



## Povzetek projekta Po kreativni poti do znanja 2017 – 2020, 2. odpiranje, za namen objave in predstavitve na spletni strani sklada

### 1. Polni naslov projekta: Polimerni nosilci za imobilizacijo bioligandov

- V katero področje na prvi klasifikacijski ravni KLASIUS-P-16 se uvršča projekt glede na vsebinsko zasnovo:

05 - Naravoslovje, matematika in statistika

### 2. V sodelovanju z:

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru  
Merel d.o.o.

### 3. Besedilo:

- Opredelite problem, ki se je razreševal tekom izvajanja projekta

Osnovna dejavnost podjetja Merel d.o.o. je prodaja in servis analitskih instrumentov, ter uvajanje novih analiznih postopkov in metod v analizni kemiji in farmaciji. Podjetje je uspešno vzdrževanje in prodajo analizne laboratorijske opreme v zadnjih letih dopolnila z novimi projekti iz področja razvoja in raziskav. Imajo čedalje več lastnih proizvodov (dissoGuard®, dissoSwitch®, dissoShield®, TOGA analizator, aparatura za raztapljanje farmacevtskih učinkovin s koračnimi motorji in magnetnimi mešali). Svoje izdelke uspešno tržijo v svetovnem merilu, uvrščeni so v prodajni program zelo uspešnih svetovnih korporacij kot so Agilent Technologies, podjetij kot so Dissolution Accessories. Na tržišču so znani po unikatnih rešitvah, po nestandardnih izboljšavah procesov, merilnih tehnik, mehanskih sklopov in podobno. Nenehno sodelujejo z izjemnimi laboratoriji v Sloveniji in tujini (Fakulteta za farmacijo Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Maribor, Fakulteta za elektrotehniko, računalništvo in informatiko Maribor, Končar Institut Zagreb in drugi). Težijo k širjenju nabora merilnih tehnik številnih analitskih aparatov, saj s tem večajo njihovo aplikativnost, kar je ključnega pomena za uporabnike te opreme. V predlaganem projektu smo s podjetjem skušali razviti novo merilno tehniko za UV-Vis spektrofotometer, ki ga podjetje trži. V ta namen smo sintetizirali porozne polimerne materiale z uporabo tehnike verižne radikalske polimerizacije kontinuirne faze emulzije z visokim deležem notranje faze. Materiale smo sintetizirali v obliki monolitov primernih za pretočne sisteme. Pri takšnih materialih ni opaziti difuzijskih omejitev, prenos snovi je konvekcijski. Monolite smo pripravili iz monomerov s funkcionalnimi skupinami, ki smo jih v nadaljevanju izkoristili za nadaljnjo funkcionalizacijo, kot na primer za imobilizacijo biologandov in za povečanje specifične površine. Zaradi svojih lastnosti, kot so nizka gostota, visoka specifična površina, permeabilnost idr., imajo takšni materiali širok spekter uporabe. Tako pripravljen material, ki je služil kot katalizator za kemijsko reakcijo smo testirali tako na fakulteti kot tudi na sedežu podjetja. Kinetiko reakcije smo spremljali z

Merelovo analitsko opremo.

- Opišite potek reševanja problema oz. kratek povzetek projekta

V okviru projekta »PN-IBL«, smo izvajali sinteze poroznih polimernih nosilcev primernih za imobilizacijo biokatalizatorjev oziroma encimov. Le-te smo uporabili kot katalizatorje za reakcijo hidrolize 4-nitrofenil butirata, katere učinkovitost smo spremljali z UV-Vis spektroskopijo. Pri encimskih reakcijah je zaželeno, da s čim manjšo količino encima v čim krajšem času pretvorimo maksimalno količino substrata v produkt, imobilizirane encime pa lahko recikliramo in jih uporabimo za več ciklov.

