

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Olivera L. Prodanović

**RAZVOJ IMOBILISANIH SISTEMA  
PEROKSIDAZE IZ RENA (*Armoracia  
rusticana*) ZA POLIMERIZACIONE  
REAKCIJE I UKLANJANJE FENOLA IZ  
OTPADNIH VODA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Olivera L. Prodanović

**DEVELOPMENT OF IMMOBILIZED  
HORSE RADISH (*Armoracia rusticana*)  
PEROXIDASE FOR POLYMERIZATION  
REACTIONS AND REMOVAL OF  
PHENOLS FROM WASTE WATERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

MENTOR:

---

Dr. Zorica Knežević-Jugović,  
Redovni profesor  
Tehnološko-metalurškog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

---

Dr Dušan Mijin,  
Redovni profesor  
Tehnološko-metalurškog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

---

Dr Dejan Bezbradica,  
Vanredni profesor  
Tehnološko-metalurškog fakulteta  
Univerziteta u Beogradu

---

Dr Ksenija Radotić Hadži-Manić,  
Naučni savetnik  
IMSI  
Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE: \_\_\_\_\_

## **Zahvalnica**

*Ova doktorska teza je rađena u Institutu za Multidisciplinarna Istraživanja Univerziteta u Beogradu*

*Zahvaljujem se mentoru Prof Zorici Knežević-Jugović na predloženoj temi i podršci tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Kseniji Radotić Hadži-Manić na korisnim savetima tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.*

*Posebno želim da se zahvalim članovima komisije Prof Dušanu Mijinu i Prof Dejanu Bezbradici na pomoći i korisnim savetima koje su mi pružili tokom pisanja ove doktorske disertacije.*

*Htela bih i da se zahvalim svim kolegama na nesebičnoj pomoći i podršci koju su mi pružali sve ove godine.*

*Najveću zahvalnost dugujem roditeljima, bratu, supruhu Radivoju i sinovima Marku i Stefanu.*

## **Razvoj imobilisanih sistema peroksidaze rena (*Armoracia rusticana*) za polimerizacione reakcije i uklanjanje fenola iz otpadnih voda**

### **IZVOD**

U prvom delu ove teze je makroporozni kopolimer glicidil metakrilata i etilen glikol dimetakrilata, poly(GMA-co-EGDMA) sa dijametrom čestica od 150 do 500  $\mu\text{m}$  i različitim karakteristikama površine i različitom srednjom veličinom dijametra pora od 44 do 200 nm sintetisan, modifikovan 1,2-diaminoetanom i testiran kao nosač za imobilizaciju peroksidaze iz rena (HRP) koristeći dve kovalentne metode, glutaraldehidnu i perjodatnu. Najveća specifična aktivnost od oko 35 U/g suve mase nosača je postignuta na poly(GMA-co-EGDMA) kopolimeru sa srednjom veličinom dijametra pora od 200 i 120 nm koristeći perjodatni metod. Proučavanjem kinetike deaktivacije na 65 °C i u 80% (v/v) dioksanu je otkriveno da perjodatna metoda takođe dovodi do značajne stabilizacije biokatalizatora, i da stabilizacioni faktor zavisi snažno od površinskih karakteristika kopolimera. HRP imobilizovana na kopolimeru sa srednjom veličinom dijametra pora od 120 nm perjodatnom metodom je pokazala najveću specifičnu aktivnost ali takođe i dobru stabilnost, tako da je u daljem radu dodatno karakterisana. Imobilizacija je dovela do stabilizacije enzima u širem opsegu pH, dok je Mihaelisova konstanta ( $K_m$ ) imobilizovane HRP bila 10,8 mM što je otprilike 5,6 puta više nego za slobodni enzim. Posle 6 upotreba u bač reaktoru za oksidaciju pirogalola imobilizovana peroksidaza je zadržala 45% polazne aktivnosti.

U drugom delu ove teze ista serija makroporoznih kopolimera glicidil metakrilata i etilen glikol dimetakrilata, poly(GMA-co-EGDMA) sa veličinom pora od 200 nm (ZS9) pa do neporoznog (ZS6) je testirana kao nosač za imobilizaciju peroksidaze iz rena, ali ovaj put sa dijametrom čestica od 2 do 2,5  $\mu\text{m}$ . HRP je imobilizovana na 4 načina, preko epoksidne grupe na kopolimeru, i nakon aminovanja kopolimera glutaraldehidnom, perjodatnom i karbodiimidnom metodom. Najveća aktivnost imobilizovane HRP od 14,5 U/g je dobijena glutaraldehidnom metodom, a odmah zatim najveća aktivnost od 13,7 U/g karbodiimidnom metodom na poly(GMA-co-EGDMA) označenom kao ZS9 čija je srednja veličina pora bila oko 200 nm. Prinos imobilizacije je bio veći u odnosu na seriju kopolimera sa većom veličinom čestica i iznosio je 33,5% za glutaraldehidnu metodu i 30,3 % za karbodiimidnu u odnosu na oko 5% prinosa dobijenog za seriju kopolimera sa većom veličinom čestica i

glutaraldehydnu metodu imobilizacije. U svim metodama imobilizacije ZS9 sa najvećom veličinom pora se opet pokazao kao najbolji nosač u odnosu na ostale nosače sa manjom veličinom pora.

U trećem delu ove teze fenolne i amino grupe su uvedene u različitim stepenima u alginat oksidacijom sa perjodatom u 2,5; 5, 10, 15 i 20 mol% odnosu prema glikozidnim jedinicama i kasnijom reduktivnom aminacijom u prisustvu tiramina. Modifikacija alginata je potvrđena FTIR-om i UV-VIS spektroskopijom, dok je koncentracija fenolnih i jonizabilnih grupa određena koristeći apsorbanciju na 275 nm i kiselo-baznu titraciju. Svi tiramin-alginati su mogli da formiraju hidrogelove nakon umrežavanja sa peroksidazom rena i vodonik peroksidom. Tiramin-alginati oksidovani do 10 mol% perjodata su bili u stanju da formiraju hidrogelove i u reakciji sa kalcijumom. Tiramin-alginati su testirani za imobilizaciju HRP-a unutar mikro-kuglica alginata dobijenih peroksidazom katalizovanom emulzionom polimerizacionom reakcijom koristeći unutrašnju dostavu peroksida preko glukoza oksidaze i glukoze. Najveća aktivnost imobilizovane peroksidaze je dobijena sa 20 % (w/v) tiramin-alginatom dobijenim preko 20 mol% perjodatne oksidacije. Imobilizovani enzim nije cureo iz mikro-kuglica alginata i dalje je okarakterisan kinetički za oksidaciju pirogalola. Km za pirogalol je povećan nakon imobilizacije sa 1,93 mM za rastvornu peroksidazu na 7,34 mM za imobilizovanu peroksidazu. pH optimum je takođe povećan od 7,0 do 8,0. Temperaturna i stabilnost u organskom rastvaraču je značajno bila povećana tako da je polu-život na 70°C povećan otprilike oko 4 puta, dok je polu-život u 80% (w/v) dioksanu povećan 22 puta. Posle višestruke upotrebe 6 puta u bač reaktoru za oksidaciju pirogalola imobilizovana HRP je zadržala 45 % početne aktivnosti.

Na kraju je izvršena optimizacija upotrebe rastvorne i HRP imobilizovane na poly(GMA-co-EGDMA) i tiramin-alginatu u bač reaktoru za uklanjanje fenola koncentracije 2 mM koristeći različite načine dostave vodonik peroksida. Najbolji rezultati su dobijeni dostavom vodonik peroksida preko 0,125 U/ml glukoza oksidaze iz *Aspergillus niger* i 4 mM glukoze gde je fenol uklonjen do 70% iz vodenog rastvora.

**Ključne reči:** peroksidaza, makroporozni, alginat, emulzija, tiramin, fenol

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo

**Uža naučna oblast:** Biotehnologija i biohemijsko inženjerstvo

UDK broj: 577.152:66.022.3:661.18

## **Development of immobilized horse radish (*Armoracia rusticana*) peroxidase for polymerization reactions and removal of phenols from waste waters**

### **ABSTRACT**

In the first part of this thesis macroporous copolymer of glycidyl methacrylate and ethylene glycol dimethacrylate, poly(GMA-co-EGDMA) with various surface characteristics and mean pore size diameters ranging from 44 to 200 nm was synthesized, modified with 1,2-diaminoethane and tested as a carrier for immobilization of horseradish peroxidase (HRP) by two covalent methods, glutaraldehyde and periodate. The highest specific activity of around 35 U/g of dry weight of carrier was achieved on poly(GMA-co-EGDMA) copolymers with mean pore diameter of 200 and 120 nm by the periodate method. Study of deactivation kinetics at 65°C and in 80% (v/v) dioxane revealed that the periodate immobilization also produced an appreciable stabilization of the biocatalyst, while stabilization factor depended strongly on the surface characteristics of the copolymers. HRP immobilized on copolymer with mean pore diameter of 120 nm by periodate method showing the highest specific activity but also good stability was further characterized. It appeared that the immobilization resulted in stabilization of enzyme over a broader pH range while the Michaelis constant value ( $K_m$ ) of the immobilized HRP was 10.8 mM, approximately 5.6 times higher than that of the free enzyme. After 6 cycles of repeated use in batch reactor for pyrogallol oxidation, the immobilized HRP retained 45% of its original activity.

In the second part of this thesis the same series of macroporous copolymer of glycidyl methacrylate and ethylene glycol dimethacrylate, poly(GMA-co-EGDMA) with pore diameter from 200 nm (ZS9) to the nonporous (ZS6) was tested as carrier for immobilization of HRP, but this time with particle diameter between 2 and 2.5  $\mu\text{m}$ . HRP was immobilized in 4 ways, via epoxide group on copolymer and after amination of copolymer using glutaraldehyde, periodate and carbodiimide method. The highest activity of immobilized HRP of 14.5 U/g was obtained using glutaraldehyde method and immediately after 13.75 U/g using carbodiimide method on poly(GMA-co-EGDMA) named ZS9 with average pore size of 200 nm. Yield of immobilization was



higher compared to the series of copolymers with larger particle diameter and was 33.5 % for glutaraldehyde and 30.3 % for carbodiimide method with respect to the 5 % for series of copolymers with larger particle diameter and glutaraldehyde method of immobilization. In all tested methods for immobilization ZS9 with largest pore diameter showed as the best carrier among others with smaller pore diameters.

In the third part of this thesis phenol and amino groups were introduced into alginate to different degrees via oxidation with 2.5, 5, 10, 15 and 20 mol% of periodate and reductive amination by tyramine. Modification of alginate with tyramine was confirmed by FTIR and UV-VIS spectroscopy, while concentration of phenol and ionizable groups was determined using absorbance at 275 nm and acid-base titration. All tyramine-alginates were able to form hydrogels after cross-linking with horse radish peroxidase (HRP) and hydrogen peroxide. Tyramine-alginates oxidized with up to 10 mol% of periodate were also capable of forming hydrogels with calcium ions. Tyramine-alginates were tested for HRP immobilization within micro-beads obtained by peroxidase catalyzed emulsion polymerization using internal delivery of hydrogen peroxide via glucose oxidase and glucose. Highest activity of immobilized peroxidase was obtained with 20 % (w/v) tyramine-alginate obtained via 20 mol% periodate oxidation. Immobilized enzyme was not leaking from the micro-beads and was further kinetically characterized for pyrogallol oxidation.  $K_m$  for pyrogallol was increased after immobilization from 1.93 mM for soluble HRP to 7.34 mM for immobilized HRP. pH optimum was also increased from pH 7.0 to 8.0. Temperature and organic solvent stability improved significantly after immobilization, so that half-life at 70°C increased around four times, while half-life in 80 % (v/v) dioxane increased 22 times. After repeated use of 6 times in batch reactor for pyrogallol oxidation immobilized HRP retained 45 % of original activity.

At the end optimization of immobilized peroxidase was done in batch reactor for phenol removal using various hydrogen peroxide delivery modes. The best results of 70% phenol removal from water solution was achieved using delivery of hydrogen peroxide by 0.125 U/mL of glucose oxidase from *Aspergillus niger* and 4 mM glucose.

**Keywords:** peroxidase, macroporous, alginate, emulsion, tyramine, phenol

**Academic Expertise:** Engineering technology Major in: Biotechnology and Biochemical Engineering

**UDK number:** 577.152:66.022.3:661.18

## SADRŽAJ

I TEORIJSKI DEO.....	1
1. UVOD.....	1
2. PEROKSIDAZE.....	3
2.1. Podela i stuktura .....	3
2.2. Peroksidaza iz rena (horseradish peroxidase – HRP) <i>Armoracia rusticana</i> ...	5
2.3. Primena peroksidaza u biotehnologiji .....	9
2.4. Peroksidaza iz rena u tretmanu otpadnih voda .....	10
3. IMOBILIZOVANI ENZIMI .....	13
3.1. Hemijske metode imobilizacije .....	13
3.2. Fizičke metode imobilizacije.....	16
3.3. Nosači za imobilizaciju .....	17
3.4. Kinetika imobilizovanih enzima.....	30
4. MAKROPOROZNI KOPOLIMERI KAO NOSAČI ZA IMOBILIZACIJU ENZIMA .....	36
4.1. Eupergit C.....	36
4.2. Kopolimer glicidilmetakrilata i etilenglikoldimetakrilata .....	37
SGE 10/12 aktiviran etilen-diaminom stari.....	41
4.4. Primeri imobilizacije peroksidaze na makroporoznim nosačima.....	42
5. IMOBILIZACIJA ENZIMA U ALGINATU .....	43
5.1. Istorijski uvod .....	43
5.2. Dobijanje alginata.....	44
5.3. Fizičke osobine alginata .....	45
5.4. Hidrogelovi.....	46
5.5. Hemijske osobine alginata.....	49
5.6. Modifikacije alginata .....	49
5.7. Hemijska modifikacija hidroksilne grupe.....	50
5.7.1. Oksidacija .....	50
5.7.2. Reduktivna-aminacija .....	51
5.7.3. Sulfonovanje .....	53
5.7.4. Kopolimerizacija.....	54

5.7.5. Acetilacija .....	54
5.7.6. Fosforilacija .....	55
5.8. Hemijska modifikacija karboksilne grupe .....	56
5.8.1. Esterifikacija .....	56
5.8.2. Ugi reakcija .....	57
5.8.3. Amidacija .....	57
5.8.4. Vezivanje signalnih molekula .....	59
5.9. Primena alginata u biotehnologiji .....	60
5.10. Primena alginata u imobilizaciji peroksidaza .....	63
II EKSPERIMENTALNI DEO .....	64
6. MATERIJALI I METODE .....	64
6.1. Modifikacija polimera perjodatom i tiraminom .....	64
6.2. Imobilizacija peroksidaze iz rena .....	65
6.3. Merenje enzimske aktivnosti .....	65
6.4. Snimanje spektara .....	66
6.5. Titracija jonizabilnih grupa .....	66
6.6. pH optimum .....	66
6.7. Termostabilnost .....	67
6.8. Stabilnost u organskom rastvaraču .....	67
6.9. Km i Vmax .....	67
6.10. Uklanjanje fenola .....	67
6.11. Koncentracija fenolnih grupa .....	68
6.12. Optički mikroskop .....	68
6.13. Uticaj gustine polimera na geliranje i parametre imobilizacije HRP .....	69
6.14. Uticaj procenta oksidacije polimera na parametre imobilizacije HRP .....	69
6.15. Uticaj količine enzima na parametre imobilizacije HRP .....	69
6.16. Uticaj koncentracije glukoze i GOX-a na parametre imobilizacije HRP .....	69
6.17. Ispitivanje uticaja količine dodatog enzima na vezanu aktivnost, specifičnu aktivnost imobilizata i prinos glutaraldehidne imobilizacije .....	69
6.18. Određivanje zavisnosti imobilizacije od vremena inkubacije .....	70
6.19. Ispitivanje uticaja količine dodatog enzima na vezanu aktivnost, specifičnu aktivnost imobilizata i prinos perjodatne imobilizacije .....	71
6.20. Termostabilnost .....	71
6.21. Stabilnost u organskom rastvaraču – 80% 1,4 dioksanu .....	72

6.22. pH optimum.....	72
6.23. Određivanje Km i Vmax.....	72
6.24. Uklanjanje fenola.....	73
6.25. Izvođenje sinteze umreženih makroporoznih kopolimera postupkom suspensione kopolimerizacije .....	73
6.26. Aktivacija polimera etilendiaminom .....	75
6.27. Titracija amino grupa.....	75
6.28. Određivanje odnosa vlažne i suve mase polimera.....	76
6.29. Konvencionalna metoda imobilizacije enzima.....	76
6.30. Određivanje specifične aktivnosti supernatanata .....	77
6.31. Određivanje specifične aktivnosti imobilizata .....	77
6.32. Imobilizacija enzima na polimeru aktiviranom glutaraldehidom.....	78
6.33. Imobilizacija enzima na polimeru aktiviranom natrijum-perjodatom.....	79
6.34. Imobilizacija enzima na polimeru aktiviranom natrijum-perjodatom uz dodatak EDAC-a.....	80
<b>III REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>82</b>
<b>7. KOVALENTNA IMOBILIZACIJA PEROKSIDAZE NA MAKROPOROZNIM GLICIDIL METAKRILATU VELIČINE ČESTICA OD 150 DO 500 <math>\mu\text{m}</math>.....</b>	<b>82</b>
7.1. Sinteza makroporoznog glicidil metakrilata veličine čestica od 150 do 500 $\mu\text{m}$ .....	83
7.2. Optimizacija imobilizacije peroksidaze na glicidil metakrilatu .....	84
7.3. Određivanje stabilnosti imobilizovane peroksidaze .....	86
7.4. Kinetička karakterizacija imobilizovane peroksidaze .....	89
7.5. Karakterizacija imobilizovane peroksidaze u bač reaktoru .....	90
<b>8. KOVALENTNA IMOBILIZACIJA PEROKSIDAZE NA MAKROPOROZNOM GLICIDIL METAKRILATU VELIČINE ČESTICA OD 2 DO 2,5 <math>\mu\text{m}</math>.....</b>	<b>92</b>
8.1. Sinteza i karakteristike makroporoznog glicidil metakrilata veličine čestica od 2 do 2,5 $\mu\text{m}$ .....	92
8.2. Modifikacija kopolimera etilendiaminom .....	95
8.3. Imobilizacije HRP na novosintetisani kopolimer preko epoksidne grupe ....	95
8.4. Imobilizacije HRP na novosintetisani kopolimer glutaraldehidnom metodom .....	97
8.5. Imobilizacije HRP na novosintetisani kopolimer perjodatnom metodom (bez EDAC-a) .....	98

8.6.	Imobilizacije HRP na novosintetisani kopolimer perjodatnom metodom sa karbodimidom EDAC-om.....	100
9.	IMOBILIZACIJE PEROKSIDAZE U MIKROKUGLICAMA ALGINATA....	102
9.1.	Sinteza i karakterizacija tiramin-alginata .....	102
9.2.	Umrežavanje alginata i sinteza hidrogelova.....	106
9.3.	Optimizacija imobilizacije peroksidaze u mikrokuglicama alginata.....	107
9.4.	Studije stabilnosti imobilizovane peroksidaze u alginatu .....	110
9.5.	Kinetička karakterizacija imobilizovane HRP .....	112
9.6.	Upotreba u bač reaktoru imobilizovane HRP.....	114
10.	OPTIMIZACIJA PROCESNIH PARAMETARA ZA UKLANJANJE FENOLA IZ VODENIH RASTVORA.....	116
10.1.	Polimerizacija fenola rastvornom peroksidazom .....	116
10.2.	Polimerizacija fenola peroksidazom imobilizovanom na glicidilmetakrilatu 120	
10.3.	Polimerizacija fenola peroksidazom imobilizovanom u tiramin-alginatu...121	
IV	ZAKLJUČNA RAZMATRANJA .....	123
V	LITERATURA.....	125
	Изјава о ауторству.....	136
	Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада.....	137
	Изјава о коришћењу .....	138

## I TEORIJSKI DEO

### 1. UVOD

Upotreba biokatalizatora u industriji u poslednje vreme dobija sve više na značaju zbog nekoliko dobrih osobina koji oni poseduju kao što su visoka katalitička moć, visoka specifičnost i enantioselektivnost, upotreba pri blagim reakcionim uslovima što dovodi do uštede u energiji kao i njihova netoksičnost i biodegradabilnost. Glavni nedostaci su relativno mala stabilnost u odnosu na klasične katalizatore i visoka cena proizvodnje. Da bi se povećala ekonomičnost upotrebe biokatalizatora u industriji radi se na razvoju imobilisanih enzimskih sistema koji dovode do povećanja stabilnosti i mogućnosti njihove ponovne upotrebe i samim tim smanjenja cene pri njihovoj upotrebi. Imobilizacija predstavlja ograničavanje slobode kretanja molekula enzima u rastvoru i najčešće se razvijaju kovalentne metode imobilizacije na makroporoznim nosačima i metode imobilizacije enzima unutar polimernih hidrogelova. I jedna i druga metoda imobilizacije imaju prednosti i nedostatke, tako se kovalentnom imobilizacijom najčešće dobijaju stabilni preparati enzima kod kojih ne dolazi do curenja enzima tokom upotrebe ali dolazi do njegove inaktivacije usled hemijskih reakcija tokom same metode imobilizacije. Pri enkapsulaciji enzima unutar hidrogelova sam molekul enzima ne učestvuje u hemijskoj reakciji imobilizacije tako da se aktivnost enzima ne gubi usled denaturacije ali se gubi usled velikih difuzionih ograničenja, dok se zbog velikog dijametra pora polimernog hidrogela gubi enzimaska aktivnost usled curenja enzima tokom upotrebe.

Peroksidaze predstavljaju važnu klasu enzima koje katalizuju reakciju polimerizacije fenolnih jedinjenja. U medicini pronalaze svoju primenu kao klinički reagensi, dok u industriji mogu da se primene za polimerizaciju fenola i njihovu precipitaciju iz vodenih rastvora kao i za sintezu fenolnih polimera u organskim rastvaračima. Da bi se efikasno upotrebila neophodno joj je povećati stabilnost i smanjiti gubitak aktivnosti usled inaktivacije vodonik peroksidom. U tu svrhu se radi na razvoju imobilisanih enzimskih sistema sa peroksidazom i na razvoju načina dostave vodonik peroksida u reakcioni sistem.

Cilj ove doktorske disertacije je bio razvoj imobilisanih enzimskih sistema peroksidaze iz rena u cilju dobijanja biokatalizatora koji bi se mogao upotrebiti više puta u reakcijama polimerizacije fenola u vodenim sistemima. U tu svrhu je peroksidaza iz rena imobilizovana kovalentno na makroporoznom glicidil metakrilatu i

unutar polimernih alginatnih hidrogelova. Urađena je optimizacija imobilizacije u pogledu količine dodatog enzima, tipa hemijske reakcije korišćene za imobilizaciju i veličine pora i čestica makroporoznog glicidil metakrilata. Takođe je u cilju poboljšanja efikasnosti imobilizacije u alginatu sintetisan novi hemijski modifikovani alginat koji je mogao da formira hidrogelove i u reakciji sa kalcijumom i u reakciji se peroksidazom i vodonik-peroksidom.



## 2. PEROKSIDAZE

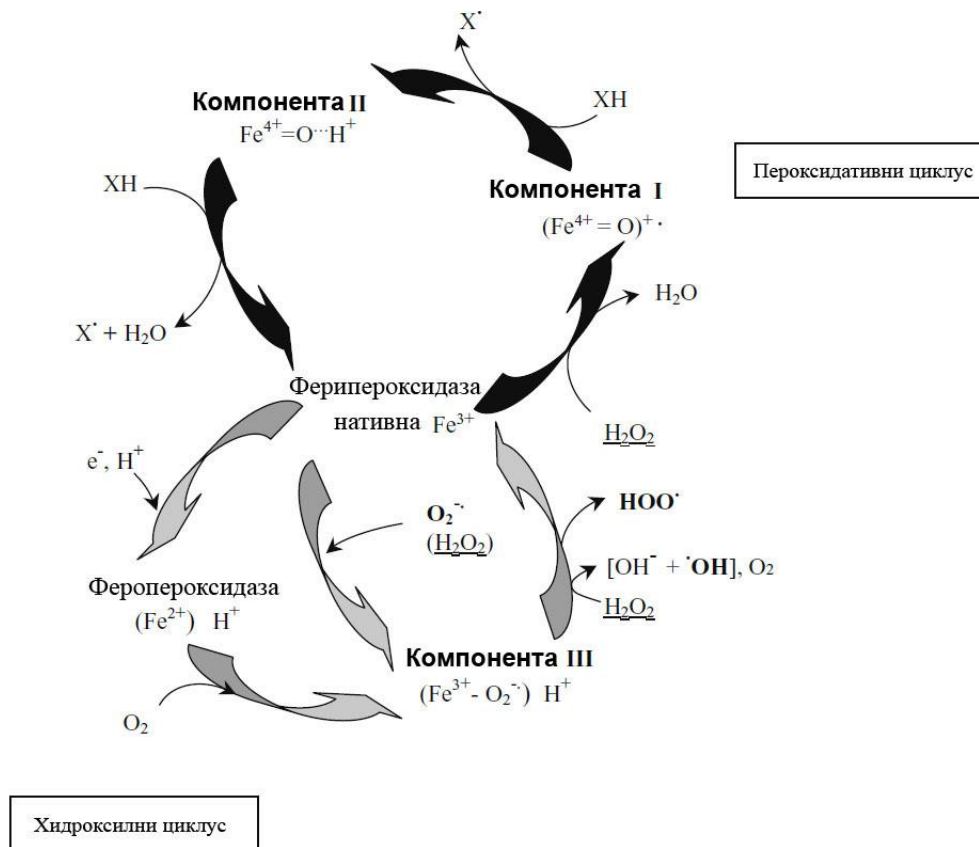
### 2.1. Podela i struktura

Peroksidaze predstavljaju superfamiliju proteina koji sadrži tri različite klase peroksidaza [1]:

- a) Intracelularne peroksidaze (klasa 1, *E.C.* 1.11.1.5/6/11)
- б) Ekstracelularne peroksidaze gljiva (klasa 2, *E.C.* 1.11.1.13/14)
- в) Ekstracelularne peroksidaze biljaka (klasa 3, *E.C.* 1.11.1.7)

Peroksidaze specifične za biljke u svojoj strukturi imaju hem i pripadaju klasi 3 peroksidaza (u daljem tekstu peroksidaze).

Peroksidaze su glikoproteini koji sadrže po dva jona kalcijuma koji utiču na rastvorljivost enzima kao i na strukturu aktivnog mesta [2]. U toku svog katalitičkog ciklusa (peroksidativni ciklus), katalizuju redukciju vodonik peroksida uz pomoć elektrona koje uzimaju od molekula kao što su fenolna jedinjenja, prekursori lignin, auksin ili sekundarni metaboliti [3]. Uprkos tome što koriste širok spektar elektron donora imaju zajednički supstrat gvajakol, pa im opšte ime može biti i gvajakol peroksidaze [4]. Niskospinskog +3 stanja gvožđa u kom je peroksidaza neaktivna mogu proizvesti neki supstrati [5]. U odvojenom hidroksilnom ciklusu, peroksidaze mogu da katalizuju i nastajanje slobodno radikalskih vrsta kiseonika, Slika 1.



**Slika 1.** Katalitički ciklus klase 3 peroksidaza [1]

Peroksidaze mogu da katalizuju veliki broj reakcija što ukazuje na njihov značaj u mnogobrojnim fiziološkim procesima kao što su metabolizam auksina, formiranje suberina i lignina, odbrana od patogena, umrežavanje komponenata ćelijskog zida i klijanje semena. Kod biljaka su peroksidaze su prisutne u citoplazmi, peroksizomima, u sastavu ćelijskog zida, u vakuolama, plazma membrani, mitohondrijama.

Peroksidaze ćelijskog zida učestvuju u polimerizaciji fenolnih jedinjenja i sintezi lignina, otpornosti na bolesti, degradaciji indol-3-sirćetne kiseline i biosintezi etanola [6]. Zbog toga peroksidaze imaju veoma važnu ulogu u toku rasta i razvoja korena i nadzemnih organa. Pa se i najintenzivnija aktivnost peroksidaza uočava upravo u mladom tkivu koje se diferencira i raste. Zapaženo je da do porasta aktivnosti POD-a dolazi paralelno sa porastom količine lignina u ćelijskom zidu [2].

Svaka promena u spoljašnjoj sredini može da indukuje promenu aktivnosti POD u ćelijskom zidu, jer one imaju ulogu i u odbrani od stresa iz spoljašnje sredine [2]. Sintaza peroksidaze u lišću različitog drveća je upotrebljavana kao parametar za monitoring i mapiranje odbrane od aerozagađenja [7]. POD kod vodenog cveta

(*Nymphaea*) su uključene u mehanizam zaštite od toksičnog dejstva kadmijuma [8], tako što katalizuju nastajanje fenolnog polimera koji kompleksira jone kadmijuma u vidu kristala. Osim u otpornosti na teške metale peroksidaze mogu imati ulogu i u zaštiti od toksičnih organskih molekula kao što je 2,4-dihloro fenol [9].

Zahvaljujući hidroksilnom ciklusu, peroksidaze mogu katalizovati nastajanje vodonik peroksida i superoksidnog radikala. Tako je u radu gde su semena *Castanea sativa* izložena sušenju, uočena povećana produkcija ekstracelularnog superoksidnog radikala, nastalog u reakciji redukcije vodonik peroksida cinamičnom kiselinom, katalizovanoj od strane ekstracelularne peroksidaze ćelijskog zida [10]. Proizvodnja vodonik peroksida u apoplastu lista kravljeg graška (*Vigna unguiculata*) je katalizovana peroksidazom i ima ulogu u toleranciji biljke na mangan [11].

## **2.2. Peroksidaza iz rena (horseradish peroxidase – HRP) *Armoracia rusticana***

Peroksidaza iz rena (na engl. *horseradish peroxidase* - HRP, EC 1.11.1.7) je enzim izolovan iz korena rena koji se intenzivno koristi pre svega u biohemijskim procesima. Ova peroksidaza se često koristi kod konjugata, da bi se utvrdilo prisustvo ciljanog molekula. HRP je najpoželjniji enzim za detekciju antitela jer je najmanji i najstabilniji od tri najpopularnija enzima (HRP, alkalna fosfataza i  $\beta$ -galaktozidaza).

HRP je jedan od enzima koji mogu katalizovati oksidaciju velikog broja organskih i neorganskih jedinjenja zbog čega je našla primenu za različite namene od sinteze finih hemikalija kao što su DOPA (L-3,4-dihidroksifenilalanin) i bifenoli, uklanjanja toksičnih jedinjenja iz otpadnih voda u prečišćavanju voda, pa do primene u biosenzorima. Ova peroksidaza, zajedno sa drugim hem peroksidazama, je jarko obojena, posebno pod UV svetlošću. Ova osobina hem peroksidaza ih čini korisnim za jer oni mogu biti vidljivi na različitim talasnim dužinama svetlosti. Hem grupa u peroksidazi iz rena je jednostavnija od one kod sisara i samim tim odlična polazna tačka u studijama hem peroksidaza i njenih funkcija. Pronađeno je da, kada se HRP kombinuje sa drugim jedinjenjima, postaje visoko reaktivna prema ćelijama tumora kod čoveka. To bi moglo da dovede do mnogih dostignuća u ciljanoj terapiji raka.

HRP je izolovana iz korena rena (*Armoracia rusticana*) i pripada feroprotoporfirinskoj grupi peroksidaza. To je jednolančani polipeptid koji sadrži četiri disulfidna mosta. Predstavlja glikoprotein, koji sadrži 18% ugljenih hidrata. Od ugljenih hidrata zastupljeni su: galaktoza, arabinoza, ksiloza, fukoza, manozna, manozamin i

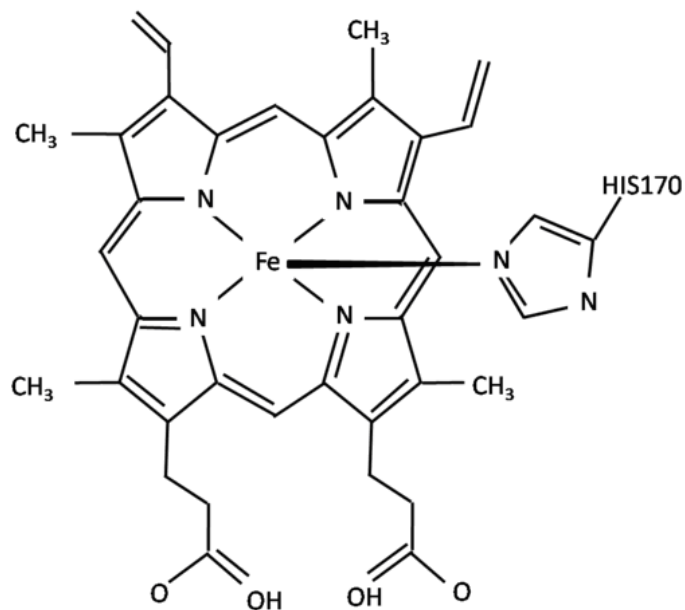
galaktozamin, u zavisnosti od specifičnog izoenzima. Njegova molekulska masa (44 kDa) obuhvata polipeptidni lanac (33.890 Da), hem sa  $\text{Ca}^{2+}$  (700 Da) i ugljene hidrate (9.400 Da). Izoelektrična tačka HRP izoenzima je u opsegu od 3,00 do 9,00. Postoji najmanje 7 HRP izoenzima. Enzim HRP-a, nađen u renu se intenzivno koristi u biohemijskim procesima, prvenstveno zbog njene sposobnosti da pojača slab signal i poveća detekciju ciljanog molekula.

Struktura peroksidaze je prvi put određena pomoću rendgenske kristalografije 1997. godine, i to na više različitih supstrata. To je  $\alpha$ -helikoidni protein koji ima vezan hem kao kofaktor.

Strukturne koordinate proučavane su pomoću programa za vizuelizaciju RasMol i Protein Structure Explorer. Strukturni podaci su analizirani u pogledu:

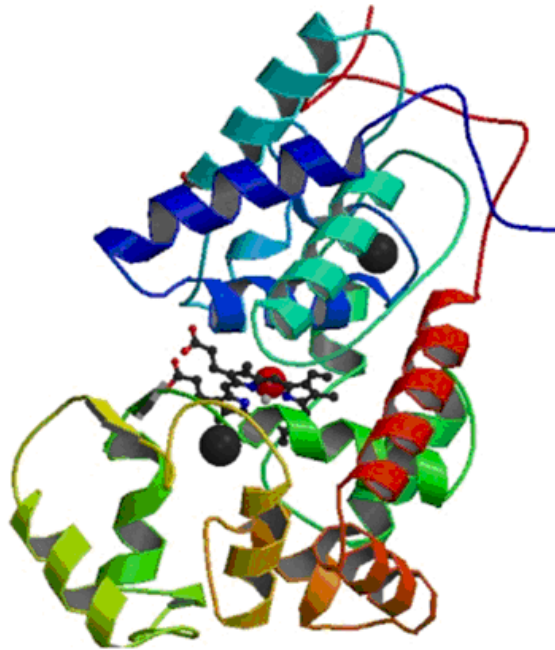
- 1) dužine  $\alpha$ -heliksa,
- 2) broja formiranih vodoničnih veza po ostatku,
- 3) broja molekula vode u rastojanju vodoničnih veza do 3,5 Å po ostatku.

Postalo je odmah jasno da u osnovi postoje dve grupe  $\alpha$ -heliksa u molekulu: dugi i kratki. Prilikom definisanja dugih  $\alpha$ -heliksa, koji imaju najmanje 10 aminokiselinskih ostataka, utvrđeno je da oni doprinose 34% sekundarnoj strukturi HRP-a [12, 13]. Ovo se bliže odnosi na oblast doprinosa  $\alpha$ -heliksa amidnoj IR traci na 1660  $\text{cm}^{-1}$  (31%). Kraći  $\alpha$ -heliksi, sa manje od 10 ostataka, doprinose 14% strukturi HRP-a. Ovo ukazuje na činjenicu da su nisko-frekventni amid I veze na 1650  $\text{cm}^{-1}$  (20%) u velikoj meri zastupljene kod kratkih heliksa, dok visoke frekvencije proizilaze najčešće od dužih helikoidnih segmenata. Postoji veliki broj izoenzima peroksidaze iz rena, ali najčešći je tip C. HRP tipa C ima dva metalna centra, jednu hem grupu sa atomom gvožđa i dva atoma kalcijuma, Slika 2.



**Slika 2.** Struktura hem grupe u HRP-u

Hem grupa ima planarnu strukturu sa atomom gvožđa koji se drži čvrsto u sredini porfirinskog prstena koji se sastoji iz četiri molekula pirola. Gvožđe ima dve otvorene vezane strane, jedna iznad i jedna ispod ravni hem grupe. Hem grupa ima histidin (enzim) pridodat proksimalnom histidin ostatku (His170) koji se nalazi ispod hem grupe. Drugi ostatak histidina, koji se nalazi u delu iznad hem grupe, predstavlja mesto vezivanja za vodonik-peroksid pri oksido-redukcionim reakcijama. Atom kiseonika će se vezati za ovu slobodnu stranu tokom aktivacije. Šesta oktaedarska pozicija atoma gvožđa predstavlja aktivno mesto enzima. Tokom enzimske reakcije, vezivanje vodonik-peroksida za atom gvožđa, stvara oktaedarnu strukturu oko atoma gvožđa. Drugi mali molekuli se takođe mogu vezati za distalnu stranu, stvarajući istu oktaedarnu strukturu.



**Slika 3.** Trodimenziona struktura HRP-a.

Slika 3 prikazuje trodimenzionalnu strukturu HRP-a. Hem grupa je u centru enzima i prikazana je crnom bojom sa atomom gvožđa koji je predstavljen crvenom sferom. Dva atoma kalcijuma su crne sfere i leže između helikoidnih oblasti enzima, jedan u distalnom delu i jedan u proksimalnom delu.  $\alpha$ -Heliks i  $\beta$ -naborane ploče enzima su prikazani kao raznobojne spiralne strukture. I hem grupa i atomi kalcijuma su od presudnog značaja aktivnost enzima i, isto tako, na stabilnost enzima jer gubitak jednog od njih prouzrokuje nestabilnost.

Peroksidaze su visoko specifične samo prema vodonik-peroksidu, dok prema drugom supstratu pokazuju malu specifičnost [14, 15]. Tako peroksidaza iz rena može kao donore vodonika da koristi veliki broj različitih hemijskih jedinjenja kao što su fenoli, aromatični amini, nitriti, boje, pa čak i jodidi, ferocijanid i druga. Utvrđeno je da enzim pored peroksidatne aktivnosti, poseduje i oksidaznu aktivnost, odnosno da može da oksiduje veliki broj hemijskih jedinjenja u prisustvu kiseonika.

Molekulska masa peroksidaze iznosi 44kDa, dok je izoelektrična tačka u rasponu od 3,0 do 9,0 sa najmanje sedam izoenzima. HRP se lako kombinuje sa vodonik-peroksidom ( $H_2O_2$ ) i kao rezultat ( $HRP-H_2O_2$ ) kompleks može oksidovati širok spektar hromogenih donora vodonika. Takođe HRP može koristiti hemiluminescentne supstrate kao što su luminol i izoluminol, i fluorogene supstrate kao što su tiramin, homovanilična kiselina, 4-hidroksifenol acetatna kiselina.

Inhibitori HRP-a su natrijum-azid, cijanid, L-cistin, dihromat, etilentiourea, hidroksilamin, sulfid, p-aminobenzoeva kiselina,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  [16-18].

pH optimum HRP je u opsegu od 6,0-6,5; aktivnost na 7,5 je 84% od maksimuma. Enzim je najstabilniji u pH opsegu od 5,0-9,0.

Apsorpcioni odnos A403/A275 je mera sadržaja hema u enzimu peroksidazi, ne aktivnosti enzima. Čak i preparati sa visokim vrednostima RZ-a, mogu imati nisku enzimsku aktivnost.

### **2.3. Primena peroksidaza u biotehnologiji**

Peroksidaze se najčešće primenjuju u kliničkoj biohemiji i enzimskim imunoesejima, ali se u poslednje vreme sve češće pominje njihova upotreba i u biotehnologiji za tretman otpadnih voda i uklanjanje fenola, sintezu različitih hemikalija kao što su DOPA i bifenoli, uklanjanje peroksida iz industrijskog otpada i proizvodnju biosenzora. Aromatična jedinjenja koja se najčešće mogu pronaći u otpadnim vodama su fenoli i oni predstavljaju toksična koja moraju biti uklonjena pre nego što se izluče u okolnu sredinu. Enzimski tretman je jedna od metoda za njihovo uklanjanje i većina tih metoda se zasniva na primeni peroksidaze iz rena u prisustvu vodonik peroksida gde dolazi do polimerizacionih reakcija i precipitacije polifenolnih proizvoda [19].

Da bi se povećala efikasnost procesa i smanjila inaktivacija peroksidaze ona se imobilizuje na različite nosače ili joj se dodaju polimeri kao što je polietilen glikol koji formira zaštitni sloj u blizini aktivnog mesta enzima tako da ograničava napad fenoksi radikala koji se formira u katalitičkom ciklusu [20-23].

Peroksidaza iz rena se u glavnom koriste kao reagensi za organske sinteze i biotransformacije, kao i u kuplovanim enzimskim analizama, hemiluminiscentnim analizama, imunotestovima ali i u tretmanu otpadnih voda (obezbojavanje, uklanjanje ulja, fenola) [15, 16].

Unapređenje poželjnih svojstava enzima, kao na primer njegova relativno dobra stabilnost u vodenim i nevodenim sistemima, postiže se hemijskom modifikacijom i usmerenom mutagenezom. Neke primene HRP u malim organskim sintezama uključuju N- i O-dealkilaciju, oksidativno kuplovanje, selektivnu hidroksilaciju i reakcije prenosa kiseonika. Primena peroksidaze u enantioselektivnim reakcijama oksidacije, na industrijskom nivou, zahteva znatno smanjenje cene samog enzima po

jedinici proizvoda. Rešenje ovog problema je bolje upravljanje procesima sa  $H_2O_2$  da bi se sprečila inaktivacija enzima ili korišćenje modifikovanih enzima sa poboljšanom stabilnošću i katalitičkom efikasnošću.

