike ili nastaje samo silika gel. Dakle idealan omjer za sintezu je negdje između 0,5 i 6 wt. % [115].

Različite vrste Pluronic triblok kopolimera razlikuju se prema omjerima svojih PEO i PPO skupina te također utječu na morfologiju gdje veći omjer PPO favorizira heksagonalnu strukturu, dok veći omjer PEO dovodi do kubičnih struktura [115].

Uz modificiranje omjera triblok kopolimera, temperature te trajanja reakcije kao metoda za usmjeravanje sinteze prema produktima željene morfologije i mezopornih karakteristika, za SBA-15 siliku je značajno i korištenje kootapala, tj. agensa za bubrenje, najčešće u obliku TMB (trimetilbenzena). Iako je TMB moguće koristiti i za povećanje pora MCM materijala, kod SBA silike je njegov utjecaj puno izraženiji te omogućuje povećanje pora do čak 30 nm. Daljnje dodavanje TMB-a iznad omjera TMB/P123 od 0,3 dovodi do stvaranja novog tipa silike, tzv. mezostrukturirane stanične pjene (engl. *mesostructured celluar foam,* MCF) (Slika 10) koja se sastoji od velikih sferičnih ćelija s porama u rasponu 20-50 nm, koje su međusobno povezane

tzv. prozorima veličine 10-15 nm te zajedno čine neprekidan i slabo uređen 3D sustav pora [116–118].



Slika 10. Shema poprečnog presjeka strukture MCF [119].

MCF se ističe kao izuzetan nosač za heterogenu katalizu zbog svojih jedinstvenih strukturnih karakteristika i svestranosti. S obzirom da posjeduje dobro definiranu strukturu pora s međusobno povezanim mezoporama, difuzija reaktanata i produkata kroz materijal je osjetno poboljšana. Ova svojstva ujedno ga čine idealnim nosiocem za imobilizaciju enzima, gdje navedena struktura ujedno uspješno sprječava odvajanje enzima s potpore, naročito u kombinaciji s kovalentnim vezanjem pomoću funkcionalnih skupina koje je lako dodati na površinu silike [111]. Kako su ćelije i prozori koji sačinjavaju MCF siliku osjetno veći od ostalih tipova mezoporozne silike, na nju je moguće imobilizirati i veće molekule enzima nego što je uobičajeno za ovakav tip materijala [120]. Chrzanowska i sur. [121] uspješno su imobilizirali lizozim unutar MCF strukture različitih veličina pora koristeći tehniku fizikalne adsorpcije pri čemu je najveća veličina pora očekivano pružila najbržu difuziju molekula enzima unutar strukture silike. Jarzębski i sur. [122] koristili su MCF za kovalentnu imobilizaciju tripsina, pri čemu su proveli usporedbu s komercijalnim nosačima na bazi silike i zaključili da MCF pruža značajno veću uspješnost imobilizacije kao i veću aktivnost imobiliziranog enzima.

2.5. Magnetske nanočestice

Interes za tehnologije i materijale koji pripadaju području nano- veličina, s posebnim naglaskom na magnetske nanočestice u stalnom je porastu. Primjena takvih tehnologija i materijala aktivno se provodi ili razmatra kroz široki spektar industrije i istraživačkih projekata

koji se bave katalizom, biotehnologijom, biomedicinom, magnetskom rezonancom te obradom otpadnih voda [123–126].

Shodno tome konstantno se razvijaju nove metode za njihovu sintezu, imajući na umu da stabilnost samih čestica najviše ovisi o području primjene. Važno je u obzir uzeti veličinu i oblik čestica, njhova intrinzična magnetska svojstva, površinski naboj te interakcije s vodom ili otapalom u kojem će se koristiti. Generalno govoreći, MNP su najučinkovitije kad je veličina individualnih čestica ispod kritične veličina <20 nm pri čemu svaka čestica za sebe postaje jednoznačna magnetska domena s superparamagnetičnim svojstvima iznad granične temperature. Takve čestice posjeduju jedinstven magnetski moment i ponašaju se kao paramagnetska jedinka prilikom primjene vanjskog magnetskog polja, uz zanemarivi rezidualni magnetizam [127].

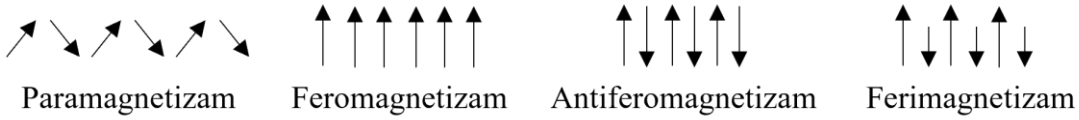
Usprkos prednostima MNP u takvom niskom rasponu veličina, neizbježan problem je njihova tendencija da stvaraju aglomerate te, s obzirom na visoku kemijsku aktivnost MNP, da oksidiraju u prisustvu zraka prilikom čega dolazi do osjetnog pada ili potpunog gubitka svojstva magnetičnosti. Iz tog razloga pribjegava se raznim tehnikama zaštite površinskog sloja čestica prilikom ili nakon sinteze, najčešće dodatkom raznih surfaktanata, polimera ili anorganskih spojeva kao što je silika. Dodatna prednost takvog procesa je što na površini MNP dobijemo sloj koji je sklon naknadnoj funkcionalizaciji aktivnim skupinama koje je moguće iskoristiti za npr. imobilizaciju enzima [128].

Iako postoji veliki izbor materijala koji je moguće sintetizirati i koristiti kao magnetske nanočestice, uključujući željezove okside (Fe_3O_4, γ-Fe_2O_3), ferite (MFe_2O_4 (M = Cu, Mn, Mg, Ni itd.)) i različite legure (FePt, CoPt), željezovi oksidi se učestalo nameću kao najbolji izbor. Razlog tome su dobra magnetska svojstva, visoka stabilnost, niska ekotoksičnost te velik izbor tehnika sinteze [23].

2.5.1. Magnetizam

U svakoj raspravi vezanoj za magnetske nanočestice, nužno je osvrnuti se na njihovo najistaknutije svojstvo, a to je magnetizam. Magnetizam je temeljni fizički fenomen koji proizlazi iz gibanja električnih naboja i manifestira se u privlačnim ili odbojnim silama između objekata. Svojstven je različitim materijalima, naročito onima koji sadrže željezo, nikal i kobalt. Na razini atoma, magnetizam potječe iz kutnog impulsa i spina elektrona. Kada je značajan broj atomskih magnetskih momenata usmjeren u istom smjeru, materijal pokazuje magnetizaciju na makroskopskoj razini. Ovakvo ponašanje klasificira se u nekoliko vrsta kao što su paramagnetizam, feromagnetizam, antiferomagnetizam ili ferimagnetizam (Slika 11) pri čemu

je svaka karakterizirana različitim obrascima usmjerenja i interakcijama magnetskih momenata unutar materijala [129].



Slika 11. Različiti tipovi magnetizma.

Paramagnetizam je tip magnetizma koji se očituje u materijalima kad su magnetski momenti individualnih atoma i iona nasumično orijentirani u nedostatku vanjskog magnetskog polja. Na razini atoma, paramagnetizam uzrokovan je prisutnošću nesparenih elektrona, od kojih svaki posjeduje magnetski dipolni moment zbog intrinzičnog spina elektrona, ali ti magnetski dipolni momenti su nasumično orijentirani zbog termalne agitacije. Kada se vanjsko magnetsko polje primjeni na takav sustav, magnetski momenti orijentiraju se paralelno u smjeru polja, pri čemu je primjetna pozitivna magnetizacija. Za razliku od feromagnetskih materijala, paramagnetski materijali potpuno gube svoju magnetičnost jednom kad se vanjsko magnetsko polje ukloni, što je ujedno i ključna karakteristika koja paramagnetske materijale izdvaja od ostalih tipova magnetizma [130].

Feromagnetizam javlja se u slučaju kad su magnetski momenti atoma ili iona orijentirani paralelno čak i u odsutnosti vanjskog magnetskog polja. Elektroni u feromagnetskom materijalu preferiraju paralelno usmjerenje susjednih elektronskih spinova, pri čemu je ta interakcija dovoljno snažna da nadjača utjecaj toplinske agitacije. Iz tog razloga posjeduju snažnu trajnu magnetizaciju, to jest zadrže određenu stopu magnetizacije i kad se vanjsko magnetsko polje ukloni. Taj remanentni magnetizam moguće je smanjiti ili potpuno ukloniti primjenom magnetskog polja suprotnog smjera. Feromagnetski materijali mogu izgubiti svoja svojstva pri visokoj, tzv. Curie temperaturi, specifičnom za svaki materijal, gdje se počinju ponašati kao paramagneti [130].

Antiferomagnetizam primjetan je u materijalima gdje su magnetski momenti atoma ili iona orijentirani naizmjenično u suprotnim smjerovima. Takva orijentacija za rezultat ima nepostojeću makroskopsku magnetizaciju, jer se suprotstavljeni magnetski momenti međusobno poništavaju [131].

Ferimagnetizam sličan je antiferomagnetizmu jer su magnetski momenti također orijentirani u suprotnim smjerovima, ali magnitude oba smjera nisu jednake stoga je primjetna određena količina makroskopske magnetizacije. Taj fenomen najviše ovisi o kristalnoj strukturi

materijala. Većina ferimagnetskih materijala su spineli s općenitom formulom AB2O4, gdje A i B predstavljaju metalne katione koji zauzimaju različita mjesta u kristalnoj rešetki, A kationi koji čine tetraedar i B kationi koji čine oktaedar. Magnetski metalni kationi na tim mjestima dolaze u interakciju s kisikovim anionima, pri čemu dolazi do pojave antiparalelnog usmjerenja njihovih magnetskih momenata. Najpoznatiji primjer tog fenomena upravo je magnetit, Fe_3O_4. Temperatura također ima značajan utjecaj na ferimagnetske materijale, gdje prelaskom preko kritične točke Curie temperature dolazi do nasumične promjene njihovih magnetskih momenata te prelaska u paramagnetično stanje [132].

2.5.2. Metode sinteze

Odabir metode za sintezu magnetskih nanočestica ima najveći utjecaj na njihovu veličinu, oblik, raspodjelu veličine i površinsku kemiju, stoga je bitno ispravno odabrati metodu koja će biti idealna i za primjenu tih nanočestica nakon sinteze. Svaka metoda predstavlja sebi svojstvene izazove, zbog čega se konstantno radi na modifikacijama postojećih, kao i istraživanju novih tehnika. Najčešća i najviše istražena skupina metoda koje se danas koriste je tzv. kemijska sinteza, gdje spadaju sutaloženje, mikroemulzija, termički raspad i hidrotermalna sinteza [133].

2.5.2.1. Sutaloženje

Sutaloženje (*engl.* coprecipitation) vjerojatno je najučestalija metoda za sintezu magnetskih nanočestica s točno određenom veličinom i magnetskim svojstvima. Temelji se na miješanju baze i otopine željezovih soli, u uvjetima inertne atmosfere i sobne ili povišene temperature. Proces je moguće prikazati slijedećim jednadžbama kemijske reakcije:

$$Fe^{2+} + 2OH^- \rightarrow Fe(OH)_2 \quad (6)$$

$$Fe^{3+} + 3OH^- \rightarrow Fe(OH)_3 \quad (7)$$

$$Fe(OH)_2 + 2Fe(OH)_3 \rightarrow Fe_3O_4 + 4H_2O \quad (8)$$

Veličina i oblik čestica ovisi o korištenim željezovim solima (kloridi, sulfati, nitrati itd.), omjeru fero i feri iona, pH vrijednosti, temperaturi, ionskoj snazi medija kao i mehaničkim faktorima poput brzine i vrste miješanja [134,135]. Za postizanje kompletnog taloženja u inertnoj atmosferi nužan je pH između 8 i 14 te stehiometrijski omjer Fe^{3+} i Fe^{2+} 2:1. Kontroliranjem pH vrijednosti moguće je značajno utjecati na konačnu veličinu čestica [136,137]. Inertna atmosfera, najčešće u obliku dušika koji se propušta kroz otopinu tokom

cijelog procesa, također je nužan uvjet kako ne bi došlo do oksidizacije i gubitka magnetita Fe_3O_4 njegovim prelaskom u γ-Fe_2O_3 u prisustvu kisika. Prisutnost dušika također ima utjecaj na samu veličinu čestica [138]. Glavni problem koji se javlja prilikom sinteze sutaloženjem je mala veličina dobivenih čestica, što osjetno povećava njihovu tendenciju prema aglomeraciji, te vrlo visoka osjetljivost na male promjene pH i temperature [139].

2.5.2.2. Mikroemulzija

Mikroemulzija je termodinamički stabilna i izotropna mješavina dvoje nemješljivih faza, ulja i vode, u prisustvu surfaktanta koji stvara monosloj na granici faza ulje-voda pri čemu se hidrofilne glave surfaktanta nalaze u vodi, a hidrofobni repovi u ulju. Molekule surfaktanta ograničavaju nukleaciju, rast i aglomeraciju čestica. Prilikom dodatka otopine željezovih soli u mikroemulziju, ona će se zadržati u mikrokapljicama vode koje se potom kontinuirano sudaraju, povezuju i ponovno odvajaju, pri čemu dolazi do stvaranja taloga željezovih nanočestica u obliku micela koje se zatim filtriraju iz otopine [140].

Glavna prednost ove metode su niski zahtjevi prema potrebnoj aparaturi i uvjetima sinteze (sobna temperatura i atmosferski tlak), mogućnost precizne kontrole veličine i sastava MNP koje posjeduju visoku specifičnu površinu, te dobivanje čestica koje imaju veliku zasićenost magnetizmom. Nedostaci ove metode su negativan utjecaj zaostalog surfaktanta na karakteristike dobivenih čestica, te relativno mali prinos nakon sinteze uz potrebu za korištenjem značajnih količina otapala, što otežava mogućnost za uvećanje (engl. *scale-up*) procesa [141,142].

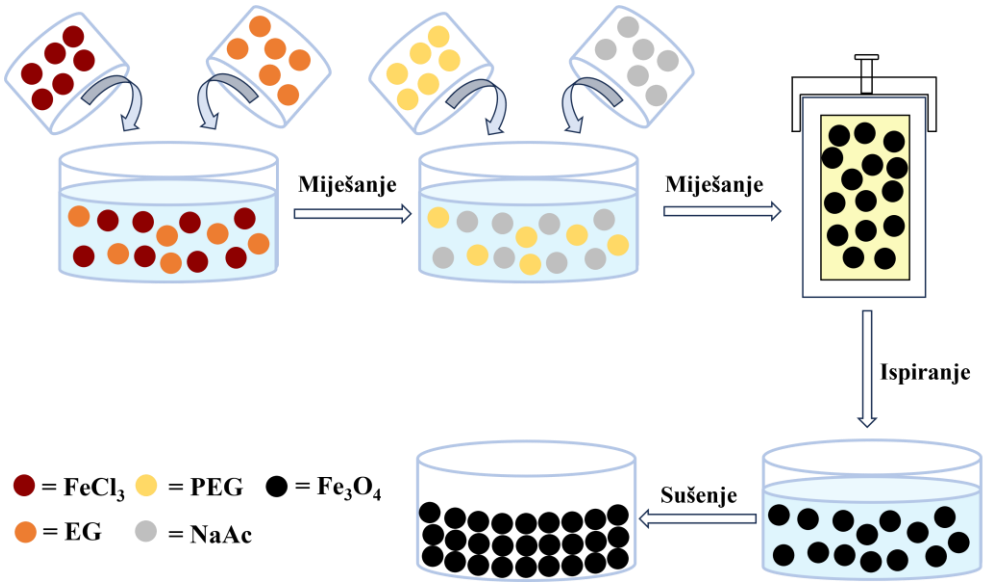
2.5.2.3. Termički raspad

Termički raspad podrazumijeva razgradnju prekursora željeza u prisutnosti organskih surfaktanata, najčešće oleinska kiselina ili derivati masnih kiselina, pri visokoj temperaturi pri čemu se dobiju nanočestice željezovog oksida s mogućnošću precizne kontrole veličina čestica uskog raspona veličina te dobre disperzivnosti. Ključni parametri za optimiranje veličine i morfologije nanočestica su početni omjeri prekursora, surfaktanta i otapala, kao i uvjeti reakcije koji uključuju temperaturu i vrijeme starenja. Iako ove metoda pruža vjerojatno najbolju mogućnost za preciznu kontrolu veličine i morfologije MNP, njeni glavni nedostatci su kompleksni uvjeti sinteze, potreba za visokom temperaturom i inertnom atmosferom, kao i dugo vrijeme starenja [143,144].

2.5.2.4. Hidrotermalna sinteza

Sinteza magnetskih nanočestica u vodenom mediju pri povišenoj temperaturi i tlaku naziva se hidrotermalna sinteza. Ova metoda također omogućuje finu kontrolu konačne veličine i morfologije čestica s visokom zasićenošću magnetizmom. Ključni faktori za uspješnu sintezu su korištenje autoklav reaktora koji može podnijeti visoke temperature i tlakove kako bi se kod vode postigli nužni uvjeti superkritičnog fluida te dodatak raznih aditiva u početnu otopinu željezovih soli kako bi se spriječila aglomeracija ili utjecalo na proces nukleacije. Sam mehanizam koji se odvija tijekom sinteze vrlo je kompleksan, ali može se pojednostaviti na proces nukleacije prilikom kojeg dolazi do agregiranja manjih čestica prekursora željeza u centre nukleacije, potom njihovog rasta u veće nanočestice potpomognuto visokim tlakom i temperaturom te konačno Ostwald dozrijevanja gdje se manji kristali raspadaju i talože na veće, što dovodi do ujednačene raspodjele veličina MNP [145–147].

Prvi dio procesa prije stavljanja u autoklav reaktor može krenuti od već spomenutog sutaloženja, gdje imamo izvore feri i fero iona u lužnatoj otopini, ili se može temeljiti na metodi redukcije prikazanoj na Slici 12. Deng i sur. [148] predložili su metodu gdje se željezova sol koja sadrži trovalentni Fe^{3+} ion, npr. $FeCl_3$, miješa s agensom za reduciranje kao što je etilen-glikol (EG), koji se učestalo koristi u poliol procesima za proizvodnju metalnih oksida, kako bi se postigla redukcija trovalentnog Fe^{3+} iona do forme željezovog oksida, Fe_3O_4. S obzirom da feritne nanočestice imaju sklonost aglomeraciji, u proces se dodaje natrijev acetat (NaAc) koji služi kao elektrostatski stabilizator, te poli(etilen-glikol) (PEG) čija funkcija surfaktanta također može doprinijeti smanjenju mogućnosti aglomeracije. Ovim procesom uspješno su dobivene monodisperzne magnetske mikrosfere dimenzija ≈ 200-800 nm.



Slika 12. Shematski prikaz hidrotermalne sinteze [149].

Glavni nedostatak ove metode je to što je teško dobiti čestice manje veličine, te poprilično spora kinetika rasta što dovodi do dužeg vremena potrebnog za provođenje reakcije. Ipak, Ge i sur. [150] su pokazali da je hidrotermalnom sintezom moguće dobiti i Fe_3O_4 nanočestice veličine manje od 50 nm, upotrebom $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ kao prekursora željezo iona i dodatkom etanola. Korištenjem visoke početne koncentracije $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ dolazi do formiranja velikog broja centara nukleacije, što posljedično dovodi do manjih čestica. Korištenjem etanola dolazi do fizikalnog vezanja na površinu MNP vodikovim vezama, što za posljedicu ima inhibitorski utjecaj na rast i agregaciju čestica. Promjenom omjera prekursora željeza i etanola uspješno su dobivene MNP u rasponu veličina od 15 nm do 30 nm.

2.5.3. Metode oblaganja

Usprkos svim naprecima u sintezi magnetskih nanočestica, kao ključan problem ostaje njihova tendencija prema aglomeraciji, taloženju i oksidaciji, te je veoma bitno pronaći način kako da se održi njihova stabilnost kroz duži period. To je posebno izraženo kod čistih metala kao što su željezo, kobalt i nikal te njihovih legura, jer su oni posebno osjetljivi na prisutnost zraka, uz to što ta sklonost oksidaciji ima obrnuto proporcionalni odnos sa samom veličinom čestica. Iz tog razloga nakon svake sinteze bitno je nanijeti određenu vrstu zaštitnog omotača na MNP, kako zrak ne bi mogao doprijeti do njihove površine. Metoda oblaganja se općenito dijele u dvije skupine, organski omotači što uključuje razne oblike surfaktanata ili polimera te anorganski omotači kao što su silika, ugljik, plemeniti metali ili oksidi. Moguća je i opcija korištenja gustih matrica polimera ili silike u koje se zatim uklope MNP, ali veliki nedostatak takve metode je što je nanočesticama onemogućeno slobodno gibanje u prostoru [128,151].

2.5.3.1. Oblaganje polimerima

Surfaktanti ili polimeri učestalo se upotrebljavaju kako bi se pasivizirala površina nanočestica tijekom ili poslije sinteze te u svrhu sprječavanja aglomerizacije. Pojava elektrostatskog ili steričkog odbijanja upotrebom surfaktanta pomaže pri disperziji MNP te održavanju koloidnog sustava. Taj fenomen najviše je izražen kod ferofluida, obzirom da su nanočestice dobivene sutaloženjem Fe^{2+} i Fe^{3+} negativno nabijene, što dovodi do njihove aglomeracije. Kako bi se to spriječilo i ujedno postigao stabilan koloidni sustav, kao surfaktant koristi se tetrametilamonij hidroksid ili perklorična kiselina [152].

Kod oblaganja MNP polimerom ili surfaktantom dolazi do formiranja jednog ili dva sloja koji stvaraju steričko odbijanje te time uravnotežuju magnetske i van der Waals sile koje djeluju između MNP. Glavni nedostatak ovakve vrste oblaganja je što zbog svoje visoke

reaktivnosti magnetske nanočestice i dalje nisu stabilne u prisutnosti zraka, te što u kiselom mediju ili pri visokoj temperaturi lako dolazi do gubitka ovog zaštitnog omotača [153].

2.5.3.2. Oblaganje plemenitim metalima

Dodavanje sloja plemenitih metala na površinu magnetskih nanočestica moguće je postići mikroemulziranjem, redoks reakcijama ili korištenjem hidroksilamina [154–156]. Ako u obzir uzmemo sve plemenite metale koji se mogu koristiti u ovu svrhu, zlato se nameće kao idealan izbor zbog svoje niske reaktivnosti, ali ključan problem u tom slučaju je velika razlika u površinskim karakteristikama MNP i zlata što znatno otežava proces oblaganja [157]. Iako postoje određeni primjeri iz literature gdje je omotač zlata uspješno nanesen korištenjem reakcijama zamjene [158], redukcije [157] i mikroemulziranja [159], često se radi o kompleksnim procesima u kojima je i teško utjecati na debljinu samog omotača.

2.5.3.3. Oblaganje ugljikom

Oblaganje ugljikom sa sobom nosi mnoge prednosti u usporedbi sa standardnim metodama, kao što je izražena biokompatabilnost, visoka kemijska i toplinska stabilnost te visok magnetski moment koji posjeduju magnetske nanočestice obložene ugljikom [160]. Glavni problem ovakvog načina oblaganja je kompleksnost samog procesa te potreba za posebnom aparaturom s obzirom da se proces oblaganja radi tehnikama električnog pražnjenja te taloženja kemijskom parom pod visokim tlakom (engl. *high-pressure chemical vapor deposition*) [160,161]. Uz to, tako dobivene MNP su često u obliku aglomerata što otežava njihovu primjenu u mnogim procesima, te je i sam mehanizam formiranja sloja još uvijek relativno nepoznat [160].

2.5.3.4. Oblaganje silikom

Silika se nameće kao idealan materijal za oblaganje MNP obzirom na svoju kemijsku stabilnost, biokompatibilnost, širok raspon mogućnosti za naknadnu funkcionalizaciju te malog utjecaja na magnetsku zasićenost. Taloženje SiO_2 skupina na površinu MNP ispunjava njihovu površinu s molekulama silanola (Si-OH) koje su idealan kandidat za vezanje raznih aktivnih skupina [162]. Metode koje se koriste za ovaj način oblaganja, Stöber i sol-gel su generalno veoma jednostavne uz dobro poznate mehanizme. Oba procesa odvijaju se kroz korake hidrolize, kondenzacije i nukleacije. Hidroliza uključuje hidrolizu prekursora silike, najčešće tetraetil ortosilikata (TEOS) u alkoholnom mediju, katalizirano amonijakom koji djeluje kao baza pri čemu iz TEOS-a nastaju reaktivne $Si(OH)_4$ silanol skupine. U koraku kondenzacije te

silanol skupine potom stvaraju siloksan Si-O-Si veze koje tvore mrežu silike po površini uzorka. Konačno u koraku nukleacije dolazi do rasta tako dobivene mreže silike što posljedično ima najveći utjecaj na debljinu dobivenog sloja [163].

Xia i sur. [164] u svojem su radu pokazali jednostavnost i fleksibilnost ovog procesa. Koristeći komercijalni ferofluid EMG 304 koji se sastoji od čestica magnetita veličine 5-15 nm, postigli su stvaranje omotača silike samo dodatkom amonijaka i TEOS-a uz miješanje u alkoholnom mediju. Promjenom koncentracije TEOS-a jednostavno su utjecali i na debljinu samog sloja u rasponu 2-100 nm. S obzirom na negativnu nabijenost omotača silike, tako obložene čestice su pokazale i vrlo dobru disperzivnost u vodenom mediju bez potrebe za korištenjem dodatnih surfaktanata. TEM snimkama potvrđeno je da su tako dobiveni sferični omotači homogeni u smislu njihove veličine i morfologije, bez obzira na početnu morfologiju nanočestica magnetita.

2.6. Matematičko modeliranje enzimatskih reakcija

Reakcijsko inženjerstvo temeljna je integrativna disciplina unutar kemijskog inženjerstva i industrijski primijenjene kemije. Pruža ključne temelje za dizajn i optimizaciju svih procesa kemijske pretvorbe, kao i toplinskih i fizičkih transformacija. Ovo u osnovi uključuje opisivanje kinetike reakcije i definiciju termodinamičkih granica koje pomažu pri odabiru optimalnih reakcijskih uvjeta i (bio)katalizatora. Razvoj kinetičkog modela u ranoj fazi procesa može biti od velike koristi za analizu troškova i koristi ili studije izvedivosti. Takvi modeli pomažu identificirati uska grla procesa i kvantificiraju potencijalne procesne probleme. Mehanistički modeli, čiji je cilj detaljno opisati reakcijske mehanizme enzima, nastoje razumjeti i predvidjeti ponašanje reakcijskog sustava te pružaju priliku za značajna poboljšanja tijekom procesa optimiranja reakcije [165,166].

Matematičko modeliranje pojednostavljeno se može razložiti na četiri područja koja će eventualno dobiveni modeli pokrivati. Od najmanjeg do najvećeg, to su redom modeli biokatalizatora na molekulskoj razini, kinetički modeli reakcije, kinetički modeli reaktora te modeli cjelokupnog procesa. Svaki od ovih modela dijelom se bazira na prethodnim, te raste po nivou kompleksnosti, iako je sve modele moguće pojednostaviti s dobro odabranim pretpostavkama [167]. Razvoj matematičkog modela ograničenog na razinu enzimske reakcije i reaktora se prema Vasić-Rački i sur. [25] može podijeliti na iduće slijedne korake:

1. Karakterizacija ovisnosti enzima o procesnim parametrima kao što su temperatura, pH i koncentraciji odabranog supstrata pri industrijski relevantnim koncentracijama.

2. Prikupljanje eksperimentalnih podataka kako bi se mogli procijeniti kinetički parametri. Koristi se metoda početnih brzina, što podrazumijeva mjerenje promjene koncentracije promatrane komponente reakcije dok je konverzija supstrata ispod 10 % te se sve ostale varijable eksperimenta drže konstantnima.
3. Određivanje parametara reakcije nelinearnom regresijskom analizom i naknadnom optimizacijom. Izračunati podaci usporede se s eksperimentalnima te ponovno računaju u optimizacijskom koraku dok se ne postigne minimalna greška između eksperimenta i modela.
4. Validacija modela u različitim tipovima reaktorima postignuta proširivanjem kinetičkog modela bilančnim reaktorskim jednadžbama, pri različitim početnim koncentracijama supstrata i enzima.
5. Primjena dobivenog modela u realnom biokatalitičkom procesu kako bi se optimirali procesni uvjeti, povećala produktivnost procesa i smanjila potrošnja enzima.

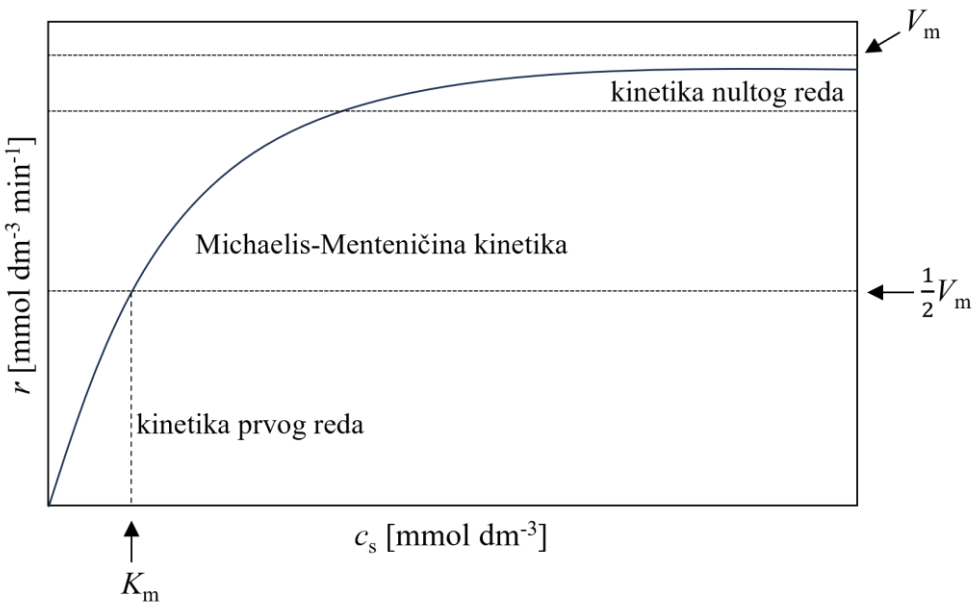
Michaelis-Menteničina kinetika je vjerojatno najviše korišten model za opisivanje enzimatskih reakcija zbog svoje jednostavnosti i široke primjenjivosti. Temelji se na idućem mehanizmu (Jednadžba 9) [25,168]:

$$S + E \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} P + E \tag{9}$$

gdje S predstavlja supstrat, E je enzim, ES je kompleks enzim-supstrat, a P produkt. k_1 je konstanta brzine reakcije stvaranja kompleksa enzim-supstrat, k_2 je konstanta brzine reakcije razlaganja kompleksa enzim-supstrat a k_3 je konstanta brzine reakcije nastanka produkta. Brzina nastanka produkta opisuje se jednosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom prema idućoj jednadžbi:

$$r = \frac{\mathrm{d}c_\mathrm{P}}{\mathrm{d}t} = \frac{V_\mathrm{m} \cdot c_\mathrm{S}}{K_\mathrm{m} \cdot c_\mathrm{S}} \tag{10}$$

gdje je r brzina reakcije [mmol L^{-1} min^{-1}], c_P koncentracija produkta [mmol L^{-1}], t vrijeme [min], V_m maksimalna brzina reakcije [mmol L^{-1} min^{-1}], c_S koncentracija supstrata [mmol L^{-1}] i K_m Michaelis-ova konstanta [mmol L^{-1}] koja je jednaka c_S kad je brzina reakcije ½ V_m. Značenje parametara ove jednadžbe opisano je Slikom 13.



Slika 13. Ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata.

Michaelis-Menteničinoj kinetici svojstvena su tri područja. U slučaju vrlo niske koncentracije supstrata, ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata je linearna i može se opisati kinetikom prvog reda. U slučaju visoke koncentracije supstrata, kad brzina reakcije više ne ovisi o koncentraciji supstrata, prelazi se u područje kinetike nultog reda. Područje između ove dvije kinetike naziva se područjem Michaelis-Menteničine kinetike i zahtjeva opisivanje Michaelis-Menteničinom jednadžbom [169].

Prilikom prisutnosti dva ili više supstrata, što i je najčešći slučaj kod enzimskih reakcija kako u prirodi, tako i u industriji, Jednadžba 10. može se proširiti na više članova [30,169]. Jednadžba za dvosupstratnu kinetiku je sljedeća (Jednadžba 11):

$$r = \frac{V_m \cdot c_{S1} \cdot c_{S2}}{(K_m^1 \cdot c_{S1}) \cdot (K_m^2 \cdot c_{S2})} \tag{11}$$

Vrlo čest slučaj kod provođenja biokatalitičkih reakcija, naročito u industriji s enzimu neprirodnim supstratima, je pojava različitih tipova inhibicije. Tri najučestalija tipa inhibicije opisana su u nastavku [170–172]:

- Kompetitivna inhibicija – inhibitor se veže na aktivno mjesto supstrata, pri čemu dolazi do pada K_m, dok V_m ostaje nepromijenjen (Jednadžba 12).

$$r = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right) + c_S} \tag{12}$$

- Antikompetitivna inhibicija – inhibitor se veže na enzim-supstrat kompleks, pri čemu dolazi do pada K_m i V_m (Jednadžba 13).

$$r = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m + c_S \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \tag{13}$$

- Nekompetitivna inhibicija – inhibitor se veže na inhibicijsko mjesto koje je različito od aktivnog. Iz tog razloga dolazi samo do pada V_m, dok K_m ostaje nepromijenjen (Jednadžba 14).

$$r = \frac{V_m \cdot c_S}{(K_m + c_S) \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \tag{14}$$

Pad aktivnosti enzima nije uzrokovan samo inhibicijom, već i deaktivacijom koja je prisutna u svakoj enzimski provođenoj reakciji, a naročito u slučaju primjene nespecifičnih supstrata. Najčešće se opisuje kinetikom prvog reda (Jednadžba 15) [173].

$$r = \frac{\mathrm{d}V_m}{\mathrm{d}t} = -k_d \cdot V_m \tag{15}$$

2.6.1. Reaktorski dizajn

Kemijski, pa tako i biokemijski, reaktori se definiraju dijelovi procesne opreme u kojima se odvija reakcija pretvorbe reaktanata u željene produkte. Za opisivanje i modeliranje reakcija u takvim sustavima koriste se idealni reaktorski modeli koji značajno pojednostavljuju procese koji se u njima odvijaju pretpostavkom idealnog miješanja ili strujanja, kao i konstantnih vrijednosti tlaka, temperature, volumena i pH. Prema načinu rada reaktori se dijele na kotlasti (šaržni), protočno kotlasti reaktor, kotlasti reaktor s dotokom i cijevni (kontinuirani) reaktor [174].

