

**UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET**

Marko M. Jonović

**IMOBILISANE PROTEAZE I PEROKSIDAZE
NA MAGNETNIM MIKRONSKIM I SUB-
MIKRONSKIM ČESTICAMA OBLOŽENIM
ALGINATOM KAO BIOKATALIZATORI ZA
HIDROLIZU PROTEINA I RAZGRADNJU
ANTRAHINONSKIH BOJA IZ OTPADNIH
VODA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY**

Marko M. Jonović

**IMMOBILIZED PROTEASE AND PEROXIDASE
ON MAGNETIC MICRON AND SUBMICRON
ALGINATE COATED PARTICLES AS BIOCAT-
ALYSTS FOR PROTEIN HYDROLYSIS AND
DECOLORIZATION OF ANTHRAQUINONE
COLORS FROM WASTEWATERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

MENTORI:

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

Dr Branko Bugarski, redovni profesor u penziji,
Univerzitet u Beogradu,
Tehnološko-metalurški fakultet

PREDSEDNIK KOMISIJE:

Dr Milena Žuža Praštalo, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu,
Institut za medicinska istraživanja

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Sonja Jakovetić Tanasković, docent,
Univerzitet u Beogradu,
Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Verica Đorđević, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu,
Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Nikola Milašinović, redovni profesor,
Kriminalističko-policijski univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE:

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija urađena je zahvaljujući finansiranju Ministarstvu nauke i tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, kao i na Katedri za hemijsko inženjerstvo, Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Doktorska disertacija je urađena pod mentorstvom prof. dr Zorice Knežević-Jugović i prof. dr Branka Bugarskog kojima se posebno zahvaljujem pre svega na omogućenim uslovima bez kojih ova doktorska disertacija ne bi mogla da se realizuje. Takođe, zahvaljujem se na uloženom trudu, pruženom vremenu, strpljenju, poverenju i podršci tokom izrade ove teze.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Mileni Žuži Praštalo, koja me je pored mojih mentora prihvatila prilikom promene oblasti istraživanja na doktorskim studijama i koja me je uvela u eksperimentalnu biotehnologiju.

Veoma sam zahvalan dr Branimiru Jugoviću, na pomoći oko sinteze i karakterizacije čestica magnetita.

Najtoplije se zahvaljujem dr Nataši Šekuljici, dr Jeleni Mijalković, doc. dr Sonji Jakovetić Tanasković, dr Neveni Prlainović, Ivani Gazikalović na pomoći oko izrade eksperimenata na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, kao i ostalima zaposlenim na katedri.

Zahvaljujem se prof. dr Nikoli Milašinoviću, prof. dr Milanu Milivojeviću i dr Verici Đorđević na prijatnoj saradnji, na svim korisnim savetima koji su umnogome doprineli da se kvalitet ove disertacije podigne na viši nivo.

Takođe se zahvaljujem, dr Predragu Petroviću, dr Nataši Obradović i dr Mini Volić na velikoj pomoći prilikom eksperimenata na Katedri za hemijsko inženjerstvo, ali pre svega na podršci tokom izrade ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Đorđu Veljoviću, dr Vukašinu Ugrinoviću, dr Luki Matoviću i dr Veljku Đokiću na pomoći oko karakterizacije čestica

Zahvaljujem se i svim kolegama sa IHTM-a koji su bili uz mene tokom izrade doktorske disertacije.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, koja je uvek bila i biće uz mene.

Ovu disertaciju posvećujem najbitnijoj osobi na svetu, mojoj ćerci Ljubici.

Imobilisane proteaze i peroksidaze na magnetim mikronskim i sub-mikronskim česticama obloženim alginatom kao biokatalizatori za hidrolizu proteina i obezbojavanje antrahinonskih boja iz otpadnih voda

REZIME

Predmet naučnog istraživanja doktorske disertacije je imobilizacija dva industrijski važna enzima, proteaze iz *Bacillus licheniformis* (komercijalni naziv alkalaza) i peroksidaze iz rena, kao i njihova primena u hidrolizi proteina i uklanjanju zagađujućih materija, kao što su fenoli i sintetičke boje, iz otpadnih voda. Fokus je na razvoju tehnika za dobijanje hidrogel čestica na bazi alginata i alginat/magnetita, kao i tehnika imobilizacije enzima koje bi omogućila dobijanje biokatalizatora sa unapređenim katalitičkim svojstvima. Enzimska hidroliza proteina i oksido-redukcija antrahinonskih boja katalizovane enzimima iz različitih grupa, odabrane su kao dve model reakcije za ispitivanje katalitičkih svojstava imobilisanih biokatalizatora, zbog komercijalne važnosti u industriji hrane i u procesima tretiranja otpadnih voda iz tekstilne industrije.

Razvojem imobilisanih enzima omogućena je primena enzima i u onim oblastima kada je primena slobodnog enzima ograničena zbog male stabilnosti usled degradacije autokatalizom, kao kod proteaza u slučaju hidrolize proteina, ili usled inhibicije supstratom u višku, kao kod peroksidaza za razgradnju antrahinonskih boja u prisustvu vodonik-peroksida. Imobilizacijom enzima mogu se dobiti stabilni biokatalizatori koji se mogu izdvojiti iz reakcione smeše po završetku reakcije filtracijom ili centrifugiranjem i koristiti više puta u šaržnim ili u toku dužeg vremenskog perioda u kontinualnim procesima. Jedan od najvažnijih faktora imobilizacije enzima je izbor i dizajn nosača za imobilizaciju, jer fizičke i hemijske karakteristike nosača u velikoj meri određuju aktivnost imobilisanog enzima.

Neorganski nosači poput oksida gvožđa mogu imati prednosti u poređenju sa drugim materijalima zbog velike termičke i mehaničke otpornosti, smanjene mikrobiološke kontaminacije i magnetnih svojstava što je, naročito, značajno kod imobilisanih enzima, gde se kao osnovna prednost u odnosu na native enzime ističe olakšana separacija iz reakcione smeše i njihova ponovna upotreba. Međutim, zbog malog broja funkcionalnih grupa na ovim neorganskim nosačima ne može se vezati dovoljna količina enzima, niti nagraditi povoljno mikrookruženje za enzim, što bi dovelo do unapređenja njegovih katalitičkih svojstava. Zato se oblaganjem magnetnih čestica dodatnom prevlakom od nekog organskog polimera sa većim brojem funkcionalnih grupa, kao što je alginat, potencijalno može vezati veća količina enzima i postići poboljšano vezivanje. U ovoj disertaciji ispitana je mogućnost korišćenja alginatnih čestica i magnetnih nanočestica obloženih alginatom kao nosača za imobilizaciju alkalaze i peroksidaze iz rena.

Veliku mogućnost primene za dobijanje čestica malih prečnika uniformnih veličina u industrijskim razmerama ima tehnika dobijanja čestica pod uticajem električnog polja, koja se u literaturi često naziva elektrostatička ekstruzija i koja se zasniva na primeni elektrostatičke sile na suspenziju polimera i biokatalizatora koja se pojavljuje na vrhu igle u vidu kapi, pri čemu dolazi do razbijanja kapi na više naelektrisanih sitnih kapljica. Ova tehnika je dosta proučena za imobilizaciju različitih biokatalizatora. U ovoj disertaciji pored elektrostatičke ekstruzije ispitan je i novi postupak za dobijanje alginatnih submikronskih čestica koji se zasniva na kombinovanju ultrazvučnog raspršivanja, sušenja toplim vazduhom i želiranja u koloni sa okvašenim zidovima. Naime, alginatne čestice su dobijene metodom ultrazvučnog raspršivanja rastvora alginata, pri čemu vazduh koji nosi raspršene čestice polimera-aerosola u zavisnosti od temperature i nezasićenosti, u manjoj ili većoj meri

podstiče isparavanje vode iz njih i na taj način im smanjuje veličinu, a tako dobijene nanočestice zatim geliraju u koloni sa okvašenim zidovima. Ovako dobijene nanočestice korišćene su kao nosači za imobilizaciju alkalaze i peroksidaze iz rena i njihova katalitička svojstva smo uporedili sa imobilisanim sistemima sa česticama dobijenim elektrostatičkom ekstruzijom. Čestice najboljih karakteristika (dimenzije, sferičnosti, raspodele veličina, magnetnih svojstva, odnosa magnetita i alginata) korišćene su za imobilizaciju enzima.

Optimizacija kovalentne imobilizacije enzima alkalaze na alginatne čestice i magnetit/alginatne čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom i ultrazvučnim raspršivanjem predstavlja drugu fazu eksperimenata. Ispitivan je uticaj uslova imobilizacije poput vrednosti pH, molariteta TRIS pufera, količine dodate alkalaze, načina hemijske aktivacije funkcionalnih grupa čestica i količine hemijskog agensa za aktivaciju, kao i samog vremena kontakta enzima sa aktiviranim česticama na aktivnost, masu vezanog enzima i prinos aktivnosti.

Količina vezane alkalaze određivana je standardnim metodama za određivanje proteina i to *Bradford*-ovom metodom, dok je proteolitička aktivnost određivana spektrofotometrijski praćenjem hidrolize hromogenog derivata kazeina, azokazeina. Morfološke karakteristike dobijenih čestica sa i bez imobilisanog enzima analizirane su primenom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Utvrđena je veličina čestica kao i morfologija površine magnetnih čestica sa i bez alginatne prevlake. Kako bi se bolje razumela priroda potencijalno uspostavljenih veza između enzima i nosača, čestice nosača i imobilizata karakterisane su infracrvenom spektroskopijom sa *Fourier*-ovim transformacijama. Metodom dinamičkog rasipanja svetlosti ispitane su raspodela veličine čestica i zeta potencijal. Magnetna svojstva čestica i jačina koercitivnog polja ispitana je primenom SQUID magnetometrije (superprovodni kvantni interferometar). Magnetna svojstva čestica su upoređena na osnovu histerezisnih krivih za magnetne i magnetit/alginat čestice na temperaturama od 5 K i 300 K.

Aktivnost slobodne i imobilisane alkalaze praćena je i u reakciji hidrolize proteina iz izolata soje i belanca u industrijski relevantnim uslovima, odnosno u reaktoru sa intenzivnim mešanjem i u prisustvu nečistoća na osnovu merenja utroška kalcijum-hidroksida za održavanje konstantne pH vrednosti tokom hidrolize. Korišćena je trinitrobenzensulfonska kiselina pri hidrolizi, tzv. TNBS metoda. Kinetika reakcije sa nativnim i imobilisanim enzimom je ispitana praćenjem brzine reakcije hidrolize proteina iz izolata soje i belanca pri različitim početnim koncentracijama supstrata u početnim uslovima, dok su kinetički parametri određeni korišćenjem aplikacije *Enzyme Kinetics* programskog paketa *OriginPro*. Ispitana je stabilnost imobilisane alkalaze, mogućnost upotrebe kroz više ciklusa izvođenja reakcije hidrolize proteina iz izolata soje i belanca u šaržnom reaktoru sa mehaničkim mešanjem i potencijalno zadržavanje aktivnosti nakon određenog vremena skladištenja. Dobijeni rezultati korišćeni su u daljem razvoju imobilisanog sistema sa peroksidazom iz rena.

Čestice najboljih karakteristika (dimenzije, sferičnosti, raspodela veličine, magnetna svojstva, odnosa magnetita i alginata) su korišćene za imobilizaciju peroksidaze iz rena. Količina vezane peroksidaze i njena aktivnost, kao i aktivnost slobodne peroksidaze, određivane su spektrofotometrijskom metodom sa pirogalolom kao supstratom. Ispitani su uticaji vremena imobilizacije, masenog odnosa enzima i nosača, koncentracije aktivirajućeg agensa na masu vezanog enzima i specifičnu aktivnost dobijenog biokatalizatora na aktivnost. Ispitana je stabilnost imobilisane alkalaze, mogućnost upotrebe kroz više ciklusa izvođenja reakcije oksidacije dve antrahinonske boje *Acid Violet 109* (AV109) i *Acid Blue 225* (AB225).

Efikasnost imobilisanih peroksidaza upoređena je na osnovu dobijenih kinetičkih parametara, aplikacijom *Enzyme Kinetics*, u reakciji oksidacije boje AV109 i AB225.

Ovaj rad je predstavio novu jednostavnu i brzu tehniku za proizvodnju submikronskih alginatnih čestica korišćenjem prilagođenog ultrazvučnog sistema za raspršivanje i uporedio čestice dobijene ovom tehnikom sa česticama dobijenim elektrostatičkom ekstruzijom u imobilisanim sistemima sa alkalazom za hidrolitičke reakcije sa standardnim i industrijskim proteinskim supstratima hrane. U te svrhe, alkalaza je efikasno kovalentno imobilisana na kalcijum-alginatne mikro- i submikronske čestice nakon modifikacije površine karbodiimidom. Optimalni uslovi za imobilizaciju alkalaze na alginatne mikročestice aktivirane sa EDAC su 5,32 IU alkalaze, 50 mM Tris-HCl pufer pH vrednosti 8,5, 30 minuta aktivacije EDAC-om (masa EDAC-a/masa nosača) (10 mg/0,5 g) i 20 sati imobilizacije. Najveću aktivnost je pokazala alkalaza imobilisana na UAD 0,4% (*w/v*) alginatnim česticama, sa maksimalnom vrednošću aktivnosti od 2716,1 IU/g nosača i najvećim opterećenjem enzima od 671,6±4 mg/g na nosaču. Imobilisani enzim na UAD 0,4% (*w/v*) alginatnim česticama pružio je bolje performanse od alginatnih mikročestica u pogledu hidrolize proteina iz belanca i izolata soje. Biokatalizator se može ponovo koristiti u sedam uzastopnih ciklusa hidrolize proteina soje sa malim smanjenjem aktivnosti. Stoga postoji potencijal za korišćenje ovog tipa submikronskih alginatnih čestica dobijenih novom tehnikom ultrazvučnog spreja za bilo koju imobilizaciju enzima.

HRP-C imobilisana na MAB se pokazala kao obećavajući biokatalizator za razgradnju dve antrahinonske boje. HRP-MAB sistem je pod optimalnim uslovima uklonio 77,3% i 76,1% AV109 i AB225 nakon 15 minuta, respektivno. Takođe je pokazao dobru ponovnu upotrebu nakon sedam ciklusa, zadržavajući 75% i 51% početne aktivnosti degradacije za AB225 i AV109, respektivno. Glavno ograničenje potencijalne komercijalne primene imobilisane HRP-C za uklanjanje antrahinonskih boja može biti inaktivacija enzima u prisustvu boje. Uprkos ograničenjima, ovi eksperimentalni rezultati ukazuju da HRP-MAB ima dobru budućnost u biokatalizi zbog niskih troškova, lakoće proizvodnje i efikasnog uklanjanja iz reakcionog medijuma radi ponovne upotrebe.

Ključne reči: Alkalaza, peroksidaza iz rena, imobilizacija, alginat, magnetit, hidroliza proteina, soja, belance, otpadne vode, antrahinonske boje

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Hemijsko inženjerstvo

UDK broj:

Immobilized Protease and Peroxidase on Magnetic Micron and Submicron Alginate Coated Particles as Biocatalysts for Protein Hydrolysis and Decolorization of Anthraquinone Colors from Wastewaters

ABSTRACT

The subject of the scientific research of the doctoral dissertation is the immobilization of two industrially important enzymes, protease from *Bacillus licheniformis* (commercial name alkalase) and peroxidase from horseradish, as well as their application in protein hydrolysis and removal of pollutants, such as phenols and synthetic dyes, from wastewater. The focus is on the development of techniques for obtaining hydrogel particles based on alginate and alginate/magnetite, as well as enzyme immobilization techniques that would enable obtaining biocatalysts with improved catalytic properties. Enzymatic hydrolysis of proteins and oxido-reduction of anthraquinone dyes catalyzed by enzymes from diverse groups we have chosen as two model reactions for evaluating the catalytic properties of immobilized biocatalysts, due to their industrial importance in the food industry and in the processes of treating wastewater from the textile industry.

The development of immobilized enzymes enabled the application of enzymes in those areas where the application of free enzymes is limited due to low stability due to degradation by autocatalysis, as in the case of proteases in the case of protein hydrolysis, or due to inhibition by excess substrate, as in the case of peroxidases for the degradation of anthraquinone dyes in the presence of hydrogen-peroxide. By immobilizing enzymes, we could obtain stable biocatalysts, which we separated from the reaction mixture after the end of the reaction by filtration or centrifugation and use repeatedly in batches or over a longer period in continuous processes. One of the most crucial factors in enzyme immobilization is the choice and design of the immobilization support, because the physical and chemical characteristics of the support determine the activity of the immobilized enzyme.

Inorganic supports such as iron oxide can have advantages compared to other materials due to high thermal and mechanical resistance, reduced microbiological contamination and magnetic properties, which is especially important for immobilized enzymes, where the main advantage compared to native enzymes has eased separation from reaction mixtures and their reuse. However, due to the small number of functional groups on these inorganic supports, enough enzyme cannot be bound, nor can we reward a favorable microenvironment for the enzyme coupling, which would lead to the improvement of its catalytic properties. Therefore, by coating the magnetic particles with an additional coating of an organic polymer with a larger number of functional groups, such as alginate, a larger number of enzymes can potentially be bound, and we could achieve improved binding. In this dissertation, we examined the possibility of using alginate particles and magnetic particles coated with alginate as carriers for the immobilization of alkalase and horseradish peroxidase.

The technique of obtaining particles under the influence of an electric field, which in the literature is often called electrostatic extrusion and which is based on the application of an electrostatic force to a suspension of polymers and biocatalysts that appears on the tip of a needle, in the form of drops, during which the drop splits into several small charged droplets, has a great possibility of application for obtaining particles with small diameters of uniform sizes on an industrial scale. Researchers have been extensively using this technique for the immobilization of various biocatalysts. However, this dissertation examined a new procedure for obtaining alginate submicron particles, which is based on a combination of ultrasonic dispersal, drying with hot air and gelling in a column with wetted walls. Namely,

we obtained alginate particles by the method of ultrasonic dispersion of alginate solution, whereby the air carrying the dispersed polymer-aerosol particles, depending on the temperature and unsaturation, to a greater or lesser extent encourages the evaporation of water from them and thus reduced their size, and thus obtained the nanoparticles gel in a column with wetted walls. We assessed the nanoparticles obtained in this way as carriers for the immobilization of alkalase and horseradish peroxidase and their catalytic properties with the immobilized systems with beads obtained by electrostatic extrusion. We used beads with the best characteristics (dimensions, sphericity, size distribution, magnetic properties, magnetite-alginate ratio) for enzyme immobilization.

Optimization of covalent immobilization of alkalase enzyme on alginate particles and magnetite/alginate particles obtained by electrostatic extrusion and ultrasonic spraying represents the second phase of the experiments. We have investigated the influence of immobilization conditions such as pH value, TRIS buffer molarity, amount of added alkalase, method of chemical activation of functional groups of particles and amount of chemical agent for activation, as well as the contact time of the enzyme with activated particles on activity, mass of bound enzyme and yield of activity.

The amount of bound alkalase and peroxidase was determined by standard methods for protein determination, the Bradford method, while the proteolytic activity was determined spectrophotometrically by monitoring the hydrolysis of the chromogenic derivative of casein, azocasein. We analyzed the morphological characteristics of the obtained particles with and without immobilized enzyme using scanning electron microscopy (SEM). The size of the particles as well as the surface morphology of the magnetic particles with and without alginate coating were determined. To better understand the nature of the potentially established bonds between the enzyme and the carrier, we have characterized the particles of the carrier and the immobilizer by Infrared Spectroscopy with Fourier transformations. Next, we examined the particle size distribution and zeta potential using the dynamic light scattering method. We examined the magnetic properties of the particles and the strength of the coercive field using SQUID magnetometry (superconducting quantum interferometer). Also, we have compared the magnetic properties of the particles based on hysteresis curves for magnetic and magnetite/alginate particles at temperatures of 5 K and 300 K.

The activity of free and immobilized alkalase we monitored in the reaction of protein hydrolysis from soy isolate and egg white under industrially relevant conditions, i.e., in a reactor with intensive mixing and in the presence of impurities based on the measurement of calcium hydroxide consumption to maintain a constant pH value during hydrolysis. We used trinitrobenzenesulfonic acid during hydrolysis, the so-called TNBS method. Kinetics of the reaction with native and immobilized enzyme, we have examined by monitoring the reaction rate of protein hydrolysis from soybean and egg white isolates at different initial substrate concentrations in initial conditions, while kinetic parameters were determined using the *Enzyme Kinetics* application of the *OriginPro* software package. We evaluated stability of the immobilized alkalase, the possibility of using it through several cycles of performing the protein hydrolysis reaction from soy and egg white isolates in a batch reactor with mechanical mixing, and the potential retention of activity after a certain storage time. We used the obtained results in the further development of the immobilized system with horseradish peroxidase.

We used beads with the best characteristics (dimensions, sphericity, size distribution, magnetic properties, ratio of magnetite and alginate) for horseradish peroxidase immobilization. The amount of bound peroxidase and its activity, as well as the activity of free peroxidase, were determined by the spectrophotometric method with pyrogallol as a

substrate. We have examined effects of immobilization time, mass ratio of enzyme and carrier, concentration of the activating agent on the mass of the bound enzyme and the specific activity of the obtained biocatalyst on the activity. With stability of the immobilized alkalase we evaluated the possibility of using it through several cycles of oxidation for two anthraquinone dyes, *Acid Violet 109*, and *Acid Blue 225*.

The effectiveness of immobilized peroxidases, we compared based on the obtained kinetic parameters, using the *Enzyme Kinetics* application, in the oxidation reaction of *AV109* and *AB225*.

The work presented here has demonstrated novel simple and fast technique for alginate submicron beads production by employing the custom-made ultrasonic spray atomization system and compared it with the electrostatic extrusion in the hydrolytic reactions with standard and industrial food protein substrates. For these purposes, we have effectively covalently immobilized alkalase onto calcium-alginate microbeads and submicron beads after surface modification by carbodiimide. The optimal conditions for the alkalase immobilization on the alginate microbeads activated with EDAC were 5,32 IU of alkalase, 50 mM Tris-HCl buffer pH 8,5, 30 min of activation by EDAC/beads mass ratio (10 mg/0,5 g) and 20 h immobilization time. The highest activity was exhibited with alkalase immobilized onto UAD 0,4% (*w/v*) alginate beads, with the maximal value of 2716,1 IU/g support and the highest enzyme loading of 671,6±4 mg/g on the carrier in comparison to 2600,8 IU/g and 592,3±6,7 mg/g for EE biocatalyst made from 2% (*w/v*) alginate solution. The immobilized enzyme onto UAD 0,4% (*w/v*) alginate beads provided better performance than micro-sized alginate counterparts in terms of egg white and soy protein hydrolysis. We have reused optimal biocatalyst in seven successive soy protein hydrolysis cycles with a slight decrease in activity. Therefore, there is potential to use this type of alginate submicron beads obtained by novel ultrasonic spray atomization technique for enzyme immobilization.

HRP-C immobilized on MABs proved to be a promising biocatalyst for degradation of two anthraquinone dyes. HRP-MABs removed 77,3% and 76,1% of *AV109* and *AB225* under optimal conditions after 15 min, respectively. It has also shown good reusability after seven cycles, retaining 75% and 51% of the initial degradation activity for *AB225* and *AV109*, respectively. A major limitation in potential commercial application of the immobilized HRP-C for anthraquinonic dye removal can be the inactivation of the enzyme in the presence of the dyes. Despite the limitations, these experimental results indicated that HRP-MABs have a good future in biocatalysis because of low cost, easy production, and efficient removal from the reaction medium for reuse.

Keywords: Alkalase, horseradish peroxidase, immobilization, alginate, magnetite, protein hydrolysis, soy, egg white, wastewater, anthraquinone dyes

Scientific area: Technological Engineering

Major area: Chemical Engineering

UDC number:

SADRŽAJ

UVOD	8
I. TEORIJSKI DEO	13
I.1. INDUSTRIJSKI ENZIMI	13
I.1.1 PROTEAZE	13
I.1.1.1 Klasifikacija proteaza	14
I.1.1.1.1 Klasifikacija proteaza na osnovu pH vrednosti	14
I.1.1.1.2 Klasifikacija proteaza na osnovu aktivnog centra proteaze	14
I.1.1.1.2.1 Serinske proteaze	14
I.1.1.1.2.2 Metallo-proteaze	15
I.1.1.1.2.3 Aspartatne proteaze	15
I.1.1.1.2.4 Cisteinske (tiolske) proteaze	15
I.1.1.1.2.5 Egzo-peptidaze	15
I.1.1.1.2.5.1 Aminopeptidaze	15
I.1.1.1.2.5.2 Karboksipeptidaze	16
I.1.1.1.2.6 Endopeptidaze	16
I.1.1.2 Izvori proteaza	17
I.1.1.2.1 Biljni izvori proteaza	17
I.1.1.2.2 Životinjski izvori proteaza	17
I.1.1.2.3 Mikroorganizmi kao izvori proteaza	17
I.1.1.2.3.1 Proteaze dobijene iz bakterija	18
I.1.2 ALKALAZA (EC 3.4.21.14)	18
I.1.3 ENZIMSKI TRETMAN PROTEINA HRANE	20
I.1.3.1 Enzimska hidroliza proteina	21
I.1.3.1.1 Hidroliza proteina jednim enzimom	23
I.1.3.1.1.1 Odnos enzima i supstrata	28
I.1.3.1.1.2 Temperatura reakcije	28
I.1.3.1.1.3 pH vrednosti reakcije	29
I.1.3.1.1.4 Vreme trajanja reakcije hidrolize	29
I.1.4 STRUKTURA I HEMIJA PROTEINA HRANE	30
I.1.4.1 Proteini soje	31
I.1.4.1.1 Struktura proteina soje	32
I.1.4.1.1.1 Globulin 11S	32
I.1.4.1.1.2 Globulin 7S	33
I.1.4.1.1.3 Struktura proteina soje u rastvorima	36
I.1.4.2 Proteini belanceta	36
I.1.4.2.1 Ovalbumin	38
I.1.4.2.2 Ovotransferin	38
I.1.4.2.3 Ovomucin	39
I.1.4.2.4 Inhibitori proteinaze	40
I.1.4.2.5 Ovomukoid	40
I.1.4.2.6 Ovoinhibitor	41
I.1.4.2.7 Cistatin	41

I.1.4.2.8 Ovostatin	42
I.1.4.2.9 Lizozim	42
I.1.4.2.10 Ovoglobulini	43
I.1.4.2.11 Proteini koji vezuju vitamine	43
I.1.4.2.11.1 Protein koji vezuje riboflavin (RfBP)	43
I.1.4.2.11.2 Avidin	44
I.1.4.2.11.3 Protein koji vezuje tiamin (ThBP)	44
I.1.5 PEROKSIDAZE	45
I.1.5.1 Klasifikacija peroksidaza	45
I.1.5.1.1 Superfamilija peroksidaza – Katalaze	46
I.1.5.1.2 Familija peroksidaza DyP – tipa	47
I.1.6 PEROKSIDAZA IZ RENA (HRP-C)	47
I.1.6.1 Struktura HRP-C	48
I.1.6.2 Mehanizam delovanja	51
I.1.6.2.1 Katalitički mehanizam delovanja HRP-C	52
I.1.6.2.2 Vezivna mesta aromatičnog supstrata	53
I.1.6.2.3 Inhibicija aktivnosti HRP-C	54
I.1.6.2.4 Primena HRP-C	55
I.2. BOJE	55
I.2.1 Klasifikacija boja	56
I.2.1.1.1 Direktne boje	59
I.2.1.1.2 Indigo boje	59
I.2.1.2 Boje za celulozna vlakna	59
I.2.1.2.1 Reaktivne boje	59
I.2.1.2.2 Sumporne boje	59
I.2.1.3 Boje za proteinska vlakna	60
I.2.1.3.1 Azo boje	60
I.2.1.3.2 Triarilmetanske boje	60
I.2.1.3.3 Ftalocijanatne boje	60
I.2.1.4 Boje za sintetička vlakna	60
I.2.1.4.1 Disperzne boje	61
I.2.1.4.2 Bazne boje	61
I.2.1.4.3 Antrahinonske boje	61
I.2.1.4.3.1 Antrahinonske boje C.I. Acid Blue 225 i C.I. Acid Violet 109	62
I.2.2 Karakteristike boja i njihov uticaj na životnu sredinu	63
I.2.2.1 Karakterizacija efluenta za bojenje tekstila	65
I.2.2.2 Štetni uticaji na zemljište i biljke	66
I.2.2.3 Štetni uticaji na vazduh	66
I.2.2.4 Štetni uticaji na ljude	66
I.2.2.5 Štetni uticaji na vodu	67
I.2.3 Tretman obojenih otpadnih voda	68
I.2.3.1 Proces fizičkog tretmana	68
I.2.3.1.1 Adsorpcija	69
I.2.3.1.2 Korišćenje nanočestica	69

I.2.3.1.3 Filtracija	70
I.2.3.1.4 Jonska razmena	70
I.2.3.2 Hemijski tretmani otpadnih voda	70
I.2.3.2.1 Oksidacija	70
I.2.3.3 Proces biološkog tretmana	71
I.2.3.3.1 Mehanizam bio-oksidacije enzima	72
I.2.3.3.1.1 Peroksidaze	72
I.2.3.3.1.2 Napredan proces bio-oksidacije	74
I.3. IMOBILIZACIJA ENZIMA	75
I.3.1 Osobine imobilisanih enzima	78
I.3.2 Tipovi imobilizacije	79
I.3.2.1 Ireverzibilne metode imobilizacije enzima	80
I.3.2.1.1 Kovalentna imobilizacija enzima	81
I.3.2.1.1.1 Aktivacija enzima EDAC-om	82
I.3.2.1.2 Zarobljavanje enzima i umrežavanje pri imobilizaciji	83
I.3.2.1.3 Inkapsulacija	83
I.3.3 Nosači za imobilizaciju enzima	84
I.3.3.1 Klasični nosači za imobilizaciju enzima	85
I.3.3.1.1 Organski materijali	86
I.3.3.1.1.1 Biopolimeri	86
I.3.4 ALGINAT	88
I.3.4.1 Struktura, derivatizacija i analiza alginata	89
I.3.4.2 Izvori ekstrakcije alginata	90
I.3.4.3 Osobine alginata	91
I.3.4.4 Metode formiranja hidrogela	92
I.3.4.4.1 Jonsko umrežavanje	93
I.3.4.4.2 Kovalentno umrežavanje	93
I.3.4.5 Metode formiranja alginatnih čestica	94
I.3.4.5.1 Elektrostatička ekstruzija	95
I.3.4.5.2 Ultrazvučno raspršivanje	97
I.3.5 Novi materijali nosača za imobilizaciju enzima	99
I.3.5.1 Neorganski materijali	100
I.3.5.1.1 Magnetne čestice	100
I.3.5.1.2 Nanočestice	100
I.3.5.2 MAGNETNE NANO ČESTICE (MNP)	101
I.3.5.2.1 Oksidi gvožđa	101
I.3.5.2.2 MAGNETIT	102
I.3.5.2.3 Fizička svojstva MNP	102
I.3.5.2.4 Sinteza magnetnih nanočestica	103
I.3.5.2.4.1 Klasična sinteza koprecipitacijom	104
I.3.5.2.4.2 Stabilizacija magnetnih čestica	107
I.3.5.2.4.2.1 Polimerni stabilizatori	108
I.3.5.2.4.2.2 Druge strategije za stabilizaciju	109
I.3.5.2.5 Organski materijali	110

I.3.5.2.6 Hibridni i kompozitni materijali	110
I.3.5.2.6.1 Organsko-neorganski hibridi	110
I.4. ENZIMSKA KINETIKA	111
I.4.1 Red reakcije	114
I.4.1.1 Reakcije prvog reda	114
I.4.1.2 Reakcije drugog reda	114
I.4.1.3 Reakcije nultog reda	116
I.4.2 Kinetika stacionarnog stanja i Mihaelis–Menten jednačina	116
I.4.3 Analiza kinetičkih podataka enzima	119
I.4.3.1 Grafički prikazi Mihaelis–Menten jednačine	119
I.4.3.1.1 Direktan i semilogaritamski prikaz	119
I.4.3.1.2 Metode linearizacije	121
I.4.3.2 Analiza krive brzine reakcije	124
I.4.3.2.1 Integrisanje Mihaelis–Menten jednačine	124
I.4.3.2.2 Određivanje brzine reakcije	125
I.4.4 Reverzibilne enzimске reakcije	128
I.4.4.1 Jednačina brzine za reverzibilne enzimске reakcije	128
I.4.4.2 Inhibicija proizvodom reakcije	130
I.4.5 Inhibicija enzima i srodni mehanizmi	132
I.4.5.1.1.1 Analizi prelaznog stanja	132
I.4.5.2 Povratna inhibicija	133
I.4.5.2.1 Opšte jednačine reda	133
I.4.5.2.2 Nekompetitivna inhibicija i grafičko predstavljanje podataka	135
I.4.5.2.3 Kompetitivna inhibicija	141
I.4.5.2.4 Akompetitivna inhibicija	143
I.4.5.3 Parcijalne inhibicije	145
I.4.5.3.1 Parcijalno nekompetitivna inhibicija	145
I.4.5.3.2 Parcijalno akompetitivna inhibicija	147
I.4.5.4 Inhibicija nekompetitivnim i akompetitivnim proizvodom	148
I.4.5.5 Inhibicija supstratom	149
I.4.6 Enzimске reakcije sa dva kompetitivna supstrata	151
I.4.7 Enzimске reakcije sa više supstrata	152
I.4.7.1 Mehanizmi enzimskih reakcija sa više supstrata	154
I.4.7.1.1 Random bi-bi mehanizam	154
I.4.7.1.2 Redni bi-bi mehanizam	158
I.4.7.1.3 Ping-pong bi-bi mehanizam	160
I.4.8 Zavisnost enzima od pH vrednosti i temperature	162
I.4.8.1 Optimum pH vrednosti i određivanje pK vrednosti	162
I.4.8.2 Stabilnost pH vrednosti	164
I.4.8.3 Temperaturna zavisnost	164
I.4.9 Kinetika imobilisanih enzima	169
I.4.9.1 Ograničenje spoljašnje difuzije	170
I.4.9.2 Ograničenje unutrašnje difuzije	172
I.4.9.3 Inhibicija imobilisanih enzima	173

I.4.9.4 pH i temperaturno ponašanje imobilisanih enzima	174
I.4.10 Prikupljanje i analiza kinetičkih podataka enzimskih reakcija	175
I.4.10.1 Redukcionizam u eksperimentalnom dizajnu	175
I.4.10.2 Izbor koncentracija supstrata	176
I.4.10.3 Početni eksperimenti i iteracija podataka	177
I.4.10.4 Važnost merenja početnih brzina	177
I.4.10.5 Primena integralnog oblika Mihaelis–Menten jednačine	178
I.4.10.6 Osnove analize eksperimentalnih podataka	178
I.4.10.6.1 Statistika, varijacije i greške pri eksperimentima	178
II. EKSPERIMENTALNI DEO	181
II.1. MATERIJALI	181
II.2. METODE	182
II.2.1 Postupak dobijanja kalcijum-alginatnih mikročestica metodom elektrostatičke ekstruzije	182
II.2.2 Postupak dobijanja kalcijum-alginatnih submikronskih čestica metodom ultrazvučnog raspršivanja	182
II.2.3 Hemijska sinteza magnetnih čestica	184
II.2.4 Postupak dobijanja magnetit-alginat čestica (MAB)	185
II.2.5 Veličina čestica i zeta potencijal	185
II.2.6 Mehanička čvrstoća MAB	186
II.2.7 Magnetna svojstva magnetita i MAB	186
II.2.8 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	186
II.2.9 Furijeova transformacijska infracrvena spektroskopija (FTIR)	186
II.2.10 Određivanje koncentracije proteina metodom po Bredfordu (<i>Bradford</i>)	186
II.2.11 Step en vlažnosti nosača	187
II.2.12 Optimizacija imobilizacije alkalaze na kalcijum-alginatne čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom	187
II.2.13 Određivanje aktivnosti imobilisane i slobodne alkalaze	188
II.2.13.1 Ispitivanje uticaja početne koncentracije alkalaze na imobilizaciju na alginatnim i MAB mikro-česticama dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom	189
II.2.13.2 Ispitivanje uticaja pH vrednosti Tris-HCl pufera na kovalentnu imobilizaciju alkalaze na alginatne mikro-čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom	189
II.2.13.3 Ispitivanje uticaja molariteta Tris-HCl pufera na kovalentnu imobilizaciju alkalaze na alginatne mikro-čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom	189
II.2.13.4 Ispitivanje uticaja vremena aktivacije nosača EDAC-om na kovalentnu imobilizaciju alkalaze na alginatne mikro-čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom	190
II.2.13.5 Ispitivanje uticaja mase EDAC-a pri aktivaciji nosača na kovalentnu imobilizaciju alkalaze na alginatne mikro-čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom	190
II.2.13.6 Ispitivanje uticaja vremena imobilizacije na kovalentnu imobilizaciju alkalaze na alginatne mikro-čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom	190

II.2.13.7 Ispitivanje uticaja koncentracije alginata i procesa sušenja na kovalentnu imobilizaciju alkalaze na alginatne nano-čestice dobijene ultrazvučnim raspršivanjem	190
II.2.14 Enzimaska hidroliza proteina iz belanceta i izolata soje imobilisanom i slobodnom alkalazom	191
II.2.14.1 Određivanje stepena hidrolize proteina	191
II.2.15 Određivanje kinetičkih konstanti u reakcijama enzimske hidrolize proteina iz izolata soje i belanceta slobodnom i imobilisanom alkalazom u šaržnom reaktoru sa mehaničkim mešanjem	192
II.2.16 Optimizacija imobilizacije HRP-C na MAB	192
II.2.16.1 Određivanje aktivnosti slobodne HRP-C	193
II.2.16.2 Određivanje aktivnosti imobilisane HRP-C	194
II.2.16.3 Ispitivanje uticaja pH vrednosti rastvora pirogalola na aktivnost slobodne HRP-C i HRP-MAB	194
II.2.16.4 Ispitivanje uticaja temperature reakcije sa rastvorom pirogalola na aktivnost slobodne HRP-C i HRP-MAB	195
II.2.16.5 Ispitivanje termalne stabilnosti reakcije sa rastvorom pirogalola preko aktivnosti slobodne HRP-C i HRP-MAB	195
II.2.17 Optimizacija procesa uklanjanja boja AB225 i AV109	195
II.2.18 Određivanje kinetičkih konstanti slobodne i imobilisane HRP-C u reakcijama uklanjanja boja AB225 i AV109	196
II.2.18.1 Korišćenje aplikacije <i>Enzyme Kinetics</i> u <i>OriginLab OriginPro 2022</i> softverskom programu	197
II.2.18.1.1 Instalacija	197
II.2.18.1.2 Primer u .OPJ formatu	197
II.2.18.1.3 Rad sa aplikacijom <i>Enzyme Kinetics</i>	198
II.2.18.1.4 Unošenje podataka u radni list	198
II.2.18.1.5 Fitovanje modela	198
II.2.18.1.6 Rezultati	199

III. REZULTATI I DISKUSIJA **200**

III.1. KARAKTERIZACIJA ČESTICA **201**

III.1.1 SEM analiza	204
III.1.2 Mehaničke osobine i magnetizacija	206
III.1.3 FTIR analiza	208
III.1.3.1 FTIR analiza za sistem alginat-alkalaza	208
III.1.3.2 FTIR analiza za sistem HRP-MAB	209

III.2. OPTIMALNI USLOVI ZA IMOBILIZACIJU ALKALAZE NA KALCIJUM ALGINATNE ČESTICE **210**

III.3. PRIMENA IMOBILISANE ALKALAZE ZA HIDROLIZU PROTEINA IZ HRANE U REALNOM REAKCIONOM SISTEMU **215**

III.3.1 Određivanje kinetičkih konstanti u reakcijama enzimske hidrolize proteina iz izolata soje i belanceta slobodnom i imobilisanom alkalazom u šaržnom reaktoru sa mehaničkim mešanjem	217
III.3.2 Recikliranje, stabilnost i ponovna upotreba imobilisana alkalaze	220

III.4. OPTIMALNI USLOVI ZA IMOBILIZACIJU HRP-C NA MAB ČESTICE	221
III.4.1 Uticaj uslova pri proizvodnji MAB čestica i imobilizaciji HRP-C na enzimsku aktivnost, ukupan sadržaj proteina i efikasnost imobilizacije	221
III.4.2 Uticaj pH vrednosti i temperature na aktivnost HRP-MAB čestica i slobodne HRP-C	225
III.4.3 Termička stabilnost slobodne HRP-C i HRP-MAB čestica	225
III.5. PRIMENA HRP-MAB ČESTICA ZA UKLANJANJE ANTRAHINONSKIH BOJA AV109 I AB225	226
III.5.1 Optimalni uslovi za proces uklanjanja boja AV109 i AB225	226
III.5.2 Određivanje kinetičkih konstanti pri reakcijama uklanjanja boja AB225 i AV109 slobodnom i imobilisanom HRP-C	230
III.5.3 Recikliranje i ponovna upotreba HRP-MAB čestica	235
ZAKLJUČAK	237
LITERATURA	242
SPISAK SKRAĆENICA	314
SPISAK SLIKA	315
SPISAK ŠEMA	321
SPISAK TABELA	322
PRILOG 1	324
BIOGRAFIJA AUTORA	331
<i>Изјава о ауторству</i>	332
<i>Изјава о коришћењу</i>	333
<i>Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада</i>	335

UVOD

Enzimi su neophodni za fiziologiju svakog živog organizma i postoje u svakom organizmu, bilo u jednostavnom ili složenom obliku. Njihova upotreba kao biokatalizatora u industrijskim procesima dobija sve više na značaju, zbog njihove sposobnosti da izvode reakcije sa visokom specifičnošću i efikasnošću, kao i enantioselektivnošću pri blagim uslovima.¹ Zbog svoje netoksičnosti i biodegradabilnosti od velike su važnosti za ekološki prihvatljive hemijske i industrijske procese.²⁻⁴ Visoka cena proizvodnje i relativno mala stabilnost u odnosu na klasične katalizatore su im glavne mane. Većina industrijskih enzima su životinjskog (himozin, pepsin, tripsin i pankreatin), biljnog (ficin, papain i bromelain) ili mikrobnog porekla (pektinaza, glukoamilaza, alkalaza).⁵⁻⁸ Mikrobnii enzimi naročito su postali neprocenjivi katalizatori u prehrambenoj, farmaceutskoj, tekstilnoj, kožarskoj, papirnoj industriji, kao i u proizvodnji deterdženata, biogoriva, pića i drugih potrošačkih proizvoda.⁹ Veći značaj mikrobnih enzima u poređenju sa enzimima biljnog i životinjskog porekla, pripisuje se njihovoj većoj stabilnosti i aktivnosti.¹⁰ Pored toga, mikrobnii enzimi se za minimalno vreme mogu proizvesti u većoj količini procesom fermentacije.¹¹

Proteolitički enzimi (koji se nazivaju i proteaze ili proteinaze) su enzimi sposobni da hidrolizuju peptidne veze u proteinima.¹² Zahvaljujući njihovoj specifičnosti da selektivno deluju na ključne proteine kontrolišući njihovu veličinu, strukturu i sastav, proteaze igraju važnu ulogu tokom različitih biohemijskih procesa.¹³ Proteaze, kao važna grupa industrijskih enzima, zauzimaju skoro 60% celog tržišta enzima i takođe čine 40% ukupne prodaje enzima, zbog njihove primena u mnogim industrijama kao što su industrija deterdženta, kožarska industrija, prehrambena industrija, prerada mesa, proizvodnja sira, papira i pulpe, recikliranje srebra iz fotografskih filmova, i procesima biremedijacije. Ovi enzimi mogu takođe da se koriste kao terapija za upalne procese i otvorene rane.¹⁴⁻¹⁸ Međutim, pored ovih tradicionalnih primena proteaza, sve više se ispituje njihov potencijal u proizvodnji bioaktivnih peptida, strukturnih proteina tačno određenih svojstava, farmaceutika i drugih finih hemikalija.

Različite proteaze imaju različita svojstva kao što su katalitička aktivnost, temperatura reakcije, pH vrednost, specifičnost supstrata, specifičnost aktivnog mesta i stabilnost.¹⁹ Zbog jednostavnosti u proizvodnim procesima, poželjnija je proizvodnja proteaza iz mikroorganizama. Većina mikrobnih proteaza je ekstracelularna i izlučuje se u medijumu za fermentaciju, što olakšava dalje procese dobijanja.²⁰ Većina komercijalno dostupnih proteaza su alkalne i biosintetišu ih uglavnom bakterije kao što su *Pseudomonas*, *Bacillus* i *Clostridium*, takođe se navodi da neke gljive proizvode ove enzime.²¹ Alkalne proteaze su veoma značajne sa industrijske tačke gledišta, zbog svoje aktivnosti i stabilnosti na alkalnim pH vrednostima, ali njihova primena je u novije vreme sve šira. Mogu se koristiti u sastavima od detergenata do farmaceutskih proizvoda. Koriste se u industrijama hrane, mleka, tekstila kao i u kožarskoj industriji (uklanjanje dlaka sa kože i za njeno pranje, omekšavanje mesa, razvoj ukusa kod sira ili poboljšanje svarljivosti stočne hrane).^{22,23}

Alkalaza (EC 3.4.21.14), je komercijalna proteaza proizvedena iz soja bakterija *Bacillus licheniformis* koja pripada klasi nespecifične endoproteaze serinskog tipa.²⁴ Kao i druge alkalne proteaze, alkalaza je prvo bila široko primenjena kao komponenta proizvoda za čišćenje, budući da je bila prva detergentna proteaza koju je *Novozymes* razvio tokom 1960-ih godina.²⁵ Svojom upotrebom u proizvodnji proteinskih hidrolizata, alkalaza je našla široku primenu u proizvodnji i modifikaciji hrane. Interesovanje za hidrolizate proteina progresivno raste u poslednje vreme, što je interesantna alternativa upotrebi intaktnih proteina kako u hrani, tako i u stočnoj hrani.^{26,27} Zasniva se na poboljšanju karakteristika proteina,

povećanju njegove svarljivosti ili smanjenju njegovih alergeni osobina. Štaviše, proizvodnja novih jedinjenja, slobodnih aminokiselina i peptida različitih veličina i sekvenci, može poboljšati funkcionalna i biološka svojstva originalnog proteina, u zavisnosti od izvora proteina supstrata i upotrebljene proteaze.^{28,29} Među ovim peptidima, mnogi mogu imati različite biološke aktivnosti, odnosno mogu pozitivno uticati na metabolizam i zdravlje ljudi i životinja, što je intenziviralo istraživanja u cilju uspostavljanja protokola za proizvodnju ovih peptida. Alkalaza je našla široku primenu u ovoj oblasti.³⁰

Peroksidaze (EC 1.11.1.7), budući da su oksidoreduktaze, katalizuju oksidaciju i redukciju raznih jedinjenja i peroksida. To su proteini sa hem grupom koji imaju molekulsku težinu u rasponu od 30 do 150 kDa i imaju specifičnu prostetičku grupu, tj. feriprotoporfirin IX poznat i kao gvožđe (III) protoporfirin IX. Značajna uloga aktivnosti peroksidaza u živim organizmima, posebno u životinjama, mikroorganizmima i biljkama, je otkrivena od 90-ih godina 20. veka. Njihova aktivnost doprinosi lignifikaciji i pruža pomoć u mehanizmu oporavka biljnih tkiva koja su ili zaražena ili telesno oštećena.^{31,32} Peroksidaze katalizuju oksidaciju peroksida i raznih drugih supstrata.^{33–35} Upotreba peroksidaza u imunološkim testovima i kliničkoj biohemiji je mnogostruka. Neke od novih i efikasnih upotreba peroksidaza obuhvataju fenolna jedinjenja koja sadrže otpadne vode, uklanjanje peroksidne kontaminacije i ostataka iz prehrambenih proizvoda, kao i industrijski otpad i sintezu aromatičnih hemikalija i jedinjenja.^{36,37} Krtole korena rena se uglavnom razmatraju i koriste za komercijalnu i masovnu proizvodnju peroksidaza, ali neke od rekombinovanih vrsta koje imaju bolje osobine takođe se koriste za proizvodnju peroksidaza.^{38,39}

Peroksidaza iz rena (HRP-C) je enzim koji sadrži hem grupu koji je sposobna da katalizuje oksidaciju različitih organskih jedinjenja kao što su hlorisana organska jedinjenja, fenoli, boje u tekstilnoj industriji, efluenti i ulja uz istovremenu redukciju vodonik-peroksida (H_2O_2) na njegovom kosupstratu stvarajući velike reaktivne hidroksilne radikale.⁴⁰ Izoenzimi peroksidaze rena pripadaju klasi III (sekretne biljne peroksidaze) superfamilije biljnih peroksidaza, koja uključuje peroksidaze bakterijskog, gljivičnog i biljnog porekla. HRP-C je pokazala potencijal kao katalizator za bioremedijaciju, zbog svoje sposobnosti da oksidira veliki broj boja čak i u prisustvu zagađivača koji se obično nalaze u otpadnim vodama, njene sposobnosti da funkcioniše u širokim rasponima temperatura i pH vrednosti, njene dostupnosti i relativno niske cene.^{41–44} Međutim, pod različitim uslovima HRP-C nije stabilna. Glavni problem u reakciji koju katalizuje slobodna HRP-C je cena enzima, kao i niska stabilnost biokatalizatora, naročito u industrijskim uslovima i u prisustvu supstrata- vodonik-peroksida, što značajno podiže cenu celog procesa.

Jedan pristup za povećanje stabilnosti enzima i razvoj isplativog bioprocesa predstavlja imobilizacija biokatalizatora na različitim nosačima, čime se omogućava njegova ponovna upotreba.^{45,46} Imobilizacijom enzima na različite prirodne i sintetičke organske ili neorganske materijale možemo dobiti enzimске sisteme sa povoljnim svojstvima. Imobilisani enzimi se mogu lako odvojiti iz reakcionih sistema za ponovnu upotrebu i koristiti više puta ili kontinuirano u različitim reaktorima, što bi smanjilo kontaminaciju proizvoda enzimom i scale-up učinilo jednostavnijim.^{47,48} Imobilisani enzimi su takođe često pokazivali veću selektivnost i specifičnost.⁴⁹

Izbor odgovarajućeg nosača i metode imobilizacije je veoma važan da bi se poboljšala stabilnost enzima, a u nekim slučajevima čak i aktivnost.^{49,50} Alginat ima veliki potencijal kao nosač jer sadrži veliki broj visoko negativno naelektrisanih grupa koje se na različite načine i preko jonskih interakcija mogu vezati za enzim. Pored toga, ovaj prirodni polisaharid sintetizovan od smeđih morskih algi i bakterija u zemljištu, lako formira strukture

slične gelu u prisustvu dvovalentnih katjona, obično Ca^{2+} u koje se enzim može umetnuti ili se hemijski vezati.^{51,52} Do sada su razvijene različite metode alginatnog želiranja (spoljno, unutrašnje i hladno želiranje), kao i metode za dobijanje čestica kalcijum-alginata (ekstruzija, emulzija, sušenje raspršivanjem, kompleksna koacervacija).^{53–55} Najpopularniji metod za imobilizaciju različitih enzima korišćenjem alginatnih čestica je inkapsulacija.^{51,52,56,57} Međutim, za imobilizaciju alkalaze, potrebno je uzeti u obzir nekoliko aspekata, kao što su jedinstvene karakteristike supstrata, obično velikih makromolekula, što uzrokuje unutrašnja ograničenja difuzije ovog velikog molekula unutar katalizatora i sklonost enzima ka autolizi. Štaviše, molekuli enzima nisu dovoljno veliki da se izbegne njihovo ispiranje iz gela, pa imobilizacija ovog enzima inkluzijom u polimernu matricu je praćena smanjenjem katalitičke efikasnosti u uzastopnim hidrolitičkim ciklusima, kao posledica curenja enzima iz hidrogela. S druge strane, kovalentno vezivanje različitih enzima za čestice kalcijum-alginata, npr. preko tzv. „višetačkastog kovalentnog vezivanja“ korišćenjem karbodiimida kao aktivirajućeg agensa, opisano je kao pogodan metod za postizanje stabilizacije nekoliko enzima kao što su β -galaktozidaza, acetilholinesteraza, α -amilaza i drugi.^{58–60} Iako enzimi kovalentno vezani za alginatne čestice nude neke posebno atraktivne prednosti za mnoge biološke primene, koliko nam je poznato, u literaturi ne postoje studije koje se odnose na kovalentnu imobilizaciju alkalaze na alginatnim mikronskim ili submikronskim česticama. Generalno, pored velike primene i značaja proteaza za modifikaciju proteina u prehrambenim matrkisima, kovalentna imobilizacija proteaza i njihova primena za katalizu hidrolitičkih reakcija u realnim sistemima hrane nije puno ispitivana, odnosno mnogo manje u poređenju sa drugim enzimima.⁶¹

Većina postojećih metoda imobilizacije enzima na ili unutar alginatnih čestica odnosi se na proizvodnju čestica veličine 100–2000 μm , dok se o submikronskim alginatnim česticama može naći samo oskudna literatura. Za potrebe imobilizacije enzima, submikronske alginatne čestice ($<1 \mu\text{m}$) imaju brojne prednosti u odnosu na veće čestice i pružaju rešenje za generalno kontradiktorna pitanja u vezi sa optimizacijom sistema imobilizacije, kao što su mnogo veća mehanička čvrstoća, minimalno ograničenje difuzije, maksimalna površina po jedinici mase i mogućnost vezivanja veće količine enzima.⁶² Štaviše, mogu lako da prođu kroz uske prskalice i kanale koji bi bili blokirani većim česticama. Većina metoda opisanih u literaturi za proizvodnju alginatnih nanočestica, nanoagregata i nanokapsula su komplikovane za izvođenje, često uključuju upotrebu različitih hemikalija (osim alginata i izvora jona Ca^{2+}) i imaju ograničenu sposobnost kontrole veličine čestica (agregata generacija). Pored toga, većina njih nije pogodna za dobijanje velikih količina čestica, što znači da nisu od velikog značaja za industrijsku primenu.^{63–66}

Hidrogelovi i nanomaterijali koji obezbeđuju veliku površinu, veliki broj funkcionalnih grupa i druge prednosti nisu optimalni nosači u smislu reciklacije i ponovne upotrebe biokatalizatora jer se ne mogu izdvojiti iz reakcionog medijuma nakon reakcije korišćenjem uobičajenih operacija kao što su centrifugiranje ili filtracija. Međutim, primena magnetnih nanočestica može imati veliki potencijal u ovoj oblasti za olakšanu separaciju biokatalizatora iz reakcionog medijuma zbog olakšane magnetne separacije primenom spoljašnjeg magnetnog polja.⁶⁷

Kao magnetni materijal, nanočestice oksida gvožđa (magnetit) su uspešno korišćene ne samo za imobilizaciju enzima, već i u mnogim drugim oblastima kao što su odvajanje biohemijskih proizvoda i magnetski potpomognuta isporuka lekova.⁶⁸ Mogu se modifikovati funkcionalnim grupama ili neorganskim jedinjenjima da bi se dobio magnetni nosač koji ima veliki potencijal za imobilizaciju enzima.⁶⁹ Međutim, magnetit ima neka

ograničenja u praktičnoj primeni, kao što su hemijska nestabilnost (lako oksiduju na vazduhu), laka aglomeracija, problematična distribucija i sakupljanje.⁷⁰ Integrisanje magnetita u druge materijale za stvaranje kompozitnih ili hibridnih materijala (npr. ugljenične nanocevi sa magnetitom, biopolimeri konjugovani sa magnetitom)⁷¹⁻⁷³ ili oblaganje magnetita sa nekim polimerom (npr. alginat, poliakrilna kiselina, poli(vinil alkohol), polietilenimin, poli(izobutilen-alt-maleinski anhidrid) polietilenglikol, skrob, metoksipoli(etilenglikol)) su glavne strategije koje se koriste za rešavanje ovih nedostataka magnetita.⁷⁴⁻⁷⁸ U okviru ove doktorske disertacije sintetisale se magnetne nanočestice obložene alginatom i ispitaće se njihov potencijal za imobilizaciju dva industrijski važna enzima. Navedene čestice kombinuju prednosti obe vrste čestica (čestice gela i magnetita) i to: brzo odvajanje spoljnim magnetnim poljem i/ili gravitaciono taloženje zbog velike gustine, velika hemijska stabilnost posebno pri nižem pH vrednostima rastvora, pojačana aktivnost enzima i mogućnost primene velikog broja dostupnih metoda koje mogu da daju velike količine čestica pod blagim i jednostavnim uslovima pripreme.

U ovom radu sintetizovana su dva tipa čestica kalcijum-alginata (mikronske i submikronske čestice). Submikronske čestice alginata su dobijene u ultrazvučnom uređaju koji koristi raspršivanje rastvora natrijum-alginata pomoću jedinice za raspršivanje ultrazvučnog raspršivača. Nakon toga, alginatni aerosol se suši i zatim prenosi strujom vazduha u kolonu sa vlažnim zidovima, gde se odvija želiranje u rastvoru kalcijum-hlorida. Takav sistem ima dve novine u poređenju sa konvencionalnom ultrazvučnom raspršivanjem. Prva je sušenje aerosola, koje omogućava stvaranje funkcionalnih submikronskih čestica iz razblaženih rastvora alginata. Naime, sušenje alginatne matrice dovodi do povećanja koncentracije alginata i čvrstoće čestica. Još jedna novina je način sakupljanja čestica, pomoću kolone sa vlažnim zidovima koji prevazilazi mnoge probleme, uključujući začepljenje kolone i formiranje aglomerata na ulazu i izlazu iz kolone koji nastaju kada alginat nije u obliku aerosola.

Druga vrsta alginatnih čestica, mikročestica, koje su formulisane u ovom radu, dobijena je metodom elektrostatičke ekstruzije koja se zasniva na procesu formiranja alginatnih kapljica pod uticajem elektrostatičkih sila.^{51,54} Od posebnog interesa je inkapsuliranje magnetita u čestice kalcijum-alginata, pošto je kovalentno vezivanje enzima za kalcijum-alginat korišćenjem karbodiimida kao aktivirajućeg agensa opisano kao pogodan metod za postizanje stabilizacije i dobrih performansi nekoliko enzima uključujući alkalazu, β -galaktozidazu, acetilholinesterazu, α -amilazu i druge.^{56-58,79} Na osnovu uvida u literaturu, u ovom radu će se prvi put ispitati peroksidaza kovalentno imobilisana na MAB česticama. Do sada, najbliži sistem ovom sistemu je onaj koji su dali Vasak (*Wasak*) sa saradnicima, koji su koristili peroksidazu tipa DyP za imobilizaciju u alginatne feromagnetne čestice, ali su autori primenili fizičko zarobljavanje kao proceduru imobilizacije.⁸⁰

Sintetičke boje imaju složenu aromatičnu molekularnu strukturu i najmanje jednu hromofornu grupu koja poseduje obojenost i neophodna su u različitim značajnim industrijama kao što su kožarska, papirna, kao i tekstilna industrija zbog svojih osobina bojenja.⁸¹ Tekstilne boje su posebno jaki zagađivači zbog svoje visoke toksičnosti po životnu sredinu, kao i potencijalne toksičnosti koja je rezultat degradacije boja u ekosistemu.⁸² Iako sastav proizvoda razgradnje tekstilnih boja varira, tokom redukcije boja i njihovih međuproizvoda mogu nastati visoko mutagena ili kancerogena jedinjenja. Konzumacija vode kontaminirane bojom od strane ljudi može izazvati razne štetne zdravstvene efekte kao što su problemi sa disanjem, supresija imuniteta, poremećaji centralnog nervnog sistema, problemi u ponašanju, alergijske reakcije, nekroza tkiva i infekcije kože i očiju.⁸³ Ovi ekološki i zdravstveni

problemi povećali su interesovanje istraživača i industrije za pronalaženje efikasnih metoda za uklanjanje ili degradaciju velikih količina ovih zagađujućih efluenta iz otpadnih voda u kratkom vremenskom periodu bez stvaranja sekundarnog zagađenja.⁸⁴ Različite metode uklanjanja boje ustanovljene su u bezbrojnim istraživačkim radovima koji tvrde da se različite boje mogu uspešno razgraditi postupcima, kao što su fizička adsorpcija, hemijska oksidacija, hemijska koagulacija/taloženje, elektrohemijska oksidacija, ultra/nano filtracija, fotokataliza i biološka anaerobna/aerobna degradacija i/ili konverzija.⁸⁵⁻⁹² Međutim, postoji niz nedostataka tehnika sintetičkog uklanjanja boja koje se moraju savladati: generišu se velike količine aktivnog mulja koje zahtevaju pravilno skladištenje i tretman, visoka cena i mala efikasnost procesa. Sa druge strane, biološkim postupcima koji se zasnivaju na primeni enzima i mikroorganizama poput bioremedijacije otpadnih voda sintetičkih boja moguće je postići veliku učinkovitost u uklanjanju boja bez opasnosti stvaranja toksičnih proizvoda ili generisanje otpada. Biološki procesi su klasifikovani kao potpuno prirodne metode gde se organske boje pretvaraju u potpuno bezopasne krajnje proizvode.⁹³

U ovom radu, ispitana je izvodljivost kovalentne imobilizacije alkalaze na mikronske i submikronske čestice kalcijum-alginata, koje su aktivirane sa 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidom (EDAC). Uslovi imobilizacije (koncentracija enzima, pH vrednost i molaritet pufera, odnos mase EDAC/nosač, vreme tretmana EDAC-om i vreme imobilizacije) su optimizovani na osnovu prinosa imobilizacije, kapaciteta vezivanja enzima i aktivnosti imobilisanog enzima na alginatnim mikronskim i submikronskim česticama. Optimalno proizvedeni biokatalizatori su zatim korišćeni u industrijski važnim reakcijama, uključujući enzimsku hidrolizu proteina iz belanceta i soje. Dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima dobijenim pri hidrolizi sa slobodnom alkalazom.

Drugi deo ove studije proizilazi iz potrebe da se razvije optimalni imobilisani biokatalizator sa peroksidazom iz rena (*HRP-C*), koji će imati najbolje karakteristike u pogledu prinosa imobilizacije, kapaciteta vezivanja enzima, mehaničke stabilnosti i aktivnosti imobilisanog enzima. Potom su performanse razvijenog biokatalizatora testirane u industrijski važnim reakcijama; odnosno ispitan je njegov katalitički potencijal u uklanjanju dve antrahinonske boje, AB225 i AV109. Ove kisele antrahinonske boje, koje imaju široku upotrebu za bojenje i štampanje vune, poliamida, svile i mešanih vlakana, odabrane su kao modeli za ova ispitivanja kao glavna klasa obojenih zagađivača životne sredine zbog svoje visoke toksičnosti i otpornosti na degradaciju i zato je važno ukloniti ih iz industrijskih efluenata pre nego što se isti ispuste u životnu sredinu.⁹⁴

I. TEORIJSKI DEO

I.1. INDUSTRIJSKI ENZIMI

U savremenoj nauci i tehnologiji, enzimi su postali ključni akteri u preoblikovanju industrijskih procesa, postavljajući temelje za razvoj napredne biotehnologije. Kao esencijalni biokatalizatori, industrijski enzimi, poput proteaza i peroksidaza, omogućavaju razvoj održivih i efikasnih tehnoloških rešenja, pružajući alternativu tradicionalnim hemijskim metodama. Njihova sposobnost da deluju specifično i efikasno na širokom opsegu temperatura i pH vrednosti ih čini idealnim za različite industrijske aplikacije. Posebno, tehnika imobilizacije ovih enzima je otvorila nove mogućnosti za njihovu ponovljenu upotrebu i kontrolisanu aplikaciju u industrijskim procesima.^{95,96}

Proteaze, koje katalizuju razlaganje proteina na manje fragmente, kad su imobilisane, pokazuju poboljšanu termalnu stabilnost i otpornost na promenljive uslove okruženja, što je ključno u industrijskim primenama kao što su proizvodnja detergenata, hidroliza proteina i razvoj terapijskih agenasa u farmaciji. Ova karakteristika omogućava njihovu efikasniju upotrebu i smanjuje troškove proizvodnje.¹⁸ S druge strane, peroksidaze su instrumentalne u oksidaciji različitih supstrata, igrajući ključnu ulogu u ekološkom inženjeringu. Kada se imobilizuju, postaju snažni alati u bioremedijaciji i obradi otpadnih voda, jer njihova imobilizacija povećava otpornost enzima na inhibitore prisutne u industrijskim otpadima. Takva poboljšanja omogućavaju peroksidazama da efikasno razgrađuju toksične materije, što je ključno za ekološku održivost.⁹⁷

Bitno je postaviti teorijski i praktični okvir za dublje razumevanje uloge i potencijala ovih industrijskih enzima, kao i istražiti kako oni, posebno u imobilisanom obliku, mogu doprineti razvoju održivih i efikasnijih industrijskih procesa.

I.1.1 PROTEAZE

Proteaze su enzimi koji se prirodno pojavljuju u većini živih ćelija i obavljaju vitalne fiziološke funkcije kao što su aktivacija proenzima, koagulacija krvi posttranslaciona modifikacija i inflamacija.⁹⁸ Oni imaju centralnu funkciju u apsorpciji aminokiselina u ćelije hidrolizom proteina i u metabolisanju azota.^{99,100} One predstavljaju najistaknutiju porodicu gena koja čini približno 2% našeg genoma.¹⁰¹ Međutim, većina proteaza početno proizvedenih u prirodi su neaktivni prekursori zvani proenzimi ili zimogeni koji sprečavaju neželjene proteolize. Oni prolaze kroz konformacione promene izazvane okolnom sredinom ili otcepljuju aktivacioni segment da bi dobili aktivni oblik.²²

Proteaze se sastoje ne samo od jednog enzima, već takođe sadrže skup enzima (koji uključuje proteinaze, peptidaze i amidaze). Proteinaze učestvuju u hidrolizi celih proteinskih molekula oslobađajući peptone i amino kiseline. Peptidaze izazivaju hidrolizu peptida i oslobađaju amino kiseline, dok amidaze katalizuju hidrolizu aminokiselina i oslobađaju amonijak.^{102,103} Molekulska masa proteaza je u opsegu 18-90 kDa.¹⁶

Danas većina enzima koji se koriste u industriji je hidrolitička i koristi se za razgradnju različitih prirodnih materijala. Zbog široke upotrebe u industriji mleka i deterdženata, proteaze predstavljaju dominantni tip enzima.¹⁰⁴ Štaviše, one su ekološki prihvatljive i obično imaju tendenciju da smanje nivo toksičnosti u atmosferi nakon upotrebe u industriji.¹⁰⁵

Zbog njihove mogućnosti da raskidaju peptidne veze u proteinima, proteaze predstavljaju osnovne industrijske enzime sa širokom primenom u hemijskim i biohemijskim procesima. Glavne prednosti korišćenja proteaza u industriji su aktivnost pri blagim uslovima reakcije, stereo-specifičnost, biorazgradljivost, mogućnost proizvodnje prirodnih proizvoda.¹⁸ Vrednost svetskog tržišta proteolitičkih enzima će se povećavati za 6,1% godišnje do 2024. godine. Očekuje se da će do 2024. godine ukupna vrednost prihoda na svetskom tržištu proteaza iznositi 3 milijarde USD.¹⁸

I.1.1.1 Klasifikacija proteaza

I.1.1.1.1 Klasifikacija proteaza na osnovu pH vrednosti

Proteaze, kao i drugi enzimi, zavisne su od pH vrednosti rastvora. Stoga, na osnovu vrednosti pH mogu se klasifikovati kao kisele (pH vrednosti u opsegu 2-6), neutralne (pH vrednosti u opsegu 6-8) i bazne (pH vrednosti u opsegu 8-13).^{29,103}

I.1.1.1.2 Klasifikacija proteaza na osnovu aktivnog centra proteaze

Proteaze koje pripadaju klasi hidrolaze (EC.3) su grupisane u podklasu peptidnih hidrolaza ili peptidaza (EC 3.4). Proteaze koje hidrolizuju spoljne peptidne veze (-NH₂ ili -COOH terminalne grupe supstrata) poznate su kao egzopeptidaze (EC 3.4.11–19), dok one koje hidrolizuju unutrašnje peptidne veze proteina su poznate kao endopeptidaze (EC 3.4.21–99).^{12,106}

Proteaze se mogu podeliti na osnovu strukture aktivnog mesta i mehanizma katalize na serinske proteaze, metalo-proteaze, aspartatne proteaze i cisteinske proteaze.

I.1.1.1.2.1 Serinske proteaze

Serinske proteaze imaju široku raznolikost u prirodi koja se javlja ne samo u carstvu ćelijskih organizama, već su prisutne i u mnogim virusnim genomima. Od poznatih proteolitičkih enzima, jedna trećina su serinske proteaze. To su generalno enzimi koji u aktivnom centru imaju aminokiselinski ostatak serina i najčešće su endopeptidaze po mehanizmu delovanja, odnosno kod kojih se kidanje veze odvija u centralnom delu lanca. Neke od njih su egzopeptidaze, koje odvajaju aminokiseline sa krajeva polipeptidne sekvence. Njihovo ime potiče od ostatka Ser, koji je nukleofilan i nalazi se u aktivnom centru enzima. Intermedijer acil-enzima se formira reagovanjem serinskog ostatka sa karbonilnim krajem predstojeće peptidne veze supstrata. Njihova nukleofilna aktivnost se može prepisati kompleksu *Asp*, *His* i *Ser* ostataka^{107,108}

I.1.1.1.2.2 Metalo-proteaze

Metallo-proteaze su uglavnom endopeptidaze koje sadrže cink. Joni metala, prisutni u gljivama, kao što su kobalt, kalcijum i cink su uključeni u njihovu reaktivaciju. Većina gljivičnih i bakterijskih metaloproteaza poseduju enzime koji sadrže cink. Cink je potreban za njihovu enzimsku aktivnost, a kalcijum je neophodan za stabilizaciju strukture molekula. Ovi enzimi imaju optimalnu pH vrednost u rasponu 5-9 i osetljivi su na agense za heliranje metala kao što je *EDTA*, ali su neosetljivi na cisteinske ili sulfohidrilne inhibitore.¹⁰⁹

I.1.1.1.2.3 Aspartatne proteaze

Aspartatne proteaze su dvokrake sa centralnim katalitičkim mestom, koje se sastoji od dva ostatka aspartata. Ove proteaze funkcionišu pri kiselj vrednosti pH i nalaze se u životinjama, biljkama i mikroorganizmima. Aspartatne proteaze imaju afinitet prema hidrofobnim amino kiselinama u blizini dipeptidne veze. Najpoznatiji predstavnici su pepsin i renin, koji su životinjski stomadni enzimi.¹¹⁰⁻¹¹²

I.1.1.1.2.4 Cisteinske (tiolske) proteaze

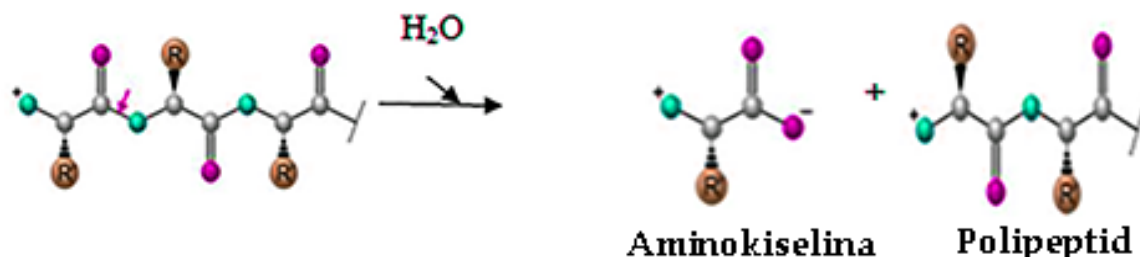
Aktivno mesto ove klase proteaza se sastoji od ostataka cisteina. One imaju prirodno poreklo u prokariotskim i eukariotskim organizmima. Optimalne pH vrednosti za njihovu proteolitičku aktivnost su u rasponu 6-8, dok je optimalna temperatura 50-70 °C. Vodoničcijanid prikazuje posledičnu ulogu pri aktivaciji ovih enzima zahvaljujući regeneraciji -SH grupe. Ove proteaze mogu da se inhibiraju oksidirajućim agensima i pokažu osetljivost na sulfohidrilne agense npr. *p-CMB*, međutim one ostaju nepromenjene sa sredstvima za heliranje metala.¹¹³

I.1.1.1.2.5 Egzopeptidaze

Egzopeptidaze katalizuju raskidanje karakterističnih peptidnih veza u blizini amino ili karboksilnih terminalnih grupa u supstratu. U zavisnosti od mesta delovanja (-NH₂ ili -COOH terminalne grupe supstrata), one su dodatno okarakterisani kao dve veće klase aminopeptidaze i karboksipeptidaze.^{114,115}

I.1.1.1.2.5.1 Aminopeptidaze

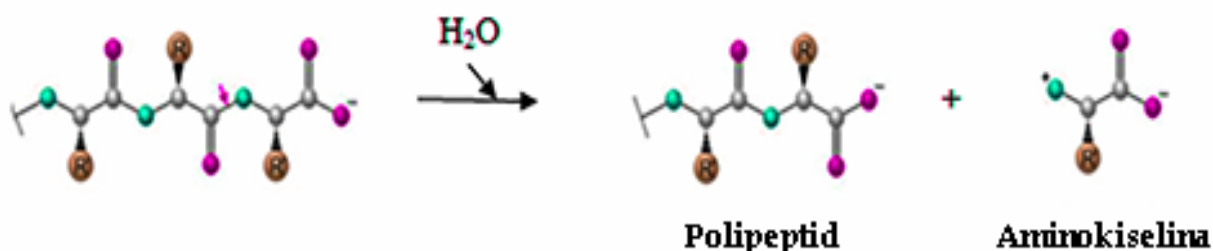
Aminopeptidaze oslobađaju tripeptidne, dipeptidne i pojedinačne aminokiselinske ostatke iz polipeptidnih lanaca sa slobodnom N-terminalnom grupom (slika 1). Nakon prepoznavanja, nastoje da uklone N-terminalni metionin koji bi mogao biti prisutan u proteinima, koji su heterologni po ekspresiji, ali se ne nalaze u mnogim prirodnim (zrelim) proteinima. Aminopeptidaze se javljaju u širokom opsegu mikrobnih sojeva, uključujući bakterije i gljivice.¹⁸



Slika 1. Reakcija katalizovana aminopeptidazom

I.1.1.1.2.5.2 Karboksipeptidaze

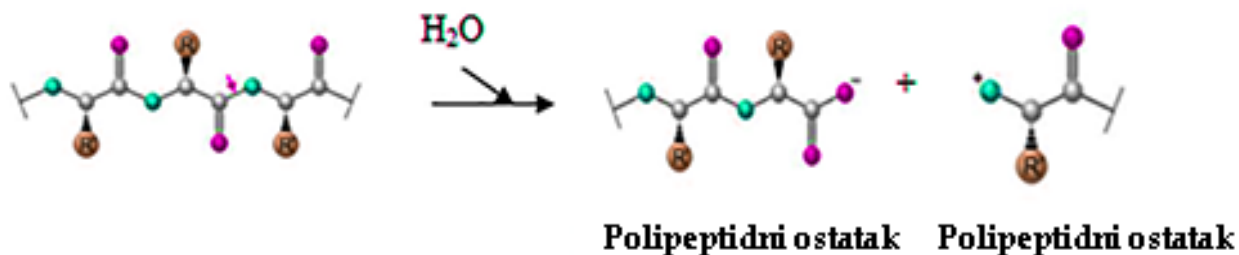
Karboksipeptidaze pokazuju svoje katalitičku aktivnost na slobodnom C terminalom kraju polimera aminokiselina uz oslobađanje dipeptida i pojedinačnih amino kiselina (slika 2). One se primarno ne tretiraju kao endopeptidaze, jer ostavljaju aminokiselinu na ciljanom proteinu. Umesto toga, one su zaslužne za klanjanje ostataka dodatih na C-terminalnom kraju ciljanog proteina. Među metalo-karboksiproteazama, karboksipeptidaza tipa A prvenstveno uklanja bočni ili aromatični lanac i smanjuje veličinu enzima, dok se tip B uvodi u proces za osnovne amino kiseline.¹⁰⁶



Slika 2. Reakcija katalizovana karboksipeptidazom

I.1.1.1.2.6 Endopeptidaze

Endopeptidaze raskidaju peptidnu vezu na mestu unutar supstrata (slika 3). Pod uticajem određene funkcionalne grupe prisutne na aktivnom mestu, endopeptidaze su dalje podeljene na serinske, aspartatne, cisteinske i metalo-proteaze.^{114,116}



Slika 3. Reakcija katalizovana endopeptidazom

I.1.1.2 Izvori proteaza

Proteze su neophodne za sve žive organizme i za njihov metabolizam. Postoje različiti izvori proteaza, kao što su biljke, gljive, životinje i mikroorganizmi.¹⁰⁷

I.1.1.2.1 Biljni izvori proteaza

Korišćenje biljaka kao izvor proteaza zavisi od različitih faktora, kao što su pristupačnost zemljištu namenjenom za uzgajanje biljaka i pogodnost klimatskih uslova za uzgoj. Štaviše, za dobijanje proteaza iz biljaka je potrebno uložiti dosta vremena. Neke od dobro poznatih proteaza kao što su papain, bromelin i keratinaza su proizvedene iz biljnih izvora.¹¹⁴ Papain se proizvodi iz papaje (*Carica papaya*) i ima svojstva zgrušavanja mleka i digestije proteina pri širokom opsegu pH vrednosti. Bromelin je biljna proteaza koja se dobija iz lista, soka, stabljike i kore ananasa. Može efikasno kontrolisati rast tumorskih ćelija.¹¹⁷ Keratinaze se proizvode od grupe biljaka koje se koriste za uklanjanje kose i vune iz kanalizacionih sistema.¹¹⁸

I.1.1.2.2 Životinjski izvori proteaza

Najpoznatiji enzimi izolovani iz životinjskih tkiva su tripsin, himotripsin, pepsin i renin. Iz creva životinja se izoluje tripsin, koji predstavlja enzim za varenje i odgovoran je za hidrolizu proteina iz hrane. Himotripsin se može naći u proizvodima koji se izlučuju iz pankreasa životinja. Prečišćeni himotripsin je skup enzim i koristi se u analitici i dijagnostici. Proteaza renet se proizvodi kao neaktivan prekursor u stomaku svih sisara. Uz pomoć pepsina se prevodi u aktivan oblik. Koristi se u mlečnoj industriji za dobijanje surutke. Pepsin je kisele prirode i nalazi se u stomaku skoro svih kičmenjaka.¹⁸

I.1.1.2.3 Mikroorganizmi kao izvori proteaza

U svetlu ograničenih kapaciteta životinjskih i biljnih proteaza da zadovolje rastuće zahteve globalnog industrijskog sektora, istraživači su usmerili fokus ka identifikaciji i eksploataciji mikrobnih izvora kao alternativnog rešenja.¹⁷ Proteaze koje su dostupne danas na tržištu se najčešće dobijaju iz mikroorganizama. Ovo je zbog nekoliko razloga, kao što su visoka stopa proizvodnje, ograničeni zahtevi prostora za uzgoj, široka biohemijska raznovrsnost, laka genetska manipulacija i karakteristike koje ih čine prikladnim za biotehnošku primenu.^{29,119,120} Proteaze izvedene iz mikroba čine oko 40% cele globalne prodaje enzima.¹²¹ Mikroorganizmi su odgovorni za proizvodnju intracelularnih i ekstracelularnih proteaza. Intracelularne proteaze su od vitalnog značaja za brojne metaboličke krajnje proizvode ćelijskih procesa kao što su razlikovanje, okretanje proteina, sporulacija, prerada hormona i proteina, uklanjanje nepotrebnih proteina, dok su ekstracelularne proteaze važne za potrošnju i hidrolizu proteinskih hranljivih materija. Ekstracelularne proteaze imaju značajnu ulogu i različitu primenu u različitim industrijama.¹⁸ Proteaze su izolovane od različitih mikroorganizama kao što su gljivice, bakterije i kvasac.

Proteaze dobijene iz mikrobnih sistema spadaju u tri tipa: kisele, neutralne i alkalne. Alkalne proteaze su efikasne pod alkalnim uslovima i sastoje se od serinskog ostatka u svom aktivnom mestu.¹²² Alkalne serinske proteaze imaju najveću primenu u bioindustriji. Alkalne proteaze su od posebnog značaja, jer su pogodnije za širok spektar primena, pošto poseduju visoku aktivnost i stabilnost u ekstremnim uslovima. Alkalne proteaze su pokazale svoju sposobnost da rade pri visokim pH vrednostima sredine, temperature i u prisustvu inhibitornih jedinjenja.¹²²⁻¹²⁵

I.1.1.2.3.1 Proteaze dobijene iz bakterija

Proteaze bakterijskog porekla, koje su alkalne po svojoj prirodi, igraju ekonomski značajnu ulogu u različitim sektorima industrije, uključujući kožarsku industriju, prehrambenu industriju, tekstilnu industriju, kao i u proizvodnji detergenata za veš, zahvaljujući svojim visokim katalitičkim aktivnostima i proizvodnim kapacitetima. Karakteriše ih povećana aktivnost u alkalnom opsegu pH vrednosti 8-12, uz optimalne temperature delovanja 50-70 °C.¹²⁶ Neke od bakterija iz kojih se proizvode proteaze su *Bacillus subtilis*,^{127,128} *B. alkaloophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. lentus*, *B. licheniformis*,^{18,129} *B. pumilus*,¹³⁰ *B. circulans*,¹³¹ i *B. safensis*.⁴

I.1.2 ALKALAZA (EC 3.4.21.14)

U kontekstu proteaza, alkalaza se smatra serinskom endopeptidazom koja pruža informacije o katalitičkoj strukturi poznatoj po klasičnoj katalitičkoj trijadi aminokiselina (Asp, His, Ser), budući da je serin jedna od njih. Ovaj enzim takođe raskida proteine u sredini lanca aminokiselina.^{132,133} Prvobitno je dobijen od *Bacillus subtilis* i nazvan „*Subtilisin Carlsberg*” (slika 4). Otkrili su ga Linderstrom-Lang (*Linderstrom-Lang*) i Otesen (*Ottesen*), a prečistili Gtintelberg (*Gtintelberg*) i Otesen.¹³⁴ Druge proteaze su proizvedene iz različitih sojeva *B. subtilis*. One su pokazale široku specifičnost i imaju optimum u alkalnoj sredini. Ovaj enzim se takođe naziva *subtilisin A*, *subtilopeptidaza A*, a od kada ga je lansirao Novozim (*Novozymes*), „Alkalaza” (*Alcalase*®). Danas se ovaj enzim proizvodi polušaržnom submerznom fermentacijom pomoću *B. licheniformis* bakterije.¹³⁵ Novozim je sredinom šezdesetih godina izbacio na tržište alkalazu kao prvu detergentsku proteazu, koja je korišćena kao sastavni deo formulacija sredstava za čišćenje. Kasnije su predložene i druge primene alkalaze, kao dodatak u procesu degumiranja svilenih vlakana,¹³⁶ ili enzimska modifikacija površine poliamida.¹³⁷

Primena pri proizvodnji i modifikaciji hrane je istaknuta 70-ih godina 20. veka u Hallovom (*Hale*) izveštaju o primeni alkalaze u proizvodnji koncentrata ribljih proteina katalizovanjem hidrolize.¹³⁸ Komercijalna „*Alcalase*®” je registrovani zaštitni znak Novozim korporacije i sastoji se od tečnog enzimskog preparata sastavljenog od oko 50% (*w/w*) glicerina, 41% (*w/w*) vode i 9% (*w/w*) ekstrakta proteaze iz *B. licheniformis*. Njena aktivnost je izražena u Anson-ovim jedinicama (AU), a najčešća vrednost aktivnosti je $\geq 2,4 \text{ Ug}^{-1}$, koja je čistoće za upotrebu u prehrambenoj industriji, prema uslovima zajedničkog stručnog komiteta FAO/WHO za aditive u hrani (JECFA) i hemijskog kodeksa hrane (FCC).¹³⁵

U kontekstu hidrolize peptidnih veza, položaji aminokiselina u supstratu u neposrednoj blizini mesta hidrolize su konvencionalno označeni kao P_1 , P_2 , P_3 , itd., nalazeći se sa leve strane raskinute peptidne veze, dok su pozicije desno od mesta hidrolize označene kao P_1' , P_2' , P_3' , itd. U skladu s pretpostavkom da prva aminokiselina u proteinskom lancu ima N-terminalni kraj, a poslednja C-terminalni kraj, aminokiselina na poziciji P_1 identifikuje se kao ona koja formira karboksilni kraj novonastalog fragmenta ili peptida nakon hidrolize. Analogno, aminokiselina na poziciji P_1' postaje novi N-terminalni kraj drugog oslobođenog fragmenta.¹¹⁸



Slika 4. Subtilisin Carlsberg (Alkalaza) vezan za inhibitor (narandžasto). Katalitička Asp, His, Ser trijada (štipići) je vezana sa sedmostranim β -listovima u sendviču između dva sloja α -spiralala

Specifičnost alkalaze je opisana kao preferencijalna za veliki nenaelektrisani ostatak u P_1 , kada su druge specifičnosti već istaknute. Adamson (*Adamson*) i Reynolds (*Reynolds*) su primetili raskidanje peptidnih veza kada su aminokiseline *Glu*, *Met*, *Leu*, *Tyr*, *Lis* i *Gln* pozicionirane na P_1 , prvenstveno ako je *Glu* na P_1 i još jedan hidrofobni ostatak na P_2' ili P_3' .¹¹⁸ Na ovaj način, alkalaza se može koristiti za dobijanje peptida sa hidrofobnim karakteristikama. Zbog širokog spektra aminokiselina koje može da prepozna, reakcija hidrolize proteina katalizovana alkalazom dovodi do obrazovanja velikog broja peptida kratkog lanca, odnosno male molekulske mase.¹³⁵

Ova izražena selektivnost i specifičnost enzima omogućavaju primenu alkalaze na širok spektar proteinskih supstrata, rezultirajući u visokom stepenu hidrolize proteina, bilo da se koristi samostalno ili u sinergiji sa drugim proteazama. Kada je Ahmadifard (*Ahmadifard*) sa saradnicima izvršio poređenje između efikasnosti alkalaze, papaina i komercijalnog koktela koji sadrži tripsin, himotripsin i aminopeptidazu u enzimskoj hidrolizi koncentrata

proteina pirinčanih mekinja i proteina soje, rezultati su pokazali da je alkalaza pokazala veću sposobnost hidrolize (oko 10 puta veću od drugih ispitanih enzima).¹³⁹

Alkalaza je izuzetno stabilna pri umereno alkalnim pH vrednostima. To je učinilo veoma adekvatnim enzimom za detergente.¹⁴⁰ Međutim, nije tako stabilna u drugim opsezima pH vrednosti. Kompanija Novozim izveštava da se optimalna aktivnost može naći na pH vrednosti 10, maksimalna aktivnost na 70 °C i da enzim održava punu aktivnost na sobnoj temperaturi u opsegu pH vrednosti 5-11, sa značajnijim smanjenjem aktivnosti pri kiselijim pH vrednostima nego na više alkalnim pH vrednostima.¹⁴¹ Enzim je takođe prilično stabilan u organskoj sredini, što je omogućilo da se koristi u mnogim različitim reakcijama.¹⁴² Npr. u 2-metil-2-propanolu i etanolu, 50% početne aktivnosti je zadržano nakon 5 dana, a u tercamil alkoholu, alkalaza je ostala potpuno aktivna nedeljama. Međutim, u metanolu je samo 50% početne aktivnosti zadržano nakon 35 min. Stabilnost se povećavala kako se polaritet ili dipolni moment rastvarača smanjivao.¹⁴² Čak i ako je enzim veoma stabilan, dalja stabilizacija može povećati opseg radnih uslova.

I.1.3 ENZIMSKI TRETMAN PROTEINA HRANE

Pored ključne uloge u procesu digestije, gde enzimi doprinose razgradnji proteina na aminokiseline, olakšavajući time njihovu apsorpciju, enzimi imaju značajnu funkciju u obradi i modifikaciji proteina unutar prehrambene industrije, posebno u pogledu izmene funkcionalnosti putem razlaganja kompleksnih proteinskih struktura. Tokom ovog procesa degradacije, veliki molekuli se razlažu, čime se otkrivaju funkcionalne amino grupe i hidrofobne regije, a istovremeno se redukuje molekulska težina rezultujućih proteinskih hidrolizata.¹⁴³⁻¹⁴⁷ Ove modifikacije su se pokazale bezbednim i smatraju se poželjnijim od neenzimskih tretmana. Funkcionalna svojstva hidrolizata u velikoj meri zavise od vrste korišćenog enzima, opterećenja (odnos enzim/supstrat), vremena reakcije, temperature i stepena hidrolize.^{143,146} Enzimska razgradnja polipeptida je selektivna i proizvodi minimalne ili nikakve neželjene reakcije. I endo- i egzopeptidaze su korišćene za hidrolizu proteina u poboljšanju njihove funkcionalnosti. Endopeptidaze uključuju tripsin, himotripsin, pepsin, pankreatin, aktinidin, bromelain, papain i alkalazu. Oni hidrolizuju peptidne veze unutar proteinske sekvence tako što deluju na neterminalnu amino kiselinu (tj. imaju tendenciju da deluju dalje od -N/-C kraja). Egzopeptidaze (npr. karboksipeptidaza Y, aminopeptidaza M, Flevorzim), s druge strane, razbijaju peptidne veze na kraju manjih polipeptidnih lanaca ne više od tri ostatka od kraja. Za aktivnost egzopeptidaze potrebna je slobodna N-terminalna amino grupa ili C-terminalna karboksilna grupa ili oboje. Sinergistički efekat koktela enzima može biti potreban da bi modifikovani proteini imali bolja funkcionalna svojstva. Enzimi sa širom specifičnošću mogu hidrolizovati više peptidnih veza i izložiti nova mesta koja možda nisu bila dostupna specifičnijim enzimima.¹⁴⁶

Enzimi gastrointestinalnog porekla (npr. pepsin, tripsin, himozin, himotripsin, itd.) se široko koriste za razgradnju proteina do hidrolizata i peptida. Enzimi biljnog porekla za hranu kao što su aktinidin (iz kivija), bromelin (iz ananasa) i papain (iz papaje) takođe dobijaju na značaju u preradi hrane. Međutim, za upotrebu u industrijskom obimu, proteolitički enzimi iz bakterija mlečne kiseline su predloženi kao održivija opcija, bolja za scale-up.¹⁴⁸ Kod svih navedenih enzima, stepen enzimske modifikacije zavisi od supstrata i

koncentracije, specifičnosti i tipa (endo- ili egzoproteaza) enzima, stanja polaznog materijala (osnovni ili denaturisani protein), trajanja tretmana, jonske snage, pH vrednosti i temperature. Prekomerna i nekontrolisana hidroliza može dovesti do oslobađanja peptida gorkog i neprijatnog ukusa, koji su nepoželjni i mogu smanjiti prihvatljivost prehrambenih proizvoda koji sadrže proteine potrošačima..

Enzimski tretman deamidazom ili transglutaminazama korišćen je za poboljšanje rastvorljivosti i drugih funkcionalnih svojstava proteina hrane.¹⁴⁹ Ovi tretmani povećavaju naelektrisanje proteina, što zauzvrat povećava njegovu hidrofilnost i elektrostatičku odbojnost između lanaca specifičnih proteina kao što su glijadini, uzrokujući da se istežu u rastvoru i stvaraju rastvorljiv proizvod. Dodavanje askorbinske kiseline stvara jone negativnog naelektrisanja, koji stupaju u interakciju sa pozitivno naelektrisanim proteinima. Smanjenje elektrostatičkog odbijanja generalno poboljšava hidrofobne interakcije. Povećanje nekovalentnih interakcija može rezultirati većom tendencijom stvaranja nerastvorljivih proteinskih agregata, čime se smanjuje rastvorljivost. Međutim, polimerizacija proteina koju katalizuju mikrobna transglutaminaza (MTG) dovodi do povećanja njihovog neto negativnog naelektrisanja, što favorizuje disocijaciju proteinskih agregata, čime se povećava rastvorljivost.

Poboljšana rastvorljivost proteinskih hidrolizata je posledica smanjenja veličine peptida i povećane dostupnosti jonizujućih grupa. Delimična hidroliza proteina ovsa značajno je poboljšala kapacitet zadržavanja vode (WHC), snagu gela i tvrdoću uporedivu sa gelom od belanaca. Enzimi su modulirali ravnotežu između sile elektrostatičkog odbijanja i hidrofobne privlačne sile među polipeptidnim lancima tokom procesa želiranja. U kontekstu ekstenzivne hidrolize, ovaj proces rezultira stvaranjem peptida niske molekulske težine, koji potencijalno gube sposobnost da se agregiraju i formiraju čvrstu umreženu strukturu. Specifični rezultati istraživanja na hidrolizovanom proteinu graška ukazuju da je, u poređenju sa dva evaluirana enzima (tripsin i alkalaza), hidrolitička obrada tripsinom rezultirala poboljšanjem funkcionalnih svojstava proteina graška, verovatno usled ograničenije hidrolize u odnosu na tretman sa kombinacijom mikrobnih enzima.¹⁵⁰

I.1.3.1 Enzimska hidroliza proteina

Hidroliza proteina predstavlja raskidanje peptidne veze, pri čemu nastaju kraći ili duži peptidni lanci i/ili aminokiseline. Ovim postupkom dolazi do denaturacije proteina, odnosno protein gubi svoju nativnu strukturu i razvija se iz kvaternerne strukture reverzibilno ili ireverzibilno. Enzimska hidroliza je proces koji se izvodi pri blagim reakcionim uslovima, lako se kontroliše i omogućava dobijanje proizvoda sa željenim svojstvima. Takođe, ona dovodi do promene veličine molekula i promene hidrofobnosti proteina, kao i do promene polarnosti i jonizujućih grupa proteinskih hidrolizata, što direktno utiče na funkcionalne osobine dobijenih hidrolizata.¹⁵¹

Rastvorljivost, penjenje, želiranje i emulgaciona svojstva hidrolizata proteina zavise od specifičnosti samog enzima i stepena hidrolize (*DH*). Međutim, upotreba enzima dovodi do povećanja troškova samog procesa, pa se pribegava korišćenju jeftinih sirovina i supstrata.¹⁵² Pravilna selekcija enzima je ključna za osiguravanje optimalne biološke aktivnosti rezultirajućih hidrolizata. Enzimске tehnike su prepoznate kao „zelenim tehnologijama” u biotehnologiji, a distinktivna karakteristika enzima leži u njihovoj sposobnosti da razlikuju

specifične grupe unutar molekula, čime se postiže regiospecifičnost. Pored toga, njihova sposobnost da razlikuju enantiomerne forme čini ih stereospecifičnim. Među enzimima, hidrolitički enzimi su ekonomski najpovoljniji, budući da ne zahtevaju ko-faktore za svoje delovanje. Njihova primena u prehrambenoj industriji je već dobro uspostavljena i široko dokumentovana.¹⁵³

Za postizanje proteinskih hidrolizata s ciljanim karakteristikama putem enzimske hidrolize, ključno je temeljito razumevanje mehanizma ove hidrolitičke reakcije. Specifičnost određenih proteaza može varirati od stroge specifičnosti prema određenim aminokiselinama koje su uključene u formiranje peptidnih veza, do manje striktnosti kod drugih proteaza. Kao rezultat, enzimske reakcije hidrolize koje katalizuju proteaze obuhvataju tri uzastopna koraka koji se odvijaju tokom procesa hidrolize, a to su:¹⁵⁴

- I. formiranje kompleksa između osnovnog peptida i enzima, poznatog kao Mihaelisov kompleks;
- II. hidroliza peptidne veze prilikom koje se oslobađa jedan ili dva peptida i
- III. nukleofilni napad na ostatak Mihaelisovog kompleksa u cilju oslobađanja drugih peptida i reciklacije slobodnog enzima.

Enzimskom hidrolizom peptidnih veza povećava se broj jonizujućih grupa ($-\text{NH}_3^+$ i $-\text{COO}^-$), koji je praćen povećanjem hidrofobnosti molekula i ukupnog naelektrisanja, a uporedo i smanjenjem molekulске mase peptida i strukturnim promenama unutar molekula proteina.¹⁵⁵ Nakon dodatka enzima u reakcionu smešu molekula proteina, dolazi do formiranja enzim-supstrat kompleksa koji može da disosuje i dovede do formiranja slobodnog enzima i supstrata ili slobodnog enzima i proizvoda reakcije.¹⁵⁶ Generalno prihvaćen mehanizam enzimske hidrolize proteina proteazama zasniva se na činjenici da je disocijacija Mihaelisovog kompleksa na slobodan enzim i proizvod reakcije, stupanj koji kontroliše ukupnu brzinu reakcije hidrolize.

Proces hidrolize proteina inicira se kada se peptidne veze supstrata translociraju na aktivno mesto enzima, zahtevajući da enzimski protein bude u konformacionom stanju pogodnom za katalizu. Održavanje katalitički aktivne konformacije enzima zahteva pažljivo podešavanje reakcionog medijuma na optimalne pH vrednosti i temperature. S obzirom na to da temperatura utiče na pH vrednost rastvora, neophodno je prvo prilagoditi temperaturu rastvora pre podešavanja njegovog nivoa pH vrednosti.¹⁵⁷ Postoje dva pristupa pripremi supstrata za enzimsku hidrolizu: jedan uključuje disperziju proteinskog materijala u vodi, sa naknadnim podešavanjem pH vrednosti, dok drugi koristi rastvor pufera na željenoj pH vrednosti.¹⁵⁸ Prva metoda, primena vodenog rastvora, omogućava kontinuirano praćenje reakcije kroz dodavanje hidroksida za održavanje željenog pH nivoa. S druge strane, puferska metoda ograničava fluktuacije pH vrednosti, ali nije pogodna za kvantitativnu procenu stepena enzimske katalize putem zapremine dodatog alkalnog rastvora. Takođe, puferska metoda ne pruža jasne indikacije o završetku proteolize, budući da se tokom reakcije javljaju minimalne promene pH vrednosti. Nasuprot tome, vodeni sistem omogućava preciznije određivanje kraja reakcije, jer se promena pH vrednosti smanjuje i zaustavlja kada enzimska reakcija prestane, odnosno kada više nema hidrolize proteina.

Hidrolitička degradacija proteina karakteristično uključuje oslobađanje H^+ jona, što dovodi do progresivnog akumuliranja kiselosti i smanjenja pH vrednosti reakcione smeše tokom vremena. Ovo smanjenje pH vrednosti može negativno uticati na aktivnost proteaza,

potencijalno dovodeći do njihove inaktivacije. Stoga, kako bi se održale optimalne brzine hidrolize, esencijalno je neutralisati akumulirane H^+ jone i time održavati pH vrednost reakcione smeše unutar optimalnog opsega. Uobičajeni postupak u ovom kontekstu uključuje dodavanje odgovarajuće baze, tipično natrijum-hidroksida (NaOH), kako bi se neutralisali oslobođeni H^+ joni i pH vrednost efikasno vratila na optimalni nivo ili na izvornu vrednost.¹⁵⁹⁻¹⁶¹ Neželjeni efekat dodavanja NaOH tokom proteolize je prisustvo visokog nivoa ostatka (natrijuma) u finalnom proizvodu proteinskog hidrolizata.¹⁶² Međutim, ako pad pH vrednosti nije značajan ili proteaza ima širok opseg pH aktivnosti, onda dodavanje NaOH možda neće biti potrebno.

Kada se hidroliza proteina završi ili se postigne odgovarajući stepen hidrolize, reakcija se može zaustaviti korišćenjem različitih metoda:

- I. reakciona smeša se podešava na nivo pH vrednosti gde je enzim neaktivan. Za većinu proteaza, ovo znači podešavanje na pH vrednosti 4–5 pošto je aktivnost obično izvan ovog pH opsega.¹⁶⁰ Za biljne proteine podešavanje pH vrednosti u opsegu 4–6, ima prednost taloženja nesvarenih proteinskih molekula, što poboljšava odvajanje rastvorljivih peptida tokom naknadnog centrifugiranja da bi se dobio supernatant bogat peptidima.
- II. reakciona smeša se drži (5-20 min) na nivou temperature koji će denaturisati proteazu i zaustaviti enzimsku aktivnost, obično iznad 80 °C za većinu enzima. Inaktivacija proteaze je zavisna od temperature i može se izvršiti sa ili bez pH inaktivacije.^{160,163,164}
- III. reakciona smeša se može čuvati na niskim temperaturama (obično manje od -20 °C), što takođe zaustavlja enzimsku reakciju. Nedostatak metode zamrzavanja je u tome što ako reakcija još nije završena na odabranoj krajnjoj tački, enzim se može ponovo aktivirati kada se odmrzne pod povoljnim uslovima.

Kada se postigne krajnja tačka ili se enzimska reakcija završi, reakciona smeša se zatim centrifugira da bi se izolovao supernatant gde su peptidi podeljeni; talog se obično odbacuje. U zavisnosti od eksperimenata, supernatant se može osušiti zamrzavanjem kao hidrolizat proteina ili podvrgnuti protokolima frakcionisanja peptida. Hidroliza proteina se može postići sa jednim enzimom ili kombinacijom dva ili više enzima.¹⁶⁵ U tabeli 1 su prikazani problemi koji se javljaju prilikom enzimске hidrolize proteina.

I.1.3.1.1 Hidroliza proteina jednim enzimom

Hidroliza proteina jednim enzimom predstavlja najčešći pristup koji se koristi u proizvodnji hidrolizata proteina hrane. U ovoj metodi, protein koji se hidrolizuje se prilagođava temperaturi i pH vrednostima koji omogućavaju optimalnu i dugotrajnu katalizu proteazom (slika 5). Tipični reakcioni uslovi za različite enzime prikazani su u tabeli 2.

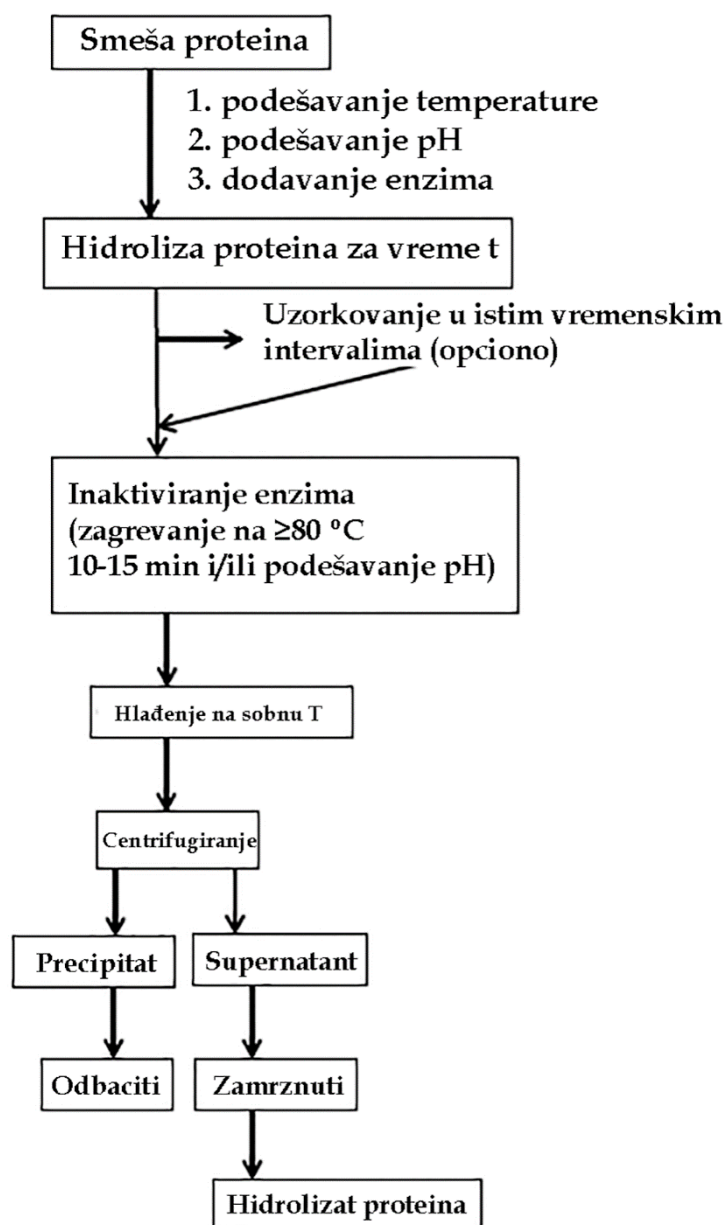
Tabela 1. Problemi koji se javljaju prilikom enzimске hidrolize proteina¹⁶⁶

Problem	Uzrok	Rešenje problema
Gorčina hidrolizata	Reakcija hidrolize nije optimizovana sa aspekta stepena hidrolize i/ili izbora enzima	Izabrati odgovarajući enzim i podesiti stepen hidrolize da ne bude ni suviše mali ni suviše veliki
	Previše jak termički tretman	Zameniti termičke tretmane netermičkim postupcima
	Preveliko zadržavanje na visokoj temperaturi	Smanjiti dugo tretiranje na visokoj temperaturi naročito ako je proizvod koncentrovan
Hidrolizati nemaju ukus	Infekcija u toku obrade	Proveriti kvalitet supstrata i/ili smanjiti vreme procesa u kome je moguć rast mikroba. Druga mogućnost je pasterizacija ili dodatak soli.
Spora hidroliza	Temperatura izvan kontrole	Proveriti temperaturu upotrebom drugog termometra
	Mala količina enzima	Povećati količinu enzima
	Gubitak aktivnosti enzima usled neadekvatnog čuvanja	Proveriti način čuvanja, rok trajanja i aktivnost enzima standardnom metodom sa azokazeinom
	Razblaženje enzima vodom pre upotrebe	Enzim je stabilan samo u originalnoj formulaciji, stoga ga ne treba razblaživati
	Inhibitor proteaza u supstratu	Eliminisati inhibitore termičkom denaturacijom ili nekim drugim fizičkim predtretmanom
	Koncentracija proteina drugačija od očekivane	Proveriti koncentraciju i ako je potrebno podesiti je dodatkom rastvora NaOH ili NaCl Proveriti pH vrednost i podesiti na odgovarajuću

Može se izabrati jedna krajnja tačka gde će se enzimska reakcija zaustaviti da bi se izolovali digestirani peptidi ili se alikvot smeše za varenje može ukloniti u unapred određenim vremenskim intervalima kao sredstvo za praćenje katalitičke brzine.^{160,167} Po završetku enzimске reakcije, stepen hidrolize, koji predstavlja procenat ukupnog broja prekinutih peptidnih veza, može se izračunati pomoću nekoliko metoda.

Tabela 2. Najčešće korišćene proteaze sa optimalnim uslovima za hidrolizu proteina

Proteaza	Optimalna pH vrednost	Optimalna temperatura (°C)
Alkalaza	8,0–9,5	50–60
Tripsin	7,0–8,0	37–50
Himotripsin	7,0–8,0	37–50
Pepsin	2,0	37–50
Pankreatin	7,0–8,0	37–50
Flevorzim	6,0–7,0	50–60
Papain	6,5–7,0	40–70
Neutraza	6,5–7,0	50–60
Protamex	7,0	50
Pronaza	7,0–8,0	37–40
Ficin	7,0	37
Bromelain	7,0	40–50
Alkalna proteaza	10,0	55
Validaza	7,0	55
Savinaza	8,0	40



Slika 5. Tipičan dijagram toka hidrolize sa jednim enzimom¹⁶⁵

U tabeli 3 su prikazane najčešće metode koje se koriste za enzimsku hidrolizu proteina sa svojim prednostima i manama.¹⁶⁵

Tabela 3. Najčešće metode koje se koriste za praćenje enzimске hidrolize proteina sa svojim prednostima i manama¹⁶⁶

Metoda	Prednost	Mana
<i>pH-stat</i>	Praćenje u realnom vremenu Ne utiče na denaturaciju proteina Brza metoda Nema derivatizaciju	Preciznost zavisi od vrste enzima Egzoproteaze daju lošu procenu DH Odnos potrošnje baze i DH nije precizan za sve proteine Samo za alkalne reakcione smeše
<i>TNBS</i>	Generalno tačna i precizna Brza derivatizacija	Nemogućnost praćenja u realnom vremenu Samo za rastvorljive uzorke Toksično jedinjenje Interferira sa ostacima lizina Zahteva korak derivatizacije Netačna za proteine bogate prolinom
<i>OPA</i>	Brza derivatizacija Praćenje u realnom vremenu	Neprecizna za proteine bogate cisteinomi/ili prolinom Samo za rastvorljive uzorke Interferira sa ostacima lizina Zahteva korak derivatizacije
<i>TCA</i>	Brza metoda	Određuje rastvoreni azot, pre nego stepen hidrolize
<i>Formol titracija</i>	Brza metoda Praćenje u realnom vremenu	Indirektna i direktna metoda ne daju različite rezultate Promenljivi rezultati

U prvoj metodi (pH-stat), količina potrošenog alkalnog rastvora (tj. koja se koristi za podešavanje pH vrednosti) se uključuje u standardnu jednačinu na sledeći način:

$$DH(\%) = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{MP} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100 \quad (1)$$

gde je:

B – potrošena količina alkalnog rastvora (L)

N_b – normalitet baze

α – prosečan stepen disocijacije α-NH₂ grupe

MP – masa proteina (kg)

h_{tot} – ukupan broj peptidnih veza u proteinskom supstratu (m_{eq} g⁻¹proteina)

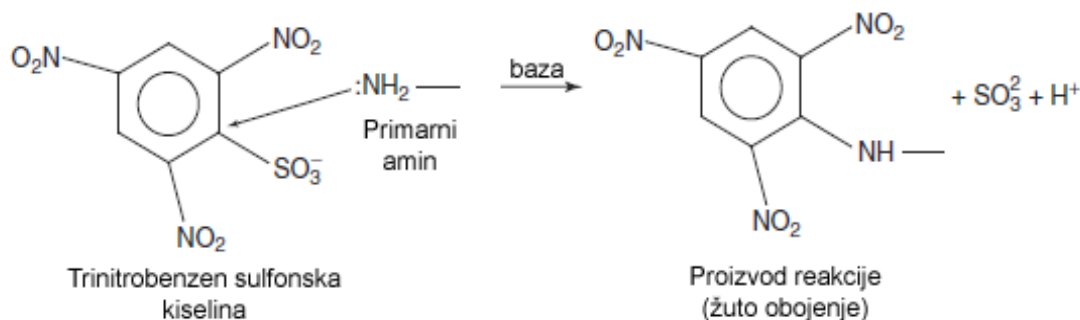
Stepen disocijacije:

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1+10^{pH-pK}} \quad (2)$$

gde je pK prosečna pK vrednost α -amino grupa oslobođenih tokom hidrolize.¹⁶⁸

Druga metoda je kolorimetrijska i koristi vezivanje određenih jedinjenja za slobodne amino grupe; intenzitet boje je direktno proporcionalan broju slobodnih amino grupa. Vrednost apsorpcije se zatim konvertuje u kvantitativne vrednosti korišćenjem standardne krive pripremljene sa slobodnom aminokiselinom, obično leucinom. DH se izračunava kao procentualni odnos vrednosti hidrolizata prema vrednosti celog proteina. Da bi se dobile ukupne slobodne amino grupe, ceo protein se digestira u aminokiseline i koristi za kolorimetrijski test. Najčešće kolorimetrijske metode uključuju upotrebu trinitrobenzensulfonske kiseline (TNBS) i ortoftaldialdehida (OPA).^{169,170}

TNBS metoda je u osnovi spektrofotometrijski test hromofora nastalog reakcijom TNBS-a sa primarnim aminima. TNBS kiselina reaguje se aminokiselinama u neprotonovanom obliku dajući proizvod žutog obojenja (slika 6).



Slika 6. Reakcija TNBS kiseline sa primarnim aminom

Reakcija se odvija u blago alkalnim uslovima i sa snižavanjem pH vrednosti se prekida. Stepenn hidrolize (DH) se izračunava prema jednačini:

$$DH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \quad (4)$$

gde su: h - broj ekvivalentnih peptidnih veza hidrolizovanih u trenutku t , h_{tot} - ukupan broj peptidnih veza u proteinskom supstratu u mmol g^{-1} proteina ($meq\ g^{-1}$ proteina).

Treća metoda koristi rastvorljivost peptida u trihlorsirćetnoj kiselini (TCA). U najobičnijoj varijanti, zapremina vodenog rastvora hidrolizata proteina je rastvorena u jednakoj zapremini od 20% TCA nakon čega sledi centrifugiranje.¹⁷¹ Količina peptida u TCA supernatantu se zatim određuje i izražava kao procenat ukupne težine proteina u hidrolizatu. Nedostatak TCA metode je što je početni uzorak (hidrolizat) već digestiran i sadrži visok sadržaj rastvorljivih peptida; stoga se dobijaju veće vrednosti DH nego kod TNBS i OPA metoda.

Glavni faktori koji utiču na stepen hidrolize proteina jesu:

- odnos enzima i supstrata,
- temperatura na kojoj se odigrava reakcije hidrolize,
- pH vrednost rastvora u kome se izvodi reakcija i
- vreme trajanja reakcije hidrolize.

I.1.3.1.1.1 Odnos enzima i supstrata

Kako je početna brzina reakcije hidrolize proporcionalna koncentraciji enzima, povećanje brzine reakcije se može postići povećanjem koncentracije enzima, pri čemu povećanje stepena hidrolize u tačno definisanom vremenskom intervalu prati trend krive hiperbole. Povećanje količine proteaze utiče na raskidanje većeg broja peptidnih veza supstrata što pozitivno utiče na sam tok reakcije hidrolize, a praćeno je i naknadnim povećanjem rastvorljivosti proteina.¹⁷² Generalno, u određenom intervalu količine proteaze, stepen hidrolize je proporcionalan količini enzima. Potrebno je naglasiti da prevelika koncentracija enzima negativno utiče na tok reakcije hidrolize, dovodeći do smanjenja stepena hidrolize. U početku reakcije, sa povećanjem količine enzima dolazi do naglog povećanja brzine reakcije, sve do momenta kada svi molekuli supstrata budu zasićeni enzimom i tada dolazi do smanjenja brzine reakcije hidrolize.¹⁷³ Takođe, jedan od mogućih razloga smanjenja brzine reakcije hidrolize jeste inhibicija enzima peptidima nastalim tokom hidrolize.¹⁷⁴ Moguća inhibicija reakcije hidrolize može biti posledica prisustva proizvoda reakcije (nastali peptidi) ili hidrolize svih dostupnih peptidnih veza supstrata. Kako je prevelika koncentracija rastvorljivih peptida nepovoljna sa aspekta brzine enzimske reakcije hidrolize, poželjno je ukloniti nastale peptide iz reakcione smeše kako bi došlo do povećanja brzine reakcije.¹⁷⁵

I.1.3.1.1.2 Temperatura reakcije

Povećanje temperature reakcije dovodi do povećanja brzine reakcije hidrolize, jer se učestalost sudara molekula enzima i supstrata povećava i dolazi do povećanja broja efektivnih sudara i dostizanja minimalne energije potrebne za odvijanje reakcije. Dostizanjem odgovarajućeg sadržaja energije veliki broj molekula može efikasno reagovati dajući proizvode reakcije (peptide). Ipak, preterano povećanje temperature negativno utiče na brzinu reakcije hidrolize, dovodeći do denaturacije enzima. Postoji optimalna temperatura na kojoj je aktivnost enzima maksimalna, a iznad koje aktivnost enzima naglo opada. Za proteine koji su veoma osetljivi na termičku denaturaciju, početno povećanje temperature reakcije dovodi do tzv. odmotavanja molekula proteina i izlaganja peptidnih veza iz unutrašnjosti molekula proteina molekulima enzima. Dalje povećanje temperature utiče na uspostavljanje hidrofobnih interakcija koje dovode do agregacije molekula proteina utičući tako na sprečavanje dalje hidrolize dostupnih peptidnih veza. Dva glavna uticaja temperature na brzinu reakcije hidrolize jesu povećanje brzine hidrolize i povećanje stope denaturacije enzima.¹⁷²

Kako bi uopšte došlo do hidrolize proteina, moraju se postići efikasni sudari između enzima i proteina koji bi doveli do vezivanja proteina za aktivno mesto enzima. Sa povećanjem temperature povećava se učestalost sudara u jedinici vremena, pa se i brzina reakcije povećava u okviru dozvoljenih granica. Isto tako, povećanje temperature reakcije dovodi do povećanja unutrašnje energije molekula koja uključuje translatorsku energiju, energiju rotacije i vibracije molekula, kao i energiju hemijskih veza i energiju međumolekulskih interakcija. Ako je unutrašnja energija proteina prilično velika, može doći do raskidanja veza koje učestvuju u održavanju trodimenzionalne strukture proteina, a samim tim i do termičke denaturacije proteina. Stoga, previše visoka temperatura može uticati na smanjenje

brzine reakcije hidrolize koje može biti objašnjeno denaturacijom i/ili deaktivacijom enzima ili supstrata.¹⁷⁶

I.1.3.1.1.3 pH vrednosti reakcije

Uticaj pH vrednosti na kojoj se odigrava enzimska reakcija hidrolize proteina je ključan faktor i zavisi od prirode enzima i supstrata. Promena pH vrednosti utiče na raspodelu naelektrisanja i konformaciju molekula enzima i supstrata, a takođe je bitna kako ne bi došlo do ireverzibilne denaturacije enzima u ekstremno kiselim i alkalnim sredinama koja je praćena gubitkom njihove aktivnosti.^{177,178} Isto tako, pH vrednost utiče na jonizaciju grupa koje učestvuju u održavanju odgovarajuće konformacije aktivnog centra enzima, vezivanje supstrata za enzim i konverziju supstrata u proizvod.¹⁷⁸ Ove grupe su locirane u unutrašnjosti kiselih i baznih aminokiselinских ostataka. Ekstremne pH vrednosti imaju štetan uticaj na proteine i peptide. Poznato je da se mnogi proteini odmotavaju na pH vrednostima manjim od 5 ili većim od 10, što je uglavnom posledica toga što uvijeni proteini (ili oligopeptidi) poseduju sakrivene grupe (nejonizovane) unutar svoje strukture koje mogu biti jonizovane jedino nakon odmotavanja proteina.¹⁰⁴ Takođe, ekstremno velike pH vrednosti mogu dovesti do raskidanja jonskih mostova između jonizujućih grupa. Iz svega navedenog, zaključuje se da je optimalna pH vrednost karakteristika svakog enzima i neophodno je izvođene enzimске reakcije upravo na odgovarajućoj pH vrednosti za dati enzim.

I.1.3.1.1.4 Vreme trajanja reakcije hidrolize

Kriva hidrolize u funkciji vremena je obično definisana sa dve faze, početnom brзом fazom i sporom, opadajućom fazom, kada je količina supstrata u sistemu smanjena. Tokom prve faze dolazi do hidrolize polipeptidnih lanaca, dok je druga faza karakteristična po hidrolizi manjih peptida. Sa vremenom se brzina reakcije smanjuje što može biti posledica smanjenja aktivnosti enzima, zasićenja enzima supstratom ili inhibicije enzima proizvodom reakcije.¹⁷⁵ Takođe, smanjenje brzine reakcije tokom vremena objašnjava se deaktivacijom enzima ili inhibicijom enzima.¹⁷⁹ Postoje dva uopštena mehanizma hidrolize proteina, od kojih je prvi poznat po tome da dovodi do sekvencionalnog oslobađanja jednog peptida u određenom vremenskom intervalu (na engl. *one by one mechanism*), dok je za drugi karakteristično formiranje intermedijera koji se naknadno hidrolizuje (na engl. *zipper mechanism*).^{179,180} Vreme trajanja reakcije hidrolize je bitno i sa aspekta isplativosti procesa prilikom njegove implementacije u prehrambenoj industriji. Povećanje vremena hidrolize u cilju neznatnog povećanja stepena hidrolize nije ekonomski opravdano, jer utiče na povećanje kapitalnih i operativnih troškova proizvodnje. Stoga se preporučuje da se procesi bazirani na hidrolizi proteina iz različitih izvora izvode u reaktorima manjih zapremina i budu vremenski kraći, jer se na taj način smanjuju ukupni troškovi proizvodnje i omogućava isplativa proizvodnja.

I.1.4 STRUKTURA I HEMIJA PROTEINA HRANE

Proteini se sastoje od dugih lanaca aminokiselinskih ostataka koji se savijaju u jedinstvene strukture. Ovi nabori uključuju jednu ili više specifičnih prostornih konformacija vodenih brojnim kovalentnim i nekovalentnim interakcijama (npr. vodonične veze, jonske interakcije, *van der Waals*-ove sile, hidrofobno pakovanje, mostovi soli, disulfidna veza i posttranslacione modifikacije). Proteini se mogu opisati kao linearni niz aminokiselina (primarna struktura), lokalne strukture koje se redovno ponavljaju (sekundarna struktura npr. α -heliks i β -lanac/listovi), složeno i nepravilno savijanje peptidnog lanca u tri dimenzije, tj., geometrijski oblik koji protein poprima (tercijarna struktura) i klaster proteinskih molekula ili polipeptidnih lanaca (kvaternarna struktura). Primarna struktura generalno ostaje nepromenjena tokom denaturacije proteina, ali promene u sekundarnim i tercijskim strukturama povećavaju interakcije proteina i favorizuju agregaciju usled izlaganja hidrofobnih amino kiselina površini proteina.¹⁸¹

Proteini se takođe mogu samopodružiti, da formiraju dimere i oligomere višeg reda. U zavisnosti od pH vrednosti, jonske snage i intermolekularne interakcije (odbojne ili privlačne sile) proteini mogu postojati u različitim oblicima (monomer, dimer, trimer, itd.) u vodenom rastvoru. Osnovno naelektrisanje proteina može biti pozitivno ili negativno na osnovu pH vrednosti mreže koja okružuje protein i relativnog obilja naelektrisanja na terminalnim amino ($-\text{NH}_2$) i karboksilnim ($-\text{COOH}$) grupama ili drugim naelektrisanim grupama na bočnim lancima aminokiselina. Na izoelektričnoj tački (pI) proteina se primećuje osnovno naelektrisanje jednako nuli. Hemijska svojstva kao što su vrste aminokiselinskih grupa, hidrofobnost, hidrofilnost, elektrostatičke interakcije i vodonične veze takođe utiču na povezivanje i savijanje proteina. Unutrašnji i spoljašnji faktori kao što su koncentracija proteina, sastav okolnog rastvora i kontakt, itd. utiču na funkcionalna svojstva proteina.¹⁸²⁻¹⁸⁶

Proteini se takođe klasifikuju kao globularni, membranski ili vlaknasti. Od njih su samo globularni proteini rastvorljivi i stoga su od najvećeg značaja za određivanje funkcionalnosti proteina u hrani. Većina proteina hrane je funkcionalna zbog svojstava njihovih globularnih komponenti, posebno njihove rastvorljivosti, koja se pripisuje amfifilnosti molekula. Proteini imaju okrenute ka unutrašnjosti apolarne (hidrofobne) aminokiseline koje su udaljene od vode i ostataka aminokiselina polarnog (hidrofilnog) bočnog lanca okrenutog ka spolja. Nepolarni bočni lanci i peptidne grupe koje su skrivene u savijenom ili nativnom proteinu važni su za stabilnost proteina. Ovakav raspored omogućava dipol-dipol interakcije sa rastvaračima uvijanjem i odvijanjem bočnih lanaca aminokiselina, čime se polarne grupe postavljaju na površinu proteina.

Većina namirnica, posebno žitarica i mahunarki, sadrže 10–30% proteina, a to su uglavnom proteini za skladištenje.¹⁸⁷ Proteini za skladištenje semena su klasifikovani na osnovu njihove rastvorljivosti u nizu rastvora i uključuju albumine (rastvorljive u vodi), globuline (rastvorljive u soli i drugim izotoničnim rastvorima), prolamine (rastvorljive u vodenom rastvoru alkoholu) i gluteline (rastvorljive u kiselinama, bazama, deterdžentima, haotropnim ili redukcionim agensima). Prolamini kao što su glijadin, hordein, kafirin, sekalini i zein su proteini za skladištenje bogati prolinom i glutaminom koji se nalaze u pšenici, ječmu, sirku, raži i kukuruzu. Poznato je da ovi proteini doprinose netoleranciji i alergenosti kod određenih pojedinaca. Zanimljivo je da izbor prerade hrane takođe može pojačati alergенost nekih od ovih proteina. Npr. iako suvo pečenje može dati ukus kikirikiju, ono

može povećati imunoreaktivnost i pojačati formiranje ili otkrivanje novih alergeni epitopa u proteinima kikirikija.^{188,189}

Pojedinačne i kombinovane karakteristike proteina korišćene su za modifikaciju njihovih funkcionalnih svojstava kroz različite mehanizme.^{182,184–186,190–192} Modifikacija proteina može uticati na konformaciju, orijentaciju i broj polarnih, nepolarnih i sulfhidrilnih grupa, a takođe može aktivirati ili povećati elektrostatičko odbijanje, hidrofobne interakcije i formiranje disulfidne veze. Npr. proteini sočiva se talože na pH vrednosti 4,5, što takođe odgovara njihovoj pI. Povećanje interakcija protein-protein i smanjenje odbojnih sila (negativnih ili pozitivnih) između istovetno naelektrisanih proteina rezultiraju agregacijom i precipitacijom. Ovaj koncept je korišćen za frakcionisanje koncentrata proteina i izolovanje proteina iz mlevenog semena.^{145,146,184,193} Gelovi će se takođe formirati na sobnoj temperaturi ako su privlačne interakcije veće od odbojnih sila. Iznad temperature denaturacije većine proteina, denaturisani proteini takođe mogu da formiraju gelove, jer je elektrostatičko odbijanje manje i hidrofobna interakcija između ovih modifikovanih proteina je veća.

I.1.4.1 Proteini soje

Soja je bila važna namirnica u azijskim zemljama, a takođe je prihvaćena kao zdrav sastojak u Sjedinjenim Američkim Državama i Evropi. Ona sadrži približno 40% proteina i 20% ulja na prosečnoj bazi suve materije i stoga je bila važan izvor proteina u zemljama njene velike potrošnje. Ima veliki potencijal da se dalje razvija kao izvor proteina za vegetarijance, a takođe i za ljude koji ne konzumiraju životinjske proteine iz etičkih, verskih i ekoloških razloga. Iako se procena aminokiselinskog rezultata korigovane svarljivosti proteina (PDCAAS) i dalje unapređuje, opšte je poznato da je PDCAAS proteina soje mnogo veći od onog kod drugih biljnih proteina kao što su pšenični protein.^{194,195} Pored njihovih visokih nutritivnih vrednosti, prijavljene su i neke fiziološke funkcije sojinog izoflavona kao što su snižavanje holesterola, inhibiranje resorpcije kostiju i stimulisanje formiranja kostiju, sprečavanje raka dojke i prostate.^{196,197} Prikazan je i inhibični efekat soje kod alergijskog kontaktnog dermatitisa.¹⁹⁸ Uprkos visokoj nutritivnoj vrednosti, neki potrošači ih nisu prihvatili zbog ukusa pasulja i nekih sastojaka koji izazivaju nadimanje. Zbog toga je veoma važno da namirnice na bazi soje budu ukusnije i privlačnije za ljude.

Uprkos visokoj nutritivnoj vrednosti u sirovom stanju, soju pre upotrebe treba zagrejati da bi:

- I. deaktivirali fiziološke štetne supstance, kao što su inhibitor tripsina koji smanjuje proteolizu i hemaglutinin koji izaziva aglutinaciju crvenih krvnih zrnaca,
- II. indukovali denaturaciju proteina soje, zbog boljeg varenje,
- III. omekšali tkivo soje za dalju obradu,
- IV. uklonili ili smanjili miris sirove soje radi poboljšanja ukusa i
- V. izvršili sterilizaciju.¹⁹⁹

Kao rezultat obrade uključujući zagrevanje i druge procese, sadržaj proteina u proizvodima na bazi soje koji se najčešće konzumira kreće se od 2,8 g/100 g sojinog mleka do 46,2 g/100 g kajmaka, filma koji se formira na površini zagrejanog sojinog mleka.

Soja se kuva i konzumira u kući, ali je veća potrošnja u različitim oblicima prerađene hrane. Najčešća prerađena hrana na bazi soje je tofu i sojina surutka. Drugi proizvodi uključuju prženi tofu, *natto*, sojino zrno fermentisano *Bacillus*-om, *tempeh*, fermentisano rizomom (*Rhizopus*), uglavnom se konzumiraju u Indoneziji, *miso*, koji se koristi kao slani začini, tofu surutka fermentisana *Moccus*-om ili *Rhizopus*-om, sufu, kao i sojino zrno, fermentisano *Moccus*-om, *Bacillus*-om, *douchi*, uglavnom se konzumiraju u Kini kao začini, soja pomešana sa pirinčem ili ječmom fermentisana kvascem ili enzimom otpornim na so, *shoyu*, soja sos, soja pomešana sa pšenicom fermentisana kvascem ili enzimom otpornim na so (*Aspergillus sojiae*, *Tetragenococcus halophilus*, *Zygosaccharomyces rouxii*). *Yuba*, i druge varijante proizvedene su po tradicionalnim i novostvorenim recepturama. Sojino mleko se obično servira u mnogim kineskim hotelima i restoranima, ali ne toliko u drugim zemljama, verovatno zbog njegovog ukusa pasulja koji potiče uglavnom od aldehida, pentanala i heksanala. Ovaj miris je posebno uvredljiv za ljude u zapadnim zemljama, dok se ponekad procenjuje da tofu ili sojino mleko napravljeno od sojinog zrna bez lipoksigenaze u azijskim zemljama nije dovoljno zasitićuće.²⁰⁰ Heksanska kiselina je važan sastojak koji daje *kokū*, osećaj koji se percipira kada ljudi osećaju složenost, sitost, dugotrajnost uz dobar balans između ukusa, mirisa i taktilnog osećaja u tofuu.^{201,202} Iako su uloženi veliki napor da se smanji ukus pasulja kako bi soja bila prihvatljivija na zapadu, npr. da se uzgaja soja lišena enzima lipoksigenaze koji reaguje sa nezasićenim masnim kiselinama što dovodi do aldehida i ketona, nisu mogli da zamene kravlje mleko kao prilog uz čaj ili kafu.

I.1.4.1.1 Struktura proteina soje

Uklanjanjem ulja iz sojinog zrna dobija se odmašćeno sojino brašno, koje ima široku primenu u prehrambenoj industriji. Celokupni vodeni ekstrakti sojinih proteina mogu se razdvojiti na izolat sojinih proteina (SPI) i surutku zakišeljavanjem do pH vrednosti 4,5–4,8. Frakcija koja se taloži kiselinom (SPI) uključuje glavne proteine za skladištenje soje. Preostali deo se sastoji od manjeg globulina β -konglicinina i relativno velikih količina kontaminirajućih proteina, uključujući proteine surutke koji čine 9–15,3% proteina soje.¹⁶⁵ Proteini surutke se sastoje od lipoksigenaze (LOX, 102 kDa), β -amilaze (61,7 kDa), lektina (33 kDa), inhibitora Bouman-Birk (*Bowman-Birk*) proteaze (BBI, 7,8 kDa) i Kunitzovih (*Kunitz*) inhibitora tripsina (KTI, 20 kDa).¹⁹⁹ SPI je mešavina različitih proteina, a glavni sastojci su klasifikovani u četiri kategorije proteina prema njihovim koeficijentima sedimentacije 2S, 7S, 11S i 15S koji se talože pri različitim gravitacionim silama kada se rastvor podvrgne centrifugalnom polju. Volf (*Wolf*) i Nelsen (*Nelsen*) su predložili identitet frakcije 15S sa 11S u sastavu koristeći gel elektroforezu i analizu aminokiselina.²⁰³ 7S (β -konglicinin) i 11S (glicinin) čine ~70% ukupnog sirovog proteina SPI. Nedavno je pronađen lipofilni protein pored 7S i 11S u sojinom globulinu.²⁰⁴

I.1.4.1.1.1 Globulin 11S

11S globulin soje, glicinin, je jednostavan protein i heksamer sa molekulskom masom od 180–210 kDa. Svaka podjedinica je sastavljena od kiselog polipeptida sa molekulskom masom od ~35 kDa i baznog polipeptida sa molekulskom masom od ~20 kDa. Kiseli i bazni

polipeptidi su povezani disulfidnom vezom. Kao sastavna podjedinica, identificovano je pet podjedinica: A1aB1b (G1), A2B1a (G2), A1bB2 (G3), A5A4B3 (G4) i A3B4 (G5).²⁰⁵ Aminokiselinske sekvence ovih podjedinica su izvedene iz njihovih nukleotidnih sekvenci i podeljene su u dve grupe prema njihovoj homologiji: grupa I (G1, G2 i G3) i grupa II (G4 i G5). Identitet sekvence u svakoj grupi je oko 80%, a između grupa je oko 45%. Članovi grupe I su bogatiji metioninom i manje molekulske mase su od članova grupe II.²⁰⁶ Podjedinice glicinina su kodirane sa pet gena označenih kao Gy1, Gy2, Gy3, Gy4 i Gy5.²⁰⁷ Ovi geni glicininskih podjedinica se prevode i svaka podjedinica se sintetishe kao jedan polipeptidni prekursor, preproglicinin. Signalni peptid se uklanja kotranslaciono da bi se formirao proglicinin u endoplazmatskom retikulumu (ER). Nekovalentne interakcije između podjedinica proglicinina dovode do formiranja trimera, nakon formiranja intramolekularnih disulfidnih veza između kiselih i baznih polipeptida. Kako se proglicinin sortira u vakuole za skladištenje proteina, dolazi do specifičnog posttranslacionog cepanja između Asn i Gly ostataka, što rezultira zreloom podjedinicom koja se sastoji od kiselih i baznih polipeptida. Posttranslaciono cepanje je potrebno za sklapanje trimera proglicinina u heksamere.²⁰⁸

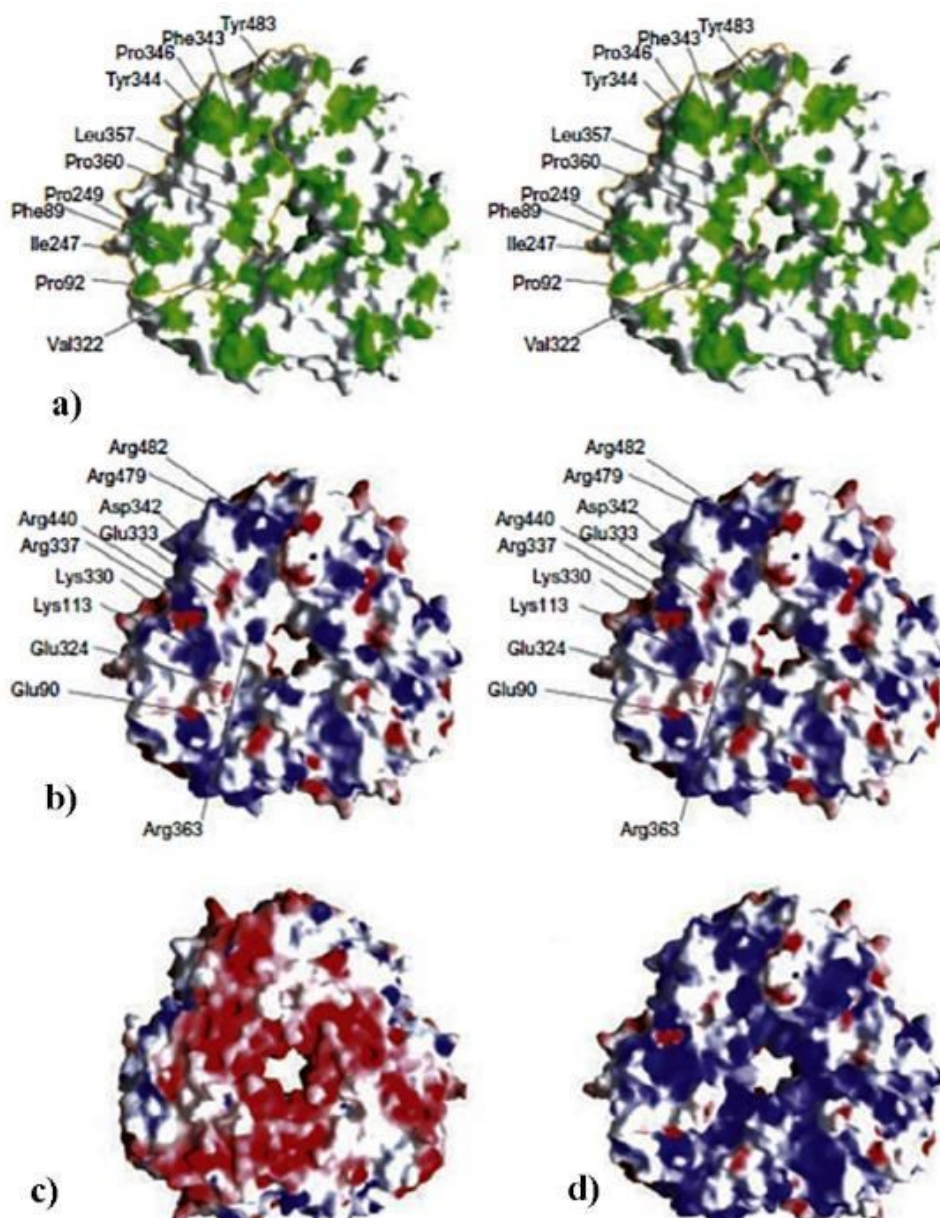
Molekularna struktura proglicinina A1aB1b određena je rendgenskom kristalografijom. Proglicinin A1aB1b je trimer sastavljen od tri protomera oko trostruke ose simetrije sa dimenzijama 9,5×9,5×40 nm. Jezgro protomera se sastoji od dva gel-rol β-lanca i dva proširena domena heliksa.²⁰⁹ Trodimenzionalna struktura glicinina A3B4 je takođe određena i otkriven je heksamer zrelog promotora glicinina sastavljen od dva posttranslaciono cepana trimera proglicinina. Dva lica normalna na trostruku osu u trimetu se nazivaju lica koja sadrže unutarlančane disulfide (IE) i lica koje sadrže disulfide na osnovu položaja disulfidnih veza između i unutar lanca (IA) (slika 7).

Kristalna struktura glicinina A3B4 pokazuje da se heksamer formira slaganjem na IE lica trimera. Homotrimer proglicinina A3B4 ima pokretni poremećeni region sastavljen od 74 aminokiselinskih ostataka (ostaci 252–325) na IE licu. Pokretni region inhibira formiranje heksamera sternim smetnjama. Specifično posttranslaciono cepanje se dešava između ostataka Asn320 i Gly321 pomoću procesnog enzima. Nakon ovog cepanja, poremećeni regioni se pomeraju sa IE lica na površinu, što rezultira sastavljanjem heksamera zrelog glicininskog protomera.²¹⁰

I.1.4.1.1.2 Globulin 7S

7S globulini su klasifikovani u tri frakcije, a to su β-konglicinin, γ-konglicinin i osnovni 7S globulin. β-Konglicinin je dominantan u 7S globulinu, dok γ-konglicinin i bažični 7S globulin čine manje od nekoliko procenata. β-Konglicinin je trimer sa molekulskom masom od 180–210 kDa i sastavljen od tri glavne podjedinice: α (68 kDa), α' (72 kDa) i β (52 kDa).²⁰⁵ Tan (*Thanh*) i Šibasaki (*Shibasaki*) izolovali su šest molekularnih vrsta i identifikovali njihove podjedinice kao α'β₂, αβ₂, αα'β, α₂β, α'₂β i α₃ iz semena soje iako je u teoriji bilo 11 molekularnih vrsta. Pored toga, prijavljena je još jedna vrsta β₃.^{211,212} Aminokiselinske sekvence ovih podjedinica su izvedene iz njihovih nukleotidnih sekvenci. Sa nutritivne perspektive, sadržaj sumpornih aminokiselina u β-konglicininu je nizak, a pronađeno je da metionin, cistein i triptofan nedostaju u β podjedinici.²⁰⁵ Podjedinice α i α' imaju regione proširenja na strani N-terminalnog kraja pored regiona jezgra koji su zajednički za sve

podjedinice, dok se β podjedinica sastoji samo od regiona jezgra. Apsolutne sličnosti u regionima jezgra između α i α' , α i β i α' i β su 86,8%, 75,5% i 71,4%, respektivno. Produžni regioni imaju više od 50% ostataka jonskih aminokiselina i posebno su bogati kiselim amino kiselinama kao što su glutaminska kiselina i asparaginska kiselina.²¹³ Koristeći sisteme ekspresije *Escherichia coli*, Ucumi (*Utsumi*) grupa je dobila po tri rekombinantne podjedinice β -konglicinina i regione jezgra α i α' podjedinica (α jezgro i α' jezgro) i proučavala odnos struktura-funkcija.

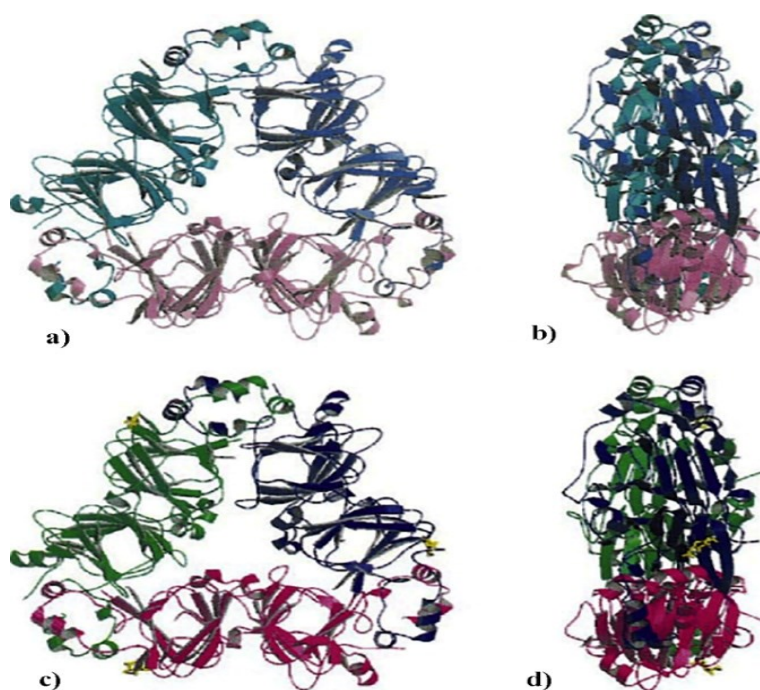


Slika 7. Distribucija hidrofobnih ostataka i elektrostatički površinski potencijal A3B4 trimera. Površina elektrostatičkog potencijala je obojena u opsegu od $-10k_B T$ (crveno) do $+14k_B T$ (plavo), gde je k_B Boltzmannova (*Boltzmann*) konstanta, a T apsolutna temperatura (u K); (a) stereodijagram hidrofobnih ostataka na IE licu. *Ala*, *Val*, *Leu*, *Ile*, *Met*, *Pro*, *Phe*, *Tyr* i *Trp* su obojeni zelenom bojom, a granica protomera je prikazana narandžastom; (b) stereodijagram elektrostatičkog površinskog potencijala IE lica, ostaci histidina nisu naelektrisani; (c) elektrostatički površinski potencijal IA lica; (d) elektrostatički površinski potencijal IE lica, ostaci histidina su pozitivno naelektrisani²¹⁰

Površinske hidrofobnosti pojedinačnih rekombinantnih proteina merene su njegovom sposobnošću da vezuju fluorescentni molekul. Redosled hidrofobnosti površine bio je $\alpha' \gg \alpha \gg \beta$. Površinske hidrofobnosti α i α' jezgra bile su veoma slične onima α i α' podjedinica, respektivno.

Termička stabilnost rekombinovanih α' , α i β -homotrimerera je određena pri jonskoj jačini 0,5 i pH vrednosti 7,5 korišćenjem diferencijalne skenirajuće kolorimetrije. Temperature denaturacije β , α i α' jezgara bile su 90,8 °C, 82,7 °C i 78,6 °C, respektivno. Nasuprot tome, temperature denaturacije α jezgra i α' jezgra bile su 83,3 °C i 77,3 °C, respektivno. Rastvorljivost rekombinantnih proteina je merena pri različitim pH vrednostima i jonskim jačinama. α Jezgro, α' jezgro i β -homotrimeri su bili nerastvorljivi pri pH vrednostima većim od 4,8 i jonskoj jačini 0,08 iako su α i α' homotrimeri bili rastvorljivi pri istim pH vrednostima i jonskoj jačini.^{213,214} Ovi rezultati pokazuju da regioni jezgra određuju površinsku hidrofobnost i termičku stabilnost, dok prošireni regioni igraju važnu ulogu u rastvorljivosti i inhibiciji agregacije protein-protein zbog visokog sadržaja ostataka jonskih aminokiselina.

β -konglicinin je glikoprotein. Podjedinice β -konglicinina se sintetišu na grubom ER i kotranslaciono glikozilovane na ostacima asparagina prisutnim u sekvenci Asn-Xaa(bilo koja amino kiselina)-Ser/Thr dodatkom jezgra oligosaharida koji sadrži manozu. Svaka α i α' podjedinica ima dva glikolizovana aminokiselinska ostatka sa šećernim delovima, dok β podjedinica ima jedan glikolizovani ostatak. N-povezani glikani nisu od suštinskog značaja za savijanje i sklapanje u trimere β -konglicinina. Ugljeni hidrati ne doprinose termičkoj stabilnosti, ali sprečavaju formiranje agregata niske jonske snage pri pH vrednosti 7,5.²¹³



Slika 8. Trakasti dijagrami rekombinantnih (a i b) i prirodnih (c i d) β -homotrimerera. Tri monomera u rekombinantnom i prirodnom β -homotrimeru prikazana su svetlo plavom, svetlo zelenom i ružičastom, odnosno plavom, zelenom i mangenta bojom. Ugljeni hidrati prirodnog β -homotrimerera prikazani su žutom bojom kao model kuglice i štapa. (a) i (c) su prikazani kao trostruka osa simetrije koja ide normalno na papir, a (b) i (d) su povezani sa prikazom na (a) i (c) rotiranjem za 90°²¹⁵

Molekularna struktura rekombinantnih i nativnih β -homotrimeru β -konglicinina određena je rendgenskom kristalografijom. Oba trimera sastavljena od tri protomera oko trostruke ose simetrije sa dimenzijama $9,6 \times 9,6 \times 44$ nm. Jezgro protomera se sastoji od dva β -lanca gel-rola i proširenih domena heliksa. Ove strukturne karakteristike su skoro konzi- stentne sa karakteristikama kanavalina i fazaolina koji su 7S globulini u bobu i običnom pasulju.^{216,217} Svaki monomer osnovnog β -homotrimeru je N-glikolizovana na Asn328, ali monomer rekombinovanih β -homotrimeru nije. Nema značajnih razlika u ukupnim struk- turama između rekombinantnih i prirodnih monomera, što ukazuje da N-vezani glikani ne utiču na konačnu strukturu β -homotrimeru (slika 8).²¹⁵

I.1.4.1.3 Struktura proteina soje u rastvorima

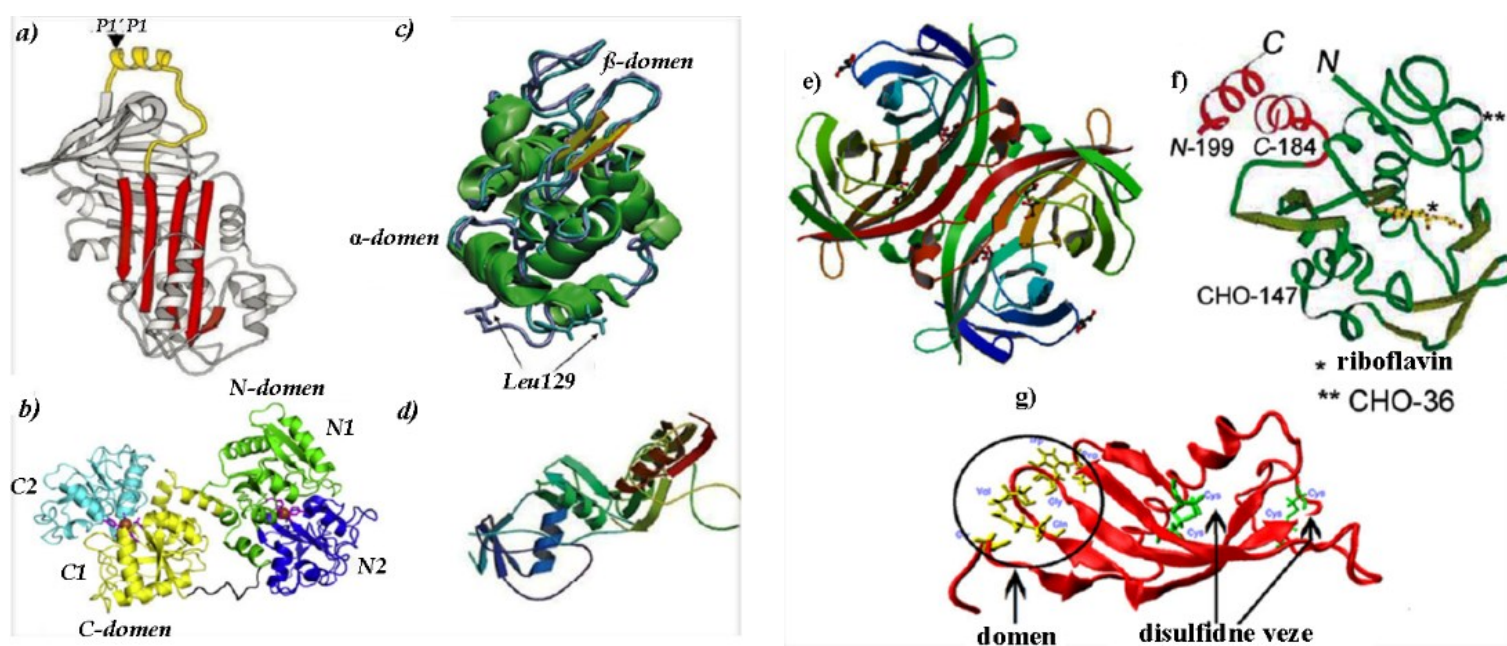
U sojinom mleku, sojini globulini koegzistiraju sa uljem. Sojino mleko se može lako frakcionisati na tri frakcije (plutajuća, rastvorljiva i frakcija u obliku čestica) ultracentrifugi- ranjem. Plutajuća frakcija se sastoji uglavnom od triacilglicerida koji postoje kao uljna tela, a rastvorljiva frakcija sadrži α i α' podjedinice 7S, kiselu (slika 8a) podjedinicu 11S i Bouman- Birk (*Bowman-Birk*) inhibitor proteina surutke soje (VSPs). U drugim VSP-ovima, β podjedi- nica 7S i bazna podjedinica (slika 8b) 11S, obiluju česticama proteina.

Poznato je da sojini globulini samoagregiraju pri niskim pH vrednostima. Samoagre- giranje nativnih sojinih globulina u vodenom rastvoru u širokom opsegu koncentracija i pH vrednosti, proučavano je primenom statičkih i dinamičkih tehnika rasejanja svetlosti.²¹⁸ Važno je napomenuti da rastvorljivost sojinih globulina nije tako dobra i da se rastvoreni globulini u supernatantu i molarna masa smanjuju sa povećanjem rotacione centrifugalne sile (RCF). Molarna masa dobijena pri nižem RCF treba da bude vrednost za agregirane sojine globuline. Proučavana je i toplotno indukovana denaturacija vodenih rastvora SPI pri neutralnoj pH vrednosti i utvrđeno je da su agregati sa istom fraktalnom strukturom kao kod osnovnog sojinog proteina nastali kada je pH vrednost bila iznad 6,4.²¹⁹

I.1.4.2 Proteini belanceta

Belance jajeta ili albumen se deponuje u cevastim žlezdama oko jajne ćelije u razvoju tokom njenog prolaska kroz jajovod, a nakon toga sledi taloženje ljuske od strane žlezde ljuske. U tipičnom jajetu domaće živine, belance čini 58% zapremine i sadrži ~50% ukupnog proteina jajeta.²²⁰ Tokom razvoja embriona, belance se postepeno unosi u amnionsku teč- nost, a zatim u sam embrion, tako da u trenutku izleganja ništa ne ostaje. Belance tako obez- beđuje vodenu sredinu u kojoj se embrion razvija, a takođe obezbeđuje deo hranljivih ma- terija. Albumen se sastoji od 88,5% vode, 10,5% proteina, 0,5% ugljenih hidrata i ostatka drugih rastvorenih materija.²²⁰ Proteini belanca karakterišu se relativnom homogenošću, s minimalnim prisustvom čestičnih materija, pri čemu većinu rastvorenih sastojaka čine pro- teini. Ova homogenost, zajedno s lakoćom njihove dostupnosti, učinila je proteine belanca predmetom intenzivnih biohemijskih istraživanja. Međutim, uprkos obimnom spektru stu- dija posvećenih ovim proteinima, fiziološke uloge mnogih od njih ostaju nedovoljno razjaš- njene do današnjeg dana. Neki proteini mogu služiti uglavnom kao hranjive materije, ali ako je tako, to ne objašnjava zašto su mnogi od onih koji su proučavani imali očuvane

sekvence aminokiselina. Ako bi jednostavno služili kao izbalansirani izvor aminokiselina, onda bi očuvanje sekvenci izgledalo manje važno. Neki od proteina imaju karakteristična svojstva koja sugeriraju funkcije, npr. inhibitori proteinaze, vezivanje proteina itd., ali fiziološki značaj ovih svojstava nije uvek jasan. Pokazana je suštinska uloga jednog proteina, odnosno proteina koji vezuje riboflavin (*RfBP*), pošto je njegovo odsustvo kod mutanta generalno smrtonosno nakon inkubacije od oko 13 dana.²²¹ Ukupan broj proteina belanaca nije poznat. Od tada je identifikovano više manjih sastojaka. Sa nekim od glavnih proteina, njihove strukture, njihovi geni i regulacija njihove sinteze su detaljno proučavani. Neka svojstva proteina belanceta su sažeta u tabeli 4, dok su strukture proteina belanceta prikazane na slici 9.^{220,222-225}



Slika 9. Proteini belanceta: (a) ovalbumin²²⁶; (b) ovotransferin²²⁷; (c) lizozim²²⁵; (d) ovomukoid²²⁸; (e) avidin²²⁹; (f) *RfBP*²³⁰ i (g) cistatin²³¹

Tabela 4. Fizička svojstva proteina belanceta (albumena)²³²

Protein	Procenat u belancetu (%)	M _r (kDa)	% ugljovodonika	pI	Moguće funkcije, ako su poznate
<i>Ovalbumin</i>	54	45	3,05	4,5	?
<i>Ovotransferin</i>	12	76,6	2,6	6,06	Prenos gvožđa
<i>Ovomucin</i>	3,5	α=210 β=720	13 58	4,5-5,0	Strukturna Strukturna
<i>Ovomukoid</i>	11	28	16,5-32,6	4,1	Inhibitor proteinaze
<i>Ovoinhibitor</i>	1,50	49	5-9,6	5,1	Inhibitor proteinaze
<i>Cistatin</i>	0,05	13,1	0	5,6 i 6,5	Inhibitor tiol proteinaze
<i>Ovostatin</i>	0,5	780	5,8	4,9	Inhibitor proteinaze
<i>Lizozim</i>	3,4	14,3	0	10,7	Enzim
<i>Ovoglobulin G2</i>	1,0	47	?	4,9-5,3	?
<i>Ovoglobulin G3</i>	1,0	50	?	4,8	?
<i>RfBP</i>	1,0	29,2	11	4,0	Prenos riboflavina
<i>Avidin</i>	0,5	68,3	7	10,0	?
<i>ThBP</i>	/	38	0	?	Prenos Tiamina

RfBP - proteina koji vezuje riboflavin; *ThBP* - protein koji vezuje tiamin

I.1.4.2.1 Ovalbumin

Ovalbumin je najzastupljeniji protein belanaca, koji čini 54% ukupnih proteina. To je glikoprotein i ima izoelektričnu tačku 4,5. Utvrđen je njegov kompletan niz od 385 aminokiselina.²³³ Ima četiri cisteinska ostatka i jedan cistin disulfidni most. Kada se proteini belanaca razdvoje elektroforezom, pojavljuju se tri ovalbuminske trake;²³⁴ oni odgovaraju defosforilovanim, mono- i difosforilovanim oblicima, a mesta fosforilovanja su identifikovana kao Ser 68 i 344. Pored toga, ovalbumin ima još dva mesta modifikacije: N-terminalni kraj je acetilovan, a ugljovodonični deo je povezan preko Asn 292. Postoje dva tipa oligosaharida koji se nazivaju tipom visoke manoze i hibridnim tipom, od kojih je svaki povezan preko jednog Asn ostatka.²³⁵ Pored toga, poznata su dva polimorfna oblika ovalbumina, ovalbumin A i ovalbumin B, koji se razlikuju po tome što imaju Asn i Asp na poziciji 311. Većina izlučenih proteina ima N-terminalnu signalnu sekvencu hidrofobnih aminokiselina, koja im omogućava da prelaze endoplazmatski retikulum. U slučaju ovalbumina, signalna sekvenca je u sredini polipeptidnog lanca na ostacima 234-252.²³⁶

Zanimljiva karakteristika strukture ovalbumina koja je postala očigledna iz njegove sekvence je njegova homologija sa grupom inhibitora proteinaze poznatih kao serpini. Utvrđeno je da ima 30% homologije sekvence sa arhetipskim članom porodice α_1 -antitripsin.²³⁷ Većina članova porodice serpina ima ono što je opisano kao naglašena (S) i opuštena (R) konformacija. Proteolitičko cepanje ih pretvara iz S u R konformaciju. Ova konformaciona promena se može detektovati spektroskopskim metodama kao što je cirkularni dihroizam.²³⁸ Takođe je utvrđeno da S i R oblici pokazuju različite toplotne stabilnosti. Ovalbumin je takođe podložan proteolizi; kada se tretira subtilizinom, on se cepa na ostacima 346 i 352, oslobađajući heksapeptid i glavni fragment koji sadrži 346 aminokiselinskih ostataka. Međutim, razloženi proizvod ne pokazuje konformacionu promenu ili razliku u toplotnoj stabilnosti.²³⁹

Iako su preliminarne studije rendgenske difrakcione analize napravljene na kristalima ovalbumina detaljna trodimenzionalna struktura nije predložena. Aminokiselinska sekvenca izvedena iz nukleotidne sekvence japske prepelice pokazuje 42 aminokiselinske supstitucije i tri delecije, u poređenju sa sekvencom domaće živine.^{240,241}

I.1.4.2.2 Ovotransferin

Ovotransferin je glikoprotein koji se nalazi u belancu, žumancu i u plazmi. Proteini iz sva tri izvora imaju istu sekvencu aminokiselina, ali postoje male razlike u glikolizaciji.²⁴² Protein ima M_r od 80 kDa i sastoji se od dva domena sa regionom kratkih veza.²⁴³ Dva domena se mogu razdvojiti nakon proteolize regiona povezivanja. Svaki domen ima veoma jako mesto vezivanja za Fe^{III} ($K_{dis} \sim 10^{-24}$). Dva domena se nazivaju N-domen i C-domen. Protein je bogat disulfidnim mostovima, ima šest u N-domenu i devet u C-domenu, dajući proteinu veliku stabilnost. Postoji oko 40% homologije u sekvencama ova dva domena, za koje se veruje da su nastale umnožavanjem gena pre 500 miliona godina.²⁴³ Ne postoje ubedljivi dokazi za postojanje jednostavnijeg monomernog oblika u plazmi današnjih kičmenjaka. Većina ovih disulfidnih mostova su unutrašnji i ne mogu se redukovati 2-merkaptotanolom bez prethodne denaturacije. Međutim, postoji jedan u vezivnim ostacima C-domena

478 do 671 koji se lakše redukuje i pretpostavlja se da je više izložen.²⁴⁴ Sličan ne postoji u ovotransferinu patke. Kompletan aminokiselinski sekvenca i nukleotidna sekvenca su objavljeni 1982. godine.^{243,245} Iako njegova trodimenzionalna struktura još nije objavljena, dva veoma blisko povezana proteina imaju, humani laktoferin i transferin zečijeg serum.^{246,247} Funkcija ovotransferina je opšte prihvaćena kao funkcija transporta gvožđa. On vezuje dva atoma Fe^{III}, po jedan u svakom domenu. Redosled vezivanja gvožđa zavisi od pH vrednosti; pri pH vrednosti 6,0 prvo se vezuje za C-domen, dok se pri pH vrednosti 8,5 prvo vezuje za N-domen. Za efikasno vezivanje gvožđa, mesta zahtevaju sinergističko vezivanje anjona.²⁴⁸ Molekuli transferina stupaju u interakciju sa receptorima na površini ćelije kako bi preneli gvožđe u ćelije. Mehanizam i zahtevi za ovaj proces su detaljno proučavani korišćenjem crvenih krvnih zrnaca pilećeg embriona i fragmenata ovotransferina.²⁴⁹ Kada se ovotransferin cepa između dva domena korišćenjem proteaza, dva odvojena domena N i C će se ponovo povezati nekovalentno. Vilijams (*Williams*) i Moreton (*Moreton*) su pokazali da uklanjanjem C-terminalnih fragmenata u N- i C-domen, ova dva domena se više ne povezuju.²⁵⁰ Konkretno, za reasocijaciju su potrebni ostaci 320-332 N-domena i ostaci 683-686 C-domena. Korišćenjem N- ili C-domena odvojeno, ne dolazi do vezivanja za membrane ćelija crvenih krvnih zrnaca. Međutim, ako se fragmenti i N- i C-domena koriste zajedno, tada dolazi do vezivanja za crvena krvna zrnca, bez obzira da li su fragmenti u stanju da dimerizuju jedan sa drugim ili ne. Oba domena su stoga potrebna za efikasno vezivanje za receptore ćelijske površine, a samim tim i za preuzimanje.

