



Univerzitet u Beogradu

Hemijski fakultet

Miloš M. Prokopijević

**IMOBILIZACIJA PEROKSIDAZE IZ SOJE
(*GLYCINE MAX*) NA MAKROPOROZNOM
GLICIDIL-METAKRILATU I HEMIJSKI
MODIFIKOVANOM PEKTINU**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.



University of Belgrade

Faculty of Chemistry

Miloš M. Prokopijević

**IMMOBILIZATION OF SOYBEAN
PEROXIDASE (*GLYCINE MAX*) ONTO
MACROPOROUS GLYCIDYL-
METHACRYLATE AND CHEMICALLY
MODIFIED PECTIN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

MENTOR:

Dr. Radivoje Prodanović, vanredni profesor,
Hemijski Fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr. Ksenija Radotić Hadži-Manić, naučni savetnik,
Institut za multidisciplinarna istraživanja,
Univerzitet u Beogradu

Dr. Marija Gavrović-Jankulović, redovni profesor,
Hemijski Fakultet, Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____

Zahvalnica

Ekperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Institutu za Multidisciplinarna Istraživanja, Univerziteta u Beogradu na odseku za Nauke o živim sistemima.

Hteo bih da se zahvalim mentoru Prof. dr. Radivoju Prodanoviću na predloženoj temi kao i vođenju doktorske teze, svim korisnim savetima u rešavanju laboratorijskih problema i sugestijama tokom pisanja.

Zahvaljujem se dr. Kseniji Radotić Hadži-Manić na ukazanom poverenju i pomoći tokom ekperimentalnog rada kao i tokom pisanja disertacije.

Zahvalio bih i profesorki dr. Mariji Gavrović-Jankulović na pomoći i korisnim savetima tokom finalne izrade i pisanja ove doktorske teze.

Zahvaljujem se i firmi Sojaprotein A.D., Bečej na donaciji očišćenog semenog omotača soje, polaznog materijala za izolovanje enzima korišćenog u radu.

Takođe veliku zahvalnost dugujem kolegama iz istraživačke grupe sa odseka na njihovoj podršci i nesebičnoj pomoći tokom ekperimentalnog rada.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, sestri i supruzi Ivani.

Imobilizacija peroksidaze iz soje (*Glycine max*) na makroporoznom glicidil-metakrilatu i hemijski modifikovanom pektinu

IZVOD

Peroksidaza iz soje (SBP, E.C. 1.11.1.7) je enzim koji pripada klasi III biljnih peroksidaza i katalizuje oksidaciju i polimerizaciju različitih fenolnih jedinjenja u prisustvu vodonik peroksida kao supstrata. Nalazi se u semenom omotaču soje koji predstavlja jeftini nusproizvod i polazni materijal za izolovanje velike količine sirovog enzima.

Izolovana SBP je imobilizovana primenom dve kovalentne metode na seriju makroporoznih kopolimera poli(GMA-co-EGDMA) različitih dijametara pora. Glutaraldehydni metod imobilizacije se pokazao boljim od perjodatnog a najveća specifična aktivnost od 23 IU/g dobijena je na kopolimeru veličine pora od 120 nm. Imobilizovana peroksidaza pokazala je veću termalnu stabilnost i stabilnost u organskom rastvaraču, aktivnost u širem opsegu pH i 2,86 puta veću K_m vrednost za pirogalol u odnosu na rastvorni enzim.

Sintetisana je serija modifikovanih pektina oksidacijom perjodatom u molarnom odnosu od 2,5 do 20 mol% i naknadnom reduktivnom aminacijom tiraminom i cijanoborhidridom. Dobijeni tiramin-pektini prave stabilne hidrogelove umrežavanjem fenolnih grupa u reakciji katalizovanoj peroksidazama u prisustvu vodonik peroksida. SBP je uspešno imobilizovana unutar mikro-kuglica hidrogela nastalih enzimskom polimerizacijom modifikovanog pektina u emulziji sa najvećom specifičnom aktivnošću postignutom na tiramin-pektinu oksidovanom 5 mol% perjodatom. Imobilizovana SBP je pored šireg pH optimuma pokazala i veću termalnu stabilnost i stabilnost u organskom rastvaraču u odnosu na slobodan enzim. Mikrokuglice sa imobilizovanom SBP zadržale su 50% početne aktivnosti nakon 7 ciklusa ponovne upotrebe za oksidaciju pirogalola u bač reaktoru.

Pod optimalnim uslovima sa unutrašnjom dostavom vodonik peroksida postignuto je uklanjanje fenola od 64% imobilizovanom SBP na poli(GMA-co-EGDMA) veličine pora od 120 nm.

Ključne reči: peroksidaza iz soje, imobilizacija enzima, glicidil metakrilat, perjodat, glutaraldehyd, hidrogel, pektin.

Naučna oblast: Biohemija.

Uža naučna oblasti: Enzimologija, imobilizacija enzima.

UDK broj: 577.15

Immobilization of soybean peroxidase (*Glycine max*) onto macroporous glycidyl-methacrylate and chemically modified pectin

ABSTRACT

Soybean peroxidase (SBP, E.C. 1.11.1.7) is an enzyme that belongs to class III of plant peroxidases that catalyses oxidation and polymerization of various phenolic compounds in the presence of hydrogen peroxide as substrate. It's located in the soybean seed hulls, an inexpensive byproduct and excellent material for isolation of large amounts of crude enzyme.

SBP was immobilized by using two covalent methods onto a series of macroporous copolymers of poly(GMA-co-EGDMA) with various pore diameters. Glutaraldehyde immobilization method proved to be better than periodate with highest specific activity of 23 IU/g obtained with copolymer with pore size of 120 nm. Compared to the soluble enzyme, immobilized peroxidase showed increased thermal and organic solvent stability, broader pH activity range and 2.86 times higher K_m value for pyrogallol.

Series of modified pectins have been synthesized by oxidation with periodate in molar ratios from 2.5 to 20 mol% and subsequent reductive amination with tyramine and cyanobohrhydride. Obtained tyramine-pectine made stable hydrogels by crosslinking phenol groups in a peroxidase catalysed reaction in the presence of hydrogen peroxide. SBP was immobilized within hydrogel microbeads created in enzyme polymerization of modified pectin in emulsion with highest specific activity achieved with tyramine-pectin oxidized by 5 mol% of periodate. Immobilized SBP in addition of having wider pH optimum showed higher thermal and organic solvent stability compared to the free enzyme. SBP bound in microbeads retained 50% of the original activity after 7 cycles of repeated usage for pyrogallol oxidation in batch reactor.

Under optimal conditions with internal hydrogen peroxide delivery phenol removal of 64% has been achieved with SBP immobilized onto poly(GMA-co-EGDMA) with pore size of 120 nm.

Key words: Soybean peroxidase, enzyme immobilization, glycidyl-methacrylate, periodate, glutaraldehyde, hydrogel, pectin.

Scientific Field: Biochemistry.

Scientific Subfield: Enzymology, enzyme immobilization.

UDK Number: 577.15

Lista skraćenica korišćenih u tekstu

| | |
|---------------|---|
| AGI | Arabinogalaktan (Arabinogalactan) |
| Api | D-Apioza (D-Apiose) |
| APX | Askorbat peroksidaza (Ascorbate peroxidase) |
| Arg | Arginin (Arginine) |
| Asn | Asparagin (Asparagine) |
| BP1 | Peroksidaza iz ječma (Barley grain peroxidase 1) |
| CcP | Citohrom C peroksidaza (Cytochrome C peroxidase) |
| CLEA | Umreženi enzimski agregati (Cross-linked enzyme aggregates) |
| CLEC | Umreženi enzimski kristali (Cross-linked enzyme crystals) |
| DA | Stepen acetilacije (Degree of Acetylation) |
| DE | Stepen esterifikacije (Degree of esterification) |
| Dha | 2-deoksi-likso-heptulopiranozilarna kiselina (2-Deoxy-lyxo-heptulopyranosylaric acid) |
| DTT | Ditiotreitol (Dithiothreitol) |
| FTIR | Furierova transformacija infracrvene spektroskopije (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) |
| Fuc | D-Fukoza (D-Fucose) |
| GalA | Galakturonska kiselina (Galacturonic Acid) |
| GdnHCl | Guanidin hidro hlorid (Guanidine hydrochloride) |
| Glc | Glukoza (Glucose) |
| GlcNAc | N-acetil-D-glukozamin (N-Acetyl-D-glucosamine) |
| Glu | Glutaminska kiselina (Glutamic acid) |
| GMA | Glicidil metakrilat (Glycidyl Methacrylate) |
| GOx | Glukoza oksidaza (Glucose Oxidase) |

| | |
|----------------------|---|
| HG | Homogalakturonan (Homogalacturonan) |
| His | Histidin (Histidine) |
| HM | Visoko esterifikovan pektin (High-methoxy pectin) |
| HRP | Peroksidaza iz rena (Horseradish Peroxidase) |
| HRP-C | Peroksidaza iz rena izoenzim C (Horseradish Peroxidase Isoenzyme C) |
| KDO | 3-ketodeoksi-mano-2-oktulopiranozilonska kiselina (Ketodeoxymanno 2-octulopyranosylonic acid) |
| LiP | Lignin peroksidaza (Lignin peroxidase) |
| LM | Nisko esterifikovan pektin (Low-methoxy pectin) |
| Man | D-Manoza (D-Mannose) |
| MnP | Mangan peroksidaza (Manganese peroxidase) |
| PNP | Peroksidaza iz kikirikija (Peanut peroxidase) |
| RGI | Ramnogalakturonan I (Rhamnogalacturonan I) |
| RGII | Ramnogalakturonan II (Rhamnogalacturonan II) |
| Rha | D-Ramnoza (D-Rhamnose) |
| SBP | Peroksidaza iz soje (Soybean Peroxidase) |
| SEM | Skenirajući Elektronski Mikroskop (Scanning Electron Microscopy) |
| T_m | Temperatura topljenja (Melting Temperature) |
| Trp | Triptofan (Tryptophan) |
| Xyl | D-Ksiloza (D-Xylose) |

Sadržaj

| | |
|--|----------|
| Sadržaj..... | IX |
| I TEORIJSKI DEO | 1 |
| 1.1. Uvod..... | 1 |
| 1.2. Peroksidaze | 3 |
| 1.2.1. Peroksidaza iz soje | 4 |
| 1.2.2. Reakcija oksidacije | 5 |
| 1.2.3. Struktura | 6 |
| 1.2.4. Zastupljenost i izolovanje | 8 |
| 1.2.5. Karakteristike SBP | 10 |
| 1.2.6. Primena SBP | 11 |
| 1.2.7. Primena SBP u bioremedijaciji | 12 |
| 1.3. Imobilizacija enzima..... | 15 |
| 1.3.1. Enzimska aktivnost | 16 |
| 1.3.2. Enzimska stabilnost | 16 |
| 1.3.3. Selektivnost enzima | 17 |
| 1.3.4. Metode imobilizacije enzima..... | 18 |
| 1.3.4.1. Glutaraldehidna imobilizacija | 21 |
| 1.3.4.2. Perjodatna imobilizacija..... | 22 |
| 1.3.5. Nosači za imobilizaciju | 23 |
| 1.3.5.1. Fizičke osobine nosača..... | 24 |
| 1.3.5.2. Hemijske osobine nosača..... | 25 |
| 1.3.5.3. Glicidil metakrilatni polimeri..... | 25 |
| 1.3.5.4. Pektin | 28 |
| 1.3.5.4.1. Hemijska struktura | 29 |
| 1.3.5.4.2. Zastupljenost pektina | 31 |
| 1.3.5.4.3. Funkcija pektina | 31 |
| 1.3.5.4.4. Osobine pektina | 32 |
| 1.3.6. Hidrogelovi..... | 33 |
| 1.3.6.1. Primena hidrogelova..... | 34 |
| 1.3.6.2. Hidrogelovi od pektina..... | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 1.3.6.3. Primena pektina za imobilizaciju | 35 |
| 1.4. Enzimska kinetika..... | 36 |
| 1.4.1. Kinetika enzimske reakcije..... | 36 |
| 1.4.2. Kinetika imobilizovanih enzima | 38 |
| 1.4.3. Termostabilnost..... | 41 |
| 1.4.4. pH optimum..... | 43 |
| II MATERIJAL I METODE..... | 44 |
| 2.1. Izolovanje peroksidaze iz soje..... | 44 |
| 2.2. Karakterizacija izolovane rastvorne peroksidaze iz soje..... | 45 |
| 2.2.1. Određivanje koncentracije proteina Bradfordovom metodom | 45 |
| 2.2.2. Nativna elektroforeza | 46 |
| 2.2.3. Zimogram..... | 48 |
| 2.2.4. Određivanje enzimske aktivnosti rastvorne i imobilizovane SBP | 48 |
| 2.3. Imobilizacija peroksidaze iz soje | 50 |
| 2.3.1. Glutaralhidna imobilizacija enzima..... | 50 |
| 2.3.2. Perjodatna imobilizacija enzima | 52 |
| 2.3.3. Određivanje temperaturne stabilnosti | 53 |
| 2.3.4. Određivanje stabilnosti u organskom rastvaraču..... | 54 |
| 2.3.5. Određivanje pH optimuma | 55 |
| 2.3.6. Određivanje kinetičkih parametara K_m i V_{max} | 55 |
| 2.3.7. Operativna stabilnost imobilizata..... | 56 |
| 2.4. Modifikacija pektina perjodatom i tiraminom..... | 57 |
| 2.4.1. Imobilizacija SBP na hemijski modifikovanom pektinu | 58 |
| 2.4.2. Optimizacija imobilizacije SBP na hemijski modifikovanom pektinu | 59 |
| 2.4.3. Određivanje dimenzija kuglica pektinskog hidrogela sa imobilizovanom SBP na optičkom mikroskopu | 60 |
| 2.4.4. Snimanje spektara | 60 |
| 2.4.5. SEM analiza..... | 60 |
| 2.4.6. FTIR Spektroskopija | 60 |
| 2.4.7. 1H NMR Spektroskopija..... | 61 |
| 2.4.8. Elementalna analiza..... | 61 |
| 2.4.9. Titracija jonizabilnih grupa | 61 |
| 2.5. Uklanjanje fenola | 62 |

| | |
|--|------------|
| III REZULTATI I DISKUSIJA | 63 |
| 3.1. Izolacija peroksidaze iz soje | 63 |
| 3.2. Kovalentna imobilizacija peroksidaze iz soje na makroporoznom glicidil metakrilatu | 64 |
| 3.2.1. Nosač za imobilizaciju | 64 |
| 3.2.2. Optimizacija količine enzima po gramu polimera | 66 |
| 3.2.3. Termostabilnost i stabilnost u organskom rastvaraču | 68 |
| 3.2.4. pH optimum..... | 70 |
| 3.2.5. Određivanje kinetičkih parametara K_m i V_{max} | 71 |
| 3.2.6. Operativna stabilnost imobilizovane peroksidaze iz soje u bač reaktoru | 72 |
| 3.3. Imobilizacija peroksidaze iz soje na hemijski modifikovanom pektinu | 74 |
| 3.3.1. Karakterizacija tiramin-pektina..... | 75 |
| 3.3.2. Imobilizacija peroksidaze iz soje na tiramin-pektinu..... | 83 |
| 3.3.3. Optimizacija imobilizacije SBP | 86 |
| 3.3.4. pH optimum..... | 89 |
| 3.3.5. Termostabilnost..... | 90 |
| 3.3.6. Stabilnost u organskom rastvaraču | 91 |
| 3.3.7. Kinetičke studije..... | 92 |
| 3.3.8. Operativna stabilnost imobilizovane SBP | 93 |
| 3.4. Uklanjanje fenola iz otpadnih voda pomoću peroksidaze iz soje | 95 |
| 3.4.1. Optimizacija uslova za uklanjanje fenola rastvornom SBP | 95 |
| 3.4.2. Uklanjanje fenola imobilizovanom SBP na glicidil metakrilatu i tiramin-pektinu .. | 98 |
| IV ZAKLJUČAK..... | 100 |
| V LITERATURA | 101 |

I TEORIJSKI DEO

1.1. Uvod

Enzimi, makromolekuli proteinske strukture, predstavljaju glavne biološke katalizatore hemijskih reakcija u živim sistemima. Zbog svojih izuzetnih osobina sposobni su za katalizu složenih reakcija pri blagim eksperimentalnim uslovima. Zahvaljujući svojoj visokoj aktivnosti, selektivnosti prema supstratu i visokoj specifičnosti, enzimi u blagim uslovima (u pogledu jonske sile, pH, temperature, pritiska...) katalizuju izuzetno kompleksne hemijske reakcije. Ovi biokatalizatori velikom brzinom modifikuju jedinstvene funkcionalne grupe (između nekoliko vrlo sličnih) koje postoje u samo jednom supstratu a u prisustvu sličnih molekula. Enzimi mogu pokazivati grupnu specifičnost u slučaju kada katalizuju reakcije koje uključuju jednu funkcionalnu grupu prisutnu kod strukturno bliskih supstrata ili apsolutnu specifičnost gde samo jedan određeni supstrat podleže katalizi.¹

Zahvaljujući svojim svojstvima, enzimi se svrstavaju u pogodne katalizatore za industrijsku primenu. Međutim, postoje i određena ograničenja korišćenja enzima u industrijskim procesima i osobine koje nisu poželjne za takvu primenu: rastvorni su katalizatori, visoka cena izolovanja i prečišćavanja enzima, obično su vrlo nestabilni, mogu trpeti jaku inhibiciju od strane supstrata ili proizvoda reakcije i najbolje rade samo sa prirodnim supstratima u fiziološkim uslovima. Zato je neophodno poboljšati određene enzimске karakteristike za njihovu upotrebu u biotehnologiji. Pored toga, u industrijskim uslovima enzimski katalizovani hemijski procesi usled tehničkih i ekonomskih razloga iziskuju ponovnu upotrebu katalizatora ili kontinualnu upotrebu tokom dužeg vremenskog perioda.¹

U cilju prevazilaženja nekih od nedostataka rastvornih enzima i smanjenja troškova za primenu u industriji, pristupa se njihovoj imobilizaciji.

Peroksidaza iz soje (*Glycine max*) je enzim koji pripada klasi III biljnih peroksidaza i katalizuje reakciju oksidacije velikog broja supstrata u prisustvu vodonik peroksida (H_2O_2). Jednostavno se može izolovati iz semenog omotača (ljuske) soje koji predstavlja jeftin poljoprivredni otpadni proizvod. Pored toga ovaj enzim pokazuje izrazitu termostabilnost kao i mogućnost polimerizacije različitih aromatičnih jedinjenja u vodenim i organskim sredinama pa stoga u poslednje vreme postaje interesantan u istraživanjima vezanim za razvoj zelenih tehnologija i primenu za prečišćavanje zagađenih otpadnih voda. Toksična fenolna jedinjenja koja se smatraju najvećim zagađivačima otpadnih voda nisu biorazgrađiva i problem njihovog uklanjanja je vrlo važno i aktuelno ekološko pitanje.^{2,3} Enzimski tretman upotrebom peroksidaze i vodonik peroksida predstavlja efikasnu i selektivnu alternativnu metodu uklanjanja

fenola iz vodenih rastvora.⁴ U cilju smanjenja troškova i povećanja stabilnosti biokatalizatora mnoga istraživanja se okreću razvoju metoda imobilizacije peroksidaze iz soje (SBP – Soybean Peroxidase).

Na osnovu toga, definisani su ciljevi ove doktorske disertacije:

- Izolovanje peroksidaze iz semenog omotača soje.
- Optimizacija imobilizacije peroksidaze iz soje na makroporozne kopolimere glicidil metakrilata (GMA) i etilen glikol dimetakrilata (EGDMA) različitih površinskih karakteristika i dimenzija pora i karakterizacija dobijenih imobilizata.
- Poređenje parametara imobilizacije glutaraldehidne i perjodatne kovalentne metode imobilizacije peroksidaze iz soje na poli(GMA-co-EGDMA) polimere.
- Sinteza novog polimera hemijskom modifikacijom pektina i njegova karakterizacija.
- Primena hemijski modifikovanog pektina za pravljenje hidrogelova i imobilizaciju peroksidaze iz soje unutar kuglica hidrogela i karakterizacija dobijenog biokatalizatora.
- Testiranje primene dobijenih imobilizata za uklanjanje fenola iz vodenog rastvora.

1.2. Peroksidaze

Peroksidaze (oksidoreduktaze, EC 1.11.1.x, x od 1-16) su enzimi koji koriste vodonik peroksid da katalizuju oksidaciju raznih organskih i neorganskih jedinjenja. Mogu se izolovati iz velikog broja organizama, a velika većina kao prostetičku grupu sadrži protoporfirin IX (hem). Podeljene su u dve superfamilije: peroksidaze sisara (u koje spadaju laktoperoksidaze i mijeloperoksidaze) i biljne peroksidaze.⁵

Članovi biljne superfamilije peroksidaza su evolutivno povezani i klasifikovani u tri klase:

- Klasa I – unutarćelijske peroksidaze, je grupa koja uključuje peroksidaze kao što su: citohrom C peroksidaze (CcP – E.1.11.1.5) i askorbat peroksidaze (APX – EC 1.11.1.11).⁵⁻⁷
- Klasa II – vanćelijske peroksidaze, obuhvata lignin peroksidaze (LiP - EC 1.11.1.14), mangan peroksidaze (MnP - EC 1.11.1.13)⁸ iz *Phanerochaete chrysosporium* i ostalih gljiva koje razlaganjem obojenog lignina prave belu trulež.^{5,9} Lignin peroksidaza ima velikog značaja u agrokulturi i ekologiji zbog svoje uloge u biodegradaciji lignina.¹⁰
- Klasa III – vanćelijske biljne peroksidaze (EC 1.11.1.7), je grupa u koju spada i najproučavanija peroksidaza iz rena (HRP – Horseradish Peroxidase), kao i peroksidaze iz soje (SBP), ječma (BP1 – Barley grain peroxidase 1) i kikirikija (PNP – Peanut peroxidase).⁵

Svaka od pomenutih peroksidaza se može naći u većem broju izoenzimskih formi, koje se razlikuju u zavisnosti od stepena diferencijacije tkiva kao i biljnog organa iz kog potiču.¹¹ Biljne peroksidaze su posebno značajne i dobijaju sve veću pažnju u brojnim istraživanjima. U zavisnosti od njihove izoelektrične tačke mogu se razvrstati na kisele, neutralne i bazne.¹²

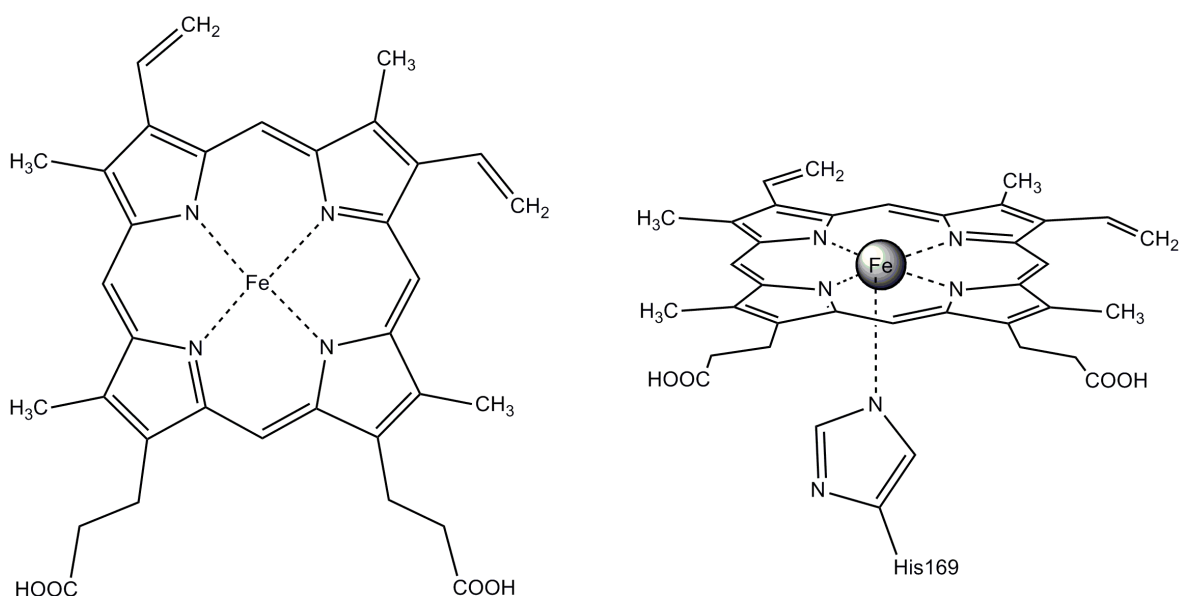
Peroksidaze klase III su uglavnom lokalizovane u biljnom ćelijskom zidu, vakuolama, transportnim organelama i granuliranom endoplazmatičnom retikulumu.¹³ Peroksidaze su uključene u važne metaboličke procese kao što su: biosinteza etilena i lignina, metabolizam auksina, polimerizacija ekstenzina, otpornost na bolesti i odbranu od patogeno, odgovor na stres izazvan zagađenjem vazduha, razvitak ćelije i očuvanje membranskog integriteta.^{11,14}

Sa ekonomskog stanovišta peroksidaza je važan enzim, koji se koristi u kliničke svrhe, pre svega u izradi dijagnostičkih kitova za enzimsko određivanje glukoze, mokraćne kiseline, holesterola, laktoze i drugih metabolita u biološkim materijalima,

kao i u nekim imunoesejima (ELISA i imunoblot).^{11,15} Ustanovljeno je da peroksidaze mogu biti korisne i za detoksikaciju i biotransformaciju različitih fenolnih jedinjenja, aromatičnih amina, bifenola i boja prisutnih u zagađenim otpadnim vodama iz raznih industrijskih postrojenja. Zbog toga se ulaže veliki napor u razvoj procedura za imobilizaciju peroksidaza iz različitih izvora u cilju uklanjanja ovih zagađivača i zaštite životne sredine.¹²

1.2.1. Peroksidaza iz soje

Peroksidaza iz ljuske soje je unutarćelijski anjonski glikoprotein sa izoelektričnom tačkom (pI) 4,1. Molekulska masa deglikozilovanog proteina je oko 37 kDa, sastoji se od 326 aminokiselinskih ostataka i sadrži 1 mol gvožđa koordinativno vezanog za protoporfirin IX po molu enzima. Glikozilovani protein ima molekulska masu od 42 kDa, što znači da glikan čini 12% ukupne mase enzima.¹⁶ Potvrđeno je prisustvo 6 mesta N-glikozilacije na proteinu a određen je i monosaharidni sastav koji čine: D-Manoza (Man), N-acetil-D-glukozamin (GlcNAc), D-Fukoza (Fuc) i D-Ksiloza (Xyl).¹⁷



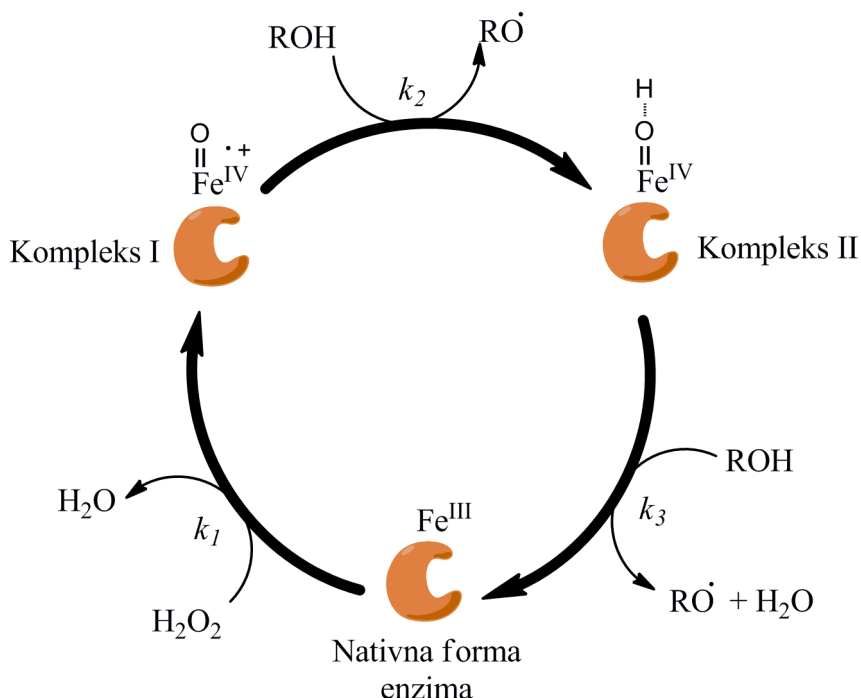
Slika 1: Struktura protoporfirina IX sa atomom gvožđa koordinativno vezanim u centru (levo) i trodimenzionalna struktura hema sa vezanim proksimalnim His169 (desno)

Strukturu prostetičke hem grupe čine četiri molekula pirola povezana u kompleksni organski prsten protoporfirina IX sa atomom gvožđa (Fe^{3+}) vezanim u sredini. Prsten je planarne strukture, a gvožđe pravi 6 koordinativnih veza od kojih su 4 sa azotima iz pirolnih jezgara u ravni prstena dok se preostala dva vezivna mesta nalaze

iznad i ispod ravni.¹⁸ Hem grupa je za enzim vezana preko petog koordinacionog mesta gvožđa sa azotom iz imidazolovog prstena prokismalnog histidina (His 169) koji se nalazi ispod ravni hema. Šesto koordinaciono mesto sa takozvane distalne strane hema, u kojem se nalazi aktivni centar enzima, dostupno je za vezivanje vodonik peroksida tokom katalitičkog procesa ili je slobodno u stanju mirovanja enzima. Manji molekuli kao što su ugljen-monoksid, cijanid, fluorid i azid takođe se vezuju za atom gvožđa sa distalne strane i prave oktaedarsku strukturu. Neki se vezuju samo u protonovanom obliku, koji je stabilizovan interakcijama i formiranjem vodoničnih veza sa aminokiselinama iz distalne šupljine hema – distalni histidin His42 i arginin Arg38.¹⁹

1.2.2. Reakcija oksidacije

Peroksidaza iz soje (SBP) katalizuje oksidaciju u vodi rastvorenih fenola vodonik peroksidom i proizvodi slobodne radikale, koji spontano međusobno reaguju proizvodeći oligomere i polimere visoke molekulske mase i male rastvorljivosti.^{20,21} Pored fenola SBP katalizuje oksidaciju drugih nefenolnih aromatičnih jedinjenja, aromatičnih amina i policikličnih aromatičnih ugljovodonika.¹⁰ Ovi proizvodi precipitiraju iz rastvora i mogu biti lako uklonjeni filtracijom ili centrifugiranjem/dekantovanjem.²⁰

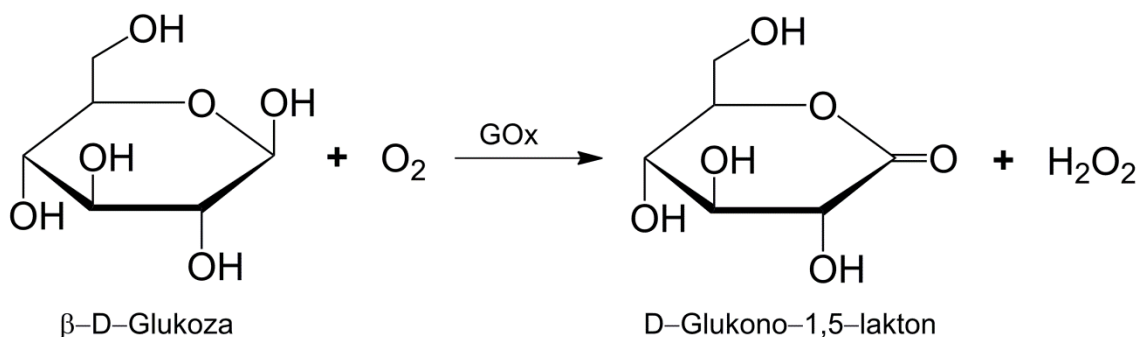


Slika 2: Mehanizam reakcije koju katalizuje peroksidaza

Mehanizam reakcije, koji važi za većinu peroksidaza klase III, uključuje dvoelektronsku oksidaciju na hemu do intermedijera koji je označen kao kompleks I, uz redukciju vodonik peroksida do vode. Naknadna jednoelektronska redukcija vraća enzim u stanje mirovanja preko drugog intermedijernog stanja (kompleks II) pri čemu dolazi do oksidacije dva molekula supstrata.¹³ Ovaj mehanizam omogućava oksidaciju nekoliko različitih neorganskih i organskih supstrata u širokom opsegu pH vrednosti.