Kotlasti reaktor (Slika 14a) je najjednostavniji tip kemijskog reaktora. Sav supstrat se unese na početku reakcije, te se nakon postizanja željene konverzije reakcija prekida. Prednosti ovog tipa reaktora su njegova jednostavnost što omogućuje veliku fleksibilnost rada, uz jednostavno praćenje reakcije. Glavni nedostatak je vrijeme koje je potrebno utrošiti na stalno pražnjenje i punjenje reakcijskog volumena [175]. Brzina reakcije u kotlastom reaktoru opisuje se idućom jednadžbom:

$$r_S = -\frac{\mathrm{d}c_S}{\mathrm{d}t} \tag{16}$$

Kotlasti reaktor s dotokom (Slika 14b) je sličan kotlastom reaktoru, samo uz dodatak kontinuiranog dotoka supstrata. Glavna prednost ove vrsta reaktora je mogućnost izbjegavanja

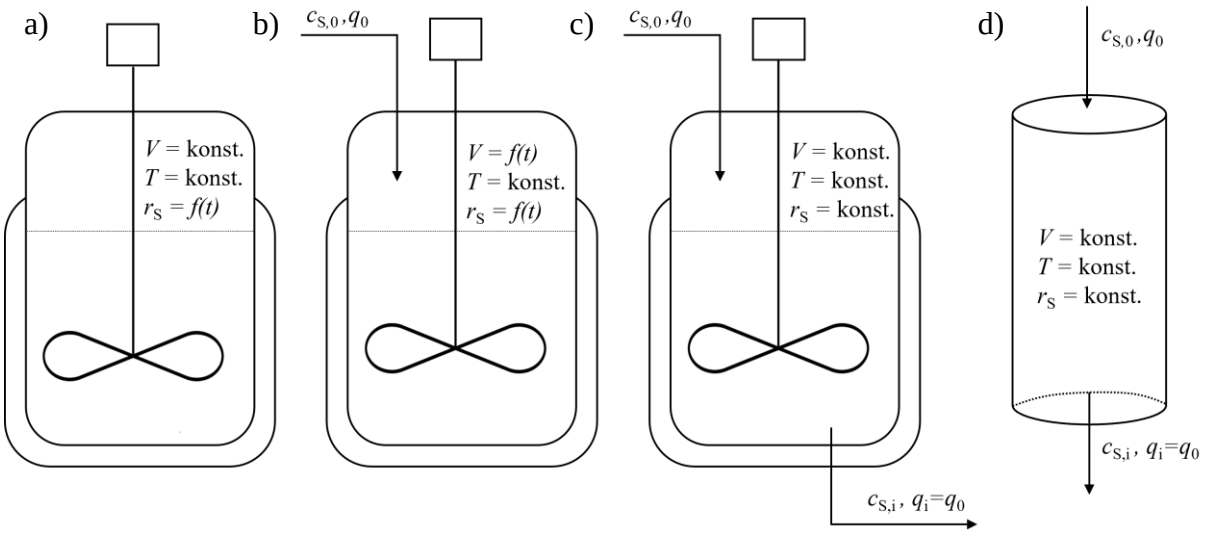
inhibicije supstratom te samim time smanjenje potrošnje enzima [176]. Brzina reakcije u slučaju samo jednog dotoka može se opisati idućom jednadžbom:

$$r_S = \frac{c_{S,0} - c_S}{V} \cdot q - \frac{dc_S}{dt} \tag{17}$$

Protočno kotlasti reaktor (Slika 14c) uz kontinuirani dotok supstrata uključuje i kontinuirani odvod produkta iz kotlastog reaktora. Koristan je za primjenu u heterogenim sustavima jer prisutnost mješanja može poboljšati kontaktno vrijeme između različitih faza. Njegove prednosti su rad u stacionarnom stanju te lakša kontrola temperature i izbjegavanja pojave lokaliziranih mjesta visoke temperature (engl. *hot spots*) zbog prisutnosti mješanja, a glavni nedostatak su potreba za visokim reakcijskim volumenom u usporedbi s drugim reaktorskim sustavima [174].

Cijevni reaktor (Slika 14d) uključuje kontinuirani dovod reaktanata i odvod produkata uz pretpostavku idealnog strujanja. Prednosti ovog tipa reaktora su skraćeno vrijeme reakcije uz jednostavniju kontrolu procesnih uvjeta te separaciju produkta na izlazu iz reaktora (npr. pročišćavanje produkta) [177]. Ako se u reaktoru pretpostavi stacionarno stanje, brzina reakcije može biti opisana idućom jednadžbom:

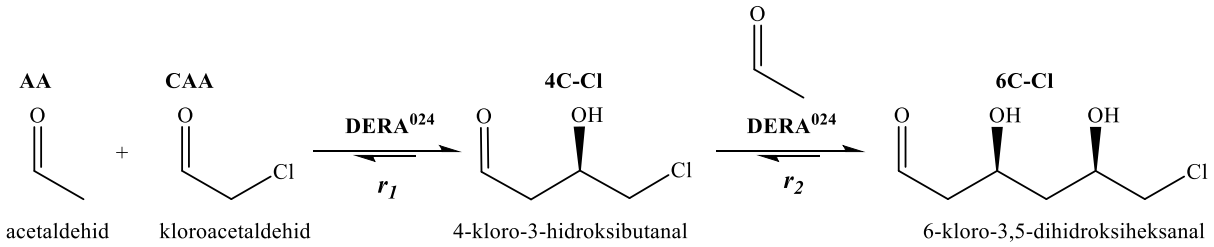
$$r_S = \frac{c_{S,0} - c_S}{V} \cdot q \tag{18}$$



Slika 14. Shema idealnog kotlastog (a), kotlastog reaktora s dotokom (b), protočno kotlastog reaktora (c) i cijevnog reaktora (d).

3. Eksperimentalni dio

Cilj ovog doktorskog rada bio je razvoj ekonomski i okolišno prihvatljive metode kovalentne imobilizacije enzima DERA^{024}, uz povećanja stabilnosti te zadržavanje aktivnosti enzima. DERA^{024} katalizira reakciju dvostruke aldolne adicije akiralnih supstrata acetaldehida i kloroacetaldehida prikazanoj na Slici 15. Reakcijom acetaldehida (AA) i kloroacetaldehida (CAA) nastaje međuprodukt 4-kloro-3-hidroksibutanal (4C-Cl) koji potom reagira s još jednom molekulom AA kako bi nastao konačni produkt (3*R,* 5*R*)-6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal (6C-Cl), koji je ujedno prekursor bočnog lanca statina.



Slika 15. Reakcije dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida.

Metodika istraživanja sastojala se od sljedećih koraka navedenim redoslijedom:

- Sinteza mezoporozne silike i magnetskih nanočestica kao nosilaca za imobilizaciju, te njihova karakterizacija kako bi se potvrdila uspješnost sinteze te veličina i morfologija dobivenih čestica
- Funkcionalizacija i aktivacija nosilaca kako bi se pronašla idealna kombinacija i koncentracija ispitivanih funkcionalnih (3-aminopropiltrietoksilan (APTES), (3-glicidiloksipropil)trimetoksilan (GPTMS), (3-metilaminopropil)trimetoksilan (APTMS)) i aktivacijskih (anhidrid jantarne kiseline, benzokinon, glutaraldehid) agensa
- Optimiranje uvjeta imobilizacije variranjem temperature i pH tijekom miješanja enzima s aktiviranim nosiocem
- Kinetička mjerenja, tj. mjerenje pojedinačnog utjecaja koncentracije oba supstrata i međuprodukta reakcije na specifičnu aktivnost enzima metodom početnih brzina
- Razvoj matematičkog modela i validacija modela za oba nosioca pomoću podataka dobivenih kinetičkim mjerenjima
- Provedba procesa u različitim tipovima reaktorima pri različitim vremenima zadržavanja, ispitan je cijevni reaktor s nasutim slojem katalizatora u slučaju mezoporozne silike te cijevni reaktor s fluidiziranim slojem katalizatora u promjenjivom magnetskom polju u slučaju magnetskih nanočestica

3.1. Kemikalije i uređaji

Prilikom izrade eksperimentalnog dijela ovog doktorskog rada korištene su iduće kemikalije:

- (3-glicidiloksipropil)trimetoksilan (GPTMS), Sigma-Aldrich, Njemačka
- (3-metilaminopropil)trimetoksilan (APTMS), Acros Organics, SAD
- 1,2,4-trimetilbenzen (TMB), Fisher Scientific, UK
- 1,4-benzokinon, Acros Organics, SAD
- 3-aminopropiltrietoksilan (APTES), Acros Organics, SAD
- acetaldehid, Acros Organics, SAD
- acetonitril (ACN), Fisher Scientific, UK
- albumin goveđeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*, BSA), Sigma-Aldrich, Njemačka
- amonijak (28 %), VWR, SAD
- anhidrid jantarne kiseline, Sigma-Aldrich, Njemačka
- DERA^{024} u obliku ekstrakta bez stanica (engl. *cell-free extract*, CFE), Prozomix, UK
- dikalijev fosfat, Lach-Ner, Češka Republika
- dušična kiselina (50 %), Lach-Ner, Češka republika
- etanol p.a., Scharlau, Španjolska
- etilen glikol, Lach-Ner, Češka Republika
- glutaraldehid, Sigma-Aldrich, Njemačka
- kalijev fosfat, Lach-Ner, Češka Republika
- kloroacetaldehid, Sigma-Aldrich, Njemačka
- klorovodična kiselina (37 %), Lach-Ner, Češka Republika
- natrij acetat bezvodni, Lach-Ner, Češka Republika
- *o*-benzilhdroksilamin klorovodik, TCI, UK
- pluronic P123, Acros Organics, SAD
- tetraetil ortosilikat (TEOS), Lach-Ner, Češka Republika
- trifluoroctena kiselina (TFA), Fisher Scientific, UK
- željezo(III) klorid heksahidrat, Gram-mol, Hrvatska

Korišteni uređaji su bili sljedeći:

- 3D-pisač (Original Prusa i3 MK3S+), Prusa, Češka republika
- Adsorpcijsko-desorpcijski analizator (ASAP 2020MP), Micrometrics, Kanada
- Analitička vaga (AUW 120), Shimadzu, Japan
- Centrifuga (Universal 320R), Hettich, Njemačka
- Inkubator (PSE-T150A), Biolab Scientific, SAD
- Klipna pumpa (PHD 4400), Harvard Apparatus, SAD
- Laboratorijska vaga (Precision Balance), Kern, Njemačka
- Liofilizator (FreeZone), LabConco, SAD
- Magnetska miješalica (Rotamix S10), Tehtnica, Slovenija
- Mufolna peć (L 5/11/B180), Nabertherm, Njemačka
- Orbitalna tresilica (PSU-10i), Biosan, Latvija
- pH metar (Lab 860), Schott, Njemačka
- Skenirajući elektronski mikroskop (TESCAN VEGA3), TESCAN, Češka Republika
- Termostatska tresilica (Thermomixer C), Eppendorf, Njemačka
- Transmisijska elektronska mikroskopija (Talos F200S), ThermoFisher, SAD
- Tresilica (Vortex 3), IKA, Hrvatska
- Ultrazvučni homogenizator (Bandelin Sonopuls HD 3100), Bandelin electronic, Njemačka
- Uređaj za dinamičko raspršenje svjetla (engl. *Dynamic light scattering*, DLS) (Zetasizer), Malvern Panalytical, UK
- Uređaj za proizvodnju ultračiste vode (NIRO-VV-UV-UF), Nirosta, Hrvatska
- Uređaj za tekućinsku kromatografiju visokog učinka (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) (kontroler CBM-20A; pumpe LC-20AT i LC-10AT; otplinjavač DGU-20A3; pećica za kolonu CTO-20AC; injektor SIL-20ACHT), Shimadzu, Japan
- UV-Vis spektrofotometar (UV 1800), Shimadzu, Japan

3.2. Analitičke metode

3.2.1. Određivanja koncentracije supstrata i produkata HPLC analizom

Za mjerenje koncentracije supstrata (AA, CAA) i produkata (4C-Cl, 6C-Cl) tijekom svih provedenih reakcija korišten je HPLC uređaj s Phenomenex Kinetex kolonom (5 μm, C18, 100 Å, 250 × 4,6 mm). Prije početka mjerenja, uzorci su derivatizirani kako bi bili vidljivi u UV spektru [36]. Derivatizacijska otopina sastoji se od 0,02 g mL^{-1} o-benzilhidroksilamina u otopini piridina, metanola i ultračiste vode u omjeru 33:15:2. 5 μL uzorka pomiješano je s 50 μL derivatizacijske otopine, te potom inkubirano 20 min pri 25 °C i 900 o min^{-1}. Nakon 20 min reakcija derivatizacije zaustavlja se dodavanjem 350 μL metanola, uzorak se potom centrifugira 5 min pri 14000 o min^{-1} i 4 °C te stavlja na HPLC analizu. Mobilna faza sastoji se od eluensa A (0,1 % TFA u otopini ACN:voda u omjeru 80:20) te eluensa B (0,1 % TFA u vodi). Protok je podešen na 1,5 mL min^{-1}, temperatura kolone na 30 °C, a UV detekcija provedene ja na λ = 215 nm. Tijekom 18 min gradijentne analize, koncentracija eluensa A pada s 90 na 28,4 % tijekom prvih 10 min, te raste s 28,4 do 90 % od 14 do 16 min. Prije mjerenja realnih uzoraka bilo je potrebno napraviti baždarne krivulje svih reaktanata. Retencijska vremena AA, CAA, 4C-Cl i 6Cl-Cl bila su 11,2, 13,2, 10,5 i 9,2 min. Primjeri baždarnih krivulja i kromatograma nalaze se u prilogu (Poglavlje 7., Slike 52-55). Za 4C-Cl i 6C-Cl koji nisu komercijalno dostupne kemikalije, baždarne krivulje dobivene su izračunom u Scientistu na osnovu reakcijske bilance masa.

3.2.2. Određivanje koncentracije proteina

Određivanje koncentracije proteina prije i nakon procesa imobilizacije provodi se kolorimetrijskom lineariziranom Bradford metodom [178,179]. 500 μL uzorka pomiješano je s 500 μL Bradford reagensa te inkubirano 10 min pri 25 °C. Nakon toga mjerena je apsorbancija uzorka pri λ = 595 i λ = 450 nm. Baždarna krivulja izrađena je koristeći poznate koncentracije BSA. Primjer baždarne krivulje nalazi se u prilogu (Poglavlje 7., Slika 54).

3.2.3. Mjerenje aktivnosti enzima $DERA^{024}$

Aktivnost slobodnog i imobiliziranog $DERA^{024}$ enzima mjerena je u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida prikazanoj na Slici 15. 100 μL otopine slobodnog enzima ili suspenzije imobiliziranog enzima pomiješano je sa 100 μL otopine aldehida i stavljeno na tresilicu pri 900 o min^{-1} i 25 °C. 5 μL uzorka uzimano je u određenim vremenskim intervalima i analizirano na HPLC-u kako je opisano u poglavlju 3.2.1. Otopina

aldehida sastojala se od 200 mmol L^{-1} acetaldehida te 100 mmol L^{-1} kloroacetaldehida u fosfatnom puferu (0,1 mol L^{-1}, pH 6). Specifična aktivnost enzima računana je preko Jednadžbe 19, gdje $\Delta c/\Delta t$ predstavlja promjenu koncentracije s vremenom, a γ_e predstavlja koncentraciju enzima. 1 mg mL^{-1} aktivnost slobodnog enzima je ekvivalentno aktivnost od 1,16 U mL^{-1}.

$$S.A. = \frac{\Delta c}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\gamma_e} \tag{19}$$

3.3. Mezoporozna silika

3.3.1. Sinteza mezoporozne silike

Sinteza MCF mezoporozne silike preuzeta je iz metode predložene u Chrzanowska i sur. [121]. 2 g Pluronic P123 otopljeno je u 90 mL 1,6 mol L^{-1} otopine HCl-a te miješano na 25 °C tijekom 2 h. Nakon 2 h, u otopinu je dodano 2/5/10 g TMB te je otopina miješana dodatna 2 h na 40 °C i 250 o min^{-1}. Zatim je u otopinu dodano 4/5/6 g TEOS-a. Nakon toga uslijedilo je miješanje na 40 °C i 180 o min^{-1} kroz 20 h. Otopina je potom stavljena u teflonski autoklav reaktor te je držana 24/96 h na 120 °C. Dobiveni precipitat silike je nakon toga filtriran, ispran s ultračistom vodom i sušen na zraku. Posljednji korak bio je uklanjanje polimernog predloška žarenjem na 500 °C kroz 8 h. Uvjeti sinteze prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti sinteze mezoporozne silike.

Ime	P123/TMB (g g^{-1})	P123/TEOS (g g^{-1})	Vrijeme starenja (h)
MCF-a	1:1	1:2	24
MCF-b	1:2,5	1:2,5	24
MCF-c	1:5	1:3	96

3.3.2. Karakterizacija mezoporozne silike

Kako bi se potvrdila morfologija te veličina pora sintetizirane silike, provedena je karakterizacija na skenirajućem elektronskom mikroskopu te adsorpcijsko-desorpcijska analiza tekućim N_2.

3.3.2.1. SEM karakterizacija

SEM analiza provedena je na uređaju TESCAN VEGA3 (TESCAN) koji je radio na 10 kV. Uzorci su prije analize proveli 90 s u naparivaču zlatom/paladijem kako bi postigli zadovoljavajuću vodljivost.

3.3.2.2. Adsorpcijsko-desorpcijska analiza tekućim N_2

Kako bi dobili uvid u veličinu specifične površine te promjer i obujam pora, uzorci mezoporozne silike podvrgnuti su desorpcijsko-adsorpcijskoj analizi na uređaju ASAP 2020MP (Micrometrics). Uzorci su prvo otplinjavani u vakuumu pri 70 °C dok nije postignut stabilan tlak od 10 μm Hg. N_2 je korišten kao adsorpcijski plin, a analiza je rađena pri -196 °C.

3.4. Magnetske nanočestice

3.4.1. Sinteza magnetskih nanočestica obloženih silikom

Magnetske nanočestice sintetizirane su hidrotermalnom metodom predloženom u radu Deng i sur. [148] koja se temelji na redukciji željezovog klorida, $FeCl_3$ u željezov oksid, Fe_3O_4. 3,38 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ otopljeno je u 100 mL etilen glikola te je potom u istu otopinu dodano 6 g natrij acetata. Nastala otopina miješala se 30 min na 25 °C, nakon čega je stavljena u teflonski autoklav reaktor te držana 8 h na 200 °C. Nakon što se otopina ohladila na 25 °C, precipitat nastalog Fe_3O_4 odvojen je od otopine pomoću neodimijskog magneta, nakon čega je više puta ispran vodom i etanolom, te stavljen u liofilizator na sušenje preko noći. Za oblaganje Fe_3O_4 silikom, 0,93 g dobivenih MNP je pomoću ultrazvučnog homogenizatora disperzirano u otopini koja se sastojala od 50 mL vode, 150 mL etanola i 1 mL TEOS-a. Nakon toga u otopinu je kapanjem dodano 4,5 mL amonijaka (28%) te je uslijedilo miješanje na 160 o min^{-1} tijekom 12 h. Dobivene $Fe_3O_4@SiO_2$ MNP su potom isprane vodom i etanolom te stavljene na sušenje u liofilizator.

3.4.2. Karakterizacija magnetskih nanočestica

Kako bi se ustanovila morfologija, veličina te raspodjela veličina dobivenih MNP, kao i kemijski sastav i uspješnost oblaganja silikom, MNP su prije i nakon oblaganja silikom podvrgnute karakterizaciji na transmisijskom elektronskom mikroskopu te dinamičkom raspršenju svijetlosti.

3.4.2.1. TEM karakterizacija

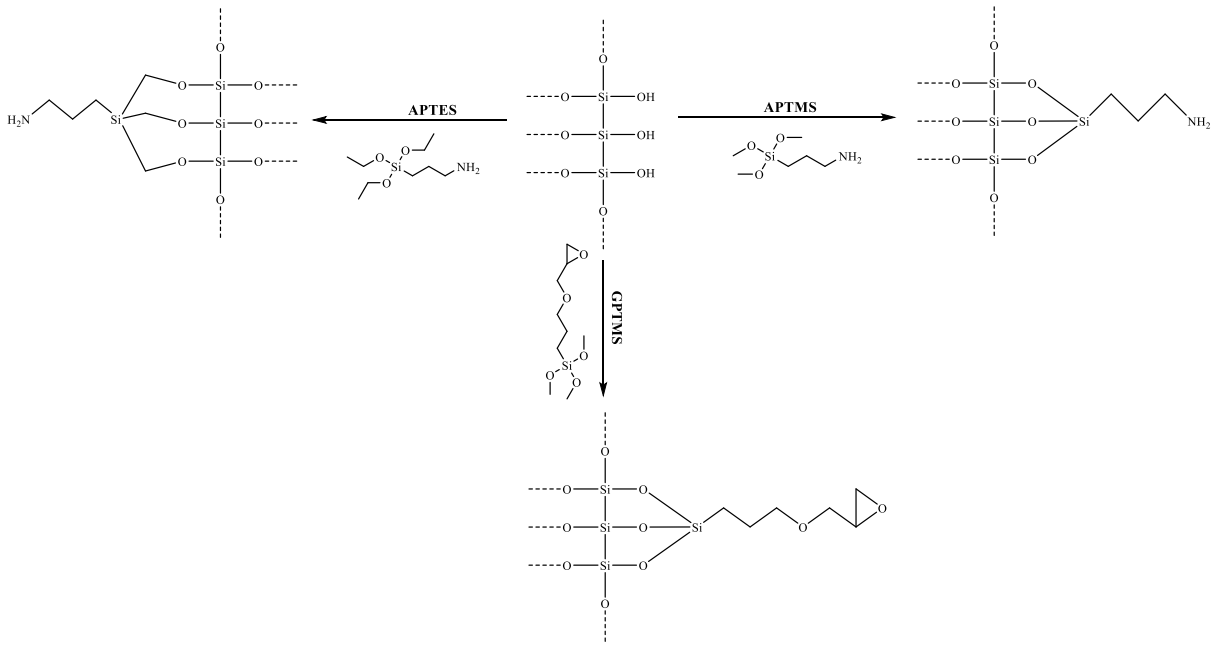
U ovom istraživanju korišten je uređaj TALOS F200S (ThermoFisher) koji je radio pri 200 kV u dva operacijska moda: TEM za skupljanje svijetlosnih TEM mikrografa (engl. *bright-field TEM micro-graphs*), te skenirajući TEM (STEM) za energetski disperzivna spektroskopska (engl. *energy-dispersive X-ray spectroscopy,* EDX) mjerenja.

3.4.2.2. Dinamičko raspršenje svijetlosti

Uzorci MNP su prije svakog mjerenja bili podvrgnuti sonifikaciji ultrazvučnom sondom snage 450 W tijekom 15 s kako bi se postigla zadovoljavajuća raspršenost čestica. Mjerenja su rađena pri sobnoj temperaturi te je svako mjerenje ponovljeno pet puta kako bi se osigurala točnost dobivenih rezultata.

3.5. Funkcionalizacija i aktivacija nosilaca

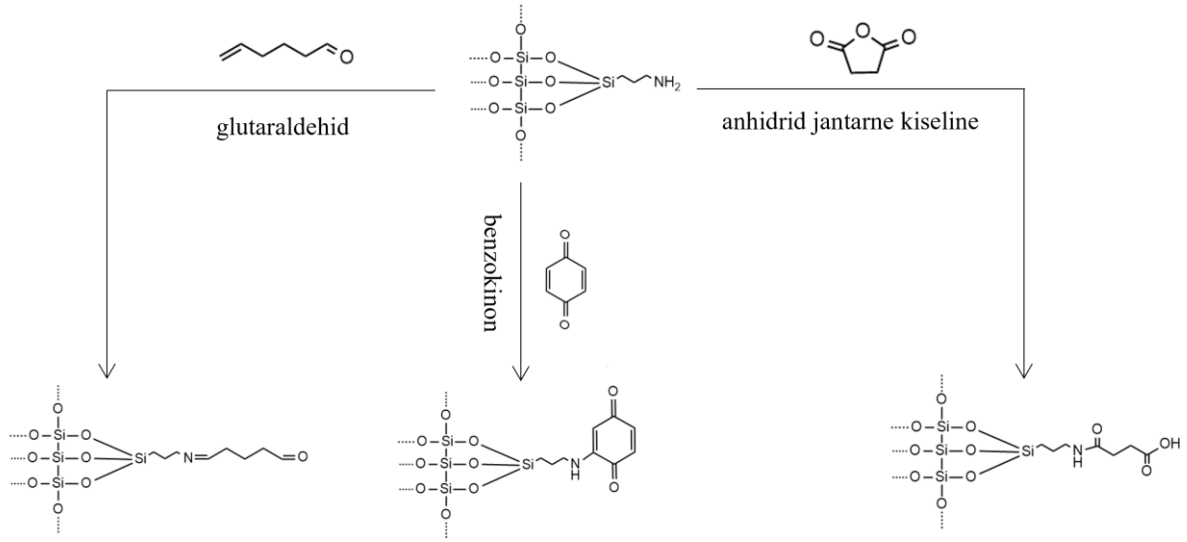
U slučaju oba nosioca prisutan je površinski sloj silike koji je potrebno podvrgnuti procesu funkcionalizacije i aktivacije kako bi se na njih mogao kovalentno vezati enzim DERA^{024}. Aminokiseline prisutne na enzimu su nukleofilne, stoga na siliku prvo moraju biti vezane reaktivne elektrofilne skupine kako bi moglo doći do kovalentnog vezanja. U ovom istraživanju za oba nosioca su kao funkcionalizacijski agensi ispitani 3-aminopropiltrietoksilan (APTES), (3-metilaminopropil)trimetoksilan (APTMS) i (3-glicidiloksipropil)trimetoksilan (GPTMS) (Slika 16). GPTMS se može direktno kovalentno vezati s enzimom, dok je kod APTES i APTMS potrebna aktivacija za koju su u ovom istraživanju korišteni benzokinon, glutaraldehid i anhidrid jantarne kiseline (Slika 17).



Slika 16. Shema funkcionalizacije oba nosioca.

1 g MCF/MNP pomiješano je s 50 mL etanola, u koji je potom dodano 3 mL APTES/APTMS nakon čega je otopina stavljena na miješanje u inertnoj atmosferi argona pri 160 o min^{-1}, 30 °C i 24 h. Dobiveni precipitat funkcionaliziranih MCF/MNP ispran je s

etanolom te stavljen na sušenje u liofilizator. Za aktivaciju benzokinonom, 25 mg MCF/MNP miješano je 2 h pri 900 o min^{-1} u 1 mL fosfatnog pufera (0,1 mol L^{-1}, pH 6) koji sadrži 1,5/3/4,5 mmol L^{-1} otopine benzokinona. Za aktivaciju anhidridom jantarne kiseline, 25 mg MCF/MNP miješano je 2 h pri 900 o min^{-1} u 1 mL fosfatnog pufera (0,1 mol L^{-1}, pH 6) koji sadrži 5/10/15 % anhidrida jantarne kiseline, u inertnoj atmosferi argona. Za aktivaciju glutaraldehidom (GA), 25 mg MCF/MNP miješano je 15 h pri 900 o min^{-1} u 1 mL fosfatnog pufera (0,1 mol L^{-1}, pH 6) koji sadrži 10/15/20 % GA. Aktivacija GPTMS-om ne zahtjeva prethodnu aktivaciju, te je 25 mg nefunkcionaliziranih MCF/MNP miješano 4 h pri 900 o min^{-1} u 1 mL fosfatnog pufera (0,1 mol L^{-1}, pH 6) koji sadrži 50 % GPTMS, u inertnoj atmosferi argona.



Slika 17. Shema aktivacije oba nosioca.

3.6. Imobilizacija enzima na nosioce

Nakon aktivacije nosioca, imobilizacija je provedena miješanjem 25 mg aktiviranog MCF/MNP nosioca s 1 mL 0,6 mg mL^{-1} $DERA^{024}$ otopine u fosfatnom puferu (0,1 mol L^{-1}, pH 6) tijekom 2 h pri 900 o min^{-1} i 25 °C. Nakon 2 h, uzet je uzorak supernatanta kako bi se odredila količina nevezanog enzima lineariziranom metodom po Bradfordu opisanom u poglavlju 3.2.2. Iz odnosa početne koncentracije enzima i nevezanog enzima dobiven je procesni pokazatelj Uspješnosti imobilizacije (Jednadžba 20):

$$Uspješnost\ imobilizacije\ (\%) = \frac{c_e - c_s}{c_e} \cdot 100 \quad (20)$$

gdje je c_e početna koncentracija enzima, a c_s koncentracija enzima u supernatantu.

3.7. Mjerenja očuvane aktivnosti i stabilnosti

Uz uspješnost imobilizacije (Jednadžba 20), u ovom istraživanju praćeni su i procesni pokazatelji očuvane aktivnosti i stabilnosti. Nakon aktivacije i imobilizacije enzima, mjerena je aktivnost enzima prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.3. Omjerom specifične aktivnosti slobodnog i imobiliziranog enzima dobijemo jednadžbu za očuvanu aktivnost (Jednadžba 21):

$$Očuvana\ aktivnost\ (\%) = \frac{S.A._{\text{imob.}}}{S.A._{\text{slob.}}} \cdot 100 \tag{21}$$

Nakon 30 minuta, po završetku prve reakcije, MCF/MNP su isprane tri puta fosfatnim puferom (0,1 mol L^{-1}, pH 6). Druga reakcija pokrenuta je dodatkom 200 μL otopine aldehida koja sadrži 100 mmol L^{-1} acetaldehida i 50 mmol L^{-1} kloroacetaldehida u fosfatnom puferu (0,1 mol L^{-1}, pH 6).

Stabilnost je potom izračunata prema Jednadžbi 22 kao omjer S.A. izmjerene u drugoj reakciji (2.r.) i S.A. izmjerene u prvoj reakciji (1.r.):

$$Stabilnost\ (\%) = \frac{S.A._{\text{2.r.}}}{S.A._{\text{1.r.}}} \cdot 100 \tag{22}$$

Za mjerenje aktivnosti slobodnog enzima u drugoj reakciji, enzim je bio ispran koristeći Amicon Ultra-0.5 centrifugalni filter (MWCO 10 kDa), a druga reakcija je pokrenuta dodatkom 200 μL otopine aldehida koja sadrži 100 mmol L^{-1} acetaldehida i 50 mmol L^{-1} kloroacetaldehida u fosfatnom puferu (0,1 mol L^{-1}, pH 6) na precipitat enzima. Za oba mjerenja, imobilizirani i slobodni enzim, određena je koncentracija proteina linearizirannom metodom po Bradfordu prije i poslije ispiranja kako bi se utvrdilo da nije došlo do ispiranja enzima s nosioca/filtera.

3.8. Utjecaj pH i temperature na proces imobilizacije

Ispitan je utjecaj temperature i pH na proces imobilizacije opisan u poglavlju 3.6. Kod oba nosioca, pH je mijenjan između 6 i 8 s koracima od 0,5 koristeći kalij fosfatni pufer (0,1 mol L^{-1}) pri 25 °C. Nakon određivanja idealnog pH, temperatura je varirana između 20 i 35 °C u koracima od 5 °C. Nakon svake imobilizacije, izračunate su vrijednosti uspješnosti imobilizacije, očuvane aktivnosti i stabilnosti.

3.9. Praćenje stabilnosti enzima DERA^{024} kod ponovne upotrebe

Stabilnost enzima DERA^{024} imobiliziranog na oba nosioca praćena je u kotlastom reaktoru kroz više ciklusa ponovne upotrebe koristeći reakciju opisanu u poglavlju 3.2.3. Reakcijsko vrijeme bilo je 20 min. Aktivnost slobodnog/imobiliziranog enzima DERA^{024} u prvom ciklusu postavljena je na 100 %. Nakon svake završene reakcije, MNP/MCF s imobiliziranim enzimom je odvojen od reakcijske otopine vanjskim magnetskim poljem/centrifugiranjem te tri puta ispran fosfatnim puferom (0,1 mol L^{-1}, pH 6). Nakon toga reakcija je pokrenuta nanovo dodavanjem 200 μL otopine aldehida koja sadrži 100 mmol L^{-1} acetaldehida i 50 mmol L^{-1} kloroacetaldehida u fosfatnom puferu (0,1 mol L^{-1}, pH 6). U slučaju slobodnog enzima, enzim je nakon svake reakcije od reakcijske otopine bio odvojen koristeći Amicon Ultra-0,5 centrifugalni filter (MWCO 10 kDa).

3.10. Kinetička karakterizacija enzima DERA^{024}

Mjerenje kinetike za oba nosioca provedeno je u reakciji dvostruke aldolne adicije prikazanoj na Slici 15. Mjeren je utjecaj oba supstrata i međuprodukta na specifičnu enzimsku aktivnost. Korištena je metoda početnih brzina, što znači da su sva mjerenja odrađena dok je konverzija supstrata bila ispod 10 %, pri istim procesnim uvjetima temperature, pH i miješanja.

3.10.1. Kinetika u prvom stupnju reakcije

Kinetika enzima DERA^{024} imobiliziranog na oba nosioca određena je u prvom stupnju reakcije koji se sastoji od aldolne adicije acetaldehida (AA) i kloroacetaldehida (CAA). Koncentracija AA mijenjana je u rasponu 0-200 mmol L^{-1} pri čemu je koncentracija CAA bila konstantna (c_{CAA} = 150 mmol L^{-1}). Nakon toga mijenjana je koncentracija CAA u rasponu 0-240 mmol L^{-1} dok je koncentracija AA bila konstantna (c_{AA} = 150 mmol L^{-1}). Koncentracija MCF/MNP imobiliziranog enzima iznosila je 1 mg mL^{-1}. Sve reakcije praćene su 10 min pri čemu su uzorci uzimani u jednakim vremenskim intervalima te analizirani na HPLC-u (poglavlje 3.2.1.).

3.10.2. Kinetika u drugom stupnju reakcije

Kinetika imobiliziranog DERA^{024} enzima određena je i u drugom stupnju reakcije koji se sastoji od aldolne adicije acetaldehida (AA) i 4-kloro-3-hidroksibutanala (4C-Cl). Koncentracija AA mijenjana je u rasponu 0-150 mmol L^{-1} pri čemu je koncentracija 4C-Cl bila konstantna ($c_{4C\text{-}Cl}$ = 100 mmol L^{-1}). Nakon toga mijenjana je koncentracija 4C-Cl u rasponu 0-150 mM dok je koncentracija AA bila konstantna (c_{AA} = 50 mmol L^{-1}). Koncentracija

MCF/MNP imobiliziranog enzima iznosila je 1 mg mL^{-1}. Sve reakcije praćene su 10 min pri čemu su uzorci uzimani u regularnim vremenskim intervalima te analizirani na HPLC-u (poglavlje 3.2.1.).

3.11. Matematičko modeliranje

Kinetički parametri Michaelis-Menteničinog modela procijenjeni su iz odnosa početne brzine reakcije i ispitivanih koncentracija komponenti reakcije. Matematički model za oba nosioca sastoji se od kinetičkog modela te reaktorskog modela.

3.11.1. Kinetički i reaktorski model

Reakcija katalizirana imobiliziranim $DERA^{024}$ enzimom sastoji se od dva stupnja, aldoldnom adicijom AA i CAA (brzina reakcije r_1, Slika 15) nakon koje slijedi aldolna adicija AA na formirani međuprodukt 4C-Cl (brzina reakcije r_2, Slika 15).