Reakcije kuplovanja biološki aktivnih jedinjenja, katalizovane peroksidazom iz rena su našle veliku primenu u sintezi lekova protiv kancera [17].

Pokazano je da je peroksidaza iz rena efikasna u obezbojavanju otpadnih voda, kao i da poseduje aktivnost u dužem vremenskom periodu pri prečišćavanju otpadnih voda industrije papira. Peroksidaza iz rena, imobilisana na aluminijumske i hitozanske nosače, je efikasna pri oksidaciji različitih hlorfenola u otpadnim vodama i zemljištu [18,19]. Imobilizacija na magnetitu putem fizičke adsorpcije je efikasnija od umrežavanja enzima za nosač [20]. Istraživanja su pokazala značajno smanjenje koncentracije fenola u otpadnim vodama industrije papira pri korišćenju imobilisane peroksidaze iz rena na poroznom nosaču na bazi litijum-titana, stakla i keramike [21]. Napravljen je biosenzor za detekciju fenola korišćenjem sol-gel tehnologije, pri čemu je peroksidaza "zarobljena" u konduktivan polimer koji je nanošen na staklene ugljene elektrode. Biosenzor je pokazao nizak operacioni potencijal, brz odgovor, visoku osetljivost i mikromolarnu detekciju različitih fenola [22]. Takođe, dizajniran je biosenzor visoke osetljivosti i reproduktivnosti, imobilizacijom peroksidaze iz rena na tetraetil-ortosilikat sol-gel filmove zajedno sa holesterol-oksidadom [23]. Isto tako, komercijalna peroksidaza je koimobilisana sa holesterol-oksidadom i holesterol-esterazom pomoću glutaraldehida, pri čemu su zadržale 76% svoje početne aktivnosti. Ovi koimobilisani enzimski sistemi imaju moguću primenu kao senzori za određivanje ukupnog holesterola. U novije vreme postoji veliko interesovanje za biosenzore koji se baziraju na konduktivnim polimerima kao što je polianilin. Na primer, razvijen je biosenzor koji sadrži holesterol-oksidadu, holesterol-esterazu i peroksidazu sa prihvatljivom temperaturnom stabilnošću i dobrom osetljivošću. Napravljen je i imobilizat pri čemu je peroksidaza imobilisana samostalno ili zajedno sa holesterol-oksidadom na silicijumski nosač, aktiviran reakcijom aminosilana i glutaraldehida [24]. I imobilisana peroksidaza i koimobilisana peroksidaza pokazale su dobru stabilnost pri različitim uslovima u poređenju sa nativnom peroksidazom [25].

#### **2.4. Peroksidaza iz rena u tretmanu otpadnih voda**

Posebna pažnja se danas pridaje razvoju zelene i održive tehnologije za tretman



otpadnih voda. Zbog uvođenja strogih zakona za prečišćavanje otpadnih voda razvijene su različite metode tretmana otpadnih voda. Ove metode uključuju: adsorpciju pomoću aktivnog uglja/smola, oksidaciju vlažnim vazduhom, ozonizaciju/napredni proces oksidacije, elektrohemijsku oksidaciju, fotokatalitičku oksidaciju i aerobnu/anaerobnu degradaciju [24, 25]. Najčešće korišćena metoda za uklanjanje fenola je adsorpcija pomoću aktivnog uglja [26, 27]. Nedostatak ove metode je što je proces regeneracije uglja skup i nekompletan zbog delimične ireverzibilne adsorpcije [28]. Napredni procesi oksidacije, kao na primer  $H_2O_2/UV$ , ozon/ $H_2O_2/UV$ , Fentonova reakcija i  $TiO_2/UV$  se danas češće koriste pri uklanjanju sintetičkih organskih jedinjenja iz otpadnih voda. Ove metode su pogodne za tretman ogromnih količina otpadnih voda gde je i procenat uklanjanja fenola, kao primarnog zagađivača, veliki. Međutim, ne može se kontrolisati formiranje međuproizvoda koji su u sledećem koraku procesa - biološkom prečišćavanju, toksični [28].

Kod tretmana otpadnih voda pomoću aktivnog mulja, prevaziđeni su problemi sa toksičnim međuproizvoda, ali ovaj pristup nije pogodan za visoke koncentracije zagađivača. U poređenju sa konvencionalnim metodama, enzimi imaju veću specifičnost i mogu da podnesu veliku koncentraciju zagađivača. Supstrat se taloži van rastvora i može se lako ukloniti, umesto da se prenosi na sedeći sistem [29, 30]. Metod enzimskog uklanjanja fenola iz otpadnih voda, koristeći peroksidaze je razvijen od strane Klibanov-a 1980-te. Prednost ove metode je visoka specifičnost enzima, što rezultuje visokom efikasnošću uklanjanja fenola i niskim rizikom formiranja sekundarnih polutanata. Takođe, enzimi zadržavaju svoju aktivnost i pri visokim koncentracijama zagađivača, širokom opsegu pH i temperatura, smanjeno je formiranje biomasa i lakša kontrola procesa [31].

Fenol je glavni zagađivač u otpadnim vodama iz petrohemijske, farmaceutske, naftne industrije i sl. On je veoma korozivan, a izaziva dijareju, zamućen vid, ekskreciju tamnog urina. Takođe, fenol je toksičan za ribe. Smrtonosna koncentracija fenola u krvi je oko 150 mg/100 ml. Različiti tretmani se koriste za uklanjanje fenola, kao na primer adsorpcija, jonska izmena, oksidacija i biološki tretman.

Stanisavljević i Nedić su ispitivali uklanjanje fenola polimerizacijom. Polimerizacija fenola je izvršena pomoću enzima peroksidaze i vodonik-peroksida. Peroksidaza konvertuje molekule fenola do slobodnih radikala i vraća ih u sistem, gde slobodni radikali fenola reaguju međusobno formirajući poliaromatične proizvode. Ovi polimeri su nerastvorni u vodi i lako je ih ukloniti. Konverzija fenola u svim eksperimentima je

bila veća od 90%, pri korišćenju prečišćene peroksidaze. Ustanovili su da dolazi do 94% polimerizacije fenola pri njegovoj koncentraciji od 100 mg/L sa slobodnom peroksidazom, a do 62% sa imobilisanom peroksidazom [32].

### **3. IMOBILIZOVANI ENZIMI**

Prilikom imobilizacije enzima dolazi do ograničavanje slobode kretanja molekula proteina u rastvoru fizičkim ili hemijskim metodama [33, 34]. U odnosu na rastvorne imobilizovani enzimi imaju nekoliko prednosti kao što su:

- povećana stabilnost imobilizovanog enzima
- ponovna upotreba enzima
- jednostavno odvajanje od proizvoda iz reakcione smese
- visoka zapreminska produktivnost reaktora sa imobilizovanim enzimom

Ipak, u poređenju sa rastvornim enzimima imobilizovani enzimi imaju i nekoliko nedostataka, kao što su:

- inaktivacija enzima tokom imobilizacije i smanjenje aktivnosti
- smanjenje aktivnosti zbog difuzionih ograničenja
- visoka cena nosača i metode imobilizacije

Metode imobilizacije enzima mogu da se podele na fizičke i hemijske [35, 36].

#### **3.1. Hemijske metode imobilizacije**

U slučaju hemijskih metoda imobilizacije molekul enzima učestvuje u hemijskoj reakciji gradeći kovalentne ili nekovalentne veze. Nedostaci hemijskih metoda u odnosu na fizičke metode imobilizacije su delimična inaktivacija enzima tokom hemijske reakcije. Enzim može biti vezan za nosač ili umrežavanjem i sam postaje nosač. Enzim se na nosač može imobilizovati adsorpcijom, jonskom vezom, koordinativnom vezom i kovalentnom vezom [37].

Adsorpcija predstavlja najjednostavniji metod imobilizacije gde je enzim vezan za nosač nekovalentnim vezama kao što su hidrofobne, vodonične, Van-der-Walls-ove i elektrostatičke. Ovo je blaga metoda imobilizacije gde se formiraju slabe veze i ne dolazi do značajnije denaturacije enzima što je dobra osobina ove metode ali je loša osobina što se sam enzim lakše spira sa nosača. U nekim varijantama ove metode

imobilizacije se umrežavanjem enzimskog sloja adsorbovanog na nosaču povećava jačina veze između enzima (helatni efekat) i nosača, ali se delimično inaktivira enzim.

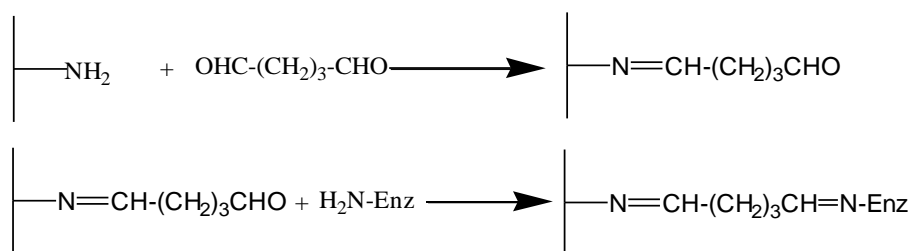
Jonska adsorpcija predstavlja metodu gde se enzimi vezuju za nosače sa naelektrisanim grupama [37]. Tom prilikom se stvara jonska veza čija jačina zavisi od koncentracije i naelektrisanja grupa na nosaču i enzimu. Imobilizovani enzimi koji su prvi korišćeni u industriji bili su imobilizovani baš jonskom adsorpcijom (u proizvodnji L-aminokiselina iz racemskih smeša). Ovde je jonska adsorpcija primenjena zbog svoje jednostavnosti i lakoće izvođenja. Druga prednost ove metode je što se imobilizat može regenerisati ponovnom adsorpcijom enzima.

Enzimi se mogu koordinativnom vezom imobilizovati na nosače prethodno tretirane solima titanijuma i cirkonijuma [38]. Koordinativne veze se formiraju između hidroksilnih grupa nosača, metala titana i aminokiselinskih ostataka u molekulu enzima (hidroksilne, merkapto i amino grupe). U toku imobilizacije prvo se tretira nosač titan-tetrahloridom, a zatim se suši na 90 °C što dovodi do isparavanja hidratacione vode i hlorovodonične kiseline i ostaje sloj oksida metala. Aktivirani nosač se zatim inkubira sa rastvorom enzima. Koordinativna veza koja se formira između enzima i nosača je jača nego veze koje se formiraju kod imobilizacije adsorpcijom i odgovara kovalentnoj vezi, a tokom imobilizacije ne dolazi do značajnije inaktivacije enzima. To ukazuje na prednost ove metode u odnosu na imobilizaciju adsorpcijom.

Kovalentna veza se formira između enzima i aktivnih grupa na površini nosača. U odnosu na ostale metode imobilizacije, prednost ove metode ogleda se u tome što su kovalentne veze jake, pa se enzim vrlo teško ispirsa sa nosača. Nedostatak je što tokom hemijske reakcije dolazi do delimične inaktivacije enzima. Postoji više različitih metoda kovalentne imobilizacije enzima. Podela je na osnovu toga koje aktivne grupe učestvuju u samoj reakciji. Metode kovalentne imobilizacije su klasifikovane na osnovu aktivnih grupa na nosaču i metode za njihovu aktivaciju [37].

Aktivacija nosača sa amino grupama

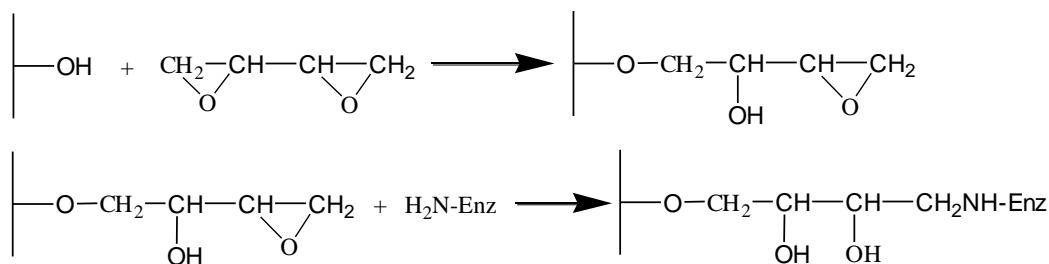
Najpoznatija metoda kovalentne imobilizacije je aktivacija amino grupa na nosaču glutaraldehidom [39-41], Slika 4



**Slika 4.** Reakcija aktivacije amino grupe glutaraldehidom

Aktivacija nosača sa hidroksilnim grupama

Kao reagens za aktivaciju kod epoksidne aktivacije, najčešće se koristi bisoksidan ili epihlorhidrin. Aktivacija se izvodi u izuzetno baznoj sredini, na pH oko 11 [42], Slika 5.



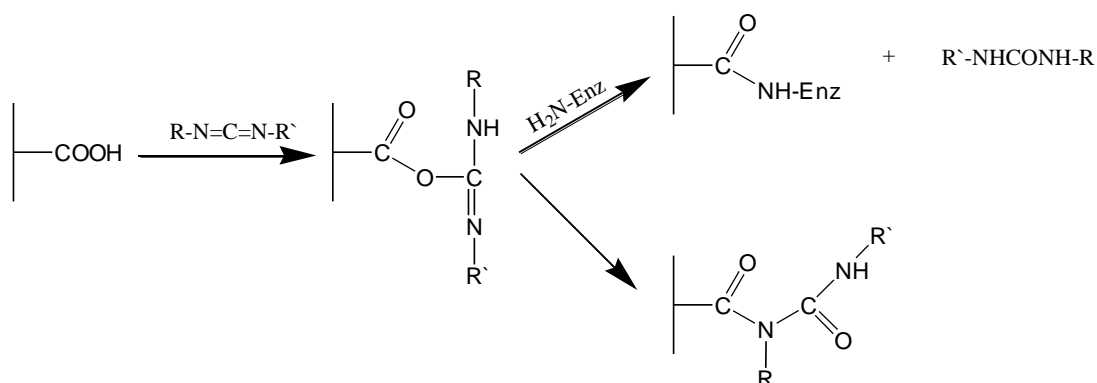
**Slika 5.** Reakcija aktivacije hidroksilnih grupa epoksidima

Enzim se vezuje za aktivirani nosač u blažim uslovima, pri čemu su najreaktivnije sulfhidrilne grupe proteina, pa amino i na kraju hidroksilne. Veza koja nastaje je izrazito stabilna. Reakcija sa proteinima se izvodi nekoliko dana, tako da je sam proces spor.

Aktivacija nosača sa karboksilnim grupama

Karbodiimidi su kondenzujući reagensi koji se koriste za aktivaciju nosača sa karboksilnim grupama. Karbodiimidi reaguju sa karboksilnim kiselinama. Reakcija se izvodi u blago kiselim uslovima i daje O-acil izoureu. Aktivirane karboksilne grupe

možu preći u acilureu ili reaguju sa amino-grupama enzima i daju odgovarajuće amide [43], Slika 6.



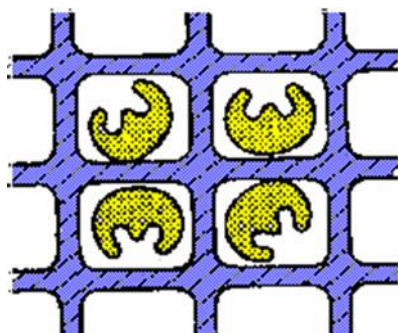
**Slika 6.** Reakcija aktivacije karboksilne grupe karbodiimidima

Intermedijer može reagovati i sa drugim nukleofilima u enzimu, kao što su hidroksilna i sulfhidrilna grupa, mada mnogo manjom brzinom.

### 3.2. Fizičke metode imobilizacije

U ovoj metodi imobilizacije sam enzim ne učestvuje u hemijskoj reakciji prilikom imobilizacije.

Najpoznatiji metod je enkapsulacija enzima unutar hidrogela. Kod ove metode imobilizacije oko rastvorenih molekula enzima dolazi do stvaranja trodimenzionalne mreže polimera, Slika 4 [44, 45]. Enzim ne učestvuje u reakciji polimerizacije, ali ostaje zarobljen u porama nastalog polimera tj. hidrogela, Slika 7.



**Slika 7.** Enkapsulirani enzim u hidrogelu

Spoljašnji oblik hidrogela zavisi od načina polimerizacije i može biti sferan, cilindričan, vlaknast ili pločast. Postoji nekoliko metoda enkapsulacije koje se dele na osnovu principa formiranja hidrogelova, Tabela 1.

**Tabela 1.** Metode formiranja hidrogelova

<b>Princip geliranja</b>	<b>Polimer</b>
Jonotropsko želiranje	Alginat, karagenan
Polikondezacija	Epoksidne smole, poliuretani
Polimerizacija	Poliakrilamid, polimetakrilati
Precipitacija rastvaračima	Acetat celuloze, polistiren
Termoreverzibilno želiranje	Agar, želatin

Enkapsulacija se najčeće koristi za imobilizaciju ćelija, zato što su pore koje nastaju obično velikog dijametra, tako da manji enzimi difunduju van granica matriksa. Još jedan nedostatak ove metode predstavlja i to što se dobijaju meki hidrogelovi slabih mehaničkih osobina. Najčešće se od polimera za enkapsulaciju koristi alginat, agarozu i poliakrilamid.

### **3.3. Nosači za imobilizaciju**

Da bi nosač bio pogodan za imobilizaciju enzima poželjno je da ima sledeće osobine:

- veliku aktivnu površinu (Što je veća dodirna površina katalizatora i rastvora brža je kataliza kod heterogene katalize)
- permeabilnost (da aktivna površina bude dostupna molekulima enzima i supstrata)
- nerastvorljivost u reakcionoj sredini (da bi se lakše odvojio od reakcione smeše)
- hidrofilni karakter (povećava permeabilnost)
- mikrobiološku, hemijsku, mehaničku i termalnu stabilnost
- odgovarajući oblik i veličinu čestica (da se smanji otpor protoku tečnosti u reaktoru, a da bude što manji uticaj difuzije na enzimsku reakciju)

Nosači se mogu klasifikovati na osnovu svojih morfoloških (fizičkih) karakteristika i na osnovu hemijske strukture tj. porekla.

#### Neporozni nosači

Glavni nedostatak ovih nosača je obično mala aktivna površina. Da bi se dobile što veće aktivne površine koriste se što sitnije čestice, ali ne u nedogled. Čestice ne treba da budu presitne, pošto to otežava izdvajanje iz reakcione smese i protok kroz reaktor. U cilju lakšeg izdvajanje iz reakcione smeše, sve se više koriste čestice sa magnetnim osobinama, koje se od proizvoda odvajaju elektromagnetom [45].

Ove polimere odlikuju izuzetno mala difuziona ograničenja, a to predstavlja njihovu najveću prednost. Uglavnom se i koriste za imobilizaciju enzima čiji supstrati imaju velike molekulske mase (amilaza, glukoamilaza), upravo zbog te osobine.

#### Porozni nosači

Veoma velika aktivna površina po jedinici mase koju porozni nosači imaju omogućava imobilizaciju velikih količina enzima i čini ih idealnim za velike industrijske reaktore [46, 47].

Površina za imobilizaciju enzima nalazi u unutrašnjosti čestica, pa su difuziona ograničenja velika, što je glavni nedostatak ovih nosača. Zato porozni nosači moraju imati unutrašnju morfologiju koja dozvoljava, ne samo imobilizaciju velikih količina enzima, nego i laku dostupnost supstrata imobilizovanom enzimu. Kao i brzu difuziju proizvoda iz čestica.

Ovakvi tipovi nosača mogu da imaju veoma široku ili usko definisanu distribuciju pora. U slučaju široke distribucije pora samo mali broj pora je dostupan i supstratu i molekulima enzima. Zbog toga prednost imaju nosači sa strogo definisanom veličinom pora. Problem je što tačno determinisanu veličinu pora nije uvek lako dobiti za svaki nosač. U izboru nosača glavni faktor je inverzna veza između aktivne površine i veličine pora, Tabela 2.



**Tabela 2.** Zavisnost aktivne površina od veličine pora, zapremina pora 1,0 mL/g [37]

<b>Veličina pora (nm)</b>	<b>Aktivna površina (m<sup>2</sup>)</b>
7,5	356
12,5	214
24	111
37	72
70	38
125	21
200	13

U velikom broju slučajeva ovi nosači nemaju stabilne pore i imaju želatinoznu strukturu, tako da veoma često dolazi do njihovog sabijanja u reaktoru.

### **Podela na osnovu hemijskih osobina [37]**

Neorganski nosači

Neorganski nosači su prvi materijali na koje su enzimi imobilizovani [48]. Međutim organski polimeri su, zahvaljujući velikoj reaktivnosti, potisnuli neorganske nosače u imobilizaciji enzima u laboratorijskim uslovima. Neorganski nosači su nasuprot tome, pogodni za industrijsku imobilizaciju enzima. Oni imaju prednost, zahvaljujući nekim svojim osobinama u odnosu na većinu organskih polimera i to:

- visoka mehanička čvrstina
- termalna stabilnost
- otpornost prema organskim rastvaračima i mikrobima
- odličan poluživot skladištenja
- laka regeneracija pirolizom

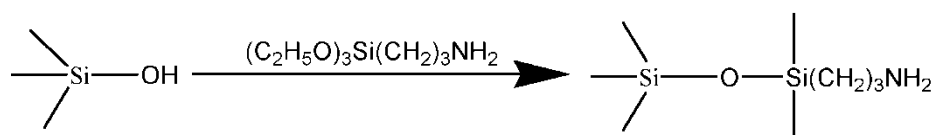
U industriji se koriste fabrički materijali sa tačno određenim karakteristikama ili jeftini prirodni materijali. Često se koriste veštački materijali za nosače, kao što je staklo sa kontrolisanom veličinom pora, u nedostatku većeg broja prirodnih makroporoznih

nosača. Neorganski nosači, se na osnovu toga koji je element najzastupljeniji u strukturi, mogu podeliti na makroporozne silikate, aluminosilikate, nosače na bazi ugljenika i nosače na bazi metala i metalnih oksida.

Makroporozni silikati mogu biti silika-gelovi, silohromi i makroporozna stakla. Kao prednosti silikatnih nosača treba navesti prisustvo čvrstog skeleta sa određenim veličinama pora, hemijsku inertnost prema mnogim rastvaračima, mehaničku postojanost, kao i otpornost prema mikroorganizmima [49-51].

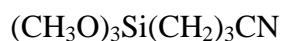
Silika-gel predstavlja amorfnu supstancu čija je opšta hemijska formula  $x\text{SiO}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ . Uglavnom se dobija u procesu starenja (polikondezacije) ortosilicijumove kiseline ( $\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) dok se u alkalnoj sredini polako rastvara. Ograničena oblast pH-stabilnosti i nespecifična adsorpcija su nedostaci silikatnih nosača.

Modifikacija silikata se izvodi da bi se uvele reaktivne grupe, smanjila rastvorljivost ili povećala stabilnosti nosača. Pokrivaju se različitim materijalima, npr. opnom oksida metala (aluminijuma, cirkonijuma, titana) ili polimerima (polietilenima). Mogu se hemijski modifikovati uvođenjem različitih reakcionih grupa (-CN, -NO<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>). Najrasprostranjenija je obrada nosača organo-silicijumovim jedinjenjima, silanima, Slika 8:

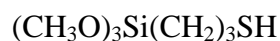


**Slika 8.** Reakcija aktivacije silikatnih nosača silanima

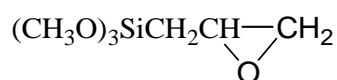
Nosači posle ove modifikacije postaju pogodni za kovalentnu imobilizaciju enzima. Pored ovog, za modifikaciju silikata se koriste i sledeći silikatni derivati:



$\gamma$ -cijanopropiltrimetoksisilan



$\gamma$ -merkaptopropiltrimetoksisilan



$\gamma$ -glicidoksiopropiltrimetoksisilan

Makroporozno staklo se pravi zagrevanjem određenih borosilikatnih stakala na 500-700 °C izvesno vreme, zatim tretmanom kiselinom, čime se stvara porozna struktura sa velikim sadržajem silicijuma [37]. Precizna kontrola fizičkog i hemijskog tretmana, omogućava da se dobiju staklene čestice različitog dijametra, sa uskim opsegom veličine pora. U zavisnosti od uslova fizičkog i hemijskog tretmana, srednja vrednost veličine pora može biti u rasponu od 4,5 do 400 nm.

Makroporozno staklo je nestabilno na pH iznad 8, tokom dugotrajne upotrebe. Oblepljuje se oksidima metala da bi mu se povećala ugopotrebljivost. Njegova visoka cena je najveća mana makroporoznog stakla.

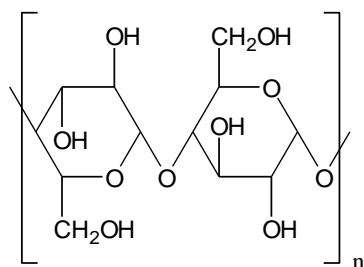
Alumosilikatne nosače predstavljaju dijatomejska zemlja, glina, zeolit ili porozna keramika. Odlikuju se velikom čvrstinom površinskih grupa.

Ugalj se može koristiti kao nosač posle aktivacije površinskih oksidnih grupa i kod adsorpcione i kod kovalentne imobilizacije. Prednost grafita je velika homogenost i električna provodljivost njegove površine, što je važno za biosenzore. Velika mana ovog nosača je loša mehanička čvrstina. Nov nosač karbohrom, stvoren je taloženjem ugljenika na granulovanu čađ. Time se kombinuje visoka mehanička čvrstina sa električnom provodljivošću grafitne čađi.

Nosači na bazi metala i oksida metala se odlikuju velikom mehaničkom čvrstinom, dobrim hidrodinamičkim osobinama, stabilnošću i pristupačnom cenom. Nosači na bazi aluminijum-oksida, titana, gvožđa i oksida gvožđa najčešće se koriste. Oni se dobijaju kao industrijski proizvodi u vidu makroporoznih praškova. Posle aktivacije nosača sa  $\gamma$ -aminopropiltrioksisilanom ili oksidima titana, enzim se na njih može imobilizovati adsorpcijom i kovalentno. Metalni oksidi sa feromagnetnim osobinama koriste se sve češće. Zbog svojih magnetnih svojstava i velike gustine oni se lako odvajaju od proizvoda u fluidizovanim reaktorima.

Organski nosači prirodnog porekla [37]

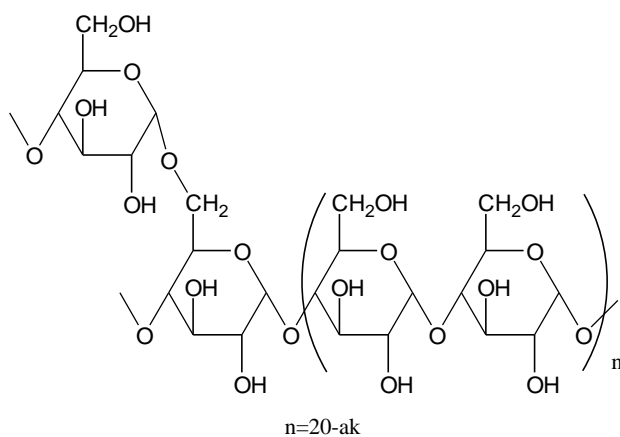
Celuloza kao najzastupljeniji prirodni polimer je jedan od prvih materijala iskorišćen za kovalentnu imobilizaciju enzima [52-54]. U svojoj strukturi ima  $\beta$ -1,4-glukopiranozilne jedinice povezane dodatnim intramolekulskim vodoničnim vezama, Slika 9.



**Slika 9.** Hemijska formula celuloze

Postoje različiti tipovi hemijski modifikovanih celuloza komercijalno dostupni to su uglavnom jonoizmenjivači. Može biti u vidu vlakana i sfernih kuglica.

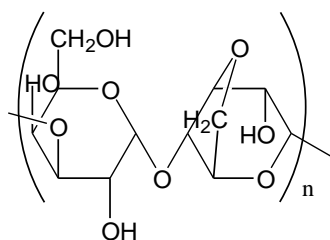
Skrob je prirodni polimer  $\alpha$ -D-glukopiranoze povezane 1,4-glikozidnim vezama gde približno na svakih dvadesetak jedinica dolazi jedna 1,6-glikozidna veza, Slika 10.



**Slika 10.** Hemijska formula skroba

Za imobilizaciju enzima skrob je od svih polisaharida najmanje pogodan, zbog sklonosti ka mikrobiološkoj kontaminaciji [55, 56]. Kao derivatizovana forma dialdehida dobijenog oksidacijom perjodatom on se najčešće koristi.

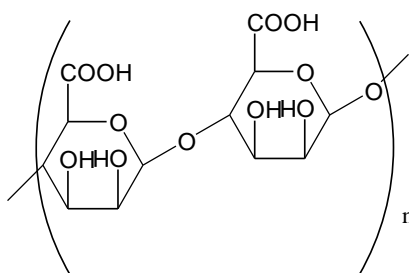
Agaroz je linearni polimer galaktoze izolovan iz agara (dobija se iz membrana nekih crvenih algi). Posедуje  $\beta$ -D-galaktopiranozil i 3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galaktopiranozil ostatke vezane naizmenično  $\alpha$ (1-4) i  $\beta$ (1-3) vezama, Slika 11.



**Slika 11.** Hemijska formula agaroze

Agarozni gelovi su dosta stabilniji od ostalih gelova i imaju veći dijametar pora. Otporni su na mikrobiološku kontaminaciju. Nedostatak im je što se ne mogu sterilisati i dezintegrišu se u alkalnoj sredini i organskim rastvaračima. Umrežavanjem sa epihlorhidrinom mogu se poboljšati mehaničke i ostale osobine agaroze.

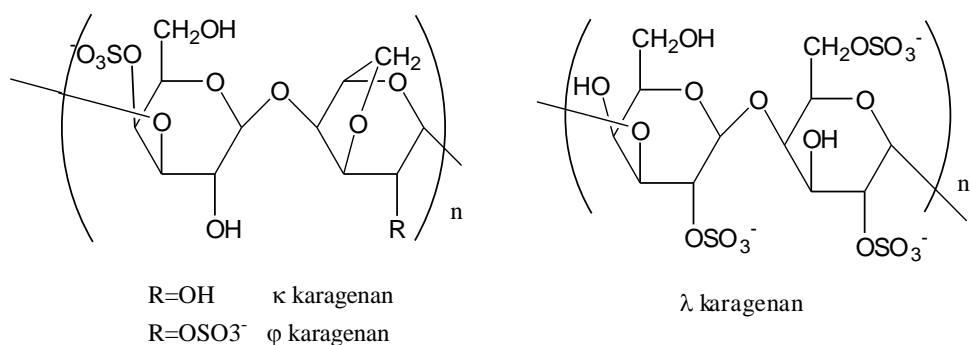
Alginat je glikuronan izolovan iz braon algi koji po hemijskoj strukturi predstavlja linearni polimer sastavljen od D-manuronske i L-guluronske kiseline, Slika 12.



**Slika 12.** Hemijska formula alginata

Jonotropnim geliranjem jonima kalcijuma formiraju se alginatni gelovi. Hemijski su veoma stabilni od pH 5 do 10. Dekarboksilacije alginata nastaje usled visoke temperature i visoke koncentracije kiselina. Alginatni gelovi su mehanički stabilni, osim u visokim koncentracijama kalijuma, magnezijuma, fosfata ili kompleksirajućih agenasa. Glavni nedostatak predstavlja curenje molekula enzima iz gela. Imobilizacija u alginatu je brza, jednostavna, blaga i jeftina. Ona se može primeniti za veliki broj makromolekula.

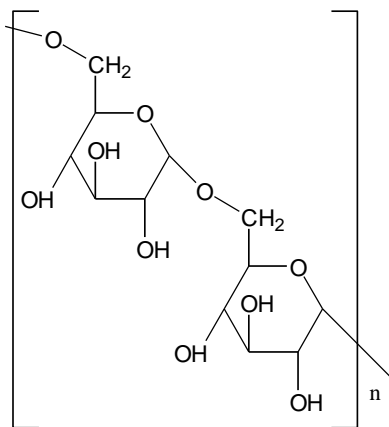
Karagenan je opšte ime za galaktane izolovane iz crvenih algi. Sastoji se od galaktoznih jedinica koje se delimično nalaze u anhidro formi, a delimično su esterifikovane sumpornom kiselinom, Slika 13.



**Slika 13.** Hemijska formula karagenana

Vrlo su slični po osobinama alginatu i agarozu. Od tri poznata tipa karagenana,  $\lambda$ ,  $\kappa$  i  $\iota$ , najbolji za imobilizaciju je  $\kappa$ . Gelove obično formiraju sa kalijumovim i kalcijumovim jonima na sobnim temperaturama, što je posledica formiranja dvostrukih heliksa. U prisustvu natrijumovih jona i na niskim pH vrednostima su nestabilni, zbog slabih glikozidnih veza između galaktoznih jedinica. Karagenan je iznad pH 4,5 stabilan, tako da se može i sterilisati toplotom.

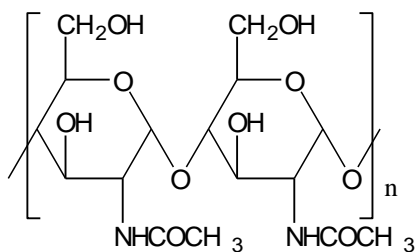
Dekstran je polimer glukoze povezane  $\alpha$ -1-6 glikozidnom vezom, gde se pojavljuju i  $\alpha$ -1,2 1,3 i 1,4 glikozidne veze, Slika 14.



**Slika 14.** Hemijska formula dekstrana

Sephadex predstavlja dekstran umrežen epihlorhidrinom. Izrazito bubri u vodi, a pri sušenju se jako steže. Sephadex ima i manji broj karboksilnih grupa. To može da utiče na aktivnost enzima čiji su kofaktori metalni joni.

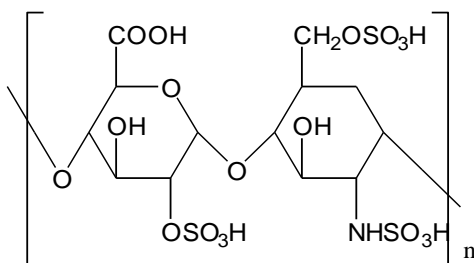
Hitin je polisaharidi koji sadrže acetilovanu amino grupu. Hitin se nalazi u oklopu insekata, kraba i rakova. Pojavljuje se i kao nus-proizvod u proizvodnji limunske kiseline i farmaceutskih sredstava, Slika 15.



**Slika 15.** Hemijska formula hitina

Poseduje poroznu strukturu. Nerastvoran je u vodi i organskim rastvaračima. Sastavljen je od jedinica 2-acetamido-2-dezoksi-D-glukopiranoze povezanih  $\alpha$ -1-4 glikozidnom vezom. Svaki šesti ostatak hitina nije acetilovan (2-amino-2-dezoksiglukoza). Deacilovanjem hitina u koncentrovanom NaOH može se dobiti hitozan rastvoran u vodi. Enzimi se najčešće imobilizuju na hitozan adsorpcijom, pa umrežavanjem glutaraldehidom. Hitozan se može u rastvornom obliku pomešati sa enzimom i onda želatinirati umrežavanjem sa glutaraldehidom ili jonotropski multivalentnim anjonima (heksacijanoferat, polifosfat, itd.). Kod enzima imobilizovanih na hitozanu zapaženo je bitno povećanje termostabilnosti.

Heparin je kiseli polisaharid koji sadrži naizmenično povezane molekule sulfatisane D-glukuronske kiseline i sulfatisanog glukozamina, Slika 16.



**Slika 16.** Hemijska formula heparina

Ima primenu za dobijanje u vodi rastvornih preparata imobilizovanih enzima, koji se u medicini upotrebljavaju za unošenje u ćeliju (*in vivo*).

Želatin se dobija iz rastvora kolagena kuvanjem u vodi. Nema mehaničku čvrstinu kao kolagen i zato se mora umrežavati multifunkcionalnim reagensima kao što je glutaraldehid. Enzimi se imobilizuju okludovanjem (temperaturno želiranje) ili kovalentnim kuplovanjem glutaraldehydom na površinu gela.

Kolagen je zastupljeniji konstitutivni protein viših vertebrata. Tako da predstavlja vrlo dostupan nosač u velikim količinama. Ima dosta dobrih osobina kao što su velika hidrofilitnost što obezbeđuje pristup enzimima na mesto vezivanja, a otvorena unutrašnja struktura obezbeđuje visoku koncentraciju vezivnih grupa. Enzimi se na njega imobilizuju adsorpcijom, kompleksiranjem, okludovanjem i kovalentnim vezivanjem.

Albumin se najčešće koristi za imobilizaciju enzima umrežavanjem glutaraldehydom i drugim multifunkcionalnim reagensima.

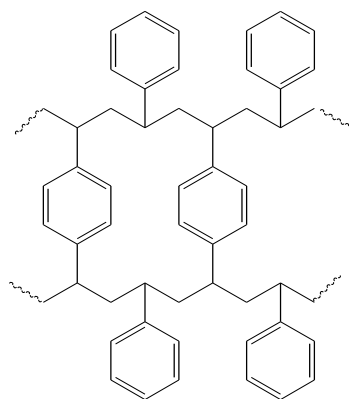
Svila po strukturi predstavlja  $\beta$ -keratine tj. ne sadrži ostatke cisteina. Posедуje dobru termalnu, hemijsku, biološku i mehaničku stabilnost. Upotreba svile zahteva površinsku aktivaciju. Koristi se aktivacija karboksilnih grupa metilovanjem, pa diazotovanjem hidrazinom i azotastom kiselinom.

Vuna po strukturi predstavlja  $\alpha$ -keratin i sadrži ostatke cisteina. Zato se na nju mogu imobilizovati enzimi preko sulfhidrilnih grupa. Ima veću mehaničku čvrstinu od svile.

Organski sintetski materijali [37]

Polistiren je prvi sintetički polimer upotrebljen kao nosač za imobilizaciju proteina. Nitrovanjem i redukcijom polistirena dobija se njegov glavni derivat aminopolistiren. Polistiren po strukturi predstavlja polimer vinil benzena. Umrežavanjem vinilbenzena i divinilbenzena pravi se makroporozni polistiren, Slika 17.

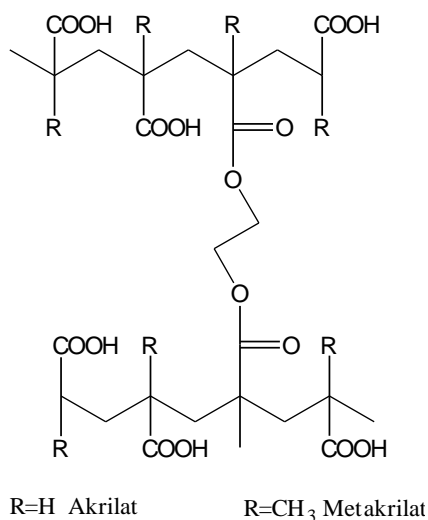




**Slika 17.** Hemijska formula polistirena

Zbog njegove hidrofobne prirode i pored visoke koncentracije aktivnih grupa, količina vezanih proteina i prinosi imobilizacije su obično mali. Hidrofobnost se može prevazići kopolimerizacijom sa hidrofilnijim monomerima, kao što su akrilna kiselina i metakrilna kiselina. Glavna prednost ovog polimera je njegova niska cena i laka dostupnost (Dowex, Amberlite, Wofatit).

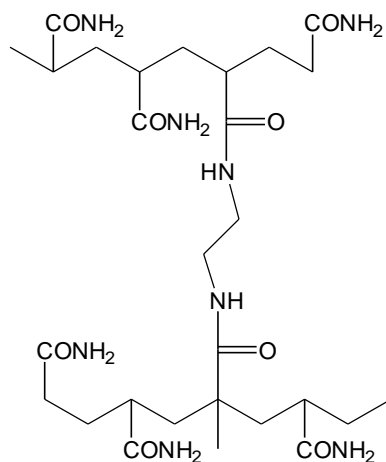
Poliakrilati i polimetakrilati se dobijaju kopolimerizacijom akrilne odnosno metakrilne kiseline sa nekim divinilnim monomerom, Slika 18.



**Slika 18.** Hemijska formula poliakrilata i metakrilata

Koriste se uglavnom u kopolimerima za dobijanje negativno naelektrisanih nosača. Uglavnom se aktiviraju karbodiimidima.

Poliakrilamid i njegovi derivati su najčešće korišćeni polimeri za imobilizaciju enzima. Zbog rastvorljivosti linearnih polimera u vodi talože se umrežavanjem bifunkcionalnim jedinjenjima. Koriste se u biohemiji, za elektroforezu i umrežavaju se N,N-metilen-bisakrilamidom, Slika 19.

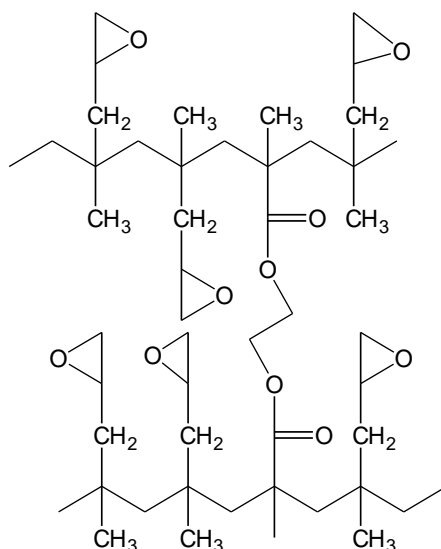


**Slika 19.** Hemijska formula poliakrilamida

Enzimi se najčešće na njih imobilizuju enkapsulacijom, mada se često i kovalentno vezuju za lance polimera.

Polihidroksialkilmetakrilati su hidrofilni organski polimeri. Oni po sadržaju hidroksilnih grupa odgovaraju polisaharidima sa povećanom mehaničkom čvrstinom i rezistencijom na mikrobiološku degradaciju. Makroporozni nosači se dobijaju suspenzionom kopolimerizacijom hidroksialkil metakrilata i umrežavajućeg reagensa (etilendimetakrilatom se dobija Spheron-Lachema).

