

Univerzitet u Beogradu

Hemijski fakultet

Aleksandra Milovanović

**Primena imobilizovanog ćelijskog zida kvasca
Saccharomyces cerevisiae u proizvodnji invertnog šećera**

Doktorska disertacija

Beograd, 2011.

MENTOR:

dr Zoran Vujčić, vanredni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Dušan Sladić, redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Goran Roglić, vanredni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Nataša Božić, naučni saradnik

IHTM – Centar za hemiju, Univerzitet u Beogradu

dr Miroslava Vujčić, naučni saradnik

IHTM – Centar za hemiju, Univerzitet u Beogradu

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za Biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Centru za hemiju, Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom vanrednog profesora dr Zorana Vujčića.

Mentoru dr Zoranu Vujčiću se zahvaljujem na velikoj pomoći u svakom trenutku planiranja eksperimenata, realizaciji, tumačenju rezultata i uobličavanju ovog rada. Takođe sam mu zahvalna na strpljenju i pruženoj prilici za bavljenje biohemijom i enzimologijom.

Dr Nataši Božić se zahvaljujem za sugestije i nesebičnu pomoć tokom izrade ovog rada od prvih eksperimenata do pisanja.

Dr Dušanu Sladiću, dr Goranu Rogliču i dr Miroslavi Vujčić želim da zahvalim na korisnim sugestijama i savetima tokom pisanja disertacije.

Zahvaljujem se dragim kolegama dr Biljani Dojnov, Nikoli Lončaru, Marici Grujić na druženju i podršci u svakom trenutku. Takođe se zahvaljujem i ostalim kolegama iz Centra za hemiju IHTM-a i Hemijskog fakulteta.

Svojoj porodici dugujem zahvalnost za strpljenje, pomoć i razumevanje.

Primena imobilizovanog ćelijskog zida kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u proizvodnji
invertnog šećera

IZVOD

Zidna invertaza je izolovana iz ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Izolovan enzimski preparat je detaljno okarakterisan i dobijeni su pH optimum na 4,0, temperaturni optimum na 60°C, K_M 30,93 mM, V_{max} 11,64 mM/min i energija aktivacije od 38 kJ/mol. Stabilnost zidne invertaze detaljno je ispitana i upoređena sa stabilnošću rastvorne invertaze izolovane iz ćelija kvasca *S. cerevisiae* na povišenoj temperaturi i u prisustvu različitih koncentracija raznih enzimskih denaturanata i inhibitora. Dokazana je veća stabilnost zidne invertaze u odnosu na rastvornu.

Zidna invertaza je uspešno imobilizovana u Ca–alginatu sa prinosom imobilizacije od 100%. pH optimum imobilizata je na 5,0, temperaturni optimum 50–80°C, K_M 72 mM, V_{max} 0,42 mM/min i energija aktivacije 25 kJ/mol. Imobilizovana zidna invertaza pokazala je značajno veću temperaturnu stabilnost u poređenju sa slobodnim enzimom. Osim dobre termalne stabilnosti pokazano je da imobilizat ima i dobru operativnu stabilnost, pa se njegova aktivnost nakon 40 ponavljajućih ciklusa rada u šaržnom reaktoru minimalno smanjila (8%).

Zidna invertaza hemijski je modifikovana različitim modifikatorima. Pokazano je da hemijskom modifikacijom zidne invertaze ne dolazi do promena u pH stabilnosti i optimumu enzima, kao ni temperaturnom optimumu, ali da se hemijskom modifikacijom zidne invertaze dobija termalno stabilniji enzim u odnosu na nemodifikovan. Zidna invertaza modifikovana glutaraldehydom je uspešno imobilizovana u Ca–alginatu. Aktivnost imobilizata je bila 91 U/g. Stabilnost i produktivnost dobijenog imobilizata izmerene su korišćenjem visoko koncentrovanih rastvora saharoze u reaktoru sa napakovanim slojem tokom 30 dana kontinualnog rada reaktora. Ukupna produktivnost reaktora bila je 3844 kg invertnog šećera po kg imobilizata. Dobijeni proizvod (invertni šećer) je bio bez boje, imao je provodljivost od 16 μ S/cm, pH 5,44, količinu suve mase 70,3°Bx i bez štetnih sastojaka.

Ključne reči: zidna invertaza, imobilizacija, alginat, hemijska modifikacija, glutaraldehyd, invertni šećer

Application of immobilized cell wall invertase from yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the production of invert sugar

ABSTRACT

Cell wall invertase (CWI) was isolated from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Isolated enzyme was characterized in detail; the optimum pH value was 4.0, temperature optimum 60°C, K_M 30.93 mM, V_{max} 11.64 mM/min and the activation energy was 38 kJ/mol. Stability of CWI was examined in detail and compared with the stability of soluble invertase isolated from yeast cells *S. cerevisiae* at high temperatures and in the presence of different concentrations of some enzyme inhibitors and denaturants. It was shown that cell wall invertase had better stability than soluble enzyme.

Cell wall invertase was successfully immobilized in Ca-alginate beads, with immobilization yield of 100%. The pH optimum of immobilized CWI was 5.0; optimum temperature 50–80°C, K_M 72 mM, V_{max} 0.42 mM/min and the activation energy was 25 kJ/mol. Obtained biocatalysts had enhanced thermal stability compared with the free enzyme. Immobilized CWI was tested in a batch reactor. After 40 consecutive cycles it retained more than 90% of its activity.

CWI was modified with different chemically reactive substances. Chemically modified and native CWIs showed similar pH stability (pH 3–11), pH optimum and temperature optimum values, while modified CWIs showed higher thermostability than the native one. CWI modified with glutaraldehyde was successfully immobilized in Ca-alginate beads, with enzyme activity of 91 U/g. Stability and productivity of obtained biocatalyst were measured using the highly concentrated substrate solution in the packed bead reactor. One month productivity of 3844 kg of inverted sugar per kg of the immobilized biocatalyst was obtained. Produced invert sugar was colourless, pH neutral (5.44), with low conductivity (16 μ S/cm), with 70.3°Bx dry weight and without unhealthy byproducts.

Key words: cell wall invertase, immobilization, alginate, chemical modification, glutaraldehyde, invert sugar

Lista skraćenica korišćenih u tekstu

Bis-akrilamid	<i>N,N'</i> -Metilenbisakrilamid
bvh	<i>eng</i> bed volumes per hour – zapremina kolone na sat
CLE	<i>eng</i> Cross-linked enzyme – umreženi enzimi
CLEA	<i>eng</i> Cross-linked enzyme aggregates – umreženi enzimski agregati
CLEC	<i>eng</i> Cross-linked enzyme crystals – umreženi enzimski kristali
CMR	<i>eng</i> continuous membrane reactor – kontinualni membranski reaktor
CSTR	<i>eng</i> continuous stirred tank reactor – kontinualni reaktor sa mešanjem
CWI	<i>eng</i> cell wall invertase – zidna invertaza
CWI (Ac)	nemodifikovana zidna invertaza u acetatnom puferu pH 4,5
CWI (Ph)	nemodifikovana zidna invertaza u fosfatnom puferu pH 7,2
CWI-155	imobilizat zidne invertaze u Grindsted [®] FD 155 alginatu
CWI-157	imobilizat zidne invertaze u Grindsted [®] FD 157 alginatu
CWI-S	imobilizat zidne invertaze u Sigma alginatu
DMS	dimetil-suberimidat
DNS	3,5-dinitrosalicilna kiselina
FA	formaldehid
FBR	<i>eng</i> fluidised bed reactor – fluidizovani reaktor
F-CWI	zidna invertaza modifikovana formaldehidom
GA	glutaraldehid
G-CWI	zidna invertaza modifikovana glutaraldehidom
HEMA	2-hidroksietil-metakrilat
MR	<i>eng</i> membrane reactor – šaržni membranski reaktor
PBR	<i>eng</i> packed bed reactor – reaktor sa napakovanim slojem
P-CWI (Ac)	zidna invertaza modifikovana perjodatom u acetatnom puferu pH 4,5
P-CWI (Ph)	zidna invertaza modifikovana perjodatom u fosfatnom puferu pH 7,2
PEI	Polietilenimin
PI	natrijum-perjodat
S-CWI	zidna invertaza modifikovana dimetil-suberimidatom
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija
STR	<i>eng</i> stirred tank reactor – šaržni reaktor sa mehaničkim mešanjem

Sadržaj

1 Uvod	1
2 Opšti deo	3
2.1 Invertni šećer	3
2.2 Invertaza	4
2.3 Imobilizovani enzimi	5
2.4 Metode imobilizacije enzima	6
2.5 Imobilizacija enzima zarobljavanjem	8
2.5.1 Osobine potencijalnih nosača	9
2.5.1.1 Fizičke osobine nosača	9
2.5.1.2 Hemijske osobine nosača	10
2.5.2 Efekti imobilizacije enzima metodom zarobljavanja	11
2.6 Imobilizovane ćelije kvasca <i>S. cerevisiae</i>	13
2.7 Uticaj reakcione sredine na aktivnost enzima	27
2.7.1 Michaelis–Menten-ova kinetika	27
2.7.2 Uticaj pH vrednosti na aktivnost biokatalizatora	34
2.7.3 Uticaj temperature na aktivnost biokatalizatora	36
2.7.4 Stabilnost biokatalizatora	38
2.7.5 Uticaj inhibitora na aktivnost biokatalizatora	41
2.8 Hemijska modifikacija biokatalizatora	41
2.8.1 Hemijske modifikacije invertaze	43
2.9 Enzimski reaktori	45
2.9.1 Tipovi enzimskih reaktora	46
2.9.2 Karakteristike enzimskih reaktora	47
2.9.3 Kinetika idealnog enzimskog reaktora	48
2.9.4 Enzimski reaktori za proizvodnju invertnog šećera	49

3 Naši radovi	53
3.1 Izolovanje invertaze iz ćelija kvasca <i>S. cerevisiae</i>	54
3.1.1 Liza ćelija kvasca <i>S. cerevisiae</i>	54
3.1.2 Izolovanje zidne invertaze	54
3.2 Karakterizacija rastvorne i zidne invertaze	55
3.2.1 Određivanje enzimске aktivnosti zidne invertaze	55
3.2.2 Određivanje pH optimuma zidne i rastvorne invertaze	56
3.2.3 Određivanje temperaturnog optimuma zidne i rastvorne invertaze	57
3.2.4 Određivanje temperaturne stabilnosti zidne i rastvorne invertaze	58
3.2.5 Određivanje K_M i V_{max} vrednosti i energije aktivacije zidne i rastvorne invertaze	59
3.2.6 Stabilnost zidne i rastvorne invertaze	61
3.2.6.1 Stabilnost invertaze u rastvorima uree	61
3.2.6.2 Stabilnost invertaze u metanolu	63
3.2.6.3 Inhibicija invertaze anilinom, Hg^{2+} i Cu^{2+} jonima	65
3.3 Imobilizacija zidne invertaze	65
3.3.1 Optimizacija imobilizacije zidne invertaze u kalcijum-alginatnom hidrogelu	66
3.3.2 Merenje fizičkih parametara imobilizata zidne invertase	69
3.3.3 Određivanje pH optimuma imobilizata	70
3.3.4 Određivanje temperaturnog optimuma imobilizata	71
3.3.5 Određivanje aktivacione energije i K_M i V_{max} vrednosti imobilizata	72
3.3.6 Određivanje temperaturne stabilnosti imobilizata	72
3.3.7 Testiranje operativne stabilnosti imobilizata u šaržnom reaktoru	74
3.4 Hemijski modifikovana zidna invertaza	76
3.4.1 Uticaj različitih modifikatora i vremena reakcije modifikacije na enzimsku aktivnost invertaze	76
3.4.2 Infracrvena (IC) spektroskopija nativne i hemijski modifikovane zidne invertaze	80
3.4.3 Mikroanaliza nativne i hemijski modifikovane zidne invertaze	80
3.4.4 Površina izolovane zidne invertaze i njenih modifikata	81
3.4.5 Određivanje pH stabilnosti hemijski modifikovane zidne invertaze	82
3.4.6 Određivanje temperaturne stabilnosti hemijski modifikovane zidne invertaze	83
3.4.7 Određivanje temperaturnog i pH optimuma zidne invertaze hemijski modifikovane glutaraldehydom	85
3.5 Imobilizacija glutaraldehydom modifikovane zidne invertaze	87

3.5.1	Produkcija invertnog šećera u kontinualnom reaktoru sa napakovanim slojem	88
3.5.1.1	Karakteristike dobijenog invertnog šećera	90
3.6	Zaključci	92
4	Eksperimentalni deo	93
4.1	Izolovanje invertaze iz ćelija kvasca <i>S. cerevisiae</i>	94
4.1.1	Liza ćelija kvasca <i>S. cerevisiae</i>	94
4.1.2	Izolovanje zidne invertaze	94
4.2	Karakterizacija rastvorne i zidne invertaze	95
4.2.1	Određivanje enzimске aktivnosti zidne invertaze	95
4.2.2	Određivanje pH optimuma zidne i rastvorne invertaze	96
4.2.3	Određivanje temperaturnog optimuma zidne i rastvorne invertaze	96
4.2.4	Određivanje temperaturne stabilnosti zidne i rastvorne invertaze	97
4.2.5	Određivanje K_M i V_{max} vrednosti i energije aktivacije zidne i rastvorne invertaze	97
4.2.6	Sabilnost zidne i rastvorne invertaze	97
4.2.6.1	Stabilnost invertaze u rastvorima uree	97
4.2.6.2	Stabilnost invertaze u metanolu	98
4.2.6.3	Inhibicija invertaze anilinom, Hg^{2+} i Cu^{2+} jonima	99
4.3	Imobilizacija zidne invertaze	101
4.3.1	Optimizacija imobilizacije zidne invertaze u kalcijum–alginatnom hidrogelu	101
4.3.2	Merenje fizičkih parametara imobilizata zidne invertaze	102
4.3.3	Određivanje pH optimuma imobilizata	102
4.3.4	Određivanje temperaturnog optimuma imobilizata	103
4.3.5	Određivanje aktivacione energije i K_M i V_{max} vrednosti imobilizata	103
4.3.6	Određivanje temperaturne stabilnosti imobilizata	103
4.3.7	Testiranje operative stabilnosti imobilizata u šaržnom reaktoru	104
4.4	Hemijski modifikovana zidna invertaza	104
4.4.1	Uticao različitih modifikatora i vremena reakcije modifikacije na enzimsku aktivnost invertaze	104
4.4.2	Infracrvena (IC) spektroskopija native i hemijski modifikovane zidne invertaze	105
4.4.3	Mikroanaliza native i hemijski modifikovane zidne invertaze	105
4.4.4	Površina izolovane zidne invertaze i njenih modifikata	105
4.4.5	Određivanje pH stabilnosti hemijski modifikovane zidne invertaze	106

4.4.6	Određivanje temperaturne stabilnosti hemijski modifikovane zidne invertaze	106
4.4.7	Određivanje temperaturnog i pH optimuma zidne invertaze hemijski modifikovane glutaraldehydom	106
4.5	Imobilizacija glutaraldehydom modifikovane zidne invertaze	106
4.5.1	Produkcija invertnog šećera u kontinualnom reaktoru sa napakovanim slojem	107
4.5.1.1	Karakteristike dobijenog invertnog šećera	107
5	Literatura	108

1 Uvod

Korišćenje invertnog šećera u različitim granama industrije ima prednost nad sličnim zaslađivačima kao što su glukozni sirup i saharoza. Proizvodnja invertnog šećera u Srbiji je bazirana na kiseloj hidrolizi saharoze. Ovakav način proizvodnje ima dugi niz nedostataka, među kojima je najznačajniji loš uticaj na zdravlje ljudi. Primera proizvodnje ovog sirupa enzimskom hidrolizom u svetu ima, uglavnom korišćenjem rastvornog enzima (CK Production, Rahul sugar products, Shahu, Sun Agro Foods, Nevuline itd.). Zbog svega ovoga veliki broj istraživačkih grupa u svetu bavi se razvojem novih imobilizovanih biokatalizatora koji bi mogli naći primenu u industrijskom postupku dobijanja invertnog šećera. Osamdesetih godina prošlog veka istraživači su uglavnom pokušavali da imobilizacijom celih ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na različitim nosačima dobiju željeni biokatalizator. Imobilizacija ćelija kvasca ima puno prednosti nad imobilizacijom izolovanog i prečišćenog enzima invertaze od kojih je najznačajniji ekonomski aspekt. Međutim, zbog niza loših osobina ovih biokatalizatora (mala aktivnost, nestabilnost imobilizata, loše mehaničke osobine, itd.), proces proizvodnje invertnog šećera u industriji na ovaj način nije zaživeo. Takođe, veliki broj istraživača bavio se i razvitkom imobilizovane invertaze koja bi mogla da se koristi. Međutim, cena ovih imobilizata je visoka, pa njihova industrijska upotreba povećava cenu invertnog šećera na visinu neprihvatljivu za tržište.

Za proizvodnju invertnog šećera sa praktičnog, ekonomskog i zdravstvenog gledišta najpogodnije je koristiti visoko koncentrovane rastvore saharoze. Na ovaj način izbegava se rad sa velikim količinama razblaženih rastvora saharoze, koje bi kasnije trebalo koncentrovati (uz veliki utrošak energije i radne snage), a za rastvore saharoze koncentracije ispod 70% (m/m) izbegava se dodavanje konzervansa da bi se sprečila mikrobiološka kontaminacija. Iako sa ekonomskog aspekta upotreba imobilizovanih ćelija kvasca *S. cerevisiae* ima prednost nad imobilizovanim invertazom, njihova upotreba u rastvorima saharoze visoke koncentracije nije moguća usled velike razlike u osmotskom pritisku u ćeliji i van nje dolazi do pucanja ćelijske membrane (na ovaj način se sprečava i mikrobiološka kontaminacija visoko koncentrovanih rastvora saharoze). Oslobođen unutarćelijski sadržaj odlazi u proizvod, pa je proizvod potpuno neupotrebljiv u granama industrije kojima je namenjen (industrija hrane i pića i farmaceutska industrija).

Da bi biokatalizator mogao da se koristi za proizvodnju invertnog šećera, osim invertazne aktivnosti koja je neophodna, mora zadovoljavati i druge kriterijume, kao što su:

cena, stabilnost (temperaturna, ali i stabilnost pri skladištenju), da ne curi iz čestica imobilizata i time kontaminira proizvod, odnosno da je kranji proizvod (invertni šećer) zdravstveno ispravan, a njegova proizvodnja ekonomski isplativa. U ćeliji kvasca *S. cerevisiae* najveći deo invertaze se nalazi prirodno imobilizovan u ćelijskom zidu. Tako bi izolovan i od svih rastvornih komponenti prečišćen ćelijski zid potencijalno mogao da se koristi kao biokatalizator za hidrolizu saharoze. Njegovom imobilizacijom dobio bi se biokatalizator lakši za manipulaciju i upotrebu u reaktorima za proizvodnju invertnog šećera. Na osnovu ove pretpostavke postavljeni su i ciljevi ovog rada:

- izolovanje i karakterizacija zidne invertaze (CWI) (ćelijskog zida kvasca *S. cerevisiae*), kao i njeno poređenje sa rastvornim enzimom;
- imobilizacija zidne invertaze i karakterizacija dobijenih imobilizata;
- poboljšanje stabilnosti zidne invertaze hemijskom modifikacijom;
- imobilizacija hemijski modifikovane zidne invertaze i karakterizacija imobilizata;
- optimizacija parametara rada novodobijenih imobilizovanih biokatalizatora i
- ispitivanje operativne stabilnosti i produktivnosti imobilizata u industrijskim uslovima.

2 Opšti deo

2.1 Invertni šećer

1830. godine je prvi put Dubrunfault izveo eksperiment u kome je kiselom hidrolizom 10% rastvora saharoze dobio ekvimolarnu smešu glukoze i fruktoze, koju je i razdvojio. Ovi monosaharidi su svoja prva imena, dekstroza i levuloza dobili 1836. godine kada je Biot otkrio da rastvor saharoze u kiseloj sredini pre i posle zagrevanja obrće ravan polarizovane svetlosti u suprotnom smeru. Tada je ovaj proizvod i dobio ime invertni šećer, a sam proces inverzija saharoze. Tokom XIX i početkom XX veka više istraživačkih grupa se bavilo ovom reakcijom. Početkom XX veka sa otkrićem enzima invertaze mnogobrojne prednosti enzimске inverzije rastvora saharoze nad kiselinskom ovaj enzim dovode u žižu interesovanja industrije hrane (1).

Invertni šećer je pogodniji za korišćenje u industriji hrane od često korišćenog glukoznog sirupa, jer je fruktoza slađa od glukoze, pa samim tim i ekvimolarna smeša glukoze i fruktoze. Osim glukoznog u industriji se koristi i fruktozni sirup, koji je pogodan za proizvodnju hrane namenjene osobama obolelim od dijabetesa, jer je metabolizam fruktoze nezavisan od insulina. Međutim, cena čistog fruktoznog sirupa je veća od cene invertnog šećera, pa je time i ekonomska isplativost za širu primenu manja.

Invertni šećer dobijen enzimskom hidrolizom u poređenju sa dobijenim kiselom hidrolizom ima niz prednosti:

- ✓ bolje organoleptičke osobine (poboljšava ukus proizvoda, nema tamno žutu boju);
- ✓ niska temperatura procesa (manji utrošak energije);
- ✓ nema nečistoća i nusproizvoda
- ✓ lakše rukovanje procesom i
- ✓ kontrolisani stepen inverzije od 0 do 100%.

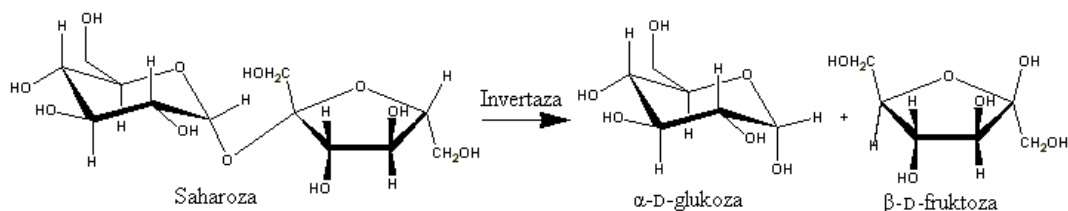
Invertni šećer dobijen kiselinskim postupkom je tamno žute boje, obično vrlo niske pH vrednosti ili visoke provodljivosti, odnosno, sadrži veliku koncentraciju soli, pa je zbog svega navedenog vrlo nepogodan za korišćenje u industriji hrane. Osim toga, ne treba zaboraviti i veliku količinu potrebne energije za njegovu proizvodnju. Ali najbitniji nedostatak je prisustvo toksičnih nusproizvoda nastalih dehidratacijom šećera na visokoj temperaturi i niskim pH vrednostima. Zbog svih navedenih nedostataka invertni šećer dobijen enzimskim postupkom ima prednost za upotrebu u industriji hrane i pića.

Danas se invertni šećer koristi u industriji hrane i pića, najčešće kao zaslađivač, jer je 1,4 puta slađi od saharoze, ali je i glavni sastojak mekih punjenja bombona i fondana, jer nema bojazni od njegove kristalizacije, što ne bi bio slučaj ukoliko bi se upotrebljavala saharoza. U farmaceutskoj industriji se koristi za proizvodnju sirupa, a koristi se i u industriji papira (za održavanje vlažnosti) i duvana (za poboljšanje ukusa duvana za žvakanje i cigareta, održavanje vlažnosti i kvaliteta duvana) (2, 3).

Cena svakog industrijskog proizvoda direktno zavisi od cena sirovina. Jedna od sirovina koja utiče na finalnu prodajnu cenu invertnog šećera je i enzim. Imobilizacijom enzima na nerastvornom nosaču, omogućava se višestruka i kontinualna upotreba enzima, pa se time smanjuje i potrebna količina, a finalno i cena invertnog šećera.

2.2 Invertaza

Invertaza (β -D-fruktofuranozid-fruktohidrolaza, EC 3.2.1.26) je važan enzim u biološkim sistemima. On hidrolizuje molekul saharoze na ekvimolsku smešu glukoze i fruktoze (slika 1).



Slika 1. Reakcija hidrolize saharoze katalizovana invertazom

Ovaj enzim je 1871. godine pronašao Ernst Hoppe-Seyler, a 1967. godine Neumann i Lampen su ga prvi put izolovali iz ćelije kvasca (*S. cerevisiae*) (4).

Invertaza se u kvascu nalazi u dva oblika, kao intracelularna i ekstracelularna (5). Intracelularna invertaza nije glikozilovana, nalazi se u ćeliji u rastvornom obliku i ima molekulsku masu od 59 kDa, dok je ekstracelularna invertaza glikoprotein, nalazi se u periplazmatskom prostoru vezana za ćelijski zid kvasca, ima molekulsku masu od 74–121 kDa (6).

Osim u kvascima, invertaza se nalazi i u biljkama.

2.3 Imobilizovani enzimi

Enzimi kao katalizatori reakcija u živim sistemima se odlikuju visokom specifičnošću prema određenom supstratu. Zahvaljujući svojim osobinama našli su primenu u mnogim granama industrije, kao i u svakodnevnom životu. Većina enzima dostupnih na tržištu ima visoku cenu, što utiče i na cenu finalnog proizvoda. Jedan od načina smanjenja troškova proizvodnje u industrijama koje upotrebljavaju enzime u svojim proizvodnim procesima je upotreba imobilizovanih enzima.

Imobilizacija enzima predstavlja ograničeno (lokalizovano) kretanje ovih molekula kroz reakcionu smešu, uz očuvanje njihove katalitičke aktivnosti. Osim dobrih strana, imobilizacija enzima ima i nedostatke. Prednosti i mogući nedostaci upotrebe imobilizovanih enzima u proizvodnim procesima su prikazani u tabeli 1.

Tabela 1. Prednosti i nedostaci korišćenja imobilizovanih biokatalizatora

Dobijene prednosti	Mogući nedostaci
<ul style="list-style-type: none">• mogućnost višestruke upotrebe• mogućnost kontinualne upotrebe• lako i trenutno odvajanje iz reakcione smeše• veća stabilnost enzima• veća produktivnost• mogućnost kontrole i regulacije procesa• mogućnost automatizacije procesa	<ul style="list-style-type: none">• smanjenje aktivnosti enzima• otežana difuzija supstrata i proizvoda• visoka cena matriksa• visoka cena postupka imobilizacije

Smanjenje aktivnosti enzima u imobilizatu može biti posledica konformacionih promena molekula tokom procesa imobilizacije. Uz ovo i otežana difuzija supstrata i proizvoda smanjuju aktivnost imobilizovanih enzima. Uzrok ovoga može biti velika viskoznost reakcione smeše ili gusta struktura imobilizata kroz koju se molekuli otežano kreću. Međutim, enzimi koji se imobilizuju sa ciljem korišćenja u industrijskim procesima mogu biti i sirovi enzimski preparati, čija je cena daleko niža od cene prečišćenog enzima, čime se značajno smanjuje cena imobilizovanih enzima, a time i cena finalnih proizvoda.

2.4 Metode imobilizacije enzima

Osnovne metode imobilizacije su:

- ✓ *adsorpcija;*
- ✓ *kovalentno vezivanje;*
- ✓ *zarobljavanje;*
- ✓ *umrežavanje i*
- ✓ *enkapsulacija.*

Često se pri imobilizaciji enzima kombinuju različite metode.

Adsorpcija je najstarija i najjednostavnija metoda imobilizacije enzima za nerastvorni matriks. Enzim i matriks u ovim imobilizatima povezuju različite nespecifične interakcije: van der Waals-ove, hidrofobne interakcije, vodonične veze i elektrostatičke sile. Postojanje i jačina ovih veza zavise od mnogih faktora: prirode nosača (adsorbenta), prirode enzima, temperature, pH vrednosti, jonske sile rastvora i sl. i o ovim parametrima je neophodno voditi računa kako tokom samog postupka imobilizacije, tako i tokom upotrebe ovih imobilizata.

Prednosti ove metode nad ostalim su:

1. *Brzina*, sama imobilizacija traje kratko.
2. *Reverzibilnost*, enzim se sa nosača može desorbovati promenom nekog od gore pomenutih parametara i na nosač se može imobilizovati nova količina enzima.
3. *Jednostavnost*, imobilizacija se izvodi u blagim reakcionim uslovima, najpovoljnijim za stabilnost enzima.
4. *Mogućnost dodatnog umrežavanja*, stvaranjem kovalentnih veza između nosača i enzima nakon njegove adsorpcije na nosač.

Kovalentna imobilizacija enzima podrazumeva nastajanje kovalentne veze između enzima i nosača. Prednost ove metode imobilizacije nad ostalima je čvrsta veza između matriksa i enzima, pa „curenja” enzima iz imobilizata praktično nema (7). Nedostatak ove metode je to što stvaranje hemijske veze, odnosno reakcioni uslovi u kojima ona nastaje, nekad nisu pogodni za očuvanje native strukture enzima i u izvesnim slučajevima može da dođe do njegove delimične ili potpune inaktivacije. Funkcionalne grupe proteina pogodne za stvaranje kovalentne veze sa matriksom su: amino, karboksilna, sulfhidrilna, hidroksilna,

imidazolov prsten i fenolna grupa. Osim SH i amino grupe, ostale grupe moraju da se pre imobilizacije aktiviraju.

Tehnika imobilizacije enzima **zarobljavanjem** podrazumeva zarobljavanje molekula enzima u polimernoj strukturi matriksa, koji je najčešće hidrofilni gel. Kroz pore polimerne strukture nosača trebalo bi nesmetano da prolaze molekuli supstrata i proizvoda, što nije uvek moguće (zavisi od veličine molekula supstrata), pa je jedan od glavnih nedostataka ove metode imobilizacije pojava difuzionih ograničenja (8). Pore matriksa bi takođe trebalo da budu nepropusne za molekule enzima, što zavisi kako od vrste nosača, tako i od veličine enzima, ali često se dešava i da enzim „curi” iz imobilizata, pa je potrebno dodatno osigurati od „curenja” imobilizat enzima (9). Ovom metodom moguće je imobilizovati veliku količinu enzima, čija aktivnost nije „vidljiva” pri merenju enzimske aktivnosti imobilizata, ali doprinosi takozvanom „depo” efektu čijim postojanjem se može objasniti pojavno velika operativna stabilnost imobilizata (10).

Međusobno **umrežavanje** molekula enzima postiže se pomoću bi- ili multi-funkcionalnih reagenasa. Imobilizat koji se dobija na ovaj način ima loše mehaničke osobine i nije pogodan za praktičan rad. Osim toga ovi imobilizati imaju malu aktivnost u odnosu na količinu imobilizovanog enzima, jer dobijeni imobilizat ima velikih difuzionih ograničenja i praktično su aktivni samo molekuli na površini imobilizovanih čestica. Upotreba reaktivnih umreživača takođe utiče na smanjenje aktivnosti ovako imobilizovanih enzima.

Posebnu vrstu imobilizovanih enzima umrežavanjem predstavljaju CLEC–ovi i CLEA–ovi. Za dobijanje CLEC–ova koriste se kristali enzima, pa je zbog toga postupak dobijanja ovih imobilizata komplikovaniji u poređenju sa postupkom dobijanja CLEA–ova. U oba slučaja za dobijanje imobilizata neophodan je čist enzim, čiji se molekuli dodatkom pogodnih reagenasa umrežavaju. Da bi očuvali maksimalnu aktivnost enzimi kristališu u prisustvu supstrata ili molekula sličnih supstratu koji mu pomažu u očuvanju aktivne konformacije. Aktivnost ovih CLE imobilizata može da bude velika.

Enkapsulacija je tehnika imobilizacije enzima u kojoj on može ostati slobodan u rastvoru koji je okružen polupropustljivom membranom. Ova membrana može biti sintetički polimer, lipidna ili prirodna polupropusljiva membrana. Enzim u kapsulama osim u rastvornom obliku može biti i nekom drugom metodom imobilizovan za čvrst nosač. Mali molekuli supstrata i proizvoda slobodno prolaze kroz membranu, dok je enzimu ograničeno kretanje unutar polupropustljive membrane.

Prilikom izbora metode za imobilizaciju nekog enzima potrebno je podjednako dobro poznavati osobine tog enzima i potencijalnih nosača, ali i gde bi dobijeni imobilizovani enzim bio korišćen i uslove u kojima bi bio korišćen. U tabeli 2 date su najvažnije osobine imobilizovanih enzima dobijenih različitim metodama imobilizacije.

Tabela 2. Karakteristike imobilizovanih enzima dobijenih različitim metodama imobilizacije

<i>Karakteristike</i>	<i>Adsorpcija</i>			<i>Umrežavanje</i>	<i>Zarobljavanje</i>
	<i>Fizička adsorpcija</i>	<i>Jonska veza</i>	<i>Kovalentno vezivanje</i>		
<i>Priprema imobilizata</i>	Jednostavna	Jednostavna	Komplikovana	Komplikovana	Komplikovana
<i>Enzimska aktivnost</i>	Niska	Srednja	Visoka	Srednja	Visoka*
<i>Supstratna specifičnost</i>	Nepromenjena	Nepromenjena	Promenljiva	Promenljiva	Nepromenjena
<i>Jačina veze</i>	Slaba	Srednja	Jaka	Jaka	Jaka
<i>Regeneracija</i>	Moguća	Moguća	Nemoguća	Nemoguća	Nemoguća**
<i>Opšta primenljivost</i>	Mala	Srednja	Srednja	Mala	Velika
<i>Cena imobilizacije</i>	Niska	Niska	Visoka	Srednja	Niska

* Depo efekat (10)

** Osim u nekim slučajevima

2.5 Imobilizacija enzima zarobljavanjem

Tehnika imobilizacije enzima zarobljavanjem je jedna od jednostavnijih metoda imobilizacije. Istorijski, ova metoda je počela da se razvija nakon adsorpcije i kovalentne imobilizacije enzima. Nosač koji se koristi za ovu vrstu imobilizacije je polupropustljive polimerne strukture, odnosno kroz njega slobodno prolaze mali molekuli supstrata i proizvoda enzimske reakcije, ali ne prolaze molekuli enzima. Dobra karakteristika ove metode je što se mogu imobilizovati dva ili više različitih enzima istovremeno.

Prilikom imobilizacija enzima zarobljavanjem, enzim se ubacuje u rastvor polimera koji formira matriks tokom procesa imobilizacije. Prekursori koji se koriste za pravljenje matriksa su različiti. Često se koriste gelovi ili nezasićeni monomeri, čije se umrežavanje inicira ozračivanjem ili hemijskim inicijatorima. U slučaju korišćenja reakcije geliranja za imobilizaciju, u istom rastvoru nalaze se enzim i polimer, a geliranje se inicira promenom temperature, dodatkom soli ili promenom rastvarača.

Gelovi koji se koriste za imobilizaciju biokatalizatora se mogu podeliti:

1. po prirodi – prirodni i sintetički;
2. po tipu tečne faze u gelu – hidrogelovi i organogelovi;
3. po prirodi veze u gelu – hemijski (jake kovalentne veze održavaju trodimenzionalnu strukturu gela) i fizički (vodonične, elektrostatičke i van der Waals–ove veze održavaju strukturu gela);
4. po načinu očvršćavanja gela dele se na:
 - a) termoreverzibilno gelirajući (agar, želatin)
 - b) jonotropno gelirajući (alginat, karagenan)
 - c) gelirajući promenom rastvarača (celuloza-acetat, polistiren)
 - d) gelirajući polikondenzacijom (poliuretan, epoksidne smole)
 - e) polimerizaciono gelirajući (poliakrilamid, polimetakrilamid)

Geometrija dobijenog imobilizata može biti različita u zavisnosti od korišćene metode i buduće upotrebe. Iako je glavni nedostatak ovih imobilizata pojava velikih difuzionih ograničenja, a time i smanjenja aktivnosti enzimskog imobilizata, ima primera da enzimi imobilizovani zarobljavanjem zadržavaju istu ili veću aktivnost nego u drugim metodama imobilizacije, jer je enzim u veoma blagim uslovima imobilizovan, pa ne dolazi do njegove denaturacije. Ovaj način imobilizacije je veoma pogodan za enzime koji se lako inaktiviraju drugim načinima imobilizacija.

2.5.1 Osobine potencijalnih nosača

2.5.1.1 Fizičke osobine nosača

Nosači za imobilizaciju enzima metodom zarobljavanja su umrežene polimerne strukture koje nastaju u toku procesa imobilizacije. Najvažnije osobine nosača su veličina pora, oblik, mehanička stabilnost i veličina čestice, priroda pora (otvorene ili zatvorene), potencijalne reaktivne grupe i sl.

Veličina pora. Nosači za imobilizaciju enzima tehnikom zarobljavanja ne mogu se svrstati u porozne nosače kao što su makroporozni sintetički nosači koji se upotrebljavaju u imobilizaciji adsorpcijom. Međutim, u nabubrelom stanju oni se mogu posmatrati kao porozni, kada su njihove pore ispunjene rastvaračem i supstratom. Veličina pora zavisi od

prirode polimera koji se koristi kao nosač, pa na primer, kod poliakrilamida zavisi od koncentracije monomera i umreživača. Stepenn bubrenja hidrofilnih gelova nosača u rastvaraču takođe utiče na veličinu pora (11).

Poroznost. U slučaju imobilizacije enzima zarobljavanjem, adsorpcijom i kovalentnom imobilizacijom veća poroznost nosača rezultira većom aktivnošću imobilizata. Povećanje poroznosti nosača obično se postiže dodatkom aditiva pri imobilizaciji, što povećava slobodnu površinu imobilizata, time i dostupnost enzima molekulima supstrata, pa su i difuziona ograničenja manja (11).

Geometrija. Veličina i oblik imobilizata ne zavise samo od korišćene metode imobilizacije i nosača, već više od njegove buduće primene. Najčešći oblici imobilizata su kuglice, konci, tanki filmovi, diskovi i sl. Svaki oblik ima svoje prednosti za korišćenje u određene svrhe, pa je na primer imobilizat u obliku filma pogodan za biosenzore, imobilizat u obliku kuglica je pogodan za protočne reaktore, a imobilizat u obliku konca ima veliku volumetrijsku aktivnost (11).

Veličina čestica. Veličina čestica imobilizata dobijenih zarobljavanjem u hidrogelu varira u zavisnosti od korišćene metode, ali je uglavnom veća od imobilizata dobijenih drugim metodama. Kod imobilizata sa velikim česticama izraženija su difuziona ograničenja, ali je lakša manipulacija (11).

2.5.1.2 Hemijske osobine nosača

Hemijske osobine nosača koje se koriste u imobilizaciji enzima zarobljavanjem zavise od osobina korišćenih prekursora. Neke od osobina su: relativna hidrofilnost, aktivna funkcionalnost i neaktivna funkcionalnost.

Generalno, gelovi su najčešće korišćeni nosači u ovoj vrsti imobilizacije, jer su hidrofilni, pa time i kompatibilni sa enzimima. Ali i hidrofobni nosači u nekim slučajevima pozitivno utiču na aktivnost i stabilnost enzima.