Brzina reakcije r_1 u slučaju oba nosioca opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom s antikompetitivnom inhibicijom CAA (Jednadžba 23). Brzina reakcije r_2 u slučaju MCF nosioca opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom uz inhibiciju supstratom AA (Jednadžba 24), dok je u slučaju MNP nosioca opisana dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom uz inhibiciju s oba supstrata AA i 4C-Cl (Jednadžba 25).

$$r_1 = \frac{V_{\mathrm{m1}} \cdot \gamma_{\mathrm{DERA}} \cdot c_{\mathrm{AA}} \cdot c_{\mathrm{CAA}}}{(K_{\mathrm{m1}}^{\mathrm{AA}} + c_{AA}) \cdot \left(K_{\mathrm{m}}^{\mathrm{CAA}} + c_{\mathrm{CAA}}(1 + \left(\frac{c_{\mathrm{4C-Cl}}}{K_{\mathrm{i4C-Cl}}}\right)^{n})\right)} \tag{23}$$

$$r_2 = \frac{V_{\mathrm{m2}} \cdot \gamma_{\mathrm{DERA}} \cdot c_{\mathrm{AA}} \cdot c_{\mathrm{4C-Cl}}}{\left(K_{\mathrm{m2}}^{\mathrm{AA}} + c_{\mathrm{4C-Cl}} + \frac{c_{\mathrm{AA}}^2}{K_{\mathrm{i}}^{\mathrm{AA}}}\right) \cdot \left(K_{\mathrm{m}}^{\mathrm{4C-Cl}} + c_{\mathrm{4C-Cl}}\right)} \tag{24}$$

$$r_2 = \frac{V_{\mathrm{m2}} \cdot c_{\mathrm{AA}} \cdot c_{\mathrm{4C-Cl}}}{(K_{\mathrm{m2}}^{\mathrm{AA}} + c_{\mathrm{AA}} + \frac{c_{\mathrm{AA}}^2}{K_{\mathrm{i}}^{\mathrm{AA}}}) \cdot (K_{\mathrm{m}}^{\mathrm{4C-Cl}} + c_{\mathrm{4C-Cl}} + \frac{c_{\mathrm{4C-Cl}}^2}{K_{\mathrm{i}}^{\mathrm{4C-Cl}}})} \tag{25}$$

Promjene koncentracija supstrata (AA, CAA), međuprodukta (4C-Cl) i produkta (6C-Cl) u kotlastom reaktoru dane su Jednadžbama 26-30. Deaktivacija enzima $DERA^{024}$ tijekom reakcije opisana je kinetikom drugog reda (Jednadžba 30).

$$\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{AA}}}{\mathrm{d}t} = -r_1 - r_2 \tag{26}$$

$$\frac{\mathrm{d}c_{CAA}}{\mathrm{d}t} = -r_1 \tag{27}$$

$$\frac{\mathrm{d}c_{4\mathrm{C-Cl}}}{\mathrm{d}t} = r_1 - r_2 \tag{28}$$

$$\frac{\mathrm{d}c_{6\mathrm{C-Cl}}}{\mathrm{d}t} = r_2 \tag{29}$$

$$\frac{\mathrm{d}\gamma_{\mathrm{DERA}}}{\mathrm{d}t} = -k_{\mathrm{d}} \cdot \gamma_{DERA}^2 \tag{30}$$

Promjene koncentracija supstrata (AA, CAA), međuprodukta (4C-Cl) i produkta (6C-Cl) u kotlastom reaktoru s dotokom dane su jednadžbama 31-34.

$$\frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{AA}}}{\mathrm{d}t} = \frac{1}{V} \cdot \left(-c_{\mathrm{AA}} \cdot \frac{\mathrm{d}V}{\mathrm{d}t} + c_{\mathrm{AA,0}} \cdot q_1\right) - r_1 - r_2 \tag{31}$$

$$\frac{\mathrm{d}c_{CAA}}{\mathrm{d}t} = \frac{1}{V} \cdot \left(-c_{\mathrm{CAA}} \cdot \frac{\mathrm{d}V}{\mathrm{d}t} + c_{\mathrm{CAA,0}} \cdot q_1\right) - r_1 \tag{32}$$

$$\frac{\mathrm{d}c_{4\mathrm{C-Cl}}}{\mathrm{d}t} = \frac{1}{V} \cdot \left(-c_{4\mathrm{C-Cl}} \cdot \frac{\mathrm{d}V}{\mathrm{d}t}\right) + r_1 - r_2 \tag{33}$$

$$\frac{\mathrm{d}c_{6\mathrm{C-Cl}}}{\mathrm{d}t} = \frac{1}{V} \cdot \left(-c_{6\mathrm{C-Cl}} \cdot \frac{\mathrm{d}V}{\mathrm{d}t}\right) + r_2 \tag{34}$$

3.11.2. Obrada podataka

Kinetički parametri Michaelis-Menteničinog modela (V_m, K_m, K_i, n) procijenjeni su iz podataka dobivenih mjerenjima početne brzine reakcija koristeći nelinearnu regresijsku analizu uključenu u SCIENTIST software, specifično simpleks metodu te metodu najmanjih kvadrata. Za provedbu simulacija korišten je *Episode* algoritam za sustave diferencijalnih jednadžbi koji je također uključen u SCIENTIST software. Standardna devijacija (σ), koeficijent determinacije

(R^2) i koeficijent korelacije (ρ) dostupni u programskom paketu SCIENTIST korišteni su kao statističko mjerilo kvalitete slaganja modela s eksperimentom.

3.12. Sinteza prekursora statina u cijevnim reaktorima

3.12.1. Sinteza prekursora statina u cijevnom reaktoru s nasutim slojem katalizatora

MCF silika kao nosilac za imobilizaciju testirana je i u cijevnom reaktoru s nasutim slojem katalizatora kako bi se ispitao utjecaj različitih protoka na nastanak međuprodukta, 4C-Cl i produkta, 6C-Cl. Cijevni reaktori volumena 300 (d_v = 8 mm, d_u = 7 mm, l = 25,5 mm), 500 (d_v = 8 mm, d_u = 7 mm, l = 42,4 mm) i 750 (d_v = 8 mm, d_u = 7 mm, l = 63,7 mm) µL izrađeni su metodom proizvodnje rastaljenim filamentom (engl. *Fused filament fabrication,* FFF) korištenjem filamenta Prusament PETG (Slika 19). U reaktore je prvo pomoću klipne pumpe unesena smjesa MCF silike s imobiliziranim enzimom, nakon čega je reaktorski ulaz spojen na drugu klipnu pumpu koja je pri različitim protocima u reaktor unosila otopinu supstrata određene koncentracije u fosfatnom puferu (0,1 mol L^{-1}, pH 6). Uzorci su uzimani nakon prolaska četiri vremena zadržavanja, gdje se pretpostavlja uspostava stacionarnog stanja. Koncentracija enzima u svakom reaktoru iznosila je 4,10 mg mL^{-1}. Uvjeti pri kojima su provođene sve reakcije navedeni su u Tablici 3. Na temelju izmjerenih vrijednosti, izračunati su procesni pokazatelji, selektivnost *S* (Jednadžba 35), konverzija *X* (Jednadžba 36), produktivnost *Pr* (Jednadžba 37) i iskorištenje *I* (Jednadžba 38).

$$S = \frac{c_{6C-Cl}}{c_{4C-Cl}} \tag{35}$$

$$X = \frac{c_{CAA,0} - c_{CAA}}{c_{CAA,0}} \tag{36}$$

$$Pr = \frac{c_{6C-Cl}}{\tau} \tag{37}$$

$$I = \frac{c_{6C-Cl}}{c_{CAA,0}} \tag{38}$$



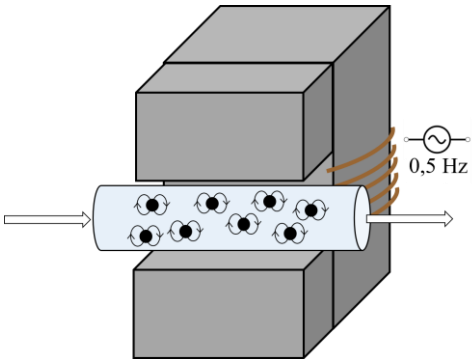
Slika 19. 3D-tiskani cijevni reaktori volumena 300, 500 i 750 μL.

Tablica 3. Procesni uvjeti tijekom procesa provedbe reakcije u cijevnom reaktoru s nasutim slojem katalizatora.

Reaktor	Ukupni volumen, V (μL)	Radni volumen, V_r (μL)	Protok, Q (μL min^{-1})	Vrijeme zadržavanja, τ (min)	Koncentracija AA, c_{AA} (mmol L^{-1})	Koncentracija CAA, c_{CAA} (mmol L^{-1})
R1-1	300	175	7	25	100	50
R1-2	300	175	5	35	100	50
R1-3	300	175	2,5	70	100	50
R2-1	500	290	11,5	25	100	50
R2-2	500	290	8,33	35	100	50
R2-3	500	290	4,16	70	100	50
R3-1	750	438	12,5	35	100	50
R3-2	750	438	6,24	70	100	50
R4-1	500	290	4,16	70	50	25

3.12.2. Sinteza prekursora statina u cijevnom reaktoru s fluidiziranim slojem katalizatora

MNP kao nosilac za imobilizaciju testirane su u cijevnom reaktoru s fludiziranim slojem katalizatora kako bi se ispitao utjecaj različitih protoka na nastanak međuprodukta, 4C-Cl i produkta, 6C-Cl. Kao cijevni reaktor korištena je teflonska cijev (d = 5 mm, l = 15,8 mm) volumena 310 μL. U cijev je pomoću šprice unesena smjesa MNP s imobiliziranim enzimom, te je reaktor potom smješten unutar elektromagneta s promjenjivim magnetskim poljem snage H = 0.73 T i frekvencije 0,5 Hz. Shematski prikaz reakcije nalazi se na Slici 20. Reaktor je potom spojen na klipnu pumpu koja je pri različitim protocima u reaktor unosila otopinu supstrata određene koncentracije u fosfatnom puferu (pH 6, 0,1 mol L^{-1}). Uzorci su uzimani nakon prolaska četiri vremena zadržavanja, gdje se pretpostavlja uspostava stacionarnog stanja. Koncentracija enzima u reaktoru iznosila je 4,52 mg mL^{-1}. Uvjeti pri kojima su provođene sve reakcije nalaze se u Tablici 4. Na temelju izmjerenih vrijednosti, izračunati su procesni pokazatelji, selektivnost S (Jednadžba 35), konverzija X (Jednadžba 36), produktivnost Pr (Jednadžba 37) i iskorištenje I (Jednadžba 38).



Slika 20. Cijevni reaktor s fluidiziranim slojem katalizatora unutar elektromagneta.

Tablica 4. Procesni uvjeti tijekom procesa provedbe reakcije u cijevnom reaktoru s nasutim slojem katalizatora.

Reaktor	Ukupni volumen, V (μL)	Radni volumen, V_r (μL)	Protok, Q (μL min^{-1})	Vrijeme zadržavanja, τ (min)	Koncentracija AA, c_{AA} (mmol L^{-1})	Koncentracija CAA, c_{CAA} (mmol L^{-1})
R1-1	310	106	5	21	100	50
R1-2	310	106	2,5	42	100	50
R2-1	310	106	5	21	100	50
R2-2	310	106	2,5	42	100	50
R3-1	310	106	2,5	42	50	25
R3-2	310	106	1,5	70	50	25

4. Rezultati i rasprava

U ovom doktorskom radu ispitan je proces kovalentne imobilizacije enzima DERA^{024} u svrhu povećanja njegove stabilnosti u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida. Kao nosioci za provedbu ovog tipa imobilizacije odabrani su mezoporozna silika i magnetske nanočestice.

U prvom dijelu rezultata (poglavlje 4.1.) obrađen je proces imobilizacije s mezoporoznom silikom. Prikazani su rezultati sinteze i detaljna karakterizacije MCF nosioca, nakon čega je ispitan utjecaj funkcionalizacije i aktivacije na procesne pokazatelje imobilizacije. Nakon što je pronađena idealna kombinacija funkcionalizacijskog i aktivacijskog agensa, ispitan je utjecaj pH i temperature na sami proces vezanja enzima na nosilac. Kako veličina pora često ima značajan utjecaj na imobilizaciju s mezoporoznim materijalima, ispitan je i ustanovljen utjecaj različitih veličina pora na ovdje ispitivanu reakciju. Nakon toga ispitana je i stabilnost enzima u kotlastom reaktoru kroz više ciklusa. Kako bi se dobio značajniji uvid u specifičnosti ispitivane reakcije s imobiliziranim enzimom, napravljena je detaljna kinetička karakterizacija te validacija dobivenog modela u kotlastom reaktoru. Kao zadnji dio istraživanja s mezoporoznom silikom reakcija je ispitana u cijevnom reaktoru s nasutim slojem katalizatora.

Drugi dio rezultata (poglavlje 4.2.) obrađuje proces imobilizacije s magnetskim nanočesticama. Metodika istraživanja slijedi gotovo isti tok kao imobilizacija s MCF, kako bi se omogućila usporedba oba procesa. Uključivala je sintezu i karakterizaciju MNP, mjerenje utjecaja funkcionalizacijskih i aktivacijskih agensa na parametre imobilizacije, ispitivanje utjecaja pH i temperature na proces imobilizacije, ispitivanje stabilnosti MNP-imobiliziranog enzima u kotlastom reaktoru kroz više ciklusa, kinetičku karakterizaciju MNP-imobiliziranog enzima i validaciju u kotlastom i protočnom kotlastom reaktoru, te primjenu procesa u cijevnom reaktoru s fluidiziranim slojem katalizatora.

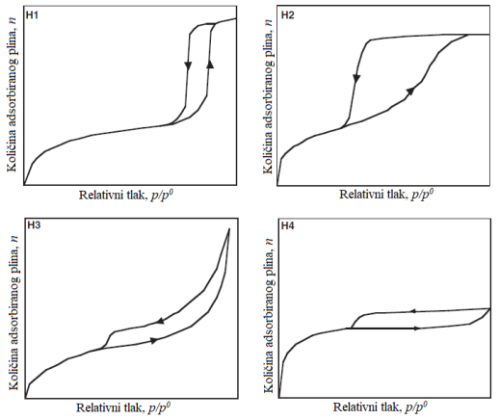
Zadnji dio rezultata (poglavlje 4.3.) prikazuje detaljnu usporedbu procesnih pokazatelja MCF i MNČ-imobiliziranog procesa u različitim tipovima ispitivanih reaktora te na osnovu toga izvodi zaključke o primjenjivosti procesa.

4.1. Mezoporozna silika

4.1.1. MCF karakterizacija

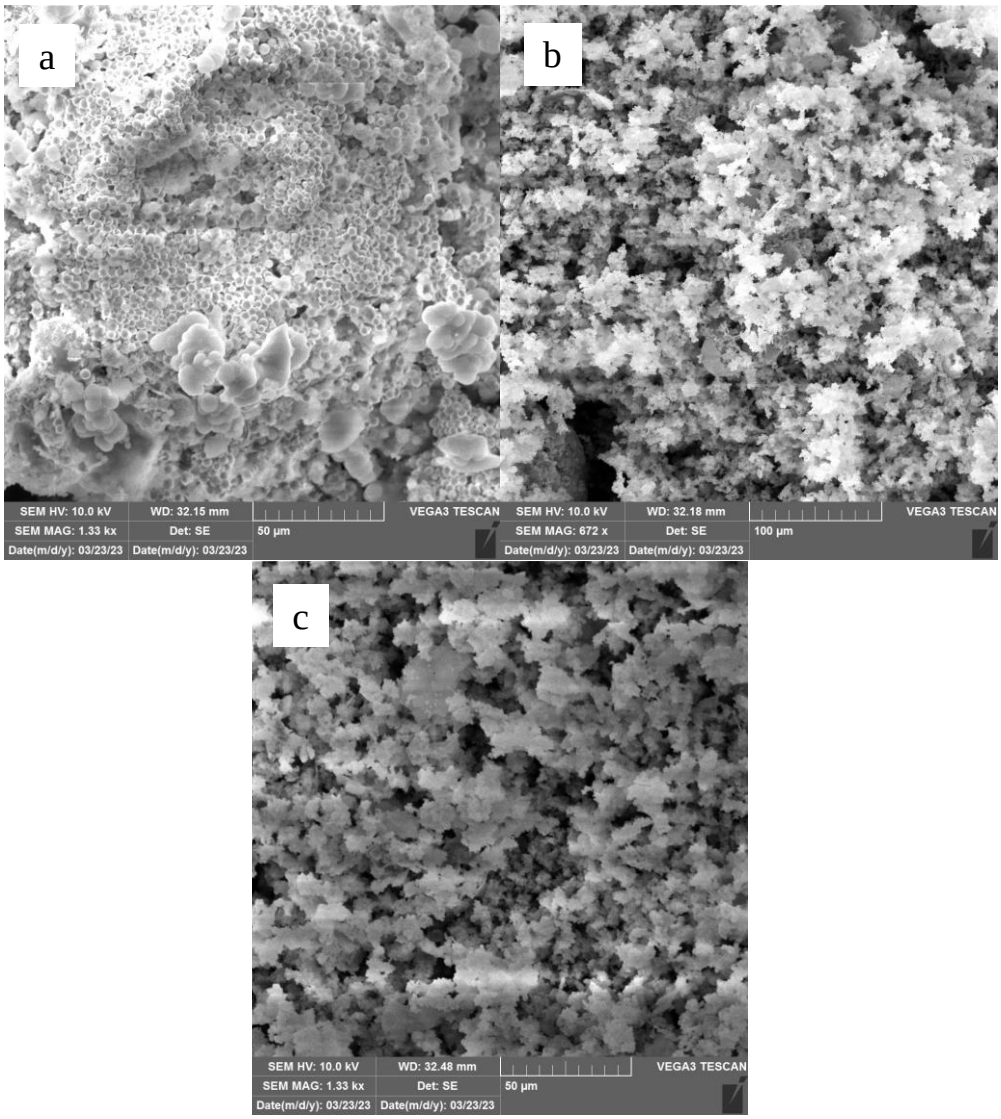
U području mikroskopije najčešće korištene metode su skenirajuća (SEM) i transmisijska (TEM) elektronska mikroskopija. Obje metode zahtijevaju da ispitivani materijal bude električno vodljiv, što znači da je ne-vodljive uzorke silike prije karakterizacije potrebno obložiti tankim slojem vodljivog materijala kako bi bili mikroskopski vidljivi. SEM je jednostavnija metoda koja sliku stvara detekcijom reflektiranih elektrona, te ne zahtijeva detaljnu pripremu uzorka, dok TEM detektira elektrone koji prolaze kroz uzorak te je potrebna detaljna priprema uzorka zbog osjetljivosti metode. Iz tog razloga TEM može pružiti uvid u unutarnju strukturu i morfologiju materijala, dok SEM daje informacije samo o vanjskom dijelu materijala [180].

Fizisorpcija, odnosno fizikalna adsorpcija tekućim dušikom gdje se pod utjecajem povećanja tlaka mjeri reverzibilna adsorpcija molekula dušika na površine mezoporoznog materijala, vrlo je česta i uobičajena tehnika za relativno precizno određivanje specifične površine, veličine pora i raspodjele veličine pora u gotovom uzorku mezoporozne silike. S obzirom da se pri adsorpciji na mezoporozne materijale zbog prisutnosti pora odvija i fenomen kapilarne kondenzacije, dobivene izoterme sadrže i petlje histereze koje se prema IUPAC-u dijele na četiri vrste prikazane su na Slici 21 [181]. SBA i MCM tipovi silike slijede petlje H1 i H2, a interpretacija dobivene petlje može pomoći pri odluci da li da se za raspodjelu veličine pora koristi adsorpcijska ili desorpcijska izoterma. Raspodjela same veličine pora dobiva se primjenom BJH (Barret-Joyner-Halenda) metode baziranoj na Kelvinovoj jednadžbi koja prikazuje odnos kondenzacije dušika u mezoporama različitih veličina. Specifična površina dobiva se primjenom BET (Braun-Emmet-Teller) jednadžbe na adsorpcijsku izotermu, te izračunava volumen monosloja adsorbiranog materijala i prema njemu određuje površinu [104].



Slika 21. Petlje histereze prema IUPAC klasifikaciji [181].

Nakon sinteze MCF mezoporozne silike, ista je bila podvrgnuta karakterizaciji na SEM-u te adsorpcijsko-desorpcijskoj analizi kako bi se utvrdila uspješnost sinteze, dobivene morfologije te promjeri dobivenih pora i specifična površina materijala. Na Slici 22. prikazani su rezultati SEM analize. Vidljivo je kako promjenom omjera P123/TMB, to jest porastom koncentracije TMB, tijekom MCF sinteze dolazi do promjene strukture i morfologije materijala, iz relativno uređene strukture sferičnih čestica u neuređeniju pjenastu strukturu karakterističnu za MCF materijal [121].



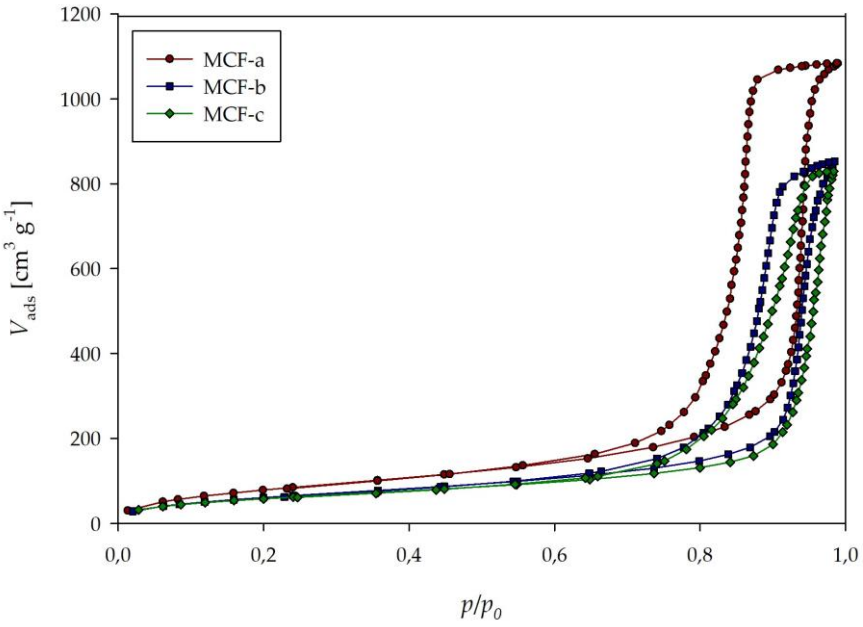
Slika 22. SEM slike MCF nosilaca dobivenih različitim omjerima P123/TMB: (a) MCF-a; (b) MCF-b; (c) MCF-c. SEM analiza rađena je pri 10 kV i 1.33 kx povećanju.

Rezultati adsorpcijsko-desorpcijske analize pokazuju kako sva tri materijala posjeduju visoku Brunauer-Emmett-Teller (BET) specifičnu površinu (298-209 m^2 g^{-1}) te visoke volumene pora (1,66-1,22 cm^3 g^{-1}), kao i da se oba ta parametra očekivano smanjuju s povećanjem promjera pora (Tablica 5).

Tablica 5. Fizikalne karakteristike MCF-a sintetiziranih različitim omjerima P123/TMB.

Ime	BET specifična površina ($m^2\ g^{-1}$)	Prosječni promjer pora-BJH adsorpcija (nm)	Prosječni promjer pora-BJH desorpcija (nm)	Volumen pora ($cm^3\ g^{-1}$)
MCF-a	298,9 ± 4.6	19,8 ± 6.5	12,5 ± 3.3	1,66
MCF-b	225,9 ± 4.1	21,8 ± 7.2	15,2 ± 5.4	1,28
MCF-c	209,2 ± 4.2	24,5 ± 8.4	16,8 ± 4.1	1,22

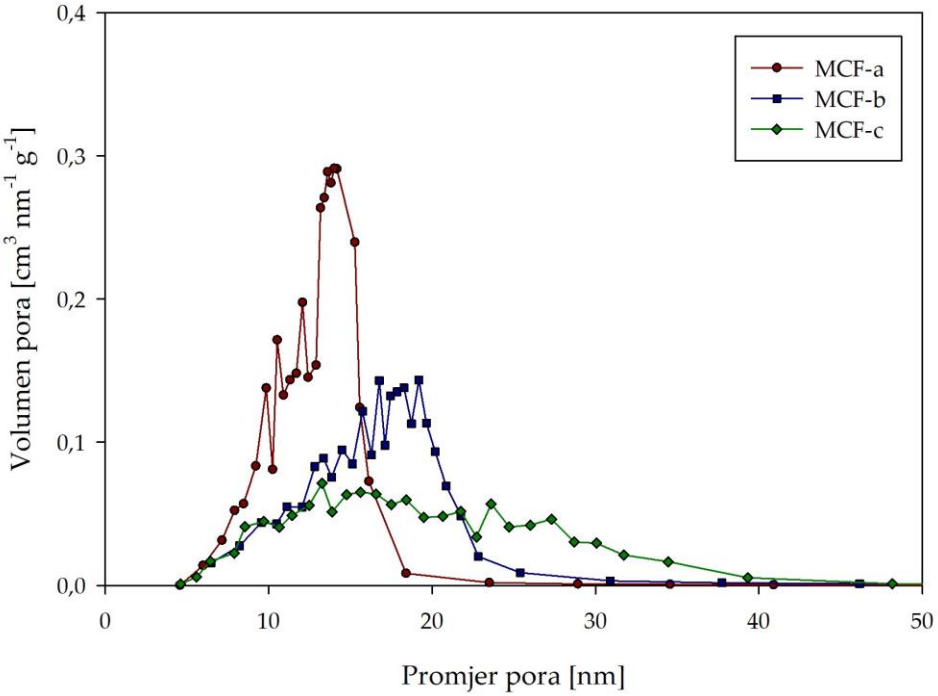
Ako se u Tablici 5. usporede prosječni promjeri pora dobiveni iz Barrett-Joyner-Halenda (BJH) izotermi, na prvi pogled nema velikih razlika (za MCF-a i MCF-c, razlika u prosječnom adsorpcijskom i desorpcijskom promjeru pora je samo 4,7 nm i 4,3 nm). Ipak, u obzir treba uzeti rezultate prikazane na Slici 23., gdje je vidljivo kako sva tri materijala slijede oblik izoterme tipa IV i petlje histereze H1 [181,182].



Slika 23. Usporedba adsorpcijsko-desorpcijskih izotermi za sva tri MCF nosioca.

Ta značajka ukazuje na to kako je distribucija veličine pora (engl. *pore size distribution*, PSD) dobivena BJH desorpcijskom izotermom puno značajnija i relevantnija za ovaj tip materijala od adsorpcijske izoterme [183]. PSD desorpcijska izoterma za sva tri nosioca prikazana je na Slici 24. Na slici je jasno vidljivo kako raspon dostupnih veličina pora raste u puno većim koracima nego što je to vidljivo u podacima koji u obzir uzimaju samo prosječni promjer (Tablica 5). Ako se u obzir uzme dostupni volumen pora, kod MCF-a najviše pora je u rasponu 12-16 nm, kod MCF-b između 18-22 nm a MCF-c pokazuje najveći raspon od 15 nm

do 35 nm. Sagledavajući ove rezultate te činjenicu da je hidrodinamički promjer enzima DERA oko 9 nm [184], zaključeno je da su ovako dobiveni materijali dobar izbor imobilizacijskog nosioca za enzim DERA^{024} te da postoje dovoljne razlike u veličini pora kako bi se mogli dobiti relevantni rezultati za utjecaj veličine pora na reakciju ispitivanu u ovom istraživanju.



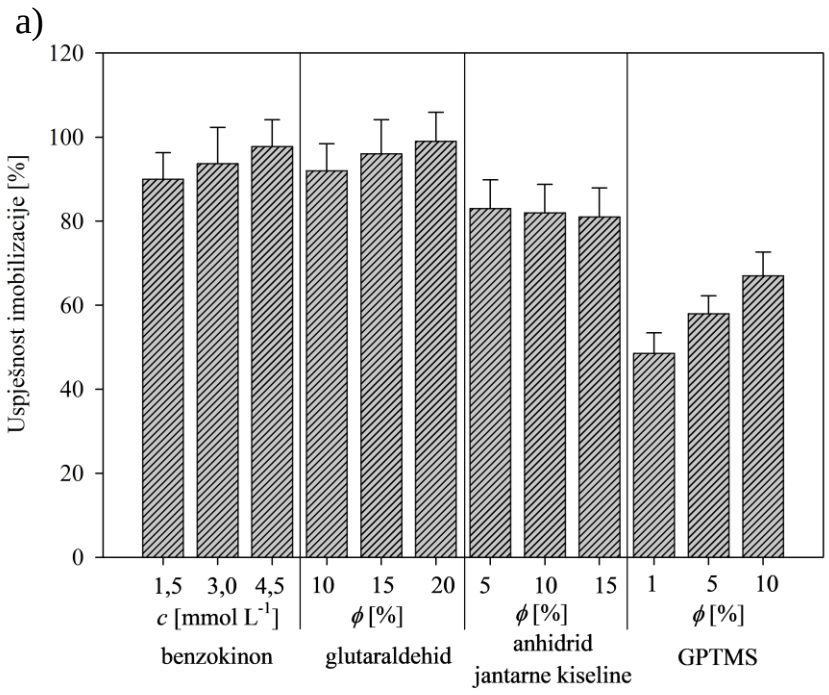
Slika 24. Distribucija veličina pora prema BJH desorpcijskoj izotermi.

4.1.2. Utjecaj funkcionalizacije i aktivacije površine nosioca na procesne pokazatelje imobilizacije na MCF nosiocu

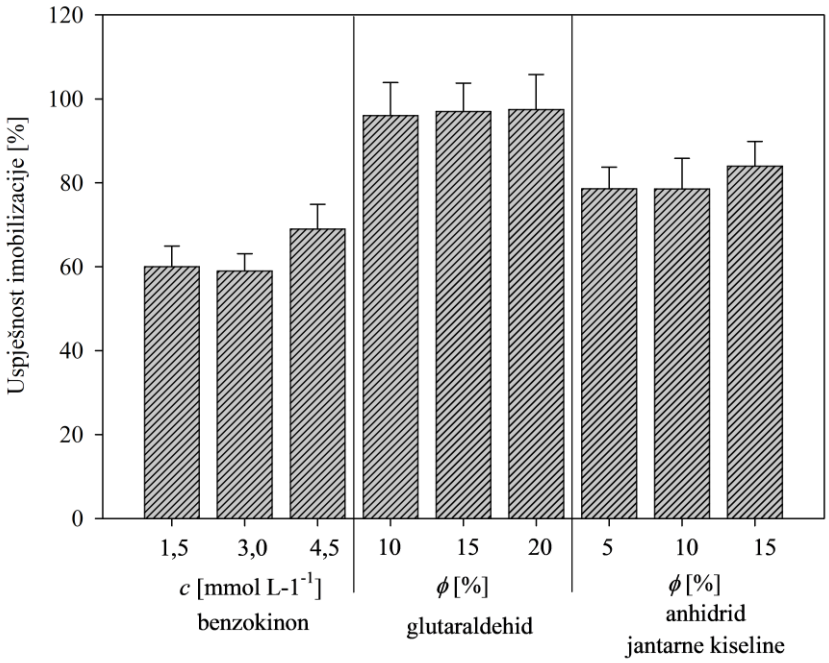
Kako bi dobili imobilizirani biokatalizator s idealnim karakteristikama iskorištenja, očuvane aktivnosti i stabilnosti, proveden je širok raspon testiranja različitih kombinacija funkcionalizacijskih i aktivacijskih agensa na nosiocu MCF-b. APTES i APTMS su učestalo korišteni organosilani zbog svoje dostupnosti, niske cijene i svestrane reaktivnosti amino skupine koju posjeduju. Jedina razlika između njih je duljina ugljičnog lanca koji se veže za površinu nosioca što utječe na duljinu molekulske razmaknice [17]. Što se tiče korištenih aktivacijskih agensa, glutaraldehid i benzokinon su već testirani za imobilizaciju enzima DERA u drugim reakcijama [67,70], a u literaturi postoje i neka obećavajuća preliminarna ispitivanja za anhidrid jantarne kiseline [21]. GPTMS je odabran zbog prisutnosti svoje epoksi skupine, koja omogućuje direktno kovalentno vezanje enzima, bez potrebe za dodatnom aktivacijom kao u slučaju APTES i APTMS [185].

Ciljana amino skupina za vezanje na enzim DERA^{024} u svim slučajevima je ε-NH_2 lizina što može dovesti i do stabilizacije enzima od utjecaja deaktivacije acetaldehidom [37]. Svi testirani aktivacijski agensi imaju različitu duljinu molekulske razmaknice (glutaraldehid-duga, benzokinon-srednja, anhidrid jantarne kiseline-kratka) što može imati značajan utjecaj na katalitičke karakteristike imobiliziranog enzima [17]. Imobilizacija epoksi skupinom i glutaraldehidom također može postići vezanje na više točaka između enzima i nosioca, što posljedično može značajno povećati stabilnost enzima, ali i smanjiti njegovu aktivnost [17]. S obzirom da koncentracija aktivacijskog agensa ima značajan utjecaj na uspješnost imobilizacije [186,187], sva ispitivanja su provedena s tri različite koncentracije aktivacijskih agensa.

Na Slici 25. prikazan je utjecaj različitih kombinacija funkcionalizacijskih i aktivacijskih agensa na procesni pokazatelj iskorištenja imobilizacije. Vidljivo je da su najbolje rezultate pokazali APTES/glutaraldehid i APTMS/glutaraldehid u svim ispitanim koncentracijama. Vrijednost iskorištenja je u svim slučajevima gotovo 100 %, što znači da je kapacitet nosioca iznosio otprilike 59 mg g^{-1}. Takva izraženija vrijednost iskorištenja u usporedbi s ostalim korištenim agensima objašnjiva je zbog mogućnosti umrežavanja enzima s glutaraldehidom uz kovalentno vezanje, što je uobičajena pojava kod korištenja glutaraldehida [86].

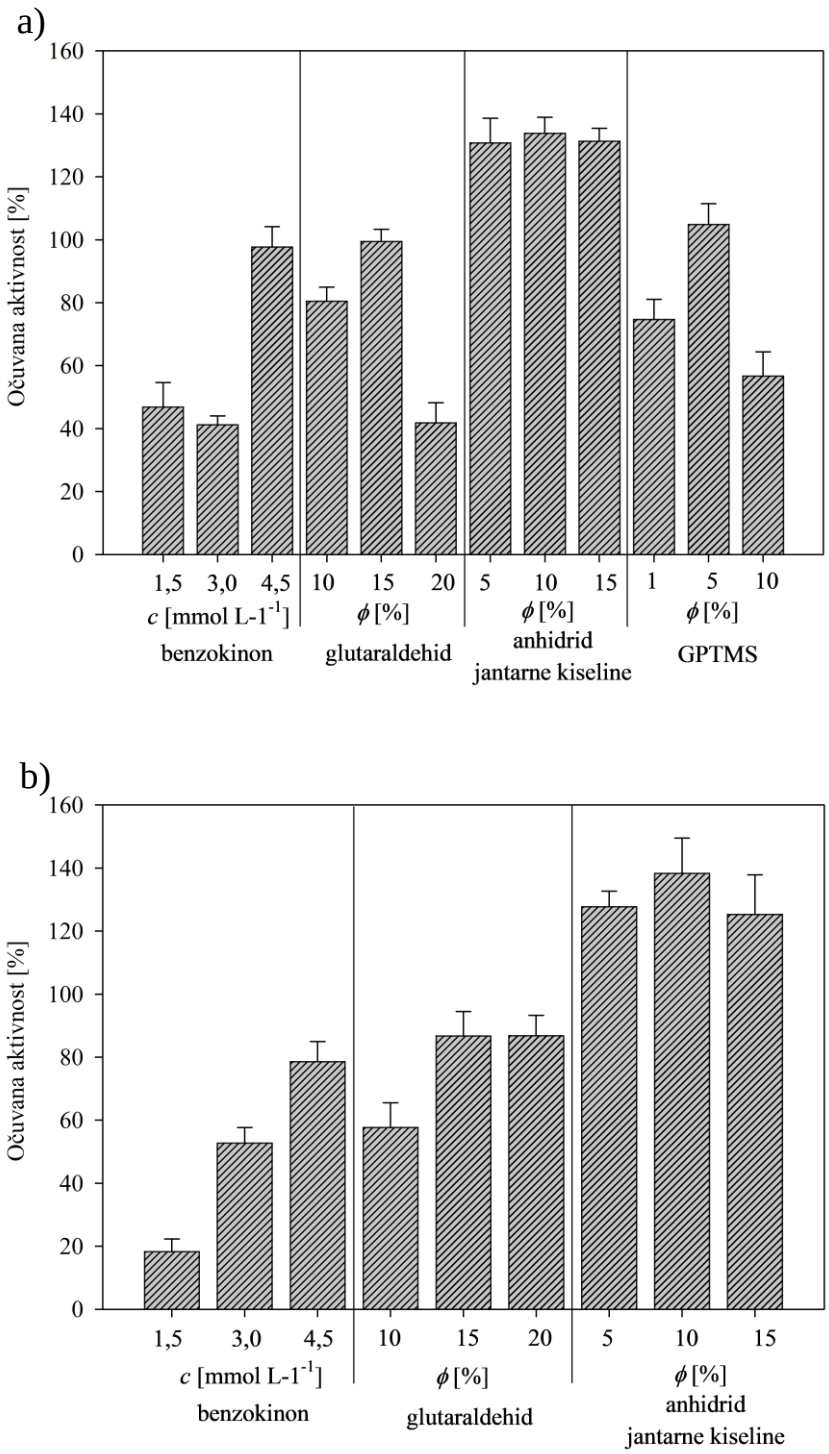


b)



Slika 25. Utjecaj različitih koncentracija aktivacijskih agensa vezanih na a) APTES i GPTMS, b) APTMS na procesni pokazatelj uspješnosti imobilizacije (fosfatni pufer 0,1 mol L^{-1}, pH 6, 25 °C).

