

UNIVERZITET U BEOGRADU

TEHNOLOŠKO–METALURŠKI FAKULTET

Milica M. Svetozarević

**BIORAZGRADNJA  
ANTRAHINONSKE BOJE  
PEROKSIDAZOM IZOLOVANOM  
IZ OTPADNOG MATERIJALA U  
ŠARŽNOM I KONTINUALNOM  
SYSTEMU**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Milica M Svetozarević

**ANANTHRAQUINONE DYE  
BIODEGRADATION BY PEROXIDASE FROM  
WASTE MATERIAL IN A BATCH AND  
CONTINUOUS FLOW SYSTEM**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

MENTOR:

---

Dr Dušan Mijin, redovni profesor  
Univerziteta u Beogradu,  
Tehnološko-metalurški fakultet

MENTOR:

---

Dr Nataša Šekuljica, naučni saradnik,  
Inovacioni Centar  
Tehnološko-metalurškog fakulteta

ČLANOVI KOMISIJE:

---

Dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor  
Univerziteta u Beogradu,  
Tehnološko-metalurški fakultet

---

Dr Zoran Popovski, redovni profesor,  
Poljoprivredni fakultet Univerzitet „Sv. Kiril i  
Metodij“, Skoplje

---

Dr Ana Dajić, naučni saradnik,  
Inovacioni Centar  
Tehnološko-metalurškog fakulteta

DATUM ODBRANE:

---



*Svom ocu Milanu Svetozareviću*

*Moj vetar u leđa*

# **Biorazgradnja antrahinonske boje peroksidazom izolovanom iz otpadnog materijala u šaržnom i kontinualnom sistemu**

## **Sažetak**

Ideja ove doktorske disertacije je izolovanje peroksidaze iz otpadnog materijala i njena upotreba u razgradnji antrahinonske boje Kiselo ljubičasto 109 (Acid Violet 109, AV109). Enzim je izolovan iz otpadnog materijala u cilju povećanje ekonomičnosti i održivosti procesa. Razmotreni su šaržni i kontinualni sistemi u cilju optimizacije razgradnje boje.

U prvom delu disertacije ispitivana je mogućnost izolovanja peroksidaze iz različitog otpadnog materijala i odabir najpogodnijeg izvora. Potom, je izvršena optimizacija procesa razgradnje AV109 u šaržnom reaktoru. Sa tim u vezi ispitan je uticaj procesnih parametara kao što su: vreme kontakta, pH reakcione smeše, koncentracija enzima, vodonik-peroksida i boje, i temperatura. Zatim, posebna pažnja je posvećena ispitivanju početne kinetike enzimske reakcije i utvrđivanju kinetičkih konstanti.

Sledeći deo disertacije odnosi se na kontinualnu razgradnju antrahinonske boje AV109 u mikroreaktorskom sistemu. Kontinualni sistemi generalno pokazuju veću efikasnost, a olakšano je i vođenje procesa. U tu svrhu, optimizovani su parametri koji imaju glavnu ulogu u razgradnji AV109 u mikroreaktoru: vreme zadržavanja, dužina i prečnik reaktora kao i koncentracijski protok vodonik-peroksida, enzima i boje.

Da bi se čitav proces unapredio i postao efikasniji, „zeleniji” i ekonomičniji, vršena je imobilizacija enzima umrežavanjem u kontinualnom i šaržnom reaktoru. Na taj način, bilo je moguće koristiti enzim dobijen iz otpadnog materijala više puta. Ova vrsta imobilizacije odvija se u dva koraka: taloženje enzima i umrežavanje. Za umrežavanje enzima korišćen je pektin - prirodni polimer bezbedan za okolinu. Nakon odabira najpogodnijeg taložnog reagensa ispitivan je uticaj koncentracije umreživača na aktivnost enzima. Umreženi enzimski agregati su primenjeni u reakciji biorazgradnje AV109 u šaržnom reaktoru zapremine 50 mL i optimizovani su sledeći parametri: pH vrednost, koncentracija imobilizata, vodonik-peroksida i boje. Takođe, ispitana je operativna stabilnost umreženih enzimskih agregata.

U kontinualnom sistemu, je ispitivana mogućnost imobilizacije enzima na unutrašnjim zidovima mikroreaktora. Imobilizacija peroksidaze u cevnom mikroreaktoru je potvrđena SEM analizom. Dalje, optimizovana je koncentracija umreživača i koncentracija enzima, a ispitivana je i operativna stabilnost u reakciji razgradnje boje AV109.

Dobijeni rezultati ukazuju na efikasnu razgradnje boje, ali mehanizam delovanja peroksidaze nije rasvetljen u potpunosti. Zbog toga, izvršena je LC/GC – MS analiza proizvoda razgradnje. Ispitivana je i hemijska potrošnja kiseonika u cilju utvrđivanja toksičnosti sekundarnih proizvoda reakcije.

**Ključne reči:** peroksidaza iz sojinih ljuspica, peroksidaza iz krompirovih ljuski, otpadni material, biorazgradnja, antrahinonska boja, mikroreaktori, imobilizacija, oksidovani pektin, umreženi enzimski agregati, umreženi enzimi, proizvodi razgradnje

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo

**Uža naučna oblast:** Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

# **An anthraquinone dye biodegradation by peroxidase from waste material in a batch and continuous flow system**

## **Abstract**

The idea behind this doctoral thesis is extraction of peroxidase from waste material and its use for biodegradation of the anthraquinone dye Acid Violet 109. The enzyme is isolated from agro-industrial waste in order to increase the overall cost-effectiveness and sustainability of the process. Batch and continuous systems are considered for dye removal process's optimization.

In the thesis first section, the possibility of peroxidase extraction from different waste material and selection of the most suitable one is examined. Afterwards, optimization of the biodegradation batch process is carried out. Contact time, pH, enzyme, hydrogen peroxide and dye concentration, temperature, kinetic constants and inhibition constants are optimized.

Next section of this doctoral thesis deals with the continuous dye biodegradation in a microreactor. Continuous systems show increased efficiency and easier manipulation of the process. Bearing in mind the latter mentioned characteristics, the key parameters for continuous biodegradation of the Acid Violet 109 dye are optimized: residence time, reactor's length and diameter, together with process parameters: concentration flow of enzyme, hydrogen peroxide and dye.

As a means to a more advanced, efficient and greener process, the enzyme is immobilized by cross-linking in the batch and continuous reactor. Thus, the enzyme obtained from a waste material can be reused several times. Pectin is used for enzyme cross-linking. It is a biopolymer that is recognized as safe for the environment. The effect of the precipitation reagents on the enzyme activity is examined. After choosing the proper precipitant, the cross-linker concentration is optimized. The cross-linked enzyme aggregates are applied in the biodegradation of the anthraquinone dye in a 50 mL batch reactor. The following parameters are optimized: pH, cross-linked enzyme, hydrogen peroxide and dye concentration. The possibility of the cross-linked enzyme aggregates reuse is confirmed by biodegrading the dye in 10 successive cycles.

In continuous flow, the peroxidase is cross-linked onto the inner walls of the PTFE tube microreactor. Scanning electron microscopy analysis confirmed the successful outcome of the immobilization. Afterwards, the enzyme and cross-linker concentration was optimized, together with reusability assessment of the immobilized enzyme microreactor.

The obtained results indicate of a successful prosperous dye biodegradation process, but the mechanism of the biodegradation is not revealed. Hence, LC/GC-MS analysis of the degradation products is performed. Chemical oxygen demand was analyzed as a validation that generation of secondary byproducts which are more toxic than the dye itself does not occur.

**Keywords:** soybean hull peroxidase, potato peel peroxidase, anthraquinone dye, waste material, immobilization, oxidized pectin, cross-linked enzyme aggregates, cross-linked enzymes, biodegradation products

**Scientific field:** Engineering technology

**Scientific subfield:** Biochemical Engineering and Biotechnology

<b>Sadržaj</b>	
<b>Uvod</b> .....	1
<b>I TEORIJSKI DEO</b> .....	2
<b>1. Bojenje tekstila</b> .....	2
<b>2. Procena štetnog uticaja otpadnih voda na životnu sredinu</b> .....	3
<b>3. Boje</b> .....	5
3.1. Klasifikacija boja.....	5
3.1.2. Antrahinonske boje.....	6
<b>4. Tehnike prečišćavanja otpadnih voda</b> .....	7
4.1. Fizičke metode prečišćavanja otpadnih voda .....	8
4.2. Hemijske metode prečišćavanja otpadnih voda.....	9
4.3. Biološke metode .....	11
4.3.2. Enzimaska razgradnja boje.....	12
<b>5. Peroksidaze</b> .....	12
5.1. Peroksidaza iz soje .....	18
<b>6. Kinetika enzimskih reakcija katalizovanih peroksidazama</b> .....	20
<b>7. Mehanizam delovanja peroksidaze</b> .....	23
<b>8. Primena mikroreaktorskih sistema u tretmanu obojenih otpadnih voda</b> .....	25
<b>9. Primena imobilisanih enzima u tretmanu obojenih otpadnih voda</b> .....	29
9.1. Tehnike imobilizacije enzima.....	30
<b>II Eksperimentalni deo</b> .....	35
<b>10. Materijali i metode</b> .....	35
10.1. Metode.....	37
10.1.1. Ekstrakcija enzima i priprema sirovog ekstrakta.....	37
10.1.2. Određivanje aktivnosti sirove peroksidaze.....	37
10.2. Optimizacija uslova biorazgradnje AV109 boje peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljušpica i krompirovih ljuški u šaržnom sistemu .....	38
10.2.1. Optimizacija pH i vremena kontakta biorazgradnje AV109 peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljušpica i krompirovih ljuški u šaržnom sistemu .....	38
10.2.2. Optimizacija početne koncentracije enzima za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljušpica i krompirovih ljuški u šaržnom sistemu .....	39
10.2.3. Optimizacija koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljušpica i krompirovih ljuški u šaržnom sistemu .....	39
10.2.4. Optimizacija koncentracije boje za biorazgradnju AV109 peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljušpica i krompirovih ljuški u šaržnom sistemu .....	39
10.2.5. Ispitivanje uticaja temperature na biorazgradnju AV109 boje katalizovanu peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljušpica i krompirovih ljuški u šaržnom sistemu .....	40
10.2.6. Ispitivanje početne kinetike reakcije biorazgradnje AV109 boje katalizovane peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljušpica i krompirovih ljuški u šaržnom sistemu .....	40

10.3.	Optimizacija uslova biorazgradnje AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljustica i krompirovih ljusticu u kontinualnom sistemu .....	41
10.3.1.	Optimizacija koncentracije enzima i određivanje vremena zadržavanja za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljustica i krompirovih ljusticu u kontinualnom sistemu.....	42
10.3.2.	Optimizacija koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljustica i krompirovih ljusticu u kontinualnom sistemu.....	43
10.3.3.	Optimizacija koncentracije boje za biorazgradnju AV109 peroksidazom iz sojinih ljustica i krompirovih ljusticu u kontinualnom sistemu .....	43
10.3.4.	Optimizacija prečnika mikroreaktora za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljustica i krompirovih ljusticu u kontinualnom sistemu .....	43
10.3.5.	Optimizacija dužine reaktora za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljustica i krompirovih ljusticu u kontinualnom sistemu .....	44
10.4.	Imobilizacija peroksidaze iz sojinih ljustica i krompirovih ljusticu .....	44
	Imobilizacija peroksidaze iz krompirovih ljusticu i sojinih ljustica u obliku umreženih enzimskih agregata.....	44
10.4.1.	Ispitivanje uticaja taložnog reagensa na imobilizaciju peroksidaze iz sojinih ljustica i krompirovih ljusticu u obliku umreženih enzimskih agregata .....	44
10.4.2.	Određivanje sadržaja proteina modifikovanom Lorijevom metodom .....	45
10.5.	Ispitivanje uticaja reagensa za umrežavanje na imobilizaciju peroksidaze iz sojinih ljustica i krompirovih ljusticu i u obliku umreženih enzimskih agregata .....	45
10.5.1.	Priprema umrežavajućeg reagensa- pektina oksidacijom perjodnom kiselinom .....	45
10.5.2.	Određivanje sadržaja aldehidnih grupa u oksidovanom pektinu .....	45
10.5.3.	Ispitivanje uticaja početne koncentracije umrežavajućeg reagensa na imobilizaciju peroksidaze iz sojinih ljustica i krompirovih ljusticu u obliku umreženih enzimskih agregata .....	46
10.5.4.	Određivanje aktivnosti peroksidaze iz sojinih ljustica i krompirovih ljusticu imobilisanih u obliku umreženih enzimskih agregata .....	46
10.6.	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR).....	47
10.7.	Biorazgradnja AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljustica i krompirovih ljusticu imobilisanih u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom reaktoru .....	47
10.7.1.	Optimizacija pH i vreme kontakta biorazgradnje AV109 imobilisanom peroksidazom iz sojinih ljustica i krompirovih ljusticu u šaržnom sistemu .....	47
10.7.2.	Optimizacija koncentracije enzima za biorazgradnju boje AV109 imobilisanom peroksidazom u obliku umreženih enzimskih agregata iz sojinih ljustica i krompirovih ljusticu u šaržnom sistemu.....	48
10.7.3.	Optimizacija koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju boje AV109 imobilisanom peroksidazom u obliku umreženih enzimskih agregata iz sojinih ljustica i krompirovih ljusticu u šaržnom sistemu 48	
10.7.4.	Optimizacija koncentracije boje za biorazgradnju boje AV109 imobilisanom peroksidazom u obliku umreženih enzimskih agregata iz sojinih ljustica i krompirovih ljusticu u šaržnom sistemu .....	48
10.7.5.	Operativna stabilnost imobilisane peroksidaze u obliku umreženih enzimskih agregata u reakciji biodegradacije AV109 u šaržnom sistemu .....	49
10.8.	Imobilizacija peroksidaze iz krompirovih ljusticu i sojinih ljustica u obliku umreženih enzimskih agregata u kontinualnom sistemu .....	49



10.8.1. Određivanje aktivnosti imobilisane peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u mikroreaktoru .....	50
10.8.2. Primena imobilisane peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u reakciji biodegradacije AV109 u kontinualnom sistemu.....	50
10.8.3. Operativna stabilnost imobilisane peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u reakciji biorazgradnje AV109 boje u kontinualnom sistemu .....	50
10.9. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) .....	51
10.10. Određivanje proizvoda biorazgradnje boje AV109 katalizovane peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski .....	51
10.11. Određivanje hemijske potrošnje kiseonika u uzorku pre i nakon biorazgradnje AV109 boje katalizovane peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski.....	52
<b>III Rezultati i diskusija .....</b>	<b>53</b>
<b>11. Biorazgradnja antrahinonske boje peroksidazom izolovanom iz otpadnog materijala u šaržnom reaktoru.....</b>	<b>53</b>
11.1. Biorazgradnja antrahinonske boje peroksidazom izolovanom iz celog zrna soje u šaržnom sistemu	53
11.1.1. Optimizacija pH i vremena kontakta biorazgradnje AV109 boje peroksidazom iz celog zrna soje u šaržnom sistemu .....	53
11.1.2. Optimizacija početne koncentracije enzima za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz celog zrna soje u šaržnom sistemu .....	54
11.1.3. Optimizacija početne koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz celog zrna soje u šaržnom sistemu .....	56
11.1.4. Optimizacija koncentracije boje za biorazgradnju AV109 peroksidazom iz celog zrna soje u šaržnom sistemu .....	57
11.1.5. Optimizacija temperature za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz celog zrna soje u šaržnom sistemu .....	58
11.1.6. Utvrđivanje kinetičkih parametara u reakciji biorazgradnje AV109 boje katalizovane peroksidazom iz celog zrna soje u šaržnom reaktoru .....	59
11.2. Biorazgradnja antrahinonske boje peroksidazom izolovanom iz sojinih ljuspica u šaržnom sistemu	61
11.2.1. Optimizacija pH i vremena kontakta biorazgradnje AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica u šaržnom sistemu.....	61
11.2.2. Optimizacija početne koncentracije enzima za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica u šaržnom sistemu .....	62
11.2.3. Optimizacija početne koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica u šaržnom sistemu .....	63
11.2.4. Optimizacija početne koncentracije boje za biorazgradnju AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica u šaržnom sistemu .....	64
11.2.5. Optimizacija temperature za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica u šaržnom sistemu .....	65
11.3.1. Optimizacija pH i vremena kontakta biorazgradnje AV109 boje peroksidazom iz krompirovih ljuski u šaržnom sistemu.....	66
11.3.2. Optimizacija početne koncentracije enzima za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz krompirovih ljuski u šaržnom sistemu.....	68

11.3.3.	Optimizacija početne koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz krompirovih ljuski u šaržnom sistemu .....	70
11.3.4.	Optimizacija početne koncentracije boje za biorazgradnju AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski u šaržnom sistemu.....	71
11.3.5.	Optimizacija temperature za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz krompirovih ljuski u šaržnom sistemu .....	72
11.3.6.	Kinetika biorazgradnje AV109 boje katalizovane peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u šaržnom reaktoru .....	73
11.4.	Stabilnost peroksidaze iz krompirovih ljuski i sojinih ljuspica tokom skladištenja .....	76
11.5.	Ispitivanje stabilnosti enzima u sintetičkoj otpadnoj vodi.....	76
<b>12.</b>	<b>Biorazgradnja antrahinonske boje peroksidazom izolovanom iz otpadnog materijala u kontinualnom sistemu .....</b>	<b>77</b>
12.1.	Biorazgradnja antrahinonske boje peroksidazom iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu.....	77
12.1.1.	Optimizacija početne koncentracije enzima za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu .....	78
12.1.2.	Optimizacija početne koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu .....	79
12.1.3.	Optimizacija koncentracije boje za biorazgradnju AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu.....	80
12.1.4.	Optimizacija prečnika reaktora za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu.....	81
12.2.	Biorazgradnja antrahinonske boje peroksidazom iz krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu	83
12.2.1.	Optimizacija početne koncentracije enzima za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu .....	83
12.2.2.	Optimizacija početne koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu.....	84
12.2.3.	Optimizacija koncentracije boje za biorazgradnju AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu.....	85
12.2.4.	Optimizacija veličine prečnika mikroreaktora za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu .....	86
<b>13.</b>	<b>Imobilizacija peroksidaze iz sojinih ljuspica u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu .....</b>	<b>87</b>
13.1.	Oksidacija pektina .....	87
13.2.	Uticao taložnog reagensa na imobilizaciju peroksidaze iz sojinih ljuspica.....	88
13.3.	Uticao koncentracije umreživača na imobilizaciju peroksidaze iz sojinih ljuspica u obliku umreženih enzimskih agregata .....	90
13.4.	Optimizacija procesnih parametara biorazgradnje AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica imobilisanom u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu.....	92
13.4.1.	Optimizacija pH vrednosti i vreme kontakta biorazgradnje AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica imobilisanom u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu .....	92
13.4.2.	Optimizacija koncentracije enzima za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica imobilisanom u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu .....	93

13.4.3.	Optimizacija koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica imobilisanom u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu .....	94
13.4.4.	Optimizacija koncentracije boje za biorazgradnju AV109 CLEA imobilisanom peroksidazom iz sojinih ljuspica u šaržnom sistemu .....	95
13.5.5.	Operativna stabilnost peroksidaze iz sojinih ljuspica imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata .....	96
13.6.1.	Uticaj taložnog reagensa na imobilizaciju peroksidaze iz krompirovih ljuski u obliku umreženih enzimskih agregata .....	97
13.6.2.	Uticaj koncentracije umreživača na aktivnost peroksidaze iz krompirovih ljuski imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata .....	98
13.6.3.	Optimizacija pH i vremena kontakta biorazgradnje boje AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu .....	99
13.6.4.	Optimizacija koncentracije enzima za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu .....	100
13.6.5.	Optimizacija koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu .....	101
13.6.6.	Optimizacija koncentracije boje za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu .....	102
13.6.7.	Operativna stabilnost peroksidaze iz krompirovih ljuski imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata .....	103
13.7.	Imobilizacija peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski umrežavanjem u kontinualnom sistemu	104
13.7.1.	Optimizacija koncentracije umreživača za imobilizaciju peroksidaze iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu.....	105
13.7.2.	Optimizacija koncentracije peroksidaze iz sojinih ljuspica za umrežavanje u kontinualnom sistemu	106
13.7.3.	Operativna stabilnost imobilisane peroksidaze iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu u reakciji biodegradacije AV109.....	107
13.8.1.	Optimizacija koncentracije umreživača za imobilizaciju peroksidaze iz krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu.....	108
13.8.2.	Optimizacija koncentracije peroksidaze iz krompirovih ljuski potrebne za umrežavanje u kontinualnom sistemu.....	109
13.8.3.	Operativna stabilnost imobilisane peroksidaze iz krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu u reakciji biodegradacije AV109.....	110
<b>14.</b>	<b>Skenirajuća elektronska mikroskopija.....</b>	<b>111</b>
<b>15.</b>	<b>Hemijska potrošnja kiseonika .....</b>	<b>112</b>
<b>16.</b>	<b>LC-MS i GC-MS analiza proizvoda biorazgradnje antrahinonske AV109 boje peroksidazom iz krompirovih ljuski i sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu .....</b>	<b>112</b>
<b>V</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>121</b>

# Uvod

Povećanje svetske populacije, kao i povećana proizvodnja uzrokuju nastanak sve veće količine otpada koji prevazilazi mehanizme prirodnog prečišćavanja. Tekstilna industrija je značajan industrijski sektor jer zapošljava 35 miliona radnika u svetu i sa 7% učestvuje u ukupnom svetskom izvozu. Međutim, ovaj industrijski sektor predstavlja jedan od najvećih globalnih zagađivača [1]. Zagađenje vazduha koje potiče od tekstilne industrije sastoji se od azotnih i sumpornih oksida, kao i od isparljivih organskih jedinjenja. Ostaci tekstilnih tkanina i prediva, kao i ambalaža čine primarni čvrsti otpad. Tekstilni mulj, kao tečni otpad, pored velike zapremine, sadrži velike koncentracije organskih materija, mikronutrienta, teških metala i patogenih mikroorganizama [2]. Najveći ekološki problem ove industrije je ispuštanje netretirane otpadne vode u vodotokove, što predstavlja 80% od ukupnog zagađenja [3]. U sastavu većine otpadnih voda, nivo biohemijske i hemijske potrošnje kiseonika (BPK i HPK) je visok. Značajan stepen zagađenosti vode je uzrokovan nerazgradivim organskim jedinjenjima, posebno bojama [4].

Procenjuje se da se više od 10.000 različitih boja koristi za bojenje tekstila i da se na globalnom nivou proizvodi više od 0,7 miliona tona sintetičkih boja [5]. Bojenje tekstilnog materijala može biti šaržni, kontinualni ili polu-kontinualni proces. Izbor procesa zavisi od tipa materijala, veličine serije i zahteva kvaliteta obojene tkanine. Bojenje tekstilnog materijala se najčešće odvija šaržno.

Zbog neefikasnosti procesa za vreme postupka bojenja i dorade tekstila 200.000 tona boje dospeva u otpadne vode [5]. Uglavnom se boje slabo uklanjaju konvencionalnim tretmanima otpadnih voda zbog njihove stabilnosti na uticaj svetlosti, temperature, vode, deterdženata i slično [6]. Osim uticaja na izgled vodotokova, boje u vodotokovima ometaju apsorpciju sunčeve svetlosti i na taj način otežavaju proces fotosinteze, kao i nivo rastvorenog kiseonika što utiče na vodeni svet [7]. Tekstilne boje imaju toksično, mutageno i kancerogeno dejstvo [8], teško se uklanjaju i njihova postojanost u životnoj sredini im omogućava kretanje kroz lanac ishrane što dovodi do biomagnifikacije.

Imajući u vidu da je bojenje tekstila jedan od industrijskih procesa koji imaju značajan negativan efekat na životnu sredinu, u daljem tekstu su detaljnije opisani procesi bojenja i dorade tekstila.

# I TEORIJSKI DEO

## 1. Bojenje tekstila

Proces bojenja ima ključnu ulogu za uspešnu trgovinu tekstilnim proizvodima. Zahtevi potrošača za različitim nijansama boja koje prate modne trendove su iz godine u godinu u porastu. Shodno tome, potrebno je zadovoljiti zahteve potrošača za različitim nijansama boja koje su na materijalu postojane prilikom izlaganja svetlosti ili prilikom mnogobrojnih ciklusa pranja. Da bi se odgovorilo na ove zahteve neophodno je da boje kojim se boje tkanine imaju veliki afinitet prema materijalu, da su uniformne, postojane na svetlost i da su pristupačne u pogledu cene. Ostala svojstva boje kao što su hemijska struktura, klasifikacija, komercijalna dostupnost, ekonomičnost i slično određuju koji će se postupak bojenja primeniti [9]. Takođe, bitan faktor za odabir tehnologije bojenja je i sama priroda vlakana. Uglavnom, postupak bojenja se može podeliti u tri faze: priprema, bojenje i dorada.

U fazi pripreme se neželjene nečistoće uklanjaju sa tkanina pre bojenja, što znači da se tkanine tretiraju vodenim alkalnim rastvorima i detergentima, ili enzimima. U cilju uklanjanja prirodne boje tkanina, vrši se izbeljivanje vodonik-peroksidom ili jedinjenjima koja sadrže hlor. Ako se tkanina prodaje bela, dodaju se optička sredstva za beljenje.

Operacija bojenja sastoji se od nanošenja boje na tekstil, uglavnom upotrebom sintetičkih boja. Ova faza često zahteva povišene temperature i pritiske [10]. Ne postoji boja koja može da oboji sve vrste vlakana, niti vlakna koja mogu da se boje svim poznatim bojama. Tokom ove faze, boje i pomoćne supstance, kao što su površinski aktivne materije, kiseline, baze, elektroliti, agensi za heliranje, emulgatori, sredstva za omekšavanje i sl. nanose se na tekstil kako bi se dobila uniformna boja i postigla postojanost pogodna za krajnju upotrebu tkanine [11]. Postupak se sastoji od difuzije boje u tečnu fazu, zatim dolazi do adsorpcije boje na spoljnoj površini vlakana i na kraju do adsorpcije boje na unutrašnjoj površini vlakana. U zavisnosti od upotrebe tkanina, može se postići različita postojanost boje. Na primer, kupaći kostimi ne smeju da puštaju boju u vodi, a tkanine za automobile ne bi trebalo da blede nakon dužeg izlaganja sunčevoj svetlosti. Za postizanje ovih svojstava koriste se različite vrste boja i hemijski aditivi tokom operacija koje se izvode u fazi dorade tkanina. Bojenje se takođe može postići nanošenjem pigmentata (pigmenti se razlikuju od boja, jer ne pokazuju hemijski ili fizički afinitet prema vlaknima) zajedno sa vezivnim agensima (polimeri koji fiksiraju pigment na vlakna) [12].

U zavisnosti od vrste materijala i zahteva za kvalitet finalnog proizvoda, bojenje se može vršiti kontinualno ili šaržno. Najčešće se primenjuje šaržni način bojenja.

Pri šaržnom bojenju, boja se postepeno adsorbuje iz kupatila na materijal koji se boji tokom relativno dugog vremenskog perioda. Bojenje se odvija u razređenim rastvorima u zatvorenom reaktoru. Za razliku od kontinualnog postupka, umesto da prođe kroz različita kupatila u dugom nizu odeljaka opreme, u šaržnom procesu tkanina ostaje u jednom delu opreme, koji se naizmenično puni vodom i potom suši, u svakom koraku procesa. Svaki put kada je tkanina izložena odvojenom kupatilu, koristi se pet do deset puta veća zapremina vode od mase tkanine. Određene mašine za šaržno bojenje dozvoljavaju rad samo na temperaturama do 100°C. Međutim, ako oprema ima opciju za rad pod pritiskom, postoji mogućnost za postizanje temperature iznad 100°C. Vlakna od

pamuka, rajona, najlona, vune se mogu bojiti na temperaturama do 100°C. Poliester i druga sintetička vlakna lakše se boje na temperaturama iznad 100°C.

U kontinualnom procesu bojenja, duge rolne tkanine prolaze kroz niz koncentrovanih rastvora. Za to vreme dovodi se toplota i para u sam sistem. Tkanina zadržava veći deo hemikalija dok ispiranjem se uklanja veći deo supstanci koje su bile prisutne u rastvoru. Svaki put kad tkanina prođe kroz rastvor, koristi se količina vode jednaka težini tkanine [13].

Stepen fiksiranja boje zavisi od prirode vlakana. Vlakna koja se koriste u tekstilnoj industriji mogu se podeliti u dve grupe: prirodna i sintetička. Prirodna vlakna su biljnog ili životinjskog porekla: vuna, pamuk, lan, svila, juta, konoplja, a koja su po strukturi celuloza ili proteini. Sintetička vlakna su organski polimeri: poliester, poliamid, rajon, acetat ili akril [14].

Vezivanje boje za vlakno uključuje primarno četiri vrste interakcija: Van der Valsove (Van der Waals), vodonične, kovalente i jonske veze. Proces se najčešće odvija u vodenom rastvoru [15].

Jonsko vezivanje boja na tkanine nastaje kao rezultat interakcija između suprotno naelektrisanih jona prisutnih u bojama i vlaknima, poput onih između pozitivnog centra amino grupa i karboksilnih grupa u vlaknima i jonskih naelektrisanja na molekulu boje, i jonsko privlačenje između katjonskih i anjonskih grupa boje ( $\text{SO}_3^-$  i  $\text{COO}^-$ ) prisutnih u molekulu polimera akrilnih vlakana. Tipični primeri ove vrste interakcije mogu se naći u bojenju vune, svile i poliamida [12].

Van der Valsove interakcije nastaju kada su  $\pi$ -orbitale molekula boje i vlakna dovoljno blizu tako da su molekuli boje pričvršćeni za vlakno bez stvaranja veze. Tipični primeri Van der Valsove interakcije su bojenje vune i poliestera bojama sa visokim afinitetom prema celulozi.

Vodonične veze nastaju između atoma vodonika kovalentno vezanih u boji i slobodnih elektronskih parova atoma donora u centru vlakna. Ova interakcija se može naći u bojenju vune, svile i sintetičkih vlakana poput etil-celuloze.

Kovalentne veze nastaju između molekula boje koje sadrže reaktivne grupe (elektrofilne grupe) i nukleofilne grupe na vlaknu, na primer veza koja nastaje između atoma ugljenika reaktivnog molekula boje i atoma kiseonika, azota ili sumpora, hidroksil-anjona ili tiolne grupe prisutne u tekstilnim vlaknima. Ova vrsta veze može se naći u bojenju pamučnih materijala [9],[14].

Faza dorade uključuje tretmane hemijskim jedinjenjima u cilju poboljšanja kvaliteta tkanine. Postupak presovanja, vodootpornost, omekšavanje, antistatička zaštita i mikrobna/fungalna zaštita su primeri tretmana tkanine koji se primenjuju u procesu dorade.

## 2. Procena štetnog uticaja otpadnih voda na životnu sredinu

Tekstilna industrija je jedan od najvećih zagađivača u svetu. Nezavisno od svojstva izabranih boja i metoda, postupak bojenja uključuje pranje materijala u kupatilu kako bi se uklonio višak boja koje nisu bile fiksirane na vlaknu u prethodnim fazama. Tokom pranja, procenjuje se da se približno 10-50 % boja koje se koriste u procesu bojenja izgubi i završi u otpadnim vodama, zagađujući životnu sredinu. Na primer, procenjeno je da će u 2021. godini, u Bangladešu količina otpadnih voda biti 349 miliona  $\text{m}^3$  [16]. Pored problema izazvanog gubitkom boje tokom procesa bojenja, povezanim sa zagađenjem životne sredine, smatra se da je tekstilna industrija jedan od najvećih zagađivača i zbog velikih količina vode koju koristi samo postrojenje, što dovodi do stvaranja velikih količina otpadnih voda. Procenjuje se da je za svaki kilogram proizvedenog pamuka potrebno približno 200 L vode [17]. Takođe, za jedan par farmerki potrebno je 3200 L vode, 400 MJ energije pri čemu se

proizvodi 32 kg CO<sub>2</sub>. Ovo je ekvivalentno vožnji od 125 km, zalivanju vrta u toku 106 min i napajanju računara za vreme od 556h [18]. Otpadne vode tekstilne industrije su složene smeše mnogih zagađivača, i sastoje se od boja koje potiču od procesa bojenja do povezanih pesticida i teških metala. Kada nisu pravilno tretirane, otpadne vode mogu izazvati kontaminaciju izvora vode. Dakle supstance koje završavaju u vodotokovima su efluenti koji sadrže velike količine organske materije i biološku potrošnju kiseonika, niske koncentracije rastvorenog kiseonika, jaku boju i mali nivo biorazgradivosti. Pored vizuelnog zagađenja, ova jedinjenja izazivaju promene u biološkim ciklusima vodenog sveta, a posebno utiču na procese fotosinteze i oksigenacije u vodi [19].

Jedna vrsta zagađujućih materija u otpadnim vodama su derivati 2-benzotriazola (PBTA), koji se stvaraju redukcijom azo boja natrijum-hidrogensulfitom i upotrebom hipohlorne kiseline. Osim stvaranja PBTA, može doći do formiranja visoko mutagenih aromatičnih amina, čija se mutagenost smatra većom od same boje. U vodi, redukcija boje se može desiti u dve faze: primenom redukcionih sredstava na novoobojena vlakna radi uklanjanja viška nevezane boje, što bi moglo dovesti do ispiranja boje tokom pranja i upotrebom redukcionih sredstava u procesu beljenja, kako bi otpadne vode bile bezbojne i usklađene sa zakonskim regulativima. Redukovani bezbojni efluent koji i dalje sadrži boje dospeva u komunalno postrojenje za prečišćavanje otpadnih voda, gde se efluent tretira hlorom pre nego što se ispusti u vodotok. U vodotokovima je moguće stvaranje PBTA. Nekoliko različitih PBTA već je opisano u literaturi, a njihove hemijske strukture variraju u zavisnosti od boje [20]. Ako nepravilno tretirani efluent dospe u vodotokove, i ako se kontaminirani vodotok koristi za navodnjavanje zemljišta doći će do začepljenja pora zemljišta i s tim do smanjenja produktivnosti zemljišta. Pored toga dolazi do povećanja tvrdoće tla što sprečava prodor korena. Otpadne vode koje protiču kroz odvodne cevi uzrokuju koroziju i smanjenje prečnika kanalizacionih cevi.

Zanimljivo je da je pojava obojenosti vodotokova prihvaćena kao estetski problem a ne kao ekotoksična opasnost. Tako na primer, javnost prihvata zelenu, plavu ili smeđu boja reka, ali „neprirodne“ boje kao što su crvena ili ljubičasta izazivaju najviše zabrinutosti [21].

Boje koje se koriste u tekstilnoj industriji potencijalno su opasne po zdravlje, jer mogu izazvati rak creva i abnormalnosti u fetusu [22]. Tekstilne boje mogu izazvati alergije kao što su kontaktni dermatitis i respiratorne bolesti, alergijske reakcije u očima, iritaciju kože, iritaciju sluzokože i gornjih disajnih puteva. Reaktivne boje formiraju kovalentne veze sa celuloznim, vunanim i poliamidnim vlaknima. Pretpostavlja se da se na isti način reaktivne boje mogu vezati za -NH<sub>2</sub> i -SH grupe proteina u živim organizmima. Pored toga, intenzivne studije su pokazale da obojeni alergeni mogu dovesti do hemijske i biološke asimilacije, uzrokuju eutrofikaciju, sprečavaju ponovnu oksigenaciju u vodotokovima, kao i da ubrzavaju genotoksičnost i mikrotoksičnost usled izdvajanja jona metala, koji su u sastavu određenih boja [23].

Potencijalni zdravstveni rizik se javlja adsorpcijom azo boja i njihovih proizvoda degradacije, razgradnje (toksični amini) kroz gastrointestinalni trakt, kožu, pluća, kao i stvaranje hemoglobinskih adukata. Zabeležene vrednosti srednje letalne doze (LD<sub>50</sub>) za aromatične azo boje kreću se 100-2000 mg/kg telesne mase. [24]. Neke azo boje mogu oštetiti DNK tako da dolazi do stvaranja malignih tumora. Elektron-donor supstituenti u orto i para položaju mogu povećati kancerogeni potencijal ovih boja. Azo boje kao što su Direct Black 38 (prekursor benzidina) i azodisalicilat (prekursor 5-fenilendiamina) i njihovi derivati razgradnje izazivaju rak kod ljudi i životinja. Ovoj grupi kancerogenih jedinjenja pripada i veliki broj anilina (2-nitroanilin, 4-hloroanilin, 4,4'-dimetilendianilin, 4-fenilendiamin), nitrozoamini, dimetilamini i sl. [21]. Pokazalo se da su antrahinonske boje, iako su manje zastupljene nego azo boje, više toksične za mikroorganizme i ljudske ćelije od azo boja.

### 3. Boje

Boje i pigmenti se mogu definisati kao „supstance sposobne da apsorbuju vidljivu svetlost i koje mogu preneti svoju obojenost na druge materije“. Obojene supstance se mogu podeliti na neorganske i organske, a zatim na prirodne i sintetske. Najvažnija podela obojenih supstanci je ona koja ih deli na boje i pigmente [25].

Kod organskih jedinjenja, apsorpcija zračenja dovodi do ekscitovanja elektrona iz spoljne orbitale na više nivoa. Jedinjenja koja su potpuno zasićena ne apsorbuju svetlost u vidljivom delu spektra, jer su atomi međusobno vezani kovalentnim  $\sigma$ -vezama. Jedinjenja koja sadrže izolovane dvostruke veze apsorbuju izrazito u UV-oblasti. Jedinjenja sa više konjugovanih dvostrukih veza, apsorbuju u vidljivom delu spektra. Konjugovane  $\pi$ -veze (dvostrukih i trostrukih) utiču na pokretljivost elektrona, a samim tim i obojenosti jedinjenja koja ih sadrže. Takve veze se u nekom jedinjenju mogu prostirati na ceo molekul ili na deo, i naziva se hromofora. Hromofore predstavljaju linearni ili ciklični sistemi konjugovanih dvostrukih veza. Talasna dužina pri kojoj jedinjenje maksimalno apsorbuje zračenje je specifična za hromofornu grupu u datom molekulu, i od nje će zavisi boja jedinjenja. Izvesni supstituenti na hromofori mogu da promene spektar, tako što pomeraju maksimum apsorpcije ka većim talasnim dužinama i menjaju vrednosti apsorpcije. Supstituenti sposobni da proizvedu takav efekat nazivaju se auksohromne grupe ili auksohromi. Sklop hromofore, auksohrome i antiauksohrome se naziva hromogenom [14].

Prva poznata organska boja, plavi indigo je korišćena prilikom umotavanja mumija u Egipatskim grobnicama pre oko 4000 godina. Sve boje korišćene do 1856. godine su bile prirodnog porekla i pripremane su u malim razmerama, uglavnom ekstrahovane iz biljaka, insekata i školjki. Engleski hemičar Vilijam Perkin (William H. Perkin) je 1856. godine otkrio prvu sintetičku boju, mauvein i od tada počinje proizvodnja sintetičkih boja u velikim razmerama [14].

#### 3.1. Klasifikacija boja

Međunarodni sistem klasifikacije boja je Indeks boja (eng. Colour index, CI); to je publikacija koju je objavilo Society of Dyers and Colourists 1924. godine [26]. Boje su klasifikovane davanjem generičkog imena određenoj upotrebnoj karakteristici boje, što je praćeno brojem indeks boja (Color Index – CI) koji se daje na osnovu hemijske strukture boje. Dodatno, boje mogu biti klasifikovane po hemijskoj strukturi ili po metodi primene.

Boje se mogu podeliti u tri kategorije: prema materijalu koji se boji, prema rastvorljivosti i prema hemijskoj strukturi [14]. Druga klasifikacija deli boje kao: katjonske, anjonske i nejonske. U tabeli je dat prikaz klasifikacije boje prema upotrebi i hemijskoj strukturi.



**Tabela 1.** Klasifikacija boje prema upotrebi i hemijskoj strukturi [14]

<b>Hemijska struktura</b>	<b>Materijal koji se boji</b>	<b>Tip boje</b>
<i>azo</i>	vuna, pamuk, svila, papir, koža, najlon, rajon, poliester, poliamid	kisele, azoik, bazne, direktne, disperzne, fluorescentne, močilske, reaktivne, rastvorne
<i>antrahinonske</i>	vuna, papir, pamuk, svila, koža, poliester, poliamid, acetat, najlon, polimeri	kisele, disperzne, močilske, reaktivne, rastvorne, redukcione
<i>trifenilmetanske</i>	vuna, svila, papir, koža, polimeri	kisele, rastvorne
<i>nitro</i>	vuna, svila, papir, poliester, acetat, poliamid	kisele, disperzne
<i>azinske</i>	poliester, papir, vuna, koža, svila	kisele, bazne
<i>ksantenske</i>	poliester, poliamid, papir, vuna, svila, koža	stilbenske, pirazolske, kumarinske
<i>stilbenske</i>	pamuk, rajon, papir, koža, najlon	direktne, fluorescentne
<i>ftalocijaninske</i>	polimeri, lakovi, najlon, vuna, svila, papir	direktne, reaktivne, rastvorne

### 3.1.2. Antrahinonske boje

Antrahinonske boje imaju uglavnom ljubičastu, plavu i zelenu nijansu. Odlikuju se sa postojanošću na svetlost. Mogu se podeliti na: močilske, kisele, disperzne i redukcione. Boja korišćena u ovoj disertaciji pripada kiselim bojama, te stoga je dat kratak pregled kiselih antrahinonskih boja.

Kisele antrahinonske boje mogu se klasifikovati u 5 grupa:

1. 1-amino-4-(supstituisane) amino antrahinone-2-sulfonske kiseline
2. diamino dihidroksi antrahinone slufonske kiseline
3. 1,4-diaminoantrahinoni sa spoljašnjom sulfonskom grupom
4. 1-amino- 4-hidroksi antrahinon sa sa spoljašnom sulfonskom grupom
5. 1-amino-2-ariloksi-4-(supstituisani)amino antrahinoni
6. druge kisele antrahinonske boje

#### **1-amino-2-ariloksi-4-(supstituisane)amino antrahinon-2-sulfonske kiseline**

Antrahinonske boje koje pripadaju ovoj grupi se dobijaju kondenzacijom bromaminske kiseline sa aromatičnim ili cikloalifatičnim aminima. Ova grupa plavih kiselih boja je od velikog komercijalnog značaja. Nijansa i postojanost na svetlosti se mogu podesiti vairanjem različitih amina. U ovu grupu spadaju C.I. Kiselo plavo 25, C.I. Kiselo plavo 62, C.I. Kiselo plavo 129, C.I. Kiselo plavo 40.

#### **Diamino dihidroksi antrahinone slufonske kiseline**

Ovo su najstarije sintetske boje za vunu, ali njihov značaj je drastično opao. U ovu grupu spada C.I. Kiselo plavo 43.

### 1,4-diaminoantrahinoni sa spoljašnom sulfonskom grupom

Ove boje se dobijaju sulfonovanjem odgovarajuće boje koja predstavlja derivat hinizarina ili halo-amino-antrahinona. Nijansa ove boje može da varira od plave do zelene u zavisnosti od korišćenog amina. Boje iz ove grupe pokazuju veću postojanost na svetlosti nego derivati bromaminske kiseline. Primeri: C.I. Kiselo zeleno 25, C.I. Kiselo zeleno 41, C.I. Kiselo ljubičasto 42.

### 1-amino-4-hidroksi antrahinon sa spoljašnjom sulfonskom grupom

Boje iz ove grupe su ljubičaste. Dobijaju se nepotpunom reakcijom hinizarina sa arilaminima, praćenom sulfonovanjem. Namenjene su za sintetska poliamidna vlakna. Kao primer je boja C.I. Kiselo ljubičasto 43.

### 1-amino-2-ariloksi-4-(supstituisani)amino antrahinoni

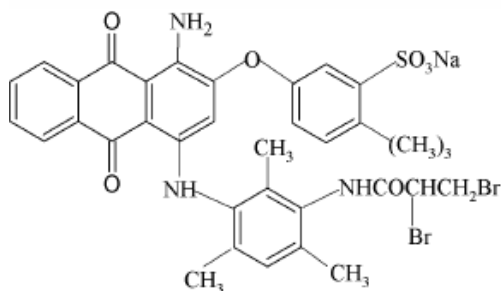
U drugoj grupi su ljubičaste kisele boje sa sjajnom nijansom i postojanošću, uvedene između 1960 i 1970. Bakarni kompleksi azo ljubičaste kisele boje su boje mutne nijanse, dok trifenilmetinske boje imaju slabu postojanost na svetlost. Antrahinonske ljubičaste boje ovog tipa se koriste za bojenje prirodnih ili sintetskih poliamidnih vlakana u svetlim nijansama. Dobijaju se u tri stupnja: 1) kondenzacijom bromaminske kiseline sa di- ili tri- alkanilinom, zatim 2) kondenzacijom alkilfenolom i na kraju 3) sulfonovanjem. U ovu grupu spada boja C.I. Kiselo ljubičasto 109.

### Druge kisele antrahinonske boje

Pored gore pomenutih klasa, na raspolaganju je čitav niz posebno razvijenih boja. Na primer, derivati antrimidina i karbazola su poznati kao sive i braon boje za vunu. Boja koja pripada ovoj grupi je C.I. Kiselo crno 48 [27].

### C.I. Kiselo ljubičasto 109

AV109 (Slika 1) je kisela antrahinonska boja sa molekulskom formulom  $C_{35}H_{34}Br_2N_3NaO_7S$  i molarnom masom 823,52 g/mol. Koristi se za bojenje svile, vune i poliamida. Drugi nazivi za ovu boju su Lanaset ljubičasto B, Kiselo ljubičasto B, Erionyl ljubičasto A-B.



*Slika 1. Hemijska struktura boje Kiselo ljubičasto 109*

## 4. Tehnike prečišćavanja otpadnih voda

Značajan problem predstavlja što tekstilna industrija troši velike količine pitke vode. U mnogim zemljama postoji nedostatak pitke vode, pa je potrebno recikliranje otpadnih voda ili smanjenje

utroška pitke vode. Uzimajući u obzir nepovoljan uticaj tekstilnih otpadnih voda na životnu sredinu i zdravlje ljudi, razvijene su brojne metode za prečišćavanje otpadnih voda.

Tretman otpadnih voda je složen proces, koji se odvija u 4 faze: 1) preliminarni, 2) primarni, 3) sekundarni i 4) tercijarni tretman. U preliminarnom tretmanu uklanjanju se plutajuće materijale kao što su grane, papir i sl. Primarni tretman služi za uklanjanje čvrstih čestica, sekundarni za oksidaciju i nitrifikaciju organskih materija, dok tercijarni tretman služi za uklanjanje specifične komponente prisutne u otpadnoj vodi, koji se ne mogu prečistiti sekundarnim tretmanom [28]. U svakoj fazi, primenjuju se različite tehnike. Po načinu uklanjanja zagađujućih materija, oni se mogu klasifikovati u tri kategorije: a) separacione i koncentracione tehnike, b) procesi dekompozicije i degradacije i c) procesi izmene [29] Takođe, tehnike prečišćavanja se mogu podeliti na: hemijske, fizičke i biološke metode u zavisnosti od načina delovanja upotrebljenog sredstva.

## 4.1. Fizičke metode prečišćavanja otpadnih voda

### Adsorpcija

Adsorpcioni je tehnika koja se najčešće koristi u prečišćavanju otpadnih voda. Pakovani reaktori za adsorpciju uključuju faze zasićenja (adsorpcije, tj. nanošenja) nakon kojih sledi desorpcija (eluiranje, tj. regeneracija). Međutim kad regeneracija nije opcija, adsorbens se može ukloniti i odložiti, a kad su fenolne zagađujuće materije u pitanju, uništava se spaljivanjem u posebnim pećima. Adsorpcione metode se koriste u velikoj meri zbog svoje efikasnosti u uklanjanju postojanih toksičnih jedinjenja koja je teško tretirati drugim metodama. Adsorpcija se ne koristi samo za uklanjanje boja i fenola, već generalno ima široku primenu u tretmanu otpadnih voda [30].

### Aktivni uglji

Među mnogim ispitivanim adsorbensima kao što su aktivni uglj, treset, adsorbensi na bazi silicijum-dioksida i zeoliti, aktivni uglj se pokazao kao najpogodniji. On je najčešće korišćeni adsorbens u industriji zbog njegove velike sposobnosti adsorpcije, velike specifične površine i homogenosti. Njegova mikroporozna, homogena struktura karakteriše se specifičnom površinom od 500 m<sup>2</sup>/g [31]. Danas, istraživanja su usmerena ka pronalaženju jeftine i efikasne alternative postojećem komercijalnom aktivnom uglju. Cena aktivnog uglja proizvedenog od biomaterijala je mnogo niža od cene komercijalnog aktivnog uglja [32]. Za proizvodnju aktivnog uglja mogu se koristiti različiti otpadni materijali kao što su: piljevina [33], bagasa [34], kokosova ljuska [35], ljuska kafe [36] i dr.

Aktivni uglj je vrlo efikasan u uklanjanju katjonskih, moćilskih i kiselih boja [37]. Ipak, da bi se proces uklanjanja boja ubrzao moraju se koristiti ogromne količine aktivnog uglja [38], tako da je ova metoda izuzetno skupa; pored toga, regeneracija (gubitak 10-15% početnog adsorpcionog kapaciteta) i odlaganje finalnog otpada moraju posebno da se rešavaju za svaki pojedinačni slučaj.

### Silika-gel

Silika-gel spada u poroznim i amorfnim adsorbensima, različite granulacije. Njegova priprema vrši se koagulacijom koloidne silicijumove kiseline. U poređenju sa aluminijum-oksikom, silika-gel ima aktivnu površinu je znatno veća, u opsegu od 250 do 900 m<sup>2</sup>/g. Ovaj adsorbent je efikasan za uklanjanje baznih boja [39]. Ipak, njegova visoka cena i moguće sporedne reakcije su ga učinile nepogodnim za komercijalnu upotrebu [40].

## Zeoliti

Zeoliti su uglavnom prirodni mikroporozni adsorbensi, ali mogu da budu i sintetički. Smatraju se selektivnim adsorbensima sa jonoizmenjivačkim svojstvima. Koriste se za uklanjanje boja, međutim ne uvek efikasno, jer je pokazano da adsorpcija zavisi od pH, koncentracije boje, i temperature, pa je optimizacija procesa ključna za efikasno uklanjanje boja [40].

Glavni problem u vezi sa primenom fizičkih metoda za uklanjanje boje su relativno dugo vreme kontakta potrebno za efikasnu adsorpciju, veliki prostor, kao i potreba za regeneracijom adsorbensa.

## 4.2. Hemijske metode prečišćavanja otpadnih voda

### Koagulacija/flokulacija sa dodatkom reagenasa

Zagađujuće materije koji se nalaze u otpadnim vodama su fino dispergovane čestice (koloidi), koje su negativno naelektrisane na površini, što dovodi do međusobnog odbijanja i nemogućnosti spajanja i formiranja čestica veće mase (flokule), pa se ne mogu ukloniti sedimentacijom. Uklanjanje ovakvih čestica može se vršiti koagulacijom i flokulacijom. Ovi predstavljaju kombinacija fizičkih i hemijskih metoda. Jedne od metode za uklanjanje boje iz obojene otpadne vode je hemijski tretman sa koagulišućim/flokulirajućim reagensom [41]. Metoda uključuje dodatak jona aluminijuma ( $Al^{3+}$ ), kalcijuma ( $Ca^{2+}$ ) ili gvožđa ( $Fe^{3+}$ ). Pokazala se kao ekonomski isplativa metoda i koja se uspešno koristi za uklanjanje disperznih, sumpornih i redukcionih boja. Međutim, nije toliko efikasna pri uklanjanje azo reaktivne, kisele- i bazne boje. Glavni nedostatak ove metode je formiranje mulja u velikim količinama, kao i to da je uticaj pH izražen. Koagulacija u kombinaciji sa enzimskim metodama je efikasna za tretman fenolne otpadne vode [42], jer reagense za koagulaciju poput hitozana i polietilenimina uklanjaju reaktivne međuproizvode time sprečavajući inaktivaciju enzima.

### Napredni oksidacioni procesi (eng. Advanced Oxidation Proceses, AOPs)

AOP su među najčešće korišćenim metodama za obezbojavanje, uglavnom zbog kratih vremena reakcije i male količine reagenasa. Svako oksidaciono sredstvo poseduje različiti oksidacioni potencijal. U Tabeli 1, date su vrednosti redoks potencijala hemijskih oksidacionih sredstava, kao i vrednosti redoks potencijala nekoliko peroksidaza.

**Tabela 2.** Redoks potencijal različitih hemijskih i enzimskih oksidacionih sredstava [43], [44]

Oksidaciono sredstvo	Redoks potencijal, V	Enzim	Redoks potencijal, V
Fluor	3,06	Peroksidaza iz rena	0,89
Hidroksil radikali	2,8	Bovin laktoperoksidaza	0,98
O <sub>3</sub>	2,08	Peroksiadza iz soje	0,95
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,78	Versatil peroksidaza	1,37
Hipohlorit	1,49	Peroksidaza is <i>C. cinereus</i>	1,18
Hlor	1,36		
Hlor-dioksid	1,27		
O <sub>2</sub>	1,23		

### **Fentonov (Fenton) reagens**

Fentonova reakcija se odvija pomoću vodonik-peroksida i soli gvožđa(II) pri čemu se dobijaju velike količine hidroksil-radikala, a koji se koriste za oksidaciju različitih organskih jedinjenja [45]. Korišćenje Fentonovog reagensa je jedan od najefikasnijih načina stvaranje  $\cdot\text{OH}$  radikala. Mehanizam generisanja  $\cdot\text{OH}$  radikala je kompleksan. Ukratko, vodonik-peroksid se katalitički razlaže dejstvom  $\text{Fe}^{2+}$  pri niskom pH ( $\text{pH} \leq 3$ ) dajući hidroksil-radikale:



$\text{Fe}^{3+}$  reaguje na niskom pH, sa  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gde se  $\text{Fe}^{3+}$  redukuje regenerišući katalizator i daje  $\text{HO}_2\cdot$  radikal. Fentonov reagens je popularna metoda za tretman otpadne vode, zato što je gvožđe dostupno i netoksično, a vodonik-peroksid je jednostavan za rukovanje. Za efikasnu reakciju je niska pH i višak vodonik-peroksida je od ključne važnosti, a to obično podrazumeva da je potrebno deponovanje značajne količine feri soli nakon završene reakcije [46]. Dodatno, tehnički zahtevi za optimizaciju i praćenje efikasnosti Fentonove reakcije su kompleksni i skupi, što ograničava njenu široku upotrebu. Fentonov reagens se može primeniti u uklanjanju rastvornih i nerastvornih boja (kiselih, direktnih, u kompleksu sa metalima). Nedostatak ovog procesa je uski radni pH opseg ( $< 3,5$ ), formiranje mulja i dugo reakciono vreme [47].

Kombinacija Fenton reakcije i UV zračenja naziva se foto-Fenton reakcijom. Ova tehnika poboljšava efikasnost Fenton reakcije [48].

### **Ozonizacija**

Ozonizacija je najefikasnija tehnologija, ali je ekonomski neopravdana. Ozonizacija se može koristiti za uklanjanje boje i smanjivanje HPK u potpunosti, što bi omogućilo upotrebe vode u sledećem ciklusu procesa. Nedostatak ove tehnologije je potreba za proizvodnjom ozona na licu mesta, kao i visoka cena. Ozonizacija podrazumeva molekularni ozon koji deluje na nukleofilnim mestima i nezasićenim vezama organskih molekula. Ozon predstavlja jedan od najsnažnijih oksidanasa koji se koristi [49], sudeći po njegovom visokom redoks potencijalu i na visokom i niskom pH ( $E^\circ=2,07\text{V}$  i  $E^\circ=1,24\text{V}$ ).

### **Hlor i hlorni derivati**

Hlor predstavlja jako oksidaciono sredstvo koje se može upotrebiti u vidu kalcijum- ili natrijum-hipohlorita. Koristi se u procesu obezbojavanja boja – direktne, reaktivne, kisele, i metalokompleksne boje se mogu uspešno ukloniti hipohloritom. Ako je boja donekle postojana na biološku razgradnju, predtretman hipohloritom može poboljšati ukupnu mineralizaciju. Nerastvore disperzne i redukcionne boje su postojane na ovaj tretman [50]. Korišćenje hlora kao gasa je jeftin proces, ali generiše hlorovana organska jedinjenja, koja mogu da budu toksičnija od polaznih jedinjenja. Hlorovana organska jedinjenja koja mogu da nastanu tokom ovog tretmana su: hlorobenzenamini, hlorofenoli, hloronitrobenzeni i sl. [51].

### **Elektrohemijska metoda**

Elektrohemijski tretman uključuje redoks reakcije pomoću električnog polja u prisustvu elektrolita. Obuhvata elektrokoagulaciju, elektroflotaciju, elektrooksidaciju, elektrodezinfekciju i elektrotaloženje. Ova metoda ima održivih prednosti u odnosu na druge postupke kao što su povećana efikasnost, jednostavnost izvođenja i ekološka opravdanost [52]. Može se koristiti za različite vrste efluenta budući da je glavni reagens elektron koji ne proizvodi čvrst otpad [53].

## Ultrazvuk

Hemijske zagađujuće materije u otpadnim vodama se mogu razgraditi pomoću ultrazvuka. Ultrazvuk se može koristiti u kombinaciji sa AOPs, spaljivanjem, nadkritičnom oksidacijom vode kao i drugim tehnologijama. Razgradnja se odvija u blagim uslovima za relativno kratko vreme. Otpadna voda ulazi u vibracioni deo nakon dodavanja odabranog flokulanta u regulacioni rezervoar. Deo organske materije u otpadnoj vodi se razgrađuje pod intenzivnim oscilacijama. Ultrazvučna tehnologija za sad je ograničena na laboratorijsku primenu [54].

### 4.3. Biološke metode

#### Razgradnja boje mikrobnim kulturama

Različite mikrobne vrste kao što su bakterije, gljive i alge mogu se koristiti za uklanjanje boja iz tekstilnih efluenata. Gljive belog truleža se najčešće koriste za razgradnju boja. *Ghanoderma sp. En3*, *Irpex lacteus*, *T. versicolor*, *A. niger* su samo neke od vrsta koje su pokazale uspešnu degradaciju boja [55]–[58]. Iako je njihov potencijal za tretman obojenih voda veliki, postoje ograničenja za njihovu upotrebu na industrijskom nivou. Potrebna je niska vrednost pH, kao i duže vreme zadržavanja za potpuno obezbojavanje. Takođe gljive mogu inhibirati rast i aktivnost ostalih korisnih mikroorganizama prisutnih u vodi. Nedostatak pri korišćenju gljive belog truleža je što su ove mikrobne vrste osetljive na sile smicanja i imaju potrebu za aeracijom [59], [60]. Bakterije su takođe pokazale veliki potencijal za uklanjanje boja iz otpadnih voda. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium* su efikasno obezbojili otpadnu vodu [61], [62]. Utvrđeno je da metaboliti nastali kao rezultat obezbojavanja su manje toksični u poređenju sa netretiranim otpadnim vodama. Čiste kulture bakterija mogu ukloniti boje iz tekstilnih efluenata, ali mešovite kulture imaju bolji učinak od čistih kultura zbog sinergijske metaboličke aktivnosti. Pojedinačni sojevi mogu direktno da razgrađuju boje, ili proizvod razgradnje jednog soja može biti supstrat za drugi mikroorganizam. Mešane kulture bakterija i gljive takođe se mogu koristiti za uklanjanje boja. Jang (Yang) i sar. su pokazali da dolazi do 90% smanjenja HPK i intenziteta obojenja pomoću konzorcijuma sastavljenog od bakterije i gljivice [63]. U Tabeli 3, prikazano je uklanjanje antrahinonskih boja mikroorganizmima.

**Tabela 3.** Razgradnja antahinonskih boja pomoću mikrobnih kultura

Mikroorganizam	Boja/Koncentracija	Razgradnja	Vreme, h	Referenca
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Reaktivno plavo 19 30 mg/L	90%	72 – 144	[64]
<i>E. coli</i>	Kiselo plavo 324, 277, 260, 40,25 Kiselo ljubičasto 43 Bazno plavo 47 300 mg/L	80% - 277/260 60% - 324 50% - 40/25/47 30% - 43	16	[65]
<i>P. vulgaris</i> <i>P. mirabilis</i>	Reaktivno plavo 4 Reaktivno plavo 19 30 mg/L	100%	12	[66]
<i>B. cereus</i>	Kiselo plavo 25 100mg/L Disperzno crveno 11 Reaktivno brilijantno plavo K-	96% - 25 90% - 11 90% - K-GR 20% - 56	6 24 24 48	[67]

	GR Kiselo plavo 56 50 mg/L			
<i>D. squalens</i>	Reaktivno plavo 19 30 mg/L	90%	2	[68]
<i>Bakterijska flora DDMY1</i>	Reaktivno plavo 19 300 mg/L	98%	48	[69]

#### 4.3.2. Enzimski razgradnja boje

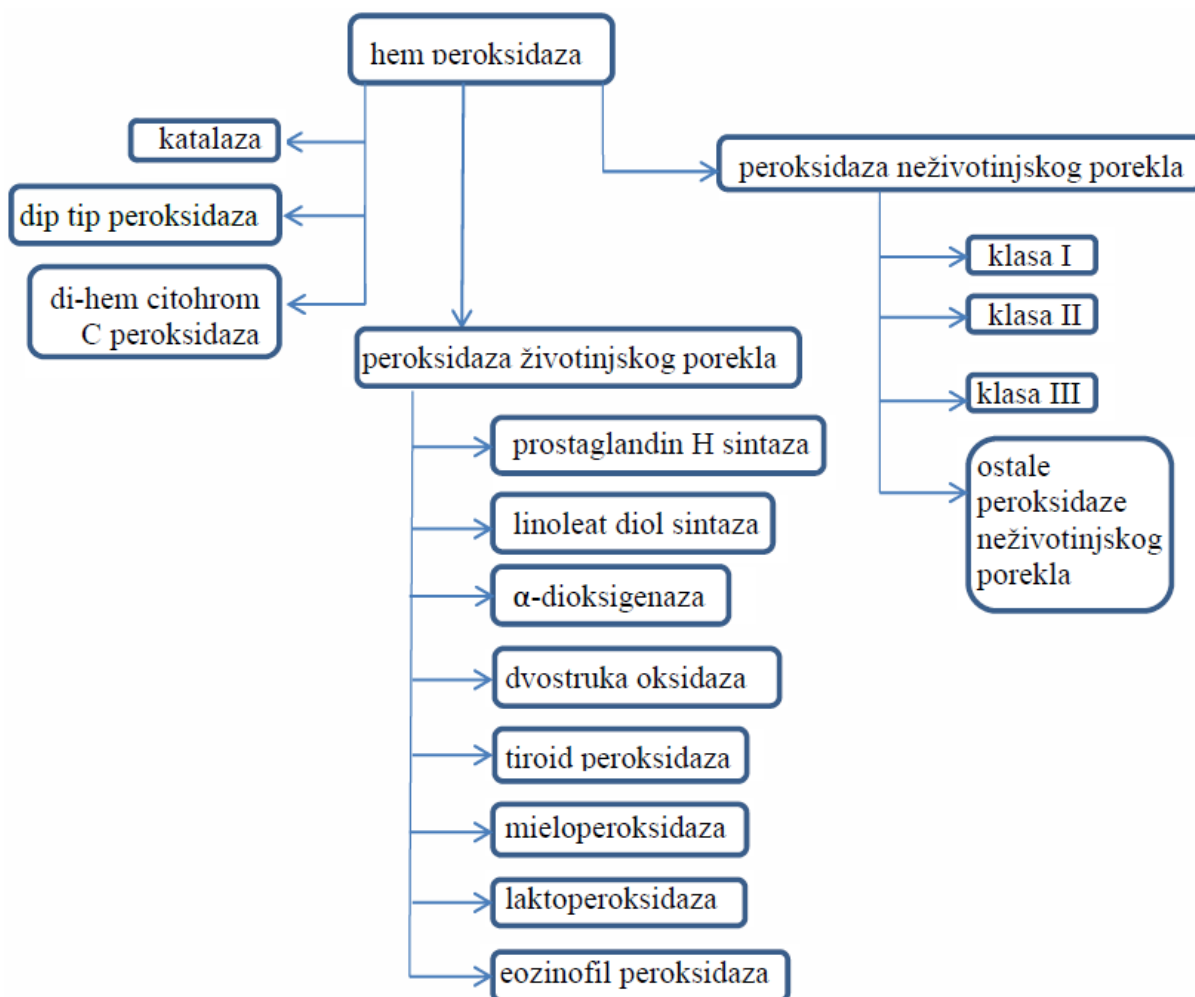
Enzimi koji se koriste za razgradnju boje pripadaju porodici oksidoreduktaza, uključujući peroksidaze, azoreduktaze (deluju specifično na azo boje) i lakaze. Prednosti enzima u poređenju sa mikrobnim kulturama su nezavisnost od brzine rasta, ne postoje difuziona ograničenja supstrata i/ili proizvoda, lakši su za upotrebu u uslovima visoke/niske temperature, pH i pritiska, poseduju veću specifičnost, i značajno je lakši postupak rukovanja i skladištenja u poređenju sa mikrobnim kulturama [70], [71]. Primenom različitih rekombinantnih tehnika i metoda imobilizacije dobijaju se enzimi unapređenih svojstava što dodatno otvara brojne mogućnosti za poboljšanje procesa uklanjanja sintetičkih boja katalizovanog izolovanim enzimima. U okviru ove disertacije korišćena je peroksidaza iz soje, sojinih ljuspica i krompirovih ljuski za razgradnju antrahinonske boje. U sledećem delu biće detaljnije opisana peroksidaza.

## 5. Peroksidaze

Peroksidaze (EC 1.11.1.x) su enzimi koji učestvuju u nekoliko važnih fizioloških i razvojnih procesa koji koriste različite perokside (ROOH) kao elektron akceptore za katalizu oksidativnih reakcija. Njihova glavna podela je na hem i ne-hem proteine. One su široko rasprostranjene i prisutne u svim živim organizmima. Kod sisara su uključene u različite biološke procese, od imunog sistema do hormonskih regulacija. Kod biljaka imaju ulogu u metabolizmu auksina, lignina i formiranju suberina, povezivanju komponenata kletičnih zidova, odbrani protiv patogena ili ćelijskoj elongaciji. Ljudi imaju više od 30 peroksidaza, dok *Arabidopsis thaliana* ima 130 peroksidaza koje su grupisane u 13 različitih porodica i 9 podfamilija.