I.1.4.2.3 Ovomucin

Ovomucin čini 1,5% ukupnog proteina belanceta. On u velikoj meri doprinosi viskoznosti belanca. Zbog toga igra ulogu u održavanju strukture belanca, a pokazalo se da gusto belance, koje čini spoljašnjih 50% zapremine, ima veći sadržaj ovomucina od retkog belanca. Interesovanje za njegova fizička svojstva je usredsređeno na gubitak viskoziteta belanceta pri skladištenju, za koji se pretpostavlja da je u velikoj meri posledica promena u svojstvima ovomucina, kao i na svojstva pene belanceta koja takođe proističu iz sadržaja ovomucina. Ova poslednja svojstva su od posebnog interesa za prehrambenu industriju. Dugi niz godina glavna poteškoća u izvođenju biohemijских studija na ovomucinu je bila dobijanje rastvorljivih preparata. Robinson (*Robinson*) i saradnici su uspeli da dobiju rastvorljive preparate nakon redukcije disulfidnih mostova.²⁵¹ Robinson (*Robinson*) i Monsey (*Monsey*) su frakcionisali redukovani ovomucin u dve komponente označene kao α -ovomucin i β -ovomucin.^{252,253} α -Ovomucin ima M_r od 210 kDa i sadrži oko 13(mas)% ugljenih hidrata. Nasuprot tome, β -ovomucin ima mnogo veći sadržaj ugljenih hidrata (~58%) i M_r od 720 kDa, koji je povezan od manjih jedinica od 112 kDa.

β -ovomucin je u velikoj meri odgovoran za želatinozne osobine ovomucina, a to je u velikoj meri posledica njegovog visokog sadržaja ugljenih hidrata, koji sadrži N-acetilgalaktozamin, galaktozu i sijalnu kiselinu. Neki ostaci ugljenih hidrata su sulfatirani. Polipeptid ima veoma visok sadržaj aminokiselina serina (13%) i treonina (16%), a za njih su vezani ostaci ugljenih hidrata. Ovomucin ne samo da ima sposobnost samo-asocijacije, formirajući velike agregate, već se može povezati i sa drugim proteinima prisutnim u belancima jajeta. Kato (*Kato*) i saradnici su dobili rastvorljivi preparat ovomucina koji ima M_r $8,3 \times 10^6$ Da, koji

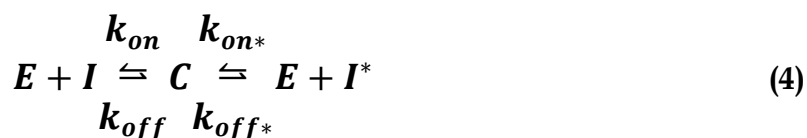
se ultrazvukom smanjuje na $1,1 \times 10^6$ Da i dalje redukuje merkaptoetanolom na $2,3 \times 10^5$ Da.²⁵⁴ Pokazali su da su svojstva pene smanjena smanjenjem M_r , ali emulgatorska svojstva koji se odnose na povećanu hidrofobnost površine su se povećala. Rabuje (*Rabouille*) i saradnicima su koristili sonikaciju praćenu gel filtracijom da bi prečistili ovomucin.²⁵⁵ Čini se da njihov prečišćeni materijal odgovara β -ovomucinu koji su pripremili Robinson (*Robinson*) i Monsey (*Monsey*).²⁵² Ima $M_r > 40 \times 10^6$ Da, ali se može razgraditi redukcijom korišćenjem ditiotreitola do M_r vrednosti 3×10^6 Da. Fizičke metode kao što su rasejanje svetlosti i elektronska mikroskopija sugerišu da je to fleksibilan linearni molekul.

I.1.4.2.4 Inhibitori proteinaze

Glavna grupa proteina prisutnih u belancu su inhibitori proteinaze. Od ovih, ovomukoid je najzastupljeniji i najopsežnije proučavan, ali su nedavno proučavani i drugi manje zastupljeni inhibitori. Iako njihove funkcije nisu pouzdano poznate, veruje se da mogu imati zaštitnu ulogu protiv bakterijskih proteinaza. Proteinaze se mogu klasifikovati prema prirodi njihovog katalitičkog mesta na serinske proteinaze, tiol proteinaze, kisele proteinaze (koje imaju Asp na aktivnom mestu) i proteinaze koje zahtevaju jone metala.²⁵⁶ Od njih su Ser proteinaze najrasprostranjenije. Ovomukoid i ovoinhibitor su inhibitori Ser proteinaza, cistatin je inhibitor tiol proteinaza, a ovostatin inhibira različite proteinaze.

I.1.4.2.5 Ovomukoid

Ovomukoid čini 10% proteina u belancu. To je toplotno stabilan glikoprotein od 185 aminokiselinskih ostataka i devet disulfidnih mostova. Ovo poslednje je ono što objašnjava njegovu veliku toplotnu stabilnost. Sekvenca se sastoji od tri homologna tandem domena za koje se veruje da su nastali kroz dve duplikacije gena.²⁵⁷ Domeni I, kao i domen II se nazivaju domenima a-tipa i pokazuju veću sličnost jedni sa drugima nego sa domenom III, koji je poznat kao domen b-tipa. Svaki domen ima tri unutardomenska disulfidna mosta. Domen b-tipa se razlikuje od domena a-tipa po tome što je kraći između prvog i drugog cisteina koji čine polovinu prvog i drugog disulfidnog mosta.²⁵⁸ Postoje tri potencijalna mesta inhibitora proteinaze, po jedno u svakom domenu. Kod ovomukoida domaće živine samo jedan domen pokazuje inhibitorna svojstva proteinaze, dok kod ovomukoida ćuretine dva domena imaju inhibitorna svojstva, a kod patke sva tri domena. Pored broja inhibitornih domena, postoji i specifičnost ovih domena. Većina ovomukoida je testirana na proteinaze tripsin i himotripsin. Obrasci inhibicije zavise od sekvence u ograničenom regionu svakog domena. Mehanizam inhibicije se odvija u dva koraka. Prvo se inhibitor (*I*) vezuje za enzim (*E*), a zatim sledi cepanje jedne peptidne veze da bi se formirao modifikovani inhibitor (*I**). Formira se stabilan inhibicioni kompleks (*C*) koji se samo vrlo sporo disosuje, zbog niskih konstanti brzine, k_{off} i k_{off*} :



U zavisnosti od amino kiseline na karboksilnoj strani peptidne veze koja se cepa, dolazi do inhibiranja tripsina ili himotripsina. Moguće je cepati ovomukoid između drugog i trećeg domena korišćenjem V-8 proteinaze i zatim prečistiti izolovani treći domen.²⁵⁹ Laskovski (*Laskowski*) i saradnici napravili su veoma opsežnu uporednu studiju sekvenci aminokiselina preko 125 različitih vrsta ptica.^{260,261} Iz ovoga je moguće pokazati da deo sekvenci koji pokazuje najviše varijacija odgovara regionu kontakta enzim-inhibitor. Iz rendgenskih kristalografskih studija jasno je da je 8 od 11 kontaktnih položaja enzim-inhibitor jako hipervarijabilno.²⁶⁰ Ovo rezultuje ovomukoidima blisko srodnih vrsta, npr. domaća živina, ćuretina, zlatni fazan, pokazuju različite obrasce inhibitorne aktivnosti. Sugerisano je da je značaj ove vrste varijabilnosti omogućavanje inhibitorima proteinaze da se prilagode inhibiciji promenljivog opsega bakterijskih proteinaza.

I.1.4.2.6 Ovoinhibitor

Ovoinhibitor je takođe inhibitor serinskih proteinaza, a po svojstvima je sličan ovomukoidu. Veći je od ovomukoida, ima vrednost M_r od 49 kDa i sastoji se od sedam domena, od kojih svaki ima sličan raspored disulfidnih mostova kao kod ovomukoida. Šest domena je a-tipa, a sedmi, koji obuhvata C-terminalni kraj, je b-tipa. Ovoinhibitor iz domaće živine je u stanju da inhibira tripsin, α -himotripsin, subtilisin i alkalnu proteazu iz *Aspergillus oryzae*.²⁶² Jedan molekul ovoinhibitora je u stanju da inhibira dva molekula tripsina i dva himotripsina, pri čemu se svaki vezuje za različite domene. Subtilizin se, s druge strane, takmiči sa α -himotripsinom za ista mesta. Postoje dokazi da dva mesta vezivanja tripsina nisu ekvivalentna.²⁶³ Moguća prednost posedovanja većeg broja domena, od kojih svaki inhibira proteinaze, jeste to što se širi opseg proteinaza može inhibirati i tako obezbediti veću meru zaštite od mikroorganizama.

I.1.4.2.7 Cistatin

Cistatin je prvi put izolovan u malim količinama iz belanaca od strane Fosuma (*Fossum*) i Vitakera (*Whitaker*) i poznat je kao inhibitor ficina zbog svojih svojstava.²⁶⁴ Naziv cistatin predložio je Beret (*Barret*) 1981. godine.²⁶⁵ Javlja se u koncentracijama od oko $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ u belancu i takođe u nižim koncentracijama ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) u serumu.²⁶⁶ Postoje dva glavna oblika cistatina koji imaju pI vrednosti od 6,5 i 5,6, koji se nazivaju A, B i 1, 2.^{266,267} Svaki od ova dva oblika postoji u kratkim i dugim oblicima, pri čemu prvom nedostaje prvih osam aminokiselinskih ostataka prisutnih u polipeptidnom lancu od 116 ostataka drugog. Dva glavna oblika su imunološki identična i nijedan ne sadrži ugljene hidrate. Cistatin inhibira brojne cisteinske proteaze uključujući ficin, papain, katepsin B, katepsin H, katepsin L i dipeptidil peptidazu I, ali ne i klostipain ili streptokoknu proteazu i samo slabo inhibira bromelin.²⁶⁶ Cistatin je sekvencioniran i njegova trodimenzionalna struktura je određena rendgenskom kristalografijom pri rezoluciji $2,0 \text{ \AA}$.²⁶⁷⁻²⁶⁹ Sadrži α -heličnu regiju i pet upređenih β -naboranih ploča i dva intralančana disulfidna mosta. Identifikovan je region koji se vezuje za proteaze.

I.1.4.2.8 Ovostatin

Ovostatin (ranije poznat kao ovomakroglobulin) je veliki molekul koji ima tetramernu strukturu ($M_r = 780 \text{ kDa} = 4 \times 195 \text{ kDa}$). On inhibira širok spektar endoproteinaza, uključujući termolizin (proteazu koja zahteva metal-jon vezu) i kolagenazu.²⁷⁰ Njegova struktura i mehanizam delovanja je sličan inhibitoru Ser proteaze, α_2 -makroglobulina.²⁷⁰ Proteaze prvo cepaju vezu unutar ovostatina, koja zatim prolazi kroz konformacionu promenu tako da ometa pristup velikim, ali ne i malim, molekulima supstrata katalitičkom mestu. Tako ovostatin inhibira aktivnost proteaze kada se meri korišćenjem proteinskih supstrata, ali ne i kada se koriste supstrati sa malom M_r , kao što su peptidni nitroanilidi. Ovostatin pokazuje 40% homologije sa α_2 -makroglobulinom, ali se razlikuje od njega po tome što je neosetljiv na metilamin, ima izrazitu imunogenost i različitu mapu peptida nakon tretmana cijanogen bromidom. Ovostatin iz domaće živine i patke je proučavan, prvi inhibira samo metaloproteaze, dok drugi inhibira metaloproteaze i serinske proteaze. Ruben (*Ruben*) i saradnici su na osnovu serije studija elektronskih mikrografa predložili elegantan model za mehanizam inhibicije pačijeg ovostatina.²⁷¹

I.1.4.2.9 Lizozim

Od svih proteina u belancu, lizozim je onaj koji je najtemeljnije istražen na molekularnom nivou. Ovo je prvenstveno zbog kombinacije faktora: prilično je bogat i lako se prečišćava, relativno je male veličine, za njega je objavljena prva rendgenska struktura atomske rezolucije i mehanizam delovanja je predložen na osnovu strukturalnih informacija.²⁷²⁻²⁷⁴ Lizozim, među glavnim proteinima belanaca, se razlikuje po tome što ima alkalni pI, što znači da može da formira komplekse sa ovomucinom, ovalbuminom i ovotransferinom. Ima ukupno 129 aminokiselinskih ostataka i sadrži četiri disulfidna mosta. Njegova enzimska aktivnost je u stanju da cepa peptidoglikane, koji se nalaze u ćelijskim zidovima bakterija. Njegova uloga u belancu jajeta može biti zaštita od invazijskih bakterija. Njegov mehanizam delovanja je detaljno proučavan, a precizni ostaci aminokiselina uključeni u katalizu, npr. aspartat-52 i glutamat-35, dobro su poznati. Njihov značaj u katalizi je očigledan, jer kada se bilo koji od njih zameni odgovarajućim amidom, Asn ili Gln, korišćenjem mutageneze usmerene položajem, katalitička aktivnost se smanjuje na 5% odnosno 0,1% od one nemodifikovanog enzima.²⁷⁵ Rendgenska kristalografija kompleksa između lizozima i jednog od njegovih supstrata otkriva prostornu dispoziciju enzima i supstrata. Rendgenska kristalografija daje statičnu sliku interakcije. U novije vreme dinamičniju sliku daju spektroskopske metode koje se mogu primeniti u rastvoru za razliku od kristala. Korišćenjem NMR spektroskopije sada je moguće identifikovati rezonancije za 126 od 129 aminokiselinskih ostataka.²⁷⁶ Iz ovoga će se dobiti dinamička slika promena tokom katalize. Pokazalo se da se jedan od četiri disulfidna mosta može selektivno redukovati, a sekundarna i tercijarna struktura zadržati, iako je katalitička aktivnost smanjena za 40%, kao toplotna stabilnost.²⁷⁷ Urađeno je više komparativnih studija o lizozimima iz belanca različitih ptica. Postoje dva osnovna tipa: c-tip (piletina) i g-tip (guska). Drugi ima veću $M_r=21 \text{ kDa}$, u poređenju sa 14 kDa. Postoje značajne razlike u sekvenci, ali i sličnosti u trodimenzionalnoj strukturi, koje je uvidela Viver (*Weaver*) sa saradnicima, pod pretpostavkom da su se oba tipa odvojila od

zajedničkog evolucionog prethodnika.²⁷⁸ Džols (*Jolles*) i saradnici uporedili su sekvence brojnih lizozima, uglavnom c-tipa, uključujući one iz fazana, prepelice, ćuretine, jarebice i patke.²⁷⁹ Između 10 i 14 supstitucija se dešava unutar fazanoidnih lizozima, a više između fazanoida i anatičnih ptica.

I.1.4.2.10 Ovoglobulini

Ovoglobulini su prvobitno podeljeni u tri klase G1, G2 i G3 na osnovu njihovog razdvajanja elektroforezom sa pokretnom granicom.²⁸⁰ Naknadni rad je pokazao da je G1 lizozim. Ovoglobulini G2 i G3 su najmanje detaljno istraženi sa biohemijskog stanovišta. Iako su pročišćene i utvrđene njihove M_r , nisu sprovedene nikakve strukturne studije. Još im nisu pripisana nikakva katalitička ili vezujuća svojstva.^{281,282} Njihova glavna osobina do danas, bila je prisustvo velikog broja genetskih varijanti.²²³ Razlike između dva od njih su istražene mapiranjem peptida.²⁸² Ovoglobulini G2A i G2B se razlikuju po svom pI, kao i po osetljivosti na himotripsin i V8 proteazu.

I.1.4.2.11 Proteini koji vezuju vitamine

Vitamini prisutni u oplodjenom jajetu su potrebni da zadovolje potrebe rasta embriona u razvoju do trenutka izleganja. Jedan broj njih je prisutan i u belancu i u žumancu vezan za odgovarajuće vezivne proteine. Proteini koji vezuju vitamine su identifikovani za riboflavin, biotin, tiamin, cijanokobalamin, retinol i holekalciferol, a oni za poslednja dva su uglavnom prisutni u žumancu.²⁸³ Najbolje okarakterisani su oni za riboflavin, biotin i tiamin. Čini se da je uloga vezivnih proteina da obezbede unos vitamina u jajne ćelije u razvoju. Ovo se najjasnije pokazuje u slučaju mutanta sa nedostatkom proteina koji vezuje riboflavin. Embrioni u razvoju umiru na ili blizu 13 dana inkubacije od nedostatka riboflavina. Nedostatak se ne može prevazići hranjenjem kokošaka hranom koja je dopunjena riboflavinom, već samo direktnim ubrizgavanjem riboflavina u jaja.²⁸⁴ Međutim, postoji mnogo neodgovorenih pitanja u vezi sa proteinima koji vezuju vitamine.²⁸³

I.1.4.2.11.1 Protein koji vezuje riboflavin (RfBP)

Protein koji vezuje riboflavin je najzastupljeniji protein koji vezuje vitamine u belancetu, čineći približno 1% sadržaja proteina. Protein je prečišćen iz belanaca jajeta domaće živine i sekvencioniran, iako njegova trodimenzionalna struktura još nije utvrđena.^{284,285} Ima devet disulfidnih mostova i to je verovatno delimično razlog za njegovu visoku termičku stabilnost. Rastvori RfBP mogu da se kuvaju 30 min bez denaturacije. Iz njegovog cirkularnog dihroičnog spektra procenjuje se da RfBP domaće živine ima približno 24% α -heliksa i 39% β -naboranih ploča.²⁸⁶ Protein ima ukupno osam fosfatnih grupa koje zajedno sa kiselim ostacima aminokiselina i sijalnom kiselinom čine njegov nizak pI od 4,0. Ima dve oligosaharidne grupe vezane za Asn 36 i 147. Za razliku od drugih proteina koji vezuju flavin, on ne pokazuje visok stepen specifičnosti prema flavinima za koje je u stanju da se veže.²⁸⁷ Fosfatne grupe i ostaci sijalne kiseline su važni za unos RfBP u oocyte, pošto njihovo

uklanjanje dovodi do značajnog smanjenja unosa.²⁸⁸ RfBP kompleksu nedostaje karakteristika fluorescencije riboflavina, što je korisno svojstvo za merenje stepena vezivanja.²⁸⁹

I.1.4.2.11.2 Avidin

Avidina je mnogo manje u belancima od RfBP, pri čemu prvi čini samo 0,05% ukupnog proteina. Ipak, on je najviše proučavan od proteina koji vezuju vitamine. Primećen je u vidu nutritivnog sindroma izazvanog konzumiranjem nekuvanih belanaca. Sadržao je avidin koji ima veoma visok afinitet za biotin, što čini hranjivi izvor nedostupnim. Upravo ovaj izuzetno visok afinitet ka biotinu ($K_{dis}=0,6 \times 10^{-15}$ M) je rezultirao brojnim primenama koje koriste ovo snažno vezivanje. Avidin je glikoprotein koji se sastoji od četiri podjedinice, od kojih svaka ima jedno mesto vezivanja za biotin. Podjedinice se sastoje od 128 amino kiselina i M_r na osnovu sekvence je 15,6 kDa. Veoma snažno vezivanje avidina za biotin, ekvivalentno promeni slobodne energije od 21 kcal mol⁻¹, je izuzetno visoko za nekovalentnu interakciju koja uključuje organski ligand. Nejasno je koje prednosti ima veoma snažno vezivanje u odnosu na moguće fiziološke uloge proteina. On je npr. 1000 puta veći od proteina koji vezuje biotin u žumancu.²⁹⁰ Čini se malo verovatnim da je njegova uloga u transportu biotina, pošto veliki deo cirkulišućeg avidina nema biotin. Više je verovatno da može delovati u cilju zaštite od bakterijskog napada. Njegove osobine su sveobuhvatno pregledane 1975. godine i od tada je naglasak stavljen u velikoj meri na primenu biotin-avidin tehnologije, tako da je tome posvećen ceo tom metoda u enzimologiji.^{291,292} Avidin ima pI od 10,5 i jedan disulfidni most. Pokazalo se da je teško dobiti odgovarajuće kristale avidina za studije difrakcije rendgenskih zraka, verovatno zato što je glikoprotein, iako je proučavano blisko srodno jedinjenje, streptavidin, koje nije glikozilovano. Ostaci oligosaharida nisu važni za vezivanje, jer se mogu odcepiti bez značajnog uticaja na vezivanje. Četiri mesta vezivanja biotina na avidin su grupisana u dva para na suprotnim stranama molekula. Brojne studije hemijskih modifikacija su napravljene da bi se utvrdilo koji su ostaci aminokiselina uključeni u domen vezivanja. Drastično smanjenje vezivanja se dešava kada se četiri ostatka triptofana u svakoj podjedinici modifikuju pomoću N-bromosukcimida. Biotin štiti četiri triptofana od modifikacije. Dinitrofenilacija jednog ostatka lizina takođe sprečava vezivanje biotina.²⁹⁰ Ostaci triptofana i lizinski ostaci su stoga uključeni u vezivanje. Avidin-biotin tehnologija koristi snažno vezivanje biotina za avidin i ima široku primenu, uključujući afinitetnu hromatografiju, citohemiju, genske sonde i isporuku lekova.²⁹² Karboksilna grupa na biotinu, zajedno sa niskom reaktivnošću njegovog fuzionisanog prstenastog sistema, znači da može biti kovalentno povezana preko karboksilne grupe sa raznim jedinjenjima, npr. veziva ili sonde. Jednom biotinilovana, jedinjenja će snažno interagovati na avidin ili konjugovani avidin. Pošto avidin ima četiri vezivna mesta, on se takođe može koristiti za umrežavanje.

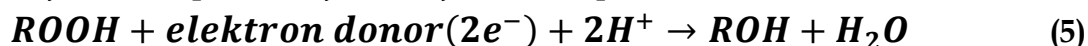
I.1.4.2.11.3 Protein koji vezuje tiamin (ThBP)

Protein koji vezuje tiamin je prečišćen iz belanaca afinitetnom hromatografijom korišćenjem tiamin pirofosfata spregnutog sa aminoetil-sefarozumom.²⁹³ Ima M_r od 38 kDa i nije glikoprotein, ima mnogo manji afinitet za vitamin ($K_{dis}=0,3$ μM) nego RfBP ili avidin. Sličan

protein je prečišćen iz žumanca jajeta koje se umrežava sa monospecifičnim antiserumom na protein koji vezuje tiamin jajeta, što sugerise da su oba proizvodi istog gena, iako se mogu razlikovati u posttranslacionoj modifikaciji.²⁹⁴

I.1.5 PEROKSIDAZE

Peroksidaze su široko rasprostranjene među svim živim organizmima u prirodi. Čak i kod striktno anaerobnih bakterija, hidroperoksidaze igraju esencijalnu ulogu, uglavnom u signalizaciji i održavanju tolerancije na kiseonik.^{295,296} Prvobitne modrozeleno alge (preteče cijanobakterija) koje su se pojavile pre oko 3,2 milijarde godina su najverovatnije bile među prvim organizmima koji su razradili mehanizme za detoksifikaciju delimično reduktivnih, reaktivnih kiseoničkih vrsta kao posledica njihovih evoluirajućih kiseoničkih fotosistema.²⁹⁷ Značajno povećanje nivoa atmosferskog kiseonika na početku proterozoika (između 2,45 i 2,32 milijarde godina) je nužno dovelo do dalje sofisticirane evolucije prokariotskih i eukariotskih antioksidativnih osobina, pri čemu su peroksidaze i katalaze najistaknutiji enzimski faktori.^{298,299} Linozije (*Linossier*) je prvi izneo naziv peroksidaza, nakon što je izolovao iz gnojnih ćelija.³⁰⁰ One su među prvim otkrivenim enzimima, sa referencama koje datiraju još iz XIX veka i opisuju peroksidativnu aktivnost u biološkim sistemima. Mogu se ekstrahovati iz većine biljnih ćelija i iz organa i tkiva životinja.³⁰¹ One predstavljaju oksidoreduktaze koje katalizuju proces oksidacije širokog spektra molekula, koristeći peroksid kao akceptor elektrona. Sledeća jednačina predstavlja reakciju katalize peroksidazama:³⁰²

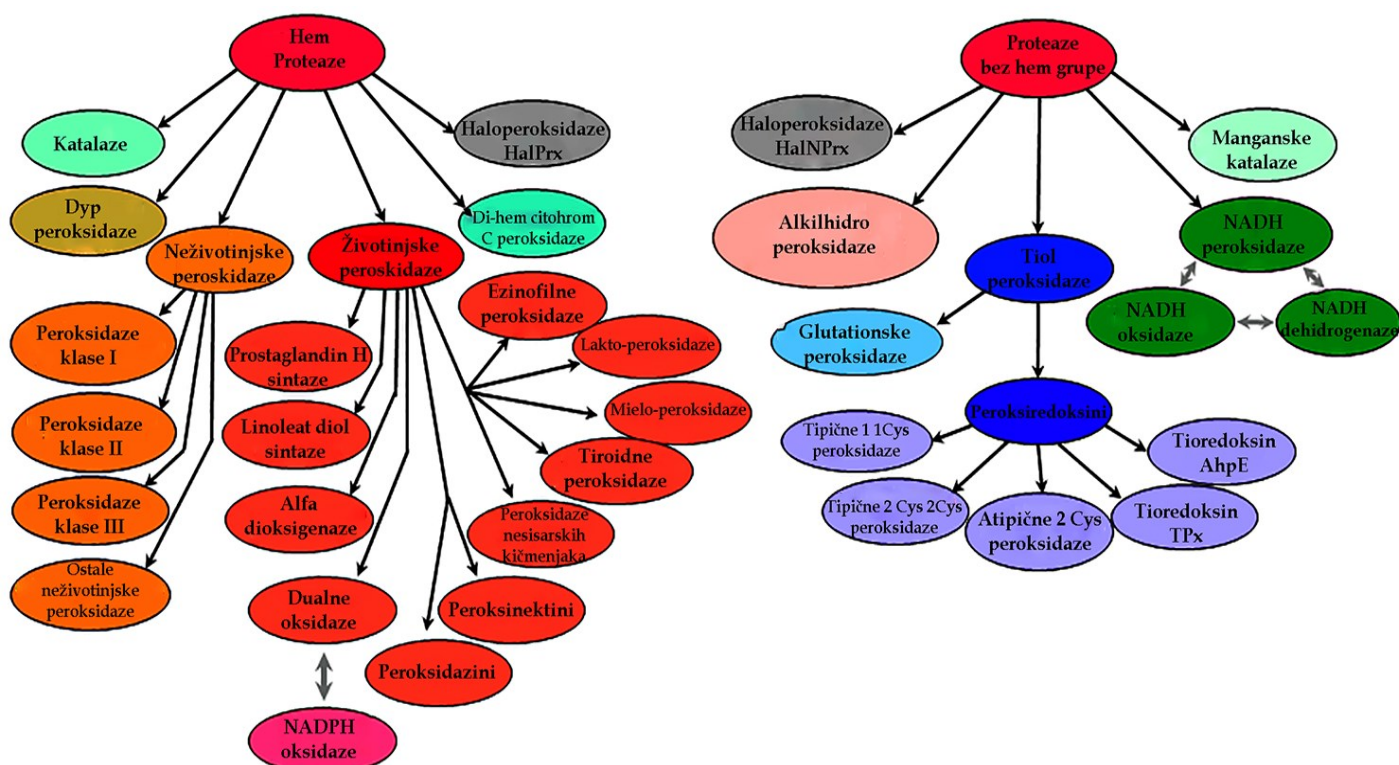


Peroksidaze su prisutne u skoro svim vaskularnim biljkama i pretpostavlja se da su uključene u širok spektar fizioloških fenomena uključujući umrežavanje polisaharida ćelijskog zida,^{303,304} zarastanje rana, odbrambene mehanizme od patogena, uklanjanje H_2O_2 iz citozola i hloroplasta,³⁰⁵ detoksifikaciju teških metala i reaktivnih vrsta kiseonika tokom procesa oksidacije i metaboličkih procesa ćelija,^{306,307} kao i reakcije biorazgradnje.³⁰⁸ Biljne peroksidaze su korišćene za različite komercijalne primene, zbog njihove široke specifičnosti supstrata i ekstenzivne biokatalitičke aktivnosti.³⁰⁹ Primenuju se u fluorescentnim senzorima,³¹⁰ kliničkoj dijagnostici i u prehrambenoj industriji.^{309,311} Takođe su uključene u kontroli štete od zagađenja vazduha³¹² i procese biobeljenja.³¹³ Štaviše, imaju potencijal za detoksifikaciju zemljišta, biotransformaciju organskih jedinjenja, uklanjanje fenola i aromatičnih amina iz zagađene vode i organskih rastvarača koji se mešaju sa vodom. Primećena je sposobnost rastvorljivih i imobilisanih peroksidaza za uklanjanje sintetskih boja iz vode kontaminirane bojom i iz industrijskih otpadnih voda.³⁰⁹

I.1.5.1 Klasifikacija peroksidaza

Osnovna podela peroksidaza je na proteine koje sadrže hem grupu i koji je ne sadrže. U većini slučajeva, hem je prostetička grupa, a njeno evolutivno dobro očuvano aminokiselinsko okruženje utiče na njenu reaktivnost. Prema filogenetskim stablima, bazu do sada poznatih peroksidaza (*Redoxi Base*, oktobar 2022.) čine 13 podgrupa koje se granaju u 60 klasa (slika 10).

Trenutno se u *Redoxi Base* bazi nalazi 15260 peroksidaza, od čega heme peroksidaze čine 84% od ukupnog broja.³¹⁴ Suprotno nekim nedavno objavljenim mišljenjima, dubinska filogenetska analiza jasno otkriva da skoro svi ovi geni koji kodiraju hem peroksidazu imaju veoma drevno prokariotsko poreklo koje verovatno datira još od porasta atmosferskog kiseonika.³¹⁵ Sve trenutno poznate peroksidaze koje sadrže hem grupu mogu se podeliti u dve glavne superfamilije i tri familije. Klasična podela na biljne i životinjske hem peroksidaze danas izgleda zastarela i neprikladna. Zbog toga je prikladnije da se grupišu prema posebnoj specifičnosti reakcije za svaku posmatranu superfamiliju.



Crne strelice povezuju klase, familije ili superfamilije proteina koje potiču od istog izvora.
Sive strelice povezuju dve različite klase proteina sa sličnom osnovom.

Slika 10. Podela peroksidaza po bazi *Redoxi Base*, oktobar 2022³¹⁴

I.1.5.1.1 Superfamilija peroksidaza – Katalaze

Ovo je trenutno najpoznatija i najintenzivnije proučavana superfamilija hem peroksidaza. Njegovi predstavnici među najstarijim poznatim peroksidazama, na primer peroksidaza rena, sistematski se proučavaju od 1930-ih godina. Prvu sistematsku klasifikaciju akumuliranih sekvenci i struktura izvršio je Velinder (*Welinder*) i podelio sve članove ove superfamilije u tri različite klase. Identifikovano je da klasa I sadrži uglavnom citohrom c peroksidazu kvasca, askorbinske peroksidaze i bakterijske katalaze-peroksidaze. U klasi II dominiraju gljivične lignin i mangan peroksidaze. Klasu III predstavljaju sekretne biljne peroksidaze u srodstvu sa peroksidazom iz rena. Cela superfamilija je tako prvo nazvana prema poreklu uključenih članova kao superfamilija biljnih, gljivičnih i bakterijskih hem peroksidaza. Ovu superfamiliju bi bilo prikladnije nazvati superfamilija peroksidaza-

katalaza, odnosno prema glavnim enzimskim aktivnostima koje vrše njeni članovi. Razumno je pretpostaviti da je bifunkcionalnost bila u korenu superfamilije peroksidaza-katalaza, jer se tvrdilo da se katalitički promiskuitet često javljao u evoluciji superfamilija proteina. Katalaza-peroksidaze su fiziološki aktivne prvenstveno kao katalaze i njihova peroksidazna funkcionalnost *in vivo* je još uvek predmet diskusije.³¹⁶ Trenutno 470 peroksidaza u *Redoxi Base* bazi odgovara kriterijumima za označavanje kao katalaza-peroksidaza.³¹⁴

I.1.5.1.2 Familija peroksidaza DyP - tipa

Prvobitno nazvane „peroksidaze koje uklanjaju boje“, ova porodica proteina je rasprostranjena među bakterijama i gljivicama.^{315,317} U *Redoxi Base* bazi je već registrovano 237 sekvenci porodice DyP peroksidaza.³¹⁴ U biotehnologiji su uglavnom DyP-članovi bazidiomikota pečuraka, postali popularni zbog svoje sposobnosti da razgrađuju različite sintetičke disperzivne boje, ali njihova fiziološka uloga i uglavnom njihovi fiziološki donori elektrona ostaju nejasni. Nakon njihovog prvog prečišćavanja, bez analize sekvence, bilo je očigledno da se one značajno razlikuju po svojoj specifičnosti supstrata od poznatih peroksidaza klase II koje su često prisutne kod sličnih gljiva i mogu da ometaju skrining uzoraka grupe.³¹⁸ Verovatno su u ovom slučaju hem peroksidaze evoluirale do svoje najveće svestranosti. Pored aktivnosti peroksidaze, sa npr. derivatima antrahinona koji služe kao donori elektrona, čini se da se enzimi tipa DyP ponašaju kao hidrolaze i oksigenaze.^{315,317}

I.1.6 PEROKSIDAZA IZ RENA (HRP-C)

Ren (*Armoracia rusticana*) je izdržljiva višegodišnja biljka koja se uzgaja u umerenim regionima sveta uglavnom zbog kulinarske vrednosti svog korena (slika 11).



a)



b)

Slika 11. Ren (*Armoracia rusticana*): (a) nadzemni deo (list i cvet); (b) koren

Takođe je bogat izvor hem peroksidaza, koje koriste vodonik peroksid za oksidaciju širokog spektra organskih i neorganskih jedinjenja. Proizvodnja peroksidaze iz korena rena se dešava u relativno velikom obimu zbog komercijalne upotrebe enzima, na primer kao komponente kliničkih dijagnostičkih kompleta i za imunotestove. Iako se termin peroksidaza rena koristi donekle uopšteno, koren biljke sadrži niz karakterističnih izoenzima peroksidaze od kojih je C izoenzim (HRP-C) najzastupljeniji.³¹⁹

Mnoge fiziološke uloge dodeljene su izoenzimima peroksidaze rena, uključujući metabolizam indol-3-sirćetne kiseline, lignifikaciju, umrežavanje polimera ćelijskog zida, formiranje suberina i otpornost na infekciju. Stoga je iznenađujuće da se tako malo zna o njihovim specifičnim funkcijama biljke.^{320,321}

Prvo zabeleženo zapažanje reakcije katalizovane peroksidazom rena pojavljuje se u belešci koju je objavio Luji Antoan Planš (*Louis Antoine Planche*), u kojoj se opisuje analiza „jalap” smole uvezene u Francusku za medicinsku upotrebu, verovatno sa Kariba.³¹⁹ Iako je termin „peroksidaza” ušao u upotrebu krajem devetnaestog veka, to je bio rad Roberta Šodata (*Robert Chodat*) i Alekseja Nikolajeviča Baha (*Alexei Nikolaevich Bach*) na Univerzitetu u Ženevi tokom prvih godina dvadesetog veka koji je pokrenuo dalja istraživanja peroksidaze iz korena rena i drugih biljnih izvora.³²² Iako su Bah (*Bach*) i Šodat (*Chodat*) dobili sirovi preparat peroksidaze iz rena, narednim studijama Ričarda Vilštatera (*Richard Willstätter*) i Uga Torelja (*Hugo Teorella*), čist enzim je konačno izolovan. Drugi napredak u periodu od približno 1920. do 1945. uključivao je demonstraciju hem grupe i ugljovodonika kao komponenti peroksidaze rena i prvo posmatranje katalitičkih intermedijera poznatih kao jedinjenja I i II, kao i prvu kinetičku analizu reakcije sa vodonik peroksidom. Ovo naglašava važan doprinos koji je istraživanje peroksidaze rena dalo našem razumevanju enzima peroksidaze uopšte.^{319,323}

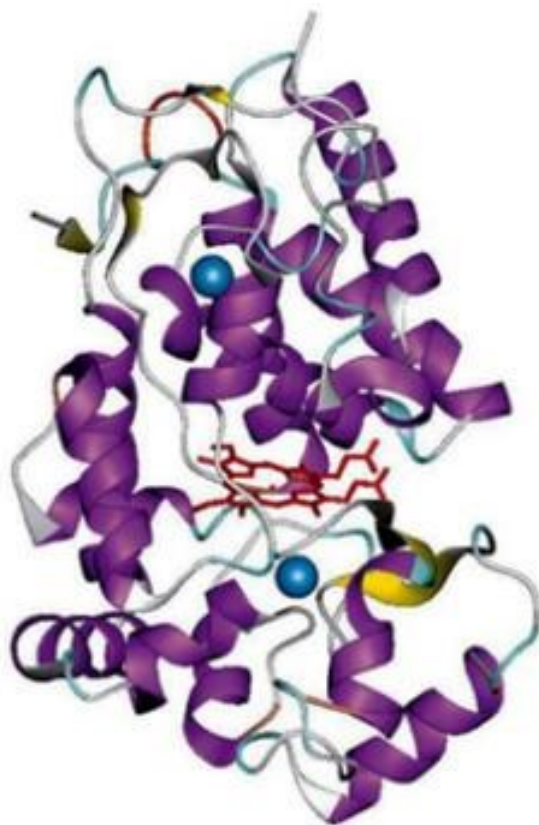
I.1.6.1 Struktura HRP-C

Struktura enzima je uglavnom α -helikalna, mada postoji i mali deo β -lista (slika 12). Postoje dva domena, distalni i proksimalni, između kojih se nalazi hem grupa. Ovi domeni su verovatno nastali kao rezultat umnožavanja gena, što je predlog podržan njihovim zajedničkim mestima za vezivanje kalcijuma i drugim strukturnim elementima.³²⁴

Strukture HRP-C i drugih biljnih peroksidaza klase III sadrže tri α -heliksa koji su dodatne strukture uz osnovne strukture peroksidaze.³²¹ Dve od njih (heliksi F' i F'') nalaze se u dugačkom umetku koji pokazuje velike varijacije u sekvenci i broju ostataka (slika 12).

Ukupni integritet strukture u ovom regionu održava se disulfidnom vezom od Cis177 do Cis209. Ono što je posebno interesantno u slučaju HRP-C je lokacija ostataka u heliksu F' koji su uključeni u pristup supstratu i vezivanje. Izoenzim C peroksidaze rena sadrži jedan polipeptid od 308 aminokiselininskih ostataka, čiju sekvencu je odredio Velinder (*Welinder*) 1976. godine.³²⁵ N-terminalni ostatak je blokiran piroglutamatom, a C-kraj je heterogen, sa nekim molekulima koji nemaju terminalni ostatak, Ser308. Postoje 4 disulfidna mosta između ostataka cisteina 11–91, 44–49, 97–301 i 177–209, i zaklonjeni most soli između Asp99 i Arg123. Devet potencijalnih mesta N-glikozilacije može se prepoznati u primarnoj sekvenci iz motiva Asn-X-Ser/Thr (gde „X” predstavlja aminokiselinski ostatak) i od njih je

osam zauzeto. Razgranati heptasaharid čini 75 do 80% glikana (tabela 5), ali je profil ugljovodonika HRP-C heterogen, a takođe su okarakterisani mnogi manji glikani.³²⁶

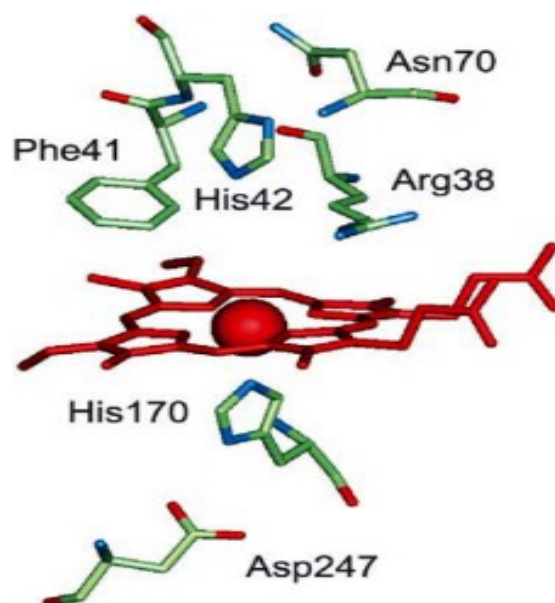


Slika 12. Trodimenzionalni prikaz rendgenske kristalne strukture izoenzima C peroksidaze rena (*Brookhaven*-ov pristupni kod 1H5A). Hem grupa (obojena crvenom bojom) se nalazi između distalnog i proksimalnog domena od kojih svaki sadrži po jedan atom kalcijuma (prikazano kao plave sfere). α-helikalni i β-list regioni enzima su prikazani ljubičastom i žutom bojom, respektivno. F' i F'' α-zavojnice se pojavljuju u donjem desnom kvadrantu molekula³¹⁹

Oni uvek sadrže dva terminalna GlcNAc i nekoliko ostataka manoze. Dalja komplikacija je varijacija u tipu glikana prisutnog na bilo kom mestu glikozilacije. Ukupan sadržaj ugljovodonika u HRP-C donekle zavisi od izvora enzima i tipične su vrednosti između 18 i 22%. HRP-C sadrži dva različita tipa metalnog centra, gvožđe(III) protoporfirin IX (koji se obično naziva „hem grupa“) i dva atoma kalcijuma (slika 12 i tabela 5).

Oba su neophodna za strukturni i funkcionalni integritet enzima. Hem grupa je vezana za enzim na His170 (proksimalni ostatak histidina) preko koordinatne veze između N atoma bočnog lanca histidina i atoma gvožđa hem grupe. Drugo aksijalno koordinaciono mesto (na takozvanoj distalnoj strani ravni hem grupe) nije zauzeto u stanju mirovanja enzima, ali je dostupno vodonik peroksidu tokom obrtanja enzima (slika 13).

Mali molekuli kao što su ugljen monoksid, cijanid, fluorid i azid vezuju se za atom gvožđa hem grupe na ovom distalnom mestu dajući komplekse peroksidaze sa šest koordinata. Neki se vezuju samo u svojim protonovanim oblicima, koji se stabilizuju kroz interakcije vodoničnim vezama sa bočnim lancima aminokiselina u distalnom hem džepu Arg38 (distalni arginin) i His42 (distalni histidin) (slika 13).

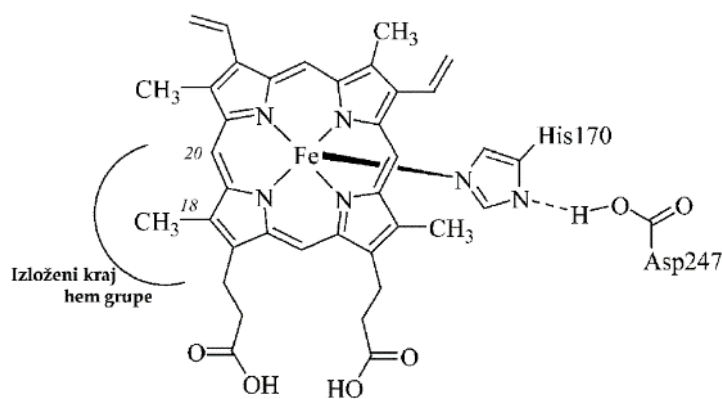


Slika 13. Ključni aminokiselinski ostaci u regionu koji se vezuje za hem grupu HRP-C. Hem grupa i atom hem gvožđa su prikazani crvenom bojom, a preostali ostaci u bojama atoma. His170, proksimalni histidinski ostatak, koordinisan je za atom gvožđa hem grupe, dok je odgovarajuće distalno koordinaciono mesto iznad ravni hem grupe prazno. Specifične funkcije za aminokiselinske ostatke prikazane ovde su date u tabeli 5³²⁷

Dva mesta vezivanja kalcijuma nalaze se na pozicijama distalno i proksimalno od ravni hem grupe i povezana su sa regionom za vezivanje hem grupe mrežom vodoničnih veza. Svako mesto kalcijuma ima sedam koordinata sa ligandima donora kiseonika obezbeđenim kombinacijom karboksilata bočnog lanca amino kiselina (Asp), hidroksilnih grupa (Ser, Thr), krajnjih karbonilnih grupa i strukturnog molekula vode (samo distalno mesto) (tabela 5). Gubitak kalcijuma dovodi do smanjenja aktivnosti enzima i termičke stabilnosti, kao i do suptilnih promena u okruženju hem grupe koje se mogu detektovati spektroskopski.^{328,329}

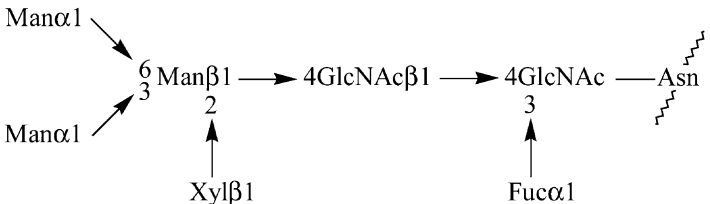
Tabela 5. Anatomija peroksidaze. Neke bitne strukturne karakteristike izoenzima C peroksidaze rena (HRP-C)³²⁷

Hem grupa



- His170 formira koordinatnu vezu sa atomom gvožđa hem grupe.
- Asp247 karboksilni bočni lanac pomaže u kontroli imidazolatnog karakter His170 prstena.
- His170Ala mutant podleže degradaciji hem grupe kada se doda H₂O₂ i jedinjenja I i II nisu otkrivena; $k_1 = 1,6 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Imidazoli mogu da se vežu za hem gvožđe u veštački stvorenoj šupljini, ali puna katalitička aktivnost se ne obnavlja jer His170Ala-imidazol kompleks ne održava stanje sa pet koordinata (His42 se takođe vezuje za Fe).
- Aromatični supstrati su oksidisani na izloženom kraju hem grupe, ali se ne vezuju za hem gvožđe.

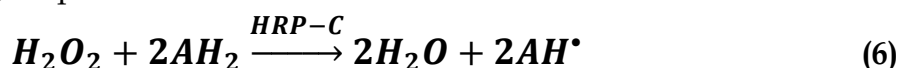
Tabela 5. Anatomija peroksidaze. Neke bitne strukturne karakteristike izoenzima C peroksidaze rena (HRP-C)³²⁷

Kalcijum			
	Distalni O-donori	Proksimalni O-donori	
	Asp43, Asp50, Ser52 (bočni lanac) Asp43, Val46, Gli48 (karbonilni) 1 strukturna voda		• Distalni i proksimalni Ca²⁺ joni su sedmokoordinatni. • Pri gubitku kalcijuma aktivnost enzima se smanjuje za 40% • Strukturna voda distalnog Ca mesta vezana je vodoničnom vezom za Glu64 koji je sam po sebi vodonično vezan za Asn70 i tako se povezuje sa distalnim hem džepom.
Ugljovodonik			
			• Mesta glikozilacije su u oblastima petlje strukture, na Asn13, Asn57, Asn158, Asn186, Asn198, Asn214, Asn255 i Asn268. • Ovde je prikazan glavni glikan; postoje i manji glikani oblika Man_mGlcNAc₂ (m = 4-7) i (Xyl)_xMan_m(Fuc)_fGlcNAc₂ (m = 2,4,5,6; f = 0 ili 1; x = 0 ili 1).
Aminokiselinski ostaci			
Arg38	Osnovne uloge u (i), formiranju i stabilizaciji jedinjenja I, (ii) vezivanju i stabilizaciji liganada i aromatičnih supstrata (npr. benzhidroksamska kiselina, ferulat itd.).	Arg38Leu mutant; $k_1 = 1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; Kd (BHA) 12,1±0,7 mM.	
Phe41	Sprečava pristup supstratu feril kiseoniku jedinjenja I.	Phe41Ala/Leu/Thr mutanti pokazuju poboljšane stope oksidacije tioanizola (hemija prenosa kiseonika).	
His42	Osnovne uloge pri (i), formiranju jedinjenja I (prihvata proton iz H ₂ O ₂), (ii) vezivanju i stabilizaciji liganada i aromatični supstrata.	His42Leu mutant; $k_1 = 1,4 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; Kd (BHA) 2,9±0,5 mM.	
Asn70	Održava baznost His42 bočnog lanca kroz Asn70-His42 par (vodonička veza od amidnog Asn70 kiseonika do His42 - NH grupe imidazola).	Asn70Val mutant; $k_1 = 6,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.	
Pro139	Deo strukturnog motiva, „-Pro-X-Pro-“ (Pro139-Ala140-Pro141 u HRP-C), koji je sačuvan u biljnim peroksidazama.	Kristalografski dokazi ukazuju na ulogu Pro139 u oksidaciji i vezivanju supstrata. Imati na umu da su ostaci Ala140, Phe142 i Phe143 takođe deo mesta vezivanja ferulata prikazanog na slici 14.	

Konstanta brzine formiranja jedinjenja I (k_1) za enzim divljeg tipa je $1,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Prividna konstanta disocijacije (K_d) za formiranje kompleksa između HRP-C u stanja mirovanja i benzhidroksamske kiseline je $2,1 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{M}$ (pH vrednost 7,0, 25 °C).

I.1.6.2 Mehanizam delovanja

Većina reakcija katalizovanih sa HRP-C i drugim izoenzimima peroksidaze rena može se izraziti sledećom jednačinom, u kojoj AH₂ i AH• predstavljaju redukcionni supstrat i njegov radikalni proizvod, respektivno:³¹⁹



Tipični redukcionni supstrati uključuju aromatične fenole, fenolne kiseline, indole, amine i sulfonate. Pretvaranje vodonik peroksida u vodu nije primarna funkcija biljnih peroksidaza klase III kao što je HRP-C.³²⁴ Formiranje radikalnih produkata u reakcijama katalizovanim sa HRP-C daje indicaciju nekih mogućih *in vivo* funkcija biljke. One mogu uključivati reakcije unakrsnog povezivanja kao što je formiranje diferulnatnih veza iz ferulatih grupa polisaharida ili pektina vezanih za polimer, formiranje ditirozinskih veza, umrežavanje fenolnih monomera u formiranju suberina i oksidativno spajanje fenolnih jedinjenja kao deo biosinteze lignina. Peroksidaze koje katalizuju reakcije unakrsnog povezivanja mogu biti izražene kao odgovor na spoljne faktore kao što je ranjavanje biljnog tkiva. Gubitak vode i invazija patogena se stoga može ograničiti formiranjem zaštitne polimerne barijere kao što je suberin. Iako *in vivo* uloge izoenzima HRP-C još nisu utvrđene, poznato je da se aktivnost peroksidaze indukuje kada su listovi rena ranjeni.³³⁰

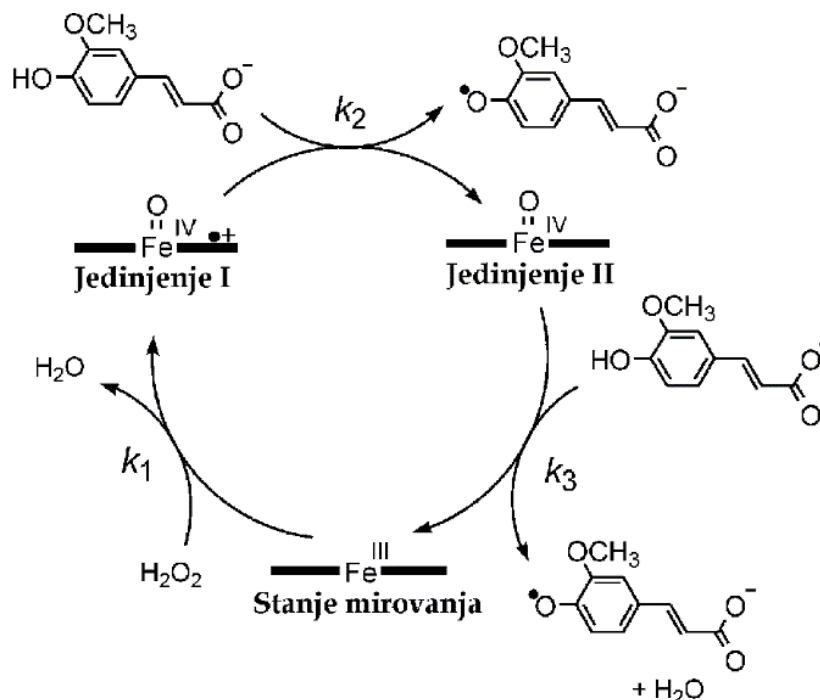
I.1.6.2.1 Katalitički mehanizam delovanja HRP-C

Mehanizam katalize peroksidaze rena, a posebno izoenzima C, je opširno istražen.^{327,331,332} Neke važne karakteristike katalitičkog ciklusa su ilustrovane na slici 14 sa ferulnom kiselinom kao redukcionim supstratom. Generisanje radikalnih vrsta u dva koraka redukcije elektrona može rezultirati složenim profilom reakcionih proizvoda, uključujući dimere, trimere i više oligomere koji sami mogu delovati kao redukcionni supstrati u narednim ponavljanjima.

Prvi korak u katalitičkom ciklusu je reakcija između vodonik-peroksida i Fe(III) u stanja mirovanja enzima da bi se dobilo jedinjenje I, intermedijer visokog oksidacionog stanja koji sadrži Fe(IV) oksoferil centar i katjonski radikal na bazi porfirina. Prolazni intermedijer (jedinjenje 0) formiran pre jedinjenja I je otkriven u reakcijama između HRP-C i vodonik-peroksida na niskim temperaturama i opisan je kao Fe(III)-hidroksi kompleks.³³³ U formalnom smislu, jedinjenje I je dva oksidirajuća ekvivalenta iznad stanja mirovanja. Prvi korak redukcije sa jednim elektronom zahteva učešće redukcionog supstrata i dovodi do stvaranja jedinjenja II, Fe(IV) oksoferil vrste koja je jedan oksidacioni ekvivalent iznad stanja mirovanja. I jedinjenje I i jedinjenje II su moćni oksidansi, sa redoks potencijalima procenjenim na +1 V.

Drugi korak redukcije sa jednim elektronom vraća jedinjenje II u stanje mirovanja enzima. Reakcija viška vodonik peroksida sa enzimom u stanju mirovanja daje jedinjenje III, koje se takođe može pripremiti na nekoliko drugih načina.³³¹ Ovaj intermedijer se najbolje opisuje kao rezonantni hibrid gvožđa(III)-superoksida i gvožđa(II)-dikiseoničkog kompleksa. Nedavno objavljena kristalna struktura visoke rezolucije od 95% čistog jedinjenja III pokazuje dikiseoničnu vezu sa hem gvožđem u savijenoj konformaciji.³²⁰ Modeli za ireverzibilnu inaktivaciju HRP-C peroksidima razvijeni su u studijama sa m-hlorperoksibenzoevom kiselinom.³³⁴ Detaljni mehanizmi koji pokazuju ulogu ostataka distalnog hem džepa Arg38 i His42 (sačuvanih kod svih članova superfamilije biljnih peroksidaza) u formiranju jedinjenja I su opisani u literaturi, ali su van okvira ovog rada. Kristalne strukture visoke rezolucije oksidisanih intermedijera HRP-C potvrđuju važnost Arg38 i His42 za peroksidnu katalizu.³²⁰ Npr. feril kiseonik jedinjenja I je vodonično vezan za Arg38 NηH₂ i molekul vode koji je takođe vezan vodoničnim vezama za Arg38 i His42.

Mehanizam za redukciju jedinjenja I i II pomoću ferulata je predložen na osnovu novih informacija iz kristalne strukture ternarnog kompleksa formiranog između ferulne kiseline i cijanidnog liganda HRP-C.³³⁵

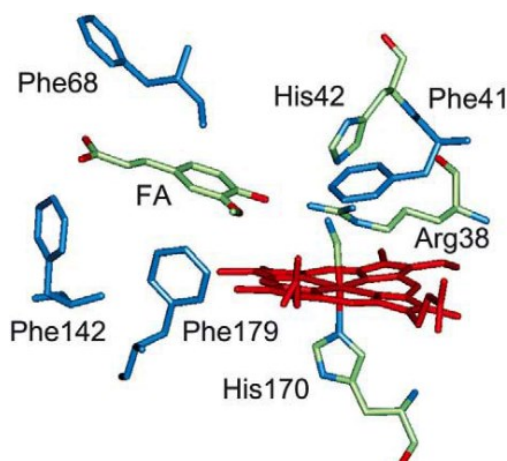


Slika 14. Katalitički ciklus peroksidaze rena (HRP-C) sa ferulnom kiselinom kao redukcionim supstratom. Konstante brzine k_1 , k_2 i k_3 predstavljaju brzinu formiranja jedinjenja I, brzinu redukcije jedinjenja I i brzinu redukcije jedinjenja II, respektivno³²⁷

I.1.6.2.2 Vezivna mesta aromatičnog supstrata

Oksidacija supstrata pomoću HRP-C se dešava na „izloženom“ kraju hem grupe, regionu koji sadrži protone hem metil C18 i hem mezo C20 (tabela 5). Ovo mesto interakcije je identifikovano u eksperimentima inaktivacije enzima sa alkil- i fenilhidrazinom, natrijum azidom i drugim reaktivnim agensima.³³⁶ Vrste slobodnih radikala koje nastaju kada se inkubiraju sa HRP-C i vodonik-peroksidom daju adukte kao što su C18-hidroksimetil i C20 mezofenil hem derivati. Ono što je posebno interesantno je kontrast između ponašanja HRP-C i drugih hemskih proteina kao što su globini i citohromi P450, gde dolazi do modifikacije atoma gvožđa hem grupe i pirolnih azota. Čini se da je pristup supstratu oksoferil centru HRP-C otežan lokalnim proteinskim okruženjem, primerom „zatvorene“ arhitekture hem grupe. Ovo je jedan od razloga zašto su peroksidaze mnogo manje efikasne kao katalizatori reakcija prenosa kiseonika od citohroma P450. Pokušaji da se poboljša ovaj aspekt hemije HRP-C učinjeni su mutagenezom usmerenom položajem. U ovim eksperimentima, pristup supstratu oksoferil centru jedinjenja I je povećan zamenom distalnih ostataka Phe41 i His42 sa manjim ostacima aminokiselina.^{337,338} Stabilni, reverzibilni kompleksi 1:1 sa različitim aromatičnim molekulima se formiraju i u stanju mirovanja HRP-C i nekim njegovim ligandom vezanim derivatima (npr. HRP-C cijanididni ligand) u odsustvu vodonik-peroksida. Spektroskopske i kristalografske studije su otkrile detaljnu sliku lokacije na kojoj se nalaze ovi aromatični supstrati³²⁷ Npr. kada se ferulna kiselina veže za HRP-C cijanidni

ligand, njen aromatični prsten se nalazi na distalnom mestu blizu izloženog kraja hem grupe i njen bočni lanac fenolne kiseline je orijentisan ka ulazu mesta vezivanja.³³⁵ Postoje interakcije vodonične veze između Arg38 NH_2 i fenolnih i metoksil atoma kiseonika ferulne kiseline i između fenolnog kiseonika i molekula vode na aktivnom mestu. Dalji od njih je takođe vodonikom vezan za karbonilnu kičmu Pro139 ostatka (invarijantni ostatak u superfamiliji biljne peroksidaze) i atom azota cijanidnog liganda. Postoje hidrofobne interakcije sa bočnim lancima aminokiseline (Phe68, Gli69, Pro139, Ala140, Phe142 i Phe179) kao i hem metil C18H_3 i hem mezo proton C20H (slika 15).



Slika 15. Mesto vezivanja ferulne kiseline peroksidaze rena (HRP-C). Ova reprezentacija je uzeta iz rendgenske kristalne strukture ternarnog kompleksa ferulne kiseline (FA) i cijanidnog liganda HRP-C (*Brookhaven*-ov pristupni kod 7ATJ). Hem grupa je prikazana u crvenoj, dok su ferulna kiselina, cijanidni ligand (vezan za hem gvožđe na upražnjenom distalnom koordinacionom mestu) i katalitički ostaci Arg38, His42 i His170 u bojama atoma. Nekoliko bočnih lanaca fenilalanina koji doprinose mestu vezivanja prikazano je plavom bojom. Imati na umu da bočni lanac ferulne kiseline nalazi u pravcu ulaza mesta vezivanja³²⁷

Struktura i dinamika kompleksa benzhidroksamske kiseline HRP-C takođe su detaljno istražene sa mutantima dobijenim mutagenезom usmerenom položajem i korišćenim za istraživanje doprinosa ostataka mesta vezivanja afinitetu supstrata.³²⁷

I.1.6.2.3 Inhibicija aktivnosti HRP-C

Iako su surfaktanti pokazali značajnu potencijalnu sposobnost za inhibiciju aktivnosti HRP-C, detaljan mehanizam ostaje nejasan. Dobro je poznato da konformacija enzima igra ključnu ulogu u regulisanju aktivnosti enzima, a konformacija enzima se može promeniti u prisustvo surfaktanta.^{301,339,340} Interakcije između surfaktanata i enzima uključuju specifične hidrofobne i elektrostatičke interakcije između monomera jonskog surfaktanta i enzima, kooperativnu interakciju molekula surfaktanta sa nekim amino kiselinским ostacima enzima gde se formiraju grozdovi surfaktanta, kao i hidrofobne interakcije između hidrofobnih lanaca surfaktanata i kratkih fleksibilnih polipeptidnih segmenata enzima.^{341,342}

Katjonski i anjonski surfaktanti u razblaženim koncentracijama (ispod cmc (kritična micelarna koncentracija)) mogu efikasno inhibirati HRP-C, što sugeriše mehanizam inhibicije kojim uglavnom dominira elektrostatička interakcija surfaktanta sa HRP-C.³⁴³ Cviterjonski surfaktant inhibira HRP-C aktivnost samo kada je prisutan u koncentracijama iznad njegove cmc, odražavajući sinergetsku interakciju između surfaktanta i HRP-C.³⁴³ Promena aktivnosti HRP-C izazvana surfaktantom nije direktno povezana sa promenom sekundarne konformacije izazvane surfaktantima. Tercijarna struktura oko aktivnog mesta hem grupe igra ključnu ulogu u aktivaciji ili inhibiciji aktivnosti HRP-C. Elektrostatička interakcija između jonskih surfaktanata i HRP-C pri koncentracijama ispod cmc istovremeno utiče na tercijarne strukture u blizini Trp117, kao i blizu hem aktivnog mesta HRP-C i smanjuje aktivnost HRP-C. Za sistem HRP-C/cviterjonski surfaktant, slaba interakcija cviterjonskog monomera sa HRP-C samo malo menja tercijarnu strukturu u blizini Trp117, pri čemu je struktura oko aktivnog mesta hem grupe ostala neporemećena, a aktivnost HRP-C ostaje na visokom nivou, dok je interakcija cviterjonskog monomera sa HRP-C u koncentracijama iznad cmc jaka, što dovodi do promena ternarne strukture u blizini Trp117 i oko aktivnog mesta hem grupe, kao i do inhibicije aktivnosti HRP-C.³⁴³

I.1.6.2.4 Primena HRP-C

Peroksidaze iz rena (pretežno HRP-C) se koriste kao reagens za organsku sintezu i biotransformaciju, kao i u testovima spregnutih enzima, hemiluminiscentnim testovima, imunoesejima i tretmanu otpadnih voda.^{327,344}

Poboljšanja poželjnih kvaliteta enzima, kao što je relativno dobra stabilnost u vodenim i nevodenim sistemima rastvarača, aktivno se traže kao rezultat hemijske modifikacije, usmerene mutageneze i studija dirigovane evolucije.³⁴⁵ Neke primene HRP-C u organskoj sintezi malih razmera uključuju N- i O-dealkilaciju, oksidativno spajanje, selektivnu hidroksilaciju i reakcije prenosa kiseonika. Mutageneza HRP-C usmerena položajem na mestu Phe41 i His42 je korišćena za poboljšanje enantioselektivnosti oksidacija arilmetilsulfida.^{337,338} Međutim, van de Veld (*van de Velde*) i saradnici generalno navode da će povećanje enantioselektivnih oksidacija katalizovanih peroksidazom na industrijski nivo zahtevati značajno smanjenje cene enzima po jedinici proizvoda.³⁴⁶ Rešenja za ovaj problem mogu uključiti bolje upravljanje procesom sa vodonik-peroksida kako bi se izbegla inaktivacija enzima i korišćenje konstruisanih enzima sa poboljšanom stabilnošću i katalitičkom efikasnošću, kao i korišćenje imobilisanih enzima.

I.2. BOJE

Boje su česte u našem životu, ali ponekad zanemarimo društveno-istorijski fenomen koji je boju učinio suštinskim elementom izražavanja i komunikacije za ljudska bića. Boja je uticala na percepciju ljudi i igrala je ključnu ulogu u prihvatanju društvenog i prirodnog okruženja.³⁴⁷

Boja se od praistorije koristila kao simbolička umetnost društva, kao vid vizuelne komunikacije i kao mehanizam izražavanja, povezan sa kulturnom evolucijom čovečanstva, jer je upotreba boje u različitim praistorijskim sredinama bila povezana sa umetničkim i

kognitivnim razvojem pojedinca.^{348–351} Neki stručnjaci veruju da je boja povezana sa simboličkim sistemom koji se širi i deli mnoga društva u različitim periodima.³⁵²

Pigmenti su nastali iz mešavine zemlje i drugih materijala sa vodom, pljuvačkom ili životinjskom mašću koja se koristi za bojenje. Pravljenje boja mešanjem pigmenata ili boja bila je učestala aktivnost u različitim civilizacijama, dok boje nisi krenule da se dobijaju od minerala, povrća ili insekata.³⁵³ Henri Perkin (*Henry Perkin*) je 1854. razvio i patentirao prvu sintetičku boju pod nazivom *Mauveine*, dobijenu od katrana uglja.^{354,355} Perkin je rešio problem proizvodnje i pokrenuo proizvodnju novih sintetskih boja različitim postupcima.³⁵⁶

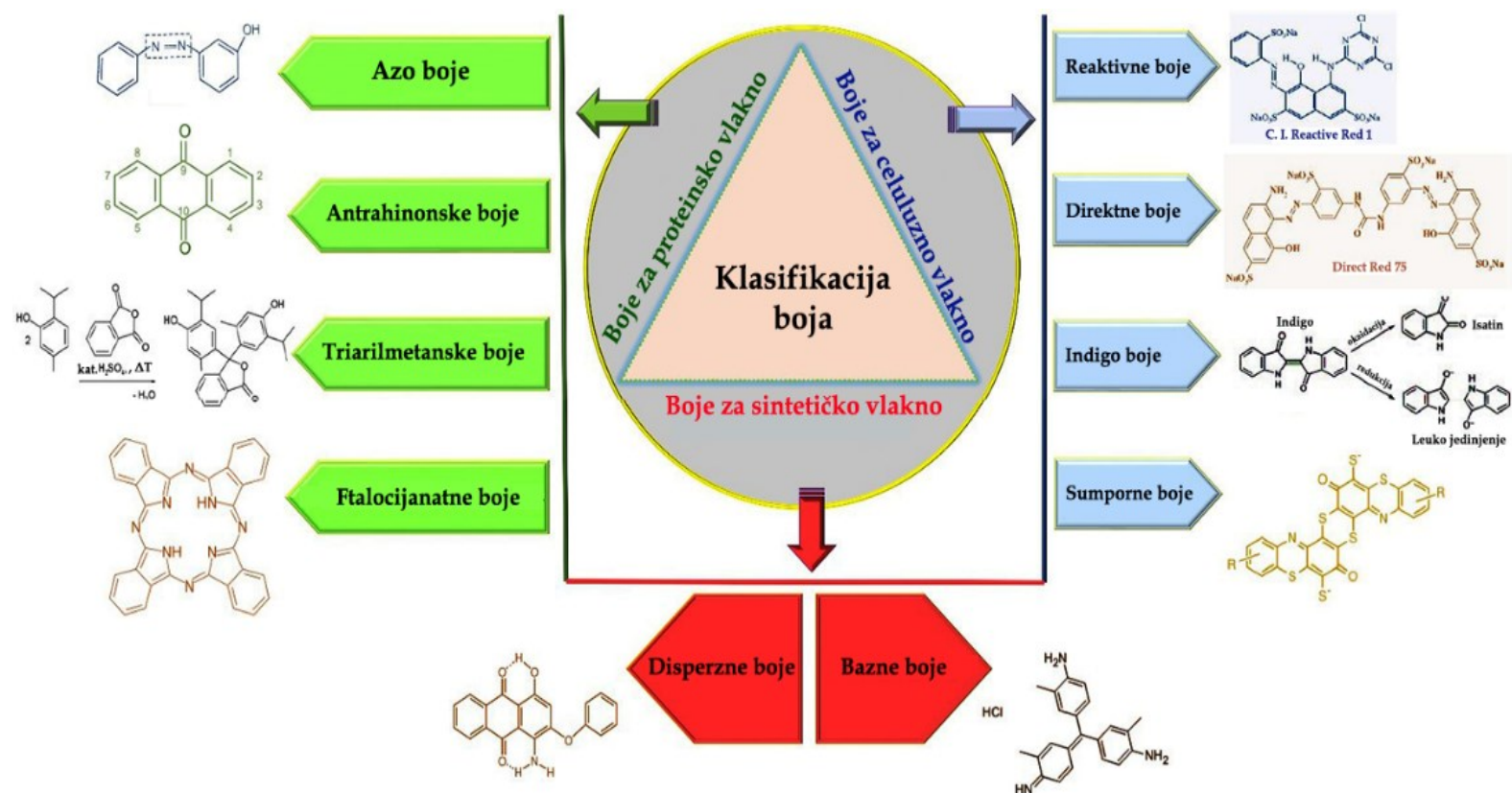
Upotreba sastojaka destilovanih od katrana uglja omogućila je razvoj novih boja, a do 1869. godine neke prirodne boje kao što je *Alizarin* su zamenjene sintetskim bojama po nižoj ceni.³⁵⁴ Od tada se proizvodnja boja diverzifikovala, sa izveštajima o više od 100,000 dobijenih sintetskih boja.³⁵⁷

I.2.1 Klasifikacija boja

Boje su prirodne ili veštačke supstance koje daju boju različitim vlaknima koja se koriste u tekstilnoj, farmaceutskoj, prehrambenoj, kozmetičkoj, plastičnoj, fotografskoj, papirnoj i drugim industrijama.³⁵⁸ Mogu biti pigmenti ili boje. Pigmenti su praktično nerastvorni, a čestice koje ih čine su 1-2 μm . Boje se lako rastvaraju u vodi i imaju veličinu čestica u rasponu od 0,025–1,0 μm .^{359,360} Industrijske prednosti za upotrebu veštačkih boja zasnovane su na:

- da su hemijski stabilne tokom vremena,
- da su inertne na fizičku, hemijsku i biološku degradaciju,
- da mogu da daju boju vlaknima koje treba da se boji kroz procese koji se mogu reprodukovati, održavajući intenzitet boje i
- niske cene.^{357,361}

Boje apsorbuju svetlost u vidljivom spektru (400–700 nm), imaju proširenu konjugaciju i jedan ili više hromofora.³⁶² Hromofori sadrže heteroatome kao što su N, O i S i uključuju veze kao što su $-\text{N}=\text{N}-$ (azo), $=\text{C}=\text{O}$ (karbonilna), NO ili N-OH (nitrozo), $-\text{NO}_2$ ili NO-OH (nitro) i $\text{C}=\text{S}$ (sulfo).⁸² Hromoforne grupe su nezasićene i sastoje se od atoma ili grupa atoma, u kojima rezonantan raspored uzastopnih jednostrukih i dvostrukih veza omogućava apsorpciju svetlosnih zraka. Sintetičke boje predstavljaju značajnu strukturnu raznolikost i stoga imaju veoma različite hemijske i fizičke osobine.⁸² Tekstilna industrija proizvodi vlakna koja formiraju predivo, koje se pretvara u tkaninu.³⁶³ Na tekstilnoj tkanini koriste boje na različite načine, npr. bojenje je proces ravnomernog premazivanja tekstilnih vlakana bojama. Štampanje je nanošenje boja na određeno područje tkanine. Izbeljivanje predstavlja uklanjanje boje (dekolorizacija) sa tekstilnih vlakana, a završna obrada obuhvata umrežavanje, omekšavanje i hidrolizu.³⁶⁴ Boje su klasifikovane u zavisnosti od njihovog porekla u dve glavne kategorije. Prirodne boje, koje su poznate od davnina, dobijaju se uglavnom iz biljaka; a sintetičke boje se veštački sintetišu iz hemijskih jedinjenja. Sintetičke boje su podeljene u tri grupe na osnovu prirode proizvedenog vlakna. To su boje za celulozna vlakna, boje za proteinska vlakna i boje za sintetička vlakna (slika 16).^{365,366}



Slika 16. Klasifikacija boja

Tabela 6. Klasifikacija i karakterizacija boja u zavisnosti od strukture hromofore

Hemijska klasa boje	Struktura hromoforne grupe	Primer boje	Karakteristike
Azo ³⁶⁷		<i>Methyl Orange</i> <i>Congo Red</i> <i>Orange G</i> <i>Amaranth</i>	Često se koriste azo boje (60%). Ove boje imaju funkcionalnu grupu (-N=N-) koja povezuje dva alkil ili aril radikala, simetrične i/ili a-simetrične, identične ili ne-azotne.
Antrahinon ³⁶⁸		<i>Reactive Blue 4</i> <i>Alizarin Red S</i> <i>Reactive Bright Blue X-BR</i> <i>Remazol Brilliant Blue R</i>	Antrahinonske boje su druge najčešće korišćene boje zbog svojih niska cena, pristupačnosti i performansi u procesu bojenja. I-maju antrahinonske hromoforne grupe koje sadrže dve karbonilne grupe sa obe strane benzenovog prstena.

Tabela 6. Klasifikacija i karakterizacija boja u zavisnosti od strukture hromofore

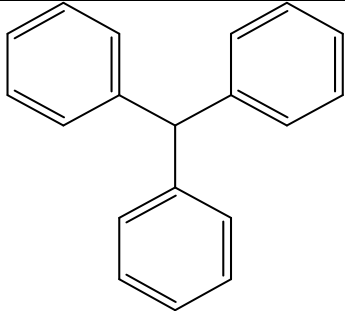
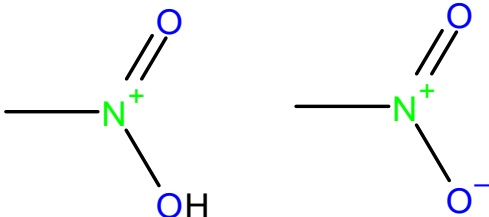
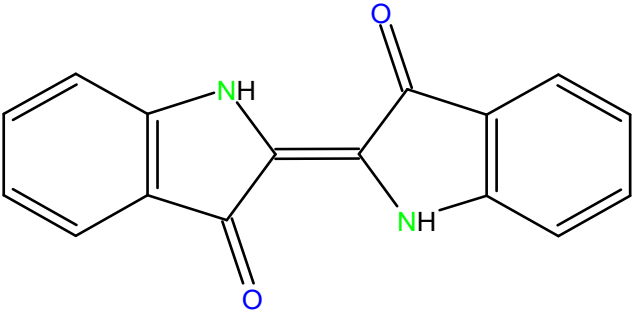
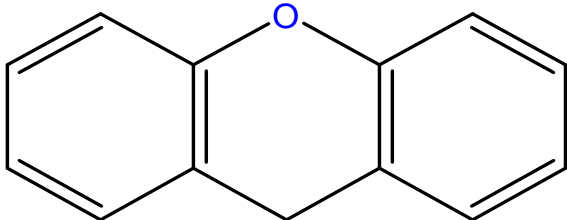
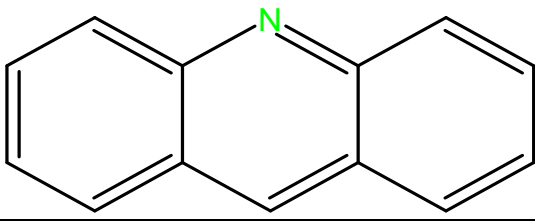
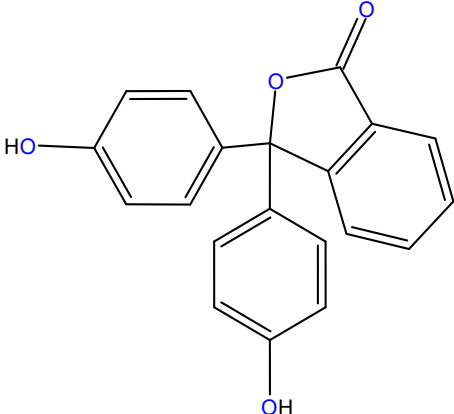
Hemijska klasa boje	Struktura hromoforne grupe	Primer boje	Karakteristike
Trifenilmetan ³⁶⁹		<i>Malachite Green</i> <i>Crystal Violet</i> <i>Bromophenol Blue</i> <i>Light Green SF</i>	Ovi molekuli imaju centralni sp ³ hibridizovani atom ugljenika, vezan za tri aril grupe i pripadaju najčešće korišćenim bojama u tekstilnoj industriji.
Nitro i nitrozo ³⁷⁰		<i>Naphtol Yellow S</i> <i>Disperse Yellow 26</i> <i>Disperse Yellow 14</i>	U nitro bojama, nitro grupa se vezuje za elektron donorske grupe preko aromatičnog sistema. Nitro boje uvek sadrže hidroksilnu donorsku grupu.
Indigo ³⁷¹		<i>Indigo Carmine</i> <i>Ciba Blue 2B</i>	Sintetička indigo boja je najšire korišćena boja u tekstilnoj industriji u svetu. Veoma je rezistentna na svetlost i visoku temperaturu.
Ksanten ³⁷²		<i>Rhodamine 6G</i> <i>Rhodamine 123</i> <i>Fluorescein</i>	Ksantani su boje koje se koriste u proizvodnoj industriji hrane, kozmetike, boja i papira, zbog njihove superiorne osobine bojenja. Slabo su biorazgradive, dok su neke i veoma toksične.
Akridin ³⁷³		<i>Acridine Orange</i> <i>Basic Yellow 9</i>	Akridinske boje su otporne na toplotu, iako imaju nisku svetlosnu postojanost. Trenutno nisu komercijalno važne.
Ftalein ³⁷⁴		<i>o-cresolphthalein</i> <i>Thymolphthalein</i> <i>Dixylenolphthalein</i> <i>Phenolphthalein</i>	Ftaleinske boje se koriste za titiranje slabih kiselina. Ftaleinske boje su nerastvorljive u vodi, ali rastvorljive u alkoholu. Često se koriste u građevinskoj, elektronskoj industriji i industriji premaza.

Tabela 6 prikazuje glavne hromofore koji utiču na klasifikaciju boja. Pored hromofora, većina boja sadrži auksohromne grupe, koje nisu odgovorne za boju, već za intenzitet (ton) i afinitet za vlakno. Neki od njih su $-NH_2$ (amino), $-COOH$ (karboksilna), $-SO_3$ (sulfonatna) i $-OH$ (hidroksi).^{82,375,376}

I.2.1.1.1 Direktne boje

Direktne boje su veoma pristupačne, ali imaju tendenciju da ostanu u vodenom obliku, a ne da se vezuju za celulozna vlakna (mogu se koristiti i sa određenim sintetičkim vlaknima). Pri tome se kombinuju sa neorganskim elektrolitima i anjonskim solima u obliku natrijum sulfata (Na_2SO_4) ili natrijum hlorida ($NaCl$) da bi se poboljšao njihov kapacitet vezivanja za tkaninu (slika 16). Stoga se preporučuje da se peru u hladnom ciklusu pranja i sa tkaninama iste boje.³⁷⁷

I.2.1.1.2 Indigo boje

Indigo ili tamnoplava boja pripada klasifikaciji vat boja, koje prvobitno nisu rastvorljive u vodi, ali su postale rastvorljive nakon alkalne redukcije (slika 16). Proces bojenja tekstila odvija se u vodi rastvorljivom ili leuko obliku indiga, zatim ovaj oblik oksidira pod izlaganjem vazduhu i vraća se u svoj prvobitni nerastvorljivi ili keto oblik kako bi se osiguralo savršeno vezivanje boje za tkaninu. Indigo boje se najviše koriste za farbanje plavog teksasa, što objašnjava njihovu proizvodnju u ogromnim količinama širom sveta.^{357,378}

I.2.1.2 Boje za celulozna vlakna

Celulozna vlakna potiču od biljaka kao što su lan, pamuk, ramie, viskoza, liocel i konoplja (slika 16). Ove vrste tkanina daju savršene rezultate bojenjem reaktivnim bojama, direktnim bojama, indigo bojama i sumpornim bojama.³⁷⁹

I.2.1.2.1 Reaktivne boje

Reaktivne boje čine glavnu klasu boja za celulozna vlakna, a dobro boje i neka proteinska vlakna (slika 16). Poznate su po svojoj visokoj pigmentaciji, trajnom efektu, lakoći manipulacije u širokom temperaturnom opsegu i svestranosti zbog različitih reaktivnih grupa koje mogu da formiraju kovalentne veze sa više vlakana.^{380,381}

I.2.1.2.2 Sumporne boje

Sumporne boje predstavljaju malu, ali važnu klasu zbog svojih odličnih svojstava za bojenje, lakoće primene i niske cene (slika 16). Imaju složenu strukturu sa disulfidnim (S-S) mostom. Oni pripadaju klasifikaciji vat boja, iako se redukuju iz keto u leuko oblik korišćenjem natrijum sulfida. Leuko sumpor postaje rastvorljiv u vodi da bi se postigla svrha bojenja.^{382,383}

I.2.1.3 Boje za proteinska vlakna

Proteinska vlakna kao što su svila, kašmir, angora, moher i vuna potiču iz životinjskih izvora (slika 16). Podložna su visokim vrednostima pH; stoga se boje korišćenjem kisele boje rastvorljive u vodi da bi se dobio molekul nerastvorljive boje na vlaknu. Kisele boje obuhvataju azo boje kao najvažniju grupu, a slede antrahinonske, triarilmetanske i ftalocijanatne boje.^{384,385}

I.2.1.3.1 Azo boje

Azo boje čine najveću kategoriju (60–70%) ukupne industrije sintetičkih boja zbog svoje svestranosti, ekonomičnosti, jednostavnosti upotrebe, visoke stabilnosti i visokog intenziteta boje.^{386,387} Ove boje imaju istaknutu strukturu hromofora ($-N=N-$), koja obezbeđuje rastvorljivost boja u vodi i njeno vezivanje za vlakno.^{388,389} Azo boje su klasifikovane u tri grupe (mono, di i poli) u zavisnosti od broja azo grupa u njihovoj strukturi (slika 16). Ove grupe su vezane za aromatično ili heterociklično jedinjenje na jednoj strani i nezasićenu heterocikličnu, karboksilnu, sulfo ili alifatičnu grupu na drugoj strani.^{390,391}

I.2.1.3.2 Triarilmetanske boje

Trifenilmetanske boje se široko primenjuju u tekstilnoj industriji za bojenje proteinskih vlakana vune i svile kada su formirane od dve grupe sulfonske kiseline (SO_3H). Mogu se koristiti kao indikatori ako u svojoj hemijskoj strukturi sadrže samo jednu auksohromnu grupu sulfonske kiseline (SO_3H) (slika 16). Ove boje su poznate po svojoj rastvorljivosti u vodi, kao i širokom i intenzivnom rasponu boja.^{379,392}

I.2.1.3.3 Ftalocijanatne boje

Ftalocijanatna familija boja se sintetiše reakcijom između jedinjenja 1,4 dicijanobenzena sa atomom metala (Ni, Co, Cu itd.) da bi se dobile zelene i plave nijanse (slika 16). Imaju svojstva kao što su dobra postojanost boje na svetlosti, otpornost na oksidaciju, rastvorljivost u vodi, kao i hemijska stabilnost.^{393,394}

I.2.1.4 Boje za sintetička vlakna

Sintetička vlakna se sastoje od spandeksa, poliestera, akrila, poliamida, poliacetata, polipropilena, ingeo polimlečne kiseline i acetatnih tkanina (slika 16). Koriste se u 60% globalne proizvodnje vlakana zbog širokog spektra primene. Ova vlakna su obojena direktnim bojama, baznim bojama i disperznim bojama.^{395,396}

I.2.1.4.1 Disperzne boje

Disperzne boje su najmanji molekuli među svim bojama. Ove boje su nerastvorljive u vodi, ali su stabilne pod visokim temperaturama (slika 16). Rastvor za bojenje na visokoj temperaturi je mešavina između praha boje i disperznog agensa.^{397,398}

I.2.1.4.2 Bazne boje

Bazne boje se takođe nazivaju katjonskim bojama jer se transformišu u šarene katjonske soli koje su odgovorne za bojenje tekstila od anjonskih vlakana.³⁷⁵ Ove boje su osetljive na svetlost; stoga se striktno koriste za bojenje papirnog najlona i modifikovanih poliestera. Njihove glavne strukture su cijanin, triarilmetan, antrahinon, diarilmetan, diazahemicijanin, oksazin, tiazin i hemicijanin (slika 16).³⁸⁰

I.2.1.4.3 Antrahinonske boje

Antrahinoni su grupa jedinjenja koja obiluju u univerzumu prirodnih supstanci. Oni su klasifikovani kao hinoni, a njihovi derivati su najveća grupa prirodnih hinona. Benzohinoni i naftohinoni su takođe deo ove grupe. Antrahinoni čine najveću grupu prirodnih pigmenta, sa oko 700 opisanih jedinjenja. Oko 200 ovih jedinjenja izolovano je iz biljaka, dok su ostala izolovana iz lišajeva i gljiva.^{399,400} Nalaze se u svim delovima biljaka: korenima, rizomima, plodovima i cvetovima. Većina ovih jedinjenja je izvedena iz osnovne strukture 9,10-antracendiona (antrahinona), tricikličnog aromatičnog organskog jedinjenja (tabela 6). Ova jedinjenja se takođe mogu naći u raznim namirnicama koje ljudi konzumiraju, a prisutni su u grašku, kupusu, salati i pasulju, koji obezbeđuju oko 0,4, 3,6, 5,9 i 36 mg antrahinona po kilogramu svežeg povrća.⁴⁰¹

Klasa antrahinona se u velikoj meri koristi u industriji bojenja tekstila.⁴⁰² Ove boje su poznate po svojoj rastvorljivosti u vodi, svetlim bojama i odličnim svojstvima postojanosti (slika 16). Na osnovu strukture antrahinona može se konstatovati veza sa azo bojama.^{403,404}

Antrahinoni takođe predstavljaju drugu najvažniju klasu boja, iza azo-boja samo zbog svog manjeg tinkturalnog kapaciteta i veće težine pripreme. Njihove karakteristične boje nalaze se u oblasti svetloplave i tirkizne.⁴⁰⁵ Pored toga, ova jedinjenja se smatraju najstarijim bojama koje su korišćene, a izveštaji pokazuju njihovu upotrebu u mumijama koje su bile stare više od 4000 godina. Za razliku od azo boja, koje nemaju prirodnih zamena, sve važne prirodne crvene boje su antrahinoni.⁴⁰⁴

Antrahinonske boje se sastoje od 9,10-antrahinona koji predstavljaju grupe donora elektrona. U skladu sa izborom ovih grupa i stepenom supstitucije, može se dobiti raznovrsna paleta boja.⁴⁰⁶ 9,10-Antrahinon je suštinski bezbojan (tabela 6). Da bi se proizvele komercijalno korisne boje, uvode se moćne donorske grupe elektrona kao što su amino ili hidroksi u jedan ili više od četiri alfa položaja (1, 4, 5 i 8). Najčešći oblici zamene su 1,4-, 1,2,4- i 1,4,5,8-. Da bi se svojstva dovela do maksimuma, koriste se primarne i sekundarne amino grupe (ne tercijalne) i hidroksi grupe. One obezbeđuju maksimalan stepen π -orbitalnog preklapanja, pojačan intramolekulskim vodoničnim vezama, uz minimalne sterne

smetnje. Snaga elektron donorskih grupa raste po redosledu: $\text{OH} < \text{NH}_2 < \text{NHR} < \text{NHAr}$. Tetra-supstituisani antrahinoni (1,4,5,8-) su batohromniji od di-(1,4-) ili tri-supstituisanih (1,2,4-) antrahinona. Dakle, odgovarajućim izborom donorskih grupa i obrazaca supstitucije, mogu se postići različite boje.⁴⁰⁷

Glavne prednosti antrahinonskih boja su jasnoća i dobra postojanost. Međutim, nisu isplative, jer imaju visoku cenu i mali tinkturalni kapacitet. To što se još uvek u velikoj meri koriste, posebno u oblastima crvenih i plavih nijansi, je zato što druge boje nisu mogle da obezbede kombinaciju svojstava koju nude antrahinonske boje, iako po višoj ceni.⁴⁰⁷

Antrahinonske boje imaju sulfo grupu koja ih čini rastvorljivim u vodi. Koriste se za bojenje vune i svile, zbog afiniteta prema pomoćnim vezivnim sredstvima. Podklasa kiselih boja, boje za hranu, koriste se za bojenje proteinskih vlakana i nekih najlonskih vlakana na visokoj temperaturi.⁴⁰⁸ Druga podklasa antrahinonskih boja, boje koja reaguju na vlakna, se koristi za bojenje proteinskih vlakana. Najvažnije i najrazličitije karakteristike ovih boja su svojstvo formiranja kovalentnih veza tokom procesa nanošenja sa supstratima koji se boje.⁴⁰⁹ Za razliku od drugih grupa boja, ove boje se sastoje od poznatog sistema hromofora koji sadrži različite reaktivne grupe. Na osnovu ovih reaktivnih grupa, one su klasifikovane u mono sidrene boje, dvostruko sidrene boje i višestruko sidrene boje.⁴⁰⁸

Pored njihove poznate upotrebe kao prirodnih boja, u literaturi je opisano nekoliko bioloških aktivnosti ovih jedinjenja, među kojima izdvajamo njihovo antitumorsko, antiinflamatorno, diuretičko, antiartritično, antifungalno, antibakterijsko, antimalarijsko i antioksidativno delovanje.^{401,410-419}

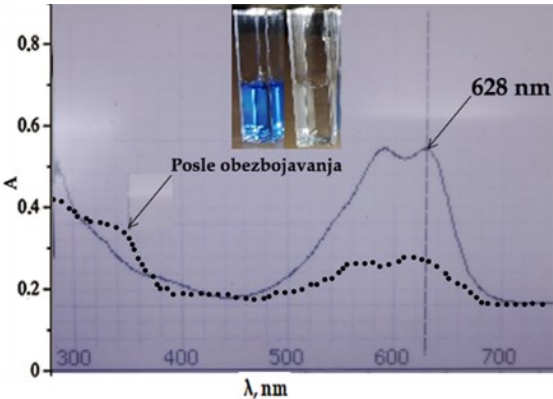
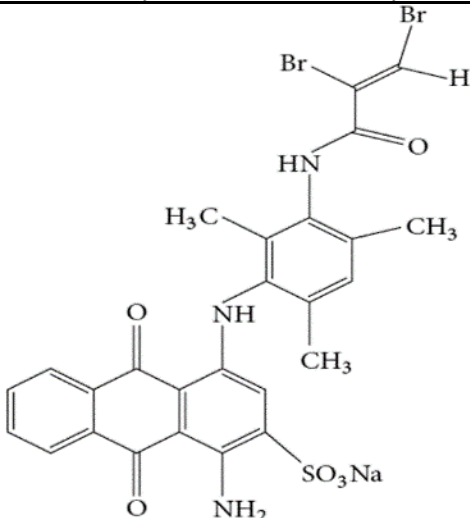
I.2.1.4.3.1 Antrahinonske boje C.I. Acid Blue 225 i C.I. Acid Violet 109

Dve kisele antrahinonske boje, *C.I. Acid Blue 225* i *C.I. Acid Violet 109*, koje se široko koriste za štampanje i za bojenje vune, poliamida, svile i mešanih vlakana, odabrane su kao modeli za naše istraživanje.

Tabela 7. Svojstva antrahinonskih boja *C.I. Acid Blue 225* i *C.I. Acid Violet 109*^{420,421}

Boja i njena svojstva	Spektar boje	Hemijska struktura boje
Ime: <i>C.I. Acid Violet 109</i> Molekulska formula: $\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{Br}_2\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}$ Molekulska masa: $823,52 \text{ g mol}^{-1}$ λ_{max} : 590; 552 nm CAS broj: 12220-63-2 Primena i svojstva: Koristi se za štampanje i bojenje svile, poliamida i vune. Plava do svetlo ljubičasta boja. Sinonimi: <i>Acid Violet B</i> , <i>Erionyl Violet A-B</i> , <i>Lanaset Violet B</i>		

Tabela 7. Svojstva antrahinonskih boja *C.I. Acid Blue 225* i *C.I. Acid Violet 109*^{420,421}

Boja i njena svojstva	Spektar boje	Hemijska struktura boje
Ime: <i>C.I. Acid Blue 225</i> Molekulska formula: C₂₆H₂₀Br₂N₃O₆S Molekulska masa: 685,32 g mol⁻¹ λ_{max}: 628; 589 nm CAS broj: 12216-97-6 Primena i svojstva: Koristi se za štampanje i bojenje vune. Crveno do svetlo plava boja. Sinonimi: <i>Weak Acid Brilliant Blue RLS, Acid Blue 2R, Lanaset Blue 2R, Polar Blue RLS</i>		

I.2.2 Karakteristike boja i njihov uticaj na životnu sredinu

Sintetičke boje se uglavnom dobijaju od petrohemijskih jedinjenja, komercijalizovane su u tečnom obliku, prahu, pastama ili granulama.⁴²²

Industrijski se koristi oko 40 000 različitih sintetičkih boja i pigmenata, a širom sveta se proizvodi oko 450 000 tona boja.⁴²³ Štaviše, sintetičke boje su korišćene za efikasnu kontrolu prečišćavanja kanalizacije i otpadnih voda, određivanjem specifične površine aktivnog mulja za praćenje podzemnih voda.⁴²⁴

Koriste se različite klase boja prema vlaknima na koja se mogu primeniti. Najčešće se koriste reaktivne boje, jer se mogu primeniti kako na prirodna (vuna, pamuk, svila), tako i na sintetička (modifikovani akrili) vlakna.⁴²⁵ Reaktivne boje se razlikuju od drugih klasa boja po tome što njihovi molekuli sadrže jednu ili više reaktivnih grupa sposobnih da formiraju kovalentnu vezu sa kompatibilnom grupom vlakana. Postale su veoma popularne zbog svoje visoke otpornosti na vlagu, sjaja i raspona nijansi.⁴²⁶ Njihova upotreba se povećala kako su sintetička vlakna postala sve brojnija. Kisele i bazične boje koriste se za bojenje svih prirodnih vlakana (vuna, pamuk, svila) i nekih sintetičkih (poliestera, akrila i viskoze). Direktne boje su klasifikovane na ovaj način jer se nanose direktno na celulozna vlakna. Osim toga, koriste se za bojenje viskoze, papira, kože i u maloj meri najlona. Primena mordantnih boja je ograničena na bojenje vune, kože, krzna i anodizovanog aluminijuma. Rastvorne boje se koriste za bojenje mastila, plastike i proizvoda od voska, masti i mineralnih ulja.⁴²³

Sintetičke boje su obdarene višestrukim potencijalima kao što su brzo i konzistentno bojenje sa različitim klasama tkanina, širokim spektrom pigmenata i nijansi boja, lakoća manipulacije, stabilnost na nekoliko spoljnih faktora i ekonomična potrošnja energije.⁴²⁷ Dakle, većina sintetičkih boja izaziva štetan uticaj, kada se ispuštaju u netretiranim ili delimično tretiranom oblicima u životnu sredinu.^{428,429}

Uopšteno govoreći, sintetičke boje nisu biorazgradive zbog svojih hemijskih karakteristika i strukture, stvarajući štetan uticaj na životnu sredinu.⁴³⁰ Većina sintetičkih boja je

postojana, kancerogena i toksična za ekosisteme.⁴³¹ S druge strane, negativan uticaj boja može biti biouveličan, stvarajući visoke stope kontaminacije na visokim trofičkim nivoima.⁴³² Međutim, toksičnost svake boje mora se procenjivati pojedinačno, jer šteta koju oni izazivaju zavisi od strukture i koncentracije izloženosti, što znači da boje mogu dugo da opstanu (~50 godina ili više) u životnoj sredini.^{82,433} Postojanost boja je usko povezana sa njihovom hemijskom reaktivnošću, tako da su nezasićena jedinjenja manje postojana od zasićenih. Perzistentnost aromatičnih jedinjenja se povećava kako se povećava broj hemijskih i halogenih supstitucija. Isto se dešava i sa postojanošću boja, pokazujući relevantnost procene degradacije boja pojedinačno i u kombinaciji.³⁷⁵ Najreprezentativnije boje koje se koriste u industriji pripadaju klasama azo, antrahinona ili triarilmetana.^{375,434}

Boje azo klase su naširoko proučavane da bi poznale njihovu upotrebu i negativne efekte. Između 60% do 70% azo boja je toksično, kancerogeno i otporno na konvencionalne fiziko-hemijske tretmane.³⁷⁵ Toksičnost azo boja prati njihovu hemijsku redukciju i kasnije formiranje aromatičnih amina, kao što su benzidin, dimetoksi-benzidin i dimetil-benzidin. Toksičnost aromatičnih amina je posledica njihove metaboličke oksidacije jer oksidacija generiše elektrofilne redukcijske posrednike (diazonijum soli) koji omogućavaju kovalentno vezivanje za DNK. Ova jedinjenja su mutagena i izazivaju bolesti kao što je rak. Varijanta ovog mehanizma je hemijska redukcija neke azo veze (koja se nalazi u određenim bojama) u odgovarajući toksični aromatični mono-azo amin.⁴³⁵⁻⁴³⁷

Kada se azojonske boje odbace u površinske ili otpadne vode, mogu da se vežu za suspendovanu organsku materiju elektrostatičkim interakcijama, prijanjaju za sedimente ili mulj otpadnih voda, povećavajući postojanost.⁴³⁸ Pored toga, obojena voda ili kontaminirani mulj dolazi u kontakt sa vodenim životinjama, prenoseći toksična jedinjenja kroz lanac ishrane do ljudi, izazivajući zdravstvene poremećaje kao što su hipertenzija, grčevi, mučnina, krvarenje, ulceracija kože ili membrana i sluzokože. U zavisnosti od izloženosti dozama boja, može doći do ključnih oštećenja bubrega, reproduktivnog sistema, jetre, mozga i centralnog nervnog sistema (CNS).^{435,437} Parot (*Parrot*) i saradnici procenjivali su efekte azo boja na krupnoglavu ribu (*Pimephales promelas*) u embrionalnoj (fazi larve) fazi upoređujući efekte boje pri različitim koncentracijama.⁴³⁹ Autori su otkrili da je upotreba 25,4 mg L⁻¹ i 16,7 mg L⁻¹ azo boja *Disperse Yellow 7* i *Sudan Red G*, respektivno, smanjila broj preživelih larvi, koje su uginule 4-10 dana nakon izleganja.⁴³⁹

Antrahinonske boje se smatraju najotrovnijim uprkos širokoj upotrebi. Studije o biotransformaciji i toksičnosti antrahinona su ograničene u poređenju sa azo bojama. Novotni (*Novotny*) i saradnici su procenili toksičnost četiri boje; dve azo (*Reactive Orange 16* (RO16); *Congo Red* (CR)) i dve antrahinonske (*Remazol Brilliant Blue R* (RBBR); *Disperse Blue 3* (DB3)), za koje su kao biološki model koristili tri vrste, *Vibrio fischeri* (bakterije), *Selenastrum capricornutum* (mikroalge) i *Tetrahimena piriformis* (cilijate).⁴⁰³ Mutagenost boja je određena korišćenjem Ames testa sa *Salmonella Tiphimurium* (His-). Autori su otkrili da je boja DB3 najtoksičnija za sve vrste i da je pokazala *in vitro* mutagene efekte u *S. Tiphimurium*.⁴⁴⁰ Neke antrahinonske boje su veoma otporne na hemijsku oksidaciju zbog svoje stabilnosti zbog rezonancije njihove aromatične strukture; ovo povećava postojanost u otpadnoj vodi i rezultira tekstilnom otpadnom vodom sa visokim procentima antrahinonskih boja.⁴⁴⁰ Toksikološke studije drugih antrahinona dale su različite rezultate. *Blue Reagent 4* (BR4) se smatra fitotoksičnim, citotoksičnim i genotoksičnim.⁴⁴¹ Međutim, *Acid Blue 80* (AB80) i *Acid Blue*

129 (AB129) procenjene na visokim koncentracijama nisu izazvale negativan efekat na larve krupnoglave ribe (*Pimephales promelas*) nakon 14 dana izlaganja.⁴³⁹

Dobro je poznato da boje iz klase triarilmetana ozbiljno utiču na metabolizam, akumuliraju se i prodiru u kožu, iritiraju ako se progutaju ili udišu, izazivaju kancerogene efekte, proizvode sarkome i izazivaju metemoglobinemiju kada su vrste preeksponirane.⁴⁴² Istraživanje sprovedeno u vodnim tokovima u Belgiji, kako bi se utvrdio nivo i akumulacija toksičnih boja u ugroženoj divljoj vrsti *Anguilla anguilla*, otkrilo je da je jegulja kontaminirana bojama u 77% uzorkovanih organa i da je između 25% i 58% Uzorci su sadržali triarilmetanske boje *Malachite Green* (MG), *Crystal Violet* (CV) i *Bright Green* (BG). Među tri boje, MG je najviše proučavana, jer se smatra toksičnom za više organa, samim tim utiče na imuni i reproduktivni sistem i ima genotoksična i kancerogena svojstva (efekti koji mogu ovu vrstu jegulja, kao i druge vrste živih bića da dovedu do istrebljenja).⁴⁴³

Procenjuje se da je najveći generator obojenih otpadnih voda tekstilna industrija, koja čini 60% ukupnog tržišta.^{444,445} Otprilike 20% boje koja se koristi za bojenje tekstilnih vlakana nije fiksirano i odlaže se u otpadne vode, što dovodi do visokog nivoa zagađenja.⁴⁴⁶ Međutim, šteta po životnu sredinu ne zavisi isključivo od količine ispuštene boje u životnu sredinu, već zavisi i od mešanja boja sa drugim supstancama, svih onih sa toksičnim svojstvima koja čine efluente iz industrije.^{447,448}

Otpadne vode iz tekstilne industrije koje su uglavnom obojene, a čestice boja su vidljive golim okom (<1 ppm), ispuštene u površinske ili podzemne vode, uzrokuju smanjenje koncentracije rastvorenog kiseonika u vodi, povećavajući vrednosti fiziko-hemijskih i bioloških parametara kao što su hemijska potreba za kiseonikom (COD), biohemijska potreba za kiseonikom (BOD), ukupne rastvorene čvrste materije (TDS), ukupni azot (TN), ukupni fosfor (TFP) i nerazgradiva organska jedinjenja.⁴⁴⁹⁻⁴⁵² S druge strane, otpadne vode imaju veoma fluktuirajuće pH vrednosti i teške metale kao što su hrom (Cr), arsen (Ar) i cink (Zn).³⁷⁵

1.2.2.1 Karakterizacija efluenta za bojenje tekstila

Bojenje je najkompleksniji od vlažnih procesa, koji uključuje stotine boja i pomoćnih hemikalija kao što su sredstva za fiksiranje, kiseline, alkalije, itd. Tokom procesa bojenja se uglavnom koriste sintetičke boje. Otprilike polovina ukupne zapremine otpadnih voda u tekstilnoj industriji nastaje procesom bojenja. Njih karakteriše tamna obojenost, visok BOD, COD, suspendovane čvrste materije i rastvorene čvrste materije. Neke od glavnih karakteristika otpadnih voda tekstilne industrije su:⁴⁵³

- I. **Boja.** Boja je u otpadnim vodama tekstilne industrije lako vidljiva, za razliku od drugih zagađivača. Boja otpadnih voda je stoga važna za komunalnu svest industrijskih postrojenja.
- II. **BOD i COD.** BOD je stepen količine rastvorenog kiseonika koji mikroorganizmi odbacaju tokom biohemijske oksidacije organske materije u otpadnoj vodi tokom perioda od 5 dana na 20 °C. COD je mera ekvivalenta kiseonika organskog materijala koji je hemijski oksidovan u reakciju i određuje se dodavanjem dihromata u kiseli rastvor otpadne vode.

- III. **DO.** Rastvoren kiseonik meri količinu gasovitog kiseonika (O_2) rastvorenog u vodenom rastvoru. Kiseonik ulazi u vodu cirkulacijom iz okolnog vazduha, aeracijom (brzim kretanjem) i kao otpadni proizvod fotosinteze.
- IV. **TDS i TSS.** Otpadne vode se mogu analizirati na ukupne suspendovane čvrste materije (TSS) i ukupne rastvorene čvrste materije (TDS) nakon eliminacije abrazivnih čvrstih materija kao što su krpe i pesak. Uzorak otpadne vode se filtrira kroz standardni filter i masa naslaga se koristi za izračunavanje TSS. Ukupne čvrste materije (TS) se dobijaju isparavanjem vode na određenoj temperaturi.
- V. **EC.** Električna provodnost se generalno koristi za demonstriranje ukupne koncentracije jonizovanih komponenti u vodenoj sredini, jer je električna provodnost mera sposobnosti vode da provodi električnu struju.
- VI. **pH vrednost.** pH vrednost je mera negativnog logaritma koncentracije vodoničnih jona u efluentu i daje indikaciju kiselosti ili alkalnosti efluenta za bojenje tekstila. Ovaj faktor je važan, jer život u vodi, naročito ribe, mogu da opstanu samo u uskom opsegu pH vrednosti 6-9.⁴⁵³

Nekoliko toksičnih elemenata ostaje u otpadnoj vodi i nakon određenih procesa prečišćavanja.^{454,455} Time izazivaju višestruke efekte kontaminacije na vazduh, zemljište, biljke i vodene resurse, kao i teška oboljenja kod ljudi.⁴⁵⁶

Kroke (Croce) i saradnici su izvršili testove biotoksičnosti na dve vrste, *Daphnia magna* i *Raphidocelis subcapitata*, sa 42 komercijalne boje. Otkrili su da je devet boja bilo toksično za *D. magna* u koncentracijama ispod 100 mg L^{-1} ; nasuprot tome, trideset njih je bilo toksično za *R. subcapitata*, što pokazuje važnost osetljivosti nekih vrsta i različitih efekata među bojama.⁴⁵⁷

I.2.2.2 Štetni uticaji na zemljište i biljke

Tečni i čvrsti otpad koji se ispušta iz tekstilne industrije sadrži boje, plastiku, poliester, vlakna, prediva i druge opasne materijale (slika 17). Ova polimerna jedinjenja su odgovorna za zagađenje lokalnih deponija i poljoprivrednih polja, posebno u zemljama u razvoju. Ovo zagađenje zemljišta prouzrokuje inhibiciju rasta biljaka izazivajući oksidativni stres, smanjuje sadržaj proteina, fotosintezu i stopu asimilacije CO_2 .^{364,458}

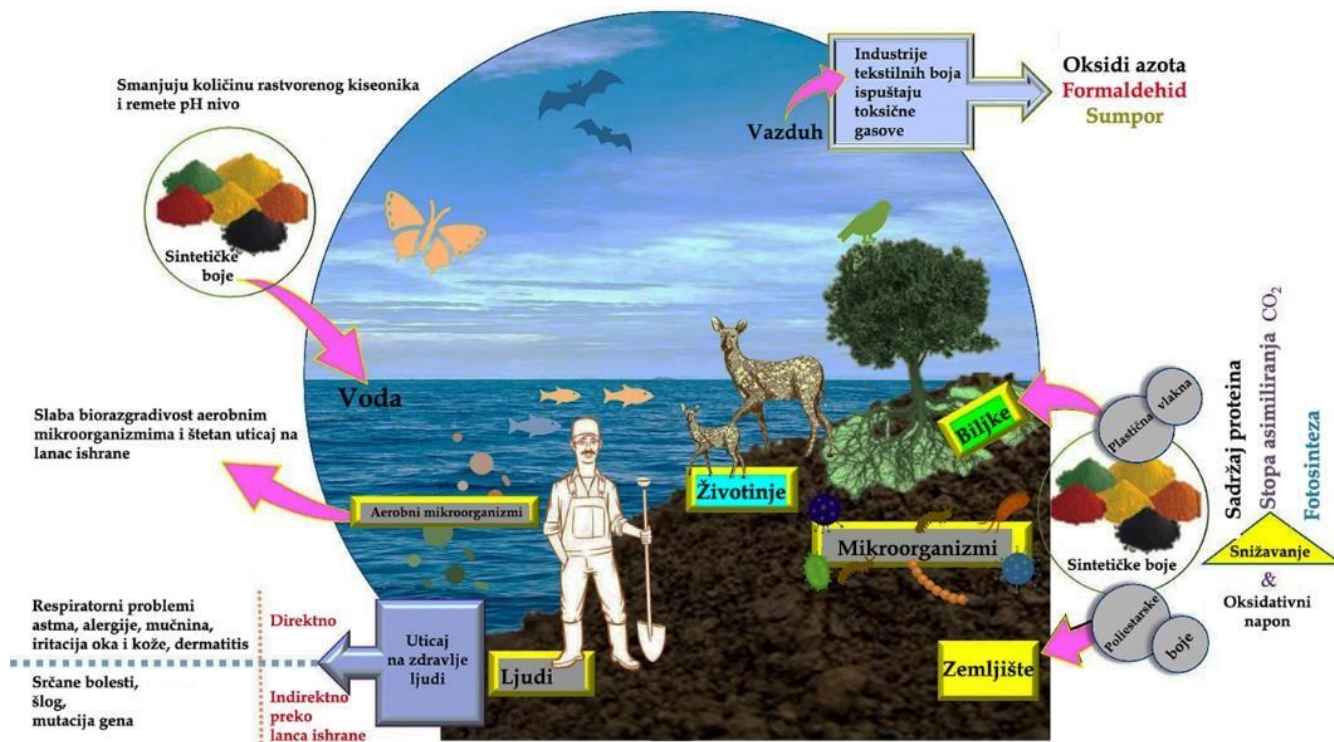
I.2.2.3 Štetni uticaji na vazduh

Industrija boja za tekstil oslobađa toksične gasove kao što su sumpor, formaldehid, okside azota, isparljiva jedinjenja, čestice i prašinu koje se razlikuju po neprijatnom mirisu (slika 17). Ovo zagađenje vazduha može uticati na ljude, životinje, finalni proizvod i životnu sredinu.^{456,460,461}

I.2.2.4 Štetni uticaji na ljude

Proizvodi bojenja i nusproizvodi koji postoje u otpadnim vodama, kao i prašina koja se proizvodi u tekstilnoj industriji, predstavljaju ozbiljan problem i ostavlja dugotrajne

zdravstvene probleme kod ljudi (slika 17). Oni utiču na nekoliko vitalnih organa (mozak, bubrezi, jetra, srce) i sisteme (respiratorni, imuni, reproduktivni) u ljudskom organizmu.^{446,462} Bolesti se mogu javiti ili direktno udisanjem, kao što su respiratorni problemi, astma, alergija, mučnina ili iritacija kože, očiju i dermatitis, ili indirektno kroz lanac ishrane kao što su tuberkuloza, rak, krvarenje, mutacije gena i bolesti srca.^{463,464}



Slika 17. Direktan i indirektan uticaj tekstilnih boja na čoveka i životnu okolinu⁴⁵⁹

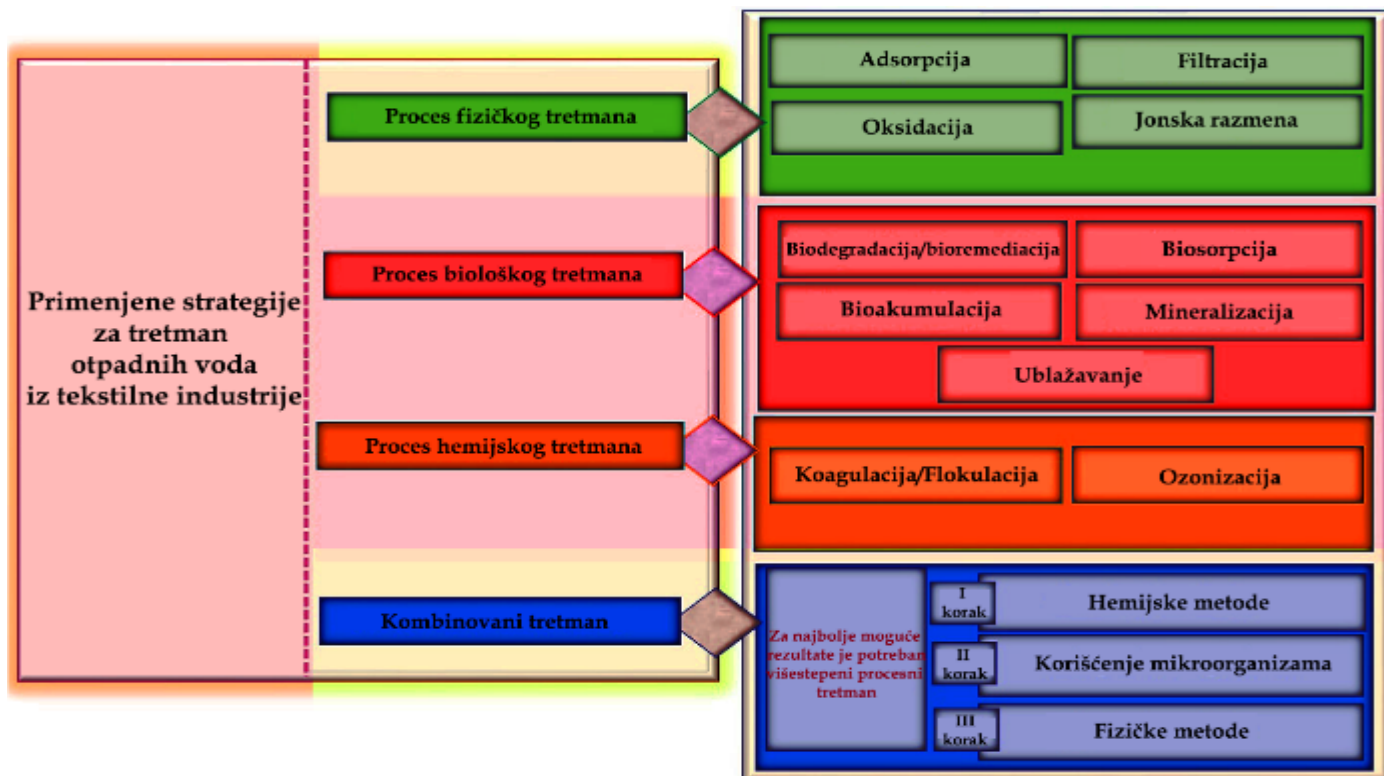
I.2.2.5 Štetni uticaji na vodu

Glavno zagađenje izazvano efluentom industrijskih boja je u vodenim telima koja ih primaju (uključujući mora, reke, jezera, prirodne bare i potoke) i zagađenje se širi na velike udaljenosti uzrokujući štetu drugim oblicima života.⁴⁶⁵

Otpadna voda sadrži više toksičnih materija i njena boja je rezultat ispuštanja nekoliko boja; primetna je i veoma postojana čak i pri niskim koncentracijama ($>1 \text{ mg L}^{-1}$), a ipak prosečna koncentracija boje koja se ispušta iz tekstila dostiže $\sim 300 \text{ mg L}^{-1}$.⁴⁶⁶ Tamna boja i visoka zamućenost ovih efluenta ometaju prenos sunčeve svetlosti kroz vodu, smanjuju količinu rastvorenog kiseonika i remete nivo pH vrednosti (slika 17). Ovi faktori dovode do nekoliko ekoloških uticaja na vodeni sistem kao što su inhibicija fotosinteze u vodenim biljkama, niska biorazgradivost od strane aerobnih mikroorganizama i štetni uticaji na lanac ishrane.^{467,468} Voda je veoma podložna zagađenju u poređenju sa drugim područjima, a takođe je teško odrediti nivo zagađenja u vodenim sistemima. Voda može izgledati čisto, iako zagađenje može dugo ostati u sedimentima i ribama.^{422,428}

I.2.3 Tretman obojenih otpadnih voda

Smanjenje jedinica boje je jedan od indikatora za tretman otpadnih voda koje sadrže boje.⁴⁶⁹ Najkritičnija faza za efikasno prečišćavanje je karakterizacija efluenta pošto se on stvara u različitim industrijama.⁴⁷⁰ Parametri ispuštanja vode ukazuju na kvalitet i promene u otpadnim vodama kada se vrši tretman.⁴⁷¹ Tekstilna industrija koristi ogromne količine vode u procesima bojenja, što otežava prečišćavanje ogromnih količina otpadnih voda (slika 18).



Slika 18. Strategije tretmana otpadnih voda tekstilne industrije ⁴⁵⁹

Smanjenje troškova tretmana i uklanjanje najvećeg procenta zagađivača pre ispuštanja otpadnih voda u vodotokove je bio fokus nekoliko studija, uključujući hemijske, fizičke, biohemijske, biološke i hibridne procese.^{469,472,473} U tom smislu, tretmani koji kombinuju fizičke, hemijske i biološke procese su uobičajeni za smanjenje zagađivača u industrijskim efluentima.^{469,470,474} Među tri vrste tretmana (biološki, hemijski i fizički), eliminacija boja fizičkim procesima je najčešća.

I.2.3.1 Proces fizičkog tretmana

Fizičke metode su jednostavne i efikasne metode i uključuju adsorpciju, flotaciju, sedimentaciju, zračenje, membransku filtraciju (nanofiltracija-ultrafiltracija) i reverznu osmozu.⁴⁷⁵ To su nedestruktivni procesi, međutim, u zavisnosti od tretmana, može doći do

stvaranja opasnog mulja koji se teško tretira i uklanja. Međutim, to je moguća opcija za boje koje stvaraju toksičnije proizvode tokom tretmana od originalne toksičnosti boje.⁴⁷²

I.2.3.1.1 Adsorpcija

Ovaj pristup je efikasan i laka se primenjuje kada otpadni efluent sadrži veliki broj boja.⁴⁶⁶ Odgovarajući adsorbent se bira u zavisnosti od njegovog afiniteta i sposobnosti regeneracije.

Poznato je da su adsorbujući materijali skupi (npr. aktivni ugalj), što je naučnim istraživačima omogućilo da pronađu alternativne adsorbujuće materijale kao što su bentonitna glina, pepeo, pšenični ostaci, koštice urme, nanočestice, itd. Oni su pristupačni i efikasni u tretmanu otpadnih voda.^{476,477} Strategija tretmana sa ovim materijalima se zasniva na veživanju zagađivača na specifičnu površinu adsorbujućeg materijala.^{478,479} Opsežno je proučavano uklanjanje boja adsorpcijom na aktivnom uglju. Npr. *Malachite Green* boja je adsorbovana aktivnim ugljem na bazi kurkume, tetraetilenpentamin aktivnim ugljem i slojevitim dvostrukim hidroksidom obloženim ugljenikom.^{476–478} *Rhodamine B* boja je uspešno adsorbovana mezoporoznim ugljenikom, komercijalnim aktivnim ugljem i tretiranim aktivnim ugljem na bazi pirinčane ljuske.^{480–483} *Acid Red 4* boja je adsorbovana aktivnim ugljem.⁴⁸⁴ Druge metode adsorpcije su primenjene da bi se uklonila *Basic Fuchsin* boja primenom adsorbensa poput pepela, bezuljne soje i biomase od ljuski dagnji, dok je *Acid Blue 25* boja adsorbovana na ljuskama škampa.^{485–489}

I.2.3.1.2 Korišćenje nanočestica

Nanotehnologija je nauka o materijalima nanorazmera (veličine ≤ 100 nm). Privukla je brojne istraživače zbog velikih potencijala nanočestica u uklanjanju tekstilnih boja.⁴⁹⁰ Nanočestice imaju širok spektar klasifikacija, hemijski su stabilne, imaju veliku površinu, mogu se pripremiti fizički, hemijski i biološki (mikrobi i biljke), jeftine su i ekološki prihvatljive.^{491,492} Oblik, veličina, struktura, čistoća i raspored nanomaterijala su važni u procesu dekolizacije.⁴⁹³ Nanočestice se uglavnom koriste direktno sa otpadnom vodom da bi adsorbovale odbačene boje na njihovoj površini radi dalje eliminacije.⁴⁹⁴ Takođe se mogu koristiti u filterima, membranama i ugljeničnim nanocjevima za dalju regeneraciju i ponovnu upotrebu u čišćenju otpadnih voda od boje.⁴⁹⁵ Ova originalna metodologija se odvija kao značajno rešenje velikih razmera za tekstilnu industriju zbog brzine čišćenja i smanjenja određenih zagađivača na nivoe približne nuli.⁴⁹⁶ Nanomaterijali se mogu sintetizovati iz biljnih ekstrakata, metala i metalnih oksida, ugljenika i nanokompozita.^{497–502} Međutim, važno je znati da se mora pozabaviti eliminacija nanočestica nakon prečišćavanja vode.⁴⁸⁰ Više naučnih radova pokrivalo je uklanjanje boje korišćenjem nanokompozita uključujući grafen oksid/cink oksid (GO/ZnO), polianilin/SiO₂ i redukovani grafen oksid-/nikl (RGO-Ni).^{485,503,504} Umar (*Umar*) i saradnici koristili su bimetalne nanočestice Pd-Ni za tretiranje *Acid Orange 8* boje.⁵⁰⁵

I.2.3.1.3 Filtracija

Filtracija je proces separacije zasnovan na membranama, koji uključuje popularne tehnike kao što su reverzna osmoza, ultrafiltracija i nanofiltracija, kaji omogućava prečišćavanje vode za višekratnu upotrebu i recikliranje boje.^{481,482,506} Koncept ovih postupaka se sastoji od prevođenje industrijske otpadne vode kroz nekoliko membrana koje se razlikuju po veličini mreže i mehanizmima separacije da bi se konačno dobila čista voda.^{507,508} Prečišćavanje obojenih otpadnih voda metodom membranske filtracije moguće je izvesti i nanomembranskom filtracijom.^{473,509–531} Liang (*Liang*) je sa saradnicima upario elektro-fenton reakciju sa membranskom filtracijom da bi postigao bolje rezultate obezbojavanja.⁵³² Liu (*Liu*) sa saradnicima kombinovao je metodu membranske filtracije sa redukcijom nanočestica gvožđa, da bi uklonio različite klase boja.⁵³³ Ova metoda se istakla u uklanjanju boja, ali ima neke nedostatke kao što su trajna promena membrane, stvaranje neprijatnih mirisa i nerastvorljivog otpada, što podrazumeva dalju preradu.^{534,535}

I.2.3.1.4 Jonska razmena

Adsorbenti za jonsku izmenu se unose u otpadnu vodu u čvrstom ili tečnom obliku, koriste se za vezivanje štetnih anjona ili katjona suprotnog naelektrisanja i zauzvrat oslobađaju ekvivalentnu količinu neštetnih jona vodonika.^{536,537} Hasan (*Hassan*) i Kar (*Carr*) su se bavili strategijama za uklanjanje reaktivnih boje primenom metode jonske razmene.^{538–540} Katjonske boje su takođe uklonjene iz vode tokom postupka jonske razmene.^{541,542} Ragu (*Raghu*) i Baša (*Basha*) su kombinovali jonsku izmenu sa hemijskim ili elektrohemijskim metodama kako bi uklonili boje iz tekstilnih otpadnih voda.⁵⁴³ Ova tehnika je odlična za eliminaciju toksičnih i rastvorljivih zagađivača iz efluenta vode, međutim, njegova upotreba je ograničena zbog visoke cene.⁵⁴⁴

I.2.3.2 Hemijski tretmani otpadnih voda

Hemijski tretmani vode su skupi u poređenju sa fizičkim ili biološkim. Iako neki hemijski tretmani mogu biti efikasni u uklanjanju boje, potrošnja jako oksidirajućih supstanci, kao što su hlor i ozon, za podsticanje hemijske degradacije boje je veoma velika.⁴⁷⁵ Dakle, scale-up procesa bi stvorio novi problem, potrebu za specijalizovanom opremom sa visokim troškovima i potrošnjom energije.³⁸³

Najčešći procesi hemijskog tretmana su koagulacija, flokulacija i ozonizacija, oni se koriste za eliminaciju zagađivača, a posebno onih koji se oslobađaju u tekstilnim otpadnim vodama (slika 18).^{466,545}

I.2.3.2.1 Oksidacija

Napredni oksidacioni procesi (AOP) su u velikoj meri primenjeni za degradaciju tekstilnih boja zbog njihove moćne sposobnosti da oksiduju širok spektar sintetičkih boja i drugih složenih zagađivača koji postoje u tekstilnim efluentima.^{546,547} Oni uključuju katalitičku

oksidaciju, što je proces proizvodnje aktivnih radikala (hidroksi ili sulfatni radikali) na određenoj površini katalizatora.^{409,548} U primeru Fentonove (*Fenton*) reakcije, vodonik peroksid je oksidujuće sredstvo, a joni gvožđa su katalizator (slika 18). Ova reakcija se odvija u kiselom medijumu (pH vrednost ~3) da bi se omogućilo razlaganje vodonik-peroksida u hidroksi slobodne radikale koji deluju kao jaka oksidujuća sredstva.⁵⁴⁹ Primenljive su i druge vrste Fentonovih tehnika kao što su elektro-Fenton, foto-Fenton i sono-Fenton, uz mogućnost njihove kombinacije.⁵⁵⁰ *Acid Yellow 17*, *Basic Violet 3* i *Amido Black 10B* boje uklonjene su *Fenton*-ovim procesom oksidacije.^{501,534,551} Inače, *Reactive Orange 16* je uklonjena metodom oksidacije ozona, *Reactive Green* je uklonjena UV/H₂O₂ AOP metodom, dok je *Indigo Carmine* podvrgnuta elektrohemijskoj oksidaciji.^{545,552,553} Glavni nedostaci tehnike oksidacije su stvaranje opasnih nusproizvoda u slučajevima nepotpune oksidacije i mogućnost stvaranja mulja.^{552,554}

I.2.3.3 Proces biološkog tretmana

Proces biorazgradnje/bioremedijacije odvija se prirodno preko širokog spektra prilagođenih mikroorganizama kao što su bakterije, gljive, alge i kvasci koji postoje u otpadnim vodama i/ili zagađenom području.^{555,556} Ovaj proces bi se takođe mogao sprovesti u laboratoriji izolovanjem i skriningom odgovarajućih mikroorganizama, nakon čega bi se omogućilo uklanjanje boje tretmanom efluenta iz tekstilne industrije.^{485,557,558} Mikroorganizmi odgovorni za biorazgradnju koriste nekoliko tehnika kao što su adsorpcija, biosorpcija, bioakumulacija, ublažavanje, eliminacija ili mineralizacija štetnih molekula otpadnih voda u neštetne ili čak korisne proizvode (slika 18).^{454,486} Ova tehnika je privukla veliku pažnju jer je ekološki prihvatljiva, bezbedna, čista (bez mulja) i ekonomična, jer je mogla da se kombinuje sa drugim tehnologijama.^{487,488} Bakterije i gljive su glavni faktori koji doprinose razgradnji otpadnih voda zbog svoje sposobnosti da proizvode razgrađujuće enzime (oksidoreduktaze, hidrolaze, oksigenaze, ligninaze, peroksidaze i lakaze) odgovorne za razlaganje nepoželjnih molekula.^{551,559–563} Važno je navesti ulogu ekstracelularne lakaze koju proizvode više gljiva kao što su *Neurospora crassa* i *Phanerochaete chrysosporium* u degradaciji različitih boja.^{445,564–583} Al-Jahari (*Al-Jawhari*) sa saradnicima je takođe naveo sposobnost nekoliko filamentoznih gljiva u uklanjanju *Crystal Violet* i *Methylene Blue* boja.⁵⁸⁴ Inače, *Bacillus subtilis*, *Proteus sp.* i *Streptococcus sp.* pokazali su se korisnim pri uklanjanju azo boja.^{584,585} Pokazalo se da RGS iz *Lysinibacillus sp.* uklanja i detoksikuje *Remazol Red* boju.^{586–589} Bez obzira na sve, prirodna bioremedijacija je dugotrajan metod, izazvana bio-razgradnja se ne reprodukuje lako, a povišene koncentracije toksičnih jedinjenja mogu sprečiti rast postojećih ili unetih mikroorganizama.^{575,590}

Biološke metode su održive alternative za tretman obojenih otpadnih voda, jer su ekološke i isplative. U zavisnosti od tretmana, proizvode manje mulja, koji se ne sme koristiti ako mulj adsorbuje boje. Pored toga, biološke metode često stvaraju neopasne metabolite ili dostižu potpunu mineralizaciju i troše malo vode.⁴⁶⁹ Međutim, neke studije su otkrile da biološke metode zahtevaju dugo vremena, a neke metode su neefikasne u uklanjanju visoko strukturiranih polimernih boja sa niskom biorazgradljivošću. Biološke metode nisu efikasne za neke od obojenih otpadnih voda zbog toksičnosti komercijalnih boja za organizme koji se koriste u procesu.⁵⁹¹ Međutim, to je dovelo do evaluacije tretmana koji ne

zahtevaju direktnu upotrebu mikroorganizma, kao što je adsorpcija mrtvom mikrobnom biomasom (biosorpcija), živa imobilisana biomasa i upotreba slobodnih ili imobilisanih enzima.^{347,432,592}

Biosorpcija koristi žive ili mrtve ćelije, ove poslednje imaju prednosti kao biosorbenti, jer ne zahtevaju hranljive materije, mogu se čuvati i koristiti tokom dugog perioda.⁵⁹³ Međutim, biosorpcioni tretman ne uklanja svu koncentraciju boje, jer je zarobljena u adsorpcionoj matrici, to je razlog zbog kojeg je neophodan naknadni tretman pre ispuštanja kontaminirane biomase. To je ograničenje za tretman velikih količina efluenta.⁴⁴⁹ Uprkos tome, biosorpcija se široko koristi kao strategija uklanjanja boje, pošto su operativni troškovi niski, a hibridni sistemi omogućavaju povećanje efikasnosti uklanjanja boje.⁴³²

Almeida (Almeida) i Corso (Corso) su procenili biosorpciju *Procion Red MKS-5B* boje koristeći biomasu *Aspergillus niger*. Otkrili su da je nakon tri sata inkubacije na 30 °C uklonjeno samo 30% boje, a UV-Vis analiza nije pokazala nikakve promene u strukturi boje. U ovoj studiji, za biorazgradnju je korišćena gljiva *Aspergillus terreus*, koja je postigla 98% uklanjanja boje nakon 336 h tretmana.⁵⁹⁴ Zoro (Zuorro) i saradnici su evaluirali mrtve ćelije mikroalge *Nannochloropsis oceanica*, otkrivši da 72 h kontakta sa RV5 bojom omogućava postizanje ravnoteže, sa maksimalnim kapacitetom adsorpcije u rasponu od 75,9 do 115 mg g⁻¹.⁵⁹⁵ Iako je uklanjanje boje bilo efikasno, vreme tretmana nije bilo prikladno za primenu u većem obimu. Štaviše, vreme tretmana i efikasnost uklanjanja zavise od faktora kao što su odnos organskog opterećenja/boje, temperatura, koncentracija kiseonika u sistemu, mešanje, pH vrednost, koncentracija soli i biomase.^{436,473,595}

Vrsta mikroorganizma za uklanjanje boje je ključna, jer neke bakterije, gljive ili alge koriste neke od različitih enzima koje proizvode.^{596,597} Generalno, biorazgradnja boja posredovana enzimima je efikasna, pošto katalitička aktivnost povećava brzinu reakcije i potrebna je mala koncentracija enzima.⁵⁹⁸ Stoga, mikroorganizmi koji proizvode odgovarajuće enzime mogu da deluju na boje i efikasno uklone boju ili smanje zagađenje vode.⁴³⁷ Međutim, na mikroorganizme mogu lako uticati pH vrednosti, temperatura, hemikalije, visoki salinitet i toksična organska jedinjenja.⁵⁹³ Upotreba enzima (bez mikroorganizama) kao alternativne strategije tretmana za boje i druge industrijske zagađivače je korisna ako uspeju da se prilagode uslovi tretmana.

Enzimi su katalizatori sa različitom specifičnošću prema supstratu. Generalno, njihove katalitičke reakcije su proizvele nusproizvode niže toksičnosti sa visokom efikasnošću. Neke od njih (oksidoreduktaze) imaju potencijal za tretman različitih boja.^{437,599} Međutim, neki autori su tvrdili da postoje razlozi za ograničenje upotrebe enzima, jer smatraju da je njihova proizvodnja skupa.⁴³⁷ Međutim, prednosti kao što su: relativno lakša upotreba, specifičnost prema supstratu i laka regulacija katalitičke aktivnosti i implementacije ostaju atraktivne i obećavajuće.⁴³⁷

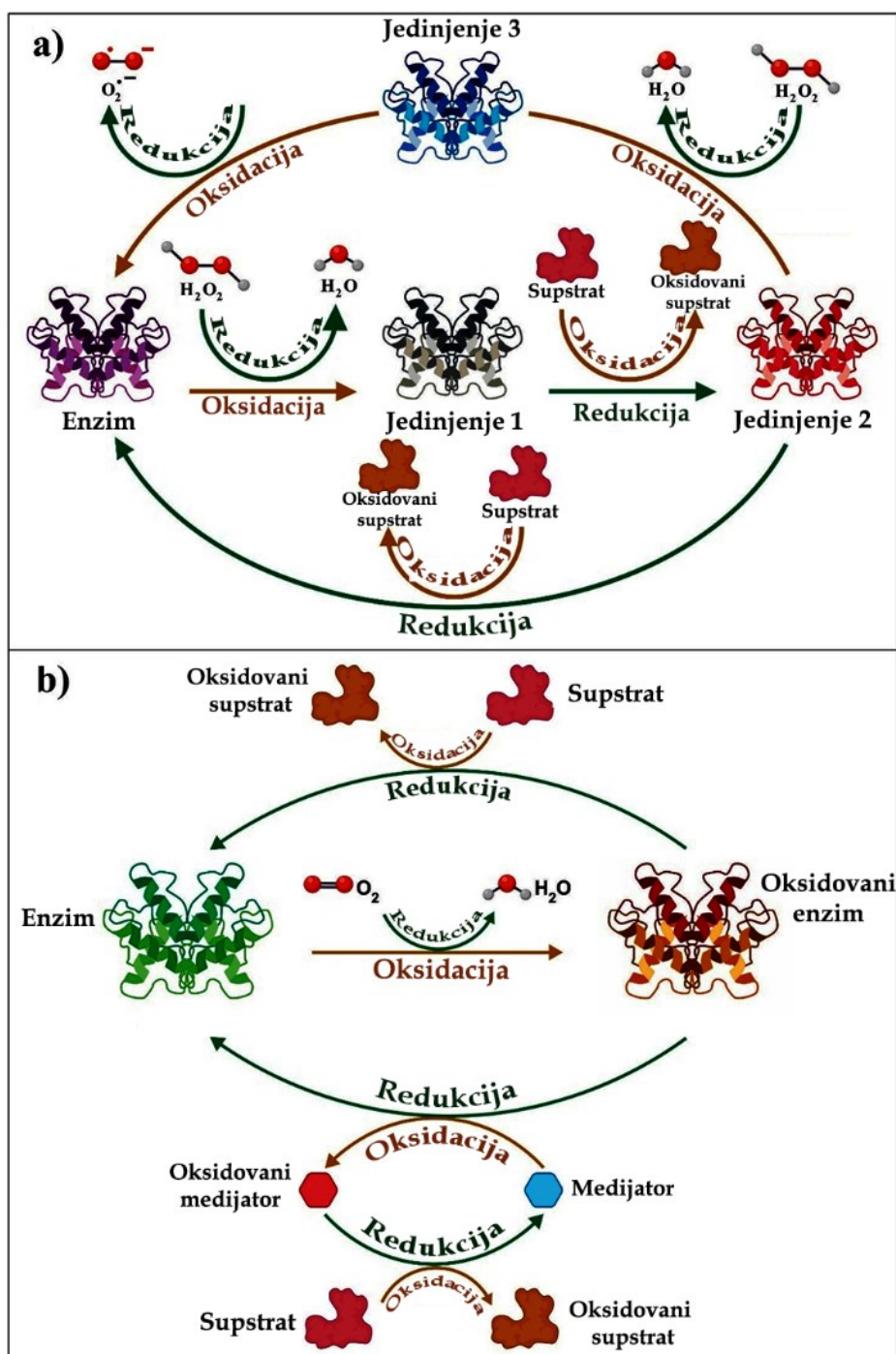
I.2.3.3.1 Mehanizam bio-oksidacije enzima

I.2.3.3.1.1 Peroksidaze

Peroksidazama je potreban pomoćni supstrat H₂O₂, koji se nazivaju pomoćni enzimi, da bi pokrenuli svoj katalitički proces. H₂O₂ izaziva oksidaciju enzima i kao rezultat enzim

gubi dva svoja elektrona i postaje jedinjenje 1. Za enzim peroksidaze mogu se razmotriti dva tipa katalitičkih ciklusa, u zavisnosti od odnosa H_2O_2 i koncentracije supstrata. Put željenog ciklusa je od osnovnog enzima do jedinjenja 1, jedinjenja 2 i osnovnog enzima. Na ovom putu, H_2O_2 igra ulogu akceptora elektrona, odnosno oksidacionog sredstva osnovnog enzima. Oksidovani enzim (jedinjenje 1) može oksidovati organski supstrat da bi nadoknađio izgubljene elektrone i regenerisao nativni enzim.⁶⁰⁰

Slika 19a prikazuje mehanizam bio-oksidacije pomoću enzima peroksidaze, dok je na slici 19b pomoću enzima oksidaza.



Slika 19. Mehanizam bio-oksidacije: (a) peroksidazama; (b) oksidazama⁶⁰⁰

Neželjeni ciklus nastaje kada je koncentracija H_2O_2 previsoka. U ovom slučaju, kao i u prethodnom ciklusu, formira se jedinjenje 2. Međutim, umesto da se vrati u osnovno stanje i podvrgne željenom ciklusu, jedinjenje 3 se formira usled viška H_2O_2 , koje nije deo željenog ciklusa peroksidaze. Ovo je neaktivno stanje enzima i razlog za smanjenje učinka enzima pri visokim koncentracijama H_2O_2 (inhibicija enzima). Ovaj ciklus je predstavljen kao mehanizam inhibicije ili autokatalitička inaktivacija, što je posledica prevelikog odnosa H_2O_2 i supstrata.⁶⁰¹⁻⁶⁰⁵

Što se tiče štetnih efekata previsoke koncentracije H_2O_2 na reakciju zbog inhibicije enzima i smanjene efikasnosti, Mukerje (*Mukherjee*) je sa saradnicima optimizovao molarni odnos H_2O_2 prema supstratu kako bi se uklonila dva zagađivača: 4-hloro-o-toluidin i 4,4-metilenbis(2-hloroanilin) koristeći SBP enzim. Za mehanizam peroksidaze se očekuje stehiometrija vodonik-peroksid-supstrat od 1:2.

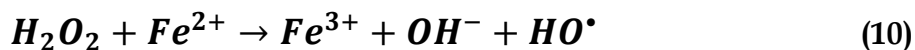
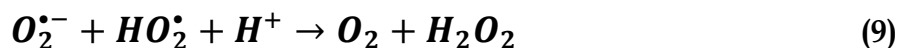
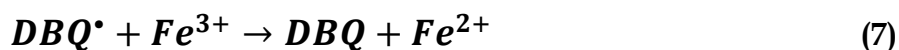
Optimalni molarni odnos H_2O_2 -supstrata je 0,5 (blizu predviđene vrednosti) za prvi zagađivač i 0,75 za drugi zagađivač. Veći zahtevi 4,4'-metilenbisa(2-hloroanilina) za H_2O_2 mogu se pripisati formiranju bis-azo trimera.⁶⁰⁶

U ovom procesu, antioksidansi igraju suštinsku ulogu u uklanjanju radikala kiseonika i smanjenju efikasnosti uklanjanja zagađivača, jer reaktivne vrste kiseonika (superoksidi) formiraju oštećenje i uništavaju ćelije.⁶⁰⁷ Studije su takođe pokazale da H_2O_2 potreban za proces, mogu da proizvode enzimi kao što je glukozo-oksidaza koja katalizuje procese u kojima se oslobađa vodonik-peroksid kao jedan od proizvoda reakcije. Ova postepena proizvodnja sprečava da enzim bude deaktiviran viškom H_2O_2 . Kao još jedna tehnika za postepenu proizvodnju H_2O_2 može se navesti i elektrohemijaska metoda.⁶⁰⁸

I.2.3.3.1.2 Napredan proces bio-oksidacije

Pored navedenih mehanizama, drugi mehanizam, nazvan napredni biološki proces, razmatran je za procese biooksidacije koji indirektno dovode do oksidacije organskih zagađivača. Kao napredna metoda oksidacije, ova metoda proizvodi aktivirane radikale kao što su hidroksi radikali, sa visokim potencijalom za oksidaciju organske materije, što rezultuje proizvodima kao što su ugljen-dioksid i voda.⁶⁰⁰

Mehanizam ove metode je da mikroorganizam kao što je *WRF* prvo oksiduje svoj medijator sličan hinonu lučenjem peroksidaze ili Lac enzima. Nakon toga, ovi oksidovani supstrati se redukuju dehidrogenazom da bi se dobio hidrohion (*DBQH2*). Nakon toga, hidrohion se oksiduje enzimima kao što su peroksidaza i Lac da bi se generisali semihion radikali (*DBQ•*). Dodavanje Fe^{3+} semihion radikal (*DBQ•*) dovodi do autooksidacije i formiranja *Fenton*-ovog reagensa. Ovaj proces dovodi do formiranja hidroksilnih jona, koji su sami po sebi jaki oksidansi.^{609,610} Sledeće reakcije pokazuju redosled objašnjenog mehanizma nakon formiranja semihion radikala:



Generisanje hidroksilnih radikala je ograničeno na hemijske, fotohemijske i elektro-hemijske metode, međutim, kao što je ranije pomenuto, to je moguće i korišćenjem bioloških metoda. Da bi se stvorili hidroksilni radikali, Gomez-Toribio (*Gomez-Toribio*) i saradnici, uključili su hinon u reakcioni ciklus u prisustvu 4-metoksi benzaldehida (anisaldehyda) i Mn^{2+} , takođe su koristili Fe^{3+} -oksalat umesto Fe^{3+} -EDTA kao izvor Fe^{3+} jona. Rezultati su pokazali povećanje proizvodnje hidroksilnih radikala za 1,2, 3 i 3,1 puta u prisustvu anisaldehyda, Mn^{2+} i zamenom Fe^{3+} -EDTA sa Fe^{3+} -oksalatom, respektivno.⁶¹⁰

U drugom istraživanju, Kruz del Alamo (*Cruz del Alamo*) i saradnici uspeali su da tretiraju dve vrste sintetičkih i pravih farmaceutskih efluenta koji su sadržali 12 različitih vrsta farmaceutskih zagađivača u prisustvu *T. versicolor* (*Trametes versicolor*) gore opisanim mehanizmom. Rezultati su pokazali da je 50%-95% od 11 vrsta farmaceutskih jedinjenja eliminisano.⁶⁰⁹ Treba napomenuti da postoji malo istraživanja o naprednim procesima bio-oksidacije, pa bi ovo moglo biti pogodno polje za buduća istraživanja.

I.3. IMOBILIZACIJA ENZIMA

Biokataliza se proučava više od jednog veka.⁹⁶ Atraktivne karakteristike biokatalize, kao što su ekološka prihvatljivost, niska potrošnja hemikalija, nedostatak proizvodnje toksičnih nusproizvoda, rad u blagim uslovima i visoka selektivnost, čine je pristupom prema ekološki prihvatljivom i održivom industrije.^{95,96,611-616} Dakle, biokatalizatori su intenzivno angažovani u različitim istraživačkim i industrijskim oblastima, uključujući fine i robusne hemikalije, farmaceutske proizvode, hranu, kozmetiku, tekstil i celulozu i papir.^{95,611} Ipak, generalno, slobodni enzimi su osetljivi na ekstremne uslove. Stoga, da bi se poboljšala izvodljivost upotrebe enzima za industrijsku primenu, mnogi pokušaji su se fokusirali na poboljšanje stabilnosti enzima.⁶¹⁷ Brojne tehnike su korišćene za poboljšanje svojstava enzima, kao što su usmerena evolucija, mutagenaza mesta vezivanja, fuzija enzima, površinski prikaz i imobilizacija enzima.^{611,614,617,618}

Imobilizacija enzima, odnosno vezivanje enzima na nosače, je dragoceno sredstvo za poboljšanje stabilnosti enzima i pretvaranje enzima u heterogene katalizatore, omogućavajući njihovu reciklažu i rad u protočnim procesima u različitim bioreaktorima.^{613,619-622} Recikliranje enzima može uštedeti troškove proizvodnje enzima, posebno za skupe enzime i izostaviti dosadne procedure kao što su priprema enzima i odvajanje enzima tokom procesa.^{611,619} Iako se imobilizacija enzima pominje u brojnim istraživačkim radovima u proteklih 100 godina, i dalje je zanimljiva tema među istraživačima, jer je samo nekoliko metoda imobilizacije uspešno komercijalizovano.^{612,613} U međuvremenu, široka lepeza materijala je korišćena u svojstvu nosača za imobilizaciju enzima.^{619,623-627} U isto vreme, interakcije između enzima i nosača, kao što su zarobljavanje, fizička adsorpcija, kovalentno vezivanje i biospecifična adsorpcija, mogu varirati u zavisnosti od tehnike imobilizacije.^{628,629} Iako je imobilizacija enzima efikasan alat u biokatalizi, još uvek treba rešiti neke nedostatke koji su prikazani u tabeli 8.^{613,622,630-634}

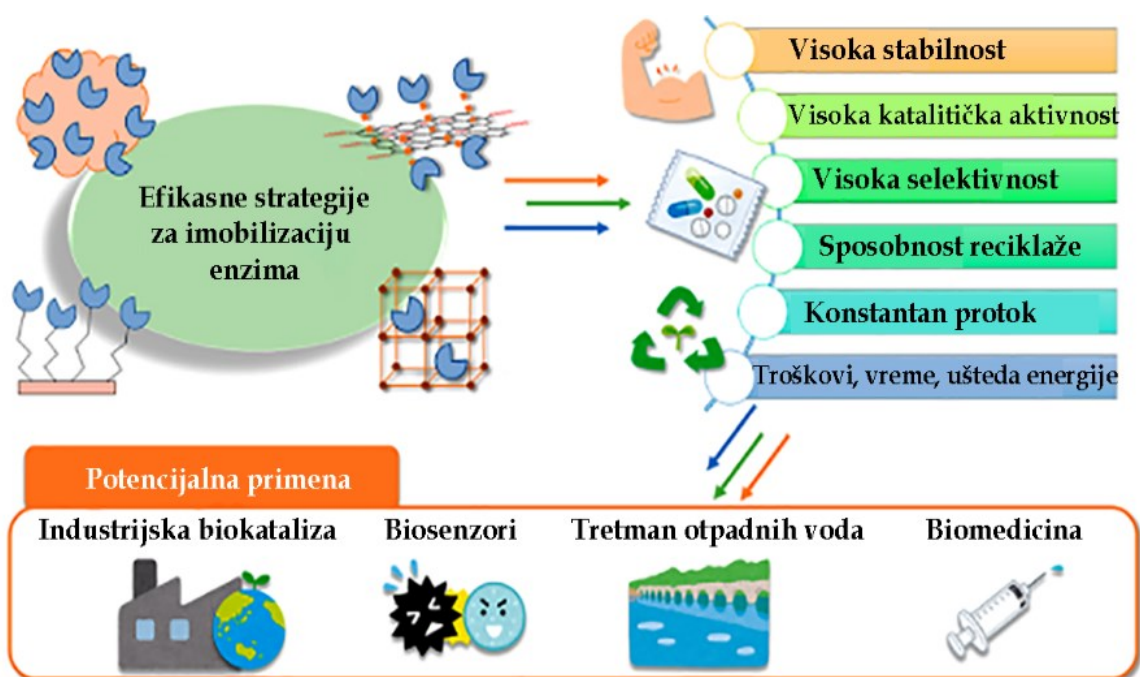
Npr. aktivnosti enzima se smanjuje nakon imobilizacije kao rezultat konformacionih promena enzima, ograničenja prenosa mase ili deaktivacije enzima hemikalijama tokom procesa imobilizacije.^{613,622,630-634}

Tabela 8. Prednosti i mane imobilizacije enzima³⁸⁹

Prednosti	Mane
• višestruka upotreba – imobilisani enzim može da se koristi više puta dok slobodan enzim može da se iskoristi samo jednom, • ne dolazi do kontaminacije reakcione smeše i proizvoda reakcije enzimom, • lako uklanjanje enzima iz reakcione smeše, • stabilizacija enzima – imobilisani enzimi su stabilniji od slobodnih, • manji troškovi prečišćavanja proizvoda i uklanjanja enzima iz reakcione smeše, • povećanje funkcionalne efikasnosti enzima, • povećana reproduktivnost procesa u kojem učestvuje enzim, • povećanje stabilnosti proizvoda reakcije, • bolja kontrola procesa i • kontinualna upotreba enzima.	○ gubitak aktivnosti prilikom samog postupka imobilizacije, ○ smanjenje aktivnosti enzima usled ograničene difuzije, ○ može doći do promene specifičnosti enzima, ○ može doći do inaktivacije enzima usled toplote koja se oslobađa prilikom imobilizacije, ○ visoka cena prečišćavanja i izolacije enzima sa nosača na koji je imobilisan i ○ primena imobilisanih enzima u industriji je ograničena na samo mali broj imobilisanih sistema i ovakvi katalizatori se još uvek retko koriste na industrijskom nivou.

Možemo se složiti, da su napredak u nauci o materijalima i nanotehnologiji pomogli u uspehu imobilizacije enzima, kao i u razumevanju mehanizama imobilizacije enzima koji čine konfigurisanu imobilizaciju izvodljivom. U isto vreme su se naširoko koristili kao vredni alati u istraživanju i razvoju organskih procesa u npr. poboljšanju aktivnosti enzima, povećanjem funkcionalnosti kombinovanjem dve tehnike imobilizacije, pojednostavljujući proces usmeravanjem enzima ka nosaču i uspostavljanjem protočnog procesa.^{613,617,620,621,623-625,627,629,635} Dobro uspostavljene strategije imobilizacije enzima mogu pružiti nekoliko prednosti za dalju primenu, kao što je ilustrovano na slici 20.^{95,96,611-616,622}

„Aktivnost koja je imobilisana“ može se tačno odrediti samo merenjem ukupne preostale aktivnosti enzima koja ostaje u rastvoru enzima nakon imobilizacije i oduzimanjem ove aktivnosti od ukupne početne aktivnosti. U nekim slučajevima treba sprovesti paralelnu slepu probu da bi se kompenzovala deaktivacija slobodnog enzima pod uslovima imobilizacije. Ponekad se merenja sadržaja proteina koriste za određivanje prinosa imobilizacije. Ovo bi moglo da dovede do zablude, posebno kada se mešavina sirovih proteina koristi za imobilizaciju, pošto različiti proteini mogu imati različite prinose imobilizacije. Međutim, može biti korisno pratiti i aktivnost enzima i koncentraciju proteina u supernatantu, da bi se isključila bilo kakva deaktivacija slobodnog enzima i da bi se odredilo ukupan sadržaj vezanih proteina i/ili enzima (*w/w%*) imobilisanog biokatalizatora.⁶³⁶



Slika 20. Prednosti efikasnih strategija imobilizacije enzima i njihove potencijalne primene³⁸⁹

Drugi termin koji se često koristi za opisivanje uspeha imobilizacije je efikasnost imobilizacije. Efikasnost imobilizacije opisuje procenat aktivnosti vezanog enzima koji se primećuje u imobilizatu:

$$\textbf{Efikasnost (\%)} = \left(\frac{\text{uočena aktivnost}}{\text{početna imobilisana aktivnost}} \right) \quad (12)$$

U teoriji, prinos imobilizacije može biti 100%, a efikasnost imobilizacije 0% kada je sav enzim u rastvoru imobilisan, ali nije pronađena aktivnost u imobilizatu, jer je enzim deaktiviran ili je iz nekog razloga postao nedostupan nakon imobilizacije.⁶³⁶

Treći termin koji opisuje uspeh imobilizacije je preostala aktivnost. Preostala aktivnost je prinos imobilizacije pomnožen sa efikasnošću imobilizacije, što vam u jednom broju daje predstavu o uspehu ukupnog procesa imobilizacije. Sa obnavljanjem aktivnosti, aktivnost imobilizata se upoređuje sa ukupnom početnom aktivnošću slobodnog enzima:

$$\textbf{Preostala aktivnost (\%)} = \left(\frac{\text{uočena aktivnost}}{\text{početna aktivnost}} \right) \quad (13)$$

Nepotrebno je reći, da se svi gornji termini moraju izračunati korišćenjem ukupne aktivnosti (jedinice, npr. $\mu\text{mol min}^{-1}$), a ne korišćenjem specifičnih aktivnosti (npr. U mL^{-1} , U mg^{-1}). Štaviše, za određivanje svih aktivnosti treba koristiti potpuno iste uslove analize aktivnosti.⁶³⁶

Uočena aktivnost u imobilizatu u odnosu na aktivnost slobodnog enzima (efikasnost imobilizacije i prinos imobilizacije) može u velikoj meri zavisi od korišćenog testa aktivnosti (npr. tipa supstrata, koncentracije supstrata, pH vrednosti i temperature reakcije) i od fizičkih svojstva imobilisanog biokatalizatora (npr. veličina čestica, hidrofobnost – hidrofilitnost i veličina pora). Ova zavisnost je najčešće uzrokovana ograničenjima u prenosu mase supstrata i/ili proizvoda u matrici za imobilizaciju, što dovodi do različitih prinosa imobilizacije i preostalih aktivnosti.