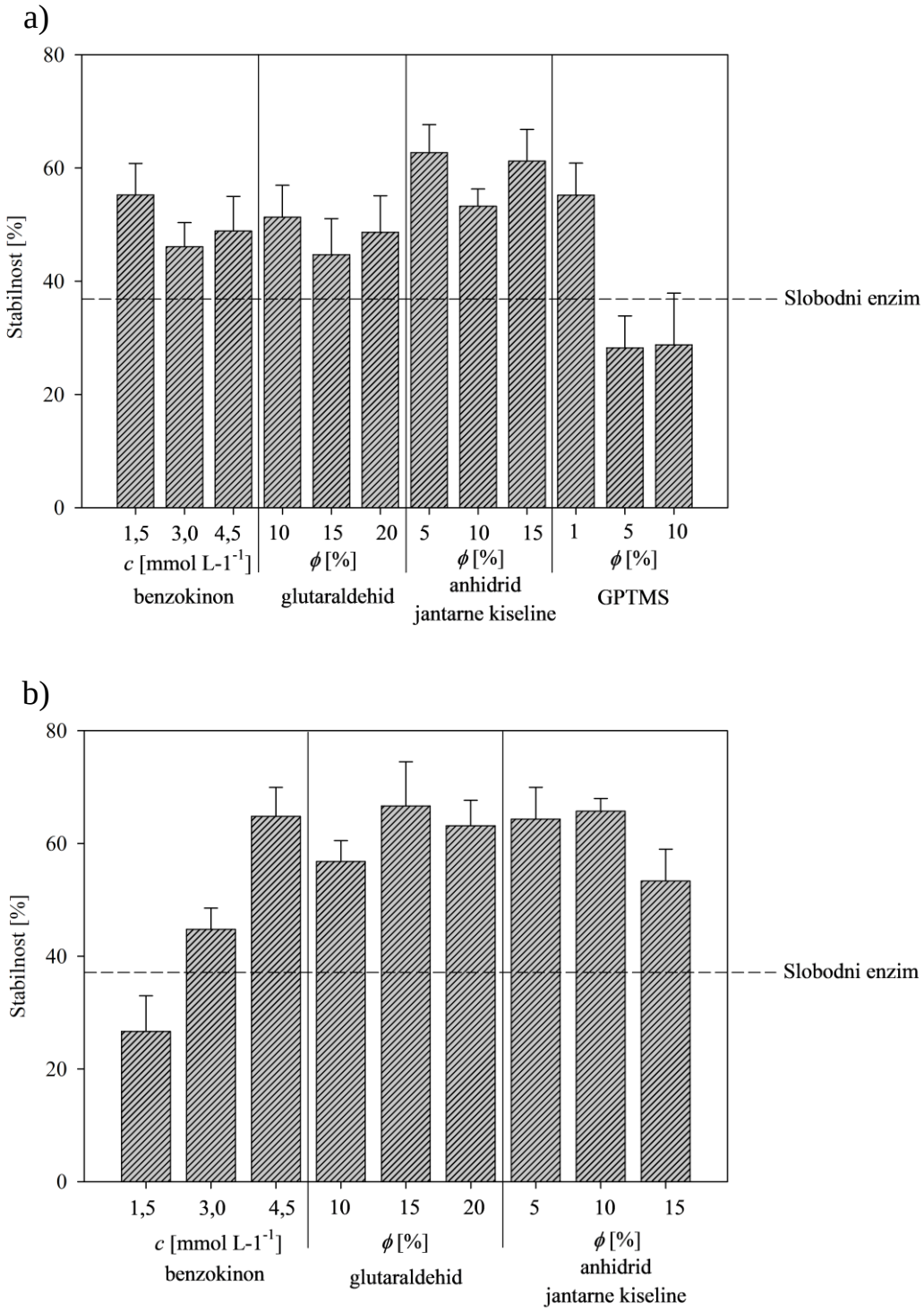
Na Slici 26. prikazan je utjecaj različitih kombinacija funkcionalizacijskih i aktivacijskih agensa na procesni pokazatelj očuvane aktivnosti. Anhidrid jantarne kiseline je ovdje pokazao uvjerljivo najbolje rezultate u svim ispitanim koncentracijama s oba funkcionalizacijska agensa, uz pojavu fenomena hiperaktivacije gdje je aktivnost imobiliziranog enzima veća od aktivnosti slobodnog enzima, što se najvjerojatnije događa zbog strukturne promjene enzima u aktivniju konformaciju [97].



Slika 26. Utjecaj različitih koncentracija aktivacijskih agensa vezanih na a) APTES i GPTMS, b) APTMS na procesni pokazatelj očuvane aktivnosti (fosfatni pufer 0,1 mmol L^{-1}, pH 6, 25 °C).

Na Slici 27. prikazan je utjecaj različitih kombinacija funkcionalizacijskih i aktivacijskih agensa na stabilnost imobiliziranog enzima. Ovdje je vidljivo kako je imobilizirani enzim s praktično svim kombinacijama aktivacijskih i funkcionalizacijskih agensa

pokazao bolju stabilnost od slobodnog enzima koja je iznosila ≈ 37 %. Isto tako prati se identičan trend kao i slučaju očuvane aktivnosti, gdje je najbolji rezultat opet pokazao anhidrid jantarne kiseline.

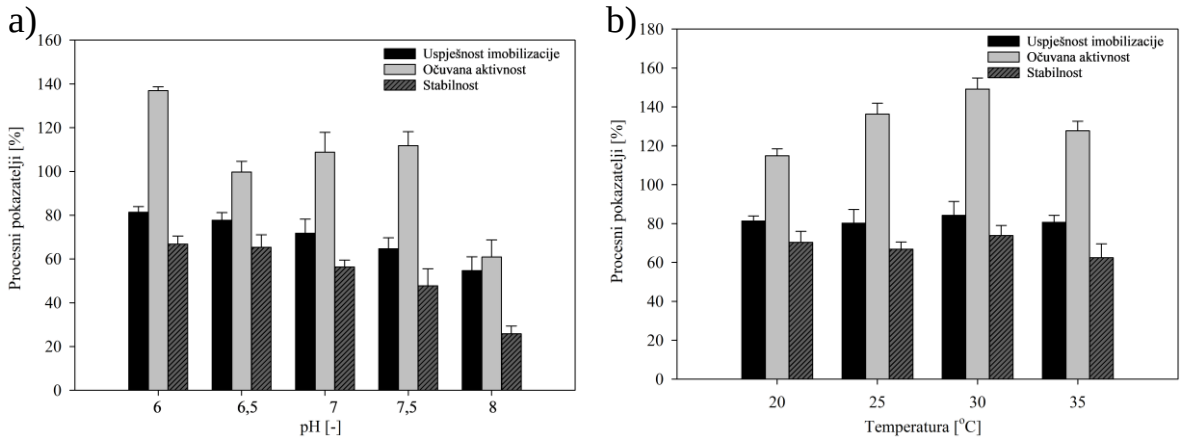


Slika 27. Utjecaj različitih koncentracija aktivacijskih agensa vezanih na a) APTES i GPTMS, b) APTMS na procesni pokazatelj stabilnosti (fosfatni pufer 0,1 mmol L^{-1}, pH 6, 25 °C).

Ako se sagledaju svi rezultati u cjelini, iako je anhidrid jantarne kiseline pokazao najlošije rezultate po pitanju iskorištenja, ipak ima značajnu prednost po pitanju očuvane aktivnosti uz otprilike istu stabilnost kao APTMS-glutaraldehid. Kad se u obzir uzme gotovo 40 % veća aktivnost te skoro duplo bolja stabilnost imobiliziranog enzima od slobodnog enzima, očito je da je 10 %-ni APTMS-anhidrid jantarne kiseline najbolji izbor za daljnju optimizaciju procesa.

4.1.3. Utjecaj pH i temperature na proces MCF imobilizacije

Na Slici 28. prikazan je utjecaj promjene pH u procesu imobilizacije na sve procesne pokazatelje procesa imobilizacije. Vidno je da povećanjem pH vrijednosti dolazi do pada vrijednosti svih pokazatelja, stoga je za proces optimiranja temperature odabran pH 6. Kod variranja temperature primjetan je porast vrijednosti svih pokazatelja zaključno s 30 °C, nakon čega slijedi osjetni pad. Sumarno, pri idealnim uvjetima imobilizacije na pH 6 i 30 °C, očuvana aktivnost poboljšana je za gotovo 10 %, te stabilnost za 5 %.



Slika 28. Utjecaj pH (a) i temperature (b) na procesne pokazatelje uspješnosti MCF imobilizacije (fosfatni pufer 0,1 mol L^{-1}, pH (pri T = 25 °C), T (pri pH = 6)).

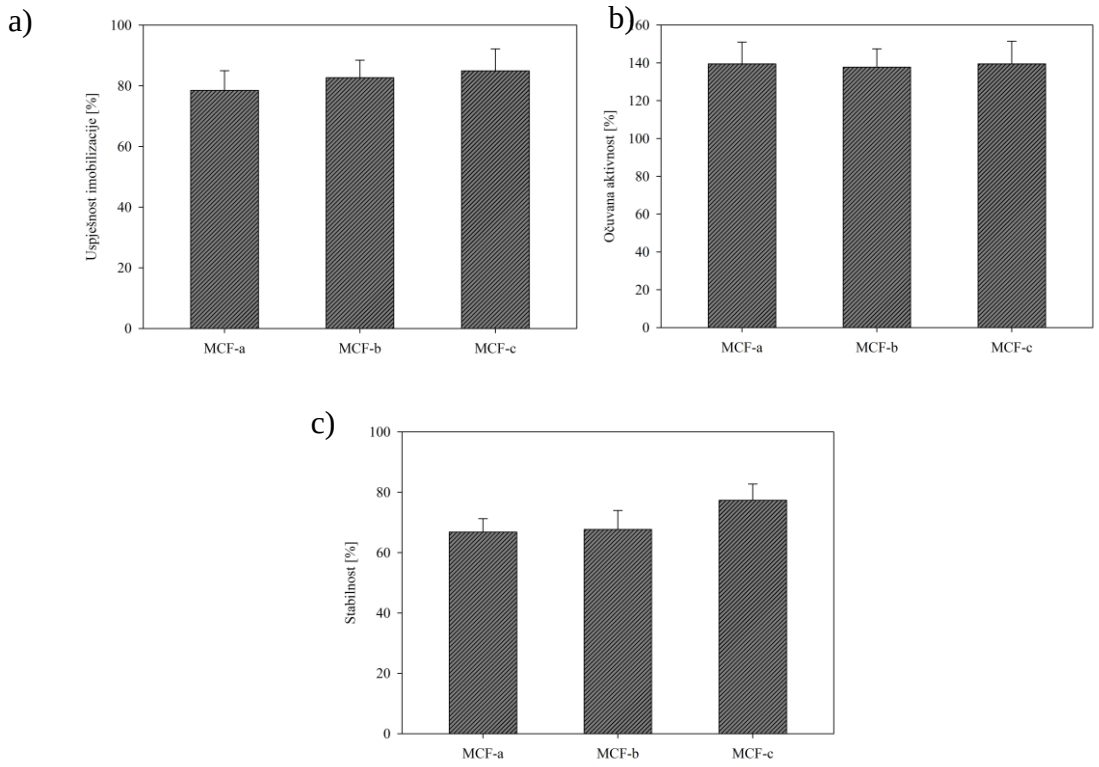
4.1.4. Utjecaj veličine pora na uspješnost imobilizacije

Nakon pronalaska optimalne kombinacije funkcionalizacijskog i aktivacijskog agensa, te pH i temperature prilikom imobilizacije na nosiocu MCF-b, procesni pokazatelji imobilizacije ispitani su i na nosiocima MCF-a i MCF-c kako bi se istražio utjecaj pora na reakciju ispitivanu u ovom istraživanju (Slika 29). Po pitanju rezultata uspješnosti imobilizacije, vidljiv je blagi porast u kapacitetu nosioca, s 78 ± 5 % kod MCF-a na 83 ± 5 % kod MCF-c. Kod očuvane aktivnosti nema gotovo nikakve razlike te sva tri nosioca pokazuju slične rezultate. Najveća razlika prisutna je kod procesnog pokazatelja stabilnosti, koja se

povećala za otprilike 12 % od MCF-a do MCF-c. Najvjerojatniji razlog tome je veći promjer pora kod MCF-c koji enzimu omogućuje nešto dublji prodor u unutarnju strukturu pora, više ga zaštićujući od vanjskih mehaničkih i fizikalnih utjecaja [120] tijekom reakcije i u procesu ispiranja nosioca između reakcija, što je u ovom istraživanju uključivalo upotrebu tresilica i centrifuge pri visokim brzinama.

Iako je za pretpostaviti da kod MCF-c dolazi do dubljeg prodiranja enzima u unutrašnjost pora ona vjerojatno nije toliko značajna s obzirom na povećanje iskorištenja od samo 7 %. Ta vrijednost sugerira da se većina enzima zadržava oko ulaza u pore, te da protein-protein steričke smetnje sprječavaju dublji prodor u unutrašnjost pora [188]. Ipak, može se zaključiti da je kombinacija većih pora, zajedno s različitom dinamikom difuzije koja je prisutna kod neuređenije strukture MCF-c [97], najviše doprinijela osjetnom povećanju stabilnosti.

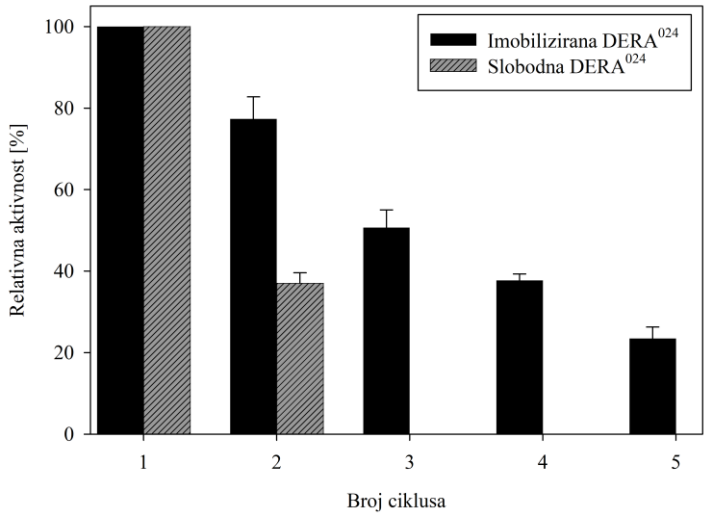
Također se vrijedi i detaljnije osvrnuti na recenzijski rad Bayne i sur. [188] koji je istražio utjecaj veličine pora na imobilizirane enzime u raznim reakcijama, koristeći detaljnu statističku analizu svih objavljenih podataka o imobilizaciji enzima na mezoporozne materijale do 2013. godine. Oni su zaključili su da u većini slučajeva kapacitet nosioca raste do specifičnih površina od 200 m^2 g^{-1} nakon čega više nema promjene, te da se isti fenomen događa s promjerima pora iznad 10 nm, što se slaže s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.



Slika 29. Utjecaj veličine pora na a) uspješnost imobilizacije, b) očuvanu aktivnost i c) stabilnost (fosfatni pufer 0,1 mol L^{-1}, pH 6, 30 °C).

4.1.5. Praćenje stabilnosti enzima DERA^{024} kod ponovne upotrebe prilikom imobilizacije na MCF

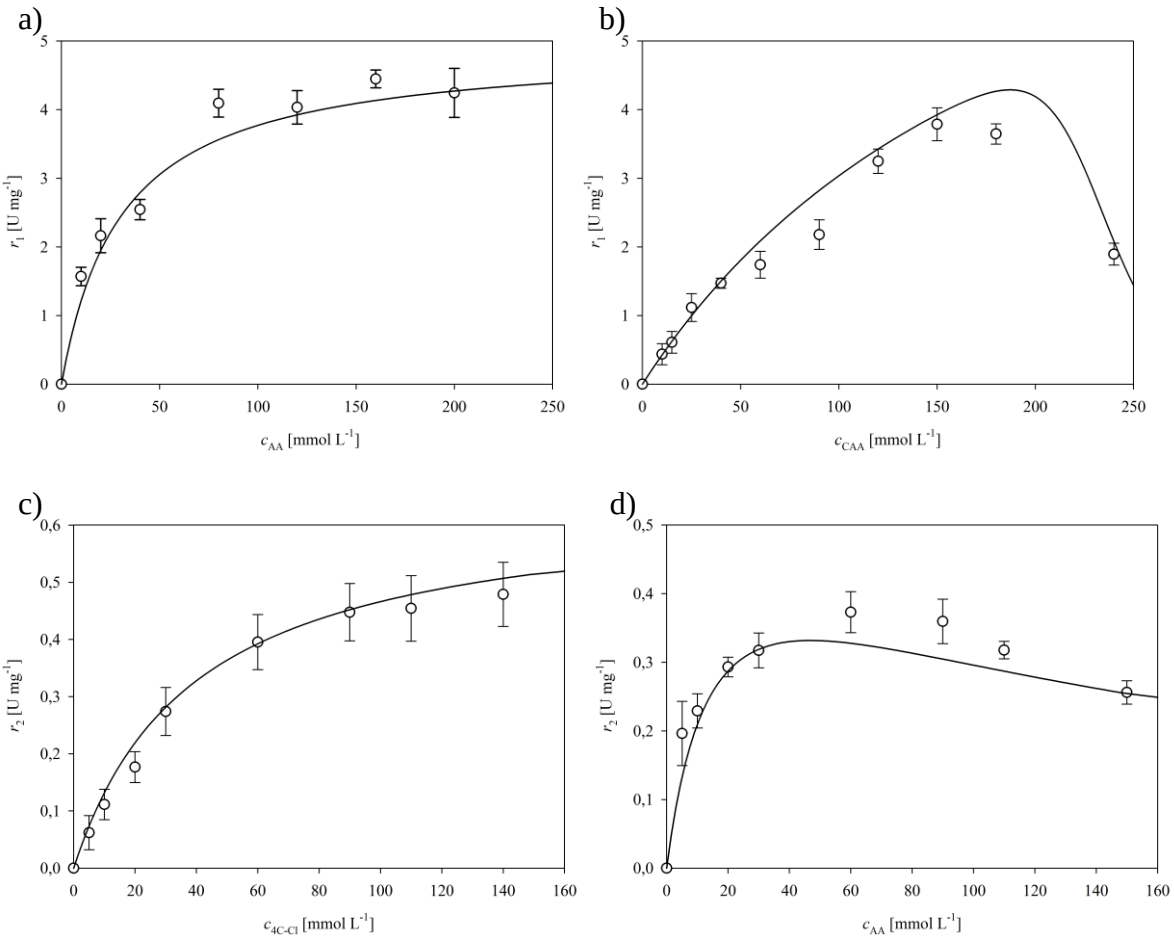
Koristeći MCF-c siliku, ispitana je stabilnost enzima kroz više ciklusa ponovne upotrebe enzima DERA^{024} u kotlastom reaktoru (Slika 30). Slobodni enzim izgubi gotovo svu aktivnost već u trećem ciklusu, dok imobilizirani enzim u istom ciklusu uspijeva zadržati 50 % početne aktivnosti. Ukupno je izvršeno pet ciklusa ponovne upotrebe enzima DERA^{024} nakon čega aktivnost imobiliziranog enzima pada ispod 20 %, što ukazuje na značajna poboljšanja stabilnosti enzima DERA^{024} nakon provedene imobilizacije. Najvjerojatniji razlog pada aktivnosti imobiliziranog enzima (uz utjecaj same reakcije) u ovom slučaju je denaturacija enzima uzrokovana mehaničkim stresom miješanja i centrifugiranja nosioca u procesu ispiranja nakon svakog provedenog ciklusa [120].



Slika 30. Usporedba relativne aktivnosti slobodnog i MCF-imobiliziranog enzima DERA^{024} u kotlastom reaktoru kroz više ciklusa (fosfatni pufer 0.1 mol L^{-1}, pH 6, 30 °C).

4.1.6. Procjena kinetičkih parametara i razvoj matematičkog modela MCF-imobiliziranog enzima DERA^{024}

Kinetika MCF-imobiliziranog enzima određena je prema prvom i drugom koraku reakcije prikazanom u reakcijskoj shemi na Slici 15. Kinetički parametri Michaelis-Menteničinog modela određeni su metodom početnih brzina opisanoj u poglavlju 3.10. te su prikazani u Tablici 6. Utjecaj različitih koncentracija sudionika reakcije na aktivnost enzima DERA^{024} prikazan je na Slici 31. Na slici točke predstavljaju rezultate eksperimenta, a linija rezultate simulacije pomoću modela u programskom paketu SCIENTIST .



Slika 31. Kinetika DERA^{024} imobiliziranog na MCF-b/APTMS/10 % anhidrid jantarne kiseline u reakciji prve (a, b) i druge (c, d) aldolne adicije. Prikazan je utjecaj različitih koncentracija: a -acetaldehida (c_{CAA} = 150 mmol L^{-1}), b -kloroacetaldehida (c_{AA} = 150 mmol L^{-1}), c -acetaldehida ($c_{4C\text{-}Cl}$ = 100 mmol L^{-1}) i d -4-kloro-3-hidroksibutanala (c_{AA} = 50 mmol L^{-1}) na početnu brzinu reakcije (fosfatni pufer 0.1 mol L^{-1}, pH 6, 25 °C, γ_{DERA}^{024} = 1 mg mL^{-1}).

Tablica 6. Procijenjeni kinetički parametri za reakciju dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida kataliziranu slobodnim i MCF-imobiliziranim enzimom DERA^{024}.

Parametar	Jedinica	Slobodna DERA^{024*}	MCF-imobilizirana DERA^{024}
V_{m1}	U mg^{-1}	4,31 ± 0,63	12,50 ± 0,28
K_{mAA1}	mmol L^{-1}	11,10 ± 2,54	30,61 ± 2,66
K_{mCAA}	mmol L^{-1}	73,51 ± 9,11	215,04 ± 7,98
K_{iSCAA}	mmol L^{-1}	260,96 ± 26,31	233,62 ± 3,11
n	-	20,00 ± 4,21	14,06 ± 3,02

Tablica 6 (nastavak). Procijenjeni kinetički parametri za reakciju dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida kataliziranu slobodnim i MCF-imobiliziranim enzimom DERA^{024}.

Parametar	Jedinica	Slobodna DERA^{024*}	MCF-imobilizirana DERA^{024}
V_{m2}	U mg^{-1}	1,53 ± 0,26	1,11 ± 0,02
K_{mAA2}	mmol L^{-1}	2,03 ± 0,28	14,97 ± 1,46
$K_{m4C\text{-}Cl}$	mmol L^{-1}	86,26 ± 7,62	39,42 ± 11,97
K_{isAA}	mmol L^{-1}	-	123,64 ± 10,56
$K_{is4C\text{-}Cl}$	mmol L^{-1}	72,44 ± 7,54	-

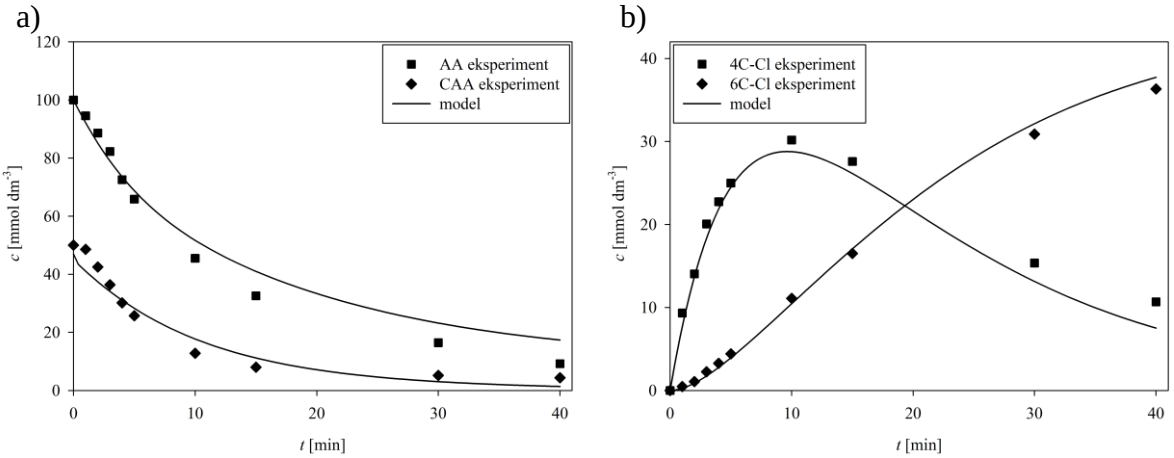
*Podaci preuzeti iz Švarc i sur. [189]

Ako usporedimo dobivene parametre, K_m vrijednosti za imobilizirani enzim u prvoj reakciji su veće nego za slobodni enzim, što implicira da je afinitet enzima prema supstratima manji nakon imobilizacije, ali maksimalna brzina reakcije V_m je gotovo tri puta veća, što je u korelaciji s dobivenim rezultatima očuvane aktivnosti. Kao što je bilo navedeno u poglavlju 4.1.2. ta hiperaktivacija vjerojatno se događa zbog prelaska enzima u aktivniju konformaciju. S obzirom da DERA^{024} pripada tipu 1 aldolaza, koje rade na principu formiranja Schiffove baze između donor supstrata i NH_2 reaktivne skupine lizina na aktivnom mjestu enzima [37], a anhidrid jantarne kiseline reagira isključivo s ε-NH_2 skupinom lizina, ta interakcija potencijalno čini aktivno mjesto enzima puno dostupnijim supstratu [190].

Osjetno više vrijednosti K_m u prvoj reakciji aldolne adicije moguće je pripisati i poroznosti materijala. Rodrigues i sur. [97] postuliraju da utjecaj imobilizacijskog procesa, koji mijenja fizikalno kemijska svojstva okruženja enzima, kao i ograničenja difuzije zbog prisutnosti pora, može imati značajan utjecaj na prilaz supstrata i produkata ka enzimu. To dovodi do sporije difuzije supstrata, što je onda vidljivo i na višim K_m vrijednostima. Iako je to na prvi pogled negativan efekt, u slučaju kad je prisutna inhibicija supstratima kao u ovdje ispitivanoj reakciji, taj fenomen zapravo može imati blago pozitivan učinak zbog smanjenog kontakta između enzima i inhibicijskih molekula.

Još jedna neobična pojava kod ove reakcije je snažna inhibicija supstratom prisutna kod koncentracija CAA iznad 200 mmol L^{-1}. Standardni Michaelis-Menteničin model uz inhibiciju supstratom to nije bio u stanju opisati, ali Bapiro i sur. [191] su predložili modifikaciju modela dodatkom parametra *n*, koji zapravo označava broj CAA molekula vezanih na inhibitorsko mjesto enzima. Primjenom te modifikacije vidljivo je da model vrlo dobro slijedi eksperimentalne podatke (Slika 31. b).

Kako bi se procijenila točnost dobivenog matematičkog modela, napravljena je ocjena valjanosti modela u kotlastom reaktoru (Slika 32.). Iz prikazanih rezultata vidljivo je da postoji snažna konvergencija između eksperimentalnih opažanja i podataka dobivenih modelom, što dodatno potvrđuju dobiveni statistički podaci standardne devijacije, koeficijenta korelacije i koeficijenta determinacije (σ = 1,965, ρ = 0,977 i R^2 = 0,955). Ovi rezultati pružaju mogućnost za razvoj i poboljšanja ovog procesa u kotlastom reaktoru.

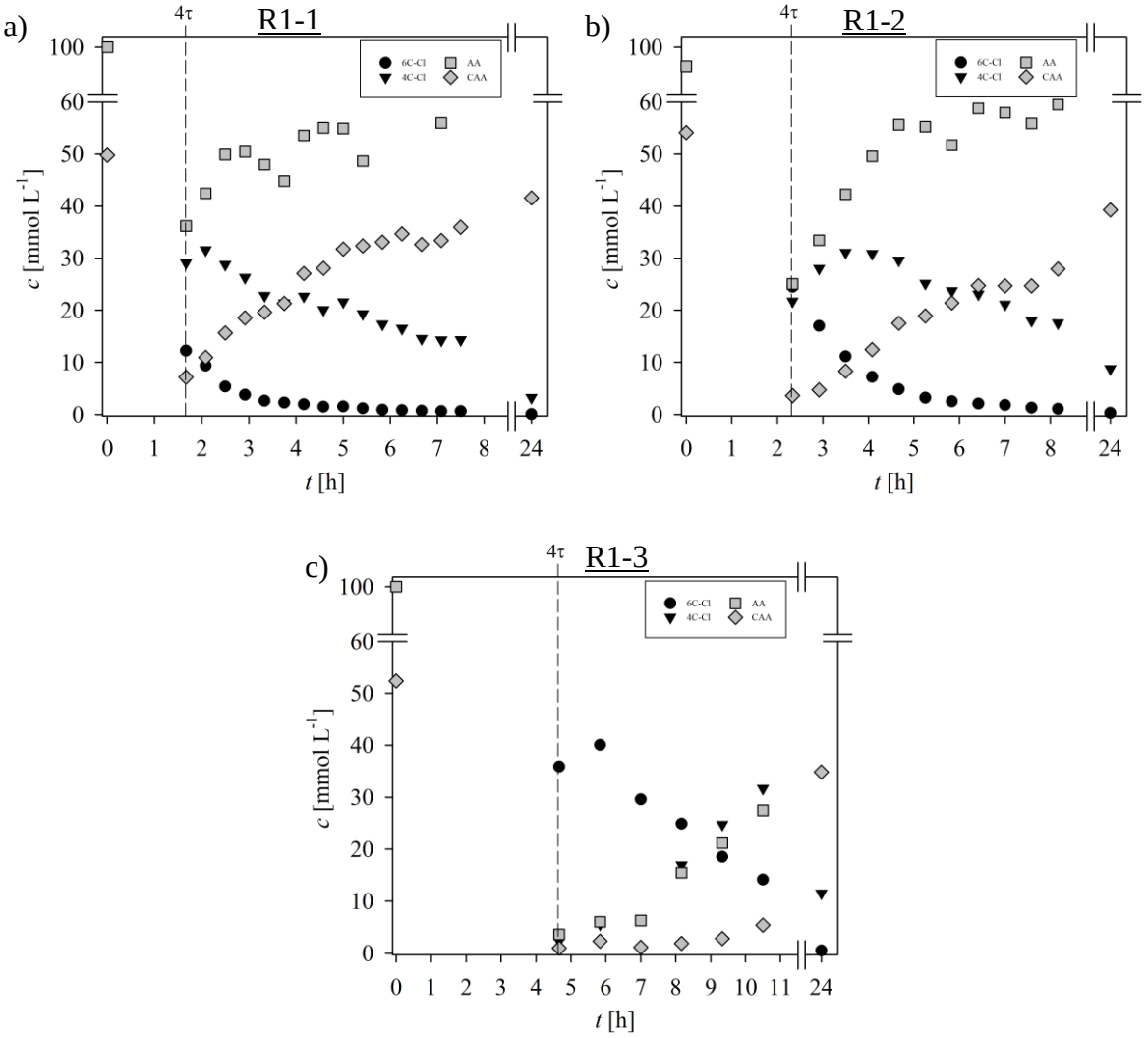


Slika 32. Ocjena valjanosti matematičkog modela u reakcije dvostruke aldolne adicije katalizirana DERA^{024} imobiliziranim na MCF-b/APTMS/10 % anhidrid jantarne kiseline u kotlastom reaktoru za a) supstrate i b) produkte (c_{AA} = 100 mmol L^{-1}, c_{CAA} = 50 mmol L^{-1}, fosfatni pufer 0,1 mol L^{-1}, pH 6, 25 °C, $\gamma_{DERA}{}^{024}$ = 3 mg mL^{-1}).

4.1.7. Sinteza prekursora statina u cijevnom reaktoru s nasutim slojem katalizatora

U cijevnom reaktoru V = 300 μL provedena su tri eksperimenta s vremenima zadržavanja od 25, 35 i 70 min (Slika 33). Prilikom mjerenja u svakom reaktoru uzimani su i uzorci za Bradford analizu na izlazu iz reaktora kako bi se detektiralo eventualno ispiranje enzima, ali ono nije bilo prisutno ni u jednom slučaju. Vidljivo je kako u sva tri slučaja nije uspostavljeno stacionarno stanje, te koncentracija 6C-Cl kreće padati već nakon 1-2 h. Kao posljedica toga, koncentracije supstrata počinju rasti, pri čemu AA pokazuje brži rast u usporedbi s CAA. Ako se u obzir uzme to i činjenica da koncentracija 4C-Cl nastavlja rasti nakon što prestane konverzija u konačni produkt 6C-Cl, može se pretpostaviti da na enzimu DERA^{024} postoje dva aktivna mjesta i da je aktivno mjesto koje katalizira prvu reakcije aldolne adicije AA i CAA u međuprodukt 4C-Cl osjetno stabilnije od drugog aktivnog mjesta koje je zaslužno za formiranje konačnog produkta 6C-Cl. Smanjenjem vremena zadržavanja, tj. povećanjem protoka vidljivo je i kako do deaktivacije dolazi brže nego što bi bilo očekivano s obzirom na prisutnu koncentraciju enzima (Slika 33a). Do deaktivacije oba aktivna mjesta

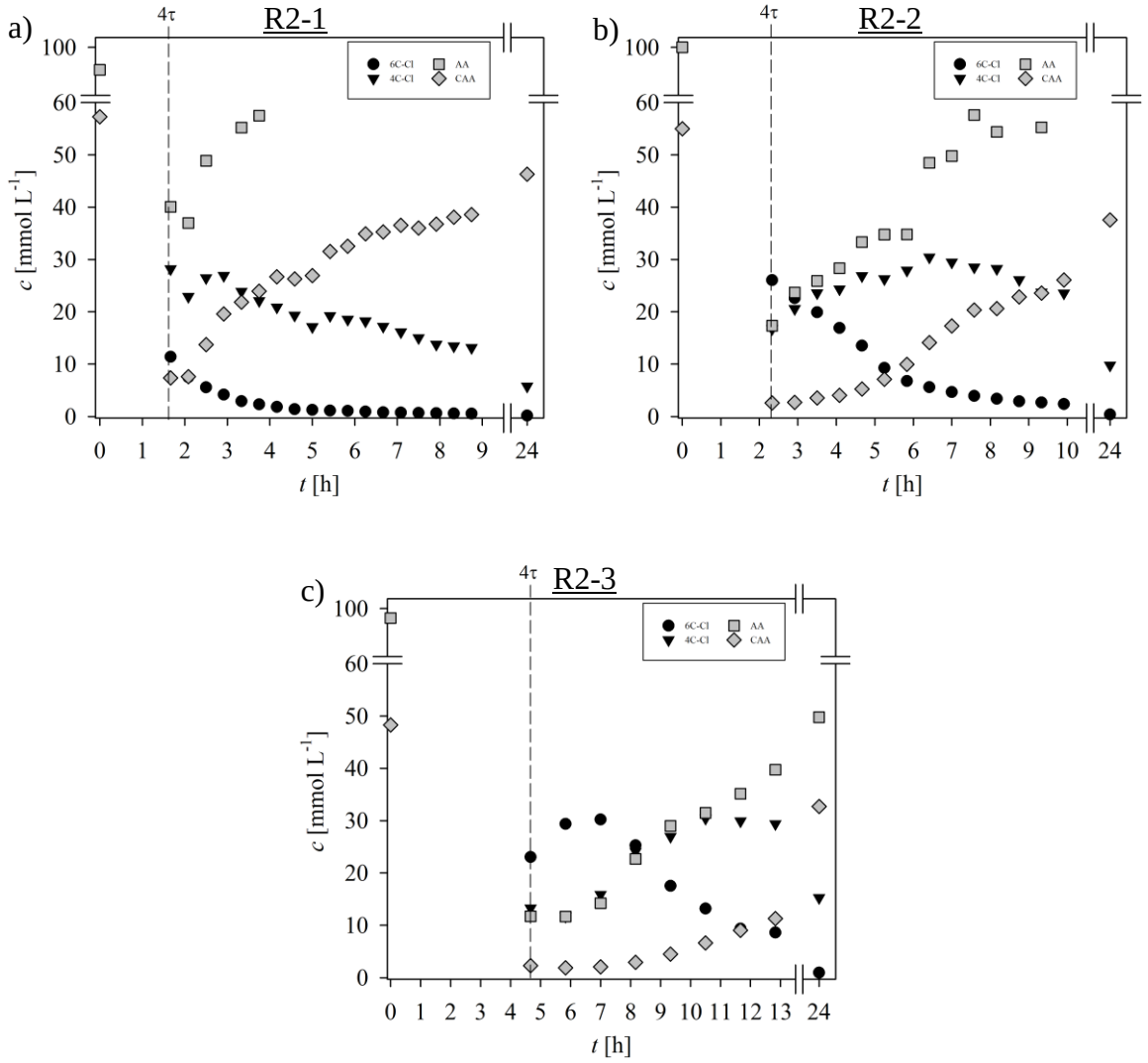
dolazi već za manje od 1 h, što je možebitna posljedica utjecaja granične faze zrak-tekućina uzrokovane smičnim silama uslijed većih protoka [192], ili, s obzirom na zbijenost i veliku gustoću nosioca u reaktoru, nemogućnosti jednolikog strujanja i pojave preferencijalnih tokova čime značajna količina enzima ostaje neiskorištena [193].