Peroksidaze ispoljavaju maksimum katalitičke aktivnosti ukoliko je njihov kontakt sa vodonik peroksidom ograničen na nekoliko minuta. Takođe tokom produžene inkubacije, ukoliko koncentracija peroksida prelazi preko 1-3 mM, dolazi do povećanja količine katalitički neaktivne hidroksiperoksidaze (kompleksa III).²²

Niska operativna stabilnost usled oksidativne degradacije hem grupe predstavlja najveći nedostatak hem-zavisnih peroksidaza. Visoke koncentracije vodonik peroksida dovode do formiranja kompleksa III koji predstavlja reverzibilan kompleks koji nastaje od kompleksa II i polako se vraća u nativnu formu ili dolazi do ireverzibilne inhibicije SBP. Međutim ovaj problem se može prevazići unutrašnjom dostavom vodonik peroksida u reakciji glukoze i kiseonika. Na taj način oksidacijom glukoze u reakciji koju katalizuje glukoza oksidaza (Slika 3) dolazi do postepenog oslobađanja vodonik peroksida koji se dalje uklanja iz reakcione smese aktivnošću peroksidaze i izbegava se visoka početna koncentracija peroksida.¹³



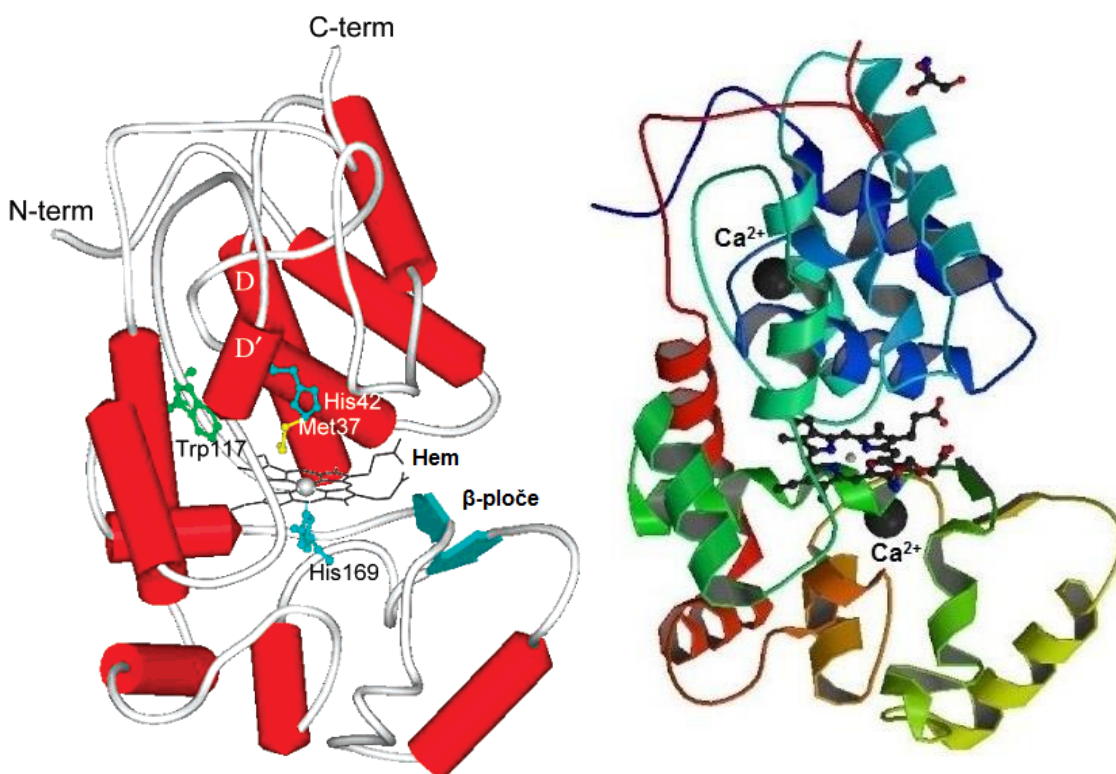
Slika 3: Reakcija oksidacije glukoze katalizovana glukoza oksidazom (GOx) uz oslobađanje vodonik peroksida

Inhibitor peroksidaze iz soje je cijanid koji pokazuje kompetitivnu inhibiciju.²³

1.2.3. Struktura

U poređenju sa izoenzimskom formom C (HRP-C peroksidaze iz rena), koja se najviše koristi iz klase III biljnih peroksidaza, SBP pokazuje 57% homologije u aminokiselinskoj sekvenci ali i upadljivu sličnost u pogledu trodimenzionalne kristalne

strukture.²⁴ Njihove zajedničke karakteristike uključuju prisustvo prostetičke grupe hem - protoporfirina IX sa gvožđem Fe(III), sličan katalitički mehanizam, četiri disulfidne veze (između aminokiselinskih ostataka 11-91, 44-49, 97-299 i 176-208 kod SBP odnosno 11-91, 44-49, 97-301 i 177-209 kod HRP), dva Ca²⁺ vezujuća mesta koja se nalaze distalno i proksimalno u odnosu na hem, osam glikana i jedan konzervirani ostatak triptofana (Trp117).^{13,25,26} Sekundarne strukture u vidu 13 α -heliksa i dve β -ploče karakteristične za peroksidaze klase III takođe su prisutne i kod SBP. Ukupno 45% sekundarne strukture čine α -heliksi dok β -ploče zauzimaju tek 3% aminokiselinske sekvence.²⁴



Slika 4: Šematski prikaz strukture peroksidaze iz soje (SBP) (levi: Kamal & Behere, 2002; desni: Protein data bank online: <http://www.rcsb.org/pdb>)

Kod SBP, šupljina u kojoj se nalazi hem ispunjena je mrežom vodoničnih veza koja se ostvaruje između distalnih molekula vode i ključnih aminokiselinskih ostataka, koja se preko propionil grupe hema, proteže prema proksimalnom kraju šupljine što je zajednička odlika većine peroksidaza klase III.²⁵ Hem je pozicioniran u regiji u kojoj su slabije zastupljeni heliksi sa dve β -ploče u neposrednoj blizini. Peto koordinaciono mesto gvožđa iz hema zauzima histidinski ostatak (His169) koji se nalazi na delu peptidnog lanca koji vodi ka β -ploči.²⁶

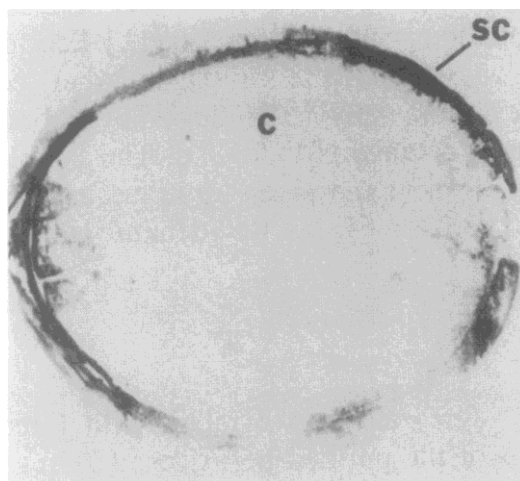
Ključni aminokiselinski ostaci od kojih zavisi enzimska aktivnost u aktivnom mestu, poput distalnog histidina (His42), distalnog arginina (Arg38), Asn70 vezanog

vodoničnom vezom za His42, Glu64 i proksimalni histidin (His169), koji imaju važnu ulogu u formiranju kompleksa I kod HRP-C, prisutni su i konzervirani i kod SBP.²⁶

1.2.4. Zastupljenost i izolovanje

Pored ostalih biljnih peroksidaza, SBP je jeftin nusproizvod iz ljuski semena soje. Može se naći u korenu, listu kao i u semenom omotaču tj. ljusci zrna soje.^{15,27} Smatra se da biljna vrsta *Glycine max* sadrži 15-20 izoenzimskih formi peroksidaze. Ljuske soje su jedinstveno biljno tkivo koje ima samo jednu izoenzimsku formu sa pl vrednosti 4,1.²⁸ Procenjeno je da se semenom omotaču soje sastoji od 11% proteina, 9-11% galaktomanana, 10-12% kiselih polisaharida, 9-10% ksilan hemiceluloze i oko 40% celuloze, dok ostatak čini lignin.²⁹

Na osnovu eksperimenata tkivnog „imprintinga“ pokazano je da je najveći deo peroksidazne aktivnosti semena soje u razvoju lokalizovan upravo u semenom omotaču. Vizuelizacija ove pojave postignuta je postavljanjem presečenog nezrelog semena na nitroceluloznu membranu natopljenu rastvorom 4-hloro-1-naftola. Presečeno seme je prvo osušeno minut, a onda blotovano na membranu, dobro pritisnuto da bi se potom razvila boja (Slika 5). Analizom enzimske aktivnosti pomoću gvajakola kao supstrata, na poprečnom preseku nezrelih semena soje pokazano je da je peroksidazna aktivnost 99 puta veća u semenom omotaču nego u kotiledonu na osnovu suve mase.³⁰



Slika 5: Poprečni presek zrna soje i lokalizacija peroksidazne aktivnosti imprintovan na nitroceluloznu membranu impregniranu sa rastvorom 4-hloro-1-naftola. (C-kotiledon; SC-semeni omotač) (Gillikin & Graham, 1991)

Peroksidaza izolovana iz ljuski zrna soje ima najveću enzimsku aktivnost u poređenju sa enzimima izolovanim iz ostalih delova biljke soje.¹⁵ Pored toga, u ljusci je prisutna u velikim količinama, lako se izoluje i predstavlja dostupan jeftin izvor enzima.²⁵ Tkivo ljuske semena soje može akumulirati velike količine peroksidaze u subepidermalnim HGC ćelijama (Hourglass cells). Akumulacija tačno određene izoenzimske forme peroksidaze u ljusci semena soje zavisi od prisustva jednog dominantnog gena Ep. Peroksidaza počinje da se akumulira približno 21 dan nakon cvetanja i nastavlja tokom sazrevanja ljuske semena.¹⁶ Enzimska aktivnost raste najviše između 21 i 28 dana sazrevanja, a zatim nešto slabijim intenzitetom raste do 50 dana. Poređenje aktivnosti peroksidaze iz komercijalno dobijenih suvih semena soje sa onim nakon 49 dana od sazrevanja dok je seme još bilo na biljci, pokazuje 1,2 puta veću aktivnost na suvim semenima. Takođe složenost proteinskog sadržaja semenog omotača soje dramatično opada tokom procesa sazrevanja. Povećanje aktivnosti u semenom omotaču tokom sazrevanja može biti i posledica povećane degradacije ostalih prisutnih solubilnih proteina.³⁰

Ovaj enzim čini 5% ukupnih rastvornih proteina ljuske soje, a smatra se da je to jedan od najbogatijih izvora peroksidaze.^{10,16} Peroksidaza iz soje zadržava svoju aktivnost u semenima najmanje 3 godine nakon žetve što pokazuje da je njena aktivnost stabilna.³⁰

Glavna funkcija zrelog semenog omotača je da obezbedi barijeru koja štiti ograđen embrion. Fiziološka uloga peroksidaze prepoznata je u nekoliko procesa tokom sazrevanja ljuske semena soje kao što su polimerizacija ekstenzina, lignifikacija i suberizacija. Proces lignifikacije katalizuje SBP tako što obavlja polimerizaciju koniferil alkohola, jednog od glavnih prekursora lignina.¹³ Peroksidaze uklanjanjem reaktivnih vrsta, redukcijom peroksida do vode, imaju važnu ulogu u smanjenju oksidativnog stresa i peroksidativnog oštećenja biljnih ćelija.³¹



Slika 6: Seme soje (levo) i odvojeni semeni omotač semena (desno)

Procena je da se trenutno na 6,0% ukupnog svetskog obradivog zemljišta uzgaja soja, a njena proizvodnja je višestruko skočila u proteklih 50 godina sa 17 miliona tona 1960. do 252 miliona tona 2011. godine. Procenjuje se da se ukupno 2% proizvedene soje troši u ishrani ljudi i to pre svega u obliku proteinskih obroka i jestivih ulja. Semena soje sadrže 18% ulja. Od ukupne proizvodnje ulja 95% čini ulje koje se koristi u ljudskoj ishrani a ostatak se koristi za različite industrijske proizvode kao što su: plastika, sredstva za uklanjanje boje, biogoriva i razne kozmetičke preparate.^{32,33} Proteinski sastav semena čini 38% mase od kojih se 98% koristi za proteinske obroke u ishrani stoke i vodenih životinja.³³

Uklanjanje ljuski je prvi korak u preradi soje za proizvodnju ulja i stočne hrane. Odvajanje semenog omotača se na industrijskoj skali postiže naizmeničnim zagrevanjem i sušenjem koje izaziva skupljanje zrna i odvajanje od ljuske, zatim nežno valjanje koje razbija ljuske bez značajnog oštećenja i mrvljenja zrna i na kraju razdvajanje grubih zrna od lakih fragmenata ljuski strujanjem vazduha u suprotnom smeru. Trenutno se najveći deo ljuski soje koristi kao stočna hrana. Pokazano je da je samo ispiranje ovih ljuski vodom dovoljno za izolovanje peroksidaze iz soje.³²

1.2.5. Karakteristike SBP

Istraživanja u svetu se sve više fokusiraju na SBP, pošto je jeftinija od peroksidaze iz rena (HRP), deluje na širi spektar supstrata, duže ostaje aktivna i zadržava katalitičku aktivnost pri širem opsegu pH vrednosti.²⁰ Mogućnost primene leži upravo u njenoj stabilnosti na niskim pH vrednostima kao i neobično visokoj termalnoj stabilnosti. Temperatura inaktivacije SBP iznosi 90,5°C i značajno je viša od temperature inaktivacije peroksidaze iz gljive *Coprinus cinereus* (65°C) koja pripada peroksidazama klase II ali i od standardne HRP-C (81,5°C).²⁴ Utvrđeno je da SBP ne podleže termalnoj inaktivaciji ispod 70°C čak i nakon 12h inkubacije.²⁵

Prilikom zagrevanja SBP dolazi do određenih ireverzibilnih promena koje se manifestuju gubitkom hema. U poređenju sa HRP-C primećeno je da je SBP manje osetljiva kako na gubitak hema usled zagrevanja, tako i na trajnu inaktivaciju vodonik peroksidom. Takođe je utvrđeno da SBP pokazuje veći afinitet prema hemu u odnosu na HRP-C. Možemo porediti termalnu stabilnost SBP i HRP-C tako što ćemo uporediti njihove T_m vrednosti. Na osnovu eksperimentalno utvrđenih T_m vrednosti HRP-C (74°C) može se zaključiti da SBP (86°C) pokazuje veću termalnu stabilnost. Poređenjem temperaturne denaturacije redukovane SBP pomoću jakih redukcionih sredstava poput DTT-a na neutralnim pH pokazuje smanjenu tačku topljenja (75°C) što pokazuje da redukcija disulfidnih veza između heliksa značajno smanjuje termičku stabilnost

enzima. U slučaju HRP-C, T_m se smanjuje na 65°C nakon tretmana sa DTT-om. Za stabilnost enzima ključnu ulogu ima prostetička grupa, što se može zaključiti na osnovu drastično smanjene T_m vrednosti za apo-SBP koja iznosi 38°C. Na osnovu toga može se izračunati doprinos hem grupe ukupnoj termalnoj stabilnosti SBP (~56%).²⁵

U cilju razumevanja stabilnosti peroksidaze iz soje na visokim temperaturama, praćena je denaturacija SBP u prisustvu različitih koncentracija guanidin hidrohlorida (GdnHCl) pri pH 7,0. U odsustvu bilo kakvog denaturacionog sredstva temperatura topljenja sekundarne strukture SBP javlja se na T_m vrednosti od 86°C. Sa povećanjem koncentracije GdnHCl, denaturacija se odvija na nižim temperaturama. Tako su dobijene vrednosti T_m u visini 55°C (za konc. GdnHCl od 5,8 M), 50°C (6,3 M) i 46°C (6,9 M) pri čemu varijacija T_m u odnosu na koncentraciju denaturacionog sredstva pokazuje linearnu zavisnost.²⁵

Peroksidaza iz soje ne gubi aktivnost na niskim pH vrednostima a aktivna je i u organskim rastvaračima.²⁵ Stabilnost i enzimaska aktivnost solubilne SBP određivane su u različitim puferskim rastvorima u rasponu pH vrednosti od 2,6 do 10,0. Iz dobijenih rezultata zaključeno je da je SBP aktivna u širokom opsegu pH sa maksimalnim vrednostima između pH 5,0 do 6,5.¹⁵ Ove osobine je čine pogodnom za potencijalnu industrijsku primenu.²⁵ Konformaciona stabilnost SBP koja pod fiziološkim uslovima iznosi 43,3 kJ/mol,²⁵ značajno je viša od vrednosti za HRP-C (~17 kJ/mol).³⁴ Katalitička aktivnost pokazuje 1,5 puta veću vrednost u odnosu na HRP-C. Peroksidaza iz soje se takođe pokazala otporna na denaturaciju ureom, ostaje u nativnoj konformaciji čak do 5 M guanidin hidrohlorida.¹⁴

1.2.6. Primena SBP

Peroksidaza iz soje nalazi svoju primenu u različitim oblastima bionauka i biotehnologije i može se koristiti za bioremedijaciju i tretman otpadnih voda, kao biokatalizator u organskim sintezama, za dijagnostičke testove i terapijske svrhe, za proizvodnju biosenzora, pa sve do ekspresije rekombinantnih proteina i proteinskog inženjeringa.³⁵

Naučna istraživanja se sve više fokusiraju na primenu peroksidaza kao katalizatora za organske sinteze kako u vodenim rastvorima tako i u organskim rastvaračima. Prednost enzimске sinteze u odnosu na klasične metode organske hemije su velika specifičnost, blagi reakcioni uslovi i ekološki prihvatljiva alternativa hemijskoj sintezi.¹³

SBP je korišćena za polimerizaciju anilina u vodenoj sredini ili u prisustvu organskog rastvarača. Polianilin je dosta izučavan polimer, interesantan zbog svoje hemijske i termalne stabilnosti i dobre električne provodljivosti. Zbog ovih karakteristika ima mogućnost široke primene. Hemijska oksidacija anilina u sintezi polianilina ima brojnih nedostataka, a najveći su grubi reakcioni uslovi u ekstremno kiseloj sredini korišćenjem jakih oksidujućih sredstava (često amonijum persulfata) pri čemu dolazi do produkcije velike količine nusproizvoda sulfonijum jona i soli amonijum sulfata. Enzimaska sinteza polianilina odigrava se takođe na nižim pH i temperaturi od 1°C, ali ne dolazi do oslobađanja štetnih nusproizvoda.³⁶

Polimerizacijom kardnola u organskim rastvaračima SBP je korišćena za dobijanje polikardnola, materijala sa potencijalnom primenom u sprečavanju formiranja biofilmova.³⁷

Peroksidaza iz soje se pokazala kao efikasni katalizator za bromovanje aromatičnih jedinjenja. Za razliku od grubih uslova potrebnih za hemijsko halogenovanje, enzimsko bromovanje odvija se pod blagim reakcionim uslovima i troši jednostavne bromidne soli. Mehanizam reakcije enzimskog bromovanja je nešto drugačiji u odnosu na standardni mehanizam reakcije SBP. Nakon inicijalne oksidacije SBP i formiranja kompleksa I, dolazi do bromovanja i nastajanja E-OB_r intermedijera koji se u dvoelektronskom transferu vraća u nativnu formu pri čemu dolazi do bromovanja aromatičnog supstrata i oslobađanja molekula vode.¹⁰

Biosenzor je analitički element u kojem se pomoću osetljivog biološkog materijala (često enzima) i transduktora proizvodi električni signal proporcionalan koncentraciji ciljanog hemijskog jedinjenja u kompleksnom tečnom analitu. Iako se od klasičnih hem peroksidaza za primenu u biosenzorima najučestalije koristi HRP, u poslednje vreme značajno je povećano interesovanje za primenu SBP pre svega zbog njenih prednosti u pogledu katalitičke aktivnosti i stabilnosti. Neke osobine kao što je aktivnost SBP u pH opsegu od 2-6 omogućuju i širu primenu.¹³ Upravo ova osobina iskorišćena je za određivanje vodonik peroksida u kiselim uslovima pomoću SBP imobilizovane na tanak sol-gel film.³⁸

1.2.7. Primena SBP u bioremedijaciji

Zagađenje životne sredine raznim aromatičnim jedinjenjima predstavlja veliki ekološki problem. Većinu zagađivača čine fenoli koji nisu biorazgradivi a mogu imati opasno kancerogeno, mutageno i akutno toksično dejstvo.^{2,3} Fenolna jedinjenja dospevaju u okolinu uglavnom putem otpadnih voda poreklom iz industrijskih postrojenja kao što su naftne rafinerije, drvno-prerađivačka industrija, tekstilna

industrija, livnice metala, industrije celuloze, papira i plastike, itd.^{2,4,20} Iako postoje zakonski propisi o dozvoljenoj količini ukupnih fenola po kubnom metru vode koja se izliva u reke, ova odredba se često ne poštuje zbog komplikovanih procedura za njegovo uklanjanje.² Konvencionalni tretman otpadnih voda fizičko-hemijskim i biološkim metodama je nedovoljno efikasan, a pored toga ove tehnike su najčešće dosta komplikovane i skupe.²⁰ Fizičko-hemijski tretmani, kao što je adsorpcija na aktivnom uglju, imaju nisku selektivnost prema ciljanim aromatičnim jedinjenjima i njihova efikasnost opada sa povećanjem koncentracije zagađivača.^{2,3} Biološke metode korišćene za smanjenje organskog sadržaja otpadnih voda upotrebljavaju mulj, ali pokazuju slabu efikasnost u smanjenju nivoa toksičnih zagađivača. Proces hemijske oksidacije su skupi za tretman visokog nivoa zagađenja, ali su efikasni u slučaju razblaženih otpadnih voda.²

Zato su u poslednje vreme uloženi veliki naponi u naučno-istraživačkom radu za uspostavljanje novih efikasnih i jeftinijih rešenja za uklanjanje fenola iz otpadnih voda, kao što su enzimski i mikrobiološki razgradnja.² Enzimski tretman primenom oksidoreduktivnih enzima koji je predložen početkom 80-ih godina prošlog veka donosi mnoge prednosti u odnosu na klasične metode pošto ima niske energetske zahteve, lako se kontroliše, može se upotrebiti u širokom opsegu radnih uslova i ostavlja minimalne posledice po životnu sredinu a u poređenju sa mikroorganizmima, enzimi su lakši za rukovanje i skladištenje.^{2,4,20} Peroksidaze katalizuju oksidaciju i polimerizaciju fenolnih jedinjenja pri čemu nastaju nerastvorni polifenolni proizvodi koji precipitiraju i lako se mogu ukloniti iz vodenog rastvora.³⁹

Međutim, upotreba solubilne peroksidaze ima nekoliko mana: enzimski aktivnost se može izgubiti usled inhibicije ili inaktivacije u brojnim nepoželjnim sporednim reakcijama, može doći do koprecipitacije enzima sa nastalim polimerom i nema ponovne upotrebe korišćenog enzima jer je odvajanje iz reakcione smeše praktično nemoguće.^{3,20} Korišćenjem aditiva kao što je polietilen glikol mogu se donekle ublažiti navedeni efekti. Zato se najčešće koristi peroksidaza imobilizovana na različite nosače čime se dobija biokatalizator povećane stabilnosti sa mogućnošću ponovne ili kontinualne upotrebe.³

Primena peroksidaza u bioremedijaciji i prečišćavanju otpadnih voda takođe je najbolje proučena na modelu visoko eksprimirane, stabilizovane rekombinantne HRP, ali nekoliko prepreka onemogućuju njenu široku primenu. Pre svega, to su netolerancija na visoke koncentracije supstrata (vodonik peroksida), slaba mogućnost ponovne primene i cena enzima koja može biti značajna jer je enzim podložan inaktivaciji raznim sporednim reakcijama tokom tretmana otpadnih voda.^{13,40} Kao jeftinija alternativa HRP-a peroksidaza iz soje je korišćena za uklanjanje različitih fenolnih jedinjenja iz sintetičkih otpadnih voda pri čemu su uspešno uklonjeni fenol, o-

krezol (o-metilfenol) i m-krezol (m-metilfenol). Određivanjem optimalnih uslova utvrđeno je da je enzim najproduktivniji pri koncentraciji peroksida od 1 mM na neutralnom pH.⁴ Jednostavno izolovanje, širok opseg pH i temperaturne stabilnosti i niska cena polazne sirovine, iz poljoprivrednog otpada lako dostupnog u velikom broju zemalja širom sveta, čini je izuzetno atraktivnim kandidatom za upotrebu u bioremedijaciji.^{4,40}

Peroksidaza iz soje efikasno je imobilizovana metodom adsorpcije na aktivni ugalj pri temperaturi od 50°C i pH 5,0. Imobilizat je primenjen za dekontaminaciju organskih zagađivača iz otpadnih voda.⁴⁰ Kovalentno imobilizovana SBP na vlaknima aromatičnog poliamida preko glutaraldehida kao „spejsera” testirana je za uklanjanje fenola. Tokom 5h enzimskog tretmana uklonjeno je 91,25% fenola iz kontaminiranih industrijskih otpadnih voda.²⁸

Procedura eliminacije 4-hlorofenola pomoću SBP takođe pokazuje dobre rezultate sa preko 90% efikasnosti pri određenim reakcionim uslovima.²⁰

U poslednje vreme sve više se ulaže u razvoj zelenih tehnologija za bioremedijaciju. U cilju lakšeg odvajanja od reakcione smeše, za imobilizaciju SBP korišćene su čestice magnetnih svojstava na bazi Fe₃O₄ obložene silicijum-dioksidom. Derivatizacijom površinskog silicijumskog sloja dobijene su amino funkcionalne grupe dostupne za kovalentnu imobilizaciju uz korišćenje glutaraldehida za umrežavanje. Prednost imobilizacije na magnetne nanočestice je u lakom odvajanju po završetku reakcije dejstvom magnetnog polja.²¹

Kako se SBP lako ekstrahuje jednostavnim potapanjem ljuski soje u vodu ili puferski rastvor, moguće je koristiti i same ljuske za enzimski tretman. Kako predstavljaju otpadni materijal u preradi soje primena čitavih ljuski ekonomski je isplativa, a takođe umanjuje dodatne troškove remedijacije zagađenog okruženja. Na ovaj način ljuske soje postepeno otpuštaju enzim, a istovremeno absorbuju polimerizovani proizvod. Testirana je upotreba različitih količina ljuski dodatih direktno u reakcionu smešu i utvrđeno je da je efikasnost uklanjanja fenola pomoću 10 g/L ljuski tokom 24h jednaka dodatku 60-80 g/L tokom 2h. U cilju izbegavanja zagađenja životne sredine preporučeno je korišćenje manje količine ljuski tokom dužeg vremenskog perioda umesto primene velike količine u kraćim intervalima.³⁶

1.3. Imobilizacija enzima

Imobilizacija enzima predstavlja fizičko ili hemijsko ograničavanje (lokalizaciju) kretanja enzima u okviru definisane oblasti prostora uz očuvanje njegove katalitičke aktivnosti. Enzimi se mogu vezivati za nosač različitim tipovima interakcija počev od reverzibilne fizičke adsorpcije i jonskih veza do stabilnog kovalentnog vezivanja. Glavne komponente celog sistema imobilizovanih enzima su sam enzim, nosač ili matriks i način vezivanja enzima za nosač.⁴¹

Osobine imobilizovanih i rastvornih enzima se u mnogome razlikuju. Imobilizovani enzimi imaju nekoliko **prednosti** u odnosu na rastvornu (slobodnu) formu koje uključuju: ponovnu ili kontinualnu upotrebu u reaktorima, veću stabilnost enzima (povećana otpornost na denaturišuće faktore i reakcione uslove - varijacije u temperaturi i pH), kontrolu formiranja proizvoda, smanjenje troškova i lako odvajanje od reakcione smeše po završetku reakcije.^{3,42}

Postoje i određeni **nedostaci** imobilizacije enzima. Deo aktivnosti može biti izgubljen tokom procesa imobilizacije, ali i dodatno tokom same reakcije može doći do delimičnog taloženja reakcionog proizvoda u vidu oligomera i polimera preko površine katalitičke čestice smanjujući aktivnost direktno blokiranjem aktivnog centra enzima ili indirektno stvaranjem difuzionih ograničenja za supstrat.³ Bez obzira na način imobilizacije može doći do „curenja“ enzima sa nosača čime se gubi deo početne aktivnosti i kontaminira proizvod reakcije. Česta su i difuziona ograničenja pogotovo prema makromolekularnim supstratima koji usled sternih smetnji ne mogu prići aktivnom centru pa je i katalitička efikasnost znatno snižena.⁴³ Nekad je i visoka cena nosača ograničavajući faktor primene ovih biokatalizatora.