V začetni fazi smo pripravili številne porozne polimerne materiale primerne za vezavo bioligandov oziroma za imobilizacijo encimov. Med sintetiziranimi polimernimi nosilci je nosilec na osnovi glicidil metakrilata (GMA). To je monomer, ki vsebuje za nukleofile zelo reaktivno epoksi skupino in je zato primeren za neposredno vpeljavo funkcionalnih skupin. Lep primer so tioli in amini, ki se v kromatografiji uporabljajo kot ionski izmenjevalci. Nadalje, na poliHIPE materiale na osnovi glicidil metakrilata lahko vežemo tudi molekule encimov in tak material uporabimo kot reaktor za encimske reakcije, kar je bil eden naših glavnih ciljev. Sintetizirali smo tudi material na osnovi divinil benzena (DVB) in 4-vinilbenzil klorida (VBC). Tak material se lahko funkcionalizira in uporabi kot adsorbent za odstranjevanje citokinov iz plazme (krvi), kar vpliva na aktivacijo endotelijskih celic. V okviru projekta smo sintetizirali tudi material na osnovi stirena in divinil benzena. Pri tem materialu smo želeli sintetizirati pore v nano dimenzijah. V ta namen smo se posluževali ultratoraksa s hitrostjo mešanja med 1000 in 25000 obratov na minuto. Materiali z majhnimi porami imajo veliko specifično površino, ki je včasih ključnega pomena pri aplikaciji materiala. Stirenski material ima takšno strukturo, da ga lahko funkcionaliziramo in na velikost por vplivamo s hiperzamreženjem.

Sintetizirane materiale smo okarakterizirali s FTIR spektroskopijo, elementno analizo, porozimetrijo, z vrstičnim elektronskim mikroskopom, helijevim piknometrom in Geo Pycom.

- Navedite in opišite rezultate projekta ter njihov doprinos k družbeni koristnosti

Sintetizirali smo porozne polimerne materiale na osnovi različnih monomerov, kot so stiren, 4-vinilbenzil klorid, glicidil metakrilat in tetratiol, ki smo jih zamrežili z uporabo zamreževal, kot so divinil benzen, etilenglikol dimetakrilat in divinil adipat. Uspešno smo sintetizirali monolitne materiale. S sintezo kroglic smo imeli manjše težave, saj so le te pri določenih pogojih aglomerirale. Z optimiranjem razmerja med monomeri, surfaktantom in temperaturo smo uspeli sintetizirati kroglice z velikostjo od 150-200  $\mu\text{m}$ . Uspešno sintetizirani monolitni materiali pa so bili trdni in stabilni, z gladkimi površinami, brez zračnih mehurčkov, s čiščenjem v organskih topilih in sušenjem na zraku in vakuumskem sušilniku se niso krčili.

FTIR analiza je v vseh primerih potrdila vključenost monomerov v polimerno verigo. In sicer, na FTIR spektrih so bili karakteristični signali za posamezne monomere, na osnovi katerih smo prišli do sklepa, da je bila polimerizacija analiziranih vzorcev (polimerov) uspešna. Na primer FTIR spekter poli(GMA-ko-EGDMA) monolita ima tipične signale za estrsko vez EGDMAja in za epoksi skupino GMAja.

SEM posnetki so pri vseh analiziranih vzorcih pokazali tipično poliHIPE strukturo, za katero so značilne primarne pore, ki so med seboj povezane s sekundarnimi oziroma povezovalnimi porami. Velikost primarnih por je variirala med 4  $\mu\text{m}$  in 16  $\mu\text{m}$  za materiale

pripravljene s klasičnim elektronskim mešalom s teflonskim propelerjem (odvisno od materiala) in med 0.3 in 2.1  $\mu\text{m}$  za poli(stiren-ko-divinilbenzenske) monolite pripravljene z souporabo ultratoraksa. Pri vseh polimerih so imele primarne pore sferično obliko (obliko kapljic notranje faze), sekundarne pore pa so imele v nekaterih primerih sferično obliko (poli(stiren-ko-divinil benzen) in poli(tetratiol-ko-divinil adipat)), v nekaterih primerih pa so bile nepravilnih oblik (poli(glicidil metakrilat-ko-etilenglikol dimetakrilat).