Slika 33. Promjena koncentracije acetaldehida (AA), kloroacetaldehida (CAA), 4-kloro-3-hidroksibutanala (4C-Cl) i 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala (6C-Cl) u vremenu prilikom provedbe reakcije dvostruke aldolne adicije u cijevnom reaktoru V = 300 μL pri vremenima zadržavanja: a) τ = 25 min, b) τ = 35 min i c) τ = 70 min (c_{AA} = 100 mmol L^{-1}, c_{CAA} = 50 mmol L^{-1}, fosfatni pufer 0,1 mol L^{-1}, pH 6, 25 °C, γ_{DERA}^{024} = 4,10 mg mL^{-1}).

Na Slici 34. prikazani su eksperimenti u cijevnom reaktoru V = 500 μL s vremenima zadržavanja od 25, 35 i 70 min. Ovdje su rezultati nešto bolji po pitanju stabilnosti prvog aktivnog mjesta i sinteze međuprodukta 4C-Cl, ali i dalje dolazi do vrlo brze deaktivacije drugog aktivnog mjesta i prestanka sinteze konačnog produkta 6C-Cl. Najbolji rezultat

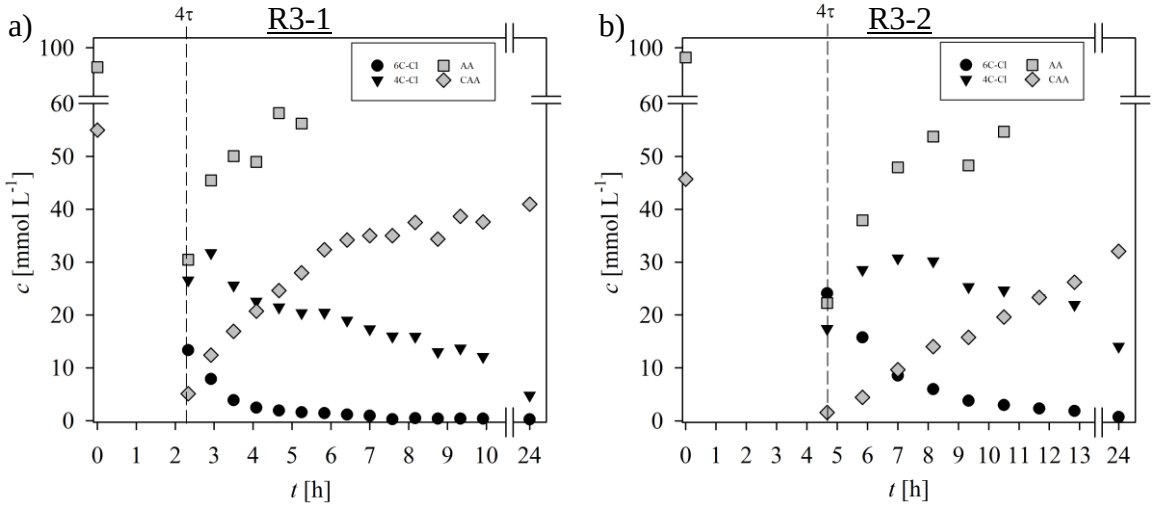
postignut je s vremenom zadržavanja τ = 70 min gdje je maksimalna koncentracija konačnog produkta iznosila 30,21 mmol L^{-1} uz iskorištenje I = 60,42 %.



Slika 34. Promjena koncentracije acetaldehida (AA), kloroacetaldehida (CAA), 4-kloro-3-hidroksibutanala (4C-Cl) i 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala (6C-Cl) u vremenu prilikom provedbe reakcije dvostruke aldolne adicije u cijevnom reaktoru V = 500 µL pri vremenima zadržavanja: a) τ = 25 min, b) τ = 35 min i c) τ = 70 min (c_{AA} = 100 mmol L^{-1}, c_{CAA} = 50 mmol L^{-1}, fosfatni pufer 0.1 mol L^{-1}, pH 6, 25 °C, γ_{DERA}^{024} = 4,10 mg mL^{-1}).

Na Slici 35. prikazani su eksperimenti u cijevnom reaktoru V = 750 µL s vremenima zadržavanja od 35 i 70 min. S obzirom da se u prethodna dva ispitivanja τ = 25 min pokazalo kao iznimno neučinkovito vrijeme zadržavanja, isto nije ispitano u ovom reaktoru. Usprkos tome, rezultati slijede isti trend kao u prethodna dva slučaja, gdje dolazi do brze deaktivacije

enzima, rasta koncentracije oba supstrata i prestanka konverzije u konačni produkt 6C-Cl, dok prvo aktivno mjesto uspijeva zadržati određenu aktivnost kroz 24 h provođenja reakcije.

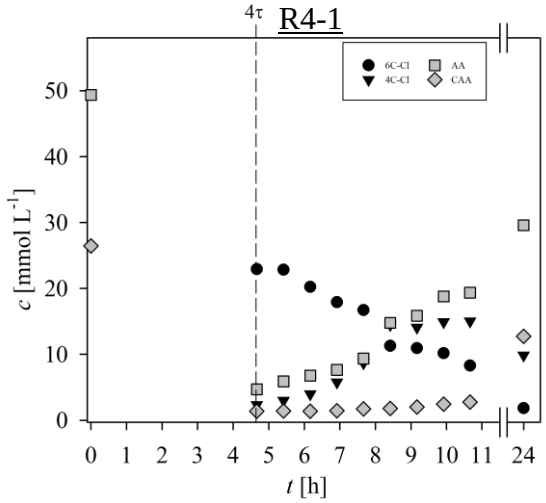


Slika 35. Promjena koncentracije acetaldehida (AA), kloroacetaldehida (CAA), 4-kloro-3-hidroksibutanala (4C-Cl) i 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala (6C-Cl) u vremenu prilikom provedbe reakcije dvostruke aldolne adicije u cijevnom reaktoru V = 750 μL pri vremenima zadržavanja: a) τ = 35 min i b) τ = 70 min (c_{AA} = 100 mmol L^{-1}, c_{CAA} = 50 mmol L^{-1}, fosfatni pufer 0.1 mol L^{-1}, pH 6, 25 °C, γ_{DERA}^{024} = 4,10 mg mL^{-1}).

S obzirom na nezadovoljavajuće rezultate postignute u svim ispitanim reaktorima, u reaktoru V = 500 μL s τ = 70 min, koji je pokazao najbolje procesne pokazatelje (Tablica 7.), provedena je još jedna reakcija s nižim početnim koncentracijama supstrata (Slika 36). Kako bi se smanjila deaktivacija enzima u kontinuiranom reaktoru, potrebno je osjetno povećati vrijeme zadržavanja, smanjiti početne koncentracije supstrata ili povećati koncentraciju enzima. S obzirom da su svi reaktori bili u potpunosti zapunjeni nosiocem koncentraciju enzima nije bilo moguće povećati, a vrijeme zadržavanja od τ = 70 min je isto tako granično visoko u smislu produktivnosti i mogućnosti praćenja reakcije kroz dan. Stoga je jedino rješenje bilo smanjenje koncentracije supstrata u dotoku na c_{AA} = 50 mmol L^{-1}, c_{CAA} = 25 mmol L^{-1}. Iz rezultata je vidljivo da manja koncentracija supstrata za posljedicu ima veću stabilnost oba aktivna mjesta na enzimu te je postignuto stacionarno stanje tijekom prva 2 h reakcije uz maksimalno dobivenu koncentraciju produkta $c_{6C\text{-}Cl,\,max}$ = 22,90 mmol L^{-1} i iskorištenje I = 91,61 %.

U Tablici 7. prikazani su procesni pokazatelji selektivnosti S, konverzije kloracetaldehida $X_{CAA,max}$, produktivnosti procesa $Pr_{6C\text{-}Cl}$ i iskorištenja I. Usporedbom procesnih pokazatelja najboljim se očekivano pokazao reaktor R4-1 gdje je ostvarena

selektivnost od 9,72 i visoko iskorištenje od 91,61 %. Najbolja produktivnost, 0,74 mmol L^{-1} min^{-1} ostvarena je reaktoru R2-2.



Slika 36. Promjena koncentracije acetaldehida (AA), kloroacetaldehida (CAA), 4-kloro-3-hidroksibutanala (4C-Cl) i 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala (6C-Cl) u vremenu prilikom provedbe reakcije dvostruke aldolne adicije u cijevnom reaktoru V = 500 μL pri vremenu zadržavanja od τ = 70 min (c_{AA} = 50 mmol L^{-1}, c_{CAA} = 25 mmol L^{-1}, fosfatni pufer 0,1 mol L^{-1}, pH 6, 25 °C, γ_{DERA}^{024} = 4,10 mg mL^{-1}).

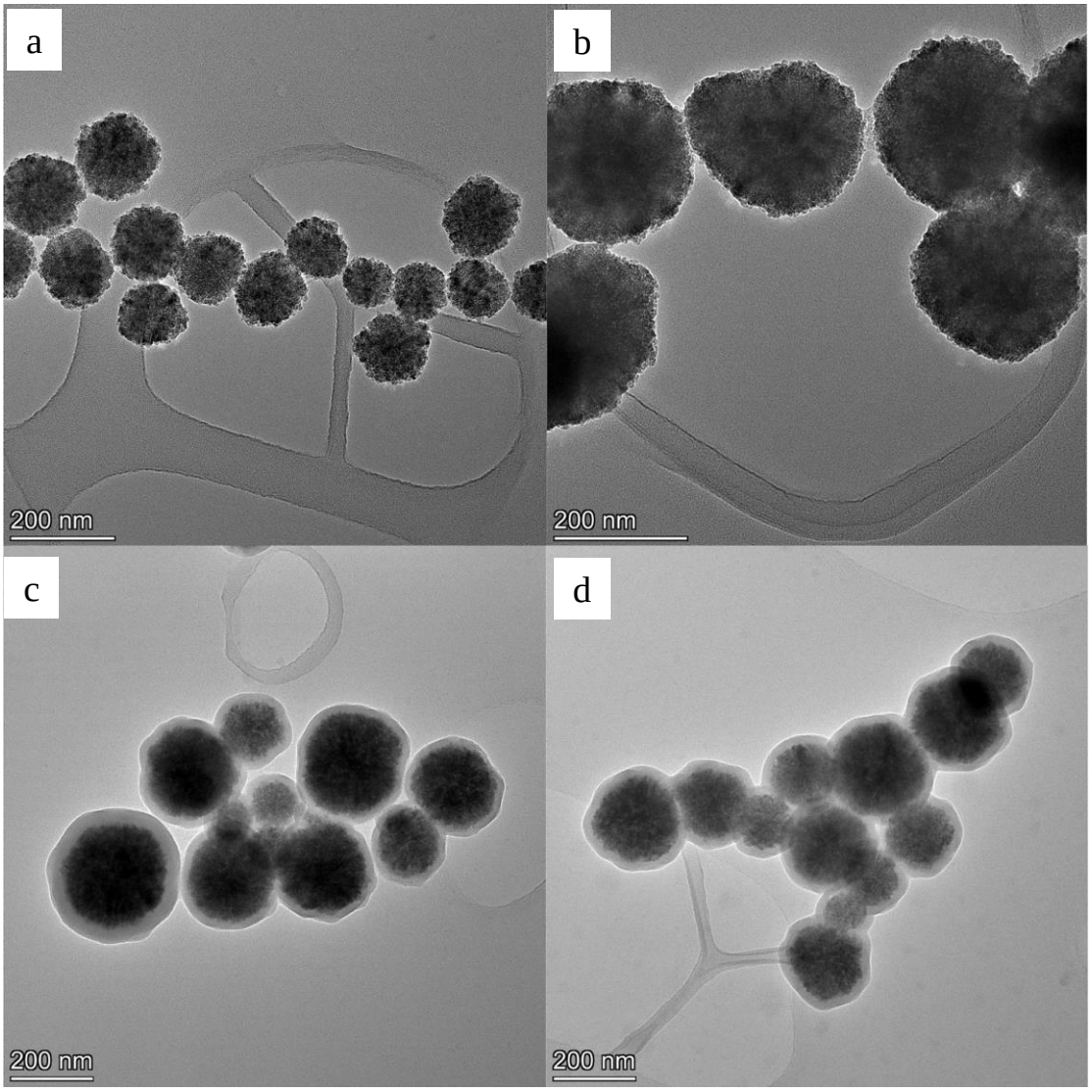
Tablica 7. Usporedba procesnih pokazatelja u različitim tipovima cijevnih reaktora.

Reaktor	τ (min)	V (μL)	S (-)	$X_{CAA,\,max}$ (%)	$Pr_{6C\text{-}Cl}$ (mmol L^{-1} min^{-1})	I (%)
R1-1	25	300	0,41	85,68	0,48	24,45
R1-2	35	300	1,12	92,85	0,70	49,00
R1-3	70	300	7,15	98,03	0,57	59,13
R2-1	25	500	0,40	85,31	0,46	22,79
R2-2	35	500	1,55	94,83	0,74	52,08
R2-3	70	500	2,51	96,25	0,44	60,42
R3-1	35	750	0,50	89,85	0,38	26,63
R3-2	70	750	1,38	96,94	0,34	48,21
R4-1	70	500	9,72	94,52	0,37	91,61

4.2. Magnetske nanočestice

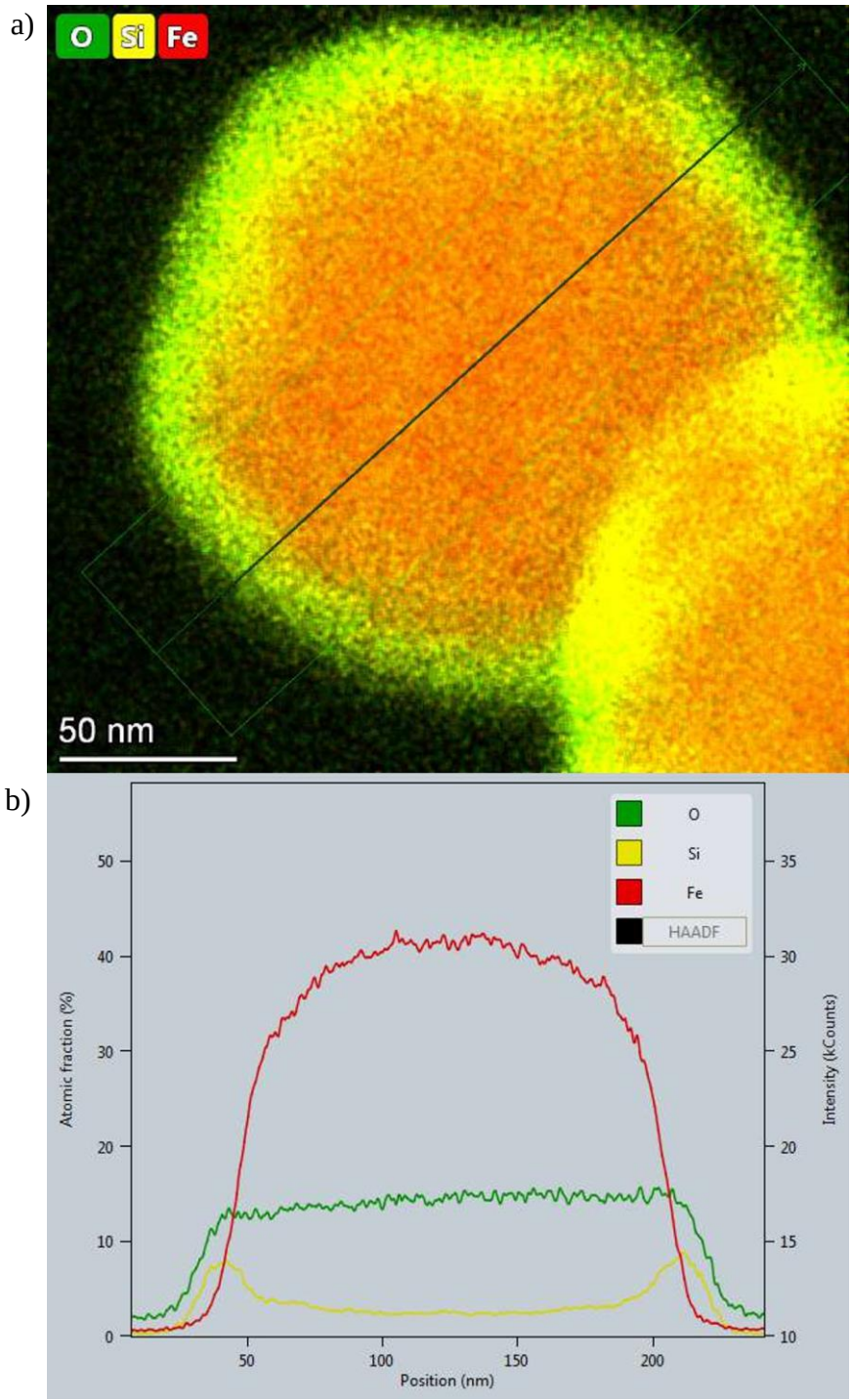
4.2.1. MNP karakterizacija

MNP čestice su nakon sinteze bile podvrgnute analizi na TEM-u i DLS-u kako bi se utvrdila dobivena veličina čestica, kemijski sastav i morfologija. Obje analize provedene su prije (Fe_3O_4) i poslije oblaganja silikom (Fe_3O_4@SiO_2). Rezultati TEM analize prikazani su na Slici 37. Vidljivo je da u oba slučaju nanočestice posjeduju sferičnu geometriju, polikristaličnost i relativno usku raspodjelu veličina. Prosječni promjer pora Fe_3O_4 iznosio je 197 ± 56,7 nm (podaci dobiveni na osnovu mjerenja veličina 31 nanočestice), te se isti promjer povećao na 254 ± 62,8 nm nakon oblaganja silikom (podaci dobiveni na osnovu mjerenja veličina 74 nanočestice) što indicira da je uspješno nanesen relativno tanak sloj omotača silike debljine ≈ 50-60 nm.



Slika 37. TEM slike visoke rezolucije za Fe_3O_4 (a, b) i Fe_3O_4@SiO_2 (c, d). Sva mjerenja rađena su pri 200 kV.

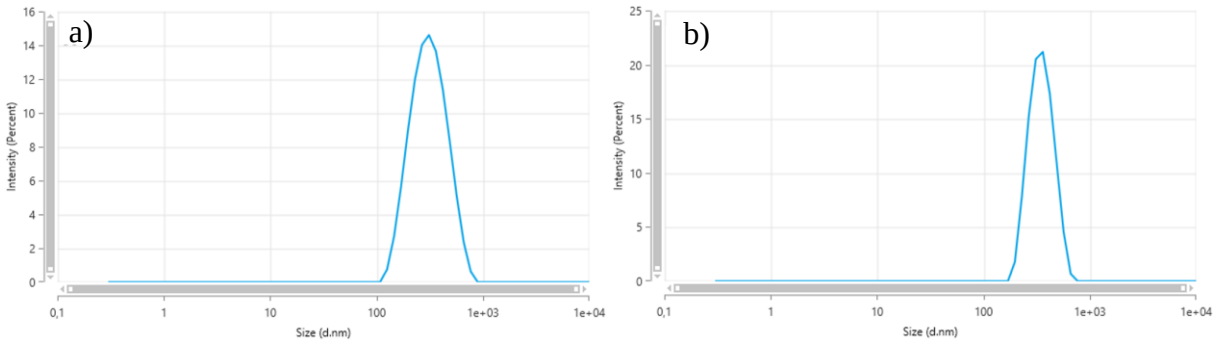
Na Slici 38. prikazani su rezultati STEM analize Fe_3O_4@SiO_2 koji daju dodatnu potvrdu uspješne primjene procesa oblaganja silikom. Grafički prikaz elementarne distribucije također slijedi očekivani trend uzimajući u obzir kemijsku strukturu Fe_3O_4@SiO_2 nanočestica.



Slika 38. STEM EDX spektroskopski profil Fe_3O_4@SiO_2 nanočestica (a) i profil elementarne distribucije (b).

Dinamičko raspršenje svjetlosti temelji se na Brownom gibanju raspršenih čestica. Kad su čestice uzorka raspršene u otopini, kreću se nasumično u svim smjerovima. Prilikom tog kretanja dolazi do sudaranja čestica uzorka s molekulama otapala, pri čemu se mijenja njihova brzina. Istovremeno laser osvjetljava čestice u otopini, te iz odnosa kuta raspršene svijetlosti i brzine čestica možemo dobiti njihov hidrodinamički promjer [194]. U ovom istraživanju za tu svrhu je korišten uređaj Zetasizer (Malvern Panalytical). Distribucija veličina čestica prema intenzitetu dobivena DLS analizom prikazana je na Slici 39. te ima trend koji slijedi rezultate dobivene na TEM-u, s relativno uskom raspodjelom veličina i promjerima od 267,2 ± 70,3 nm za Fe_3O_4 i 310,7 ± 59,4 nm za Fe_3O_4@SiO_2.

U Tablici 8. prikazana je usporedba veličina čestica dobivena TEM i DLS analizom. Razlika promjera od ≈ 50 nm u oba slučaja može se pripisati dobro poznatom fenomenu prividno povećanog hidrodinamičkog promjera kad se nanočestice nalaze u vodenoj otopini (DLS) u usporedbi s promjerom suhih čestica (TEM) [195,196].



Slika 39. DLS raspodjela veličine čestica za Fe_3O_4 (a) i Fe_3O_4@SiO_2 (b).

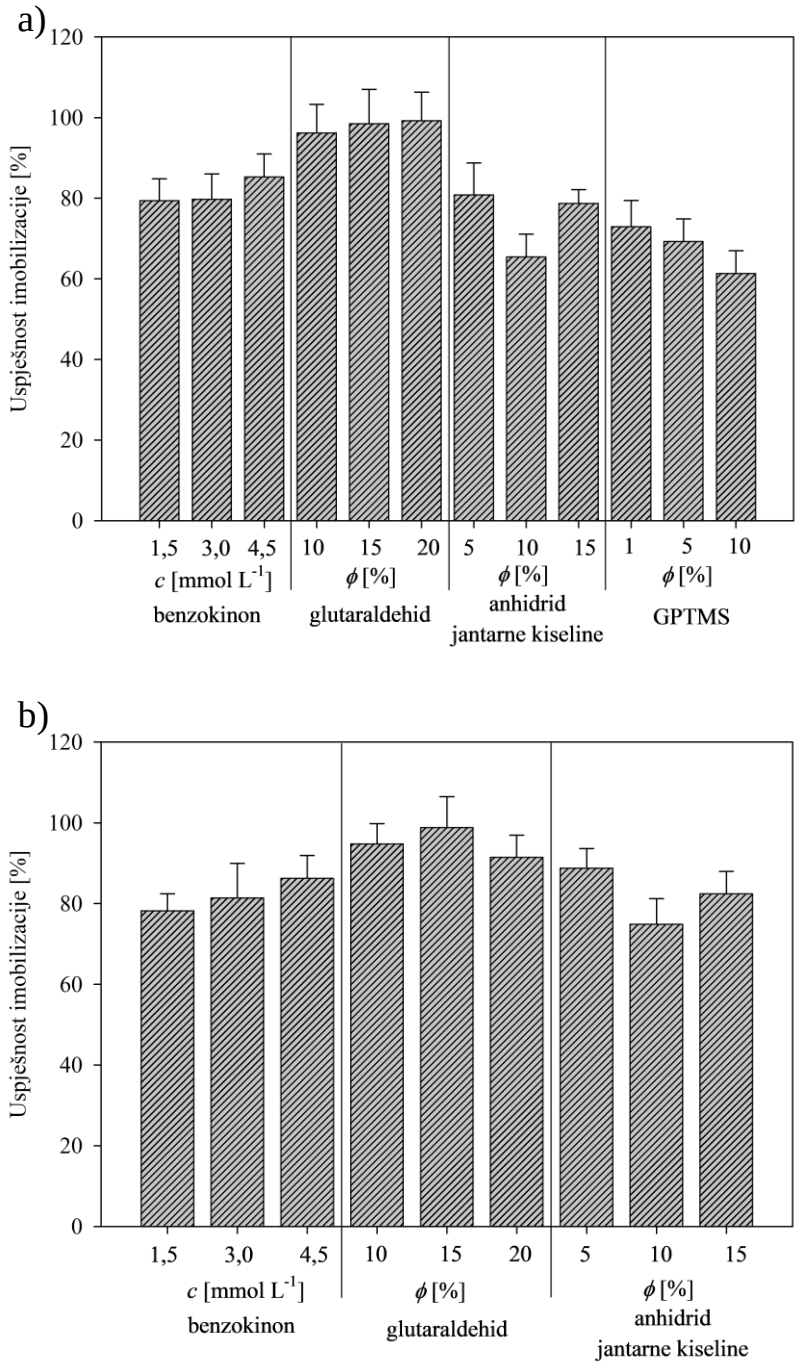
Tablica 8. Usporedba promjera Fe_3O_4 i Fe_3O_4@SiO_2 čestica dobivena TEM i DLS analizom.

Čestice	TEM (nm)	DLS (nm)
Fe_3O_4	197 ± 56,7	267,2 ± 70,3
Fe_3O_4@SiO_2	254 ± 62,8	310,7 ± 59,4

4.2.2. Utjecaj funkcionalizacije i aktivacije površine na procesne pokazatelje imobilizacije na MNP nosiocu

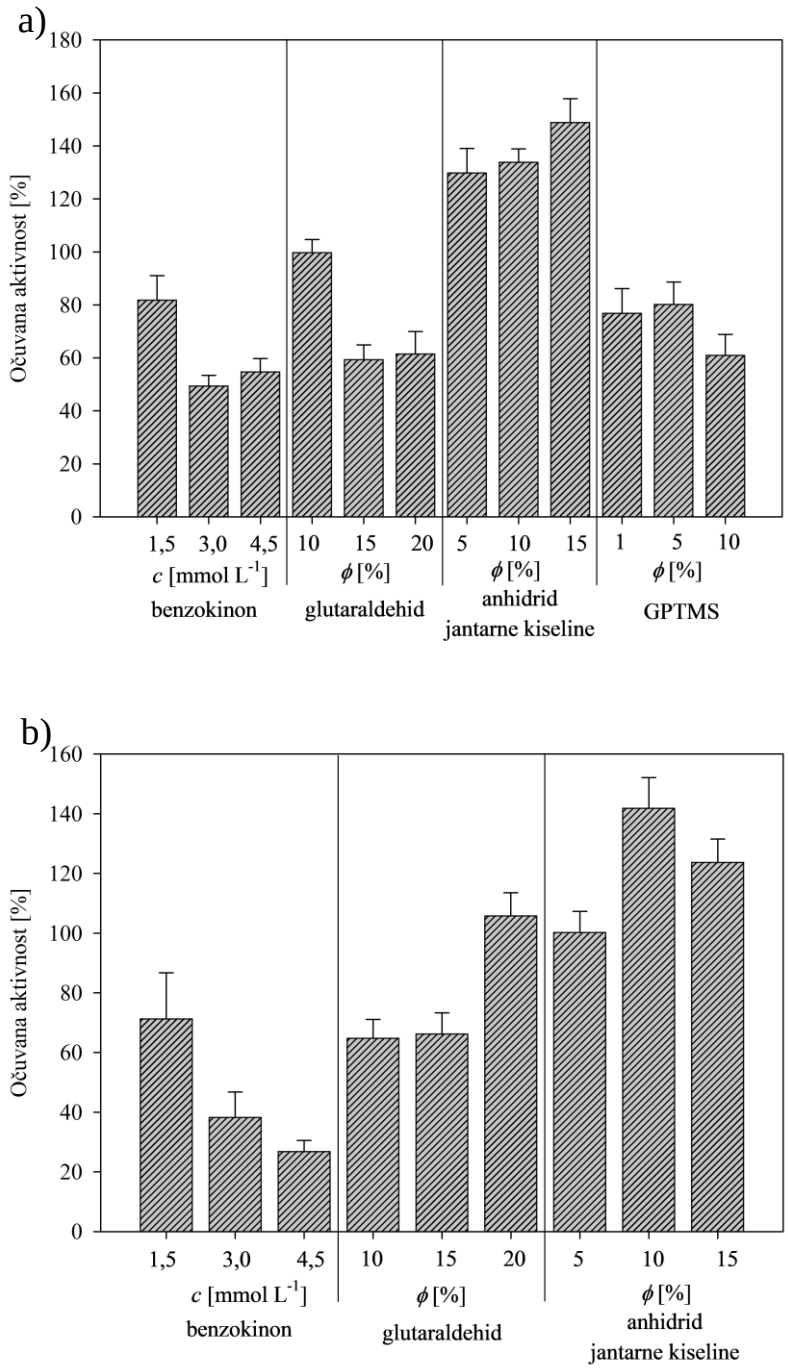
Na MNP nosiocu testirane su identične kombinacije funkcionalizacijskih i aktivacijskih agensa kao u slučaju mezoporozne silike. Detaljan pregled odabranih agensa nalazi se u poglavlju 4.1.2.

Utjecaj različitih kombinacija funkcionalizacijskih i aktivacijskih agensa na procesni pokazatelj uspješnosti imobilizacije prikazan je na Slici 40. Dobiveni rezultati prate sličan trend kao u slučaju MCF nosioca, te su APTES/glutaraldehid i APTMS/glutaraldehid pokazali najbolje rezultate kroz sve koncentracije. Kapacitet nosioca u ovom slučaju iznosio je 24 mg g^{-1}, najvjerojatnije zbog pojave umrežavanja uz kovalentno vezanje [86].



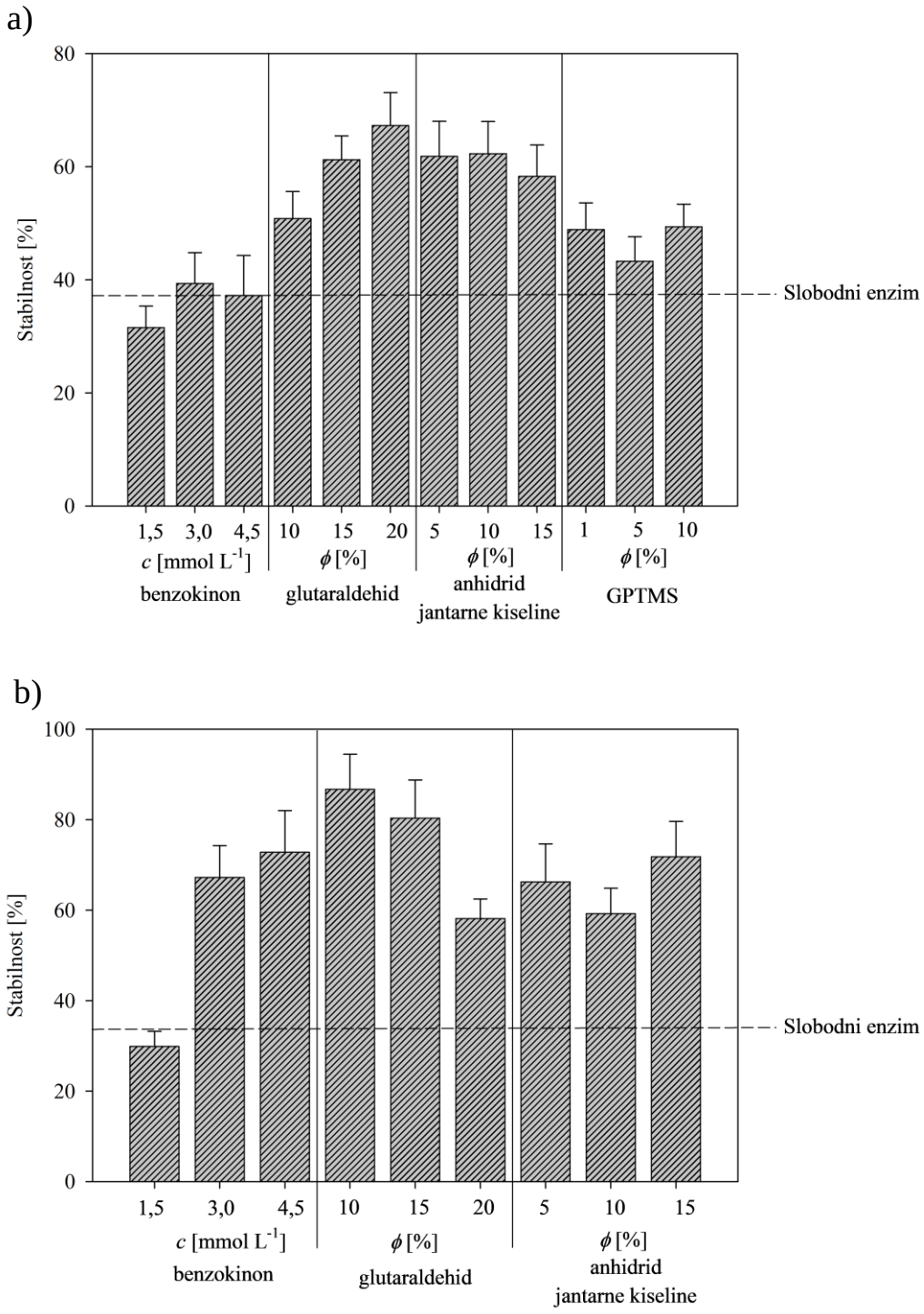
Slika 40. Utjecaj različitih koncentracija aktivacijskih agensa vezanih na a) APTES i GPTMS, b) APTMS na procesni pokazatelj uspješnosti imobilizacije (fosfatni pufer 0,1 mol L^{-1}, pH 6, 25 °C).

Utjecaj različitih kombinacija funkcionalizacijskih i aktivacijskih agensa na procesni pokazatelj očuvane aktivnosti prikazan je na Slici 41. Kao i u slučaju mezoporozne silike, imobilizirani enzim vezan na anhidrid jantarne kiseline opet je pokazao najveću aktivnost u svim ispitanim kombinacijama, uz još više izraženu hiperaktivnost koja je iznosila 158 ± 8 % kod 15 %-ni APTES-anhidrid jantarne kiseline.



Slika 41. Utjecaj različitih koncentracija aktivacijskih agensa vezanih na a) APTES i GPTMS, b) APTMS na procesni pokazatelj očuvane aktivnosti (fosfatni pufer 0,1 mol L^{-1}, pH 6, 25 °C).

Utjecaj različitih kombinacija funkcionalizacijskih i aktivacijskih agensa na procesni pokazatelj stabilnosti prikazan je na Slici 42. Enzim imobiliziran na sve ispitane kombinacije i u ovom slučaju ima bolju aktivnost nego slobodni enzim, ali općenito najbolji rezultat pokazali su 10 i 15 %-ni APTMS glutaraldehid s rezultatom stabilnosti preko 80 ± 9 %.