Nosači mogu da imaju reaktivne funkcionalne grupe, čija reaktivnost zavisi od osobina korišćenog prekursora polimera. Prekusori tokom imobilizacije reaguju samo međusobno (neaktivna funkcionalnost), i u ovom slučaju matriks ne reaguje hemijski sa enzimom već enzim biva samo fizički zarobljen u polimernoj strukturi nosača (poliakrilamid, Ca-alginat). U drugom slučaju prekursori, osim što reaguju međusobno stvarajući polimerni matriks, reaguju i sa enzimom (aktivna funkcionalnost). Enzim je u ovom slučaju zarobljen u polimernom matriksu i dodatno kovalentnim vezama učvršćen za njega, pa je curenje enzima

u ovom sličaju minimalno (polimeri sa epoksidnim grupama). Međutim, enzim tokom hemijske modifikacije može delimično da bude denaturisan. Aktivnost imobilizovanog enzima u slučaju upotrebe obe vrste nosača zavisi i od prirode nosača, koji može bitno uticati na promenu konformacije enzima u imobilizatu, pa time i njegovu inaktivaciju.

U svim tipovima imobilizacija, pa i u ovom, hidrofilnost matriksa bitno utiče na aktivnost enzima u imobilizatu, njegovu stabilnost i selektivnost. Pri izboru nosača se zato naročito vodi računa i o prirodi enzima, pa se očuvanje visoke aktivnosti imobilizovane invertaze, glukozoizomeraze ili ćelija kvasca dobija njihovom imobilizacijom u hidrofilnim matriksima, a lipaze u hidrofobnim matriksima (11).

2.5.2 Efekti imobilizacije enzima metodom zarobljavanja

Izbor matriksa koji se koristi u imobilizaciji je bitan, jer utiče na aktivnost, stabilnost i selektivnost budućeg imobilizata, pa treba izabrati pogodan metod u zavisnosti od osobina enzima, ali i njegove buduće upotrebe.

Aktivnost. U slučaju imobilizacije enzima zarobljavanjem očuvanje aktivnosti zavisi od mnogih faktora kao što su priroda nosača, veličina čestica imobilizata (difuziona ograničenja), količina imobilizovanog enzima, prisustvo aditiva, korišćena metoda i uslovi imobilizacije.

Aktivnost imobilizata, naravno, zavisi od količine imobilizovanog enzima. Imobilizacijom veće količine enzima dobija se i veća aktivnost imobilizata, ali pri imobilizaciji veće količine enzima, kao ograničavajući faktor aktivnosti javlja se difuziono ograničenje.

Zadržana aktivnost enzima u imobilizatu obično se izražava kao odnos specifične aktivnosti imobilizovanog enzima (U/mg imobilizovanog proteina) i specifične aktivnosti slobodnog enzima (U/mg proteina) (11). Ovde se podrazumeva da su aktivnosti imobilizata i slobodnog enzima merene istom reakcijom specifičnom za dati enzim, u istim reakcionim uslovima i rastvaraču, što nije uvek moguće i isključivo se odnosi na merenje aktivnosti enzima i imobilizata u vodenim rastvorima.

Na aktivnost imobilizovanog enzima utiče i priroda matriksa, odnosno njegov uticaj na promenu mikrookoline koja može bitno da promeni aktivnost ili specifičnost enzima. Difuziona ograničenja naročito su izražena kod imobilizata u gelovima. Zadržana aktivnost imobilizovanog enzima, u odnosu na rastvorni, može biti 10–20%, a nekad i manja. Međutim, ovi imobilizati nekad dobijaju i neočekivane dobre karakteristike kao što su, na primer,

povećana stereoselektivnost i stabilnost u odnosu na nativan enzim, što i pored manje enzimске aktivnosti imobilizovanog enzima opravdava upotrebu ove metode. Da bi se difuzione smetnje svele na minimum i maksimalno očuvala aktivnost enzima često se u postupku imobilizacije koriste aditivi. Njihova uloga je da povećaju poroznost nosača ili da očuvaju konformaciju enzima u aktivnom obliku. Neki od aditiva koji se u ovu svrhu koriste su krunasti etri, polisaharidi, polietilenglikol, površinski aktivne supstance, soli i sl.

Stabilnost. Vrlo često enzimi imobilizovani adsorpcijom ili kovalentno vezani za nosač imaju manju stabilnost od nativnog oblika (12). Međutim, imobilizacijom zarobljavanjem obično se dobijaju biokatalizatori koji imaju znatno veću stabilnost od rastvornog oblika, sa poluživotom (vreme za koje enzimska aktivnost pada na 50% od početne, pri tačno određenim eksperimentalnim uslovima) većim i više od sto puta (13). U stabilizaciji enzima u ovim imobilizatima glavnu ulogu imaju hidratacioni efekat matriksa, zarobljavanje i ograničenje kretanja enzima u matriksu. Naročito je izražena povećana temperaturna stabilnost ovih imobilizata. Kod gel matriksa dodatno zarobljavanje enzima dobija se skupljanjem gela i smanjivanjem veličina čestica tokom zrenja imobilizata, pa je mogućnost dalje promene konformacije enzima svedena na minimum. Naravno, imobilizacija enzima tehnikom zarobljavanja sama po sebi ne podrazumeva da će se dobiti preparat veće stabilnosti, već to zavisi kako od prirode nosača, tako i od osobina enzima.

Selektivnost. Kao i kod drugih metoda imobilizacije, adsorptivne i kovalentne imobilizacije, zarobljavanje enzima u polimernom nosaču može da utiče na promenu selektivnosti enzima (14). Selektivnost enzima delimično određuje i njegova mikrookolina. Mikrookolina enzima utiče na promenu njegove konformacije, što uslovljava i promenu njegove selektivnosti. Primećeno je da se konformacija, pa time i selektivnost imobilizata menja i tokom njihove upotrebe i usled difuzionih ograničenja. Aditivi kao što su površinski aktivne supstance i krunasti etri takođe utiču na promenu selektivnosti i aktivnosti enzima, što zavisi i od njegove prirode i konformacione fleksibilnosti. Na promenu selektivnosti enzima može da ima uticaj i priroda nosača, odnosno njegov uticaj na promenu konformacije enzima. Povećanje enantioselektivnosti enzima imobilizacijom metodom zarobljavanja je atraktivno zbog jednostavnosti metode imobilizacije i univerzalne upotrebljivosti ovih biokatalizatora.

2.6 Imobilizovane ćelije kvasca *S. cerevisiae*

Invertni šećer (ekvimolarna smeša glukoze i fruktoze) dobija se ili kiselom ili enzimskom hidrolizom saharoze. Prednosti enzimskog nad kiselinskim postupkom hidrolize opisani su u poglavlju 2.1. Enzimska hidroliza disaharida saharoze, odvija se pomoću invertaze (poglavljje 2.2). Osim čistog, rastvornog enzima u istu svrhu se mogu upotrebiti i cele ćelije kvasca *S. cerevisiae*, koji je i najzastupljeniji izvor za izolovanje ovog enzima. Međutim, prisustvo proteina, a naravno i celih ćelija bilo kog mikroorganizma, nije poželjno u bilo kom krajnjem proizvodu, naročito onom namenjenom daljoj primeni u industriji hrane ili pića. Imajući u vidu ovo, kao i veliku ekonomsku isplativost, upotreba imobilizovane invertaze ili imobilizovanih ćelija kvasca *S. cerevisiae* trebalo bi da je najzastupljeniji postupak dobijanja invertnog šećera u industrijama hrane, pića i farmaceutskih proizvoda u svetu.

Istorijski, invertaza je bila prvi imobilizovani enzim. Nelson i Griffin su 1916. godine imobilizovali rastvornu invertazu na aktivnom uglju i Al_2O_3 i time pokazali da se enzimi mogu vezati za nerastvorni nosač, uz očuvanje enzimske aktivnosti.

Sedamdesetih godina prošlog veka imobilizovanje mikroorganizama bila je jedna od najatraktivnijih oblasti biotehnologije, tada u razvoju. Međutim, imobilizovani mikroorganizmi poznati su još od 1823. godine kada je imobilizovani *Acetobacter* na piljevini korišćen za proizvodnju sirćeta (15). Imobilizacija celih ćelija ima praktični i teorijski značaj za primenu u biotehnologiji, a predstavlja i praktičnu alternativu imobilizovanju enzima (16). Korišćenjem mikroorganizama za dobijanje imobilizovanih biokatalizatora umesto iz njih izolovanih i prečišćenih enzima značajno smanjuje cenu imobilizovanih biokatalizatora, ali neretko se dobija i daleko stabilniji biokatalizator. Enzimi se u ćeliji nalaze u svom prirodnom okruženju koje ih štiti od promena spoljne sredine u kojoj se ćelija nalazi, pa su takvi i najmanje podložni denaturaciji.

Najčešće korišćena tehnika imobilizacije u početku je bila zarobljavanje ćelija mikroorganizama u poliakrilamidnim hidrogelovima. Reakcije polimerizacije poliakrilamida se obično izvode na visokim temperaturama i u visokoj koncentraciji reaktanata. Na enzimsku aktivnost invertaze u ćelijama kvasca *S. cerevisiae* imobilizovanim u ovim gelovima negativno utiče visoka temperatura, prisustvo organskih rastvarača, reaktivnih monomera kao i prisustvo dobijenih polimera. Na primer, polimerizacija 2-hidroksietil-

metakrilata (HEMA) obično se izvodi na temperaturama daleko višim od sobne temperature, ali se može uspešno izvesti i na nižim temperaturama (10–20°C). Međutim, na temperaturi pogodnoj za stabilnost enzima reakcija traje dugo (više od 10 sati) nakon čega je celokupna količina ćelija kvasca inaktivirana zbog dugog vremena izloženosti reaktivnim jedinjenjima neophodnim za reakciju polimerizacije. Na višim temperaturama (45–50°C) ista reakcija traje mnogo kraće, a naročito bez prisustva ćelija kvasca i pufera (pola sata). Prisustvo biokatalizatora povećava vreme reakcije na 1–2 sata i direktno zavisi od koncentracije ćelija (povećava vreme reakcije) i masenog procenta organske faze u reakcionoj smeši (smanjuje vreme reakcije, ali smanjuje i ukupnu aktivnost dobijenog imobilizata). Pokazano je da tokom ovog perioda neorganske soli, polimer i umreživač (etilendimetakrilat) ne utiču na enzimsku aktivnost, dok monomer nezavisno od njegove koncentracije u reakcionoj smeši (3–30%) smanjuje poluzivot invertaze na 120–140 minuta (17). Tokom grejanja reakcione smeše skoro je nemoguće sprečiti lokalna pregrevanja koja dovode do totalne inaktivacije invertaze. Jedini način prevazilaženja svih pomenutih problema je sniženje temperature reakcije na 37°C, što opet povećeva vreme potrebno za polimerizaciju, a ipak rezultira delimičnom inaktivacijom enzima. Iz svega navedenog se može zaključiti da se na ovaj način ne može dobiti imobilizat ćelija kvasca sa visokom enzimskom aktivnošću. Uz to je dobijeni imobilizat veoma krt, staklast materijal, pa iako autori tvrde da je zadovoljavajućih mehaničkih osobina, pri radu sa njim, kako i sami kažu, dolazi do površinske abrazije i lomljenja čestica imobilizata. Kako bi prevazišli problem inaktivacije enzima visokom temperaturom, isti imobilizat dobijen je i korišćenjem UV svetlosti kao inicijatora reakcije polimerizacije. Termostabilnost ćelija kvasca imobilizovanih na ovaj način je velika, ali je njihova početna aktivnost mala (prinos aktivnosti oko 2%), pa je imobilizat neupotrebljiv za praktičnu primenu (18). Imobilizacija rastvorne invertaze u HEMA polimeru nije detaljnije proučavana, jer je aktivnost dobijenih imobilizata veoma mala (prinos aktivnosti u imobilizatu 2–30%) (18), a razlog tome je inaktivacija enzima tokom reakcije polimerizacije, ali i neadekvatna veličina pora polimera kroz koji enzim lako izlazi. Međutim, ovaj polimer je ipak uspešno upotrebljen za imobilizaciju enzima, pa i invertaze, ali kao kopolimer sa nekim reaktivnim monomerom za koji se enzim može vezati adsorptivno ili kovalentno (19–22).

Poliakrilamid je bio veoma popularan kao nosač za imobilizaciju ćelija mikroorganizama početkom 80-tih godina prošlog veka. Ćelije kvasca imobilizovane su u poliakrilamidu dobijenom hemijskom i radiopolimerizacijom (γ zračenjem). Na invertaznu aktivnost dobijenih imobilizata podjednako negativno utiče i prisustvo reaktivnih komponenti

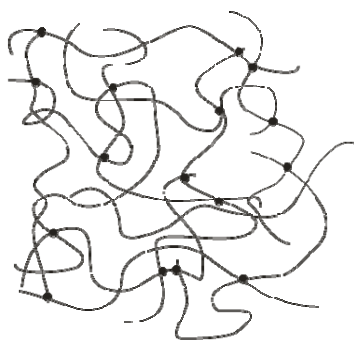
u reakcionoj smeši (u slučaju hemijske polimerizacije akrilamida) i γ zraci (u slučaju alternativne metode imobilizacije). Ipak, imobilizat sa najvećim prinosom aktivnosti dobijen je u reakciji radiopolimerizacije 85% (200 kR), dok je prinos imobilizata ćelija u poliakrilamidu dobijenog hemijskom polimerizacijom bio 70% (23). Bis-akrilamid, neophodan za umrežavanje linearnih polimera akrilamida, takođe smanjuje enzimsku aktivnost ćelija, pa su ćelije kvasca imobilizovane i u poliakrilamidu napravljenom bez prisustva drugih reaktivnih jedinjenja. Reakcija polimerizacije inicirana je velikom dozom γ zraka, 1000 kR (5 puta većom nego u prethodno opisanom slučaju kada je u reakciji korišćen i umreživač), koja je međutim inaktivirala veliki deo enzima, pa je prinos aktivnosti ovog imobilizata bio samo 22%. Pokazano je da prisustvo monomera akrilamida inhibira enzimsku aktivnost rastvorne invertaze, ćelija kvasca, kao i imobilizovanih ćelija. U 20% rastvoru akrilamida u 0,02 M acetatnom pufera pH 4 (ovaj rastvor monomera se i koristi za imobilizaciju jer je to minimalna koncentracija akrilamida kada dobijeni imobilizat ima dobre mehaničke osobine i prinos invertazne aktivnosti) aktivnost rastvorne invertaze je manja od 10% početne aktivnosti, aktivnost ćelija kvasca oko 35%, a imobilizovanih ćelija kvasca oko 45% (23).

Ćelije kvasca, kao i rastvorna invertaza imobilizovane su u sintetičkim polimerima i elektropolimerizacijom (24–26). Ovi imobilizati su značajni za razvitak same tehnike imobilizacije i karakterizaciju dobijenih imobilizata. Dobijeni imobilizati se mogu koristiti kao elektrode biosenzora, jer su imobilizati direktno vezani za platinsku elektrodu. Imobilizacija ćelija kvasca i invertaze ovom tehnikom nema nikakav praktičan značaj, jer je metoda skupa i komplikovana, osim kao model sistem za ispitivanje osobina imobilizata i razvoj metode, zbog niske cene i velike dostupnosti ćelija kvasca *S. cerevisiae* i invertaze.

Korišćenje prirodnih polimera kao što su κ -karagenan, želatin i alginat je jedan od načina prevazilaženja problema kojih ima u radu sa sintetičkim polimerima. Reakcioni uslovi pri kojima dolazi do njihove polimerizacije su blagi, dobijeni imobilizati elastičniji, neki od njih i potpuno biorazgradivi, a polimerizacija i tehnika imobilizacije jednostavnija, brža i jeftinija.

Jedan od prirodnih polimera, u literaturi često korišćen za imobilizaciju celih ćelija kvasca *S. cerevisiae* je želatin. Želatin je protein rastvoran u vodi. Dobija se delimičnom hidrolizom kolagena. Ima slobodne funkcionalne grupe: karboksilne, amino i hidroksilne. Formira u vodi elastičan gel, koji dodatno bubri u vodi i može da apsorbuje 600 – 700 puta veću masu vode od sopstvene. Njegova osobina da u reakciji sa nekim aldehidima (formaldehid i glutaraldehid) i metalnim solima (Al^{3+} i Cr^{3+}) gradi polimer, u vodi

nerastvoran na temperaturama iznad 35°C (temperatura topljenja želatina > 35°C) iskorišćena je za dobijanje imobilizovanih biokatalizatora. Reakcijom sa slobodnim amino grupama polipeptidnih lanaca želatina formaldehid gradi metilenske mostove koji stvaraju trodimenzionalnu strukturu želatina (slika 2) i istovremeno imobilizuju ćelije kvasca fizičkim zarobljavanjem u nastaloj polimernoj strukturi (27). Na sličan način imobilizovana je i rastvorna invertaza, korišćenjem glutaraldehida kao umreživača (28).



Slika 2. Shematski prikaz umreženih molekula polipeptidnih lanaca želatina

Promena koncentracije molekula umreživača u reakcionoj smeši direktno utiče na kvalitet dobijenog imobilizata. Povećanjem koncentracije umreživača aktivnost imobilizata se smanjuje, kako zbog hemijske inaktivacije enzima dejstvom reaktivnog molekula aldehida, tako i zbog nastajanja sve gušće mrežaste strukture polimera koja ograničava slobodno kretanje supstrata i proizvoda kroz čestice imobilizata (29). Najveća enzimaska aktivnost dobijena je u imobilizatu u kome je korišćena najmanja koncentracija umreživača (30). Međutim, kod ovog imobilizata je primećeno da ćelije kvasca cure iz čestica imobilizata, jer korišćena količina formaldehida nije bila dovoljna za formiranje dovoljno umrežene trodimenzionalne strukture, sa porama manjim od veličine samih ćelija, pa su one nesmetano izlazile iz čestica polimera (30). Isti rezultati dobijeni su i pri imobilizaciji rastvorne invertaze, pa je imobilizat dobijen korišćenjem velike količine glutaraldehida, kako bi se sprečilo curenje enzima, imao malu enzimsku aktivnost (28).

Smeša formaldehida i etanola koja je korišćena za očvršćavanje imobilizata (ćelija kvasca u želatinu) negativno utiče na enzimsku aktivnost, što je i eksperimentalno pokazano. Međutim, u istom radu pokazano je da imobilizat ćelija kvasca dobijen korišćenjem formaldehida ima veću aktivnost u poređenju sa imobilizatom tretiranim glutaraldehydom, koji je u literaturi češće korišćen umreživač za međusobno povezivanje molekula proteina (30). Korišćenjem veće količine umreživača sprečeno je curenje ćelija iz čestica imobilizata,

ali je ono ipak primećeno neposredno nakon imobilizacije (27). Jedan od bitnih nedostataka ovog imobilizata ćelija kvasca u želatinu je i njihovo sakupljanje i bubrenje pri promeni koncentracije saharoze. Kao jedan od načina poboljšanja mehaničkih osobina imobilizovanih ćelija kvasca u želatinu je i korišćenje granula tufa (rastresita, peskovita stena vulkanskog porekla) kao punilaca, koje su obavijene slojem imobilizovanih ćelija u želatinu (31). Nedostatak ove metode je manji prinos enzimske aktivnosti, od dobijenog imobilizacijom ćelija u želatinu u prethodnim radovima. Kao umreživači u ovoj metodi imobilizacije korišćeni su formaldehid i glutaraldehid, ali je ovog puta imobilizat dobijen upotrebom glutaraldehyda imao veću invertaznu aktivnost. Razlika u aktivnostima ova dva imobilizata može biti posledica različite strukture filma želatina na granulama tufa. Želatin tretiran formaldehidom ima sunderastu strukturu, pa je moguće da je deo aktivnih ćelija ušao u dublje slojeve nepristupačne za supstrat, dok je površina želatina tretiranog glutaraldehydom ravna i sve imobilizovane ćelije su na površini i lako dostupne za supstrat (31, 32). Scardi-jeva grupa je utvrdila da imobilizovane ćelije kvasca u želatinu u poređenju sa onim imobilizovanim u alginatu ili κ -karagenanu imaju veću aktivnost, kao i veći prinos aktivnosti, a izbegnuti su i neki nedostaci, kao što su prisustvo Ca^{2+} jona (u polimeru alginata). Osim toga cena želatina je u godinama kada se ova grupa autora bavila ovom problematikom bila manja u poređenju sa ostala dva prirodna polimera, što su oni i istakli kao bitnu prednost svog imobilizata nad ostalima.

Međutim, enzimaska aktivnost imobilizovanih ćelija kvasca u želatinu, pored svih napred pomenutih prednosti ovog imobilizata, nije bila zadovoljavajuća. Kako bi napravili imobilizat što veće aktivnosti de Alteriis et al. (32) su ćelije kvasca imobilizovali u želatinu korišćenjem tri različite tehnike, od kojih je jedna kombinacija zarobljavanja ćelija u želatinu i alginatu u isto vreme, a zatim je nastali polimer Ca-alginata rastvaran u fosfatnom pufetu. Ovaj eksperiment nije dao očekivane rezultate, jer je aktivnost imobilizovanih ćelija *S. cerevisiae* u želatinu na klasičan način uz korišćenje formaldehyda kao umreživača, imao najveću aktivnost.

Želatin se osim bifunkcionalnim organskim jedinjenjima može umrežavati i katjonima. U ovu svrhu se mogu koristiti joni aluminijuma i hroma. Molekuli želatina se međusobno umrežavaju preko slobodnih karboksilnih grupa polipeptidnih lanaca. Ćelije kvasca *S. cerevisiae* su imobilizovane u želatinu i na ovaj način, korišćenjem katjona hroma kao umreživača (16, 33). Kao i u slučaju imobilizacije u želatinu korišćenjem formaldehyda kao umreživača, sa povećanjem količine jona hroma povećava se aktivnost imobilizata, odnosno količina imobilizovanih ćelija, ali do određene vrednosti. Daljim povećanjem

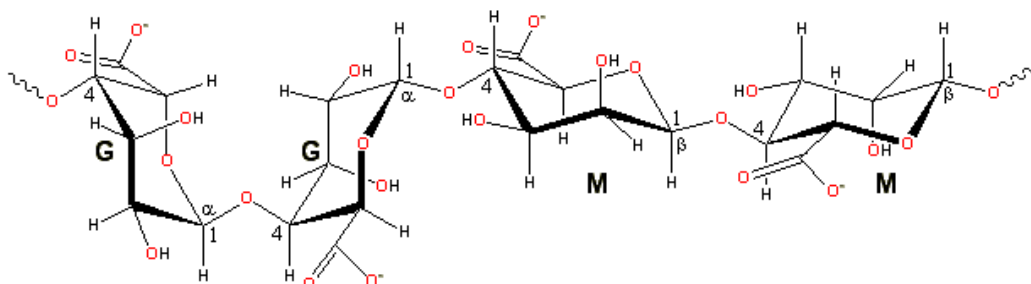
koncentracije jona hroma aktivnost imobilizata ne raste, jer preovladava inhibitorno dejstvo ovih jona na aktivnost invertaze, a rastu i difuziona ograničenja zbog sve gušće trodimenzionalne strukture polipeptidnih lanaca želatina (16, 34), što predstavlja ograničenje ukupne enzimske aktivnosti imobilizata. Rastvorna invertaza imobilizovana je takođe korišćenjem jona Cr^{3+} za umrežavanje molekula želatina, ali je dobijeni imobilizat bio loših mehaničkih osobina (34). Jedan od načina za prevazilaženje problema loših mehaničkih osobina i povećanje aktivnosti imobilizovanih biokatalizatora je dodatak punilaca. Korišćenjem poliakrilamida kao punioca dobijen je imobilizat do 79% veće aktivnosti, ali nestabilan na višim temperaturama (35).

Imobilizacija rastvorne invertaze u želatinu umreženom formaldehidom nije dala dobre rezultate (29). Na ovaj način nije moguće imobilizovati veliku količinu enzima, prinos aktivnosti u imobilizatima je bio daleko manji (12–41%) od prinosa aktivnosti imobilizacijom celih ćelija (71–79%) i direktno je zavisio od korišćene koncentracije želatina i umreživača (smanjivao se sa povećanjem koncentracije bilo koje od ove dve komponente).

Govedi serum-albumin je protein u kome su slično kao i u želatinu imobilizovane ćelije kvasca *S. cerevisiae*, kao i rastvorna invertaza, korišćenjem glutaraldehida kao umreživača na ultrafiltracionoj membrani. Dobijeni imobilizat je zadržao visok procenat enzimske aktivnosti, ali je bio neotporan na visoku temperaturu, kao i mikrobiološku kontaminaciju, a uz to i mehanički loš (18).

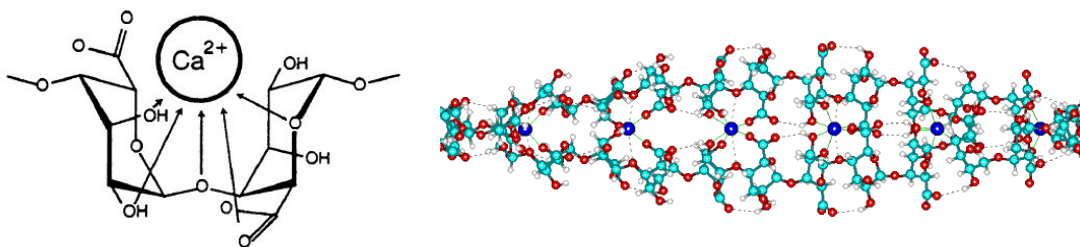
Obzirom da su imobilizovane ćelije kvasca *S. cerevisiae* u proteinskim polimerima imale loše mehaničke osobine, ne odstupajući od ideje korišćenja prirodnih polimera za imobilizaciju enzima i celih ćelija mikroorganizama, napravljen je imobilizat korišćenjem Ca-alginata kao nosača.

Alginat je termin koji se koristi za soli alginske kiseline. Prirodnog je porekla i izoluje se iz ćelijskog zida mrkih algi (Phaeophyceae). Komercijalno je dostupan kao natrijumova so, rastvorna u vodi. Alginat je prirodni polisaharid, linearni kopolimer koji čine dva homopolimerna bloka $\beta(1\rightarrow4)$ vezana manuronska kiselina i $\alpha(1\rightarrow4)$ guluronska kiselina (slika 3).



Slika 3. Deo polisaharidnog lanca alginata. β -(1 \rightarrow 4) veza anjona D-manuronske kiseline (M) i α -(1 \rightarrow 4) veza anjona L-guluronske kiseline (G)

Ovaj polimer gelira u prisustvu dvovalentnih katjona, najčešće Ca^{2+} (slika 4). Koristi se u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, kao i za imobilizaciju enzima i ćelija.

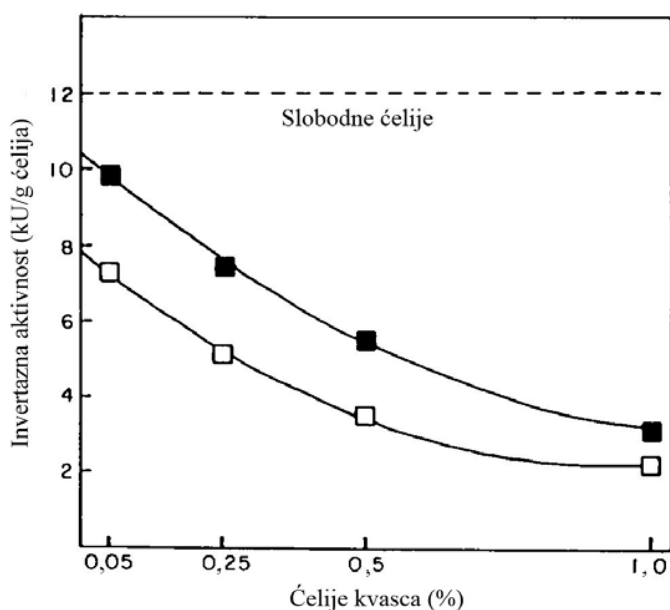


Slika 4. Kalcijum-alginat

Imobilizat u hidrogelu kalcijum-alginata može se napraviti na dva načina, eksternim i internim geliranjem alginata. Interno geliranje je redak način imobilizacije jer je tehnički komplikovaniji, podrazumeva oslobađanje *in situ* Ca^{2+} jona promenom pH reakcione smeše koje može da utiče i na aktivnost pH nestabilnih enzima (36). Geliranje rastvornog Na-alginata se najčešće radi metodom eksternog geliranja, odnosno ukapavanjem smeše Na-alginata i biokatalizatora u rastvor CaCl_2 , ili ukapavanjem smeše biokatalizatora i CaCl_2 u rastvor Na-alginata. U ovako dobijenom imobilizatu vijabilnih ćelija kvasca pokazano je da one mogu i da se umnožavaju bez curenja ćelija u okolni rastvor, ali do određene granice (83 g/L). Aktivnost ovako odgajanih imobilizovanih ćelija (2,98 U/mg suve mase ćelije) je skoro identična invertaznoj aktivnosti slobodnih ćelija gajenih na isti način (3,01 U/mg suve mase ćelije). Aktivnost dobijenog imobilizata je $2,21 \times 10^5$ U/g, dok je aktivnost slobodnih ćelija $1,02 \times 10^4$ U/g, što je najčešća vrednost invertazne aktivnosti ćelija kvasca (37, 38). Dodatak surfaktanata je ovde, kako autori tvrde, neophodan kako bi se obezbedila permeabilnost Ca-

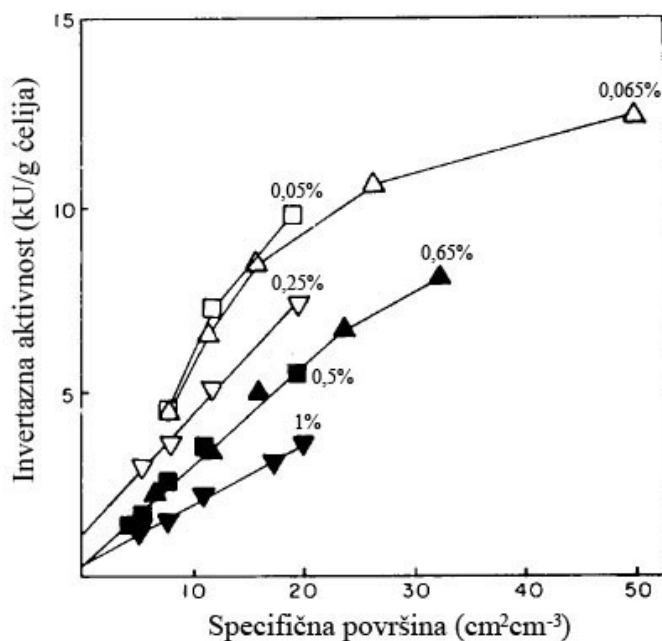
alginatne membrane i metabolički nastali CO₂ nesmetano izašao iz čestica imobilizata (37), što po mišljenju autora verovatno ograničava i količinu imobilizovanih ćelija.

Kako sa povećanjem količine imobilizovanih ćelija opada ukupna aktivnost imobilizata, zbog nemogućnosti supstrata da dođe do dubljih slojeva imobilizata (slika 5), korisno bi bilo izraziti enzimsku aktivnost imobilizata po specifičnoj površini (površina / zapremina) čestica.



Slika 5. Zavisnost invertazne aktivnosti (po gramu ćelija) od količine imobilizovanih ćelija kvasca u alginatu. Debljina dobijenog imobilizata: ■ 0,1 cm, □ 0,2 cm

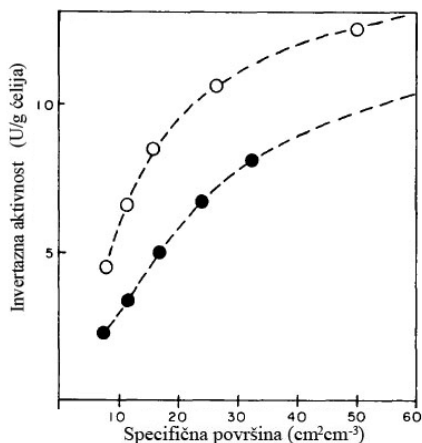
Na slici 6 prikazana je zavisnost invertazne aktivnosti imobilizata sa različitom količinom imobilizovanih ćelija kvasca od specifične površine čestica. Kod imobilizata sa većom količinom imobilizovanih ćelija vidi se linearna zavisnost aktivnosti i specifične površine čestica imobilizata do 25 cm⁻¹, dok kod imobilizata sa niskom količinom imobilizovanih enzima nema linearne zavisnosti.



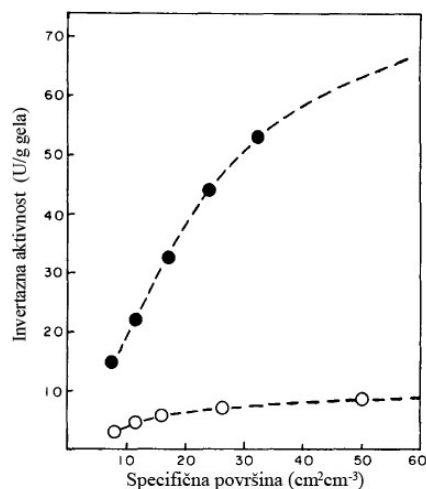
Slika 6. Zavisnost enzimske aktivnosti imobilizata od specifične površine čestica kod imobilizata sa različitom količinom imobilizovanih ćelija kvasca *S. cerevisiae* (% suve mase ćelija u imobilizatu, m/m).

Linearna zavisnost enzimske aktivnosti od specifične površine čestica imobilizata kod imobilizata sa većom koncentracijom ćelija posledica je otežanog internog transporta mase, pa je brzina enzimske reakcije direktno zavisna od specifične površine čestice imobilizata. Nelinearna zavisnost kod imobilizata sa manjom koncentracijom ćelija ukazuje na to da ograničen interni transport mase u čestici imobilizata ne utiče na brzinu enzimske reakcije, odnosno nema difuzionih ograničenja koja su prisutna u imobilizatima sa većom koncentracijom ćelija.

Aktivnost imobilizata može biti izražena na više načina, na šta treba obratiti pažnju pri poređenju enzimskih aktivnosti različitih imobilizata. Na slikama 7 i 8 su prikazane aktivnosti imobilizovanih ćelija kvasca *S. cerevisiae* u Ca-alginatu na dva načina: po gramu gela i po gramu imobilizovanih ćelija.



Slika 7. Zavisnost enzimske aktivnosti izražene po gramu imobilizovanih ćelija kvasca *S.cerevisiae* od specifične površine čestica. Koncentracija ćelija u imobilizatu ○ 0,065%; ● 0,65%.



Slika 8. Zavisnost enzimske aktivnosti izražene po gramu gela imobilizovanih ćelija kvasca *S.cerevisiae* od specifične površine čestica. Koncentracija ćelija u imobilizatu ○ 0,065%; ● 0,65%.

Ukoliko je izmerena aktivnost imobilizata prikazana po gramu ćelija (slika 7) aktivnost je veća kod imobilizata sa manjom koncentracijom ćelija, ali daleko manja u poređenju sa aktivnošću imobilizata sa 10 puta većom količinom imobilizovanih ćelija ukoliko je aktivnost prikazana po gramu gela (slika 8) (38). Sa ovih slika može se utvrditi i optimalni odnos površina/zapremina imobilizata za obe korišćene koncentracije imobilizovanih ćelija, pa je za koncentraciju ćelija od 0,065% taj odnos 25 cm^{-1} (slika 7), dok se za koncentraciju od 0,65% vrednost dobija ekstrapolacijom grafika sa slike 8 i iznosi 220 cm^{-1} . Aktivnosti imobilizata sa kuglicama koje zadovoljavaju ove dimenzije iznosi 6,8 U/g gela i 94 U/g gela. Kako bi bio istaknut veliki uticaj specifične površine imobilizata ćelija kvasca u alginatu, pokazano je da u slučaju istog odnosa količine kvasac/alginat i specifične površine imobilizata na enzimsku aktivnost dobijenog imobilizata nema nikakvog uticaja ni metod korišćen za geliranje alginata (interni ili eksterni), ni oblik imobilizata (sferni, cilindrični ili pločast).

Koncentracija alginata u kuglicama imobilizata utiče na ukupnu enzimsku aktivnost. Kod imobilizata sa niskom koncentracijom ćelija kvasca *S. cerevisiae* (0,05%) dobija se veća invertazna aktivnost korišćenjem alginata manje koncentracije (1%). Međutim, kod imobilizata sa većom koncentracijom ćelija (1%) koncentracija alginata nema značajnog uticaja na enzimsku aktivnost. U ovom slučaju enzimsku aktivnost ograničava smanjeni transport mase koji je posledica visoke koncentracije ćelija u imobilizatu.

Imobilizacija ćelija kvasca u što manjim kuglicama Ca-alginata, kako bi se dobila što veća aktivnost imobilizovanog biokatalizatora, bila je dugogodišnji izazov istraživačima u ovoj oblasti. Osim što je tehnologija dobijanja mikrokuglica Ca-alginata komplikovanija i zahtevnija od tehnologije dobijanja kuglica (2–3 mm), veliki problem nastaje i kod pokušaja njihovog odvajanja iz reakcione smeše (39, 40). Ovaj problem postaje još izraženiji u radu sa koncentrovanim rastvorima saharoze. Dodatak magnetita pri imobilizaciji ćelija *S. cerevisiae* u Ca-alginatnom gelu dobijenom imobilizatu daje magnetne osobine. Na ovaj način dobijene mikrokuglice (50–100 µm) se pomoću magneta lako odvajaju od reakcione smeše. Invertazna aktivnost mikrokuglica je znatno veća od aktivnosti milimetarskih kuglica. Tako je na primer, inverzija 20% (m/m) rastvora saharoze korišćenjem mikrokuglica kompletna nakon 1h, dok je u slučaju korišćenja milimetarskih kuglica pri istim uslovima inverzija saharoze bila 12,3% (41). Još jedna mogućnost davanja magnetnih osobina imobilizovanim ćelijama kvasca je njihovo oblaganje ferofluidom, a potom imobilizacija u Ca-alginatu. Međutim, ovaj imobilizat je imao manju aktivnost od prethodno opisanog (42).

Alginati izolovani iz različitih vrsta mrkih algi imaju različit odnos guluronske i manuronske kiseline (43). Pokazano je da alginati sa visokim sadržajem manuronske kiseline imaju veću poroznost, odnosno manje su difuzione smetnje pri kretanju molekula male i velike mase u poređenju sa alginatima sa većom količinom guluronske kiseline (44). Međutim, u slučaju imobilizovanih ćelija kvasca u alginatima sa različitim odnosom guluronske i manuronske kiseline (2,3 i 0,67) nisu primećene značajne razlike (38).

Loša osobina Ca-alginata kao nosača za imobilizaciju je njegova nestabilnost i rastvorljivost u prisustvu jedinjenja koja vezuju jone kalcijuma. Imobilizacijom ćelija kvasca *S. cerevisiae* u Ca-alginatu i akrilamidu istovremeno dobijen je imobilizat stabilan u uslovima u kojima je polimer Ca-alginata rastvoran, na primer u 3% rastvoru natrijum–citrata (45). Citrat je izabran jer se limunska kiselina u industriji često koristi za sniženje pH rastvora.

Osim Ca²⁺ jona, za geliranje Na-alginata mogu se upotrebiti i drugi dvovalentni joni, kao i nekoliko njih istovremeno. Imobilizacija živih ćelija kvasca u Ca, Ba i Sr-alginatu davala je nekonzistentne i nereproduktivne rezultate, pa su korišćene suve cele ćelije kvasca, prethodno isprane acetonom. Većina ovih imobilizata nije zadržala enzimsku aktivnost duže od 5 dana. Ćelije kvasca imobilizovane su i u alginatima koji su gelirani i kombinacijom ovih jona, Ca–Sr, Ca–Ba i Sr–Ba. Aktivnost ovih imobilizata bila je veća u poređenju sa alginatima geliranim samo jednom vrstom katjona. Međutim, Ca–Sr alginatni imobilizat je potpuno izgubio enzimsku aktivnost nakon 5 dana. Zanimljiv rezultat dobijen je sa

imobilizatom ćelija kvasca u Ca–Ba alginatu kod koga se nakon 5 dana „zrenja” na pH 5,0 opaža povećanje aktivnosti (46).