Z elementno analizo smo poleg FTIR spektroskopije potrdili kemijsko sestavo polimerov. S to analizo smo določevali v materialih delež ogljika, vodika, dušika in žvepla. Dobljene rezultate smo primerjali s teoretično izračunanimi. Rezultati so se ujemali (na primer za polimer stiren-ko-divinil benzen smo teoretično izračunali: elementov: 91% C, 9% H, z elementnim analizatorjem pa smo določili: 89% C, 11% H; za polimer tetratiol/divinil adipat smo teoretično izračunali: 56% C, 7% H, 13% S, z elementnim analizatorjem pa smo določili: 54% C, 6.5% H, 11% S). Preostali del predstavlja kisik, ki ga z elementnim analizatorjem nismo merili. S helijevim piknometrom in Geo Pycom smo materialom določili skeletno in celokupno gostoto in nato preračunali dejansko poroznost materialov. Tako določena poroznost je rahlo odstopala od predvidene poroznosti glede na uporabljen volumen notranje faze pri pripravi emulzije. In sicer, za poli(stiren-ko-divinilbenzanski) monolit smo z uporabljenim volumnom notranje faze predvideli 80% poroznost, po izračunu na osnovi podatkov gostot pa smo določili poroznost materiala med 73% in 78%. Ne gre za veliko odstopanje, predvidevamo, da je poroznost nižja zaradi izhlapevanja vode med postopkom polimerizacije pri povišani temperaturi.

Manj uspešni smo bili s polimerizacijo cinhonidina. Kot kaže zaradi velikosti molekule in steričnih ovir cinhonidin brez prisotnosti drugih monomerov ni spolimeriziral. Kombinirali smo ga s tetratiolom in divinil adiaptom. Rezultati analize z elementnim analizatorjem so pokazali, da se je cinhonidin vezal na nosilec, a v zelo majhni koncentraciji (0,69%).

Mnoge aplikacije zahtevajo materiale z visoko specifično površino. Nemodificirani materiali pripravljani s polimerizacijo HIP emulzije, imajo površine med 3 in 20  $\text{m}^2/\text{g}$ . Le-to lahko povečamo z induciranjem manjših por v skelet polimera. To lahko dosežemo s hiperzamreženjem. V okviru projekta smo hiperzamrežili poli(stiren-ko-divinil benzen) s Friedel craftsovo reakcijo alkiliranja. Kot katalizator smo uporabili železov triklorid, ki je rjavkasto obarvan. Kot produkt smo dobili rjavo obarvan material z zelo visoko specifično površino. Material pred hiperzamreženjem je imel specifično površino 7,43  $\text{m}^2/\text{g}$ , po hiperzamreženju pa 958  $\text{m}^2/\text{g}$ .

Glavni cilj projekta je bil sintetizirati porozni polimerni material za imobilizacijo bioligandov, kot so encimi. Uspešno smo imobilizirali encim lipazo na poli(glicidil metakrilat-ko-etilenglikol dimetakrilat), kar smo potrdili na več načinov. Kot prvo, smo uspešnost imobilizacije encima na polimer potrdili z določevanjem koncentracije proteinov v encimskih raztopinah pred in po imobilizaciji. V ta namen smo se poslužili Bradfordove tehnike določevanja proteinov. Po pričakovanjih je bila koncentracija proteinov v encimski raztopini pred imobilizacijo višja kot po imobilizaciji. Uspešnost imobilizacije smo potrdili tudi z elementnim analizatorjem. Poli(glicidil metakrilat-ko-etilenglikol dimetakrilat) v svoji strukturi ne vsebuje dušika, ki smo ga po imobilizaciji encima zaznali. Odstotek je bil sicer nizek (0,81%), a kljub temu zadosten, da smo potrdili uspešnost imobilizacije. Z imobiliziranim encimom smo nato izvedli reakcijo hidrolize 4-nitrofenil butirata. Nastali kompleks rumene barve smo dokazali z UV-Vis spektrometrijo in tako potrdili prisotnost encima na nosilcu, saj v nasprotnem primeru omenjeni kompleks ne nastane. Reakcijo smo testirali tudi s prostim encimom.