Peroksidaze su postale atraktivne u poslednje vreme zbog njihovog potencijalnog učešća u prevencijama bolesti i humanoj patologiji. Hem peroksidaze ubrzavaju oksidativno oštećenje više nego što ga inhibiraju. Neke hem peroksidaze animalnog porekla koriste H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za generisanje agresivnih oksidanata koji se bore protiv napada mikroorganizama [72].

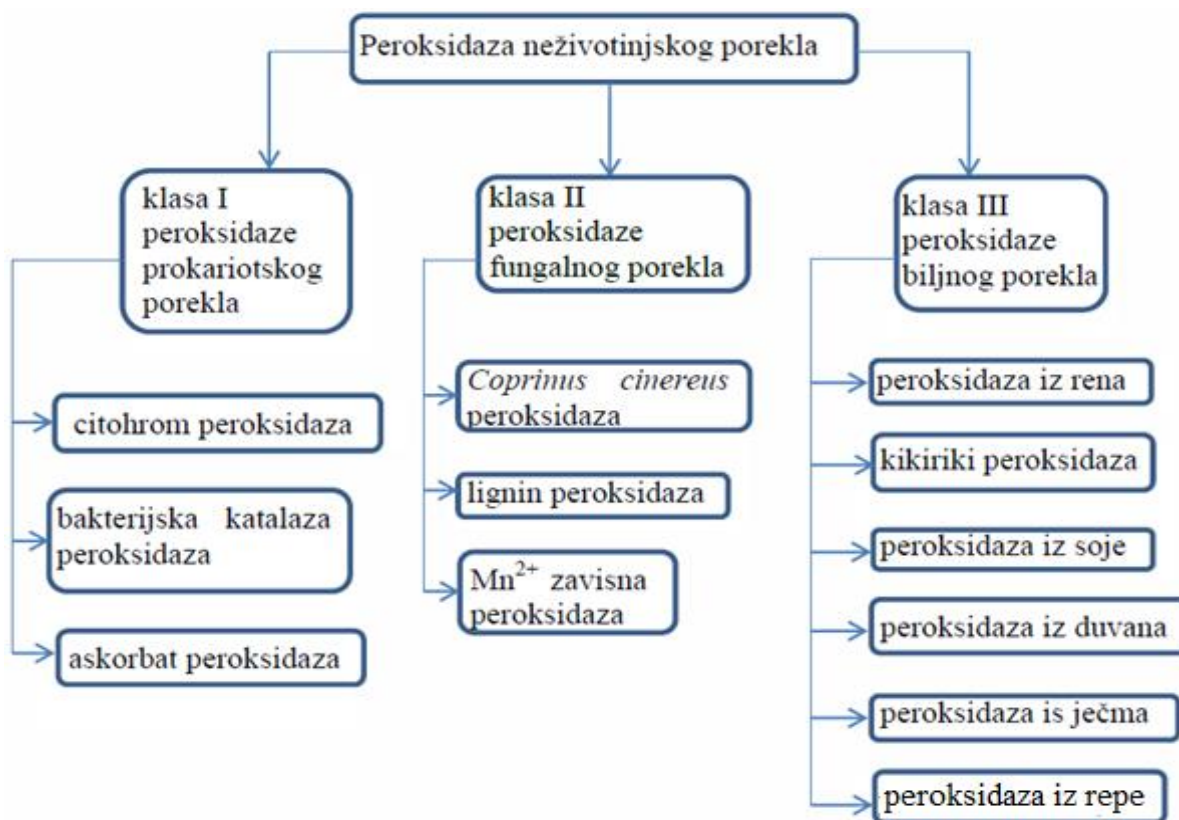
Na biohemijskom nivou, peroksidaze su klasifikovane u enzimsku pod-podklasu E.C.1.11.1.x, donor: vodonik-peroksid oksidoreduktaza [73]. Na nivou aminokiselinskih sekvenci, većina hem peroksidaza pripada dvema velikim familijama. Jedna obuhvata peroksidaze biljnog, bakterijskog i gljivičnog porekla- neživotinjskog porekla, a drugoj pripadaju peroksidaze životinjskog porekla (Slika 2).



**Slika 2.** Podela hem-peroksidaza [74]

Peroksidaze neživotinjskog porekla su klasifikovane u tri klase: klasa I, klasa II i klasa III (Slika 3). Peroksidaze klase I: uključuju prokariotske i eukariotske peroksidaze, koje uglavnom učestvuju u detoksifikaciji slobodnih radikala kiseonika (RVK, eng. *ROS-reactive oxygen species*) [75]. To su citohrom C peroksidaza (CCP; EC 1.11.1.5), askorbat peroksidaza (APX; EC 1.11.1.11) i katalaza peroksidaza (CP; EC 1.11.1.6). Citohrom C peroksidaza koristi redukujući ekvivalent citohroma C i redukuje  $H_2O_2$  do vode. Askorbat peroksidaze redukuju vodonik-peroksid pomoću askorbata kao redukujućeg ekvivalenta. Katalaza peroksidaze, koja se najčešće nalazi u bakterijama, je bifunkcionalni antioksidativni enzim koji pokazuje aktivnost katalaza i peroksidaza. Zbog njihove sposobnosti da oksiduju  $H_2O_2$  do  $O_2$  i dismutiraju  $H_2O_2$ , štite bakterije od oksidativnog stresa [76]. U svojoj strukturi, peroksidaze klase I nemaju disulfidne mostove,  $Ca^{2+}$ , a ne poseduju ni signalnu sekvencu za endoplazmatični retikulum.





**Slika 3.** Podela peroksidaza neživotinjskog porekla [74]

Klasa II peroksidaza: ovoj klasi pripadaju isključivo peroksidaze fungalnog porekla koje učestvuju u biodegradaciji lignina [77]. Gljivična lignin peroksidaza koja uzrokuje raspadanje drveta, se izlučuje u prirodi (LiPs; EC 1.11.1.14) katalizuje reakciju depolimerizacije lignina i poseduje ogromni potencijal za odlaganje otpada brojnih fenolnih i ne-fenolnih jedinjenja. Ova vrsta gljiva isto luči i mangan peroksidazu (MnP; EC 1.11.1.13), koja katalizuje peroksid zavisnu oksidaciju Mn(II) do Mn(III) i enzim oslobađa Mn(III) kao oksalat-Mn(III) kompleks koji služi kao difundirajući redoks medijator koji oksiduje lignin. Suprotno od peroksidaza klase I, peroksidaze klase II imaju N-terminalne signalne peptide, 4 disulfidna mosta i  $\text{Ca}^{2+}$  u njihovoj strukturi.

Klasa III peroksidaza: U ovoj grupi se nalaze peroksidaze iz rena, soje, kikirikija, čija uloga je od krucijalnog značaja u životnom ciklusu biljaka [78]. Učestvuju u raznim fiziološkim procesima: metabolizmu ćelijskog zida, lignifikaciji, suberizaciji, metabolizmu auksina, zarastanju rana, metabolizmu reaktivnih vrsta kiseonika, ROS, metabolizmu reaktivnih vrsta azota, (RNS, *eng. reactive nitrogen species*), rastu i zrenju plodova, odbrani od patogena. Slično kao peroksidaze klase II, sadrže N-terminalne signalne peptide, 4 disulfidna mosta i  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **Fiziološka uloga peroksidaza biljnog porekla**

Peroksidaze klase III imaju raznovrsnu ulogu u životnom ciklusu biljaka: metabolizmu ćelijskog zida, lignifikaciji, suberizaciji, metabolizmu RVK, odbrani protiv patogene infekcije, rastu i zrenju plodova, germinaciji semena i sl. [79].

### **Primena peroksidaza**

Peroksidaze se primenjuju u industriji zbog njihove sposobnosti da katalizuju oksido-redukcione reakcije u prisustvu  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gde su supstrati različita fenolna i nefenolna jedinjenja. Koriste se u

analitici, zaštiti životne sredine, medicini i sl. Primjenjuju se i u bioremedijaciji zagađujućih materija kao što su fenoli, delignifikaciji u drvenoj industriji, tehnologiji biosenzora, sintezi polimera. Koriste se u sklopu metode za određivanje i kvantifikaciju  $H_2O_2$  u biološkim i industrijskim uzorcima [80]. Mogu se koristiti za određivanje lipidne peroksidacije u proizvodima od mesa, u polimerizaciji i precipitaciji fenola, kao i u dekolorizaciji industrijskih efluenta. U daljem tekstu je razmotrena najčešća primena peroksidaza.

### **Primena kao biosenzora**

Biosenzori se najviše primenuju u medicini, kontroli kvaliteta, monitoringu prehrambenih proizvoda i životne sredine kao i u istraživanjima. Prednost enzimskih biosenzora u poređenju sa analitičkim metodama je ta što enzimski poseduju veliku selektivnost i senzitivnost.

U razvoju biosenzora se najviše koristi peroksidaza iz rena (HRP, *eng. horseradish peroxidase*). Biosenzori na bazi peroksidaze iz rena obuhvataju različite metode detekcije uključujući amperometrijski imunosenzor, maseni balans, fotonaponsku spektroskopiju, optičke i hemiluminiscentne metode [81], [82]. Potenciometrijski biosenzori su razvijeni u kombinaciji sa enzimom i transdukterom koji detektuje varijacije u protonima. Koristeći biosenzor na bazi peroksidaze pomoću potenciometrijske metode može se detektovati glukoza, maltoza ili laktat. Pored HRP, druge biljne peroksidaze kao što su one iz krompira, duvana, kikirikija, soje imaju potencijalnu primenu kao biosenzori. Peroksidaza iz slatkog krompira, zbog njene dostupnosti, specifičnosti i superiornih elektrohemijskih karakteristika smatra se dobrim izborom. [83]. Pri proizvodnji biosenzora veća prednost se daje peroksidazama iz soje u odnosu na HRP zbog njihove veće termostabilnosti.

### **Primena u dijagnostičkim kitovima**

Peroksidaze imaju široku primenu u razvoju dijagnostičkih kitova. HRP se najčešće koristi u analitičke svrhe. Međutim ostale biljne peroksidaze poseduju širok raspon pH i temperaturnog optimuma što ih pravi dobrom zamenom za HRP. Peroksidaze su pogodne za proizvodnju različitih dijagnostičkih kitova na osnovu tehnologije enzim - antitela, budući da oni proizvode stabilne hromogene proizvode [84].

Peroksidaza se koristi i u razvoju kitova za određivanje holesterola u kombinaciji sa holesterol oksidazom i holesterol esterazom [85]. Njena primena je takođe u dijagnostičkim setovima za rak prostate preko detekcije 8-hidroksideoksigvanozina i njegovih analoga u urinu [86]. Monitoring glukoze za dijabetes melitus i laktat za hipoksiju i ishemiju su od velikog značaja u medicini i poželjno je razvijanje osetljivog biosenzora za određivanje  $H_2O_2$  koji je stabilan na  $37^\circ C$  i većim temperaturama. Trake za određivanje koncentracije glukoze su napravljene pomoću imobilisane  $\beta$ -galaktozidaze, galaktoze oksidaze i HRP [11]. Biosenzori se uspešno koriste u genetički usmerenim enzimskim predlek terapijama (GDEPT, *eng. gene-directed enzyme prodrug therapy*) za tretman kancera u biomedicinskim sektorima [87].

### **Primena u dekolorizaciji industrijskih boja**

Peroksidaze imaju veliki potencijal u procesu obezbojavanja, tj. uklanjanju zagađujućih materija iz tekstilne industrije. Primena peroksidaza iz rena, šećerne trske, paradajza, soje u degradaciji i detoksifikaciji poliaromatičnih ugljovodonika, polihlorovanih bifenila i drugih sintetskih industrijskih boja se pokazala takođe kao uspešna [88]. U Tabeli 4 je dat pregled dostupnih literaturnih podataka koji se odnose na obezbojavanja antrahinonskih boja enzimima, preciznije peroksidazama.

**Tabela 4.** Efikasnost obezbojavanja antrahinonskih boja pomoću peroksidaza iz različitih izvora

Enzim	Boja/Koncentracija, mg/L	Obezbojavanje %	Vreme, min	Referenca
Peroksidaza iz rena	Reaktivno plavo/120	96	6	[71]
Peroksidaza iz rena	Remazol plavo/1000	35	9h	[89]
Peroksidaza iz rena	Lanaset plavo 2R/10-100	90	2	[90]
Peroksidaza iz rena	Kis. plavo 225, AV109/30	83/70	30/15	[91]
Peroksidaza iz soje	Kiselo ljubičasto 109/40	82	30	[92]
Peroksidaza iz krompira	Kiselo ljubičasto 109/40	73	50	[93]
Lakaza	Reaktivno plavo 19/100	89	30	[94]
Lakaza	Reaktivno plavo 19/300	100	72h	[97]
Lakaza	Reaktivno plavo 19/200	85	210	[96]
DD peroksidaza	Reaktivno plavo 19/150	95	10	[97]

### **Primena u drvnoj i papirnoj industriji**

Lignin, fenolni heteropolimer negativno utiče na eksploataciju biljne biomase u drvnoj i papirnoj industriji, pa se zato lignin uklanja da bi se proizveo papir dobrog kvaliteta. Hemijska delignifikacija uzrokuje proizvodnju različitih zagađujućih materija, pa je enzimska degradacija lignina bolja alternativa. Lignin i mangan peroksidaze se uspešno koriste za pulpiranje, beljenje kao i za selektivnu delignifikaciju u papirnoj industriji. Selektivna delignifikacija pomaže u proizvodnji celuloznih materijala koji se koriste kao efikasno biogorivo [98].

### **Bojenje kose**

Boje za kosu se sintetišu oksidativnom polimerizacijom prekursora boje (fenoli ili aminofenoli). Za ovu reakciju se koristi vodonik-peroksid (3%) koji inicira reakciju polimerizacije ali i obezbojava prirodni pigment kose, melanin. Ova koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oštećuje kosu ako se koristi više puta. Da bi se obezbedilo finije bojenje blažim procesom oksidacije mogu se koristiti enzimi kao oksidaze, peroksidaze i slično.

### **Primena u analitici**

Prednost enzimskog testa imunosorbenta (*eng. enzyme linked immunosorbent assays – ELISA*) u poređenju sa ostalim imuno testovima je njegova jednostavnost, ekonomičnost, pouzdanost i jednostavna oprema. ELISA se primenjuje najčešće u određivanju antigena ili antitela reakcijom promene boje katalizovane enzimom kao što je peroksidaza.

Ovi testovi sadrže antitelo vezano za enzim, odgovarajući antigen i hromogeni supstrat, koji daju obojeni proizvod u prisustvu enzima i intenzitet boje proizvoda je proporcionalan količini antigen/antitelo. Za ove vrste testova se najčešće koristi HRP za vezivanje antitela. Njihova primena je u skriningu monoklona antitela protiv opasnih mikotoksina različitih fungi kao što su: *Aspergillus*, *Penicillium* (ohratoksini) i *Fusarium* (T-2 toksini, trihoteceni) [99], u detekciji toksina, patogena i sl. Razvijeni su imunotestovi na osnovu HRP za određivanje nedeklarisanih mlečnih proteina (bovin β-laktoglobulin) u hrani.

Određivanje DNK pomoću komplementarne DNK probe je od velikog značaja u dijagnostici i istraživanju. Neradioaktivne DNK probe vezane za peroksidazu su bezbednije rešenje nego radioaktivne probe [100]. Peroksidaze su pogodne za mikročip analize zbog toga što katalizuju veliki broj elektron transfer reakcija sa prirodnim ili sintetskim supstratima. Koriste se direktno,

imobilisane na mikročipu [101] ili kao obeleživač za nukleinske kiseline, antitela ili druge proteine. Mikročipovi bazirani na HRP i njemu slični koriste se u ekspresionim analizama, rekombinacijama i genetskom mapiranju, analizama mutacija i sl.

### **Primena u sintezi organskih polimera**

Važnost hem- peroksidaze u reakcijama polimerizacije leži u njihovoj sposobnosti da oksiduju različite fenolne molekule pritom stvarajući reaktivne vrste (fenoksil-radikali) koje predstavljaju idealna mesta za umrežavanje. Primena peroksidaze u kalemljenju je jedna od popularnih primena u industriji. Slobodni radikali koji se formiraju u reakcijama katalizovanim peroksidazom, podstiču stvaranje novih funkcionalnih polimera kao što su polimerne smole [102]. Svoju primenu u organskoj sintezi peroksidaze pripisuju sposobnosti da katalizuju različite tipove reakcija:

1. Oksidativna dehidrogenacija ( $2RH + H_2O_2 \rightarrow 2R^\bullet + 2H_2O$ );
2. Prenos kiseonika ( $R + H_2O_2 \rightarrow RO + H_2O$ );
3. Oksidativna halogenacija ( $RH + H_2O_2 + HX \rightarrow RX + 2H_2O$ ) i
4.  $H_2O_2$  dismutacija ( $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ )

Bilinkovski i Dordik [103] su pronašli da polimerizacija fenola pomoću HRP i inkorporacija fenola u lignin, vodi do stvaranja polimera velikog potencijala kao fenolne smole. Na primer, enzimski sintetisane smole poli(*p*-fenilfenol) i poli(*p*-krezol) imaju velike temperature topljenja, dok poli(*p*-fenilfenol) ima veću električnu provodljivost nego fenol-formaldehidne smole. Inkorporacija krezola u lignin pomoću peroksidaze otvara nove mogućnosti upotrebe lignina kao sirovine za kalemljenje koja bi se koristila za dobijanje novih funkcionalnih polimera. Sposobnost peroksidaze da modifikuje lignin i razvije nove funkcionalne polimere sa izuzetnim svojstvima omogućava primenu lignina u razvoju polimernih adheziva, biodegradabilnih polimera, poliuretanskih kopolimera, boja, disperzanata u bojama i pesticidima [104]. Pomoću peroksidaze iz soje je uspešno razvijena polifenolna smola bez formaldehida, koja poseduje poboljšana svojstva u odnosu na smole dobijene konvencionalnom polimerizacijom.

Kim (Kim) i saradnici [105] su koristili peroksidazu iz soje (*eng. soybean peroxidase-SBP*) za katalizu oksidativne polimerizacije kardanola do polikardanola. Kardanol je odlična sirovina za pripremu visoko kvalitetne boje, emajla, smole za laminat i gume. Smole na bazi kardanola pokazuju otpornost na delovanje mineralnih ulja, kiselih i alkalnih uslova, termita i insekata. Takođe, njihov koeficijent trenja je manje osetljiv na temperaturne promene nego onaj kod smola baziranih na fenol-formaldehidu.

Kalra i Gros (Kalra, Gross) [106] su razvili polimerizaciju metil-metakrilata (MMA) katalizovanu peroksidazom (HRP). Poli(metil-metakrilat) (PMMA) je bezbojni polimer koji se koristi za proizvodnju optičkih materijala, PVC i polimera postojanih na grebanje. Peroksidaze se koriste za katalizu polimerizacije vinilnih monomera kao što su akrilamid, akrilna kiselina i metakrilati (metil-, feniletil-, 2-hidroksietil-metakrilat). Takođe je postignuta polimerizacija stirena u polistiren pomoću peroksidaze [107].

Kao što je već bilo pomenuto, izvori peroksidaze mogu biti različite biljke: paradajz, ren, šećerna trska, sočivo i dr. Međutim, primarna upotreba ovih izvora peroksidaze je prehrambena, što utiče na njihovu cenu. Visoka cena sirovina, postupke izolacije i prečišćavanja su doveli do alternativnih izvora peroksidaze, čime bi se postigla veća dostupnost enzima. Sa druge strane, nove tehnologije nalažu korišćenje „zelene“ tehnologije i čistiju proizvodnju. 4R principi (*eng. Reduce, Reuse, Recycle and Restore*) obuhvataju smanjenje, ponovnu upotrebu, recikliranje i obnovu resursa. Zbog toga, ispitivana je mogućnost izolovanja peroksidaze iz otpadnog materijala iz industrije za prerađu

krompira i soje. Krompir (*Solanum tuberosum L.*) je najznačajnija prehrambena kultura sa globalnom proizvodnjom od više od 368 miliona tona i proizvodnjom od 70–140 hiljada tona krompirovih ljuski širom sveta. Do nedavno, ovaj otpad se odlagao na deponije sa velikim negativnim uticajem na životnu sredinu i koristio kao stočna hrana sa niskom dodatom vrednošću u proizvodnom lancu. Danas se ukupan uticaj industrije prerade krompira na životnu sredinu kontroliše eksploatacijom ovog otpada za proizvodnju biološki aktivnih jedinjenja putem mikrobne fermentacije i obnavljanjem biokatalizatora koji se koriste u preradi otpadnih voda [108]. Osim krompira, velika proizvodnja i primena soje (*Glicine max L.*) širom sveta rezultira intenzivnim stvaranjem otpada prerade soje – ljuski, bogatih sojinom peroksidazom [109]. Dosadašnja istraživanja su pokazala da primena sojine peroksidaze predstavlja jeftinu i visokoefikasnu alternativu za tretman obojenih otpadnih voda [110].

## 5.1. Peroksidaza iz soje

Peroksidaza iz soje je glikoprotein sa molarnom masom 37 kD, koja pripada porodici sekretornih biljnih peroksidaza, klase III. Najpoznatiji član ove klase je peroksidaza iz rena, izoenzim C (HRP C) s kojom sojina peroksidaza - SBP pokazuje 57% identičnosti aminokiselinske sekvence. Potencijalna primena SBP je zanimljiva zbog velike termostabilnosti i velike aktivnosti i stabilnosti na nižim pH vrednostima [111]. Peroksidaza iz soje je oksidoreduktaza čija je najveća biološka uloga u prevenciji prevremene germinacije soje. Sojinu peroksidazu karakterišu tri domena po SCOP (*eng. structural classification of proteins*) klasifikacionom sistemu. SBP je mali protein sa 304 aminokiselinska ostatka i 7 glikozilovanih mesta koji čine 18% njene mase [103]. Takođe, SBP ima 13  $\alpha$ -heliksa i 2  $\beta$ - ploče. Prostetična grupa  $\text{Fe}^{3+}$ -protoporfirin IX, kao i 4 ključna aktivna mesta omogućavaju funkciju ovog enzima. Druga prostetska komponenta SBP je  $\text{Ca}^{2+}$ , čija funkcija nije okarakterisana. Molekul tris(hidroksimetil)-aminometana (TRIS) je vezan za tercijernu strukturu sojine peroksidaze, koji formira sekundarno mesto za vezivanje supstrata [112].

Pomoću softvera Expert Protein Analysis System (ExpASy) otkriveno je da se sojina peroksidaza karakteriše teorijskom vrednosti izoelektrične tačke 4,61 i deglikozilovanom molarnom masom 33117 Da. Poređenje enzimske strukture peroksidaza omogućava uvid u njihove funkcionalne sposobnosti. SBP i HRP-C imaju iste ključne strukturne karakteristike, kao što su lokacije 4 karakteristična disulfidna mosta, prisustvo jednog triptofana na položaju 117 i hem prostetične grupe. SBP i HRP-C imaju isti katalitički sistem, koji počinje oksidacijom dva elektrona iz hem molekula do intermedijera jedinjenje I (Šema 4). Uzastopna redukcija jednim elektronom stvara drugi intermedijer, te se vraća u osnovno stanje.

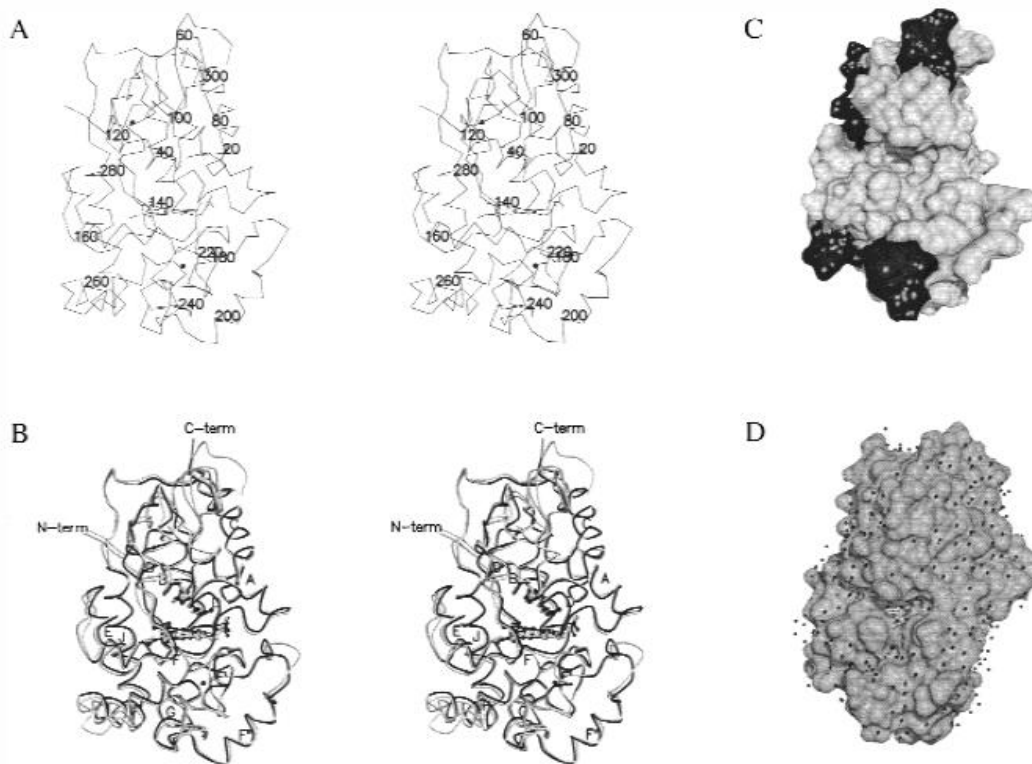
Iako je sojina peroksidaza strukturno najbližnja HRP-C, to se ne podrazumeva za homolognost aminokiselinske sekvence. Position-Specific Iterative BLAST (PSI-BLAST) je posebno dizajnirani program za poređenje proteinskih sekvenci. Pomoću PSI-BLAST je pokazano da sojina peroksidaza ima skoro identičnu primarnu strukturu kao prekursor peroksidaze 1 iz *Phaseolus vulgaris*.

Prednost SBP je njena manja osetljivost na  $\text{H}_2\text{O}_2$  inaktivaciju, što rezultuje većom robustnom aktivnošću. Dalje, SBP ima veliku katalitičku aktivnost u širokom opsegu pH 2 – 11, kao i u organskim rastvaračima. Dok se HRP-C inaktivira gubitkom hema na pH 2,4, SBP i dalje katalizuje reakcije oksidacije. Na kraju, sojina peroksidaza je aktivna i na većim temperaturama ( $T = 86\text{ }^\circ\text{C}$ ). Temperatura inaktivacije sojine peroksidaze je  $90,5\text{ }^\circ\text{C}$ , dok je temperatura inaktivacije HRP C  $81,5\text{ }^\circ\text{C}$ . Temperaturna inaktivacija kod oba proteina, kao i kod pH inaktivacije nastaje kao posledica gubitka hem grupe.

Povećana stabilnost SBP je rezultat specifične interakcije između važne aminokiseline i funkcionalne grupe. Na primer, kontakt između atoma sumpora iz Met37 i C8 vinila hema dovodi do potencijalne stabilnosti hem grupe SBP. Delokalizacija porfirinskog  $\pi$ -katjona jedinjenja I u reakcionoj šemi potencijalno utiče na stabilnost hem grupe [113].

Sekundarna i tercijarna struktura peroksidaze iz soje

Superpozicija i strukturno poravnanje biljne peroksidaze iz klase III pokazuju da SBP ima sličnu strukturu kao peroksidaza iz kikirikija (*eng. peanut peroxidase - PNP*) i HRP C [114]. Prikaz SBP je dat na Slici 4A, dok je superpozicija SBP i HRP C data na 4B. Svih 13  $\alpha$ -heliksa i dva  $\beta$ -lista karakterističnih za klasu III peroksidaza su prisutni i kod SBP.



**Slika 4.** A) Stereo prikaz SBP. B) Stereo prikaz superponiranih SBP (svetlo sivo) i HRP C (crno). C) Površina dostupna rastvaračima u istoj orijentaciji kao A) i B). D) Površina dostupna rastvaračima HRP C sa ferulinskom kiselinom vezana za aktivni centar [115].

Relativna elektrostatička svojstva svih okarakterisanih peroksidaza ne pokazuju velike razlike u njihovim kanalima za pristup supstrata. Međutim svojstva bočnih lanaca pokazuju razlike koje mogu uticati na specifičnost peroksidaze.

U svim strukturama, F'/F'' segment formira obod ispod kanala za pristup supstrata (Slika 4C). Kod HRP-C, SBP i PNP, nalazi se depresija u obodu ispod ulaza aktivnog centra, dok ostale okarakterisane peroksidaze ATP A2 (*Arabidopsis thaliana peroxidase A2*) i ATP N (*Arabidopsis thaliana neutral peroxidase*) imaju manje izražen obod. Ostaci 142/143 (HRP-C br) su odgovorni za ovaj fenomen. Hidrofobnost aminokiselinskog ostatka na položaju 143 određuje orijentaciju hidrofobnog aminokiselinskog ostatka u položaju 142. Kad je aminokiselinski ostatak u položaju 143 hidrofoban (npr. HRP C, SBP i PNP) hidrofobni aminokiselinski ostatak u položaju 142 ide prema ostatku u položaju 143 i otvara depresiju u F'/F'' segmentu.

Druga bitna topološka karakteristika je ekvatorijalni procep kod SBP, PNP i ATP A2. Kod ATP N i HRP-C, isti taj procep se ne nalazi preko celog kanala za pristup supstrata, nego je blokiran ostacima iz 'loop' regiona pre F'' heliksa. Ove razlike u topologiji su relevantne u određivanju smeru račvanja u reakcijama polimerizacije i/ili orijentaciji polimernih supstrata. Ako oksidovani monolignol reaguje sa ciljnim molekulom dok je vezan u kanalu za pristup supstrata (Slika 4D), onda će depresija u obodu dozvoliti da se reakcija odigrava između ciljanog i terminalnog C-atoma supstituenata akrilne kiseline. Ograničenje u ekvatorijalnom procepu onemogućuje reakciju između ciljanog i trećeg C-atoma supstituenta akrilne kiseline [115].

#### Hem propionil-protein interakcije

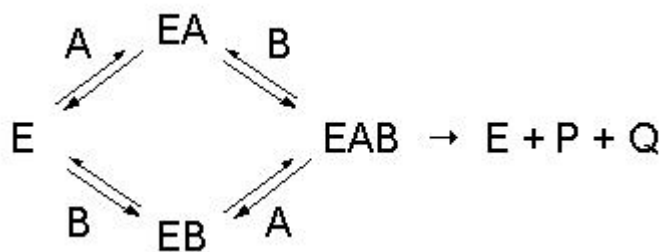
Moguću ulogu vodoničnih interakcija između hem propionil i matriks proteina u osetljivosti proteina na gubitak hema su razmatrali Mirza i saradnici (Mirza) [116]. SBP je manje osetljiv na gubitak hema nego HRP-C. Strukturno okarakterisane biljne peroksidaze se razlikuju u jednoj propionil-apoprotein interakciji. Obe SBP i HRP-A2 imaju vodonik vezan za bočni lanac arginina, dok je odgovarajući ostatak kod HRP-C glutamin (Q176, HRP-C br). PNP ima glutamin u ovom položaju, isto, dok ATP N, biljna peroksidaza koja lako gubi hem na sobnoj temperaturi i pH 9,0 ima ostatak lizina. U svim strukturno poznatim peroksidazama, isti propionil je vezan vodoničnom vezom za bočni lanac serina (S73, HRPC br). Drugi hem propionil je vezan vodoničnom vezom za bočni lanac arginina (R31, HRPC) i bočni lanac serina (S35, HRPC).

#### Aktivni centar

SBP poseduje 4 molekula vode u aktivnom centru. Struktura SBP je šesta po redu okarakterisana kristalna struktura sekretornih biljnih peroksidaza. Dostupne su informacije koje omogućavaju identifikaciju suptilnih strukturnih razlika koje uzrokuju različitu funkciju kod izoenzima peroksidaze.

## 6. Kinetika enzimskih reakcija katalizovanih peroksidazama

Izučavanjem kinetike reakcija katalizovanih peroksidazama klase III prikupljen je dovoljan broj podataka koji potvrđuju da se konverzije supstrata do proizvoda odigravaju po mehanizmu bisupstratnih reakcija. Bisupstratne reakcije čine 60% biohemijskih reakcija u prirodi. Klasifikuju se u dve grupe: sekvencijalne i ping-pong reakcije. Kod reakcija koje se odvijaju po sekvencijalnom mehanizmu, oba supstrata se vezuju za enzim pre nego što nastane prvi proizvod. Vezivanje oba supstrata za enzim dovodi do formiranja kompleksa prelaznog stanja, koji se naziva i ternarni ili centralni kompleks. U slučaju kad redosled vezivanja supstrata za enzim nije bitan, mehanizam se odvija sa nasumičnim vezivanjem supstrata, prikazan na Šemi 1. Ako se vezivanje supstrata i disocijacija proizvoda odvija po određenom redosledu, onda se naziva sekvencijalni mehanizam sa pravilnim vezivanjem supstrata (Šema 2).



**Šema 1.** Nasumični sekvencijalni mehanizam bisupstratne reakcije

Jednačina koja opisuje mehanizam nasumičnog vezivanja supstrata je sledeća[117]:

$$v_0 = \frac{v_{max}K_{SB}[A][B]}{K_{SB}[A][B]K_{mB}[B] + K_{mB}K_{SB}[A] + K_{SA}K_{mB}^2} \quad \text{Jednačina 1}$$

gde je:

$v_0$  – početna brzina, mmol/min

$v_{max}$  – maksimalna brzina reakcije, mmol/min

$K_{mA}$  – Mihaelis-Mentenova konstanta za supstrata A, mol/L (Michaelis-Menten)

$K_{mB}$  – Mihaelis-Mentenova konstanta za supstrata B, mol/L

$K_{SA}$  – konstanta disocijacije supstrata A i enzima, mol/L

$K_{SB}$  – konstanta disocijacije supstrata B i enzima, mol/L

$[A]$  – koncentracija supstrata A, mol/L

$[AB]$  – koncentracija supstrata B, mol/L



**Šema 2.** Sekvencijalni mehanizam sa pravilnim vezivanjem supstrata

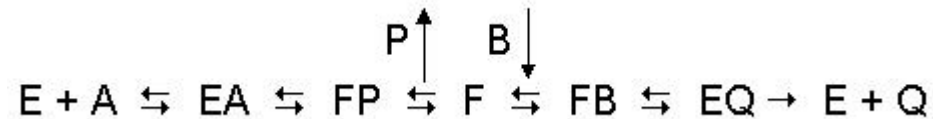
Jednačina (2) koja opisuje sekvencijalni mehanizam sa pravilnim vezivanjem supstrata [117]:

$$v_0 = \frac{v_{max}[A][B]}{K_{mA}[B] + K_{mB}[A] + K_{SA}K_{mB} + [A][B]} \quad \text{Jednačina 2}$$

Mehanizam reakcije u kojoj enzim reaguje sa jednim supstratom dajući kovalentno modifikovani enzim i oslobađajući jedan proizvod, a zatim reaguje sa drugim supstratom naziva se mehanizam dvostrukog premeštanja ili ping-pong. Nakon vezivanja jednog od dva supstrata, prvi proizvod se



oslobađa, ali neka hemijska grupa supstrata ostaje na katalitičkom mestu enzima stvarajući novi oblik stabilnog enzima. Nakon vezivanja drugog supstrata, kataliza se produžava dajući drugi proizvod uz regeneraciju originalnog enzima.



Šema 3. Ping pong bi-bi mehanizam

### Inhibicija bisupstratnih reakcija sa supstratom u višku

Ako je koncentracija supstrata povećana, postoji mogućnost inhibicije reakcije. Do smanjenja brzine reakcije može doći usled vezivanja jednog supstrata za aktivni centar enzima i da se na taj način sprečava vezivanje drugog supstrata. Inhibicija enzimske reakcije supstratom u višku se matematički opisuje:

$$v_0 = \frac{v_{max}[S_0]}{K_m + [S_0] + \frac{[S_0]^2}{K_i}} \quad \text{Jednačina 3}$$

gde je:

$K_m$  – Mihaelis-Mentenova konstanta, mol/L

$S_0$  – početna koncentracija supstrata, mol/L

$K_i$  – konstanta inhibicije, mol/L

U literaturi postoji ograničen broj podataka za kinetiku reakcije obezbojavanja boja peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski. Eksperimentalno je utvrđeno da reakcije slede ping – pong bi–bi mehanizam. U Tabeli 5 su date jednačine za pomenute mehanizme:

**Tabela 5.** Matematički modeli brzine enzimske reakcije koji se odvijaju po ping pong bi-bi mehanizmu.

*Ping–pong bez inhibicije*

Jednačina 4

$$v_0 = \frac{v_{max}[H]_0[D]_0}{K_{mD}[H]_0 + K_{mH}[D]_0 + [H]_0[D]_0}$$

*Ping –pong inhibicija bojom, D*

Jednačina 5

$$v_0 = \frac{v_{max}[H]_0[D]_0}{K_{mD}[H]_0 + K_{mH}[D]_0(1 + \frac{[D]_0}{K_{iD}}) + [H]_0[D]_0}$$

*Ping–pong inhibicija peroksidom, H*

Jednačina 6

$$v_0 = \frac{v_{max}[H]_0[D]_0}{K_{mD}[H]_0(1 + \frac{[H]_0}{K_{iH}}) + K_{mH}[D]_0 + [H]_0[D]_0}$$

Gde je:

$[H]_0$  – početna koncentracija vodonik-peroksida, mol/L

$[D]_0$  – početna koncentracija boje, mol/L

$K_{mD}$  – Mihaelis-Mentenova konstanta za boju, mol/L

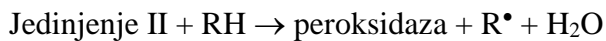
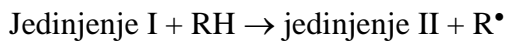
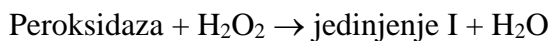
$K_{mH}$  – Mihaelis-Mentenova konstanta za vodonik-peroksid, mol/L

$K_{iD}$  – Konstanta inhibicije za boju, mol/L

$K_{iH}$  – Konstanta inhibicije za vodonik-peroksid, mol/L

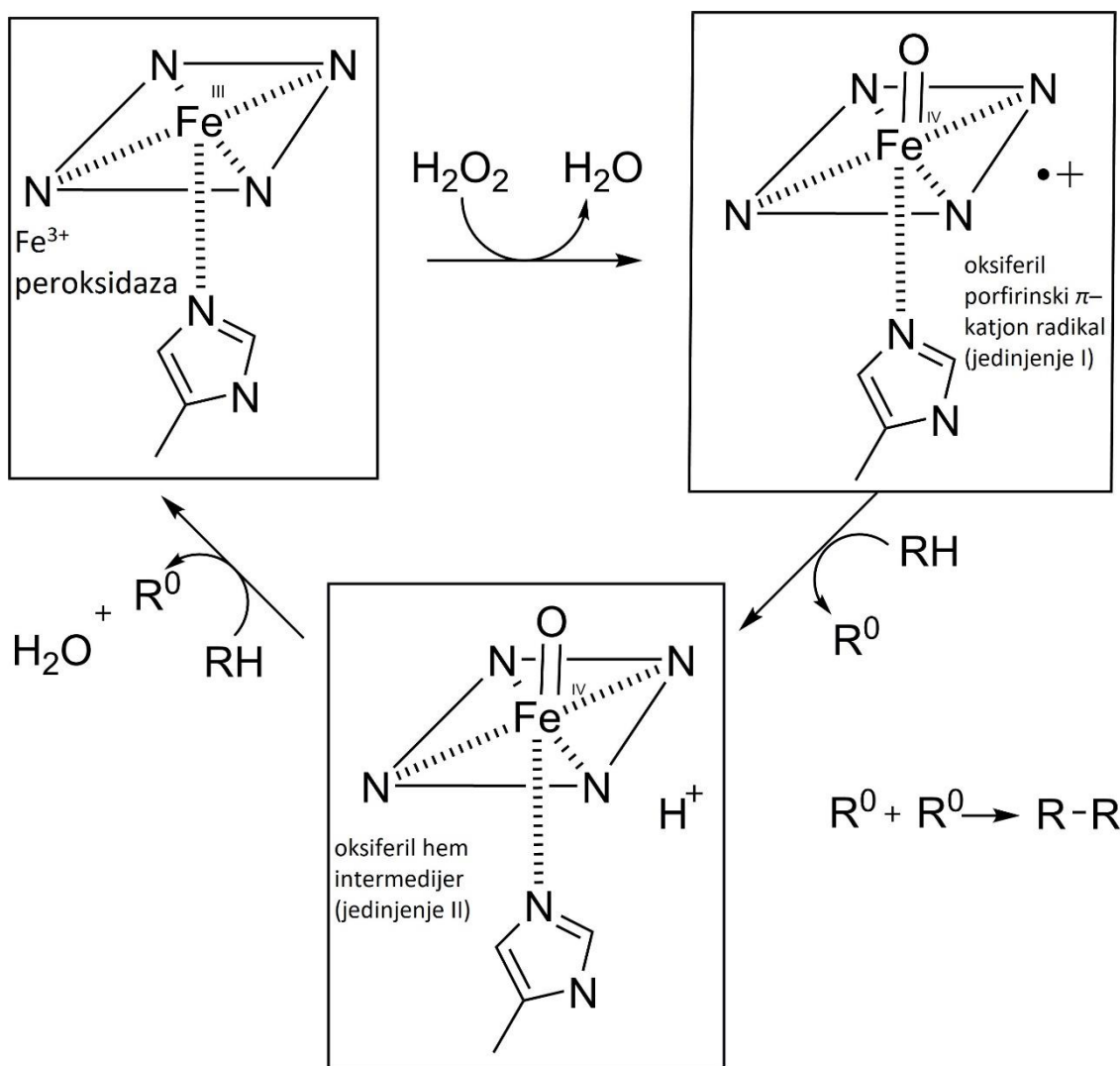
## 7. Mehanizam delovanja peroksidaze

Mehanizam delovanja peroksidaza klase III se može opisati pomoću sledećih jednačina:



Ukoliko se sumiraju prethodno navedene jednačine, može se prikazati mehanizam delovanja peroksidaza na sledeći način:  $2\text{RH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{R}^\bullet + 2 \text{H}_2\text{O}$ ,

gde RH je supstrat a  $\text{R}^\bullet$  je proizvod - slobodan radikal.



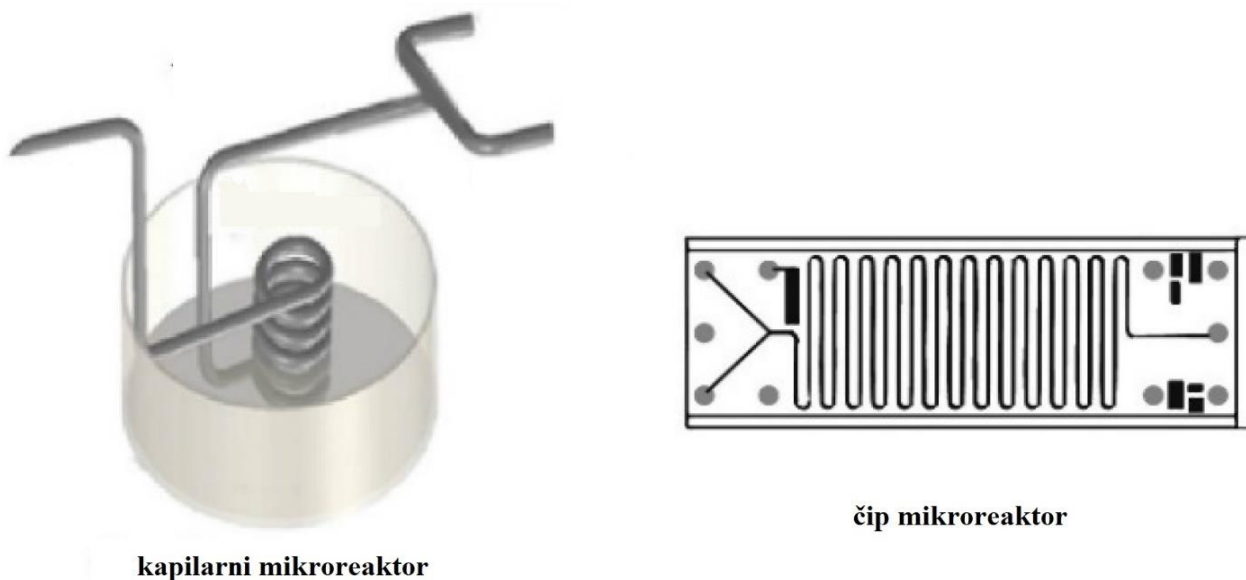
Šema 4. Mehanizam delovanja peroksidaze [118].

Katalitički ciklus biljne hem peroksidaze počinje koordinacijom peroksida do Fe<sup>3+</sup> (Šema 4). Peroksid se podvrgava heterolitičkom raskidanju, stvarajući molekul vode i polustabilni intermedijer tzv. jedinjenje I. Dolazi do prenosa protona iz peroksida O1 do O2 gde sledi raskidanje O–O veze. O2 se zajedno sa vodonikom izdvaja kao molekul vode, a ostaje O1 koji je već koordiniran do hema sa 6 elektrona i njegova elektronska konfiguracija se popunjava oduzimanjem 2 elektrona sa enzima. Jedan elektron potiče od gvožđa, pa dolazi do stvaranja oksiferil (Fe=O) centra. Kod većina peroksidaza, drugi elektron se uklanja sa porfirinskog prstena i stvara se porfirinski π–katjon radikal. Porfirinski radikal prima jedan elektron iz elektron donor supstrata, gde se dobija supstrat slobodni radikal i jedinjenje II. U sledećem redukcijeskom koraku, drugi molekul supstrata redukuje jedinjenje II do feri-peroksidaze [119]. Drugi intermedijer jedinjenje III, gde je gvožđe Fe<sup>2+</sup>, obično se formira kad je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u višku. Ovaj intermedijer se uglavnom formira kao kombinacija superoksida sa feri enzimom. Superoksid se može formirati oksidacijom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ili transferom elektrona sa oksidovanih supstrata do molekulskog kiseonika. Jedinjenje III nije katalitički aktivan intermedijer.

## 8. Primena mikroreaktorskih sistema u tretmanu obojenih otpadnih voda

Mikroreaktor predstavlja uređaj gde se hemijska reakcija odvija unutar kapilarnih kanala. U njima se proces izvodi kontinualno. Glavno svojstvo mikroreaktorskih sistema je smanjenje zapremine procesne opreme na red veličine od desetak nanolitara do jednog mililitra. Procesni uređaj ovih veličina u kojoj se sprovode hemijske i biohemijske reakcije naziva se nanoreaktor ili milireaktor, a naziv koji se najčešće koristi i koji je u literaturi našao široku primenu je mikroreaktor. Pojam mikroreaktora u osnovi se vezuje za male dimenzije njegove osnovne strukturne jedinice – mikrokanala čije su tipične dimenzije u rasponu 10  $\mu\text{m}$  – 1000  $\mu\text{m}$  [120]. Mikroreaktori su sastavljeni od kapilarnih kanala prečnika manjeg od 1 mm, ili od mreže kanala koji se spajaju [121], [122]. Prednosti mikroreaktora u odnosu na obični makroreaktor su vezane za energetska efikasnost, brzinu reakcije i ukupan prinos proizvoda, kao i jednostavno upravljanje. Mikroreaktori se mogu koristiti za izvođenje složenih reakcija poput esterifikacije, hemijske hidrogenacije i sinteze sa slobodnim radikalima.

Ukupni prihod od proizvodnje mikroreaktora iznosio je 1,8 milijardi dolara u 2014. godini [123]. Razvoj mikroreaktora je usmeren ka materijalima za njihovu izradu, koji poseduju izvrsna svojstva i nisku cenu. Mikroreaktor može biti napravljen od različitih vrsta materijala kao što su silicijum, staklo, čelik, keramika i polimeri. Dizajn mikroreaktora se poboljšava i utiče na simulaciju i analizu hemijske reakcije. Oni se mogu projektovati kao kapilarni ili u obliku čipa (Slika 5), što omogućava njihovu široku primenu u različitim naučnim oblastima. Kapilarni reaktori moraju imati zadovoljavajuće karakteristike u pogledu veličine i dužine kapilara, s obzirom na svojstva tečnosti.



*Slika 5. Izgled kapilarnog i čip mikroreaktora [124]*

U poređenju sa klasičnim makroreaktorskim sistemima, mikroreaktori imaju brojne prednosti. Strujanje fluida u sistemu je laminarno zbog malog prečnika kanala. Karakteristično za mikroreaktore je da imaju veliku specifičnu površinu, zbog čega je prenos mase i toplote efikasniji, a količina i broj otpadnih procesnih struja znatno smanjena. Primena mikroreaktora omogućava preciznu regulaciju procesa, kao i upotrebu malih količina reaktanata i katalizatora. Pogodni su za

egzo/endotermne reakcije, reakcije koje su eksplozivne i zahtevaju upotrebu opasnih hemikalija. Upotrebom mikroreaktora, prenos je u većoj razmeri (*eng. scale-up*) znatno pojednostavljen jer se izvodi povezivanjem procesnih jedinica (*eng. numbering-up*), čime su uklonjeni visoki troškovi projektovanja i skraćeno je vreme potrebno za prenošenje iz laboratorijskih razmera na industrijsku primenu. Do danas su razvijeni mikroreaktori u kojima je moguće izvođenje nekoliko istovremenih reakcija, razdvajanje i analiza komponenata sistema u jednom mikrokanalu.

Specifična konstrukcija i male dimenzije mikroreaktora omogućavaju širu primenu mikroreaktora u odnosu na postojeće makroskopske reaktorske sisteme. Zbog toga se hemijski i biohemijski procesi koji se izvode u mikroreaktorima mogu znatno razlikovati od procesa koji se sprovode u velikim reakcionim sistemima. Smanjenje veličine procesne opreme dovodi do povećanja efikasnosti, produktivnosti i sigurnosti procesa [125]. Zbog bolje regulacije procesnih uslova, upotrebe malih količina reaktanata i katalizatora, znatno većeg razmera međufazne površine i zapremina reaktora, dolazi do intenzivnijeg prenosa mase i energije i smanjenja količine otpadnih procesnih struja u odnosu na procese koji se odvijaju u konvencionalnim reaktorima. Zbog toga, mikroreaktori nalaze nove mogućnosti primene, najviše u medicini i farmaceutskoj industriji. Glavni nedostatak mikroreaktora je u tome što se još uvek ne mogu primeniti kao zamena za sve postojeće sisteme, a zbog malog prečnika mikrokanala u radu s viskoznim i čvrstim sistemima može doći do njihovog začepljenja.

Prikaz mikroreaktora je dat na Slici 6. Na početku procesa reaktanti ulaze u mikroreaktorski sistem pomoću pumpe koja ih vodi do miksera gde se reaktanti mešaju, a zatim produžavaju u reaktor. Na kraju se proizvod skuplja i prečišćava po potrebi, ili se direktno analizira.



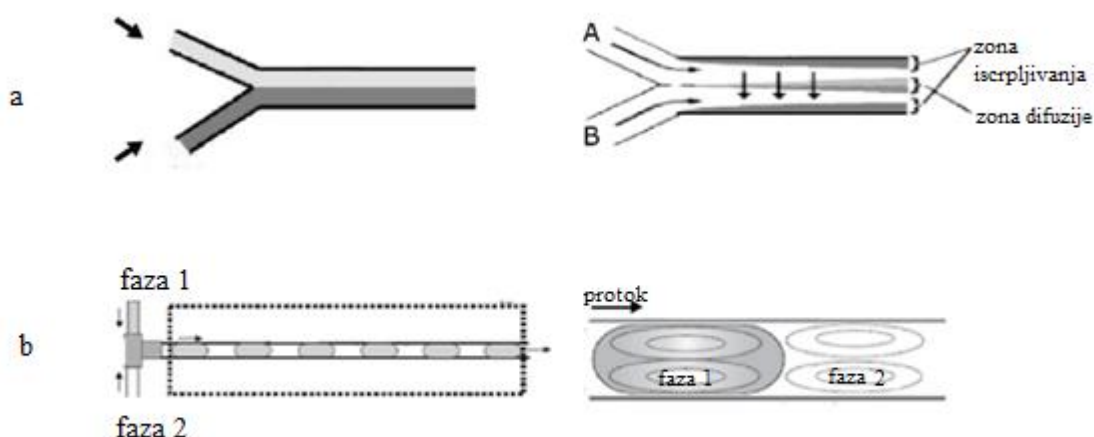
**Slika 6.** Mikroreaktorski sistem za obezbojavanje AV109 pomoću peroksidaze iz otpadnog materijala

Ukoliko je protok idealan, zavisno od dužine puta, na određenom mestu koncentracija reaktanta i produkta je konstantna pri stabilnim uslovima. To mesto se izražava u vremenu zadržavanja koje je vreme između inicijacije i terminacije kontinualne reakcije i često se pogrešno upoređuje sa vremenom šaržne reakcije. Vreme zadržavanja se definiše kao odnos dužine ili zapremine puta i brzine protoka. Inicijacija se postiže mešanjem reaktanata, zagrevanjem ili zračenjem, a terminacija pravilnim tehnikama gašenja. Zavisno od tipa reakcije, gašenje može biti termičko, hemijsko ili spontano kao što je kod fotohemijjskih reakcija koje se gase nakon izlaska iz reaktora jer više nisu izložene određenom zračenju. Vreme zadržavanja jednostavno se određuje kod reakcija sa jednom fazom jer su zapremina reaktora i brzina protoka definisani od strane korisnika, a kod višefaznih reakcija najbolje je vreme zadržavanja odrediti puštanjem obojenih rastvora kroz kanal mereći vreme [126].

### Mešanje u mikroreaktoru

Zbog male površine mikroreaktora, frekvencija sudara molekula je kinetičke prirode, što ubrzava stvaranje krajnjeg proizvoda. Mešanje u mikroreaktoru može biti aktivno i pasivno. Aktivno mešanje nastaje po principu kinetičke energije, ubrzavanjem elektrona, ili hidrofuidnog dinamičkog kretanja [127]. Pasivno mešanje deluje po principu difuzije na površini mikrokanala i efikasno je u višefaznim fluidnim sistemima. Sa industrijske strane, pasivno mešanje je poželjno u višefaznom sistemu zbog povećavanja operativnog učinka u hemijskoj sintezi [128], [129].

Pasivno mešanje omogućava laminarne uslove protoka u sistemu sa više fluida, što povećava specifičnu površinu dostupnu za difuziju. Takođe, pasivno mešanje povećava efikasnost i operacionu funkcionalnost. Kretanje tečnosti u mikrokanalu ima oblik kontinualnog protoka sa pasivnim segmentima mešanja. Prema tome, laminarni protok u mikroreaktoru naziva se kontinualni protok ili segmentirani ili isprekidan (dezintegrisani) protok. Dezintegrisani protok se pojavljuje u gasnim, tečnim sistemima, kao gas-tečnost dezintegrisani protok ili kao tečno-tečno dezintegrisani protok. Protok u mikroreaktorima je dat na Slici 7.



**Slika 7.** Vid protoka u mikroreaktoru: a) laminarni protok, b) klinasti protok,

U mikroreaktorima, protok je skoro uvek laminaran sa niskim vrednostima Rejnoldsovog broja (Reynolds), gde su viskozitet i površinske sile bitna svojstva. Veza između brzine fluida i

apsolutnog pritiska za nestišljivu viskoznu tečnost je data klasičnom teorijom dinamike fluida i Navijer-Stoksovom ( Navier-Stokes) jednačinom:

$$\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} = -\nabla \left( \frac{P}{\rho} \right) + \mu \Delta \vec{v} \quad \text{Jednačina 7}$$

gde je  $v$  vektorska brzina fluida, za svaku Ojlerovu (Euler) komponentu (x,y,z,t),  $P$  je apsolutni pritisak,  $\rho$  je relativna gustina, a  $\mu$  je koeficijent kinematičkog viskoziteta. Na primeru mikroreaktorskog horizontalnog kanala (x osa), sa laminarnim protokom i malim padom pritiska, jednosmernim protokom i konstantnim pritiskom, jednačina dobija oblik:

$$\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = -\frac{1}{\rho} \frac{\Delta P}{L} + \mu \left( \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \right) \quad \text{Jednačina 8}$$

gde je  $L$  dužina mikrokanala. Ako je protok stacionaran, vreme je jednako nuli:

$$\frac{\Delta P}{\eta L} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} = 0 \quad \text{Jednačina 9}$$

gde  $\eta$  predstavlja koeficijent dinamičkog viskoziteta. Bezdimenzioni parametri od značaja za mikroreaktorski sistem su Rejnoldsov (Re), Frudov (Froude-Fr) i Pekletov (Peclet-Pe) broj za molekularnu difuzivnost, i Damkolerov (Damköhler-Da) broj za reakcioni sistem. Da bi se olakšala karakterizacija protoka i difuzije u mikrokanalima, potrebno je  $Re < 10$  da bi protok bio laminarni, i  $Pe \approx 10\,000$ , zbog difuzivnosti.

Dobro mešanje, kratko vreme zadržavanja i konstantna temperatura su preduslovi za dobijanje pouzdanih kinetičkih vrednosti. Vreme mešanja treba biti kraće u poređenju sa vremenom hemijske reakcije. Fat (Fath) i saradnici su procenili da teorijsko vreme mešanja u cevnom mikroreaktoru, uključujući molekularnu difuziju i smicajni napon, kad je protok laminaran [130] se može predstaviti jednačinom 10:

$$t_{\text{mešanje}} = \frac{d^2}{8Pe} \ln(1,52Pe), \quad \text{Jednačina 10}$$

gde je  $d$ -prečnik mikroreaktora, a  $Dm$  koeficijent difuzivnosti.

Specifična površina mikroreaktora je parametar od značaja, jer određuje učestalost raspodele supstanci u različitim intervalima. Brzina molekula u sistemu gas-tečno zavisi od učestalosti sudara gasa ili tečnosti molekula, koji određuju konfiguraciju protoka sistema. Homogenost i vreme zadržavanja u gasovitim smešama ili smešama gas-tečnost zavisi od sila vezivanja koje deluju između segmenata tečnosti. Ove sile poboljšavaju mešanje i obezbeđuju duže vreme zadržavanje eluenta. Svojstva kao brzine protoka i viskoznost, određuju brzinu difuzije u mikrokanalu.

### Uvećanje razmera procesa

U cilju uvećanje procesa na industrijski nivo, mikroreaktori se mogu povezati paralelno ili serijski (*eng. numbering-up ili scaling-out*). Ovo je jednostavnije u odnosu na klasično uvećanje procesa (*eng. scaling-up*) koje je znatno složeniji, dugotrajniji, skuplji i manje isplativ postupak. Prednost mikroreaktora pri uvećanju procesa je sigurnost odvijanja reakcije bez prekida ili većih smetnji u slučaju prestanka rada pojedinog reaktora iz bilo kojeg razloga. Ne znači da su mikroreaktorski uređaji, vezani serijski i/ili paralelno, manji po dimenzijama i volumenom od konvencionalnih „makroreaktora“. Naprotiv, po potrebi mogu se konstruisati tako da budu veći od prosečne dimenzije makroreaktora. Čerkasov (Cherkasov) i saradnici su procenili da je moguća proizvodnja od 10-50 kg/dan tečnog 2-metil-2-butanola u mikroreaktoru [131].

Paralelno vezivanje većeg broja mikroreaktora se naziva i spoljašnje povećanje (*eng. external numbering-up*), odnosno povećanje broja strukturnih jedinica.

Serijsko vezivanje većeg broja elemenata unutar jednog mikroreaktora predstavlja unutrašnje povećanje (*eng. internal numbering-up*). Formira se jedan zajednički ulazni tok i jedan izlaz za proizvod. Pri serijskom vezivanju, maksimalni broj jedinica koji se mogu vezati zavisi od pada pritiska.

### Primena mikroreaktora

U poređenju sa konvencionalnim reaktorima, reakcije u mikroreaktoru se odlikuju većom selektivnošću, povećanom produktivnosti, jednostavnom manipulacijom, manjom potrošnjom energije i smanjenjem zagađenja, kao i manjom cenom. Najčešće se primenjuju u sintezi organskih jedinjenja i (bio)polimera, bioloških i farmaceutskih jedinjenja, kao i u sintezi nanočestica. Zbog poboljšane regulacije pritiska, različite organske sinteze su lako izvodljive u mikroreaktorima, kao što su sinteza toluena, reakcije dehidrogenacije, višefazne složene organske reakcije [132]–[134]. Takođe, temperatura do 300°C se može postići, čime se eliminišu bočne reakcije. Sintaza polimera koji se koriste u kozmetici je moguća u mikroreaktorima [135]. Mikroreaktori su našli primenu i u biološkim analizama kao što su liziranje ćelija, detekcija i ekstrakcija ćelijskih komponenti. Takođe se primenjuju i u oblasti biološkog inženjerstva- inženjerstvo tkiva i mikroinženjerstvo [136], [137]. Mikroreaktori se uspešno primenjuju za dobijanje nanočestica zeolita, magnetita, cink-oksida i silicijum-dioksida [138]–[142].

## **9. Primena imobilisanih enzima u tretmanu obojenih otpadnih voda**

Dostupna literatura obiluje podacima koji se odnose na enzimsko uklanjanje sintetičkih boja ([143]–[150]). Međutim, da bi upotreba enzima u industrijskim razmerima bila ekonomski opravdana, enzimi moraju ispunjavati određene kriterijume kao što su stabilnost, jednostavnost rukovanja i ponovna upotreba [151]. Primenom različitih tehnika imobilizacije razvijeni su novi, biokatalizatori poboljšani svojstava čime je primena enzimskih sistema u katalizi uklanjanja sintetičkih boja unapređena u smislu povećanja efikasnosti procesa, stabilnosti enzima kao i povećanja ekonomske opravdanosti postupka [152]–[156].

Imobilizacija enzima se definiše kao „pričvršćivanje enzima u definisanom prostoru, omogućavajući kontinualnu i ponovnu upotrebu, pri čemu enzim treba da zadrži svoju katalitičku aktivnost“ [157]. Svaki imobilisani enzim treba da ispuni nekatalitičke zahteve kao što su određena forma, veličina, čvrstina, dužina i sl, koji doprinose lakšoj separaciji i ponovnoj upotrebi, kao i



katalitičke zahteve, a to su: aktivnost, selektivnost, stabilnost, pH i temperaturni optimum [158]. Takođe, imobilizacija utiče na konformaciju enzima, što znači da se imobilizacijom može menjati selektivnost enzima.

Prednosti imobilizacije:

- 1) Mogućnost ponovne upotrebe
- 2) Povećana stabilnost u odnosu na visoke temperature, ekstremne pH vrednosti, velike koncentracije supstrata, polarne rastvarače, sile smicanja i sl.
- 3) Povećana i/ili modifikovana selektivnost (regio, acil, hemo i enantioselektivnost)

Metode imobilizacije se mogu podeliti na fizičke i hemijske. Imobilizacija enzima fizičkim metodama podrazumeva fizičko vezivanje ili zarobljavanje enzima za nosač. Glavna prednost ovakve imobilizacije je što enzim najčešće zadržava nativnu konformaciju i strukturu. Međutim, nedostatak je to što je veza između nosača i enzima slaba, što uzrokuje odvajanje enzima sa nosača u vodenim sredinama. Adsorpcija i obuhvatanje enzima nošačem su najčešće primenjivane fizičke metode imobilizacije enzima. U hemijske metode spadaju kovalentno vezivanje na nosač, kovalentna imobilizacija bez nosača i autoimobilizacija. Imobilizacija enzima hemijskim metodama može izmeniti strukturu proteina, zbog toga što se enzim vezuje za nosač hemijskim vezama koje mogu promeniti konformaciju enzima [159].

## 9.1. Tehnike imobilizacije enzima

### Adsorpcija

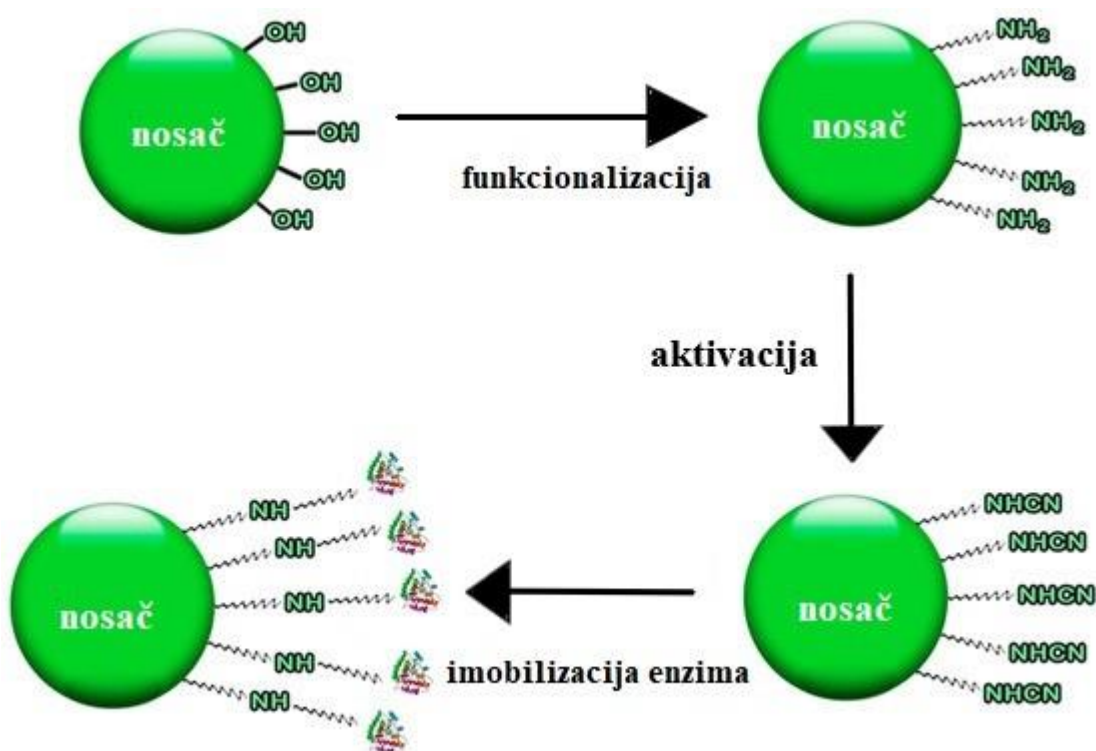
Adsorpcija predstavlja jednostavnu metodu, gde se imobilizacija vrši mešanjem enzima sa adsorbensom, pod tačno određenim uslovima: pH i jonska jačina. Nakon ispiranja slabo vezanih i nevezanih enzima, imobilizat je spreman za korišćenje. Imobilizacija adsorpcijom bazira se na Van der Waalsovim, jonskim, vodoničnim i hidrofobnim interakcijama. To su prilično slabe sile, ali mnogobrojne, pa enzim ostaje vezan za nosač. Adsorpcija kao način imobilizacije može zaštititi enzim od aglomeracije i proteolize. Ova metoda obično uzrokuje promene u mikrosredini proteina zato što dolazi do više interakcije između jednog molekula proteina i više funkcionalnih grupa sa površine nosača. Nedostatak je što lako može doći do desorpcije zbog temperaturne fluktuacije, promena supstrata i pH [160]. Kao adsorbensi se mogu koristiti različite materijale kao što su: glina, smole, različite okside, i sl. Na primer, Šekuljica (Šekuljica) i saradnici su uspešno adsorbovali peroksidazu iz rena na Purolite smolu, i postigli ~90% obezbojavanja antrahinonske boje Kiselo ljubičasto 109 [161]. Druga grupa autori su imobilisali peroksidazu iz rena na modifikovani kukuruzni škrob [162]. Imobilisana peroksidaza je korišćena u reakciji degradacije azo boje metil oranž, gde je postignuto 97% obezbojavanja za 1h. Za obezbojavanja antrahinonske boje Kiselo zeleno 25 i azo boje Reaktivno crno 5, grupa istraživača iz Poljske su prvo sintetisali okside titanijuma i cinka, koji su ih kasnije upotreбили za imobilizaciju lakaze. Njihov biokatalitički sistem se pokazao kao jako efikasan, budući da je postignuto 99% obezbojavanja [163].

