

Enzimatska sinteza nanočestica zlata

Komljenović, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:232944>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Katarina Komljenović

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

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

Katarina Komljenović

ENZIMATSKA SINTEZA NANOČESTICA ZLATA

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki
2. prof. dr. sc. Vesna Tomašić
3. prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

Zagreb, srpanj 2019.

Veliko Hvala!

Mojoj mentorici, prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki, na prenesenom znanju i strpljenju kojim ste me vodili kroz ovaj rad.

Zahvaljujem asistentici Leli Pintarić na nesebičnoj pomoći, brojnim savjetima i potpori prilikom izvođenja eksperimentalnog djela rada.

Zahvaljujem i svim ostalim djelatnicima Zavoda za reakcijsko inženjerstvo i katalizu na strpljenju, suradnji i ugodnom boravku na Zavodu.

Od srca hvala mojim roditeljima i braći bez kojih ne bih bila ovdje i koji su vjerovali u mene kada možda ni sama nisam. Hvala za svaki kolokvij i ispit koji ste proživljavali zajedno sa mnom, tješili me i slavili sa mnom.

Mome dečku Bernardu hvala na potpori i ohrabrenjima kroz studij.

Prijateljicama Dori, Karmen i Barbari te Valeriji, Antonelli i ostalim kolegama koji su me podržavali kroz godine studiranja i učinili moje studentske dane ljepšima.

SAŽETAK

U radu je provedena enzimatska sinteza nanočestica zlata uz enzime glukoza dehidrogenaza (*Gc* GDH) koja katalizira reakciju oksidacije glukoze i celobioza dehidrogenaza (*Mt* CDH) korištenjem reakcije oksidacije celobioze. Ispitana je kinetika oba enzima u navedenim reakcijama, te je promatran utjecaj iona zlata na aktivnost enzima. Kinetika je u oba slučaja opisana jednosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom uz kompetitivnu inhibiciju ionima zlata. Procijenjena konstanta inhibicije je pokazala značajnu inhibiciju reakcije oksidacije glukoze uz *Gc* GDH s ionima zlata. Provođenjem sinteze nanočestica zlata uz *Mt* CDH i reakciju oksidacije celobioze, pokazano je da je mehanizam nastajanja nanočestica direktno povezan s kinetikom reakcije. Za navedenu sintezu postavljen je matematički model koji je pokazao dobro slaganje s eksperimentalnim rezultatima. Prilikom sinteze nanočestica s *Gc* GDH uz glukozu, utvrđeno je da mehanizam nastajanja nanočestica nije povezan s kinetikom reakcije, već nanočestice zlata nastaju redukcijom iona zlata uz glukozu i uz aminokiseline iz proteina odnosno enzima. Navedeno je i potvrđeno u kontrolnim eksperimentima.

Ključne riječi: enzim, glukoza dehidrogenaza, celobioza dehidrogenaza, nanočestice, zlato

ABSTRACT

In this study enzymatic synthesis of gold nanoparticles was carried out using the reaction of the glucose oxidation catalyzed by glucose dehydrogenase (*Gc* GDH) and the cellobiose oxidation catalyzed by cellobiose dehydrogenase (*Mt* CDH). The kinetics of both enzymes were investigated in the above reactions and the influence of the gold ions on the enzyme activity was examined. Kinetics in both cases were described by one-substrate Michaelis-Menten kinetics with competitive inhibition of gold ions. Estimated inhibition constant revealed significant inhibition of *Gc* GDH by gold ions in the reaction of glucose oxidation. By carrying out the synthesis of gold nanoparticles with cellobiose oxidation catalysed *Mt* CDH, it has been shown that the mechanism of nanoparticles formation is directly related with reaction kinetics. For this synthesis a mathematical model was set and it was in good agreement with experimental results. The results of the synthesis of nanoparticles with *Gc* GDH and glucose showed that the nanoparticle formation mechanism is not related to the kinetics of the reaction. In this case gold nanoparticles were formed by the reduction of gold ions with glucose and protein i.e. enzyme amino acids. This was also confirmed in the control experiments.

Keywords: enzymes, glucose dehydrogenase, cellobiose dehydrogenase, nanoparticles, gold

SADRŽAJ

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | UVOD..... | 1 |
| 2 | OPĆI DIO..... | 2 |
| 2.1 | Enzimi..... | 2 |
| 2.1.1 | Karakteristike enzima..... | 3 |
| 2.1.2 | Podjela i primjena enzima..... | 4 |
| 2.1.3 | Koenzim nikotinamid adenin dinukleotid..... | 5 |
| 2.1.4 | Oksidoreduktaze..... | 5 |
| 2.1.5 | Glukoza dehidrogenaza..... | 6 |
| 2.1.6 | Celobioza dehidrogenaza..... | 6 |
| 2.2 | Nanotehnologija..... | 7 |
| 2.2.1 | Nanočestice..... | 8 |
| 2.2.2 | Nanočestice zlata..... | 9 |
| 2.3 | Modeliranje biotransformacija..... | 11 |
| 2.3.1 | Kinetički modeli enzimatskih reakcija..... | 12 |
| 2.3.2 | Rektorski modeli..... | 14 |
| 3 | EKSPERIMENTALNI DIO..... | 16 |
| 3.1 | Aparatura..... | 16 |
| 3.1.1 | Analitička vaga..... | 16 |
| 3.1.2 | pH-metar..... | 16 |
| 3.1.3 | Kotlasti reaktor..... | 16 |
| 3.1.4 | Spektrofotometar..... | 17 |
| 3.1.5 | Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)..... | 18 |
| 3.1.6 | Centrifuga..... | 19 |
| 3.1.7 | Liofilizator..... | 20 |
| 3.2 | Analitičke metode..... | 21 |
| 3.2.1 | Određivanje koncentracije glukoze i celobioze..... | 21 |
| 3.2.2 | Određivanje koncentracije glukonolaktona i glukonske kiseline..... | 21 |
| 3.2.3 | Određivanje apsorpcijskog spektra nanočestica zlata..... | 21 |
| 3.2.4 | Određivanje koncentracije NADH..... | 21 |
| 3.3 | Kinetička mjerenja..... | 21 |

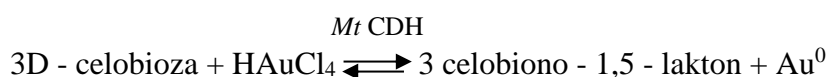
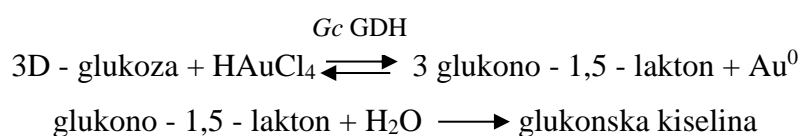
| | | |
|-------|--|----|
| 3.3.1 | Kinetika enzima <i>Gc</i> GDH i <i>Mt</i> CDH..... | 21 |
| 3.3.2 | Utjecaj iona zlata na kinetiku <i>Gc</i> GDH | 22 |
| 3.3.3 | Utjecaj iona zlata na kinetiku <i>Mt</i> CDH..... | 22 |
| 3.4 | Sinteza nanočestica zlata..... | 23 |
| 3.4.1 | Kontrolni eksperimenti sinteze nanočestica zlata uz enzim <i>Gc</i> GDH..... | 23 |
| 3.4.2 | Kontrolni eksperimenti sinteze nanočestica zlata uz enzim <i>Mt</i> CDH..... | 23 |
| 3.4.3 | Sinteza nanočestica zlata uz enzim <i>Gc</i> GDH i koenzim NAD ⁺ | 24 |
| 3.4.4 | Sinteza nanočestica zlata katalizirana enzimima <i>Gc</i> GDH i <i>Mt</i> CDH | 24 |
| 3.4.5 | Obrada rezultata..... | 25 |
| 4 | MATEMATIČKI MODEL..... | 26 |
| 4.1 | Kinetički model..... | 26 |
| 4.2 | Reaktorski model | 26 |
| 5 | REZULTATI I RASPRAVA..... | 28 |
| 5.1 | Kinetika enzima <i>Gc</i> GDH i <i>Mt</i> CDH | 28 |
| 5.2 | Utjecaj iona zlata na kinetiku enzima <i>Gc</i> GDH i <i>Mt</i> CDH | 30 |
| 5.3 | Sinteza nanočestica zlata katalizirana enzimom <i>Mt</i> CDH..... | 31 |
| 5.4 | Kontrolni eksperimenti sinteze nanočestice zlata katalizirane enzimom <i>Mt</i> CDH..... | 35 |
| 5.5 | Sinteza nanočestica zlata katalizirana enzimom <i>Gc</i> GDH | 35 |
| 5.6 | Sinteza nanočestica zlata katalizirana enzimom <i>Gc</i> GDH uz koenzim NAD ⁺ | 38 |
| 5.7 | Kontrolni eksperimenti sinteze nanočestica zlata katalizirane enzimom <i>Gc</i> GDH | 41 |
| 5.8 | Usporedba nastajanja nanočestica u različitim enzimatskim sustavima..... | 43 |
| 6 | ZAKLJUČAK..... | 45 |
| 7 | POPIS SIMBOLA I KRATICA | 46 |
| 8 | LITERATURA | 47 |
| 9 | PRILOZI..... | 50 |
| 10 | ŽIVOTOPIS | 52 |

1 UVOD

Enzimi ili biokatalizatori su tvari koje ubrzavaju kemijske reakcije te su sa stajališta zelene kemije prihvatljivi zbog svoje selektivnosti, specifičnosti, stereospecifičnosti, netoksičnosti, obnovljivosti, mogućnosti razgradnje toksične tvari te mogućnosti kataliziranja pri blagim i za okoliš prihvatljivim uvjetima. Kao nedostaci ističu se visoka cijena, nestabilnost izvan prirodnog okruženja te podložnost inhibiciji i deaktivaciji. Upotreba enzima u industriji sve se više primjenjuje, a najčešće se koriste u farmaceutskoj, prehrambenoj, naftnoj i tekstilnoj industriji. Da bi enzim bio pogodan u industrijskom mjerilu potrebno ga je ispitati u realnim reaktorskim uvjetima, kinetički ga karakterizirati te pronaći metodu njegove stabilizacije. Matematički modeli procesa se postavljaju zbog odabira adekvatnog reaktora za provođenje biokatalitičkih reakcija. Modeli su se pokazali učinkovitima u pronalasku optimalnih radnih uvjeta te stvaranja optimalnog mikrookoliša za bioreaktor s ciljem optimiziranja produktivnosti i konverzije supstrata.

Za proizvodnju nanočestica koje nisu opasne za okoliš, ljude i životinje koriste se metode enzimatske sinteze. Enzimatskom sintezom eliminirana je upotreba kemikalija te je energetska manje zahtjevnja. Fizikalna i kemijska svojstva tako dobivenih nanočestica razlikuju se od svojstva nanočestica dobivenih drugim metodama. Pomoću enzima se mogu uspješno sintetizirati nanočestice u obliku tankih filmova, šupljih mikro i nano sfera, nanočestica, 2D i 3D uzoraka te biominerala. Zbog toga su enzimatske reakcije nastajanja nanočestica iznimno važne u zdravstvenim istraživačkim područjima koja otvaraju mogućnost novih načina primjene nanočestica (npr. u terapiji i liječenju karcinoma).

Enzim korišteni za sintezu nanočestica zlata, u ovom radu su *Gc* GDH – *Glomerella cingulata* glukoza dehidrogenaza i *Mt* CDH – *Myriococcum thermophilum* celobioza dehidrogenaza, a sinteza se odvijala prema shemi prikazanoj na *Slici 1.1*



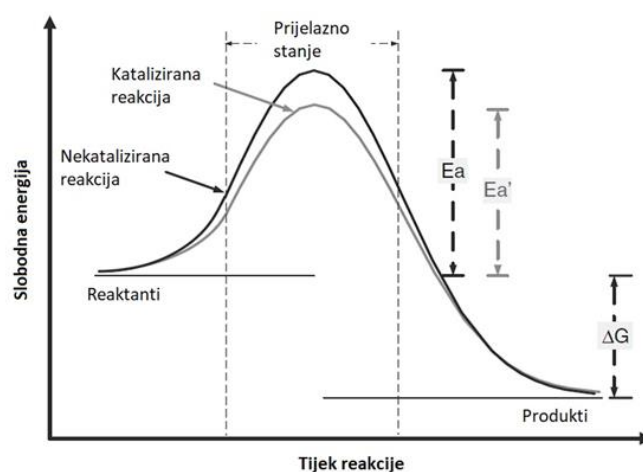
Slika 1.1 Sheme reakcija enzimatske sinteze nanočestica zlata uz enzime *Gc* GDH i *Mt* CDH

2 OPĆI DIO

2.1 Enzimi

Katalizatori su spojevi koji ubrzavaju odvijanje kemijske reakcije, a da pri tome ne dolazi ni do kakve promjene u njihovoj strukturi. Uz otkriće kemijskih katalizatora, razvoj katalize išao je u smjeru otkrića katalizatora koji ubrzavaju reakcije u biološkim sustavima.

Enzimi su organske molekule koje nastaju unutar živih stanica s ciljem ubrzavanja kemijskih reakcija sinteze i razgradnje, koje se događaju u živim organizmima. Zbog toga ih nazivamo i biokatalizatorima. Po kemijskoj građi enzimi su proteini sastavljeni od velikog broja amino kiselina.¹ Ovisno o broju amino kiselina u proteinu, molekulske mase enzima kreću se od nekoliko tisuća do nekoliko stotina tisuća. Enzimi kataliziraju specifične reakcije (oksidacije i redukcije, hidrolize, izomerizacije i sl.) koje se odvijaju u blagim uvjetima, sličnim onima u živoj stanici, snižavajući energetska barijeru biokemijskih reakcija na temelju interakcije sa supstratom, te pritom ne utječu na kemijsku ravnotežu. Pri tome nastaje prijelazni aktivirani kompleks koji se prevodi u konačni produkt, a katalizator pri tome ostaje nepromijenjen. Stvaranje kompleksa mora biti brzo i reverzibilno, da bi se produkt mogao lako odvojiti od enzima po završetku reakcije, te da se enzim može koristiti za daljnje katalitičko djelovanje. Shematski prikaz mehanizma katalitičke reakcije prikazan je na *Slici 2.1*, gdje su E_a i E'_a energije aktivacije nekatalizirane i katalizirane reakcije, a ΔG predstavlja izmjenu slobodne energije reakcije.



Slika 2.1 Shematski prikaz mehanizma katalitičke i nekatalitičke reakcije

Tijekom reakcije katalizator se ne troši i ne mijenja, te se može koristiti na neodređeno vrijeme. Vrijek upotrebe katalizatora ograničen je njegovom stabilnošću, jer se u reakcijskim uvjetima aktivnost katalizatora smanjuje s vremenom.

Prednosti enzima u odnosu na klasične kemijske katalizatore su: blagi reakcijski uvjeti (pH, temperatura, tlak), djelovanje pri niskim koncentracijama, obnovljivost izvora enzima, biorazgradivost, te provođenje kompleksne reakcije u jednom stupnju. Nedostaci enzima pred klasičnim katalizatorima su: visoka cijena izolacije i pročišćavanja, lako podliježu inhibiciji supstratom i/ili produktom, dolazi do deaktivacije uslijed promjene reakcijskih uvjeta te nestabilnost izvan prirodnog okruženja.

Pojedini enzimi su kao samostalne jedinice same sebi dovoljne za postizanje potpune aktivnosti, međutim, nekim enzimima su potrebne dodatne molekule koje im pomažu pri aktiviranju enzima. Te molekule nazivaju se kofaktori. Kofaktori provode kemijsku reakciju koju nije moguće provesti s uobičajenim amino kiselinama. Možemo ih podijeliti u dvije skupine: metalni kofaktori i koenzimi. Koenzimi su male organske molekule koje mogu biti jače ili slabije vezane za enzim. Koenzimi su derivati vitamina, te jednu vrstu koenzima mogu koristiti različiti enzimi. U tome je ključna razlika koenzima i supstrata. Enzimi koji koriste isti koenzim, kataliziraju slične kemijske reakcije.² Jedan od najvažnijih koenzima je nikotinamid adenin dinukleotid, oksidirani oblik NAD^+ koji primanjem hidrida sa supstrata prelazi u reducirani oblik, NADH .

2.1.1 Karakteristike enzima

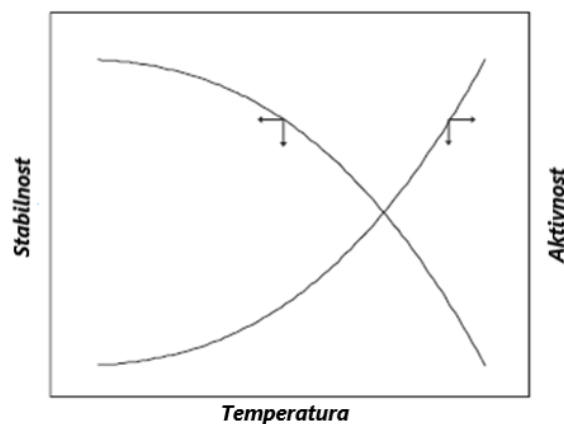
Karakteristike enzima se očituju u njegovoj strukturi, obliku, nabijenosti te hidrofiličnim i hidrofobnim svojstvima. Najznačajnija svojstva enzima su aktivnost, selektivnost tj. specifičnost i stabilnost. U odnosu na standardne katalizatore posebno svojstvo enzima jest njihova specifičnost. Pri tome razlikujemo više vrsta specifičnosti. Ako enzim katalizira reakciju samo sa jednim određenim supstratom, kažemo da pokazuje apsolutnu specifičnost. Ako katalizira reakciju u kojoj se pojavljuje supstrat sa određenom atomskom skupinom, radi se o grupnoj specifičnosti. Kada enzim katalizira točno određeni tip reakcije, bez obzira na grupe atoma, govorimo o najnižem stupnju specifičnosti koji je opisan reakcijskom specifičnošću. Ako pak enzimi kataliziraju reakcije u kojima je zastupljen supstrat određenog stereokemijskog oblika, govorimo o stereospecifičnosti.³

Kataliziranje točno određenih reakcija eliminira mogućnost nastajanja neželjenih nusprodukata, čime se povećava produktivnost reakcije.⁴

Svaka molekula na koju utječe određeni enzim ima točno određen oblik pomoću kojeg se veže na enzim. Ovakvo djelovanje enzima opisuje se modelom ključ-brava kojeg je predložio Emil Fisher 1894.g. Na djelovanje enzima i na njegovu aktivnost utječu različite tvari. Stabilnost enzima je sposobnost enzima da zadrži svoju aktivnost. Na stabilnost utječu različiti faktori

kao što su inhibitori enzima, pH vrijednost, temperatura, tlak, brzina miješanja, denaturacija proteina te prisutnost ili odsutnost određene komponente. Stabilnost enzima vrlo je važna za ocjenu kvalitete enzima, a uvjeti za optimalnu aktivnost često se ne podudaraju s uvjetima optimalne stabilnosti.

Povišenje temperature dovodi do porasta brzine reakcije, ali i povećava brzinu kojom se enzim deaktivira. Optimalna temperatura je vremenski ovisna jer je enzimatska aktivnost neovisna o vremenu (početna brzina reakcije), dok je stabilnost ovisna. Zbog toga se temperaturni optimum smanjuje s povećanjem vremena izloženosti enzima u reakcijskom mediju. Neophodno je napraviti kompromis između aktivnosti i stabilnosti⁵ (Slika 2.2).