Npr. enzim imobilisan u gustu polarnu matricu imaće veći prinos imobilizacije i preostalu aktivnost kada se test aktivnosti sprovodi sa malim polarnim supstratom u visokoj koncentraciji nego kada se koristi veliki nepolarni supstrat pri niskoj koncentraciji, pod pretpostavkom da je originalni slobodni enzim podjednako aktivan na oba jedinjenja. Iako je razlika u gornjem primeru prilično očigledna, manje očigledne razlike mogu imati veliki uticaj na rezultate. Zbog toga je od vitalnog značaja za ekonomičnost procesa imobilizacije da se dizajnira imobilisani biokatalizator za specifičnu primenu i da se sprovedu testovi aktivnosti što bliže konačnoj primeni u kojoj će se imobilisani enzim primeniti.⁶³⁶

Za upotrebu u organskim rastvaračima, izračunavanje preostale aktivnosti postaje komplikovanije, jer poređenje suspenzija slobodnog enzima u prahu i enzima u imobilisanom obliku u organskom rastvaraču nije uvek lako. Generalno, očekivalo bi se da imobilisani enzim daje bolje rezultate, zahvaljujući boljem pristupu supstrata pojedinačnim molekulima enzima, kada su uredno raspoređeni na površini u poređenju sa masnim enzimskim prahom koji, da stvar bude još gora, često sadrži aditive kao što su polisaharidi. Direktna poređenja aktivnosti u ovim slučajevima često dovode do preostalih aktivnosti viših od 100%. Ukratko, treba razlikovati osnovni gubitak aktivnosti deaktivacijom i (očigledan) gubitak aktivnosti zbog nedostupnosti frakcije molekula enzima u imobilizatu. Ovo se može utvrditi titracijom aktivnog mesta.⁶³⁷ Ova tehnika omogućava merenje količine aktivnog enzima upotrebom jedinjenja koja nepovratno inhibiraju enzim, tako što se uspešno vezuju za aktivno mesto enzima, dok istovremeno oslobađaju jedinjenje koje se lako može otkriti. Poznavanje količine aktivnog enzima dostupnog u imobilisanom biokatalizatoru je veoma korisno za razumevanje procesa imobilizacije, difuzionih ograničenja i načina na koji enzim reaguje na određeni materijal. Može se koristiti, na primer, da se utvrdi da li se nasledna katalitička aktivnost enzima menja kao rezultat konformacionih promena izazvanih interakcijom sa nosačem.⁶³⁶

I.3.1 Osobine imobilisanih enzima

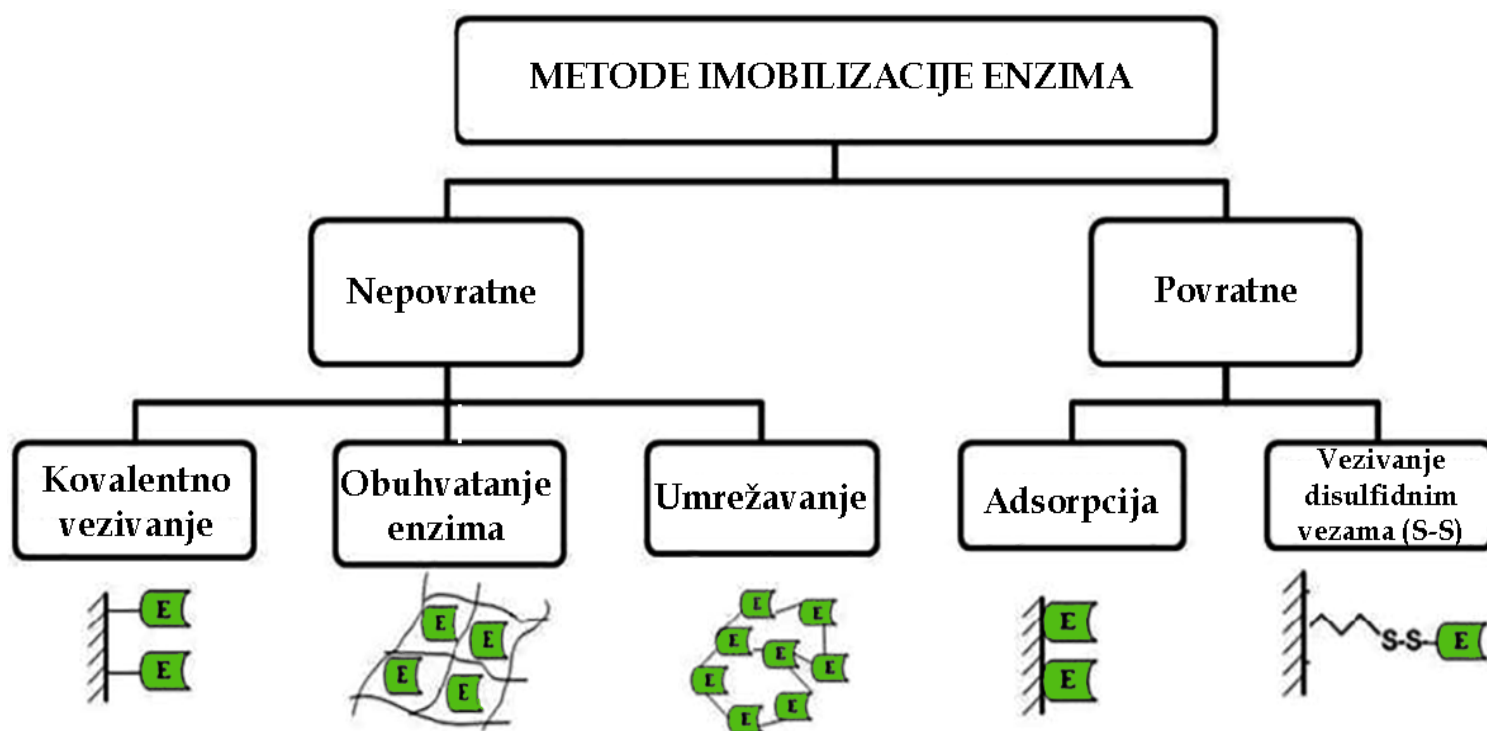
Osobine imobilisanih enzima su određene karakteristikama materijala nosača, kao i prirodom i brojem interakcija između enzima i nosača. Kao posledica imobilizacije enzima, stabilnost i kinetička svojstva enzima se obično menjaju, uglavnom zbog mikrokruženja i modifikacija koje nameće nosač.^{638,639}

Ova modifikacija svojstava može biti uzrokovana ili promenama unutrašnje aktivnosti imobilisanog enzima ili činjenicom da se interakcija između imobilisanog enzima i supstrata odvija u mikrokruženju koje se razlikuje od glavnog rastvora. Dakle, jedan od glavnih problema povezanih sa upotrebom imobilisanih enzima je gubitak katalitičke aktivnosti, posebno kada enzimi deluju na makromolekulske supstrate. Zbog ograničenog pristupa supstrata aktivnom mestu enzima, aktivnost se može smanjiti samo na pristupačne površinske grupe supstrata. Ovo sterno ograničenje može zauzvrat da promeni karakterističan obrazac proizvoda dobijenih iz makromolekulskog supstrata.⁶⁴⁰ Postoji nekoliko strategija da se izbegnu ovi sterni problemi, kao što su izbor nosača sastavljenih od mreža izolovanih makromolekulskih lanaca, pažljiv izbor ostataka enzima uključenih u imobilizaciju i upotreba hidrofilnih i inertnih krajeva.⁶⁴¹

Uočene promene u katalitičkim svojstvima nakon imobilizacije mogu takođe biti posledica promena u trodimenzionalnoj konformaciji proteina izazvanih vezivanjem enzima za matricu. Ovi efekti su prikazani i u manjoj meri, iskorišćeni za ograničen broj enzimskih sistema. Vrlo često, kada je enzim imobilisan, njegova radna stabilnost na višoj temperaturi i u prisustvu organskih rastvarača je poboljšana.⁶⁴² Koncept stabilizacije je stoga bio važna pokretačka snaga za imobilizaciju enzima. Prava stabilizacija na molekularnom nivou je prikazana u slučaju proteina imobilisanih kovalentnom vezom preko većeg broja funkcionalnih grupa.⁶⁴³ Studije koje je sproveo nekoliko autora koristeći različite metode su pokazale da postoji korelacija između stabilizacije i broja kovalentnih veza sa nosačem.^{644–646}

I.3.2 Tipovi imobilizacije

Enzimi se mogu vezati za nosač interakcijama koje se kreću od reverzibilne fizičke adsorpcije i jonskih veza do stabilnih kovalentnih veza. Jedan od načina klasifikacije različitih pristupa imobilizaciji enzima je u dve široke kategorije: nepovratne (ireverzibilne) i povratne (reverzibilne) metode (slika 21).



Slika 21. Metode imobilizacije enzima⁶⁴⁷

Jačina vezivanja je obično obrnuto proporcionalna lakoći kojom se može preokrenuti. Ova dva suprotstavljena cilja, stabilnost i reverzibilnost, teško je istovremeno ostvariti. Tradicionalni pristup je bio da se veza učini što je moguće jačom i da se žrtvuje reverzibilnost. Pored toga, metode imobilizacije se često klasifikuju i prema vrsti hemijske reakcije koja se koristi za vezivanje (tabela 9).

U nekim slučajevima, protokoli za imobilizaciju enzima su takođe zasnovani na kombinaciji nekoliko metoda imobilizacije. Npr. enzim se može prethodno imobilisati na čestice nosača adsorpcijom, afinitetom ili kovalentnim vezama pre daljeg zarobljavanja u poroznom polimeru. Svaka metoda imobilizacije ima prednosti i nedostatke (tabela 9).

Tabela 9. Prednosti i mane glavnih metoda za imobilizaciju enzima⁶⁴⁷

Metoda i priroda vezivanja	Prednosti	Mane
<i>Fizička adsorpcija</i>		
Slabe veze: hidrofobne, <i>van der Waals</i> -ove ili jonske interakcije	Jednostavna i jeftina; Male konformacione pomene enzima	Desorpcija; Nespecifična adsorpcija
<i>Afinitet</i>		
Veze na osnovu afiniteta između dva partnera po afinitetu	Jednostavna i orijentisana imobilizacija; Odlična selektivnost	Visoki troškovi
<i>Kovalentno vezivanje</i>		
Hemijsko vezivanje između funkcionalnih grupa enzima i nosača	Nema curenja enzima; Potencijal za stabilizaciju enzima	Nosač i enzim se ne regenerišu; Pad aktivnosti
<i>Obuhvatanje enzima</i>		
Ubacivanje enzima unutar polimerne mreže	Široka primena	Ograničenja pri prenosu mase; Curenje enzima
<i>Umrežavanje enzima</i>		
Molekuli enzima su umreženi preko funkcionalnog reaktanta	Stabilizacija biokatalizatora	Umreženi biokatalizatori nisu pogodni za pakovani sloj; Ograničenja pri prenosu mase; Gubitak aktivnosti

Izbor najprikladnije tehnike zavisi i od prirode enzima (biohemijska i kinetička svojstva) i nosača (hemijske karakteristike, mehanička svojstva). Dakle, interakcija između enzima i nosača stvara imobilisani enzim sa određenim biohemijskim i fiziko-hemijskim osobinama koje određuju njihovu primenljivost na specifične procese.

I.3.2.1 Ireverzibilne metode imobilizacije enzima

Koncept ireverzibilne imobilizacije znači da kada se biokatalizator zakači za nosač, ne može se odvojiti bez uništavanja biološke aktivnosti enzima ili podloge. Najčešći postupci ireverzibilne imobilizacije enzima su kovalentno vezivanje, obuhvatanje ili mikroenkapsulacija i umrežavanje (slika 21).

I.3.2.1.1 Kovalentna imobilizacija enzima

Imobilizacija proteina metodama zasnovanim na formiranju kovalentnih veza spada među najčešće korišćene metode. Njihova prednost je u tome što se, zbog stabilne prirode veza formiranih između enzima i nosača, enzim ne oslobađa u rastvor prilikom upotrebe.

Međutim, da bi se postigao visok nivo vezane aktivnosti, aminokiselinski ostaci neophodni za katalitičku aktivnost ne smeju biti uključeni u kovalentnu vezu sa nosačem, a to se može pokazati kao težak zahtev za ispunjavanje u nekim slučajevima. Jednostavna procedura koja ponekad poboljšava prinos aktivnosti je izvođenje reakcije kuplovanja u prisustvu analoga supstrata. Kovalentne metode za imobilizaciju se koriste kada postoji strogi zahtev za odsustvom enzima u proizvodu.⁶³⁸ Osnovni principi koji kontrolišu tok kovalentnog spajanja na nosač su analogni onima koji se koriste za hemijsku modifikaciju proteina. Ova metoda imobilizacije (slika 21) uključuje formiranje kovalentne veze između enzima/ćelije i nosećeg materijala.⁶⁴⁸ Veza se normalno formira između funkcionalnih grupa prisutnih na površini nosača i funkcionalnih grupa koje pripadaju aminokiselinskim ostacima na površini enzima. Brojne funkcionalne grupe aminokiselina su pogodne za učešće u formiranju kovalentne veze.⁶⁴⁹ Najčešće korišćene reakcije uključuju bočne lance aminokiselina lizina ili arginina (ϵ -amino grupa), serina (hidroksilna grupa), cisteina (tiol grupa), asparaginske i glutaminske kiseline (karboksilna grupa).

Postoji mnogo reakcionih postupaka za spajanje enzima i nosača u kovalentnu vezu.⁶⁵⁰ Međutim, većina reakcija spada u sledeće kategorije:

- I. formiranje izourea veze
- II. formiranje diazo veze,
- III. formiranje peptidne veze,
- IV. reakcija alkilacije.

Važno je odabrati metodu koja neće inaktivirati enzim reagovanjem sa aminokiselinama na aktivnom mestu. Dakle, ako enzim koristi karboksilnu grupu na aktivnom mestu za učešće u katalizi, mudro je izabrati reakciju koja uključuje amino grupe za kovalentnu vezu sa nosačem.

U osnovi, dva koraka su ključna za kovalentno vezivanje enzima za noseće materijale. Prvo, funkcionalne grupe na površini nosača se aktiviraju specifičnim reagensom, a drugo, enzim se dodaje pri reakciji kuplovanja da bi se formirala kovalentna veza sa površinom nosača. Razvijene su različite reakcije u zavisnosti od funkcionalnih grupa dostupnih na nosaču.⁶⁵⁰

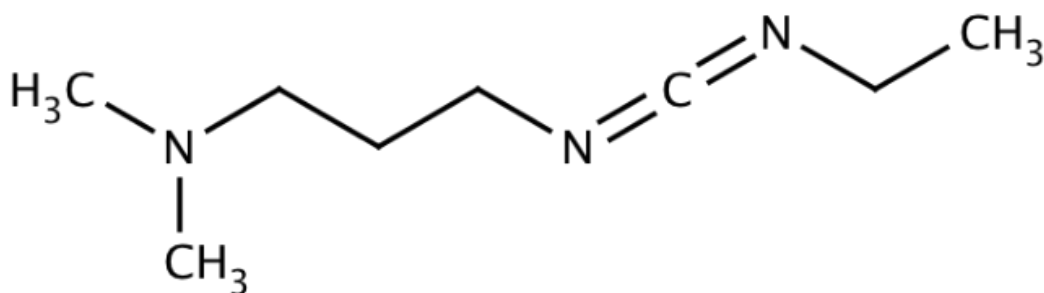
Procesi aktivacije su generalno dizajnirani da generišu elektrofilne grupe na nosaču koje u koraku kuplovanja reaguju sa jakim nukleofilima na proteinima, kao što su amino ($-NH_2$) funkcionalne grupe određenih aminokiselina na površini enzima, da bi se formirala kovalentna veza. Cijanogen bromid (CNBr) se često koristi za aktiviranje hidroksilnih funkcionalnih grupa u polisaharidnim nosačima. U ovoj metodi, enzim i nosač su spojeni preko izourea veze. U slučaju karbodiimidne aktivacije, materijal nosača treba da ima karboksilnu ($-COOH$) funkcionalnu grupu, a enzim i nosač su povezani peptidnom vezom. Ako nosač sadrži aromatičnu amino funkcionalnu grupu, može se diazotovati korišćenjem azotaste kiseline. Naknadno dodavanje enzima dovodi do formiranja diazo veze između reaktivne diazo grupe na nosaču i strukture prstena aromatične amino kiseline, kao što je tirozin.

Važno je prepoznati da nijedna metoda imobilizacije 1 nije ograničena na određenu vrstu nosača i da je moguć izuzetno veliki broj permutacija između metoda imobilizacije i nosača. Ovo je omogućeno hemijskom modifikacijom normalnih funkcionalnih grupa na nosaču kako bi se proizveo niz derivata koji sadrže različite funkcionalne grupe. Npr., normalna funkcionalna grupa u celulozi je hidroksilna grupa, a njena hemijska modifikacija je proizvela niz derivata celuloze, kao što su AE-celuloza (aminoetil), CM-celuloza (karboksimetil) i DEAE-celuloza (dietilaminoetil). Dakle, hemijska modifikacija povećava opseg metoda imobilizacije koje se mogu koristiti za dati materijal za podršku. Derivatizacija se takođe može koristiti za modifikovanje naelektrisanja na površini nosača da bi se poboljšalo vezivanje biokatalizatora.⁶⁴⁹ Postoji mnogo komercijalno dostupnih nosača za imobilizaciju; najbolji izbor u svakom slučaju zahteva razmatranje nekih relevantnih osobina katalizatora i nameravane upotrebe. Međutim, obično je potrebno isprobati više od jednog pristupa, a zatim prilagoditi metod specifičnim okolnostima.⁶⁵⁰

Kovalentne reakcije koje se obično koriste, dovode do enzima vezanih za nosač preko, npr. amidne, etarske, tioetarske ili karbamatne veze. Dakle, enzim je snažno vezan za nosač i u mnogim slučajevima je takođe stabilizovan. Međutim, zbog kovalentne prirode veze, nosač se mora odbaciti zajedno sa enzimom kada se enzimska aktivnost smanji. Prednost dobijanja nepropusnog vezivanja između enzima i nosača kao rezultat ovih reakcija može biti delimično nadoknađena cenom, u smislu generalno niskog prinosa imobilizovane aktivnosti i nepovratnog karaktera ovog vezivanja. Enzimi vezani kovalentno disulfidnim vezama za čvrste nosače predstavljaju jedan od načina da se izbegne ovaj problem.⁶³⁸

I.3.2.1.1.1 Aktivacija enzima EDAC-om

Neophodno je prethodno izvršiti aktivaciju nosača ili enzima, kako bi se enzim uspešno kovalentno vezao za nosač. 1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etil-karbodiimid (EDAC) se koristio kao aktivirajući agens (slika 22). EDAC stupa u interakciju sa karboksilnim (-COOH) grupama na molekulu alginata, prevodeći ih u reaktivniji oblik i na taj način aktivira čestice alginata i MAB. Ovako aktivirane čestice mogu da stupe u interakciju sa amino (-NH₂) grupama na molekulu enzima prilikom čega dolazi do stvaranja peptidne (amidne) veze između molekula enzima i nosača, a enzim biva kovalentno vezan za nosač. Peptidna veza se uspostavlja između karboksilne grupe koja je prisutna na nosaču i amino grupe koja je prisutna na molekulu enzima stvarajući kovalentnu vezu, a EDAC se reciklira (ne troši se u reakciji).⁶⁵¹



Slika 22. Hemijska struktura EDAC-a (C₈H₁₇N₃)

I.3.2.1.2 Zarobljavanje enzima i umrežavanje pri imobilizaciji

Metoda zarobljavanja se zasniva na inkluziji enzima unutar polimerne mreže koja dozvoljava supstratu i proizvodima da prođu kroz njih, ali zadržava enzim.⁶⁵² Imobilizacija obuhvatanjem (slika 21) se razlikuje od adsorpcije i kovalentnog vezivanja po tome što su molekuli enzima slobodni u rastvoru, ali ograničeni u kretanju rešetkastom strukturom gela.⁶⁵² Poroznost rešetke gela se kontroliše kako bi se osiguralo da je struktura dovoljno čvrsta da spreči curenje enzima ili ćelija, a da u isto vreme omogući slobodno kretanje supstrata i proizvoda. Neizbežno, podloga će delovati kao prepreka za prenos mase, iako ovo može imati ozbiljne implikacije na kinetiku reakcije, može imati koristi, jer su štetne ćelije, proteini i enzimi sprečeni u interakciji sa imobilisanim biokatalizatorom.⁶⁵³

Postoji nekoliko glavnih metoda zarobljavanja enzima:

- I. jonotropno želiranje makromolekula sa multivalentnim katjonima (npr. alginat),
- II. želiranje izazvano temperaturom (npr. agaroz, želatin),
- III. organska polimerizacija hemijskom/fotohemijskom reakcijom (npr. poliakrilamid),
- IV. taloženje iz rastvarača koji se ne meša (npr. polistiren).

Zarobljavanje enzima se može postići mešanjem enzima sa polijonskim polimernim materijalom i zatim umrežavanjem polimera sa multivalentnim katjonima u reakciji jonske razmene, da bi se formirala strukturna mreža koja hvata enzime (jonotropno želiranje). Promena temperature je jednostavna metoda želiranja faznim prelazom, korišćenjem 1-4% rastvora agaroze ili želatina. Međutim, formirani gelovi su meki i nestabilni. Alternativno, moguće je mešati enzim sa monomerima, koji se zatim polimerizuju da bi se formirala polimerna mreža, hvatajući enzim u prostoru između rešetaka. Poslednja metoda se više koristi i za formiranje hidrofilnih kopolimera dostupan je veliki broj akrilnih monomera. Npr. akrilamidni monomer je polimerizovan da bi se formirao poliakrilamid, a metilakrilat polimerizovanjem formira polimetakrilat. Pored monomera, agens za umrežavanje se dodaje tokom polimerizacije kako bi se formirale mreže između polimernih lanaca i pomoglo u stvaranju trodimenzionalne mreže. Veličina pora gela i njegova mehanička svojstva određuju se relativnim količinama monomera i agensa za umrežavanje. Stoga je moguće varirati ove koncentracije da bi se uticalo na strukturu mreže. Formirani polimer se može razbiti na čestice željene veličine, ili se polimerizacija može organizovati tako da se formiraju čestice definisane veličine. Precipitacija se javlja razdvajanjem faza, a ne hemijskom reakcijom, ali dovodi enzime u kontakt sa organskim rastvaračem koji se meša sa vodom, a većina enzima nije tolerantna na takve rastvarače. Dakle, ova metoda je ograničena na visoko stabilne/prethodno stabilizovane enzime. Postoje različiti postupci obuhvatanja enzima kao što su obuhvatanje u gelu ili obuhvatanje vlakana i mikroinkapsulacija.⁶⁵⁴⁻⁶⁵⁶ Praktična upotreba ovih metoda je ograničena ograničenjima prenosa mase kroz membrane ili gelove.

I.3.2.1.3 Inkapsulacija

Inkapsulacija enzima može se postići obmotavanjem bioloških komponenti unutar različitih oblika polupropusnih membrana.^{649,657,658} Slično je zarobljavanju po tome što su enzimi slobodni u rastvoru, ali ograničeni u prostoru. Veliki proteini ili enzimi ne mogu da prođu iz ili u kapsulu, ali mali supstrati i proizvodi mogu slobodno da prođu kroz

polupropusnu membranu. Mnogi materijali su korišćeni za izradu mikrokapsula prečnika 10-100 μm ; npr. najlon i nitrat celuloze su se pokazali popularnim. Problemi sa difuzijom su izraženiji i mogu dovesti do pucanja membrane ako se proizvodi reakcije brzo akumuliraju. Sledeći problem je u tome što imobilisani enzimi mogu imati gustinu sličnu osnovnom rastvoru sa posledničnim problemima u konfiguraciji reaktora, dinamici protoka itd. Takođe je moguće koristiti biološke ćelije kao kapsule, a značajan primer za to je upotreba eritrocita (crvenih krvnih zrnaca). Membrana eritrocita je normalno propusna samo za male molekule. Međutim, kada se eritrociti stave u hipotonični rastvor, oni nabubre, rastežući ćelijsku membranu i značajno povećavajući permeabilnost. U ovom stanju, proteini eritrocita difunduju van ćelije, a enzimi mogu difundovati u ćeliju. Vraćanje nabubrelih eritrocita u izotonični rastvor omogućava ćelijskoj membrani da se vrati u svoje normalno stanje, a enzimi zarobljeni unutar ćelije ne isticu. Izrazita prednost ove metode je koimobilizacija. Ćelije i/ili enzimi mogu biti imobilisani u bilo kojoj željenoj kombinaciji, kako bi imali specifičnu primenu.⁶⁴⁹

I.3.3 Nosači za imobilizaciju enzima

Osobine imobilisanih enzimskih sistema su regulisane osobinama enzima i materijala nosača. Interakcija između njih obezbeđuje imobilisani enzim sa specifičnim hemijskim, bi-ohemijskim, mehaničkim i kinetičkim svojstvima. Razvijene su različite tehnike imobilizacije, uključujući adsorpciju, kovalentno vezivanje, obuhvatanje, inkapsulaciju i umrežavanje.⁶⁵⁹ One se razlikuju po vrsti i karakteru formiranih interakcija i po obliku i vrsti upotrebljenih pomoćnih materijala. Izbor najprikladnije metode imobilizacije i materijala za nosač u velikoj meri zavisi od vrste i uslova katalitičkog procesa, kao i od tipa enzima.⁴⁶ Međutim, treba naglasiti da je izbor materijala za nosač najvažniji izazov zbog velikog uticaja koji nosač može imati na svojstva biokatalitičkog sistema.

Kao nosač za imobilizaciju enzima može se koristiti veoma širok spektar materijala različitog porekla. Nosač treba da zaštiti strukturu enzima od teških reakcionih uslova i tako pomogne imobilisanom enzimu da zadrži visoku katalitičku aktivnost.⁶³⁶ Međutim, postoje neka ograničenja u ovoj oblasti, jer nosač ne sme imati negativan uticaj na strukturu enzima i ne bi trebalo da poremeti enzim više nego što je potrebno stvaranjem stabilnih interakcija enzim-nosač. Pored toga, trebalo bi da postoji afinitet između funkcionalnih grupa dva materijala kako bi se omogućilo formiranje ovih interakcija enzim-nosač i efikasno vezivanje enzima za nosač. Ovo je posebno važno u slučaju kovalentne imobilizacije.⁶⁶⁰ Nosač treba da izloži aktivna mesta katalizatora radi lakšeg vezivanja molekula supstrata i smanjenja difuzionih ograničenja supstrata i proizvoda.⁶⁶¹

Glavne karakteristike nosača za efikasnu imobilizaciju enzima su:

- mehanička stabilnost,
- termička stabilnost,
- veličina i oblik čestice,
- mogućnost regeneracije i recikliranja,
- dostupnost i cena,
- visok afinitet prema vezanim enzimima,
- prisustvo reaktivnih grupa za vezivanje sa enzimom,

- rastvorljivost,
- hidrofilnost, hidrofobnost i
- poroznost.

Ipak, treba imati na umu da je odgovarajući izbor nosača direktno povezan sa vrstom enzima i procesom u kome će se biokatalitički sistem koristiti. Materijali koji se koriste kao nosači za imobilizaciju enzima klasifikovani su kao klasični materijali koji su najčešće korišćeni i novi materijali koji nude posebna poželjna svojstva. Novi materijali se takođe trenutno koriste za imobilizaciju i ne samo da omogućavaju efikasno vezivanje enzima, već i povećavaju primenljivost dobijenih biokatalitičkih sistema. Ovi materijali se generalno mogu podeliti na organske, neorganske i hibridne ili kompozitne.⁶¹⁹

I.3.3.1 Klasični nosači za imobilizaciju enzima

Od početka rada na razvoju tehnika imobilizacije, postojala je potreba da se definiše grupa materijala za koje se mogu vezati enzimi. Generalno, traženi su materijali koji nude visoku stabilnost, dostupnost, relativno nisku cenu i visok afinitet prema vezanim enzimima. Širok spektar materijala, kako neorganskog tako i organskog porekla, ocenjen je kao efikasna podrška za biokatalizatore i klasifikovani su kao klasični materijali (slika 23). Iako se klasični materijali ređe primenjuju poslednjih godina, oni ostaju važna grupa materijala koji se koriste za imobilizaciju enzima.⁶¹⁹



Slika 23. Odabrani primeri klasičnih materijala neorganskog i organskog porekla koji se koriste za imobilizaciju enzima⁶⁶³

Neorganske materijali za nosače, kao što su neorganski oksidi, minerali ili materijali na bazi ugljenika, karakteriše uglavnom dobra termička i hemijska stabilnost, kao i odlična mehanička otpornost. Ovi materijali su takođe poznati po svojim dobrim sorpcionim osobinama koje su rezultat njihove dobro razvijene porozne strukture i obično velike površine koja obezbeđuje brojna kontaktna mesta za efikasnu imobilizaciju enzima. Nasuprot tome, sintetički polimeri i biopolimeri, takođe grupisani pod klasičnim materijalima, nude brojne funkcionalne grupe koje olakšavaju čak i kovalentno vezivanje enzima bez agenasa za umrežavanje. Pored toga, biopolimere obično karakteriše visok afinitet za proteine kao i biokompatibilnost koja ograničava negativne efekte nosača na strukturu enzima. Štaviše, bez obzira na poreklo, klasični materijali za imobilizaciju enzima su obično rasprostranjeni

u prirodi (minerali, biopolimeri) ili se lako sintetišu (neorganski oksidi, sintetički polimeri) što ih čini relativno jeftinim. Ove činjenice znače da ovi materijali i dalje igraju važnu ulogu kao nosači za imobilizaciju enzima.⁶⁶²

I.3.3.1.1 Organski materijali

Dobro je poznato da ne postoji univerzalni materijal za nosač pogodan za sve enzime i sve njihove primene. Neorganski nosači imaju određena ograničenja, kao što su ograničena biokompatibilnost, manji afinitet prema biomolekulima i smanjene mogućnosti stvaranja različitih geometrijskih oblika. Štaviše, sredstvo za umrežavanje kao što je glutaraldehid obično je potrebno za stvaranje kovalentne veze između enzima i neorganskog nosača. Iz ovih razloga, neki materijali organskog porekla se takođe koriste za imobilizaciju različitih enzima pod različitim protokolima imobilizacije. Generalno, organski materijali nosača za imobilizaciju mogu se podeliti u dve grupe:

- sintetički materijali (uglavnom polimeri) i
- obnovljivi materijali dobijeni iz prirodnih izvora (biopolimeri).

Obe grupe su bile široko korišćene od početka imobilizacije enzima za vezivanje različitih vrsta biokatalizatora.⁶⁶³

I.3.3.1.1.1 Biopolimeri

Alternativa upotrebi sintetičkih polimera kao nosača za imobilizaciju enzime je upotreba biopolimera (polimeri prirodnog porekla). Biopolimeri uključuju ugljene hidrate, ali i proteine kao što su albumin i želatin.⁶⁶⁴ Materijali kao što su kolagen, celuloza, keratini i karagenan, kao i hitin, hitozan i alginat su primeri biopolimera koji se koriste za imobilizaciju.^{622,665–667} Biopolimeri poseduju jedinstven skup svojstava, od biorazgradljivosti do bezopasnih proizvoda, biokompatibilnosti i netoksičnosti, do izuzetnog afiniteta prema proteinima, što ih čini pogodnim nosačima za enzime.⁶⁶⁸ Njihovo prirodno poreklo i biokompatibilnost svodi na minimum njihov negativan uticaj na strukturu i svojstva enzima i tako imobilisani proteini zadržavaju visoku katalitičku aktivnost. Štaviše, dostupnost reaktivnih funkcionalnih grupa u njihovoj strukturi (uglavnom hidroksilnih, amino i karbonilnih grupa) omogućava direktnu reakciju između enzima i nosača, olakšavajući modifikaciju njihove površine.⁶⁶⁹ Pre svega, međutim, ovi materijali su obnovljivi i lako ih je nabaviti; u mnogim slučajevima su nusproizvodi različitih industrija, što ih čini jeftinim i smanjuje troškove povezane sa procesom imobilizacije.⁶⁷⁰ Biopolimeri se koriste za imobilizaciju adsorpcijom i kovalentnim vezivanjem; međutim, njihova sposobnost da kreiraju različite geometrijske konfiguracije i sklonost formiranju gela znače da se takođe koriste za imobilizaciju inkapsulacijom i obuhvatanjem enzima.

Hitozan se na osnovu istraživanja literature može smatrati najčešće korišćenim biopolimerom za imobilizaciju enzima. Hitozan se može primeniti u različitim oblicima. Npr. Ši (*Shi*) sa saradnicima je koristio mikrosfere hitozana umrežene glutaraldehydom za imobilizaciju nukleaze, koja je važan enzim za genetski inženjering.⁶⁷¹ U drugim studijama, izomera glukoze je adsorbovana u makroporoznim česticama hitozana i alginata pripremljenim

heliranjem sa različitim metalnim jonima.^{672,673} Kako su izvestili Kim (*Kim*) i saradnici, nanokristali celuloze dobijeni od celuloze pamučnog lintera mogu se koristiti za imobilizaciju nespecifičnim adsorpcionim interakcijama *Candida rugosa* lipaze sa visokom efikasnošću punjenja, dok je lipaza imobilisana obuhvatanjem κ -karagenanskim hidrogelovima od strane Tumturka (*Tumturka*) i saradnika.^{674,675} Povrće i morski sušferi koje karakteriše otvorena vlaknasta mreža koja smanjuje difuziona ograničenja takođe su korišćeni kao nosači za imobilizaciju lipaza, uglavnom preko vodoničnih veza.^{676,677} Može se zaključiti da se biopolimeri mogu koristiti za imobilizaciju enzima koji pripadaju različitim katalitičkim klasama uz zadržavanje dobrih katalitičkih svojstava. Štaviše, proizvedeni biokatalitički sistemi nude poboljšanu termičku stabilnost i generalno su poznati po svojoj dobroj ponovnoj upotrebi.

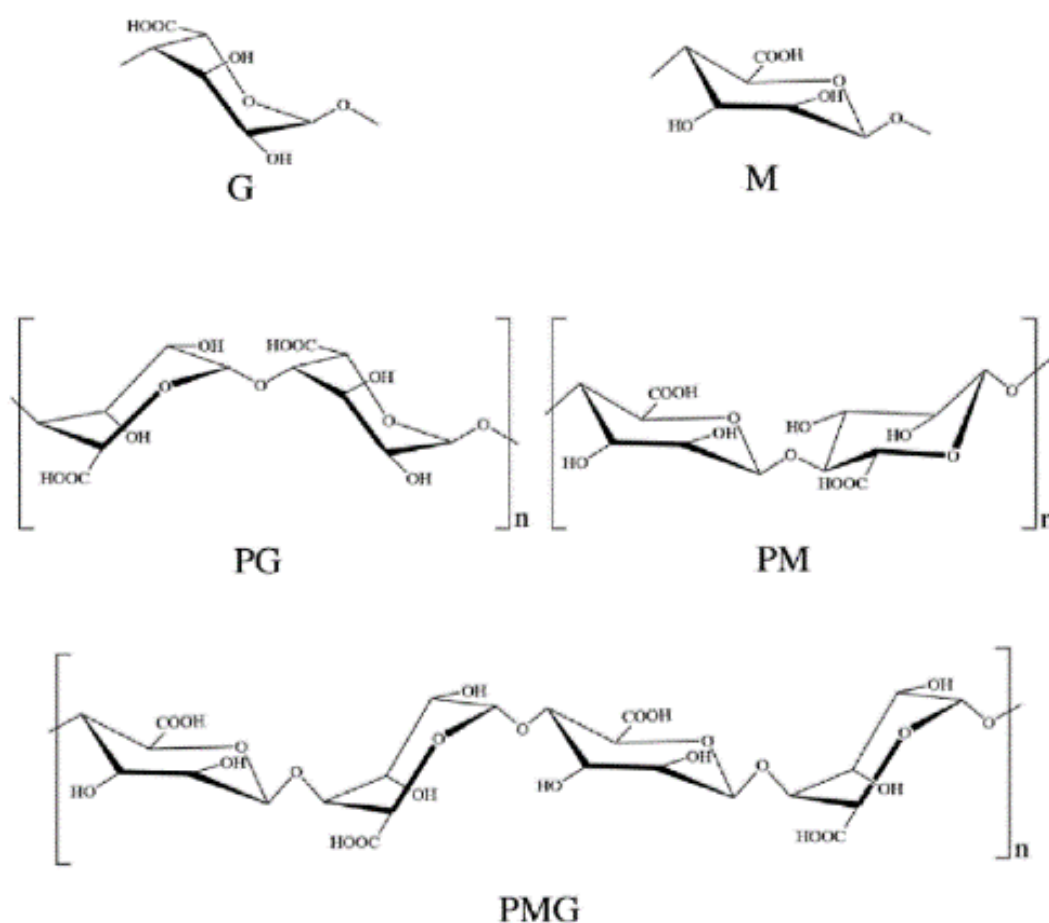
Posebnu pažnju treba posvetiti i alginatima. Njihove izuzetne sposobnosti za želiranje, uglavnom koristeći jone natrijuma ili kalcijuma za stvaranje gelova u kojima se mogu imobilisati jedan ili više enzima, znače da se ovi materijali uglavnom koriste za inkapsulaciju i obuhvatanje.⁶⁷⁸ Proizvodi su pokazali dobro zadržavanje katalitičke aktivnosti, ali je njihova ponovna upotreba bila loša zbog ispiranja enzima iz nosača. Npr. Betigeri (*Betigeri*) i No (*Neau*) su imobilisali lipazu u česticama kalcijum alginata obuhvatanjem, dok su Kočaturk (*Kocaturk*) i Jagar (*Iagar*) inkapsulirali polifenolnu oksidazu u čestice bakar-alginata i dobili visoke prinose imobilizacije.^{679,680} Kovalentno vezivanje različitih enzima za čestice kalcijum-alginata primenom hemije karbodiimida je opisano kao pogodna metoda za postizanje stabilizacije nekoliko enzima preko tzv. Višetačkastog kovalentnog vezivanja kao što su β -galaktozidaza, acetilholinesteraza, α -amilaza i drugi.⁵⁸⁻⁶⁰ Iako enzimi kovalentno vezani za alginatne čestice nude neke posebno atraktivne prednosti za mnoge biološke primene, koliko nam je poznato, u literaturi ne postoje studije koje se odnose na kovalentnu imobilizaciju alkalaze na alginatnim mikronskim- ili submikronskim-česticama. Generalno, kovalentna imobilizacija proteaza i njihova primena za katalizu hidrolitičkih reakcija u stvarnim sistemima hrane su istraživani u daleko manjoj meri od aplikacija koje uključuju slobodne enzime.⁶¹

Agaroz je popularan izbor među biopolimerima za upotrebu u imobilizaciji enzima. Ovaj linearni heteropolisaharidni biopolimer se sastoji od jedinica β -D-galaktoze i 3,6-anhidro- α -L-galaktoze, povezanih β -1-4 glikozidnim i α -1-3 glikozidnim vezama.⁶⁸¹ Kao i alginati, agaroz takođe ispoljava veliku sposobnost želiranja koje se može javiti na temperaturama rastvora agaroze ispod 35 °C, bez dodavanja bilo kakvih jona i rezultira formiranjem visoko uređenih stabilnih i krutih struktura.⁶⁸² Vredi napomenuti da 3D arhitektura ovog hidrofilnog materijala ostaje gotovo nepromenjena u prisustvu različitih organskih rastvarača i da se u takvim uslovima ne skuplja i ne bubri.⁶⁴⁸ Sposobnost agaroznog gela da formira različite oblike, kao što su sfere, kapsule ili vlakna, dovela je do toga da je ovaj organski potporni materijal od velikog interesa za industrijsku primenu. Npr. Prakaš (*Prakash*) i Jaisval (*Jaisval*) su koristili čestice agaroze za jednostavno fizičko hvatanje termostabilne α -amilaze. Praktična primena rezultujućeg biokatalitičkog sistema je testirana za uklanjanje mrlja od skroba sa odeće i utvrđeno je da je ponovna upotreba enzima imobilisanog agarozom moguća do pet ciklusa.⁶⁸³ U drugoj studiji, umreženi agarozni nosač sa aktiviranim aldehidnim grupama je primenjen za višetačkasto kovalentno vezivanje komercijalnog enzima Depol™ 333MDP (β -1,4-endoksilanaza). Uočena je visoka efikasnost imobilizacije

od preko 85% i imobilisani enzim je pokazao značajno poboljšanje termičke stabilnosti u poređenju sa slobodnim proteinom.⁶⁸⁴

I.3.4 ALGINAT

Alginat, otkriven 1880-ih, je linearni polisaharid koji proizvode smeđe alge i bakterije.^{685–687} To nije samo biopolimer već i polielektrolit koji se smatra netoksičnim, biokompatibilnim, biorazgradivim i neimunogenim. Alginat je anjonski kopolimer, a njegova struktura je prikazana na slici 24, koja uključuje β -D-manuronsku kiselinu (M) i α -L-guluronsku kiselinu (G), povezane 1,4-glikozidnim vezama.^{688,689}



Slika 24. Struktura alginata. (M) β -D-manuronska kiselina; (G) α -L-guluronska kiselina; (PG) poliguluronska kiselina; (PM) polimanuronska kiselina i (PMG) heteropolimerni regioni sa smešom ostataka PM-PG⁶⁸⁸

Raspoređen je u nepravilnom blokovskom šablonu različitih proporcija GG, MG i MM blokova. Na fiziko-hemijske osobine alginata kritično utiču odnos M/G i dužina svakog bloka.⁶⁹⁰ MM blokovi formiraju β -1,4-glikozidnu vezu, čineći da deo M bloka predstavlja linearnu fleksibilnu strukturu, dok GG blokovi imaju α -1,4-glikozidne veze sa prostornim sternim smetnjama oko karboksilnih grupa. Iz tog razloga, segment G-bloka

obezbeđuje savijenu i krutu strukturnu konformaciju koja je odgovorna za značajnu krutost molekularnog lanca.⁶⁹⁰

Poznato je da alginat formira hidrogelove u prisustvu dvovalentnih katjona. Sa dvovalentnim katjonima, posebno Ca^{2+} , alginat može formirati mrežu gela. Ove karakteristike omogućavaju da se ovaj polisaharid koristi za kontrolu oslobađanja određenih sastojaka hrane, bioaktivnih jedinjenja i farmaceutskih materijala za različite proizvode.⁶⁹¹

Alginat je opšti naziv za soli alkalnih metala rastvorljivih u vodi.⁶⁹² Alginat je glavni sastojak ćelijskog zida smeđih algi (uglavnom algi *Sargassum* i *Kelp*, slika 25).

Zauzima oko 40% suve mase algi.⁶⁹⁰ Alginat se uglavnom ekstrahuje na osnovu njegove visoke rastvorljivosti u alkalnom rastvoru i niske rastvorljivosti u vodi. Rastvor natrijum karbonata se koristi za rastvaranje alginata iz ćelijskog zida algi, a zatim se talože podešavanjem pH vrednosti kiselinom.⁶⁹³ Pošto u braon alginatu nema modifikacione grupe kao što je sulfat grupa, nema potrebe da se razmatra problem opadanja modifikacionih grupa u procesu kiselog taloženja.^{692,693}



Slika 25. Smeđe alge: (a) *Kelp* i (b) *Sargassum*

I.3.4.1 Struktura, derivatizacija i analiza alginata

Struktura alginata je ilustrovana na slici 24, gde se nalaze blokovi ostataka duž lanca. Postoje homopolimerni regioni poliguluronske kiseline (PG) i polimanuronske kiseline (PM), odvojeni heteropolimernim regionima sa smešom ostataka PM-PG (PMG).

Različite smeđe alge proizvode različite proporcije i redosled M i G ostataka, koji utiču na molekulsku težinu i fizička svojstva alginata.⁶⁹¹ Ove strukture u alginatu su rezultat jedinstvenog biosintetskog puta u kome se G ostaci generišu iz prethodno formiranih polimera manuronske kiseline pomoću porodice izoenzima sa aktivnošću C-5 epimeraze.⁶⁹⁴⁻⁶⁹⁶

PM i PG se mogu razdvojiti hidrolizom alginata sa hlorovodoničnom kiselinom (HCl) pri pH vrednosti 2,85. Pri ovoj pH vrednosti, rastvorljivi deo sadrži 80-90% M ostataka, a nerastvorni talog sadrži 80-90% G ostataka.⁶⁹³ Sadržaj G u *Sargassum*-u je veći, dok je sadržaj M u *Kelp*-u veći. Odnos M/G u alginatu nije fiksiran. Čak i za iste morske alge, proporcija će se menjati sa različitim godinama rasta, sezonama branja i lokacijama.⁶⁹⁷

Za primarnu strukturu, M i G se razlikuju samo po položaju karboksilne grupe na mestu C5, ali upravo zbog ove male razlike imaju značajne razlike u prostornoj strukturi i

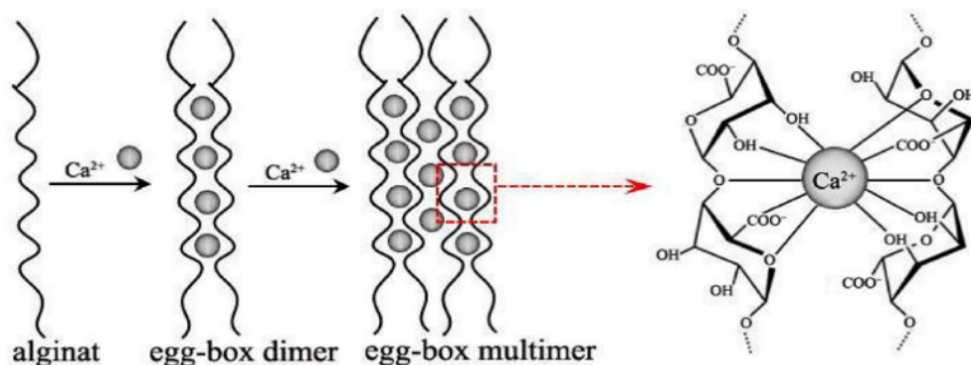
fizičkim svojstvima. Prostorna struktura PG pokazuje da se monosaharidne jedinice nalaze u 1C konformaciji stolice i da su stabilizovane vodoničnim vezama između intramolekularnih O2 i O6, dok je PM konformacija čamca i stabilizovana vodoničnim vezama između intramolekularnih O2 i O5, što dovodi do presavijenih i krutih konformacija PG i linearnu, fleksibilnu i ravnu konformaciju PM.⁶⁹⁸ Zbog toga, visok sadržaj G obezbeđuje veću čvrstoću za alginat od visokog sadržaja M. Pored toga, ove strukturne razlike dovode do velikih razlika u otpornosti na kiselu hidrolizu fragmenata PM, PG i PMG. PMG se lako hidrolizuje, dok se PM i PG ne hidrolizuju lako, a otpornost PG na kiselu hidrolizu je očigledno jača od otpornosti PM.⁶⁹³

Alginat je vrsta hidrofilnog polisaharida, koji se može modifikovati u amfifilne ili hidrofobne molekule izvođenjem hidroksilnih i karboksilnih grupa. Generalno, derivatizacija alginata se dešava na poziciji -OH (C-2 i C-3) ili -COOH (C-6). Modifikacija karboksilne grupe u C6 poziciji alginata se obično odvija kroz esterifikaciju ili amino reakciju za uvođenje dugih alkil grupa ili masnih kiselina, zbog čega alginat postaje amfifilni molekul.^{699,700} S druge strane, hidroksilna grupa se može modifikovati sulfacijom, fosforilacijom i selenizacijom da bi se poboljšala bioaktivnost alginata.^{688,701-707} Zbog distribucije velikog broja hidroksilnih i karboksilnih grupa u glavnom lancu, alginat se može lako hemijski modifikovati kako bi se poboljšale njegove karakteristike. Iako je dosta posla urađeno na sintezi derivata alginata, još uvek postoji mnogo potencijalnih puteva za proučavanje. Alginat se široko koristi u industriji zbog svoje sposobnosti da gelira sa jonima kalcijuma; međutim, na ovo svojstvo snažno utiče i njegov sastav uronske kiseline, odnosno odnos M/G.⁷⁰⁸ U međuvremenu, primena derivata natrijum-alginata u različitim oblastima i dalje ima velike perspektivu.

I.3.4.2 Izvori ekstrakcije alginata

Alginat, linearni i anjonski polisaharid u prirodnom izobilju, obično se dobija iz ćelijskog zida smeđih morskih algi koje pripadaju klasi *phaeophyceae*, uključujući *ascophillum nodosum*, *laminaria hiperborea*, *laminaria digitata*, *laminaria japonica* i *microcistis pirif*, mnogi sojevi bakterija, uključujući *acetobacter* i *pseudomonas spp*.^{709,710} Iako se može stvoriti od bakterijskog porekla, komercijalno je dostupan iz algi u obliku soli natrijum-alginata.⁷¹⁰

Divalentni katjoni, npr. Ba^{2+} i Ca^{2+} , mogu brzo da konstruišu sisteme „kutija za jaja” (egg-box) sa G blokom za izgradnju alginatnih hidrogelova postupkom želiranja (slika 26).⁷¹¹



Slika 26. Sistem „kutija za jaja” vezivanja kalcijumovog jona i G bloka alginata⁶⁵⁶

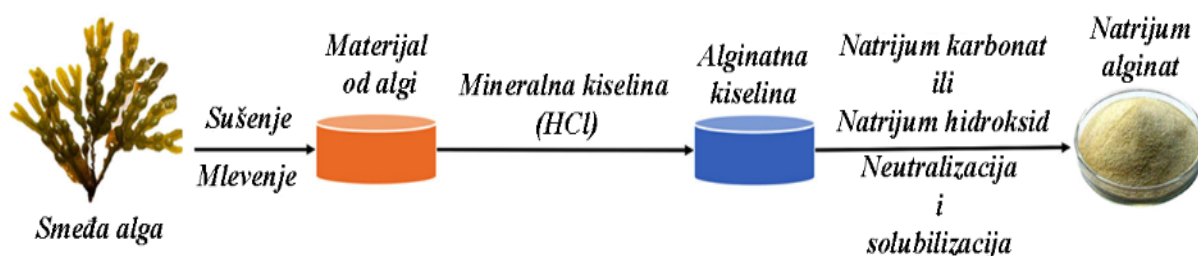
Povećanje molekulske mase i dužine G-bloka dramatično povećava mehanička svojstva alginat. Komercijalno dostupan alginat ima prosečnu molekulsku težinu koja varira između 32000 i 400000 g mol⁻¹. Rastvori alginata imaju maksimalnu viskoznost pri pH vrednostima 3,0–3,5, zbog vodonične veze karboksilnih grupa koje formiraju lanac alginata.⁷¹⁰

Iz smeđih morskih algi se sprovodi višestepeni proces ekstrakcije (slika 27), koji uključuje kiseli predtretman ekstrakta morskih algi, praćen vodenim alkalnim tretmanom (uglavnom natrijum hidroksidom) u kojem se koriste različiti oblici soli prirodnog alginata, modifikovanog u vodeno rastvorljiv natrijum-alginat.⁷¹²

Nakon toga, filtrirani ekstrakt se meša sa natrijumom ili kalcijum hloridom, dok se alginat taloži. Zatim se dodaje razređeni HCl i soli alginata se pretvaraju u alginsku kiselinu; nakon daljeg prečišćavanja i modifikacije, priprema se praškasti oblik natrijum-alginata rastvorljivog u vodi.

Proizvodnja alginata iz bakterijske biosinteze ima određene fizičke karakteristike i hemijske strukture različite od ekstrahovanog alginata iz smeđih morskih algi. Različiti koraci biosinteze alginata su:

- I. sinteza supstrata prekursora,
- II. transfer polimerizacije i citoplazmične membrana,
- III. transport i promena periplazmične membrane i konvekcija preko spoljašnje membrane.⁷¹³



Slika 27. Tehnika ekstrakcije natrijum-alginata iz braon morskih algi.⁷¹²

I.3.4.3 Osobine alginata

Alginatova biokompatibilnost, reološka svojstva, biorazgradljivost, marginalna toksičnost i hemijska raznovrsnost su istaknuti, zajedno sa njegovim izuzetnim karakteristikama u proizvodnji stabilnog hidrogela dodavanjem multivalentnih katjona, što čini alginat korisnim za isporuka lekova.^{691,714–717} Štaviše, alginati se mogu lako kreirati u različite polučvrste ili čvrste okvire u umerenom okruženju zbog njihove izuzetne sposobnosti prelaska sol-gel. Dakle, alginati se takođe često koriste kao supstance koje povećavaju viskozitet i kao zgusnivači u farmaceutskoj industriji.⁷¹⁷

Procenat tri vrste blokova (MM, GG i MG) određuje fizička svojstva alginata. Sa većim procentom G, alginati imaju bolje karakteristike želiranja, dok sa visokim sadržajem M, imaju veći viskozitet. Određivanje M/G odnosa je takođe bitno za alginat, oni sa visokim odnosom M/G proizvode elastične gelove, dok oni sa malim odnosom M/G proizvode lomljive gelove.^{718,719} Mehaničke karakteristike formulacije zasnovane na alginatu rigorozno se oslanjaju na koncentraciju G i M jedinica. Ako ostaci G prevaziđu M, formulacija pokazuje

veću mehaničku krutost. Tako je promenom sadržaja G i M moguće modifikovati modul elastičnosti.⁷²⁰

Alginat se podvrgava hidrataciji pri niskim pH vrednostima, što dovodi do razvoja „kiselih gelova“, koji su visoko viskozni. pH osetljivost alginata može se pripisati kiselim visećim grupama koje prihvataju ili oslobađaju protone zbog intermolekularnog vezivanja kada se pH vrednost promeni. Kao rezultat toga, molekuli vode ulaze u alginatnu matricu i bivaju fizički zarobljeni u njoj, ali su i dalje slobodni da migriraju. Ova sposobnost je neophodna u formiranju alginatnog gela za inkapsulaciju ćelija.⁷²¹ Sposobnost alginata da proizvodi dve različite klase u zavisnosti od pH vrednosti, odnosno kisel i gel pri niskom pH vrednostima i jonotropni gel pri višim pH vrednostima, čini ga jedinstvenim u poređenju sa neutralnim molekulima.⁷²²

Alginat ima odlične mukoadhezivne karakteristike zbog postojanja slobodnih karboksilnih grupa, omogućavajući biopolimeru da se veže za mucin putem vodonične veze, kao i elektrostatičkih interakcija. S druge strane, rastvorljivost alginata u velikoj meri zavisi od pH vrednosti okoline, pa shodno tome utiče na njihovu mukoadhezivnu osobinu, pošto samo jonizovane karboksilne grupe interaguju sa tkivima sluzokože. Štaviše, rastvorljivi alginat pomaže prodiranju rastvarača kroz polimernu matricu, formirajući visoko viskozni i kohezivni gel okvir za povećanje čvrstoće mukoadhezivne veze. Nasuprot tome, prekomerna i vanorbitalna hidratacija alginatne mreže u fiziološkom rastvoru mogla bi da umanjí mukoadhezivna svojstva usled slabljenja funkcionalnih grupa alginata dostupnih za interakcije mukoznog tkiva.^{723,724}

Alginati mogu biti prilagođeni da ispune zahteve bilo farmaceutske, bilo biomedicinske primene. Zbog njihovog visokog sadržaja vode, odloženog oslobađanja, povećane poroznosti i neimunogenosti, alginati su našli široku primenu u zavojima za rane.⁷²⁵ Kompoziti na bazi alginata nude veliku korist u bioremedijaciji uklanjanjem teških metala, boja, antibiotika i drugih zagađivača iz otpadnih voda.⁷²⁶ Na osnovu tipova umreživača i korišćenih pristupa umrežavanju, materijali u rasponu od malih lekovitih supstanci do makromolekularnih proteina mogu biti dizajnirani kao kontrolisani sistemi za isporuku lekova.⁷²⁷

Biokompatibilnost je još jedan vitalni faktor koji treba proučiti, jer je ekstrakcija alginata dobijenog iz prirode praćena postojanjem brojnih nečistoća koje mogu da izazovu alergijske reakcije. U stvari, imunološka reakcija je navedena u industrijskom alginatu; bez obzira na to, metoda višestepene ekstrakcije za eliminisanje metalnih nečistoća i polifenolnih supstanci dozvoljava dobijanje alginata, suštinski visoke čistoće, za upotrebu u biomedicini.⁷²⁸

Primećeno je i antioksidativno i antiinflamatorno dejstvo alginata. Primećeno je da alginatni oligosaharidi smanjuju proizvodnju azot-oksida, reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i eikosanoida, kao što su prostaglandin E2 i ciklooksigenaza COX-2. Stoga su izuzetne karakteristike alginata otključale vrata u široko rasprostranjenim aplikacijama za isporuku aktivnih sastojaka.⁷²⁹⁻⁷³¹

I.3.4.4 Metode formiranja hidrogela

U biomedicini, alginat se obično koristi u obliku hidrogela za zarastanje rana, isporuku lekova i za regeneraciju tkiva. Hidrogelovi se odnose na visoko umrežene 3D mreže

koje se sastoje od hidrofilnih polimera. Pošto su hidrogelovi fizički uporedivi sa biomakromolekularnim sastojcima, oni su često biokompatibilni i mogu se davati u telo neinvazivnom primenom. Hidrogelovi se obično formiraju od hidrofilnih polimera hemijskim i/ili fizičkim umrežavanjem; njihove fiziko-hemijske karakteristike zavise od vrste umrežavanja, gustine umrežavajućeg sredstva i hemijskog sastava i molekulske mase polimera.⁷³²

I.3.4.4.1 Jonsko umrežavanje

Kombinovanje vodene mešavine alginata sa reagensima za jonsko umrežavanje, posebno dvovalentnim katjonima (tj. Ca^{2+}), je najčešći pristup za pripremu hidrogelova. Smatra se da se dvovalentni katjoni jasno vezuju za guluronat blok polimera alginatnog lanaca, jer struktura guluronatnih blokova dozvoljava dobar stepen koordinacije dvovalentnih jona. Prikazano kao način umrežavanja u „kutiji za jaja” (slika 26), guluronatne jedinice jednog alginatnog lanca formiraju veze sa guluronatnim blokovima susednih polimernih lanaca, što kulminira u strukturi gela.⁷³³ Kalcijum-hlorid (CaCl_2) je uobičajeno korišćeno jonsko sredstvo za umrežavanje za alginatne. S obzirom na visoku rastvorljivost u vodenim rastvorima, često dovodi do brzog i loše regulisanog želiranja. Jedna opcija je upotreba pufera bogatog fosfatima (npr. natrijum heksametafosfat) za ograničavanje i kontrolu formiranja gela. Ovi molekuli fosfata u puferu se takmiče sa alginatnim karboksilnim grupama u interakciji sa katjonima kalcijuma, usporavajući tako proces želiranja.⁷³⁴

Kada se koriste dvovalentni katjoni, brzina želiranja igra važnu ulogu u uticaju na snagu i konsistenciju gela; veća brzina želiranja dovodi do homogenije strukture i poboljšanog mehaničkog karaktera.⁷³⁵ Temperatura na kojoj dolazi do želiranja utiče na brzinu želiranja i performanse materijala; tipična reaktivnost jonskih umrežavača (npr. Ca^{2+}) se smanjuje na nižim temperaturama i posledično otežava umrežavanje. Umreženi okvir koji rezultira je višeg reda, što poboljšava mehaničke karakteristike.⁷²⁰ Štaviše, određena hemijskim sastavom alginata, mehanička svojstva jonski umreženih alginatnih hidrogelova mogu se dramatično razlikovati. Npr. hidrogelovi napravljeni od velike koncentracije G blokova su tvrdi od onih napravljenih od alginata sa manjim brojem G blokova.⁷³⁶

I.3.4.4.2 Kovalentno umrežavanje

Kovalentno umrežavanje se intenzivno proučava kako bi se poboljšala stabilnost alginatnih hidrogelova za različite biomedicinske primene, pri čemu je njegova karboksilna grupa glavno mesto interakcija kovalentnog vezivanja. Unakrsne veze se raspadaju i reorganizuju na drugom mestu, a voda se uklanja iz hidrogela, a naprezanje primenjeno na njega se opušta, što dovodi do plastične deformacije. Iako migracija vode može izazvati relaksaciju napona u kovalentno umreženim gelovima, nesposobnost rastvaranja i ponovnog uspostavljanja formiranja veze izaziva značajan elastični deformitet. Kovalentni reagensi za umrežavanje, s druge strane, mogu biti opasni, a jedinjenja koja ne reaguju mogu zahtevati potpuno eliminaciju iz gelova.

Kovalentno umrežavanje alginata sa poli(etilen glikol)-diaminima promenljive molekulske težine je prvobitno proučavano u cilju stvaranja gelova sa različitim stepenom mehaničkog ponašanja. Kako je modul elastičnosti stalno rastao sa povećanjem gustine

umrežavanja ili masenog udela PEG-a u gelu, on je zatim opao pošto je molekulaska masa između poprečnih veza postala niža od one mekšeg PEG-a.⁷³⁷ Istraživanjem upotrebe različitih tipova agenasa za umrežavanje i regulisanjem gustine umrežavanja, kasnije je dokazano da se mehaničke karakteristike i bubrenje alginatnih hidrogelova mogu fino kontrolisati. Kao što se može zamisliti, hemijski sastav lanaca umrežavanja ima značajan uticaj na sposobnost bubrenja hidrogela. Dodavanje hidrofilnih jedinjenja za umrežavanje (npr. PEG) kao pratećeg makromolekula može racionalizovati gubitak hidrofilnosti hidrogela usled reakcije umrežavanja.⁷³⁸ Gao (*Gao*) sa saradnicima, koristio je dvostruko umreženi metakrilovani alginatni hidrogel da bi se prevazišla tendencija jonskih umreženih hidrogelova da budu skloni razgradnji u vodi. Kovalentne veze unutar mreže između metakrilatnih grupa sprečile su lom dvostruko umreženih lanaca hidrogelova pripremljenih pod UV zračenjem.⁷³⁹

I.3.4.5 Metode formiranja alginatnih čestica

Želiranje alginata se dešava putem jednog od dva mehanizma:

- spoljašnjeg želiranja, u kojem katjoni ulaze u alginatni sistem spolja, ili
- unutrašnjeg želiranja, u kojem katjoni izlaze iz alginatne strukture.

Čestice na bazi alginata različitih dimenzija mogu se proizvesti i kategorisati u različite kategorije:

- I. makročestice, kao što su one u tabletama lekova ili vitamina, mogu se videti golim okom;
- II. mikročestice značajno variraju u veličini od nekoliko mikrona do nekoliko milimetara; i
- III. nanočestice imaju prečnik u rasponu od 1 do 100 nm.⁷⁴⁰⁻⁷⁴³

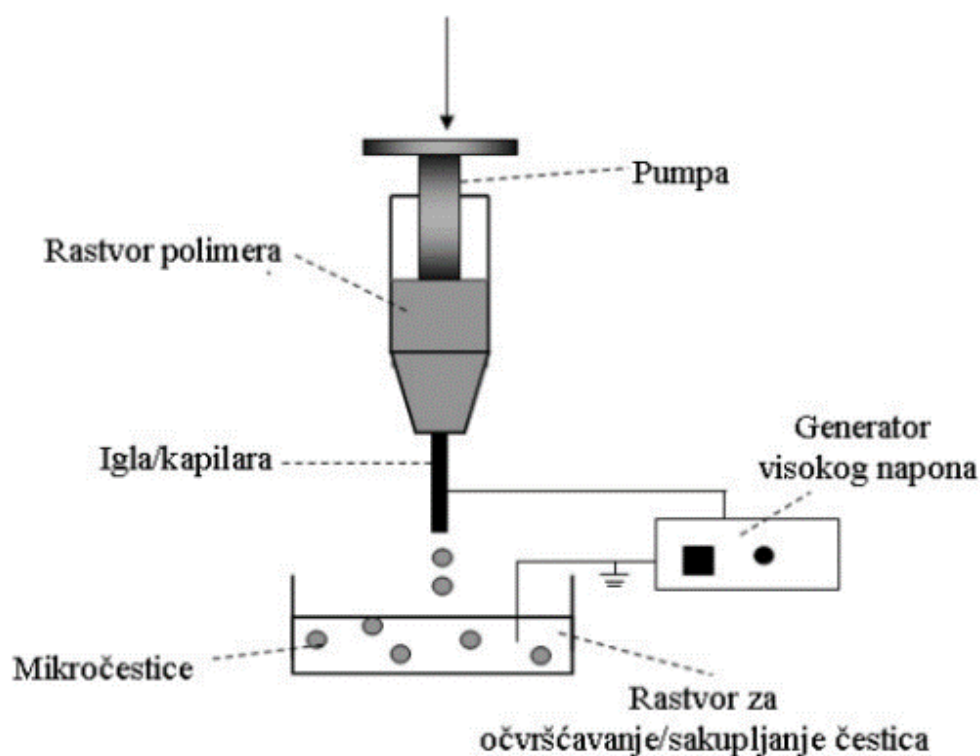
Najpopularnija metoda za proizvodnju alginatnih čestica je ekstruzija alginatnog rastvora kap po kap kroz iglu u katjonskom kupatilu. Spoljašnje želiranje se koristi za stvaranje alginatnih čestica prečnika između 500–5000 μm .⁷⁴⁴⁻⁷⁴⁶ Veličina alginatnih čestica se može smanjiti, a čestice koje imaju manju distribuciju veličine mogu se generisati na nekoliko načina u zavisnosti od ovog spoljašnjeg procesa želiranja, uključujući koaksijalni laminarni protok vazduha na mlaznici, elektrostatička polja i vibrirajuće mlaznice.⁷⁴⁶⁻⁷⁴⁹

Proces emulzifikacije se takođe može koristiti za pravljenje alginatnih čestica. Geliране sfere se prave emulzifikacijom rastvora alginata u organskoj fazi, nakon čega sledi želiranje kapljica alginatne emulzije. Spoljašnje želiranje kapljica alginatne emulzije dovodi do razdvajanja emulzije; međutim, sfere se agregiraju i kao rezultat se formiraju brojne kapljice emulzije ($V/U/V$).^{750,751} Membranska emulzifikacija može dati alginatne čestice sa prilično malom distribucijom veličine; međutim, proizvodnja čestica je ograničena na mikro opseg ($>1 \mu\text{m}$), a začepljenje membranskog sloja, kao i izvodljivost povećanja procesa, ostaje problem procesa. Mehanička emulgacija je najpraktičnija za industriju, jer proizvodi alginatne čestice svih veličina. Ipak, varijacije veličine proizvedenih čestica su relativno velike. Alginatne nanočestice se mogu napraviti na različite načine, iako se većina njih oslanja na kompleksiranje, bilo kroz interakcije sa jonima kao što je kalcijum ili negativno naelektrisanim polielektrolitima kao što je alginat-hitozan (CS) ili poli-L-lizin.^{752,753} Kompleksiranje se koristi i u drugim procesima, kao što je emulzifikacija, za jačanje nanočestica. U većini slučajeva,

kompleksiranje će biti potrebno kao dodatak za dobijanje čestica. Ugradnja kalcijum hlorida u rastvor alginata proizvodi nanoagregate; generalno, lek se obično dodaje pre ovog koraka. Veličina nanočestica u velikoj meri varira u zavisnosti od različitih faktora, kao što su proces proizvodnje, parametri pripreme, reagens za umrežavanje, molekulska masa alginata itd. Pošto je alginat negativno naelektrisan polielektrolit, nanočestice mogu biti u veličini od nekoliko desetina do nanometara, a zeta potencijal je generalno negativan.⁷⁵⁴

I.3.4.5.1 Elektrostatička ekstruzija

Elektrostatička ekstruzija koristi elektrostatičku silu koja deluje na površinu rastvora polimera na vrhu igle/kapilare da bi se generisao veliki broj kapljica i formirale mikročestice u rastvoru za očvršćavanje. Sastavni delovi aparature uključuju pumpu kojom se rastvor istiskuje iz rezervoara kroz kapilaru ili iglu od nerđajućeg čelika različitog prečnika (šema 1).⁷⁵⁵



Šema 1. Aparatura za elektrostatičku ekstruziju⁷⁵⁵

Elektrostatički potencijal primenjuje se između kapilare/igle i rastvora u kome se sakupljaju čestice, korišćenjem generatora visokog napona, dok se rastojanje između vrha kapilare/igle i rastvora za sakupljanje čestica može podesiti.

Ova metoda karakteriše se smanjenjem prečnika kapljica sa porastom primenjenog elektrostatičkog potencijala U , sve dok ne dostignu kritičnu vrednost U_c . Kada se dostigne kritični elektrostatički potencijal U_c , formira se nestabilan mlaz rastvora polimera koji se fragmentiše u veliki broj naelektrisanih kapljica. Ove kapljice se skupljaju u rastvoru za očvršćavanje, gde formiraju čestice.⁷⁵⁵

Proces formiranja kapljica viskoznog rastvora polimera pod uticajem elektrostatičkog polja se razlikuje od procesa formiranja kapljica tečnosti sa manjom viskoznošću (npr. vode) pod istom jačinom elektrostatičkog polja. Kod viskoznih rastvora dolazi do izduživanja tečnosti u obliku vlakna, pri čemu se vlakno sve više izdužuje i tanji. Na mestu najvećeg suženja dolazi do otkidanja polimera i formiranja manjih kapljica. Jače elektrostatičko polje dovodi do većeg izduživanja vlakna, što stvara dodatni oblak finih kapljica, naročito kod viskoznih rastvora. Distribucija veličine dobijenih kapljica može biti bimodalna ili multimodalna, što ukazuje na značaj podešavanja procesnih parametara za svaki sistem nosač-materijal za inkapsulaciju primenom elektrostatičke ekstruzije. Naime, kada se primeni elektrostatičko polje na viskozni rastvor polimera poput alginata, dolazi do izduživanja rastvora u obliku "vlakna" umesto formiranja kapljica kao u slučaju tečnosti niske viskoznosti poput vode. Ovo "vlakno" se dalje izdužuje i istanjuje što je veća viskoznost rastvora, a na mestu najvećeg suženja dolazi do otkidanja polimera i formiranja manjih kapljica. U jačem elektrostatičkom polju, "vlakno" se još više izdužuje i stvara dodatni "oblak" finih kapljica, što može dovesti do bimodalne ili multimodalne raspodele veličina kapljica. Ovo ukazuje na važnost pravilnog podešavanja procesnih parametara za svaki sistem nosač-materijal za inkapsulaciju pri primeni elektrostatičke ekstruzije.⁷⁵⁵

Elektrostatička ekstruzija je metoda kojom se mogu dobiti čestice veličine 100-1000 µm na jednostavan način, putem podešavanja procesnih parametara. Ovaj proces se odvija na sobnoj temperaturi i atmosferskom pritisku, što omogućava sterilne uslove rada. Ova tehnologija pokazala se izuzetno obučavajućom u farmaceutske i kozmetičke industrije, kao i u oblasti biotehnologije, gde su niske temperature neophodne za očuvanje stabilnosti termolabilnih materijala. Elektrostatička ekstruzija je jednostavna i precizna metoda koja ne zahteva veliku potrošnju energije, niti visoku cenu koštanja, a omogućava proizvodnju jedinstvenih i stabilnih proizvoda.⁷⁵⁵

Osim elektrostatičkog potencijala, još tri parametra su značajna za formiranje veličine čestica u procesu elektrostatičke ekstruzije: protok rastvora polimera, prečnik igle (kapilare) i geometrija ekstruzionog uređaja. Povećanje protoka uzrokuje veće čestice zbog povećanja količine površinski aktivnih molekula i povećanja površinskog napona. Smanjenje prečnika igle proizvodi manje čestice, ali veličina čestica takođe ovisi o karakteristikama materijala koji se inkapsulira i padu pritiska kroz iglu. Promena koncentracije rastvora alginata menja viskoznost i mehanizam formiranja kapljica, što utiče na veličinu formiranih čestica. Geometrija ekstruzionog uređaja igra važnu ulogu u formiranju alginatnih čestica, jer može promeniti uticaj drugih parametara kao što su protok rastvora polimera, prečnik igle i koncentracija rastvora alginata na veličinu formiranih čestica. Ova promena se dešava jer geometrija ekstruzionog uređaja utiče na količinu rastvora polimera koja prolazi kroz iglu i na brzinu kojom se rastvor polimera izbacuje iz igle. Stoga, promena geometrije ekstruzionog uređaja može promeniti interakciju površinski aktivnih molekula sa površinom kapljica i smanjiti ili povećati veličinu formiranih čestica. Proces formiranja čestica kroz elektrostatičku ekstruziju uključuje njihovo dalje očvršćavanje u rastvoru za želiranje, što značajno povećava broj faktora koji mogu uticati na finalne karakteristike i veličinu dobijenih čestica. Stoga, istraživanja u ovom području uključuju analizu uticaja različitih parametara, kao što su koncentracija i sastav rastvora alginata, kao i koncentracija dvovalentnih katjona potrebnih za želiranje, na fiziko-hemijske karakteristike formiranih čestica.⁷⁵⁵

Jedno od glavnih ograničenja šire primene tehnike elektrostatičke ekstruzije je da se visoko koncentrisani rastvori alginata (3 i 4% (*w/w*)) ne mogu procesirati kako bi se dobile mehanički čvrste alginatne čestice sa inkapsuliranim materijalom, koje bi bile pogodne za upotrebu u bioreaktorima pod visokim silama smicanja.⁷⁵⁵

Iako su pronađeni dokazi o elektrohemijским reakcijama tokom procesa elektrostatičke ekstruzije, većina autora smatra da materijal koji se inkapsulira (bilo da se radi o hemijskoj supstanci, biološkom materijalu ili živim ćelijama) ostaje nepromenjen tokom primene elektrostatičkog potencijala. Neki autori jednostavno zanemaruju ovaj efekat.⁷⁵⁵

I.3.4.5.2 Ultrazvučno raspršivanje

Ultrazvuk je zvuk visoke frekvencije koju ljudsko uho ne može registrovati, jer je iznad praga čujnosti od 20 kHz. Ova vrsta zvuka se koristi u medicini za ultrazvučnu dijagnostiku, kao i u hemiji zbog toga što ne reaguje s molekulima i ne uzrokuje hemijske promene zbog velike talasne dužine u odnosu na veličinu molekula. U biohemijском inženjerstvu i biotehnologiji proučavaju se aspekti primene ultrazvuka, jer pod određenim uslovima ultrazvučni talasi mogu pospešiti difuzioni transport između ćelija i okoline, što može poboljšati brzine reakcija i proizvodnju metabolita. U eksperimentalnom delu ovog rada koristi se uređaj poznat kao ultrazvučni generator, koji radi na principu ultrazvučnih talasa.⁷⁵⁶

Ultrazvučni generator, takođe poznat kao ultrazvučni raspršivač, je medicinski uređaj koji se koristi za pretvaranje tečnosti u aerosol, čime se omogućava lako disanje lekova i drugih supstanci u obliku sitnih čestica koje se lako udišu.

Pri opisivanju funkcionisanja ultrazvučnih generatora treba uzeti u obzir sledeće faktore:

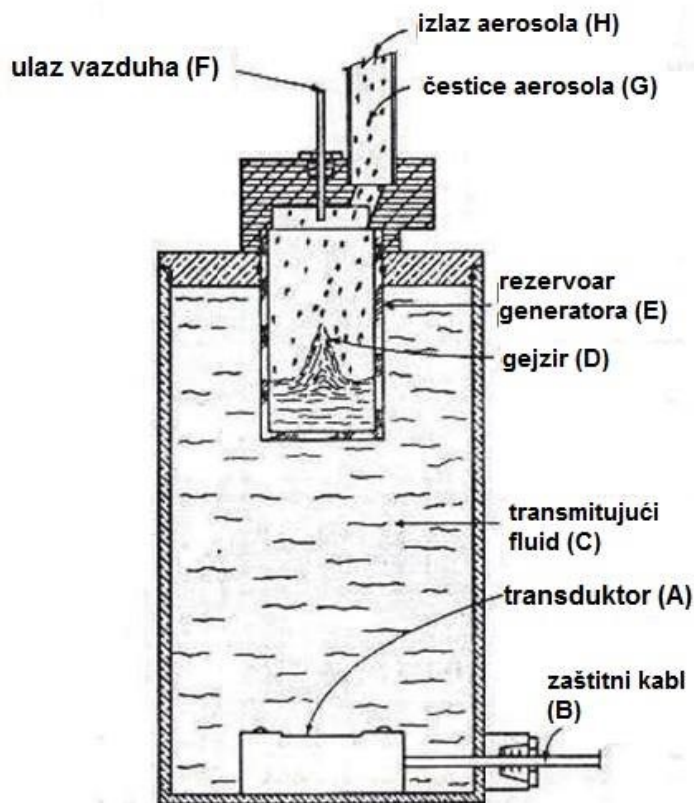
- brzinu na izlazu i koncentraciju upotrebljivog aerosola,
- zapreminsku brzinu vazduha,
- gubitke koji nastaju isparavanjem tečnosti i zavise od radne temperature,
- raspodelu veličine kapljica,
- zapreminu potrebne tečnosti za normalan rad i
- optimalno vreme procesa

Ultrazvučne mlaznice su uobičajeni elementi u tehnici ultrazvučnog raspršivanja, koja koristi visokofrekventne vibracije da bi izazvala kapilarne talase u tečnom filmu na vrhu mlaznice. Kada ove vibracije dostignu kritičnu amplitudu, zbog snage koju isporučuje generator, talasi se pretvaraju u previsoke kapilare, što dovodi do stvaranja sitnih kapljica koje padaju s vrha talasa i stvaraju aerosol.⁷⁵⁶

U proizvodnji kapljica, ključni faktori koji utiču na njihovu početnu veličinu su frekvencija vibracija. Ove vibracije se obično kreću u opsegu od 20-180 kHz, što je izvan opsega ljudskog sluha.

Svaki ultrazvučni generator sastoji se od transduktora, što je cilindrični piezoelektrični uređaj. Ovaj uređaj transformiše električnu struju visoke frekvencije, koja mu služi za napajanje, u mehaničke oscilacije. Zahvaljujući prikladnom obliku i prirodi kristala, ove mehaničke oscilacije su visoko usmerene i proizvode jako ultrazvučno polje u

tečnosti koja se prenosi kretanjem molekula u pravcu propagacije. Ovaj proces je ilustrovan na šema 2.⁷⁵⁶



Šema 2. Operativni ultrazvučni generator aerosola sa transduktorom (A) koji prima energiju kroz zaštitni kabl (B) pri čemu se generiše akustično polje u povezujućem fluidu (C) i stvara ultrazvučni gejzir (D) u rezervoaru generatora (E), a kroz ulaz (F) dolazi vazduh i nosi aerosol (G) do izlaza (H)⁷⁵⁶

Kada se temperatura i gustina tečnosti pravilno promene, dolazi do snažnih adijabatskih kompresija i razređenja. Iako stvarna amplituda kretanja iznosi samo 0,2 μm pri frekvenciji od 800 Hz, postiže se veliko ubrzanje koje prelazi 500000 g. Ovo izaziva turbulencije i stvara gradijent pritiska duž ose transduktora, što dovodi do formiranja vodenog gejzira u rezervoaru. Zahvaljujući visokofrekventnoj turbulenciji u gejziru, stvaraju se kapljice aerosola koje se, nošene strujom vazduha, emituju iz uređaja.⁷⁵⁶

Veličina kapljica formiranih primenom ove metode zavisi od frekvencije ultrazvučnog polja, kao i od fiziko-hemijskih svojstava tečnosti (površinski napon i viskoznost tečnosti) i brzine odnošenja kapljica iz gejzira, budući da se, pri visokim koncentracijama kapljica, često javlja njihovo spajanje (koagulacija). Kapljice najmanje veličine obično se stvaraju pri najvišim frekvencijama.⁷⁵⁶

Ultrazvučni generatori imaju sposobnost da prenesu veliku energiju tečnosti, što izaziva atomizaciju tečnosti i povećano isparavanje. Takođe, prisustvo materijala u rastvoru ili suspenziji može dovesti do denaturacije, degradacije ili deformacije tih materijala. Ovi uređaji su izrazito osetljivi na hemijske karakteristike rastvora ili suspenzije koja se atomizuje.⁷⁵⁶

I.3.5 Novi materijali nosača za imobilizaciju enzima

Mogućnosti za praktičnu primenu imobilisanih enzima nastavljaju da rastu. Iz tog razloga, otkrivanje i upotreba novih materijala sa željenim svojstvima, prilagođenih određenim enzimima, u poslednje vreme postaje izuzetno važno. Ovi materijali, kako organskog tako i neorganskog porekla, odlikuju se izuzetnom termičkom i hemijskom stabilnošću i veoma dobrim mehaničkim svojstvima. Štaviše, ovi materijali se proizvode u različitim morfološkim oblicima sa kontrolisanim veličinama čestica, obično u nano razmeri, što ih čini pogodnim za upotrebu sa enzimima. Štaviše, ovi materijali poseduju izuzetne količine različitih funkcionalnih grupa, koje odgovaraju hemijskim grupama proteina, koje pojačavaju vezivanje enzima i modifikaciju površine za vezivanje.⁷⁵⁷ Međutim, tokom poslednje decenije, naučna pažnja je usmerena na hibridne i kompozitne materijale, koji kombinuju svojstva oba tipa kompozitnih prekursora i na taj način povećavaju njihove prednosti.⁷⁵⁸ Dakle, korišćenjem novih materijala (videti sliku 28) kao nosača enzima, poboljšava se kontrola tehnološkog procesa, imobilisani enzimi pokazuju povećanu katalitičku efikasnost i povećava se čistoća i kvalitet proizvoda reakcije u poređenju sa procesima katalizovanim enzimima imobilisanim na klasične materijale.



Slika 28. Odabrani primeri novih materijala neorganskog, organskog i hibridnog porekla, primenjeni za imobilizaciju enzima⁶⁶²

Novi materijali sa prilagođenim svojstvima se sve češće koriste kao nosači enzima, kako zbog ograničenja u primeni klasičnih materijala, tako i za poboljšanje svojstava imobilisanih enzima. Materijali koji pripadaju grupi novih materijala mogu olakšati lako odvajanje biokatalitičkih sistema iz reakcionih smeša (magnetne nanočestice) ili omogućiti izbegavanje preopterećenja čestica enzima na površini nosača (nanočestice i mezoporozni materijali). Štaviše, materijali kao što su grafen ili grafen oksid poboljšavaju prenos elektrona između imobilisanog enzima i supstrata, rezultirajući povećanom katalitičkom aktivnošću biomolekula. Najveća prednost materijala organskog porekla među novim materijalima, je

to što se mogu formirati u različitim geometrijskim oblicima kao što su vlakna ili membrane i smanjuju difuziona ograničenja i poboljšavaju efikasnost biokatalitičkih procesa.

U okviru novih materijala postoji kontinuirano i sve veće interesovanje za hibridne materijale. Hibridni nosači se mogu sintetizovati kombinacijom prekursora različitog porekla i njihova svojstva mogu biti prilagođena zahtevima biokatalizatora kao i tehnološkom procesu u kome će se proizvod koristiti nakon imobilizacije. Hibridni nosači se odlikuju dobrom termičkom i hemijskom stabilnošću i mehaničkom čvrstoćom i obično obezbeđuju stabilno, kovalentno vezivanje enzima.⁶⁶³

I.3.5.1 Neorganski materijali

I.3.5.1.1 Magnetne čestice

Odvajanje biokatalizatora iz reakcione smeše nakon katalitičkog procesa je jedan od ključnih problema koji se mora rešiti kada se koriste imobilisani enzimi. Jedno od mogućih rešenja je vezivanje molekula enzima za magnetne nanočestice gvožđe oksida (MNP) i jednostavno odvajanje biokatalitičkog sistema korišćenjem spoljašnjeg magnetnog polja.⁷⁵⁹ MNP su takođe poznati po velikoj površini i obilju hidroksilnih grupa na njihovoj površini što omogućava njihovu laku modifikaciju i snažno (kovalentno) vezivanje enzima. Ovo su veoma važne karakteristike. Velika mehanička stabilnost i niska poroznost, međutim, koji smanjuju sterne smetnje, takođe su relevantni za stvaranje stabilnog biokatalitičkog sistema enzim-nosač.⁷⁶⁰ Prema Netu (*Netto*), mnogi enzimi iz grupe oksidoreduktaza, hidrolaza ili transferaza mogu biti imobilisani na površini magnetnih nanočestica da bi se stvorili generalno stabilni sistemi koji nude visoku mogućnost ponovne upotrebe i lako odvajanje od reakcione smeše.⁷⁶¹ Postoji nekoliko primera koji pokazuju ove prednosti. Merasbi (*Mehrasbi*) sa saradnicima je imobilisao lipazu na magnetne nanočestice funkcionalizovane sa 3-glicidoksiipropiltrimetoksisilanom. Imobilisani enzim, kada se koristio za katalizu proizvodnje biodizela iz otpadnog ulja za kuvanje, zadržao je 100% svoje početne aktivnosti čak i nakon šest reakcionih ciklusa.⁷⁶² U drugoj studiji, Aber (*Aber*) je imobilisala glukozo oksidazu adsorpcijom na nemodifikovane MNP i koristila rezultujući sistem za obezbojenje boje *Acid Yellow 12*. Posle 15 katalitičkih ciklusa imobilisana glukozo oksidaza je zadržala više od 90% svojih početnih svojstava.⁷⁶³ Atakan (*Atacan*) sa saradnicima je koristio magnetne nanočestice, prethodno tretirane galnom kiselinom, za kovalentnu imobilizaciju tripsina. Njihovi rezultati su pokazali da biokatalizator MNP-tripsin može sa visokom efikasnošću razgraditi goveđi serum albumin.⁷⁶⁴

I.3.5.1.2 Nanočestice

Nanočestice i neorganskog i organskog porekla prečnika do 30 nm su opsežno proučavane poslednjih godina kao potencijalni nosači za imobilizaciju enzima. Međutim, pažnja je usmerena na nanočestice neorganskog porekla, jer ovi materijali privlače sve veće interesovanje zbog činjenice da generalno značajno poboljšavaju prinos imobilizacije i efikasnost dobijenog biokatalitičkog sistema.^{765,766} Nanočestice obezbeđuju veliku površinu za

vezivanje enzima što dovodi do većeg opterećenja enzima na površini nosača i povećanog prinosa imobilizacije. Međutim, najveća prednost nanočestica u odnosu na druge neorganske materijale je njihova sposobnost da minimizuju difuziona ograničenja. Molekuli enzima su pričvršćeni za površinu neporoznih čestica i njihova aktivna mesta su izložena širokom kontaktu sa supstratima.^{767,768} To znači da biokatalitički sistemi zasnovani na nanočesticama obično obezbeđuju visoko zadržavanje katalitičke aktivnosti.⁷⁶⁹

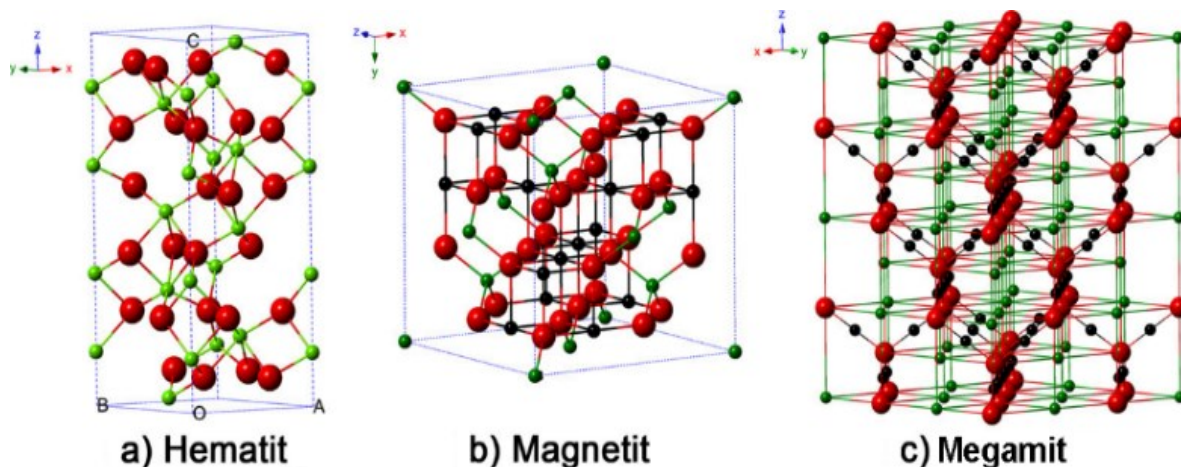
Različiti neorganski nanomaterijali kao što su nanozlato i grafen mogu se koristiti kao nosači za imobilizaciju enzima.^{770,771} Međutim, najčešće se koriste nanočestice neorganskog oksida. Npr. Hu (*Hou*) je koristio nanočestice titanijuma za imobilizaciju ugljenične anhidraze glutaraldehidom i imobilisao preko 160 mg enzima po gramu nosača. Proizvod je korišćen za biomimetičku konverziju CO₂.⁷⁷²

I.3.5.2 MAGNETNE NANO ČESTICE (MNP)

Trenutno, istraživanja magnetnih nanočestica (MNP) privukla su značajnu pažnju naučnika zbog njihove primene u različitim oblastima kao što su fizika, medicina, biologija i nauka o materijalima.⁷⁷³ Magnetne nanočestice, posebno gvožđe oksida, su široko proučavane i korišćene dugo vremena u mnogim oblastima kao što su hipertermija, ciljana magnetna isporuka lekova, magnetna rezonanca, skladištenje podataka, sanacija životne sredine, kao fotokatalizatori, senzori itd.^{774,775} Napredak u upotrebi magnetnih čestica u biomedicini zavisi od metoda sinteze, koje imaju veću kontrolu nad strukturnim karakteristikama, kao što su veličina, distribucija veličine, faze, itd. Štaviše, magnetna svojstva i karakteristike površine čestica su važne karakteristike koje moraju biti kontrolisane. Nanočestice oksida gvožđa, veličine ispod 15 nm, imaju tendenciju da se ponašaju kao superparamagnetni materijal.⁷⁷⁵ Posebno su bioaplikacije zasnovane na magnetnim nanočesticama dobile na značaju, jer nude bolje mogućnosti u odnosu na druge materijale. Npr. MNP su jeftine za proizvodnju, fizički i hemijski stabilne, biokompatibilne i bezbedne po životnu sredinu.⁷⁷⁶ Međutim, nanočestice magnetnog oksida gvožđa, kao i drugi sistemi nanočestica, imaju veliki odnos površine i zapremine koji, u kombinaciji sa različitim tipovima interakcija (dipol-dipol, dipol-naelektrisanje, Debajeve (*Debye*), magnetne, itd.) može dovesti do agregacije nanočestica.⁷⁷⁷ Stoga, nekoliko autora preporučuje oblaganje sintetisanih nanočestica da bi se sprečio ovaj efekat, iako to obično dovodi do promene njihovih magnetnih svojstava u poređenju sa neobloženim nanočesticama gvožđe oksida.⁷⁷⁵ S druge strane, magnetne nanočestice su dosta hemijski aktivne, pa lako oksiduju na vazduhu, što može dovesti do gubitka magnetizma i agregacije.⁷⁷⁸⁻⁷⁸⁰ Osim toga, ove nanočestice mogu prouzrokovati i sekundarno zagađenje životne sredine zbog svojih veoma malih dimenzija, ako se koriste bez obloge koji bi ih držala u zatvorenom prostoru.⁷⁷⁸

I.3.5.2.1 Oksidi gvožđa

Poznato je osam oksida gvožđa, među ovim oksidima gvožđa, hematit (α -Fe₂O₃), magnetit (Fe₃O₄) i megamit (γ -Fe₂O₃) su veoma obećavajući i popularni kandidati zbog njihovog polimorfizma temperaturno indukovane fazne tranzicije (slika 29).



Slika 29. Kristalne strukture (a) hematita, (b) magnetita i (c) megamita (crne loptice su Fe^{2+} , zelene loptice Fe^{3+} i crvene loptice O^{2-})⁷⁸⁷

Svaki od ova tri oksida gvožđa ima jedinstvena biohemijska, magnetna, katalitička i druga svojstva koja pogoduju za specifične tehničke i biomedicinske primene.⁷⁸¹

I.3.5.2.2 MAGNETIT

Kao što je prikazano na slici 29b, magnetit Fe_3O_4 ima kubnu spinalnu strukturu centriranu na lice, zasnovanu na 32 O^{2-} jona i tesno pakovanih duž pravca. Fe_3O_4 se razlikuje od većine drugih oksida gvožđa po tome što sadrži dvovalentno i trovalentno gvožđe. Magnetit ima kubičnu inverznu spinalnu strukturu koja se sastoji od kubičnog tesno zbijenog niza O^{2-} jona, gde svi Fe^{2+} joni zauzimaju polovinu oktaedarskih mesta, a Fe^{3+} su ravnomerno podeljeni preko preostalih oktaedarskih mesta i tetraedarskih mesta. U stehiometrijskom magnetitu $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}} = 1/2$, a dvovalentna gvožđa mogu biti delimično ili u potpunosti zamenjena drugim dvovalentnim jonima (Co, Mn, Zn, itd.). Dakle, Fe_3O_4 može biti i n- i p-tip poluprovodnika. Međutim, Fe_3O_4 ima najmanju otpornost među oksidima gvožđa zbog svog malog pojasa (0,1 eV).⁷⁸²

I.3.5.2.3 Fizička svojstva MNP

Razumevanje korelacije između magnetnih svojstava, veličine i oblika MNP je preduslov za široku primenu magnetizma u oblastima skladištenja podataka i bio-separacije.⁷⁸³ Generalno, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ima slab feromagnetizam na sobnoj temperaturi, dok je magnetizacija zasićenja često manja od 1 emu g^{-1} . Međutim, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ i Fe_3O_4 pokazuju ferimagnetizam na sobnoj temperaturi, sa magnetizacijom zasićenja koja dostiže 92 emu g^{-1} .⁷⁸⁴ Važno je napomenuti da mnoga svojstva MNP-a zavise od njihove veličine i oblika. Npr, Levi (*Levi*) i saradnici proučavali su magnetna svojstva MNP-a veličine 6-18 nm. Rezultati su otkrili da je magnetni poremećaj bio posebno očigledan za MNP 13-18 nm, zbog drastičnog gubitka njihovih performansi hipertermije.⁷⁸⁵ Gvardia (*Guardia*) i saradnici su izvestili da su pseudosferne i fasetirane MNP sa uskom distribucijom veličine (4-20 nm) i visokom magnetizacijom zasićenja ($M_s \approx 80\text{--}85$ emu g^{-1} na 5 K) dobijeni termičkim

razlaganjem korišćenjem oleinske kiseline kao surfaktanta. Nasuprot tome, dekanska kiselina daje mnogo veće pseudokubične MNP-e (45 nm) sa širom distribucijom veličine i većom magnetizacijom zasićenja ($M_s=92 \text{ emu g}^{-1}$ na 5 K), što je blizu očekivane vrednosti za masni magnetit.⁷⁸⁶ Jednodimenzionalne nanostrukture oksida gvožđa su veoma privlačne, zahvaljujući svojim brojnim jedinstvenim fiziko-hemijskim osobinama zasnovanim na visokoj intrinzičnoj anizotropiji i površinskoj aktivnosti. Pokazana je komparativna studija magnetnog ponašanja pojedinačnih i cevastih klasterizovanih Fe_3O_4 nanočestica. Rezultati su otkrili da bi konkurencija energije demagnetizacije oblika i energije magnetokristalne anizotropije malih MNP povećala koercitivnost, a na magnetna svojstva snažno utiče morfologija Fe_3O_4 nanočesta.⁷⁸⁶ Generalno, MNP postaju superparamagnetne na sobnoj temperaturi kada je veličina MNP-a ispod 15 nm, što znači da toplotna energija može prevazići energetska barijeru anizotropije jedne nanočestice. Međutim, agregacija među superparamagnetnim MNP je uobičajena pojava. Dakle, za zaštitu neobloženih MNP-a od agregacije, magnetna svojstva mogu biti prilagođena materijalima za oblaganje, kao što su Au, Ag i CO_3O_4 . Postoji niz magnetnih svojstava za karakterizaciju MNP-a. Najodlučnija svojstva su tip odziva na magnetno polje (uključujući feromagnetno, paramagnetno, antiferomagnetno i ferimagnetno) i magnetizacija, koja se može meriti iz histerezis petlje (M-H) i krivih hlađeno nulto polje/hlađen polje (ZFC/FC, M-T).

Neizbežan problem povezan sa MNP u opsegu veličina je njihova suštinska nestabilnost tokom dužih perioda, koja se manifestuje na dva glavna načina:

- gubitak disperzibilnosti, gde manje nanočestice imaju tendenciju da se agregiraju i formiraju velike čestice kako bi smanjile površinsku energiju; i
- gubitak magnetizma, gde se neobložene MNP lako oksiduju na vazduhu zbog njihove visoke hemijske aktivnosti, posebno Fe_3O_4 i $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanočestice.

Stoga je ključno razviti odgovarajuću strategiju zaštite za hemijsku stabilizaciju MNP-a od oštećenja tokom ili nakon naknadne primene. Za biomedicinske primene potrebno je nabaviti nanočestice disperzibilne u vodi, jer su većina bioloških medija skoro neutralni vodeni rastvori.⁷⁸⁷

I.3.5.2.4 Sinteza magnetnih nanočestica

Brojne hemijske metode se mogu koristiti za sintezu magnetnih nanočestica za primenu u medicinskom imidžingu: mikroemulzije, sol-gel sinteze, sonohemijske reakcije, hidrotermalne reakcije, hidroliza i termoliza prekursora, sinteze ubrizgavanjem i elektrosprej sinteze.⁷⁸⁸⁻⁷⁹⁴ Sintaza superparamagnetnih nanočestica je složen proces zbog njihove koloidne prirode. Prvi glavni hemijski izazov sastoji se od definisanja eksperimentalnih uslova, koji dovode do monodisperzne populacije magnetnih čestica odgovarajuće veličine. Druga kritična tačka je odabir ponovljivog procesa koji se može industrijalizovati bez ikakvog složenog postupka prečišćavanja, kao što je ultracentrifugiranje, permeabilna hromatografija koja razdvaja molekule po veličini, magnetna filtracija ili gradijent polja protoka.⁷⁹⁵⁻⁷⁹⁸ Ove metode su korišćene za pripremu čestice sa homogenim sastavom i uskom distribucijom veličine. Međutim, najčešći metod za proizvodnju nanočestica magnetita, zbog jednostavnosti sinteze, je tehnika hemijskog

koprecipitacije soli gvožđa.⁷⁹⁹⁻⁸⁰³ Karakterizacija gore navedenih sintetičkih metoda je ukratko sažeta u tabeli 10.

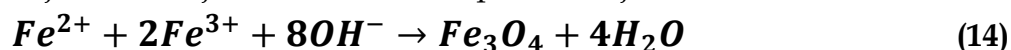
Tabela 10. Poređenje sintetičkih metoda za proizvodnju MNP⁷⁸⁷

Metoda	Reakcija i uslovi	Reakciona temperatura, °C	Vreme trajanja reakcije	Raspodela veličina	Kontrola oblika	Prinos
<i>Koprecipitacija</i>	Vrlo jednostavna, ambijentalni	20–150	Minuti	Relativno uska	Nije dobra	Visok
<i>Termičko razlaganje</i>	Komplikovana, ubačena atmosfera	100–350	Sati-dani	Veoma uska	Vrlo dobra	Visok
<i>Hidro ili termorastvorna sinteza</i>	Jednostavna, pod visokim pritiskom	150–220	Sati-dani	Veoma uska	Vrlo dobra	Visok
<i>Sol-gel i poliol metoda</i>	Komplikovana, ambijentalni	25–200	Sati	Uska	Dobra	Srednji
<i>Mikroemulzija</i>	Komplikovana, ambijentalni	20–80	Sati	Uska	Dobra	Nizak
<i>Sonoliza ili sonohemijska metoda</i>	Vrlo jednostavna, ambijentalna	20–50	Minuti	Uska	Loša	Srednji
<i>Mikrotalasna sinteza</i>	Vrlo jednostavna, ambijentalni	100–200	Minuti	Srednja	Dobra	Srednji
<i>Biosinteza</i>	Komplikovana, ambijentalni	Sobna temperatura	Sati-dani	Široka	Loša	Nizak
<i>Elektrohemijske metode</i>	Komplikovana, ambijentalni	Sobna temperatura	Sati-dani	Srednja	Srednja	Srednji
<i>Metode aerosola/pare</i>	Komplikovana, ubačena atmosfera	>100	Minuti-sati	Relativno uska	Srednja	Visok

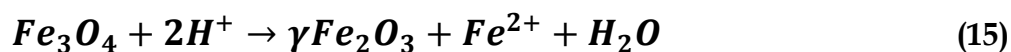
I.3.5.2.4.1.1 Klasična sinteza koprecipitacijom

Tehnika koprecipitacije je verovatno najjednostavniji i najefikasniji hemijski put za dobijanje magnetnih čestica. Oksidi gvožđa (bilo Fe₃O₄ ili γ-Fe₂O₃) se obično pripremaju starenjem stehiometrijske mešavine soli gvožđa i gvožđa u vodenom medijumu.

Hemijska reakcija formiranja Fe₃O₄ može se zapisati kao jednačina:



Prema termodinamici ove reakcije, potpunu precipitaciju Fe₃O₄ treba očekivati na pH vrednostima 8-14, sa stehiometrijskim odnosom od 2:1 (Fe³⁺/Fe²⁺) u neoksidacionoj sredini kiseonika.⁸⁰⁴ Međutim, magnetit (Fe₃O₄) nije veoma stabilan i osetljiv je na oksidaciju. Magnetit se u prisustvu kiseonika pretvara u megemit (γ-Fe₂O₃):



Oksidacija u vazduhu nije jedini način da se magnetit (Fe_3O_4) transformiše u megemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Uključeni su različiti transferi elektrona ili jona u zavisnosti od pH vrednosti suspenzije, prema jednačini (15).⁸⁰⁵ U kiselim i anaerobnim uslovima, površinski Fe^{2+} joni se desorbuju kao heksa-akva kompleksi u rastvoru, dok u bazičnim uslovima oksidacija magnetita uključuje oksido-redukciju površine magnetita. Oksidacija jona gvožđa je uvek u korelaciji sa migracijom katjona kroz rešetkasti okvir, stvarajući katjonske praznine za održavanje ravnoteže naelektrisanja, objašnjavajući strukturu megemita. U megemitu, joni gvožđa su raspoređeni na oktaedarskim i tetraedarskim mestima strukture spinela (slika 29), ali se megemit razlikuje od magnetita po prisustvu katjonskih slobodnih mesta unutar oktaedarskog mesta. Šema raspoređivanja slobodnih radnih mesta je usko povezana sa metodom pripreme uzorka i rezultira smanjenjem simetrije i eventualno nadgradnjom. Slobodna radna mesta mogu biti potpuno nasumična ili delimično ili potpuno raspoređena. Pokazano je, u suštini kombinovanom IR spektroskopijom i difrakcijom rendgenskih zraka, da se uređenje praznina javlja samo za čestice veće od 5 nm.⁸⁰⁶

Glavna prednost procesa koprecipitacije je da se može sintetizovati velika količina nanočestica. Međutim, kontrola raspodele veličine čestica je ograničena, jer samo kinetički faktori kontrolišu rast kristala. U procesu koprecipitacije su uključene dve faze: dolazi do kratkog naleta nukleacije kada koncentracija vrste dostigne kritično prezasićenje, a zatim dolazi do sporog rasta jezgara difuzijom rastvorenih materija na površinu kristala.^{781,807-811} Da bi se proizvele monodisperzne nanočestice gvožđe oksida, ove dve faze treba da budu razdvojene; tj. nukleaciju treba izbegavati tokom perioda rasta.⁸¹² La Merov (*LaMer*) dijagram ilustruje formiranje monodisperznih nano- i mikročestica sa mehanizmima nukleacije i rasta kristala.⁸¹³ U prezasićenom rastvoru kada se jezgra formiraju u isto vreme, naknadni rast ovih jezgara dovodi do formiranja čestica sa veoma uskom distribucijom veličine.⁸¹⁴ U zaključku, kontrola veličine monodisperznih čestica se obično mora vršiti tokom veoma kratkog perioda nukleacije, jer je konačni broj čestica određen krajem nukleacije i ne menja se tokom rasta čestica. Širok spektar faktora može se podesiti u sintezi nanočestica oksida gvožđa da bi se kontrolisala veličina, magnetne karakteristike ili svojstva površine. Brojne studije su se bavile uticajem ovih različitih faktora.⁸¹⁵⁻⁸²⁰

Veličina i oblik nanočestica mogu se relativno uspešno prilagoditi podešavanjem pH vrednosti, jonske snage, temperature, prirode soli (perhlorati, hloridi, sulfati i nitrati), ili odnos koncentracija $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$. Tako se mogu dobiti čestice veličine od 2 do 17 nm. Uticaj različitih parametara (sastav medija, odnos $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$, tokovi ubrizgavanja, koncentracija gvožđa, temperatura i kiseonik) na magnetna svojstva i veličinu proučavan je u osnovnom procesu koprecipitacije.⁷⁹⁵ Dodavanje helatnih organskih anjona (karboksilati ili α hidroksi karboksilatni joni, kao što su limunska, glukonska ili oleinska kiselina) ili agensi za površinsko umrežavanje polimera (dekstran, karboksidekstran, skrob ili polivinil alkohol) tokom formiranja magnetita mogu pomoći u kontroli veličine nanočestica. Prema molarnom odnosu između organskog jona i soli gvožđa, helacija ovih organskih jona na površini oksida gvožđa može ili sprečiti nukleaciju i zatim dovesti do većih čestica ili inhibirati rast kristalnih jezgara, što dovodi do malih nanočestica.

Prvu kontrolisanu pripremu superparamagnetnih čestica oksida gvožđa korišćenjem alkalne precipitacije FeCl_3 i FeCl_2 izveo je Massart.⁸²¹ Masartov proces, opisuje

koprecipitaciju bez molekula za stabilizaciju. U originalnoj sintezi, čestice magnetita su bile približno sferne, a njihov prečnik meren sa XRD bio je 8 nm. Parametri procesa su pažljivo proučavani da bi se demonstrirao uticaj baze (amonijak, CH_3NH_2 i NaOH), pH vrednosti, dodatih katjona [$\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$, CH_3NH_3^+ , Na^+ , Li^+ , K^+ i NH_4^+] i odnos $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ na prinos reakcije koprecipitacije i prečnik i polidisperznosti nanočestica.^{811,822} Kada su svi ovi parametri modifikovani, moguće je dobiti čestice veličine od 16,6 do 4,2 nm.⁸²¹ Druge studije su pokazale da modifikacija kiselosti i jonske snage omogućava prilagođavanje veličine čestica u opsegu od 2-15 nm. Varijacija oblika je povezana sa varijacijom elektrostatičke površinske gustine nanočestica.^{822,823} Čestice se mogu dispergovati u vodenom medijumu ili u nepolar-nim tečnostima, kao što su ulje ili organski rastvarači, što omogućava pripremu magnetne emulzije, kapsula i vezikula.⁸²²⁻⁸²⁴ Proces koji je konstruisao Masart za brzu sintezu homogenih nanočestica $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ omogućava oblaganje širokim spektrom monomernih vrsta, kao što su aminokiseline, α -hidroksi kiseline (limunska, vinska i glukonska kiselina), hidroksamat (arginin hidroksamat), dimerkaptosukcinska kiselina (DMSA), ili fosforil holin.^{795,823,825-828}

Konduktometrijska merenja i adsorpcione izoterme su pokazale da se DMSA oksiduje tokom procesa oblaganja u tetramernim polisulfidnim lancima [DMSAox], koji se apsorbuju u karboksilatnom oksidu. na česticama nakon alkalizacije i neutralizacije da bi se dobile stabilne čestice na pH vrednosti 7.^{827,828} Dodavanje sve veće količine citratnih jona u *Massart*-ovom procesu omogućava smanjenje prečnika nanočestica obloženih citratom sa 8 na 3 nm. Efekat citrata može se racionalizovati pomoću dva procesa: heliranje citrata jonima gvožđa sprečava nukleaciju, a adsorpcija citrata na jezgra dovodi do hidrolize, inhibirajući rast jezgara.⁸²⁹

Odabir veličine je proces gde se rastvor elektrolita ili nerastvarač dodaje u stabilan koloidni rastvor da bi se poremetio, uzrokujući taloženje većih čestica i ostavljajući manje i skoro monodisperzne čestice u supernatantu. Kroz takav proces odabira veličine korišćenjem NaCl kao dodatnog elektrolita, distribucija veličine 7 nm citratnih nanočestica dobijenih *Masartovim* procesom može se smanjiti.^{830,831} Ovaj proces sortiranja veličine je takođe prijavljen na katjonskim *Masartovim* nanočesticama koje koriste azotnu kiselinu kao elektrolit i dozvoljava da frakcioniše distribuciju veličine čestica sa veoma dobrim prinosom.⁸¹⁴ Žoliv (*Jolivet*) i saradnici proučavali su uticaj odnosa $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ na sastav, veličinu, morfologiju i magnetna svojstva koprecipitiranih čestica nanorazmera.⁸³² Poznato je da male vrednosti odnosa $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ dovode do formiranja getita. Za $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=0,3$, dve različite faze koegzistiraju: jedna za koju se veruje da je oksihidroksid i napravljena je od čestica veličine 4 nm sa niskim sadržajem Fe^{2+} ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ oko 0,07) i druga koja je nestehiometrijski magnetit i sastoji se od većih čestica promenljive veličine sastava $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ oko 0,33. Za $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=0,35$, poslednja faza je jedini. Za $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=0,5$ što odgovara stehiometriji magnetita, nađeno je da su čestice homogene po veličini i sastavu.⁸³²

Babes (*Babes*) i saradnici su takođe proučavali uticaj različitih parametara, uključujući medijum gvožđa i koncentraciju gvožđa.⁷⁹⁵ U njihovoj postavci, najvažniji faktor je $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ molarni odnos. Srednja veličina je porasla sa odnosom $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, dok je prinos preparata opao. Ovi rezultati su potvrđeni literaturnim podacima.^{833,834} Samo čestice sintetizovane sa odnosom između 0,4 i 0,6 su dovoljno efikasne da se koriste kao kontrastna sredstva.

Drugi najvažniji faktor koji utiče na sintezu je koncentracija gvožđa. Evolucija ovog faktora je slična onoj kod odnosa $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, sa optimumom između 39 i 78 mM. Srednja veličina čestica magnetita u velikoj meri zavisi od kiselosti i jonske jačine taložnog medijuma.⁸³⁵⁻⁸³⁷ Što su pH vrednost i jonska snaga veća, to će biti manja veličina čestica i širina raspodele veličine, jer ovi parametri određuju hemikalije, sastav površine kristala i elektrostatičkog površinskog naelektrisanja čestica.⁸³⁸

Kju (*Qiu*) je sa saradnicima istraživao zavisnost jonske jačine reakcionog rastvora od formiranja magnetita.⁸³⁹ Magnetit pripremljen dodatkom 1 M vodenog rastvora NaCl stvorio je nanočestice oksida gvožđa 1,5 nm manje od onih koje su nastale bez njegovog prisustva. Pored toga, ove manje nanočestice formirane u rastvorima veće jonske snage pokazuju nižu magnetizaciju zasićenja (63 emu g^{-1}) od onih pripremljenih u rastvorima bez NaCl (71 emu g^{-1}). Niža magnetizacija se pripisuje smanjenju veličine čestice kada se priprema u medijumu veće jonske jačine. Neki drugi faktori utiču na veličinu nanočestica. Npr. povećanje brzine mešanja ima tendenciju da smanji veličinu čestica. Na isti način, smanjenje veličine kao i polidisperznosti primećuje se kada se baza doda reaktivnim materijama u poređenju sa suprotnim procesom. Naprotiv, čini se da brzine fluksa ubrizgavanja nemaju preovlađujući uticaj na sintezu nanočestica.^{795,821,839}

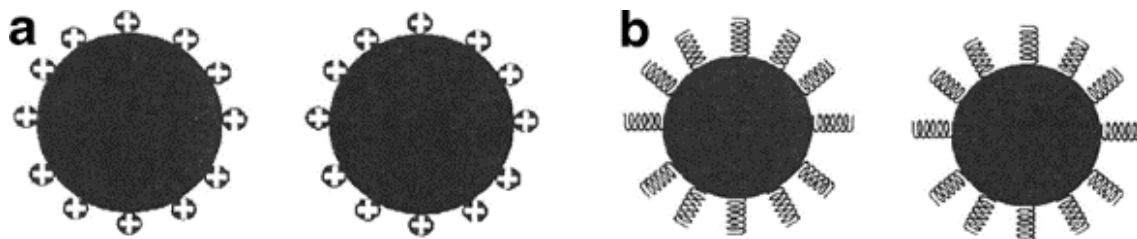
Nekoliko istraživača izveštava o upotrebi povišene temperature reakcije i sugerise njen značaj u optimalnom formiranju kristala.⁸⁴⁰ Različite studije pokazuju da se formiranje čestica magnetita smanjuje sa povećanjem temperature.^{795,811} Istraživanja podržavaju teoriju nukleacije i rasta čestica.

Propuštanje gasa azota kroz rastvor ne samo da štiti od kritične oksidacije magnetita, već i smanjuje veličinu čestica u poređenju sa metodama bez uklanjanja kiseonika.^{841,842} Nanočestice magnetita, pripremljene koprecipitacijom Fe^{2+} i Fe^{3+} sa NH_4OH , mogu se stabilizovati silicijum dioksidom za formiranje dobro dispergovanih magnetnih silicijumskih nanosfera. Prednost silicijumskog premaza je uspostavljena hemija za modifikaciju površine silicijum-dioksida. Hidroksilne površinske grupe mogu biti hemijski modifikovane da bi se dobile različite biokonjugacione grupe, kao što su amino i karboksilna. Veličina čestica se može kontrolisati promenom odnosa $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$.^{843,844}

1.3.5.2.4.2 Stabilizacija magnetnih čestica

Stabilizacija čestica oksida gvožđa je ključna za dobijanje magnetnih koloidnih ferrofluida koji su stabilni na agregaciju i u biološkom medijumu i u magnetnom polju. Stabilnost magnetne koloidne suspenzije je rezultat ravnoteže između privlačnih i odbojnih sila. Teoretski, četiri vrste sila mogu doprineti međučestičnom potencijalu u sistemu. Van der Valsove (*van der Waals*) sile izazivaju snažne izotropne privlačnosti kratkog dometa. Elektrostatičke odbojne sile mogu se delimično zaštititi dodavanjem soli u suspenziju. Teorijski opis ove dve sile poznat je kao teorija *Derjaguin-Landau-Verweij-Overbeek* (DLVO).^{845,846} Za magnetne suspenzije moraju se dodati magnetne dipolne sile između dve čestice. Ove sile indukuju anizotropne interakcije, za koje je utvrđeno da su globalno privlačne ako se anizotropni međučestični potencijal integriše u svim pravcima. Konačno, sile sternih odbijanja moraju se uzeti u obzir za negole čestice.^{847,848}

Stabilizacija magnetnih čestica može se postići igranjem na jednu ili obe od dve sile odbijanja: elektrostatičku i sternu repulsiju (slika 30).⁸⁰⁷



Slika 30. Stabilizacija MAB: (a) čestice stabilizovane elektrostatičkim slojem; (b) čestice stabilizovane sternim odbijanjem⁸⁰⁵

Kontrolisanje snage ovih sila je ključni parametar za dobijanje čestica sa dobrom stabilnošću. Sterne sile je teško predvideti i kvantifikovati. One zavise, između ostalih parametara, od molekulske težine polimera i njegove gustine.^{848,849} Elektrostatička repulsija se može pratiti kroz poznavanje difuzionog potencijala koji može biti veoma blizak zeta potencijalu i Debaj-Hickelova (*Debye-Huckel*) dužina koja uglavnom zavisi od jonske snage i pH vrednosti rastvora.^{850,851}

Način testiranja elektrostatičke stabilnosti je praćenje kinetike agregacije koloidnih suspenzija variranjem koncentracije soli. U oksidu gvožđa, površinski atomi gvožđa deluju kao *Lewis*-ove kiseline i koordiniraju sa molekulima koji doniraju usamljeni par elektrona. Zbog toga, u vodenim rastvorima, atomi Fe koordiniraju sa vodom, koja se lako disocira i ostavlja funkcionalnu hidroksilnu grupu na površini oksida gvožđa. Ove hidroksilne grupe su amfoterne i mogu da reaguju sa kiselinama ili bazama.⁸¹⁴ U zavisnosti od pH vrednosti rastvora, površina magnetita će biti pozitivna ili negativna. Izoelektrična tačka je primećena na pH vrednosti 6,8.⁸²² Oko ove tačke [tačka nultog naelektrisanja (*PZC*)], površinska gustina naelektrisanja (Σ) je premala i čestice više nisu stabilne u vodi i flokulišu. Neophodno je težiti i elektrostatičkoj i sternoj stabilizaciji da bi se dobile stabilne nanočestice oksida gvožđa.

I.3.5.2.4.2.1 Polimerni stabilizatori

Razvijeno je nekoliko postupaka za oblaganje nanočestica oksida gvožđa, uključujući *in situ* premaze i obloge nakon sinteze. U prvom pristupu, nanočestice su obložene tokom sinteze. Npr. Žozefson (*Josephson*) i saradnici su razvili proces koprecipitacije u prisustvu dekstrana.⁸⁵² Metoda oblaganja nakon sinteze sastoji se od kalemljenja polimera na magnetne čestice nakon sinteze (polimerni surfaktanti).^{853–855} U literaturi su najčešći premazi dekstran, karboksimetilovani dekstran, karboksidekstran, skrob, arabinogalaktan, glikozaminoglikan, sulfonirani stiren-divinilbenzen, polietilen glikol (*PEG*), polivinil alkohol (*PVA*), polioksameri.⁸⁰¹

Alginat je elektrolitički polisaharid sa mnogo karboksilnih grupa. Istraživači su stoga spekulirali da bi karboksilna grupa alginata i jona gvožđa interagovali i da elektrostatička repulsija može učiniti superparamagnetne nanočestice gvožđe oksida MAB stabilnim. Alginati se široko koriste u biotehnologiji, medicini ili prehrambenoj industriji, budući da su

njihova svojstva želiranja uglavnom uzrok njihove industrijske primene.⁷⁷⁴ Zbog ove sposobnosti da formiraju stabilne hidrogelove, alginati mogu da inkapsuliraju različite materijale, što može ojačati njihova svojstva adsorpcije ili im dati druga privlačna svojstva, kao što su magnetne karakteristike ili poboljšana mehanička svojstva.⁸⁵⁶⁻⁸⁵⁹ Ponekad su originalna svojstva podvučena zbog sinergijskih efekata između različitih komponenti sistema.⁸⁶⁰ Stoga je alginat trenutno vruća tema za istraživanje životne sredine i mnogi polimerni nanokompoziti se razvijaju za primenu u ovoj oblasti.⁷⁷⁴ Štaviše, prema Vangu (*Wang*) i saradnicima izrada magnetnih materijala i nanočestica u alginat dovodi do efekata nano-razmera i magnetne tehnologije u kompozite dok se postižu odlične performanse adsorpcije i smanjuju potencijalni rizik po životnu sredinu od nanočestica uz dodatne prednosti jednostavnog rada i lakog odvajanja.⁸⁶¹⁻⁸⁶³

U svakom slučaju, većina studija se fokusirala na razvoj magnetnih kompozitnih čestica, a samo nekoliko radova izveštava o svojstvima kompozitnih filmova na bazi alginata i magnetnih neorganskih funkcionalnih aditiva, iako se ovi filmovi mogu ponašati kao pogodni i efikasni adsorbenti na bazi prirodnih polimera, bez nedostataka vezanih za slobodne sisteme nano-čestica.⁷⁷⁹ Jedan od ovih nekoliko primera je rad Rodžera (*Roger*) sa saradnicima, koji izveštava o dobijanju kompozita alginat-magnetne nanočestice sa sinergičkim svojstvima kao što je sprega između magnetnih svojstava čestica i elastičnih svojstava polimera.⁸⁵⁹

Nedavno je razvijeno nekoliko istraživanja koja se bave pripremom nanočestica oksida gvožđa sa alginatom.^{697,864-866} Standardna hemijska sinteza se sastoji od tri koraka:

- I. želiranje alginata i jona gvožđa,
- II. *in situ* precipitacija gvožđe hidroksida alkalnim tretmanom alginata i
- III. oksidacijom gvožđe hidroksida oksidacionim agensom, kao što je O₂ ili H₂O₂. Ova metoda je složena.

Ma (*Ma*) i saradnici su razvili novu modifikovanu metodu koprecipitacije u dva koraka.⁸⁶⁷ Rezultati su otkrili da su tipične nanočestice oksida gvožđa Fe₃O₄ sa prečnikom jezgra 5-10 nm i da MAB imaju hidrodinamički prečnik 193,8-483,2 nm. Morales (*Morales*) i saradnici su takođe opisali novu metodu za sintezu magnetnih nanočestica gvožđe oksida u perle alginata sa kontrolisanom veličinom i magnetnim svojstvima za primenu u primeni lekova.⁸⁶⁸ Rezultati snažno sugerišu da upotreba polimera u sintezi materijala ograničava veličinu čestica.

I.3.5.2.4.2.2 Druge strategije za stabilizaciju

Druga metoda za sintezu magnetnih nanočestica polimernog jezgra/ljuske je korišćenje prethodno formiranih sintetičkih polimera kao matrice za kontrolu formiranja magnetnih jezgara.⁸⁶⁹⁻⁸⁷⁴ Nedavni napredak u sintezi magnetnih nanočestica u prisustvu polimera zasniva se na upotrebi polimernih gelova.⁸⁷⁵ Prednosti upotrebe polimernih gelova su višestruke, ali je najvažnija prednost to što se nukleacija i rast oksida gvožđa mogu kontrolisati pomoću ograničene arhitekture polimernog gela. Gel služi kao nanoreaktor, gde se nanočestice oksida gvožđa formiraju *in situ*.⁸⁷⁶⁻⁸⁷⁸ Konačno, drugi metod za pripremu magnetnih nanočestica je da se čestice oksida gvožđa inkorporiraju u polimerne čestice polimerizacijom *in situ*.⁸⁷⁹⁻⁸⁸³

I.3.5.2.5 Organski materijali

Kao što je već pomenuto, svojstva imobilisanog enzima snažno zavise od strukture i karakteristika nosača. Generalno, organski materijali koji su ovde klasifikovani kao novi materijali su uglavnom isti materijali i sadrže veoma slične hemijske grupe kao one opisane u odeljku I.3.3.1.1. Međutim, ovde se ovi organski materijali pojavljuju u potpuno različitim oblicima i kao rezultat imaju veoma različita svojstva. Ovi materijali se na primer mogu koristiti u obliku pojedinačnih čestica, vlakana nano veličine ili membrana. Ovi nosači povećavaju performanse, efikasnost i stabilnost imobilisanih biomolekula i čine ove poslednje upotrebljivijim. Štaviše, kontrola procesa je poboljšana i procesi se mogu odvijati na kontinuiran način, što ih čini isplativim. Stoga, biokatalitički sistemi zasnovani na ovim materijalima mogu postati atraktivni za primenu u procesima industrijskog obima. Odabrani slučajevi upotrebe novih materijala organskog porekla za imobilizaciju enzima su razmatrani u nastavku.⁸⁸⁴

I.3.5.2.6 Hibridni i kompozitni materijali

U svetlu gore navedenih jedinstvenih karakteristika i svojstava neorganskih i organskih nosača, sprovedena su mnoga istraživanja sa ciljem njihovog kombinovanja kako bi se povećale njihove prednosti. Mogućnost odabira i kombinovanja prekursora kako bi se ispunili zahtevi datog enzima i procesa u kojem će se on koristiti olakšava precizniju kontrolu procesa imobilizacije enzima. Pored toga, tako proizvedeni biokatalitički sistemi mogu se koristiti u širem spektru praktičnih primena.⁸⁸⁵ Kombinovani i ojačani materijali obično pokazuju svojstva koja nisu primećena za njihove pojedinačne komponente. Hibridi i kompoziti obično omogućavaju stabilizaciju interakcija između enzima i nosača i čine biokatalizatore mehanički otpornijim i stabilnijim u uslovima reakcije. Treba dodati da hibridni nosači generalno obezbeđuju pogodno okruženje za biomolekule koje favorizuje zadržavanje visokih katalitičkih svojstava imobilisanim enzimom, čini biokatalitički sistem višekratnim i štiti ga od konformacionih promena tokom skladištenja.⁸⁸⁶ Dodatna prednost upotrebe kompozitnih nosača je činjenica da su ovi materijali pogodni za enzime koji pripadaju svim katalitičkim klasama. U potrazi za materijalima koji se koriste za imobilizaciju enzima, posebnu pažnju treba obratiti na hibridne ili kompozitne materijale dobijene konjugacijom:

- organsko-organsko,
- neorgansko-neorganske ili
- organsko-neorganske prekursore.

I.3.5.2.6.1 Organsko-neorganski hibridi

Veoma širok spektar materijala organskog i neorganskog porekla može se kombinovati da bi se stvorili hibridni ili kompozitni nosači za imobilizaciju enzima. Najčešće korišćeni neorganski prekursori uključuju silicijum dioksid, neorganske okside kao što su oksidi cinka i titanijuma, kao i minerale, ugljenične materijale i magnetne nanočestice.⁸⁸⁷⁻⁸⁹⁰

Mogu se kombinovati sa polimerima sintetičkog porekla, npr. poliakrilonitrilom, polietileniminom i polivinil alkoholom, kao i sa biopolimerima kao što su hitozan, lignin i alginat.⁸⁹¹⁻⁸⁹⁴ Ovi materijali se uglavnom koriste za adsorpciju ili kovalentnu imobilizaciju hidrolaza, oksidoreduktaza i transferaza, ali je takođe prijavljeno inkapsuliranje ovih enzima u nosače ovog tipa.⁸⁹⁵ Organsko-neorganski hibridi pokazuju veliki potencijal kao pomoćni materijal za enzime; takvi hibridi obezbeđuju dobru stabilnost i mehaničku otpornost i veoma visok afinitet prema biološkim molekulima. Visoka stabilnost, a često i hemijska inertnost povezani su sa karakteristikama neorganskog prekursora. Dobra sposobnost vezivanja enzima je zbog organskih komponenti, jer sintetički polimeri i biopolimeri imaju mnogo funkcionalnih grupa u svojim strukturama koje su u stanju da stupe u interakciju sa hemijskim grupama biokatalizatora.⁸⁹⁶ Zbog svoje stabilnosti i funkcionalnosti, hibridi iz ove grupe mogu se koristiti za mnoge praktične primene, što je njihova najveća prednost. Mnoge različite kombinacije organskih i neorganskih supstanci su korišćene za proizvodnju funkcionalnih organsko-neorganskih kompozita i hibrida za imobilizaciju enzima.⁸⁹⁷⁻⁹⁰¹

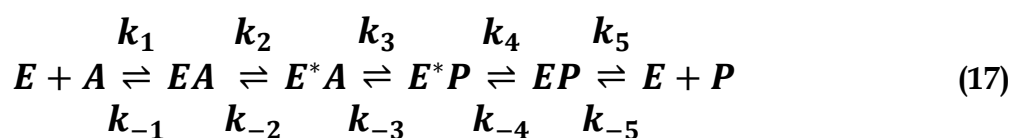
I.4. ENZIMSKA KINETIKA

Enzimska kinetika, za razliku od vremenski nezavisne *višestruke ravnoteže*, bavi vremenski zavisnim enzimskim reakcijama van ravnoteže – reakcija teži da postigne ravnotežno stanje. Proučavanje enzimskih reakcija je vredan pristup za razjašnjavanje mehanizama katalize i regulacije enzima. Oba polja se dopunjuju; istraživanje ravnoteže pokriva oblasti kinetike enzima, kao što je početni proces vezivanja koji prethodi katalitičkom koraku, dok kinetičke studije enzima takođe pružaju informacije o procesima vezivanja. Kooperativni fenomeni se istražuju i proučavanjem vezivanja i enzimске kinetike, a istraživanje enzimskih reakcija sa više od jednog supstrata može biti u velikoj meri potpomognuto studijama vezivanja. Dok su zakoni višestruke ravnoteže primenljivi na sve procese vezivanja u ćeliji, enzimska kinetika je ograničena na enzime (sa nekoliko izuzetaka, kao što su transportni sistemi). Studije enzimске kinetike obično počinju posmatranjem enzimskog supstrata i njegove konverzije u proizvod. Zatim se ispituju interakcije sa kofaktorima, inhibitorima ili aktivatorima. Preduslov za takve studije je poznavanje redosleda hemijskih reakcija.⁹⁰²⁻⁹⁰⁸

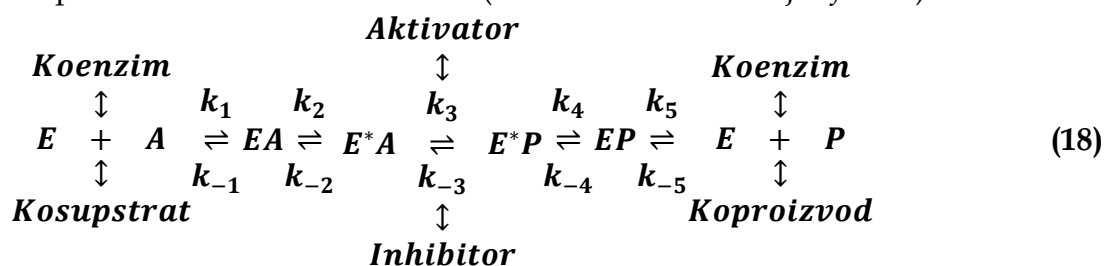
Enzimska reakcija u svom najjednostavnijem obliku može se napisati kao



Supstrat A reaguje sa enzimom E i formira kompleks enzim-supstrat EA. Od toga se proizvod formira u uzastopnom ireverzibilnom koraku, a enzim može ući u novi reakcioni ciklus. Svakom koraku reakcije pripada specifična konstanta brzine k . Označava se pozitivnom cifrom ($k_1, k_2, k_3, \dots$), dok se reakcija u suprotnom smeru označava negativnom ($k_{-1}, k_{-2}, k_{-3}, \dots$). Međutim, nakon detaljnijeg ispitivanja ove naizgled jednostavne reakcije, moraju se razmotriti dodatni koraci:



U početku, supstrat i enzim formiraju u brznoj ravnoteži slab asocijacijski kompleks EA . Preraspoređivanje u sledećem koraku interakcijom supstrata sa ostacima katalitičkog centra daje jak kompleks prelaznog stanja E^*A . Ovo stanje je pripremljeno da pretvori supstrat u proizvod formirajući jak E^*P kompleks, koji se pretvara u slab asocijacijski kompleks EP pre nego što se disocira u slobodni proizvod i enzim. Čitava sekvenca reakcija izgleda prilično simetrična i može se proći iz pravca napred, ali slično i iz pravca unazad, P deluje kao supstrat, dok je A proizvod. Za razliku od gornje jednostavne šeme sa dva reakciona koraka i tri konstante brzine, 5 reakcionih koraka sa 10 konstanti brzine mora se uzeti u obzir za precizniji opis iste reakcije. Pažljivije posmatranje enzimske reakcije može otkriti još komplikovaniju situaciju. U stvari, u većini enzimskih reakcija je uključeno više komponenti, kao što su dva ili više supstrata ($A, B, C, \dots$) i proizvoda ($P, K, R, \dots$), kofaktori, a kao regulacione komponente inhibitori i aktivatori (oba se takođe nazivaju *efektori*):



Da bi se razotkrili tako komplikovani mehanizmi, potrebni su sofisticirani teorijski tretmani i opsežni metodički pristupi. Prvi cilj je pojednostaviti šemu. Zapravo, svaki pojedinačni korak se može dodeliti dva različita tipa: ravnotežni i kinetički koraci. Obe vrste zahtevaju poseban tretman. Svaka reakcija počinje vezivanjem liganda za enzim, formirajući ravnotežu. Takvi koraci vezivanja mogu se pojedinačno istražiti posebnim metodama vezivanja. S druge strane, konverziju supstrata u proizvod prate kinetičke metode. Kombinacija oba pristupa, možda uključujući metode za otkrivanje konformacijskih promena, služi za otkrivanje centralnih koraka šeme. Konačno, kombinovanjem svih detaljnih rezultata, može se razviti kompletan mehanizam. Ovo razmatranje pokazuje da kinetičke studije same po sebi nisu dovoljne da se detaljno opiše enzimska reakcija, jer svakom kinetičkom koraku prethodi korak vezivanja. Vezivanje, kao ravnotežna reakcija, može se istražiti samo u potpunom odsustvu bilo kakvog kinetičkog procesa, a teorijski tretmani kao i metode za oba tipa reakcija su principijelno različite. Stoga, pre nego što se pređe na kinetiku enzima, raspravlja se o ravnotežama. Zbog strogog odsustva kinetičkih procesa, ovaj tretman nije ograničen na enzime, već je primenljiv na bilo koji specifični proces vezivanja. U tom pogledu, vezivanje se shvata kao specifična interakcija između dva jedinjenja. *Ligand*, obično jedinjenje male molekularne mase, kao što je supstrat, inhibitor, aktivator, induktor, hormon, stupa u interakciju sa većom metom, kao što je protein, receptor ili DNK.⁹⁰²⁻⁹⁰⁷

Ravnoteža je vremenski nezavisna, i shodno tome, može se uglavnom meriti bez vremenskog ograničenja, dok su kinetička merenja vezana za relativno kratko vreme reakcije. Međutim, činjenica da biološke supstance, posebno enzimi, nisu veoma stabilne u eksperimentalnim uslovima zahteva kratko vreme merenja i za studije ravnoteže. Za razliku od enzimskih reakcija, gde se hemijska konverzija supstrata u proizvod može koristiti kao signal za detekciju, reverzibilno vezivanje ne izaziva suštinske promene u karakteristikama komponenti, tako da je teško pronaći jasan signal za detekciju ravnoteže.

Glavne razlike između ravnotežnih i kinetičkih istraživanja sumirane su u tabeli 11.

Tabela 11. Razlike između ravnotežnih i kinetičkih studija⁹⁰²

Postupak	Ravnotežno stanje	Enzimska kinetika
Vremenska zavisnost	Vremenski nezavisna brza ravnoteža	Vremenski zavisna smerna progresija
Princip detekcije	Slobodne i vezane komponente su hemijski identične	Supstrat i proizvod su hemijski različiti
Osetljivost detekcije	Zavisno od koncentracije makromolekula	U zavisnosti od formiranja proizvoda
Potrebne količine makromolekula	Makromolekul i ligand u uporedivim količinama $[E] \sim [A]$	Količine katalitičkih enzima $[E] \ll [A]$
Zahtevi za čistoću	Makromolekul prisutan u visokoj čistoći	Visoka aktivnost enzima; ako nema ometajućih uticaja, visoka čistoća nije potrebna
Konstante	Termodinamičke konstante: konstante disocijacije (asocijacije)	Kinetičke konstante: Michaelis-ova konstanta, maksimalna brzina

Zbog uglavnom slabog signala, potrebne su velike količine makromolekula, jer je udeo vezivanja direktno proporcionalan koncentraciji makromolekula. Kinetički eksperimenti, nasuprot tome, trebaju samo katalitičke (tj. veoma niske) količine enzima. Zahtevi za čistoću makromolekula su takođe različiti. Za merenja vezivanja, gde je poznavanje molarne koncentracije makromolekula neophodno, potrebna je visoka čistoća. Za kinetička određivanja enzima, s druge strane, enzim mora biti aktivan, ali ne mora biti čist, sve dok nema ometajućih uticaja, kao što su sporedne reakcije. Konačno, postoje i razlike u konstantama. Iz tretmana ravnoteže izvode se termodinamičke konstante, konstante asocijacije ili disocijacije, dok kinetičke studije daju složenije kinetičke konstante. Međutim, oba tipa konstanti se sastoje od konstanti brzine, koje važe za oba pristupa, pa čak i uz kinetičke studije mogu se dobiti konstante disocijacije, kao što su konstante inhibicije. Sve zajedno, može se konstatovati da je proučavanje ravnoteže lakše u teorijskom tretmanu, ali teže u eksperimentalnom postupku, dok je u poređenju sa njima lakše eksperimentalno određivanje kinetike enzima, ali je teorijski pristup složeniji. Lakši metodološki pristup razlog je šire primene kinetike enzima.^{902–907}

Posebna oblast je tretman brzih reakcija. Ovo polje se na sličan način može diferencirati na kinetičke metode, koje direktno posmatraju brze reakcije, odnosno metode kontinuiranog i zaustavljenog toka, i na tehnike koje se bave ravnotežama, kao što su metode relaksacije (iako je odstupanje od ravnoteže kinetički proces). Ove tehnike omogućavaju analizu složenih mehanizama sa određene tačke gledišta i pored činjenice da brzi procesi postaju dostupni, mogu se odrediti pojedinačne konstante brzine, što ovaj pristup čini vrednom vezom između ravnotežnih i kinetičkih studija sa konvencionalnim metodama.^{902,909–914}

I.4.1 Red reakcije

Redosled hemijske reakcije u odnosu na pojedinačne komponente je definisan kao snaga koncentracije komponente uključene u jednačinu brzine. Ukupan redosled reakcije je zbir svih redosleda komponenti.

Reakcija:



je treći red u pravcu napred, drugi red za reaktant A i prvi red za B kao i za povratnu reakciju.

I.4.1.1 Reakcije prvog reda

Najjednostavnija hemijska reakcija je spontana konverzija edukta u proizvod P :



Tipičan primer za ovaj reakcioni mehanizam je radioaktivni raspad.^{902,907,915}

Brzina reakcije v se može odrediti iz vremenski zavisnog smanjenja količine A ili iz povećanja P i direktno je proporcionalna količini A :

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_1[A] \quad (21)$$

k_1 , konstanta brzine prvog reda, ima dimenziju s^{-1} , nezavisnu od koncentracije.

Integracijom jednačine (22) od 0 do vremena t dobijamo:

$$-\int_{A_0}^{A_1} \frac{d[A]}{[A]} = \int_{t_0}^t k_1 dt \quad (22)$$

$$\ln[A] = \ln[A]_0 - k_1 t \quad (23)$$

$$[A] = [A]_0 e^{-k_1 t} \quad (24)$$

Smanjenje koncentracije supstrata ili povećanje koncentracije proizvoda se odvija eksponencijalno s vremenom (slika 31a).

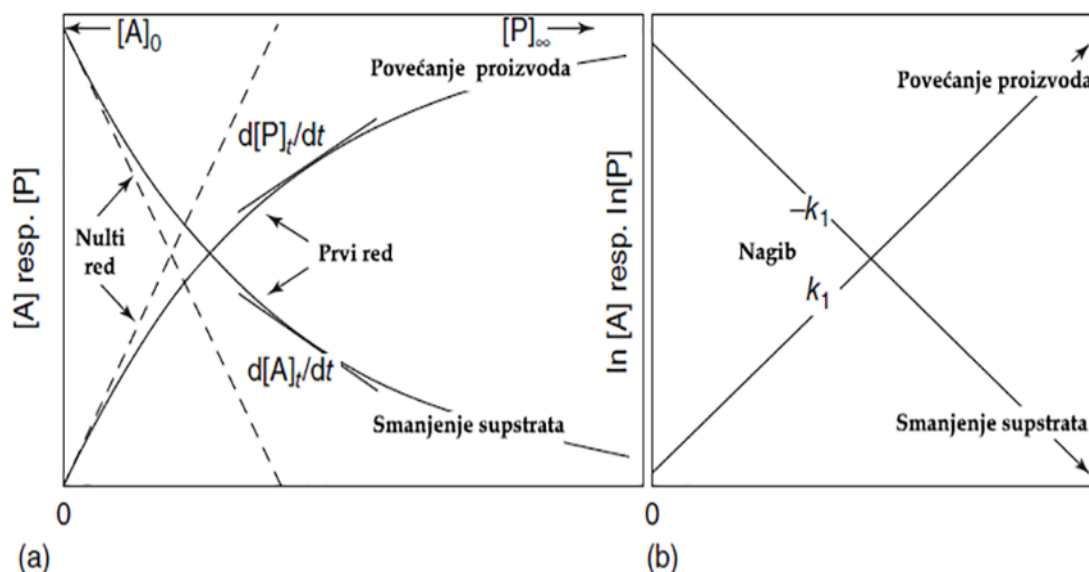
Krive se mogu linearizovati prema jednačini (24) semilogaritamskim crtanjem koncentracije supstrata ili proizvoda u odnosu na vreme t .^{910,916-920} Konstanta brzine prvog reda može se izvesti iz nagiba (slika 31b) ili iz vremena poluraspada $t_{1/2}$, vremena potrebnog za konverziju polovine početne količine supstrata. $[A]$ postaje $[A]_0/2$ i $\ln([A]_0/[A]) = \ln 2$:

$$k_1 = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} = \frac{0.69}{t_{1/2}} \quad (25)$$

I.4.1.2 Reakcije drugog reda

Dva supstrata reaguju jedan sa drugim:





Slika 31. Krive brzine reakcija nultog i prvog reda nakon formiranja proizvoda ili smanjenja koncentracije supstrata u direktnom (a) i semilogaritamskom (b) dijagramu. Tangencionalna metoda za izračunavanje brzine reakcije (a)⁹⁰²

Brzina reakcije je proporcionalna smanjenju A i B , a povećanju P (o reakciji se govori samo u pravcu napred i ovde nije bitno da li se formiraju jedan, dva ili više proizvoda):

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_1[A][B] \quad (27)$$

Dimenzija konstante brzine drugog reda k_1 ($s^{-1} M^{-1}$) uključuje član koncentracije. Integracija jednačine (27) daje:

$$k_1 t = \frac{1}{[A]_0 - [B]_0} \ln \frac{[B]_0[A]}{[A]_0[B]} \quad (28)$$

Brzina reakcije sada zavisi od dve nepoznate, A i B , a prave linije se više neće dobijati na semilogaritamskom dijagramu. Za rešavanje jednačine (27), jedna nepoznata se mora smatrati konstantnom. Ovo se može uraditi ako je jedan reaktant, na primer, $[B]_0$, prisutan u velikom višku, tako da je promena njegove koncentracije u toku reakcije zanemarljiva. Tada je reakcija *pseudo prvog reda*:

$$v = k_1[A][B]_0 = k'_1[A] \quad (29)$$

Konstanta $[B]_0$ je uključena u konstantu brzine pseudo prvog reda $k'_1 = k_1[B]_0$. Pod ovim uslovima, reakcija se može tretirati kao reakcija prvog reda. Prave linije na semilogaritamskom dijagramu (slika 31b) potvrđuju preovlađivanje ovih uslova. Njihovi nagibi, podeljeni sa koncentracijom konstantnog učesnika u reakciji, daju konstantu brzine drugog reda. Ovaj dijagram takođe razlikuje pseudo i pravi prvi red prema menjanju početne koncentracije konstantnog reaktanta. Reakcije prvog reda su nezavisne od koncentracije, a nagib mora ostati konstantan. Nasuprot tome, nagibi reakcija pseudo-prvog reda se menjaju za isti faktor kao i koncentracija. Na ovaj način, može se razlikovati, npr. da li se promena konformacije enzima javlja spontano ili je indukovana vezivanjem liganda.^{902,909-914}

Ako se ne mogu uspostaviti uslovi pseudo-prvog reda, odnosno ako nisu moguće veoma visoke koncentracije jednog reaktanta, oba reaktanta se mogu dodati u potpuno istim količinama, $[A]_0=[B]_0$. U ovom slučaju, jednačina (27) pojednostavljuje na

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k_1[A]^2 \quad (30)$$

Integracijom po t :

$$-\int_{A_0}^{A_1} \frac{d[A]}{[A]^2} = \int_{t_0}^t k_1 dt \quad (31)$$

daje

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + k_1 t \quad (32)$$

Na dijagramu $1/[A]$ u odnosu na t , dobiće se prava linija sa nagibom k_1 . Slično, konstanta brzine drugog reda k_1 može se izvesti iz $t_{1/2}$:

$$k_1 = \frac{1}{t_{1/2}[A]_0} \quad (33)$$

I.4.1.3 Reakcije nultog reda

Kao što je već pomenuto, najjednostavnije hemijske reakcije su *prvog reda* i trebalo bi da bude nemoguće dobiti jednostavnije reakcije, kao što su reakcije *nultog reda*. Takve reakcije moraju biti nezavisne od bilo koje koncentracije reaktanata. Ovaj uslov važi za reakcije koje izvodi katalizator, sve dok je katalizator prisutan u veoma ograničenim količinama. U ovom slučaju, brzina reakcije je diktirana isključivo količinom katalizatora koji ostaje nepromenjen tokom reakcije, bez obzira na koncentraciju reaktanta. Reakcija se odvija nezavisno od koncentracije reaktanata iako je suštinski drugog reda:



$$v = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_1 \quad (35)$$

Integracija po vremenu daje linearnu vezu:

$$[A] = [A]_0 - k_1 t \quad (36)$$

Linearna progresija smanjenja supstrata ili formiranja proizvoda ukazuje na reakcije nultog reda (slika 31a). Nagib daje konstantu brzine nultog reda.^{902,909-914}

I.4.2 Kinetika stacionarnog stanja i Mihaelis–Menten jednačina

Iako je izvedena za najjednostavniji slučaj ireverzibilne enzimске reakcije, pretvaranje jednog supstrata u proizvod, Mihaelis–Menten jednačina se pokazala kao fundamentalna veza u enzimskoj kinetici. Primeri su reakcije cepanja (peptidaze, nukleaze, amilaze) ili izomerizacije (uzimajući u obzir samo naprednu reakciju). Za nepovratnu reakciju nije bitno da li se formira jedan ili više proizvoda:



Vremenski zavisne varijacije pojedinačnih reaktanata su izražene sledećim diferencijalnim jednačinama:

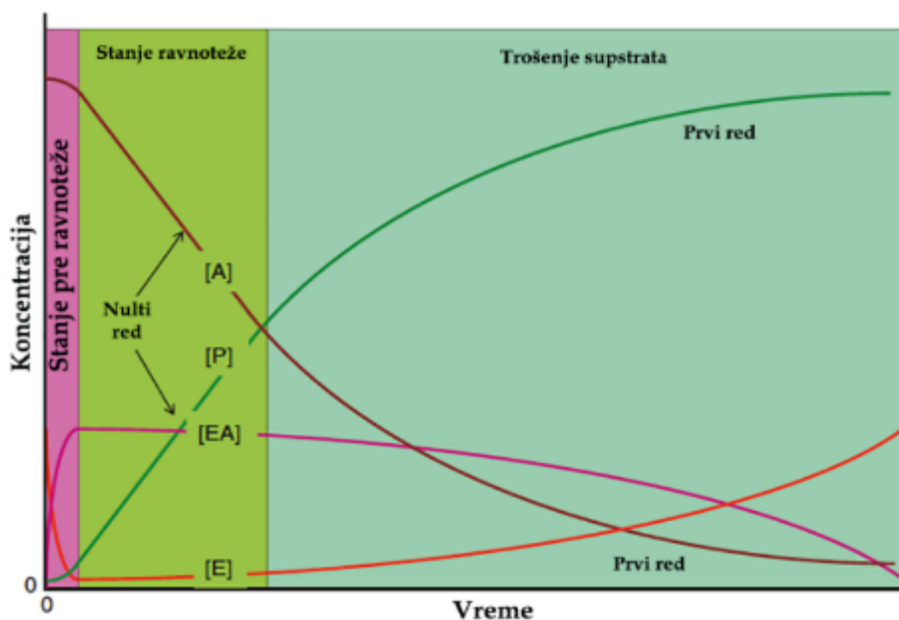
$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A][E] + k_{-1}[EA] \quad (38)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[A][E] + (k_{-1} + k_2)[EA] \quad (39)$$

$$\frac{d[EA]}{dt} = k_1[A][E] - (k_{-1} + k_2)[EA] \quad (40)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[EA] = v \quad (41)$$

Brzina reakcije v je definisana kao formiranje proizvoda i direktno je proporcionalna količini kompleksa enzim-supstrat EA , prema jednačini (40); $[EA]$ zavisi od koncentracije reaktanata. Da bi se rešile jednačine (38)–(41), treba znati vremenski zavisne promene koncentracije reaktanata, ali je to teško u praksi, posebno za $[E]$ i $[EA]$. Simulacija vremenski zavisnih varijacija svih reaktanata uz pretpostavku odgovarajućih konstanti prikazana je na slici 32.



Slika 32. Vremenski zavisne varijacije reaktanata nepovratne reakcije katalizovane enzima tokom tri faze reakcije⁹⁰²

Mogu se razlikovati tri faze:

- I. Brza početna faza (*burst* ili *pre-steady-state*): $[EA]$ kompleks se formira trenutno, dok se slobodni enzim smanjuje. Stopa prevođenja i formiranje proizvoda su niski u ovoj oblasti.
- II. Srednja faza: stopa prevođenja je najveća; koncentracija $[EA]$ kompleksa ostaje skoro konstantna.
- III. Faza trošenja: supstrat se troši, kompleks $[EA]$ se raspada, a stopa prevođenja se smanjuje, konačno do 0.

Trajanje tri faze zavisi od vrednosti konstanti brzine reakcije. Ako su sve tri konstante uporedive veličine, srednja faza postaje kratka i koncentracija $[EA]$ neće biti konstantna ni

u jednom trenutku. Međutim, moguće je pretpostaviti da je početna ravnoteža vezivanja mnogo brža od enzimске katalize, odnosno $k_1 \approx k_{-1} > k_2$. U ovim uslovima, srednja faza postaje znatno duža kao što je prikazano na slici 32. I smanjenje supstrata i formiranje proizvoda se odvijaju linearno (nultog reda), dok koncentracija $[EA]$ kompleksa ostaje skoro konstantna, jer se formiranje i razlaganje $[EA]$ kompleksa održava u ravnoteži. Ova faza se može smatrati kvazi-ravnotežnim stanjem, koje se održava u ograničenom periodu. Za razliku od prave ravnoteže, ona se označava kao *stacionarno stanje*.

Pošto brzina reakcije direktno zavisi od koncentracije kompleksa $[EA]$, linearna konverzija nultog reda supstrata u proizvod odražava samo opseg stacionarnog stanja, tokom kojeg vremenski zavisne promene $[EA]$, a samim tim i od $[E]$, mogu se izjednačiti sa nulom, $d[EA]/dt = d[E]/dt = 0$. Zatim se jednačine (39) i (40) pojednostavljaju na:

$$k_1[A][E] = (k_{-1} + k_2)[EA] \quad (42)$$

Odnos $[E]_0 = [E] + [EA]$ se uzima kao zamena za $[E]$:

$$[EA] = \frac{k_1[A][E]_0}{k_1[A] + k_{-1} + k_2} \quad (43)$$

Zamenom ovog izraza u jednačinu (42), dobija se odnos između brzine reakcije i količine supstrata:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[EA] = \frac{k_2[E]_0[A]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [A]} \quad (44)$$

Ovo je jednačina brzine za nepovratnu reakciju sa jednim supstratom u smislu konstanti brzine. Pošto pojedinačne konstante brzine nisu direktno dostupne, one se pretvaraju u kinetičke konstante. Izraz $(k_1 + k_2)/k_1$ uključuje tri konstante brzine, koje su kombinovane u zajedničku konstantu K_m , Mihaelisovu konstantu. Ukupna količina enzima $[E]_0$ kao katalizatora mora ostati konstantna tokom reakcije tako da izraz $k_2[E]_0$ može biti zamenjen drugim kinetičkom konstantom, V (često označavanom kao V_{max}), maksimalnom brzinom. To je najveći mogući utrošak u eksperimentalnim uslovima i postiže se kada u reakciji učestvuju svi raspoloživi molekuli enzima. U smislu kinetičkih konstanti, jednačina (44) glasi:

$$v = \frac{V[A]}{K_m + [A]} \quad (45)$$

Džordž Edvard Brigs (*George Edward Briggs*) i Džon Barton Sanderson Halden (*John Barton Sanderson Haldane*) izveli su ovu jednačinu iz teorije stacionarnog stanja 1925. godine.⁹¹¹ Do sada je to centralni odnos kinetike enzima iako je izveden samo za jednostavan slučaj nepovratne reakcije sa jednim supstratom. Preliminarne verzije ovog odnosa su već 1902. predstavili Adrian J. Braun (*Adrian J. Brown*) u Birmingemu i Viktor Anri (*Victor Henri*) u Parizu za opis reakcije sa invertazom.^{912,921} Leonor Mihaelis (*Leonor Michaelis*) je zajedno sa kanadskom kolegicom Mod Leonor Menten (*Maud Leonor Menten*) proučavao validnost Anrijeve jednačine sa enzimom invertazom 1913. godine u Berlinu.⁹²² Njihova posebna zasluga bila je percepcija da enzimске reakcije zahtevaju striktno standardizovane uslove u pogledu temperature, pH vrednosti i jonske snage. Međutim, za razliku od teorije stacionarnog stanja, ove rane studije su bile zasnovane na pretpostavci ravnoteže. Pretpostavljalo se da se ravnoteža između slobodnih komponenti i kompleksa enzim-supstrat (Mihaelisov kompleks) odvija veoma brzo, u poređenju sa katalitičkim obrtom, tako da se k_2 može zanemariti i koncentracija kompleksa enzim-supstrat zavisi samo od k_1 i k_{-1} .

U ovom slučaju, v je direktna mera $[EA]$, odnosno $[A]_{\text{vezanog}}$, pri ravnoteži brzog vezivanja. Jednačina za brzinu reakcije može predstaviti kao jednačina vezivanja sledećom jednačinom:

$$v = \frac{V[A]}{K_d + [A]} = \frac{V[A]}{\frac{k_{-1}}{k_1} + [A]} \quad (46)$$

Ovde je K_m zamenjena konstantom disocijacije K_d . Izvođenje jednačine brzine reakcije na osnovu teorije stacionarnog stanja bliže je stvarnosti. Pojednostavljenje zanemarivanjem katalitičke konstante k_2 , često nije opravdano. Količina $[EA]$ je zapravo određena postizanjem ravnoteže i brzinom katalize. Kinetički određena konstanta K_m često odstupa od konstante disocijacije K_d dobijene merenjima vezivanja, zbog uticaja k_2 . Ipak, termin *Mihaelis-Menten jednačina* je sačuvan za jednačinu stacionarnog stanja, kao i *Mihaelisova konstanta* za K_m , uvažavajući zasluge Mihaelisa i Mentenove.

Prema analogiji između Mihaelis-Menten jednačine i jednačine vezivanja, primenljivi su slični postupci evaluacije. *Funkcija zasićenja* $[A]_{\text{vezanog}}$ (respektivno $r = [A]_{\text{vezanog}}/[E]_0$) kao zavisna promenljiva odgovara brzini reakcije v . Zasićenje se postiže pri $n[E]^0$ (respektivno n), respektivno pri V . K_d se zamenjuje Mihaelisovom konstantom K_m . Međutim, principijalna razlika postoji u odnosu na nezavisnu promenljivu. To je slobodni ligand $[A]$ za studije vezivanja, a to bi takođe trebalo da bude slučaj i za Mihaelis-Menten jednačinu. Ali pošto su za kinetička merenja potrebne samo katalitičke količine enzima, a $[E]_0 \ll [A]$, deo od $[EA]$ se može zanemariti i uzima se ukupna koncentracija supstrata koja je dodata pri ispitivanje enzima, umesto teže dostupne koncentracije slobodnog supstrata $[A]_0 = [EA] + [A] \sim [A]$.⁹²²⁻⁹²⁹

Mihaelis-Menten jednačinu karakterišu dve konstante:

- *Mihaelisova konstanta* - K_m ; jedinice M; vezano za konstantu disocijacije; pokazuje afinitet supstrata, niske vrednosti K_m predstavljaju visoke afinitete.
- *Katalitička konstanta* - k_{cat} ; jedinice s^{-1} ; mera brzine reakcije enzima.

Iz Mihaelis-Menten jednačine, K_m i maksimalna brzina V_{max} mogu se dobiti direktno, ali za $k_{cat} = V_{max}/[E]_0$ molarna količina primenjenog enzima mora biti poznata. To nije uvek slučaj, a takođe i aktivnost enzima može da varira, tako da vrednosti V_{max} određene nezavisnim eksperimentima mogu da se razlikuju, iako bi trebalo da budu konstantne.

Odnos $k_{cat}/K_m = k_{cat}k_1/(k_{-1} + k_2)$ je definisan kao *katalitička efikasnost* ili *konstanta specifičnosti*, velike vrednosti ukazuju na visoku specifičnost. Ima jedinice konstante brzine drugog reda $M^{-1}s^{-1}$.^{902,909-914}

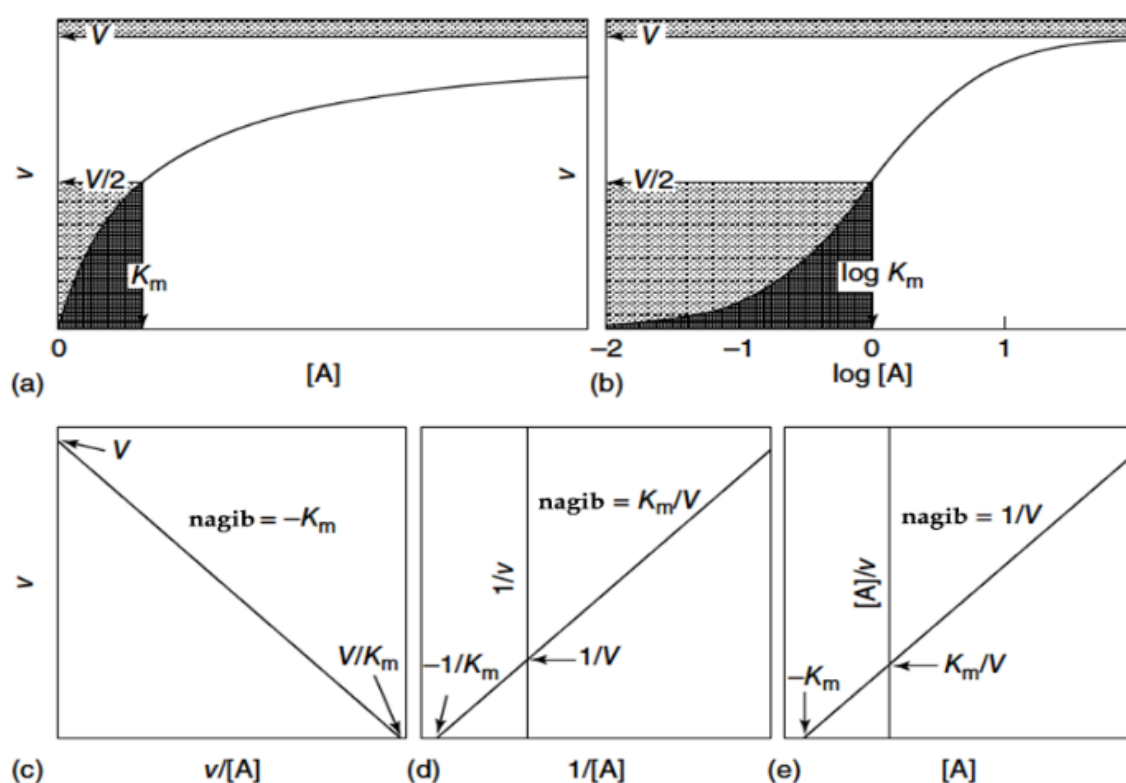
I.4.3 Analiza kinetičkih podataka enzima

I.4.3.1 Grafički prikazi Mihaelis-Menten jednačine

I.4.3.1.1 Direktan i semilogaritamski prikaz

Prema Mihaelis-Menten jednačini, zavisnost brzine reakcije v od koncentracije supstrata $[A]$ daje hiperboličnu krivu zasićenja, sličnu onoj iz opšte jednačine vezivanja u direktnom prikazu (slika 33a). Strmo povećanje pri malim količinama supstrata usporava se pri

višim koncentracijama i dostiže maksimalnu brzinu V pri zasićenju. Tačno zasićenje se može postići samo za $[A] \rightarrow \infty$, kada je K_m u imeniocu jednačine (45) može se zanemariti i $v=V$. Pri $V/2$ koncentracija supstrata postaje jednaka vrednosti K_m . Dakle, V se može dobiti iz zasićenja, a K_m iz polovine zasićenja (slika 33b). Ovo uključuje, međutim, izvesnu nesigurnost, jer se često zanemaruje da je V definisan samo za beskonačne koncentracije supstrata. Opadajući oblik krive navodi na mišljenje da se rano očekuje zasićenje i da se time potceni V , a samim tim i K_m . Svakako, beskonačne količine supstrata se uopšte ne mogu postići, a čak je i velike količine često teško ostvariti zbog inhibitornih uticaja ili ograničene rastvorljivosti. Često se pretpostavlja da je određena višestruka vrednost K_m kao koncentracije supstrata, na primer 5- ili 10-struka, „praktično” zasićujuća. Čak i 10-struka vrednost K_m daje samo oko 90% maksimalne brzine, za tačno određivanje potrebno je najmanje 100-struka vrednost K_m .^{917-920,930-933}



Slika 33. Nelinearni i linearni prikazi Mihaelis–Menten jednačine. (a) Direktan dijagram, (b) semilogaritamski dijagram, (c) Edi-Hofsti dijagram, (d) dvostruko recipročni (Linviver-Burk) dijagram i (e) Hanesov dijagram. Naznačeni su načini za određivanje K_m i V ⁹⁰²

U praksi je situacija još komplikovanija. Eksperimentalni podaci su uvek skloni rasipanju grešaka, a dati skup podataka se može upariti raznim krivama (slika 34). Zbog toga se eksperimenti moraju raditi više puta, a od suštinskog je značaja da uvek cela kriva bude pokrivena tačkama podataka – dobro pravilo je opseg supstrata od 1/10 do 10 puta K_m . Slika 34 prikazuje slučajeve podataka koji pokrivaju samo niži ili viši opseg koncentracija. U oba slučaja, nesigurnost rezultujuće krive postaje vredna pažnje.