### Obuhvatanje enzima nosačem

Ova metoda se definiše kao ograničeno kretanje enzima u poroznom gelu, gde se enzimi ponašaju kao slobodni molekuli u rastvoru. Ova metoda je pogodna kada su u pitanju mali molekuli supstrata i proizvoda. U suprotnom, dolazi do otežanog prenosa mase. Obuhvatanje enzima nosačem može se uspostaviti preko fizičkog zarobljavanja enzima ili preko kovalentnog vezivanja. Kao nosači koriste se agar, agaroz, želatin koji se dobijaju termo reverznom polimerizacijom, ili alginat i karagenan dobijeni jonotrpskim želiranjem [164].

### Kovalentno vezivanje

Ovim metodom enzim se ireverzibilno vezuje za nosač kovalentnim vezama, što predstavlja najstabilniji način imobilizacije. Na Slici 8, je prikazan postupak imobilizacije enzima kovalentnim vezivanjem.



*Slika 8. Postupak kovalentne imobilizacije enzima na neorganskim nosačima [165].*

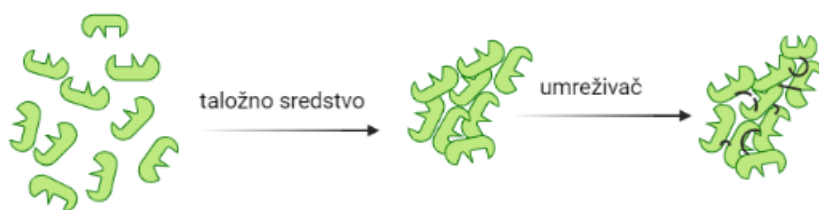
Ukoliko je nosač neorganska supstanca, vrši se njegova funkcionalizacija, tj. uvode se nove grupe na površini nosača. Epoksi i aldehid funkcionalizovane nosače mogu se koristiti za imobilizaciju enzima, direktno, bez aktivacije. U svim drugim slučajevima, potrebna je aktivirati nosač sa specifičnim reagensima koji reaguju sa funkcionalnim grupama enzima. Nakon toga, vrši se aktivacija nosača [165]. Reakcija gde se enzim vezuje za nosač izvodi se pod uslovima koji znatno ne utiču na aktivnost enzima. Takođe, reagensi koji se koriste za imobilizaciju ne treba da utiču na aktivni centar. Bočni lanac amino kiselina kao što su lizin, arginin, asparaginska kiselina i histidin reaguje sa različitim funkcionalnim grupama nosača: imidazolil-, indoil-, hidroksil- i sl. Modifikovana površina nosača peptidima doprinosi većoj specifičnoj aktivnosti i stabilnosti enzima [166]. U cilju poboljšanja svojstava nosača, vrši se aktivacija njihovih funkcionalnih grupa. Enzim i

nosač se mogu povezati direktno ili preko određenih molekula različite dužine, koji se nazivaju „spejseri“. Spejseri omogućavaju veći stepen slobode enzima, što dovodi do poboljšane aktivnosti enzima u poređenju sa direktno vezanim enzimom. Na primer, grupa istraživača je vezala glutaraldehid na CNBr – agarozu i CNBr – aktiviranu sefarozu da bi poboljšali temperaturnu stabilnost enzima [167]. Kašefi (Kashefi) i sar. su imobilisali lakazu na magnetnom grafen-oksidu, koji su ga aktivirali glutaraldehidom. Na tako modifikovani nosač su imobilisali lakazu, koju su kasnije koristili za degradaciju azo boje Direktno crveno 23. Postigli su 95% degradacije [168]. Salami (Salami) i sar. su koristili imobilisanu lakazu na epoksi funkcionalizovanu siliku za degradaciju diazo (Kiselo oranž 156), ksanten (Kiselo crveno 52) i tri aril metanske boje (metil ljubičasto, Brilljantno plavo i Malahitno zeleno). Pomoću redoks medijatora su postigli 78-99% obezbojavanja [169].

### **Imobilizacija bez nosača – umrežavanje enzima**

Imobilizacija enzima bez nosača postiže se preko njihovog međusobnog povezivanja pomoću bi- ili multifunkcionalnih reagenasa [164]. Reagens koji se najčešće koristi za umrežavanje enzima je glutaraldehid. Do umrežavanja dolazi formiranjem Schiff-ovih baza između obe karbonilne grupe glutaraldehida i pozitivno naelektrisanih amino-grupa na površini proteina. Najčešće je to  $\epsilon$ -amino-grupa lizina. Prednosti imobilizacije bez nosača su visoki prinosi i velika produktivnost [170]. Ovaj način imobilizacije vrši se direktnim umrežavanjem rastvorenih enzima (*eng. cross-linked enzymes, CLE*), enzimskih kristala (*eng. cross-linked enzyme crystals, CLEC*) i enzimskih agregata (*eng. cross-linked enzyme aggregates, CLEA*). Umreženi enzimi (CLE) dobijaju se sa umrežavanjem enzima u rastvoru pomoću umreživača. U poređenju sa slobodnim enzimima, CLE imaju poboljšanu temperaturnu stabilnost, ali mala zadržana aktivnost, slaba reproducibilnost i niska mehanička stabilnost su neke od mana zbog kojih ova metoda nije zaživela. CLEC, pak poseduju dobru mehaničku, temperaturnu i pH stabilnost. Takođe, umreženi enzimi su se pokazali kao stabilni i u prisustvu organskih rastvarača [171]. Katalitička aktivnost CLEC-a može se povećati smanjenjem veličine enzimskih kristala. Međutim, CLEC je komplikovana metoda imobilizacije zbog zahtevnih koraka kristalizacije proteina, što povećava i cenu proizvoda [172].

U poređenju sa kristalizacijom, agregacija enzimskih molekula i njihovo umrežavanje dodavanjem soli, organskih rastvarača ili nejonskih polimera je jeftinija metoda. Umreženi enzimski agregati se dobijaju iz neprečišćenih istaloženih enzimskih molekula formiranjem čvrstih čestica koje su nekovalentno vezane (Slika 9). CLEA postaju nerastvorni nakon kovalentnog vezivanja sa umreživačem kao što je glutaraldehid [173]. CLEC i CLEA imaju 10 do 1000 puta veću aktivnost nego isti enzimi pričvršćeni na nosač [174]. Upotreba imobilisanih enzima bez nosača u većim razmerama je pogodna zbog toga što se na taj način može dovesti u reaktor veća količina enzima, čime se kompenzuje gubitak aktivnosti pri ponovnoj upotrebi, bez prolongiranja reakcionog vremena [175]. Iako za pripremu CLEA nije potrebna kristalizacija enzima, postupak taloženja i umrežavanja enzima je različit za različite enzime, što znači da se mora izvršiti optimizacija uslova pripreme CLEA. Katalitička aktivnost CLEA zavisi i od taložnog reagensa. Različiti taložni reagensi deluju različito na konformaciju enzima, pa odabir pravog taložnog reagensa je od velikog značaja.



*Slika 9. Postupak pripreme umreženih enzimskih agregata*

Za pripremu CLEA najčešće se koristi glutaraldehid, zbog njegove niske cene i dostupnosti [176]. Međutim, zadržana aktivnost umreženih agregata nitrilaza sa glutaraldehidom je jako niska [177]. Ovo je najverovatnije posledica male molarne mase glutaraldehida (0,1 kDa) koji uspeva da prodre unutar proteina i naruši tercijarnu strukturu enzima, što uzrokuje potpuni gubitak aktivnosti. Mateo (Mateo) i sar. su zaobišli ovaj problem korišćenjem dekstran-polialdehida kao umreživača, čija molarna masa iznosi 100-200 kDa [178]. Drugi reagensi koji su korišćeni za umreživanje su diepoksidi različite dužine i *p*-benzohinon za imobilizaciju lipaza, hitozan za imobilizaciju lakaza, i pektin za imobilizaciju glukoamilaza [177], [179]–[181].

Koncentracija umreživača reguliše stepen umrežavanja i s tim modifikuje krajnju strukturu CLEA, što utiče na njihovu stabilnost i aktivnost. Majumder (Majumder) i sar. su ispitivali uticaj glutaraldehida pri imobilizaciji lipaza [182], i došli su do zaključka da sa povećanjem koncentracije glutaraldehida, povećava termostabilnost enzima. Naime, veći broj inter- i intramolekulskih kovalentnih veza dovodi do veće termostabilnosti. Međutim, s druge strane, ovo utiče negativno na aktivnost i enantioselektivnost, budući da se povećava rigidnost enzima. Takođe, vreme i temperatura umrežavanja utiču na aktivnost CLEA. Veća temperatura i duže vreme dovode do većeg stepena umrežavanja a s tim i do smanjenja aktivnosti enzima [183]. Uticaj pH je isto od velikog značaja, budući da se glutaraldehid može pojaviti kao monomer ili polimer u zavisnosti od pH sredine. Glutaraldehid polimerizuje u alkalnim sredinama, pa su CLEA čestice veće [184].

Aktivnost CLEA zavisi od nekoliko faktora kao što su taložni reagens, aditivi, umreživač, vreme umrežavanja, enzimska koncentracija, temperatura, pH sredine i mešanje. Taložni reagensi i uslovi taloženja doprinose aktivnijoj konformaciji enzima [185]. Kao taložni reagensi koriste se soli ili organski rastvarači. Organski rastvarači mogu izazvati denaturaciju enzima zbog toga što uklanjaju molekule vode vezane za proteine, što utiče na njihovu fleksibilnost. Da bi rešili ovaj problem, Vang (Wang) i sar. su dodavali šećere kao što su glukoza, saharoza i trehaloza za vreme taloženja [186]. Aktivnost CLEA se može poboljšati dodavanjem aditiva: sufraktanti i krunski etri [187]. Budući da se aditivi ne vezuju kovalentno za enzim, mogu se ukloniti ispiranjem organskim rastvaračima, pa imobilisani enzim zadržava povoljniju katalitičku konformaciju.

Priprema CLEA sa enzimima koji imaju nizak sadržaj lizina je otežana budući da lizinski ostaci učestvuju u umrežavanju. Ovo se rešava tako što se taloženje enzima vrši u prisustvu polimera sa primarnim amino-grupama kao što su polilizin i polietilenimin [188], [189]. Polietilenimin formira pozitivno naelektrisanu mikrosredinu koja onemogućava kontakt između organskih rastvarača i proteina [190]. Osim polilizina i polietilenimina, može se koristiti i goveđi serum albumin (BSA) koji služi kao izvor proteina i amino-grupa za izvođenje imobilizacije. Dodatkom BSA u pripremi CLEA poboljšavaju se performanse umrežavanja, veličina, fleksibilnost i stabilnost umreženih enzimskih agregata [190]. Takođe, sprečava se proteoliza, i s tim povećava stabilnost enzima.

Iako se glutaraldehyd pokazao kao odličan umreživač u većini CLEA, ipak njegova toksičnost ne opravdava njegovu upotrebu. Takođe može da iritira kožu, da izazove glavobolje i konstantno izlaganje ovoj hemikaliji uzrokuje povećani rizik od raka.

U ovoj disertaciji kao umreživač će se koristiti oksidovani pektin, zbog njegove dostupnosti, niske cene i ekološke opravdanosti.

Pektin je polisaharid i predstavlja strukturnu komponentu primarnog zida biljnih ćelija i srednje lamele. Pektin se sastoji od tri glavne komponente: homogalakturonana, ramnogalakturonana i supstituisanih galakturonana [190]. Najčešće se koristi u prehrambenoj industriji u proizvodnji džemova, želea, mlečnih proizvoda i poslastica. Koristi se i kao stabilizator u proizvodnji voćnih sokova i mlečnih pića. U skorije vreme nalazi svoju primenu u biomedicini zbog njegove citokompatibilnosti i želirajućih svojstva [191]. Oksidacijom pektina, dolazi do konverzije vicinalnih diola prisutne na C2 i C3 anhidro D-glukopiranoznom prstenu, u dialdehidnim grupama. Za vreme oksidacije dolazi do razgradnje polimernog lanca i smanjenja molarne mase pektina [192].

U okviru ove disertacije, ispitaće se mogućnost imobilizacije peroksidaze krompirovih ljuski i sojinih ljuspica u umrežene enzimске agregate. U prvom koraku ispitaće se uticaj različitih taložnih reagenasa, a nakon odabira najpogodnijeg sredstva za taloženje, ispitaće se mogućnost umrežavanja enzimskih agregata pomoću oksidovanog pektina.

## II Eksperimentalni deo

### 10. Materijali i metode

Za eksperimentalni deo ove doktorske disertacije korišćen je enzim, peroksidaza iz zrna soje, sojinih ljuspica i krompirovih ljuski. Enzim je izlovan iz 5 domaćih sorti soje: Lela, Laura, Lena, Olga i Selenia i 3 sorte krompira: Memphis, Arizona i Esmea, a sirovine, soja i krompir su dobijeni od lokalnih proizvođača.

Hemikalije i reagensi koji su korišćeni u realizaciji eksperimentalnog plana ove doktorske disertacije:

- Kiselo ljubičasto109, DCC colorants (Ningbo, Kina)
- pirogalol (Merck, SAD)
- vodonik-peroksid (Dr. Max)
- natrijum-acetat (Merck-Alkaloid)
- sirćetna kiselina (Beta-Hem, Srbija)
- dinatrijum-citrat trihidrat (Lach-Ner, Češka)
- limunska kiselina (Alkaloid, S. Makedonija)
- dikalijum-hidrogen-fosfat anhidrovan (Sigma Aldrich, SAD)
- kalijum-dihidrogen-fosfat dodekahidrat (Sigma Aldrich, SAD)
- TRIS baza, (3-hidroksipropiltriazolilmetil)amin, (Sigma Aldrich, SAD)
- natrijum-hidroksid (Merck, SAD)
- hlorovodonična kiselina (Beta-Hem, Srbija)
- sumporna kiselina (Zorka Pharma, Srbija)
- goveđi serum albumin (Sigma Aldrich, SAD)
- pektin iz jabuka (Sigma Aldrich, SAD)
- natrijum-perjodat (Sigma Aldrich, SAD)
- etanol (Zorka Pharma, Srbija)
- aceton (Zorka Pharma, Srbija)
- 2-propanol (Zorka Pharma, Srbija)
- 2,4-dinitrofenilhidrazin (Sigma Aldrich, SAD)
- amonijum-sulfat (Sigma Aldrich, SAD)

- kalijum-natrijum-tartarat (Sigma Aldrich, SAD)
- bakar-II-sulfat (Zorka Pharma, Srbija)
- natrijum-karbonat (Alkaloid, S. Makedonija)
- Folin-Siejkaluov (Folin-Ciocalteu) reagens (Sigma Aldrich, SAD)

Svi upotrebljavani reagensi su bili p.a. čistoće, i korišćeni su bez naknadnog prečišćavanja.

Pored hemikalija i reagenasa za realizaciju eksperimentalnog plana ove doktorske disertacije korišćeni su sledeći instrumenti i uređaji koji se nalaze na katedri za Organsku hemiju, Organsku hemijsku tehnologiju i katedri za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju i to:

- UV- Vis spektrofotometar (Ultrospec 3300 pro, Ameris Cham Bioscience)
- UV- Vis spektrofotometar, UV-1800 (Schimadzu)
- Vodeno kupatilo (Mettler)
- Magnetna mešalica (LLG)
- Magnetna mešalica (IKA Werk)
- Centrifuga (Sigma Aldrich 2-16, rotor 12 141,)
- pH metar, Hanna instruments, HI11310 digitalna kombinovana elektroda
- Multiparametar fotometar, Hanna instruments HI83314
- COD reaktor, Hanna Instruments HI839800
- HPLC-MS analizator, Thermo Scientific Accela /TSQ Quantum Access MAX trostruki kvadrupol, Accucore aQ, 100 × 2.1 mm, 2.6 μm kolona
- Klipne pumpe, LC-20AD XR (Shimadzu )
- PTFE cev, (VICI Jour).

## 10.1. Metode

### 10.1.1. Ekstrakcija enzima i priprema sirovog ekstrakta

#### Ekstrakcija peroksidaze iz celog zrna soje

Proces ekstrakcije peroksidaze iz celog zrna soje se vrši tako što se soja potopi u destilovanu vodu u odnosu 1:4 i homogenizuje 10 min. Zatim se vrši ekstrakcija koja traje 24 h na 4°C, a nakon toga se vrši filtracija kroz gazu. Odvojena tečna faza, filtrat, zagreva se 3 min na 65°C zbog termičke denaturacije katalaze. Nakon zagrevanja, rastvor se odmah hladi do 20°C u ledenom kupatilu i centrifugira 10 min na 1·10<sup>4</sup> o/min (Sigma Aldrich 2-16, rotor 12 141). Dobijeni sirovi ekstrakt peroksidaze čuva se u frižideru.

#### Ekstrakcija peroksidaze iz sojinih ljuspica

Određena količina soje se potopi 3h u destilovanu vodu, da bi zrna nabubrila (1:1). Nakon potapanja, vrši se odvajanje ljuske od zrna. Ljuske se potope u vodi u odnosu 1:4, pa se nakon toga vrši homogenizacija 10 min. Ekstrakcija traje 24h na 4°C. Nakon ekstrakcije, čvrsta faza se odvaja od tečne filtriranjem kroz gazu. Filtrat se zagreva 3 min na 65°C zbog termičke denaturacije katalaze i hladi se u ledenom kupatilu do sobne temperature. Ohlađeni rastvor se centrifugira 10 min na 1·10<sup>4</sup> o/min (Sigma Aldrich 2-16, rotor 12 141). Supernatant koji predstavlja sirovi ekstrakt peroksidaze iz sojinih ljuspica se čuva u frižideru na 4°C do upotrebe.

#### Ekstrakcija peroksidaze iz krompirovih ljuski

Krompirove ljuske potapaju se u 100 mM fosfatni pufer, pH = 6,0 u odnosu 1:4 i homogenizuju 10 min. Ekstrakcija traje 24h na 4°C. Nakon ekstrakcije, smeša se filtrira kroz gazu i filtrat se zagreva 3 min na 65°C, pa se hladi do 20°C u ledenom kupatilu. Nakon hlađenja, rastvor se centrifugira 10 min na 1·10<sup>4</sup> o/min (Sigma Aldrich 2-16, rotor 12 141). Supernatant se čuva u frižideru [193].

### 10.1.2. Određivanje aktivnosti sirove peroksidaze

Aktivnost peroksidaze određivana je korišćenjem pirogalola kao standardnog supstrata. Supstrat, 13 mM pirogalol se priprema neposredno pre upotrebe u 100 mM fosfatnom puferu, pH 7,0. Nakon pripreme, 1 mL supstrata se prenese u kivetu promera 1 cm, a zatim se doda 0,01 mL 3 % vodonik-peroksida, 0,01 mL sirovog ekstrakta peroksidaze i sve se homogenizuje mešanjem pipetom. Paralelno, priprema se slepa proba na isti način kao uzorak sa izuzetkom da se u reakcionu smešu umesto sirovog ekstrakta peroksidaze unosi 0,01 mL fosfatnog pufera (100 mM, pH 7,0). Promena apsorbance u uzorku i slepoj probi na svakih 0,5 minuta, se prati spektrofotometrijski (Ultrospec 3300 pro, Amerissham Bioscience) na 420 nm u odnosu na fosfatni pufer, 3 minuta. Aktivnost peroksidaze se izražava u internacionalnim jedinicama (IU) koje pokazuju količinu proizvoda, purpurogalina (μmol) nastalog razgradnjom pirogalola katalizovanog peroksidazom iz sojinih ljuspica, celog zrna soje i krompirovih ljuski pod definisanim uslovima reakcije (pH 7,0, T=20 °C) (Prodanović et al., 2012). Aktivnost peroksidaze se preračunava prema sledećoj jednačini:

$$\text{Aktivnost peroksidaze } \left( \frac{\text{IU}}{\text{mL}} \right) = \frac{\Delta A \cdot V_u \cdot d_f}{\Delta t \cdot 12 \cdot V_s} \quad \text{Jednačina 11}$$



gde su:

$\frac{\Delta A}{\Delta t}$  ( $1/min$ ) – početna brzina reakcije,

$V_u$  (mL) – ukupna zapremina reakcione smeše (1,02 mL)

$d_f$  – faktor razblaženja

12 ( $1/mM$ ) – molarni ekstincioni - koeficijent purpurogalina,

$V_s$  (mL) – zapremina enzima u reakcionoj smeši (0,01 mL)

## 10.2. Optimizacija uslova biorazgradnje AV109 boje peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u šaržnom sistemu

Procesni parametri koji utiču na stepen biorazgradnje su: vreme kontakta, pH, koncentracija enzima, koncentracija vodonik-peroksida, koncentracija boje i temperatura. Optimizacija procesnih parametara je izvedena korišćenjem principa jednog faktora u isto vreme, sa ciljem postizanja maksimalne biorazgradnje.

### 10.2.1. Optimizacija pH i vremena kontakta biorazgradnje AV109 peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u šaržnom sistemu

Optimalna pH vrednost sredine za biorazgradnju AV109 boje utvrđena je u rastvorima boje koncentracije 30 mg/L, pripremljenih u puferima različitih pH vrednosti i konstantnog molariteta, 50 mM. Za ispitivanje optimalnog pH korišćeni su sledeći puferi: citratni pufer pH 3, acetatni pufer pH 4-5, fosfatni pH 6-8 i Tris-HCl pufer, pH 9. Optimizacija pH vrednosti je izvedena u šaržnom reaktoru zapremine 50 mL na sobnoj temperaturi ( $T=22-25^{\circ}C$ ) uz konstantno mešanje reakcione smeše – 200 o/min (*multi-position magnetic stirrer mix 6*, LLG). Nakon rastvaranja boje u određenom puferu, u sistem se dodaje enzim (0,2 U) i vodonik-peroksid (0,1 mM). U trenutku dodavanja vodonik-peroksida reakcija započinje, a tok reakcije se prati tako što se prati promena apsorbance na svakih 5 min pomoću spektrofotometra (Ultrospec 3300 pro, Amersham Bioscience) na talasnoj dužini  $\lambda = 590$  nm, što ujedno predstavlja i apsorpcioni maksimum za boju AV109.

Reakcija se odvija u čaši, a mešanje se ostvaruje pomoću magnetne mešalice. Kad promena apsorbancije postane zanemarljivo mala, smatra se da je postignuta ravnoteža u reakcionom sistemu i to vreme se usvaja kao optimalno i uzima kao konstantno u sledećim fazama optimizacije procesnih parametara za biorazgradnju AV109 boje u šaržnom reaktoru.

Stepen biorazgradnje se proračunava preko jednačine 12:

$$\text{Biorazgradnja (\%)} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \cdot 100$$

*Jednačina 12*

$A_0$  – apsorbancia rastvora boje pre početka reakcije,

$A_t$  – apsorbancia rastvora boje nakon određenog vremena reakcije,  $t=5n$  min;  $n=1,2,3...$

### **10.2.2. Optimizacija početne koncentracije enzima za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u šaržnom sistemu**

Optimalna koncentracija enzima za biorazgradnju AV109 boje utvrđena je variranjem početne koncentracije enzima u opsegu 0,1 – 1 IU. Sa tim u vezi, pripremljen je rastvor AV109 boje (50 mL) koncentracije 30 mg/L u 50 mM citratnom puferu (pH 3,0) za reakciju katalizovanu peroksidazom iz celog zrna soje i 50 mM acetatnom puferu (pH 4,0) za reakciju katalizovanu peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski. U ovako pripremljen rastvor boje dodaje se vodonik-peroksid tako da je finalna koncentracija u rastvoru 0,1 mM. Nakon dodatka enzima u rastvor (0,1–1 IU), reakcija biorazgradnje AV109 se izvodi na sobnoj temperaturi ( $T=22-25^{\circ}\text{C}$ ) uz konstantno mešanje reakcione smeše – 200 o/min (*multi-position magnetic stirrer mix 6*, LLG). Reakcija biorazgradnje boje katalizovana peroksidazom iz celog zrna soje i sojinih ljuspica se prati 30 minuta, dok se reakcija katalizovana peroksidazom iz krompirovih ljuski prati 50 minuta. Praćenje reakcije se vrši spektrofotometrijski beleženjem promene apsorbance svakih 5 minuta na talasnoj dužini  $\lambda=590$  nm. Stepenn biorazgradnje boje AV109 se se proračunava korišćenjem jednačine 12.

### **10.2.3. Optimizacija koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u šaržnom sistemu**

Optimalna koncentracija vodonik-peroksida za biorazgradnju AV109 boje utvrđena je variranjem početne koncentracije vodonik-peroksida u opsegu 0,01–1 mM. Sa tim u vezi, pripremljen je rastvor AV109 boje koncentracije 30 mg/L (50 mL) u 50 mM citratnom puferu (pH 3,0) za reakciju katalizovanu peroksidazom iz celog zrna soje i 50 mM acetatnom puferu (pH 4,0) za reakciju katalizovanu peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski. U ovako pripremljen rastvor boje dodaje se sirovi ekstrakt peroksidaze iz krompirovih ljuski, celog zrna soje i sojinih ljuspica tako da se u rastvoru nalazi 0,6; 0,1; i 1 IU enzimske aktivnosti, redom. Nakon dodatka vodonik-peroksida u rastvor (0,01–1 mM), reakcija biorazgradnje AV109 se izvodi na sobnoj temperaturi ( $T=22-25^{\circ}\text{C}$ ) uz konstantno mešanje reakcione smeše – 200 o/min (*multi-position magnetic stirrer mix 6*, LLG). Reakcija biorazgradnje boje katalizovana peroksidazom iz celog zrna soje i sojinih ljuspica se prati 30 minuta, dok se reakcija katalizovana peroksidazom iz krompirovih ljuski prati 50 minuta. Praćenje reakcije se vrši spektrofotometrijski beleženjem promene apsorbance svakih 5 minuta na talasnoj dužini  $\lambda=590$  nm. Stepenn biorazgradnje boje AV109 se se proračunava korišćenjem jednačine 12.

### **10.2.4. Optimizacija koncentracije boje za biorazgradnju AV109 peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u šaržnom sistemu**

Optimalna koncentracija boje pri kojoj se postiže maksimalna biorazgradnja AV109 boje katalizovana peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u šaržnom sistemu utvrđena je variranjem početne koncentracije boje u opsegu 10–100 mg/L. Za ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na biorazgradnju katalizovanu peroksidazom iz celog zrna soje pripremljen je osnovni rastvor boje koncentracije 100 mg/L u 50 mM citratnom puferu (pH 3,0), dok je za ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na biorazgradnju katalizovanu peroksidazom iz krompirovih ljuski i sojinih ljuspica pripremljen stok rastvor boje koncentracije 100 mg/L u 50 mM acetatnom puferu (pH 4,0). Zatim, rastvori boje različitih početnih koncentracija su pripremljeni razblaživanjem stok rastvora koncentracije 100 mg/L odgovarajućim puferom.

U ovako pripremljen rastvor boje (50 mL) dodaje se sirovi ekstrakt peroksidaze iz celog zrna soje, sojinih ljuspica i krompirovih ljuski, tako da se u rastvoru nalazi 0,1; 1 i 0,6 IU; enzimske aktivnosti, redom. Nakon dodatka; 1,0; 0,01 i 0,01mM vodonik-peroksida u rastvor reakcija biorazgradnje AV109 katalizovana peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljuspica i krompirovih ljuski, redom, se izvodi na sobnoj temperaturi ( $T=22-25^{\circ}\text{C}$ ) uz konstantno mešanje reakcione smeše – 200 o/min (*multi-position magnetic stirrer mix 6*, LLG). Reakcija biorazgradnje boje katalizovana peroksidazom iz celog zrna soje i sojinih ljuspica se prati 30 minuta, dok se reakcija katalizovana peroksidazom iz krompirovih ljuski prati 50 minuta. Praćenje reakcije se vrši spektrofotometrijski beleženjem promene apsorbance svakih 5 minuta na talasnoj dužini  $\lambda=590$  nm. Stepenn biorazgradnje boje AV109 se se proračunava korišćenjem jednačine 12.

#### **10.2.5. Ispitivanje uticaja temperature na biorazgradnju AV109 boje katalizovanu peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u šaržnom sistemu**

Uticaj temeperature na biorazgradnju AV109 boje katalizovanu peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u šaržnom sistemu ispitan je variranjem temperature na kojoj se izvodi reakcija biorazgradnje pod prethodno definisanim optimalnim uslovima pH, vremena kontakta, koncentracije enzima, vodonik-peroksida i boje. Uticaj temperature na reakciju biorazgradnje AV109 boje katalizovane peroksidazom iz a) celog zrna soje (optimalni uslovi: pH 3,0, boja 40 mg/L, 0,1 U enzima, 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  i 30 min vreme kontakta), b) sojinih ljuspica (optimalni uslovi: pH 4,0, boja 10 mg/L, 1 U enzima, 0,01 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  i 30 min vreme kontakta) i c) krompirovih ljuski (optimalni uslovi: pH 4,0, boja 40 mg/L, 0,6 U enzima, 0,01 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  i 50 min vreme kontakta) ispitan je izvođenjem reakcije na različitim temperaturama: 25, 38, 50, 60 i  $70^{\circ}\text{C}$ . Reakcija je praćena spektrofotometrijski beleženjem promene apsorbance svakih 5 minuta na talasnoj dužini  $\lambda=590$  nm. Stepenn biorazgradnje boje AV109 se proračunava korišćenjem jednačine 12.

#### **10.2.6. Ispitivanje početne kinetike reakcije biorazgradnje AV109 boje katalizovane peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u šaržnom sistemu**

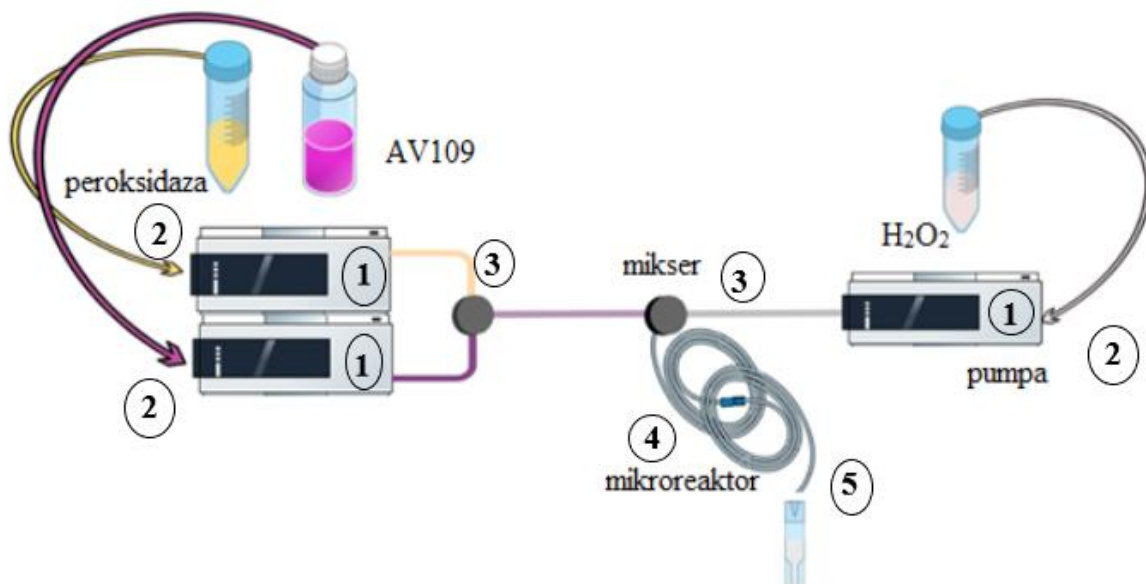
Početna kinetika reakcije biorazgradnje AV109 boje katalizovane peroksidazom iz celog zrna soje, sojinih ljuspica i krompirovih ljuski ispitan je u šaržnom reaktoru zapremine 1 mL (kiveta zapremine 1 mL). Budući da se radi o dvosupstratnoj reakciji, ispitan je uticaj početne koncentracije boje i početne koncentracije vodonik-peroksida na vrednosti kinetičkih parametara dok su procesni parametri: pH, temperatura i koncentracija enzima održavani konstantnim. Vrednosti kinetičkih parametara za boju prikupljeni su izvođenjem reakcije biorazgradnje AV109 boje pri različitoj početnoj koncentraciji boje 10-100 mg/L i pri konstantnoj početnoj koncentraciji vodonik-peroksida 0,01 mM u slučaju katalize reakcije peroksidazom iz sojinih ljuspica (1 IU) i krompirovih ljuski (0,6 IU), dok je koncentracija vodonik-peroksida u slučaju katalize reakcije peroksidazom iz celog zrna soje (0,1 IU) iznosila 1,0 mM. Vrednosti kinetičkih parametara za vodonik-peroksid prikupljeni su izvođenjem reakcije biorazgradnje AV109 boje pri različitoj početnoj koncentraciji vodonik-peroksida 0,01-0,1 mM, dok je koncentracija boje održavana konstantnom, 10 mg/L u slučaju katalize reakcije peroksidazom iz sojinih ljuspica (1 IU), dok je koncentracija boje u slučaju katalize reakcije peroksidazom iz celog zrna soje (0,1 IU) i krompirovih ljuski (0,6 IU) 40 mg/L. Početna brzina reakcije je praćena dok u trenutku kada je proreagovalo manje od 20% supstrata, a zatim su dobijene vrednosti iskorišćene za modelovanje odgovarajućim matematičkim modelima kinetike dvosupstratnih reakcija sa i bez inhibicije supstratom korišćenjem programskih paketa (Origin Pro 8.5 i MatLab).

### **10.3. Optimizacija uslova biorazgradnje AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu**

Prednosti kontinualnog mikroreaktorskog sistema su: velika specifična površina, poboljšano mešanje i poboljšani prenos mase i toplote, laminarni protok, smanjena potrošnja reagenasa a samim tim i čistija proizvodnja. Ovo dovodi i do povećane efikasnosti procesa, što je glavni razlog za primenu ovog sistema u biorazgradnji antrahinonske boje AV109. Proces je automatizovan, pa omogućena je jednostavna kontrola i monitoring procesa. Mikroreaktorski sistem za biorazgradnju boje AV109 se sastoji iz 5 segmenata (Slika 10):

1. kontrolne table,
2. ulaz,
3. mešanje,
4. reaktor i
5. izlaz.

U mikroreaktorskom sistemu za biorazgradnju boje AV109 postoje tri ulazne struje: rastvor boje AV109, rastvor peroksidaze i vodonik-peroksida, čije se kretanje ostvaruje pomoću klipnih pumpi. Protok se reguliše preko kontrolne table i u ovim eksperimentima, odnos protoka reaktanata je uvek 1:1:1. Rastvor boje AV109 i rastvor peroksidaze se mešaju u prvom mikseru. Reakcija ne može otpočeti bez vodonik-peroksida, pa se zato prvo mešaju ova dva reaktanta. Na izlazu smeše boje i peroksidaze iz prvog miksera, postavljen je i drugi mikser gde ulazi ova smeša i meša se sa vodonik-peroksidom. Na izlazu iz drugog miksera nalazi se PTFE cev određene dužine, gde počinje reakcija i taj deo predstavlja mikroreaktor. Sud za prikupljanje proizvoda reakcije nalazi se na izlazu iz mikroreaktora, tačnije na kraju PTFE cevi. Osim koncentracije reaktanata (enzim, boja, vodonik-peroksid), parametri od značaja su vreme zadržavanja, dužina reaktora i prečnik reaktora. U ovom delu izvršena je optimizacija ovih parametara za biorazgradnju boje AV109. Optimizacijom procesnih parametara biorazgradnje AV109 boje u šaržnom reaktoru, utvrđena je značajno veća efikasnost peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski, te je ispitana mogućnost biorazgradnje AV109 boje katalizovane peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u kontinualnom mikroreaktorskom sistemu.



**Slika 10.** Šema mikroreaktorskog sistema za bidegradaciju boje AV109 peroksidazom iz otpadnog materijala.

### 10.3.1. Optimizacija koncentracije enzima i određivanje vremena zadržavanja za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu

Optimalna koncentracije enzima neophodna za postizanje maksimalne biorazgradnje AV109 boje u kontinualnom mikroreaktorskom sistemu zapremine 1,17mL utvrđena je variranjem početne koncentracije enzima u opsegu 0,05-0,6 IU/mL i 0,2-1,0 IU/mL za reakciju katalizovanu peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski, redom. Ostali procesni parametri su bili konstantni: koncentracija vodonik-peroksida 0,2 mM, koncentracija boje AV109 30 mg/L, temperatura je 25°C i pH 4,0. Vreme zadržavanja reaktanata u sistemu je određeno na osnovu jednačine:

$$t_{residence} = \frac{V}{Q} = \frac{r^2 \pi L}{Q}$$

*Jednačina 13*

gde je:

V- zapremina mikroreaktora, mL

Q – pojedinačni protok reaktanata, mL/min

r – poluprečnik mikroreaktora

$\pi$  – 3,14

L – dužina mikroreaktora, 6 m

Nakon tačno određenog vremena zadržavanja, uzima se uzorak tako što se na samom izlazu iz mikroreaktora postavi kiveta, koja se puni direktno. Zatim se uzorku određuje promena apsorbance

na  $\lambda=590$  nm i utvrđuje stepen obezbojavanja korišćenjem jednačine 12. Na ovaj način se za tačno definisanu koncentraciju enzima utvrđuje i vreme zadržavanja reaktanata u mikroreaktorskom sistemu.

### **10.3.2. Optimizacija koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljustica i krompirovih ljustica u kontinualnom sistemu**

Optimalna koncentracija vodonik-peroksida neophodna za postizanje maksimalne biorazgradnje AV109 boje u kontinualnom mikroreaktorskom sistemu zapremine 1,17mL utvrđena je variranjem početne koncentracije vodonik-peroksida u opsegu 0,04-2 mM i 0,04-2 mM za reakciju katalizovanu peroksidazom iz sojinih ljustica (0,2 IU/mL) i krompirovih ljustica (0,8 IU/mL), redom. Ostali procesni parametri su bili konstantni: koncentracija boje 30 mg/L, temperatura 25°C, pH 4,0, prečnik reaktora 0,5 mm i dužina reaktora 6 m. Vreme zadržavanja reaktanata u mikroreaktorskom sistemu pod navedenim procesnim parametrima je 4 min za reakciju katalizovanu peroksidazom iz sojinih ljustica i 3 min za reakciju katalizovanu peroksidazom iz krompirovih ljustica. Nakon tačno određenog vremena zadržavanja, uzima se uzorak tako što se na samom izlazu iz mikroreaktora postavi kiveta, koja se puni direktno. Zatim se uzorku određuje promena apsorbance na  $\lambda=590$  nm i utvrđuje stepen obezbojavanja korišćenjem jednačine 12.

### **10.3.3. Optimizacija koncentracije boje za biorazgradnju AV109 peroksidazom iz sojinih ljustica i krompirovih ljustica u kontinualnom sistemu**

Optimalna koncentracija AV109 boje za postizanje maksimalne biorazgradnje AV109 boje u kontinualnom mikroreaktorskom sistemu zapremine 1,17mL, utvrđena je variranjem početne koncentracije boje u opsegu 30-210 mg/L i 90-450 mg/L, za reakciju katalizovanu peroksidazom iz sojinih ljustica (0,2 IU/ml) i krompirovih ljustica (0,8 IU/mL), redom. Koncentracija vodonik-peroksida u reakciji katalizovanoj peroksidazom iz sojinih ljustica iznosila je 0,2 mM, dok je u reakciji katalizovanoj peroksidazom iz krompirovih ljustica koncentracija vodonik-peroksida iznosila 1 mM. Ostali procesni parametri su bili konstantni: temperatura 25°C, pH 4,0, prečnik reaktora 0,5 mm i dužina reaktora 6 m. Vreme zadržavanja reaktanata u mikroreaktorskom sistemu pod navedenim procesnim parametrima je 4 min za reakciju katalizovanu peroksidazom iz sojinih ljustica i 3 min za reakciju katalizovanu peroksidazom iz krompirovih ljustica. Nakon tačno određenog vremena zadržavanja, uzima se uzorak tako što se na samom izlazu iz mikroreaktora postavi kiveta, koja se puni direktno. Zatim se uzorku određuje promena apsorbance na  $\lambda=590$  nm i utvrđuje stepen obezbojavanja korišćenjem jednačine 12.

### **10.3.4. Optimizacija prečnika mikroreaktora za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljustica i krompirovih ljustica u kontinualnom sistemu**

Specifična površina reaktora, prenos mase i toplote su samo neka od svojstva mikroreaktora koja su usko vezana i zavisna od prečnika reaktora. Shodno tome, ispitan je uticaj prečnika mikroreaktora (0,5 i 0,8 mm) na biorazgradnju AV109 boje katalizovanu peroksidazom iz sojinih ljustica i krompirovih ljustica. Uticaj prečnika mikroreaktora ispitan je pod prethodno utvrđenim optimalnim parametrima za biorazgradnju AV109 boje katalizovanu peroksidazom iz a) sojinih ljustica (koncentracija boje 10 mg/L, koncentracija vodonik-peroksida 0,2 mM, koncentracija enzima 0,2 IU/mL, vreme zadržavanja 4 min) i b) krompirovih ljustica (koncentracija boje 150 mg/L, koncentracija vodonik-peroksida 1,0 mM, koncentracija enzima 0,8 IU/mL, vreme zadržavanja 3 min) na 25 °C i pH 4,0. Nakon tačno određenog vremena zadržavanja, uzima se uzorak tako što se

na samom izlazu iz mikroreaktora postavi kiveta, koja se puni direktno. Zatim se uzorku određuje promena apsorbance na  $\lambda=590$  nm i utvrđuje stepen obezbojavanja korišćenjem jednačine 12.

### **10.3.5. Optimizacija dužine reaktora za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu**

Vreme zadržavanja, kao krucijalni parametar u kontinualnim sistemima, zavisi od zapremine reaktora, a s tim i od njegove dužine. Ujedno, dužina je parametar s kojim se najlakše manipuliše u cilju povećanja produktivnosti. S toga, dužina reaktora je optimizovana variranjem u opsegu 2,5-15 m za prečnik 0,5 mm. Uslovi pod kojim se izvodi eksperiment sa peroksidazom iz krompirovih ljuski su: koncentracija boje AV109 150 mg/L, 0,8 U/mL koncentracija enzima, 1 mM koncentracija vodonik-peroksida i vreme zadržavanja 3 min. Uslovi za eksperimente sa peroksidazom iz sojine ljuspice su: koncentracije boje AV109 10 mg/L, 0,2 U/mL koncentracija enzima, 0,2 mM koncentracija vodonik-peroksida i vreme zadržavanja 4 min. Temperatura je održavana na 25°C, a pH reakcione smeše pH=4,0. Na samom izlazu reaktora postavlja se kiveta i meri se apsorbancija na  $\lambda=590$  nm. Stepen biorazgradnje se proračunava jednačinom 12.

## **10.4. Imobilizacija peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski**

### **Imobilizacija peroksidaze iz krompirovih ljuski i sojinih ljuspica u obliku umreženih enzimskih agregata**

Postupak imobilizacije peroksidaze u obliku umreženih enzimskih agregata se odvija u dve faze: 1) taloženje i 2) umrežavanje. Da bi se postigla veća zadržana aktivnost, ispitivan je uticaj više taložnih reagenasa. Nakon odabira najboljeg taložnog reagenasa, istaložena peroksidaza se umrežava sa prethodno odabranim reagensom za umrežavanje.

#### **10.4.1. Ispitivanje uticaja taložnog reagenasa na imobilizaciju peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u obliku umreženih enzimskih agregata**

Uticaj taložnog reagenasa je ispitivan taloženjem enzima sa: etanolom, 2-propanolom, acetonom i amonijum-sulfatom. Taloženje organskim rastvaračima je vršeno mešanjem 1 mL sirovog enzimskog ekstrakta i 3 mL hladnog organskog rastvarača. Taloženje amonijum-sulfatom je vršeno dodatkom čvrstog amonijum-sulfata u sirovi ekstrakt enzima do postizanja 90 % zasićenja amonijum-sulfatom. Zatim, smeše se inkubiraju 1h na 4°C, a nakon toga talog i supernatant se odvajaju centrifugiranjem 10 min na 4°C i 10000 o/min (Sigma Aldrich 2-16, rotor 12 141). Dobijeni talog se resuspenduje u maloj zapremini 0,5 mL acetatnog pufera (pH 4,0; 50 mM) a zatim se u resuspendovanom talogu i supernatantu određuje aktivnost peroksidaze po metodi opisanoj u potpoglavlju 10.1.2. i sadržaj proteina modifikovanom Lorijevom (Lowry) metodom. Za odabir najpovoljnijeg taložnog reagenasa, koristi se jednačina 14, pomoću koje se proračunava prinos aktivnosti:

$$\text{prinos aktivnosti (\%)} = \frac{\text{aktivnost imobilisanog preparata (IU)}}{\text{aktivnost peroksidaze unete u sistem (IU)}} \cdot 100 \quad \text{Jednačina 14}$$

#### 10.4.2. Određivanje sadržaja proteina modifikovanom Larijevom metodom

Za određivanje koncentracije proteina modifikovanom Larijevom metodom potrebno je pripremiti sledeće reagense [194]:

Reagens A: 0,2 g  $C_4H_4KNaO_6$  i 10 g  $Na_2CO_3$  rastvara se u 50 mL 1M NaOH i dopuni se do 100 mL destilovanom vodom.

Reagens B: 2 g  $C_4H_4KNaO_6$  i 1 g  $Cu_2SO_4 \cdot 5 H_2O$  rastvara se u 90 mL destilovane vode i dopuni se do 100 mL sa 1M NaOH.

Reagens C: Folin-Siejkaltuov reagens razblaži se u odnosu 1:15 tako da uvek bude sveže pripremljen.

Pipetira se 0,2 mL uzorka i doda 0,18 mL reagens A. Dobijeni rastvori mešaju se na vorteksu i drže se 10 min u vodenom kupatilu na 50°C. Nakon toga, rastvori se hlade i dodaje im se 0,02 mL rastvora B. Mešaju se opet na vorteksu i ostave 10 min na sobnoj temperaturi. Zatim se dodaje se 0,6 mL rastvora C, meša na vorteksu i inkubira 10 min na 50°C. Rastvori se hlade se do sobne temperature i meri im se apsorbance na 650 nm. Za slepu probu koristi se 0,2 mL pufera umesto uzorka. Za standardnu pravu dodaje se 0,2 mL rastvora BSA poznate koncentracije u opsegu 0,1 – 0,5 mg/mL i na osnovu apsorbance se konstruiše prava.

#### 10.5. Ispitivanje uticaja reagens A za umrežavanje na imobilizaciju peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljusk i u obliku umreženih enzimskih agregata

##### 10.5.1. Priprema umrežavajućeg reagens A- pektina oksidacijom perjodnom kiselinom

Pripremi se 2 % (w/v) rastvor pektina u 100 mL 20 % (v/v) etanola. Zatim se doda 3 mL 0,5 M perjodne kiseline. Po potrebi se podešava pH rastvora na 3,5 pomoću HCl ili  $NaHCO_3$ . Erlenmajer se zatvori i uvije u aluminijumsku foliju kako bi se sprečila autooksidacija vazduhom ili svetlošću. Reakcija se odvija 2h na 60°C uz konstantno mešanje. Nakon toga, oksidovani pektin se taloži viškom hladnog 2-propanola i izdvaja vakuum filtracijom. Dobijeni oksidovani pektin suši se liofilizacijom (Christ, Beta 2-8 LSCBasic, Osterode, Nemačka).

##### 10.5.2. Određivanje sadržaja aldehidnih grupa u oksidovanom pektinu

Hidrazini reaguju sa aldehidima dajući hidrazone. Dinitrofenilhidrazin (DNPH) reaguje sa oksidovanim pektinom, i pritom se dobija dinitrofenilhidrazon. Stoga, količina potrošenog DNPH je ekvivalentna količini aldehidnih grupa oksidovanog pektina.

##### Priprema svežeg DNPH reagens A

Dinitrofenilhidrazin, 40 mg se rastvori u 0,3 mL koncentrovane sumporne kiseline. Zatim se u rastvor doda 3 mL etanola uz konstantno mešanje na sobnoj temperaturi. Nakon homogenizacije smeše, dodaje se destilovana voda do 10 mL.



### **DNPH metoda za određivanje sadržaja aldehidnih grupa**

U čašu se doda 10 mL sveže pripremljenog rastvora DNPH i 0,1 mL 0,3 % (w/v) rastvora oksidovanog pektina. Nakon 1h mešanja na sobnoj temperaturi meri se apsorbancija na 357 nm, koja odgovara količini neizreagovalog DNPH. Za proračunavanje koncentracije aldehidnih grupa, konstruiše se standardna prava DNPH u opsegu 2-10 mg/mL. Na osnovu dobijenih vrednosti apsorbancije proračunava se koncentracija DNPH. Sadržaj aldehidnih grupa se proračunava jednačinom:

$$\text{koncentracija aldehidnih grupa} \left( \frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right) = \text{Jednačina 15}$$
$$\left[ \frac{\text{proreagovali DNP} / \frac{\text{mmol}}{198,14 \text{ mL}}}{0,3 \cdot 10^{-4} \frac{\text{g}}{\text{mL}}} \right]$$

gde je:

198,14 – molarna masa DNPH (mg/mmol)

$0,3 \cdot 10^{-4}$  – koncentracija pektina (g/mL)

#### **10.5.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije umrežavajućeg reagensa na imobilizaciju peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u obliku umreženih enzimskih agregata**

Uticaj početne koncentracije taložnog reagensa na imobilizaciju peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski ispitan je variranjem početne koncentracije oksidovanog pektina u opsegu 0,1-2 % (w/v). Preciznije, nakon dodatka amonijum-sulfata do postizanja 90 % zasićenja u sirovi ekstrakt enzima zapremine 1 mL, smeša je inkubirana 1h na 4°C. Zatim se u smešu dodaje oksidovani pektin u različitim koncentracijama. Po dodatku oksidovanog pektina smeša je inkubirana 24h na 4°C. Nakon 24h, umreženi enzimski agregati se odvajaju od ostatka rastvora centrifugiranjem 10 min na 13.000 o/min na 4°C (Sigma Aldrich 2-16, rotor 12 141). Dobijeni imobilizat se ispira 50 mM acetatnim puferom (pH 4,0) da bi se uklonio ostatak enzima i oksidovanog pektina, a potom se određuje aktivnost. U preostalom supernatantu se određuje sadržaj proteina i aktivnost enzima.

#### **10.5.4. Određivanje aktivnosti peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski imobilisanih u obliku umreženih enzimskih agregata**

Aktivnost imobilisane peroksidaze određivana je korišćenjem pirogalola kao standardnog supstrata. Supstrat, 13 mM pirogalol se priprema neposredno pre upotrebe u 100 mM fosfatnom puferu, pH 7,0. Nakon pripreme, 3 mL supstrata se prenese u kivetu, a zatim se doda 0,03 mL 3 % vodonik-peroksida, i određena masa imobilisane peroksidaze. Promena apsorbance u uzorku na svakih 0,5 minuta, se prati spektrofotometrijski (Ultrospec 3300 pro, Amerissham Bioscience) na 420 nm u odnosu na fosfatni pufer, 3 minuta. Aktivnost peroksidaze se izražava u internacionalnim jedinicama (IU) koje pokazuju količinu proizvoda, purpurogalina (μmol) nastalog razgradnjom pirogalola katalizovanog peroksidazom iz sojinih ljuspica, celog zrna soje i krompirovih ljuski pod definisanim uslovima reakcije (pH 7,0, T=20°C). Aktivnost enzima izražena u IU/g<sub>imobilizata</sub> se proračunava na osnovu sledeće jednačine:

$$\text{Aktivnost CLEA peroksidaze } \left( \frac{IU}{g} \right) = \frac{\Delta A \cdot V_u}{\Delta t \cdot \varepsilon \cdot m_{\text{imobilizata}}}$$

gde je

$\frac{\Delta A}{\Delta t} \left( \frac{1}{\text{min}} \right)$  početna brzina reakcije,

$V_u$  (mL) - ukupna zapremina reakcione smeše, 3,03 mL,

12  $\left( \frac{\text{mmol}}{L} \right)$  - molarni ekstincioni koeficijent purpurogalina, ( $\varepsilon$ )

$m_{\text{imobilizata}}$  - masa imobilisane peroksidaze upotrebljene za merenje aktivnosti ( $m_{\text{CLEA}}$  peroksidaze iz sojinih ljuspica=0,4-0,6 mg;  $m_{\text{CLEA}}$  peroksidaze iz krompirovih ljuski=3,0-5,0 mg).

## 10.6. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR)

Za utvrđivanje oksidacije pektina FT-IR spektrometrijom, korišćen je Nicolet™ iST™ 10 FT-IR spektrometar (Thermo Fisher Scientific) na Smart iTR™ ATR kristalu. ATR-FTIR spektar je snimljen u opsegu 500 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

## 10.7. Biorazgradnja AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski imobilisanih u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom reaktoru

Glavna prepreka za primenu enzima u velikim razmerama je njihova visoka cena koja je pre svega posledica nemogućnosti izdvajanja enzima i ponovne upotrebe u nekom procesu. Shodo tome, u okviru ove disertacije razijen je postupak imobilizacije dve peroksidaze iz otpadnih tokova industrije i to korišćenjem jednostavne tehnike i poštovanjem svih ekoloških standarda. Ovako imobilisane peroksidaze su ispitane u nizu reakcija biorazgradnje AV109 boje optimizacijom procesnih parametara.

### 10.7.1. Optimizacija pH i vreme kontakta biorazgradnje AV109 imobilisanom peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u šaržnom sistemu

Uticaj pH vrednosti na biorazgradnju AV109 imobilisanom peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski ispitivan je u rastvorima boje koncentracije 30 mg/L, variranjem pH vrednosti u opsegu 3-9. Pripremaju se različiti puferi: citratni pufer pH 3, acetatni pufer pH 4-5, fosfatni pH 6-8 i Tris pufer pH 9, svaki od njih sa koncentracijom od 50 mM. Eksperimenti su izvedeni u šaržnom reaktoru zapremine 50 mL na sobnoj temperaturi ( $T=22-25^{\circ}\text{C}$ ) uz konstantno mešanje reakcione smeše – 200 o/min (*multi-position magnetic stirrer mix 6*, LLG). Rastvara se boja u svakom puferu i dodaje se imobilizat, 0,2 U/g. Reakcija počinje u trenutku kad se doda 0,2 mM vodonik-peroksid. Reakcija se prati na 5 min, spektrofotometrijski na  $\lambda=590$  nm. Kad promena apsorbance postane zanemarljivo mala, smatra se da je postignuta ravnoteža u reakcionom sistemu i to vreme se usvaja kao optimalno i uzima kao konstantno u sledećim fazama optimizacije procesnih parametara za biorazgradnju AV109 boje imobilisanom peroksidazom u šaržnom reaktoru. vreme kontakta

biorazgradnje boje imobilisanom peroksidazom. Stepen biorazgradnje se proračunava preko jednačine 12.

#### **10.7.2. Optimizacija koncentracije enzima za biorazgradnju boje AV109 imobilisanom peroksidazom u obliku umreženih enzimskih agregata iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u šaržnom sistemu**

U cilju određivanja optimalne koncentracije enzima, varira se početna koncentracija enzima u opsegu 0,1 – 1 IU. Sa tim u vezi, pripremljen je rastvor AV109 boje koncentracije 30 mg/L u 50 mM citratnom puferu (pH 3,0). Prvo se dodaje imobilizat, a potom vodonik-peroksid, čija finalna koncentracija u rastvoru iznosi 0,1 mM. Dodatkom vodonik-peroksida reakcija je otpočeta. Reakcija biorazgradnje AV109 se izvodi na sobnoj temperaturi ( $T=22-25^{\circ}\text{C}$ ) uz konstantno mešanje reakcione smeše – 200 o/min (*multi-position magnetic stirrer mix 6*, LLG). Reakcija biorazgradnje boje katalizovana imobilisanom peroksidazom u obliku umreženih enzimskih agregata iz sojinih ljuspica se prati 20 minuta, dok se reakcija katalizovana peroksidazom iz krompirovih ljuski prati 90 minuta. Praćenje reakcije se vrši spektrofotometrijski beleženjem promene apsorbance svakih 5 minuta na talasnoj dužini  $\lambda=590$  nm. Stepen biorazgradnje boje AV109 se se proračunava korišćenjem jednačine 12.

#### **10.7.3. Optimizacija koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju boje AV109 imobilisanom peroksidazom u obliku umreženih enzimskih agregata iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u šaržnom sistemu**

Uticaj koncentracije vodonik-peroksida na reakciju oksidacije boje imobilisanom peroksidazom iz sojine ljuspice i krompirovih ljuski u obliku umreženih enzimskih agregata ispitivan je variranjem početne koncentracije vodonik-peroksida u opsegu 0,1-1 mM. Sa tim u vezi, pripremljen je rastvor AV109 boje koncentracije 30 mg/L (50 mL), u 50 mM citratnom puferu pH 3,0, za reakciju katalizovanu imobilisanom peroksidazom u obliku umreženih enzimskih agregata iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski. U ovako pripremljen rastvor boje dodaje se 0,8 IU imobilisane peroksidaze iz krompirovih ljuski, odnosno 0,4 IU imobilisane peroksidaze iz sojinih ljuspica. Reakcija biorazgradnje AV109 se izvodi na sobnoj temperaturi ( $T=22-25^{\circ}\text{C}$ ) uz konstantno mešanje reakcione smeše – 200 o/min (*multi-position magnetic stirrer mix 6*, LLG). Nakon dodatka vodonik-peroksida u rastvor (0,01–1 mM), reakcija počinje i prati se 20 min kada je korišćena imobilisana peroksidaza iz sojinih ljuspica, a kada je korišćena peroksidaza iz krompirovih ljuski 90 min. Praćenje reakcije se vrši spektrofotometrijski beleženjem promene apsorbance svakih 5 minuta na talasnoj dužini  $\lambda=590$  nm. Stepen biorazgradnje boje AV109 se se proračunava korišćenjem jednačine 12.

#### **10.7.4. Optimizacija koncentracije boje za biorazgradnju boje AV109 imobilisanom peroksidazom u obliku umreženih enzimskih agregata iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u šaržnom sistemu**

Za određivanje optimalne koncentracije boje u reakciji biorazgradnje boje AV109 pomoću imobilisane peroksidaze u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu, varirana je koncentracija boje u opsegu 10 – 60 mg/L. Za ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na biorazgradnju katalizovanu imobilisanom peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski, pripremljen stok rastvor boje koncentracije 100 mg/L u 50 mM citratnom puferu, pH, 3,0. Zatim, rastvori boje različitih početnih koncentracija su pripremljeni razblaživanjem stok rastvora koncentracije 100 mg/L odgovarajućim puferom. U ovako pripremljenih rastvora boje zapremine 50

mL, dodaje se imobilisani preparat (0,8 IU imobilisane peroksidaze iz krompirovih ljuski, a 0,4 IU imobilisane peroksidaze iz sojinih ljuspica). Dalje, dodaje se 0,4 mM vodonik-peroksid u reakciju katalizovanu imobilisanom peroksidazom iz krompirovih ljuski, a 0,2 mM vodonik-peroksid za optimizaciju početne koncentracije boje u reakciji sa imobilisanom peroksidazom iz sojinih ljuspica. Reakcija se odvija na sobnoj temperaturi ( $T=22-25^{\circ}\text{C}$ ) uz konstantno mešanje reakcione smeše – 200 o/min (*multi-position magnetic stirrer mix 6*, LLG). Reakcija biorazgradnje boje katalizovana imobilisanom peroksidazom iz sojinih ljuspica se prati 20 minuta, dok se reakcija katalizovana peroksidazom iz krompirovih ljuski prati 90 minuta. Praćenje reakcije se vrši spektrofotometrijski beleženjem promene apsorbance svakih 5 minuta na talasnoj dužini  $\lambda=590$  nm. Step en biorazgradnje boje AV109 se se proračunava korišćenjem jednačine 12.

#### **10.7.5. Operativna stabilnost imobilisane peroksidaze u obliku umreženih enzimskih agregata u reakciji biodegradacije AV109 u šaržnom sistemu**

U cilju ispitivanja operativne stabilnosti peroksidaze iz krompirovih ljuski i sojinih ljuspica imobilisanih u obliku umreženih enzimskih agregata, praćena je reakcija biodegradacije AV109 u šaržnom sistemu. Nakon završenog ciklusa, imobilizat se izdvaja iz sistema vakuum filtracijom, ispira se 0,05 M acetatnim puferom pH 4 i dodaje u novom ciklusu biodegradacije AV109. Postupak se ponavlja sve dok se reakcija odigrava.

Za reakciju oksidacije uzete su određene optimalne vrednosti parametara:

- reakcija sa peroksidazom iz sojinih ljuspica: aktivnost enzima 0,4 U, koncentracija vodonik-peroksida 0,2 mM, koncentracija boje 10 mg/L i pH 3,0, vreme kontakta 20 min:
- reakcija sa peroksidazom iz krompirovih ljuski: aktivnost enzima 0,8 U, koncentracija vodonik-peroksida 0,4 mM, koncentracija boje 30 mg/L i pH 3,0, vreme kontakta 70 min.

#### **10.8. Imobilizacija peroksidaze iz krompirovih ljuski i sojinih ljuspica u obliku umreženih enzimskih agregata u kontinualnom sistemu**

Pored šaržnog reaktora u okviru ove doktorske disertacije ispitana je mogućnost imobilizacije enzima, peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski umrežavanjem pomoću oksidovanog pektina u kontinualnom sistemu. Mogućnost imobilizacije ispitana je u kontinualnom mikroreaktorskom sistemu dužine 1 m i prečnika 0,5 mm. Imobilizacija peroksidaze iz sojinih ljuspica na unutrašnjim zidovima mikroreaktora se postiže mešanjem rastvora oksidovanog pektina (0,05-1 % (w/v)) koji se u sistem dovodi pomoću pumpe (Shimadzu, LC-20AD XR) protokom 0,001 mL/min i rastvora enzima (0,1-0,5 mg/mL) koji se u sistem dovodi pomoću pumpe (Shimadzu, LC-20AD XR) protokom 0,0008 mL/min. Imobilizacija peroksidaze iz krompirovih ljuski na unutrašnjim zidovima mikroreaktora se postiže mešanjem rastvora oksidovanog pektina (0,05-1 % (w/v)) koji se u sistem dovodi pomoću pumpe (Shimadzu, LC-20AD XR) protokom 0,001 mL/min i rastvora enzima (0,2-0,8 mg/mL) koji se u sistem dovodi pomoću pumpe (Shimadzu, LC-20AD XR) protokom 0,0008 mL/min. Vreme zadržavanja reaktanata i vreme trajanja imobilizacije iznosi 108,8 min. Nakon 108,8 min vremena zadržavanja, skuplja se rastvor na izlazu mikroreaktora i meri se sadržaj proteina modifikovanom Larijevom metodom [194]. Zatim, višak oksidovanog pektina i enzima se uklanja iz reaktora propuštanjem acetatnog pufer (pH 4,0, 50 mM). Efikasnost imobilizacije u mikroreaktoru proračunava se jednačinom:

$$EFIKASNOST\ IMOBILIZACIJE\ (\%) = \frac{m_{rt=0} - m_{rt=108,8}}{m_{rt=0}} \cdot 100$$

*Jednačina 17*

gde je:

$m_{rt=0}$  (mg) masa proteina u početnom rastvoru korišćenom za imobilizaciju,

$m_{rt=108,8}$  (mg) masa proteina u rastvoru skupljenom na izlazu iz mikroreaktora nakon imobilizacije

### **10.8.1. Određivanje aktivnosti imobilisane peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u mikroreaktoru**

Aktivnost peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski imobilisanih u mikroreaktoru određivana je pirogalolom kao supstratom. Nakon imobilizacije u mikroreaktor sa imobilisanom peroksidazom se pomoću pumpe (Shimadzu, LC-20AD XR) uvodi svež rastvor pirogalola 13 mM, pripremljen u fosfatnom puferu (0,1 M, pH 7,0) protokom 0,1 mL/min a zatim i rastvor vodonik-peroksida 0,97 mM protokom 0,1 mL/min. Nakon zadržavanja reaktanata u sistemu 1 min, meri se promena apsorbance na  $\lambda = 420$  nm. Aktivnost peroksidaze se izražava u internacionalnim jedinicama (IU) koje pokazuju količinu proizvoda, purpurogalina ( $\mu\text{mol}$ ) nastalog razgradnjom pirogalola katalizovanog peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski pod definisanim uslovima reakcije (pH 7,0, T=22-25°C).

### **10.8.2. Primena imobilisane peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u reakciji biodegradacije AV109 u kontinualnom sistemu**

Peroksidaza iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski imobilisana na unutrašnjim zidovima mikroreaktorskog sistema ispitana je u reakciji biorazgradnje AV109 boje. Efikasnost imobilisanih peroksidaza ispitana je pod prethodno utvrđenim optimalnim parametrima uklanjanja boje sa slobodnim enzimom u mikroreaktorskome sistemu. Razgradnja boje imobilisanom peroksidazom iz sojinih ljuspica je ispitivana pod sledećim uslovima: 0,2 mM vodonik-peroksid, 10 mg/L boje AV109, pH 4,0, T=22-25°C,  $L_{\text{reaktor}}=6$  m,  $d_{\text{reaktor}}=0,5$ mm,  $t_{\text{residence}}=4$ min. Razgradnja boje imobilisanom peroksidazom iz krompirovih ljuski je ispitivana pod uslovima: 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 150 mg/L boje, pH 4,0, T=22-25°C,  $L_{\text{reaktor}}=6$  m,  $d_{\text{reaktor}}=0,5$ mm,  $t_{\text{residence}}=4$ min.