Imobilizovani enzimi sve češće nalaze svoju primenu u industriji, analitici, medicini i raznim oblastima nauke.⁴³ Imobilizacija enzima može se definisati kao tehnika koja omogućava ponovnu upotrebu ili kontinualnu upotrebu biokatalizatora, pri čemu su jednostavnost i isplativost ključne osobine u interesu industrije.¹ Zahtevi koje bi trebao da ispunjava biokatalizator za primenu u modernom katalitičkom procesu su: da poseduje visoku aktivnost, operiše u blagim reakcionim uslovima, pokazuje visoku selektivnost prema supstratu (da bi umanjio sporedne reakcije), da može da se koristi u velikom broju reakcionih ciklusa tj. ima visoku operativnu stabilnost, da ima visoku produktivnost ali pored svega toga da bude isplativ odnosno ima nisku cenu proizvodnje. Pored toga mora biti bezbedan za upotrebu (da zadovoljava bezbednosne propise).⁴⁴

Zbog velikog broja gore navedenih parametara, koji su ključni za uspešnu imobilizaciju, ne postoji jedinstven model koji bi se mogao primeniti. Zbog toga je neophodno za svaku pojedinačnu primenu pronaći zasebna rešenja i uslove koji bi zadovoljili visoko specifične zahteve industrije. Prilagođavanje procesa imobilizacije za ispunjenje ovih kriterijuma oslanja se na težak eksperimentalni proces pokušaja i grešaka.

Specifičnost proističe iz trodimenzionalne strukture enzimskog aktivnog mesta, koja je komplementarna prelaznom stanju supstrata tokom reakcije. Katalitički učinak imobilizovanog enzima zavisi od aktivnosti, stabilnosti i selektivnosti.

1.3.1. Enzimska aktivnost

Ustanovljeno je da mnogi enzimi imobilizovani različitim tehnikama imobilizacije ispoljavaju veću aktivnost u odnosu na solubilni oblik. Uslovi koji utiču na zadržavanje aktivnosti su količina nanetog enzima, pH, izbor nosača i priroda vezivanja. Aktivnost imobilizata zavisi od količine nanetog enzima, pri čemu dolazi do povećavanja specifične aktivnosti sa povećanjem količine imobilizovanog enzima. Međutim, pri velikim količinama dodatog enzima, dolazi do nejednake raspodele enzima unutar porozne strukture matriksa i do određenih difuzionih ograničenja supstrata pa samim tim i smanjenja očekivane aktivnosti.

Konformaciona fleksibilnost je uglavnom povezana sa enzimskom aktivnošću. Ograničavanje fleksibilnosti za posledicu najčešće ima smanjenje aktivnosti. Zato je prilikom imobilizacije poželjno koristiti odgovarajući „spejser” jer je dokazano da se na taj način bolje zadržava enzimska aktivnost u odnosu na imobilizaciju bez „spejsera”.⁴⁴ Konformacione promene u nekim slučajevima mogu dovesti i do povećanja enzimске aktivnosti, posebno kada povećavaju dostupnost aktivnom centru, bez narušavanja njegove katalitičke sposobnosti. Efekat vezivanja molekula enzima za nosač može se odraziti na aktivnost, a ovaj uticaj zavisi od broja nastalih veza, njihovog položaja i prirode, tj. jačine same veze (kovalentna, koordinativna, jonska...). Pored navedenih efekata, na povećanje enzimске aktivnosti imobilizovanog enzima može uticati mikrookruženje i molekulska orijentacija unutar nosača.

1.3.2. Enzimska stabilnost

Svaki enzim shodno svojoj prirodnoj funkciji i fiziološkim uslovima sredine u kojoj se nalazi pokazuje različitu stabilnost u ekstremnim uslovima sredine kao što su:

temperatura, pH, organski rastvarači. Na osnovu toga stabilnost slobodnog enzima obuhvata nekoliko kategorija kao što su: termostabilnost, pH stabilnost, stabilnost u organskom rastvaraču i operativna stabilnost. Pokazalo se da imobilizacijom enzima najčešće dolazi do stabilizacije, pri čemu stepen stabilizacije može biti različit u različitim kategorijama u zavisnosti od metode imobilizacije.

Dok stabilnost rastvornog enzima zavisi samo od njegove trodimenzionalne strukture i konformacije, stabilnost imobilizovanog enzima u mnogome zavisi od brojnih faktora kao što su: hemijske i fizičke osobine nosača i „spejsera“, interakcija enzima sa nosačem, položaj mesta vezivanja i broj ostvarenih veza, sloboda konformacionih pomeranja unutar matriksa, mikrookruženje i hidratacioni efekat u blizini enzima i uslovi u kojima je izvedena imobilizacija.⁴⁴

Povećana stabilnost imobilizovanih enzima najčešće se pripisuje unutrašnjim karakteristikama samog procesa imobilizacije. Kod kovalentnog vezivanja kao posledica hemijskih modifikacija može doći do formiranja novih vodoničnih veza unutar molekula enzima ali i do povećane rigidnosti konformacije usled višestrukog vezivanja. Povoljna mikrookolina adekvatnim izborom nosača i molekulske ograničavanje koje se često javlja kod okludovanja mogu takođe uticati na dobijanje imobilizovanog biokatalizatora koji pokazuje povećanu stabilnost u odnosu na nativni oblik. Međutim, teško je proceniti koji metod može dati stabilne imobilizate, jer čak isti metod može dovesti do različitog stepena stabilizacije enzima.

1.3.3. Selektivnost enzima

Enzimi su izuzetno selektivni biokatalizatori, sposobni da izaberu jedan supstrat iz velikog broja sličnih jedinjenja. Selektivnost se može ispoljavati na različite načine:

- a) selektivnost supstrata – sposobnost da razlikuje i reaguje na manju ograničenu grupu jedinjenja unutar veće grupe hemijski srodnih jedinjenja;
- b) stereoselektivnost – sposobnost da reaguje isključivo sa jednim enantiometrom ili diastereometrom;
- c) regioselektivnost – sposobnost da reaguje isključivo na jednu lokaciju na molekulu;
- d) selektivnost za funkcionalnu grupu – sposobnost da selektivno deluje na jednu funkcionalnu grupu u prisustvu drugih jednako ili čak više reaktivnih funkcionalnih grupa.

Tehnikama imobilizacije enzima može se uticati na selektivnost enzima prema supstratu. Prema mestu delovanja mogu se razvrstati u dve kategorije: selektivnost

kontrolisana nosačem (ograničenjem veličine pora ili difuzionim ograničenjem) i selektivnost kontrolisana konformacijom (mikrookruženjem ili promenama u aktivnom centru). Postoje brojni primeri u kojima se selektivnost enzima promenila različitim tehnikama imobilizacije. Pokazano je da je moguće neselektivne enzime transformisati u npr. stereoselektivne nakon imobilizacije.⁴⁴

1.3.4. Metode imobilizacije enzima

Sve metode imobilizacije enzima se mogu podeliti u nekoliko osnovnih kategorija, mada ima dosta varijacija osnovnih metoda kao i njihovih kombinacija:

- a) Adsorpcija
- b) Kovalentna imobilizacija
- c) Umrežavanje
- d) Okludovanje
- e) Enkapsulacija

Većina ovih metoda imobilizacije (kovalentna, umrežavanje, okludovanje i enkapsulacija) su ireverzibilne, odnosno nakon vezivanja biokatalizatora za nosač nije moguće njihovo odvajanje bez narušavanja aktivnosti enzima ili oštećenja nosača. Kod reverzibilnih metoda moguće je regenerisati nosač za ponovnu upotrebu ispiranjem enzima pod blagim uslovima. U reverzibilne metode spadaju adsorpcija (nespecifična, jonska, hidrofobna, afinitetna i heliranje) i imobilizacija formiranjem disulfidne veze.⁴¹

a) Adsorpcija je najstarija i najjednostavnija metoda imobilizacije enzima koji se nekovalentnim vezama vezuje za čvrsti nerastvorni nosač. Kod ove vrste imobilizacije enzim se za nosač vezuje različitim nespecifičnim interakcijama kao što su Van der Waalove sile, vodonične veze, hidrofobne, elektrostatičke interakcije i afinitetna adsorpcija. Prednosti imobilizacije enzima adsorpcijom su u jednostavnosti ove metode, koja se odvija pod blagim uslovima pri kojima ne dolazi do hemijske modifikacije ni denaturacije enzima (enzimska aktivnost ostaje očuvana) i reverzibilnosti, koja omogućava prečišćavanje enzima i ponovnu upotrebu nosača.⁴⁴ Usled relativno slabih interakcija između enzima i nosača najveću manu ove metode predstavlja „curenje“ enzima.

Priroda sila koje učestvuju u nekovalentnoj imobilizaciji je takva da se mogu lako raskinuti jer zavise od promena uslova sredine koji utiču na jačinu interakcija: temperatura, pH vrednost, jonska sila rastvora, polarnost rastvarača.⁴¹ Zbog velikog broja faktora koji utiču na jačinu vezivanja, neophodna je intenzivnija optimizacija uslova imobilizacije.⁴⁵ Kako bi se

smanjilo spiranje enzima, ova metoda se često kombinuje sa umrežavanjem što obezbeđuje bolje zadržavanje enzima na nosaču, očuvanje aktivnosti i termostabilnosti enzima i povećanje operativne stabilnosti.⁴⁴

b) Kovalentna imobilizacija podrazumeva formiranje stabilne kovalentne veze direktno između enzima i nosača ili posredno preko „spejsera”. Za postizanje efikasnog vezivanja nepohodno je izvršiti aktivaciju funkcionalnih grupa na polimeru ili enzimu. Ova metoda je postala jedna od najčešće primenjivanih zbog stabilizacije konformacije enzima usled višestrukog vezivanja za nosač. Tu leži i najveća prednost ove metode, stabilna i čvrsta kovalentna veza između enzima i nosača ne dozvoljava spiranje i „curenje“ enzima sa imobilizata tokom upotrebe. Najveći nedostak kovalentne metode je taj što (zbog nekada grubih reakcionih uslova) tokom procesa imobilizacije može doći do hemijske modifikacije enzima i gubitka aktivnosti usled delimične ili potpune inaktivacije. Funkcionalne grupe enzima koje obično učestvuju u stvaranju kovalentne veze su najčešće slobodne N-terminalne α -amino grupe ili ϵ -amino grupe lizina, ali i nešto ređe sulfhidrilne, hidrosilne, fenolne, imidazolne ili slobodne karboksilne grupe.⁴⁶ Jedinostveni metod kovalentnog vezivanja čine imobilizati nastali vezivanjem disulfidnom (S-S) vezom koja je stabilna ali reverzibilna kovalentna veza i može se raskinuti pod blagim uslovima dejstvom nekog redukujućeg agensa.^{41,47} Imobilizacije pomoću glutaraldehida i perjodata korišćene u ovom radu za imobilizaciju peroksidaze iz soje na makroporozne nosače spadaju u kovalentne metode.

c) Umrežavanje enzima se postiže pomoću bi- ili multi- funkcionalnih reagenasa koji reaguju sa molekulima enzima gradeći nerastvornu trodimenzionalnu mrežu. Reagensi za umrežavanje koji se najčešće koriste su glutaraldehyd, diizocijanati, glioksal itd.⁴⁵ Ovako nastali imobilizati nazvani su umreženi enzimi (CLE – Cross-linked enzymes).⁴⁸ Kod ove metode umreženi biokatalizator ima ulogu sopstvenog nosača tako da praktično imobilizat čini čist enzim čime se eliminišu sve prednosti i nedostaci povezani sa nosačem.⁴⁹ U tome leži i prednost ove metode jer kako je molekulaska masa umreživača zanemarljiva u poređenju sa enzimom, dobijeni biokatalizator se sastoji od 100% aktivnog enzima. Međutim, ova metoda ima i brojne nedostatke: niska aktivnost u odnosu na količinu vezanog enzima, slaba reproduktivnost, velika difuziona ograničenja praktično čine molekule enzima u unutrašnjosti nedostupnim supstratu, loše mehaničke osobine mreže i teškoće u rukovanju sa gelastim imobilizatom. Kao i kod kovalentne metode može doći do gubitka aktivnosti zbog inaktivacije enzima dejstvom reaktivnih umreživača.⁴⁸

Da bi se prevazišli neki nedostaci klasičnog umrežavanja razvijene su metode umreženih enzimskih kristala (CLEC) i umreženih enzimskih agregata (CLEA).

Umreženi enzimski kristali (CLEC – Cross-Linked Enzyme Crystals) dobijaju se kristalizacijom čistog enzima i njegovim naknadnim umrežavanjem dodatkom odgovarajućih reagenasa.⁴⁸ Učinak dobijenog imobilizata u velikoj meri zavisi od konformacije enzimskog molekula u kristalnoj rešetki. Zato je izbor konformacije u kojoj ispoljava najveću aktivnost variranjem uslova kristalizacije presudna za uspešnu imobilizaciju. Aktivna konformacija može se očuvati kristalizacijom u prisustvu supstrata ili njegovih analoga.⁴⁴ Čvrsto umrežena kristalna rešetka proteina ograničava njegovu konformacionu slobodu zbog čega se pokazala znatno stabilnijom na denaturišuće efekte temperature, organskih rastvarača i proteolizu u odnosu na solubilni ili liofilizovani enzim.^{45,48} Suštinski problem i nedostatak CLEC-ova je potreba za kristalizacijom enzima, jer dobijanje neophodnog proteina visoke čistoće zahteva dugu i komplikovanu proceduru.⁴⁸

Umreženi enzimski agregati (CLEA – Cross-Linked Enzyme Aggregates) dobijaju se znatno jednostavnije taloženjem enzima iz vodenog rastvora i umrežavanjem nastalih agregata. U odnosu na CLEC-ove pokazuju uporedive rezultate. Agregati nastaju precipitacijom enzima klasičnim metodama bez narušavanja njihove tercijarne strukture, dodatkom soli (amonijum sulfat), organskih rastvarača (aceton) ili polimera (polietilenglikol).⁴⁸

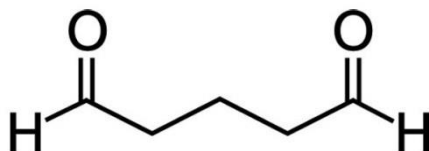
- d) Okludovanje** predstavlja metod fizičkog zarobljavanja molekula enzima unutar trodimenzionalne polimerne mreže. Enzim ne učestvuje u reakciji nego ostaje u rastvornom obliku unutar nastalog hidrogela pa zato nativna struktura enzima ostaje očuvana i ne dolazi do gubitka aktivnosti tokom imobilizacije. Pore unutar polimerne strukture trebalo bi da budu dovoljno velike da dozvole nesmetanu difuziju molekula supstrata i proizvoda, ali da ne propuštaju enzim. Oblik i veličina čestica hidrogela zavisi od nosača, načina polimerizacije ali i osobenosti primene. Najčešće se prave u obliku kuglica, diskova, vlakana, membrana ili tankih filmova.⁴⁴ Prednost ove metode je u tome što omogućava imobilizaciju više enzima ili celih ćelija istovremeno. Najveći nedostak ove metode je delimično „curenje” enzima, pogotovo ako su manjih molekulskih masa. Ovaj problem se donekle može prevazići povećanjem stepena umreženosti gela čime se smanjuje veličina pora. To zauzvrat ima povećanje difuzionih ograničenja u smislu mogućnosti upotrebe supstrata/proizvoda malih molekulskih masa.⁴⁵ Pored toga, mehanička stabilnost hidrogelova je slabija a najčešće imaju i sposobnost bubrenja u vodenom rastvoru.

e) **Inkapsulacija** enzima predstavlja formiranje polupropustljive membranske barijere koja fizički odvaja rastvoran enzim od ostatka medijuma. Membrana mora biti takva da ograničava kretanje enzima unutar kapsule ali da supstrat i proizvodi reakcije mogu slobodno difundovati. Prednosti inkapsulacije nalaze se u mogućnosti imobilizacije različitih enzima ili enzima i ćelija istovremeno u istu kapsulu, što omogućava odvijanje reakcije u više koraka. Kao i kod adsorpcije, ni kod ove metode nema hemijske modifikacije tokom samog procesa enkapsulacije čime se zadržava nativna forma enzima.⁴⁴ Mana inkapsulacije je ta što je teško kontrolisati veličinu pora i debljinu membrane, odnosno napraviti pravi balans između zadržavanja i „curenja” enzima pogotovo kod enzima manje molekulske mase pa se ova tehnika često kombinuje sa metodom umrežavanja.

1.3.4.1. Glutaraldehidna imobilizacija

Upotreba glutaraldehida za imobilizaciju enzima jedna je od najčešćih tehnika kovalentne imobilizacije enzima. Prednost aktivacije polimera glutaraldehidom leži u jednostavnosti same procedure i blagim reakcionim uslovima koji pogoduju imobilizaciji i čuvaju enzim od gubitka aktivnosti. Upotreba glutaraldehida kod nekih enzima ipak dovodi do potpunog gubitka aktivnosti zbog kovalentne modifikacije aminokiselina prisutnih u aktivnom centru čime se narušava njegova funkcija. Enzimi koji sadrže manji broj lizinskih ostataka su podložniji inaktivaciji glutaraldehidom.⁴⁵

Ovaj bifunkcionalni reagens ima dva reaktivna kraja (Slika 7) sposobna za reakciju sa dve slobodne amino grupe, pa je stoga idealan kao „spejser” a prednost ove metode je i u visokoj reaktivnosti, niskoj ceni i komercijalnoj dostupnosti glutaraldehida.⁵⁰ Pored imobilizacije enzima, glutaraldehid je korišćen za imobilizaciju proteina na čvrste nosače.

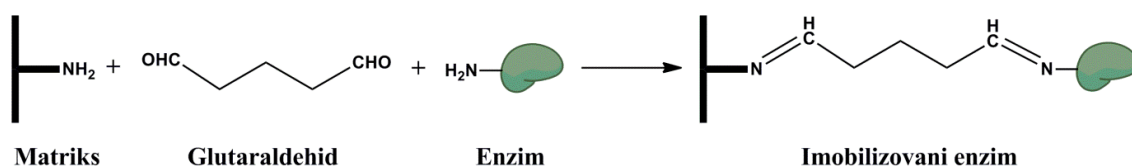


Slika 7: Glutaraldehid

Glutaraldehid se može koristiti za imobilizaciju na više načina: prvo, za imobilizaciju enzima na nosače prethodno aktivirane glutaraldehidom; drugo, za tretman proteina koji su adsorbovani na nosač koji poseduje primarne amino grupe; i treće, unakrsno umrežavanje samih enzima glutaraldehidom bez nosača praveći

proteinske agregate. Glutaraldehid se vezuje za lizinske aminokiselinske ostatke u proteinima jednim krajem dok drugom aldehidnom gupom reaguje sa slobodnom amino grupom na nosaču (Slika 8).⁵⁰

Aldehidi po pravilu grade imine ili Šifove baze (Schiff-ova baza) u reakciji sa primarnim aminima u reakciji u kojoj dolazi do nukleofilnog napada azota na ugljenik iz aldehidne grupe.⁵¹



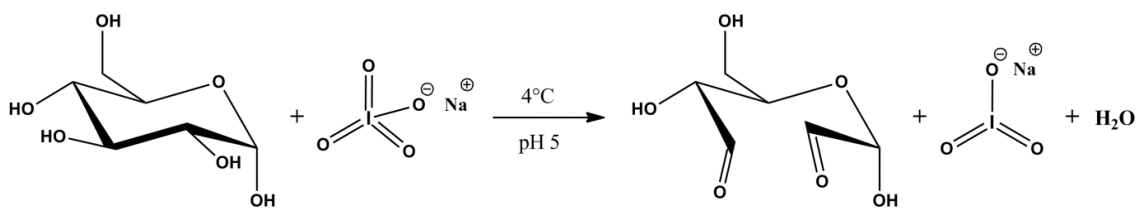
Slika 8: Reakcija glutaraldehida

Nagrađene Šifove baze su nestabilne u kiseloj sredini gde može doći do njihove razgradnje odnosno reverzibilne reakcije do slobodnog aldehida i amina. Zato se preporučuje korišćenje nekog redukcionog sredstva poput natrijum bor hidrida (NaBH_4), da redukuje Šifovu bazu do stabilne sekundarne amino veze.⁵¹

1.3.4.2. Perjodatna imobilizacija

Perjodatna oksidacija je reakcija koja se koristi za oksidaciju vicinalnih diola do aldehidnih grupa. U oksidacionoj reakciji perjodatni jon (IO_4^-) napada vicinalne hidroksilne grupe čime dolazi do stvaranja dialdehida, uz istovremeno raskidanje C–C veze. Ova reakcija je intenzivno korišćena kao rutinski metod prilikom objašnjavanja struktura složenih ugljenih hidrata, tako da je njena najranija primena pomogla tumačenju struktura mnogih polisaharida kao što su celuloza, skrob, glikogen i ksilan.⁵² Reakcija je idealna za oksidaciju različitih šećera jer su kod njih česte vicinalne hidroksilne grupe, međutim oksidaciji i raskidanju C–C veze podležu i druge 1,2-dioksigenovane grupe kao i 1,2-amino alkoholi.⁵²

Oksidaciono sredstvo je natrijum perjodat (NaIO_4) koji dovodi do oslobađanja jednog mola jodata prilikom oksidacije jednog mola monosaharidne jedinice do odgovarajućeg dialdehidnog derivata.⁵³ Reakcija se odvija u mraku pri temperaturi od 4°C u puferskom rastvoru na pH 5.



Slika 9: Reakcija oksidacije natrijum perjodatom

U imobilizaciji ova reakcija je korisna za aktivaciju enzima ili nosača pošto je aldehidna veza koja nastaje znatno reaktivnija od hidroksilne i omogućava kovalentnu imobilizaciju enzima, koji se vezuju formiranjem Šifovih baza između aldehidne i amino grupe. Ukoliko postoji nosač za imobilizaciju sa slobodnim amino grupama, kao što je slučaj sa aminovanim makroporoznim glicidil metakrilatom, pristupa se oksidaciji vicinalnih –OH grupa koje su prisutne na šećerima glikozidne komponente proteina. Ovako nastale aldehidne grupe u reakciji sa amino grupom na nosaču grade Šifovu bazu koja se može redukovati do sekundarnog amina.⁵² Imobilizacija enzima preko reaktivne aminokiselinske grupe nekad dovodi do gubitka enzimske aktivnosti. Zato se za imobilizaciju glikoenzima predlaže alternativna metoda, vezivanje preko glikozilne komponente. Pošto ugljenohidratni lanac vezan za enzim ne učestvuje u katalitičkom procesu, imobilizacija enzima preko glikozilne jedinice je prilično bezbedna u smislu očuvanja aktivnosti.⁵⁴

Perjodatna oksidacija može se primeniti i na nosač, najčešće ukoliko je on polisaharidne strukture, kao u slučaju pektina. Šifova baza u ovom slučaju nastaje tako što se na novonastale aldehidne grupe na polimeru vezuju enzimi preko slobodnog lizinskog aminokiselinskog ostatka koji se nalazi na površini trodimenzionalne strukture proteina.

Perjodatna reakcija korišćena je i za dobijanje novih funkcionalnih karakteristika određenih polimera. Raskidanje piranoznog prstena, pored uvođenja novih hidrofilnih grupa koje mogu poboljšati rastvorljivost, dovodi i do povećane fleksibilnosti lanca.⁵²

1.3.5. Nosači za imobilizaciju

Karakteristike matriksa za imobilizaciju su od ogromnog značaja za osobine imobilizata.¹ Na izbor optimalnog materijala kao nosača za imobilizaciju utiču sledeće osobine.⁵⁵

- Velika površina dostupna za vezivanje enzima
- Mogućnost modifikacije – dostupnost funkcionalnih grupa

- Odgovarajuća veličina i oblik čestica
- Inertnost na enzimsku derivatizaciju i razgradnju
- Otpornost na mikrobiološku razgradnju
- Mehanička stabilnost i otpornost na kompresiju – kako bi izbegli sabijanje materijala i tako zaštitili strukturu enzima
- Termalna stabilnost
- Hidrofilnost
- Dostupnost i niska cena (ili mogućnost regeneracije) nosača

Svi nosači poseduju određene fizičke i hemijske osobine od kojih zavisi uspešnost imobilizacije.

1.3.5.1. Fizičke osobine nosača

Fizičke karakteristike nosača kao što su prosečan dijametar čestica, veličina pora, poroznost, vijugavost, oblik čestica, mehanička stabilnost, bubrenje i hidratacija su osobine koje određuju njegovu prirodu i mogu se kvantitativno opisati. Veličina čestica, njihova poroznost i parametri pora određuju ukupnu slobodnu dostupnu površinu za vezivanje enzima kao i potencijalna difuziona ograničenja.¹ Poroznost predstavlja odnos zapremine unutrašnjih šupljina u odnosu na spoljašnju zapreminu čestice. Ova veličina varira u vrednostima od 0-1,0 (kad je poroznost 0, ne postoje pore na nosaču, dok je nosač gotovo šupalj kad se vrednost približava jedinici).⁴⁴ Vijugavost (τ) je prosečna razdaljina kroz pore između bilo koje dve tačke unutar čestice u odnosu na njihovu apsolutnu udaljenost. Ova veličina je veća ili jednaka jedinici, a njena vrednost zavisi od geometrije pora.⁵⁶ Na osnovu poroznosti i distribucije veličina pora nosači se mogu podeliti na neporozne i porozne.