Osim prirodnih hidrogelova kao nosači za imobilizaciju celih ćelija kvasca *S. cerevisiae* mogu se koristiti i drugi materijali prirodnog porekla. Ćelije kvasca imobilizovane su na primer na vuni pomoću glutaraldehida (47), na pamučnoj tkanini (48) i juti (49) (biljka, lignoceluloznog sastava, uspeva u zemljama Bliskog i Dalekog istoka) pomoću polietilenimina.

Kako bi se dobio imobilizat ćelija kvasca na vuni glutaraldehydom su tretirane i ćelije kvasca i vuna, a optimalan način za ovu imobilizaciju dobijen je kombinacijom nemodifikovanih i glutaraldehydom modifikovanih komponenti. Pokazano je da se najstabilniji imobilizat dobija imobilizacijom hemijski modifikovanih ćelija na nemodifikovanoj vuni (47). Kod ovog imobilizata nije detektovana desorpcija ćelija ispiranjem ni rastvorom 1 M kalijum-hlorida, kao ni 0,1 M puferima pH 3,5–7,5. Imobilizati su tretirani i 50% rastvorom etilenglikola, ali rezultati nisu dati u radu. Naime, kako se za modifikaciju ćelija koristi glutaraldehyd, a ovako modifikovane ćelije odmah imobilizuju na vuni, tvrdnja autora da je kod ovog imobilizata reč o adsorpciji se može dovesti u pitanje. Veća je verovatnoća da je reč o kovalentnoj vezi između nosača i ćelija. Takođe, nema ni podataka da li je detektovana desorpcija ćelija kvasca protokom supstrata. Pored optimizacije više standardnih parametara imobilizacije, optimizovan je i pH sredine pri kojem se dobija najaktivniji imobilizat. Dobijena su dva različita opsega pH vrednosti 4,2–4,6 i 7,5–8,0. Pošto u literaturi nema sličnih rezultata, Krastanov smatra da su ćelije modifikovane glutaraldehydom adsorptivno vezane za vunu, a pomenuti pH opsezi pogoduju nastanku suprotno naelektrisanih jona različitih funkcionalnih grupa na nosaču i ćelijama, pa je veza između njih dodatno ojačana nastankom jonskih interakcija (47).

Ćelije kvasca imobilizovane su adhezivno na pamučnoj tkanini tretiranoj polietileniminom (PEI) (48). Pokazano je da PEI, za razliku od glutaraldehida, ne utiče na invertaznu aktivnost ćelija kvasca, kao ni na njihovu vijabilnost (50). Najveća aktivnost imobilizata je dobijena korišćenjem ćelija tretiranih sa PEI i netretiranog pamuka, ali zbog jednostavnosti i brzine dobijanja imobilizata za dalji rad i karakterizaciju korišćen je imobilizat dobijen od pamuka tretiranog sa PEI i netretiranih ćelija. Na vezivanje ćelija za nosač nema uticaja ni jonska sila, ni pH sredine. Pokazano je da veza između ćelija i nosača nije ni jonska ni kovalentna, ali tačna priroda nastalih veza ostala je nepoznata autorima D'Souza et al. (48).

Pokušavajući da nađu dobar, a u isto vreme i jeftin materijal za imobilizaciju ćelija kvasca ista grupa autora desetak godina kasnije napravila je sličan imobilizat na tkanini jute tretiranoj sa PEI (49). Korišćena koncentracija PEI za modifikaciju tkanine jute je bila 10× veća (2%) od koncentracije PEI korišćene za modifikaciju pamučne tkanine (0,2%). Do ove optimalne koncentracije PEI za modifikaciju došli su eksperimentalno, jer korišćenjem duplo manje količine PEI aktivnost imobilizata je bila manja od 50%. Na ovaj način uspeali su da imobilizuju dvostruko veću količinu ćelija u poređenju sa imobilizatom na pamuku. Postojanost imobilizata ispitivali su kontinualnim ispiranjem 0,1 M puferima različitih pH vrednosti (ćelije kvasca sa pamuka se ne desorbuju na pH vrednostima 3,6–8,0, a sa jute 3–10), rastvorima različitih jonskih sila (ćelije kvasca sa pamuka se ne desorbuju 1M KCl, dok su one imobilizovane na tkanini jute postojane u rastvorima NaCl do koncentracije od 0,5 M). Prednost ovih imobilizata je što se mogu koristiti u reaktorima različitih oblika, ali kako autori i sami kažu, nije sigurno da je imobilizat mehanički dovoljno stabilan i da nema mehaničke abrazije ćelija tokom korišćenja.

Kako su mehaničke osobine nosača jedna od bitnijih karakteristika, ćelije kvasca tretirane sa PEI su imobilizovane na staklu (50). Ćelije su na ovom nosaču imobilizovane na njegovoj površini u tankom sloju, pa kod ovog imobilizata nema ni problema sa difuzijom supstrata i proizvoda kao kod imobilizata u različitim hidrogelovima. Ćelije kvasca na ovaj način mogu biti imobilizovane na staklenoj vuni, staklenim kuglicama, kapilarama ili na unutrašnjosti čaša ili erlenmajera. Ćelije vezane za staklenu površinu ne mogu se isprati vodom, 1 M rastvorima soli, kao ni puferima pH vrednosti 3–10, ali se mehaničkom abrazijom tanak film ćelija na staklu lako skida. Kako priroda veze u ovim imobilizatima nije do kraja jasna autorima (50), u ovom slučaju se pretpostavlja da se radi o jonskim interakcijama između pozitivno naelektrisanih modifikovanih ćelija kvasca sa PEI i negativno naelektrisane površine stakla, ali i dodatne hidrofobne interakcije između PEI i stakla mogu imati značajnu ulogu, s obzirom na to da se i na staklu tretiranom sa PEI vezuju netretirane ćelije kvasca.

Enzimi sa niskom pI vrednošću (invertaza) takođe mogu da se imobilizuju za tkaninu tretiranu sa PEI. Veza između enzima i nosača je jonska, pa se enzim lako desorbuje rastvorima NaCl koncentracije manje od 0,1 M, zbog čega ovi imobilizati nemaju nikakvu mogućnost upotrebe.

Ćelije kvasca su osim na sintetičkim i prirodnim materijalima organskog porekla imobilizovane i na neorganskim materijalima. Plovućac aktiviran solima prelaznih metala, i njegovi modifikati različitim organskim jedinjenjima su korišćeni kao nosači za imobilizaciju

mikroorganizama (51). Plovućac je kamen vulkanskog porekla, sastoji se od oko 67% SiO₂ i 15% Al₂O₃, male je gustine, odnosno lak i pluta na vodi. Za imobilizaciju ćelija *S. cerevisiae* korišćene su čestice plovućca veličine od oko 300 μm sa površinom od oko 5,7 m²/g. Modifikovan plovućac se dobija u reakciji soli prelaznih metala MCl_x sa SiOH grupama plovućca. Invertazna aktivnost i poluživot ovih imobilizata bio je visok, a što je valenca metala veća poluživot dobijenih imobilizata je bio veći. Velika aktivnost imobilizata i najveći poluživot imobilizata dobijeni su na karbonil derivatu titanom aktiviranog plovućca (17,7 dana) (52).

Ćelijski zid kvasca sastoji se između ostalog i od polisaharida. Polisaharidi se mogu modifikovati (oksidovati) perjodatom. Ova osobina je iskorišćena i za imobilizaciju ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na aminoetil-celulozi. Međutim, dobijeni imobilizat je bio male aktivnosti (53).

Imobilizacija ćelija kvasca bez korišćenja nosača je prvi i poslednji put pomenuta početkom 90-tih godina prošlog veka. Imobilizat je dobijen međusobnim umrežavanjem ćelija reaktivnim rastvornim polimerom (dobijenim od polietilenimina i glutaraldehida) i glutaraldehydom (54). Dobijeni imobilizat nije bio uniformnog oblika i veličine, pa mu se i aktivnosti razlikuju (tabela 3):

Tabela 3. Raspodela veličina čestica i enzimaska aktivnost umreženih ćelija kvasca

<i>Veličina čestice imobilizata (mm)</i>	<i>Maseni udeo (%)</i>	<i>Invertazna aktivnost (U/g)</i>
0,05–0,25	15,0	1140
0,25–0,32	20,3	920
0,32–0,50	21,4	750
0,50–0,71	19,8	660
0,71–1,25	17,6	580
1,25–2,00	5,9	330

Imajući u vidu invertaznu aktivnost ćelija pre imobilizacije (20000–26000 U/g suve mase kvasca koja sadrži oko 27% (m/m) ćelija kvasca), dobijeni imobilizat je imao mali prinos enzimaska aktivnosti. Kako bi dobili imobilizat veće aktivnosti na isti način je imobilizovan i ćelijski zid istog komercijalnog soja kvasca *S. cerevisiae*. Početna invertazna aktivnost izolovanog ćelijskog zida kvasca bila je 50–60% veća (28000–36000 U/g), ali je dobijeni imobilizat bio neočekivano nestabilan.

2.7 Uticaj reakcione sredine na aktivnost enzima

Svoje katalitičke osobine enzim pokazuje u karakterističnim opsezima fizičkih (npr. temperatura) i hemijskih (pH, prisustvo određenih jona, inhibitora, stabilizatora) parametara reakcione sredine. To su optimalni uslovi za enzim, odnosno uslovi pri kojima pokazuje maksimalnu aktivnost, što je od velikog značaja za njihovu industrijsku upotrebu. Pri promeni ovih parametara sredine dolazi do promena i aktivnog centra enzima i čitave proteinske strukture. Praktično postoje dva tipa optimalnih uslova za enzimsku aktivnost:

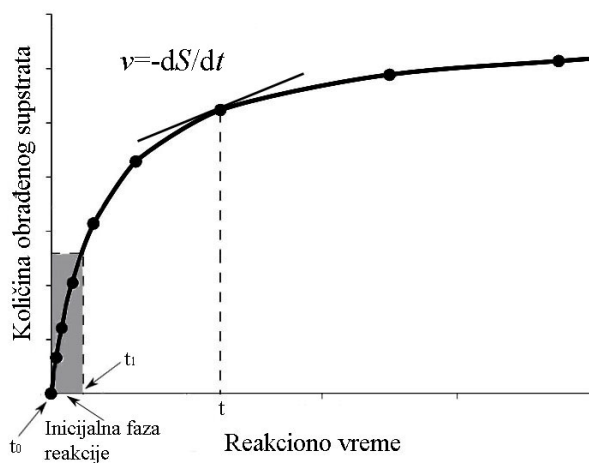
- optimum stabilnosti – utiču na stabilnost enzima
- optimum aktivnosti – utiču na enzimsku aktivnost

Optimum stabilnosti enzima često obuhvata širi opseg vrednosti od optimuma njegove aktivnosti. Pri industrijskoj upotrebi enzima oba pomenuta optimuma su vrlo važna, jer su opseg i vrednosti uslova za jedan i drugi optimum često različiti, pa je potrebno sa ekonomskog stanovišta doneti odluku o promeni uslova delovanja enzima u industrijskom procesu.

Temperatura i pH vrednost su najznačajniji fiziko–hemijski parametri koji utiču na enzimsku aktivnost. Uticaj pH vrednosti sredine je specifičniji od uticaja temperature. Na primer dvostruki pikovi pH optimuma mogu da ukažu da se u preparatu nalazi smeša enzima sa sličnim katalitičkim osobinama.

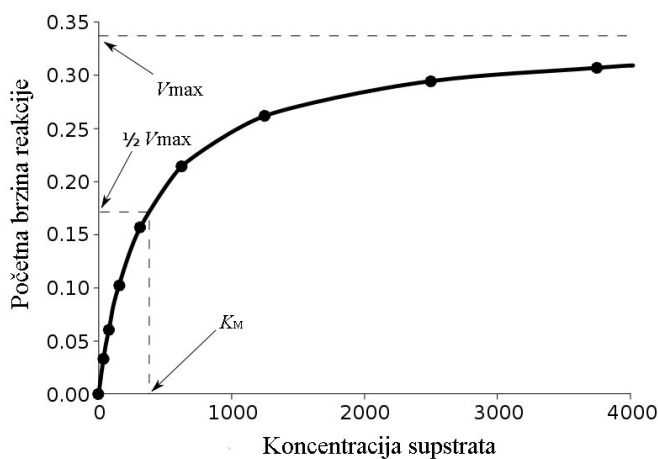
2.7.1 Michaelis–Menten-ova kinetika

Za industrijsku upotrebu enzima osnovni zahtev je maksimalni prinos proizvoda uz minimalnu cenu, a time i vreme trajanja reakcije. Praćenjem konverzije supstrata u proizvod tokom reakcije dobija se kriva prikazana na slici 9.



Slika 9. Kriva tipične (idealne) enzimski katalizovane reakcije.

Kako reakcija protiče tokom vremena, pri konstantnoj koncentraciji enzima, količina supstrata se smanjuje i postaje limitirajući faktor brzine reakcije. Tangenta nacrtana na reakcionoj krivi u vremenu t daje trenutnu brzinu reakcije. Merenje početne brzine reakcije u vremenu t_0-t_1 omogućava prikazivanje krive odnosa početne brzine enzimske reakcije i (u funkciji) početne koncentracije supstrata (slika 10).

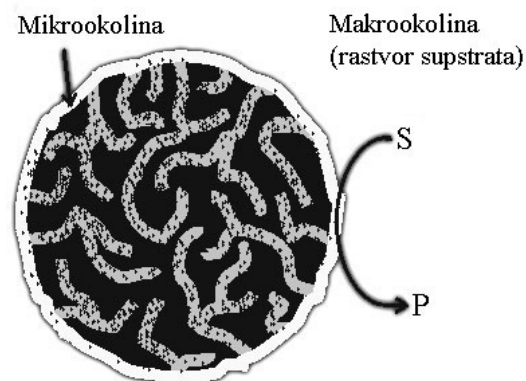


za $S = K_M$, $v = V_{\max}/2$;
 za $S = 10K_M$, $v = 91\%V_{\max}$

Slika 10. Zavisnost početne brzine reakcije od koncentracije supstrata

Pri visokim koncentracijama supstrata početna brzina reakcije jednaka je maksimalnoj brzini reakcije (V_{\max}) i postaje nezavisna od koncentracije supstrata. Michaelis–Menten-ova konstanta (K_M) je karakteristika svakog enzima pri tačno definisanim uslovima (pH, temperatura i dr.), nezavisna od koncentracije enzima. Ova konstanta je mera afiniteta enzima za pojedinačni supstrat (visoka vrednost znači nizak afinitet i obrnuto). Za industrijsku primenu enzima K_M je bitan podatak kako bi se odredila najbolja koncentracija supstrata za postizanje brze konverzije. Za razliku od K_M , brzina enzimske reakcije, pa i V_{\max} , direktno zavisi od koncentracije enzima, pri konstantnoj koncentraciji supstrata.

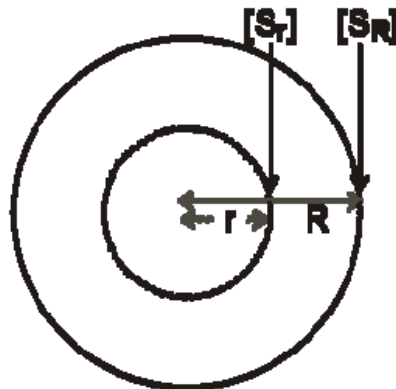
Imobilizacija enzima može rezultirati promenom K_M i V_{\max} vrednosti. Osnovna enzimska kinetika se može upotrebiti i za imobilizovane enzime, mada je često promenjena. Čestice imobilizata (veliĉine optimalne za korišćenje u reaktoru) imaju kinetiku koja je delom definisana difuzionim ograniĉenjima, pa se molekuli koji se nalaze u unutrašnjosti ĉestice nalaze pod uslovima koji se razlikuju od onih kojima su izloženi molekuli enzima na površini ĉestice imobilizata (slika 11). Ove lokalne razlike posledica su otežane difuzije supstrata u proizvod, ali su uzrokovane i lokalnim promenama sredine koje može da izazove nosaĉ (na primer, promena pH vrednosti).



Slika 11. Imobilizovani biokatalizator i njegova mikrookolina

Mikrookolina imobilizata se sastoji od rastvora identičnog onome unutar ĉestice, ali je pod većim uticajem okolnog rastvora od unutrašnjeg dela ĉestice. Molekul supstrata mora difundovati prvo kroz sloj rastvora koji okružuje ĉesticu (eksterna difuzija) da bi stigao do enzima koji se nalazi na površini ĉestice i bio preveden do proizvoda (P), a da bi svi enzimi bili "iskorišćeni" supstrat mora difundovati do unutrašnjosti ĉestice imobilizata (interna difuzija). *Poroznost* (ϵ) (2) ĉestice je odnos između zapremine rastvora u ĉestici imobilizata i ukupne zapremine reakcione smeše. *Vijugavost* (τ) (2) je proseĉni odnos dužine puta, kroz

pore, između bilo koje tačke unutar čestice i njene apsolutne udaljenosti od površine ($\tau \geq 1$). Mikrookolina se sastoji od difuzionog sloja (~do 10 μm) i tanjeg razdvajajućeg sloja (~do 20 nm).



Slika 12. Razlika u koncentraciji supstrata u čestici imobilizata

Koncentracija supstrata na površini čestice (radijusa R) je $[S_R]$, dok je unutrašnja koncentracija pri bilo kom manjem radijusu (r) manje vrednosti i označena sa $[S_r]$ (slika 12).

Difuzioni procesi utiču na brzinu enzimom katalizovane reakcije. Ako je eksterni prenos mase mali, protok rastvora oko čestice imobilizata utiče na brzinu reakcije. Ovaj problem se može prevazići mešanjem spoljnog rastvora. Sličan problem javlja se i kod reaktora sa napakovanim slojem ako je protok kroz njega mali. U mikrookolini čestice imobilizata nalazi se tanak film kroz koji supstrat i proizvod difunduju. Razlika njihove koncentracije u okolnom rastvoru i mikrookolini čestice je pokretačka sila njihove difuzije i veća razlika uslovljava bržu difuziju, a samim tim i veću brzinu reakcije. Ukoliko se enzim nalazi unutar čestice imobilizata situacija je mnogo kompleksnija. Interna difuzija je najčešće manja od eksterne i predstavlja ograničavajući faktor za brzinu reakcije. Visoka koncentracija nativnog enzima u imobilizatu ne znači da imobilizat ima i veliku aktivnost, što je često posledica difuzionih ograničenja. Molekuli enzima unutar čestice obično ostaju nedostupni supstratu jer ga molekuli enzima iz spoljašnjih slojeva imobilizata prevode u proizvod brže nego što on difunduje do molekula enzima u središtu čestice.

Fizičko zarobljavanje ćelija mikroorganizama u hidrogelovima je veoma popularna tehnika imobilizacije. Neke od prednosti ovih imobilizata su niska cena, jednostavnost, blagi uslovi imobilizacije koji najčešće ne utiču na vijabilnost ćelija i njihovu enzimsku aktivnost. Međutim, veliki nedostatak ovih imobilizata su loše mehaničke osobine i mala enzimska

aktivost, kao posledica otežanog tranfera mase kroz polimernu strukturu matriksa, odnosno velika difuziona ograničenja. Kako se imobilizati dobijeni na različite načine (različita količina imobilizovanih ćelija), korišćeni u različitim reakcionim uslovima (različita koncentracija supstrata, oblik i veličina imobilizata, reakciona temperatura, pH i sl.), ne mogu međusobno porediti, na osnovu dosadašnjih publikacija ne može se doneti generalni zaključak o imobilizatima ćelija *S. cerevisiae* u hidrogelovima, osim da problem otežane difuzije postoji svuda. Podaci o razlikama u difuziji supstrata i proizvoda reakcije hidrolize saharoze postoje samo za četiri najčešće pominjana hidrogela napravljena posebno za ovaj eksperiment (29). Gelovi su morali da budu jednakih oblika i veličine (10% želatin umrežen 1% formaldehidom, 2% Ca-alginat, 2% κ -karagenan i 2% agar). U tabeli 4 prikazane su vrednosti difuzionog koeficijenta za glukozu (D_g) u ovim hidrogelovima.

Tabela 4. Difuzioni koeficijenti glukoze u hidrogelovima (D_g) najčešće korišćenih za imobilizaciju celih ćelija

<i>Hidrogel</i>	D_g (cm^2/s)	D_g/D_w^a
Želatin	$2,36 \times 10^{-6}$	0,35
Ca-alginat	$3,55 \times 10^{-6}$	0,53
κ -karagenan	$5,82 \times 10^{-6}$	0,86
Agar	$6,35 \times 10^{-6}$	0,94

^a D_w – difuzioni koeficijent glukoze u vodi, $6,728 \times 10^{-6} cm^2/s$
Vrednosti difuzionih koeficijenata mereni su na 20°C

Imobilizacijom iste količine istog soja ćelija kvasca *S. cerevisiae* u ovim hidrogelovima, dobijeni su imobilizati iste veličine i oblika, ali različite enzimске aktivnosti. U tabeli 5 prikazane su invertazne aktivnosti ovih imobilizata.

Tabela 5. Prinos aktivnosti imobilizovanih ćelija kvasca u različitim hidrogelovima

<i>Nosač</i>	<i>Aktivnost</i> ($\mu mol min^{-1} mg^{-1}$)	<i>Prinos aktivnosti</i> (%)
Želatin	4,12	73
Ca-alginat	3,98	70
κ -karagenan	4,42	76
Agar	4,74	84

Veća aktivnost imobilizovanih ćelija u želatinu u poređenju sa Ca-alginatom nije u skladu sa podacima o difuzionim koeficijentima iz tabele 4, ali se može objasniti postojanjem velikog broja šupljina u polimeru želatina, pa time i većom dodirnom površinom dostupnom supstratu.

Veličina koeficijenta difuzije zavisi od koncentracije Ca-alginata, pa difuzioni koeficijent saharoze za 1,2% gel iznosi $2,9 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (55), a za 5% gel $4,05 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (56), ali zavisi i od količine imobilizovanih ćelija, pa za koncentraciju ćelija od 8,5 do 12,5% (v/v) u 1,5% Ca-alginatu koeficijent difuzije molekula saharoze iznosi $(0,67-2,86) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (57).

Koncentracija supstrata oko molekula enzima zavisi od pozicije enzima u čestici. Brzina reakcije u malom delu čestice može se izraziti Michaelis–Menten-ovom kinetikom. Zapažena brzina reakcije (v'') imobilizovanog enzima predstavlja prosečnu vrednost brzina reakcije u svim delovima čestice imobilizata. Ukoliko nema otežane difuzije, izmerena brzina reakcije biće jednaka brzini reakcije slobodnog (neimobilizovanog) enzima (v'). Stepen ograničenja transporta mase često se izražava *faktorom efikasnosti* (η) (2):

$$\eta = \frac{v''}{v'}$$

Faktor efikasnosti zavisi od karakteristika samog enzima, tehnike imobilizacije i uslova pri kojima se izvodi enzimski reakcija. Menja se kroz česticu imobilizata, veći je na delu čestice bližem površini, a manji u delu bliže sredini. Obično se smanjuje sa povećanjem veličine čestica imobilizata, kao i sa povećanjem koncentracije enzima u njima. Na ovaj način se i prepoznaje prisustvo interne difuzione smetnje kod imobilizata. Smanjenje ovih difuzionih smetnji može se postići:

- upotrebom malih molekula kao supstrata
- upotrebom velike koncentracije supstrata
- upotrebom niskih koncentracija enzima
- primenom malih vrlo poroznih čestica nosača u kojima su pore velike, nisu vijugave i međusobno su povezane
- vezivanjem enzima isključivo na površinu nosača.

Michaelis–Mentenova konstanta (K_M) merilo je afiniteta enzima za supstrat. Kako je supstrat za invertazu saharoza, ova konstanta eksperimentalno se dobija merenjem početnih brzina reakcije hidrolize rastvora saharoze različitih koncentracija. U literaturi se mogu naći različiti podaci za ovu konstantu, zavisno od korišćenog raspona koncentracija rastvora saharoze i drugih reakcionih uslova. U tabeli 6 prikazane su vrednosti kinetičkih parametara ćelija kvasca *S. cerevisiae* i njihovih imobilizata.

Tabela 6. Vrednosti kinetičkih konstanti za slobodne i imobilizovane ćelije kvasca.

K_M		V_{max}		Reakcioni uslovi	Referenca
Ćelije	Imobilizat	Ćelije	Imobilizat		
40 mM	40 mM	/	/	[saharoza]=6–150 mM, 45°C	16
8 mM	8 mM	/	/	[saharoza]=0,2–10%	22
65 mM	50–54 mM	0,3 U/ml	1,2–2,1 U/elektrodi	50°C	23
36,4 mM ^a	66,5 mM ^a		110 $\mu\text{mol}/\text{min}$	[saharoza]=20–200 mM	30
10 mM	110–120 mM	0,0262 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$	1,85–1,87 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$	[saharoza]=10–1000 mM	32
1,8 %	1,9–3,0 %	19,5 $\mu\text{mol}/\text{g}\cdot\text{min}$	7,0–13,5 $\mu\text{mol}/\text{g}\cdot\text{min}$	[saharoza]= do 10%	37
10,6 mM ^b					
37,5 mM ^c	16,6–250 mM			promenljivo pH	45
5,3 mM ^d					
/	0,837–1,517 M	/	/	[saharoza]=0,75–2 M	53
20 mM	/	/	/	[saharoza]=10–300 mM	54
24,5–25,2 mM	24,5–25,2 mM ^e	/	/	[saharoza]=10–300 mM	57
30 mM	50 mM	4,38 $\mu\text{mol}/\text{min}$	1,38 $\mu\text{mol}/\text{min}$	[saharoza]=7–100 mM	58
23 mM	183 mM	590 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$	300 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$	/	59

^a mereno u koloni sa napakovanim slojem

^b vijabilne ćelije pH reakcione smeše 10,0

^c nevijabilne ćelije pH reakcione smeše 5,0

^d nevijabilne ćelije pH reakcione smeše 9,0

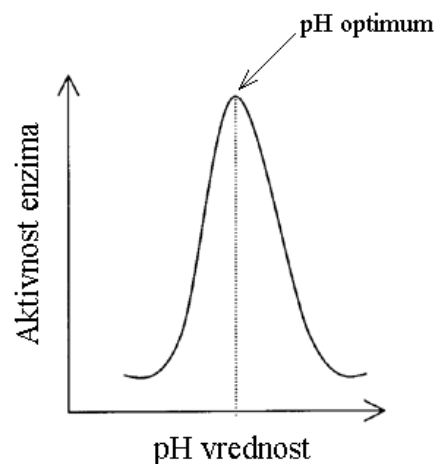
^e autori nisu eksperimentalno došli do ovog podatka

Različite vrednosti kinetičkih parametara prikazane u tabeli 6 posledica su različitih reakcionih uslova, a najveći uticaj na dobijene vrednosti ima korišćeni opseg koncentracija saharoze (naši rezultati). U većini primera u literaturi javlja se inhibicija supstratom pri koncentracijama saharoze većim od 200 mM (18) ili većim od 10% (23, 38), mada se mogu naći i primeri da inhibicije supstratom nema čak ni pri koncentraciji saharoze od 1000 mM (18, 33). Pokazano je takođe da kinetički parametri K_M i V_{max} zavise i od mnogih drugih faktora kao što su: koncentracija ćelija u imobilizatu, procentni udeo nosača (gela) u imobilizatu (38), veličina čestica imobilizata (K_M se smanjuje sa smanjenjem veličine čestica imobilizata), način čuvanja imobilizata (54), pH vrednost reakcione smeše (46). Najčešće se merenje početne brzine reakcije eksperimentalno izvodi u šaržnom reaktoru, međutim postoje primeri korišćenja kolone sa napakovanim slojem u ovim eksperimentima koji su pokazali da

se vrednosti Michaelis–Menten-ove konstante (K_M) dobijene na ova dva načina razlikuju (31, 59), kao i da dobijena vrednost konstante u protočnom reaktoru zavisi od brzine protoka supstrata kroz kolonu (sa povećanjem brzine protoka opada dobijena vrednost konstante K_M) (31, 59). Povećanje K_M i smanjenje V_{max} vrednosti u imobilizatu u odnosu na neimobilizovane ćelije najčešće je posledica postojanja internih difuzionih smetnji (ukoliko su eksterne otklonjene), a ređe (obično kod imobilizata dobijenih metodom kovalentne imobilizacije) posledica strukturnih promena molekula enzima. Rastvorni enzim (invertaza) izolovan iz ćelija kvasca *S. cerevisiae* ima K_M vrednost najčešće oko 25 mM (61), što je slično nekim od rezultata dobijenim za cele ćelije ovog kvasca. Slično kao i u slučaju poređenja slobodnih i imobilizovanih ćelija, K_M vrednost rastvornog enzima manja je od vrednosti dobijene za enzim u ćeliji (7,4 mM i 15,4 mM), dok je V_{max} manja kod enzima u ćeliji (3,2 U/L) u odnosu na rastvoran enzim (2,6 U/mL) (62).

2.7.2 Uticaj pH vrednosti na aktivnost biokatalizatora

Promene pH vrednosti utiču na jonizaciju aminokiselina, pa tako i na aktivnost samog enzima. Tipičan izgled krive koja opisuje uticaj pH na enzimsku aktivnost je kriva zvonastog oblika (simetrična ili asimetrična sa obe strane pH optimuma), slika 13.



Slika 13. Zavisnost enzimske aktivnosti od pH vrednosti sredine

Enzimi su katalizatori hemijskih reakcija i ne mogu da utiču na njenu termodinamičku ravnotežu, već samo povećavaju brzinu reakcije, tj. brzinu uspostavljanja ravnoteže. Enzimi koji katalizuju reakcije koje nemaju veliku promenu ukupne slobodne energije (ΔG°) mogu

da katalizuju reakciju u oba smera. Promena pH vrednosti u ovom slučaju može određivati i smer reakcije (glukoizoizomeraza).

pH stabilnost enzima izmerena za duži vremenski period može dati relevantnije podatke o uticaju ovog parametra na tok enzimske reakcije i informacije o izboru enzima za određen industrijski proces. Pri tome se ne sme zaboraviti istovremeni uticaj temperature i koncentracije supstrata. Takođe se ne sme zanemariti da se mnoge reakcije ne odvijaju pri konstantnom pH (menja se tokom reakcije), što treba kontrolisati upotrebom pufera ili regulisanjem pH vrednosti reakcione smeše – titrovanjem.

pH vrednost mikrookoline imobilizovanih biokatalizatora može se razlikovati od pH vrednosti okolnog rastvora, pa se kod imobilizata može opaziti prividna promena pH optimuma imobilizovanog u odnosu na slobodan enzim.

pH optimum invertaze izolovane iz kvasca *S. cerevisiae* je $4,6 \pm 0,1$ (61, 63). Slična je vrednost pH optimuma i za invertaznu aktivnost celih ćelija, uz nešto veći opseg vrednosti, 4,00–4,85 (17, 23, 33, 59). U literaturi se mogu naći i neki izuzeci, kao što je pH optimum u rasponu pH vrednosti 4,5–6,5 (48) ili na pH vrednosti 10,0 (46).

Tabela 7. pH optimumi slobodnih i imobilizovanih ćelija

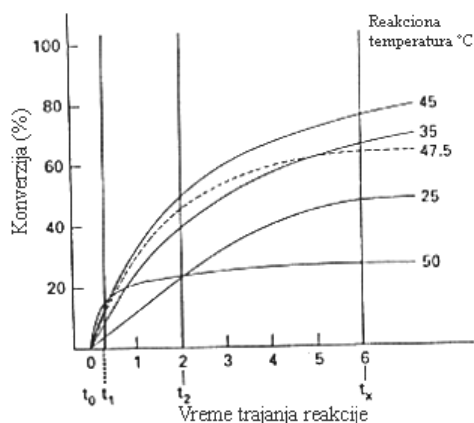
kvasca <i>S. cerevisiae</i>		
pH optimum		Referenca
Ćelije	Imobilizat	
4,75	4,5	16
4,0	3,5–5,0	22
4,6	7,2	32
10,0	4,0–9,0*	45
4,5–6,5	4,5–5,5	47
4,5	4,5	49
/	4,6	63
4,85	4,65	58

* Svaki imobilizat je imao 2–3 pH optimuma

U tabeli 7 se može videti da se pH optimum imobilizovanih ćelija najčešće vrlo malo razlikuje od pH optimuma neimobilizovanih ćelija.

2.7.3 Uticaj temperature na aktivnost biokatalizatora

Uticaj temperature na brzinu reakcije i ukupni prinos proizvoda enzimske reakcije zavisi od mnogih faktora, kao što su: stabilnost enzima, stabilnost supstrata, raspoloživost supstrata (rastvorljivost u reakcionoj smeši), afinitet enzima prema supstratu (prisustvo aktivatora i inhibitora, K_M), nastajanje nusproizvoda, brzina raspada kompleksa enzim-supstrat, energija aktivacije i drugih. Temperaturna stabilnost enzima u laboratorijskim, a naročito industrijskim uslovima se razlikuje od njihove stabilnosti u prirodnim uslovima, tj. ćelijama, gde najčešće zavisi od životnog veka ćelije. Na temperaturnu stabilnost i aktivnost enzima u industrijskim uslovima osim temperature uticaj imaju i drugi faktori.



Slika 14. Uticaj temperature na tok hemijske reakcije

Na slici 14 prikazan je vremenski tok jedne enzimski katalizovane reakcije, na različitim temperaturama. U vremenu t_0-t_1 je prava početna brzina reakcije i povećava se sa porastom temperature. t_2-t_1 količina transformisanog supstrata po jedinici vremena u bilo kojem konačnom periodu vremena postepeno opada. Odavde se može zaključiti da temperaturni optimum nije konstantan i zavisi od vremena trajanja reakcije. Povećanje temperature utiče na enzim na dva načina: povećava katalitičku aktivnost u t_0-t_1 i inaktivira enzim, odnosno termolabilnu proteinsku strukturu. Kada kriva postane paralelna y-osi na slici 14 enzim je izgubio aktivnost, a vreme t_x-t_0 je vreme inaktivacije enzima (pri poznatim uslovima reakcije).

Temperaturni optimum rastvorne invertaze izolovane iz ćelija kvasca *S. cerevisiae* i invertazne aktivnosti celih ćelija imaju istu vrednost, 55–60°C (23, 24, 33, 37, 49, 61, 63–

65). Pri imobilizaciji celih ćelija kao i iz njih izolovanog enzima ne dolazi do promene temperaturnog optimuma, ili su promene male (temperaturni optimum se nalazi na temperaturi višoj za 5–10°C) (23, 24, 33, 37, 49, 61, 63–65).

Imobilizovani biokatalizatori su imobilizacijom delimično stabilizovani, pa je uticaj temperature na njihovu aktivnost manji u odnosu na pH optimum koji kod imobilizata ima često širi opseg u poređenju sa neimobilizovanim biokatalizatorom.

Povećanje katalitičke aktivnosti enzima sa povećanjem temperature predstavlja u stvari smanjenje aktivacione energije reakcije. Aktivaciona energija enzimom katalizovane reakcije može se izračunati iz Arrhenius-ove jednačine:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

k – konstanta brzine reakcije
 A – Arenijusova konstanta
 E_a – energija aktivacije
 R – univerzalna gasna konstanta
 T – temperatura

– ova jednačina modifikovana za enzime je (66):

$$E_a = 19,1 \cdot \frac{T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \cdot \log \frac{A_2}{A_1}$$

T_1, T_2 – temperatura na kojoj je merena enzimaska aktivnost

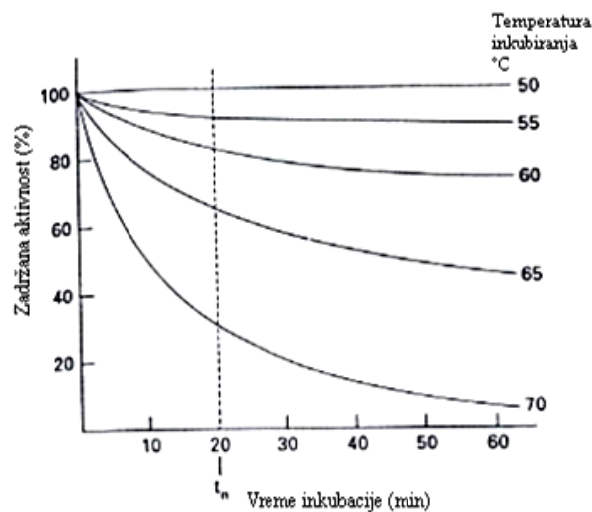
A_1, A_2 – enzimaska aktivnost na temperaturama T_1 i T_2

Podatak o energiji aktivacije invertaze, kao i ćelija kvasca podatak je o kome govori samo mali broj autora. U literaturi se može naći vrednost energije aktivacije slobodnih ćelija od 8,7 kcal/mol (36,42 kJ/mol) (59). Ova vrednost je slična vrednosti energije aktivacije rastvornog enzima (67), kao i energiji aktivacije ćelija kvasca publikovane u literaturi 36,2 kJ/mol (54). Energije aktivacije imobilizovanih ćelija i rastvornog enzima obično su manje u odnosu na neimobilizovane (18, 59, 67). U poređenju sa rastvornim i enzimom u ćeliji, kao i u slučaju vrednosti kinetičkih konstanti i pH optimuma, enzim u ćeliji se ponaša kao imobilizovani enzim, pa je energija aktivacije rastvornog enzima veća od energije aktivacije istog enzima u ćeliji (59, 68).

2.7.4 Stabilnost biokatalizatora

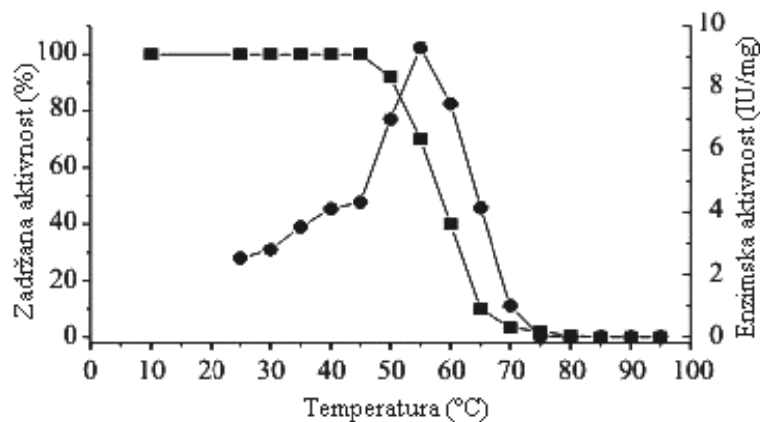
Brzina temperaturne inaktivacije enzima je za industrijsku primenu jedna od najbitnijih karakteristika svakog enzima. Obično se ovaj podatak prikazuje na dva načina:

- preostala (zadržana) enzimska aktivnost u funkciji vremena za različite temperature (slika 15). Teško se upoređuju ovako prikazani podaci za stabilnost i podaci o aktivnosti enzima na različitim temperaturama (69).



Slika 15. Kriva stabilnosti enzima izražena u obliku preostale enzimске aktivnosti u funkciji vremena pri različitim temperaturama (69).