Slika 2.2 Utjecaj povišenja temperature na stabilnost i aktivnost enzima

Enzimi su polionski spojevi te pH utječe na većinu njihovih spojeva tako da npr. mijenja raspored naboja na aktivnim mjestima ili na cijeloj površini proteina. Brzine enzimatski kataliziranih reakcija se smanjuju pri ekstremnim vrijednostima pH i često pokazuju maksimum pri nekim srednjim vrijednostima. Optimalni uvjeti pH za aktivnost se određuju unutar raspona pH u kojima je enzim najstabilniji.⁶ Do smanjenja ili potpunog gubitka aktivnosti enzima dolazi uslijed djelovanja inhibitora. Inhibitori se dijele na kompetitivne, antikompetitivne i nekompetitivne.

2.1.2 Podjela i primjena enzima

Međunarodna Unija Biokemije i Molekularne Biologije (IUBMB) razlikuje 4 000 enzima i kategorizira ih koristeći enzimatsku nomenklaturu. U prirodi je prisutno gotovo 25 000 enzima, a do sada ih je izolirano 3 000.⁴ Enzime možemo podijeliti prema građi, mjestu djelovanja te prema osnovi reakcije koje kataliziraju.

Prema građi se dijele na jednostavne (proteinski dio) i složene (proteinski i neproteinski dio, koenzim), prema mjestu djelovanja mogu biti: endoenzimi, egzoenzimi i proenzimi, dok se prema katalitičkom djelovanju dijele na: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze.⁷ (Tablica 2.1)

Tablica 2.1 Klasifikacija enzima prema katalitičkom djelovanju

| <i>NAZIV</i> | <i>VRSTA REAKCIJE</i> |
|------------------------|--|
| Oksidoreduktaze | oksidacija-redukcija |
| Transferaze | prijenos skupina |
| Hidrolaze | reakcija hidrolize |
| Liaze | adicija/eliminacija |
| Izomeraze | izomerizacija |
| Ligaze | vezanje dvaju supstrata na teret hidrolize ATP |

U današnje vrijeme velika pažnja se pridaje zelenim, čistim tehnologijama u koju se ubraja i primjena enzima. Enzimi se najčešće koriste u farmaceutskoj, prehrambenoj, naftnoj te drugim industrijama poput tekstilne, kožne, industrije detergenata.

2.1.3 Koenzim nikotinamid adenin dinukleotid

Nikotinamid adenin dinukleotid je koenzim prisutan u svim živim stanicama. Sastoji se od dva nukleotida spojena fosfatnim grupama. Jedan nukleotid sadrži adeninsku bazu, a drugi nikotinamid.⁸ Koenzim sudjeluje u redoks reakcijama s glavnom funkcijom prijenosa elektrona. Dolazi u dva oblika, kao oksidirani (NAD^+) i kao reducirani (NADH) nikotinamid. Nikotinamidni prsten je redoks aktivan, prima vodikov ion te se reducira u NADH. Nikotinamid koenzim se ne veže kovalentnim vezama za enzim, već lagano disocira. Iznimno je skup da bi se koristio kao stehiometrijski reagens, te je potrebna njegova regeneracija. Regeneracijom koenzima može se promijeniti ravnoteža reakcije, termodinamički nepovoljnu reakciju može se pretvoriti u termodinamički povoljnu.

2.1.4 Oksidoreduktaze

Oksidoreduktaze su enzimi koji kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije u bioprocesima, prijenosom vodikovog ili kisikovog atoma ili elektrona od jednog do drugog supstrata, pri čemu je jedan od supstrata najčešće koenzim. Nalaze se u većini živih organizama, a dijele se na dehidrogenaze (kataliziraju reakcije dehidrogenacije), oksidaze (kataliziraju reakcije u kojima je molekularni kisik akceptor elektrona), oksigenaze (kataliziraju reakcije u kojima se

atmosferski kisik izravno ugrađuje u organski spoj).⁹ Zbog velikog broja supstrata s kojima reagiraju te zbog posjedovanja enantio-, regio- i stereoselektivnih svojstava imaju vrlo veliku važnost u organskim sintezama.¹⁰ Koenzimi mogu biti vezani za enzim (FAD, FAM) ili mogu postojati kao topljive komponente enzima (NAD, NADP).¹¹ Zbog skupoće korištenja koenzima u sintezama, potrebna je njihova regeneracija. Oksidoreduktaze se primjenjuju za sintezu lijekova, steroida, polimera, oksidativnu razgradnju zagađivača, te za konstrukciju biosenzora za različite analitičke i kliničke primjene.⁴ Enzimi korišteni u ovom radu, glukoza dehidrogenaza (*Gc* GDH) i celobioza dehidrogenaza (*Mt* CDH), spadaju u skupinu oksidoreduktaza.

2.1.5 Glukoza dehidrogenaza

Glukoza dehidrogenaza je izvanstanični enzim izoliran iz gljive *Glomerella Cingulata*. Pripada skupini oksidoreduktaza, a prvi ju je opisao 1964. godine g. Hauge, dok su enzimu korisni koenzimi PQQ i drugi, kasnije identificirani.

Oksidoreduktaze koje djeluju na CH-OH skupinu molekula donora klasificiraju se u skupinu enzima koji uključuju nekoliko oksidoreduktaza koje se koriste za praćenje glukoze. Sve one djeluju na redukcijskom kraju glukoze, na prvoj hidroksilnoj skupini. Ovi enzimi podijeljeni su ovisno o njihovoj sposobnosti da reagiraju s vanjskim akceptorima elektrona u dvije skupine:

1. glukoza oksidaze (GO_x) – koriste kisik kao vanjski akceptor elektrona, oslobađajući vodikov peroksid
2. glukoza dehidrogenaze (GDH) – ne koriste kisik kao akceptor elektrona te umjesto toga prenose elektrone u različite prirodne i umjetne akceptore elektrona

Gc GDH je enzim otporan na visoke temperature i organska otapala, katalizira reakciju oksidacije glukoze u prisutnosti koenzima kao što je nikotinamid adenin dinukleotid (NAD), FAD ili pirolokinolin (PQQ). *Gc* GDH koji koristi NAD^+ kao koenzim proizvodi NADH koji se može mjeriti amperometrijskim, spektrometrijskim, kulonometrijskim ili kromogenim metodama.¹²

2.1.6 Celobioza dehidrogenaza

Celobioza dehidrogenaza je izvanstanični gljivični enzim. Prvi puta je opisana 1974. godine kao vanstanični enzim gljive *Phanerochaete chrysosporium*.¹³ Studije su otkrile da katalizira oksidaciju topljivih produkata razgradnje celobioze nastale tijekom truljenja drva. Za ispunjenje katalitičkog ciklusa bila je potrebna popratna redukcija različitih kininoidnih spojeva dobivenih iz lignina. Usporedno s time, međudjelovanje s molekularnim kisikom kasnije je utvrdilo katalitičku funkciju CDH kao dehidrogenaze s određenom aktivnošću.

Ubrzo nakon otkrića, postalo je očito da je CDH sveprisutno distribuirani enzim u gljivama koje se nalaze u drvu tijekom procesa truljenja.

Zajednička značajka svih CDH enzima je njihova kompleksna struktura, koja sadrži dvije domene, C - terminalni citokrom – vezujući fragment (CYT) i veću katalitičku flavodehidrogenazu (DH) domenu kodiranu unutar jednog polipeptidnog lanca. Domene su međusobno povezane linearnim, papain – osjetljivim veznim peptidom, koji sadrži od 15 do 33 aminokiselina.¹⁴ Elektroni mogu međusobno prelaziti iz jedne u drugu domenu intermolekularnim prijenosom elektrona.¹⁵

CDH katalizira oksidaciju celobioze s dva elektora, a produkt reakcije je celobionolakton, koji reducira 1 ili 2 elektron akceptora osobito kinona kisika dikloroindifenola i kompleksa željeza, uključujući citokrom.¹⁶ U ovom radu korišten je enzim CDH izoliran iz gljive *Myriococcum thermophilum*.

2.2 Nanotehnologija

Nanotehnologija je znanost, inženjerstvo i tehnologija koja se provodi na nanoskali (1 – 100 nm). Nano dolazi od grčke riječi *νανος* što znači patuljak. Znanost o nanotehnologiji obuhvaća proučavanje i primjenu iznimno malih stvari koje se mogu koristiti u drugim područjima znanosti kao što su kemija, biologija, fizika, znanost o materijalima, a osobito u biotehnologiji i informatičkim tehnologijama, odnosno podrazumijeva sve vrste tehnologije koje se bave objektima barem jedne dimenzije do 100 nm. Pored navedenih, nanotehnologija obuhvaća i praške, vlakna, slojeve, sintezu i obradu, nanostrukturiranje, modeliranje i karakterizaciju.¹⁷ Cilj nanotehnologije je razviti nove proizvode i tehnologije koji će unaprijediti život ljudi u različitim područjima, poput zdravstva, energetike, elektronike, tehnologije materijala, zaštite okoliša, itd. Stoga se pojavljuje vrlo širok konceptualni pristup nanotehnologiji za koji bi se gotovo moglo reći da obuhvaća sve materijale, objekte, načine manipulacije i fenomene na nanoskali, uključujući i prirodne biološke sustave.

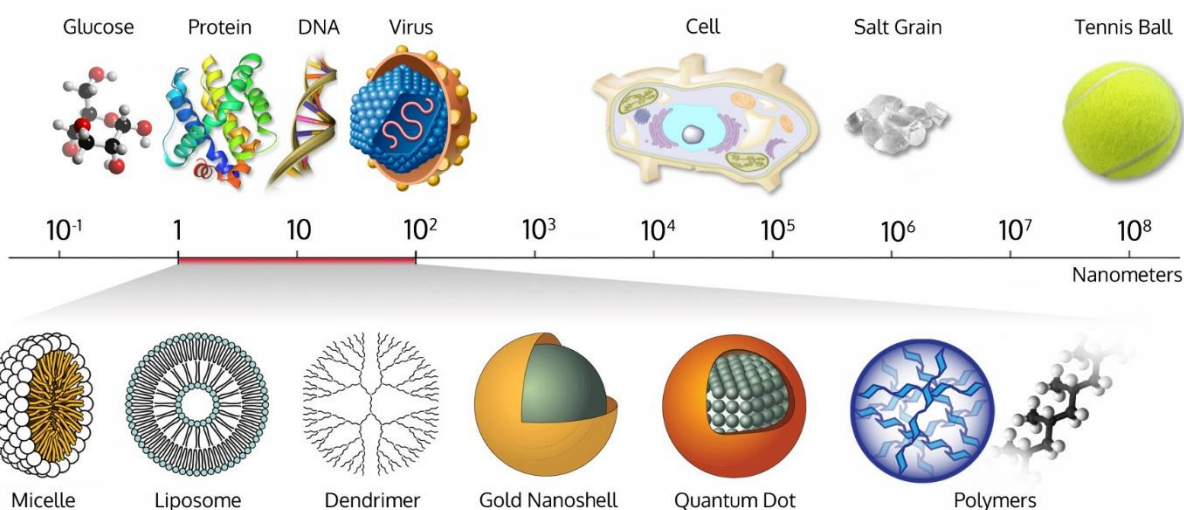
Prvu upotrebu koncepta u nanotehnologiji uveo je američki fizičar i dobitnik Nobelove nagrade, Richard Feynman 1959. god. u svom poznatom predavanju „*There's Plenty of Room at the Bottom*“.¹⁸ Tim predavanjem Feynman je potaknuo znanstvenike na razmišljanje o potencijalnim mogućnostima manipulacije pojedinačnih atoma kako bi stvorili nove materijale nanodimenzija.¹⁹ Pojam „nanotehnologija“ prvi je definirao profesor Norio Taniguchi 1974. god. : „Nanotehnologija se uglavnom sastoji od obrade, odvajanja, konsolidacije i deformacije materijala za jedan atom ili jednu molekulu“.¹⁸

Nanočestice, nanotube, nanokompoziti, nanokristali, fulereni i dendrimeri su tvorevine nanotehnologije koje imaju višestruku primjenu u industriji (kozmetička, poljoprivredna, farmaceutska, ...), biotehnologiji, elektronici i dr. Zbog njihove ubrzane proizvodnje povećana je njihova interakcija s biološkim sustavima, odnosno prisustvo u okolišu, te je iznimno važno provoditi istraživanja toksičnih učinaka nanomaterijala, procjene njihovih rizika te sigurnosti za ljude, životinje i okoliš.²⁰

Za proizvodnju nanočestica potencijalno manje opasnih za okoliš, ljude i životinje koriste se metode enzimske sinteze. Enzimskom sintezom eliminirana je upotreba kemikalija te je energetski manje zahtjevna. Tako dobivene nanočestice imaju veću specifičnu površinu, katalitički su aktivnije, a brzina njihova nastajanja i veličina ovise o procesnim parametrima: pH, temperatura, koncentracija supstrata.²¹ Pomoću enzima se mogu uspješno sintetizirati nanočestice u obliku tankih filmova, šupljih mikro i nano sfera, nanočestica, 2D i 3D uzoraka te biominerala. Zbog toga su enzimatske reakcije nastajanja nanočestica iznimno važne u zdravstveno istraživačkim područjima koja otvaraju mogućnost novih načina primjene nanočestica (npr. u terapiji i liječenju karcinoma).

2.2.1 Nanočestice

Europska komisija definirala je 2013. god. nanomaterijale i nanočestice na sljedeći način: „*Nanomaterijal je definiran kao prirodni, slučajni ili proizvedeni materijal, koji sadržava čestice u nevezanom, agregiranom ili aglomeriranom stanju u kojem 50 % ili više čestica, u jednolikoj veličinskoj raspodjeli, ima jednu ili više vanjskih dimenzija u rasponu od 1 do 100 nm. U posebnim uvjetima, gdje postoji zabrinutost za okoliš, zdravlje, sigurnost ili kompetitivnost, granica od 50 % se može pomaknuti na granicu od 1 do 50 %*“.²⁰ Na Slici 2.3 prikazana je skala veličina poznatih tvari u usporedbi s veličinama nanomaterijala.



Slika 2.3 Skala veličine tvari u usporedbi s veličinama nanomaterijala

Zbog nanodimenzija nanočestice imaju različita svojstva od istovrsnog materijala na makroskali, a moguća je i promjena nekih svojstava. Osnovne razlike između nanočestica i makromaterijala su sljedeće:

1. različita elektronska struktura
2. pri opisu fenomena, nanočestice koriste kvantno mehanički model, a makromaterijali klasični mehanički model
3. nanočestice imaju znatno veći omjer površine i volumena u odnosu na makromaterijale
4. gravitacijske sile su manje važne, prevladavaju elektromagnetske sile, a nasumično gibanje čestica ima veću važnost
5. struktura materijala nanočestica može biti drugačija od strukture makromaterijala¹⁷

Nanočestice imaju posebna fizikalno-kemijska svojstva koja se mogu podijeliti u tri grupe:

1. svojstva ovisna o površini čestica (katalitička moć nanočestica, kemijska reaktivnost nanočestica, Lotus učinak, površinska provodljivost oksida, ...)
2. svojstva ovisna o veličini čestica (optički transparentni slojevi - pigmenti, interferencijski učinci, superparamagnetizam, ...)
3. kvantni učinci ovisni o veličini čestica, koji se događaju pri prijelazu atoma ili molekula, točno određenih energetske razina u raspršene sastave atoma.²²

2.2.2 Nanočestice zlata

Nanočestice zlata se koriste od davnina zahvaljujući iznimnim, životopisnim bojama proizvedenim njihovom interakcijom s vidljivom svjetlosti. Topljivo zlato je nastalo u 4. ili 5. stoljeću prije Krista, u Egiptu i Kini. Vizualno najbolji primjer je Likurgov kalež (*Slika 2.4*). Kalež

prikazuje različito obojenje ovisno o načinu izlaganja svjetlosti. U transmisiji daje crvenu boju, dok u refleksiji daje zelenu boju. Koloidno zlato je zatim korišteno za izradu rubin stakla i za bojanje keramike. U Srednjem vijeku zlato postaje sve cjenjenije zbog primjene u medicinske svrhe.²³



Slika 2.4 Likurgov kalež u trenutku refleksije (lijevo) i transmisije (desno)¹⁷

Nanočestice zlata su jedne od najviše ispitivanih i najviše korištenih nanomaterijala zbog svoje stabilnosti i optičkih svojstava. Njihova površina se kemijski vrlo lako modificira, te su zbog toga idealni primjer sustava za ispitivanje fizikalnih i kemijskih svojstava metalnih nanočestica.

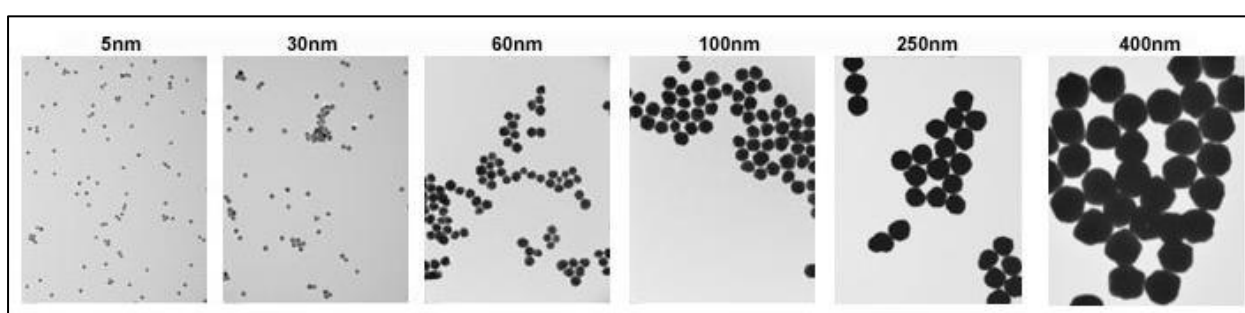
Boja nanočestica metala (Au, Ag, Cu, Al) različita je od boje metala u makroobliku i mijenja se s veličinom, oblikom i adsorpcijom stranih molekula na površinu nanočestice. Uzrok te pojave su rezonancije površinskih plazmona, odnosno površinskih elektromagnetskih valova.

Za male monodisperzne nanočestice zlata (~30nm), fenomen površinske plazmonske rezonancije uzrokuje apsorpciju svjetla u plavo-zelenom dijelu spektra (~450 nm) dok se crveno svjetlo (~700 nm) reflektira, dajući bogatu crvenu boju. Kako se veličina čestica povećava, valna duljina apsorpcije koja se odnosi na površinsku plazmonske rezonancije pomiče se na dulje, crvene valne duljine. Crveno svjetlo tada apsorbira i reflektira plavo svjetlo (*Slika 2.5*). S povećanjem veličina čestica, valne duljine rezonancije površinskog plazmona prelaze u IR dio spektra, dok se većina vidljivih valnih duljina reflektira, dajući nanočesticama bistru i prozirnu boju. Površinska plazmonska rezonancija može se podešavati promjenom veličine i oblika nanočestica, dovodeći do čestica željenih optičkih svojstava.²³



Slika 2.5 Boje monodisperznih zlatnih nanočestica različitih veličina
(od manje prema većoj)²³

Na *Slici 2.6* prikazane su različite veličine nanočestica zlata snimljene korištenjem transmisijskog elektronskog mikroskopa (TEM).