Neporozni nosači imaju izuzetno malu slobodnu površinu pa je i površina dostupna za vezivanje enzima prilično ograničena, što predstavlja njihov glavni nedostatak. Količina vezanog enzima se može donekle povećati upotrebom finih čestica ili vlakana. Međutim, usitnjavanje veličine čestica otežava njihovu upotrebu i odvajanje od reakcione smeše pa je u praksi ustanovljena minimalna veličina čestica od 50 μm . Prednost upotrebe neporoznih nosača leži u tome što je enzim vezan za spoljašnju površinu i u neposrednom je kontaktu sa okolnom sredinom. Tako su difuziona ograničenja svedena na minimum pa i veliki supstrati mogu nesmetano prilaziti aktivom mestu.⁵⁷

Porozni nosači mogu imati kontrolisanu ili široku distribuciju pora. Kontrolisana veličina pora se odnosi na prilično usku distribuciju dijametra pora, dok je kod široke taj raspon znatno veći i kod ovog tipa matriksa dešava se da enzim ne može da pristupi

porama malih dimenzija, koje ostaju neiskorišćene. Najveći nedostatak poroznih nosača je što se većina aktivne površine za vezivanje enzima nalazi u unutrašnjoj strukturi. Zato su kod njih prisutna velika difuziona ograničenja. Prednosti poroznih materijala su velika aktivna površina za imobilizaciju i delimična zaštita enzima od varirajućih uslova okruženja koja je omogućena vezivanjem u unutrašnjosti pora.⁵⁷ Na osnovu veličine pora nosači se mogu podeliti na mikroporozne (dijametar pora od 0,1-10 µm), mezoporozne (3-10 nm) i makroporozne (8-1000 nm).⁴⁴ Neophodno je da dijametar pora bude 4-5 puta veći od dijametra enzima kako bi nesmetano obložio unutrašnjost matriksa.⁵⁸

1.3.5.2. Hemijske osobine nosača

U hemijske osobine nosača spadaju hemijski sastav, aktivne funkcionalne grupe i njihova gustina, naelektrisanje, hidrofilitnost i mikrokruženje. Nosači se na osnovu hemijskog sastava mogu podeliti na neorganske i organske. Organski nosači se dalje mogu podeliti na prirodne i sintetičke polimere.¹

Neorganski nosači koji se najčešće upotrebljavaju su: zeoliti, keramika, silikati, betonit, makroporozno staklo, metali i oksidi metala. **Prirodni organski polimeri** mogu biti polisaharidi i njihovi derivati (celuloza, dekstran, škrob, agar, agaroz, karagenan, sefaroza, hitin, alginat, heparin, pektin), proteini (kolagen, želatin, albumin) i ugalj. **Sintetički organski polimeri** u upotrebi su polistiren, poliakrilati, polimetakrilati, poliglicidil metakrilati, poliakrilamid, poliamidi, najlon, vinil- i alil-polimeri. Pored brojnih prednosti neorganskih nosača (velika stabilnost prema fizičkoj, hemijskoj i mikrobnj degradaciji), većina industrijskih primena ostvaruje se na organskim nosačima.^{41,57,59}

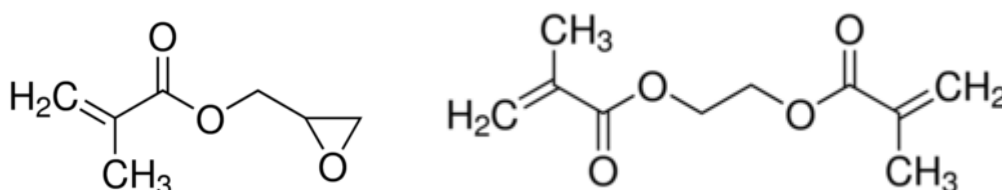
Količina imobilizovanog enzima, njegova stabilnost i zadržavanje na nosaču kao i broj ostvarenih veza sa nosačem direktno zavisi od gustine dostupnih funkcionalnih grupa ali i njihovog mikrokruženja. Gustina vezivnih mesta se odnosi na broj aktivnih funkcionalnih grupa po jedinici površine nosača. Na nosaču se razlikuju dva tipa funkcionalnih grupa: aktivne tj. one koje direktno učestvuju u reakciji i vezivanju enzima i inertne koje ne učestvuju direktno u vezivanju ali ostvaruju nekovalentne interakcije sa enzimom.⁴⁴

1.3.5.3. Glicidil metakrilatni polimeri

Makroporozni kopolimeri mogu služiti za pripremu različitih vrsta inertnih matriksa stacionarne faze za neke tipove hromatografija, matrikse za jonoizmenjivačku

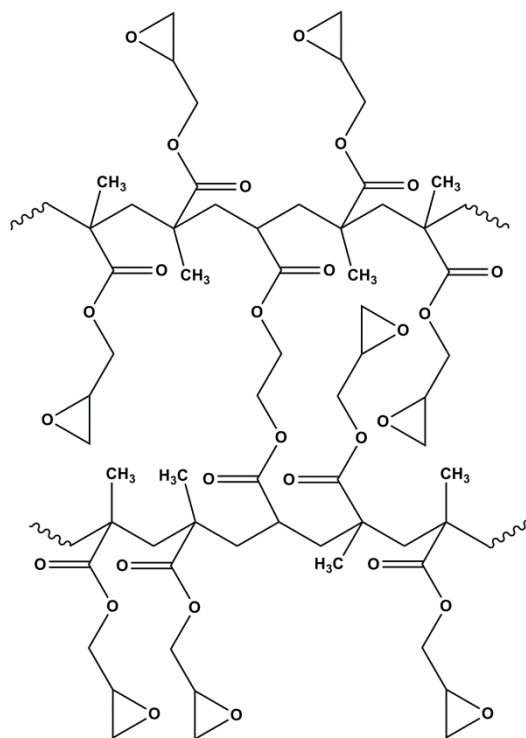
hromatografiju, za adsorbense, nosače za klasične katalizatore ili imobilizaciju enzima. Makroporozni kopolimeri koji se koriste u ove svrhe mogu biti različite hemijske strukture i sastava, od kojih se najčešće koriste oni na bazi stirena sa divinilbenzenom, dok su nešto ređe u upotrebi polimeri na bazi vinilpiridina sa divinilbenzenom kao i oni od mono- i di-metakrilata.^{60,61}

Polimerni matriksi na bazi glicidil metakrilata (2,3-epoksipropilmetakrilat, GMA) i etilen glikol dimetakrilata (EGDMA) korišćeni su za različite primene. Umrežavanjem ovog materijala metodom kopolimerizacije u suspenziji, pri čemu je u smeši monomera i inicijatora prisutna inertna komponenta niske molekulske mase, dobijen je polimerni materijal poli(glicidil metakrilat)-co-(etilen glikol dimetakrilat) ili poly(GMA-co-EGDMA).⁶⁰ Inertna komponenta je obično sastavljena od cikloheksanola i alifatičnih alkohola, najčešće heksanola ili dodekanola.^{60,62} Primenljivost ovih polimera zavisi pre svega od njihove poroznosti na koju se može uticati tokom procesa sinteze.^{60,63} Utvrđeno je da najveći uticaj na poroznost strukture GMA-co-EGDMA imaju odnos umrežavajućeg agensa (EGDMA) u monomernoj smeši, udeo inertne komponente u monomernoj fazi i udeo dodekanola u inertnoj komponenti pošto je kopolimer nerastvorljiv u ovoj fazi.^{60,61}



Slika 10: Hemijska struktura monomernih jedinica GMA (levo) i EGDMA (desno)

Nakon polimerizacije u suspenziji umrežavanjem materijala dobijene su sferične kuglice različitih veličina (dijametra od 150 do 500 μm). Drugi oblici su takođe korišćeni, kao što su makroporozni blokovi ili diskovi.⁶⁴ Hemijska struktura polimera prikazana je na *Slici 11*.



Slika 11: Hemijska struktura poly(GMA-co-EGDMA) polimera

Samo prisustvo izrazito reaktivne epoksidne grupe omogućava veliki broj različitih hemijskih modifikacija polaznog polimera kojim se ova funkcionalna grupa lako može prevesti u hidroksil, karbonil, keto ili amino grupe ali daje i mogućnost direktnog vezivanja enzima za matriks.^{61,63,65} Matriksi na bazi poly(GMA-co-EGDMA), nakon derivatizacije i otvaranja epoksidnog prstena mogu biti korišćeni za najrazličitije analitičke primene.⁶⁴

Ovako umreženi polimer zbog svojih jedinstvenih fizičko-hemijskih osobina imao je široku upotrebu. Korišćen je kao stacionarna faza za HPLC hromatografiju⁶⁶, uklanjanje jona teških metala ili izvlačenje plemenitih metala resorpcijom iz vodenih rastvora.⁶⁷ Porozna površina polimera prekrivena epoksidnim grupama u reakciji sa cistaminom i kasnijom redukcijom i raskidanjem disulfidnog mosta dovodi do nastanka polimera sa slobodnom tiolnom grupom. Za tiolne grupe se zatim vezuju zlatne nanočestice koje su obložene 1-oktantiolom. Ovako pripremljen matriks korišćen je kao stacionarna faza u kapilarnim kolonama, za razdvajanje proteina, ponašajući se istovremeno kao reverzno-fazna i jonoizmenjivačka kolona.⁶⁸ Zbog svoje velike slobodne površine, hidrofilnog mikrookruženja i brojnih aktivnih grupa idealan je kao nosač za imobilizaciju različitih enzima – tripsina⁶⁹, lipaze⁶², invertaze⁷⁰, amiloglukozidaze⁷¹, α -glukozidaze⁷², itd. Mehanički je stabilan polimer i ne dolazi do bubrenja prilikom hidratacije, zbog čega se može prenositi iz vodenog u anhidrovani medij bez značajnih promena u zapremini i strukturi materijala. Velika poroznost i

unutrašnja geometrija omogućuju difuziju enzima u unutrašnjost pora a veliki broj reaktivnih funkcionalnih grupa na nosaču omogućuje jake interakcije, imobilizaciju i stabilizaciju enzima. Enzimi najčešće reaguju i vezuju se za nosač preko svojih amino, sulfhidril, hidroksil i fenolnih grupa.⁷³

Način obeležavanja sintetisanih polimera zavisi od polaznih monomera, tipa polimerizacije i sastava inertne komponente. Tako na primer kod polimera označenog SGE-20/12 slovo S predstavlja polimerizaciju u suspenziji, dok slova G i E označavaju monomere – glicidil metakrilat (GMA) i etilen glikol dimetakrilat (EGDMA). Prvi broj u oznaci predstavlja udeo alifatičnog alkohola u inertnoj komponenti (w/w) dok je drugi broj C-atoma alifatičnog alkohola.⁶²

1.3.5.4. Pektin

Pektini predstavljaju složenu grupu biljnih polisaharida koji se nalaze u primarnom ćelijskom zidu.^{74,75} Iako je osobina pektina da lako gelira korišćena u procesu proizvodnje džema i marmelada, poznata još od davnina, ovaj biopolimer izolovan je i karakterisan po prvi put tek 1825. godine od strane Henrija Braconnot-a (Henri Braconnot).^{76,77} Reč potiče od grčke reči πηκτικός što u prevodu znači „gelirati“ ili „očvrsnuti“.⁷⁷

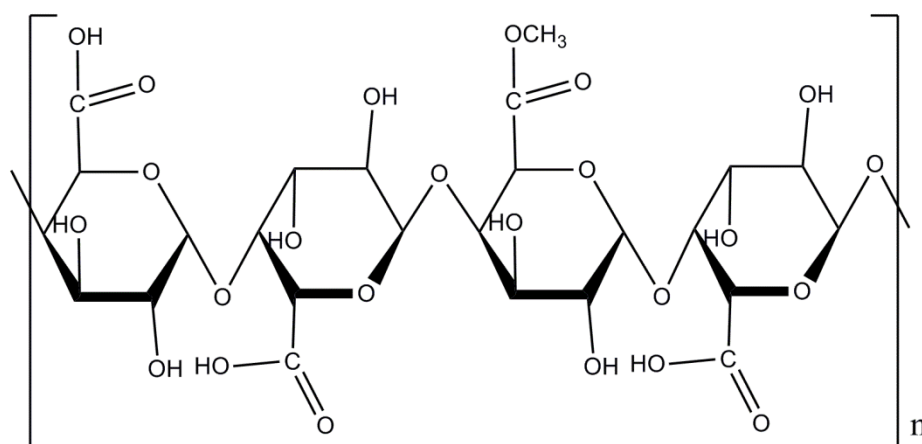
Precizan sastav i struktura pektina ni dan danas nisu u potpunosti razjašnjeni iako je otkriven još u 19. veku. To je delimično zato što se parametri kao što su molekulska masa i šećerni sastav razlikuju od molekula do molekula u istom uzorku pektina. Ali i zato što dolazi do promene sastava tokom samog procesa izolovanja, skladištenja i obrade biljnog materijala.⁷⁸ U pogledu hemijske strukture pektin je u suštini linearni polisaharid sačinjen od osnovnog lanca α -(1-4)-D-galakturonske kiseline sa različitim stepenom metilacije karboksilnih ostataka.^{79,80} Pored linearnih lanaca sačinjenih od galakturonske kiseline, postoje i razgranate regije u sastavu kojih su ramnogalakturonski ostaci vezani 1-2 glikozidnim vezama.⁸⁰ Molekulska masa ovog polisaharida se kreće u rasponu od 50000 do 150000 daltona što odgovara sadržaju od par stotina do oko hiljadu šećernih ostataka po lancu.⁸¹

Pektin je vrlo rasprostranjen biopolimer. On čini jednu trećinu ukupne suve mase biljnog ćelijskog zida dikotiledonih i nekih monokotiledonih biljaka.^{75,81} Količina pektina prisutna u biljnom tkivu, njegova struktura kao i hemijski sastav pre svega zavise od biljne vrste ali i u okviru iste vrste može varirati sa periodom razvoja i sazrevanja ili od biljnog tkiva u kome se nalazi.⁷⁸

1.3.5.4.1. Hemijska struktura

U pektinskom molekulu mogu se definisati tri osnovna polisaharidna domena: homogalakturonan (HG), ramnogalakturonan I (RGI) i ramnogalakturonan II (RGII).⁷⁷

Homogalakturonan je nerazgranati, linearni polisaharidni lanac i glavna komponenta pektina u ćelijskom zidu koji čini oko 60% ukupnog udela, sačinjen od α -D-galakturonske kiseline vezane 1,4 glikozidnim vezama (*Slika 12*).^{77,82} Ovaj lanac nema bočnih grana ali GalpA ostaci mogu biti metil-esterifikovani na poziciji C-6 ili O-acetilovani na položajima O-2 ili O-3.⁸² Stepenn esterifikacije i acetilacije zavisi od porekla uzorka.⁸³

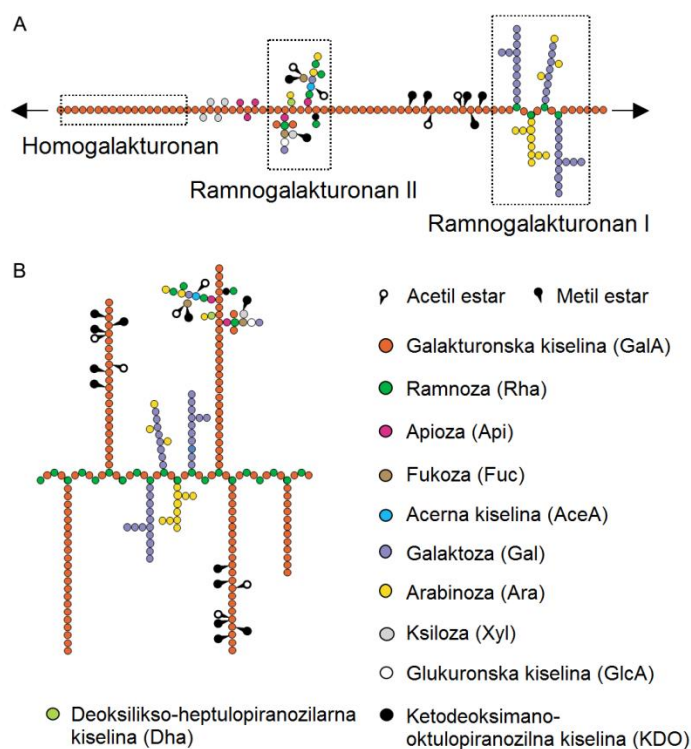


Slika 12: Hemijska struktura homogalakturonana

Ramnogalakturonan I je razgranati pektinski domen sastavljen od osnovnog lanca u kom se naizmenično smenjuju α -D-galakturonska kiselina vezana 1,4 i α -L-ramnopiranozil ostaci vezani 1,2 glikozidnim vezama koji su supstituisani na poziciji O-4 bočnim lancima od neutralnih šećera: arabinoze i galaktoze.^{80,82} U suštini ovaj domen je sastavljen od ponavljajućeg disaharida [-4)- α -D-GalA-(1-2)- α -L-Rha-(1-)].^{77,82} Dužina ovih ponovaka disaharidnih jedinica zavisi od izvora iz kog je pektin izolovan i može varirati od oko 20 monosaharidnih jedinica kod pektina iz šećerne repe pa čak do 300 disaharidnih ponovaka kod pektina iz ćelija javora gajenih u kulturi.⁸² Dužina ramnogalakturonskog lanca međutim nije sa sigurnošću utvrđena pošto tokom samog procesa ekstrakcije može doći do kisele hidrolize i dobijanja lažno umanjениh vrednosti.⁸² U proseku svaki drugi ramnozil ostatak je supstituisan na poziciji O-4.⁸⁴ Bočni lanci mogu biti monosaharidni gde je jedan β -D-galaktopiranozil ostatak vezan 1,4 vezom ali i polisaharidni sastavljeni od 50 glikozilnih ostataka kao što su arabinogalaktani I (AGI) i arabinani.⁸² AGI u bočnim lancima sastoje se od osnovnog lanca 1,4- β -D-Galp sa O-3 supstituisanim ostacima α -L-Araf i O-6 supstituisanom β -galaktozom. Arabinani su sastavljeni od α -L-Araf vezane 1,5 glikozilnom vezom i mogu imati bočne lance isto od α -L-Araf vezanih 1,2 ili 1,3.⁸²

Ramnogalakturonan II (RGII) je izrazito razgranata pektinska struktura koja se nalazi unutar homogalakturonske regije. Nasuprot RGI čija dužina, sastav i struktura dosta variraju ne samo u zavisnosti od biljne vrste, već i u različitim tkivima kao i periodima sazrevanja zbog čega se opisuje kao izrazito heterogena, struktura RGII smatra se visoko konzerviranom. Sastavljen je od osnovnog lanca od 1,4 α -D-galakturonske kiseline koji sadrži bočne lance sastavljene od nekih retkih šećera među kojima su Fukoza (Fuc), Apioza (Api), 2-deoksi-likso-heptulopiranozilarna kiselina (Dha) i 3-ketodeoksi-mano-2-oktulopiranozilonska kiselina (KDO).^{77,82}

Postoje dva predložena modela organizacije tri postojeća domena (*Slika 13*): A - osnovni lanac čine HG i RGI za koji su vezani kraći bočni lanci; B – osnovni lanac čini RGI u odnosu na koji se vezuju dugački bočni lanci HG domena.⁷⁷



Slika 13: Struktura dva predložena modela pektina (Willats et al, 2006)

Sposobnost pektina da formira gel zavisi pre svega od njegove molekulske mase kao i stepena metil-esterifikacije (DE – Degree of esterification).⁸¹ Na osnovu stepena esterifikacije pektini se mogu podeliti u dve kategorije – HM (high-methoxyl) pektin ili visoko-esterifikovani (high-ester) ukoliko stepen esterifikacije prelazi >50% i LM (low-methoxyl) pektin ili nisko-esterifikovani (low-ester) kad je stepen esterifikacije <50%.⁷⁷ Funkcionalne karakteristike pektina pored DE zavise i od stepena acetilacije (DA – Degree of acetylation).⁷⁷

1.3.5.4.2. Zastupljenost pektina

Iako je pektin široko rasprostranjen u biljnom svetu i prisutan u većini biljnih tkiva izvori ovog polisaharida za izolovanje u komercijalne svrhe su ograničeni.⁷⁸ Kao izbor za komercijalno izolovanje pektina ne može se koristiti svako voće koje karakteriše prisustvo velikih količina pektina zato što sposobnost geliranja drastično varira od polaznog materijala usled brojnih parametara. Zbog toga su najbolji polazni materijali za komercijalno izolovanje kora citrusnog voća (sadržaj pektina u odnosu na suhu masu 20-30%) i mesnati deo ploda jabuke (sadržaj pektina u odnosu na suhu masu 10-15%). Obe sirovine predstavljaju nusproizvode industrije proizvodnje sokova. Pored ova dva glavna izvora, pektin se može dobiti i ekstrakcijom iz otpadnih materija iz procesa dobijanja šećera iz šećerne repe, glave suncokreta nakon što se semenje odvoji za proizvodnju ulja i otpada manga.⁷⁸

1.3.5.4.3. Funkcija pektina

Pektin ima značajnu i raznoliku funkciju u biljnim tkivima. On ima značajnu ulogu u izgradnji ćelijskog zida viših biljaka koji pruža snagu i potporu a ujedno je i vrlo dinamične strukture. Udeo pektina u sastavu ćelijskog zida je različit. Dikotiledone biljke sadrže najviše pektina u svom zidu, oko 35%, a u njegov sastav ulazi 30% celuloze, 30% hemiceluloze i oko 5% proteina. Većina trava međutim sadrži 2-10% pektina dok drvenasta tkiva sadrže oko 5%. Procentualni sadržaj pektina je možda najveći u ćelijskom zidu pojedinih vrsta voća i povrća.⁸²

Pektin utiče na različita svojstva ćelijskog zida – poroznost, površinski napon, pH i jonsku ravnotežu i zato posreduje transport jona u ćelijskom zidu. Poznato je i da pektinski oligosaharidi aktiviraju biljne odbrambene mehanizme, izazivajući akumulaciju fitoaleksina, supstance koja obuhvata širok spektar različitih inhibitora koji se grupišu u oblastima patogene infekcije i poseduju antimikrobnu aktivnost. Pektinski oligosaharidi izazivaju lignifikaciju i akumulaciju proteaznih inhibitora u biljnim tkivima.⁸²

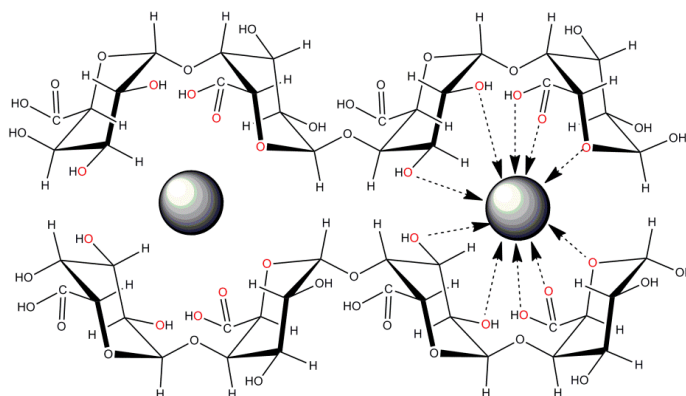
U biljnim tkivima prisutni su enzimi pektinaze i pektin esteraze čijom aktivnošću dolazi do razlaganja pektina i cepanja pektinskih lanaca. Ovaj proces je u osnovi procesa sazrevanja voća kada se razgrađuje pektin prisutan u središnjim lamelama ćelijskog zida pri čemu se ćelije razdvajaju jedna od druge i plod postaje mekši. Slična je i osnova procesa opadanja lišća kod listopadnih vrsta.⁷⁸

1.3.5.4.4. Osobine pektina

Pektini su polisaharidi rastvorni u vodi. Po dodatku u vodu, suvi pektinski prah se brzo hidratiše i formira grudvice koje u unutrašnjosti ostaju suve dok je kontaktna površina sa vodom izrazito hidratizirana. Ove grudvice se dalje vrlo sporo rastvaraju na kraju praveći viskozni rastvor. Viskoznost rastvora pektina zavisi pre svega od koncentracije rastvora i molekulske mase, ali na nju utiču i DE, pH ali i prisustvo jona u rastvoru.⁷⁸

Gelirajuće osobine pektina u mnogome zavise od brojnih faktora kao što su vrsta pektina (molekulska masa, redosled monosaharida u lancu, gustina naelektrisanja, stepen esterifikacije, stepen acetilacije), temperatura, pH rastvora, jonska jačina, koncentracija kalcijuma, kao i prisustvo šećera i drugih rastvornih supstanci.^{74,77} Rastvorljivost, viskoznost i geliranje su u suštini povezane osobine time što na njih utiču isti faktori. Osobine koje jačaju sposobnost geliranja i čvrstinu gela u isto vreme smanjuju rastvorljivost i povećavaju viskoznost.⁷⁸ Gustina gela se povećava sa porastom koncentracije pektina, povećanjem jonske sile i jona kalcijuma u sistemu.⁷⁴

Postoje dva načina pravljenja pektinskog gela. HM pektini imaju veliki broj esterifikovanih karboksilnih grupa i geliraju umrežavanjem HG domena vodoničnim vezama i hidrofobnim interakcijama između metoksi grupa na niskim pH (2,5-3,5) u prisustvu velike koncentracije saharoze (55-75%) ili sličnih šećera.^{74,77,81} Struktura HM pektinskog gela smatra se ireverzibilnom jer se pri zagrevanju gel ne topi za razliku od većine polisaharidnih gelova. Sa druge strane LM pektini imaju dovoljno slobodnih karboksilnih grupa za pravljenje termo-reverzibilnog gela u prisustvu jona kalcijuma pri širokom opsegu pH sa ili bez prisustva dodatnih šećera. Model vezivanja elektrostatičkim interakcijama i jonskim vezama za dvovalentne katjone preko karboksilnih grupa, prethodno predložen za alginat („egg-box“ model), važi i za LM pektin (Slika 14).



Slika 14: Šematski prikaz „egg-box“ modela geliranja pektina u prisustvu Ca²⁺ jona.

Potrebno je minimum sedam uzastopnih karboksilnih grupa sa unutrašnje strane oba lanca koja učestvuju u interakciji sa kalcijumom da bi se formirala stabilna veza, a najčešće se formiraju blokovi od 7-20 uzastopnih jezgara sa koordinisanim kalcijumom.^{81,82} Uticaj koncentracija kalcijuma i pektina na geliranje LM pektina se može predstaviti faznim dijagramom na kom su definisana tri domena: sol faza u kojoj ne dolazi do geliranja, gel faza i domen koji predstavlja heterogeni sistem u kom je deo polimera precipitirao.⁷⁴ Ovako umreženi pektiski polimeri koji vezuju veliku količinu vode se još nazivaju i hidrogelovi.

1.3.6. Hidrogelovi

Hidrogelovi su hidrofilini umreženi polimerni materijali koji mogu absorbovati vodu od 10-20% (što predstavlja donju granicu) pa sve do nekoliko hiljada puta od njihove suve mase.⁸⁵ U stanju su da absorbuju velike količine vode pa zbog toga pokazuju sklonost ka bubrenju u hidrofilnim rastvorima.⁸⁶ Hidrogelovi mogu biti različiti u sastavu, polarnosti i stabilnosti a njihova strukturna celovitost zavisi pre svega od načina umrežavanja polimernih lanaca putem različitih hemijskih veza ili fizičkih interakcija.⁸⁷ Na osnovu polaznog materijala mogu se podeliti na **sintetičke** i **prirodne**.⁸⁸ Mogu biti hemijski stabilni ili se mogu razgraditi i na kraju raspasti i rastvoriti.^{85,89}

Na osnovu vrsta interakcija hidrogelovi se mogu podeliti na fizičke ili „reverzibilne“ i hemijske ili „trajne“ hidrogelove. U **fizičke gelove** spadaju oni kod kojih se mreža održava zahvaljujući molekulskom uplitanju i sekundarnim silama u koje spadaju jonske, vodonične veze i hidrofobne interakcije. Fizički hidrogelovi nisu homogene strukture, zato što se formiraju grupacije upletenih molekula ili hidrofobno ili jonski-povezane grupacije. Fizički hidrogelovi se još nazivaju i „reverzibilni“ zato što su sve ove interakcije reverzibilne i mogu se narušiti promenama fizičkih uslova kao što su jonska sila, temperatura i pH.⁸⁵

Kod **hemijskih hidrogelova** dolazi do kovalentnog umrežavanja različitih polimernih lanaca koje se može postići unakrsnim vezivanjem u suvom stanju ili u rastvoru.^{85,89} Kad se umreženi hidrogel stavi u vodeni rastvor dolazi do bubrenja do postizanja ravnotežnog nivoa hidratacije koji zavisi najpre od gustine umrežavanja. Ni hemijski gelovi, kao ni fizički, nisu homogeni jer obično sadrže gusto umrežene regije sa niskim stepenom hidratacije (bubrenja) koji se nazivaju klasteri a koji su rasuti unutar regija niske gustine umrežavanja a visokog stepena hidratacije.⁸⁵ Hemijski hidrogelovi mogu se sintetisati na dva načina: prvi je trodimenzionalna polimerizacija gde se hidrofilni monomeri polimerizuju u prisustvu multifunkcionalnih sredstava za

unakrsno umrežavanje i drugo je direktno unakrsno umrežavanje polimera rastvornih u vodi.⁸⁹

1.3.6.1. Primena hidrogelova

Hidrogelovi su našli široku primenu pre svega u medicini kao matriksi za tkivni inženjering, u farmaciji za dostavu lekova ali i u osnovnim istraživanjima.⁸⁸ Zahvaljujući visokom procentu sadržaja vode, svojoj poroznosti i mekoj konzistenciji, hidrogelovi najpribližnije mogu simulirati prirodno živo tkivo.⁸⁹ Važna karakteristika hidrogela za primenu u tkivnom inženjeringu je njegova biokompatibilnost, pri čemu prirodni polimeri najčešće pokazuju dovoljnu biokompatibilnost dok sintetički mogu izazvati značajne negativne odgovore.⁹⁰ U okviru tkivnog inženjeringa hidrogelovi mogu služiti za različite funkcije, kao agensi za popunjavanje prostora, kao sredstvo dostave za prenos raznih bioaktivnih molekula ili kao trodimenzionalne strukture koje organizuju ćelije.⁸⁷ Agensi za popunjavanje prostora obuhvataju trodimenzionalni matriks koji obezbeđuje punjenje nakon raznih vrsta plastičnih i rekonstruktivnih hirurških intervencija, sprečava prijanjanje u post-operativnim uslovima ili imaju funkciju biološki adhezivnih mekih tkiva. Dizajnirani su hidrogelovi za dostavu bioaktivnih supstanci u cilju lokalne i specifične dostave do željenog tkiva supstanci koje mogu izazvati ozbiljne neželjene efekte pri sistemske dostavi. Hidrogelovi imaju primenu u razvoju tkiva koja je zasnovana na dostavi ćelija koje se vezuju unutar hidratizirane trodimenzionalne mreže koja propušta hemijske signale i omogućuje ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju.⁸⁷

Hidrogelovi su intenzivno proučavani u razvoju sistema za dostavu lekova. Polimerni materijal štiti lek od grubih spoljašnjih uslova (prisustva enzima i niske pH u stomaku). Hidrogelovi su takođe u stanju da kontrolišu otpuštanje lekova promenom strukture gela u odgovoru na stimulaciju iz svoje okoline. Materijali koji poseduju ovakve senzorne osobine podležu gel-sol faznom prelazu ili zapreminskom faznom prelazu (širenje/skupljanje pora) prilikom promene uslova sredine. Mnogi fizički i hemijski stimuli su primenjivani za izazivanje odgovora takozvanih "pametnih" hidrogelova. U fizičke stimuluse spadaju temperatura, električno polje, svetlost, pritisak i magnetno polje dok u hemijske ili biološke spadaju pH, jonska sila, hemijski sastav rastvora i specifično molekularno prepoznavanje. Za primenu u dostavi lekova najčešće se koriste hidrogelovi osetljivi na promene temperature ili pH dok su ostale osobine našle svoju primenu u imobilizaciji enzima i ćelija.⁹¹

1.3.6.2. Hidrogelovi od pektina

Aktuelne teme raznih istraživanja vezanih za pektin sve više se okreću biomedicinskoj primeni hidrogelova na bazi ovog polimera zbog njegove citokompatibilnosti i izuzetnih gelirajućih osobina.⁹² Sposobnost pravljenja hidrogelova i njegove osobine u mnogome zavise od strukture pektina, pre svega od monosaharidnog sadržaja, razgranatosti i prostornog rasporeda bočnih lanaca. Kao što je slučaj sa mnogim drugim prirodnim polimerima, molekulska masa, stepen esterifikacije i acetilacije (DE i DA) se mogu značajno razlikovati u zavisnosti od polaznog izvora kao i uslova ekstrakcije pektina. Sve ove osobine treba pažljivo razmotriti prilikom dizajniranja pektinskih hidrogelova za specifične primene.⁹²

Jednostavan postupak geliranja pektina omogućava pripremu hidrogelova na bazi pektina za biomedicinske primene poput dostave lekova (nazalne⁹³, oralne⁹⁴), dostave gena^{95,96}, tkivnog inženjeringa i zarastanja rana⁹⁷.