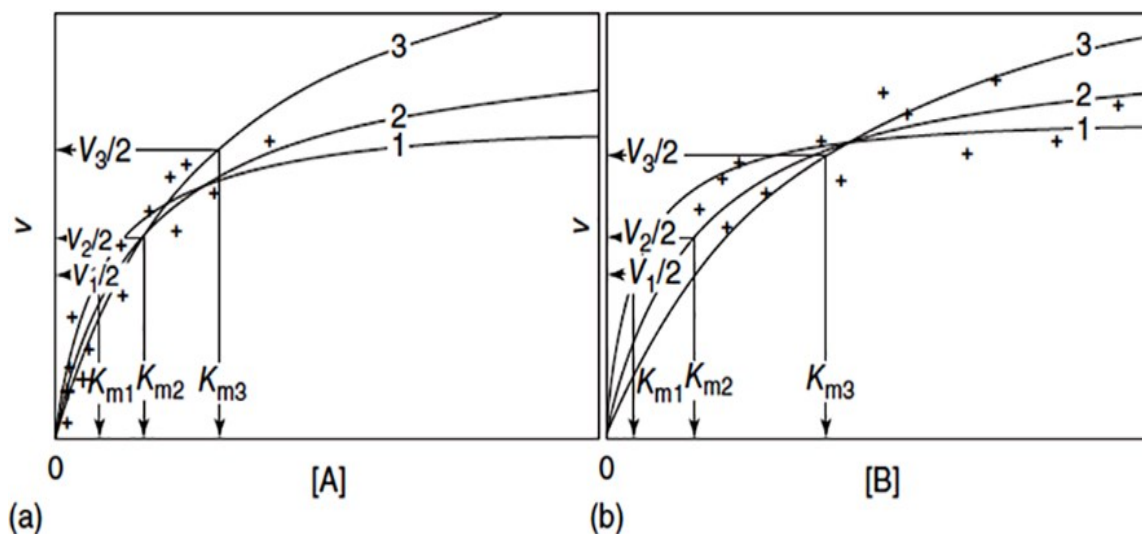
Oblik krive zasićenja koje se pridržavaju Mihaelis–Menten jednačine, shodno tome i opšte jednačine vezivanja, opisan je kao hiperboličan.

Alternativni nelinearni prikaz je *semilogaritamski dijagram* za v u odnosu na $\log[A]$, koji daje krive u obliku slova S (sigmoidne) čak i za normalne krive zasićenja (slika 33b). Ovaj dijagram se preporučuje ako se supstrat testira u širokom opsegu koncentracija.

Odstupanja od normalne krive, uzrokovana alternativnim mehanizmima, veštačkim uticajima ili sistematskim greškama, teško je prepoznati u nelinearnim prikazima. Negativna kooperativnost ili neidentična mesta vezivanja daju krive vrlo slične hiperboličnoj funkciji zasićenja, a takođe se odstupanja poput sigmoidnih oblika mogu lako prevideti, ako su slabo izražena u rasejanju velikih grešaka.⁹²²⁻⁹²⁹

Uprkos takvim nedostacima, nelinearni dijagrami imaju svoje prednosti. Temeljna enzimaska kinetička analiza neće biti ograničena samo na jedan dijagram, a za prvu procenu eksperimenta povoljna je direktna prezentacija podataka. Podaci se prikazuju direktno sa njihovom distribucijom grešaka bez ikakvih izobličenja. Metode nelinearne regresije za Michaelis–Menten jednačinu su pouzdanije za procenu kinetičkih konstanti od linearnih regresija u linearizovanim dijagramima, mada se svaka metoda regresije mora kritički proceniti, posebno ako se posmatraju odstupanja od normalne krive.⁹¹⁹

Pored navedenih grafičkih metoda za određivanje kinetičkih konstanti postoje još Diksonova (*Dixon*) i Kilro-Smit (*Kilroe-Smith*) nelinearna metoda, kao i metoda sa direktno linearnim graphicima po Esentalu (*Eisenthal*) i Korniš-Bodenu (*Cornish-Bowden*).^{919,920,931,934,935}



Slika 34. Nesigurnosti u određivanju kinetičkih konstanti Michaelis–Menten jednačine sa dosta rasejanja podataka i neodgovarajućim opsezima za koncentraciju supstrata. Pod (a) samo donji, a (b) samo veći opseg koncentracija supstrata je pokriven. Prikazane su tri primera krive (1–3) koje odgovaraju svim datim tačkama podataka i iz njih su procenjene kinetičke konstante da bi se demonstrirala široka promenljivost⁹⁰²

I.4.3.1.2 Metode linearizacije

Metode linearizacije izbegavaju različite nedostatke nelinearnih dijagrama. Kinetičke konstante se mogu izvesti direktno iz odsečka ili iz nagiba pravih linija. Odstupanja od Michaelis–Menten zakona dovode do udaljavanja od linearne progresije, a način udaljavanja je indikacija odgovarajućih mehanizama (npr. kooperativnost) ili veštački uticaji. Metode

linearizacije su veoma značajne za analizu eksperimenata enzimske kinetike, posebno za identifikaciju inhibicije enzima i mehanizama sa više supstrata. Dobijeni uzorak pravih linija je jak pokazatelj posebnog mehanizma.

Važna karakteristika metoda linearizacije je mogućnost ekstrapolacije u regione, koji nisu dostupni eksperimentima, npr. visoka koncentracija supstrata do beskonačnosti. Mora se imati na umu da nijedna metoda analize nije u stanju da pruži informacije koje nisu uključene u podatke. To se pokazuje na primeru enzima katalaze. Uobičajenim metodama je teško odrediti K_m vrednost supstrata vodonik-peroksida, jer visoke koncentracije vodonik-peroksida inaktiviraju enzim, tako da se može testirati samo donji opseg supstrata. Zasićenje, pa čak i polovina zasićenja za određivanje K_m , nisu dostupne. Međutim, opseg niske koncentracije je dostupan, i ovaj region se može linearizovati, npr. u dvostruko recipročnom dijagramu. Ekstrapolacijom na beskonačne koncentracije supstrata, V treba dobiti iz preseka ordinate, a K_m iz preseka apscise, očigledno bez potrebe za podacima iz nedostupne oblasti zasićenja. Međutim, primenom ove metode može se videti da su dostupni podaci donjeg regiona supstrata neprikladni da bi omogućili ispravnu ekstrapolaciju. Tačke se skupljaju daleko u gornjem desnom uglu grafikona sa proširenim granicama greške. Pravo se ne može odrediti nedvosmislen položaj, već se ekstrapolira na vrednosti koordinata i ne mogu se uočiti tačni preseki ordinate i apscise.

Postoje tri jednostavne linearne transformacije Mihaelis–Menten jednačine, koje je prvi predložio Vulf (*Woolf*), i pominju se u knjizi Haldena (*Haldane*) i Sterna (*Stern*), „*Hemija enzima*“ („*Enzyme Chemistry*“).⁹⁰⁹ Ovo kratko pominjanje nije naišlo na poseban odjek. Kasnije su drugi autori opisali pojedinačne metode linearizacije u obimnim publikacijama. Kako se linearna transformacija Mihaelis–Menten jednačine teško može smatrati dubokim matematičkim otkrićem, često korišćeni nazivi će biti poželjniji za jasno razlikovanje dijagrama.

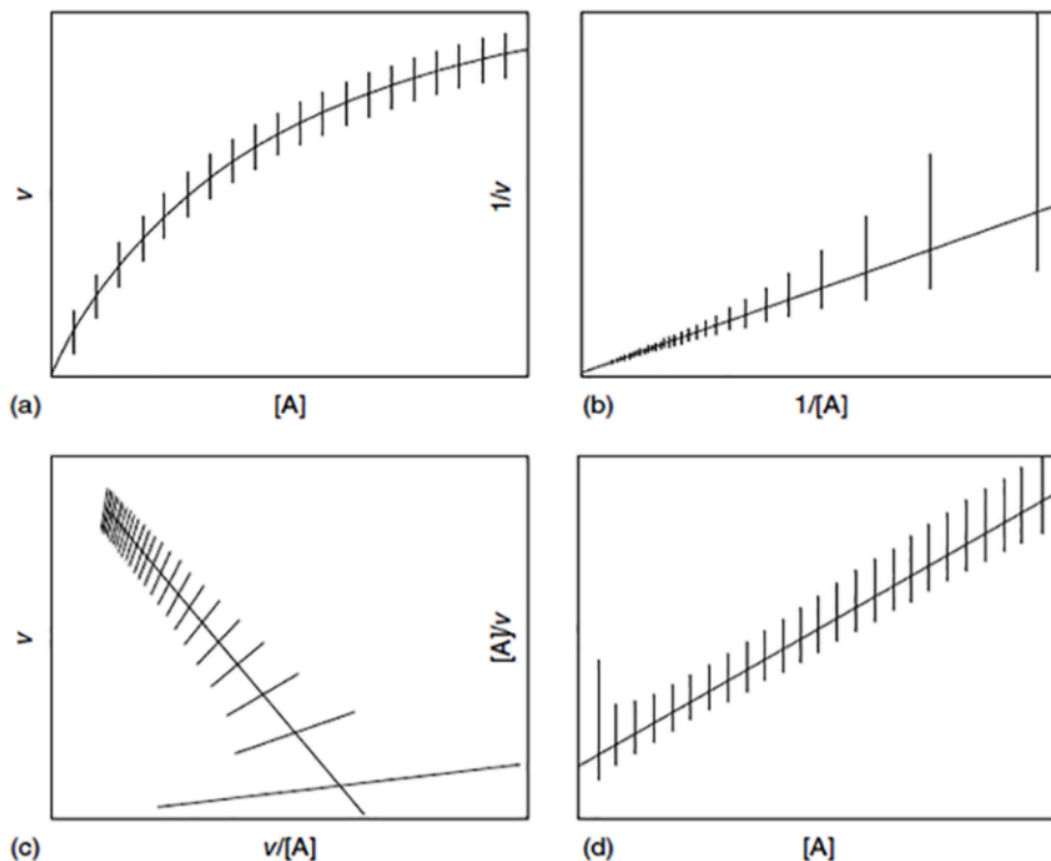
Dvostruko recipročni dijagram (takođe poznat kao Linviver-Burk (*Lineweaver-Burk*) dijagram), kako je izraženo njegovom oznakom, zasniva se na recipročnom obliku Mihaelis–Menten jednačine:⁹³⁶

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[A]} \quad (47)$$

Iscrtavanje recipročne brzine $1/v$ u odnosu na recipročnu koncentraciju supstrata $1/[A]$ daje pravu liniju koja seče ordinatu na $1/V$ i apscisu na $1/K_m$ (slika 33d). Ovo nije samo najčešće korišćena metoda linearizacije za Mihaelis–Menten jednačinu, već i najmanje odgovarajući. Suštinski nedostatak je neravnomerna distribucija podataka. Zbog recipročne transformacije, ekvidistantne koncentracije supstrata će biti komprimovane prema koordinatama i rastegnute u suprotnom smeru. Ako su koncentracije supstrata odabrane da daju jednake udaljenosti na ovoj grafici da bi se kompenzovao ovaj nedostatak, one ne pokrivaju krivu zasićenja na zadovoljavajući način. Zavisna promenljiva v trpi isto neujednačeno izobličenje. Uz pretpostavku apsolutne, konstantne greške u celoj direktnoj predstavi (slika 35a), u dvostrukom recipročnom dijagramu granice greške za v su komprimovane prema ordinati i snažno proširene prema gornjem desnom uglu (slika 35b).

Linearna regresija zasnovana na ravnomernoj raspodeli greške će proizvesti ozbiljna odstupanja i velike greške u određivanju konstanti. Već male greške pri niskim koncentracijama supstrata postaju veoma proširene i skraćuju liniju regresije. Stoga, regresiona analiza mora uzeti u obzir odgovarajuće faktore težine.⁹³⁷ Na prvi pogled izgleda

kontradiktorno da je upravo ovo izobličenje razlog za široku primenu ovog dijagrama, ali kompresija grešaka pri visokim koncentracijama supstrata daje utisak niske greške rasejanja i podaci izgledaju pouzdani. Prava prednost ovog grafikona u poređenju sa drugim metodama linearizacije je individualni prikaz promenljivih v i $[A]$, odvojenih koordinatama. Odstupanja od prave linija usled alternativnih mehanizama ili veštačkih uticaja, kao i inhibicije i višestrukih mehanizama supstrata, daju karakteristične oblike i mogu se lako identifikovati na ovom dijagramu.



Slika 35. Granice grešaka na različitim dijagramima za Mihaelis–Menten jednačinu pretpostavljajući apsolutnu konstantnu grešku: (a) direktni dijagram; (b) Linviver-Burk dijagram; (c) Edi–Hofsti dijagram; (d) Hanesov dijagram⁹⁰²

Množenjem recipročne Mihaelis–Menten jednačine sa $[A]$ dobija se izraz za Hanesov (Hanes) dijagram:⁹⁰²

$$\frac{[A]}{v} = \frac{[A]}{V} + \frac{K_m}{V} \quad (48)$$

Prave linije sa nagibom $1/V$, presekom apscisa- K_m i presekom ordinata K_m/V se dobijaju ako se $[A]/v$ nacrtu u odnosu na $[A]$ (slika 33e i slika 35d). Granice greške su samo malo izobličene na niske koncentracije supstrata tako da se mogu primeniti jednostavne linearne regresije. Međutim, nepoznate $[A]$ i v nisu razdvojene, a koncentracije supstrata su uključene na obe ose.

Množenje jednačine za Hanesov dijagram sa vV dobija se izraz za Edi–Hofsti dijagram:⁹³⁸

$$v = V - K_m \cdot \frac{v}{[A]} \quad (49)$$

Iscrtavanje v u odnosu na $v/[A]$, daje V iz preseka sa ordinatom i $-K_m$ iz nagiba (slika 33c i slika 35c). Ovaj dijagram odgovara Šačardovom (*Scatchard*) dijagramu, koji se često koristi za ispitivanje vezivanja, samo ose zamene mesta. Promenljive nisu razdvojene, a postoji i distorzija granica greške, koja se proteže na veće koncentracije supstrata, što međutim nije tako drastično kao na Linviver-Burkovom (*Lineweaver-Burk*) dijagramu.^{936,939}

I.4.3.2 Analiza krive brzine reakcije

Grafički prikazi do sada opisane Mihaelis–Menten jednačine zasnovani su na pretpostavci da se brzine reakcija mere u odvojenim testovima na različitim koncentracijama supstrata, a vrednosti za početne brzine v i početne koncentracije supstrata $[A]_0$ su ucrtane u dotične dijagrame. Međutim, tokom jedne pojedinačne enzimске reakcije proći će sve koncentracije supstrata, počevši od $[A]_0$ i završavajući sa $[A]_\infty=0$ (za ireverzibilne reakcije). Vrednosti na ordinati krive za brzinu reakcije, npr. apsorpcija u fotometrijskom enzimskom testu, ukazuju na stvarnu koncentraciju supstrata (ili proizvoda) u određenom trenutku. Nagibi tangenti u bilo kojoj tački krive za brzinu reakcije, predstavljaju odgovarajuće brzine reakcije $v=d[P]/dt$ (slika 33a). Očigledno, jedna kriva za brzinu reakcije sadrži sve informacije za Mihaelis–Menten kinetiku. Ako je $[A]_0$ dovoljno velika, da reakcija prolazi kroz ceo opseg zasićenja od visokih do niskih količina supstrata, sve $[A]$ i v vrednosti će biti obezbeđene za potpunu procenu Mihaelis–Menten jednačine. Međutim, osim nepreciznosti u primeni tangenata na različite delove eksperimentalne krive sa njenim odstupanjima grešaka i veštačkim uticajima, najteži nedostatak ovog postupka proizilazi iz dve neizbežne karakteristike enzimskih reakcija, inhibicije proizvoda i reverzibilnosti (ovo poslednje se može zanemariti za kvazi nepovratne reakcije). Ove komplikacije se mogu uzeti u obzir pri konstrukciji krive za brzinu reakcije. Krive za brzinu reakcije su podeljene na jednake vremenske segmente (npr. 12 s), na kojima se određuju odgovarajuće koncentracije supstrata (npr. putem apsorpcije). Odgovarajući red reakcije se dobija iz nagiba linije koja povezuje dve susedne tačke.⁹⁴⁰

I.4.3.2.1 Integrisanje Mihaelis–Menten jednačine

Gore pomenuti jednostavna metoda za određivanje brzina reakcije celog opsega koncentracije supstrata poravnavanjem tangenti u različitim tačkama krive napredovanja može se suštinski poboljšati uzimanjem integrisane Mihaelis–Menten jednačine. Matematički opisuje napredovanje enzimске reakcije u zavisnosti od vremena. Primenom ove jednačine, krive brzine reakcije se mogu direktno proceniti, npr. linearizacijom, a sve potrebne informacije mogu se dobiti iz jednog eksperimenta bez potrebe za serijom testova sa različitim koncentracijama supstrata. Dalja prednost ove metode je mogućnost onlajn snimanja i obrade krivih za brzinu reakcije odmah nakon svake analize sa računarom povezanim sa mernim instrumentom.

Da bi se izveo integrisani oblik Mihaelis–Menten jednačine, Mihaelis–Menten jednačina je preuređena u sledeći oblik:

$$v = -\frac{K_m + [A]}{[A]} d[A] = -\frac{K_m}{[A]} d[A] - d[A] = V dt \quad (50)$$

Zatim se integriše od $[A]_0$ u trenutku $t=0$ do $[A]$ u trenutku t :

$$-K_m \int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]} - \int_{[A]_0}^{[A]} d[A] = V \int_0^t dt \quad (51)$$

Dobijena integrisana Mihaelis–Menten jednačina glasi:

$$K_m \ln \frac{[A]_0}{[A]} + [A]_0 - [A] = Vt \quad (52)$$

Mihaelis–Menten jednačinu je prvi izveo u ovom obliku Viktor Anri (*Victor Henri*).^{921,941,942} Prikazane su tri vrste linearne transformacije ove jednačine:⁹⁴³

$$\frac{[A]_0 - [A]}{t} = V - K_m \frac{\ln \frac{[A]_0}{[A]}}{t} \quad (53)$$

a za dekadni logaritam

$$\frac{[A]_0 - [A]}{t} = V - K_m \frac{2.3 \cdot \log \frac{[A]_0}{[A]}}{t} \quad (54)$$

Ako se umesto potrošnje supstrata meri formiranje proizvoda, mora se uzeti u obzir izraz $[P] = [A]_0 - [A]$, pod pretpostavkom da je reakcija nepovratna. $[P]_\infty$ je koncentracija proizvoda na kraju reakcije:

$$\frac{[P]}{t} = V - K_m \frac{\ln \frac{[P]_\infty}{[P]_\infty - [P]}}{t} \quad (55)$$

$$\frac{[P]}{t} = V - K_m \frac{2.3 \cdot \log \frac{[P]_\infty}{[P]_\infty - [P]}}{t} \quad (56)$$

Prave linije sa nagibom od $-K_m$ i preseccima ordinata V se dobijaju kada se $([A]_0 - [A])/t$ ucrtava u odnosu na $\ln([A]_0/[A])/t$ i $[P]/t$ u odnosu na $\ln([P]_\infty/([P]_\infty - [P]))/t$ (ili kao $\log$ umesto $\ln$) (slika 36a).

Ovo je najčešći prikaz integrisane Mihaelis–Menten jednačine. Jednačina za drugu metodu linearizacije u $\log$ obliku je:

$$\frac{t}{[P]} = \frac{2.3 \cdot \log \frac{[P]_\infty}{[P]_\infty - [P]}}{[P]} \cdot \frac{K_m}{V} + \frac{1}{V} \quad (57)$$

$-1/K_m$ se uzima iz preseka apscise, a $1/V$ iz preseka ordinate (slika 36b). Treća metoda linearizacije zasniva se na formuli:

$$\frac{t}{2.3 \cdot \log \frac{[P]_\infty}{[P]_\infty - [P]}} = \frac{[P]}{V \cdot 2.3 \cdot \log \frac{[P]_\infty}{[P]_\infty - [P]}} \cdot \frac{K_m}{V} \quad (58)$$

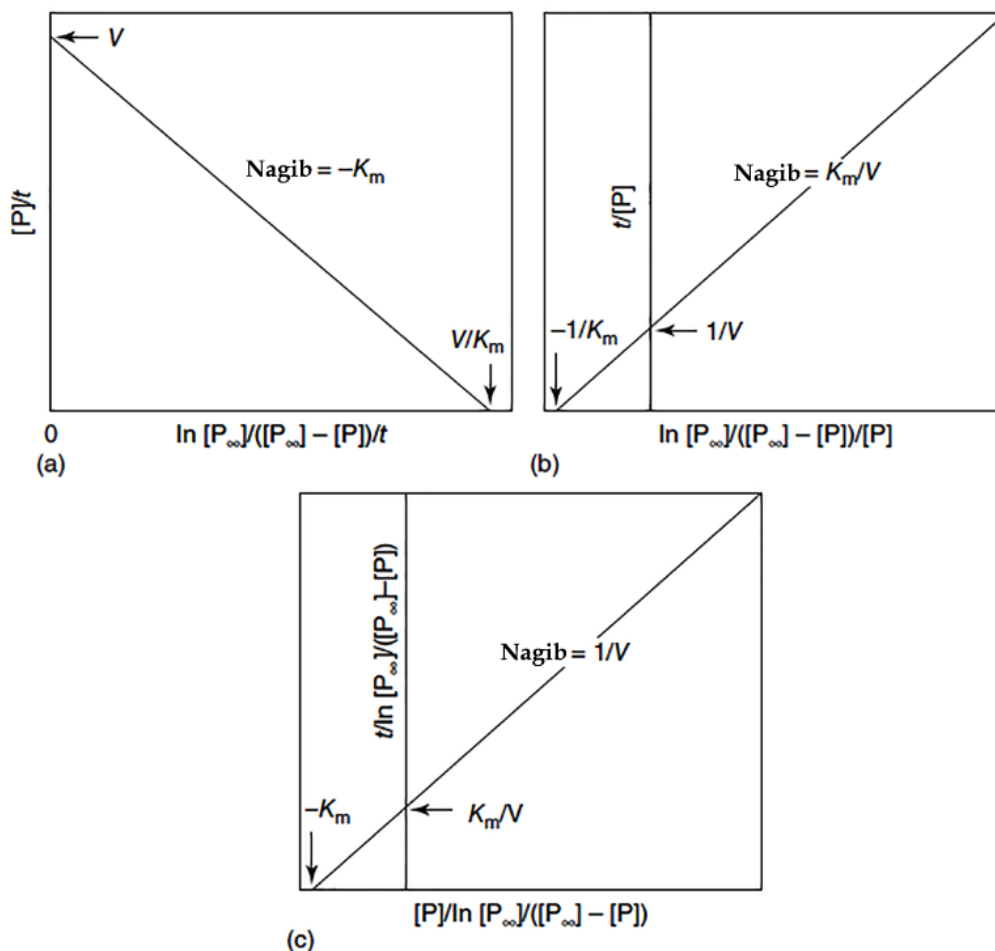
Dobija se $1/V$ kao nagib, K_m/V kao presek ordinate i $-K_m$ kao presek apscise (slika 36).

U dijagramima integrisane jednačine složeniji mehanizmi, kao što su inhibicija enzima ili reakcije više supstrata, mogu se identifikovati iz oblika linija ili iz odstupanja od prave linije, slično kao kod metoda direktne analize za Mihaelis–Menten jednačinu.

I.4.3.2.2 Određivanje brzine reakcije

Za procenu Mihaelis–Menten jednačine, moraju se izvršiti enzimski testovi da bi se dobile brzine reakcije. Za ovo se moraju uzeti u obzir neki glavni aspekti. Napredovanje

reakcija enzimske katalize može se podeliti u tri faze kao što je prikazano na slici 33, fazu pre-stacionarnog stanja, fazu stacionarnog stanja i fazu trošenja supstrata. Pošto su kinetički odnosi enzima zasnovani na validnosti pretpostavke o stacionarnom stanju, samo srednji linearni opseg krive nultog reda je važan za određivanje brzine.



Slika 36. Linearni dijagrami integrisane Mihaelis-Menten jednačine: grafici (a)-(c) prikazuju tri različita načina prezentovanja (za detalje pogledati tekst)⁹⁰²

Krive brzine reakcije treba, koliko god je to moguće, kontinuirano dokumentovati (*kontinuirani testovi*). Nekoliko metoda, posebno optičkih, omogućavaju kontinuiranu registraciju. Za mnoge enzimske reakcije, međutim, promene u koncentraciji supstrata ili proizvoda ne mogu se direktno pratiti i reakcija se mora zaustaviti nakon određenog vremena da bi se odredila stvarna koncentracija supstrata ili proizvoda odgovarajućom metodom, kao što je kolorimetrija, HPLC ili radioaktivno obeležavanje (*test zaustavljanja*). Mogu se dobiti samo različite vremenske vrednosti umesto neprekidne krive i očigledno je da se dokumentacija toka reakcije oslanja na broj vremenskih vrednosti. Pošto svaka vrednost zahteva poseban test, ova mukotrpa procedura se često skraćuje i meri se samo jedna jedina vrednost u različito vreme, npr. 5 minuta se meri. Red reakcije se meri iz nagiba linije između slepe probe u tački $t=0$ i u određenom vremenu, pod pretpostavkom da merenje leži unutar linearnog opsega krive napredovanja (*merenje u jednoj tački*). Takav postupak je neprikladan za studije enzimske kinetike, ne samo zbog velikih grešaka pojedinačnih merenja, već i zbog

toga što je trajanje linearnog stacionarnog opsega ograničeno i zavisi od više faktora, posebno od koncentracije enzima i supstrata. Čak i ako se preliminarnim testovima utvrdi da je vreme analize lako unutar opsega stacionarnog stanja, varijacije parametra, npr. koncentracije supstrata, mogu lako da proizvedu ograničavajuće uslove.^{910,913,918,924–926,941,942,944,945}

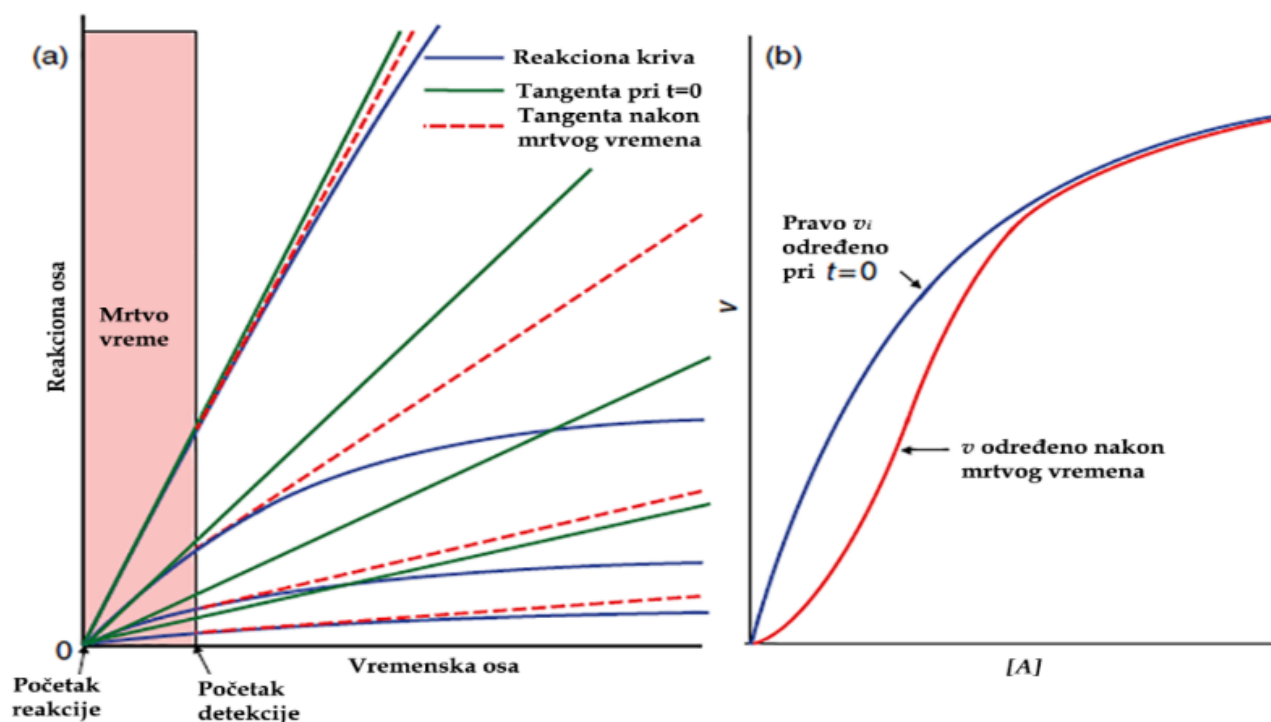
Upareni testovi se često primenjuju da bi se dobile dostupne enzimске reakcije koje je inače teško otkriti. Test reakcija je povezana sa reakcijom koja se kontinuirano može detektovati, kao što je NADH-zavisna dehidrogenaza, pri čemu proizvod jedne reakcije služi kao supstrat za drugu. Za ispitivanje enzimске kinetike, ovo je takođe problematičan princip. Mora se obezbediti da pod svim uslovima brzina test reakcije, a ne reakcije detekcije vezivanja, ostane ograničavajuća brzina. Ovo se obično obezbeđuje viškom enzima za detekciju u odnosu na test enzim. Međutim, variranjem različitih parametara tokom ispitivanja kinetike enzima, uslovi se mogu promeniti u korist aktivnosti test enzima.

Pošto je Mihaelis–Menten jednačina izvedena za uslov $d[EA]/dt=0$, ona je striktno važeća samo u okviru linearnog dela stacionarnog stanja. Što je bolje ispunjen uslov $[E]_0 \ll [A]_0$, ovaj deo je izraženiji. Zbog toga, sa zasićujućim količinama supstrata, linearne krive brzine reakcije se lako detektuju. Sa smanjenjem koncentracije supstrata, međutim, faza stabilnog stanja postaje sve kraća, a posebno ispod vrednosti K_m linearnost je teško uočiti, ponekad potpuno nestaje. U takvim slučajevima, tangenta je poravnata sa krivom na $t=0$ da bi se odredila „početna brzina“, pod pretpostavkom da faza stacionarnog stanja postoji barem na početku reakcije, čak i ako nijedan linearni deo krive brzine reakcije ne može biti viđen (*tangentna metoda*). Prednost ove metode je u tome što se uticaji nastalog proizvoda, kao što su inhibicija proizvoda i reverzibilna reakcija, mogu zanemariti. Problem nije samo u pitanju da li se jednačina stacionarnog stanja može smatrati validnom za ovo nelinearno početno područje. Enzimska reakcija počinje upravo u trenutku kada se dodaju sve komponente testa, već joj je potrebno određeno vreme, najmanje nekoliko sekundi, za mešanje, pokretanje instrumenta i registraciju. Stoga, stvarno izmerena brzina nije stvarna početna brzina (slika 37a).

Za linearnu progresiju pri visokim i srednjim koncentracijama supstrata, ovo nije problem, ali sa nelinearnom krivom brzina reakcije će biti potcenjena. Što su početne koncentracije supstrata niže, to je potcenjivanje veće. Pod takvim uslovima dobijaju se sigmoidne umesto hiperboličnih krivih (slika 37b).

U principu, smanjenje količine enzima u testu poboljšava uslove stacionarnog stanja. Vremenska progresija, a time i linearna oblast, postaje produžena, ali na račun brzine reakcije. Ovaj efekat se može nadoknaditi povećanjem osetljivosti metode; sve dok je to moguće, brzina ne pada ispod nivoa detekcije. Za takve slučajeve, grafičke metode mogu proceniti brzinu reakcije pod nepovoljnim uslovima. Pre diskusije o ovoj temi, mora se pomenuti očigledna kontradikcija. Mihaelis–Menten jednačina je izvedena uz pretpostavku stacionarnog stanja $d[EA]/dt=0$, nezavisno od koncentracije supstrata. Prema tome, jednačina treba da važi sve dok važi uslov $[E]_0 \ll [A]_0$. Ovaj uslov se često pogrešno tumači, u smislu da enzim mora biti zasićen da bi se garantovao višak supstrata, te stoga se linearnost krivih brzina reakcije može očekivati samo pri zasićenju supstrata. Ovo gledište zanemaruje činjenicu da višak supstrata ne znači automatski zasićenje enzima. U stvari, stepen zasićenja zavisi od konstante ravnoteže. Npr. za koncentraciju enzima od $[E]_0=10^{-9}$ M, koncentracija supstrata od 10^{-6} M znači 1000 šuta veći višak. Ako je $K_m=10^{-5}$ M, količina kompleksa enzim-

supstrat prema $K_d = [A][E]/[EA]$ biće $[EA] = 10^{-10}$. Iako je veliki višak supstrata, enzim je zasićen samo za 10%.^{910,913,918,924-926,941,942,944,945}



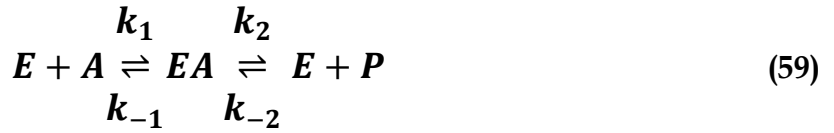
Slika 37. Određivanje početnog reda reakcije metodom tangente: (a) tangente su usklađene sa krivim brzine reakcije (plava) koje se prate sa različitim koncentracijama supstrata od zasićenja (gornja leva kriva) do niskih koncentracija (donje krive). Zelene tangente su poravnate sa krivim brzine reakcije na $t=0$, dajući pravu početnu brzinu v_i , a crvene tangente su poravnate sa opsegom koji se može detektovati na krivi brzine reakcije neposredno nakon mrtvog vremena; (b) krive zasićenja dobijene za oba slučaja⁹⁰²

I.4.4 Reverzibilne enzimске reakcije

I.4.4.1 Jednačina brzine za reverzibilne enzimске reakcije

Mihaelis-Menten jednačina je izvedena za ireverzibilnu enzimsku reakciju, gde se supstrati pretvaraju u proizvode, ali se proizvodi ne mogu pretvoriti u supstrate. Iako se u termodinamičkom smislu svaka reakcija mora smatrati reverzibilnom, za veliki broj enzimskih reakcija povratna reakcija je u velikoj meri nepovoljna zbog energetske barijere, kao što su fosfataze, peptidaze i invertaza, koja je služila kao model za Mihaelis-Menten jednačina. U takvim slučajevima, radi jednostavnosti, reakcija se može uzeti kao kvazi-ireverzibilna, ali većina enzimskih reakcija, kao što su izomeraze, dehidrogenaze ili transaminaze, su potpuno reverzibilne. Supstrati se neće potpuno pretvoriti u proizvod, već sistem teži ka stanju ravnoteže. Isto važi i za proizvod, tako da se reakcija može započeti ili sa supstratom ili sa proizvodom; u oba slučaja će se postići isto stanje ravnoteže. Mihaelis-Menten jednačina će imati ograničenu vrednost ako je ograničena samo na nepovratne reakcije.⁹⁴²

Sledeća šema pokazuje najjednostavniji oblik reverzibilne enzimске reakcije:



U poređenju sa izvođenjem Mihaelis–Menten jednačine za ireverzibilnu reakciju, diferencijalne jednačine za E , EA i izraz za brzinu v moraju biti modifikovani:

$$\frac{d[E]}{dt} = -(k_{-1} + k_2)[EA] - (k_1[A] + k_{-2}[P])[E] \quad (60)$$

$$\frac{d[EA]}{dt} = -(k_{-1} + k_2)[EA] + (k_1[A] + k_{-2}[P])[E] \quad (61)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[EA] - k_{-2}[P][E] = v \quad (62)$$

Iz prethodnih jednačina, $[E]$ i $[EA]$ se mogu izračunati primenom odnosa za ukupnu količinu enzima $[E]_0 = [E] + [EA]$:

$$[E] = \frac{(k_{-1} + k_2)[E]_0}{k_1[A] + k_{-2}[P] + (k_{-1} + k_2)} \quad (63)$$

$$[EA] = \frac{(k_1[A] + k_{-2}[P])[E]_0}{k_1[A] + k_{-2}[P] + (k_{-1} + k_2)} \quad (64)$$

Zamena u jednačinu. (62) daje jednačinu stope u smislu konstante brzine:

$$v = \frac{(k_1 k_2 [A] + (k_{-1} k_{-2} [P])) [E]_0}{k_1 [A] + k_{-2} [P] + (k_{-1} + k_2)} \quad (65)$$

Pošto je konstante brzine teško odrediti, prethodna jednačina se pretvara u oblik kinetičkih konstanti množenjem brojioca i imenioca sa $(k_{-1} + k_2)/k_1 k_{-2}$. K_{mA} i V_1 su Mihaelisova konstanta i maksimalna brzina za prednju reakciju, a K_{mP} i V_2 odgovarajuće konstante za povratnu reakciju:

$$K_{mA} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}; K_{mP} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}}; V_1 = k_2 [E]_0; V_2 = k_{-1} [E]_0;$$

$$v = v_1 - v_2 = \frac{K_{mP} V_1 [A] - K_{mA} V_2 [P]}{K_{mP} K_{mA} + K_{mP} [A] + K_{mA} [P]} \quad (66)$$

Ako se $[P]$ ili $[A]$ uzme kao nula, jednačina (66) se svodi na Mihaelis–Menten jednačinu za prednju ili zadnju reakciju, respektivno:

$$v_1 = \frac{V_1 [A]}{K_{mA} + [A]}; v_2 = \frac{V_2 [P]}{K_{mP} + [P]} \quad (67)$$

Ovo pokazuje da je Mihaelis–Menten jednačina važeća čak i u prisustvu reverzibilne reakcije, sve dok je proizvod zanemarljiv. Međutim, u toku reakcije, koncentracija proizvoda stalno raste, a povratna reakcija koja počinje u velikoj meri utiče na brzinu reakcije. Dakle, početni nagib krive za brzinu reakcije će biti isti kao i za ireverzibilnu reakciju, sve dok se $[P]$ može smatrati nulom. Međutim, u poređenju sa originalnom Mihaelis–Menten jednačinom, kriva brzine reakcije će ranije odstupiti od linearnosti (uslovi nultog reda), kada se $[P]$ akumulira u količini dovoljno visokoj da podrži povratnu reakciju.⁹⁴²

Ovo pokazuje, s jedne strane, univerzalnost Mihaelis–Menten jednačine, koja je primenljiva čak i za reverzibilne reakcije; s druge strane, njegov opseg validnosti je ograničen na uži vremenski period za $[P] \approx 0$. Prema tome, studije enzimske kinetike moraju se striktno koncentrisati na početne brzine krive u trenutku t_0 .

Isto razmatranje važi i za povratnu reakciju kada se počinje sa proizvodom, koji sada deluje kao supstrat. I u ovom slučaju, koncentracija supstrata mora biti nula na t_0 . Na ovaj

način, reverzibilna reakcija koja poštuje jednačinu (66) može se analizirati i sa strane supstrata i sa strane proizvoda, primenom jednostavne Mihaelis–Menten jednačine i četiri kinetičke konstante K_{mA} , K_{mP} , V_1 i V_2 , a sa njihovim znanjem, mogu se odrediti i četiri konstante brzine:

$$k_1 = \frac{V_1+V_2}{K_{mA}[E]_0}; k_{-1} = \frac{V_2}{[E]_0}; k_2 = \frac{V_1}{[E]_0}; k_{-2} = \frac{V_1+V_2}{K_{mP}[E]_0}; \quad (68)$$

Dakle, početne stope reakcija napred i nazad pružaju vredne informacije. Ali kontinuirano napredovanje povratne reakcije menja tok krivih napretka. Metode linearizacije zasnovane na integrisanoj Mihaelis–Menten jednačini više ne daju prave linije. Za analizu reverzibilnih reakcija, jednačina. (66) mora biti integrisana, dajući odnos:

$$\frac{[A]_0-[A]}{t} = \frac{K_{mP}V_1-K_{mA}V_2}{K_{mP}-K_{mA}} - \frac{K_{mP}K_{mA}}{K_{mP}-K_{mA}} \cdot \left(1 + \frac{(V_1+V_2)[A]_0}{K_{mP}V_1-K_{mA}V_2}\right) \cdot \frac{\ln\left(1-\frac{[A]_0-[A]}{[P]_e}\right)}{t} \quad (69)$$

Prave linije se sada dobijaju i za reverzibilne reakcije, ako se $([A]_0-[A])/t$ ucrtava u odnosu na $\ln\{1-([A]_0-[A])/[P]_e\}/t$. Ovaj tretman, međutim, zahteva poznavanje $[P]_e$, koncentracije proizvoda u ravnoteži reakcije. Ako su $[P]_e$ ili V_2 nepoznati, K_{mA} i V_1 se mogu dobiti iz početne oblasti ($[P]=0$) crtanjem $([A]_0-[A])/t$ u odnosu na $\ln([A]_0/[A])/t$ pri različitim $[A]_0$ vrednostima, a K_{mP} i V_2 se dobijaju na sličan način iz povratne reakcije. Ovaj pristup, međutim, liči na uobičajeni metod određivanja početnih brzina pri različitim koncentracijama supstrata, bez primene integrisane Mihaelis–Menten jednačine.⁹⁴²

I.4.4.2 Inhibicija proizvodom reakcije

Obavezna posledica reverzibilnosti je inhibicija enzima proizvodom reakcije. Prvo-bitno izvođenje Mihaelis–Menten jednačine za ireverzibilnu reakciju pretpostavlja samo ravnotežu vezivanja za supstrat. Međutim, formirani proizvod je takođe vezan za enzim, čak i ako je povratna reakcija zanemarljiva, a sve dok ostaje vezan za enzim, blokira vezivanje novog molekula supstrata. Stoga se za svaki enzim mora očekivati inhibicija proizvoda. Samo u slučaju slabog vezivanja proizvoda, inhibicija može biti slaba. U toku reakcije, inhibitorski efekat nije konstantan, već se povećava na isti način kako nastaje proizvod. Da bi se analizirala ova inhibicija, proizvod se dodaje u određenoj koncentraciji $[P]$ pre nego što reakcija počne dodavanjem supstrata. Pod pretpostavkom da je povratna reakcija zanemarljiva, $V_2=k_{-1}[E]_0=0$, iz istog razloga Mihaelisova konstanta proizvoda K_{mP} se svodi na konstantu vezivanja $K_P=k_2/k_{-2}$, koja tada ima značaj inhibicione konstante:

$$v = \frac{K_P V_1 [A]}{K_P K_{mA} + K_P [A] + K_{mA} [P]} = \frac{V_1 [A]}{K_{mA} \left(1 + \frac{[P]}{K_P}\right) + [A]} \quad (70)$$

Recipročni oblik jednačine je:

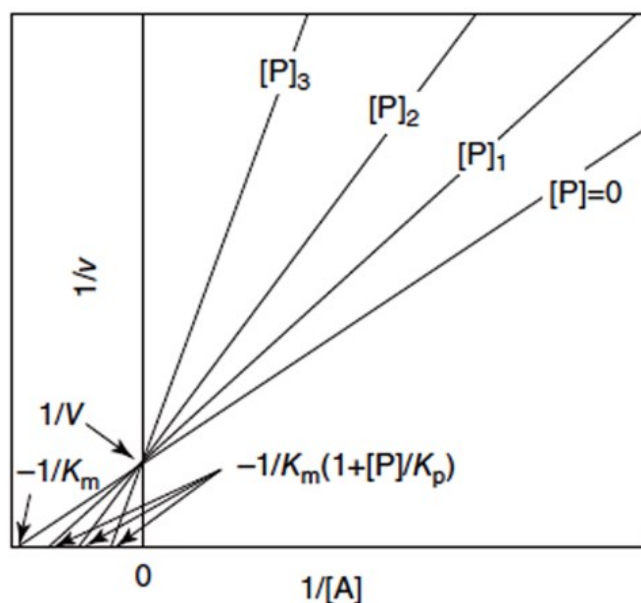
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_1} + \frac{K_{mA} \left(1 + \frac{[P]}{K_P}\right) + [A]}{V_1 [A]} \quad (71)$$

Za svaku koncentraciju proizvoda dobija se prava linija u dvostruko recipročnom dijagramu (slika 38).

Prave imaju zajednički presek ordinate na $1/V$ i sastaju se sa apscisom na $-1/K_{mA}(1+[P]/K_P)$. K_{mA} sledi iz preseka apscise u odsustvu proizvoda, a K_P se može izračunati. Zajednički presek ordinate ukazuje da se maksimalna brzina V neće promeniti ovom

inhibicijom. Pri beskonačnoj koncentraciji, supstrat potpuno zamenjuje proizvod vezivanja za enzim i eliminiše njegov inhibitorski efekat. Ovo je *kompetitivna inhibicija proizvoda*, gde se proizvod takmiči za mesto vezivanja supstrata u katalitičkom centru.⁹⁴⁶⁻⁹⁴⁸

Kao aproksimacija za izvođenje jednačine za inhibiciju proizvoda, pretpostavlja se da će koncentracija proizvoda ostati konstantna, barem tokom kratkog vremena određivanja početne brzine. Međutim, ova pretpostavka ne važi za celu reakciju, tokom koje se proizvod neprekidno povećava. Zbog toga se krive brzine reakcije ne mogu lako proceniti ili lineari-
zovati, primenom integrisane Mihaelis-Menten jednačine. Pošto je svaka enzimska reakcija podložna inhibiciji proizvodom, ove procene se mogu koristiti samo ako je efekat veoma slab.



Slika 38. Kompetitivna inhibicija proizvoda na dvostruko recipročnom dijagramu. Prikazan je način određivanja kinetičke konstante⁹⁰²

Za opštiji tretman, mora se uzeti u obzir inhibicija proizvoda:⁹³²

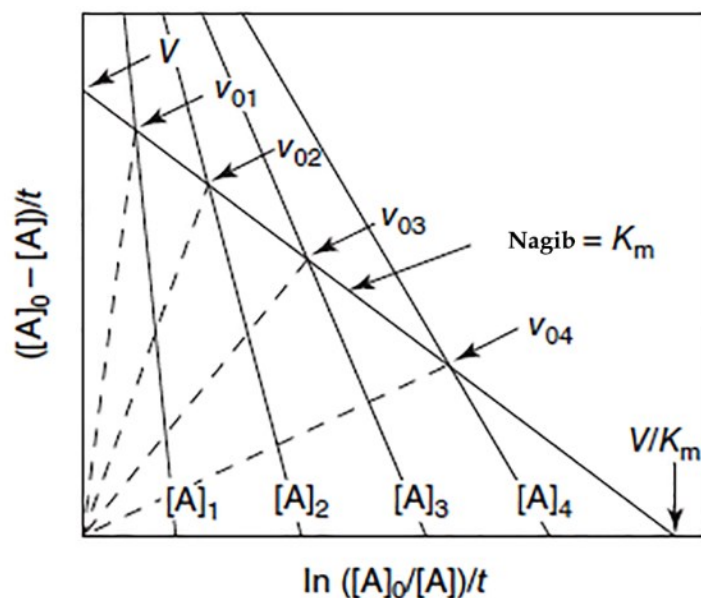
$$\frac{[A]_0 - [A]}{t} = \frac{K_P V}{K_P - K_{mA}} - \frac{K_{mA}(K_P + [A]_0)}{K_P - K_{mA}} \cdot \frac{\ln \frac{[A]_0}{[A]}}{t} \quad (72)$$

Za različite početne koncentracije $[A]_0$, dobija se obrazac pravih linija sa zajedničkim presekom ordinate za $\pm V/(1 - K_{mA}/K_P)$, kada se $([A]_0 - [A])/t$ ucrtava u odnosu na $\ln([A]_0/[A])/t$. Nagibi linija su negativni za $K_{mA} < K_P$ i pozitivni za $K_{mA} > K_P$ i za $K_{mA} = K_P$ (slika 39).

Ove prave grade pravi ugao sa apscisom. Početne linije sa nagibom odgovarajuće početne koncentracije supstrata $[A]_0$ presecaju prave linije za brzinu reakcije u koordinati v_0 , pri realnoj početnoj brzini za $t=0$. Preseci izvornih linija sa linijama napretka leže na pravoj liniji, kao što je prikazano na slici 39, što predstavlja idealnu krivu napredovanja u odsustvu inhibicije proizvoda. Njen nagib je K_{mA} , presek ordinate V , a presek apscise V/K_{mA} . Poznavajući ove konstante, K_P se može izračunati. Vrednost nagiba pojedinačnih krivih brzina reakcija je $K_{mA}(K_P + [A]_0)/(K_P - K_{mA})$ prema prethodnoj jednačini. Ponovnim iscrtavanjem nagiba prema $[A]_0$, presek apscise je $-K_P$.⁹⁴⁶⁻⁹⁴⁸

Kompetitivna inhibicija proizvoda je najčešći tip inhibicije proizvoda, ali proizvod takođe može uticati na reakcije enzima na druge načine. U reakcijama sa više od jednog supstrata, proizvod će zameniti samo supstrat iz kojeg je direktno izašao, ali ne i kosupstrat. U takvim slučajevima mogu da deluju druge vrste inhibicije, *nekompetitivna* i *akompetitivna inhibicija proizvoda*.⁹⁴⁶⁻⁹⁴⁸

Inhibiciju proizvoda ne treba mešati sa inhibicijom povratnim proizvodom ili krajnjim proizvodom. Ovo je opšti princip regulacije metaboličkih puteva. Konačni proizvod lanca inhibira aktivnost prvog enzima i isključuje ceo put da bi se sprečilo nakupljanje međuprodukta. Istaknuti primer je aspartat transkarbamoilaza. Ovaj inicijatorski enzim biosintetskog puta pirimidina je inhibiran krajnjim proizvodom CTP. Zbog višestrukih koraka lanca, krajnji proizvod se suštinski razlikuje od supstrata ili proizvoda prvog enzima i katalitički centar ga neće prepoznati. Dakle, enzim poseduje odvojeno *alosterično* regulatorno mesto, koje je specifično za inhibitor povratnog proizvoda. Vezivanje inhibitora za ovo mesto utiče indirektno, npr. promenom konformacije, na katalitički centar.⁹⁴⁶⁻⁹⁴⁸



Slika 39. Evaluacija krive brzine reakcije pri inhibiciji proizvoda sa integrisanom Mihaelis-Menten jednačinom po metodi Foster (Foster) i Niemana (Niemann)⁹³²

I.4.5 Inhibicija enzima i srodni mehanizmi

I.4.5.1.1 Analizi prelaznog stanja

U toku katalitičkog mehanizma, supstrat prolazi kroz prelazno stanje, gde je veoma čvrsto vezan. Intenzivno reaguje sa grupama katalitičkog centra u cilju smanjenja energije aktivacije. Konfiguracija molekula je prisiljena u pravcu proizvoda. U normalnim reakcionim uslovima, vreme trajanja prelaznog stanja je veoma kratko, u rasponu od pikosekundi. Analizi, koji oponašaju prelazno stanje, vezuju se izuzetno čvrsto. Čak i ako vezivanje nije kovalentno, analog ostaje čvrsto vezan i ne može se lako ukloniti metodama separacije kao što su dijaliza ili gel filtracija.⁹⁰²

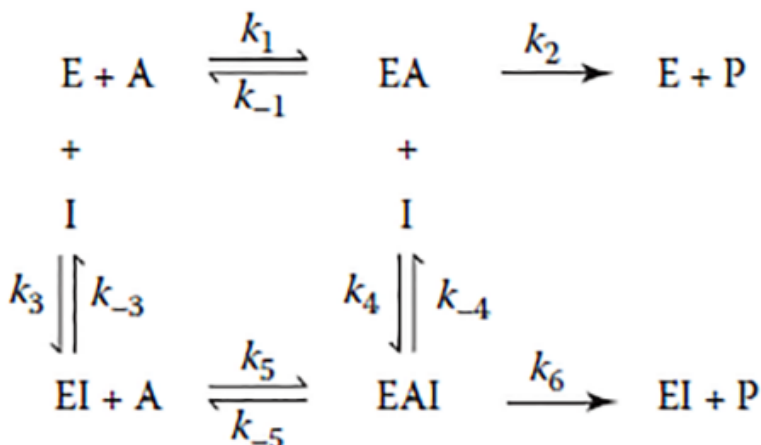
I.4.5.2 Povratna inhibicija

I.4.5.2.1 Opšte jednačine reda

Za inhibitor povratne reakcije vezivanja postoje različite mogućnosti interakcije i prema tome, različiti mehanizmi inhibicije. Za svaki mehanizam može se izvesti posebna jednačina u skladu sa opštim pravilima za jednačine u stacionarnom stanju kako bi se opisala zavisnost brzine enzima na supstrata i inhibitora, slično kako je već prikazana za jednostavnu i reverzibilnu Mihaelis–Menten jednačinu (jednačine (41) i (66)). Ovde se koristi alternativni pristup. Definisan je opšti mehanizam inhibicije, uključujući sve bitne tipove inhibicije. Za ovo je izvedena opšta jednačina brzine, koja obuhvata sve specijalne jednačine brzine pojedinačnih mehanizama inhibicije. Posebne jednačine brzine odgovarajućih mehanizama dobijaju se pojednostavljivanjem opšte šeme. Napravljene su sledeće pretpostavke:

- I. Inhibitor se vezuje za enzim formirajući EI (enzim-inhibitor) kompleks.
- II. Inhibitor se takođe može vezati za kompleks enzim-supstrat, formirajući EAI (enzim-supstrat-inhibitor) kompleks.
- III. EAI kompleks može biti neaktivan ili aktivan^{902,934,948,949}

Može se videti da ova naizgled jednostavna pravila obuhvataju sve verodostojne mehanizme. Prvi korak za bilo koji mehanizam mora biti proces vezivanja, ali tip mesta vezivanja ostaje otvoren – može, ali ne mora biti u katalitičkom centru. Isto važi i za uticaj inhibitora na aktivnost enzima. Može delovati direktnom interakcijom ili biti posredovana preko konformacionih promena. Ovaj opšti mehanizam se može formulisati sledećom šemom reakcije:



Šema 3. Povratna inhibicija enzima⁹⁰²

Mehanizam reakcije sadrži dve konstante brzine, k_2 za neinhibiranu reakciju i k_6 za EAI kompleks, i po dve konstante disocijacije za supstrat A i inhibitor I:

$$K_A = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][A]}{[EA]}; K_{Ai} = \frac{k_{-5}}{k_5} = \frac{[EI][A]}{[EAI]}; K_{iC} = \frac{k_{-3}}{k_3} = \frac{[E][I]}{[EI]}; K_{iu} = \frac{k_{-4}}{k_4} = \frac{[EA][I]}{[EAI]} \quad (73)$$

Povezuju ih odnos

$$\frac{K_A}{K_{Ai}} = \frac{K_{iC}}{K_{iu}} \quad (74)$$

tako da se četvrta konstanta može izračunati ako su poznate tri.

Diferencijalne jednačine za slobodni enzim i za kompleks enzim-supstrat mogu se uzeti kao nula, pod pretpostavkom stacionarnog stanja:

$$\frac{d[E]}{dt} = -(k_{-1} + k_2)[EA] - (k_1[A] + k_3[I])[E] + k_{-3}[EI] = 0 \quad (75)$$

$$\frac{d[EA]}{dt} = -(k_{-1} + k_2 + k_4)[EA] + k_1[E][A] + k_{-4}[EAI] = 0 \quad (76)$$

Jednačina za brzinu reakcije v je:

$$v = \frac{d[EP]}{dt} = k_2[EA] + k_6[EAI] \quad (77)$$

Ukupna količina enzima je zbir svih mogućih formi enzima, pri čemu se termini za komplekse enzim-inhibitor mogu zameniti konstantama inhibicije:

$$[E]_0 = [E] + [EA] + [EI] + [EAI] = [E] + [EA] + \frac{[E][I]}{K_{ic}} + \frac{[EA][I]}{K_{iu}} \quad (78)$$

Iz ovoga se dobija izraz za $[E]$:

$$[E] = \frac{[E]_0 - [EA] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)}{1 + \frac{[I]}{K_{ic}}} \quad (79)$$

U jednačini (75), $[EI]$ se zamenjuje sa $K_{ic} = k_{-3}/k_3$:

$$-(k_1[A] + k_3[I])[E] + (k_{-1} + k_2)[EA] + k_3[E][I] = 0 \quad (80)$$

$$-k_1[A][E] + (k_{-1} + k_2)[EA] = 0 \quad (81)$$

i $[E]$ se uklanja korišćenjem jednačine:

$$\frac{(k_{-1} + k_2)[EA]}{k_1[A]} = \frac{[E]_0 - [EA] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)}{1 + \frac{[I]}{K_{ic}}} \quad (82)$$

Ovo daje termin za $[EA]$, postavljajući $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$:

$$[EA] = \frac{[E]_0}{\frac{K_m}{[A]} \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)} \quad (83)$$

Zamenom ovog člana u jednačinu brzine reakcije (77), primenom $V_1 = k_2[E]_0$, $V_2 = k_6[E]_0$ i zamenom $[EAI]$ sa K_{iu} , sledi:

$$v = \left(k_2 + \frac{k_6[I]}{K_{iu}}\right) [EA] \quad (84)$$

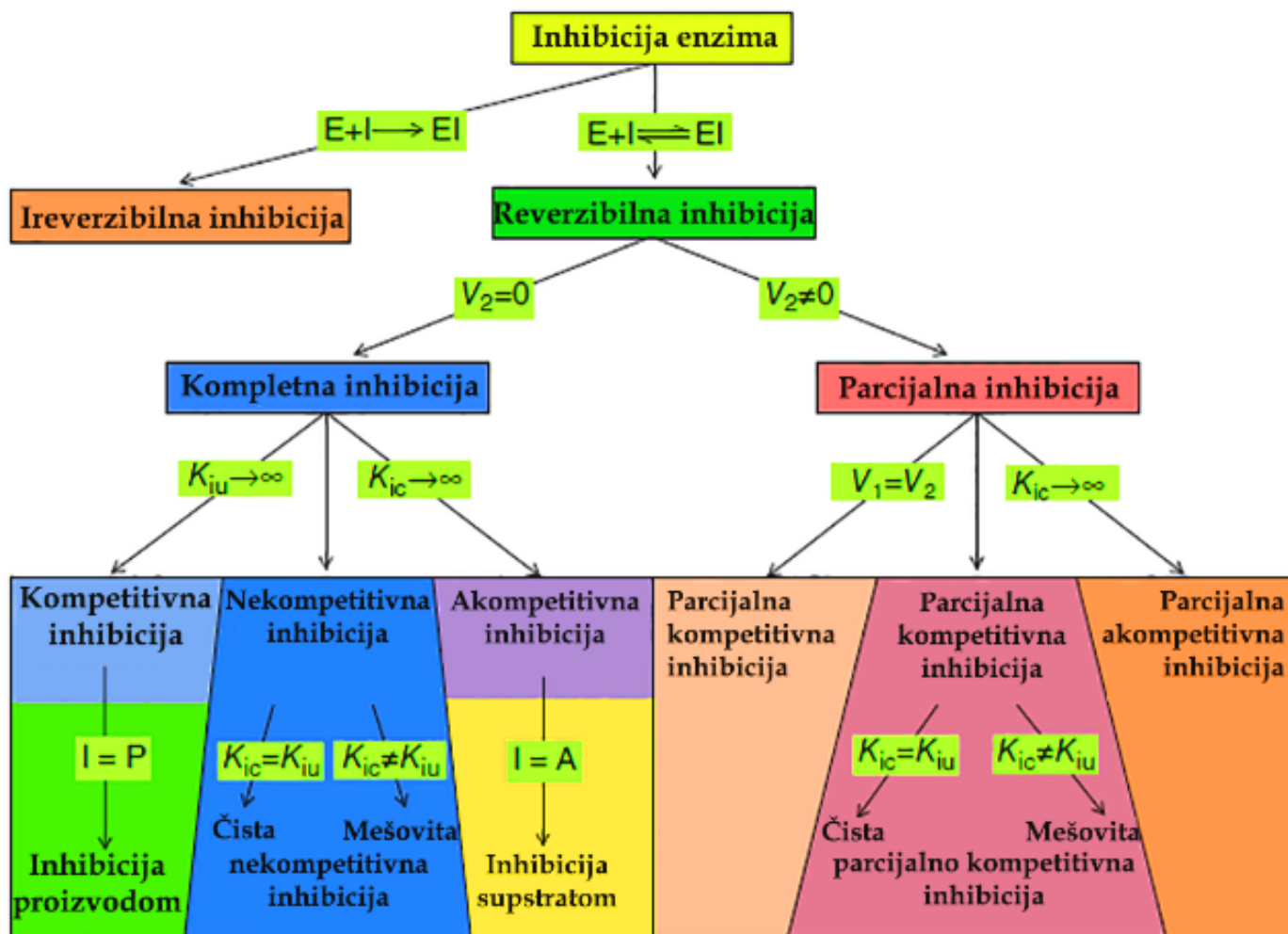
$$v = \frac{\left(V_1 + \frac{V_2[I]}{K_{iu}}\right)[A]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)[A]} \quad (85)$$

Ovo je jednačina brzine reakcije za opštu šemu inhibicije. To je takođe jednačina za poseban mehanizam inhibicije, parcijalno nekompetitivnu inhibiciju.

Na prvoj tački grananja reverzibilne inhibicije, mora se odlučiti da li je enzim još uvek aktivan u prisustvu inhibitora. Takvi mehanizmi se nazivaju parcijalna inhibicija. Ako vezivanje inhibitora potpuno inaktivira enzim, dolazi do potpune inhibicije, EAI je neaktivan ($k_6 \sim V_2 = 0$) i označava se kao mrtvi kompleks. Izraziti mehanizmi inhibicije se dobijaju ako se inhibitoru dozvoli da se vezuje za oba, E i EA, ili samo za jedan oblik enzima. Za nevezujuće forme enzima, odgovarajuće konstante vezivanja (inhibicije) se smatraju

beskonačnim. U slučaju parcijalnih inhibicija, odnosi k_2 prema k_6 i V_1 prema V_2 , mogu da variraju.^{902,934,948,949}

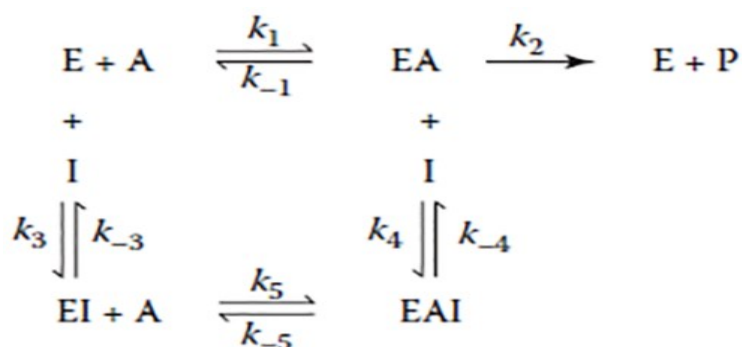
Slika 40 daje pregled svih bitnih tipova reverzibilnih inhibicija uključenih u ovu šemu.



Slika 40. Pregled osnovnih reverzibilnih mehanizama inhibicije enzima⁹⁰²

I.4.5.2.2 Nekompetitivna inhibicija i grafičko predstavljanje podataka

Ako je EAI neaktivan kompleks, onda k_6 odnosno $V_2=0$, reakciona šema 3 se svodi na:



Šema 4. Nekompetitivna inhibicija⁹⁰²

i jednačina (38) je pojednostavljena ($V_1=V$):

$$v = \frac{V[A]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)[A]} \quad (86)$$

Recipročni oblik za Linviver-Burk grafik je

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)}{V[A]} + \frac{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}}{V} \quad (87)$$

Transformacija prema Hanesovom zapletu:

$$\frac{[A]}{v} = \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)}{V} + \frac{[A] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)}{V} \quad (88)$$

i grafik Edi-Hofstija:

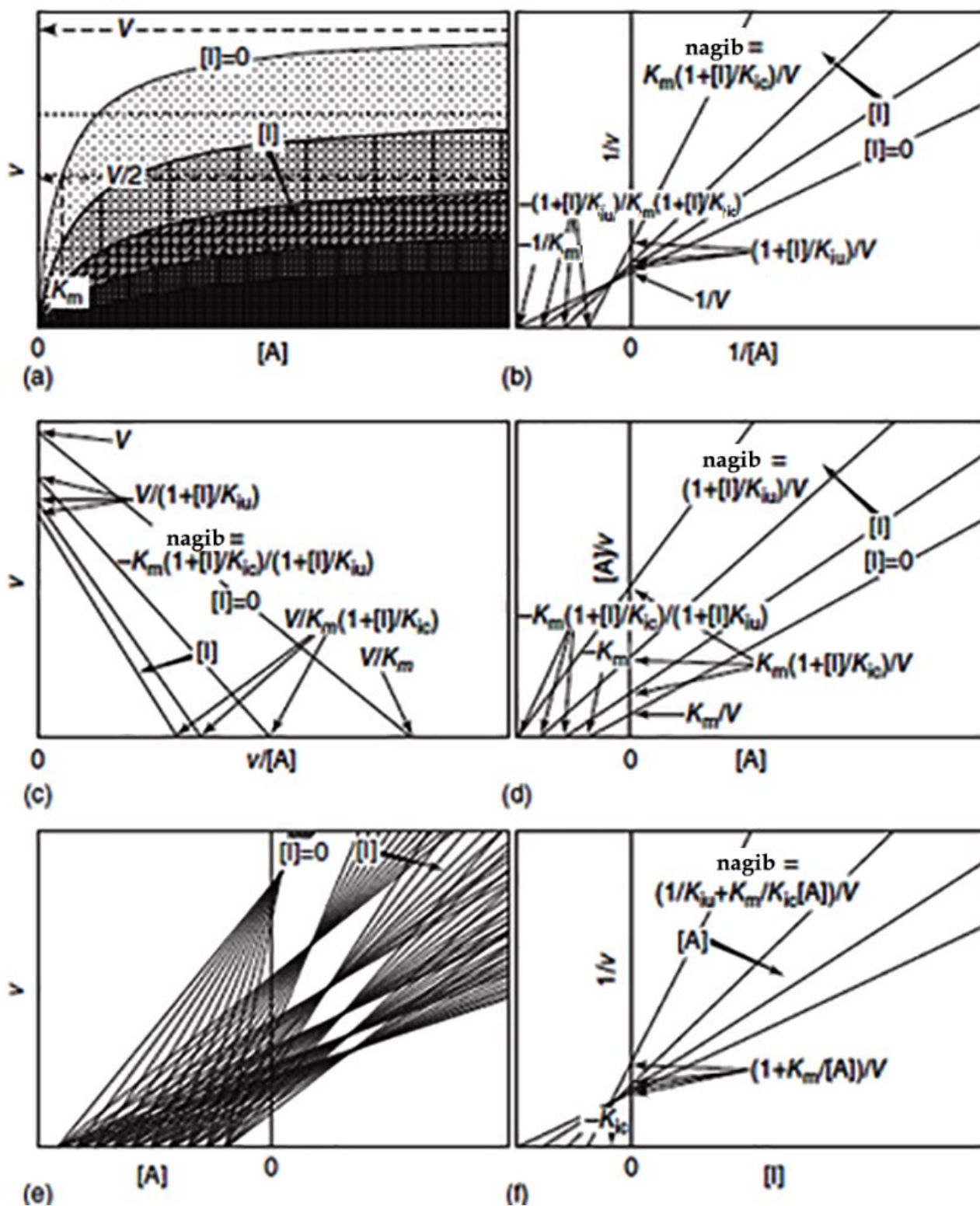
$$v = \frac{V}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} - \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} \cdot \frac{v}{[A]} \quad (89)$$

Ovaj opšti oblik potpune inhibicije se naziva nekompetitivna. Inhibitor utiče na prividnu Mihaelisovu konstantu i maksimalnu brzinu.^{902,919,920,933-935,948,950,951}

Nekompetitivna inhibicija je najvažnija inhibicija za regulaciju ćelijskog metabolizma. Na aktivnost enzima mogu uticati metaboliti bez ikakve analogije sa supstratom, kao u slučaju inhibicije krajnjeg proizvoda i inhibicije sa alosteričnim enzimima. Zbog kooperativnih efekata, ovi enzimi često pokazuju sigmoidne krive zasićenja, koje se ne mogu linearizovati konvencionalnim dijagramima. Ovo komplikuje analizu, izgled linija za identifikaciju odgovarajućeg mehanizma, odnosno spojeni odsecci se moraju izvesti ekstrapolacijom na beskonačnu koncentraciju supstrata. Obično se nekonkurentna inhibicija javlja sa višestrukim reakcijama supstrata. Analog jednog supstrata će delovati i inhibirati reakciju tako što će istisnuti samo ovaj supstrat sa njegovog mesta vezivanja. Međutim, on ne može da zameni kosubstrat, koji se još uvek može vezati za enzim, ali sa neaktivnim analogom vezanim za prvo mesto supstrata, reakcija ne može da se nastavi. Dakle, analog će biti nekompetitivni inhibitor u odnosu na kosubstrat. Slična situacija se javlja sa inhibicijom proizvoda, gde se konkurencija obično posmatra sa supstratom iz kojeg je proizvod direktno izveden, dok je nekompetitivan u odnosu na kosupstrat. Ovo bi samo trebalo da bude primer principa nekonkurentne inhibicije. U stvari, situacija je komplikovanija, u zavisnosti od odgovarajućih višesupstratnih mehanizama.⁹⁰²

Različiti tipovi inhibicije, kao što je nekompetitivna inhibicija, mogu se identifikovati eksperimentalnim pristupom, gde se najpre određuju brzine reakcije pri različitim koncentracijama supstrata. Iz ove serije testova će se dobiti K_m i V prema Mihaelis-Menten jednačini. U drugoj seriji, enzim se testira sa istim koncentracijama supstrata, ali sada u prisustvu konstantne količine inhibitora. Još dve ili tri serije se izvode na isti način, menjajući samo koncentraciju inhibitora, koja se uvek mora održavati konstantnom unutar iste serije testova. Koncentracije supstrata i inhibitora variraju oko odgovarajuće Mihaelisove i inhibicione konstante (preko 10 puta slabija). Za normalan mehanizam inhibicije, svaka serija testova daje hiperboličnu krivu crtanjem brzine u odnosu na koncentraciju supstrata (slika 41a). U prisustvu inhibitora, krive će postati ravnije, a čak i pri visokim koncentracijama supstrata neće se dostići nivo maksimalne brzine neinhibirane krive. Odnos između različitih krivih postaje jasniji u linearnim dijagramima. Linearnost je očuvana u prisustvu

inhibitora. Zajednički presek levo od ordinate u dvostrukom recipročnom dijagramu ukazuje na nekompetitivnu inhibiciju. Linije se razlikuju po nagibu i preseku ordinate, jer inhibitor utiče i na prividnu Mihaelisovu konstantu i na maksimalnu brzinu (slika 41b).



Slika 41. Nekompetitivna inhibicija prezentovana različitim dijagramima: (a) Direktan dijagram, (b) Linviver-Burk dijagram, (c) Edi-Hofsti dijagram, (d) Hanesov dijagram, (e) direktan linearni dijagram (f) Diksonov inhibicioni dijagram (1953). Određivanja kinetičkih konstanti su naznačena⁹⁰²

Relativni položaj zajedničkog preseka linija daje dodatne informacije o mehanizmu. Ako je $K_{ic}=K_{iu}$ (u ovom slučaju i $K_A=K_{Ai}$), inhibitor se vezuje sa jednakim afinitetom i za slobodni enzim i za kompleks enzim-supstrat, odnosno, vezivanje supstrata ne utiče na vezivanje inhibitora i obrnuto. Vezivanje inhibitora neće uticati na vezivanje supstrata. U ovom slučaju, sve prave se sastaju u jednoj tački direktno na apscisi, a K_m se u ovom mehanizmu ne menja. Za $K_{ic}<K_{iu}$, zajednički presek se nalazi iznad apscise. U ovom slučaju koji se često javlja, inhibitor se vezuje sa većim afinitetom za slobodni enzim nego za kompleks enzim-supstrat. Već vezani supstrat ometa vezivanje inhibitora, npr. sternom ili elektrostatičkom smetnjom. Shodno tome, na vezivanje supstrata će takođe uticati na sličan način već vezani inhibitor ($K_A<K_{Ai}$). Ređi su slučajevi u kojima već vezani supstrat ili inhibitor olakšava vezivanje odgovarajućeg drugog jedinjenja, $K_{ic}>K_{iu}$ i $K_A>K_{Ai}$. Presek prave linije se sada nalazi ispod apscise.^{902,919,920,933-935,948,950,951}

Za tri slučaja nekompetitivne inhibicije koriste se različiti termini. Potpuno nezavisno vezivanje supstrata i inhibitora sa zajedničkim apscisnim presekom označava se kao *čista nekompetitivna inhibicija*, dok se drugi slučajevi često nazivaju *mešanom inhibicijom*, jer se oba mogu smatrati mešavinom između dva različita tipa inhibicije. Slučaj sa presekom iznad apscise usmerava ka (ili je „pomešan sa”) konkurentskoj inhibiciji, koju karakteriše zajednički ordinatni presek, dok se slučaj sa presekom ispod apscise približava paralelnim linijama nekonkurentne inhibicije. Međutim, ova oznaka je opravdana samo grafičkim prikazima. Sa mehaničke tačke gledišta, sva tri slučaja su stvarne nekonkurentne inhibicije koje se povinuju mehanizmu reakcije prema jednačini (87), a ne mešavine različitih tipova inhibicije.^{902,919,920,933-935,948,950,951}

Hanesov dijagram (slika 41d) pokazuje isti pravi obrazac kao i Linviver–Burk dijagram, samo je lokacija preseka iznad ili ispod apscise obrnuta. Na Edi–Hofsti dijagramu (slika 41c), presek prave linije za $K_i<K_{iu}$ nalazi se u gornjem levom uglu, dok za $K_{ic}>K_{iu}$ u donjem desnom kvadrantu, a $K_{ic}=K_{iu}$ daje paralelne linije. Pored identifikacije odgovarajućih mehanizama inhibicije, linearni dijagrami su korisni za određivanje kinetičkih konstanti. K_m i V se mogu dobiti direktno iz neinhibiranih reakcija, a konstante inhibicije su uključene u bilo koju promenu linija zavisnu od inhibitora.

Prema jednačini (87) K_{ic} ulazi u nagib, a K_{iu} u presek ordinate dvostrukog recipročnog dijagrama. Slični odnosi važe i za ostale dijagrame (jednačine (87)–(89)). Sekundarni grafici (replotovi) se preporučuju kao pogodan postupak ne samo za grafičko određivanje konstanti, već oni takođe služe kao dodatna potvrda mehanizma inhibicije. U nastavku je ovo prikazano za dvostruko recipročni dijagram, ali slične procedure se mogu izvesti sa drugim metodama linearizacije. Odgovarajuće karakteristike, koje postaju promenjene inhibicijom na primarnom grafiku, npr. nagibi i preseci ordinata, su ucrtani u odnosu na koncentraciju inhibitora. Iz ove procedure proizilaze prave linije, ali samo sa potpunim inhibicijama sa neaktivnim kompleksom. Delimične inhibicije pokazuju nelinearne zavisnosti tako da se mogu razlikovati oba ova reverzibilna tipa inhibicije.

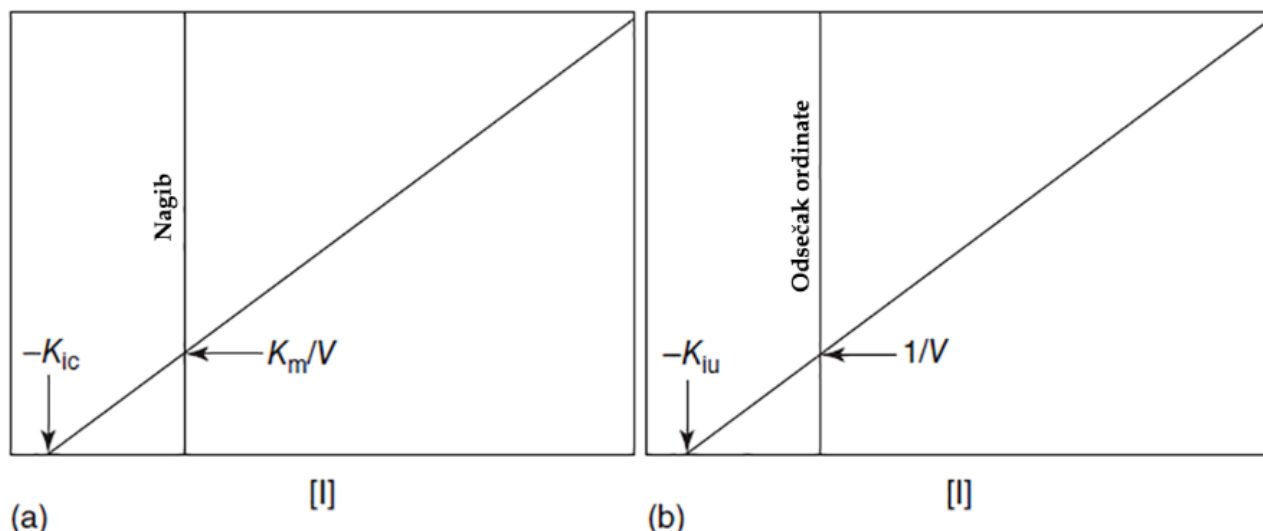
Izraz za nagib Sl u jednačini (87) za Lineweaver–Burk dijagram je

$$Sl = \frac{K_m}{V} + \frac{[I]K_m}{K_{ic}V} \quad (112)$$

a za ordinatni presek Or

$$Or = \frac{1}{v} + \frac{[I]}{K_{ic}v} \quad (113)$$

Iscrtavanje nagiba u odnosu na preseke ordinata na *Lineweaver–Burk*-ovom dijagramu u odnosu na koncentracije inhibitora primenjene za svaku seriju testova, i trebalo bi da se dobiju prave linije sa presecima apscise $-K_{ic}$ i $-K_{iu}$, respektivno (slika 42).



Slika 42. Sekundarni grafici nagiba (a) i odsečka ordinate (b) na Linviver–Burkovim dijagramima za nekompetitivnu inhibiciju⁹⁰²

Direktni linearni grafik je alternativna prezentacija kinetičkih podataka enzima, gde je svaki par promenljivih nacrtan kao prava linija umesto tačke. Konstante se dobijaju iz zajedničkog preseka svih linija. Sličan obrazac se dobija u prisustvu inhibitora, samo se presek kreće, u pravcu karakterističnom za odgovarajući mehanizam inhibicije. Za nekompetitivnu inhibiciju, on se kreće poprečno naniže, kao što je prikazano na slici 41e.

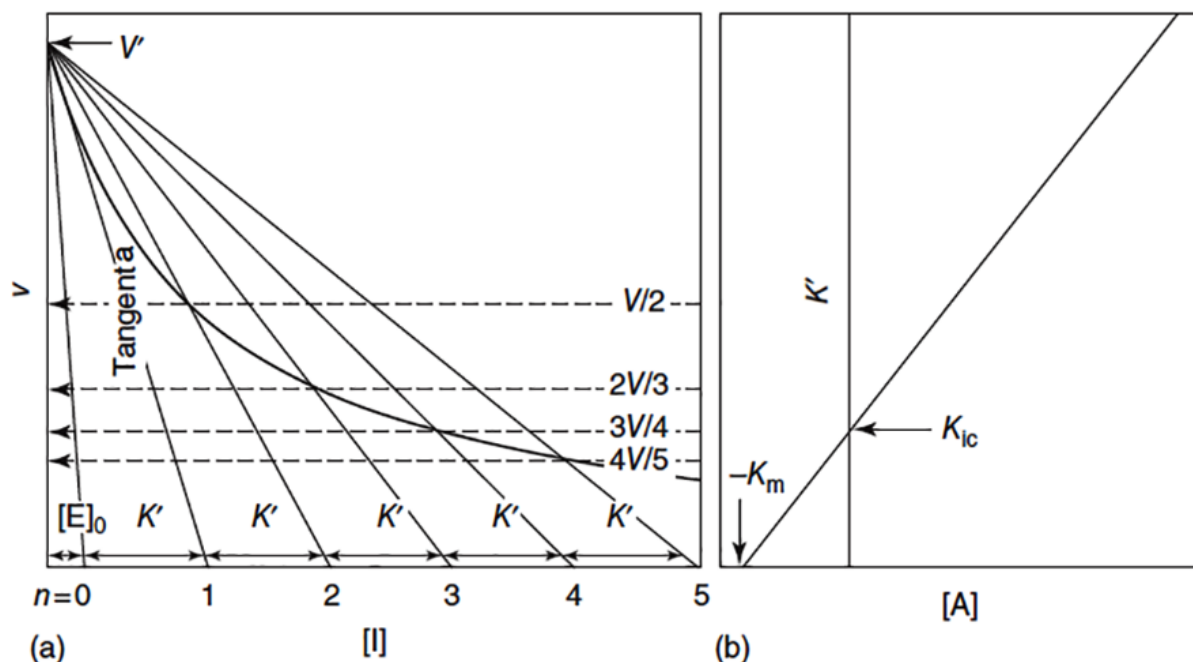
Transformacija jednačine (87):

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_m}{[A]}\right) + \frac{[I]}{V} \cdot \left(\frac{1}{K_{iu}} + \frac{K_m}{K_{ic}[A]}\right) \quad (92)$$

otkriva linearnu zavisnost $1/v$ od $[I]$. Za ovaj dijagram, koji je predložio Dikson, koncentracija inhibitora varira pri nekoliko konstantnih koncentracija supstrata.⁹⁴⁸ Ovaj dijagram takođe služi za razlikovanje potpune i delimične inhibicije, pri čemu prva daje prave linije, dok druga daje nelinearne zavisnosti. Za nekompetitivnu inhibiciju, linije se seku levo od ordinate, za $K_{ic} < K_{iu}$ iznad, $K_{ic} > K_{iu}$ ispod, i $K_{ic} = K_{iu}$ na apscisi, slično kao dvostruko recipročna dijagrama. X-koordinata preseka je K_{ic} (slika 41f). Nedostatak ovog grafika je što nekompetitivna (za slučaj $K_{ic} < K_{iu}$) i kompetitivna inhibicija pokazuju isti oblik odsečka u drugom kvadrantu i ne mogu se razlikovati.

Druga Diksonova metoda (1972), pogodna i za određivanje K_m , zahteva samo zavisnost brzine reakcije od koncentracije inhibitora pri jednoj (zasićenju) količini supstrata⁹³⁴ Za ovu proceduru mora biti poznat odgovarajući tip inhibicije. V' je neinhibirana brzina reakcije pri $[I]=0$ (nije identična maksimalnoj brzini V pri beskonačnoj koncentraciji supstrata). Sa povećanjem inhibitora, aktivnost opada na hiperboličan način i ide ka baznoj liniji pri potpunoj inhibiciji (slika 43a).

Vezne linije su povučene između V' i tačaka na krivoj $v'=V'(n-1)/n$ (za $n=1, 2, 3, \dots$, tj. $V/2, 2V/3, 3V/4, 4V/5, \dots$). Oni seku osnovnu liniju na jednakim rastojanjima (K'), koje imaju, u slučaju nekompetitivne inhibicije, vrednost K_{ic} , koja se odnosi na skalu koncentracije apscise. Prava za $n=1$ jednaka je izvornoj tangenti na krivu. Ako se rastojanje za K_{ic} još jednom unese levo od njegovog preseka, dobija se prava za $n=0$. Udaljenost do ordinate ($[I]=0$) odgovara primenjenoj koncentraciji enzima. Za kompetitivnu inhibiciju, rastojanja preseka veznih linija sa baznom linijom zavise od koncentracije supstrata. U ovom slučaju, eksperiment se mora izvesti pri različitim koncentracijama supstrata. Iscrtavanje rastojanja u odnosu na količine supstrata dovodi do prave linije koja preseca ordinatu ($[A]=0$) u K_{ic} i apscisu na $-K_m$ (slika 43b).^{902,919,920,933-935,948,950,951}



Slika 43. Diksonova metoda za određivanje konstanti inhibicije i Mihaelisovih konstanti (a); Sekundarni grafik prividnih K' vrednosti u odnosu na koncentracije supstrata (b)⁹⁰²

Mehanizmi inhibicije se takođe mogu analizirati primenom integrisane Mihaelis-Menten jednačine. Za nekompetitivnu inhibiciju, integracija jednačine (86) daje:

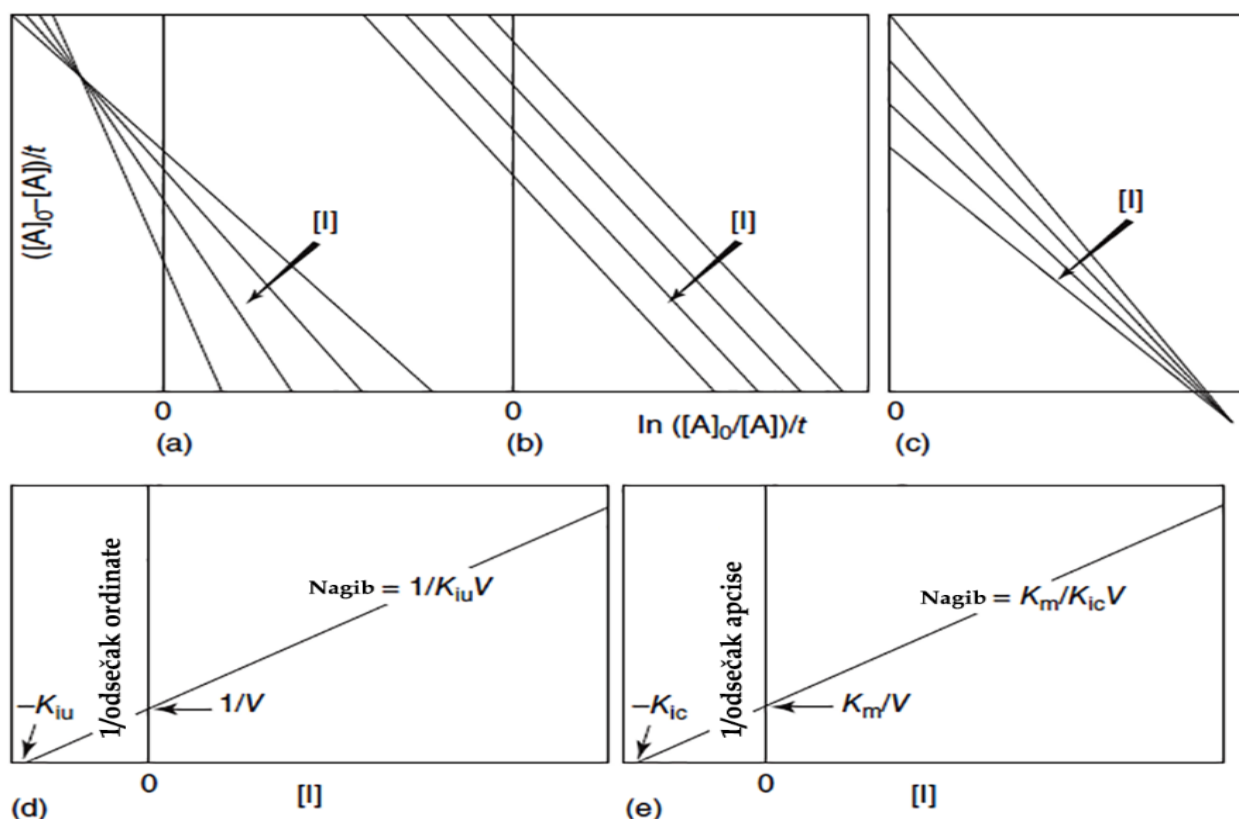
$$\frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} \cdot \ln \frac{[A]_0}{[A]} + [A]_0 - [A] = \frac{Vt}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} \quad (93)$$

Tri linearna oblika mogu se izvesti iz integrisane Mihaelis-Menten jednačine, takođe u proširenom obliku jednačine (93). Ovde je predstavljen samo jedan od njih:

$$\frac{[A]_0 - [A]}{t} = \frac{V}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} - \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} \cdot \frac{\ln \frac{[A]_0}{[A]}}{t} \quad (94)$$

Krive brzine reakcije sa jasno izraženom početnom koncentracijom supstrata i različitim koncentracijama inhibitora daju grupe pravih linija sa zajedničkim presekom. Lokacija preseka otkriva međusobnu vezu obe konstante inhibicije: u drugom kvadrantu za $K_{ic} < K_{iu}$

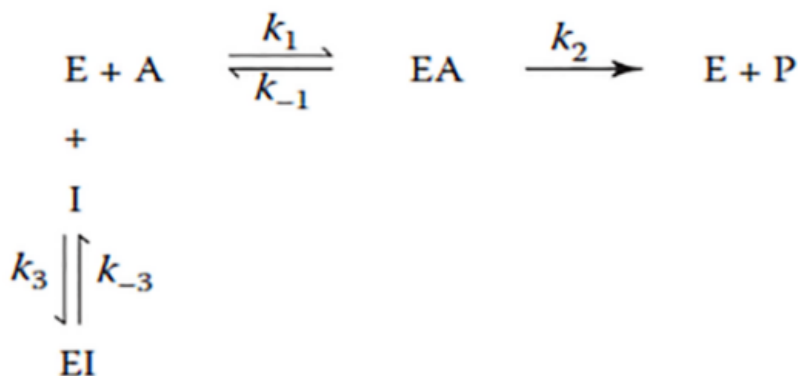
(slika 44a), u četvrtom kvadrantu za $K_{ic} > K_{iu}$ (slika 44c), i paralele za $K_{ic} = K_{iu}$ (slika 44). Vrednosti konstanti inhibicije mogu se dobiti iz sekundarnih dijagrama (slika 44d,e).⁹⁰²



Slika 44. Nekompetitivna inhibicija u linearizovanim dijagramima integrisane Mihaelis-Menten jednačine. Gornji grafici pokazuju slične dijagrame za slučajeve (a) $K_{ic} < K_{iu}$; (b) $K_{ic} = K_{iu}$; (c) $K_{ic} > K_{iu}$; Donji grafici pokazuju sekundarne dijagrame recipročnih preseka ordinate (d) i apscise (e) u odnosu na koncentraciju inhibitora⁹⁰²

I.4.5.2.3 Kompetitivna inhibicija

Ovaj mehanizam inhibicije pretpostavlja da se inhibitor vezuje isključivo za slobodni enzim. Reakciona šema 4 za nekompetitivnu inhibiciju se smanjuje na odgovarajući način:



Šema 5. Kompetitivna inhibicija⁹⁰²

i jednačina (89) se pojednostavljuje uzimanjem u obzir $K_{iu} \rightarrow \infty$, $[I]/K_{iu} = 0$.

Dakle, jednačina brzine reakcije za kompetitivnu inhibiciju sadrži samo jednu konstantu inhibicije, K_{ic} :

$$v = \frac{V[A]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + [A]} \quad (95)$$

Linearizacija jednačine (95) prema Linviver-Burku daje

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)}{V[A]} \quad (96)$$

prema Hanesu

$$\frac{[A]}{v} = \frac{[A]}{V} + \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)}{V} \quad (97)$$

prema Edi-Hofstiju

$$v = V - K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) \cdot \frac{v}{[A]} \quad (98)$$

prema Diksonu

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_m}{[A]}\right) + \frac{[I]K_m}{VK_{ic}[A]} \quad (99)$$

Kao posledica mehanizma kompeticije, veliki višak supstrata pomera inhibitor sa mesta vezivanja, pa se, prema tome, maksimalna brzina V definisana za $[A] \rightarrow \infty$ neće promeniti. Nasuprot tome, velike količine inhibitora istiskuju supstrat. Ova karakteristika, primetna na duplo-recipročnom dijagramu zajedničkim presekom ordinate svih pravih linija na $1/V$ (slika 45b), ukazuje na ovu vrstu inhibicije. Shodno tome, hiperbole u direktnom dijagramu teže ka istom nivou zasićenja (slika 45a). Inhibicija utiče samo na prividnu Mihaelisovu konstantu, i shodno tome, oni parametri koji sadrže K_m se menjaju u linearizovanim dijagramima (slika 45b-d), npr. nagibi i preseki apscise na Linviver-Burk dijagramu. Konstanta vezivanja za kompetitivni inhibitor, *konstanta kompetitivne inhibicije* K_{ic} , može se dobiti iz preseka apscise sekundarnog grafikona nagiba u odnosu na koncentraciju inhibitora (slika 43a).⁹⁰²

Integrisana Mihaelis-Menten jednačina za kompetitivnu inhibiciju može se izvesti iz jednačine (86) za nekompetitivnu inhibiciju bez obzira na termine koji sadrže K_{iu} :

$$K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) \cdot \ln \frac{[A]_0}{[A]} + [A]_0 - [A] = Vt \quad (100)$$

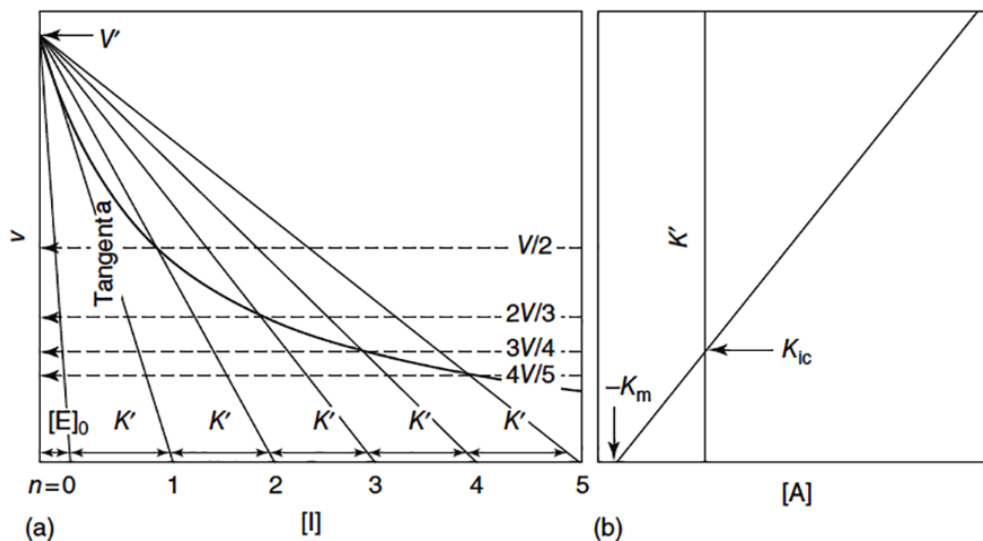
Prave linije sa zajedničkim presekom na V dobijaju se na linearnom dijagramu koji poštuje jednačinu (100):

$$\frac{[A]_0 - [A]}{t} = V - K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) \cdot \frac{\ln \frac{[A]_0}{[A]}}{t} \quad (101)$$

Sekundarni dijagram nagiba ili recipročnih preseka apscise u odnosu na koncentracije inhibitora daje $-K_{ic}$ iz preseka apscise (slika 45e).⁹⁰²

Mehanizam kompetitivne inhibicije pretpostavlja alternativno vezivanje supstrata i inhibitora, oba se ne mogu vezati istovremeno, već se takmiče za isto mesto, obično katalitički centar. Proučavanje kompetitivne inhibicije sa različitim analogima supstrata daje vredne informacije o specifičnosti enzima. Kompetitivni inhibitori (antagonisti) služe kao ciljani blokatori enzimskih reakcija u terapiji. U regulaciji metabolizma, kompetitivna inhibicija se javlja uglavnom kao inhibicija proizvoda. Ovo sprečava nakupljanje većih količina

proizvoda, čak i u prisustvu viška supstrata. Iako se obično pretpostavlja da kompetitivna inhibicija zahteva strukturnu analogiju između supstrata i inhibitora, ovaj tip inhibicije se ponekad nalazi u očigledno nepovezanim jedinstvenjima.⁹⁴⁹

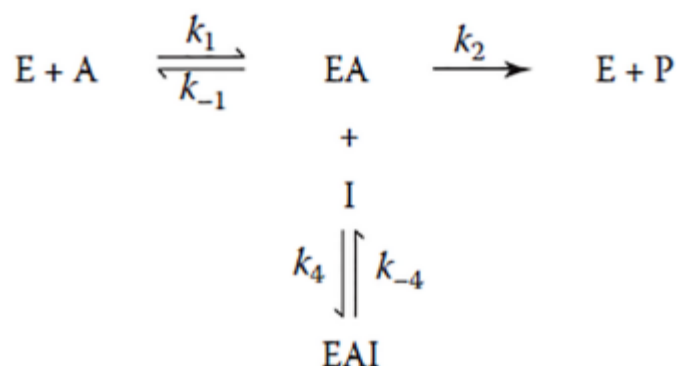


Slika 45. Dixon-ova metoda za određivanje konstanti inhibicije i *Michaelis*-ovih konstanti (a); Sekundarni grafik prividnih K' vrednosti u odnosu na koncentracije supstrata (b) ⁹⁰²

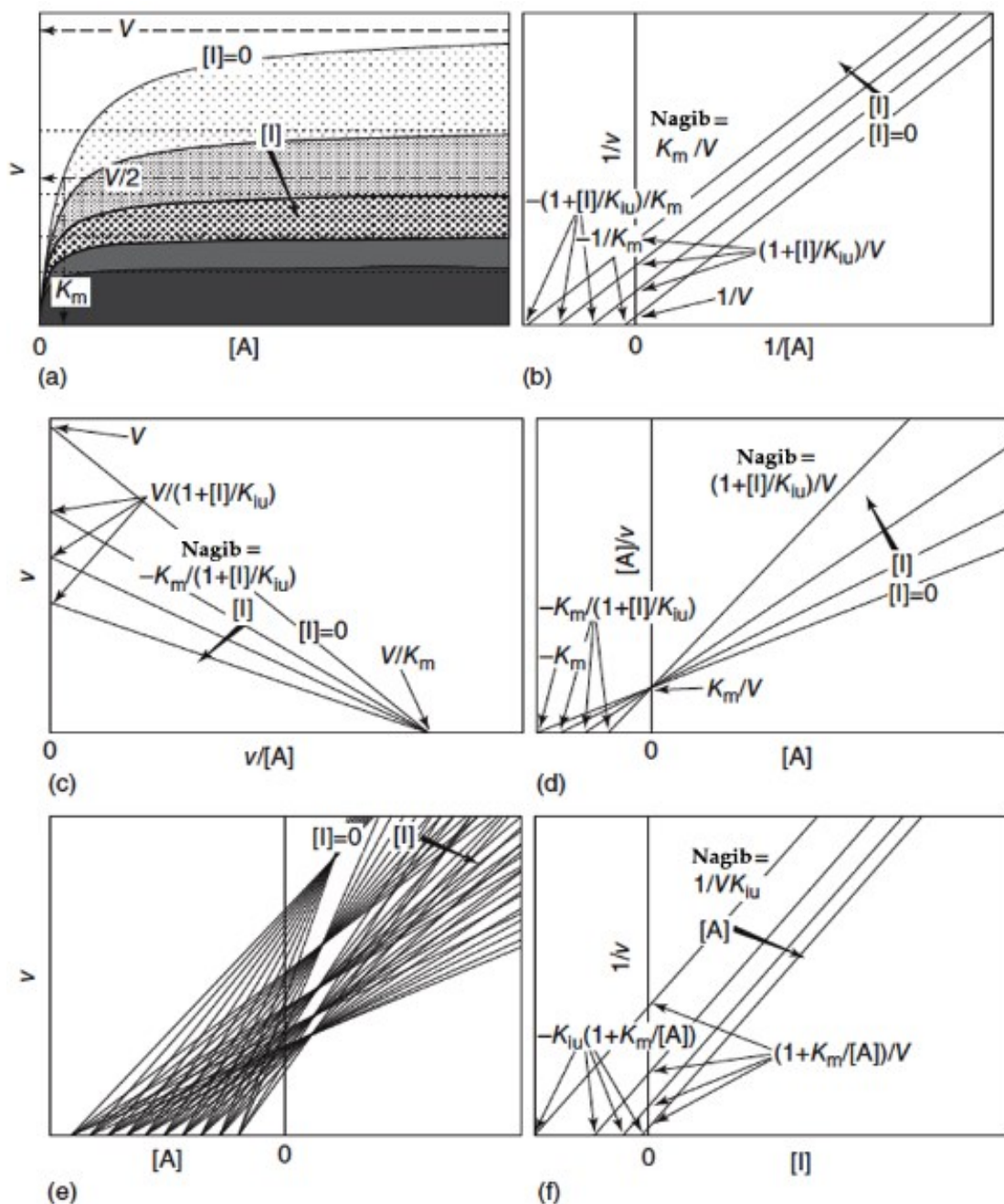
Interakcija inhibitora sa regulatornim mestom povezanim sa striktnom prevencijom vezivanja supstrata, izazvanom konformacionom promenom, takođe se može opisati ovim mehanizmom, ali je to prilično retko. Konačno, *delimično kompetitivna inhibicija* pokazuje isti obrazac inhibicije u linearizovanim dijagramima kao prava kompetitivna inhibicija, iako je zasnovana na potpuno drugačijem mehanizmu.⁹⁰²

I.4.5.2.4 Akompetitivna inhibicija

U ovom retkom tipu inhibicije, inhibitor se vezuje isključivo za kompleks enzim-supstrat. Već vezani supstrat je potreban da bi se završilo mesto vezivanja za inhibitor:



Šema 6. Akompetitivna inhibicija enzima



Slika 46. Akompatitivna inhibicija predstavljena na različitim graficima. (a) Direktna dijagram, (b) Linviver-Burk dijagram, (c) Edi-Hofsti dijagram, (d) Hanesov dijagram, (e) direktan linearni dijagram (f) Diksonov inhibicioni dijagram; Određivanja kinetičkih konstanti su naznačena⁹⁰²

U jednačini (89) za nekonkurentnu inhibiciju $K_{ic} \rightarrow \infty$, $[I]/K_{ic} = 0$, K_{iu} ostaje kao pojedinačna konstanta inhibicije:

$$v = \frac{V[A]}{K_m + \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)[A]} \quad (102)$$

Jednačina prema Linviver-Burku je

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V[A]} + \frac{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}}{V} \quad (103)$$

prema Hanesu

$$\frac{[A]}{v} = \frac{K_m}{V} + \frac{[A] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)}{V} \quad (104)$$

prema Edi-Hofstiju

$$v = \frac{V}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} - \frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} \cdot \frac{v}{[A]} \quad (105)$$

prema Diksonu

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_m}{[A]}\right) + \frac{[I]}{VK_{iu}} \quad (106)$$

U donjem opsegu supstrata, primećuje se hiperboličan rast na sličan način kako u odsustvu tako i u prisustvu inhibitora, a pri višim koncentracijama, krive se kreću ka različitim vrednostima zasićenja (slika 46a).

Dvostruko recipročni i Diksonov dijagram daju paralele (slika 46b,f), Edi-Hofsti dijagram ima zajednički odsečak apscise (slika 46c), a zajednički presek ordinate se pojavljuje na Hanesovom dijagramu (slika 46d). Konstanta akompetitivne inhibicije K_{iu} se dobija iz sekundarnog dijagrama ordinatnih preseka (slika 42b). U direktnom linearnom dijagramu, preseki teže pravo nadole (slika 46e).

Integrisana Mihaelis–Menten jednačina za ovaj tip inhibicije je

$$\frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} \cdot \ln \frac{[A]_0}{[A]} + [A]_0 - [A] = \frac{Vt}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} \quad (107)$$

i linearizovano

$$\frac{[A]_0 - [A]}{t} = \frac{V}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} - \frac{K_m \ln \frac{[A]_0}{[A]}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)t} \quad (108)$$

Dobija se zajednički presek apscise. Sekundarni grafik recipročnih ordinatnih odsečaka u odnosu na koncentracije inhibitora daje $-K_{iu}$ kao presek apscise (slika 44d).⁹⁰²

I.4.5.3 Parcijalne inhibicije

I.4.5.3.1 Parcijalno nekompetitivna inhibicija

Parcijalne inhibicije karakteriše još uvek aktivan EAI kompleks. Njegova aktivnost može biti ili nepromenjena u odnosu na EA kompleks, ili može biti promenjena na negativan ili pozitivan način. Dakle, za razliku od potpunih inhibicija, može doći i do aktivacije. Reakciona šema (šema 4) i jednačina brzine za ovu vrstu inhibicije su već predstavljene.

Linivier-Burk jednačina:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)}{\left(V_1 + \frac{V_2 [I]}{K_{iu}}\right) [A]} + \frac{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}}{V_1 + \frac{V_2 [I]}{K_{iu}}} \quad (109)$$

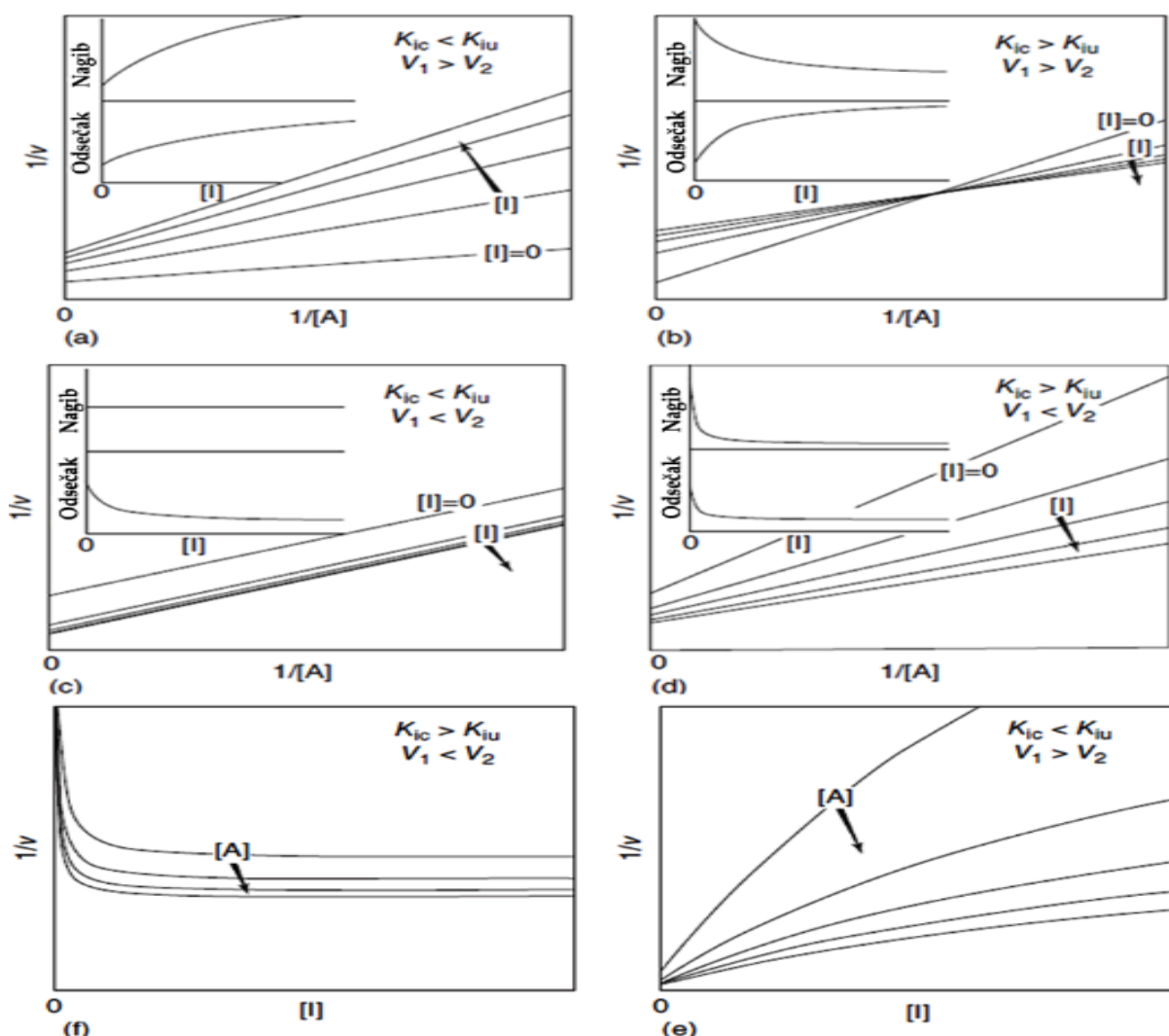
Hanesova jednačina:

$$\frac{[A]}{v} = \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)}{V_1 + \frac{V_2 [I]}{K_{iu}}} + \frac{[A] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)}{V_1 + \frac{V_2 [I]}{K_{iu}}} \quad (110)$$

Edi-Hofsti jednačina:

$$v = \frac{V_1 + \frac{V_2 [I]}{K_{iu}}}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} - \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right)}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} \cdot \frac{v}{[A]} \quad (111)$$

Linearne zavisnosti se takođe primećuju u sva tri dijagrama za delimične inhibicije, a relativni položaji pravih linija su često slični odgovarajućim tipovima potpune inhibicije. Međutim, postoji veći izbor obrazaca krive, pošto se pored konstanti inhibicije može promeniti i konstanta brzine obrtanja k_6 za EAI kompleks. Ovo komplikuje identifikaciju i analizu ovog tipa inhibicije. Slika 47 prikazuje neke od takvih kombinacija u Linviver-Burkovim dijagramima (a-d) i Diksonovim dijagramima (e,f).

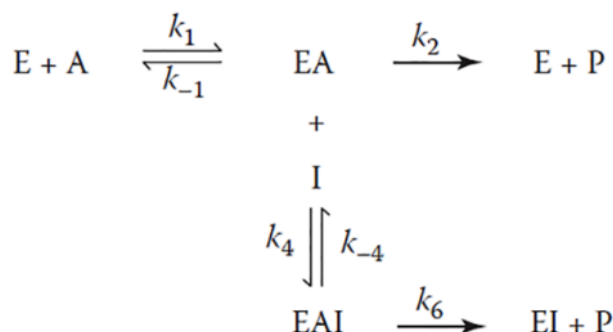


Slika 47. Parcijalno nekompetitivna inhibicija u dvostruko recipročnim (a-d) i Diksonovim (e,f) dijagramima pri različitim kombinacijama inhibicionih konstanti i maksimalne brzine reakcije V_1 i V_2 . Umetci pokazuju sekundarne dijagrame nagiba i odsečka ordinate postavljene u odnosu na koncentraciju inhibitora⁹⁰²

Moguća lokacija zajedničkog preseka u prvom kvadrantu dvostruke recipročne grafike je izuzetna (slika 47b). Karakteristično za parcijalne inhibicije i kriterijum za razlikovanje od potpunih inhibicija je činjenica da sve dijagrame sa inhibitorom kao promenljivom, odnosno sekundarni i Diksonovi dijagrami ne daju prave linije (slika 47e, f i umeci u (a)–(d)). Dalja posebnost mehanizama parcijalne inhibicije je da oni mogu opisati aktivacije na dva različita načina. Ako je $k_6 > k_2$, EAI kompleks postaje aktivniji od EA kompleksa. Aktivacija će se takođe posmatrati ako $K_{ic} > K_{iu} \approx K_A > K_{Ai}$. Pod ovim uslovom, ravnoteža se pomera sa neaktivnih oblika E i EI na aktivne komplekse EA i EAI.⁹⁰²

I.4.5.3.2 Parcijalno akompetitivna inhibicija

Ovaj tip inhibicije je poseban oblik nekonkurentne inhibicije kada je tercijalni EAI kompleks još uvek aktivan:



Šema 7. Šema parcijalno akompetitivna inhibicija enzima⁹⁰²

Jednačina brzine reakcije za ovaj tip inhibicije je:

$$v = \frac{\left(V_1 + \frac{V_2[I]}{K_{iu}}\right)[A]}{K_m + \left(\frac{1+[I]}{K_{iu}}\right)[A]} \quad (112)$$

po Linviver-Burku:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{\left(V_1 + \frac{V_2[I]}{K_{iu}}\right)[A]} + \frac{\frac{1+[I]}{K_{iu}}}{V_1 + \frac{V_2[I]}{K_{iu}}} \quad (113)$$

po Hanesu:

$$\frac{[A]}{v} = \frac{K_m}{V_1 + \frac{V_2[I]}{K_{iu}}} + \frac{[A]\left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)}{V_1 + \frac{V_2[I]}{K_{iu}}} \quad (136)$$

po Edi-Hofstiju:

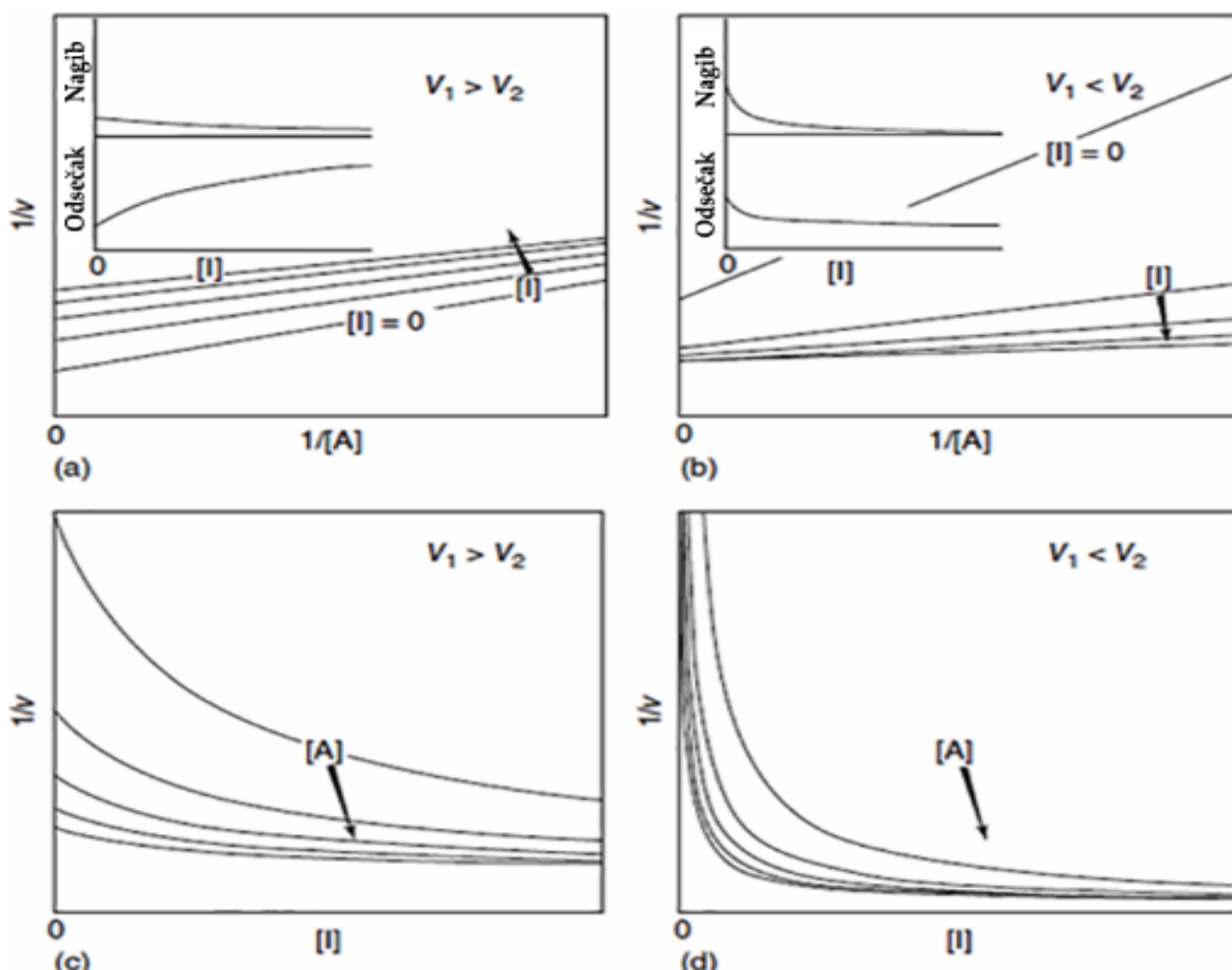
$$v = \frac{V_1 + \frac{V_2[I]}{K_{iu}}}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} - \frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} \cdot \frac{v}{[A]} \quad (137)$$

Grafici mogu biti slična onoj kod potpune nekompetitivne inhibicije, ali, u zavisnosti od odgovarajućih konstanti, može doći do odstupanja i linije u Linviver-Burkovom dijagramu

više ne moraju biti paralelne (slika 48a,b). Aktivacija je takođe moguća sa ovim mehanizmom inhibicije. Diksonov i sekundarni dijagrami su nelinearni (slika 48a–d).⁹⁰²

I.4.5.4 Inhibicija nekompetitivnim i akompetitivnim proizvodom

Inhibicija enzima od strane proizvoda je konkurentna za enzimске reakcije sa samo jednim supstratom i uglavnom takođe za reakcije sa više supstrata u odnosu na supstrat iz kojeg je proizvod direktno izveden. Međutim, mogu se pojaviti i druge vrste inhibicije proizvoda. Posebno u pogledu kosupstrata, primećuje se nekompetitivna ili akompetitivna inhibicija proizvodom.



Slika 48. Parcijalno akompetitivna inhibicija u dvostruko recipročnim (a, b) i Diksonovim (c, d) dijagramima pri različitim kombinacijama maksimalne brzine reakcije V_1 i V_2 . Umeci pokazuju sekundarne dijagrame nagiba i odsečka ordinate postavljene u odnosu na koncentraciju inhibitora⁹⁰²

Jednačine brzine reakcije za odgovarajući mehanizam inhibicije mogu se pretvoriti u jednačine za inhibiciju proizvoda zamenom pojma $[I]$ sa $[P]$ (ovde nije prikazano). Obratna reakcija, koji se može pojaviti u prisustvu proizvoda, biće zanemaren zbog jednostavnosti. Odgovarajući obrasci pravih linija prate odgovarajući tip inhibicije. Konstante inhibicije

imaju značenje konstanti vezivanja proizvoda. Integracija jednačine (86) za slučaj inhibicije nekompetitivnog proizvoda rezultira sledećim pojmom, postavljanjem $[P]=[A]_0-[A]$:

$$K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) \cdot \ln \frac{[A]_0}{[A]} + \left(1 - \frac{K_m}{K_{ic}}\right) [P] + \frac{[P]^2}{2K_{iu}} = Vt \quad (116)$$

Zbog kvadratnog člana, ovaj odnos se ne može pretvoriti u linearnu jednačinu prema metodama linearizacije integrisane Mihaelis-Menten jednačine, kao što je pokazano crtanjem $([A]_0-[A])/t$ u odnosu na $\ln([A]_0/[A])/t$:

$$\frac{[A]_0-[A]}{t} = \frac{V}{1 + \frac{[A]_0-[A]}{2K_{iu}} - \frac{K_m}{K_{ic}}} - \frac{K_m \left(1 + \frac{[A]_0}{K_{ic}}\right)}{1 + \frac{[A]_0-[A]}{2K_{iu}} - \frac{K_m}{K_{ic}}} \cdot \frac{\ln \frac{[A]_0}{[A]}}{t} \quad (117)$$

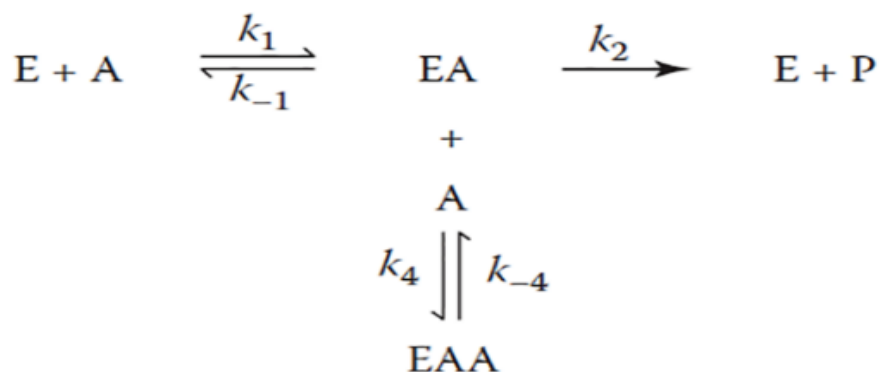
Dodavanjem konstantne količine proizvoda $[P]$ od početka reakcije, jednačina (117) postaje:⁹⁰²

$$\frac{[A]_0-[A]}{t} = \frac{V}{1 + \frac{[P]_0 + [A]_0-[A]}{2K_{iu}} - \frac{K_m}{K_{ic}}} - \frac{K_m \left(1 + \frac{[A]_0}{K_{ic}}\right)}{1 + \frac{[P]_0 + [A]_0-[A]}{2K_{iu}} - \frac{K_m}{K_{ic}}} \cdot \frac{\ln \frac{[A]_0}{[A]}}{t} \quad (118)$$

Kako nekompetitivna inhibicija uključuje i kompetitivnu i akompetitivnu inhibiciju, njihove jednačine se mogu dobiti redukcijom jednačina (116)–(118), postavljanjem $K_{iu}=\infty$ za kompetitivnu i $K_{ic}=\infty$ za akompetitivnu inhibiciju. Evaluacija krive brzine reakcije za identifikaciju tipa inhibicije može se izvršiti pomoću Fosterove i Niemanove metode.⁹³²

I.4.5.5 Inhibicija supstratom

Ovaj tip inhibicije, koji se takođe naziva inhibicija supstratom u višku, često se primećuje. Efekat inhibicije postaje vidljiv pri visokim koncentracijama supstrata, gde se brzina reakcije smanjuje umesto da teži maksimalnoj brzini. Drugi molekul supstrata se vezuje za aktivni EA kompleks i inhibira reakciju. Ovo drugo mesto vezivanja može biti mesto vezivanja proizvoda enzima. Vezani dodatni molekul supstrata sprečava stvaranje proizvoda od strane prvog molekula supstrata. Mora se pretpostaviti da će prvi vezujući molekul supstrata zauzeti pravo mesto vezivanja supstrata (u suprotnom enzim neće biti funkcionalan).



Šema 8. Šema inhibicije enzima supstratom u višku⁹⁰²

Molekul inhibitornog supstrata može da se veže samo za EA kompleks i deluje kao nekompetitivni inhibitor.

Jednačine (98)–(102) za nekompetitivnu inhibiciju primenjuju se zamenom $[I]$ sa $[A]$:

$$v = \frac{V[A]}{K_m + \left(1 + \frac{[A]}{K_{iu}}\right)[A]} \quad (119)$$

Linivier-Burk jednačina:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V[A]} + \frac{1 + \frac{[A]}{K_{iu}}}{V} \quad (120)$$

Hanesova jednačina:

$$\frac{[A]}{v} = \frac{K_m}{V} + \frac{[A]\left(1 + \frac{[A]}{K_{iu}}\right)}{V} \quad (121)$$

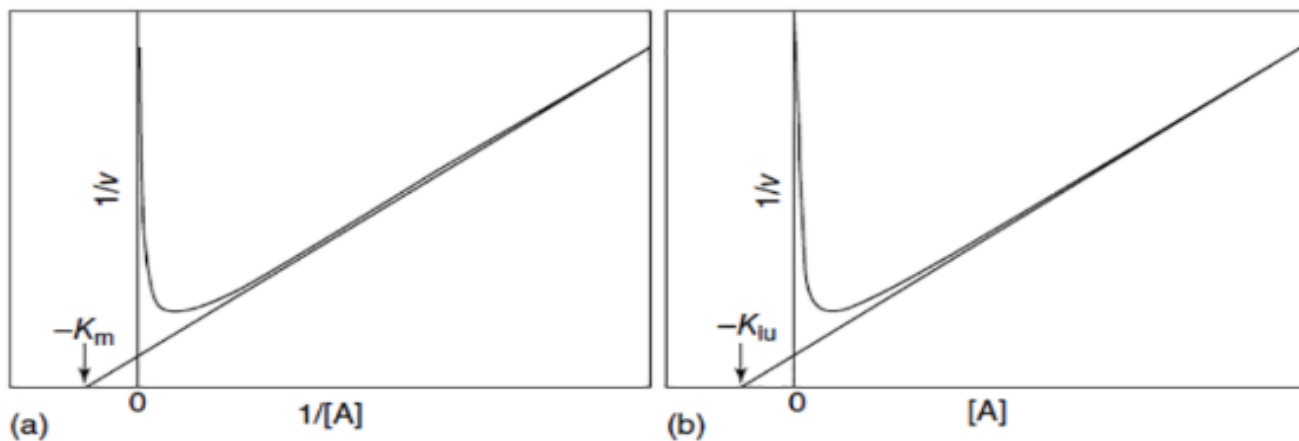
Edi-Hofsti jednačina:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{[A]}{K_{iu}}} - \frac{K_m}{1 + \frac{[A]}{K_{iu}}} \cdot \frac{v}{[A]} \quad (122)$$

Diksonova jednačina:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \cdot \left(1 + \frac{K_m}{[A]}\right) + \frac{[A]}{VK_{iu}} \quad (123)$$

Pošto isto jedinjenje deluje istovremeno i kao supstrat i kao inhibitor, dva suprotna efekta se ne mogu posmatrati odvojeno. Linearizovani dijagrami ne daju prave linije, a oblik rezultujućih krivih identifikuje inhibiciju supstrata. U dvostrukom recipročnom dijagramu, kriva se savija prema gore prema ordinati (slika 49a).



Slika 49. Inhibicija supstratom: (a) dvostruko recipročni dijagram i (b) Diksonov dijagram⁹⁰²

Ovo otežava određivanje konstanti, jer se Mihaelisova konstanta ne može odrediti u odsustvu inhibitora. Približno, može se pretpostaviti da je inhibitorski efekat zanemarljiv pri niskim koncentracijama supstrata i da se od asimptote do krive u ovom regionu može proceniti K_m i V (slika 49a).^{902,934,948,951}

Diksonovi dijagrami (slika 49b), na kojem je supstrat (koji se sada smatra inhibitorom) direktno nacrtan u odnosu na recipročnu brzinu, pokazuje slično odstupanje kao kod

dvostruke recipročnih grafika i, ovde, konstanta inhibicije za supstrat može biti ekstrapolirana na isti način od odsečka apscise sa asimptotom na oblast visokog supstrata, gde preovlađuje inhibicioni efekat.

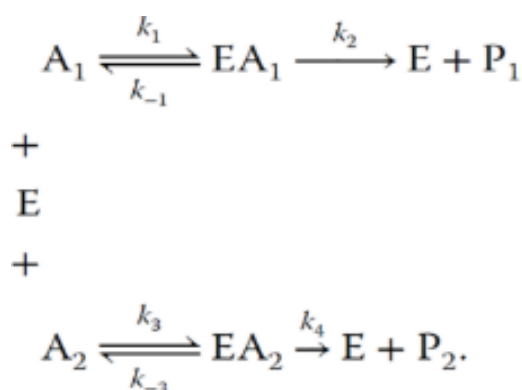
Krive brzine reakcije se takođe ne mogu linearizovati integracijom jednačine (119):

$$\frac{[A]_0 - [A]}{t} = V - \frac{[A]_0^2 - [A]^2}{2K_{iu}t} - K_m \frac{\ln \frac{[A]_0}{[A]}}{t} \quad (124)$$

I.4.6 Enzimske reakcije sa dva kompetitivna supstrata

Enzimi poseduju visoku supstratnu specifičnost i često prihvataju samo svoj pravi supstrat, ali neki enzimi pokazuju široku specifičnost supstrata. Oni mogu da reaguju sa blisko povezanim ili homolognim jedinjenjima, kao što je alkohol dehidrogenaza, koja oksidiše alkohole različite dužine lanca. Ako su dva homologa supstrata, A_1 i A_2 , istovremeno prisutna, samo jedan po jedan može biti prihvaćen i pretvoren u proizvod (šema 7).^{902,934,948,951}

Jedan od supstrata, obično fiziološki, biće efikasniji, dok lošiji supstrat ima uspoređujući uticaj, uspoređujući ukupnu stopu obrtanja, vezivanje i kataliza. Jedan supstrat može biti superiorniji od drugog u oba aspekta, ali se takođe mogu razlikovati i oba efekta mogu da se suprotstave jedan drugom; jedan supstrat može da se vezuje sa većim afinitetom, ali razvija sporiju konverziju od drugog, i obrnuto.



Šema 9. Šema enzimske reakcije sa dva kompetitivna supstrata⁹⁰²

Izvođenje jednačine brzine za istovremeno prisustvo dva aktivna supstrata prati aproksimaciju stacionarnog stanja:

$$\frac{d[EA_1]}{dt} = k_1[E][A_1] - (k_{-1} + k_2)[EA_1] = 0 \quad (125)$$

$$\frac{d[EA_2]}{dt} = k_3[E][A_2] - (k_{-3} + k_4)[EA_2] = 0 \quad (126)$$

$$v = k_2[EA_1] + k_4[EA_2] \quad (127)$$

$$[E]_0 = [E] + [EA_1] + [EA_2] \quad (128)$$

Zamena $[E]$ iz jednačine (128) u jednačini (125) i jednačina (126) daje

$$[EA_2] = [E]_0 - [EA_1] \left(1 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1[A_1]} \right) \quad (129)$$

$$[EA_1] = [E]_0 - [EA_2] \left(1 + \frac{k_{-3}+k_4}{k_3[A_2]} \right) \quad (130)$$

Jednačina (129) se zamenjuje u jednačinu. (130), uzimajući u obzir $K_{m1}=(k_{-1}+k_2)/k_1$ i $K_{m2}=(k_{-3}+k_4)/k_3$:

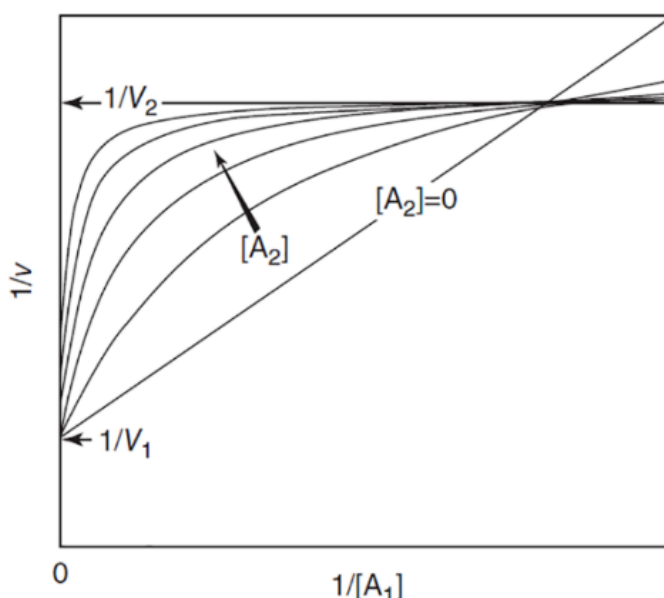
$$[EA_1] = \frac{K_{m2}[E]_0[A_1]}{K_{m2}[A_1]+K_{m1}[A_2]+K_{m1}K_{m2}} \quad (131)$$

$$[EA_2] = \frac{K_{m1}[E]_0[A_2]}{K_{m2}[A_1]+K_{m1}[A_2]+K_{m1}K_{m2}} \quad (132)$$

Zamena jednačina (131) i (132) u jednačinu (127) daje jednačinu brzine za reakciju sa dva alternativna supstrata, postavljanjem $V_1=k_2[E]_0$ i $V_2=k_4[E]_0$:

$$v = \frac{V_1K_{m2}[A_1]+V_2K_{m1}[A_2]}{K_{m2}[A_1]+K_{m1}[A_2]+K_{m1}K_{m2}} \quad (133)$$

Slika 50 prikazuje primer reakcije sa dva kompetitivna supstrata.



Slika 50. Reakcija sa dva različita supstrata na dvostruko recipročnom dijagramu. Maksimalna vrednost brzine V_1 varirajućeg supstrata A_1 je veća od vrednosti V_2 za konstantni supstrat A_2 . Jednake Mihaelisove konstante su uzete za oba supstrata⁹⁰²

Linearna zavisnost u prisustvu samo jednog supstrata A_1 menja se sa oba supstrata u dvofaznu karakteristiku, pri čemu se jedna faza približava maksimalnoj brzini V_1 prvog supstrata, a druga maksimalnoj brzini V_2 drugog supstrata A_2 . Za $V_1 > V_2$, kao što je prikazano na slici 50, krive se savijaju nagore od prave linije za $[A_2]=0$, u obrnutom slučaju, za $V_1 < V_2$, odstupaju i teže ka dole, a zatim smanjuju vrednosti $1/V_2$. Nelinearna odstupanja slična onima prikazanim na slici 50 se takođe primećuju kada su Mihaelisove konstante različite za oba supstrate. Supstrat sa nižom Mihaelisovom konstantom određuje tok krive.⁹⁰²

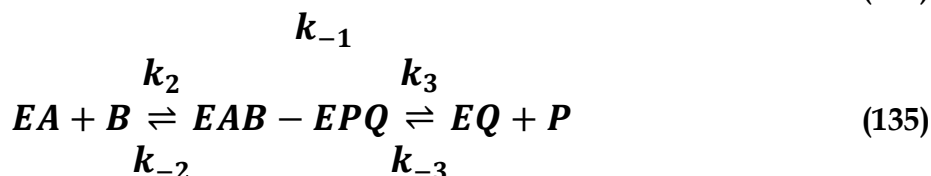
I.4.7 Enzimske reakcije sa više supstrata

Mihaelis–Menten jednačina je prvobitno izvedena za ireverzibilnu enzimsku reakciju sa samo jednim supstratom, ali je pokazano da ona ostaje važeća i za reverzibilne reakcije i

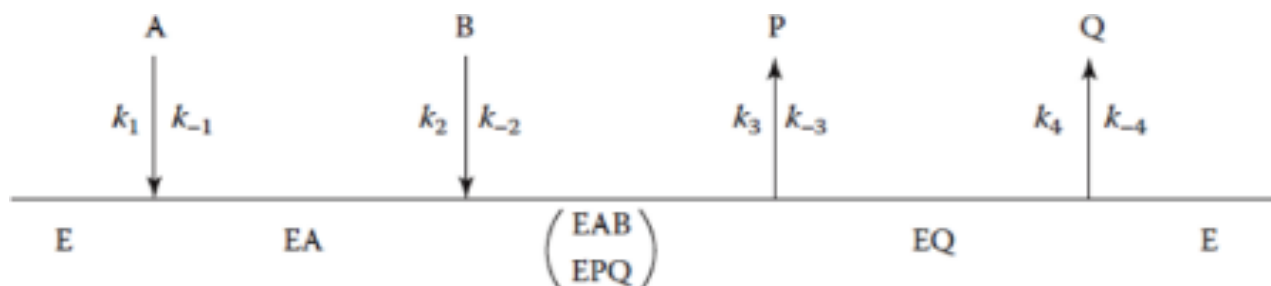
u prisustvu inhibitora. Međutim, da bi se smatrala osnovnim odnosom kinetike enzima, Mihaelis–Menten jednačina mora da se pokaže kao validna i za reakcije sa dva ili više supstrata, koji predstavljaju većinu enzimskih reakcija. U jednostavnom pristupu, takve reakcije se mogu tretirati pod uslovima u kojima se sve komponente, odnosno kosubstrati, kofaktori ili koenzimi, održavaju na konstantnom, zasićenju viška i samo jedan supstrat će varirati kao u slučaju reakcije sa jednim supstratom. i formalno se mogu dobiti konstante (K_m i V) samo za ovaj supstrat. Međutim, takav postupak neće otkriti ništa o posebnom mehanizmu i interakcijama između više supstrata. Za ovo se mora izvršiti detaljnija analiza, uzimajući u obzir sve komponente uključene u reakciju, i primeniti adekvatne jednačine.⁹⁰²

Supstrati dobijaju nazive redosledom njihovog vezivanja za enzime kao A, B, C, a proizvodi po redosledu njihovog oslobađanja P, Q, R. Različita stanja enzima su označena E, F, G. Sa supstratima i proizvodima enzim formira *prelazne komplekse*, EA, EP itd. Oni se mogu raspasti u unimolekularnom koraku oslobađajući supstrat ili proizvod, ili formirati *centralne komplekse* koji izvide katalitičku reakciju. Da bi se razlikovali od prelaznih kompleksa, centralni kompleksi su postavljeni u zagradi, npr. (EAB). Ne mogu da vežu još supstrata ili proizvoda, jer su sva mesta već zauzeta. Umesto toga, oni oslobađaju supstrat ili proizvod u unimolekularnim koracima. Kako kinetika stacionarnog stanja ne pruža informacije o katalitičkoj konverziji supstrata u proizvod (i obrnuto) na molekulu enzima, definisan je samo jedan centralni kompleks za oba stanja pre i posle katalize (EAB–EPQ). Broj supstrata koji učestvuju u direktnoj reakciji i proizvoda koji učestvuju u obrnutoj reakciji biće izražen terminima uni, bi, ter i quad za 1, 2, 3 i 4, respektivno. Ovi termini se dodaju imenu odgovarajućih reakcionih mehanizama. Za *bi-uni* mehanizam, dva supstrata kreiraju jedan proizvod. Mehanizmi pri kojima se svi supstrati moraju vezati pre nego što se proizvod oslobodi nazivaju se *sekvencijalni* mehanizmi. Vezivanje supstrata može biti *random* ili *redno*. Pri *ping-pong* mehanizmu, proizvod se oslobađa pre nego što su svi supstrati vezani. U ovom mehanizmu, enzim postoji u dva ili više oblika, modifikovanih grupama supstrata. U *izo-mehanizmima*, enzim se izomerizuje u dve ili više stabilne konformacije.⁹⁵⁰

Da bi tok reakcija sa više supstrata bio transparentniji, izabran je jednostavan Klilandov (Cleland) šematski oblik. Horizontalna linija, *reakciona koordinata*, oslikava progres reakcije. Ispod ove linije su naznačena različita stanja enzima koja se pojavljuju tokom reakcije. Vezivanje supstrata je prikazano vertikalnim strelicama ka reakcionoj koordinati, dok je disocijacija proizvoda vertikalnim strelicama od reakcione koordinate. Konstante brzine su pripisane na mestima strelica: glavna reakcija levo i povratna reakcija desno. Alternativno, navedena je konstanta vezivanja. Prema ovim pravilima, jednačine reakcije za *redni bi-bi* mehanizam su napisane u konvencionalnom stilu:



Šema po Klilandu:

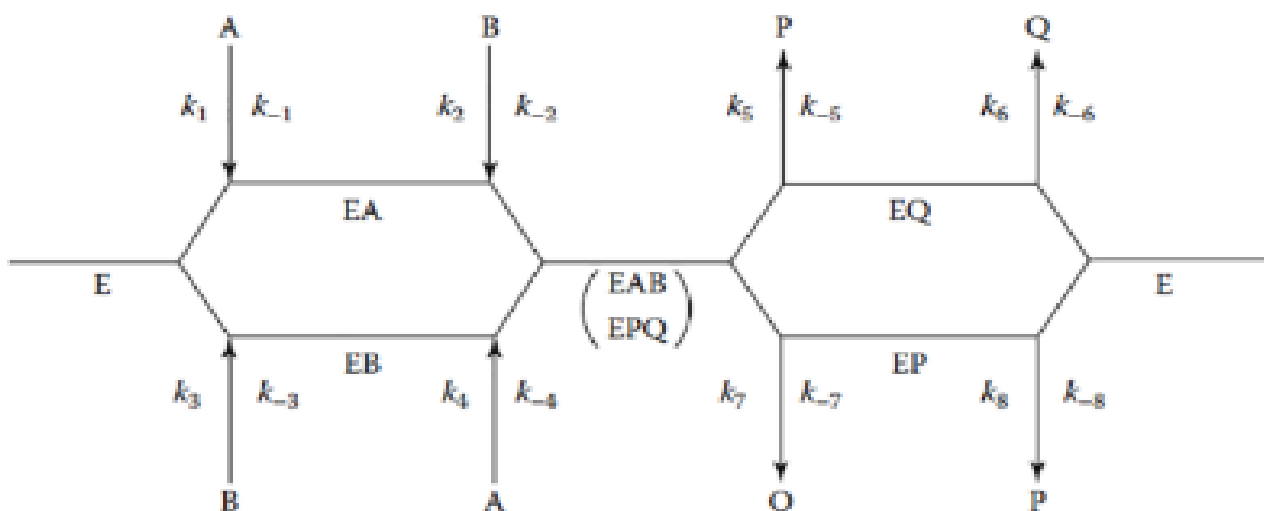


Šema 10. Klilandova šema za *redni bi-bi* mehanizam⁹⁰²

I.4.7.1 Mehanizmi enzimskih reakcija sa više supstrata

I.4.7.1.1 Random bi-bi mehanizam

Tipični primeri ovog multi-supstratnog mehanizma su kinaze ili fosforilaza B. Vezivanje supstrata i proizvoda odvija se u slučajnom nizu, to jest, oni moraju da se vezuju potpuno nezavisno jedan od drugog bez ikakve međusobne interakcije. Reakciona shema za *random bi-bi* mehanizam sa dva supstrata i dva proizvoda je:



Šema 11. Klilandova šema za *random bi-bi* mehanizam⁹⁰²

U poređenju sa mehanizmom sa jednim supstratom, za koji je izvedena Mihaelis-Menten jednačina, mora se uzeti u obzir skup novih konstanti. Pored dve maksimalne brzine, V_1 za prednju reakciju i V_2 za povratnu reakciju, svaki supstrat i svaki proizvod poseduju sopstvenu Mihaelisovu konstantu, K_{mA} , K_{mB} , K_{mC} , ..., i K_{mP} , K_{mQ} , K_{mR} , respektivno. Kao i kod jednostavne Mihaelis-Menten jednačine, Mihaelisoze konstante predstavljaju interakciju supstrata (ili proizvoda u povratnoj reakciji) sa enzimom da bi se formirao aktivni (centralni) kompleks enzim-supstrat. U slučaju multi-supstratnih reakcija, međutim, prvi korak vezivanja supstrata za slobodni enzim stvara samo prolazni kompleks koji karakteriše čista konstanta disocijacije. Vezivanje supstrata za enzim sa već vezanim kosubstratom dovodi do aktivnog enzimskog kompleksa koji karakteriše Mihaelisoza konstanta.

I konstanta disocijacije i Mihaelisova konstanta za isti supstrat mogu imati različite vrednosti. Da bi se razlikovale od Mihaelisovih konstanti, konstante disocijacije supstrata ili proizvoda na slobodni enzim su označene kao K_{iA} , K_{iB} , K_{iC} , ..., K_{iP} , K_{iQ} , K_{iR} ; „i’’ označava „inhibiciju”, pošto će odgovarajuće jedinjenje delovati kao inhibitor proizvoda u povratnoj reakciji. Ova karakteristika se koristi za identifikaciju mehanizama sa više supstrata, odgovarajuće konstante su označene kao *konstante inhibicije*. Što se tiče reakcije napred i nazad, postoji 10 kinetičkih konstanti za *random bi-bi* mehanizam: 2 maksimalne brzine, 4 konstante inhibicije i 4 Mihaelissove konstante. Sve ove konstante se ne mogu dobiti jednostavnim kinetičkim tretmanom kao što je prethodno opisano, već je potrebna detaljnija analiza. Postupak je sličan onom koji je već opisan za analizu inhibicije enzima (zaista, *random* mehanizam ima dalekosežne sličnosti sa nekompetitivnom inhibicijom). Nekoliko serija testova mora da se izvede menjajući jedan supstrat (npr. A), ostavljajući koncentraciju drugog supstrata [B] konstantnom unutar serije, ali se menja od jedne do druge serije.^{902,945}

Zbog svojih alternativnih reakcionih puteva, *random* mehanizam u svom opštem obliku je opisan složenom jednačinom brzine, koja ne daje hiperboličke krive zasićenja supstrata (ili prave linije u odgovarajućim dijagramima) sve dok supstrati nisu prisutni u količinama zasićenja. Značajno pojednostavljenje je postignuto pretpostavkom o brzoj ravnoteži u poređenju sa relativno sporom konverzijom centralnih tercijalnih kompleksa (EAB) i (EPQ) (*brz ravnotežni-random* mehanizam). Jednačina brzine reakcije za *random bi-bi* mehanizam je tada:

$$v = \frac{V_1 V_2 ([A][B] - \frac{[P][Q]}{K_e})}{K_{iA} K_{mB} V_2 + K_{mB} V_2 [A] + K_{mA} V_2 [B] + \frac{K_{mQ} V_1 [P]}{K_e} + \frac{K_{mP} V_1 [Q]}{K_e} + V_2 [A][B] + \frac{V_1 [P][Q]}{K_e}} \quad (137)$$

gde je K_e konstanta ravnoteže ukupne reakcije. U zatvorenom reakcionom ciklusu, što se tiče *random bi-bi* mehanizma (po sličnosti sa nekompetitivnom inhibicijom), konstante su povezane: $K_{iA}/K_{iB} = K_{mA}/K_{mB}$ i $K_{iP}/K_{iQ} = K_{mP}/K_{mQ}$; stoga se moraju odrediti samo tri od četiri konstante. Jednačina brzine reakcije za *random bi-bi* mehanizam se može dodatno pojednostaviti uzimajući u obzir samo početne brzine u jednom pravcu, npr. reakciju napred, kada je $[P]=[Q]=0$:

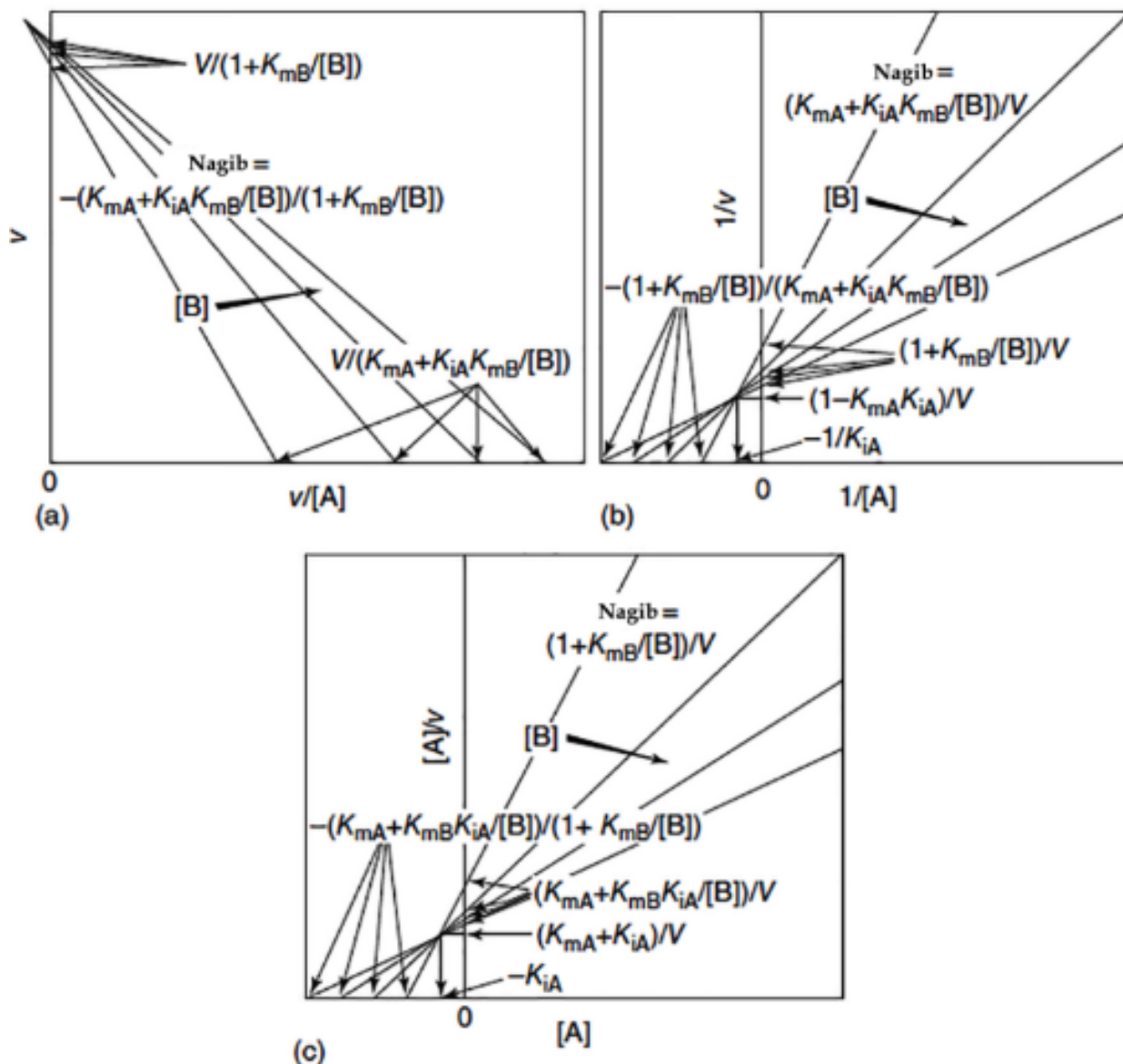
$$v = \frac{V_1 [A][B]}{K_{iA} K_{mB} + K_{mB} [A] + K_{mA} [B] + [A][B]} \quad (138)$$

Ako se jedan od dva supstrata održava konstantnim, prethodna jednačina se svodi na običnu Mihaelis-Menten jednačinu i varijacijom drugih supstrata dobijaju se hiperboličke zavisnosti, postajući linearne primenom dvostruko recipročne jednačine:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{iA} K_{mB}}{V_1 [A][B]} + \frac{K_{mA}}{V_1 [A]} + \frac{K_{mB}}{V_1 [B]} + \frac{1}{V_1} \quad (139)$$

Prava linija se dobija ako se jedan supstrat, npr. [A], menja održavajući [B] konstantnim. Izborom različitih konstantnih koncentracija [B] u nekoliko serija testova dobija se obrazac pravih linija sa zajedničkim presekom levo od ordinate u duplo recipročnom dijagramu (slika 51b). Relativna pozicija ovog presretanja daje dalje informacije o mehanizmu o kome je već bilo reči za nekompetitivnu inhibiciju. Za strogi *random* mehanizam, oba supstrata, A i B, moraju da se vežu u potpunosti nezavisno jedan od drugog. U ovom slučaju, isti supstrat (tj. A) se podjednako dobro vezuje za slobodni enzim E, kao i za kompleks enzim-kosupstrat EB, odnosno $K_{iA} = K_{mA}$ i $K_{iB} = K_{mB}$. Dobija se odsečak na apscisi $-1/K_{mA}$.

Sličan obrazac sa odsečkom apscise na $1/K_{mB}$ dobija se pri varijaciji B. Ako je reakcija reverzibilna, Mihaelisove konstante za proizvode se mogu dobiti na odgovarajući način. Na ovaj način su sve kinetičke konstante lako dostupne. Ako već vezani kosubstrat ometa vezivanje drugog supstrata, vezivanje za slobodni enzim će se desiti sa većim afinitetom, dakle $K_{iA} < K_{mA}$ i $K_{iB} < K_{mB}$. Zajednički odsečak je sada iznad apscise. Odsečak će biti ispod apscise ako vezani kosubstrat promoviše vezivanje drugog supstrata, $K_{iA} > K_{mA}$, $K_{iB} > K_{mB}$. Slični obrasci linija se dobijaju bez obzira da li se $[A]$ ili $[B]$ menja u prisustvu konstantnih količina odgovarajućeg drugog supstrata. Mihaelisove inhibicione konstante mogu se odrediti iz nagiba i koordinatnih preseka linija, kao što je prikazano na slici 51b.



Slika 51. Random bi-bi mehanizam: (a) Edi-Hofsti dijagram, (b) Linviver-Burk dijagram i (c) Hanesov grafik. Određivanje kinetičkih konstanti je označeno⁹⁰²

Alternativno, konstante se mogu dobiti iz sekundarnih dijagrama na sličan način kao što je već diskutovano u kinetici inhibicije. Linearnost na ovim dijagramima je dodatni test za pretpostavljeni mehanizam (tabela 12).

Tabela 12. Odsečki apscise i ordinate sekundarnih dijagrama za bisupstratne reakcije; Sl_A , Sl_B su nagibi, a Or_A , Or_B odsečki ordinate⁹⁰²

Primarni dijagram		Sekundarni dijagram					
Oznaka ose		Oznaka ose		Odsečki			
Y	X	Y	X	Random/redni mehanizam		Ping-pong mehanizam	
				Ordinata	Apscisa	Ordinata	Apscisa
$1/v$	$1/[A]$	Sl_A	$1/[B]$	K_{mA}/V	$-K_{mA}/K_{iA}K_{mB}$		
		Ab_A	$1/[B]$			$1/K_{mA}$	$-1/K_{mB}$
		Or_A	$1/[B]$	$1/V$	$-1/K_{mB}$	$1/V$	$-1/K_{mB}$
$1/v$	$1/[B]$	Sl_B	$1/[A]$	K_{mB}/V	$-1/K_{iA}$		
		Ab_B	$1/[A]$			$1/K_{mB}$	$-1/K_{mA}$
		Or_B	$1/[A]$	$1/V$	$-1/K_{mA}$	$1/V$	$-1/K_{mA}$
$[A]/v$	$[A]$	Sl_A	$1/[B]$	$1/V$	$-1/K_{mB}$	$1/V$	$-1/K_{mB}$
		$1/Ab_A$	$1/[B]$			K_{mA}	$-1/K_{mB}$
		Or_A	$1/[B]$	K_{mA}/V	$-K_{mA}/K_{iA}K_{mB}$		
$[B]/v$	$[B]$	Sl_B	$1/[A]$	$1/V$	$-1/K_{mA}$	$1/V$	$-1/K_{mA}$
		$1/Ab_B$	$1/[A]$			K_{mB}	$-1/K_{mA}$
		Or_B	$1/[A]$	K_{mB}/V	$-1/K_{iA}$		
$v/[A]$	v	Sl_A	$1/[B]$			$-1/K_{mA}$	$-1/K_{mB}$
		$1/Ab_A$	$1/[B]$	$1/V$	$-1/K_{mB}$	$1/V$	$-1/K_{mB}$
		Or_A	$1/[B]$	K_{mA}/V	$-K_{mA}/K_{iA}K_{mB}$		
$v/[B]$	v	Sl_B	$1/[A]$			$-1/K_{mB}$	$-1/K_{mA}$
		$1/Ab_B$	$1/[A]$	$1/V$	$-1/K_{mA}$	$1/V$	$-1/K_{mA}$
		Or_B	$1/[A]$	K_{mB}/V	$1/K_{iA}$		

Nagib Sl_A prave linije na primarnom grafiku, prema jednačini (139), je

$$Sl_A = \frac{K_{iA}K_{mB}}{v_1[B]} + \frac{1}{v_1} \quad (140)$$

crtanje nagiba naspram $1/[B]$ daje pravu liniju sa odsečkom apscise $-K_{mA}/K_{iA}K_{mB}$ (odnosno $-1/K_{mB}$ za $K_{mA}=K_{iA}$). Odsečak ordinate Or_A na primarnim graficima je:

$$Or_A = \frac{K_{mB}}{v_1[B]} + \frac{1}{v_1} \quad (141)$$

ucrtane u odnosu na $1/[B]$ takođe rezultiraju pravom linijom, koja seče apscisu na $-1/K_{mB}$.

Varijacija $[B]$ u primarnom dijagramu dovodi do prave linije na sekundarnom grafiku sa nagiba Sl_B ucrtanih nasuprot $1/[A]$ sa odsečkom apscise $-1/K_{iA}$:

$$Sl_B = \frac{K_{iA}K_{mB}}{v_1[A]} + \frac{K_{mB}}{v_1} \quad (142)$$

Apsciski odsečak $-1/K_{mA}$ dobija se iscrtavanjem odsečka ordinata Or_B naspram $1/[A]$:

$$Or_B = \frac{K_{mA}}{v_1[A]} + \frac{1}{v_1} \quad (143)$$

Slična analiza se može izvesti primenom drugih metoda linearizacije.

Prema Hanesu, $[A]/v$ je ucrtano naspram $[A]$ ili $[B]/v$ protiv $[B]$, respektivno:

$$\frac{[A]}{v} = \frac{1}{v_1} \left(K_{mA} + \frac{K_{iA}K_{mB}}{[B]} \right) + \frac{[A]}{v_1} \left(\frac{1+K_{mB}}{[B]} \right) \quad (144)$$

$$\frac{[B]}{v} = \frac{K_{mB}}{V_1} \left(1 + \frac{K_{iA}}{[A]} \right) + \frac{[B]}{V_1} \left(1 + \frac{K_{mA}}{[A]} \right) \quad (145)$$

Otkriva se zajednički presek levo od ordinate (slika 51c).

Kinetičke konstante se mogu dobiti ili iz nagiba i koordinatnih odsečaka sa primarnih grafika ili iz sekundarnih sa nagiba ili odsečaka ordinate nacrtanih u odnosu na recipročne koncentracije kosupstrata (tabela 12).

Primenom Edi-Hofsti dijagrama $v/[A]$, odnosno $v/[B]$, iscrtava se u odnosu na v :

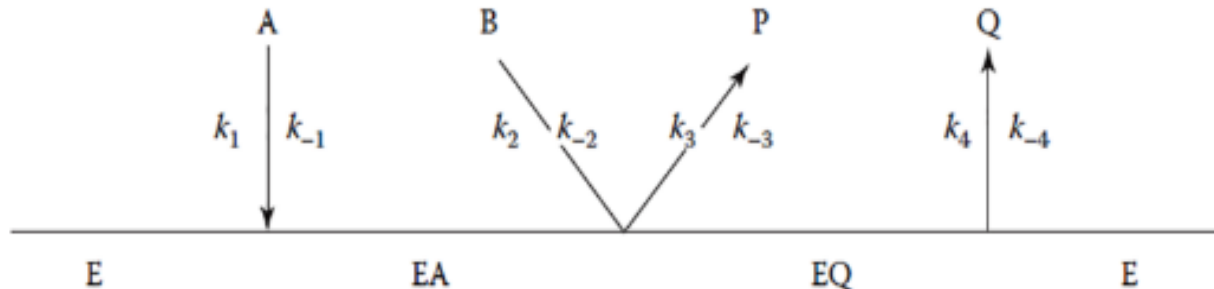
$$v = \frac{V_1}{1 + \frac{K_{mB}}{[B]}} - \frac{v}{[A]} \cdot \frac{K_{mA} + \frac{K_{iA}K_{mB}}{[B]}}{1 + \frac{K_{mB}}{[B]}} \quad (146)$$

$$v = \frac{V_1}{1 + \frac{K_{mA}}{[A]}} - \frac{v}{[B]} \cdot \frac{K_{mB} \left(1 + \frac{K_{iA}}{[A]} \right)}{1 + \frac{K_{mA}}{[A]}} \quad (147)$$

Zajednički presek se nalazi levo od ordinate za $K_{iA} > K_{mA}$ (slika 51a) i desno od ordinate, ispod apscise, za $K_{iA} < K_{mA}$. Ako je $K_{iA} = K_{mA}$, dobijaju se paralelne prave. U sekundarnim dijagramima, recipročni odsecci apscisa ili ordinate su iscrtani u odnosu na odgovarajuće koncentracije kosupstrata (tabela 12).^{902,945}

I.4.7.1.2 Redni bi-bi mehanizam

Ovaj mehanizam karakteriše stroga sekvenca vezivanja supstrata. Šema redne bi-bi reakcije je već predstavljena (šema 12).



