

## UTICAJ VELIČINE ČESTICA POLIANILINA NA IMOBILIZACIJU ALFA-AMILAZE

Mirjana Radovanović<sup>1</sup>, Vesna Đurović<sup>1</sup>, Milica Gvozdrenović<sup>2</sup>, Branimir Jugović<sup>3</sup>, Branimir Grgur<sup>2</sup>, Zorica Knežević-Jugović<sup>2</sup>

**Izvod:** U ovom radu sintetisane su čestice polianilina postupkom polimerizacije anilina na granici dve faze voda/hloroform. Četiri frakcije dobijenih mikročestica polianilina u opsegu od 90-800 µm korišćene su kao nosač za imobilizaciju enzima alfa-amilaze iz *Bacillus licheniformis*. Određena je ravnotežna masa enzima, masa ispranog enzima, prinos mase, aktivnost dobijenog biokatalizatorskog sistema kao i prinos aktivnosti. Utvrđeno je da se najveća masa enzima veže za čestice veličine 90-160 µm, ali da se sa ovih čestica i najviše enzima desorbuje tokom ispiranja. Međutim, pokazano je da se sa povećanjem veličine čestica smanjuje aktivnost imobilisanog enzima sa izuzetkom čestica dimenzija od 160-315 µm, pri čemu aktivnost imobilizata ne zavisi od prinosa mase. Prinos aktivnosti imobilisane  $\alpha$ -amilaze u odnosu na aktivnost slobodnog enzima koji se vezao za nosač prosečno je najveći kod čestica veličine 160-315 µm.

**Ključne reči:** adsorpcija, alfa-amilaza, polianilin

### Uvod

Alfa-amilaze (E.C.3.1.1.1) su enzimi koji katalizuju hidrolizu skroba i sličnih ugljenohidratnih makromolekula po endo- mehanizmu nasumično delovanjem unutar makromolekula, a kao proizvod nastaju maltodekstrini sa različitim brojem glukozičnih ostataka. Primenjuju se u prehrambenoj industriji, industriji papira, u tekstilstvu, za proizvodnju deteregenata i biogoriva. Imobilizacijom enzima na čvrstim nosačima moguće je dobiti biokatalizatorski sistem koji se može lako izdvojiti iz reakcionog medijuma i koristiti u više racionih ciklusa. Adsorpcija je jednostavan postupak imobilizacije kod koga se za razliku od ostalih postupaka zadržava značajan procenat početne aktivnosti enzima. Osnovni nedostatak jeste nespecifičnost vezivanja enzima a time i teža optimizacija uslova imobilizacije. Pravilnim odabirom nosača i uslova imobilizacije adsorpcija se može značajno unaprediti i učiniti specifičnijom.

Od otkrića provodnih osobina polianilina 80-ih godina prošlog veka stalno se iznalaze nove mogućnosti upotrebe ovog polimera. Zbog svoje inertnosti, stabilnosti, provodljivosti i lake sinteze polianilin je našao primenu u različitim oblastima: za imobilizaciju enzima (Bezbradica i sar., 2011., Radovanović i sar., 2016.), kao antikorozijska prevlaka (Mirmohsen i Oladegaragoze, 2000.), za proizvodnju biosenzora (Gvozdrenović i sar., 2011.) itd.

<sup>1</sup>Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Cara Dušana 34, Čačak, Srbija (mira.radovanovic@kg.ac.rs)

<sup>2</sup>Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Karnegijeva 4, 11 000, Beograd, Srbija

<sup>3</sup>Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti, Karnegijeva 4, 11 000, Beograd, Srbija

Opšti zahtev za bilo koji nosač za koji se želi poboljšati kontakt enzim-nosač jeste da ima veću specifičnu površinu od  $100 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$  (Cantone i sar., 2012.), što podrazumeva upotrebu čestica manjih dimenzija. S druge strane za dobru filtraciju pogodnije su krupnije čestice. U praksi se često iznalazi kompromisno rešenje za dimenzije čestica, kako bi istovremeno zadovoljile dva suprotstavljena zahteva, posedovanje: dobrih filtracionih svojstava i velike specifične površine.