- merenje stabilnosti enzima merenjem preostale enzimске aktivnosti prema (u funkciji) temperaturi u određenom vremenu (t_n na slici 15) (slika 16). Povoljnije je za poređenje kriva aktivnosti i stabilnosti (uz poznate reakcione uslove i imajući u vidu prisustvo, odnosno odsustvo supstrata) i donošenje zaključaka važnih za njegovu industrijsku primenu (69).



Slika 16. Zavisnost enzimske aktivnosti (-●-) i stabilnosti (-■-) od temperature.

Kao što je prethodno naglašeno, ćelije kvasca *S. cerevisiae* u poređenju sa rastvornom invertazom se ponašaju kao imobilizovani enzim, pa je njihova temperaturna stabilnost veća u odnosu na čist enzim (23, 64). Temperaturna stabilnost invertaze u imobilizatima celih ćelija kvasca, kao i kod većine imobilizata, veća je od temperaturene stabilnosti slobodnih ćelija (18, 23, 37, 49, 64). Razlika u stabilnosti imobilizata i slobodnih ćelija naročito je izražena na temperaturama većim od 50°C.

Često se stabilnost enzima izražava i kao poluživot enzima ($t_{1/2}$), što predstavlja vreme za koje aktivnost enzima pada na 50% početne aktivnosti. Ovaj podatak je vrlo važan za primenu enzima u kontinualnim reaktorima, a naročito imobilizovanih enzima. Sa povećanjem temperature povećava se brzina reakcije (pa samim tim i enzimska aktivnost), ali povećava se i brzina inaktivacije enzima. Konstanta inaktivacije enzima (k) je još jedan bitan parametar koji opisuje njegovu stabilnost, a dobija se kao i $t_{1/2}$ iz podataka dobijenih u eksperimentu ispitivanja enzimske stabilnosti. Iz jednačine se dobija brojna vrednost ove konstante karakteristična za svaki enzim i temperaturu:

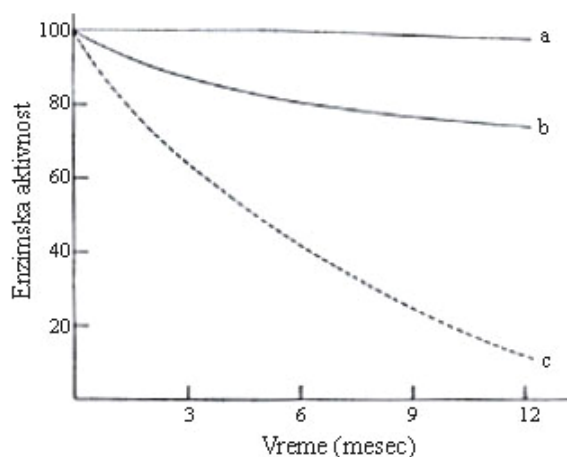
$$[A] = [A_0] \cdot e^{-kt}$$

k – konstanta inaktivacije (min^{-1})

A_0 – početna aktivnost enzima (U/mg)

A – aktivnost enzima nakon vremena t (U/mg)

Stabilnost enzima pri skladištenju je još jedna osobina enzima veoma važna za njihovu industrijsku upotrebu, a naročito kada su u pitanju imobilizovani enzimi. Enzimi koji se koriste u industriji moraju imati deklarisanu aktivnost i način čuvanja, kao i rok upotrebe. U toku ovog perioda pod propisanim uslovima čuvanja enzimi zadržavaju veći deo ili potpunu aktivnost. Enzimi su najstabilniji u kristalnom ili praškastom obliku (69). Na slici 17 prikazana je stabilnost skladištenja istog enzima u različitim uslovima.



Slika 17. Stabilnost tipičnog komercijalnog enzima pri skladištenju tokom 12 meseci. a) liofilizovan enzim na 5°C, b) liofilizovan enzim na 25°C, c) liofilizovan enzim rastvoren u puferu na pH optimalnom za dati enzim na 25°C (69).

Stabilnost imobilizata ćelija kvasca retko je izražena preko konstante denaturacije (17, 54), poluživota imobilizata (17, 54) ili stabilnosti pri skladištenju (24, 37), što bi bilo lakše za međusobno poređenje različitih imobilizata. Autori se obično odlučuju za najpovoljniji način izražavanja stabilnosti svojih imobilizata. Pri opisu stabilnosti ćelija kvasca neophodno je naglasiti uslove u kojima je imobilizat inkubiran ili skladišten. Pokazano je da je stabilnost enzima daleko veća u prisustvu saharoze nego bez prisutnog supstrata (64), kao i da zavisi i od pH vrednosti sredine (46).

2.7.5 Uticaj inhibitora na aktivnost biokatalizatora

Osim fizičkih faktora koji utiču nespecifično na proteinsku strukturu enzima, a time i na njihovu aktivnost, hemijske supstancije utiču na enzimsku aktivnost precizno i specifično. Ove supstancije često imaju uticaj na enzim i u vrlo malim koncentracijama, što je čest razlog neodgovarajućoj enzimskoj aktivnosti pri upotrebi u realnim industrijskim uslovima (kada supstrat nije čista supstanca rastvorena u puferu).

Specifične supstancije koje u malim količinama smanjuju brzinu enzimom katalizovane reakcije zovu se inhibitori. Oni selektivno utiču samo na ograničen broj mesta na enzimu, bez značajne promene njegove trodimenzionalne strukture.

Kao svi ostali enzimi i enzimska aktivnost invertaze smanjena je u prisustvu nekih supstancija. Osim ranije pomenute saharoze, neki od najčešće pominjanih su joni teških metala (npr. Hg^{2+}), anilin (70, 71), metanol (72) i urea (73). Najzanimljiviji jon kao inhibitor invertazne aktivnosti je Hg^{2+} jon, pre svega zato što često može biti prisutan u uzorku, u njegovoj industrijskoj upotrebi, pa je podatak o stepenu inhibicije veoma značajan. Prvi radovi koji opisuju živu kao inhibitor invertaze datiraju još od sredine prošlog veka (74). Na molekulskom nivou inhibicija enzima živom zasniva se na kovalentnom vezivanju Hg^{2+} jona sa $-\text{SH}$ aminokiselinskom grupom na proteinu (68). Inhibicija invertaze živom veoma zavisi i od pH sredine (75). Uticaj različitih inhibitora na enzim nam može poslužiti za karakterizaciju i poređenje osobina istih enzima.

2.8 Hemijska modifikacija biokatalizatora

Stabilnost enzima je različita i zavisi, kako od prirode enzima, odnosno njegove mogućnosti da očuva svoju aktivnu konformaciju, tako i od njegove okoline. Jedna od metoda povećanja stabilnosti enzima je njihova hemijska modifikacija.

U literaturi je poznato da se hemijska modifikacija proteina koristi za:

- *stabilizaciju* tercijarne i kvaternerne strukture proteina;
- *detektovanje i identifikaciju* nepoznatih proteinskih interakcija;
- *vezivanje* proteina za antitela ili druge čiste proteine;
- *imobilizaciju* antitela ili drugih proteina u svrhu analize ili afinitetnog prečišćavanja i
- *vezivanje* peptida na veće proteine "nosače" radi lakšeg rukovanja ili čuvanja.

Hemijski modifikatori su hemijska jedinjenja kojima se modifikuju, odnosno menjaju pojedine funkcionalne grupe na proteinu. Podeljeni su u grupe po svojoj reaktivnosti (specifičnosti za određene funkcionalne grupe) i drugim hemijskim osobinama koje određuju njihovu upotrebu, kao što su:

- *hemijska specifičnost*; da li je reaktant homobifunkcionalan ili heterobifunkcionalan;
- *dužina spejsera*, podrazumeva i mogućnost ili nemogućnost njegovog hemijskog cepanja;
- *rastvorljivost u vodi i ćelijska permeabilnost*, da li reagens može da prodre u ćeliju ili poveže hidrofobne proteine unutar membrane i
- *spontano reaktivne ili foto-reaktivne grupe*, da li će reakcija početi odmah nakon dodatka reagensa ili je potrebna dodatna aktivacija hemijskim inicijatorima reakcije ili ozračivanjem.

Funkcionalne grupe koje se najčešće hemijski modifikuju na proteinima su:

- *primarna amino grupa (-NH₂)*
- *karboksilna grupa (-COOH)*
- *karbonilna grupa (-CHO)*
- *sulfhidrilna grupa (-SH)*

Razna hemijska jedinjenja se mogu koristiti za modifikaciju proteina. U tabeli 8 dat je prikaz najčešće korišćenih funkcionalnih grupa u hemijskoj modifikaciji proteina i odgovarajuća jedinjenja za njihovu hemijsku modifikaciju.

Tabela 8. Funkcionalne grupe proteina pogodne za hemijsku modifikaciju i odgovarajući hemijski modifikatori

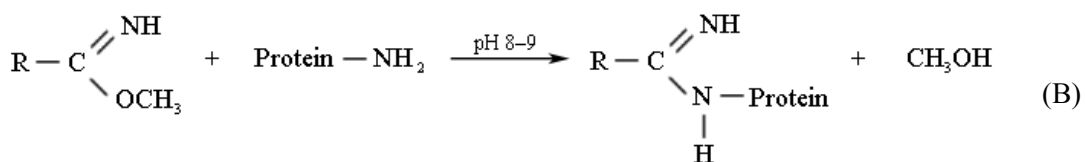
<i>Funkcionalna grupa na proteinu</i>	<i>Modifikator</i>
Karboksilna	Karbodiimid
Amino	<i>N</i> -hidroksisukcinimidni estar, imido estar, pentafluorofenil estar, hidroksimetil-fosfin
Sulfhidrilna	Maleimid, haloacetil, piridildisulfid, vinil-sulfon
Karbonilna	Hidrazin
Hidroksilna	Izocijanat

U praksi se za hemijsku modifikaciju enzima koriste bifunkcionalni ili multifunkcionalni reagensi, koji reaguju sa slobodnim (reaktivnim) funkcionalnim grupama proteina. Modifikacijom i međusobnim umrežavanjem molekula enzima dobijaju se stabilizovani biokatalizatori (76). Stabilizacija enzima je posledica stvaranja međumolekulskih veza, smanjene fleksibilnosti molekula i manje mogućnosti narušavanja native strukture (77).

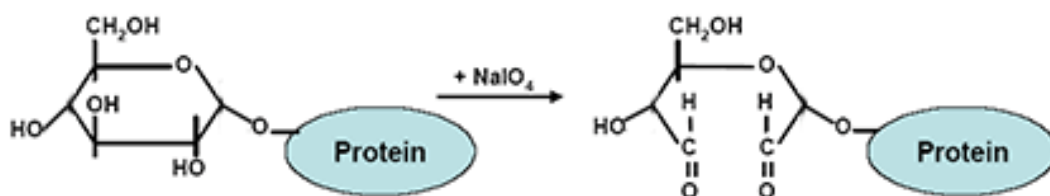
2.8.1 Hemijske modifikacije invertaze

Najpogodnije grupe za hemijske modifikacije proteina su amino-grupe. Za ovu vrstu modifikacije najčešće se koriste bifunkcionalni aldehidi ili imidoestri.

Pri umrežavanju, enzimima se smanjuje konformaciona pokretljivost, pa time postaju otporniji na štetne promene sredine, koja vremenom utiče na smanjenje njihove aktivnosti. Aktivna konformacija enzima je stabilizovana, a broj reaktivnih grupa je nakon modifikacije smanjen. Prikazane su hemijske reakcije između amino grupe proteina i bifunkcionalnog aldehida (A) i imidoestra (B):



Invertaza u svom aktivnom centru nema aminokiseline sa amino-grupama (78, 79), pa modifikacija amino-grupe ne utiče na promene na aktivnom mestu. Pokazano je da rastvorna invertaza nakon modifikovanja dimetil-suberimidatom ima bolju pH stabilnost od nemodifikovane invertaze (80). Kako je invertaza glikoprotein, čijih 50% mase (kada se radi s rastvornom invertazom) čine šećeri (7), ovaj enzim se može modifikovati i preko šećernog dela. Ova modifikacija u kiselim uslovima, teorijski ne smanjuje stabilnost enzima, ukoliko ne dovodi do njegove aglomeracije. Stoga je perjodat jedan od najčešće korišćenih modifikatora šećernih ostataka (81). Nastale aldehydne grupe se moraju „ugasiti” dodatnim tretmanom, da bi se sprečilo dalje međusobno umrežavanje molekula enzima. Na slici 18 prikazana je reakcija cepanja C–C veze šećernog dela glikoproteina reakcijom sa perjodatom.



Slika 18. Reakcija šećernog dela glikoproteina i perjodata

Prodanović et al. (82) su perjodatno oksidovali rastvornu invertazu u cilju njene imobilizacije adsorpcijom na sepiolitu. Ovako dobijen imobilizat upoređen je sa imobilizatom hemijski nemodifikovanog enzima dobijenog na isti način i pokazao je bolje karakteristike. Imobilizat je bio postojaniji, bolje temperaturne stabilnosti i odlične produktivnosti.

U literaturi su malobrojni primeri modifikacije ćelija kvasca. Ciljevi njihove modifikacije bili su da se omogući njihova imobilizacija. Hemijski reagensi najčešće korišćeni u ovu svrhu su glutaraldehid (18, 31, 32, 47, 54) i formaldehid (30–32). S obzirom na to da cilj ovih modifikacija nije bio stabilizacija enzima, nema podataka da li je modifikacijom ona promenjena. Ćelije kvasca površinski prevučene ferofluidom, a zatim imobilizovane u alginatu pokazale su lošu invertaznu aktivnost, pa kao takve dalje nisu ni karakterisane (42). Kako ćelijski zid kvasca sadrži veliku količinu različitih polisaharida, ova njegova osobina iskorišćena je za njegovu modifikaciju reakcijom sa perjodatnim anjonom. Ovako modifikovane ćelije imale su oko 27% veću invertaznu aktivnost u poređenju sa nemodifikovanim ćelijama (53), što autori objašnjavaju boljom pristupačnošću enzima (lociranom u ćelijskom zidu) supstratu. Iako je cilj ove modifikacije bio dobijanje imobilizata, promena enzimske stabilnosti uzrokovana hemijskom modifikacijom nije opisana.

2.9 Enzimski reaktori

Enzimski reaktor (ili reaktor za katalizu) je sud u kome se odvija reakcija katalizovana slobodnim (rastvornim) ili imobilizovanim enzimima (celim ćelijama) pri tačno definisanim i regulisanim uslovima. Uloga reaktora je da u procesu osigura odvijanje konverzije reaktanta u specifični proizvod u datom vremenu, uz minimalnu cenu. Enzimski reaktori se razlikuju od hemijskih reaktora jer se reakcija izvodi pri niskom pritisku i temperaturi, a od fermentora jer nema produkcije biomase (77).

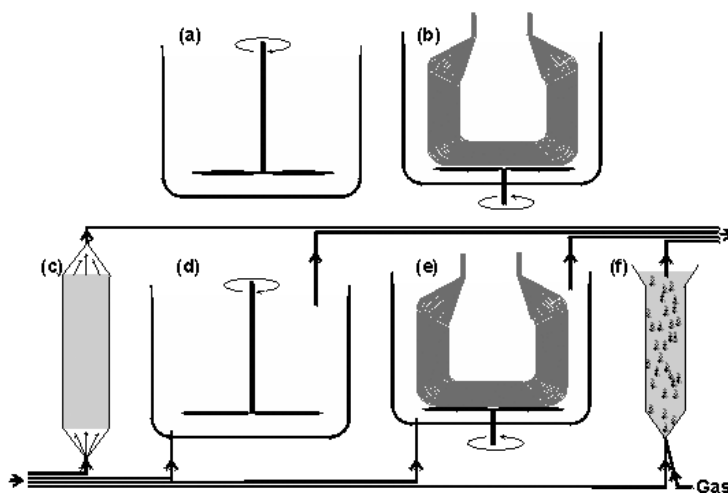
Reaktori se po različitim kriterijumima dele na:

- *Homogene i heterogene* u zavisnosti od sadržaja reaktora. Homogeni reaktori sadrže samo jednu fazu, a heterogeni više od jedne faze. Obično su reaktori za biokatalizu heterogeni, sa tečnim rastvorom supstrata i čvrstim imobilizovanim biokatalizatorom.
- *Šaržne i kontinualne* u zavisnosti od načina izvođenja procesa.
- *Otvorene i zatvorene*, zavisno od toga da li se katalizator zadržava u reaktoru ili izlazi sa strujom reakcione smeše.
- *Reaktore sa mešalicom* u kojima su sastav reakcione smeše i uslovi procesa u svakom delu reaktora jednaki i *reaktore bez mešalice* u kojima se tečni deo kreće kroz reaktor, bez povratnog mešanja sa tečnošću koja se uvodi na vrh reaktora.

U šaržnom reaktoru sa mešanjem, sastav reaktanata menja se sa vremenom trajanja reakcije, ali je jednak u celoj zapremini reaktora. Međutim, u reaktoru sa protokom, sastav reaktanata se menja duž visine reaktora, ali je stepen konverzije proizvoda konstantan u svakoj pojedinačnoj tački duž kolone (odnosno, zavisi od pređenog puta supstrata kroz kolonu, pod pretpostavkom da je enzimska aktivnost konstantna), što znači da će se reakcija najbrže odvijati na ulaznom kraju reaktora, a najsporije na izlaznom, zbog smanjenja koncentracije supstrata, kako reaktanti prolaze kroz reaktor.

2.9.1 Tipovi enzimskih reaktora

Najčešće korišćeni tipovi enzimskih reaktora predstavljeni su na slici 19.



Slika 19. Tipovi enzimskih reaktora

- a) Šaržni ("batch") reaktor sa mehaničkim mešanjem (STR), sadrži enzim i supstrat, reakcija traje dok se konverzija ne završi.
- b) Šaržni membranski reaktor (MR), enzim se nalazi unutar polupropustljive membrane; reaktor se može koristiti i kao polukontinualni, korišćenjem istog rastvora enzima za nekoliko šaržnih ciklusa.
- c) Reaktor sa napakovanim slojem (PBR), sadrži u koloni napakovan sloj imobilizovanih čestica enzima.
- d) Kontinualni šaržni reaktor sa mehaničkim mešanjem (CSTR), verzija reaktora a sa kontinualnim protokom.
- e) Kontinualni membranski reaktor (CMR), verzija reaktora b sa kontinualnim protokom.
- f) Fluidizovani reaktor (FBR), protok gasa ili supstrata održavaju čestice imobilizata u fluidnom stanju.

Svi reaktori (slika 19) mogu imati dodatnu cev za grejanje ili hlađenje reakcione smeše (unutrašnja kod reaktora a i d, ili spoljna obloga kod reaktora b, c, e i f). Osim toga, reaktori sa mešanjem mogu imati i dodatne pregrade kako bi se povećala efikasnost mešanja (kod reaktora a, b, d i e) ili smanjila (kod reaktora f). Kod kontinualnih reaktora (c–f) može

biti dodata i petlja za recirkulaciju, pa se deo reakcione smeše koja je već prošla kroz kolonu mešanjem sa rastvorom supstrata ponovo uvodi u kolonu. Svi reaktori mogu biti korišćeni za rad sa imobilizovanim biokatalizatorima, a reaktori *a*, *b* i *e* (i reaktori *d* i *f* ako se na izlazu iz kolone proizvod propusti kroz polupropustljivu membranu) mogu koristiti imobilizovan biokatalizator unutar membrane.

Izbor pravog tipa reaktora, isto kao i njegovo projektovanje i rad su vrlo važni za uspešnu primenu biokatalizatora u industriji. Mnogi faktori utiču na pravilnu primenu reaktora. Tu su uključeni kontrola pH vrednosti i temperature, potrebe za dovodenjem ili uklanjanjem gasovitih reaktanata, prisutnost poželjnih ili nepoželjnih čvrstih čestica u ulaznoj tečnosti, hemijska i biološka stabilnost supstrata i proizvoda, frekvencija izmene biokatalizatora, inhibicija supstratom ili proizvodom, veličina reaktora, pa i tip i način upotrebe proizvoda.

Za proizvodnju invertnog šećera korišćenjem imobilizovanih biokatalizatora mogu se koristiti kako šaržni, tako i kontinualni enzimski reaktori. Neophodno je da reaktor ima mogućnost kontrole temperature reakcije, jer je proces proizvodnje invertnog šećera efikasniji na temperaturama nešto većim od sobne temperature. Korišćenje reaktora sa petljom za recirkulaciju korisna je u ovom procesu jer se mešanjem rastvora delimično invertovane saharoze i rastvora saharoze uklanja bilo kakva mogućnost kristalizacije koncentrovanog rastvora supstrata.

2.9.2 Karakteristike enzimskih reaktora

Karakteristike reaktora se mere pomoću aktivnosti, stabilnosti i selektivnosti, zatim prinosa dobijenih proizvoda i stepena konverzije supstrata u proizvod.

Aktivnost je obično izražena u kg proizvoda po m³ zapremine reaktora i vremenu trajanja procesa. Ova aktivnost zavisi od koncentracije i aktivnosti imobilizovanog biokatalizatora i određena je enzimskom aktivnošću neimobilizovanog biokatalizatora, količinom biokatalizatora vezanog na nosač i delom aktivnosti nakon imobilizacije.

Stabilnost biokatalizatora se obično izražava kao vrednost poluživota tj. vremenom potrebnim da aktivnost reaktora opadne na polovinu od početne vrednosti. Naravno traže se imobilizovani biokatalizatori koji su najstabilniji, a da pri tome imaju visoku aktivnost.

Selektivnost biokatalizatora se definiše kao odnos između količine željenog proizvoda i ukupne količine nastalih proizvoda. Poželjno je da su reakcije visokoselektivne, zbog efikasnije potrošnje supstrata i postizanja visokog prinosa željenog proizvoda, posebno

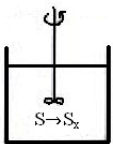
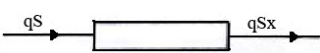
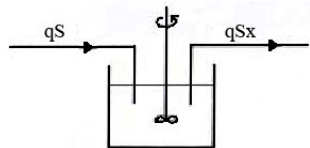
ako se može održavati visoki stepen konverzije supstrata u proizvod. Veća selektivnost reaktora osigurava lakše izolovanje i prečišćavanje proizvoda.

2.9.3 Kinetika idealnog enzimskog reaktora

Kinetika enzimskih reaktora se izvodi iz izraza kinetike enzimske reakcije za imobilizovane biokatalizatore, uzimajući u obzir brzinu protoka supstrata kroz reaktor, stepen konverzije supstrata u proizvod, opseg mešanja rastvora u reaktoru i uticaj inhibitora. Ukupni efekat ovih parametara je da utiču na veličinu reaktora ili koncentraciju enzima potrebnu za postizanje određene produktivnosti.

Za neinhibiranu ireverzibilnu reakciju uz primenu jednog enzima u reaktoru, pri izotermnim uslovima, jednačine koje opisuju osobine tri osnovna tipa reaktora: šaržni, cevni (sa kontinualnim protokom) i kontinualni sa mešanjem, prikazane su u tabeli 9.

Tabela 9. Shematski prikaz osnovnih modela reaktora

Tip reaktora	Shematski prikaz	Jednačina koja opisuje karakteristike reaktora ^a
Šaržni reaktor sa mešanjem		$XS - K_M \times \ln(1 - X) = \frac{k_{cat}E \times r}{V}$
Cevni reaktor sa kontinualnim protokom		$XS - K_M \times \ln(1 - X) = \frac{k_{cat}E}{q} - \frac{k_{cat}E \times r}{V}$
Šaržni reaktor sa kontinualnim protokom		$XS - K_M \times \ln \frac{X}{1 - X} = \frac{k_{cat}E}{q} - \frac{k_{cat}E \times r}{V}$

^a Jednačine važe za enzim koji reaguje sa jednim molekulom supstrata i bez inhibicije.

X – deo supstrata prevedenog u proizvod (≤ 1)

E – ukupna enzimaska aktivnost u reaktoru (mol)

S i S_x – početna i krajnja koncentracija supstrata (mol/L)

q – brzina protoka supstrata u reaktoru (L/min)

t – vreme trajanja procesa (min)

K_M – Michaelis – Mentenova konstanta (mol/L)

k_{cat} – konstanta brzine raspada ES kompleksa u proizvod (min^{-1})

r – prosečno vreme zadržavanja rastvora supstrata u reaktoru (min)

V – radna zapremina reaktora (L)

Izbor enzimskog reaktora zavisi od faktora kao što su: mehaničke osobine i priroda imobilizata, osobine enzimske reakcije (inhibicija supstratom ili proizvodom) kao i samog supstrata, ali jedan od najvažnijih je potreba za održavanjem konstantne produktivnosti reaktora.

2.9.4 Enzimski reaktori za proizvodnju invertnog šećera

U literaturi su opisani brojni načini imobilizacije ćelija kvasca *S. cerevisiae*. Često, korišćenje ćelija kvasca kao biokatalizatora u ovim metodama imobilizacije nema za cilj industrijsku ili bilo kakvu drugu upotrebu dobijenih imobilizata, već je najčešće samo model sistem u ispitivanju tehnike imobilizacije, njene mogućnosti primene na cele ćelije mikroorganizama ili promena enzimskih karakteristika u njihovoj interakciji sa korišćenim nosačem. Osim toga, vrlo često je dobijeni imobilizat bio neadekvatan za upotrebu u proizvodnji invertog šećera, zbog loših mehaničkih osobina dobijenog biokatalizatora, male enzimske aktivnosti dobijenih imobilizata ili visoke cene dobijenog biokatalizatora.

Kako svaka grupa autora pri karakterizaciji svojih imobilizata koristi različite reaktore, najpogodnije ili dostupne, upoređivanje biokatalizatora opisanih u različitim reaktorima nije moguće. Najčešće opisivani reaktori za produkciju invertnog šećera su šaržni reaktor (23, 41, 45, 48, 49, 50, 54, 64) i reaktor sa napakovanim slojem (kolona) (49, 51, 64, 83–86), ređe kontinualni šaržni reaktor (30, 31, 37).

Pri testiranju produkcije imobilizata i njihove operativne stabilnosti (stabilnost enzimske aktivnosti u uslovima rada biokatalizatora) u šaržnom reaktoru istraživačke grupe koje se bave ovom oblašću koriste različit broj ponavljajućih ciklusa. Neki od imobilizata su testirani u do 10 ponavljajućih ciklusa (23, 41). Rezultati dobijeni na ovaj način (nema pada enzimske aktivnosti) ne daju realni rezultat operativne stabilnosti imobilizata i kao takvi potpuno su neupotrebljivi. U literaturi su najčešći primeri gde je operativna stabilnost imobilizovane invertaze testirana u više (10–30) ponavljajućih ciklusa (37, 45, 48–50, 64). Ovaj broj ponovljenih ciklusa za karakterizaciju nekih od imobilizata je bio dovoljan jer je primećen pad aktivnosti iz koga se može izračunati poluživot imobilizata (pri datim eksperimentalnim uslovima), koji je jedan od najznačajnijih podataka o stabilnosti dobijenog imobilizovanog biokatalizatora. Međutim, operativna stabilnost biokatalizatora testirana u 100 i više ponavljajućih šaržnih ciklusa je eksperiment koji daje podatke značajne za eventualnu primenu biokatalizatora u industriji (54).

Temperature na kojima su ispitivane operativne stabilnosti imobilizata su takođe različite, od sobne temperature (25°C) (45, 48–50, 64) do 75°C (54), a pokazano je i da temperatura ima veliki uticaj na operativnu stabilnost imobilizovane invertaze (87).

Koncentracije rastvora saharoze su takođe veoma različite, najčešće autori se opredeljuju za nisko koncentrovane rastvore saharoze, od 10–20% (23, 37, 41, 45, 49, 50) jer je sa njima lakše raditi (manje su viskozni), a enzimi pokazuju veću aktivnost jer nema difuzionih smetnji kao kod koncentrovanih viskoznih rastvora i inhibicije enzima proizvodom. Retko su imobilizovane ćelije kvasca testirane u reaktorima korišćenjem rastvora saharoze visoke koncentracije do 66% (m/m) (54, 64). Eksperimentalni uslovi su odabrani tako da su rezultati svih gore pomenutih imobilizata potpuno ili skoro potpuno očuvanje enzimске aktivnosti, što je potpuno neprihvatljiv rezultat sa industrijskog aspekta. Jedini rezultat koji je značajan za eventualnu industrijsku primenu imobilizovanih ćelija kvasca dobijen je u eksperimentu 200 ponovljenih ciklusa inverzije 66% (m/m) rastvora saharoze na 75°C (54).

Produkcija invertnog šećera imobilizovanom invertazom u literaturi opisana je i pomoću kolone sa napakovanim slojem imobilizovanog enzima. Najčešće se autori opredeljuju za rad sa kolonama male zapremine, kako zbog lakše manipulacije, tako i zbog male količine dobijenog imobilizata. Rezultate dobijene na ovaj način praktično je nemoguće ili veoma teško projektovati na industrijsku skalu. Kao i u slučaju šaržnog reaktora korišćene koncentracije saharoze su različite od nekoliko procenata (51) do 80% (m/v) (49, 64). Testiranje rada imobilizata u reaktorima ima za cilj izračunavanje poluživota i produktivnosti novodobijenih biokatalizatora u industrijskim ili bar sličnim uslovima rada. Svaki od zadatih parametara rada reaktora utiče na dobijene vrednosti ove dve, za industriju najvažnije karakteristike imobilizata. Pokazano je da korišćena koncentracija supstrata utiče na ukupnu produktivnost reaktora (83). Promena temperature rada reaktora takođe utiče na produktivnost reaktora, sa smanjenjem temperature od 5°C (na temperaturama od 60–70°C) produktivnost reaktora opada za 20–30% u odnosu na njegovu produktivnost na višoj temperaturi (47, 84). Tokom rada reaktora dolazi do smanjenja procenta inverzije saharoze, odnosno pada aktivnosti (47, 84), mada je ovo u literaturi retko naglašeno. Autori se najčešće odlučuju da ovaj podatak ne naglase, a nekad ga ni nemaju, jer je vreme trajanja eksperimenta kratko ili su korišćeni razblaženi rastvori supstrata (45), pa nije ni došlo do pada aktivnosti imobilizata. U nekim slučajevima je poluživot imobilizovanih ćelija kvasca mali (49, 85, 86), odnosno ćelije u jednom trenutku naglo gube aktivnost posle kratkog vremena, pa se ne može govoriti o smanjenju enzimске aktivnosti. Produktivnost

biokatalizatora i reaktora zavise prvenstveno od reakcionih uslova temperature i pH sredine (parametri koji ne ulaze u izraz i trebalo bi ih navesti pored podatka o produktivnosti). Pri testiranju imobilizovanih ćelija kvasca većina autora koristi puferisani rastvor saharoze na pH vrednosti 4,0–5,0, iako neki autori tvrde da pH nema velikog uticaja na produktivnost (83). Način na koji se izražava produktivnost reaktora sa napakovanim slojem se razlikuje od publikacije do publikacije, od autora do autora, a najčešće sledećim izrazima:

$$\text{Specifična produktivnost biokatalizatora} \quad SPC = \frac{S_0 \cdot Y}{W \cdot t_m} \quad (84)$$

$$\text{Totalna (ukupna) produktivnost biokatalizatora} \quad TPC = \int_0^{T_m} SPC(t) dt \quad (84)$$

$$\text{Specifična produktivnost reaktora (produktivnost po jedinici zapremine ili mase)} \quad SPR = SPC \cdot W \quad (84)$$

S_0 – početna koncentracija supstrata

Y – konverzija

W – zapremina (masa) biokatalizatora

t_m – vreme koje supstrat provede u reaktoru

T_m – maksimalno vreme rada reaktora

Ako se produktivnosti reaktora sa napakovanim slojem imobilizovanih ćelija kvasca obračunaju na isti način (koliko kg saharoze obradi 1 kg imobilizovanog biokatalizatora za 1 h) dobija se raspon od 1 do 10 kg hidrolizovane saharoze po kg biokatalizatora po satu. Najveći broj testiranih reaktora je imao produktivnost od 3,2 do 3,5 kg hidrolizovane saharoze po kg biokatalizatora po satu (47, 87). Najniža do sada publikovana specifična produktivnost reaktora je 0,82–1 kg (23, 85), dok je najvća 9,38 kg hidrolizovane saharoze po kg biokatalizatora po satu (86). Poluživot imobilizovanih ćelija kvasca korišćenih u ovim reaktorima ima veoma širok opseg od 3,5 dana (85) do 470 dana (51).

Produktivnost nekih tipova imobilizovanih ćelija kvasca nije moguće ispitati u reaktoru sa napakovanim slojem, zbog loših mehaničkih osobina (pucanje čestica imobilizata u koloni) (37). Za karakterizaciju ovih imobilizata korišćen je kontinualni šaržni enzimski reaktor, a broj ovih reaktora opisanih u literaturi je mali. Imobilizati su testirani kratak vremenski period od 24 h do 15 dana (30, 31), korišćenjem razblaženih rastvora

saharoze (200–500 mM). Kao i kod reaktora sa napakovanim slojem, produktivnost kontinualnih šaržnih reaktora raste sa povećanjem protoka supstrata kroz reaktor, ali do određene vrednosti kada stepen konverzije pada na neželjenu vrednost. Produktivnost ovog tipa bioreaktora je daleko manja od produktivnosti reaktora sa napakovanim slojem, a kreće se u intervalu od 97,5 do 152 g hidrolizovane saharoze po L biokatalizatora po satu (37).

3 Naši radovi

Invertni šećer se koristi kao zaslađivač u prehrambenoj industriji širom sveta. Razlog korišćenja ovog zaslađivača je prvenstveno ekonomski jer je slađi od saharoze (potrebna je manja količina da bi se dobilo željeni ukus proizvoda) kao i da bi se sprečila kristalizacija šećera u konditorskom proizvodu (visoko koncentrovani rastvori invertnog šećera ne kristališu na sobnoj temperaturi za razliku od visoko koncentrovanih rastvora saharoze).

U većini industrijskih postupaka invertni šećer se dobija kiselinskim postupkom. Ovim postupkom se, pored produkcije ekvimolarne smeše glukoze i fruktoze, u proizvodu dobijaju i nusproizvodi, koji pored toga što proizvod boje u tamno-žutu boju su i toksični. Međutim, enzimskim postupkom dobijanja invertnog šećera svi nedostaci su prevaziđeni. Enzimski postupak ne zahteva zagrevanje rastvora saharoze na visokoj temperaturi, što je i velika ekonomska prednost, a široko gledano i doprinos u očuvanju životne sredine. Korišćenjem imobilizovane invertaze u ove svrhe cena finalnog proizvoda je dodatno smanjena.

Izbor nosača za imobilizaciju invertaze za dobijanje biokatalizatora koji bi se koristio u prehrambenoj industriji je dodatno ograničen strogim zahtevima ove industrijske grane. Česta pojava curenja enzima iz imobilizata je osobina koja isključuje mogućnost njegove upotrebe u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Visoka produktivnost i stabilnost su takođe važni parametri za izbor biokatalizatora za industrijsku upotrebu.

U literaturi se mogu naći brojni primeri imobilizovanih celih ćelija kvasca, kao i rastvorne invertaze. Međutim, još su brojniji njihovi nedostaci, počevši od curenja enzima iz imobilizata (9), velike nestabilnosti dobijenih imobilizata (46), do nemogućnosti njihovog korišćenja u rastvorima saharoze visoke koncentracije (nije naglašena ni u jednoj publikaciji), a u slučaju korišćenja celih ćelija male aktivnosti (53), pucanja ćelija u visoko koncentrovanim rastvorima saharoze (nije naglašena ni u jednoj publikaciji), nastajanja nusproizvoda (etanola) (88) itd.

U ćeliji kvasca *S. cerevisiae* najveći deo enzima invertaze nalazi se u ćelijskom zidu. Mogućnost korišćenja ćelijskog zida kao biokatalizatora bila bi višestruko korisna, jer bi se prevazišao do sada najveći problem koji se javljao pri imobilizaciji rastvorne invertaze a to je curenje enzima iz čestica imobilizata u okolni rastvor (9). Pored toga njegova cena dobijanja bi bila manja od cene rastvornog enzima. Cilj ovog rada bilo je dobijanje imobilizovanog biokatalizatora koji bi ispunjavao sve stroge zahteve prehrambene industrije, dobre produktivnosti i stabilnosti, a porv h svega dobijanje biokatalizatora čija bi industrijska

upotreba bila ekonomski isplativa. Izolovanje i karakterizacija ćelijskog zida kvasca *S. cerevisiae*, njegova imobilizacija i testiranje mogućnosti njegove upotrebe u proizvodnji invertnog šećera bili su primarni cilj ovog rada.

3.1 Izolovanje invertaze iz ćelija kvasca *S. cerevisiae*

3.1.1 Liza ćelija kvasca *S. cerevisiae*

Ćelije kvasca *S. cerevisiae* (komercijalno dostupnog u maloprodaji) su autolizirane pomoću toluola. Ovaj rastvarač „nagriza” ćelijski zid kvasca i oslobađa citosolni sadržaj sa svim enzimima prisutnim u ćeliji, koji nastavljaju liziranje ćelijskog zida. Kako se najveći deo invertaze nalazi baš u ćelijskom zidu, na početku lize u rastvornom delu ove smeše prisutna je mala količina invertaze koja se sa vremenom povećava. Takođe, sa povećanjem vremena autolize smanjuje se aktivnost ćelijskog zida. Zavisno od toga koja je od dva tipa invertaze cilj izolovanja, menja se dužina trajanja lize ćelija. Ukoliko je potrebno izolovati rastvornu invertazu, liza kvasca započinje u trajanju od 4 h na povišenoj temperaturi (40°C), a potom traje još 7 dana na sobnoj temperaturi. Ukoliko je potrebno izolovati zidnu invertazu, liza se završava nakon 4 h na temperaturi od 40°C.

3.1.2 Izolovanje zidne invertaze

Nakon 4 sata autolize ćelija kvasca *S. cerevisiae* u talogu nakon centrifugiranja nalazi se ćelijski zid, odnosno zidna invertaza. Da bi se dobio što čistiji preparat zidne invertaze pogodan kako za korišćenje, tako i za čuvanje, talog dobijen nakon centrifugiranja ćelijskog lizata je dobro ispran da bi se otklonile sve nečistoće. U ovom koraku naročito je važno da se otklone svi rastvorni proteini, koji bi mogli da kontaminiraju proizvod enzimske reakcije. Iz dobijenog enzimskog preparata neophodno je ukloniti i soli zaostale nakon njegovog ispiranja fiziološkim rastvorom. Zidna invertaza je odmašćena acetonom i osušena na vazduhu. Enzimska aktivnost zidne invertaze izmerena je korišćenjem rastvora saharoze, spektrofotometrijskim određivanjem koncentracije nastalih redukujućih šećera nakon reakcije sa 3,5–dinitrosalicilnim (DNS) reagensom (89).