### **10.8.3. Operativna stabilnost imobilisane peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u reakciji biorazgradnje AV109 boje u kontinualnom sistemu**

Operativne stabilnost imobilisane peroksidaze iz krompirovih ljuski i sojinih ljuspica na zidovima mikroreaktora je parametar koji ukazuje na to da li je odabrana metoda imobilizacije isplativa, i da li se može koristiti za višekratnu upotrebu. Operativna stabilnost je ispitivana pod optimalnim uslovima reakcije razgradnje boje imobilisanom peroksidazom u mikroreaktoru. Nakon završenog ciklusa, mikroreaktor je ispiran acetatnim puferom 50 mM, pH 4,0. Postupak se ponavlja sve dok se ne primeti znatni pad aktivnosti imobilisane peroksidaze. Za imobilizaciju peroksidaze korišćen je 0,5 mg/mL rastvor oksidovanog pektina i 0,5 mg/mL peroksidaze iz sojinih ljuspica. Imobilizacija

traje 108,8 min. Za određivanje operativne stabilnosti imobilisane peroksidaze iz sojinih ljuspica na zidovima mikroreaktora, pripremljen je rastvor boje 10 mg/L u 50 mM citratnom puferu pH 4,0, 0,2 mM vodonik-peroksid. Pomoću pumpi se oba reaktanta dovode u mikroreaktoru, na čijim zidovima je umrežena peroksidaza oksidovanim pektinom. Reakcija se odvija u mikroreaktoru dužine 6 m, prečnika 0,5 mm na sobnoj temperaturi  $T=22-25^{\circ}\text{C}$ ,  $t_{\text{residence}}=4$  min. Operativna stabilnost imobilisane peroksidaze iz krompirovih ljuski je ispitivana u reaktoru dužine 6 m, prečnika 0,05 mm na sobnoj temperaturi  $T=22-25^{\circ}\text{C}$ . Za imobilizaciju peroksidaze korišćen je 0,5 mg/mL rastvor oksidovanog pektina i 0,8 mg/mL peroksidaze iz krompirovih ljuski. Imobilizacija traje 108,8 min. Nakon imobilizacije vrši se reakcija razgradnje u mikroreaktoru. Pripremljen rastvor boje 150 mg/L u 50 mM citratnom puferu pH 4,0 i 0,2 mM vodonik-peroksida se dovode u mikroreaktor pomoću pumpe (Shimadzu, LC-20AD XR). Praćenje reakcije se vrši spektrofotometrijski beleženjem promene apsorbance na talasnoj dužini  $\lambda=590$  nm pre početka reakcije i nakon vremena zadržavanja od 4 min. Step en biorazgradnje boje AV109 se proračunava korišćenjem jednačine 12.

## 10.9. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Korišćen je skenirajući elektronski mikroskop (Tescan FE-SEM Mira 3 XMU) pri naponu ubrzanja od 5 keV za karakterizaciju morfologije cevnog mikroreaktora pre i posle imobilizacije. Uzorci se pripremaju prevlačenjem tankog sloja zlata pomoću instrumenta Polaron SC502 Sputter Coater (Fison Instruments, UK).

## 10.10. Određivanje proizvoda biorazgradnje boje AV109 katalizovane peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski

Proizvodi razgradnje boje AV109 su određeni primenom tečne hromatografije-masene spektrometrije i gasne hromatografije-masene spektrometrije (LC-MS i GC-MS): Thermo Scientific Accela /TSQ Quantum Access MAX trostruki kvadrupol HPLC-MS sistem sa protokom mobilne faze ((A:  $\text{H}_2\text{O}$  0,1 %  $\text{HCOOH}$ , 5 mM  $\text{HCOONH}_4$  and B:  $\text{MeOH}$  0,1 %  $\text{HCOOH}$ , 5 mM  $\text{HCOONH}_4$ ) od 0,3 ml/min. Gradijent mobilne faze: 100 % A za 0,5 min, sledi 70 % B 7 min, 100 % B 9 min. Parametri instrumenta: masena detekcija vršena je u opsegu 50-1000 m/z, HESI, negativna jonizacija, napon spreja 3700 V, temperature uparivača  $270^{\circ}\text{C}$  i temperatura kapilare  $300^{\circ}\text{C}$ . Injekciona zapremina je iznosila 10  $\mu\text{L}$ , dok je separacija izvođena na Thermo Scientific Accucore aQ,  $100 \times 2.1$  mm, 2.6  $\mu\text{m}$  koloni. Rezultati su analizovani pomoću softvera Thermo Xcalibur 2.2. Poluisparljive organske materije su ispitane GC-MS analizom, koristeći Varian CP-3800 GC sa autosemplerom with Saturn 2200 MS i CP-8200cx (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Sistem je opremljen sa injektorom i sa bez razdvajanja na temperaturi  $280^{\circ}\text{C}$ . Temperaturni program za razdvajanje analita: od  $60^{\circ}\text{C}$  do  $300^{\circ}\text{C}$  brzinom  $8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , i zadržavanjem od 10 min. Protok gasa 1 mL/min. Za identifikaciju proizvoda razgradnje boje AV109, 1  $\mu\text{L}$  uzorka je analiziran na koloni FactorFour (VF-5 ms)  $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm ID}$ , FT 0.25  $\mu\text{m}$ . MS analiza je izvršena u modu elektronske jonizacija 70 eV, sa masenom detekcijom u opsegu 45-450 m/z.

### **10.11. Određivanje hemijske potrošnje kiseonika u uzorku pre i nakon biorazgradnje AV109 boje katalizovane peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski**

U cilju određivanja kvaliteta i toksičnosti rastvora boje nakon enzimskog tretmana, određena je hemijska potrošnja kiseonika (HPK metar, Hanna Instruments). Određivanje je vršeno modifikovanom dihromatnom metodom (Metoda 410.4 EPA, Određivanje HPK poluautomatskom kolorimetrijom). U vijalu sa unapred pripremljenim reagensom (HI93754C-25) dodaje se 0,2 mL uzorka pod uglom 45°, zatvara, meša pažljivo inverzijom i zagreva 2h na 150 °C. Slepa proba sadrži boja, vodonik-peroksid i denaturisan enzim. Nakon zagrevanja, vijale se hlade do 120°C, mešaju opet inverzijom i hlade do sobne temperature. Na aparatu, bira se program za određivanje HPK i postavlja se vijala u HPK metar. Očitana vrednost se izražava u mg/L kiseonika (O<sub>2</sub>). Uzorak pre enzimskog tretmana sa peroksidazom iz sojinih ljuspica sadrži 30 mg/L AV109, 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 0,21 IU/mL denaturisane peroksidaze, a uzorak pre enzimskog tretmana sa peroksidazom iz krompirovih ljuski sadrži 150 mg/L AV109, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 0,8 IU/mL denaturisane peroksidaze. Uzorci nakon enzimskog tretmana sadrže iste komponente, samo sa aktivnim enzimom, a HPK je ispitana 3 min vremena zadržavanja sa peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski. Slepa proba sadrži pufer, vodonik-peroksid i enzim.

### III Rezultati i diskusija

## 11. Biorazgradnja antrahinonske boje peroksidazom izolovanom iz otpadnog materijala u šaržnom reaktoru

Razvoj nauke i tehnologije u velikoj meri je doprineo primeni enzima u svim oblastima i granama industrije. Primena enzima se direktno povezuje sa prečišćenim enzimskim preparatima. Međutim, postupak izolovanja i prečišćavanja enzima obuhvata razne tehnike koje zahtevaju potrošnju velikih količina reagenasa i vremena, a neretko se dogodi da u toku prečišćavanja enzim izgubi deo svoje aktivnosti. Postupak kao što je tretman obojenih otpadnih voda ne zahteva primenu enzimskih preparata visokog stepena čistoće pa je sa tim u vezi u ovoj doktorskoj disertaciji korišćen otpadni materijal za dobijanje sirovog ekstrakta enzima koji je pod odgovarajućim uslovima skladišten i korišćen u takvom, neprečišćenom obliku u konkretnoj reakciji. U okviru ove doktorske disertacije izvršena je selekcija nekoliko sorti soje i krompira koje se gaje na teritoriji Republike Srbije sa ciljem pronalaženja one koja je bogatiji izvor peroksidaze. Tako je, nakon ekstrakcije peroksidaze po metodi opisanoj u potpoglavlju 10.1.1. izolovana peroksidaza i utvrđena njena aktivnost korišćenjem metode opisane u potpoglavlju 10.1.2. Dobijene vrednosti nedvosmisleno ukazuju na to da je soja sorte Lela (65 IU/mL) bogatija peroksidazom u poređenju sa Laura (18 IU/mL), Lidija (0,1 IU/mL), Olga (0,1 IU/mL), Selena (3,4 IU/mL). Ispitivane sorte krompira Memfis, Arizona i Esme su pokazali aktivnost peroksidaze: 0,5, 1,6 i 0,8 IU/mL.

Na osnovu navedenih rezultata, odabrana je otpadni materijal soje sorte Lela i krompira sorte Arizona koji će se koristiti za izolovanje peroksidaze.

### 11.1. Biorazgradnja antrahinonske boje peroksidazom izolovanom iz celog zrna soje u šaržnom sistemu

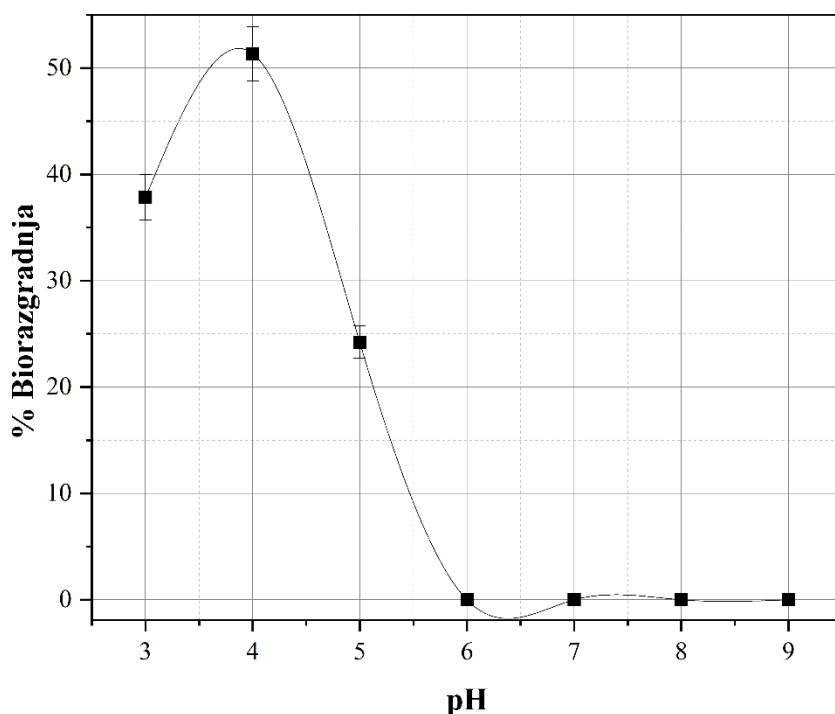
#### 11.1.1. Optimizacija pH i vremena kontakta biorazgradnje AV109 boje peroksidazom iz celog zrna soje u šaržnom sistemu

pH vrednost za utvrđivanje aktivnosti oksidoredukujućih enzima korišćenjem standardnog supstrata uglavnom nisu u dobroj korelaciji sa optimalnim pH vrednostima za biorazgradnju sintetičkih tekstilnih boja. Objašnjenje za ovakvo ponašanje enzima se nalazi u činjenici da su tekstilne boje izuzetno kompleksnih hemijskih struktura u kojima se nalaze različite jonizujuće grupe koje su različito naelektrisane u zavisnosti od uslova sredine. Način na koji će se vezati supstrat za aktivno mesto enzima dodatno zavisi od naelektrisanja aminokiselinskih ostataka u strukturi aktivnog centra enzima. Na slici 11, prikazan je uticaj pH na biorazgradnju boje AV109 katalizovanu peroksidazom iz celog zrna soje. Može se zaključiti da je peroksidaza iz celog zrna soje aktivna u opsegu pH 3–5, pri čemu je postignut stepen biorazgradnje od  $37,82 \pm 0,81$  % na pH 3,  $51,35 \pm 0,75$  % na pH 4,0, dok je na pH 5,0 zabeležena biorazgradnja od  $24,22 \pm 0,56$  %. Iako postoje literaturni navodi da se u jako kiseljoj sredini oslobađa gvožđe iz porfirinskog jezgra i na taj način inaktivira enzim, evidentno je da do toga nije došlo u ovom slučaju. Takođe, u ovom istraživanju je utvrđeno da na pH vrednostima iznad 5 (5–9), nije moguće izvesti reakciju biorazgradnje pomenute boje peroksidazom iz celog zrna soje. Ukoliko se dobijeni rezultati uporede sa literaturnim navodima, jasno je da postoje sličnosti u ponašanju kada se radi o peroksidazama poreklom iz biljaka koje katalizuju biorazgradnju sintetičkih, antrahinonskih boja. Tako su Šekuljica i saradnici koristili



peroksidazu iz korena rena za biorazgradnju iste boje, AV109 [91]. U ovom istraživanju je utvrđeno da se maksimum biorazgradnje AV109 boje katalizovane peroksidazom iz rena postiže na pH 4, dok se na ostalim pH vrednostima iznad 4, stepen biorazgradnje značajno smanjuje. Dalja optimizacija uslova biorazgradnje AV109 boje katalizovane peroksidazom iz celog zrna soje u šaržnom reaktoru izvedena je na pH 4.

Paralelno sa optimizacijom pH, utvrđeno je i vreme kontakta, tačnije vreme trajanja reakcije biorazgradnje. Nakon 30 minuta, reakcija se značajno usporava, preciznije povećanje biorazgradnje je neznajno. Shodno dobijenim rezultatima, 30 minuta je vreme neophodno za postizanje maksimalne biorazgradnje  $51,35 \pm 0,75$  % katalizovane peroksidazom iz celog zrna soje. Peroksidaza iz otpadnog materijala soje je korišćena za obezbojavanje azo boje Direktno plavo 2 [195]. Za 240 min je postignuto obezbojavanje od 50%.

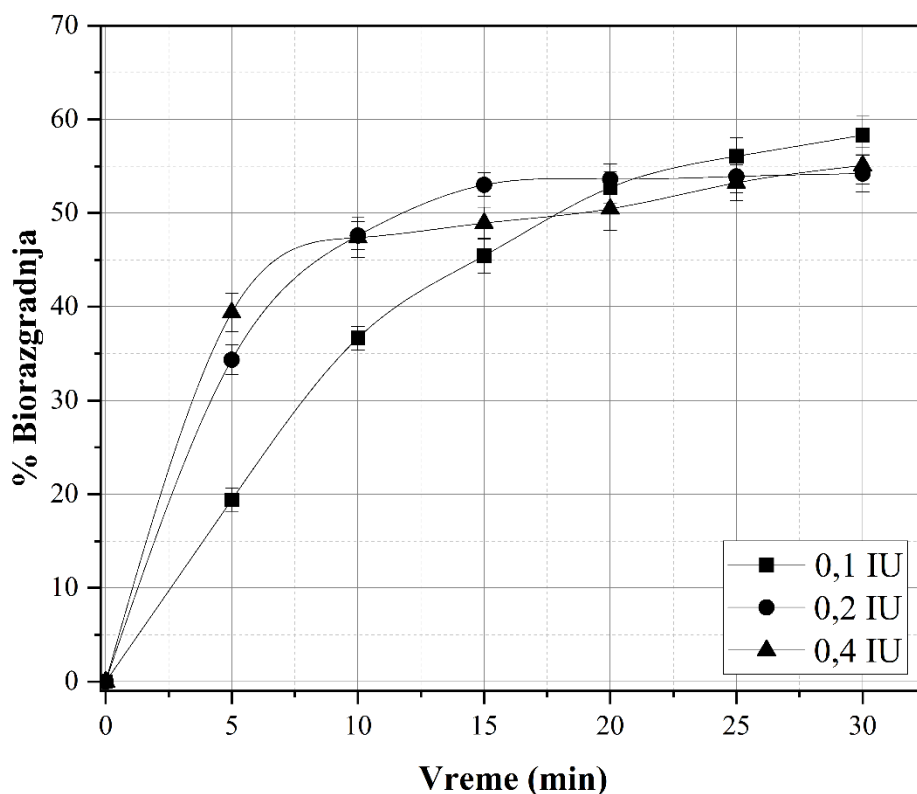


*Slika 11. Uticaj pH na biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz celog zrna soje (reakcioni uslovi: koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija vodonik-peroksida 0,1 mM, koncentracija enzima 0,1 IU, temperatura 22-25°C)*

### **11.1.2. Optimizacija početne koncentracije enzima za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz celog zrna soje u šaržnom sistemu**

Ekonomičnost postupka u kome se koriste enzimski preparati se značajno povećava ukoliko se pažljivo utvrde uslovi, tačnije početna koncentracije enzima neophodna za izvođenje ciljane reakcije. Preciznije, neophodno je utvrditi optimalnu - minimalnu koncentraciju enzima da bi se postigla maksimalna biorazgradnja AV109 boje.

U cilju određivanja optimalne enzimske koncentracije za biorazgradnju AV109, broj dodatih jedinica peroksidaze iz celog zrna soje u reakcionu smešu je varirana u opsegu 0,1 – 0,4 IU. To odgovara koncentraciji enzima 0,002 – 0,008 IU/mL (Slika 12).

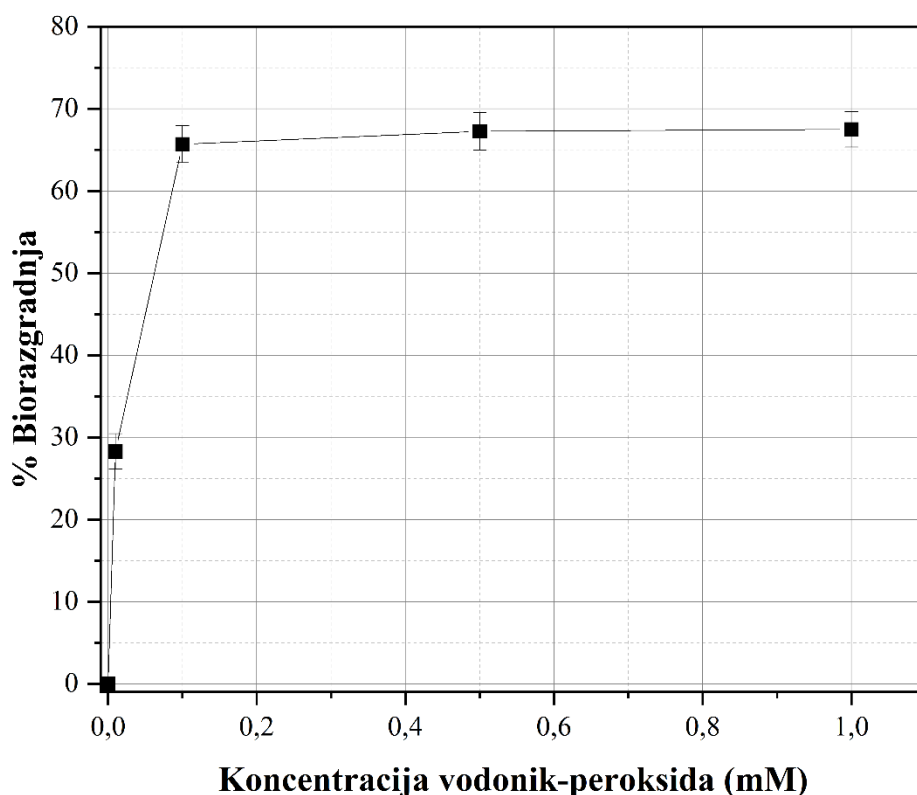


**Slika 12.** Zavisnost biorazgradnje AV109 od koncentracije peroksidaze iz celog zrna soje (uslovi: pH 4, koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija vodonik-peroksida 0,1 mM, temperatura 25°C)

Sa povećanjem koncentracije enzima ne dolazi do znatne promene u biodegradaciji AV109. Kad je korišćena 0,1 IU (0,002 IU/mL), dobijeni procenat biodegradacije je bio  $58,31 \pm 1,15$  %. Kalsum (Kalsoom) i sar. su koristili sojinu peroksidazu za degradaciju diazo boje Tripan plavo. Korišćenjem 40 IU/mL su postigli 57,8% biodegradaciju nakon 10 minuta [196]. U odnosu na koncentraciju peroksidaze potrebnu za degradaciju antrahinoncke boje AV109, ovo je znatno veća koncentracija enzima. Takođe, Altahir (Altahir) i sar. su koristili sirovu sojinu peroksidazu za degradaciju dve kisele azo boje Kiselo oranž 7 i Kiselo crno 2 [197]. Za degradaciju od 95% obe boje pri njihovoj koncentraciji od 0,5 mM, bilo je potrebno 3h i koncentracija enzima 1,2 IU/mL. Za degradaciju antrahinonske boje Lanaset plavo 2R od 95% je bilo potrebno 10 min i koncentracija komercijalne peroksidaze od 14,9 IU/mL komercijalne peroksidaze. Korišćenjem komercijalnog preparata peroksidaze iz rena postignut je veći procenat degradacije boje za kraće vreme trajanja reakcije u odnosu na reakciju sa peroksidazom dobijenom iz celog zrna soje koja ima jednostavniji način dobijanja i nižu cenu koštanja.

### 11.1.3. Optimizacija početne koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz celog zrna soje u šaržnom sistemu

Smatra se da velika koncentracija vodonik-peroksida može da deluje inhibitory na enzim i da utiče na značajno smanjenje biorazgradnje boje. Uticaj početne koncentracije vodonik-peroksida na stepen biorazgradnje antrahinonske boje AV109 je ispitan u opsegu 0,01–1 mM, a dobijeni rezultati su prikazani na Slici 13. Rezultati prikazani na Slici 13 nedvosmisleno ukazuju da početna koncentracija vodonik-peroksida u opsegu 0,1–1 mM ne utiče značajno na biorazgradnju. Preciznije, pri nižim početnim koncentracijama vodonik-peroksida (0,01 mM) postignut je niži stepen biorazgradnje (28 %), dok je sa 1 mM vodonik-peroksida procenat biorazgradnje trostruko veći,  $77,51 \pm 1,23$  %. Može se zaključiti da nedovoljna kao i prevelika koncentracija vodonik-peroksida može biti ograničavajući faktor reakcije. Silva (Silva) i sar. su došli do istog saznanja na primeru boje Remazol plavo R (RBR) [110]. Silva i sar. su optimizovali postupak biorazgradnje RBR boje i utvrdili da se maksimalna biorazgradnja postiže pod sledećim uslovima: peroksidaza iz soje aktivnosti 70,4 IU/mL, koncentracija boje 40 mg/L, pH 6 i koncentracija vodonik-peroksida 100 mM.



*Slika 13. Zavisnost biorazgradnje AV109 iz celog zrna soje od koncentracije vodonik-peroksida (uslovi: pH 4, koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija enzima 0,1 IU, temperatura 25°C)*

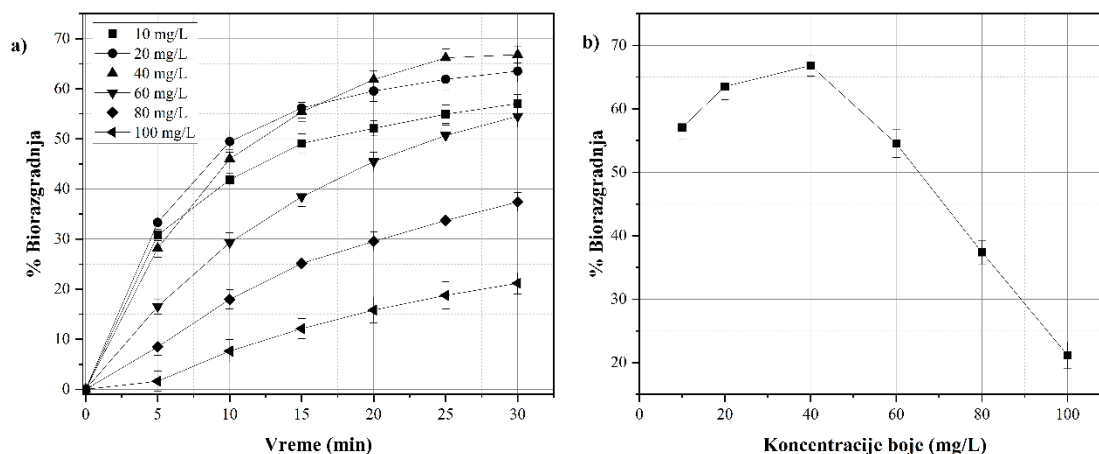
Eksperimentalno dobijeni odnos koncentracije vodonik-peroksida i antrahinonske boje AV109 značajno se razlikuje od teorijski predviđenih vrednosti. Teorijske vrednosti su zasnovane na mehanizmu delovanja oksidoreduktaze. Vodonik-peroksid je kosupstrat koji može biti i aktivator,

ali i inhibitor ako je u višku. Stehiometrijski koeficijent vodonik-peroksida je 0,5. Međutim, u praksi ova vrednost se potpuno razlikuje. U slučaju boje AV109, maksimalna efikasnost peroksidaze iz celog zrna soje je postignuta kada je odnos početnih koncentracija vodonik-peroksida i antrahinonske boje AV109 bio 20. Iako se eksperimentalna vrednost razlikuje od teorijske, grupa autora je došla do jako sličnog rezultata [198]. U navedenom istraživanju ista grupa autora je koristila sirovi ekstrakt peroksidaze iz soje za biorazgradnju boje metil oranž. U ovom istraživanju je utvrđeno da je optimalan odnos vodonik-peroksida i boje, metil oranža, 22. Moguće objašnjenje za znatno povećanu koncentraciju vodonik-peroksida u odnosu na teorijsko predviđanje može biti prisustvo drugih oksidoreduktivnih enzima koji se mogu naći u sirovom ekstraktu enzima. Na primer, askorbat peroksidaze i katalaze su sastavni deo biljnog tkiva soje i takođe mogu da reaguju sa vodonik-peroksidom.

Sa druge strane, u reakciji biorazgradnje AV109 boje nije zabeleženo formiranje taloga, što se može objasniti stvaranjem intermedijera koji su dobro rastvorni u vodi. Samim tim, povećana koncentracija vodonik-peroksida potrebna za biorazgradnju AV109 boje može se pripisati paralelnim degradacionim ciklusima, gde formirani intermedijeri iz prvog ciklusa degradacije nastavljaju degradaciju u sledećem ciklusu. Peroksidaza katalizuje oksidaciju novih molekula supstrata, kao i nastalih intermedijera. To je mogući razlog za postojanje velike razlike između teorijske i stvarne količine vodonik-peroksida potrebne za biodegradaciju [199].

#### 11.1.4. Optimizacija koncentracije boje za biorazgradnju AV109 peroksidazom iz celog zrna soje u šaržnom sistemu

Poznato je da sintetičke boje vrlo često deluju inhibitory na aktivnost enzima. Shodno tome, koncentracija supstrata boje, je bitan parametar koji je potrebno optimizovati. Na Slici 14a prikazana je zavisnost biorazgradnje AV109 u vremenu za različite koncentracije boje. Koncentracija boje je varirana u opsegu 10–100 mg/L, a maksimalan procenat biorazgradnje je postignut pri koncentraciji boje 40 mg/L iznosi  $66,81 \pm 1,28 \%$ .



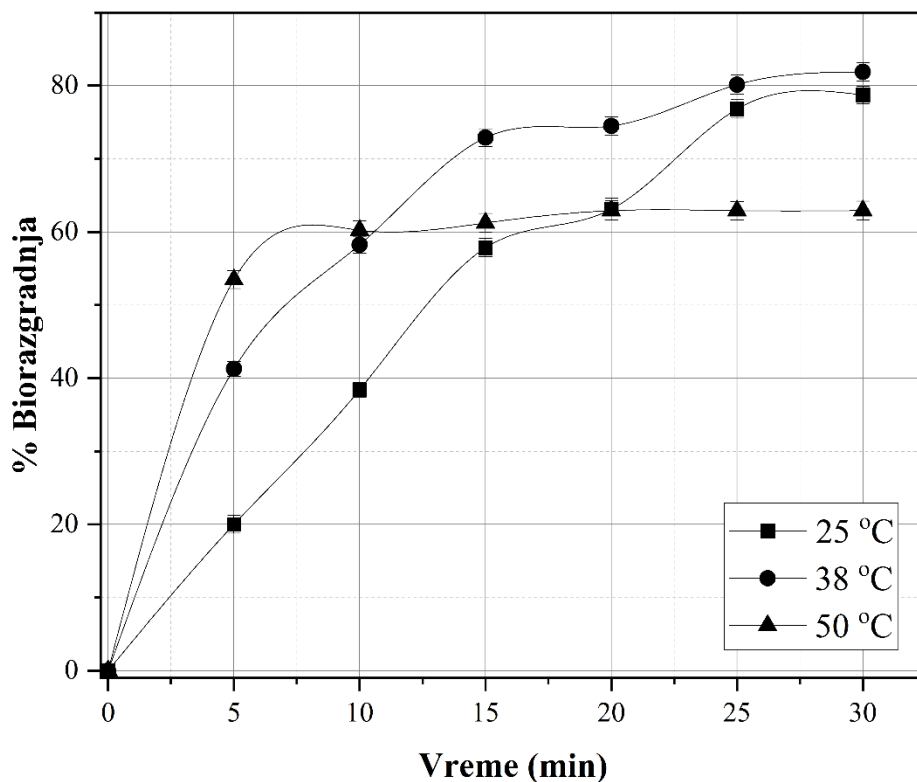
**Slika 14.** a) Zavisnost biorazgradnje AV109 peroksidazom iz celog zrna soje od vremena za različite koncentracije boje (uslovi: pH 4, koncentracija vodonik-peroksid 1 mM, koncentracija enzima 0,1 IU, temperatura 25°C). b) Uticaj koncentracije boje AV109 na biorazgradnju (uslovi: pH 4, koncentracija vodonik-peroksida 1 mM, koncentracija enzima 0,1 IU, temperatura 25°C)

Sa povećanjem koncentracije boje dolazi do smanjene biorazgradnje. Pri koncentraciji boje od 100 mg/L, procenat biorazgradnje je  $21,8 \pm 2,12 \%$ , što ukazuje na moguću inhibiciju, a to je i evidentno sa Slike 14b. Mandujano (Mandujano) i sar. su ispitivali mogućnost degradacije azo boje

pomoću sojine peroksidaze [195]. Uspešno su razgradili 70 % boje koncentracije 40 mg/L na pH 5 i reakcionoj temperaturi 40°C, i koncentraciji enzima 15 IU/mL.

#### 11.1.5. Optimizacija temperature za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz celog zrna soje u šaržnom sistemu

Budući da celokupni proces bojenja zahteva u nekom trenutku zagrevanje na visokim temperaturama, u otpadnim tokovima tekstilne industrije beleži se značajan porast temeprature. Za tretman obojenih otpadnih voda poželjno je pronaći enzim koji je aktivan i stabilan u širokom temperaturnom opsegu. Uticaj temperature na biorazgradnju antrahinonske boje AV109 je ispitan na 25, 38 i 50°C i dobijeni rezultati su prikazani na Slici 15. Ostali parametri reakcije koji su bili konstantni su utvrđeni u prethodnom istraživanju i to: optimalan pH 4,0; optimalna koncentracija boje 40 mg/L, optimalna koncentracija enzima 0,1 IU i optimalna koncentracija vodonik-peroksida 1mM. Peroksidaza se pokazala kao termostabilan enzim, čija aktivnost je nepromenjena čak i na temperaturi do 70°C [200]. Međutim, peroksidaza iz celog zrna soje, korišćena u ovoj disertaciji, nije pokazala aktivnost na temperaturama iznad 60°C. Do sličnog zaključka su došli i Vatanabi Watanbe) i sar., koji su izolovali sojinu peroksidazu koja je imala temperaturni optimum na 30°C [201]. Optimalna temperatura reakcione smeše na kojoj peroksidaza iz celog zrna soje ima najveću aktivnost iznosi 38°C, a postignut stepen biorazgradnje antrahinonske boje je AV109  $81,88 \pm 2,18$  %.

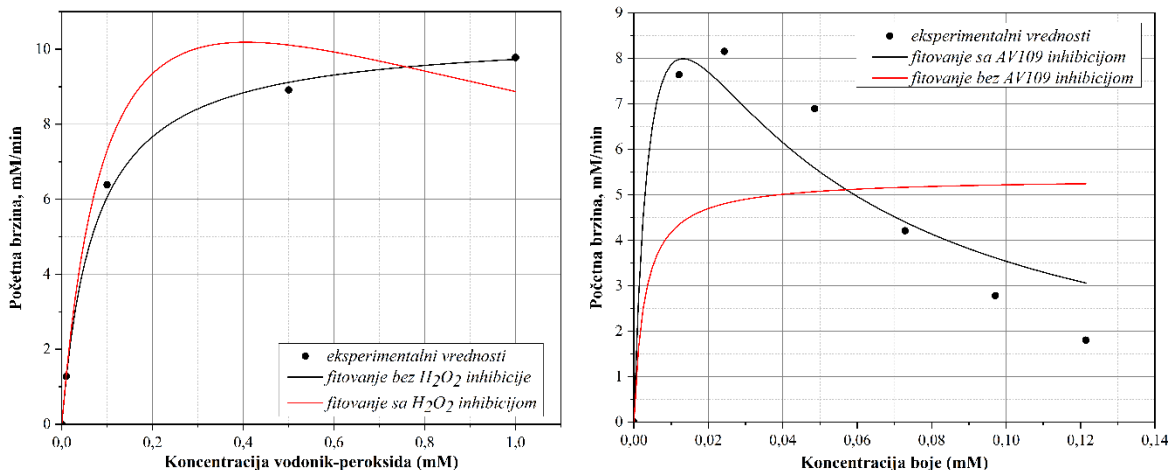


**Slika 15.** Uticaj temperature na biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz celog zrna soje (uslovi: pH 4, koncentracija vodonik-peroksida 1 mM, koncentracija enzima 0,1 IU, koncentracija boje 40 mg/L)

### 11.1.6. Utvrđivanje kinetičkih parametara u reakciji biorazgradnje AV109 boje katalizovane peroksidazom iz celog zrna soje u šaržnom reaktoru

Poznavanje kinetike enzimski katalizovanih reakcija daje tačan uvid u enzimsku reakciju što olakšava optimizaciju i izvođenje konkretne reakcije. Praćenjem kinetike enzimске reakcije dobijaju se informacije o afinitetu enzima prema supstratu što je od velikog značaja prilikom prevođenja procesa sa laboratorijskog na industrijski nivo. Kinetika biorazgradnje AV109 boje peroksidazom iz biljnih izvora, tačnije peroksidazom iz rena je detaljno ispitana od strane Šekuljice i saradnika [91]. Naime, pažljivim ispitivanjem uticaja početne koncentracije boje i vodonik-peroksida, a zatim modelovanjem dobijenih eksperimentalnih podataka sa matematičkim modelima dvo-supstratnih reakcija izveden je zaključak da se ova reakcija odvija po ping-pong mehanizmu, preciznije mehanizmu dvosupstratnih reakcija koje uključuju postojanje inhibicije supstratom.

Longu (Longu) i sar. su takođe ispitivali mehanizam delovanja peroksidaze iz rena [202]. U početku, dolazi do vezivanja vodonik-peroksida za porfirinsko jezgro enzima, tačnije za hem-Fe<sup>3+</sup>, što dovodi do stvaranje intermedijernog jedinjenja (EI). EI se redukuje pomoću supstrata (boje) i formira se sledeće intermedijerno jedinjenje EII. EII se ponovo redukuje sa sledećim molekulom supstrata. Na ovaj način enzim se ponovo vraća u svoju nativnu formu. Do formiranja neaktivnog kompleksa enzima i supstrata/proizvoda je moguće ako uslovi reakcije nisu optimizovani. U cilju određivanja vrste kinetičkog modela koji najbolje opisuje reakciju biorazgradnje AV109 boje katalizovanu peroksidazom iz celog zrna soje varirana je koncentracija boje i vodonik-peroksida, dok su ostali uslovi reakcije održavani konstantnim. Dobijeni eksperimentalni podaci su fitovani matematičkim modelom kinetike koja ne uključuje inhibiciju i matematičkim modelom koji uključuje inhibiciju bojom i vodonik-peroksidom (Tabela 6). Slika 16a ukazuje na to da koncentracija vodonik-peroksida nema negativan uticaj na biorazgradnju antrahinonske boje AV109. Sa slike se jasno vidi da ispitivani opseg početnih koncentracija vodonik-peroksida nema inhibitorski uticaj na enzim, što potvrđuje i vrednost faktora korelacije,  $R^2 = 0,9981$ . Kad se eksperimentalne vrednosti obrade pomoću modela sa inhibicijom, faktor korelacije je manji  $R^2 = 0,9603$  što predstavlja još jedan dokaz da vodonik-peroksid ne izaziva inhibiciju peroksidaze iz celog zrna soje u ispitivanom opsegu. Poređenjem vrednosti Mihaelis-ove konstante za peroksidazu iz rena i celog zrna soje, čiji su vrednosti  $K_m = 0,1091$  mM za peroksidazu iz celog zrna soje i  $K_m = 0,2356$  mM za peroksidazu iz rena, može se zaključiti da peroksidaza iz celog zrna soje ima veći afinitet ka vodonik-peroksidu [91].



**Slika 16.** a) Uticaj inicijalne koncentracije vodonik-peroksida na inicijalnu brzinu reakcije pri konstantnoj koncentraciji boje 0,048 mM. Eksperimentalni podaci su obrađeni modelima sa inhibicijom - crvena linija i bez inhibicije - crna linija. b) Uticaj inicijalne koncentracije boje AV109 na inicijalnu brzinu reakcije pri konstantnoj koncentraciji vodonik-peroksida od 1 mM. Eksperimentalni podaci su obrađeni modelima sa inhibicijom - crna linija i bez inhibicije - crvena linija

Što se tiče boje, njen inhibitorni uticaj je lako uočljiv. Ako se uporede  $K_m$  vrednosti za peroksidazu iz rena,  $K_m=0,2374$  mM i peroksidazu iz celog zrna soje ( $K_m=0,0052$  mM za peroksidazu iz celog zrna soje), može se zaključiti da peroksidaza iz celog zrna soje ima veći afinitet ka boji. Ipak, kad se uporede konstante inhibicije, boja AV109 ima veći inhibitorni uticaj na peroksidazu iz celog zrna soje nego na peroksidazu iz rena.  $K_i$  boje za peroksidazu iz celog zrna soje iznosi  $7,1234 \cdot 10^{-5}$  mM, a  $K_i$  za peroksidazu iz rena je 0,008 mM. Sa Slike 16b se jasno vidi da se matematički model bez inhibicije bojom ne poklapa sa dobijenim ekperimentalnim vrednostima.

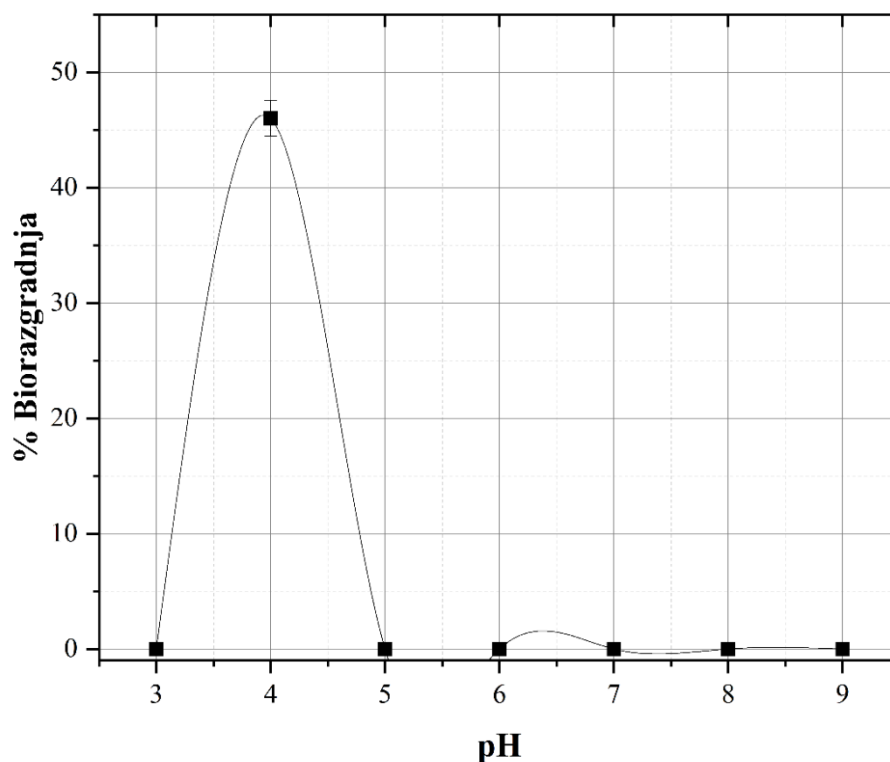
**Tabela 6.** Vrednosti kinetičkih parametara dobijenih modelovanjem prema ping pong bi-bi mehanizmu bez inhibicije  $H_2O_2$  i sa inhibicijom AV109 bojom za peroksidazu iz celog zrna soje

$H_2O_2$				
$v_{max}$ , mM/min	$K_m^{boja}$ , mM	$K_m^{H_2O_2}$ , Mm	$K_I^{H_2O_2}$ , mM	$R^2$
15,7880	0,0246	0,1091	/	0,9981
<i>Inhibicija bojom</i>				
$v_{max}$ , mM/min	$K_m^{boja}$ , mM	$K_m^{H_2O_2}$ , mM	$K_I^{boja}$ , mM	$R^2$
14,3210	0,0052	0,0011	$7,1234 \times 10^{-5}$	0,9203

## 11.2. Biorazgradnja antrahinonske boje peroksidazom izolovanom iz sojinih ljuspica u šaržnom sistemu

### 11.2.1. Optimizacija pH i vremena kontakta biorazgradnje AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica u šarnom sistemu

Altahir i sar. su potvrdili značaj optimizacije pH vrednosti rastvora u kome se odigrava reakcija biorazgradnje katalizovana peroksidazama iz biljnih izvora. Naime, pomenuta grupa saradnika je ispitivala biorazgradnju dve azo boje katalizovanu peroksidazom iz sojinih ljuspica. Iako je u pitanju kataliza biorazgradnje istim enzimom zabeležen je različit pH optimum za dve ispitivane boje, što potvrđuje značajan uticaj pH na naelektrisanje jonizujućih grupa u moleuklu boje. [197]. Sa Slike 17 se može videti da je biorazgradnja antrahinonske boje AV109, katalizovana peroksidazom iz sojinih ljuspica moguća samo u rastvoru pufera, pH 4,0 i iznosi  $46,00 \pm 3,34$  %. Sa druge strane, prethodnim istraživanjem je potvrđeno da je peroksidaza iz celog zrna soje aktivna u širem opsegu pH, pH 3–5. Najverovatniji razlog ovakvog ponašanja peroksidaze iz sojinih ljuspica se pripisuje činjenici da se u sojinim ljuspicama nalazi samo jedan izoenzim. [203]. U toku utvrđivanja optimalnog pH za reakciju biorazgradnje AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica usvojen je još jedan parametar, a to je vreme kontakta od 30 min.

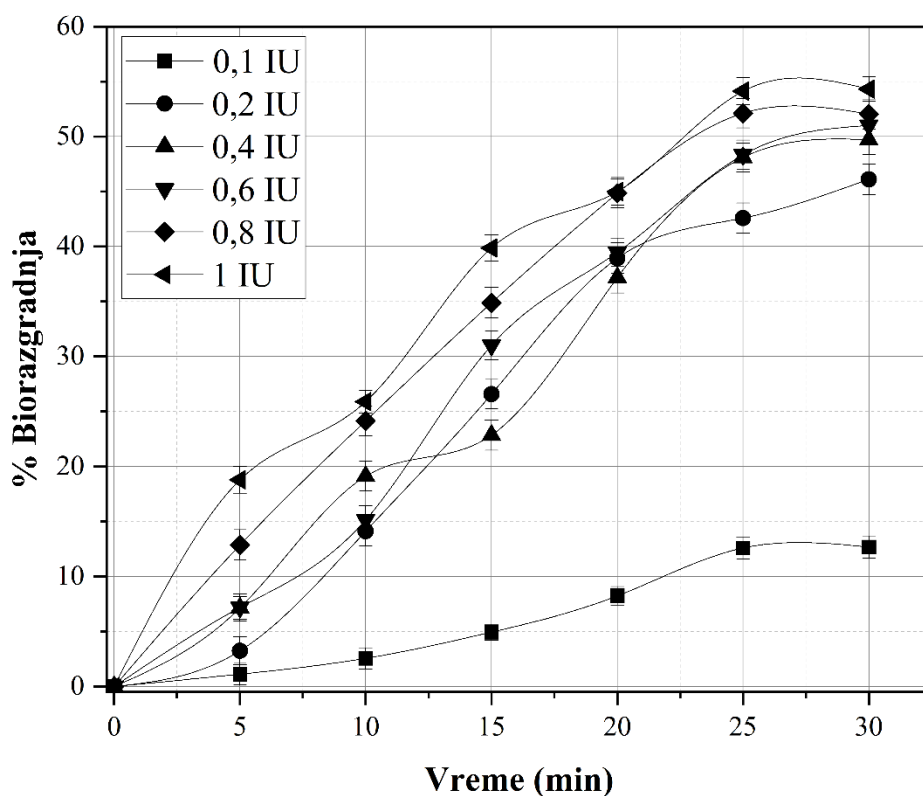


*Slika 17. Uticaj pH na biorazgradnju boje AV109 na sobnoj temperaturi peroksidazom iz sojinih ljuspica (reakcioni uslovi: koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija vodonik-peroksida 0,1 mM, koncentracija enzima 0,2 IU)*



### 11.2.2. Optimizacija početne koncentracije enzima za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica u šaržnom sistemu

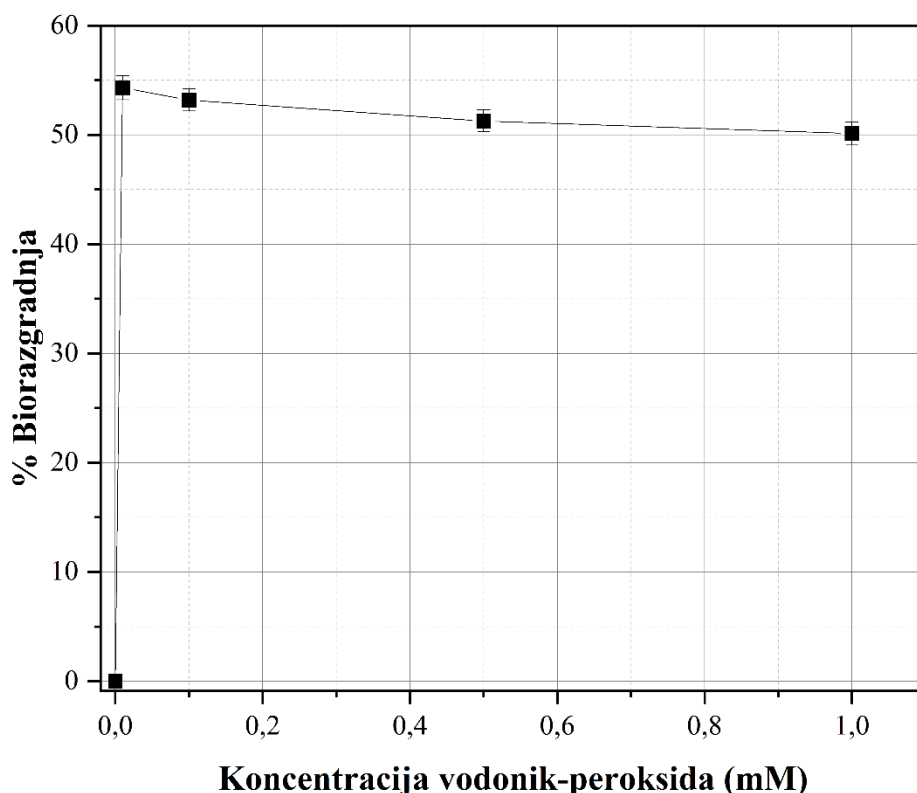
U cilju ispitivanja uticaja koncentracije enzima na biorazgradnju boje AV109, broj jedinica peroksidaze iz sojinih ljuspica je variran u opsegu 0,1 – 1 IU, što odgovara koncentraciji 0,002 – 0,02 IU/mL. Rezultati su prikazani na Slici 18. Stepen biorazgradnje raste proporcionalno sa povećanjem koncentracije peroksidaze. Maksimalna biorazgradnja od  $54,32 \pm 1,11\%$  je postignuta sa 1 IU peroksidaze iz sojinih ljuspica. Koncentracija peroksidaze iz sojinih ljuspica potrebna za biorazgradnju boje do sličnog procenta za isto vreme, je znatno veća u poređenju sa peroksidazom iz celog zrna soje (0,1 IU). Mogući razlog za ovakvog ponašanja ekstrakata je prisustvo jedne izoforme peroksidaze u sojinim ljuspicama, za razliku od peroksidaze iz celog zrna soje kod koje je prisutno više njih.



**Slika 18.** Zavisnost biorazgradnje AV109 od koncentracije peroksidaze iz sojinih ljuspica (uslovi: pH 4, koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija vodonik-peroksida: 0,1 mM, temperatura: 25°C)

### 11.2.3. Optimizacija početne koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica u šaržnom sistemu

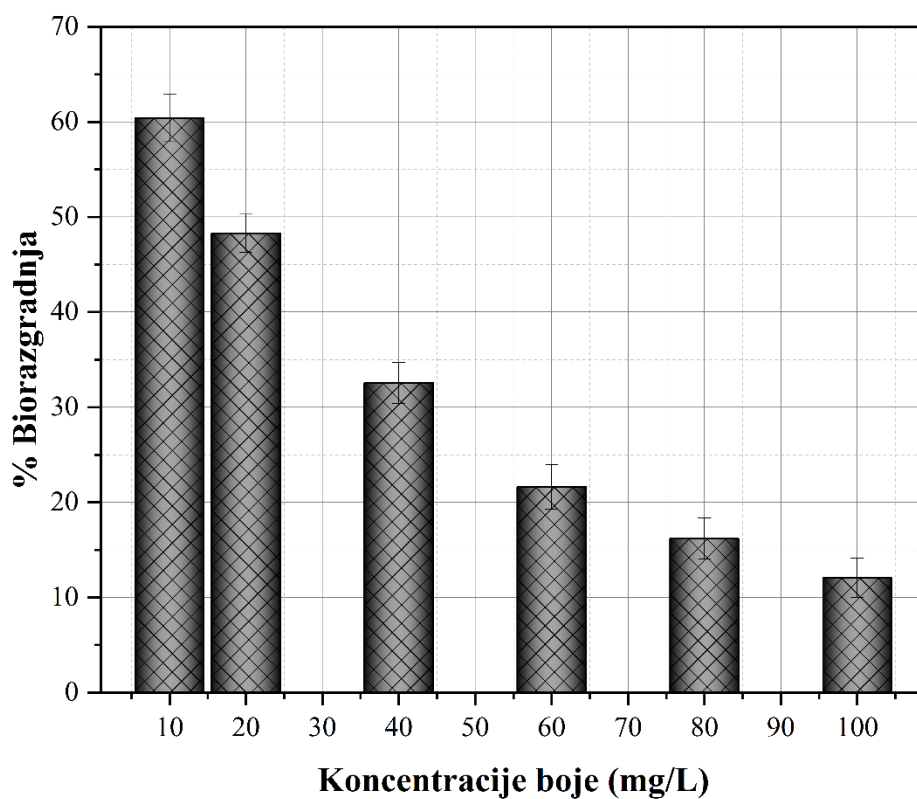
Vodonik-peroksid ima funkciju aktivatora peroksidaze, čija mala koncentracija može biti ograničavajući faktor reakcije, dok koncentracija u višku može uticati inhibitorno na reakciju. Koncentracija vodonik-peroksida je varirana u opsegu 0,01–1 mM, a dobijeni rezultati su prikazani na Slici 18. Sa Slike 19, može se zaključiti da sa povećanjem koncentracije vodonik-peroksida dolazi do smanjenje stepena biorazgradnje. Optimalna koncentracija vodonik-peroksida u reakciji biorazgradnje antrahinonske boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica je 0,01 mM, gde je postignuti stepen biorazgradnje  $54,32 \pm 1,11$  %. Čiong (Chiong) i sar. uspeli su da uklone 81,5 % boje metil oranž peroksidazom iz sojinih ljuspica sa 2 mM  $H_2O_2$  što je 20 puta veća koncentracija od koncentracije vodonik-peroksida korišćena za degradaciju AV109 [198]. U poređenju sa peroksidazom iz celog zrna soje (optimalna  $H_2O_2$  koncentracija 1 mM), peroksidaza iz sojinih ljuspica zahteva mnogo manje vodonik-peroksida, ali je i procenat biorazgradnje manji. Moguće objašnjenje je da u celom zrnu soje nalazi više izoforni peroksidaze koje pokazuju različito ponašanje u prisustvu povećanih koncentracija vodonik-peroksida, dok se u ekstraktu iz sojinih ljuspica nalazi samo jedna izoforma, nakon čije inaktivacije ne postoji mogućnost biorazgradnje. Budući da se radi o sirovom, neprečišćenom ekstraktu, postoji mogućnost da se vodonik-peroksid troši i od strane ostalih prisutnih enzima.



*Slika 19. Zavisnost biorazgradnje AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica od koncentracije vodonik-peroksida (uslovi: pH 4, koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija peroksidaze 1 IU, temperatura 25°C)*

#### 11.2.4. Optimizacija početne koncentracije boje za biorazgradnju AV109 peroksidazom iz sojinih ljušpica u šaržnom sistemu

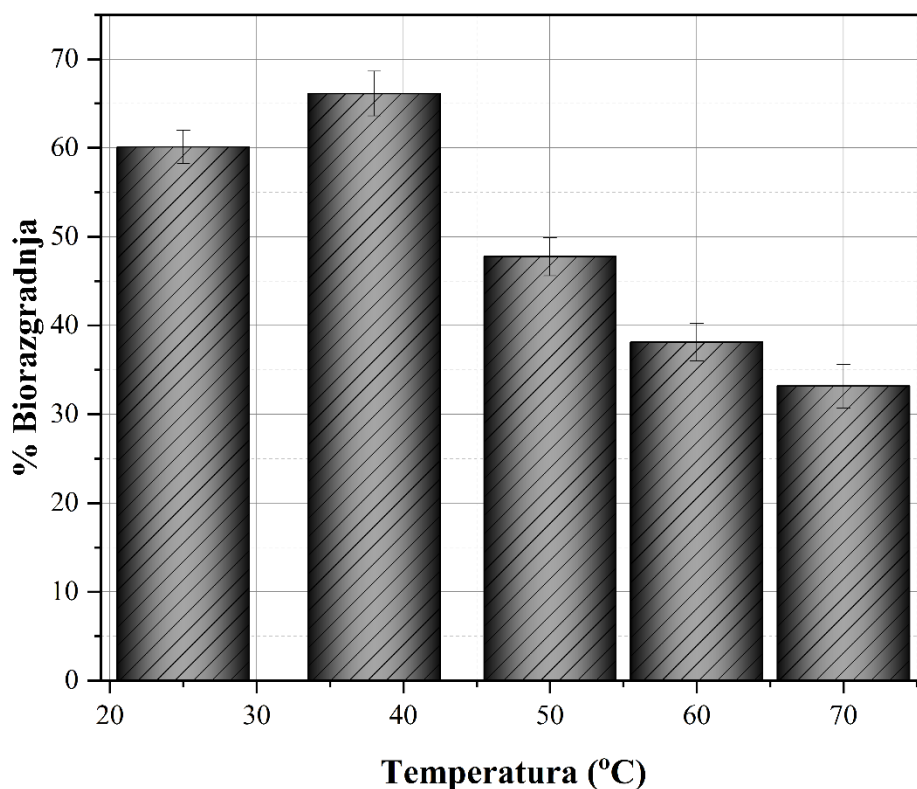
U cilju ispitivanja uticaja antrahinonske boje AV109 na biorazgradnju, koncentracija boje je varirana u opsegu 10–100 mg/L. Rezultati su prikazani na Slici 20. Koncentracija boje s kojom je postignut maksimalni stepen biorazgradnje peroksidazom iz sojinih ljušpica je 10 mg/L. Takođe, jasno se vidi sa Slike 19 da biorazgradnja opada sa povećanjem početne koncentracije boje iznad 10 mg/L. Tačnije, pri početnoj koncentraciji boje od 10 mg/L ostvarena je biorazgradnja od  $60,39 \pm 2,49$  %, dok je pri početnoj koncentraciji boje od 100 mg/L ostvarena biorazgradnja  $12,06 \pm 1,19$  %. Altahir i sar. su koristili komercijalni sirovi ekstrakt peroksidaze iz sojinih ljušpica za obezbojavanje dve azo boje Kiselo crno 2 i Kiselo oranž 7. Postigli su 95% degradacije boje nakon 3h sa 1,2 IU/mL za obe boje i 1,5 mM vodonik-peroksida u reakciji obezbojavanja Kiselo oranž 7, a 1,25 mM vodonik-peroksida u reakciji obezbojavanja Kiselo crno 2 [197]. Druga grupa istraživača, Marčis (Marchis) i sar, su ispitivali razgradnju boje Remazol tirkizno plavo G133 komercijalnom peroksidazom [204]. Nakon 4h, procenat biodegradacije je bio 96 % pri koncentraciji enzima od  $2,06 \cdot 10^{-4}$  mM enzima, koncentraciji boje od 200 mg/L i koncentraciji vodonik-peroksida od 0,1 mM. Sa druge strane, Silva i sar. su ispitivali mogućnost razgradnje nekoliko boja: Drimaren plavo X-3RL, Drimaren plavo X-BLN, Drimaren rubinol X-3RL i Drimaren plavo CL-R peroksidazom iz rena [71]. Pri koncentraciji boje od 120 mg/L i korišćenjem 3,5 U/mL i 0,55 mM vodonik-peroksida postignuta je biodegradacija u opegu 77-99 %. Vreme kontakta za boje Drimaren plavo X-3RL i Drimaren plavo CL-R je samo 5 min, dok je za ostale 1h. Šekuljica i sar. su ispitivali razgradnju dve antrahinonske boje: kiselo plavo 225 i AV109 komercijalnom peroksidazom iz rena [91]. Korišćenjem 0,15 IU/mL enzima postignuto je 94,7 % razgradnje boje AV109, i 89,36 % razgradnje boje Kiselo plavo 225. Vreme kontakta degradacije boje AV109 je bilo 15 min na pH 4, a koncentracija boje 30 mg/L i koncentracija vodonik-peroksida 0,4 mM. Vreme kontakta za Kiselo plavo 225 je bilo 32 min na pH 5, 30 mg/L koncentracije boje i 0,04 mM vodonik-peroksida. Može se zaključiti da su komercijalni preparati enzima efikasniji pri većim početnim koncentracijama boje. Veći stepen biorazgradnje AV109 boje je postignut pri većim početnim koncentracijama boje, 40 mg/L i iznosi  $66,81 \pm 1,28$  %, kad je korišćena peroksidaza iz celog zrna soje.



*Slika 20. Zavisnost biorazgradnje AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica od koncentracije boje (uslovi: pH 4, koncentracija peroksidaze 1 IU, koncentracija vodonik-peroksida 0,01 mM, temperatura: 25°C)*

#### **11.2.5. Optimizacija temperature za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica u šaržnom sistemu**

Uticaj temperature na biorazgradnju antrahinonske boje AV109 je ispitivan u opsegu 25 – 70°C. Rezultati su prikazani na Slici 21, gde se može videti da je maksimalni stepen biorazgradnje od  $66,12 \pm 2,51$  % na temperaturi od 38°C. Na temperaturi od 60°C je postignuta biorazgradnja od  $38,13 \pm 2,12$  %, dok je na 70°C procenat biorazgradnje bio  $33,17 \pm 2,45$  %.

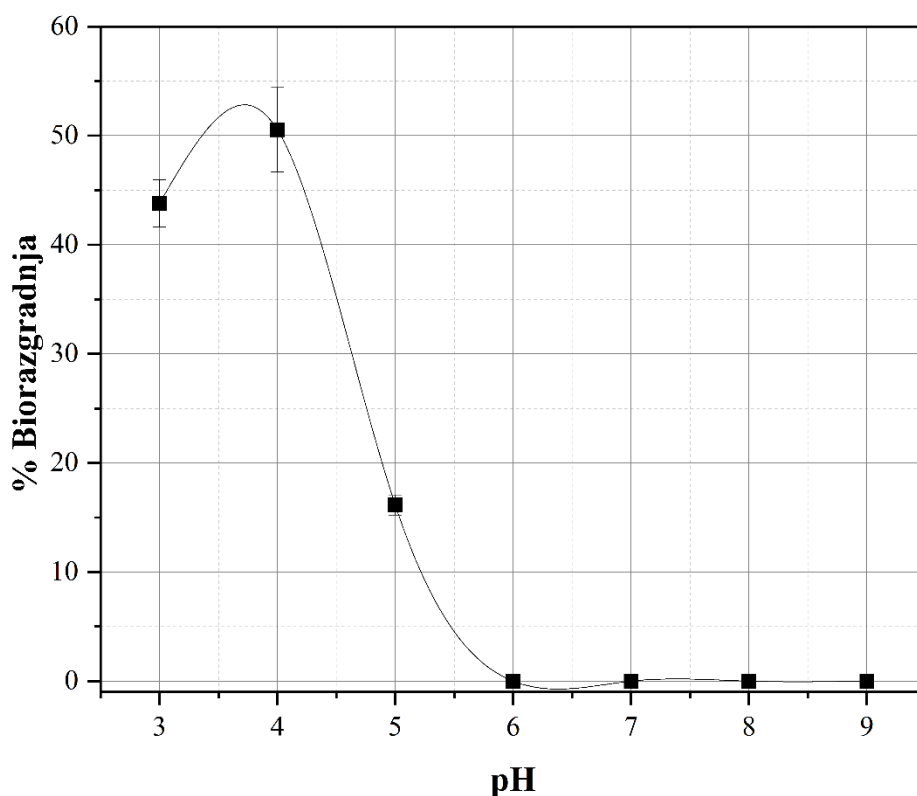


**Slika 21.** Zavisnost biorazgradnje AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica od temperature (uslovi: pH 4, koncentracija peroksidaze 1 IU, koncentracija vodonik-peroksida 0,01 mM, koncentracija boje 10 mg/L)

U poređenju sa peroksidazom iz celog zrna soje, čija je aktivnost jednaka nuli na temperaturi iznad 60°C, peroksidaza iz sojinih ljuspica se pokazala kao stabilnija na višim temperaturama. To ukazuje da je pomenuta peroksidaza iz sojinih ljuspica pogodnija za industrijsku upotrebu.

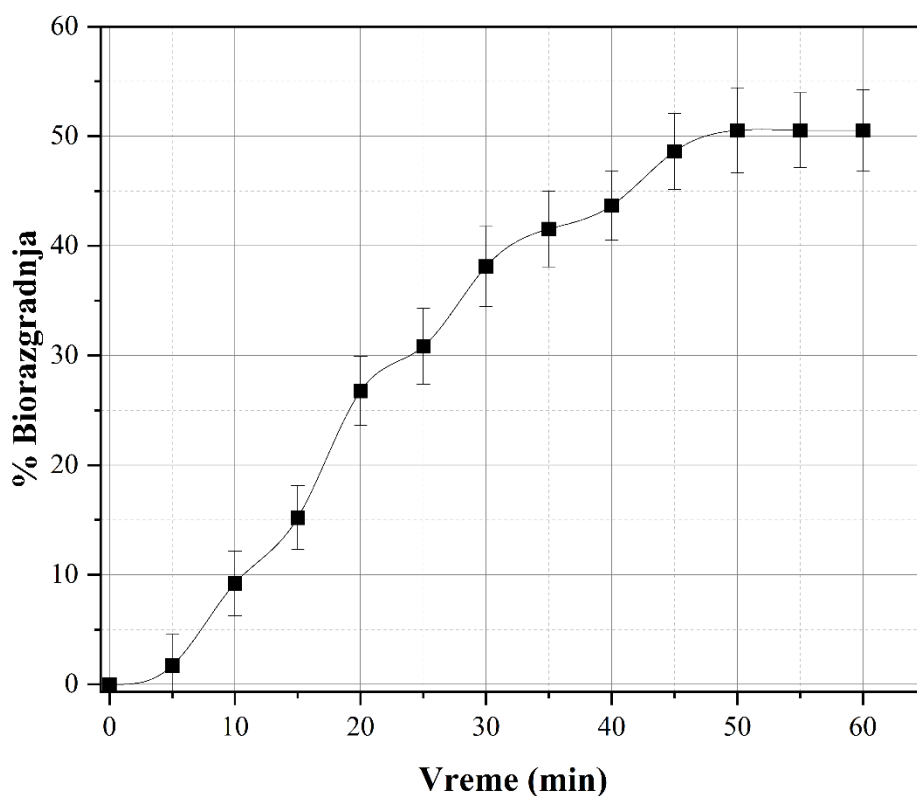
### 11.3.1. Optimizacija pH i vremena kontakta biorazgradnje AV109 boje peroksidazom iz krompirovih ljuski u šaržnom sistemu

Određivanje optimalne pH vrednosti za biorazgradnju antrahinonske boje AV109 peroksidazom je od ogromne važnosti za sam proces što potvrđuju literaturno dostupni podaci sa jedne strane, i rezultati prethodno prikazani u ovoj disertaciji sa druge strane. Ukoliko pH reakcione smeše ne odgovara naelektrisanju boje i enzima, reakcija neće moći da se odigra. Optimizacija pH za biorazgradnju AV109 boje katalizovanu peroksidazom iz krompirovih ljuski je izvršena na način opisan u potpoglavlju 10.2.1, a dobijeni rezultati su prikazani na Slici 22.