1.3.6.3. Primena pektina za imobilizaciju

Iako pektin kao polimer formira stabilne hidrogelove pogodne za imobilizaciju, u praksi nije često korišćen kao matriks za zarobljavanje enzima zbog značajnog „curenja“ biokatalizatora. Zato je najčešće primenjivan u kombinaciji sa drugim polimerima. Kombinacija pektin-hitin i pektin-alginat u prisustvu kalcijumovih jona korišćena je kao nosač za okludovanje različitih enzima. Ova metoda je pokazala značajnu termalnu stabilizaciju kao i otpornost na denaturišuće agense.⁵⁹

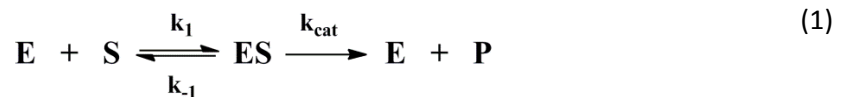
Kao nosač za imobilizaciju korišćene su čestice hitina obložene pektinom koji je anjonski polisaharid i pravi jake elektrostatičke i jonske interakcije sa pozitivno naelektrisanim polimerom kao što je hitozan. Hemijski modifikovan enzim je derivatizovan kačenjem hitozana i tako jonski vezan za nosač. Imobilizacija se zasniva na formiranju stabilnog polielektrolitnog kompleksa između enzima sa katjonskim polimerom i suprotno naelektrisanim nosačem.⁹⁸

1.4. Enzimaska kinetika

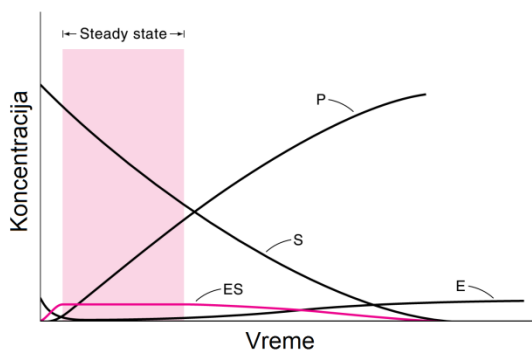
Enzimaska aktivnost se meri kao količina potrošenog supstrata (ili dobijenog proizvoda) po jedinici vremena. Merenje aktivnosti trebalo bi izvoditi pri optimalnim i ustaljenim uslovima u pogledu pH, jonske sile i temperature (najčešće na 25, 30 ili 37°C). Enzimaska jedinica (U) ili kasnije poznatija kao Internacionalna jedinica enzimske aktivnosti (IU) definisana je kao količina enzima koja pod standardnim uslovima razgradi 1 μmol supstrata za jedan minut. Katal (kat) je ona količina enzima koja razgradi 1 mol supstrata u sekundi pod standardnim uslovima. Specifična aktivnost se može izraziti kao količina internacionalnih jedinica po mg proteina (IU/mg) ili kao katal po kg proteina (kat/kg).⁴⁶

1.4.1. Kinetika enzimske reakcije

Proučavanje mehanizma dejstva enzima i određivanje njegovih katalitičkih parametara od velikog su značaja ne samo za razumevanje samog procesa već i zbog optimizacije primene u industriji. Jednostavna enzimska reakcija u kojoj se jedan supstrat (S) transformiše u proizvod (P) može se prikazati na sledeći način:



Enzim (E) i supstrat se moraju sudariti u rastvoru kako bi napravili ES-kompleks. Ovo je reverzibilan proces ali pri visokim (zasićujućim) koncentracijama [S] favorizovan je njegov nastanak.⁹⁹ Pri ovakvim uslovima merenjem koncentracije supstrata u rastvoru i brzine nastanka proizvoda dobijaju se krive prikazane na *Slici 15*.¹⁰⁰

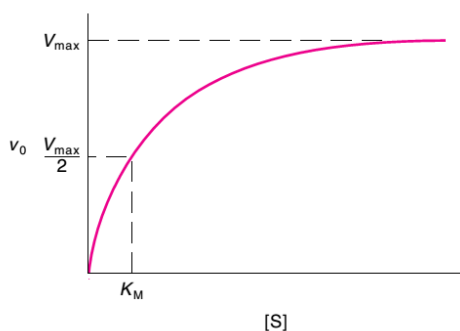


$$V_0 = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} \quad (2)$$

Slika 15: Zavisnost koncentracije supstrata i proizvoda od vremena reakcije. Linearni deo krive predstavlja ravnotežno stanje [ES] kompleksa (Chang, 2005).

Na samom početku reakcije koncentracija slobodnog enzima opada, odnosno, dolazi do formiranja ES kompleksa do momenta kad se sva aktivna mesta enzima ne popune supstratom. Istovremeno raste brzina reakcije i počinje da se detektuje proizvod. Ova faza reakcije se još naziva „presteady-state“ međutim ona traje vrlo kratko i brzo se uspostavlja ravnotežno stanje ili „steady-state“.⁹⁹ Daljim tokom reakcije dolazi do linearne zavisnosti količine formiranog proizvoda od vremena reakcije i nakon određenog vremena dolazi do smanjenja brzine enzimske reakcije što je prikazano na grafiku. Koncentracija metabolita u stanju ravnoteže postiže se kada se brzina njegove proizvodnje izjednači sa brzinom razgradnje. Ovaj koncept se primenjuje prilikom računanja parametara enzimske kinetike na koncentraciju enzim-supstrat kompleksa.¹⁰¹ Ukoliko pratimo brzinu reakcije nakon ravnotežnog stanja, možemo zaključiti da dolazi do postepenog smanjenja brzine nastanka proizvoda do momenta kad je njegova promena u vremenu jednaka nuli.

Prilikom ispitivanja enzimske kinetike prvo se pristupa određivanju **početne brzine reakcije (V_0)** u trenutku t_0 upravo od momenta postizanja ravnotežnog stanja. Za poznatu konstantnu količinu enzima, poznatu koncentraciju supstrata, V_0 se približno može odrediti iz nagiba linearnog dela prave promene koncentracije proizvoda u funkciji od vremena (*Slika 15*).^{99,100} Konstruisanjem grafika zavisnosti početne brzine enzimi katalizovane reakcije od koncentracije supstrata dobija se hiperbola (*Slika 16*) koja se ponaša u skladu sa Michaelis-Menten-inom jednačinom:



$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

$$V_{max} = k_{cat} \cdot [E] \quad (4)$$

Slika 16: Michaelis-Menten-in grafik zavisnosti brzine enzimi katalizovane reakcije od koncentracije supstrata (Chang, 2005).

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

Michaelis-Menten-ina konstanta (K_m) predstavlja koncentraciju supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovini maksimalne brzine reakcije ($V=V_{max}/2$). Drugim rečima, K_m predstavlja koncentraciju supstrata pri kojoj je polovina aktivnih mesta enzima popunjena molekulima supstrata. Vrednost K_m za određeni enzim zavisi pre

svoga od prirode supstrata, temperature, pH, jonske sile, prisustva aktivatora ili inhibitora i ostalih reakcionih uslova. Dakle, ona služi za karakterizaciju određenog enzim-supstrat sistema pod tačno određenim uslovima. Ona je mera afiniteta ka supstratu, sa povećanjem vrednosti K_m , smanjuje se afinitet enzima prema supstratu. **Maksimalna brzina reakcije (V_{max})** je brzina pri kojoj se ukupna količina enzima u reakciji nalazi u [ES] kompleksu i zavisi od količine enzima. To je najveća brzina reakcije koju enzim može da postigne.⁹⁹

Katalitička konstanta, K_{cat} je broj molekula supstrata (ili mola supstrata) koji se prevode u proizvod po jedinici vremena, kada je enzim potpuno zasićen supstratom. Odnos k_{cat}/K_m ili konstanta specifičnosti (u jedinicama $M^{-1}s^{-1}$) je merilo katalitičke efikasnosti enzima. Ukoliko je ovaj odnos veliki, favorizuje se formiranje proizvoda, dok je reverzna reakcija favorizovana pri niskim vrednostima.⁹⁹

Iako se V_{max} i K_m mogu dobiti direktno iz grafika, u praksi je teško odrediti vrednost V_{max} kao asimptotsku vrednost pri visokim koncentracijama supstrata. Zato se najčešće pribegava nekoj od metoda linearizacije kao što je Lineweaver-Burk-ova:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (5)$$

Oba kinetička parametra (K_m i V_{max}) se mogu odrediti iz nagiba i odsečka prave recipročne vrednosti početne brzine $1/V_0$ u zavisnosti od recipročne vrednosti koncentracije supstrata $1/[S]$.

1.4.2. Kinetika imobilizovanih enzima

Imobilizacija enzima može uticati na promene kinetičkih parametara (K_m , V_{max}) u odnosu na slobodan enzim u rastvoru.⁴⁵ Ovakav efekat može izazvati okruženje i mikrookolina u kome se nalazi imobilizovan enzim i u kome se odvija njegova interakcija sa supstratom ili može biti posledica konformacionih promena samog enzima. Prilikom imobilizacije enzim se nalazi u novom okruženju koje se razlikuje od onog u rastvoru pa može doći do određenih konformacionih promena. Za očuvanje aktivnosti enzim mora biti u pravilnoj konformaciji i zadržati konformacionu fleksibilnost tokom katalitičkog procesa. Obzirom da katalitička aktivnost direktno zavisi od konformacionih promena, očekivano je da dođe do promena vrednosti K_m i V_{max} .¹⁰²

Za razliku od okolnog rastvora, enzim koji se nalazi unutar polimernog matriksa je izložen lokalnim promenama sredine koje se mogu razlikovati u pH vrednosti ili koncentraciji supstrata u odnosu na makrookolinu. Postoje dva načina na koja

polimerni nosač može uticati na mikrookruženje, a to su efekat raspodele i difuziono ograničenje. Efekat raspodele zavisi od fizičko-hemijskih svojstava polimera koji mogu privlačiti ili odbijati supstrate, inhinitore, proizvode reakcije ili druge molekule prema ili od svoje površine, na taj način ih koncentrovati ili razblaživati u neposrednoj blizini enzima. Kod difuzionih ograničenja polimer utiče na mikrookolinu enzima tako što se sam ponaša kao barijera slobodnoj difuziji molekula ka ili od enzima.¹⁰²

Efekat raspodele se ispoljava prema polarnosti i naelektrisanju nosača i supstrata ali i ostalih molekula u rastvoru. Naelektrisani nosač će privlačiti i nagomilavati suprotno naelektrisane supstrate u svom okruženju, ali će naravno i odbijati isto naelektrisane. Ovakvi polimeri bi ne samo privlačili ili odbijali supstrate već i druge katjone/anjone pa i protone. Zato se pH unutar čestica može razlikovati od okolnog rastvora. Raspodela supstrata $[S]$ na površini polimerne čestice $[S_i]$ i njegova koncentracija u okolnom rastvoru $[S_o]$ izražava se koeficijentom raspodele supstrata.

$$P = \frac{[S_i]}{[S_o]} \quad (6)$$

Različita koncentracija supstrata unutar nosača u neposrednoj blizini enzima utiče na K_m tako što njena vrednost prividno opada sa porastom koncentracije supstrata unutar nosača.

$$K_{m(app)} = \frac{K_m}{P} \quad (7)$$

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S_0]}{K_{m(app)} + [S_0]} \quad (8)$$

Particioni efekat više je izražen ukoliko se imobilizat nalazi u rastvoru niske jonske sile. Kada na imobilizat deluje samo particioni efekat, pri datoj jonskoj jačini, imobilizovani enzim će pratiti Michaelis-Menten-inu kinetiku.¹⁰²

Za nesmetano odvijanje reakcije, katalizovane imobilizovanim enzimom, mora biti omogućeno supstratima da difunduju do katalitičkog aktivnog mesta, ali isto tako i proizvodima reakcije da difunduju u spoljašnji rastvor. Ograničenja koja supstrat mora prevazići difuzijom kroz pore nosača do enzima ne postoje kada se reakcija dešava u homogenoj vodenoj sredini sa slobodnim enzimom, čak ni kod najbržih enzimskih reakcija.

Nakon mešanja imobilizata sa supstratom, supstrat difunduje unutar čestice i enzim počinje transformaciju brzinom koja zavisi od koncentracije supstrata u njegovoj okolini. Dolazi do stvaranja koncentracionog gradijenta od površine polimera ka unutrašnjosti i ubrzo se postiže stacionarno stanje u kome je brzina difuzije supstrata

do neke tačke unutar polimera jednaka brzini enzimske katalize i uklanjanja supstrata. Što je ova tačka dalje od površine čestice to je koncentracija supstrata niža. Ukoliko je katalitička aktivnost enzima dovoljno visoka i pri nižim koncentracijama supstrata uz difuziona ograničenja supstrat nije u stanju da se probije do centra čestice jer biva transformisan u proizvod.

Postoje dve vrste difuzionih efekata a to su spoljašnja i unutrašnja difuziona barijera.

U slučaju **spoljašnje difuzije** supstrat teba da prevaziđe barijeru koja se nalazi na površini čestice nosača u vidu tankog, neuskomešanog sloja rastvarača koji ometa slobodnu difuziju a naziva se Nernstov sloj. Debljina ovog sloja se sa vremenom povećava a zavisi do određene mere od brzine mešanja rastvora u kom se nalaze čestice imobilizata. Molekuli difunduju kroz ovaj sloj kombinacijom pasivne molekulske difuzije i konvekcije (kretanje u rastvoru pod uticajem gradijenta gustine, pritiska ili temperature).¹⁰² Brzina spoljašnje difuzije (V_d) supstrata ponaša se po Fikovom prvom zakonu.

$$V_d = D_e \cdot \frac{F}{r} \cdot (S_o - S_i) \quad (9)$$

gde su F difuziona površina izražena u cm^2 , r debljina Nernstovog sloja izražena u cm a S_o i S_i koncentracije supstrata u okolnom rastvoru i na samoj površini čestice respektivno.¹⁰³

Unutrašnju difuziju ograničava sama priroda polimernog nosača, pre svega njegove fizičke karakteristike (poroznost, veličine pora). Unutar polimernog matriksa odvija se isključivo pasivna molekulska difuzija na koju brzina mešanja rastvora nema nikakvog uticaja. Za čestice sfernog oblika (prečnika r), koje su najčešće kod imobilizovanih enzima, unutrašnja difuzija odvija se u skladu sa Tilovim modulom:

$$\varphi = \frac{r}{3} \sqrt{\frac{V_{max}}{K_m \cdot D_e}} \quad (10)$$

gde je D_e efektivna difuziona konstanta [cm^2/s]. Tilov modul predstavlja pouzdan bezdimenzioni indeks koji definiše uticaj unutrašnje difuzije.¹⁰⁴

Zbog difuzionih ograničenja neophodno je da supstrat difunduje iz spoljašnjeg medijuma do katalitičnog centra što je često korak koji određuje brzinu reakcije. Zato je brzina reakcije katalizovana imobilizovanim enzimom uglavnom sporija u odnosu na istu količinu slobodnog enzima u rastvoru. Mera koja pokazuje koliko daleko reaktanti

treba da difunduju unutar čestice dok ne izreaguju predstavljena je faktorom efektivnosti (η) čija se vrednost nalazi između 0 i 1 a zavisi od koncentracije supstrata u okolnom medijumu.⁵⁶

Efektivnost je definisana kao odnos brzina reakcije imobilizovanog biokatalizatora (V_i) i istog biokatalizatora u nativnom stanju (V_r).¹⁰⁴

$$\eta = \frac{V_i}{V_r} \quad (11)$$

Efektivnost procesa katalizovanog imobilizovanim enzimom se povećava sa rastom koncentracije supstrata.¹⁰⁴ Za razliku od particionog efekta, ukoliko su prisutni samo difuzioni, reakcija ne prati Michaelis-Menten-inu kinetiku. Difuzioni efekat je izraženiji pri niskim koncentracijama supstrata.¹⁰²

1.4.3. Termostabilnost

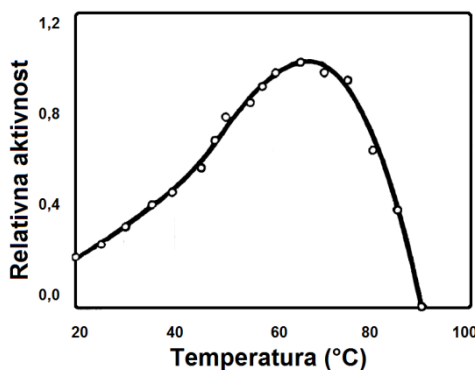
Promene temperature utiču na brzinu svake hemijske reakcije.^{57,100} Da bi došlo do reakcije, reaktanti se moraju sudariti u rastvoru i posedovati dovoljno energije da bi savladali energiju aktivacije prelaznog stanja. Sa porastom temperature molekuli poseduju veću kinetičku energiju, brže se kreću pa samim tim učestalost sudara raste i sve više molekula poseduje dovoljno energije prilikom sudara da savlada ovu energetsku barijeru.⁴⁶ Brzina hemijske reakcije, uključujući i one katalizovane enzimima, zavisi od energije aktivacije (E_a) i broja sudara reaktanata (A) i podleže Arenijusovoj jednačini:

$$k = Ae^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} \quad \text{ili logaritamski oblik} \quad \ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R \cdot T} \quad (12)$$

gde su k - konstanta brzine reakcije (karakteristična za datu reakciju na temperaturi T), A - Arenijusova konstanta (konstanta frekvencije sudara), R - konstanta idealnog gasa (8,314 J/mol K) i T - temperatura u kelvinima. Sa grafika zavisnosti $\ln(k)$ od recipročne vrednosti temperature može se odrediti energija aktivacije iz nagiba prave.

Aktivnost enzima raste sa povećanjem temperature u okviru ograničenog temperaturnog opsega, nakon određene kritične vrednosti, koja je karakteristična za svaki protein, značajno će se smanjiti.¹⁰⁰ Razlog za to je taj što su enzimi proteini i podležu ireverzibilnoj denaturaciji i potpunom gubitku aktivnosti kada temperatura pređe odođenu vrednost.^{57,100} Uticaj temperature na aktivnost nativnog i imobilizovanog enzima može se predstaviti takozvanom krivom temperaturnog

optimuma (Slika 17). Treba imati u vidu da temperaturni „optimum” dobijen sa ovakvog grafika nije konstantan za dati biokatalizator već se razlikuje u zavisnosti od dužine vremena u kojem je enzim izložen određenoj temperaturi odnosno dužini merenja. Što je vreme izloženosti enzima visokim temperaturama kraće, smanjuje se efekat denaturacije, to je temperaturni optimum enzimske reakcije viši.¹⁰⁴



Slika 17: Kriva temperaturnog optimuma – zavisnost relativne enzimske aktivnosti od temperature

Kriva optimuma je rezultat ukupnog efekta povećanja aktivnosti ubrzanjem hemijske reakcije sa porastom temperature i istovremenog porasta inaktivacije čime se gubi aktivnost. Inaktivacija biokatalizatora može se lako odrediti iz eksponencijalne zavisnosti:

$$[A] = [A_0] \cdot e^{-kt} \quad (13)$$

gde je k - konstanta inaktivacije, A_0 i A - početna enzimska aktivnost i aktivnost nakon nekog vremena t . Veličina koja se koristi za karakterizaciju temperaturne stabilnosti enzima je polu-život na određenoj temperaturi. Polu-život enzima ($t_{1/2}$) je vreme potrebno da aktivnost padne na polovinu početne vrednosti pod definisanim uslovima.¹⁰⁴

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5)}{-k} \quad (14)$$

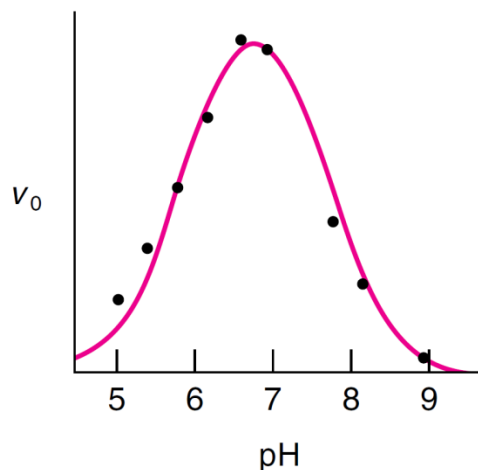
Ova jednačina se može primeniti na računanje energije aktivacije enzimski katalizovane reakcije na temperaturama T_1 i T_2 .

$$E_a = 19,1 \cdot \frac{T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \cdot \log \frac{A_2}{A_1} \quad (15)$$

1.4.4. pH optimum

Aktivnost enzima varira u zavisnosti od pH sredine na način koji se može objasniti jonizacijom kiselina i baza. Aminokiseline na površini molekula, ali i u samom aktivnom centru enzima, se ponašaju kao kiseline i baze. Naelektrisanje ovih grupa, od kojih zavisi katalitička aktivnost, na različitim pH vrednostima variraće u skladu sa njihovim konstantama disocijacije.

Uticaj pH na enzimsku aktivnost na grafiku ima izgled zvonaste krive koja može biti simetrična ili asimetrična (*Slika 18*). Vrednost pH na maksimumu ove krive naziva se pH optimum i odgovara maksimalnoj aktivnosti enzima.⁹⁹ Većina enzima podleže denaturaciji tek pri ekstremnim vrednostima pH. U nekom srednjem opsegu pH dolazi do promene jonizacije aminokiselina usled protonovanja/deprotonovanja, promene naelektrisanja unutar aktivnog mesta kao i naelektrisanja supstrata.⁴³ Imobilizovani enzimi mogu imati prividno izmenjen pH optimum u odnosu na rastvorni usled lokalne promene pH izazvane prirodnom mikrookoline i particionog koeficijenta.¹⁰³



Slika 18: Zavisnost enzimске aktivnosti od pH (Chang, 2005)

II MATERIJAL I METODE

2.1. Izolovanje peroksidaze iz soje

Reagensi:

- Amonijum sulfat
- Aceton
- 0,1 M Natrijum-fosfatni pufer pH 7,0

Peroksidaza je izolovana iz ljuski semena soje koprecipitacijom amonijum sulfatom i acetonom. Odmereno je 200 g ljuski soje koje su homogenizovane na suvo u mlinu za kafu. U 4 čaše zapremine od 1 litra odmereno je po 50 g samlevenih ljuski i dejonizovana voda u odnosu 1:12 (m/v). Homogenizat je dobro promešan 30 minuta na magnetnoj mešalici a zatim pokriven i ostavljen da se ekstrahuje preko noći na sobnoj temperaturi. Ekstrakt je dodatno homogenizovan ultra-turrax-om tokom 2 minuta a zatim ostavljen preko noći. Nakon ekstrakcije homogenizat je prvo ceđen kroz troslojnu, a zatim i četvoroslojnu gazu. Proceđeni ekstrakt je zatim centrifugiran 20 minuta na 4000 rpm. Dekantovan je supernatant i tako dobijen sirovi ekstrakt SBP.

U 200 ml sirovog ekstrakta dodat je čvrst amonijum sulfat do 45% zasićenja na ledu tokom 5 minuta uz lagano mešanje. Iz literarno dostupnih podataka uzeta je vrednost 45% zasićenja 1 litra rastvora koja iznosi 277 g amonijum sulfata, pa je u 200 mL dodato proporcionalno 55,4 g. Nakon rastvaranja amonijum sulfata dodato je 60 mL hladnog acetona (0,3 zapremine od početne količine ekstrakta) tokom 5 minuta uz lagano mešanje na ledu. Po završetku dodavanja acetona smeša je prenetu u levak za odvajanje koji je ostavljen 45 do 60 minuta u cilju odvajanja vodene i acetonske faze. Donja vodena faza je odlivena i centrifugirana 20 minuta na 4000 rpm-a. Supernatanti su spojeni a talozi odbačeni. Izmerena je zapremina spojenih supernatanata.

U spojene supernatante dodato je amonijum sulfata do 75% zasićenja. Preuzet je literaturni podatak da je od zasićenja rastvora amonijum sulfatom od 45% do 75% na 1L potrebno dodati 210 g čvrstog amonijum sulfata. U 150 mL supernatanta dodato je 31,5 g čvrstog amonijum sulfata uz mešanje na magnetnoj mešalici. Rastvor je zatim centrifugiran 20 minuta na 4000 rpm. Centrifugiranjem razdvojile su se tri faze: donja vodena faza, proteinski precipitat u međufazi i gornja acetonska faza. Pokupljen je precipitat iz međufaze koji je prebačen u balon na vakuum uparivaču u cilju uparavanja acetona.

Nakon uparavanja vodeni rastvor peroksidaze iz soje prebačen je u crevo za dijalizu i dijalizovan naspram 100 mM natrijum-fosfatnog pufera pH 7,0, uz minimum 3 promene pufera od najmanje 4h. Dijalizat je zatim centrifugiran 10 minuta na 12000 rpm. Nakon centrifugiranja dobijen je bistar žućkast rastvor peroksidaze iz ljuski soje. Izmerena je koncentracija proteina u rastvoru SBP Bradford-ovom metodom kao i apsorbancija na 280 i 403 nm na spektrofotometru.

2.2. Karakterizacija izolovane rastvorne peroksidaze iz soje

2.2.1. Određivanje koncentracije proteina Bradfordovom metodom

Reagensi:

- Rastvor boje CBB G-250
 - 100 mg CBB G-250
 - 50 mL 95% Etanola
 - 100 mL 85% H₃PO₄
 - Do 200 mL dH₂O100 mg boje CBB G-250 rastvoreno je u etanolu, zatim je dodata fosforna kiselina i na kraju destilovana voda do finalne zapremine.
- Bradfordov reagens

| | |
|------------------------|--------|
| Rastvor boje CBB G-250 | 100 mL |
| Vode do | 500 mL |

Bradfordov reagens je pre upotrebe profiltriran kroz filter papir.
- Rastvor BSA 1 mg/mL
Od rastvora BSA koncentracije 1 mg/mL pripremljena je serija rastvora u rasponu koncentracija od 0,1 do 1,0 mg/mL za standardnu pravu.

Koncentracija proteina u uzorku izolovane peroksidaze iz soje merena je tako što je na 100 µL rastvora dodato 5 mL Bradfordovog reagensa. Sadržaj epruvete promešan je na vibracionoj mešalici (vortex-u). Boja je razvijana 5 minuta. Merena je apsorbancija na 595 nm gde se nalazi maksimum apsorbancije kompleksa protein-boja. Na osnovu dobijenih vrednosti konstruisana je standardna prava. Koncentracija proteina se određuje na osnovu standardne prave od serije rastvora BSA.