Poliglicidilmetakrilati su nosači koji sadrže epoksidne grupe, što omogućava direktno kuplovanje enzima za nosač. Znači bez prethodne aktivacije i hemijske modifikacije polimera. Umrežavanjem glicidilmetakrilata i etilenglikoldimetakrilata dobijaju se makroporozni glicidilmetakrilati, Slika 20.

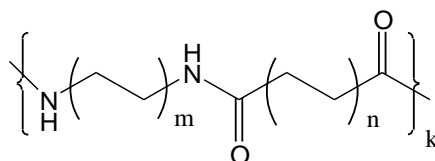


**Slika 20.** Hemijska formula glicidilmetakrilata (Eupergita)

Oksiranska grupa u reakciji sa aminima i drugim funkcionalnim grupama gradi izrazito stabilne veze koje se ne hidrolizuju u vodenim rastvorima. Prodaju se pod nazivom Eupergit, kao komercijalni proizvod [57, 58].

Vinilni i alilni polimeri su enzimski nosači koji imaju neutralne i hidrofilne karakteristike. Oni se mogu dobiti hemijskim modifikacijama polivinil-alkohola, polialil-alkohola ili viniletarskih kopolimera. Hemijskom modifikacijom polialilnih alkohola se mogu dobiti reaktivne forme sa izocijanatnim grupama koje služe kao umrežavajući reagens. Dobijeni nerastvorni polimer može direktno vezati kovalentno enzim preko izocijanatnih grupa.

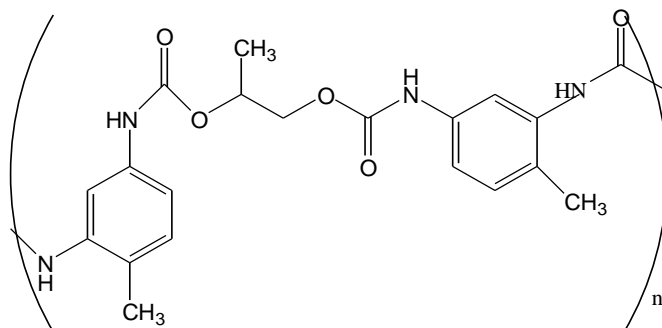
Poliamidi su kopolimeri  $\alpha,\omega$ -dikarbonskih kiselina i  $\alpha,\omega$ -diamina, Slika 21.



**Slika 21.** Hemijska formula poliamida

Mogu se sintetisati u vidu membrana, vlakana, prahova i cevi. Mehanička čvrstina, biološka rezistencija i relativna hidrofilnost su dobre osobine ovih polimera. Moraju se aktivirati za imobilizaciju, pa je neophodna delimična kisela hidroliza [59].

Poliuretani su polimeri koji se mogu dobiti reakcijom izocijanata sa polioliima (2,4-tolilen-diizocijanat i triol npr.), Slika 22.



**Slika 22.** Hemijska formula poliuretana

Oni su stabilniji od poliamida u vodi i u prisustvu oksidacionih sredstava.

Direktno vezivanje enzima na nosač dozvoljavaju kopolimeri anhidrida maleinske kiseline i etilena, zahvaljujući visokom sadržaju negativnih karboksilatnih grupa. Neutralizacija negativne šarže se može izvesti dodavanjem diamina tokom imobilizacije. To dodatno poboljšava vezivanje enzima za nosač.

### 3.4. Kinetika imobilizovanih enzima

#### Osnovni termini u enzimologiji [60]

Katal je ona količina enzima koja pod standardnim uslovima razgradi 1 moL supstrata (napravi 1 moL proizvoda) u jednom sekundu. Katal je  $6 \times 10^7$  puta veći od IU, odnosno  $1 \text{ IU} = 16,67 \text{ nkat}$ .

Internacionalna jedinica enzimске aktivnosti predstavlja onu količinu enzima koja pod standardnim uslovima transformiše 1  $\mu\text{mol}$  supstrata (nagradi 1  $\mu\text{mol}$  proizvoda) za 1 minut. Standardni uslovi podrazumevaju optimalni pH, zasićujuću koncentraciju supstrata i temperaturu od 25 °C (najčešće), 30 °C ili 37 °C.

Specifična aktivnost predstavlja broj jedinica enzimske aktivnosti po miligramu proteina. Ona je merilo čistoće proteina i njegove katalitičke moći.

Koncentracija enzimske aktivnosti predstavlja broj jedinica enzimske aktivnosti po jedinici zapremine rastvora enzima (IU/mL ili kat/L). Ona je merilo koncentracije enzimske aktivnosti tj. koncentracije enzima.

Molekulska aktivnost (turnover number) je broj jedinica enzimske aktivnosti u katalima po jednom molu enzima ili broj molekula supstrata koji preradi 1 molekul enzima u jednoj sekundi. Ona je merilo katalitičke moći molekula enzima

Aktivnost katalitičkog centra (katalitička konstanta  $k_{cat}$ ) je molekulska aktivnost podeljena sa brojem aktivnih mesta u jednom molekulu enzima ili broj molekula supstrata koje preradi 1 aktivni centar u jednoj sekundi. Ona je merilo katalitičke moći aktivnog centra enzima.

Jednačina Mihaelis-Mentenove

Jednačina Mihaelisa i Mentenove opisuje zavisnost početne brzine enzimske reakcije od početne koncentracije supstrata.

$$V_o = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad V_{max} = k_{cat}[E]$$

[S] je koncentracija supstrata, a [E] koncentracija enzima.

Početna brzina ( $V_o$ ) predstavlja brzinu enzimske reakcije u trenutku  $t=0$  po uspostavljanju "steady state" stanja, kada je manje od 5 % supstrata razgrađeno.

Maksimalna brzina ( $V_{max}$ ) je najveća početna brzina koju enzim može postići povećanjem koncentracije supstrata. Proporcionalna je količini enzima.

$K_m$  je koncentracija supstrata kada je početna brzina dostigla polovinu maksimalne.

$k_{cat}$  je aktivnost katalitičkog centra enzima i konstanta brzine za enzimsku reakciju kada je enzim zasićen supstratom tj. za visoke koncentracije supstrata.

$k_{cat}/K_m$  predstavlja specifičnost enzima ka supstratu i konstantu brzine enzimске reakcije za male koncentracije supstrata

### **Kinetički parametri imobilizovanog enzima [61]**

Specifična aktivnost imobilizata predstavlja broj mikromolova supstrata koje će jedinica mase imobilizovanog enzima sa nosačem transformisati u jednom minutu pod standardnim uslovima. Ona je merilo aktivnosti imobilizata i obično se izražava u IU/g. Za ocenu uspešnosti imobilizacije enzima to je najvažniji faktor, jer od njega zavisi i produktivnost imobilizata.

Prinos imobilizacije predstavlja odnos specifične aktivnosti imobilizata i količine vezanih enzimskih jedinica na jedinicu mase nosača. Obično je prinos imobilizacije manji od jedan. Znači stvarna aktivnost imobilizovanog enzima je manja od njegove aktivnosti u rastvoru pre imobilizacije. To je posledica inaktivacije enzima tokom imobilizacije i difuzionih ograničenja (brzinu reakcije određuje brzina difuzije supstrata i proizvoda do i od enzima)

Prinos imobilizacije predstavlja u stvari procenat iskorišćenosti enzimске aktivnosti u imobilizovanom obliku. Za ocenu uspešnosti imobilizacije kod skupih enzima, prinos imobilizacije predstavlja važan faktor.

Na kinetičke parametre enzima imobilizacija utiče na dva načina. Pri imobilizaciji enzima može doći do promene konformacije enzima i samim tim i njegovih fizičko-hemijskih osobina kao što su  $K_m$  i  $V_{max}$ . Enzim može i da sačuva svoju konformaciju, pa da ima iste fizičko-hemijske osobine kao i njegov slobodan oblik u rastvoru, ali da se zbog uticaja difuzije i različite raspodele supstrata unutar nosača i okolnog rastvora, izmerene vrednosti razlikuju od vrednosti za nativni enzim. Tada dobijamo prividne kinetičke konstante, koje ne odgovaraju pravim konstantama enzima.

$K_m$  enzima se može prividno povećati ili čak smanjiti po uticajem koeficijenta raspodele supstrata. Koeficijent raspodele predstavlja odnos koncentracije supstrata u okolnom rastvoru i koncentracije unutar čestica nosača.

$$P = \frac{[S]_r}{[S]_n} \quad K_{m \text{ priv}} = K_m * P$$

$[S]_r$  je koncentracija supstrata u okolnom rastvoru,  $[S]_n$  je koncentracija supstrata unutar nosača.  $P$  je koeficijent raspodele i  $K_{m \text{ priv}}$  je prividna Mihaelis-Mentenova konstanta.

U slučaju se koncentracija supstrata unutar čestica nosača smanji, što je posledica visoke enzimске aktivnosti i male brzine difuzije, onda se prividna Mihaelis-Mentenova konstanta povećava i smanjen je afinitet ka supstratu. Ukoliko se koncentracija supstrata unutar čestica nosača poveća u odnosu na koncentraciju supstrata u okolnom rastvoru onda se afinitet enzima ka supstratu povećava, što može biti poželjno kod enzima koji imaju slabu aktivnost i mali afinitet ka supstratu. Koeficijent raspodele manji od jedan se postiže ukoliko je npr. nosač suprotnog naelektrisanja u odnosu na supstrat.

$V_{\max}$  se smanjuje za faktor efikasnosti i smanjenje je posledica inaktivacije enzima tokom imobilizacije i unutrašnje difuzije. Uticaj spoljašnje difuzije je minimalan jer se radi sa visokim koncentracijama supstrata pri određivanju maksimalne brzine.

Kada se enzimska reakcija odvija sporije od brzine difuzije supstrata iz spoljašnjeg rastvora do same površine čestice onda je enzimska reakcija kontrolisana spoljašnjom difuzijom. Ako je spoljašnja difuzija brža od enzimске reakcije, a ona opet brža od brzine difuzije supstrata od površine čestice do unutrašnjosti čestice, onda imamo enzimsku reakciju kontrolisanu unutrašnjom difuzijom. U slučaju da je najsporiji stupanj sama enzimska reakcija, onda imamo kinetički kontrolisanu enzimsku reakciju.

Samu brzinu reakcije određuje brzina difuzije supstrata ( $V_{\text{dif}}$ ) iz rastvora do površine čestice i ona je data izrazom:

$$V_{\text{dif}} = k_s a (C_{\text{sr}} - C_s) = V_{\max} C_s / (K_m + C_s)$$

$C_{\text{sr}}$  je koncentracija supstrata u okolnom rastvoru, a  $C_s$  koncentracija supstrata na površini čestice.  $k_s$  je konstanta difuzije, a je površina čestice. Što je koncentracija supstrata u spoljašnjem rastvoru veća to je manji uticaj difuzije.

U kojoj meri brzinu reakcije određuje unutrašnja difuzija opisuje Tilov modul ( $u$ ).

$$u = \frac{r}{3} \sqrt{\frac{V_{\max}}{K_m D_e}}$$

$r$  je poluprečnik čestice,  $D_e$  difuziona konstanta supstrata. Efektivnost predstavlja odnos brzine reakcije imobilizovanog enzima i brzine koju bi taj enzim imao u rastvoru.

$$\eta = V_{\text{imobilizat}}/V_{\text{rastvoran}}$$

Faktor efikasnosti zavisi od Tilovog modula i koncentracije supstrata. Što je koncentracija supstrata veća, to je difuzija brža i samim tim ima manji uticaj na brzinu reakcije, tj. faktor efikasnosti je približno 1. Pri malim koncentracijama supstrata difuzija dolazi do izražaja.

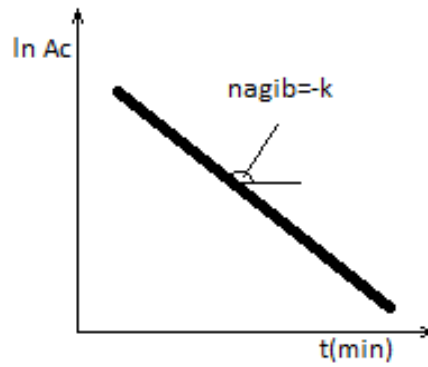
Termostabilnost,  $k_{in}$

Enzimi se vremenom inaktiviraju i ta brzina inaktivacije zavisi od temperature. Što je temperatura veća to je stabilnost enzima manja. Enzimaska aktivnost se smanjuje u funkciji vremena po eksponencijalnoj zavisnosti prvog ili drugog reda, što zavisi od samog mehanizma denaturacije. Najčešće se smanjenje aktivnosti dešava po kinetici prvog ili drugog reda [62]:

$$A_t = A_0 e^{-kt} \qquad A_t = A_{01} e^{-kt} + A_{02} e^{-lt}$$

$A_0$  je početna aktivnost imobilizata,  $A_{01}$  i  $A_{02}$  početne aktivnosti različitih formi imobilizovanog enzima,  $A_t$  je aktivnost imobilizata u trenutku  $t$  dok su  $k$  i  $l$  inaktivacione konstante. Eksperimentalno se konstanta inaktivacije prvog reda određuje crtanjem grafika zavisnosti  $\ln A_t$  od  $t$ , .Slika 23





**Slika 23.** Zavisnost logaritme aktivnosti enzima od vremena inaktivacije

Iz inaktivacione konstante se može izračunati poluživot enzima na toj temperaturi.

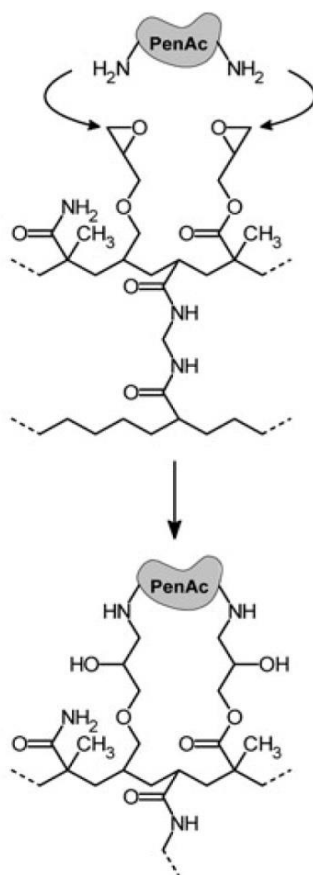
$$t_{1/2} = \ln(1/2) / -k$$

Crtanjem zavisnosti  $\ln(k)$  od recipročne vrednosti temperature može se izračunati i energija aktivacije za denaturaciju enzima i predvideti brzina denaturacije enzima na bilo kojoj temperaturi.

## 4. MAKROPOROZNI KOPOLIMERI KAO NOSAČI ZA IMOBILIZACIJU ENZIMA

### 4.1. Eupergit C

Eupergit® C (Slika 24) je makroporozni kopolimer metakrilamida, glicidilmetakrilata i alilglicidil etra, umrežen sa N,N'-metilen-bis(metakrilamidom), sa prosečnom veličinom čestica 170  $\mu\text{m}$  i prečnikom pora 25 nm. Istraživači nemačke kompanije, Rohm, Darmstadt, Germany, razvili su i komercijalizovali Eupergit 70-ih godina. Eupergit® C je veoma hidrofilan i vezuje približno tri puta veću masu vode u odnosu na svoju masu. Zbog svoje strukture Eupergit je stabilan i hemijski i mehanički u pH opsegu od 0 do 14, ne bubri i ne kontrahuje se čak i pri drastičnim pH promenama [63-66] .

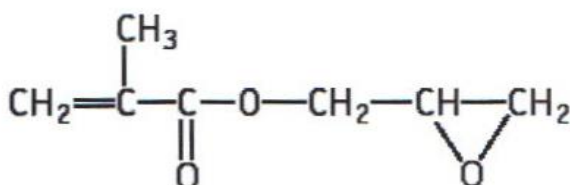


**Slika 24.** Struktura Eupergita C i enzima vezanog kovalentno višestrukim vezama

Enzimi se kovalentno vezuju za Eupergit® C direktnim nukleofilnim napadom slobodnih amino grupa na epoksidne grupe na nosaču (Slika 24). Procedura se izvodi pri neutralnim ili alkalnim pH i dobijene veze su dugoročno stabilne unutar pH opsega od pH 1 do 12. Preporučuje se velika koncentracija soli (do 1 M fosfata), koja verovatno ispoljava efekat isoljavanja. Zbog velike gustine epoksidnih grupa na površini čestica nosača (600 μmol po g suvog Eupergita® C), molekul enzima može da formira višestruke veze (“višetačkasto vezivanje”), koje se smatraju glavnim faktorom doprinosa velikoj operacionoj stabilnosti enzima vezanih za Eupergit® C. Preostale epoksidne grupe mogu biti blokirane različitim reagensima (merkaptetanolom, etanolaminom, glicinom, itd.) da bi se sprečile neželjene reakcije nosača i proteina.

#### 4.2. Kopolimer glicidimetakrilata i etilenglikoldimetakrilata

Glicidimetakrilat (GMA, 2,3-epoksipropilmetakrilat) se smatra najpogodnijim monomerom za direktno dobijanje reaktivnih kopolimera. S obzirom na to da se epoksidna grupa koja se nalazi u molekulu GMA može relativno lako prevesti u hidroksilnu, keto, karboksilnu ili amino grupu i tako svojstva kopolimera prilagoditi različitim oblastima primene, u literaturi postoji veći broj radova posvećenih upravo kopolimerima GMA sa različitim monomerima, od kojih će ovde biti pomenuti samo makroporozni kopolimeri GMA i etilenglikoldimetakrilata (EGDMA), koji se koriste u hromatografiji (GC, GPC i HPLC), zatim za dobijanje kopolimera koji mogu da stvaraju komplekse sa različitim metalima, specijalnih jonoizmenjivača, katalizatora, nosača enzima, itd.



Slika 25. Struktura glicidimetakrilata

Švec je sa saradnicima pokazao da se makroporozni kopolimeri GMA i EGDMA mogu dobiti suspenzionom kopolimerizacijom GMA i EGDMA u prisustvu niskomolekulske inertne komponente u smeši monomera i inicijatora (monomerna

faza). Inertna komponenta se sastoji od cikloheksana (rastvarač) i dodekanola (nerastvarač za kopolimer). Čestice kopolimera GMA/EGDMA sintetizovane na ovaj način su sfernog oblika. Udeo čestica nepravilnog oblika je mali (oko 5%) i raste sa povećanjem brzine mešanja, udela umreživača u monomernoj fazi i udela dodekanola u inertnoj komponenti. Raspodela veličina čestica sintetizovanih kopolimera GMA/EGDMA je vrlo uska. Najviše su zastupljene čestice dimezija 250-400  $\mu\text{m}$  (60-85 mas%). Prema Švec-u i saradnicima na parametre porozne strukture makroporoznih kopolimera GMA/EGDMA, najviše utiču: udeo umreživača, EGDMA, u reakcionoj smeši, udeo inertne komponente u reakcionoj smeši i udeo dodekanola u inertnoj komponenti [67-70].

Sa povećanjem udela umreživača EGDMA dolazi do povećanja specifične površine, dok zapremina pora opada. Suprotno tome, sa povećanjem udela dodekanola u inertnoj komponenti, nastaju pore veće zapremine, a specifična površina opada.

Kopolimeri GMA/EGDMA se, osim postupkom suspenzione kopolimerizacije, mogu sintetisati i u kalupu. Švec i saradnici su sintetizovali makroporozne ravne ploče (membrane) kopolimerizacijom GMA i EGDMA. Sastav reakcione smeše je bio isti kao za odgovarajuće sinteze suspenzionom kopolimerizacijom.

Prema eksperimentalnim rezultatima ovih autora, konverzija monomera u kopolimer je vrlo brza i dostiže 100% za oko 2 časa. Specifična površina poroznog proizvoda se menja i nakon dostizanja konverzije od 100%, a svoju krajnju vrednost dostiže tek nakon 3 časa od početka kopolimerizacije. Dalje zagrevanje je praćeno restrukturiranjem i promenama u morfologiji unutar membrane. Krajnji proizvod garantovanih osobina se dobija kopolimerizacijom u trajanju 3-4 časa.

Brzina kopolimerizacije zavisi i od koncentracije umreživača u smeši za kopolimerizaciju. Povećanje udela EGDMA usporava kopolimerizaciju, najverovatnije zbog povećane mogućnosti ciklizacije.

Pokazalo se da porozne čestice nastale suspenzionom kopolimerizacijom i kopolimer dobijen u kalupu, pri istom sastavu monomerne smeše, inertne komponente i pri istoj temperaturi kopolimerizacije, imaju bitno različitu makroporoznu strukturu. Kopolimerizacijom u kalupu u prisustvu inertne komponente nastaju kopolimeri sa vrlo velikim porama čije dimenzije prelaze 1000 nm i za red veličine su veće nego kod kopolimera sintetizovanih u suspenziji. Kopolimer sintetizovan u kalupu ima dve različite vrste pora-velike kanale i uobičajne difuzione pore.

Zapaženo je da se na nižim temperaturama dobijaju kopolimeri sa većim prečnicima pora.

Kopolimeri GMA/EGDMA sintetizovani pri većem udelu dodekanola u smeši cikloheksanol/dodekanol imaju veće pore. Dodekanol je, naime, bolje taložno sredstvo za kopolimer GMA/EGDMA od cikloheksanola, pa do razdvajanja faza dolazi ranije u sistemu u kojem je prisutno više dodekanola. Takođe, ovakav uticaj dodekanola je slabije izražen pri nižim temperaturama, jer je brzina kopolimerizacije mala, tako da uvek nastaju velike pore. Suprotno tome, uticaj dodekanola je dominantan pri temperaturama od 70-80°C.

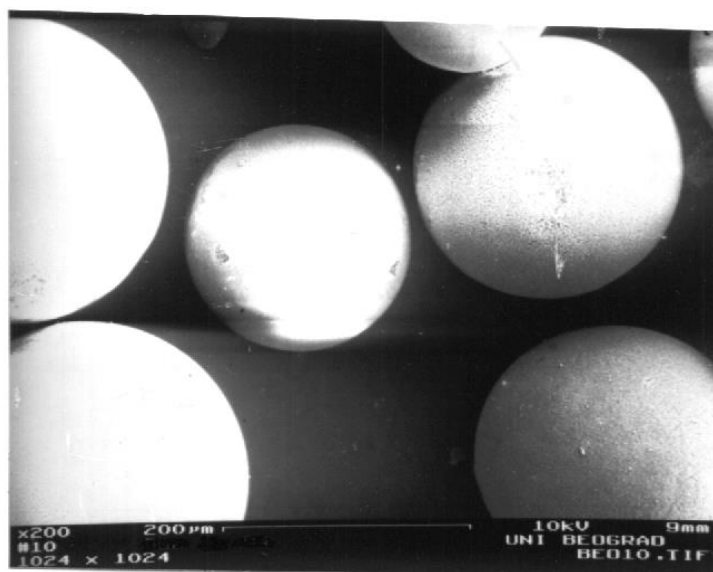
Povećanje udela umreživača u smeši monomera uzrokuje pomeranje raspodele veličina pora ka manjim porama.

Makroporozni poliglicidil-metakrilat koji je u prethodnim istraživanjima sintetisan je pokazao veoma veliku aktivnu površinu sa usko definisanim opsegom veličine pora, Tabela 3.

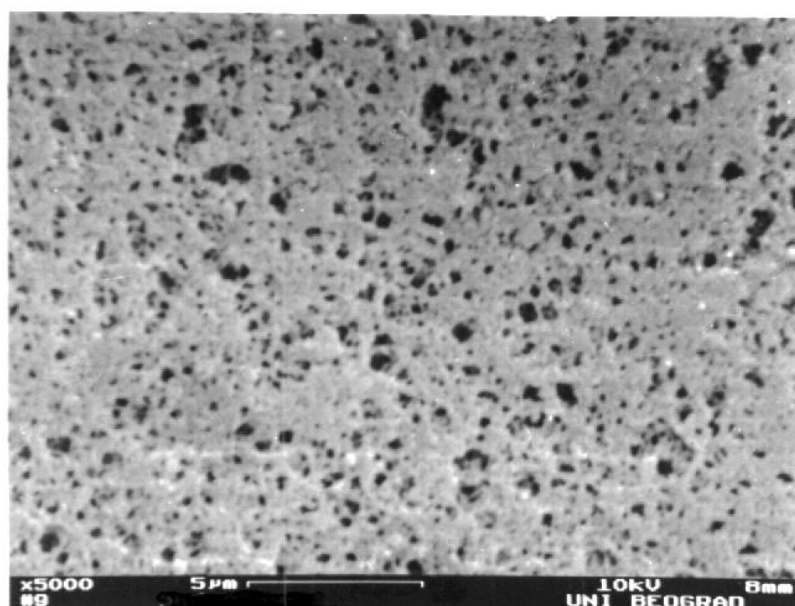
**Tabela 3.** Karakteristike makroporoznog glicidil-metakrilata [71, 72]

Vrsta polimera	Aktivna površina (m <sup>2</sup> )	Zapremina pora (mL/g)	Poroznost polimera (%)	Dijametar pora (nm)	Koncentracija epoksidnih grupa (mmol/g)
SGE 10/12	50	0,610	42	53	2,08
SGE 15/16	34	1,020	55	200	2,48

To se može videti i na elektronskim mikrografijama čestica jednog od polimera dobijenih po metodi Prof Jovanovića [72]. Tako se na najmanjem uveličanju vidi da su dobijene kuglice sfernog oblika Slika 26.

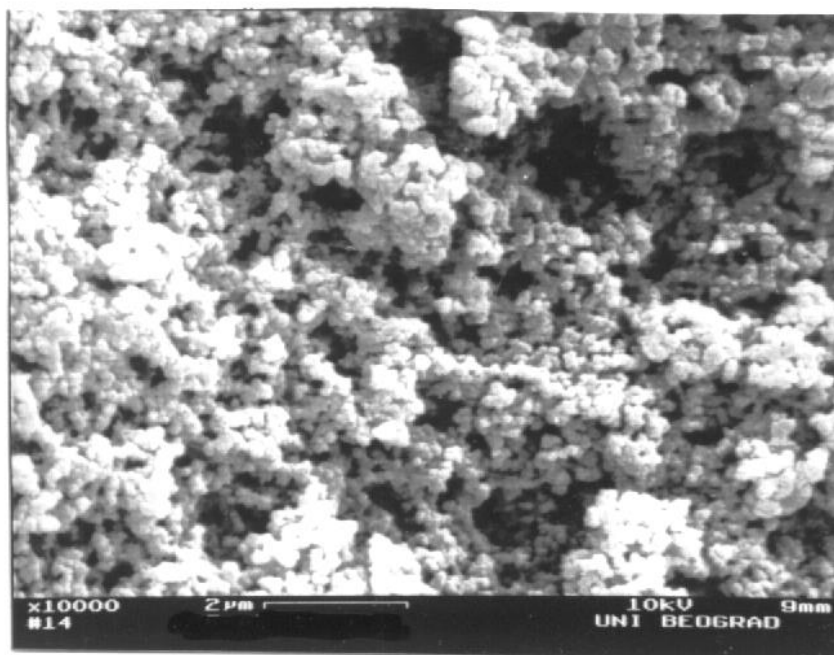


**Slika 26.** Elektronska mikrografija kuglica SGE 10/16 pri uveličanju od 200.  
Na nešto većem uveličanju je dobijena slika porozne strukture površine kuglice, Slika 27.



**Slika 27.** Elektronska mikrografija površine kuglice SGE 10/16 pri uveličanju od 5000.

Dok se na najvećem uveličanju preloma kuglice vidi veoma velika poroznost same unutrašnjosti makroporoznog glicidil metakrilata dobijenog po metodi Prof Jovanovića, Slika 28.



**Slika 28.** Elektronska mikrografija preloma kuglice SGE 10/16 pri uveličanju od 10000.

Kiselo baznom titracijom nakon aktivacije polimera diaminima dobijena je koncentracija jonizabilnih grupa na polimeru u rasponu od 0,2 do 1,2 mmol/g, Tabela 4.

**Tabela 4.** Zavisnost koncentracije jonizabilnih grupa na polimeru od šarže polimera i vrste aktivacije

<b>Vrsta polimera</b>	<b>Koncentracija jonizabilnih grupa (mmol/g)</b>
SGE 10/12 aktiviran etilen-diaminom stari	1,18
SGE 10/12 aktiviran amonijakom	0,47
SGE 10/12 aktiviran etilen-diaminom	0,81
SGE 10/12 aktiviran heksmetilen-diaminom	0,40
SGE 15/16 aktiviran amonijakom	0,18
SGE 15/16 aktiviran etilen-diaminom	0,37
SGE 15/16 aktiviran heksametilen-diaminom	0,54

Vlažna masa polimera u odnosu na suhu masu polimera iznosio 3,30.

#### **4.4. Primeri imobilizacije peroksidaze na makroporoznim nosačima**

Peroksidaza iz rena je do sada imobilizovana na makroporoznim kuglicama silicijuma SBA-15 sa prosečnim dijametrom pora od 7,6 nm. Usled velike uređenosti površine i uskog raspona veličine pora dobijeni preparat imobilizovane peroksidaze je pokazao izuzetnu stabilizaciju u prisustvu haotropnih agenasa kao što je urea i guanidijum hidrohlorid kao i veliko povećanje termostabilnosti na 70 °C. Jedini nedostatak je bio smanjenje aktivnosti imobilizovane peroksidaze [73].

Imobilizacijom peroksidaze na magnetnim kuglicama kopolimera poliglicidil metakrilata i polimetilmetakrilata dobijen je preparat imobilizovane peroksidaze sa 3,35 mg/g vezanog enzima i zadržavanjem aktivnosti od 79% nakon imobilizacije [74]. Dobijeni preparat je nakon 2 dana kontinualne upotrebe u reaktoru za oksidaciju p-hlorofenola zadržao 80% polazne aktivnosti.

Peroksidaza je imobilizovana i na makroporozno funkcionalizovano staklo sa amino grupama na svojoj površini uz povećanje termostabilnosti [75].



## 5. IMOBILIZACIJA ENZIMA U ALGINATU

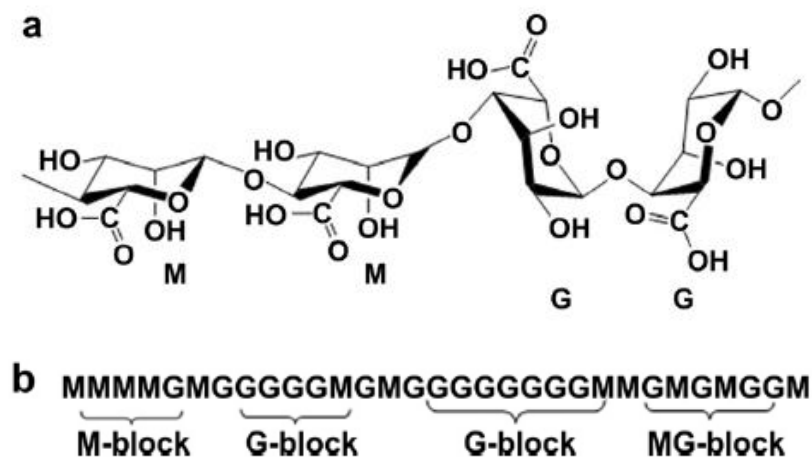
Alge su velika grupa organizama u koju spadaju raznovrsni oblici, od jednoćelijskih do višćelijskih. To su autotrofni organizmi koji u procesu fotosinteze iz neorganskih materija (ugljen-dioksida i vode), uz pomoć Sunčeve svetlosti i hlorofila stvaraju organsku materiju i kiseonik. Od organskih materija koje se nalaze u algama od velikog značaja su polisaharidi. Polisaharidi algi kao i polisaharidi viših biljaka sadrže D-glukozu i D-galaktozu. Najzastupljeniji polisaharidi su:

1. Alginska kiselina i alginati
2. Agar i karagen
3. Kompleksni polisaharidi zelenih algi

### 5.1. Istorijski uvod

Prvi je alginat predstavio hemičar E.C.C. Stanford 1881. godine. On je opisao izolovanje algininske kiseline iz smeđih algi. 1883. godine objavio je rad u kom je izneo pretpostavku da alginat sadrži azot u svojoj strukturi i tako je doprineo razjašnjenju hemijske strukture alginata. Dve grupe istraživača su 1926. godine došle do istog zaključka: u sastav alginata ulaze uronske kiseline. Ubrzo nakon toga usledilo je otkriće da se hidrolizat alginata sastoji od odgovarajuće uronske kiseline: D-manuronske kiseline. Priroda veze između ostataka uronskih kiselina otkrivena je 1939. godine. 1955. godine Fisher i Dorfel su hromatografskim istraživanjem došli do zaključka da u sastav alginata pored D-manuronske kiseline ulazi i L-glukuronska kiselina [76].

Danas je poznato da je alginat anjonski kopolimer koji se sastoji od manuronskih kiselina (M- blok) i glukuronskih kiselina (G-blok). Manuronske kiseline su povezane  $\beta$ -(1-4) glikozidnim vezama, dok su glukuronske kiseline povezane  $\alpha$ -(1-4) glikozidnim vezama. Alginat se može hidrolizovati, pri čemu se dobijaju 3 frakcije. To je dokaz da se alginat sastoji od naizmenično povezanih homo i heterooligomera (MM, GG i MG), Slika 29.



**Slika 29.** Struktura alginata: (a) konformacija lanca (b) raspored blokova

Alginati nemaju regularnu ponavljajuću sekvencu. Važno je napomenuti da različiti izvori alginata daju polimere sa različitim hemijskim strukturama. Tako na primer alginat dobijen iz bakterija sadrži veći udeo G-blokova, što se odražava na njegovu krutost.

## 5.2. Dobijanje alginata

Komercijalno dostupan alginat dobija se danas uglavnom iz smeđih algi. Alginat se nalazi u njihovom intracelularnom matriksu u obliku gela sa natrijumovim, kalcijumovim i magnezijumovim jonima. Prvi korak u ekstrakciji alginata iz algi jeste otklanjanje jona. To se vrši dodatkom 0,1-0,2M mineralne kiseline. Ovako se dobija nerastvoran alginat u obliku svoje kiseline, koji se potom prevodi u rastvoran oblik dodatkom natrijum-karbonata ili natrijum-hidroksida. Kako bi se otklonile nečistoće vrši se prosejavanje, flotacija, centrifugiranje i filtracija. Natrijum-alginat se potom taloži dodatkom alkohola, kalcijum-hlorida ili neke mineralne kiseline. Dobijeni proizvod se potom suši i melje [77].

Alginat dobijen na ovaj način sadrži nečistoće zbog kojih nije pogodan za biomedicinsku primenu. Ultračisti alginati se mogu dobiti korišćenjem rigoroznijih tehnika. Za otklanjanje mitogenskih nečistoća koristi se elektroforeza slobodnog protoka, koja nije pogodna za proizvodnju velike količine alginata, jer je skupa i zahteva dosta vremena. Zbog toga se koristi drugi princip koji se zasniva na korišćenju

barijum-alginata. Barijumovi joni pokazuju veći afinitet prema alginatu u poređenju sa kalcijumovim jonima, pa su i dobijeni alginati stabilniji. Za dobijanje alginata na ovaj način koristi se ekstrakcija sa etanolom, rastvaranje u alkalnom rastvoru i dijaliza. Nakon dijalize alginat se taloži dodatkom etanola [77].

### 5.3. Fizičke osobine alginata

Fizičke osobine značajno utiču na stabilnost gelova, brzinu oslobađanja lekova iz gelova, kao i na funkciju ćelija enkapsuliranih u alginatnim gelovima.

Molekulska masa komercijalno dostupnog alginata se kreće od 32.000 do 400.000g/mol. Povećanje molekulske mase može poboljšati osobine hidrogela. Međutim, rastvor alginata napravljen od polimera velike molekulske mase često postaje jako viskoznan što je nepovoljno prilikom njegovog daljeg korišćenja. Elastičnost gelova se može povećati korišćenjem kombinacije polimera velike i male molekulske mase. Time će se viskoznost rastvora samo u maloj meri povećati [76].

Rastvorljivost alginata u vodi zavisi od 3 faktora:

1. pH rastvarača
2. jonske jačine medijuma
3. prisustva gelirajućih jona u rastvaraču.

Da bi se alginat rastvorio vrednost pH mora da bude optimalna. Menjanje jonske jačine medijuma utiče na osobine rastvora, kao što su konformacija polimera, dužina lanca i viskoznost. Alginat gelira u prisustvu dvovalentnih katjona kao što su  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  i  $\text{Sr}^{2+}$ . Zbog toga je neophodno da u vodenom rastvoru ovi joni ne budu prisutni kako bi se omogućilo rastvaranje [78].

Rastvorljivost alginata zavisi od oblika u kom se nalazi karboksilna grupa. Alginat u kom se karboksilne grupe nalaze u protonovanom obliku ne rastvara se ni u jednom ispitanom rastvaraču, uključujući i vodu. Da bi alginat bio rastvoran karboksilne grupe prisutne u alginatnoj kičmi moraju biti deprotonovane. Natrijum-alginat se rastvara u vodi, ali se ne rastvara u organskim rastvaračima. Alginat preveden u tetrabutilamonijum so rastvara se u vodi, etilen-glikolu i polarnim aprotičnim rastvaračima [78].

## 5.4. Hidrogelovi

Hidrogelovi su trodimenzionalne mreže, koje se sastoje od hidrofilnih polimera sa visokim sadržajem vode. Kada su ćelije uključene u hidrogelove njihovo bubrenje olakšava transport hranljivih materija u ćeliju i iz nje. Alginat je hidrofilan i rastvorljiv u vodi, zgušnjava se u neutralnim uslovima, što je od velikog značaja za građenje hidrogelova. Alginati koji se mogu koristiti u tkivnom inženjeringu mogu se svrstati u fizičke i kovalentne u zavisnosti od mehanizma geliranja. Za formiranje hidrogelova koriste se metode kao što su: jonske interakcije, fazni prelazi, umrežavanja i slobodno-radikalne polimerizacije. Pošto alginat nema informacionu strukturu za pozitivan biološki odgovor obično je neophodna modifikacija alginatnih hidrogelova [79].

Alginat sa dvovalentnim katjonima gradi hidrogelove koji su umreženi jonskim interakcijama. U povezivanju učestvuju pretežno G i MG blokovi. Zbog toga alginati koji sadrže veći udeo G-bloka grade jače gelove. Za umrežavanje se mogu koristiti  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$ .  $\text{Ca}^{2+}$  je katjon koji se najčešće koristi za formiranje hidrogelova. Za umrežavanje uz pomoć ovog katjona koriste se 2 metode. Prvi je difuzni metod koji podrazumeva da umrežavajući joni difunduju u alginatni rastvor iz spoljašnjeg izvora. Drugi metod je metod unutrašnjeg postavljanja u okviru kog je izvor jona smešten u unutrašnjosti alginatnog rastvora i biva oslobođen i spreman za umrežavanje dejstvom nekog pokretača. Za dobijanje gelova difuznom metodom ukapava se rastvor natrijum-alginata u rastvor kalcijum-hlorida, dok se za dobijanje gelova drugom metodom koriste nerastvorne soli kalcijuma kao što je kalcijum-karbonat. Jonski umreženi hidrogelovi imaju manju efikasnost, snagu i tvrdoću što ograničava njihovu primenu u regenerativnoj medicini [79].

Fazni prelazi se mogu koristiti za formiranje hidrogelova zato što se geliranje može izvesti samo povećanjem temperature iznad kritične vrednosti. Hidrogelovi koji na ovaj način nastaju imaju veliku primenu u tkivnom inženjeringu.

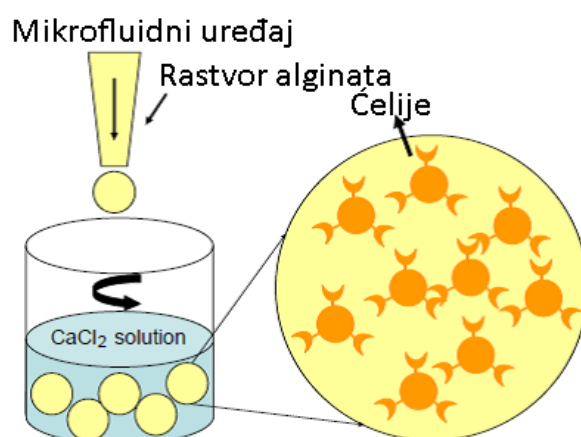
Specifične interakcije između receptora i liganda se mogu iskoristiti za umrežavanje alginatnih gelova. Alginat se sastoji od inertnih monomera kojima nedostaju odgovarajući ligandi kako bi mogli da grade hidrogelove. Kada se ćelije dodaju modifikovanom alginatu, receptori na površini ćelije mogu se vezati za ligande modifikovanog alginata. Modifikovani alginat se postepeno umrežava i grade se receptor-ligand interakcije između ćelijske površine i modifikovanog alginata. Iako

ovakvi hidrogelovi pokazuju veliku bioaktivnost, gelovi su tvrdi, a veze unutar njih su slabe, što ograničava njihovu primenu [79].

Proces slobodno-radikalske polimerizacije podrazumeva transformaciju linearnog polimera u trodimenzionalnu mrežu. Ovakva polimerizacija može da se sprovede na fiziološkom pH i temperaturi sa odgovarajućim hemijskim inicijatorima. Blagi uslovi geliranja omogućavaju ćeliji da bude inkapsulirana unutar polimera i da se zadrži u tom obliku dok god je to potrebno. Ovo obezbeđuje bolju vremensku i prostornu kontrolu nad procesom geliranja. Prednost ovakve polimerizacije je lakoća sa kojom različite hemikalije mogu da se ugrade u hidrogelove jednostavnim mešanjem makromolekula i potom kopolimerizacijom.