**Slika 22.** Uticaj pH na biorazgradnju boje AV109 na sobnoj temperaturi peroksidazom iz krompirovih ljuski (reakcioni uslovi: koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija vodonik-peroksida 0,1 mM, koncentracija enzima 0,2 IU)

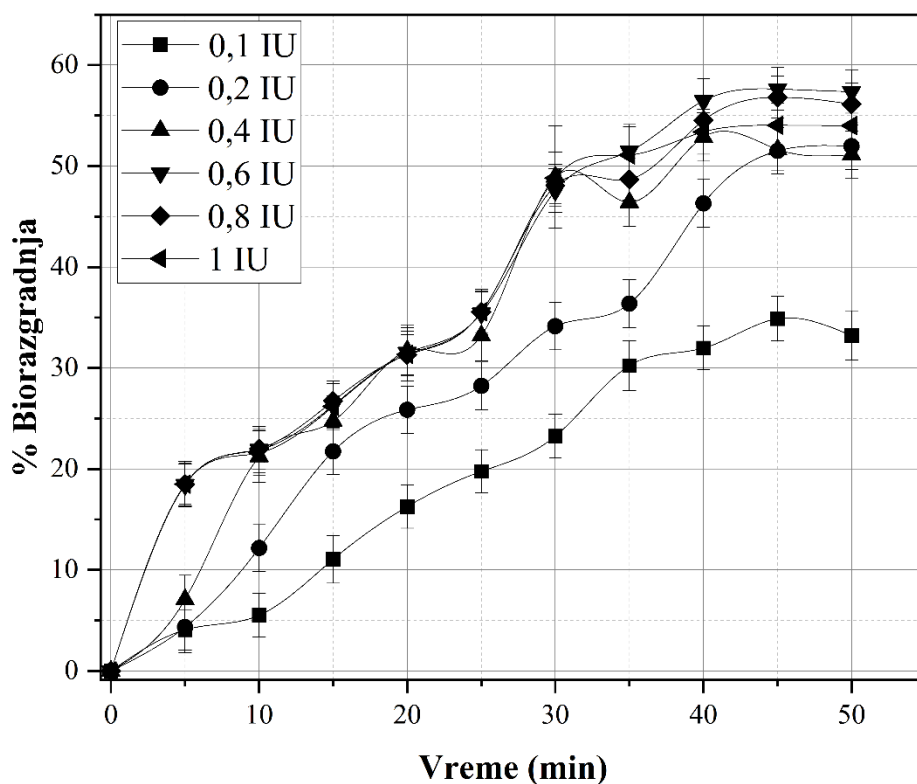
Sa Slike 22, se može videti da je peroksidaza iz krompirovih ljuski aktivna u opsegu pH 3-5, sa maksimalnim procentom biorazgradnje od  $50,53 \pm 3,88$  % na pH 4. Dobijeni rezultat je u saglasnosti sa već prikazanim rezultatima koji se odnose na biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica i celog zrna soje. Sa Slike 23 se uočava jasan rastući trend biorazgradnje do 40-og minuta reakcije. Povećanjem vremena kontakta peroksidaze iz krompirovih ljuski i AV109 boje, ne dolazi do značajnog porasta biorazgradnje, tačnije primetno je zasićenje enzima supstratom i zaravnjenje krive biorazgradnje. Shodno navedenom, usvojeno je vreme reakcije 50 min pri kojem se postiže ~ 50 % biorazgradnje. U poređenju sa peroksidazama iz celog zrna soje i sojinih ljuspica, gde je reakcija biorazgradnje boje AV109 trajala 30 min, reakcija biorazgradnje AV109 boje katalizovana peroksidazom iz krompirovih ljuski je sporija.



**Slika 23.** Utvrđivanje optimalnog vremena kontakta za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz krompirovih ljuski (uslovi: pH 4, koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija vodonik-peroksida 0,1 mM, koncentracija enzima 0,2 IU, temperatura 25°C)

### 11.3.2. Optimizacija početne koncentracije enzima za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz krompirovih ljuski u šaržnom sistemu

Optimizacija početne koncentracije enzima za biorazgradnju antrahinonske boje AV109 ispitana je variranjem aktivnosti peroksidaze iz krompirovih ljuski u opsegu 0,1–1 IU, što odgovara početnoj koncentraciji enzima 0,002–0,02 IU/mL. Sa Slike 24 se može videti da stepen biorazgradnje raste sa povećanjem koncentracije enzima, sve do jednog trenutka gde koncentracija enzima više nema uticaj na biorazgradnju. Najveći stepen biorazgradnje od  $57,35 \pm 2,12$  % je postignut pri aktivnosti enzima 0,6 IU (0,012 IU/mL). Dalje povećanje koncentracije enzima iznad 0,012 IU/mL ne utiče na biorazgradnju boje AV109. Mogući razlog za ovo je nedovoljna količina vodonik-peroksida u reakciji. Peroksidaza koristi vodonik-peroksid kao elektron-akceptor da bi katalizovala reakciju oksidacije. Ako je koncentracija vodonik-peroksida niska, onda ne dolazi do aktivacije enzima, a s tim je i biorazgradnja zanemarljivo mala.



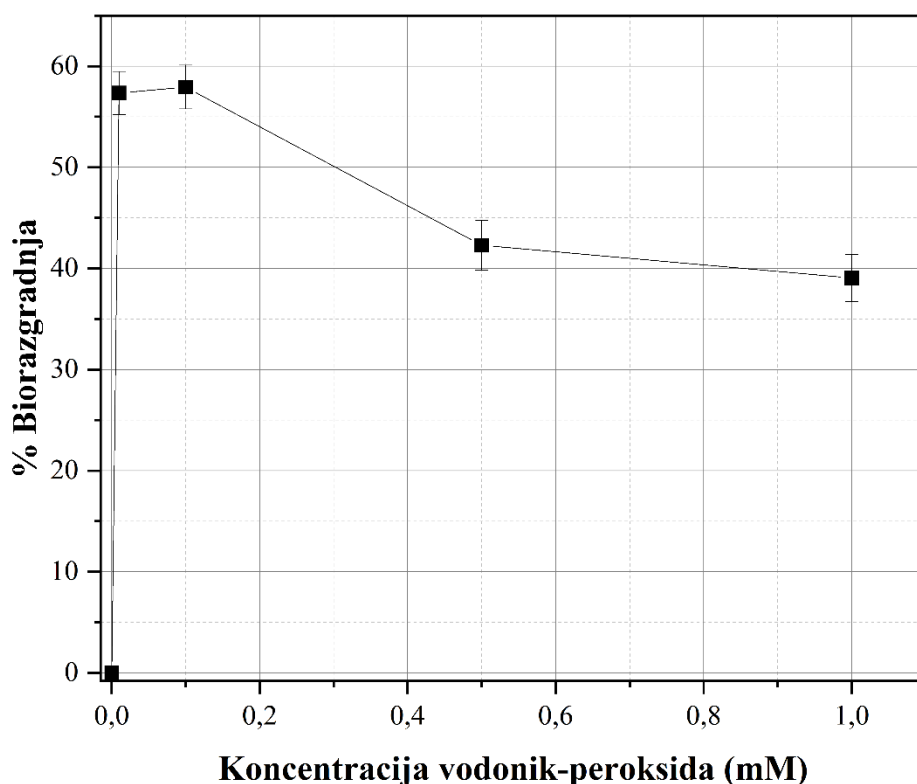
**Slika 24.** Zavisnost biorazgradnje AV109 od koncentracije peroksidaze iz krompirovih ljuski u šaržnom sistemu (uslovi: pH 4, koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija vodonik-peroksida 0,1 mM, temperatura 25°C)

Kada se uporede rezultati optimizacije, jasno je da se biorazgradnja AV109 boje od  $58,31 \pm 1,15$  % postiže sa 0,1 IU peroksidaze iz celog zrna soje, dok je za približno isti stepen biorazgradnje,  $57,35 \pm 2,12$  %, iste boje potrebno uneti u sistem 0,6 IU peroksidaze iz krompirovih ljuski. Poređenjem efikasnosti peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski, jasno je da se sa 1 IU peroksidaze iz sojinih ljuspica postiže biorazgradnja od  $54,32 \pm 1,11$  % što je lošiji rezultat u poređenju sa  $57,35 \pm 2,12$  % biorazgradnje AV109 boje, postignute sa 0,6 IU peroksidaze iz krompirovih ljuski.



### 11.3.3. Optimizacija početne koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz krompirovih ljuski u šaržnom sistemu

Uticaj početne koncentracije vodonik-peroksida na biorazgradnju antrahinonske boje AV109 ispitan je variranjem koncentracije vodonik-peroksida u opsegu 0,1–1 mM, a dobijeni rezultati su prikazani na Slici 25. Povećanjem koncentracije vodonik-peroksida dolazi do smanjenje stepena biorazgradnje, kao što se može videti sa Slike 25.

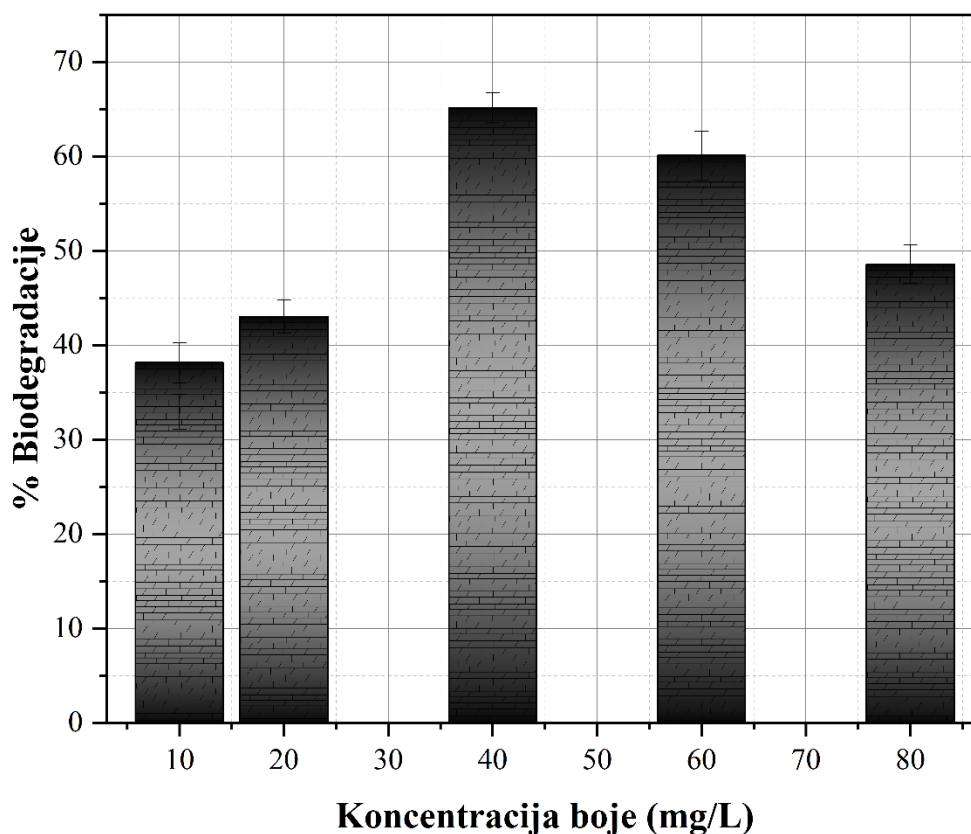


*Slika 25. Uticaj početne koncentracije vodonik-peroksida na biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz krompirovi ljuski u šaržnom sistemu (uslovi: pH 4, koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija peroksidaze 0,6 IU, temperatura 25°C)*

Optimalna koncentracija vodonik-peroksida za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz krompirovih ljuski je 0,01 mM, najveći stepen biorazgradnje  $57,35 \pm 2,12$  %. Hidalgo (Hidalgo) i sar. su ispitivali oksidaciju Domalan boje koje predstavljaju kombinaciju antrahinonskih i azoik jedinjenja [205]. Koristili su sirovu peroksidazu iz sočiva. Za razgradnju zelene Domalan boje je bilo potrebno 0,3 mM vodonik-peroksida, dok su koncentracije vodonik-peroksida iznad 1 mM delovale inhibitorno na reakciju. Optimalna koncentracija vodonik-peroksida u reakciji biorazgradnje AV109 peroksidazom iz rena je 0,4 mM [91]. Inhibitorni efekat se može zabeležiti kad je koncentracija vodonik-peroksida iznad 0,6 mM. U reakciji biorazgradnje katalizovanoj peroksidazom iz sojinih ljuspica bilo je potrebno 0,1 mM vodonik-peroksida dok je u slučaju biorazgradnje AV109 boje katalizovane peroksidazom iz celog zrna soje bilo potrebno 1,0 mM vodonik-peroksida.

### 11.3.4. Optimizacija početne koncentracije boje za biorazgradnju AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski u šaržnom sistemu

U cilju ispitivanja uticaja boje na biorazgradnju AV109 katalizovanu peroksidazom iz krompirovih ljuski, njena koncentracija je varirana u opsegu 10– 100 mg/L. Rezultati su prikazani na Slici 26. Sa slike se može videti da je maksimalni stepen biorazgradnje od  $65,11 \pm 1,59$  % postignut pri koncentraciji boje od 40 mg/L.



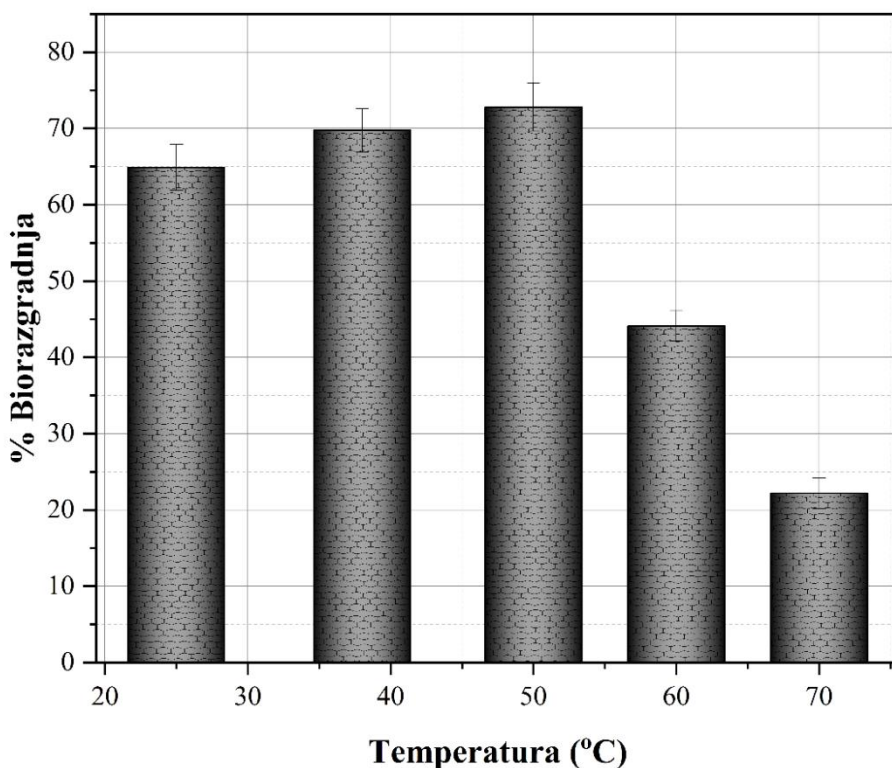
**Slika 26.** Uticaj početne koncentracije boje na biorazgradnju AV109 boje katalizovanu peroksidazom iz krompirovih ljuski (uslovi: pH 4, koncentracija peroksidaze 0,6 IU, koncentracija vodonik-peroksida 0,01 mM, temperatura 25°C)

Povećanjem koncentracije boje veće od 40 mg/L, stepen biorazgradnje opada da bi za koncentraciju boje od 100 mg/L on bio  $38,13 \pm 2,11$  %. Vujčić i sar. su ispitivali degradaciju više različitih boja peroksidazom iz rena [206]. Među ispitivanim bojama se nalazi i antrahinonska boja Remazol brilijantno plavo. U ovoj studiji je postignuta biorazgradnja 91 % boje za 60 min, pri početnoj koncentraciji boje od 100 mg/L. Sa peroksidazom iz sojinih ljuspica (1 IU) je postignuta razgradnja od  $60,39 \pm 2,49$  % boje (10 mg/L). Kada je korišćena peroksidaza iz celog zrna soje (0,1 IU), stepen biorazgradnje boje (40 mg/L) je bio  $66,81 \pm 1,28$  %. Postignuti rezultati ukazuju da je stepen biorazgradnje AV109 boje korišćenjem sva tri enzima, u opsegu 60 – 67 %. Međutim, koncentracija enzima se razlikuje drastično: za istu reakciju je potrebno skoro dvostruko veća koncentracija

peroksidaze iz krompirovih ljuski nego peroksidaze iz celog zrna soje, kao i skoro dvostruko veća koncentracija peroksidaze iz sojinih ljuspica nego peroksidaze iz krompirovih ljuski.

### 11.3.5. Optimizacija temperature za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz krompirovih ljuski u šaržnom sistemu

Imajući u vidu temperaturnu osetljivost enzima i mogućnost njihove ireverzibilne inaktivacije na povišenim temperaturama ispitan je uticaj ovog faktora na efikasnost peroksidaze iz krompirovih ljuski. Efikasnost peroksidaze iz krompirovih ljuski u reakciji biorazgradnje AV109 boje ispitivana je na različitim temperaturama u opsegu 25–70°C. Rezultati su prikazani na Slici 27. Optimalna temperatura na kojoj je postignuta maksimalna biorazgradnja od  $72,78 \pm 3,13$  % je 50°C. Na temperaturama iznad 50°C, tačnije na 60 i 70°C, stepen biorazgradnje primetno opada. Iako je optimalna temperatura za peroksidazu iz sojinih ljuspica bila 38°C, ova peroksidaza je pokazala zadovoljavajuću stabilnost na temperaturi od 70°C, za razliku od peroksidaze iz krompira, koja je uspela da obezboji  $21,15 \pm 2,016$  % AV109 na toj temperaturi. Peroksidaza iz celog zrna soje nije pokazala nikakvu aktivnost već na temperaturi od 60 °C.

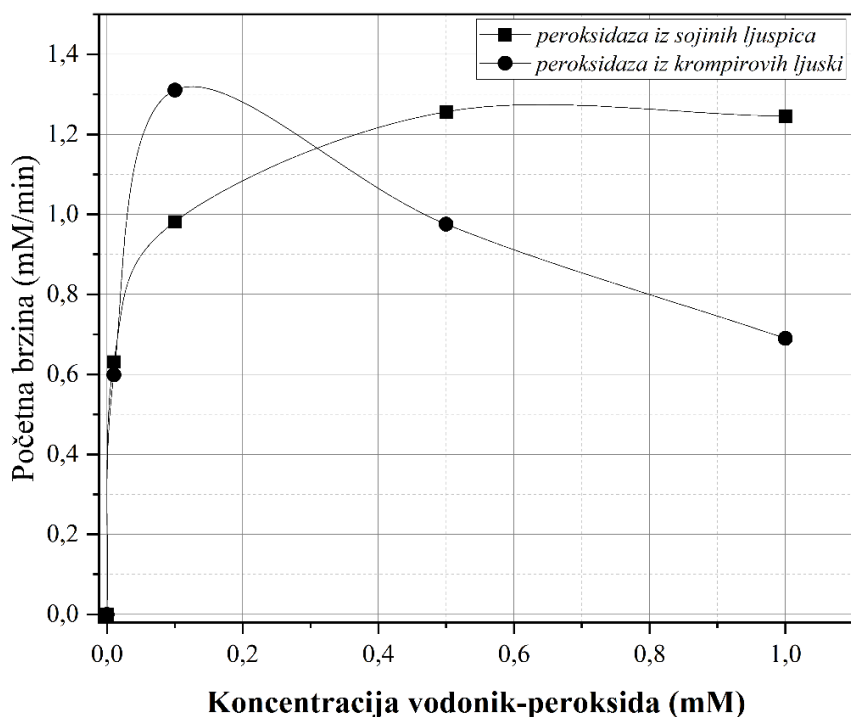


*Slika 27. Uticaj temperature na biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz ljuse krompira (uslovi: pH 4, koncentracija peroksidaze 0,6 IU, koncentracija vodonik-peroksida 0,01 mM, koncentracija boje 40 mg/L)*

### 11.3.6. Kinetika biorazgradnje AV109 boje katalizovane peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u šaržnom reaktoru

Utvrđivanje kinetičkih parametara je od vitalnog značaja za izvođenje enzimskog procesa na industrijskom nivou. U slučaju biorazgradnje AV109 boje, razmatrane u ovoj doktorskoj disertaciji ispitana je početna kinetika biorazgradnje katalizovana peroksidazom iz sojinih ljuspica i iz krompirovih ljuski u pogledu kinetičkih parametara za oba supstrata, boju i vodonik-peroksida. Eksperimentalni postupak analize kinetike biorazgradnje je opisan u potpoglavlju 10.2.6. Dobijene eksperimentalne vrednosti su fitovane odgovarajućim matematičkim modelom dvosupstratnih reakcija korišćenjem Origin Pro 8.5 programskog paketa, a dobijeni rezultati su prikazani na Slici 28-29 i u Tabeli 7-8.

Sa slike 28 se može videti da vodonik-peroksid različito utiče na aktivnost peroksidaze iz krompirovih ljuski i sojinih ljuspica. Naime, vrednosti kinetičkih parametara za vodonik-peroksid prikazani u Tabeli 7, dokazuju da se reakcija biorazgradnje AV109 boje katalizovana peroksidazom iz krompirovih ljuski odigrava po Ping Pong Bi-Bi mehanizmu, određeni je inhibicijom supstratom ( $R^2=0,9918$ ). Za razliku od peroksidaze iz krompirovih ljuski, peroksidaza iz sojinih ljuspica je pokazala dobro slaganje sa modelom bez inhibicije. Poređenjem vrednosti Mihaelisove konstante za vodonik-peroksid u oba slučaja, tačnije u slučaju kada je korišćena peroksidaza izolovana iz krompirovih ljuski za biorazgradnju ( $K_m^{H_2O_2} = 7,52 \cdot 10^{-5} \text{ mM}$ ) i sojinih ljuspica ( $K_m^{H_2O_2} = 0,2276 \text{ mM}$ ), evidentno je da peroksidaza iz sojinih ljuspica ima veći afinitet prema vodonik-peroksidu nego peroksidaza iz krompirovih ljuski. Manji afinitet peroksidaze iz krompirovih ljuski prema vodonik-peroksida se može objasniti činjenicom da je peroksidaza iz krompirovih ljuski inihibirana vodonik-peroksidom ( $K_i = 0,03905 \text{ mM}$ ). Peroksidaza iz celog zrna soje čija Mihaelisova konstanta za  $H_2O_2$  ( $K_m^{H_2O_2} = 0,1091 \text{ mM}$ ), je isto pokazala dobro slaganje sa modelom bez inhibicije. Peroksidaza iz celog zrna soje ima veći afinitet prema vodonik-peroksidu od peroksidaze iz krompirovih ljuski, a manji od peroksidaze iz celog zrna soje.

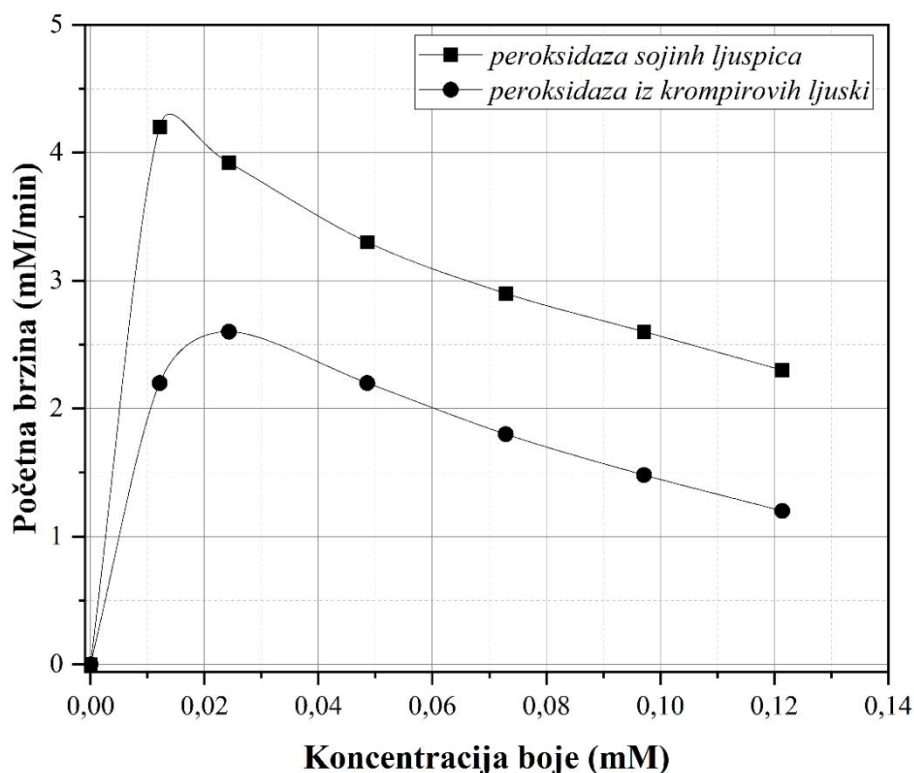


**Slika 28.** Uticaj vodonik-peroksida na početnu brzinu reakcije pri konstantnoj koncentraciji boje na reakciju biorazgradnje AV109 boje katalizovane peroksidazom iz krompirovih ljuski (koncentracija boje 0,0485 mM) i reakciju biorazgradnje AV109 boje katalizovane peroksidazom iz sojinih ljuspica (koncentracija boje 0,0121 mM). b) Uticaj koncentracije boje na početnu brzinu reakcije pri konstantnoj koncentraciji vodonik-peroksida, 0,01 mM za obe peroksidaze.

**Tabela 7.** Vrednosti kinetičkih parametara dobijenih modelovanjem prema ping pong bi-bi mehanizmu bez inhibicije  $H_2O_2$  za peroksidazu iz sojinih ljuspica, sa inhibicijom  $H_2O_2$  za peroksidazu iz krompirovih ljuski

Inhibicija vodonik-peroksidom					
	$v_{max}$	$K_m^{boja}, mM$	$K_m^{H_2O_2}, mM$	$K_I^{H_2O_2}, mM$	$R^2$
Peroksidaza iz krompirovih ljuski	1,326	$2,553 \times 10^{-6}$	$7,52 \times 10^{-5}$	0,03095	0,9918
Peroksidaza iz sojinih ljuspica	0,9881	0,2531	0,2276	/	0,9845

Za razliku od vodonik-peroksida, boja se pokazala kao inhibitor oba enzima (Slika 29). Ipak, stepen inhibicije nije isti. To se može videti preko konstante inhibicije:  $1,034 \cdot 10^{-5}$  mM za peroksidazu iz krompirovih ljuski i  $5,488 \cdot 10^{-6}$  mM za peroksidazu iz sojinih ljuspica. Ovo ukazuje na to da peroksidaza iz krompirovih ljuski ima veći afinitet prema boji. Boja takođe deluje inhibitory na peroksidazu iz celog zrna soje, čija je konstanta inhibicije  $7,1234 \cdot 10^{-5}$  mM. U poređenju sa komercijalnom peroksidazom iz rena, boja AV109 ima veći inhibitory uticaj na peroksidazu iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski [91]. U Tabeli 8 su date vrednosti kinetičkih parametara nakon fitovanja odgovarajućim matematičkim modelom dvosupstratnih reakcija za inhibicijom AV109.



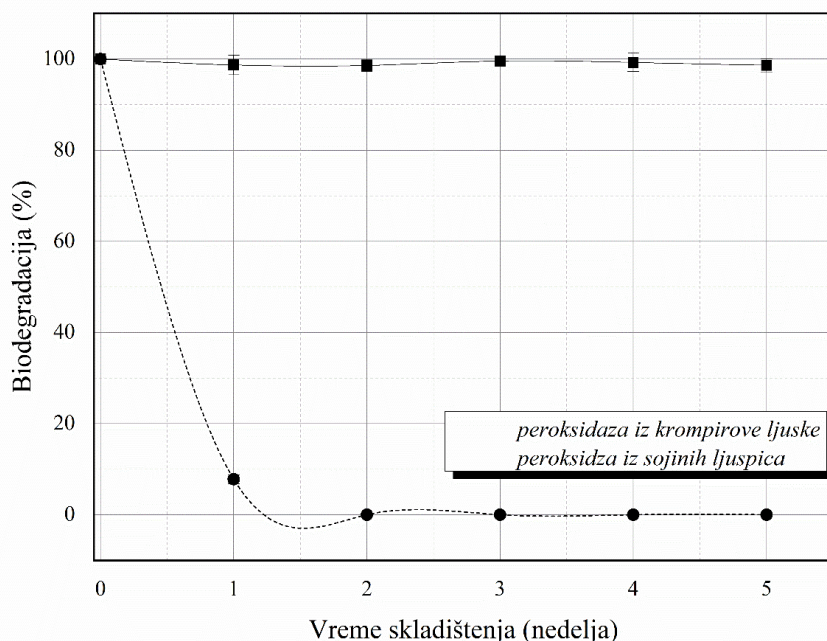
**Slika 29.** Uticaj koncentracije boje na početnu brzinu reakcije pri konstantnoj koncentraciji vodonik-peroksida, 0,01 mM za obe peroksidaze.

**Tabela 8.** Vrednosti kinetičkih parametara dobijenih modelovanjem prema Ping Pong Bi-Bi mehanizmu bez inhibicije vodonik-peroksida za peroksidazu iz sojinih ljuspica, sa inhibicijom vodonik-peroksida za peroksidazu iz krompirovih ljuski i sa inhibicijom AV109 za obe peroksidaze

Inhibicija vodonik-peroksidom					
	$v_{max}$	$K_m^{boja}, mM$	$K_m^{H_2O_2}, mM$	$K_I^{boja}, mM$	$R^2$
Peroksidaza iz krompirovih ljuski	2,573	$2,365 \times 10^{-4}$	$3,652 \times 10^{-5}$	$1,034 \times 10^{-5}$	0,9901
Peroksidaza iz sojinih ljuspica	4,311	$3,223 \times 10^{-4}$	$3,691 \times 10^{-6}$	$5,488 \times 10^{-6}$	0,9881

#### 11.4. Stabilnost peroksidaze iz krompirovih ljuski i sojinih ljuspica tokom skladištenja

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju na veliki potencijal primene peroksidaze iz otpadnog materijala, krompirovih ljuski i sojinih ljuspica. Shodno tome, postoji potreba za utvrđivanjem stabilnosti pomenutih enzima, tačnije za ispitivanjem da li i u kom procentu enzim gubi aktivnost ukoliko se skladišti na 4°C. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 30. Sa Slike 30 se može videti da se aktivnost peroksidaze iz krompirovih ljuski ne menja značajno u toku 5 nedelja, kada se sirov ekstrakt čuva na 4°C. Nakon 5 nedelja skladištenja na 4°C sirovi ekstrakt je korišćen za biorazgradnju AV109 boje i zabeležen je neznatan pad u biorazgradnji, svega 2%, što znači da je peroksidaza iz krompirovih ljuski stabilna kao tečni preparat i ima potencijala za industrijsku upotrebu. Sa druge strane, uočava se da je peroksidaza iz sojinih ljuspica drastično izgubila aktivnost nakon nedelju dana skladištenja na 4°C, kad je postignuta biorazgradnja od 7,81 %. Dalje skladištenje peroksidaze iz sojinih ljuspica na 4°C je dovelo do potpunog gubitka aktivnosti. Ovo pokazuje da skladištenje peroksidaze iz sojinih ljuspica na ovoj temperaturi u formi tečnog preparata nije pogodno.

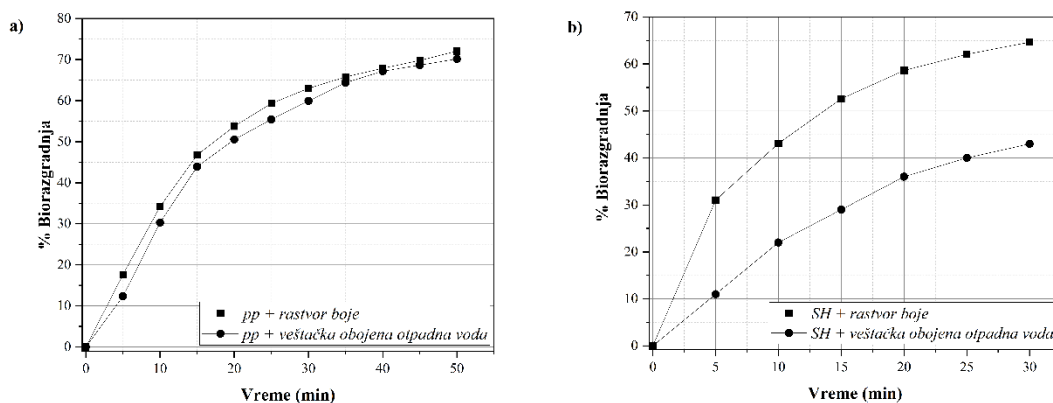


*Slika 30. Stabilnost peroksidaze iz krompirovih ljuski i sojinih ljuspica tokom skladištenja na 4 °C.*

#### 11.5. Ispitivanje stabilnosti enzima u sintetičkoj otpadnoj vodi

Obojena otpadna voda, osim boje, sadrži i različite soli koji potiču iz celokupnog procesa bojenja. Da bi se ispitala efikasnost biorazgradnje u realnom sistemu, pripremljena je sintetička otpadna voda na način opisan od strane Jasena i Šolca (Yaseen, Scholz) [207] i ispitana je biorazgradnja AV109 boje pod optimalnim uslovima. Rezultati su prikazani na Slici 31b. Evidentno je da je

efikasnost peroksidaze iz sojinih ljuspica u biorazgradnji AV109 boje značajno smanjenja kada se u reakcionoj smeši nalaze komponente karakteristične za otpadne vode tekstilne industrije kao što su benzoati, nitrati, natrijum-hlorid i sl. Negativan uticaj komponenata otpadnih voda se reflektuje u smanjenju stepena biorazgradnje. Razlog za to može biti prisustvo jona metala koji imaju inhibitorno dejstvo, ili prisustvo benzoil grupe koja se može vezati za aktivni centar enzima i na taj način izazvati inhibiciju [208]. Za razliku od peroksidaze iz sojinih ljuspica, peroksidaza iz krompirovih ljuski se pokazala stabilnom i efikasnom u sistemu koji imitira uslove realnih otpadnih tokova tekstilne indutrije. Naime, sa Slike 31a, se može videti da prisustvo različitih soli u reakcionoj smeši uopšte ne utiče na stepen biorazgradnje.



**Slika 31.** Uticaj simulirane otpadne vode na biorazgradnju AV109 boje katalizovane peroksidazom iz a) krompirovih ljuski i b) sojinih ljuspica

## 12. Biorazgradnja antrahinonske boje peroksidazom izolovanom iz otpadnog materijala u kontinualnom sistemu

Nakon ispitivanja u šaržnom sistemu, vršena su ispitivanja u kontinualnom mikroreaktorskom sistemu. Mikroreaktori pokazuju veću efikasnost procesa zbog prednosti u odnosu na šaržni sistem: bolje mešanje, bolji prenos mase i toplote, korišćenje manje količina reagenasa. Smanjena potrošnja reagenasa je od izuzetnog značaja za životnu sredinu, jer to znači da se smanjuje otpad i primena ovakvog sistema se može opisati kao čistija proizvodnja. U cilju poboljšanja enzimski katalizovane razgradnje boje AV109, korišćen je mikroreaktorski sistem, a od enzima peroksidaze iz krompirovih ljuski i sojinih ljuspica.

### 12.1. Biorazgradnja antrahinonske boje peroksidazom iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu

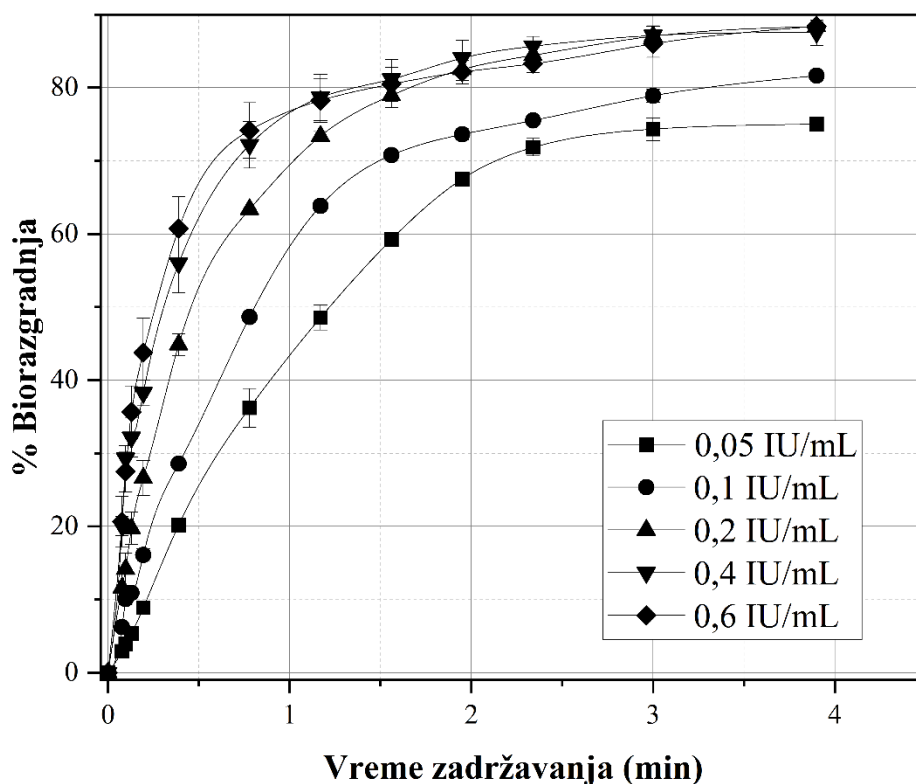
Nakon ispitivanja uticaja glavnih parametara za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica u šaržnom sistemu, utvrđeni su optimalne vrednosti pH, koncentracije enzima, vodonik-peroksida, boje, kao i optimalna temperatura. U reakcionoj smeši zapremine 50 mL, na pH 4, sa 1 IU i 0,01 mM vodonik-peroksida je postignuto  $66,12 \pm 2,51$  % razgradnje boje (10 mg/L) na temperaturi 38°C. Zbog već navedenih prednosti kontinualnog sistema, ispitana je mogućnost i



efikasnost razgradnje boje u mikroreaktoru. U prethodnim istraživanjima je utvrđeno da je pH 4 optimalna vrednost za razgradnju boje AV109 peroksidazom. Budući da parametri kao što su koncentracija enzima, vodonik-peroksida i boje, ne utiču na pH vrednost reakcije, jer naelektrisanje aminokiselinskih ostataka sa aktivnog centra enzima zajedno sa naelektrisanjem boje diktiraju pH vrednost na kojoj se izvodi reakcija, pH 4 je uzeta kao konstantna vrednost za eksperimente u kontinualnom sistemu.

### **12.1.1. Optimizacija početne koncentracije enzima za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu**

Izolacija enzima iz poljoprivrednog otpada doprinosi održivosti procesa. Takođe, ekstrakcija enzima iz poljoprivrednog otpada primenom jednostavnih metoda omogućava lak transfer i razvoj tehnologije. Ipak, optimizacija koncentracije enzima je od važnosti za efikasnost i ekonomsku opravdanost procesa. Uticaj početne koncentracije enzima, peroksidaze iz sojinih ljuspica na biorazgradnju AV109 boje u kontinualnom sistemu je ispitivan variranjem koncentracije enzima u opsegu 0,05–0,6 IU/mL. Rezultati su dati na Slici 32. Sa Slike 32 se može videti da stepen biorazgradnje raste sa povećanjem koncentracije enzima do 3 min. Dalje povećavanje koncentracije enzima iznad 0,2 IU/mL ne utiče na stepen biorazgradnje. U skladu sa prikazanim rezultatima, usvojena je optimalna koncentracija enzima od 0,2 IU/mL, sa kojom je postignuta maksimalna biorazgradnja od  $88,39 \pm 0,58$  %. Reakcija biorazgradnje AV109 boje u kontinualnom sistemu zapremine 1,17 mL je trajala 3 min, pa se može zaključiti da je optimalno vreme zadržavanja boje u pomenutom sistemu 3 min. Produženje vremena zadržavanja ne utiče na promenu biorazgradnje AV109 boje u datom kontinualnom sistemu.



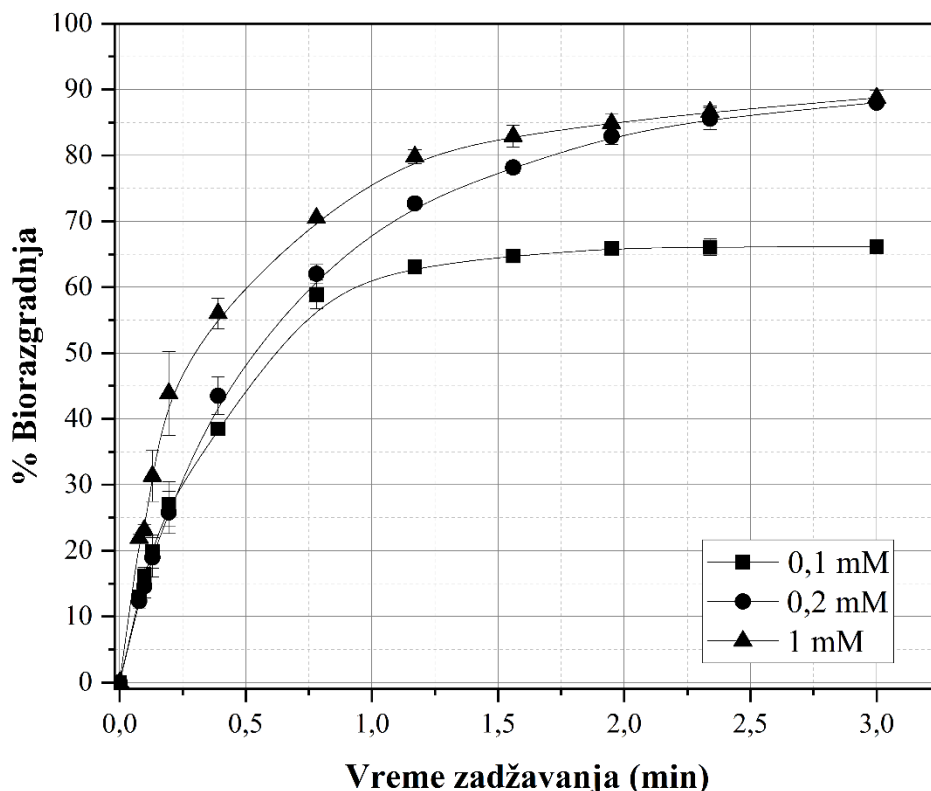
**Slika 32.** Uticaj početne koncentracije enzima na biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu (uslovi: pH 4, koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija vodonik-peroksida: 0,2 mM, temperatura 25°C, d=0,5 mm, L=6m)

Kosta (Costa) i sar. su ispitivali degradaciju 2,4,6- trihlorfenola komercijalnom peroksidazom iz soje u mikoreaktorskom sistemu [209]. Pomenuta grupa istraživača je ispitivala biorazgradnju 2,4,6- trihlorfenola u kontinualnom sistemu zapremine 0,250 mL. Utvrđeno je da je potrebno vreme zadržavanja od 6 min da bi se postigla biorazgradnja 2,4,6- trihlorfenola od 90 %. Iako su Kosta i sar. koristili komercijalnu peroksidazu za degradaciju 2,4,6- trihlorfenola, jedinjenja strukturno jednostavnijeg nego AV109 boja, utvrđeno je da je potrebno 2 puta duže vremena zadržavanja u reaktoru ~ 5 puta manje zapremine.

### 12.1.2. Optimizacija početne koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu

Uspešnost reakcije biorazgradnje AV109 boje katalizovane peroksidazom iz sojinih ljuspica u velikoj meri zavisi od količine vodonik-peroksida koji se nalazi u sistemu, kao što je pokazano u poglavlju 11. Efikasnost enzima u šaržnom i kontinualnom sistemu se u velikoj meri razlikuje, pa je sa tim u vezi, ispitan uticaj vodonik-peroksida na efikasnost peroksidaze iz sojinih ljuspica u kontinualnim uslovima biorazgradnje AV109 boje. U cilju optimizacije koncentracije vodonik-peroksida varirana je njegova koncentracija u opsegu 0,04–1 mM. Rezultati su prikazani na Slici 33. Sa Slike 33 se može videti da je na niskim koncentracijama vodonik-peroksida, efikasnost reakcije mala, još određenije postiže se manji stepen biorazgradnje od  $21,64 \pm 0,33$  %. U opsegu početnih koncentracije vodonik-peroksida od 0,2–1 mM stepen biorazgradnje AV109 boje je skoro nepromenjen i iznosi  $87,99 \pm 0,19$ – $88,73 \pm 1,23$  %. Usvojena optimalna koncentracija vodonik-

peroksida je 0,2 mM. Kosta i sar. su utvrdili da je optimalna koncentracija vodonik-peroksida za biorazgradnju 2,4,6-trihlorfenola komercijalnom peroksidazom iz soje 0,3 mM što ukazuje na prilično dobro slaganje rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji sa dostupnim literaturnim navodima.

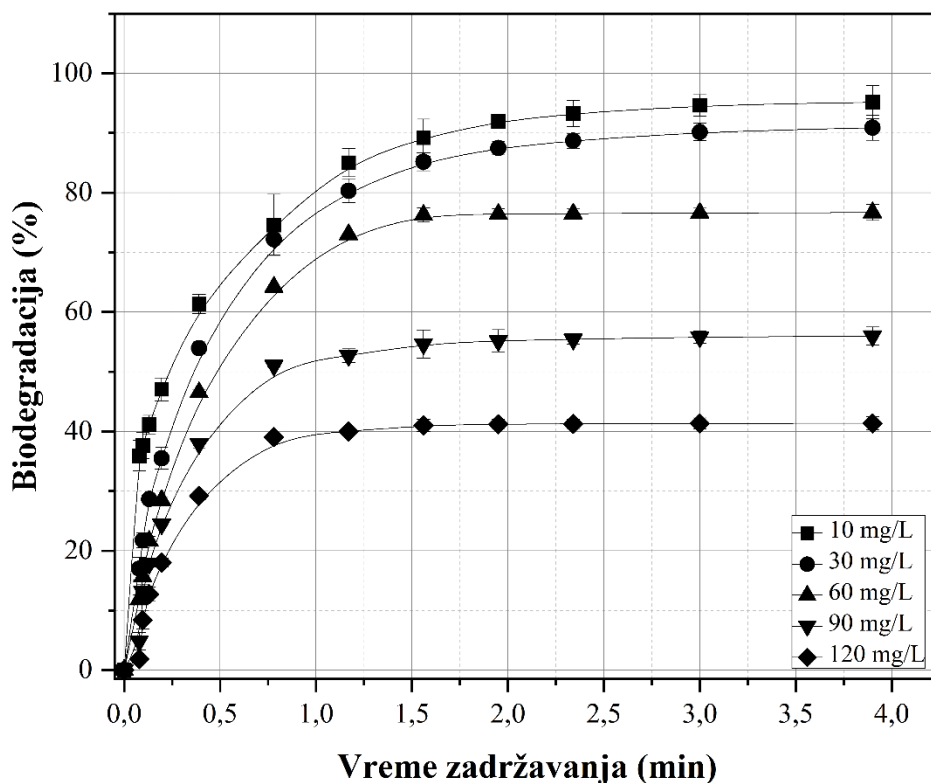


**Slika 33.** Uticaj početne koncentracije vodonik-peroksida na biorazgradnju AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu (uslovi: pH 4, koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija peroksidaze 0,2 IU/mL, temperatura 25°C, d=0,5 mm, L=6 m)

### 12.1.3. Optimizacija koncentracije boje za biorazgradnju AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu

Koncentracija boje se pokazala kao značajan faktor koji utiče na reakciju biorazgradnje u šaržnom sistemu. Veća koncentracija boje u sistemu može dovesti do inhibicije enzima a tako i do neuspešne reakcije što je evidentno u potpoglavlju 11.2.4. Koncentracija boje je varirana u opsegu 10–120 mg/L. Rezultati su prikazani na Slici 34, gde se uočava pad stepena biorazgradnje sa porastom koncentracije boje. Očigledno je da boja ima jak inhibitorski uticaj na biorazgradnju. Optimalna koncentracija boje je 10 mg/L, a postignuti stepen biorazgradnje je  $95,13 \pm 2,77$  %. Kada se uporedi uticaj koncentracije boje na procenat biorazgradnje u kontinualnom i šaržnom sistemu, može se zaključiti da je u kontinualnom sistemu povećana efikasnost. Naime, pri početnoj koncentraciji boje od 10 mg/L u šaržnom sistemu je postignuta biorazgradnja od  $60,39 \pm 2,49$  % što je znatno manje nego u kontinualnom sistemu,  $95,13 \pm 2,77$ %. Takođe, u šaržnom sistemu pri početnoj koncentraciji

boje od 60 mg/L stepen biorazgradnje je bio  $21,61 \pm 2,33$  %, dok je u kontinualnom sistemu pri istim uslovima ostvarena biorazgradnja od  $76,66 \pm 1,32$  %.

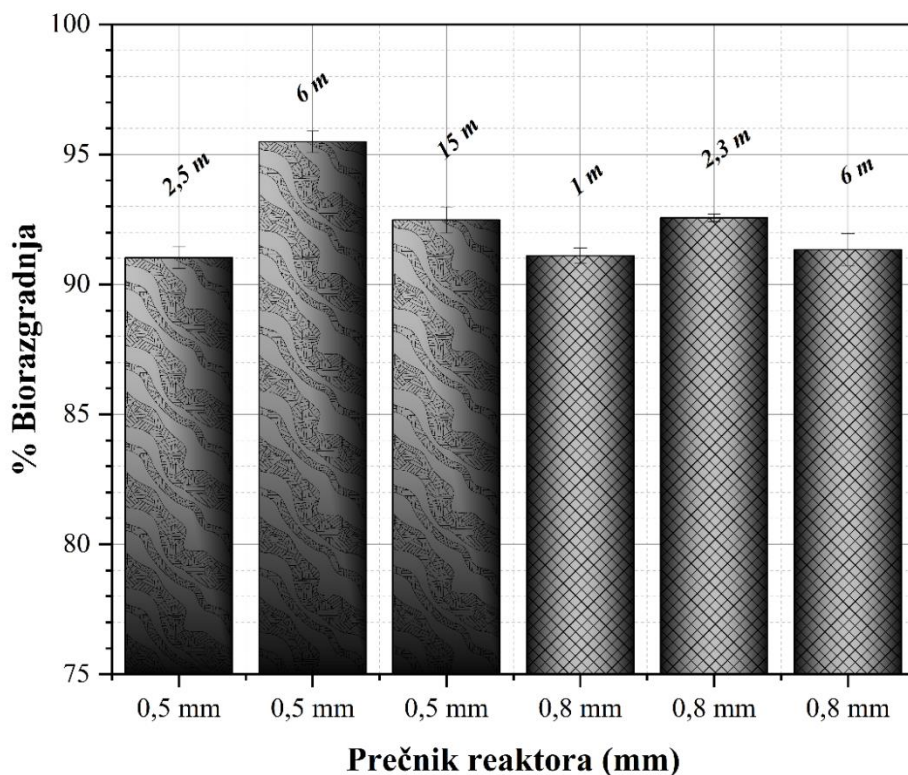


**Slika 34.** Uticaj početne koncentracije boje na biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu (uslovi: pH 4, koncentracija vodonik-peroksida 0,2 mM, koncentracija peroksidaze 0,2 IU/mL, temperatura 25°C, d=0,5 mm, L=6 m)

#### 12.1.4. Optimizacija prečnika reaktora za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu

Geometrija reaktora utiče na njegove performanse što znači da utiče i na efikasnost procesa. Geometrijski parametri od značaja su dužina i prečnik reaktora. Za optimizaciju su korišćeni reaktori prečnikom 0,5 mm i dužine 2,5, 6 i 15 m. Shodno tome, njihova zapremina je bila 0,5, 1,17 i 3 mL. Takođe, vršena je optimizacija biorazgradnje u mikroreaktoru prečnikom 0,8 mm i dužine 1, 2,3 i 6 m, zapremine 0,5, 1,17 i 3 mL. Rezultati su prikazani na Slici 35. Sa slike 35, veći uticaj prečnika na uspeh biorazgradnje se može zabeležiti kod reaktora sa prečnikom 0,5mm. Liu (Liu) i sar. su kroz niz različitih primera pokazali da se otpor prenosa mase može smanjiti smanjenjem prečnika mikroreaktora [210]. Kada je prečnik bio 0,5 mm i dužina 2,5 m postignut je  $91,03 \pm 0,42$  % biodegradacije koji se povećava do  $95,48 \pm 0,41$  % sa reaktorom dužine 6 m. Dalje povećavanje dužine reaktora dovodi do pada stepena biodegradacije. Razlika u biodegradaciji je mala, ali dovoljna da se uoči da je optimalna dužina 6m (prečnik 0,5 mm). Dajić i sar. su ispitivali mogućnost razgradnje boje Reaktivno oranž 16 u mikroreaktoru sa NaOCl. Deo njihovog ispitivanja uključio optimizaciju veličine prečnika gde su koristili reaktore sa prečnika od 0,25 mm i

0,5 mm. Razlika u razgradnji boje Reaktivno oranž 16 je bila minimalna: 88,8 i 86,4 % [211]. Uticaj dužine mikroreaktora se može bolje uočiti kod dvofaznih sistema. Grupa istraživača sa Univerziteta Nagoja u Japanu ispitivala je hidrolizu benzil-hlorida u tečno-tečnom sistemu u mikroreaktorskom sistemu [212]. Za ispitivanje uticaja dužine reaktora koristili su dva reaktora dužine 50 i 153 cm. Razliku su uočili pri dužim vremenima zadržavanja, gde se jasno vidi da je konverzija benzil-hlorida uspešnija u reaktoru dužine 153 cm. Zaključili su da za isto vreme zadržavanja, veći protok u reaktoru od 153 cm povoljno utiče na povećanje prinosa reakcije.

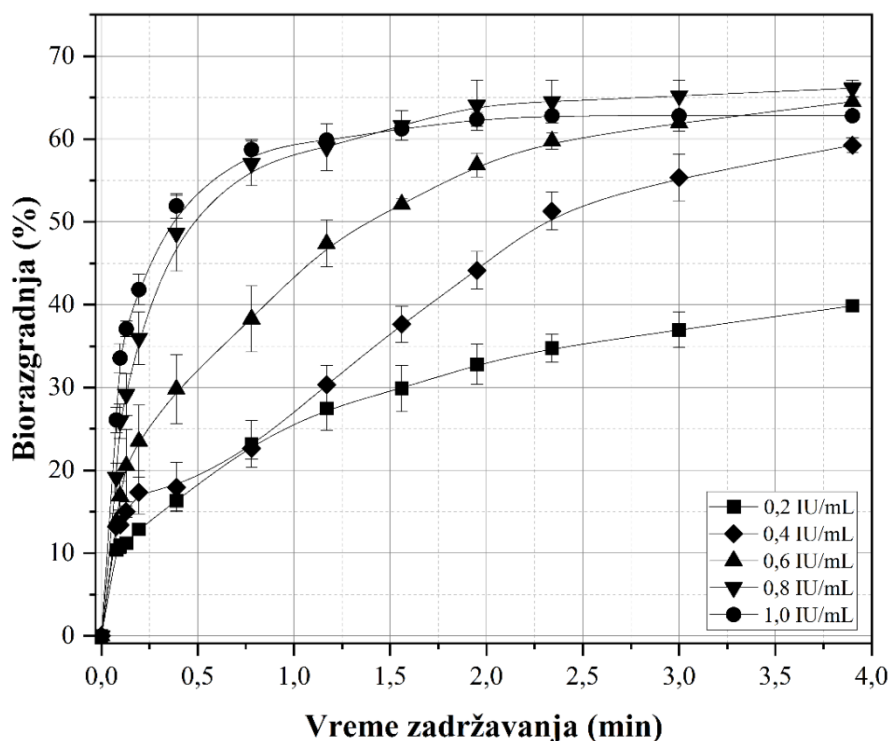


**Slika 35.** Uticaj dužine i prečnika mikroreaktora na razgradnju AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu (uslovi: pH 4, koncentracija vodonik-peroksida 0,2 mM, koncentracija peroksidaze 0,2 IU/mL, koncentracija boje 10 mg/L, temperatura 25°C)

## 12.2. Biorazgradnja antrahinonske boje peroksidazom iz krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu

### 12.2.1. Optimizacija početne koncentracije enzima za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu

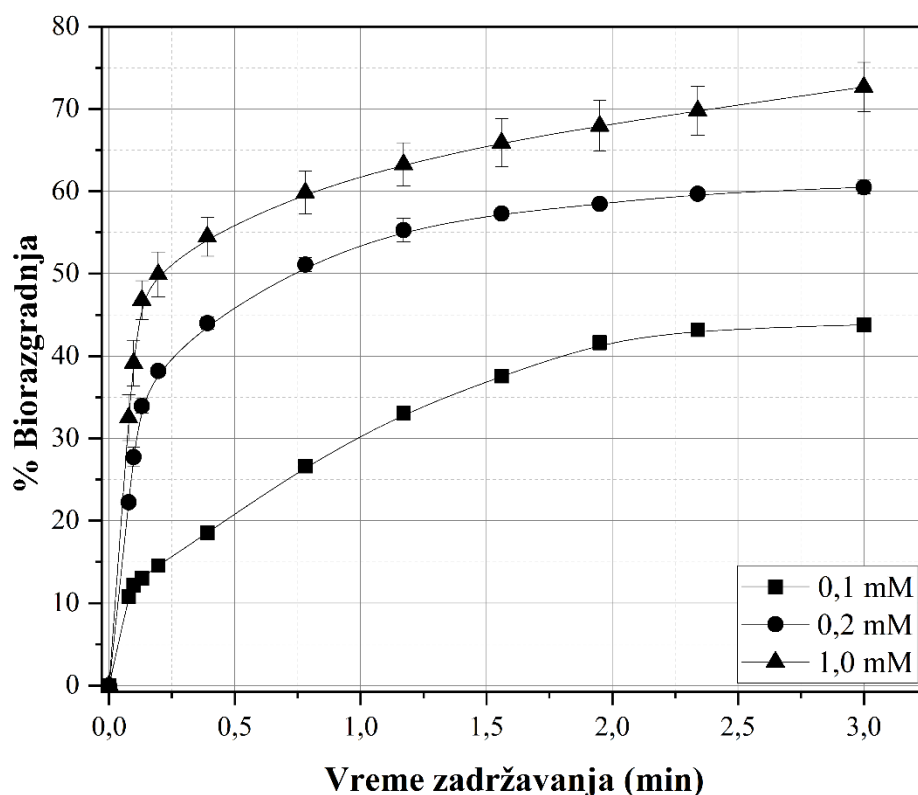
Optimalna koncentracija peroksidaze iz krompirovih ljuski je određena variranjem iste u opsegu 0,2–1 IU/mL. Sa Slike 36 se može videti da se sa povećanjem koncentracije enzima, povećava i stepen biorazgradnje. Pri početnoj koncentraciji peroksidaze od 0,8 IU/mL iz krompirovih ljuski postignuto je  $66,13 \pm 0,99$  % biorazgradnje, a sa 1 IU/mL  $62,81 \pm 0,37$  %. Shodno tome, usvojena je optimalna koncentracija peroksidaze od 0,8 IU/mL. U toku utvrđivanja optimalne koncentracije peroksidaze iz krompirovih ljuski zabeleženo je da se promene u stepenu biorazgradnje dešavaju za vreme zadržavanja u reaktoru  $\leq 3$  min. Kada je vreme zadržavanja veće od 3 min ne beleže se značajne promene u sistemu u pogledu procenata biorazgradnje, pa je za optimalnu koncentraciju enzima od 0,8 IU/mL usvojeno vreme zadržavanja u kontinualnom sistemu od 3 min. Ukoliko se uporedi efikasnost peroksidaze iz krompirovih ljuski (0,8 IU/mL;  $66,13 \pm 0,99$  % biorazgradnje) i peroksidaze iz sojinih ljuspica (0,2 IU/mL;  $88,39 \pm 0,58$  % biorazgradnje) u kontinualnom sistemu u kome je vreme zadržavanja reaktanata 3 min, evidentno je da se sa manje jedinica aktivnosti peroksidaze iz sojinih ljuspica postiže značajno veći stepen biorazgradnje.



*Slika 36. Uticaj početne koncentracije peroksidaze iz krompirovih ljuski na biorazgradnju AV109 boje u kontinualnom sistemu (uslovi: pH 4, koncentracija boje: 30 mg/L, koncentracija vodonik-peroksida: 0,2 mM, temperatura: 25°C, d=0,5 mm, L=6m)*

### 12.2.2. Optimizacija početne koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu

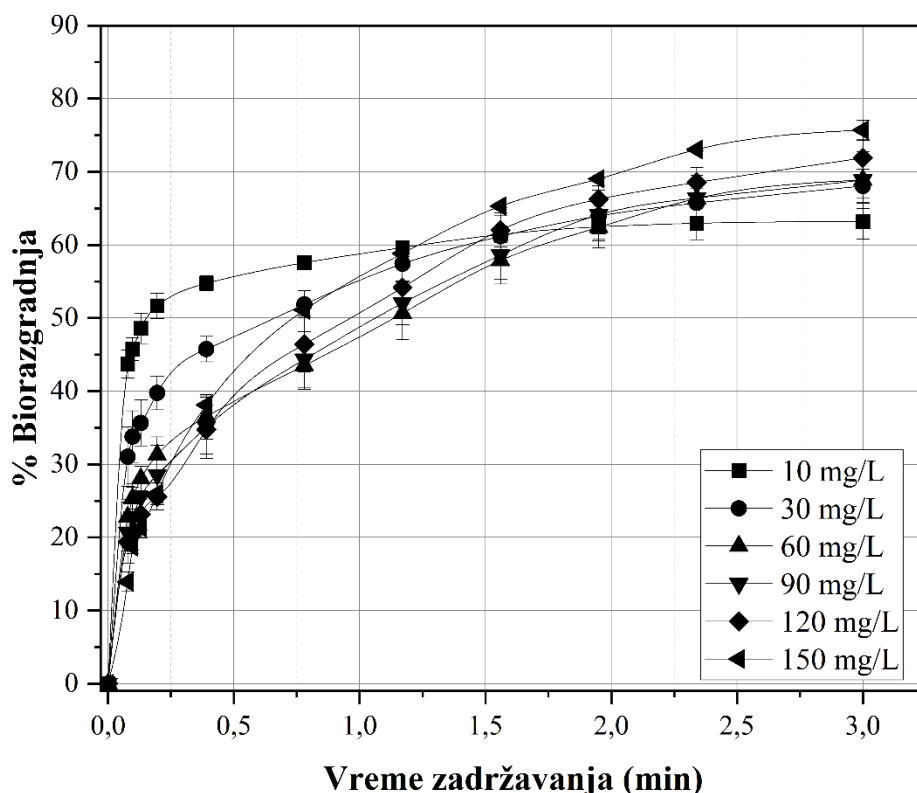
Da bi se ispitaio uticaj vodonik-peroksida na peroksidazu iz krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu varirana je početna koncentracija kosupstrata u opsegu 0,1–1 mM i rezultati su prikazani na Slici 37. Sa Slike 37 se može videti da sa porastom koncentracije vodonik-peroksida raste i stepen biorazgradnje. Pri početnoj koncentraciji vodonik-peroksida 0,1 mM, postiže se relativno nizak stepen biorazgradnje  $43,77 \pm 0,46$  %. Dalje povećanje početne koncentracije vodonik-peroksida do 1 mM ima izrazito pozitivan efekat na biorazgradnju, pa je zabeleženo uklanjanje  $72,66 \pm 2,99$  % boje iz rastvora. Ova koncentracija vodonik-peroksida se pokazala kao optimalna. Važno je naglasiti da nije uočena inhibicija peroksidom u kontinualnom sistemu u oba slučaja: i kad je korišćena peroksidaza iz sosjinih ljuspica, i kad je korišćena peroksidaza iz krompirovih ljuski. U šaržnom sistemu, vodonik-peroksid je pokazao izraženi inhibitorni uticaj na peroksidazu iz krompirovih ljuski. Može se zaključiti da je moguće zaobići glavno ograničenje industrijske primene enzimske razgradnje boje korišćenjem mikoreaktora. Poboljšanje procesa razgradnje boje u mikoreaktoru se odnosi na odsustvo enzimske inhibicije zbog velike koncentracije vodonik-peroksida.



*Slika 37. Uticaj početne koncentracije vodonik-peroksida na biorazgradnju AV109 boje u kontinualnom sistemu (uslovi: pH 4, koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija peroksidaze 0,8 IU/mL, temperatura 25°C, d=0,5 mm, L=6 m)*

### 12.2.3. Optimizacija koncentracije boje za biorazgradnju AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu

Koncentracija boje, kao jedan od najbitnijih faktora koji utiču na biorazgradnju boje, varirana je u opsegu 10–150 mg/L. Rezultati su prikazani na Slici 38. Sa Slike 38 se može videti da povećanjem koncentracije boje, raste i stepen biorazgradnje. Peroksidaza iz krompirovih ljuski je zadržala svoju aktivnost i kad je koncentracija boje bila 150 mg/L. To je ujedno i koncentracija AV109 s kojom je postignut najveći stepen biorazgradnje  $75,71 \pm 1,33$  %. Stepen razgradnje postignut u kontinualnom sistemu sa peroksidazom iz sojinih ljuspica iznosi  $95,13 \pm 2,77$  % razgradnje AV109 koncentracije 10 mg/L za vreme zadržavanja 3 min. Ukoliko se razgradnja boje predstavi njenom masom, onda sa peroksidazom iz sojinih ljuspica razgrađeno 9,5 mg boje, a sa peroksidazom iz krompirovih ljuski 113,6 mg boje, što je znatno više. De Sá (De Sá) i saradnici su ispitivali razgradnju boja Rodamin B i metilensko plavo fotokatalizom pomoću  $\text{TiO}_2$  u mikroreaktoru [213]. Postigli su 97 % degradacije boje za vreme zadržavanja od 1h. Koncentracija boja koje su koristili je 5 mg/L, što je 30 puta manja koncentracija boje nego što je peroksidaza iz krompirovih ljuski uspela da razgradi u mikroreaktoru.