2.2.2. Nativna elektroforeza

Pripremljeni su sledeći rastvori za elektroforezu:

1. Tris pufer pH 8,8 – Pufer za razdvajajući gel (1,5 M Tris pH 8,8)

| | |
|-------------------|----------|
| Tris | 36,3 g |
| dH ₂ O | 170,0 mL |
| 4 M HCl do | pH 8,8 |
| Voda do | 200,0 mL |

2. Tris pH 6,8 – Pufer za koncentrujući gel (0,5 M Tris pH 6,8)

| | |
|-------------------|----------|
| Tris | 6,0 g |
| dH ₂ O | 80,0 mL |
| 4 M HCl do | pH 6,8 |
| Voda do | 100,0 mL |

3. Pufer za elektroforezu (0,025 M Tris, 0,192 M Gly pH 8,3)

| | | |
|---------|---------|---------|
| | 1 x | 10 x |
| Tris | 3,0 g | 30 g |
| Glicin | 14,4 g | 144 g |
| Voda do | 1000 mL | 1000 mL |

4. APS (amonijum persulfat) 10% m/V – inicijator

| | |
|---------|-------|
| APS | 0,2 g |
| Voda do | 2 mL |

5. Monomerni rastvor akrilamid (AA)

| | | |
|--------------|--------|--------|
| Akrilamid | 58,4 g | 29,2 g |
| Bisakrilamid | 1,6 g | 0,8 g |
| Voda do | 200 mL | 100 mL |

6. PUZ – Pufer za uzorak

| | | | |
|-----------------------|----------|---------|----------|
| | 1 x | 2 x | 3 x |
| 0,5 M Tris pH 6,8 | 3,12 mL | 6,25 mL | 9,36 mL |
| 99% Glicerol | 2,5 mL | 5,0 mL | 7,5 mL |
| 0,1 % Bromfenol plavo | 0,5 mL | 1,0 mL | 1,5 mL |
| Voda do | 23,75 mL | 22,5 mL | 21,25 mL |

| Gel za razdvajanje (10%) | | Gel za koncentrovanje (5%) | |
|--------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Tris (1,5 M) pH 8,8 | 3,75 mL | Tris (0,5 M) pH 6,8 | 0,63 mL |
| dH ₂ O | 6,025 mL | dH ₂ O | 3,4 mL |
| AA | 5 mL | AA | 0,83 mL |
| TEMED | 8 μ L | TEMED | 65 μ L |
| <u>APS</u> | <u>160 μL</u> | <u>APS</u> | <u>8 μL</u> |
| Σ | 15 mL | Σ | 5 mL |

Rastvor gela za razdvajanje je nakon dezaeracije na vakuum pumpi sipan polako između ploča za elektroforezu. Površina gela je zatim nadslojena dodavanjem destilovane vode i gel je ostavljen da polimerizuje. Po završetku polimerizacije donjeg gela pripremljen je gel za koncentrovanje, dezaerisan i nasut između ploča preko donjeg gela. Na vrh je postavljen češalj i gel je ostavljen da polimerizuje. Kada je završena polimerizacija koncentrujućeg gela izvađen je češalj a bunari za uzorke isprani su destilovanom vodom a zatim naliveni puferom za elektroforezu.

U 20 μ L uzorka proteina dodato je 20 μ L pufera za uzorke (2 x koncentrovanog). Uzorci su naneti u bunare na gelu. Gel je prebačen u aparaturu za elektroforezu a radni uslovi su podešeni tako da je prvih 30 minuta napon od 80 V konstantan, dok uzorci prolaze kroz koncentrujući gel. Nakon ulaska uzoraka u gel za razdvajanje napon je povišen na 120 V a kasnije i na 150 V.

7. Rastvor za fiksiranje, bojenje i obezbojavanje (50% metanol, 10% sirćetna kiselina)

| | |
|-------------------|---------|
| Metanol | 500 mL |
| Sirćetna kiselina | 100 mL |
| Voda do | 1000 mL |

8. Rastvor boje (0,1% CBB, 50% metanol, 10% sirćetna kiselina)

| | |
|--------------------------|--------|
| CBB G-250 | 0,5 g |
| Rastvor za fiksiranje do | 500 mL |

9. Rastvor za obezbojavanje

| | |
|-------------------|---------|
| Metanol | 50 mL |
| Sirćetna kiselina | 70 mL |
| Voda do | 1000 mL |

Po završetku elektroforeze i rasklapanja aparature gel je prvo fiksiran u rastvoru za fiksiranje tokom 20 minuta. Zatim je prenet u rastvor za bojenje tokom 20 minuta i na kraju u rastvor za obezbojavanje.

2.2.3. Zimogram

Reagensi:

- 4-hlor- α -naftol 10 mg u 10 mL metanola
- Rastvor se pravi neposredno pre upotrebe:
 - Metanolni rastvor 1 mL
 - Vodonik peroksid 30% 10 μ L
 - 5mM Natrijum-fosfatni pufer pH 7,0 10 mL

Nakon završene native elektroforeze deo gela je odvojen za detekciju enzimske aktivnosti peroksidaze iz soje na zimogramu. Gel sa elektroforeze je potopljen u rastvor 4-hlor- α -naftola do razvijanja boje.

2.2.4. Određivanje enzimske aktivnosti rastvorne i imobilizovane SBP

Reagensi:

- 0,1 M Natrijum-fosfatni pufer pH 7,0
- 13 mM Pirogalol u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0
- 0,97 M Vodonik peroksid

Enzimska aktivnost slobodne (rastvorne) peroksidaze iz soje merena je na sobnoj temperaturi (21°C). U 1 mL rastvora 13 mM pirogalola dodato je 10 μ L odgovarajućeg razblaženja enzima i 10 μ L 0,97 M vodonik peroksida nakon čega je rastvor dobro promešan i izmerena je apsorbancija na 420 nm na spektrofotometru. Rastvor supstrata pirogalola izuzetno je osetljiv pa stoga mora biti svež, priprema se neposredno pred merenje i čuva na tamnom mestu do upotrebe. U reakciji nastaje narandžasto obojeni purpurogalin, proizvod peroksidazom katalizovane oksidacije pirogalola sa maksimumom apsorpcije na 420 nm. Enzimska aktivnost izračunava se po formuli (16) na osnovu molarnog ekstincionog koeficijenta (ϵ) dobijenog proizvoda purpurogalina na 420 nm koji za 20 sekundi iznosi 12 cm²/ μ mol.

Enzimska aktivnost slobodne (rastvorne) peroksidaze iz soje u ispirku (nevezanoj frakciji peroksidaze nakon imobilizacije) meri se tako što se u 1 mL rastvora pirogalola (13 mM) doda 50 μ L uzorka, 10 μ L vodonik peroksida (0,97 M) i prati kinetika reakcije na 420 nm tokom 7 minuta.

Jedna jedinica enzimske aktivnosti SBP (IU) definisana je kao količina enzima sposobna da proizvede 1,0 mg purpurogalina od polaznog pirogalola za 20 sekundi na

temperaturi od 21°C i pH 7,0. Aktivnost enzima koja je dodata u reakcionu smešu (A_c), izražena u internacionalnim jedinicama [IU ili $\mu\text{mol}/\text{min}$], može se dobiti iz jednačine:

$$A_c = \frac{\Delta A_{420\text{nm}} \cdot V_{rs} \cdot R}{\epsilon \cdot \Delta t \cdot d} \quad (16)$$

Gde su:

$\Delta A_{420\text{nm}}$ – apsorbancija na 420 nm

V_{rs} – ukupna zapremina reakcione smese [mL]

R – faktor razblaženja

ϵ – molarni ekstincioni koeficijent koji za pirogalol na 420_{nm} za 20 sekundi iznosi 12,0 [$\text{cm}^2/\mu\text{mol}$]

Δt – vreme trajanja reakcije izraženo u minutima [min]

d – dužina optičkog puta [cm] (najčešće 1 cm)

Koncentracija enzimske aktivnosti (C_e [IU/mL]) u rastvoru enzima može se dobiti iz odnosa enzimske aktivnosti u reakcionoj smeši i zapremine dodatog alikvota enzima, gde je:

$$C_e = \frac{A_c}{V_e} \quad (17)$$

C_e – koncentracija enzimske aktivnosti u rastvoru enzima [IU/mL]

V_e – zapremina enzima dodata u reakcionu smesu [mL]

Specifična aktivnost imobilizovane SBP merena je sa pirogalolom i vodonik peroksidom kao supstratima na sobnoj temperaturi (21°C). Pomešno je 1-10 mg vlažnog glicidil metakrilatnog imobilizata, odnosno 100-150 μL kuglica tiramin-pektina sa 3 mL rastvora pirogalola, dodato je 30 μL 0,97 M vodonik peroksida. Merena je apsorbancija na 420 nm nakon 5, 10 i 15 minuta reakcije.

Specifična aktivnost imobilizovanog enzima S_p (IU/g) preračunata je kao enzimska aktivnost po gramu imobilizata po formuli:

$$S_p = \frac{A_c}{m} \quad (18)$$

Gde su:

A_c – enzimska aktivnost izračunata po formuli (16)

m – masa suvog polimera [g]

2.3. Imobilizacija peroksidaze iz soje

2.3.1. Glutaralhidna imobilizacija enzima

Ova metoda imobilizacije podrazumeva aktivaciju makroporoznog polimera na bazi glicidil metakrilata glutaralhidom i vezivanje enzima kovalentno za aktivirani nosač. Korišćena je delimično modifikovana publikovana procedura.⁷⁰

Reagensi:

- 0,1 M Natrijum-fosfatni pufer pH 7,0
- 0,1 M Natrijum-fosfatni pufer pH 8,0
- 2,5 % rastvor glutaralhidu u 0,1 M fosfatnom puferu pH 8,0
- 1 M Natrijum hlorid u 0,1 M fosfatnom puferu pH 7,0
- 1 M Glicin u 0,1 M fosfatnom puferu pH 8,0

Odmereno je po 50 mg suvog polimera u 4 vaje i dodato po 1 mL 0,1 M natrijum-fosfatnog pufera pH 8. Rastvor je dezaerisan 10 min na vodenoj vakuum pumpi. Nakon dezaeracije polimer je ispiran dva puta sa po 5 mL u istom puferu.

Polimer je resuspendovan u 2 mL 2,5% rastvora glutaralhidu u istom puferu. Aktivacija polimera glutaralhidom je trajala 2h uz blago mešanje na šejkeru na sobnoj temperaturi. Posle 2 sata polimer je ispiran tri puta sa po 5 mL 0,1 M natrijum-fosfatnog pufera pH 7,0.

Napravljena su razblaženja rastvora enzima od po 1 mL koncentracija 1,25 mg/mL; 0,625 mg/mL; 0,168 mg/mL i 0,034 mg/mL koristeći štok enzima od 2,5 mg/mL.

| Koncentracija SBP (mg/mL) | Rastvor 2,5 mg/mL peroksidaze (µL) | dH ₂ O (µL) | Količina enzima na 1 g suvog polimera (mg) |
|------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|---|
| 1,25 | 500 | 500 | 25,0 |
| 0,625 | 250 | 750 | 12,5 |
| 0,168 | 67,2 | 932,8 | 3,36 |
| 0,034 | 13,6 | 986,4 | 0,68 |

U vaje sa aktiviranim polimerom dodato je po 1 mL rastvora pripremljenih koncentracija enzima. Rastvor enzima sa polimerom inkubiran je 24h uz lagano mućkanje na šejkeru na sobnoj temperaturi od 21°C.

Supernatant sa frakcijom nevezanih enzima odvojen je od polimera. Polimer je ispiran dva puta po 5 minuta sa po 5 mL 1 M rastvora natrijum hlorida u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0 da bi se uklonili tragovi nevezanih enzima. Ispirci su spojeni sa supernatantom i sačuvani za određivanje enzimске aktivnosti nevezane frakcije enzima.

Preostale reaktivne aldehidne grupe na polimeru blokirane su inkubacijom sa 3 mL rastvora 1 M glicina tokom 30 minuta. Glicin je zatim ispiran dva puta sa po 3 mL 0,1 M natrijum-fosfatnog pufera pH 7,0. Polimer je resuspendovan u istom puferu i čuvan na +4°C do upotrebe.

Određena je specifična aktivnost imobilizata. Izmerena je koncentracija enzimске aktivnosti nevezane frakcije iz spojenih supernatanata nakon ispiranja polimera kao i u alikvotu polaznog rastvora peroksidaze iz soje. Količina nevezanih jedinica enzima se dobija množenjem koncentracije enzimске aktivnosti izmerene u spojenim ispicima nakon imobilizacije sa ukupnom zapreminom ispirka. Količina vezanih jedinica enzimске aktivnosti na ukupnu masu suvog polimera dobija se iz razlike enzimskih jedinica dodatih tokom imobilizacije i nevezanih jedinica.

Na osnovu izračunatih enzimskih aktivnosti vezane frakcije i specifične aktivnosti imobilizovanog enzima izračunat je prinos imobilizacije (formula 19). Dobijeni podaci se koriste za konstruisanje grafika zavisnosti specifične aktivnosti i prinosa imobilizacije od količine dodatih enzimskih jedinica. Sa grafika je određena optimalna količina jedinica enzimске aktivnosti koju je potrebno dodati za dati polimer.

Prinos imobilizacije (Y) određivan je na osnovu odnosa specifične i vezane aktivnosti po sledećoj formuli:

$$Y = \frac{S_p}{A_{vezana}} \cdot 100\% \quad (19)$$

Gde su:

S_p – specifična aktivnost (IU/g)

A_{vezana} – vezana aktivnost

Količina vezanih jedinica enzima (vezana aktivnost) dobija se računanjem nevezane frakcije enzima u ispirku i množenjem sa ukupnom zapreminom ispirka. Dobijena vrednost nevezane aktivnosti se oduzme od vrednosti ukupne aktivnosti enzima nanetog na nosač.

Korišćena su 4 različita polimera (označena SGE 10/4, SGE 10/12, SGE 20/12 i SGE 15/16) sa različitim veličinama pora, tako da je opisana procedura ponovljena za svaki polimer. Ispitan je uticaj veličine pora i količine dodatog enzima na vezanu aktivnost, specifičnu aktivnost imobilizata i prinos imobilizacije u cilju izbora imobilizata najboljih karakteristika za dalji rad.

2.3.2. Perjodatna imobilizacija enzima

U ovoj metodi imobilizacije enzim se aktivira oksidacijom natrijum perjodatom, nakon čega se kovalentno vezuje za aminovane makroporozne polimere glicidil metakrilata različitih karakteristika.⁷⁰

Reagensi:

- 50 mM Natrijum-acetatni pufer pH 5,0
- 50 mM Natrijum-perjodat
- 2,5 mg/mL enzima
- 99% Glicerol
- 5 mM EDTA

U četiri plastične epruvete odmereno je po 50 mg suvog polimera i dodato po 1 mL 50 mM natrijum-acetatnog pufera pH 5,0. Polimer je dezaerisan 10 min na vodenoj vakuum pumpi a zatim ispiran dva puta sa po 5 mL istog pufera.

Rastvoreno je 8,3 mg liofilizovane peroksidaze iz soje u 3,3 mL 50 mM natrijum-acetatnog pufera pH 5,0. U rastvor enzima dodato je 0,4 mL 50 mM natrijum-perjodata. Rastvor je inkubiran na tamno u frižideru na +4°C tokom 6 sati uz povremeno mešanje. Nakon toga je dodato 10 µL 99% glicerola i inkubirano još pola sata na sobnoj temperaturi. Rastvor perjodatno oksidovanog enzima postavljen je na dijalizu naspram 50 mM natrijum-acetatnog pufera pH 5,0. Dijaliza je postavljena na tamno uz minimum tri izmene pufera u trajanju od po 4h.

Nakon završene dijalize osnovni štok aktiviranog enzima koncentracije 2,5 mg/mL korišćen je za pripremu radnih razblaženja koncentracija: 1,25 mg/mL; 0,625 mg/mL; 0,168 mg/mL i 0,034 mg/mL. U prethodno isprani polimer dodato je po 1 mL pripremljenih rastvora perjodatno oksidovane peroksidaze što odgovara količini od dodatih 25; 12,5; 3,36 i 0,68 mg enzima na 1 g suvog polimera što je tabelarno prikazano.

| Koncentracija SBP (mg/mL) | Rastvor 2,5 mg/mL peroksidaze (μ L) | dH ₂ O (μ L) | Količina enzima na 1 g suvog polimera (mg) |
|---------------------------|--|------------------------------|--|
| 1,25 | 500 | 500 | 25,0 |
| 0,625 | 250 | 750 | 12,5 |
| 0,168 | 67,2 | 932,8 | 3,36 |
| 0,034 | 13,6 | 986,4 | 0,68 |

Uzorci su zaštićeni od svetlosti i inkubirani 12 sati na sobnoj temperaturi uz blago mešanje na šejkeru. Inkubacija je nastavljena u frižideru na +4°C tokom 36 sati.

Supernatant sa frakcijom nevezanih enzima odvojen je od polimera. Polimer je ispiran dva puta u trajanju od 5 minuta sa po 5 mL natrijum-acetatnog pufera pH 5,0 u cilju uklanjanja tragova nevezanih enzima. Svi supernatanti su spojeni i ostavljeni za merenje frakcije nevezanih enzima. Polimer je resuspendovan u 2-3 mL 50 mM natrijum-acetatnog pufera i čuvan na +4°C do upotrebe.

Određena je specifična aktivnost imobilizovanog enzima. Izmerena je koncentracija enzimske aktivnosti nevezane frakcije iz spojenih supernatanata nakon ispiranja polimera kao i u alikvotu polaznog rastvora peroksidaze iz soje. Na osnovu dobijenih podataka izračunata je količina vezanih jedinica enzima kao i prinos imobilizacije (formula 19).

Perjodatna imobilizacija je kao i glutaraldehidna rađena sa 4 različita polimera (označena SGE 10/4, SGE 10/12, SGE 20/12 i SGE 15/16) različitih veličina pora, tako da je opisana procedura ponovljena za svaki polimer. Ispitan je uticaj veličine pora i količine dodatog enzima na vezanu aktivnost, specifičnu aktivnost imobilizata i prinos imobilizacije u cilju izbora imobilizata najboljih karakteristika za dalji rad.

2.3.3. Određivanje temperaturne stabilnosti

Reagensi:

- 50 mM Tris pufer pH 7,0

Za određivanje temperaturne stabilnosti rastvorne SBP, 50 μ L rastvora enzima koncentracije 0,1 mg/mL inkubirano je na 85°C u termobloku (Grant QBD21, United Kingdom). Pre zagrevanja odvojen je jedan alikvot od 10 μ L za merenje enzimske aktivnosti u polaznom rastvoru. Alikvoti od po 10 μ L su odvajani tokom inkubacije nakon 1, 10 i 30 minuta i hlađeni na ledu. Napravljena su odgovarajuća razblaženja

odvojenih alikvota i merena je njihova enzimaska aktivnost sa pirogalolom i vodonik peroksidom u 1 mL reakcione smeše po proceduri opisanoj u poglavlju br. 2.2.4.

Termostabilnost imobilizovanog enzima određena je za imobilizate SBP na makroporoznom glicidil metakrilatu vezanog glutaraldehidnom metodom kao i za SBP imobilizovanu unutar hidrogel kuglica od modifikovanog (5% oksidovanog) pektina. Imobilizati u TRIS puferu pH 7,0 zagrevani su na 85°C u termobloku. Specifična aktivnost imobilizata merena je nakon perioda inkubacije od 0, 1, 10 i 30 minuta. Rezidualna aktivnost izražena je u procentima u odnosu na početnu aktivnost za nezagrevan uzorak (t_0).

2.3.4. Određivanje stabilnosti u organskom rastvaraču

Reagensi:

- 0,1 M Natrijum-fosfatni pufer pH 7,0
- 80% 1,4-dioksan

Za merenje stabilnosti slobodne (rastvorne) kao i imobilizovane peroksidaze iz soje u organskom rastvaraču korišćen je 80% rastvor 1,4-dioksana u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0. Za određivanje stabilnosti rastvorne SBP u 800 μ L dioksana dodato je 100 μ L 0,1 M natrijum-fosfatnog pufera i 100 μ L peroksidaze iz soje koncentracije 0,1 mg/mL. Enzim je inkubiran na sobnoj temperaturi. Za merenje rezidualne enzimske aktivnosti alikvotirani su uzorci zapremine 10 μ L nakon 2h, 24h i 48h inkubacije. Za nulto vreme korišćen je rastvor bez dodatka dioksana odnosno u 900 μ L fosfatnog pufera dodato je 100 μ L SBP koncentracije 0,1 mg/mL. Enzimaska aktivnost merena je sa pirogalolom i vodonik peroksidom po proceduri opisanoj u poglavlju br. 2.2.4.

Stabilnost imobilizovane SBP u 80% dioksanu određena je za SBP imobilizovanu glutaraldehidnom metodom na makroporoznim glicidil metakrilatnim polimerima kao i za SBP imobilizovanu unutar hidrogel kuglica od modifikovanog (5% oksidovanog) pektina. Za svaki imobilizat u seriji od četiri epruvete odmerena je ista masa vlažnog imobilizata. U jednu epruvetu iz svake serije dodato je 2 mL 0,1 M natrijum-fosfatnog pufera pH 7,0 dok je u sve preostale dodato po 2 mL 80% dioksana u natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0 nakon čega su inkubirane na sobnoj temperaturi tokom 2h, 24h i 48h. Nakon završenih navedenih perioda inkubacije dioksan je uklonjen a imobilizatima je izmerena specifična aktivnost po proceduri opisanoj u poglavlju br. 2.2.4. Izmerena specifična aktivnost u uzorku inkubiranom u puferu korišćena je kao početna aktivnost i u odnosu na nju poređene su rezidualne aktivnosti nakon 2h, 24h i

48h inkubacije za svaki imobilizat. Konstruisan je grafik zavisnosti rezidualne aktivnosti od vremena inkubacije.

2.3.5. Određivanje pH optimuma

Reagensi:

- 0,1 M Natrijum-fosfatni pufer pH 7,0
- 0,1 M Natrijum-citratni pufer pH 2,0
- 0,1 M Glicin pH 9,0
- Pirogalol

Za peroksidazu iz soje imobilizovanu glutaraldehidnom metodom na makroporozni glicidil metakrilatni polimer, SBP imobilizovanu unutar hidrogel kuglica od modifikovanog (5% oksidovanog) pektina kao i za rastvorni enzim određen je pH optimum tj. pH vrednost na kojoj enzim pokazuje najveću aktivnost. Puferi pH vrednosti u rasponu od 2,0-8,0 pripremljeni su titracijama 0,1 M natrijum-citratnog pufera pH 2,0 i 0,1 M natrijum-fosfatnog pufera pH 7,0. Za vrednost pH 9,0 korišćen je 0,1 M glicin. U 5 mL natrijum-citratno-fosfatnog pufera odgovarajuće pH vrednosti (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 i 8,0) odnosno glicina pH 9,0 rastvoreno je po 8,2 mg pirogalola.

Enzimska aktivnost određena je po proceduri opisanoj u poglavlju br. 2.2.4. merenjem A_{420} tokom 3 minuta. Kontrola supstrata odrađena je na radnim pH vrednostima po proceduri za određivanje enzimske aktivnosti, merenjem apsorbancije na 420 nm bez dodatka enzima. Konstruisan je grafik zavisnosti enzimske aktivnosti od pH.

2.3.6. Određivanje kinetičkih parametara K_m i V_{max}

Reagensi:

- 0,1 M Natrijum-fosfatni pufer pH 7,0
- Rastvori pirogalola u opsegu od 0,5-70 mM u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0
- 0,97 M Vodonik peroksid

Za određivanje kinetičkih parametara K_m i V_{max} rastvorne i imobilizovane peroksidaze iz soje sa pirogalolom kao supstratom pripremljena je serija različitih koncentracija supstrata. Za rastvornu SBP korišćeni su rastvori pirogalola u opsegu od

0,5 do 5 mM dok su za imobilizate (makroporozni glicidil metakrilat označen SGE 20/12 i hidrogel kuglice od 5 mol% tiramin-pektina) pripremljeni rastvori od 0,7 do 70 mM. Merenja enzimske aktivnosti su rađena sa konstantnom koncentracijom enzima (solubilnog i imobilizovanog), pri zasićujućim koncentracijama vodonik peroksida i varirajućim koncentracijama pirogalola po proceduri opisanoj u poglavlju br. 2.2.4. Na osnovu dobijenih vrednosti početnih brzina reakcije konstruisan je Michaelis-Menten-in grafik. Urađena je Lineweaver-Burk-ova linearizacija prave i iz jednačine prave izračunate su vrednosti K_m i V_{max} .

2.3.7. Operativna stabilnost imobilizata

Reagensi:

- 50 mM Tris pufer pH 7,0
- 13 mM Pirogalol u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0
- 0,97 M Vodonik peroksid

Mogućnost višestruke upotrebe dobijenih imobilizata praćena je sposobnošću imobilizovane SBP da ukloni pirogalol iz vodenih puferskih rastvora u nekoliko ciklusa. Testirani su imobilizati SBP na makroporoznom glicidil metakrilatu (SGE 20/12 imobilizovan glutaraldehidnom metodom) i SBP okludovana unutar kuglica hidrogela od 5 mol% tiramin-pektina. U 3 mL rastvora pirogalola (13 mM) dodata je odgovarajuća količina imobilizata. Reakcija startuje po dodatku 30 μ L vodonik peroksida (0,97 M) i odvija se uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici. Reakcija u bač reaktoru praćena je diskontinualnom metodom uzimanjem alikvota (na početku, nakon 5, 10, 15 minuta a zatim na svakih 30 minuta u trajanju od 2h) i merenjem rezidualne količine pirogalola na spektrofotometru. Alikvoti od po 10 μ L su razblaženi 100x i merena im je apsorbancija na 420 nm.

Nakon svakog završenog ciklusa imobilizat je dobro ispiran (bar 5 puta) u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0 od ostatka supstrata i reakcionog proizvoda. Zatim je dodata sveža količina pirogalola za naredni ciklus koji je praćen po istoj proceduri. Konstruisan je grafik zavisnosti rezidualne aktivnosti od broja ciklusa.

2.4. Modifikacija pektina perjodatom i tiraminom

Reagensi:

- Natrijum perjodat (1,5 mM, 3 mM, 6 mM, 9 mM i 12 mM)
- 99% glicerol
- Natrijum hlorid
- 99% etanol
- 0,1 M Natrijum-fosfatni pufer pH 6,0
- Tiramin hidrohlorid
- Natrijum cijanoborhidrid (NaBH_3CN)

U rastvor pektina (0,14 g u 10 mL dH_2O) dodato je 2,5 mL natrijum perjodatnog rastvora (1,5 mM, 3 mM, 6 mM, 9 mM i 12 mM) tako da odnos molariteta perjodata i polisaharida bude 2,5 mol%; 5 mol%; 10 mol%; 15 mol% i 20 mol%. Rastvor je inkubiran na tamno u frižideru na $+4^\circ\text{C}$ preko noći.

U cilju prekidanja reakcije u rastvor polisaharida i perjodata, koji je inkubiran preko noći, dodato je 0,7 mL glicerola i ostavljen je još pola sata na sobnoj temperaturi zaštićen od svetlosti, a zatim je dodato 0,07 g NaCl. Kad se NaCl rastvorio dodato je 20 mL čistog etanola, promešano je i centrifugirano (10 minuta, 4000 rpm). Talog je rastvoren u 10 mL destilovane vode, zatim je dodato 0,02 g NaCl, kada se rastvorio dodato je 20 mL čistog etanola, promešano je i centrifugirano (10 minuta, 4000 rpm). Talog je opet rastvoren u 10 mL destilovane vode, nakon rastvaranja dodato je 0,01 g NaCl i kada se rastvorio dodato je 20 mL etanola, promešano je i ponovo centrifugirano (10 minuta, 4000 rpm). Talogu je dodato 10 mL čistog etanola, mešano je 15 minuta, radi ispiranja, centrifugirano je (10 minuta, 4000 rpm) nakon čega je talog osušen na sobnoj temperaturi.

Oksidovani osušeni polimer je rastvoren u 10 mL Na-fosfatnog pufera pH 6,0. U rastvor je zatim dodat čvrst tiramin-HCl (0,15 g u 10 mL polimera) nakon čega je postavljen na magnetnu mešalicu i mešan tokom 30 minuta. U digestoru je dodato 0,05 g natrijum cijanoborhidrida (NaBH_3CN) nakon čega je ostavljen u digestoru tokom 24h na tamnom mestu.

Rastvor je centrifugiran 10 minuta na 4000 rpm-a. U supernatant (rastvor modifikovanog pektina) dodato je NaCl do finalne koncentracije od 1 M (0,584 g na 10 mL rastvora). Nakon rastvaranja dodato je 20 mL čistog etanola (minimalan odnos rastvora modifikovanog pektina i etanola je 1:2 V/V). Rasvor je zatim centrifugiran (10 minuta, 4000 rpm), odvojeni talog rastvoren je u 10 mL dH_2O . Postupak taloženja sa 1

M NaCl i etanolom je ponovljen. Dobijeni talog ispran je etanolom i osušen na vazduhu. Osušeni polimer čuvan je u zamrzivaču na -20°C do upotrebe.

Dobijeno je 5 različitih hemijski modifikovanih pektina, koji u zavisnosti od procenta oksidacije perjudatom (2,5 mol%, 5 mol%, 10 mol%, 15 mol% i 20 mol%) imaju drugačije karakteristike.

2.4.1. Imobilizacija SBP na hemijski modifikovanom pektinu

Ragensi:

- 50 mM Tris pufer pH 7,0
- 15% rastvor modifikovanog pektina
- 0,01 M Glukoza
- Glukoza oksidaza (GOx; 1 mg/mL, specifična aktivnost 149,8 IU/mg)
- 3% Span 80 u lakom mineralnom ulju
- 0,5% Triton X-100 u 5% CaCl₂
- 5% CaCl₂

Za imobilizaciju peroksidaze iz soje okludovanjem unutar kuglica koje nastaju geliranjem hemijski modifikovanog pektina odmereno je 22,5 mg tiramin-pektina i rastvoreno u 150 µL dH₂O (15% rastvor). Kad se pektin rastvorio dodato je sledećim redom:

150 µl - pektin (15% rastvor)

79 µl - 50 mM Tris pufer pH 7,0

30 µl - Peroksidaza iz soje (SBP; 26,8 IU/mL)

1 µl - GOx

40 µl - 0,01 M Glukoza

Za imobilizaciju unutar kuglica hidrogela dodato je po 30 µL izolovane peroksidaze iz soje (konc. 26,8 IU/ml), tako da je u reakciji bilo ukupno 0,8 IU. Odmah po dodatku glukoze, rastvor je dobro promešan i dodat je u 600 µL rastvora Span 80 (3%) u lakom mineralnom ulju koji je postavljen na magnetnu mešelicu. Neophodno je da se ovaj korak brzo izvede kako ne bi došlo do geliranja u mikrotubi. Konstantnim mešanjem formirale su se kuglice. Nakon 20 min reakcija je prekinuta dodatkom 1 mL 0,5% Triton X-100 u 5% CaCl₂ rastvorenom u destilovanoj vodi i mešanje je nastavljeno još 5 min. Zatim su kuglice ispirane 3 puta sa istim rastvorom tritona u CaCl₂ a onda 3 puta sa rastvorom 5% CaCl₂. Ispirci su spojeni i izmerena im je zapremina. U ispicima je izmerena enzimaska aktivnost SBP-a (u 1 mL reakcione smeše i 50 µL uzorka) koja

predstavlja koncentraciju nevezane frakcije enzima. Nakon ispiranja kuglice su staložene, odliven je višak rastvora a kuglice ostavljene u maloj zapremini rastvora (da se ne bi osušile). Izmerena je zapremina kuglica i ukupna zapremina rastvora. Iz dobijenih zapremina kuglica i rastvora izračunat je procenat kuglica u rastvoru što je neophodno za računanje specifične aktivnosti.