3.2 Karakterizacija rastvorne i zidne invertaze

3.2.1 Određivanje enzimske aktivnosti zidne invertaze

Kako u reakciji invertaze i saharoze nastaje ekvimolarna količina redukujućih šećera glukoze i fruktoze, njihova reakcija sa DNS daje obojeni proizvod iskorišćen za merenje količine redukujućih šećera u reakcionoj smeši, pa samim tim i enzimske aktivnosti. Enzimski test koji je korišćen za određivanje aktivnosti dobijenih enzima je tzv. stop esej. Koncentracija nastalog obojenog proizvoda dobija se merenjem apsorbancije dobijenog rastvora na 540 nm (89), na osnovu koje se korišćenjem standardne prave može izračunati koncentracija redukujućih šećera u reakcionoj smeši nakon enzimske hidrolize saharoze. Za izračunavanje enzimske aktivnosti po mL rastvora enzima koristi se jednačina:

$$A = \frac{c_{r\check{s}} \cdot V_{rs}}{t \cdot V_e}$$

A – enzimska aktivnost (IU/mL)

$c_{r\check{s}}$ – koncentracija redukujućih šećera (mM)

V_{rs} – zapremina reakcione smeše (mL)

t – vreme trajanja reakcije (min)

V_e – zapremina enzima (mL)

Enzimska aktivnost se izražava internacionalnom jedinicom (IU). Jedna internacionalna jedinica invertazne aktivnosti definisana je kao ona količina enzima koja katalizuje hidrolizu jednog mikromola saharoze u minutu pri datim reakcionim uslovima. Aktivnost dobijene zidne invertaze bila je 10 ± 2 IU/mg, a prinos dobijenog enzima bio je 12 – 20 % u odnosu na masu presovanog kvasca. Prinos i aktivnost dobijene zidne invertaze su bili različiti u zavisnosti od proizvođača pekarskog kvasca.

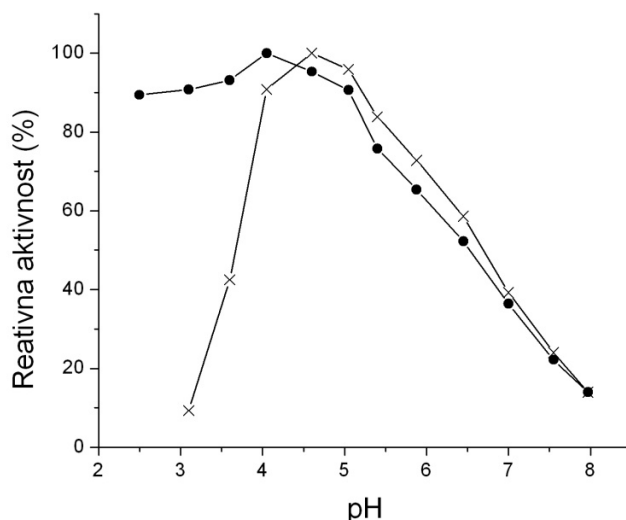
Umesto zapremine enzima (V_e) u jednačini za izračunavanje enzimske aktivnosti može se koristiti i masa biokatalizatora korišćena u reakciji, pri čemu je dobijen rezultat izražen kao IU/mg ili IU/g biokatalizatora.

Za određivanje aktivnosti zidne invertaze pravljena je suspenzija enzima koncentracije 1 mg/mL.

3.2.2 Određivanje pH optimuma zidne i rastvorne invertaze

Enzimska aktivnost je direktno zavisna od pH vrednosti sredine. Promenom pH okoline enzima menja se naelektrisanje pojedinih aminokiselina u molekulu enzima, pa i u njegovom aktivnom centru, što za posledicu ima promenu aktivnosti enzima. pH optimum enzima je ona pH vrednost na kojoj on ima optimalnu aktivnost.

pH optimum aktivnosti invertaze određen je u rastvorima saharoze različitih pH vrednosti u pH oblasti od 2,5 do 8,0. Sa slike 20 vidi se da obe vrste invertaze imaju slične vrednosti pH optimuma. pH optimum rastvorne invertaze je 4,5, dok je kod zidne invertaze pomeren za pola pH jedinice ka kiseloj oblasti (4,0). Rezultati dobijeni za rastvornu invertazu su u skladu sa do sada objavljenim podacima različitih grupa autora koji su takođe radili sa invertazom izolovanom iz kvasca *S. cerevisiae* (35, 67, 70, 90). Zidna invertaza se nalazi imobilizovana u ćelijskom zidu kvasca, koji pored invertaze sadrži i veliki broj drugih proteina i ostalih jedinjenja, koja mogu da utiču na lokalnu promenu pH vrednosti u mikrookolini enzima i pomere pH optimum u odnosu na čist rastvorni enzim. Za razliku od rastvorne invertaze, zidna je znatno aktivnija u oblasti pH vrednosti nižim od optimuma. Kao što se vidi sa slike 20 njena aktivnost u oblasti pH od 2,5 do 3,5 je 90% i više, dok rastvorna tek na pH 4,0 pokazuje značajniju aktivnost. Takođe, i na višim pH vrednostima zidna invertaza zadržava do 95 % aktivnosti do pH 5,0. S toga se može zaključiti da se zidna invertaza može koristiti u oblasti pH od 2,5 do 5,0, bez veće promene enzimске aktivnosti, dok je ova oblast (minimalnih promena aktivnosti sa promenom pH) kod rastvorne invertaze uža i obuhvata samo jednu pH jedinicu, od pH 4,0 do pH 5,0. Dobijene vrednosti pH optimuma zidne invertaze u skladu su sa do sada u literaturi publikovanim pH optimumima celih ćelija kvasca (23).

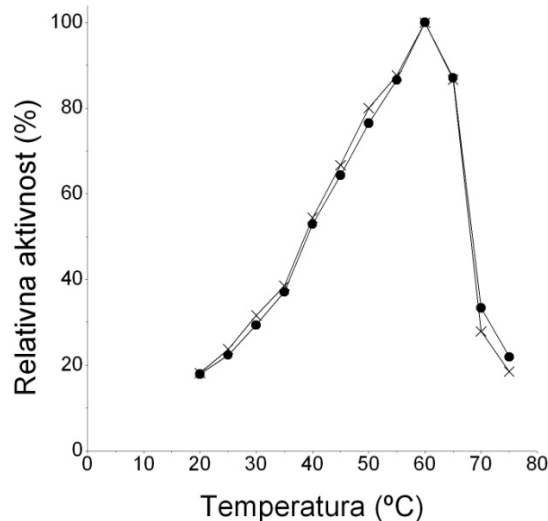


Slika 20. pH optimum rastvorne (-x-) i zidne invertaze (-•-) izolovane iz kvasca *S. cerevisiae*

3.2.3 Određivanje temperaturnog optimuma zidne i rastvorne invertaze

Temperaturni optimum je pored pH optimuma enzimske aktivnosti jedna od važnijih karakteristika svakog enzima. To je temperatura na kojoj je enzimska aktivnost optimalna. Sa povećanjem temperature aktivnost enzima se povećava, jer se ubrzava kretanje molekula u rastvoru. Međutim, zajedno sa povećanjem pokretljivosti molekula, povećava se i mogućnost denaturacije enzima, a time i smanjuje njegova aktivnost. Temperaturni optimum enzima je rezultat zajedničkog uticaja oba ova efekta, aktivnosti i denaturacije enzima na datoj temperaturi.

Temperaturni optimum invertaze određen je u opsegu temperatura 20–75°C. Na slici 21 je prikazana promena aktivnosti enzima u zavisnosti od temperature na kojoj je rađen test enzimske aktivnosti. Aktivnosti obe vrste invertaze su pokazale istu zavisnost od temperature. Sa porastom temperature od 20 do 60°C aktivnost oba enzima raste, sa početnih oko 18% do maksimalnih 100% na 60°C, a sa daljim porastom temperature aktivnost enzima opada na početnu vrednost (oko 20%) na najvišoj temperaturi na kojoj je testirana enzimska aktivnost. Na temperaturama $\pm 5^\circ\text{C}$ oko tačke na kojoj je temperaturni optimum (60°C) aktivnost enzima je 87%, dok na 70°C aktivnost naglo opada na oko 30% aktivnosti. Ista vrednost temperaturnog optimuma rastvorne invertaze izolovane iz ćelija kvasca *S. cerevisiae* je najčešća publikovana vrednost za ovaj enzim (90, 91), kao i za cele ćelije kvasca (23, 33, 49).

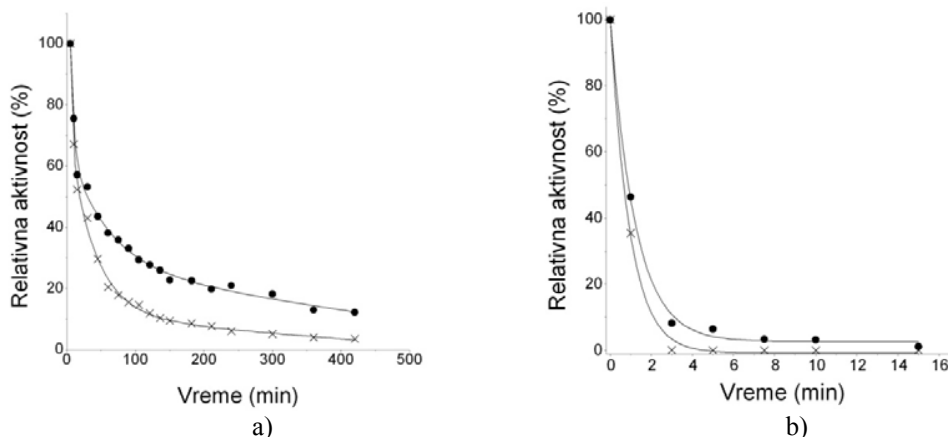


Slika 21. Temperaturni optimum rastvorne (-x-) i zidne invertaze (-●-) izolovane iz kvasca *S. cerevisiae*

3.2.4 Određivanje temperaturne stabilnosti zidne i rastvorne invertaze

Temperaturna stabilnost enzima je zadržana aktivnost enzima nakon inkubacije na određenoj temperaturi određeno vreme. Inkubacijom na povišenoj temperaturi enzim se denaturiše, pa mu se aktivnost smanjuje sa vremenom. Temperaturna stabilnost karakteristična je za svaki enzim, a zavisi od strukture enzima i uslova eksperimenta. Ovaj podatak je važan za svaki enzim, ali je od presudne važnosti za njegovu upotrebu u proizvodnim procesima, jer njegova stabilnost direktno utiče na cenu finalnog proizvoda.

Kako je temperaturni optimum obe vrste invertaze 60°C, za temperature na kojima će se pratiti njihova stabilnost izabrane su dve, i to temperaturni optimum enzima (60°C) i temperatura veća od optimuma enzimske aktivnosti (70°C). Promena aktivnosti obe vrste invertaze praćena je u zavisnosti od vremena inkubacije na datoj temperaturi. Na slici 22 prikazane su promene aktivnosti rastvorne i zidne invertaze u zavisnosti od vremena inkubacije na 60 i 70°C.



Slika 22. Temperaturna stabilnost rastvorne (-x-) i zidne invertaze (-•-) izolovane iz kvasca *S. cerevisiae* na a) 60°C i b) 70°C

Promena aktivnosti rastvorne i zidne invertaze praćena tokom 7 sati na temperaturi od 60°C prikazana je na slici 22a. Nakon 100 minuta na 60°C aktivnost rastvorne invertaze je pala na 13% polazne aktivnosti, a nakon istog vremena inkubacije zidna invertaza je zadržala 30% početne aktivnosti. Nakon 7 sati inkubacije na ovoj temperaturi rastvorna invertaza je zadržala nešto više od 3%, a zidna invertaza više od 12% početne aktivnosti.

Temperaturna stabilnost ova dva enzima praćena na 70°C tokom 15 minuta prikazana je na slici 22b. Nakon 5 minuta inkubacije rastvorna invertaza je izgubila svu aktivnost, dok je zidna zadržala oko 7% početne aktivnosti. Nakon 15 minuta inkubiranja zidna invertaza ostaje i dalje aktivna, ali sa svega 1,5% od početne aktivnosti.

Kako je zidna invertaza pokazala veoma veliku temperaturnu stabilnost u poređenju sa rastvornom, upotreba zidne invertaze mogla bi da zameni rastvornu invertazu, a pored toga bi bila daleko ekonomski isplativija za industrijsku upotrebu.

3.2.5 Određivanje K_M i V_{max} vrednosti i energije aktivacije zidne i rastvorne invertaze

Aktivaciona energija rastvorne i zidne invertaze određena je na osnovu aktivnosti ova dva enzima na različitim temperaturama i izračunata pomoću formule (67):

$$E_a = 19,1 \cdot \frac{T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \cdot \log \frac{A_2}{A_1} \quad T_1, T_2 - \text{temperatura na kojoj je merena enzimaska aktivnost}$$

$A_1, A_2 - \text{enzimaska aktivnost na temperaturama } T_1 \text{ i } T_2$

Početne brzine, kao i Michaelis-Menten-ova konstanta, rastvorne i zidne invertaze određene su korišćenjem saharoze kao supstrata u opsegu koncentracija od 1 do 200 mM u slučaju rastvorne invertaze i od 1 do 400 mM u slučaju zidne invertaze. Korišćenje većih koncentracija saharoze dovodi do inhibicije invertazne aktivnosti (18, 23, 38). Dobijeni podaci obrađeni su nelinearnom regresijom GraphPad Prism 5.0 programom i prikazani su u tabeli 10.

Tabela 10. Michaelis-Menten-ove konstante i početne brzine reakcija

	Rastvorna invertaza	Zidna invertaza
K_M (mM)	$29,65 \pm 3,79$	$30,93 \pm 5,26$
V_{max} (mM/min)	$19,82 \pm 0,82$	$11,64 \pm 0,54$
E_a (kJ/mol)	$43 \pm 3,1$	$38 \pm 2,2$

Na osnovu dobijenih vrednosti kinetičkih konstanti rastvorne i zidne invertaze može se reći da je afinitet ova dva enzima ka saharozu kao supstratu jednak. Ove vrednosti su u skladu sa prethodno publikovanim vrednostima za rastvorni enzim (70, 91, 92), kao i sa K_M vrednostima celih ćelija kvasca (59). Manja vrednost V_{max} zidne invertaze u odnosu na rastvorni enzim poznata je pojava u poređenju neimobilizovanog i imobilizovanog enzima (u ovom slučaju zidnu invertazu možemo posmatrati kao imobilizat rastvorne invertaze) (38, 59, 60, 93). Vrednost energije aktivacije nešto je veća od do sada publikovanih za rastvornu invertazu (66, 94) što se može objasniti velikom čistoćom enzima koji je korišćen za ovaj eksperiment, dok je vrednost E_a zidne invertaze u skladu sa publikovanim vrednostima za cele ćelije kvasca (54, 59). Manja energija aktivacije zidne u odnosu na rastvornu invertazu takođe je očekivana kada se porede rastvorni i imobilizovani enzim (18, 59, 66), što se objašnjava postojanjem internih difuzionih smetnji u imobilizatu, odnosno zidnoj invertazi u ovom slučaju (95).

3.2.6 Stabilnost zidne i rastvorne invertaze

Inhibitor je bilo koja supstancija koja smanjuje brzinu enzimske reakcije. Kao svi ostali enzimi i invertaza ima svoje specifične inhibitore. Jedni od najčešće pominjanih su joni teških metala (npr. Hg^{2+}) i anilin. Smanjenje aktivnosti enzima, odnosno denaturacija enzima u rastvorima metanola i uree je takođe dobro poznata pojava. Neki od ovih molekula ili jona mogu biti prisutni u uzorku pri industrijskoj upotrebi enzima, pa je podatak o stepenu inhibicije, odnosno enzimske stabilnosti veoma važan. Osim toga stabilnost enzima u prisustvu različitih supstancija može da poslužiti za poređenje osobina istih enzima.

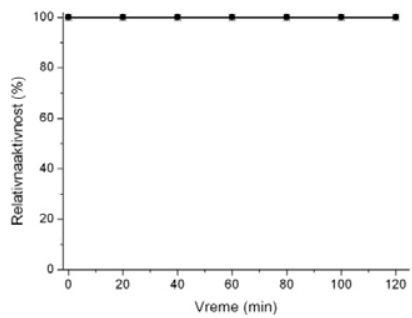
Pomenuti inhibitori i denaturanti invertaze korišćeni su i u našim radovima za poređenje rastvorne i zidne invertaze. Stabilnost enzima u rastvorima različitih koncentracija uree i metanola na obe vrste enzima detaljno je ispitano, kako bi eventualne razlike bile što jasnije utvrđene.

3.2.6.1 Stabilnost invertaze u rastvorima uree

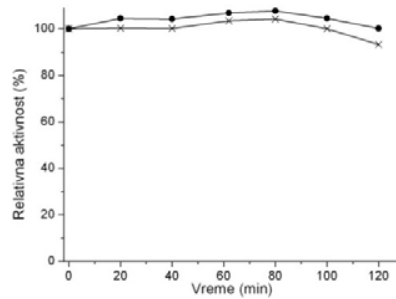
Urea je jedan od univerzalnih enzimskih denaturanata (96). Oslobađanjem sulfhidrilnih grupa proteina u rastvorima uree njihova struktura se narušava, a time i enzimska aktivnost smanjuje ili potpuno nestaje (97). Promena aktivnosti rastvorne i zidne invertaze praćena je u 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8 M rastvoru uree tokom 22 časa. Tokom prvih 2 sata promena enzimske aktivnosti praćena je na 20 minuta.

Na slici 23 prikazana je promena invertazne aktivnosti u zavisnosti od vremena inkubacije enzima u rastvoru uree.

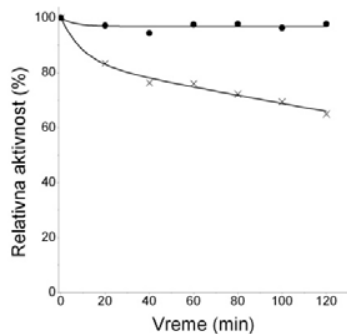
Rastvori uree više utiču na aktivnost rastvornog enzima, dok je zidna invertaza daleko otpornija na prisustvo ove supstancije. U 1 i 2 M rastvorima uree kod obe vrste invertaze nema smanjenja enzimske aktivnosti tokom prvih 2 sata inkubacije, u 3, 4 i 5 M rastvoru uree opaža se smanjenje aktivnosti rastvorne forme enzima, dok aktivnost zidne invertaze ostaje nepromenjena ili u granicama eksperimentalne greške. U rastvorima uree veće koncentracije opaža se njeno negativno dejstvo na oba enzima, ali dok aktivnost rastvorne invertaze u rastvoru uree najveće korišćene koncentracije 8 M pada na oko 10% početne, zidna invertaza u rastvoru uree iste koncentracije zadržava čak 60% početne aktivnosti. Smanjenje enzimske aktivnosti invertaze u 8 M rastvoru uree opisano je u literaturi (4).



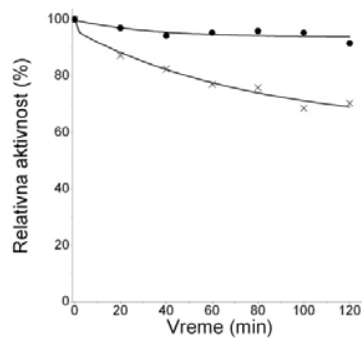
a)



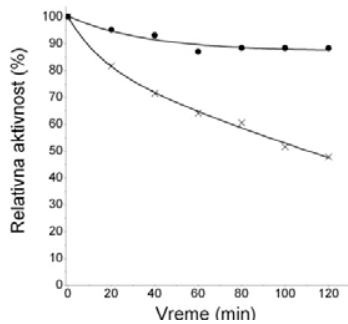
b)



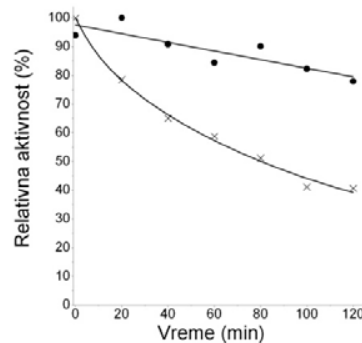
c)



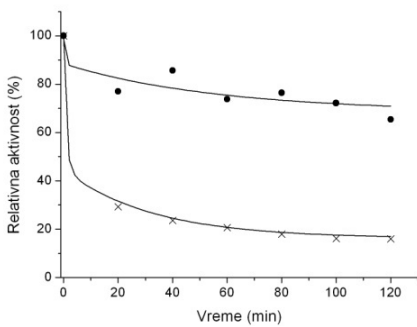
d)



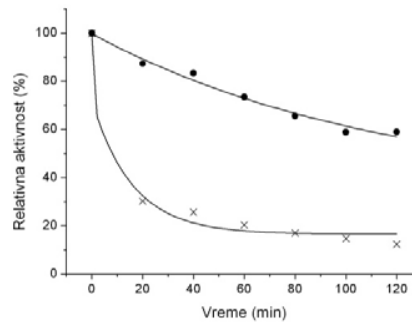
e)



f)



g)

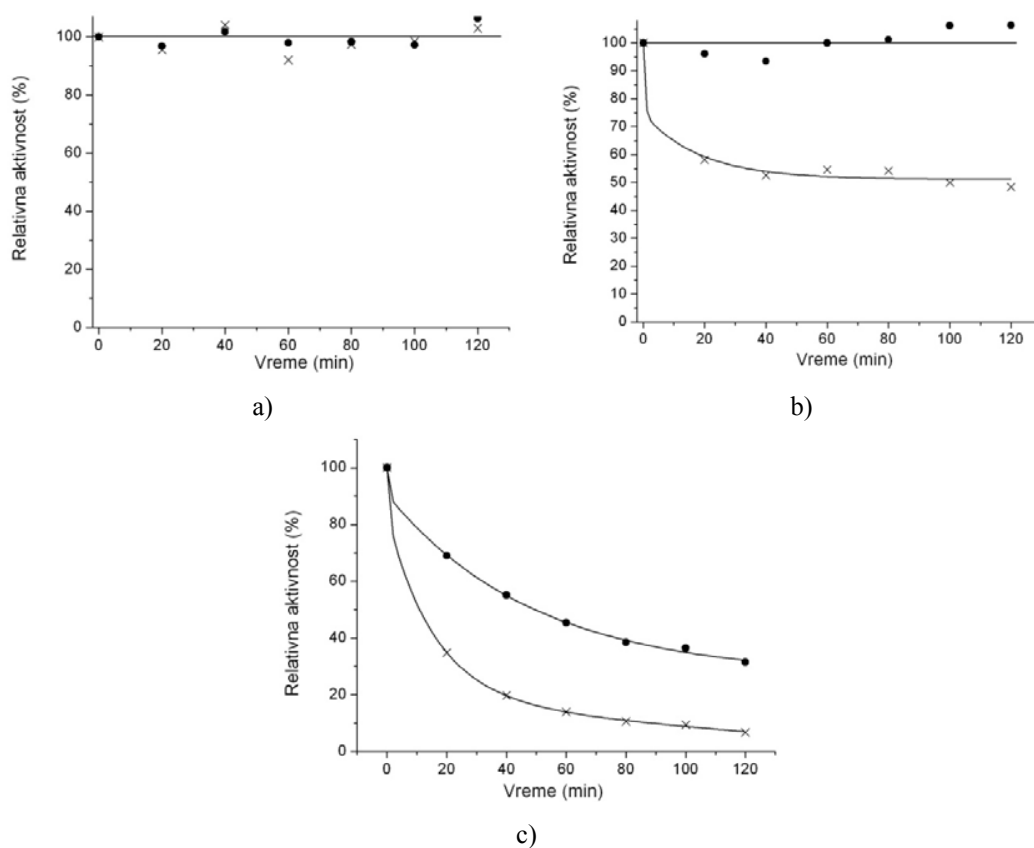


h)

Slika 23. Promena enzimske aktivnosti rastvorne (-x-) i zidne invertaze (-●-) tokom vremena inkubacije enzima u rastvoru uree koncentracije a) 1 M, b) 2 M, c) 3 M, d) 4 M, e) 5 M, f) 6 M, g) 7 M i h) 8 M

3.2.6.2 Stabilnost invertaze u metanolu

Organski rastvarači su takođe univerzalni denaturanti enzima (96). Taloženje invertaze dodatkom alkohola je jedan od koraka u njenom prečišćavanju (91). Praćena je promena aktivnosti invertaze u rastvorima metanola koncentracija 30, 40 i 50% tokom 22 časa. Tokom prva 2 sata promena enzimske aktivnosti praćena je na 20 minuta. Na slici 24 prikazana je promena invertazne aktivnosti u zavisnosti od vremena inkubacije enzima u rastvoru metanola različitih koncentracija.

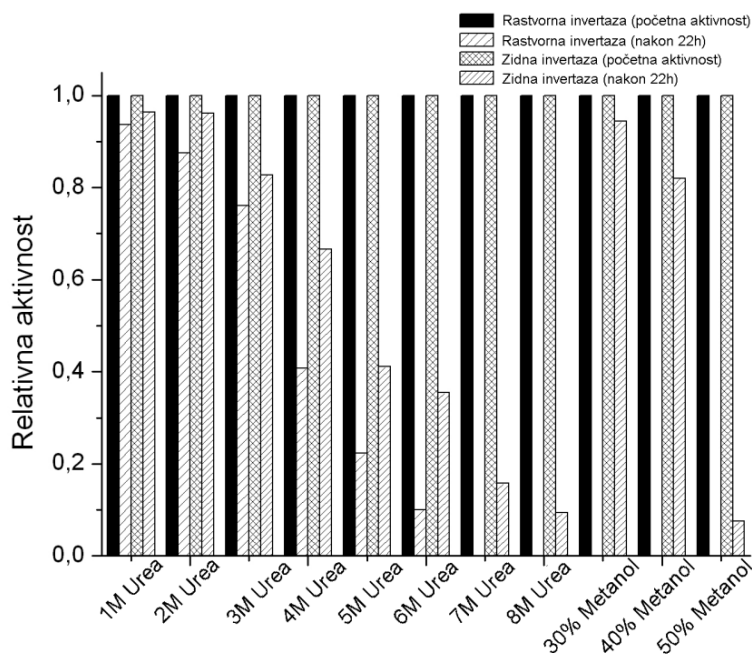


Slika 24. Promena enzimske aktivnosti rastvorne (-x-) i zidne invertaze (-●-) tokom vremena inkubacije enzima u rastvoru metanola koncentracije a) 30%, b) 40% i c) 50%

U 30% -tnom rastvoru metanola obe vrste invertaze zadržavaju početnu aktivnost tokom 2 h. U 40% -tnom rastvoru opaža se značajna razlika u stabilnosti: zidna invertaza zadržava 100% početne aktivnosti tokom 2 h, a rastvorna ostaje sa nešto manje od 50%. Oba oblika enzima u 50% metanolu gube deo aktivnosti, a nakon 2 h inkubacije rastvorna ostaje

sa nešto više od 6%, dok zidna ostaje sa 32% početne aktivnosti. Dobijeni rezultati u skladu su sa ranije publikovanim, mada je rastvoran enzim korišćen u ovom radu pokazao veću stabilnost od ranije publikovanih, što je posledica različitih temperatura na kojima je enzim tokom rada inkubiran (72). Veća inaktivacija rastvorne invertaze u rastvorima metanola većih koncentracija (40 i 60%) u poređenju sa 20%-tnim rastvorom od ranije je poznata u literaturi (72). I u slučaju korišćenja metanola kao inaktivatora invertaze, kao i uree, opaža se značajna stabilnost zidne invertaze u poređenju sa rastvornom invertazom.

Na slici 25 prikazane su aktivnosti rastvorne i zidne invertaze nakon dvadesetdvočasovne denaturacije u rastvorima uree i metanola različitih koncentracija.



Slika 25. Promena enzimske aktivnosti rastvorne i zidne invertaze nakon 22h inkubacije u rastvorima uree i metanola različitih koncentracija

Sa povećanjem koncentracije denaturanata njihov uticaj na aktivnost obe vrste invertaze je veći. Međutim, zidna invertaza u prisustvu bilo kog od ova dva jedinjenja u bilo kojoj od ispitivanih koncentracija ne gubi potpuno svoju aktivnost, dok rastvorna nakon 22 h inkubacije u 7 i 8 M urei ili bilo kojoj od tri korišćene koncentracije metanola potpuno gubi aktivnost. U slučaju korišćenja 30 i 40% metanola nakon 22 h inkubacije rastvorna invertaza potpuno gubi aktivnost, dok su promene u enzimskoj aktivnosti zidne invertaze bile minimalne ili u okviru eksperimentalne greške.

3.2.6.3 Inhibicija invertaze anilinom, Hg²⁺ i Cu²⁺ jonima

Ispitivan je uticaj i ostalih poznatih invertaznih inhibitora, kao što su anilin, živa(II) i bakar(II) jon. Rastvorna i zidna invertaza su inkubirane u rastvorima različitih koncentracija pomenutih molekula i jona, a nakon 15 minuta inkubacije merena je aktivnost enzima (98). Na osnovu dobijenih rezultata izračunate su vrednosti IC₅₀ i na osnovu njih poređene osobine zidne i rastvorne invertaze.

Tabela 11. IC₅₀ vrednosti rastvorne i zidne invertaze za različite inhibitore

<i>Inhibitor</i>	<i>Rastvorna invertaza</i>	<i>Zidna invertaza</i>
Anilin	7,51 mM	5,01 mM
Živa(II)	1,13x10 ⁻³ mM	1,36x10 ⁻³ mM
Bakar(II)	212,4 mM	53,75 mM

Anilin je poznati inhibitor invertaze i jedna je od supstancija čiji se uticaj na aktivnost invertaze često koristi za karakterizaciju izolovanog enzima (99, 100). Na osnovu promene enzimске aktivnosti u prisustvu različitih koncentracija anilina izračunate su IC₅₀ vrednosti zidne i rastvorne invertaze. Anilin je pokazao jače inhibitorno dejstvo i to za 50% u slučaju zidne invertaze. Ova osobina anilina, da jače inhibira imobilizovani enzim u odnosu na rastvoran je i ranije opisana u literaturi (71).

Vrednost IC₅₀ za Cu²⁺ jon rastvorne invertaze je skoro četiri puta veća od IC₅₀ vrednosti za zidnu invertazu. U tabeli 11 prikazane su i dobijene IC₅₀ vrednosti za Hg²⁺ jon, ali u slučaju ovog inhibitora nema razlike između rastvorne i zidne invertaze. Inhibitorno dejstvo živa(II) jona ima isti red veličine kod obe vrste invertaze, ali se ipak pokazao kao nešto jači inhibitor enzimске aktivnosti rastvorne invertaze. Slični rezultati inhibicije invertazne aktivnosti Hg²⁺ jonom opisani su u literaturi (101).

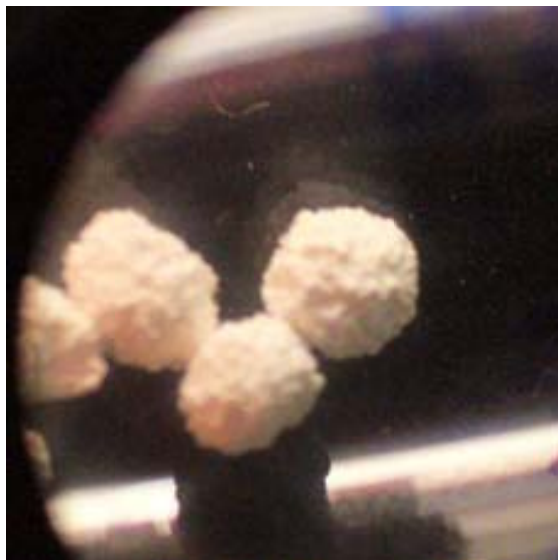
3.3 Imobilizacija zidne invertaze

Na osnovu dobijenih rezultata pokazana je veća stabilnost zidne u odnosu na rastvornu invertazu ćelija kvasca *S. cerevisiae*. Kako je upotreba invertaze već dugi niz godina poznata u proizvodnji invertnog šećera u rastvornom i imobilizovanom obliku, izolovana zidna invertaza mogla bi biti adekvatna zamena rastvornom enzimu. Njenom imobilizacijom i optimizacijom za upotrebu u proizvodnji invertnog šećera proverila bi se

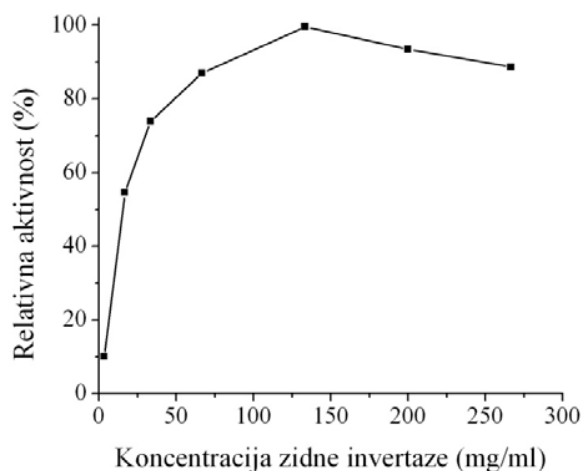
ova početna pretpostavka. Kao matriks za imobilizaciju našeg enzima izabran je alginat zbog niske cene, dostupnosti na tržištu, relativno jednostavne tehnike imobilizacije, a što je najvažnije on je dozvoljen za upotrebu u prehrambenoj industriji, koja bi bila i ciljni korisnik dobijenog imobilizata.

3.3.1 Optimizacija imobilizacije zidne invertaze u kalcijum-alginatnom hidrogelu

Zidna invertaza pripremljena kao što je opisano u poglavlju 3.1.2 je suspendovana u destilovanoj vodi i homogenizovana mešanjem i u ultrazvučnom kupatilu, a zatim pomešana sa jednakom zapreminom prethodno pripremljenog 2% rastvora natrijum-alginata. Napravljeno je sedam suspenzija različitih koncentracija zidne invertaze i pomešane su sa istom zapreminom rastvora natrijum-alginata. Suspenzije su zatim izlivanе u 2% rastvor kalcijum-hlorida. Dobijeni su imobilizati uniformnog i pravilnog oblika kuglica (slika 26). Ovako dobijenim imobilizatima je izmerena enzimska aktivnost. Na slici 27 prikazana je zavisnost aktivnosti imobilizata od količine enzima imobilizovanog u hidrogelu kalcijum-alginata.



Slika 26. Imobilizovana zidna invertaza u Ca-alginatnom hidrogelu



Slika 27. Zavisnost aktivnosti imobilizata od količine imobilizovane zidne invertaze

Na grafiku (slika 27) se vidi da sa povećanjem količine enzima u imobilizatu raste i njegova aktivnost do vrednosti 150 mg/mL, kada aktivnost imobilizata više ne raste sa povećanjem količine enzima, nego se opaža blagi pad aktivnosti. Kod imobilizata sa najmanjom količinom invertaze opaža se značajna međusobna razlika u aktivnosti, odnosno veća aktivnost je u imobilizatima sa većom količinom enzima (prve tri tačke na slici 27), dok se sa daljim povećanjem količine enzima opažaju manje promene u aktivnosti imobilizata. Visoka koncentracija enzima u imobilizatu nije uvek preduslov za njegovu veliku aktivnost, što je u ovom slučaju posledica difuzionih ograničenja. Molekuli enzima unutar čestice obično ostaju nedostupni supstratu, jer ga molekuli enzima iz spoljašnjih slojeva imobilizata prevode u proizvod brže nego što on difunduje do molekula enzima u središtu čestice. Tako, aktivnost enzima iz unutrašnjeg dela imobilizata ne učestvuje u ukupnoj aktivnosti imobilizata. Na osnovu rezultata dobijenih u ovom eksperimentu za optimalnu količinu zidne invertaze u alginatnom imobilizatu izabrana je koncentracija od 100 mg zidne invertaze/mL smeše za imobilizaciju. Imobilizacijom ove količine enzima dobijen je imobilizat aktivnosti 1400 IU/g. Izabrana koncentracija zidne invertaze je u isto vreme i ekonomski najisplativija, jer se sa povećanjem količine enzima za 50% (150 mg/mL) dobija imobilizat svega 10% aktivniji.

Najveći problem kod imobilizacije enzima zarobljavanjem je njegovo curenje iz čestica imobilizata u okolni rastvor (9). Međutim, u rastvorima kalcijum-hlorida u koje je izlivena smeša alginata i zidne invertaze, kao i u ostalim rastvorima korišćenim za očvršćavanje i ispitivanje dobijenih imobilizata, nije detektovana invertazna aktivnost. Na

osnovu toga možemo reći da je prinos ove imobilizacije 100%, odnosno sva dodata količina zidne invertaze je i imobilizovana u kuglicama kalcijum-alginata, a nema ni naknadnog curenja enzima. Osim ovog načina za izražavanje prinosa imobilizacije često se on može izraziti i kao prinos enzimske aktivnosti u imobilizatu. Razlika ukupne enzimske aktivnosti dodatog enzima u imobilizat i enzimske aktivnosti dobijenog imobilizata predstavlja prinos enzimske aktivnosti u imobilizatu.

$$Y = \frac{A_i \cdot m}{A_e \cdot V}$$

Y – prinos enzimske aktivnosti u imobilizatu

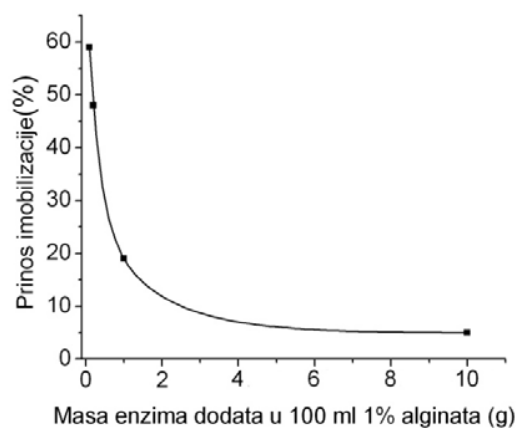
A_i – aktivnost imobilizata po jedinici mase

m – ukupna masa dobijenog imobilizata

A_e – aktivnost slobodnog enzima

V – ukupna zapremina slobodnog enzima korišćenog za imobilizaciju

Na slici 28 prikazana je promena prinosa enzimske aktivnosti sa povećanjem količine enzima u imobilizatu.



Slika 28. Prinos enzimske aktivnosti u imobilizatu CWI-157

Sa povećanjem količine enzima u imobilizatu prinos imobilizacije se smanjuje. Razlog ovome je ograničenje kretanja supstrata i proizvoda kroz kuglicu imobilizata, kao što je napred pomenuto. Imobilizat za koji smo ranije utvrdili da ima optimalnu količinu enzima (100 mg/mL, na ovoj slici predstavljeno kao 10 g/100mL) ima prinos enzimske aktivnosti od 5%. S obzirom na nisku cenu enzima i imobilizata, prinos imobilizacije nije bio odlučujući faktor u izboru optimalnih količina za imobilizaciju, već njegova aktivnost.

Na raspolaganju su nam bile tri vrste alginata: Grindsted[®] alginati FD 155 i 157 i alginat proizvođača Sigma. Napravljena su tri imobilizata sa istom koncentracijom enzima u njima, CWI-S (imobilizat zidne invertaze u Sigma alginatu), CWI-155 (imobilizat zidne invertaze u Grindsted[®] FD 155 alginatu) i CWI-157 (za imobilizat zidne invertaze u Grindsted[®] FD 157 alginatu).

3.3.2 Merenje fizičkih parametara imobilizata zidne invertaze

Dobijeni imobilizati bili su pravilnog loptastog oblika, uniformne veličine i dobrih mehaničkih osobina (nisu menjali oblik pri pritiscima sličnim onima kojima bi bili izloženi u reaktoru). Nakon imobilizacije, masa i zapremina dobijenih imobilizata razlikovale su se od mase i zapremine smeša za imobilizaciju (natrijum-alginata, zidne invertaze i vode). Kako bismo mogli da predvidimo ili napravimo željenu zapreminu ili masu imobilizata urađena su merenja nekih fizičkih parametara dobijenog imobilizata. Masa smeše za imobilizaciju pre iskapavanja u rastvor CaCl₂ je imala masu od 27,75 g. Dobijen je imobilizat mase 12,50 g, 45% od polazne mase (smeše za imobilizaciju). Prečnik kuglica imobilizata je oko 3,0 mm. Zapremina ovog imobilizata merena je na dva načina, zapremina koju imobilizat zauzima u koloni (slegnuta zapremina) i realna (fizička) zapremina kuglica imobilizata. Dobijene vrednosti su 21 mL i 12 mL. Izmerena gustina kuglica imobilizata je 1,10 g/cm³.