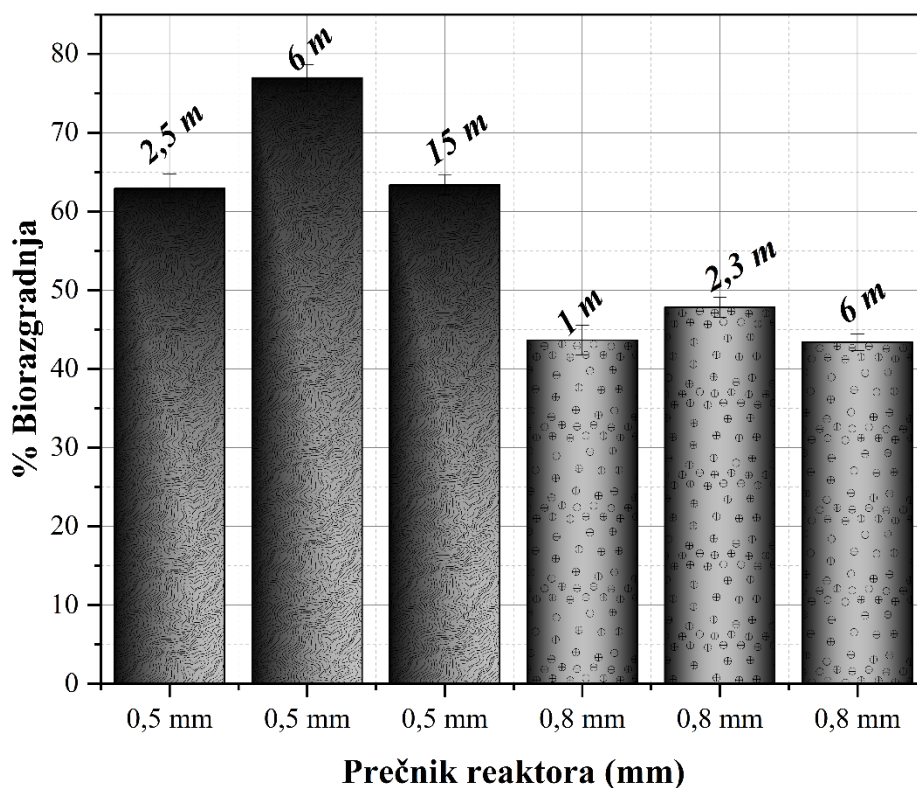


**Slika 38.** Uticaj početne koncentracije boje na biorazgradnju AV109 boje u kontinualnom sistemu (uslovi: pH 4, koncentracija vodonik-peroksida 1 mM, koncentracija peroksidaze 0,8 IU/mL, temperatura 25°C,  $d=0,5$  mm,  $L=6$  m)



#### 12.2.4. Optimizacija veličine prečnika mikroreaktora za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu

U cilju ispitivanja uticaja veličine prečnika i dužine mikroreaktora na biorazgradnju antrahinonske boje peroksidazom iz krompirovih ljuski, korišćeni su mikroreaktori prečnika 0,5 mm i dužine 2,5, 6 i 15 m. Shodno tome, njihova zapremina je bila 0,5, 1,17 i 3 mL. Takođe, vršena je optimizacija biorazgradnje u mikroreaktorima prečnika 0,8 mm i dužine 1, 2,3 i 6 m, zapremine 0,5, 1,17 i 3 mL. Rezultati su prikazani na Slici 39. Sa Slike 39, se može uočiti da prečnik mikroreaktora ima značajan uticaj na biorazgradnju. U mikroreaktoru dužine 6 m i prečnika 0,5 mm stepen obezbojavanja je  $76,95 \pm 1,64$  %, dok u mikroreaktoru od 6 m dužine i prečnika 0,8 mm stepen obezbojavanja znatno opada na  $43,38 \pm 1,08$  %. Korišćenjem mikroreaktora prečnika 0,5 mm i dužine 2,5 m i 15 m biodegradacija je  $62,9 \pm 1,85$  % i  $63,36 \pm 1,23$  %. U reaktorima prečnika 0,8 mm, stepen biodegradacije je u opsegu  $43,38 - 47,82$  % za reaktore dužine 1, 2,5 i 6 m. Može se zaključiti da geometrija reaktora utiče na stepen razgradnje boje i da se najbolji rezultati postižu u reaktoru prečnika 0,5 mm i dužine 6 m. Enal (Önal) i saradnici su ispitivali mogućnost hidrogenacije nezasićenih aldehida u mikroreaktoru. Zaključili su da povećanjem prečnika u opsegu 0,5–1 mm, dolazi do smanjenje efikasnosti reakcije [214].



*Slika 39. Uticaj dužine i prečnika mikroreaktora na razgradnju AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu (uslovi: pH 4, koncentracija vodonik-peroksida 1 mM, koncentracija peroksidaze 0,8 IU/mL, koncentracija boje 150 mg/L, temperatura 25°C)*

### **13. Imobilizacija peroksidaze iz sojinih ljuspica u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu**

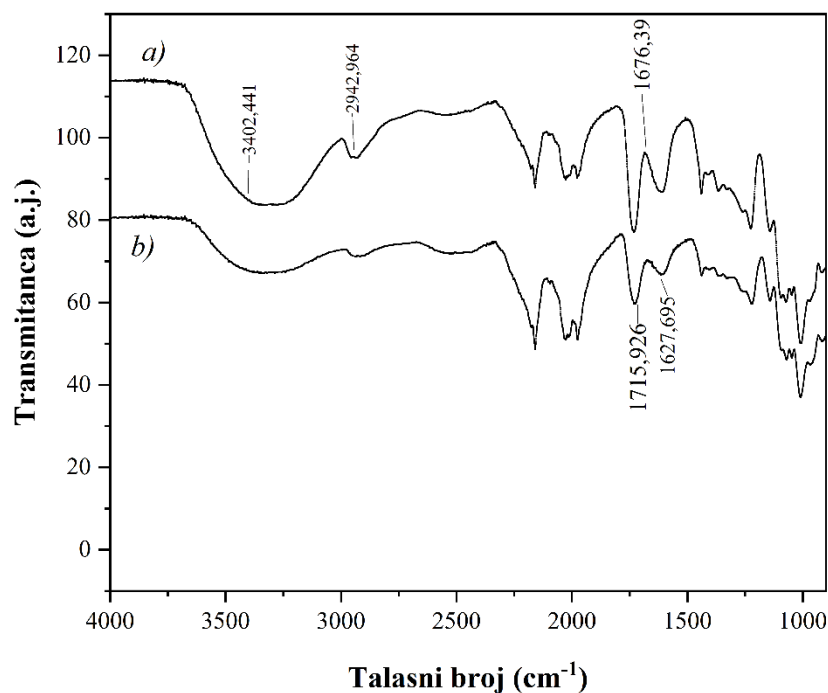
Imobilizacija predstavlja jednu od nezamenljivih tehnika kada je u pitanju povećanje stabilnosti enzima i otvaranje puta ka primeni enzima sa laboratorijskog na industrijski nivo. Imobilizacijom je moguće pored povećanja stabilnosti, olakšati izdvajanje enzima od proizvoda reakcije, što znači ponovnu upotrebu enzima u novom procesu, kao i značajno smanjenje troškova upotrebe enzima. Imobilizacija se najčešće odvija vezivanjem enzima u određenom prostoru ili za određeni nosač. U novije vreme, razvijen je novi pristup koji sve više privlači pažnju istraživača, a to je imobilizacija bez primene nosača. Naime, u ovoj tehnici imobilizacije koriste se strukturna svojstva enzima, tačnije prisustvo određenih grupa i reagensa za umrežavanje.

Imobilizacija enzima u obliku umreženih enzimskih agregata odvija se u dve faze:

1. taloženje enzima pomoću soli ili organskih rastvarača,
2. umrežavanje enzima.

#### **13.1. Oksidacija pektina**

U potrazi za ekološkom alternativom umreživača kao što je toksični glutaraldehid modifikovani su prirodni polimeri kao što su: pektin, hitozan, polilizin, dekstran i sl. [215]. U ovoj disertaciji korišćen je oksidovani pektin kao umreživač. Vršena je oksidacija pektina perjodatnom kiselinom. Oksidacija je potvrđena određivanjem sadržaja aldehidnih grupa DNPH metodom i FT-IR analizom (Slika 40). Sadržaj aldehidnih grupa u nativnom pektinu je 0,0253 mmol/g, dok je u oksidovanom 0,0468 mmol/g. Duplo veći sadržaj aldehidnih grupa u oksidovanom pektinu ukazuje na uspešnu oksidaciju. Slične rezultate su dobili Gupta (Gupta) i sar. u njihovim eksperimentima funkcionalizacije pektina [192].

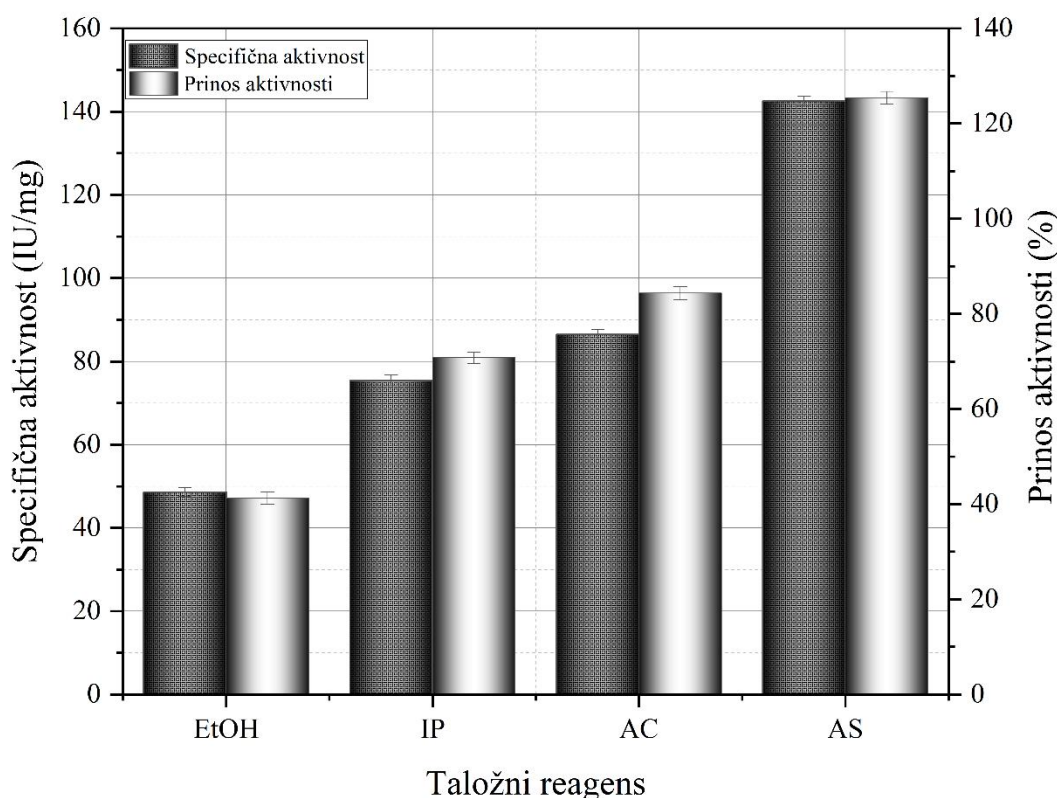


**Slika 40.** FT-IR spektar a) nativnog i b) oksidovanog pektina

Potvrda za uspešnu oksidaciju pektina je pojava trake na  $1715,926\text{ cm}^{-1}$  koja odgovara dialdehidnim grupama dobijenim perjodatnom oksidacijom polisaharida. Pojava trake na  $1627,695\text{ cm}^{-1}$  može se povezati sa slobodnim  $\text{COO}^-$  grupama u oksidovanom pektinu. Takođe, intenzitet karakteristične trake između  $3200 - 3550\text{ cm}^{-1}$ , koja se odnosi na valentnu vibraciju hidroksilne grupe je znatno smanjen kod oksidovanog pektina. Perojodatnom oksidacijom pektina, dolazi do oksidacije vicinalnih diola vezanih za C2 i C3 anhidro D-glukopiranoznog prstena pektina i dobijanje dialdehidne strukture. To znači da je u oksidovanom pektinu prisutan manji broj hidroksilnih grupa, što pokazuje FT-IR analiza, što je u saglasnosti sa dosadašnjim literaturnim podacima [192].

### 13.2. Uticaj taložnog reagensa na imobilizaciju peroksidaze iz sojinih ljuspica

Kao što je već navedeno, imobilizacija enzima u obliku umreženih agregata se sastoji iz dve faze. Prva faza svakako podrazumeva koncentrovanje enzima i to tehnikom taloženja. Taloženje može da se izvodi solima ali i organskim rastvaračima, a izbor zavisi od uticaja taložnog reagensa pre svega na aktivnost željenog enzima u talogu. Sa tim u vezi, u ovoj doktorskoj disertaciji ispitan je uticaj nekoliko taložnih reagenasa: amonijum-sulfat, etanol, 2-propanol i aceton. Rezultati su prikazani na Slici 41.



**Slika 41.** Uticaj taložnog reagensa na specifičnu aktivnost i na prinos aktivnosti peroksidaze iz sojinih ljuspica imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata. IP–2-propanol, EtOH–etanol, AC–aceton, AS–amonijum-sulfat (temperatura 4°C, vreme 1h, odnos taložni reagens: enzimski ekstrakt 1:3)

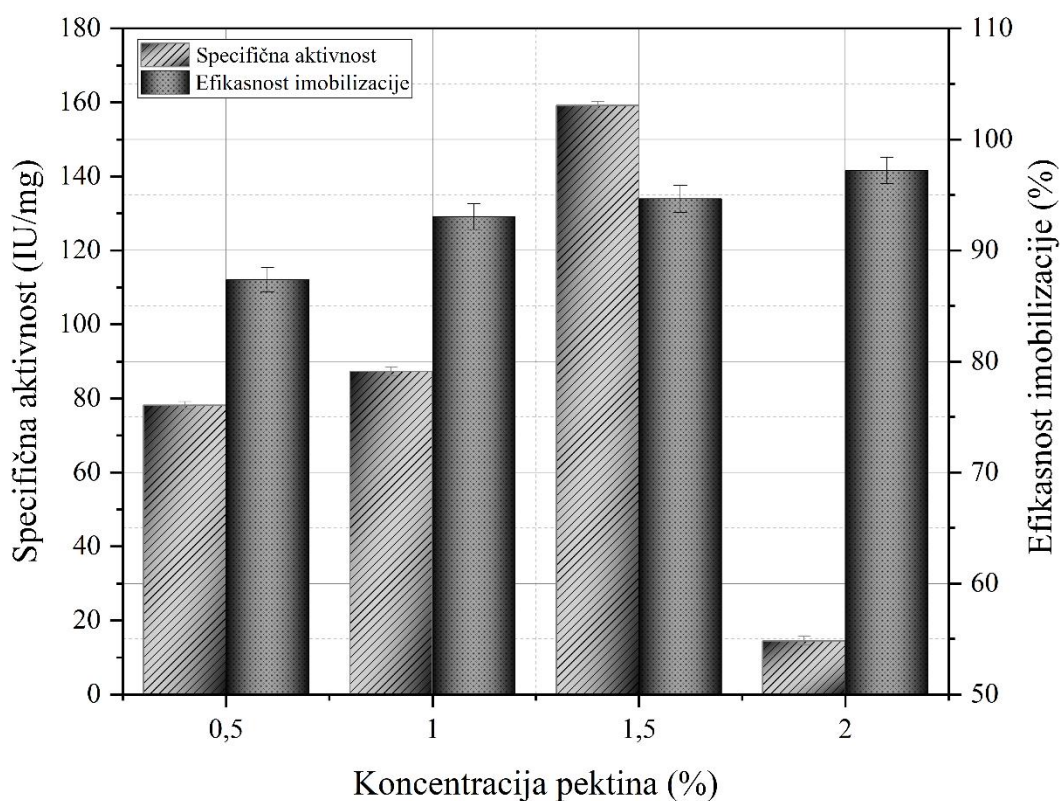
Sa Slike 41 se može videti da se amonijum-sulfat pokazao kao najpogodniji taložni reagens. Iako je prinos aktivnosti približno jednak, korišćenjem amonijum-sulfata kao taložnog reagensa zabeležena je značajno veća specifična aktivnost peroksidaze u talogu u poređenju sa talogom dobijenim nakon taloženja acetonom. Naime, specifična aktivnost peroksidaze iz sojinih ljuspica u talogu nakon dodatka amonijum-sulfata iznosi  $142,5 \pm 1,16$  IU/mg sa prinosom aktivnosti  $125,42 \pm 1,31$  %. Sa druge strane, specifična aktivnost peroksidaze iz sojinih ljuspica u talogu nakon dodatka acetona iznosi  $86,43 \pm 1,29$  IU/mg sa prinosom aktivnosti  $84,33 \pm 1,19$  %. Očigledno je da je amonijum-sulfat taložio značajno manji sadržaj proteina iz ekstrakta, dok je acetom taložio dosta drugih proteina i manje peroksidaze. Kad se uporede organski rastvarači, može se zabeležiti da sa smanjenjem polarosti taložnog reagensa, raste i negativni uticaj rastvarača. Polarni organski rastvarači talože enzime na taj način što uklanjaju molekule vode sa površine enzima i vezuju ih oko molekula organskog rastvarača. Što je sloj vode oko enzima manji, to je lakše da se enzim istaloži pomoću privlačne elektrostatičke sile. Mešljivi organski rastvarači smanjuju dielektričnu konstantu vode, što omogućava agregaciju enzimskih molekula [216].

Reman (Rehman) i sar. su imobilisali lipaze u obliku CLEA. U tim eksperimentima su ispitivali uticaj taložnih reagenasa kao što su: acetom, amonijum-sulfat, etanol, 2-propanol i terc-butanol. Korišćenjem amonijum-sulfata su dobijeni najbolji rezultati [217]. Pored ostalih faktora, na aktivnost imobilizata utiču taložni reagens i izvor enzima. Naime, post-translatorne modifikacije

enzima variraju u zavisnosti od njegovog porekla. To znači da je glikozilacija enzima, koja učestvuje u formiranju prostorne konformacije enzima i utiče na oligomerizaciju, stabilnost rastvorljivost i aktivnost enzima, različita kod enzima iz različitih izvora. Pretpostavlja se da glikani koji se nalaze na površini enzima reaguju sa taložnim reagensima pri čemu može doći do različitog pakovanja i konformacije enzima [218], [219]. Različito ponašanje enzima pri taloženju u zavisnosti od porekla, može se pronaći u istraživanjem Šekuljice i sar [220]. Za imobilizaciju peroksidaze iz rena u obliku umreženih enzimskih agregata, ispitivan je uticaj nekoliko taložnih reagenasa: acetona, 2-propanola i amonijum-sulfata. Kao najpogodniji taložni reagens pokazao se aceton. U ovom slučaju, amonijum-sulfat se pokazao kao najbolji izbor taložnog reagensa, pa je usvojen kao taložni reagens u narednoj fazi istraživanja.

### **13.3. Uticaj koncentracije umreživača na imobilizaciju peroksidaze iz sojinih ljuspica u obliku umreženih enzimskih agregata**

Nakon odabira najpogodnijeg reagensa za taloženje, ispitivan je uticaj umreživača na aktivnost imobilisane peroksidaze. Za imobilizaciju peroksidaze u obliku umreženih enzimskih agregata korišćen je oksidovani pektin. Oksidovani pektin sadrži dialdehidne grupe koje se kovalentno vezuju za amino grupe enzima formirajući Šifove baze. Nedovoljna koncentracija umreživača može dovesti do malog stepena imobilizacije. Sa druge strane, velika koncentracija umreživača može uticati negativno na aktivnost enzima. Velika koncentracija umreživača znači i veliki broj kovalentnih veza između enzima i pektina, što povećava rigidnost enzima i utiče negativno na njegovu fleksibilnost. Takođe, može doći do sternih smetnji, a postoji i veća mogućnost da dođe do vezivanja amino-grupe prisutne u aktivnom centru enzima što dovodi do onesposobljavanja enzimskih molekula za katalizu. U cilju određivanja optimalne koncentracije umreživača, varirana je koncentracija oksidovanog pektina za imobilizaciju peroksidaze iz sojinih ljuspica u opsegu 0,5–2 %, i utvrđen je njen uticaj na aktivnost enzima, kao i na efikasnost imobilizacije. Rezultati su dati na Slici 42.



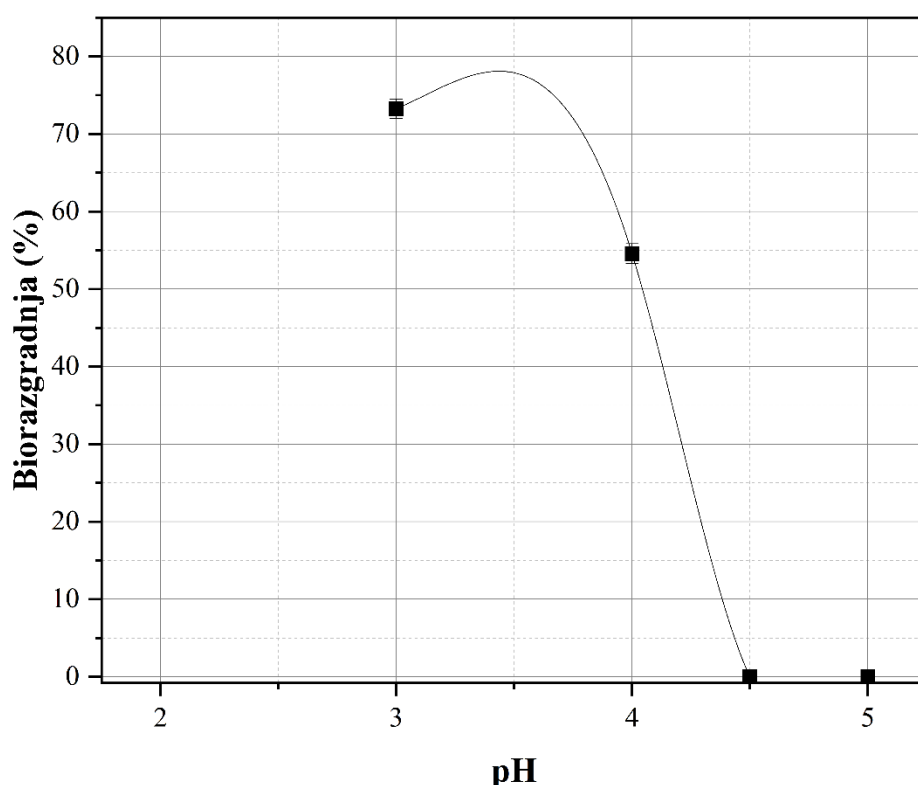
**Slika 42.** Uticaj koncentracije umreživača na efikasnost imobilizacije i na specifičnu aktivnost peroksidaze iz sojinih ljuspica. (temperatura 4 °C, vreme 24h uz konstantno mešanje)

Sa Slike 42 se može videti da specifična aktivnost peroksidaze raste sa porastom koncentracije umreživača sve do jednog trenutka kad se beleži drastičan pad aktivnosti od  $159 \pm 1,09$  IU/mg na  $14,51 \pm 1,15$  IU/mg. Može se zaključiti da veća koncentracija umreživača deluje negativno na aktivnost enzima. Efikasnost imobilizacije raste sa povećanjem koncentracije pektina od  $87,36 \pm 1,08$  % do  $97,20 \pm 1,19$  %. Kao optimalna koncentracija umreživača je odabrana ona od 1,5% za sledeće eksperimente.

## 13.4. Optimizacija procesnih parametara biorazgradnje AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica imobilisanom u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu

### 13.4.1. Optimizacija pH vrednosti i vreme kontakta biorazgradnje AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica imobilisanom u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu

Promena optimalne pH vrednosti nakon imobilizacije enzima je česta pojava [221], [222]. Razlog za ovo su konformacione promene enzima kao rezultat promene u jonizaciji bočnih lanaca amino kiselina u mikrookolini aktivnog centra enzima. Zato je ovaj parametar od važnosti i optimizacija je neophodna. Uticaj pH vrednosti na biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica imobilisanom u obliku umreženih enzimskih agregata je prikazana na Slici 43.



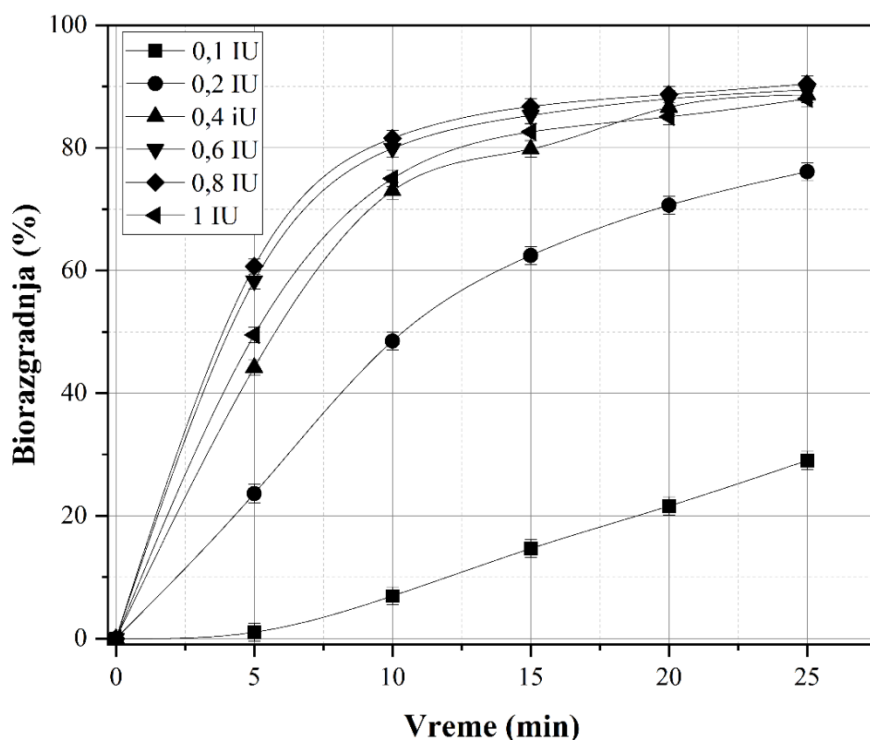
*Slika 43. Uticaj pH na biorazgradnju boje AV109 na sobnoj temperaturi CLEA peroksidazom iz sojinih ljuspica (reakcioni uslovi: koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija vodonik-peroksida 0,1 mM, koncentracija enzima 0,2 IU)*

Sa Slike 43 se može videti da je optimalna pH vrednost za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom imobilisanom u obliku umreženih enzimskih agregata, 3. U eksperimentima sa slobodnom peroksidazom iz sojinih ljuspica optimalna pH vrednost je bila 4. Ujedno to je bila jedina pH na

kojoj je enzim pokazivao aktivnost, što ukazuje na prisustvo jednog izoenzima peroksidaze. CLEA imobilizacijom, optimalna pH je pomerena na 3, ali enzim pokazuje aktivnost i na pH 4. Imobilizacijom, proširuje se pH opseg na koji je peroksidaza aktivna, što omogućava njenu upotrebu u težim uslovima. Takođe, ispitivano je i vreme kontakta biorazgradnje boje AV109 imobilisanom peroksidazom iz sojinih ljuspica u šaržnom sistemu. Vreme potrebno za biorazgradnju iznosi 20 min. U šaržnom sistemu sa slobodnom peroksidazom iz sojinih ljuspica, reakcija je trajala 30 min. Može se uočiti da imobilizacija utiče pozitivno i na vreme reakcije.

#### 13.4.2. Optimizacija koncentracije enzima za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica imobilisanom u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu

Za određivanje optimalne koncentracije imobilisane peroksidaze u obliku umreženih enzimskih agregata za biorazgradnju boje AV109, varirana je aktivnost enzima u sistemu u opsegu 0,1–1 IU. Rezultati su dati na Slici 44. Sa Slike 44 se može videti da je razlika u stepenu biorazgradnje mala  $87,99 \pm 1,26$ – $90,41 \pm 1,28$  % kad je aktivnost enzima 0,4–1 IU. Budući da izolacija enzima kao i njegova imobilizacija zahtevaju određeno vreme optimizacije uslova i troškove, a stepen biorazgradnje se razlikuje za 2%, kao optimalna vrednost usvojena je aktivnost peroksidaze od 0,4 IU. U reakciji biorazgradnje boje AV109 slobodnom peroksidazom iz sojinih ljuspica u šaržnom sistemu, optimalna aktivnost enzima je bila 1 IU, gde je bila potrebna 2,5 puta veća koncentracija enzima nego kad je peroksidaza imobilisana u obliku umreženih enzimskih agregata.

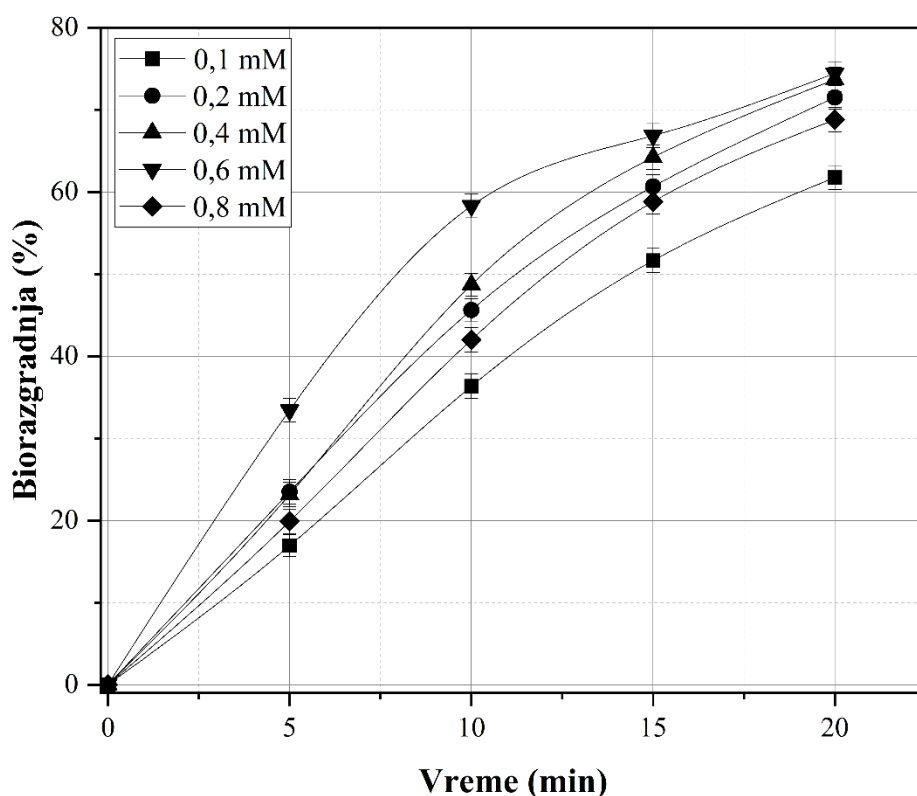


**Slika 44.** Zavisnost biorazgradnje boje AV109 od koncentracije imobilisane peroksidaze iz sojinih ljuspica u obliku umreženih enzimskih agregata (uslovi: pH 3, koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija vodonik-peroksida 0,1 mM, temperatura 25°C)



### 13.4.3. Optimizacija koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju AV109 boje peroksidazom iz sojinih ljuspica imobilisanom u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu

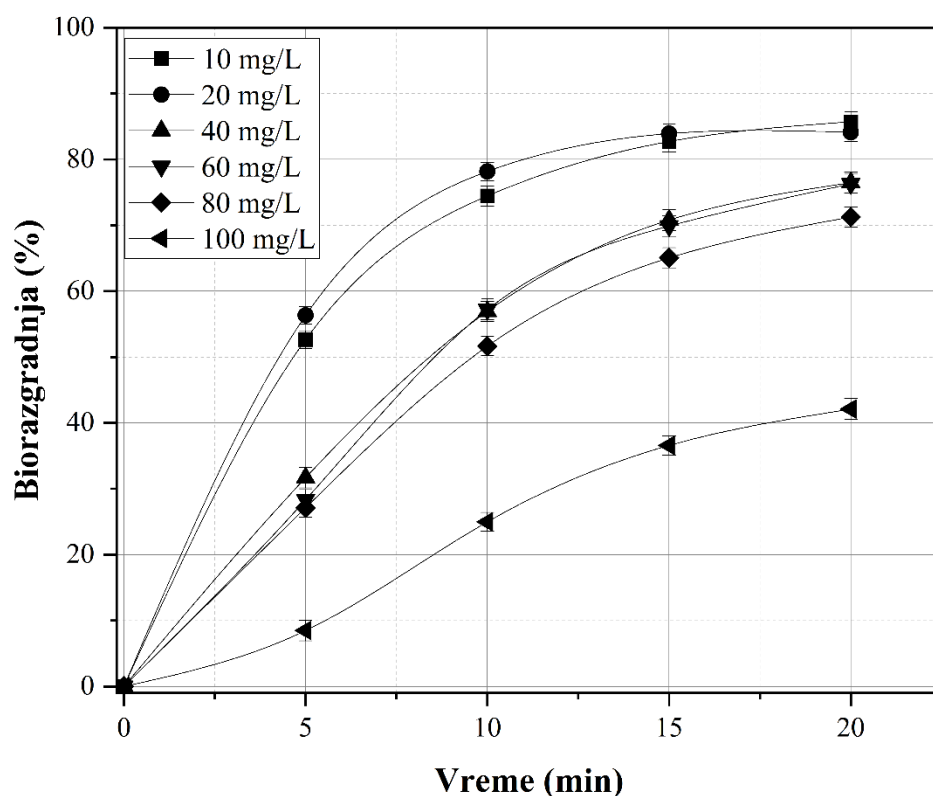
U cilju određivanja optimalne koncentracije vodonik-peroksida u reakciji biorazgradnje boje AV109 katalizovane peroksidazom imobilisanom u obliku umreženih enzimskih agregata, koncentracija vodonik-peroksida je varirana u opsegu 0,1–0,8 mM. Rezultati su dati na Slici 44. Zabeležen je najveći stepen biorazgradnje od  $71,49 \pm 1,46$  % pri početnoj koncentraciji vodonik-peroksida od 0,2 mM. Povećanjem koncentracije vodonik-peroksida iznad 0,2 mM, stepen biorazgradnje se ne menja znatno. Koncentracija vodonik-peroksida od 0,2 mM predstavlja optimalnu koncentracija za biorazgradnju boje AV109 CLEA imobilisanom peroksidazom iz sojinih ljuspica. U poređenju sa slobodnom peroksidazom iz sojinih ljuspica u šaržnom sistemu, gde je optimalna koncentracija vodonik-peroksida bila 0,01 mM, može se zaključiti da je CLEA imobilisanoj peroksidazi potrebno 20 puta više vodonik-peroksida za degradaciju AV109 nego slobodnoj peroksidazi. Do sličnog zaključka su došli Šekuljica i sar. kad su ispitivali oksidaciju AV109 imobilisanom peroksidazom iz rena u obliku umreženih enzimskih agregata [223]. CLEA imobilisana peroksidaza iz rena je pokazala veću otpornost na velike koncentracije vodonik-peroksida. Zbog toga, optimalna koncentracija vodonik-peroksida bila je 1 mM za imobilisanu peroksidazu, dok je za slobodnu peroksidazu iz rena optimalna vodonik-peroksida koncentracija je bila 0,4 mM.



*Slika 45. Uticaj početne koncentracije vodonik-peroksida na biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica imobilisanom u obliku umreženih enzimskih agregata (uslovi: pH 3, koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija peroksidaze 0,4 IU, temperatura 25°C)*

#### 13.4.4. Optimizacija koncentracije boje za biorazgradnju AV109 CLEA imobilisanom peroksidazom iz sojinih ljuspica u šaržnom sistemu

Nakon određivanja optimalnih vrednosti pH, koncentracije enzima i vodonik-peroksida, ispitan je i uticaj koncentracije boje na stepen biorazgradnje AV109 imobilisanom peroksidazom iz sojinih ljuspica u obliku umreženih enzimskih agregata. Koncentracija boje je varirana u opsegu 10–100 mg/L. Rezultati su prikazani na Slici 46. Maksimalni stepen biorazgradnje –  $85,71 \pm 1,45 \%$  je postignut pri početnoj koncentraciji boje 10 mg/L. Povećanjem koncentracije boje, stepen biorazgradnje opada. Pri početnoj koncentraciji boje od 100 mg/L, procenat biorazgradnje boje AV109 imobilisanom peroksidazom iz sojinih ljuspica u obliku umreženih enzimskih agregata iznosi  $42,1 \pm 1,61\%$ . Bilal (Bilal) i sar. su došli do sličnog zaključka kad su ispitali mogućnost obezbojavanja metil oranža peroksidazom iz rena imobilisanom u poliakrilamidnom gelu [224].



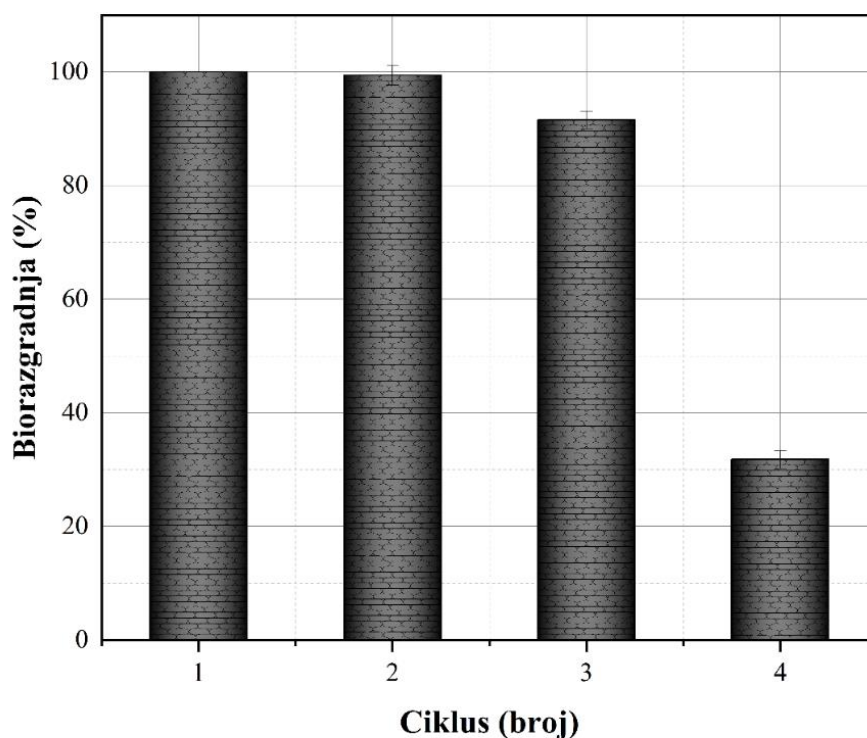
**Slika 46.** Uticaj početne koncentracije boje na biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica imobilisanom u obliku umreženih enzimskih agregata (uslovi: pH 3, koncentracija peroksidaze 0,4 IU, koncentracija vodonik-peroksida 0,2 mM, temperatura 25°C)

Pri ispitivanju uticaja koncentracije boje na reakciju obezbojavanja, zaključeno je da imobilisana peroksidaza pokazuje bolje rezultate kad je koncentracija boje niska, optimalno 10 mg/L. U reakciji biorazgradnje AV109 slobodnom peroksidazom iz sojinih ljuspica usvojena optimalna koncentracija boje je takođe 10 mg/L. Međutim, primećuje se znatni rast u stepenu biorazgradnje kad je korišćena imobilisana peroksidaza:  $60,39 \pm 2,49 \%$  biodegradacije sa slobodnom peroksidazom, a sa imobilisanom  $85,71 \pm 1,45 \%$  kad je koncentracija boje 10 mg/L. Znatni porast

biorazgradnje je zabeležen i kad je koncentracija boje 100 mg/L. Sa slobodnom peroksidazom je postignuto  $12,06 \pm 1,19$  % biorazgradnje, da bi se sa CLEA peroksidazom povećao za 30 %. Ovo ukazuje na to da imobilizacija utiče na povećanje stabilnosti enzima, preciznije da se umrežavanjem peroksidaze postiže to da enzim zadrži dobar deo svoje aktivnosti i kad je koncentracija boje znatno povećana. Povećanje stabilnosti enzima u prisustvu veće koncentracije boje omogućava njegovu potencijalnu primenu za industrijske potrebe.

### **13.5.5. Operativna stabilnost peroksidaze iz sojinih ljuspica imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata**

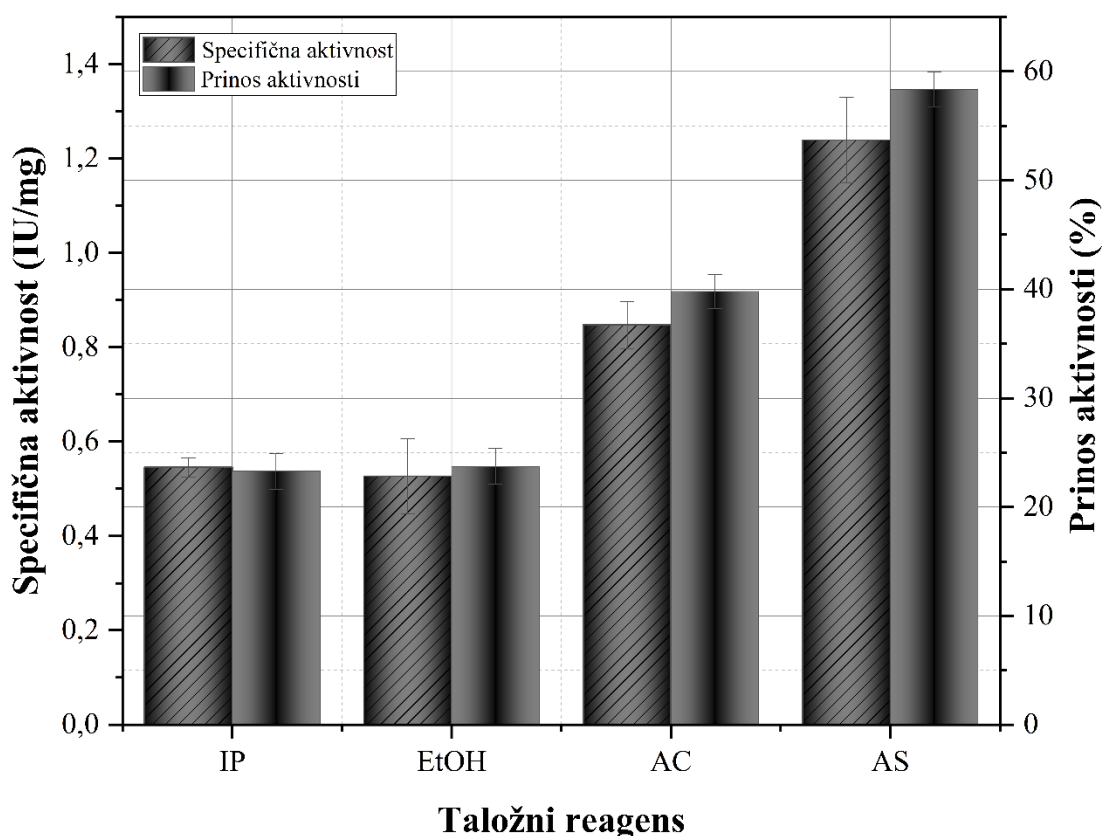
Operativna stabilnost imobilisane peroksidaze je parametar koji ukazuje na to da li je imobilizacija ekonomski opravdana, pored ostalog. Mogućnost višekratne upotrebe imobilizata pospešuje efikasnost procesa i od ključnog je značaja za industrijsku primenu. U tom cilju, ispitivana je operativna stabilnost imobilisane peroksidaze iz sojinih ljuspica u obliku umreženih enzimskih agregata u reakciji biorazgradnje boje AV109 u šaržnom sistemu pod optimalnim uslovima. Rezultati su dati na Slici 47. Do trećeg ciklusa CLEA imobilisana peroksidaza iz sojinih ljuspica je zadržala  $91,55 \pm 1,59$  % svoje aktivnosti. Nakon trećeg ciklusa, zadržana aktivnost je naglo opala na  $31,79 \pm 1,57$  %. Dahili (Dahili) i sar. su ispitivali oksidaciju 2,4-dihlorfenola pomoću peroksidaze iz rena imobilisane na nosač – čestice poli(mlečne-ko-glikolne kiseline) [225]. Nakon 4 ciklusa imobilisani preparat je zadržao više od 30% aktivnosti, s tim da je nosač adsorbovao znatnu količinu supstrata. Pad aktivnosti se može pripisati akumulaciji proizvoda i intermedijera reakcije oko aktivnog centra enzima i smanjenjem katalitičke efikasnosti enzima u narednim ciklusima. Drugi mogući razlog je spiranje enzima iz agregata. Druga grupa istraživači, Džou (Xhou) i sar., su imobilisali peroksidazu iz rena, glukozu oksidazu i njihovu kombinaciju u obliku magnetnih umreženih enzimskih agregata [226]. Imobilisani preparati korišćeni su u reakciji obezbojavanja boje Direktno crno 38. Umreženi agregati peroksidaze koje sadrže magnete su zadržali 50,81 % svoje aktivnosti nakon 8 konsektivnih ciklusa.



*Slika 47. Operativna stabilnost imobilisane peroksidaze iz sojinih ljuspica u obliku umreženih agregata (uslovi: pH 3, koncentracija boje 10 mg/L, aktivnost enzima 0,4 IU, koncentracija vodonik peroksida 0,2 mM, temperatura 25°C)*

### **13.6.1. Uticaj taložnog reagensa na imobilizaciju peroksidaze iz krompirovih ljuski u obliku umreženih enzimskih agregata**

Za ispitivanje uticaja taložnog reagensa na imobilizaciju peroksidaze iz krompirovih ljuski korišćeni su: 2-propanol, etanol, aceton i amonijum sulfat. Rezultati su dati na Slici 48. Sa Slike 48 se može videti da se amonijum-sulfat pokazao kao najbolje sredstvo za taloženje, sa prinosom aktivnosti  $58,32 \pm 1,61\%$ . Aceton je slabije taložio peroksidazu, dok zadržana aktivnost peroksidaze kad su korišćeni etanol i 2-propanol kao taložna sredstva je najmanja i iznosi  $23,73 \pm 1,66$  i  $23,29 \pm 1,63$  %. Specifična aktivnost je najveća kad je korišćen amonijum-sulfat kao taložno sredstvo  $1,24 \pm 0,09$  IU/mg. Kad je taloženje vršeno acetonom, specifična aktivnost je iznosila  $0,83 \pm 0,08$  IU/mg. Kao najslabija sredstva za taloženje su se pokazali da su 2-propanol i etanol sa specifičnom aktivnošću  $0,55 \pm 0,02$  IU/mg i  $0,53 \pm 0,05$  IU/mg. Amonijum-sulfat se takođe pokazao kao najpogodnije sredstvo za taloženje peroksidaze iz sojinih ljuspica sa prinosom aktivnosti  $125,42 \pm 1,31$  %.

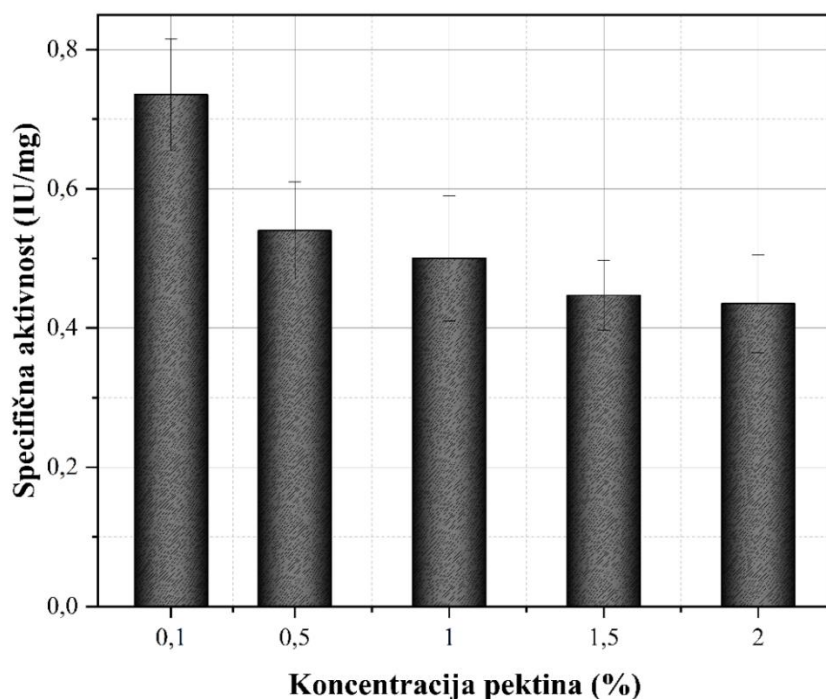


**Slika 48.** Uticaj taložnog reagensa na specifičnu aktivnost i prinos aktivnosti nakon taloženja peroksidaze iz krompirovih ljuski taložnim reagensima IP–2-propanol, EtOH–etanol, AC–aceton, AS–amonijum-sulfat (temperatura 4°C, vreme 1h, odnos taložnog reagensa: enzimski ekstrakt 1:3)

### 13.6.2. Uticaj koncentracije umreživača na aktivnost peroksidaze iz krompirovih ljuski imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata

Koncentracija pektina je varirana u opsegu 0,1–2 % u cilju određivanja optimalne koncentracije umreživača. Imobilizacija je trajala 24 h, na 4°C uz konstantno mešanje. Rezultati su dati na Slici 49. Sa Slike 49 se može jasno videti da je optimalna koncentracija pektina 0,1 %, gde je postignuta specifična aktivnost  $0,735 \pm 0,08$  IU/mg. Povećanjem koncentracije pektina na 0,5, 1, 1,5 i 2 %, specifična aktivnost opada na  $0,54 \pm 0,07$ ,  $0,50 \pm 0,09$ ,  $0,447 \pm 0,05$  i  $0,435 \pm 0,07$  IU/mg. Isti trend opadanja sa povećanjem koncentracije pektina je zabeležen kod aktivnosti imobilizata. Aktivnost imobilisanog preparata peroksidaze iznosi  $15,18 \pm 0,58$  IU/g kad je koncentracija pektina 0,1 %. Sa povećanjem koncentracije umreživača na 0,5 %, aktivnost imobilizata drastično opada na  $4,49 \pm 0,47$  IU/g. Dalji porast koncentracije pektina na 2 % doprinosi još značajnijem padu aktivnosti imobilisane peroksidaze,  $1,06 \pm 0,39$  IU/g. Ista zavisnost između aktivnosti i koncentracije umreživača je zabeležana i u slučaju imobilizacije peroksidaze iz sojinih ljuspica. Kumar (Kumar) i sar. su takođe zaključili da manja koncentracija umreživača doprinosi boljoj aktivnosti enzima [227]. U ovim istraživanjima je korišćen je glutaraldehid za umrežavanje lakaze koja je upotrebljena za obezbojavanje dve trifenilmetanske boje Kiselo ljubičasto i Bazno crveno, i dve

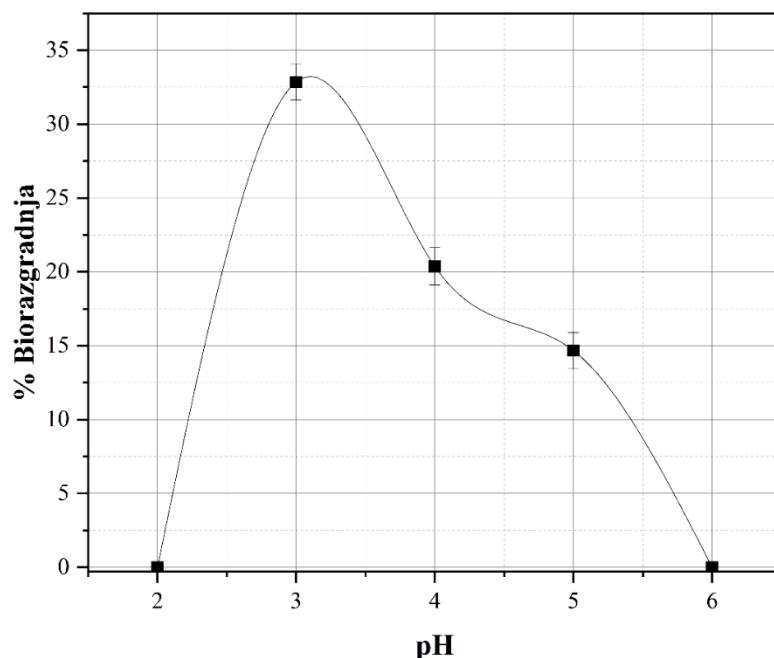
reaktivne boje Reaktivno oranž i Reaktivno ljubičasto. Optimalna koncentracija glutaraldehida je bila 0,2 %.



*Slika 49. Uticaj koncentracije umreživača na specifičnu aktivnost peroksidaze iz sojinih ljuspica. (temperatura 4°C, vreme 24h uz konstantno mešanje)*

### **13.6.3. Optimizacija pH i vremena kontakta biorazgradnje boje AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu**

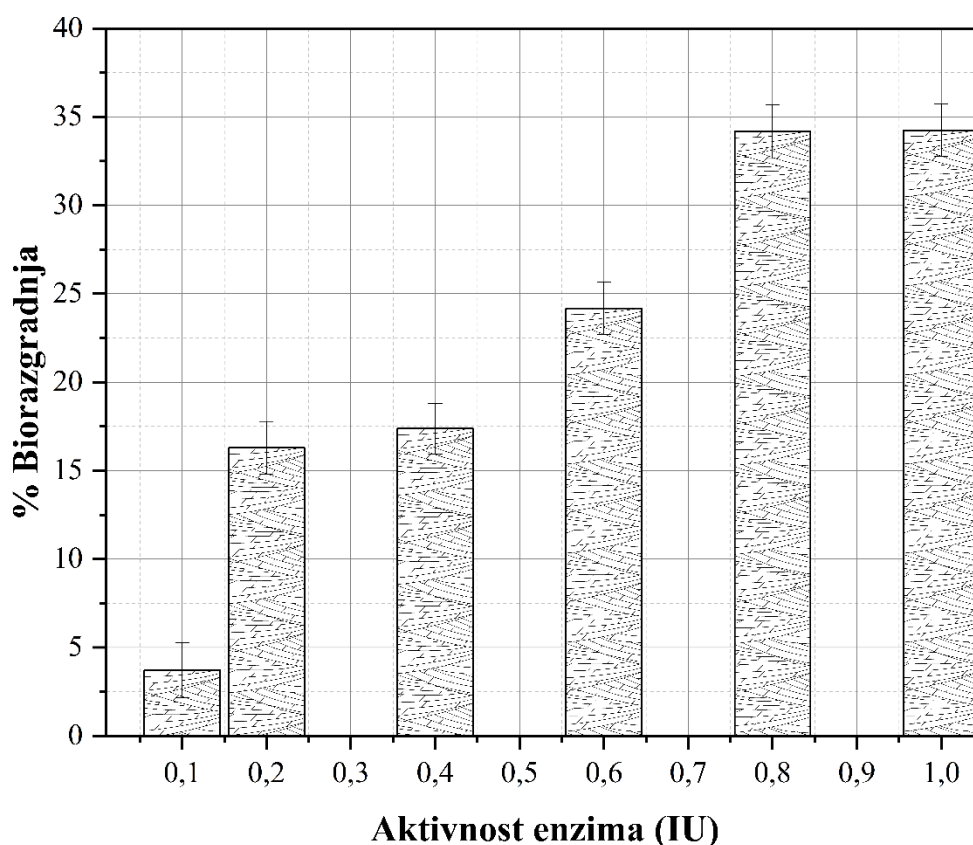
U cilju određivanja pH vrednosti pri kojoj je biorazgradnja boje AV109 CLEA peroksidazom iz krompirovih ljuski maksimalna, pH reakcione smeše je varirana u opsegu 2–6. Rezultati su dati na Slici 50. Sa Slike 50 se može videti da je optimalna pH 3. U poređenju sa slobodnom peroksidazom iz krompirovih ljuski, pH vrednost je promenjena. Optimalna pH vrednost za slobodnu peroksidazu iz krompirovih ljuski u reakciji oksidacije boje AV109 je bila 4. Ista pojava se može zabeležiti i kod peroksidaze iz sojinih ljuspica. Imobilisana peroksidaza iz krompirovih ljuski u obliku umreženih enzimskih agregata je pokazala aktivnost i na pH 5, sa stepenom biorazgradnje 15 %. Nakon 70 min biorazgradnje nije uočena značajna razlika u stepenu biorazgradnje, pa je ovo vreme usvojeno za sledeće eksperimente kao optimalno vreme kontakta. Korišćenjem imobilisane peroksidaze iz krompirovih ljuski vreme biorazgradnje AV109 boje u šaržnom sistemu je povećano, (70 min) u poređenju sa vremenom reakcije katalizovane slobodnom peroksidazom iz krompirovih ljuski (50 min) u istoj konfiguraciji bioreaktora, što je jasan pokazatelj da postoje izvesne sterne smetnje, nastale nakon imobilizacije, koje otežavaju pristup supstrata enzimu.



*Slika 50. Uticaj pH na biorazgradnju boje AV109 na sobnoj temperaturi CLEA peroksidazom iz krompirovih ljuski (reakcioni uslovi: koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija vodonik-peroksida 0,1 mM, koncentracija enzima 0,2 IU)*

#### **13.6.4. Optimizacija koncentracije enzima za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu**

Koncentracija enzima optimizovana je variranjem aktivnosti enzimskog imobilizata u opsegu 0,1–1 IU. Rezultati su dati na Slici 51. Povećanjem aktivnosti enzima do 0,8 IU, raste i stepen biorazgradnje. Razlika u stepenu biorazgradnje boje AV109 kad je aktivnost enzima 0,8 i 1 IU skoro i ne postoji  $34,17 \pm 1,52 \%$  i  $34,24 \pm 1,48 \%$ , redom. Usvojena optimalna aktivnost enzima koja će biti korišćena u narednim eksperimentima je 0,8 IU. Za biorazgradnju AV109 slobodnom peroksidazom iz krompirovih ljuski u šaržnom sistemu bilo je potrebno 0,6 IU enzima. Ovo je još jedan pokazatelj nastanka sternih smetnji nakon imobilizacije, jer je u istoj konfiguraciji reaktora, potrebno uneti više jedinica aktivnosti imobilisane peroksidaze u poređenju sa slobodnom da bi se postigao željeni stepen biorazgradnje, što nije bio slučaj sa peroksidazom iz sojinih ljuspica. Imajući u vidu da je enzim izolovan iz otpadnog materijala jednostavnom metodom, povećanje koncentracija enzima da bi se odigrala reakcija je i dalje opravdana.

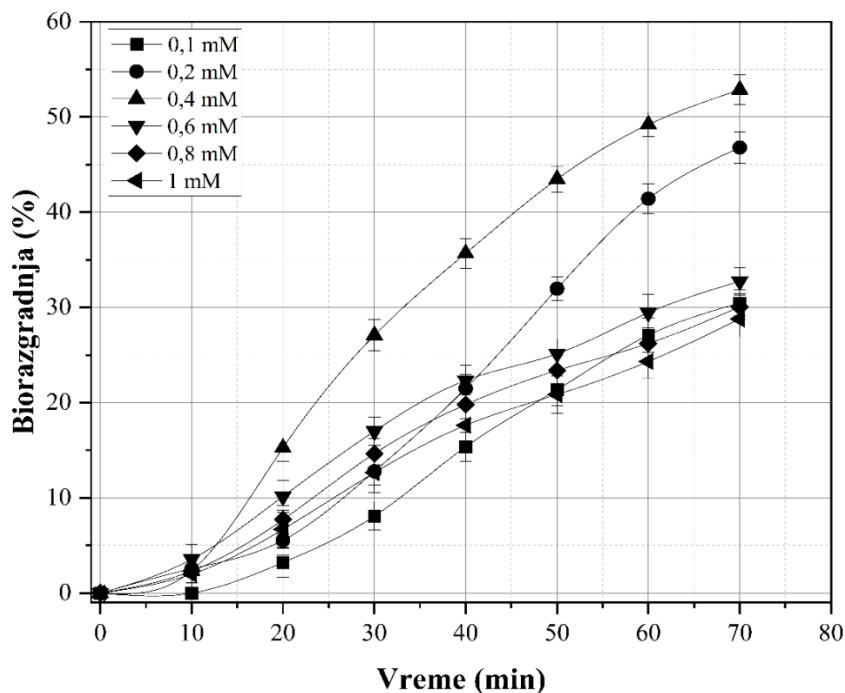


**Slika 51.** Uticaj početne koncentracije peroksidaze iz krompirovih ljuski imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata na biorazgradnju boje AV109 boje u šaržnom sistemu (uslovi: pH 3, koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija vodonik-peroksida 0,1 mM, temperatura 25°C)

### 13.6.5. Optimizacija koncentracije vodonik-peroksida za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu

Koncentracija vodonik-peroksida je varirana u opsegu 0,1–1 mM u reakciji biorazgradnje boje AV109 imobilisanom peroksidazom iz krompirovih ljuski u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu. Rezultati su dati na Slici 52, gde se može videti da je najveći stepen biorazgradnje postignut sa koncentracijom vodonik-peroksida od 0,4 mM –  $52,86 \pm 1,56$  %. Povećanjem koncentracije vodonik-peroksida iznad 0,4 mM, procenat biorazgradnje opada, odnosno veća koncentracija vodonik-peroksida deluje inhibitorno. U reakciji biorazgradnje boje AV109 slobodnom peroksidazom iz krompirovih ljuski optimalna koncentracija vodonik-peroksida je bila 0,01 mM. Iako je vodonik-peroksid mali molekul, moguće je da umreživanjem dolazi do zaklanjanja aktivnog centra enzima, pa je pristup do istog otežan. Zbog toga je potrebna veća koncentracija vodonik-peroksida za postizanje najvećeg stepen biorazgradnje. Sličan zaključak se može izvesti i kad je biorazgradnja boje AV109 katalizovana slobodnom i imobilisanom peroksidazom iz sojinih ljuspica. Za biorazgradnju boje AV109 slobodnom peroksidazom je bilo potrebno 0,01 mM, dok je sa imobilisanom bilo potrebno 0,2 mM.

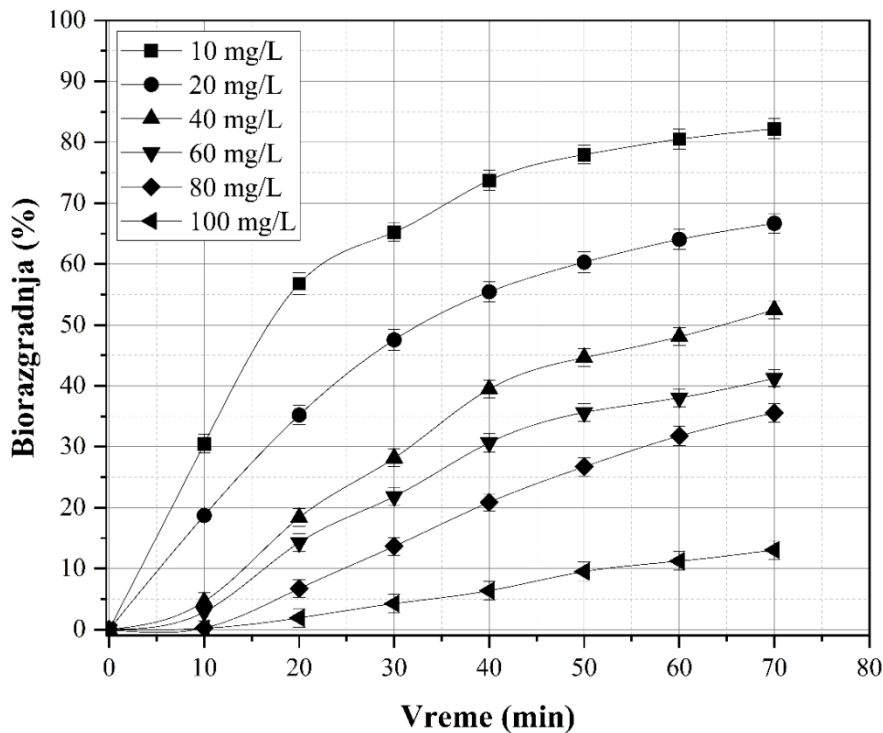




*Slika 52. Uticaj početne koncentracije vodonik-peroksida na biorazgradnju boje AV109 boje peroksidazom iz krompirovih ljuski imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu (uslovi: pH 3, koncentracija boje 30 mg/L, koncentracija peroksidaze 0,8 IU, temperatura 25°C)*

### 13.6.6. Optimizacija koncentracije boje za biorazgradnju boje AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu

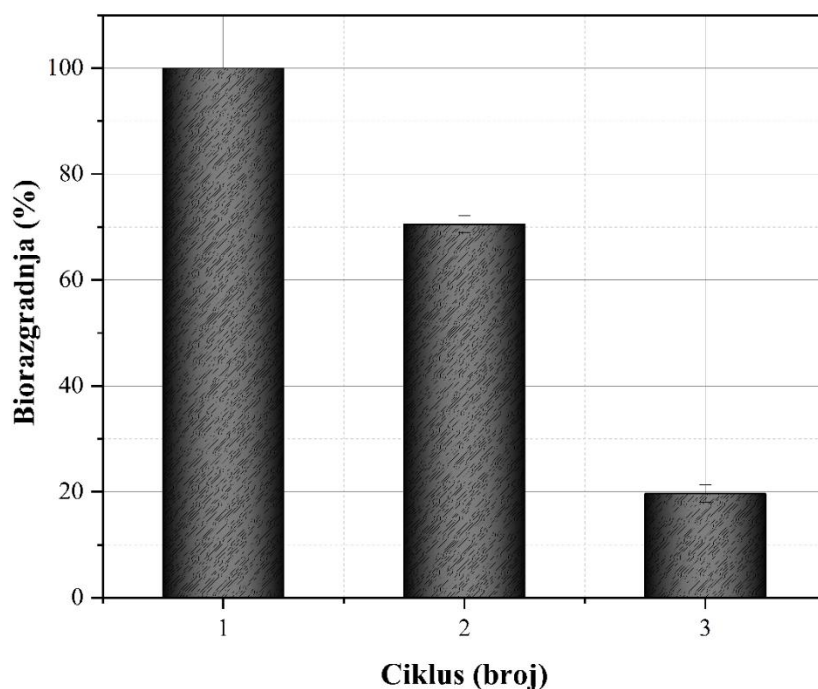
U cilju određivanja optimalne vrednosti koncentracije boje u reakciji razgradnje boje AV109 imobilisanom peroksidazom iz krompirovih ljuski u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu, koncentracija boje je varirana u opsegu 10–100 mg/L. Rezultati su dati na Slici 53. Sa Slike 53 se može videti da je najveći stepen biorazgradnje  $82,2 \pm 1,65$  % postignut kad je koncentracija boje 10 mg/L. Sa povećanjem koncentracije boje do 100 mg/L stepen biorazgradnje opada na  $13,06 \pm 1,53$  %. Optimalna koncentracija boje kad je korišćena slobodna peroksidaza iz krompirovih ljuski u istoj reakciji je 40 mg/L i postignuti stepen biorazgradnje  $65,11 \pm 1,59$  % i vreme kontakta 50 min. CLEA imobilisana peroksidaza iz krompirovih ljuski je uspela da razgradi  $52,49 \pm 1,49$  % boje za 70 min kad je početna koncentracija bila 40 mg/L. Ovo ukazuje na otežanu difuziju supstrata kao i da dolazi do nakupljanje intermedijera, pa se sama reakcija odvija sporije. Imajući u vidu da se umreženi enzim može koristiti više puta za katalizu, njegova imobilizacija je i dalje opravdana.