U literaturi postoji mali broj radova o uticaju mikročestica različitih dimenzija na imobilizaciju i aktivnost enzima. U ovom radu, izvršena je hemijska sinteza polianilina, a zatim pripremljeno 4 različite frakcije mikročestica, u opsegu od 90 do 800  $\mu\text{m}$ . Na dobijenim mikročesticama polianilina adsorbovana je  $\alpha$ -amilaza. Određena je ravnotežna masa enzima, masa ispranog enzima, prinos mase, aktivnost i prinos aktivnosti dobijenog biokatalizatorskog sistema.

### Materijal i metode rada

Sinteza polianilina izvršena je polimerizacijom anilina na granici dve faze voda/hloroform prema postupku opisaom u literaturi (Huang i Kaner, 2004.). Posebno je pripremljeno 3,3 mmol anilina u 10 mL hloroforma i 0,8 mmol amonijum peroksidisulfata u 10 mL hlorovodonične kiseline koncentracije  $1 \text{ molL}^{-1}$ . Rastvori su zatim pomešani, a nakon kratkog indukcionog perioda od oko 30 s do nekoliko minuta uočavao se zeleni polianilin na dodirnoj površini dve faze koji je odmah prelazio u vodenu fazu. Reakcioni sistem ostavljan je preko noći kako bi se završila polimerizacija. Dobijeni polianilin izdvojen je filtriranjem, zatim ispran destilovanom vodom čime se dobijao polianilin u formi emeraldin soli, provodnih svojstava. Nakon sušenja polianilin je prosejan kroz niz spojenih sita sa prečnikom pora od 800, 500, 315, 160 i 90  $\mu\text{m}$ . Na ovaj način dobijene su četiri frakcije polianilina: čestice prečnika od 90-160, 160-315, 315-500 i od 500-800  $\mu\text{m}$ .

Metodom adsorpcije vršena je imobilizacija  $\alpha$ -amilaze iz *Bacillus licheniformis* (Termamyl Novozymes A/S Danska) na prethodno sintetisanim mikročesticama polianilina. Pripremljen je rastvor enzima koncentracije  $5 \text{ mgmL}^{-1}$  u fosfatnom puferu pH 6,9 i zagrejan na 30 °C. Uslovi imobilizacije bili su sledeći: mešano je 50 mg čestica nosača i 5 mL rastvora enzima (šejker IKA, Nemačka na 500 o/min), na temperaturi od 30 °C 60 minuta. Nakon imobilizacije, smeša je centrifugirana (2000 o/min) 5 minuta. U izdvojenom supernatantu određen je sadržaj proteina, kao i aktivnost enzima. Dobijeni imobilizati zatim su ispirani sa po 5 mL fosfatnog pufera pH 6,9 i ponovo centrifugirani (2000 o/min) 5 minuta. Izdvojan je rastvor od ispiranja i u njemu određivan sadržaj proteina i aktivnost enzima. Imobilizati su ostavljani 6 sati na 30°C, nakon čega je ispitana njihova aktivnost.

Aktivnost slobodne i imobilisane  $\alpha$ -amilaze određena je merenjem početne brzine reakcije hidrolize 2% (w/v) rastvora skroba (Yoo i sar., 1984.). U rastvor supstrata koji je predstavljao smešu 3 mL 2% (w/v) rastvora skroba i 2,5 mL fosfatnog pufera pH 6,9 dodavano je po 0,1 mL rastvora enzima (ili 50 mg imobilizata). U određenim vremenskim intervalima (na 5 min) iz reakcionog suda uzimano je po 0,1 mL smeše i dodavano redom u epruvete u kojima se nalazio rastvor joda (5 mL radnog rastvora joda, 5 mL hlorovodonične kiseline koncentracije  $0,1 \text{ molL}^{-1}$  i 0,9 mL fosfatnog pufera pH 6,9).

Sadržaj epruveta dobro je promešan pre merenja intenziteta boje stvorenog skrobno-jodnog kompleksa spektrofotometrijski (Photo Lab 6100 vis, Germany) na 600 nm. Enzimska aktivnost određena je na osnovu količine skroba dobijene iz prethodno konstruisane kalibracione krive supstrata. Jedna jedinica enzimske aktivnosti (U) definisana je kao količina enzima neophodna da razgradi 1 mg skroba na sobnoj temperaturi i pri pH 6,9.

Sadržaj proteina meren je spektrofotometrijski na talasnoj dužini 500 nm na osnovu stvaranja obojenih proizvoda aromatičnih aminokiselina proteina sa Folin-Ciocalten-ovim reagensom u kombinaciji sa biuretskom reakcijom za peptidne veze (Lowry i sar., 1951.).