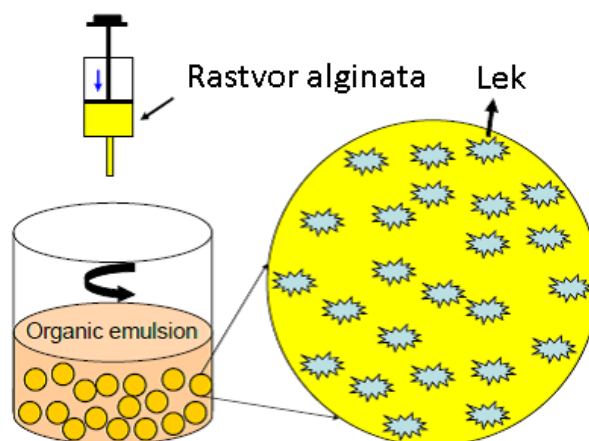
Alginatni hidrogelovi mogu se naći u različitim oblicima i tako koristiti u mnogim sferama nauke i industrije. Jedan od mogućih oblika su kuglice. Kuglice se mogu koristiti u tkivnom inženjeringu, za oslobađanje ćelija, gena, proteina ili lekova. Alginati u obliku kuglica dobijaju se u vodenim uslovima putem jonskog umrežavanja ili isparavanjem rastvarača. Ovakvi alginati pokazuju veliku biokompatibilnost kada se koriste u regenerativnoj medicini.

Alginatne gel-sfere dobijene umrežavanjem u prisustvu kalcijumovih jona se koriste za kontrolisano oslobađanje ćelija i faktora rasta. Ćelije i faktori rasta se pomešaju sa jednakom količinom alginatnog rastvora i grade mikrosfere u rastvoru kalcijum-karbonata. Prečnik ovako dobijenih mikrosfera je od 200 do 500 $\mu$ m, a ćelije su ravnomerno raspoređene u unutrašnjosti gela, Slika 30.



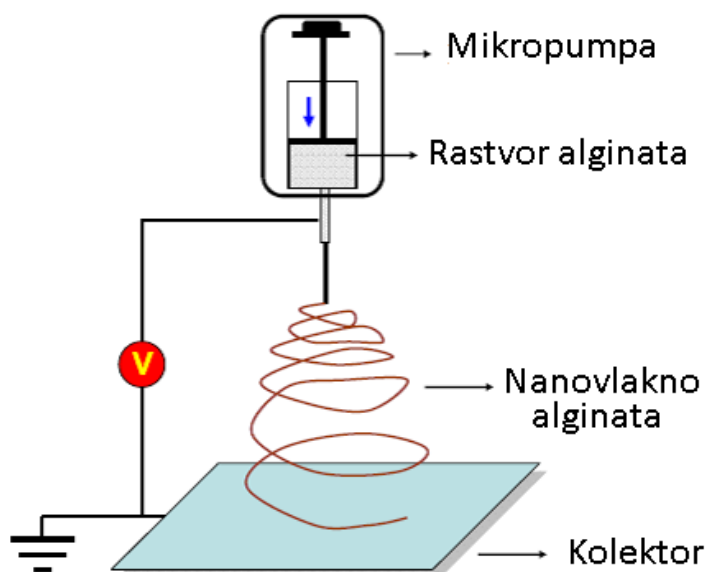
**Slika 30.** Dobijanje alginatnih gel-sfera

Alginatni gelovi zasnovani na čvrstim mikrosferama se mogu dobiti korišćenjem emulzione tehnike sa organskim rastvaračem. Na taj način se lekovi i drugi mali molekuli mogu smeštati unutar gel, Slika 31 [79].



**Slika 31.** Dobijanje alginatnih gelova zasnovanih na čvrstim sferama

Elektrospining je lak način za pravljenje alginatnih nanovlakana, koja se pored regenerativne medicine mogu koristiti i u mnogim drugim oblastima. Veličina dobijenih vlakana može se kontrolisati podešavanjem uslova pod kojima se elektrospining izvodi i svojstava rastvarača koji se koriste. Vlakna dobijena na ovaj način imaju ograničenu upotrebu u tkivnom inženjeringu zato što pokazuju manju debljinu i gusto pakovanje vlakana, Slika 32.



**Slika 32..** Elektrospining

## 5.5. Hemijske osobine alginata

Alginat u obliku praha može se čuvati na hladnom, suvom i tamnom mestu nekoliko meseci bez razgradnje. Rok trajanja alginata se može produžiti ukoliko se on čuva u frižideru. Alginat u obliku kiseline se mnogo brže razgrađuje od natrijum-alginata zbog karboksilne grupe na C5 atomu.

Alginat hidrolizuje u prisustvu kiseline. Dolazi do raskidanja glikozidnih veza u 3 koraka. Prvi korak obuhvata protonovanje kiseonika glikozidne veze i dobijanje pozitivnog naelektrisanja. Drugi korak podrazumeva raskidanje glikozidne veze i stvaranje karbonijum jona, koji potom u trećem koraku biva izložen dejstvu vode i adiciji hidroksilne grupe na kraju lanca.

Enzimska degradacija alginata odvija se u prisustvu enzima liaze,  $\beta$ -eliminacionim mehanizmom. Stepenn degradacije se povećava kad se promeni pH vrednost. Na pH vrednostima većim od 10 dolazi do degradacije  $\beta$ -eliminacionim mehanizmom, a na pH vrednostima manjim od 5 dolazi do kisele hidrolize glikozidnih veza. Alginati ne podležu degradaciji samo u prisustvu kiseline ili baze, već je to takođe moguće i u neutralnim uslovima dodatkom redukujućih agenasa. Neka redukujuća sredstva kao što su hidrohion, natrijum-sulfit, cistein, askorbinska kiselina ili hidrazin-sulfat mogu dovesti do degradacije alginata [78].

Degradacija alginata je veoma bitna kada se radi modifikacija. Potrebno je pažljivo odabrati sredstva za modifikaciju i uslove pod kojima će se modifikacija izvršiti kako u toku sinteze derivata ne bi došlo do smanjenja dužine polimernog lanca zbog degradacije.

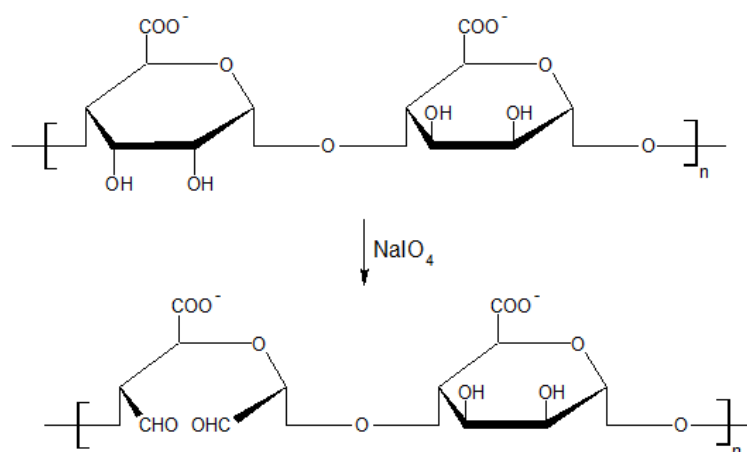
## 5.6. Modifikacije alginata

Mnogi naučnici se bave modifikacijom alginata kako bi se poboljšale postojeće osobine samog alginata ili kako bi se dobile potpuno nove osobine. Za modifikaciju alginata koriste se tehnike kao što su: oksidacija, sulfonovanje, esterifikacija, amidacija. Modifikacije se mogu izvršiti na hidroksilnim i na karboksilnim grupama koje su zastupljene u polimernom lancu. Ovako modifikovani alginati mogu imati brojne primene.

## 5.7. Hemijska modifikacija hidroksilne grupe

### 5.7.1. Oksidacija

U poslednje vreme se mnogo pažnje poklanja oksidaciji alginata, zato što oksidovani alginati imaju reaktivnije grupe i podležu bržoj degradaciji kada se koriste za oslobađanje lekova. Oksidacija se vrši na 2 hidroksilne grupe na C2 i C3 atomima sa natrijum-perjodatom kao oksidujućim sredstvom. Tom reakcijom stvaraju se 2 aldehidne grupe po monomernoj jedinici. Neophodno je da se reakcija odvija u mraku kako bi se eliminisale sporedne reakcije. Moguće je kontrolisati stepen oksidacije koristeći različite koncentracije natrijum-perjodata, Slika 33.



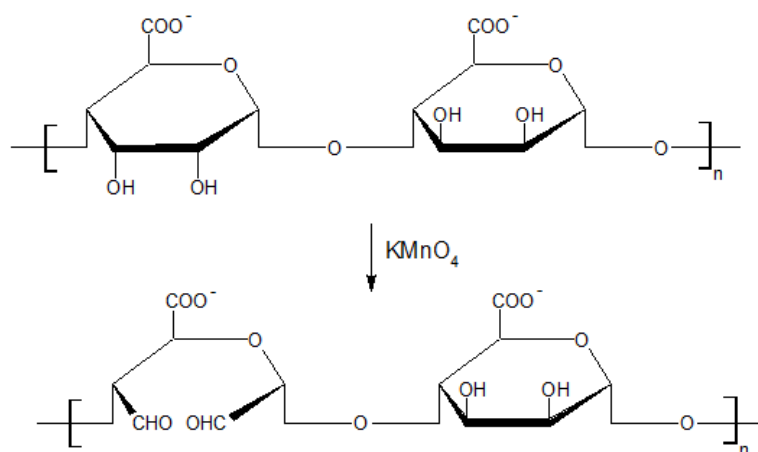
**Slika 33.** Oksidacija alginata natrijum-perjodatom

Primećeno je da oksidacija alginata dovodi do smanjenja krutosti [78]. Alginati velike molekulske mase bi teoretski trebalo da sadrže 1mol natrijum-perjodata po ostatku uronske kiseline. Brojna istraživanja su pokazala da to nije slučaj i da je oksidacioni limit alginata oko 50%, što je posledica građenja stabilnog intermedijarnog hemiacetala. Pokazano je takođe da se G-blokovski oksiduju brže nego M-blokovski. Oksidovani alginati se razlažu isto kao i nemodifikovani alginati, samo znatno sporije. Degradacije su moguće čak i na niskim temperaturama, a optimalno pH na kom je oksidovani alginat stabilan je 5,5. Oksidovani polimer se u potpunosti razgrađuje pri fiziološkim uslovima (37°C i pH~7,4). Ispitana je i sposobnost geliranja oksidovanog alginata u prisustvu kalcijumovih jona. Iako stepen geliranja zavisi od prisutnih G-blokovski, a njihov broj se u oksidovanom polimeru ne menja, uočeno je da polimeri



slabije geliraju kako se povećava stepen oksidacije. Oksidacijom alginata smanjuje se njegova krutost [80].

Oksidacija alginata se može izvesti i korišćenjem kalijum-permanganata u prisustvu sumporne kiseline kao katalizatora. Kalijum-permanganat oksiduje vicinalne diole do aldehidnih grupa, ali ukoliko se koristi višak  $\text{KMnO}_4$ , hidroksilne grupe se mogu oksidovati do karboksilnih grupa, Slika 34.

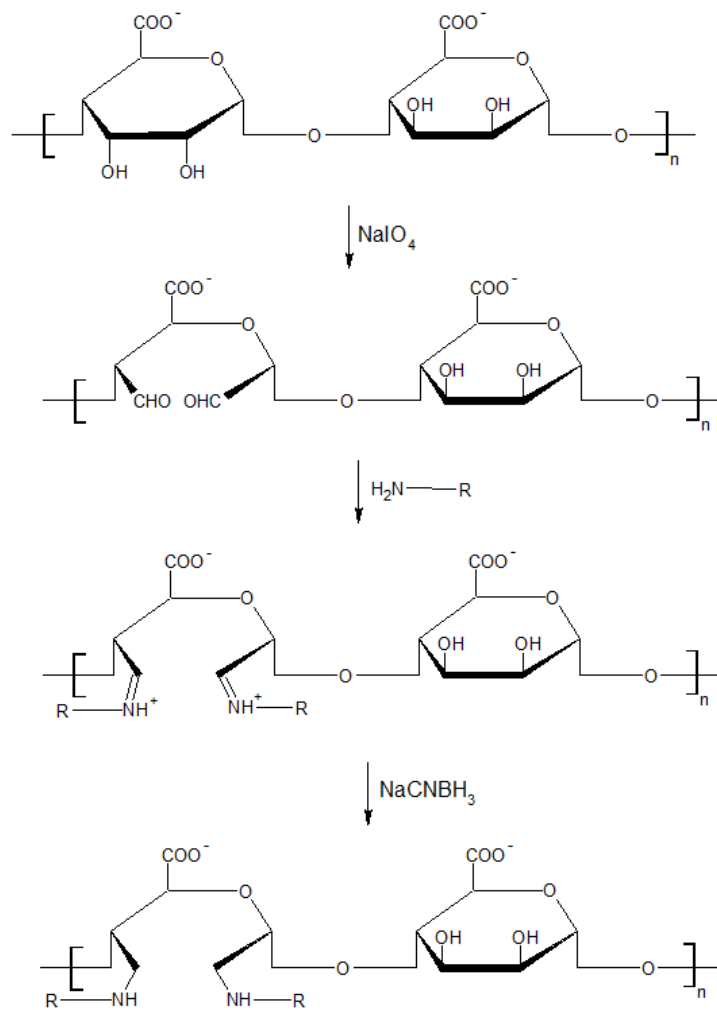


**Slika 34.** Oksidacija alginata kalijum-permanganatom

$\text{KMnO}_4$  je jeftinije, bezbednije i dostupnije oksidaciono sredstvo od natrijum-perjodata. Ograničenje prilikom korišćenja ovog oksidacionog sredstva jeste što je teško kontrolisati stepen i brzinu oksidacije [81].

### 5.7.2. Reduktivna-aminacija

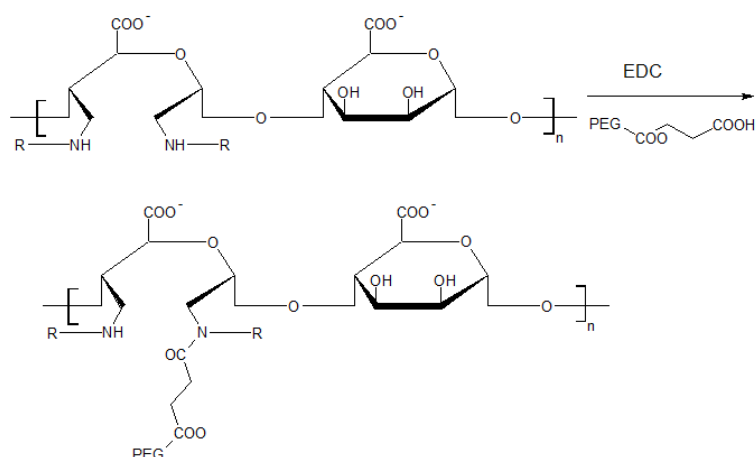
Oksidovani alginat sa aldehidnim grupama na polimernom lancu ima nove reaktivne grupe koje se mogu iskoristiti za reduktivnu-aminaciju. Reduktivna-aminacija može se izvesti sa propil-aminom koristeći natrijum-cijanoborhidrid kao redukujuće sredstvo. Natrijum-cijanoborhidrid je mnogo reaktivniji i selektivniji od natrijum-borhidrida koji se češće koristi, Slika 35.



**Slika 35.** Reduktivna-aminacija

Prednost NaCNBH<sub>3</sub> jeste i to što je brzo redukciono sredstvo na pH vrednostima od 6 do 7 [78].

Dodatak dugačkih alkil nizova na alginat dovodi do pojave novih karakteristika takvog alginata kao što su niži površinski napon, rastvaranje čvrstog azobenzena i adsorpcija teških metala. Sintetisan je i novi alginat-polietilenglikol (PEG). Kuplovanje između PEG i alginata je izvršeno koristeći karbodiimidnu reakciju u vodenoj sredini, Slika 36.

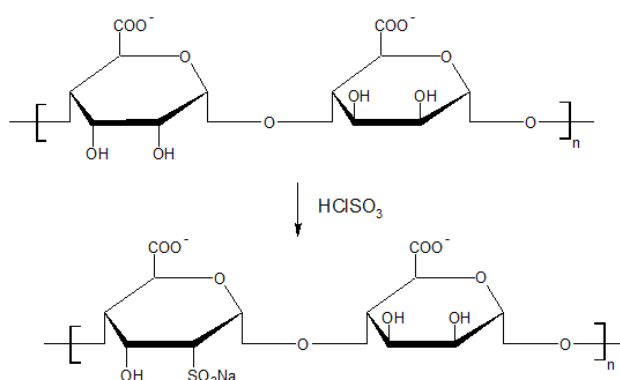


**Slika 36.** Karbodiimidna reakcija

Ovaj derivat alginata zadržava sposobnost za geliranjem i može se koristiti kada je potrebna veća biokompatibilnost [78].

### 5.7.3. Sulfonovanje

Kada se alginat sulfonuje on pokazuje veliku strukturnu sličnost sa heparinom, koji se koristi kao antikoagulans više od 60 godina. Reakcija sulfonovanja se može izvesti sa hlorsumpornom kiselinom u formamidu. Alginat je dodat u rastvor koji sadrži formamid i hlorsumpornu kiselinu. Dobija se braon rastvor, dok se za taloženje polimera može koristiti aceton. Ovako sulfonovani alginat pokazuje sposobnost da se ponaša kao antikoagulans, Slika 37 [82].



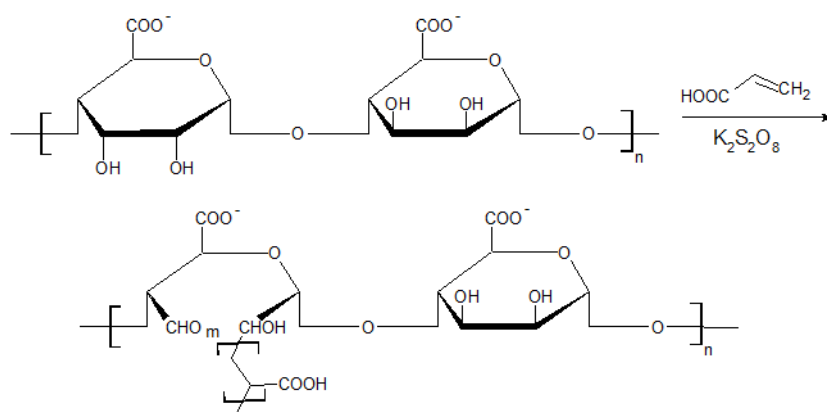
**Slika 37.** Sulfonovanje alginata

Sulfonovani alginat se može dobiti i korišćenjem karbodiimidne reakcije. Hidroksilne grupe se mogu sulfonovati korišćenjem reagensa dobijenog mešanjem DCC i

sumporne kiseline. Takođe je sulfonovanje moguće izvesti korišćenjem natrijum-bisulfita i natrijum-nitrata u vodenom rastvoru [83].

#### 5.7.4. Kopolimerizacija

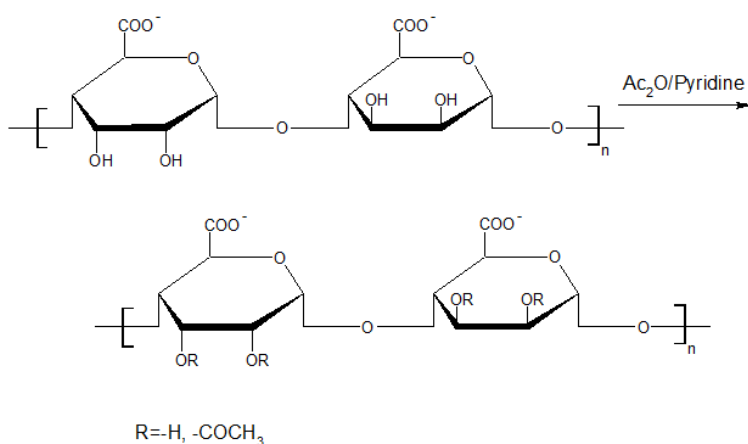
Kopolimerizacijom natrijum-akrilata sa natrijum-alginatom može se napraviti superabsorbent. Ovakav superabsorbent može da apsorbuje vodu i da se pri tome njegova masa poveća od 85 do 1000 puta. On takođe pokazuje i izvanrednu sposobnost za geliranjem. Modifikovani alginat dobijen na ovaj način pokazuje bolje osobine što se tiče apsorpcije metala, flokulacije i otpornosti na biorazgradivost u odnosu na alginat, Slika 38 [78].



Slika 38. Kopolimerizacija natrijum-akrilata sa alginatom

#### 5.7.5. Acetilacija

Hidroksilne grupe prisutne u alginatu ne mogu direktno da reaguju sa acetanhidridom zato što grade jake vodonične veze. Međutim u vodenoj sredini vodonične veze slabe i alginat postaje reaktivan. Mešanjem anhidrida sa alginatom dobija se modifikovani alginat, koji pokazuje veliku sklonost ka degradaciji, Slika 39 [77].



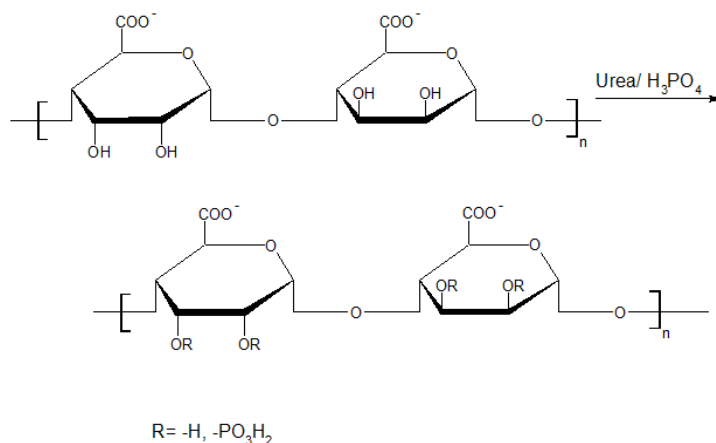
**Slika 39.** Acetilacija alginata sa anhidridom sirćetne kiseline

Acetilacija se može izvesti korišćenjem ketena u gasnim uslovima. Gradi se acetat algininske kiseline, koji je nerastvoran kako u vodi, tako i u organskim rastvaračima. U proseku se uvodi jedna acetil-grupa po jedinici monosaharida u alginatnom lancu. Algininska kiselina dobijena na ovaj način može se prevesti u odgovarajuću so natrijuma ili kalcijuma dodatkom hidroksida. Za razliku od algininske kiseline i natrijum-alginata, kalcijum-alginat se ne razgrađuje. Alginat se može prevesti u acetilovani oblik kiselo katalizovanom esterifikacijom. Modifikovani alginat može se dobiti reakcijom sirćetne kiseline i acetanhidrida u perhlornoj kiselini. Alginati dobijeni acetilovanjem ne pokazuju značajan stepen degradacije. Uvođenje acetil grupe dovodi do povećanja dužine polimernog lanca i samim tim utiče na njegovu konformaciju. Sa kalcijumovim jonima grade gelove, koji su slabije jačine u odnosu na gelove dobijene drugačijim tipovima modifikacija. Pokazano je da mogu biti acetilovani i M i G-blokovi [77].

### 5.7.6. Fosforilacija

Fosforilaciju alginata je moguće izvesti koristeći ureu i fosfornu kiselinu. Najveći stepen fosforilacije se postiže kada je molarni odnos alginat:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:urea 1:20:70. Pošto je fosforna kiselina jaka kiselina, ona dovodi do degradacije polimernog lanca u toku modifikacije. U većem stepenu fosforilaciji podleže hidroksilna grupa na trećem C-atomu M-bloka u odnosu na onu na drugom C-atomu. Uzrok tome je regioselektivnost i činjenica da su ekvatorijalna mesta dostupnija za reakciju u odnosu na aksijalna. Fosforilovani alginati ne pokazuju sposobnost za geliranjem, a tome najviše doprinosi

degradacija tokom reakcije modifikacije koja dovodi do konformacione promene. Gelovi se mogu dobiti ukoliko se spoji nereaktivni alginat sa fosforilovanim alginatom, Slika 40 [84].



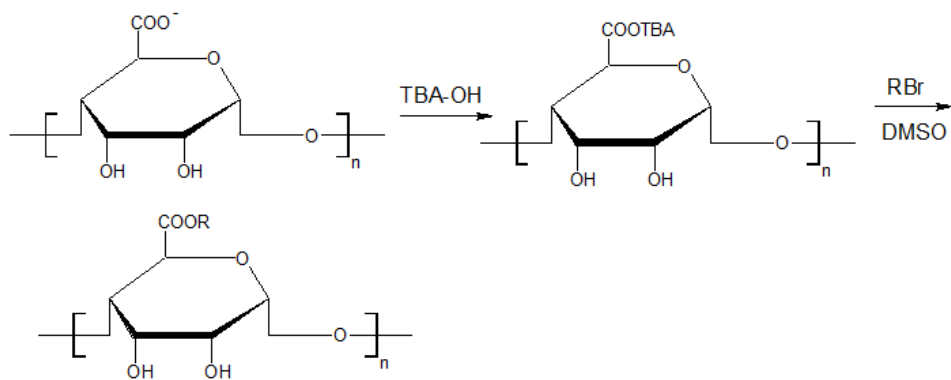
**Slika 40.** Fosforilacija alginata

## 5.8. Hemijska modifikacija karboksilne grupe

### 5.8.1. Esterifikacija

Esterifikacija se često koristi kao jednostavan metod za uvođenje alkil-grupe u molekul. Ovaj metod se često koristi za modifikaciju alginata i time se povećava njegova hidrofobna priroda dodatkom novih grupa na kičmu nativnog alginata.

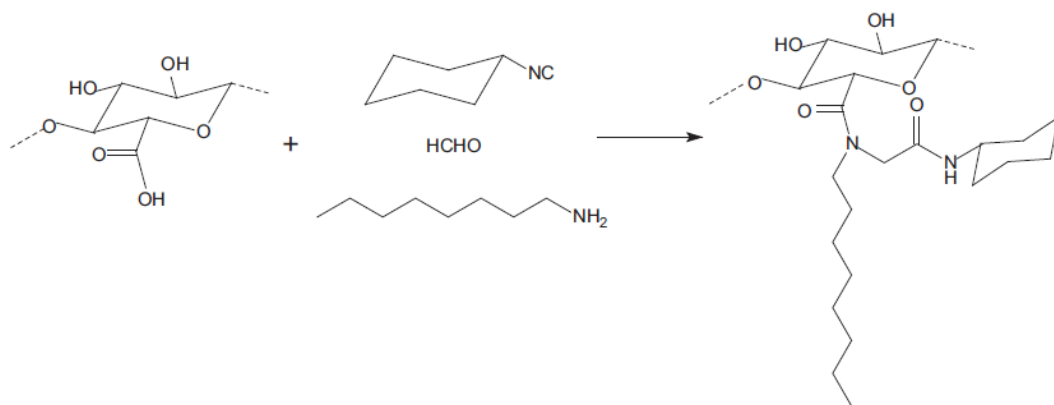
Nativni alginat se može modifikovati alkoholima u prisustvu katalizatora. Pri tome alkohol mora biti u višku, kako bi se osiguralo da ravnoteža bude pomerenka ka građenju proizvoda. Poslednjih nekoliko decenija esterifikovani derivat alginata koji ima komercijalnu primenu je propilen-glikolni estar alginata (PGA) koji je dobijen esterifikacijom alginata propilenoksidom. Modifikovani alginat dobijen esterifikacijom sa butanolom u prisustvu sumporne kiseline kao katalizatora pokazuje sposobnost za enkapsulaciju i hidrofobnih i hidrofilnih molekula. Takođe je moguće natrijum-alginat transformisati do kiseline, dodatkom etanolnog rastvora hlorovodonične kiseline, a zatim dobijeni proizvod tretirati tretabutilamonijumhidroksidom. Dobijena se prevodi u estar dodatkom alkil-halida, Slika 41 [78].



**Slika 41.** Esterifikacija alginata

### 5.8.2. Ugi reakcija

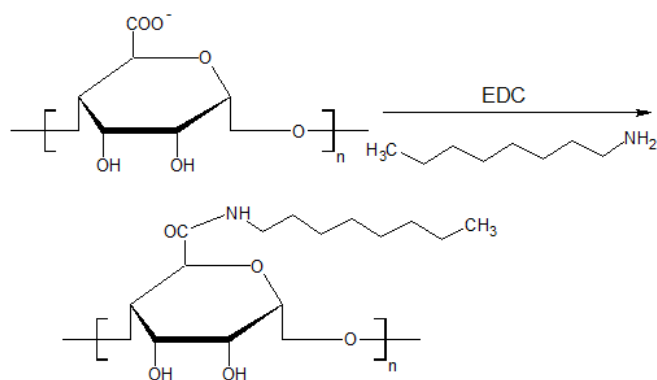
Ugi reakcija je multikomponentna reakcija koja uključuje keton ili aldehid, amin, izocijanid i karboksilnu grupu. Vodi stvaranju bis-amida. Derivat alginata može se dobiti kada se pomešaju formamid, n-oktilamin i cikloheksil-izocijanid sa nativnim alginatom na pH 3,6, Slika 42 [78].



**Slika 42.** Ugi reakcija

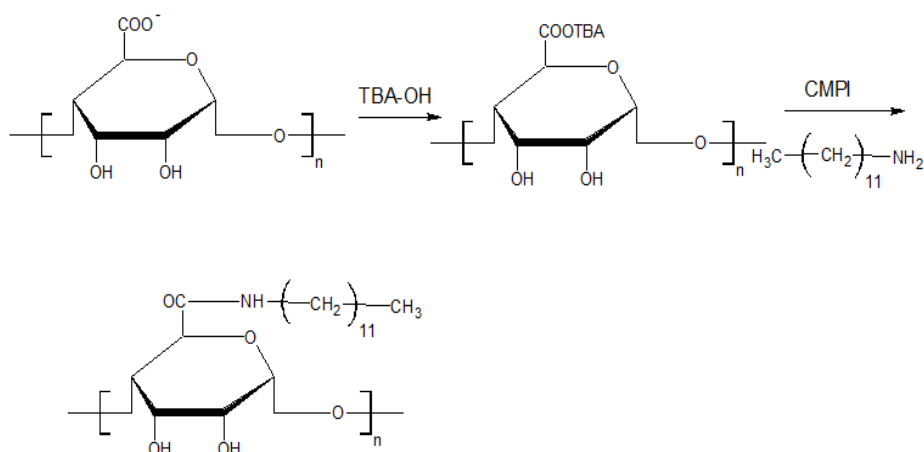
### 5.8.3. Amidacija

1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrohlorid (EDC-HCl) se može koristiti za stvaranje amidne veze između karboksilne grupe alginata i amino-grupe odgovarajućeg molekula, Slika 43.



**Slika 43.** Amidacija alginata

Kuplovanjem N-(3-aminopropil) pirola sa alginatom stvara se amidna veza između njih. Ovako dobijeni polimer može da podlegne elektropolimerizaciji. Time nastaje biomolekul koji može da zadržava enzime. Derivat alginata se može pripremiti kovalentnim vezivanjem dodecilamina za polisaharid, građenjem amidne veze. Kao kuplujući agens se koristi 2-hloro-1-metilpiridinium jodid (CMPI), Slika 44 [78].

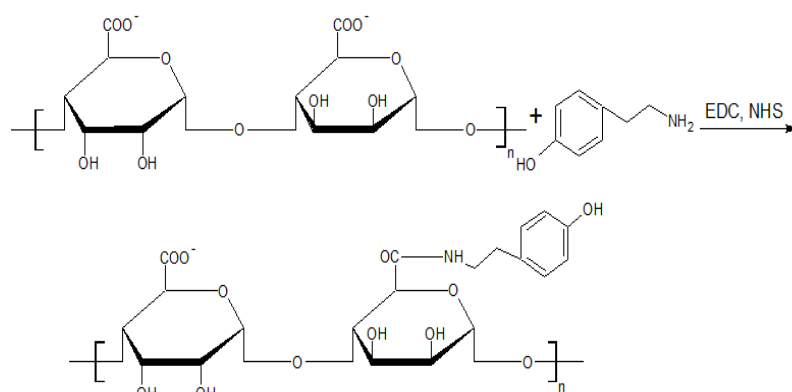


**Slika 44.** Građenje amidne veze

Reakcijom između primarne amino grupe tiramina i karboksilne grupe alginata gradi se amidna veza. Na ovaj način se može uvesti aromatični prsten u polimerni lanac. Oksidativnim kuplovanjem fenolnih grupa uz pomoć peroksidaze kao kuplujućeg agensa grade se C-C i C-O veze i na taj način dolazi do umrežavanja i stvaranja gelova. Kada se na modifikovani alginat primeni odgovarajući pritisak, on se deformiše. Ta deformacija je manja kod modifikovanog alginata u poređenju sa nemodifikovanim. Obajšnjenje za ovakvo ponašanje nalazi se u građenju kovalentnih veza prilikom umrežavanja. Na ovaj način može se ispitati kako redukcija karboksilne



grupe utiče na mehaničke osobine samog gela. Ovako dobijeni alginat ima veliku primenu za enkapsulaciju ćelija, Slika 45 [85].

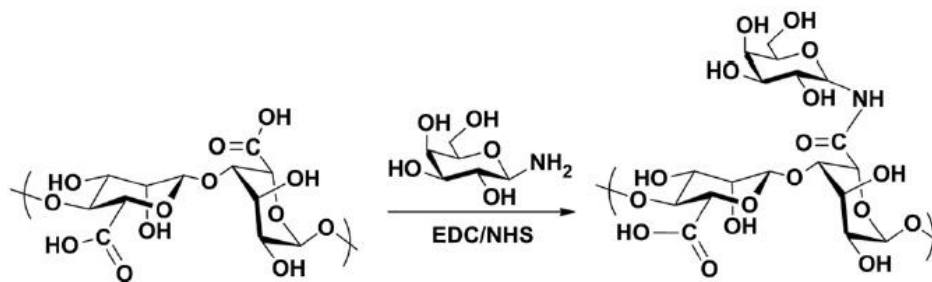


Slika 45. Građenje amidne veze između alginata i tiramina

#### 5.8.4. Vezivanje signalnih molekula

Velika primena alginata kao biomaterijala je uslovljena njihovom sposobnošću da obezbede sredinu koja je kako hemijski, tako i fizički pogodna za prisustvo bioloških vrsta. Sposobnost alginata da gradi gelove u koje se mogu ugraditi različite ćelije, lekovi ili neke druge biološke vrste je još jedna prednost prilikom korišćenja ovog polimera u biološke svrhe.

Kako bi se poboljšalo prepoznavanje ćelija hepatocita, alginat je kovalentno povezan za ostatak galaktoze. Hepatociti su važni za normalno funkcionisanje jetre, ali izvan jetre oni gube svoje funkcije i mogu da opstanu samo kratak vremenski period. Alginati, zbog svojih sposobnosti da grade gelove, se smatraju dobrim matriksima pogodnim za održavanje funkcije hepatocita i izvan organizma. U te svrhe mogu se napraviti gelovi vezivanjem galaktoze za alginat tako što karboksilna grupa alginata može reagovati sa 1-amino-1-deoksi- $\beta$ -D-galaktozom. U reakciji u većem obimu učestvuju M-blokovi, dok modifikovani alginat zbog prisustva velike grupe pokazuje značajne konformacione promene, Slika 46 [86].



**Slika 46.** Kovalentno vezivanje galaktoze za alginat

Vezivanje galaktoze za alginat je moguće izvesti i korišćenjem laktobionskog laktona i etilendiamina, pri čemu primarna amino grupa reaguje sa karboksilnom grupom alginata.

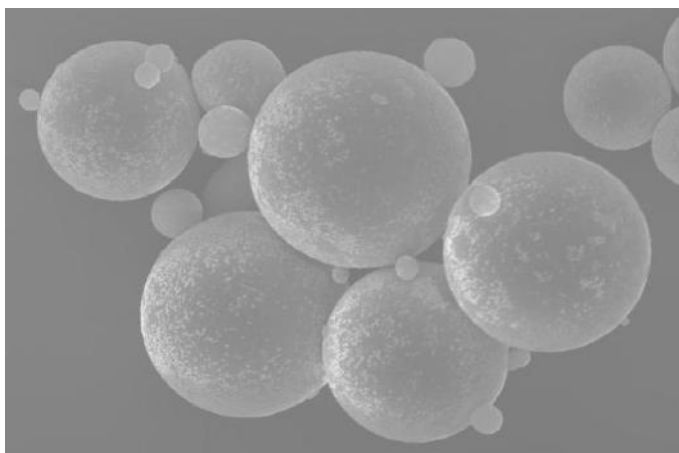
### 5.9. Primena alginata u biotehnologiji

Potreba za biomaterijalima zasnovanim na alginatnim polimerima u tkivnom inženjeringu i za oslobađanje lekova je ogromna. Posebno važnu ulogu imaju u oblastima regenerativne medicine. Polimeri bazirani na alginatu se mogu koristiti kao potencijalne ćelije i nosači lekova.

Alginati se danas jako koriste za previjanje rana. Oni mogu da se koriste u obliku zavoja, sunđera ili hidrogelova obezbeđujući dobre podloge za zarastanje rana. Alginati dobro upijaju vodu, prilagodljivi su, imaju antiseptička svojstva, nisu toksični i biorazgradivi su. Sve te osobine čine ih jako pogodnim za korišćenje prilikom previjanja rana. Pošto su gaze na bazi alginata vlažne, one mogu da spreče isušivanje rana, a to dovodi do bržeg zarastanja. Veoma su važna antimikrobna svojstva svih materijala koji se koriste za previjanje rana, zato što su otvorene rane pogodno mesto za razvijanje bakterija, što samo može dovesti do težeg zarastanja. Alginat u kombinaciji sa hitozanom se koristi za proizvodnju materijala koji pokazuju jako dobre antiadhezivne i antimikrobne osobine [79].

Još od 1938. godine alginat u obliku natrijumove soli ima primenu u farmaceutskoj industriji. Natrijum-alginat se tradicionalno koristi kao adhezioni sredstvo u mnogim tabletama, dok se alginat koristi prilikom oslobađanja lekova. Prah natrijum-alginata se dodaje u toku procesa granuliranja, time ga pojednostavljuje i povećava čvrstoću tableta. Može se koristiti i u tečnim lekovima za povećanje viskoznosti. Propilen-glikolni estar alginata povećava stabilnost emulzija.

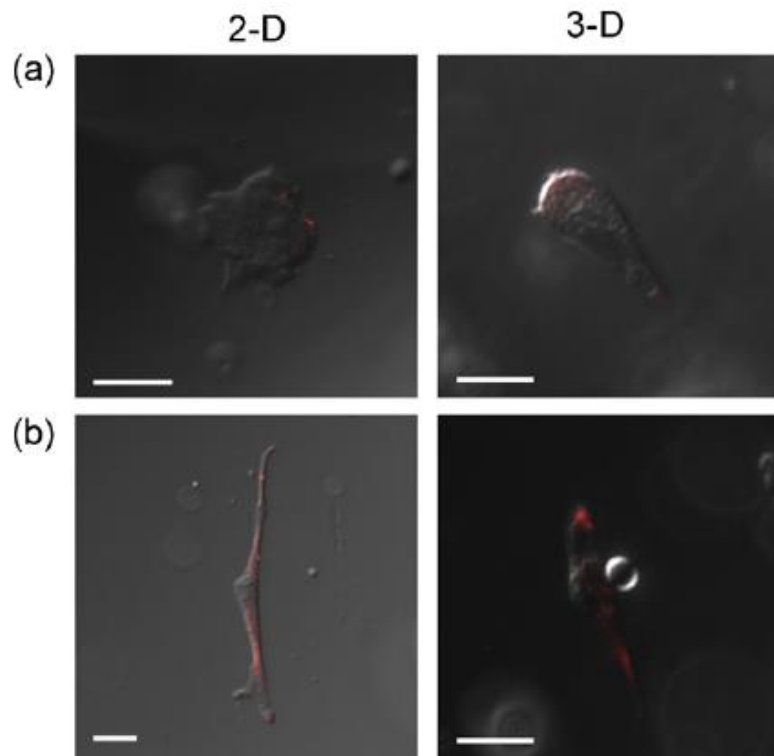
Jedna od najvažnijih primena alginata je u oslobađanju lekova. Ova primena privlači veliku pažnju godinama unazad, a važna je zato što se na taj način mogu prenositi kako mali molekuli i joni, tako i veliki biomolekuli kao što su proteini i geni. Alginat se koristi kao nosač za imobilizaciju ili enkapsulaciju lekova, biološki aktivnih molekula, proteina i ćelija zahvaljujući svojim biokompatibilnim i biorazgradivim osobinama. Već dugo se alginatni gelovi ispituju za oslobađanje različitih lekova, a dokazano je da su oni tako korisni zato što mogu da iskoriste primarne i sekundarne veze između leka i alginata da bi se kontrolisala kinetika oslobađanja leka. Alginati su nanoporozne čestice, što omogućava brzu difuziju malih molekula kroz pore gela [80]. Teofilin je lek koji više od 70 godina služi za lečenje bronhijalne astme. Kako bi rešili problem slabog zadržavanja ovog leka u disajnim organima i iritacije koje se tom prilikom javljaju, naučnici su iskoristili natrijum-alginatne mikrosfere za zarobljavanje ovog leka i tako poboljšali njegove osobine, Slika 47 [87].



**Slika 47.** Prikaz alginatnih kuglica sa lekom teofilinom zarobljenim u alginatnoj mikrosferi [87]

Alginatni gelovi se sve češće koriste kao model sistem za ćelije sisara u biomedicini. Ovi gelovi se mogu prilagoditi da služe bilo kao 2D ili 3D model sistem, mada se mnogo više koriste kao 3D model sistem. Alginati mogu da posluže kao idealna površina na koju se može vezati odgovarajuća ćelija, koja se dalje može ugrađivati u organizam. Alginati su poslednjih nekoliko decenija veoma istraženi kao sredstva koja mogu poslužiti kao matrice u inženjeringu tkiva i organa, koja imaju veliku primenu u regenerativnoj medicini. Ovakvo ponašanje je moguće zbog fizičkih osobina gelova, sposobnosti za adhezijom ćelija i degradativnih osobina alginata. Veličina regenerativnih agenasa koji se mogu osloboditi iz alginatnih gelova mora biti oko

5nm. Većina proteina lako difunduje iz alginatnih gelova, čak i kad nema degradacije. Formiranje novih krvnih sudova je takođe obećavajuća alternativa za lečenje pacijenata koji pate od ograničenog ili sprečenog protoka krvi usled koronarnih ili perifernih arterijskih bolesti. Ovo se može postići transplantacijom različitih tipova ćelija u telu, kao što su rekombinantni proteini ili geni, a za njihovu dostavu mogu poslužiti alginatni gelovi, Slika 48 [88].