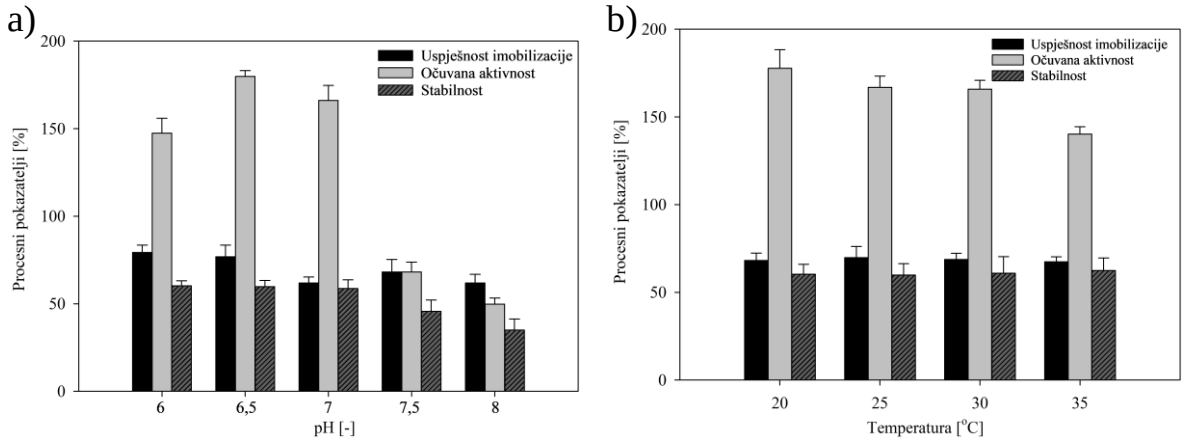


Slika 42. Utjecaj različitih koncentracija aktivacijskih agensa vezanih na a) APTES i GPTMS, b) APTMS na procesni pokazatelj stabilnosti (fosfatni pufer 0,1 mol L^{-1}, pH 6, 25 °C).

Uz vrlo slične trendove dobivenih vrijednosti procesnih pokazatelja imobilizacije kao i kod mjerenja provedenih na mezoporoznoj silici, anhidrid jantarne kiseline opet se nameće kao najbolji izbor za daljnja ispitivanja. Iako je imobilizirani enzim vezan na glutaraldehid pokazao nešto bolju uspješnost imobilizacije i stabilnost, iznimno visoka očuvana aktivnost 15 % APTES-anhidrid jantarne kiseline je razlog zašto je isti odabran za sve iduće eksperimente.

4.2.3. Utjecaj pH i temperature na proces imobilizacije na MNP

Utjecaj promjene pH i temperature u procesu imobilizacije na sve procesne pokazatelje procesa imobilizacije prikazan je na Slici 43. Po pitanju promjene pH vrijednosti, primjetan je osjetan porast očuvane aktivnosti s povišenjem pH na 6,5, ali već nakon pH 7 dolazi do naglog pada vrijednosti svih ispitivanih procesnih pokazatelja. Promjena temperature je iz tog razloga provedeno pri pH 6,5, gdje vrijednosti iskorištenja i stabilnosti ostaju konstantne kroz čitav temperaturni raspon, ali kod očuvane aktivnosti primjetan je padajući trend sa svakim temperaturnim povišenjem. Pri optimalnim uvjetima imobilizacije na pH 6.5 i 20 °C, postignut je značajan porast očuvane aktivnosti na 178 ± 5 %, dok kod iskorištenja i stabilnosti nije bilo većih promjena.

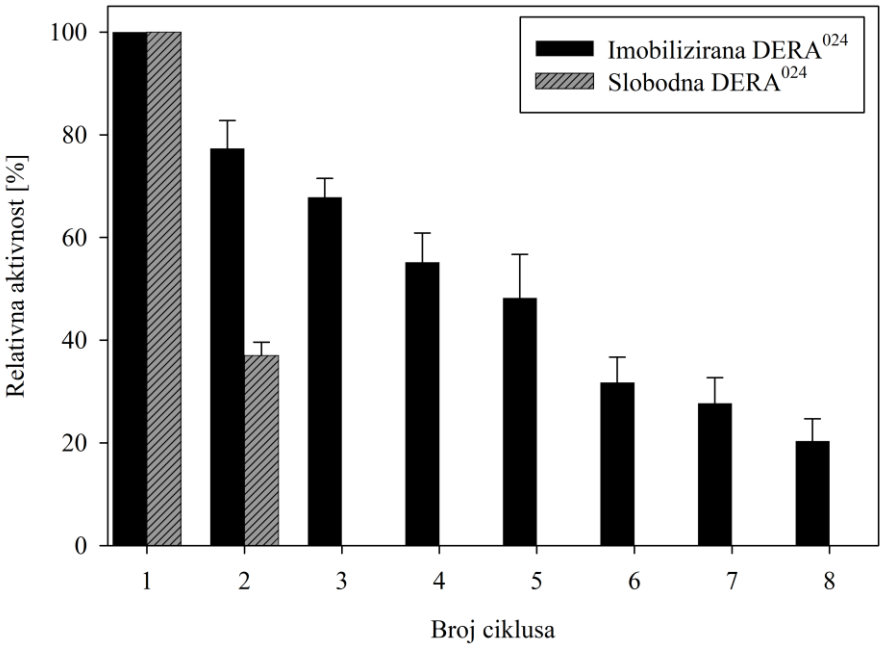


Slika 43. Utjecaj pH (a) i temperature (b) na procesne pokazatelje uspješnosti MCF imobilizacije (fosfatni pufer 0,1 mol L^{-1}, pH (T = 25 °C), T (pH = 6,5)).

4.2.4. Praćenje stabilnosti enzima DERA^{024} kod ponovne upotrebe prilikom imobilizacije na MNP

Na Slici 44. prikazana je usporedba relativne aktivnosti slobodnog i MNP-imobiliziranog enzima DERA^{024} u kotlastom reaktoru kroz više ciklusa. Reakcija je provedena osam puta, pri čemu slobodni enzim u trećem ciklusu postaje potpuno neaktivan, dok je MNP-imobilizirani enzim zadržao preko 50 % svoje početne aktivnosti kroz pet ciklusa reakcije i tek u osmom ciklusu njegova aktivnost pada ispod 20 %, što pokazuje značajno unaprjeđenje

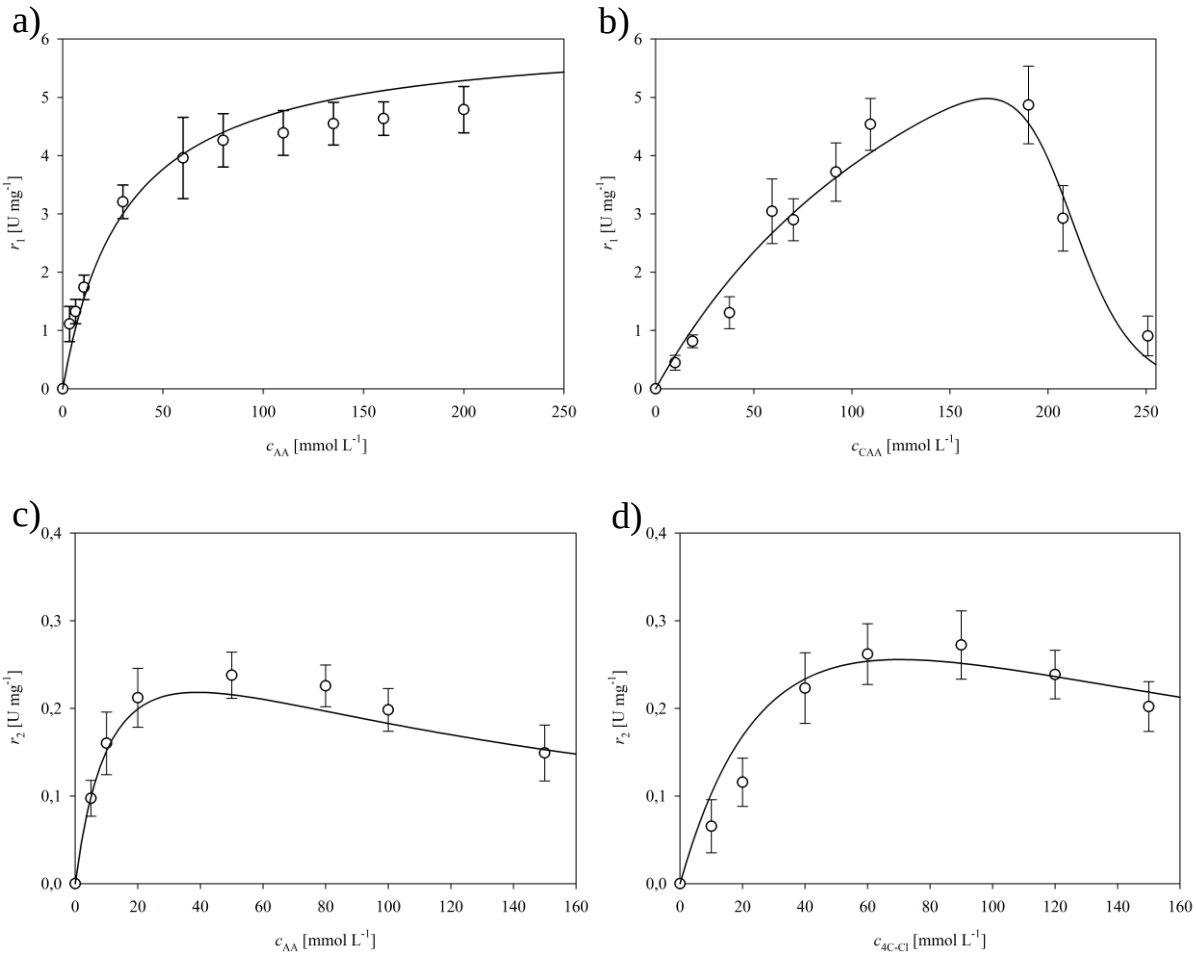
stabilnosti MNP-imobiliziranog enzima u kotlastom reaktoru. Ovo je ujedno i poboljšanje naspram procesa s MCF-imobiliziranim enzimom, gdje je aktivnost imobiliziranog enzima pala ispod 20 % u petom ciklusu, iz čega se može zaključiti da je imobilizacija na magnetske nanočestice povoljnija za provedbu ovdje ispitivane reakcije u kotlastom reaktoru. Najvjerojatniji razlog tomu je proces ispiranja enzima nakon svakog provedenog ciklusa, koji je slučaju MNP-imobiliziranog enzima zbog mogućnosti upotrebe magneta puno blaži po pitanju mehaničkog stresa i ne uključuje upotrebu tresilica i centrifuge pri visokoj brzini/okretajima.



Slika 44. Usporedba relativne aktivnosti slobodnog i MNP-imobiliziranog DERA^{024} enzima u kotlastom reaktoru kroz više ciklusa (fosfatni pufer 0.1 mol L^{-1}, pH 6, 30 °C).

4.2.5. Kinetika i matematički model MNP-imobiliziranog DERA^{024} enzima

Kinetika MNP-imobiliziranog enzima određena je prema prvom i drugom koraku reakcije prikazanom u reakcijskoj shemi na Slici 15. Kinetički parametri Michaelis-Menteničinog modela određeni su metodom početnih brzina opisanoj u poglavlju 3.10. te su prikazani u Tablici 9. Na Slici 45. prikazan je utjecaj različitih koncentracija supstrata i produkata reakcije na aktivnost enzima.



Slika 45. Kinetika DERA^{024} imobiliziranog na MNP/APTES/15 % anhidrid jantarne kiseline u reakciji prve (a, b) i druge (c, d) aldolne adicije. Prikazan je utjecaj različitih koncentracija: a -acetaldehida (c_{CAA} = 150 mmol L^{-1}), b -kloroacetaldehida (c_{AA} = 150 mmol L^{-1}), c -acetaldehida ($c_{4C\text{-}Cl}$ = 100 mmol L^{-1}) i d -4-kloro-3-hidroksibutanala (c_{AA} = 50 mmol L^{-1}) na početnu brzinu reakcije (fosfatni pufer 0.1 mol L^{-1}, pH 6, 25 °C, γ_{DERA}^{024} = 1 mg mL^{-1}).

Tablica 9. Procijenjeni kinetički parametri za reakciju dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida kataliziranu slobodnim i MNP-imobiliziranim enzimom DERA^{024}.

Parametar	Jedinica	Slobodna DERA^{024*}	MNP-imobilizirana DERA^{024}
V_{m1}	U mg^{-1}	4,31 ± 0,63	13,64 ± 0,33
K_{mAA1}	mmol L^{-1}	11,10 ± 2,54	28,34 ± 2,82
K_{mCAA}	mmol L^{-1}	73,51 ± 9,11	188,20 ± 8,11
K_{iSCAA}	mmol L^{-1}	260,96 ± 26,31	204,88 ± 3,27
n	-	20,00 ± 4,21	15,43 ± 3,75

Tablica 9 (nastavak). Procijenjeni kinetički parametri za reakciju dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida kataliziranu slobodnim i MNP-imobiliziranim enzimom DERA^{024}.

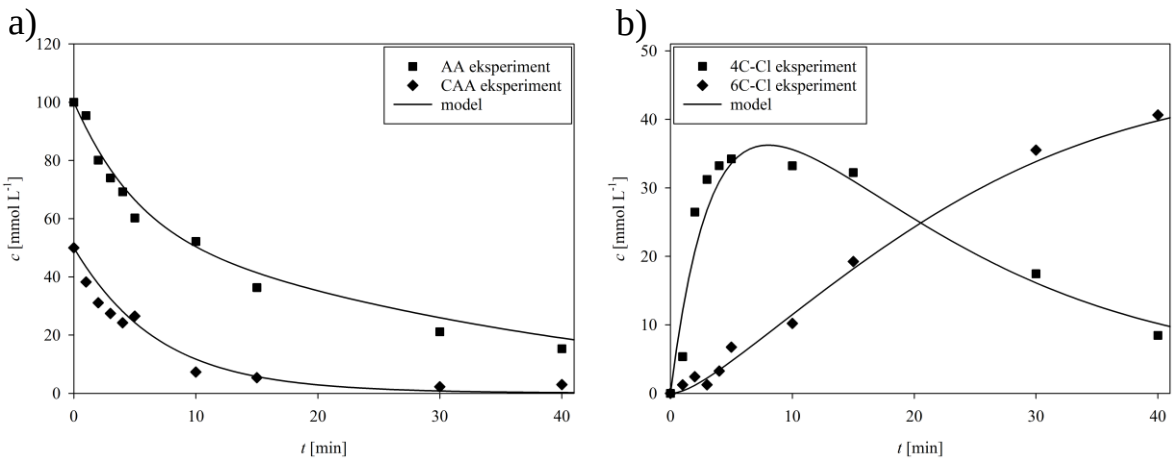
Parametar	Jedinica	Slobodna DERA^{024*}	MNP-imobilizirana DERA^{024}
V_{m2}	U mg^{-1}	1,53 ± 0,26	1,06 ± 0,02
K_{mAA2}	mmol L^{-1}	2,03 ± 0,28	13,11 ± 1,52
K_{m4C-Cl}	mmol L^{-1}	86,26 ± 7,62	47,90 ± 3,15
K_{isAA}	mmol L^{-1}	-	115,19 ± 9,70
$K_{is4C-Cl}$	mmol L^{-1}	72,44 ± 7,54	103,42 ± 8,03

*Podaci preuzeti iz Švarc i sur. [189]

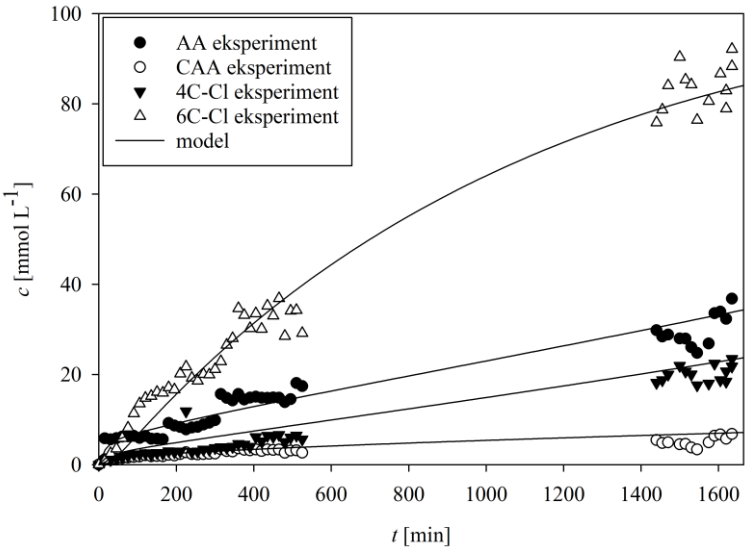
Usporedbom dobivenih parametara vidljiv je sličan trend kao i kod MCF-imobiliziranog enzima. U prvoj reakciji aldolne adicije opet je vidljiva velika razlika u maksimalnoj brzini reakciji, ovaj put i nešto veća nego u slučaju MCF-imobiliziranog enzima, što je u skladu s osjetno većom hiperaktivacijom dobivenom s ovom imobilizacijom. Dobivene vrijednosti K_m nešto su niže u usporedbi sa slobodnim enzimom te je opet prisutna snažna inhibicija kloroacetaldehidom koja je opisana dodatnim parametrom *n* [191]. Detaljniji osvrt na ove fenomene napravljen je u poglavlju 4.1.6.

Kod druge reakcije aldolne adicije, prisutna je niža maksimalna brzina reakcije V_{m2} te slabiji afinitet imobiliziranog enzima prema acetaldehidu (K_{mAA2}), kao i blaga inhibicija K_{isAA} ali poboljšan je afinitet enzima prema međuproduktu 4C-Cl (K_{m4C-Cl}) te je i inhibicija s 4C-Cl u ovom slučaju nešto manje izražena ($K_{is4C-Cl}$).

Ocjena valjanosti predloženog matematičkog modela provedena je u kotlastom (Slika 46) i kotlastom reaktoru s dotokom (Slika 47). U slučaju kotlastog reaktora, dobiveno je vrlo dobro slaganje modela s eksperimentalnim podacima što je potvrđeno rezultatima statističke analize (σ = 1,450, ρ = 0,987 i R^2 = 0,985). Kod kotlastog reaktora s dotokom, opet postoji dobro slaganje rezultata modela i eksperimenta koji slijede identičan trend, ali je prisutno nešto veće rasipanje točaka eksperimenta što je reflektirano i u nešto lošijim rezultatima statističke analize (σ = 15,27, ρ = 0,894 i R^2 = 0,915). Vjerojatni razlog tome je primjena višestrukog razrjeđivanja svakog uzorka s obzirom na porast koncentracija supstrata i produkata kroz vrijeme u reaktoru te viskoznost otopine zbog velike količine nosioca u reaktoru što dodatno otežava uzorkovanje. Ipak, oba rezultata su dovoljno dobra da ostave mogućnost za naknadnu optimizaciju ispitivane reakcije korištenjem dobivenih modela.



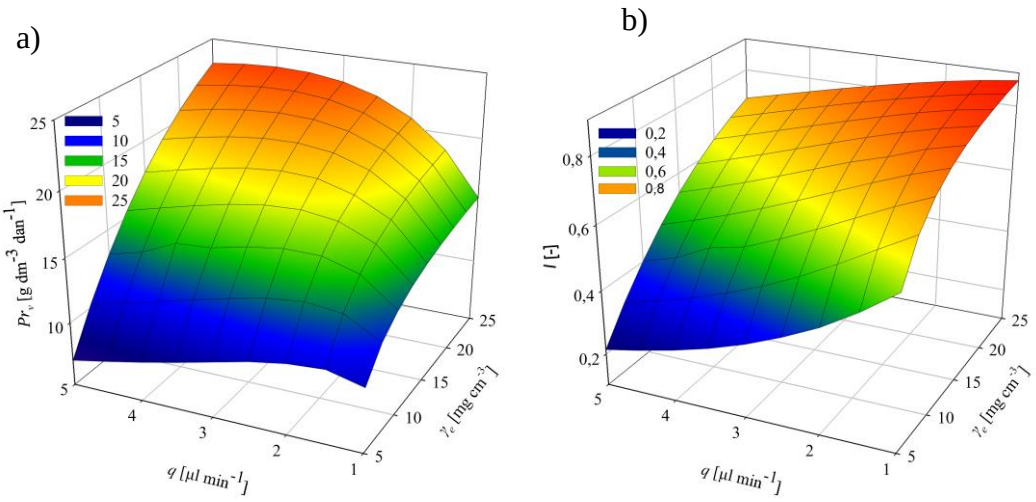
Slika 46. Ocjena valjanosti predloženog modela reakcije dvostruke aldolne adicije katalizirana DERA^{024} imobiliziranim na MNP/APTES/15 % anhidrid jantarne kiseline u kotlastom reaktoru za a) supstrate i b) produkte (c_{AA} = 100 mmol L^{-1}, c_{CAA} = 50 mmol L^{-1}, fosfatni pufer 0.1 mol L^{-1}, pH 6, 25 °C, γ_{DERA}^{024} = 3 mg mL^{-1}).



Slika 47. Validacija reakcije dvostruke aldolne adicije katalizirana DERA^{024} imobiliziranim na MNP/APTES/15 % anhidrid jantarne kiseline u kotlastom reaktoru s dotokom (q = 1 μL min^{-1}, $c_{AA,0}$ = 500 mmol L^{-1}, $c_{CAA,0}$ = 250 mmol L^{-1}, V_0 = 2 mL, fosfatni pufer 0.1 mol L^{-1}, pH 6, 25 °C, γ_{DERA}^{024} = 9 mg mL^{-1}).

S obzirom na dobro slaganje eksperimenta s modelom, isti je iskorišten kako bi se simulacijama u programu SCIENTIST istražio utjecaj protoka i koncentracije enzima na volumnu produktivnost (Slika 48a) i iskorištenje (Slika 48b) u kotlastom reaktoru s dotokom. Volumna produktivnost računata je prema Jednadžbi 37 a iskorištenje prema Jednadžbi 38.

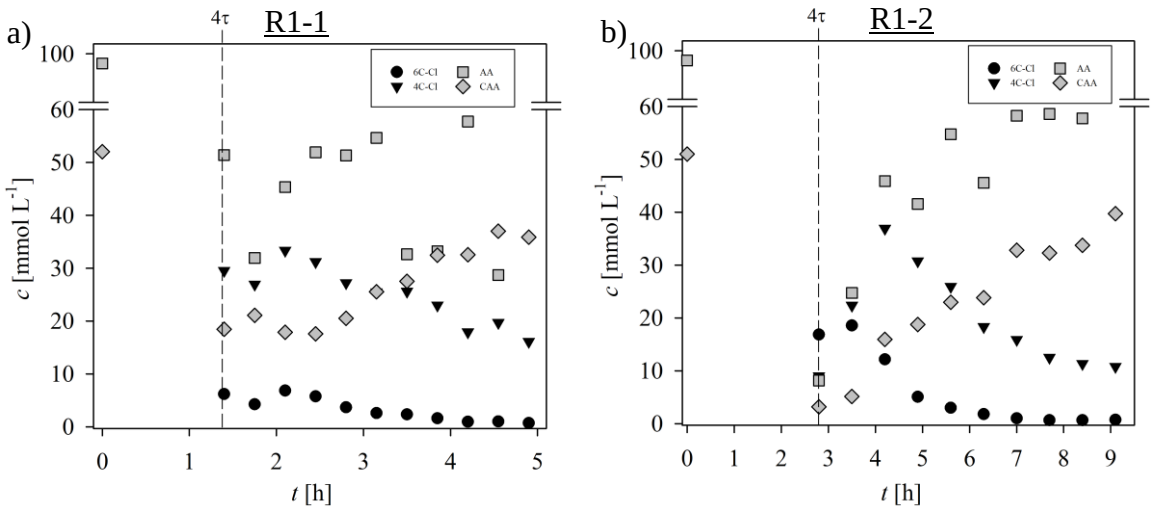
Prilikom provedbe simulacije, početni volumen reaktora i koncentracije supstrata su bile identične kao u eksperimentu, V_0 = 2 mL, $c_{AA,0}$ = 500 mmol L^{-1}i $c_{CAA,0}$ = 250 mmol L^{-1}. Rezultati pokazuju kako je pri najvišoj vrijednosti simuliranog protoka (q = 5 µL min^{-1}) i koncentracije enzima (25 mg mL^{-1}) moguće postići volumnu produktivnost od ≈ 23 g L^{-1} dan^{-1} i iskorištenje od ≈ 70 %. Vidljivo je da je pri istoj koncentraciji enzima koja je korištena u eksperimentu validacije (γ_{DERA}^{024} = 9 mg mL^{-1}), samo uz povećanje protoka s 1 na 2 µL min^{-1} moguće postići povećanje volumne produktivnosti od ≈ 19 % (s 13,11 na 16,11 g L^{-1} dan^{-1}). Iz navedenog se može uvidjeti korisnost primjene matematičkog modeliranja za optimiranje ovdje ispitivane reakcije.



Slika 48. Simulacija utjecaja protoka q i koncentracije enzima γ_e na a) volumnu produktivnost i b) iskorištenje u kotlastom reaktoru s dotokom ($c_{AA,0}$ = 500 mmol L^{-1}, $c_{CAA,0}$ = 250 mmol L^{-1}, V_0 = 2 mL, t = 24 h).

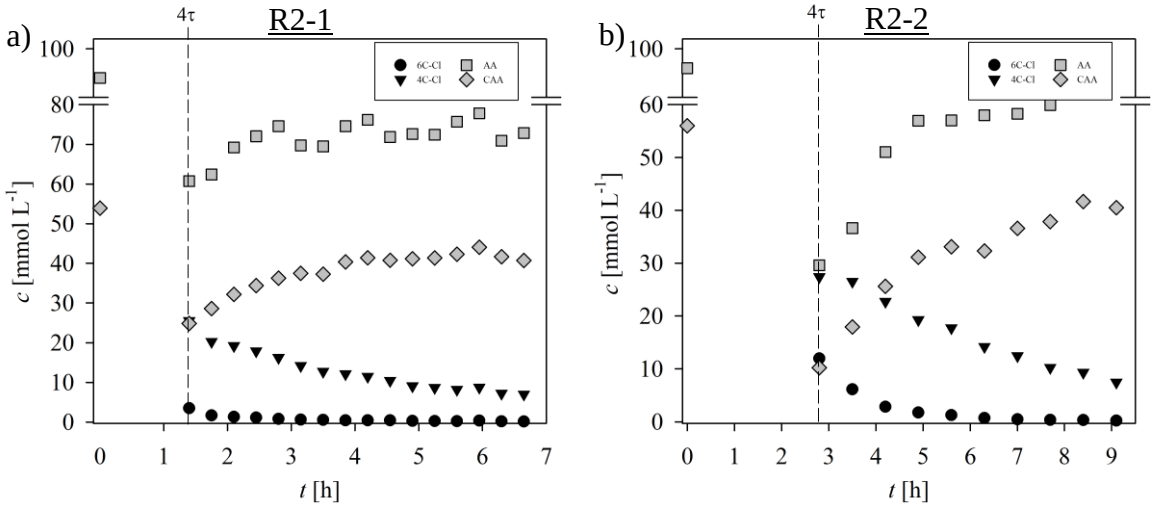
4.2.6. Sinteza prekursora statina u cijevnom reaktoru s fluidiziranim slojem katalizatora

Na Slici 49. prikazani su rezultati eksperimenata provedenih u cijevnom reaktoru s fluidiziranim slojem katalizatora pri vremenima zadržavanja od 21 i 42 min. S obzirom na prisutnu koncentraciju enzima i supstrata, navedena vremena zadržavanja bila su vidno prekratka te je došlo do vrle niske konverzije u konačan produkt 6C-Cl i brze deaktivacije enzima. Pri τ = 42 min imamo nešto bolju konverziju u međuprodukt 4C-Cl, ali i dalje vrlo nisku. U oba slučaja primjetan je isti fenomen kao u slučaju cijevnog reaktora s mezoporoznom silikom (poglavlje 4.1.7.) to jest dolazi do bržeg rasta koncentracije AA od CAA te nastavka formiranja međuprodukta 4C-Cl nakon što prestane konverzija u 6C-Cl, što opet navodi na mogućnost postojanja dva aktivna mjesta na enzimu $DERA^{024}$ od kojih je prvo značajno stabilnije.



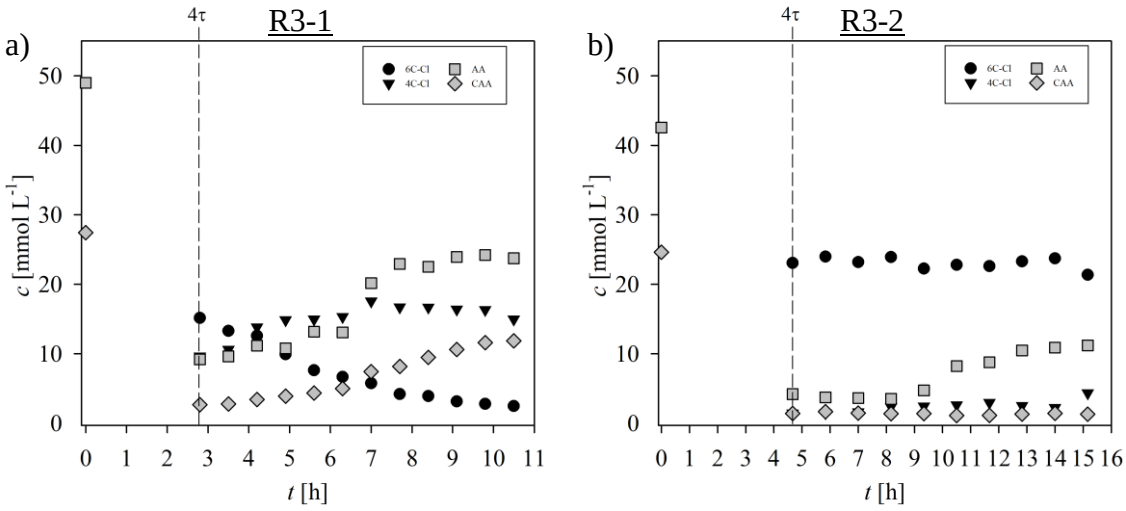
Slika 49. Promjena koncentracije acetaldehida (AA), kloroacetaldehida (CAA), 4-kloro-3-hidroksibutanala (4C-Cl) i 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala (6C-Cl) u vremenu prilikom provedbe reakcije dvostruke aldolne adicije u cijevnom reaktoru V = 310 μL s enzimom imobiliziranim na MNP/APTES/15 % anhidrid jantarne kiseline pri vremenima zadržavanja: a) τ = 21 min, b) τ = 42 min (c_{AA} = 100 mmol L^{-1}, c_{CAA} = 50 mmol L^{-1}, fosfatni pufer 0.1 mol L^{-1}, pH 6, 25 °C, γ_{DERA}^{024} = 4,52 mg mL^{-1}).

S obzirom da je pri rezultatima ispitivanja funkcionalizacijskih i aktivacijskih agensa na procesne pokazatelje imobilizacije (poglavlje 4.2.2.) glutaraldehid pokazao bolji rezultat stabilnosti, specifično 14 % veća stabilnost u slučaju MNP/APTMS/10 % glutaraldehid, ta kombinacija također je testirana u reaktoru s fluidiziranim slojem katalizatora s rezultatima prikazanim na Slici 50. Usprkos boljoj stabilnosti u kotlastom reaktoru, očuvana aktivnost enzima je za ovdje ispitivane uvjete reakcije očito bila premala da bi se postigli zadovoljavajuće vrijednosti konverzije te je konverzija u konačan produkt 6C-Cl bila vrlo niska.



Slika 50. Promjena koncentracije acetaldehida (AA), kloroacetaldehida (CAA), 4-kloro-3-hidroksibutanala (4C-Cl) i 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala (6C-Cl) u vremenu prilikom provedbe reakcije dvostruke aldolne adicije u cijevnom reaktoru V = 310 μL s enzimom imobiliziranim na MNP/APTMS/10 % glutaraldehid pri vremenima zadržavanja: a) τ = 21 min, b) τ = 42 min (c_{AA} = 100 mmol L^{-1}, c_{CAA} = 50 mmol L^{-1}, fosfatni pufer 0.1 mol L^{-1}, pH 6, 25 °C, γ_{DERA}^{024} = 4,52 mg mL^{-1}).

Kako se u prethodnim eksperimentima ispostavilo da su ispitivana vremena zadržavanja bila prekratka, a koncentracija supstrata previsoka, kako bi se postigla zadovoljavajuća konverzija, na Slici 51. prikazani su rezultati mjerenja pri duplo nižoj koncentraciji supstrata te uz veće vrijeme zadržavanja. Kao što je vidljivo na Slici 51a, postignuto je stacionarno stanje u reakciji prve aldolne adicije i konverzije u međuprodukt, ali je i dalje dolazilo do deaktivacije drugog aktivnog mjesta. Stoga je uz smanjenje koncentracije supstrata vrijeme zadržavanja povećano na 70 min te na Slici 51b vidimo da su time ostvareni gotovo idealni uvjeti za ovdje promatranu reakciju te je postignuta konverzija u konačan produkt i iskorištenje iznad 95 % kroz stacionarno stanje koje je trajalo tijekom 15 h provođenja reakcije.



Slika 51. Promjena koncentracije acetaldehida (AA), kloroacetaldehida (CAA), 4-kloro-3-hidroksibutanala (4C-Cl) i 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala (6C-Cl) u vremenu prilikom provedbe reakcije dvostruke aldolne adicije u cijevnom reaktoru V = 310 μL s enzimom imobiliziranim na MNP/APTES/15 % anhidrid jantarne kiseline pri vremenima zadržavanja: a) τ = 42 min, b) τ = 70 min (c_{AA} = 50 mmol L^{-1}, c_{CAA} = 25 mmol L^{-1}, fosfatni pufer 0.1 mol L^{-1}, pH 6, 25 °C, γ_{DERA}^{024} = 4.52 mg mL^{-1}).

U tablici 10. prikazani su procesni pokazatelji selektivnosti *S*, konverzije kloracetaldehida $X_{CAA,max}$, produktivnosti procesa $Pr_{6C\text{-}Cl}$ i iskorištenja *I*. Najbolja selektivnost od 16,34, konverzija od 97,78 % i maksimalno iskorištenje od 95,85 % dobivena je u reaktoru R3-2.

Tablica 10. Usporedba procesnih pokazatelja u različitim tipovima cijevnih reaktora.

Reaktor	τ (min)	V (μL)	S (-)	$X_{CAA,max}$ (%)	$Pr_{6C\text{-}Cl}$ (mmol L^{-1} min^{-1})	I (%)
R1-1	21	310	0,20	64,86	0,32	12,37
R1-2	42	310	1,87	93,67	0,44	37,11
R2-1	21	310	0,13	50,32	0,17	7,17
R2-2	42	310	0,44	79,58	0,29	23,89
R3-1	42	310	1,57	94,70	0,36	60,61
R3-2	70	310	16,34	97,78	0,33	95,85

4.3. Usporedba rezultata

U tablici 11. prikazani su izračunati procesni pokazatelji za sve tipove reaktora i nosioca koji su ispitani u ovom doktorskom radu. Usporedbom kotlastog reaktora za MCF i MNP, produktivnost je u oba slučaja gotovo ista, ali su selektivnost, konverzija i iskorištenje osjetno viši prilikom upotrebe magnetskih nanočestica. Kod MNP kotlastog reaktora s dotokom, *S*, $X_{CAA,max}$ i *I* su sličnih vrijednosti kao u kotlastom reaktoru, ali je produktivnost značajno niža, a razlog tome je niska koncentracija supstrata u dotoku. Usporedbom najboljih rezultata oba nosioca za cijevni reaktor, magnetske nanočestice su i u toj vrsti reaktora ostvarile bolji rezultat. Produktivnost je nešto manja (0,33 mmol L^{-1} min^{-1} naspram 0,37 mmol L^{-1} min^{-1}), ali selektivnost je pokazala najbolji rezultat od svih ispitanih reaktora (16,34) uz vrlo visoku konverziju (97,78 %) i iskorištenje (95,85 %). Usporedbom svih rezultata, MNP se nameću kao najbolji izbor nosioca za ovdje ispitivanu reakciju. Po pitanju izbora kotlastog ili cijevnog MNP reaktora, produktivnost cijevnog reaktora u ovdje ispitanim uvjetima je tri puta niža, ali su zato selektivnost i iskorištenje značajno viših vrijednosti, te u obzir treba uzeti i dugotrajnost stacionarnog stanja u MNP cijevnom rektoru.