Sve hemikalije korišćene u radu bile su p.a. čistoće.

Osnovni rastvor joda dobijao se rastvaranjem 0,5 g kalijum -jodida i 5,0 g joda u 100 mL destilovane vode, a njegovim razblaživanjem 100 puta dobijan je radni rastvor joda.

Efikasnost imobilizacije ocenjivana je na osnovu prinosa mase  $Y_M$  (%) i prinosa aktivnosti  $\alpha$ -amilaze  $Y_A$  (%):

$$Y_M = m_E / m_{E0} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (1)$$

gde je

$m_E$  masa vezanog enzima za nosač, mg

$m_{E0}$  početna masa enzima, mg

$$Y_A = SA_i / SA_0 \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (2)$$

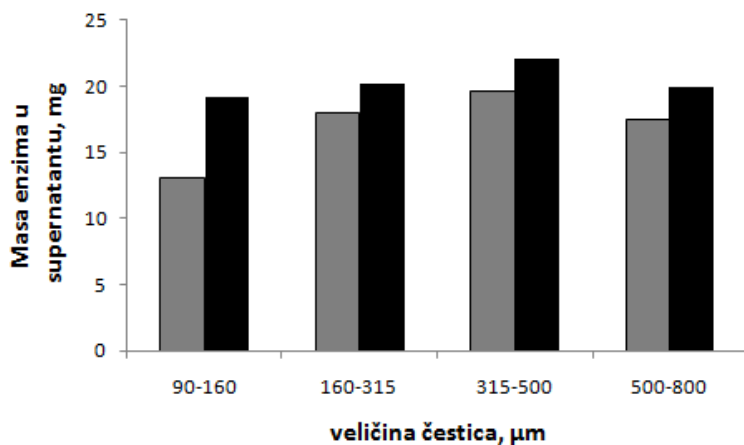
gde je

$SA_i$  specifična aktivnost imobilizata, U/mg

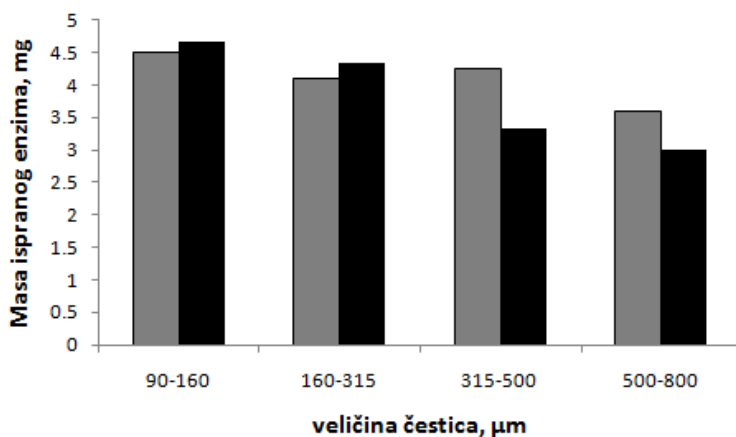
$SA_0$  specifična aktivnost slobodnog enzima, U/mg

### Rezultati istraživanja i diskusija

Veličina čestica nosača je bitan faktor koji određuje efikasnost procesa imobilizacije kao i katalitičke osobine imobilizata. Da bi se bolje razumeo proces adsorpcije, pored krajnjih rezultata prinosa mase, aktivnosti i prinosa aktivnosti imobilizata prikazani su i rezultati sadržaja enzima (mg) u supernatantima, kao i u rastvorima od ispiranja. Merenjem ravnotežnog sadržaja proteina u rastvoru neposredno nakon adsorpcije pokazalo se da je prosečno najmanje enzima prisutno u supernatantu čestica prečnika 90-160  $\mu\text{m}$  (Grafik 1, a). To znači da je na ovim česticama vezano najviše enzima.



a)



b)

Grafik 1. Uticaj veličine čestica polianilina na masu  $\alpha$ -amilaze: a) zaostale u supernatantu, b) desorbovane ispiranjem fosfatnim puferom pH 6,9, ■-proba 1 i ■-proba 2  
 Graphic 1. Effect of polyaniline particles size on  $\alpha$ -amylase amount: a) remaining in supernatant, b) desorbed washing with phosphate buffer pH 6,9, ■-assay 1, ■-assay 2