**Slika 48.** Mikroskopski prikazi ljudskih fibroblasta u alginatnom hidrogelu [88]

U prehrambenoj industriji alginat se koristi kao prirodni aditiv u obliku natrijumove, kalijumove ili amonijumove soli. Može se koristiti kao sredstvo za zgušnjavanje u sosevima, sirupima i prelivima za sladoled. Natrijum-alginat se takođe koristi kao stabilizator za sladoled, tako što se koristi za smanjivanje kristala leda tokom zamrzavanja dajući krajnju glatku strukturu. Takođe se koristi za smanjenje stvaranja emulzija u mešavini vode i ulja, kao na primer u različitim majonezima i prelivima za salate. Natrijum-alginat se koristi za proizvodnju tzv. funkcionalne hrane, kao što je hrana koja se koristi prilikom različitih dijeta. Dugoročno unošenje hrane koja sadrži natrijum-alginat, kao tradicionalni lek koji smanjuje nivo glukoze u krvi, pomaže u lečenju nekih bolesti kao što su dijabetes, hipertenzija ili gojaznost. Alginat može da smanjuje gubitak vlage prilikom procesa proizvodnje mesa. Kada se koristi u

proizvodima od mesa alginat ne samo da povećava prinos, već takođe i poboljšava teksturu mesa, smanjuje troškove proizvodnje i poboljšava kvalitet proizvoda.

Od alginata se mogu praviti filmovi ili vlakna koja imaju veliku primenu u mnogim oblastima, kao što su imobilizacija enzima ili za izradu biosenzora koji se koriste u mašinskoj i elektrotehničkoj industriji. Imobilizovan enzim je enzim koji je vezan za inertan i nerastvorljiv materijal, kao što je kalcijum-alginat dobijen umrežavanjem alginata uz pomoć kalcijum-hlorida. Ovakav enzim pokazuje veću otpornost na spoljašnje promene kao što su pH i temperatura. Alginat takođe omogućava da se enzim drži na jednom mestu tokom reakcije, nakon čega se lako odvajaju od proizvoda i može se ponovo koristiti. Elektrospining je najjednostavniji, najefikasniji i najjeftiniji postupak za dobijanje polimernih nanovlakana. Korišćenjem ove metode do danas je dobijeno preko 50 sintetičkih ili prirodnih polimera. Elektrospining daje polimerna nanovlakna korišćenjem elektrostatičke sile. Dugačka nanovlakna nastaju tako što se na tečnu kapljicu polimera primeni dovoljno visok napon da telo tečnosti postane naelektrisano. Elektrostatičko odbijanje koje pri tome nastane dovodi do poništavanja površinskog napona i kapljica počinje da se isteže. U jednom trenutku rastvarač ispari, a nanovlakna se skupljaju na kolektoru. Nanovlakna dobijena na ovaj način imaju brojne primene [89].

#### **5.10. Primena alginata u imobilizaciji peroksidaza**

Alginat je jedan od najkorišćenijih prirodnih polisaharida za imobilizaciju enzima i ćelija [90-94]. Peroksidaza iz ren je imobilizovana u alginatnim mikrokuglicama za primenu u degradaciji azo boja [95] i uklanjanje fenola iz otpadnih voda [96]. U svim ovim studijama imobilizacije zbog velike veličine pora u polisaharidnom gelu dolazilo je do curenja enzima i gubitka aktivnosti. Da bi se zadržao enzim unutar alginatnog hidrogela korišćene su kuglice dijametara nekoliko milimetara koje su opet dovodile do difuzionih ograničenja i smanjene efikasnosti enzima. U cilju smanjenja curenja enzima a sprečavanja difuzionih ograničenja neophodno je uvoditi dodatne hemijske korake modifikacije bilo samih molekula enzima bilo polisaharidnog lanca [97, 98].

## II EKSPERIMENTALNI DEO

### 6. MATERIJALI I METODE

#### 6.1. Modifikacija polimera perjodatom i tiraminom

U rastvor polisaharida (alginat ili celuloza) 0,14g u 10 ml dH<sub>2</sub>O se doda 2,5 ml natrijum perjodatnog rastvora tako da odnos molariteta perjodata i polisaharida bude 2,5% (1,5mM); 5% (3mM); 10% (6mM); 15% (9mM) i 20% (12mM) u ukupno 12,5 ml. Rastvor se uvije u foliju i ostavi na tamno preko noći na +4°C (u frižider).

U rastvor polisaharida i perjodata koji je stajao preko noći dodati 0,7 ml glicerola i ostaviti još pola sata da se prekine reakcije, a onda dodati 0,07 g NaCl da se rastvori. Kad se rastvori NaCl dodati 20 ml čistog etanola promešati i iscentrifugirati (10 min na oko 4000 rpm). Rastvor odbaciti, a talog rastvoriti u 10 mL destilovane vode, kada se rastvori dodati 0,02 g NaCl da se rastvori, a nakon toga 10 mL čistog etanola, pa opet promešati i iscentrifugirati. Talog opet rastvoriti u 10 mL destilovane vode, nakon rastvaranja dodati 0,01 g NaCl da se rastvori i nakon toga dodati 20 mL etanola, promešati i ponovo centrifugirati. Talogu dodati 10 mL čistog etanola mešati 15 minuta da se ispere, iscentrifugirati i osušiti talog na sobnoj temperaturi.

Oksidovani osušeni polimer zatim rastvoriti u 10 ml Na-fosfatnog pufera (0,1M) pH 6. U rastvore je zatim dodat čvrst tiramin-HCl (po 0,15g u 10ml polimera) i ostavljen na magnetnoj mešalici 30 minuta (uz proveru pH rastvora). Zatim u kapeli dodati po 0,05 g na 10 ml natrijum cijanoborhidrida (NaCNBH<sub>3</sub>) promešan i ostavljen u kapeli 24 h uvijen u alufoliju.

Talog je odvojen centrifugiranjem (ukoliko ga ima, a ne bi trebalo da padne talog). U supernatant, rastvor modifikovanog polisaharida, dodato je NaCl do finalne koncentracije od 1M (0,584 g na 10 ml rastvora), a kad se rastvori dodat je čist etanol (bar 2 zapremine) – 20 ml etanola. Rastvor je zatim centrifugiran, odvojen talog rastvoren u 10 ml dH<sub>2</sub>O i još jednom ponovljen postupak taloženja sa 1M NaCl i etanolom. Na kraju talog je ispran u etanolu i osušen na vazduhu. Osušeni polimer dobro zatvoriti i spakovati u zamrzivač na -20°C.

## 6.2. Imobilizacija peroksidaze iz rena

Odmereno je po 22,5 mg modifikovanog alginata i rastvoreno u 150  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$  da se napravi 15% rastvor. Kad se alginat rastvori, sledećim redom je dodato:

- 150  $\mu\text{l}$  - alginata (15% rastvor)
- 106,11  $\mu\text{l}$  - 50mM Tris pufer pH 7
- 2,89  $\mu\text{l}$  - HRP (1mg/ml)
- 1  $\mu\text{l}$  - GOX(1mg/ml)
- 40  $\mu\text{l}$  - 1M Glukoza

Za pravljenje kuglica dodato je po 2,89  $\mu\text{l}$  komercijalne peroksidaze iz rena tip II (konc. 150-250 U/mg), tako da je u reakciji bilo ukupno 0,5 U. Odmah po dodatku glukoze, rastvor dobro promešan i dodat u 600  $\mu\text{l}$  rastvora Span 80 u lakom mineralnom ulju na magnetnoj mešalici. Kuglice su pravljene mešanjem 10-15 min konstantnom brzinom, a reakcija je prekinuta dodatkom 1 ml 0,5% Triton X-100 u 5%  $\text{CaCl}_2$  u destilovanoj vodi i ostavljena da se meša još 5 min. Zatim su kuglice ispirane 3 puta sa istim rastvorom tritona u  $\text{CaCl}_2$ , a onda 3 puta sa rastvorom 5%  $\text{CaCl}_2$  u destilovanoj vodi i ispirci su skupljeni i izmerena ukupna zapremina ispiraka. Nakon ispiranja kuglice su staložene, odliven višak rastvora i obeležena zapremina kuglica i ukupna zapremina rastvora. Na kraju se iz zapremina kuglica i rastvora izračunava procenat kuglica u rastvoru, sto je neophodno za računanje specifične aktivnosti.

Merenje specifične aktivnosti kuglica (u 3 ml reakcione smese u 100-130 $\mu\text{l}$  kuglica) i ispiraka (u 1 ml reakcione smese i 43,3  $\mu\text{l}$  ispirka(10 puta razblazen)).

## 6.3. Merenje enzimске aktivnosti

Supstrati za merenje su: pirogalol (13 mM) i vodonik peroksid (9,7 mM) na sobnoj temperaturi (21°C). Aktivnost slobodne (rastvorne) peroksidaze iz rena tipa II (HRP) meri se dodavanjem 10  $\mu\text{l}$  HRP (1 mg/mL) u 1mL rastvora pirogalola u 50 mM TRIS puferu (pH 7) uz dodavanje 10  $\mu\text{l}$  (0,97 M)  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Reakcija se prati 7 minuta. Nastaje narandžasto-braon proizvod purpurogalin, pri reakciji peroksidaze koja katalizuje oksidaciju pirogalola u prisustvu vodonik peroksida, merenog na 420 nm na Shimadzu spektrofotometru. Enzimska aktivnosti se izračunava na osnovu molarnog

ekstencionog koeficijenta, nagrađenog proizvoda, purpurogalina od  $12\text{cm}^2\text{mg}^{-1}$  (na 420 nm).

Isti postupak je primenjen i za merenje aktivnosti imobilizovane HRP, izuzev što je reakciona smeša 3 ml (rastvor pirogalola) sa 130  $\mu\text{l}$  suspenzije alginatnih kuglica, uz dodavanje 30  $\mu\text{l}$  (0,97M)  $\text{H}_2\text{O}_2$ , na kraju (što je i vreme početka reakcije). Reakcija se prati uz stalno mešanje 7 minuta. Meri se apsorbancija na 420 nm, filtriranog (ceđenog) alikvota, nakon 3, 5 i 7 minuta reakcije.

Jedna jedinica enzimske aktivnosti HRP (U) je definisana kao količina enzima sposobna da nagredi 1 miligram proizvoda purpurogalin od pirogalola u 20 sekundi na pH 7,0 i  $21^\circ\text{C}$ .

#### **6.4. Snimanje spektara**

Pripremljeni su 0,1% rastvori modifikovanih alginata oksidovanih sa 2,5, 5, 10, 15 i 20% perjodata i nemodifikovanog alginata u destilovanoj vodi. Merene su apsorbancije na 260 i 280 nm, zatim UV spektar u rasponu od 200-380 nm talasne dužine.

#### **6.5. Titracija jonizabilnih grupa**

Uzima se 40 mg polimera i rastvori u 4 mL 50 mM rastvora KCL da se dobije 1% rastvor. Najpre se izmeri pH rastvora, pa se ta vrednost pH smanji na 2-3, dodatkom razblažene HCL. Taj rastvor je titrovao 0,1M NaOH do pH 10. Titruje se postepeno uz dodavanje po 50 do 100  $\mu\text{l}$  hidroksida uz beleženje svih vrednosti. Titracija je rađena sa modifikovanim i sa nemodifikovanim polimerom, kao i rastvorom 50mM KCL kao slepe probe.

Broj mmol-ova hidroksida preračunat je iz dobjenih vrednosti zapremina utrošenog 0,1M NaOH, rastvora za titraciju (umanjenog za titraciju čistog KCL). Koncentracija karboksilnih grupa po gramu polimera (izražena u mmol/g) dobijena je iz odnosa broja mmol-ova potrošenog hidroksida sa gramima titrovanog polimera.

#### **6.6. pH optimum**

Određen je pH optimum gde je najveća peroksidazna aktivnost za slobodnu HRP i



imobilizovanu HRP u 10% oksidovanom (modifikovanom) alginatu (pravljene su kuglice u 15% gelu). Korišćena je serija 0,1 M TRIS-citratnog pufera sa pH vrednostima od 2,0-9,0. Enzimaska aktivnost pri različitim pH vrednostima se određuje na već opisan način, spektrofotometrijom, merenjem apsorbanije na 420 nm za 7 minuta.

### **6.7. Termostabilnost**

Temperaturna stabilnost slobodne-rastvorne i imobilizovane peroksidaze (HRP sa 0,5U) u kuglicama 10% modifikovanog alginata, se određuje inkubiranjem (zagrevanjem) enzima na 65°C u 50mM TRIS puferu pH 7,0. Inkubacioni period u termobloku (Grant QBD21, United Kingdom) je bio 120 minuta, na datoj temperaturi, pri čemu se uzimaju alikvoti posle 1 min, 5min, 15min, 30 min, 60 min i 120 minuta.

### **6.8. Stabilnost u organskom rastvaraču**

Za određivanje stabilnosti peroksidaze iz rena u organskom rastvaraču korišćen je 80% rastvor 1,4-dioksana sa 20% 50 mM TRIS pufera pH 7,0 na sobnoj temperaturi od 25°C. Izmerena je stabilnost slobodnog i imobilizovanog enzima u kuglicama 10% oksidovanog alginata sa 0,5 U HRP-a, inkubiranjem odgovarajućih alikvota u rastvor 80% dioksana tokom 2, 24 i 48 sati.

### **6.9. Km i Vmax**

Parametri kinetike enzima: Michaelis-Mentenova konstanta ( $K_m$ ) i maksimalna brzina reakcije ( $V_{max}$ ) su određivani za rastvornu i imobilizovanu HRP. Pripremljena je serija različitih koncentracija supstrata (pirogalola) od 0,44 - 44 mM sa zasićujućom količinom  $H_2O_2$ , početna brzina je određena na opisan način. Na osnovu dobijenih aktivnosti nacrtana je Michaelis-Mentenova kriva. Izračunate su vrednosti za  $K_m$  i  $V_{max}$ .

### **6.10. Uklanjanje fenola**

Za kalibracionu pravu pripreme se različite koncentracije fenola u 50 mM TRIS puferu

pH 8,0. Fenolni rastvor od 800  $\mu\text{L}$  se meša sa po 100  $\mu\text{L}$   $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (83,4 mM; Mr-329,26 g/mol) i 4-aminoantipirina (AAP 20,8 mM; Mr-203,25 g/mol) u 250 mM Na-bikarbonatnom puferu pH 8,0. Boja se razvija 10 minuta i posle toga se očitava apsorbanca na 510 nm.

Za slobodnu-rastvornu peroksidazu (HRP) koristimo 3 mL rastvor fenola 2 mM (u 50 mM TRIS puferu) u koji se doda  $\text{H}_2\text{O}_2$  do finalne koncentracije od 2,4 mM i HRP do 0,8 U/mL. Smeša se stavi na magnetnu mešalicu, pa se u određenom vremenu uzima alikvot (40  $\mu\text{L}$ ). Alikvot se sipa u 760  $\mu\text{L}$  pufera, pa se dodaje po 100  $\mu\text{L}$  rastvora  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (83,4 mM) i AAP (20 mM u 250 mM Na-bikarbonatnom puferu). Posle mešanja od 1 minuta uzima se alikvot, boja se razvija 10 minuta, pa se očitava apsorbanca na 510 nm. Uklanjanje fenola u prisustvu rastvorne HRP praćeno je u intervalu od 60 minuta, apsorbanca su očitavane 5, 10, 30 i 60 minuta.

Za imobilizovanu HRP koristimo isti protokol samo se umesto rastvornog enzima peroksidaze iz rena doda imobilizat. Kuglice imobilizata su od 10% modifikovanog polisaharida alginata sa 0,8U HRP u suspenziji.

Drugi imobilizat koji je korišćen je perjodatno modifikovan HRP sa polimerom EDA 20/12. Za uklanjanje fenola dodato je 80 mg imobilizata.

Računat je procenat uklonjenog fenola u odnosu na početnu koncentraciju (pomoću standardne prave) posle 2h od početka reakcije.

### **6.11. Koncentracija fenolnih grupa**

Određena je razlika u apsorbancama za 0,1% rastvor nemodifikovanog alginata i 0,1% rastvora oksidovanog polimera, kao i 0,01% rastvor tiramina. Preračunata je koncentracija fenolnih grupa u  $\mu\text{mol/ml}$  i broj fenolnih grupa po ostatku glukoze.

### **6.12. Optički mikroskop**

Napravljene su kuglice od 10% oksidovanog alginata i posmatrane su pod optičkim mikroskopom pri uveličanju od 50 puta i napravljeno je nekoliko slika. Izmerena je prosečna dimenzija kuglica na uzorku jednog vidnog polja odnosno 51 kuglica. Određena je maksimalna i minimalna veličina kuglica u tom uzorku.

### **6.13. Uticaj gustine polimera na geliranje i parametre imobilizacije HRP**

Od alginata modifikovanog perjodatom i tiramina pravljenе su kuglice sa različitim koncentracijama polisaharida. Od 10% oksidovanog alginata perjodatom i tiraminom testirani su parametri imobilizacije HRP u odnosu na različite gustine gela za pravljenje kuglica (5, 10, 15 i 20%).

Praćeni parametri imobilizacije HRP su: specifična aktivnost, nevezana aktivnost, vezana aktivnost i prinos imobilizacije.

### **6.14. Uticaj procenta oksidacije polimera na parametre imobilizacije HRP**

Parametri imobilizacije poređeni su u odnosu na stepen oksidacije alginata perjodatom. Kuglice su pravljenе od 15% gela sa ukupno 0,5U peroksidaze iz rena. Testirane su vrednosti specifične aktivnosti, procenta aktivnosti nakon 24 sata od imobilizacije, vezana aktivnost kao i prinos imobilizacije za kuglice ( 2,5%, 5%, 10%, 15% i 20%) oksidovanog alginata perjodatom.

### **6.15. Uticaj kolicine enzima na parametre imobilizacije HRP**

U zavisnosti od količine dodatog enzima izmereni su parametri imobilizacije HRP. Napravljenе su kuglice sa 0,5U; 2U; 5U i 10U peroksidaze iz rena sa 1U glukozo-oksidge i 1M koncentracijom glukoze pod istim uslovima.

### **6.16. Uticaj koncentracije glukoze i GOX-a na parametre imobilizacije HRP**

Poređene su parametri imobilizacije peroksidaze iz rena kod kuglica od 10% oksidovanog alginata. Kuglice su pravljenе po istoj proceduri, samo sa različitim koncentracijama glukoze. Korišćene su koncentracije glukoze od 0,02 M, 0,1 M i 1,0 M da bi proverili da li višak peroksida koji nastaje pri većim koncentracijama glukoze inhibira enzim.

### **6.17. Ispitivanje uticaja količine dodatog enzima na vezanu aktivnost, specifičnu aktivnost imobilizata i prinos glutaraldehidne imobilizacije**

Korišćena su četiri aminovana (predhodno je bila aktivacija diaminima i amonijakom) polimera sa razlicitom velicinom pora. To su MP3150-300, SGE15/16, EDA20/12, EDA10/12. Odmereno je 4 puta po 50 mg suvog polimera u vajlu (i tako za sve četiri vrste polimera). Doda mu se 1 mL 0,1 M natrijum-fosfatnog pufera pH 8,0 i dezaeriše se 10 min na vodenoj vakum pumpi. Posle dezaeracije polimer se ispere 2 puta sa po 5 mL istog pufera.

Polimer se resuspenduje u 2 mL 2,5 % rastvora glutaraldehyda u istom puferu (1.8mL Na-fosfatnog pufera i 200 µL 25% glutaraldehyda), sto je aktivacija polimera. Polimer se ostavi 2 h na šejker da se blago meša na sobnoj temperaturi. Posle 2 h polimer se ispere tri puta sa po 5 mL 0,1 M Na-fosfatnog pufera pH 7,0.

Napravi se razblaženja rastvora enzima po 1 mL sledećih koncentracija 2,5 mg/mL; 1,25 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,05 mg/mL, što odgovara količini od 50; 25; 5 i 1 mg enzima na 1 g suvog polimera. Ponovi se četiri puta za svaku vrstu datog polimera.

U vajlu sa polimerom se dodaju enzimi ovih koncentracija (po 1 mL). Rastvor enzima sa polimerom se inkubira 1 dan na šejkeru na sobnoj temperaturi. Nakon toga se čuvaju uzorci imobilizacije u frižideru.

Odvoji se supernatant (sa frakcijom nevezanih enzima) i ostavi za merenja. Polimer se ispere dva puta po 5 minuta sa po 5 mL 1 M NaCl u natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0. Spoje se svi supernatant i iostave.

Aldehydne grupe na polimera, koje su preostale, se blokiraju inkubacijom 30 minuta sa 3 mL 1M glicina (sa natrijum-fosfatnim puferom ). Glicin se zatim ispira tri puta sa po 3mL Na-fosfatnog pufera.

Polimer se resuspenduje u istom, 0.1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0, uskladišten u frižideru do upotrebe.

Odredi se koncentracija enzima i proteina u spojenim supernatantima kao i u alikvotu polaznog rastvora enzima. Množenjem koncentracije enzima sa zapreminom supernatanta dobija se količina nevezanog enzima. Razlika između količine nevezanog enzima i dodatog predstavlja količinu vezanog enzima i proteina na 50 mg suvog polimera.

### **6.18. Određivanje zavisnosti imobilizacije od vremena inkubacije**

Pripremi se rastvor enzima HRP, koncentracije 1,25 mg/mL i to četiri puta po 1mL.Odmeri se u četiri vajle po 50 mg suvog aminovanog polimera EDA10/12,

dezaeriše i aktivira glutaralhidom po opisanoj proceduri, kao sa prethodnom imobilizacijama.

U sve četiri vaje, posle ispiranja glutaralhidom, doda se po 1 mL 1,25 mg/mL. Rastvor enzima sa polimerom inkubira se na šejkeru uz vreme imobilizacije od: 2, 6, 24 i 48 sati.

### **6.19. Ispitivanje uticaja količine dodatog enzima na vezanu aktivnost, specifičnu aktivnost imobilizata i prinos perjodatne imobilizacije**

U plastične vaje se odmeri po 50 mg suvog polimera ( i to MP3150-300, SGE15/16, EDA20/12, EDA10/12 ). Doda mu se 1 mL natrijum-acetatnog pufera pH 5,0 (50 mM) i dezaeriše se 10 minuta, a zatim se ispere 2 puta sa po 5 mL istog pufera. Ostavi se u frižider do daljeg korišćenja.

Rastvori se 6,25 mg peroksidaze u 5 mL 50 mM natrijum-acetatnog pufera pH 5,0 i u to se doda 0,3 mL 50 mM natrijum-perjodata. Rastvor se ostavi na tamno u frižider 6 h uz povremeno mešanje. Posle 6 h doda mu se 0,01 mL glicerola (99%) i ostavi još pola sata na sobnoj temperaturi. Nakon pola sata se stavi na dijalizu (na tamno) naspram 50 mM natrijum-acetatnog pufera pH 5,0, uz tri izmene pufera u trajanju od četiri sata. Posle skidanja sa dijalize od osnovnog štoka enzima (2,5 mg/mL) se prave ostala potrebna razblaženja.

U isprani polimer se doda 1 mL rastvora perjodatno oksidovane peroksidaze koncentracije: 2,5 mg/mL; 1,25 mg/mL; 0,25 mg/mL i 0,05 mg/mL što odgovara količinama od dodatih 50; 25; 5; 1 mg enzima na 1 g suvog polimera. Rastvor enzima sa polimerom se inkubira 1 dan.

Odvadi se supernatant (sa frakcijom nevezanih enzima) i ostavi za merenja. Polimer se ispere dva puta po 5 minuta sa po 5 mL 1 M NaCl u natrijum-acetatnog puferu pH 5,0. Spoje se svi supernatanti i ostave za merenje.

Polimer se resuspenduje u 0,5 M natrijum-acetatnom puferu pH 5,0, uskladišten u frižideru do upotrebe.

### **6.20. Termotabilnost**

Termperaturna stabilnost slobodne-rastvorne peroksidaze (HRP) se određuje inkubacijom( zagrevanjem) 60 µl enzima koncentracije 0,1 mg/mL na 65 °C u

termobloku (Grant QBD21, United Kingdom). Uzimani su alikvoti od 10  $\mu$ L na 0, 1, 5 i 30 minuta. Svi uzorci su razblaženi po 10 puta i merena je enzimska aktivnost.

Za temperaturnu stabilnost perijodno imobilizovane HRP odmereno je 5,0 mg polimera (imobilizata) koncentracije 1,25 mg/mL u 100  $\mu$ L 0,1 M Na-fosfatnog pufera pH 7. Posle inkubacije na 65°C uzimani su alikvoti na 0, 1, 5 i 30 minuta. Nakon inkubacije uzorci su stavljeni na led, pa je merena enzimska aktivnost u imobilizatima.

### **6.21. Stabilnost u organskom rastvaraču – 80% 1,4 dioksanu**

Za određivanje slobodne-rastvorne peroksidaze (HRP) koristi se 80% rastvor 1,4-dioksana sa 20% Na-fosfatnog pufera pH 7,0 koncentracije 0,1M na sobnoj temperaturi od 23°C. Odmereno je 800  $\mu$ L dioksana i dodato 150  $\mu$ L pufera, a zatim i 50  $\mu$ L HRP koncentracije 0,25 mg/mL. Uziman je alikvot od 10  $\mu$ L, pa je merena enzimska aktivnost na: 0, 10, 20, 30, 60, 120 i 180 minuta, kao i posle 24 i 48 sati.

U odmerene imobilizate svih polimera koncentracije HRP 1,25 mg/mL dodato 2 mL 80% dioksana. Merena je specifična aktivnost nakon 0, 2, 24 i 48 sati inkubacije, imobilizata inkubiranih u organskom rastvaraču na sobnoj temperaturi.

### **6.22. pH optimum**

pH optimumom je određeno gde je najveća peroksidazna aktivnost za slobodnu-rastvornu HRP (0,1 mg/mL-10 puta razblažena) i imobilizovanu peroksidazu (koriscen je EDA20/12 1,25mg/mL). Napravljena je serija 0,1M fosfatno-citratnog pufera sa pH vrednostima od 3,0-8,0. Za pH 9,0 uzima se 0,1 M glicin.

Ista količina supstrata-pirogalola (8 mg) rastvorena je u po 5 mL svakog pufera i merena je enzimska aktivnosti. Urađena je i kontrola supstrata na svim pH vrednostima (tokom 3 minuta, bez HRP).

Enzimska aktivnost pri različitim pH vrednostima se određuje na već opisan način, spektrofotometrijom, merenjem apsorbancije na 420 nm za 3 minuta.

### **6.23. Određivanje $K_m$ i $V_{max}$**

Michaelis-Mentenova konstanta ( $K_m$ ) i maksimalna brzina reakcije ( $V_{max}$ ) su određivani za imobilizat i rastvornu HRP. Literaturna vrednost za  $K_m$  je 2,235mM ( za

rastvornu HRP). Na osnovu ove vrednosti za  $K_m$ , određivan je  $K_m$  rastvorne HRP i imobilizovane uz konstantnu koncentraciju  $H_2O_2$  i enzima, a menjanjem koncentracije pirogalola. Merena je enzimaska aktivnost rastvornog HRP koncentracije 0,25 mg/mL (20 puta razblažen), kao i imobilizata sa svim koncentracijama pirogalola, merena aktivnost 3 minuta na 420 nm.

#### **6.24. Uklanjanje fenola**

Odmereno je 4 mg vlažnog imobilizata EDA20/12 i pripremljen svež pirogalol. Dodato je 3 mL 13 mM pirogalol i uzimani su alikvoti od po 10  $\mu$ l na svakih 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75 i 90 minuta. Alikvoti su razblaženi 100 puta (sa 990  $\mu$ l  $H_2O$ ) i merena je apsorbancija na 420 nm. Nakon jednog ciklusa imobilizat se ispira četiri puta sa po 5 mL 0.1 M Na-fosfatnog pufera pH 7.

#### **6.25. Izvođenje sinteze umreženih makroporoznih kopolimera postupkom suspenzione kopolimerizacije**

Za reakciju kopolimerizacije je korišćena aparatura prikazana na slici 4.1. Reaktor zapremine 1 dm<sup>3</sup> je snabdeven povratnim hladnjakom i mešalicom. Mešalicu je pokretao motor „Tehtnica“ Železniki, snage 150 W. Zagrevanje je vršeno u termostatu.

Uzorci makroporoznih polimera sintetisani su u etanolu kao reakcionom medijumu pri temperaturi od 73 °C. Vreme odigravanja reakcije polimerizacije je iznosilo 4 h. Vodena faza, koju čine etanol i PVP, se unosi u reaktor. Reaktor se termostatira na 73 °C i mešalica se pušta u rad (broj obrtaja,  $n \approx 250$  o/min). Kada se PVP potpuno rastvori, u reaktor se unosi prethodno pripremljena uljna faza, koja se sastoji od monomerne faze u čiji sastav ulaze monomeri, GMA i EGDMA i inicijator, AIBN, i inertne faze u čiji sastav ulaze cikloheksanol i dodekanol.

Uljna faza se disperguje u vodenoj fazi do kapljica željenih dimenzija, koje se stabilizuju PVP-om iz vodene faze. Reakciona smeša se greje na temperaturu od 73 °C i tako startuje reakcija polimerizacije. Posle dva časa temperatura se povisi na 80 °C i reakcija se vodi na toj temperaturi.



**Slika 49.** Aparatura za izvođenje suspenzione kopolimerizacije

Makroporozni kopolimer dobijen suspenzinom kopolimerizacijom, se iz reaktora procedi na Bihnerovom levku i nekoliko puta ispira vodom da bi se uklonio zaostali PVP. Zatim se ispira tehničkim etanolom da bi se uklonila inertna komponenta. Polimer se ostavlja u etanolu preko noći, a zatim procedi i suši u vakuum sušnici pri temperaturi od 40 °C, do konstantne mase.

Sintetizovani makroporozni kopolimer je u obliku sfernih čestica različitih dimenzija. [12]

Uzorak ZS6 i ZS9 se razlikuju po odnosu monomera korišćenih za sintezu. Kod uzorka ZS6 odnos GMA i EGDMA je iznosio 90:10, a kod uzorka ZS9 odnos je 60:40.

Sinteza uzoraka ZS9, ZS16, ZS17 i ZS18 je izvršena pri identičnim uslovima. Razlike se ogledaju u odnosu porogena. Pri sintezi ZS9 odnos cikloheksanola i dodekanola iznosio je 50:50, pri sintezi ZS16 odnos je 60:40, da bi pri sintezi uzorka ZS17 i



ZS18 iznosio 70:30 odnosno 90:10. Ispitivanja kopolimera GMA-EGDMA dobijenog suspenzionom polimerizacijom su pokazala da povećanje udela alifatskog alkohola vodi ka povećanju specifične zapremine, poroznosti i veličine pora uz istovremeno smanjenje specifične površine. Zbog toga se očekuje da prilikom sinteze i u etanolu kao reakcionom medijumu povećanje udela cikloheksanola u odnosu na dodekanol dovede do opadanja prečnika pora uz istovremeni porast poroznosti i specifične površine.

Veličina čestica makroporoznog polimera ZS9 određena je upotrebom optičkog mikroskopa i metode rasipanja svetlosti.

#### **6.26. Aktivacija polimera etilendiaminom**

a) Polimer se ispere tri puta sa po dve zapremine etanola, a zatim dezaeriše u vodi 10 minuta na vakuum-pumpi.

b) 50 mg suvog polimera posle ispiranja i dezaeracije resuspenduje se u 2 mL rastvora etilendiamina koncentracije 1,3 mg/mL ili u 20 mL rastvora termostatira se 2,5 h na 70°C i ostavi preko noći na sobnoj temperaturi. Sutradan se polimer ispere vodom dok joj pH ne bude oko 6, procedi se na Bihnerovom levku i suši u sušnici na 50°C.

#### **6.27. Titracija amino grupa**

a) Odmeri se oko 10 mg vlažnog polimera i resuspenduje u 5 mL 0,5M KCl u epruveti sa magnetom. Uz mešanje podesi se pH suspenziji polimera na 11,0 dodatkom 0,1 M NaOH.

b) U suspenziju se dodaje u porcijama od po 0,05 mL 0,01M HCl. Titracija se radi do pH 6.

c) Ponovi se identična procedura i za 5 mL 0,5 M KCl.

d) Iz razlike utrošenih zapremina (V) HCl za 0,5 M KCl i uzorak dobija se broj molova amino grupa na izmerenih 10 mg vlažnog polimera:

$$n=0.01 M \times V$$

e) Odatle se dalje preračuna količina amino grupa na 1 g vlažnog polimera ili suvog

### 6.28. Odredjivanje odnosa vlažne i suve mase polimera

Izmeri se masa prazne epruvete ( $m_1$ ), u nju se doda oko 100 mg vlažnog polimera i ponovo se izmeri masa epruvete ( $m_2$ ). Epruveta sa polimerom se suši na 50°C sve dok masa epruvete ne prestane da se smanjuje, odnosno do konstantne mase ( $m_3$ ). Odnos mase vlažnog i suvog polimera, faktor  $F$  dobija se po formuli:

$$F = \frac{(m_2 - m_1)}{(m_3 - m_1)}$$

### 6.29. Konvencionalna metoda imobilizacije enzima

U ovoj metodi enzim se direktno vezuje za nemodifikovani polimer u rastvoru visoke jonske jačine. To je najjednostavniji način imobilizacije jer nije potrebna prethodna aktivacija nosača ili enzima, odnosno amino grupe enzima se direktno vezuju za epoksidne grupe nosača.

a) U 5 plastičnih epruveta odmeri se po 50,0 mg određenog suvog aminovanog polimera. 1,25 mg enzima se rastvori u 5 ml 1,25 M kalijum-fosfatnog pufera pH 8 i u svaku epruvetu se doda po 1 mL ovog rastvora. Epruvete se stave u tresilicu na sobnoj temperaturi (20-25°C) 48 h da bi se obavio proces imobilizacije.

b) Odvadi se supernatant i polimer se ispere dva puta sa po 5 mL 1 M NaCl u natrijum-acetatnom puferu pH 5,0. Svi supernatanti se spoje i ostave. Polimer se resuspenduje u 50 mM natrijum-acetatnom puferu do upotrebe.

c) Odredi se koncentracija enzima i proteina, kao i aktivnost enzima u spojenim supernatantima i u alikvotu polaznog rastvora enzima.

d) Imobilizat se ispere više puta sa puferom da se uklone i tragovi nevezanog enzima i onda mu se odredi specifična aktivnost.

e) Crta se grafik zavisnosti specifične aktivnosti i prinosa imobilizacije od količine dodatih proteina i sa njega se odredi optimalna količina enzima koju je potrebno dodati.

### **6.30. Odredjivanje specifične aktivnosti supernatanata**

Direktno u kivetu odmeriti 1 ml rastvora pirogalola u puferu. Rastvor pirogalola mora biti sveže pripremljen i zaštićen od svetlosti, jer je jako osetljiv na svetlost, i ukoliko je izložen vazduhu i svetlosti duže vreme, potamni i gubi aktivnost. Dodati 10  $\mu$ l vodonik-peroksida i 10  $\mu$ l supernatanta. Uključiti štopericu i staviti kivetu u spektrofotometar. Meriti aktivnost supernatanata 3 minuta, na svakih 30 sekundi, polazeci od nultog trenutka tj. trenutka kada stavimo kivetu u spektrofotometar. Slepa proba predstavlja pirogalol u puferu. Zabeležiti rezultate.

Množenjem koncentracije enzimске aktivnosti sa zapreminom supernatanta dobija se količina nevezanih jedinica enzima. Razlika između količine nevezanog enzima i dodatog predstavlja količinu vezanog enzima i proteina na 50 mg suvog polimera. Sve se preračunava na 1 g suvog polimera množenjem sa 20.

### **6.31. Odredjivanje specifične aktivnosti imobilizata**

U plastičnu epruvetu odmeriti 5 mg imobilizata, doda mu se 1 ml pufera da se ne osuši. Pred merenje se pufer odvadi i stavi se magnet u epruvetu. U epruvetu se doda 3 ml rastvora 0.013 M pirogalola u puferu. U trenutku dodavanja 30  $\mu$ l 0,97 M vodonik-peroksida uključi se štoperica i magnetna mešalica na maksimum. Na svakih 60 sekundi vaditi automatskom pipetom alikvot od 1 ml ovog rastvora, filtrirati kroz nastavak za pipetu napunjen vatom, a zatim meriti aktivnost. Apsorbancija se meri na 420 nm, koristeći kao ekstincioni koeficijent pirogalola  $\epsilon=12$  mmol/cm.

Slepa proba predstavlja pirogalol u puferu. Zabeležiti rezultate.

**Prinos imobilizacije** se računa po sledećoj formuli:

$$Y = Sp / Avezana \times 100 \%$$

Gde je:

*Sp*- specifična aktivnost,

*Avezana*-aprorbancija vezanog enzima.

**Specifična aktivnost** se računa po formuli:

$$Sp = (3 * A / (\epsilon * t)) / \text{mimobilizata}$$

**Enzimska aktivnost peroksidaze** se određuje prema formuli:

$$\text{Units/ml enzima} = (\Delta A_{420/30s} * 3 * df) / 12 * 0.01$$

gde su:

s- sekundi,

3- zapremina (u mililitrima),

df- faktor razblazenja,

12- ekstincioni koeficijent,

0.01- zapremina (u mililitrima) dodatog enzima. [8]

Dobijenu vrednost množimo sa 11 da bi dobili količinu nevezanih jedinica (11 je ukupna zapremina svih spojenih supernatanata). Ta vrednost se oduzme od vrednosti aktivnosti slobodnog enzima i dobija se količina vezanih jedinica.

### **6.32. Imobilizacija enzima na polimeru aktiviranom glutaraldehidom**

U ovoj metodi enzim se vezuje za polimer prethodno aktiviran glutaraldehidom.

a) U 5 plastičnih epruveta se odmeri po 50,0 mg suvog prethodno aminovanog polimera. Doda mu se 1 mL 0,1 M natrijum-fosfatnog pufera pH 8,0 i dezaeriše se 10 min na vodenoj vakuum pumpi. Posle dezaeracije polimer se ispere 2 puta sa po 5 mL istog pufera i resuspenduje u 2 mL 2,5 % rastvora glutaraldehida u istom puferu. Polimer se ostavi 2 h na sobnoj temperaturi. Posle 2 h polimer se ispere tri puta sa po 5 mL 0,1 M fosfatnog pufera pH 7,0.

b) U epruvete se doda 1 mL rastvora enzima koncentracije 0,25 mg/mL što odgovara količini od dodatih 25 mg enzima na 1 g suvog polimera. Rastvor enzima sa polimerom se inkubira 1 dan.

c) Odvadi se supernatant i polimer se ispere dva puta sa po 5 mL 1 M NaCl u natrijum-acetatnom puferu pH 5,0. Svi supernatanti se spoje i ostave. Polimer se resuspenduje u 50 mM natrijum-acetatnom puferu do upotrebe.

d) Odredi se koncentracija enzima i proteina u spojenim supernatantima i u alikvotu polaznog rastvora enzima.

e) Imobilizat se ispere više puta sa puferom da se uklone i tragovi nevezanog enzima i onda mu se odredi specifična aktivnost.

f) Crta se grafik zavisnosti specifične aktivnosti i prinosa imobilizacije od količine dodatih proteina i sa njega se odredi optimalna količina enzima koju je potrebno dodati.

### **6.33. Imobilizacija enzima na polimeru aktiviranom natrijum-perjodatom**

U ovoj metodi enzim se vezuje za polimer prethodno aktiviran natrijum perjodatom.

a) Rastvori se 10 mg peroksidaze u 5 mL 50 mM natrijum-acetatnog pufera pH 5,0 i u to se doda 0,6 mL 50 mM natrijum-perjodata. Rastvor se ostavi na tamno u frižider 6 h uz povremeno mešanje. Posle 6 h doda mu se 0.2 mL etilen glikola i nakon pola sata se stavi na dijalizu naspram 50 mM natrijum-acetatnog pufera pH 5,0.

b) U plastične epruvete se odmeri 50 mg suvog aminovanog polimera, doda mu se 1 mL natrijum-acetatnog pufera pH 5,0 i dezaeriše se 10 minuta, a zatim se ispere 2 puta sa po 5 mL istog pufera. U isprani polimer se doda 1 mL rastvora perjodatno oksidovane peroksidaze koncentracije 0,25 mg/mL što odgovara količinama od dodatih 25 mg enzima na 1 g suvog polimera. Rastvor enzima sa polimerom se inkubira 1 dan.

c) Odvadi se supernatant i polimer se ispere dva puta sa po 5 mL 1 M NaCl u natrijum-acetatnom puferu pH 5,0. Svi supernatanti se spoje i ostave. Polimer se resuspenduje u 50 mM natrijum-acetatnom puferu do upotrebe.

d) Odredi se koncentracija enzima i proteina u spojenim supernatantima i u alikvotu polaznog rastvora enzima.

e) Imobilizat se ispere više puta sa destilovanom vodom da se uklone i tragovi nevezanog enzima i onda mu se odredi specifična aktivnost.

#### **6.34. Imobilizacija enzima na polimeru aktiviranom natrijum-perjodatom uz dodatak EDAC-a**

U ovoj metodi enzim se vezuje za polimer prethodno aktiviran natrijum perjodatom.

a) Rastvori se 10 mg peroksidaze u 5 mL 50 mM natrijum-acetatnog pufera pH 5,0 i u to se doda 0,6 mL 50 mM natrijum-perjodata. U ovaj rastvor doda se 1 mL 0,1 M EDAC-a rastvorenog u natrijum-acetatnom puferu pH 5,0. Rastvor se ostavi na tamno u frižider 6 h uz povremeno mešanje. Posle 6 h doda mu se 0.2 mL etilen glikola i nakon pola sata se stavi na dijalizu naspram 50 mM natrijum-acetatnog pufera pH 5,0.

b) U plastične epruvete se odmeri 50 mg suvog aminovanog polimera, doda mu se 1 mL natrijum-acetatnog pufera pH 5,0 i dezaeriše se 10 minuta, a zatim se ispere 2 puta sa po 5 mL istog pufera. U isprani polimer se doda 1 mL rastvora perjodatomno oksidovane peroksidaze koncentracije 0,25 mg/mL što odgovara količinama od dodatih 25 mg enzima na 1 g suvog polimera. Rastvor enzima sa polimerom se inkubira 1 dan.

c) Odvadi se supernatant i polimer se ispere dva puta sa po 5 mL 1 M NaCl u natrijum-acetatnom puferu pH 5,0. Svi supernatanti se spoje i ostave. Polimer se resuspenduje u 50 mM natrijum-acetatnom puferu do upotrebe.