Šema 12. Šema rednog bi-bi mehanizama⁹⁰²

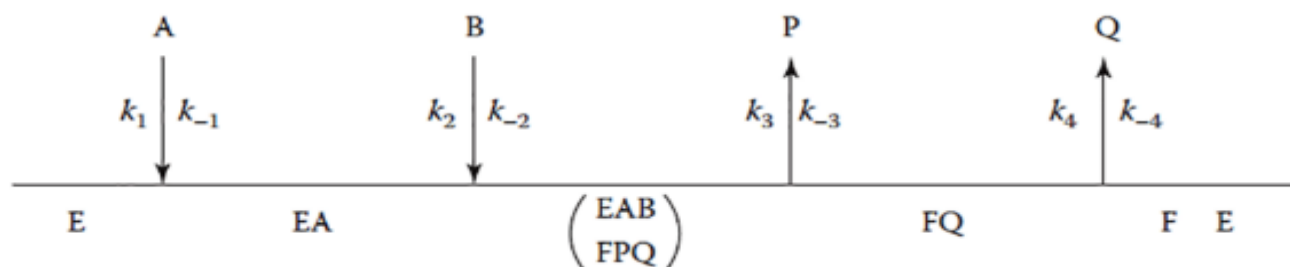
Redni bi-bi mehanizam je povezan sa slučajnim mehanizmom, mogu se koristiti iste jednačine brzine. Dok se za $K_{iA} = K_{mA}$ ne daje prednost i postoji čist *random* mehanizam, u slučaju $K_{iA} < K_{mA}$ supstrat A se prvenstveno vezuje za slobodni enzim E i za $K_{iA} > K_{mA}$ supstrat preferira vezivanje za EB kompleks. U oba slučaja, vezivanje se povinuje jasnom redosledu, što se konstante više razlikuju, to je red vezivanja stroži. Stoga se oba slučaja mogu smatrati antagonističkim pozicijama istog opšteg mehanizma, čistog *random* mehanizma bez interakcije i uređenog mehanizma za jaku interakciju supstrata. Jednačina izvedena za brzi ravnotežni *random* bi-bi mehanizam, može se na sličan način uzeti za *redni* bi-bi mehanizam. Oba mehanizma se razlikuju samo u pogledu razlika između njihove inhibicije i Mihaelisovih konstanti, i u linearizovanim dijagramima, po relativnom položaju zajedničkih pravih preseka^{902,945}

Redni mehanizmi se često primećuju u dehidrogenazama. Alkohol dehidrogenaza pokazuje izuzetan slučaj Torel-Šans (*Theorell-Chance*) mehanizma, u kojem se centralni kompleks razlaže tako brzo da je njegova stacionarna koncentracija zanemarljiva i može se zanemariti u jednačini brzine.

Jednačina (136) za prednju reakciju normalno uređenih mehanizama važi i za ovaj mehanizam, tako da se grafičkom analizom ne može napraviti razlika. Međutim, u odsustvu centralnog kompleksa, obrazac inhibicije proizvoda oba mehanizma se razlikuje (tabela 13).^{902,945}

Kompletna jednačina brzine za ovaj mehanizam sadrži dodatne veze, koje su, međutim, irelevantne za reakciju napred, tako da jednačina (135) još uvek važi, ali utiče na inhibiciju proizvoda (tabela 13).^{902,945}

Izo-mehanizmi su modifikacije normalnog mehanizma. Izo-redni mehanizam postoji kada se enzim izomerizuje u centralnom kompleksu od EAB do FPQ:



Šema 13. Šema izo-rednog bi-bi mehanizma⁹⁰²

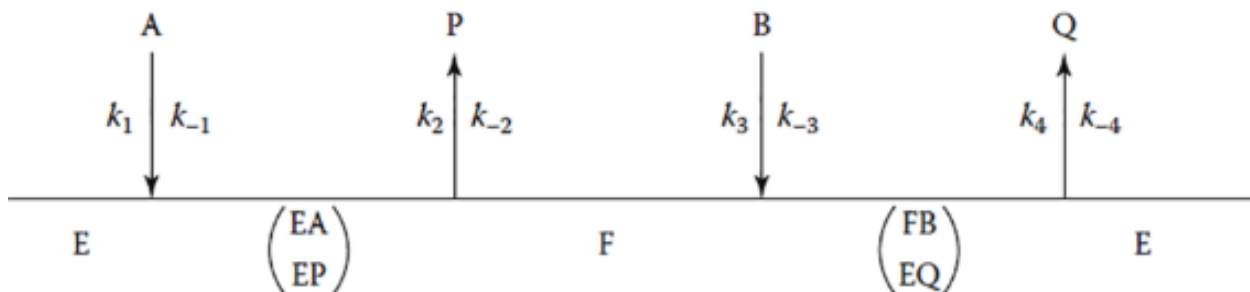
Tabela 13. Način inhibicije proizvodom pri bisupstratnom mehanizmu⁹⁰²

Mehanizam	Inhibišući proizvod	Promenjliva količina supstrata			
		A		B	
		Nezasićen	Zasićen sa B	Nezasićen	Zasićen sa A
<i>Redni bi-bi</i>	P	NC	UC	NC	NC
	Q	C	C	NC	NI
<i>Theorell-Chance</i>	P	NC	NI	C	C
	Q	C	C	NC	NI
<i>Izo-redni bi-bi</i>	P	NC	UC	NC	NC
	Q	NC	NC	NC	UC
<i>Random bi-bi</i> <i>Brz ravnotežni</i> <i>Ping-pong bi-bi</i>	P or Q	C	NI	C	NI
<i>Izo ping-pong bi-bi</i> <i>(Izomerizacija enzima)</i>	P	NC	NI	C	C
	Q	C	C	NC	NI
	P	NC	NI	C	C
	Q	NC	NC	NC	NC

Vrsta inhibicije: C-kompetitivna; NC -nekompetitivna; UC-akompetitivna; NI-bez inhibicije⁹⁵¹

I.4.7.1.3 Ping-pong bi-bi mehanizam

Ime ilustruje naizmenično vezivanje supstrata i oslobađanje proizvoda karakterističnih za ovaj mehanizam:



Šema 14. Šema ping-pong bi-bi mehanizama⁹⁰²

Nakon vezivanja prvog supstrata, prvi proizvod se oslobađa, a zatim sledi vezivanje drugog supstrata i oslobađanje drugog proizvoda. Stroga karakteristika ovog mehanizma je formiranje posrednog oblika enzima u reakciji sa prvim supstratom, obično prenosom reaktivne grupe. Drugi supstrat uklanja ovu grupu formirajući drugi proizvod. Reakcije aminotransferaze (transaminaze) su tipični primeri ovog mehanizma. Amino kiselina, npr. aspartat, prenosi svoju amino grupu na piridoksal fosfatni kofaktor enzima i oslobađa se kao α -okso kiselina (oksalacetat). Formira se piridoksamin fosfat kao kovalentni enzimski intermedijer. Druga α -okso kiselina (α -oksoglutarat) prihvata amino grupu iz kofaktora i pretvara se u amino kiselinu (glutamat). Za sintezu masnih kiselina pronađen je *višestrani ping-pong mehanizam*. Supstrat se prenosi preko sedam katalitičkih centara pomoću rastućeg lanca masnih kiselina vezanih za centralni ostatak pantetena.^{902,945}

Redukovana jednačina za reakciju napred je:

$$v = \frac{V_1[A][B]}{K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]} \quad (148)$$

Ping-pong mehanizam daje paralelne linije na dijagramu Linviver-Burka (slika 52b) u suprotnosti sa drugim mehanizmima sa više supstrata:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{mA}}{V_1[A]} + \frac{K_{mB}}{V_1[B]} + \frac{1}{V_1} \quad (149)$$

Za sekundarne dijagrame, odsecci ordinate ili apscise su iscrtani u odnosu na recipročne koncentracije kosupstrata (tabela 12).

Na dijagramu Hanesa, prave se seku u K_{mA}/V_1 i K_{mB}/V_1 (slika 52c):

$$\frac{[A]}{v} = \frac{K_{mA}}{V_1} + \frac{[A]}{V_1} \left(\frac{1 + K_{mB}}{[B]} \right) \quad (150)$$

$$\frac{[B]}{v} = \frac{K_{mB}}{V_1} + \frac{[B]}{V_1} \left(1 + \frac{K_{mA}}{[A]} \right) \quad (151)$$

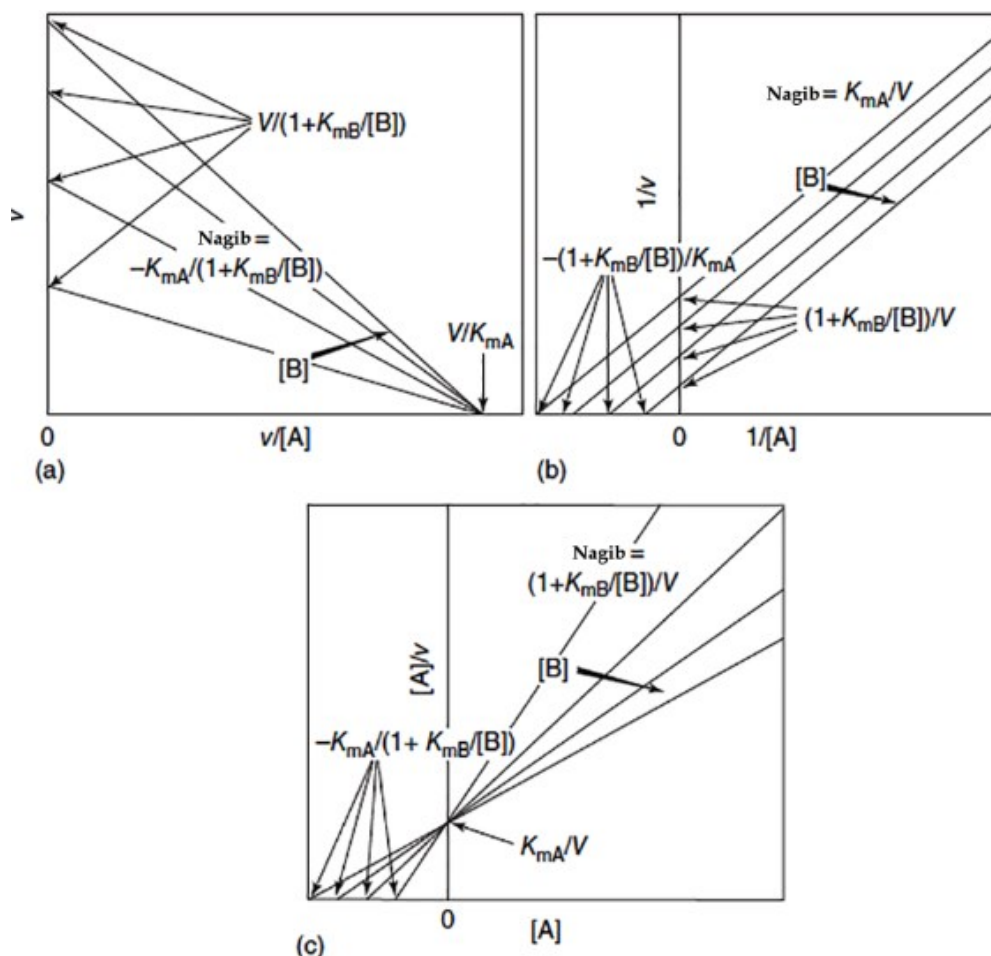
Sekundarni grafici se dobijaju iscrtavanjem nagiba ili odsečka apscise, respektivno, u odnosu na recipročne koncentracije kosupstrata (tabela 12).^{902,945}

Edi-Hofsti dijagram takođe daje zajednički presek prave linije na apscisi (slika 52a):

$$v = \frac{V_1}{1 + \frac{K_{mB}}{[B]}} - \frac{v}{[A]} \cdot \frac{K_{mA}}{1 + \frac{K_{mB}}{[B]}} \quad (152)$$

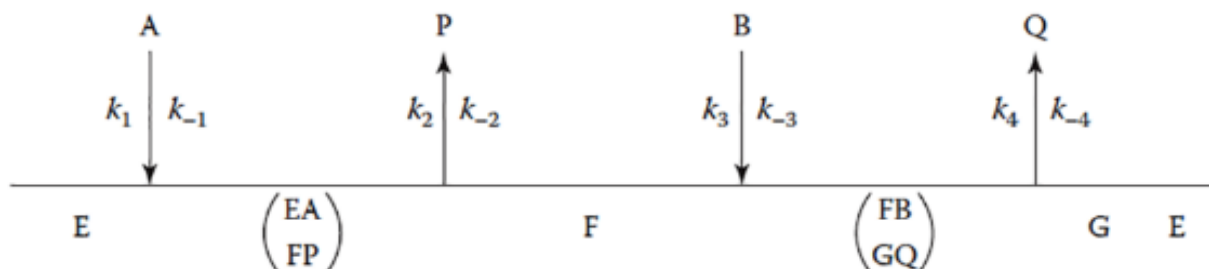
$$v = \frac{V_1}{1 + \frac{K_{mA}}{[A]}} - \frac{v}{[B]} \cdot \frac{K_{mB}}{1 + \frac{K_{mA}}{[A]}} \quad (153)$$

Sekundarni grafici se dobijaju iz nagiba i recipročnih vrednosti odsečaka apscise (tabela 12).



Slika 52. Ping-pong bi-bi mehanizam (a) Edi-Hofsti dijagram, (b) Linviver-Burk dijagram i (c) Hanesov dijagram. Određivanje kinetičkih konstanti je naznačeno⁹⁰²

Pri *ping-pong* mehanizmu, enzim se izomerizuje u formu F i dalje u formu G:



Šema 15. Šema *ping-pong bi-bi* mehanizma⁹⁰²

Ovaj mehanizam se može identifikovati u načinu inhibicije proizvodom (tabela 13).^{902,945}

I.4.8 Zavisnost enzima od pH vrednosti i temperature

I.4.8.1 Optimum pH vrednosti i određivanje pK vrednosti

Enzimi reaguju veoma osetljivo na promene pH vrednosti. Ako se aktivnost enzima testira u zavisnosti od pH vrednosti, uglavnom se dobija kriva u obliku zvona (slika 53a). Njihov maksimum (optimum pH vrednosti) se često poklapa sa fiziološkom pH vrednošću $\sim 7,4$. Aktivnost se značajno smanjuje i konačno pada na nulu prema ekstremnije kiselim i alkalnim opsezima pH vrednosti. Najmanje dva efekta određuju ovo ponašanje:

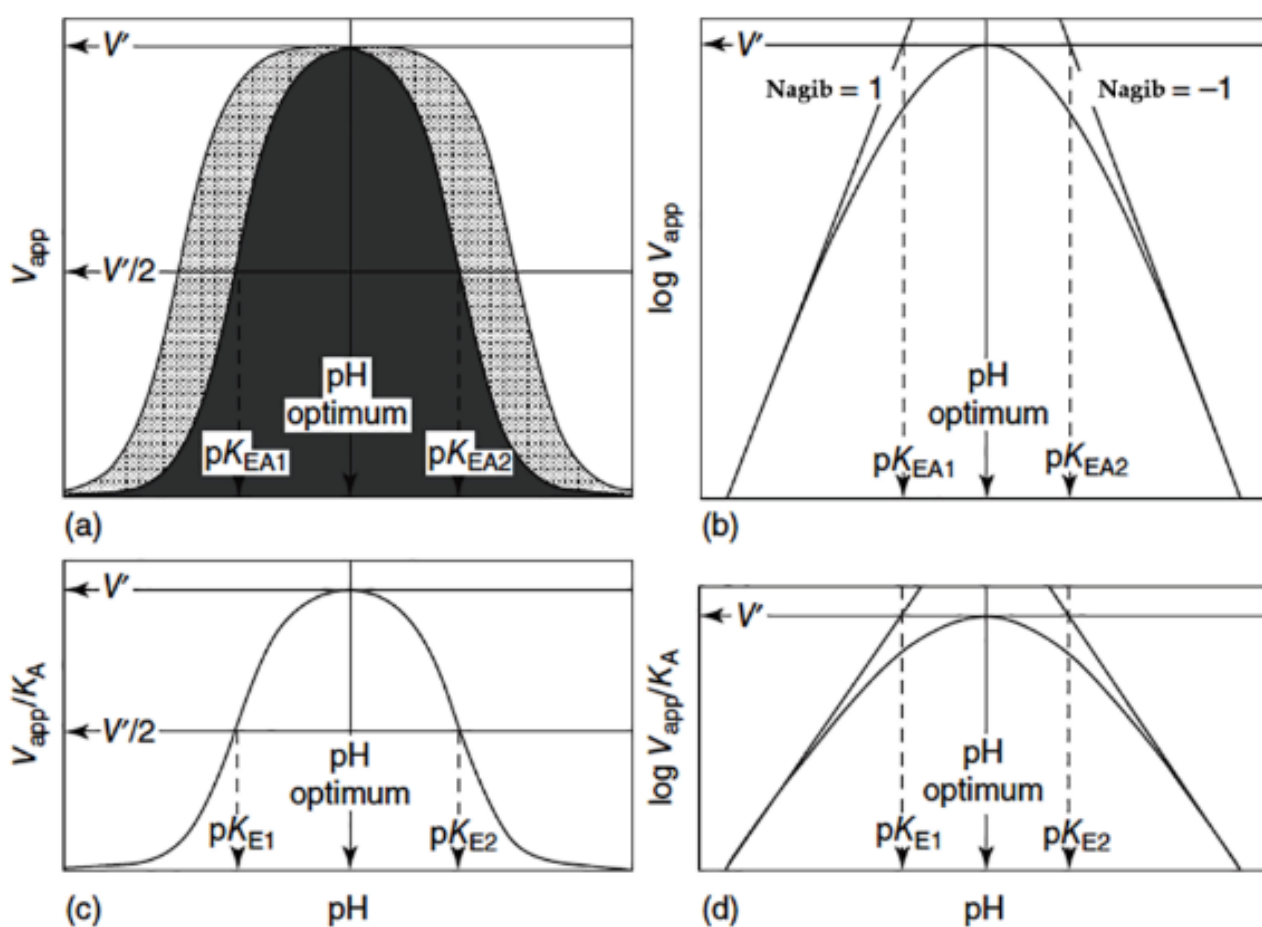
- I. učešće jonskih grupa u katalitičkom mehanizmu i
- II. uključivanje naelektrisanih grupa za stabilizaciju strukture proteina.^{902,952,953}

Da bi se odredila zavisnost enzimske reakcije od pH vrednosti, moraju se uzeti u obzir neki eksperimentalni aspekti. Zahtevani su uslovi zasićenja u odnosu na sve komponente kao što su supstrati ili kofaktori. Pošto se zasićenje može postići samo pri beskonačnim koncentracijama, merenja se vrše pri visokoj (aline i potpuno zasićenoj) koncentraciji supstrata i stoga će biti samo prividna maksimalna brzina V_{app} umesto prave V (koji se može odrediti samo ekstrapolacijom) se dobija. Da bi se promenila pH vrednost u enzimskom ispitivanju, pH vrednost pufera se varira. Međutim, mora se uzeti u obzir da komponente u smeši za ispitivanje mogu uticati na pH vrednost. Izrazite reakcije enzima, kao što su lipaza i holinesteraza, izazivaju promenu pH vrednosti usled oslobađanja kiselih komponenti. Zbog toga se pH vrednost mora ispitati u smeši za ispitivanje pre i na kraju reakcije. Kapacitet puferskih sistema zavisi od različitih faktora kao što su jonska snaga i koncentracija, ali je generalno ograničen. Puferski sistemi su efikasni samo u uskom opsegu, najviše jednu pH jedinicu ispod i jednu iznad njegove pKa vrednosti. Zbog toga se zavisnost enzima od pH vrednosti ne može odrediti sa jednim jedinim puferskim sistemom. Nekoliko puferskih sistema može se kombinovati da pokrije ceo opseg pH vrednosti, ali ovo je nezadovoljavajuća procedura, jer aktivnost enzima zavisi od vrste pufera i prirode i jačine uključenih jona. Ovo se može utvrditi upoređivanjem različitih pufera u regionima koji se preklapaju. Upotreba univerzalnih pufera, koji pokrivaju širok opseg pH vrednosti, kao što su Torell-Štagen (*Teorell-Stenhagen*) ili Briton-Robinson (*Britton-Robinson*) pufer, se preporučuje. Dalje se mora uzeti u obzir da bitne komponente u ispitivanju, supstrati, koenzimi ili pomoćni enzimi u spregnutim testovima poseduju sopstvene zavisnosti pH vrednosti, koje mogu da odstupaju od one enzima i mogu da dovedu do pogrešnih tumačenja.^{902,952,953}

Jonske grupe su često uključene u enzimsku katalizu, npr. kao kiselo-bazni katalizatori, a stanje protonovanja je bitno za reakciju. Istaknuti primer je katalitička trijada serinskih proteaza, kao što je himotripsin, gde hidroksi grupa serina, imidazolna grupa histidina i karboksil grupa aspartata deluju zajedno, a transfer protona sa serinske hidroksi grupe na imidazol azot je suštinski korak za cepanje peptidne veze. Promena pH vrednosti utiče na protonovano stanje i na katalitički mehanizam. U jednostavnom diprotičnom sistemu, optimalna kriva pH vrednosti se sastoji od dve krive titracije, rastuće i opadajuće, a vrednosti pK_{EA} za obe grupe u kompleksu enzimskog supstrata odgovaraju pH vrednostima odgovarajućih tačaka pregiba (slika 53a). Prema Diksonu i Vebu logaritamska skala je primenjena za V_{app} (slika 53b).⁹⁵³ Normalne krive titracije će rasti, sa nagibom od 1 i -1, respektivno, na obe lokacije optimalne krive.^{902,952,953}

Odgovarajuće tangente se susreću sa horizontalnom linijom kroz maksimum krive na pozicijama vrednosti pK_{EA} . Ako je protonovanje na aktivnom mestu enzima promenjeno vezivanjem supstrata, vrednosti pK_{EA} se menjaju u pK_E vrednosti i prividna konstanta vezivanja supstrata K_A postaje zavisna od protonovanja odgovarajućih grupa i prema tome, od pH vrednosti (dok su osnovne K_A vrednosti pH nezavisne). Vrednosti pK_E slobodnog enzima su izvedene iz grafika V_{app}/K_A (ili V_{app}/K_m) ili $\log V_{app}/K_A$ u odnosu na pH vrednosti na isti način kao i vrednosti pK_{EA} (slika 53c,d).

Konstante jonizacije se takođe mogu izvesti iz sekundarnih Linviver-Burk dijagrama. Zavisnost brzine v od koncentracije supstrata se meri pri različitim pH vrednostima. Iscrtaivanje $1/v$ naspram $1/[A]$ daje niz pravih linija sa zajedničkim presekom levo od ordinate. Sekundarni dijagram nagiba ovih pravih u odnosu na $1/[H^+]$ daje pravu liniju koja seče apscisu na $-1/K_{EA}$.



Slika 53. Uticaj pH vrednosti na enzimске reakcije: (a) Direktni dijagram prividne maksimalne brzine V_{app} u odnosu na pH vrednost. Unutrašnja kriva prikazuje idealnu pH optimalnu krivu sa dve titracione esencijalne grupe u katalitičkom centru, a spoljna kriva predstavlja krivu stabilnosti pH vrednosti. Načini određivanja pK vrednosti kompleksa EA (b) i slobodnog enzima E prema Diksonu i Vebu (1979) su naznačeni u (c,d)⁹⁰²

Međutim, vrednosti pK_1 i pK_2 moraju se razlikovati za više od 3,5 pH jedinica da bi se odredile ovom metodom crtanja. Ako je uključeno više od dve jonske grupe, dobiće se krive odstupanja. Ako samo jedna pojedinačna grupa treba da bude protonovana (ili je proces

protonovanja relevantan samo za aktivnosti enzima unutar određenog opsega pH vrednosti, bilo kiselog ili baznog), pojaviće se pH optimalna kriva sa samo jednim bokom. Sa više od dve grupe, krive titracije se preklapaju i mogu postati spljoštene ili će se pojaviti stepenice u bokovima. Vrednosti pK_a izvedene iz krive optimalne pH vrednosti mogu dati indicaciju tipa grupa uključenih u katalitički proces, npr. za specijalne aminokiselinske ostatke kao što su aspartat ($pK_a=3,86$), histidin (6,09), cistein (8,3), serin (9,15), tirozin (10,11) i arginin (12,28). Međutim, integracija ovih grupa u strukturu proteina može modifikovati ove vrednosti čak i za nekoliko pH jedinica.^{902,952,953}

I.4.8.2 Stabilnost pH vrednosti

Pored specifičnih efekata grupa direktno uključenih u katalitički mehanizam, enzim poseduje veliki broj naelektrisanih grupa unutar i na svojoj površini, koje su važne za funkciju enzima, za ravnotežu između fleksibilnosti značajne za katalitički mehanizam, kao što je formiranje prelaznog stanja, i rigidnost za održavanje trodimenzionalne strukture ili za izvršavanje kontrolisanih konformacionih promena. Dok je protonovanje esencijalnih ostataka u aktivnom centru pretežno reverzibilan proces, promene u naelektrisanju strukturno važnih grupa mogu proizvesti nepovratna oštećenja osnovne strukture. Da bi se napravila razlika između reverzibilnih i ireverzibilnih pH efekata, krivu pH stabilnosti treba uporediti sa optimalnom pH krivom. Da bi se dobila optimalna kriva, odgovarajuća pH vrednost se direktno podešava pri ispitivanju, a aktivnost se meri odmah nakon dodavanja enzima. Za krivu stabilnosti pH vrednosti, enzim se preinkubira sam (ili u kombinaciji sa različitim komponentama) na odgovarajuću pH vrednost tokom definisanog vremenskog intervala (npr. 1 h) i nakon toga se testira na optimalnoj pH vrednosti u normalnom enzimskom testu. Reverzibilni procesi ne bi trebalo da utiču na aktivnost enzima. Prema tome, kriva stabilnosti često pokazuje širok plato u optimalnom opsegu, a smanjenje aktivnosti se dešava više pri ekstremnim pH vrednostima u poređenju sa optimalnom krivom (slika 53a). Pošto druge komponente u enzimskom testu takođe mogu biti osetljive na ekstremne pH vrednosti, kao što je NADH, sa takvim komponentama treba izvršiti test stabilnosti.^{902,952,953}

Izoelektrična tačka pI je pH vrednost pri kojoj su pozitivna i negativna suvišna naelektrisanja molekula enzima u balansu. U ovoj tački, rastvorljivost enzima i njegova stabilnost postaju snažno smanjeni.^{902,952,953}

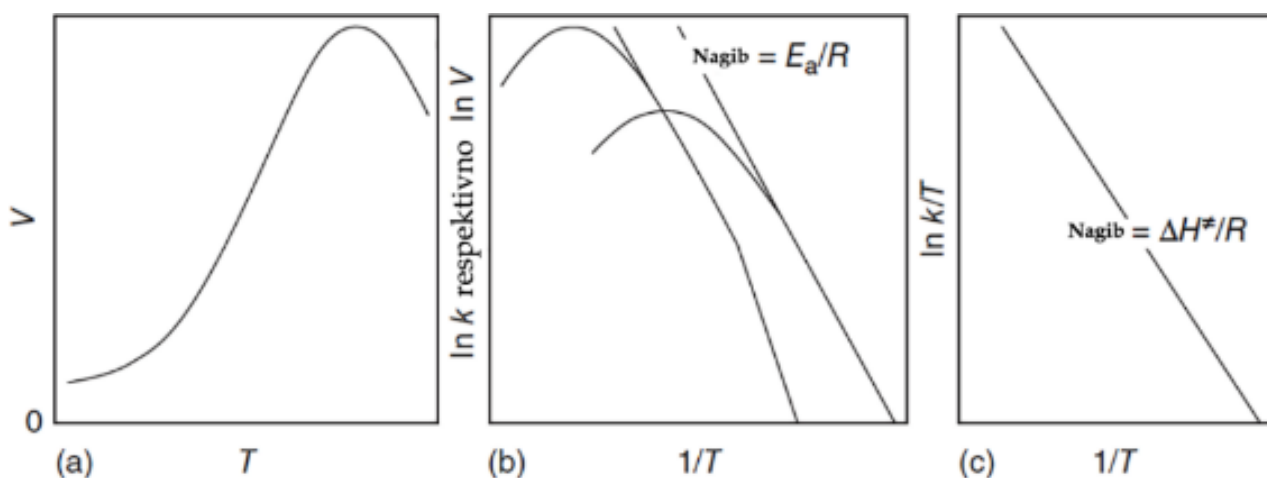
I.4.8.3 Temperaturna zavisnost

Aktivnost enzima u suštini zavisi od temperature. Slično kao kod uobičajenih hemijskih reakcija, brzina reakcija katalizovanih enzima povećava se za faktor 2-3 na svakih 10 °C prema van't Hofovom (*van't Hoff*) pravilu. Teoretski, ne postoji gornja granica za ovo povećanje, već iznad određene temperature povećanje prestaje, i konačno se brzina reakcije približava nuli (slika 54a).

Ovo smanjenje je zbog ograničene termičke stabilnosti, opšte karakteristike svakog proteina. Dakle, temperaturno zavisno ponašanje enzima određuju dva različita i nezavisna procesa. Ako se aktivnost enzima testira u zavisnosti od temperature, dobiće se kriva koja liči na krivu optimalne pH vrednosti u obliku zvona, ali se ona mora tumačiti na sasvim

drugačiji način: početno kontinuirano povećanje usled van't Hofovog pravila postaje suprotstavljeno procesom denaturacije.

Brzina reakcije prelazi maksimum sa najvećom aktivnošću, ali za razliku od zavisnosti pH vrednosti, ovo nije optimum aktivnosti enzima, jer maksimum ukazuje na početak ireverzibilnog procesa denaturacije. Stoga, termin „temperaturni optimum“ za ovaj maksimum treba izbegavati. Optimalne temperature nisu one sa najvećom aktivnošću, već jasno moraju biti ispod opsega inaktivacije. Štaviše, denaturacija proteina nije samo proces koji zavisi od temperature, već i od vremena. Inkubacija enzima na visokoj temperaturi duže vreme će izazvati veću inaktivaciju, a temperaturni maksimum će se pomeriti ka nižim temperaturama. Za razliku od optimuma pH vrednosti, temperaturni maksimum određenog enzima se ne može smatrati konstantnom vrednošću.^{902,954,955}

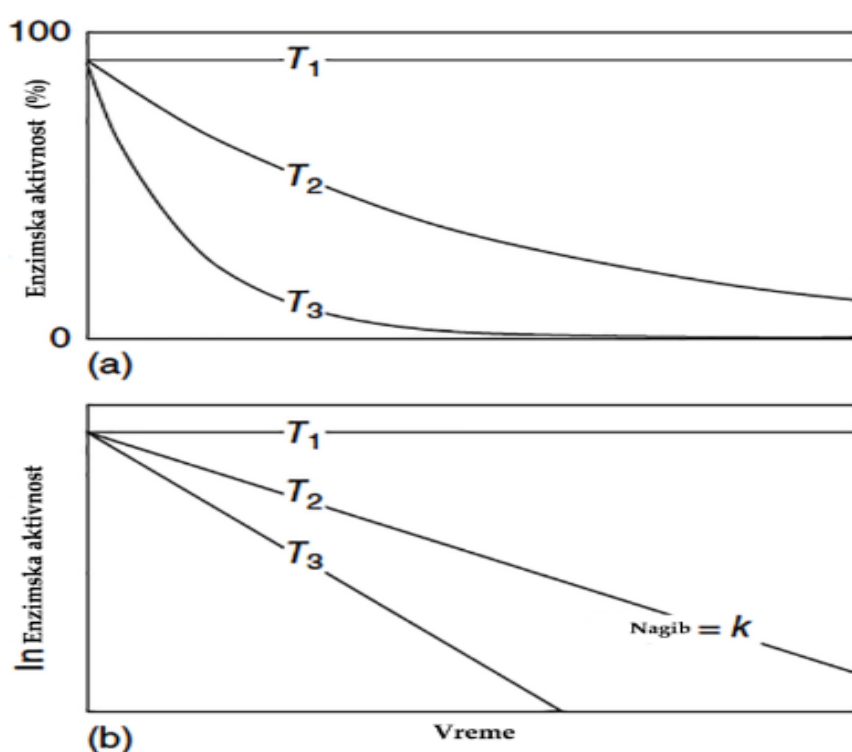


Slika 54. Uticaj temperature na enzimske reakcije: (a) direktan dijagram prividne maksimalne brzine V_{app} u odnosu na temperaturu; (b) Arenijusov (Arrhenius) dijagram, desna kriva pokazuje običan kurs prema krivoj pod (c), leva kriva dvofazno temperaturno ponašanje; tangente su prilagođene linearnim opsezima krivih da bi se odredila energija aktivacije; (c) dijagram za određivanje entalpije reakcije $\Delta H^\ddagger$ prelaznog stanja⁹⁰²

Većina enzima ostaje aktivna do fiziološke temperature (37 °C), ali samo na nekoliko stepeni iznad nje, između 40 i 50 °C, postaju nestabilni. Veoma temperaturno osetljivi enzimi trpe inaktivaciju čak i na nižim temperaturama, kao što je alkohol dehidrogenaza, koja postaje nestabilna već iznad 30 °C, dok je blisko srodna laktat dehidrogenaza stabilna do 50 °C. Termofilni mikroorganizmi koji žive u vrelim izvorima preživljavaju čak i u ključaloj vodi, i može se pretpostaviti da svi njihovi enzimi mogu da izdrže tako visoke temperature. Ovo je zaista slučaj za mnoge, ali ne i za sve ove enzime; neki se inaktiviraju znatno ispod rastuće temperature organizma. Očigledno, ovi enzimi su stabilizovani različitim ćelijskim komponentama, posebno visoko koncentrovanim rastvorom proteina. Zanimljiva je činjenica da su enzimi iz termofilnih organizama strukturno blisko povezani sa enzimima iz mezofilnih organizama. Ne mogu se uočiti suštinske razlike čak ni u sastavu aminokiselina, osim izvesnog povećanja hidrofobnih i naelektrisanih ostataka, što uzrokuje veću rigidnost proteina. U stvari, temperaturna osetljivost nije neizbežna karakteristika proteina. S obzirom na vruću prvobitnu atmosferu u kojoj su evoluirali prvi organizmi, može se pretpostaviti da su enzimi mezofilnih organizama uključujući i one sa konstantnom telesnom

temperaturom izgubili termičku stabilnost, jer više nema potrebe za tim. S druge strane, prvi enzimi u ranom vremenu evolucije, ribozimi, sastojali su se od temperaturno stabilnije RNK.^{902,954,955}

Ponašanje enzima zavisno od temperature može se proučavati pomoću dve različite procedure. Enzim se može ili direktno testirati u testu prilagođenom odgovarajućim temperaturama, ili se može prethodno inkubirati na odgovarajućim temperaturama u različitim vremenskim intervalima i nakon toga testirati na normalnoj temperaturi testa. Dok prvi postupak direktno razmatra temperaturnu zavisnost aktivnosti, drugi postupak posmatra vremensku zavisnost, a time i dugoročnu stabilnost enzima. U prvom slučaju, reakcija se testira odmah nakon dodavanja enzima. Treba izbegavati duže preinkubacije kako bi se isključio aspekt koji zavisi od vremena, koji treba posebno proučavati. U nižem temperaturnom opsegu, enzim treba da ostane stabilan duže vreme (T_1 , slika 55a).



Slika 55. Termostabilnost enzima predstavljenog u direktnom (a) i semilogaritamskom dijagramu (b). Enzim je prethodno inkubiran određeno vreme pre određivanja njegove aktivnosti na različitim temperaturama, T_1 u rasponu ispod, T_2 unutar, a T_3 iznad temperaturnog maksimuma⁹⁰²

Ova činjenica se koristi kao kontrola za ispitivanje stabilnosti enzima, jer i drugi procesi, kao što su proteolitički napad ili oksidacija, mogu izazvati gubitak aktivnosti. Mora se dalje razmotriti moguća termička nestabilnost drugih jedinjenja, supstrata, koenzima ili pomoćnih enzima u spregnutim testovima. Nakon preinkubacije na umereno povišenoj temperaturi, enzim trpi spor gubitak aktivnosti (T_2 , slika 55a), dok na visokoj temperaturi aktivnost opada brže (T_3 , slika 55a). Vremenski tok za termičku inaktivaciju enzim često prati reakciju prvog reda. Denaturacija enzima je složen proces, koji prolazi kroz nekoliko koraka, ali je uglavnom jedan korak odgovoran za gubitak katalitičke aktivnosti. Iscrtane na

semilogaritamski način, u ovom slučaju se mogu očekivati prave linije, a konstante brzine denaturacije na odgovarajućoj temperaturi mogu se izračunati iz nagiba (slika 55b).^{902,954,955}

Za crtanje temperaturnih krivih treba uzeti katalitičku konstantu k_{cat} , ali se često koristi brzina reakcije v . On je direktno povezan sa k_{cat} sve dok se koncentracija enzima može uzeti kao konstantna. Koncentracije zasićenja treba primeniti za sve komponente, posebno u odnosu na supstrate i kofaktore, tako da se v (odnosno V_{app}) približi V . Zakrivljenost dobijena direktnim crtanjem (slika 54a) može se analizirati dijagramom na osnovu empirijska jednačina Arenijusa.^{902,954,955}

$$k = A \cdot e^{-E_a/RT} \quad (154)$$

logaritamska konverzija daje linearni odnos:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \text{ ili } \log k = \log A - \frac{E_a}{2.3RT} \quad (155)$$

Energija aktivacije E_a prelaznog stanja unutar katalitičkog mehanizma može se dobiti iz nagiba Arenijusovog dijagrama. Konstanta A predstavlja verovatnoću reakcije i sadrži komponente za učestalost sudara i orijentaciju sudarajućih čestica. R je gasna konstanta, a T je apsolutna temperatura (Kelvin, $0^\circ\text{C}=273,15\text{ K}$). Arenijusova jednačina opisuje i linearizuje samo temperaturno zavisno ubrzanje brzine reakcije, ali ne i termičku inaktivaciju proteina, koja odstupa od linearnosti (slika 54b, desna kriva).

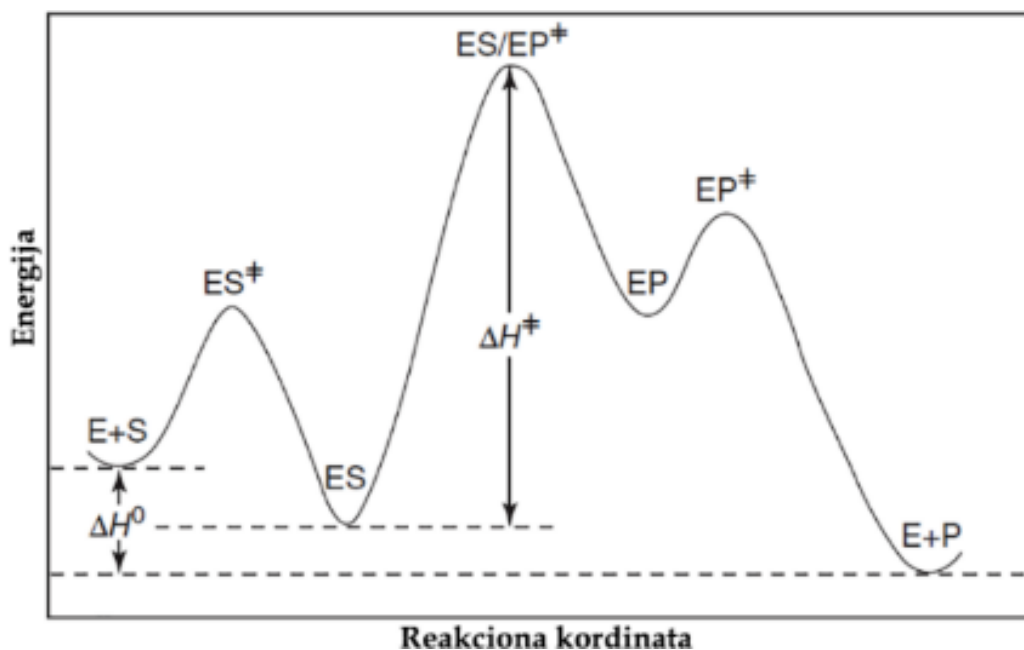
Ponekad se nehomogenosti primećuju u nižem temperaturnom opsegu. One mogu biti posledica konformacionih promena dotičnog enzima. Posebno, termofilni enzimi, koji pokrivaju široko temperaturno područje, često pokazuju nehomogenosti u gornjem linearnom opsegu, što se može tumačiti kao adaptacija na viši temperaturni opseg (slika 54b, leva kriva). Dalji razlozi za odstupanja od linearnosti mogu biti mešavina izoenzima ili testovi spregnutih enzima sa dve ili više vrsta enzima koje se razlikuju po svom temperaturnom ponašanju. Enzimi vezani za membranu mogu biti pod uticajem temperaturno zavisnih prelaza membrane.^{902,954,955}

Energija aktivacije E_a je kompleksna konstanta koja se sastoji od različitih koraka katalitičkog mehanizma. Svaki korak ima sopstvenu temperaturnu korelaciju, a korak koji određuje brzinu može da se promeni tokom porasta temperature. Vrednosti za E_a se uglavnom kreću između 40 i 50 kJ mol⁻¹ i mogu se proceniti iz nagiba dijagrama Arenijusove jednačine ili merenjem v na dve različite temperature T_1 i T_2 prema jednačini, koja se dobija iz jednačine (154) finalnom integracijom:

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a}{2.3RT} \cdot \left(\frac{T_2 - T_1}{T_1 T_2} \right) \quad (156)$$

Teorija Ejringa (Eyring) daje opis principa enzimske katalize. Nakon vezivanja za enzim, supstrat formira prelazno stanje, koje smanjuje energiju aktivacije neophodnu za prevazilaženje energetske barijere za konverziju u proizvod.⁹⁵²

Samo supstrati koji raspolazu sa dovoljno energije mogu da prevaziđu energetska barijeru prelaznog stanja. Što je barijera niža, veći je udeo molekula supstrata koji se pretvaraju u proizvod. Slika 56 prikazuje energetska profila reakcije katalizovane enzimom, pretpostavljajući prelazna stanja za vezivanje reaktanata iz oba smera, kao i za efikasan proces konverzije. Za nekoliko enzimskih reakcija stvorena su jedinjenja (*analozi prelaznog stanja*) koja oponašaju prelazno stanje. Vežu se za nekoliko redova veličine jače za enzim nego za nutrašnji supstrat. Čak i ako su nekovalentno vezani, teško se mogu ukloniti iz enzima.^{902,954}



Slika 56. Energetski profil reakcije katalizovane enzimom⁹⁰²

Arenijus (*Arrhenius*) je razvio svoju jednačinu po analogiji sa van't Hofovom reakcijskom izobarom, opisujući zavisnost konstante disocijacije K_d od temperature u reakcionoj ravnoteži:

$$\left(\frac{d \ln K_d}{dT}\right)_p = \frac{\Delta H^0}{RT^2} \quad (157)$$

Standardna entalpija reakcije ΔH^0 može se uzeti kao nezavisna od temperature unutar uskih opsega, tako da integracija

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^0}{RT} + C \quad (158)$$

daje linearnu vezu između logaritma konstante disocijacije i $1/T$. ΔH_0 se može izvesti iz nagiba. Integraciona konstanta C uključuje entropiju reakcije ΔS^0 :

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (159)$$

koji se može dobiti iz preseka ordinate. Jednačina (188) je izvedena iz odnosa za *Gibsovu slobodnu standardnu energiju* $\Delta G^0 = \Delta H^0 + T\Delta S^0$. Gibsova slobodna energija je povezana sa konstantom disocijacije: $\Delta G^0 = RT \ln K_d$. Za slobodnu energiju prelaznog stanja $\Delta G^\ddagger$, dobija se izraz:

$$\Delta G^\ddagger = -RT \cdot \ln K^\ddagger = \Delta H^\ddagger - \Delta S^\ddagger \quad (160)$$

Prema kvantnoj mehanici konstanta brzine $k^\ddagger$ za formiranje prelaznog stanja povezana je sa konstantom ravnoteže prelaznog stanja $K^\ddagger$: $k^\ddagger = K^\ddagger(RT/N_A h)$. N_A je Avogadrova konstanta, a h je Plankova konstanta. Iz jednačine (191) dobija se odnos za prelazno stanje:

$$\log \frac{k}{T} = -\frac{\Delta H^\ddagger}{2.3RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{2.3R} + \log \frac{R}{N_A h} \quad (161)$$

Linearna funkcija bi trebalo da rezultira iscrtavanjem $\log k/T$ u odnosu na $1/T$, a $\Delta H^\ddagger$ se može izvesti iz nagiba (slika 54c). Za razliku od Arenijusovog dijagrama, apsolutne vrednosti se moraju uzeti za $k^\ddagger$. Arenijusova energija aktivacije je povezana sa entalpijom prelaznog stanja relacijom: $E_a = \Delta H^\ddagger + RT$.^{902,954,955}

I.4.9 Kinetika imobilisanih enzima

Imobilisani enzimi imaju sve veći značaj u biotehnološkim procesima u enzimskim reaktorima, biosenzorima i medicini. U ćeliji, enzimi vezani za membranu mogu se smatrati imobilisanim sistemima. Kinetički tretman imobilisanog enzimskog sistema zavisi od njegove specifične strukture i opšta pravila se teško mogu definisati. Imobilizacija enzima se često postiže kovalentnim vezivanjem za čvrste površine, za nosač, kao što su dekstran, agaroz, sintetički polimeri, staklo ili keramika. Ovi sistemi se mogu tretirati kinetički kao rastvorljivi enzim, sve dok efekti nosača na reaktante mogu isključiti, posebno pri slobodnoj difuziji supstrata ili proizvoda. Međutim, nosač može da odbaci ili privuče supstrate ili proizvode i tako utiče na njihovu koncentraciju u blizini imobilisanog enzima, bilo negativno ili pozitivno. (Često hidrofobna) površina nosača može delovati kao barijera ili granični sloj, ometajući prolaz supstrata do katalitičkog centra. Ovo važi i za enzime ugrađene u membrane organela. Drugi princip fiksacije je ugrađivanje enzima u matricu propustljivu za supstrat, na primer, agarozu, poliakrilamid ili najlonske čestice. Enzim nije modifikovan kovalentnom fiksacijom i zadržava u suštini svoju nativnu strukturu. Pravila za enzime u rastvoru važe sve dok su koncentracije unutar čestice ekvivalentne koncentracijama u okolnom rastvoru. Ovo zahteva slobodnu difuziju svih komponenti, kao što su supstrati, proizvodi ili joni (pH promene!). Do odstupanja u ponašanju imobilisanog enzima dolazi ako ima uticaja na difuziju. Ako je enzimska konverzija supstrata brža od njegove difuzije kroz matricu, dolazi do iscrpljivanja supstrata u oblasti oko enzima, u kojoj meri zavisi od koncentracije supstrata u cirkulirajućoj sredini. U slučaju niskih koncentracija supstrata, kada enzim reaguje maksimalnom efikasnošću, iscrpljivanje supstrata je izraženije, dok je u blizini zasićenja supstrata manje. Nasuprot tome, ograničena difuzija izaziva akumulaciju proizvoda i sprečava ga da se odvoji od enzima; tako se povećava inhibicija proizvoda.^{902,944,956}

Kinetički modeli razvijeni iz takvih razmatranja odnose se samo na interakcije između enzima i njegovog neposrednog okruženja u nosaču, posebno supstrata. Posebni efekti na pojedinačne enzime se ne mogu uzeti u obzir. Imobilizacija enzima kovalentnom modifikacijom funkcionalnih grupa koje direktno ili indirektno učestvuju u katalitičkom mehanizmu može uticati na mehanizam reakcije. Prelasci konformacije u aktivno stanje ili regulatorni uticaji mogu biti sprečeni ili potpuno potisnuti fiksacijom za nosač. Uska fiksacija za matricu može izazvati zaklon aktivnog centra.^{902,944,956}

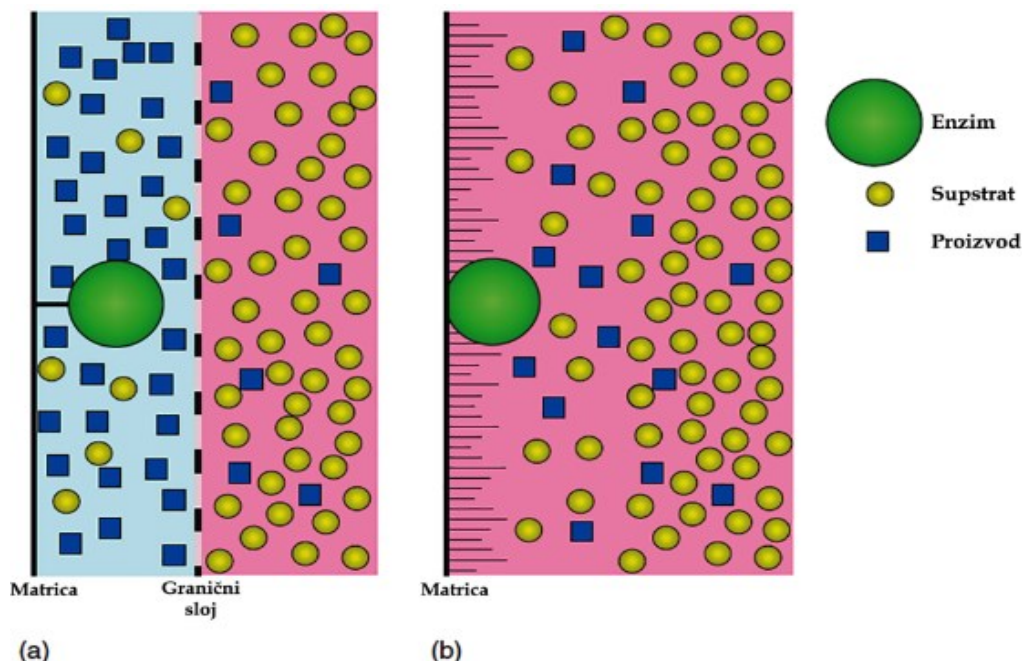
Zbog ometanja difuzije supstrata, eksperimentalno određene brzine reakcije v' imobilisanih enzima mogu se značajno razlikovati od onih sa nativnim enzimom u rastvoru v_{kin} :

$$v' = \eta_e v_{kin} = \eta_e \frac{v[A]}{K_m + [A]} \quad (162)$$

Faktor efikasnosti η_e je funkcija koncentracije supstrata; za $\eta_e=1$, reakcija je kinetički kontrolisana.

Reakcija imobilisanog enzima je jednaka reakciji slobodnog enzima i ponaša se prema Mihaelis–Menten jednačini. Što je niži η_e ($\eta_e < 1$), reakcija postaje više kontrolisana difuzijom. Mihaelis–Menten jednačina više ne važi, i ne dobijaju se prave linije uobičajenim metodama linearizacije. Jednačina (162) i sledeća razmatranja zasnivaju se na reakciji sa jednim supstratom. Sve dok su svi drugi supstrati i kofaktori prisutni u zasićenim količinama, ovaj

tretman se takođe može primeniti za reakcije sa više supstrata. Postoje dve vrste ograničene difuzije (šema 16). Ograničenje spoljašnje difuzije je uzrokovano graničnim slojem između matrice u koji je enzim ugrađen i cirkulirajućeg rastvora. Supstrat mora da prevaziđe ovu barijeru. Pri ograničenju unutrašnje difuzije, matrica utiče na difuziju supstrata.^{902,944,956}



Šema 16. Šematski prikaz (a) spoljašnjeg i (b) unutrašnjeg difuzionog ograničenja⁹⁰²

I.4.9.1 Ograničenje spoljašnje difuzije

Supstrat mora da prođe kroz granični sloj da bi stigao do katalitičkog centra enzima fiksiranog za čvrsto-tečnu-nepropusnu površinu. Procesi transporta i katalize se odvijaju sukcesivno. Protok supstrata J_A iz cirkulirajućeg rastvora sa koncentracijom supstrata $[A]_0$ do katalitičkog centra na površini sa koncentracijom supstrata $[A]$ je:

$$J_a = h_A([A]_0 - [A]) = \frac{D_A([A]_0 - [A])}{\delta} \quad (163)$$

$h_A = D_A/\delta$ je koeficijent transporta, a D_A koeficijent difuzije supstrata, δ je efektivna debljina graničnog sloja. D_A i h_A se mogu odrediti metodama kao što je tehnika radioaktivnog praćenja ili difuzionih ćelija ili se mogu uzeti iz literature. Protok supstrata ka katalitičkom centru i enzimsko transformacija supstrata, obično prateći Mihaelis-Menten odnos, se javljaju sukcesivno. U uslovima stacionarnog stanja, oba procesa se odvijaju jednakom brzinom:

$$h_A([A]_0 - [A]) = \frac{V[A]}{K_m + [A]} \quad (164)$$

Za koncentraciju supstrata, postavljen je bezdimenzionalni termin $\alpha = [A]/K_m$:

$$\alpha_0 - \alpha = \frac{V\alpha}{h_A K_m (1 + \alpha)} = \eta \cdot \frac{\alpha}{1 + \alpha} \quad (165)$$

$\eta = V/h_A K_m$ je bezdimenzionalni modul supstrata, koji ukazuje na odnos između brzina reakcije i transporta sistema. U graničnom slučaju $K_m \gg [A]$, to jest, pri veoma niskim koncentracijama supstrata, jednačina (165) postaje:

$$h_A([A]_0 - [A]) = \frac{v[A]}{K_m} \quad (166)$$

Ukupna reakcija prati kinetiku prvog reda. Efektivna koncentracija supstrata u oblasti oko katalitičkog centra je:

$$[A] = \frac{h_A[A]_0}{h_A + \frac{v}{K_m}} \quad (167)$$

Eksperimentalno utvrđena brzina reakcije v' je:

$$v' = \frac{v[A]}{K_m} = \frac{\frac{v}{K_m} h_A [A]_0}{h_A + \frac{v}{K_m}} = \frac{[A]_0}{\frac{1}{h_A} + \frac{K_m}{v}} \quad (168)$$

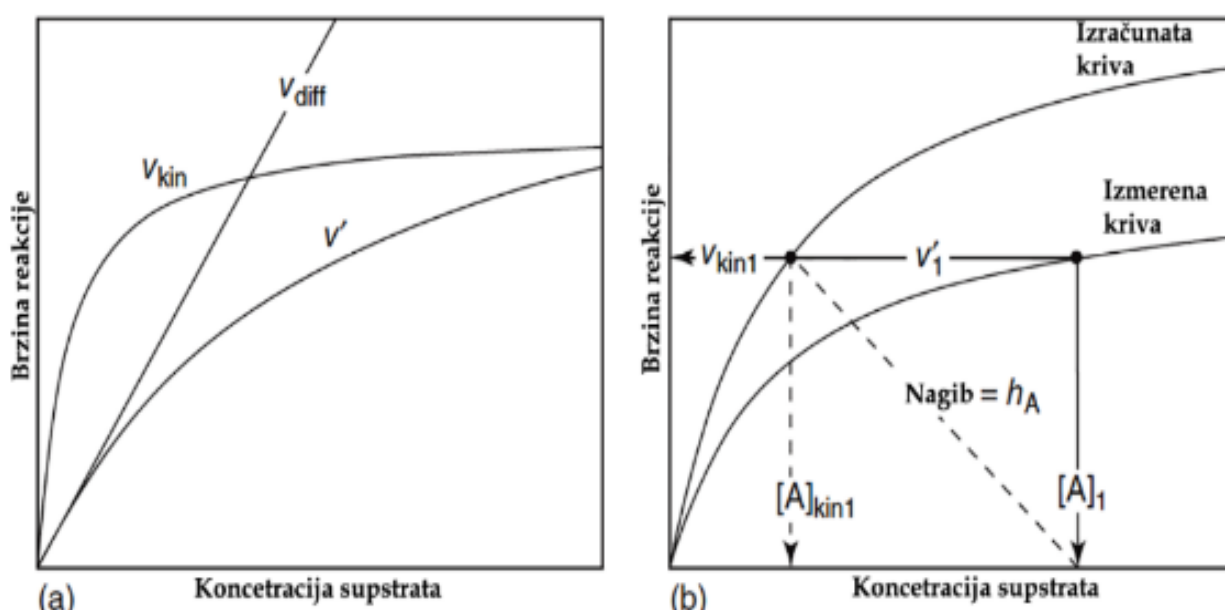
Za $h_A \gg v/K_m$, transport je brži od kinetički kontrolisane enzimske reakcije:

$$v' = v_{kin} = \frac{v[A]_0}{K_m} \quad (169)$$

I obrnuto, reakcija postaje kontrolisana difuzijom pri veoma sporom transportu kroz matricu, $h_A \ll v/K_m$:

$$v' = v_{diff} = h_A [A]_0 \quad (170)$$

U graničnom slučaju $K_m \ll [A]_0$, to jest, pri zasićenju koncentracije supstrata u oblasti nultog reda reakcije, v' teži vrednosti zasićenja V (jednačina (164), (slika 57a).



Slika 57. Reakcija imobilisanih enzima. (a) Poređenje izmerenih (v'), difuzno kontrolisanih (v_{diff}) i kinetički kontrolisanih (v_{kin}) stopa obrtnja. (b) Određivanje koncentracije v_{kin} i supstrata $[A]_{kin}$ na aktivnom mestu imobilisanog enzima⁹⁰²

U srednjem opsegu supstrata ($[A] \sim K_m$), u zavisnosti od njihove veličine, ili v_{kin} ili v_{diff} doprinose većem delu reakcije. Dobija se funkcija zasićenja, sastavljena od delova transportnog procesa i kinetičke reakcije. Prikazuje, u skladu sa stepenom ograničenja difuzije, povećanu prividnu vrednost K_m (dobijenu pri pola zasićenja) u odnosu na pravu K_m vrednost enzimske reakcije. Kriva odstupa sa povećanjem ograničenja difuzije u metodama grafičke linearizacije (npr. u dvostruko recipročnom dijagramu) od linearnog ponašanja kinetički

kontrolisane reakcije. Karakteristika spoljnog ograničenja difuzije je činjenica da se na njega može uticati mešanjem. Ubrzava se ravnoteža difuzijom između rastvora i imobilisanog enzima.^{902,957-959}

Sa poznatim transportnim koeficijentom h_A , brzina kinetički kontrolisane enzimске reakcije v_{kin} i odgovarajuća koncentracija supstrata $[A]_{kin}$ u katalitičkom centru na površini membrane mogu se grafički odrediti iz zavisnosti izmerene brzine od koncentracije supstrata. cirkumfluentni rastvor (slika 57b). Prava linija sa nagibom h_A povučena je kroz nasumične tačke na apscisi, koja odgovara fiksnoj spoljnoj koncentraciji supstrata $[A]_1$. Presek ove prave linije sa paralelom apscise u tački odgovarajuće merene brzine v_1 ima koordinate $[A]_{kin}$ i v_{kin1} . Ovom metodom karakteristike kinetičke reakcije dobijaju se tačku po tačku, a konstante uobičajenim grafičkim metodama.^{902,957-959}

I.4.9.2 Ograničenje unutrašnje difuzije

Za razliku od spoljašnje difuzije, unutrašnja difuzija teče paralelno sa reakcijom katalizovanom enzimima. Usled trošenja supstrata, brzina reakcije opada sa smanjenjem udaljenosti imobilisanog enzima od površine membrane, dok formiranje proizvoda izaziva lokalnu akumulaciju i formiranje gradijenta produkta. Istovremeni procesi difuzije preko membrane i kinetička reakcija ponašaju se aditivno:

$$\frac{\partial[A]}{\partial t} = \left(\frac{\partial[A]}{\partial t}\right)_{diff} + \left(\frac{\partial[A]}{\partial t}\right)_{kin} \quad (171)$$

Za difuziju se primenjuje Fikov (Fick) drugi zakon difuzije i Mihaelis-Menten odnos za kinetičku reakciju. V''' je unutrašnja maksimalna brzina po jedinici zapremine poroznog medijuma ili membrane:

$$\frac{\delta[P]}{\delta t} = D_A \left(\frac{\delta^2[A]}{\delta x^2}\right) - \frac{V'''[A]}{K_m + [A]} \quad (172)$$

U stacionarnom stanju, $\delta[A]/\delta t=0$:

$$D_A \left(\frac{\delta^2[A]}{\delta x^2}\right) = \frac{V'''[A]}{K_m + [A]} \quad (173)$$

Diferencijalna jednačina (173) može se rešiti numeričkim proračunom. Uvedeni su bezdimenzionalni termini za koncentraciju supstrata $\alpha=[A]/K_m$ i za rastojanje x od površine, $l=x/L$, L je debljina membrane (za sferu poluprečnika čestice r , L je zamenjena sa $r/3$) i l položaj unutar membrane:

$$\frac{d^2\alpha}{dl^2} = \frac{L^2 V'''}{K_m D_A} \cdot \frac{\alpha}{1+\alpha} = \Phi_A^2 \cdot \frac{\alpha}{1+\alpha} \quad (174)$$

Φ_A je supstrat ili Tileov (Thiele) modul:

$$\Phi_A = L \sqrt{\frac{V'''}{K_m D_A}} \quad (175)$$

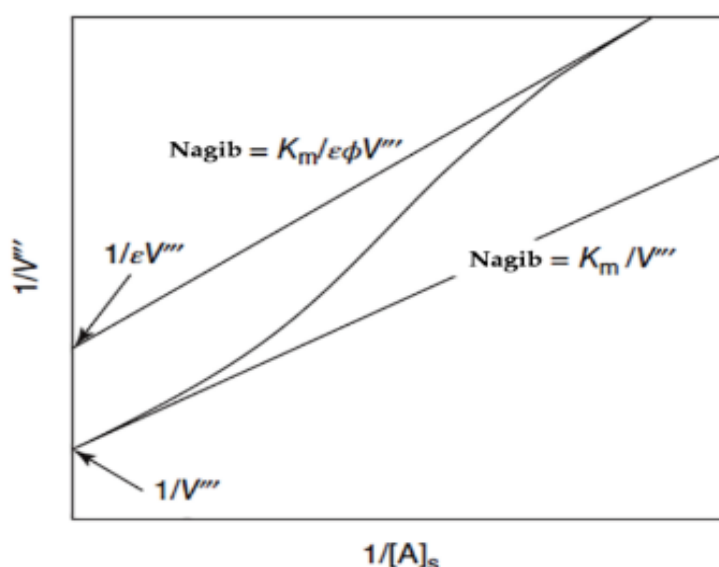
Tileov modul sadrži tri faktora koji određuju profil supstrata u membrani: debljinu membrane, difuzivnost supstrata i aktivnost enzima. Sa povećanjem Φ_A , stvarna koncentracija supstrata u membrani opada, a strmina gradijenta supstrata u membrani se povećava. Membrana je osiromašena supstratom i enzimska reakcija je usporena. U linearizovanim dijagramima postoje odstupanja. Koncentracija supstrata određena pri polovini zasićenja

veća je od K_m vrednosti slobodnog enzima, kao kod spoljnog ograničenja difuzije. Pri niskim vrednostima ($\Phi_A \leq 1$), reakcija je uglavnom kinetički kontrolisana i povinuje se Mihaelis-Menten kinetici.^{902,957-959}

Za određivanje kinetičkih konstanti imobilisanih enzima, važno je meriti u širokom opsegu supstrata, kao u nelinearnim zavisnostima u uskom opsegu, mogu se pojaviti linearni regioni i mogu dovesti do netačnih rezultata. Nelinearne krive se mogu proceniti prema uobičajenim grafičkim metodama, pod pretpostavkom da će ograničenje difuzije preovladavati pri veoma niskim koncentracijama supstrata, a enzimskata kataliza pri visokim koncentracijama. Konstante se dobijaju iz tangenti u ekstremnim oblastima (videti sliku 58). Ovi dijagrami su zasnovani na transformaciji jednačine (151) za dvostruko recipročni grafik:

$$\frac{1}{v'''} = \frac{1}{\eta_e V'''} + \frac{K_m}{\eta_e V''' [A]_s} \quad (207)$$

$[A]_s$ je efektivna koncentracija supstrata na površini. Na slici 58 prikazani su tipovi odstupanja od normalnog linearnog kretanja uzrokovanih ograničenjem difuzije.



Slika 58. Grafička metoda za određivanje kinetičkih konstanti imobilisanih enzima u ograničenju unutrašnje difuzije. ϵ - faktor efikasnosti⁹⁴⁴

Za veoma niske koncentracije na $[A]_s$, η_e aproksimira faktor efikasnosti ϵ za reakciju prvog reda. Prividna Mihaelisova konstanta u ovom regionu je $K = K_m / \epsilon$. Za visoke vrednosti Φ_A , $\epsilon = 1 / \Phi_A$.^{902,957-959}

I.4.9.3 Inhibicija imobilisanih enzima

Svi efekti koji smanjuju brzinu reakcije imobilisanog enzima suprotstavljaju trošenje supstrata oko enzima. Inhibicija enzima i ograničena difuzija deluju antagonistički. Ako oba efekta postoje istovremeno, oni se međusobno umanjuju; ukupno su slabiji nego što bi se očekivalo na osnovu zbira pojedinačnih efekata. Tako, pod sličnim uslovima, izgleda da je stepen inhibicije niži za imobilisane enzime u poređenju sa nativnim. Nelinearnost krivih u linearizovanim dijagramima uzrokovana ograničenjem difuzije je oslabljena, ali čak i iz

nelinearnosti ostaje očigledan tip inhibicije: kompetitivna inhibicija menja samo prividnu vrednost K_m , ali ne i maksimalnu brzinu; V takođe ne utiče na ograničenje difuzije. Nekompetitivna inhibicija menja oba parametra, što je takođe očigledno u ograničenju difuzije. Za jednostavnu nekompetitivnu inhibiciju ($K_{ic}=K_{iu}=K_i$) u spoljnoj ograničenoj difuziji, jednačina (152) bi se proširila na:

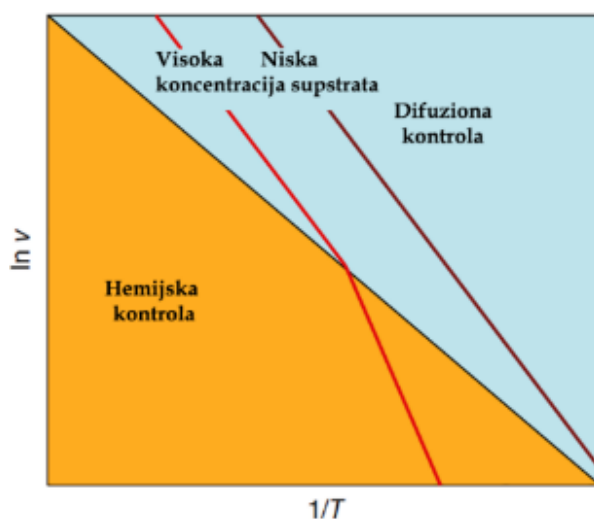
$$h_A([A]_0 - [A]) = \frac{V[A]}{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)(K_m + [A])} \quad (177)$$

Inhibicija proizvoda je poseban slučaj jer se, uz ograničenje difuzije, proizvod akumulira u predelu imobilisanog enzima i dodatno pojačava inhibiciju. Zbog ovog efekta, ograničenje difuzije postaje smanjeno. Može se zaključiti da imobilisani enzim slabije reaguje na promene koncentracije proizvoda u njegovoj blizini.^{902,957-959}

Svi drugi faktori koji utiču na aktivnost enzima takođe se suprotstavljaju ograničenju difuzije, npr., delimična inaktivacija uzrokovana postupkom imobilizacije enzima. Step inaktivacije je generalno potcenjen zbog smanjenja ograničenja difuzije, simulirajući efikasniju imobilizaciju. Ovo daje utisak očigledno poboljšane dugoročne stabilnosti kao posledice imobilizacije.^{902,957-959}

I.4.9.4 pH i temperaturno ponašanje imobilisanih enzima

Imobilisani enzimi pokazuju izmenjenu zavisnost od pH vrednosti i jonske snage, posebno ako su ovi parametri promenjeni samom enzimskom reakcijom, kao što je potrošnja ili formiranje kiselina (npr. proteaza) ili baza (npr. ureaza) kao supstrata ili proizvoda enzimske reakcije. Akumulacija takvih reakcionih proizvoda ograničenjem difuzije može pomeriti prividni pH optimum enzima za 1-2 pH stepena, u poređenju sa slobodnim enzimom. Do sličnih pomeranja krive optimalne pH vrednosti dolazi kada je enzim fiksiran za pozitivno ili negativno naelektrisanu matricu. Na Arenijusovom dijagramu, imobilisani enzimi često pokazuju nehomogenosti, odnosno prelaze između regiona različitih nagiba. Ovo se dešava u nižem temperaturnom opsegu kada je ceo proces hemijski kontrolisan, jer je enzimski reakcija veoma spora, a ograničenje difuzije nije izraženo (slika 59).



Slika 59. Temperaturna osetljivost imobilisanih enzima⁹⁰²

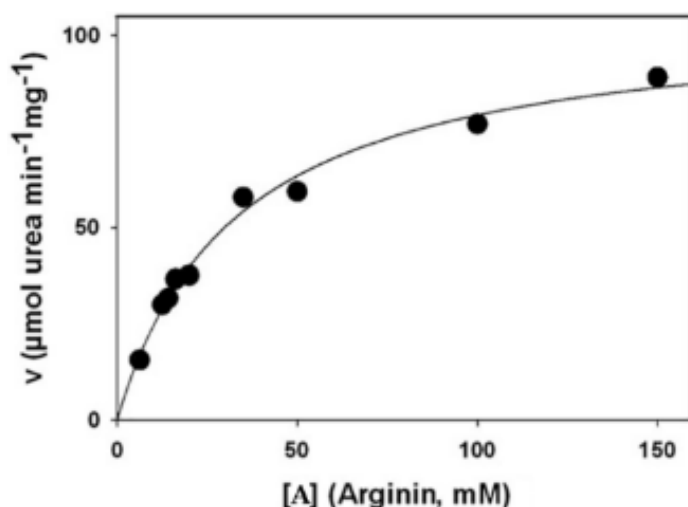
Sa povećanjem brzine reakcije na višim temperaturama, dolazi do trošenja supstrata, pri čemu ukupna reakcija pokazuje karakteristike ograničenja difuzije, što se prikazuje manjim nagibom na Arenijusovom dijagramu. Međutim, pri veoma niskim koncentracijama supstrata, kontrola difuzije pokriva ceo opseg merenja i dobija se samo jedna prava linija.^{902,957-959}

I.4.10 Prikupljanje i analiza kinetičkih podataka enzimskih reakcija

Mihaelis-Menten formalizam je nesumnjivo veoma važna prva aproksimacija za svaki novi enzim koji treba proučavati. Iako jednostavan i elegantan, on ima samo ograničen opseg primenljivosti. Ne pridržavaju se svi enzimi Mihaelis-Menten kinetike i postoje značajni izuzeci. Odgovarajući kinetički eksperimentalni dizajn nam omogućava da donesemo ovu procenu. Prikupljanje kinetičkih podataka dobrog kvaliteta je prvi zadatak u karakterizaciji enzima. Pouzdana i robusna metoda analize je preduslov za dobijanje podataka o enzimima. Dobri kinetički eksperimenti takođe obezbeđuju prikupljanje najkvalitetnijih primarnih podataka.⁹⁶⁰

I.4.10.1 Redukcionizam u eksperimentalnom dizajnu

Kinetički eksperimentalni dizajn skoro uvek ima redukcionistički pristup – menjajući jedan po jedan parametar dok sve ostale održava konstantnim. Parametri koji mogu da variraju uključuju $[A]$, $[P]$, pH vrednost, jonsku snagu, puferske vrste, aktivatore, inhibitore, itd. Možda je najvažniji i informativni skup podataka promena početne brzine u odnosu na koncentraciju supstrata ($v \rightarrow [A]$ dijagram). Podsetimo se da čak i u reakciji sa više supstrata dolazi do niza bimolekularnih sudara da bi se sklopio produktivni enzimski kompleks. Dalje, takve reakcije se mogu tretirati kao pseudounimolekularne u odnosu na jedan supstrat držeći sve ostale konstantnim. U tom smislu, primarni skup podataka je $v \rightarrow [A]$ kriva koja ima šest do deset tačaka podataka za svaki supstrat (slika 60).



Slika 60. v u odnosu na $[A]$ grafik. Linija povučena kroz tačke je nelinearni najmanji kvadrat, koji najbolje odgovara Mihaelis-Menten jednačini i predstavlja pravougaonu hiperbolu⁹⁶⁰

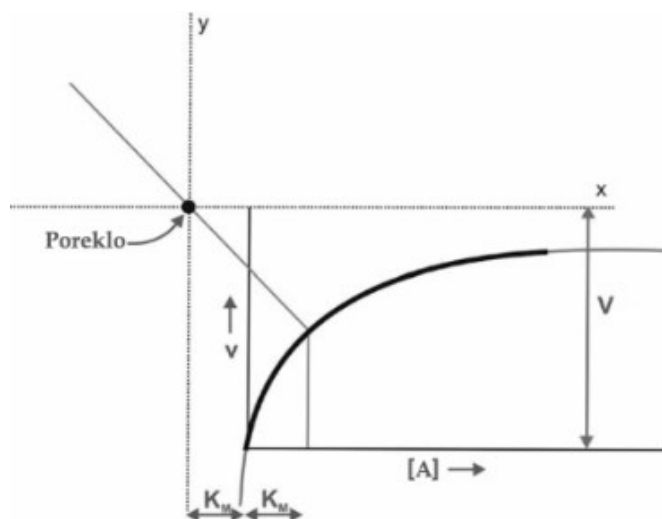
Potpuna kinetička analiza *bi*-supstratne reakcije ($n=2$) stoga zahteva približno 10^2 nezavisna ispitivanja da bi se izvršila. Kako se broj reaktanata i modifikatora povećava, eksperimentalni podaci koji se prikupljaju postaju ogromni. Tipično, obim podataka raste kao funkcija snage od „ n “, gde je „ n “ broj reaktanata (supstrat/proizvod) i modifikatora (aktivator/inhibitor) povezanih sa tim enzimom. Npr. na *E. coli* glutamin sintetaza utiče najmanje osam reaktanata/modifikatora. Shodno tome, čak 10^8 testova može biti neophodno da bi se u potpunosti definisala njena kinetika.⁹⁶⁰

I.4.10.2 Izbor koncentracija supstrata

Glavni cilj u kinetičkom profilisanju bilo kog enzima je određivanje njegovih kinetičkih konstanti V (i stoga k_{cat}) i K_m . Početna merenja brzine napravljena na različitim $[A]$ su originalni podaci potrebni da bi se to postiglo. Prvi i najjednostavniji način analize originalnih podataka je iscrtavanje grafika od $v \rightarrow [A]$ kao što je prikazano na slici 60. Razumne procene V i K_m mogu se dobiti iz takvih dijagrama – pod uslovom da podaci pokrivaju širok raspon $[A]$.

Mora se koristiti širok raspon $[A]$ da bi se dobile pouzdane procene V i K_m . Dva ekstremna slučaja $[A] \ll K_m$ i $[A] \gg K_m$, respektivno, definišu V/K_m i V na slici 60. Obično se počinje sa definisanjem V - podataka za visoku vrednost $[A]$. Ako je pokriven samo donji opseg $[A]$, tada će se činiti da su podaci prvog reda u odnosu na $[A]$. Ovo je definisano sa $v = (V/K_m) \cdot [A]^1$, graničnim slučajem Mihaelis–Menten jednačine. S druge strane, merenja izvršena samo na višem opsegu $[A]$ su pristrasna prema V . Iz takvih podataka može se proceniti V , ali ne postoji način da se odredi K_m .

Jasno je da raspon koncentracija supstrata, između $0,1 K_m$ i $10 K_m$ (najmanje $0,33 K_m$ do $3 K_m$!), treba koristiti za precizno određivanje kinetičkih konstanti. Grafik $v \rightarrow [A]$ oko K_m vrednosti je oblast maksimalne zakrivljenosti za pravougaonu hiperbolu (slika 61).



Slika 61. $v \rightarrow [A]$ kriva opisana Mihaelis–Menten jednačinom je deo pravougaone hiperbole. Istaknuti kratki luk (tamna linija) je stvarna oblast u kojoj su eksperimentalna zapažanja za enzim fizički moguća. Dva kraka ove pravougaone hiperbole formiraju asimptote beskonačne krive kao što je prikazano. Ovo otežava direktnu procenu vrednosti K_m i V ⁹⁶⁰

Stoga je mudro odabrati tačke podataka na obe strane K_m tako da kriva bude najbolje definisana.⁹⁶⁰

I.4.10.3 Početni eksperimenti i iteracija podataka

Novo istraživanje enzima često počinje pouzdanom metodom analize, ali bez prethodnog znanja o njegovim kinetičkim konstantama. Kako onda izabrati odgovarajući opseg $[A]$? Uobičajena je praksa da se sprovede pilot eksperimenti sa tačkama koje obuhvataju širok opseg $[A]$.

Iz ovih preliminarnih podataka dobija se gruba procena V i K_m . Pouzdanije procene se tada mogu dobiti sužavanjem raspona $[A]$ sa $0,33 K_m$ na $3 K_m$ (koristeći grubu vrednost ove K_m dobijene iz pilot eksperimenta). Konačno, veliki broj tačaka podataka se generiše unutar ovog opsega da bi se izračunale vrednosti V i K_m . Dobijanje pouzdanih i korisnih $v \rightarrow [A]$ setova podataka za enzim je stoga iterativni proces. U roku od nekoliko rundi iteracija, trebalo bi da budemo u mogućnosti da postignemo najbolji opseg potrebnih koncentracija supstrata.⁹⁶⁰

I.4.10.4 Važnost merenja početnih brzina

Precizno merenje početne brzine je od primarne važnosti u kinetičkoj analizi. Potcenjivanje početne brzine je uobičajen problem kada se posmatraju nelinearni vremenski tokovi. Podaci dobijeni „kontinuiranom analizom“ su stoga pouzdaniji. Jedano praktično rešenje za nelinearni vremenski tok je *upotreba razblaženih rastvora enzima*. Rad sa prikladno razblaženim enzimom takođe pomaže pri:

- smanjivanju brzine reakcije na nivoe kojima se može upravljati,
- čuvanju dragocenog enzima i
- eliminisanju neželjenih interakcija, ako ih ima.

Druge poteškoće pri eksperimentalnom merenju početne brzine pri većoj $[A]$ mogu biti zbog ograničene rastvorljivosti, smetnji pri merenjima, osetljivosti metode detekcije itd.

Osnovno razmatranje pri merenju „ $[A]$ naspram v “ podataka je da se prave početne brzine zabeleže, pri svakoj testiranoj koncentraciji supstrata. Ovo je u praksi, međutim, lakše reći nego uraditi – posebno pri niskim $[A]$ vrednostima. U Mihaelis–Menten formalizmu, pretpostavljamo da je $[A_t] \approx [A]$. U praksi stoga, do 5–10% trošenja $[A_t]$ može se tolerisati tokom perioda analize. To je zato što same eksperimentalne greške (i varijacije) često doprinose više od efekata trošenja supstrata. Zbog toga bi trebalo osigurati da se manje od 5–10% supstrata pretvori u proizvod(e) dok se ispituje enzim na najnižoj odabranoj $[A]$. Svaki viši nivo $A \rightarrow P$ konverzije brzo dovodi do odstupanja brzine reakcije od linearnosti – i potcenjivanja v . Pošto su eksperimentalne greške velike pri niskom $[A]$ i poželjno je ograničiti konverziju supstrata na ispod 10%. Mnoga ponovljena merenja mogu biti potrebno pri niskim vrednostima $[A]$.

Li (Lee) i Vilson (Willson) su predložili modifikaciju za analizu kinetičkih podataka gde je došlo do značajne konverzije supstrata (do 40% konverzije).⁹³⁰ Pretpostavimo da se koncentracija supstrata smanji sa $[A_i]$ na $[A_f]$ do kraja testa. Umesto korišćenja dodane

početne koncentracije supstrata ($[A]$ total, tj. $[A_t]$), preporučuje se aritmetička sredina $[A_t]$ i $[A_f]$. Enzim ne vidi $[A_t]$ tokom perioda analize. Stoga je aritmetička sredina ($[\bar{A}] = ([A_t] + [A_f])/2$) prikladnija mera koncentracije supstrata u $v \rightarrow [A]$ dijagramima. Npr. pretpostavimo da se početna koncentracija supstrata od 5,0 mM smanjuje na 4,0 mM (na kraju analize) zbog konverzije od 20%. Efektivna prosečna koncentracija supstrata $[\bar{A}]$ koju enzim oseti tokom testa je 4,5 mM (a ne 5 mM!). Ova razlika je još veća kada konverzija supstrata postane veća. Li-Vilson (*Lee-Willson*) modifikacija dobro funkcioniše samo kada supstrat i proizvod ne inhibiraju značajno enzim. Ovaj postupak nije pogodan za enzime gde se primećuje inhibicija supstrata ili se javlja značajna inhibicija proizvoda na niskim $[P]$ nivoima.⁹⁶⁰

I.4.10.5 Primena integralnog oblika Mihaelis–Menten jednačine

Kompletni vremenski tok (kriva brzine reakcije) je zapravo robusniji izvor kinetičkih informacija. Omogućava nam da okarakterišemo ponašanje brzine pri različitim stepenima konverzije supstrata i akumulacije proizvoda. Kinetička analiza vremenskog toka je moguća sa integralnim oblikom odgovarajuće jednačine brzine. *Integralne jednačine brzine se obično koriste u hemijskoj kinetici*, ali retko u enzimskoj kinetici (naravno sa izuzetkom kinetike brze reakcije – analiza prelaznog stanja). U principu, sa integralnim oblikom jednačine, jedna produžena analiza toka vremena reakcije bi trebala biti dovoljna da se dobiju svi kinetički parametri enzima. Ovo takođe izbegava greške mešanja koje su povezane sa metodama početne brzine. Zašto su onda studije početnih brzina reakcije popularne u enzimskoj kinetici? Jedan razlog je istorijski. Drugi, integralni oblik ne uključuje efekte akumulacije proizvoda. Međutim, kada se ovi efekti ubace, sistem se brzo komplikuje – čak i za primer, jedan supstrat-proizvoda. Na kraju, metoda merenja početne brzine je povoljna, jer se pojedinačnim promenljivim vrednostima kao što su $[A]$, $[P]$, $[E_t]$, itd. može manipulirati pojedinačno i po želji.⁹⁶⁰

I.4.10.6 Osnove analize eksperimentalnih podataka

Istraživanje kinetičkih svojstava enzima podrazumeva učenje kako on reaguje na promene u okruženju. Najčešća promenljiva je $[A]$ i neophodno je raditi u širokom opsegu $[A]$, gde se brzina reakcije značajno menja. Pod uslovom da enzim poštuje Mihaelis–Menten jednačinu, dobar dizajn kinetičkih eksperimenata zahteva da $[A]$ vrednosti treba da se protežu na obe strane vrednosti K_m . Obično je poželjno tri do pet tačaka podataka ispod i jednak broj iznad K_m vrednosti. Set podataka za dobro predstavljen $v \rightarrow [A]$ dijagram treba da ima najmanje šest do deset dobro raširenih tačaka.⁹⁶⁰

I.4.10.6.1 Statistika, varijacije i greške pri eksperimentima

Bez obzira da li Mihaelis–Menten formalizam funkcioniše ili ne, $v \rightarrow [A]$ podaci za enzim predstavljaju nelinearnu vezu. Eksperimentalni podaci zauzimaju samo segment pravougaone hiperbole (slika 61). Stoga se mora započeti kinetička analiza sa

visokokvalitetnim, originalnim $v \rightarrow [A]$ podacima. Velike greške su povezane sa merenjima v na nižem opsegu $[A]$. To je zato što početna brzina reaguje strmo u ovom $[A]$ opsegu. I možda će biti potrebno mnogo ponavljanja. Ovo međutim zahteva brigu i pažnju, posebno kada se radi sa nestabilnim enzimskim preparatima. Npr. pretpostavimo da želimo da promenimo jedan parametar ($[A]$) na četiri različite vrednosti drugog (recimo drugi supstrat). Za deset tačaka po $v \rightarrow [A]$ setu podataka, potrebno je izvršiti ukupno 40 testova. Enzim može izgubiti značajnu aktivnost pred kraj ovog dugog eksperimenta. Ovo naravno treba proveriti. Moguće je objediniti originalne $v \rightarrow [A]$ podatke iz odvojenih eksperimenata dok se procenjuju kinetičke konstante (kao što su V i K_m). Ali najbolje je koristiti ceo set $v \rightarrow [A]$ podataka generisanih u jednom eksperimentu – ovo svodi na minimum varijacije „između eksperimenata”. Trebalo bi izvršiti ponovljena merenja da bi se dobio pouzdan set podataka, jer *bilo koji stepen sofisticirane analize neće transformisati loše podatke u dobre podatke*.⁹⁶⁰

Greške se ne mogu izbeći prilikom dobijanja kinetičkih podataka. Važno je razumeti prirodu ovih grešaka i njihovu rasejanost. Zbog rasipanja grešaka, postaje teško odlučiti da li izmereni podaci odgovaraju pretpostavljenoj jednačini brzine (kao što je Mihaelis-Menten jednačina i hiperbolična kriva). Analiza takvih podataka zahteva statističke alate i posebno regresijske metode. Ovaj tretman je veoma koristan za nelinearne krive gde je okom teže detektovati sistematska odstupanja. Koeficijent korelacije ukazuje na konzistentnost podataka sa pretpostavljenim modelom (i jednačinom brzine reakcije). Grafici ostatka se koriste za merenje odstupanja svake vrednosti od pretpostavljene funkcije (prema jednačini brzine reakcije). Rigorozna statistička analiza smanjuje opasnost od subjektivnosti u tumačenju. Ipak, vredi zapamtiti da tačnost proračuna ne može nadoknaditi nedostatak tačnosti u prikupljanju ili beleženju podataka. Najbolje uklapanje krive može biti generisano nelinearnim usklađivanjem podataka na osnovi najmanjih kvadrata u jednačini brzine reakcije, kao što je Mihaelis-Menten jednačina. Mnogi grafički programi su danas dostupni za izvođenje nelinearnog prilagođavanja krive. Nekoliko primera je navedeno u tabeli 14. Međutim, trebalo bi biti dobro upoznat sa ograničenjima takvih programa. Dve nepoznate V i K_m se u takvim programima rešavaju iterativno. Direktna analiza netransformisanih podataka daje najpouzdanije procene V i K_m . Jedan od ciljeva kinetičkih studija je da se dobije procena kinetičkih konstanti iz odsečaka kao što su V (i stoga k_{cat}) i K_m za enzim.⁹⁶⁰

Tabela 14. Softver dostupan za analizu kinetičkih podataka enzimskih reakcija

Ime softvera	Opis softvera
<i>Cleland's Package</i>	Fortran program; Methods in Enzymology 63:103 (1979); Open source ⁹⁶⁰
<i>Sigrafit</i>	Microsoft Visual Basic Studio program; Biochemistry and Molecular Biology Education 33:399 (2005); Open source ⁹⁶⁰
<i>Hyper and Median</i>	Program za analizu podataka enzimске kinetike; http://homepage.ntlworld.com/john.easterby/abouthyp.html ; Open source ⁹⁶⁰
<i>DynaFit</i>	BioKin, Ltd.; Analytical Biochemistry 237, 260- (1996); http://www.biokin.com/ ; Open source/komercijalan ⁹⁶⁰
<i>VisualEnzymics</i>	Softzymics, Inc. 623 Brickhouse Road, Princeton, NJ 08540; http://www.softzymics.com/ ; Commercial ⁹⁶⁰
<i>SigmaPlot</i>	Enzyme Kinetics Module; Systat Software Inc.; http://www.sigmaplot.com/ ; komercijalan ⁹⁶⁰
<i>Enzfitter</i>	BIOSOFT, PO Box 1013, Great Shelford, Cambridge, CB22 5WQ GB - United Kingdom; http://www.biosoft.com/w/enzfitter.htm ; komercijalan ⁹⁶⁰
<i>KinTek Explorer</i>	Program KinTek Corp-a za analizu podataka enzimске kinetike; https://www.kintekexplorer.com/ ; komercijalan
<i>GraphPad Prism</i>	Sveobuhvatna analiza i statistika eksperimentalnih podataka; Dotmatics-ov program; https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/ ; komercijalan
<i>Enzyme Kinetics</i>	OriginLab-ova aplikacija za enzimsku kinetiku; Enzyme Kinetics - File Exchange - OriginLab ; Open source

II. EKSPERIMENTALNI DEO

II.1. MATERIJALI

Biokatalizatori korišćeni u radu su alkalaza (proteaza iz *Bacillus licheniformis*, Subtilisin EC 3.4.21.14) 2,4 L i peroksidaza (E. C. 1.11.1.7; donor: H₂O₂ oksidoreduktaza) iz rena (*Armoracia rusticana*) (HRP-C) proizvođača *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA).

Sinteza i tretman magnetnih čestica vršeni su pomoću gvožđe(III)-hlorida heksahidrata iz *Analytika-e* (Prag, Češka Republika), gvožđe(III)-sulfata heptahidrata iz *Lach-Ner-a* (Neratovice, Češka Republika), 25%-ni amonijum-hidroksid i limunska kiselina monohidrat iz *Centrohem-a* (Stara Pazova, Srbija), fenolftalein iz *Molar Chemicals KFT-a* (Budimpešta, Mađarska).

Kao nosač za kovalentnu imobilizaciju enzima korišćen je natrijum-alginat niske viskoznosti proizvođača *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, USA).

Kao aktivator nosača za kovalentnu imobilizaciju enzima korišćen je 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDAC) proizvođača *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, USA). Nakon aktivacije korišćen je 2-merkaptetanol proizvođača *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA).

Za određivanje standardne enzimske aktivnosti alkalaze korišćen je azokazein i trihlorsirćetna kiselina proizvođača *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA), natrijum-hidroksid iz *NRK Inženjering-a* (Beograd, Srbija), dok je za određivanje standardne enzimske aktivnosti peroksidaze korišćen pirogalol proizvođača *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA) i 3% rastvor vodonik-peroksida (*v/v*) proizvođača *Galapharm* (Beograd, Srbija).

Kao standard za određivanje sadržaja proteina korišćen je goveđi serum albumin proizvođača *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA).

Za Bradfordovu metodu korišćen je koncentrovani rastvor boje *Coomassie Blue G-250* proizvođača *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA) i 96% etanol proizvođača *Zorka Pharma* (Šabac, Srbija).

Za pravljenje Tris-HCl pufera, Tris(hidroksimetil)-metilamin proizvođača *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, USA) i korišćena je hlorovodonična kiselina proizvođača *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA), dok su za pravljenje fosfatnog i acetatnog pufera korišćeni natrijum-dihidrogen fosfat, dinatrijum-hidrogen fosfat i sirćetna kiselina proizvođača *Zorka Pharma* (Šabac, Srbija).

Za hidrolizu proteina iz soje i belanceta korišćena je trinitrobenzenska kiselina (TNBS) proizvođača *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA) i natrijum-dodecil sulfat (SDS) i kalcijum-hidroksid proizvođača *NRK Inženjering* (Beograd, Srbija).

Belance je nabavljeno od *PKB Inshri* (Beograd, Srbija), dok je izolat proteina soje od 90% nabavljen od kompanije *Sojaprotein d.o.o.* (Bečej, Srbija).

Antrahinonske boje korišćene u ovo radu, *C.I. Acid Blue 225* (AB225) i *C.I. Acid Violet 109* (AV109) nabavljene su od *Lanaset-a* (*Lanaset Violet B*, *Lanaset Blue 2R*, Huntsman International LL, The Woodlands, TX, USA).

Sve hemikalije su imale čistoću p.a.

II.2. METODE

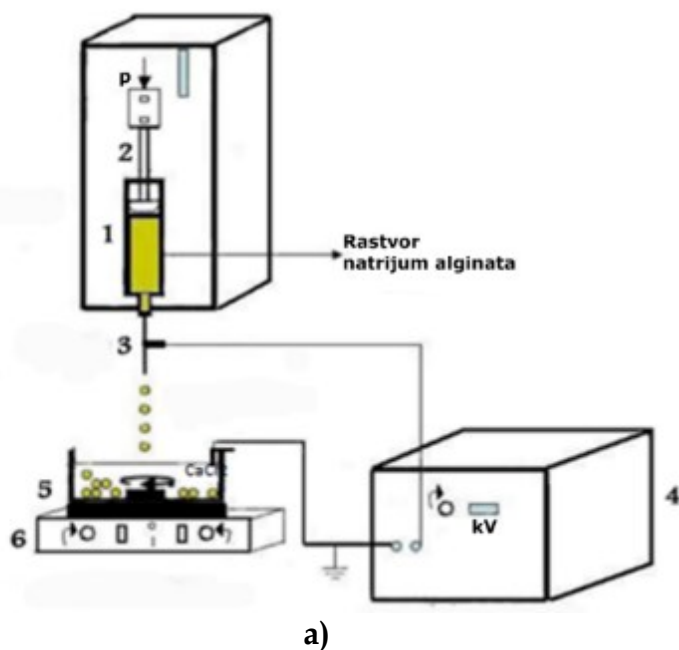
II.2.1 Postupak dobijanja kalcijum-alginatnih mikročestica metodom elektrostatičke ekstruzije

Kalcijum-alginatne mikročestice dobijene su elektrostatičkom ekstruzijom, koja predstavlja disperznu metodu koja primenjuje elektrostatičku silu.^{51,961} 2% polimerni rastvor (w/v) je pripremljen rastvaranjem praha natrijum-alginata niske viskoznosti u destilovanoj vodi. Rastvor je mešan 3 h na magnetnoj mešalici (500 rpm) (*Staufen*, Nemačka). Sferične kapi su formirane ekstruzijom polimerne suspenzije kroz iglu sa ravnim vrhom od nerđajućeg čelika (22 G) pomoću automatske pumpe (*Razel, Scientific Instruments*, Stamford, CT, USA) i šprica od 20 mL, protokom $27,3 \text{ mL h}^{-1}$. Igla je bila pozitivno naelektrisana pomoću elektrode izvedene iz generatora visokog napona (*Model 30R, Bertan Associates Inc.*, New York, NY, USA), dok je elektroda sa uzemljenjem uronjena u rastvor za želiranje. Rastvor za želiranje je 1,5% rastvor CaCl_2 (w/v). Rastojanje između vrha igle i rastvora CaCl_2 je bilo 2,5 cm, a elektrostatički napon je bio 6,5 kV. U prostoru između vrha igle i gornjeg nivoa rastvora CaCl_2 ostvareno je određeno električno polje. Pod dejstvom gravitacione i elektrostatičke sile, potiskivani rastvor se otkida od vrha igle u obliku mlaza sitnih naelektrisanih kapljica. Kapi su se skupljale u rastvoru za želiranje (u *Petri* šolji) uz konstantno mešanje pomoću magnetne mešalice (130 rpm), kako bi se omogućila što bolja distribucija čestica u rastvoru za želiranje, pri čemu dolazi do razmene Na^+ i Ca^{2+} jona i dolazi do očvršćavanja kapi u obliku sfernih mikročestica. Kalcijum-alginatne mikročestice koje se nalaze u rastvoru za želiranje se ispiraju destilovanom vodom i filtriraju pod vakuumom, pomoću *Buchner*-ovog levka u kombinaciji sa guč-bocom. Čestice su se do dalje upotrebe čuvale u Tris-HCl puferu (50 mM, pH vrednosti 8,5) u frižideru. Slika aparature za ekstruziju i šema aparature za dobijanje kalcijum-alginatnih mikročestica elektrostatičkom ekstruzijom su prikazane na šemi 17.

II.2.2 Postupak dobijanja kalcijum-alginatnih submikronskih čestica metodom ultrazvučnog raspršivanja

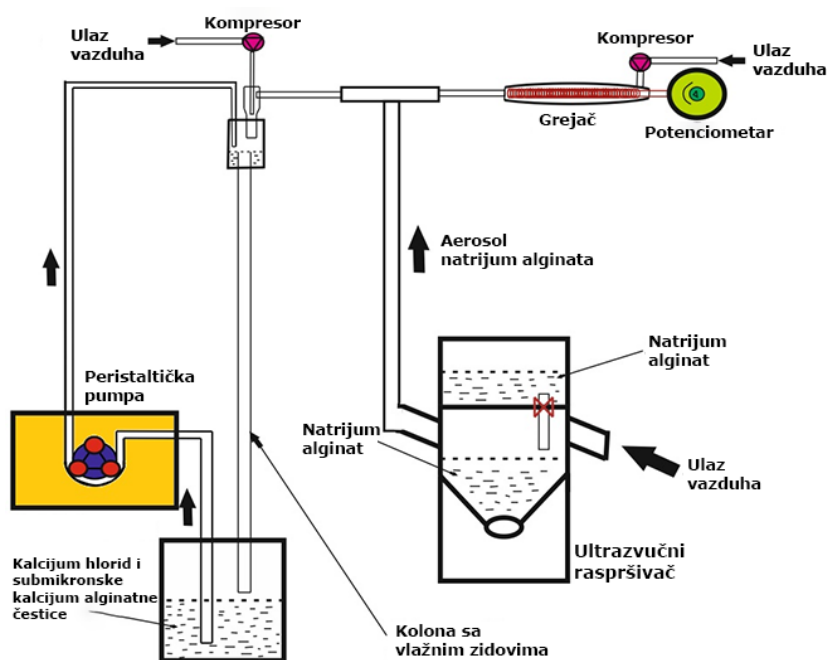
Rastvaranjem praškastog natrijum-alginata niske viskoznosti u destilovanoj vodi dobijeni su rastvori natrijum-alginata od 0,4 i 0,5% (w/v). Rastvori su mešani pomoću magnetne mešalice (350 rpm), a do potpunog rastvaranja natrijum-alginata dolazilo je nakon 1 h. Novi sistem ultrazvučnog raspršivanja je ručno pravljen i konfigurisan kao ultrazvučni raspršivač (za raspršivanje rastvora natrijum-alginata), opcionalno sa grejačem (za sušenje čestica alginatnog aerosola) i staklene kolone (za želiranje alginatne aerosoli). Ultrazvučni generator varijabilne frekvencije *Omron Profi Sonic KCW-6TD*, 220 V/50 Hz (Hoofddorp, Holandija), je korišćen za primenu konstantne frekvencije od 1,7 MHz.

Staklena cev u kojoj se nalazio grejač na jednom kraju je povezana sa kompresorom koji je obezbeđivao protok toplog vazduha, dok je na drugom kraju cev podeljena na dva dela. Jedan deo je bio vezan plastičnim crevom za uređaj u kome je bio rastvor natrijum-alginata, dok su se kroz drugi deo plastičnim crevom prenosile sušene čestice aerosola, koje su nošene vazдушnom strujom do kolone sa okvašenim zidovima rastvorom za želiranje (2% rastvor CaCl_2 (w/v)). Čestice su isprane destilovanom vodom i do dalje upotrebe su se čuvale u Tris-HCl puferu (50 mM, pH vrednosti 8,5) u frižideru.



Šema 17. Šematski prikaz eksperimentalne aparature za dobijanje alginatnih mikročestica elektrostatičkom ekstruzijom (a): (1) 2% rastvor natrijum-alginata (*w/v*) (2) se propušta pumpom (3) kroz iglu prečnika 22 G, čiji je vrh odvojen 2,5 cm od površine rastvora za želiranje (1,5% rastvor CaCl_2 (*w/v*)) (4) povezanu sa generatorom visokog napona, pri naponu od 6,5 kV (5) dobijene kapi se skupljaju u Petri šolji sa rastvorom za želiranje (1,5% rastvor CaCl_2 (*w/v*)) (6) koji se meša na magnetnoj mešalici (130 rpm); (b) slika aparature za ekstruziju

Šema aparature za dobijanje alginatnih submikronskih čestica metodom ultrazvučnog raspršivanja je prikazana na šemi 18.



Šema 18. Aparatura za dobija alginatnih submikronskih čestica metodom ultrazvučnog raspršivanja

Na slici 62 predstavljena je aparatura za proizvodnju submikronskih alginatnih čestica metodom ultrazvučnog raspršivanja.



Slika 62. Aparatura za proizvodnju submikronskih alginatnih čestica metodom ultrazvučnog raspršivanja

II.2.3 Hemijska sinteza magnetnih čestica

Metodom koprecipitacije FeCl_3 i FeSO_4 u višku amonijaka, sintetisane su magnetne čestice.⁹⁶² Rastvoreno je 5,6 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i 10,8 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ u 300 mL destilovane vode. Dobijeni rastvor je zagrevan na 80 °C u vodenom kupatilu sa 200 mL 25%-nog rastvora NH_4OH (*w/v*) (uz povratni Alinov (*Allihn*) kondenzator). Sintezu je potrebno vršiti u digestoru zbog isparavanja amonijaka. Rastvor je energično i neprestano mešan 60 minuta (podešeno mešanje na vodenom kupatilu, s tim da i kondenzator mora biti pričvršćen uz stativ na vodenom kupatilu kako bi se sve zajedno mešalo).

Smeša je filtrirana kroz običan filter papir nakon sat vremena sinteze, na 5-6 mesta za filtraciju zbog kraćeg vremena, a samim tim se čestice bolje rasporede po filter papiru i lakše isperu.^{963,964} Dobijane čestice dalje su ispirane temeljno dvostruko destilovanom vodom do pH vrednosti 7,0 (ili do gubitka boje sa fenolftaleinom), sušene na 105 °C, a nakon toga prosejavane ($<100 \mu\text{m}$). Čestice ($4,49 \pm 0,07$ g) su zatim ostavljane u rastvoru 100 mL fenolftaleina na 50 °C 24 h i nakon toga ispirane dvostruko destilovanom vodom i ponovo sušene preko noći.

II.2.4 Postupak dobijanja magnetit-alginat čestica (MAB)

Za dobijanje MAB korišćena je metoda ekstruzije sa i bez električnog generatora⁵¹ 2% polimerni rastvor (*w/v*) je pripremljen rastvaranjem praha natrijum-alginata niske viskoznosti u destilovanoj vodi. Rastvor je mešan 3 h na magnetnoj mešalici (500 rpm) (*Staufen*, Nemačka). Različita masa (0,04–0,2 g) magnetnih čestica je dodavana u 20 mL 2% rastvora natrijum-alginata (*w/v*). Sferične kapi su formirane ekstruzijom polimerne suspenzije kroz igle različitog prečnika (18–25 G) sa ravnim vrhom od nerđajućeg čelika pomoću automatske pumpe (*Razel, Scientific Instruments*, Stamford, CT, USA) i šprica od 20 mL, protokom 27,3 mL h⁻¹. Pri procesima elektrostatičke ekstruzije, igla je bila pozitivno naelektrisana pomoću elektrode izvedene iz generatora visokog napona (*Model 30R, Bertan Associates Inc.*, New York, NY, USA), dok je elektroda sa uzemljenjem uronjena u rastvor za želiranje. Rastvor za želiranje je 1,5% rastvor CaCl₂ (*w/v*). Rastojanje između vrha igle i rastvora CaCl₂ je bilo 2,5 cm, a elektrostatički napon je bio 6,5 kV. U prostoru između vrha igle i gornjeg nivoa rastvora CaCl₂ ostvareno je određeno električno polje. Pod dejstvom gravitacione i elektrostatičke sile, potiskivani rastvor se otkida od vrha igle u obliku mlaza sitnih naelektrisanih kapljica. Kapi su se skupljale u rastvoru za želiranje (u *Petri* šolji) uz konstantno mešanje pomoću magnetne mešalice (130 rpm), kako bi se omogućila što bolja distribucija čestica u rastvoru za želiranje, pri čemu dolazi do razmene Na⁺ i Ca²⁺ jona i do očvršćavanja kapi u obliku sfernih mikročestica. MAB su isprane destilovanom vodom nakon čega su čuvane na 4 °C u Tris-HCl puferu (50 mM, pH vrednosti 8,5) do dalje upotrebe.

II.2.5 Veličina čestica i zeta potencijal

Veličina i raspodela veličine alginatnih mikročestica dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom određene su pomoću analizatora veličine čestica *Mastersizer 2000* (*Malvern Instruments*, Worcestershire, UK), opremljenim sa *Hydro 2000S* disperzionom uređajem. Srednji prečnik po zapremini je korišćen kao reprezentativni prečnik. Jedan od uobičajenih indikatora raspodele veličine je raspon definisan kao:

$$\text{raspon raspodele veličine} = \frac{(D_{90} - D_{10})}{D_{50}} \quad (178)$$

koji predstavlja koliko su udaljene tačke od 10 i 90%, normalizovano sa srednjom tačkom. Srednja veličina čestica submikronske veličine alginata proizvedenih ultrazvučnom raspršivanjem izmerena je fotonskom korelacionom spektroskopijom, koristeći *Zetasizer Nano Series, Nano ZS* (*Malvern Instruments Ltd.*, Malvern, UK) sa opsegom merenja 0,6 nm–6 mm. Ovim instrumentom vršena su i merenja zeta potencijala.

Podaci koji se odnose na veličinu MAB dobijeni su pomoću optičkog mikroskopa *Olympus CX41RF* (Tokio, Japan), opremljenog softverom za analizu slike *Olympus* - „*CellA*“ (Tokio, Japan). Sve čestice su ispitane odmah nakon formiranja. Za sve slučajeve merene su veličine 100 čestica.

II.2.6 Mehanička čvrstoća MAB

Mehanička čvrstoća MAB je merena ispitivanjem kompresije čestica između dve ravne površine. Testovi su obavljeni na *Universal Testing Machine, AG-Xplus* (Shimadzu, Japan) opremljene sa ćelijom opterećenja od 100 N (opseg sile od 0,01 do 100 N). Kompresija je izvedena do 30% deformacije uzorka pri brzinama kompresije $0,25 \text{ mm min}^{-1}$. Za snimanje i analizu eksperimentalnih podataka korišćen je softver *TRAPEZIUMX 1.13* (Shimadzu, Japan).

II.2.7 Magnetna svojstva magnetita i MAB

Magnetna karakterizacija magnetita i MAB merene su pomoću *Quantum Design MPMS* (Magnetic Property Measurement System) *XL-5 SQUID* magnetometra (*Quantum Design*, San Dijego, CA, USA) kojim je moguće meriti magnetizaciju uzorka u intervalu temperature 1,8 do 350 K i opsegu magnetnog polja od -50 do 50 kOe . Magnetna histerezis petlja magnetita i MAB je merena pomoću vibrirajućeg magnetometra na 5 K. Kriva magnetizacije na 5 K merena je za jednu česticu kao funkcija magnetnog polja između 0 i 50 kOe .^{965,966} Merenja su vršena u Laboratoriji za teorijsku fiziku i fiziku kondenzovane materije Instituta za nuklearne nauke Vinča.

II.2.8 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Efekat HRP-C i alkalaze na morfologiju površine nosača je ispitivana pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije koja je izvedena *TESCAN MIRA3* elektronskim mikroskopom (*TESCAN ORSAY HOLDING, a.s.*, Brno, Češka Republika) na ubrzavajućem naponu od 10 i 20 kV. Pre posmatranja, uzorci su degazirani i raspršeni su zlatom pomoću *Polaron SC502 Sputter Coater-a* (*Fison Instruments*, Glazgov, UK).

II.2.9 Furijeova transformacijska infracrvena spektroskopija (FTIR)

Analiza infracrvene spektroskopije sa Fourijeovim transformacijama (FTIR) izvedena je korišćenjem *Nicolet iS 10* spektrometra (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) u režimu oslabljene ukupne refleksije (ATR) pri rezoluciji od 4 cm^{-1} sa ATR korekcijom i OMNIC softverom (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA). Spektri su dobijeni u opsegu talasnih brojeva između 4000 i 400 cm^{-1} na $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. FTIR je korišćen za proveru hemijske interakcije i promena nakon imobilizacije.

II.2.10 Određivanje koncentracije proteina metodom po Bredfordu (Bradford)

Bredford-ova metoda za određivanje koncentracije proteina zasniva se na nekovalentnom vezivanju proteina i anjonskog oblika molekula *Coomassie Blue G-250*. Ovaj reagens reaguje prvenstveno sa ostacima arginina, ali može da reaguje u maloj meri i sa drugim baznim aminokiselinama (lizinom i histidinom), kao i aromatičnim aminokiselinama (triptofanom, fenilalaninom i tirozinom).

Koncentrovani rastvor boje *Coomassie Blue G-250* se pripremi rastvaranjem 100 mg boje prvo u 96% rastvoru etanola (*w/v*), a zatim se ovaj rastvor prenese u normalni sud od 200 mL, doda se 100 mL fosforne kiseline i dopuni do crte destilovanom vodom. Bredford-ov reagens se priprema razblaživanjem koncentrovanog rastvora boje *Coomassie Blue G-250* i filtriranjem razblaženog rastvora kroz filter papir. Razblaživanje se izvodi tako što se 200 mL koncentrovanog rastvora boje *Coomassie Blue G-250* dopuni do 1 L destilovanom vodom. Prvih 20-30 mL proceđenog rastvora treba odbaciti. U epruvetu se prenese 40 μ L uzorka nepoznate koncentracije proteina i 2 mL Bredford-ovog reagensa i ova smeša se promeša na vortex-u. Nakon 5 min meri se apsorbanca na 595 nm.

Na osnovu određene standardne prave, izračunava se koncentracija proteina u uzorku. Standardna prava se konstruiše pripremanjem rastvora standardnog proteina u opsegu koncentracija 0,1 do 1 mg mL⁻¹ (slika S2a). Potom se po 40 μ L svakog od pripremljenih rastvora prenese u drugi set epruveta. Reakcija započinje dodavanjem 2 mL Bredford-ovog reagensa. Smeša se promeša na vorteksu i nakon 5 min meri se apsorbanca na 595 nm.

II.2.11 Stepen vlažnosti nosača

Stepen vlažnosti nosača određen je da bi se aktivnosti imobilisanih enzima mogle izraziti po masi suvog nosača, jer se vlažan nosač suspenduje u rastvoru enzima za imobilizaciju. Stepenn vlažnosti, *f*, je odnos mase vlažnog nosača i mase nosača osušenog do konstantne vrednosti mase.

$$f = \frac{m_v}{m_s} \quad (179)$$

gde je *m_v* – masa vlažnog nosača, a *m_s* – masa nosača osušenog do konstantne vrednosti mase.

II.2.12 Optimizacija imobilizacije alkalaze na kalcijum-alginatne čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom

Za aktivaciju 0,5 g vlažnih kalcijum-alginatnih čestica, dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom, u erlenmajeru od 100 mL korišćena je različita masa EDAC-a (10–60 mg) i 10 mL Tris-HCl pufera različite koncentracije (10–200 mM) i pH vrednost (7-9) na 25 °C tokom 15-12 h uz lagano mešanje (150 rpm). Nakon reakcije aktivacije EDAC-om, dalja reagovanje EDAC-a sa karboksilnim grupama je zaustavljeno dodavanjem 2-merkaptetanola (10 puta više u odnosu na EDAC) tokom 10 minuta. Čestice su isfiltrirane i višak 2-merkaptetanola je uklonjen ispiranjem Tris-HCl puferom (50 mM, pH vrednosti 8,5), što je sprečilo dalje reagovanje EDAC-a sa karboksilnim grupama na enzimu tokom procesa imobilizacije.⁶⁰ Za imobilizaciju 0,5 g aktiviranih vlažnih čestica, dodavali smo određenu količinu alkalaze (0,33-5,32 IU) i Tris-HCl pufera do 10 mL. Nakon dodavanja enzima i pufera varirano je vreme imobilizacije 1–48 h na 25 °C uz lagano mešanje (150 rpm). Na kraju ovog perioda, proizvod je ispran sa Tris-HCl puferom i zatim je ispran destilovanom vodom nakon čega je čuvan na 4 °C u Tris-HCl puferu (50 mM, pH vrednosti 8,5) pre upotrebe. Uzorci rastvora enzima pre i posle imobilizacije, zajedno sa rastvorima za ispiranje, uzeti su za određivanje sadržaja proteina i aktivnosti enzima.

Koncentracija alkalaze je određena prema Bredfordovoj metodi korišćenjem goveđeg seruma albumina (BSA) kao standarda.⁹⁶⁷

Količina vezanog enzima određena je indirektno iz razlike između količine enzima unešenog u reakcionu smešu za vezivanje i količine enzima u filtratu i u rastvorima za ispi-
ranje.

Efikasnost imobilizacije je procenjena u odnosu na prinos vezivanja enzima. Prinos vezanog enzima je izračunat na sledeći način:

$$\eta_{enz} = \frac{P_g}{P_0} \times 100 \quad (180)$$

gde je P_g imobilisana količina proteina i P_0 početna količina proteina u rastvoru za imobilizaciju određena *Bradford*-ovom metodom. Aktivnost je određena korišćenjem azokazeina kao standardnog supstrata.

Nakon dobijanja optimalnih uslova imobilizacije, alkalaza je pod optimalnim uslovima kovalentno imobilisana na MAB čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom radi poređenja. Takođe radi poređenja alkalaza je inkapsulirana u MAB čestice elektrostatičkom ekstruzijom. U 50 mL 2% rastvora natrijum-alginata (*w/v*) rastvorenog u Tris-HCl puferu (50 mM, pH vrednosti 8,5), dodata je masa od 25 mg EDAC-a i smeša je mešana na magnetnoj mešalici (150 rpm) 30 minuta na 25 °C, nakon čega je dodato 0,25 g magnetnih čestica i smeša je promešana tako da su magnetne čestice bile ravnomerno raspoređene kroz rastvor. Zatim je dodato 5 mL alkalaze i uočeno je formiranje agregata, odnosno želiranje rastvora, što pokazuje da u rastvoru enzima postoje viševalentni joni zbog kojih dolazi do jonske izmene. Proces je reverzibilan pa se dodatkom 300 µL 2 M NaOH i mešanjem (150 rpm) 5-10 min na 25 °C dobija ponovo rastvor. Sferične kapljice su formirane elektrostatičkim ekstruzijom suspenzije polimera kroz tupu iglu od nerđajućeg čelika (22 G) pomoću automatske pumpe (*Razel, Scientific Instruments, Stamford, CT, USA*) i šprica od 20 mL, protokom 27,3 mL h⁻¹ po proceduri i pod istim uslovima koji su opisani u odeljku II.2.1. Čestice alkalaze inkapsulirane u MAB su isprane destilovanom vodom nakon čega su čuvane na 4 °C u Tris-HCl puferu (50 mM, pH vrednosti 8,5) do dalje upotrebe.

II.2.13 Određivanje aktivnosti imobilisane i slobodne alkalaze

Aktivnost alkalaze je merena korišćenjem azokazeina kao supstrata.⁹⁶⁸ Smeša za ispitivanje koja sadrži 75 µL rastvora enzima ili različite mase imobilisane alkalaze (0,01–0,2 g) i 125 µL 2% rastvor azokazeina (*w/v*), rastvorenog u 50 mM Tris-HCl (pH vrednosti 9,0), je inkubirana 30 minuta na 37 °C. Reakcija je prekinuta dodavanjem 600 µL 10% rastvora trihlorsirćetne kiseline (*w/v*). Da bi se uklonio dobijeni precipitat, epruvete za analizu su ohlađene u ledenom kupatilu 10 min, pre centrifugiranja tokom 10 minuta na 8000 rpm. Nakon toga, 600 µL supernatanta je dodato u 700 µL 1 M NaOH i merena je apsorpcija na 440 nm u odnosu na slepu probu pripremljenu posebno za svaki uzorak dodavanjem stop rastvora trihlorsirćetne kiseline pre mešanja rastvora enzima sa supstratom.

Aktivnost se izračunava na osnovu molarnog koeficijenta apsorpcije ϵ , koji je 38 L M⁻¹cm⁻¹ za azokazein na datoj talasnoj dužini prema formuli:⁹⁶⁹

$$A[U\text{mL}^{-1}] = \frac{tg_{\alpha}R}{\epsilon} \quad (181)$$

gde je R (razblaženje) odnos zapremine ukupne reakcione smeše i zapremine uzorka enzima. Jedinica aktivnosti alkalaze je definisana kao količina enzima koja je potrebna da se proizvede povećanje apsorpcije od 1,0 na 440 nm u kiveti od 1 cm, pod gore navedenim uslovima analize.

Specifične aktivnosti imobilisanog enzima se izražavaju kao jedinica po mg proteina imobilisanog na nosaču.

II.2.13.1 Ispitivanje uticaja početne koncentracije alkalaze na imobilizaciju na alginatnim i MAB mikro-česticama dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom

Da bi ispitali kako početna koncentracija alkalaze pri imobilizaciji na alginatne mikro-čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom (metoda u poglavlju II.2.12) utiče na aktivnost i sadržaj proteina imobilisanog biokatalizatora (metode u poglavljima II.2.10 i II.2.13) varirali smo je u opsegu od 2 do 33,6 mg_{alkalaze} g_{nosača}⁻¹. Reakcioni parametri pri aktivaciji su 0,5 g alginatnih čestica, 10 mL 0,1 M Tris-HCl pufera pH vrednosti 8 i 10 mg EDAC-a tokom 15 min na 25 °C, dok su pri imobilizaciji uslovi bili: 0,5 g aktiviranih čestica je mešano 20 h na 25 °C sa različitom koncentracijom alkalaze i istim Tris-HCl puferom do 10 mL.

II.2.13.2 Ispitivanje uticaja pH vrednosti Tris-HCl pufera na kovalentnu imobilizaciju alkalaze na alginatne mikro-čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom

Ispitivanje uticaja pH vrednosti Tris-HCl pufera na imobilizaciju alkalaze na alginatne čestice je odrađeno variranjem pH vrednosti pufera u opsegu od 7 do 9. U dobijenom supernatantu i filtratu nakon imobilizacije po metodi opisanoj u poglavlju II.2.12 određivani su aktivnost i sadržaj proteina (metode u poglavljima II.2.10 i II.2.13). Reakcioni parametri pri aktivaciji su 0,5 g alginatnih čestica, 10 mL 0,1 M Tris-HCl pufera različite pH vrednosti i 10 mg EDAC-a i vreme aktivacije 15 min na 25 °C, dok su pri imobilizaciji uslovi bili: 0,5 g aktiviranih čestica mešano je 20 h na 25 °C sa 3,99 IU alkalaze i istim Tris-HCl puferom do 10 mL.

II.2.13.3 Ispitivanje uticaja molariteta Tris-HCl pufera na kovalentnu imobilizaciju alkalaze na alginatne mikro-čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom

Variranjem molariteta Tris-HCl pufera između 10 i 200 mM pri imobilizaciji (metoda u poglavlju II.2.12) uticali smo na aktivnost i sadržaj proteina biokatalizatora (metode u poglavljima II.2.10 i II.2.13). Reakcioni parametri pri aktivaciji su 0,5 g alginatnih čestica, 10 mL Tris-HCl pufera pH vrednosti 8,5, 10 mg EDAC-a pri vremenu aktivacije 15 min na 25 °C, dok su pri imobilizaciji uslovi bili: 0,5 g aktiviranih čestica mešano je 20 h na 25 °C sa 3,99 IU alkalaze i istim Tris-HCl puferom do 10 mL.

II.2.13.4 Ispitivanje uticaja vremena aktivacije nosača EDAC-om na kovalentnu imobilizaciju alkalaze na alginatne mikro-čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom

Ispitali smo uticaj vremena aktivacije pri imobilizaciji alkalaze na alginatne čestice (metoda u poglavlju II.2.12) na aktivnost i sadržaj proteina biokatalizatora (metode u poglavljima II.2.10 i II.2.13) varirajući vreme aktivacije od 15 do 720 min. Reakcioni parametri pri aktivaciji su 0,5 g alginatnih čestica, 10 mL 50 mM Tris-HCl pufera pH vrednosti 8,5, 10 mg EDAC-a pri različitom vremenu aktivacije na 25 °C, dok su pri imobilizaciji uslovi bili: 0,5 g aktiviranih čestica mešano je 20 h na 25 °C sa 3,99 IU alkalaze i istim Tris-HCl puferom do 10 mL.

II.2.13.5 Ispitivanje uticaja mase EDAC-a pri aktivaciji nosača na kovalentnu imobilizaciju alkalaze na alginatne mikro-čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom

Uticaja mase EDAC-a pri aktivaciji nosača na kovalentnu imobilizaciju alkalaze na alginatne mikro-čestice (metoda u poglavlju II.2.12) na aktivnost i sadržaj proteina biokatalizatora (metode u poglavljima II.2.10 i II.2.13) ispitan je njenim variranjem od 10 do 60 mg. Reakcioni parametri pri aktivaciji su 0,5 g alginatnih čestica, 10 mL 50 mM Tris-HCl pufera pH vrednosti 8,5, sa različitom masom EDAC-a pri vremenu aktivacije od 30 min na 25 °C, dok su pri imobilizaciji uslovi bili: 0,5 g aktiviranih čestica mešano je 20 h na 25 °C sa 3,99 IU alkalaze i istim Tris-HCl puferom do 10 mL.

II.2.13.6 Ispitivanje uticaja vremena imobilizacije na kovalentnu imobilizaciju alkalaze na alginatne mikro-čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom

Uticaj vremena imobilizacije na aktivnost i sadržaj proteina biokatalizatora (metode u poglavljima II.2.10 i II.2.13) pri imobilizaciji alkalaze na alginatne mikro-čestice (metoda u poglavlju II.2.12) ispitan je njegovim variranjem od 1 do 48 h. Reakcioni parametri pri aktivaciji su 0,5 g alginatnih čestica, 10 mL 50 mM Tris-HCl pufera pH vrednosti 8,5, 10 mg EDAC-a pri vremenu aktivacije od 30 min na 25 °C, dok su pri imobilizaciji uslovi bili: 0,5 g aktiviranih čestica je mešano u periodu od 1 do 48 h na 25 °C sa 3,99 IU alkalaze i istim Tris-HCl puferom do 10 mL.

II.2.13.7 Ispitivanje uticaja koncentracije alginata i procesa sušenja na kovalentnu imobilizaciju alkalaze na alginatne nano-čestice dobijene ultrazvučnim raspršivanjem

Uticaja koncentracije alginata i procesa sušenja na aktivnost i sadržaj proteina biokatalizatora (metode u poglavljima II.2.10 i II.2.13) pri kovalentnoj imobilizaciji alkalaze na kalcijum-alginatne nano-čestice dobijene ultrazvučnim raspršivanjem ispitan je variranjem koncentracije alginata (0,4 i 0,5%) u procesu proizvodnje nano-čestica (slika 62) sa uvođenjem grejača u proces, kao i bez zagrevanja. Reakcioni parametri pri aktivaciji su 0,5 g alginatnih čestica, 10 mL 50 mM Tris-HCl pufera pH vrednosti 8,5, 10 mg EDAC-a pri vremenu

aktivacije od 30 min na 25 °C, dok su pri imobilizaciji uslovi bili sledeći: 0,5 g aktiviranih čestica mešano je 20 h na 25 °C sa 3,99 IU alkalaze i istim Tris-HCl puferom do 10 mL.

II.2.14 Enzimska hidroliza proteina iz belanceta i izolata soje imobilisanom i slobodnom alkalazom

Aktivnost imobilisane alkalaze u industrijski važnim reakcijama ispitana je praćenjem hidrolize 1% (*w/w*) vodenog rastvora izolata sojinog proteina (min. sadržaj proteina 90%) i 10% (*w/w*) vodenog rastvora prethodno termički tretiranog belanceta (11,4 mg mL⁻¹, sadržaj proteina određen prema standardnoj *Kjeldahl* metodi).⁹⁷⁰ Hidroliza je izvedena u šaržnom reaktoru od 600 mL sa mehaničkim mešanjem (*Staufen*, Nemačka) sa kontrolom temperature i pH vrednosti. Pre enzimske hidrolize, rastvor proteina belanca je podvrgnut prethodnoj termičkoj obradi na 75 °C tokom 30 minuta, a zatim je rastvor držan na sobnoj temperaturi da se ohladi. Posle stabilizacije pH vrednosti (pH vrednost je podešavana 4 M rastvorom kalcijum-hidroksida (*w/v*)) i temperature (oko 20 minuta) pri optimalnim uslovima za alkalazu (50 °C i pH vrednosti 8,0), reakcija hidrolize je započeta dodavanjem imobilisanog ili slobodnog enzima u rastvor proteina iz belanceta i rastvor izolata sojinog proteina, uz mešanje na 200 rpm.⁹⁷¹ Početne koncentracije korišćenih imobilisanih enzima (alkalaza kovalentno imobilisana na alginatne čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom i ultrazvučnim raspršivanjem, kovalentno vezana i inkapsulirana alkalaza na i u MAB čestice) bile su ekvivalentne početnoj koncentraciji korišćenog slobodnog enzima i to 9,98 IU i 0,53 IU za belance i soju, respektivno. Temperatura se tokom enzimske hidrolize održava konstantnom. Po završetku hidrolize (što se primećuje konstantnošću pH vrednosti 8) i/ili tokom iste (uzorkovanje na svakih 15 minuta) vrši se inaktivacija imobilisanog enzima u svim hidrolizatima zagrevanjem 15 minuta na 90 °C (u ključalom vodenom kupatilo).

Hidrolitička aktivnost alkalaze imobilisane na alginatnim česticama dobijenim ultrazvučnim raspršivanjem (UAD) sa izolatom sojinog proteina je ispitivana tokom 8 ciklusa pod istim uslovima, a vreme trajanja reakcije za svaku šaržu je bilo 225 min. Posle svakog reakcionog ciklusa, biokatalizator je uklonjen filtracijom, ispiran i čuvan između svakog eksperimenta u 50 mM Tris-HCl puferskom rastvoru (pH vrednosti 8,5) koji sadrži 0,2 M rastvor CaCl₂ na 4 °C.

II.2.14.1 Određivanje stepena hidrolize proteina

Reakcija se odvija u blago alkalnim uslovima i sa snižavanjem pH vrednosti se prekida. Stepenn hidrolize (DH) se izračunava prema jednačini:

$$DH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \quad (182)$$

gde su: *h* - broj ekvivalentnih peptidnih veza hidrolizovanih u trenutku *t*, *h_{tot}* - ukupan broj peptidnih veza u proteinskom supstratu u mmol g⁻¹ proteina (meqg_{proteina}⁻¹). Korekcionni faktori za ukupan broj proteina su za soju *m_{proteina}* = *h_{tot}* • 5,71 i belance *m_{proteina}* = *h_{tot}* • 6,25.⁹⁷²

Tokom reakcije jednostepene enzimске hidrolize, na svakih 15 minuta uzimani su uzorci (250 μ L) iz reakcionog suda. U svakom uzorku se odmah inaktivira imobilisani enzim dodatkom 2 mL 1% rastvora SDS-a (*w/v*), pri čemu se inaktivacija izvodi u vodenom kupatilu sa mešanjem 15 minuta na 75 °C. Zatim, u čiste epruvete prenese se 250 μ L od svakog uzorka i doda se po 2 mL 0,2 M fosfatnog pufera pH vrednosti 8,2 i 2 mL 0,1% rastvora TNBS (*w/v*) (neophodno je rastvor TNBS zaštititi od uticaja svetlosti, tako što se sud u kome se nalazi obavije folijom, a rastvor se pripremi neposredno pre upotrebe. Reakciona smeša se promeša na vorteksu i inkubira u vodenom kupatilu sa mešanjem 60 minuta na 50 °C. Slepа probа se priprema na isti način kao i uzorak, ali se umesto uzorka dodaje destilovana voda. Po isteku inkubacionog vremena, reakcija se zaustavlja dodavanjem 4 mL 0,1 M rastvora HCl (*w/v*), a apsorbanca nastalog proizvoda očitavana je spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 340 nm na UV-Vis spektrofotometru UV Shimadzu 1700 (Shimadzu Corporation, Kjoto, Japan).

Za konstruisanje standardne prave korišćena je prečišćena aminokiselina leucin. Od početnog rastvora leucina neophodno je pripremiti šest do deset različitih razblaženja. Svaki uzorak razblaženja leucina (250 μ L) koristi se reakciji se TNBS na način koji je prethodno opisan (slika S2b).

II.2.15 Određivanje kinetičkih konstanti u reakcijama enzimске hidrolize proteina iz izolata soje i belanceta slobodnom i imobilisanom alkalazom u šaržnom reaktoru sa mehaničkim mešanjem

Ispitana je početna kinetika u reakcijama enzimске hidrolize proteina iz izolata soje i belanceta katalizovanim slobodnom alkalazom i imobilisanom na alginatne čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom i ultrazvučnim raspršivanjem. Varirana je početna koncentracija supstrata, 0,19-0,68 μ M $\text{mg}_{\text{proteina}}^{-1}$ za rastvor proteina belanceta i 0,21-0,55 μ M $\text{mg}_{\text{proteina}}^{-1}$ za rastvor proteina izolata soje pri optimalnoj početnoj koncentraciji za slobodnu i imobilisanu alkalazu na EE i UAD čestice od 0,53 IU i 9,98 IU za reakciju hidrolize iz izolata soje i belanceta, respektivno.

Eksperimentalno dobijeni podaci su fitovani odgovarajućim matematičkim modelima korišćenjem aplikacije *Enzyme Kinetics 1.10* u *OriginLab*-ovom *OriginPro 2022* softveru i odabrane su vrednosti kinetičkih konstanti za modele sa najmanjim odstupanjima, odnosno najvećim koeficijentom poklapanja R^2 koji su konvergirali.

II.2.16 Optimizacija imobilizacije HRP-C na MAB

Za imobilizaciju HRP-C na MAB čestice koristili smo optimalne uslove do kojih smo došli pri optimizaciji imobilizacije alkalaze na alginatne čestice.⁸ Da bi aktivirali MAB, čestice su tretirane sa 10 mg EDAC-a u 10 mL Tris-HCl puferu (50 mM, pH vrednosti 8,5) tokom 30 minuta na 25 °C, pri laganom mešanju (150 rpm). Nakon reakcije aktivacije EDAC-om, dalja reagovanje EDAC-a sa karboksilnim grupama je zaustavljeno dodavanjem 2-merkaptoetanola (10 puta više u odnosu na EDAC) tokom 10 minuta. Čestice su isfiltrirane i višak 2-merkaptoetanola je uklonjen ispiranjem Tris-HCl puferom (50 mM, pH vrednosti 8,5), što je sprečilo dalje reagovanje EDAC-a sa karboksilnim grupama na enzimu tokom

procesa imobilizacije.⁶⁰ Nakon toga u sud sa 0,5 g aktiviranih MAB dodato je 2 mL rastvora HRP-C različite koncentracije (12,5–2500 mg L⁻¹) sa 18 ml Tris-HCl pufera (50 mM, pH vrednosti 8,5). Imobilizacija je trajala 20 h na 25 °C, pri laganom mešanju (150 rpm). Nakon imobilizacije proizvod je ispran sa Tris-HCl puferom i zatim je ispran destilovanom vodom nakon čega je čuvan na 4 °C u Tris-HCl puferu (50 mM, pH vrednosti 8,5) pre upotrebe. Uzorci rastvora enzima pre i posle imobilizacije, zajedno sa rastvorima za ispiranje, uzeti su za određivanje sadržaja proteina i aktivnosti enzima. Koncentracija za HRP-C je određena prema *Bradford*-ovoj metodi korišćenjem goveđeg seruma albumina (BSA) kao standarda (poglavlje II.2.10). Efikasnost imobilizacije i količina vezanog enzima određeni su kao pri imobilizaciji alkalaze (poglavlje II.2.12).

Radi poređenja nakon dobijanja optimalnih uslova imobilizacije, HRP-C je pod optimalnim uslovima kovalentno imobilisana na alginatne čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom bez magnetita.

Takođe radi poređenja HRP-C je inkapsulirana u alginatne čestice sa magnetitom elektrostatičkom ekstruzijom na sledeći način: u 100 mL 2% rastvora natrijum-alginata (*w/v*) rastvorenog u Tris-HCl puferu (50 mM, pH vrednosti 8,5), dodata je masa od 50 mg EDAC-a i mešana na magnetnoj mešalici (150 rpm) 30 minuta na 25 °C. Zatim je dodato 6,25 mg HRP-C i mešano (150 rpm) na 25 °C tokom 20 h. Nakon tog perioda, dodali smo 0,5 g magnetita u rastvor i mešanjem staklenim štapićem se magnetit ravnomerno rasporedio kroz rastvor (početni odnos enzim/nosač bio je 2,5 mg g⁻¹). Sferične kapljice su formirane elektrostatičkom ekstruzijom suspenzije polimera kroz tupu iglu od nerđajućeg čelika (22 G) pomoću automatske pumpe (*Razel, Scientific Instruments, Stamford, CT, USA*) i šprica od 20 mL, pri protoku 27,3 mL h⁻¹ po proceduri i pod istim uslovima koji su opisani u odeljku II.2.1. MAB su isprane destilovanom vodom nakon čega su čuvane na 4 °C u Tris-HCl puferu (50 mM, pH vrednosti 8,5) do dalje upotrebe.

II.2.16.1 Određivanje aktivnosti slobodne HRP-C

Korišćenjem pirogalola kao standardnog supstrata, aktivnost peroksidaze se određuje spektrofotometrijski na 420 nm. Za određivanje aktivnosti peroksidaze pripremi se 13 mM rastvor pirogalola u puferu (fosfatni, 0,1 M, pH vrednosti 7), rastvor enzima željene koncentracije i rastvor vodonik-peroksida (0,97 mM). Postupak merenja aktivnosti je sledeći: u prvu kivetu se odmeri se odmeri 1 mL pirogalola pripremljenog u puferu (fosfatni, pH vrednosti 7, 0,1 M) i 10 µL vodonik-peroksid, u drugu kivetu se odmeri 1 mL pirogalola pripremljenog u puferu (fosfatni, pH vrednosti 7, 0,1 M), 10 µL vodonik-peroksida i 10 µL rastvora enzima, u treću kivetu se odmeri 1 mL pufera (slepa proba). U trenutku kada se doda vodonik-peroksid, uključuje se štoperica i beleži promena apsorbance svakih 30 s narednih 3 min. Aktivnost peroksidaze se izražava u jedinicama, U. 1 U se definiše kao količina peroksidaze koja katalizuje konverziju pirogalola do 1 mg purpurogalina za 20 s na 20 °C i vrednosti pH 7. Ova purpurogalin jedinica je ekvivalentna ~18 µM jedinica po minuti na 25 °C.

Aktivnost HRP-C izražena u U mL⁻¹ se određuje na osnovu sledećeg izraza:⁹⁷³

$$\text{Aktivnost HRP (U mL}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta A \times V_t \times d_f}{\Delta t \times \epsilon \times 3 \times 0.01} \quad (183)$$

gde je: $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ (min^{-1}) – početna brzina reakcije, V_t – ukupna zapremina reakcione smeše, d_f – faktor razblaženja, ϵ – molarni apsorpcioni koeficijent koji iznosi $12 \text{ (mM}^{-1} \text{ L)}$, **0,01** (mL) – zapremina uzorka za određivanje aktivnosti, **3** – koeficijent proporcionalnosti

II.2.16.2 Određivanje aktivnosti imobilisane HRP-C

Korišćenjem standardnog supstrata pirogalola i vodonik-peroksida izračunata je aktivnost imobilisane HRP-C.⁹⁷³ Aktivnost imobilisane HRP-C se određuje spektrofotometrijski na 420 nm. Za određivanje aktivnosti HRP-C pripremi se 13 mM rastvor pirogalola u fosfatnom puferu (pH vrednosti 7, 0,1 M), rastvor vodonik-peroksida (3% v/v; 0,97 mM) i imobilisan enzim željene koncentracije (0,05–10 mg_{HRP} mg_{nosača}⁻¹). Reakciona smeša za određivanje aktivnosti imobilisane HRP-C je zapremine 3,03 mL. Postupak određivanja aktivnosti je sledeći: u kivetu se odmeri 3 mL pirogalola u fosfatnom puferu, doda se 2 mg imobilisane HRP-C i 30 μL vodonik-peroksida. Nakon dodatka H_2O_2 počinje reakcija. Promena boje od žute (pirogolol) u tamno braon (purpurogalin) je praćena spektrofotometrijski na 420 nm korišćenjem UV-Vis spektrofotometra *UV Shimadzu 1700* (*Shimadzu Corporation*, Kjoto, Japan). Paralelno se pripremi i jedna kiveta pirogalola u puferu (slepa proba) i kiveta sa 3 mL pirogalola u puferu i odmerena imobilisana peroksidaza (kontrola) u kojima se takođe prati promena apsorbance. Promena apsorbance u odnosu na slepu probu (pirogolol u puferu) se meri svakih 30 s tokom 3 minuta. Nakon svakog merenja apsorbance kivete se energično promešaju.

Ukupna aktivnost enzima izražena u U se određuje na osnovu sledećeg izraza:⁹⁷⁴

$$A_{IE} = \frac{\Delta A \times V_t}{\Delta t \times \epsilon} \quad (184)$$

gde je: $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ – promena apsorbance po minuti, ϵ – molarni apsorpcioni koeficijent koji iznosi $12 \text{ mmol}^{-1} \text{ L}$, V_t – ukupna zapremina reakcione smeše = 3,03 mL. Specifična aktivnost imobilisanog enzima (Ug^{-1}) izražena je po gramu nosača. 1 U se definiše kao količina peroksidaze koja katalizuje konverziju pirogalola do 1 mg purpurogalina za 20 s na 20°C i vrednosti pH 7,0. Ova purpurogalin jedinica je ekvivalentna $\sim 18 \mu\text{M}$ jedinica po minuti na 25°C .⁹⁷³

Aktivnost HRP-MAB čestica pod optimalnim uslovima je zatim upoređena sa aktivnošću kovalentno imobilisane HRP-C pod istim uslovima na alginatne čestice u odsustvu magnetita, inkapsulirane HRP-C u MAB čestice sa istim početnim odnosom enzim/nosač i slobodne HRP-C sa istom početnom koncentracijom.

II.2.16.3 Ispitivanje uticaja pH vrednosti rastvora pirogalola na aktivnost slobodne HRP-C i HRP-MAB

Uticaj pH vrednosti rastvora pirogalola na aktivnost slobodne HRP-C i HRP-MAB ispitan je rastvaranjem pirogalola po metodama opisanim u poglavljima II.2.16.1 i II.2.16.2 u puferima različite pH vrednosti (200 mM acetatni pufer za rastvore pH vrednosti 3-6 i 100 mM Tris-HCl puferu za pH vrednosti 7-9).

II.2.16.4 Ispitivanje uticaja temperature reakcije sa rastvorom pirogalola na aktivnost slobodne HRP-C i HRP-MAB

Ispitivanje uticaja temperature reakcije sa rastvorom pirogalola (u 100 mM fosfatnom puferu pH vrednosti 7) na aktivnost slobodne HRP-C i HRP-MAB vršeno je na temperaturama reakcije 25–55 °C, po metodama opisanim u poglavljima II.2.16.1 i II.2.16.2.

II.2.16.5 Ispitivanje termalne stabilnosti reakcije sa rastvorom pirogalola preko aktivnosti slobodne HRP-C i HRP-MAB

Pre početka reakcije, slobodna HRP-C i HRP-MAB su inkubirane u kalijum-fosfatnom puferu (100 mM, pH vrednosti 7) na 60 i 70 °C, 30–120 min pre dodatka vodonik-peroksida i rastvora pirogalola. Nakon hlađenja, aktivnost je merena po metodama opisanim u poglavljima II.2.16.1 i II.2.16.2. Najveća vrednost aktivnosti za slobodnu HRP-C i HRP-MAB za svaki set eksperimenata je uzeta kao referentna aktivnost od 100%.

II.2.17 Optimizacija procesa uklanjanja boja AB225 i AV109

Da bi se optimizovali parametri procesa uklanjanja boja iz otpadnih voda tekstilne industrije sa HRP-C ispitivani su uticaj koncentracije enzima, koncentracije boje, koncentracije vodonik-peroksida, mase HRP-MAB, odnosa magetit/alginat, prečnik HRP-MAB čestica, reakcione temperature i pH vrednost rastvora za obe boje. Boja (AB225 i AV109) je pripremana u acetatnom puferu (200 mM, pH vrednosti 3–6) i Tris-HCl puferu (100 mM, pH vrednosti 7–9) u koncentracijama 10–100 mg L⁻¹. Pre reakcije inicijacije smeša je mešana magnetnom mešalicom brzinom od 100 rpm i dovedena u termalnu ravnotežu pri sobnoj temperaturi. 3 ml rastvora boje je prenešeno u kivetu i 50–500 mg HRP-MAB čestica je dodato u rastvor. Reakcija je inicirana dodavanjem 0,097–0,97 mM rastvora vodonik-peroksida. Temperatura reakcije je varirana u opsegu 25–55 °C. Na UV-Vis spektrofotometru (*UV Shimadzu 1700, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan*) je svakih 5 minuta merena apsorbanca pri maksimalnim talasnim dužinama testiranih boja ($\lambda_{\max}$ =590 nm za AV109, i $\lambda_{\max}$ =628 nm za AB225, tabela 7.).⁹⁷⁵Preeliminarni eksperimenti su pokazali da HRP-MAB čestice same uklanjaju 5–11% od obe boje, bez dodavanja vodonik-peroksida. Takođe, rastvori za obe boje su bili stabilni kada su izloženi samo vodonik-peroksidu, bez dodavanja čestica, iz čega se zaključuje da je proces obezbojavanja zavistan kako od vodonik-peroksida tako i od enzima.

Procentat uklanjanja boja se definiše kao:⁹⁷⁶

$$\% \text{ uklanjanja boje} = \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \times 100 \quad (185)$$

gde je A_0 početna apsorbanca u rastvoru boje pre reakcije (kontrola) i A_t apsorbanca rastvora boje u trenutku t tokom reakcije.

Procentat uklanjanja obe boje sa HRP-MAB pod optimalnim uslovima je zatim upoređen sa procentom uklanjanja boja kovalentno imobilisanom HRP-C pod istim uslovima na alginatne čestice u odsustvu magnetita, inkapsuliranom HRP-C u MAB

česticama sa istim početnim odnosom enzim/nosač i slobodnom HRP-C pri istoj početnoj koncentraciji.

U tabeli 15 predstavljeni su reakcioni uslovi pri kojima su varirani parametri.

II.2.18 Određivanje kinetičkih konstanti slobodne i imobilisane HRP-C u reakcijama uklanjanja boja AB225 i AV109

U okviru ove eksperimentalne serije ispitana je početna kinetika razgradnje boja AB225 i AV109 slobodnom komercijalnom HRP-C i imobilisanom na MAB čestice. Početna kinetika je ispitana variranjem koncentracije jednog supstrata, dok je konstantnom održavana koncentracija drugog supstrata pri optimalnim uslovima reakcije (~1 mM HRP-MAB čestice, magnetit/alginat odnos 1:4, početna koncentracija enzima 10 mg_{HRP} g_{nosac}⁻¹ (16,9 U ili 32,8 U g_{nosaca}⁻¹), pH vrednosti 4 i 5 za AV109 i AB225, respektivno i temperatura 25 °C). Početna koncentracija boje je varirana u opsegu 0,0073-0,073 mM za AB225 i 0,0061-0,061 za AV109, dok je početna koncentracija vodonik-peroksida varirana u opsegu 0,044-0,88 mM za reakciju katalizovanu optimalnom početnom koncentracijom komercijalne i imobilisane HRP-C.

Eksperimentalno dobijeni podaci su fitovani odgovarajućim matematičkim modelima korišćenjem aplikacije *Enzyme Kinetics 1.10* u *OriginLab*-ovom *OriginPro 2022* softveru i odabrane su vrednosti kinetičkih konstanti za modele koji najmanje odstupaju, odnosno sa najvećim koeficijentom poklapanja R^2 koji su konvergirali.

Tabela 15. Reakcioni uslovi za optimizaciju procesa obezbojavanja boja AB225 i AV109

Varirani parametar	Vreme, min	Magnetit/alginat	C _{peroksid} , mM	C _{boja} , g _{HRP} mg _{boje} ⁻¹	Masa čestica, g _{HRP} mg _{boje} ⁻¹	C _{HRP} , g _{HRP} mg _{nosac} ⁻¹	Veličina igle	T, °C	pH
Magnetit/alginat	AB 25 AV 40	1:10 – 1:2	0,097	0,1	0,05	2,5	*22G _{ee}	25	3,6
C _{peroksid} , mM	AB 40 AV 40	1:4	0,097 – 0,97	0,1	0,025	10	22G _{ee}	25	3,6
C _{boja} , g _{HRP} mg _{boje} ⁻¹	AB 70 AV 60	1:4	0,097	0,02 – 0,2	0,05	2,5	22G _{ee}	25	3,6
Masa čestica, g _{HRP} mg _{boje} ⁻¹	AB 50 AV 40	1:4	0,097	0,1	0,025 – 0,25	2,5	22G _{ee}	25	3,6
C _{HRP} , g _{HRP} mg _{nosac} ⁻¹	AB 35 AV 45	1:4	0,097	0,1	0,05	0,05 - 10	22G _{ee}	25	3,6
Veličina igle	AB 40 AV 20	1:4	0,097	0,1	0,05	10	18G – 22G _{ee}	25	3,6
T, °C	AB 15 AV 15	1:4	0,097	0,07	0,05	10	22G _{ee}	25-55	3,6
pH	AB 15 AV 15	1:4	0,097	0,07	0,05	2,5	22G _{ee}	25	3-9

C_{peroksid} – H₂O₂ koncentracija; C_{boja} – koncentracija boje; C_{HRP} – početna HRP koncentracija; *ee – elektrostatička ekstruzija

II.2.18.1 Korišćenje aplikacije *Enzyme Kinetics* u *OriginLab OriginPro 2022* softverskom programu

Enzyme Kinetics aplikacija služi za fitovanje podataka i upoređivanje modela za reakcije enzimske kinetike.

II.2.18.1.1 Instalacija

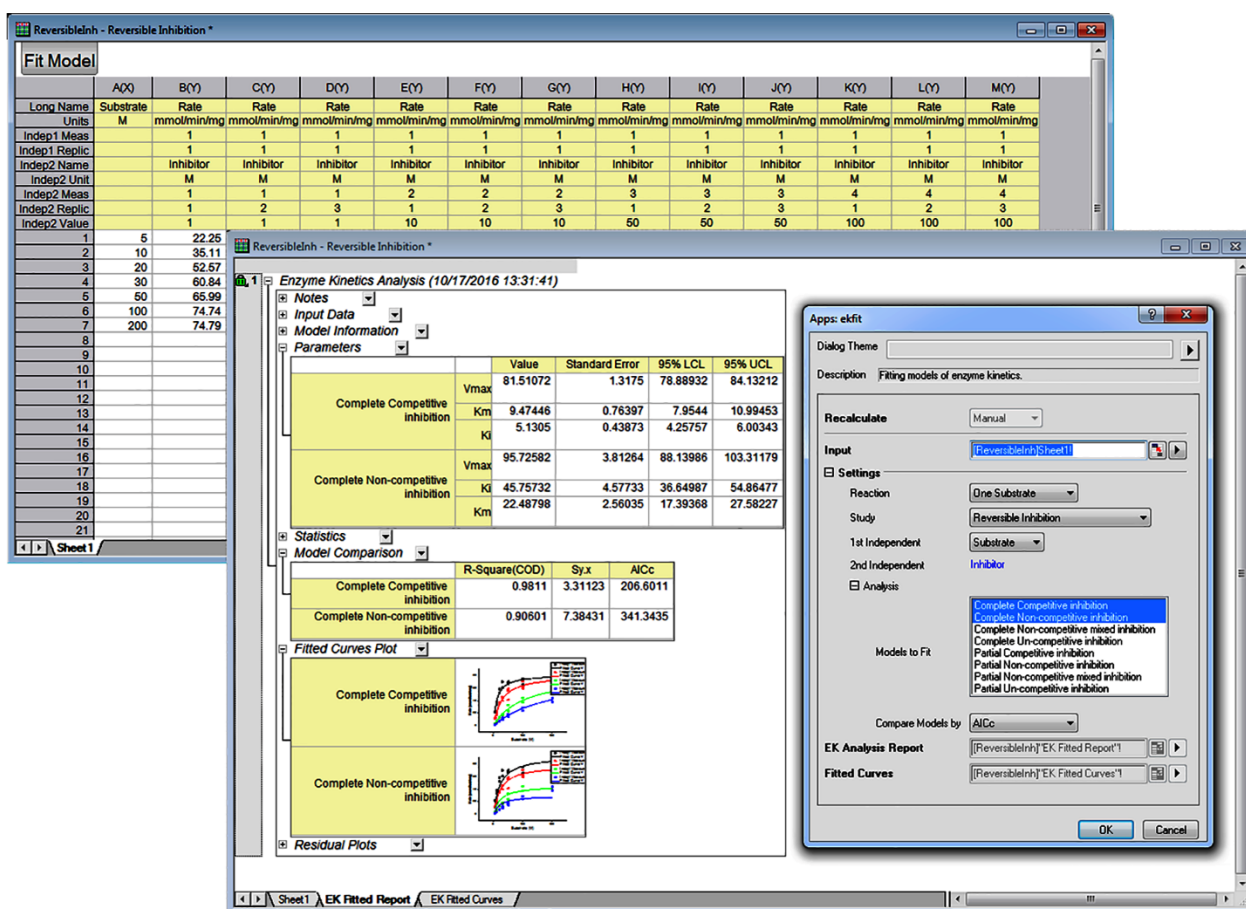
Preuzmite *Enzyme Kinetics.opx* aplikaciju sa sajta [Enzyme Kinetics - File Exchange - OriginLab](#), a zatim prevucite i spustite u *Origin* radni prostor. Ikona *Enzyme Kinetics* će se pojaviti u prozoru *Apps Gallery*.

Napomena: Ovaj alat zahteva *OriginPro 2018 (9.5)* kao najstariju verziju.

II.2.18.1.2 Primer u .OPJ formatu

Ova aplikacija se isporučuje sa primer u .OPJ formatu. U *Apps Gallery* prozoru kliknite desnim tasterom miša na ikonu *Enzyme Kinetics* i izaberite *Show Samples Folder*. Prevucite i pustite *Enzyme Kinetics Sample.opj* u *Origin* da biste otvorili projekat (slika 63).

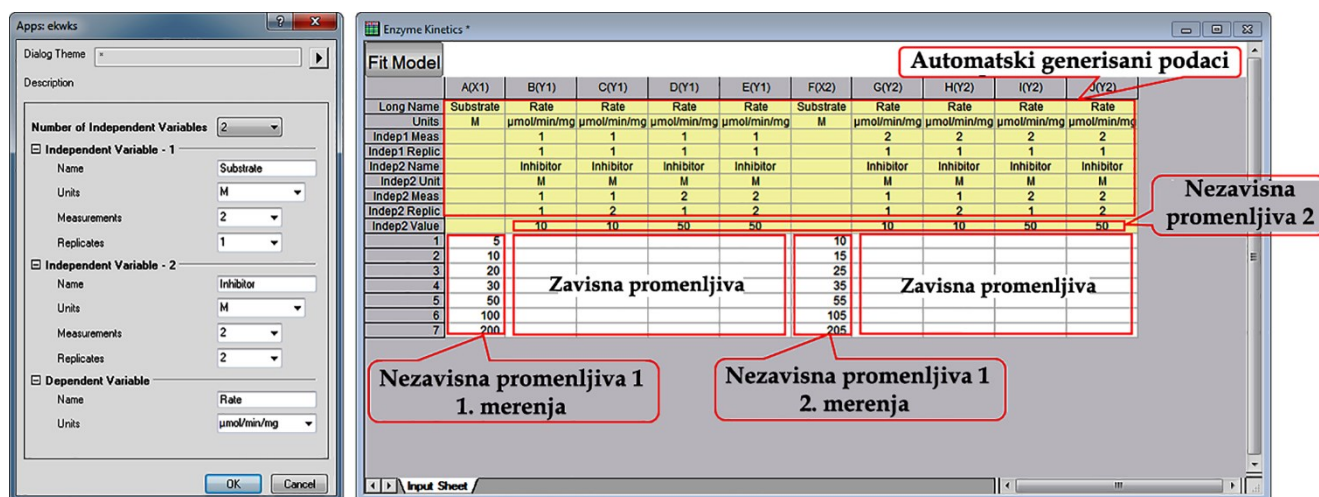
Napomena: Ako želite da sačuvate .OPJ fajl nakon što ga promenite, najbolje je da sačuvate na drugoj lokaciji (npr. sačuvajte u *User Files Folder*-u).



Slika 63. Primer *Enzyme Kinetics Sample.opj*

II.2.18.1.3 Rad sa aplikacijom *Enzyme Kinetics*

- Kliknite na ikonu *Enzyme Kinetics* u *Apps Gallery* prozoru. Biće otvoren dijalog koji vam omogućava da odredite strukturu radnog lista za ulazne podatke (slika 64 levo).
- U dijalogu *Number of Independent Variables* izaberite broj nezavisnih promenljivih prema vašim podacima i funkcijom za fitovanje (slika 64).
- Na *Independent Variable* grani, navedite ime, jedinice, broj merenja i ponavljanja (*Name*, *Units*, *Measurements* i *Replicates*, respektivno) za svaku nezavisnu promenljivu (slika 64).
- Na *Dependent Variable* grani navedite ime i jedinice (*Name* i *Units*) za zavisnu promenljivu. Može postojati više merenja za svaku nezavisnu promenljivu i više ponavljanja za svako merenje (slika 64).
- Jedinice, broj merenja i ponavljanja (*Units*, *Measurements* i *Replicates*) se mogu prilagoditi u *combo box*-u (slika 64).
- Kliknite na dugme OK (slika 64).
- Biće kreiran šablon radnog lista sa navedenim podešavanjima.



Slika 64. Ubacivanje podataka u radni list aplikacije *Enzyme Kinetics*

II.2.18.1.4 Unošenje podataka u radni list

- Popunite prvu X kolonu podacima prve nezavisne promenljive (slika 64).
- Ako je definisano više merenja za prvu nezavisnu promenljivu, potrebno je popuniti više X kolona.
- Ako postoje 2 nezavisne promenljive, navedite vrednost za drugu nezavisnu promenljivu svake grupe Y podataka u zaglavlju kolone *Indep2 Value* (slika 64).
- Popunite svaku Y kolonu podacima za zavisnu promenljivu (slika 64).

II.2.18.1.5 Fitovanje modela

- Kliknite na dugme u gornjem levom uglu *Fit Model* na radnom listu da biste otvorili dijalog za fitovanje (slika 64).

- Izaberite tip reakcije i ispitivanja (slika 63).
- Na grani *Analysis*, izaberite funkcije za fitovanje u listi *Models to Fit*. Izaberite metode u padajućoj listi *Compare Models* da biste uporedili modele, metode uključuju R^2 (COD), $Sy.x$ i $AICc$ (slika 63).
- Ako postoje 2 nezavisne promenljive, izaberite 1. nezavisnu promenljivu (1st Independent Variable) za funkciju za fitovanje sa padajuće liste, uverite se da je 1. nezavisna promenljiva u skladu sa postavkama podataka radnog lista, a 2. nezavisna promenljiva (2nd Independent Variable) će se automatski ažurirati u dijalogu.

II.2.18.1.6 Rezultati

- Kliknite na dugme OK (slika 64).
- Biće kreirani list sa izveštajem i list sa podacima koji uključuju fitovane rezultate i rezultat poređenja modela (slika 63).

Napomene:

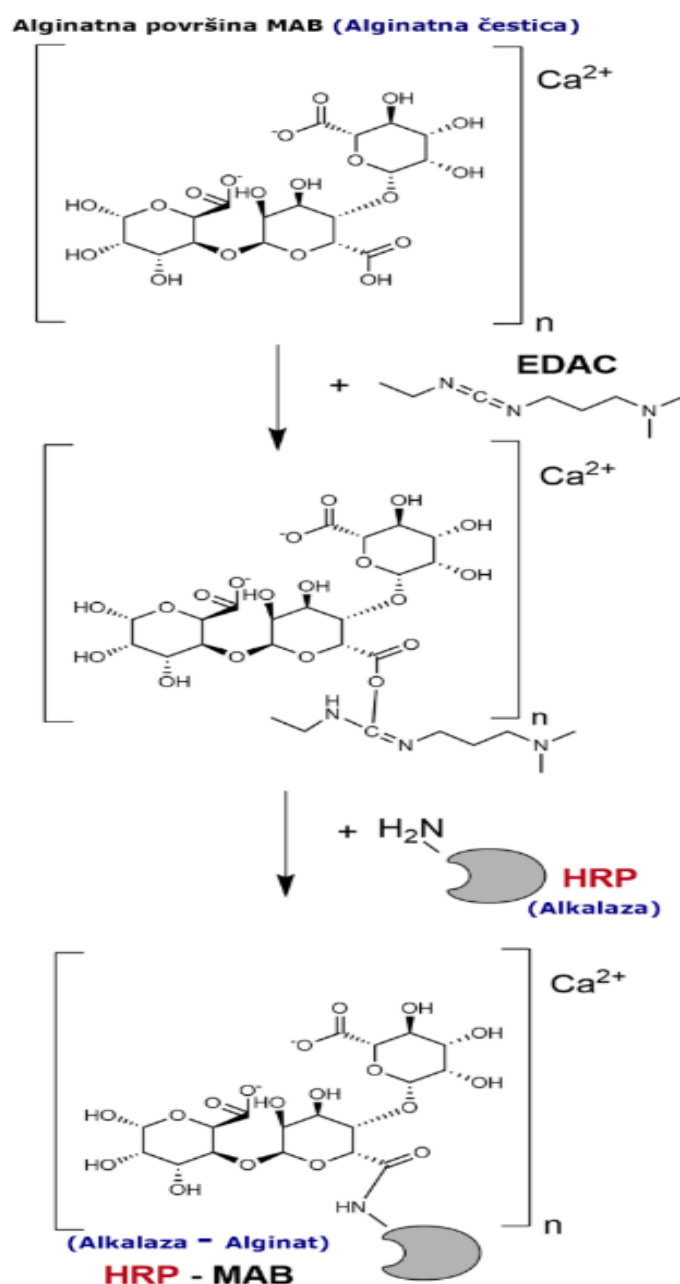
- Ako su podaci za ponavljanja naslagani u koloni, izaberite 1 u *Replicates combo box*-u.
- List izveštaja sadrži tabelu sa informacijama o modelu (*Model Information*), koja prikazuje imena .FDF datoteka funkcija za fitovanje u analizi. Ako želite da izmenite neke funkcije za fitovanje, (npr. možda mislite da podrazumevane početne vrednosti za neke funkcije nisu dovoljno dobre) možete da ih promenite tako što ćete izabrati funkciju iz kategorije *Enzyme Kinetics* u dijalogu *Fitting Function Organizer* ili dijalogu *Fitting Function Builder*. Takođe možete da izaberete funkciju za fitovanje u ugrađenom alatu *Nonlinear Curve Fit* da biste izvršili ručno fitovanje.