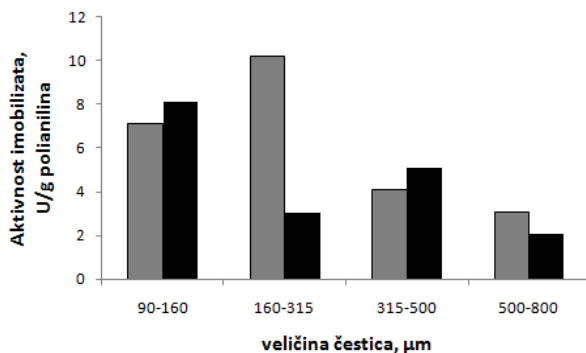
Međutim ispiranjem imobilizata odgovarajućim puferom pokazano je da se najviše proteina ispralo upravo sa čestica najmanjih dimenzija (Grafik 2, b). Može se pretpostaviti da je određena masa proteina vezana slabijim međumolekulskim interakcijama kod čestica najmanjeg prečnika pri čemu se lakše desorbuju i odlaze u rastvor. Pored najizraženije desorpcije i najveća razlika u masi zaostalog enzima u supernatantima dve probe čestica 90-160  $\mu\text{m}$  može dodatno ukazati na najmanju specifičnost adsorpcije na ovim česticama.

Prinos mase adsorbovane  $\alpha$ -amilaze u odnosu na početnu masu slobodnog enzima ne zavisi od veličine čestica (Tabela 1). Značajne razlike u prinosu mase između dve probe čestica istih dimenzija ukazuju na nespecifičnost procesa adsorpcije.

Tabela 1. Uticaj veličine čestica na prinos mase adsorbovane  $\alpha$ -amilaze  
*Table 1. Effect of particle size on yield of adsorbed  $\alpha$ -amylase*

Veličina čestica, $\mu\text{m}$ <i>Particle size, <math>\mu\text{m}</math></i>	Prinos mase $\alpha$ -amilaze, % <i>Mass yield of <math>\alpha</math>-amylase, %</i>	
	Proba 1 <i>Assay 1</i>	Proba 2 <i>Assay 2</i>
90-160	29,68	4,32
160-315	12	2
315-500	4,68	7,08
500-800	16	8,32

Međusobnim upoređivanjem aktivnosti imobilizata uočava se trend smanjenja aktivnosti sa porastom veličine čestica, uz odstupanje čestica dimenzija od 160-315  $\mu\text{m}$  (Grafik 2). Jasno je da aktivnost imobilizata ne zavisi od prinosa mase enzima. To je vrlo izraženo kod čestica veličine 90-160  $\mu\text{m}$  kod kojih mali maseni prinos postignut u drugoj probi pokazuje veću enzimsku aktivnost od prve probe gde se adsorbovalo znatno više enzima. Ovo se može objasniti neujednačenim rasporedom molekula enzima na površini nosača. U nekim mikroregijama molekuli enzima formiraju više slojeva, povećavajući difuzione limitacije supstrata ka molekulima enzima u slojevima bližim nosaču, što uzrokuje manju aktivnost veće mase enzima.



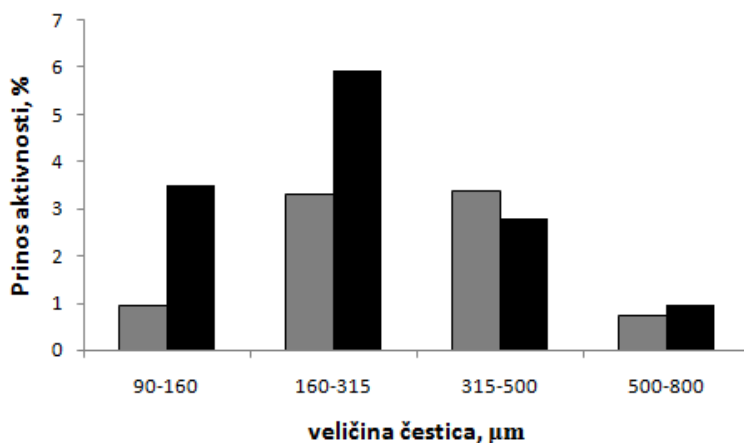
Grafik 2. Zavisnost aktivnosti imobilisane  $\alpha$ -amilaze od veličine čestica polianilina: ■-prva i ■-druga proba