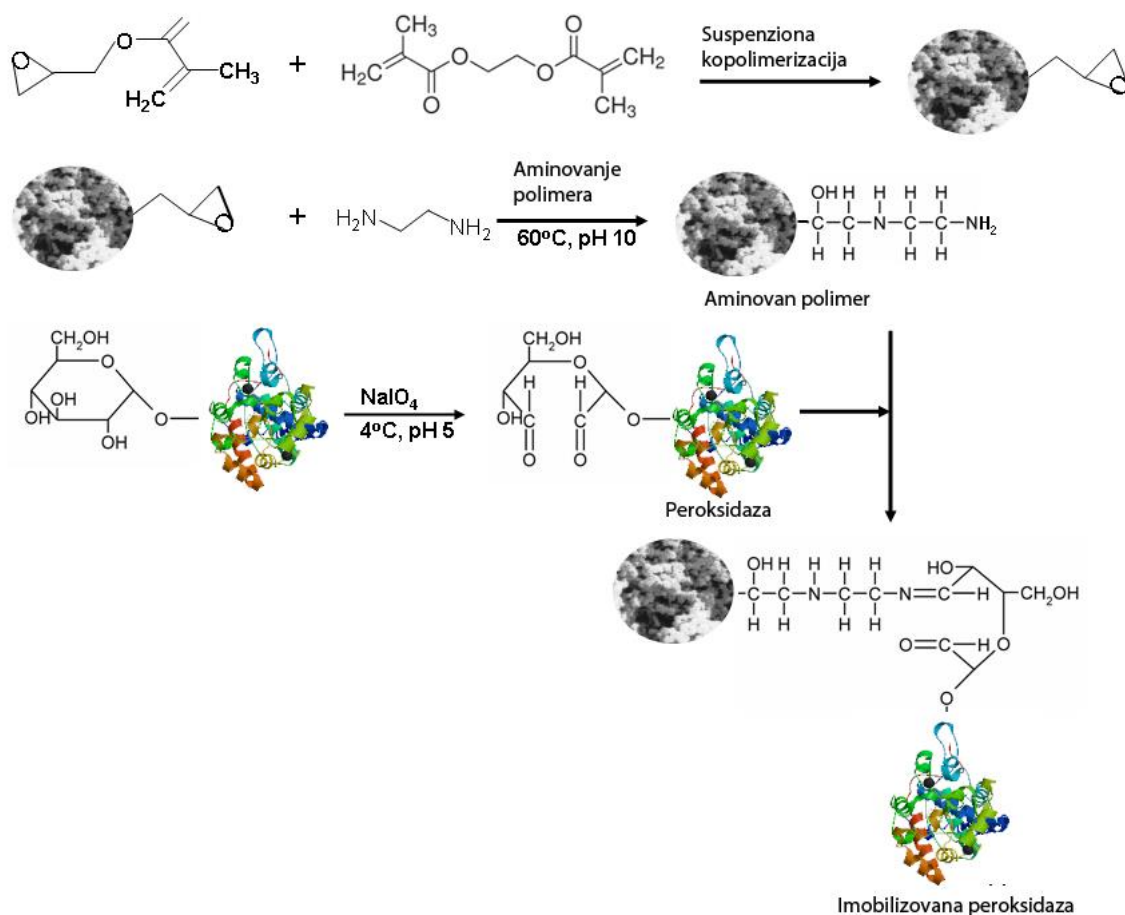
d) Odredi se koncentracija enzima i proteina u spojenim supernatantima i u alikvotu polaznog rastvora enzima.

e) Imobilizat se ispere više puta sa destilovanom vodom da se uklone i tragovi nevezanog enzima i onda mu se odredi specifična aktivnost.

### III REZULTATI I DISKUSIJA

#### 7. KOVALENTNA IMOBILIZACIJA PEROKSIDAZE NA MAKROPOROZNIM GLICIDIL METAKRILATU VELIČINE ČESTICA OD 150 DO 500 $\mu\text{m}$

U prvom delu ovog rada su sintetisani makroporozni glicidilmetakrilati sa različitim površinskim karakteristikama i dijametrom čestica od 150 do 500  $\mu\text{m}$  a zatim je peroksidaza iz rena imobilizovana perjodatnom i glutaraldehidnom metodom i izmerena je njena aktivnost i stabilnost u rastvornom i imobilizovanom stanju, Slika 50.

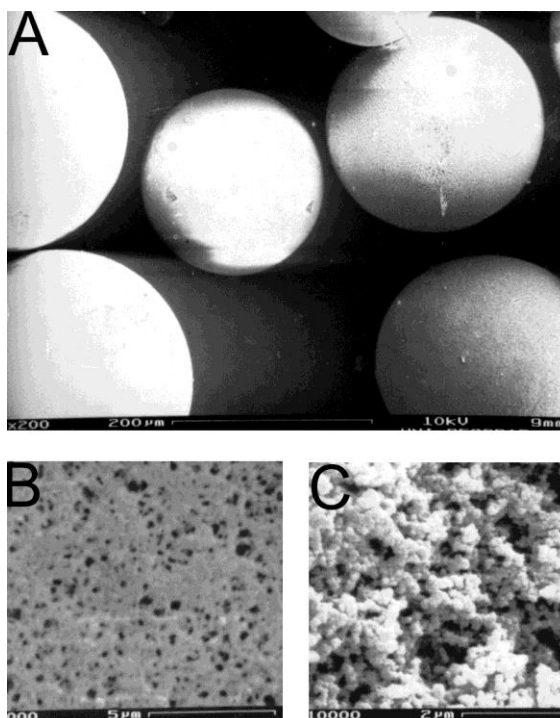


**Slika 50.** Reakciona šema imobilizacije peroksidaze na makroporoznom glicidilmetakrilatu



## 7.1. Sinteza makroporoznog glicidil metakrilata veličine čestica od 150 do 500 $\mu\text{m}$

Četiri različita kopolimera su dobijena po metodi Prof Jovanovića [71, 72]. Dijametar čestica dobijenog kopolimera je bio u opsegu od 150-500  $\mu\text{m}$  i površina ovih čestica je bila veoma porozna, Slika 51.



**Slika 51.** Skenirajuća elektronska mikroskopija makroporoznog poli(GMA-co-EGDMA). A) kuglice pri uvećanju od 200 puta; B) površina kuglica pri uvećanju od 5000 puta; C) površina kuglica pri uvećanju od 10 000 puta.

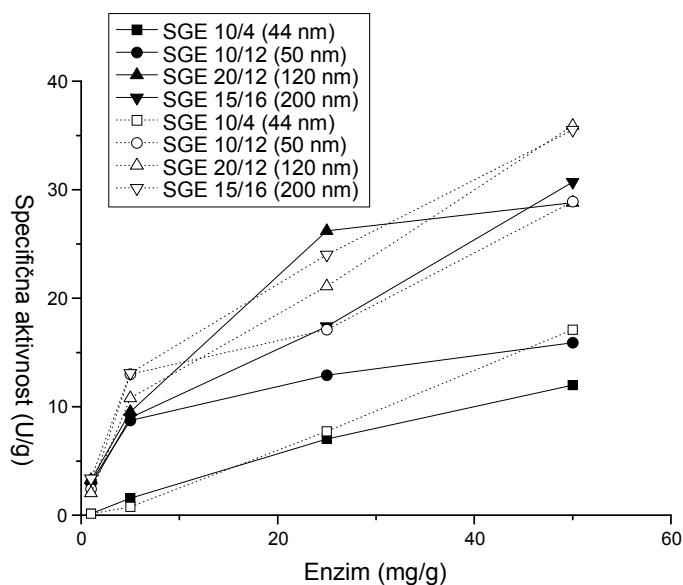
Specifična zapremina pora, specifična površina i srednji dijametar pora kopolimera je određen pre modifikacije a koncentracija amino grupa je određena nakon modifikacije sa diaminoetanom titracijom sa 0,100 M HCl, Tabela 5.

**Tabela 5.** Karakteristika površine makroporoznog poli(GMA-co-EGDMA).

Kopolimer	Veličina pora $d_{V2}$ (nm)	Zapremina pora $V_s$ (mL/g)	Aktivna površina $S_{s,Hg}$ (m <sup>2</sup> /g)	Amino grupe ( $\mu$ mol/g)
SGE-10/4	44	0.580	70	790
SGE-10/12	53	0.610	50	810
SGE-20/12	120	0.960	31	1050
SGE-15/16	200	1.020	34	370

## 7.2. Optimizacija imobilizacije peroksidaze na glicidil metakrilatu

Različite šarže polimera imaju različite karakteristike površine i visoku koncentraciju amino grupa. Pošto je pokazano da karakteristike površine nosača korišćenog za imobilizaciju enzima ima uticaj na aktivnost i stabilnost imobilizovanih glikozidaza [99] odredili smo koja je od ovih šarži najpogodnija za imobilizaciju peroksidaze koristeći glutaraldehidni i perjodatni metod prethodno optimizovan za glikozidaze [100-102]. Da bi to uradili različite količine enzima su dodavane na gram polimera i specifična aktivnost imobilizata je određivana. Povećanjem količine dodatog enzima po gramu kopolimera specifična aktivnost imobilizovanog enzima je takođe rasla, Slika 52.



**Slika 52.** Uticaj količine dodatog enzima na specifičnu aktivnost imobilizovane peroksidaze. Otvoreni simboli – perjodatna imobilizacija, zatvoreni simboli – glutaraldehidna imobilizacija.

Perjodatna metoda je dala u proseku 1,5 puta veću specifičnu aktivnost imobilizovanog enzima od glutaraldehidne metode kada smo koristili istu količinu dodatog enzima. Veća aktivnost imobilizovanog enzima sa perjodatnom metodom je takođe prethodno dobijena sa lipazom na eupergitu [100] ili Sepabeads EC-EP [103]. Ovi rezultati ukazuju da je perjodatni metod superiorniji verovatno zato što proteinski deo molekula ostaje intaktan. Oksidacija ugljenohidratnog dela molekula dovodi do formiranja većeg broja reaktivnih grupa što povećava verovatnoću imobilizacije. Prisustvo ugljenohidratnog spejsera smanjuje difuziona ograničenja i povećava samim tim aktivnost enzima.

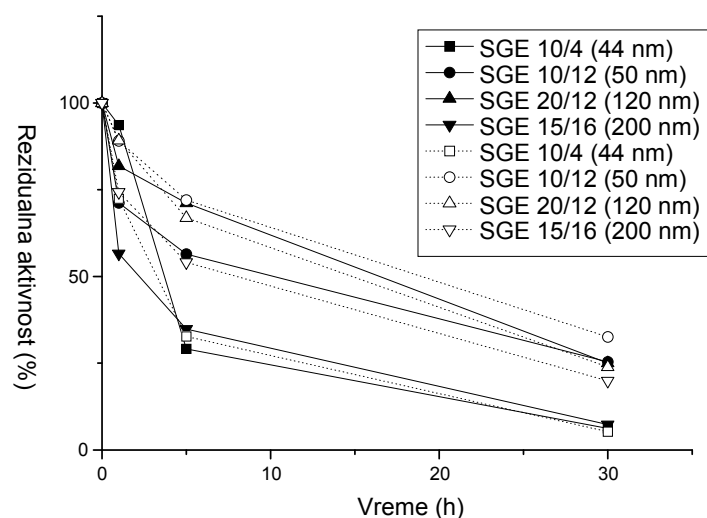
Površinske karakteristike kopolimera su takođe imala utvak tako da je najveću aktivnost pokazao (120 and 200 nm) SGE 20/12 i SGE 15/16 koji su dali aktivnost od oko 35 U/g. Sličan trend je bio dobijen i za glutaraldehidni metod gde je specifična aktivnost peroksidaze imobilizovane na kopolimeru sa veličinom pora od 200 nm bila oko tri puta veća od specifične aktivnosti peroksidaze imobilizovane na nosaču sa veličinom pora od 44 nm. Kopolimeri sa malom veličinom pora daju veliku aktivnu površinu ali veoma male pore takođe dovode do smanjenja brzine difuzije enzima i supstrata. Primećeno povećanje specifične aktivnosti nosača sa većim porama je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim pri imobilizaciji subtilizina na različitim

silicijumskim nosačima gde je primećeno da silicijumski nosači sa većom veličinom pora daju veću specifičnu aktivnost u odnosu na nosače sa manjim porama [104]. Prinos imobilizacije za najaktivniji glutaraldehidni imobilizat je bio oko 5 % a za perjodatni oko 2 %. Razlog za manji prinos kod perjodatne metode može biti inaktivacija enzima tokom perjodatne oksidacije.

Slični rezultati su dobijeni koristeći Eupergit C i Eupergit C 250L za imobilizaciju format dehidrogenaze gde se dobija mnogo veća aktivnost u slučaju Eupergita 250L zbog 10 puta većeg dijametra pora [105]. Navedeni rezultati su u suprotnosti sa rezultatima dobijenim sa lipazom iz *C.rugosa* imobilizacijom na Eupergitu C gde je I aktivniji i stabilniji imobilizat dobijen nego imobilizacijom na Eupergitu C 250L [100]. Iz svega navedenog sledi zaključak da optimalna veličina pora zavisi od nosača i od enzima koji se imobilizuje. U ovo doktorskoj disertaciji peroksidaza iz rena sa molekulskom masom od 40 000 Da i dijametrom molekula od 5-6 nm daje imobilizate sa najvećom aktivnošću na nosačima sa veličinom pora od 120 do 200 nm. Opšte je prihvaćeno pravilo iz literature da dijametar pora treba da bude barem 4 do 5 puta veći od dijametra molekula enzima da bi efikasnost imobilizacija bila velika [106].

### **7.3. Određivanje stabilnosti imobilizovane peroksidaze**

U svim proučavanim imobilizatima termostabilnost imobilizovanog enzima je bila veća od termostabilnosti rastvorne peroksidaze. Stabilizacioni factor je zavisio od površinskih karakteristika kopolimera i od vrste korišćene imobilizacione metode. Najveću termostabilnost na 65°C je imao enzim imobilizovan perjodatnom metodom na kopolimeru od 50 nm porama (SGE 10/12), Slika 53.



**Slika 53.** Uticaj inkubacionog vremena na 65°C na aktivnost imobilizovanog enzima. Otvoreni simboli – perjodatna imobilizacija, zatvoreni simboli – glutaraldehidna imobilizacija.

Takođe se može uočiti da je peroksidaza imobilizovana perjodatnom metodom davala termostabilniji imobilizat u odnosu na glutaraldehidnu metodu. Koristeći model kinetike prvog reda sa pretpostavkom parcijalnog zadržavanja aktivnosti finalnog enzimskog stanja izračunati su poluživoti I konstante inaktivacije imobilizata, Tabela 6.

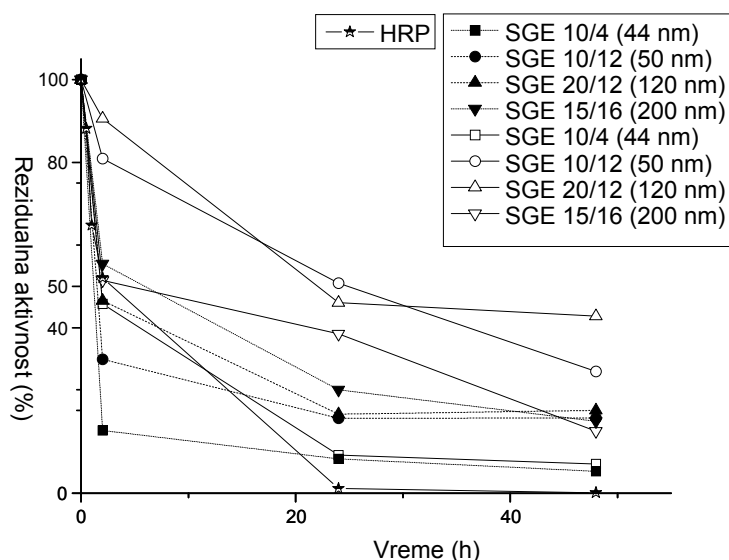
**Tabela 6.** Parametri kinetike inaktivacije slobodne I imobilizovane peroksidaze na 65°C za različite kopolimere I metode imobilizacije

Kopolimer	Glutaraldehidni metod				Perjodatni metod			
	$k_D, h^{-1}$	$\alpha$	$t_{1/2}, h$	$F$	$k_D, h^{-1}$	$\alpha$	$t_{1/2}, h$	$F$
SGE-10/4	0.245	4.56	2.83	1.26	0.264	6.02	2.62	1.17
SGE-10/12	0.191	26.19	3.63	1.62	0.083	29.16	8.35	3.73
SGE-20/12	0.099	18.91	7.00	3.12	0.108	20.89	6.42	2.87
SGE-15/16	0.474	15.10	1.46	0.65	0.178	20.20	3.89	1.74

Parametri za rastvornu peroksidazu:  $k_D = 0.310 h^{-1}$ ;  $\alpha = 3.02$ ;  $t_{1/2} = 2.24 h$ ;  $F = 1$

Iz izračunatih podataka se može odmah videti da je peroksidaza na kopolimeru sa veličinom pora od 53 nm (SGE 10712) imobilizovana perjodatnom metodom najstabilnija sa najvećim poluživotom od 8,35h i rezidualnom aktivnošću od 29,2 %. U poređenju sa glutaraldehidnom metodom imobilizacije stabilnost perjodatnog imobilizata je bila dva puta veća dok je u odnosu na rastvornu peroksidazu imobilizat pokazao 4 puta veću stabilnost. Kopolimer SGE 20/12 sa veličinom pora od 120nm koji je dao imobilizat sa najvećom aktivnošću je pokazao i dobru stabilnost posle 30 h na 65°C zadržavši 25 % polazne aktivnosti. Niska termostabilnost imobilizata na kopolimeru sa najvećom veličinom pora (poluživot od 1,46 i 3,89 h za glutaraldehidni i perjodatni imobilizat) može biti posledica malog broja vezivnih mesta za enzim na kopolimeru i nemogućnosti višestrukog vezivanja molekula enzima za nosač.

Pošto je stabilnost u organskom rastvaraču veoma važna za sintezu hemikalija a nije uvek u korelaciji sa termostabilnošću ispitali smo i stabilnost imobilizata u 80% (v/v) dioksanu. Rastvorni enzim je nakon 48 h inkubacije u 80 % (v/v) dioksanu u potpunosti izgubio aktivnost dok je rezidualna aktivnost za sve imobilizate bila dosta veća u odnosu na rastvorni enzim u opsegu od 5,3 do 42,8 %, Slika 54.



**Slika 54.** Uticaj inkubacionog vremena u dioksanu na aktivnost rastvorne i imobilizovane HRP. Otvoreni simboli – perjodatna imobilizacija, zatvoreni simboli – glutaraldehidna imobilizacija.

Posle 48 h u 80 % dioksanu rastvorni enzim je izgubio potpuno aktivnost dok je imobilizat na SGE 20/12 zadržao 43 % polazne aktivnosti. Koristeći isti kinetički model kao I kod temperaturne stabilnosti I ovde smo izračunali kinetičke konstante inaktivacije enzima u dioksanu, Tabela 7.

**Tabela 7.** Kinetički parametri inaktivacije peroksidaze u 80 % (v/v) dioksanu

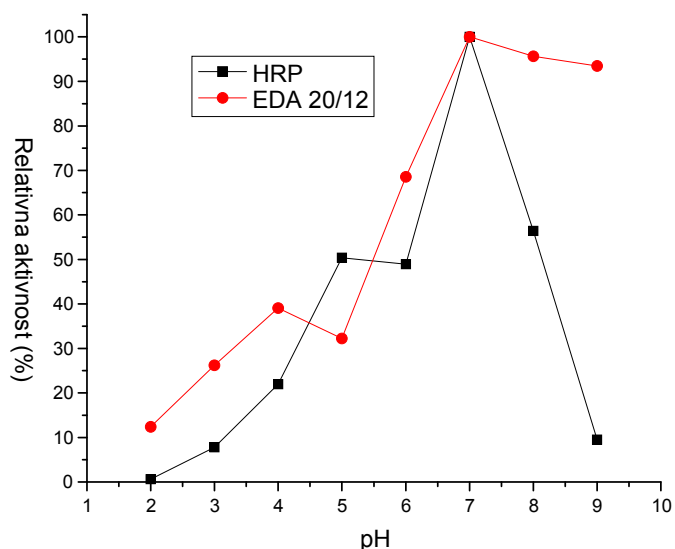
Kopolimer	Glutaraldehydni metod				Perjodatni metod			
	$k_D, h^{-1}$	$\alpha$	$t_{1/2}, h$	$F$	$k_D, h^{-1}$	$\alpha$	$t_{1/2}, h$	$F$
SGE-10/4	1.203	6.80	0.034*	-	0.446	8.14	1.55	0.79
SGE-10/12	0.874	18.15	0.79	0.40	0.138	38.69	5.02	2.55
SGE-20/12	0.545	19.55	1.27	0.64	0.102	41.81	6.80	3.45
SGE-15/16	0.416	21.20	1.67	0.85	0.542	26.7	1.23	0.62

\* u  $min^{-1}$ . Parametri za slobodnu peroksidazu:  $k_D=0.352 h^{-1}$ ;  $\alpha=0$ ;  $t_{1/2}=1.97 h$ ;  $F=1$

Ovo povećanje u termostabilnosti i stabilnosti u organskom rastvaraču je dokaz da perjodatna imobilizacija više doprinosi stabilnosti zbog višestrukih interakcija enzima sa nosačem.što je posledica formiranja velikog broja reaktivnih grupa u ugljenoidratnom delu molekula nakon perjodatne oksidacije.

#### 7.4. Kinetička karakterizacija imobilizovane peroksidaze

Peroksidaza imobilizovna perjodatom na SGE 20/12 copolymer sa veličinom pora od 120 nm je pokazala najveću aktivnost i značajnu stabilnost zato je dalje kinetički okarakterisana. Imobilizat je pokazao širi pH optimum u odnosu na slobodan enzime, Slika 55.



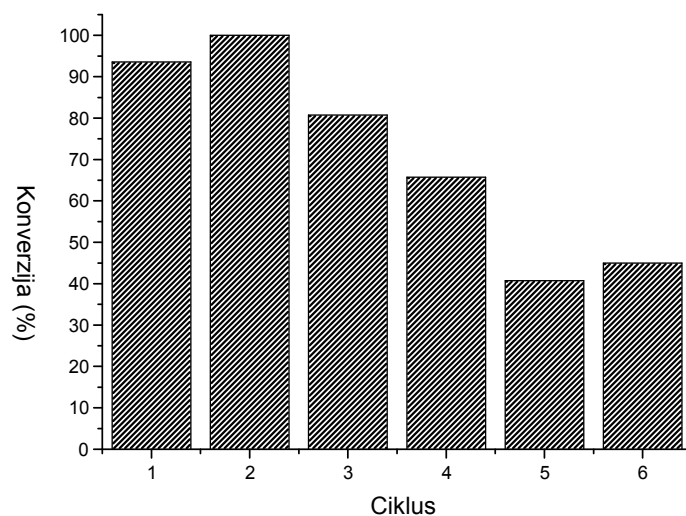
**Slika 55.** Uticaj pH na aktivnost rastvorne (HRP) i imobilizovane peroksidaze (EDA 20/12).

Veća aktivnost imobilizovanog enzima je više izražena na baznim pH vrednostima. Peroksidaza se ponašala u skladu sa Mihaelis-Mentenovom kinetikom i Mihaelisova konstanta za pirogalol je bila 12.1 mM za imobilizovanu peroksidazu dok je za rastvornu bila 1.93 mM pri zasićujućim koncentracijama peroksida. Ovo je bilo u skladu sa prethodnim studijama imobilizacije peroksidaza gde je takođe pokazano povećanje  $K_m$  vrednosti [74, 107] što je posledica povećanja difuzionih ograničenja zbog velike veličine čestica makroporoznog kopolimera koja je između 150-500  $\mu\text{m}$ . Tako je na primer primećeno povećanje  $K_m$  vrednosti za 15,6 puta za gvajakol za peroksidazu imobilizovanu na hitozanu [108] ili povećanje od 1,65 puta za peroksidazu imobilizovanu na magnetnom poliglicidilmetakrilatu [74].

### 7.5. Karakterizacija imobilizovane peroksidaze u bač reaktoru

Da bi joj testirali operativnu stabilnost imobilizovana peroksidaza je upotrebljena u bač reaktoru za oksidaciju pirogalola. Urađeno je 6 ciklusa i nakon završetka reakcije u svakom ciklusu imobilizovana peroksidaza je isprana i ponovno upotrebljena u sledećem ciklusu, Slika 56.





**Slika 56.** Višestruka upotreba peroksidaze u reaktoru

Za vreme prva 4 ciklusa aktivnost je padala i posle toga ostala konstanta na 45 % početne aktivnosti. Imobilizovana peroksidaza je pokazala dobru stabilnost pod operacionim uslovima i optimizacija vodoničnog peroksidne koncentracije i dostava u reakcionom sistemu je rađena korišćenjem glukoza oksidaze i glukoze.

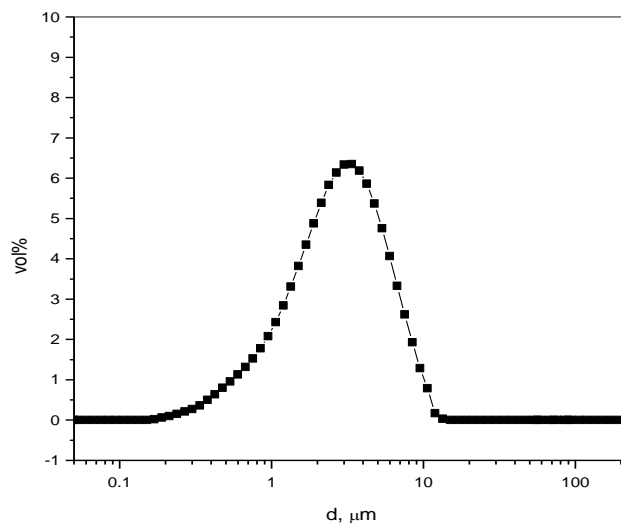
## **8. KOVALENTNA IMOBILIZACIJA PEROKSIDAZE NA MAKROPOROZNOM GLICIDIL METAKRILATU VELIČINE ČESTICA OD 2 DO 2,5 $\mu\text{m}$**

U ovom delu rada su se kao nosači koristili novosintetisani kopolimeri glicidilmetakrilata i etilenglikoldimetakrilata sa veličinom čestica od 2 do 2,5 mikrometra. Testirane se 4 metode imobilizacije i 5 serija kopolimera sa različitim površinskim karakteristikama.

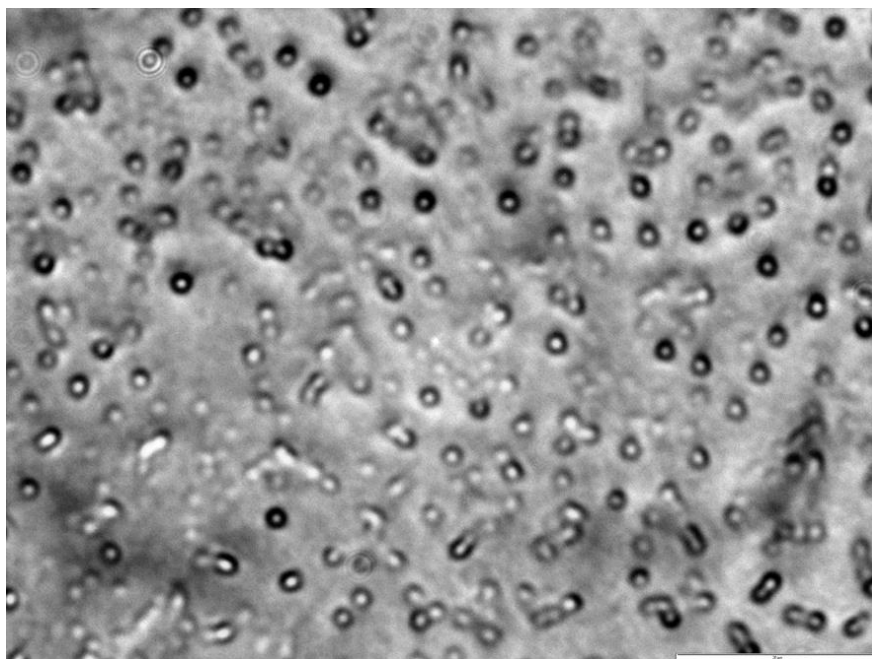
### **8.1. Sinteza i karakteristike makroporoznog glicidil metakrilata veličine čestica od 2 do 2,5 $\mu\text{m}$**

U ovom delu rada za imobilizaciju enzima korišćena su pet novosintetisanih kopolimera, koji se razlikuju po odnosu monomera, veličini čestica i pora i obeleženi su kao: ZS6, ZS9, ZS16, ZS17, ZS18. Za sintezu su korišćeni polivinil pirolidon, glicidilmetakrilat (GMA), etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) i azobisisobutironitril (AIBN). Kao porogen korišćeni su cikloheksanol i dodekanol. Slučajnim odabirom uzorka ispitana su svojstva polimera ZS9, što je prikazano na narednim slikama. Svojstva ostalih polimera su u fazi ispitivanja.

Ispitivanje veličine čestica makroporoznog polimera ZS9 upotrebom optičkog mikroskopa i metode rasipanja svetlosti je pokazalo da je veličina čestica oko 2  $\mu\text{m}$  (Slika 57 i Slika 58).

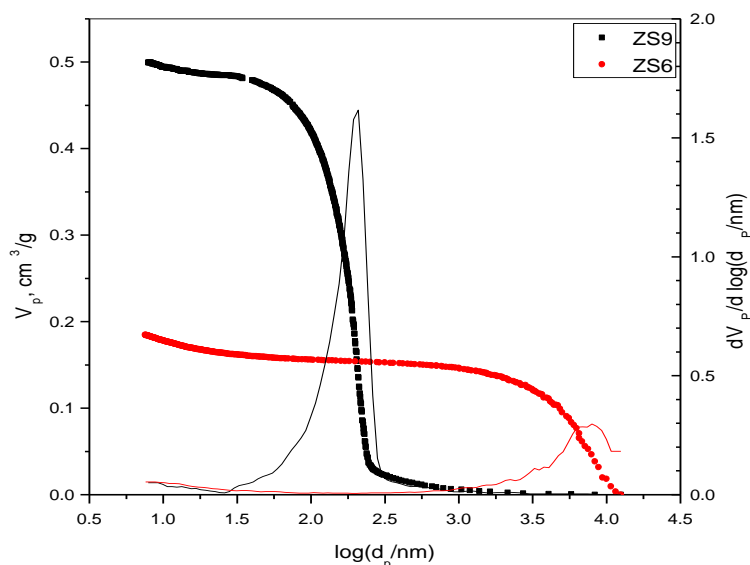


**Slika 57.** Zavisnost zapreminskog udela čestica od prečnika čestica



**Slika 58.** Optička mikroskopija uzorka ZS9 (končanica 20 μm)

Uzorak ZS6 i ZS9 se razlikuju po odnosu monomera korišćenih za sintezu. Kod uzorka ZS6 odnos GMA i EGDMA je iznosio 90:10, a kod uzorka ZS9 odnos je 60:40. Neka od svojstava navedenih kopolimera prikazana su na Slika 59.



**Slika 59.** Specifična zapremina pora za različite prečnike i raspodela veličina pora za kopolimere ZS6 i ZS9

Uočava se da sa povećanjem udela EGDMA smanjuje se veličina pora, uz istovremeni porast poroznosti, specifične zapremine pora i specifične površine. Za uzorak ZS6 se može smatrati da je neporozan tj. poroznost koja se na grafiku javlja je posledica međučestičnih praznina, Tabela 8.

**Tabela 8.** Karakteristike površine za kopolimere ZS6 i ZS9

	Specifična poroznost, (cm <sup>3</sup> /g)	Specifična površina, (m <sup>2</sup> /g)	Poroznost, (%)	Veličina pora, (nm)	Veličina čestica, <d <sub>v</sub> >, (μm)
ZS6	0,185	8,1	18,9	-	
ZS9	0,499	18,5	38,6	209	3,3

Uzorak ZS9 ima pore veličine od 30 do 300 nm sa pikom pri vrednosti od oko 200 nm. Kod ostalih uzoraka kako raste oznaka, tako bi trebalo da opada velicina pora a sa njom da raste specifična površina i poroznost čestica. Faktor vlažnosti računat je iz datih podataka, Tabela 9.

**Tabela 9.** Faktor vlažnosti (odnos vlažne i suve mase polimera)

polimer	ZS6	ZS9	ZS16	ZS17	ZS18
<i>mvlaz</i>	0,3	0,8	0,58	0,69	0,53
<i>msuv</i>	0,17	0,17	0,17	0,18	0,18
F, faktor vlažnosti	1,76	4,71	3,41	3,83	2,94

## 8.2. Modifikacija kopolimera etilendiaminom

Kopolimeri su modifikovani etilendiaminom. Nakon uvođenja amino grupe u kopolimere, određivana je njihova koncentracija kiselo-baznom titracijom Tabela 10.

**Tabela 10.** Količina amino grupa nakon tretiranja etilendiaminom.

Polimer	Zapremina HCl, mL	Količina amino grupa, mol
ZS6	3,4	1100
ZS9	4,8	2500
ZS16	4,3	2000
ZS17	4,8	2500
ZS18	3	700

Iz priložene tablice se vidi da se najveća koncentracija amino grupa dobijena za kopolimere ZS9 i ZS17, i to podjednako. Takođe se može primetiti da je koncentracija amino grupa bila skoro do dva puta veća od koncentracije amino grupa dobijene za seriju kopolimera sa veličinom čestica od 150 do 500 mikrometara u prvom delu ove doktorske disertacije.

## 8.3. Imobilizacije HRP na nosivom sintetisanom kopolimeru preko epoksidne grupe

U ovoj metodi enzim se direktno kovalentno vezuje preko amino grupa za epoksidne grupe nosača u rastvoru visoke jonske jačine. To je najjednostavniji način imobilizacije jer nije potrebna prethodna aktivacija nosača ili enzima. Ispitan je uticaj

svojstava nosača na količinu vezanih jedinica i aktivnost imobilizata i rezultati su dati u Tabela 11.

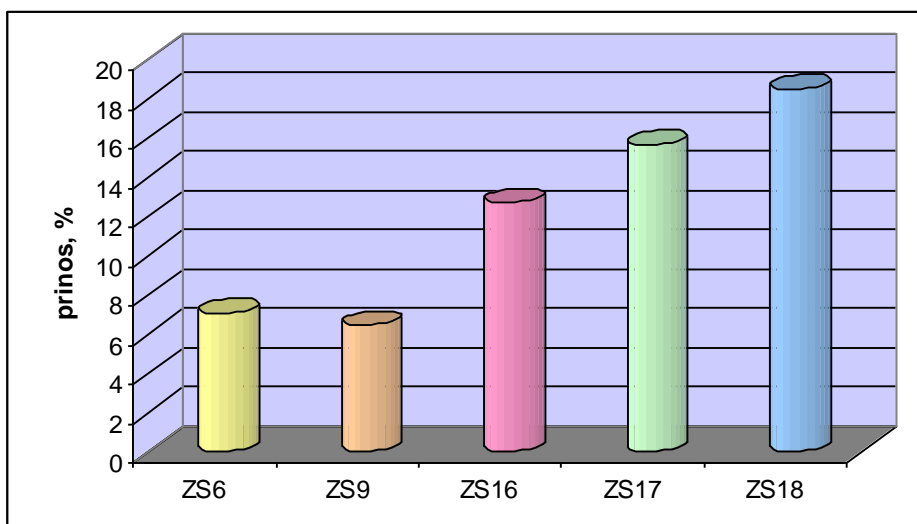
**Tabela 11.** Vezane jedinice i aktivnost imobilizata dobijeni konvencionalnom metodom.

Kopolimer	Vezane jedinice, (IU/ml)	Aktivnost, (IU/g)
ZS 6	44,7	3,50
ZS 9	45,9	3,19
ZS 16	31,9	3,63
ZS 17	31,7	5,52
ZS 18	31,2	6,64

Uzorak ZS6 i ZS9 se razlikuju po odnosu monomera korišćenih za sintezu (GMA i EGDMA). Uzorci ZS9, ZS16, ZS17 i ZS18 se razlikuju samo u odnosu porogena (cikloheksanola i dodekanola). U skladu sa postavkama sinteze i prethodnim rezultatima sa kopolimerima očekuje se da idući od ZS9 ka ZS18 veličina pora opada, a samim tim i da poroznost i specifična površina rastu.

U tabeli su prikazane zavisnosti vezanih jedinica, kao i aktivnosti od vrste polimera. Na osnovu ovih podataka vidi se da se najviše enzima vezalo za polimer ZS9, pa bi se očekivalo da je i aktivnost na ovom nosaču najveća, što ovde nije slučaj, šta više aktivnost na ovom nosaču je najmanja. Najmanje vezanih jedinica ima polimer ZS18, iako je to polimer sa najmanjom veličinom pora, tj. sa najvećom poroznošću. Jedino objašnjenje za ovu pojavu je pretpostavka da je veličina enzima veća od dijametra jedne populacije pora unutar kopolimera, i da stoga enzim nije u mogućnosti da prodje kroz celokupnu unutrašnju zapreminu čestice.

Deobom specifične aktivnosti imobilizata i vezanih jedinica po jedinici mase kopolimera dobijama prinos imobilizacije, Slika 60.



**Slika 60.** Zavisnost prinosa imobilizacije od vrste kopolimera primenom konvencionalne metode.

Sa ovog grafika vidimo da prinos raste u zavisnosti od vrste polimera tj. sa opadanjem veličine pora. Zapaža se nepravilnost samo kod polimera ZS9 koji ima neznatno niži prinos od polimera ZS6.

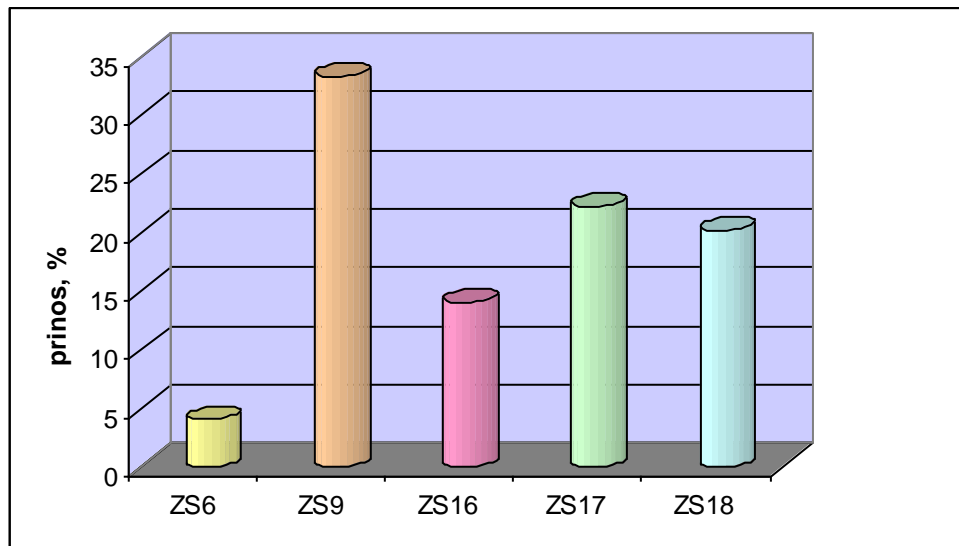
#### **8.4. Imobilizacije HRP na novosintetisani kopolimer glutaraldehydom metodom**

U ovoj metodi enzim se vezuje za kopolimer čije su epoksidne grupe prevedene u amino grupe, zatim je kopolimer aktiviran glutaraldehydom. Koristeći ovu metodu dobijen je porast specifične aktivnosti imobilizata sa smanjenjem veličine pore sem u slučaju kopolimera ZS9, Tabela 12.

**Tabela 12.** Vezane jedinice i aktivnost imobilizata dobijeni glutaraldehydom metodom.

<b>Kopolimer</b>	<b>Vezane jedinice, IU/ml</b>	<b>Aktivnost, IU/g suvog nosača</b>
<b>ZS 6</b>	43,9	1,77
<b>ZS 9</b>	43,4	14,5
<b>ZS 16</b>	42,5	5,96
<b>ZS 17</b>	35,0	7,78
<b>ZS 18</b>	42,4	8,55

Kopolimer ZS9 pokazuje najveću aktivnost od 14,5 U/g, a u isto vreme ima i veliki broj vezanih jedinica. Kopolimera ZS6 ima najviše vezanih jedinica i najmanju specifičnu aktivnost, te samim tim i najmanji prinos imobilizacije, Slika 61.



**Slika 61.** Zavisnost prinosa od vrste polimera primenom glutaraldehydne metode.

Najmanji prinos ima polimer ZS6, a najveći ZS9 dok u poređenju sa prethodnom metodom imobilizacije preko epoksidnih grupa se dobija 2 puta veći prinos. Jedno od objašnjenja bi moglo da bude i prisustvo spejsera između površine nosača i molekula enzima u vidu etilen diamina i glutaralhide što može da smanji sterne smetnje kopolimera ka enzimu i da dovede do veće pristupačnosti molekula enzima supstratu.