Podjetje Merel d.o.o. je z našo pomočjo testiral imobilizirane encime na njihovem najsodobnejšem UV-Vis spektrofotometru. Uspešno smo izvedli encimsko katalizirano reakcijo in produkte analizirali s spektroskopijo. Analize smo izvedli na končnih produktih reakcij, ki smo jih izvedli v epruveti, ter reakcij, ki smo jih izvajali v kiveti in spremljali kinetiko. Prednost uporabe imobiliziranih encimov se kaže v tem, da jih lahko recikliramo in ponovno uporabimo. Postopek recikliranja je enostaven, dovolj je filtracija. Mi smo encime uporabili za dva cikla. Aktivnost encima je v drugem ciklu znižala za 20%.

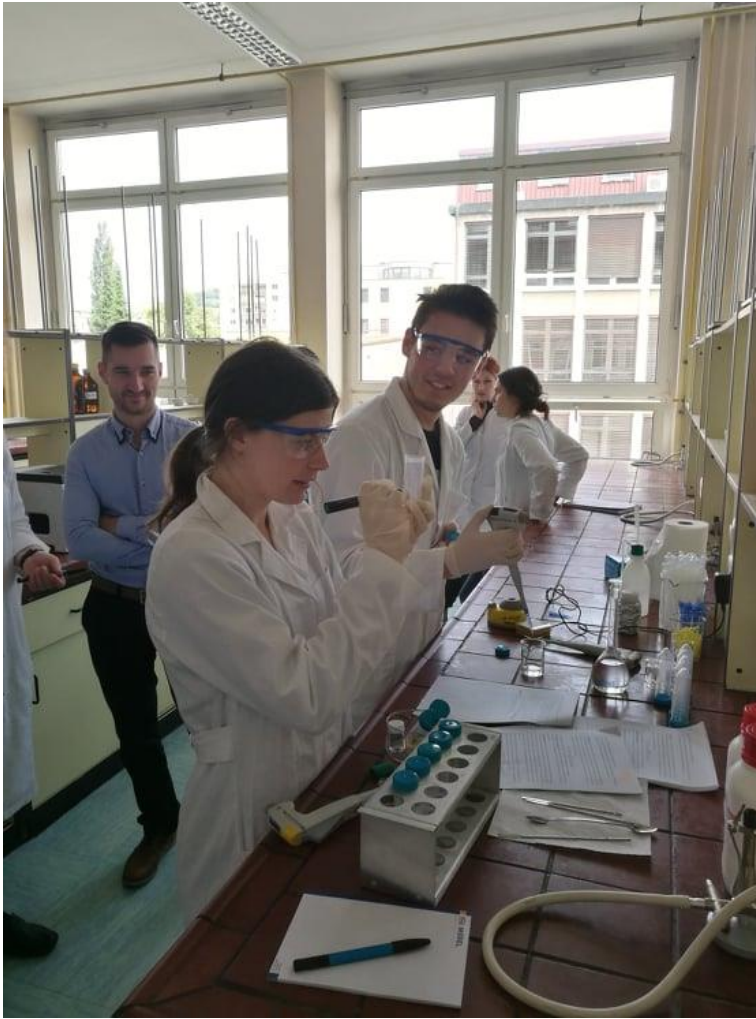
#### 4. Priloge:

- Slikovno gradivo:

Prenos znanja - predavanja:



Prenos znanja – delavnice:



SEM posnetek morfologije poli(GMA-ko-EGDMA) monolita.