Merena je specifična aktivnost kuglica (u 3 mL reakcione smeše i 100-150 μ L kuglica) po proceduri opisanoj u poglavlju br. 2.2.4.

2.4.2. Optimizacija imobilizacije SBP na hemijski modifikovanom pektinu

Uticaj gustine polimera na pravljenje hidrogela kao i na parametre imobilizacije SBP unutar mikrokuglica optimizovan je za tiramin-pektin (oksidovanim 10 mol%). Korišćene su različite koncentracije modifikovanog pektina (2,5; 5,0; 7,5 i 10% w/v u finalnoj smeši) za sintezu gela različitih gustina po opisanoj proceduri. Praćena su mehanička svojstva gela i parametri imobilizacije SBP (specifična aktivnost, prinos imobilizacije) u cilju pronalaženja optimalne gustine.

Ispitivan je uticaj procenta oksidacije pektina perjodatom na parametre imobilizacije SBP u kuglicama modifikovanog pektina tako što su pri optimalnoj gustini polimera (7,5% w/v) testirani svi dobijeni modifikati (oksidovani 2,5; 5; 10; 15 i 20 mol%). Napravljene su kuglice sa 0,8 IU SBP i poređeni parametri imobilizacije praćenjem vrednosti specifične aktivnosti i prinosa imobilizacije.

Uticaj količine imobilizovanih enzimskih jedinica na parametre imobilizacije SBP ispitivan je pravljenjem kuglica sa 5 mol% oksidovanim pektinom pri optimalnoj gustini gela (7,5% w/v), dodatkom 1 IU glukoza oksidaze, 1 M glukoze i variranjem količine dodatog enzima. Napravljene su kuglice sa 0,2 IU; 0,4 IU; 1,5 IU i 2 IU peroksidaze iz soje i praćen je odnos specifične aktivnosti i prinosa imobilizacije.

Optimizovane su koncentracije glukoze i enzima glukoza oksidaze i praćen je njihov uticaj na parametre imobilizacije SBP. Imobilizovano je 0,8 IU SBP u kuglice hidrogela gustine 7,5% (w/v) od modifikovanog pektina (5 mol% oksidovanog) sa dodatkom 0,1 IU odnosno 1 IU glukoza oksidaze i varirajućim koncentracijama glukoze od 0,01 M, 0,1 M i 1 M.

2.4.3. Određivanje dimenzija kuglica pektinskog hidrogela sa imobilizovanom SBP na optičkom mikroskopu

Dobijene gelaste kuglice od hemijski modifikovanog pektina (10 mol% oksidovanog) sa imobilizovanom peroksidazom iz soje posmatrane su pod optičkim mikroskopom pri uveličanju od 5 puta (Carl Zeiss Axio Observer.Z1, Germany). Na osnovu jednog vidnog polja od 50 kuglica izmeren je prečnik (minimalni i maksimalni) i određena je prosečna dimenzija kuglica. Konstruisan je i histogram raspodele veličine kuglica.

2.4.4. Snimanje spektara

Hemijska modifikacija pektina i uvođenje fenil grupe u polimer vezivanjem tiramina praćena je snimanjem UV spektra čistog tiramina kao i svih modifikata. Pripremljeni su 0,1% rastvori modifikovanih pektina oksidovanih sa 2,5; 5; 10; 15 i 20 mol% perjodata i nemodifikovanog pektina u destilovanoj vodi. Merena je apsorbancija na 260 i 280 nm, kao i spektar u UV oblasti u rasponu talasnih dužina od 200-380 nm na UV-VIS spektrofotometru (Shimadzu Corporation UV-2501PC, Japan).

2.4.5. SEM analiza

Poređenje površinske strukture nativnog pektina sa modifikovanim pektinom kao i snimanje strukture makroporoznog glicidil metakrilata urađeno je na skenirajućem elektronskom mikroskopu SEM-EDS (Joel Ltd. JSM-6610, Japan). Mikrografije su dobijene korišćenjem metode sekundarnih elektrona sa spot size 40 nm, pri radnoj razdaljini od 8 mm i voltaži od 30 kV. Uzorci su prethodno premazani ultra tankim slojem zlata (električno provodljivog materijala). Snimci su napravljeni pri uveličanju od 370, 5000 i 15000 puta.

2.4.6. FTIR Spektroskopija

Snimljeni su FTIR spektri nativnog komercijalnog pektina koji je korišćen za oksidaciju kao i modifikovanog 10 mol% tiramin-pektina u opsegu od 4000-400 cm^{-1} . Spektri su dobijeni direktno iz čvrstog uzorka koristeći ATR metodu pomoću Nicolet 6700 Thermo-Scientific spektrometra.

2.4.7. ^1H NMR Spektroskopija

Protonski NMR spektri nativnog i 10 mol% modifikovanog pektina snimljeni su na Bruker Avance III 500 MHz (AV500) spektrometru. Hemijska pomeranja (δ) su izražena u ppm-ovima (parts per million) u odnosu na referentni tetrametilsilan (TMS) kao interni standard. Kao rastvarač korišćen je deuterijum oksid.

2.4.8. Elementalna analiza

Elementalni sastav (C, H, N) nativnog pektina i modifikovanog 10 mol% tiramin-pektina određeni su elementalnom analizom na Vario EL III, Elementar Analysen Systeme GmbH (Germany).

2.4.9. Titracija jonizabilnih grupa

Reagensi:

- 50 mM Kalijum hlorid (KCl)
- 0,1 M Natrijum hidroksid (NaOH)

Odmereno je 40 mg polimera i rastvoreno u 4 mL 50 mM rastvora KCl i tako dobijen 1% rastvor polimera. Nakon rastvaranja izmerena je pH vrednost rastvora, a zatim pH spušten na vrednosti 2-3 dodatkom razblažene HCl. Dobijena pH je zabeležena a rastvor titrovan 0,1 M NaOH do pH 10. Titracija je rađena polako uz postepeno dodavanje po 50 ili 100 μL hidroksida uz beleženje svih međuvrednosti. Titracija je rađena kako sa modifikovanim tako i sa nemodifikovanim polimerom, kao i rastvorom 50 mM KCl kao slepe probe.

Iz dobijenih zapremina utrošenog NaOH za titraciju (umanjenog za titraciju čistog KCl), preračunat je broj mmol-ova utrošenog hidroksida. Vrednost koncentracije jonizabilnih grupa po gramu polimera (mmol/g) dobijena je iz odnosa broja mmol-a potrošenog hidroksida i grama titrovanog polimera.

2.5. Uklanjanje fenola

Reagensi:

- 50 mM TRIS pufer pH 8,0
- 250 mM Natrijum bikarbonatni pufer pH 8,0
- 83,4 mM $K_3Fe(CN)_6$ u 250 mM natrijum bikarbonatni pufer pH 8,0
- 20,8 mM 4-aminoantipirin u 250 mM natrijum bikarbonatni pufer pH 8,0
- 2 mM fenol u 50 mM TRIS puferu pH 8,0

Koncentracija fenola određivana je na osnovu kalibracione prave za koju je pripremljena serija rastvora različitih koncentracija fenola u rasponu od 0 do 120 μ M u 50 mM TRIS puferu pH 8,0. Po 800 μ L rastvora fenola u TRIS puferu mešano je sa 100 μ L 83,4 mM $K_3Fe(CN)_6$ i 100 μ L 20,8 mM 4-aminoantipirina. Nakon 10 minuta tokom kojih se razvija boja, očitavana je apsorbancija na 510 nm na sprektrofotometru. Na osnovu dobijenih vrednosti konstruisana je kalibraciona prava, grafik zavisnosti apsorbancije od koncentracije fenola.

Uklanjanje fenola rastvornom peroksidazom iz soje rađeno je u zapremini reakcione smeše od 3 mL 2 mM rastvora fenola u TRIS puferu sa dodatkom vodonik peroksida i rastvorne SBP. Količina dodatih jedinica enzimske aktivnosti (0,5-10 IU) kao i finalna koncentracija vodonik peroksida (0,5-3,0 mM) su varirani u cilju optimizacije procedure. Reakcija je postavljena na magnetnu mešalicu i alikvotirano je po 40 μ L u tačno definisanim periodima od početka reakcije (0, 15, 30, 60, 90 i 120 min). Svaki alikvot je razblažen u 760 μ L pufera a zatim je dodato 100 μ L rastvora $K_3Fe(CN)_6$ i 100 μ L 4-aminoantipirina. Nakon 10 minuta, očitavana je apsorbancija na 510 nm.

Praćenje uklanjanja fenola imobilizovanom SBP odvija se po istom postupku, samo što se umesto rastvornog enzima dodaje imobilizat. Testirana su dva imobilizata: glutaralhidno imobilizovana SBP na polimeru od glicidil metakrilata (SGE 20/12) i SBP imobilizovana unutar kuglica od tiramin-pektina (5 mol%).

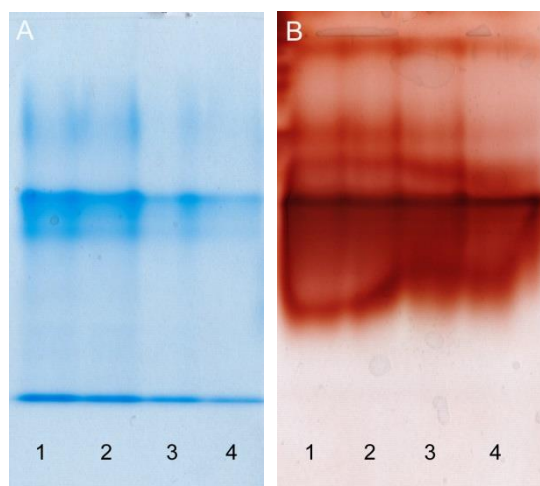
Procenat uklonjenog fenola nakon 2h od početka reakcije u odnosu na početnu koncentraciju preračunava se pomoću standardne prave.

III REZULTATI I DISKUSIJA

3.1. Izolacija peroksidaze iz soje

Peroksidaza je izolovana iz semenog omotača (ljuski) soje po publikovanoj proceduri.¹⁰⁵ Budući da u semenom omotaču soje zahvaljujući njenom dominantnom genu postoji samo jedna izoenzimska forma peroksidaze i da ljuske soje predstavljaju bogat polazni materijal, korišćena je jednostavna metoda frakcionog taloženja proteina amonijum sulfatom i nakon toga kooperativni „salting out“ efekat dvofaznog sistema – acetone-amonijum sulfat.

Prečišćeni uzorak enzima je pušten na nativnu elektroforezu posle koje je urađen zimogram da bi se proverilo prisustvo i čistoća izolovane peroksidaze. U kontrolni bunar nanet je uzorak komercijalne peroksidaze iz rena (HRP Tip VI-A) koncentracije 0,25 mg/mL. Peroksidaza iz rena ima molekulsku masu od 44 kDa, pokazuje blizu 60% homologije u sekvenci i sličnu trodimenzionalnu strukturu i na osnovu toga prelazi sličnu putanju na akrilamidnom gelu (*Slika 19*).



Slika 19: A) Elektroforeza prečišćenog uzorka SHP; B) Zimogram prečišćenog uzorka SHP; Bunari br 1, 2 i 3 – tri šarže izolovane peroksidaze iz soje; bunar br. 4 – komercijalna HRP tip VI-A koncentracije 0,25 mg/mL

Prečišćenom uzorku peroksidaze iz soje određena je koncentracija proteina Bradfordovom metodom kao i koncentracija enzimske aktivnosti. Deo uzorka je liofilizovan.

3.2. Kovalentna imobilizacija peroksidaze iz soje na makroporoznom glicidil metakrilatu

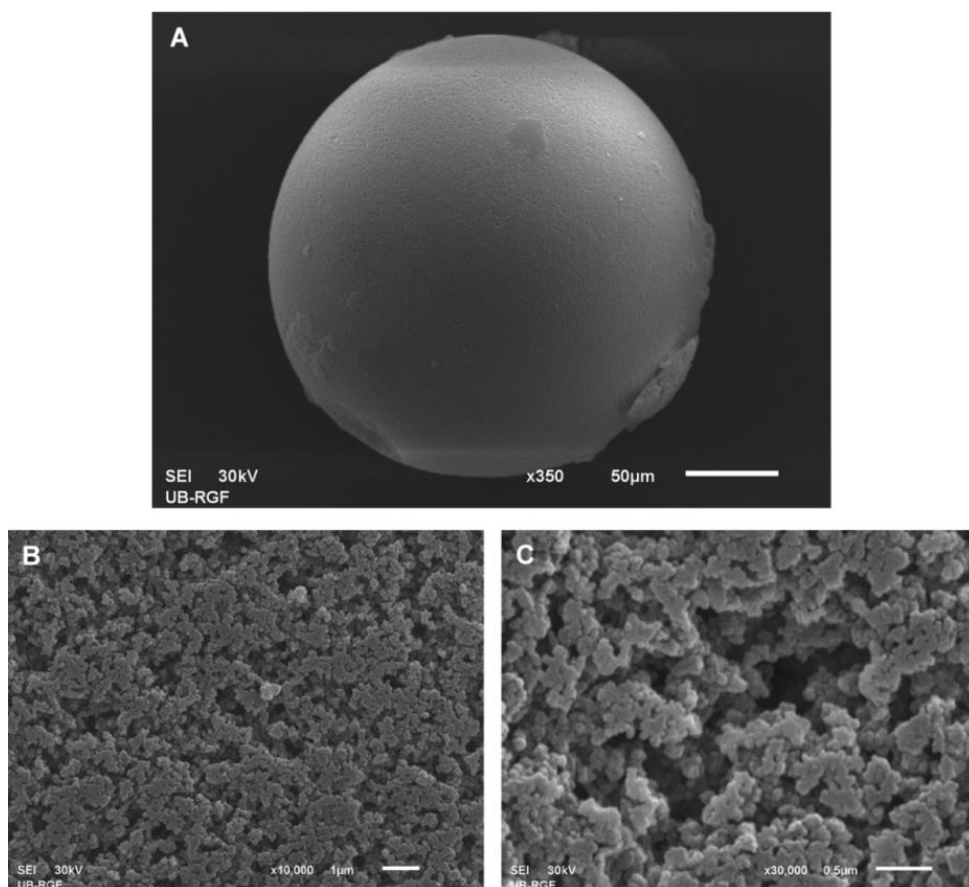
U prvom delu ovog rada peroksidaza iz soje imobilizovana je na sintetisanim makroporoznim polimerima glicidil metakrilata različitih površinskih karakteristika i dimenzija pora. Poređena su dva načina imobilizacije, glutaraldehidna i perjodatna metoda. Merena je enzimska aktivnost rastvornog enzima i specifična aktivnost imobilizata. Meren je stepen stabilizacije imobilizata u odnosu na rastvorni enzim poređenjem termostabilnosti, stabilnosti u organskom rastvaraču, pH optimuma i katalitičkih parametara. Na kraju je merena operativna stabilnost najboljeg imobilizata pri višestrukoj upotrebi u bač reaktoru.

3.2.1. Nosač za imobilizaciju

Korišćena su četiri različita kopolimera na bazi glicidil metakrilata (GMA) i etilen glikol dimetakrilata (EGDMA) sintetisana u obliku kuglica sa rasponom dijametra od 150-500 μm izuzetno porozne površinske strukture. Svi korišćeni polimeri sintetisani su po publikovanoj proceduri i modifikovani etilendiaminom kako je prethodno opisano.^{60,61,63} Polimeri su označeni na sledeći način:

1. SGE 10/4 (veličina pora od 40 nm)
2. SGE 10/12 (veličina pora od 50 nm)
3. SGE 20/12 (veličina pora od 120 nm)
4. SGE 15/16 (veličina pora od 200 nm)

Oblik, veličina i porozna površinska struktura potvrđena je skenirajućom elektronskom mikroskopijom čestica označenih SGE 20/12 sa porama veličine od 120 nm (*Slika 20*).



Slika 20: Mikrografija sa skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM-EDS) makroporoznog GMA-co-EGDMA kopolimera SGE 20/12 (veličine pora od 120 nm). A) kuglica polimera pri uveličanju od 350 puta; B) površina kuglice pri uveličanju od 10000 puta; C) površina čestice polimera pri uveličanju od 30000 puta.

Ovi polimeri se ne razlikuju samo po veličinama pora već i po dostupnoj aktivnoj površini kao i koncentraciji slobodnih amino grupa. Sve karakteristike polimera prikazane su tabelarno (Tabela 1).

Tabela 1: Karakteristike polimera

| Polimer | Veličina pora $d_{v/2}$ (nm) | Zapremina pora V_s (mL/g) | Aktivna površina $S_{s,Hg}$ (m^2/g) | Amino grupe ($\mu\text{mol/g}$) |
|-----------|------------------------------|-----------------------------|---|-----------------------------------|
| SGE 10/4 | 44 | 0,580 | 70 | 790 |
| SGE 10/12 | 53 | 0,610 | 50 | 810 |
| SGE 20/12 | 120 | 0,960 | 31 | 1050 |
| SGE 15/16 | 200 | 1,020 | 34 | 370 |

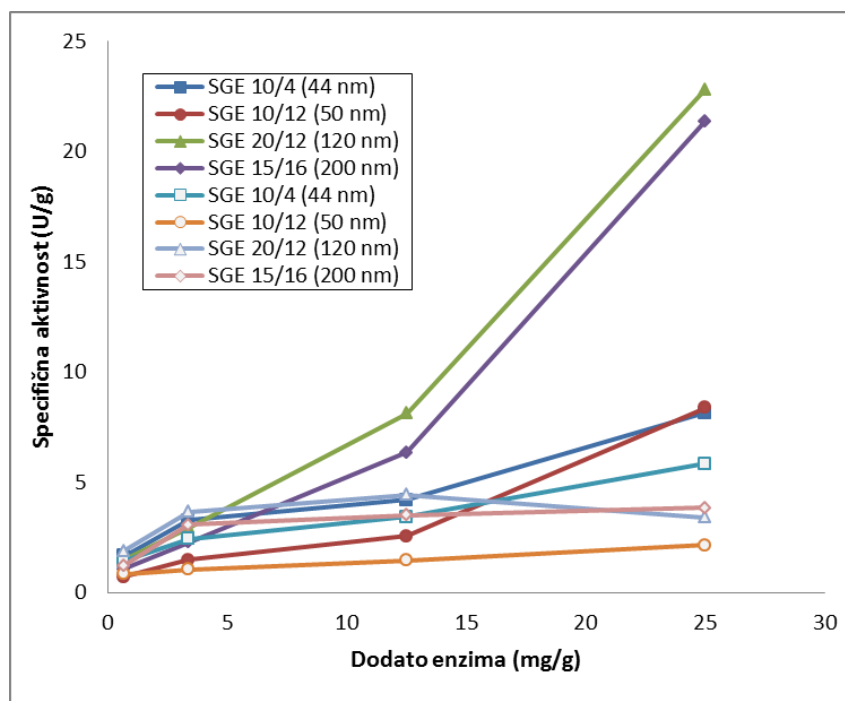
U zavisnosti od količine inertne komponente tokom same sinteze polimera u reakciji kopolimerizacije u suspenziji, kopolimeri dobijeni od monomera GMA i EGDMA

moгу imati različite površinske karakteristike, koncentraciju amino grupa pa i naelektrisanje. Pošto površinske karakteristike nosača imaju značajnu ulogu u stabilizaciji enzima, optimizacijom uslova imobilizacije određen je polimer koji daje imobilizat sa najvećom specifičnom aktivnošću.

3.2.2. Optimizacija količine enzima po gramu polimera

Budući da različite karakteristike korišćenih makroporoznih kopolimera, u pogledu veličine pora i aktivne površine, imaju značajnu ulogu kod imobilizacije enzima, optimizovane su dve kovalentne metode imobilizacije (glutaraldehydna i perjodatna) kako bi se odredio polimer koji dovodi do najveće stabilizacije enzima i pokazuje najveću specifičnu aktivnost. U cilju pronalaženja imobilizata sa najboljim karakteristikama, za oba načina imobilizacije, varirana je količina dodatog enzima po masi suvog polimera.

Za imobilizaciju na glicidil metakrilat nosače korišćene su različite koncentracije rastvora peroksidaze iz soje koje odgovaraju količini od 0,68; 3,36; 12,5 i 25,0 mg enzima na 1 g suvog polimera. Dobijeni imobilizati okarakterisani su merenjem specifične aktivnosti (IU/mL). Vrednost specifične aktivnosti raste sa povećanjem količine dodatog enzima kod svih imobilizata (*Slika 21*).



Slika 21: Uticaj količine dodatog enzima (mg/g) po gramu polimera na specifičnu aktivnost (IU/g) imobilizovane peroksidaze iz soje, puni simboli: glutaraldehydna metoda, prazni simboli: perjodatna metoda.

Glutaraldehydni metod imobilizacije pokazao je značajno veće specifične aktivnosti u odnosu na perjodatni, kada se porede imobilizati istih kopolimera uz nanetu istu količinu enzima. Ovo se može objasniti delimičnom inaktivacijom peroksidaze iz soje tokom aktivacije enzima odnosno prilikom oksidacije sa perjodatom.

Površinske karakteristike polimernog nosača su pokazale da imaju velikog uticaja na specifičnu aktivnost. Najveće aktivnosti dobijene su sa kopolimerima najvećih dimenzija pora (120 i 200 nm) označenih kao SGE 20/12 i SGE 15/16 za koje su izmerene specifične aktivnosti 22,8 IU/g odnosno 21,4 IU/g respektivno za glutaraldehydni metod. Sa povećanjem dimenzija pora povećava se poroznost čestica i smanjuje vijugavost što utiče na smanjenje difuzionih ograničenja i brži prenos supstrata do aktivnog mesta kao i otklanjanje proizvoda kroz pore na površini polimera. Ovo može biti objašnjenje za povećanje specifične aktivnosti sa rastom veličine pora. Pošto su glutaraldehydnim metodom imobilizacije dobijeni imobilizati koji pokazuju daleko bolje aktivnosti, upravo oni su korišćeni u daljem radu i detaljnije su okarakterisani.

Imobilizati koji su pokazali najveću aktivnost, glutaraldehydno imobilizovana SBP (12,5 mg na 1 g suvog polimera) na sva četiri kopolimera, čuvani su u puferskom rastvoru pH 7,0 na 4°C. Nakon 3 meseca od imobilizacije izmerena je ponovo aktivnost da bi se videlo koliko su imobilizati stabilni tokom dužeg skladištenja. Rezidualna aktivnost kod sva četiri uzorka kretala se oko 50 ± 4 %.

Tabela 2: Rezidualna aktivnost (%) glutaraldehydних imobilizata nakon 3 meseca čuvanja.

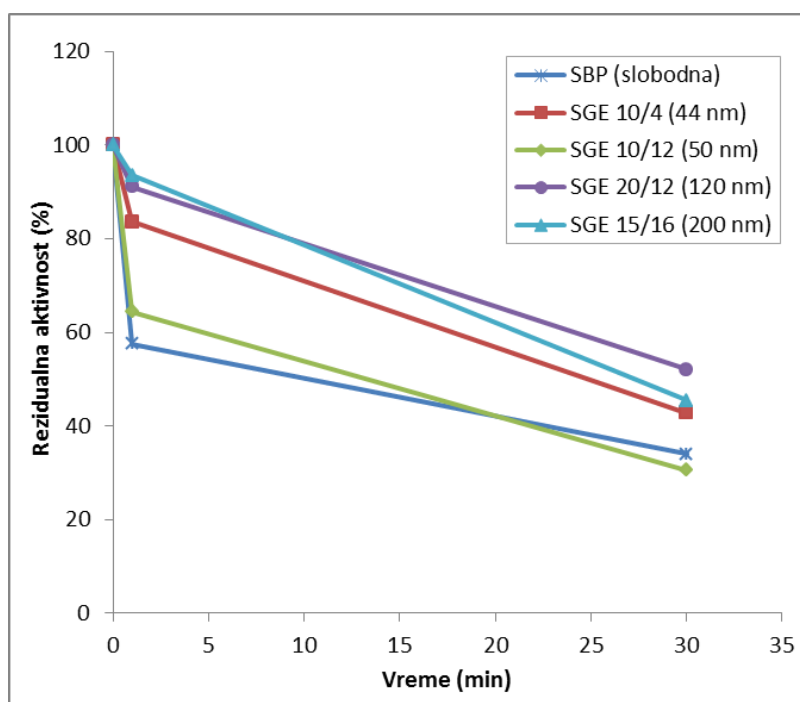
| Kopolimer | Veličina pora (nm) | Procenat rezidualne aktivnosti (%) |
|------------------|--------------------|------------------------------------|
| SGE 10/4 | 44 | 46,09 |
| SGE 10/12 | 53 | 47,00 |
| SGE 20/12 | 120 | 51,91 |
| SGE 15/16 | 200 | 53,00 |

Najmanji pad aktivnosti zabeležen je kod kopolimera najvećih dimenzija pora – 53% od početne aktivnosti, dok je najveći pad pokazao kopolimer sa najmanjim porama – 46% rezidualne aktivnosti. Dobijeni rezultati potvrđuju da se uz adekvatno skladištenje imobilizati mogu koristiti duži vremenski period.

3.2.3. Termostabilnost i stabilnost u organskom rastvaraču

Kovalentnom imobilizacijom peroksidaze iz soje dolazi do dodatne stabilizacije enzima, koja u velikoj meri zavisi od površinske strukture samog nosača. Da bi utvrdili koji od četiri korišćena nosača dovodi do najveće stabilizacije, poređena je termostabilnost rastvorne i imobilizovane SBP (na sva 4 različita nosača) u određenim vremenskim intervalima. Kako peroksidaza iz soje važi za izuzetno termostabilan enzim, za studije termostabilnosti podešena je inkubaciona temperatura od 85°C.

Pošto se glutaraldehidna metoda imobilizacije pokazala znatno boljom od perjodatne, u smislu specifične aktivnosti i prinosa imobilizacije, merena je termostabilnost samo glutaraldehidno vezanog enzima. Uzeti su imobilizati sva četiri polimera sa istom količinom imobilizovane peroksidaze po gramu nosača od 12,5 mg peroksidaze po 1 g suvog polimera i svi su pokazali veću termostabilnost u odnosu na rastvornu SBP. Najveću termostabilnost na 85°C pokazuje SBP imobilizovana na polimer označen kao SGE 20/12 sa veličinama pora od 120 nm (*Slika 22*).

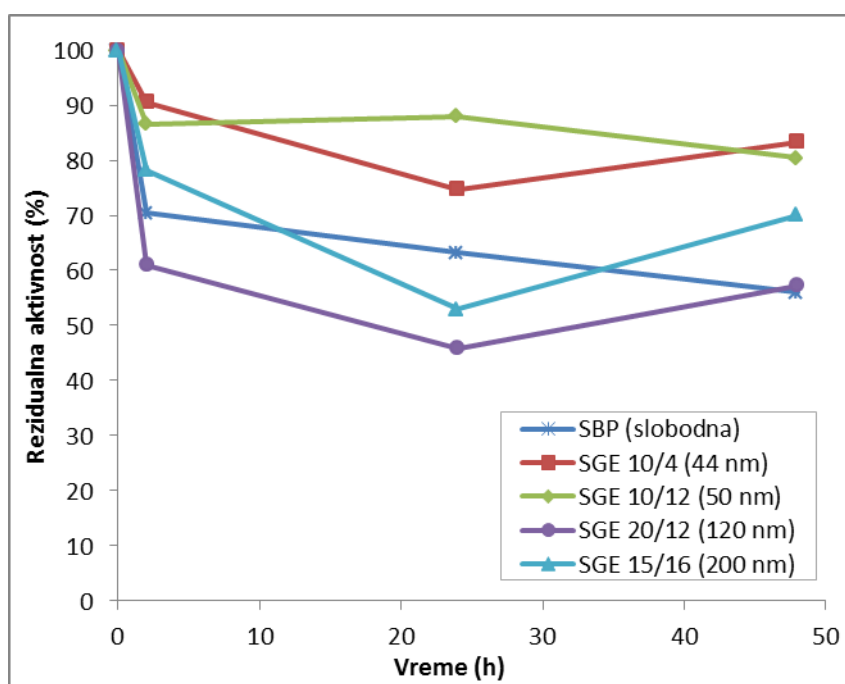


Slika 22: Uticaj vremena inkubacije na 85°C na rezidualnu aktivnost rastvornog i imobilizovanog enzima glutaraldehidnom metodom.