### **8.5. Imobilizacije HRP na nosilac sintetisani kopolimer perjodatnom metodom (bez EDAC-a)**

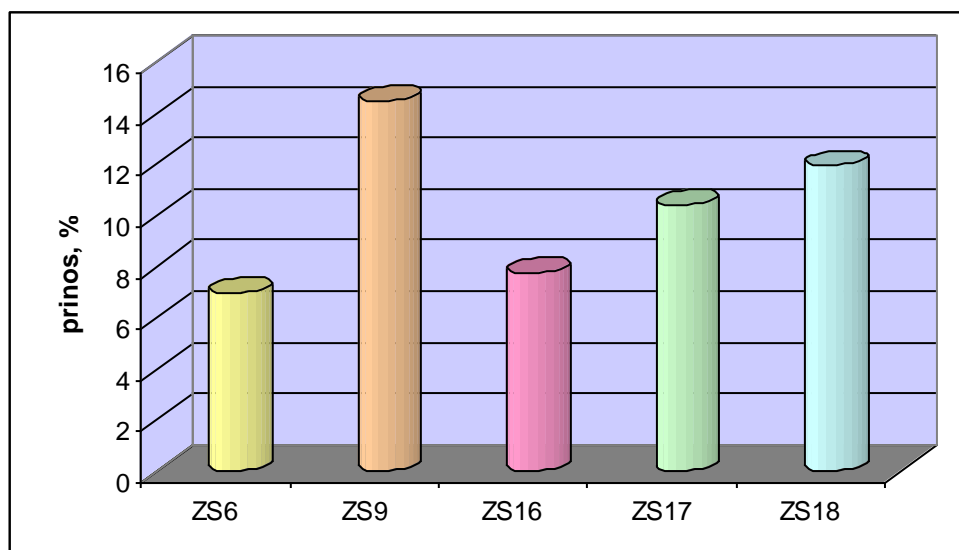
Pri perjodatnoj metodi imobilizacije reaktivne grupe se na molekulu enzima uvode perjodatnom oksidacijom njegove ugljenohidratne komponente. Koristeći ovu metodu dobijene su specifične aktivnosti imobilizata manje nego kod glutaraldehydne metode, Tabela 13.



**Tabela 13.** Vezane jedinice i aktivnost imobilizata dobijeni perjodatnom metodom (bez EDAC-a)

Polimer	Vezane jedinice, IU/ml	Aktivnost, IU/g suvog nosača
ZS 6	43,7	3,05
ZS 9	45,0	6,52
ZS 16	44,5	3,46
ZS 17	44,6	4,65
ZS 18	45,1	5,39

Kod ove metode uočava se linearna zavisnost između vrste polimera (veličine pora) i broja vezanih jedinica, odnosno aktivnosti. Sa smanjenjem velicine pora, tj. sa porastom poroznosti rastu kako broj vezanih jedinica tako i aktivnost. Jedino vrednosti polimera ZS9 odstupaju, i za ovaj polimer se HRP najviše vezao i ima najveću aktivnost. I prinos imobilizacije je bio najveći u slučaju kopolimera ZS9, Slika 62.



**Slika 62.** Zavisnost prinosa od vrste polimera primenom perjodatne metode (bez EDAC-a).

Ukoliko bismo sa ovog grafika izuzeli polimer ZS9, uočili bismo linearnu zavisnost između vrste polimera i prinosa. Polimer ZS9 pokazuje daleko veći prinos od ostalih polimera.

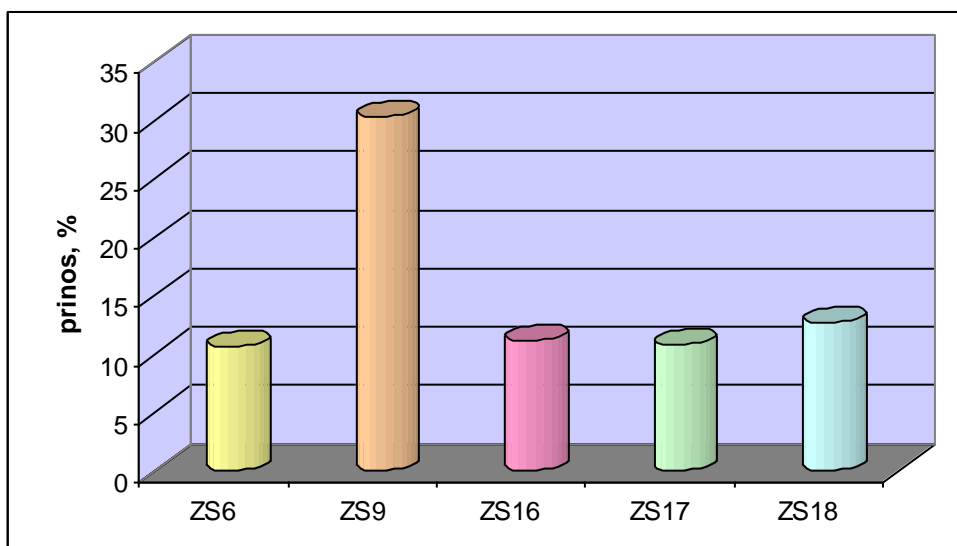
## 8.6. Imobilizacije HRP na novosintetisani kopolimer perjodatnom metodom sa karbodimidom EDAC-om

U ovoj metodi perjodatno oksidovan enzim se vezuje za polimer prethodno aktiviran dodatkom EDAC-a. Koristeći ovu metodu dobijene su najveće specifične aktivnosti imobilizata i nije korelacija između specifične aktivnosti imobilizata i veličine dijametra pora, Tabela 14.

**Tabela 14.** Vezane jedinice i aktivnost imobilizata dobijeni perjodatnom metodom ( sa EDAC-om)

<b>Polimer</b>	<b>Vezane jedinice, IU/ml</b>	<b>Aktivnost, IU/g suvog nosača</b>
<b>ZS 6</b>	43,8	4,65
<b>ZS 9</b>	45,0	13,65
<b>ZS 16</b>	44,9	5,04
<b>ZS 17</b>	45,0	4,90
<b>ZS 18</b>	44,6	5,67

Kopolimer ZS 9 je vezao najviše enzima, pa samim tim ima i najveću specifičnu aktivnost. Razlika između vrednosti za broj vezanih jedinica i aktivnost kod ostalih polimera je zanemarljiva, Slika 63.



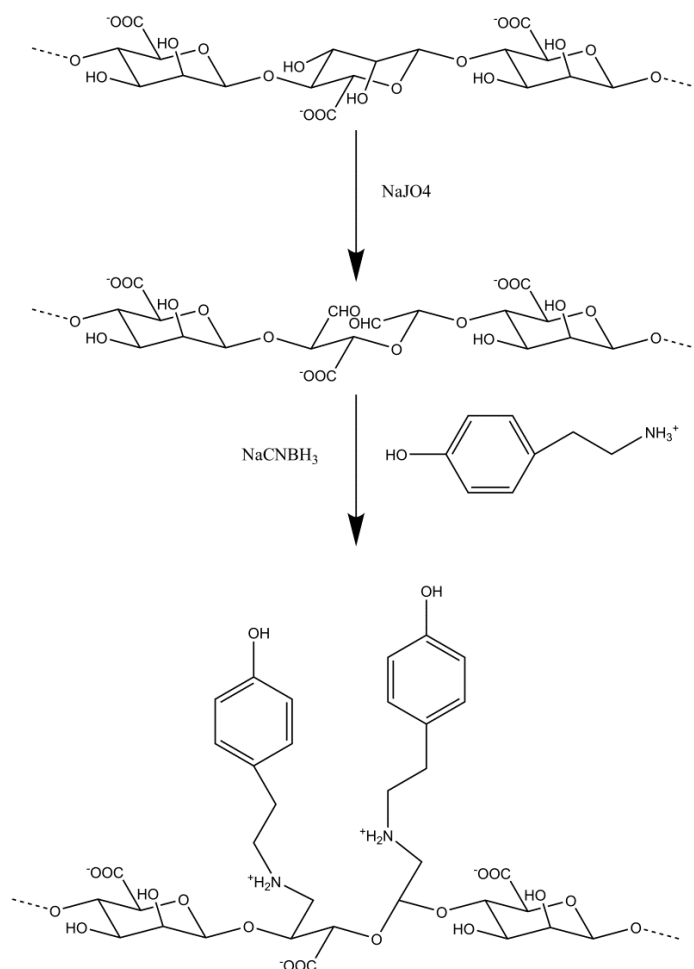
**Slika 63.** Zavisnost prinosa od vrste polimera primenom perjodatne metode (sa EDAC-om).

Kada posmatramo prinos u zavisnosti od vrste polimera, isti je slučaj kao i sa brojem vezanih jedinica i aktivnošću. Polimer ZS9 pokazuje znatno veći prinos, dok ostali polimeri imaju približno iste vrednosti.

## 9. IMOBILIZACIJE PEROKSIDAZE U MIKROKUGLICAMA ALGINATA

### 9.1. Sinteza i karakterizacija tiramin-alginata

Natrijum alginat je prvo oksidovan sa natrijum perjodatom tokom 24h u mraku na 4°C i prečišćen. Posle oksidacije sa različitim količinama perjodata dalje je modifikovan reduktivnom aminacijom, Slika 64.



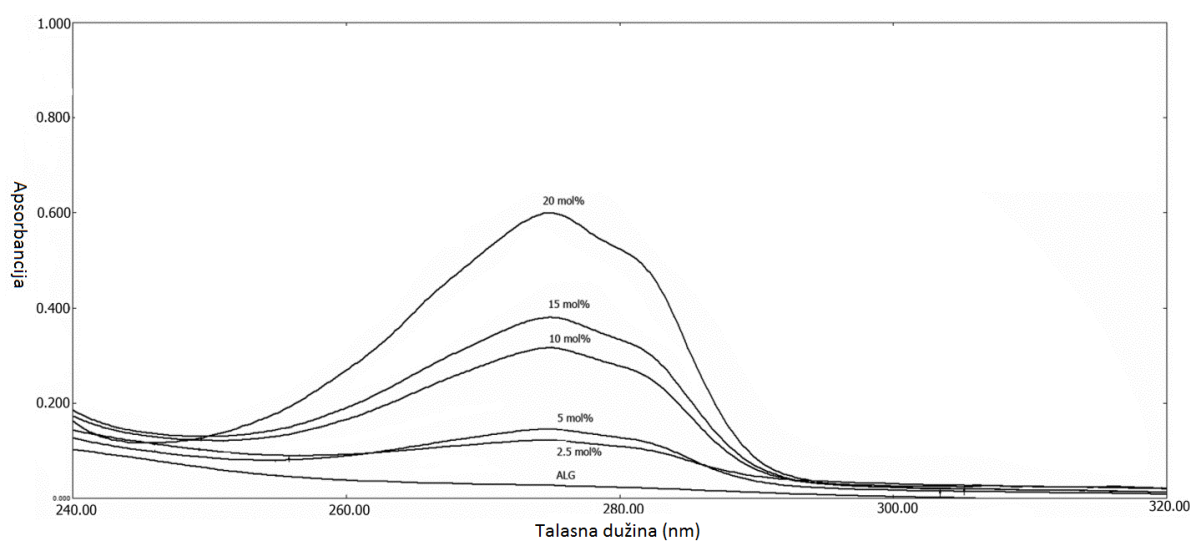
**Slika 64.** Tiramin alginat sintetska reakcija pomoću perjodatne oksidacije i reduktivne aminacije.

Stepen modifikacije alginata sa amino i fenolnim grupama je određen korišćenjem UV-VIS spektroskopije, FTIR spektara i kiselo baznom titracijom. Alginati sa različitim stepenima modifikacije su testirani u 2 reakcije za formiranje hidrogelova, sa kalcijumom i sa peroksidazom i vodonik peroksidom. Na kraju su dobijeni tiramin-

alginati testirani kao materijali za imobilizaciju peroksidaze unutar mikrokuglica sintetisanih u enzimatskoj emulzionoj polimerizacionoj reakciji koristeći glukoza oksidazu i glukozu za unutrašnju dostavu vodonik peroksida.

Zbog prisustva fenolnih grupa, tiramin je pokazao apsorpcioni maksimum na 275 nm dok nativni alginat nije apsorbovao na toj talasnoj dužini.

Da bi odredili stepen modifikacije alginata fenolnim grupama, UV-VIS spektri nativnog i modifikovanog alginata su snimljeni u opsegu od 240 do 320 nm, Slika 65.

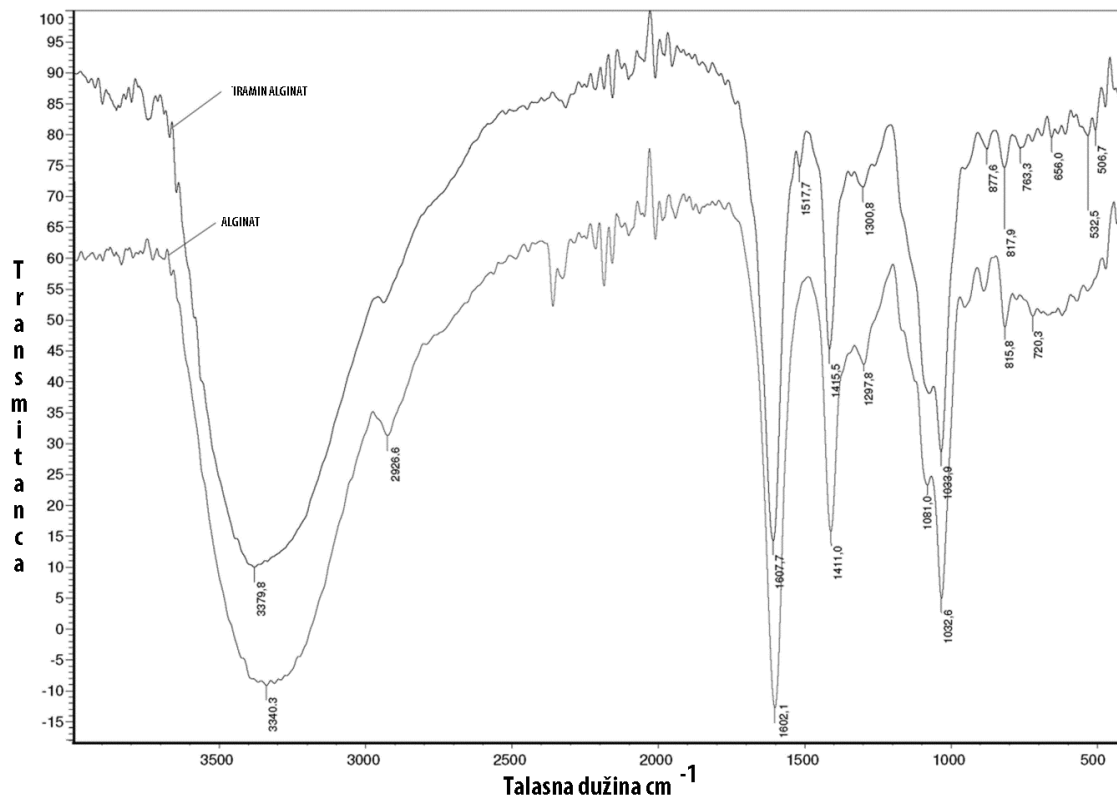


**Slika 65.** UV-VIS spektri nativnog i tiramin modifikovanog alginata.

Iz spektara se može videti da sa povećanjem molarnog odnosa perijodata na alginat apsorpcioni maksimum na 275 nm se takođe povećavao.

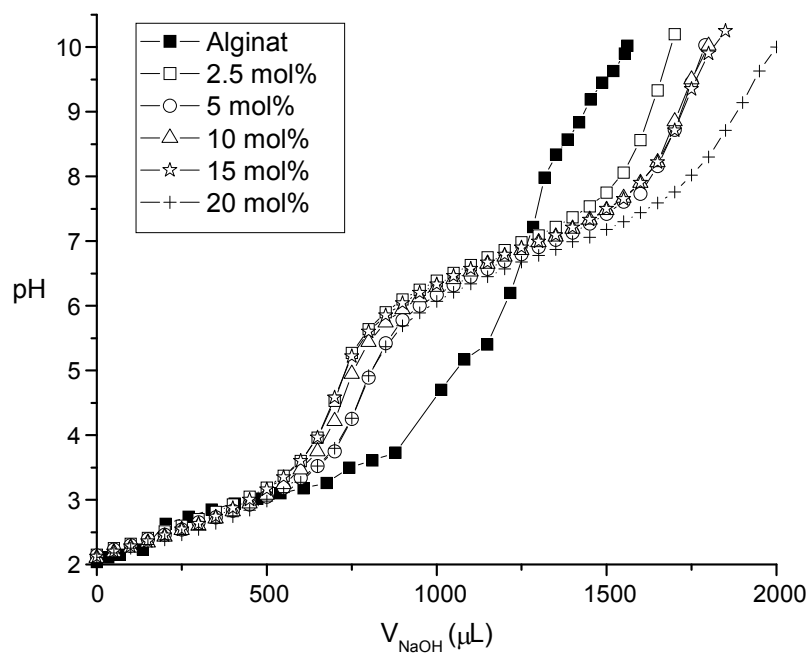
Ovo je potvrdilo prisustvo fenolnih grupa u modifikovanom alginatu i to je korišćeno za određivanje koncentracije fenolnih grupa u tiramin-alginatima.

FTIR spektri tiramin-alginata su pokazali prisustvo aromatičnih prstenova zbog prisustva pika C-C (in-ring) strečing vibracije na  $1517\text{ cm}^{-1}$  i to samo u spektru modifikovanog alginata, Slika 66.



**Slika 66.** FTIR spektar nativnog i 20 mol% perjodatom oksidovanog alginata.

Da bi odredili pKa vrednost i koncentraciju jonizabilnih grupa prisutnih u nativnom i modifikovom alginatu kiselo bazna titracija je urađena uz upotrebu standardnog rastvora natrijum hidroksida. Iz titracionih kriva se vidi da tiramin-alginati pokazuju prisustvo jedne karboksilne grupe na pKa 3 kao i nativan alginat oko 3 dok modifikovani alginati imaju i dodatnu više baznu grupu na pKa 7,5 Slika 67.



**Slika 67.** Titraciona kriva nativnog i modifikovanih alginata (perjodat 2.5-20 mol%).

Ovo je potvrdilo prisustvo još jedne dodatne bazne grupe u tiramin-alginatu što je rezultat reduktivne aminacione reakcije. Koncentracija ovih jonizabilnih grupa u nativnom i tiramin-alginatu je izračunata zasnovano na količini potrošenog natrijum hidroksida tokom titracije, dok je koncentracija fenolnih grupa izračunata iz UV-VIS spektara, Tabela 15.

**Tabela 15.** Koncentracija jonizabilnih i fenolnih grupa po gramu suvog alginata

Molarni odnos perjodata (mol%)	0	2,5	5	10	15	20
Jonizabilne grupe (mmol/g)	2,7	3,8	4,0	4,1	4,2	4,3
Fenolne grupe (mmol/g)	0	0,0816	0,100	0,248	0,303	0,492
Stepen modifikacije tiraminom (mol%)	0	1,63	2,00	4,96	6,06	9,84

Kao što se može videti, nakon perjodatne oksidacije i reduktivne aminacije alginata tiraminom karboksilne grupe su sačuvane dok su i nove pozitivno naelektrisane grupe uvedene u strukturu molekula. Ovo predstavlja potpuno različitu hemiju u poređenju sa prethodno opisanim tiramid alginatima gde je koncentracija karboksilnih grupa smanjena usled reakcije sa amino grupom tiramina pa je samim tim i rastvorljivost alginata veoma smanjena [85, 109]. Prisustvo i pozitivne i negativne grupe unutar tiramin-alginata i povećanje ukupne koncentracije naelektrisanih grupa vodi adsorpciji ćelija, enzima, malih molekula unutar alginatnih hidrogelova što je od velikog značaja u tkivnom inženjeringu, dostavi lekova i imobilizacionim studijama. Takođe zbog ovoga je i rastvorljivost tiramin alginata značajno povećana nego kod prethodno korišćenih karbodiimidnih metoda [85]. Prisustvo više karboksilnih grupa takođe vodi jačem vezivanju i čvršćim hidrogelovima.

## 9.2. Umrežavanje alginata i sinteza hidrogelova

Svi modifikovani alginati su testirani za sposobnost pravljenja hidrogelova u umrežavajućim reakcijama sa kalcijumovim jonima, U cilju ovoga alginatni rastvor je pipetiran u rastvor  $\text{CaCl}_2$  koji se mešao. Tyramine-alginati koji su dobijeni upotrebom perjodata za oksidaciju u koncentraciji do 10 mol% su mogli da formiraju hidrogelove dok su ostali pravili samo amorfne precipitate, Tabel 16.

**Tabela 16.** Tip i vreme formiranja hidrogela za nativni alginat (0 mol%) i tiramin-alginat (2,5-20 mol%) koristeći  $\text{Ca}^{2+}$  i peroksidaza uslovljeno umrežavanje

Koncentracija perjodata	0 mol%	2,5 mol%	5 mol	10 mol%	15 mol%	20 mol
Formiranje kuglica ukapavanjem u $\text{CaCl}_2$	Kuglice	Kuglice	Kuglice	Kuglice	Neppravilni oblici	Amorfni precipitat
Vreme umrežavanja peroksidazom i peroksidom	-	2 min	2 min	1 min	30 s	30 s

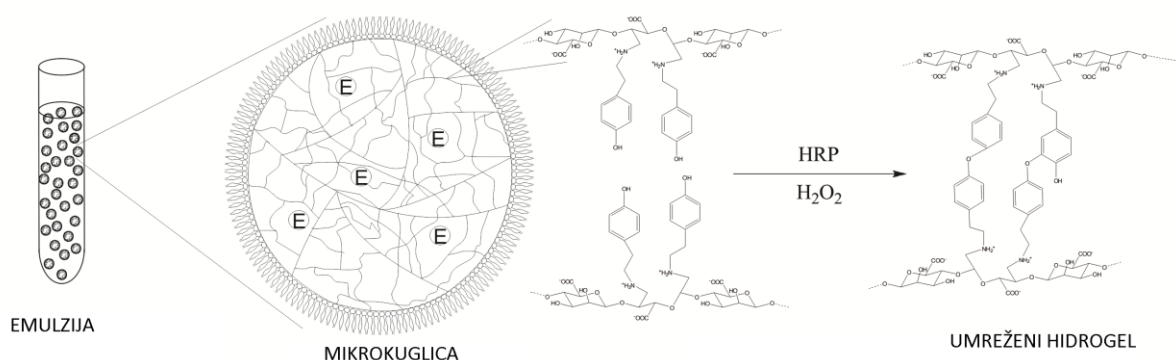


Alginati sa većim stepenom oksidacije i modifikacije su formirali precipitate, Razlog za ovo leži u činjenici da se nakon perjodatne oksidacije molekulska masa alginata smanjuje a samim tim i rigidnost molekula [110]. Tako se na primer u studijama uticaja koncentracije perjodata pri oksidaciji na molekulska težinu nativnog alginata utvrdilo da se oksidacijom nativnog alginata 10 mol% perjodatom molekulska težina alginata smanjila sa 231500 g/mol na 35800 g/mol [80].

U reakciji sa peroksidazom i vodonik peroksidom svi modifikovani alginati su formirali hidrogelove, Tabela 16. Nativni alginat kao što smo i očekivali nije mogao da formira hidrogelove pošto nije imao fenolne grupe koje su mogle da prave hidrogelove. Za vreme umrežavajućih reakcija sa peroksidazom hidrogelovi koji su formirani menjali su boju iz bele u mrko braon kao I u slučaju tiramidn-alginata [109] što je bio dokaz za polimerizacionu reakciju fenola.

### 9.3. Optimizacija imobilizacije peroksidaze u mikrokuglicama alginata

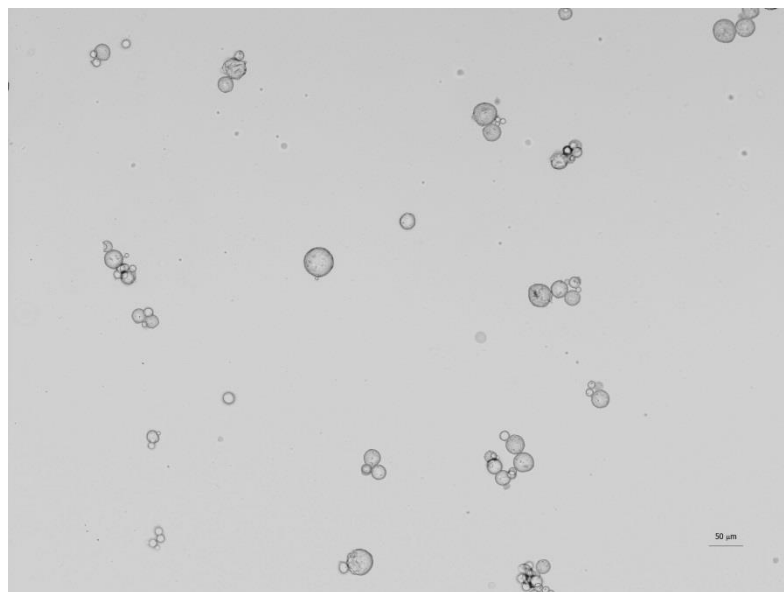
Da bi testirali dobijene hidrogelove za imobilizaciju malih molekula uz upotrebu umrežavanja preko fenolnih grupa peroksidaza je imobilizovana u mikrokuglicama alginata dobijenim u enzimskoj polimerizacionoj reakciji gde su glukoza oksidaza i glukoza bili izvor vodonik peroksida, Slika 68.



**Slika 68.** Shematski prikaz reakcije imobilizacije peroksidaze unutar tiramin-alginatnih mikrokuglica

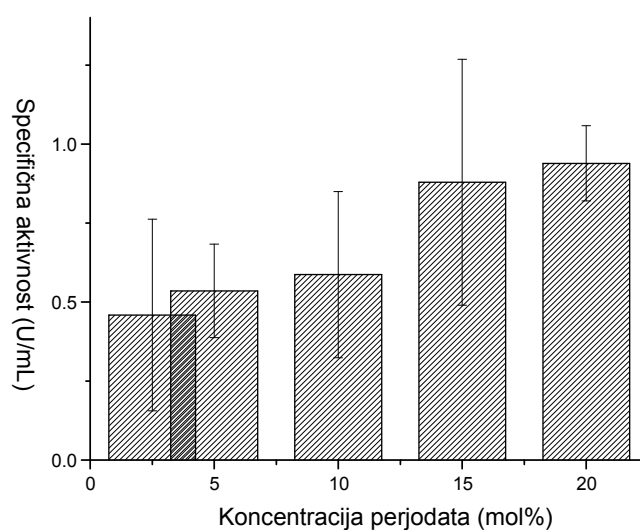
Oksidacija glukoze je obezbedila sporo oslobađanje vodonik peroksida i samim tim

smanjenj inaktivacije peroksidaze. Mikro kuglice alginata sa prosečnim dijametrom od 29  $\mu\text{m}$  su dobijeni, Slika 69.



**Slika 69.** Mikrografija tiramin-alginatnih mikrokuglica dobijenih u emulzionoj polimerizacionoj reakciji.

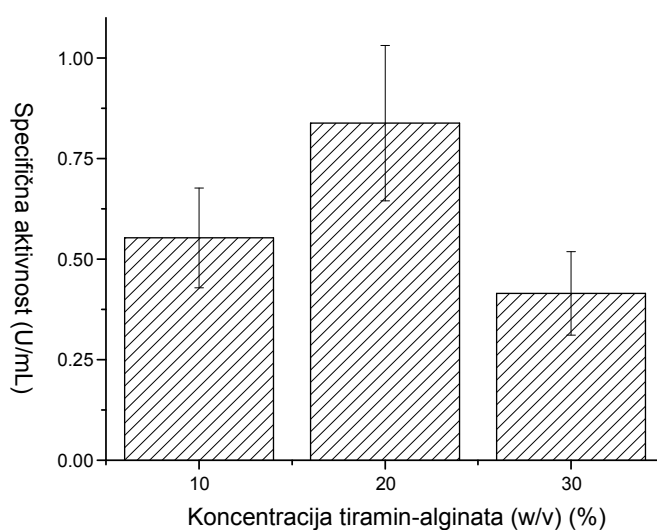
Specifična aktivnost imobilizovane peroksidaze unutar mikro kuglica alginata je merena i alginati sa većim stepenom oksidacije su pokazali i veću specifičnu aktivnost, Slika 70.



**Slika 70.** Uticaj stepena modifikacije tiramin-alginata na specifičnu aktivnost imobilizata.

Najveća specifična aktivnost imobilizovane peroksidaze je bila 0.9 U/mL i dobijena je za tiramin alginat dobijen oksidacijom 20 mol% perjodatom. Koristeći isti emulzioni sistem nemodifikovani alginat sa unutrašnjom dostavom kalcijum anije vezivao uopšte peroksidazu unutar mikro kuglica.

Ovo je značilo da alginat modifikovan tiraminom može da veže peroksidazu mnogo jače nego nativan alginat i to verovatno pomoću hidrofobnih interakcija molekula peroksidaze i fenolnih jezgara. Takođe formiranjem tiramin radikala tokom polimerizacija može da dovede i do kovalentnog vezivanja peroksidaza preko molekula tirozina na površini molekula enzima, kao što je prethodno primećeno kod bojenja ćelija kvasaca tiraminom preko tirozina u ćelijskom zidu [111, 112]. Pošto je oksidacija alginata dovela do povećanja i njegove rastvorljivosti u vodi to smo ispitali i uticaj masene koncentracije modifikovanog alginata na specifičnu aktivnost imobilizata, Slika 71.



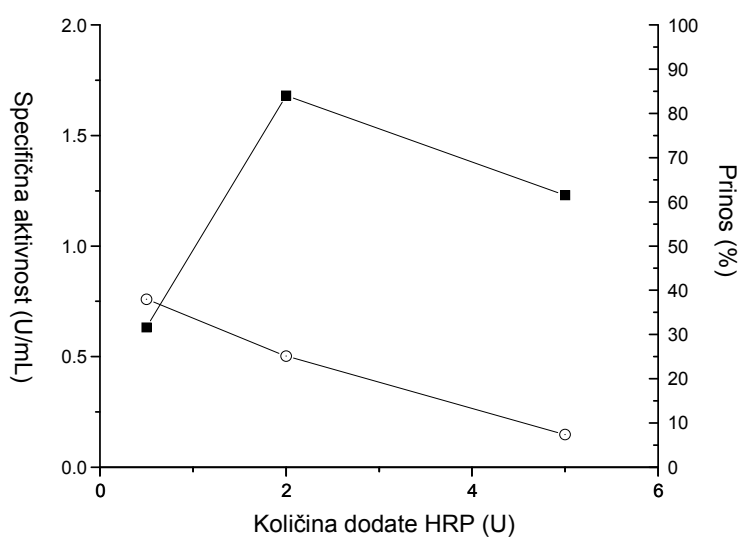
**Slika 71.** Uticaj koncentracije tiramin-alginata (20 mol% perjodatno oksidovanog) na specifičnu aktivnost imobilizata

Iz dobijenih rezultat se može videti da je najveća aktivnost imobilizovanog enzima dobijena za 20 % (w/v) koncentraciju tiramin-alginata. Manja specifična aktivnost imobilizovane peroksidaze pri višim koncentracijama tiramin-alginata je verovatno rezultat difuzionih ograničenja koji se javljaju usled preguste 3D mreže polisaharidnog

polimera, dok se pri nižim koncentracijama tiramin-alginata dobija slabije vezivanje i zadržavanje molekula peroksidaze unutar hidrogela.

Za dalje imobilizacije smo koristili 20 % (w/v) koncentraciju tiramin-alginata koji je dobijen oksidacijom sa 20 mol% koncentracijom perjodata.

U sledećem setu eksperimenata smo ispitali uticaj količine dodate aktivnosti peroksidaze na specifičnu aktivnost imobilizata i prinos imobilizacije, Slika 72.



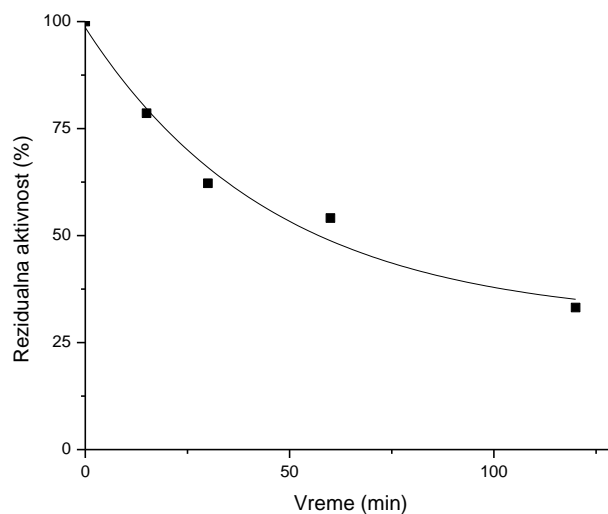
**Slika 72.** Zavisnost specifične aktivnosti imobilizovanog enzima i prinosa imobilizacije od količine dodatog enzima HRP.

Dodavanjem više od 0,5 U na 0,3 mL tiramin alginatnog rastvora za vreme imobilizacije povećalo je specifičnu aktivnost imobilizovane peroksidaze ali je prinos imobilizacije značajno opadao. Ovo je bilo u skladu sa prethodnim studijama gde je usled povećane količine dodatog enzima došlo do difuzionih ograničenja i smanjenje dostupnosti supstrata molekula enzima zarobljenim unutar alginatnih kuglica [107]. Zbog toga je kao optimum uzet dodatak 2 U, jer se dobijala specifična aktivnost od 1,7 U/mL i 25% prinos imobilizacije.

#### 9.4. Studije stabilnosti imobilizovane peroksidaze u alginatu

Termalna stabilnost imobilizovane peroksidaze je određivana an 70 °C i poređena sa rastvornim enzimom. Dobijeni podaci su fitovani koristeći jednačinu za brzinu

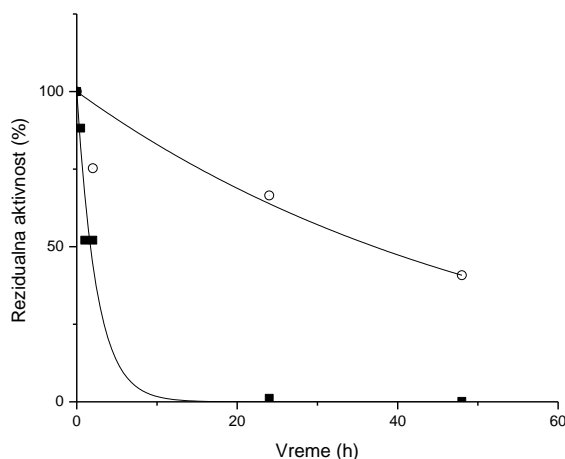
reakcije drugog reda, Slika 73.



**Slika 73.** Zavisnost reziđualne aktivnosti imobilizovane peroksidaze od vremena inkubiranja na 70 °C.

Iz dobijenih podataka je izrađunato da je poluživot imobilizovane peroksidaze bio 57 minuta što je oko 4 puta više od poluživota rastvorne peroksidaze od 14 min izmerene u prethodnim studijama pri istim uslovima [113]. Veća stabilnost imobilizovane peroksidaze je verovatno rezultat višestrukog vezivanja enzima kovalentnim i nekovalentnim interakcijama za polisaharidnu mrežu. Zahvaljujući prisustvu reaktivnih fenoksi radikala za vreme polimerizacije i formiranja hidrogela višestruke kovalentne veze se mogu formirati između molekula enzima i tiramin-alginata [111] što može voditi značajnijoj stabilizaciji enzima u poređanju sa imobilizatom peroksidaze u nativnom alginatu.

Pošto je osim termalne stabilnosti, važna i stabilnost peroksidaze u organskim rastvaračima posebno pri primeni u sintezi hemikalija ispitali smo i stabilnost našeg imobilizata u 80 % (v/v) dioksanu, Slika 74.

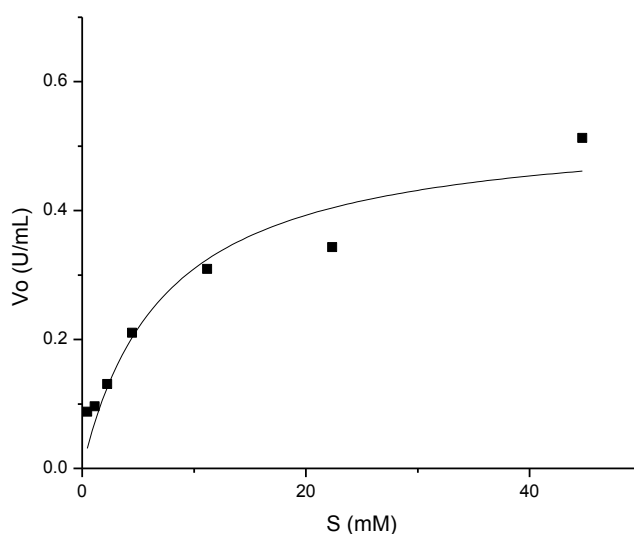


**Slika 74.** Zavisnost rezidualne aktivnosti imobilizovane rastvorne peroksidaze od vremena inkubacije u 80% (v/v) dioksanu na 25°C.

Poluživot imobilizovane peroksidaze u 80 % (v/v) je iznosio 37 h, što je bilo 22 puta više nego za rastvorni enzim za koji smo izmerili poluživot od 1,7 h. U poređenju sa stabilnošću imobilizata na makroporoznom glicidil metakrilatu SGE-20/12 to je bio okok 5,5 puta duži poluživot [114]. Povećanje poluživota od 22 puta u odnosu na rastvornu peroksidazu ukazuje još jednom da je tokom imobilizacije došlo do formiranja višestrukih veza između molekula enzima i polisaharidne mreže. Naši rezultati su bili u saglasnosti sa sličnim studijama imobilizacije gde se višestrukim vezivanjem molekula enzima za nosač pri imobilizaciji dobila značajnija stabilizacija enzima [115, 116].

### 9.5. Kinetička karakterizacija imobilizovane HRP

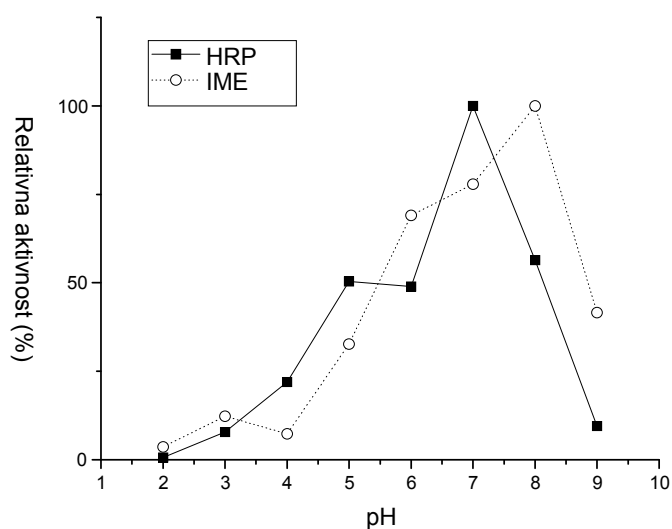
Kinetički parametri su određeni fitovanjem eksperimentalnih podataka direktno u Michaelis-Menten kinetički model.  $K_m$  je određen za pirogalol, držeći vodonik peroksid na zasićujućim koncentracijama, Slika 75.



**Slika 75.** Zavisnost specifične aktivnosti imobilizovane peroksidaze od koncentracije supstrata.  $K_m=7,34$  mM,  $V_{max}=0,537$  U/mL.

Vrednost Mihaelisove konstante za imobilizovanu peroksidazu je bila oko 7,34 mM što je otprilike 3,8 puta više nego za slobodan enzim ( $K_m$  vrednost za slobodan enzim je bila 1,93 mM). Dobijeni rezultati su bili u skladu sa prethodnim studijama imobilizacije peroksidaze gde se povećanje  $K_m$  vrednosti takođe dešavalo usled difuzionih ograničenja [74, 107].

Efekat pH na aktivnost imobilizovane i slobodne peroksidaze je određen u opsegu od pH 2 do 9 Slika 76.



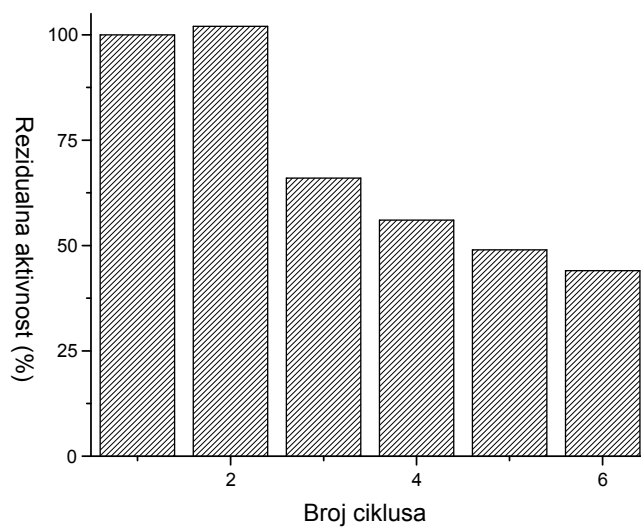
**Slika 76.** Zavisnost aktivnosti imobilizovane (IME) i rastvorne peroksidaze (HRP) od pH.

Dok je u prethodnim studijama pri imobilizaciji peroksidaze unutar nemodifikovanog alginata pH optimum ostajao nepromenjen [96, 117] u našim proučavanjima pH optimum se pomerio sa pH 7 za rastvorni enzim na pH 8. Razlog za promenu pH optimuma leži najverovatnije u činjenici da se prilikom hemijske modifikacije alginata uvodi dodatno pozitivno naelektrisana amino grupa koja može da promeni koncentracija pH jona u okolini enkapsuliranog enzima.

### 9.6. Upotreba u bač reaktoru imobilizovane HRP

Da bi testirali operativnu stabilnost imobilizovane HRP ista šarža enzima je korišćena u bač reaktoru nekoliko puta za oksidaciju pirogalola i rezidualna aktivnost imobilizata je određivana nakon svakog ciklusa, Slika 77.