Slika 2.6 TEM slike od 5 nm (lijevo) do 400 nm (desno) nanočestica zlata²³

2.3 Modeliranje biotransformacija

Modeliranje je osnovno načelo reakcijskog inženjerstva. U današnje vrijeme modeliranje ima iznimnu ulogu kod enzimatskih reakcija, te konstantno raste. Tijekom provedbe procesa biotransformacije, velika pažnja se obraća na broj prisutnih parametara (temperatura, koncentracija enzima, supstrata, fizikalna i kemijska svojstva, ...). Modeliranjem odnosno odabirom odgovarajućeg matematičkog modela, te procjenom kinetičkih parametara istog, predviđa se ponašanje sustava, na temelju kojeg se određuje najpovoljniji tip reaktora te početni reakcijski uvjeti.⁴

Matematički modeli pokazuju veliku učinkovitost određivanja optimalnih radnih uvjeta s ciljem optimiranja produktivnosti i konverzije supstrata. Prilikom optimiranja procesa, simulacijama, pomoću modela, može se odrediti tijek reakcije u određenim uvjetima, te tako uštediti vrijeme i novac potreban za provođenje eksperimenta.

Matematički model procesa uključuje kinetički i reaktorski model, tj. bilance tvari komponente koje ovise o tipu reaktora.

2.3.1 Kinetički modeli enzimatskih reakcija

Kinetičkim modelima opisuje se ovisnost brzine reakcije o reakcijskim veličinama i parametrima. Enzimatske reakcije mogu biti jednosupstratne i dvosupstratne. Brzina enzimskih reakcija opisuje se Michaelis - Menteničinom kinetičkom jednadžbom.²⁴ Michaelis - Menteničina kinetika predstavlja ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata i enzima na temelju mehanizma prikazanih jednadžbama 2.1 i 2.2.



Kod jednosupstratnih reakcija u prvom koraku dolazi do brze reverzibilne reakcije enzima (E) i supstrata (S) pri čemu nastaje kompleks enzim-supstrat (ES) (*Jedn. 2.1*). Kompleks zatim kemijski reagira i dolazi do stvaranja produkta (P) odvojenog od enzima (E) (*Jedn. 2.2*).

Jednosupstratne enzimatske reakcije, koje slijede Michaelis - Menteničinu kinetiku karakterizira hiperbolička ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata (*Slika 2.7*) (*Jedn. 2.3*).

$$r = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s + c_s} \quad (2.3)$$

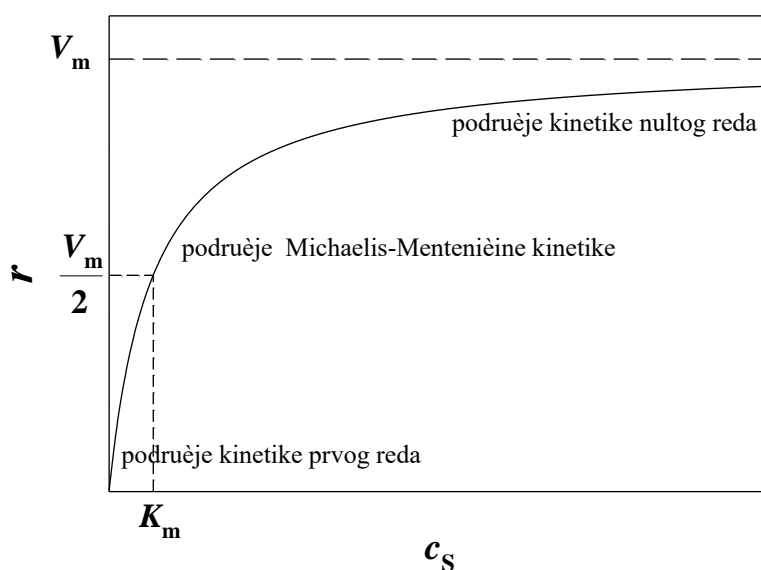
U navedenoj jednadžbi c_s označava koncentraciju supstrata, V_m je maksimalna brzina reakcije, a K_m^s Michaelis - Menteničina konstanta. Ključni parametri Michaelis - Menteničine kinetike su maksimalna brzina reakcije (V_m) koja ovisi o koncentraciji enzima (*Jedn. 2.4*) i Michaelis - Menteničina konstanta (K_m^s) (*Jedn. 2.5*) koja ovisi o konstantama brzina reakcija k_1 , k_2 i k_3 , prikazanih u jednadžbama mehanizma reakcije (*Jedn 2.1* i *2.2*).

$$V_m = k_2 \cdot E_0 \quad (2.4)$$

$$K_m^s = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (2.5)$$

Za Michaelis - Menteničinu ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata karakteristična su tri područja (*Slika 2.7*):

1. područje kinetike prvog reda
2. područje Michaelis - Menteničine kinetike
3. područje kinetike nultog reda



Slika 2.7 Grafički prikaz ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata za Michaelis - Menteničinu kinetiku

U području niske koncentracije supstrata, $c_s \ll K_m^s$, pri konstantnoj koncentraciji enzima, E , brzina reakcije je linearno proporcionalna koncentraciji supstrata, te se to područje aproksimira kinetikom reakcije 1. reda. U području visoke koncentracije supstrata, $c_s \gg K_m^s$, brzina reakcije ne ovisi o koncentraciji supstrata, te se to područje aproksimira kinetikom reakcije 0. reda. Područje između dva navedena, je Michaelis - Menteničino područje.

Dvosupstratna enzimatska kinetika opisuje enzimatske reakcije u kojem dolazi do reakcije dva supstrata. Drugi supstrat je najčešće koenzim.²⁵ Navedena dvosupstratna reakcija (*Jedn. 2.6*) opisuje se Michaelis - Menteničnim kinetičkim modelom (*Jedn. 2.7*), koja se ovisno o broju supstrata mijenja.



$$r = \frac{V_m \cdot c_{S_1} \cdot c_{S_2}}{(K_m^{S_1} + c_{S_1}) \cdot (K_m^{S_2} + c_{S_2})} \quad (2.7)$$

U biokatalitičkim reakcijama vrlo često dolazi do smanjenja aktivnosti enzima, koja se očituje smanjenjem brzine enzimatske reakcije zbog inhibicije reakcije. Inhibitor se veže za aktivno mjesto na enzimu i usporava brzinu reakcije. Inhibitor može biti supstrat ili produkt neke kemijske reakcije. Razlikujemo tri tipa inhibicije enzima²⁶:

1. Kompetitivna inhibicija (*Jedn. 2.8*) – inhibitor se veže na aktivno mjesto na enzimu, smanjujući na njemu koncentraciju supstrata, što rezultira smanjenjem brzine reakcije i povećanjem Michaelis - Menteničine konstante.

2. Nekompetitivna inhibicija (*Jedn. 2.9*) – inhibitor se ireverzibilno veže na mjesto različito od aktivnog, čime se mijenja oblik enzima te je na taj način ometano vezanje supstrata na aktivno mjesto enzima, što dovodi do smanjenja brzine enzimatske reakcije.
3. Antikompetitivna inhibicija (*Jedn. 2.10*) – kombinacija kompetitivne i nekompetitivne inhibicije.

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right) + c_s} \quad (2.8)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s + c_s \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (2.9)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{(K_m^s + c_s) \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (2.10)$$

Osim promjenom aktivnosti enzima, smanjenje brzine enzimatske reakcije moguće je i zbog deaktivacije enzima. Uzroci deaktivacije mogu biti: temperatura, pH, tlak, denaturacija proteina, brzina miješanja i dr. Brzina deaktivacije enzima opisuje se kinetikom prvog i drugog reda.²⁶

2.3.2 Reaktorski modeli

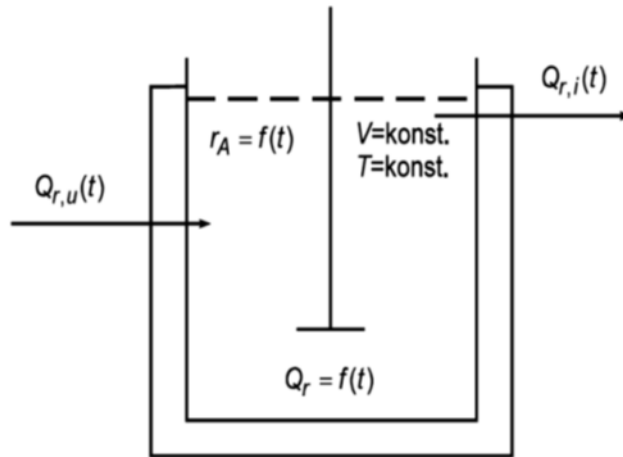
Bioreaktori su kemijski reaktori u kojima se odvijaju bioprocesi. Koriste se za proizvodnju biomase i bioprodukata pomoću mikroorganizama ili životinjskih stanica, te za biotransformacije pomoću enzima. Bioreaktore dijelimo na fermentatore i enzimatske reaktore. Kod fermentatora se reakcije odvijaju uz žive mikroorganizme ili njihove stanice, dok se kod enzimatskih reaktora odvijaju procesi katalizirani enzimima. Postoje različiti tipovi bioreaktora, no osnovna tri su: kotlasti (šaržni) reaktor, protočno kotlasti i cijevni reaktor.

Kriteriji za odabir bioreaktora su: tip reakcijskog medija, tip kinetike i oblik biokatalizatora. Važno je da bioreaktor bude optimiran kako bi se postigla što bolja produktivnost, odnosno da se proizvede što više produkata po jedinici vremena, jedinici enzimatske aktivnosti biokatalizatora i jedinici vremena.²⁷

Kotlasti (šaržni / *batch*) reaktor je zatvoreni sustav u kojem tijekom reakcije ne dolazi do izmjene tvari s okolinom. U reaktoru se ostvaruje približno idealno miješanje te je sastav reakcijske smjese u svakoj točki isti. U kotlastom reaktoru sve veličine stanja (sastav reakcijske smjese, brzina kemijske reakcije, količina oslobođene i utrošene topline) ovise o vremenu, odnosno on radi u nestacionarnom stanju. Pretpostavlja se izotermni rad jer je temperatura jedina veličina koja se u reaktoru ne mijenja, te pretpostavka da je volumen reakcijske smjese stalan i nezavisan o vremenu tj. da ne dolazi do promijene gustoće.²⁸

Kotlasti reaktor se najčešće koristi u industriji, za reakcije u kapljevitoj fazi te za proizvodnju manjih količina produkata na umjerenim tlakovima i temperaturama. Pogodan je za reakcijske sustave koji nisu inhibirani niti supstratom niti produktom.²⁹

Na *Slici 2.8* prikazan je idealni kotlasti reaktor s naznačenim najvažnijim značajkama.



Slika 2.8 Shematski prikaz kotlastog reaktora ²⁸

Bilanca tvari za kotlasti reaktor, uz pretpostavku idealnog miješanja, opisana je *Jedn. 2.11*.

$$r_A \cdot V = -\frac{d(V \cdot c_A)}{dt} \quad (2.11)$$

S pretpostavkom da je i volumen reakcijske smjese stalan i neovisan o vremenu, *Jedn. 2.11* glasi:

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

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Aparatura

3.1.1 Analitička vaga

Sve potrebne mase tvari u čvrstom agregatnom stanju koje su bile potrebne za provođenje eksperimenata vagane su na analitičkoj vagi *Shimadzu* (Slika 3.1).



Slika 3.1 Analitička vaga *Shimadzu*

3.1.2 pH-metar

Za pripravu pufera korišten je pH metar *Schott* (Slika 3.2).



Slika 3.2 pH-metar *Schott*

3.1.3 Kotlasti reaktor

U ovom radu svi eksperimenti su provedeni u kotlastim reaktorima, reakcijske smjese volumena 1, 2,5 i 3 mL u termostatiranoj tresilici (Slika 3.3) na temperaturi od 37 °C bez prisustva

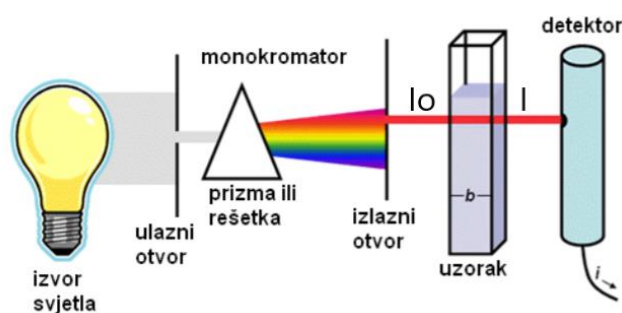
svjetlosti, bez miješanja i bez kisika, u 0,1 M fosfatnom puferu pH ~ 5,5 za eksperimente s glukozom i pH ~ 7 za eksperimente s celobiozom.



Slika 3.3 Termostatirana tresilica

3.1.4 Spektrofotometar

Različite molekule apsorbiraju zračenje različitih valnih duljina. Analiza spektra elektromagnetskog zračenja provodi se spektrofotometrom, koji mjeri količinu svjetla koju apsorbira određeni uzorak, odnosno mjeri apsorbanciju kao funkciju valne duljine svjetlosti. Kada svjetlo prolazi kroz uzorak, dio se apsorbira, a dio propušta. Spektrofotometar se sastoji od izvora zračenja, monokromatora i detektora (*Slika 3.4*) te mjeri neapsorbirano ili propušteno zračenje, odnosno intenzitet svjetla koje je prošlo kroz uzorak (I), te ga uspoređuje sa intenzitetom ulaznog svjetla (I_0).



Slika 3.4: Shematski prikaz spektrofotometra ³⁰

Apsorpcija svjetlosti kroz otopinu opisuje se matematički, Lambert-Beerovim zakonom (*Jedn. 3.1*), gdje ABS predstavlja apsorpciju na određenoj valnoj duljini svjetlosti, ϵ je molarni apsorpcijski koeficijent [$L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$], karakterističan za svaku molekulsku vrstu i ovisan o valnoj

duljini svjetlosti, b predstavlja duljinu puta svjetlosti kroz otopinu [cm] , a c je koncentracija tvari u otopini [mol L⁻¹]

$$ABS = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (3.1)$$

U ovom radu korišten je spektrofotometar *Shimadzu UV-1800* (Slika 3.5) za praćenje nastanka nanočestica zlata.



Slika 3.5: Spektrofotometar Shimadzu UV-1800

3.1.5 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Analitička metoda, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je oblik kromatografije na stupcu, koji se koristi za razdvajanje komponenata. Sastoji se od mobilne i stacionarne faze. HPLC radi na način da se određena količina uzorka injektira u mobilnu fazu, koja pod visokim tlakom putuje kroz kolonu punjenu stacionarnom fazom. Interakcije uzorka i mobilne faze sa stacionarnom fazom određuju brzinu eluiranja i separaciju komponenata u uzorku. Vrijeme koje je potrebno da analizirana tvar dođe do kraja stupca, ovisi o stacionarnoj i mobilnoj fazi te o prirodi analizirane tvari, a naziva se vrijeme zadržavanja, odnosno retencijsko vrijeme. Što je retencijsko vrijeme manje, kromatogram je bolji, a to se postiže korištenjem visokog tlaka. Nakon kolone uzorak ulazi u UV-detektor koji mjeri apsorpciju svjetla na određenoj valnoj duljini ili RI-detektor koji mjeri razliku indeksa loma otopine s analitom i reference, što rezultira karakterističnim signalom u kromatogramu. Učinkovitost separacije spojeva ovisi o primjeni odgovarajuće stacionarne i mobilne faze, te o brzini eluiranja. U ovom radu korišten je *Shimadzu* modularni sustav (Slika 3.6), a korištene su:

1. *Carbohydrate Ca²⁺ Resin* kolona (CS Chromatographie Service GmbH, 300 x 6,5 mm) za određivanje ugljikohidrata (celobioze i glukoze). Kao mobilna faza korištena je je

voda protoka $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, na temperaturi $80 \text{ }^\circ\text{C}$ s trajanjem analize 10 minuta. Retencijska vremena komponenata su:

- RT (celobioza) = $\sim 4,8 \text{ min}$
- RT (glukoza) = $\sim 5,9 \text{ min}$

Korišten detektor je RID detektor (*Refractive Index Detector*)

2. *Hypersil APS* kolona (Hewlett Packard, $5\mu\text{m}$, $200 \times 4,6 \text{ mm}$) za određivanje glukonske kiseline i glukonolaktona. Korišteni eluent je kisela voda (voda zakiseljena perklornom kiselinom pH 2,10 – 2,15) protoka $0,9 \text{ mL min}^{-1}$, na temperaturi od $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Retencijska vremena komponenata su:

- RT (glukonolakton) = $\sim 2,8 \text{ min}$
- RT (glukonska kiselina) = $\sim 4,4 \text{ min}$

Korišten je UV detektor na valnoj duljini $\lambda = 210 \text{ nm}$.



Slika 3.6: Shema HPLC-a

3.1.6 Centrifuga

Centrifuga *Hettich Universal 320R* (*Slika 3.7*) je korištena za odvajanje čestica zlata i pripremu uzorka za sušenje radi mogućnosti daljnje karakterizacije. Uzorci su centrifugirani na 14 000 okretaja po minuti, na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od $t=5 \text{ min}$, nakon čega su ispirani redestiliranom vodom i ponovno centrifugirani na navedeni način. Postupak ispiranja proveden je 3 puta.



Slika 3.7: Centrifuga Hettich Universal 320R

3.1.7 Liofilizator

Liofilizator je uređaj za sušenje uzoraka. Radi na način da uzorak prolazi kroz dvije faze sušenja, primarnu i sekundarnu fazu. U primarnoj fazi uzorak je u smrznutom stanju (od $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) tijekom kojeg se u sustav dovodi toplina te se iz uzorka uklanja slobodna voda. U sekundarnoj fazi sušenja je sušenje iz tekućeg stanja, te dolazi do uklanjanja vezane vode. Kemijski sastav, biološko – fiziološka i senzorna svojstva uzoraka ostaju nepromijenjena. Liofilizator se primjenjuje u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (ekstrakti kave, voćnih sokova, začina, antibiotici, ...) te za čuvanje proteina, enzima, mikroorganizama. U ovom radu korišten je liofilizator *LABCONCO Free Zone* (Slika 3.8) za sušenje sintetiziranih nanočestica zlata, koje se dalje mogu analizirati, primjerice pretražnim elektronskim mikroskopom.



Slika 3.8: Liofilizator LABCONCO Free Zone

3.2 Analitičke metode

3.2.1 Određivanje koncentracije glukoze i celobioze

Koncentracija glukoze i celobioze određivana je na HPLC uređaju. Korištena je *Carbohydrate Ca²⁺ Resin* kolona duljine $l = 30$ cm pri temperaturi od 80 °C, kao stacionarna faza. Kao mobilna faza tj. eluent, korištena je voda protoka $q = 0,8$ mL min⁻¹. Mjerenja su provedena na RID detektoru.

Za određivanje koncentracije glukoze i celobioze u uzorcima, napravljeni su baždarni dijagrami gdje je izmjerena površina pikova na kromatogramu (A) točno određenih koncentracija pojedinih komponenata (*Prilog 1 i 2*).

3.2.2 Određivanje koncentracije glukonolaktona i glukonske kiseline

Za određivanje glukonolaktona i glukonske kiseline korišten je HPLC uređaj s *Hypersil APS* kolonom duljine $l = 20$ cm, kao stacionarnom fazom. Kao eluent korištena je kisela voda pH 2,15 (pH podešen s HClO₄), $q = 0,9$ mL min⁻¹, na temperaturi od 30 °C. Korišten je UV detektor na valnoj duljini $\lambda = 210$ nm.