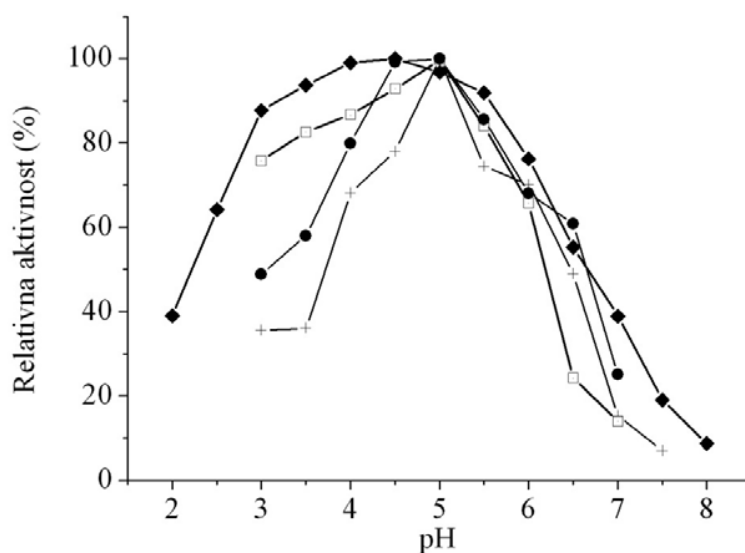
Rezultati dobijeni u ovom eksperimentu su pokazali da se mase i zapremine smeše za imobilizaciju i dobijenog imobilizata razlikuju. Isti parametri izmereni su i imobilizatima sa manjom količinom enzima, a dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 12. Kako je za potencijalnu industrijsku upotrebu imobilizovanih biokatalizatora njihova cena jedna od bitnih karakteristika, izračunata je cena sirovina neophodnih za dobijanje ovog imobilizata i ona iznosi oko 5 \$ po kilogramu (10).

Tabela 12. Fizičke karakteristike imobilizata zidne invertaze u Ca–alginatnim kuglicama

Količina zidne invertaze u imobilizatu (mg/mL)	1	2	10	100
<i>Masa smeše za imobilizaciju (g)</i>	25,275	25,30	25,50	27,75
<i>Masa dobijenog imobilizata (g)</i>	8,64	8,62	7,76	12,49
<i>Slegnuta zapremina imobilizata (mL)</i>	13	13	14	21
<i>Realna zapremina imobilizata (mL)</i>	8	8	8	12
<i>Gustina imobilizata (g/cm³)</i>	1,08	1,07	0,97	1,10
<i>Prečnik kuglica imobilizata (mm)</i>	2,5	2,5	2,5	3,0

3.3.3 Određivanje pH optimuma imobilizata

pH optimumi zidne invertaze imobilizovane u tri vrste alginata određeni su korišćenjem supstrata (saharoze) rastvorenoj u puferima različitih pH vrednosti na temperaturi od 25°C. Oblast pH vrednosti u kojima je ispitivana pH zavisnost aktivnosti imobilizata je bio u opsegu od 2,0 do 8,0 (0,05 M glicin-HCl pufer za pH 2,0 i 2,5; 0,05 M acetatni pufer u opsegu pH vrednosti 3,0–5,6; 0,05 M fosfatni pufer u opsegu pH vrednosti 5,7–8,0). Na slici 29 prikazana je promena aktivnosti svih imobilizata i neimobilizovane zidne invertaze, koja je korišćena za imobilizaciju, u zavisnosti od pH sredine u kojoj je ispitivana enzimaska aktivnost.



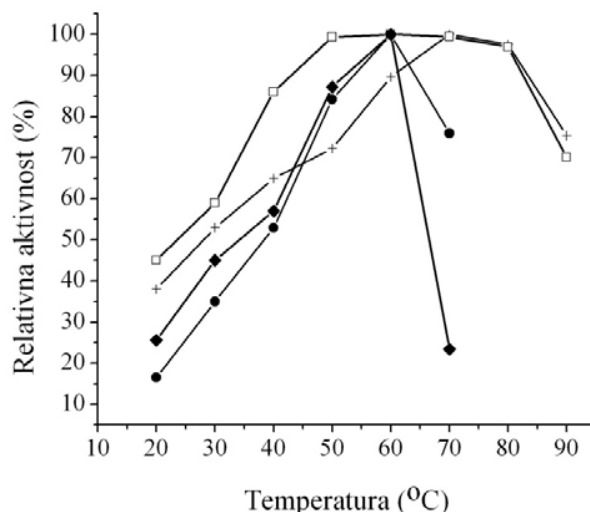
Slika 29. Zavisnost enzimske aktivnosti slobodne i imobilizovane zidne invertaze od pH vrednosti reakcione smeše. (-◆-) CWI, (-●-) CWI-S, (-+-) CWI-155, (-□-) CWI-157

Aktivnost imobilizata je ispitivana na pH vrednostima iznad pH 3,0 jer na nižim pH vrednostima dolazi do kisele hidrolize saharoze, pa ova pH oblast nije od značaja za industrijsku upotrebu imobilizata. Sa slike 29 se vidi da je pH optimum imobilizata zidne invertaze u Ca-alginatu pomeren ka višim vrednostima, pa je pH optimum u slučaju CWI-155 i CWI-157 imobilizata 5,0, a CWI-S u opsegu pH vrednosti od 4,5 do 5,0. Pomeranje pH optimuma kod imobilizata u odnosu na slobodan enzim je veoma čest slučaj i najčešće je posledica naelektrisanja na nosaču koji lokalno menja pH sredinu u svojoj okolini, pa mikrookolina imobilizata ima različitu pH vrednost u odnosu na okolni rastvor kome merimo

pH (35, 102, 103). Dobijena vrednost pH optimuma za CWI razlikuje se od vrednosti dobijene u prethodnom eksperimentu (slika 20), što je posledica korišćenja različitih sojeva kvasca (različitih proizvođača) u ova dva eksperimenta.

3.3.4 Određivanje temperaturnog optimuma imobilizata

Temperaturni optimum zidne invertaze i njenih imobilizata određen je merenjem enzimске aktivnosti na različitim temperaturama (20–90°C). Na slici 30 je prikazana ova zavisnost.



Slika 30. Zavisnost enzimске aktivnosti slobodne i imobilizovane zidne invertaze od temperature reakcione smeše. (-♦-) CWI, (-●-) CWI-S, (-+-) CWI-155, (-□-) CWI-157

Temperaturni optimumi slobodne zidne invertaze i CWI-S imobilizata su isti (60°C), dok je temperaturni optimum ostala dva imobilizata nešto drugačiji. CWI-155 ima maksimalnu aktivnost na temperaturama između 70 i 80°C, dok CWI-157 imobilizat ima temperaturni optimum u širokom temperaturnom opsegu od 50 do 80°C. Dobijene vrednosti temperaturnog optimuma u skladu su sa ranije publikovanim vrednostima za neimobilizovanu i imobilizovanu rastvornu invertazu i cele ćelije kvasca (23, 24, 33, 49, 61, 63, 65), kao i razlike za 5–10°C u temperaturnom optimumu slobodnog i imobilizovanog biokatalizatora (23, 24, 33, 37, 49, 61, 63–65). Kako je u ovom eksperimentu pokazano da je CWI-S imobilizat najneotporniji prema višim temperaturama, a pored toga i cena ovog matriksa je veća od cena ostalih, on nije korišćen u daljim eksperimentima.

3.3.5 Određivanje aktivacione energije i K_M i V_{max} vrednosti imobilizata

Aktivaciona energija imobilizovane i slobodne zidne invertaze određena je na osnovu aktivnosti ova dva enzima na različitim temperaturama (poglavlje 3.2.5).

Dobijene vrednosti aktivacione energije slobodne i imobilizovane invertaze prikazane su u tabeli 13. Promena energije aktivacije najčešće ukazuje na prisutna difuziona ograničenja u čestici imobilizata, ali i konformacione promene u enzimu nastale pri njegovoj imobilizaciji (104). Manja aktivaciona energija imobilizata u poređenju sa slobodnim enzimom je poznata pojava (18, 59, 66, 105) i predstavlja jedan od pokazatelja veće temperaturne stabilnosti imobilizata u poređenju sa rastvornim enzimom (95).

Michaelis-Menten-ova konstanta i brzina reakcije, rastvorne i zidne invertaze određene su korišćenjem saharoze kao supstrata u opsegu koncentracija od 1 do 200 mM. Dobijeni podaci obrađeni su nelinearnom regresijom GraphPad Prism 5.0 programom i prikazani su u tabeli 13.

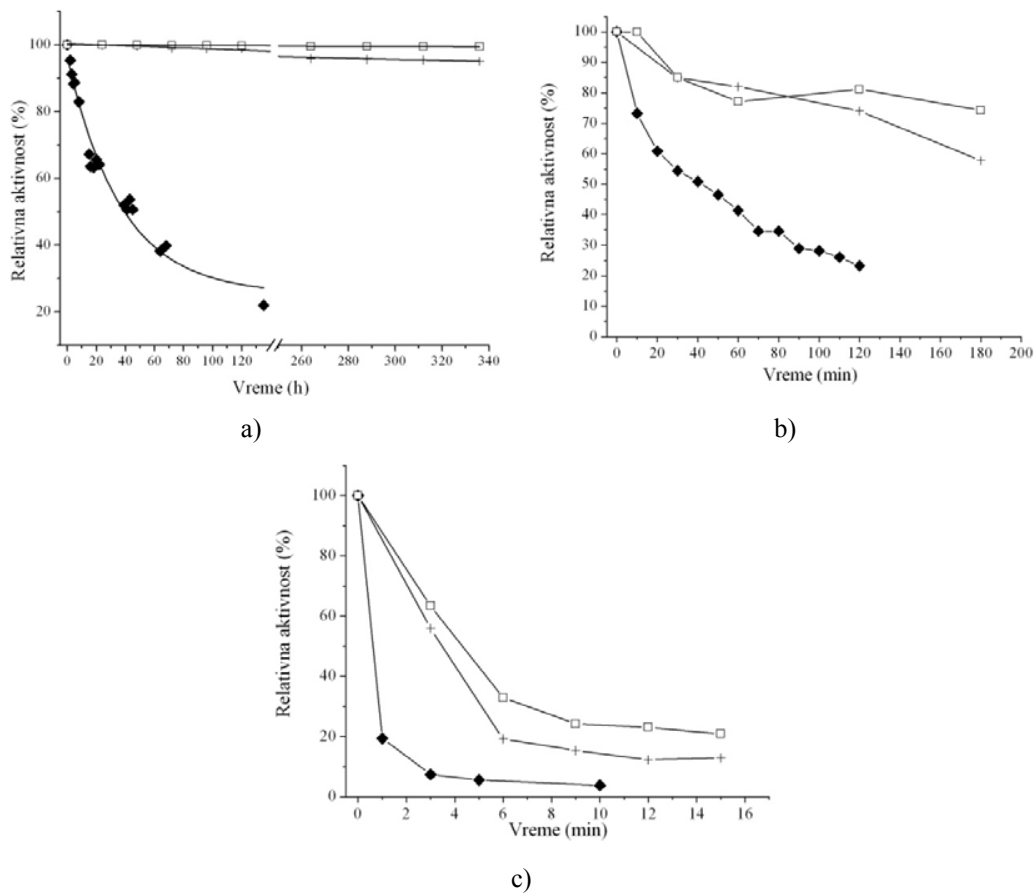
Tabela 13. Kinetički parametri za slobodnu i imobilizovanu zidnu invertazu

	CWI	CWI-157	CWI-S	CWI-155
E_a (kJ/mol)	32	25	45	21
K_M (mM)	28,4	72	/	/
V_{max} (mM/min)	4,5	0,42	/	/

Slične vrednosti kinetičkih parametara dobili su i drugi autori (9, 103). Manja V_{max} vrednost imobilizata u odnosu na slobodan enzim posledica je difuzionih ograničenja u kuglicama imobilizata (38, 59, 60, 93).

3.3.6 Određivanje temperaturne stabilnosti imobilizata

Temperaturna stabilnost imobilizata CWI-155 i CWI-157 ispitivana je na temperaturama 50, 60 i 70°C. Da bi se promena u temperaturnoj stabilnosti imobilizata u odnosu na slobodan enzim lakše uočila, istovremeno je posmatrana i temperaturna stabilnost slobodne zidne invertaze koja je korišćena za imobilizaciju. Imobilizati i slobodna zidna invertaza su inkubirani na svakoj temperaturi određeno vreme (340 h na 50°C, 180 min na 60°C i 15 min na 70°C), nakon čega su ohlađeni na sobnu temperaturu, na kojoj je i merena njihova aktivnost. Na slici 31 je prikazana promena aktivnosti imobilizata i zidne invertaze tokom inkubacije na tri različite temperature.



Slika 31. Temperaturna stabilnost imobilizata zidne invertaze u alginatu na a) 50°C, b) 60°C i c) 70°C. (-♦-) CWI, (-+-) CWI-155, (-□-) CWI-157

Razlike u temperaturnoj stabilnosti imobilizovane i slobodne zidne invertaze se jasno vide na sve tri temperature. Nakon 135 sati inkubacije na 50°C zidna invertaza zadržava samo 22% početne aktivnosti, dok za isto vreme nema promene u aktivnosti oba imobilizata. Tek nakon 336 sati ili 14 dana inkubacije na 50°C opaža se mali pad aktivnosti jednog od imobilizata, CWI-155 zadržava 95% svoje početne aktivnosti, dok CWI-157 i dalje zadržava 100% svoje aktivnosti.

Inkubacija na temperaturi od 60°C takođe je pokazala značajnu stabilnost imobilizovanog u odnosu na slobodni enzim. Nakon 120 sati inkubacije zidna invertaza zadržava 23% svoje početne aktivnosti, dok CWI-155 za isto vreme inkubacije ostaje aktivan sa 74%, a CWI-157 sa čak 81% početne aktivnosti. Imobilizati su inkubirani duže da bi eventualna razlika u njihovim temperaturnim stabilnostima bila bolje uočena, pa nakon 180 sati (7,5 dana) CWI-155 ima 58%, a CWI-157 74% vrednosti svojih početnih aktivnosti.

Temperatura od 70°C bila je dovoljno visoka za denaturaciju i dezaktivaciju slobodne zidne invertaze koja nakon samo 3 minuta ostaje aktivna 7,5%, a nakon 10 minuta inkubacije ostaje sa samo 4% početne aktivnosti. Inkubacija imobilizata je trajala nešto duže, pa nakon 10 minuta CWI-155 zadržava 12%, a CWI-157 23% početne aktivnosti.

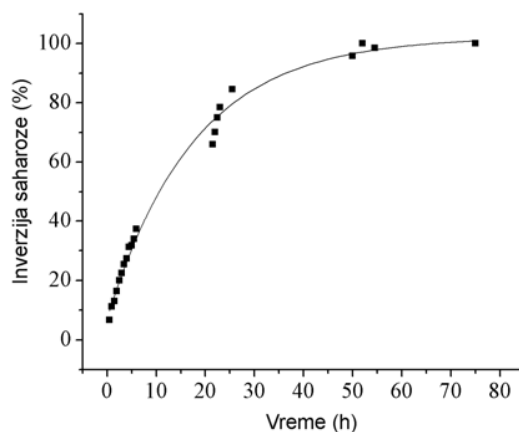
Temperaturna stabilnost imobilizovanog enzima je jedna od bitnih karakteristika biokatalizatora u razmatranju njegove ekonomičnosti i potencijalne industrijske primene. Kako je cilj imobilizacije izolovane zidne invertaze bila upotreba dobijenog imobilizata u industrijskoj proizvodnji invertnog šećera, dobijeni rezultat je veoma značajan. Kako se sa slike 31 vidi dobijeni imobilizati su temperaturno stabilniji od slobodne zidne invertaze, ali se i među sobom razlikuju u temperaturnoj stabilnosti, što je primećeno i ranije poređenjem slobodnih i imobilizovanih ćelija kvasca *S. cerevisiae* (18, 23, 37, 49, 64). Imobilizat CWI-157 je pokazao veću temperaturnu stabilnost od imobilizata CWI-155 na svim ispitivanim temperaturama, a naročito je značajan podatak da ovaj imobilizat zidne invertaze ne gubi aktivnost nakon 14 dana inkubacije na temperaturi od 50°C. Ako uzmemo u obzir da je i njegov temperaturni optimum na istoj temperaturi, upotreba ovog imobilizata u proizvodnji invertnog šećera bi bila vrlo ekonomična, pa je u daljim eksperimentima, značajnim za potencijalnu industrijsku upotrebu, korišćen samo ovaj imobilizat.

3.3.7 Testiranje operativne stabilnosti imobilizata u šaržnom reaktoru

Enzimska karakterizacija imobilizata je neophodna, ali ne i dovoljna za opis imobilizovanog biokatalizatora potencijalno upotrebljivog u industriji. Njegova karakterizacija u šaržnom reaktoru u uslovima sličnim industrijskim je za ovu vrstu biokatalizatora veoma značajna. Operativna stabilnost biokatalizatora predstavlja njegovu stabilnost u većem broju ponavljajućih ciklusa identičnog šaržnog reaktora.

Da bi smo potvrdili mogućnost upotrebe dobijenog imobilizata u procesu proizvodnje invertnog šećera i dobili realne parametre za ove svrhe, ispitali smo produkciju ovog imobilizata i operativnu stabilnost u šaržnom reaktoru.

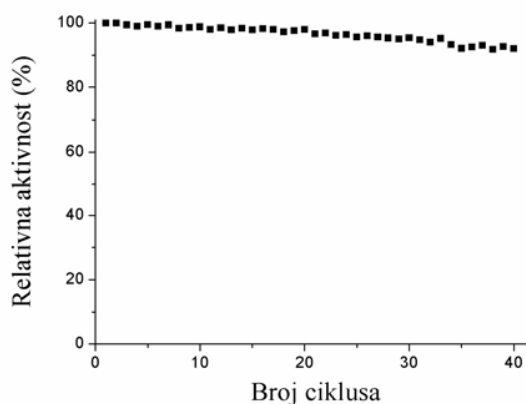
U prvom šaržnom reaktoru praćena je produkcija invertnog šećera imobilizovanom zidnom invertazom u Ca-alginatnim kuglicama tokom vremena. Da bi uslovi produkcije bili što sličniji industrijskim korišćen je 70% rastvor saharoze. Rastvoru supstrata zapremine od 50 mL dodato je 10 g imobilizata. Reaktor je termostatiran sve vreme na 50°C u vodenom termostatu uz mešanje. Na slici 32 se vidi povećanje količine invertnog šećera tokom vremena u jednom šaržnom reaktoru.



Slika 32. Hidroliza 70% rastvora saharoze u šaržnom reaktoru korišćenjem imobilizata CWI-157.

U prvih 35 sati procenat inverzije se menja brže i dostiže oko 85% konverzije saharoze. Nakon prvih 35 sati promena količine invertnog šećera je daleko sporija, pa se totalna konverzija postiže nakon 55 sati kontinualnog rada šaržnog reaktora. Rezultati dobijeni u ovom eksperimentu su bolji (konverzija saharoze je brža) u poređenju sa publikovanim rezultatima dobijenim u sličnim eksperimentima korišćenjem rastvorne invertaze imobilizovane u kalcijum-alginatnom hidrogelu (9, 66).

Operativna stabilnost imobilizata testirana je u 40 ponavljajućih ciklusa u šaržnom reaktoru na 50°C uz kontinualno mešanje. U ovom eksperimentu korišćen je 60% rastvor saharoze.



Slika 33. Operativna stabilnost imobilizata u ponavljajućem šaržnom reaktoru

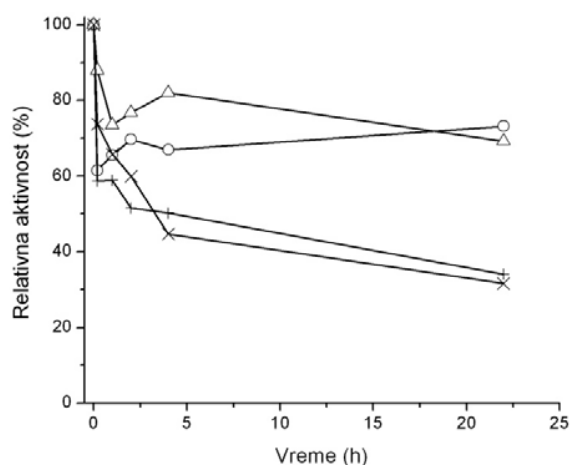
Svaki ciklus je trajao 60 minuta, nakon čega je imobilizat odvojen, ispran i dodata je nova količina saharoze. Na osnovu promene procenta inverzije izračunata je aktivnost imobilizata CWI-157. Sa slike 33 se vidi da je pad aktivnosti i nakon 40 ponavljajućih ciklusa minimalan i nakon 40-tog ciklusa aktivnost imobilizata je bila 92% od početne aktivnosti. Sa grafika prikazanog na slici 33 je ekstrapolacijom izračunat poluživot imobilizata, pri datim eksperimentalnim uslovima, i iznosi 260 ciklusa. Operativna stabilnost ovog imobilizata veća je od ranije publikovane vrednosti za operativnu stabilnost celih ćelija kvasca imobilizovanih u Ca-alginatu, čija aktivnost pada na 80% nakon 16 ciklusa rada (48), dok kod našeg imobilizata za isti broj ciklusa nema promene početne aktivnosti. Velika operativna stabilnost imobilizovanog enzima je veoma bitna za njegovu upotrebu u industriji (35).

3.4 Hemijski modifikovana zidna invertaza

3.4.1 Uticaj različitih modifikatora i vremena reakcije modifikacije na enzimsku aktivnost invertaze

Cilj hemijske modifikacije zidne invertaze je bio da se pronađu modifikatori koji povećavaju termostabilnost enzima. Za modifikacije su korišćeni reagensi kojima je modifikovan ili proteinski ili šećerni deo enzima. Za modifikaciju proteinskog dela korišćeni su formaldehid (FA), glutaraldehid (GA) i bifunkcionalni imidoestar dimetil-suberimidat (DMS). Za modifikaciju šećernog dela enzima korišćen je natrijum-perjodat (PI).

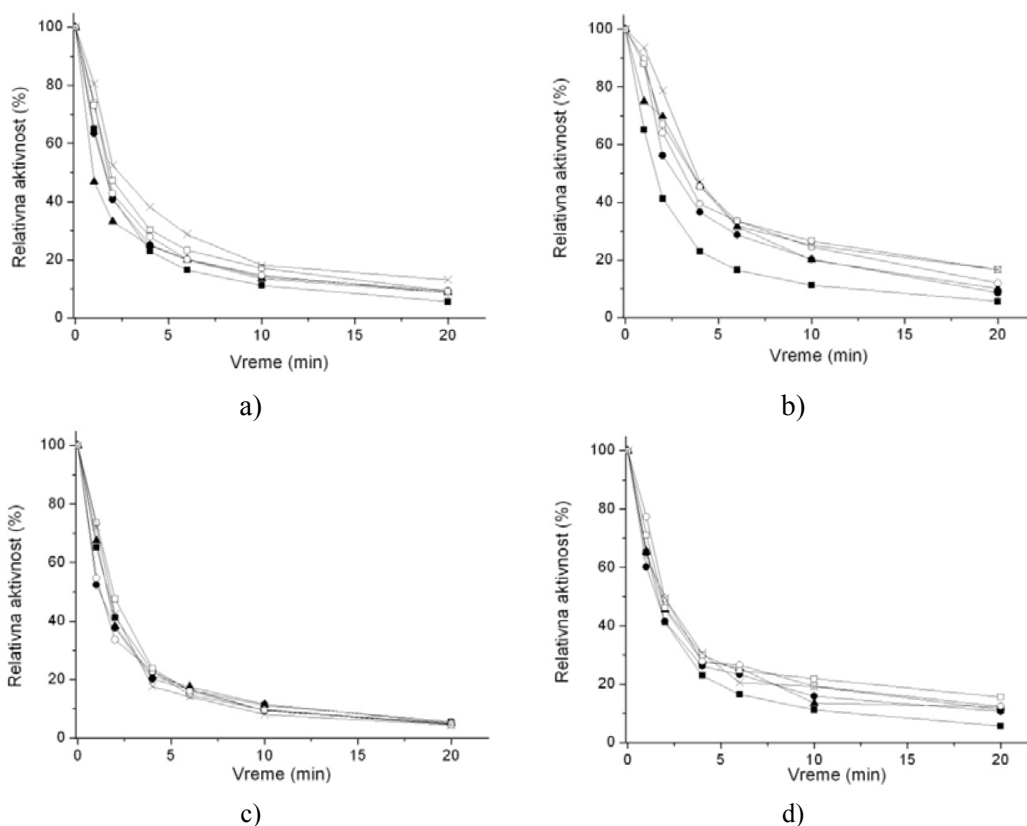
Zidna invertaza modifikovana je jedinjenjima koja reaguju sa amino-grupom (FA, GA i DMS) u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,2 i natrijum-perjodatom, koji modifikuje njen šećerni deo u 50 mM acetatnom puferu pH 4,5. Reakcije modifikacije enzima odvijale su se u konstantnim reakcionim uslovima tokom određenog vremena. Modifikati su nakon završene reakcije modifikacije tretirani 0,1 M etanolaminom na pH 7,0, kako bi sve reaktivne grupe bile „ugašene”. Svi modifikati su dodatno ispirani puferom i dalje analizirani. Tokom modifikacije zidne invertaze praćena je promena aktivnosti.



Slika 34. Promena aktivnosti zidne invertaze tokom reakcije modifikacije. (-o-) zidna invertaza modifikovana sa GA, (-+-) zidna invertaza modifikovana sa FA, (-△-) zidna invertaza modifikovana sa DMS, (-x-) zidna invertaza modifikovana sa PI

Na slici 34 prikazana je promena aktivnosti zidne invertaze tokom reakcija modifikacije. Najveći pad aktivnosti tokom reakcije sa FA primećen je na samom početku reakcije. Nakon 12 minuta modifikat je imao 60% početne aktivnosti, a u narednih 5 sati je izgubio dodatnih 10% aktivnosti. Nakon 22 časa modifikacije formaldehidom, zidna invertaza je zadržala 34% početne aktivnosti. U reakciji modifikacije sa GA takođe se opaža veći pad aktivnosti u prvim minutima reakcije, ali ovako modifikovana zidna invertaza nakon 5 časova reakcije zadržava 67% početne aktivnosti; a nakon 22 časa opaža se blagi pad aktivnosti. Promena aktivnosti zidne invertaze u reakciji sa DMS je najmanja i ovaj modifikat i nakon 22 časa modifikacije zadržava 70% početne aktivnosti. U reakciji modifikacije perjodatom zidna invertaza u prva 4 sata reakcije gubi aktivnost konstantnom brzinom i nakon 4 sata zadržava 45% početne aktivnosti, a nakon 22 sata ostaje aktivna sa 22% od svoje početne aktivnosti.

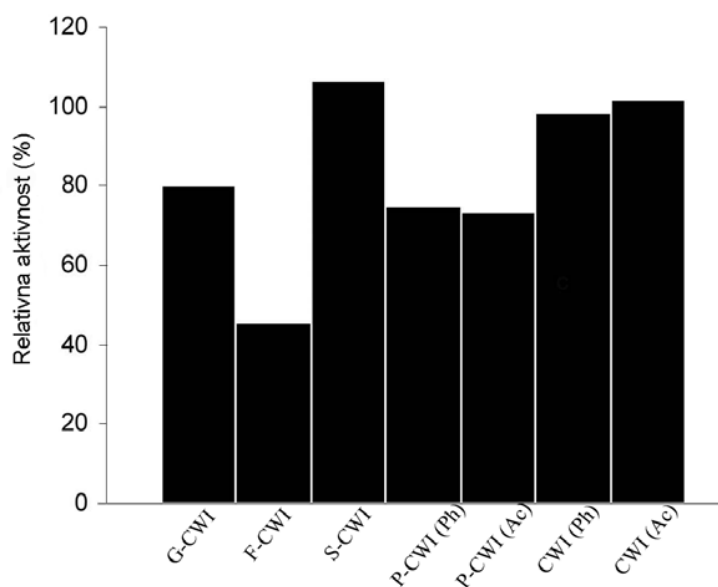
Kako je cilj hemijske modifikacije zidne invertaze bio da se poboljša stabilnost enzima, svim modifikatima koji su dobijeni u reakcijama sa različitim modifikatorima, pri različitim vremenima trajanja reakcije testirana je temperaturna stabilnost na 70°C, na kojoj se razlika u stabilnosti najbrže i najlakše uočava. Modifikati su inkubirani u termostatu na 70°C i merena im je promena enzimske aktivnosti nakon različitog vremena inkubacije. Na slici 35 prikazane su promene enzimske aktivnosti svih dobijenih modifikata.



Slika 35. Temperaturna stabilnost hemijski modifikovane zidne invertaze različitim reagensima za modifikaciju u različitim vremenima trajanja reakcije modifikacije. a) zidna invertaza modifikovana sa GA, b) zidna invertaza modifikovana sa FA, c) zidna invertaza modifikovana sa DMS, d) zidna invertaza modifikovana sa PI. (-■-) kontrola, (-●-) 0,2 h modifikacije, (-▲-) 1 h modifikacije, (-○-) 2 h modifikacije, (-□-) 4 h modifikacije, (-×-) 22 h modifikacije

U ovom eksperimentu kao kontrola je korišćena nativna zidna invertaza koja je sve vreme tretirana kao i modifikati (mućkana na šejeru, ispirana puferom itd.), bez dodatka reagenasa za modifikaciju. Sa slike 35 se vidi da je temperaturna stabilnost modifikata u većini slučajeva veća od temperaturene stabilnosti kontrole (106). Temperaturna stabilnost modifikata se razlikuje u zavisnosti od toga koliko je trajala reakcija modifikacije i sa slike 35 a–d se može videti da se sa dužim vremenom trajanja reakcije povećava stabilnost modifikata, što se najlakše uočava na primeru modifikacije formaldehidom. Kako razlika u temperaturnoj stabilnosti između modifikata kod kojih je reakcija trajala 4 i 22 h nije značajna, kao pogodno vreme za modifikacije zidne invertaze je izabrano vreme od 4 h, pa su za dalji rad korišćeni modifikati dobijeni nakon 4 h reakcije.

Modifikatima i kontrolama je izmerena enzimaska aktivnost kako bi se uporedili i eventualno odbacili loši derivati ukoliko bi invertazna aktivnost bila značajnije smanjena (slika 36).



Slika 36. Promena enzimске aktivnosti zidne invertaze nakon hemijske modifikacije

Sa slike 36 se vidi da je aktivnost native i perjodatom modifikovane zidne invertaze tretirane u puferima različite pH vrednosti slična. Kao 100% enzimске aktivnosti na slici 36 uzeta je srednja vrednost enzimskih aktivnosti nemodifikovane zidne invertaze (kontrola) tretirane fosfatnim puferom pH 7,2 (CWI (Ph)) i acetatnim puferom pH 4,5 (CWI (Ac)). Najmanju aktivnost (46%) ima zidna invertaza modifikovana formaldehidom (F-CWI), a najveću (7% više od nemodifikovane) zidna invertaza modifikovana dimetil-suberimidatom (S-CWI). Aktivnosti zidne invertaze modifikovane perjodatom u acetatnom puferu pH 4,5 (P-CWI (Ac)) i fosfatnom puferu pH 7,2 (P-CWI (Ph)) su slične; 73% i 75%, dok je zidna invertaza modifikovana glutaraldehidom (G-CWI) zadržala 80% početne aktivnosti. Slični rezultati dobijeni su i perjodatom modifikacijom rastvorne invertaze (106).

3.4.2 Infracrvena (IC) spektroskopija nativne i hemijski modifikovane zidne invertaze

Hemijska modifikacija zidne invertaze menja neke od funkcionalnih grupa u enzimskom preparatu, pa je jedna od mogućnosti potvrde ovih promena poređenje izgleda IC spektara modifikovanog i nemodifikovanog enzima.

Snimljeni su IC spektri nativne i hemijski modifikovanih zidnih invertaza. Dobijeni spektri su dati u prilogu. Nema značajnih razlika u izgledu IC spektara nativne i hemijski modifikovanih zidnih invertaza. Razlog ovome može biti mali broj hemijski modifikovanih funkcionalnih grupa u ćelijskom zidu kvasca *S. cerevisiae*.

3.4.3 Mikroanaliza nativne i hemijski modifikovane zidne invertaze

Mikroanalizom različitih uzoraka određuje se procentni sadržaj pojedinih elemenata (N, C, H i S) u njemu. Ova metoda se prvenstveno koristi za karakterizaciju organskih molekula, pa se procentni sadržaj kiseonika dobija iz razlike dobijenog procentnog sadržaja navedenih elemenata do 100%.

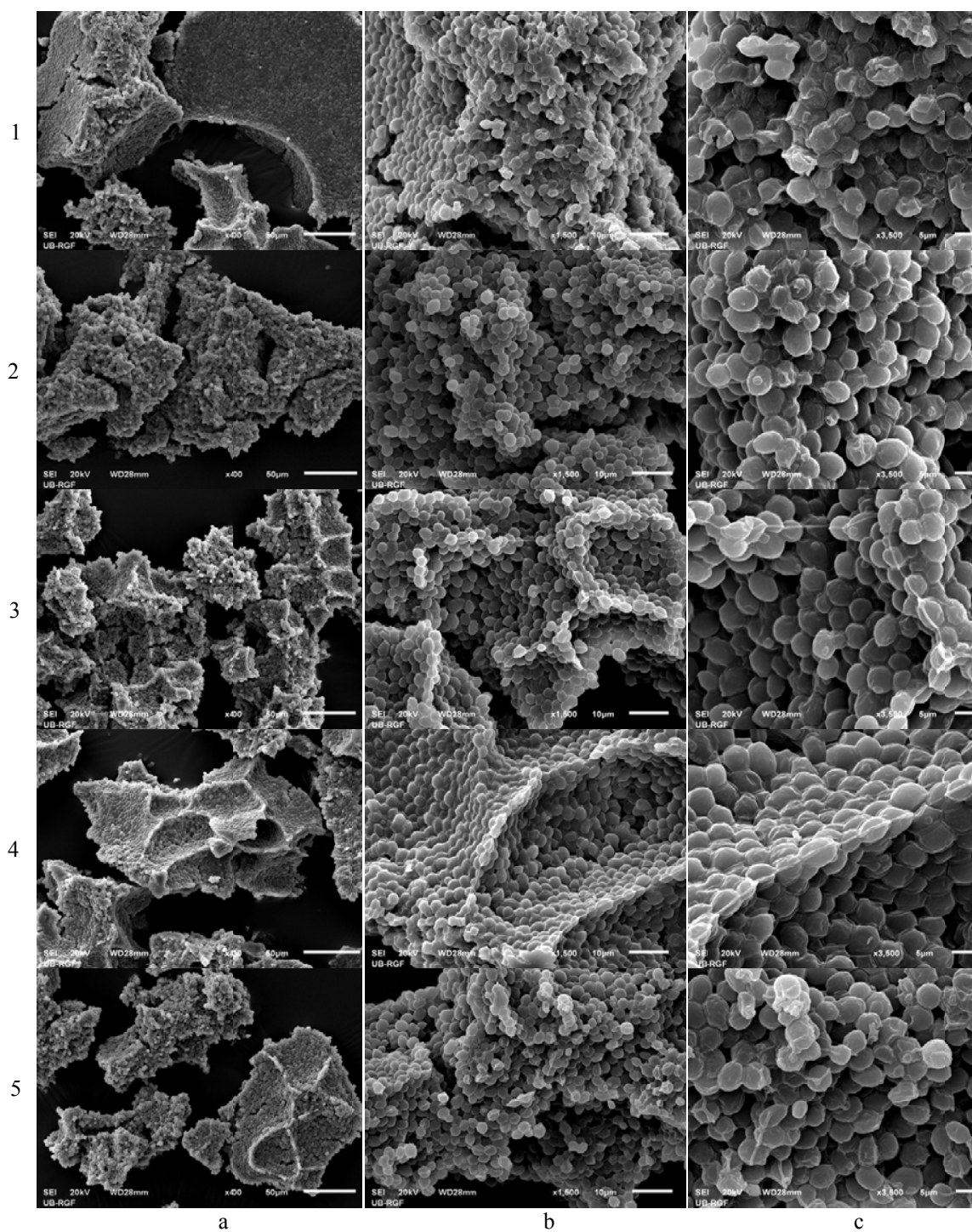
Mikroanalizom nemodifikovane zidne invertaze i njenih hemijskih modifikata dobijen je prosečan sadržaj nekih elemenata u ćelijskom zidu. Razlike u procentnom sadržaju azota su očekivane iako su male. U tabeli 14 prikazani su rezultati dobijeni mikroanalizom nativnog i modifikovanih ćelijskih zidova kvasca *S. cerevisiae*.

Tabela 14. Procentni sadržaj nekih elemenata u ćelijskom zidu kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

	<i>N (%)</i>	<i>C (%)</i>	<i>H (%)</i>	<i>S (%)</i>
<i>CWI</i>	9,48	47,19	7,35	0,43
<i>GA-CWI</i>	9,68	48,44	7,54	0,34
<i>FA-CWI</i>	9,82	48,32	7,54	0,38
<i>DMS-CWI</i>	9,62	48,56	7,84	0,35
<i>PI-CWI</i>	9,16	47,39	7,27	0,52

Ovaj rezultat potvrđuje prethodnu konstataciju da je količina hemijski modifikovanih grupa mala, odnosno korišćene metode su nedovoljno osetljive za nastale promene.

3.4.4 Površina izolovane zidne invertaze i njenih modifikata

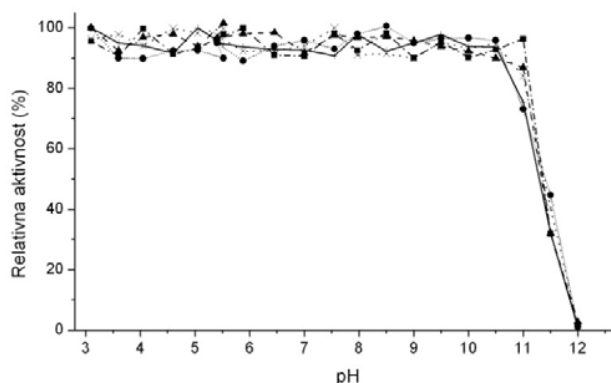


Slika 37. Zidna invertaza i njeni modifikati dobijeni SEM metodom na uvećanju a – 400×, b – 1500× i c – 3500×. 1 – CWI, 2 – G-CWI, 3 – F-CWI, 4 – S-CWI, 5 – P-CWI.

Površina izolovane zidne invertaze kvasca *S. cerevisiae* i njenih modifikata snimljena je skenirajućim elektronskim mikroskopom u više različitih uvećanja. Na slici 37 prikazane su površine ispitivanih biokatalizatora, sa koje se može uočiti razlika između modifikovane i nativne zidne invertaze.