*Slika 53. Zavisnost biodegradacije AV109 CLEA imobilisanom peroksidazom iz krompirovih ljuski od koncentracije boje (uslovi: pH 3, koncentracija peroksidaze 0,8 IU, koncentracija vodonik-peroksida 0,4 mM, temperatura 25°C)*

### 13.6.7. Operativna stabilnost peroksidaze iz krompirovih ljuski imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata

Operativna stabilnost CLEA imobilisane peroksidaze ispitana je biorazgradnjom boje AV109 pod optimalnim uslovima u više uzastopnih ciklusa. Nakon završetka reakcije, imobilizat je izdvajan iz reakcione smeše filtracijom, ispiran puferom i korišćen u novom ciklusu biorazgradnje. Sve dok je CLEA peroksidaza pokazivala aktivnost, postupak je ponavljan. Rezultati su dati na Slici 54. U drugom ciklusu imobilisani preparat je zadržao  $70,54 \pm 1,58$  % od početne aktivnosti, dok je u trećem ciklusu zabeležen drastični pad na  $19,66 \pm 1,64$  % početne aktivnosti. U poređenju sa operativnom stabilnošću CLEA peroksidaze iz sojinih ljuspica, gde se drastični pad aktivnosti pojavio u četvrtom ciklusu, može se zaključiti da je stabilnost oba preparata skoro ista. Imajući u vidu da ova vrsta imobilizacije uključuje kovalentne veze među enzima i umreživača bez nosača, relativno slaba, loša mehanička stabilnost imobilisanog preparata je očekivana.



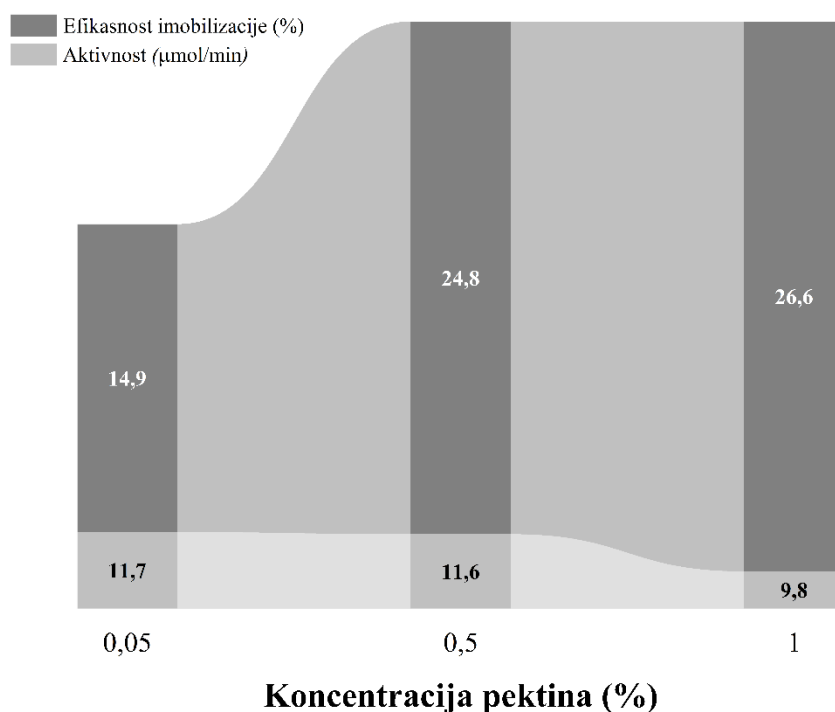
*Slika 54. Operativna stabilnost imobilisane peroksidaze iz krompirovih ljuski u obliku umreženih agregata (uslovi: pH 3, koncentracija boje 10 mg/L, aktivnost enzima 0,8 IU, koncentracija vodonik peroksida 0,4 mM, temperatura 25°C)*

### **13.7. Imobilizacija peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski umrežavanjem u kontinualnom sistemu**

Pored toga što imobilizacija enzima u kontinualnim sistemima omogućava njihovu višekratnu upotrebu, prednost imobilisanih preparata je jednostavno razdvajanje proizvoda reakcije što smanjuje mogućnost inhibicije enzima proizvodom. Umrežavanje enzima na zidovima mikroreaktora je relativno jednostavan i ne previše zahtevan proces kojim dobija se stabilan sistem sa slabom mogućnošću „curenja” enzima [228]. Imajući u vidu da je biodegradacija AV109 ekološki opravdan proces koji se zasniva na principima cirkularne ekonomije, upotreba toksičnih reagenasa kao što su glutaraldehid, paraformaldehid ili *p*-benzohinon nije prihvatljiva. Zbog toga, u ovoj disertaciji se, kao umreživač koristi oksidovani pektin. Pektin je prirodni polisaharid čijom oksidacijom se uvode aldehidne grupe u njegovu strukturu. Kovalentnim vezivanjem NH<sub>2</sub> – grupa enzima i CHO – grupa pektina dolazi do formiranja Šifovih baza. Na ovaj način, enzim je umrežen dovoljno čvrsto da ne dolazi do curenja imobilizata, a imobilizacija je dovoljno fleksibilna da su sterne smetnje i ograničenja prenosa mase minimalne. U sledećem delu disertacije ispitan je uticaj umreživača i enzima na aktivnost imobilizata, kao i operativna stabilnost umreženih peroksidaza.

### 13.7.1. Optimizacija koncentracije umreživača za imobilizaciju peroksidaze iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu

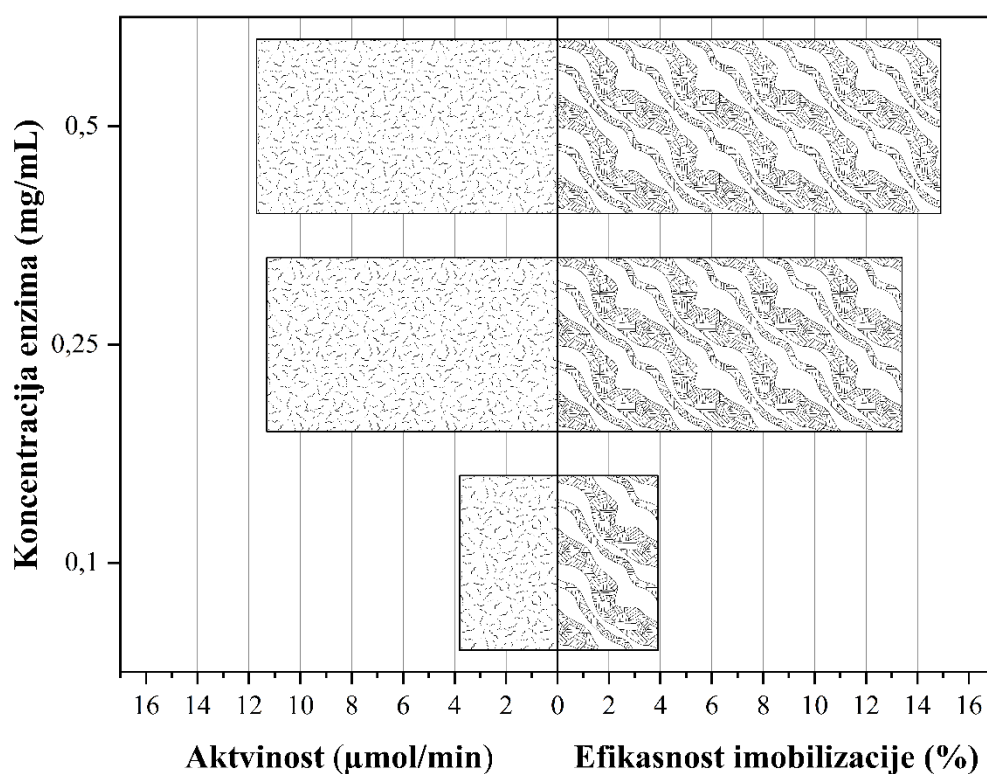
Uticaj koncentracije umreživača na imobilizaciju peroksidaze iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu je ispitivan variranjem koncentracije oksidovanog pektina u opsegu 0,05 – 1 %. Rezultati su prikazani na Slici 55. Sa slike se može videti da porastom koncentracije umreživača raste i količina vezanih enzima. Kako raste efikasnost imobilizacije, aktivnost enzima opada od 11,7  $\mu\text{mol}/\text{min}$  na 9,8  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . Najverovatnije dolazi do formiranja više slojeva umreživača i enzima, pa dolazi do sternih smetnji. Najveća aktivnost peroksidaze je zabeležana kad je koncentracija oksidovanog pektina najmanja (0,05%). Do sličnog zaključka su došli Loret (Lioret) i sar. kad su imobilisali lakazu u cevnom mikoreaktoru glutaraldehidom i paraformaldehidom [229]. Koristili su mikoreaktor dužine 13 cm i prečnika 0,5 mm za umrežavanje lakaze na zidovima PTFE cevnog reaktora, koji je kasnije upotrebljen za biotransformaciju anti-inflamatornih jedinjenja. Njihov zaključak je bio da povećanje koncentracije umreživača dovodi do smanjenja aktivnosti imobilisane lakaze. Na osnovu dobijenih rezultata, za dalji rad usvojena je koncentracija pektina od 0,05 %.



**Slika 55.** Uticaj koncentracije oksidovanog pektina na aktivnost peroksidaze iz sojinih ljuspica i na efikasnost imobilizacije. (Uslovi: 60 IU/mL (0,5 mg/mL) sirovi ekstrakt peroksidaze, 108,8 min vreme zadržavanja, temperatura 25°C)

### 13.7.2. Optimizacija koncentracije peroksidaze iz sojinih ljuspica za umrežavanje u kontinualnom sistemu

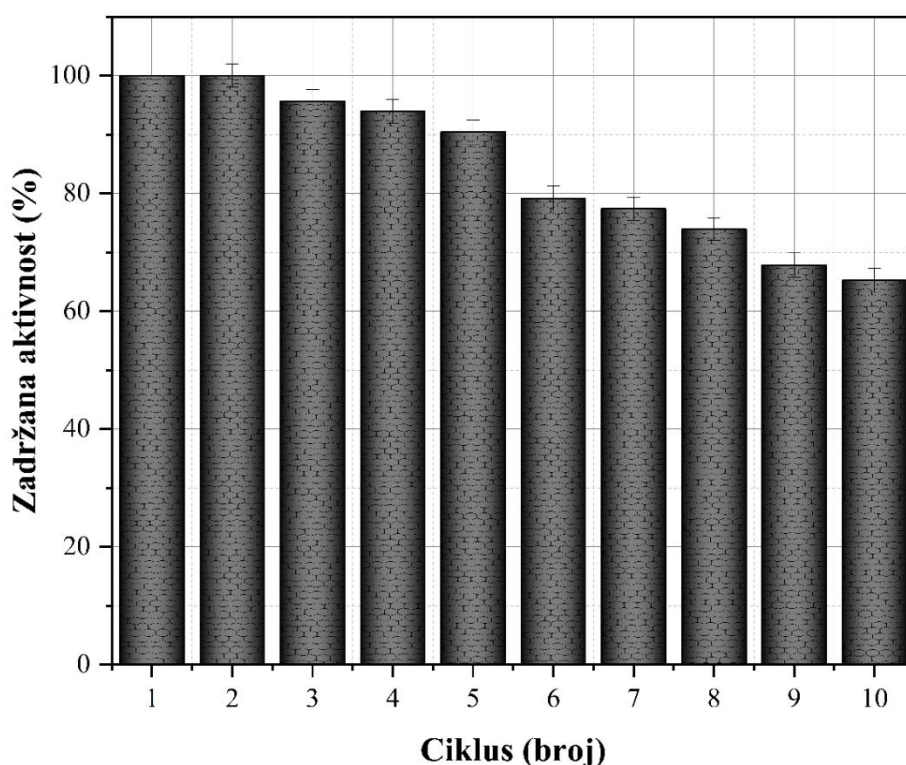
U cilju određivanja optimalne koncentracije enzima za imobilizaciju na zidovima mikroreaktora, koncentracija peroksidaze je varirana u opsegu 0,1–0,5 mg/mL. Rezultati su dati na Slici 56. Sa slike se može videti da kad je korišćena koncentracija enzima od 0,25 mg/mL, aktivnost enzima je 11,3  $\mu\text{mol}/\text{min}$  i povećava se minimalno na 11,7  $\mu\text{mol}/\text{min}$  kad je koncentracija enzima dvostruko veća (0,5 mg/mL). Efikasnost imobilizacije je porasla sa 3,96% na 14,97 % povećanjem koncentracije enzima od 0,25 mg/mL na 0,5 mg/mL. Budući da se sa većom koncentracijom enzima za imobilizaciju neznatno povećava aktivnost imobilisane peroksidaze, usvojena optimalna koncentracija peroksidaze iz sojinih ljuspica je 0,25 mg/L (30 IU/mL).



**Slika 56.** Uticaj koncentracije peroksidaze iz sojinih ljuspica na aktivnost enzima i na efikasnost imobilizacije. (Uslovi: 0,05 % oksidovanog pektina, 108,8 min vreme zadržavanja, temperatura 25 °C)

### 13.7.3. Operativna stabilnost imobilisane peroksidaze iz sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu u reakciji biodegradacije AV109

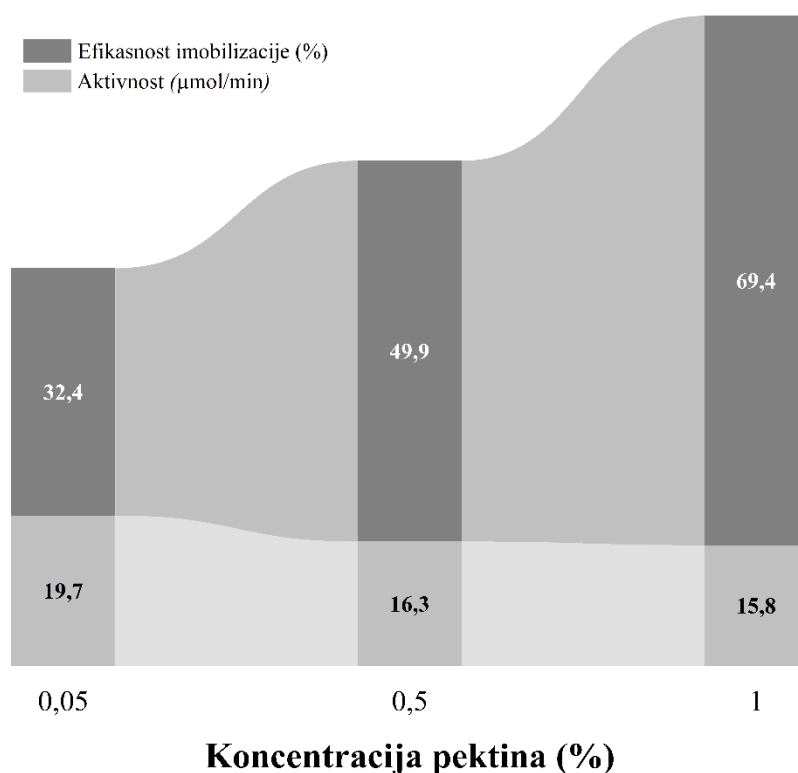
Mogućnost višekratne upotrebe je jedan od razloga zbog kojeg su imobilisani enzimi atraktivni za komercijalnu upotrebu. Na slici 57 je data operativna stabilnost peroksidaze iz sojinih ljuspica imobilisane na zidovima mikroreaktora oksidovanim pektinom. Može se videti da je peroksidaza zadržala 80 % svoje aktivnosti u 6 uzastopnih ciklusa biodegradacije AV109. Nakon desetog ciklusa efikasnost opada na  $65 \pm 2,03$  %. Moguće objašnjenje je da se nakon svakog ciklusa, menja mikrookolina enzima što dodatno utiče na konformaciju enzima i dovodi do smanjenja aktivnosti imobilizata [230]. Kalsum i sar. su imobilisali peroksidazu iz soje u poliakrilamidnom gelu [231]. Imobilisani preparat je korišćen za degradaciju diazo boje gde je efikasnost uklanjanja boje bila 60% nakon šestog ciklusa.



*Slika 57. Operativna stabilnost imobilisane peroksidaze iz sojinih ljuspica u cevnom mikroreaktoru (uslovi: pH 4, koncentracija boje 10 mg/L, aktivnost enzima 11,7  $\mu\text{mol}/\text{min}$ , koncentracija vodonik peroksid: 0,2 mM, temperatura 25°C)*

### 13.8.1. Optimizacija koncentracije umreživača za imobilizaciju peroksidaze iz krompirovih ljuški u kontinualnom sistemu

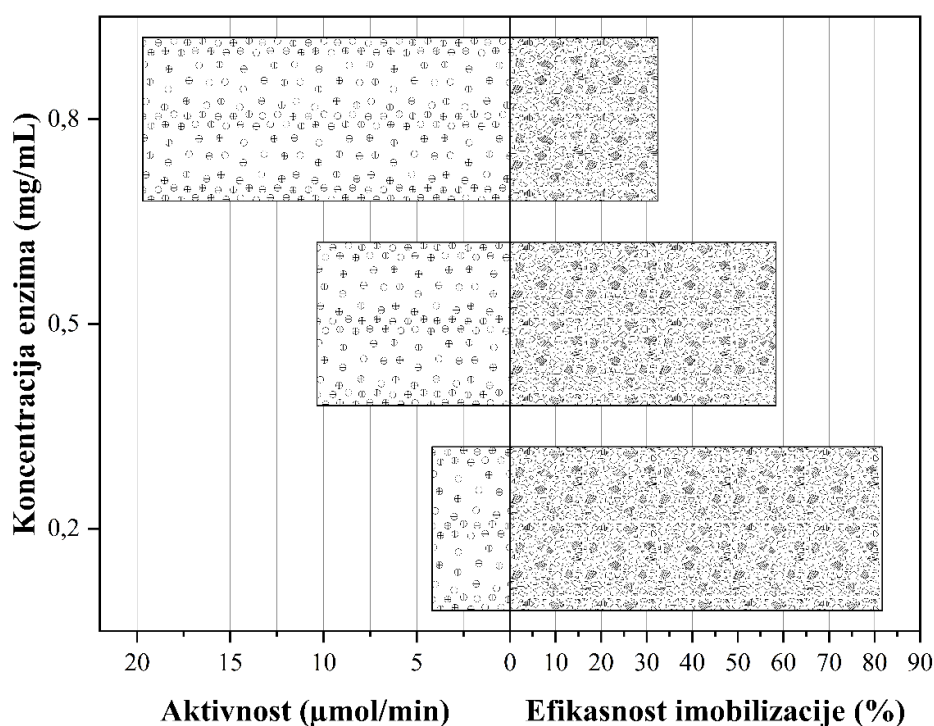
Uticaj koncentracije umreživača na imobilizaciju peroksidaze iz krompirovih ljuški u kontinualnom sistemu je ispitivan variranjem koncentracije oksidovanog pektina u opsegu 0,05–1 %. Rezultati su prikazani na Slici 58. Sa slike se može videti da povećanjem koncentracije oksidovanog pektina raste i efikasnost imobilizacije od 32,44 do 69,40 %. Aktivnost enzima, pak, opada sa 19,7 na 15,8  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . Može se zaključiti da umreživač ima isti uticaj na aktivnosti peroksidaze iz sojinih ljušpica i krompirovih ljuški, sa jednom razlikom što je kod peroksidaze iz krompirovih ljuški efikasnost imobilizacije 2,5 puta veća. Janat i Jang (Jannat i Yang) su ispitivali mogućnost imobilizacije sirove proteaze i katalaze na unutrašnjosti cevnog reaktora [232]. Kao umreživač su koristili dekstran polialdehid, a kao reaktor tajgon cev (Tygon®), što predstavlja polimerni kompozit fleksibilne, biokompatibilne i glatke cevi. Nakon imobilizacije, ispitivali su uticaj umreživača i došli do istog zaključka, da povećanjem koncentracije dekstran polialdehida, dolazi do smanjenje aktivnosti enzima. Moguće objašnjenje je da dolazi do blokiranja aktivnog centra enzima usled velike koncentracije umreživača. Za dalji rad je usvojena je koncentracija oksidovanog pektina od 0,05 %.



**Slika 58.** Uticaj koncentracije oksidovanog pektina na aktivnost peroksidaze iz krompirovih ljuški i na efikasnost imobilizacije. (Uslovi: sirovi ekstrakt peroksidaze 2 IU/mL (0,8 mg/mL), vreme zadržavanja 108,8 min, temperatura 25°C)

### 13.8.2. Optimizacija koncentracije peroksidaze iz krompirovih ljuski potrebne za umrežavanje u kontinualnom sistemu

U cilju određivanja optimalne koncentracije enzima za imobilizaciju na zidovima mikroreaktora, koncentracija peroksidaze je varirana u opsegu 0,2–0,8 mg/mL. Rezultati su dati na Slici 59, gde se može videti da povećanjem koncentracije enzima opada količina vezanih proteina. Sa druge strane, aktivnost enzima raste sa 4,2 na 19,7  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . Kad se uporede obe peroksidaze, iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski, može se videti da za istu koncentraciju enzima od 0,5 mg/mL aktivnost imobilizata je skoro ista: 11,7  $\mu\text{mol}/\text{min}$  za peroksidazu iz sojinih ljuspica i 10,4  $\mu\text{mol}/\text{min}$  za peroksidazu iz krompirovih ljuski. Međutim postoji uočljiva razlika u efikasnost imobilizacije: 14,9% za peroksidazu iz sojinih ljuspica i 58,4% za peroksidazu iz krompirovih ljuski. Veća masa vezanih proteina se može objasniti preko strukture enzima. Umrežavanje nastaje preko slobodne aldehidne grupe oksidovanog pektina i amino-grupa ostataka lizina, pa se može pretpostaviti da je broj ostataka lizina veći kod peroksidaze iz krompirovih ljuski nego kod peroksidaze iz sojinih ljuspica.

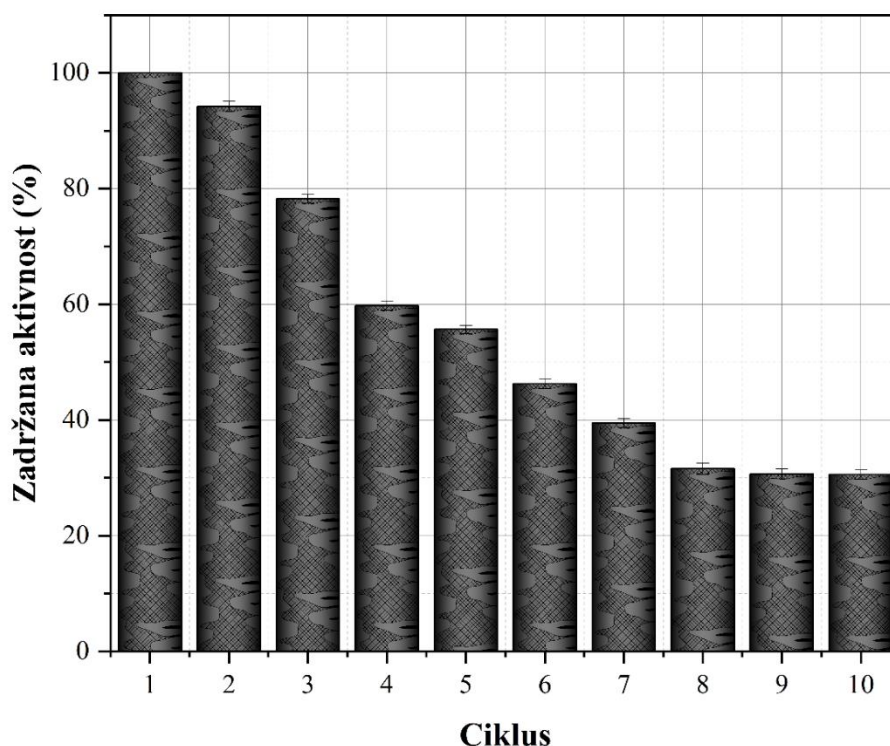


*Slika 59. Uticaj koncentracije peroksidaze iz krompirovih ljuski na aktivnost enzima i na efikasnost imobilizacije. (Uslovi: koncentracija oksidovanog pektina: 0,05 %, vreme zadržavanja: 108,8 min, temperatura: 25°C)*



### 13.8.3. Operativna stabilnost imobilisane peroksidaze iz krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu u reakciji biodegradacije AV109

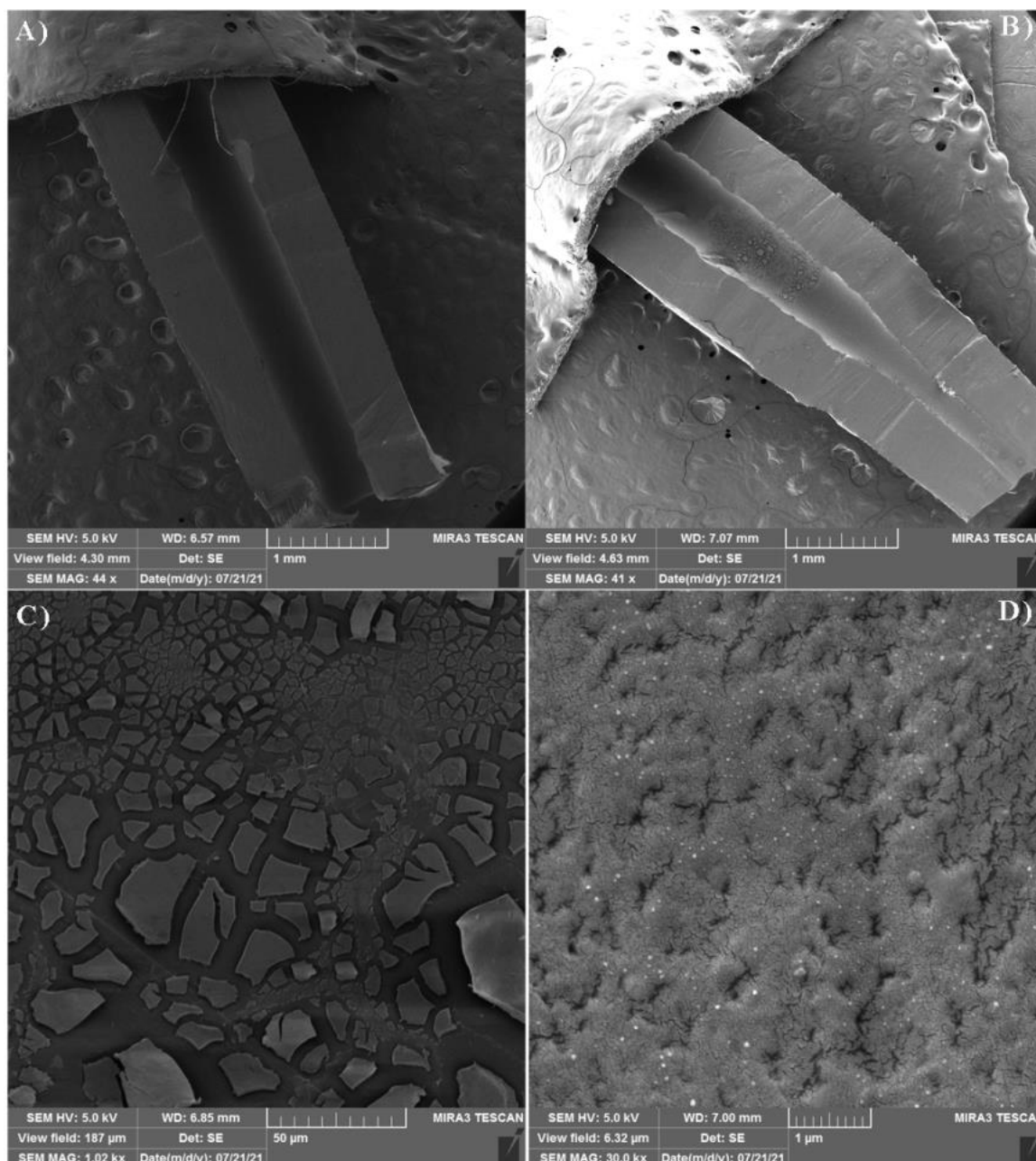
Operativna stabilnost imobilizata je ispitana u 10 uzastopnih ciklusa. Praćenje stabilnosti je vršeno biodegradacijom boje AV109 u cevnom mikoreaktoru na čijim zidovima je imobilisana peroksidaza iz krompirovih ljuski. Nakon svakog ciklusa, ispira se mikoreaktor acetatnim puferom 0,05 M, pH 4. Rezultati su dati na Slici 60. Sa Slike 60 se može videti da je enzim zadržao  $35,56 \pm 0,79$  % svoje aktivnosti nakon 10-og ciklusa. U poređenju sa operativnom stabilnošću peroksidaze iz sojinih ljuspica, gde je imobilizat zadržao  $65,22 \pm 2,03$  % svoje aktivnosti nakon 10-og ciklusa, može se zaključiti da peroksidaza iz sojinih ljuspica ima veći potencijal za višekratnu upotrebu. Pantić i sar. su imobilisali peroksidazu iz rena u tiramin-alginatnim mikroperlama [233]. Osim peroksidaze, dodali su glukozu i glukozu oksidazu za unutrašnje stvaranje vodonik-peroksida. Imobilisani preparat je primenjen za uklanjanje fenola iz vodenog rastvora. Nakon 4 ciklusa peroksidaza iz rena je zadržala više od 60% svoje aktivnosti. Janatova i Jangova imobilisana proteaza u tajgon cevi je zadržala 73% svoje aktivnosti nakon 6 ciklusa, kad su ispitivali enzimsku hidrolizu kazeina [232].



*Slika 60. Operativna stabilnost imobilisane peroksidaze iz krompirovih ljuski u cevnom mikoreaktoru (uslovi: pH 4, koncentracija boje 150 mg/L, aktivnost enzima 11,7  $\mu\text{mol}/\text{min}$ , koncentracija vodonik-peroksida 0,2 mM, temperatura 25°C)*

## 14. Skenirajuća elektronska mikroskopija

U cilju dalje karakterizacije imobilisanog enzima iz otpadnog materijala, izvršeno je snimanje imobilisanog enzimskog preparata skenirajućom elektronskom mikroskopijom (Slika 61). Na slici je prikazana PTFE cev pre i nakon imobilizacije pri različitim uvećanjima. Jasno se vidi da je površina cevi drugačija nakon imobilizacije i da je umrežavanje enzima uspešno. Može se uočiti da je površina cevi pre imobilizacije glatka, bez ikakvih neravnina ili pukotina. Nakon imobilizacije, formiranjem polimerne membrane koja se sastoji iz umreživača i enzima, površina cevi postala je hrapava sa puno agregata nehomogene distribucije. Slični rezultati su dobijeni imobilizacijom pektinaze [234].



*Slika 61. SEM slike PTFE cevi A) pre imobilizacije, 44x uvećanje i imobilisana peroksidaza umrežavanjem oksidovanim pektinom na unutrašnjim zidovima PTFE cevi B) 40x uvećanje, C) 1000x uvećanje i D) 30000x uvećanje*

## 15. Hemijska potrošnja kiseonika

Hemijska potrošnja kiseonika je parametar koji ukazuje na kvalitet ispitivane vode. Za potrebe ove disertacije, ispitana je hemijska potrošnja kiseonika pre i nakon enzimskog tretmana u mikroreaktoru sa peroksidazom iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski.

Vrednost potrošnje kiseonika za uzorak pre enzimskog tretmana peroksidazom iz sojinih ljuspica iznosi 653 mg O<sub>2</sub>/L, a vrednost uzorka nakon tretmana je 92 mg O<sub>2</sub>/L.

Uzorak pre enzimskog tretmana peroksidazom iz krompirovih ljuski je pokazao 1852 mg O<sub>2</sub>/L, a nakon enzimskog tretmana 362 mg O<sub>2</sub>/L.

Dobijene vrednosti ukazuju na poboljšanje kvaliteta vode nakon tretmana i smanjenje potrošnje kiseonika. Enzimska degradacija AV109 se pokazala kao efikasno sredstvo za oksidaciju boja i prečišćavanje obojenih otpadnih voda [235].

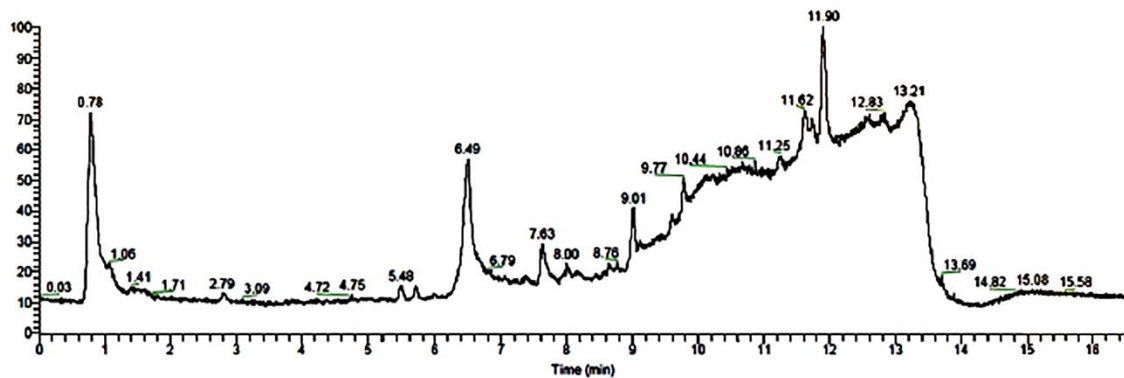
## 16. LC-MS i GC-MS analiza proizvoda biorazgradnje antrahinonske AV109 boje peroksidazom iz krompirovih ljuski i sojinih ljuspica u kontinualnom sistemu

Da je biodegradacija AV109 peroksidazom izolovanom iz otpadnog materijala efikasan i ekološki prihvatljiv način uklanjanja boja iz otpadnih voda, potvrđeno je i LC-MS i GC-MS analizom degradacionih proizvoda. LC-MS analizom utvrđen je mehanizam razgradnje boje AV109. Od masenog sprekttra i m/z vrednosti, pretpostavljena je molarna masa i struktura intermedijera, data u Tabeli 9. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je prisustvo 6 međuproizvoda. Intermedijeri su obeleženi oznakama M1 do M6, a njihovi spektri su dati na Slikama 62-69. Biorazgradnja boje počinje stvaranjem intermedijera (**M1**) *N*-(3((4-amino-9,10-diokso-9,10-dihidroantracen-1-il)amino)-2,4,6-trimetilfenil)propionamid sa m/z 428,83 i r<sub>t</sub>=11,9 min i (**M2**) 2-(butil)-5-hidroksibenzensulfonske kiseline sa r<sub>t</sub>=9,73 min i m/z 254,96. Raskidanjem veze između iminogrupe i C3' u molekulu intermedijera (**M1**) nastaju 1,4-bis(hidroksiamino)antracen-9,10-dion (**M3**), r<sub>t</sub>=9,00, m/z 293,93) i 2,4,6-trimetilanilin (**M4**) (r<sub>t</sub>=5,47 min, m/z 135,85). Daljom razgradnjom intermedijera M3 nastaju intermedijeri (**M5**) benzen-1,2-dikarboksilna kiselina (r<sub>t</sub>=13,29 min, m/z 165,18) i cikloheksa-1,3-dien (**M6**) (r<sub>t</sub>=10,95 i m/z 80,00). Stvaranje benzen-1,2-dikarboksilne kiseline (ftalne kiseline) pri enzimskoj razgradnji boja sa antrahinonskom grupom je u skladu sa dostupnim literaturnim podacima. Sličan rezultat je dobijen nakon identifikacije biorazgradnje Kiselo plavo 129 katalizovane lakazom i biorazgradnje boje Reaktivno plavo 5 katalizovane peroksidazom iz gljive *Thanatephorus cucumeris* Dec 1 [236], [237]. Osim biorazgradnje antrahinonskih boja katalizovanim peroksidazama klase II, ftalna kiselina, odnosno benzen-1,2-dikarboksilna kiselina se pojavljuje i kao proizvod otvaranja antrahinonskog prstena tokom biorazgradnje ovih boja peroksidazama klase III, tačnije ren peroksidaza [154]. Sulfatni jon je identifikovan na retencionom vremenu od 0,75 min sa m/z 218,74, i Br<sup>-</sup> na retencionom vremenu od 0,85 min sa m/z 103,87 i 202,78. Liu i sar. su potvrdili prisustvo proizvoda razgradnje male mase, dok su istraživali degradaciju antrahinonske boje Alizarin crveno pomoću hloroperoksidaze [238]. Potvrdili su i da je dejstvo peroksidaza iz agroindustrijskog otpada dovelo do fragmentacije boje AV109 na nekoliko manjih nusproizvoda. Štaviše, nestanak boje je direktno povezan sa razgradnjom strukture hromofora. U skladu sa identifikovanim proizvodima biorazgradnje boje

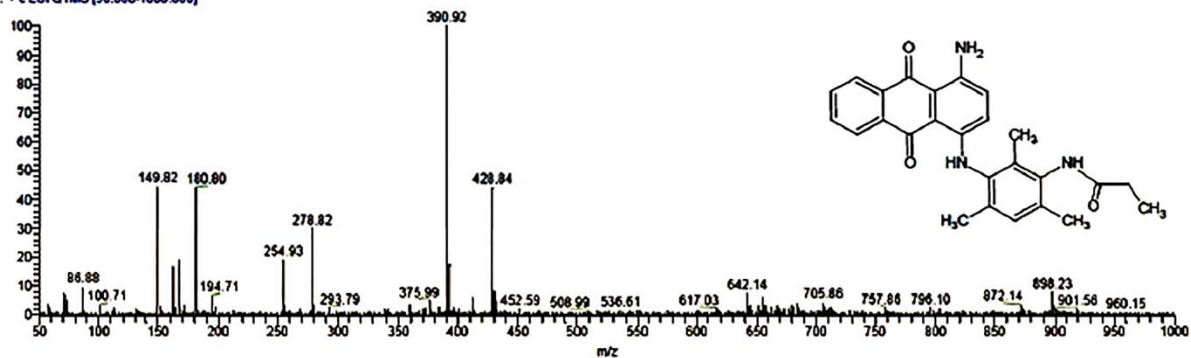
AV109 katalizovane peroksidazama koje potiču iz industrije prerade soje i krompira, put biorazgradnje je dat na Šemi 5.

**Tabela 9.** Intermedijeri biorazgradnje AV109 boje identifikovani LC-MS i GC-MS analizom

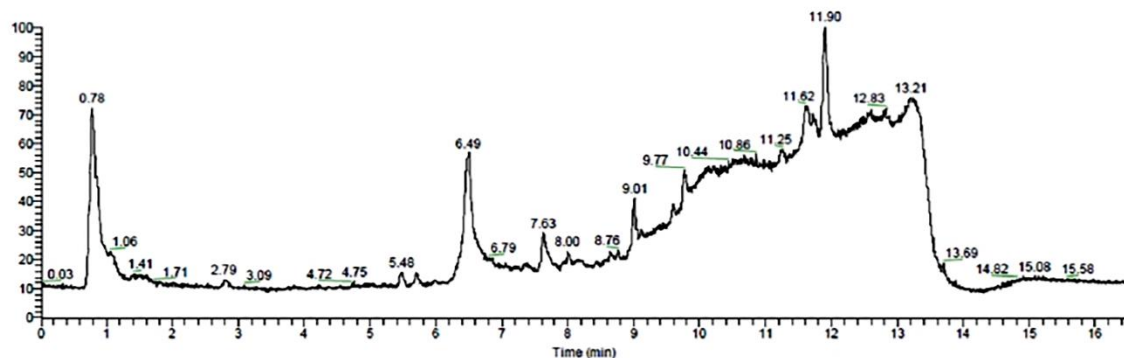
<i>Molekulska formula</i>	<i>m/z</i>	<b>Pretpostavljena struktura</b>
<i>C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (M1)</i>	428,84	
<i>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S (M2)</i>	254,92	
<i>C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M3)</i>	293,93	
<i>C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub> (M4)</i>	135,85	
<i>C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (M5)</i>	165,18	
<i>C<sub>6</sub>H<sub>8</sub> (M6)</i>	80,00	



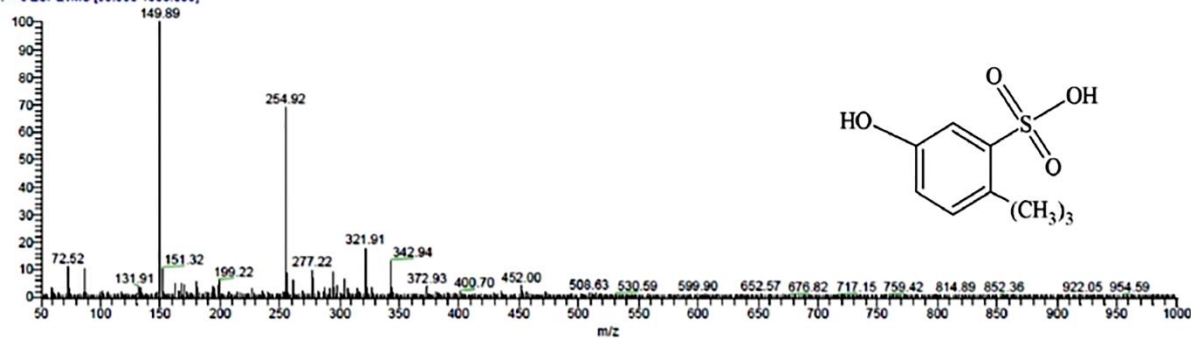
PP15-04-onan-icmms #2349 RT: 11.89 AV: 1 NL: 9.80E7  
T: + c ESI Q1MS [50.000-1000.000]



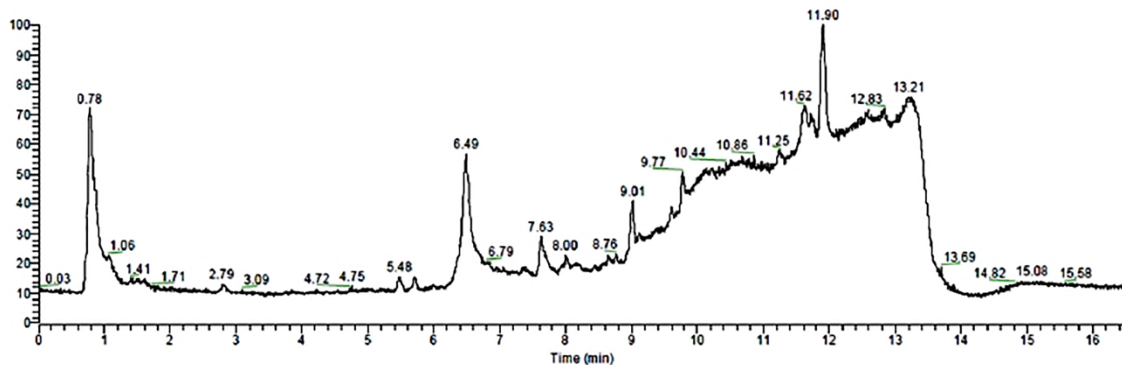
Slika 62. Intermedijer M1 identifikovan LC-MS analizom



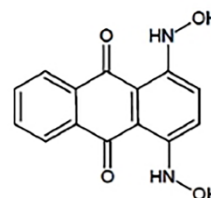
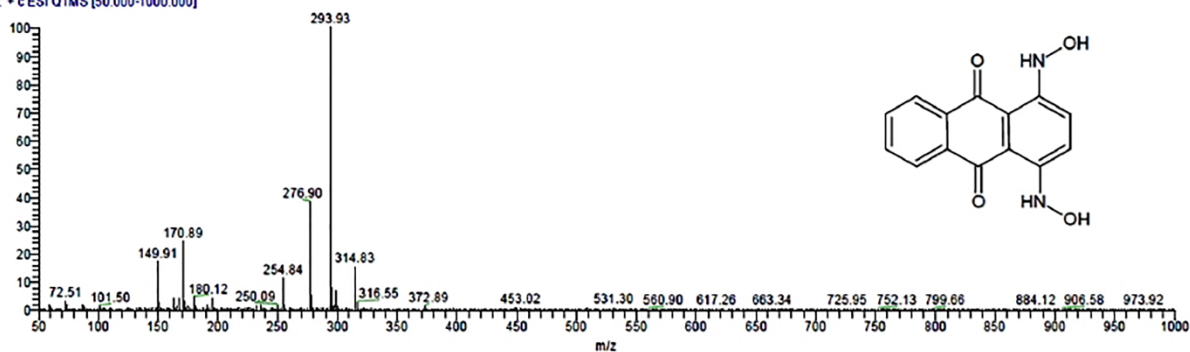
PP15-04-onan-icmms #1922 RT: 9.73 AV: 1 NL: 5.68E7  
T: + c ESI Q1MS [50.000-1000.000]



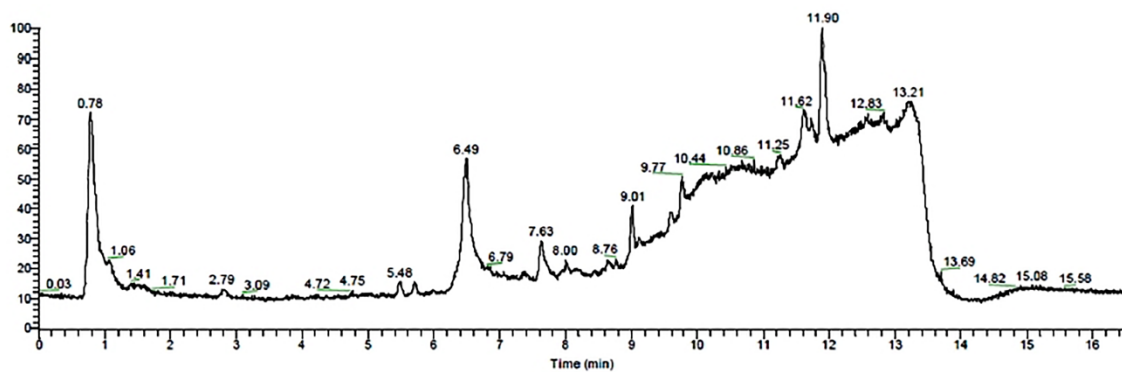
Slika 63. Intermedijer M2 identifikovan LC-MS analizom



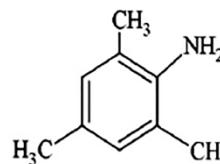
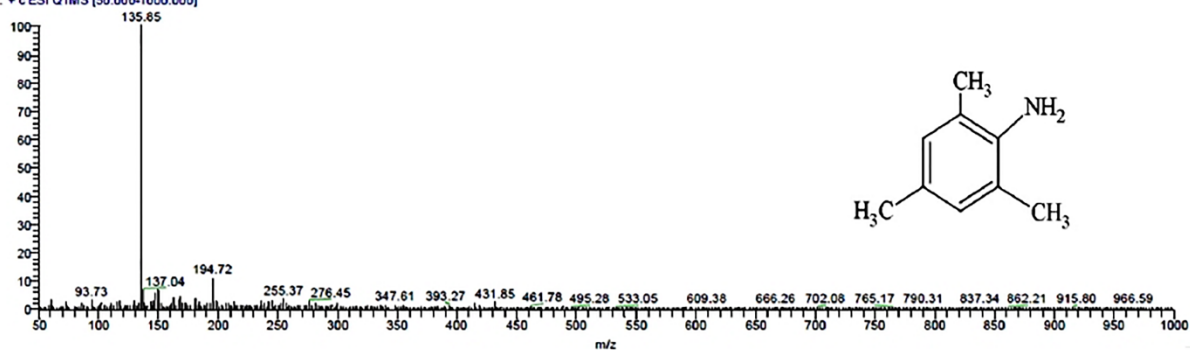
PP15-04-onan-lcmsms#1778 RT: 9.00 AV: 1 NL: 8.28E7  
T: + c ESI Q1MS [50.000-1000.000]



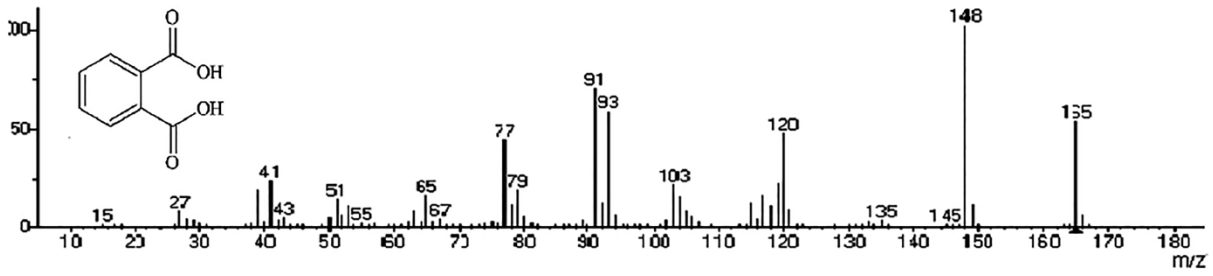
Slika 64. Intermedijer M3 identifikovan LC-MS analizom



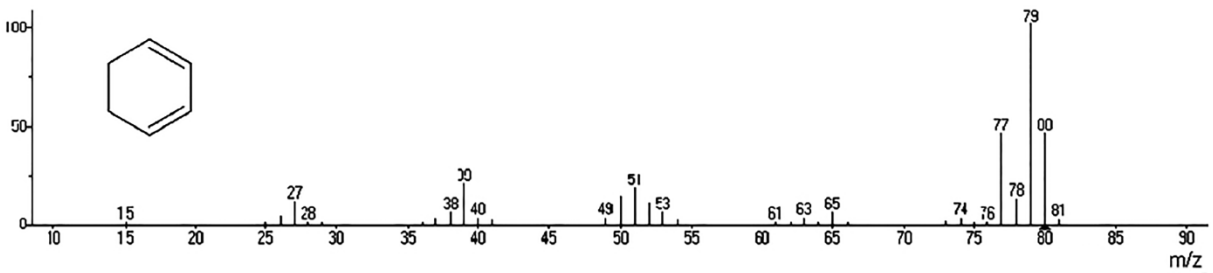
PP15-04-onan-lcmsms#1081 RT: 5.47 AV: 1 NL: 3.05E7  
T: + c ESI Q1MS [50.000-1000.000]



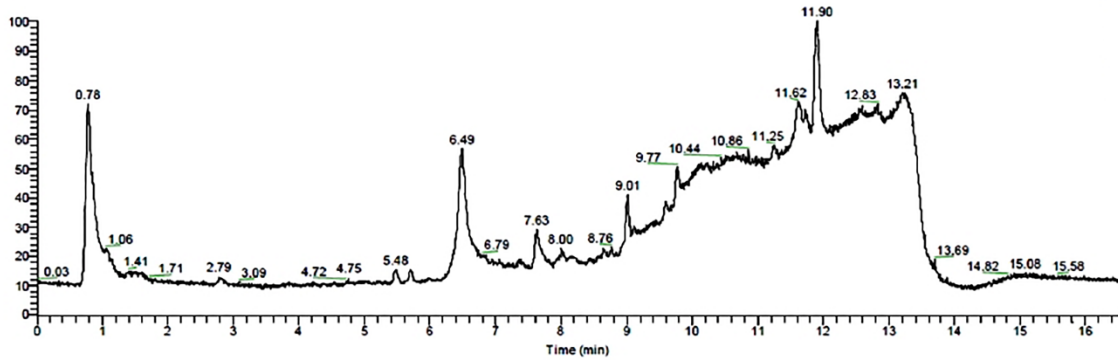
Slika 65. Intermedijer M4 identifikovan LC-MS analizom



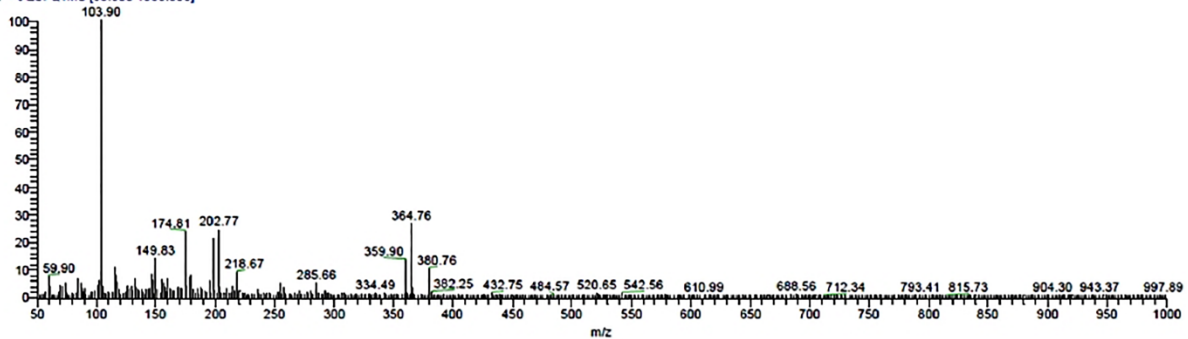
Slika 66. Intermedijer M5 identifikovan GC-MS analizom



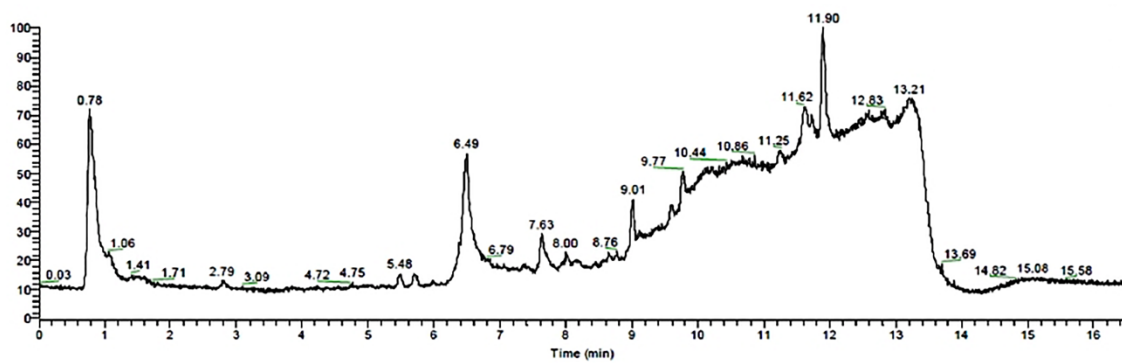
Slika 67. Intermedijer M6 identifikovan GC-MS analizom



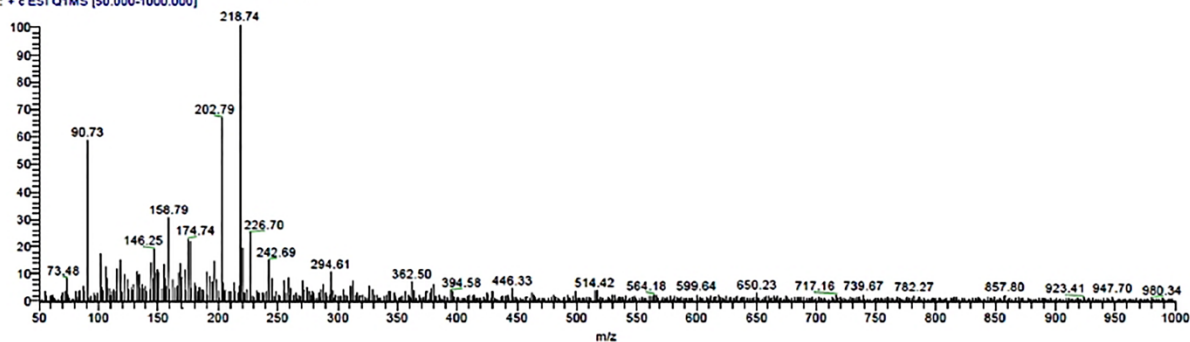
PP15-04-onan-4cmsms#168 RT: 0.85 AV: 1 NL: 5.62E7  
T: + c ESI Q1MS [50.000-1000.000]



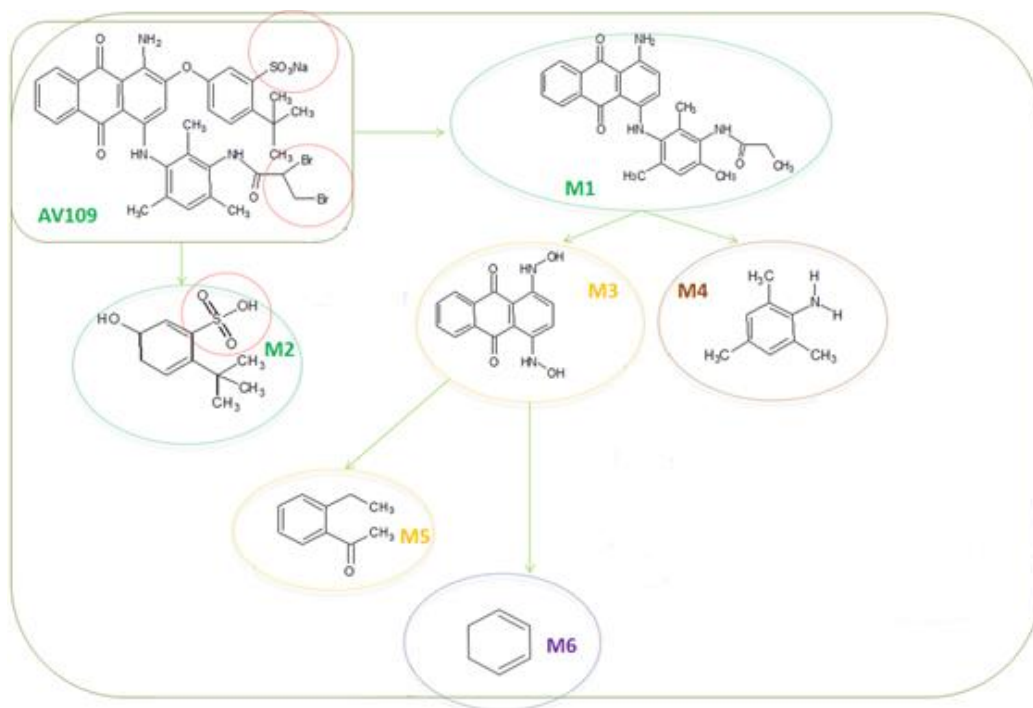
Slika 68.  $Br^-$  jon identifikovan LC-MS analizom



PP15-04-onan-4cmsms#149 RT: 0.75 AV: 1 NL: 2.94E7  
 T: + c ESI Q1MS (50.000-1000.000)



Slika 69.  $SO_4^-$  identifikovan LC-MS analizom



Šema 5. Predloženi put degradacije AV109 peroksidazom



## IV Zaključak

Uspešnost biodegradacije antrahinonske boje peroksidazom izolovanom iz otpadnog materijala u različitim sistemima ukazuje na potencijal ekološki prihvatljivog i ekonomski značajnog procesa za komercijalnu upotrebu. Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

*Peroksidaza iz otpadnog materijala korišćena u reakciji biodegradacije AV109 u šaržnom sistemu kao slobodan enzim*

- Peroksidaze izolovane iz različitog otpadnog materijala – krompirovih ljuski i sojinih ljuspica su uspešno razgradile boju AV109
- Nakon utvrđivanje optimalnih uslova za delovanje peroksidaze iz celog zrna soje: pH 4, vreme kontakta: 30 min, koncentracija enzima: 0,1 IU, koncentracija vodonik-peroksida: 0,1 mM, koncentracija boje: 40 mg/L i temperatura: 38°C, postignuta je razgradnja od  $81,88 \pm 2,18$  % boje AV109 peroksidazom iz celog zrna soje
- Nakon utvrđivanje optimalnih uslova za delovanje peroksidaze iz sojinih ljuspica: pH 4, vreme kontakta: 30 min, koncentracija enzima: 1 IU, koncentracija vodonik-peroksida: 0,01 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koncentracija boje: 10 mg/L boje pH 4, i temperatura: 38°C, postignuta je razgradnja od  $72,78 \pm 3,13$  % AV109 peroksidazom iz sojinih ljuspica
- Nakon utvrđivanje optimalnih uslova za delovanje peroksidaze iz krompirovih ljuski: pH 4, vreme kontakta: 50 min, koncentracija enzima: 0,6 IU enzima, koncentracija vodonik-peroksida: 0,01 mM, koncentracija boje: 40 mg/L i temperatura: 50°C, postignuta je razgradnja od  $66,12 \pm 2,51$  % AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski
- Pomoću Ping Pong Bi-Bi modelom ispitani su inhibitorni uticaji boje i vodonik-peroksida na peroksidaze iz celog zna soje, krompirovih ljuski i sojinih ljuspica
- Na osnovu dobijenih vrednosti kinetičkih konstanti utvrđeno je da boja ima inhibitorni uticaj na sve tri peroksidaze, dok je uticaj inhibicije vodonik-peroksida manje izražen

*Peroksidaza iz otpadnog materijala korišćena u reakciji biodegradacije AV109 u obliku umreženih enzimskih agregata u šaržnom sistemu*

- Imobilizacija peroksidaze iz sojinih ljuspica i krompirovih ljuski u obliku umreženih enzimskih agregata je uspešno izvršena
- Kao umreživač, korišćen je oksidovani pektin koji je bezbedan za okolinu
- Amonijum-sulfat se pokazao kao najbolje sredstvo za taloženje
- Koncentracija oksidovanog pektina od 0,5% je optimalna za umrežavanje peroksidaze iz sojinih ljuspica

- Dobijeni umreženi agregati peroksidaze iz sojinih ljuspica uspešno su razgradili  $85,71 \pm 1,45$  % boje, pod optimalnim uslovima: pH 3, imobilizata 0,4 IU, koncentracija vodonik-peroksida 0,2 mM, koncentracija boje 10 mg/L
- Ispitana je operativna stabilnost imobilisane peroksidaze iz sojinih ljuspica. Nakon 4-og ciklusa zadržana aktivnost je iznosila  $31,57 \pm 1,79$  %
- Za umrežavanje peroksidaze iz krompirovih ljuski korišćena je koncentracija pektina od 0,1%
- Optimalni uslovi razgradnje AV109 peroksidazom iz krompirovih ljuski u obliku umreženih enzimskih agregata su: pH 3, 0,8 IU imobilizata, 0,4 mM vodonik-peroksida, 10 mg/L boje. Postignuti stepen razgradnje je iznosio  $82,2 \pm 1,65$  %
- Ispitana je operativna stabilnost imobilisane peroksidaze iz krompirovih ljuski. Nakon trećeg ciklusa zadržana aktivnost je iznosila  $19,66 \pm 1,64$  %

*Peroksidaza iz otpadnog materijala korišćena u reakciji biodegradacije AV109 u kontinualnom sistemu kao slobodan enzim*

- Upotreba peroksidaze iz otpadnog materijala u cevnom PTFE mikroreaktoru za biodegradaciju antrahinonske je pokazala poboljšane performanse u odnosu na šaržni sistem.
- Primenom koncentracijskih protoka: 0,2 IU/mL peroksidaze iz sojinih ljuspica, 0,2 mM vodonik-peroksida, 10 mg/L boje, pH 4, vreme zadržavanja 3 min, prečnik mikroreaktora 0,5 mm i dužina mikroreaktora 6 m, uspešno je razgrađeno  $95,48 \pm 0,41$  % AV109.
- Pomoću peroksidaze iz krompirovih ljuski postignuta je biodegradacija od  $76,95 \pm 1,64$  % u mikroreaktoru, pod optimalnim uslovima: pH 4, koncentracija peroksidaze 0,8 IU/mL, koncentracija vodonik-peroksida 1 mM, koncentracija boje 150 mg/L, vreme zadržavanja 3 min, prečnik mikroreaktora 0,5 mm i dužina mikroreaktora 6 m.

*Umrežena peroksidaza iz otpadnog materijala korišćena u reakciji biodegradacije AV109 u kontinualnom sistemu*

- Izvršena je imobilizacija peroksidaze iz krompirovih ljuski i sojinih ljuspica umrežavanjem na unutrašnjim zidovima cevnog mikroreaktora pomoću oksidovanog pektina.
- Imobilizacija je potvrđena SEM analizom
- Za imobilizaciju peroksidaze iz sojinih ljuspica u cevnom mikroreaktoru korišćena je koncentracija pektina od 0,05%
- Optimalna koncentracija peroksidaze iz sojinih ljuspica je 30 IU/mL
- Ispitivanjem operativne stabilnosti umrežene peroksidaze iz sojinih ljuspica u mikroreaktoru, utvrđeno je da peroksidaza iz sojinih ljuspica zadržala  $65,22 \pm 2,03$  % svoje aktivnosti nakon 10 ciklusa
- Za imobilizaciju peroksidaze iz krompirovih ljuski na unutrašnjim zidovima mikroreaktora korišćena je koncentracija pektina od 0,05%

- Koncentracija peroksidaze iz krompirovih ljuski od 2 IU/mL se pokazala kao optimalna
- Nakon 10 ciklusa upotrebe za biorazgradnju boje AV109, umrežene peroksidaze iz krompirovih ljuski u mikroreaktoru, enzim je zadržao  $35,56 \pm 0,79$  % od svoje početne aktivnosti

#### *Proizvodi degradacije*

- LC/MS-GC metodom je izvršena analiza proizvoda razgradnje. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je prisustvo 6 međuproizvoda.

#### *Hemijska potrošnja kiseonika*

- HPK analizom utvrđeno je smanjenje vrednosti potrošnje kiseonika 80,4 % u reakciji sa peroksidazom iz krompirovih ljuski u kontinualnom sistemu, i 85,9 % u reakciji sa peroksidazom iz sojinih ljuspica. Ovo ukazuje da biodegradacijom ne dolazi do stvaranja sekundarnih zagađujućih jedinjenja koja su toksičnija od same boje.

## V LITERATURA

- [1] A. Desore and S. A. Narula, “An overview on corporate response towards sustainability issues in textile industry,” *Environment, Development and Sustainability*, vol. 20, no. 4, pp. 1439–1459, 2018, doi: 10.1007/s10668-017-9949-1.
- [2] S. C. Bhatia, *Pollution Control in Textile Industry*, 1st ed. WPI Publishing, 2017. doi: 10.1201/9781315148588.
- [3] D. M. Wang, “Environmental protection in clothing industry,” in *Sustainable Development*, WORLD SCIENTIFIC, 2015, pp. 729–735. doi: doi:10.1142/9789814749916\_0076.
- [4] F. Orts, A. I. del Río, J. Molina, J. Bonastre, and F. Cases, “Electrochemical treatment of real textile wastewater: Trichromy Procion HEXL®,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 808, pp. 387–394, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.06.051>.
- [5] C. J. Ogugbue and T. Sawidis, “Bioremediation and Detoxification of Synthetic Wastewater Containing Triarylmethane Dyes by *Aeromonas hydrophila* Isolated from Industrial Effluent.,” *Biotechnology research international*, vol. 2011, p. 967925, 2011, doi: 10.4061/2011/967925.
- [6] S. Rodríguez Couto, “Dye removal by immobilised fungi.,” *Biotechnology advances*, vol. 27, no. 3, pp. 227–235, 2009, doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.12.001.
- [7] M. M. Hassan and C. M. Carr, “A critical review on recent advancements of the removal of reactive dyes from dyehouse effluent by ion-exchange adsorbents,” *Chemosphere*, vol. 209, pp. 201–219, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.043>.
- [8] M. Mishra, G., & Tripathy, “A critical review of the treatments for decolourization of textile effluent,” *Colourage*, vol. 40, no. 10, pp. 35–38, 1993.
- [9] C. C. I. Guaratini and M. V. B. Zanoni, “Corantes tÃ\textordfemeninexteis,” *QuÃ\mica Nova*, vol. 23, pp. 71–78, 2000, [Online]. Available: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422000000100013&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422000000100013&nrm=iso)
- [10] N. S. P. R. Sajjala Sreedhar Reddy, Bijjam Kotaiah, “Color pollution control in textile dyeing industry effluents using tannery sludge derived activated carbon,” *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, vol. 22, no. 3, pp. 369–378, 2008, doi: 10.4314/bcse.v22i3.61211.
- [11] M. A. , Hubbe, K. R. , Beck, W. G. , O’Neal, and Y. C. Sharma, “Cellulosic substrates for removal of pollutants from aqueous systems: A review. 2. Dyes,” *BioResources*, vol. 7, no. 2, pp. 2592–2687, 2012.
- [12] H. Langhals, “Color Chemistry. Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments. 3rd revised edition. By Heinrich Zollinger.,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 43, no. 40, pp. 5291–5292, Oct. 2004, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.200385122>.