Za određivanje koncentracije glukonolaktona i glukonske kiseline u uzorcima, napravljeni su baždarni dijagrami gdje je izmjerena površina pikova na kromatogramu (A) točno određenih koncentracija pojedinih komponenata (*Prilog 3 i 4*).

3.2.3 Određivanje apsorpcijskog spektra nanočestica zlata

Na UV – VIS spektrofotometru mjeren je apsorpcijski spektar nanočestica zlata u rasponu od 300 do 700 nm, tijekom određenog vremena. Karakteristični pikovi od 500 do 550 nm ukazuju na nastanak nanočestica zlata. Mjerenja su provedena u kvarcnim kivetama.

3.2.4 Određivanje koncentracije NADH

Transformacija koenzima NAD⁺ u NADH, odnosno rast apsorbancije tijekom 695 h praćen je na UV – VIS spektrofotometru na valnoj duljini od 340 nm, na kojoj NADH apsorbira svjetlo. Eksperimenti su provedeni u kvarcnim kivetama.

3.3 Kinetička mjerenja

3.3.1 Kinetika enzima *Gc* GDH i *Mt* CDH

Kinetika enzima *Gc* GDH za reakciju oksidacije glukoze i *Mt* CDH za reakciju oksidacije celobioze (*Slika 1.1*) ispitana je u 0,1 M dušificiranom fosfatnom puferu pH 7 za *Mt* CDH i pH 5,5 za *Gc* GDH, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja, na temperaturi od 37 °C. Mjerenja su provedena u kotlastom reaktoru, volumena reakcijske smjese 2,5 mL, pri konstantnoj koncentraciji enzima *Gc* GDH od 0,006 mg mL⁻¹ i enzima *Mt* CDH od 0,06 mg mL⁻¹. Mjerena je

početna brzina reakcije pri različitim početnim koncentracijama glukoze i celobioze u rasponu od 0,2 do 15 mM. Za svaku reakciju uzimano je 9 uzoraka tijekom 240 min. Reakcijska smjesa bez enzima termostatirana je 2 min. te je uzet 0. uzorak. Zatim je dodan enzim čime je aproksimiran početak reakcije. Volumen od 200 μ L uzorka uziman je iz reaktora u određenim vremenskim razmacima, profiltriran radi uklanjanja enzima, odnosno zaustavljanja reakcije i smrznut do analize. Na HPLC-u uz *Carbohydrate Ca²⁺ Resin* kolonu određene su koncentracije glukoze i celobioze, dok je na *Hypersil APS* koloni određena koncentracija glukonolaktona i glukonske kiseline u slučaju praćenja kinetike enzima *Gc GDH*.

Korištenjem izraza za promjenu koncentracije u ovisnosti o vremenu reakcije, izračunata je specifična aktivnost enzima A_s [U mg⁻¹] (Jedn. 3.2), pomoću koje su procijenjeni parametri reakcijske kinetike.

$$A_s = \frac{\frac{dc_{(supstrat)/(produkt)}}{dt}}{c_{Mt CDH/Gc GDH}} \quad (3.2)$$

3.3.2 Utjecaj iona zlata na kinetiku *Gc GDH*

Utjecaj iona zlata na kinetiku enzima *Gc GDH* ispitivan je u kotlastom reaktoru, volumena reakcijske smjese 2,5 mL. Reakcijski medij je dušificirani 0,1 M fosfatni pufer pH vrijednosti 5,5. Koncentracija glukoze ($c(\text{glukoza}) = 15 \text{ mM}$) i enzima ($c(\text{Gc GDH}) = 0,006 \text{ mg mL}^{-1}$) je konstantna, dok je koncentracija HAuCl_4 varirana u rasponu od 0 do 0,55 mM. Reakcija je provedena na 37 °C bez miješanja. Reakcijska smjesa bez dodanog enzima termostatirana je 2 minute te je uzet prvi uzorak od 200 μ L iz reaktora u plastične epruvete volumena 2 mL. Uzorak je centrifugiran te je odvojeni supernatant profiltriran u vialu i smrznut do analize. Početak reakcije aproksimirao se dodatkom enzima u reaktor, a preostali uzorci uzimani su iz reaktora na opisan način tijekom 28 h (9 uzoraka).

3.3.3 Utjecaj iona zlata na kinetiku *Mt CDH*

Utjecaj iona zlata na kinetiku enzima *Mt CDH* ispitivan je analogno ispitivanju utjecaja iona zlata na kinetiku *Gc GDH*, ali u fosfatnom puferu pH vrijednosti 7. Koncentracija celobioze ($c(\text{celobioza}) = 15 \text{ mM}$) i enzima ($c(\text{Mt CDH}) = 0,06 \text{ mg mL}^{-1}$) je konstantna dok je koncentracija HAuCl_4 varirana u intervalu od 0 do 0,55 mM.

3.4 Sinteza nanočestica zlata

3.4.1 Kontrolni eksperimenti sinteze nanočestica zlata uz enzim *Gc* GDH

Kontrolni eksperimenti sinteze nanočestica zlata uz enzim *Gc* GDH provedeni su bez prisustva svjetlosti u 0,1 M dušificiranom fosfatnom puferu (pH 5,5) na 37 °C bez miješanja kombiniranjem komponenata reakcijske smjese: 0,3 mg mL⁻¹ enzima *Gc* GDH, 0,55 mM HAuCl₄ te 1 mM glukoze. Provedeno je 7 različitih eksperimenata (*Tablica 3.1*). Mjerenjem spektra u području od 300 do 700 nm na UV – VIS spektrofotometru određeno je u kojim je eksperimentima došlo do sinteze nanočestica zlata. Uzorci su u prvih nekoliko sati trajanja reakcije intenzivnije ispitivani, no kasnije su praćeni svakih 24 h sve do 264 h. Volumen reakcijske smjese iznosio je 1 mL.

Tablica 3.1 Komponente reakcijske smjese

| REAKTOR | KOMPONENTE REAKTORA |
|----------------|--|
| 1. | <i>Gc</i> GDH+glukoza+ HAuCl ₄ +pufer |
| 2. | <i>Gc</i> GDH+glukoza+pufer |
| 3. | <i>Gc</i> GDH+pufer |
| 4. | <i>Gc</i> GDH+HAuCl ₄ +pufer |
| 5. | glukoza+HAuCl ₄ +pufer |
| 6. | glukoza+pufer |
| 7. | HAuCl ₄ +pufer |

3.4.2 Kontrolni eksperimenti sinteze nanočestica zlata uz enzim *Mt* CDH

Kontrolni eksperimenti sinteze nanočestice zlata uz enzim *Mt* CDH također su provedeni u dušificiranom fosfatnom puferu (pH 7) na temperaturi od 37 °C bez miješanja kombiniranjem komponenata reakcijske smjese: 0,3 mg mL⁻¹ *Mt* CDH, 0,55 mM HAuCl₄, te 0,7 mM celobioze. Provedeno je pet eksperimenata s različitim komponentama reakcije (*Tablica 3.2*). Uzorci su ispitivani 144 h, svakih 24 h mjerenjem spektra u području od 300 do 700 nm na UV – VIS spektrofotometru gdje je određeno u kojim je eksperimentima došlo do sinteze nanočestica zlata. Volumen reakcijske smjese u svim eksperimentima je iznosio 200 µL.

Tablica 3.2 Komponente reakcijske smjese

| REAKTOR | KOMPONENTE REAKTORA |
|----------------|---|
| 1. | <i>Mt</i> CDH+celobioza+HAuCl ₄ +pufer |
| 2. | celobioza+HAuCl ₄ +pufer |
| 3. | <i>Mt</i> CDH+HAuCl ₄ +pufer |
| 4. | HAuCl ₄ +pufer |
| 5. | <i>Mt</i> CDH+celobioza+pufer |

3.4.3 Sinteza nanočestica zlata uz enzim *Gc* GDH i koenzim NAD⁺

U kotlastom reaktoru, reakcijske smjese volumena 2,5 mL, pri temperaturi od 37 °C bez miješanja, u mraku i dušificiranom 0,1 M fosfatnom puferu provedena je reakcija sinteze praćena tijekom 720 h. Sastav reaktora je bio: 0,1 M fosfatni pufer, 1 mM NAD⁺, 0,55 mM HAuCl₄, 0,3 mg mL⁻¹ *Gc* GDH te 1 mM glukoze. Dodatkom enzima *Gc* GDH u reaktor pokretala se reakcija. U prvih 10 min trajanja reakcije intenzivnije je praćena aktivnost koncentracije NADH na 340 nm. Tijekom određenog vremena (10, 15, 30 min, 24, 48h, ...) uziman je 1 mL iz reaktora te je izmjeren spektar (od 300 do 700 nm) za praćenje nastanka nanočestica zlata i vrijednosti apsorbancije (*ABS*) na 340 nm kako bi se pratilo transformiranje koenzima NAD⁺ u NADH.

3.4.4 Sinteza nanočestica zlata katalizirana enzimima *Gc* GDH i *Mt* CDH

Nakon određene enzimatske kinetike i utjecaja iona zlata na kinetiku, u svrhu validacije modela i sinteze veće količine nanočestica zlata provedeni su eksperimenti sinteze nanočestica zlata katalizirani enzimima *Gc* GDH i *Mt* CDH.

Uvjeti provođenja eksperimenta su isti kao i uvjeti kod praćenja kinetike, a to su dušificirani 0,1 M fosfatni pufer (pH 7 za enzim *Mt* CDH i pH 5,5 za enzim *Gc* GDH), bez miješanja i bez prisustva svjetlosti na temperaturi od 37 °C. Za provođenje eksperimenta volumen reakcijske smjese kotlastog reaktora je bio 2,5 mL, a koncentracije komponenata navedene su u *Tablici 3.3*.

Tablica 3.3 Koncentracije komponenata u reaktoru

| | <i>Gc</i> GDH | | <i>Mt</i> CDH |
|--|----------------------|--|----------------------|
| <i>c</i> (glukoza) [mM] | 1 | <i>c</i> (celobioza) [mM] | 0,7 |
| <i>c</i> (HAuCl ₄) [mM] | 0,55 | <i>c</i> (HAuCl ₄) [mM] | 0,55 |
| <i>c</i> (<i>Gc</i> GDH) [mg mL ⁻¹] | 0,3 | <i>c</i> (<i>Mt</i> CDH) [mg mL ⁻¹] | 0,3 |
| <i>c</i> (PBS pH ~ 5,5) [M] | 0,1 | <i>c</i> (PBS pH ~ 7) [M] | 0,1 |

Uzorci za praćenje nastanka nanočestica zlata i potrošnje supstrata uzimani su u određenim vremenskim intervalima (5, 30, 24, 48 h, ...) na način opisan u *Poglavlju 3.3.1*, a dodatno su izmjereni apsorpcijski spektri u području od 300 do 700 nm, na UV – VIS spektrofotometru. Reakcija je praćena tijekom 144 h u slučaju kada je korišten enzim *Gc* GDH, odnosno 168 h kada je korišten enzim *Mt* CDH.

Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa sa zlatom je centrifugirana. Dobivene čestice zlata ispirane su redestiliranom vodom i ponovno centrifugirane na isti način, te je postupak ponovljen 3 puta, a zatim su sušene tijekom 24 h u liofilizatoru.

3.4.5 Obrada rezultata

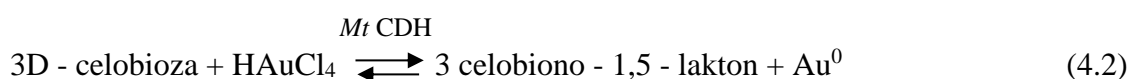
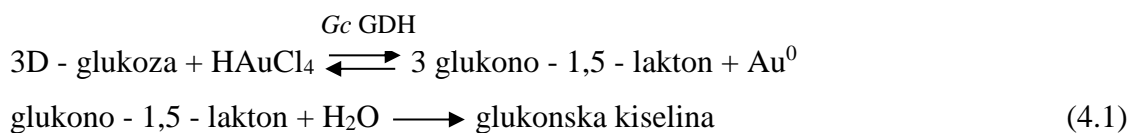
Eksperimentalni podaci obrađeni su u programskom paketu *Scientist*. Provedena je simulacija na temelju napisanog modela i dobivenih eksperimentalnih podataka. Kinetički parametri procijenjeni su nelinearnom regresijom uz metodu najmanjih kvadrata i simpleks metodu. Parametri se procjenjuju s ciljem pronalaženja minimalnog zbroja kvadrata greške između seta eksperimentalnih podataka i seta podataka izračunatih pomoću modela.

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

Procijenjeni parametri kao što su maksimalna brzina reakcije, Michaelis – Mentničina konstanta i konstanta inhibicije procijenjeni su iz kinetičkih mjerenja odnosno iz ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji. Navedeni parametri korišteni su za simulacije pomoću modela, tj. za predviđanje promjena koncentracija produkata i reaktanata s vremenom u reaktorskom sustavu.

4 MATEMATIČKI MODEL

Matematički model sinteze nanočestica zlata katalizirane enzimima *Gc* GDH i *Mt* CDH sastoji se od kinetičkih i bilancnih jednadžbi. Matematički model razvijen je korištenjem procijenjenih kinetičkih parametara i reakcijske sheme prikazane *Jedn. 4.1* i *4.2*.



4.1 Kinetički model

Kinetika reakcije oksidacije glukoze uz enzim *Gc* GDH i i celobioze uz *Mt* CDH opisana je jednosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom (*Jedn. 4.3* i *4.4*).

$$r_{\text{glukoza}} = \frac{V_m \cdot c_{\text{glukoza}}}{K_m^{\text{glukoza}} + c_{\text{glukoza}}} \quad (4.3)$$

$$r_{\text{celobioza}} = \frac{V_m \cdot c_{\text{celobioza}}}{K_m^{\text{celobioza}} \cdot c_{\text{celobioza}}} \quad (4.4)$$

Kinetika istih reakcija, ali uz prisutnost iona zlata opisana je Michaelis – Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom ionima zlata (*Jedn. 4.5* i *4.6*).

$$r_{\text{Au-glukoza}} = \frac{V_m \cdot c_{\text{glukoza}}}{K_m^{\text{glukoza}} \cdot \left(\frac{1+c_{\text{Au}^{3+}}}{K_i^{\text{Au}^{3+}}} \right) + c_{\text{glukoza}}} \quad (4.5)$$

$$r_{\text{Au-celobioza}} = \frac{V_m \cdot c_{\text{celobioza}}}{K_m^{\text{celobioza}} \cdot \left(\frac{1+c_{\text{Au}^{3+}}}{K_i^{\text{Au}^{3+}}} \right) + c_{\text{celobioza}}} \quad (4.6)$$

4.2 Reaktorski model

Za sintezu nanočestica zlata uz reakciju oksidacije celobioze uz *Mt* CDH reaktorski model se sastoji od bilancnih jednadžbi za trošenje celobioze (*Jedn. 4.7*), trošenje iona zlata u otopini (*Jedn. 4.8*) te za nastajanje nanočestica zlata (*Jedn. 4.9*).

$$\frac{dc_{celobioza}}{dt} = -r_{Au-celobioza} \quad (4.7)$$

$$\frac{d_{Au^{3+}}}{dt} = -\frac{r_{Au-celobioza}}{3} \quad (4.8)$$

$$\frac{d_{Au-NP_s}}{dt} = \frac{r_{Au-celobioza}}{3} \cdot k \quad (4.9)$$

Brzina inaktivacije enzima u reaktoru opisana je kinetikom prvog reda (*Jedn. 4.10*), a konstanta deaktivacije je procijenjena iz eksperimentalnih podataka.

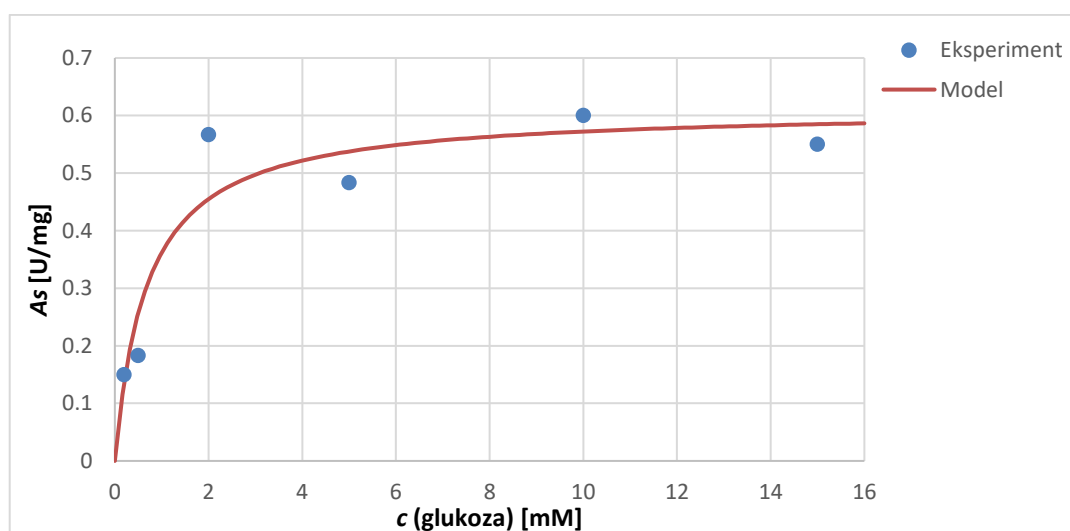
$$\frac{dA_{MtCDH}}{dt} = -k_{d,MtCDH} \cdot A_{MtCDH} \quad (4.10)$$

5 REZULTATI I RASPRAVA

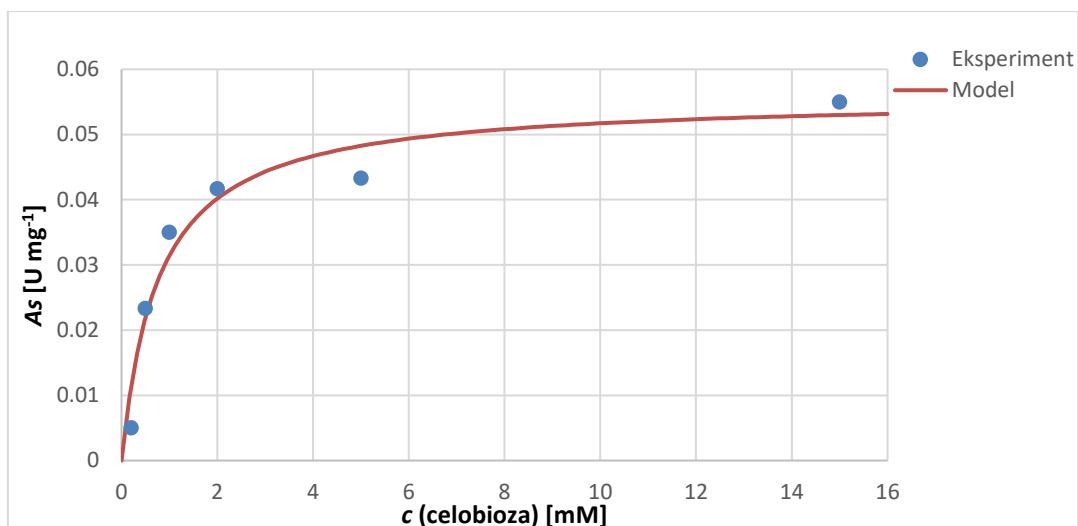
U ovom radu provedena je enzimatska sinteza nanočestica zlata katalizirana enzimima *Gc* GDH i *Mt* CDH. Svrha rada bila je ispitati mogućnosti enzimatske sinteze nanočestica zlata uz navedene enzime i odrediti njihovu kinetiku te ih matematičkim modelom opisati.