3.4.5 Određivanje pH stabilnosti hemijski modifikovane zidne invertaze

Kako su hemijskom modifikacijom zidne invertaze promenjene neke funkcionalne grupe neophodno je proveriti da li je prilikom hemijske modifikacije promenjena pH stabilnost modifikata u poređenju sa nativnim enzimom. Svi modifikati i nativan enzim su inkubirani u puferima različite pH vrednosti 150 minuta, nakon čega su merene enzimske aktivnosti dodatkom supstrata rastvorenog u 50 mM acetatnom puferu pH 4,5, pa je finalno pH u kome je merena enzimska aktivnost bilo optimalno za invertazu (pH 4,5).



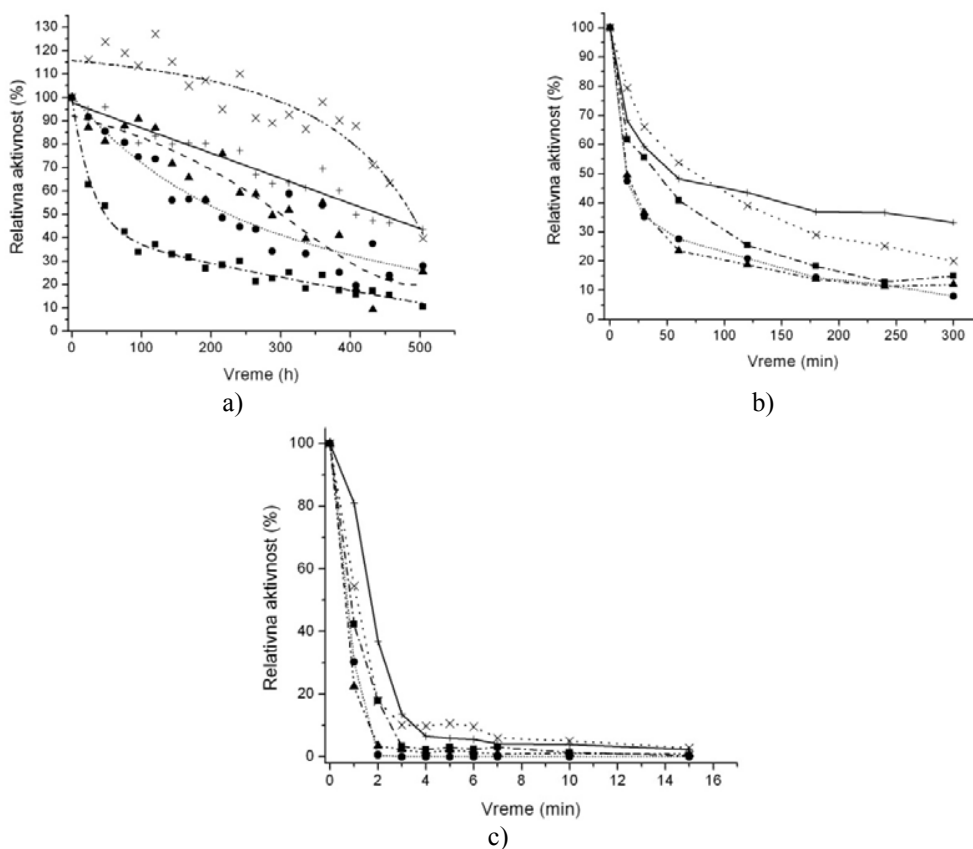
Slika 38. pH stabilnost nativne i hemijski modifikovane zidne invertaze. (-●-) CWI, (-+-) G-CWI, (-x-) F-CWI, (-▲-) S-CWI, (-■-) P-CWI.

Sa slike 38 se vidi da je pH stabilnost svih modifikata, kao i nemođifikovane zidne invertaze ista. Svi enzimi su u ispitivanim eksperimentalnim uslovima stabilni u opsegu pH vrednosti od 3,0 do 11,0. Na pH vrednosti od 11,5 zadržana početna aktivnost svih modifikata i kontrole je od 30% do 44%, dok na pH vrednosti 12 ni jedan od enzima nije stabilan, ali su i dalje aktivni, u tragovima (1–2%). Zidna invertaza modifikovana dimetil-suberimidatom pokazala je veću pH stabilnost od rastvorne invertaze modifikovane istim modifikatorom (80). Kako nema nikakve razlike u pH stabilnosti modifikata, u poređenju sa nativnom zidnom invertazom, može se zaključiti da do hemijskih modifikacija nije došlo u aktivnom centru enzima ili njegovoj okolini, što je važno za enzimsku aktivnost.

3.4.6 Određivanje temperaturne stabilnosti hemijski modifikovane zidne invertaze

Hemijskom modifikacijom enzima poboljšava se njihova stabilnost jer je smanjena fleksibilnost molekula. Temperaturna stabilnost je jedna od bitnih karakteristika imobilizovane zidne invertaze jer se produkcija invertnog šećera odvija na povišenoj temperaturi, pa se sa povećanjem temperaturne stabilnosti enzima povećava njegov poluživot, a time i cena proizvoda, invertnog šećera.

Temperaturna stabilnost hemijski modifikovanih zidnih invertaza praćena je na tri različite temperature. Da bi se uporedila promena u temperaturnoj stabilnosti u isto vreme je praćena i temperaturna stabilnost kontrole. Cilj ovog eksperimenta je bio da se izabere najbolji modifikator, odnosno temperaturno najstabilniji modifikat zidne invertaze kvasca *S. cerevisiae*. Na slici 39 a–c prikazana je promena enzimske aktivnosti svih modifikata i natiivne zidne invertaze.



Slika 39. Temperaturna stabilnost hemijski modifikovanih i natiivne zidne invertaze na temperaturama a) 50°C, b) 60°C i c) 70°C. (-●-) CWI, (-○-) G-CWI, (-×-) F-CWI, (-▲-) S-CWI, (-■-) P-CWI.

Temperaturne stabilnosti dobijenih modifikata kao i nemodifikovane zidne invertaze testirane su inkubacijom bez prisustva supstrata na 50°C tokom 21 dan (500 sati), na 60°C 5 sati i na 70°C 15 minuta. Tokom ovih perioda u određenim vremenskim intervalima su uzimani uzorci svih enzima i testirana je njihova invertazna aktivnost.

Tokom inkubacije nativne i modifikovane zidne invertaze na temperaturi od 50°C enzimaska aktivnost svih uzoraka je opadala (slika 39a). Izuzetak od ovog pada aktivnosti tokom inkubacije je FA modifikat zidne invertaze kome tokom prvih 50 sati aktivnost raste, narednih 100 sati ostaje nepromenjena, a zatim naglo pada, pa nakon 500 sati pada na 40% od početne aktivnosti. Zidna invertaza modifikovana glutaraldehydom je pokazala najbolju temperaturnu stabilnost. Nakon 500 sati inkubacije i zadržanih 45% početne aktivnosti kod ovog imobilizata se opaža i linearni pad aktivnosti tokom vremena, pa je lako pretpostaviti njegovu aktivnost i nakon dužeg vremena inkubacije na 50°C. Najmanju temperaturnu stabilnost u ovom eksperimentu ima PI modifikat. Pad na 50% od početne aktivnosti modifikati i nemodifikovana zidna invertaza dostižu u različitom vremenu, PI-CWI nakon 46 sati, CWI nakon 222 sata, DMS-CWI nakon 303 sata, GA-CWI nakon 440 sati i FA-CWI nakon 488 sati.

Nagli pad aktivnosti GA i FA modifikata opaža se u prva 4 časa inkubacije na 60°C, kada GA modifikat zadržava 40%, a FA modifikat čak 54%, dok nemodifikovana zidna invertaza ima 22% početne aktivnosti. U narednih 44 časa, pad invertazne aktivnosti je znatno manji, pa nakon 48 časova, na ovoj temperaturi GA modifikat zadržava 22%, a FA modifikat 24%. Pri ovim uslovima nativna (nemodifikovana) zidna invertaza ima 12% početne aktivnosti. U slučaju PI modifikata opaža se nešto bolja termička stabilnost, u poređenju sa nemodifikovanom zidnom invertazom, u prvih 7 časova inkubacije (slika 39b). Ipak, pri dužoj inkubaciji na 60°C, aktivnost DMS i PI modifikata opada brže nego aktivnost nemodifikovane invertaze, pa nakon 48 časova zadržavaju isti procenat početne aktivnosti (12%). Termostabilnost DMS modifikata na svim ispitivanim temperaturama je ista ili neznatno bolja od temperaturne stabilnosti nemodifikovane invertaze.

Tokom inkubacije na 70°C najveći procenat početne aktivnosti (16,8%) zadržava formaldehydni modifikat, dok glutaraldehydni modifikat zadržava 13% početne aktivnosti nakon 20 minuta inkubacije (slika 35). Ipak, zidna invertaza sa modifikovanim amino-grupama aldehydima pokazuje bolju temperaturnu stabilnost od nemodifikovane. Pri inkubaciji na 70°C nemodifikovane, PI i DMS modifikovane zidne invertaze primećuje se i nagli pad aktivnosti tokom prva 4 minuta, što je kod GA modifikata manje, a kod FA modifikata najmanje izraženo.

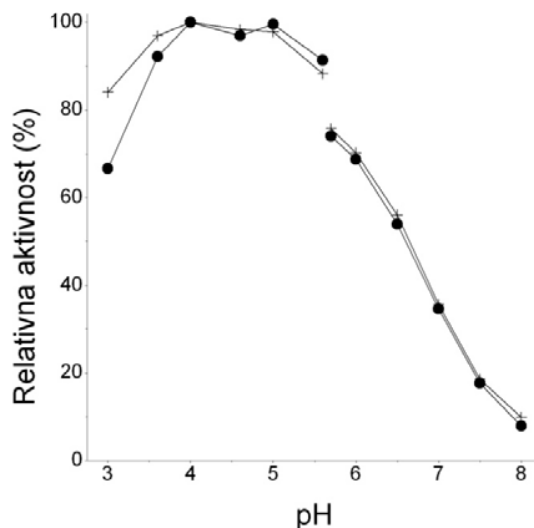
Nijedan modifikat, kao ni zidna invertaza, nakon 2 dana inkubacije na 60°C i 21 dan na 50°C (bez prisustva supstrata) nisu potpuno izgubili aktivnost. Sa slike 39a–c se vidi da su FA i GA modifikati pokazali na svim temperaturama značajno veću temperaturnu stabilnost. Kako je početna aktivnost glutaraldehidnog modifikata zidne invertaze skoro dva puta veća od početne aktivnosti njenog formaldehidnog modifikata, kao najbolji reagens za hemijsku modifikaciju zidne invertaze sa ciljem temperaturne stabilizacije enzima izabran je glutaraldehid. Isti zaključak može se dobiti i računanjem njihove produktivnosti na temperaturi od 50°C (površina ispod grafika, slika 39a) (67). Produktivnost FA modifikata je manja od produktivnosti GA modifikata jer aktivnost ovog biokatalizatora naglo pada nakon 400-tog sata inkubacije.

3.4.7 Određivanje temperaturnog i pH optimuma zidne invertaze hemijski modifikovane glutaraldehidom

Kako je prethodnim eksperimentima utvrđeno da je glutaraldehidom hemijski modifikovana zidna invertaza temperaturno stabilnija od nativne, a razlika u njihovoj aktivnosti je mala (oko 20%) u daljem radu je korišćena glutaraldehidom modifikovana zidna invertaza. Prednost korišćenja glutaraldehida nad formaldehidom je pokazana i kod imobilizacije celih ćelija kvasca, odnosno dobijena je veća invertazna aktivnost imobilizata korišćenjem glutaraldehida (31).

Dobijenoj modifikovanoj zidnoj invertazi bilo je potrebno proveriti da li je reakcijom hemijske modifikacije promenjen pH ili temperaturni optimum.

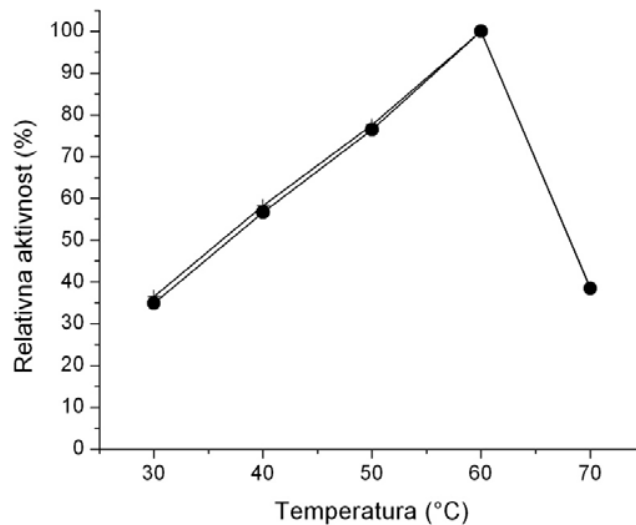
pH optimum modifikovane i nativne zidne invertaze ispitivan je u opsegu pH vrednosti od 3,0 do 8,0. Supstrat je rastvoren u 50 mM acetatnim puferima pH vrednosti od 3,0 do 5,5 i fosfatnim puferima pH vrednosti od 5,5 do 8,0. Zavisnost enzimske aktivnosti od pH vrednosti reakcione smeše prikazan je na slici 40.



Slika 40. pH optimum nativne i glutaralhidom modifikovane zidne invertaze. (-●-) kontrola, (-+-) zidna invertaza modifikovana glutaralhidom

pH optimumi oba enzima su slični. Hemijski modifikovana zidna invertaza ima nešto veću aktivnost u kiseljoj oblasti pH vrednosti od nativne, dok se na pH vrednostima većim od 4,0 ponašaju identično. pH optimum obe vrste zidne invertaze je u opsegu pH vrednosti od 4,0 do 5,0. Vrednost pH optimuma nemodifikovane zidne invertaze razlikuje se od rezultata prikazanih na slici 20, jer su u ovim eksperimentima korišćeni različiti sojevi kvasca *S. cerevisiae* trenutno dostupni na tržištu. Na pH vrednostima iznad 6,0 enzimaska aktivnost oba biokatalizatora naglo pada. Ipak na pH vrednosti 6,5 obe vrste invertaze zadržavaju 55% svoje početne aktivnosti, slično kao i rastvorna invertaza modifikovana hitozanom (107).

Temperaturni optimum nemodifikovane i hemijski modifikovane zidne invertaze ispitivan je na temperaturama od 30°C do 70°C (slika 41). Pre dodatka enzima, rastvor supstrata je inkubiran na određenoj temperaturi kako bi u trenutku početka enzimske reakcije supstrat bio zagrejan na željenu temperaturu.



Slika 41. Temperaturni optimum native i glutaralhidom modifikovane zidne invertaze. (-●-) kontrola, (-○-) zidna invertaza modifikovana glutaralhidom

Promena enzimske aktivnosti native i modifikovane zidne invertaze sa promenom temperature je identična. Sa povećanjem temperature od 30°C do 60°C aktivnost oba enzima raste i na 60°C dostiže maksimalnu vrednost (temperaturni optimum), dok sa daljim porastom temperature enzimska aktivnost oba enzima naglo pada, do 30% aktivnosti.

Iz rezultata dobijenih u ovim eksperimentima može se zaključiti da pri modifikaciji zidne invertaze nije došlo do hemijskih promena na delu enzima koji učestvuje u reakciji hidrolize saharoze.

3.5 Imobilizacija glutaralhidom modifikovane zidne invertaze

Kako je prethodnim eksperimentima (poglavlje 3.3.1) optimizovana imobilizacija zidne invertaze u kalcijum-alginatu, rezultati koji su dobijeni korišćeni su i za imobilizaciju hemijski modifikovane zidne invertaze. Smeša za imobilizaciju sadržala je 100 mg/mL suvog enzima i 1% natrijum-alginat. Iskapavana je u 2% rastvor CaCl_2 uz konstantno mešanje. Dobijeni imobilizat je bio pravilnog sfernog oblika. Aktivnost dobijenog imobilizata je bila 91 U/g, što je 20% veća aktivnost u poređenju sa imobilizovanom nativnom zidnom invertazom u kalcijum-alginatnim kuglicama.

Dobijeni imobilizat nije detaljnije karakterisan, jer kao što je pokazano u prethodnim eksperimentima glutaralhidom modifikovana zidna invertaza ima isti pH i temperaturni

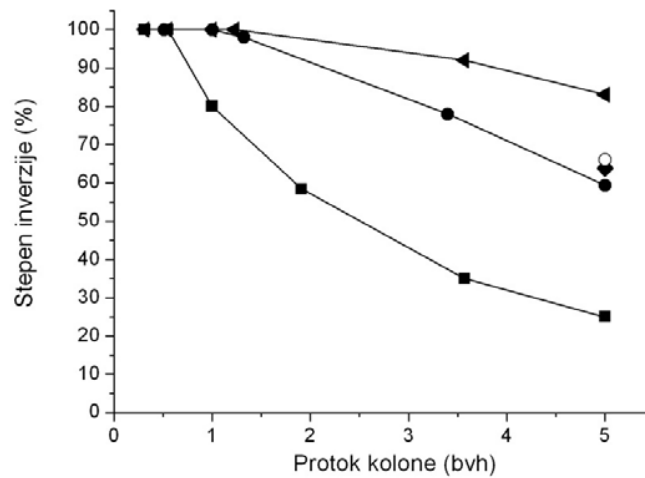
optimum (poglavlje 3.4.7) i pH stabilnost kao i nemodifikovana zidna invertaza (poglavlje 3.4.5). Takođe, imobilizacijom zidne invertaze u alginatnim kuglicama pokazano je da nema značajne promene ovih parametara pri imobilizaciji (poglavlja 3.3.3 i 3.3.4). Jedina razlika koja je u prethodnim eksperimentima pokazana je da je temperaturna stabilnost enzima značajno poboljšana njegovom imobilizacijom u kalcijum-alginatnom hidrogelu (poglavlje 3.3.6), kao i hemijskom modifikacijom zidne invertaze glutaraldehydom (poglavlje 3.4.6).

3.5.1 Produkcija invertnog šećera u kontinualnom reaktoru sa napakovanim slojem

Karakterizacija imobilizata napravljenih sa ciljem za korišćenje u industrijskim procesima preko enzimske aktivnosti, pH i temperaturnog optimuma, kinetičkih konstanti, temperaturne stabilnosti i sl. je potrebna, ali ne i dovoljna za ovaj tip biokatalizatora. Njihova operativna stabilnost u uslovima sličnim industrijskim i produktivnost su parametri koji su neophodni za karakterizaciju. Ove vrednosti zavise i od tipa i veličine korišćenog enzimskog reaktora, pa je uz dobijene brojne vrednosti neophodno dati i detaljan opis i karakteristike korišćenog reaktora i uslova rada.

U ovom eksperimentu je korišćena glutaraldehydom modifikovana zidna invertaza imobilizovana u kalcijum-alginatnom hidrogelu sa ciljem upotrebe u proizvodnji invertnog šećera. Prethodno napravljeni imobilizat native invertaze u alginatu je okarakterisan u realnim industrijskim uslovima (modifikovanim za laboratorijsku skalu) u šaržnom reaktoru (poglavlje 3.3.7). Kako je dobijeni imobilizat modifikovane zidne invertaze temperaturno stabilniji od prethodno dobijenog korišćenjem nemodifikovane zidne invertaze, što se može zaključiti na osnovu svih prethodno opisanih rezultata, njegova potencijalna industrijska upotreba je testirana u uslovima približnijim industrijskim (od prethodno opisanog šaržnog reaktora, poglavlje 3.3.7), na većoj skali i u kontinualnom reaktoru sa napakovanim slojem biokatalizatora.

Produkcija invertnog šećera ispitivana je korišćenjem 60% i 67% rastvora saharoze. Ovi rastvori saharoze prvobitno nisu dodatno pufferisani. Produkcija reaktora je testirana i u 60% rastvorima saharoze pufferisanim acetatnim pufferom na različitim pH vrednostima. Temperature reaktora i supstrata pre ulaska u reaktor su bile 45°C. Meren je stepen inverzije saharoze korišćenjem različitih rastvora supstrata i menjanjem protoka supstrata kroz reaktor. Na slici 42 su prikazani dobijeni rezultati koji predstavljaju srednje vrednosti dobijene nakon deset merenja u različitim vremenskim intervalima.



Slika 42. Produkcija invertnog šećera u koloni pri različitim brzinama protoka supstrata, različitih koncentracija i pH vrednosti. (■) 67% rastvor saharoze pH 7,8; (●) 60% rastvor saharoze pH 7,8; (◆) 60% rastvor saharoze pH 6,8; (○) 60% rastvor saharoze pH 6,2; (◄) 60% pH rastvor saharoze 4,9

Stepen inverzije saharoze je procenat invertovane saharoze u rastvoru koji izlazi iz enzimskog reaktora, u ovom slučaju kolone sa napakovanim slojem biokatalizatora. Količina invertovane saharoze, odnosno redukujućih šećera merena je pomoću DNS reagensa.

Kolona zapremine 460 mL napunjena je sa 280 mL imobilizata, prethodno ekvilibrisanog u rastvoru saharoze odgovarajuće koncentracije. Nakon ekvibracije imobilizata u rastvorima saharoze visoke koncentracije dolazi do smanjenja njihove zapremine. Ovu osobinu imobilizovanih biokatalizatora u Ca-alginatu drugi autori najčešće izbegavaju da naglase (9, 66). Kao što se vidi sa slike 42 stepen inverzije rastvora saharoze zavisi od brzine protoka supstrata kroz kolonu (smanjuje se za povećanjem brzine protoka kolone), ali i od pH vrednosti rastvora supstrata.

Promena stepena inverzije sa promenom brzine protoka supstrata praćena je korišćenjem 67% rastvora saharoze, bez dodatka pufera. Pri protoku od 0,5 bv/h (*eng bed volumes per hour* – zapremina kolone na sat) rastvora saharoze koncentracije 67% procenat invertovanog supstrata je 100%, dok sa povećanjem protoka na 1 bv/h procenat inverzije pada na 80%, a pri protoku od 5 bv/h na 25%.

Promena stepena inverzije sa promenom brzine protoka kolone praćena je i u 60% rastvoru saharoze pH 5,1. Pri povećanju brzine protoka kolone sa 0,5 do 1,2 bv/h nema promena stepena inverzije koja je 100% pri svim protocima. Sa povećanjem protoka na 3,6 bv/h procenat inverzije pada na 92%, a na 5 bv/h je 83%.

Uticaj promene pH vrednosti rastvora supstrata praćen je promenom pH vrednosti 60% rastvora saharoze dodatkom acetatnog pufera. Sa smanjenjem pH vrednosti rastvora za jednu pH jedinicu (sa 7,8 na 6,8) inverzija raste sa 60% na 64%. Daljim smanjenjem pH vrednosti na 6,2 procenat inverzije raste na 66%, a na pH 4,9 na 83%, pri konstantnom protoku.

Dobijene rezultate nije moguće porediti sa do sada publikovanim, jer su u literaturi korišćeni razblaženi rastvori saharoze (51, 66). U nekim od publikacija naglašena je upotreba visoko koncentrovanih rastvora saharoze od 80% (m/v), što je takođe manje koncentrovan rastvor od korišćenog u ovom eksperimentu (67% (m/m)). Ukupna produktivnost ovog reaktora tokom 30 dana iznosi 3844 kg invertnog šećera po kg imobilizata. Dobijena vrednost je malo manja od produktivnosti kontinualnog reaktora sa napakovanim slojem celih ćelija kvasca na vuni (47), ali duplo veća od produktivnosti kontinualnog reaktora u kome su korišćene agregirane i umrežene cele ćelije kvasca (84).

3.5.1.1 Karakteristike dobijenog invertnog šećera

Invertni šećer dobijen enzimskom hidrolizom koncentrovanog rastvora saharoze u prethodnom eksperimentu okarakterisan je određivanjem procenta suve materije, pH, provodljivosti i organoleptičkih osobina. Karakteristike dobijenog invertnog šećera upoređene su i sa dva različita uzorka invertnih šećera koji se koriste u konditorskoj industriji u Srbiji i prirodnim medom. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 15.

Tabela 15. Karakteristike različitih uzoraka invertnih šećera

<i>Invertni šećer</i>	<i>Suva masa (°Bx)</i>	<i>pH</i>	<i>Provodljivost (μS/cm)</i>	<i>Boja</i>
<i>Komercijalni 1</i>	80,3	3,40	205	bledo žuta
<i>Komercijalni 2</i>	76,5	6,35	194	jarko žuta
<i>Dobijen u ovom radu</i>	70,3	5,44	16	bez boje
<i>Med</i>	81,2	4,20	120	žuta

Provodljivost oba uzorka komercijalnog invertnog šećera je 10 puta veća od invertnog šećera dobijenog enzimskom hidrolizom, što je posledica prisustva soli. Prisustvo soli u konditorskim proizvodima je nepoželjno jer može izazvati hipertenziju kod konzumenata. Dakle, jedini uzorak invertnog šećera koji ne bi mogao da izazove ovakve posledice je invertni šećer dobijen u ovom radu, enzimskom hidrolizom saharoze. U uzorku invertnog

šećera komercijalnog 1 izmerena je pH vrednost 3,4 (tabela 15) što je jasan pokazatelj da je proizvod dobijen kiselom hidrolizom saharoze, dok je u uzorku 2 pH vrednost viša. Povećanje pH vrednosti je verovatno postignuto dodavanjem rastvora neke baze nakon kisele hidrolize. U uzorku 2 je verovatno korišćena manja količina kiseline u poređenju sa uzorkom 1, ali je reakciona smeša grejana na višoj temperaturi, pa je boja dobijenog invertnog šećera tamnija. Iz rezultata prikazanih u tabeli 15 i svega navedenog jasno se može zaključiti da je invertni šećer dobijen u reaktoru sa napakovanim slojem (imobilizovane glutaraldehidom modifikovane zidne invertaze) sa zdravstvenog i organoleptičkog aspekta bolji za korišćenje u industriji hrane u odnosu na komercijalne.

3.6 Zaključci

- ✓ izolovana je zidna invertaza iz ćelijskog zida kvasca *S. cerevisiae* sa aktivnošću od 10 ± 2 IU/mg;
- ✓ pokazana je i veća temperaturna stabilnost zidne invertaze od rastvorne i veća stabilnost u rastvorima tipičnih enzimskih denaturanata do visokih koncentracija;
- ✓ pokazano je da nema veće razlike u pH i temperaturnim optimumima, kao i kinetičkim parametrima zidne i rastvorne invertaze;
- ✓ zidna invertaza je uspešno imobilizovana u Ca-alginatnom hidrogelu, sa prinosom imobilizacije od 100%;
- ✓ dobijeni imobilizat imao je bolju temperaturnu stabilnost od slobodnog enzima;
- ✓ dobijeni imobilizat pokazao je dobru operativnu stabilnost u visoko koncentrovanim rastvorima saharoze;
- ✓ hemijskom modifikacijom zidne invertaze dobijeni su temperaturno stabilniji biokatalizatori;
- ✓ pokazano je da pri hemijskoj modifikaciji zidne invertaze nije došlo do promene pH stabilnosti, temperaturnog i pH optimuma;
- ✓ uspešno je imobilizovan temperaturno najstabilniji modifikat zidne invertaze (G-CWI) u Ca-alginatnom hidrogelu, sa prinosom imobilizacije od 100%;
- ✓ dobijeni imobilizat imao je 20% veću aktivnost u odnosu na imobilizat nemodifikovane zidne invertaze u istom matriksu;
- ✓ produktivnost dobijenog imobilizata testirana u kontinualnom reaktoru sa napakovanim slojem imala je visoku vrednost od 3844 kg invertnog šećera po kg imobilizata;
- ✓ dobijeni imobilizat modifikovane zidne invertaze glutaraldehydom pokazao se kao vrlo ekonomičan biokatalizator za proizvodnju invertnog šećera;
- ✓ dobijeni invertni šećer je vrhunskog kvaliteta.

4. Eksperimentalni deo

Spisak korišćene opreme

Analitička vaga Mettler

Aparat za elementalnu analizu Elementar Vario EL III

Centrifuga, Beckman J6-MI

Centrifuga, miniSpin plus, Eppendorf

FT Infracrveni spektrometar Perkin Elmer 1725X

Konduktometar WTW LF521, inoLab

Magnetna mešalica IKA Mag Rec G

Mikrotalasna pećnica, Samsung

pH metar Checker sa kombinovanom elektrodom

Protočni vodeni termostat Multitemp 2209 LKB, Bromma

Refraktometar, ABE

Skenirajući elektronski mikroskop JSM-6610LV, Jeol

Spektrofotometar UV-VIS-NIR PU 8630 Philips

Tehnička vaga Mettler PE 3600

Vibraciona mešalica Tehnica EV -100

4.1 Izolovanje invertaze iz ćelija kvasca *S. cerevisiae*

4.1.1 Liza ćelija kvasca *S. cerevisiae*

Za ovaj eksperiment korišćen je sveži pekarski kvasac. Posuda u kojoj se odvija liza kvasca neophodno je da ima mogućnost hermetičkog zatvaranja. Dodatkom toluola (3% od mase kvasca) i anhidrovanog natrijum–karbonata (1% od mase kvasca) počinje ćelijska liza pekarskog kvasca. Smeša se termostatira na 40°C 4 h.

Nakon ovih 4 h autoliza ćelija se prekida centrifugiranjem smeše na 3000 rpm 20 minuta na 4°C, posle čega se supernatant odvaja, a preostali talog dalje tretira.

4.1.2 Izolovanje zidne invertaze

Talog dobijen iz suspenzije ćelija kvasca se koristi za dobijanje zidne invertaze. Talog se ispira tri puta sa što većom zapreminom fiziološkog rastvora (minimum 5 puta većom zapreminom pri svakom ispiranju), a zatim 2–3 puta destilovanom vodom. Pri svakom ispiranju suspenduje se celokupna količina taloga, centrifugiranjem se odvaja talog od supernatanta na 3000 rpm 20 minuta na 4°C. Nakon ispiranja zidne invertaze i uklanjanja svih u vodi rastvornih komponenti, preparat je neophodno odmastiti i osušiti. U ovom koraku korišćen je aceton. Neophodno je isprati celokupni preparat zidne invertaze bar tri puta acetonom, a u svakom koraku zapremina acetona bi trebalo da bude veća od zapremine taloga. Između dva ispiranja preparata acetonom, talog se od rastvora odvaja centrifugiranjem na 3000 rpm 15 minuta na 4°C. Preparat se zatim suši na vazduhu na sobnoj temperaturi, raspoređen na filter papiru u tankom sloju. Nakon sušenja dobijen preparat zidne invertaze je u obliku praha.

4.2 Karakterizacija rastvorne i zidne invertaze

4.2.1 Određivanje enzimske aktivnosti zidne invertaze

Enzimska aktivnost rastvorne i zidne invertaze određivana je istim enzimskim testom. Supstrat korišćen u ovom testu je 0,3 M rastvor saharoze u 50 mM acetatnom puferu pH 4,5. 5,13 g saharoze je rastvoreno u 50 mL 50 mM pufera (45 mL vode i 5 mL 500 mM acetatnog pufera pH 4,5 –pufer za enzimski test).

Reagens za zaustavljanje reakcije između enzima i supstrata u ovom testu je DNS reagens, čiji je sastav dat u tabeli 16. Komponente reagensa bi trebalo rastvarati redom kako su u tabeli navedene.

Tabela 16. DNS reagens

<i>NaOH</i>	<i>16 g</i>
<i>KNa – tartarat</i>	<i>300 g</i>
<i>3,5 – dinitrosalicilna kiselina (DNS)</i>	<i>10 g</i>
<i>Voda</i>	<i>do 1 L</i>

Izolovani prah zidne invertaze neophodno je suspendovati u vodi bar pola sata pre rada. Optimalna koncentracija suspenzije zidne invertaze za enzimski test je 1 mg/mL, dok razblaženje rastvorne invertaze tokom prečišćavanja zavisi od njene čistoće. Suspenziju ćelija kvasca tokom i nakon lize potrebno je razblažiti 500 puta da bi dobijena koncentracija redukujućih šećera ušla u opseg standardne prave. Ovako dobijeni rastvori invertaze se koriste u enzimskom testu.

U 50 μ L rastvora enzima dodaje se 450 μ L rastvora supstrata i nakon 3 minuta reakcija se prekida dodatkom 500 μ L DNS reagensa. Za svako merenje enzimske aktivnosti napravljena je i odgovarajuća slepa proba. Slepa proba je po sastavu ista kao i reakciona smeša, samo je redosled dodavanja komponenti drugačiji (redom: 50 μ L enzima, 500 μ L DNS reagensa, 450 μ L supstrata) u odnosu na reakcionu smešu u kojoj merimo enzimsku aktivnost (redom: 50 μ L enzima, 450 μ L supstrata, 3 minuta, 500 μ L DNS reagensa). Reakcionu smešu nakon prekida reakcije dodatkom stop reagensa, kao i slepu probu neophodno je termostatirati 5 minuta na ključalom vodenom kupatilu kako bi se reakcija redukujućih šećera i DNS-a ubrzala, a zatim ohladiti na sobnu temperaturu. Nakon razblaživanja svih reakcionih smeša dodatkom 4 mL vode i homogenizovanja rastvora,

koncentracija redukujućih šećera određuje se merenjem apsorbancije na 540 nm. Na osnovu količine dobijenih redukujućih šećera u vremenu trajanja reakcije izračunava se enzimska aktivnost.

Standardna serija rastvora redukujućih šećera obuhvata sedam rastvora različitih koncentracija: 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mM u odnosu na glukozu i u odnosu na fruktozu, odnosno predstavljaju rastvore invertnog šećera ovih koncentracija. Pomešani sa DNS reagensom u odnosu 1:1, rastvori standardne serije inkubirani su na ključalom vodenom kupatilu 5 minuta, a nakon hlađenja na sobnu temperaturu dodato je 4 mL vode, nakon čega im je izmerena apsorbancija na 540 nm. Konstruisana je standardna kriva kao zavisnost apsorbancije rastvora standardne serije od koncentracije invertnog šećera u njima.

4.2.2 Određivanje pH optimuma zidne i rastvorne invertaze

Za određivanje pH optimuma rastvorne i zidne invertaze enzimski test rađen je na različitim pH vrednostima reakcione smeše. Napravljena je serija rastvora 50 mM pufera različitih pH vrednosti. Za pH vrednosti od 3,0 do 5,5 korišćeni su acetatni puferi (0,143 mL konc. AcOH razblaženo do 50 mL vodom i pH je podešeno korišćenjem 1 M HCl ili 1 M NaOH). Za pH vrednosti od 5,5 do 8,0 korišćeni su fosfatni puferi (0,45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ rastvoreno u 50 mL i pH je podešeno).

U svakom od pufera rastvoren je supstrat (saharoza) u koncentraciji $0,3 \text{ mol/dm}^3$ i sa dobijenom serijom supstrata različite pH vrednosti urađen je enzimski test rastvorne i zidne invertaze (poglavlje 4.2.1). Kako bi se izbegle varijacije enzimске aktivnosti zbog promene sobne temperature tokom dana, rastvori supstrata i reakcione smeše tokom rada su termostatirani u vodenom kupatilu na temperaturi od 25°C .

4.2.3 Određivanje temperaturnog optimuma zidne i rastvorne invertaze

Za određivanje temperaturnog optimuma rastvorne i zidne invertaze urađena je serija enzimskih testova na različitim temperaturama. Supstrat (0,3 M rastvor saharoze u 50 mM acetatnom puferu pH 4,5) je pola sata pre reakcije termostatiran na svakoj temperaturi na kojoj je raden enzimski test. Enzimске aktivnosti rastvorne i zidne invertaze merene su na temperaturama od 20 do 75°C enzimskim testom opisanim u poglavlju 4.2.1. Za termostatiranje supstrata pre reakcije i reakcione smeše korišćen je vodeni termostat.

4.2.4 Određivanje temperaturne stabilnosti zidne i rastvorne invertaze

Temperaturna stabilnost rastvorne i zidne invertaze praćena je na dve različite temperature, 60 i 70°C. Razblažena rastvorna invertaza za enzimski test i suspenzija zidne invertaze koncentracije 2 mg/mL razlivena su u 18, odnosno 6 ependorf kiveta po 200 μ L i termostatirane na 60°C, odnosno 70°C. Po jedna ependorf kiveta rastvorne i zidne invertaze vađena je iz termostata nakon 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 121, 136, 150, 182, 211, 240, 300, 360 i 420 minuta (u eksperimentu određivanja temperaturne stabilnosti enzima na 60°C) ili 1, 3, 5, 7,5, 10 i 15 minuta (u eksperimentu određivanja temperaturne stabilnosti enzima na 70°C) i odmah ohlađena pomoću hladnog bloka. Ovako dobijenim uzorcima enzima određena je enzimska aktivnost kao što je opisano u poglavlju 4.2.1. Enzimska aktivnost u vremenu 0 na grafiku je izmerena enzimskom aktivnošću iz istog rastvora, odnosno suspenzije zidne invertaze korišćene u ovom eksperimentu.

4.2.5 Određivanje K_M i V_{max} vrednosti i energije aktivacije zidne i rastvorne invertaze

Korišćeno je devet različitih koncentracija saharoze u 50 mM acetatnom puferu pH 4,5 – 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 i 800 mM. Opsezi koncentracija koje su upotrebljene u izračunavanju ovih konstanti označene su u poglavlju 3.2.5. Enzimski testovi su rađeni kao što je opisano u poglavlju 4.2.1, s tim što su korišćene koncentracije supstrata gore navedene i u enzimskim testovima sa najnižim koncentracijama supstrata (1 i 5 mM) vreme trajanja reakcije je produženo na 5 minuta.

4.2.6 Stabilnost zidne i rastvorne invertaze

4.2.6.1 Stabilnost invertaze u rastvorima uree

Rastvorna i zidna invertaza inkubirane su u rastvorima uree različitih koncentracija i u određenim vremenskim intervalima merena im je enzimska aktivnost. Koncentracije rastvora uree pre početka eksperimenta i njihov način pravljenja prikazan je u tabeli 17.

Tabela 17. Količine dodatih komponenti u eksperimentu inhibicije invertazne aktivnosti ureom

<i>Finalna koncentracija uree u eksperimentu</i>	<i>Koncentracija rastvora uree (X)</i>	<i>Masa uree</i>	<i>Zapremina rastvora uree koncentracije X</i>
<i>1 M</i>	<i>1,11 M</i>	<i>0,2278 g</i>	<i>3,420 mL</i>
<i>2 M</i>	<i>2,22 M</i>	<i>0,57685 g</i>	<i>4,331 mL</i>
<i>3 M</i>	<i>3,33 M</i>	<i>0,6148 g</i>	<i>3,074 mL</i>
<i>4 M</i>	<i>4,44 M</i>	<i>0,7803 g</i>	<i>2,929 mL</i>
<i>5 M</i>	<i>5,56 M</i>	<i>1,0380 g</i>	<i>3,112 mL</i>
<i>6 M</i>	<i>6,67 M</i>	<i>1,27865 g</i>	<i>3,200 mL</i>
<i>7 M</i>	<i>7,78 M</i>	<i>1,7705 g</i>	<i>3,793 mL</i>
<i>8 M</i>	<i>8,89 M</i>	<i>1,6650 g</i>	<i>3,121 mL</i>

U 2,700 mL svakog rastvora uree dodato je po 300 μ L enzima 10 puta koncentrovanijeg od onog koji je korišćen u enzimskim testovima (s obzirom na to da je u prethodnim eksperimentima korišćen rastvor invertaze koji je bilo neophodno razblažiti 1000 puta za enzimski test, ovde je korišćen isti enzim, ali 100 puta razblažen, dok je suspenzija zidne invertaze bila koncentracije 10 mg /mL). Ovako dobijeni rastvori rastvorne i zidne invertaze ostavljeni su na sobnoj temperaturi uz povremeno mešanje i u toku prvih 2 sata uzimani su uzorci od po 200 μ L svakih 20 minuta i merena je njihova invertazna aktivnost. Poslednji uzorci enzima kojima je izmerena invertazna aktivnost uzeti su nakon 22 sata. Enzimski testovi su sa ovim uzorcima enzima rađeni kao što je to opisano u poglavlju 4.2.1. Uzorci enzima uzeti su i odmah nakon mešanja rastvora uree i enzima; njima je odmah određena invertazna aktivnost (početna enzimska aktivnost bez dejstva inhibitora), pa je tokom eksperimenta praćena razlika početnih enzimskih aktivnosti i onih izmerenih u uzorcima uzetim nakon određenog vremenskog perioda.