Tablica 11. Usporedba procesnih pokazatelja u svim tipovima ispitanih reaktora.

Reaktor	τ **(min)**	γ_{DERA}^{024} **(mg mL^{-1})**	***S*** **(-)**	$X_{CAA,\,max}$ **(%)**	$Pr_{6C\text{-}Cl}$ **(mmol L^{-1} min^{-1})**	***I*** **(%)**
MCF-kotlasti	40	3	3,6	92,25	0,87	76,10
MNP-kotlasti	40	3	5,5	98,30	0,88	90,20
MNP-kotlasti s dotokom	1440	9	5,6	96,26	0,06	81,22
MCF-cijevni	70	4,10	9,72	94,52	0,37	91,61
MNP-cijevni	70	4,52	16,34	97,78	0,33	95,85

5. Zaključak

Cilj ovog rada bio je razvoj ekonomski i okolišno prihvatljive metode imobilizacije enzima DERA za provedbu reakcije dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida u svrhu proizvodnje prekursora bočnog lanca statina uz povećanje stabilnosti te zadržavanje aktivnosti enzima, te izrada i validacija matematičkog modela za navedenu reakciju s imobiliziranim enzimom. U tu svrhu izvršena je sinteza dva tipa nosioca, mezoporozne silike i magnetskih nanočestica. S oba nosioca provedena je detaljna karakterizacija kojom su ispitana njihova mehanička i fizikalno-kemijska svojstva. Istražen je utjecaj različitih kombinacija funkcionalizacijskih i aktivacijskih agensa na procesne pokazatelje uspješnosti imobilizacije. Provedeno je ispitivanje utjecaja temperature i pH na proces imobilizacije. Analiziran je utjecaj veličine pora na uspješnost imobilizacije. Napravljena je usporedba stabilnosti imobiliziranog i slobodnog enzima u kotlastom reaktoru kroz više ciklusa. Kinetičkim ispitivanjima i validacijom modela izrađen je matematički model za obje vrste nosioca. Ispitan je utjecaj različitih protoka i vremena zadržavanja na procesne pokazatelje u cijevnom reaktoru.

Sinteza obje vrste nosioca bila je uspješna. Sintezom MCF silike napravljeni su materijali s tri različite veličine pora, a SEM analizom silike utvrđena je razlika u morfologiji karakteristična za ovaj tip materijala. Adsorpcijsko-desorpcijskom analizom određen je promjer i volumen pora, kao i BET specifična površina, te je zaključeno kako su razlike u veličini pora dovoljne za provedbu daljnjih ispitivanja. Sintezom MNP i naknadnim oblaganjem silikom, TEM analizom ustanovljen je promjer dobivenih čestica koji je iznosio 254 ± 62,8 nm, koji je dodatno potvrđen DLS analizom. EDX analizom utvrđen je elementarni sastav MNP te uspješnost oblaganja silikom.

Rezultati ispitivanja utjecaja funkcionalizacije i aktivacije na procesne pokazatelje procesa imobilizacije dokazali su iznimnu učinkovitost primjene anhidrida jantarne kiseline kao aktivacijskog agensa kod oba nosioca. Kod MCF, kombinacijom 10 %-tnog APTMS-anhidrida jantarne kiseline ostvarena je uspješnost imobilizacije od 78 %, čime je kapacitet nosioca iznosio 44 mg g^{-1}. Očuvana aktivnost iznosila je 136 %, što ukazuje na to da je postignuta hiperaktivacija enzima. Vrijednost stabilnosti bila je 65 %, gotovo dva puta veća od rezultata stabilnosti za slobodni enzim koji je iznosio 37 %. Rezultati MNP pratili su sličan trend, te je kombinacijom 15 %-tnog APTES-anhidrid jantarne kiseline uspješnost imobilizacije iznosila je 75 % (kapacitet nosioca 18 mg g^{-1}), očuvana aktivnost 158 % a stabilnost 66 %.

Nakon optimiranja uvjeta imobilizacije variranjem pH i temperature, postignuta su osjetna poboljšanja kod oba nosioca. U slučaju MCF, pri uvjetima imobilizacije od pH 6 i

30 °C očuvana aktivnost povećana je za 10 %, a stabilnost za 5 %. Kod MNP, pri uvjetima imobilizacije od pH 6.5 i 20°C nije bilo promjena kod iskorištenja i stabilnosti, ali je očuvana aktivnost povećana za 20 % te je ista iznosila 178 %.

Prilikom ispitivanja utjecaja veličine pore na procesne pokazatelje procesa imobilizacije, utvrđen je mjerljiv utjecaj po pitanju iskorištenja i stabilnosti, dok kod očuvane aktivnosti nije bilo promjena. Povećanjem veličine pora uspješnost imobilizacije je porasla s 78 % na 85 %, dok je stabilnost porasla s 65 % na 77 %. Dobiveni rezultati ukazuju na prednost korištenja materijala veće poroznosti prilikom upotrebe enzima DERA^{024}, pružajući mu mogućnost dubljeg prodora u unutrašnjost pora istovremeno ga štiteći od vanjskih utjecaja.

Ispitivanjem stabilnosti enzima u kotlastom reaktoru kroz više ciklusa, ostvarena su značajna poboljšanja kod oba nosioca u usporedbi s slobodnim enzimom. Slobodni enzim izgubio je svu aktivnost nakon dva provedena ciklusa, dok je kod MCF nosioca uspješno provedeno pet reakcija, a kod MNP nosioca osam reakcija prije nego je njihova aktivnost pala ispod 20 %. Iz dobivenih rezultata također se može zaključiti kako su magnetske nanočestice prikladniji izbor za provedbu reakcije dvostruke aldolne adicije u kotlastom reaktoru.

Korištenjem metode početnih brzina određena je kinetika reakcije s oba ispitivana nosioca. Na osnovu eksperimentalnih kinetičkih podataka, razvijeni su matematički modeli reakcije temeljeni na Michaelis-Menteničinoj kinetici. Dobiveni kinetički parametri reakcije, specifično maksimalna brzina reakcije V_{m1} koja je iznosila 12,50 i 13,64 U mg^{-1} za MCF i MNP, u usporedbi s V_{m1} slobodnog enzima od 4,31 U mg^{-1}, dodatno su potvrdili pojavu hiperaktivacije u slučaju aktivacije anhidridom jantarne kiseline. Dobiveni matematički modeli za oba nosioca uspješno su validirani u kotlastom reaktoru, te kotlastom reaktoru s dotokom u slučaju MNP.

Rezultati eksperimenata u cijevnom reaktoru s nasutim slojem katalizatora ukazuju na vjerojatnost postojanja dva aktivna mjesta na enzimu koji kataliziraju prvi i drugi korak reakcije dvostruke aldolne adicije, pri čemu je prvo znatno stabilnije. Najbolji rezultat ostvaren je u reaktoru volumena 500 μL s vremenom zadržavanja od 70 min pri nižim početnim koncentracijama supstrata (c_{AA} = 50 mmol L^{-1}, c_{CAA} = 25 mmol L^{-1}), gdje je postignuta selektivnost S od 9,72, konverzija supstrata $X_{CAA,max}$ od 94,52 %, produktivnost $Pr_{6C\text{-}Cl}$ od 0,37 mmol L^{-1} min^{-1} i iskorištenje I od 91,61 %.

Prilikom provedbe reakcije u cijevnom reaktoru s fluidiziranim slojem katalizatora s MNP dobiveni su značajno bolji rezultati, te je u reaktoru V = 310 μL s τ = 70 min pri nižim početnim koncentracijama supstrata (c_{AA} = 50 mmol L^{-1}, c_{CAA} = 25 mmol L^{-1}) postignuto stacionarno stanje u trajanju od 15 h, pri čemu je ostvarena selektivnost S od 16,34, maksimalna konverzija supstrata $X_{CAA,\ max}$ od 97,78 %, produktivnost $Pr_{6C\text{-}Cl}$ od 0,33 mmol L^{-1} min^{-1} i

iskorištenje *I* od 95,85 %. Usporedbom svih ispitanih reaktorskih sustava, zaključeno je kako su MNP bolji izbor nosioca za kotlasti i cijevni reaktor.

Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaključiti kako kovalentna imobilizacija enzima DERA^{024} pruža značajna poboljšanja u provedbi procesa proizvodnje prekursora bočnog lanca statina u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida. Razvijeni matematički modeli pružaju koristan uvid u kinetičke karakteristike imobiliziranog enzima te njegova možebitna ograničenja, čime su ostvareni temelji za naknadna poboljšanja ispitivanog procesa te olakšanu primjenu i optimizaciju u različitim tipovima reaktora.

6. Literatura

1. Alcalde, M.; Ferrer, M.; Plou, F.; Ballesteros, A. *Environmental Biocatalysis: From Remediation with Enzymes to Novel Green Processes*; 2006; Vol. 24;.
2. Sheldon, R. *ChemInform Abstract: E Factors, Green Chemistry and Catalysis: An Odyssey*; 2008; Vol. 39;.
3. ENDO, A. A Historical Perspective on the Discovery of Statins. *Proc. Japan Acad. Ser. B* **2010**, *86*, 484–493, doi:10.2183/pjab.86.484.
4. Reiner, Z. *Primary Prevention of Cardiovascular Disease with Statins in the Elderly*; 2014; Vol. 16;.
5. Patel, J.M. Biocatalytic Synthesis of Atorvastatin Intermediates. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *61*, 123–128, doi:10.1016/j.molcatb.2009.07.004.
6. Zhang, M.; Su, X.; Ang, E.; Zhao, H. *Recent Advances in Biocatalyst Development in the Pharmaceutical Industry*; 2013; Vol. 1;.
7. Vajdič, T.; Ošlaj, M.; Kopitar, G.; Mrak, P. *Engineered, Highly Productive Biosynthesis of Artificial, Lactonized Statin Side-Chain Building Blocks: The Hidden Potential of Escherichia Coli Unleashed*; 2014; Vol. 24;.
8. Schürmann, M. An Aldolase for the Synthesis of the Statin Side Chain. *Ind. Enzym. Appl.* 2019, 385–403.
9. Greenberg, W.A.; Varvak, A.; Hanson, S.R.; Wong, K.; Huang, H.; Chen, P.; Burk, M.J. Development of an Efficient, Scalable, Aldolase-Catalyzed Process for Enantioselective Synthesis of Statin Intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 5788 LP – 5793, doi:10.1073/pnas.0307563101.
10. Švarc, A.; Fekete, M.; Hernandez, K.; Clapés, P.; Findrik Blažević, Z.; Szekrenyi, A.; Skendrović, D.; Vasić-Rački, Đ.; Charnock, S.J.; Presečki, A.V. An Innovative Route for the Production of Atorvastatin Side-Chain Precursor by DERA-Catalysed Double Aldol Addition. *Chem. Eng. Sci.* **2021**, *231*, 116312, doi:10.1016/j.ces.2020.116312.
11. Rouvinen, J.; Andberg, M.; Pääkkönen, J.; Hakulinen, N.; Koivula, A. Current State of and Need for Enzyme Engineering of 2-Deoxy-D-Ribose 5-Phosphate Aldolases and Its Impact. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 6215–6228, doi:10.1007/s00253-021-11462-0.
12. Jennewein, S.; Schürmann, M.; Wolberg, M.; Hilker, I.; Luiten, R.; Wubbolts, M.; Mink, D. Directed Evolution of an Industrial Biocatalyst: 2-Deoxy-D-Ribose 5-Phosphate Aldolase. *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 537–548, doi:10.1002/biot.200600020.

13. Voutilainen, S.; Heinonen, M.; Andberg, M.; Jokinen, E.; Maaheimo, H.; Pääkkönen, J.; Hakulinen, N.; Rouvinen, J.; Lähdesmäki, H.; Kaski, S.; et al. Substrate Specificity of 2-Deoxy-D-Ribose 5-Phosphate Aldolase (DERA) Assessed by Different Protein Engineering and Machine Learning Methods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 10515–10529, doi:10.1007/s00253-020-10960-x.
14. C. Aragon, C.; M. Palomo, J.; Filice, M.; Mateo, C. Immobilization of Aldolase for C-C Bond Formation. *Curr. Org. Chem.* 2016, *20*, 1243–1251.
15. Cavalcante, F.T.T.; Cavalcante, A.L.G.; de Sousa, I.G.; Neto, F.S.; dos Santos, J.C.S. Current Status and Future Perspectives of Supports and Protocols for Enzyme Immobilization. *Catalysts* 2021, *11*.
16. Federsel, H.-J.; Moody, T.S.; Taylor, S.J.C. Recent Trends in Enzyme Immobilization—Concepts for Expanding the Biocatalysis Toolbox. *Molecules* 2021, *26*.
17. Zucca, P.; Sanjust, E. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. *Mol.* 2014, *19*.
18. Jeelani, P.G.; Mulay, P.; Venkat, R.; Ramalingam, C. Multifaceted Application of Silica Nanoparticles. A Review. *Silicon* **2019**, doi:10.1007/s12633-019-00229-y.
19. Narayan, R.; Nayak, U.Y.; Raichur, A.M.; Garg, S. Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 118, doi:10.3390/pharmaceutics10030118.
20. Moritz, M.; Geszke-Moritz, M. Mesoporous Materials as Multifunctional Tools in Biosciences: Principles and Applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *49*, doi:10.1016/j.msec.2014.12.079.
21. Guo, H.; Tang, Y.; Yu, Y.; Xue, L.; Qian, J.Q. Covalent Immobilization of α-Amylase on Magnetic Particles as Catalyst for Hydrolysis of High-Amylose Starch. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *87*, 537–544, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.080.
22. Xu, J.; Sun, J.; Wang, Y.; Sheng, J.; Wang, F.; Sun, M. Application of Iron Magnetic Nanoparticles in Protein Immobilization. *Mol.* 2014, *19*.
23. Hasany, S.F.; Ahmed, I.; Jose, R.; A.Rehman Systematic Review of the Preparation Techniques of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles. *Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *1(1): 1-11*, doi:10.5923/j.nn.20120206.01.
24. Bilal, M.; Zhao, Y.; Rasheed, T.; Iqbal, H.M.N. Magnetic Nanoparticles as Versatile Carriers for Enzymes Immobilization: A Review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, *120*, 2530–2544.
25. Vasić-Rački, D.; Findrik, Z.; Vrsalović Presečki, A. Modelling as a Tool of Enzyme

Reaction Engineering for Enzyme Reactor Development. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91*, 845–856, doi:10.1007/s00253-011-3414-0.

26. Walters, D. Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry. Second Edition By T. D. H. Bugg. Blackwell Publishing, Oxford, U.K. x + 304 Pp. 17.5 × 24 Cm. ISBN 1-4051-1452-5. $75.00. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1296, doi:10.1021/jm040218m.
27. Mu, R.; Wang, Z.; Wamsley, M.C.; Duke, C.N.; Lii, P.H.; Epley, S.E.; Todd, L.C.; Roberts, P.J. Application of Enzymes in Regioselective and Stereoselective Organic Reactions. *Catalysts* 2020, *10*.
28. Kirk, O.; Borchert, T.V.; Fuglsang, C.C. Industrial Enzyme Applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 345–351, doi:10.1016/s0958-1669(02)00328-2.
29. Illanes, A. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*; 2008;
30. Saibi, W.; Abdeljalil, S.; Masmoudi, K.; Gargouri, A. Biocatalysts: Beautiful Creatures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *426*, 289–293, doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.028.
31. Samland, A.; Sprenger, G. *Microbial Aldolases as C-C Bonding Enzymes - Unknown Treasures and New Developments*; 2006; Vol. 71;.
32. Gefflaut, T.; Blonski, C.; Perie, J.; Willson, M.; Fessner, W.-D.; Schneider, A.; Held, H.; Sinerius, G.; Walter, C.; Hixon, M.; et al. Class I Aldolases: Substrate Specificity, Mechanism, Inhibitors and Structural Aspects. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2006**, *35*, 301–340, doi:https://doi.org/10.1002/anie.199622191.
33. Fessner, W.-D.; Schneider, A.; Held, H.; Sinerius, G.; Walter, C.; Hixon, M.; Schloss, J. V The Mechanism of Class II, Metal-Dependent Aldolases. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1996**, *35*, 2219–2221, doi:https://doi.org/10.1002/anie.199622191.
34. Hoffee, P.; Snyder, P.; Sushak, C.; Jargiello, P. Deoxyribose-5-P Aldolase: Subunit Structure and Composition of Active Site Lysine Region. *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *164*, 736–742, doi:https://doi.org/10.1016/0003-9861(74)90087-3.
35. VALENTIN-HANSEN, P.; BOËTIUS, F.; HAMMER-JESPERSEN, K.; SVENDSEN, I. The Primary Structure of Escherichia Coli K12 2-Deoxyribose 5-Phosphate Aldolase. *Eur. J. Biochem.* **1982**, *125*, 561–566, doi:https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06719.x.
36. Clapés, P.; Garrabou, X. Current Trends in Asymmetric Synthesis with Aldolases. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2263–2283, doi:https://doi.org/10.1002/adsc.201100236.
37. Haridas, M.; Abdelraheem, E.M.M.; Hanefeld, U. 2-Deoxy-d-Ribose-5-Phosphate Aldolase (DERA): Applications and Modifications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 9959–9971, doi:10.1007/s00253-018-9392-8.

38. Gijsen, H.J.M.; Wong, C.-H. Unprecedented Asymmetric Aldol Reactions with Three Aldehyde Substrates Catalyzed by 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8422–8423, doi:10.1021/ja00097a082.
39. Wong, C.-H.; Garcia-Junceda, E.; Chen, L.; Blanco, O.; Gijsen, H.J.M.; Steensma, D.H. Recombinant 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase in Organic Synthesis: Use of Sequential Two-Substrate and Three-Substrate Aldol Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3333–3339, doi:10.1021/ja00117a003.
40. Clapés, P.; Fessner, W.D.; Sprenger, G.A.; Samland, A.K. Recent Progress in Stereoselective Synthesis with Aldolases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2010, *14*, 154–167.
41. Rimac, H.; Zorc, B. Statini u Prevenciji i Liječenju Zloćudnih Bolesti. *Farm. Glas.* **2015**, *71*, 151–158.
42. Maji, D.; Shaikh, S.; Solanki, D.; Gaurav, K. Safety of Statins. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **2013**, *17*, 636, doi:10.4103/2230-8210.113754.
43. Hoyos, P.; Pace, V.; Alcántara, A.R. Biocatalyzed Synthesis of Statins: A Sustainable Strategy for the Preparation of Valuable Drugs. *Catalysts* 2019, *9*.
44. Tao, J.; Xu, J.-H. *Biocatalysis in Development of Green Pharmaceutical Processes*; 2009; Vol. 13;.
45. Istvan, E.S. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science (80-.).* **2001**, *292*, 1160–1164, doi:10.1126/science.1059344.
46. Lennernäs, H.; Fager, G. Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of the HMG-CoA Reductase Inhibitors. Similarities and Differences. *Clin. Pharmacokinet.* **1997**, *32*, 403–425, doi:10.2165/00003088-199732050-00005.
47. Jones, P.; Kafonek, S.; Laurora, I.; Hunninghake, D. Comparative Dose Efficacy Study of Atorvastatin versus Simvastatin, Pravastatin, Lovastatin, and Fluvastatin in Patients with Hypercholesterolemia (the CURVES Study). *Am. J. Cardiol.* **1998**, *81*, 582–587, doi:10.1016/s0002-9149(97)00965-x.
48. Endo, A. The Discovery and Development of HMG-CoA Reductase Inhibitors. *J. Lipid Res.* **1992**, *33*, 1569–1582.
49. Casar, Z. Historic Overview and Recent Advances in the Synthesis of Super-Statins. *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 816–845, doi:10.2174/138527210791111858.
50. Lee, S.-H.; Park, O.-J. Uses and Production of Chiral 3-Hydroxy-γ-Butyrolactones and Structurally Related Chemicals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 817–828, doi:10.1007/s00253-009-2143-0.
51. Schürmann, M.; Wolberg, M.; Panke, S.; Kierkels, H. The Development of Short,

Efficient, Economic, and Sustainable Chemoenzymatic Processes for Statin Side Chains. In; 2010; pp. 127–144 ISBN 9783527629688.

52. Greenberg, W.; Wong, K.; Varvak, A.; Swanson, R. Chemoenzymatic Methods for the Synthesis of Statins and Statin Intermediates 2004, 199.
53. Fei, H.; Zheng, C.; Liu, X.; Li, Q. An Industrially Applied Biocatalyst: 2-Deoxy-d-Ribose-5- Phosphate Aldolase. *Process Biochem.* **2017**, *63*, 55–59, doi:10.1016/j.procbio.2017.08.001.
54. Luo, Y.; Chen, Y.; Ma, H.; Tian, Z.; Zhang, Y.; Zhang, J. Enhancing the Biocatalytic Manufacture of the Key Intermediate of Atorvastatin by Focused Directed Evolution of Halohydrin Dehalogenase. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, doi:10.1038/srep42064.
55. Patel, R.N. Pharmaceutical Intermediates by Biocatalysis: From Fundamental Science to Industrial Applications. In *Applied Biocatalysis: From Fundamental Science to Industrial Applications*; 2016; pp. 367–403 ISBN 9783527677122.
56. Ao, Y.-F.; Wang, D.-X.; Zhao, L.; Wang, M.-X. Synthesis of Quaternary-Carbon-Containing and Functionalized Enantiopure Pentanecarboxylic Acids from Biocatalytic Desymmetrization of Meso-Cyclopentane-1,3-Dicarboxamides. *Chem. – An Asian J.* **2015**, *10*, 938–947, doi:https://doi.org/10.1002/asia.201402913.
57. Dean, S.M.; Greenberg, W.A.; Wong, C.-H. Recent Advances in Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1308–1320, doi:https://doi.org/10.1002/adsc.200700115.
58. Öhrlein, R.; Baisch, G. Chemo-Enzymatic Approach to Statin Side-Chain Building Blocks. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 713–715, doi:10.1002/adsc.200303028.
59. DeSantis, G.; Wong, K.; Farwell, B.; Chatman, K.; Zhu, Z.; Tomlinson, G.; Huang, H.; Tan, X.; Bibbs, L.; Chen, P.; et al. Creation of a Productive, Highly Enantioselective Nitrilase through Gene Site Saturation Mutagenesis (GSSM). *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11476–11477, doi:10.1021/ja035742h.
60. You, Z.; Liu, Z.; Zheng, Y.-G. *Chemical and Enzymatic Approaches to the Synthesis of Optically Pure Ethyl (R)-4-Cyano-3-Hydroxybutanoate*; 2013; Vol. 98;.
61. Wolberg, M.; Filho, M.V.; Bode, S.; Geilenkirchen, P.; Feldmann, R.; Liese, A.; Hummel, W.; Müller, M. Chemoenzymatic Synthesis of the Chiral Side-Chain of Statins: Application of an Alcohol Dehydrogenase Catalysed Ketone Reduction on a Large Scale. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2008**, *31*, 183–191, doi:10.1007/s00449-008-0205-9.
62. Wolberg, M.; Hummel, W.; Wandrey, C.; Müller, M. Highly Regio- and Enantioselective Reduction of 3,5-Dioxocarboxylates. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2000**, *39*,

4306–4308, doi:https://doi.org/10.1002/1521-3773(20001201)39:23<4306::AID-ANIE4306>3.0.CO;2-G.

63. Kizaki, N.; Yasohara, Y.; Hasegawa, J.; Wada, M.; Kataoka, M.; Shimizu, S. Synthesis of Optically Pure Ethyl (S)-4-Chloro-3-Hydroxybutanoate by Escherichia Coli Transformant Cells Coexpressing the Carbonyl Reductase and Glucose Dehydrogenase Genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *55*, 590–595, doi:10.1007/s002530100599.
64. Fox, R.J.; Davis, S.C.; Mundorff, E.C.; Newman, L.M.; Gavrilovic, V.; Ma, S.K.; Chung, L.M.; Ching, C.; Tam, S.; Muley, S.; et al. Improving Catalytic Function by ProSAR-Driven Enzyme Evolution. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 338–344, doi:10.1038/nbt1286.
65. Panke, S.; Wubbolts, M. *Advances in Biocatalytic Synthesis of Pharmaceutical Intermediates*; 2005; Vol. 9;.
66. DeSantis, G.; Liu, J.; Clark, D.P.; Heine, A.; Wilson, I.A.; Wong, C.-H. Structure-Based Mutagenesis Approaches toward Expanding the Substrate Specificity of D-2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 43–52, doi:10.1016/s0968-0896(02)00429-7.
67. Fei, H.; Xu, G.; Wu, J.P.; Yang, L.R. Improvement of the Thermal Stability and Aldehyde Tolerance of Deoxyriboaldolase via Immobilization on Nano-Magnet Material. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *101*, 87–91, doi:10.1016/j.molcatb.2014.01.004.
68. Ošlaj, M.; Cluzeau, J.; Orkić, D.; Kopitar, G.; Mrak, P.; Časar, Z. A Highly Productive, Whole-Cell DERA Chemoenzymatic Process for Production of Key Lactonized Side-Chain Intermediates in Statin Synthesis. *PLoS One* **2013**, *8*, e62250, doi:10.1371/journal.pone.0062250.
69. You, Z.; Liu, Z.; Zheng, Y.-G.; Shen, Y.-C. *Characterization and Application of a Newly Synthesized 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase*; 2012;
70. Wang, A.; Gao, W.; Zhang, F.; Chen, F.; Du, F.; Yin, X. Amino Acid-Mediated Aldolase Immobilisation for Enhanced Catalysis and Thermostability. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2012**, *35*, 857–863, doi:10.1007/s00449-011-0670-4.
71. Subrizi, F.; Crucianelli, M.; Grossi, V.; Passacantando, M.; Giorgia Botta, †; Antiochia, R.; Saladino, R. *Versatile and Efficient Immobilization of 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase (DERA) on Multiwalled Carbon Nanotubes*; 2014; Vol. 4;.
72. Feron, G.; Mauvais, G.; Martin, F.; Sémon, E.; Blin-Perrin, C. Microbial Production of 4-hydroxybenzylidene Acetone, the Direct Precursor of Raspberry Ketone. *Lett. Appl. Microbiol.* **2007**, *45*, 29–35, doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02147.x.

73. Lin, B.; Tao, Y. Whole-Cell Biocatalysts by Design. *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16*, 106, doi:10.1186/s12934-017-0724-7.
74. Jiao, X.-C.; Pan, J.; Kong, X.-D.; Xu, J.-H. Protein Engineering of Aldolase LbDERA for Enhanced Activity toward Real Substrates with a High-Throughput Screening Method Coupled with an Aldehyde Dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *482*, 159–163, doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.020.
75. Nara, T.Y.; Togashi, H.; Ono, S.; Egami, M.; Sekikawa, C.; Suzuki, Y.; Masuda, I.; Ogawa, J.; Horinouchi, N.; Shimizu, S.; et al. Improvement of Aldehyde Tolerance and Sequential Aldol Condensation Activity of Deoxyriboaldolase via Immobilization on Interparticle Pore Type Mesoporous Silica. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, *68*, 181–186, doi:10.1016/j.molcatb.2010.10.008.
76. Zhang, S.; Bramski, J.; Tutus, M.; Pietruszka, J.; Böker, A.; Reinicke, S. A Biocatalytically Active Membrane Obtained from Immobilization of 2-Deoxy-d-Ribose-5-Phosphate Aldolase on a Porous Support. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 34441–34453, doi:10.1021/acsami.9b12029.
77. Chibata, I. Industrial Application of Immobilized Enzyme Systems. **1978**, *50*, 667–675, doi:doi:10.1351/pac197850070667.
78. Sheldon, R. *Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance*; 2007; Vol. 38;.
79. Sirisha, V.L.; Jain, A.; Jain, A. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. *Adv. Food Nutr. Res.* **2016**, *79*, 179–211.
80. Brena, B.; González-Pombo, P.; Batista-Viera, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *Immobil. Enzym. Cells Third Ed.* **2013**, 15–31.
81. Datta, S.; Christena, L.R.; Rajaram, Y.R.S. Enzyme Immobilization: An Overview on Techniques and Support Materials. *3 Biotech* **2013**, *3*, 1–9.
82. Tischer, W.; Wedekind, F. Immobilized Enzymes: Methods and Applications BT - Biocatalysis - From Discovery to Application. In; Fessner, W.-D., Archelas, A., Demirjian, D.C., Furstoss, R., Griengl, H., Jaeger, K.-E., Morís-Varas, E., Öhrlein, R., Reetz, M.T., Reymond, J.-L., Schmidt, M., Servi, S., Shah, P.C., Tischer, W., Wedekind, F., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1999; pp. 95–126 ISBN 978-3-540-68116-8.
83. Carlsson, N.; Gustafsson, H.; Thörn, C.; Olsson, L.; Holmberg, K.; Åkerman, B. Enzymes Immobilized in Mesoporous Silica: A Physical–Chemical Perspective. *Adv.*

Colloid Interface Sci. **2014**, *205*, 339–360, doi:https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.08.010.

84. Jesionowski, T.; Zdarta, J.; Krajewska, B. Enzyme Immobilization by Adsorption: A Review. *Adsorption* **2014**, *20*, 801–821.
85. Heck, T.; Faccio, G.; Richter, M.; Thöny-Meyer, L. Enzyme-Catalyzed Protein Crosslinking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 461–475.
86. Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M.J.; Waldron, K.C. Glutaraldehyde: Behavior in Aqueous Solution, Reaction with Proteins, and Application to Enzyme Crosslinking. *Biotechniques* **2004**, *37*, 790–802, doi:10.2144/04375RV01.
87. Maddock, R.M.A.; Pollard, G.J.; Moreau, N.G.; Perry, J.J.; Race, P.R. Enzyme-catalysed Polymer Cross-linking: Biocatalytic Tools for Chemical Biology, Materials Science and Beyond. *Biopolymers* **2020**, *111*, e23390.
88. Imam, H.T.; Marr, P.C.; Marr, A.C. Enzyme Entrapment, Biocatalyst Immobilization without Covalent Attachment. *Green Chem.* **2021**, *23*, 4980–5005.
89. Cottone, G.; Giuffrida, S.; Bettati, S.; Bruno, S.; Campanini, B.; Marchetti, M.; Abbruzzetti, S.; Viappiani, C.; Cupane, A.; Mozzarelli, A. More than a Confinement:“Soft” and “Hard” Enzyme Entrapment Modulates Biological Catalyst Function. *Catalysts* **2019**, *9*, 1024.
90. Mohamad, N.R.; Marzuki, N.H.C.; Buang, N.A.; Huyop, F.; Wahab, R.A. An Overview of Technologies for Immobilization of Enzymes and Surface Analysis Techniques for Immobilized Enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2015**, *29*, 205–220, doi:10.1080/13102818.2015.1008192.
91. Gan, J.; Bagheri, A.R.; Aramesh, N.; Gul, I.; Franco, M.; Almulaiky, Y.Q.; Bilal, M. Covalent Organic Frameworks as Emerging Host Platforms for Enzyme Immobilization and Robust Biocatalysis–A Review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *167*, 502–515.
92. Rodrigues, R.C.; Berenguer-Murcia, Á.; Carballares, D.; Morellon-Sterling, R.; Fernandez-Lafuente, R. Stabilization of Enzymes via Immobilization: Multipoint Covalent Attachment and Other Stabilization Strategies. *Biotechnol. Adv.* **2021**, *52*, 107821.
93. Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity via Immobilization Techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451–1463, doi:https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018.
94. Garcia-Galan, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Fernandez-Lafuente, R.; Rodrigues, R.C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme

Performance. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2885–2904, doi:https://doi.org/10.1002/adsc.201100534.

95. Hoffmann, F.; Cornelius, M.; Morell, J.; Fröba, M. Silica-Based Mesoporous Organic-Inorganic Hybrid Materials. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 3216–3251, doi:10.1002/anie.200503075.
96. Srere, P.A.; Uyeda, K. Functional Groups on Enzymes Suitable for Binding to Matrices. *Methods Enzymol.* **1976**, *44*, 11–19, doi:10.1016/s0076-6879(76)44004-1.
97. Rodrigues, R.C.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Torres, R.; Fernández-Lafuente, R. Modifying Enzyme Activity and Selectivity by Immobilization. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6290–6307, doi:10.1039/C2CS35231A.
98. Lu, G.; Zhao, X. *Nanoporous Materials-An Overview*; Imperial College Press, 2004;
99. Mcnaught, A.; Wilkinson, A. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*; 2nd ed.; Oxford: Blackwell Scientific Publications, 2019;
100. Beck, J.S.; Vartuli, J.C.; Roth, W.J.; Leonowicz, M.E.; Kresge, C.T.; Schmitt, K.D.; Chu, C.T.W.; Olson, D.H.; Sheppard, E.W.; McCullen, S.B.; et al. A New Family of Mesoporous Molecular Sieves Prepared with Liquid Crystal Templates. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10834–10843, doi:10.1021/ja00053a020.
101. Sun, B.; Zhou, G.; Zhang, H. Synthesis, Functionalization, and Applications of Morphology-Controllable Silica-Based Nanostructures: A Review. *Prog. Solid State Chem.* **2016**, *44*, 1–19, doi:https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2016.01.001.
102. Rahikkala, A.; Pereira, S.A.P.; Figueiredo, P.; Passos, M.L.C.; Araújo, A.R.T.S.; Saraiva, M.L.M.F.S.; Santos, H.A. Mesoporous Silica Nanoparticles for Targeted and Stimuli-Responsive Delivery of Chemotherapeutics: A Review. *Adv. Biosyst.* **2018**, *2*, 1800020, doi:10.1002/adbi.201800020.
103. Lashgari, N.; Badiei, A.; Mohammadi Ziarani, G. Modification of Mesoporous Silica SBA-15 with Different Organic Molecules to Gain Chemical Sensors: A Review. *Nanochemistry Res.* **2016**, *1*, 127–141, doi:10.7508/ncr.2016.01.014.
104. Meynen, V.; Cool, P.; Vansant, E.F. Verified Syntheses of Mesoporous Materials. *Microporous Mesoporous Mater.* **2009**, *125*, 170–223, doi:https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.03.046.
105. Huo, Q.; Margolese, D.I.; Ciesla, U.; Demuth, D.G.; Feng, P.; Gier, T.E.; Sieger, P.; Firouzi, A.; Chmelka, B.F. Organization of Organic Molecules with Inorganic Molecular Species into Nanocomposite Biphase Arrays. *Chem. Mater.* **1994**, *6*, 1176–1191, doi:10.1021/cm00044a016.

106. Soler-Illia, G.J. de A.A.; Sanchez, C.; Lebeau, B.; Patarin, J. Chemical Strategies To Design Textured Materials: From Microporous and Mesoporous Oxides to Nanonetworks and Hierarchical Structures. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4093–4138, doi:10.1021/cr0200062.

107. Lombardo, D.; Kiselev, M.; magazù, S.; Calandra, P. Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches. *Adv. Condens. Matter Phys.* **2015**, *2015*, 1–22, doi:10.1155/2015/151683.

108. Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces*; Third Edit.; Academic Press, 2011; ISBN 9780123751829.

109. Holmberg, K.; Jönsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B. Surfactant Micellization. *Surfactants Polym. Aqueous Solut.* 2004, 39–66.

110. Ojeda-López, R.; Pérez-Hermosillo, I.J.; Marcos Esparza-Schulz, J.; Cervantes-Uribe, A.; Domínguez-Ortiz, A. SBA-15 Materials: Calcination Temperature Influence on Textural Properties and Total Silanol Ratio. *Adsorption* **2015**, *21*, 659–669, doi:10.1007/s10450-015-9716-2.