5.1 Kinetika enzima *Gc* GDH i *Mt* CDH

Kinetika enzima *Gc* GDH je određena u reakciji oksidacije glukoze pri čemu kao produkti nastaju glukonolakton koji potom spontano hidrolizira u glukonsku kiselinu dok je kinetika enzima *Mt* CDH određena u reakciji oksidacije celobioze. Iz rezultata promjene koncentracije supstrata odnosno produkta u vremenu izračunata je specifična aktivnost enzima A_s [U mg^{-1}], pomoću *Jedn. 3.2*. Reakcijska kinetika je prikazana kao ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentraciji glukoze i celobioze. Rezultati su prikazani *Slikom 5.1* i *Slikom 5.2*.



Slika 5.1 Ovisnost specifične aktivnosti enzima *Gc* GDH o koncentraciji glukoze (dušificirani fosfatni pufer pH 5,5, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(\text{Gc GDH}) = 0,006 \text{ mg mL}^{-1}$)



Slika 5.2 Ovisnost specifične aktivnosti enzima *Mt* CDH o koncentraciji celobioze (dušificirani fosfatni pufer pH 7, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(Mt\ CDH) = 0,06\ mg\ mL^{-1}$)

Eksperimentalno dobiveni podaci za specifičnu aktivnost oba enzima u navedenim uvjetima vrlo dobro se slažu s podacima dobivenim simulacijom u programskom paketu *Scientist* korištenjem Michaelis – Menteničine kinetike (*Jedn. 4.3 i 4.4*), stoga možemo zaključiti da pretpostavljena Michaelis – Menteničina kinetika vrlo dobro opisuje ove reakcije. U *Scientist*-u su nelinearnom regresijom procijenjeni i parametri Michaelis – Menteničine kinetike te su dani u *Tablici 5.1*.

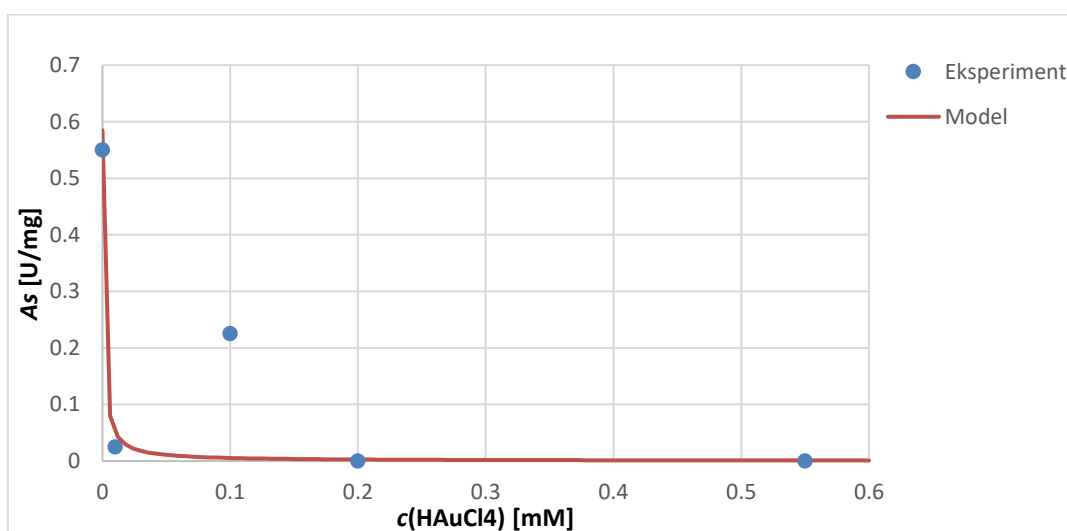
Tablica 5.1 Parametri Michaelis – Menteničine kinetike procijenjeni u *Scientist* -u

| Procijenjeni parametri | <i>Gc</i> GDH | <i>Mt</i> CDH |
|-------------------------|---------------|---------------|
| $V_m [U\ mg^{-1}]$ | 0,6118 | 0,0557 |
| $K_m^s [mmol\ dm^{-3}]$ | 0,6901 | 0,7736 |

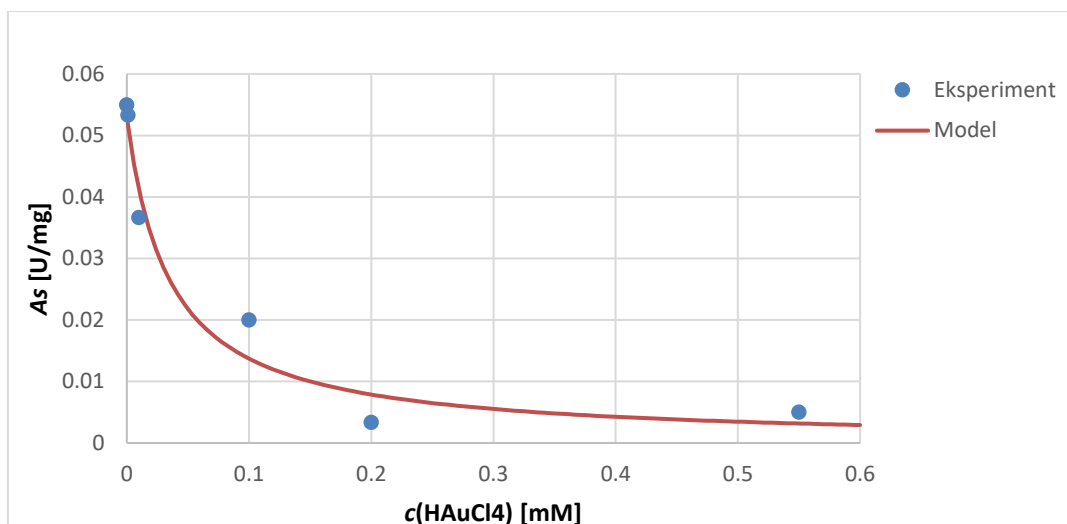
Vrijednost maksimalne brzine reakcije, V_m , je veća u sustavu s enzimom *Gc* GDH. Michaelis – Menteničina konstanta, K_m^s , opisuje afinitet enzima prema supstratu. Što je njegova vrijednost niža, enzim će biti specifičniji za određeni supstrat. U provedenim eksperimentima vrijednost Michaelis – Menteničine konstante je u oba sustava približno jednaka, tj niska, čime zaključujemo da je enzim *Gc* GDH specifičan za glukozu, a *Mt* CDH za celobiozu.

5.2 Utjecaj iona zlata na kinetiku enzima *Gc* GDH i *Mt* CDH

Utjecaj iona zlata na aktivnost enzima *Gc* GDH i *Mt* CDH, odnosno na početnu reakcijsku brzinu, pri sintezi nanočestica zlata određen je mjerenjem specifične aktivnosti enzima *Gc* GDH i *Mt* CDH u ovisnosti o različitim koncentracijama Au^{3+} iona. Mjerenja su također provedena u dušificiranom fosfatnom puferu, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri $37\text{ }^\circ\text{C}$, uz stalnu koncentraciju enzima, $c(\textit{Gc GDH}) = 0,006\text{ mg mL}^{-1}$ i $c(\textit{Mt CDH}) = 0,06\text{ mg mL}^{-1}$, stalnu koncentraciju glukoze i celobioze od 15 mM , te koncentraciju HAuCl_4 u rasponu od $0 - 0,55\text{ mM}$. Dobiveni rezultati prikazani su kao ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentraciji HAuCl_4 te su prikazani na *Slikama 5.3* i *5.4*.



Slika 5.3 Ovisnost specifične aktivnosti enzima *Gc* GDH o koncentraciji HAuCl_4 (dušificirani fosfatni pufer pH 5,5, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri $37\text{ }^\circ\text{C}$, $c(\textit{Gc GDH}) = 0,006\text{ mg mL}^{-1}$)



Slika 5.4 Ovisnost specifične aktivnosti enzima *Mt* CDH o koncentraciji HAuCl_4 (dušificirani fosfatni pufer pH 7, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri $37\text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{Mt CDH}) = 0,06\text{ mg mL}^{-1}$)

Može se vidjeti da u oba slučaja porastom koncentracije HAuCl_4 dolazi do opadanja specifične aktivnosti enzima, no u slučaju s *Gc* GDH dolazi do značajnijeg pada specifične aktivnosti već pri nižim koncentracijama HAuCl_4 . Inhibicija je opisana Michaelis - Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom. Konstante inhibicije su prema izrazima (*Jedn. 4.5 i 4.6*) procijenjene nelinearnom regresijom u *Scientist*-u, a njihove vrijednosti su dane u *Tablici 5.2*.

Tablica 5.2 Konstante inhibicije ionima zlata procijenjene u *Scientist*-u

| Procijenjeni parametri | <i>Gc</i> GDH | <i>Mt</i> CDH |
|----------------------------|----------------------|---------------|
| $K_i[\text{mmol dm}^{-3}]$ | $4,17 \cdot 10^{-5}$ | 0,00171 |

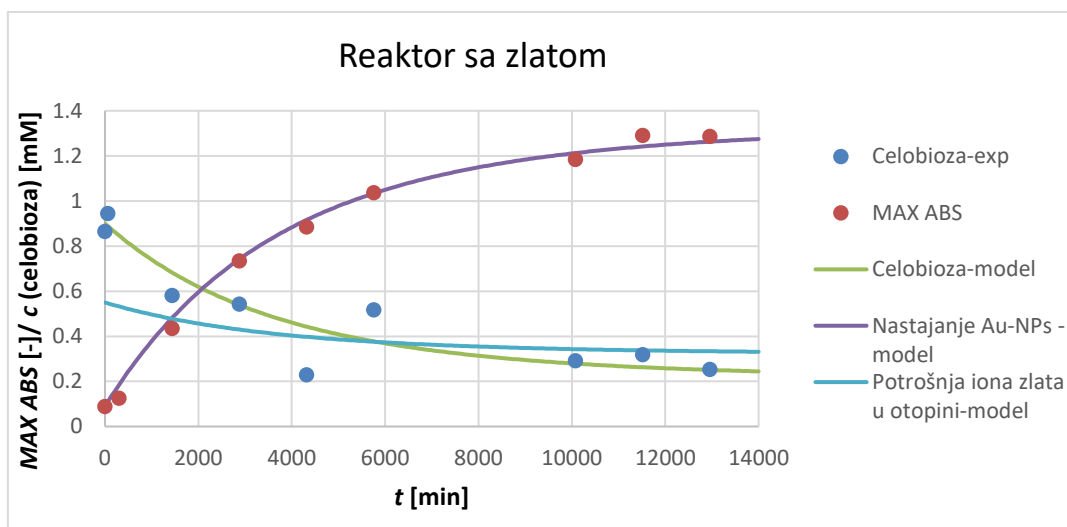
Vidljivo je da je inhibicija Au^{3+} ionima u sustavu s *Gc* GDH znatno veća nego u sustavu s *Mt* CDH. Iz navedenog se može zaključiti da će dodatkom iona zlata u otopinu reakcija oksidacije glukoze uz *Gc* GDH biti potpuno zaustavljena.

5.3 Sintaza nanočestica zlata katalizirana enzimom *Mt* CDH

Nakon procijenjenih kinetičkih parametara za kinetiku enzima *Mt* CDH, provedena je sinteza nanočestica zlata uz enzim *Mt* CDH u prisutnosti soli HAuCl_4 i celobiozu.

Tijekom reakcije praćena je koncentracija celobioze te su određeni maksimumi apsorbancije pri valnoj duljini od 530 do 540 nm.

Dobiveni rezultati prikazani su kao ovisnost koncentracije celobioze i maksimalne apsorbancije o vremenu trajanja reakcije. Na *Slici 5.5* prikazana je usporedba eksperimentalno dobivenih vrijednosti i podataka dobivenih simulacijom pomoću programskog paketa *Scientist*.



Slika 5.5 Rezultati dobiveni sintezom nanočestica zlata (dušificirani fosfatni pufer pH 7, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(Mt\ CDH) = 0,3\ \text{mg mL}^{-1}$)

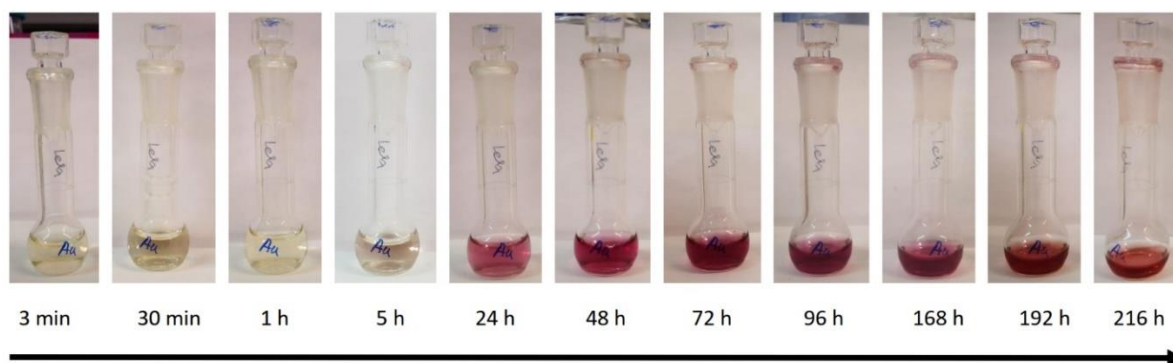
Prema prikazanim rezultatima možemo zaključiti da se pretpostavljeni matematički model za sintezu nanočestica zlata, uz enzim *Mt CDH* i HAuCl_4 , vrlo dobro slaže s eksperimentalnim podacima prilikom provođenja u navedenim uvjetima. Također se zaključuje da je kinetika nastajanja nanočestica zlata povezana za kinetikom oksidacije celebioze. Procijenjeni kinetički parametri dani su u *Tablici 5.3*.

Tablica 5.3 Procijenjeni kinetički parametri

| Procijenjeni parametri | |
|--------------------------|---------|
| $k_d\ [\text{min}^{-1}]$ | 0,00019 |
| k | 5,4267 |

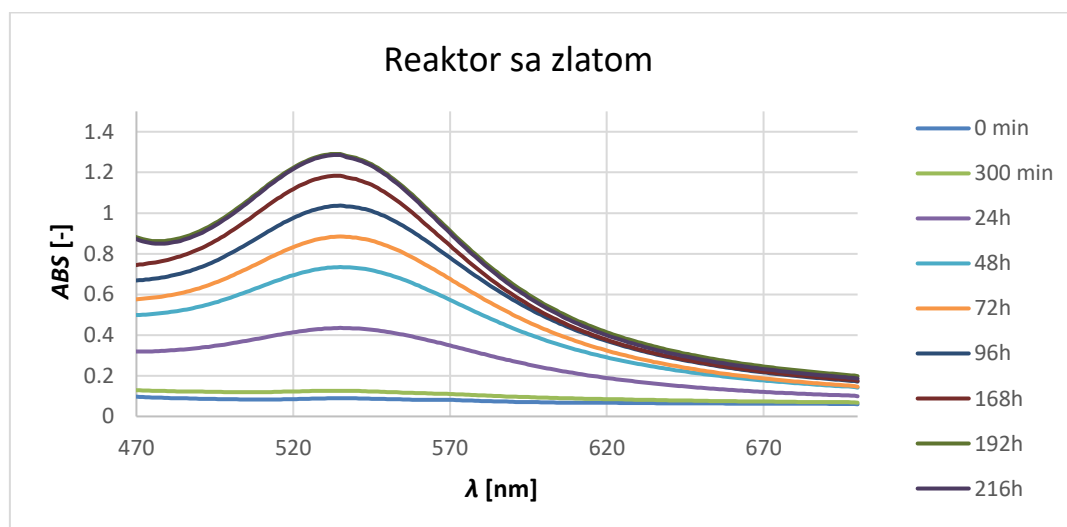
Uočeno je da pri provođenju reakcije sinteze nanočestica zlata uz *Mt CDH* dolazi do blage deaktivacije enzima, te je ista opisana kinetikom prvog reda (*Jedn. 4.10*), a konstanta deaktivacije k_d je procijenjena iz eksperimentalnih rezultata. Konstanta proporcionalnosti, k , predstavlja odnos između vrijednosti trošenja iona zlata i maksimalnih apsorbancija u valnom području od 531 do 537 nm koja su direktna mjera nastanka nanočestica zlata.

Na *Slici 5.6* prikazani su reaktori u različitim vremenima tijekom provođenja reakcije. Vidljiva je promjena boje u reaktoru s porastom vremena provođenja reakcije. Roza obojenje otopine je pokazatelj nastanka nanočestica zlata. Intenzivnije obojenje reakcijske otopine praćeno je i porastom maksimalne apsorbancije (*Slika 5.7*) što ukazuje na povećanje koncentracije nastalih nanočestica zlata.



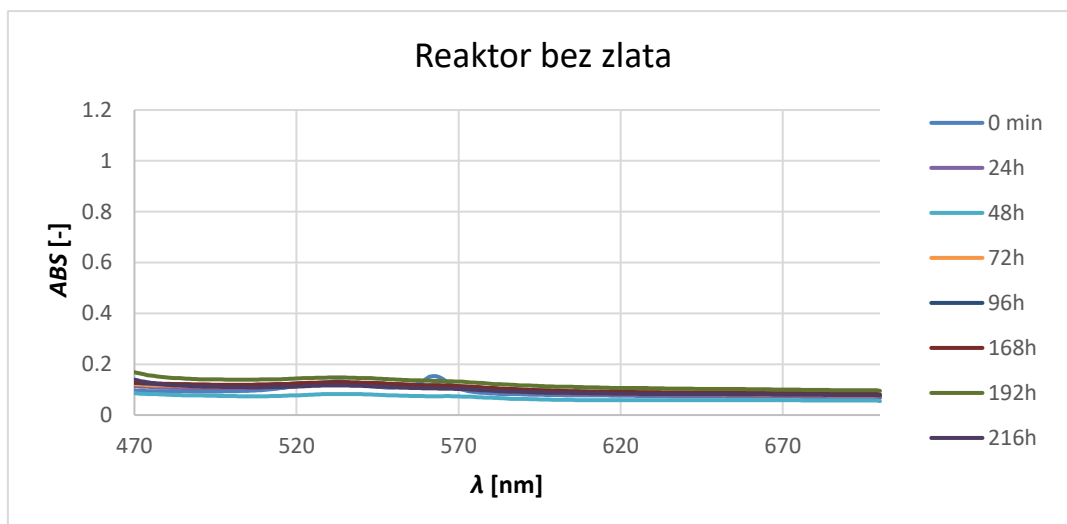
Slika 5.6 Kotlasti reaktori sa zlatom u različitim vremenima provođenja reakcije (dušificirani fosfatni pufer pH 7, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(\text{Mt CDH}) = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$)

Osim promijene boje, nastanak nanočestica zlata možemo vidjeti mjereći spektar na UV-VIS spektrofotometru. Pikovi između 500 i 550 nm, nastali nakon 24 h provođenja reakcije, potvrđuju prisustvo nanočestica zlata (*Slika 5.7*).