- [13] S. B. Moore and L. W. Ausley, "Systems thinking and green chemistry in the textile industry: concepts, technologies and benefits," *Journal of Cleaner Production*, vol. 12, no. 6, pp. 585–601, 2004, doi: [https://doi.org/10.1016/S0959-6526\(03\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S0959-6526(03)00058-1).
- [14] K. Hunger and Wiley-VCH., *Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications*. Wiley-VCH, 2007. [Online]. Available: <https://books.google.rs/books?id=tSz7jwEACAAJ>
- [15] R. Christie, *Colour Chemistry*. The Royal Society of Chemistry, 2001. doi: 10.1039/9781847550590.
- [16] L. Hossain, S. K. Sarker, and M. S. Khan, "Evaluation of present and future wastewater impacts of textile dyeing industries in Bangladesh," *Environmental Development*, vol. 26, pp. 23–33, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2018.03.005>.
- [17] P. A. Carneiro, M. E. Osugi, J. J. Sene, Marc. A. Anderson, and M. V. B. Zanoni, "Evaluation of color removal and degradation of a reactive textile azo dye on nanoporous TiO<sub>2</sub> thin-film electrodes," *Electrochimica Acta*, vol. 49, no. 22, pp. 3807–3820, 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2003.12.057>.
- [18] L. Hossain and M. S. Khan, "Water Footprint Management for Sustainable Growth in the Bangladesh Apparel Sector," *Water*, vol. 12, no. 10, 2020, doi: 10.3390/w12102760.
- [19] G. McMullan *et al.*, "Microbial decolourisation and degradation of textile dyes.," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 56, no. 1–2, pp. 81–87, Jul. 2001, doi: 10.1007/s002530000587.
- [20] T. Shiozawa *et al.*, "Mutagenic activity of 2-phenylbenzotriazole derivatives related to a mutagen, PBTA-1, in river water.," *Mutation research*, vol. 442, no. 2, pp. 105–111, Jun. 1999, doi: 10.1016/s1383-5718(99)00069-8.
- [21] Z. Carmen, "Textile Organic Dyes – Characteristics, Polluting Effects and Separation/Elimination Procedures from Industrial Effluents – A Critical Overview," S. D. E.-T. P. E.-A. Mostrag-Szlichtyng, Ed. Rijeka: IntechOpen, 2012, p. Ch. 3. doi: 10.5772/32373.
- [22] K. A. Doble M, *Biotreatment of Industrial Effluents*, vol. 51, no. 2. 2005. doi: <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2007.01.012>.
- [23] K. Y. Foo and B. H. Hameed, "Decontamination of textile wastewater via TiO<sub>2</sub>/activated carbon composite materials.," *Advances in colloid and interface science*, vol. 159, no. 2, pp. 130–143, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.cis.2010.06.002.
- [24] K. G. Steinhäuser and S. Richter, "Assessment and Management of Chemicals – How Should Persistent Polar Pollutants be Regulated?," *Organic Pollutants in the Water Cycle*. pp. 311–339, Jul. 06, 2006. doi: <https://doi.org/10.1002/352760877X.ch12>.
- [25] A. Gürses, M. Açıkyıldız, K. Güneş, and M. S. Gürses, "Classification of Dye and Pigments," in *Dye and Pigments*, 2016, pp. 31–45. doi: 10.1007/978-3-319-33892-7\_3.
- [26] D. H. B. Michael J. Swain, "Color Indexing," *International Journal of Computer Vision*, vol. 7, no. 32, 1991.
- [27] N. Sekar, "15 - Acid dyes," in *Woodhead Publishing Series in Textiles*, vol. 1, M. B. T.-H. of T. and I. D. Clark, Ed. Woodhead Publishing, 2011, pp. 486–514. doi: <https://doi.org/10.1533/9780857093974.2.486>.

- [28] Jayalekshmi S J, Minnu Biju, Jithin Somarajan, P E Muhammad Ajas, and Dona Sunny, "Wastewater Treatment Technologies: A Review," vol. 9, no. 9, pp. 8–12, 2021.
- [29] V. Jegatheesan, B. K. Pramanik, J. Chen, D. Navaratna, C.-Y. Chang, and L. Shu, "Treatment of textile wastewater with membrane bioreactor: A critical review," *Bioresource Technology*, vol. 204, pp. 202–212, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.006>.
- [30] F. R. P. Sales, R. B. G. Serra, G. J. A. de FigueirÃ\textordfemeninedo, P. H. A. da Hora, and A. C. de Sousa, "Wastewater treatment using adsorption process in column for agricultural purposes," *Revista Ambiente & Água*, vol. 14, 2019, [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1980-993X2019000100307&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1980-993X2019000100307&nrm=iso)
- [31] E. Routoula and S. v Patwardhan, "Degradation of Anthraquinone Dyes from Effluents: A Review Focusing on Enzymatic Dye Degradation with Industrial Potential," *Environmental Science & Technology*, vol. 54, no. 2, pp. 647–664, Jan. 2020, doi: 10.1021/acs.est.9b03737.
- [32] M. Qiu and C. Huang, "Removal of dyes from aqueous solution by activated carbon from sewage sludge of the municipal wastewater treatment plant," *Desalination and Water Treatment*, vol. 53, no. 13, pp. 3641–3648, Mar. 2015, doi: 10.1080/19443994.2013.873351.
- [33] P. K. Malik, "Dye removal from wastewater using activated carbon developed from sawdust: adsorption equilibrium and kinetics," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 113, no. 1, pp. 81–88, 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.05.022>.
- [34] W. T. Tsai, C. Y. Chang, M. C. Lin, S. F. Chien, H. F. Sun, and M. F. Hsieh, "Characterization of activated carbons prepared from sugarcane bagasse by ZnCl<sub>2</sub> activation," *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 36, no. 3, pp. 365–378, Apr. 2001, doi: 10.1081/PFC-100103576.
- [35] J. C. Moreno-Piraján, V. S. Garcia-Cuello, and L. Giraldo, "The removal and kinetic study of Mn, Fe, Ni and Cu ions from wastewater onto activated carbon from coconut shells," *Adsorption*, vol. 17, no. 3, pp. 505–514, 2011, doi: 10.1007/s10450-010-9311-5.
- [36] M. A. Ahmad and N. K. Rahman, "Equilibrium, kinetics and thermodynamic of Remazol Brilliant Orange 3R dye adsorption on coffee husk-based activated carbon," *Chemical Engineering Journal*, vol. 170, no. 1, pp. 154–161, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.03.045>.
- [37] S. Abuzerr, M. Darwish, and A. H. Mahvi, "Simultaneous removal of cationic methylene blue and anionic reactive red 198 dyes using magnetic activated carbon nanoparticles: equilibrium, and kinetics analysis.," *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, vol. 2017, no. 2, pp. 534–545, May 2018, doi: 10.2166/wst.2018.145.
- [38] T. Robinson, G. McMullan, R. Marchant, and P. Nigam, "Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative," *Bioresource Technology*, vol. 77, no. 3, pp. 247–255, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00080-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00080-8).
- [39] N. Cherkasov, M. 'moun Al-Rawashdeh, A. O. Ibhaddon, and E. v Rebrov, "Scale up study of capillary microreactors in solvent-free semihydrogenation of 2-methyl-3-butyn-2-ol," *Catalysis Today*, vol. 273, pp. 205–212, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2016.03.028>.

- [40] M. R. Abukhadra and A. S. Mohamed, “Adsorption Removal of Safranin Dye Contaminants from Water Using Various Types of Natural Zeolite,” *Silicon*, vol. 11, no. 3, pp. 1635–1647, 2019, doi: 10.1007/s12633-018-9980-3.
- [41] M. R. Gadekar and M. M. Ahammed, “Coagulation/flocculation process for dye removal using water treatment residuals: modelling through artificial neural networks,” *Desalination and Water Treatment*, vol. 57, no. 55, pp. 26392–26400, Nov. 2016, doi: 10.1080/19443994.2016.1165150.
- [42] S. A. Ishak, M. F. Murshed, H. Md Akil, N. Ismail, S. Z. Md Rasib, and A. A. S. Al-Gheethi, “The Application of Modified Natural Polymers in Toxicant Dye Compounds Wastewater: A Review,” *Water*, vol. 12, no. 7, 2020, doi: 10.3390/w12072032.
- [43] A. P. Periyasamy, S. K. Ramamoorthy, S. Rwawiire, and Y. Zhao, “Sustainable Wastewater Treatment Methods for Textile Industry,” in *Sustainable Innovations in Apparel production. Textile Science and Clothing Technology*, M. S., Ed. Singapore: Springer, 2018, pp. 21–87. doi: 10.1007/978-981-10-8591-8\_2.
- [44] M. Ayala, R. Roman, and R. Vazquez-Duhalt, “A catalytic approach to estimate the redox potential of heme-peroxidases,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 357, no. 3, pp. 804–808, 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.020>.
- [45] R. Vasquez-Medrano, D. Prato-Garcia, and M. Vedrenne, “Chapter 4 - Ferrioxalate-Mediated Processes,” S. C. Ameta and R. B. T.-A. O. P. for W. W. T. Ameta, Eds. Academic Press, 2018, pp. 89–113. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810499-6.00004-8>.
- [46] E. Neyens and J. Baeyens, “A review of classic Fenton’s peroxidation as an advanced oxidation technique.,” *Journal of hazardous materials*, vol. 98, no. 1–3, pp. 33–50, Mar. 2003, doi: 10.1016/s0304-3894(02)00282-0.
- [47] N. Thomas, D. D. Dionysiou, and S. C. Pillai, “Heterogeneous Fenton catalysts: A review of recent advances,” *Journal of hazardous materials*, vol. 404, no. Pt B, p. 124082, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124082.
- [48] A. C. Affam, M. Chaudhuri, S. R. M. Kutty, and K. Muda, “UV Fenton and sequencing batch reactor treatment of chlorpyrifos, cypermethrin and chlorothalonil pesticide wastewater,” *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 93, pp. 195–201, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.06.002>.
- [49] C. v Rekhate and J. K. Srivastava, “Recent advances in ozone-based advanced oxidation processes for treatment of wastewater- A review,” *Chemical Engineering Journal Advances*, vol. 3, p. 100031, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceja.2020.100031>.
- [50] V. Golob and A. Ojstršek, “Removal of vat and disperse dyes from residual pad liquors,” *Dyes and Pigments*, vol. 64, no. 1, pp. 57–61, 2005, doi: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2004.04.006>.
- [51] S. H. Lin and M. L. Chen, “Treatment of textile wastewater by chemical methods for reuse,” *Water Research*, vol. 31, no. 4, pp. 868–876, 1997, doi: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00318-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00318-1).
- [52] W. T. Mook, M. K. Aroua, and G. Issabayeva, “Prospective applications of renewable energy based electrochemical systems in wastewater treatment: A review,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 38, pp. 36–46, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.042>.

- [53] F. Ghanbari and M. Moradi, "A comparative study of electrocoagulation, electrochemical Fenton, electro-Fenton and peroxi-coagulation for decolorization of real textile wastewater: Electrical energy consumption and biodegradability improvement," *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 3, no. 1, pp. 499–506, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.12.018>.
- [54] B. Neppolian, M. Ashokkumar, I. Tudela, and J. González-García, "Hybrid sonochemical treatment of contaminated wastewater," in *Sonophotochemical and sonoelectrochemical approaches. Part I: Description of the techniques*, vol. 9789400742, Springer Netherlands, 2014, pp. 267-302 BT-Advances in Water Treatment and Poll. doi: 10.1007/978-94-007-4204-8\_10.
- [55] R. Zhuo *et al.*, "Decolorization of different dyes by a newly isolated white-rot fungi strain *Ganoderma sp.En3* and cloning and functional analysis of its laccase gene," *Journal of hazardous materials*, vol. 192, no. 2, p. 855—873, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.05.106.
- [56] K.-S. Shin, "The role of enzymes produced by white-rot fungus *Irpex lacteus* in the decolorization of the textile industry effluent.," *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, vol. 42, no. 1, pp. 37–41, Mar. 2004.
- [57] P. F. F. Amaral *et al.*, "Decolorization of Dyes from textile wastewater by *Trametes versicolor*," *Environmental Technology*, vol. 25, no. 11, pp. 1313–1320, Nov. 2004, doi: 10.1080/09593332508618376.
- [58] M. M. Assadi and M. R. Jahangiri, "Textile wastewater treatment by *Aspergillus niger*," *Desalination*, vol. 141, no. 1, pp. 1–6, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(01\)00383-6](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(01)00383-6).
- [59] C. Karigar, A. Mahesh, M. Nagenahalli, and D. J. Yun, "Phenol Degradation by Immobilized Cells of *Arthrobacter citreus*," *Biodegradation*, vol. 17, no. 1, pp. 47–55, 2006, doi: 10.1007/s10532-005-3048-y.
- [60] L. Valentin, L.-C. TA, C. Lopez, G. Feijoo, M. MT, and L. JM, "Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the white-rot fungus *Bjerkandera sp BOS55*," *Process Biochemistry*, vol. 42, no. 4, pp. 641–648, 2007, doi: 10.1016/j.procbio.2006.11.011.
- [61] A. A. Telke, S. M. Joshi, S. U. Jadhav, D. P. Tamboli, and S. P. Govindwar, "Decolorization and detoxification of Congo red and textile industry effluent by an isolated bacterium *Pseudomonas sp. SU-EBT*," *Biodegradation*, vol. 21, no. 2, pp. 283–296, 2010, doi: 10.1007/s10532-009-9300-0.
- [62] V. v Dawkar, U. U. Jadhav, S. U. Jadhav, and S. P. Govindwar, "Biodegradation of disperse textile dye Brown 3REL by newly isolated *Bacillus sp. VUS.*," *Journal of applied microbiology*, vol. 105, no. 1, pp. 14–24, Jul. 2008, doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03738.x.
- [63] Q. Yang, C. Li, H. Li, Y. Li, and N. Yu, "Degradation of synthetic reactive azo dyes and treatment of textile wastewater by a fungi consortium reactor," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 43, no. 3, pp. 225–230, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.002>.
- [64] G. Palmieri, G. Cennamo, and G. Sannia, "Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 36, no. 1, pp. 17–24, 2005, doi: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.026>.



- [65] M. Cerboneschi, M. Corsi, R. Bianchini, M. Bonanni, and S. Tegli, “Decolorization of acid and basic dyes: understanding the metabolic degradation and cell-induced adsorption/precipitation by *Escherichia coli*,” *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 99, no. 19, pp. 8235–8245, Oct. 2015, doi: 10.1007/s00253-015-6648-4.
- [66] N. Parmar and S. R. Shukla, “Microbial Decolorization of Reactive Dye Solutions,” *CLEAN – Soil, Air, Water*, vol. 43, no. 10, pp. 1426–1432, Oct. 2015, doi: <https://doi.org/10.1002/clen.201400441>.
- [67] D. Deng, J. Guo, G. Zeng, and G. Sun, “Decolorization of anthraquinone, triphenylmethane and azo dyes by a new isolated *Bacillus cereus* strain DC11,” *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 62, no. 3, pp. 263–269, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.01.017>.
- [68] M. Susla, C. Novotný, and K. Svobodová, “The implication of *Dichomitus squalens* laccase isoenzymes in dye decolorization by immobilized fungal cultures,” *Bioresource technology*, vol. 98, no. 11, pp. 2109–2115, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.biortech.2006.08.007.
- [69] X. H. Xie *et al.*, “High-efficient biodegradation of refractory dye by a new bacterial flora DDMY1 under different conditions,” *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 17, no. 3, pp. 1491–1502, 2020, doi: 10.1007/s13762-019-02582-2.
- [70] L. Gianfreda and M. A. Rao, “Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 35, no. 4, pp. 339–354, 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.05.006>.
- [71] M. R. da Silva, L. R. V. de Sá, C. Russo, E. Scio, and V. S. Ferreira-Leitão, “The Use of HRP in Decolorization of Reactive Dyes and Toxicological Evaluation of Their Products,” *Enzyme research*, vol. 2010, p. 703824, Jan. 2011, doi: 10.4061/2010/703824.
- [72] L. Flohé and F. Ursini, “Peroxidase: a term of many meanings,” *Antioxidants & redox signaling*, vol. 10, no. 9. United States, pp. 1485–1490, Sep. 2008. doi: 10.1089/ars.2008.2059.
- [73] A. Fleischmann *et al.*, “IntEnz, the integrated relational enzyme database,” *Nucleic acids research*, vol. 32, no. Database issue, pp. D434-7, Jan. 2004, doi: 10.1093/nar/gkh119.
- [74] V. P. Pandey, M. Awasthi, S. Singh, S. Tiwari, and U. N. Dwivedi, “A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases,” *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, vol. 06, no. 01, 2017, doi: 10.4172/2161-1009.1000308.
- [75] A. Brenot, K. Y. King, B. Janowiak, O. Griffith, and M. G. Caparon, “Contribution of glutathione peroxidase to the virulence of *Streptococcus pyogenes*,” *Infection and immunity*, vol. 72, no. 1, pp. 408–413, Jan. 2004, doi: 10.1128/iai.72.1.408-413.2004.
- [76] M. Bernroitner, M. Zamocky, P. G. Furtmüller, G. A. Peschek, and C. Obinger, “Occurrence, phylogeny, structure, and function of catalases and peroxidases in cyanobacteria,” *Journal of experimental botany*, vol. 60, no. 2, pp. 423–440, 2009, doi: 10.1093/jxb/ern309.
- [77] K. Piontek, A. T. Smith, and W. Blodig, “Lignin peroxidase structure and function,” *Biochemical Society transactions*, vol. 29, no. Pt 2, pp. 111–116, May 2001, doi: 10.1042/0300-5127:0290111.
- [78] C. Cosio and C. Dunand, “Specific functions of individual class III peroxidase genes,” *Journal of experimental botany*, vol. 60, no. 2, pp. 391–408, 2009, doi: 10.1093/jxb/ern318.

- [79] F. Passardi, C. Cosio, C. Penel, and C. Dunand, "Peroxidases have more functions than a Swiss army knife.," *Plant cell reports*, vol. 24, no. 5, pp. 255–265, Jul. 2005, doi: 10.1007/s00299-005-0972-6.
- [80] V. A. Neves, "Ionically Bound Peroxidase from Peach Fruit," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 45, pp. 7–16, 2002, [Online]. Available: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-89132002000100002&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132002000100002&nrm=iso)
- [81] V. P. Pandey, S. Singh, R. Singh, and U. N. Dwivedi, "Purification and characterization of peroxidase from papaya (*Carica papaya*) fruit.," *Applied biochemistry and biotechnology*, vol. 167, no. 2, pp. 367–376, May 2012, doi: 10.1007/s12010-012-9672-1.
- [82] P. M. Civello, G. A. Martinez, A. R. Chaves, and M. C. Anon, "Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial Purification and Determination of Some Properties," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 43, no. 10, pp. 2596–2601, Oct. 1995, doi: 10.1021/jf00058a008.
- [83] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, and E. Reimhult, "Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures," *Sensors (Basel, Switzerland)*, vol. 8, no. 3, pp. 1400–1458, Mar. 2008, doi: 10.3390/s80314000.
- [84] S. M. S. B. Hameed Akbar, Divine Mensah Sedzro, Mazhar Khan, Sm Faysal Bellah, "Structure, Function and Applications of a Classic Enzyme: Horseradish Peroxidase," *Journal of Chemical, Environmental and Biological Engineering*, vol. Vol. 2, no. No. 2, pp. 52–59, 2018, doi: 10.11648/j.jcebe.20180202.13.
- [85] V. Malik and C. S. Pundir, "Determination of total cholesterol in serum by cholesterol esterase and cholesterol oxidase immobilized and co-immobilized on to arylamine glass.," *Biotechnology and applied biochemistry*, vol. 35, no. 3, pp. 191–197, Jun. 2002.
- [86] M. K. Shigenaga, C. J. Gimeno, and B. N. Ames, "Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 86, no. 24, pp. 9697–9701, Dec. 1989, doi: 10.1073/pnas.86.24.9697.
- [87] O. Greco, L. K. Folkes, P. Wardman, G. M. Tozer, and G. U. Dachs, "Development of a novel enzyme/prodrug combination for gene therapy of cancer: horseradish peroxidase/indole-3-acetic acid," *Cancer Gene Therapy*, vol. 7, no. 11, pp. 1414–1420, 2000, doi: 10.1038/sj.cgt.7700258.
- [88] K. Tatsumi, S. Wada, and H. Ichikawa, "Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase.," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 51, no. 1, pp. 126–130, Jul. 1996, doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960705)51:1<126::AID-BIT15>3.0.CO;2-O.
- [89] A. Bhunia, S. Durani, and P. P. Wangikar, "Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 72, no. 5, pp. 562–567, Mar. 2001, doi: [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20010305\)72:5<562::AID-BIT1020>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20010305)72:5<562::AID-BIT1020>3.0.CO;2-S).
- [90] S. M. A. G. Ulson de Souza, E. Forgiarini, and A. A. Ulson de Souza, "Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP).," *Journal of hazardous materials*, vol. 147, no. 3, pp. 1073–1078, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.06.003.

- [91] N. Ž. Šekuljica *et al.*, “Decolorization of Anthraquinonic Dyes from Textile Effluent Using Horseradish Peroxidase: Optimization and Kinetic Study,” *The Scientific World Journal*, vol. 2015, p. 371625, 2015, doi: 10.1155/2015/371625.
- [92] M. Svetozarević, N. Šekuljica, Z. Knežević-Jugović, and D. Mijin, “Optimization and Kinetic Study of Anthraquinone Dye Removal from Colored Wastewater Using Soybean Seed as a Source of Peroxidase,” *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, vol. 39, no. 2, pp. 196–206, 2020, doi: 10.20450/mjce.2020.2150.
- [93] M. Svetozarević, N. Šekuljica, Z. Knežević-Jugović, and D. Mijin, “Agricultural waste as a source of peroxidase for wastewater treatment: Insight in kinetics and process parameters optimization for anthraquinone dye removal,” *Environmental Technology & Innovation*, vol. 21, p. 101289, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101289>.
- [94] L. Lu, M. Zhao, S.-C. Liang, L.-Y. Zhao, D.-B. Li, and B.-B. Zhang, “Production and synthetic dyes decolourization capacity of a recombinant laccase from *Pichia pastoris*,” *Journal of applied microbiology*, vol. 107, no. 4, pp. 1149–1156, Oct. 2009, doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04291.x.
- [95] A. K. Verma, C. Raghukumar, R. R. Parvatkar, and C. G. Naik, “A Rapid Two-Step Bioremediation of the Anthraquinone Dye, Reactive Blue 4 by a Marine-Derived Fungus,” *Water, Air, & Soil Pollution*, vol. 223, no. 6, pp. 3499–3509, 2012, doi: 10.1007/s11270-012-1127-3.
- [96] M. Y. Dauda and E. A. Erkurt, “Investigation of reactive Blue 19 biodegradation and byproducts toxicity assessment using crude laccase extract from *Trametes versicolor*,” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 393, p. 121555, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121555>.
- [97] M. Shakeri and M. Shoda, “Change in turnover capacity of crude recombinant dye-decolorizing peroxidase (rDyP) in batch and fed-batch decolorization of Remazol Brilliant Blue R,” *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 76, no. 4, pp. 919–926, Sep. 2007, doi: 10.1007/s00253-007-1042-5.
- [98] J. C. McAuliffe, W. Aehle, G. M. Whited, and D. E. Ward, “Industrial Enzymes and Biocatalysis BT - Kent and Riegel’s Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology,” J. A. Kent, Ed. Boston, MA: Springer US, 2007, pp. 1375–1420. doi: 10.1007/978-0-387-27843-8\_31.
- [99] E. P. Meulenber, “Immunochemical methods for ochratoxin A detection: a review,” *Toxins*, vol. 4, no. 4, pp. 244–266, Apr. 2012, doi: 10.3390/toxins4040244.
- [100] R. P. M. van Gijlswijk *et al.*, “Use of horseradish peroxidase- and fluorescein-modified cisplatin derivatives for simultaneous labeling of nucleic acids and proteins,” *Clinical chemistry*, vol. 48, no. 8, pp. 1352–1359, Aug. 2002.
- [101] J. Yakovleva *et al.*, “Microfluidic Enzyme Immunoassay Using Silicon Microchip with Immobilized Antibodies and Chemiluminescence Detection,” *Analytical Chemistry*, vol. 74, no. 13, pp. 2994–3004, Jul. 2002, doi: 10.1021/ac015645b.
- [102] A. M. Blinkovsky and J. S. Dordick, “Peroxidase-catalyzed synthesis of lignin–phenol copolymers,” *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 31, no. 7, pp. 1839–1846, Jun. 1993, doi: <https://doi.org/10.1002/pola.1993.080310722>.

- [103] A. M. Blinkovsky and J. S. Dordick, "Peroxidase-catalyzed synthesis of lignin–phenol copolymers," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 31, no. 7, pp. 1839–1846, Jun. 1993, doi: <https://doi.org/10.1002/pola.1993.080310722>.
- [104] J. C. McAuliffe, W. Aehle, G. M. Whited, and D. E. Ward, "Industrial Enzymes and Biocatalysis BT - Kent and Riegel's Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology," J. A. Kent, Ed. Boston, MA: Springer US, 2007, pp. 1375–1420. doi: 10.1007/978-0-387-27843-8\_31.
- [105] Y. Hwan Kim, E. Suk An, B. Keun Song, D. Shik Kim, and R. Chelikani, "Polymerization of cardanol using soybean peroxidase and its potential application as anti-biofilm coating material," *Biotechnology Letters*, vol. 25, no. 18, pp. 1521–1524, 2003, doi: 10.1023/A:1025486617312.
- [106] B. Kalra and R. A. Gross, "Horseradish Peroxidase Mediated Free Radical Polymerization of Methyl Methacrylate," *Biomacromolecules*, vol. 1, no. 3, pp. 501–505, Sep. 2000, doi: 10.1021/bm005576v.
- [107] A. Singh, D. Ma, and D. L. Kaplan, "Enzyme-Mediated Free Radical Polymerization of Styrene," *Biomacromolecules*, vol. 1, no. 4, pp. 592–596, Dec. 2000, doi: 10.1021/bm005537j.
- [108] S. L. Sampaio *et al.*, "Potato peels as sources of functional compounds for the food industry: A review," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 103, pp. 118–129, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.015>.
- [109] M. Fernandes, D. H. Souza, R. O. Henriques, M. V. Alves, E. Skoronski, and A. F. Junior, "Obtaining soybean peroxidase from soybean hulls and its application for detoxification of 2,4-dichlorophenol contaminated water," *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 8, no. 3, p. 103786, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103786>.
- [110] M. C. Silva, J. A. Torres, L. R. Vasconcelos de Sá, P. M. B. Chagas, V. S. Ferreira-Leitão, and A. D. Corrêa, "The use of soybean peroxidase in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R and toxicological evaluation of its degradation products," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 89, pp. 122–129, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.004>.
- [111] J. Nicell, "Environmental applications of enzymes," *Interdisciplinary Environmental Review*, vol. 3, p. 14, 2001.
- [112] K. G. Welinder and Y. B. Larsen, "Covalent structure of soybean seed coat peroxidase.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1698, no. 1, pp. 121–126, Apr. 2004, doi: 10.1016/j.bbapap.2003.11.005.
- [113] A. Henriksen *et al.*, "Structure of soybean seed coat peroxidase: a plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions," *Protein science : a publication of the Protein Society*, vol. 10, no. 1, pp. 108–115, Jan. 2001, doi: 10.1110/ps.37301.
- [114] M. Gajhede, D. J. Schuller, A. Henriksen, A. T. Smith, and T. L. Poulos, "Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution," *Nature Structural Biology*, vol. 4, no. 12, pp. 1032–1038, 1997, doi: 10.1038/nsb1297-1032.
- [115] A. Henriksen *et al.*, "Structure of soybean seed coat peroxidase: a plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions," *Protein science : a publication of the Protein Society*, vol. 10, no. 1, pp. 108–115, Jan. 2001, doi: 10.1110/ps.37301.

- [116] O. Mirza, A. Henriksen, L. Østergaard, K. G. Welinder, and M. Gajhede, “{\it Arabidopsis thaliana} peroxidase N: structure of a novel neutral peroxidase,” *Acta Crystallographica Section D*, vol. 56, no. 3, pp. 372–375, Mar. 2000, doi: 10.1107/S0907444999016340.
- [117] G. D. Yadav and Deepali B. Magadum, “Kinetic Modelling of Enzyme Catalyzed Biotransformation Involving Activations and Inhibitions,” in *Enzyme Inhibitors and Activators*, D. B. M. E.-M. Senturk, Ed. Rijeka: IntechOpen, 2017, p. Ch. 4. doi: 10.5772/67692.
- [118] F. K. de Oliveira, L. O. Santos, and J. G. Buffon, “Mechanism of action, sources, and application of peroxidases,” *Food Research International*, vol. 143, p. 110266, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110266>.
- [119] D. C. Goodwin, T. A. Grover, and S. D. Aust, “Roles of Efficient Substrates in Enhancement of Peroxidase-Catalyzed Oxidations,” *Biochemistry*, vol. 36, no. 1, pp. 139–147, Jan. 1997, doi: 10.1021/bi961465y.
- [120] L. Kiwi-Minsker and A. Renken, “Microstructured reactors for catalytic reactions,” *Catalysis Today*, vol. 110, no. 1, pp. 2–14, 2005, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2005.09.011>.
- [121] D. Bothe, C. Stemich, and H. Warnecke, “Fluid mixing in a T-shaped micro-mixer,” *Chemical Engineering Science*, vol. 61, pp. 2950–2958, 2006.
- [122] S. J. Haswell, R. J. Middleton, B. O’Sullivan, V. Skelton, P. Watts, and P. Styring, “The application of micro reactors to synthetic chemistry,” *Chem. Commun.*, no. 5, pp. 391–398, 2001, doi: 10.1039/B008496O.
- [123] L. R. Volpatti and A. K. Yetisen, “Commercialization of microfluidic devices,” *Trends in biotechnology*, vol. 32, no. 7, pp. 347–350, Jul. 2014, doi: 10.1016/j.tibtech.2014.04.010.
- [124] A. A. Bojang and H.-S. Wu, “Design, Fundamental Principles of Fabrication and Applications of Microreactors,” *Processes*, vol. 8, no. 8, 2020, doi: 10.3390/pr8080891.
- [125] O. Wörz, K.-P. Jäckel, Th. Richter, and A. Wolf, “Microreactors – A New Efficient Tool for Reactor Development,” *Chemical Engineering & Technology*, vol. 24, no. 2, pp. 138–142, Feb. 2001, doi: [https://doi.org/10.1002/1521-4125\(200102\)24:2<138::AID-CEAT138>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-4125(200102)24:2<138::AID-CEAT138>3.0.CO;2-C).
- [126] M. P. C. Marques and P. Fernandes, “Microfluidic devices: useful tools for bioprocess intensification,” *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 16, no. 10, pp. 8368–8401, Sep. 2011, doi: 10.3390/molecules16108368.
- [127] S. Gambhire, N. Patel, G. Gambhire, and S. Kale, *A Review on Different Micromixers and its Micromixing within Microchannel*. 2016. doi: 10.13140/RG.2.1.4235.4324.
- [128] R. K. Jena and C. Y. Yue, “Cyclic olefin copolymer based microfluidic devices for biochip applications: Ultraviolet surface grafting using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine,” *Biomicrofluidics*, vol. 6, no. 1, p. 12822, 2012, doi: 10.1063/1.3682098.
- [129] J. Jovanović, E. v Rebrov, T. A. (Xander) Nijhuis, V. Hessel, and J. C. Schouten, “Phase-Transfer Catalysis in Segmented Flow in a Microchannel: Fluidic Control of Selectivity and Productivity,” *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 49, no. 6, pp. 2681–2687, Mar. 2010, doi: 10.1021/ie9017918.
- [130] V. Fath, S. Szmais, P. Lau, N. Kockmann, and T. Röder, “Model-Based Scale-Up Predictions: From Micro- to Millireactors Using Inline Fourier Transform Infrared

Spectroscopy,” *Organic Process Research & Development*, vol. 23, no. 9, pp. 2020–2030, Sep. 2019, doi: 10.1021/acs.oprd.9b00265.

- [131] N. Cherkasov, M. 'moun Al-Rawashdeh, A. O. Ibhaddon, and E. v Rebrov, “Scale up study of capillary microreactors in solvent-free semihydrogenation of 2-methyl-3-butyn-2-ol,” *Catalysis Today*, vol. 273, pp. 205–212, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2016.03.028>.
- [132] J. Yoshida, A. Nagaki, T. Iwasaki, and S. Suga, “Enhancement of Chemical Selectivity by Microreactors,” *Chemical Engineering & Technology*, vol. 28, no. 3, pp. 259–266, Mar. 2005, doi: <https://doi.org/10.1002/ceat.200407127>.
- [133] R. Nassar, J. Hu, J. Palmer, and W. Dai, “Modeling of cyclohexene hydrogenation and dehydrogenation reactions in a continuous-flow microreactor,” *Catalysis Today*, vol. 120, no. 1, pp. 121–124, 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2006.07.008>.
- [134] A. Schuster, K. Sefiane, and J. Ponton, “Multiphase mass transport in mini/micro-channels microreactor,” *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 86, no. 5, pp. 527–534, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2008.02.008>.
- [135] I. Antonopoulou, S. Varriale, E. Topakas, U. Rova, P. Christakopoulos, and V. Faraco, “Enzymatic synthesis of bioactive compounds with high potential for cosmeceutical application,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, no. 15, pp. 6519–6543, 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7647-9.
- [136] P. Watts and C. Wiles, “Micro Reactors, Flow Reactors and Continuous Flow Synthesis,” *Journal of Chemical Research*, vol. 36, no. 4, pp. 181–193, Apr. 2012, doi: 10.3184/174751912X13311365798808.
- [137] P. Watts and C. Wiles, “Micro reactors: a new tool for the synthetic chemist,” *Org. Biomol. Chem.*, vol. 5, no. 5, pp. 727–732, 2007, doi: 10.1039/B617327F.
- [138] D. Wang, M. Iqbal, and M. Q. Zhu, “Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Nanoparticles in a Helical Microreactor,” *Key Engineering Materials*, vol. 842, pp. 174–181, 2020, doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.842.174.
- [139] P. Watts, C. Wiles, N. Hao, M. Zhang, and J. X. J. Zhang, “Microfluidics for ZnO micro-nanomaterials development: rational design, controllable synthesis, and on-chip bioapplications,” *Org. Biomol. Chem.*, vol. 5, no. 5, pp. 1783–1801, Apr. 2012, doi: 10.1039/C9BM01787A.
- [140] J. Zhang and X. Luo, “Mixing Performance of a 3D Micro T-Mixer with Swirl-Inducing Inlets and Rectangular Constriction,” *Micromachines*, vol. 9, no. 5, p. 199, Apr. 2018, doi: 10.3390/mi9050199.
- [141] I. Lignos *et al.*, “Facile Droplet-based Microfluidic Synthesis of Monodisperse IV–VI Semiconductor Nanocrystals with Coupled In-Line NIR Fluorescence Detection,” *Chemistry of Materials*, vol. 26, no. 9, pp. 2975–2982, May 2014, doi: 10.1021/cm500774p.
- [142] M. Su, “Synthesis of highly monodisperse silica nanoparticles in the microreactor system,” *Korean Journal of Chemical Engineering*, vol. 34, no. 2, pp. 484–494, 2017, doi: 10.1007/s11814-016-0297-x.
- [143] J. D. Rueda-Villabona *et al.*, “Crude enzymatic extract from *Dictyopanus pusillus* LMB4 as a biotechnological tool for crystal violet biodegradation,” *Bioresource Technology Reports*, vol. 15, p. 100723, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100723>.

- [144] S. Sharma, N. Rani R, V. K.T., R. M.B., C. Shivamallu, and R. R. Achar, “Detoxification of Sunset yellow and Brilliant blue dyes using Soybean peroxidases,” *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, vol. 4, p. 100215, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100215>.
- [145] Q. Zhou, M. Guo, K. Ni, and F. M. Kerton, “Construction of supramolecular laccase enzymes and understanding of catalytic dye degradation using multispectral and molecular docking approaches,” *React. Chem. Eng.*, vol. 6, no. 10, pp. 1940–1949, 2021, doi: 10.1039/D1RE00111F.
- [146] K. Ilić Đurđić *et al.*, “Improved degradation of azo dyes by lignin peroxidase following mutagenesis at two sites near the catalytic pocket and the application of peroxidase-coated yeast cell walls,” *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, vol. 15, no. 2, p. 19, 2020, doi: 10.1007/s11783-020-1311-4.
- [147] L. Xu, J. Sun, M. A. Qaria, L. Gao, and D. Zhu, “Dye Decoloring Peroxidase Structure, Catalytic Properties and Applications: Current Advancement and Futurity,” *Catalysts*, vol. 11, no. 8, 2021, doi: 10.3390/catal11080955.
- [148] A. Krithika, K. V. Gayathri, D. T. Kumar, and C. G. P. Doss, “Mixed azo dyes degradation by an intracellular azoreductase enzyme from alkaliphilic *Bacillus subtilis*: a molecular docking study,” *Archives of Microbiology*, vol. 203, no. 6, pp. 3033–3044, 2021, doi: 10.1007/s00203-021-02299-2.
- [149] Y. Zhang, J. Ren, Q. Wang, S. Wang, S. Li, and H. Li, “Oxidation characteristics and degradation potential of a dye-decolorizing peroxidase from *Bacillus amyloliquefaciens* for crystal violet dye,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 168, p. 107930, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.107930>.
- [150] H.-F. Xiang *et al.*, “Efficient biodegradation of malachite green by an artificial enzyme designed in myoglobin,” *RSC Adv.*, vol. 11, no. 26, pp. 16090–16095, 2021, doi: 10.1039/D1RA02202D.
- [151] U. Hanefeld, L. Gardossi, and E. Magner, “Understanding enzyme immobilisation,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 2, pp. 453–468, 2009, doi: 10.1039/B711564B.
- [152] M. Altikatoglu Yapaoz and A. Attar, “An accomplished procedure of horseradish peroxidase immobilization for removal of acid yellow 11 in aqueous solutions,” *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, vol. 81, no. 12, pp. 2664–2673, Jun. 2020, doi: 10.2166/wst.2020.326.
- [153] M. Aldhahri *et al.*, “Ultra-Thin 2D CuO Nanosheet for HRP Immobilization Supported by Encapsulation in a Polymer Matrix: Characterization and Dye Degradation,” *Catalysis Letters*, vol. 151, no. 1, pp. 232–246, 2021, doi: 10.1007/s10562-020-03289-7.
- [154] M. Bilal, T. Rasheed, Y. Zhao, and H. M. N. Iqbal, “Agarose-chitosan hydrogel-immobilized horseradish peroxidase with sustainable bio-catalytic and dye degradation properties,” *International journal of biological macromolecules*, vol. 124, pp. 742–749, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.220.
- [155] M. Bilal and H. M. N. Iqbal, “Lignin peroxidase immobilization on Ca-alginate beads and its dye degradation performance in a packed bed reactor system,” *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 20, p. 101205, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101205>.

- [156] R. DiCosimo, J. McAuliffe, A. J. Poulouse, and G. Bohlmann, "Industrial use of immobilized enzymes.," *Chemical Society reviews*, vol. 42, no. 15, pp. 6437–6474, Aug. 2013, doi: 10.1039/c3cs35506c.
- [157] B. Brena, P. González-Pombo, and F. Batista-Viera, "Immobilization of enzymes: a literature survey.," *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1051, pp. 15–31, 2013, doi: 10.1007/978-1-62703-550-7\_2.
- [158] L. Cao, L. van Langen, and R. A. Sheldon, "Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?," *Current opinion in biotechnology*, vol. 14, no. 4, pp. 387–394, Aug. 2003, doi: 10.1016/s0958-1669(03)00096-x.
- [159] N. R. Mohamad, N. H. C. Marzuki, N. A. Buang, F. Huyop, and R. A. Wahab, "An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes," *Biotechnology, biotechnological equipment*, vol. 29, no. 2, pp. 205–220, Mar. 2015, doi: 10.1080/13102818.2015.1008192.
- [160] T. Jesionowski, J. Zdarta, and B. Krajewska, "Enzyme immobilization by adsorption: a review," *Adsorption*, vol. 20, no. 5, pp. 801–821, 2014, doi: 10.1007/s10450-014-9623-y.
- [161] N. Ž. Šekuljica *et al.*, "Immobilization of horseradish peroxidase onto Purolite® A109 and its anthraquinone dye biodegradation and detoxification potential," *Biotechnology Progress*, vol. 36, no. 4, p. e2991, 2020, doi: <https://doi.org/10.1002/btpr.2991>.
- [162] S. A. Mohamed *et al.*, "Improvement of enzymatic properties and decolorization of azo dye: immobilization of horseradish peroxidase on cationic maize starch," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 38, p. 102208, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102208>.
- [163] A. Kołodziejczak-Radzimska, J. Zembruska, K. Siwińska-Ciesielczyk, and T. Jesionowski, "Catalytic and Physicochemical Evaluation of a TiO<sub>2</sub>/ZnO/Laccase Biocatalytic System: Application in the Decolorization of Azo and Anthraquinone Dyes," *Materials*, vol. 14, no. 20, 2021, doi: 10.3390/ma14206030.
- [164] S. Datta, L. R. Christena, and Y. R. S. Rajaram, "Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials," *3 Biotech*, vol. 3, no. 1, pp. 1–9, Feb. 2013, doi: 10.1007/s13205-012-0071-7.
- [165] P. Zucca and E. Sanjust, "Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms," *Molecules*, vol. 19, no. 9, pp. 14139–14194, 2014, doi: 10.3390/molecules190914139.
- [166] J. Fu, J. Reinhold, and N. W. Woodbury, "Peptide-modified surfaces for enzyme immobilization.," *PloS one*, vol. 6, no. 4, p. e18692, Apr. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0018692.
- [167] V. Singh, M. Sardar, and M. N. Gupta, "Immobilization of enzymes by bioaffinity layering.," *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1051, pp. 129–137, 2013, doi: 10.1007/978-1-62703-550-7\_9.
- [168] S. Kashefi, S. M. Borghei, and N. M. Mahmoodi, "Superparamagnetic enzyme-graphene oxide magnetic nanocomposite as an environmentally friendly biocatalyst: Synthesis and biodegradation of dye using response surface methodology," *Microchemical Journal*, vol. 145, pp. 547–558, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.11.023>.



- [169] F. Salami, Z. Habibi, M. Yousefi, and M. Mohammadi, “Covalent immobilization of laccase by one pot three component reaction and its application in the decolorization of textile dyes,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 120, pp. 144–151, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.077>.
- [170] R. C. Rodrigues, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, and R. Fernández-Lafuente, “Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization,” *Chemical Society reviews*, vol. 42, no. 15, pp. 6290–6307, Aug. 2013, doi: [10.1039/c2cs35231a](https://doi.org/10.1039/c2cs35231a).
- [171] J. J. Roy and T. E. Abraham, “Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase,” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 38, no. 1, pp. 31–36, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2005.11.001>.
- [172] D. Brady, L. Steenkamp, E. Skein, J. A. Chaplin, and S. Reddy, “Optimisation of the enantioselective biocatalytic hydrolysis of naproxen ethyl ester using ChiroCLEC-CR,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 34, no. 3, pp. 283–291, 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.11.002>.
- [173] H. Yamaguchi, Y. Kiyota, and M. Miyazaki, “Techniques for Preparation of Cross-Linked Enzyme Aggregates and Their Applications in Bioconversions,” *Catalysts*, vol. 8, no. 5, 2018, doi: [10.3390/catal8050174](https://doi.org/10.3390/catal8050174).
- [174] Z. Zhou, F. Piepenbreier, M. VRR, K. Karbacher, and M. Hartmann, “Immobilization of lipase in cage-type mesoporous organosilicas via covalent bonding and crosslinking,” *Catalysis Today*, vol. 243, pp. 173–183, 2015, doi: [10.1016/j.cattod.2014.07.047](https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.07.047).
- [175] S. Velasco-Lozano, F. López-Gallego, J. C. Mateos-Díaz, and E. Favela-Torres, “Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review,” *Biocatalysis*, vol. 1, no. 1, pp. 166–177, 2016, doi: [doi:10.1515/boca-2015-0012](https://doi.org/10.1515/boca-2015-0012).
- [176] M. T. de Martino *et al.*, “Compartmentalized cross-linked enzymatic nano-aggregates (c-CLEnA) for efficient in-flow biocatalysis,” *Chem. Sci.*, vol. 11, no. 10, pp. 2765–2769, 2020, doi: [10.1039/C9SC05420K](https://doi.org/10.1039/C9SC05420K).
- [177] R. A. Sheldon, “Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance,” *Advanced Synthesis & Catalysis*, vol. 349, no. 8–9, pp. 1289–1307, 2007, doi: <https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>.
- [178] C. Mateo, J. M. Palomo, L. M. van Langen, F. van Rantwijk, and R. A. Sheldon, “A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates,” *Biotechnology and bioengineering*, vol. 86, no. 3, pp. 273–276, May 2004, doi: [10.1002/bit.20033](https://doi.org/10.1002/bit.20033).
- [179] N. Miletić and K. Loos, “Over-Stabilization of Chemically Modified and Cross-Linked *Candida antarctica* Lipase B Using Various Epoxides and Diepoxides,” *Australian Journal of Chemistry*, vol. 62, no. 8, pp. 799–805, 2009, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1071/CH09033>
- [180] S. Talekar, S. Nadar, A. Joshi, and G. Joshi, “Pectin cross-linked enzyme aggregates (pectin-CLEAs) of glucoamylase,” *RSC Adv.*, vol. 4, no. 103, pp. 59444–59453, 2014, doi: [10.1039/C4RA09552A](https://doi.org/10.1039/C4RA09552A).
- [181] Y.-Y. Zang, S. Yang, Y.-Q. Xu, Z.-G. Chen, and T. Wu, “Carrier-Free Immobilization of Rutin Degrading Enzyme Extracted From *Fusarium* spp.,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, p. 470, 2020, doi: [10.3389/fbioe.2020.00470](https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00470).

- [182] A. B. Majumder, K. Mondal, T. P. Singh, and M. N. Gupta, “Designing cross-linked lipase aggregates for optimum performance as biocatalysts,” *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 26, no. 3, pp. 235–242, Jan. 2008, doi: 10.1080/10242420701685601.
- [183] A. Zerva *et al.*, “Optimization of Transesterification Reactions with CLEA-Immobilized Feruloyl Esterases from *Thermothelomyces thermophila* and *Talaromyces wortmannii*,” *Molecules*, vol. 23, no. 9, 2018, doi: 10.3390/molecules23092403.
- [184] H. W. Yu, H. Chen, X. Wang, Y. Y. Yang, and C. B. Ching, “Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles: Application to *Candida rugosa* lipase,” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 43, no. 1, pp. 124–127, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.07.001>.
- [185] S. S. Mahmood, F. Yusof, M. S. Jami, and S. Khanahmadi, “Optimizing the preparation conditions and characterization of a stable and recyclable cross-linked enzyme aggregate (CLEA)-protease,” *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 3, no. 1, p. 3, 2016, doi: 10.1186/s40643-015-0081-5.
- [186] M. Wang, W. Qi, C. Jia, Y. Ren, R. Su, and Z. He, “Enhancement of activity of cross-linked enzyme aggregates by a sugar-assisted precipitation strategy: technical development and molecular mechanism,” *Journal of biotechnology*, vol. 156, no. 1, p. 30–38, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.08.002.
- [187] P. López-Serrano, L. Cao, F. van Rantwijk, and R. A. Sheldon, “Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases,” *Biotechnology Letters*, vol. 24, no. 16, pp. 1379–1383, 2002, doi: 10.1023/A:1019863314646.
- [188] J. Ye, A. Li, T. Chu, X. Pan, and B. He, “Poly-lysine supported cross-linked enzyme aggregates of penicillin G acylase and its application in synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 140, pp. 423–428, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.021>.
- [189] R. de Melo, R. C. Alnoch, A. S. de Sousa, H. Harumi Sato, R. Ruller, and C. Mateo, “Cross-Linking with Polyethylenimine Confers Better Functional Characteristics to an Immobilized  $\beta$ -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7,” *Catalysts*, vol. 9, no. 3, 2019, doi: 10.3390/catal9030223.
- [190] T. Montes *et al.*, “Improved Stabilization of Genetically Modified Penicillin G Acylase in the Presence of Organic Cosolvents by Co- Immobilization of the Enzyme with Polyethyleneimine,” *Advanced Synthesis & Catalysis*, vol. 349, no. 3, pp. 459–464, 2007, doi: <https://doi.org/10.1002/adsc.200600313>.
- [191] T. Vanitha, “Role of Pectin in Food Processing and Food Packaging,” M. K. E.-M. Masuelli, Ed. Rijeka: IntechOpen, 2020, p. Ch. 4. doi: 10.5772/intechopen.83677.
- [192] B. Gupta, M. Tummalapalli, B. L. Deopura, and M. S. Alam, “Functionalization of pectin by periodate oxidation,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 98, no. 1, pp. 1160–1165, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.069>.
- [193] G. D. Idesa and B. Getachew, “Extraction and Partial Purification of Peroxidase Enzyme from Plant Sources for Antibody Labeling,” 2018.
- [194] E. F. Hartree, “Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response,” *Analytical Biochemistry*, vol. 48, no. 2, pp. 422–427, 1972, doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90094-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90094-2).

- [195] E. Miranda-Mandujano, G. Moeller-Chávez, O. Villegas-Rosas, G. Buitrón, and M. A. Garza-Zamora, “Decolourization of Direct Blue 2 by peroxidases obtained from an industrial soybean waste,” *Water SA*, vol. 44, pp. 204–210, 2018, [Online]. Available: [http://www.scielo.org.za/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1816-79502018000200006&nrm=iso](http://www.scielo.org.za/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1816-79502018000200006&nrm=iso)
- [196] U. Kalsoom, S. S. Ashraf, M. A. Meetani, M. A. Rauf, and H. N. Bhatti, “Mechanistic study of a diazo dye degradation by Soybean Peroxidase,” *Chemistry Central Journal*, vol. 7, no. 1, p. 93, 2013, doi: 10.1186/1752-153X-7-93.
- [197] B. M. Altahir *et al.*, “Soybean Peroxidase Catalyzed Decoloration of Acid Azo Dyes,” *Journal of Health and Pollution*, vol. 10, no. 25, Mar. 2020, doi: 10.5696/2156-9614-10.25.200307.
- [198] T. Chiong, S. Y. Lau, Z. H. Lek, B. Y. Koh, and M. K. Danquah, “Enzymatic treatment of methyl orange dye in synthetic wastewater by plant-based peroxidase enzymes,” *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 4, no. 2, pp. 2500–2509, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.04.030>.
- [199] A. Kaur, K. E. Taylor, and N. Biswas, “Soybean peroxidase-catalyzed degradation of a sulfonated dye and its azo-cleavage product,” *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 96, no. 2, pp. 423–430, 2021, doi: <https://doi.org/10.1002/jctb.6555>.
- [200] J. P. McEldoon and J. S. Dordick, “Unusual Thermal Stability of Soybean Peroxidase,” *Biotechnology Progress*, vol. 12, no. 4, pp. 555–558, Jan. 1996, doi: <https://doi.org/10.1021/bp960010x>.
- [201] C. Watanabe, A. Kashiwada, K. Matsuda, and K. Yamada, “Soybean peroxidase-catalyzed treatment and removal of BPA and bisphenol derivatives from aqueous solutions,” *Environmental Progress & Sustainable Energy*, vol. 30, no. 1, pp. 81–91, Apr. 2011, doi: <https://doi.org/10.1002/ep.10453>.
- [202] S. Longu, R. Medda, A. Padiglia, J. Z. Pedersen, and G. Floris, “The reaction mechanism of plant peroxidases,” *The Italian journal of biochemistry*, vol. 53, no. 1, pp. 41–45, 2004.
- [203] M. M. Al-Ansari, A. Steevensz, N. Al-Aasm, K. E. Taylor, J. K. Bewtra, and N. Biswas, “Soybean peroxidase-catalyzed removal of phenylenediamines and benzenediols from water,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 45, no. 4, pp. 253–260, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.07.004>.
- [204] T. Marchis, P. Avetta, A. Bianco-Prevot, D. Fabbri, G. Viscardi, and E. Laurenti, “Oxidative degradation of Remazol Turquoise Blue G 133 by soybean peroxidase,” *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 105, no. 2, pp. 321–327, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.11.009>.
- [205] N. Hidalgo *et al.*, “Oxidation and removal of industrial textile dyes by a novel peroxidase extracted from post-harvest lentil (*Lens culinaris* L.) stubble,” *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 16, no. 4, p. 821, 2011, doi: 10.1007/s12257-010-0453-9.
- [206] Z. Vujčić *et al.*, “Exploitation of neglected horseradish peroxidase isoenzymes for dye decolorization,” *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 97, pp. 124–127, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.10.007>.

- [207] D. A. Yaseen and M. Scholz, "Treatment of synthetic textile wastewater containing dye mixtures with microcosms," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, no. 2, pp. 1980–1997, 2018, doi: 10.1007/s11356-017-0633-7.
- [208] J. de C. Pereira, M. M. de Souza Moretti, and A. C. dos S. Gomes, "Effect of Metal Ions, Chemical Agents and Organic Compounds on Lignocellulolytic Enzymes Activities," in *Enzyme Inhibitors and Activators*, E. C. Giese, Ed. Rijeka: IntechOpen, 2017, p. Ch. 6. doi: 10.5772/65934.
- [209] R. A. Costa, A. S. Cunha, C. G. Peres, A. R. Azzoni, E. Laurenti, and A. S. Vianna, "Enzymatic Degradation of 2,4,6-Trichlorophenol in a Microreactor using Soybean Peroxidase Rodrigo," 2020, doi: 10.3390/sym12071129.
- [210] Y. Liu, G. Chen, and J. Yue, "Manipulation of gas-liquid-liquid systems in continuous flow microreactors for efficient reaction processes," *Journal of Flow Chemistry*, vol. 10, no. 1, pp. 103–121, 2020, doi: 10.1007/s41981-019-00062-9.
- [211] A. Dajic, M. Mihajlovic, S. Mandic-Rajcevic, D. Mijin, M. Jovanovic, and J. Jovanovic, "Improvement of the Textile Industry Wastewater Decolorization Process Using Capillary Microreactor Technology," *International Journal of Environmental Research*, vol. 13, no. 1, pp. 213–222, 2019, doi: 10.1007/s41742-018-0162-3.
- [212] S. Aljbour, H. Yamada, and T. Tagawa, "Ultrasound-assisted phase transfer catalysis in a capillary microreactor," *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, vol. 48, no. 6, pp. 1167–1172, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.04.004>.
- [213] D. S. de Sá *et al.*, "Intensification of photocatalytic degradation of organic dyes and phenol by scale-up and numbering-up of meso- and microfluidic TiO<sub>2</sub> reactors for wastewater treatment," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 364, pp. 59–75, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.05.020>.
- [214] Y. Önal, M. Lucas, and P. Claus, "Application of a Capillary Microreactor for Selective Hydrogenation of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Aldehydes in Aqueous Multiphase Catalysis," *Chemical Engineering & Technology*, vol. 28, no. 9, pp. 972–978, Sep. 2005, doi: <https://doi.org/10.1002/ceat.200500147>.
- [215] S. Talekar, S. Nadar, A. Joshi, and G. Joshi, "Pectin cross-linked enzyme aggregates (pectin-CLEAs) of glucoamylase," *RSC Advances*, vol. 4, no. 103, pp. 59444–59453, 2014, doi: 10.1039/C4RA09552A.
- [216] P. Novák and V. Havlíček, "4 - Protein Extraction and Precipitation," in *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition)*, P. Ciborowski and J. Silberring, Eds. Boston: Elsevier, 2016, pp. 51–62. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63688-1.00004-5>.
- [217] S. Rehman, H. N. Bhatti, M. Bilal, and M. Asgher, "Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Penicillium notatum* lipase enzyme with improved activity, stability and reusability characteristics," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 91, pp. 1161–1169, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.081>.
- [218] P. Goettig, "Effects of Glycosylation on the Enzymatic Activity and Mechanisms of Proteases," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 12. 2016. doi: 10.3390/ijms17121969.

- [219] B. L. A. Prabhavathi Devi, Z. Guo, and X. Xu, "Characterization of Cross-Linked Lipase Aggregates," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 86, no. 7, pp. 637–642, Jul. 2009, doi: <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1401-8>.
- [220] N. Ž. Šekuljica *et al.*, "Removal of Anthraquinone Dye by Cross-Linked Enzyme Aggregates From Fresh Horseradish Extract," *CLEAN – Soil, Air, Water*, vol. 44, no. 7, pp. 891–900, Jul. 2016, doi: <https://doi.org/10.1002/clen.201500766>.
- [221] Z. Wang *et al.*, "The study of laccase immobilization optimization and stability improvement on CTAB-KOH modified biochar," *BMC Biotechnology*, vol. 21, no. 1, p. 47, 2021, doi: [10.1186/s12896-021-00709-3](https://doi.org/10.1186/s12896-021-00709-3).
- [222] D. Qi, M. Gao, X. Li, and J. Lin, "Immobilization of Pectinase onto Porous Hydroxyapatite/Calcium Alginate Composite Beads for Improved Performance of Recycle," *ACS Omega*, vol. 5, no. 32, pp. 20062–20069, Aug. 2020, doi: [10.1021/acsomega.0c01625](https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01625).
- [223] Šekuljica N. *et al.*, "The oxidation of anthraquinone dye using HRP immobilized as a cross-linked enzyme aggregates," *Advanced Technologies*, vol. 5, no. 2, pp. 18–26, 2016.
- [224] M. Bilal, T. Rasheed, H. M. N. Iqbal, H. Hu, W. Wang, and X. Zhang, "Horseradish peroxidase immobilization by copolymerization into cross-linked polyacrylamide gel and its dye degradation and detoxification potential," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 113, pp. 983–990, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.062>.
- [225] L. A. Dahili, E. N. and T. F. <sup>1, 2, and 3\*</sup>, "2,4-Dichlorophenol Enzymatic Removal and Its Kinetic Study Using Horseradish Peroxidase Crosslinked to Nano Spray-Dried Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Fine Particles," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 27, no. 4, pp. 768–774, Apr. 2017, doi: [10.4014/jmb.1606.06002](https://doi.org/10.4014/jmb.1606.06002).
- [226] L. Zhou, W. Tang, Y. Jiang, L. Ma, Y. He, and J. Gao, "Magnetic combined cross-linked enzyme aggregates of horseradish peroxidase and glucose oxidase: an efficient biocatalyst for dye decolorization," *RSC Advances*, vol. 6, no. 93, pp. 90061–90068, 2016, doi: [10.1039/C6RA12009A](https://doi.org/10.1039/C6RA12009A).
- [227] V. Vinoth Kumar, M. P. Prem Kumar, K. v Thiruvankadaravi, P. Baskaralingam, P. Senthil Kumar, and S. Sivanesan, "Preparation and characterization of porous cross linked laccase aggregates for the decolorization of triphenyl methane and reactive dyes," *Bioresource Technology*, vol. 119, pp. 28–34, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.078>.
- [228] Y. Zhu, Q. Chen, L. Shao, Y. Jia, and X. Zhang, "Microfluidic immobilized enzyme reactors for continuous biocatalysis," *Reaction Chemistry & Engineering*, vol. 5, no. 1, pp. 9–32, 2020, doi: [10.1039/C9RE00217K](https://doi.org/10.1039/C9RE00217K).
- [229] L. Lloret, G. Eibes, M. T. Moreira, G. Feijoo, J. M. Lema, and M. Miyazaki, "Improving the catalytic performance of laccase using a novel continuous-flow microreactor," *Chemical Engineering Journal*, vol. 223, pp. 497–506, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.03.018>.
- [230] R. Morsi *et al.*, "Immobilized Soybean Peroxidase Hybrid Biocatalysts for Efficient Degradation of Various Emerging Pollutants," *Biomolecules*, vol. 11, no. 6, 2021, doi: [10.3390/biom11060904](https://doi.org/10.3390/biom11060904).

- [231] U. Kalsoom, S. S. Ashraf, M. A. Meetani, M. A. Rauf, and H. N. Bhatti, "Mechanistic study of a diazo dye degradation by Soybean Peroxidase," *Chemistry Central Journal*, vol. 7, no. 1, p. 93, 2013, doi: 10.1186/1752-153X-7-93.
- [232] M. Jannat and K.-L. Yang, "Immobilization of Enzymes on Flexible Tubing Surfaces for Continuous Bioassays," *Langmuir*, vol. 34, no. 47, pp. 14226–14233, Nov. 2018, doi: 10.1021/acs.langmuir.8b02991.
- [233] N. Pantić, R. Prodanović, K. I. Đurđić, N. Polović, M. Spasojević, and O. Prodanović, "Optimization of phenol removal with horseradish peroxidase encapsulated within tyramine-alginate micro-beads," *Environmental Technology & Innovation*, vol. 21, p. 101211, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101211>.
- [234] S. S. Hosseini, F. Khodaiyan, S. M. E. Mousavi, S. Z. Azimi, and M. Gharaghani, "Immobilization of pectinase on the glass bead using polyaldehyde kefir as a new safe cross-linker and its effect on the activity and kinetic parameters," *Food Chemistry*, vol. 309, p. 125777, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125777>.
- [235] Svetozarević, M., Šekuljica, N., Onjia, A., Barać, N., Mihajlović, M., Knežević-Jugović, Z., & Mijin, D. (2022). Biodegradation of synthetic dyes by free and cross-linked peroxidase in microfluidic reactor. *Environmental Technology and Innovation*, 26, 102373. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102373>
- [236] R. Alam *et al.*, "Biodegradation and metabolic pathway of anthraquinone dyes by *Trametes hirsuta* D7 immobilized in light expanded clay aggregate and cytotoxicity assessment," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 405, p. 124176, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124176>.
- [237] Y. Sugano, Y. Matsushima, K. Tsuchiya, H. Aoki, M. Hirai, and M. Shoda, "Degradation pathway of an anthraquinone dye catalyzed by a unique peroxidase DyP from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1," *Biodegradation*, vol. 20, no. 3, pp. 433–440, 2009, doi: 10.1007/s10532-008-9234-y.
- [238] L. Liu *et al.*, "Rapid decolorization of anthraquinone and triphenylmethane dye using chloroperoxidase: Catalytic mechanism, analysis of products and degradation route," *Chemical Engineering Journal*, vol. 244, pp. 9–18, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.01.063>.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Milica (Milan) Svetozarević je rođena 6.10.1990. godine u Đevđeliji, Republika Severna Makedonija. Osnovnu školu i gimnaziju je završila u Đevđeliji. Diplomirala je u julu 2014. godine, na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta Sv. Kiril i Metodij, u Skoplju, studijski program Prehrambena tehnologija i biotehnologija, sa prosečnom ocenom 9,63. Školske 2014/15. godine upisala je master studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, studijski program Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija. Master studije je završila u septembru 2015. godine, odbranom završnog master rada na temu „Imobilizacija peroksidaze iz svežeg rena glutaraldehidom u umrežene enzimske agregate“, sa prosečnom ocenom 9,00. Doktorske studije je upisala školske 2015/16. godine na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, studijski program Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija. U februaru 2017. godine zaposlila se kao inženjer tehnološkog razvoja u profitnom centru Farmacija, „Alkaloid AD“, Skoplje, gde je radila do novembra 2018. U novembru 2018. godine Milica Svetozarević je angažovana u Inovacionom centru TMF-a. U periodu od novembra 2018. god. do decembra 2019. god. bila je na projektu „Razvoj tehnoloških procesa za tretman otpadnih voda energetskih postrojenja primenom čistije proizvodnje“ (TR 34009) koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od januara 2019. do danas radi u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Pored toga, učestvovala je na projektu pod nazivom „Održivi proces bojenja zaštitne tkanine na bazi novih boja istaknutih svojstava“ (2020-2021). Projekat je finansiran preko Fonda za inovacionu delatnost Republike Srbije. Zvanje istraživač pripravnik je stekla u septembru 2018. Oblasti istraživanja Milice Svetozarević su enzimsko inženjerstvo, primena enzima u tretman otpadnih voda u mikroreaktorskom sistemu. Kandidat Milica Svetozarević je predložila temu doktorske disertacije 15.12.2020. godine (odluka br. 2001/1) pod nazivom “Biorazgradnja antrahinonske boje peroksidazom izolovanom iz otpadnog materijala u šaržnom i kontinualnom sistemu”. Na sednici Nastavno-naučnog veća TMF-a od 04.02.2021. godine doneta je odluka pod brojem 35/19, o prihvatanju Referata Komisije o oceni i podobnosti teme i kandidata i odobrena je izrada doktorske disertacije pod nazivom “Biorazgradnja antrahinonske boje peroksidazom izolovanom iz otpadnog materijala u šaržnom i kontinualnom sistemu”. Veće naučnih oblasti tehničkih nauka Univerziteta u Beogradu na sednici održanoj 03.03.2021. godine donelo je odluku pod brojem 61206-972/2-21 o saglasnosti predložene teme doktorske disertacije.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

---

---

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_\_

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

---

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

## ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Биоразградња антрахинонске боје пероксидазом изолованом из отпадног материјала у шаржном и континуалном систему“, аутора Милице Светозаревић, констатујем да утврђено подударање текста износи 13%. Овај степен подударности последица је општих места, односно употребе стручних термина и података који се тичу обрађене теме, као и навођења дефиниција различитих појмова и објашњења параметара који се налазе у релацијама наведеним у тези. Значајан део подударности се односи на цитирану литературу, биографију кандидата као и изјаве кандидата.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

21.02.2022.

Ментор

Душан Мијин