**Slika 77.** Rezidualna aktivnost imobilizovanog enzima posle višestruke upotrebe u bač reaktoru.

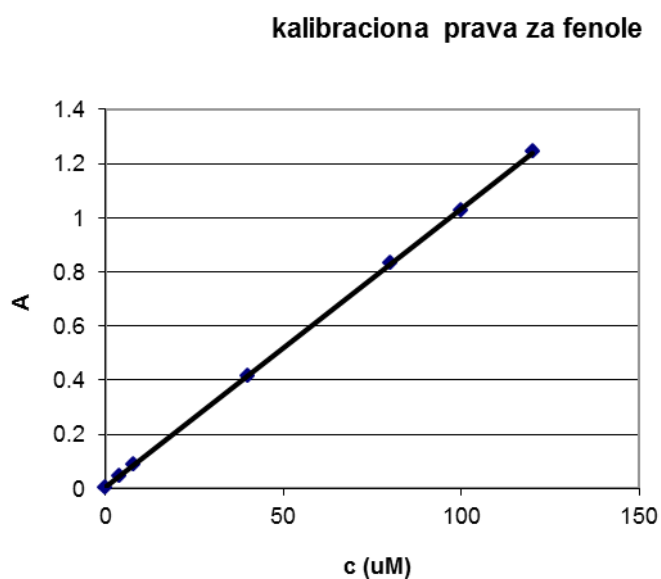
Posle 6 uzastopnih upotreba u bač reaktoru imobilizovana peroksidaza je zadržala 44 % polazne aktivnosti, slično HRP-u kovalentno imobilizovanom na makroporoznim kopolimerima [114]. Imobilizovana peroksidaza je takođe pokazala otpornost na ispiranje što je ukazivalo na kovalentne veze sa alginatom.

## 10. OPTIMIZACIJA PROCESNIH PARAMETARA ZA UKLANJANJE FENOLA IZ VODENIH RASTVORA

U cilju primene imobilisane peroksidaze za uklanjanje fenola iz vodenih rastvora prvo je optimizovana reakcija uklanjanja fenola rastvornom peroksidazom. Reakcija je optimizovana u pogledu koncentracije vodonik peroksida i brzine njegovog dodavanja u reakcioni sistem. Nakon toga je pri optimizovanim uslovima reakcije testirana peroksidaza imobilizovana na makroporoznom glicidl metakrilatu i u tiramin-alginatu za polimerizaciju i uklanjanje fenola.

### 10.1. Polimerizacija fenola rastvornom peroksidazom

U cilju određivanja koncentracije zaostalog fenola u rastvoru nakon polimerizacije napravljena je kalibraciona kriva zavisnosti apsorbancije od koncentracije rastvornog fenola, Slika 78.



**Slika 78.** Zavisnost apsorbancije na 512 nm od koncentracije fenola u rastvoru

Nakon toga je testirana rastvorna peroksidaza u reakciji polimerizacije 2 mM fenola pri 2,4 mM koncentraciji vodonik peroksida i koncentraciji rastvorne peroksidaze od 0,27 U/mL. Procenat zaostalog fenola je određivan u vremenu praćenjem apsorbancije na 512 nm, Tabela 17.

**Tabela 17.** Zavisnost procenta zaostalog fenola od vremena reakcije. 0,8 U peroksidaze u 3 mL rastvora 2 mM fenola i 2,4 mM vodonik peroksida.

Vreme reakcije (min)	A <sub>510nm</sub> (OD)	Zaostali fenol (%)	Uklonjen fenol (%)
0	0,94	100	0
15	0,756	80,43	19,57
30	0,653	69,47	30,53
50	0,614	65,32	34,68
90	0,583	62,02	37,98
120	0,577	62,02	37,98
150	0,539	57,34	42,66

Može se videti da je nakon 1h reakcija praktično stala i da je procenat zaostalog peroksida posle 2,5h bio oko 40%. Da bi povećali efikasnost uklanjanja fenola reakcija je ponovljena korišćenjem 2 puta veće koncentracije peroksidaze, Tabela 18.

**Tabela 18.** Zavisnost procenta zaostalog fenola od vremena reakcije. 1,6 U peroksidaze u 3 mL rastvora 2 mM fenola i 2,4 mM vodonik peroksida

Vreme reakcije (min)	A <sub>510nm</sub> (OD)	Zaostali fenol (%)	Uklonjen fenol (%)
0	0,998	100	0
1	0,818	81,96	18,04
5	0,587	58,82	41,18
7	0,533	53,41	46,59
10	0,496	49,70	50,30
30	0,398	39,88	60,12
60	0,3230	32,36	67,64

U ponovljenoj reakciji procenat uklonjenog fenola je dostigao 67% što je bilo u skladu sa literaturnim vrednostima [96, 118]. Pošto je bilo poznato da vodonik peroksid dovodi do inaktivacije peroksidaze posebno u slučajevima kada mu je koncentracija iznad 1 mM, reakcija je ponovljena ali uz dodavanje vodonik peroksida generisanjem u reakciji glukoza oksidaze i glukoze, Tabela 19 .

**Tabela 19.** Zavisnost procenta zaostalog fenola od vremena reakcije. 1,6 U peroksidaze, 0,75 U glukoza oksidaze u 3 mL rastvora 2 mM fenola i 20 mM glukoze.

Vreme reakcije (min)	A510nm (OD)	Zaostali fenol (%)	Uklonjen fenol (%)
0	0,983	100	0
5	0,905	92,1	7,9
10	0,872	88,7	11,3
30	0,808	82,2	17,8
60	0,468	51,7	48,3
90	0,294	29,9	71,1
120	0,256	26,0	74,0
150	0,202	20,5	19,5
180	0,184	18,7	81,2
210	0,186	18,9	81,1

Procenat uklonjenog fenola je ovaj put dostigao 81 % što je bio rezultat značajno bolji od prethodnog i posledica je postepenog oslobađanja vodonik peroksida. To je dovelo do toga da se koncentracija vodonik peroksida tokom trajanja enzimske reakcije održava relativno niskom što je dovelo do smanjenja inaktivacije peroksidaze tokom same reakcije polimerizacije.

Da bi dodatno smanjili inaktivaciju peroksidaze sledeće reakcije su postavljene sa 5 puta manjom koncentracijom glukoze, Tabela 20.

**Tabela 20.** Zavisnost procenta zaostalog fenola od vremena reakcije. 1,6 U peroksidaze, 0,75 U glukoza oksidaze u 3 mL rastvora 2 mM fenola i 4 mM glukoze.

Vreme reakcije (min)	A510nm (OD)	Zaostali fenol (%)	Uklonjen fenol (%)
0	0,875	100	0
15	0,814	93,0	6,97
30	0,586	67,0	33,0
60	0,265	30,3	69,7
90	0,046	5,26	94,7
120	0,036	4,11	95,9
150	0,017	1,94	98,1
180	0,017	1,94	98,1

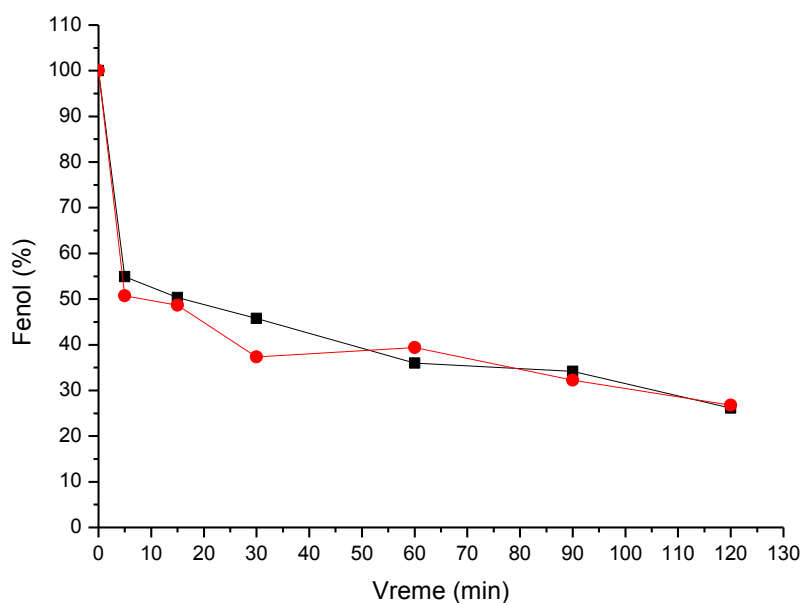
Pri ovim uslovima fenol je uklonjen u procentu od preko 98% što je bio značajno bolji rezultat od literaturno zabeleženog [96, 118]. Pri ovim optimizovanim uslovima za uklanjanje fenola testirani su imobilizati peroksidaze. Upotrebom 2 puta manje koncentracije peroksidaze i glukoza oksidaze fenol je takođe u potpunosti uklonjen ali manjom brzinom, Tabela 21.

**Tabela 21.** Zavisnost procenta zaostalog fenola od vremena reakcije. 0,8 U peroksidaze, 0,375 U glukoza oksidaze u 3 mL rastvora 2 mM fenola i 4 mM glukoze.

Vreme reakcije (min)	A510nm (OD)	Zaostali fenol (%)	Uklonjen fenol (%)
0	0,887	100	0
15	0,807	91,0	9,02
30	0,732	82,5	17,5
60	0,518	58,4	41,6
90	0,385	43,4	56,6
120	0,338	38,1	61,9
150	0,320	36,1	63,9
180	0,309	34,8	65,2
600	0,015	1,69	98,3

## 10.2. Polimerizacija fenola peroksidazom imobilizovanom na glicidilmetakrilatu

Imobilizat peroksidaze na makroporoznom kopolimeru glicidil metakrilatu sa najvećom aktivnošću i stabilnošću je testiran za polimerizaciju 2 mM fenola u prisustvu 0,25 U/mL glukoza oksidaze i 20 mM glukozi, Slika 79.

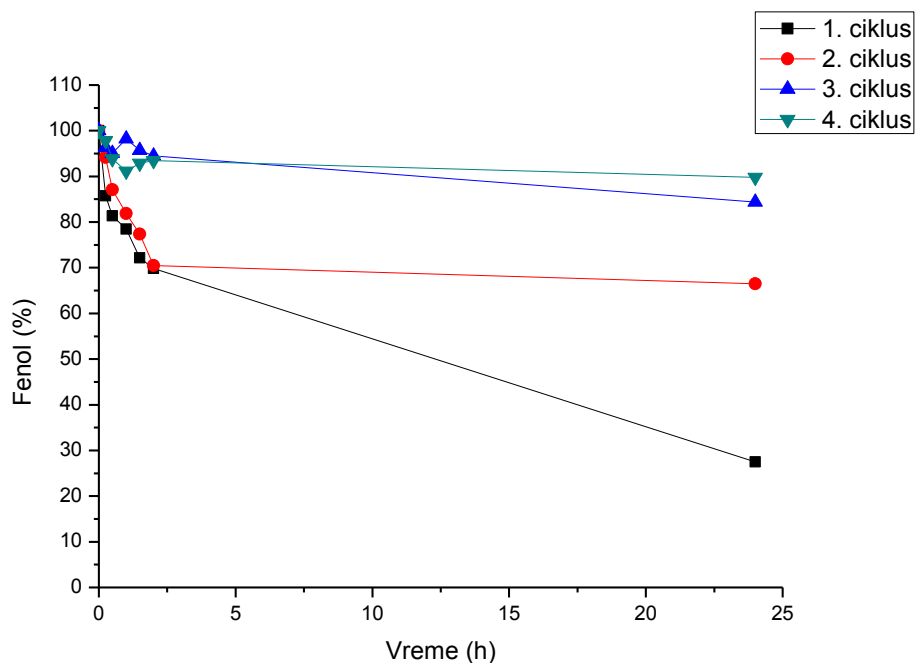


**Slika 79.** Zavisnost procenta zaostalog fenola od vremena reakcije. 80 mg vlažnog imobilizata peroksidaza imobilizovane na SGE 20/12; 0,375 U glukoza oksidaze u 3 mL rastvora 2 mM fenola i 4 mM glukoze.

Nakon 2h reakcije procenat uklonjenog fenola je dostigao 70%, što je bio bolji rezultat od literaturnih vrednosti od 60% uklonjenog 2 mM fenola nakon 3h upotrebe HRP imobilizovane u alginatu [96]. Ponovnom upotrebom imobilizata nije dobijeno značajnije smanjenje aktivnosti imobilizata.

### 10.3. Polimerizacija fenola peroksidazom imobilizovanom u tiramin-alginatu

Pod istim uslovima je testiran i imobilizat HRP u alginatu dobijen pod prethodno optimizovanim uslovima enkapsulacije. U prvom ciklusu nakon jednog dana je uklonjeno 70% prisutnog fenola, Slika 80.



**Slika 80.** Zavisnost procenta zaostalog fenola od vremena reakcije. 150 mg/mL vlažnog imobilizata peroksidaze imobilizovane u tiramin-alginatu; 0,375 U glukoza oksidaze u 3 mL rastvora 2 mM fenola i 4 mM glukoze.

Dobijena efikasnost uklanjanja fenola za naš imobilizat HRP u tiramin-alginatu je bila veća od prijavljenih 60% za imobilizat HRP u nativnom alginatu [96]. Povećane efikasnost uklanjanja fenola može biti posledica optimizacije dostavljanja vodonik peroksida u reakcionu sistem što dovodi do smanjene inaktivacije HRP i upotrebe mikrometarskih mikro-kuglica alginata što u odnosu na milimetarske kuglice alginata korišćene u prethodnim studijama [96, 118] dovodi do manjih difuzionih ograničenja i veće aktivnosti imobilizovanog enzima.

Ponovnom upotrebom imobilizovane HRP u tiramin-alginatu dolazilo je do većeg pada efikasnosti uklanjanja fenola nego u slučaju makroporoznog kopolimera što može biti posledica polimerizacije fenola i lepljenja ze fenolom (tiraminom) modifikovani alginat.



#### IV ZAKLJUČNA RAZMATRANJA

Nekoliko šarži makroporoznog kopolimera veličine čestica od 150 do 500  $\mu\text{m}$  je testirano za imobilizaciju peroksidaze koristeći glutaraldehydnu i perjodatnu metodu.

Najveća specifična aktivnost od 35 U/g je dobijena za perjodatnu metodu imobilizacijom na kopolimeru SGE 20/12 sa veličinom pora od 120 nm i površinom od 31  $\text{m}^2/\text{g}$ .

Peroksidaza imobilizovana na ovom kopolimeru je imala 8 puta veći poluživot u 80 % dioksanu u poređenju sa rastvornim enzimom.

U bač reaktoru nakon 6 ciklusa ponovne upotrebe imobilizovana peroksidaza je zadržala 45 % polazne aktivnosti.

Nekoliko šarži istog makroporoznog kopolimera sa manjom veličinom čestica od 2 do 2,5  $\mu\text{m}$  je testirano za imobilizaciju peroksidaze koristeći glutaraldehydnu i perjodatnu metodu kao i u prethodnoj seriji eksperimenata kao i epoksidnu i karbodiimidnu metodu.

Najveća specifična aktivnost imobilizata je dobijena sa kopolimerom sa najvećom veličinom pora od 200 nm i to glutaraldehydnom metodom od 14,5 U/g a zatim karbodiimidnom metodom od 13,7 U/g.

Prinos imobilizacije je bio veći za seriju kopolimera sa manjom veličinom čestica od 2-2,5  $\mu\text{m}$  nego za seriju kopolimera sa veličinom čestica 150 -500  $\mu\text{m}$  i to 33,5% u odnosu na 5% za glutaraldehydnu metodu na kopolimeru sa dijametrom pora od 200 nm.

Koristeći perjodatnu oksidaciju i reduktivnu aminaciju u prisustvu tiramina alginati sa različitim stepenom modifikacije su sintetisani.

Tiramin-alginati su mogli da prave hidrogelove i u prisustvu kalcijuma i u prisustvu peroksidaze i vodonik peroksida.

Tiramin-alginat je uspešno iskorišćen za imobilizaciju HRP u mikro-kuglicama dobijenih enzimskog polimerizacijom u emulzijama alginata u mineralnom ulju. Najveća aktivnost imobilizovane HRP je dobijena za 20 % (w/v) tiramin-alginat dobijen oksidacijom 20 mol% perjodatom.

HRP imobilizovana u tiramin-alginatu je imala 4 puta povećan poluživot na 70 °C i 22 puta povećan poluživot u 80% (v/v) dioksanu u odnosu na rastvornu HRP.

Posle višestruke upotrebe od 6 puta u bač reaktoru za oksidaciju pirogalola imobilizovana HRP je zadržala 45% početne aktivnosti.

Optimizacijom dostave vodonik peroksida u reakciji polimerizacije 2 mM fenola sa HRP dobijeno je uklanjanje fenola od preko 98%.

Upotrebom HRP imobilizovane na makroporoznom kopolimeru i unutar mikro-kuglica tiramin-alginata dobijeno je uklanjanje fenola od 70% uz mogućnost ponovne upotrebe imobilizata.

## V LITERATURA

1. Passardi, F., et al., *Peroxidases have more functions than a Swiss army knife*. Plant Cell Reports, 2005. **24**(5): p. 255-265.
2. Vanhuystee, R.B., *Some Molecular Aspects of Plant Peroxidase Biosynthetic-Studies*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1987. **38**: p. 205-219.
3. Dunford, H.B., *Peroxidases*. Advances in Inorganic Biochemistry, 1982. **4**: p. 41-68.
4. Siegel, B.Z., *Plant Peroxidases - an Organismic Perspective*. Plant Growth Regulation, 1993. **12**(3): p. 303-312.
5. Metzler, D.E., *The Chemical Reactions of Living Cells*. Biochemistry. 1977: Academic Press. New York.
6. Asada, K., *Ascorbate Peroxidase - a Hydrogen Peroxide-Scavenging Enzyme in Plants*. Physiologia Plantarum, 1992. **85**(2): p. 235-241.
7. Keller, T., *The use of peroxidase activity for monitoring and mapping air pollution areas*. European Journal of Forest Pathology, 1974. **4**(1): p. 11-19.
8. Lavid, N., et al., *The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae)*. Planta, 2001. **212**(3): p. 323-331.
9. Agostini, E., et al., *Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol by Brassica napus hairy root cultures*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2003. **37**: p. 139-144.
10. Roach, T., et al., *Extracellular superoxide production, viability and redox poise in response to desiccation in recalcitrant Castanea sativa seeds*. Plant Cell and Environment, 2010. **33**(1): p. 59-75.
11. Fecht-Christoffers, M.M., et al., *The role of hydrogen peroxide-producing and hydrogen peroxide-consuming peroxidases in the leaf apoplast of cowpea in manganese tolerance*. Plant Physiology, 2006. **140**(4): p. 1451-1463.
12. Gajhede, M., et al., *Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution*. Nat Struct Biol, 1997. **4**(12): p. 1032-8.
13. Gadelha, F.R., et al., *Evidence for free radical formation during horseradish peroxidase-catalyzed N-demethylation of crystal violet*. Chem Biol Interact, 1992. **85**(1): p. 35-48.

14. Rodriguez-Lopez, J.N., et al., *Mechanism of reaction of hydrogen peroxide with horseradish peroxidase: identification of intermediates in the catalytic cycle*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(48): p. 11838-47.
15. Griffin, B.W. and P.L. Ting, *Mechanism of N-demethylation of aminopyrine by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase, metmyoglobin, and protohemin*. Biochemistry, 1978. **17**(11): p. 2206-11.
16. Aitken, S.M., et al., *Mechanism of horseradish peroxidase inactivation by benzhydrazide: a critical evaluation of arylhydrazides as peroxidase inhibitors*. Biochem J, 2003. **375**(Pt 3): p. 613-21.
17. Navas Diaz, A., F. Garcia Sanchez, and J.A. Gonzalez Garcia, *Phenol derivatives as enhancers and inhibitors of luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-horseradish peroxidase chemiluminescence*. J Biolumin Chemilumin, 1998. **13**(2): p. 75-84.
18. Sullivan, P.C., A.L. Ferris, and B. Storrie, *Effects of temperature, pH elevators, and energy production inhibitors on horseradish peroxidase transport through endocytic vesicles*. J Cell Physiol, 1987. **131**(1): p. 58-63.
19. Azevedo, A.M., et al., *Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology*. Biotechnol Annu Rev, 2003. **9**: p. 199-247.
20. Aumiller, W.M., Jr., et al., *Coupled enzyme reactions performed in heterogeneous reaction media: experiments and modeling for glucose oxidase and horseradish peroxidase in a PEG/citrate aqueous two-phase system*. J Phys Chem B, 2014. **118**(9): p. 2506-17.
21. Huang, Q., et al., *Heme structural perturbation of PEG-modified horseradish peroxidase C in aromatic organic solvents probed by optical absorption and resonance Raman dispersion spectroscopy*. Biophys J, 2003. **84**(5): p. 3285-98.
22. Jiang, T.J., et al., *PEG-Modified Horseradish Peroxidase and Its Properties in Nonaqueous Media*. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai), 1998. **30**(6): p. 644-647.
23. Wicomb, W.N., et al., *Value of polyethylene glycol (PEG) and horseradish peroxidase (HRP) for hypothermic rabbit heart perfusion*. Transplant Proc, 1989. **21**(1 Pt 2): p. 1366-8.
24. Ayrançi, E. and O. Duman, *Adsorption behaviors of some phenolic compounds onto high specific area activated carbon cloth*. J Hazard Mater,

2005. **124**(1-3): p. 125-32.
25. Dabrowski, A., et al., *Adsorption of phenolic compounds by activated carbon-- a critical review*. Chemosphere, 2005. **58**(8): p. 1049-70.
  26. Ahmaruzzaman, M., *Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: A review*. Adv Colloid Interface Sci, 2008. **143**(1-2): p. 48-67.
  27. Lee, K.M. and P.E. Lim, *Bioregeneration of powdered activated carbon in the treatment of alkyl-substituted phenolic compounds in simultaneous adsorption and biodegradation processes*. Chemosphere, 2005. **58**(4): p. 407-16.
  28. Fernandez, I., et al., *Aerobic biodegradation of a mixture of monosubstituted phenols in a sequencing batch reactor*. J Hazard Mater, 2013. **260**: p. 563-8.
  29. D'Annibale, A., S.R. Stazi, and M. Petruccioli, *Effect of additives on enzyme-catalyzed polymerization of phenols and aromatic amines*. Front Biosci (Schol Ed), 2012. **4**: p. 1249-65.
  30. Piccolo, A., et al., *Polymerization of humic substances by an enzyme-catalyzed oxidative coupling*. Naturwissenschaften, 2000. **87**(9): p. 391-4.
  31. Barbosa, O., et al., *Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization*. RSC Advances, 2014. **4**(4): p. 1583-1600.
  32. Stanisavljević, M., *Removal Of Phenol From Industrial Wastewaters By Horseradish (Cochlearia Armoracia L) Peroxidase*. Working and Living Environmental Protection 2004. **2**: p. 345-349.
  33. Mohamad, N.R., et al., *An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes*. Biotechnol Biotechnol Equip, 2015. **29**(2): p. 205-220.
  34. Singh, P., et al., *Determination of concentration and activity of immobilized enzymes*. Anal Biochem, 2015. **484**: p. 169-72.
  35. Klibanov, A.M., *Immobilized enzymes and cells as practical catalysts*. Science, 1983. **219**(4585): p. 722-7.
  36. Surovtsev, V.I., *[Immobilized enzymes and cells]*. Usp Sovrem Biol, 1975. **80**(3): p. 370-81.
  37. Roig, M.G., *Immobilised cells and enzymes — A practical approach: Edited by J Woodward. pp 177. IRL Press, Oxford. 1985. £13. ISBN -947946-21-7. Biochemical Education, 1986. 14(2): p. 91-91.*
  38. Dias, S.M.M., J.M. Novais, and J.M.S. Cabral, *Immobilization of yeasts on*

- titanium activated inorganic supports*. Biotechnology Letters, 1982. **4**(3): p. 203-208.
39. Ghafourifar, G., A. Fleitz, and K.C. Waldron, *Development of glutaraldehyde-crosslinked chymotrypsin and an in situ immobilized enzyme microreactor with peptide mapping by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2013. **34**(12): p. 1804-11.
40. Yamato, S., et al., *Sweet potato acid phosphatase immobilized on glutaraldehyde-activated aminopropyl controlled-pore glass: activation, repeated use and enzyme fatigue*. Biol Pharm Bull, 2004. **27**(2): p. 210-5.
41. Chen, C.Z. and Y.T. Yu, *Immobilized enzyme activity improvement in glutaraldehyde method*. Biomater Artif Cells Artif Organs, 1989. **17**(3): p. 329-34.
42. Porath, J. and N. Fornstedt, *Group fractionation of plasma proteins on dipolar ion exchangers*. J Chromatogr, 1970. **51**(3): p. 479-89.
43. Hoare, D.G. and D.E. Koshland, *A Procedure for the Selective Modification of Carboxyl Groups in Proteins*. Journal of the American Chemical Society, 1966. **88**(9): p. 2057-2058.
44. de Souza, T.P., et al., *Spontaneous encapsulation and concentration of biological macromolecules in liposomes: an intriguing phenomenon and its relevance in origins of life*. J Mol Evol, 2014. **79**(5-6): p. 179-92.
45. Costa-Silva, T.A., et al., *Enzyme encapsulation in magnetic chitosan-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> microparticles*. J Microencapsul, 2015. **32**(1): p. 16-21.
46. Noppe, W., et al., *Macroporous monolithic gels, cryogels, with immobilized phages from phage-display library as a new platform for fast development of affinity adsorbent capable of target capture from crude feeds*. J Biotechnol, 2007. **131**(3): p. 293-9.
47. Mansfeld, J. and A. Schellenberger, *Invertase immobilized on macroporous polystyrene: properties and kinetic characterization*. Biotechnol Bioeng, 1987. **29**(1): p. 72-8.
48. Nelson, J.M. and E.G. Griffin, *ADSORPTION OF INVERTASE*. Journal of the American Chemical Society, 1916. **38**(5): p. 1109-1115.
49. Fonseca, L.P., J.P. Cardoso, and J.M. Cabral, *Immobilization studies of an industrial penicillin acylase preparation on a silica carrier*. J Chem Technol Biotechnol, 1993. **58**(1): p. 27-37.

50. Abraham, M., L. Boross, and B. Szajani, [*Immobilization of glucose oxidase on silica-based supports*]. Prikl Biokhim Mikrobiol, 1988. **24**(4): p. 499-503.
51. Iankevich, M.I., et al., [*Trypsin immobilization in silica gel*]. Prikl Biokhim Mikrobiol, 1981. **17**(4): p. 500-4.
52. Yildiz, H., E. Akyilmaz, and E. Dinckaya, *Catalase immobilization in cellulose acetate beads and determination of its hydrogen peroxide decomposition level by using a catalase biosensor*. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2004. **32**(3): p. 443-52.
53. Metelitsa, D.I., et al., [*Covalent immobilization of catalase on molded cellulose carriers*]. Prikl Biokhim Mikrobiol, 1992. **28**(4): p. 531-8.
54. van Leemputten, E. and M. Horisberger, *Letter: Immobilization of trypsin on partially oxidized cellulose*. Biotechnol Bioeng, 1974. **16**(7): p. 997-1003.
55. Lu, W., et al., *Preparation and protein immobilization of magnetic dialdehyde starch nanoparticles*. J Phys Chem B, 2013. **117**(14): p. 3720-5.
56. Kucera, J., *Preparation of starch beads as support material for enzyme immobilization*. Biotechnol Bioeng, 1983. **25**(2): p. 599-602.
57. Tibhe, J.D., et al., *Flow synthesis of phenylserine using threonine aldolase immobilized on Eupergit support*. Beilstein J Org Chem, 2013. **9**: p. 2168-79.
58. Lin, R., et al., *Immobilization of oxalate decarboxylase to Eupergit and properties of the immobilized enzyme*. Prep Biochem Biotechnol, 2011. **41**(2): p. 154-65.
59. Ilan, E. and T.M. Chang, *Conversion of ammonia to glutamate by L-glutamic dehydrogenase, alcohol dehydrogenase and NAD<sup>+</sup> immobilized within lipid-polyamide polyethyleneimine microcapsules*. Adv Exp Med Biol, 1987. **223**: p. 189-92.
60. Dixon, M. and E.C. Webb, *Enzymes*. 3d ed. 1979, New York: Academic Press. xxiv, 1116 p.
61. Hartmeier, W., *Immobilized biocatalysts : an introduction*. 1988, Berlin ; New York: Springer-Verlag. ix, 212 p.
62. Aymard, C. and A. Belarbi, *Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism*. Enzyme Microb Technol, 2000. **27**(8): p. 612-618.
63. Bortone, N., M. Fidaleo, and M. Moresi, *Immobilization/stabilization of acid*

- urease on Eupergit(R) supports*. Biotechnol Prog, 2012. **28**(5): p. 1232-44.
64. Lloret, L., et al., *Immobilisation of laccase on Eupergit supports and its application for the removal of endocrine disrupting chemicals in a packed-bed reactor*. Biodegradation, 2012. **23**(3): p. 373-86.
  65. Knezevic-Jugovic, Z.D., et al., *The immobilization of enzyme on Eupergit(R) supports by covalent attachment*. Methods Mol Biol, 2011. **679**: p. 99-111.
  66. Fleminger, G., et al., *Eupergit C as a carrier for high-performance liquid chromatographic-based immunopurification of antigens and antibodies*. J Chromatogr, 1990. **510**: p. 311-9.
  67. Svec, F. and J.M. Frechet, *New formats of polymeric stationary phases for HPLC separations: molded macroporous disks and rods*. J Mol Recognit, 1996. **9**(5-6): p. 326-34.
  68. Svec, F. and J.M. Frechet, *New designs of macroporous polymers and supports: from separation to biocatalysis*. Science, 1996. **273**(5272): p. 205-11.
  69. Svec, F. and J.M. Frechet, *"Molded" rods of macroporous polymer for preparative separations of biological products*. Biotechnol Bioeng, 1995. **48**(5): p. 476-80.
  70. Tennikova, T.B., et al., *Hydrolysed macroporous glycidyl methacrylate-ethylene dimethacrylate copolymer sorbent for size-exclusion high-performance liquid chromatography of synthetic polymers and biopolymers*. J Chromatogr, 1988. **435**(2): p. 357-62.
  71. Jovanovic, S.M., et al., *Targeted porous structure of macroporous copolymers based on glycidyl methacrylate*. Advanced Materials for High Technology Applications, 1996. **214**: p. 155-162.
  72. Jovanović, S.M., et al., *The influence of inert component composition on the porous structure of glycidyl methacrylate/ethylene glycol dimethacrylate copolymers*. Die Angewandte Makromolekulare Chemie, 1994. **219**(1): p. 161-168.
  73. Hideki Ikemoto, Q.C., Jens Ulstrup, *Stability and Catalytic Kinetics of Horseradish Peroxidase Confined in Nanoporous*. Journal of Physical Chemistry, 2010. **114**: p. 16174-16180.
  74. Bayramoglu, G. and M.Y. Arica, *Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on*



- magnetic beads*. J Hazard Mater, 2008. **156**(1-3): p. 148-55.
75. Tiller, J.C., et al., *Stabilization of activity of oxidoreductases by their immobilization onto special functionalized glass and novel aminocellulose film using different coupling reagents*. Biomacromolecules, 2002. **3**(5): p. 1021-9.
  76. Dr. Kurt Ingar Draget, P.D.O.S., Prof. Dr. Gudmund Skjak-Braek, ed. *Alginates from Algae Polysaccharides and Polyamides in Food Industry. Properties, Production and Patents*, ed. S.K.R. U A. Steinbuechel. 2005, Wiley-VCH: Weinheim.
  77. Pawar, S.N. and K.J. Edgar, *Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications*. Biomaterials, 2012. **33**(11): p. 3279-305.
  78. Ji-Sheng Yand, Y.-J.X., Wen He, *Research progress on chemical modification of alginate: A review*. Carbohydrate Polymers, 2011. **84**: p. 33-39.
  79. Jinchun Sun, H.T., *Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications*. Materials, 2013. **6**: p. 1285-1309.
  80. C.G. Gomez, M.R., M.A. Villar, *Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives*. Carbohydrate Polymers, 2007. **67**: p. 296-304.
  81. Lingbin Lu, P.Z., Yang Cao, Qiang Lin, Sujuan Pang, Huaming Wang, *Study on Partially Oxidized Sodium Alginate with Potassium Permanganate as the Oxidant*. Journal of Applied Polymer Science, 2009. **113**: p. 3585-3589.
  82. Freeman, I., A. Kedem, and S. Cohen, *The effect of sulfation of alginate hydrogels on the specific binding and controlled release of heparin-binding proteins*. Biomaterials, 2008. **29**(22): p. 3260-8.
  83. Ronghua H, Y.D., Jiannhong Y, *Preparation and in vitro antcoagulant activities of alginate sulfate and its quaterized derivatives*. Carbohydrate Polymers, 2008. **53**: p. 19-24.
  84. Coleman, R.J., et al., *Phosphorylation of alginate: synthesis, characterization, and evaluation of in vitro mineralization capacity*. Biomacromolecules, 2011. **12**(4): p. 889-97.
  85. Sakai, S. and K. Kawakami, *Both ionically and enzymatically crosslinkable alginate-tyramine conjugate as materials for cell encapsulation*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008. **85A**(2): p. 345-351.
  86. Donati, I., et al., *Galactose-substituted alginate: preliminary characterization and study of gelling properties*. Biomacromolecules, 2003. **4**(3): p. 624-31.

87. M.L. Soni, M.K., K.P. Namdeo, *Sodium alginate microspheres for extending drug release: formulation and in vitro evaluation*. International Journal of Drug Delivery, 2010. **2**: p. 64-68.
88. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Alginate: properties and biomedical applications*. Prog Polym Sci, 2012. **37**(1): p. 106-126.
89. Nie, H., et al., *Effects of chain conformation and entanglement on the electrospinning of pure alginate*. Biomacromolecules, 2008. **9**(5): p. 1362-5.
90. Bibi, Z., S.A. Qader, and A. Aman, *Calcium alginate matrix increases the stability and recycling capability of immobilized endo-beta-1,4-xylanase from Geobacillus stearothermophilus KIBGE-IB29*. Extremophiles, 2015. **19**(4): p. 819-27.
91. Tsai, C.T. and A.S. Meyer, *Enzymatic cellulose hydrolysis: enzyme reusability and visualization of beta-glucosidase immobilized in calcium alginate*. Molecules, 2014. **19**(12): p. 19390-406.
92. Keerti, et al., *Kinetic Characterization and Effect of Immobilized Thermostable beta-Glucosidase in Alginate Gel Beads on Sugarcane Juice*. ISRN Biochem, 2014. **2014**: p. 178498.
93. Duarte, J.C., et al., *Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation*. AMB Express, 2013. **3**(1): p. 31.
94. Kierstan, M., G. Darcy, and J. Reilly, *Studies on the characteristics of alginate gels in relation to their use in separation and immobilized applications*. Biotechnol Bioeng, 1982. **24**(7): p. 1507-17.
95. Mohan, S.V., et al., *Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process*. Chemosphere, 2005. **58**(8): p. 1097-1105.
96. Alemzadeh, I. and S. Nejati, *Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase*. Journal of Hazardous Materials, 2009. **166**(2-3): p. 1082-1086.
97. Brown, J.Q., R. Srivastava, and M.J. McShane, *Encapsulation of glucose oxidase and an oxygen-quenched fluorophore in polyelectrolyte-coated calcium alginate microspheres as optical glucose sensor systems*. Biosensors & Bioelectronics, 2005. **21**(1): p. 212-216.
98. Kaygusuz, H. and F.B. Erim, *Alginate/BSA/montmorillonite composites with enhanced protein entrapment and controlled release efficiency*. Reactive & Functional Polymers, 2013. **73**(11): p. 1420-1425.

99. Prodanovic, R.M., *Stabilization of alpha-glucosidase in organic solvents by immobilization on macroporous poly(GMA-co-EGDMA) with different surface characteristics (vol 71, pg 339, 2006)*. Journal of the Serbian Chemical Society, 2006. **71**(5): p. 573-573.
100. Knezevic, Z., et al., *Immobilization of lipase from Candida rugosa on Eupergit (R) supports by covalent attachment*. Biochemical Engineering Journal, 2006. **30**(3): p. 269-278.
101. Milosavic, N., et al., *Immobilization of glucoamylase via its carbohydrate moiety on macroporous poly(GMA-co-EGDMA)*. Enzyme and Microbial Technology, 2007. **40**(5): p. 1422-1426.
102. Prodanovic, R., S. Jovanovic, and Z. Vujcic, *Immobilization of invertase on a new type of macroporous glycidyl methacrylate*. Biotechnology Letters, 2001. **23**(14): p. 1171-1174.
103. Prlainovic, N.Z., et al., *Immobilization of lipase from Candida rugosa on Sepabeads((R)): the effect of lipase oxidation by periodates*. Bioprocess Biosyst Eng, 2011. **34**(7): p. 803-10.
104. Ferreira, L., et al., *Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a Bacillus licheniformis protease (Subtilisin Carlsberg)*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003. **21**(4-6): p. 189-199.
105. Boller, T., C. Meier, and S. Menzler, *EUPERGIT Oxirane Acrylic Beads: How to Make Enzymes Fit for Biocatalysis*. Organic Process Research & Development, 2002. **6**(4): p. 509-519.
106. Torres-Salas, P., et al., *Immobilized biocatalysts: novel approaches and tools for binding enzymes to supports*. Adv Mater, 2011. **23**(44): p. 5275-82.
107. Monier, M., et al., *Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads*. Int J Biol Macromol, 2010. **46**(3): p. 324-30.
108. Bindhu, L.V. and E.T. Abraham, *Immobilization of horseradish peroxidase on chitosan for use in nonaqueous media*. Journal of Applied Polymer Science, 2003. **88**(6): p. 1456-1464.
109. Sakai, S., et al., *Peroxidase-catalyzed cell encapsulation in subsieve-size capsules of alginate with phenol moieties in water-immiscible fluid dissolving H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*. Biomacromolecules, 2007. **8**(8): p. 2622-2626.
110. Kristiansen, K.A., A. Potthast, and B.E. Christensen, *Periodate oxidation of*

- polysaccharides for modification of chemical and physical properties.* Carbohydrate Research, 2010. **345**(10): p. 1264-1271.
111. Antipov, E., et al., *Highly L and D enantioselective variants of horseradish peroxidase discovered by an ultrahigh-throughput selection method.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(46): p. 17694-17699.
  112. Prodanovic, R., et al., *Ultrahigh Throughput Screening System for Directed Glucose Oxidase Evolution in Yeast Cells.* Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2011. **14**(1): p. 55-60.
  113. Machado, M.F. and J.M. Saraiva, *Thermal stability and activity regain of horseradish peroxidase in aqueous mixtures of imidazolium-based ionic liquids.* Biotechnol Lett, 2005. **27**(16): p. 1233-9.
  114. Prodanovic, O., et al., *Improved covalent immobilization of horseradish peroxidase on macroporous glycidyl methacrylate-based copolymers.* Appl Biochem Biotechnol. **168**(5): p. 1288-301.
  115. Lopez-Gallego, F., et al., *Stabilization of enzymes by multipoint covalent immobilization on supports activated with glyoxyl groups.* Methods Mol Biol. **1051**: p. 59-71.
  116. Mateo, C., et al., *Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment\*.* Enzyme Microb Technol, 2000. **26**(7): p. 509-515.
  117. Gholami-Borujeni, F., et al., *Application of immobilized horseradish peroxidase for removal and detoxification of azo dye from aqueous solution.* Research Journal of Chemistry and Environment, 2011. **15**(2): p. 217-222.
  118. Alemzadeh, I. and S. Nejati, *Removal of Phenols with Encapsulated Horseradish Peroxidase in Calcium Alginate.* Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering-International English Edition, 2009. **28**(2): p. 43-49.

## Biografija autora

Olivera Prodanović rođena je 13.11.1973. godine u Čačku. Diplomirala je 2000. godine na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na smeru Zaštita, obnova i unapređivanje životne sredine sa prosečnom ocenom 8,26. Magistrirala je na Institutu za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu 2010. godine, smer biofizika, na temu "Antioksidativni enzimi tokom klijanja semena Pančićeve omorike (*Picea omorika* (Panč) Purkinye) u fiziološkim i uslovima stresa izazvanog visokim koncentracijama kadmijuma".

2000. godine rad na određeno vreme Osnovna škola "Branislav Nušić" u Beogradu kao nastavnik biologije

2003. godine rad na određeno vreme Srednja medicinska škola "Veljko Dugošević", Beogradu kao profesor biologije

Od 16.4.2004. godine zaposlena je u Institutu za multidisciplinarna istraživanja u Beogradu, na odseku biofizika kod prof. Dr Ksenije Radotić Hadži-Manić na projektu 143043.

Od 2004.- 2007. godine u zvanju istraživač pripravnik.

Od aprila 2007. godine do avgusta 2008. godine je bila na trudničkom i porodijskom bolovanju.

Od septembra 2008. godine do jula 2010. godine je bila na neplaćenom odsustvu.

Od avgusta 2010. godine zaposlena je u Institutu za multidisciplinarna istraživanja u Beogradu, na odseku živi sistemi kod Dr Ksenije Radotić Hadži-Manić na projektu 173017, u zvanju istraživač saradnik.

Do sada je objavila 9 naučnih radova u časopisima sa impakt faktorom, od toga dva rada iz doktorske teze kao prvi autor, jedan kategorije M22 i jedan kategorije M21.

**Прилог 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани-а    Оливера Продановић  
број индекса    Магистар

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом  
Развој имобилисаних система пероксидазе из рена (*Armoracia rusticana*) за  
полимеризационе реакције и уклањање фенола из отпадних вода

---

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 01.07.2015.

---

## Прилог 2.

### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора	Оливера Продановић
Број индекса	Магистар
Студијски програм	Биохемијско инжењерство и биотехнологија
Наслов рада	Развој имобилисаних система пероксидазе из рена ( <i>Armoracia rusticana</i> ) за полимеризационе реакције и уклањање фенола из отпадних вода
Ментор	Зорица Кнежевић Југовић
Потписани/а	Оливера Продановић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда**

У Београду, 01.07.2015.

---

### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

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

Развој имобилисаних система пероксидазе из рена (*Armoracia rusticana*) за полимеризационе реакције и уклањање фенола из отпадних вода

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 01.07.2015

Потпис докторанда

---



1. Ауторство - Дозвољавате 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. Дозвољавате 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 прераде. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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 прераде. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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.