Tabela 16. Dostupni modeli za analizu u aplikaciji *Enzyme Kinetics*

Reaction	Study	Model	Independent Variables
One Substrate	Absence of Inhibitor	Michaelis Menten	Substrate
		Substrate Activation (Ordered)	Substrate
		Substrate Activation (Random)	Substrate
		Hill	Substrate
		Isozyme	Substrate
	Reversible Inhibition	Complete Competitive inhibition	Substrate, Inhibitor
		Complete Non-competitive inhibition	Substrate, Inhibitor
		Complete Non-competitive mixed inhibition	Substrate, Inhibitor
		Complete Un-competitive inhibition	Substrate, Inhibitor
		Partial Competitive inhibition	Substrate, Inhibitor
		Partial Non-competitive inhibition	Substrate, Inhibitor
		Partial Non-competitive mixed inhibition	Substrate, Inhibitor
		Partial Un-competitive inhibition	Substrate, Inhibitor
	Tight Binding Inhibition	Competitive inhibition	Substrate, Inhibitor
		Noncompetitive inhibition	Substrate, Inhibitor
		Uncompetitive inhibition	Substrate, Inhibitor
		Mixed inhibition	Substrate, Inhibitor
	Nonessential Activator	Nonessential Activation	Substrate, Activator
		Specific	Substrate, Activator
	Substrate-activator (SA) complex	Catalytic	Substrate, Activator
		Mixed	Substrate, Activator
Two Substrates	Two Substrates	Sequential Random bi-bi Mechanism	Substrate A, Substrate B
		Sequential Ordered bi-bi Mechanism	Substrate A, Substrate B
		Non-sequential Ping Pong bi-bi Mechanism	Substrate A, Substrate B
Others	pH Activity Profile	pKa Rise	pH
		pKa Fall	pH
		pKa With Offset	pH
		Bell Shaped	pH
		Bell Shaped With Plateau	pH
		Plateau Shaped	pH
	First Order Rate	First Order	Time
		First Order with Offset	Time
	Chemical Denaturation	Chemical Denaturation	Denaturant
		Thermal Denaturation	Temperature
	Exponential Delay	Single Exponential	Time
		Single Exponential + Offset	Time
		Double Exponential	Time
		Double Exponential + Offset	Time
	Linear Regression	Linear Regression	X

III. REZULTATI I DISKUSIJA

U ovom istraživanju izvršena je imobilizacija alkalaze i peroksidaze iz rena (HRP-C) kovalentnim vezivanjem amidnom vezom na alginatne i magnetit/ alginatne čestice, koristeći karbodiimid kao aktivacioni agens. Nanočestice magnetita su inkapsulirane u alginatnim česticama, što je rezultiralo hidrofilnom prevlakom sa karboksilnim grupama, koja bi mogla biti pogodna za kovalentno vezivanje oba enzima. Lako odvajanje čestica alginata iz reakcione smeše korišćenjem konvencionalnog magneta može se postići uvođenjem feromagnetnih čestica u strukturu polimera.^{977,978} Šematski prikaz vezivanja, alkalaze na alginatne čestice i HRP-C na MAB čestice, amidnom vezom između amino grupe enzima i karboksilne grupe alginata aktivirane EDAC-om, predstavljen je šemi 19.



Šema 19. Mogući mehanizam kovalentne imobilizacije HRP-C i alkalaze na MAB i alginatne čestice aktivirane EDAC-om

III.1. KARAKTERIZACIJA ČESTICA

Tokom našeg istraživanja proizveli smo različitim metodama čestice na koje smo potom kovalentno vezali alkalazu i HRP-C. Magnetit/ alginatne čestice su proizvedene dispergovanjem suspenzije natrijum-alginata i magnetita u kapljice, koje su nakon toga očvrsnule hemijskim umrežavanjem sa kalcijumovim jonima iz rastvora kalcijum-hlorida. Variranjem prečnika igle (18-25 G), proizvedene su čestice različitih veličina sa prečnikom u intervalu 0,38-3,3 mm) i po pravilu, smanjivanjem prečnika igle dobijane su manje čestice. Međutim, da bi se dobile čestice prečnika ispod 2 mm, morali smo da uvedemo električno polje prilikom procesa ukapavanja. Ova metoda je poznata pod nazivom elektrostatička ekstruzija. Alginatne mikročestice dobijene su elektrostatičkom ekstruzijom dispergovanjem rastvora natrijum-alginata u rastvor kalcijum-hlorida, dok su submikronske alginatne čestice dobijene ultrazvučnim raspršivanjem na kolonu nakvašenu rastvorom kalcijum-hlorida. Prilikom proizvodnje submikronskih alginatnih čestica varirana je koncentracija natrijum-alginata, dok je proces vršen sa i bez sušenja. Kada je pri proizvodnji bilo sušenja dobijali smo manje čestice zbog isparivanja vode iz čestica prilikom raspršivanja.

Srednji prečnik alginatnih mikročestica proizvedenih elektrostatičkom ekstruzijom sa imobilisanim enzimom bio je $803 \pm 23 \mu\text{m}$ sa rasponom raspodele veličine od $1,3 \pm 0,1$. Prosečna veličina alginatnih čestica submikronske veličine proizvedenih ultrazvučnom raspršivanjem (UA) sa imobilisanom alkalazom dostigla je $0,607 \pm 0,103 \mu\text{m}$ sa indeksom polidisperznosti $0,463 \pm 0,053$, dok su imobilisane sušene čestice (UAD) bile manje i to prečnika $0,394 \pm 0,051 \mu\text{m}$. Zeta potencijal (ZP), koji pokazuje električni napon na površini čestice, nije se značajno razlikovao između različitih čestica i kretao se od $-6,2 \text{ mV} \pm 5,3\%$ za alginatne čestice i $-28,9 \text{ mV} \pm 4,4\%$ za alginatne čestice sa imobilisanim enzimom, što je blizu granice fizičke stabilnosti koloidnih sistema (-30 mV).

Međutim, pokazalo se da je enzimaska prevlaka izazvala smanjenje zeta potencijala u poređenju sa alginatnim česticama, ukazujući na to da površinski sloj enzima značajno sprečava agregaciju i adheziju čestica. Ovo smanjenje vrednosti ZP može se pripisati činjenici da je većina $-\text{NH}_2$ grupa na površini molekula enzima bila vezana za aktivirane alginatne čestice, omogućavajući negativno naelektrisanim aminokiselinskim ostacima da ostanu slobodni i da preovlađuju. Rezultati sugerišu da su sušenjem aerosola uz pomoć grejača povezanog sa aparatom za ultrazvučno raspršivanje dobijene čestice submikronske veličine. Nakon imobilizacije enzima i mikronske i submikronske čestice su se povećale, što se vidi na osnovu podataka da su čestice bez enzima dobijene tehnikom elektrostatičke ekstruzije (EE), ultrazvučnog raspršivanja (UA) i ultrazvučnog raspršivanja sa sušenjem (UAD) imale prečnike $698 \pm 0,21 \mu\text{m}$, $428 \pm 78 \text{ nm}$ i $261 \pm 33 \text{ nm}$, respektivno (tabela 17).

Srednji prečnici čestica dobijenih jednostavnim ukapavanjem pod uticajem gravitacionog polja, ukapavanjem u elektrostatičkom polju, pre i posle imobilizacije sa HRP-C i alkalazom su dati u tabeli 18 za uzorak sa masenim odnosom magnetit/ alginat 1:4. Vrsta vezanog enzima nije uticala na veličinu čestice i rezultati u tabeli 18 predstavljaju srednje vrednosti prečnika čestica.

Činilo se da vlažne čestice dobijene jednostavnim ukapavanjem bez prisustva električnog polja imaju sferni oblik, a srednji prečnik je u rasponu od $3268,0 \pm 32,2 \mu\text{m}$ do $2408,1 \pm 40,7 \mu\text{m}$, i od $3309,1 \pm 60,3$ do $2513,1 \pm 54,8 \mu\text{m}$ za MAB i HRP-MAB čestice,

respektivno, u zavisnosti od veličine igle. Kao što se može videti, čestice su se povećale nakon imobilizacije enzima u odnosu na čestice bez enzima (tabela 18), a ovaj efekat (povećanje od 5–28% u odnosu na prečnik pre imobilizacije) bio je najizraženiji za mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom, koje odgovaraju većem prinosu imobilizacije (slika 65).

Tabela 17. Prečnik čestica i zeta potencijal

Vrsta čestica	Prečnik d	Zeta potencijal, mV
<i>EE čestice</i>	0,698±0,21 μm	–6,34±0,33
<i>UA čestice</i>	0,428±0,078 nm	–6,15±0,26
<i>UAD čestice</i>	0,261±0,033 nm	–6,17±0,27
<i>Imobilisane EE čestice</i>	0,803±0,23 μm	–28,6±1,40
<i>Imobilisane UA čestice</i>	0,607±0,103 nm	–27,8±1,69
<i>Imobilisane UAD čestice</i>	0,394±0,051 nm	–30,3±1,11

*EE čestice – alginatne mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom; UAD i UA čestice – alginatne submikronske čestice dobijene ultrazvučnim raspršivanjem sa i bez sušenja, respektivno; d – prečnik čestice

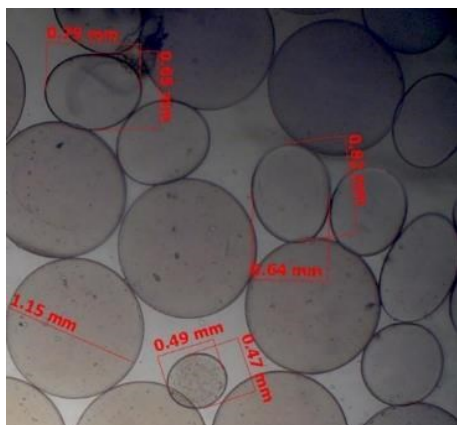
Tabela 18. Prečnici MAB, HRP-MAB i alkalaza-MAB čestica dobijenih jednostavnim ukapavanjem i elektrostatičkom ekstruzijom, sa odnosom magnetit/ alginat=1:4

Veličina igle	Pre imobilizacije d, μm	Posle imobilizacije d, μm
<i>18G</i>	3268,0±32,2	3309,1±60,3
<i>20G</i>	2965,9±39,6	3003,2±40,1
<i>22G</i>	2568,3±53,5	2662,1±60,2
<i>25G</i>	2408,1±40,7	2513,1±54,8
<i>18G_{ee}</i>	1995,8±80,0	2095,3±74,3
<i>20G_{ee}</i>	953,1±60,3	1112,3±23,7
<i>22G_{ee}</i>	806,6±82,1	1030,9±73,8
<i>25G_{ee}</i>	382,2±91,2	472,3±51,1

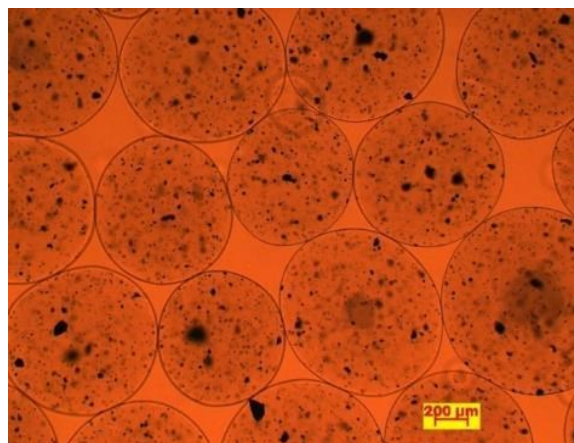
*d – prečnik čestice; ee – čestice proizvedene elektrostatičkom ekstruzijom

Prečnik čestica je imao standardnu devijaciju u opsegu 1–24%, bez sistematske zavisnosti od sastava. Heterogenost je poznati nedostatak ekstruzionih tehnika kada se primenjuje velika brzina protoka u režimu prskanja. Na slici 65 prikazane su mikronske i submikronske čestice u rastvoru kalcijum-hlorida dobijene elektrostatičkom ekstruzijom korišćenjem igle 22G (slika 65a,b,c) i ultrazvučnim raspršivanjem (slika 65d,e,f) sa i bez imobilisanog enzima slikane optičkim mikroskopom.

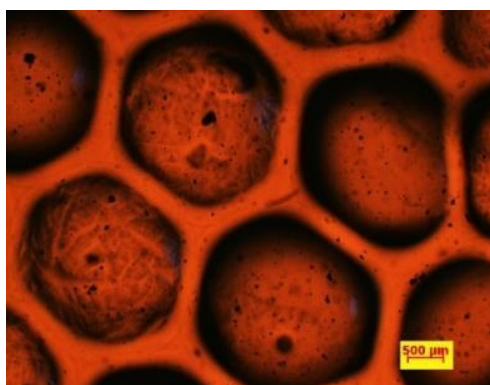
Na slici 65a su prikazane alginatne čestice i može se videti da nisu sve čestice sfernog oblika, već ima i elipsoidnih. Na slici 65b,c se unutar i MAB i HRP-MAB čestica vide crne tačke koje predstavljaju agregate Fe₂O₃ nanočestice (prečnika ~15 nm), koji su homogeno raspoređeni kroz zapreminu čestica. Pre imobilizacije MAB čestice su bile transparentne i kružnog oblika, dok su nakon imobilizacije potamnele, izgubile transparentnost i dobile poliedarne oblike zbog vezivanja HRP-C na njihovu površinu.



a)



b)



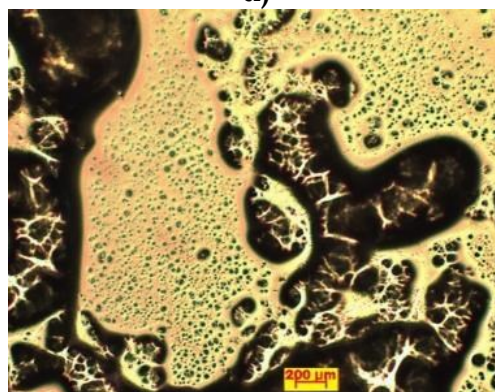
c)



d)



e)



f)

Slika 65. Izgled čestica pod optičkim mikroskopom: (a) alginatne čestice dobijene korišćenjem igle 22G_{ee} pri uvećanju 5x; (b) MAB čestice dobijene korišćenjem igle 22G_{ee} pri uvećanju 5x; (c) HRP-MAB čestice pri uvećanju 5x; (d) UAD čestice pri uvećanju 20x; (e) UAD čestice pri uvećanju 5x; (f) UAD čestice sa imobilisanom alkalazom pri uvećanju 5x

Oblik MAB čestica najverovatnije odstupa od idealne sfere kao posledica tretmana Tris-HCl puferom (pH vrednosti 8,5) koji je korišćen sa imobilizaciju i čuvanje čestica. Naime, u baznoj sredini kalcijum-alginat bubri vezivanjem vode. Proces bubrenja, uglavnom, pri baznim pH vrednostima može trajati i nekoliko sati, nakon čega počinje rastvaranje i degradacija.⁹⁷⁹ Na slici 65d,f predstavljene su UAD čestice koje takođe imaju sferične oblike i transparentne su, kao čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom. Nakon aktiviranja E-DAC-om i vezivanjem alkalaze čestice više nisu providne, jer se enzim vezao na njihovu površinu (slika 65f).

Pored submikronskih UAD čestica sa imobilisanom alkalazom vide se i agregati nastali spajanjem većeg broja čestica. Ove razlike na površini ukazuju na uspešnu imobilizaciju enzima na površinu čestica, što je dalje i potvrđeno detaljnijim FTIR i SEM analizama.

III.1.1 SEM analiza

Sve dobijene čestice su sušene u sušnici, da bi se ispitala mogućnost proizvodnje biokatalizatora u praškastom obliku, pogodnog za industrijsku primenu. Poređenjem masa vlažnih i suvih čestica izračunali smo stepen vlažnosti koji je iznosio $97,45 \pm 0,2\%$.

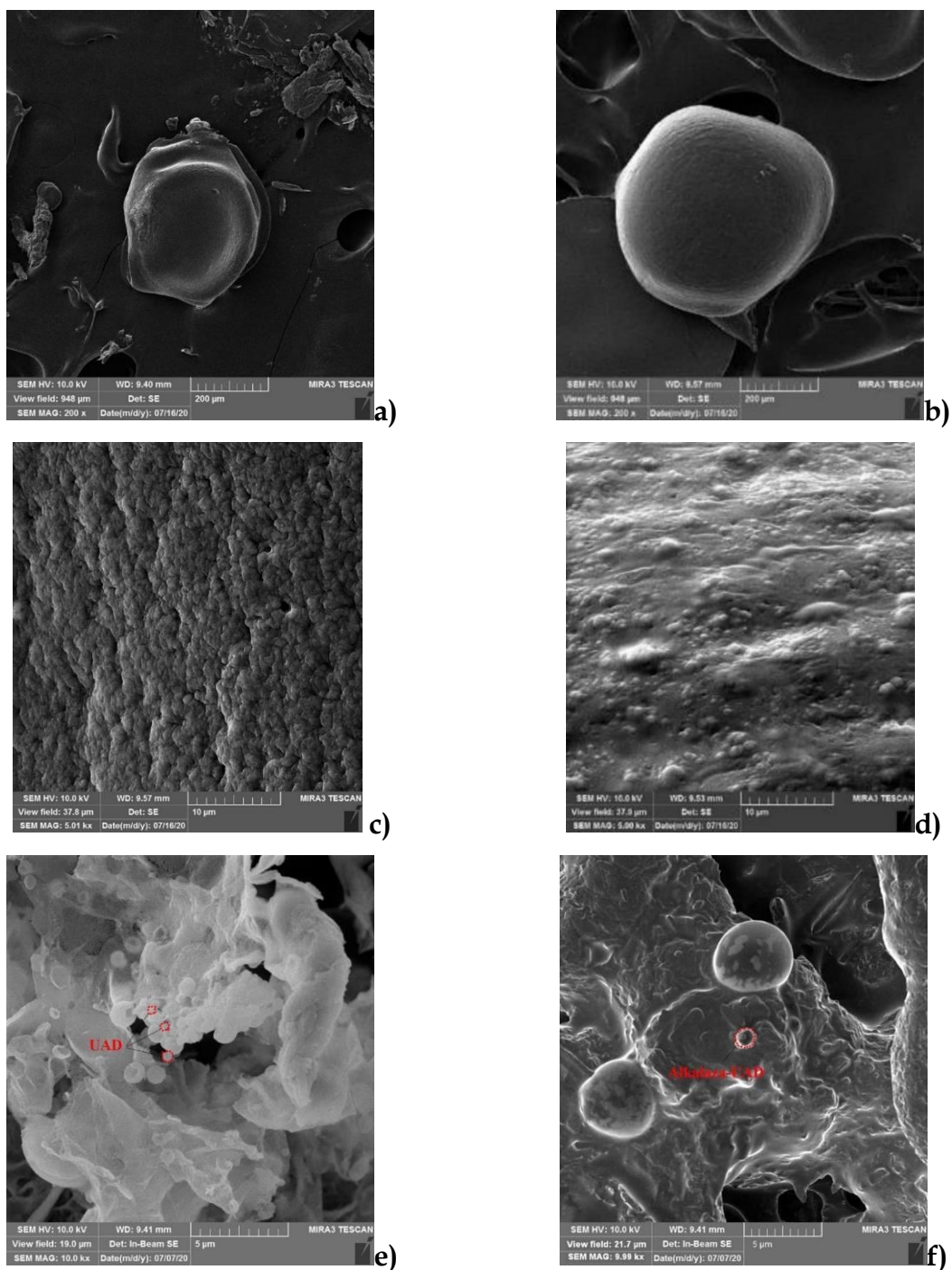
Na slici 66 prikazane su SEM slike alginatnih čestica dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom korišćenjem igle 22G sa i bez imobilisane alkalaze (slika 66a,b,c,d), kao i alginatne nano-čestice dobijene ultrazvučnim raspršivanjem sa sušenjem, takođe sa i bez imobilisane alkalaze (slika 66e,f).

Alginatne čestice prikazane na slici 66 imaju okrugao oblik sa različitom morfologijom površine. Nakon sušenja alginatnih čestica direktno u SEM komori bez posebne zaštite, došlo je do smanjenja veličine čestica, pri čemu je veće smanjenje primećeno kod čestica na koje nije vezan enzim, što je primećeno i poređenjem slika 65 i 66. U prikazima sa većim uvećanjem odgovarajućih površina, hrapavost je uočena naročito na česticama na koje nije vezan enzim, dok je površina imobilisanih čestica izgledala kompaktnije (slika 66c,d).

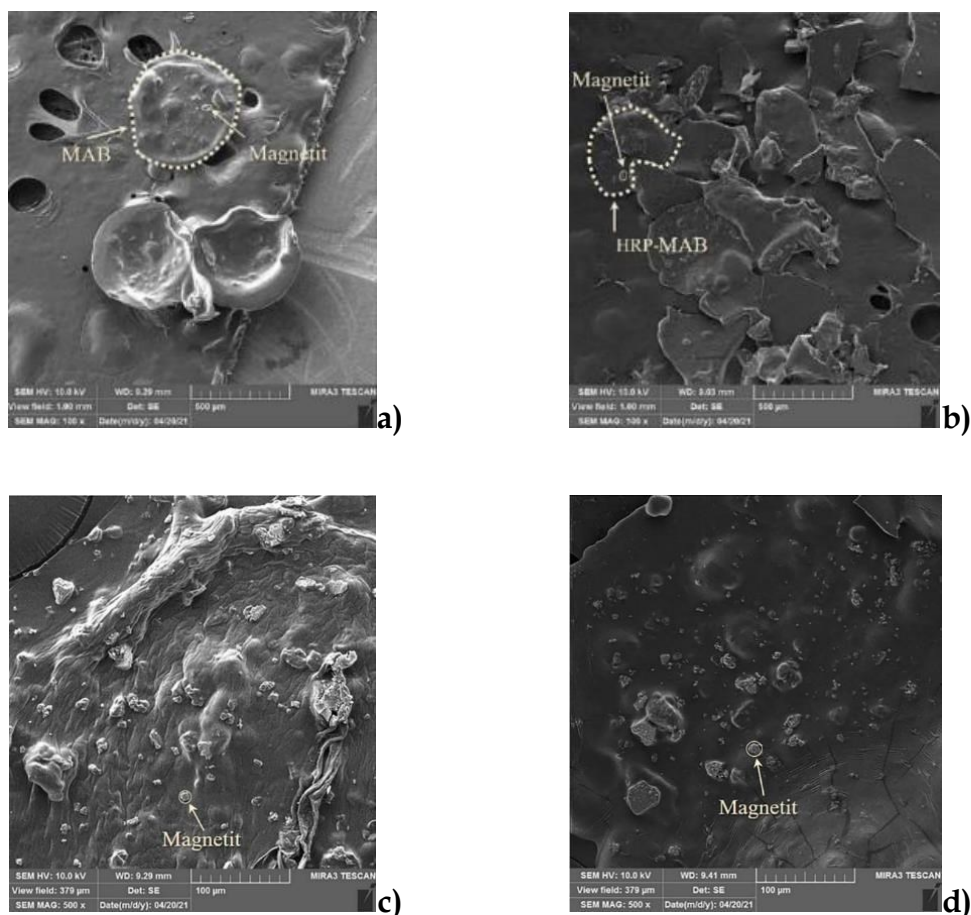
Izgledalo je da sušenje ima manje efekta na imobilisane alginatne čestice nego na MAB čestice, najverovatnije kao rezultat manjeg broja hidrofilnih grupa na imobilisanim česticama, pošto se kovalentna imobilizacija alkalaze odvija preko karboksilnih grupa alginata. Slično našem zapažanju, prijavljena je kompaktnija površina čestica alginata sa inkapsuliranom tanazom u odnosu na prazne alginatne čestice, a autori su pretpostavili da hidroksilne grupe tanaze formiraju intermolekularne vodonične veze sa karboksilnim grupama alginata.⁹⁸⁰ UAD čestice sa imobilisanim enzimom pri sušenju prave agregate, pa se teže mogu izdvojiti zasebne čestice na SEM slikama. Na površini imobilisanih UAD čestica se vidi zatamnjenje koje predstavlja vezani enzim (slika 66e,f).

SEM slike suvih MAB čestica i imobilisane HRP-C na MAB čestice proizvedene elektrostatičkom ekstruzijom korišćenjem igle 22G su predstavljene na slici 67.

Nakon sušenja, prazne čestice su se skupile i delimično deformisale, ali su zadržale okrugli oblik (slika 67a), dok su se čestice prekrivene enzimima više deformisale i izgledale su spojeno (slika 67b). Sa uvećanjem od 500x na odgovarajućim površinama, primećena je hrapavost površine, posebno primetna u slučaju MAB čestica, dok su se površine HRP-MAB čestica činile kompaktnijim (slika 67d) u poređenju sa MAB česticama (slika 67c). Ovaj rezultat se može objasniti manjim brojem hidrofilnih grupa na mikročesticama sa imobilisanim enzimom, pošto se kovalentna imobilizacija HRP-C najverovatnije odvija preko karboksilnih grupa MAB.⁹⁸⁰



Slika 66. SEM mikrografici: (a) alginatne mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom pri uvećanju 200 $\times$; (b) alginatne mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom sa imobilisanom alkalazom pri uvećanju 200 $\times$; (c) alginatne mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom pri uvećanju 5000 $\times$; (d) alginatne mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom sa imobilisanom alkalazom pri uvećanju 5000 $\times$; (e) alginatne submikronske čestice dobijene ultrazvučnim raspršivanjem sa sušenjem pri uvećanju 10000 $\times$; (f) alginatne submikronske čestice dobijene ultrazvučnim raspršivanjem sa sušenjem sa imobilisanom alkalazom pri uvećanju 10000 $\times$



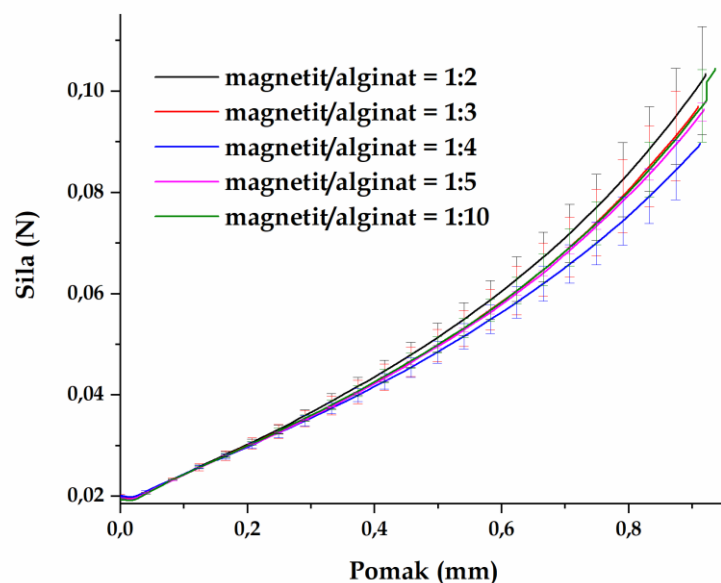
Slika 67. SEM mikrografici MAB čestica: (a) prazne MAB čestice pri uvećanju 100×; (b) HRP-MAB čestice pri uvećanju 100×; (c) spoljna površina praznih MAB čestica pri uvećanju 500×; (d) spoljna površina HRP-MAB čestica pri uvećanju 500×

III.1.2 Mehaničke osobine i magnetizacija

Rezultati mehaničkih ispitivanja komprimovanja čestica su prikazani na slici 68.

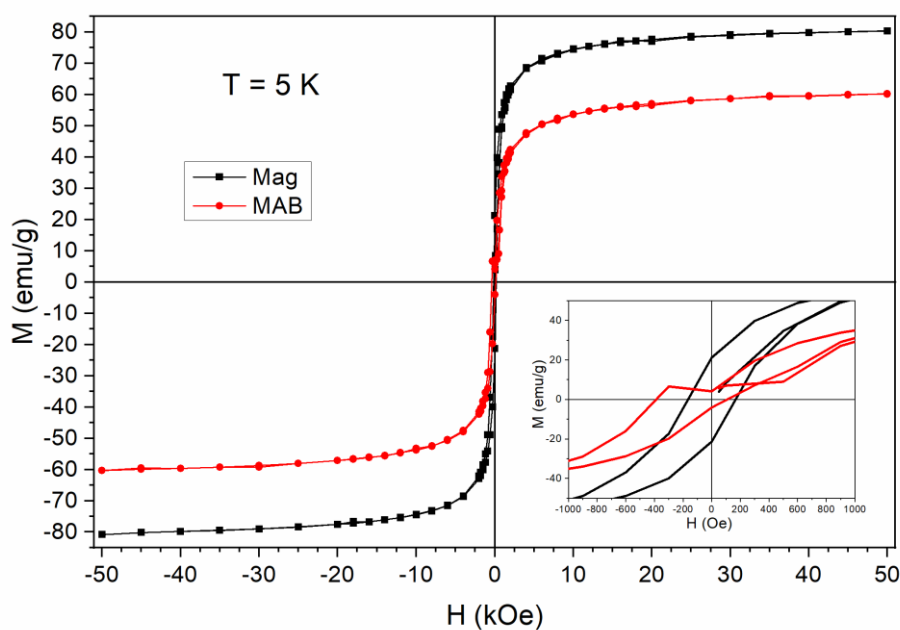
Na osnovu dobijenih rezultata mehaničke čvrstoće i modula elastičnosti, nije uočena značajna razlika između uzoraka magnetit/alginatnih čestica pripremljenih sa različitim odnosima magnetita i alginata (1:2, 1:3, 1:4, 1: 5 i 1:10). Modul elastičnosti bio je oko 25 kPa. Ovo može biti rezultat nekih suprotnih efekata. S jedne strane, očekivalo bi se da će ugradnja čestica magnetita kao ekstra-polimernih komponenti poremetiti mrežu i oslabiti strukturu.

S druge strane, dodavanje magnetita rastvoru alginata jača ukupnu strukturu čestica, kao što je ranije dokazano da nanočestice gvožđe-oksida mogu delovati kao ojačavači;^{966,981} međutim, poslednja primedba je tačna samo do neke tačke. Naime, sa povećanjem koncentracije magnetita dolazi do formiranja aglomerata čestica koji su bili manje kruti od pojedinačnih nanočestica, delujući kao defektne tačke u polimernoj matrici, a zatim dovode do smanjenja krutosti.^{966,981} Naši rezultati su uporedivi sa rezultatima Čičija (*Czichi*) i saradnika koji je utvrdio da se *Joung*-ov modul alginat-metilceluloznog gela obogaćenog česticama magnetita nije značajno promenio sa povećanjem koncentracije čestica do 35% (*w/w*).⁹⁸²



Slika 68. Testovi sabijanja uzoraka MAB napravljenih sa različitim odnosom magnetit/alginat (1:2, 1:3, 1:4, 1:5 i 1:10)

Magnetizacione krive jedne čestice magnetita i magnetit/alginat čestica (MAB) merene su na 5 K kao funkcija magnetnog polja između 0 Oe i 50 kOe i prikazane su na slici 69. Vrednosti magnetizacije zasićenja (saturacione magnetizacije) su nađene kao 80 i 55 emu g⁻¹ za magnetit i MAB, respektivno. Ispostavilo se da obe krive imaju malu remanentnost i koercitivnost u histerezisnim petljama, pokazujući dobra magnetna svojstva. Magnetit i MAB čestice su imale dobru disperzibilnost u vodi i brz magnetni odgovor pošto su bile odvojene iz suspenzije spoljnim magnetom u roku od 1 min (slika 70). Čini se da je smanjenje magnetizacije zasićenja u slučaju MAB čestica posledica dodatnog alginatnog sloja u koji su ugrađene nanočestice.



Slika 69. Magnetizacione krive za magnetit i MAB čestice

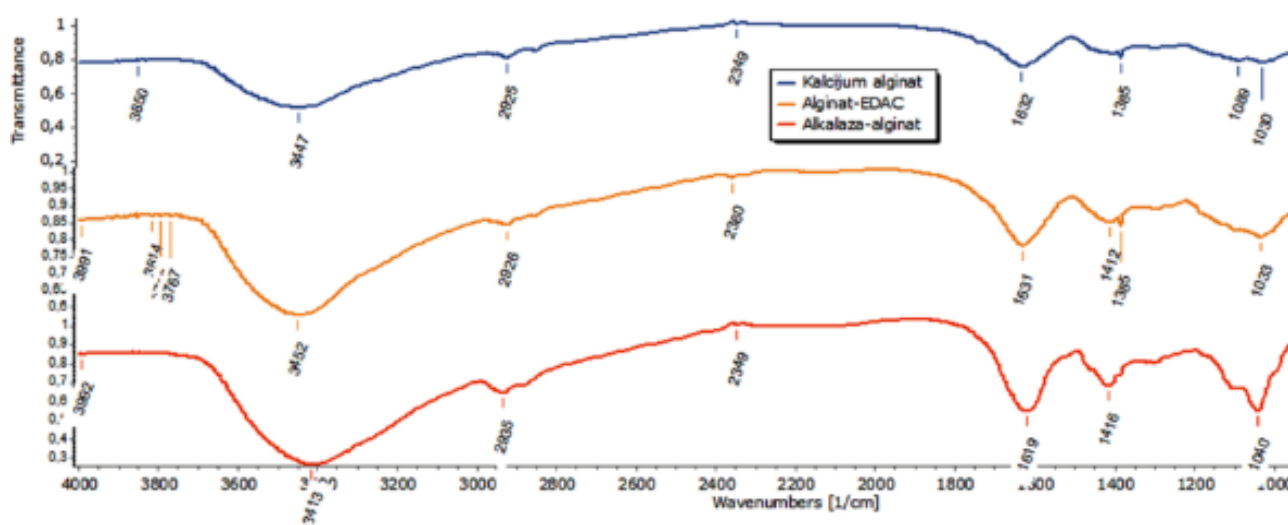


Slika 70. Odvajanje MAB čestica iz suspenzije spoljnim magnetnim poljem u roku od 1 min

III.1.3 FTIR analiza

III.1.3.1 FTIR analiza za sistem alginat-alkalaza

Vibracije istezanja -OH veza čistog alginata pojavile su se u opsegu talasnih dužina $3000\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$, dok se vibracije istezanja alifatične -CH veze uočava na 2925 cm^{-1} (slika 71).



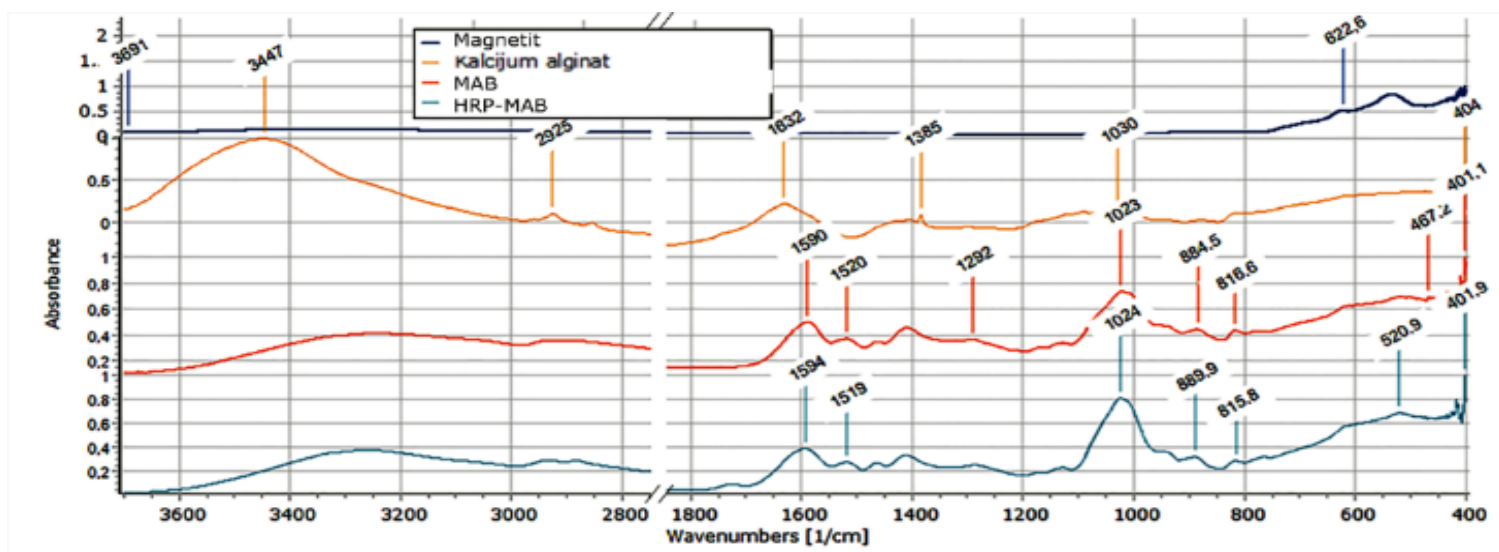
Slika 71. FTIR spektri za sistem alkalaza-alginat: (-) alginat; (-) alginat aktiviran EDAC-om; (-) imobilisana alkalaze na alginat

Pikovi na oko 1632 cm^{-1} i na 1385 cm^{-1} mogu se pripisati asimetričnim i simetričnim vibracijama istezanja karboksilnog jona, respektivno. Pikovi na oko 1107 cm^{-1} i 935 cm^{-1} mogu se pripisati vibracijama istezanja C-O piranozilnog prstena i C-O istezanju uz doprinose C-C-H i C-O-H deformacija. Pik na 1033 cm^{-1} koja odgovara rastezanju CO takođe je karakteristična za alginat. Pored toga, pikovi koje se pojavljuju oko 885 cm^{-1} i 815 cm^{-1} mogu se pripisati manuronskoj i guluronskoj kiselini, respektivno, koje su obe prisutne u alginatnoj strukturi. Može se primetiti nekoliko razlika u spektrima alginat-EDAC-a i

alginat-alkalaze u poređenju sa alginatom. Čini se da je povećanje intenziteta svih pikova u oba spektra (alginat-EDAC i alginat-alkalaza spoj) posledica aktivacije čestica sa EDAC-om. Prvobitni hidroksilni pik (3447 cm^{-1}) postao je širi vrh i pomerio se na nižu talasnu dužinu (3413 cm^{-1}), što bi trebalo da bude posledica superpozicije vibracije istezanja $\alpha\text{-NH}_2$ na alkalazu. Štaviše, pikovi na 1632 cm^{-1} i 1385 cm^{-1} (oba karakteristična za karboksilni jon) u spektru početnih praznih čestica su pomereni na 1619 cm^{-1} i 1416 cm^{-1} , respektivno u spektru alginat-alkalaze i povećani u intenzitetu; rezultat su preklapanja između vibracije istezanja $\alpha\text{-COOH}$ i vibracije promenljivog ugla $\alpha\text{-NH}_2$. Pored toga, pojavili su se novi pikovi, na 1300 cm^{-1} i 1040 cm^{-1} , koji su bili u oblasti karakterističnoj za N-H ili C-N veze. Naime, EDAC kao i aminokiselinski ostaci vezani za polimernu kičmu mogu proizvesti nove azotovodonik ili azot-ugljenik veze. Slično, Davidivič-Pinas (*Davidovich-Pinhas*) i saradnici primećili su nove pikove locirane u opsegu $1240\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ u spojevima alginat-cistein nakon aktivacije alginata EDAC-om.⁹⁸³ Dodatni pik je takođe detektovan u spektru alginat-alkalaza na 928 cm^{-1} što se nalazi u oblasti poliaromatičnih ugljovodonika.

III.1.3.2 FTIR analiza za sistem HRP-MAB

Da bi se bolje okarakterisale interakcije između funkcionalnih grupa enzima, alginata i magnetita, sprovedena je FTIR analiza i rezultati su prikazani na slici 72.



Slika 72. FTIR spektri za sistem HRP-MAB uzorka: (—) magnetit; (—) alginat; (—) MAB; (—) HRP-MAB

U oblasti velikih talasnih dužina, vibracije istezanja O-H veza alginata pojavljuju se u opsegu talasnih dužina $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$,⁹⁸⁴ dok se vibracije istezanja alifatičnog C-H primećuju na $2950\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$. Pikovi oko 1632 cm^{-1} mogu se pripisati karboksilnom jonu, pik na 1460 cm^{-1} asimetričnim i simetričnim vibracijama istezanja, a oni na 1120 cm^{-1} i 935 cm^{-1} C-O piranozilnog prstena i C-O istezanju uz doprinose C-C-H i C-O-H deformacija.⁹⁷⁹ Rastezanje C=O grupe nedisocirane karboksilne grupe je takođe detektovano na 1730 cm^{-1} i 1631 cm^{-1} , kao što je navedeno za alginatne filmove.⁹⁸⁵ Dodatni pik na 1414 cm^{-1} je pripisan simetričnoj vibraciji istezanja COO^- natrijum-alginata.⁹⁸⁶ Slab pik primećen na 1385 cm^{-1} pripisuje se vibraciji istezanja C=O veze.⁹⁸⁷ Pikovi na 1030 cm^{-1} , pomereni na 1023 cm^{-1} i 1024

cm^{-1} , ukazuju na vibracije istezanja C–O.⁹⁸⁸ Pored toga, pikovi oko 800 cm^{-1} mogu se pripisati manuronskoj i guluronskoj kiselini, respektivno, koje su obe prisutne u alginatnoj strukturi.^{989,990}

Važno je napomenuti da je asimetrična vibracija istezanja karboksilnog jona ($1632\text{--}1590\text{ cm}^{-1}$) pomerena na niže talasne dužine u poređenju sa očekivanim za natrijum-alginat.⁹⁹¹ Može se videti da je oblast apsorpcije O–H vibracija istezanja čestica kalcijum-alginata uža od one kod natrijum-alginata. Ovakva razlika je verovatno posledica interakcije alginatnih hidroksilnih i karboksilnih grupa sa Ca^{2+} pri formiranju helatne strukture i posledičnog smanjenja broja vodoničnih veza među OH grupama.⁹⁹¹

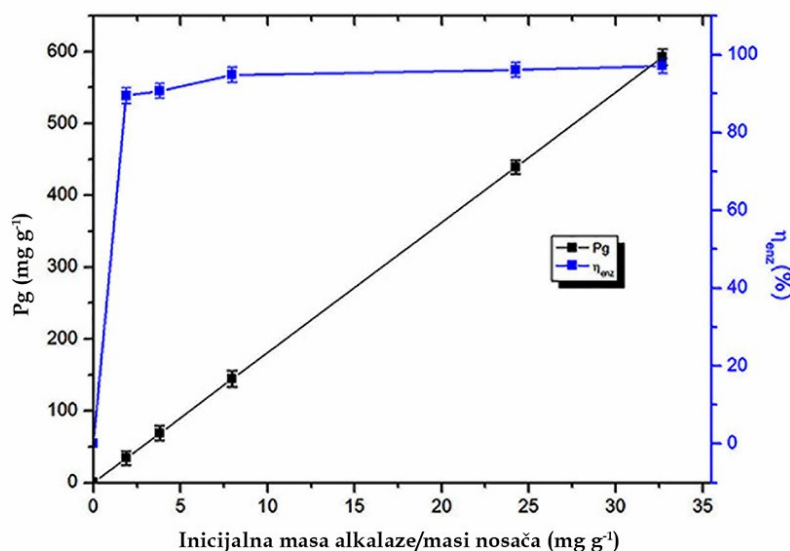
Što se tiče FTIR spektra HRP-MAB čestica, čini se da je region otiska prsta ($1300\text{--}650\text{ cm}^{-1}$) mnogo bogatiji karakterističnim pikovima nego kod MAB čestica. Ovaj region uključuje doprinose kompleksnih interakcijskih vibracija, što dovodi do generalno jedinstvenog otiska prsta svakog jedinjenja. Pored toga, pomeranje vrhova po talasnoj dužini i smanjenje intenziteta jasno pokazuju da postoje interakcije između alginata, HRP-C i Ca^{2+} FTIR spektri MAB i HRP-MAB pokazuju vrh na 520 cm^{-1} zbog Fe–O vibracije istezanja, dok su pikovi na 1590 cm^{-1} i 1594 cm^{-1} pomereni sa 1632 cm^{-1} zbog O–H savijanja i vibracija istezanja koje su vezan za površinu atoma gvožđa.⁹⁹² –OH istezanje HRP-MAB mikročestica je pomereno na nižu frekvenciju (3364 cm^{-1}), zbog elektrostatičke privlačnosti između C=O grupe polimerne matrice i –NH₂ grupe sa HRP-C, što potvrđuje da je HRP-C uspešno vezana za MAB čestice.⁹⁹³ Uočeni su novi pikovi na 622 cm^{-1} , 467 cm^{-1} i 419 cm^{-1} zbog Fe–O grupe, što potvrđuje da su magnetitne čestice uspešno inkapsulirani u kalcijum-alginat.⁹⁹⁴ Pik se primećuje u intervalu $3417\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$; širina pika je posledica i –OH i –NH vibracije istezanja, što ukazuje da je HRP-C vezana za MAB.⁹⁹²

III.2. OPTIMALNI USLOVI ZA IMOBILIZACIJU ALKALAZE NA KALCIJUM ALGINATNE ČESTICE

Definisanje optimalnih uslova imobilizacije je ključno za uspešno kovalentno vezivanje enzima preko većeg broja funkcionalnih grupa, tzv. „višetačkasto vezivanje” i reakciju enzim-nosač.⁵⁰ Zbog toga su ispitivani efekti i početne mase alkalaze po masi nosača u rastvor za imobilizaciju ($2\text{--}33,6\text{ mg}_{\text{alkalaze}}\text{ g}^{-1}_{\text{mikročestica}}$) na imobilisanu masu proteina i prinos imobilisanog enzima na mikročestice alginata dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom (EE). Rezultati su prikazani na slici 73.

Povećanje početnog odnosa enzim/nosač rezultiralo je linearnim povećanjem vezanog enzima, dostižući maksimalnu količinu vezane alkalaze po g suvog nosača od $592,3\pm 6,7\text{ mg g}^{-1}$. Na prinos imobilizacije je u manjoj meri uticala početna koncentracija enzima, tako da je prinos bio $97,1\%$ sa početnim odnosom enzim/nosač od $8,4\text{ mg g}^{-1}$. Druge publikacije o imobilizaciji alkalaze pokazale su niže ili uporedive vrednosti za vezivanje enzima sa prinosom imobilizacije u širokom opsegu vrednosti. Pesato (*Pessato*) sa saradnicima je postigao vezivanje $0,028\text{ mg proteina g}^{-1}$ nosača sa česticama glioksil-agaroze.⁹⁹⁵ Korici (*Corîci*) sa saradnicima je fizički zarobio alkalazu u staklenim sol-gel matricama korišćenjem različitih tipova alkoksisilana pomešanih sa tetrametoksisilanom u različitim odnosima; autori su postigli sadržaj inkapsuliranog proteina između 83 i 163 mg g^{-1} gela u zavisnosti od formulacije matrice.⁹⁹⁶ Fererira (*Ferreira*) i saradnici su kovalentno imobilisali alkalazu na derivate

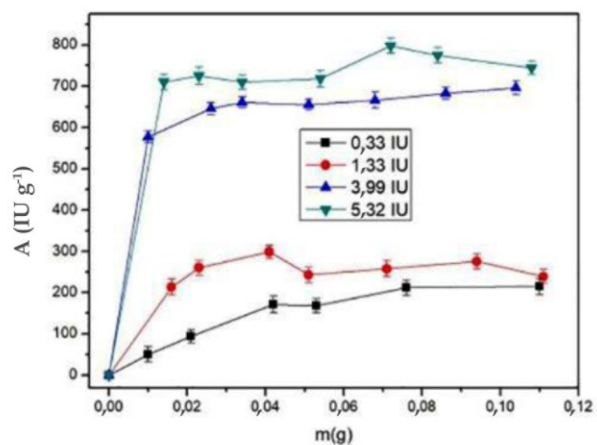
silicijum-dioksida različite veličine pora i morfologije površine (terminalne amino naspram hidroksilnih grupa) i dostigli 2,4–6,3 mg proteina po gramu SiO_2 sa stepenom imobilisanog proteina između 27-70%,⁹⁹⁷ dok je Zeng (Zeng) sa saradnicima za alkalazu imobilisanu na $\text{HMSS-NH}_2\text{-Fe}^{3+}$ postigao odlično vezivanje enzima na nosač od $227,8 \pm 23,7 \text{ mg g}^{-1}$.⁹⁹⁸ U nedavnoj studiji, alkalaza je imobilisana različitim mehanizmima (adsorpcija, umrežavanje enzima i kovalentno vezivanje) za aktivirane mikročestice hitozana; autori su dobili masu vezanog enzima po gramu nosača u opsegu od 116 do $340,2 \text{ mg g}^{-1}$, sa prinosom imobilizacije enzima od 96,4 do 98,7%, u zavisnosti od metode korišćene za dobijanje mikročestice hitozana (elektrostatička ekstruzija i tehnike inverzne emulzije) i formulacije matrice (odnos hitozan/umreživač).⁹⁹⁹ Dobro vezivanje enzima postignuto ovde može se objasniti neselektivnim spajanjem enzima na matricu, preko različitih funkcionalnih grupa, što je prouzrokovalo formiranje višestrukog vezivanja aktivnih funkcionalnih grupa enzima sa alginatnom matricom.



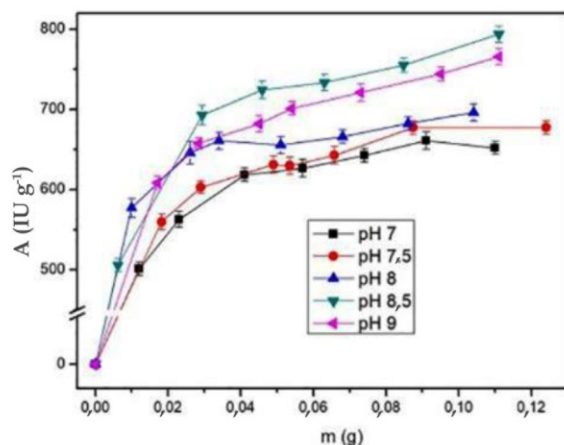
Slika 73. Uticaj početne mase alkalaze po gramu nosača na imobilisanu količinu proteina (P_g) i prinos imobilizacije (η_{enz})

Proučavali smo efekte mase biokatalizatora (alkalaza imobilisana na alginatne mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom) na specifičnu aktivnost (aktivnost po masi suvog nosača) biokatalizatora, variranjem imobilizacionih parametara kao što su početna koncentracija enzima, pH vrednosti pufera, molaritet pufera, vreme aktivacije EDAC-om, maseni odnos EDAC/nosač i vreme imobilizacije. Aktivacija alginatnih čestica za kovalentno vezivanje sa alkalazom i variranje parametara pri imobilizaciji izvršena je po metodi opisanoj u poglavlju II.2.12, a aktivnost biokatalizatora je određivana po metodi opisanoj u poglavlju II.2.13. Rezultati su prikazani na slici 74.

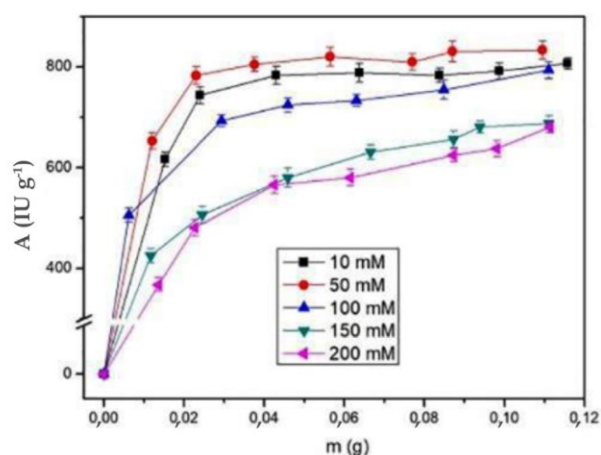
Generalno, aktivnost biokatalizatora je rasla sa porastom mase imobilisanog enzima. Aktivnost imobilizovane alkalaze je rasla sa porastom početne koncentracije alkalaze u osnovnom rastvoru za imobilizaciju. Pokazalo se da najveća početna koncentracija enzima u rastvoru za imobilizaciju od 5,32 IU daje najveću aktivnost imobilisanog sistema (slika 74a) i korišćena je u daljim istraživanjima.



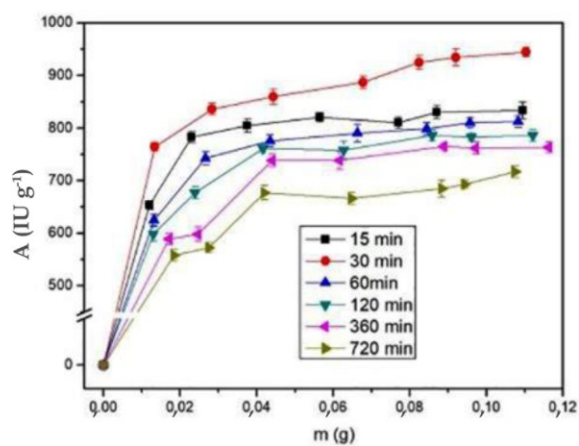
(a)



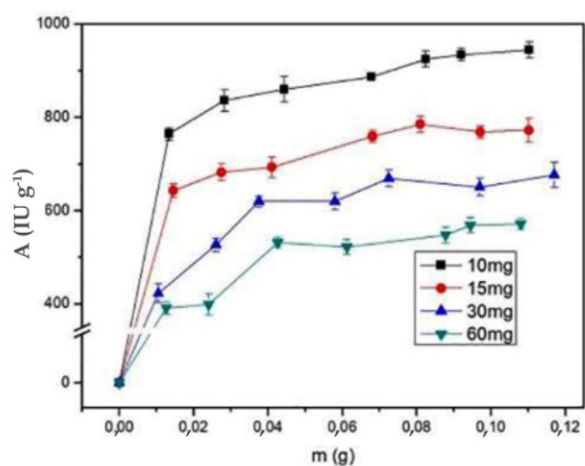
(b)



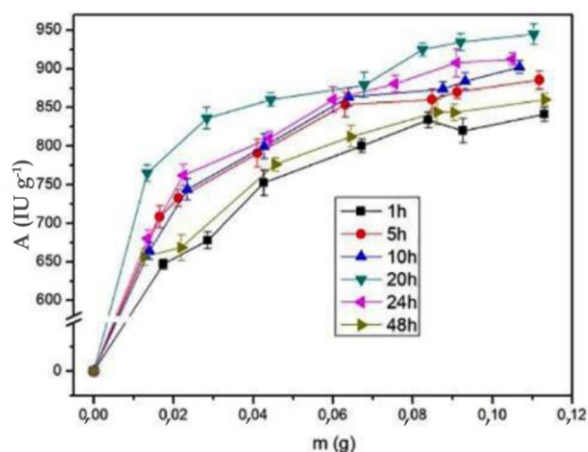
(c)



(d)



(e)



(f)

Slika 74. Uticaj mase biokatalizatora (alkalaza imobilisana na alginatne mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom) na specifičnu aktivnost biokatalizatora pri variranju parametara imobilizacije: (a) početna koncentracija enzima (b) pH vrednost Tris-HCl pufera (c) molaritet Tris-HCl pufera (d) vreme aktivacije alginatnih mikročestica EDAC-om (e) odnos početne mase EDAC-a i mase alginatnih mikročestica pri aktivaciji (f) vreme imobilizacije alkalaze na alginatne mikročestice aktivirane EDAC-om

Da bi se izbeglo rastvaranje alginata, reakcija aktivacije alginatnih mikročestica EDAC-om je sprovedena u Tris-HCl puferu iako je fosfatni pufer korišćen u većini ranije objavljenih studija.^{1000,1001} Glavni nedostatak alginata je osetljivost na kalcijumove helatore kao što su fosfat i laktati.

Što se tiče uticaja pH vrednosti pufera, imobilisani enzim dobijen sa Tris-HCl puferom pH vrednosti 7 pokazao je najnižu aktivnost, a aktivnost biokatalizatora je rasla sa porastom pH vrednosti pufera do pH vrednosti 8,5, a zatim je počela da opada sa daljim povećanjem (slika 74b).

Naime, odbijanje karboksilnih grupa alginata bilo je intenzivnije u rastvoru sa višom pH vrednošću, što je rezultiralo povećanjem mreže polimera tako da su funkcionalne karboksilne grupe postale dostupnije za vezivanje sa EDAC-om. Međutim, izvan krajnjih vrednosti pH pufera, mreža je počela da se raspada. Povećanje molariteta Tris-HCl pufera dovelo je do smanjenja aktivnosti imobilisanog enzima, tako da je najveću aktivnost pokazao biokatalizator dobijen sa 50 mM Tris-HCl puferom čiji je pH vrednost 8,5, koji je korišćen u daljim istraživanjima (slika 74c). Ovaj efekat može biti povezan sa pI-zavisnim ponašanjem bubrenja alginata, pošto se ravnotežno bubrenje alginatnih gelova smanjilo sa povećanjem jonske snage pufera.¹⁰⁰²

Proučavano je i vreme aktivacije alginatnih čestica EDAC-om u opsegu 30–720 min (slika 74d). Zaključili smo da 15 minuta nije dovoljno da se proces aktivacije završi, ali je vreme reakcije duže od 30 minuta rezultiralo smanjenjem aktivnosti biokatalizatora. Ovo se može objasniti očigledno prekomernim umrežavanjem alginatnih čestica EDAC-om, što dovodi do naknadnog međusobnog umrežavanja između molekula enzima, što zauzvrat može izazvati deaktivaciju enzima. Stoga je 30 minuta odabrano kao optimalno vreme aktivacije.

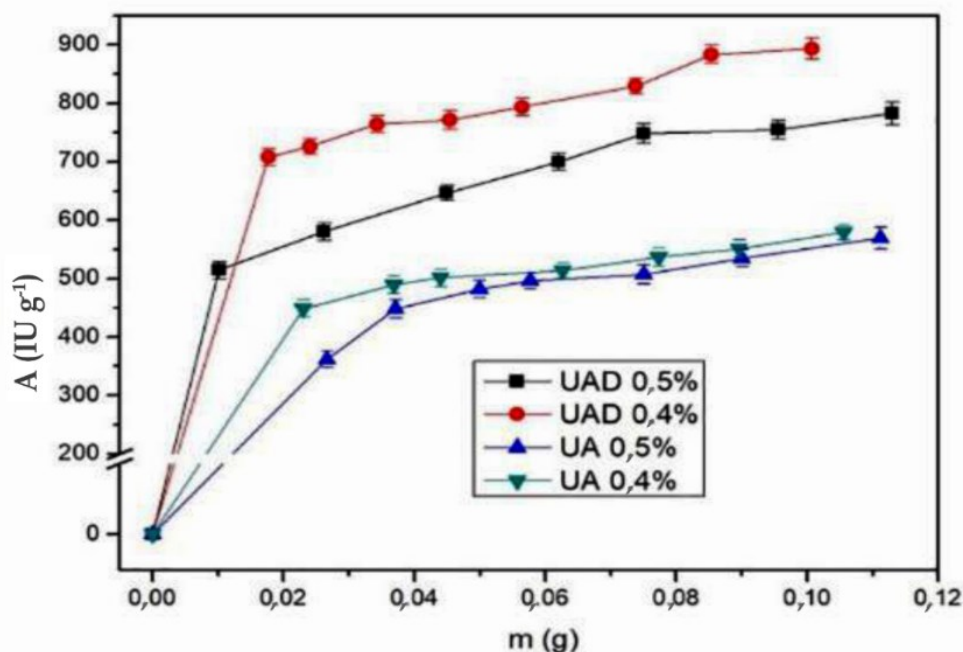
Efekat mase EDAC-a po masi nosača (10–60 mg/0,5 g) na aktivnost imobilisanog enzima je prikazana na slici 74e. Najveća aktivnost je postignuta sa 10 mg EDAC-a na 0,5 g čestica, i sa povećanjem mase EDAC-a je opadala. Nekoliko razloga može objasniti ovakav rezultat. Naime, EDAC ima funkcionalne grupe koje mogu da reaguju sa karboksilnim grupama mikročestica alginata (kao što je prikazano na slici 71). Međutim, karboksilne grupe enzimskih aminokiselina takođe mogu da reaguju sa EDAC-om, onoliko intenzivnije koliko je koncentracija EDAC-a bila veća. Naime, aktivno mesto alkalaze obuhvata zajedničku katalitičku trijadu koju čine tri aminokiseline, serin, aspartat i histidin. Pokazalo se da karboksilna grupa aspartata može da reaguje sa viškom EDAC-a što dovodi do smanjene aktivnosti enzima nakon imobilizacije. Drugo moguće objašnjenje je da je vezivanje enzima preko većeg broja funkcionalnih grupa izazvano uvođenjem velikog broja dodatnih grupa na nosač, kao i sterne smetnje izazvane preopterećenjem enzima takođe dovelo do nedostupnosti enzima supstratu. Problem reaktivacije aktivnih mesta enzima sa amino grupom EDAC-a uočili su Ti (*Tee*) i saradnici, koji su istraživali imobilizaciju α -amilaze kovalentnim vezivanjem na alginatnu matricu; autori su predložili dvostepeni protokol konjugacije za zaštitu aktivnog mesta enzima: nakon reakcije čestica kalcijum-alginata sa EDAC-om, dalja reaktivnost EDAC-a sa karboksilnim grupama je ugašena dodavanjem 2-merkaptetanola u reakcionu smešu, koji je sprečio da EDAC dalje reaguje sa aktivnim mestima karboksilnih grupa enzima tokom koraka imobilizacije.⁶⁰ U cilju boljeg razumevanja o tome kako višak EDAC-a utiče na aktivnost imobilisane alkalaze, dodali smo 2-merkaptetanol u drugom

koraku i ponovili eksperiment. Utvrđene aktivnosti biokatalizatora nisu otkrile značajne razlike među različitim testiranim uzorcima (prilog 1, slika S1), pokazujući da je doprinos prvog uzroka deaktivaciji enzima bio zanemarljiv. Čini se da višestruko vezivanje enzima za nosač, koje je ograničavalo fleksibilnost polipeptidnog lanca ili preopterećenje enzimom, objašnjava smanjenu aktivnost biokatalizatora korišćenjem veće koncentracije EDAC-a.

Vreme inkubacije procesa imobilizacije (15–720 min) takođe je pokazalo uticaj na aktivnost imobilisane alkalaze (slika 74f). Činilo se da, kada je vreme imobilizacije bilo manje od 20 h i dalje postoje raspoložive karboksilne grupe na površini alginatne matrice za vezivanje, dok sa produženjem vremena kontakta preko 20 h, dolazi do deaktivacije enzima.

Optimalni uslovi imobilizacije su bili sledeći: 5,32 IU alkalaze, 50 mM Tris-HCl pufer pH vrednosti 8,5, 30 minuta aktivacije sa 10 mg EDAC-a na 0,5 g alginatnih mikročestica i vreme imobilizacije od 20 h.

Drugi tip biokatalizatora je takođe napravljen od čestica alginata koje su sintetisane iz rastvora natrijum-alginata u koncentraciji od 0,4 i 0,5% (*w/v*) tehnikom ultrazvučnog raspršivanja bez sušenja (UA) i sa sušenjem (UAD) aerosola generisanog ultrazvučnim raspršivačem. Dobijene UAD i UA submikronske čestice su korišćene za imobilizaciju alkalaze pod prethodno određenim optimalnim uslovima sa alginatnim česticama dobijenim elektrostatičkom ekstruzijom. U stvari, tako dobijeni UAD i UA biokatalizatori su znatno manji od većine enzimsko-alginatnih čestica navedenih u literaturi.^{1003,1004} Oba biokatalizatora su imala visok kapacitet vezivanja pošto je postignut prinos imobilizacije od 94 do 97% za UA i UAD, respektivno. Aktivnost imobilisane alkalaze se povećavala sa njenom masom u reakciji, kako se i očekivalo (slika 75).



Slika 75. Uticaj mase biokatalizatora (alkalaza imobilisana na alginatne submikronske čestice dobijene ultrazvučnim raspršivanjem sa i bez sušenja) na aktivnost imobilisane alkalaze pri variranju početne koncentracije natrijum-alginata

Štaviše, biokatalizator UAD je pokazao veću aktivnost u poređenju sa UA biokatalizatorom. Ovo se može objasniti sa dve činjenice:

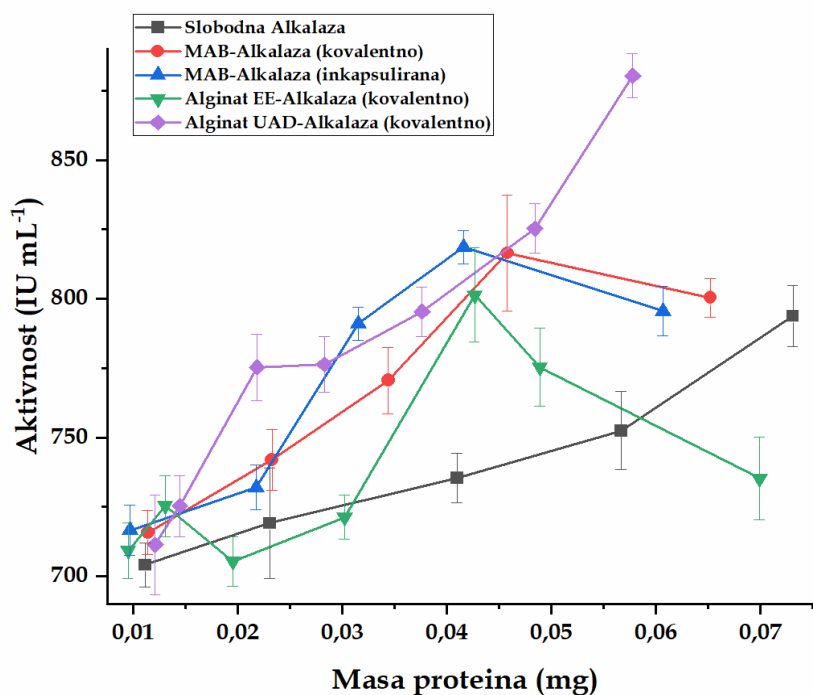
- povećanjem broja reaktivnih grupa po jedinici mase alginatnih čestica nakon sušenja i
- UAD čestice su bile daleko manje od UA, pa su imale veću specifičnu površinu, odnosno kontaktnu površinu za odvijanje biokatalitičke reakcije.

Pored toga, biokatalizator napravljen od 0,4% rastvora natrijum-alginata (*w/v*) pokazao je bolju aktivnost od onih napravljenih sa 0,5% rastvorom (*w/v*). Ovaj rezultat bi se mogao pripisati i razlici u njihovoj veličini, pošto su čestice niže koncentracije alginata bile manje.

Treći tip biokatalizatora je takođe napravljen kovalentnim vezivanjem alkalaze na MAB čestice koje su sintetisane iz 2,0% rastvora natrijum-alginata (*w/v*) i magnetita u odnosu 4:1 tehnikom elektrostatičke ekstruzije (EE). Postignut je prinos imobilizacije od 93%.

Najveća aktivnost pokazana je korišćenjem alkalaze imobilisane na UAD 0,4% alginatne čestice (*w/v*). Sa najaktivnijim biokatalizatorom po g nosača od 2716,1 IU g_{nosača}⁻¹, dobijeno je najviše imobilisanog enzima po g nosača od 671,6±4 mg_{proteina} g_{nosača}⁻¹ u poređenju sa 2600,8 IU g_{nosača}⁻¹ i 592,3±6,7 mg_{proteina} g_{nosača}⁻¹ za EE biokatalizator napravljen od 2% rastvora natrijum-alginata (*w/v*), dok je za alkalazu kovalentno vezanu na MAB čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom čestice dobijeno 2692,6 IU g_{nosača}⁻¹ i 643,3 mg_{proteina} g_{nosača}⁻¹.

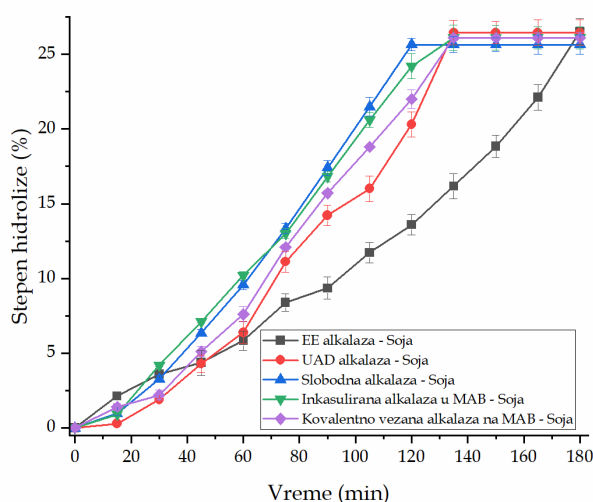
Radi poređenja određena je aktivnost slobodne i inkapsulirane alkalaze u MAB čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom pri optimalnim uslovima imobilizacije alkalaze početne koncentracije 3,99 IU (slika 76).



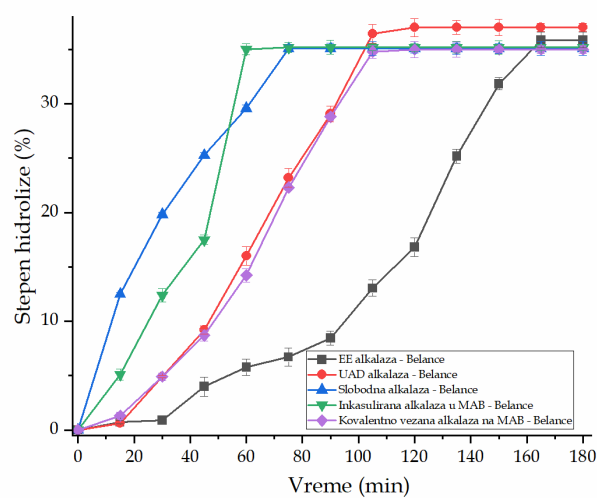
Slika 76. Uticaj mase proteina na aktivnost slobodne i imobilisane alkalaze na različite nosače pri optimalnim uslovima imobilizacije početne količine enzima od 3,99 IU

III.3. PRIMENA IMOBILISANE ALKALAZE ZA HIDROLIZU PROTEINA IZ HRANE U REALNOM REAKCIONOM SISTEMU

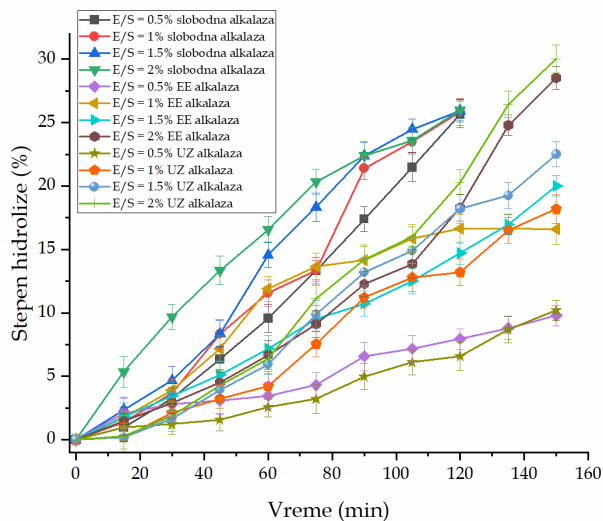
Performanse UAD, EE i MAB biokatalizatora ispitane su u realnim sistemima za hidrolizu proteina iz belanceta i izolata soje. Slika 77 prikazuje stepen hidrolize (DH) kao funkciju vremena za sve biokatalizatore u zavisnosti od vrste nosača za imobilizaciju i početnog enzim/supstrat (E/S) odnosa.



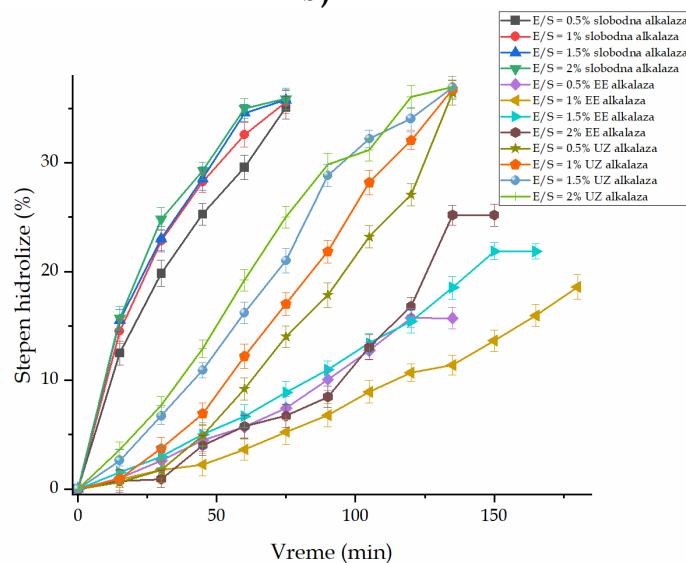
a)



b)



c)



d)

Slika 77. Krive progresa enzimske hidrolize proteina u zavisnosti od načina imobilizacije i početnog odnosa enzim/supstrat iz (a,c) izolata soje i (b,d) belanceta sa imobilisanom, inkapsuliranom i slobodnom alkalazom početne koncentracije 3,99 IU

Očigledno je da su tip čestica sa imobilisanom alkalazom i vrsta proteinskog supstrata uticali na početnu brzinu, obim i tok hidrolize. Najveći stepeni hidrolize proteina iz belanceta i izolata soje, postignuti sa alkalaza-UAD submikronskim česticama bili su $37,03 \pm 0,39\%$ i $26,45 \pm 0,85\%$ za 120 i 135 min, respektivno. Sa druge strane, slobodna alkalaza

je hidrolizovala $35,10 \pm 0,52\%$ proteina belanceta za 75 minuta i $25,64 \pm 0,42\%$ proteina izolata soje za 135 min, što je u saglasnosti sa prethodnim radom.⁹⁹⁹

Sa svim biokatalizatorima je bilo moguće postići približno isti stepen hidrolize, ali je ravnoteža reakcija sa alkalazom imobilisanom na MAB i UAD čestice brže uspostavljena u odnosu na EE biokatalizatore; ovo se može pripisati jednoj ili više opštih karakteristika imobilisanih enzimskih sistema kao što je ograničena dostupnost supstrata aktivnim mestima enzima uzrokovana difuzionim ograničenjima, sterni efekti i strukturne promene enzima nakon imobilizacije.

MAB čestice su se pri hidrolizi ponašale slično slobodnoj alkalazi i maksimalni stepen hidrolize je dostignut brže u odnosu na alginatne EE čestice bez magnetita. Imobilizacija enzima je često bila praćena smanjenjem aktivnosti enzima, što se činilo uglavnom zbog ograničenja difuzije velikih molekula supstrata unutar pora enzima, koji se mogu modulirati korišćenjem nosača sa većim prečnikom pora, kako je prikazano u literaturi.⁹⁹⁸ Rezultati proteolitičke aktivnosti imobilisane alkalaze bili su u saglasnosti sa rezultatima prijavljenim za alkalazu imobilisanu na HMSS-NH₂-Fe³⁺, koja je imala veću biokatalitičku efikasnost za proteolizu goveđeg seruma albumina 2,1 puta od slobodnog enzima. Veća aktivnost imobilisanog enzima objašnjena je aktivacijom alkalaze koordinacijom sa metalnim jonima, što je povoljno promenilo sekundarnu strukturu enzima, što je potvrđeno FTIR analizom.⁹⁹⁸ Prema rezultatima hidrolize sa oba supstrata, iz belanceta i izolata soje, činilo se da alkalaza imobilisana na UAD česticama pokazuje najpovoljnije katalitičke performanse.

Sa povećanjem početnog E/S odnosa u intervalu 0,5-2%, smo zaključili da dolazi do povećanja brzine hidrolize proteina za oba supstrata i da je brzina veća za hidrolizu sa UAD česticama u odnosu na hidrolizu sa EE česticama i dobijamo veći stepen hidrolize u odnosu na reakciju sa slobodnom alkalazom.

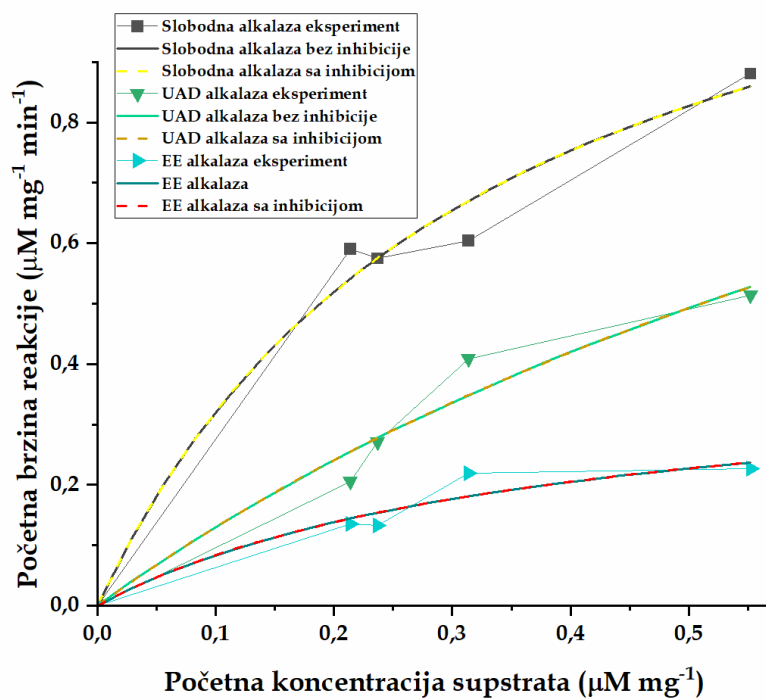
III.3.1 Određivanje kinetičkih konstanti u reakcijama enzimske hidrolize proteina iz izolata soje i belanceta slobodnom i imobilisanom alkalazom u šaržnom reaktoru sa mehaničkim mešanjem

Ispitana je početna kinetika u reakcijama enzimske hidrolize proteina iz izolata soje i belanceta slobodnom alkalazom i imobilisanom na alginatne čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom i ultrazvučnim raspršivanjem.

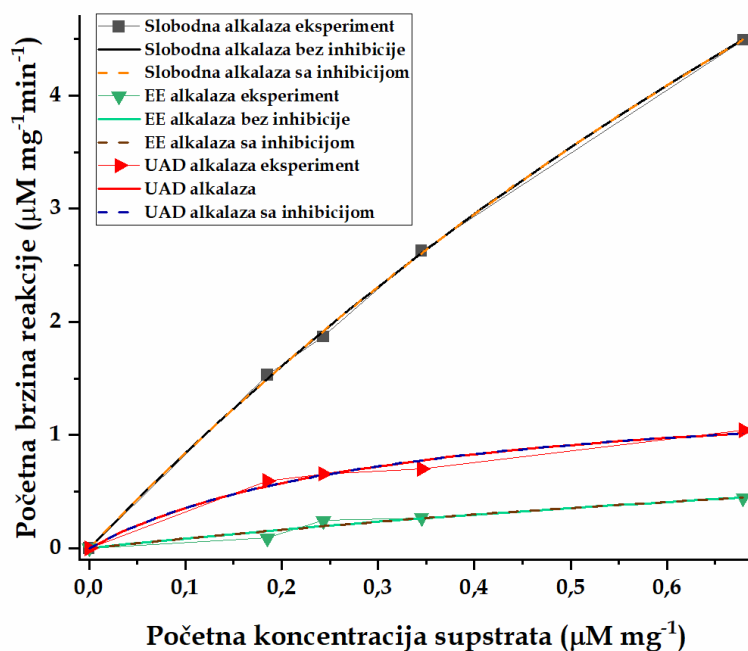
Eksperimentalno dobijeni podaci su fitovani odgovarajućim matematičkim modelima korišćenjem aplikacije *Enzyme Kinetics 1.10* u *OriginLab*-ovom *OriginPro 2022* softveru i odabrane su vrednosti kinetičkih konstanti za modele sa najvećim koeficijentom poklapanja R^2 koji su konvergirali i rezultati su prikazani u tabeli 19 i na slici 78.

Rezultati za hidrolizu proteina iz izolata soje, koji se najviše poklapaju sa modelom za kompletnu kompetitivnu reverzibilnu inhibiciju ($R^2=0,9828$ za slobodnu alkalazu, $0,9598$ za UAD alkalazu i $0,9785$ za EE alkalazu), pokazuju da se maksimalna početna brzina reakcije smanjuje imobilizacijom sa $1,37 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ na $1,04 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ za UAD čestice i $0,4 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ za EE čestice, dok je u reakciji bez inhibicije supstratom najveća početna maksimalna brzina sa UAD česticama $1,63 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, dok je za EE čestice $0,23 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ i za slobodnu alkalazu isto kao i sa inhibicijom $1,37 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Na osnovu konstanti inhibicije $929,96 \mu\text{M mg}^{-1}$ za slobodnu alkalazu, $308,23 \mu\text{M mg}^{-1}$ za UAD alkalazu i

537,16 $\mu\text{M mg}^{-1}$ za EE alkalazu, primećujemo da je izraženiji inhibitorni uticaj supstrata sa imobilisanom alkalazom.



a)



b)

Slika 78. Uticaj početne koncentracije supstrata na početnu brzinu reakcije hidrolize proteina iz (a) belanceta i (b) izolata soje

Tabela 19. Kinetički parametri za reakcije enzimske hidrolize proteina iz izolata soje i belanceta slobodnom i imobilisanom alkalazom fitovani odgovarajućim matematičkim modelima sa najvećim koeficijentom poklapanja R^2 koji su konvergovali

Kinetički parametar	Inhibicija supstratom Slobodna alkalaza	Bez inhibicije supstratom Slobodna alkalaza	Inhibicija supstratom UAD alkalaza	Bez inhibicije supstratom UAD alkalaza	Inhibicija supstratom EE alkalaza	Bez inhibicije supstratom EE alkalaza
<i>Hidroliza proteina iz izolata soje</i>						
Model	Kompetitivna reverzibilna inhibicija	Mihaelis Menten mehanizam	Akompetitivna reverzibilna inhibicija	Mihaelis Menten mehanizam	Kompetitivna reverzibilna inhibicija	Mihaelis Menten mehanizam
$V, \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$	1,37	1,37	1,04	1,63	0,40	0,23
$K_m, \mu\text{M mg}^{-1}$	258,69	326,37	733,40	1158,39	237,78	375,91
$K_i, \mu\text{M mg}^{-1}$	929,96	/	308,23	/	537,16	/
R^2	0,9828	0,9828	0,9598	0,9598	0,9366	0,9785
<i>Hidroliza proteina iz belanceta</i>						
Model	Kompetitivna reverzibilna inhibicija	Mihaelis Menten mehanizam	Kompetitivna reverzibilna inhibicija	Mihaelis Menten mehanizam	Kompetitivna reverzibilna inhibicija	Mihaelis Menten mehanizam
$V, \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$	17,82	17,82	1,68	1,68	1,49	1,49
$K_m, \mu\text{M mg}^{-1}$	612,62	2015,13	506,01	1862,554	264,74	318,05
$K_i, \mu\text{M mg}^{-1}$	421,26	/	403,78	/	1260,51	1260,51
R^2	0,9996	0,9996	0,9465	0,9613	0,9856	0,9856

V – maksimalna brzina reakcije, K_m – Mihaelisova konstanta za hidrolizu, K_i – konstante inhibicije hidrolize, R^2 – koeficijent poklapanja

Poređenjem vrednosti Mihaelisovih konstanti za supstrat, za reakciju bez inhibicije na vrednost za reakciju s inhibicijom, $67,7 \mu\text{M mg}^{-1}$ za slobodnu alkalazu, $424,99 \mu\text{M mg}^{-1}$ za UAD alkalazu i $138,13 \mu\text{M mg}^{-1}$ za EE alkalazu, utvrđujemo da je manji afinitet alkalaze prema supstratu za reakciju sa imobilisanom alkalazom, što je u skladu sa prethodno utvrđenim manjim inhibitornim efektom supstrata za reakciju sa slobodnom alkalazom.

Rezultati za hidrolizu proteina iz belanceta, koji se najviše poklapaju sa modelom za kompetitivnu reverzibilnu inhibiciju ($R^2=0,9996$ za slobodnu alkalazu, $0,9465$ za UAD alkalazu i $0,9856$ za EE alkalazu), pokazuju da se maksimalna početna brzina reakcije smanjuje imobilizacijom sa $17,82 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ na $1,68 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ za UAD čestice i $1,49 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ za EE čestice, a pri reakciji bez inhibicije supstratom brzine su bile iste.

Na osnovu konstanti inhibicije $421,26 \mu\text{M mg}^{-1}$ za slobodnu alkalazu, $403,78 \mu\text{M mg}^{-1}$ za UAD alkalazu i $1260,51 \mu\text{M mg}^{-1}$ za EE alkalazu, primećujemo da je izraženiji inhibitorni uticaj supstrata sa UAD alkalazom koja ima sličan uticaj kao slobodna alkalaza, dok EE alkalaza ima dosta manji efekat.

Poređenjem smanjenja vrednosti Mihaelisovih konstanti za supstrat, od vrednosti za reakciju bez inhibicije na vrednost za reakciju s inhibicijom, $1402,51 \mu\text{M mg}^{-1}$ za slobodnu

alkalazu, $1356,54 \mu\text{M mg}^{-1}$ za UAD alkalazu i $53,31 \mu\text{M mg}^{-1}$ za EE alkalazu, utvrđujemo manji afinitet slobodne alkalaze prema supstratu, što je u skladu sa prethodno utvrđenim većim inhibitornim efektom supstrata za reakciju sa slobodnom alkalazom u odnosu na EE alkalazu i sličnim efektom sa UAD alkalazom.

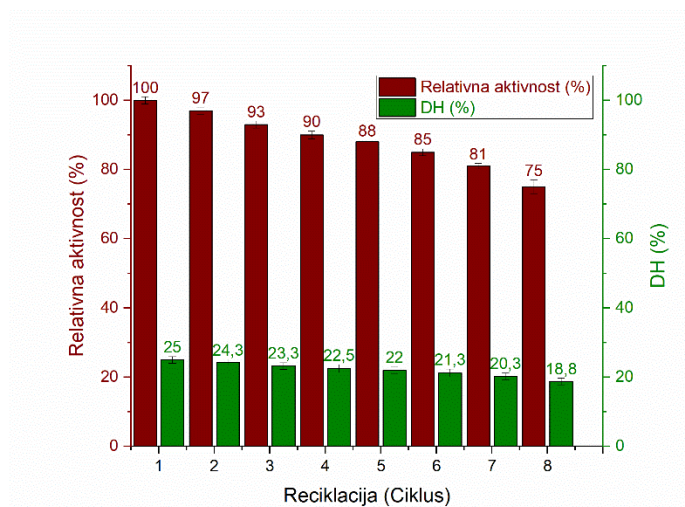
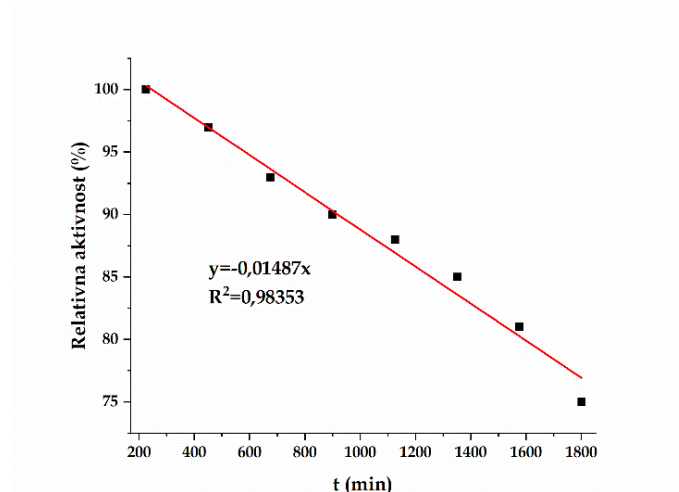
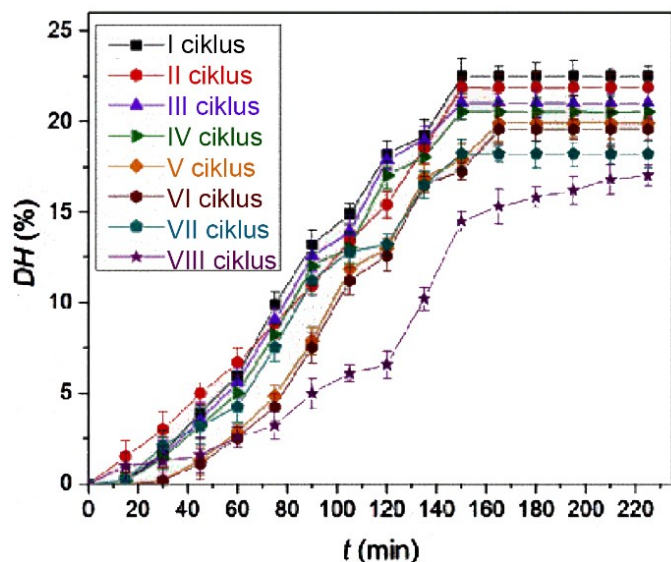
Na osnovu svega navedenog, katalitički mehanizam hidrolize proteina iz izolata soje i belanceta je prikazan na šemi 5.

III.3.2 Recikliranje, stabilnost i ponovna upotreba imobilisana alkalaze

Sa industrijskog stanovišta, upotreba imobilisanih enzima je ekonomski isplativa, jer se mogu reciklirati na kraju ciklusa hidrolize i ponovo upotrebiti, dok se slobodni enzimi moraju inaktivirati da bi se reakcija zaustavila, najčešće zagrevanjem. Tako je izvodljivost hidrolize sojinih proteina u uzastopnim ciklusima, alkalazom imobilisanom na 0,4% UAD submikronskim česticama, procenjena tokom 8 ciklusa, koji su obuhvatali period duži od 15 dana, dok se imobilisani enzim izvan operativnih uslova čuvao na 4°C u 50 mM Tris-HCl puferskom rastvoru (pH vrednosti 8,5), koji je sadržao 0,2 M rastvor CaCl_2 . Rezultati su prikazani na slici 79a. Fitovanjem trenda relativne aktivnosti u zavisnosti od dužine trajanja ciklusa linearnom funkcijom, moguće je proceniti polужivot biokatalizatora (slika 79b). Relativna aktivnost predstavlja procenat početne aktivnosti koju je zadržao biokatalizator nakon ponovljenog ciklusa hidrolize (8 ciklusa). Na slici 79c je prikazana relativna aktivnost biokatalizatora i stepen hidrolize postignut tokom svakog ciklusa reciklaže.

Aktivnost je postepeno opadala, pokazujući polужivot od 3792,3 min (63,2 h) što odgovara za 16,8 ciklusa hidrolize. Naime, imobilisana alkalaza je zadržala aktivnost tokom 7 narednih ciklusa hidrolize (1575 min), nakon kojih je gubitak aktivnosti postao značajniji. Ovo smanjenje aktivnosti enzima može se pripisati curenju enzima tokom procesa hidrolize, odvajanja i pranja ili deaktivaciji enzima inhibicijom sa supstratom i proizvodima. Štaviše, deaktivacija enzima mešanjem takođe može doprineti gubitku aktivnosti. Imobilisana alkalaza je bila stabilna najmanje 15 dana skladištenja pod navedenim uslovima.

Primećeno je da su imobilisani enzimi na alginatnim česticama stabilni tokom skladištenja. Npr. pektinaza zarobljena u alginatnim česticama zadržala je svoju početnu enzimsku aktivnost do 11 nedelja, dok je liofilizovani biokatalizator zadržao svoju prvobitnu aktivnost čak i nakon 8 meseci skladištenja.¹⁰⁰⁵ Konačno, pokazalo se da je hidroliza sojinog proteina alkalazom poboljšala njegov nutritivni sadržaj, tehno funkcionalnost i antioksidativnu aktivnost.^{79,1006} Međutim, treba uzeti u obzir i bezbednosni aspekt bioaktivnih peptida.⁸⁰ Iako su ovi preliminarni rezultati otkrili da alkalaza imobilisana na UAD alginatnim česticama može biti interesantna za hidrolizu proteina iz hrane, kako bi se poboljšale performanse imobilisane alkalaze moraju se sprovesti dodatna ispitivanja o karakteristikama hidrolizata, karakterizacija biokatalizatora, kao i mogući bezbednosni problemi bioaktivnih peptida.



c)

Slika 79. (a) Stabilnost imobilisane alkalaze na 0,4% UAD čestice pri reciklaciji biokatalizatora u 8 ciklusa za hidrolizu proteina iz izolata soje. Svaki ciklus je trajao 225 min. Reakcioni uslovi: 1% vodeni rastvor izolata soje (*w/w*) (2,4 mg mL⁻¹, sadržaj proteina), 50 °C, pH 8,0, mešanje 240 rpm (b) Relativna aktivnost u funkciji od vremena (c) Relativna aktivnost i stepen hidrolize (DH) pri 8 ciklusa reciklaže

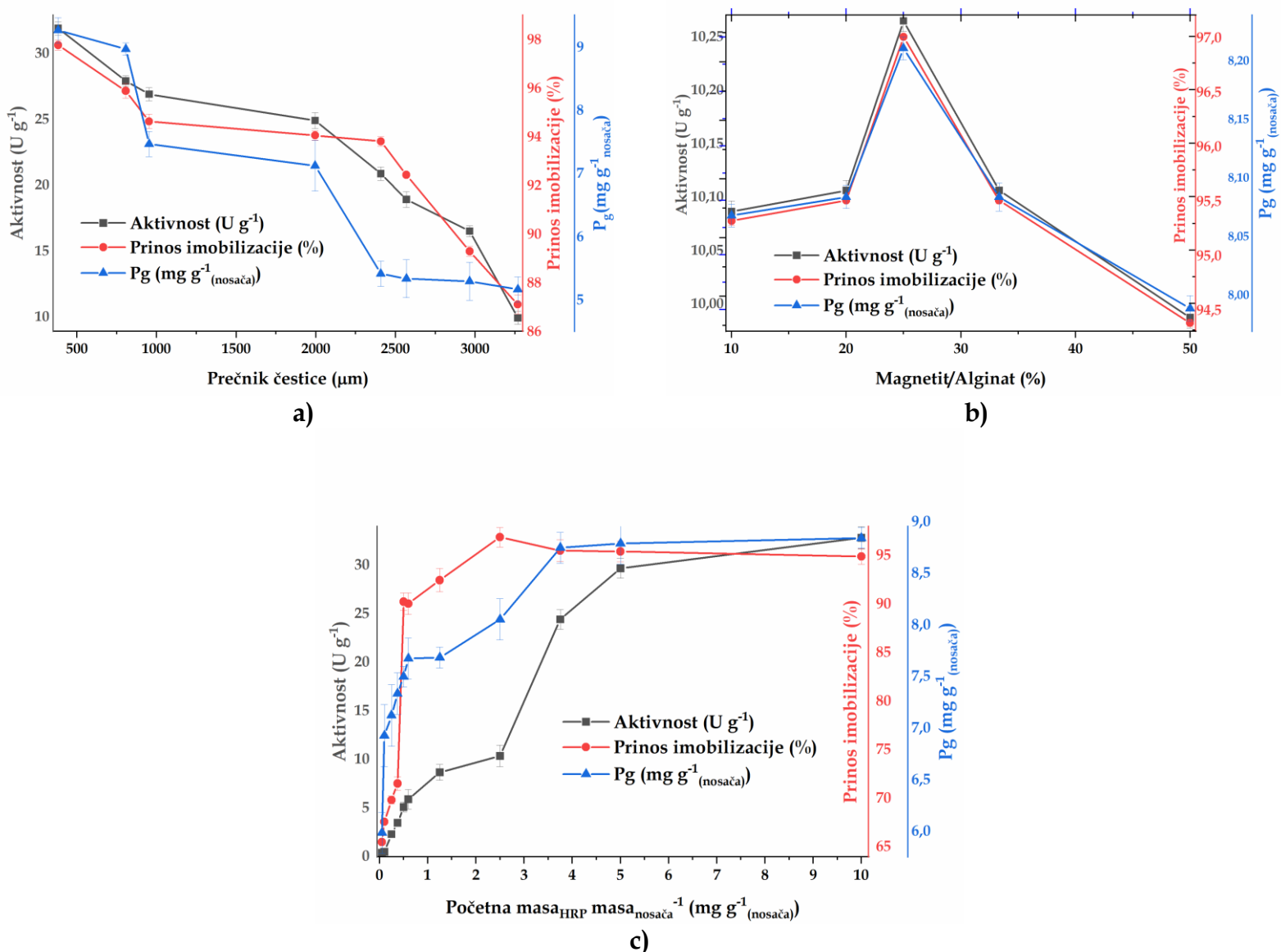
III.4. OPTIMALNI USLOVI ZA IMOBILIZACIJU HRP-C NA MAB ČESTICE

III.4.1 Uticaj uslova pri proizvodnji MAB čestica i imobilizaciji HRP-C na enzimsku aktivnost, ukupan sadržaj proteina i efikasnost imobilizacije

Kovalentna imobilizacija HRP-C na MAB čestice je izvedena formiranjem amidne veze korišćenjem karbodiimida (EDAC) kao aktivirajućeg agensa. Hemija kovalentne imobilizacije HRP-C preko amino grupa enzima i karboksilne grupe alginata je predstavljena na slici 72. Kao što je prikazano, EDAC reaguje sa karboksilnim grupama alginata na površini MAB čestica formirajući O-acilizourea međuproizvod. Ovaj intermedijer, naime

aktivirano karboksilno jedinjenje, brzo reaguje sa amino grupom enzima da bi se formirala amidna veza i oslobađa izoureu kao nusproizvod (slika 72).

Efikasnost imobilisanog enzima je testirana i sa modelnim supstratom (pirogalol) i sa realnim supstratom, simuliranom otpadnom vodom koja sadrži sintetičke boje. Efekti veličine HRP-MAB čestica (slika 80a), masenog odnosa mag-alginata (1:10–1:2) (slika 80b) i početnog odnosa enzim/nosač (0,05–10 mg g⁻¹) (slika 80c) na efikasnost imobilizacije (prinos i ukupan sadržaj vezanih proteina) i aktivnosti HRP-MAB biokatalizatora su ispitani najpre preko aktivnosti u standardnoj reakciji sa pirogalolom, da bi se odredili optimalni uslovi imobilizacije.



Slika 80. Uticaj (a) prečnika HRP-MAB čestice; (b) odnosa magnetit/alginat i (c) početne mase HRP-C po masi nosača na aktivnost, prinos imobilizacije i masu vezanih proteina po g nosača

Aktivnost HRP-MAB biokatalizatora varirala je od zanemarljive do $\sim 32 \text{ Ug}^{-1}_{\text{nosača}}$, u zavisnosti od uslova imobilizacije. Prinos imobilizacije je bio u opsegu 65–98%. Kao što se očekivalo, smanjenjem veličine MAB čestica dobili smo veći prinos imobilizacije sa HRP-C, što se poklapalo sa povećanjem aktivnosti enzima (slika 80a). Shodno tome, najviše vezanih proteina $9,8 \text{ mg g}^{-1}_{\text{nosača}}$ i najveća aktivnost koja je dostignuta od 32 Ug^{-1} postignuta je sa najmanjim česticama. Drugi istraživači su takođe izvestili o povećanju aktivnosti imobilisanog enzima sa smanjenjem veličine čestica usled manjeg otpora pri prenosu mase.^{51,977}

Ovde treba naglasiti da je proces elektrostatičke ekstruzije kroz najužu iglu (25G) bio praćen čestim začepljenjem igle, što je drastično produžavalo proces proizvodnje MAB čestica. Zbog toga su čestice prosečnog prečnika $\sim 1 \text{ mm}$ (koje su dobijene nakon završetka procesa imobilizacije HRP-C), koje su prikazale drugi najbolji rezultat efikasnosti imobilizacije (dobijene korišćenjem igle 22G), odabrane kao optimalne i korišćene u daljoj analizi.

Što se tiče dejstva čestica magnetita, povećanjem mase magnetita u rastvoru magnetit/alginat dovelo je do povećanja prinosa imobilizacije i aktivnosti (slika 80b), ali samo do odnosa magnetit/alginata 1:4. Dalje povećanje mase magnetita u rastvoru imalo je suprotan efekat. Moguće je da je do ovog efekta došlo zato što su karboksilne grupe alginata postale manje dostupne za aktivaciju zbog prisustva čestica magnetita u većoj količini na površini nosača, čime su ponovo ograničena aktivna mesta za vezivanje enzima.

Pošto kovalentno vezivanje enzima za nosač ne zavisi samo od svojstava MAB čestica, već i od koncentracije enzima, sprovedeni su dalji eksperimenti da bi se utvrdili efekti početne koncentracije HRP-C u rastvoru za imobilizaciju na ukupan sadržaj vezanih proteina, aktivnost HRP-MAB čestica i prinos imobilizacije. U tu svrhu korišćene su MAB čestice dobijene pri optimalnim uslovima (22 Gee i magnetit/alginat odnos 1:4), dok je početna koncentracija HRP-C varirana u opsegu $12,5$ do 2500 mg L^{-1} (odnos enzim/nosač $0,05$ – $10 \text{ mg g}^{-1}_{\text{nosača}}$) (slika 80c). Sa povećanjem početne koncentracije enzima, prinos imobilizacije se prvo brzo povećao na $96,9\%$, a zatim je utvrđena postepena stagnacija pri koncentraciji od $2,5 \text{ mg g}^{-1}_{\text{nosača}}$, što ukazuje na zasićenje nosača (slika 80c).

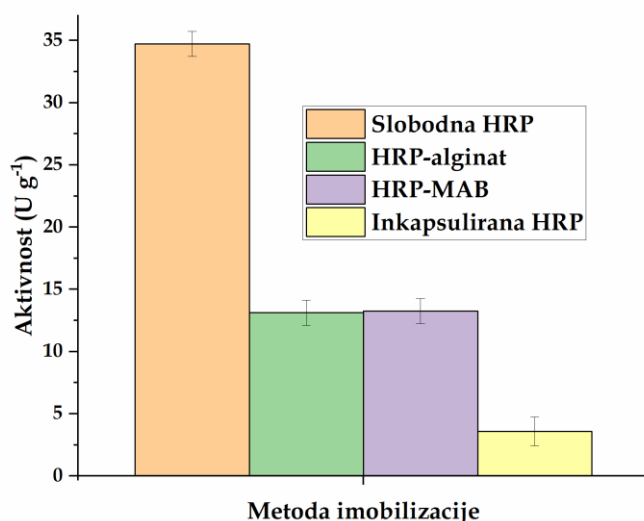
Pri optimalnim uslovima, $8,9 \text{ mg}$ HRP-C je imobilisano na svaki gram nosača, čime je postignut prinos imobilizacije $94,9\%$ i aktivnost biokatalizatora je bila $32,8 \text{ U g}^{-1}_{\text{nosača}}$ (slika 80c). Ovi rezultati su slični ili povoljniji u poređenju sa prijavljenim u literaturi za HRP-C imobilisanu na druge nosače. Radi poređenja, maksimalno vezivanje HRP-C od $4,8 \text{ mg g}^{-1}_{\text{nosača}}$ i $3,3 \text{ mg g}^{-1}_{\text{nosača}}$ postignuto je sa komercijalnom smolom (*Purolite® A109*) adsorpcijom i kovalentnom imobilizacijom, respektivno.⁹³

Utvrđeno je da je maksimalni kapacitet adsorpcije HRP-C na kaolin $4,63 \text{ mg g}^{-1}_{\text{nosača}}$.⁹⁷⁶ Međutim, kada se uporedi aktivnost HRP-MAB čestica sa vrednostima postignutim u literaturi za isti tip peroksidaze, nekoliko istraživača je opisalo slične ili bolje rezultate, u rasponu od ~ 5 do $\sim 85 \text{ Ug}^{-1}$.^{93,976} Problemi usled sternih smetnji koji se često povezuju sa velikom vrednošću ukupno vezanih proteina na nosač su moguće objašnjenje za odstupanje od nekih očekivanih vrednosti.

Ispitana je aktivnost nekoliko biokatalizatora i upoređene su vrednosti. Tako, aktivnost HRP-MAB čestica je upoređena sa aktivnošću HRP-C kovalentno imobilisane na prazne čestice alginata (dobijenih korišćenjem igle 22G_{ee}), inkapsulirane HRP-C u čestice MAB pod istim uslovima, kao i odgovarajućom količinom slobodne HRP-C (slika 81). Inkapsulacija HRP-C u MAB čestice izvedena je odvojeno pod istim uslovima (prečnik

čestice ~1 mm, odnos magnetit/alginata 1:4, početni odnos enzim/nosač 2,5 mg g⁻¹_{nosača}). Ove dve vrste imobilizacije su sprovedene da bi se uporedile kako različite tehnike i mikro-rokoline imobilisanog enzima utiču na katalitičke aktivnosti biokatalizatora i utvrdilo koji biosistem je efikasniji u procesu dekolorizacije antrahinonskih boja.

Kao što se očekivalo, zbog izlaganja enzima hemijskom tretmanu tokom imobilizacije i ograničenja prenosa mase u heterogenom imobilisanom sistemu, slobodna HRP-C je imala najveću aktivnost od 34,7 U (8,9 mg), što odgovara specifičnoj aktivnosti od 3,9 U mg⁻¹_{enzima}). Strukturne i konformacione promene u molekulu enzima nakon imobilizacije takođe mogu izazvati promenu katalitičkih svojstava enzima. Pošto nijedan hemijski agens za razdvajanje nije bio uključen u korak imobilizacije, moguće da su molekuli enzima bili previše blizu nosača što je izazvalo strukturne promene ili smanjilo konformacionu fleksibilnost molekula enzima zbog vezivanja preko većeg broja funkcionalnih grupa ili smanjilo dostupnost aktivnih mesta molekula. Štaviše, kovalentna imobilizacija može da izazove promenu mikrookruženja enzima i efekte raspodele, posebno kada je nosač negativno naelektrisan poput čestica alginata na pH vrednosti reakcije. Kada je analizirana zadržana aktivnost imobilisanog enzima (odnos specifične aktivnosti imobilisanog enzima i slobodnog), pokazalo se da su HRP-MAB čestice zadržale 38,3% od početne aktivnosti.



Slika 81. Uticaj metode imobilizacije na aktivnost imobilisane HRP-C i poređenje sa aktivnošću slobodne HRP-C pri istim uslovima

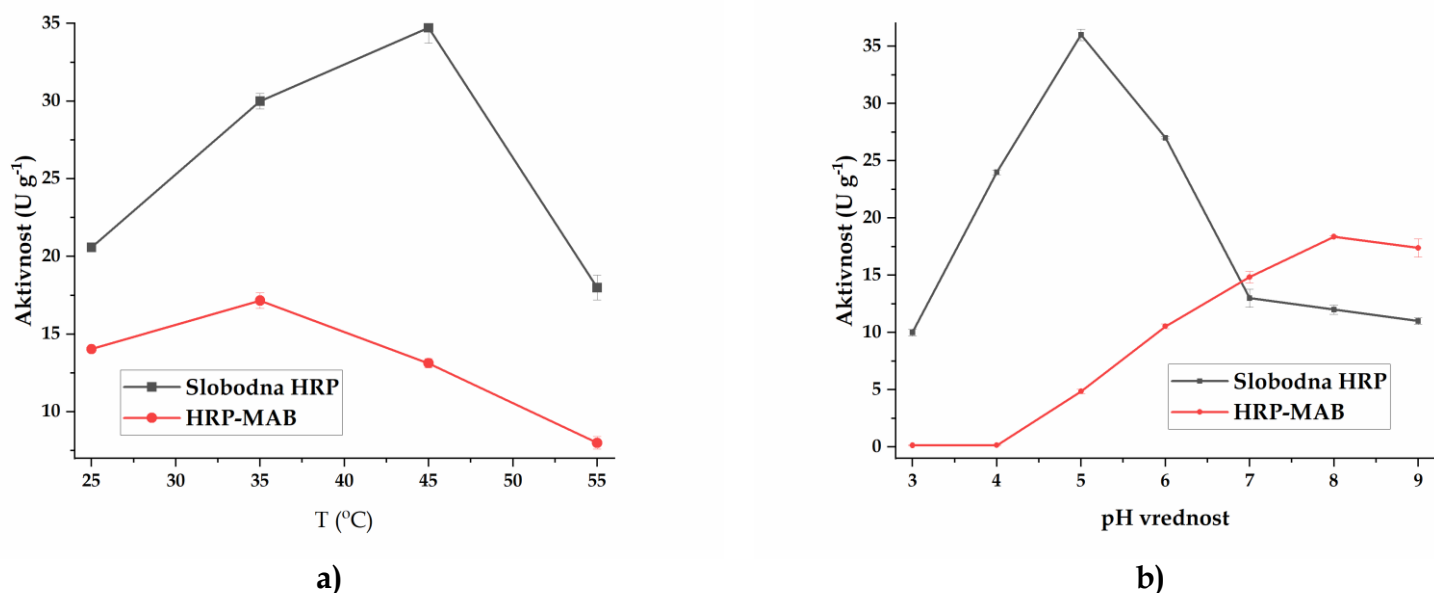
Inkapsulacija HRP-C u MAB čestice dala je veći prinos imobilizacije, ali skoro 4 puta nižu aktivnost od kovalentno imobilisane HRP-C na MAB. Niža aktivnost inkapsulirane HRP-C može se objasniti preopterećenjem enzima i blokiranjem aktivnih mesta imobilisanog enzima pri višim koncentracijama enzima. Štaviše, značajna ograničenja difuzije su uobičajena za imobilizaciju unutar nosača i uprkos visokim prinosima imobilizacije, zabeležena je smanjena aktivnost enzima i relativno nizak stepen konverzije.¹⁰⁰⁷

Masa vezanih proteina na nosač, prinos imobilizacije i aktivnost za HRP-C imobilisanu na prazne čestice alginata bili su 8,76 mg g⁻¹_{nosača}, 91,2% i 13,1 U g⁻¹, respektivno, što je bilo nešto niže nego za HRP-MAB čestice, 8,89 mg g⁻¹_{nosača}, 94,8% i 13,3 U g⁻¹, respektivno.

Ove nešto bolje vrednosti mogle su se postići zbog sinergijskog doprinosa magnetita sa i-mobilisanom HRP-C. Dakle, uprkos dokazima da je aktivnost HRP-C bila veća u prisustvu čestica magnetita,¹⁰⁰⁸ nije bilo značajnog poboljšanja aktivnosti HRP-C u našem sistemu. Međutim, magnetne nanočestice mogu poboljšati stabilnost i ponovnu upotrebu biokatalizatora zbog brzog odvajanja biokatalizatora iz rastvora i lake manipulacije spoljnim magnetnim poljem.

III.4.2 Uticaj pH vrednosti i temperature na aktivnost HRP-MAB čestica i slobodne HRP-C

Uticaj temperature i pH vrednosti na aktivnost slobodne HRP-C i HRP-MAB čestica prikazani su na slici 82.



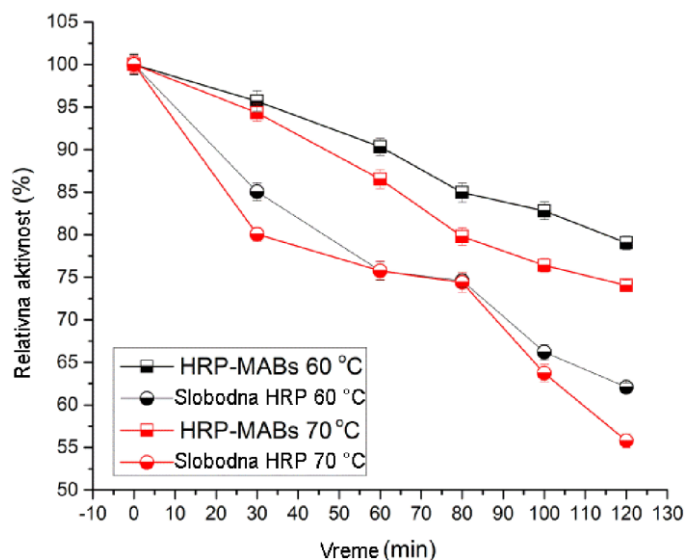
Slika 82. Uticaj (a) temperature i (b) pH vrednosti na aktivnost slobodne HRP-C i HRP-MAB čestica

Pokazalo se da HRP-MAB čestice imaju različite pH vrednosti i temperaturne profile u odnosu na slobodan enzim. Optimalna temperatura je pala sa 45 °C na 35 °C nakon imobilizacije (slika 82a), ali optimalna pH vrednost se pomerila na baznu stranu, pokazujući odličnu aktivnost HRP-MAB čestica pod ekstremnijim uslovima pH vrednosti (slika 82b).

Povećanje aktivnosti HRP-MAB na višim pH vrednostima može biti posledica elektrostatičkih interakcija između H⁺ iz rastvora i negativnog površinskog naelektrisanja anjonske polimerne matrice alginata. Efekti odvajanja H⁺ i OH⁻ mogu izazvati značajnu razliku između pH vrednosti mikrookruženja HRP-MAB i pufereskog rastvora, što kao rezultat ima pomeranje optimalne pH vrednosti ka baznoj sredini. Veća aktivnost imobilisane HRP-C na višem pH vrednostima takođe može objasniti različitu specifičnu aktivnost HRP-MAB čestica za razliku od slobodnog enzima, pošto je standardni test izveden pri pH vrednosti 7.

III.4.3 Termička stabilnost slobodne HRP-C i HRP-MAB čestica

Eksperimenti termičke stabilnosti su izvedeni sa slobodnom HRP-C i HRP-MAB česticama koje su inkubirane u odsustvu supstrata na 60 °C i 70 °C, a rezultati su prikazani na slici 83.



Slika 83. Termička stabilnost slobodne HRP-C i HRP-MAB čestica

Uočeno je da se termička stabilnost HRP-C značajno poboljšana kovalentnom imobilizacijom zbog činjenice da su kovalentne veze između HRP-C i nosača stabilizovale strukturu molekula enzima čak i na višoj temperaturi, zadržavajući njegovu aktivnu konformaciju. Očigledno je da su HRP-MAB čestice tretirane na 70 °C tokom 2 sata zadržale aktivnost od $74,05 \pm 0,6\%$, dok je slobodna HRP-C izgubila skoro 45% od početne aktivnosti pri ovim uslovima. Ovu hipotezu potvrdili su i drugi autori.^{45,46}

III.5. PRIMENA HRP-MAB ČESTICA ZA UKLANJANJE ANTRAHINONSKIH BOJA AV109 I AB225

Uslovi reakcija za optimizaciju procesa uklanjanja boja AB225 i AV109 i efekti na proces uklanjanja boje u toku vremena (veličina HRP-MAB čestica, odnos magnetit/alginat, početna koncentracija HRP-C, masa HRP-MAB čestica, pH vrednosti rastvora boja, temperatura odvijanja reakcije, početna koncentracija vodonik-peroksida i početna koncentracija boja) prikazani su u tabeli 15 i slici S2 (videti prilog 1).

III.5.1 Optimalni uslovi za proces uklanjanja boja AV109 i AB225

Nakon optimizacije procesa imobilizacije HRP-C na MAB čestice, pristupili smo ispitivanju aktivnosti i stabilnosti imobilisane HRP-C u reakcijama uklanjanja boja, AB225 i AV109 antrahinonskih boja, koje spadaju u grupu teško biorazgradivog otpada. Generalno,

očekivano je da se uklanjanje boje korišćenjem enzima imobilisanog na alginatne čestice može postići jednim od dva mehanizma, enzimskom biorazgradnjom ili bioakumulacijom/biosorpcijom boje na alginatne čestice.⁹⁷⁷ Stoga su prazne MAB čestice primenjene u reakciji uklanjanja boje pod istim reakcionim uslovima kao sa HRP-MAB česticama. Potvrda da je degradacija boje sa HRP-C bila dominantan mehanizam je činjenica da su prazne MAB čestice bile u stanju da uklone samo 5–11% boja. Pored toga, uočili smo da su rastvori obe boje stabilni nakon izlaganju samo vodonik-peroksidu, što pokazuje da je uklanjanje boje rezultat enzimske reakcije zavisne od vodonik-peroksida.

Slobodne peroksidaze pokazuju veći procenat uklanjanja boje, za različite boje u poređenju sa imobilisanim, ali ponovna upotreba i stabilnost čine imobilisanu peroksidazu efikasnijim biokatalizatorom.^{93,975,977,1007} Podaci iz literature o efikasnosti imobilisane HRP-C u tretmanu obojenih otpadnih voda su raznovrsni i kreću se od ~70% do ~90% u zavisnosti od postavke imobilizacije i vrste boje.^{93,977}

U ovom istraživanju, svi imobilisani HRP-C preparati su testirani u reakcijama uklanjanja obe boje i dobijene reakcione krive su potvrdile naše zaključke o katalitičkom ponašanju HRP-MAB čestica u zavisnosti od veličine i mase vezanog enzima (slika S3, videti prilog 1). Male HRP-MAB čestice (1 mm, magnetit/alginat 1:4, početne koncentracije HRP-C 10 mg g⁻¹_{nosača}) omogućile su najveći procenat uklanjanja boje od 76,3% za AB225 i 75,7% za AV109 pod specifičnim reakcionim uslovima (početna koncentracija boje 0,1 g_(HRP-MAB)mg⁻¹_{boje} (odnos masa biokatalizatora/masa boje), početne koncentracija vodonik-peroksida 0,097 mM).

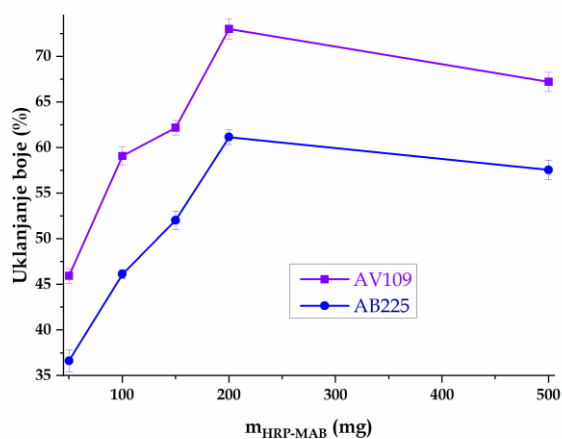
Kao sledeći zadatak, istražen je uticaj specifičnih reakcionih uslova (masa biokatalizatora, početna koncentracija boje i početna koncentracija vodonik-peroksida) na prinos konverzije (procenat uklanjanja boje) u cilju uspostavljanja optimalnih uslova za reakcije uklanjanja boja sa HRP-MAB česticama.

Procenat uklanjanja boje je očigledno zavisio od mase biokatalizatora (izražene kao g čestica po mg boje) korišćenog u reakciji (slika 84a).

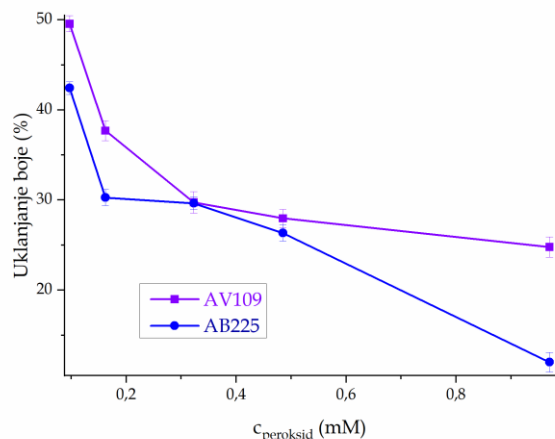
Povećanje mase sa 0,025 na 0,1 g mg⁻¹ rezultiralo je efikasnijom dekolorizacijom u slučaju obe boje, a maksimalni procenat dekolorizacije je bio 73% i 61% za AV109 i AB225 respektivno, postignut sa 0,1 g mg⁻¹_(HRP-MAB) (ekvivalentno do 0,25 mg imobilisane HRP-C po mg boje) nakon samo 10 minuta kontakta između čestica i boje. Dodavanje više HRP-MAB (0,25 g mg⁻¹) izazvalo je smanjenje efekta na uklanjanje boje, što je ukazivalo na zasićenje enzima supstratom.

Uticaj početne koncentracije vodonik-peroksida ispitivan je variranjem u opsegu 0,097–0,97 mM. Povećanjem početne koncentracije vodonik-peroksida, uočen je pad procenta uklanjanja boja, a optimalna početna koncentracija vodonik-peroksida za reakciju dekolorizacije bila je 0,097 mM za obe boje (slika 84b). Takođe je evidentno da je inhibitorski efekat HRP-C kosupstrata bio izraženiji u slučaju AB225 nego AV109, pošto je uočen pad od 42% prema 12% od maksimalne aktivnosti sa povećanjem koncentracije vodonik-peroksida na 0,97 mM.

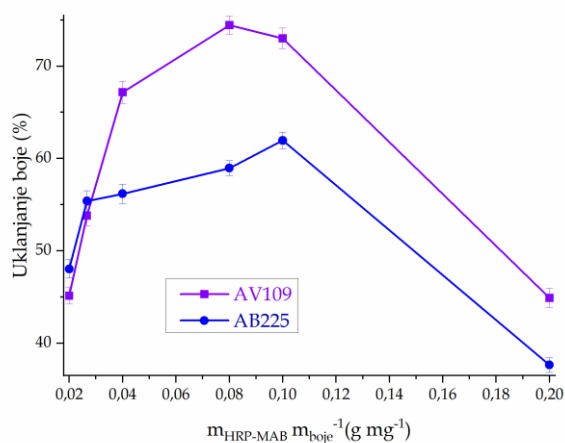
Poređenja radi, HRP-C imobilisana na kaolin pokazala je optimalnu koncentraciju vodonik-peroksida od 0,2 mM.⁹⁷⁶ Barbosa (*Barbosa*) i saradnici su pokazali da interakcija između magnetita i vodonik-peroksida može biti odgovorna za inaktivaciju HRP-C.¹⁰⁰⁹



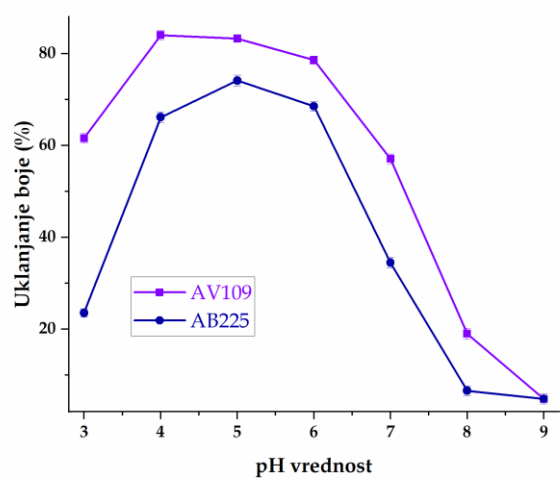
a)



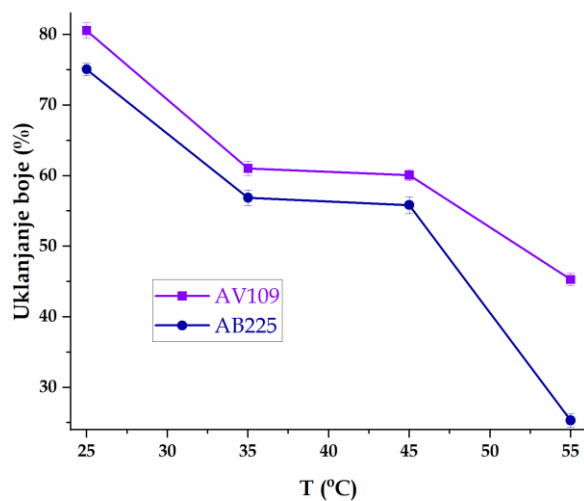
b)



c)



d)



e)

Slika 84. Efekti (a) mase HRP-MAB čestica; (b) početne koncentracije vodonik-peroksida; (c) koncentracije boje (d) pH vrednost rastvora boja (e) temperature procesa na proces uklanjanja boja AB225 i AV109; uslovi pri kojima su izvođene reakcije uklanjanja boja prikazani su u tabeli 15

Korišćeni su različiti pristupi kako bi se izbegao inhibitorni efekat vodonik-peroksida, uključujući dodavanje glukoze oksidaze. Glukoza oksidaza proizvodi vodonik-peroksida samo u dozama neophodnim za reakciju i može se izbeći inhibicioni efekat veće koncentracije vodonik-peroksida.¹⁰¹⁰

Kondenzovani aromatični prstenovi i rezonantni efekti u aromatičnim strukturama antrahinonskih boja, čine ih težim za uklanjanje iz rastvora od azo boja. Ove boje su postojane hemikalije, jer se kod njih veze ugljenik-ugljenik moraju prekinuti, što je teže postići od kidanja azotnih veza u azo bojama zbog njihove manje elektronegativnosti.¹⁰¹¹ Zbog specifičnosti supstrata, ispitivan je uticaj početne koncentracije boje (0,02–0,2 g mg⁻¹ odnos čestice/boja) na efikasnost procesa obezbojavanja. Sa slike 84c smo zaključili da su testirane antrahinonske boje pokazale inhibitorni efekat na imobilisanu HRP-C. Procenat uklanjanja obe boje sa HRP-MAB česticama se povećao povećanjem koncentracije boje sa 0,08 na 0,1 g mg⁻¹ za AV109 i AB225, respektivno, a zatim se postepeno smanjivao.

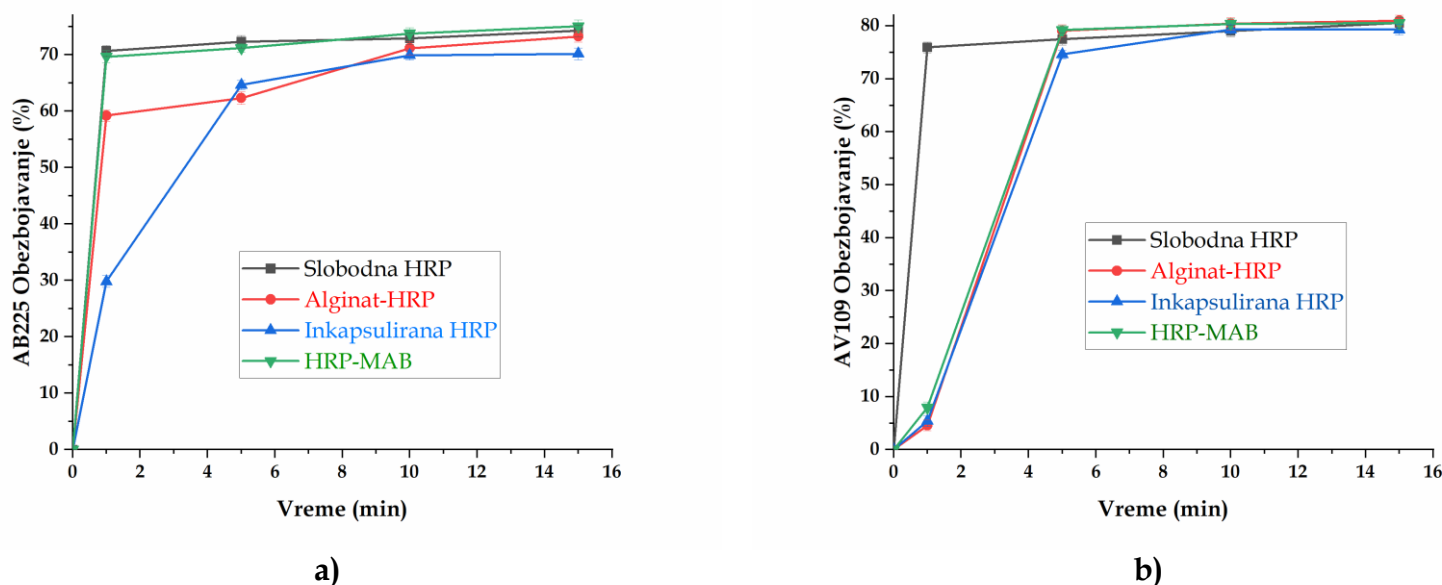
Uočili smo da su HRP-MAB čestice pokazale veći afinitet prema AV109 nego AB225 i maksimalnu koncentraciju AV109 koja se može obezbojiti u visokom procentu (>65%) pod određenim uslovima (čestice prečnika 1 mm, odnos magnetit/alginata 1:4, početna koncentracije HRP-C 2,5 mg g⁻¹ nosača, početna koncentracija vodonik-peroksida 0,097 mM) bila je 0,04 g mg⁻¹ (odnos čestice/boja).

Uticaj pH vrednosti rastvora boja koncentracije 0,07 g mg⁻¹ na uklanjanje boja AV109 i AB225 prikazan je na slici 84d. Definisani optimum pH vrednosti u opsegu od 4 do 5 bio je očigledan za obe boje sa zvonastim krivama. Uočili smo značajno smanjenje procenta uklanjanja boja u opsegu pH vrednosti nižem od 3,6 ili višem od 6, što se može pripisati pH-zavisnoj aktivnosti HRP-C.¹⁰¹² Jedan od razloga zašto se pri pH vrednostima iznad 6 i ispod 3,6 mala količina boje uklanja je taj što supstrati mogu imati jonizujuće grupe i samo na jedan od jonizovanih oblika supstrata može delovati HRP-C, a u tom obliku enzim ne može pokazati njegovu katalitičku aktivnost. Smanjenje specifične aktivnosti enzima, jer enzim može značajno da promeni svoju strukturu, može se primetiti i na bazičnoj i na kiseljoj strani ovog optimuma pH vrednosti.⁹⁷⁵ Dobro je poznato da ispod pH vrednosti 4, oslobađanje hem grupe sa aktivnog mesta enzima zavisi od pH vrednosti i da se javlja brže, što dovodi do gubitka aktivnosti HRP-C.¹⁰¹³ Sa slike 84d vidimo da je optimalna pH vrednost rastvora boje bila 4 i 5 za AV109 i AB225, respektivno.

U opsegu 25–55 °C ispitivan je uticaj temperature na uklanjanje boja (slika 84e). Za obe boje profil degradacije je bio sličan. Sa povećanjem reakcione temperature, primećeno je brzo smanjenje procenta uklanjanja boja. Optimalna temperatura za razgradnju obe boje bila je 25 °C.

Nakon dobijanja optimalnih uslova za reakciju uklanjanja boja (~1 mm HRP-MAB čestice, magnetit/alginat odnos 1:4, početna koncentracija HRP-C 10 mg g⁻¹ (odnos enzim/nosač), koncentracija boje od 0,08 g mg⁻¹ i 0,1 g mg⁻¹ (HRP-MAB/boja odnos) za AV109 i AB225, respektivno, početna koncentracija vodonik-peroksida 0,097 mM, pH vrednosti 4 i 5 za AV109 i AB225, respektivno i temperatura 25 °C) uporedili smo efekat obezbojavanja HRP-MAB česticama sa obezbojavanjem HRP-C kovalentno imobilisanom na alginatne čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom pri istim optimalnim uslovima, inkapsuliranom HRP-C u MAB čestice i slobodnom HRP-C sa istom početnom koncentracijom od 16,9 U (10 mg_{HRP} g_{nosač}⁻¹) (slika 85).

Sa slike 85 možemo videti da je za obe boje slobodna HRP-C postigla skoro maksimalno obezbojenje za 1 min. Pri uklanjanju AB225 boje sa HRP-MAB česticama postigli smo skoro isti procenat obezbojenja za 1 min kao i sa slobodnom HRP-C, a krajnji procenat obezbojenja je bio skoro isti. Za uklanjanje AV109 boje, reakcija je bila malo sporija, ali finalni procenat obezbojenja je bio približno isti nakon 15 min. Inkapsulirana HRP-C je pokazala najnižu aktivnost i najsporiju reakciju sa obe boje. HRP-C imobilisana na alginatne čestice je sporije reagovala u odnosu na HRP-MAB čestice, ali sa približno istim procentom obezbojenja nakon 15 min. Možemo pretpostaviti da su HRP-MAB čestice brže reagovala usled sinergijskog doprinosa magnetita u HRP-MAB česticama pri procesu obezbojenja. Na osnovu poređenja rezultata na slici 85, možemo zaključiti da su pri optimalnim uslovima HRP-MAB čestice dobar potencijalni biokatalizator za proces uklanjanja antrahinonskih boja.



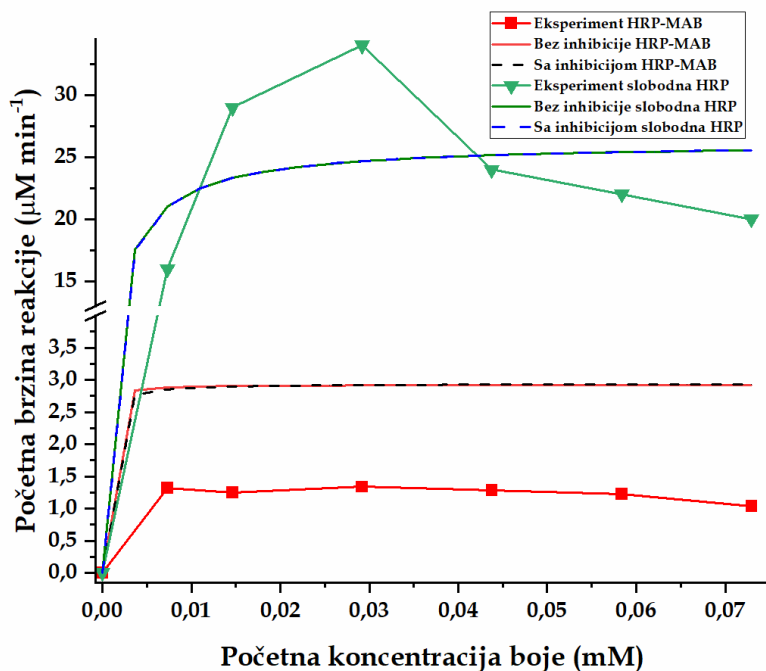
Slika 85. Efekti metode imobilizacije HRP-C pri istoj početnoj koncentraciji enzima ($10 \text{ mg}_{\text{enzima}} \text{ g}^{-1}_{\text{nosača}}$) na proces uklanjanja boja (a) AB225 (b) AV109

III.5.2 Određivanje kinetičkih konstanti pri reakcijama uklanjanja boja AB225 i AV109 slobodnom i imobilisanom HRP-C

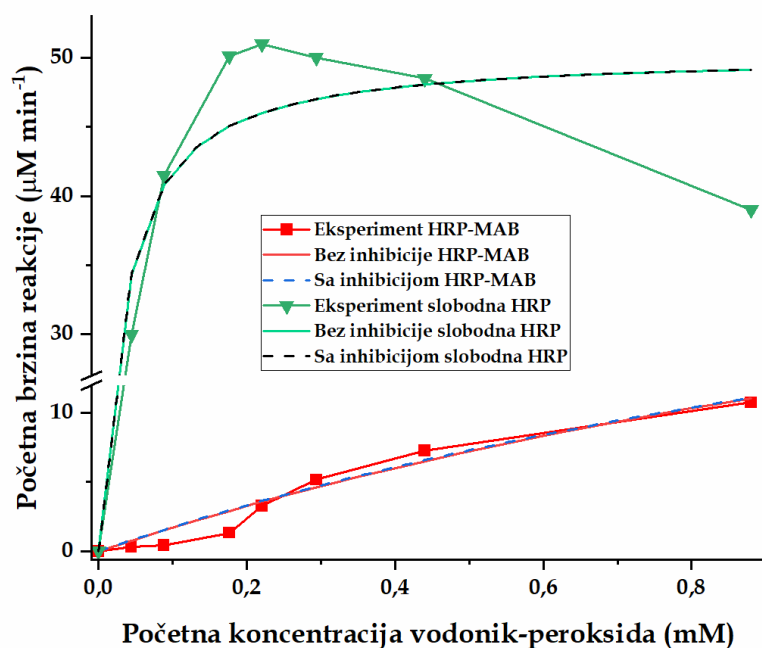
Početna kinetika je ispitana variranjem koncentracije jednog supstrata, dok je konstantnom održavana koncentracija drugog supstrata pri optimalnim uslovima reakcije ($\sim 1 \text{ mm}$ HRP-MAB čestice, magnetit/alginat odnos 1:4, početna koncentracija HRP-C $10 \text{ mg}_{\text{HRP}} \text{ g}_{\text{nosača}}^{-1}$ ($16,9 \text{ U}$ ili $32,8 \text{ U g}_{\text{nosača}}^{-1}$), pH vrednost 4 i 5 za AV109 i AB225, respektivno i temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

Eksperimentalno dobijeni podaci su fitovani odgovarajućim matematičkim modelima korišćenjem aplikacije *Enzyme Kinetics 1.10* u *OriginLab*-ovom *Origin 2022* softveru i odabrane su vrednosti kinetičkih konstanti za modele sa najvećim koeficijentom poklapanja (R^2) koji su konvergovali i rezultati su prikazani u tabeli 20 i na slici 86 za AB225 kao i slici 87 za AV109, dok su u prilogu prikazane sve zavisnosti početne brzine reakcije uklanjanja boja pri konstantnoj početnoj koncentraciji vodonik-peroksida od početne koncentracije boje

i konstantnoj početnoj koncentraciji boje od početne koncentracije vodonik-peroksida na slikama S4 i S5 u prilogu 1.

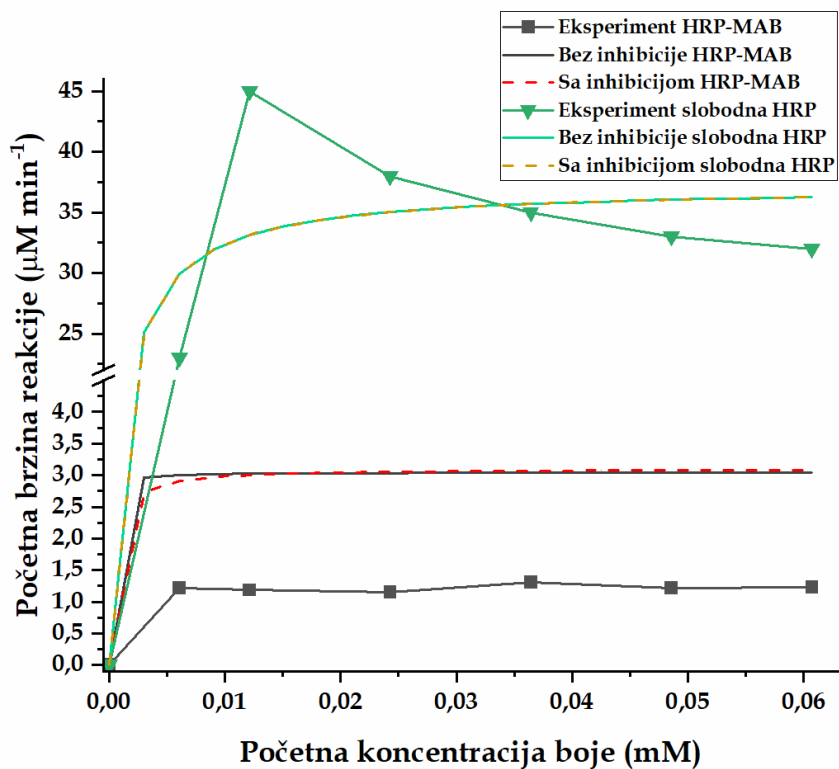


a)

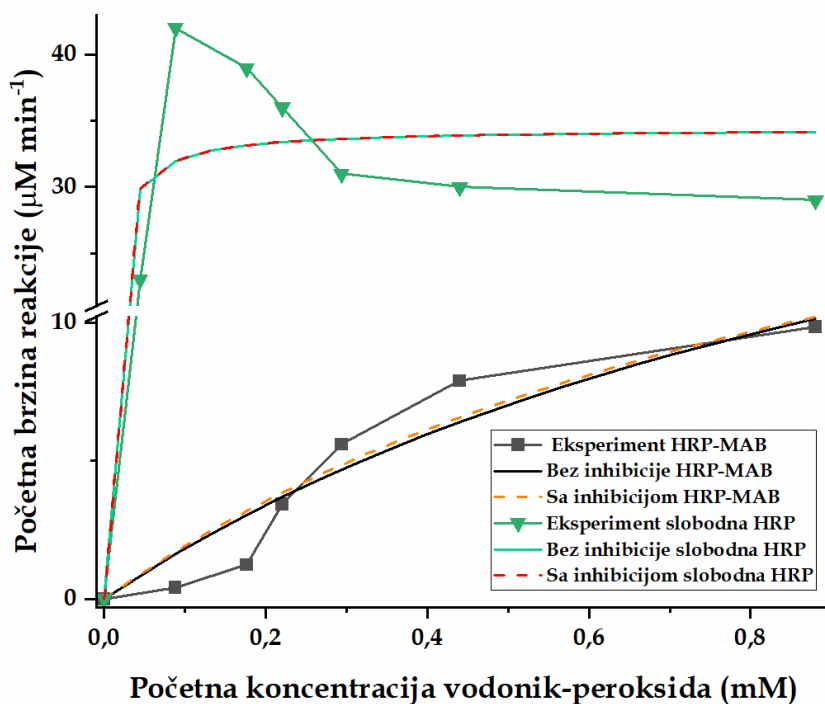


b)

Slika 86. Zavisnost početne brzine reakcije uklanjanja boje AB225 sa slobodnom HRP-C i HRP-MAB česticama pri: (a) konstantnoj početnoj koncentraciji vodonik-peroksida od početne koncentracije boje i (b) konstantnoj početnoj koncentraciji boje od početne koncentracije vodonik-peroksida



a)



b)

Slika 87. Zavisnost početne brzine reakcije uklanjanja boje AV109 sa slobodnom HRP-C i HRP-MAB česticama pri: **(a)** konstantnoj početnoj koncentraciji vodonik-peroksida od početne koncentracije boje i **(b)** konstantnoj početnoj koncentraciji boje od početne koncentracije vodonik-peroksida

Tabela 20. Kinetički parametri za reakcije uklanjanja boja AB225 i AV109 slobodnom i imobilisanom HRP-C fitovani odgovarajućim matematičkim modelima sa najvećim koeficijentom poklapanja R^2 koji su konvergovali

Kinetički parametar	Inhibicija bojom Slobodna HRP-C	Inhibicija bojom HRP-MAB	Bez inhibicije bojom Slobodna HRP-C	Bez inhibicije bojom HRP-MAB	Inhibicija vodonik-peroksidom Slobodna HRP-C	Inhibicija vodonik-peroksidom HRP-MAB	Bez inhibicije vodonik-peroksidom Slobodna HRP-C	Bez inhibicije vodonik-peroksidom HRP-MAB
AV109								
<i>Model</i>	Akompetitivna reverzibilna inhibicija, Supstrat-aktivator kompleks	Parcijalna a-kompetitivna reverzibilna inhibicija, Supstrat-aktivator kompleks	Nesekvencijalni Ping-Pong bi-bi mehanizam	Nesekvencijalni Ping-Pong bi-bi mehanizam	Akompetitivna reverzibilna inhibicija, Supstrat-aktivator kompleks	Parcijalna a-kompetitivna reverzibilna inhibicija, Supstrat-aktivator kompleks	Nesekvencijalni Ping-Pong bi-bi mehanizam	Nesekvencijalni Ping-Pong bi-bi mehanizam
$V, \mu M\ mg^{-1}\ min^{-1}$	37,13	23,99	51,12	24,56	50,29	24,53	126,14	24,53
$K_{m(boja)}, \mu M\ mg^{-1}$	2,02	0,3017	2,01	0,68	6,70	0,3017	720,89	0,68
$K_i, \mu M\ mg^{-1}$	354,13	1164,74	/	/	413,96	273,98	/	/
$K_{m(peroksid)}, \mu M\ mg^{-1}$	622,54	1193,15	50,83	1241,43	624,72	1327,35	24,56	1241,54
R^2	0,8231	0,8642	0,8231	0,8640	0,8022	0,8611	0,8022	0,8542
Kinetički parametar	Inhibicija bojom Slobodna HRP-C	Inhibicija bojom HRP-MAB	Bez inhibicije bojom Slobodna HRP-C	Bez inhibicije bojom HRP-MAB	Inhibicija vodonik-peroksidom Slobodna HRP-C	Inhibicija vodonik-peroksidom HRP-MAB	Bez inhibicije vodonik-peroksidom Slobodna HRP-C	Bez inhibicije vodonik-peroksidom HRP-MAB
AB225								
<i>Model</i>	Akompetitivna reverzibilna inhibicija, Supstrat-aktivator kompleks	Parcijalna ne-kompetitivna reverzibilna inhibicija, Supstrat-aktivator kompleks	Nesekvencijalni Ping-Pong bi-bi mehanizam	Nesekvencijalni Ping-Pong bi-bi mehanizam	Akompetitivna reverzibilna inhibicija, Supstrat-aktivator kompleks	Parcijalna ne-kompetitivna reverzibilna inhibicija, Supstrat-aktivator kompleks	Nesekvencijalni Ping-Pong bi-bi mehanizam	Nesekvencijalni Ping-Pong bi-bi mehanizam
$V, \mu M\ mg^{-1}\ min^{-1}$	47,62	36,61	99,89	38,83	68,39	38,83	53,58	38,84
$K_{m(boja)}, \mu M\ mg^{-1}$	2,48	0,2299	6,88	1,50	11,98	1,5	11,45	1,51
$K_i, \mu M\ mg^{-1}$	387,24	2014,13	/	/	476,55	73,00	/	/
$K_{m(peroksid)}, \mu M\ mg^{-1}$	695,06	2014,27	631,71	2160,46	416,93	2160,43	21,75	2161,05
R^2	0,7345	0,93133	0,7345	0,9316	0,9129	0,9303	0,9129	0,93025

V – maksimalna brzina reakcije, $K_{m(boja)}$ i $K_{m(peroksid)}$ – Mihaelisove konstante za boju i peroksid, K_i – konstante inhibicije boje i peroksida, R^2 – koeficijent poklapanja

Rezultati pokazuju da se proces uklanjanja boje AB225 slobodnom HRP-C i HRP-MAB česticama najviše slaže sa *nesekvencijalnim Ping-Pong bi-bi* mehanizmom, za reakcije bez inhibicije bojom i vodonik-peroksidom. Efikasnost slobodne HRP-C i HRP-MAB pokazuje se kroz koeficijente R^2 , koji su iznosili 0,7345 za slobodnu HRP-C i 0,9316 za HRP-MAB u reakcijama bez inhibicije bojom, te 0,9129 za slobodnu HRP-C i 0,9305 za HRP-MAB u reakcijama bez inhibicije vodonik-peroksidom. Maksimalna početna brzina reakcije bez inhibicije bojom se smanjila usled imobilizacije, sa 99,89 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ na 38,83 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, kao i brzina reakcije bez inhibicije vodonik-peroksidom, koja se smanjila sa 53,58 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ na 38,84 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ nakon imobilizacije.

U reakciji sa inhibicijom bojom, najveće poklapanje bilo je sa modelom akompetitivne reverzibilne inhibicije sa slobodnom HRP-C ($R^2=0,7345$) i modelom parcijalno nekompetitivne reverzibilne inhibicije sa HRP-MAB ($R^2=0,9313$), maksimalna početna brzina reakcije se smanjila imobilizacijom sa 47,62 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ i 36,61 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ za slobodnu HRP-C i HRP-MAB, respektivno.

Pri reakciji kada je vodonik-peroksid inhibitor, najveće poklapanje bilo je sa modelom akompetitivne reverzibilne inhibicije sa slobodnom HRP-C ($R^2=0,9129$) i modelom parcijalno nekompetitivne reverzibilne inhibicije sa HRP-MAB česticama ($R^2=0,9303$), maksimalna početna brzina reakcije se smanjila imobilizacijom sa 68,39 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ na 38,83 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Na osnovu konstanti inhibicije bojom 387,24 $\mu\text{M mg}^{-1}$ za slobodnu HRP-C i 2014,13 $\mu\text{M mg}^{-1}$ za HRP-MAB čestice, kao i konstanti inhibicije vodonik-peroksidom 476,55 $\mu\text{M mg}^{-1}$ za slobodnu HRP-C i 73 $\mu\text{M mg}^{-1}$ za HRP-MAB čestice, primećujemo da je izraženiji inhibitorski uticaj boje kod slobodne HRP-C koji se smanjuje imobilizacijom, dok je za HRP-MAB čestice znatno veći inhibitorski uticaj vodonik-peroksida koji se povećao imobilizacijom.

Poređenjem vrednosti Mihaelisovih konstanti iz tabele 20 za AB225 boju i vodonik-peroksid potvrđujemo veći inhibitorski uticaj boje u odnosu na peroksid. Mihaelisove konstante za boju, pokazuju da se imobilizacijom povećava afinitet biokatalizatora prema boji, a smanjuje prema vodonik-peroksidu.

Rezultati za reakciju uklanjanja boje AV109 slobodnom HRP-C i sa HRP-MAB česticama najviše slaže sa *nesekvencijalnim Ping-Pong bi-bi* mehanizmom, za reakcije bez inhibicije bojom i vodonik-peroksidom. Efikasnost slobodne HRP-C i HRP-MAB pokazuje se kroz koeficijente R^2 , koji su iznosili 0,8231 za slobodnu HRP-C i 0,8640 za HRP-MAB, za reakcije bez inhibicije bojom, te 0,8022 za slobodnu HRP-C i 0,8542 za HRP-MAB, za reakcije bez inhibicije vodonik-peroksidom. Uočeno je smanjenje maksimalne početne brzine reakcije usled imobilizacije, sa 51,12 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ na 24,56 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bez inhibicije bojom, i sa 126,14 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ na 24,53 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bez inhibicije vodonik-peroksidom. U reakcijama sa inhibicijom bojom, najbolje su se poklapali modeli akompetitivne reverzibilne inhibicije za slobodnu HRP-C i parcijalno akompetitivne reverzibilne inhibicije za HRP-MAB, sa sličnim maksimalnim početnim brzinama reakcije. Kod reakcija sa vodonik-peroksidom kao inhibitorom, takođe su primećeni akompetitivni, sa slobodnom HRP-C ($R^2=0,8022$), i parcijalno akompetitivni sa HRP-MAB česticama ($R^2=0,8611$), mehanizmi inhibicije. Maksimalna početna brzina reakcije se smanjila imobilizacijom sa 50,29 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ na 24,53 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, oko dva puta.

Na osnovu konstanti inhibicije bojom $354,13 \mu\text{M mg}^{-1}$ za slobodnu HRP-C i $1164,74 \mu\text{M mg}^{-1}$ za HRP-MAB čestice, kao i konstanti inhibicije vodonik-peroksidom $413,96 \mu\text{M mg}^{-1}$ za slobodnu HRP-C i $273,98 \mu\text{M mg}^{-1}$ za HRP-MAB čestice, primećujemo da je izraženiji inhibitorni uticaj boje koji se smanjuje imobilizacijom, dok se imobilizacijom povećava inhibitorni uticaj vodonik-peroksida.

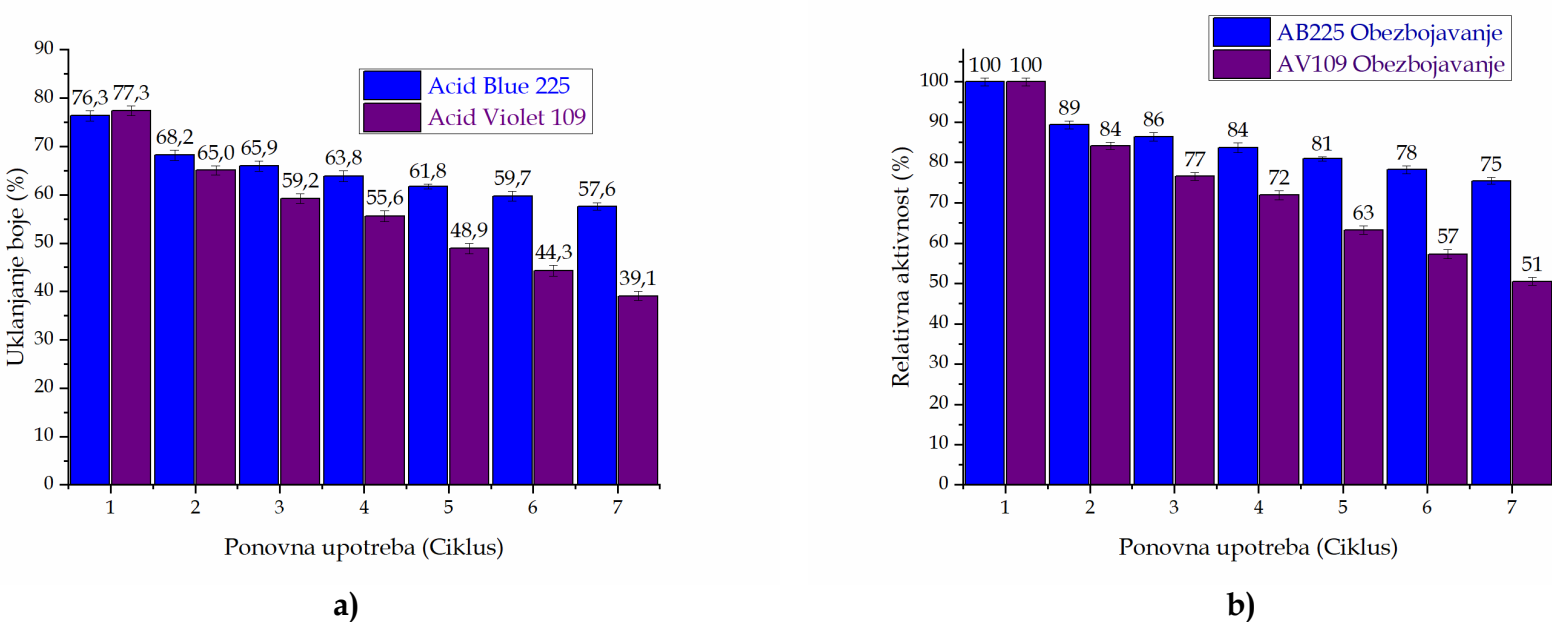
Poređenjem vrednosti Mihaelisovih konstanti iz tabele 20 za AV109 boju i vodonik-peroksid potvrđujemo veći inhibitorni uticaj boje u odnosu na vodonik-peroksid. Mihaelisoze konstante za boju pokazuju da se imobilizacijom smanjuje afinitet biokatalizatora prema boji, a povećava prema vodonik-peroksidu.

Prethodni rezultati su pokazali da se za obe boje imobilizacijom smanjuju početna brzina reakcije, pri čemu se smanjuje inhibitorni efekat boje, a povećava efekat vodonik-peroksida na inhibiranje reakcije. HRP-C je pokazala veći afinitet ka uklanjanju AV109 boje.

III.5.3 Recikliranje i ponovna upotreba HRP-MAB čestica

Ponovna upotreba biokatalizatora je jedan od najvažnijih aspekata koje treba uzeti u obzir prilikom dizajniranja imobilisanog enzima široke primene. Istražili smo da li se HRP-MAB čestice mogu uspešno reciklirati u ponovljenim serijama za obezbojavanje AB225 i AV109 boja pod prethodno utvrđenim optimalnim parametrima reakcije.

Da bi se testirala ponovna upotreba HRP-MAB čestica, čestice su korišćene za enzimsku reakciju, a na kraju svakog ciklusa, čestice su odvojene magnetom, ispirane dejonizovanom vodom i prenete u svež reakcioni pufer. Ponovna upotreba (relativna aktivnost) je izražena u odnosu na aktivnost HRP-MAB čestica u prvom ciklusu (100%). Ispitivano je do sedam ciklusa i rezultati procesa uklanjanja boja su prikazani na slici 88.



Slika 88. Recikliranje HRP-MAB čestica: (a) procenat uklanjanja boja AB225 i AV109 tokom sedam ciklusa recikliranja (b) relativna aktivnost uklanjanja boja AB225 i AV109 tokom sedam ciklusa recikliranja

Sa povećanjem vremena ponovljenog rada sa 15 min za prvi ciklus na 210 min za poslednji, katalitička aktivnost HRP-MAB čestica se polako smanjivala. U početku su rezultati uklanjanja boje bili bolji za AV109 nego AB225, 77,3% i 76,1% (slika 88a), respektivno, ali nakon svakog ciklusa procenat uklanjanja boje se brže smanjivao sa AV109 nego sa AB225 bojom. Posle sedam ciklusa, procenat uklanjanja boje je opao na 75% i 51% od početne vrednosti za AB225 i AV109, respektivno (slika 88b).

Supstrat ili proizvod mogu izazvati blokiranje nekih pora čestica koje ograničavaju pristup narednim molekulima supstrata aktivnim mestima imobilisane HRP-C nakon većeg broja ciklusa obezbojavanja.⁹⁷⁷ Kovalentno imobilisani enzimi obično imaju dugoročnu operativnu stabilnost za razliku od onih koji su vezani inkapsulacijom ili adsorpcijom. Intenzivno curenje enzima usled slabih interakcija enzim-nosač i/ili porozne strukture nosača jedno je od ograničenja inkapsulacije i adsorpcije. Rezultati dobijeni u ovoj studiji donekle su zadovoljavajući kada se uporedi sa drugim imobilisanim sistemima na osnovu literature. Npr. MAB čestice sa inkapsuliranom HRP-C zadržale su ~50% svoje prvobitne aktivnosti nakon 7 uzastopnih ciklusa pri obezbojavanju boje *Reactive Blue 5*.¹⁰⁰⁷ HRP-C imobilisana na kaolin je zadržala 35% početne aktivnosti nakon sedam uzastopnih ciklusa obezbojavanja AV109 boje.⁹⁷⁶

Imobilisani enzim je čuvan na 4 °C tokom šest meseci i primećeno je da se aktivnost za razgradnju boje nije smanjila nakon skladištenja. Naime, HRP-MAB čestice su zadržale skoro 100% početne aktivnosti pre skladištenja. Sve u svemu, ovi rezultati pokazuju da iako naša hipoteza da će nano čestice magnetita poboljšati mehanička svojstva enzima nije potvrđena, pokazalo se da magnetit olakšava separaciju biokatalizatora iz reakcione smeše, olakšavajući njegovu ponovnu upotrebu tokom više ciklusa upotrebe i poboljšava stabilnost pri skladištenju.

ZAKLJUČAK

Prilikom izrade ove disertacije je prvi put primenjena originalna metoda za proizvodnju submikronskih alginatnih čestica ultrazvučnim raspršivanjem. Takođe, razvijen je originalni postupak kovalentne imobilizacije alkalaze i peroksidaze iz rena na alginatne čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom, ultrazvučnim raspršivanjem, kao i na MAB čestice. Tako nastali biokatalizatori su pokazali obećavajuće rezultate u realnim sistemima za hidrolizu proteina iz belanca i izolata soje u šaržnom reaktoru sa mehaničkim mešanjem, kao i u realnim sistemima za uklanjanje antrahinonskih boja iz rastvora.

Određeni su optimalni uslovi kovalentne imobilizacije alkalaze na alginatne hidrogel čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom i ultrazvučnim raspršivanjem sa stanovišta mase vezanog enzima, aktivnosti i stabilnosti biokatalizatora.