*Graphic 2. Activity of immobilized  $\alpha$ -amylase in function of polyaniline particle size: ■-assay 1, ■-assay 2*

Veća aktivnost čestica manjeg prečnika u odnosu na čestice većih dimenzija može ukazati na lakšu difuziju supstrata kroz suspenziju čestica manjih dimenzija, jer

povećanje dimenzija čestica može uzrokovati gubitak enzimske aktivnosti uzrokovano difuzionim limitacijama, zbog spore difuzije supstrata kroz suspendovane krupne čestice (Sheldon, van Pelt, 2013.). Autori Biró i sar. (2008.) pokazali su da se najveća količina enzima veže na makročesticama, a suprotno tome imobilisan enzim na najsitnijim česticama (nano dimenzija) pokazuje najveću aktivnost.

Prinos aktivnosti imobilisane  $\alpha$ -amilaze (Grafik 3), koja predstavlja odnos specifične aktivnosti imobilisane i slobodne  $\alpha$ -amilaze razlikuje se od profila aktivnosti imobilizata čestica različite veličine (Grafik 2). To je uzrokovano adsorpcijom različite mase enzima za nosač. Iako najveću prosečnu aktivnost imobilizata pokazuje  $\alpha$ -amilaza adsorbovana na česticama veličine 90-160  $\mu\text{m}$ , prosečno najveći ostvareni prinos aktivnosti 4,62% (praktično značajniji parametar) utvrđen je kod čestica veličine 160-315  $\mu\text{m}$  (Grafik 3). Literaturni podaci pokazuju znatno više vrednosti prinosa aktivnosti  $\alpha$ -amilaze na polianilinu. Ashly i sar. (2011.) ispitivanjem efikasnosti imobilizacije  $\alpha$ -amilaze na polianilinu u formi emeraldin soli utvrdili su da se adsorpcijom postiže prinos aktivnosti od 32,5 %, dok je kod polianilina u istoj formi ali aktiviranog glutaraldehidom (kod koga je došlo do kovalentnog vezivanja  $\alpha$ -amilaze na čestice polimera) postignut viši prinos aktivnosti od 52,7%.



Grafik 3. Uticaj veličine čestica polianilina na prinos aktivnosti imobilisane  $\alpha$ -amilaze:  
 ■-proba 1 i ■-proba 2

Graphic 3. Activity yield of immobilized  $\alpha$ -amylase in function of polyaniline particle size, ■-assay 1, ■-assay 2

Izraženi nedostaci opisanog načina imobilizacije mogu se poboljšati optimizovanjem uslova: produženim vremenom imobilizacije, smanjenjem brzine mešanja reakcione smeše i ostvarivanjem veće kontaktne površine između rastvora enzima i nosača (vršiti imobilizaciju u širem reakcionom sudu).

Takođe, čestice polianilina mogu se aktivirati funkcionalnim reagensima kao što je glutaraldehid, kako bi se omogućilo kovalentno vezivanje enzima i nosača.

Sintezom višefunkcionalnih nosača specifičnih osobina, kao što su magnetne čestice presvučene polianilinskom prevlakom (Radovanović i sar., 2016.) može se poboljšati sam proces adsorpcije, jer se zahvaljujući magnetnim svojstvima imobilizata vrši lakša kontrola protoka enzima u bioreaktoru, laka separacija a smanjuju se i mehanička oštećenja izazvana brzim mešanjem i centrifugiranjem reakcione smeše.

### Zaključak

Četiri frakcije sintetisanih mikročestica polianilina u opsegu od 90-800  $\mu\text{m}$  korišćene su kao nosač za imobilizaciju enzima alfa-amilaze iz *Bacillus licheniformis*. Utvrđeno je da se najveća masa enzima veže za čestice veličine 90-160  $\mu\text{m}$ , ali da se sa ovih čestica i najviše enzima desorbuje tokom ispiranja. S druge strane, pokazano je da sa povećanjem veličine čestica opada aktivnost imobilisanog enzima sa izuzetkom čestica dimenzija od 160-315  $\mu\text{m}$ , pri čemu aktivnost imobilizata ne zavisi uvek od prinosa mase. Prinos aktivnosti imobilisane  $\alpha$ -amilaze u odnosu na aktivnost slobodnog enzima koji se vezao za nosač prosečno je bio najveća kod čestica veličine 160-315  $\mu\text{m}$ , a iznosio je 4,62%. Prinosi mase i aktivnosti imobilizata postignuti adsorpcijom  $\alpha$ -amilaze na mikročesticama polianilina mogu se povećata promenom uslova imobilizacije kao i korišćenjem polianilina magnetnih svojstava.

### Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekta III 46010 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

### Literatura

- Ashly P.C., Joseph M.J., Mohanan P.V. (2011). Activity of diastase  $\alpha$ -amylase immobilized on polyanilines (PANIs). *Food Chemistry*.127: 1808-1813.
- Bezbradica D., Jugović B., Gvozdenović M., Jakovetić S., Knezević-Jugović Z.(2011), Electrochemically synthesized polyaniline as support for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic*. 70: 55–60.
- Biró E., Németh A.S., Sisak C., Feczko T., Gyenis J. (2008). Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 70: 1240–1246.
- Cantone S. Ferrario V., Corici L., Ebert C., Fattor D., Spizzoa P., Gardossi L. (2012). Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. *Chemical Society Reviews*. 42: 6262-6276.
- Gvozdenović M., Jugović B., Bezbradica D., Antov, M., Knežević-Jugović Z., Grgur B. (2011). Electrochemical determination of glucose using polyaniline electrode modified by glucose oxidase. *Food Chemistry*. 124: 396–400.
- Huang J., Kaner R.B. (2004). A General Chemical Route to Polyaniline Nanofibers. *Journal of the American Chemical Society*. 126: 851–855.

- Lowry H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265–275.
- Mirmohsen A., Oladegaragoze A. (2000). Anti-corrosive properties of polyaniline coating on iron. *Synthetic Metals*. 114: 105–108.
- Radovanović M., Jugović B., Gvozdrenović M., Jokić B., Grgur B., Bugarski B., Knežević-Jugović Z. (2016). Immobilization of  $\alpha$ -amylase via adsorption on magnetic particles coated with polyaniline. *Starch- Stärke*. 68: 427-435.
- Sheldon R.A., Van Pelt S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*. 42: 6223-6235.
- Yoo Y.J., Hong J., Hatch R.T. (1987). Comparison of  $\alpha$ -amylase activities from different assay methods. *Biotechnology and Bioengineering*. 30: 147–151.

## EFFECT OF PARTICLE SIZE OF POLYANILINE ON ALPHA-AMYLASE IMMOBILIZATION

*Mirjana Radovanović<sup>1</sup>, Vesna Đurović<sup>1</sup>, Milica Gvozdrenović<sup>2</sup>, Branimir Jugović<sup>3</sup>, Branimir Grgur<sup>2</sup>, Zorica Knežević-Jugović<sup>2</sup>*

### Abstract

In this paper polyaniline was synthesized by interfacial polymerization of monomer aniline in a water/chloroform system. Four fractions of polyaniline microparticles (in the range of 90-800  $\mu\text{m}$ ) are used as a support for immobilizing the alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. The equilibrium amount of enzyme, amount of washed enzyme, adsorption yield, the activity of immobilized enzyme and activity yield were studied. It was found that the maximum amount of the adsorbed enzyme was to a particle size of 90-160  $\mu\text{m}$ , but at the same time from these particles enzymes were desorbed to larger extent during washing. However, it has been shown that as the particle size increased the activity of the immobilized enzyme decreased with the exception of the particle sizes of 160-315  $\mu\text{m}$  and the activity of immobilized enzyme was not dependent on adsorption yield. The highest average activity yield of adsorbed  $\alpha$ -amylase, 4,62% was at polyaniline particle size of 160-315  $\mu\text{m}$ .

**Key words:** adsorption, alpha-amylase, polyaniline

---

<sup>1</sup>University of Kragujevac, Faculty of Agronomy Čačak, Cara Dušana 34, Čačak, Serbia (mira.radovanovic@kg.ac.rs)

<sup>2</sup>University of Belgrade, Faculty of Technology and Metallurgy, Karnegijeva 4, 11 000 Belgrade, Serbia,

<sup>3</sup>Institute of Technical Sciences of the Serbian Academy of Sciences and Arts, Karnegijeva 4, Belgrade, Serbia