111. Aktas, O.; Yasyerli, S.; Dogu, G.; Dogu, T. Structural Variations of MCF and SBA-15-like Mesoporous Materials as a Result of Differences in Synthesis Solution PH. *Mater. Chem. Phys.* **2011**, *131*, 151–159, doi:https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.07.082.

112. Stevens, W.J.J.; Lebeau, K.; Mertens, M.; Van Tendeloo, G.; Cool, P.; Vansant, E.F. Investigation of the Morphology of the Mesoporous SBA-16 and SBA-15 Materials. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 9183–9187, doi:10.1021/jp0548725.

113. Lettow, J.S.; Han, Y.J.; Schmidt-Winkel, P.; Yang, P.; Zhao, D.; Stucky, G.D.; Ying, J.Y. Hexagonal to Mesocellular Foam Phase Transition in Polymer-Templated Mesoporous Silicas. *Langmuir* **2000**, *16*, 8291–8295, doi:10.1021/la000660h.

114. Impéror-Clerc, M.; Davidson, P.; Davidson, A. Existence of a Microporous Corona around the Mesopores of Silica-Based SBA-15 Materials Templated by Triblock Copolymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11925–11933, doi:10.1021/ja002245h.

115. Zhao, D.; Feng, J.; Huo, Q.; Melosh, N.; Fredrickson, G.H.; Chmelka, B.F.; Stucky, G.D. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science (80-.).* **1998**, *279*, 548–552, doi:10.1126/science.279.5350.548.

116. Zholobenko, V.L.; Khodakov, A.Y.; Durand, D. Synchrotron X-Ray Diffraction-Diffusion Studies of the Preparation of SBA-15 Materials. *Microporous Mesoporous Mater.* **2003**, *66*, 297–302, doi:10.1016/j.micromeso.2003.09.023.

117. Santos, S.M.L.; Cecilia, J.A.; Vilarrasa-García, E.; Silva Junior, I.J.; Rodríguez-Castellón, E.; Azevedo, D.C.S. The Effect of Structure Modifying Agents in the SBA-15 for Its Application in the Biomolecules Adsorption. *Microporous Mesoporous Mater.* **2016**, *232*, 53–64, doi:10.1016/j.micromeso.2016.06.004.
118. Hermida, L.; Agustian, J.; Abdullah, A.Z.; Mohamed, A.R. Review of Large-Pore Mesostructured Cellular Foam (MCF) Silica and Its Applications. *Open Chem.* **2019**, *17*, 1000–1016, doi:10.1515/chem-2019-0107.
119. Schmidt-Winkel, P.; Lukens Wayne W.; Yang, P.; Margolese, D.I.; Lettow, J.S.; Ying, J.Y.; Stucky, G.D. Microemulsion Templating of Siliceous Mesostructured Cellular Foams with Well-Defined Ultralarge Mesopores. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 686–696, doi:10.1021/cm991097v.
120. Hudson, S.; Cooney, J.; Magner, E. Proteins in Mesoporous Silicates. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *47*, 8582–8594, doi:https://doi.org/10.1002/anie.200705238.
121. Chrzanowska, A.; Derylo-Marczewska, A.; Wasilewska, M. Mesocellular Silica Foams (MCFs) with Tunable Pore Size as a Support for Lysozyme Immobilization: Adsorption Equilibrium and Kinetics, Biocomposite Properties. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, *21*.
122. Jarzębski, A.B.; Szymańska, K.; Bryjak, J.; Mrowiec-Białoń, J. Covalent Immobilization of Trypsin on to Siliceous Mesostructured Cellular Foams to Obtain Effective Biocatalysts. *Catal. Today* **2007**, *124*, 2–10, doi:https://doi.org/10.1016/j.cattod.2007.03.023.
123. Govan, J.; Gun'ko, Y.K. Recent Advances in the Application of Magnetic Nanoparticles as a Support for Homogeneous Catalysts. *Nanomaterials* 2014, *4*, 222–241.
124. Mehta, R. V Synthesis of Magnetic Nanoparticles and Their Dispersions with Special Reference to Applications in Biomedicine and Biotechnology. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *79*, 901–916, doi:https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.135.
125. Shukla, S.; Khan, R.; Daverey, A. Synthesis and Characterization of Magnetic Nanoparticles, and Their Applications in Wastewater Treatment: A Review. *Environ. Technol. Innov.* **2021**, *24*, 101924, doi:https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101924.
126. Rümenapp, C.; Gleich, B.; Haase, A. Magnetic Nanoparticles in Magnetic Resonance Imaging and Diagnostics. *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 1165–1179, doi:10.1007/s11095-012-0711-y.
127. Akbarzadeh, A.; Samiei, M.; Davaran, S. Magnetic Nanoparticles: Preparation, Physical Properties, and Applications in Biomedicine. *Nanoscale Res. Lett.* **2012**, *7*, 144,

doi:10.1186/1556-276X-7-144.

128. Ansari, M.J.; Kadhim, M.M.; Hussein, B.A.; Lafta, H.A.; Kianfar, E. Synthesis and Stability of Magnetic Nanoparticles. *Bionanoscience* **2022**, *12*, 627–638, doi:10.1007/s12668-022-00947-5.
129. Saini, S.; Frankel, R.B.; Stark, D.D.; Ferrucci, J.T.J. Magnetism: A Primer and Review. *AJR. Am. J. Roentgenol.* **1988**, *150*, 735–743, doi:10.2214/ajr.150.4.735.
130. Kaufman, A.A.; Hansen, R.O.; Kleinberg, R.L.K. Chapter 6 Paramagnetism, Diamagnetism, and Ferromagnetism. In *Principles of the Magnetic Methods in Geophysics*; Kaufman, A.A., Hansen, R.O., Kleinberg, R.L.K.B.T.-M. in G. and G., Eds.; Elsevier, 2008; Vol. 42, pp. 207–254 ISBN 0076-6895.
131. Nagamiya, T.; Yosida, K.; Kubo, R. Antiferromagnetism. *Adv. Phys.* **1955**, *4*, 1–112, doi:10.1080/00018735500101154.
132. Smart, J.S. The Néel Theory of Ferrimagnetism. *Am. J. Phys.* **1955**, *23*, 356–370, doi:10.1119/1.1934006.
133. Ali, A.; Shah, T.; Ullah, R.; Zhou, P.; Guo, M.; Ovais, M.; Tan, Z.; Rui, Y. Review on Recent Progress in Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Diverse Applications. *Front. Chem.* **2021**, *9*, 629054, doi:10.3389/fchem.2021.629054.
134. Kandpal, N.D.; Sah, N.; Loshali, R.; Joshi, R.; Prasad, J. Co-Precipitation Method of Synthesis and Characterization of Iron Oxide Nanoparticles. *J. Sci. Ind. Res. (India).* **2014**, *73*, 87–90.
135. Daoush, W. Co-Precipitation and Magnetic Properties of Magnetite Nanoparticles for Potential Biomedical Applications. *J. Nanomedicine Res.* **2017**, doi:10.15406/jnmr.2017.05.00118.
136. Roca, A.G.; Costo, R.; Rebolledo, A.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Tartaj, P.; Gonzalez-Carreno, T.; Morales, M. del P.; Serna, C. The Preparation of Magnetic Nanoparticles for Applications in Biomedicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2009**, *42*, 224002, doi:10.1088/0022-3727/42/22/224002.
137. Mascolo, M.C.; Pei, Y.; Ring, T.A. Room Temperature Co-Precipitation Synthesis of Magnetite Nanoparticles in a Large PH Window with Different Bases. *Materials (Basel).* 2013, *6*, 5549–5567.
138. Kim, D.K.; Zhang, Y.; Voit, W.; Rao, K. V; Muhammed, M. Synthesis and Characterization of Surfactant-Coated Superparamagnetic Monodispersed Iron Oxide Nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **2001**, *225*, 30–36, doi:10.1016/S0304-8853(00)01224-5.

139. T K, I.; Lakshmi, P. Magnetic Nanoparticles – A Review. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol* **2009**, *3*, doi:10.37285/ijpsn.2010.3.3.1.
140. López Pérez, J.A.; López Quintela, M.A.; Mira, J.; Rivas, J.; Charles, S.W. Advances in the Preparation of Magnetic Nanoparticles by the Microemulsion Method. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 8045–8047, doi:10.1021/jp972046t.
141. Mathew, D.S.; Juang, R.-S. An Overview of the Structure and Magnetism of Spinel Ferrite Nanoparticles and Their Synthesis in Microemulsions. *Chem. Eng. J.* **2007**, *129*, 51–65, doi:https://doi.org/10.1016/j.cej.2006.11.001.
142. Sanchez-Dominguez, M.; Pemartin, K.; Boutonnet, M. Preparation of Inorganic Nanoparticles in Oil-in-Water Microemulsions: A Soft and Versatile Approach. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2012**, *17*, 297–305, doi:https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.06.007.
143. Shao, H.; Lee, H.; Huang, Y.; Ko, I.; Kim, C. Control of Iron Nanoparticles Size and Shape by Thermal Decomposition Method. *Magn. IEEE Trans.* **2005**, *41*, 3388–3390, doi:10.1109/TMAG.2005.855206.
144. Hyeon, T. Chemical Synthesis of Magnetic Nanoparticles. *Chem. Commun.* **2003**, 927–934, doi:10.1039/B207789B.
145. Xiao, D.; Lu, T.; Zeng, R.; Bi, Y. Preparation and Highlighted Applications of Magnetic Microparticles and Nanoparticles: A Review on Recent Advances. *Microchim. Acta* **2016**, *183*, 1–21, doi:10.1007/s00604-016-1928-y.
146. Torres-Gómez, N.; Nava, O.; Argueta-Figueroa, L.; García-Contreras, R.; Baeza-Barrera, A.; Vilchis-Nestor, A.R. Shape Tuning of Magnetite Nanoparticles Obtained by Hydrothermal Synthesis: Effect of Temperature. *J. Nanomater.* **2019**, *2019*, 7921273, doi:https://doi.org/10.1155/2019/7921273.
147. Fu, C.; Ravindra, N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Applications. *Bioinspired, Biomim. Nanobiomaterials* **2012**, *1*, 229–244, doi:10.1680/bbn.12.00014.
148. Deng, H.; Li, X.; Peng, Q.; Wang, X.; Chen, J.; Li, Y. Monodisperse Magnetic Single-Crystal Ferrite Microspheres. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44*, 2782–2785, doi:https://doi.org/10.1002/anie.200462551.
149. Li, R.; Dalton; Kumar, P.; Khanduri, H.; Pathak, S.; Singh, A.; Basheed, G.; Pant, R. Temperature Selectivity for Single Phase Hydrothermal Synthesis of PEG-400 Coated Magnetite Nanoparticles. **2020**.
150. Ge, S.; Shi, X.; Sun, K.; Li, C.; Uher, C.; Baker, J.R.J.; Banaszak Holl, M.M.; Orr, B.G. Facile Hydrothermal Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Tunable Magnetic

Properties. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 13593–13599, doi:10.1021/jp902953t.

151. Sun孙, S.-N.; Wei魏, C.; Zhu, Z.; Hou侯, Y.-L.; Venkatraman, S.; Xu徐, Z.-C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Coating Techniques for Biomedical Applications. *Chinese Phys. B* **2014**, *23*, 37503, doi:10.1088/1674-1056/23/3/037503.
152. Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans. Magn.* **1981**, *17*, 1247–1248, doi:10.1109/TMAG.1981.1061188.
153. Farrell, D.; Majetich, S.A.; Wilcoxon, J.P. Preparation and Characterization of Monodisperse Fe Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 11022–11030, doi:10.1021/jp0351831.
154. Park, J.-I.; Cheon, J. Synthesis of "Solid Solution" and "Core-Shell" Type Cobalt−Platinum Magnetic Nanoparticles via Transmetalation Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5743–5746, doi:10.1021/ja0156340.
155. Lyon, J.L.; Fleming, D.A.; Stone, M.B.; Schiffer, P.; Williams, M.E. Synthesis of Fe Oxide Core/Au Shell Nanoparticles by Iterative Hydroxylamine Seeding. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 719–723, doi:10.1021/nl035253f.
156. O'Connor, C.; Kolesnichenko, V.; Carpenter, E.; Sangregorio, C.; Zhou, W.; Kumbhar, A.; Sims, J.; Agnoli, F. Fabrication and Properties of Magnetic Particles with Nanometer Dimensions. *Synth. Met.* **2001**, *122*, 547–557, doi:10.1016/S0379-6779(01)00328-9.
157. Cho, S.-J.; Idrobo, J.-C.; Olamit, J.; Liu, K.; Browning, N.D.; Kauzlarich, S.M. Growth Mechanisms and Oxidation Resistance of Gold-Coated Iron Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 3181–3186, doi:10.1021/cm0500713.
158. Ban, Z.; Barnakov, Y.; Li, F.; Golub, V.; O'Connor, C. The Synthesis of Core–Shell Iron@gold Nanoparticles and Their Characterization. *J. Mater. Chem. - J MATER CHEM* **2005**, *15*, doi:10.1039/b504304b.
159. Spasova, M.; Radetic, T.; Sobal, N.S.; Hilgendorff, M.; Wiedwald, U.; Farle, M.; Giersig, M.; Dahmen, U. Structure and Magnetism of Co and CoAg Nanocrystals. *MRS Online Proc. Libr.* **2011**, *721*, 23, doi:10.1557/PROC-721-E2.3.
160. El-Gendy, A.A.; Ibrahim, E.M.M.; Khavrus, V.O.; Krupskaya, Y.; Hampel, S.; Leonhardt, A.; Büchner, B.; Klingeler, R. The Synthesis of Carbon Coated Fe, Co and Ni Nanoparticles and an Examination of Their Magnetic Properties. *Carbon N. Y.* **2009**, *47*, 2821–2828, doi:https://doi.org/10.1016/j.carbon.2009.06.025.
161. Scott, J.H.J.; Majetich, S.A. Morphology, Structure, and Growth of Nanoparticles Produced in a Carbon Arc. *Phys. Rev. B* **1995**, *52*, 12564–12571, doi:10.1103/PhysRevB.52.12564.

162. de Mendonça, E.S.D.T.; de Faria, A.C.B.; Dias, S.C.L.; Aragón, F.F.H.; Mantilla, J.C.; Coaquira, J.A.H.; Dias, J.A. Effects of Silica Coating on the Magnetic Properties of Magnetite Nanoparticles. *Surfaces and Interfaces* **2019**, *14*, 34–43, doi:https://doi.org/10.1016/j.surfin.2018.11.005.
163. Pham, X.-H.; Kyeong, S.; Jang, J.; Kim, H.-M.; Kim, J.; Jung, S.; Lee, Y.-S.; Jun, B.-H.; Chung, W.-J. Facile Method for Preparation of Silica Coated Monodisperse Superparamagnetic Microspheres. *J. Nanomater.* **2016**, *2016*, 1730403, doi:https://doi.org/10.1155/2016/1730403.
164. Yu, L.; Yin, Y.; Mayers, B.; Xia, Y. Modifying the Surface Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles through A Sol-Gel Approach. *Nano Lett.* **2002**, *2*, 183–186, doi:10.1021/nl015681q.
165. Finnigan, W.; Cutlan, R.; Snajdrova, R.; Adams, J.P.; Littlechild, J.A.; Harmer, N.J. Engineering a Seven Enzyme Biotransformation Using Mathematical Modelling and Characterized Enzyme Parts. *ChemCatChem* **2019**, *11*, 3474–3489, doi:https://doi.org/10.1002/cctc.201900646.
166. M Woodley, J. *New Opportunities for Biocatalysis: Making Pharmaceutical Processes Greener*; 2008; Vol. 26;.
167. Sin, G.; Woodley, J.M.; Gernaey, K. V Application of Modeling and Simulation Tools for the Evaluation of Biocatalytic Processes: A Future Perspective. *Biotechnol. Prog.* **2009**, *25*, 1529–1538, doi:10.1002/btpr.276.
168. Srinivasan, B. A Guide to the Michaelis–Menten Equation: Steady State and Beyond. *FEBS J.* **2022**, *289*, 6086–6098, doi:https://doi.org/10.1111/febs.16124.
169. Johnson, K.A. A Century of Enzyme Kinetic Analysis, 1913 to 2013. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 2753–2766, doi:https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.012.
170. Robinson, P.K. Enzymes: Principles and Biotechnological Applications. *Essays Biochem.* **2015**, *59*, 1–41, doi:10.1042/bse0590001.
171. Lai, C.-J.; Wu, J.C. A Simple Kinetic Method for Rapid Mechanistic Analysis of Reversible Enzyme Inhibitors. *Assay Drug Dev. Technol.* **2003**, *1*, 527–535.
172. Rodriguez, J.-M.G.; Towns, M.H. Analysis of Student Reasoning about Michaelis–Menten Enzyme Kinetics: Mixed Conceptions of Enzyme Inhibition. *Chem. Educ. Res. Pract.* **2019**, *20*, 428–442.
173. Henley, J.P.; Sadana, A. Deactivation Theory. *Biotechnol. Bioeng.* **1986**, *28*, 1277–1285.
174. Foutch, G. Reactors in Process Engineering. *Encycl. Phys. Sci. Technol.* **2003**, doi:10.1016/B0-12-227410-5/00654-2.

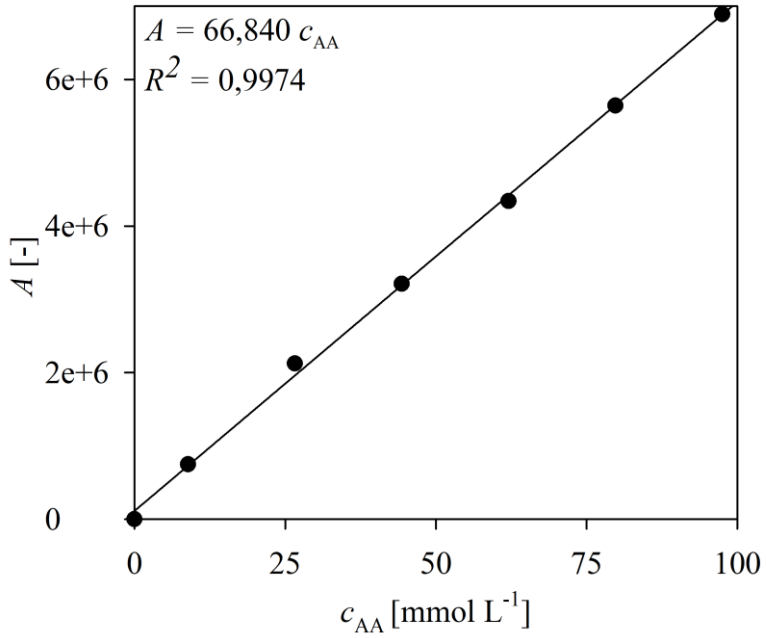
175. Chook, K.Y.; Aroua, M.K.; Gew, L.T. Enzyme Biocatalysis for Sustainability Applications in Reactors: A Systematic Review. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2023**, *62*, 10800–10812.
176. Kim, P.-Y.; Pollard, D.J.; Woodley, J.M. Substrate Supply for Effective Biocatalysis. *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 74–82, doi:https://doi.org/10.1021/bp060314b.
177. Wiles, C.; Watts, P. Continuous Flow Reactors: A Perspective. *Green Chem.* **2012**, *14*, 38–54.
178. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254, doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
179. Ernst, O.; Zor, T. Linearization of the Bradford Protein Assay. *J. Vis. Exp.* **2010**, doi:10.3791/1918.
180. Crawford, B.J.; Burke, R.D. TEM and SEM Methods. *Methods Cell Biol.* **2004**, *74*, 411–441.
181. Sing, K.S.W.; Williams, R.T. Physisorption Hysteresis Loops and the Characterization of Nanoporous Materials. *Adsorpt. Sci. Technol.* **2004**, *22*, 773–782, doi:10.1260/0263617053499032.
182. Sing, K.S.W. Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity (Recommendations 1984). **1985**, *57*, 603–619, doi:doi:10.1351/pac198557040603.
183. Groen, J.C.; Peffer, L.A.A.; Pérez-Ramírez, J. Pore Size Determination in Modified Micro- and Mesoporous Materials. Pitfalls and Limitations in Gas Adsorption Data Analysis. *Microporous Mesoporous Mater.* **2003**, *60*, 1–17, doi:https://doi.org/10.1016/S1387-1811(03)00339-1.
184. RCSB PDB - 3R13: Crystal Structure of a Deoxyribose-Phosphate Aldolase (TM_1559) from THERMOTOGA MARITIMA at 1.83 A Resolution Available online: https://www.rcsb.org/structure/3r13 (accessed on 29 December 2023).
185. Shao, Y.-B.; Jing, T.; Tian, J.-Z.; Zheng, Y.-J.; Shang, M.-H. Characterization and Optimization of Mesoporous Magnetic Nanoparticles for Immobilization and Enhanced Performance of Porcine Pancreatic Lipase. *Chem. Pap.* **2015**, *69*, 1298–1311, doi:10.1515/chempap-2015-0142.
186. Wang, A.; Wang, M.; Wang, Q.; Chen, F.; Zhang, F.; Li, H.; Zeng, Z.; Xie, T. Stable and Efficient Immobilization Technique of Aldolase under Consecutive Microwave Irradiation at Low Temperature. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 469–474,

doi:10.1016/j.biortech.2010.08.048.

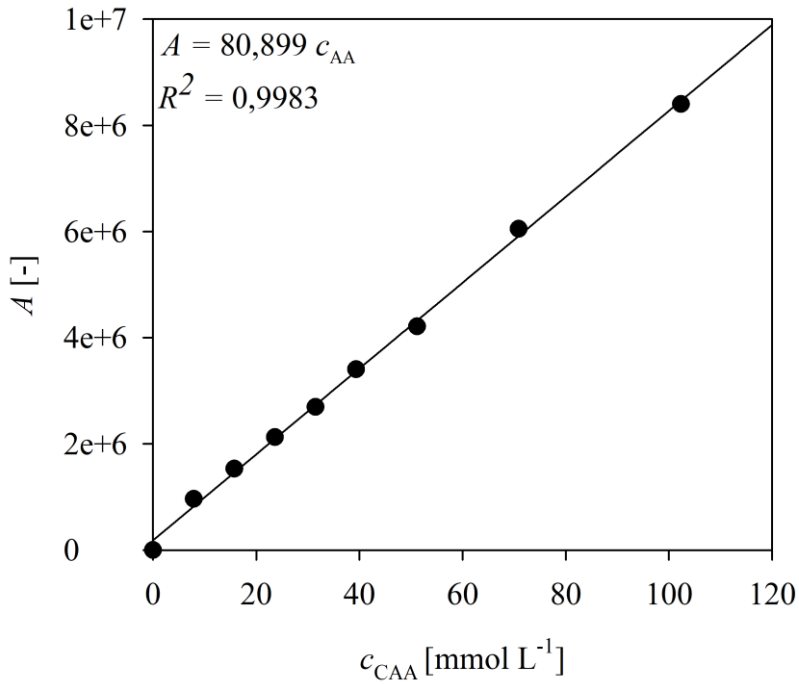
187. Chen, R.; Wei, Q.; Wei, X.; Liu, Y.; Zhang, X.; Chen, X.; Yin, X.; Xie, T. Stable and Efficient Immobilization of Bi-Enzymatic NADPH Cofactor Recycling System under Consecutive Microwave Irradiation. *PLoS One* **2020**, *15*, e0242564.
188. Bayne, L.; Ulijn, R. V; Halling, P.J. Effect of Pore Size on the Performance of Immobilised Enzymes. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 9000–9010, doi:10.1039/C3CS60270B.
189. Švarc, A.; Findrik Blažević, Z.; Vasić-Rački, Đ.; Charnock, S.J.; Vrsalović Presečki, A. A Multi-Enzyme Strategy for the Production of a Highly Valuable Lactonized Statin Side-Chain Precursor. *Chem. Eng. Res. Des.* **2020**, *164*, 35–45, doi:https://doi.org/10.1016/j.cherd.2020.09.016.
190. Singhal, S.D.-N.A.-S.D.-N.A.-R.S. Chemical Modification of Laccase Using Phthalic and 2-Octenyl Succinic Anhydrides: Enzyme Characterization, Stability, and Its Potential for Clarification of Cashew Apple Juice. *Process Biochem.* **2022**, *v. 122*, 181-195–2022 v.122, doi:10.1016/j.procbio.2022.08.033.
191. Bapiro, T.E.; Sykes, A.; Martin, S.; Davies, M.; Yates, J.W.T.; Hoch, M.; Rollison, H.E.; Jones, B. Complete Substrate Inhibition of Cytochrome P450 2C8 by AZD9496, an Oral Selective Estrogen Receptor Degrader. *Drug Metab. Dispos.* **2018**, *46*, 1268–1276, doi:10.1124/dmd.118.081539.
192. Harrington, T.J.; Gainer, J.L.; Kirwan, D.J. Effects of Fluid Shear on Immobilized Enzyme Kinetics. *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, *13*, 610–616, doi:https://doi.org/10.1016/0141-0229(91)90073-J.
193. Alzahrani, F.; Rusi, H.; Assabumrungrat, S.; Fernandes, D.L.A.; Aiouache, F. Deactivation of the Preferential Oxidation of CO in Packed Bed Reactor by 3D Modelling and Near-Infrared Tomography. *Chem. Eng. J.* **2019**, *378*, 122082, doi:https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122082.
194. Stetefeld, J.; McKenna, S.A.; Patel, T.R. Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences. *Biophys. Rev.* **2016**, *8*, 409–427.
195. Lim, J.; Yeap, S.P.; Che, H.X.; Low, S.C. Characterization of Magnetic Nanoparticle by Dynamic Light Scattering. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8*, 381, doi:10.1186/1556-276X-8-381.
196. Kaasalainen, M.; Aseyev, V.; von Haartman, E.; Karaman, D.Ş.; Mäkilä, E.; Tenhu, H.; Rosenholm, J.; Salonen, J. Size, Stability, and Porosity of Mesoporous Nanoparticles Characterized with Light Scattering. *Nanoscale Res. Lett.* **2017**, *12*, 74,

doi:10.1186/s11671-017-1853-y.

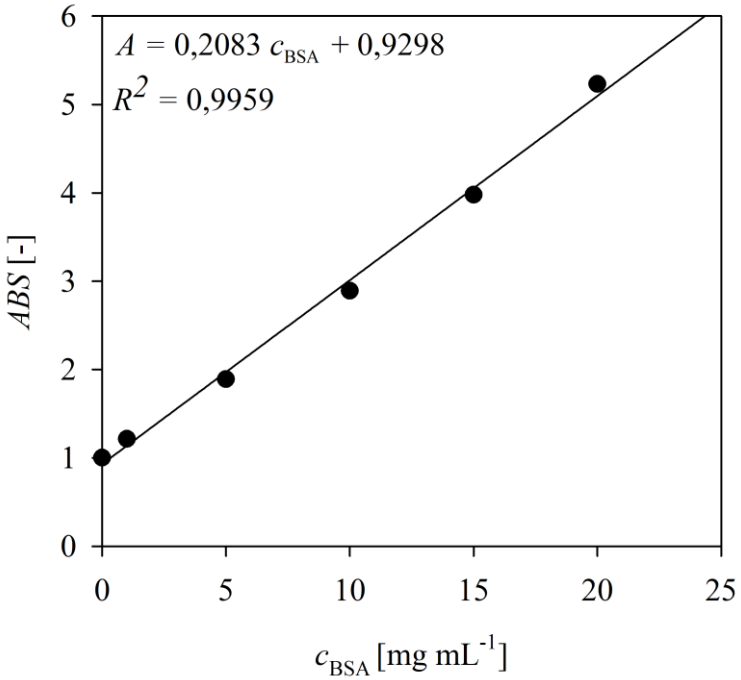
7. Prilozi



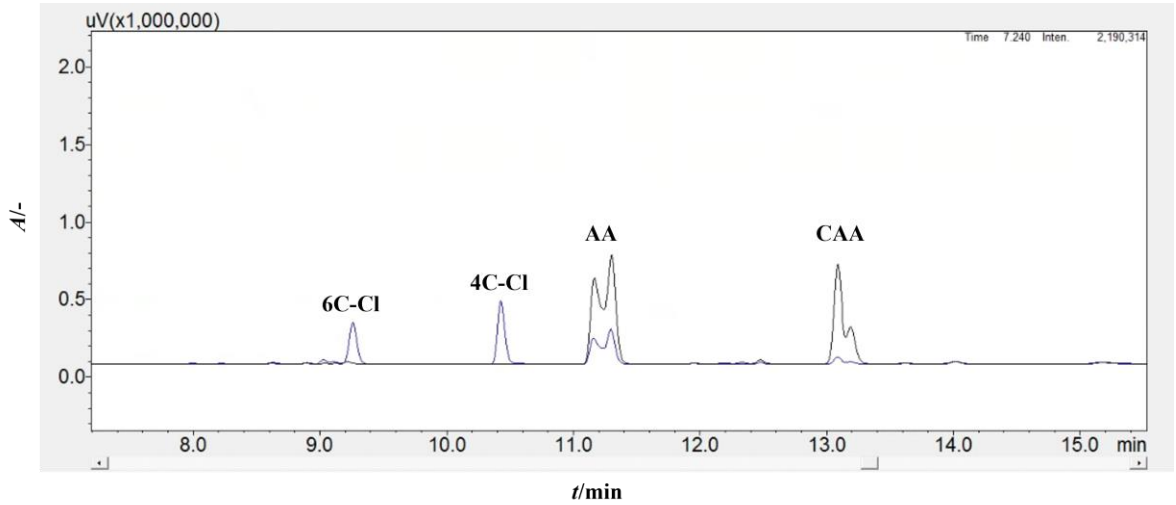
Slika 52. Baždarna krivulja za acetaldehid (AA).



Slika 53. Baždarna krivulja za kloroacetaldehid (CAA).



Slika 54. Baždarna krivulja za albumin goveđeg seruma (BSA).



Slika 55. Preklopljeni HPLC kromatogrami koji prikazuju acetaldehid (AA), kloroacetaldehid (CAA), 4-kloro-3-hidroksibutanal (4C-Cl) i 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal (6C-Cl). Kromatogram prikazuje dva različita vremena uzoraka uzetih iz provođene reakcije dvostruke aldolne adicije. Crni kromatogram je uzorak uzet na početku reakcije (t = 0 min), gdje su prisutni samo supstrati AA i CAA. Plavi kromatogram je uzorak uzet nakon određenog vremena provođenja reakcije (t = 10 min), gdje je vidljiv rast međuprodukta 4C-Cl i konačnog produkta 6C-Cl. Retencijska vremena AA, CAA, 4C-Cl i 6Cl-Cl bila su 11,2, 13,2, 10,5 i 9,2 min.

8. Skraćenice i simboli

8.1. Skraćenice

4C-Cl – 4-kloro-3-hidroksibutanal

6C-Cl – 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal

AA – acetaldehid

ACN – acetonitril

ADH – alkohol dehidrogenaza

APTES – 3-aminopropiltrietoksilan

APTMS – (3-metilaminopropil)trimetoksilan

BET – Braun-Emmet-Teller

BJH – Barret-Joyner-Halenda

BSA – albumin goveđeg seruma

CAA – kloroacateldehid

CFE – ekstrakt bez stanice

DERA – 2-deoksi-D-riboza 5-fosfat aldolaza

DLS – dinamičko raspršenje svijetla

DR5P – 2-deoksiriboza-5-fosfat

EDX – energetski disperzivna spektroskopija

FSA – fruktoza-6-fosfat aldolaza

G3P – gliceraldehid-3-fosfat

GPTMS – (3-glicidiloksipropil)trimetoksilan

HHDH – halogenhidrin-dehalogenaza

HPLC – tekućinska kromatografija visokog učinka

KCN – kalijev cijanid

LDL – kolesterol niske gustoće

MCF – mezoporozna silika

MCM – Mobil Composition of Matter No. 41

MNP – magnetske nanočestice

NaAc – natrijev acetat

PEG – poli(etilen-glikol)

PLA – esteraza iz svinjske jetre

SBA – Santa Barbara Amorphous

SEM – skenirajući elektronski mikroskop

STEM – skenirajući transmisijski elektronski mikroskop

TEM – transmisijski elektronski mikroskop

TEOS – tetraetil ortosilikat

TFA – trifluoroctena kiselina

TMB – 1,2,4-trimetilbenzen

8.2. Simboli

c – molarna koncentracija, mmol L^{-1}

d – promjer, nm

I – iskorištenje, -

k_d – deaktivacijska konstanta, min^{-1}

K_i – konstanta inhibicije, mmol L^{-1})

K_m – Michaelis konstanta, mmol L^{-1}

m – masa, g

n – broj inhibitorskih molekula vezanih na inhibitorsko mjesto enzima, -

p – tlak, bar

Pr – produktivnost, %

Q – volumni protok, μL min^{-1}

r – brzina reakcije, U mL^{-1} (mmol mL^{-1} min^{-1})

R^2 – koeficijent determinacije, -

S – selektivnost, -

$S.A.$ – specifična enzimska aktivnost, U mg^{-1}

T – temperatura, °C

t – vrijeme, min ili h

V – volumen, μL ili mL

V_{ads} – volumen adsorbiranog sloja, cm^3 g^{-1}

V_m – maksimalna brzina reakcije, U mg^{-1} (mmol mg^{-1} min^{-1})

V_r – radni volumen, μL

X – konverzija supstrata, %

γ – masena koncentracija, mg mL^{-1}

ρ – koeficijent korelacije, -

σ – standardna devijacija, -

τ – vrijeme zadržavanja, min

φ – volumni udio, %

9. Životopis

Dino Skendrović rođen je 1989. Osnovnu i srednju završio je u Samoboru. U rujnu 2018. godine je diplomirao na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, na smjeru Ekoinženjerstvo, s radom pod naslovom „Matematički model aldolne adicije katalizirane D-fruktoza-6-fosfat aldolazom“. U siječnju 2019. godine upisuje Sveučilišni znanstveni poslijediplomski doktorski studij Kemijsko inženjerstvo i primijenjena kemija na Sveučilištu u Zagrebu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod mentorstvom prof. dr. sc. Ane Vrsalović Presečki, te se zapošljava kao asistent na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu istog Fakulteta. Tijekom doktorskog studija sudjelovao je u pisanju četiri znanstvena rada, od kojih je na dva prvi autor. Sudjelovao je i na osam konferencija, od čega pet domaćih s četiri posterskih priopćenja i jednim usmenim priopćenjem, te tri međunarodne s tri posterska priopćenja. Odradio je znanstveno usavršavanje izvan hrvatske na Fakultetu za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, Slovenija u periodu 13.5.-13.6.2019. Odradio je predavanje i vodio međunarodnu radionicu u sklopu Erasmus + Blended Intensive Programme (BIP) pod nazivom Basics & Application of Computational Chemistry in Action, održanoj 2-4.4.2024. (virtualno) i 3-7.6.2024. (uživo) u Łódź, Poljska.

Popis objavljenih radova:

D. Skendrović, M. Primožić, T. Rezić, A. Vrsalović Presečki, Mesocellular Silica Foam as Immobilization Carrier for Production of Statin Precursors, IJMS 25 (2024) 1-13.

D. Skendrović, A. Švarc, T. Rezić, A. Chernev, A. Rađenović, A. Vrsalović Presečki, Improvement of DERA activity and stability in the synthesis of statin precursors by immobilization on magnetic nanoparticles, React. Chem. Eng. 9 (2024) 82-90.

A. Švarc, M. Fekete, K. Hernandez, P. Clapés, Z. Findrik Blažević, A. Szekrenyi, D. Skendrović, Đ. Vasić-Rački, S. J. Charnock, A. Vrsalović Presečki, An innovative route for the production of atorvastatin side-chain precursor by DERA-catalysed double aldol addition, Chem. Eng. Sci. 231 (2021), 116312.

A. Švarc, D. Skendrović, A. Vrsalović Presečki, Biocatalysis for the Production of Pharmaceutical Intermediates: Statin Precursors, Kem. Ind. 68 (2019) 469-479.