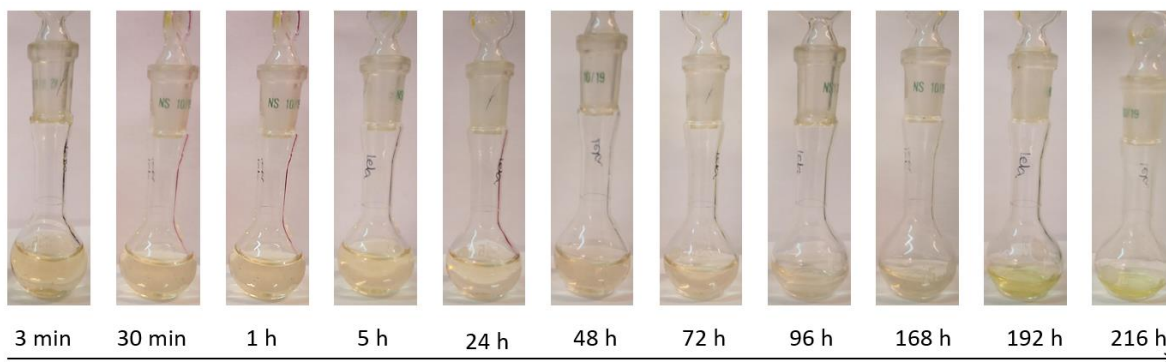


Slika 5.7 Rezultati dobiveni mjerenjem spektra na UV-VIS spektrofotometru kao ovisnost apsorbancije o valnoj duljini (dušificirani fosfatni pufer pH 7, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(\text{Mt CDH}) = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$)

Pored navedenog eksperimenta napravljen je i kontrolni eksperiment bez iona zlata u kojem je praćen UV - VIS spektar tijekom provođenja reakcije. U istome nije uočeno nastajanje nikakvog pika u valnom području između 500-550 nm niti obojenja reakcijske smjese. (Slika 5.8 i Slika 5.9).



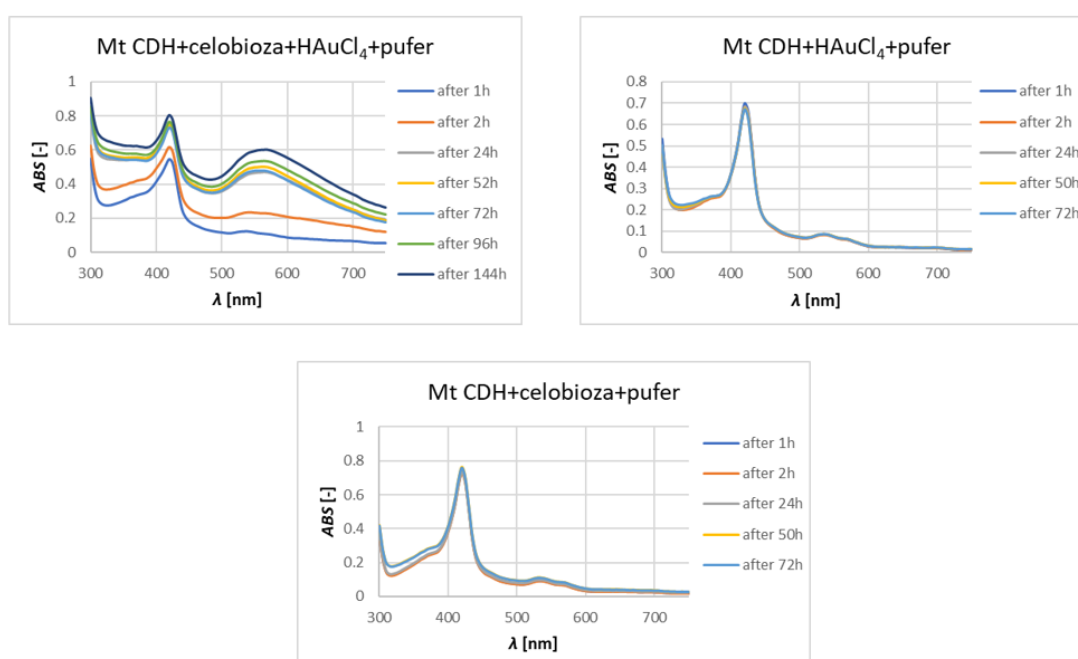
Slika 5.8 Rezultati dobiveni mjerenjem spektra na UV-VIS spektrofotometru kao ovisnost apsorbancije o valnoj duljini (dušificirani fosfatni pufer pH 7, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(\text{Mt CDH}) = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$)



Slika 5.9 Kotlasti reaktori bez zlata u različitim vremenima provođenja reakcije (dušificirani fosfatni pufer pH 7, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(\text{Mt CDH}) = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$)

5.4 Kontrolni eksperimenti sinteze nanočestice zlata katalizirane enzimom *Mt* CDH

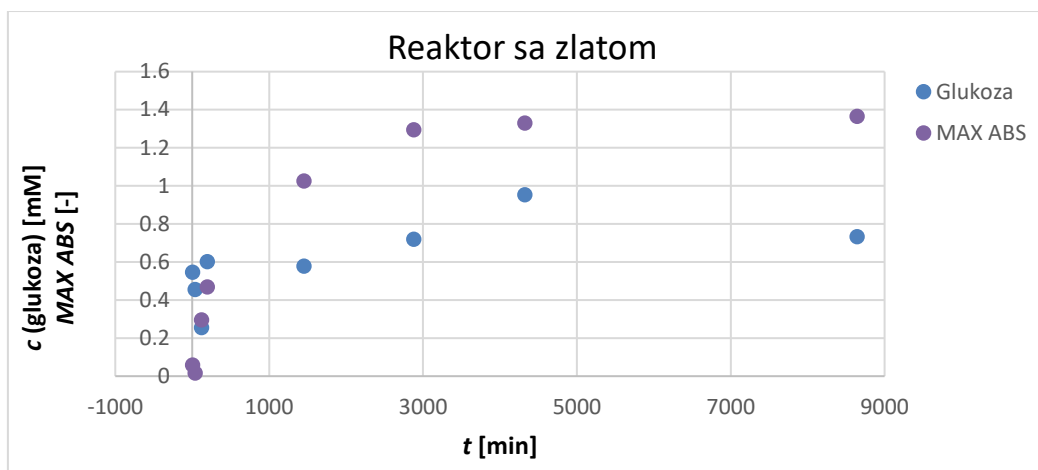
U kontrolnim eksperimentima pratio se nastanak nanočestica zlata u različitim kombinacijama (Tablica 3.2). Nakon 144 h reakcije su zaustavljene. Obojene otopine znak su prisutnosti nanočestica, a na UV – VIS spektrofotometru snimljen je spektar od 300 do 700 nm, gdje pikovi od 500 do 550 nm odgovaraju prisutnosti nanočestica zlata (Slika 5.10). Nastanak nanočestica primijećen je samo u reaktoru sa svim komponentama (*Mt* CDH + celobioza + HAuCl_4 + pufer), te je kao i u kinetici potvrđeno da je mehanizam zlatnih nanočestica uz CDH isključivo vezan uz kinetiku reakcije oksidacije celebioze uz CDH.



Slika 5.10 Rezultati dobiveni mjerenjem spektra na UV - VIS spektrofotometru kao ovisnost apsorbancije o valnoj duljini u kontrolnim eksperimentima (dušificirani fosfatni pufer pH 7, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(\text{Mt CDH}) = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$)

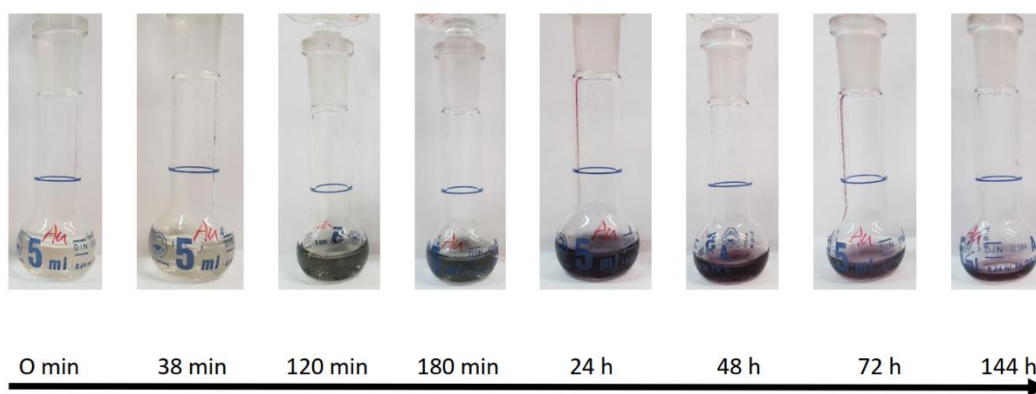
5.5 Sinteza nanočestica zlata katalizirana enzimom *Gc* GDH

Nakon procijenjenih kinetičkih parametara za kinetiku enzima *Gc* GDH, provedeni su eksperimenti sinteze nanočestice zlata uz enzim *Gc* GDH i zlato u obliku soli HAuCl_4 i glukozu. Dobiveni rezultati prikazani su kao ovisnost koncentracija glukoze i maksimalne apsorbancije o vremenu trajanja reakcije (Slika 5.11).



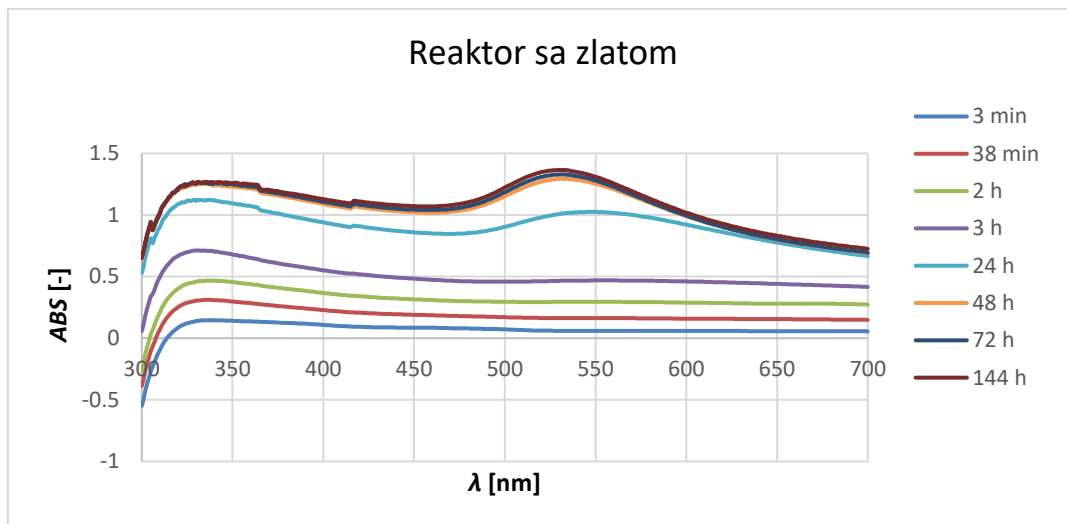
Slika 5.11 Rezultati dobiveni sintezom nanočestica zlata (dušificirani fosfatni pufer pH 5,5, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(\text{Gc GDH}) = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$)

Na *Slici 5.11* vidljivo je da tijekom provođenja reakcije ne dolazi do promjene koncentracije glukoze. Maksimalna apsorbancija, u valnom području od 529 do 550 nm, s vremenom trajanja reakcije raste što ukazuje da dolazi do nastanka nanočestica zlata, no navedena reakcija nije vezana uz reakciju razgradnje glukoze. Naime u kinetičkim mjerenjima uočena je značajna inhibicija reakcije oksidacije glukoze s ionima zlata, te je ovim eksperimentom i potvrđeno da ioni zlata potpuno zaustavljaju reakciju. Unatoč navedenom došlo je nastajanja nanočestica zlata. Naime poznato je da aminokiseline koji su sastavni dio proteina mogu uspješno provesti redukciju iona zlata. Nastanak nanočestica zlata potvrđen je i promjenom boje reakcijske otopine (*Slika 5.12*).



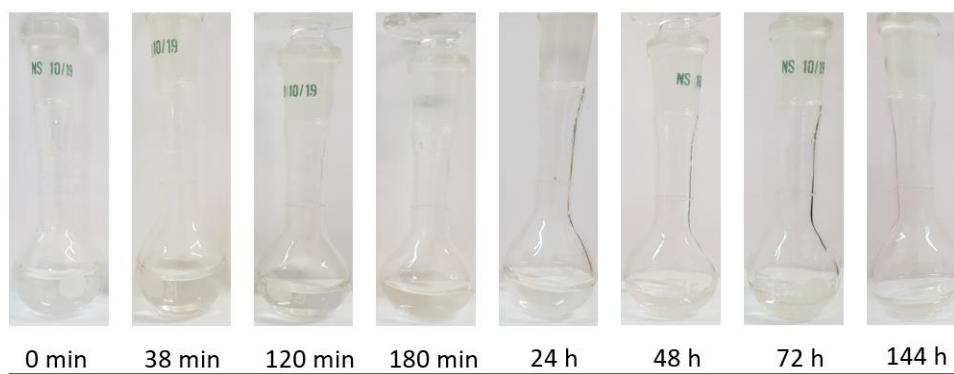
Slika 5.12 Kotlasti reaktori sa zlatom u različitim vremenima provođenja reakcije (dušificirani fosfatni pufer pH 5,5, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(\text{Gc GDH}) = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$)

Na UV - VIS spektrofotometru izmjeren je apsorpcijski spektar u području od 300 do 700 nm, te su uočeni karakteristični pikovi u području 500-550 nm, nakon 24 h provođenja reakcije, posljedica nastajanja nanočestica zlata (*Slika 5.13*).

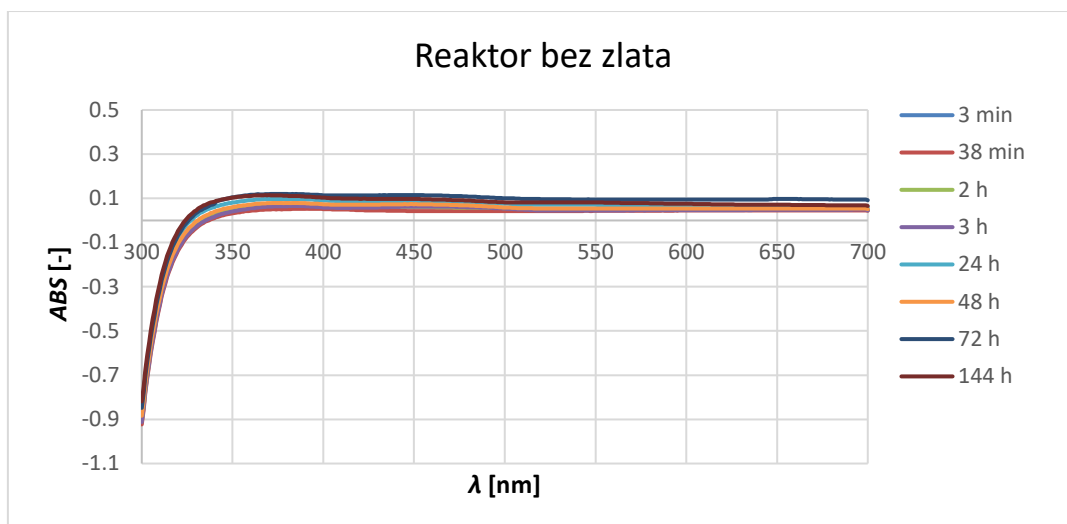


Slika 5.13 Rezultati dobiveni mjerenjem spektra na UV - VIS spektrofotometru kao ovisnost apsorpcije o valnoj duljini (dušificirani fosfatni pufer pH 5,5, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(\text{Gc GDH}) = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$)

U kontrolnom reaktoru bez zlata tijekom provođenja reakcije ne dolazi do obojenja otopine (*Slika 5.14*), a apsorpcijski spektri prikazani *Slikom 5.15* to potvrđuju.



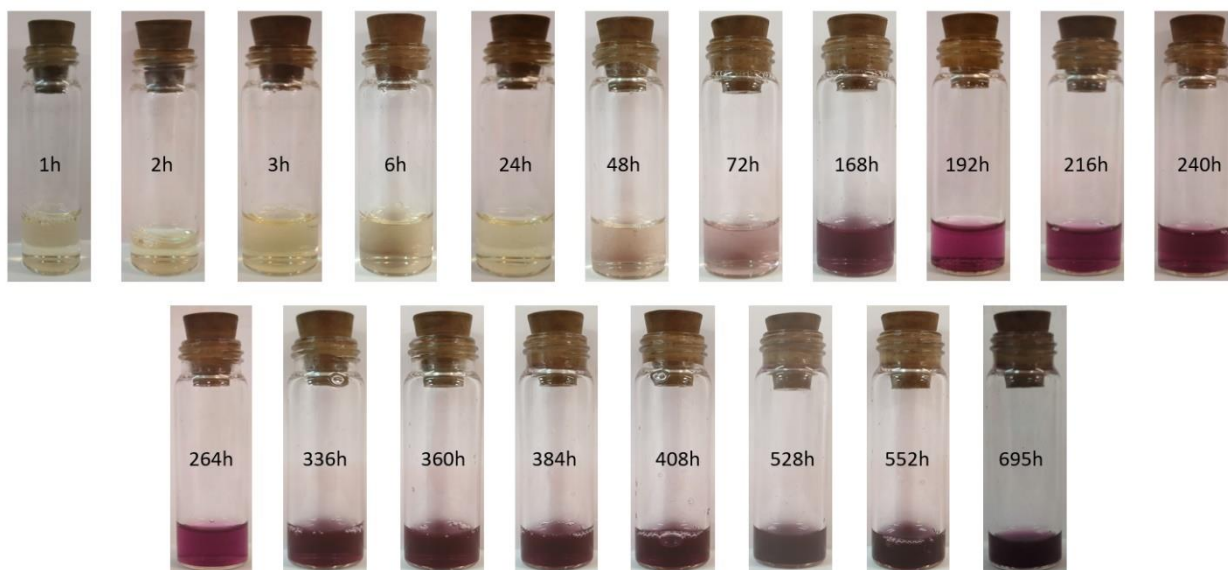
Slika 5.14 Kotlasti reaktori bez zlata u različitim vremenima provođenja reakcije (dušificirani fosfatni pufer pH 5,5, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(\text{Gc GDH}) = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$)



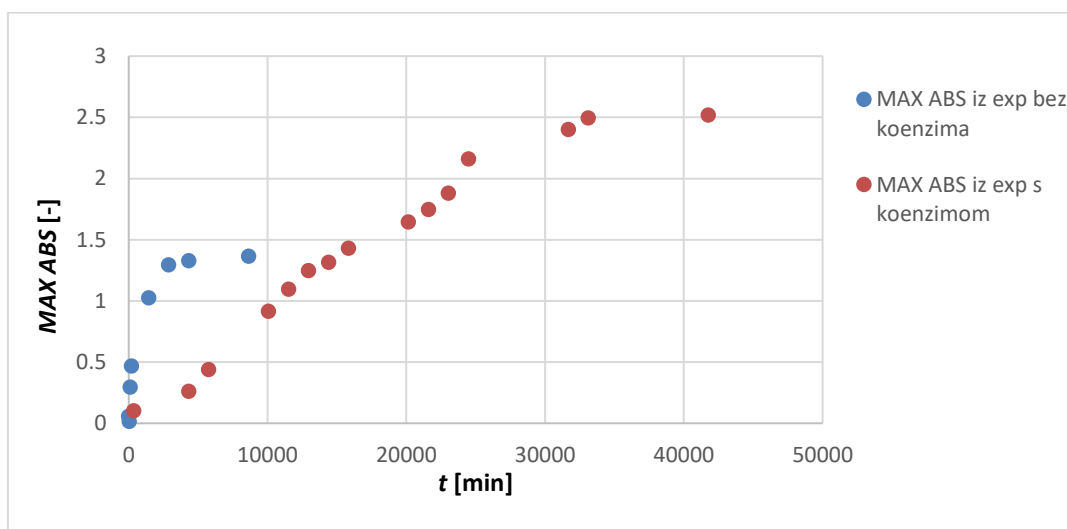
Slika 5.15 Rezultati dobiveni mjerenjem spektra na UV - VIS spektrofotometru kao ovisnost apsorbanije o valnoj duljini (dušificirani fosfatni pufer pH 5,5, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(\text{Gc GDH}) = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$)