- Optimalni uslovi imobilizacije bili su: 5,32 IU alkalaze, 50 mM Tris-HCl pufer pH vrednosti 8,5, 30 minuta aktivacije sa 10 mg EDAC-a na 0,5 g alginatnih čestica pri vremenu imobilizacije od 20 h.
- Kao optimalni nosač za imobilizaciju alkalaze su određene UAD submikronske čestice dobijene iz 0,4% (*w/v*) alginata sa maksimalnom vrednosti aktivnosti od 2716,1 IU g_{nosača}⁻¹, sa njima je dobijeno najviše imobilisanog enzima 671,6±4 mg_{proteina} g_{nosača}⁻¹, pri stepenu imobilizacije od 97%.
- Pri optimalnim uslovima imobilizacije, alkalaza je imobilisana i na MAB čestice i svi biokatalizatori su iskorišćeni u realnim sistemima za hidrolizu proteina u šaržnom reaktoru sa mehaničkim mešanjem iz izolata soje i belanca, pri čemu je njihova aktivnost upoređena sa slobodnom i inkapsuliranom alkalazom pri istoj koncentraciji enzima od 3,99 IU. Očigledno je da su tip čestica sa imobilisanom alkalazom i vrsta proteinskog supstrata uticali na početnu brzinu, obim i oblik hidrolize. Najveći stepeni hidrolize proteina iz belanceta i izolata soje, postignuti sa alkalaza-UAD submikronskim česticama bili su 37,03±0,39% i 26,45±0,85% za 120 i 135 min, respektivno. Sa druge strane, slobodna alkalaza je hidrolizovala 35,10±0,52% proteina belanceta za 75 minuta i 25,64±0,42% proteina izolata soje za 135 min.
- Sa svim biokatalizatorima je bilo moguće postići približno isti stepen hidrolize, ali on se brže dostiže u katalizi sa alkalazom imobilisanom na MAB i UAD čestice u odnosu na EE alginatne biokatalizatore; ovo se može pripisati jednoj ili više opštih karakteristika imobilisanih enzimskih sistema kao što je ograničena dostupnost supstrata aktivnim mestima enzima uzrokovana difuzionim ograničenjima, sterna efekti i strukturne promene enzima nakon imobilizacije.
- Sa povećanjem E/S odnosa u intervalu 0,5-2%, smo zaključili da dolazi do povećanja brzine hidrolize proteina za oba supstrata i da je brzina veća za hidrolizu sa UAD česticama u odnosu na hidrolizu sa EE česticama i dobijamo veći stepen hidrolize u odnosu na reakciju sa slobodnom alkalazom.

- Rezultati za hidrolizu proteina iz izolata soje, koji se najviše poklapaju sa modelom za kompletnu kompetitivnu povratnu inhibiciju ($R^2=0,9828$ za slobodnu alkalazu, $0,9598$ za UAD alkalazu i $0,9785$ za EE alkalazu), pokazuju da se maksimalna početna brzina reakcije smanjuje imobilizacijom sa $1,37 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ na $1,04 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ za UAD čestice i $0,4 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ za EE čestice, dok je u reakciji bez inhibicije supstratom najveća početna maksimalna brzina sa UAD česticama $1,63 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, dok je za EE čestice $0,23 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ i za slobodnu alkalazu isto kao i sa inhibicijom $1,37 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.
- Na osnovu konstanti inhibicije $929,96 \mu\text{M mg}^{-1}$ za slobodnu alkalazu, $308,23 \mu\text{M mg}^{-1}$ za UAD alkalazu i $537,16 \mu\text{M mg}^{-1}$ za EE alkalazu, primećujemo da je izraženiji inhibitorni uticaj supstrata na imobilisanu alkalazu u poređenju sa slobodnim enzimom.
- Rezultati za hidrolizu proteina iz belanceta, koji se najviše poklapaju sa modelom za kompletnu kompetitivnu povratnu inhibiciju ($R^2=0,9996$ za slobodnu alkalazu, $0,9465$ za UAD alkalazu i $0,9856$ za EE alkalazu), pokazuju da se maksimalna početna brzina reakcije smanjuje imobilizacijom sa $17,82 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ na $1,68 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ za UAD čestice i $1,49 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ za EE čestice, a pri reakciji bez inhibicije supstratom brzine su bile iste.
- Na osnovu konstanti inhibicije $421,26 \mu\text{M mg}^{-1}$ za slobodnu alkalazu, $403,78 \mu\text{M mg}^{-1}$ za UAD alkalazu i $1260,51 \mu\text{M mg}^{-1}$ za EE alkalazu, primećujemo da je izraženiji inhibitorni uticaj supstrata na UAD alkalazu koja ima sličan uticaj kao i na slobodnu alkalazu, dok je značajno manji inhibitorni uticaj na EE alkalazu.
- Sa industrijskog stanovišta, upotreba imobilisanih enzima je ekonomski isplativa, jer se mogu reciklirati na kraju ciklusa hidrolize i ponovo upotrebiti, dok se slobodni enzimi moraju inaktivirati da bi se reakcija zaustavila, najčešće zagrevanjem. Tako je izvodljivost hidrolize sojinih proteina u uzastopnim ciklusima, alkalazom imobilisanom na $0,4\%$ UAD submikronskim česticama, procenjena tokom 8 ciklusa, koji su obuhvatali period duži od 15 dana, dok se imobilisani enzim čuvao na 4°C u 50 mM Tris-HCl puferskom rastvoru (pH vrednosti $8,5$), koji je sadržao $0,2 \text{ M}$ CaCl_2 . Aktivnost je postepeno opadala, pokazujući polужivot od $3792,3 \text{ min}$ ($63,2 \text{ h}$) što odgovara $16,8$ ciklusa hidrolize. Naime, imobilisana alkalaza je zadržala aktivnost tokom 7 narednih ciklusa hidrolize (1575 min), nakon kojih je gubitak aktivnosti postao značajniji.
- Primećeno je da su imobilisani enzimi na alginatnim česticama stabilni tokom skladištenja.

Optimalni uslovi kovalentne imobilizacije HRP-C na MAB su određeni sa stanovišta mase vezanog enzima, aktivnosti i stabilnosti biokatalizatora.

- Pri imobilizaciji iskorišćeni su prethodno određeni optimalni uslovi za imobilizaciju alkalaze, pri čemu su varirane početna koncentracija HRP-C, odnos magnetit/alginat pri proizvodnji MAB čestica i veličina dobijenih MAB čestica. Pri optimalnim uslovima, $8,9 \text{ mg}$ HRP-C je imobilisano na svaki gram nosača, čime je postignut prinos imobilizacije $94,9\%$ i aktivnost biokatalizatora je bila $32,8 \text{ U g}^{-1}_{\text{nosača}}$.

- Aktivnost HRP-MAB čestica je upoređena sa aktivnošću HRP-C kovalentno imobilisane na prazne čestice alginata (dobijenih korišćenjem igle 22G_{ee}), inkapsulirane HRP-C u čestice MAB pod istim uslovima, kao i odgovarajućom količinom slobodne HRP-C. Kao što se očekivalo, zbog izlaganja enzima hemijskom tretmanu tokom imobilizacije i ograničenja prenosa mase u heterogenom imobilisanom sistemu, slobodna HRP-C je imala najveću aktivnost od 34,7 U (8,9 mg), što odgovara specifičnoj aktivnosti od 3,9 U_{mg⁻¹ enzima}). Inkapsulacija HRP-C u MAB čestice dala je veći prinos imobilizacije, ali skoro 4 puta nižu aktivnost od kovalentno imobilisane HRP-C na MAB.
- Pokazalo se da HRP-MAB čestice imaju različite pH vrednosti i temperaturne profile u odnosu na slobodan enzim. Optimalna temperatura je pala sa 45 °C na 35 °C nakon imobilizacije, ali optimalna pH vrednost se pomerila na baznu stranu, pokazujući mogućnost primene HRP-MAB čestica pod ekstremnijim uslovima pH vrednosti.
- Uočeno je da je termička stabilnost HRP-C značajno poboljšana kovalentnom imobilizacijom zbog činjenice da su kovalentne veze između HRP-C i nosača stabilizovale strukturu molekula enzima čak i na višoj temperaturi, zadržavajući njegovu aktivnu konformaciju.

Nakon optimizacije procesa imobilizacije HRP-C na MAB čestice, pristupili smo ispitivanju aktivnosti i stabilnosti imobilisane HRP-C u reakcijama uklanjanja AB225 i AV109 antrahinonskih boja, koje spadaju u grupu teško biorazgradivog otpada.

- Potvrda da je degradacija boje sa HRP-C bila dominantan mehanizam je činjenica da su MAB čestice bez imobilisanog enzima bile u stanju da uklone samo 5–11% boja. Pored toga, uočili smo da su rastvori obe boje stabilni nakon izlaganja samo vodonik-peroksidu, što pokazuje da je uklanjanje boje rezultat enzimske reakcije zavisne od vodonik-peroksida.
- U ovom istraživanju, svi imobilisani HRP-C preparati su testirani u reakcijama uklanjanja obe boje i dobijene reakcione krive su potvrdile naše zaključke o katalitičkom ponašanju HRP-MAB čestica u zavisnosti od veličine i mase vezanog enzima.
- HRP-MAB čestice (prečnik 1 mm, magnetit/alginat odnos 1:4, početna koncentracija enzima 10 mg g⁻¹ nosača) omogućile su najveći procenat uklanjanja boje 76,3% za AB225 i 75,7% za AV109 pod specifičnim reakcionim uslovima (početna koncentracija boje 0,1 g_(HRP-MAB)mg⁻¹boje (odnos masa biokatalizatora/masa boje), početna koncentracija vodonik-peroksida 0,097 mM).

Istražen je uticaj specifičnih reakcionih uslova (masa biokatalizatora, početna koncentracija boje i početna koncentracija vodonik-peroksida) na procenat uklanjanja boje u cilju uspostavljanja optimalnih uslova za reakcije uklanjanja boja sa HRP-MAB česticama.

- Nakon dobijanja optimalnih uslova za reakciju uklanjanja boja (prečnik HRP-MAB čestice ~1 mm, magnetit/alginat odnos 1:4, početna koncentracija HRP-C 10 mg g⁻¹ (odnos enzim/nosač), početna koncentracija boje od 0,08 g mg⁻¹ i 0,1 g mg⁻¹ (HRP-

MAB/boja odnos) za AV109 i AB225, respektivno, koncentracija vodonik-peroksida 0,097 mM, pH vrednosti 4 i 5 za AV109 i AB225, respektivno i temperatura 25 °C) uporedili smo efekat obezbojavanja HRP-MAB česticama sa obezbojavanjem HRP-C kovalentno imobilisanom na alginatne čestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom pri istim optimalnim uslovima, inkapsuliranom HRP-C u MAB čestice i slobodnom HRP-C sa istom početnom koncentracijom od 16,9 U (10 mg_{HRP} g_{nosac}⁻¹).

- Pri uklanjanju AB225 boje sa HRP-MAB česticama postigli smo skoro isti procenat obezbojenja za 1 min kao i sa slobodnom HRP-C, a krajnji procenat obezbojenja je bio skoro isti. Za uklanjanje AV109 boje, reakcija je bila malo sporija, ali finalni procenat uklanjanja boje je bio približno isti nakon 15 min. Inkapsulirana HRP-C je pokazala najnižu aktivnost i najsporiju reakciju sa obe boje. HRP-C imobilisana na alginatne čestice je sporije reagovala u odnosu na HRP-MAB čestice, ali sa približno istim procentom obezbojenja nakon 15 min.
- Početna kinetika je ispitana variranjem koncentracije jednog supstrata, dok je konstantnom održavana koncentracija drugog supstrata pri optimalnim uslovima reakcije (HRP-MAB čestice prečnika ~1 mm, magnetit/alginat odnosa 1:4, početna koncentracija HRP-C 10 mg_{HRP} g_{nosac}⁻¹ (16,9 U ili 32,8 U g_{nosaca}⁻¹), pH vrednosti 4 i 5 za AV109 i AB225, respektivno i temperatura 25 °C).
- Rezultati za reakciju uklanjanja boje AB225 slobodnom HRP-C i sa HRP-MAB česticama, koji se najviše poklapaju sa modelom za nesekvencijalni Ping-Pong bi-bi mehanizam za reakciju bez inhibicije bojom ($R^2=0,7345$ za slobodnu HRP-C, a 0,9316 za HRP-MAB) i bez inhibicije vodonik-peroksidom ($R^2=0,9129$ za slobodnu HRP-C, a 0,9305 za HRP-MAB čestice), pokazuju da se maksimalna početna brzina reakcije bez inhibicije bojom smanjuje imobilizacijom sa 99,89 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ na 38,83 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ i bez inhibicije vodonik-peroksidom smanjuje imobilizacijom sa 53,58 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ na 38,84 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.
- U reakciji u kojoj je boja inhibitor, najveće poklapanje bilo je sa modelom akompetitivne reverzibilne inhibicije sa slobodnom HRP-C ($R^2=0,7345$) i modelom parcijalno nekompetitivne reverzibilne inhibicije sa HRP-MAB česticama ($R^2=0,9313$), maksimalna početna brzina reakcije se smanjila imobilizacijom sa 47,62 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ i 36,61 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ za slobodnu HRP-C i HRP-MAB čestice, respektivno.
- Pri reakciji kada je vodonik-peroksid inhibitor, najveće poklapanje bilo je sa modelom akompetitivne reverzibilne inhibicije sa slobodnom HRP-C ($R^2=0,9129$) i modelom parcijalno nekompetitivne reverzibilne inhibicije sa HRP-MAB česticama ($R^2=0,9303$), maksimalna početna brzina reakcije se smanjila imobilizacijom sa 68,39 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ na 38,83 $\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.
- Na osnovu konstanti inhibicije bojom 387,24 $\mu\text{M mg}^{-1}$ za slobodnu HRP-C i 2014,13 $\mu\text{M mg}^{-1}$ za HRP-MAB čestice, kao i konstanti inhibicije vodonik-peroksidom 476,55 $\mu\text{M mg}^{-1}$ za slobodnu HRP-C i 73 $\mu\text{M mg}^{-1}$ za HRP-MAB čestice, primećujemo da je izraženiji inhibitorni uticaj boje kod slobodne HRP-C koji se smanjuje imobilizacijom, dok je za HRP-MAB čestice znatno veći inhibitorni uticaj vodonik-peroksida koji se povećao imobilizacijom.
- Rezultati za reakciju uklanjanja boje AV109 slobodnom HRP-C i sa HRP-MAB česticama, koji se najviše poklapaju sa modelom za nesekvencijalni Ping-Pong bi-bi

mehanizam za reakciju bez inhibicije bojom ($R^2=0,8231$ za slobodnu HRP-C, a $0,8640$ za HRP-MAB) i bez inhibicije vodonik-peroksidom ($R^2=0,8022$ za slobodnu HRP-C, a $0,8542$ za HRP-MAB), pokazuju da se maksimalna početna brzina reakcije bez inhibicije bojom smanjuje imobilizacijom sa $51,12 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ na $24,56 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ i bez inhibicije vodonik-peroksidom smanjuje imobilizacijom sa $126,14 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ na $24,53 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

- U reakciji sa inhibicijom bojom, najveće poklapanje bilo je sa modelom akompetitivne reverzibilne inhibicije sa slobodnom HRP-C ($R^2=0,8231$) i modelom parcijalno akompetitivne reverzibilne inhibicije sa HRP-MAB česticama ($R^2=0,8642$), maksimalna početna brzina reakcije je približno ista $37,13 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ i $23,99 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ za slobodnu HRP-C i HRP-MAB čestice, respektivno.
- Pri reakciji kada je vodonik-peroksid inhibitor, najveće poklapanje bilo je sa modelom akompetitivne reverzibilne inhibicije sa slobodnom HRP-C ($R^2=0,8022$) i modelom parcijalno akompetitivne reverzibilne inhibicije sa HRP-MAB česticama ($R^2=0,8611$), maksimalna početna brzina reakcije se smanjila imobilizacijom sa $50,29 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ na $24,53 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.
- Na osnovu konstanti inhibicije bojom $354,13 \mu\text{M mg}^{-1}$ za slobodnu HRP-C i $1164,74 \mu\text{M mg}^{-1}$ za HRP-MAB čestice, kao i konstanti inhibicije vodonik-peroksidom $413,96 \mu\text{M mg}^{-1}$ za slobodnu HRP-C i $273,98 \mu\text{M mg}^{-1}$ za HRP-MAB čestice, primećujemo da je izraženiji inhibitorni uticaj boje koji se smanjuje imobilizacijom, dok se imobilizacijom povećava inhibitorni uticaj vodonik-peroksida.
- Prethodni rezultati su pokazali da se za obe boje imobilizacijom smanjuju početna brzina reakcije, pri čemu se smanjuje inhibitorni efekat boje, a povećava efekat vodonik-peroksida na inhibiranje reakcije. HRP-C je pokazala veći afinitet ka uklanjanju AV109 boje.
- Da bi se testirala ponovna upotreba biokatalizatora, HRP-MAB čestice su korišćene za enzimsku reakciju u sedam ciklusa, a na kraju svakog ciklusa, čestice su odvojene magnetom, ispirane dejonizovanom vodom i prenete u svež reakcioni pufer. Sa povećanjem vremena ponovljenog ciklusa sa 15 min za prvi ciklus na 210 min za poslednji, katalitička aktivnost HRP-MAB čestica se polako smanjivala. U početku su rezultati uklanjanja boje bili bolji za AV109 nego AB225, i to 77,3% i 76,1%, respektivno, ali nakon svakog ciklusa procenat uklanjanja boje se brže smanjivao sa AV109 nego sa AB225 bojom. Posle sedam ciklusa, procenat uklanjanja boje je opao na 75% i 51% od početne vrednosti za AB225 i AV109, respektivno
- Imobilisani enzim je čuvan na 4°C tokom šest meseci i primećeno je da se aktivnost za razgradnju boje nije smanjila nakon skladištenja. Naime, HRP-MAB čestice su zadržale skoro 100% početne aktivnosti pre skladištenja.
- Sve u svemu, ovi rezultati pokazuju da iako naša hipoteza da će nano čestice magnetita poboljšati mehanička svojstva enzima nije potvrđena, pokazalo se da magnetit olakšava separaciju biokatalizatora iz reakcione smeše, olakšavajući njegovu ponovnu upotrebu tokom više ciklusa upotrebe i poboljšava stabilnost pri skladištenju

- Na osnovu poređenja rezultata, možemo zaključiti da su pri optimalnim uslovima HRP-MAB čestice dobar potencijalni biokatalizator za proces uklanjanja antrahinonskih boja.

LITERATURA

1. Azrin NAM, Ali MSM, Rahman RNZRA, Oslan SN, Noor NDM. Versatility of subtilisin: A review on structure, characteristics, and applications. *Biotechnol Appl Biochem*. 2022;(December 2021):1-18. doi:10.1002/bab.2309
2. Kumar P, Sharma S. Enzymes in green chemistry: The need for environment and sustainability. *International Journal of Applied Research*. 2016;2(6):337-341. <https://www.allresearchjournal.com/archives/2016/vol2issue6/PartF/2-6-45-275.pdf>
3. Nigam P. Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. *Biomolecules*. 2013;3(4):597-611. doi:10.3390/biom3030597
4. Rekik H, Zraï Jaouadi N, Gargouri F, et al. Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. *Int J Biol Macromol*. 2019;121:1227-1239. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.139
5. Tan Y, Chang SKC, Meng S. Comparing the kinetics of the hydrolysis of by-product from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fillet processing by eight proteases. *LWT*. 2019;111(February):809-820. doi:10.1016/j.lwt.2019.05.053
6. Saad AM, Osman AOM, Mohamed AS, Ramadan MF. Enzymatic Hydrolysis of *Phaseolus vulgaris* Protein Isolate: Characterization of Hydrolysates and Effect on the Quality of Minced Beef During Cold Storage. *Int J Pept Res Ther*. 2020;26(1):567-577. doi:10.1007/s10989-019-09863-x
7. Daniell H, Ribeiro T, Lin S, et al. Validation of leaf and microbial pectinases: commercial launching of a new platform technology. *Plant Biotechnol J*. 2019;17(6):1154-1166. doi:10.1111/pbi.13119
8. Jonović M, Žuža M, Đorđević V, et al. Immobilized Alcalase on Micron- and Submicron-Sized Alginate Beads as a Potential Biocatalyst for Hydrolysis of Food Proteins. *Catalysts*. 2021;11(3):305. doi:10.3390/catal11030305
9. Morin-Crini N, Lichtfouse E, Torri G, Crini G. Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. *Environ Chem Lett*. 2019;17(4):1667-1692. doi:10.1007/s10311-019-00904-x
10. Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *Biomed Res Int*. 2013;2013:1-18. doi:10.1155/2013/329121
11. Anbu P, Gopinath SCB, Chaulagain BP, Lakshmipriya T. Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2016. *Biomed Res Int*. 2017;2017:1-3. doi:10.1155/2017/2195808

12. David Troncoso F, Alberto Sánchez D, Luján Ferreira M. Production of Plant Proteases and New Biotechnological Applications: An Updated Review. *ChemistryOpen*. 2022;11(3). doi:10.1002/open.202200017
13. de Strooper B, Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci*. 2000;113(11):1857-1870. doi:10.1242/jcs.113.11.1857
14. Sharma M, Gat Y, Arya S, Kumar V, Panghal A, Kumar A. A Review on Microbial Alkaline Protease: An Essential Tool for Various Industrial Approaches. *Industrial Biotechnology*. 2019;15(2):69-78. doi:10.1089/ind.2018.0032
15. Abdel Wahab WA, Ahmed SA. Response surface methodology for production, characterization and application of solvent, salt and alkali-tolerant alkaline protease from isolated fungal strain *Aspergillus niger* WA 2017. *Int J Biol Macromol*. 2018;115(2017):447-458. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.04.041
16. Uma C, Gomathi D, Muthulakshmi C, Gopalakrishnan VK. Optimization and characterization of invertase by *Aspergillus fumigatus* using fruit peel waste as substrate. *Res J Pharm Biol Chem Sci*. 2010;1(2):93-101. <http://www.rjpbcs.com/pdf/Old files/15.pdf>
17. Fazilat A. Production , isolation , purification and partial characterization of an extra-cellular acid protease from *Aspergillus niger*. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 2016;3(3):32-38. <https://ijarbs.com/pdfcopy/mar2016/ijarbs5.pdf>
18. Naveed M, Nadeem F, Mehmood T, Bilal M, Anwar Z, Amjad F. Protease – A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. *Catal Letters*. 2021;151(2):307-323. doi:10.1007/s10562-020-03316-7
19. Borkar PS. Purification and immobilization of thermostable serine alkaline protease from *Bacillus subtilis*. *Pharma Innovation*. 2018;7(5):622-626.
20. Savitha S, Sadhasivam S, Swaminathan K, Lin FH. Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. *J Taiwan Inst Chem Eng*. 2011;42(2):298-304. doi:10.1016/j.jtice.2010.05.012
21. Kumar CG, Takagi H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv*. 1999;17(7):561-594. doi:10.1016/s0734-9750(99)00027-0
22. Tatta ER, Imchen M, Moopantakath J, Kumavath R. Bioprospecting of microbial enzymes: current trends in industry and healthcare. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2022;106(5-6):1813-1835. doi:10.1007/s00253-022-11859-5
23. Pant G, Prakash A, Pavani JVP, et al. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*. 2015;9(1):50-55. doi:10.1016/j.jtusci.2014.04.010
24. Jonović M, Žuža M, Knežević-Jugović Z, Bugarski B. Optimization of Alcalase Immobilization on the Alginate Beads Obtained by Electrostatic Extrusion. In: *BioTech 2017 and 7th Czech-Swiss Symposium with Exhibition*. ; 2017:179-180. ISBN 978-80-7080-989-1
25. Singh S, Bajaj BK. Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. *Energy Ecol Environ*. 2017;2(6):370-386. doi:10.1007/s40974-017-0076-5

26. Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci Technol.* 2000;11(7):254-262. doi:10.1016/S0924-2244(01)00007-3
27. Hou Y, Wu Z, Dai Z, Wang G, Wu G. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *J Anim Sci Biotechnol.* 2017;8(1):24. doi:10.1186/s40104-017-0153-9
28. Tavano OL. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *J Mol Catal B Enzym.* 2013;90:1-11. doi:10.1016/j.molcatb.2013.01.011
29. Tavano OL, Berenguer-Murcia A, Secundo F, Fernandez-Lafuente R. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2018;17(2):412-436. doi:10.1111/1541-4337.12326
30. Udenigwe CC, Aluko RE. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *J Food Sci.* 2012;77(1):R11-24. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x
31. Wakamatsu K, Takahama U. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiol Plant.* 1993;88(1):167-171. doi:10.1111/j.1399-3054.1993.tb01774.x
32. Biles CL, Martyn RD. Peroxidase, polyphenoloxidase, and shikimate dehydrogenase isozymes in relation to tissue type, maturity and pathogen induction of watermelon seedlings. *Plant Physiol Biochem.* 1993;31(4):499-506.
33. Wong DWS. *Food Enzymes*. 2nd ed. Springer US; 1995. doi:10.1007/978-1-4757-2349-6
34. Chung KT, Kirkovsky L, Kirkovsky A, Purcell WP. Review of mutagenicity of monocyclic aromatic amines: quantitative structure-activity relationships. *Mutat Res.* 1997;387(1):1-16. doi:10.1016/s1383-5742(97)00019-7
35. Mantha R, Biswas N, Taylor KE, Bewtra JK. Removal of nitroaromatics from synthetic wastewater using two-step zero-valent iron reduction and peroxidase-catalyzed oxidative polymerization. *Water Environ Res.* 2002;74(3):280-287. doi:10.2175/106143002x140017
36. Zhe-fu Lin, Li-hong Chen, Wei-qin Zhang. Peroxidase from *Ipomoea cairica* (L) SW. Isolation, purification and some properties. *Process Biochemistry.* 1996;31(5):443-448. doi:10.1016/0032-9592(95)00088-7
37. Agostini E, Hernández-Ruiz J, Arnao MB, Milrad SR, Tigier HA, Acosta M. A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnol Appl Biochem.* 2002;35(1):1. doi:10.1042/ba20010049
38. Kim YH, Yoo YJ. Peroxidase production from carrot hairy root cell culture. *Enzyme Microb Technol.* 1996;18(7):531-535. doi:10.1016/0141-0229(95)00168-9
39. Egorov AM, Reshetnikova IA, Fechina VA, Gazaryan IG. Comparative Studies of Plant and Fungal Peroxidases. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;750(1 Enzyme Engine):469-472. doi:10.1111/j.1749-6632.1995.tb19998.x
40. Nunavath H, Banoth C, Talluri VR, Bhukya B. An analysis of horseradish peroxidase enzyme for effluent treatment. *Bioinformation.* 2016;12(6):318-323. doi:10.6026/97320630012318

41. Ulson de Souza SMAG, Forgiarini E, Ulson de Souza AA. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *J Hazard Mater.* 2007;147(3):1073-1078. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.06.003
42. Bhunia A, Durani S, Wangikar PP. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnol Bioeng.* 2001;72(5):562-567. doi:10.1002/1097-0290(20010305)72:5<562::AID-BIT1020>3.0.CO;2-S
43. Mohan SV, Prasad KK, Rao NC, Sarma PN. Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. *Chemosphere.* 2005;58(8):1097-1105. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.09.070
44. Zhang A, Fang L, Wang J, Liu W. Enzymatic decolorization of Orange II: Optimization by response surface methodology and pathway. *Environ Prog Sustain Energy.* 2013;32(2):294-301. doi:10.1002/ep.11628
45. Fernandez-Lafuente R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent sub-unit dissociation. *Enzyme Microb Technol.* 2009;45(6-7):405-418. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.08.009
46. Guzik U, Hupert-Kocurek K, Wojcieszynska D. Immobilization as a Strategy for Improving Enzyme Properties-Application to Oxidoreductases. *Molecules.* 2014;19(7):8995-9018. doi:10.3390/molecules19078995
47. Aybastier Ö, Demir C. Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on styrene-divinylbenzene copolymer using response surface methodology. *J Mol Catal B Enzym.* 2010;63(3-4):170-178. doi:10.1016/j.molcatb.2010.01.013
48. Won K, Kim S, Kim KJ, Park HW, Moon SJ. Optimization of lipase entrapment in Calcium alginate gel beads. *Process Biochemistry.* 2005;40(6):2149-2154. doi:10.1016/j.procbio.2004.08.014
49. Garcia-Galan C, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Adv Synth Catal.* 2011;353(16):2885-2904. doi:10.1002/adsc.201100534
50. Mateo C, Grazu V, Palomo JM, Lopez-Gallego F, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1022-1033. doi:10.1038/nprot.2007.133
51. Knezevic Z, Bobic S, Milutinovic A, Obradovic B, Mojovic L, Bugarski B. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. *Process Biochemistry.* 2002;38(3):313-318. doi:10.1016/S0032-9592(02)00085-7
52. Kumar S, Haq I, Prakash J, Raj A. Improved enzyme properties upon glutaraldehyde cross-linking of alginate entrapped xylanase from *Bacillus licheniformis*. *Int J Biol Macromol.* 2017;98:24-33. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.01.104
53. Corstens MN, Berton-Carabin CC, Schroën K, Viau M, Meynier A. Emulsion encapsulation in calcium-alginate beads delays lipolysis during dynamic in vitro digestion. *J Funct Foods.* 2018;46(May):394-402. doi:10.1016/j.jff.2018.05.011
54. Lević S, Pajić Lijaković I, Dorević V, et al. Characterization of sodium alginate/d-limonene emulsions and respective calcium alginate/d-limonene beads produced by

- electrostatic extrusion. *Food Hydrocoll.* 2015;45:111-123. doi:10.1016/j.food-hyd.2014.10.001
55. Silva J de C, França PRL de, Converti A, Porto TS. Kinetic and thermodynamic characterization of a novel *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonase. Comparison of free and calcium alginate-immobilized enzyme. *Process Biochemistry.* 2018;74:61-70. doi:10.1016/j.procbio.2018.07.010
 56. Prasad R, Jayakumaran Nair A. Immobilization of *Bacillus* SP. protease on different matrices and its enzymatic characterization. *Int J Pharma Bio Sci.* 2013;4(4):2013.
 57. Bedzo OKK, Trollope K, Gottumukkala LD, Coetzee G, Görgens JF. Amberlite IRA 900 versus calcium alginate in immobilization of a novel, engineered β -fructofuranosidase for short-chain fructooligosaccharide synthesis from sucrose. *Biotechnol Prog.* 2019;35(3):1-9. doi:10.1002/btpr.2797
 58. Domínguez E, Nilsson M, Hahn-Hägerdal B. Carbodiimide coupling of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* to alginate. *Enzyme Microb Technol.* 1988;10(10):606-610. doi:10.1016/0141-0229(88)90107-X
 59. Tümtürk H, Şahin F, Demirel G. A new method for immobilization of acetylcholinesterase. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2007;30(2):141-145. doi:10.1007/s00449-006-0106-8
 60. Tee BL, Kaletunç G. Immobilization of a thermostable α -amylase by covalent binding to an alginate matrix increases high temperature usability. *Biotechnol Prog.* 2009;25(2):436-445. doi:10.1002/btpr.117
 61. Lopes LA, Novelli PK, Fernandez-Lafuente R, Tardioli PW, Giordano RLC. Glyoxyl-Activated Agarose as Support for Covalently Link Novo-Pro D: Biocatalysts Performance in the Hydrolysis of Casein. *Catalysts.* 2020;10(5):466. doi:10.3390/catal10050466
 62. Jia L, Wong H, Cerna C, Weitman SD. Effect of nanonization on absorption of 301029: Ex vivo and in vivo pharmacokinetic correlations determined by liquid chromatography/mass spectrometry. *Pharm Res.* 2002;19(8):1091-1096. doi:10.1023/A:1019829622088
 63. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm.* 2010;385(1-2):113-142. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018
 64. Sonavane GS, Devarajan P v. Preparation of alginate nanoparticles using Eudragit E100 as a new complexing agent: Development, in-vitro, and in-vivo evaluation. *J Biomed Nanotechnol.* 2007;3(2):160-169. doi:10.1166/jbn.2007.005
 65. Yeo Y, Park K. A new microencapsulation method using an ultrasonic atomizer based on interfacial solvent exchange. *Journal of Controlled Release.* 2004;100(3):379-388. doi:10.1016/j.jconrel.2004.09.012
 66. Dalmoro A, D'Amore M, Barba AA. Droplet size prediction in the production of drug delivery microsystems by ultrasonic atomization. *Transl Med UniSa.* 2013;7(2):6-11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24251250>
 67. Jonović M, Jugović B, Žuža M, et al. Immobilization of Horseradish Peroxidase on Magnetite-Alginate Beads to Enable Effective Strong Binding and Enzyme Recycling during Anthraquinone Dyes' Degradation. *Polymers (Basel).* 2022;14(13):2614. doi:10.3390/polym14132614

68. Majewski AP, Stahlschmidt U, Jérôme V, Freitag R, Müller AHE, Schmalz H. PDMAEMA-Grafted Core-Shell-Corona Particles for Nonviral Gene Delivery and Magnetic Cell Separation. *Biomacromolecules*. 2013;14(9):3081-3090. doi:10.1021/bm400703d
69. Ansari SA, Husain Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnol Adv*. 2012;30(3):512-523. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.005
70. Chen Z, Wu C, Zhang Z, Wu W, Wang X, Yu Z. Synthesis, functionalization, and nanomedical applications of functional magnetic nanoparticles. *Chinese Chemical Letters*. 2018;29(11):1601-1608. doi:10.1016/j.cclet.2018.08.007
71. Li J, Chen X, Xu D, Pan K. Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun magnetic nanofibers for phenol removal. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019;170(December 2018):716-721. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.12.043
72. Zhang C, Cai X. Immobilization of horseradish peroxidase on Fe₃O₄/nanotubes composites for Biocatalysis-degradation of phenol. *Compos Interfaces*. 2019;26(5):379-396. doi:10.1080/09276440.2018.1504265
73. Zdarta J, Anteck K, Jędrzak A, Synoradzki K, Łuczak M, Jesionowski T. Biopolymers conjugated with magnetite as support materials for trypsin immobilization and protein digestion. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018;169:118-125. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.05.018
74. Lilhare S, Mathew SB, Singh AK, Carabineiro SAC. Calcium Alginate Beads with Entrapped Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Functionalized with Methionine – A Versatile Adsorbent for Arsenic Removal. *Nanomaterials*. 2021;11(5):1345. doi:10.3390/nano11051345
75. Yang J, Fan L, Xu Y, Xia J. Iron oxide nanoparticles with different polymer coatings for photothermal therapy. *Journal of Nanoparticle Research*. 2017;19(10):333. doi:10.1007/s11051-017-4031-3
76. Ahmadpoor F, Masood A, Feliu N, Parak WJ, Shojasadati SA. The Effect of Surface Coating of Iron Oxide Nanoparticles on Magnetic Resonance Imaging Relaxivity. *Frontiers in Nanotechnology*. 2021;3(April):1-12. doi:10.3389/fnano.2021.644734
77. Abushrida A, Elhuni I, Taresco V, Marciani L, Stolnik S, Garnett MC. A simple and efficient method for polymer coating of iron oxide nanoparticles. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2019;55:101460. doi:10.1016/j.jddst.2019.101460
78. LENG G. Inequalities for polars of mixed projection bodies. *Science in China Series A*. 2004;41(2):175. doi:10.1360/02ys0350
79. Jovanović J, Stefanović A, Culetu A, et al. Enzymatic treatment of soy protein concentrate: Influence on the potential techno-functional and antioxidant properties. *Journal of Hygienic Engineering and Design*. 2019;30:58-68. <https://keypublishing.org/jhed/wp-content/uploads/2020/11/05.-Full-paper-Jelena-Jovanovic.pdf>
80. Liu L, Li S, Zheng J, Bu T, He G, Wu J. Safety considerations on food protein-derived bioactive peptides. *Trends Food Sci Technol*. 2020;96:199-207. doi:10.1016/j.tifs.2019.12.022

81. Fu Y, Viraraghavan T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresour Technol.* 2001;79(3):251-262. doi:10.1016/s0960-8524(01)00028-1
82. Pereira L, Alves M. Dyes – Environmental Impact and Remediation. In: Malik A, Grohmann E, eds. *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development. Strategies for Sustainability.* Springer Netherlands; 2012:111-162. doi:10.1007/978-94-007-1591-2_4
83. Pan H, Feng J, He GX, Cerniglia CE, Chen H. Evaluation of impact of exposure of Sudan azo dyes and their metabolites on human intestinal bacteria. *Anaerobe.* 2012;18(4):445-453. doi:10.1016/j.anaerobe.2012.05.002
84. Katheresan V, Kansedo J, Lau SY. Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: A review. *J Environ Chem Eng.* 2018;6(4):4676-4697. doi:10.1016/j.jece.2018.06.060
85. Sun G, Xu X. Sunflower Stalks as Adsorbents for Color Removal from Textile Wastewater. *Ind Eng Chem Res.* 1997;36(3):808-812. doi:10.1021/ie9603833
86. Ledakowicz S, Solecka M, Zylla R. Biodegradation, decolourisation and detoxification of textile wastewater enhanced by advanced oxidation processes. *J Biotechnol.* 2001;89(2-3):175-184. doi:10.1016/s0168-1656(01)00296-6
87. Sabur MA, Khan AA, Safiullah S. Treatment of Textile Wastewater by Coagulation Precipitation Method. *Journal of Scientific Research.* 2012;4(3):623-633. doi:10.3329/jsr.v4i3.10777
88. Anthuvan Babu S, Raja S, Sibi S, Neeraja P. Electrochemical oxidation of textile polluted water and its reuse. *Journal of Industrial Pollution Control.* 2012;28(1):73-82. <https://www.icontrolpollution.com/articles/electrochemical-oxidation-of-textile-pollutedwater-and-its-reuse-.pdf>
89. Mijin DŽ, Radišić MM, Šekuljica NŽ, Grgur BN. Electrochemical decolorization of C.I. Acid Orange 3 in the presence of sodium chloride at iridium oxide electrode. *Chemical Papers.* 2017;71(11):2173-2184. doi:10.1007/s11696-017-0211-y
90. Lau WJ, Ismail AF. Polymeric nanofiltration membranes for textile dye wastewater treatment: Preparation, performance evaluation, transport modelling, and fouling control – a review. *Desalination.* 2009;245(1-3):321-348. doi:10.1016/j.desal.2007.12.058
91. Domingues FS, Geraldino HCL, Freitas TKF de S, de Almeida CA, Figueiredo FF de, Garcia JC. Photocatalytic degradation of real textile wastewater using carbon black-Nb 2 O 5 composite catalyst under UV/Vis irradiation. *Environ Technol.* 2021;42(15):2335-2349. doi:10.1080/09593330.2019.1701565
92. Işık M, Sponza DT. Anaerobic/aerobic treatment of a simulated textile wastewater. *Sep Purif Technol.* 2008;60(1):64-72. doi:10.1016/j.seppur.2007.07.043
93. Šekuljica NŽ, Jovanović JR, Jakovetić Tanasković SM, et al. Immobilization of horseradish peroxidase onto Purolite® A109 and its anthraquinone dye biodegradation and detoxification potential. *Biotechnol Prog.* 2020;36(4):e2991. doi:10.1002/btpr.2991
94. Celebi M, Altikatoglu M, Mustafaeva Akdeste Z, Yildirim H. Determination of decolorization properties of Reactive Blue 19 dye using Horseradish Peroxidase enzyme. *Turkish Journal of Biochemistry.* 2013;38(2):200-206. doi:10.5505/tjb.2013.96636

95. Choi JM, Han SS, Kim HS. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnol Adv.* 2015;33(7):1443-1454. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.014
96. Basso A, Serban S. Industrial applications of immobilized enzymes – A review. *Molecular Catalysis.* 2019;479(August):110607. doi:10.1016/j.mcat.2019.110607
97. Sellami K, Couvert A, Nasrallah N, Maachi R, Abouseoud M, Amrane A. Peroxidase enzymes as green catalysts for bioremediation and biotechnological applications: A review. *Sci Total Environ.* 2022;806(Pt 2):150500. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.150500
98. Martin CE, Murray AS, Sala-Hamrick KE, et al. Posttranslational modifications of serine protease TMPRSS13 regulate zymogen activation, proteolytic activity, and cell surface localization. *Journal of Biological Chemistry.* 2021;297(4):1-15. doi:10.1016/j.jbc.2021.101227
99. Sabotič J, Kos J. Microbial and fungal protease inhibitors – current and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;93(4):1351-1375. doi:10.1007/s00253-011-3834-x
100. Souza PM de, Bittencourt ML de A, Caprara CC, et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2015;46(2):337-346. doi:10.1590/S1517-838246220140359
101. Li Q, Yi L, Marek P, Iverson BL. Commercial proteases: Present and future. *FEBS Lett.* 2013;587(8):1155-1163. doi:10.1016/j.febslet.2012.12.019
102. Munawar TM, Aruna K, Swamy AVN. Production, Purification and Characterization of Alkaline Protease From Agro Industrial Wastes By Using *Aspergillus Terreus* (Ab661667) Under Solid State Fermentation. *International Journal of Advanced Research in Engineering and Applied Sciences Impact Factor: 4.* 2014;817(10). www.garph.co.uk
103. Mohamed Abdullah Maitig A, A.M. Alhoot M, Tiwari K. Isolation and Screening of Extracellular Protease Enzyme from Fungal Isolates of Soil. *J Pure Appl Microbiol.* 2018;12(4):2059-2067. doi:10.22207/JPAM.12.4.42
104. Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13(4):345-351. doi:10.1016/S0958-1669(02)00328-2
105. Jegannathan KR, Nielsen PH. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. *J Clean Prod.* 2013;42:228-240. doi:10.1016/j.jclepro.2012.11.005
106. Mótyán J, Tóth F, Tőzsér J. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules.* 2013;3(4):923-942. doi:10.3390/biom3040923
107. Thakur N, Goyal M, Sharma S, Kumar D. Proteases: Industrial Applications and Approaches used in Strain Improvement. *Biological Forum–An International Journal.* 2018;10(1):158-167. www.researchtrend.net
108. Page MJ, di Cera E. Serine peptidases: Classification, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2008;65(7-8):1220-1236. doi:10.1007/s00018-008-7565-9
109. Ellaiah P, Srinivasulu B, Adinarayana K. A review on microbial alkaline proteases. *J Sci Ind Res (India).* 2002;61(9):690-704. [http://nopr.niscpr.res.in/bitstream/123456789/26375/1/JSIR 61%289%29_690-704.pdf](http://nopr.niscpr.res.in/bitstream/123456789/26375/1/JSIR_61%289%29_690-704.pdf)

110. Theron LW, Divol B. Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(21):8853-8868. doi:10.1007/s00253-014-6035-6
111. Vashishta A, Saraswat Ohri S, Vetvickova J, Fusek M, Ulrichova J, Vetvicka V. Procathepsin D secreted by HaCaT keratinocyte cells - A novel regulator of keratinocyte growth. *Eur J Cell Biol.* 2007;86(6):303-313. doi:10.1016/j.ejcb.2007.03.008
112. Souza PM, Werneck G, Aliakbarian B, et al. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food Chem Toxicol.* 2017;109(Pt 2):1103-1110. doi:10.1016/j.fct.2017.03.055
113. Nadeem M. *Biotechnological Production of Alkaline Protease for Industrial Use*. PhD Thesis. UNIVERSITY OF THE PUNJAB, LAHORE, PAKISTAN; 2009. <http://prh.hec.gov.pk/jspui/bitstream/123456789/744/2/1054S.pdf>
114. Sawant R, Nagendran S. Protease : an Enzyme With Multiple Industrial Applications. *World J Pharm Pharm Sci.* 2014;3(6):568-579.
115. Sani JT, Omolbanin S, Gharibi S, Shariati MA. The Importance of Alkaline Protease Commercial Applications : a Short Review. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology.* 2017;5(1):5-8. [https://www.ijrpb.com/issues/Volume 5_Issue 1/ijrpb 5\(1\) 2 Javad Taghipour Sani 5-8.pdf](https://www.ijrpb.com/issues/Volume 5_Issue 1/ijrpb 5(1) 2 Javad Taghipour Sani 5-8.pdf)
116. Siroya H, Patel S, Upadhyay D. Industrial Applications of Protease : A Review. *Studies in Indian Place Names.* 2020;40(71):224-232. doi:ISSN: 2394-3114
117. Chanalia P, Gandhi D, Jodha D, Singh J. Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry. *Reviews in Medical Microbiology.* 2011;22(4):96-101. doi:10.1097/MRM.0b013e3283494749
118. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande V v. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 1998;62(3):597-635. doi:10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998
119. Singhal P, Nigam VK, Vidyarthi AS. Studies on Production, Characterization and Applications of Microbial Alkaline Proteases. *Int J Adv Biotechnol Res.* 2012;3(3):653-669. <http://www.bipublication.com>
120. Ramesh C. Ray, Rosell CM. *Microbial Enzyme Technology in Food Applications*. (Ray RC, Rosell CM, eds.). CRC Press; 2017. doi:10.1201/9781315368405
121. Freitas AC, Baleeiro FCF, Fonseca RF, Bertucci Neto V, Pinto GAS, Farinas CS. Bio-process development to add value to canola cake used as substrate for proteolytic enzyme production. *Food and Bioprocess Processing.* 2015;95(July):173-182. doi:10.1016/j.fbp.2015.05.006
122. Gupta R, Beg QK, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;59(1):15-32. doi:10.1007/s00253-002-0975-y
123. Johnvesly B, Naik GR. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry.* 2001;37(2):139-144. doi:10.1016/S0032-9592(01)00191-1

124. Gupta A, Joseph B, Mani A, Thomas G. Biosynthesis and properties of an extracellular thermostable serine alkaline protease from *Virgibacillus pantothenicus*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2008;24(2):237-243. doi:10.1007/s11274-007-9462-z
125. Vijayalakshmi S, Venkat KS, Thankamani V. Optimization and cultural characterization of *Bacillus RV.B2.90* producing alkalophilic thermophilic protease. *Res J Biotechnol*. 2013;8(5):37-43.
126. N. Jisha V, B. Smitha R, Pradeep S, et al. Versatility of microbial proteases. *Adv Enzyme Res*. 2013;01(03):39-51. doi:10.4236/aer.2013.13005
127. Romsomsa N, Chim-anagae P, Jangchud A. Optimization of silk degumming protease production from *Bacillus subtilis* C4 using Plackett-Burman design and response surface methodology. *ScienceAsia*. 2010;36(2):118-124. doi:10.2306/scienceasia1513-1874.2010.36.118
128. dos Santos Aguilar JG, Sato HH. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Res Int*. 2018;103(January):253-262. doi:10.1016/j.foodres.2017.10.044
129. Romsomsa N, Chim-anagae P, Jangchud A. Optimization of silk degumming protease production from *Bacillus subtilis* C4 using Plackett-Burman design and response surface methodology. *ScienceAsia*. 2010;36(2):118. doi:10.2306/scienceasia1513-1874.2010.36.118
130. Al-Qodah Z, Daghistani H, Alananbeh K. Isolation and characterization of thermostable protease producing *Bacillus pumilus* from thermal spring in Jordan. *Afr J Microbiol Res*. 2013;7(29):3711-3719. <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/EBBB34A42943>
131. Jaswal RK, Kocher GS, Virk MS. Production of alkaline protease by *Bacillus circulans* using agricultural residues: A statistical approach. *Indian J Biotechnol*. 2008;7(3):356-360. [http://nopr.niscpr.res.in/bitstream/123456789/1850/1/IJBT 7\(3\) 356-360.pdf](http://nopr.niscpr.res.in/bitstream/123456789/1850/1/IJBT%207(3)%20356-360.pdf)
132. Polgár L. The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005;62(19-20):2161-2172. doi:10.1007/s00018-005-5160-x
133. Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS : the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(D1):D503-D509. doi:10.1093/nar/gkt953
134. DeLange RJ, Smith EL. Subtilisin Carlsberg. *Journal of Biological Chemistry*. 1968;243(9):2134-2142. doi:10.1016/S0021-9258(18)93457-5
135. Tacias-Pascacio VG, Morellon-Sterling R, Siar EH, Tavano O, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R. Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *Int J Biol Macromol*. 2020;165(Pt B):2143-2196. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060
136. Kim J, Kwon MY, Kim S. Biological Degumming of Silk Fabrics with Proteolytic Enzymes. *Journal of Natural Fibers*. 2016;13(6):629-639. doi:10.1080/15440478.2015.1093578
137. Kanelli M, Vasilakos S, Ladas S, Symianakis E, Christakopoulos P, Topakas E. Surface modification of polyamide 6.6 fibers by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*. 2017;59:97-103. doi:10.1016/j.procbio.2016.06.022

138. Hale MB. *Technical Report Fish Protein Concentrates By Enzymatic Hydrolysis A Status Report on Research and Some Processes and Products NMFS.*; 1972. <https://spo.nmfs.noaa.gov/sites/default/files/legacy-pdfs/SSRF657.pdf>
139. Ahmadifard N, Murueta JHC, Abedian-Kenari A, Motamedzadegan A, Jamali H. Comparison the effect of three commercial enzymes for enzymatic hydrolysis of two substrates (rice bran protein concentrate and soy-been protein) with SDS-PAGE. *J Food Sci Technol*. 2016;53(2):1279-1284. doi:10.1007/s13197-015-2087-6
140. Hassan YI, Trofimova D, Samuleev P, Miah MF, Zhou T. Omics Approaches in Enzyme Discovery and Engineering. In: *Omics Technologies and Bio-Engineering*. Elsevier; 2018:297-322. doi:10.1016/B978-0-12-815870-8.00016-4
141. Novozyme, Proteases for biocatalysis. Accessed 7.10.2022. <https://www.novozymes.com/es/advance-your-business/pharma>
142. Chen ST, Chen SY, Wang KT. Kinetically controlled peptide bond formation in anhydrous alcohol catalyzed by the industrial protease alcalase. *J Org Chem*. 1992;57(25):6960-6965. doi:10.1021/jo00051a052
143. Humiski LM, Aluko RE. Physicochemical and Bitterness Properties of Enzymatic Pea Protein Hydrolysates. *J Food Sci*. 2007;72(8):S605-S611. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00475.x
144. Rajamohamed SH, Aryee ANA, Hucl P, Patterson CA, Boye JI. In vitro Gastrointestinal Digestion of Glabrous Canaryseed Proteins as Affected by Variety and Thermal Treatment. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2013;68(3):306-312. doi:10.1007/s11130-013-0374-9
145. Aryee ANA, Boye JI. Comparative Study of the Effects of Processing on the Nutritional, Physicochemical and Functional Properties of Lentil. *J Food Process Preserv*. 2017;41(1):e12824. doi:10.1111/jfpp.12824
146. Aryee ANA, Boye JI. Improving the Digestibility of Lentil Flours and Protein Isolate and Characterization of Their Enzymatically Prepared Hydrolysates. *Int J Food Prop*. 2016;19(12):2649-2665. doi:10.1080/10942912.2015.1123269
147. He R, Girgih AT, Rozoy E, Bazinet L, Ju XR, Aluko RE. Selective separation and concentration of antihypertensive peptides from rapeseed protein hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chem*. 2016;197(Pt A):1008-1014. doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.081
148. Agyei D, Danquah MK. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnol Adv*. 2011;29(3):272-277. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.001
149. Ndayishimiye JB, Huang WN, Wang F, et al. Rheological and functional properties of composite sweet potato – wheat dough as affected by transglutaminase and ascorbic acid. *J Food Sci Technol*. 2016;53(2):1178-1188. doi:10.1007/s13197-015-2004-z
150. Tamm F, Herbst S, Brodkorb A, Drusch S. Functional properties of pea protein hydrolysates in emulsions and spray-dried microcapsules. *Food Hydrocoll*. 2016;58:204-214. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.02.032

151. Chen C, Chi YJ, Xu W. Comparisons on the Functional Properties and Antioxidant Activity of Spray-Dried and Freeze-Dried Egg White Protein Hydrolysate. *Food Bio-
proc Tech.* 2012;5(6):2342-2352. doi:10.1007/s11947-011-0606-7
152. Graszekiewicz A, Zelazko M, Trziszka T. Application of pancreatic enzymes in hydro-
lysis of egg-white proteins. *Pol J Food Nutr Sci.* 2010;60(1):57-61. [http://journal.pan.olsztyn.pl/pdf-98242-30957?filename=APPLICATION OF PANCREATIC.pdf](http://journal.pan.olsztyn.pl/pdf-98242-30957?filename=APPLICATION%20OF%20PANCREATIC.pdf)
153. Wang L, Mao X, Cheng X, Xiong X, Ren F. Effect of enzyme type and hydrolysis con-
ditions on the in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and ash
content of hydrolysed whey protein isolate. *Int J Food Sci Technol.* 2010;45(4):807-812.
doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02210.x
154. Kristinsson HG, Rasco BA. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and
Functional Properties. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2000;40(1):43-81.
doi:10.1080/10408690091189266
155. Mahmoud MI, Malone WT, Cordle CT. Enzymatic Hydrolysis of Casein: Effect of De-
gree of Hydrolysis on Antigenicity and Physical Properties. *J Food Sci.* 1992;57(5):1223-
1229. doi:10.1111/j.1365-2621.1992.tb11304.x
156. Adler-Nissen J. Enzymatic Hydrolysis of Proteins for Increased Solubility. *J Agric Food
Chem.* 1976;24(6):1090-1093. doi:10.1021/jf60208a021
157. Guo H, Sun J, He H, Yu GC, Du J. Antihepatotoxic effect of corn peptides against
Bacillus Calmette-Guerin/lipopolysaccharide-induced liver injury in mice. *Food and
Chemical Toxicology.* 2009;47(10):2431-2435. doi:10.1016/j.fct.2009.06.041
158. Adjonu R, Doran G, Torley P, Agboola S. Screening of whey protein isolate hydroly-
sates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme speci-
ficity. *Food Chem.* 2013;136(3-4):1435-1443. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.053
159. Barbana C, Boye JL. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil
protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chem.*
2011;127(1):94-101. doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.093
160. He R, Alashi A, Malomo SA, et al. Antihypertensive and free radical scavenging prop-
erties of enzymatic rapeseed protein hydrolysates. *Food Chem.* 2013;141(1):153-159.
doi:10.1016/j.foodchem.2013.02.087
161. Torres-Fuentes C, Alaiz M, Vioque J. Affinity purification and characterisation of che-
lating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chem.* 2011;129(2):485-490.
doi:10.1016/j.foodchem.2011.04.103
162. Girgih AT, Alashi A, He R, Malomo S, Aluko RE. Preventive and treatment effects of
a hemp seed (*Cannabis sativa* L.) meal protein hydrolysate against high blood pres-
sure in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Nutr.* 2014;53(5):1237-1246.
doi:10.1007/s00394-013-0625-4
163. Alashi AM, Blanchard CL, Mailer RJ, et al. Antioxidant properties of Australian can-
ola meal protein hydrolysates. *Food Chem.* 2014;146:500-506. doi:10.1016/j.food-
chem.2013.09.081
164. Alashi AM, Blanchard CL, Mailer RJ, et al. Blood pressure lowering effects of Austral-
ian canola protein hydrolysates in spontaneously hypertensive rats. *Food Research In-
ternational.* 2014;55:281-287. doi:10.1016/j.foodres.2013.11.015

165. Rickey Y, Yada. *Proteins in Food Processing*. 2nd ed. (Yada RY, ed.). Elsevier Ltd.; 2018. doi:10.1016/C2015-0-01620-3
166. Whitehurst RJ, van Oort M. *Enzymes in Food Technology*. 2nd ed. (Whitehurst RJ, van Oort M, eds.). Wiley-VCH Verlag GmbH; 2010. doi:10.1002/9781444309935
167. Garcia-Mora P, Peñas E, Frias J, Martínez-Villaluenga C. Savinase, the Most Suitable Enzyme for Releasing Peptides from Lentil (*Lens culinaris* var. Castellana) Protein Concentrates with Multifunctional Properties. *J Agric Food Chem*. 2014;62(18):4166-4174. doi:10.1021/jf500849u
168. Adler-Nissen J, Eriksen S, Olsen HS. Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*. 1983;32(3-4):411-423. doi:10.1007/BF01091198
169. Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J Agric Food Chem*. 1979;27(6):1256-1262. doi:10.1021/jf60226a042
170. Nielsen PM, Petersen D, Dambmann C. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *J Food Sci*. 2001;66(5):642-646. doi:10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x
171. Kim SY, Park PSW, Rhee KC. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *J Agric Food Chem*. 1990;38(3):651-656. doi:10.1021/jf00093a014
172. Cheftel C, Ahern M, Wang DIC, Tannenbaum SR. Enzymatic solubilization of fish protein concentrate: batch studies applicable to continuous enzyme recycling processes. *J Agric Food Chem*. 1971;19(1):155-161. doi:10.1021/jf60173a007
173. Herries DG. Chemistry and Control of Enzyme Reactions. *Biochem Educ*. 1978;6(3):63. doi:10.1016/0307-4412(78)90070-5
174. Klomklao S, Kishimura H, Benjakul S. Use of viscera extract from hybrid catfish (*Clarias macrocephalus*×*Clarias gariepinus*) for the production of protein hydrolysate from toothed ponyfish (*Gazza minuta*) muscle. *Food Chem*. 2013;136(2):1006-1012. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.037
175. Shahidi F, Han XQ, Synowiecki J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem*. 1995;53(3):285-293. doi:10.1016/0308-8146(95)93934-J
176. Kessel A, Ben-Tal N. *Introduction to Proteins: Structure, Function and Motion*. 2nd ed. CRC Press, Taylor & Francis Group; 2018. doi:10.1201/9781315113876
177. Klomklao S, Benjakul S, Kishimura H, Chaijan M. 24kDa Trypsin: A predominant protease purified from the viscera of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus*×*Clarias gariepinus*). *Food Chem*. 2011;129(3):739-746. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.014
178. Whitaker JR. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. Vol 61. 2nd ed. (Whitaker JR, ed.). Marcel Dekker, Inc.; 1994. doi:10.1201/9780203742136
179. Guerard F, Guimas L, Binet A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J Mol Catal B Enzym*. 2002;19(20):489-498. doi:10.1016/S1381-1177(02)00203-5

180. Choisnard L, Froidevaux R, Nedjar-Arroume N, et al. Kinetic study of the appearance of an anti-bacterial peptide in the course of bovine haemoglobin peptic hydrolysis. *Biotechnol Appl Biochem*. 2002;36(3):187. doi:10.1042/BA20010103
181. Foegeding EA, Davis JP. Food protein functionality: A comprehensive approach. *Food Hydrocoll*. 2011;25(8):1853-1864. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.05.008
182. Tcholakova S, Denkov ND, Ivanov IB, Campbell B. Coalescence stability of emulsions containing globular milk proteins. *Adv Colloid Interface Sci*. 2006;123-126(SPEC. ISS.):259-293. doi:10.1016/j.cis.2006.05.021
183. Boye J, Zare F, Pletch A. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*. 2010;43(2):414-431. doi:10.1016/j.foodres.2009.09.003
184. Boye JI, Aksay S, Roufik S, et al. Comparison of the functional properties of pea, chick-pea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*. 2010;43(2):537-546. doi:10.1016/j.foodres.2009.07.021
185. Ma H, Forssell P, Partanen R, Buchert J, Boer H. Charge Modifications to Improve the Emulsifying Properties of Whey Protein Isolate. *J Agric Food Chem*. 2011;59(24):13246-13253. doi:10.1021/jf203240e
186. Lam RSH, Nickerson MT. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Food Chem*. 2013;141(2):975-984. doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.038
187. Rebello CJ, Greenway FL, Finley JW. Whole Grains and Pulses: A Comparison of the Nutritional and Health Benefits. *J Agric Food Chem*. 2014;62(29):7029-7049. doi:10.1021/jf500932z
188. Maleki SJ, Chung SY, Champagne ET, Raufman JP. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000;106(4):763-768. doi:10.1067/mai.2000.109620
189. Kroghsbo S, Rigby NM, Johnson PE, et al. Assessment of the Sensitizing Potential of Processed Peanut Proteins in Brown Norway Rats: Roasting Does Not Enhance Allergenicity. Dileepan KN, ed. *PLoS One*. 2014;9(5):e96475. doi:10.1371/journal.pone.0096475
190. Mune Mune MA, Minka SR, Mbome IL. Functional properties of acetylated and succinylated cowpea protein concentrate and effect of enzymatic hydrolysis on solubility. *Int J Food Sci Nutr*. 2011;62(4):310-317. doi:10.3109/09637486.2010.538670
191. Singh A, Ramaswamy HS. Effect of high-pressure treatment on trypsin hydrolysis and antioxidant activity of egg white proteins. *Int J Food Sci Technol*. 2014;49(1):269-279. doi:10.1111/ijfs.12443
192. O'Sullivan J, Murray B, Flynn C, Norton I. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. *Food Hydrocoll*. 2016;53:141-154. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.02.009
193. Barbana C, Boye JI. In vitro protein digestibility and physico-chemical properties of flours and protein concentrates from two varieties of lentil (*Lens culinaris*). *Food Funct*. 2013;4(2):310-321. doi:10.1039/C2FO30204G

194. Lee SY, Mow C v, Se A. Comparison of Milk-Based and Soymilk-Based Yogurt. *J Food Sci.* 1990;55(2):532-536. doi:10.1111/j.1365-2621.1990.tb06803.x
195. Schaafsma G. The Protein Digestibility–Corrected Amino Acid Score. *J Nutr.* 2000;130(7):1865S-1867S. doi:10.1093/jn/130.7.1865S
196. Chatterjee C, Gleddie S, Xiao CW. Soybean Bioactive Peptides and Their Functional Properties. *Nutrients.* 2018;10(9):1211. doi:10.3390/nu10091211
197. Messina M. Insights Gained from 20 Years of Soy Research. *J Nutr.* 2010;140(12):2289S-2295S. doi:10.3945/jn.110.124107
198. Nagano T, Wu W, Tsumura K, Yonemoto-Yano H, Kamada T, Haruma K. The inhibitory effect of soybean and soybean isoflavone diets on 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2016;80(5):991-997. doi:10.1080/09168451.2015.1132150
199. Nishinari K, Fang Y, Guo S, Phillips GO. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocoll.* 2014;39:301-318. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.01.013
200. O'Toole DK. Soybean: Soymilk, Tofu, and Okara. In: *Encyclopedia of Food Grains.* Vol 3-4. 2nd ed. Elsevier; 2016:134-143. doi:10.1016/B978-0-12-394437-5.00130-3
201. Guan X, Zhong X, Lu Y, et al. Changes of Soybean Protein during Tofu Processing. *Foods.* 2021;10(7):1594. doi:10.3390/foods10071594
202. Tachibana S, Tsuda K. A Study of a Method to Understand the Intention of Taste Expressions through Text Mining. *Procedia Comput Sci.* 2020;176:1793-1802. doi:10.1016/j.procs.2020.09.218
203. Wolf WJ, Nelsen TC. Partial Purification and Characterization of the 15S Globulin of Soybeans, a Dimer of Glycinin. *J Agric Food Chem.* 1996;44(3):785-791. doi:10.1021/jf940493p
204. Samoto M, Maebuchi M, Miyazaki C, et al. Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate. *Food Chem.* 2007;102(1):317-322. doi:10.1016/j.foodchem.2006.05.054
205. Damodaran S, Paraf A. *Food Proteins and Their Applications.* 1st ed. (Damodaran S, ed.). CRC Press, Taylor & Francis Group; 1997. doi:10.1201/9780203755617
206. Nielsen NC. The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans. *J Am Oil Chem Soc.* 1985;62(12):1680-1686. doi:10.1007/BF02541665
207. Nielsen NC, Dickinson CD, Cho TJ, et al. Characterization of the glycinin gene family in soybean. *Plant Cell.* 1989;1(3):313-328. doi:10.1105/tpc.1.3.313
208. Dickinson CD, Hussein EH, Nielsen NC. Role of posttranslational cleavage in glycinin assembly. *Plant Cell.* 1989;1(4):459-469. doi:10.1105/tpc.1.4.459
209. Adachi M, Takenaka Y, Gidamis AB, Mikami B, Utsumi S. Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. *J Mol Biol.* 2001;305(2):291-305. doi:10.1006/jmbi.2000.4310
210. Adachi M, Kanamori J, Masuda T, et al. Crystal structure of soybean 11S globulin: Glycinin A3B4 homohexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003;100(12):7395-7400. doi:10.1073/pnas.0832158100

211. Thanh VH, Shibasaki K. Heterogeneity of beta-conglycinin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*. 1976;439(2):326-338. doi:10.1016/0005-2795(76)90068-4
212. Yamauchi F, Sato M, Sato W, Kamata Y, Shibasaki K. Isolation and Identification of a New Type of β -Conglycinin in Soybean Globulins. *Agric Biol Chem*. 1981;45(12):2863-2868. doi:10.1080/00021369.1981.10864970
213. Maruyama N, Katsube T, Wada Y, et al. The roles of the N-linked glycans and extension regions of soybean beta-conglycinin in folding, assembly and structural features. *Eur J Biochem*. 1998;258(2):854-862. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2580854.x
214. Maruyama N, Mohamed Salleh MR, Takahashi K, et al. Structure–Physicochemical Function Relationships of Soybean β -Conglycinin Heterotrimers. *J Agric Food Chem*. 2002;50(15):4323-4326. doi:10.1021/jf0117053
215. Maruyama N, Adachi M, Takahashi K, et al. Crystal structures of recombinant and native soybean β -conglycinin β homotrimers. *Eur J Biochem*. 2001;268(12):3595-3604. doi:10.1046/j.1432-1327.2001.02268.x
216. Ko TP, Ng JD, McPherson A. The Three-Dimensional Structure of Canavalin from Jack Bean (*Canavalia ensiformis*). *Plant Physiol*. 1993;101(3):729-744. doi:10.1104/pp.101.3.729
217. Lawrence MC, Izard T, Beuchat M, Blagrove RJ, Colman PM. Structure of Phaseolin at 2.2 Å Resolution. *J Mol Biol*. 1994;238(5):748-776. doi:10.1006/jmbi.1994.1333
218. Chen N, Zhao M, Chassenieux C, Nicolai T. Structure of self-assembled native soy globulin in aqueous solution as a function of the concentration and the pH. *Food Hydrocoll*. 2016;56:417-424. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.12.028
219. Chen N, Zhao M, Chassenieux C, Nicolai T. Thermal aggregation and gelation of soy globulin at neutral pH. *Food Hydrocoll*. 2016;61:740-746. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.06.028
220. Larsen DS. The Structure and Properties of Eggs. In: *Encyclopedia of Food Chemistry*. Vol 3. Elsevier; 2019:27-32. doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.21686-7
221. Winter WP, Buss EG, Claggett CO, Boucher R v. The nature of the biochemical lesion in avian renal riboflavinuria – II. The inherited change of a riboflavin-binding protein from blood and eggs. *Comp Biochem Physiol*. 1967;22(3):897-906. doi:10.1016/0010-406X(67)90780-3
222. Nys Y, Bain M, van Immerseel F. *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products Volume 1: Egg Chemistry, Production and Consumption*. Vol 1. 1st ed. (Nys Y, Bain M, van Immerseel F, eds.). Woodhead Publishing Limited; 2011. doi:10.1533/9780857093912
223. Baker CMA, Croizier G, Strati A, Manwell C. Identity and Nomenclature of Some Protein Polymorphisms of Chicken Eggs and Sera. In: Caspari EW, ed. *Advances in Genetics*. Vol 15. Academic Press; Elsevier Inc.; 1970:147-174. doi:10.1016/S0065-2660(08)60073-5
224. van Immerseel F, Nys Y, Bain M. *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: Volume 2: Egg Safety and Nutritional Quality*. Vol 2. 1st ed. (Immerseel F van, Nys Y, Bain M, eds.). Woodhead Publishing Limited; 2011.

<https://www.sciencedirect.com/book/9780857090720/improving-the-safety-and-quality-of-eggs-and-egg-products#book-description>

225. Fallis AG. *Bioactive Egg Compounds*. 1st ed. (Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R, eds.). Springer Berlin Heidelberg; 2007. doi:10.1007/978-3-540-37885-3
226. Huntington JA, Stein PE. Structure and properties of ovalbumin. *J Chromatogr B Bio-med Sci Appl*. 2001;756(1-2):189-198. doi:10.1016/S0378-4347(01)00108-6
227. Mizutani K, Toyoda M, Mikami B. X-ray structures of transferrins and related proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2012;1820(3):203-211. doi:10.1016/j.bbagen.2011.08.003
228. Papamokos E, Weber E, Bode W, et al. Crystallographic refinement of Japanese quail ovomucoid, a Kazal-type inhibitor, and model building studies of complexes with serine proteases. *J Mol Biol*. 1982;158(3):515-537. doi:10.1016/0022-2836(82)90212-1
229. Meir A, Bayer EA, Livnah O. Structural Adaptation of a Thermostable Biotin-binding Protein in a Psychrophilic Environment. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(22):17951-17962. doi:10.1074/jbc.M112.357186
230. Monaco HL. Crystal structure of chicken riboflavin-binding protein. *EMBO J*. 1997;16(7):1475-1483. doi:10.1093/emboj/16.7.1475
231. Guo A. Comparative Analysis of Cystatin Superfamily in Platyhelminths. Munderloh UG, ed. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124683. doi:10.1371/journal.pone.0124683
232. Stevens L. Egg white proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and*. 1991;100(1):1-9. doi:10.1016/0305-0491(91)90076-P
233. Nisbet AD, Saundry RH, Moir AJ, Fothergill LA, Fothergill JE. The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *Eur J Biochem*. 1981;115(2):335-345. doi:10.1111/j.1432-1033.1981.tb05243.x
234. Lush IE. Genetic Polymorphisms in the Egg Albumen Proteins of the Domestic Fowl. *Nature*. 1961;189(4769):981-984. doi:10.1038/189981a0
235. Ishihara H, Takahashi N, Ito J, Takeuchi E, Tejima S. Either high-mannose-type or hybrid-type oligosaccharide is linked to the same asparagine residue in ovalbumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*. 1981;669(2):216-221. doi:10.1016/0005-2795(81)90243-9
236. Lingappa VR, Lingappa JR, Blobel G. Chicken ovalbumin contains an internal signal sequence. *Nature*. 1979;281(5727):117-121. doi:10.1038/281117a0
237. Hunt LT, Dayhoff MO. A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha1-proteinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1980;95(2):864-871. doi:10.1016/0006-291X(80)90867-0
238. Bruch M, Weiss V, Engel J. Plasma serine proteinase inhibitors (serpins) exhibit major conformational changes and a large increase in conformational stability upon cleavage at their reactive sites. *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(32):16626-16630. doi:10.1016/S0021-9258(18)37436-2
239. Stein PE, Tewkesbury DA, Carrell RW. Ovalbumin and angiotensinogen lack serpin S-R conformational change. *Biochemical Journal*. 1989;262(1):103-107. doi:10.1042/bj2620103

240. Miller M, Weinstein JN, Wlodawer A. Preliminary x-ray analysis of single crystals of ovalbumin and plakalbumin. *Journal of Biological Chemistry*. 1983;258(9):5864-5866. doi:10.1016/S0021-9258(20)81974-7
241. Mucha J, Klaudiny J, Klaudinyová V, Hanes J, Šimúth J. The sequence of Japanese quail ovalbumin cDNA. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(18):5553-5553. doi:10.1093/nar/18.18.5553
242. Williams J. A comparison of glycopeptides from the ovotransferrin and serum transferrin of the hen. *Biochemical Journal*. 1968;108(1):57-67. doi:10.1042/bj1080057
243. Williams J. The evolution of transferrin. *Trends Biochem Sci.* 1982;7(11):394-397. doi:10.1016/0968-0004(82)90183-9
244. Williams J, Moreton K, Goodearl ADJ. Selective reduction of a disulphide bridge in hen ovotransferrin. *Biochemical Journal*. 1985;228(3):661-665. doi:10.1042/bj2280661
245. Jeltsch JM, Chambon P. The complete nucleotide sequence of the chicken ovotransferrin mRNA. *Eur J Biochem.* 1982;122(2):291-295. doi:10.1111/j.1432-1033.1982.tb05879.x
246. Anderson BF, Baker HM, Dodson EJ, et al. Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987;84(7):1769-1773. doi:10.1073/pnas.84.7.1769
247. Bailey S, Evans RW, Garratt RC, et al. Molecular structure of serum transferrin at 3.3-Å resolution. *Biochemistry*. 1988;27(15):5804-5812. doi:10.1021/bi00415a061
248. Oe H, Takabashi N, Doi E, Hirose M. Effects of Anion Binding on the Conformations of the Two Domains of Ovotransferrin. *The Journal of Biochemistry*. 1989;106(5):858-863. https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/106/5/106_5_858/_pdf
249. Oratore A, D'Andrea G, Moreton K, Williams J. Binding of various ovotransferrin fragments to chick-embryo red cells. *Biochemical Journal*. 1989;257(1):301-304. doi:10.1042/bj2570301
250. Williams J, Moreton K. The dimerization of half-molecule fragments of transferrin. *Biochemical Journal*. 1988;251(3):849-855. doi:10.1042/bj2510849
251. Roberts JR. Factors Affecting Egg Internal Quality and Egg Shell Quality in Laying Hens. *J Poult Sci.* 2004;41(3):161-177. doi:10.2141/jpsa.41.161
252. Robinson DS, Monsey JB. Studies on the composition of egg-white ovomucin. *Biochemical Journal*. 1971;121(3):537-547. doi:10.1042/bj1210537
253. Robinson DS, Monsey JB. The composition and proposed subunit structure of egg-white β -ovomucin. The isolation of an unreduced soluble ovomucin. *Biochemical Journal*. 1975;147(1):55-62. doi:10.1042/bj1470055
254. Kato A, Oda S, Yamanaka Y, Matsudomi N, Kobayashi K. Functional and Structural Properties of Ovomucin. *Agric Biol Chem.* 1985;49(12):3501-3504. doi:10.1080/00021369.1985.10867297
255. Rabouille C, Aon MA, Muller G, Cartaud J, Thomas D. The supramolecular organization of ovomucin. Biophysical and morphological studies. *Biochemical Journal*. 1990;266(3):697-706. doi:10.1042/bj2660697
256. Hartley BS. Proteolytic Enzymes. *Annu Rev Biochem.* 1960;29(1):45-72. doi:10.1146/an-nurev.bi.29.070160.000401

257. Kato I, Kohr WJ, Laskowski M. Evolution of Avian Ovomucoids. In: Magnusson S, Foltmann B, Ottesen M, Neurath H, Danø K, eds. *Regulatory Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors: 11th Meeting Copenhagen 1977*. 1st ed. Elsevier Ltd.; 1978:197-206. doi:10.1016/B978-0-08-022628-6.50022-1
258. Laskowski M, Kato I. Protein Inhibitors of Proteinases. *Annu Rev Biochem.* 1980;49(1):593-626. doi:10.1146/annurev.bi.49.070180.003113
259. Empie MW, Laskowski M. Thermodynamics and kinetics of single residue replacements in avian ovomucoid third domains: effect on inhibitor interactions with serine proteinases. *Biochemistry.* 1982;21(10):2274-2284. doi:10.1021/bi00539a002
260. Laskowski M, Kato I, Ardelt W, et al. Ovomucoid third domains from 100 avian species: isolation, sequences, and hypervariability of enzyme-inhibitor contact residues. *Biochemistry.* 1987;26(1):202-221. doi:10.1021/bi00375a028
261. Laskowski M, Apostol I, Ardelt W, et al. Amino acid sequences of ovomucoid third domain from 25 additional species of birds. *J Protein Chem.* 1990;9(6):715-725. doi:10.1007/BF01024766
262. Liu WH, Means GE, Feeney RE. The inhibitory properties of avian ovoinhibitors against proteolytic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure.* 1971;229(1):176-185. doi:10.1016/0005-2795(71)90331-X
263. Zahnley JC. Evidence That the Two Binding Sites for Trypsin on Chicken Ovoinhibitor Are Not Equivalent. *Journal of Biological Chemistry.* 1974;249(13):4282-4285. doi:10.1016/S0021-9258(19)42514-3
264. Fossum K, Whitaker JR. Ficin and papain inhibitor from chicken egg white. *Arch Biochem Biophys.* 1968;125(1):367-375. doi:10.1016/0003-9861(68)90672-3
265. Barrett AJ. Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinases. In: Lorand L, ed. *Methods in Enzymology*. Vol 80. Academic Press; Elsevier Inc.; 1981:771-778. doi:10.1016/S0076-6879(81)80059-6
266. Anastasi A, Brown MA, Kembhavi AA, et al. Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum. *Biochemical Journal.* 1983;211(1):129-138. doi:10.1042/bj2110129
267. Turk V, Brzin J, Longer M, et al. Protein inhibitors of cysteine proteinases. III. Amino-acid sequence of cystatin from chicken egg white. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1983;364(11):1487-1496. doi:10.1515/bchm2.1983.364.2.1487
268. Schwabe C, Anastasi A, Crow H, McDonald JK, Barrett AJ. Cystatin. Amino acid sequence and possible secondary structure. *Biochemical Journal.* 1984;217(3):813-817. doi:10.1042/bj2170813
269. Bode W, Engl R, Musil D, et al. The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *EMBO J.* 1988;7(8):2593-2599. doi:10.1002/j.1460-2075.1988.tb03109.x
270. Nagase H, Harris ED, Woessner JF, Brew K. Ovostatin: a novel proteinase inhibitor from chicken egg white. I. Purification, physicochemical properties, and tissue distribution of ovostatin. *Journal of Biological Chemistry.* 1983;258(12):7481-7489. doi:10.1016/S0021-9258(18)32203-8

271. Ruben GC, Harris ED, Nagase H. Electron microscopic studies of free and proteinase-bound duck ovomacroglobulins (ovomacroglobulins). Model of ovomacroglobulin structure and its transformation upon proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(6):2861-2869. doi:10.1016/S0021-9258(18)69148-3
272. Phillips DC. The Hen Egg-White Lysozyme Molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1967;57(3):483-495. doi:10.1073/pnas.57.3.483
273. Hammes GG. *Enzyme Catalysis and Regulation*. 1st ed. Academic Press; Elsevier Inc.; 1982. doi:10.1016/B978-0-12-321960-2.X5001-X
274. Imoto T, Johnson LN, North ACT, Phillips DC, Rupley JA. Vertebrate Lysozymes. In: Boyer PD, ed. *Enzymes*. Vol 7. Elsevier Inc.; 1972:665-868. doi:10.1016/S1874-6047(08)60465-5
275. Malcolm BA, Rosenberg S, Corey MJ, Allen JS, de Baetselier A, Kirsch JF. Site-directed mutagenesis of the catalytic residues Asp-52 and Glu-35 of chicken egg white lysozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(1):133-137. doi:10.1073/pnas.86.1.133
276. Redfield C, Dobson CM. Sequential proton NMR assignments and secondary structure of hen egg white lysozyme in solution. *Biochemistry*. 1988;27(1):122-136. doi:10.1021/bi00401a020
277. Radford SE, Woolfson DN, Martin SR, Lowe G, Dobson CM. A three-disulphide derivative of hen lysozyme. Structure, dynamics and stability. *Biochemical Journal*. 1991;273(1):211-217. doi:10.1042/bj2730211
278. Weaver LH, Grütter MG, Remington SJ, Gray TM, Isaacs NW, Matthews BW. Comparison of goose-type, chicken-type, and phage-type lysozymes illustrates the changes that occur in both amino acid sequence and three-dimensional structure during evolution. *J Mol Evol*. 1985;21(2):97-111. doi:10.1007/BF02100084
279. Jollès J, Ibrahimi IM, Prager EM, Schoentgen F, Jollès P, Wilson AC. Amino acid sequence of pheasant lysozyme. Evolutionary change affecting processing of prelysozyme. *Biochemistry*. 1979;18(13):2744-2752. doi:10.1021/bi00580a009
280. Itoh T, Sugawara H, Adachi S. Isolation and characterization of new minor proteins (Ovoglycocomponents) from chicken and quail egg whites. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 1980;67(2):261-264. doi:10.1016/0305-0491(80)90142-X
281. Feeney RE, Abplanalp H, Clary JJ, Edwards DL, Clark JR. A Genetically Varying Minor Protein Constituent of Chicken Egg White. *Journal of Biological Chemistry*. 1963;238(5):1732-1736. doi:10.1016/S0021-9258(18)81128-0
282. Stevens L, Duncan D. Peptide mapping of ovoglobulins G2A and G2B in the domestic fowl. *Br Poult Sci*. 1988;29(3):665-669. doi:10.1080/00071668808417092
283. White HB. Vitamin-binding proteins in the nutrition of the avian embryo. *J Exp Zool Suppl*. 1987;1(SUPPL. 1):53-63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3298537>
284. White HB, Merrill AH. Riboflavin-Binding Proteins. *Annu Rev Nutr*. 1988;8(1):279-299. doi:10.1146/annurev.nu.08.070188.001431
285. Norioka N, Okada T, Hamazume Y, Mega T, Ikenaka T. Comparison of the amino acid sequences of hen plasma-, yolk-, and white-riboflavin binding proteins. *J Biochem*. 1985;97(1):19-28. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135044

286. Walker M, Stevens L, Duncan D, Price NC, Kelly SM. A comparative study of the structure of egg-white riboflavin binding protein from the domestic fowl and Japanese quail. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 1991;100(1):77-81. doi:10.1016/0305-0491(91)90088-U
287. Becvar J, Palmer G. The binding of flavin derivatives to the riboflavin-binding protein of egg white. A kinetic and thermodynamic study. *Journal of Biological Chemistry*. 1982;257(10):5607-5617. doi:10.1016/S0021-9258(19)83821-8
288. Miller MS, Benore-Parsons M, White HB. Dephosphorylation of chicken riboflavin-binding protein and phosvitin decreases their uptake by oocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1982;257(12):6818-6824. doi:10.1016/S0021-9258(18)34503-4
289. Rhodes MB, Bennett N, Feeney RE. The Flavoprotein-Apoprotein System of Egg White. *Journal of Biological Chemistry*. 1959;234(8):2054-2060. doi:10.1016/S0021-9258(18)69866-7
290. Michael Green N. Avidin and streptavidin. In: Wilchek M, Bayer EA, eds. *Methods in Enzymology*. Vol 184. Academic Press; Elsevier Inc.; 1990:51-67. doi:10.1016/0076-6879(90)84259-J
291. Green NM. Avidin. *Adv Protein Chem*. 1975;29:85-133. doi:10.1016/s0065-3233(08)60411-8
292. Wilchek M, Bayer EA. Introduction to avidin-biotin technology. In: Wilchek M, Bayer EA, eds. *Methods in Enzymology*. Vol 184. Academic Press; Elsevier Inc.; 1990:5-13. doi:10.1016/0076-6879(90)84256-G
293. Muniyappa K, Adiga PR. Isolation and characterization of thiamin-binding protein from chicken egg white. *Biochemical Journal*. 1979;177(3):887-894. doi:10.1042/bj1770887
294. Muniyappa K, Adiga PR. Nature of the thiamin-binding protein from chicken egg yolk. *Biochemical Journal*. 1981;193(3):679-685. doi:10.1042/bj1930679
295. Talwalkar A, Kailasapathy K. The Role of Oxygen in the Viability of Probiotic Bacteria with Reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Curr Issues Intest Microbiol*. 2004;5(1):1-8. https://www.researchgate.net/profile/Kasipathy-Kailasapathy/publication/8645195_The_Role_of_Oxygen_in_the_Viability_of_Probiotic_Bacteria_with_Reference_to_L_acidophilus_and_Bifidobacterium_spp/links/550910a40cf2d7a2812bd511/The-Role-of-Oxygen-in-the-Viab
296. Meuric V, Gracieux P, Tamanai-Shacoori Z, Perez-Chaparro J, Bonnaure-Mallet M. Expression patterns of genes induced by oxidative stress in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23(4):308-314. doi:10.1111/j.1399-302X.2007.00429.x
297. Bernroitner M, Zamocky M, Furtmüller PG, Peschek GA, Obinger C. Occurrence, phylogeny, structure, and function of catalases and peroxidases in cyanobacteria. *J Exp Bot*. 2009;60(2):423-440. doi:10.1093/jxb/ern309
298. Regelsberger G, Jakopitsch C, Plasser L, et al. Occurrence and biochemistry of hydroperoxidases in oxygenic phototrophic prokaryotes (cyanobacteria). *Plant Physiology and Biochemistry*. 2002;40(6-8):479-490. doi:10.1016/S0981-9428(02)01405-5

299. Bekker A, Holland HD, Wang PL, et al. Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature*. 2004;427(6970):117-120. doi:10.1038/nature02260
300. Kalsoom U, Bhatti HN, Asgher M. Characterization of Plant Peroxidases and Their Potential for Degradation of Dyes: a Review. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015;176(6):1529-1550. doi:10.1007/s12010-015-1674-3
301. Azevedo AM, Martins VC, Prazeres DMF, Vojinović V, Cabral JMS, Fonseca LP. Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnol Annu Rev*. 2003;9(3):199-247. doi:10.1016/s1387-2656(03)09003-3
302. Mogharrab N, Ghourchian H, Amininasab M. Structural stabilization and functional improvement of horseradish peroxidase upon modification of accessible lysines: Experiments and simulation. *Biophys J*. 2007;92(4):1192-1203. doi:10.1529/biophysj.106.092858
303. Manu BT, Rao UJSP. Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran. *Food Chem*. 2009;114(1):66-71. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.028
304. Lee TM, Lin YH. Changes in soluble and cell wall-bound peroxidase activities with growth in anoxia-treated rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles and roots. *Plant Science*. 1995;106(1):1-7. doi:10.1016/0168-9452(94)04053-J
305. Cardinali A, Tursi N, Ligorio A, et al. Purification, biochemical characterization and cloning of a new cationic peroxidase isoenzyme from artichoke. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2011;49(4):395-403. doi:10.1016/j.plaphy.2011.01.028
306. Pandey VP, Dwivedi UN. Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume. *J Mol Catal B Enzym*. 2011;68(2):168-173. doi:10.1016/j.molcatb.2010.10.006
307. de Gara L. Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. *Phytochemistry Reviews*. 2004;3(1-2):195-205. doi:10.1023/B:PHYT.0000047795.82713.99
308. Zhang Z, Pang X, Xuwu D, Ji Z, Jiang Y. Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chem*. 2005;90(1-2):47-52. doi:10.1016/j.foodchem.2004.03.023
309. Fatima A, Husain Q, Khan RH. A peroxidase from bitter melon (*Momordica charantia*) with enhanced stability against organic solvent and detergent: A comparison with horseradish peroxidase. *J Mol Catal B Enzym*. 2007;47(1-2):66-71. doi:10.1016/j.molcatb.2007.03.010
310. Purrello R, Gurrieri S, Lauceri R. Porphyrin assemblies as chemical sensors. *Coord Chem Rev*. 1999;190-192:683-706. doi:10.1016/S0010-8545(99)00106-X
311. Moreira PR, Bouillenne F, Almeida-Vara E, Xavier Malcata F, Frère JM, Duarte JC. Purification, kinetics and spectral characterisation of a new versatile peroxidase from a *Bjerkandera* sp. isolate. *Enzyme Microb Technol*. 2006;38(1-2):28-33. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.12.035
312. Lee MY. Effects of Na₂SO₃ on the activities of antioxidant enzymes in geranium seedlings. *Phytochemistry*. 2002;59(5):493-499. doi:10.1016/S0031-9422(01)00478-2

313. Dubey A, Diwakar SK, Rawat SK, et al. Characterization of Ionically Bound Peroxidases from Apple(*Mallus pumilus*) Fruits. *Prep Biochem Biotechnol*. 2007;37(1):47-58. doi:10.1080/10826060601040871
314. Redoxi Base. Accessed 18.10.2022. <https://peroxibase.toulouse.inra.fr/>
315. Sugano Y. DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009;66(8):1387-1403. doi:10.1007/s00018-008-8651-8
316. Zamocky M, Jakopitsch C, Furtmüller PG, Dunand C, Obinger C. The peroxidase-cyclooxygenase superfamily: Reconstructed evolution of critical enzymes of the innate immune system. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2008;72(2):589-605. doi:10.1002/prot.21950
317. Sugano Y, Muramatsu R, Ichiyanagi A, Sato T, Shoda M. DyP, a unique dye-decolorizing peroxidase, represents a novel heme peroxidase family: ASP171 replaces the distal histidine of classical peroxidases. *J Biol Chem*. 2007;282(50):36652-36658. doi:10.1074/jbc.M706996200
318. Kim SJ, Shoda M. Purification and Characterization of a Novel Peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 Involved in Decolorization of Dyes. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(3):1029-1035. doi:10.1128/AEM.65.3.1029-1035.1999
319. Veitch NC. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. 2004;65(3):249-259. doi:10.1016/j.phytochem.2003.10.022
320. Berglund GI, Carlsson GH, Smith AT, Szöke H, Henriksen A, Hajdu J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*. 2002;417(6887):463-468. doi:10.1038/417463a
321. Gajhede M, Schuller DJ, Henriksen A, Smith AT, Poulos TL. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat Struct Biol*. 1997;4(12):1032-1038. doi:10.1038/nsb1297-1032
322. Bach A, Chodat R. Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. IV. Ueber Peroxydase. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1903;36(1):600-605. doi:10.1002/cber.190303601119
323. Aebi H. Peroxidase. The Properties and Uses of a Versatile Enzyme and of some Related Catalysts. Von B. C. Saunders, A. G. Holmes-Siedle und B. P. Stark. Butterworths, London 1964. 1. Aufl. X, 271 S., zahlr. Abb. u. Tab., geb. £ 3.0.0. *Angewandte Chemie*. 1965;77(24):1144-1144. doi:10.1002/ange.19650772421
324. Akbar H, Mensah Sedzro D, Khan M, Faysal Bellah S, Saker Billah SM. Structure, Function and Applications of a Classic Enzyme: Horseradish Peroxidase. *Journal of Chemical, Environmental and Biological Engineering*. 2018;2(2):52-59. doi:10.11648/j.jcebe.20180202.13
325. Welinder KG. Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7). *FEBS Lett*. 1976;72(1):19-23. doi:10.1016/0014-5793(76)80804-6
326. Yang BY, Gray JSS, Montgomery R. The glycans of horseradish peroxidase. *Carbohydr Res*. 1996;287(2):203-212. doi:10.1016/0008-6215(96)00073-0
327. Veitch NC, Smith AT. Horseradish peroxidase. In: *Advances in Inorganic Chemistry*. Vol 51. Academic Press; 2000:107-162. doi:10.1016/S0898-8838(00)51002-2

328. Haschke RH, Friedhoff JM. Calcium-related properties of horseradish peroxidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1978;80(4):1039-1042. doi:10.1016/0006-291x(78)91350-5
329. Howes BD, Feis A, Raimondi L, Indiani C, Smulevich G. The critical role of the proximal calcium ion in the structural properties of horseradish peroxidase. *J Biol Chem*. 2001;276(44):40704-40711. doi:10.1074/jbc.M107489200
330. Kawaoka A, Kawamoto T, Ohta H, Sekine M, Takano M, Shinmyo A. Wound-induced expression of horseradish peroxidase. *Plant Cell Rep*. 1994;13-13(3-4):601-606. doi:10.1007/BF00239882
331. Dunford B, Raven E. *Heme Peroxidases*. Vol 4. RSC Metall. (Raven E, Dunford B, eds.). The Royal Society of Chemistry; 2016. doi:10.1002/9780470034590.emrstm0200
332. Harris RZ, Newmyer SL, Ortiz de Montellano PR. Horseradish peroxidase-catalyzed two-electron oxidations. Oxidation of iodide, thioanisoles, and phenols at distinct sites. *J Biol Chem*. 1993;268(3):1637-1645. doi:10.1016/S0021-9258(18)53900-4
333. Filizola M, Loew GH. Role of Protein Environment in Horseradish Peroxidase Compound I Formation: Molecular Dynamics Simulations of Horseradish Peroxidase-HOOH Complex. *J Am Chem Soc*. 2000;122(1):18-25. doi:10.1021/ja992793z
334. Rodríguez-López JN, Lowe DJ, Hernández-Ruiz J, Hiner ANP, García-Cánovas F, Thorneley RNF. Mechanism of reaction of hydrogen peroxide with horseradish peroxidase: identification of intermediates in the catalytic cycle. *J Am Chem Soc*. 2001;123(48):11838-11847. doi:10.1021/ja011853+
335. Henriksen A, Smith AT, Gajhede M. The Structures of the Horseradish Peroxidase C-Ferulic Acid Complex and the Ternary Complex with Cyanide Suggest How Peroxidases Oxidize Small Phenolic Substrates. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(49):35005-35011. doi:10.1074/jbc.274.49.35005
336. Ortiz de Montellano PR. Catalytic Sites of Hemoprotein Peroxidases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1992;32(1):89-107. doi:10.1146/annurev.pa.32.040192.000513
337. Newmyer SL, de Montellano PRO. Horseradish Peroxidase His-42 → Ala, His-42 → Val, and Phe-41 → Ala Mutants. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(33):19430-19438. doi:10.1074/jbc.270.33.19430
338. Ozaki S ichi, Ortiz de Montellano PR. Molecular Engineering of Horseradish Peroxidase: Thioether Sulfoxidation and Styrene Epoxidation by Phe-41 Leucine and Threonine Mutants. *J Am Chem Soc*. 1995;117(27):7056-7064. doi:10.1021/ja00132a003
339. Campomanes P, Rothlisberger U, Alfonso-Prieto M, Rovira C. The Molecular Mechanism of the Catalase-like Activity in Horseradish Peroxidase. *J Am Chem Soc*. 2015;137(34):11170-11178. doi:10.1021/jacs.5b06796
340. Rong J, Zhou Z, Wang Y, et al. Immobilization of horseradish peroxidase on multi-armed magnetic graphene oxide composite: Improvement of loading amount and catalytic activity. *Food Technol Biotechnol*. 2019;57(2):260-271. doi:10.17113/ftb.57.02.19.5832
341. Ibel K, May RP, Kirschner K, Szadkowski H, Mascher E, Lundahl P. Protein-decorated micelle structure of sodium-dodecyl-sulfate--protein complexes as determined by neutron scattering. *Eur J Biochem*. 1990;190(2):311-318. doi:10.1111/j.1432-1033.1990.tb15578.x

342. Srinivasulu S, Rao AGAppu. Kinetic and structural studies on the interaction of surfactants with lipooxygenase L1 from soybeans (*Glycine max*). *J Agric Food Chem*. 1993;41(3):366-371. doi:10.1021/jf00027a006
343. Wang J, Yao M, Bai G, Liu J, Wang Y. Inhibition of horseradish peroxidase activity through conformational change in surfactant solution. *J Surfactants Deterg*. 2022;25(4):477-486. doi:10.1002/jsde.12589
344. Krieg R, Halbhuber KJ. Detection of endogenous and immuno-bound peroxidase--the status quo in histochemistry. *Prog Histochem Cytochem*. 2010;45(2):81-139. doi:10.1016/j.proghi.2009.11.001
345. Ó'Fágáin C. Enzyme stabilization—recent experimental progress. *Enzyme Microb Technol*. 2003;33(2-3):137-149. doi:10.1016/S0141-0229(03)00160-1
346. van de Velde F, van Rantwijk F, Sheldon RA. Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. *Trends Biotechnol*. 2001;19(2):73-80. doi:10.1016/s0167-7799(00)01529-8
347. Ardila-Leal LD, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, Quevedo-Hidalgo BE. A Brief History of Colour, the Environmental Impact of Synthetic Dyes and Removal by Using Laccases. *Molecules*. 2021;26(13):3813. doi:10.3390/molecules26133813
348. Morriss-Kay GM. The evolution of human artistic creativity. *J Anat*. 2010;216(2):158-176. doi:10.1111/j.1469-7580.2009.01160.x
349. Gilbert KG. Dyes. In: Thomas B, Murray BG, Murphy DJ, eds. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Vol 2. 2nd ed. Academic Press; Elsevier Inc.; 2017:368-373. doi:10.1016/B978-0-12-394807-6.00069-1
350. Robert E. The role of the cave in the expression of prehistoric societies. *Quaternary International*. 2017;432:59-65. doi:10.1016/j.quaint.2015.11.083
351. Duarte CM. Red ochre and shells: clues to human evolution. *Trends Ecol Evol*. 2014;29(10):560-565. doi:10.1016/j.tree.2014.08.002
352. Hovers E, Ilani S, Bar-Yosef O, Vandermeersch B. An Early Case of Color Symbolism. *Curr Anthropol*. 2003;44(4):491-522. doi:10.1086/375869
353. Barnett JR, Miller S, Pearce E. Colour and art: A brief history of pigments. *Opt Laser Technol*. 2006;38(4-6):445-453. doi:10.1016/j.optlastec.2005.06.005
354. Abel A. The history of dyes and pigments. In: Best J, ed. *Colour Design: Theories and Applications*. 2nd ed. Woodhead Publishing Series in Textiles. Elsevier Ltd.; 2012:557-587. doi:10.1016/B978-0-08-101270-3.00024-2
355. Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour Technol*. 2001;77(3):247-255. doi:10.1016/S0960-8524(00)00080-8
356. Johnston W. The discovery of aniline and the origin of the term "aniline dye." *Biotechnic & Histochemistry*. 2008;83(2):83-87. doi:10.1080/10520290802136793
357. Paz A, Carballo J, Pérez MJ, Domínguez JM. Biological treatment of model dyes and textile wastewaters. *Chemosphere*. 2017;181:168-177. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.04.046

358. Chequer FMD, de Oliveira GAR, Ferraz ERA, Cardoso JC, Zanoni MVB, de Oliveir DP. Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact. In: Günay M, ed. *Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing*. InTech; 2013:151-176. doi:10.5772/53659
359. Braun H. Particle Size and Solubility of Disperse Dyes. *Review of Progress in Coloration and Related Topics*. 1983;13(1):62-72. doi:10.1111/j.1478-4408.1983.tb03728.x
360. Torres FAE, Zaccarim BR, de Lencastre Novaes LC, et al. Natural colorants from filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(6):2511-2521. doi:10.1007/s00253-015-7274-x
361. Zucca P, Cocco G, Sollai F, Sanjust E. Fungal laccases as tools for biodegradation of industrial dyes. *Biocatalysis*. 2016;1(1):82-108. doi:10.1515/boca-2015-0007
362. Kuenemann MA, Szymczyk M, Chen Y, et al. Weaver's historic accessible collection of synthetic dyes: a cheminformatics analysis. *Chem Sci*. 2017;8(6):4334-4339. doi:10.1039/C7SC00567A
363. Yaseen DA, Scholz M. Textile dye wastewater characteristics and constituents of synthetic effluents: a critical review. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2019;16(2):1193-1226. doi:10.1007/s13762-018-2130-z
364. Bhatia D, Sharma NR, Singh J, Kanwar RS. Biological methods for textile dye removal from wastewater: A review. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 2017;47(19):1836-1876. doi:10.1080/10643389.2017.1393263
365. Shindhal T, Rakholiya P, Varjani S, et al. A critical review on advances in the practices and perspectives for the treatment of dye industry wastewater. *Bioengineered*. 2021;12(1):70-87. doi:10.1080/21655979.2020.1863034
366. Gita S, Shukla SP, Choudhury TG, Prakash C, Singh AR. A prototype of novel agro-waste based column bed device for removal of textile dye Optilan Red. *Water Science and Technology*. 2017;76(5):1251-1260. doi:10.2166/wst.2017.311
367. Benkhaya S, M'rabet S, el Harfi A. Classifications, properties, recent synthesis and applications of azo dyes. *Heliyon*. 2020;6(1):e03271. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03271
368. Li HH, Wang Y tao, Wang Y, Wang HX, Sun KK, Lu ZM. Bacterial degradation of anthraquinone dyes. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*. 2019;20(6):528-540. doi:10.1631/jzus.B1900165
369. Monez N, Lepre L, Ando R. Unraveling the Solvatochromism of a Triarylmethane Dye by Resonance Raman Spectroscopy. *Quim Nova*. 2019;X(00):1-6. doi:10.21577/0100-4042.20170428
370. Raue R, Corbett JF. Nitro and Nitroso Dyes. In: Wiley-VCH, ed. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Vol 24. 6th ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2000:273-290. doi:10.1002/14356007.a17_383
371. Paul R, Blackburn RS, Bechtold T. Indigo and Indigo Colorants. In: Wiley-VCH, ed. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 7th ed. Wiley-VCH Verlag GmbH; 2021:1-16. doi:10.1002/14356007.a14_149.pub3
372. Apostol LC, Pereira L, Pereira R, Gavrilescu M, Alves MM. Biological decolorization of xanthene dyes by anaerobic granular biomass. *Biodegradation*. 2012;23(5):725-737. doi:10.1007/s10532-012-9548-7

373. Gessner T, Mayer U. Triarylmethane and Diarylmethane Dyes. In: Wiley-VCH, ed. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Vol 37. 6th ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2000:425-478. doi:10.1002/14356007.a27_179
374. Sabnis RW. Developments in the chemistry and applications of phthalein dyes. Part 1: Industrial applications. *Coloration Technology*. 2018;134(3):187-205. doi:10.1111/cote.12323
375. Berradi M, Hsissou R, Khudhair M, et al. Textile finishing dyes and their impact on aquatic environs. *Heliyon*. 2019;5(11):e02711. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02711
376. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Some Aromatic Amines, Organic Dyes, and Related Exposures*. Vol 99. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; 2010. doi:10.1136/jcp.48.7.691-a
377. Burkinshaw SM, Salihu G. The role of auxiliaries in the immersion dyeing of textile fibres: Part 5 practical aspects of the role of inorganic electrolytes in dyeing cellulosic fibres with direct dyes. *Dyes and Pigments*. 2019;161:581-594. doi:10.1016/j.dyepig.2017.09.002
378. Chowdhury MF, Khandaker S, Sarker F, Islam A, Rahman MT, Awual MR. Current treatment technologies and mechanisms for removal of indigo carmine dyes from wastewater: A review. *J Mol Liq*. 2020;318:114061. doi:10.1016/j.molliq.2020.114061
379. Ghaly A, Ananthashankar R, Alhattab M, Ramakrishnan V. Production, Characterization and Treatment of Textile Effluents: A Critical Review. *Journal of Chemical Engineering & Process Technology*. 2014;5(1):1000182. doi:10.4172/2157-7048.1000182
380. Thakur S, Chauhan MS. Treatment of Dye Wastewater from Textile Industry by Electrocoagulation and Fenton Oxidation: A Review. In: Singh VP, Yadav S, Yadava RN, eds. *Water Quality Management: Select Proceedings of ICWEES-2016*. Vol 79. Water Science and Technology Library. Springer Singapore; 2018:117-129. doi:10.1007/978-981-10-5795-3_11
381. Barathi S, Karthik C, S N, Padikasan IA. Biodegradation of textile dye Reactive Blue 160 by *Bacillus firmus* (Bacillaceae: Bacillales) and non-target toxicity screening of their degraded products. *Toxicol Rep*. 2020;7:16-22. doi:10.1016/j.toxrep.2019.11.017
382. Nguyen TA, Juang RS. Treatment of waters and wastewaters containing sulfur dyes: A review. *Chemical Engineering Journal*. 2013;219:109-117. doi:10.1016/j.cej.2012.12.102
383. Khattab TA, Abdelrahman MS, Rehan M. Textile dyeing industry: environmental impacts and remediation. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020;27(4):3803-3818. doi:10.1007/s11356-019-07137-z
384. Wan Z, Li D, Jiao Y, Ouyang X, Chang L, Wang X. Bifunctional MoS₂ coated melamine-formaldehyde sponges for efficient oil-water separation and water-soluble dye removal. *Appl Mater Today*. 2017;9:551-559. doi:10.1016/j.apmt.2017.09.013
385. Salem MZM, Ibrahim IHM, Ali HM, Helmy HM. Assessment of the Use of Natural Extracted Dyes and Pancreatin Enzyme for Dyeing of Four Natural Textiles: HPLC Analysis of Phytochemicals. *Processes*. 2020;8(1):59. doi:10.3390/pr8010059
386. Li W, Mu B, Yang Y. Feasibility of industrial-scale treatment of dye wastewater via bio-adsorption technology. *Bioresour Technol*. 2019;277(January):157-170. doi:10.1016/j.biortech.2019.01.002

387. Zhang L, Shao Q, Xu C. Enhanced azo dye removal from wastewater by coupling sulfidated zero-valent iron with a chelator. *J Clean Prod.* 2019;213:753-761. doi:10.1016/j.jclepro.2018.12.183
388. Singh RL, Singh PK, Singh RP. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes – A review. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2015;104:21-31. doi:10.1016/j.ibiod.2015.04.027
389. Louati I, Elloumi-Mseddi J, Cheikhrouhou W, et al. Simultaneous cleanup of Reactive Black 5 and cadmium by a desert soil bacterium. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020;190(December 2019):110103. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.110103
390. Al-Tohamy R, Sun J, Fareed MF, Kenawy ER, Ali SS. Ecofriendly biodegradation of Reactive Black 5 by newly isolated *Sterigmatomyces halophilus* SSA1575, valued for textile azo dye wastewater processing and detoxification. *Sci Rep.* 2020;10(1):12370. doi:10.1038/s41598-020-69304-4
391. Liu SH, Tsai SL, Guo PY, Lin CW. Inducing laccase activity in white rot fungi using copper ions and improving the efficiency of azo dye treatment with electricity generation using microbial fuel cells. *Chemosphere.* 2020;243:125304. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125304
392. Cao DJ, Wang JJ, Zhang Q, et al. Biodegradation of triphenylmethane dye crystal violet by *Cedecea davisae*. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2019;210:9-13. doi:10.1016/j.saa.2018.11.004
393. Silva MC, Corrêa AD, Amorim MTSP, Parpot P, Torres JA, Chagas PMB. Decolorization of the phthalocyanine dye reactive blue 21 by turnip peroxidase and assessment of its oxidation products. *J Mol Catal B Enzym.* 2012;77:9-14. doi:10.1016/j.molcatb.2011.12.006
394. Dindaş GB, Şahin Z, Cengiz Yatmaz H, İşci Ü. Cobalt phthalocyanine-TiO₂ nanocomposites for photocatalytic remediation of textile dyes under visible light irradiation. *J Porphyr Phthalocyanines.* 2019;23(04n05):561-568. doi:10.1142/S1088424619500482
395. Salvador Cesa F, Turra A, Baroque-Ramos J. Synthetic fibers as microplastics in the marine environment: A review from textile perspective with a focus on domestic washings. *Science of The Total Environment.* 2017;598:1116-1129. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.04.172
396. Carney Almroth BM, Åström L, Roslund S, Petersson H, Johansson M, Persson NK. Quantifying shedding of synthetic fibers from textiles; a source of microplastics released into the environment. *Environmental Science and Pollution Research.* 2018;25(2):1191-1199. doi:10.1007/s11356-017-0528-7
397. Al-Etaibi AM, El-Asasery MA. Dyeing Performance of Disperse Dyes on Polyester Fabrics Using Eco-Friendly Carrier and Their Antioxidant and Anticancer Activities. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(23):4603. doi:10.3390/ijerph16234603
398. Bayramoglu G, Kunduzcu G, Arica MY. Preparation and characterization of strong cation exchange terpolymer resin as effective adsorbent for removal of disperse dyes. *Polym Eng Sci.* 2020;60(1):192-201. doi:10.1002/pen.25272

399. Duval J, Pecher V, Poujol M, Lesellier E. Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. *Ind Crops Prod.* 2016;94:812-833. doi:10.1016/j.indcrop.2016.09.056
400. Seigler DS. *Plant Secondary Metabolism*. 1st ed. Springer New York, NY; 1998. doi:10.1007/978-1-4615-4913-0
401. Dave H, Ledwani L. A review on anthraquinones isolated from Cassia species and their applications. *Indian J Nat Prod Resour.* 2012;3(3):291-319. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/14810>
402. Shahid M, Wertz J, Degano I, Aceto M, Khan MI, Quye A. Analytical methods for determination of anthraquinone dyes in historical textiles: A review. *Anal Chim Acta.* 2019;1083:58-87. doi:10.1016/j.aca.2019.07.009
403. Novotný Č, Dias N, Kapanen A, et al. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. *Chemosphere.* 2006;63(9):1436-1442. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.10.002
404. Gürses A, Açıkyıldız M, Güneş K, Gürses MS. Classification of Dye and Pigments. In: Gürses A, Açıkyıldız M, Güneş K, Gürses MS, eds. *Dyes and Pigments*. 1st ed. Springer Briefs in Molecular Science. Springer Cham; 2016:31-45. doi:10.1007/978-3-319-33892-7_3
405. Gordon PF, Gregory P. Anthraquinone Dyes. In: *Organic Chemistry in Colour*. Vol 22. 1st ed. Springer Study Edition. Springer Berlin Heidelberg; 1987:163-199. doi:10.1007/978-3-642-82959-8_4
406. Kim E mi, Choi J hong. Synthesis of cationized anthraquinone dyes and their dyeing properties for meta-aramid fiber. *Fibers and Polymers.* 2013;14(12):2054-2060. doi:10.1007/s12221-013-2054-7
407. Waring DR, Hallas G. *The Chemistry and Application of Dyes*. 1st ed. (Waring DR, Hallas G, eds.). Plenum Press, Springer US; 1990. doi:10.1007/978-1-4684-7715-3
408. Hunger K. *Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications*. 1st ed. (Hunger K, ed.). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2002. doi:10.1002/3527602011
409. Zhang F, Yediler A, Liang X, Kettrup A. Effects of dye additives on the ozonation process and oxidation by-products: A comparative study using hydrolyzed C.I. Reactive Red 120. *Dyes and Pigments.* 2004;60(1):1-7. doi:10.1016/S0143-7208(03)00111-6
410. Malik EM, Müller CE. Anthraquinones As Pharmacological Tools and Drugs. *Med Res Rev.* 2016;36(4):705-748. doi:10.1002/med.21391
411. Huang Q, Lu G, Shen HM, Chung MCM, Ong CN. Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. *Med Res Rev.* 2007;27(5):609-630. doi:10.1002/med.20094
412. Murdock KC, Child RG, Fabio PF, et al. Antitumor agents. 1. 1,4-Bis[(aminoalkyl)amino]-9,10-anthracenediones. *J Med Chem.* 1979;22(9):1024-1030. doi:10.1021/jm00195a002
413. Shrestha JP, Fosso MY, Bearss J, Chang CWT. Synthesis and anticancer structure activity relationship investigation of cationic anthraquinone analogs. *Eur J Med Chem.* 2014;77:96-102. doi:10.1016/j.ejmech.2014.02.060

414. Shrestha JP, Subedi YP, Chen L, Chang CWT. A mode of action study of cationic anthraquinone analogs: a new class of highly potent anticancer agents. *Medchemcomm.* 2015;6(11):2012-2022. doi:10.1039/C5MD00314H
415. Chien SC, Wu YC, Chen ZW, Yang WC. Naturally Occurring Anthraquinones: Chemistry and Therapeutic Potential in Autoimmune Diabetes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2015;2015(Figure 1):1-13. doi:10.1155/2015/357357
416. Dagne E, Yenesew A, Asmellash S, Demissew S, Mavi S. Anthraquinones, pre-anthraquinones and isoeleutherol in the roots of Aloe species. *Phytochemistry.* 1994;35(2):401-406. doi:10.1016/S0031-9422(00)94771-X
417. Jankasem M, Wuthi-udomlert M, Gritsanapan W. Antidermatophytic Properties of Ar-Turmerone, Turmeric Oil, and Curcuma longa Preparations. *ISRN Dermatol.* 2013;2013(April 2009):1-3. doi:10.1155/2013/250597
418. Fosso MY, Chan KY, Gregory R, Chang CWT. Library Synthesis and Antibacterial Investigation of Cationic Anthraquinone Analogs. *ACS Comb Sci.* 2012;14(3):231-235. doi:10.1021/co2002075
419. Winter RW, Cornell KA, Johnson LL, Ignatushchenko M, Hinrichs DJ, Riscoe MK. Potentiation of the antimalarial agent rufigallol. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(6):1408-1411. doi:10.1128/AAC.40.6.1408
420. <https://www.worlddyevariety.com/acid-dyes/acid-violet-109.html>. Acid Violet 109. date accessed: 24.12.2022. Published 2022. <https://www.worlddyevariety.com/acid-dyes/acid-violet-109.html>
421. <https://www.worlddyevariety.com/acid-dyes/acid-blue-225.html>. Acid Blue 225. date accessed: 24.12.2022. Published 2022. <https://www.worlddyevariety.com/acid-dyes/acid-blue-225.html>
422. Gita S, Hussan A, Choudhury TG, Gita S. Impact of Textile Dyes Waste on Aquatic Environments and its Treatment Wastewater Management View project Tribal Sub Plan View project. *Environment & Ecology.* 2017;35(3C):2349-2353. <https://www.researchgate.net/publication/321443064>
423. Malik A, Grohmann E. *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development.* 1st ed. (Malik A, Grohmann E, eds.). Springer Dordrecht; 2012. doi:10.1007/978-94-007-1591-2
424. Forgacs E, Cserhádi T, Oros G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environ Int.* 2004;30(7):953-971. doi:10.1016/j.envint.2004.02.001
425. O'Neill C, Hawkes FR, Hawkes DL, Lourenço ND, Pinheiro HM, Delée W. Colour in textile effluents - sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* 1999;74(11):1009-1018. doi:10.1002/(SICI)1097-4660(199911)74:11<1009::AID-JCTB153>3.0.CO;2-N
426. Hao OJ, Kim H, Chiang PC. Decolorization of Wastewater. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 2000;30(4):449-505. doi:10.1080/10643380091184237
427. Hossen MZ, Hussain ME, Hakim A, Islam K, Uddin MN, Azad AK. Biodegradation of reactive textile dye Novacron Super Black G by free cells of newly isolated *Alcaligenes faecalis* AZ26 and *Bacillus* spp obtained from textile effluents. *Heliyon.* 2019;5(7):e02068. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02068

428. Ito T, Adachi Y, Yamanashi Y, Shimada Y. Long-term natural remediation process in textile dye-polluted river sediment driven by bacterial community changes. *Water Res.* 2016;100:458-465. doi:10.1016/j.watres.2016.05.050
429. Singh L. Biodegradation of Synthetic Dyes: A Mycoremediation Approach for Degradation/Decolourization of Textile Dyes and Effluents. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering.* 2017;3(5):430-435. doi:10.15406/jabb.2017.03.00081
430. Husain Q. Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the Decolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from Polluted Water: A Review. *Crit Rev Biotechnol.* 2006;26(4):201-221. doi:10.1080/07388550600969936
431. Aghaie-Khouzani M, Forootanfar H, Moshfegh M, Khoshayand MR, Faramarzi MA. Decolorization of some synthetic dyes using optimized culture broth of laccase producing ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Biochem Eng J.* 2012;60:9-15. doi:10.1016/j.bej.2011.09.002
432. Lellis B, Fávaro-Polonio CZ, Pamphile JA, Polonio JC. Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. *Biotechnology Research and Innovation.* 2019;3(2):275-290. doi:10.1016/j.biori.2019.09.001
433. Ferraz ERA, Grando MD, Oliveira DP. The azo dye Disperse Orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*. *J Hazard Mater.* 2011;192(2):628-633. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.05.063
434. Liu YQ, Maulidiany N, Zeng P, Heo S. Decolourization of azo, anthraquinone and triphenylmethane dyes using aerobic granules: Acclimatization and long-term stability. *Chemosphere.* 2021;263:128312. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128312
435. Sarayu K, Sandhya S. Current Technologies for Biological Treatment of Textile Wastewater–A Review. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012;167(3):645-661. doi:10.1007/s12010-012-9716-6
436. Varjani S, Rakholiya P, Ng HY, You S, Teixeira JA. Microbial degradation of dyes: An overview. *Bioresour Technol.* 2020;314:123728. doi:10.1016/j.biortech.2020.123728
437. Sarkar S, Banerjee A, Halder U, Biswas R, Bandopadhyay R. Degradation of Synthetic Azo Dyes of Textile Industry: a Sustainable Approach Using Microbial Enzymes. *Water Conservation Science and Engineering.* 2017;2(4):121-131. doi:10.1007/s41101-017-0031-5
438. Soriano JJ, Mathieu-Denoncourt J, Norman G, de Solla SR, Langlois VS. Toxicity of the azo dyes Acid Red 97 and Bismarck Brown Y to Western clawed frog (*Silurana tropicalis*). *Environmental Science and Pollution Research.* 2014;21(5):3582-3591. doi:10.1007/s11356-013-2323-4
439. Parrott JL, Bartlett AJ, Balakrishnan VK. Chronic toxicity of azo and anthracenedione dyes to embryo-larval fathead minnow. *Environmental Pollution.* 2016;210:40-47. doi:10.1016/j.envpol.2015.11.037
440. Shwe MT, Dimaculangan MM, de Luna MDG. Decolourization of Simulated Dye Wastewater Containing Reactive Blue 19 (RB19) by the Electro-Fenton Reaction in the Presence of Metal Oxide-Coated Electrodes. *Adv Mat Res.* 2013;858:40-45. doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.858.40

441. Chaudhari AU, Paul D, Dhotre D, Kodam KM. Effective biotransformation and detoxification of anthraquinone dye reactive blue 4 by using aerobic bacterial granules. *Water Res.* 2017;122:603-613. doi:10.1016/j.watres.2017.06.005
442. Mittal A, Mittal J, Malviya A, Kaur D, Gupta VK. Decoloration treatment of a hazardous triarylmethane dye, Light Green SF (Yellowish) by waste material adsorbents. *J Colloid Interface Sci.* 2010;342(2):518-527. doi:10.1016/j.jcis.2009.10.046
443. Belpaire C, Reyns T, Geeraerts C, van Loco J. Toxic textile dyes accumulate in wild European eel *Anguilla anguilla*. *Chemosphere.* 2015;138:784-791. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.08.007
444. Senthivelan T, Kanagaraj J, Panda RC. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: An eco-friendly approach - A review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 2016;21(1):19-38. doi:10.1007/s12257-015-0278-7
445. Javaid R, Qazi UY. Catalytic Oxidation Process for the Degradation of Synthetic Dyes: An Overview. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(11):2066. doi:10.3390/ijerph16112066
446. Kant R. Textile dyeing industry an environmental hazard. *Nat Sci (Irvine).* 2012;4(1):22-26. doi:10.4236/ns.2012.41004
447. Tkaczyk A, Mitrowska K, Posyniak A. Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: A review. *Science of The Total Environment.* 2020;717:137222. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137222
448. Clarke EA, Anliker R. Organic Dyes and Pigments. In: Hutzinger O, ed. *Anthropogenic Compounds*. Vol 3. 1st ed. Handbook of Environmental Chemistry. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1980:181-215. doi:10.1007/978-3-540-38522-6_7
449. Ali H. Biodegradation of Synthetic Dyes – A Review. *Water Air Soil Pollut.* 2010;213(1-4):251-273. doi:10.1007/s11270-010-0382-4
450. Golka K, Kopps S, Myslak ZW. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. *Toxicol Lett.* 2004;151(1):203-210. doi:10.1016/j.toxlet.2003.11.016
451. Mojsov K, Andronikov D, Janevski A, Kuzelov A, Gaber S. The application of enzymes for the removal of dyes from textile effluents. *Advanced technologies.* 2016;5(1):81-86. doi:10.5937/savteh1601081M
452. Zhou L, Xu K, Cheng X, Xu Y, Jia Q. Study on optimizing production scheduling for water-saving in textile dyeing industry. *J Clean Prod.* 2017;141:721-727. doi:10.1016/j.jclepro.2016.09.047
453. Islam M, Mostafa M. Textile Dyeing Effluents and Environment Concerns - A Review. *Journal of Environmental Science and Natural Resources.* 2019;11(1-2):131-144. doi:10.3329/jesnr.v11i1-2.43380
454. Khandare R v., Govindwar SP. Phytoremediation of textile dyes and effluents: Current scenario and future prospects. *Biotechnol Adv.* 2015;33(8):1697-1714. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.09.003
455. Tabish TA, Memon FA, Gomez DE, Horsell DW, Zhang S. A facile synthesis of porous graphene for efficient water and wastewater treatment. *Sci Rep.* 2018;8(1):1817. doi:10.1038/s41598-018-19978-8

456. Aldalbahi A, El-Naggar M, El-Newehy M, Rahaman M, Hatshan M, Khattab T. Effects of Technical Textiles and Synthetic Nanofibers on Environmental Pollution. *Polymers (Basel)*. 2021;13(1):155. doi:10.3390/polym13010155
457. Croce R, Cinà F, Lombardo A, et al. Aquatic toxicity of several textile dye formulations: Acute and chronic assays with *Daphnia magna* and *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2017;144(May):79-87. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.05.046
458. Vikrant K, Giri BS, Raza N, et al. Recent advancements in bioremediation of dye: Current status and challenges. *Bioresour Technol*. 2018;253:355-367. doi:10.1016/j.biortech.2018.01.029
459. Slama H ben, Chenari Bouket A, Pourhassan Z, et al. Diversity of Synthetic Dyes from Textile Industries, Discharge Impacts and Treatment Methods. *Applied Sciences*. 2021;11(14):6255. doi:10.3390/app11146255
460. Muthu SS. *Sustainability in the Textile Industry*. 1st ed. (Muthu SS, ed.). Springer Singapore; 2017. doi:10.1007/978-981-10-2639-3
461. Park M, Lee KS, Shim J, et al. Environment friendly, transparent nanofiber textiles consolidated with high efficiency PLEDs for wearable electronics. *Org Electron*. 2016;36:89-96. doi:10.1016/j.orgel.2016.05.030
462. Rovira J, Domingo JL. Human health risks due to exposure to inorganic and organic chemicals from textiles: A review. *Environ Res*. 2019;168:62-69. doi:10.1016/j.envres.2018.09.027
463. Yadav AK, Jain CK, Malik DS. Toxic characterization of textile dyes and effluents in relation to human health hazards. *Journal of Sustainable Environmental Research*. 2014;3(1):95-102. https://www.researchgate.net/profile/Anuj-Yadav/publication/304461731_Toxic_characterization_of_textile_dyes_and_effluents_in_relation_to_human_health_hazards/links/57701daa08ae0b3a3b7b9019/Toxic-characterization-of-textile-dyes-and-effluents-in-relation-
464. Khan S, Malik A. Toxicity evaluation of textile effluents and role of native soil bacterium in biodegradation of a textile dye. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018;25(5):4446-4458. doi:10.1007/s11356-017-0783-7
465. Donkadokula NY, Kola AK, Naz I, Saroj D. A review on advanced physico-chemical and biological textile dye wastewater treatment techniques. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2020;19(3):543-560. doi:10.1007/s11157-020-09543-z
466. Eslami H, Shariatifar A, Rafiee E, et al. Decolorization and biodegradation of reactive Red 198 Azo dye by a new *Enterococcus faecalis*-*Klebsiella variicola* bacterial consortium isolated from textile wastewater sludge. *World J Microbiol Biotechnol*. 2019;35(3):38. doi:10.1007/s11274-019-2608-y
467. Imran M, Crowley DE, Khalid A, Hussain S, Mumtaz MW, Arshad M. Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2015;14(1):73-92. doi:10.1007/s11157-014-9344-4
468. Sakib A, Masum S, Hoinkis J, Islam R, Molla Md. Synthesis of CuO/ZnO Nanocomposites and Their Application in Photodegradation of Toxic Textile Dye. *Journal of Composites Science*. 2019;3(3):91. doi:10.3390/jcs3030091

469. Berkessa YW, Yan B, Li T, Jegatheesan V, Zhang Y. Treatment of anthraquinone dye textile wastewater using anaerobic dynamic membrane bioreactor: Performance and microbial dynamics. *Chemosphere*. 2020;238:124539. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.124539
470. Khan R, Patel V, Khan Z. Bioremediation of dyes from textile and dye manufacturing industry effluent. In: Singh P, Kumar A, Borthakur A, eds. *Abatement of Environmental Pollutants: Trends and Strategies*. 1st ed. Elsevier Science Ltd. Elsevier Inc.; 2020:107-125. doi:10.1016/B978-0-12-818095-2.00005-9
471. Gulzar T, Huma T, Jalal F, et al. Bioremediation of Synthetic and Industrial Effluents by *Aspergillus niger* Isolated from Contaminated Soil Following a Sequential Strategy. *Molecules*. 2017;22(12):2244. doi:10.3390/molecules22122244
472. Hussain S, Khan N, Gul S, Khan S, Khan H. Contamination of Water Resources by Food Dyes and Its Removal Technologies. In: Eyvaz M, Yüksel E, eds. *Water Chemistry*. 1st ed. IntechOpen; 2020:1-14. doi:10.5772/intechopen.90331
473. Holkar CR, Jadhav AJ, Pinjari D v., Mahamuni NM, Pandit AB. A critical review on textile wastewater treatments: Possible approaches. *J Environ Manage*. 2016;182:351-366. doi:10.1016/j.jenvman.2016.07.090
474. Chatzisyneon E, Xekoukoulotakis NP, Coz A, Kalogerakis N, Mantzavinos D. Electrochemical treatment of textile dyes and dyehouse effluents. *J Hazard Mater*. 2006;137(2):998-1007. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.03.032
475. Katheresan V, Kansedo J, Lau SY. Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: A review. *J Environ Chem Eng*. 2018;6(4):4676-4697. doi:10.1016/j.jece.2018.06.060
476. George G, Saravanakumar MP. Facile synthesis of carbon-coated layered double hydroxide and its comparative characterisation with Zn-Al LDH: application on crystal violet and malachite green dye adsorption – isotherm, kinetics and Box-Behnken design. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018;25(30):30236-30254. doi:10.1007/s11356-018-3001-3
477. Arora C, Kumar P, Soni S, Mittal J, Mittal A, Singh B. Efficient removal of malachite green dye from aqueous solution using Curcuma caesia based activated carbon. *Desalination Water Treat*. 2020;195:341-352. doi:10.5004/dwt.2020.25897
478. Ghasemi M, Mashhadi S, Asif M, Tyagi I, Agarwal S, Gupta VK. Microwave-assisted synthesis of tetraethylenepentamine functionalized activated carbon with high adsorption capacity for Malachite green dye. *J Mol Liq*. 2016;213:317-325. doi:10.1016/j.molliq.2015.09.048
479. Shedbalkar U, Jadhav JP. Detoxification of malachite green and textile industrial effluent by *Penicillium ochrochloron*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2011;16(1):196-204. doi:10.1007/s12257-010-0069-0
480. Jedynak K, Wideł D, Rędzia N. Removal of Rhodamine B (A Basic Dye) and Acid Yellow 17 (An Acidic Dye) from Aqueous Solutions by Ordered Mesoporous Carbon and Commercial Activated Carbon. *Colloids and Interfaces*. 2019;3(1):30. doi:10.3390/colloids3010030

481. Lops C, Ancona A, di Cesare K, et al. Sonophotocatalytic degradation mechanisms of Rhodamine B dye via radicals generation by micro- and nano-particles of ZnO. *Appl Catal B*. 2019;243(October 2018):629-640. doi:10.1016/j.apcatb.2018.10.078
482. Ding L, Zou B, Gao W, et al. Adsorption of Rhodamine-B from aqueous solution using treated rice husk-based activated carbon. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2014;446:1-7. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.01.030
483. Jabeen S, Sufaid Khan M, Khattak R, et al. Palladium-Supported Zirconia-Based Catalytic Degradation of Rhodamine-B Dye from Wastewater. *Water (Basel)*. 2021;13(11):1522. doi:10.3390/w13111522
484. Alam S, Khan MS, Bibi W, et al. Preparation of Activated Carbon from the Wood of *Paulownia tomentosa* as an Efficient Adsorbent for the Removal of Acid Red 4 and Methylene Blue Present in Wastewater. *Water (Basel)*. 2021;13(11):1453. doi:10.3390/w13111453
485. Durmus Z, Kurt BZ, Durmus A. Synthesis and Characterization of Graphene Oxide/Zinc Oxide (GO/ZnO) Nanocomposite and Its Utilization for Photocatalytic Degradation of Basic Fuchsin Dye. *ChemistrySelect*. 2019;4(1):271-278. doi:10.1002/slct.201803635
486. Gupta VK, Mittal A, Gajbe V, Mittal J. Adsorption of basic fuchsin using waste materials—bottom ash and deoiled soya—as adsorbents. *J Colloid Interface Sci*. 2008;319(1):30-39. doi:10.1016/j.jcis.2007.09.091
487. Zhao YH, Geng JT, Cai JC, Cai YF, Cao CY. Adsorption performance of basic fuchsin on alkali-activated diatomite. *Adsorption Science & Technology*. 2020;38(5-6):151-167. doi:10.1177/0263617420922084
488. el Haddad M. Removal of Basic Fuchsin dye from water using mussel shell biomass waste as an adsorbent: Equilibrium, kinetics, and thermodynamics. *Journal of Taibah University for Science*. 2016;10(5):664-674. doi:10.1016/j.jtusci.2015.08.007
489. Daneshvar E, Sohrabi MS, Kousha M, et al. Shrimp shell as an efficient bioadsorbent for Acid Blue 25 dye removal from aqueous solution. *J Taiwan Inst Chem Eng*. 2014;45(6):2926-2934. doi:10.1016/j.jtice.2014.09.019
490. Chen CY, Kuo JT, Cheng CY, Huang YT, Ho IH, Chung YC. Biological decolorization of dye solution containing malachite green by *Pandora pulmonicola* YC32 using a batch and continuous system. *J Hazard Mater*. 2009;172(2-3):1439-1445. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.08.009
491. Mukherjee T, Das M. Degradation of Malachite Green by *Enterobacter asburiae* Strain XJUH-4TM. *Clean (Weinh)*. 2014;42(6):849-856. doi:10.1002/clen.201200246
492. Liu Y, Jin JH, Zhou YG, Liu HC, Liu ZP. *Flavobacterium caeni* sp. nov., isolated from a sequencing batch reactor for the treatment of malachite green effluents. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60(2):417-421. doi:10.1099/ijs.0.010603-0
493. Muthukumaran C, Sivakumar VM, Thirumarimurugan M. Adsorption isotherms and kinetic studies of crystal violet dye removal from aqueous solution using surfactant modified magnetic nanoadsorbent. *J Taiwan Inst Chem Eng*. 2016;63:354-362. doi:10.1016/j.jtice.2016.03.034

494. Fabryanty R, Valencia C, Soetaredjo FE, et al. Removal of crystal violet dye by adsorption using bentonite – alginate composite. *J Environ Chem Eng.* 2017;5(6):5677-5687. doi:10.1016/j.jece.2017.10.057
495. Jayasanthi Kumari H, Krishnamoorthy P, Arumugam TK, Radhakrishnan S, Vasudevan D. An efficient removal of crystal violet dye from waste water by adsorption onto TLAC/Chitosan composite: A novel low cost adsorbent. *Int J Biol Macromol.* 2017;96:324-333. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.11.077
496. Wu J, Gao H, Yao S, Chen L, Gao Y, Zhang H. Degradation of Crystal Violet by catalytic ozonation using Fe/activated carbon catalyst. *Sep Purif Technol.* 2015;147:179-185. doi:10.1016/j.seppur.2015.04.022
497. Mbacké MK, Kane C, Diallo NO, et al. Electrocoagulation process applied on pollutants treatment- experimental optimization and fundamental investigation of the crystal violet dye removal. *J Environ Chem Eng.* 2016;4(4):4001-4011. doi:10.1016/j.jece.2016.09.002
498. Parshetti GK, Parshetti SG, Telke AA, Kalyani DC, Doong RA, Govindwar SP. Biodegradation of Crystal Violet by *Agrobacterium radiobacter*. *Journal of Environmental Sciences.* 2011;23(8):1384-1393. doi:10.1016/S1001-0742(10)60547-5
499. Grassi P, Reis C, Drumm FC, et al. Biosorption of crystal violet dye using inactive biomass of the fungus *Diaporthe schini*. *Water Science and Technology.* 2019;79(4):709-717. doi:10.2166/wst.2019.091
500. Iqbal J, Wattoo FH, Wattoo MHS, et al. Adsorption of acid yellow dye on flakes of chitosan prepared from fishery wastes. *Arabian Journal of Chemistry.* 2011;4(4):389-395. doi:10.1016/j.arabjc.2010.07.007
501. Khan J, Sayed M, Ali F, Khan HM. Removal of Acid Yellow 17 Dye by Fenton Oxidation Process. *Zeitschrift für Physikalische Chemie.* 2018;232(4):507-525. doi:10.1515/zpch-2017-1072
502. Kashefialasl M, Khosravi M, Marandi R, Seyyedi K. Treatment of dye solution containing colored index acid yellow 36 by electrocoagulation using iron electrodes. *International Journal of Environmental Science and Technology.* 2006;2(4):365-371. <http://www.bioline.org.br/pdf?st05049>
503. Das P, Ghosh S, Baskey (Sen) M. Heterogeneous catalytic reduction of 4-nitroaniline by RGO-Ni nanocomposite for water resource management. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics.* 2019;30(22):19731-19737. doi:10.1007/s10854-019-02323-8
504. Tanzifi M, Yarak MT, Kiadehi AD, et al. Adsorption of Amido Black 10B from aqueous solution using polyaniline/SiO₂ nanocomposite: Experimental investigation and artificial neural network modeling. *J Colloid Interface Sci.* 2018;510:246-261. doi:10.1016/j.jcis.2017.09.055
505. Umar A, Khan M, Alam S, et al. Synthesis and Characterization of Pd-Ni Bimetallic Nanoparticles as Efficient Adsorbent for the Removal of Acid Orange 8 Present in Wastewater. *Water (Basel).* 2021;13(8):1095. doi:10.3390/w13081095
506. Machado ÊL, de Sales Dambros V, Kist LT, Alcayaga Lobo EA, Tedesco SB, Moro CC. Use of Ozonation for the Treatment of Dye Wastewaters Containing Rhodamine B

- in the Agate Industry. *Water Air Soil Pollut.* 2012;223(4):1753-1764. doi:10.1007/s11270-011-0980-9
507. Khan SS, Arunarani A, Chandran P. Biodegradation of Basic Violet 3 and Acid Blue 93 by *Pseudomonas putida*. *Clean (Weinh)*. 2013;43(1):67-72. doi:10.1002/clen.201200676
 508. Deivasigamani C, Das N. Biodegradation of Basic Violet 3 by *Candida krusei* isolated from textile wastewater. *Biodegradation*. 2011;22(6):1169-1180. doi:10.1007/s10532-011-9472-2
 509. Galán J, Rodríguez A, Gómez JM, Allen SJ, Walker GM. Reactive dye adsorption onto a novel mesoporous carbon. *Chemical Engineering Journal*. 2013;219:62-68. doi:10.1016/j.cej.2012.12.073
 510. Rápó E, Aradi LE, Szabó Á, Posta K, Szép R, Tonk S. Adsorption of Remazol Brilliant Violet-5R Textile Dye from Aqueous Solutions by Using Eggshell Waste Biosorbent. *Sci Rep*. 2020;10(1):8385. doi:10.1038/s41598-020-65334-0
 511. el Malah T, Nour HF, Radwan EK, Abdel Mageid RE, Khattab TA, Olson MA. A bi-pyridinium-based polyhydrazone adsorbent that exhibits ultrahigh adsorption capacity for the anionic azo dye, direct blue 71. *Chemical Engineering Journal*. 2021;409(December 2020):128195. doi:10.1016/j.cej.2020.128195
 512. Ruan W, Hu J, Qi J, Hou Y, Zhou C, Wei X. Removal of dyes from wastewater by nanomaterials: A review. *Adv Mater Lett*. 2019;10(1):9-20. doi:10.5185/amlett.2019.2148
 513. Yogalakshmi KN, Das A, Rani G, Jaswal V, Randhawa JS. Nano-bioremediation: A New Age Technology for the Treatment of Dyes in Textile Effluents. In: Saxena G, Bharagava RN, eds. *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety: Industrial Waste and Its Management*. Vol I. 1st ed. Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety. Springer Singapore; 2020:313-347. doi:10.1007/978-981-13-1891-7_15
 514. Dhand C, Dwivedi N, Loh XJ, et al. Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview. *RSC Adv*. 2015;5(127):105003-105037. doi:10.1039/C5RA19388E
 515. Sivasubramanian V, Pugazhendhi A, Moorthy G. *Sustainable Development in Energy and Environment: Select Proceedings of ICSDEE 2019*. 1st ed. (Sivasubramanian V, Pugazhendhi A, Moorthy IG, eds.). Springer Singapore; 2020. doi:10.1007/978-981-15-4638-9
 516. Tara N, Siddiqui SI, Rathi G, Chaudhry SA, Inamuddin, Asiri AM. Nano-engineered Adsorbent for the Removal of Dyes from Water: A Review. *Curr Anal Chem*. 2020;16(1):14-40. doi:10.2174/1573411015666190117124344
 517. Dasgupta N, Ranjan S, Lichtfouse E. *Environmental Nanotechnology Volume 3*. Vol 27. 1st ed. (Dasgupta N, Ranjan S, Lichtfouse E, eds.). Springer International Publishing; 2020. doi:10.1007/978-3-030-26672-1
 518. Wang T, Lin J, Chen Z, Megharaj M, Naidu R. Green synthesized iron nanoparticles by green tea and eucalyptus leaves extracts used for removal of nitrate in aqueous solution. *J Clean Prod*. 2014;83:413-419. doi:10.1016/j.jclepro.2014.07.006

519. Nagajyothi PC, Prabhakar Vattikuti S v., Devarayapalli KC, Yoo K, Shim J, Sreekanth TVM. Green synthesis: Photocatalytic degradation of textile dyes using metal and metal oxide nanoparticles-latest trends and advancements. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 2020;50(24):2617-2723. doi:10.1080/10643389.2019.1705103
520. Pal U, Sandoval A, Madrid SIU, Corro G, Sharma V, Mohanty P. Mixed titanium, silicon, and aluminum oxide nanostructures as novel adsorbent for removal of rhodamine 6G and methylene blue as cationic dyes from aqueous solution. *Chemosphere*. 2016;163:142-152. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.08.020
521. Kalia A, Singh S. Myco-decontamination of azo dyes: nano-augmentation technologies. *3 Biotech*. 2020;10(9):384. doi:10.1007/s13205-020-02378-z
522. Sahoo Y, Pizem H, Fried T, et al. Alkyl phosphonate/phosphate coating on magnetite nanoparticles: A comparison with fatty acids. *Langmuir*. 2001;17(25):7907-7911. doi:10.1021/la010703+
523. Gonçalves GAB, Marques P. *Nanostructured Materials for Treating Aquatic Pollution*. 1st ed. (Gonçalves GAB, Marques P, eds.). Springer International Publishing; 2019. doi:10.1007/978-3-030-33745-2
524. Chu T, Nguyen N, Vu T, et al. Synthesis, Characterization, and Modification of Alumina Nanoparticles for Cationic Dye Removal. *Materials*. 2019;12(3):450. doi:10.3390/ma12030450
525. Sahinkaya E, Sahin A, Yurtsever A, Kitis M. Concentrate minimization and water recovery enhancement using pellet precipitator in a reverse osmosis process treating textile wastewater. *J Environ Manage*. 2018;222(March):420-427. doi:10.1016/j.jenvman.2018.05.057
526. Long Q, Zhang Z, Qi G, Wang Z, Chen Y, Liu ZQ. Fabrication of Chitosan Nanofiltration Membranes by the Film Casting Strategy for Effective Removal of Dyes/Salts in Textile Wastewater. *ACS Sustain Chem Eng*. 2020;8(6):2512-2522. doi:10.1021/acssuschemeng.9b07026
527. Jin P, Zhu J, Yuan S, et al. Erythritol-based polyester loose nanofiltration membrane with fast water transport for efficient dye/salt separation. *Chemical Engineering Journal*. 2021;406(April 2020):126796. doi:10.1016/j.cej.2020.126796
528. Yin H, Qiu P, Qian Y, et al. Textile Wastewater Treatment for Water Reuse: A Case Study. *Processes*. 2019;7(1):34. doi:10.3390/pr7010034
529. Ji J, Kulshreshtha S, Kakade A, Majeed S, Li X, Liu P. Bioaugmentation of membrane bioreactor with *Aeromonas hydrophila* LZ-MG14 for enhanced malachite green and hexavalent chromium removal in textile wastewater. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2020;150(March):104939. doi:10.1016/j.ibiod.2020.104939
530. Rashidi HR, Sulaiman NMN, Hashim NA, Hassan CRC, Ramli MR. Synthetic reactive dye wastewater treatment by using nano-membrane filtration. *Desalination Water Treat*. 2015;55(1):86-95. doi:10.1080/19443994.2014.912964
531. Sadegh H, Ali GAM, Gupta VK, et al. The role of nanomaterials as effective adsorbents and their applications in wastewater treatment. Anjum NA, Gill SS, Tuteja N, eds. *J Nanostructure Chem*. 2017;7(1):1-14. doi:10.1007/s40097-017-0219-4

532. Liang P, Rivallin M, Cerneaux S, Lacour S, Petit E, Cretin M. Coupling cathodic Electro-Fenton reaction to membrane filtration for AO7 dye degradation: A successful feasibility study. *J Memb Sci*. 2016;510:182-190. doi:10.1016/j.memsci.2016.02.071
533. Liu H, Zhang J, Lu M, Liang L, Zhang H, Wei J. Biosynthesis based membrane filtration coupled with iron nanoparticles reduction process in removal of dyes. *Chemical Engineering Journal*. 2020;387(January):124202. doi:10.1016/j.cej.2020.124202
534. Abubakar A, Gaya UI. Box-Behnken-optimized Cu(I) photo-Fenton-like degradation of Basic Violet 3. *J Mater Environ Sci*. 2019;10(1):15-21. https://www.researchgate.net/profile/Umar-Gaya/publication/332798257_Box-Behnken-optimized_CuI_photo-Fenton-like_degradation_of_Basic_Violet_3/links/5cca03794585156cd7c1a42c/Box-Behnken-optimized-CuI-photo-Fenton-like-degradation-of-Basic-Violet-3.pdf?ori
535. Sorbiun M, Shayegan Mehr E, Ramazani A, Taghavi Fardood S. Biosynthesis of Ag, ZnO and bimetallic Ag/ZnO alloy nanoparticles by aqueous extract of oak fruit hull (Jaft) and investigation of photocatalytic activity of ZnO and bimetallic Ag/ZnO for degradation of basic violet 3 dye. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. 2018;29(4):2806-2814. doi:10.1007/s10854-017-8209-3
536. Satapanajaru T, Chompuchan C, Suntornchot P, Pengthamkeerati P. Enhancing decolorization of Reactive Black 5 and Reactive Red 198 during nano zerovalent iron treatment. *Desalination*. 2011;266(1-3):218-230. doi:10.1016/j.desal.2010.08.030
537. Nazari P, Setayesh SR. Effective degradation of Reactive Red 195 via heterogeneous electro-Fenton treatment: theoretical study and optimization. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2019;16(10):6329-6346. doi:10.1007/s13762-018-2048-5
538. Hassan MM, Carr CM. A critical review on recent advancements of the removal of reactive dyes from dyehouse effluent by ion-exchange adsorbents. *Chemosphere*. 2018;209:201-219. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.06.043
539. Yurtsever A, Basaran E, Ucar D. Process optimization and filtration performance of an anaerobic dynamic membrane bioreactor treating textile wastewaters. *J Environ Manage*. 2020;273(February):111114. doi:10.1016/j.jenvman.2020.111114
540. Arslan S, Eyvaz M, Gürbulak E, Yüksel E. A Review of State-of-the-Art Technologies in Dye-Containing Wastewater Treatment – The Textile Industry Case. In: Kumbasar EPA, Körlü AE, eds. *Textile Wastewater Treatment*. 1st ed. InTech; 2016:1-28. doi:10.5772/64140
541. Marin NM, Pascu LF, Demba A, Nita-Lazar M, Badea IA, Aboul-Enein HY. Removal of the Acid Orange 10 by ion exchange and microbiological methods. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2019;16(10):6357-6366. doi:10.1007/s13762-018-2164-2
542. Joseph J, Radhakrishnan RC, Johnson JK, Joy SP, Thomas J. Ion-exchange mediated removal of cationic dye-stuffs from water using ammonium phosphomolybdate. *Mater Chem Phys*. 2020;242:122488. doi:10.1016/j.matchemphys.2019.122488
543. Raghu S, Ahmed Basha C. Chemical or electrochemical techniques, followed by ion exchange, for recycle of textile dye wastewater. *J Hazard Mater*. 2007;149(2):324-330. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.03.087

544. Sonai GG, de Souza SMAGU, de Oliveira D, de Souza AAU. The application of textile sludge adsorbents for the removal of Reactive Red 2 dye. *J Environ Manage.* 2016;168:149-156. doi:10.1016/j.jenvman.2015.12.003
545. Labiadh L, Barbucci A, Carpanese MP, Gadri A, Ammar S, Panizza M. Direct and indirect electrochemical oxidation of Indigo Carmine using PbO₂ and TiRuSnO₂. *Journal of Solid State Electrochemistry.* 2017;21(8):2167-2175. doi:10.1007/s10008-017-3559-6
546. Kalyani DC, Telke AA, Dhanve RS, Jadhav JP. Ecofriendly biodegradation and detoxification of Reactive Red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas* sp. SUK1. *J Hazard Mater.* 2009;163(2-3):735-742. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.07.020
547. Wang H, Su JQ, Zheng XW, Tian Y, Xiong XJ, Zheng TL. Bacterial decolorization and degradation of the reactive dye Reactive Red 180 by *Citrobacter* sp. CK3. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2009;63(4):395-399. doi:10.1016/j.ibiod.2008.11.006
548. Moussavi G, Mahmoudi M. Degradation and biodegradability improvement of the reactive red 198 azo dye using catalytic ozonation with MgO nanocrystals. *Chemical Engineering Journal.* 2009;152(1):1-7. doi:10.1016/j.cej.2009.03.014
549. Saratale RG, Saratale GD, Chang JS, Govindwar SP. Ecofriendly degradation of sulfonated diazo dye C.I. Reactive Green 19A using *Micrococcus glutamicus* NCIM-2168. *Bioresour Technol.* 2009;100(17):3897-3905. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.051
550. Sari AA, Tachibana S, Muryanto, Hadibarata T. Development of bioreactor systems for decolorization of Reactive Green 19 using white rot fungus. *Desalination Water Treat.* 2016;57(15):7029-7039. doi:10.1080/19443994.2015.1012121
551. Sun JH, Sun SP, Wang GL, Qiao LP. Degradation of azo dye Amido black 10B in aqueous solution by Fenton oxidation process. *Dyes and Pigments.* 2007;74(3):647-652. doi:10.1016/j.dyepig.2006.04.006
552. Zuorro A, Lavecchia R. Evaluation of UV/H₂O₂ advanced oxidation process (AOP) for the degradation of diazo dye Reactive Green 19 in aqueous solution. *Desalination Water Treat.* 2014;52(7-9):1571-1577. doi:10.1080/19443994.2013.787553
553. Tizaoui C, Grima N. Kinetics of the ozone oxidation of Reactive Orange 16 azo-dye in aqueous solution. *Chemical Engineering Journal.* 2011;173(2):463-473. doi:10.1016/j.cej.2011.08.014
554. Palma-Goyes RE, Silva-Agredo J, Vazquez-Arenas J, Romero-Ibarra I, Torres-Palma RA. The effect of different operational parameters on the electrooxidation of indigo carmine on Ti/IrO₂-SnO₂-Sb₂O₃. *J Environ Chem Eng.* 2018;6(2):3010-3017. doi:10.1016/j.jece.2018.04.035
555. Khandegar V, Saroha AnilK. Electrochemical Treatment of Textile Effluent Containing Acid Red 131 Dye. *J Hazard Toxic Radioact Waste.* 2014;18(1):38-44. doi:10.1061/(ASCE)HZ.2153-5515.0000194
556. Jorfi S, Barzegar G, Ahmadi M, et al. Enhanced coagulation-photocatalytic treatment of Acid red 73 dye and real textile wastewater using UVA/synthesized MgO nanoparticles. *J Environ Manage.* 2016;177:111-118. doi:10.1016/j.jenvman.2016.04.005
557. Bhole BD, Ganguly B, Madhuran A, Deshpande D, Joshi J. Biosorption of methyl violet, basic fuchsin and their mixture using dead fungal biomass. *Curr Sci.* 2004;86(12):1641-1645. <https://www.currentscience.ac.in/Volumes/86/12/1641.pdf>

558. Celia MP, Suruthi S. Textile dye degradation using bacterial strains isolated from textile mill effluent. *International Journal of Applied Research*. 2016;2(3):337-341. <https://www.allresearchjournal.com/archives/2016/vol2issue3/PartF/2-2-46.pdf>
559. Singh L, Singh VP. Textile Dyes Degradation: A Microbial Approach for Biodegradation of Pollutants. In: Singh SN, ed. *Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters*. 1st ed. Environmental Science and Engineering. Springer International Publishing Switzerland; 2015:187-204. doi:10.1007/978-3-319-10942-8_9
560. Wang L, Wang J, Pan H, Zhao M, Chen J. Kinetics and removal pathway of basic fuchsin by electrochemical oxidization. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2021;880:114792. doi:10.1016/j.jelechem.2020.114792
561. Senthilkumar S, Perumalsamy M, Janardhana Prabhu H. Decolourization potential of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on synthetic dye bath effluent containing Amido black 10B. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2014;18(6):845-853. doi:10.1016/j.jscs.2011.10.010
562. Angelova R, Baldikova E, Pospiskova K, Safarikova M, Safarik I. Magnetically modified sheaths of *Leptothrix* sp. as an adsorbent for Amido black 10B removal. *J Magn Magn Mater*. 2017;427:314-319. doi:10.1016/j.jmmm.2016.10.094
563. Garg A, Mainrai M, Bulasara VK, Barman S. Experimental investigation on adsorption of amido black 10b dye onto zeolite synthesized from fly ash. *Chem Eng Commun*. 2015;202(1):123-130. doi:10.1080/00986445.2013.836636
564. Cseri L, Topuz F, Abdulhamid MA, Alammar A, Budd PM, Szekely G. Electrospun Adsorptive Nanofibrous Membranes from Ion Exchange Polymers to Snare Textile Dyes from Wastewater. *Adv Mater Technol*. 2021;6(10):2000955. doi:10.1002/admt.202000955
565. Babu DS, Srivastava V, Nidheesh PV, Kumar MS. Detoxification of water and wastewater by advanced oxidation processes. *Science of The Total Environment*. 2019;696:133961. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.133961
566. Al-Sakkaf BM, Nasreen S, Ejaz N. Degradation Pattern of Textile Effluent by Using Bio and Sono Chemical Reactor. *J Chem*. 2020;2020:1-13. doi:10.1155/2020/8965627
567. Nidheesh P v., Rajan R. Removal of rhodamine B from a water medium using hydroxyl and sulphate radicals generated by iron loaded activated carbon. *RSC Adv*. 2016;6(7):5330-5340. doi:10.1039/C5RA19987E
568. Zhang LP, Liu Z, Faraj Y, et al. High-flux efficient catalytic membranes incorporated with iron-based Fenton-like catalysts for degradation of organic pollutants. *J Memb Sci*. 2019;573:493-503. doi:10.1016/j.memsci.2018.12.032
569. Lyu L, Han M, Cao W, et al. Efficient Fenton-like process for organic pollutant degradation on Cu-doped mesoporous polyimide nanocomposites. *Environ Sci Nano*. 2019;6(3):798-808. doi:10.1039/C8EN01365A
570. Ameta R, K. Chohadia A, Jain A, Punjabi PB. Fenton and Photo-Fenton Processes. In: Ameta SC, Ameta R, eds. *Advanced Oxidation Processes for Waste Water Treatment: Emerging Green Chemical Technology*. 1st ed. Academic Press; Elsevier Inc.; 2018:49-87. doi:10.1016/B978-0-12-810499-6.00003-6

571. Tarkwa JB, Oturan N, Acayanka E, Laminsi S, Oturan MA. Photo-Fenton oxidation of Orange G azo dye: process optimization and mineralization mechanism. *Environ Chem Lett.* 2019;17(1):473-479. doi:10.1007/s10311-018-0773-0
572. Dotto J, Fagundes-Klen MR, Veit MT, Palácio SM, Bergamasco R. Performance of different coagulants in the coagulation/flocculation process of textile wastewater. *J Clean Prod.* 2019;208:656-665. doi:10.1016/j.jclepro.2018.10.112
573. GilPavas E, Dobrosz-Gómez I, Gómez-García MÁ. Coagulation-flocculation sequential with Fenton or Photo-Fenton processes as an alternative for the industrial textile wastewater treatment. *J Environ Manage.* 2017;191:189-197. doi:10.1016/j.jenvman.2017.01.015
574. Wang J, Chen H, Yuan R, Wang F, Ma F, Zhou B. Intensified degradation of textile wastewater using a novel treatment of hydrodynamic cavitation with the combination of ozone. *J Environ Chem Eng.* 2020;8(4):103959. doi:10.1016/j.jece.2020.103959
575. Jamee R, Siddique R. Biodegradation of synthetic dyes of textile effluent by microorganisms: an environmentally and economically sustainable approach. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2019;9(4):114-118. doi:10.1556/1886.2019.00018
576. Su Z, Liu T, Yu W, Li X, Graham NJD. Coagulation of surface water: Observations on the significance of biopolymers. *Water Res.* 2017;126:144-152. doi:10.1016/j.watres.2017.09.022
577. Miralles-Cuevas S, Oller I, Agüera A, Llorca M, Sánchez Pérez JA, Malato S. Combination of nanofiltration and ozonation for the remediation of real municipal wastewater effluents: Acute and chronic toxicity assessment. *J Hazard Mater.* 2017;323(Pt A):442-451. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.03.013
578. Yang YC, Zeng SS, Ouyang Y, et al. An intensified ozonation system in a tank reactor with foam block stirrer: Synthetic textile wastewater treatment and mass transfer modeling. *Sep Purif Technol.* 2021;257(July 2020):117909. doi:10.1016/j.seppur.2020.117909
579. Powar A, Perwuelz A, Behary N, et al. Environmental Profile Study of Ozone Decolorization of Reactive Dyed Cotton Textiles by Utilizing Life Cycle Assessment. *Sustainability.* 2021;13(3):1225. doi:10.3390/su13031225
580. Kurade MB, Waghmode TR, Patil SM, Jeon BH, Govindwar SP. Monitoring the gradual biodegradation of dyes in a simulated textile effluent and development of a novel triple layered fixed bed reactor using a bacterium-yeast consortium. *Chemical Engineering Journal.* 2017;307:1026-1036. doi:10.1016/j.cej.2016.09.028
581. Song L, Shao Y, Ning S, Tan L. Performance of a newly isolated salt-tolerant yeast strain *Pichia occidentalis* G1 for degrading and detoxifying azo dyes. *Bioresour Technol.* 2017;233:21-29. doi:10.1016/j.biortech.2017.02.065
582. Brahmabhatt N. The Role of Algae in Bioremediation of Textile Effluent. *International Journal of Engineering Research and General Science.* 2016;4(1):443-453. www.ijergs.org
583. Das S, Dash HR. *Handbook of Metal-Microbe Interactions and Bioremediation.* 1st ed. (Das S, Dash HR, eds.). CRC Press; 2017. doi:10.1201/9781315153353
584. Al-Jawhary IFH. Microbial degradation of dyes: An overview. *Int J Environ Bioremediat Biodegrad.* 2015;3(2):62-65. doi:10.12691/ijebb-3-2-4

585. Neelambari V, Maharani V, Vijayalakshmi S, Balasubramanian T. Degradation and detoxification of reactive azo dyes by native bacterial communities. *Afr J Microbiol Res.* 2013;7(20):2274-2282. doi:10.5897/AJMR12.1539
586. Saratale RG, Gandhi SS, Purankar M v., et al. Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye C.I. Remazol Red and textile effluent by isolated *Lysinibacillus* sp. RGS. *J Biosci Bioeng.* 2013;115(6):658-667. doi:10.1016/j.jbiosc.2012.12.009
587. Abdulrazzaq NN, Al-Sabbagh BH, Shanshool HA. Coupling of electrocoagulation and microflotation for the removal of textile dyes from aqueous solutions. *Journal of Water Process Engineering.* 2021;40(January):101906. doi:10.1016/j.jwpe.2020.101906
588. Logroño W, Pérez M, Urquizo G, et al. Single chamber microbial fuel cell (SCMFC) with a cathodic microalgal biofilm: A preliminary assessment of the generation of bioelectricity and biodegradation of real dye textile wastewater. *Chemosphere.* 2017;176:378-388. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.02.099
589. Chaturvedi A, Rai BN, Singh RS, Jaiswal RP. A comprehensive review on the integration of advanced oxidation processes with biodegradation for the treatment of textile wastewater containing azo dyes. *Reviews in Chemical Engineering.* 2022;38(6):617-639. doi:10.1515/revce-2020-0010
590. Zapata-Castillo P, Villalonga-Santana L, Islas-Flores I, Rivera-Muñoz G, Ancona-Escalante W, Solís-Pereira S. Synergistic action of laccases from *Trametes hirsuta* Bm2 improves decolourization of indigo carmine. *Lett Appl Microbiol.* 2015;61(3):252-258. doi:10.1111/lam.12451
591. Nidheesh PV, Gandhimathi R, Ramesh ST. Degradation of dyes from aqueous solution by Fenton processes: a review. *Environmental Science and Pollution Research.* 2013;20(4):2099-2132. doi:10.1007/s11356-012-1385-z
592. Gouzy-Olmos M, Chaves-Tequia LM, Rojas-Fajardo MF, et al. Statistical Improvement of Batch Culture with Immobilized *Pichia pastoris* Cells for rPOXA 1B Laccase Production. *Am J Biochem Biotechnol.* 2018;14(2):88-107. doi:10.3844/ajbbbsp.2018.88.107
593. Solís M, Solís A, Pérez HI, Manjarrez N, Flores M. Microbial decolouration of azo dyes: A review. *Process Biochemistry.* 2012;47(12):1723-1748. doi:10.1016/j.procbio.2012.08.014
594. Almeida EJ, Corso CR. Comparative study of toxicity of azo dye Procion Red MX-5B following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. *Chemosphere.* 2014;112:317-322. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.04.060
595. Zuorro A, Maffei G, Lavecchia R. Kinetic modeling of azo dye adsorption on non-living cells of *Nannochloropsis oceanica*. *J Environ Chem Eng.* 2017;5(4):4121-4127. doi:10.1016/j.jece.2017.07.078
596. Legerská B, Chmelová D, Ondrejovič M. Degradation of Synthetic Dyes by Laccases – A Mini-Review. *Nova Biotechnologica et Chimica.* 2016;15(1):90-106. doi:10.1515/nbec-2016-0010
597. Collivignarelli MC, Abbà A, Carnevale Miino M, Damiani S. Treatments for color removal from wastewater: State of the art. *J Environ Manage.* 2019;236(October 2018):727-745. doi:10.1016/j.jenvman.2018.11.094