4.2.6.2 Stabilnost invertaze u metanolu

Rastvorna i zidna invertaza inkubirane su u rastvorima metanola različitih koncentracija i u određenim vremenskim intervalima im je merena enzimska aktivnost. Finalne koncentracije metanola u rastvorima sa enzimima kojima je praćena promena aktivnosti u vremenu bile su 30%, 40% i 50%. U tabeli 18 prikazani su sastojci u svakom eksperimentu. Potrebna količina metanola dodata je na kraju.

Tabela 18. Količine dodatih komponenti u eksperimentu inhibicije invertazne aktivnosti metanolom

<i>Koncentracija metanola</i>	<i>Voda</i>	<i>Enzim</i>	<i>Metanol</i>
30%	2,4 mL	0,4 mL	1,2 mL
40%	2,0 mL	0,4 mL	1,6 mL
50%	1,6 mL	0,4 mL	2,0 mL

Koncentracije enzima date u tabeli 18 su kao i u prethodnom eksperimentu 10 puta veće od koncentracije enzima korišćenih u enzimskim testovima. Ovako dobijeni rastvori rastvorne i zidne invertaze ostavljeni su na sobnoj temperaturi uz povremeno mešanje i u toku prva 2 sata uzimani su uzorci od po 200 μ L svakih 20 minuta i merena je njihova aktivnost. Poslednji uzorci enzima kojima je izmerena invertazna aktivnost uzeti su nakon 22 sata. Enzimski testovi su sa ovim uzorcima enzima rađeni kao što je to opisano i poglavlju 4.2.1. Uzorci enzima uzeti su i odmah nakon mešanja metanola i enzima, njima je odmah određena enzimska aktivnost (početna enzimska aktivnost bez dejstva inhibitora), pa je tokom eksperimenta praćena razlika početnih enzimskih aktivnosti i onih izmerenih u uzorcima uzetim nakon određenog vremenskog perioda.

4.2.6.3 Inhibicija invertaze anilinom, Hg^{2+} i Cu^{2+} jonima

Inhibitorni uticaj anilina, živa(II) i bakar(II) jona ispitivan je u rastvorima različitih koncentracija pomenutih inhibitora invertazne aktivnosti. Napravljeni su rastvori anilina (koncentracije 50 mM u 50 mM acetatnom puferu pH 4,5; rastvoreno je 0,46 mL anilina u 100 mL pufera), živa(II)-hlorida (5 mM rastvor; rastvoreno je 8,75 mg HgCl_2 u 6,44 mL vode) i bakar(II)-sulfata (500 mM rastvor; rastvoreno je 0,6242 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ u 5 mL vode) od kojih su razblaživanjem po potrebi pravljene rastvori manje koncentracije (tabele 19–21).

Tabela 19. Količine dodatih komponenti u eksperimentu inhibicije invertazne aktivnosti anilinom

Koncentracija anilina	Zapremina koncentrovanog rastvora anilina (koncentracija dodatog rastvora)	Zapremina rastvora / suspenzije enzima	Zapremina vode
30 mM	150 μ L (50 mM)	25 μ L	75 μ L
20 mM	100 μ L (50 mM)	25 μ L	125 μ L
10 mM	50 μ L (50 mM)	25 μ L	175 μ L
5 mM	25 μ L (50 mM)	25 μ L	200 μ L
0,5 mM	25 μ L (5 mM)	25 μ L	200 μ L
0,05 mM	25 μ L (0,5 mM)	25 μ L	200 μ L
0 mM (kontrola)	/	25 μ L	225 μ L

Rasvori anilina koncentracije 5 mM i 0,5 mM dobijene su razblaživanjem 50 mM rastvora anilina 50 mM acetatnim puferom pH 4,5, 10 puta (50 μ L 50 mM rastvora do 500 μ L) i 100 puta (50 μ L 5 mM rastvora do 500 μ L).

Tabela 20. Količine dodatih komponenti u eksperimentu inhibicije invertazne aktivnosti HgCl₂ jonom

Koncentracija HgCl ₂ jona	Zapremina koncentrovanog rastvora HgCl ₂ jona (koncentracija dodatog rastvora)	Zapremina rastvora / suspenzije enzima	Zapremina vode
0,5 mM	250 μ L (1 mM)	50 μ L	200 μ L
1×10⁻² mM	50 μ L (0,1 mM)	50 μ L	400 μ L
1×10⁻³ mM	50 μ L (1×10 ⁻² mM)	50 μ L	400 μ L
1×10⁻⁴ mM	50 μ L (1×10 ⁻³ mM)	50 μ L	400 μ L
0 mM (kontrola)	/	50 μ L	450 μ L

Rasvori HgCl₂ jona koncentracije 1, 1×10⁻² i 1×10⁻³ mM dobijene su razblaživanjem 5 mM rastvora 5 puta (100 μ L 5 mM rastvora do 500 μ L), a zatim još 10 puta (50 μ L 1 mM rastvora do 500 μ L) i još 10 puta.

Tabela 21. Količine dodatih komponenti u eksperimentu inhibicije invertazne aktivnosti Cu²⁺ jonom

Koncentracija Cu ²⁺ jona	Zapremina koncentrovanog rastvora Cu ²⁺ jona (koncentracija dodatog rastvora)	Zapremina rastvora / suspenzije enzima	Zapremina vode
1 mM	25 μ L (10 mM)	25 μ L	200 μ L
10 mM	25 μ L (100 mM)	25 μ L	200 μ L
50 mM	25 μ L (500 mM)	25 μ L	200 μ L
100 mM	50 μ L (500 mM)	25 μ L	175 μ L
250 mM	125 μ L (500 mM)	25 μ L	100 μ L
0 mM (kontrola)	/	25 μ L	225 μ L

Rasvori Cu²⁺ jona koncentracije 100 i 10 mM dobijene su razblaživanjem 500 mM rastvora 5 puta (100 μ L 5 mM rastvora do 500 μ L), a zatim još 10 puta (50 μ L 1 mM rastvora do 500 μ L).

Koncentracije enzima korišćene u ovom eksperimentu su iste kao u prethodna dva (10 puta koncentrovaniji od rastvora za određivanje enzimске aktivnosti). Svi gore navedeni rastvori inkubirani su 15 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega im je izmerena invertazna aktivnost kao što je opisano u poglavlju 4.2.1.

4.3 Imobilizacija zidne invertaze

4.3.1 Optimizacija imobilizacije zidne invertaze u kalcijum–alginatnom hidrogelu

Potrebno je pripremiti rastvore 2% natrijum-alginata i suspenzije zidne invertaze nekoliko sati pre imobilizacije, kako bi se sva količina zidne invertaze hidratizovala, a alginata rastvorila. Nakon rastvaranja u vodi obe komponente smeše za imobilizaciju se mešaju u jednakim zapreminama.

Napravljeno je sedam smeša za imobilizaciju sa različitim koncentracijama zidne invertaze. Smeše su sadržale:

<i>Zidna invertaza</i>	<i>Natrijum-alginat</i>	<i>Voda</i>
<i>1 g</i>	<i>0,6 g</i>	<i>do 30 mL</i>
<i>5 g</i>	<i>0,6 g</i>	<i>do 30 mL</i>
<i>10 g</i>	<i>0,6 g</i>	<i>do 30 mL</i>
<i>20 g</i>	<i>0,6 g</i>	<i>do 30 mL</i>
<i>40 g</i>	<i>0,6 g</i>	<i>do 30 mL</i>
<i>60 g</i>	<i>0,6 g</i>	<i>do 30 mL</i>
<i>80 g</i>	<i>0,6 g</i>	<i>do 30 mL</i>

Smeše su dobro homogenizovane i u rastvor CaCl_2 izlivanе u kapima iz šprica sa iglom (prečnik otvora 0,5 mm). Rastvor 2% CaCl_2 zapremine oko 200 mL u kome je smeša za imobilizaciju izlivanа mešan je magnetnom mešalicom. Nakon izlivanja celokupne količine rastvor CaCl_2 je zamenjen novom količinom svežeg.

Enzimska aktivnost imobilizovane zidne invertaze određivana je testom sličnim kao i za određivanje enzimske aktivnosti rastvorne i slobodne zidne invertaze uz male modifikacije. Za merenje enzimske aktivnosti uzimano je 10 kuglica imobilizata čija je masa (prosušenih kuglica na filter papiru) merena na analitičkoj vagi. Ova količina imobilizata dodata je u 5 mL supstrata (0,3 M rastvor saharoze u 50 mM acetatnom puferu pH 4,5). Nakon 5 minuta reakcije uz konstantno mešanje iz reakcione smeše uziman je uzorak od 500 μL i ubrizgavan u epruvetu koja sadrži 500 μL DNS reagensa. Slepa proba za svako merenje bila je smeša 500 μL supstrata i 500 μL DNS reagensa. Ovi rastvori su zatim termostatorirani 5 minuta na ključalom vodenom kupatilu, hlađeni na sobnu temperaturu, razblaživani 5 puta dodatkom 4 mL vode i merena im je apsorbancija na talasnoj dužini od 540 nm.

Enzimaska aktivnost je računata na osnovu nagrađene količine redukujućih šećera za vreme trajanja reakcije, a obračunata na 1 g imobilizata.

Prinos enzimske aktivnosti u imobilizatu izračunat je na osnovu razlike ukupne aktivnosti zidne invertaze dodate u smešu za imobilizaciju i ukupne enzimske aktivnosti celokupne mase dobijenog imobilizata.

4.3.2 Merenje fizičkih parametara imobilizata zidne invertaze

Za ovaj eksperiment napravljene smeše za imobilizaciju sadržale su:

<i>Zidna invertaza</i>	<i>Natrijum-alginat</i>	<i>Voda</i>
25 mg	0,25 g	do 25 mL
50 mg	0,25 g	do 25 mL
250 mg	0,25 g	do 25 mL
2,5 g	0,25 g	do 25 mL

Postupak imobilizacije je identičan opisanom u poglavlju 4.3.1. Za određivanje fizičkih karakteristika imobilizata u svakom koraku eksperimenta su merene finalne mase i zapremine nakon mešanja komponenti i polimerizacije alginata, kao i veličina dobijenih kuglica imobilizata.

Prečnik kuglica imobilizata meren je pomoću milimetarskog papira. Fizička i slegnuta zapremina imobilizata merene su menzutom od 25 mL ili 50 mL. Nakon dodatka celokupne količine imobilizata u menzuru je dodato po 10 mL vode. Na osnovu razlike u zapreminama sadržaja menzure izračunata je realna (fizička) zapremina kuglica imobilizata, a nakon njihovog sleganja sa menzure je očitana slegnuta zapremina imobilizata.

4.3.3 Određivanje pH optimuma imobilizata

pH optimum imobilizovane zidne invertaze određen je na osnovu promene enzimske aktivnosti merene testovima kao što je opisano u poglavlju 4.3.1 korišćenjem supstrata (0,3 M saharoze) rastvorenog u puferima različitih pH vrednosti (od pH 2,00 do 8,00) kao što je opisano u poglavlju 4.2.2.

4.3.4 Određivanje temperaturnog optimuma imobilizata

Temperaturni optimum imobilizovane zidne invertaze određen je na osnovu promene enzimске aktivnosti merene enzimskim testovima kao što je opisano u poglavlju 4.3.1 na različitim temperaturama (od 20 do 90°C) kao što je opisano u poglavlju 4.2.3.

4.3.5 Određivanje aktivacione energije i K_M i V_{max} vrednosti imobilizata

Energija aktivacije izračunata je korišćenjem podataka o enzimskoj aktivnosti imobilizovane i slobodne zidne invertaze na različitim temperaturama iz eksperimenta određivanja temperaturnog optimuma ovih biokatalizatora.

Merenjem enzimskih aktivnosti imobilizovane i slobodne zidne invertaze u reakcijama sa različitim koncentracijama supstrata, a korišćenjem programa GraphPad Prism 5.0 izračunate su vrednosti K_M i V_{max} za ove biokatalizatore. Korišćeno je devet različitih koncentracija saharoze u 50 mM acetatnom puferu pH 4,5 – 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 i 800 mM. Opseg koncentracija koje su upotrebljene u izračunavanju ovih konstanti označene su u poglavlju 3.3.5. Enzimski testovi su rađeni kao što je opisano u poglavlju 4.3.1, s tim što su korišćene koncentracije supstrata gore navedene i u enzimskim testovima sa najnižim koncentracijama supstrata (1 mM i 5 mM) vreme trajanja reakcije je produženo na 5 minuta.

4.3.6 Određivanje temperaturne stabilnosti imobilizata

Temperaturna stabilnost imobilizata zidne invertaze i slobodnog enzima određena je na temperaturama od 50, 60 i 70°C. Izmerena je masa 10 kuglica imobilizata u po 15 epruveta sa zatvaračem za eksperiment na 50°C, 5 vajli za eksperiment na 60°C i 5 vajli za eksperiment na 70°C. U svaku vajlu dodato je po 2,5 mL 50 mM acetatnog pufera pH 4,5. Svi uzorci za određivanje temperaturne stabilnosti na jednoj temperaturi su stavljeni u istom trenutku u termostat prethodno zagrejan na željenu temperaturu i na svakih 20 minuta (50°C), nakon 10, 30, 60, 120 ili 180 minuta (60°C) i 3, 6, 9, 12 ili 15 minuta (70°C) po jedna epruveta je izvađena iz termostata, ohlađena na sobnu temperaturu i svakom uzorku je merena enzimska aktivnost kao što je to opisano u poglavlju 4.3.1, ali dodatkom 2,5 mL 0,6 M rastvora saharoze u 50 mM acetanom puferu pH 4,5.

4.3.7 Testiranje operativne stabilnosti imobilizata u šaržnom reaktoru

Rastvor saharoze koncentracije 70% napravljen je rastvaranjem 70 g saharoze u 30 g vode. Izmereno je 10 g imobilizata u plastičnoj vaji zapremine 50 mL i u svakom novom ciklusu dodavana nova količina 70% rastvora saharoze. Tokom reakcije reakciona smeša je termostatirana na 50°C u vodenom termostatu šejkeru uz kontinualno mešanje. Nakon svakog ciklusa kuglice imobilizata su isprane 2–3 puta destilovanom vodom pre dodatka nove količine supstrata. Nakon svakog završenog ciklusa meren je procenat inverzije saharoze. Rastvor saharoze koncentracije 70% korišćen je u ovom eksperimentu kao slepa proba. Svi koncentrovani rastvori šećera su razblaživani 500 puta, a zatim je 500 µL ovako dobijenog rastvora šećera mešano sa 500 µL DNS reagensa. Dalja procedura merenja koncentracije redukujućih šećera je identična opisanoj u poglavlju 4.2.1.

4.4 Hemijski modifikovana zidna invertaza

4.4.1 Uticaj različitih modifikatora i vremena reakcije modifikacije na enzimsku aktivnost invertaze

6,28 g zidne invertaze suspendovano je u 28 g destilovane vode i ostavljeno preko noći da se hidrira. Celokupna količina dobijene suspenzije je raspoređena u 4 epruvete po 5 g suspenzije (za hemijsku modifikaciju) i 2 epruvete po 2,5 g suspenzije (kontrola). U svaku epruvetu dodato je po 1 mL modifikatora sa odgovarajućim puferom;

<i>Modifikat zidne invertaze</i>	<i>Modifikator</i>	<i>Pufer</i>	<i>Voda</i>
<i>Glutaraldehydni (GA)</i>	<i>74,4 µL (25% GA)</i>	<i>600 µL (500 mM fosfatnog pufera pH 7,2)</i>	<i>326 µL</i>
<i>Formaldehidni (FA)</i>	<i>85,7 µL (35% FA)</i>	<i>600 µL (500 mM fosfatnog pufera pH 7,2)</i>	<i>314 µL</i>
<i>Dimetil-suberimidatni (DMS)</i>	<i>18 mg (DMS)</i>	<i>600 µL (500 mM fosfatnog pufera pH 7,2)</i>	<i>382 µL</i>
<i>Natrijum-perjodatni (P)</i>	<i>30 mg (IO₄⁻)</i>	<i>600 µL (500 mM fosfatnog pufera pH 7,2)</i>	<i>370 µL</i>
	<i>30 mg (IO₄⁻)</i>	<i>600 µL (500 mM acetatnog pufera pH 4,5)</i>	<i>370 µL</i>
<i>Kontrola (K)</i>	<i>/</i>	<i>250 µL (500 mM fosfatnog pufera pH 7,2)</i>	<i>250 µL</i>
	<i>/</i>	<i>250 µL (500 mM acetatnog pufera pH 4,5)</i>	<i>250 µL</i>

Sve eptuvete su mešane na šejkeru tokom reakcije modifikacija, a u određenim vremenskim periodima (nakon 0,2, 1, 4 i 22 časa) iz njih su uzimani uzorci zapremine 1 mL. Centrifugiranjem na 14 500 rpm 1 minut biokatalizatori su staloženi i odvojeni od ostatka reakcione smeše, isprani sa po 1 mL odgovarajućeg pufera 3 – 5 puta, a zatim resuspendovani u zapremini od 6 mL 1% etanolamina pH 7,2. Suspenzije zidne invertaze koje su korišćene u ovom eksperimentu kao kontrole tretirane su kao i modifikati. Ovako dobijenim suspenzijama zidne invertaze i njenih modifikata izmerena je enzimska aktivnost postupkom opisanom u poglavlju 4.2.1 (svi uzorci su razblaženi 100 puta za merenje enzimske aktivnosti).

Svatom uzorku ovako dobijenog modifikata zidne invertaze praćena je temperaturna stabilnost na temperaturi od 70°C tokom 20 minuta inkubacije. Eksperiment praćenja temperaturne stabilnosti identičan je eksperimentu opisanom u poglavlju 4.2.4. Kao što je napred rečeno svi uzorci su i u ovom eksperimentu razblaženi 100 puta i kao takvi termostatorani.

4.4.2 Infracrvena (IC) spektroskopija native i hemijski modifikovane zidne invertaze

Modifikati zidne inveraze i nemodifikovana zidna invertaza su iz vodene suspenzije prevedeni u praškasto stanje liofilizacijom. Ovako dobijenim uzorcima snimljen je IC spektar metodom KBr pilule.

4.4.3 Mikroanaliza native i hemijski modifikovane zidne invertaze

Modifikati zidne invertaze i nemodifikovana zidna invertaza su iz vodene suspenzije prevedeni u praškasto stanje liofilizacijom. Ovako dobijenim uzorcima određen je procentni sastav azota, ugljenika, vodonika i sumpora mikroanalizom.

4.4.4 Površina izolovane zidne invertaze i njenih modifikata

Modifikati zidne invertaze i nemodifikovana zidna invertaza su iz vodene suspenzije prevedeni u praškasto stanje liofilizacijom. Svaki uzorak u snopu elektromagnetnog polja prekriven je slojem zlata i ovako dobijenim uzorcima snimljene su površine skenirajućim elektronskim mikroskopom.

4.4.5 Određivanje pH stabilnosti hemijski modifikovane zidne invertaze

Svi modifikati i nemodifikovana zidna invertaza (kontrola) suspendovani su u puferima pH vrednosti od 3,0 do 12,0 (inkrementi od 0,5 pH jedinica). Korišćeni su acetatni pufer za opseg pH vrednosti od 3,0 do 5,5 i fosfatni pufer za opseg pH vrednosti od pH 5,5 do 12,0. Puferi su napravljeni kao što je to opisano u poglavlju 4.2.2. Koncentracija enzima u puferskim suspenzijama je 10 mg/mL. Modifikati i kontrola su inkubirani u ovim suspenzijama različite pH vrednosti 150 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim razblaženi 10 puta 50 mM acetatnim puferom pH 4,5, kako bi enzim bio vraćen na optimalnu pH vrednost i razblažen za reakciju određivanja invertazne aktivnosti, kao što je to opisano u poglavlju 4.2.1.

4.4.6 Određivanje temperaturne stabilnosti hemijski modifikovane zidne invertaze

Temperaturna stabilnost svih uzoraka hemijski modifikovane i nemodifikovane zidne invertaze praćena je kao što je to opisano u poglavlju 4.2.4.

4.4.7 Određivanje temperaturnog i pH optimuma zidne invertaze hemijski modifikovane glutaraldehydom

Temperaturni i pH optimum zidne invertaze modifikovane glutaraldehydom i kontrole određeni su kao što je opisano u poglavljima 4.2.2 i 4.2.3.

4.5 Imobilizacija glutaraldehydom modifikovane zidne invertaze

50 g zidne invertaze suspendovano je u 200 mL vode i ostavljeno preko noći da se hidratiše. Nakon odvajanja hidratizane zidne invertaze centrifugiranjem na 10000 rpm 15 minuta celokupna količina je resuspendovana u 200 mL vode, dodato je još 25 mL 500 mM fosfatnog pufera pH 7,2, 3,1 mL 25 % rastvora glutaraldehyda i vode do 250 mL. Nakon 4 sata kontinualnog mešanja na šejkeru modifikovana zidna invertaza je odvojena centrifugiranjem, isprana 3 puta 50 mM fosfatnim puferom pH 7,2, a zatim resuspendovana u 3% rastvoru etanolamina pH 7,2 i ostavljeno preko noći u frižideru. Dobijena modifikovana zidna invertaza je odvojena centrifugiranjem i korišćena za imobilizaciju.

5g natrijum-alginata rastvoreno je u 250 mL vode, a celokupna količina dobijene modifikovane zidne invertaze je resuspendovana u 250 mL vode. Ova dva rastvora su pomešana, smeša dobro homogenizovana, proceđena kroz cediljku (da se odvoje eventualni krupni delovi koji mogu smetati pri iskapavanju) i pomoću šprica i igle iskapavana u 2% rastvor CaCl₂.

4.5.1 Produkcija invertnog šećera u kontinualnom reaktoru sa napakovanim slojem

Korišćena je staklena kolona (47×4 cm) sa spoljnom oblogom preko koje je kolona termostatirana protokom termostatirane vode na 45°C. Kroz kolonu je pomoću peristaltičke pumpe uvođen rastvor saharoze. Imobilizat je pre pakovanja u kolonu prethodno ekvilibrisan u 67% rastvoru saharoze. Kroz kolonu je prvo propušan 67% rastvor saharoze (3,35 kg saharoze rastvoreno u 1,65 L vode), a zatim 60% rastvor saharoze (3 kg saharoze rastvoreno je u 2 L vode). pH vrednost ovako dobijenih koncentrovanih rastvora saharoze je bila 7,80, pa je pH vrednost 60% rastvora saharoze pomoću razblažene sirćetne (1:4) kiseline spuštена na 6,80, 6,20 i 4,90. Protoci kolone regulisani su peristaltičkom pumpom, a tačne brzine protoka supstrata kroz kolonu merene su pomoću menzure (zapremina iz koje je izračunata svaka trenutna brzina protoka kolone nije bila manja od 100 mL). Svi rastvori saharoze su pre ulaska u kolonu bili termostatirani na temperaturi od 45°C. Nakon svakih oko 100 mL rastvora invertnog šećera koji je izašao iz kolone pri konstantnom protoku meren je stepen inverzije, odnosno koncentracija redukujućih šećera. Slepa proba pri ovim merenjima bio je rastvor supstrata koji je korišćen u eksperimentu. Svi rastvori šećera su razblaživani 500 puta i merena je koncentracija redukujućih šećera kao što je to opisano u poglavlju 4.3.7. Zapremina rastvora šećera u koloni bila je oko 210 mL.

4.5.1.1 Karakteristike dobijenog invertnog šećera

Svi opisani parametri mereni su odgovarajućim aparatima.

5 Literatura

1. Jordan, S., *Ind. Eng. Chem.*, **16(3)** (1924) 307–310.
2. <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/> posećena 25.03.2011.
3. Stavanja, M.S., Ayres, P.H., Meckley, D.R., Bombick, B.R., Pence, D.H., Borgerding, M.F., Morton, M.J., Mosberg, A.T., Swauger, J.E., *J. Toxicol. Environ. Health A.*, **66(15)** (2003) 1453–1473.
4. Neumann, N.P., Lampen, J.O., *Biochemistry*, **6(2)** (1967) 468–475.
5. Lehle, L., Cohen, R.E., Ballou, C.E., *J. Biol. Chem.*, **254(23)** (1979) 12209–12218.
6. Zeng, C., Biemann, K., *J. Mass. Spectrom.*, **34** (1999) 311–329.
7. Zarbosky, O: *Immobilised enzymes*, CRC Press, Cleveland (1973).
8. Uhlich, T., Ulbricht, M., Tomaschewski, G., *Enzyme Microb. Technol.*, **19** (1996) 124–131.
9. Tanriseven, A., Doğan, Ş., *Process Biochem.*, **36(11)** (2001) 1081–1083.
10. Milovanović, A., Božić, N., Vujčić, Z., *Food Chem.*, **104** (2007) 81–86.
11. Cao, L., *Carrier-bound Immobilized Enzymes*, Wiley-VCH, Weinheim, (2005).
12. Kimura, K., Yokote, Y., Fujita, M., Samejima, H., *Enzym Eng.*, **3** (1978) 531–536.
13. Chen, Q., Kenausis, G.L., Heller, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **120** (1998) 4582–4585.
14. Palomo, J.M., *Curr. Org. Synth.*, **6** (2009) 1–14.
15. http://www.eplantscience.com/index_files/biotechnology/Microbial%20biotechnology/Enzyme%20Technology/biotech_enzyme_immobilization.php, posećena 25.03.2011.
16. Sungur, S., Al-Taweel, R., Yıldırım, Ö., Loğoğlu, E., *Polymer – Plast. Technol. Eng.*, **45** (2006) 929–934.
17. Cantarella, M., Migliaresi, C., Tafuri, M.G., Alfani, F., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20** (1984) 233–237.
18. Cantarella, M., Cantarella, L., Cirielli, G., Gallifuoco, A., Alfani, F., *J. Membrane Sci.*, **41** (1989) 225–236.
19. Arica, M.Y., Alaeddinoğlu, N.G., Hasirci, V., *Enzyme Microb. Technol.*, **22** (1998) 152–157.
20. Sari, M.M., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, doi 10.1007/s12010-010-9106-x.
21. Altinok, H., Aksoy, S., Tümtürk, H., Hasirci, N., *J. Food Biochem.*, **32** (2008) 299–315.
22. Danisman, T., Tan, S., Kacar, Y., Ergene, A., *Food Chem.*, **85** (2004) 461–466.
23. D’Souza, S.F., Nadkarni, G.B., *Enzyme Microb. Technol.*, **2** (1980) 217–222.

24. Balci, Z., Akbulut, U., Toppare, L., Alkan, S., Bakir, U., Yağci, Y., *J. Macromol. Sci.– Pure Appl. Chem.*, **A39(3)** (2002) 183–197.
25. Selampinar, F., Akbulut, U., Özden, M.Y., Toppare, L., *Biomaterials*, **18** (1997) 1163–1168.
26. Kizilyar N., Akbulut U., Toppare L., Özden M.Y., Yağci Y., *Synth. Met.*, **104** (1999) 45–50.
27. Gianfreda, L., Parascandola, P., Scardi, V., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **11** (1980) 6–7.
28. Kennedy, J.F., Kalogerakis, B., Cabral, J.M.S., *Enzyme Microb. Technol.*, **6(3)** (1984) 127–131.
29. de Alteriis, E., Scardi, V., Masi, P., Parascandola, P., *Enzyme Microb. Technol.*, **12** (1990) 539–545.
30. Dhulster, P., Parascandola, P., Scardi, V., *Enzyme Microb. Technol.*, **5** (1983) 65–69.
31. Parascandola, P., Scardi, V., Tartaglione, O., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26** (1987) 507–510.
32. de Alteriis, E., Parascandola, P., Pecorella, M.A., Scardi, V., *Biotechnol. Techn.*, **1(2)** (1987) 109–114.
33. Sungur, S., Al-Taweel, R., *J. Macromol. Sci.*, **43** (2006) 187–185.
34. Emregül, E., Sungur, S., Akbulut, U., *Biomaterials*, **17** (1996) 1423–1427.
35. Emregül, E., Sungur, S., Akbulut, U., *Food Chem.*, **97** (2006) 591–597.
36. Johansen, A., Flink, J.M., *Enzyme Microb. Technol.*, **8** (1986) 145–148.
37. Chang, H.N., Seong, G.H., Yoo, I-K., Park, J.K., *Biotechnol. Bioeng.*, **51** (1996) 157–162.
38. Johansen, A., Flink, J.M., *Enzyme Microb. Technol.*, **8** (1986) 485–490.
39. Safarikova, M., Safarik, I., *Magn. Electr. Separ.*, **10** (2001) 223–252.
40. Safarik, I., Safarikova, M., *Scientific and clinical applications of magnetic carriers.*, Editori Häfeli, U., Schütt, W., Teller, J., Zborowski, M., Plenum Press, New York and London, (1997).
41. Safarik, I., Sabatkova, Z., Safarikova, M., *J. Magn. Magn. Mater.*, **321** (2009) 1478–1481.
42. Safarikova, M., Maderova, Z., Safarik, I., *Food Res. Int.*, **42** (2009) 521–524.
43. Minghou, J., Yujun, W., Zuhong, X., Yucai, G., *Hydrobiologia*, **116/117** (1984) 554–556.
44. Kierstan, M., Darcy, G., Reilly, J., *Biotechnol. Bioeng.*, **24(7)** (1982) 1507–1517.
45. Gupte, A., D'Souza, S.F., *J. Biochem. Biophys. Methods*, **40** (1999) 39–44.
46. Meena, K., Raja, T.K., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **22** (2006) 651–652.

47. Krastanov, A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47** (1997) 476–481.
48. D'Souza, S.F., Kamath, N., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29** (1988) 136–140.
49. D'Souza, S.F., Melo, J.S., *Process Biochem.*, **36** (2001) 677–681.
50. D'Souza, S.F., Melo, J.S., Deshapande, A., Nadkarni, G.B., *Biotechnol. Lett.*, **8(9)** (1986) 643–648.
51. Cabral, J.M.S., Novais, J.M., Kennedy, J.F., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23** (1986) 157–162.
52. Cabral, J.M.S., Cadete, M.M., Novais, J.M., Cardoso, J.P., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **434(1)** (1984) 483–486.
53. Marek, M., Káš, J., Valentová, O., Demnerová, K., Vodrážka, Z., *Biotechnol. Lett.*, **8(10)** (1986) 721–724.
54. Hasal, P., Vojtíšek, V., Čejková, A., Kleczek, P., Kofroňová, O., *Enzyme Microb. Technol.*, **14** (1992) 221–229.
55. Handriková, G., Štefuca, V., Polakovič, M., Bálaš, V., *Enzyme Microb. Technol.*, **18** (1996) 581–584.
56. Mehmetoglu, U., *Enzyme Microb. Technol.*, **12** (1990) 124–126.
57. Pu, H.T., Yang, R.Y.K., *Biotechnol. Bioeng.*, **32** (1988) 891–896.
58. Polakovič, M., Kudláčová, G., Štefuca, V., Bálaš, V., *Chem. Eng. Sci.*, **56** (2001) 459–466.
59. Parascandola, P., Scardi, V., *Biotechnol. Lett.*, **3(7)** (1981) 369–374.
60. de Alteriis, E., Parascandola, P., Pecorella, M.A., Scardi, V., *Biotechnol. Techn.*, **2(3)** (1988) 205–210.
61. http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.26, posećena 07.04.2011.
62. Vitolo, M., Yassuda, T., *Biotechnol. Lett.*, **13(1)** (1991) 53–56.
63. Kotwal, S.M., Shankar, V., *Biotechnol. Adv.*, **27(4)** (2009) 311–322.
64. Godbole, S.S., Kubal, B.S., D'Souza, S.F., *Enzyme Microb. Technol.*, **12** (1990) 214–217.
65. Vujčić, Z., Miloradović, Z., Milovanović, A., Božić, N., *Food Chem.*, **126(1)** (2011) 236–240.
66. Arruda, L.M., Vitolo, M. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **81(1)** (1999) 23–33.
67. Hartmeier, W., *Immobilized biocatalysts*. Springer, Berlin (1988).
68. Webb, J.L., *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, vol. 2, Academic Press, New York, (1966).
69. www.pbf.hr/hr/content/download/5243/33247
70. Goldstein, A., Lampen, J.O., *Method. Enzymol.*, **42** (1975) 504–511.

71. Filippusson, H., Hornby, W.E., *Biochem. J.*, **120** (1970) 215–219.
72. Rodríguez, M., Gómez, A., González, F., Barzana, E., López-Munguía, A., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2** (1997) 299–306.
73. Chase, A.M., Krotkov, M.S., *J. Cell. Physiol.*, **47(3)** (1956) 305–316.
74. Neuberg, C., Mandl, I., *Invertse. U The Enzymes*, vol.1, Editori: Sumner, J.B., Myrback, K., Academic Press, New York (1950).
75. Mealar, D., Townshend, A., *Talanta*, **15(8)** (1968) 747 – 758.
76. Kazan, D., Ertan, H., Erarslan, A., *Process Biochem.*, **31** (1996) 135–140.
77. Buchholz, K., Kasche, V., Bornscheuer, U.T., *Biocatalysts and Enzyme Technology*, Wiley-VCH, Weinheim (2005)
78. Reddy, V.A., Maley, F., *J. Biol. Chem.*, **265** (1990) 10817–10820.
79. Reddy, V.A., Maley, F., *FASEB Journal*, **9** (1995) A1295.
80. Kaplan, Ö., Bakir, U., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **14** (1998) 277–280.
81. Ramírez, H.L., Chico, B., Villalonga, R., *J. Bioact. Compat. Polym.*, **17** (2002) 161–172.
82. Prodanović, R.M., Simić, M.B., Vujčić, Z.M., *J. Serb. Chem. Soc.*, **68(11)** (2003) 819–824.
83. Manston, B.K., Rodgers, P.B. in *Proc.4th Europ. Congress on Biotechnology*, vol. 2, Editori: Nwijssel, O.M., Van der Meer, R.R., Luyben, K.Ch.A.M., Elsevier, Amsterdam (1987).
84. Hasal, P., Čejková, A., Vojtíšek, V., *Enzyme Microb. Technol.*, **14** (1992) 1007–1012.
85. Horbah, U., Hartmeier, W., *Gordian*, **89** (1989) 134–136.
86. Melo, J.S., D'Souza, S.F., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **15** (1999) 17–21.
87. Mansfeld J., Förster M., Schellenberger A., Dautzenberg H., *Enzyme Microb. Technol.*, **13** (1991) 240-244.
88. Pira, L., Pinto, C., Rolz, C., *J. Ind. Microbiol.*, **8** (1991) 247–252.
89. Bernfeld, P., *Method. Enzymol.*, **1** (1955) 149-158.
90. Sanjay, G., Sugunan, S., *Food Chem.*, **94(4)** (2006). 573-579.
91. Andjelković, U., Pićurić, S., Vujčić, Z., *Food Chem.*, **120** (2010) 799–804.
92. Gascón, S., Neumann, N.P., Lampen, J.O., *J. Biol. Chem.*, **243(7)** (1968) 1573–1577.
93. Prodanović, R., Jovanović, S., Vujčić, Z., *Biotechnol. Lett.*, **23(14)** (2001) 1171-1174.
94. Cadena, P.G., Jeronimo, R.A.S., Melo, J.M., Silva, R.A., Lima Filh, J.L., Pimentel, M.C.B., *Bioresource Technol.*, **101** (2010) 1595–1602.
95. Amaya-Delgado, L., Hidalgo-Lara, M.E., Montes-Horcasitas, M.C., *Food Chem.*, **99** (2006) 299-304.

96. Neurath, H., Greenstein, J.P., Putnam, F.W., Erickson, J.A., *Chem. Rev.*, **34(2)** (1944) 157–265.
97. Greenstein, J.P., *J. Biol. Chem.*, **125** (1938) 501–513.
98. Amine, A., Cremisini, C., Palleschi, G., *Mikrochim. Acta*, **121** (1995) 183–190.
99. Liu, C.-C., Huang, L.-C., Chang, C.-T., Sung, H.-Y., *Food Chem.*, **96** (2006) 621–631.
100. Hoshino, J., Momose, A., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **12(2)** (1966) 163–177.
101. Kidby, D.K., *J. Gen. Microbiol.*, **84** (1974) 343–349.
102. Akgöl, S., Kaçar, Y., Denizli, A., Arıca, M.Y., *Food Chem.*, **74** (2001) 281–288.
103. Tümtürk, H., Arslan, F., Disli A., Tufan, Y., *Food Chem.*, **69** (2000) 5–9.
104. Miyamoto, K., Fujii, T., Tamaoki, N., Okazaki, M., Miura, Y., *J. Ferment. Technol.*, **51** (1973) 566–574.
105. Bahar, T., Tuncel, A., *J. Appl. Polym. Sci.*, **83(6)** (2002) 1268–1279.
106. Husain, S., Jafri, F., Saleemuddin, M., *Enzyme Microb. Technol.*, **18(4)** (1996) 275–280.
107. Gómez, L., Ramírez, H.L., Villalonga, M., Hernández, J., Villalonga, R., *Enzyme Microb. Technol.*, **38** (2006) 22–27.

BIOGRAFIJA

Aleksandra Milovanović je rođena 20.09.1980. godine u Nišu, Republika Srbija. Na Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani hemičar upisana je školske 1999/2000. godine. Diplomirala je 29.09.2004. godine sa prosečnom ocenom 9,00 u toku studija i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Na poslediplomske studije na Katedri za biohemiju upisala se školske 2004/05. godine.

Od februara 2005. godine zaposlena je na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Centar za hemiju, Univerziteta u Beogradu, kao istraživač-pripravnik, a 2008. godine izabrana u zvanje istraživač saradnik.

Član je Srpskog hemijskog društva, Biohemijskog društva Srbije, FEBS-a i Evropskog biotehnološkog društva.

Do sada je objavila 7 radova u međunarodnim časopisima, 4 u časopisima kategorije M21, 2 u časopisima kategorije M23 i jedan iz kategorije M51; jedno saopštenje na skupu međunarodnog značaja i 5 na skupovima nacionalnog značaja.

Прилог

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Потписани/а

Изјављујем да је електронска верзија моје докторске дисертације

**Примена имобилизованог ћелијског зида квасца *Saccharomyces cerevisiae* у
производњи инвертног шећера**

коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума
Универзитета у Београду** истоветна штампаној верзији која се налази у фонду
Универзитетске библиотеке „Светозар Марковић“.

Потпис

У Београду, 04.06.2014.

A. Merceћ

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Миловановић Александра

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Примена имобилизованог ћелијског зида квасца *Saccharomyces cerevisiae* у производњи инвертног шећера

- 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

У Београду, 03.04.2014.

A. Milovanović

Прилог 2.

Изјава о коришћењу

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

Примена имобилизованог ћелијског зида квасца *Saccharomyces cerevisiae* у производњи инвертног шећера

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).

Потпис

У Београду, 03.04.2014.

Д. Марковић