5.6 Sinteza nanočestica zlata katalizirana enzimom Gc GDH uz koenzim NAD^+

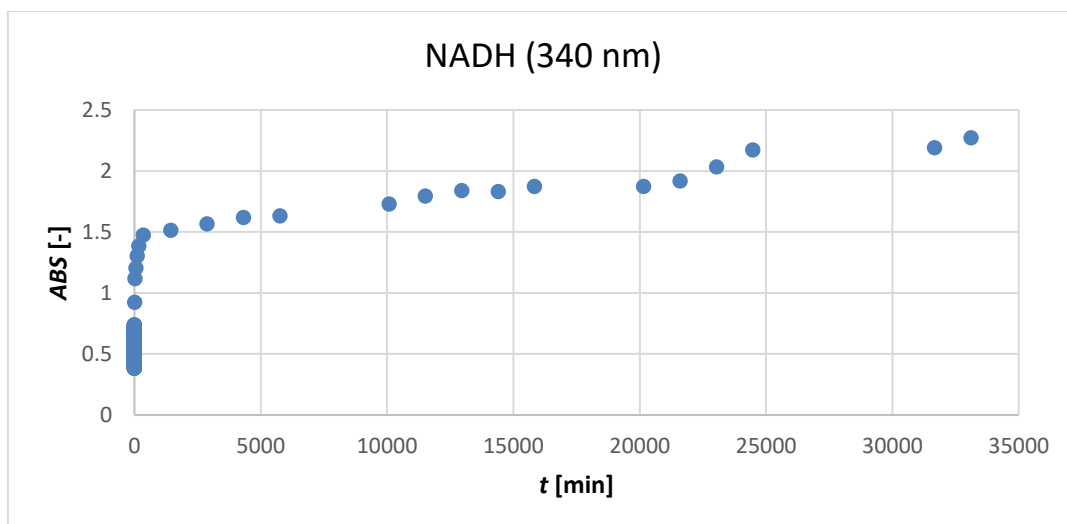
Proveden je eksperiment sinteze nanočestica zlata katalizirane enzimom Gc GDH uz koenzim NAD^+ . Naime NAD^+ je koenzim koji se upotrebljava kao redukcijsko sredstvo u reakciji oksidacije glukoze, te se željelo ispitati da li će kinetika reakcije imati poveznicu s kinetikom nastajanja nanočestica. Reakcija je praćena 695 h, a obojenje reakcijske smjese se pratilo kao znak nastanka nanočestica zlata (Slika 5.16). Prema dobivenim rezultatima, na Slici 5.17 vidljivo je da nanočestice zlata nastaju brže u reakciji bez koenzima NAD^+ , no u konačnici, u reakciji s koenzimom NAD^+ (prema vrijednostima određenih maksimalnih apsorbancija) nastaje puno više nanočestica zlata. Tijekom reakcije praćena je transformacija koenzima NAD^+ u NADH na 340 nm kao direktan pokazatelj kinetike reakcije. Na Slici 5.18 prikazan je rast apsorbancije tj. nastajanje NADH tijekom 695 h. Iz navedenog se može zaključiti da kinetika reakcije nije povezana s kinetikom nastajanja nanočestica zlata. Naime NAD^+ se puno brže reducira nego što nastaju nanočestice zlata. Veća koncentracija nanočestica zlata je vjerojatno zbog prisutnosti koenzima NADH koji je dokazan kao uspješan reducens prilikom sinteze zlatnih nanočestica.³¹



Slika 5.16 Nastanak nanočestica zlata u reakciji sa koenzimom NAD^+ (dušificirani fosfatni pufer pH 5,5, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri $37\text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{Gc GDH}) = 0,3\text{ mg mL}^{-1}$, $c(\text{NAD}^+) = 1\text{ mM}$)

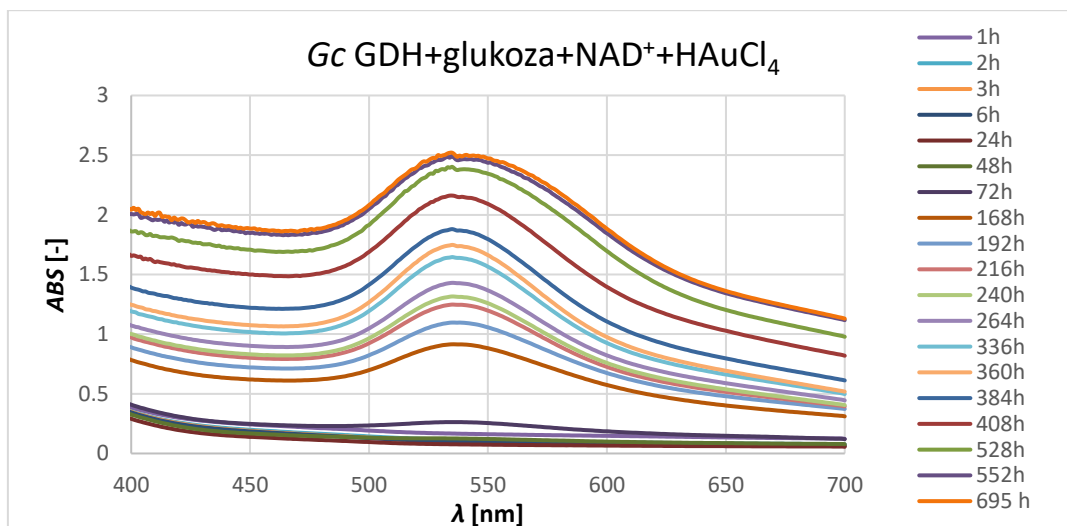


Slika 5.17 Usporedba maksimalne apsorbancije iz eksperimenta sinteze nanočestica zlata sa i bez NAD^+ koenzima (dušificirani fosfatni pufer pH 5,5, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri $37\text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{Gc GDH}) = 0,3\text{ mg mL}^{-1}$, $c(\text{NAD}^+) = 1\text{ mM}$)



Slika 5.18 Praćenje transformiranja NAD^+ u NADH prikazano kao ovisnost apsorbancije na 340 nm o vremenu (dušificirani fosfatni pufer pH 5,5, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri $37\text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{Gc GDH}) = 0,3\text{ mg mL}^{-1}$, $c(\text{NAD}^+) = 1\text{ mM}$)

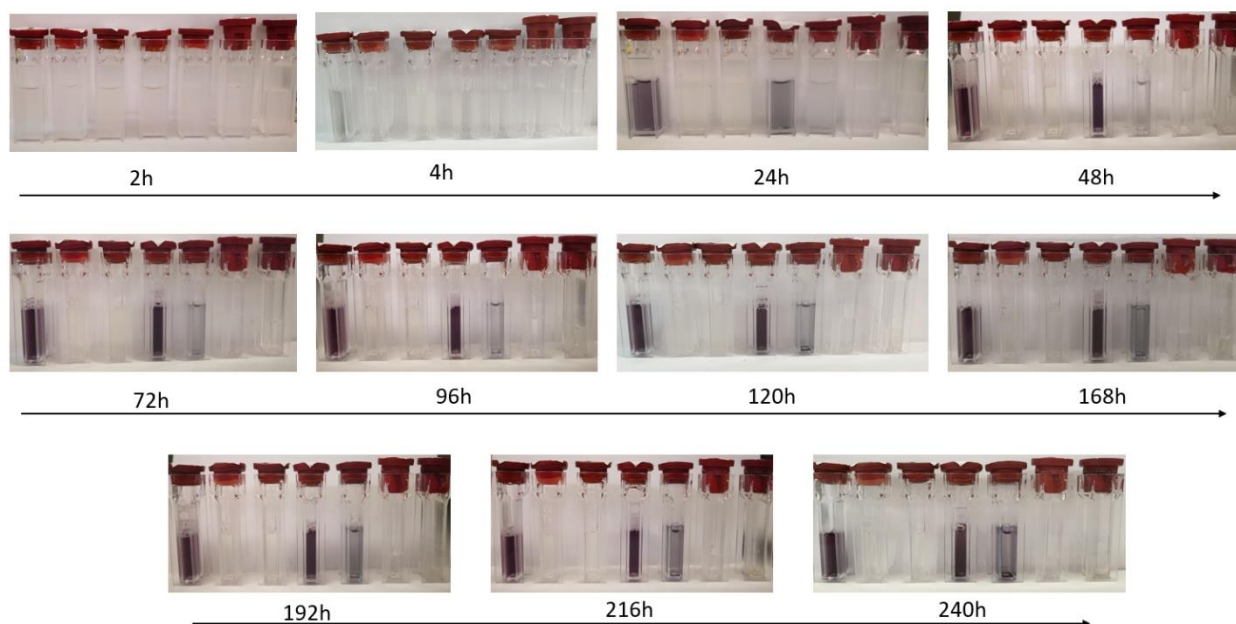
Tijekom 695 h trajanja reakcije izmjereni su spektri na UV - VIS spektrofotometru (*Slika 5.19*) u različitim vremenskim intervalima, te pikovi između 500 i 550 nm potvrđuju nastanak nanočestica zlata.



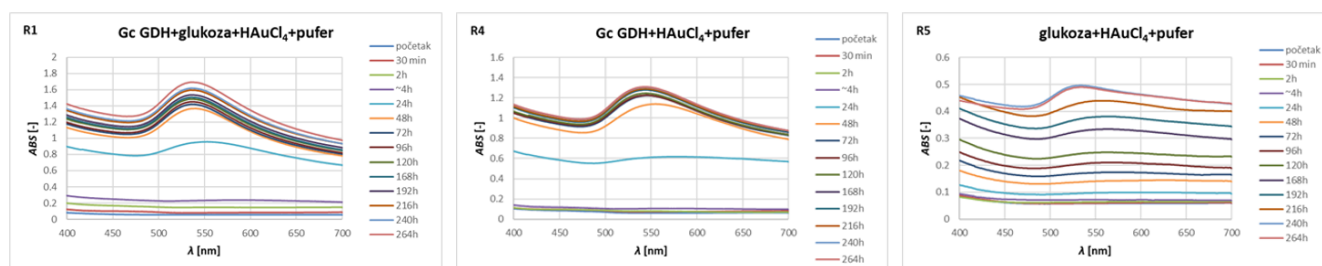
Slika 5.19 Rezultati dobiveni mjerenjem spektra na UV - VIS spektrofotometru kao ovisnost apsorbancije o valnoj duljini (dušificirani fosfatni pufer pH 5,5, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri $37\text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{Gc GDH}) = 0,3\text{ mg mL}^{-1}$, $c(\text{NAD}^+) = 1\text{ mM}$)

5.7 Kontrolni eksperimenti sinteze nanočestica zlata katalizirane enzimom Gc GDH

Kontrolni eksperimenti provedeni su zbog isključenja nastanka nanočestica zlata u drugim mogućim kombinacijama (Tablica 3.1). Reakcije su praćene 240 h. Obojenja prisutna u reaktorima 1, 4 i 5 (Slika 5.20) i pikovi spektra između 500 i 550 nm, snimljeni na UV - VIS spektrofotometru, potvrđuju nastanak nanočestica zlata (Slika 5.21).



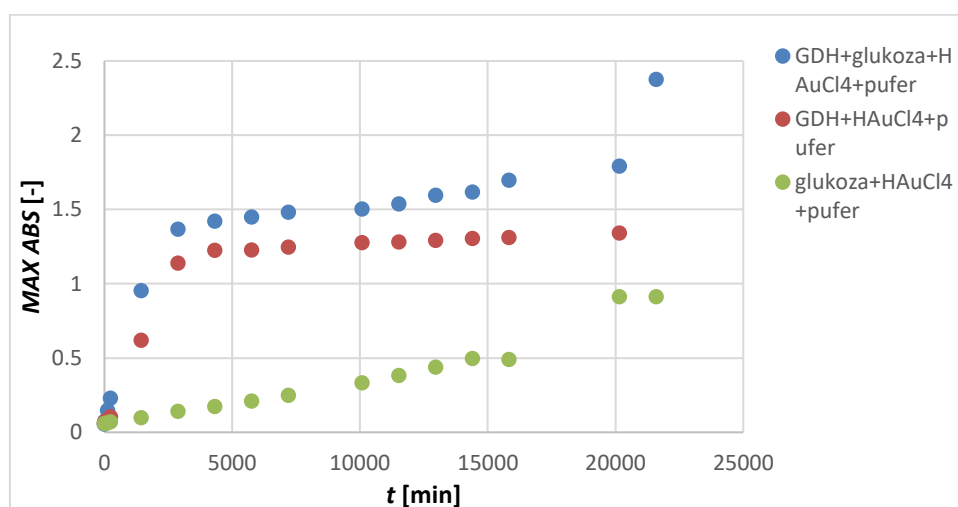
Slika 5.20 Setovi reaktora s različitim reakcijskim sastavom u različitim vremenima provedenja reakcije (dušificirani fosfatni pufer pH 5,5, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(\text{Gc GDH}) = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$)



Slika 5.21 Rezultati dobiveni mjerenjem spektra na UV - VIS spektrofotometru kao ovisnost apsorbancije o valnoj duljini (dušificirani fosfatni pufer pH 5,5, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(\text{Gc GDH}) = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$)

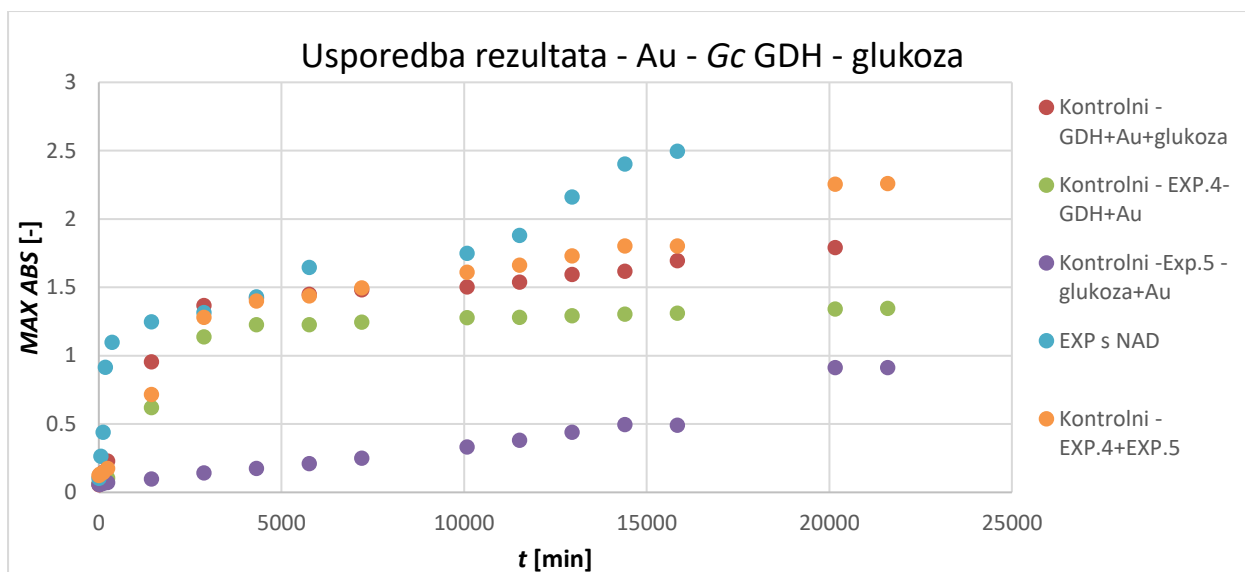
Iz navedenih slika vidljiva je prisutnost nanočestica zlata u prvom (*Gc* GDH + glukoza + HAuCl₄ + pufer), četvrtom (*Gc* GDH + HAuCl₄ + pufer) i petom reaktoru (glukoza + HAuCl₄ + pufer) tj. u reaktorima u kojima je prisutno zlato u obliku soli HAuCl₄.

Slika 5.22 prikazuje odnose vrijednosti maksimalne apsorbancije prvog, četvrtog i petog reaktora, odnosno reaktora u kojima nastaju nanočestice zlata u vremenu. Vidljivo je da je maksimalna apsorbancija najveća u prvom reaktoru u kojem su prisutne sve komponente (*Gc* GDH + glukoza + HAuCl₄ + pufer).



Slika 5.22 Usporedba odnosa vrijednosti maksimalne apsorbancije 1., 4. i 5. reaktora u vremenu (dušificirani fosfatni pufer pH 5,5, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(Gc\ GDH) = 0,3\ mg\ mL^{-1}$)

Na Slici 5.23 prikazana je usporedba rezultata maksimalne apsorbancije u ovisnosti o vremenu za sve provedene eksperimente sinteze nanočestica zlata s enzimom *Gc* GDH, kontrolne eksperimente nastanka nanočestica zlata te eksperiment s koenzimom NAD⁺.

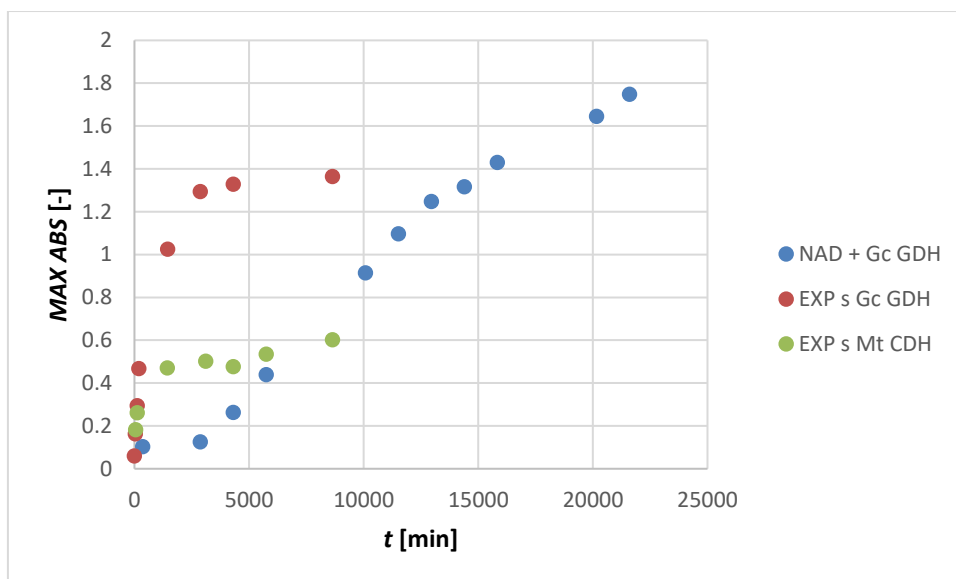


Slika 5.23 Usporedba rezultata maksimalne apsorbancije u ovisnosti o vremenu za eksperimente sinteze Au-NP_s, kontrolne eksperimente nastanka Au-NP_s te eksperimente s koenzimom NAD⁺ (dušificirani fosfatni pufer pH 5,5, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(Gc\ GDH) = 0,3\text{ mg mL}^{-1}$, $c(NAD^+) = 1\text{ mM}$)

Vidljivo je da eksperiment s koenzimom NAD⁺ pokazuje najveću apsorbanciju odnosno nastaje najviše nanočestica zlata. Najmanju apsorbanciju pokazuje kontrolni eksperiment 5 (glukoza i HAuCl₄) no kada se zbroji s kontrolnim eksperimentom 4 (*Gc* GDH i HAuCl₄) gotovo se podudara s kontrolnim eksperimentom 1 (*Gc* GDH, glukoza, HAuCl₄). Navedeno upućuje da je mehanizam sinteze nanočestica zlata uz *Gc* GDH, glukozu i HAuCl₄ podijeljen na dva mehanizma. Jedan je nastajanje nanočestica uz glukozu što je također već objavljeno³² te drugi korištenjem aminokiselina iz enzima.³³

5.8 Usporedba nastajanja nanočestica u različitim enzimatskim sustavima

Na *Slici 5.24* prikazana je usporedba ovisnosti maksimalnih apsorbancija u vremenu, za eksperimente sinteze nanočestica zlata s enzimima *Gc* GDH i *Mt* CDH te s enzimom *Gc* GDH i koenzimom NAD⁺. Iz priloženog se vidi kako najviše nanočestica zlata nastaje uz eksperiment sa enzimom *Gc* GDH i koenzimom NAD⁺. Uspoređujući vrijednosti maksimalnih apsorbancija u eksperimentima s *Gc* GDH i *Mt* CDH vidljivo je kako u istom vremenu nastane puno više nanočestica uz enzim *Gc* GDH. Iz toga proizlazi zaključak da je za enzimatsku sintezu nanočestica zlata pogodniji enzim *Gc* GDH.