598. Choi KY. Discoloration of indigo dyes by eco-friendly biocatalysts. *Dyes and Pigments*. 2021;184:108749. doi:10.1016/j.dyepig.2020.108749
599. Routoula E, Patwardhan S v. Degradation of Anthraquinone Dyes from Effluents: A Review Focusing on Enzymatic Dye Degradation with Industrial Potential. *Environ Sci Technol*. 2020;54(2):647-664. doi:10.1021/acs.est.9b03737
600. Mohammadi SA, Najafi H, Zolgharnian S, Sharifian S, Asasian-Kolur N. Biological oxidation methods for the removal of organic and inorganic contaminants from wastewater: A comprehensive review. *Sci Total Environ*. 2022;843(April):157026. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.157026
601. Aranda C, Carro J, González-Benjumea A, et al. Advances in enzymatic oxyfunctionalization of aliphatic compounds. *Biotechnol Adv*. 2021;51(xxxx):107703. doi:10.1016/j.biotechadv.2021.107703
602. Malomo SO, Adeoye RI, Babatunde L, Saheed IA, Iniaghe MO, Olorunniji FJ. Bio-kemistri Suicide inactivation of horseradish peroxidase by excess hydrogen peroxide : The effects of reaction pH , buffer ion concentration , and redox mediation. *International Journal of the Nigerian Society of Experimental Biology*. 2011;23(3):124-128. <https://www.ajol.info/index.php/biokem/article/view/77688/68116>
603. Passardi F, Penel C, Dunand C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci*. 2004;9(11):534-540. doi:10.1016/j.tplants.2004.09.002
604. Sardarelli S, Hasanzadeh M, Razmi H. Chemical binding of horseradish peroxidase enzyme with poly beta-cyclodextrin and its application as molecularly imprinted polymer for the monitoring of H_2O_2 in human plasma samples. *Journal of Molecular Recognition*. 2021;34(5). doi:10.1002/jmr.2884
605. Valderrama B, Ayala M, Vazquez-Duhalt R. Suicide Inactivation of Peroxidases and the Challenge of Engineering More Robust Enzymes. *Chem Biol*. 2002;9(5):555-565. doi:10.1016/S1074-5521(02)00149-7
606. Mukherjee D, Taylor KE, Biswas N. Soybean peroxidase-catalyzed oligomerization of arylamines in water: optimization, kinetics, products and cost. *J Environ Chem Eng*. 2020;8(4):103871. doi:10.1016/j.jece.2020.103871
607. Song T, Li S, Lu Y, et al. Biodegradation of hydrolyzed polyacrylamide by a *Bacillus megaterium* strain SZK-5: Functional enzymes and antioxidant defense mechanism. *Chemosphere*. 2019;231:184-193. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.05.143
608. Razzaghi M, Karimi A, Ansari Z, Aghdasinia H. Phenol removal by HRP/GOx/ZSM-5 from aqueous solution: Artificial neural network simulation and genetic algorithms optimization. *J Taiwan Inst Chem Eng*. 2018;89:1-14. doi:10.1016/j.jtice.2018.03.040
609. Cruz del Álamo A, Pariente MI, Martínez F, Molina R. *Trametes versicolor* immobilized on rotating biological contactors as alternative biological treatment for the removal of emerging concern micropollutants. *Water Res*. 2020;170:115313. doi:10.1016/j.watres.2019.115313
610. Gómez-Toribio V, García-Martín AB, Martínez MJ, Martínez AT, Guillén F. Enhancing the Production of Hydroxyl Radicals by *Pleurotus eryngii* via Quinone Redox

- Cycling for Pollutant Removal. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(12):3954-3962. doi:10.1128/AEM.02138-08
611. Thompson MP, Peñafiel I, Cosgrove SC, Turner NJ. Biocatalysis Using Immobilized Enzymes in Continuous Flow for the Synthesis of Fine Chemicals. *Org Process Res Dev.* 2019;23(1):9-18. doi:10.1021/acs.oprd.8b00305
 612. Dwevedi A. *Enzyme Immobilization: Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment*. First. Springer International Publishing; 2016. doi:10.1007/978-3-319-41418-8
 613. DiCosimo R, McAuliffe J, Poulouse AJ, Bohlmann G. Industrial use of immobilized enzymes. *Chem Soc Rev.* 2013;42(15):6437-6474. doi:10.1039/c3cs35506c
 614. Matsuda T, Yamanaka R, Nakamura K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron Asymmetry.* 2009;20(5):513-557. doi:10.1016/j.tetasy.2008.12.035
 615. Yu J, Chen X, Jiang M, et al. Efficient promiscuous Knoevenagel condensation catalyzed by papain confined in Cu₃(PO₄)₂ nanoflowers. *RSC Adv.* 2018;8(5):2357-2364. doi:10.1039/C7RA12940H
 616. Li S, Yang X, Yang S, Zhu M, Wang X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Comput Struct Biotechnol J.* 2012;2(3):e201209017. doi:10.5936/csbj.201209017
 617. Madhavan A, Sindhu R, Binod P, Sukumaran RK, Pandey A. Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. *Bioresour Technol.* 2017;245(Pt B):1304-1313. doi:10.1016/j.biortech.2017.05.031
 618. Nakamura K, Yamanaka R, Matsuda T, Harada T. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. *Tetrahedron Asymmetry.* 2003;14(18):2659-2681. doi:10.1016/S0957-4166(03)00526-3
 619. Zdarta J, Meyer AS, Jesionowski T, Pinelo M. Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review. *Adv Colloid Interface Sci.* 2018;258:1-20. doi:10.1016/j.cis.2018.07.004
 620. Zhao F, Li H, Wang X, et al. CRGO/alginate microbeads: an enzyme immobilization system and its potential application for a continuous enzymatic reaction. *J Mater Chem B.* 2015;3(48):9315-9322. doi:10.1039/C5TB01508A
 621. Zhao F, Wang Q, Dong J, et al. Enzyme-inorganic nanoflowers/alginate microbeads: An enzyme immobilization system and its potential application. *Process Biochemistry.* 2017;57:87-94. doi:10.1016/j.procbio.2017.03.026
 622. Tischer W, Wedekind F. Immobilized Enzymes: Methods and Applications. In: *Topics in Current Chemistry: Biocatalysis - From Discovery to Application*. Vol 200. Springer Berlin Heidelberg; 1999:95-126. doi:10.1007/3-540-68116-7_4
 623. Cui J, Jia S. Organic-inorganic hybrid nanoflowers: A novel host platform for immobilizing biomolecules. *Coord Chem Rev.* 2017;352(29):249-263. doi:10.1016/j.ccr.2017.09.008
 624. Oshige M, Yumoto K, Miyata H, et al. Immobilization of His-Tagged Proteins on Various Solid Surfaces Using NTA-Modified Chitosan. *Open Journal of Polymer Chemistry.* 2013;03(01):6-10. doi:10.4236/ojpchem.2013.31002

625. Peris E, Okafor O, Kulcinskaja E, et al. Tuneable 3D printed bioreactors for transaminations under continuous-flow. *Green Chemistry*. 2017;19(22):5345-5349. doi:10.1039/C7GC02421E
626. Soozanipour A, Taheri-Kafrani A. Enzyme Immobilization on Functionalized Graphene Oxide Nanosheets: Efficient and Robust Biocatalysts. In: *Methods in Enzymology*. Vol 609. 1st ed. Elsevier Inc.; 2018:371-403. doi:10.1016/bs.mie.2018.06.010
627. Kulsharova G, Dimov N, Marques MPC, Szita N, Baganz F. Simplified immobilisation method for histidine-tagged enzymes in poly(methyl methacrylate) microfluidic devices. *N Biotechnol*. 2018;47(June):31-38. doi:10.1016/j.nbt.2017.12.004
628. Mohamad NR, Marzuki NHC, Buang NA, Huyop F, Wahab RA. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 2015;29(2):205-220. doi:10.1080/13102818.2015.1008192
629. Zhou L, Jiang Y, Gao J, Zhao X, Ma L, Zhou Q. Oriented immobilization of glucose oxidase on graphene oxide. *Biochem Eng J*. 2012;69:28-31. doi:10.1016/j.bej.2012.07.025
630. Ren S, Li C, Jiao X, et al. Recent progress in multienzymes co-immobilization and multienzyme system applications. *Chemical Engineering Journal*. 2019;373:1254-1278. doi:10.1016/j.cej.2019.05.141
631. Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. *Biotechnol Adv*. 2015;33(5):435-456. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.03.006
632. Cui J, Ren S, Lin T, Feng Y, Jia S. Shielding effects of Fe³⁺-tannic acid nanocoatings for immobilized enzyme on magnetic Fe₃O₄@silica core shell nanosphere. *Chemical Engineering Journal*. 2018;343(March):629-637. doi:10.1016/j.cej.2018.03.002
633. Cui J, Cui L, Jia S, Su Z, Zhang S. Hybrid Cross-Linked Lipase Aggregates with Magnetic Nanoparticles: A Robust and Recyclable Biocatalysis for the Epoxidation of Oleic Acid. *J Agric Food Chem*. 2016;64(38):7179-7187. doi:10.1021/acs.jafc.6b01939
634. Rodrigues RC, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Fernández-Lafuente R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem Soc Rev*. 2013;42(15):6290-6307. doi:10.1039/c2cs35231a
635. Ge J, Lei J, Zare RN. Protein-inorganic hybrid nanoflowers. *Nat Nanotechnol*. 2012;7(7):428-432. doi:10.1038/nnano.2012.80
636. Sheldon RA, van Pelt S. Enzyme immobilization in biocatalysis: Why, what and how. *Chem Soc Rev*. 2013;42(15):6223-6235. doi:10.1039/c3cs60075k
637. Janssen MHA, van Langen LM, Pereira SRM, van Rantwijk F, Sheldon RA. Evaluation of the performance of immobilized penicillin G acylase using active-site titration. *Biotechnol Bioeng*. 2002;78(4):425-432. doi:10.1002/bit.10208
638. Brena B, González-Pombo P, Batista-Viera F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: Guisan JM, ed. *Methods in Molecular Biology -Immobilization of Enzymes and Cells*. Vol 1051. Third. Springer Science+Business Media; 2013:15-31. doi:10.1007/978-1-62703-550-7_2

639. Hartmeier W. *Immobilized Biocatalysts An Introduction*. 1st ed. Springer Berlin Heidelberg; 1988. doi:10.1007/978-3-642-73364-2
640. Boundy JA, Smiley KL, Swanson CL, Hofreiter BT. Exoenzymic activity of alpha-amylase immobilized on a phenol-formaldehyde resin. *Carbohydr Res*. 1976;48(2):239-244. doi:10.1016/S0008-6215(00)83219-X
641. Bickerstaff GF. *Immobilization of Enzymes and Cells*. Vol 22. Second. (Guisan JM, ed.). Humana Press; 2006. doi:10.1007/978-1-59745-053-9
642. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol*. 2007;40(6):1451-1463. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.01.018
643. Blanco RM, Guisán JoséM. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. *Enzyme Microb Technol*. 1989;11(6):360-366. doi:10.1016/0141-0229(89)90020-3
644. Koch-Schmidt AC, Mosbach K. Studies on conformation of soluble and immobilized enzymes using differential scanning calorimetry. 1. Thermal stability of nicotinamide adenine dinucleotide dependent dehydrogenases. *Biochemistry*. 1977;16(10):2101-2105. doi:10.1021/bi00629a008
645. Koch-Schmidt AC, Mosbach K. Studies on conformation of soluble and immobilized enzymes using differential scanning calorimetry. 2. Specific activity and thermal stability of enzymes bound weakly and strongly to Sepharose CL 4B. *Biochemistry*. 1977;16(10):2105-2109. doi:10.1021/bi00629a009
646. Gabel D, Steinberg IZ, Katchalski E. Changes in conformation of insolubilized trypsin and chymotrypsin, followed by fluorescence. *Biochemistry*. 1971;10(25):4661-4669. doi:10.1021/bi00801a011
647. Gupta MN, Mattiasson B. Unique applications of immobilized proteins in bioanalytical systems. *Methods Biochem Anal*. 1992;36:1-34. doi:10.1002/9780470110577.ch1
648. Porath J, Axén R. Immobilization of enzymes to agar, agarose, and sephadex support. In: Mosbach K, ed. *Methods in Enzymology: Immobilized Enzymes*. Elsevier Inc.; 1976:19-45. doi:10.1016/S0076-6879(76)44005-3
649. Bickerstaff GF. Immobilization of Enzymes and Cells: Some Practical Considerations. In: Bickerstaff GF, ed. *Methods in Biotechnology*. Vol 1. First. Humana Press Inc; 1997:1-12. doi:10.1385/0-89603-386-4:1
650. Scouten WH. A survey of enzyme coupling techniques. *Methods Enzymol*. 1987;135(C):30-65. doi:10.1016/0076-6879(87)35063-3
651. Jonović M, Žuža M, Đorđević V, et al. Immobilized Alcalase on Micron- and Submicron-Sized Alginate Beads as a Potential Biocatalyst for Hydrolysis of Food Proteins. *Catalysts*. 2021;11(3):305. doi:10.3390/catal11030305
652. O'Driscoll KF. Techniques of enzyme entrapment in gels. In: Mosbach K, ed. *Methods in Enzymology: Immobilized Enzymes*. Vol 44. Elsevier Inc.; 1976:169-183. doi:10.1016/S0076-6879(76)44014-4
653. Hall RD, Holden MA, Yeoman MM. Immobilization of Higher Plant Cells. In: Bajaj YPS, ed. *Medicinal and Aromatic Plants I: Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 4. Springer-Verlag; 1988:136-156. doi:10.1007/978-3-642-73026-9_6

654. Bernfeld P, Wan J. Antigens and Enzymes Made Insoluble by Entrapping Them into Lattices of Synthetic Polymers. *Science*. 1963;142(3593):678-679. doi:10.1126/science.142.3593.678
655. Wadiak DT, Carbonell RG. Kinetic behavior of microencapsulated beta-galactosidase. *Biotechnol Bioeng*. 1975;17(8):1157-1181. doi:10.1002/bit.260170806
656. Zhang X, Wang X, Fan W, Liu Y, Wang Q, Weng L. Fabrication, Property and Application of Calcium Alginate Fiber: A Review. *Polymers (Basel)*. 2022;14(15):3227. doi:10.3390/polym14153227
657. Ge X, Yang L, Xu J. Cell Immobilization: Fundamentals, Technologies, and Applications. In: Wittmann C, Liao JC, eds. *Industrial Biotechnology: Products and Processes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2017:205-236. doi:10.1002/9783527807833
658. Groboillot A, Boadi DK, Poncelet D, Neufeld RJ. Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit Rev Biotechnol*. 1994;14(2):75-107. doi:10.3109/07388559409086963
659. Sheldon RA. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv Synth Catal*. 2007;349(8-9):1289-1307. doi:10.1002/adsc.200700082
660. Cao L, Langen L van, Sheldon RA. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Curr Opin Biotechnol*. 2003;14(4):387-394. doi:10.1016/s0958-1669(03)00096-x
661. Wong LS, Khan F, Micklefield J. Selective covalent protein immobilization: strategies and applications. *Chem Rev*. 2009;109(9):4025-4053. doi:10.1021/cr8004668
662. Grunwald P. *Immobilized Biocatalysts*. (Grunwald P, ed.). MDPI; 2018. https://open-researchlibrary.org/ext/api/media/9446b74c-2b81-4d06-8f37-2dbe3e4df28e/assets/external_content.pdf
663. Zdarta J, Meyer A, Jesionowski T, Pinelo M. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. *Catalysts*. 2018;8(2):92. doi:10.3390/catal8020092
664. Elnashar M. *Biotechnology of Biopolymers*. First. (Elnashar M, ed.). InTech; 2011. doi:10.5772/683
665. Horchani H, Aissa I, Ouertani S, Zarai Z, Gargouri Y, Sayari A. Staphylococcal lipases: Biotechnological applications. *J Mol Catal B Enzym*. 2012;76:125-132. doi:10.1016/j.molcatb.2011.11.018
666. Vijayaraghavan K, Yamini D, Ambika V, Sravya Sowdamini N. Trends in inulinase production – a review. *Crit Rev Biotechnol*. 2009;29(1):67-77. doi:10.1080/07388550802685389
667. Homaei AA, Sariri R, Vianello F, Stevanato R. Enzyme immobilization: an update. *J Chem Biol*. 2013;6(4):185-205. doi:10.1007/s12154-013-0102-9
668. Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb Technol*. 2004;35(2-3):126-139. doi:10.1016/j.enzmictec.2003.12.013
669. Kurita K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog Polym Sci*. 2001;26(9):1921-1971. doi:10.1016/S0079-6700(01)00007-7
670. Peter MG. Applications and Environmental Aspects of Chitin and Chitosan. *Journal of Macromolecular Science, Part A*. 1995;32(4):629-640. doi:10.1080/10601329508010276

671. Shi LE, Tang ZX, Yi Y, Chen JS, Xiong WY, Ying GQ. Immobilization of nuclease p1 on chitosan micro-spheres. *Chem Biochem Eng Q.* 2011;25(1):83-88. <https://hrcak.srce.hr/file/98931>
672. Cahyaningrum SE, Herdyastusi N, Maharani DK. Immobilization of Glucose Isomerase in Surface-Modified Chitosan Gel Beads. *Res J Pharm Biol Chem Sci.* 2014;5(2):104-111. [https://www.rjpbcs.com/pdf/2014_5\(2\)/\[13\].pdf](https://www.rjpbcs.com/pdf/2014_5(2)/[13].pdf)
673. Tümtürk H, Demirel G, Altinok H, Aksoy S, Hasirci N. Immobilization of glucose isomerase in surface-modified alginate gel beads. *J Food Biochem.* 2008;32(2):234-246. doi:10.1111/j.1745-4514.2008.00171.x
674. Kim HJ, Park S, Kim SH, et al. Biocompatible cellulose nanocrystals as supports to immobilize lipase. *J Mol Catal B Enzym.* 2015;122:170-178. doi:10.1016/j.molcatb.2015.09.007
675. Tümtürk H, Karaca N, Demirel G, Şahin F. Preparation and application of poly(N,N-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)/ κ -Carrageenan hydrogels for immobilization of lipase. *Int J Biol Macromol.* 2007;40(3):281-285. doi:10.1016/j.ijbiomac.2006.07.004
676. Zdarta J, Norman M, Smulek W, et al. Spongin-Based Scaffolds from *Hippospongia communis* Demosponge as an Effective Support for Lipase Immobilization. *Catalysts.* 2017;7(5):147. doi:10.3390/catal7050147
677. Zdarta J, Jesionowski T. Luffa cylindrica sponges as a thermally and chemically stable support for *Aspergillus niger* lipase. *Biotechnol Prog.* 2016;32(3):657-665. doi:10.1002/btpr.2253
678. Hwang ET, Gu MB. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. *Eng Life Sci.* 2013;13(1):49-61. doi:10.1002/elsc.201100225
679. Betigeri SS, Neau SH. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. *Biomaterials.* 2002;23(17):3627-3636. doi:10.1016/S0142-9612(02)00095-9
680. Kocaturk S, Yagar H. Optimization of Polyphenol Oxidase Immobilization in Copper Alginate Beads. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology.* 2010;38(3):157-163. doi:10.3109/10731191003790406
681. Ball SG, Morell MK. From Bacterial Glycogen to Starch: Understanding the Biogenesis of the Plant Starch Granule. *Annu Rev Plant Biol.* 2003;54(1):207-233. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134927
682. Delattre C, Fenoradosoa TA, Michaud P. Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2011;54(6):1075-1092. doi:10.1590/S1516-89132011000600002
683. Prakash O, Jaiswal N. Immobilization of a thermostable α -amylase on agarose and agar matrices and its application in starch stain removal. *World Appl Sci J.* 2011;13(3):572-577. [http://www.idosi.org/wasj/wasj13\(3\)/28.pdf](http://www.idosi.org/wasj/wasj13(3)/28.pdf)
684. Martins de Oliveira S, Moreno-Perez S, Romero-Fernández M, Fernandez-Lorente G, Rocha-Martin J, Guisan JM. Immobilization and stabilization of commercial β -1,4-endoxylanase Depol™ 333MDP by multipoint covalent attachment for xylan hydrolysis:

- Production of prebiotics (xylo-oligosaccharides). *Biocatal Biotransformation*. 2018;36(2):141-150. doi:10.1080/10242422.2017.1308497
685. Stanford ECC. Algin: A New Substance Obtained from Some of the Commoner Species of Marine Algæ. *Sci Am*. 1883;16(396supp):6323-6324. doi:10.1038/scientificamerican08041883-6323supp
 686. Linker A, Jones R. A Polysaccharide resembling Alginic Acid from a Pseudomonas Micro-organism. *Nature*. 1964;204(4954):187-188. doi:10.1038/204187a0
 687. Linker A, Jones RS. A New Polysaccharide Resembling Alginic Acid Isolated from Pseudomonads. *Journal of Biological Chemistry*. 1966;241(16):3845-3851. doi:10.1016/S0021-9258(18)99848-0
 688. Bi D, Yang X, Yao L, et al. Potential Food and Nutraceutical Applications of Alginate: A Review. *Mar Drugs*. 2022;20(9):564. doi:10.3390/md20090564
 689. Brownlee IA, Allen A, Pearson JP, et al. Alginate as a Source of Dietary Fiber. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005;45(6):497-510. doi:10.1080/10408390500285673
 690. Flórez-Fernández N, Torres MD, González-Muñoz MJ, Domínguez H. Recovery of bioactive and gelling extracts from edible brown seaweed *Laminaria ochroleuca* by non-isothermal autohydrolysis. *Food Chem*. 2019;277:353-361. doi:10.1016/j.foodchem.2018.10.096
 691. Ching SH, Bansal N, Bhandari B. Alginate gel particles–A review of production techniques and physical properties. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;57(6):1133-1152. doi:10.1080/10408398.2014.965773
 692. Onsøyen LE. *Thickening and Gelling Agents for Food*. (Imeson AP, ed.). Springer US; 1997. doi:10.1007/978-1-4615-2197-6
 693. Haug A, Myklestad S, Larsen B, Smidsrød O. Correlation between chemical structure and physical properties of alginates. *Acta Chem Scand*. 1967;21(3):768-778. https://scholar.google.com/scholar_url?url=http://actachem-scand.org/pdf/acta_vol_21_p0768-0778.pdf&hl=en&sa=X&ei=5k2IY6AjipTL1g_ZkZmIAw&scisig=AAGBfm1sS8GN4vIWdPKa468jjCpcE0Spzg&oi=scholar
 694. Larsen B, Haug A. Biosynthesis of alginate: Part I. Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Carbohydr Res*. 1971;17(2):287-296. doi:10.1016/S0008-6215(00)82536-7
 695. Haug A, Larsen B. Biosynthesis of alginate: Part II. Polymannuronic acid C-5-epimerase from *Azotobacter vinelandii*. *Carbohydr Res*. 1971;17(2):297-308. doi:10.1016/S0008-6215(00)82537-9
 696. Larsen B, Haug A. Biosynthesis of alginate : Part III. Tritium incorporation with polymannuronic acid 5-epimerase from *Azotobacter vinelandii*. *Carbohydr Res*. 1971;20(2):225-232. doi:10.1016/S0008-6215(00)81375-0
 697. Llanes F, Ryan DH, Marchessault RH. Magnetic nanostructured composites using alginates of different M/G ratios as polymeric matrix. *Int J Biol Macromol*. 2000;27(1):35-40. doi:10.1016/S0141-8130(99)00115-4
 698. Atkins EDT, Nieduszynski IA, Mackie W, Parker KD, Smolko EE. Structural components of alginic acid. II. The crystalline structure of poly-?-L-guluronic acid. Results

- of X-ray diffraction and polarized infrared studies. *Biopolymers*. 1973;12(8):1879-1887. doi:10.1002/bip.1973.360120814
699. Yang JS, Xie YJ, He W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydr Polym*. 2011;84(1):33-39. doi:10.1016/j.carbpol.2010.11.048
 700. Pawar SN, Edgar KJ. Alginate esters via chemoselective carboxyl group modification. *Carbohydr Polym*. 2013;98(2):1288-1296. doi:10.1016/j.carbpol.2013.08.014
 701. Bi D, Li X, Li T, et al. Characterization and Neuroprotection Potential of Seleno-Polymannuronate. *Front Pharmacol*. 2020;11(February):1-9. doi:10.3389/fphar.2020.00021
 702. Bi D, Lai Q, Li X, et al. Neuroimmunoregulatory potential of seleno-polymannuronate derived from alginate in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Food Hydrocoll*. 2019;87:925-932. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.09.013
 703. Bi D, Lai Q, Cai N, et al. Elucidation of the Molecular-Mechanisms and In Vivo Evaluation of the Anti-inflammatory Effect of Alginate-Derived Seleno-polymannuronate. *J Agric Food Chem*. 2018;66(9):2083-2091. doi:10.1021/acs.jafc.7b05719
 704. Putri AP, Picchioni F, Harjanto S, Chalid M. Alginate Modification and Lectin-Conjugation Approach to Synthesize the Mucoadhesive Matrix. *Applied Sciences*. 2021;11(24):11818. doi:10.3390/app112411818
 705. Pallmann J, Ren Y, Mahltig B, Huo T. Phosphorylated sodium alginate/APP/DPER intumescent flame retardant used for polypropylene. *J Appl Polym Sci*. 2019;136(29):47794. doi:10.1002/app.47794
 706. Park J, Lee SJ, Lee H, Park SA, Lee JY. Three dimensional cell printing with sulfated alginate for improved bone morphogenetic protein-2 delivery and osteogenesis in bone tissue engineering. *Carbohydr Polym*. 2018;196(May):217-224. doi:10.1016/j.carbpol.2018.05.048
 707. Gionet-Gonzales M, Casella A, Diloretto D, et al. Sulfated Alginate Hydrogels Prolong the Therapeutic Potential of MSC Spheroids by Sequestering the Secretome. *Adv Healthc Mater*. 2021;10(21):2101048. doi:10.1002/adhm.202101048
 708. Penman A, Sanderson GR. A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. *Carbohydr Res*. 1972;25(2):273-282. doi:10.1016/S0008-6215(00)81637-7
 709. Hay ID, Rehman ZU, Moradali MF, Wang Y, Rehm BHA. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microb Biotechnol*. 2013;6(6):637-650. doi:10.1111/1751-7915.12076
 710. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012;37(1):106-126. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003
 711. Tavakoli J, Laisak E, Gao M, Tang Y. AIEgen quantitatively monitoring the release of Ca²⁺ during swelling and degradation process in alginate hydrogels. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;104(July):109951. doi:10.1016/j.msec.2019.109951
 712. Mohammed A, Bissoon R, Bajnath E, et al. Multistage extraction and purification of waste Sargassum natans to produce sodium alginate: An optimization approach. *Carbohydr Polym*. 2018;198:109-118. doi:10.1016/j.carbpol.2018.06.067
 713. Satheeshbabu B, Mohamed I. Synthesis and characterization of sodium alginate conjugate and study of effect of conjugation on drug release from matrix tablet. *Indian J Pharm Sci*. 2015;77(5):579. doi:10.4103/0250-474X.169045

714. Vauchel P, Arhaliass A, Legrand J, Kaas R, Baron R. Decrease In Dynamic Viscosity And Average Molecular Weight Of Alginate From Laminaria Digitata During Alkaline Extraction. *J Phycol.* 2008;44(2):515-517. doi:10.1111/j.1529-8817.2008.00482.x
715. Vauchel P, Kaas R, Arhaliass A, Baron R, Legrand J. A New Process for Extracting Alginates from Laminaria digitata: Reactive Extrusion. *Food Bioproc Tech.* 2008;1(3):297-300. doi:10.1007/s11947-008-0082-x
716. Peteiro C. Alginate Production from Marine Macroalgae, with Emphasis on Kelp Farming. In: *Springer Series in Biomaterials Science and Engineering*. Vol 11. ; 2018:27-66. doi:10.1007/978-981-10-6910-9_2
717. Cardoso MJ, Costa RR, Mano JF. Marine Origin Polysaccharides in Drug Delivery Systems. *Mar Drugs.* 2016;14(2):34. doi:10.3390/md14020034
718. Fertah M, Belfkira A, Dahmane E montassir, Taourirte M, Brouillette F. Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan Laminaria digitata brown seaweed. *Arabian Journal of Chemistry.* 2017;10:S3707-S3714. doi:10.1016/j.arabjc.2014.05.003
719. Fenoradosoa TA, Ali G, Delattre C, et al. Extraction and characterization of an alginate from the brown seaweed Sargassum turbinarioides Grunow. *J Appl Phycol.* 2010;22(2):131-137. doi:10.1007/s10811-009-9432-y
720. Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromol Biosci.* 2006;6(8):623-633. doi:10.1002/mabi.200600069
721. Jain D, Bar-Shalom D. Alginate drug delivery systems: application in context of pharmaceutical and biomedical research. *Drug Dev Ind Pharm.* 2014;40(12):1576-1584. doi:10.3109/03639045.2014.917657
722. Tønnesen HH, Karlsen J. Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Dev Ind Pharm.* 2002;28(6):621-630. doi:10.1081/DDC-120003853
723. Haugstad K, Håti A, Nordgård C, et al. Direct Determination of Chitosan–Mucin Interactions Using a Single-Molecule Strategy: Comparison to Alginate–Mucin Interactions. *Polymers (Basel).* 2015;7(2):161-185. doi:10.3390/polym7020161
724. Taylor C, Pearson JP, Draget KI, Dettmar PW, Smidsrød O. Rheological characterisation of mixed gels of mucin and alginate. *Carbohydr Polym.* 2005;59(2):189-195. doi:10.1016/j.carbpol.2004.09.009
725. Aderibigbe B, Buyana B. Alginate in Wound Dressings. *Pharmaceutics.* 2018;10(2):42. doi:10.3390/pharmaceutics10020042
726. Wang B, Wan Y, Zheng Y, et al. Alginate-based composites for environmental applications: a critical review. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 2019;49(4):318-356. doi:10.1080/10643389.2018.1547621
727. Pawar SN, Edgar KJ. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials.* 2012;33(11):3279-3305. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.01.007
728. Spasojevic M, Bhujbal S, Paredes G, Haan BJ, Schouten AJ, Vos P. Considerations in binding diblock copolymers on hydrophilic alginate beads for providing an immunoprotective membrane. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(6):1887-1896. doi:10.1002/jbm.a.34863

729. Zhou R, Shi X, Gao Y, Cai N, Jiang Z, Xu X. Anti-inflammatory Activity of Guluronate Oligosaccharides Obtained by Oxidative Degradation from Alginate in Lipopolysaccharide-Activated Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. *J Agric Food Chem.* 2015;63(1):160-168. doi:10.1021/jf503548a
730. Rocha de Souza MC, Marques CT, Guerra Dore CM, Ferreira da Silva FR, Oliveira Rocha HA, Leite EL. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J Appl Phycol.* 2007;19(2):153-160. doi:10.1007/s10811-006-9121-z
731. Maciel D, Figueira P, Xiao S, et al. Redox-Responsive Alginate Nanogels with Enhanced Anticancer Cytotoxicity. *Biomacromolecules.* 2013;14(9):3140-3146. doi:10.1021/bm400768m
732. Ansari MJ, Rajendran RR, Mohanto S, et al. Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Hydrogels for Biomedical Applications: A Review of the State-of-the-Art. *Gels.* 2022;8(7):454. doi:10.3390/gels8070454
733. Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Lett.* 1973;32(1):195-198. doi:10.1016/0014-5793(73)80770-7
734. Crow BB, Nelson KD. Release of bovine serum albumin from a hydrogel-cored biodegradable polymer fiber. *Biopolymers.* 2006;81(6):419-427. doi:10.1002/bip.20442
735. Kuo CK, Ma PX. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials.* 2001;22(6):511-521. doi:10.1016/S0142-9612(00)00201-5
736. Drury JL, Dennis RG, Mooney DJ. The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials.* 2004;25(16):3187-3199. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.10.002
737. Eiselt P, Lee KY, Mooney DJ. Rigidity of Two-Component Hydrogels Prepared from Alginate and Poly(ethylene glycol)-Diamines. *Macromolecules.* 1999;32(17):5561-5566. doi:10.1021/ma990514m
738. Lee KY, Rowley JA, Eiselt P, Moy EM, Bouhadir KH, Mooney DJ. Controlling Mechanical and Swelling Properties of Alginate Hydrogels Independently by Cross-Linker Type and Cross-Linking Density. *Macromolecules.* 2000;33(11):4291-4294. doi:10.1021/ma9921347
739. Gao Y, Jin X. Dual Crosslinked Methacrylated Alginate Hydrogel Micron Fibers and Tissue Constructs for Cell Biology. *Mar Drugs.* 2019;17(10):557. doi:10.3390/md17100557
740. Sugiura S, Oda T, Izumida Y, et al. Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array. *Biomaterials.* 2005;26(16):3327-3331. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.08.029
741. Ouerghi O, Geesi MH, Ibnouf EO, et al. Sol-gel synthesized rutile TiO₂ nanoparticles loaded with cardamom essential oil: Enhanced antibacterial activity. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2021;64:102581. doi:10.1016/j.jddst.2021.102581
742. Silva CM, Ribeiro AJ, Figueiredo IV, Gonçalves AR, Veiga F. Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. *Int J Pharm.* 2006;311(1-2):1-10. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.050

743. Ansari MJ, Ansari MJ. Factors Affecting Preparation and Properties of Nanoparticles by Nanoprecipitation Method, *Indo Am. J Ansari*. 2017;2017(12):4854-4858. doi:10.5281/zenodo.1134425
744. Fundueanu G, Nastruzzi C, Carpov A, Desbrieres J, Rinaudo M. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. *Bio-materials*. 1999;20(15):1427-1435. doi:10.1016/S0142-9612(99)00050-2
745. Seifert DB, Phillips JA. Production of Small, Monodispersed Alginate Beads for Cell Immobilization. *Biotechnol Prog*. 1997;13(5):562-568. doi:10.1021/bp9700723
746. Brun-Graeppi AKAS, Richard C, Bessodes M, Scherman D, Merten OW. Cell micro-carriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers. *Journal of Controlled Release*. 2011;149(3):209-224. doi:10.1016/j.jconrel.2010.09.023
747. Zimmermann H, Shirley SG, Zimmermann U. Alginate-based encapsulation of cells: Past, present, and future. *Curr Diab Rep*. 2007;7(4):314-320. doi:10.1007/s11892-007-0051-1
748. Reis CP, Neufeld RJ, Vilela S, Ribeiro AJ, Veiga F. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *J Microencapsul*. 2006;23(3):245-257. doi:10.1080/02652040500286086
749. Shilpa A, Agrawal SS, Ray AR. Controlled Delivery of Drugs from Alginate Matrix. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*. 2003;43(2):187-221. doi:10.1081/MC-120020160
750. Poncelet D, Lencki R, Beaulieu C, Halle JP, Neufeld RJ, Fournier A. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1992;38(1):39-45. doi:10.1007/BF00169416
751. Poncelet D. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;944(1):74-82. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03824.x
752. Sæther HV, Holme HK, Maurstad G, Smidsrød O, Stokke BT. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydr Polym*. 2008;74(4):813-821. doi:10.1016/j.carbpol.2008.04.048
753. Rajaonarivony M, Vauthier C, Couarraze G, Puisieux F, Couvreur P. Development of a New Drug Carrier Made from Alginate. *J Pharm Sci*. 1993;82(9):912-917. doi:10.1002/jps.2600820909
754. Severino P, da Silva CF, Andrade LN, de Lima Oliveira D, Campos J, Souto EB. Alginate Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting. *Curr Pharm Des*. 2019;25(11):1312-1334. doi:10.2174/1381612825666190425163424
755. Kostic I, Isailovic B, Djordjevic V, Levic S, Nedovic V, Bugarski B. Electrostatic extrusion as a dispersion technique for encapsulation of cells and bioactive compounds. *Hem Ind*. 2012;66(4):505-517. doi:10.2298/HEMIND111209013K
756. Liu BYH. *Fine Particles: Aerosol Generation, Measurement, Sampling, and Analysis*. 1st ed. (Liu BYH, ed.). Academic Press; Elsevier Inc.; 1976. doi:10.1016/B978-0-12-452950-2.X5001-5
757. Singh V, Srivastava P, Singh A, Singh D, Malviya T. Polysaccharide-Silica Hybrids: Design and Applications. *Polymer Reviews*. 2016;56(1):113-136. doi:10.1080/15583724.2015.1090449

758. Grigoras AG. Catalase immobilization—A review. *Biochem Eng J.* 2017;117:1-20. doi:10.1016/j.bej.2016.10.021
759. Cao M, Li Z, Wang J, et al. Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. *Trends Food Sci Technol.* 2012;27(1):47-56. doi:10.1016/j.tifs.2012.04.003
760. Li XS, Zhu GT, Luo YB, Yuan BF, Feng YQ. Synthesis and applications of functionalized magnetic materials in sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2013;45(1):233-247. doi:10.1016/j.trac.2012.10.015
761. Netto CGCM, Toma HE, Andrade LH. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *J Mol Catal B Enzym.* 2013;85-86:71-92. doi:10.1016/j.molcatb.2012.08.010
762. Mehraşbi MR, Mohammadi J, Peyda M, Mohammadi M. Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil. *Renew Energy.* 2017;101:593-602. doi:10.1016/j.renene.2016.09.022
763. Aber S, Mahmoudikia E, Karimi A, Mahdizadeh F. Immobilization of Glucose Oxidase on Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles and its Application in the Removal of Acid Yellow 12. *Water Air Soil Pollut.* 2016;227(3):93. doi:10.1007/s11270-016-2754-x
764. Atacan K, Çakıroğlu B, Özacar M. Improvement of the stability and activity of immobilized trypsin on modified Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for hydrolysis of bovine serum albumin and its application in the bovine milk. *Food Chem.* 2016;212:460-468. doi:10.1016/j.foodchem.2016.06.011
765. Jia H, Zhu G, Wang P. Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility. *Biotechnol Bioeng.* 2003;84(4):406-414. doi:10.1002/bit.10781
766. Kim J, Grate JW, Wang P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem Eng Sci.* 2006;61(3):1017-1026. doi:10.1016/j.ces.2005.05.067
767. Cipolatti EP, Valério A, Henriques RO, et al. Nanomaterials for biocatalyst immobilization – state of the art and future trends. *RSC Adv.* 2016;6(106):104675-104692. doi:10.1039/C6RA22047A
768. Hu C, Wang N, Zhang W, Zhang S, Meng Y, Yu X. Immobilization of *Aspergillus terreus* lipase in self-assembled hollow nanospheres for enantioselective hydrolysis of ketoprofen vinyl ester. *J Biotechnol.* 2015;194:12-18. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.11.032
769. Wang X, Shi J, Li Z, et al. Facile One-Pot Preparation of Chitosan/Calcium Pyrophosphate Hybrid Microflowers. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014;6(16):14522-14532. doi:10.1021/am503787h
770. Kotal M, Srivastava SK, Maiti TK. Fabrication of Gold Nanoparticle Assembled Polyurethane Microsphere Template in Trypsin Immobilization. *J Nanosci Nanotechnol.* 2011;11(11):10149-10157. doi:10.1166/jnn.2011.4979
771. Bolibok P, Wiśniewski M, Roszek K, Terzyk AP. Controlling enzymatic activity by immobilization on graphene oxide. *The Science of Nature.* 2017;104(3-4):36. doi:10.1007/s00114-017-1459-3

772. Hou J, Dong G, Xiao B, Malassigne C, Chen V. Preparation of titania based biocatalytic nanoparticles and membranes for CO₂ conversion. *J Mater Chem A Mater.* 2015;3(7):3332-3342. doi:10.1039/C4TA05760K
773. Srivastava M, Singh J, Yashpal M, et al. Synthesis of superparamagnetic bare Fe₃O₄ nanostructures and core/shell (Fe₃O₄/alginate) nanocomposites. *Carbohydr Polym.* 2012;89(3):821-829. doi:10.1016/j.carbpol.2012.04.016
774. Talbot D, Abramson S, Griffete N, Bée A. pH-sensitive magnetic alginate/γ-Fe₂O₃ nanoparticles for adsorption/desorption of a cationic dye from water. *Journal of Water Process Engineering.* 2018;25(June):301-308. doi:10.1016/j.jwpe.2018.08.013
775. Sreeram KJ, Nidhin M, Nair BU. Synthesis of aligned hematite nanoparticles on chitosan–alginate films. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2009;71(2):260-267. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.02.015
776. Lu AH, Salabas EL, Schüth F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition.* 2007;46(8):1222-1244. doi:10.1002/anie.200602866
777. Leite ER, Ribeiro C. *Crystallization and Growth of Colloidal Nanocrystals*. First. Springer New York; 2012. doi:10.1007/978-1-4614-1308-0
778. Li J, Jiang B, Liu Y, et al. Preparation and adsorption properties of magnetic chitosan composite adsorbent for Cu²⁺ removal. *J Clean Prod.* 2017;158:51-58. doi:10.1016/j.jclepro.2017.04.156
779. Kloster GA, Mosiewicki MA, Marcovich NE. Chitosan/iron oxide nanocomposite films: Effect of the composition and preparation methods on the adsorption of congo red. *Carbohydr Polym.* 2019;221:186-194. doi:10.1016/j.carbpol.2019.05.089
780. Reddy DHK, Lee SM. Application of magnetic chitosan composites for the removal of toxic metal and dyes from aqueous solutions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2013;201-202:68-93. doi:10.1016/j.cis.2013.10.002
781. Cornell RM, Schwertmann U. *Introduction to the Iron Oxides*. Second. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2003. doi:10.1002/3527602097.ch1
782. Boxall C, Kelsall G, Zhang Z. Photoelectrophoresis of colloidal iron oxides. Part 2. — Magnetite (Fe₃O₄). *J Chem Soc, Faraday Trans.* 1996;92(5):791-802. doi:10.1039/FT9969200791
783. Wu W, Xiao XH, Zhang SF, et al. Synthesis and Magnetic Properties of Maghemite (γ-Fe₂O₃) Short-Nanotubes. *Nanoscale Res Lett.* 2010;5(9):1474-1479. doi:10.1007/s11671-010-9664-4
784. Yamaura M, Camilo RL, Sampaio LC, Macêdo MA, Nakamura M, Toma HE. Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *J Magn Magn Mater.* 2004;279(2-3):210-217. doi:10.1016/j.jmmm.2004.01.094
785. Levy M, Quarta A, Espinosa A, et al. Correlating Magneto-Structural Properties to Hyperthermia Performance of Highly Monodisperse Iron Oxide Nanoparticles Prepared by a Seeded-Growth Route. *Chemistry of Materials.* 2011;23(18):4170-4180. doi:10.1021/cm201078f

786. Wu W, Xiao XH, Ren F, Zhang SF, Jiang CZ. A Comparative Study of the Magnetic Behavior of Single and Tubular Clustered Magnetite Nanoparticles. *J Low Temp Phys.* 2012;168(5-6):306-313. doi:10.1007/s10909-012-0634-3
787. Wu W, Wu Z, Yu T, Jiang C, Kim WS. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci Technol Adv Mater.* 2015;16(2):23501. doi:10.1088/1468-6996/16/2/023501
788. Chin AB, Yaacob II. Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure. *J Mater Process Technol.* 2007;191(1-3):235-237. doi:10.1016/j.jmatprotec.2007.03.011
789. Alborno C, Jacobo SE. Preparation of a biocompatible magnetic film from an aqueous ferrofluid. *J Magn Magn Mater.* 2006;305(1):12-15. doi:10.1016/j.jmmm.2005.11.021
790. Hee Kim E, Sook Lee H, Kook Kwak B, Kim BK. Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method for MRI contrast agent. *J Magn Magn Mater.* 2005;289:328-330. doi:10.1016/j.jmmm.2004.11.093
791. Wan J, Chen X, Wang Z, Yang X, Qian Y. A soft-template-assisted hydrothermal approach to single-crystal Fe₃O₄ nanorods. *J Cryst Growth.* 2005;276(3-4):571-576. doi:10.1016/j.jcrysgro.2004.11.423
792. Kimata M, Nakagawa D, Hasegawa M. Preparation of monodisperse magnetic particles by hydrolysis of iron alkoxide. *Powder Technol.* 2003;132(2-3):112-118. doi:10.1016/S0032-5910(03)00046-9
793. Salazar-Alvarez G, Muhammed M, Zagorodni AA. Novel flow injection synthesis of iron oxide nanoparticles with narrow size distribution. *Chem Eng Sci.* 2006;61(14):4625-4633. doi:10.1016/j.ces.2006.02.032
794. Basak S, Chen DR, Biswas P. Electrospray of ionic precursor solutions to synthesize iron oxide nanoparticles: Modified scaling law. *Chem Eng Sci.* 2007;62(4):1263-1268. doi:10.1016/j.ces.2006.11.029
795. Babes L, Denizot B, Tanguy G, le Jeune JJ, Jallet P. Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Used as MRI Contrast Agents: A Parametric Study. *J Colloid Interface Sci.* 1999;212(2):474-482. doi:10.1006/jcis.1998.6053
796. Sjögren CE, Johansson C, Naevestad A, Sontum PC, Briley-Saebø K, Fahlvik AK. Crystal size and properties of superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles. *Magn Reson Imaging.* 1997;15(1):55-67. doi:10.1016/s0730-725x(96)00335-9
797. Nunes AC, Yu ZC. Fractionation of a water-based ferrofluid. *J Magn Magn Mater.* 1987;65(2-3):265-268. doi:10.1016/0304-8853(87)90047-3
798. Thurm S, Odenbach S. Magnetic separation of ferrofluids. *J Magn Magn Mater.* 2002;252(1-3 SPEC. ISS.):247-249. doi:10.1016/S0304-8853(02)00679-0
799. Martínez-Mera I, Espinosa-Pesqueira ME, Pérez-Hernández R, Arenas-Alatorre J. Synthesis of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles without surfactants at room temperature. *Mater Lett.* 2007;61(23-24):4447-4451. doi:10.1016/j.matlet.2007.02.018
800. Morrison SA, Cahill CL, Carpenter EE, Calvin S, Harris VG. Atomic Engineering of Mixed Ferrite and Core-Shell Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2005;5(9):1323-1344. doi:10.1166/jnn.2005.303

801. Sun Y kang, Ma M, Zhang Y, Gu N. Synthesis of nanometer-size maghemite particles from magnetite. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2004;245(1-3):15-19. doi:10.1016/j.colsurfa.2004.05.009
802. Qiu J, Yang R, Li M, Jiang N. Preparation and characterization of porous ultrafine Fe₂O₃ particles. *Mater Res Bull.* 2005;40(11):1968-1975. doi:10.1016/j.materres-bull.2005.05.025
803. Lee SJ, Jeong JR, Shin SC, Kim JC, Kim JD. Synthesis and characterization of superparamagnetic maghemite nanoparticles prepared by coprecipitation technique. *J Magn Magn Mater.* 2004;282(1-3):147-150. doi:10.1016/j.jmmm.2004.04.035
804. Jolivet JP, Chanéac C, Tronc E. Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. *Chem Commun.* 2004;4(5):477-483. doi:10.1039/B304532N
805. Laurent S, Forge D, Port M, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev.* 2008;108(6):2064-2110. doi:10.1021/cr068445e
806. Morales MP, Veintemillas-Verdaguer S, Montero MI, et al. Surface and Internal Spin Canting in γ -Fe₂O₃ Nanoparticles. *Chemistry of Materials.* 1999;11(11):3058-3064. doi:10.1021/cm991018f
807. Cornell RM, Schwertmann U. *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization.* Vol 191. Second. (Cornell RM, Schwertmann U, eds.). Wiley-VCH Verlag GmbH; 2000. doi:10.1002/9783527613229
808. Boistelle R, Astier JP. Crystallization mechanisms in solution. *J Cryst Growth.* 1988;90(1-3):14-30. doi:10.1016/0022-0248(88)90294-1
809. Sugimoto T. Formation of Monodispersed Nano- and Micro-Particles Controlled in Size, Shape, and Internal Structure. *Chem Eng Technol.* 2003;26(3):313-321. doi:10.1002/ceat.200390048
810. Schwarzer HC, Peukert W. Tailoring Particle Size Through Nanoparticle Precipitation. *Chem Eng Commun.* 2004;191(4):580-606. doi:10.1080/00986440490270106
811. Gribov NM, Bibik EE, Buzunov OV, Naumov VN. Physico-chemical regularities of obtaining highly dispersed magnetite by the method of chemical condensation. *J Magn Magn Mater.* 1990;85(1-3):7-10. doi:10.1016/0304-8853(90)90005-B
812. Buschow KHJ. *Handbook of Magnetic Materials.* Vol 16. 1st ed. (Buschow KHJ, ed.). Elsevier B.V.; 2006. <https://www.sciencedirect.com/handbook/handbook-of-magnetic-materials/vol/16/suppl/C>
813. LaMer VK, Dinegar RH. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J Am Chem Soc.* 1950;72(11):4847-4854. doi:10.1021/ja01167a001
814. Lefebure S, Dubois E, Cabuil V, Neveu S, Massart R. Monodisperse magnetic nanoparticles: Preparation and dispersion in water and oils. *J Mater Res.* 1998;13(10):2975-2981. doi:10.1557/JMR.1998.0407
815. Tominaga M, Matsumoto M, Soejima K, Taniguchi I. Size control for two-dimensional iron oxide nanodots derived from biological molecules. *J Colloid Interface Sci.* 2006;299(2):761-765. doi:10.1016/j.jcis.2006.02.022

816. Sjøgren CE, Briley-Sæbø K, Hanson M, Johansson C. Magnetic characterization of iron oxides for magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med.* 1994;31(3):268-272. doi:10.1002/mrm.1910310305
817. Itoh H, Sugimoto T. Systematic control of size, shape, structure, and magnetic properties of uniform magnetite and maghemite particles. *J Colloid Interface Sci.* 2003;265(2):283-295. doi:10.1016/S0021-9797(03)00511-3
818. Thapa D, Palkar VR, Kurup MB, Malik SK. Properties of magnetite nanoparticles synthesized through a novel chemical route. *Mater Lett.* 2004;58(21):2692-2694. doi:10.1016/j.matlet.2004.03.045
819. Pardoe H, Chua-anusorn W, st. Pierre TG, Dobson J. Structural and magnetic properties of nanoscale iron oxide particles synthesized in the presence of dextran or polyvinyl alcohol. *J Magn Magn Mater.* 2001;225(1-2):41-46. doi:10.1016/S0304-8853(00)01226-9
820. Khalafalla S, Reimers G. Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids. *IEEE Trans Magn.* 1980;16(2):178-183. doi:10.1109/TMAG.1980.1060578
821. Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans Magn.* 1981;17(2):1247-1248. doi:10.1109/TMAG.1981.1061188
822. Bacri JC, Perzynski R, Salin D, Cabuil V, Massart R. Ionic ferrofluids: A crossing of chemistry and physics. *J Magn Magn Mater.* 1990;85(1-3):27-32. doi:10.1016/0304-8853(90)90010-N
823. Massart R, Roger J, Cabuil V. New Trends in Chemistry of Magnetic Colloids: Polar and Non Polar Magnetic Fluids, Emulsions, Capsules and Vesicles. *Brazilian Journal of Physics.* 1995;25(2):135-141. <http://www.sbfisica.org.br/bjp/download/v25/v25a14.pdf>
824. Neveu-Prin S, Cabuil V, Massart R, Escaffre P, Dussaud J. Encapsulation of magnetic fluids. *J Magn Magn Mater.* 1993;122(1-3):42-45. doi:10.1016/0304-8853(93)91035-6
825. Fauconnier N, Bee A, Roger J, Pons JN. Adsorption of gluconic and citric acids on maghemite particles in aqueous medium. In: *Trends in Colloid and Interface Science X*. Vol 100. Steinkopff; 1996:212-216. doi:10.1007/BFb0115782
826. Fauconnier N, Bée A, Roger J, Pons JN. Synthesis of aqueous magnetic liquids by surface complexation of maghemite nanoparticles. *J Mol Liq.* 1999;83(1-3):233-242. doi:10.1016/S0167-7322(99)00088-4
827. Fauconnier N, Pons JN, Roger J, Bee A. Thiolation of Maghemite Nanoparticles by Dimercaptosuccinic Acid. *J Colloid Interface Sci.* 1997;194(2):427-433. doi:10.1006/jcis.1997.5125
828. Roger J, Pons JN, Massart R, Halbreich A, Bacri JC. Some biomedical applications of ferrofluids. *The European Physical Journal Applied Physics.* 1999;5(3):321-325. doi:10.1051/epjap:1999144
829. Bee A, Massart R, Neveu S. Synthesis of very fine maghemite particles. *J Magn Magn Mater.* 1995;149(1-2):6-9. doi:10.1016/0304-8853(95)00317-7
830. Massart R, Dubois E, Cabuil V, Hasmonay E. Preparation and properties of monodisperse magnetic fluids. *J Magn Magn Mater.* 1995;149(1-2):1-5. doi:10.1016/0304-8853(95)00316-9

831. Cabuil V, Dubois E, Neveu S, Bacri JC, Hasmonay E, Perzynski R. Phase separation in aqueous magnetic colloidal solutions. In: *Trends in Colloid and Interface Science IX*. Vol 98. Progress in Colloid & Polymer Science. Steinkopff; 1995:23-29. doi:10.1007/BFb0115201
832. Jolivet JP, Henry M, Livage J. *De La Solution à l'oxyde: Condensation Des Cations En Solution Aqueuse Chimie de Surface Des Oxydes*. CNRS Éditions; 1994. <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>
833. Tronc E, Belleville P, Jolivet JP, Livage J. Transformation of ferric hydroxide into spinel by iron(II) adsorption. *Langmuir*. 1992;8(1):313-319. doi:10.1021/la00037a057
834. Jolivet JP, Belleville P, Tronc E, Livage J. Influence of Fe(II) on the Formation of the Spinel Iron Oxide in Alkaline Medium. *Clays Clay Miner*. 1992;40(5):531-539. doi:10.1346/CCMN.1992.0400506
835. Jolivet JP, Henry M, Livage J, Bescher E. *Metal Oxide Chemistry and Synthesis*. Second. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2000. <https://www.wiley.com/en-us/Metal+Oxide+Chemistry+and+Synthesis%3A+From+Solution+to+Solid+State-p-9780471970569>
836. Vayssières L, Chanéac C, Tronc E, Jolivet JP. Size Tailoring of Magnetite Particles Formed by Aqueous Precipitation: An Example of Thermodynamic Stability of Nanometric Oxide Particles. *J Colloid Interface Sci*. 1998;205(2):205-212. doi:10.1006/jcis.1998.5614
837. Jiang W, Yang HC, Yang SY, et al. Preparation and properties of superparamagnetic nanoparticles with narrow size distribution and biocompatible. *J Magn Magn Mater*. 2004;283(2-3):210-214. doi:10.1016/j.jmmm.2004.05.022
838. Tartaj P, González-Carreño T, Serna CJ. Single-Step Nanoengineering of Silica Coated Maghemite Hollow Spheres with Tunable Magnetic Properties. *Advanced Materials*. 2001;13(21):1620-1624. doi:10.1002/1521-4095(200111)13:21<1620::AID-ADMA1620>3.0.CO;2-Z
839. Qiu XP. Synthesis and characterization of magnetic nano particles. *Chin J Chem*. 2010;18(6):834-837. doi:10.1002/cjoc.20000180607
840. Sun S, Zeng H. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2002;124(28):8204-8205. doi:10.1021/ja026501x
841. Gupta AK, Wells S. Surface-Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2004;3(1):66-73. doi:10.1109/TNB.2003.820277
842. Kim DK, Zhang Y, Voit W, Rao KV, Muhammed M. Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles. *J Magn Magn Mater*. 2001;225(1-2):30-36. doi:10.1016/S0304-8853(00)01224-5
843. Liu X, Ma Z, Xing J, Liu H. Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres. *J Magn Magn Mater*. 2004;270(1-2):1-6. doi:10.1016/j.jmmm.2003.07.006
844. Liu X, Xing J, Guan Y, Shan G, Liu H. Synthesis of amino-silane modified superparamagnetic silica supports and their use for protein immobilization. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2004;238(1-3):127-131. doi:10.1016/j.colsurfa.2004.03.004

845. Derjaguin B, Landau L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Prog Surf Sci.* 1993;43(1-4):30-59. doi:10.1016/0079-6816(93)90013-L
846. Verwey EJW. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. *J Phys Colloid Chem.* 1947;51(3):631-636. doi:10.1021/j150453a001
847. Vincent B, Edwards J, Emmett S, Jones A. Depletion flocculation in dispersions of sterically-stabilised particles ("soft spheres"). *Colloids and Surfaces.* 1986;18(2-4):261-281. doi:10.1016/0166-6622(86)80317-1
848. Fritz G, Schädler V, Willenbacher N, Wagner NJ. Electrosteric Stabilization of Colloidal Dispersions. *Langmuir.* 2002;18(16):6381-6390. doi:10.1021/la015734j
849. Napper DH. Steric stabilization. *J Colloid Interface Sci.* 1977;58(2):390-407. doi:10.1016/0021-9797(77)90150-3
850. Ortega-Vinuesa JL, Martín-Rodríguez A, Hidalgo-Álvarez R. Colloidal Stability of Polymer Colloids with Different Interfacial Properties: Mechanisms. *J Colloid Interface Sci.* 1996;184(1):259-267. doi:10.1006/jcis.1996.0619
851. Kobayashi M, Skarba M, Galletto P, Cakara D, Borkovec M. Effects of heat treatment on the aggregation and charging of Stöber-type silica. *J Colloid Interface Sci.* 2005;292(1):139-147. doi:10.1016/j.jcis.2005.05.093
852. Palmacci S, Josephson L. Synthesis of polysaccharide covered superparamagnetic oxide colloids. Published online 1993;6. <https://patentimages.storage.googleapis.com/2b/6e/49/5a4d4401e014b3/US5262176.pdf>
853. Häfeli U, Schütt W, Teller J, Zborowski M, eds. *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers.* Second. Springer US; 1997. doi:10.1007/978-1-4757-6482-6
854. Pijera MSO, Viltres H, Kozempel J, et al. Radiolabeled nanomaterials for biomedical applications: radiopharmacy in the era of nanotechnology. *EJNMMI Radiopharm Chem.* 2022;7(1):8. doi:10.1186/s41181-022-00161-4
855. Okassa LN, Archais H, Douziech-Eyrolles L, et al. Development and characterization of sub-micron poly(d,l-lactide-co-glycolide) particles loaded with magnetite/magnetite nanoparticles. *Int J Pharm.* 2005;302(1-2):187-196. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.06.024
856. Li C, Zhang X, Geng H, Yan J. Robustness Analysis Model for MADM Methods Based on Cloud Model. *Procedia Comput Sci.* 2017;107(Icict):84-90. doi:10.1016/j.procs.2017.03.061
857. Kloster GA, Muraca D, Mosiewicki MA, Marcovich NE. Magnetic composite films based on alginate and nano-iron oxide particles obtained by synthesis "in situ." *Eur Polym J.* 2017;94:43-55. doi:10.1016/j.eurpolymj.2017.06.041
858. Bunkoed O, Nurerk P, Wannapob R, Kanatharana P. Polypyrrole-coated alginate/magnetite nanoparticles composite sorbent for the extraction of endocrine-disrupting compounds. *J Sep Sci.* 2016;39(18):3602-3609. doi:10.1002/jssc.201600647
859. Roger S, Talbot D, Bee A. Preparation and effect of Ca²⁺ on water solubility, particle release and swelling properties of magnetic alginate films. *J Magn Magn Mater.* 2006;305(1):221-227. doi:10.1016/j.jmmm.2006.01.005

860. Rassis DK, Saguy IS, Nussinovitch A. Collapse, shrinkage and structural changes in dried alginate gels containing fillers. *Food Hydrocoll.* 2002;16(2):139-151. doi:10.1016/S0268-005X(01)00071-6
861. Wang B, Wan Y, Zheng Y, et al. Alginate-based composites for environmental applications: a critical review. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 2019;49(4):318-356. doi:10.1080/10643389.2018.1547621
862. Mahmoodi NM. Magnetic ferrite nanoparticle–alginate composite: Synthesis, characterization and binary system dye removal. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 2013;44(2):322-330. doi:10.1016/j.jtice.2012.11.014
863. Mohammadi A, Daemi H, Barikani M. Fast removal of malachite green dye using novel superparamagnetic sodium alginate-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Int J Biol Macromol.* 2014;69:447-455. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.05.042
864. Nishio Y, Yamada A, Ezaki K, Miyashita Y, Furukawa H, Horie K. Preparation and magnetometric characterization of iron oxide-containing alginate/poly(vinyl alcohol) networks. *Polymer (Guildf).* 2004;45(21):7129-7136. doi:10.1016/j.polymer.2004.08.047
865. Finotelli PV, Morales MA, Rocha-Leão MH, Baggio-Saitovitch EM, Rossi AM. Magnetic studies of iron(III) nanoparticles in alginate polymer for drug delivery applications. *Materials Science and Engineering: C.* 2004;24(5):625-629. doi:10.1016/j.msec.2004.08.005
866. Kroll E, Winnik FM, Ziolo RF. In Situ Preparation of Nanocrystalline γ -Fe₂O₃ in Iron(II) Cross-Linked Alginate Gels. *Chemistry of Materials.* 1996;8(8):1594-1596. doi:10.1021/cm960095x
867. Ma H li, Qi X rong, Maitani Y, Nagai T. Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate. *Int J Pharm.* 2007;333(1-2):177-186. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.10.006
868. Morales MA, Finotelli PV, Coaquira JAH, et al. In situ synthesis and magnetic studies of iron oxide nanoparticles in calcium-alginate matrix for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C.* 2008;28(2):253-257. doi:10.1016/j.msec.2006.12.016
869. Moeser GD, Roach KA, Green WH, Laibinis PE, Hatton TA. Water-Based Magnetic Fluids as Extractants for Synthetic Organic Compounds. *Ind Eng Chem Res.* 2002;41(19):4739-4749. doi:10.1021/ie0202118
870. Sun S, Anders S, Hamann HF, et al. Polymer Mediated Self-Assembly of Magnetic Nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2002;124(12):2884-2885. doi:10.1021/ja0176503
871. Gómez-Lopera SA, Plaza RC, Delgado AV. Synthesis and Characterization of Spherical Magnetite/Biodegradable Polymer Composite Particles. *J Colloid Interface Sci.* 2001;240(1):40-47. doi:10.1006/jcis.2001.7579
872. Deng YH, Yang WL, Wang CC, Fu SK. A Novel Approach for Preparation of Thermoresponsive Polymer Magnetic Microspheres with Core–Shell Structure. *Advanced Materials.* 2003;15(20):1729-1732. doi:10.1002/adma.200305459
873. Liao MH, Chen DH. Preparation and characterization of a novel magnetic nano-adsorbent. *J Mater Chem.* 2002;12(12):3654-3659. doi:10.1039/b207158d

874. Yu S, Chow GM. Carboxyl group ($-\text{CO}_2\text{H}$) functionalized ferrimagnetic iron oxide nanoparticles for potential bio-applications. *J Mater Chem.* 2004;14(18):2781-2786. doi:10.1039/B404964K
875. Zhang J, Xu S, Kumacheva E. Polymer Microgels: Reactors for Semiconductor, Metal, and Magnetic Nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2004;126(25):7908-7914. doi:10.1021/ja031523k
876. Breulmann M, Cölfen H, Hentze HP, Antonietti M, Walsh D, Mann S. Elastic Magnets: Template-Controlled Mineralization of Iron Oxide Colloids in a Sponge-like Gel Matrix. *Advanced Materials.* 1998;10(3):237-241. doi:10.1002/(SICI)1521-4095(199802)10:3<237::AID-ADMA237>3.3.CO;2-Y
877. Ziolo RF, Giannelis EP, Weinstein BA, et al. Matrix-Mediated Synthesis of Nanocrystalline ggr- Fe_2O_3 : A New Optically Transparent Magnetic Material. *Science.* 1992;257(5067):219-223. doi:10.1126/science.257.5067.219
878. Gass J, Poddar P, Almand J, Srinath S, Srikanth H. Superparamagnetic Polymer Nanocomposites with Uniform Fe_3O_4 Nanoparticle Dispersions. *Adv Funct Mater.* 2006;16(1):71-75. doi:10.1002/adfm.200500335
879. Sun Y, Ding X, Zheng Z, Cheng X, Hu X, Peng Y. Surface initiated ATRP in the synthesis of iron oxide/polystyrene core/shell nanoparticles. *Eur Polym J.* 2007;43(3):762-772. doi:10.1016/j.eurpolymj.2006.10.021
880. Furusawa K, Nagashima K, Anzai C. Synthetic process to control the total size and component distribution of multilayer magnetic composite particles. *Colloid Polym Sci.* 1994;272(9):1104-1110. doi:10.1007/BF00652379
881. Arias JL, Gallardo V, Gómez-Lopera SA, Plaza RC, Delgado AV. Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *Journal of Controlled Release.* 2001;77(3):309-321. doi:10.1016/S0168-3659(01)00519-3
882. Elaissari A. *Colloidal Biomolecules, Biomaterials, and Biomedical Applications.* Vol 116. First. (Elaissari A, ed.). Marcel Dekker, Inc.; 2003. doi:10.1201/9780203912843
883. Zaitsev VS, Filimonov DS, Presnyakov IA, Gambino RJ, Chu B. Physical and Chemical Properties of Magnetite and Magnetite-Polymer Nanoparticles and Their Colloidal Dispersions. *J Colloid Interface Sci.* 1999;212(1):49-57. doi:10.1006/jcis.1998.5993
884. Anu Bhushani J, Anandharamakrishnan C. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. *Trends Food Sci Technol.* 2014;38(1):21-33. doi:10.1016/j.tifs.2014.03.004
885. Gan J, Bagheri AR, Aramesh N, et al. Covalent organic frameworks as emerging host platforms for enzyme immobilization and robust biocatalysis – A review. *Int J Biol Macromol.* 2021;167:502-515. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.002
886. Yang XY, Tian G, Jiang N, Su BL. Immobilization technology: a sustainable solution for biofuel cell design. *Energy Environ Sci.* 2012;5(2):5540-5563. doi:10.1039/C1EE02391H
887. Li J, Wu H, Liang Y, Jiang Z, Jiang Y, Zhang L. Facile Fabrication of Organic-Inorganic Hybrid Beads by Aminated Alginate Enabled Gelation and Biomimetic Mineralization. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2013;24(2):119-134. doi:10.1163/156856212X627351

888. Li L, Li M, He L. Characteristics of magnetic microspheres and its application in enzyme immobilization. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*. 2008;12(41):8198-8200. <https://www.doc88.com/p-4961610267801.html>
889. Amirbandeh M, Taheri-Kafrani A. Immobilization of glucoamylase on triazine-functionalized Fe₃O₄/ graphene oxide nanocomposite: Improved stability and reusability. *Int J Biol Macromol*. 2016;93(Pt A):1183-1191. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.09.092
890. Jędrzak A, Rębiś T, Kłapiszewski Ł, Zdarta J, Milczarek G, Jesionowski T. Carbon paste electrode based on functional GOx/silica-lignin system to prepare an amperometric glucose biosensor. *Sens Actuators B Chem*. 2018;256:176-185. doi:10.1016/j.snb.2017.10.079
891. Wan LS, Ke BB, Xu ZK. Electrospun nanofibrous membranes filled with carbon nanotubes for redox enzyme immobilization. *Enzyme Microb Technol*. 2008;42(4):332-339. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.10.014
892. Lima Barros AE, Almeida AMP, Carvalho Jr. LB, Azevedo WM. Polysiloxane/PVA-glutaraldehyde hybrid composite as solid phase for immunodetections by ELISA. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2002;35(4):459-463. doi:10.1590/S0100-879X2002000400008
893. Shah N, Ul-Islam M, Khattak WA, Park JK. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. *Carbohydr Polym*. 2013;98(2):1585-1598. doi:10.1016/j.carbpol.2013.08.018
894. Foresti ML, Valle G, Bonetto R, Ferreira ML, Briand LE. FTIR, SEM and fractal dimension characterization of lipase B from *Candida antarctica* immobilized onto titania at selected conditions. *Appl Surf Sci*. 2010;256(6):1624-1635. doi:10.1016/j.apusc.2009.09.083
895. Vatsyayan P, Bordoloi S, Goswami P. Large catalase based bioelectrode for biosensor application. *Biophys Chem*. 2010;153(1):36-42. doi:10.1016/j.bpc.2010.10.002
896. Zhang S, Jiang Z, Zhang W, Wang X, Shi J. Polymer-inorganic microcapsules fabricated by combining biomimetic adhesion and bioinspired mineralization and their use for catalase immobilization. *Biochem Eng J*. 2015;93:281-288. doi:10.1016/j.bej.2014.10.021
897. Han E, Li X, Cai JR, Cui HY, Zhang XA. Development of Highly Sensitive Amperometric Biosensor for Glucose Using Carbon Nanosphere/Sodium Alginate Composite Matrix for Enzyme Immobilization. *Analytical Sciences*. 2014;30(9):897-902. doi:10.2116/analsci.30.897
898. Chang MY, Kao HC, Juang RS. Thermal inactivation and reactivity of β -glucosidase immobilized on chitosan-clay composite. *Int J Biol Macromol*. 2008;43(1):48-53. doi:10.1016/j.ijbiomac.2007.10.004
899. Miranda RA, Llorca J, Medina F, Sueiras JE, Segarra AM. Asymmetric epoxidation of chalcone catalyzed by reusable poly-L-leucine immobilized on hydrotalcite. *J Catal*. 2011;282(1):65-73. doi:10.1016/j.jcat.2011.05.026
900. Gao J, Lu CL, Wang Y, et al. Rapid Immobilization of Cellulase onto Graphene Oxide with a Hydrophobic Spacer. *Catalysts*. 2018;8(5):180. doi:10.3390/catal8050180

901. Zhao H, Cui Q, Shah V, Xu J, Wang T. Enhancement of glucose isomerase activity by immobilizing on silica/chitosan hybrid microspheres. *J Mol Catal B Enzym.* 2016;126:18-23. doi:10.1016/j.molcatb.2016.01.013
902. Bisswanger H. *Enzyme Kinetics: Principles and Methods, Third, Enlarged and Improved Edition.* 3rd ed. (Bisswanger H, ed.). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2017. doi:10.1002/9783527806461
903. Kuby SA. *A Study of Enzymes: Enzyme Catalysis, Kinetics, and Substrate Binding.* Vol I. 1st ed. CRC Press; 2005. doi:10.1201/9780429291579
904. Marangoni AG. *Enzyme Kinetics: A Modern Approach.* 1st ed. John Wiley & Sons, Inc.; 2003. doi:10.1002/0471267295
905. Leskovac V. *Comprehensive Enzyme Kinetics.* 1st ed. Springer Science+Business Media; 2003. doi:10.1007/b100340
906. Cornish-Bowden A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics.* 4th ed. (Cornish-Bowden A, ed.). Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA; 2012. doi:10.1016/C2013-0-04130-8
907. Puneekar NS. *Enzymes: Catalysis, Kinetics and Mechanisms.* 1st ed. Springer Singapore; 2018. doi:10.1007/978-981-13-0785-0
908. Knežević-Jugović Z. *Enzimsko Inženjerstvo: Udžbenik.* I. (Grbavčić Ž, Ušćumlić Š, eds.). Tehnološko-metalurški fakultet, Univerziteta u Beogradu; 2008.
909. Haldane JBS, Stern KG. Allgemeine Chemie der Fermente. Von Dr. I. B. S. Haldane, Professor der Physiologie an der Universität Cambridge, und Dr. Kurt G. Stern, Berlin. Mit einem Geleitwort von Prof. Dr. L. Michaelis, New York. Mit 35 Tabellen und 28 Abbildungen im Text. Dresden. *Arch Pharm (Weinheim).* 1932;270(7):432-432. doi:10.1002/ardp.19322700733
910. Boeker EA. Initial rates. A new plot. *Biochemical Journal.* 1982;203(1):117-123. doi:10.1042/bj2030117
911. Briggs GE, Haldane JBS. A Note on the Kinetics of Enzyme Action. *Biochemical Journal.* 1925;19(2):338-339. doi:10.1042/bj0190338
912. Brown AJ. XXXVI.—Enzyme action. *J Chem Soc, Trans.* 1902;81:373-388. doi:10.1039/CT9028100373
913. Waley SG. An easy method for the determination of initial rates. *Biochemical Journal.* 1981;193(3):1009-1012. doi:10.1042/bj1931009
914. Wharton CW. Some recent advances in enzyme kinetics. *Biochem Soc Trans.* 1983;11(6):817-825. doi:10.1042/bst0110817
915. Fromm HJ. *Initial Rate Enzyme Kinetics.* Vol 22. 1st ed. (Kleinzeller A, Springer GF, Wittmann HG, eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1975. doi:10.1007/978-3-642-80966-8
916. Nimmo IA, Atkins GL. An Evaluation of Methods for Determining the Initial Velocities of Enzyme-Catalysed Reactions from Progress Curves. *Biochem Soc Trans.* 1978;6(3):548-550. doi:10.1042/bst0060548
917. Orsi BA, Tipton KF. Kinetic analysis of progress curves. In: Purich DL, ed. *Enzyme Kinetics and Mechanism Part A Initial Rate and Inhibitor Methods.* Vol 63. Methods in enzymology. Elsevier Inc.; 1979:159-183. doi:10.1016/0076-6879(79)63010-0

918. Rudolph FB, Fromm HJ. Plotting methods for analyzing enzyme rate data. In: Purich DL, ed. *Enzyme Kinetics and Mechanism Part A Initial Rate and Inhibitor Methods*. Vol 63. Methods in enzymology. Elsevier Inc.; 1979:138-159. doi:10.1016/0076-6879(79)63009-4
919. Eisenthal R, Cornish-Bowden A. The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochemical Journal*. 1974;139(3):715-720. doi:10.1042/bj1390715
920. Cornish-Bowden A. The use of the direct linear plot for determining initial velocities. *Biochemical Journal*. 1975;149(2):305-312. doi:10.1042/bj1490305
921. Henri V. Théorie générale de l'action de quelques diastases par Victor Henri [C. R. Acad. Sci. Paris 135 (1902) 916-919]. *C R Biol*. 2006;329(1):47-50. doi:10.1016/j.crv.2005.10.007
922. Johnson KA, Goody RS. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper. *Biochemistry*. 2011;50(39):8264-8269. doi:10.1021/bi201284u
923. Rübsamen H, Khandker R, Witzel H. Sigmoid Kinetics of the Monomeric Ribonuclease I. Due to Ligand-Induced Shifts of Conformation Equilibria. *Biol Chem*. 1974;355(1):687-708. doi:10.1515/bchm2.1974.355.1.687
924. Volkenstein MV, Goldstein BN. A new method for solving the problems of the stationary kinetics of enzymological reactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1966;115(2):471-477. doi:10.1016/0304-4165(66)90445-4
925. Fromm HJ. A simplified schematic method for deriving steady-state rate equations using a modification of the "theory of graphs" procedure. *Biochem Biophys Res Commun*. 1970;40(3):692-697. doi:10.1016/0006-291X(70)90959-9
926. Cha S. A Simple Method for Derivation of Rate Equations for Enzyme-catalyzed Reactions under the Rapid Equilibrium Assumption or Combined Assumptions of Equilibrium and Steady State. *Journal of Biological Chemistry*. 1968;243(4):820-825. doi:10.1016/S0021-9258(19)81739-8
927. Alberty RA. The Relationship between Michaelis Constants, Maximum Velocities and the Equilibrium Constant for an Enzyme-catalyzed Reaction. *J Am Chem Soc*. 1953;75(8):1928-1932. doi:10.1021/ja01104a045
928. Wolfenden R, Radzicka A. Transition-state analogues. *Curr Opin Struct Biol*. 1991;1(5):780-787. doi:10.1016/0959-440X(91)90179-W
929. Schramm VL. Enzymatic transition states and transition state analogues. *Curr Opin Struct Biol*. 2005;15(6):604-613. doi:10.1016/j.sbi.2005.10.017
930. Lee HJ, Wilson IB. Enzymic parameters: Measurement of V and Km. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*. 1971;242(3):519-522. doi:10.1016/0005-2744(71)90144-6
931. Kilroe-Smith T. A modified graphical method for determination of equilibrium constants. *Biochemical Journal*. 1966;100(2):334-335. doi:10.1042/bj1000334
932. Foster RJ, Niemann C. The Evaluation of the Kinetic Constants of Enzyme Catalyzed Reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1953;39(10):999-1003. doi:10.1073/pnas.39.10.999

933. Cornish-Bowden A, Eisenthal R. Estimation of Michaelis constant and maximum velocity from the direct linear plot. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*. 1978;523(1):268-272. doi:10.1016/0005-2744(78)90030-X
934. Dixon M. The graphical determination of K_m and K_i . *Biochemical Journal*. 1972;129(1):197-202. doi:10.1042/bj1290197
935. Dixon M. Graphical Determination of Equilibrium Constants. *Biochemical Journal*. 1965;94(3):760-762. doi:10.1042/bj0940760
936. Lineweaver H, Burk D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J Am Chem Soc*. 1934;56(3):658-666. doi:10.1021/ja01318a036
937. Wilkinson G. Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochemical Journal*. 1961;80(2):324-332. doi:10.1042/bj0800324
938. Hofstee BHJ. Specificity of Esterases. *Journal of Biological Chemistry*. 1952;199(1):357-364. doi:10.1016/S0021-9258(18)44843-0
939. Scatchard G. The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Ann N Y Acad Sci*. 1949;51(4):660-672. doi:10.1111/j.1749-6632.1949.tb27297.x
940. Balcom JK, Fitch WM. A Method for the Kinetic Analysis of Progress Curves Using Horse Serum Cholinesterase As a Model Case. *Journal of Biological Chemistry*. 1970;245(7):1637-1647. doi:10.1016/S0021-9258(19)77140-3
941. Schwert GW. Use of Integrated Rate Equations in Estimating the Kinetic Constants of Enzyme-catalyzed Reactions. *Journal of Biological Chemistry*. 1969;244(5):1278-1284. doi:10.1016/S0021-9258(18)91840-5
942. Alberty RA, Koerber BM. Studies of the Enzyme Fumarase. VII. 1 Series Solutions of Integrated Rate Equations for Irreversible and Reversible Michaelis-Menten Mechanisms 2. *J Am Chem Soc*. 1957;79(24):6379-6382. doi:10.1021/ja01581a011
943. Jennings RR, Niemann C. The Evaluation of the Kinetic Constants of Enzyme-catalyzed Reactions by Procedures Based upon Integrated Rate Equations. *J Am Chem Soc*. 1955;77(20):5432-5433. doi:10.1021/ja01625a077
944. Engasser JM, Horvath C. Effect of internal diffusion in heterogeneous enzyme systems: Evaluation of true kinetic parameters and substrate diffusivity. *J Theor Biol*. 1973;42(1):137-155. doi:10.1016/0022-5193(73)90153-7
945. Cleland WW. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: I. Nomenclature and rate equations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects*. 1963;67(2):104-137. doi:10.1016/0926-6569(63)90211-6
946. Yadav GD, Magadum DB. Kinetic Modelling of Enzyme Catalyzed Biotransformation Involving Activations and Inhibitions. *Enzyme Inhibitors and Activators*. Published online 2017. doi:10.5772/67692
947. Eadie GS. The Inhibition of Cholinesterase by Physostigmine and Prostigmine. *Journal of Biological Chemistry*. 1942;146(1):85-93. doi:10.1016/S0021-9258(18)72452-6
948. Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochemical Journal*. 1953;55(1):170-171. doi:10.1042/bj0550170

949. Boiwe T, Bränden CI. X-ray investigation of the binding of 1,10-phenanthroline and imidazole to horse-liver alcohol dehydrogenase. *Eur J Biochem.* 1977;77(1):173-179. doi:10.1111/j.1432-1033.1977.tb11655.x
950. Cleland WW. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products☆II. Inhibition: Nomenclature and theory. *Biochim Biophys Acta.* 1963;67(C):173-187. doi:10.1016/0006-3002(63)91815-8
951. Cleland WW. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. *Biochim Biophys Acta.* 1963;67(C):188-196. doi:10.1016/0006-3002(63)91816-x
952. Eyring H. The Activated Complex in Chemical Reactions. *J Chem Phys.* 1935;3(2):107-115. doi:10.1063/1.1749604
953. Tipton KF, Dixon HBF. Effects of pH on enzymes. In: Purich DL, ed. *Enzyme Kinetics and Mechanism Part A Initial Rate and Inhibitor Methods*. Vol 63. Methods in enzymology. Elsevier Inc.; 1979:183-234. doi:10.1016/0076-6879(79)63011-2
954. Laidler KJ, Peterman BF. Temperature effects in enzyme kinetics. In: Daniel L. Purich, ed. *Enzyme Kinetics and Mechanism Part A Initial Rate and Inhibitor Methods*. Vol 63. Methods in enzymology. Elsevier Inc.; 1979:234-257. doi:10.1016/0076-6879(79)63012-4
955. Arrhenius S. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Zeitschrift für Physikalische Chemie.* 1889;4U(1):226-248. doi:10.1515/zpch-1889-0416
956. Goldstein L. Kinetic behavior of immobilized enzyme systems. In: Purich DL, ed. *Immobilized Enzymes*. Vol 44. Methods in enzymology. Elsevier Inc.; 1976:397-443. doi:10.1016/s0076-6879(76)44031-4
957. Berg OG. Orientation constraints in diffusion-limited macromolecular association. The role of surface diffusion as a rate-enhancing mechanism. *Biophys J.* 1985;47(1):1-14. doi:10.1016/S0006-3495(85)83870-4
958. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 6th ed. (Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, eds.). W. H. Freeman and Company; 2013. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2989-6
959. Bisswanger H. *Practical Enzymology*. 2nd, Compl ed. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA; 2011. <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=5693a1b97dfbf9445d8b45b2&asset-Key=AS:316688241758209@1452515768641>
960. Puneekar NS. *Enzymes: Catalysis, Kinetics and Mechanisms*. 1st ed. Springer Nature Singapore Pte Ltd.; 2018. doi:10.1007/978-981-13-0785-0
961. Bugarski B, Li Q, Goosen MFA, Poncelet D, Neufeld RJ, Vunjak G. Electrostatic Drop-let Generation: Mechanism. *AIChE Journal.* 1994;40(6):1026-1031.
962. Răcuciu M. Synthesis protocol influence on aqueous magnetic fluid properties. *Current Applied Physics.* 2009;9(5):1062-1066. doi:10.1016/j.cap.2008.12.003
963. Radovanović M, Jugović B, Gvozdenović M, et al. Immobilization of α -amylase via adsorption on magnetic particles coated with polyaniline. *Starch - Stärke.* 2016;68(5-6):427-435. doi:10.1002/star.201500161

964. Neri DFM, Balcão VM, Dourado FOQ, Oliveira JMB, Carvalho LB, Teixeira JA. Immobilized β -galactosidase onto magnetic particles coated with polyaniline: Support characterization and galactooligosaccharides production. *J Mol Catal B Enzym*. 2011;70(1-2):74-80. doi:10.1016/j.molcatb.2011.02.007
965. Sim B, Chae HS, Choi HJ. Fabrication of polyaniline coated iron oxide hybrid particles and their dual stimuli-response under electric and magnetic fields. *Express Polym Lett*. 2015;9(8):736-743. doi:10.3144/expresspolymlett.2015.68
966. Kloster GA, Muraca D, Moscoso Londoño O, Pirota KR, Mosiewicki MA, Marcovich NE. Alginate based nanocomposites with magnetic properties. *Compos Part A Appl Sci Manuf*. 2020;135(March):105936. doi:10.1016/j.compositesa.2020.105936
967. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
968. Bannister W. Medicinal Chemistry. A Biochemical Approach (Second Edition). *Biochem Educ*. 1990;18(1):55. doi:10.1016/0307-4412(90)90038-p
969. Chanachev AS, Simeonova SS, Georgiev PD, Ivanova TN, Petrova SD, Balashev KT. Characterization by atomic force microscopy of gold nanoparticles functionalized with azocasein for protease colorimetric enzyme assay. *Bulgarian Chemical Communications*. 2018;50(2):223-227. http://bcc.bas.bg/BCC_Volumes/Volume_50_Number_2_2018/BCC-50-2-2018-36-Chanachev-223-227.pdf
970. Sáez-Plaza P, Michałowski T, Navas MJ, Asuero AG, Wybraniec S. An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part I. Early History, Chemistry of the Procedure, and Titrimetric Finish. *Crit Rev Anal Chem*. 2013;43(4):178-223. doi:10.1080/10408347.2012.751786
971. Stefanović AB, Jovanović JR, Grbavčić S, et al. Impact of ultrasound on egg white proteins as a pretreatment for functional hydrolysates production. *European Food Research and Technology*. 2014;239(6):979-993. doi:10.1007/s00217-014-2295-8
972. FAO. *Food Energy – Methods of Analysis and Conversion Factors*. Vol 77. (FAO, ed.). FAO; 2003. <https://www.fao.org/3/y5022e/y5022e00.htm#Contents>
973. Prodanović O, Prokopijević M, Spasojević D, et al. Improved Covalent Immobilization of Horseradish Peroxidase on Macroporous Glycidyl Methacrylate-Based Copolymers. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;168(5):1288-1301. doi:10.1007/s12010-012-9857-7
974. Šekuljica NŽ. *Enzimsko Obezbojavanje Antrahinonskih Boja Iz Otpadnih Voda*. Doctoral Dissertation. University of Belgrade, Faculty of Technology and Metallurgy, Serbia; 2016. Accessed March 16, 2022. https://nardus.mpn.gov.rs/handle/123456789/7539?locale-attribute=sr_RS
975. Šekuljica NŽ, Prlainović NŽ, Stefanović AB, et al. Decolorization of Anthraquinonic Dyes from Textile Effluent Using Horseradish Peroxidase: Optimization and Kinetic Study. *The Scientific World Journal*. 2015;2015(Article ID 371625):1-12. doi:10.1155/2015/371625
976. Šekuljica NŽ, Prlainović NŽ, Jovanović JR, et al. Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2016;39(3):461-472. doi:10.1007/s00449-015-1529-x

977. Bilal M, Asgher M. Dye decolorization and detoxification potential of Ca-alginate beads immobilized manganese peroxidase. *BMC Biotechnol.* 2015;15(1):111. doi:10.1186/s12896-015-0227-8
978. Bilal M, Asgher M. Sandal reactive dyes decolorization and cytotoxicity reduction using manganese peroxidase immobilized onto polyvinyl alcohol-alginate beads. *Chem Cent J.* 2015;9(1):47. doi:10.1186/s13065-015-0125-0
979. Bajpai SK, Sharma S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions. *React Funct Polym.* 2004;59(2):129-140. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2004.01.002
980. Larosa C, Salerno M, de Lima JS, et al. Characterisation of bare and tannase-loaded calcium alginate beads by microscopic, thermogravimetric, FTIR and XRD analyses. *Int J Biol Macromol.* 2018;115(Avgust):900-906. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.04.138
981. Hammouda S ben, Adhoum N, Monser L. Synthesis of magnetic alginate beads based on Fe₃O₄ nanoparticles for the removal of 3-methylindole from aqueous solution using Fenton process. *J Hazard Mater.* 2015;294(May):128-136. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.03.068
982. Czichy C, Spangenberg J, Günther S, Gelinsky M, Odenbach S. Determination of the Young's modulus for alginate-based hydrogel with magnetite-particles depending on storage conditions and particle concentration. *J Magn Magn Mater.* 2020;501(May):166395. doi:10.1016/j.jmmm.2020.166395
983. Davidovich-Pinhas M, Harari O, Bianco-Peled H. Evaluating the mucoadhesive properties of drug delivery systems based on hydrated thiolated alginate. *Journal of Controlled Release.* 2009;136(1):38-44. doi:10.1016/j.jconrel.2009.01.029
984. Manuja A, Kumar S, Dilbaghi N, et al. Quinapyramine sulfate-loaded sodium alginate nanoparticles show enhanced trypanocidal activity. *Nanomedicine.* 2014;9(11):1625-1634. doi:10.2217/nnm.13.148
985. Yeom CK, Lee KH. Characterization of sodium alginate membrane crosslinked with glutaraldehyde in pervaporation separation. *J Appl Polym Sci.* 1998;67(2):209-219. doi:10.1002/(SICI)1097-4628(19980110)67:2<209::AID-APP3>3.0.CO;2-Y
986. Bindhu MR, Umadevi M. Green Synthesized Gold Nanoparticles as a Probe for the Detection of Fe³⁺ Ions in Water. *J Clust Sci.* 2014;25(4):969-978. doi:10.1007/s10876-013-0679-8
987. Navarrete JTL, Hernández V, Ramírez FJ. Ir and Raman spectra of <sc>L</sc> - aspartic acid and isotopic derivatives. *Biopolymers.* 1994;34(8):1065-1077. doi:10.1002/bip.360340810
988. Dennis G, Harrison W, Agnes K, Erastus G. Effect of Biological Control Antagonists Adsorbed on Chitosan Immobilized Silica Nanocomposite on *Ralstonia solanacearum* and Growth of Tomato Seedlings. *Adv Res.* 2016;6(3):1-23. doi:10.9734/AIR/2016/22742
989. Cardenas-Jiron G, Leal D, Matsuhira B, Osorio-Roman IO. Vibrational spectroscopy and density functional theory calculations of poly- <sc>D</sc>-mannuronate and heteropolymeric fractions from sodium alginate. *Journal of Raman Spectroscopy.* 2011;42(4):870-878. doi:10.1002/jrs.2760

990. Chandía N. Alginic acids in *Lessonia trabeculata*: characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy. *Carbohydr Polym.* 2001;46(1):81-87. doi:10.1016/S0144-8617(00)00286-1
991. Daemi H, Barikani M. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. *Scientia Iranica.* 2012;19(6):2023-2028. doi:10.1016/j.scient.2012.10.005
992. Obireddy SR, Chintla M, Kashayi CR, Venkata KRKS, Subbarao SMC. Gelatin-Coated Dual Cross-Linked Sodium Alginate/Magnetite Nanoparticle Microbeads for Controlled Release of Doxorubicin. *ChemistrySelect.* 2020;5(33):10276-10284. doi:10.1002/slct.202002604
993. da Silva Barbosa GS, Oliveira MEPS, dos Santos ABS, Sánchez OC, Soares CMF, Fricks AT. Immobilization of low-cost alternative vegetable peroxidase (*Raphanus sativus* L. peroxidase): Choice of support/technique and characterization. *Molecules.* 2020;25(16):3668. doi:10.3390/molecules25163668
994. Kayal S, Ramanujan RV. Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. *Materials Science and Engineering: C.* 2010;30(3):484-490. doi:10.1016/j.msec.2010.01.006
995. Pessato TB, de Carvalho NC, Tavano OL, Fernandes LGR, Zollner R de L, Netto FM. Whey protein isolate hydrolysates obtained with free and immobilized Alcalase: Characterization and detection of residual allergens. *Food Research International.* 2016;83:112-120. doi:10.1016/j.foodres.2016.02.015
996. Coríci LN, Frissen AE, Zoelen D van, et al. Synthesis of Peptide Amides using Sol-Gel Immobilized Alcalase in Batch and Continuous Reaction System. *World Acad Sci Eng Technol.* 2011;76(4):361-366.
997. Ferreira L, Ramos MA, Dordick JS, Gil MH. Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg). *J Mol Catal B Enzym.* 2003;21(4-6):189-199. doi:10.1016/S1381-1177(02)00223-0
998. Zeng Q, Li Q, Sun D, Zheng M. Alcalase Microarray Base on Metal Ion Modified Hollow Mesoporous Silica Spheres as a Sustainable and Efficient Catalysis Platform for Proteolysis. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8(June):1-11. doi:10.3389/fbioe.2020.00565
999. Žuža MG, Milašinović NZ, Jonović MM, et al. Design and characterization of alcalase-chitosan conjugates as potential biocatalysts. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2017;40(11):1713-1723. doi:10.1007/s00449-017-1826-7
1000. Xie W, Ma N. Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nano-particles. *Biomass Bioenergy.* 2010;34(6):890-896. doi:10.1016/j.biombioe.2010.01.034
1001. Das A, Singh J, Yogalakshmi KN. Laccase immobilized magnetic iron nanoparticles: Fabrication and its performance evaluation in chlorpyrifos degradation. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2017;117:183-189. doi:10.1016/j.ibiod.2017.01.007
1002. Myrnes EE. Alginate gels cross-linked with mixtures of calcium and chitosan oligomers : Effect on swelling properties and leakage from the gel Erlend Eikeland Myrnes. 2016;(May).

1003. Nawaz MA, Rehman HU, Bibi Z, Aman A, Ul Qader SA. Continuous degradation of maltose by enzyme entrapment technology using calcium alginate beads as a matrix. *Biochem Biophys Rep.* 2015;4:250-256. doi:10.1016/j.bbrep.2015.09.025
1004. Mong Thu TT, Krasaekoopt W. Encapsulation of protease from *Aspergillus oryzae* and lipase from *Thermomyces lanuginosus* using alginate and different copolymer types. *Agriculture and Natural Resources.* 2016;50(3):155-161. doi:10.1016/j.anres.2016.06.002
1005. Martín MC, López O v., Ciolino AE, Morata VI, Villar MA, Ninago MD. Immobilization of enological pectinase in calcium alginate hydrogels: A potential biocatalyst for winemaking. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2019;18(March):101091. doi:10.1016/j.bcab.2019.101091
1006. Anh TLQ, Hoa NTQ, Nguyen PDT, et al. Soybean Protein Extraction by Alcalase and Flavourzyme, Combining Thermal Pretreatment for Enteral Feeding Product. *Catalysts.* 2020;10(8):829. doi:10.3390/catal10080829
1007. Wasak A, Drozd R, Struk Ł, Grygorcewicz B. Entrapment of DyP-type peroxidase from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 into Ca-alginate magnetic beads. *Biotechnol Appl Biochem.* 2018;65(2):238-245. doi:10.1002/bab.1562
1008. Chalkias NG, Kahawong P, Giannelis EP. Activity Increase of Horseradish Peroxidase in the Presence of Magnetic Particles. *J Am Chem Soc.* 2008;130(10):2910-2911. doi:10.1021/ja7102263
1009. Barbosa EF, Molina FJ, Lopes FM, García-Ruiz PA, Caramori SS, Fernandes KF. Immobilization of peroxidase onto magnetite modified polyaniline. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012(Article ID 716374):716374. doi:10.1100/2012/716374
1010. Lan J, Huang X, Hu M, et al. High efficient degradation of dyes with lignin peroxidase coupled with glucose oxidase. *J Biotechnol.* 2006;123(4):483-490. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.12.034
1011. Jamal F, Qidwai T, Pandey PK, Singh R, Singh S. Azo and anthraquinone dye decolorization in relation to its molecular structure using soluble *Trichosanthes dioica* peroxidase supplemented with redox mediator. *Catal Commun.* 2011;12(13):1218-1223. doi:10.1016/j.catcom.2011.04.012
1012. Wu Y, Taylor KE, Biswas N, Bewtra JK. Comparison of additives in the removal of phenolic compounds by peroxidase-catalyzed polymerization. *Water Res.* 1997;31(11):2699-2704. doi:10.1016/S0043-1354(97)00119-X
1013. Thongsook T, Barrett DM. Purification and Partial Characterization of Broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) Peroxidases. *J Agric Food Chem.* 2005;53(8):3206-3214. doi:10.1021/jf048162s
1014. Abourehab MAS, Rajendran RR, Singh A, et al. Alginate as a Promising Biopolymer in Drug Delivery and Wound Healing: A Review of the State-of-the-Art. *Int J Mol Sci.* 2022;23(16):9035. doi:10.3390/ijms23169035

SPISAK SKRAĆENICA

- AB129
 Acid Blue 129 65
- AB80
 Acid Blue 80 64
- Ala
 alanin 34
- AOP
 napredni oksidacioni procesi 70
- Asp
 asparaginska kiselina 14
- BG
 Bright Green 65
- BOD
 biohemijska potreba za kiseonikom 65
- BR4
 Blue Reagent 4 64
- BSA
 goveđi serum albumina 188
- CNS
 centralni nervni sistem 64
- COD
 hemijska potreba za kiseonikom 65
- CR
 Congo Red 64
- CV
 Crystal Violet 65
- DB3
 Disperse Blue 3 64
- DBQ•
 semihinon radikal 74
- DBQH2
 hidrohinon 74
- DH
 stepen hidrolize 21
- DLVO
 Derjaguin-Landau-Verwei-Overbeek 107
- DMSA
 dimerkaptosukcinska kiselina 106
- DO
 rastvoren kiseonik 66
- EC
 električna provodnost 66
- EDTA
 etilendiaminotetrasirćetna kiselina 15
- ER
 endoplazmatski retikulum 33
- FA
 ferulna kiselina 54
- FAO/WHO
 Food and Agriculture Organization/
 World Health Organization 18
- FCC
 hemijski kodeks hrane 18
- Gln
 glutamin 19
- Glu
 glutaminska kiselina 19
- H₂O₂
 Vodonik-peroksid 9
- His
 histidin 14
- HRP-C
 Peroksidaza iz rena 9, 12
- Ile
 izoleucin 34
- JECFA
 stručni komitet FAO/WHO za aditive u
 hrani 18
- Leu
 leucin 19
- Lis
 lizin 19
- MAB
 magnetit-alginat čestice 82
- Met
 metionin 19
- MG
 Malachite Green 65
- MTG
 mikrobna transglutaminaza 21
- OPA
 ortoftaldialdehid 27
- p-CMB
 p-hlorživabenzat 15
- PEG
 poli(etilen glikol) 94
- pH
 mera negativnog logaritma koncentracije
 vodoničnih jona u efluentu 14

Phe	TDS
fenilalanin 34	ukupne rastvorene čvrste materije 65
Pro	TFP
prolin 34	ukupni fosfor 65
PVA	<i>ThBP</i>
polivinil alkohol 108	proteini koji vezuju tiamin 37
PZC	TN
tačka nultog naelektrisanja 108	ukupni azot 65
RBBR	TNBS
Remazol Brilliant Blue R 64	trinitrobenzensulfonska kiselina 27
RCF	Trp
rotaciona centrifugalna sila 36	triptofan 34
<i>RfBP</i>	TSS
proteini koji vezuju riboflavin 37	suspendovane čvrste materije 66
RO16	Tyr
Reactive Orange 16 64	tirozin 19
ROS	Val
reaktivna vrsta kiseonika 92	valin 34
SBP	VSPs
peroksidaza iz soje 74	inhibitor proteina surutke soje 36
SDS	WHC
natrijum-dodecil sulfat 181	kapacitet zadržavanja vode 21
Ser	Xaa
serin 14	bilo koja aminokiselina 35

SPISAK SLIKA

Slika 1. Reakcija katalizovana aminopeptidazom	16
Slika 2. Reakcija katalizovana karboksipeptidazom	16
Slika 3. Reakcija katalizovana endopeptidazom.....	16
Slika 4. Subtilisin Carlsberg (Alkalaza) vezan za inhibitor (narandžasto). Katalitička Asp, His, Ser trijada (štapići) je vezana sa sedmostranim β -listovima u sendviču između dva sloja α -spirala	19
Slika 5. Tipičan dijagram toka hidrolize sa jednim enzimom.....	25
Slika 6. Reakcija TNBS kiseline sa primarnim aminom.....	27
Slika 7. Distribucija hidrofobnih ostataka i elektrostatički površinski potencijal A3B4 trimera. Površina elektrostatičkog potencijala je obojena u opsegu od $-10k_B T$ (crveno) do $+14k_B T$ (plavo), gde je k_B Boltzmannova (<i>Boltzmann</i>) konstanta, a T apsolutna temperatura (u K); (a) stereodijagram hidrofobnih ostataka na IE licu. <i>Ala</i> , <i>Val</i> , <i>Leu</i> , <i>Ile</i> , <i>Met</i> , <i>Pro</i> , <i>Phe</i> , <i>Tyr</i> i <i>Trp</i> su obojeni zelenom bojom, a granica protomera je prikazana narandžastom; (b) stereodijagram elektrostatičkog površinskog potencijala IE lica, ostaci histidina nisu naelektrisani; (c) elektrostatički površinski potencijal IA lica; (d) elektrostatički površinski potencijal IE lica, ostaci histidina su pozitivno naelektrisani	34

Slika 8. Trakasti dijagrami rekombinantnih (a i b) i prirodnih (c i d) β -homotrimeri. Tri monomera u rekombinantnom i prirodnom β -homotrimeru prikazana su svetlo plavom, svetlo zelenom i ružičastom, odnosno plavom, zelenom i mangenta bojom. Ugljeni hidrati prirodnog β -homotrimeri prikazani su žutom bojom kao model kuglice i štapa. (a) i (c) su prikazani kao trostruka osa simetrije koja ide normalno na papir, a (b) i (d) su povezani sa prikazom na (a) i (c) rotiranjem za 90°	35
Slika 9. Proteini belanceta: (a) ovalbumin; (b) ovotransferin; (c) lizozim; (d) ovomukoid; (e) avidin; (f) RfBP i (g) cistatin.....	37
Slika 10. Podela peroksidaza po bazi <i>Redoxi Base</i> , oktobar 2022	46
Slika 11. Ren (<i>Armoracia rusticana</i>): (a) nadzemni deo (list i cvet); (b) koren	47
Slika 12. Trodimenzionalni prikaz rendgenske kristalne strukture izoenzima C peroksidaze rena (<i>Brookhaven</i> -ov pristupni kod 1H5A). Hem grupa (obojena crvenom bojom) se nalazi između distalnog i proksimalnog domena od kojih svaki sadrži po jedan atom kalcijuma (prikazano kao plave sfere). α -helikalni i β -list regioni enzima su prikazani ljubičastom i žutom bojom, respektivno. F' i F'' α -zavojnice se pojavljuju u donjem desnom kvadrantu molekula	49
Slika 13. Ključni aminokiselinski ostaci u regionu koji se vezuje za hem grupu HRP-C. Hem grupa i atom hem gvožđa su prikazani crvenom bojom, a preostali ostaci u bojama atoma. His170, proksimalni histidinski ostatak, koordinisan je za atom gvožđa hem grupe, dok je odgovarajuće distalno koordinaciono mesto iznad ravni hem grupe prazno.....	50
Slika 14. Katalitički ciklus peroksidaze rena (HRP-C) sa ferulnom kiselinom kao redukcionim supstratom. Konstante brzine k_1 , k_2 i k_3 predstavljaju brzinu formiranja jedinjenja I, brzinu redukcije jedinjenja I i brzinu redukcije jedinjenja II, respektivno.....	53
Slika 15. Mesto vezivanja ferulne kiseline peroksidaze rena (HRP-C). Ova reprezentacija je uzeta iz rendgenske kristalne strukture ternarnog kompleksa ferulne kiseline (FA) i cijanidnog liganda HRP-C (<i>Brookhaven</i> -ov pristupni kod 7ATJ). Hem grupa je prikazana u crvenoj, dok su ferulna kiselina, cijanidni ligand (vezan za hem gvožđe na upražnjenom distalnom koordinacionom mestu) i katalitički ostaci Arg38, His42 i His170 u bojama atoma. Nekoliko bočnih lanaca fenilalanina koji doprinose mestu vezivanja prikazano je plavom bojom. Imati na umu da bočni lanac ferulne kiseline nalazi u pravcu ulaza mesta vezivanja.....	54
Slika 16. Klasifikacija boja	57
Slika 17. Direktan i indirektan uticaj tekstilnih boja na čoveka i životnu okolinu.	67
Slika 18. Strategije tretmana otpadnih voda tekstilne industrije.....	68
Slika 19. Mehanizam bio-oksidacije: (a) peroksidazama; (b) oksidazama	73
Slika 20. Prednosti efikasnih strategija imobilizacije enzima i njihove potencijalne primene	77
Slika 21. Metode imobilizacije enzima	79
Slika 22. Hemijska struktura EDAC-a ($C_8H_{17}N_3$)	82
Slika 23. Odabrani primeri klasičnih materijala neorganskog i organskog porekla koji se koriste za imobilizaciju enzima.....	85

Slika 24. Struktura alginata. (M) β -D-manuronska kiselina; (G) α -L-guluronska kiselina; (PG) poliguluronska kiselina; (PM) polimanuronska kiselina i (PMG) heteropolimerni regioni sa smešom ostataka PM-PG.....	88
Slika 25. Smeđe alge: (a) <i>Kelp</i> i (b) <i>Sargassum</i>	89
Slika 26. Sistem „kutija za jaja“ vezivanja kalcijumovog jona i G bloka alginata.	90
Slika 27. Tehnika ekstrakcije natrijum-alginata iz braon morskih algi.	91
Slika 28. Odabrani primeri novih materijala neorganskog, organskog i hibridnog porekla, primenjeni za imobilizaciju enzima.....	99
Slika 29. Kristalne strukture (a) hematita, (b) magnetita i (c) megamita (crne loptice su Fe^{2+} , zelene loptice Fe^{3+} i crvene loptice O^{2-})	102
Slika 30. Stabilizacija MAB: (a) čestice stabilizovana elektrostatičkim slojem; (b) čestice stabilizovane sternim odbijanjem	108
Slika 31. Krive brzine reakcija nultog i prvog reda nakon formiranja proizvoda ili smanjenja koncentracije supstrata u direktnom (a) i semilogaritamskom (b) dijagramu. Tangencionalna metoda za izračunavanje brzine reakcije (a)	115
Slika 32. Vremenski zavisne varijacije reaktanata nepovratne reakcije katalizovane enzima tokom tri faze reakcije	117
Slika 33. Nelinearni i linearni prikazi Mihaelis–Menten jednačine. (a) Direktni dijagram, (b) semilogaritamski dijagram, (c) Eadie–Hofstee dijagram, (d) dvostruko recipročni (Lineweaver–Burk) dijagram i (e) Hanesov dijagram. Naznačeni su načini za određivanje K_m i V_{max}	120
Slika 34. Nesigurnosti u određivanju kinetičkih konstanti Mihaelis–Menten jednačine sa dosta rasejanja podataka i neodgovarajućim opsezima za koncentraciju supstrata. Pod (a) samo donji, a (b) samo veći opseg koncentracija supstrata je pokriven. Prikazane su tri primera krive (1–3) koje odgovaraju svim datim tačkama podataka i iz njih su procenjene kinetičke konstante da bi se demonstrirala široka promenljivost	121
Slika 35. Granice grešaka na različitim dijagramima za Mihaelis–Menten jednačinu pretpostavljajući apsolutnu konstantnu grešku: (a) direktni dijagram; (b) Lineweaver–Burk dijagram; (c) Eadie–Hofstee dijagram; (d) Hanesov dijagram.....	123
Slika 36. Linearni dijagrami integrisane Mihaelis–Menten jednačine: grafici (a–c) prikazuju tri različita načina prezentovanja (za detalje pogledati tekst)	126
Slika 37. Određivanje početnog reda reakcije metodom tangente: (a) tangente su usklađene sa krivim brzine reakcije (plava) koje se prate sa različitim koncentracijama supstrata od zasićenja (gornja leva kriva) do niskih koncentracija (donje krive). Zelene tangente su poravnate sa krivim brzine reakcije na $t=0$, dajući pravu početnu brzinu v_i , a crvene tangente su poravnate sa opsegom koji se može detektovati na krivi brzine reakcije neposredno nakon mrtvog vremena; (b) krive zasićenja dobijene za oba slučaja.....	128
Slika 38. Kompetitivna inhibicija proizvoda na dvostruko recipročnom dijagramu. Prikazan je način određivanja kinetičke konstante	131
Slika 39. Evaluacija krive brzine reakcije pri inhibiciji proizvoda sa integrisanom Mihaelis–Menten jednačinom po metodi Fostera (Foster) i Niemana (Niemann).....	132
Slika 40. Pregled osnovnih reverzibilnih mehanizama inhibicije enzima	135

- Slika 41.** Nekompetitivna inhibicija prezentovana različitim dijagramima: (a) Direktan dijagram, (b) Linviver–Burk dijagram, (c) Edi–Hofsti dijagram, (d) Hanesov dijagram, (e) direktan linearni dijagram (f) Diksonov inhibicioni dijagram (1953). Određivanja kinetičkih konstanti su naznačena..... 137
- Slika 42.** Sekundarni grafici nagiba (a) i odsečka ordinate (b) na Linviver–Burkovim dijagramima za nekompetitivnu inhibiciju 139
- Slika 43.** Diksonova metoda za određivanje konstanti inhibicije i Mihaelisovih konstanti (a); Sekundarni grafik prividnih K' vrednosti u odnosu na koncentracije supstrata (b)..140
- Slika 44.** Nekompetitivna inhibicija u linearizovanim dijagramima integrisane Mihaelis–Menten jednačine. Gornji grafici pokazuju slične dijagrame za slučajeve (a) $K_{ic} < K_{iui}$; (b) $K_{ic} = K_{iui}$; (c) $K_{ic} > K_{iui}$; Donji grafici pokazuju sekundarne dijagrame recipročnih preseka ordinate (d) i apscise (e) u odnosu na koncentraciju inhibitora..... 141
- Slika 45.** Dixon-ova metoda za određivanje konstanti inhibicije i Michaelis-ovih konstanti (a); Sekundarni grafik prividnih K' vrednosti u odnosu na koncentracije supstrata (b) 143
- Slika 46.** Akompetitivna inhibicija predstavljena na različitim graphicima. (a) Direktan dijagram, (b) Linviver–Burk dijagram, (c) Edi–Hofsti dijagram, (d) Hanesov dijagram, (e) direktan linearni dijagram (f) Diksonov inhibicioni dijagram; Određivanja kinetičkih konstanti su naznačena 144
- Slika 47.** Parcijalno nekompetitivna inhibicija u dvostruko recipročnim (a–d) i Diksonovim (e,f) dijagramima pri različitim kombinacijama inhibicionih konstanti i maksimalne brzine reakcije V_1 i V_2 . Umeci pokazuju sekundarne dijagrame nagiba i odsečka ordinate postavljene u odnosu na koncentraciju inhibitora 146
- Slika 48.** Parcijalno akompetitivna inhibicija u dvostruko recipročnim (a, b) i Diksonovim (c, d) dijagramima pri različitim kombinacijama maksimalne brzine reakcije V_1 i V_2 . Umeci pokazuju sekundarne dijagrame nagiba i odsečka ordinate postavljene u odnosu na koncentraciju inhibitora 148
- Slika 49.** Inhibicija supstratom: (a) dvostruko recipročni dijagram i (b) Diksonov dijagram 150
- Slika 50.** Reakcija sa dva različita supstrata na dvostruko recipročnom dijagramu. Maksimalna vrednost brzine V_1 varirajućeg supstrata A_1 je veća od vrednosti V_2 za konstantni supstrat A_2 . Jednake Mihaelisove konstante su uzete za oba supstrata..... 152
- Slika 51.** Random bi-bi mehanizam: (a) Edi–Hofsti dijagram, (b) Linviver–Burk dijagram i (c) Hanesov grafik. Određivanje kinetičkih konstanti je označeno 156
- Slika 52.** Ping-pong bi-bi mehanizam (a) Edi–Hofsti dijagram, (b) Linviver–Burk dijagram i (c) Hanesov dijagram. Određivanje kinetičkih konstanti je naznačeno..... 161
- Slika 53.** Uticaj pH vrednosti na enzimске reakcije: (a) Direktan dijagram prividne maksimalne brzine V_{app} u odnosu na pH vrednost. Unutrašnja kriva prikazuje idealnu pH optimalnu krivu sa dve titracione esencijalne grupe u katalitičkom centru, a spoljna kriva predstavlja krivu stabilnosti pH vrednosti. Načini određivanja pK vrednosti kompleksa EA (b) i slobodnog enzima E prema Diksonu i Vebu (1979) su naznačeni u (c,d)..163
- Slika 54.** Uticaj temperature na enzimске reakcije: (a) direktan dijagram prividne maksimalne brzine V_{app} u odnosu na temperaturu; (b) Arenijusov (Arrhenius) dijagram,

desna kriva pokazuje običan kurs prema krivoj pod (c), leva kriva dvofazno temperaturno ponašanje; tangente su prilagođene linearnim opsezima krivih da bi se odredila energija aktivacije; (c) dijagram za određivanje entalpije reakcije $\Delta H^\ddagger$ prelaznog stanja..165

Slika 55. Termostabilnost enzima predstavljenog u direktnom (a) i semilogaritamskom dijagramu (b). Enzim je prethodno inkubiran određeno vreme pre određivanja njegove aktivnosti na različitim temperaturama, T_1 u rasponu ispod, T_2 unutar, a T_3 iznad temperaturnog maksimuma..... 166

Slika 56. Energetski profil reakcije katalizovane enzimom..... 168

Slika 57. Reakcija imobilisanih enzima. (a) Poređenje izmerenih (v'), difuzno kontrolisanih (v_{diff}) i kinetički kontrolisanih (v_{kin}) stopa obrtanja. (b) Određivanje koncentracije v_{kin} i supstrata $[A]_{kin}$ na aktivnom mestu imobilisanog enzima..... 171

Slika 58. Grafička metoda za određivanje kinetičkih konstanti imobilisanih enzima u ograničenju unutrašnje difuzije. ε - faktor efikasnosti..... 173

Slika 59. Temperaturna osetljivost imobilisanih enzima 174

Slika 60. v u odnosu na $[A]$ grafik. Linija povučena kroz tačke je nelinearni najmanji kvadrat, koji najbolje odgovara Mihaelis-Menten jednačini i predstavlja pravougaonu hiperbolu 175

Slika 61. $v \rightarrow [A]$ kriva opisana Mihaelis–Menten jednačinom je deo pravougaone hiperbole. Istaknuti kratki luk (tamna linija) je stvarna oblast u kojoj su eksperimentalna zapažanja za enzim fizički moguća. Dva kraka ove pravougaone hiperbole formiraju asimptote beskonačne krive kao što je prikazano. Ovo otežava direktnu procenu vrednosti K_m i V 176

Slika 62. Aparatura za proizvodnju submikronskih alginatnih čestica metodom ultrazvučnog raspršivanja 184

Slika 63. Primer *Enzyme Kinetics Sample.opj* 197

Slika 64. Ubacivanje podataka u radni list aplikacije *Enzyme Kinetics*..... 198

Slika 65. Izgled čestica pod optičkim mikroskopom: (a) alginatne čestice dobijene korišćenjem igle 22G_{ee} pri uvećanju 5x; (b) MAB čestice dobijene korišćenjem igle 22G_{ee} pri uvećanju 5x; (c) HRP-MAB čestice pri uvećanju 5x; (d) UAD čestice pri uvećanju 20x; (e) UAD čestice pri uvećanju 5x; (f) UAD čestice sa imobilisanom alkalazom pri uvećanju 5x 203

Slika 66. SEM mikrografici: (a) alginatne mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom pri uvećanju 200x; (b) alginatne mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom sa imobilisanom alkalazom pri uvećanju 200x; (c) alginatne mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom pri uvećanju 5000x; (d) alginatne mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom sa imobilisanom alkalazom pri uvećanju 5000x; (e) alginatne submikronske čestice dobijene ultrazvučnim raspršivanjem sa sušenjem pri uvećanju 10000x; (f) alginatne submikronske čestice dobijene ultrazvučnim raspršivanjem sa sušenjem sa imobilisanom alkalazom pri uvećanju 10000x..... 205

Slika 67. SEM mikrografici MAB čestica: (a) prazne MAB čestice pri uvećanju 100x; (b) HRP-MAB čestice pri uvećanju 100x; (c) spoljna površina praznih MAB čestica pri uvećanju 500x; (d) spoljna površina HRP-MAB čestica pri uvećanju 500x 206

Slika 68. Testovi sabijanja uzoraka MAB napravljenih sa različitim odnosom magnetit/alginat (1:2, 1:3, 1:4, 1:5 i 1:10)	207
Slika 69. Magnetizacija krive za magnetit i MAB čestice	207
Slika 70. Odvajanje MAB čestica iz suspenzije spoljnim magnetnim poljem u roku od 1 min.....	208
Slika 71. FTIR spektri za sistem alkalaza-alginat: (-) alginat; (-) alginat aktiviran EDAC-om; (-) imobilisana alkalaze na alginat	208
Slika 72. FTIR spektri za sistem HRP-MAB uzorka: (-) magnetit; (-) alginat; (-) MAB; (-) HRP-MAB.....	209
Slika 73. Uticaj početne mase alkalaze po gramu nosača na imobilisanu količinu proteina (P_g) i prinos imobilizacije (η_{enz})	211
Slika 74. Uticaj mase biokatalizatora (alkalaza imobilisana na alginatne mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom) na specifičnu aktivnost biokatalizatora pri variranju parametara imobilizacije: (a) početna koncentracija enzima (b) pH vrednost Tris-HCl pufera (c) molaritet Tris-HCl pufera (d) vreme aktivacije alginatnih mikročestica EDAC-om (e) odnos početne mase EDAC-a i mase alginatnih mikročestica pri aktivaciji (f) vreme imobilizacije alkalaze na alginatne mikročestice aktivirane EDAC-om	212
Slika 75. Uticaj mase biokatalizatora (alkalaza imobilisana na alginatne submikronske čestice dobijene ultrazvučnim raspršivanjem sa i bez sušenja) na aktivnost imobilisane alkalaze pri variranju početne koncentracije natrijum-alginata.....	214
Slika 76. Uticaj mase proteina na aktivnost slobodne i imobilisane alkalaze na različite nosače pri optimalnim uslovima imobilizacije početne količine enzima od 3,99 IU.	215
Slika 77. Krive progressa enzimske hidrolize proteina u zavisnosti od načina imobilizacije i početnog odnosa enzim/supstrat iz (a,c) izolata soje i (b,d) belanceta sa imobilisanom, inkapsuliranom i slobodnom alkalazom početne koncentracije 3,99 IU	216
Slika 78. Uticaj početne koncentracije supstrata na početnu brzinu reakcije hidrolize proteina iz (a) belanceta i (b) izolata soje	218
Slika 79. (a) Stabilnost imobilisane alkalaze na 0,4% UAD čestice pri reciklaciji biokatalizatora u 8 ciklusa za hidrolizu proteina iz izolata soje. Svaki ciklus je trajao 225 min. Reakcioni uslovi: 1% vodeni rastvor izolata soje (w/w) (2,4 mg mL ⁻¹ , sadržaj proteina), 50 °C, pH 8,0, mešanje 240 rpm (b) Relativna aktivnost u funkciji od vremena (c) Relativna aktivnost i stepen hidrolize (DH) pri 8 ciklusa reciklaže	221
Slika 80. Uticaj (a) prečnika HRP-MAB čestice; (b) odnosa magnetit/alginat i (c) početne mase HRP-C po masi nosača na aktivnost, prinos imobilizacije i masu vezanih proteina po g nosača	222
Slika 81. Uticaj metode imobilizacije na aktivnost imobilisane HRP-C i poređenje sa aktivnošću slobodne HRP-C pri istim uslovima	224
Slika 82. Uticaj (a) temperature i (b) pH vrednosti na aktivnost slobodne HRP-C i HRP-MAB čestica.....	225
Slika 83. Termička stabilnost slobodne HRP-C i HRP-MAB čestica.....	226

Slika 84. Efekti (a) mase HRP-MAB čestica; (b) početne koncentracije vodonik-peroksida; (c) koncentracije boje (d) pH vrednost rastvora boja (e) temperature procesa na proces uklanjanja boja AB225 i AV109	228
Slika 85. Efekti metode imobilizacije HRP-C pri istoj početnoj koncentraciji enzima (10 mg _{enzima} g ⁻¹ _{nosača}) na proces uklanjanja boja (a) AB225 (b) AV109.....	230
Slika 86. Zavisnost početne brzine reakcije uklanjanja boje AB225 sa slobodnom HRP-C i HRP-MAB česticama pri: (a) konstantnoj početnoj koncentraciji vodonik-peroksida od početne koncentracije boje i (b) konstantnoj početnoj koncentraciji boje od početne koncentracije vodonik-peroksida	231
Slika 87. Zavisnost početne brzine reakcije uklanjanja boje AV109 sa slobodnom HRP-C i HRP-MAB česticama pri: (a) konstantnoj početnoj koncentraciji vodonik-peroksida od početne koncentracije boje i (b) konstantnoj početnoj koncentraciji boje od početne koncentracije vodonik-peroksida	232
Slika 88. Recikliranje HRP-MAB čestica: (a) procenat uklanjanja boja AB225 i AV109 tokom sedam ciklusa recikliranja (b) relativna aktivnost uklanjanja boja AB225 i AV109 tokom sedam ciklusa recikliranja	235
 Slika S1. Uticaj mase alkalaza-alginat biokatalizatora (imobilisana alkalaza), dobijenog jednostepenim i dvostepenim konjugacionim protokolom (sa dodatkom 2-markaptoetanola), na aktivnost imobilisanog enzima pri dva različita odnosa mase EDAC-a i mase mikročestica	325
Slika S2. Standardne prave za izračunavanje koncentracije: (a) proteina po <i>Bradford</i> -u (b) hidrolizata proteina po TNBS metodi (c) boje AB225 (d) boje AV109	326
Slika S3. Efekti na proces obezbojavanja boja u zavisnosti od vremena: veličine HRP-MAB čestica (a) AB225, (b) AV109; magnetit/alginat odnosa (c) AB225, (d) AV109; početne koncentracije HRP-C (e) AB225, (f) AV109; mase HRP-MAB čestica (g) AB225, (h) AV109; početna koncentracija vodonik-peroksida (i) AB225, (j) AV109; koncentracije boje (k) AB225, (l) AV09; pH vrednost rastvora boje (m) AB225, (n) AV109; temperature reakcije uklanjanja boje (o) AB225, (p) AV109	329
Slika S4. Zavisnost početne brzine reakcije uklanjanja boje AB225 sa HRP-MAB pri: (a) konstantnoj početnoj koncentraciji peroksida od početne koncentracije boje i (b) konstantnoj početnoj koncentraciji boje od početne koncentracije peroksida ..	330
Slika S5. Zavisnost početne brzine reakcije uklanjanja boje AV109 sa HRP-MAB pri: (a) konstantnoj početnoj koncentraciji peroksida od početne koncentracije boje i (b) konstantnoj početnoj koncentraciji boje od početne koncentracije peroksida ..	331

SPISAK ŠEMA

Šema 1. Aparatura za elektrostatičku ekstruziju	95
Šema 2. Operativni ultrazvučni generator aerosola sa transduktorom (A) koji prima energiju kroz zaštitni kabl (B) pri čemu se generiše akustično polje u povezujućem fluidu (C) i stvara ultrazvučni	

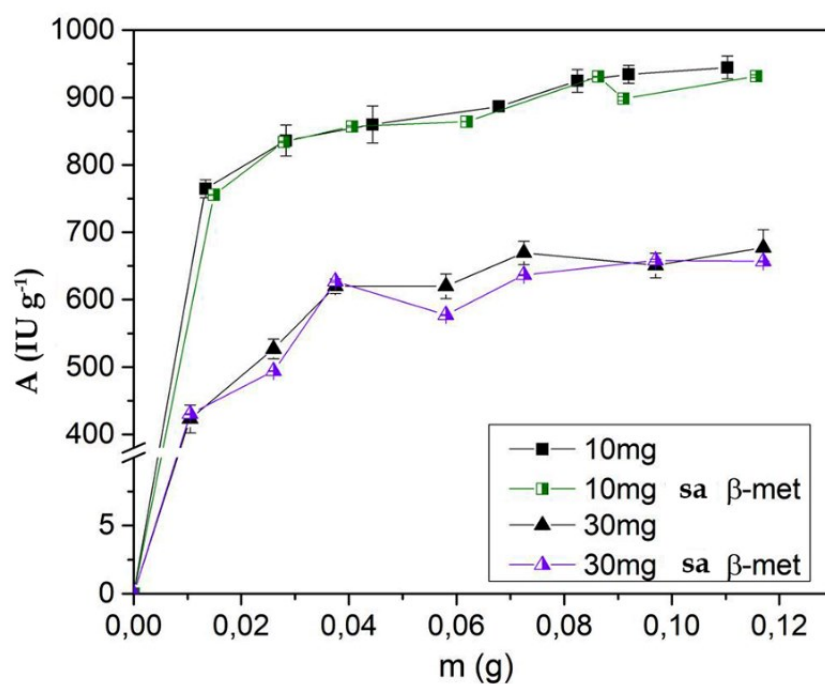
gejzir (D) u rezervoaru generatora (E), a kroz ulaz (F) dolazi vazduh i nosi aerosol (G) do izlaza (H)	98
Šema 3. Povratna inhibicija enzima	133
Šema 4. Nekompetitivna inhibicija	135
Šema 5. Kompetitivna inhibicija	141
Šema 6. Akompetitivna inhibicija enzima.....	143
Šema 7. Šema parcijalno akompetitivna inhibicija enzima.....	147
Šema 8. Šema inhibicije enzima supstratom u višku.....	149
Šema 9. Šema enzimске reakcije sa dva kompetitivna supstrata	151
Šema 10. Klilandova šema za <i>redni bi-bi</i> mehanizam	154
Šema 11. Klilandova šema za <i>random bi-bi</i> mehanizam.....	154
Šema 12. Šema <i>rednog bi-bi</i> mehanizama	158
Šema 13. Šema <i>izo-rednog bi-bi</i> mehanizama	159
Šema 14. Šema <i>ping-pong bi-bi</i> mehanizama	160
Šema 15. Šema <i>izo ping-pong bi-bi</i> mehanizma.....	161
Šema 16. Šematski prikaz (a) spoljašnjeg i (b) unutrašnjeg difuzionog ograničenja..	170
Šema 17. Šematski prikaz eksperimentalne aparature za dobijanje alginatnih mikročestica elektrostatičkom ekstruzijom (a): (1) 2% rastvor natrijum-alginata (<i>w/v</i>) (2) se propušta pumpom (3) kroz iglu prečnika 22 G, čiji je vrh odvojen 2,5 cm od površine rastvora za želiranje (1,5% rastvor CaCl_2 (<i>w/v</i>)) (4) povezanu sa generatorom visokog napona, pri naponu od 6,5 kV (5) dobijene kapi se skupljaju u <i>Petri</i> šolji sa rastvorom za želiranje (1,5% rastvor CaCl_2 (<i>w/v</i>)) (6) koji se meša na magnetnoj mešalici (130 rpm); (b) slika aparature za ekstruziju	183
Šema 18. Aparatura za dobija alginatnih submikronskih čestica metodom ultrazvučnog raspršivanja.....	183
Šema 19. Mogući mehanizam kovalentne imobilizacije HRP-C i alkalaze na MAB i alginatne čestice aktivirane EDAC-om	200

SPISAK TABELA

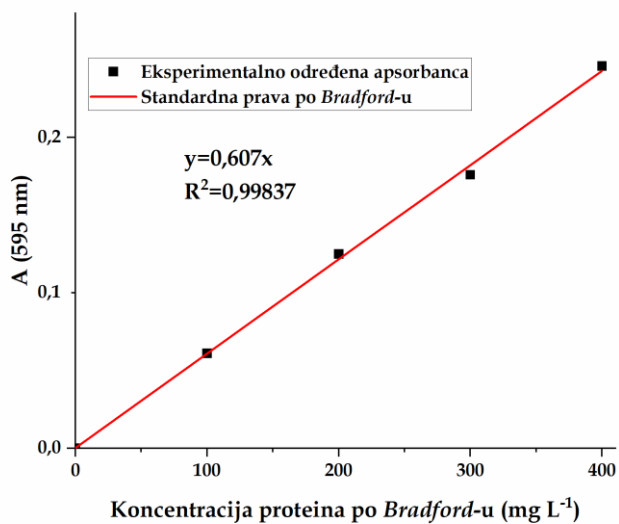
Tabela 1. Problemi koji se javljaju prilikom enzimске hidrolize proteina	24
Tabela 2. Najčešće korišćene proteaze sa optimalnim uslovima za hidrolizu proteina..	25
Tabela 3. Najčešće metode koje se koriste za praćenje enzimске hidrolize proteina sa svojim prednostima i manama.....	26
Tabela 4. Fizička svojstva proteina belanceta (albumena).....	37
Tabela 5. Anatomija peroksidaze. Neke bitne strukturne karakteristike izoenzima C peroksidaze rena (HRP-C)	50
Tabela 6. Klasifikacija i karakterizacija boja u zavisnosti od strukture hromofore..	57

Tabela 7. Svojstva antrahinonskih boja <i>C.I. Acid Blue 225</i> i <i>C.I. Acid Violet 109</i> ..	62
Tabela 8. Prednosti i mane imobilizacije enzima	76
Tabela 9. Prednosti i mane glavnih metoda za imobilizaciju enzima.....	80
Tabela 10. Poređenje sintetičkih metoda za proizvodnju MNP	104
Tabela 11. Razlike između ravnotežnih i kinetičkih studija	113
Tabela 12. Odsecci apscise i ordinate sekundarnih dijagrama za bisupstratne reakcije; Sl_A , Sl_B su nagibi, a Or_A , Or_B odsecci ordinate.....	157
Tabela 13. Način inhibicije proizvodom pri bisupstratnom mehanizmu	159
Tabela 14. Softver dostupan za analizu kinetičkih podataka enzimskih reakcija..	180
Tabela 15. Reakcioni uslovi za optimizaciju procesa obezbojavanja boja AB225 i AV109	196
Tabela 16. Dostupni modeli za analizu u aplikaciji <i>Enzyme Kinetics</i>	199
Tabela 17. Prečnik čestica i zeta potencijal.....	202
Tabela 18. Prečnici MAB, HRP-MAB i alkalaza-MAB čestica dobijenih jednostavnim ukapavanjem i elektrostatičkom ekstruzijom, sa odnosom magnetit/ alginat=1:4..	202
Tabela 19. Kinetički parametri za reakcije enzimске hidrolize proteina iz izolata soje i belanceta slobodnom i imobilisanom alkalazom fitovani odgovarajućim matematičkim modelima sa najvećim koeficijentom poklapanja R^2 koji su konvergovali	219
Tabela 20. Kinetički parametri za reakcije uklanjanja boja AB225 i AV109 slobodnom i imobilisanom HRP-C fitovani odgovarajućim matematičkim modelima sa najvećim koeficijentom poklapanja R^2 koji su konvergovali.....	233

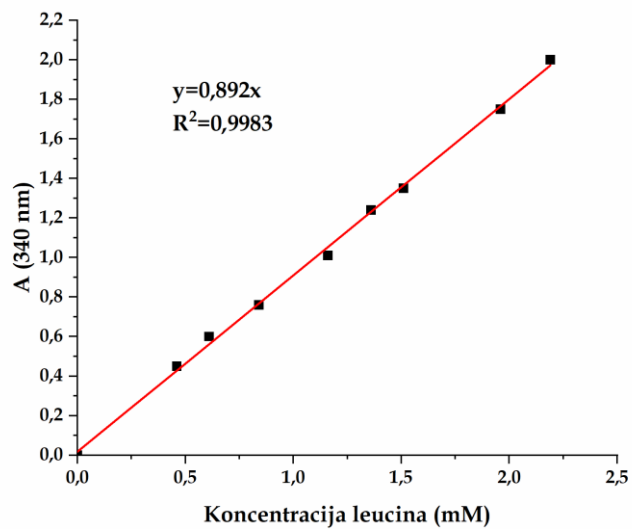
PRILOG 1



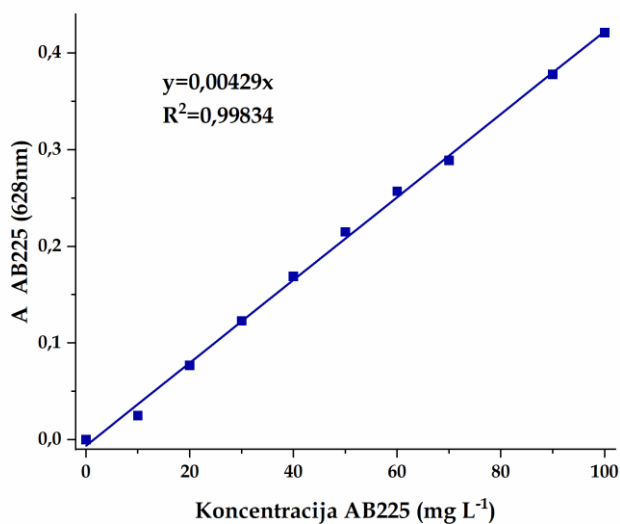
Slika S1. Uticaj mase alkalaza-alginat biokatalizatora (imobilisana alkalaza), dobijenog jednostepenim i dvostepenim konjugacionim protokolom (sa dodatkom 2-markaptoetanola), na aktivnost imobilisanog enzima pri dva različita odnosa mase EDAC-a i mase mikročestica



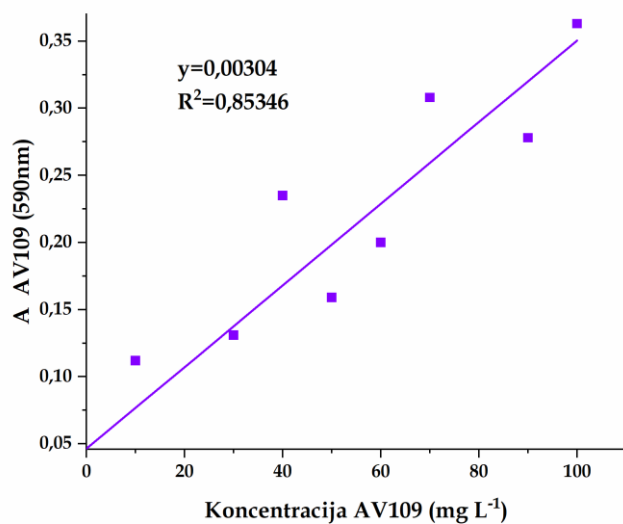
a)



b)

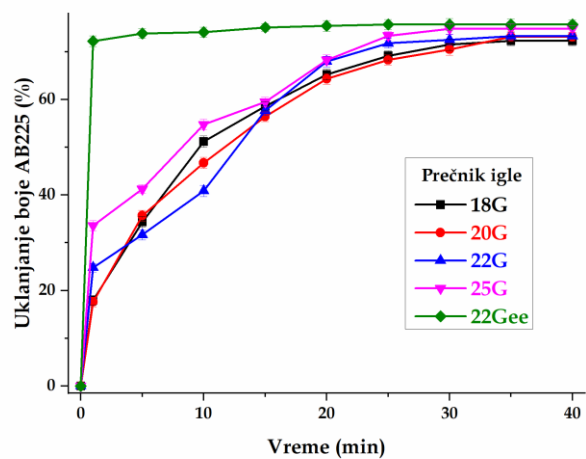


c)

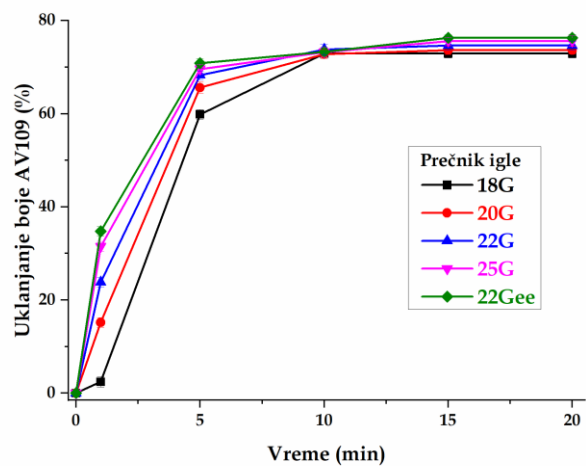


d)

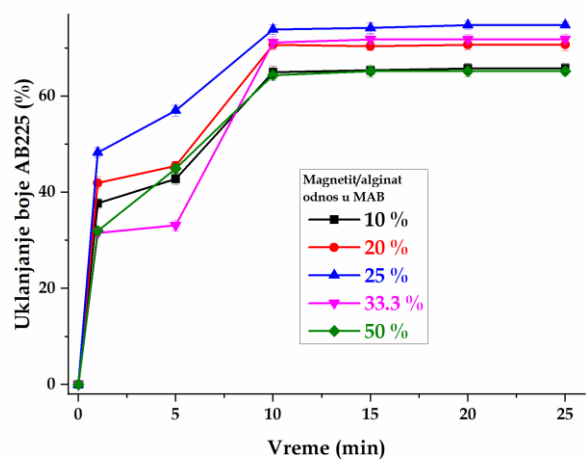
Slika S2. Standardne prave za izračunavanje koncentracije: (a) proteina po *Bradford*-u (b) hidrolizata proteina po TNBS metodi (c) boje AB225 (d) boje AV109



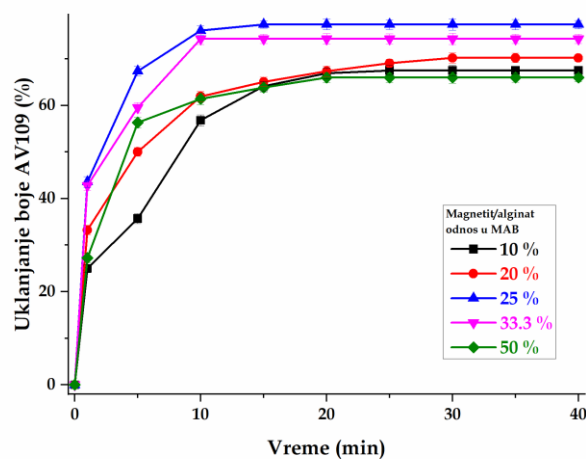
a)



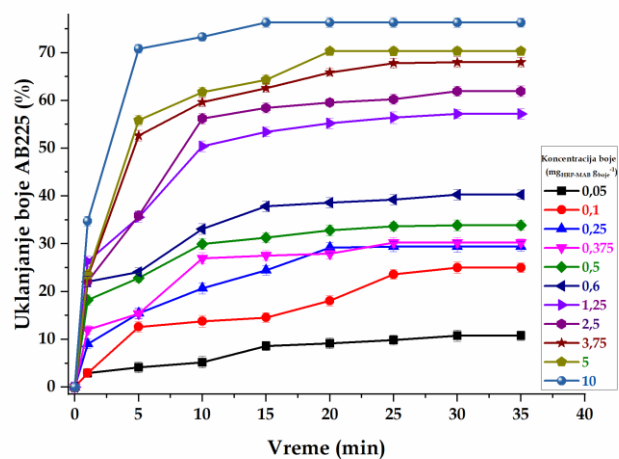
b)



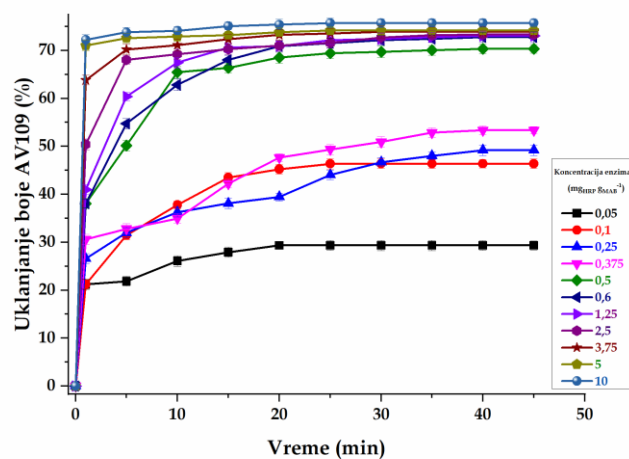
c)



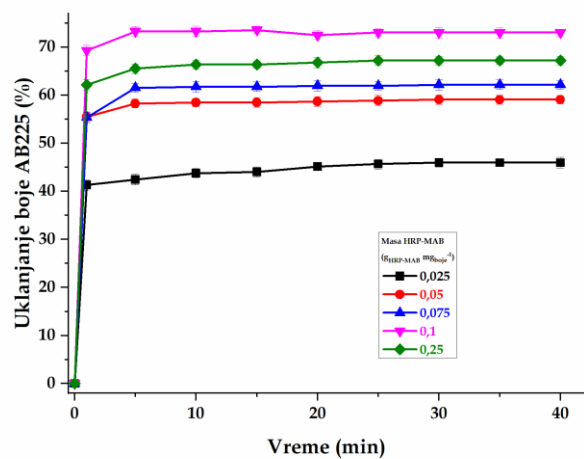
d)



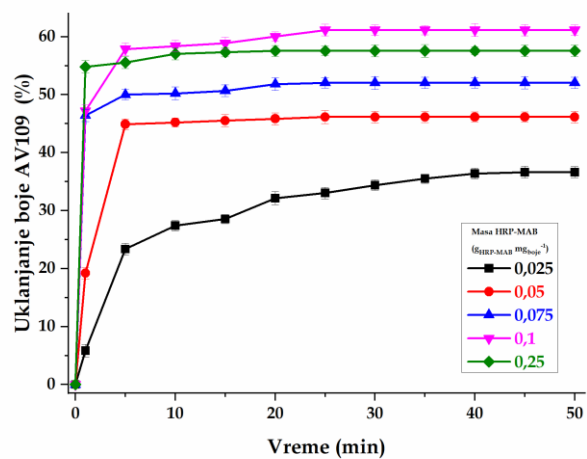
e)



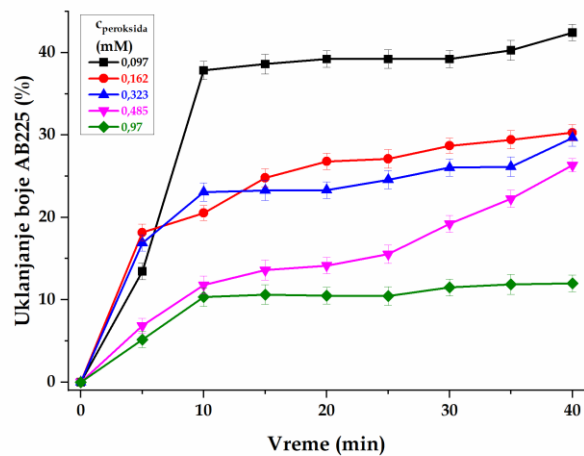
f)



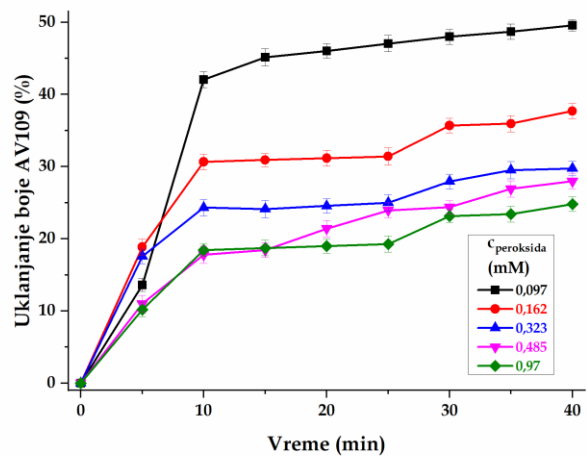
g)



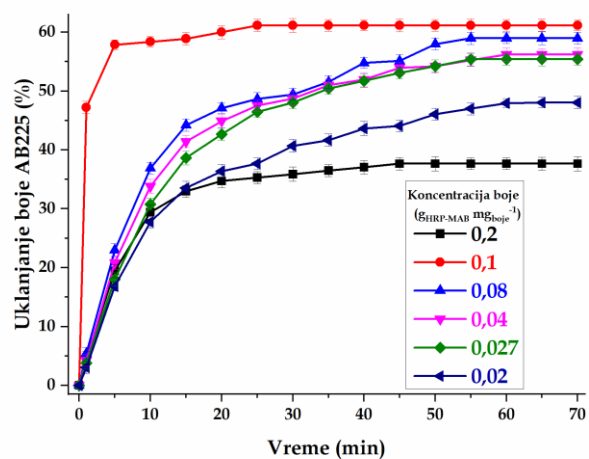
h)



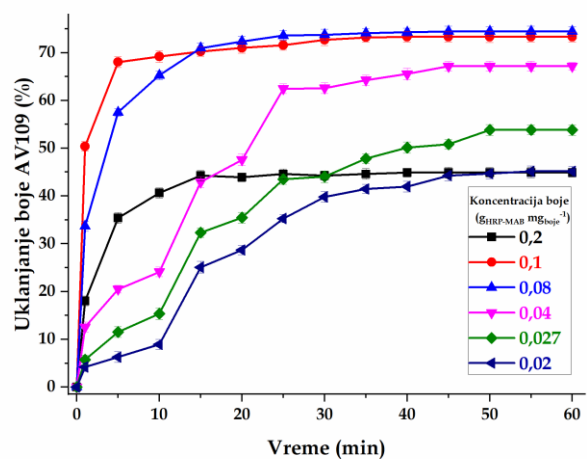
i)



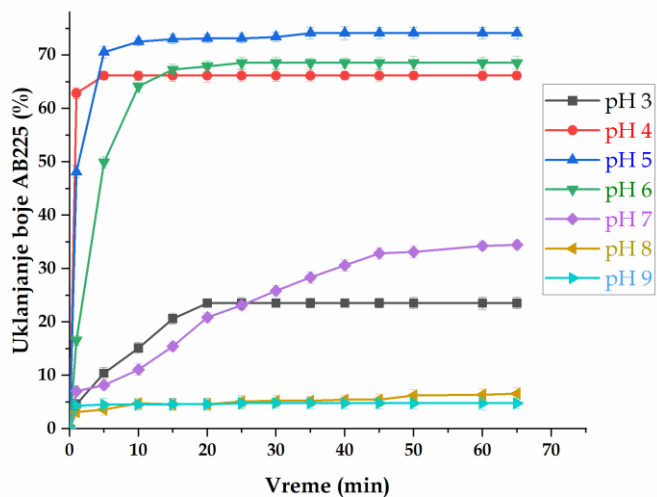
j)



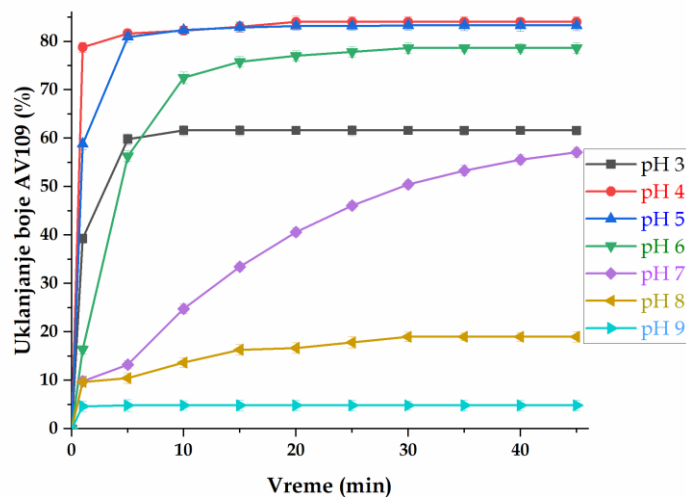
k)



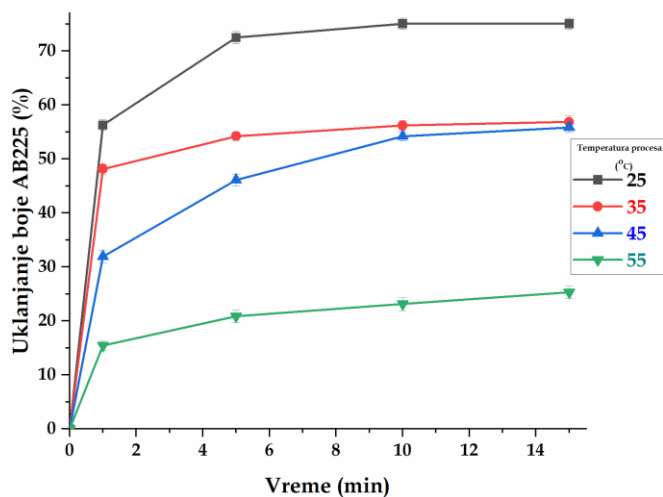
l)



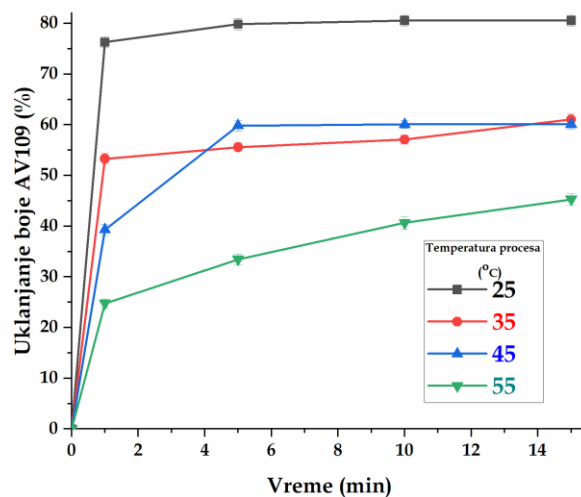
m)



n)

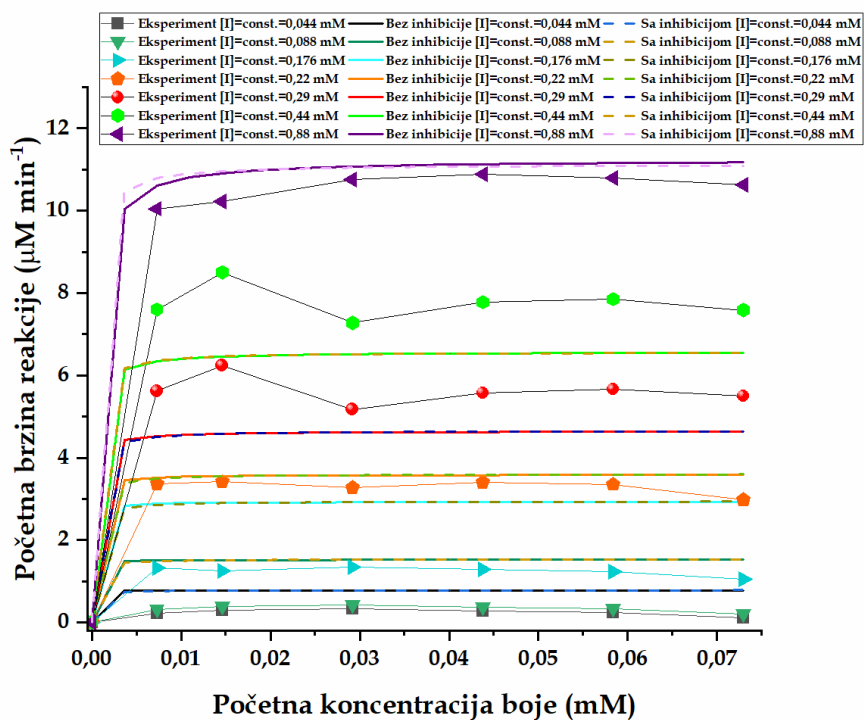


o)

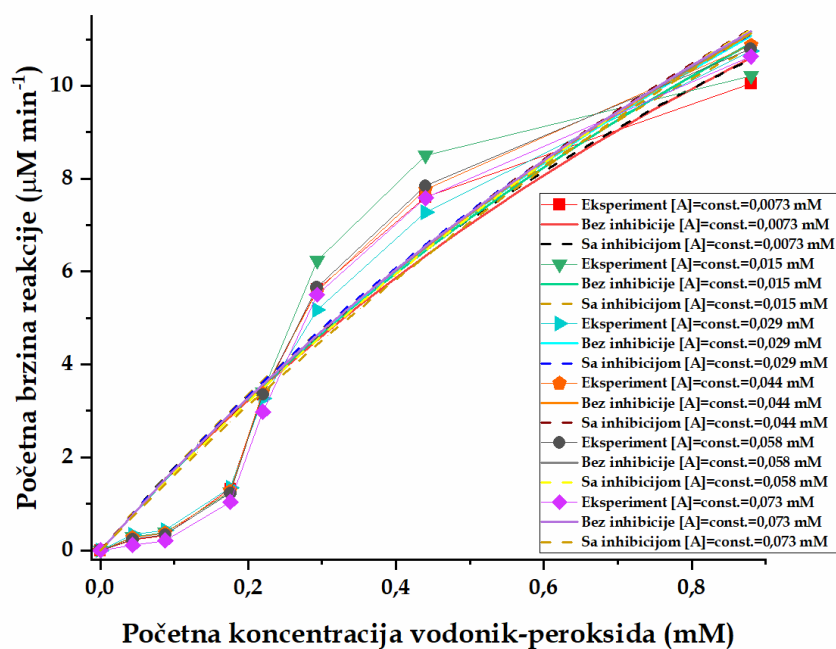


p)

Slika S3. Efekti na proces obezbojavanja boja u zavisnosti od vremena: **veličine HRP-MAB čestica** (a) AB225, (b) AV109; **magnetit/alginat odnosa** (c) AB225, (d) AV109; **početne koncentracije HRP-C** (e) AB225, (f) AV109; **mase HRP-MAB čestica** (g) AB225, (h) AV109; **početna koncentracija vodonik-peroksida** (i) AB225, (j) AV109; **koncentracije boje** (k) AB225, (l) AV09; **pH vrednost rastvora boje** (m) AB225, (n) AV109; **temperature reakcije uklanjanja boje** (o) AB225, (p) AV109; uslovi pri kojima su izvođene reakcije uklanjanja boja prikazani su u tabeli 19

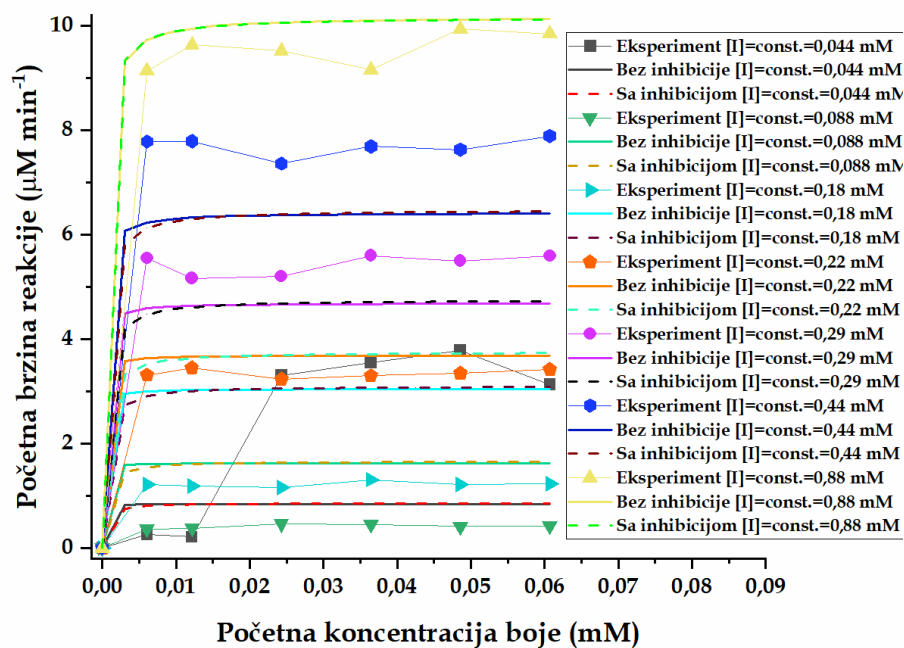


a)

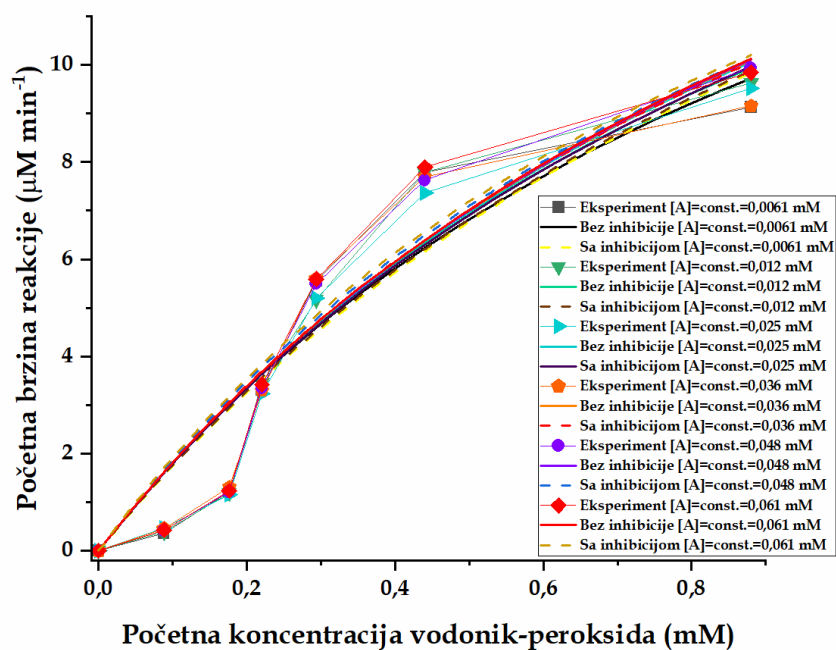


b)

Slika S4. Zavisnost početne brzine reakcije uklanjanja boje AB225 sa HRP-MAB pri: (a) konstantnoj početnoj koncentraciji peroksida od početne koncentracije boje i (b) konstantnoj početnoj koncentraciji boje od početne koncentracije peroksida



a)



b)

Slika S5. Zavisnost početne brzine reakcije uklanjanja boje AV109 sa HRP-MAB pri: (a) konstantnoj početnoj koncentraciji peroksida od početne koncentracije boje i (b) konstantnoj početnoj koncentraciji boje od početne koncentracije peroksida

BIOGRAFIJA AUTORA

MARKO M. JONVIĆ, dipl. Inž. tehnologije, rođen je 26.06.1986. godine u Zaječaru. U Boru je završio gimnaziju "Bora Stanković". Diplomirao je na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu, na katedri za Organsku hemijsku tehnologiju i polimerno inženjerstvo. Diplomski rad po nazivom "Ekstrakcija ugljen (IV)-oksidom iz matičnjaka (*Melissa officinalis*) – kinetika procesa i matematičko modelovanje" odbranio je 27.09.2013.

Od 01.11.2013. je zaposlen kao istraživač pripravnik u Centru za elektrohemiju, Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu, a od 02.02.2015. kao istraživač saradnik.

Doktorske studije – studijski program : Hemijsko inženjerstvo upisao je na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2013/2014 godine. Na doktorskim studijama se bavi imobilizacijom enzima i njihovom upotrebom pri prečišćavanju otpadnih voda i pri hidrolizi proteina. Ispite na doktorskim studijama položio je sa prosečnom ocenom 9,67.

Bio je angažovan na projektu Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije: TR-37001 „Uticaj rudarskog otpada iz RTB-a Bor na zagađenje vodotokova sa predlogom mera i postupaka za smanjenje štetnog dejstva na životnu sredinu“, period 2011-2019, čiji je rukovodilac bio dr Mile Bugarin. U 2024. godini je rukovodilac internog projekta IHTM-a, "Dokaz koncepta", u okviru SAIGE transformacije pod nazivom "Biocidni omekšivač za rublje", u trajanju od šest meseci.

Autor je jednog M21 rada i M22 rada, po jednog saopštenja sa međunarodnog skupa u kategorijama M33 i M34. Kao koautor do sada je učestvovao u izradi i publikaciji jednog patenta na nacionalnom nivou M94, jednog rada M22, četiri rada u kategoriji M24 i osam saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u celini M33.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Марко Јонових**

Број индекса **4024/2022**

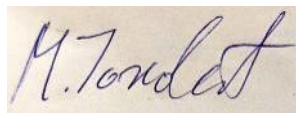
Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Имобилисане протеазе и пероксидазе на магнетним микронским и субмикронским честицама обложеним алгинатом као биокатализатори за хидролизу протеина и разградњу антрахинонских боја из отпадних вода“

- 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 ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора



У Београду, 21.12.2023. године

Изјава о коришћењу

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

„Имобилисане протеазе и пероксидазе на магнетним микронским и субмикронским честицама обложеним алгинатом као биокатализатори за хидролизу протеина и разградњу антрахинонских боја из отпадних вода“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао 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.

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)

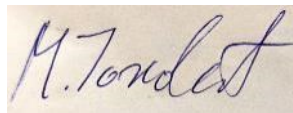
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

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, 21.12.2023. године

1. **Ауторство.** Дозвољавање 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.** Дозвољава 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.** Дозвољава 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.** Дозвољава 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.** Дозвољава 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.** Дозвољава 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.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Марко Јонових**
Број индекса **4024/2022**
Студијски програм **Хемијско Инжењерство**

Наслов рада „**Имобилисане протеазе и пероксидазе на магнетним микронским и суб-микронским честицама обложеним алгинатом као биокатализатори за хидролизу протеина и разградњу антрахинонских боја из отпадних вода**”

Ментор 1. **Др Зорица Кнежевић-Југовић**, редовни професор, Технолошко-металуршки факултет, Универзитета у Београду,

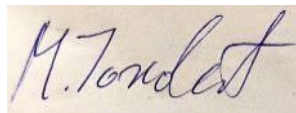
Ментор 2. **Др Бранко Бугарски**, редовни професор у пензији, Технолошко-металуршки факултет, Универзитета у Београду

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао ради похрањена 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, 21.12.2023. године