Slika 5.24 Usporedba vrijednosti maksimalnih apsorbancija u vremenu za eksperimente sinteze nanočestica zlata s enzimima *Gc* GDH i *Mt* CDH te s enzimom *Gc* GDH i koenzimom NAD^+ (dušificirani fosfatni pufer pH 5,5 za sustav s *Gc* GDH i pH 7 za sustav s *Mt* CDH, bez prisustva svjetlosti i bez miješanja pri 37 °C, $c(\text{Gc GDH}) = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$, $c(\text{NAD}^+) = 1 \text{ mM}$, $c(\text{Mt CDH}) = 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$)

6 ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitivana je enzimatska sinteza nanočestica zlata uz enzime glukoza dehidrogenaza (*Gc* GDH) s glukozom i celobioza dehidrogenaza (*Mt* CDH) s celebiozom bez prisustva svjetlosti, bez kisika i bez miješanja u dušificiranom fosfatnom puferu.

Kinetika enzima *Gc* GDH u reakciji oksidacije glukoze, te enzima *Mt* CDH u reakciji oksidacije celebioze opisana je Michaelis – Menteničinim kinetičkim modelom te su procijenjeni kinetički parametri V_m i K_m^S . Na temelju procijenjenih vrijednosti maksimalne brzina reakcije, V_m , veća je u sustavu s enzimom *Gc* GDH, a Michaelis – Menteničina konstanta, K_m^S , za oba enzima ima nisku, približnu vrijednost, što pokazuje da je enzim *Gc* GDH specifičan za glukozu, a *Mt* CDH za celobiozu.

Ioni zlata (Au^{3+}) inhibiraju oba enzima kompetitivnom inhibicijom, no u slučaju s enzimom *Gc* GDH inhibicija je znatno veća.

Pretpostavljeni matematički model vrlo dobro opisuje sintezu nanočestica zlata u prisutnosti enzima *Mt* CDH uz reakciju oksidacije celebioze. U slučaju s *Gc* GDH uz glukozu nastajanje nanočestica nije vezano za kinetiku reakcije već nanočestice nastaju redukcijom iona zlata uz glukozu, te uz aminokiseline iz enzima, što je potvrđeno provedenim kontrolnim eksperimentima. Usporedbom apsorpcijskih spektara za nanočestice zlata nastale u eksperimentima *Gc* GDH s glukozom i *Mt* CDH s celebiozom zaključeno je da uz *Gc* GDH i glukozu nastaje više nanočestica zlata.

7 POPIS SIMBOLA I KRATICA

Simboli

| | |
|---------------|---|
| A | površina pika kromatograma |
| A_s | specifična aktivnost enzima [U mg^{-1}] |
| b | duljina puta svjetlosti [cm] |
| c | koncentracija [mmol dm^{-3}] |
| ε | molarni apsorpcijski (ekstincijski) koefijcent [$\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$] |
| k | konstanta brzine reakcije [min^{-1}] |
| k_d | konstanta deaktivacije enzima [min^{-1}] |
| K_i | konstanta inhibicije [mmol dm^{-3}] |
| K_m | Michaelis – Menteničina konstanta [mmol dm^{-3}] |
| V_m | maksimalna brzina reakcije [$\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$, U mg^{-1}] |
| λ | valna duljina zračenja [nm] |
| r | reakcijska brzina [$\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$] |
| t | vrijeme [min] |
| T | temperatura [$^{\circ}\text{C}$] |
| V | volumen [min] |

Kratice

| | |
|--------------------|---|
| ABS | apsorbancija |
| E | enzim |
| S | supstrat |
| ES | kompleks enzim – supstrat |
| P | produkt |
| HPLC | tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (<i>engl. High performance liquid chromatography</i>) |
| Au-NP _s | nanočestice zlata |

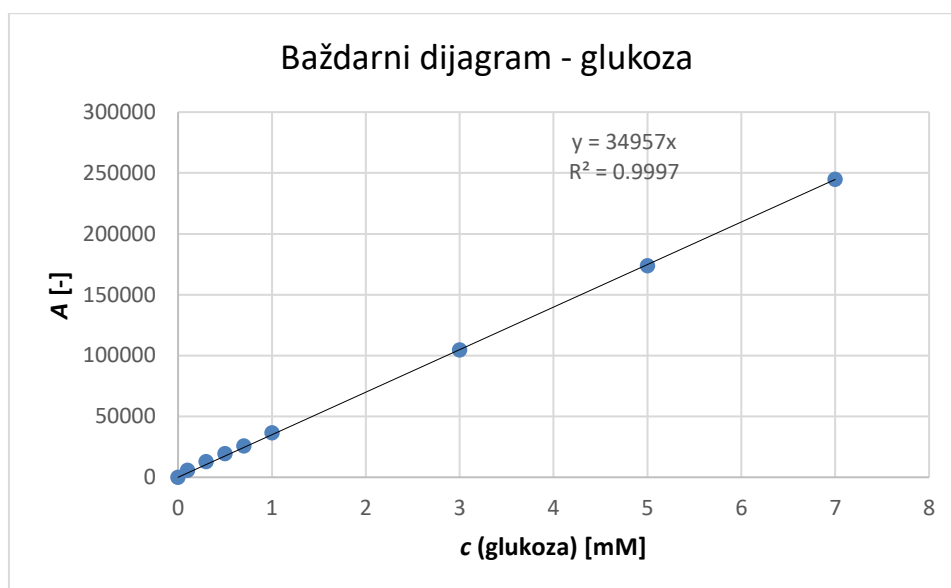
8 LITERATURA

1. Denniston K., Topping J., Caret R.; (2005); *General Organic and Biochemistry*; McGraw-Hill; New York; str. 65
2. Mildner B.; *Osnove biokemije Enzimi-1*; Prirodoslovno matematički fakultet; Sveučilište u Zagrebu; Zagreb
3. Findrik Z.; (2004); *Biokatalitička oksidacija L-DOPE*; magistarski rad; Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije; Sveučilište u Zagrebu; Zagreb
4. Vrsalović-Presečki A.; (2006); *Studij fumaraze i alkohol dehidrogenaze u biotransformacijama*; disertacija; Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije; Sveučilište u Zagrebu; Zagreb
5. Wiseman A.; (1983); *Mechanisms of catalyses: Opposing relationship with enzyme stability*; *Biochemical Society Transactions*; 11(1); str. 18-19
6. Illanes A.; (2008); *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*; School of Biochemical Engineering; Pontificia Universidad Catolica de Valparaiso; Chile
7. <http://www.bionet-skola.com/w/Enzimi> (pristup travanj 2019.)
8. Nelson D. L. and Cox M. C., Freeman W. H. & Co; (2004); *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th ed.); New York; 1119 pp (plus 17 pp glossary)
9. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=44942> (pristup travanj 2019.)
10. Sariaslani F. S., Rosazza J. P. N.; (1984); *Biocatalysis in natural products chemistry*; *Enzyme Microb; Technol.* 6; str 242-253
11. Hummel W.; (1999); *Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments*; *Trends Biotechnol.* 17; str. 487-492
12. Ferri S., Kojima K., & Sode K.; (2011); *Review of Glucose Oxidases and Glucose Dehydrogenases: A Bird's Eye View of Glucose Sensing Enzymes*; *Journal of Diabetes Science and Technology*; 5(5); str. 1068–1076
13. Westermarck U., Eriksson K. E.; (1974); *Cellobiose: kinon oksidoreduktaza, novi enzim koji razgrađuje drvo iz gljivica bijele truleži*; *Acta Chemica Scandinavica* 28b; str. 209–214
14. Ludwig R., Kracher D.; (2016); *Cellobiose dehydrogenase: An essential enzyme for lignocellulose degradation in nature – A review*; *Journal of Land Management, Food and Environment*; 67(3); str. 145-163

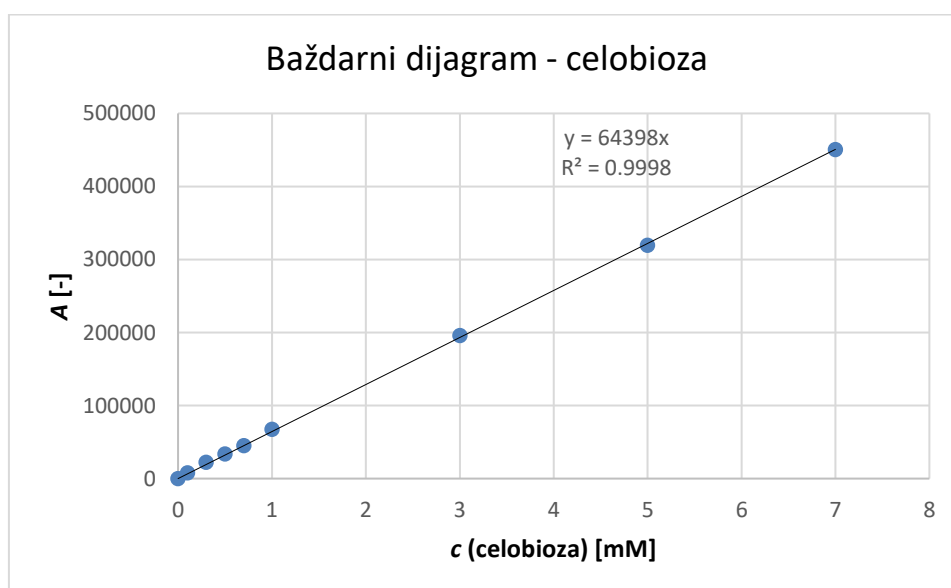
15. Malel E., Ludwig R., Gorton L., & Mandler D.; (2010); Localized Deposition of Au Nanoparticles by Direct Electron Transfer through Cellobiose Dehydrogenase; Chemistry - A European Journal; 16(38); str. 11697–11706
16. Mason M. G., Nicholls P., Wilson M. T.; (2003); Rotting by radicals-the role of cellobiose oxidoreductase?; Department of Biological Sciences; University of Essex; Wivenhoe Park; Colchester; Essex CO4 3SQ, U.K
17. Kurajica S., Lučić Blagojević S.; (2017); Uvod u nanotehnologiju; Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa; Zagreb
18. Bummiller M.; (2007); Nanotechnology; Nanoparticles and Nanononsense; Horiba
19. Poole C. P. Jr., Owens F. J.; (2003); Introduction to Nanotechnology; John Wiley & Sons, Inc., Hoboken; New Jersey
20. Singh S., Nalwa H. S.; (2007); Nanotechnology and Health Safety – Toxicity and Risk Assessments of Nanostructured Materials on Human Health; Journal of Nanoscience and Nanotechnology; 7(9); str. 3048-3070
21. Bondarenko O., Juganson K., Ivask A., Kasemets K., Mortimer M., Kahru A.; (2013); Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro; a critical review; Archives of Toxicology; 87(7); str. 1181-1200
22. Li X., Xu H., Chen Z. S., Chen G.; (2011); Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications; Journal of Nanomaterials; str. 1-16
23. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html> (pristup travanj 2019.)
24. Dunn I. J., Heinzle E., Ingham J., Prenosil J. E.; (1992); Biological Reaction Engineering: Principles, Applications and Modelling with PC simulation; Wiley-VCH; Weinheim; str. 25-31
25. Blanch H. W., Clark D. S.; (1993); Biochemical Engineering; Marcel Dekker; New York; str. 151-157
26. Laidler K. J., Bunting P. S.; (1973); The Chemical Kinetics of Enzyme Reaction; Clarendon Press; Oxford University Press; str. 93-97, 430-435
27. Vasić-Rački Đ.; (1990); Biokemijsko inženjerstvo; Kemija u industriji; 39(10); str. 459-467
28. Kosar V.; (2017); Reaktori i bioreaktori; Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije; Sveučilište u Zagrebu; Zagreb
29. Gomzi Z.; (1998); Kemijski reaktori; HINUS; Zagreb; str. 36-55

30. https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Odredjivanje_struktura_organ-skih_spojeva_nastavni_tekst.pdf (pristup svibanj 2019.)
31. Baymiller M., Huang F., Rogelj S.; (2017); Rapid one-step synthesis of gold nanoparticles using the ubiquitous coenzyme NADH; Biochemistry, University of Illinois at Urbana – Champaign; Civil and Environmental Engineering, New Mexico Institute of Mining and Technology; Biology, New Mexico Tech; Matters; str. 2297-8240
32. Liu J., Qin G., Raveendran P. and Ikushima Y.; (2006); Facile „Green“ Synthesis, Characterization and Catalytic Function of β -D-Glucose – Stabilized Au Nanoparticles; Chemistry-A European Journal; 12(8); str. 2131-2138
33. Sanghi R., Verma P., Puri S.; (2011); Enzymatic Formation of Gold Nanoparticles Using *Phanerochaete Chrysosporium*; Advances in Chemical Engineering and Science; 1(3); str. 154-162

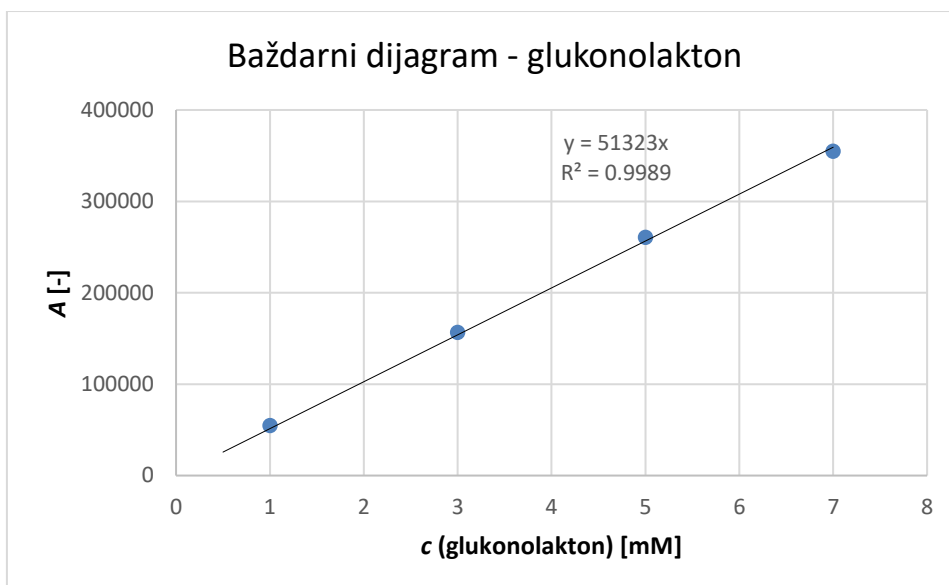
9 PRILOZI



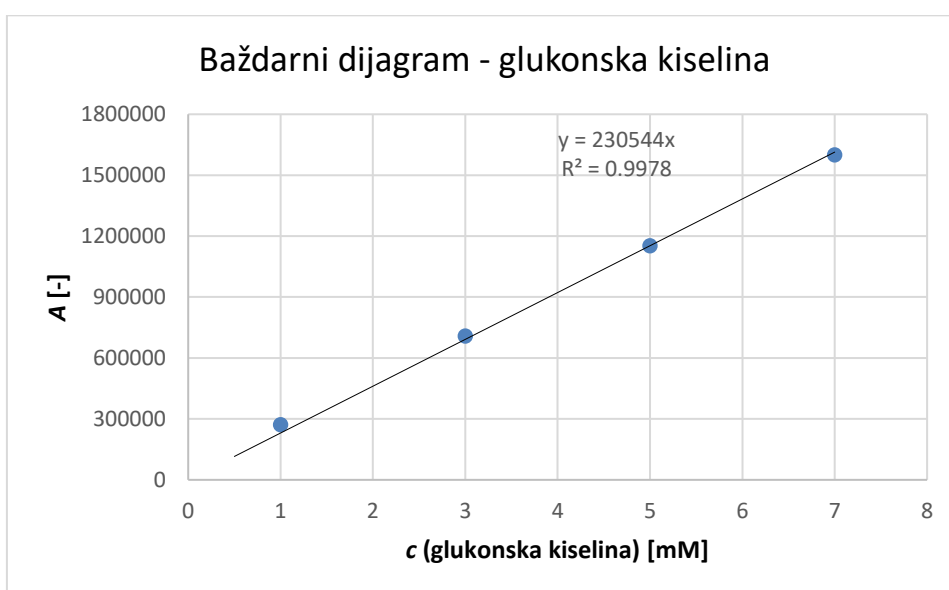
Slika 9.1 Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukoze
(c(glukoza) = 0 – 7 mM)



Slika 9.2 Baždarni dijagram za određivanje koncentracije celobioze
(c(celobioze) = 0 – 7mM)



Slika 9.3 Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukonolaktona
($c(\text{glukonolakton}) = 0,5 - 7 \text{ mM}$; $\lambda = 210 \text{ nm}$)



Slika 9.4 Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukonske kiseline
($c(\text{glukonska kiselina}) = 0,5 - 7 \text{ mM}$; $\lambda = 210 \text{ nm}$)

10 ŽIVOTOPIS

Katarina Komljenović [REDACTED] Osnovnu školu završava 2008. g. te upisuje Prirodoslovno matematičku gimnaziju u Delnicama. Maturirala je 2012. g. te upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, gdje 2017. završava preddiplomski studij, smjer Kemijsko inženjerstvo. Obrazovanje nastavlja na diplomskom studiju Kemijskog inženjerstva. Stručnu praksu je odradila u Plivinom pogonu u Savskom Marofu na procesu proizvodnje Omeprazola, pod mentorstvom Marka Mrvelja mag. ing. cheming. Tijekom studija volontirala je s djecom bez odgovarajuće roditeljske skrbi, a od siječnja 2018. do svibnja 2019. godine radi kao osobni asistent osobi s invaliditetom. Ljeti od 2014. do 2017. g. radi u administraciji, kao asistent doktorici opće medicine.