Kao što se vidi sa grafika (*Slika 22*) veličina i karakteristike pora imaju značajan uticaj na termostabilnost dobijenih imobilizata. Aktivnost rastvorne SBP nakon 30 minuta inkubacije na 85°C pala je na 34% od početne, dok su imobilizati sa najvećim dijametrima pora od 120 i 200 nm, koji su imali i najveću specifičnu aktivnost, zadržali

najviše aktivnosti, tačnije 1,5 puta (52%) odnosno 1,3 puta (45%) veću rezidualnu aktivnost u odnosu na rastvorni enzim respektivno. Dobijena vrednost za termalnu inaktivaciju rastvorne SBP na 85°C odgovara prethodno objavljenim literaturnim podacima¹⁵.

Stabilnost u organskom rastvaraču je važna karakteristika biokatalizatora koja se može iskoristiti u raznim industrijskim primenama pre svega za organsku sintezu. Stabilnost u organskom rastvaraču je testirana inkubiranjem peroksidaze iz soje u rastvoru 80% (v/v) dioksana. Rastvorni enzim zadržao je 56% od početne aktivnosti nakon 48h inkubacije u dioksanu. Imobilizovana SBP očekivano je zadržala više rezidualne aktivnosti od solubilne, s tim što su primećene razlike u procentu preostale aktivnosti između peroksidaze imobilizovane na polimerima različitih veličina pora. Nasuprot termostabilnosti, kod koje je došlo do veće stabilizacije imobilizata većih dimenzija pora, kod stabilnosti u organskom rastvaraču imobilizati sa nosačima manjih veličina pora (SGE 10/4 sa porama od 44 nm i SGE 10/12 sa porama od 50 nm) zadržali su oko 85% rezidualne aktivnosti nakon 48h inkubacije, dok su imobilizati većih dimenzija pora izgubili nešto više od početne aktivnosti (*Slika 23*).



Slika 23: Uticaj vremena inkubacije u 80% dioksanu na rezidualnu aktivnost rastvornog i imobilizovanog enzima glutaraldehydom metodom.

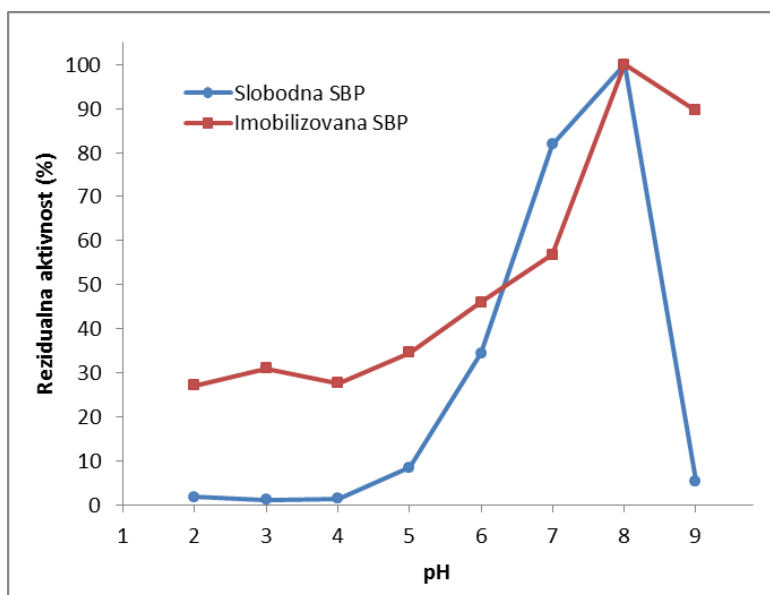
Polimer koji je pokazao najveću stabilnost u organskom rastvaraču SGE 10/4 ima najveću aktivnu površinu, ali takođe i najmanju veličinu i zapreminu pora. Razlog tome može biti u mikrookolini enzima, koja mu pruža dodatnu stabilizaciju, ali i u

difuzionim ograničenjima jer sporijom difuzijom denaturišući agens (organski rastvarač) sporije dopire do samog enzima.

Imobilizat koji je pokazao najveću specifičnu aktivnost i najveću termostabilnost dalje je karakterisan određivanjem pH optimuma, katalitičkih parametara enzimske reakcije K_m i V_{max} a određena mu je i operativna stabilnost pri kontinualnoj upotrebi u nekoliko reakcionih ciklusa u bač reaktoru. Peroksidaza iz soje imobilizovana pomoću glutaraldehida na SGE 20/12 kopolimer veličine pora od 120 nm pokazao je najbolje osobine pa je stoga dalje karakterisan.

3.2.4. pH optimum

Optimalna pH vrednost na kojoj peroksidaza iz soje pokazuje najveću aktivnost merena je u rasponu pH od 2 do 9. Efekat pH na rastvornu i imobilizovanu SBP koja je pokazala najveću aktivnost i najveću stabilizaciju (glutaraldehydno imobilizovana na SGE 20/12 sa veličinom pora od 120 nm) prikazan je na *Slici 24*.



Slika 24: Uticaj pH vrednosti na aktivnost rastvorne i imobilizovane SBP. (●) rastvorna SHP; (▪) imobilizovana SHP na SGE 20/12 kopolimeru

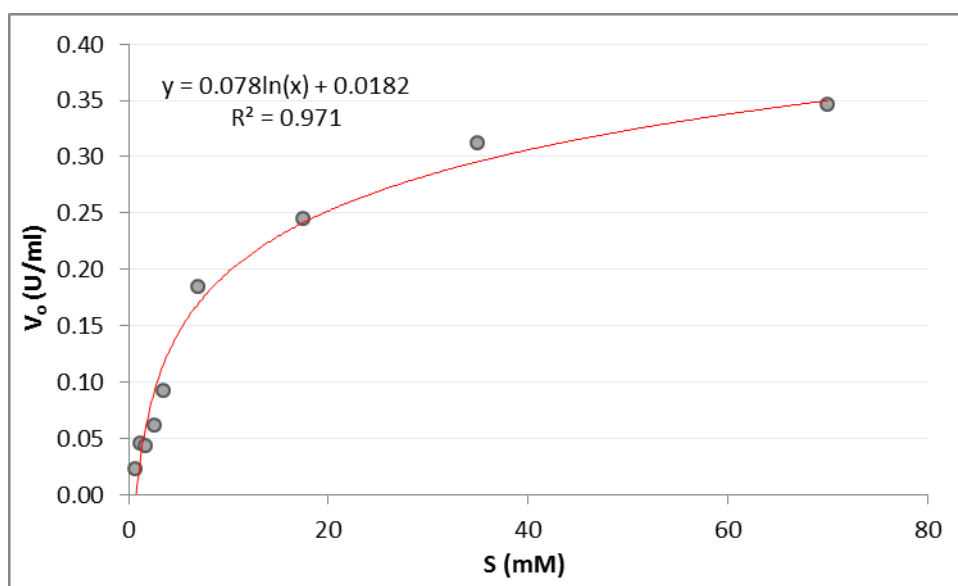
Iako je pH optimum nepromenjen kod imobilizovane peroksidaze, nalazi se kao i u slučaju rastvorne na pH 8,0, može se zaključiti da imobilizovani enzim ima širi opseg dejstva jer pokazuje veću aktivnost kako u baznim tako i u kiselim uslovima. To je posebno uočljivo na kiselim pH vrednostima od pH 2-5, gde rastvorna peroksidaza gotovo ne pokazuje nikakvu aktivnost, imobilizovana ima oko 30% od aktivnosti u optimalnim uslovima. Poboljšana aktivnost u ekstremnim uslovima pH korisna je u

potencijalnoj primeni imobilizovanog enzima jer mu daje veću toleranciju na male promene pH tokom reakcije.

3.2.5. Određivanje kinetičkih parametara K_m i V_{max}

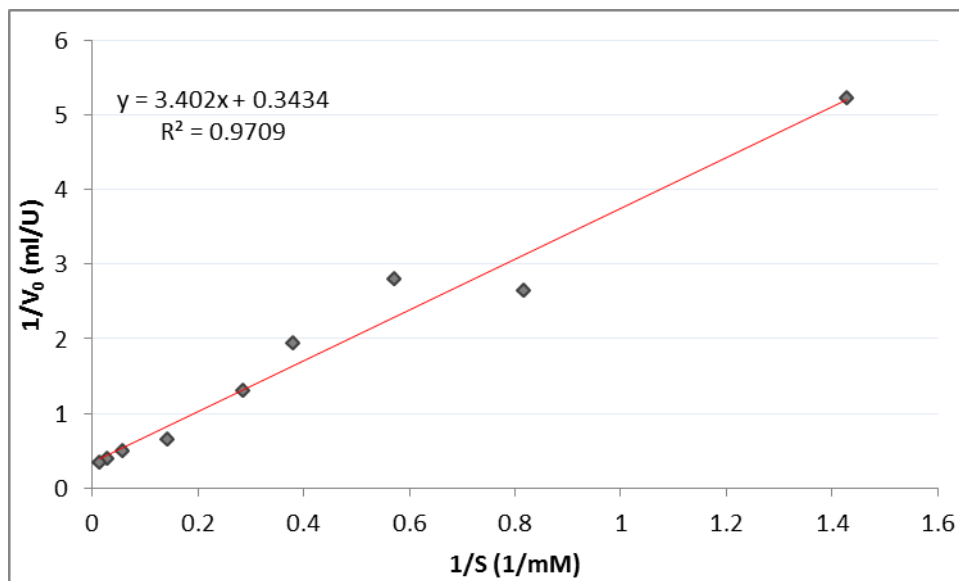
Michaelis-ova konstanta (K_m) za pirogalol kao supstrat određena je pri zasićujućim koncentracijama vodonik peroksida. Konstruisanjem grafika zavisnosti početne brzine enzimske reakcije od koncentracije pirogalola pokazano je da se SBP ponaša u skladu sa Michaelis-Menteninom kinetikom. Dobijena vrednost K_m za rastvornu peroksidazu iznosi 3,46 mM.

Određena je K_m vrednost za imobilizovanu SBP tako što su pripremljeni rastvori koncentracije supstrata (pirogalola) u vrednostima od 0,2 do 20 K_m za rastvornu peroksidazu i praćena je početna brzina reakcije. Iz Michaelis-Mentenine krive dobijena je K_m vrednost od 11,1 mM za pirogalol (Slika 25).



Slika 25: Michaelis-Mentenina kriva za imobilizovanu SBP (SGE 20/12, 12,5 mg SBP po gramu nosača)

U cilju određivanja kinetičkih parametara imobilizovane SBP (na SGE 20/12 kopolimeru), korišćenjem dobijenih vrednosti početne brzine za različite koncentracije supstrata urađena je i linearizacija prave po Lineweaver-Burk-u.

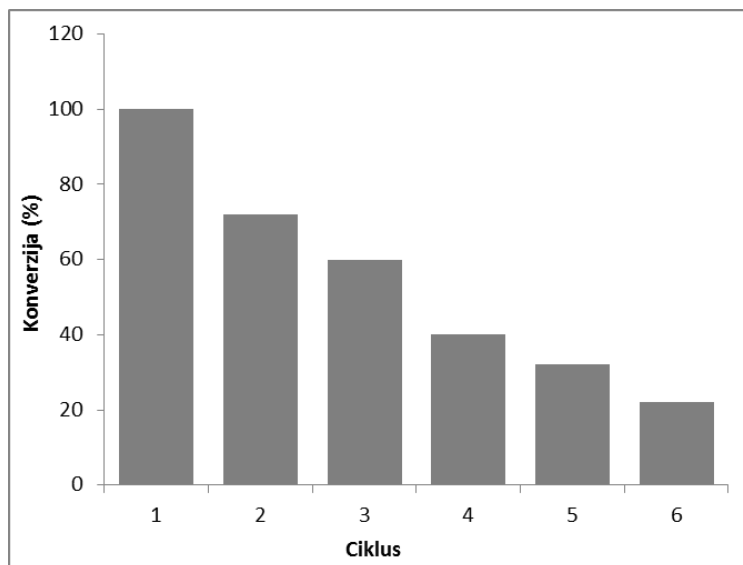


Slika 26: Lineweaver-Burk-ova linearizacija prave za imobilizovanu peroksidazu iz soje.

Vrednost K_m imobilizata dobijena linearizacijom iznosila je 9,91 mM za pirogalol. Vrednost Michaelis-ove konstante za imobilizovanu SBP je 2,86 puta veća od dobijene konstante za rastvorni enzim (3,46 mM). Povećanje vrednosti K_m kod imobilizovanog enzima često prati proces imobilizacije, a dešava se da kao posledica velikih difuzionih ograničenja zbog poroznosti korišćenog polimera, supstrat ne difunduje dovoljno brzo kroz čestice do enzima u unutrašnjosti. Odnosno difuzija supstrata predstavlja ograničavajući faktor brzine enzimске katalize.

3.2.6. Operativna stabilnost imobilizovane peroksidaze iz soje u bač reaktoru

U cilju testiranja operativne stabilnosti, imobilizovana peroksidaza iz soje upotrebljena je u nekoliko ciklusa za oksidaciju pirogalola u bač reaktoru. Odmerena količina imobilizata je nakon svakog ciklusa ispirana od ostataka proizvoda prethodne reakcije i ponovo vraćana u reaktor sa svežom količinom supstrata. Rezidualna aktivnost merena je spektrofotometrijski i poređena na osnovu procenta oksidovanog pirogalola u svakom ciklusu u odnosu na prvi ciklus u kome je pretpostavljeno da imobilizat ima 100% aktivnosti.

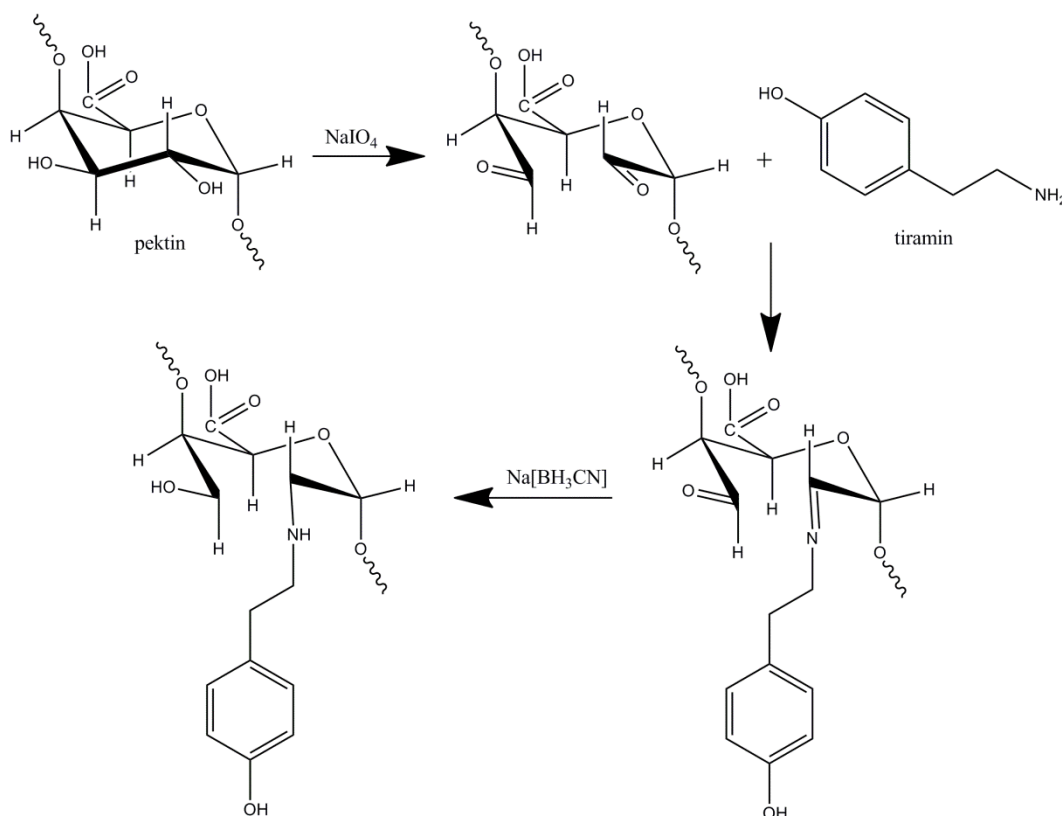


Slika 27: Aktivnost tokom ponovne upotrebe imobilizovane SBP na najboljem SGE 20/12 kopolimeru u bač reaktoru

U prva tri ciklusa aktivnost imobilizata se održava iznad 60%, međutim, nakon šestog, aktivnost opada na 22% od polazne vrednosti (Slika 27). Ovakav pad aktivnosti može biti i posledica prekrivanja površine same čestice polimerizovanim fenolima, koji smanjuju slobodnu difuziju supstrata kroz pore do aktivnog centra enzima. Oblaganje čestice reakcionim proizvodom je vidljivo jer su bele kuglice posle svakog završenog ciklusa sve više obojene, a boja potiče od narandžastog purpurogalina.

3.3. Imobilizacija peroksidaze iz soje na hemijski modifikovanom pektinu

Hemijski modifikovani pektin korišćen je kao materijal za pravljenje hidrogelova i kao nosač za imobilizaciju peroksidaze iz soje. Hemijska modifikacija pektina je započeta oksidacijom sa različitim količinama natrijum perjodata i formiranjem aldehydnih grupa. Reakcija se odvijala tokom 24 časa u mraku na 4°C. Dobijena serija oksidovanog pektina različitog stepena oksidacije (od 2,5% do 20%) dalje je modifikovana kačenjem tiramina u molarnom višku. U reakciji reduktivne aminacije u prisustvu natrijum cijanoborhidrida, kao blagog redukcionog sredstva, dolazi do redukcije aldehydne grupe i vezivanja tiramina preko amino grupe (Slika 28). Novonastala sekundarna amino grupa je stabilna i preko nje je za pektin vezana fenolna grupa.



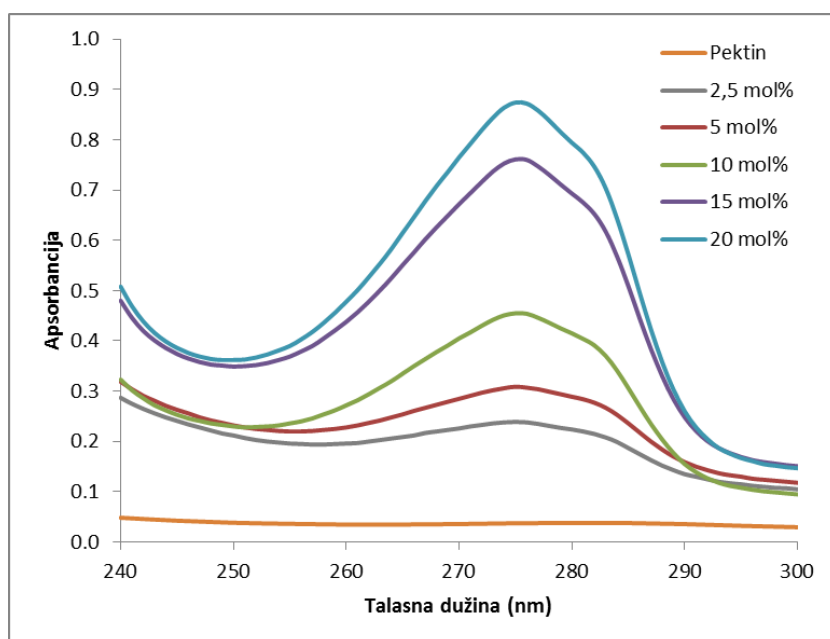
Slika 28: Sinteza tiramin-pektina: oksidacija pektina pomoću natrijum perjodata (gornji red); reduktivna aminacija sa tiraminom i cijanoborhidridom (drugi red)

Karakterizacija dobijenih modifikata različitog stepena modifikacije određena je metodama UV-VIS spektroskopije, FTIR analizom, elementarnom analizom, ^1H NMR-om i kiselo-baznom titracijom.

Sintetisani tiramin-pektin, za razliku od nemodifikovanog pektina, pokazao se kao bolji materijal za geliranje i formiranje hidrogelova. Novosintetisani polimer korišćen je kao nosač za imobilizaciju peroksidaze iz soje unutar mikrokuglica koje nastaju polimerizacijom tiramin-pektina u prisustvu vodonik peroksida.

3.3.1. Karakterizacija tiramin-pektina

U cilju katarakterizacije sintetisanih tiramin-pektin polimera snimljen je UV-VIS spektar 0,1% rastvora za potvrdu prisustva tiramina. Novouvedene fenolne grupe iz molekula tiramina imaju apsorpcioni maksimum na 275 nm. Iz apsorpcionog spektra moguće je utvrditi stepen modifikacije pektina. Sa povećanjem oksidacije pektina, odnosno molarnog odnosa perjodata od 2,5 do 20% dolazi do vezivanja više tiraminskih grupa, što se može zapaziti povećanjem intenziteta pika na 275 nm u odnosu na nativni pektin, što je prikazano na grafiku (*Slika 29*).



Slika 29: UV-VIS spektri nativnog pektina i tiramin-pektina različitog stepena modifikacije od 240 do 300 nm.

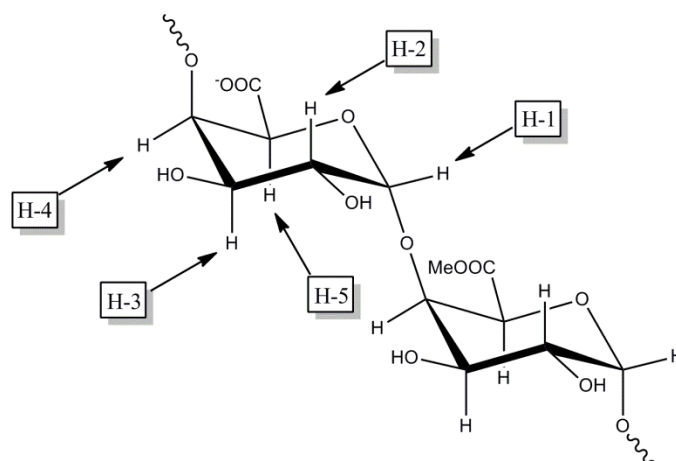
Koncentracija fenolnih grupa u pektinu i tiramin-pektinu može se izračunati iz odnosa apsorbanca na 275 nm i 300 nm i molarnog ekstincionog koeficijenta tiramin hidrohlorida. Dalje, iz odnosa koncentracije fenolnih grupa, molekulske mase i koncentracije polimera preračunata je prosečna distribucija supstituisanih monosaharidnih jedinica. Izražene vrednosti odnose se na prosečan razmak između dve supstituisane monosaharidne jedinice (*Tabela 3*).

Tabela 3: Koncentracija fenolnih grupa (mmol/g) u 0,1% rastvoru pektina i tiramin-pektina, efikasnost modifikacije i distribucija supstituisanih monosaharidnih grupa.

| Molarni odnos perjodata (mol%) | 0 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 |
|---|--------|--------|-------|-------|-------|-------|
| Koncentracija tiramina (mmol/g) | 0 | 0,0545 | 0,101 | 0,238 | 0,442 | 0,538 |
| Efikasnost modifikacije tiraminom (mol%) | 0 | 1,09 | 2,02 | 4,76 | 8,84 | 10,80 |
| Prosečna distribucija supstituisanih monosaharida tiraminom | 113,24 | 56,62 | 39,72 | 21,07 | 12,44 | 10,44 |

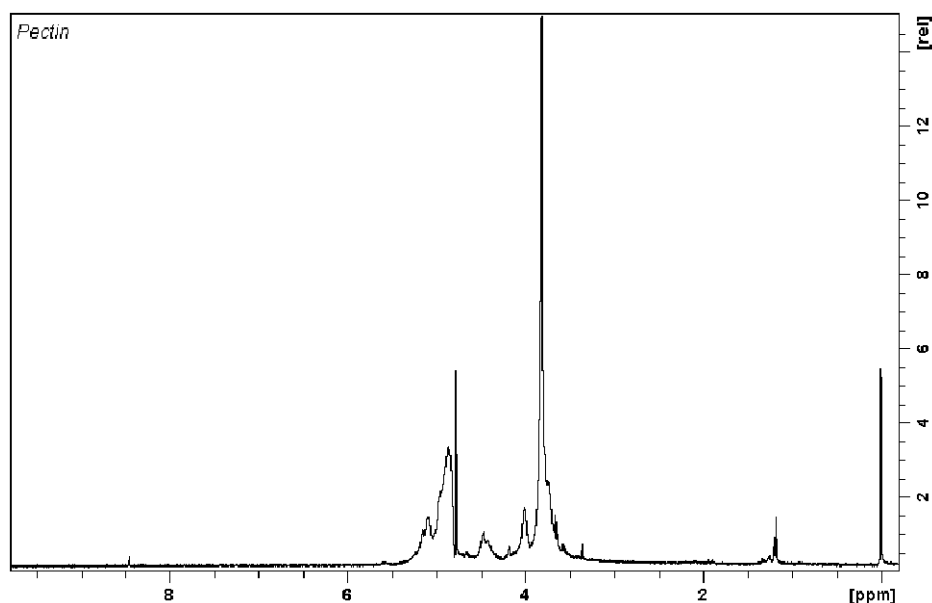
U nemodifikovanom pektinu u proseku na svaka 113,24 monosaharidna ostatka vezana je jedna fenolna grupa, dok se kod različitog stepena modifikovanih pektina sa povećanjem procenta oksidacije smanjuje i razmak između monosaharidnih jedinica za koje je vezan molekul tiramina. Tako kod 2,5% tiramin-pektina u proseku svaka 56,62 monosaharidna jedinica sadrži vezanu fenolnu grupu, dok je kod 20% tiramin-pektina u proseku svaka 10,44 monosaharidna jedinica supstituisana.

Modifikacije pektina su potvrđene i snimanjem ^1H NMR spektra. Dominantnu strukturnu karakteristiku pektina predstavlja linearni lanac poli- α -(1-4)-D-galakturonske kiseline sa varirajućim procentom metilacije karboksilne grupe koji je isprekidan bočnim lancima.¹⁰⁶ Na *Slici 30* prikazana je struktura sa obeleženim protonima vidljivim na ^1H NMR-u.



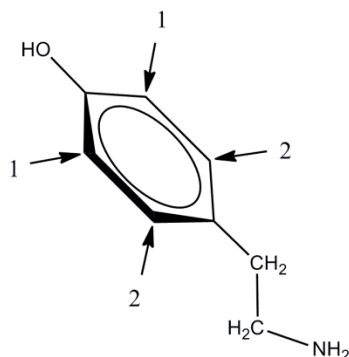
Slika 30: Struktura osnovnog lanca pektina (HG) sa obeleženim protonima

Na ^1H NMR spektru čistog pektina protoni H-1 i H-5 pokazuju hemijsko pomeranje oko 5 ppm-a, a tačna pozicija i oblik pikova zavisi od stepena metilacije. Ukoliko je pektin u potpunosti demetilovan i H-5 u svojoj okolini ima slobodnu karboksilnu grupu, pik se pomera na 4,8 ppm-a, dok je pik H-1 u demetilovanom pektinu oko 5,1 ppm. Sa povećanjem metilacije dolazi do približavanja pikova H-1 i H-5 na oko 5 ppm-a za 100% metilovane pektine. Proton H-4 ima hemijsko pomeranje oko 4,4 ppm, a metilacijom dolazi do blagog pomeranja ka višim vrednostima. Na kraju H-2 i H-3 protoni se nalaze na oko 3,7 ppm, odnosno 4,0 ppm, i njihova pomeranja obično ostaju nepromenjena metilacijom karboksilne grupe.¹⁰⁶ Sva navedena pomeranja su prisutna na spektru nemodifikovanog pektina (Slika 31).



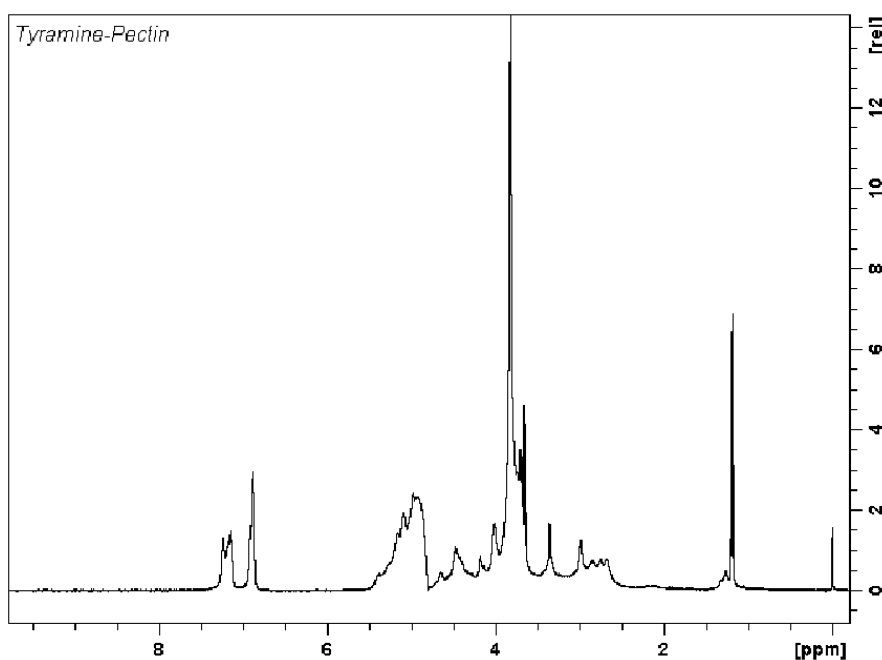
Slika 31: ^1H NMR spektar pektina snimljen u deuterijum oksidu (500 MHz)

Nakon reakcije i vezivanja tiramina za pektin snimljen je i spektar modifikovanog pektina na kome su pored postojećih vidljivi i pikovi koji potiču od protona sa molekula tiramina.



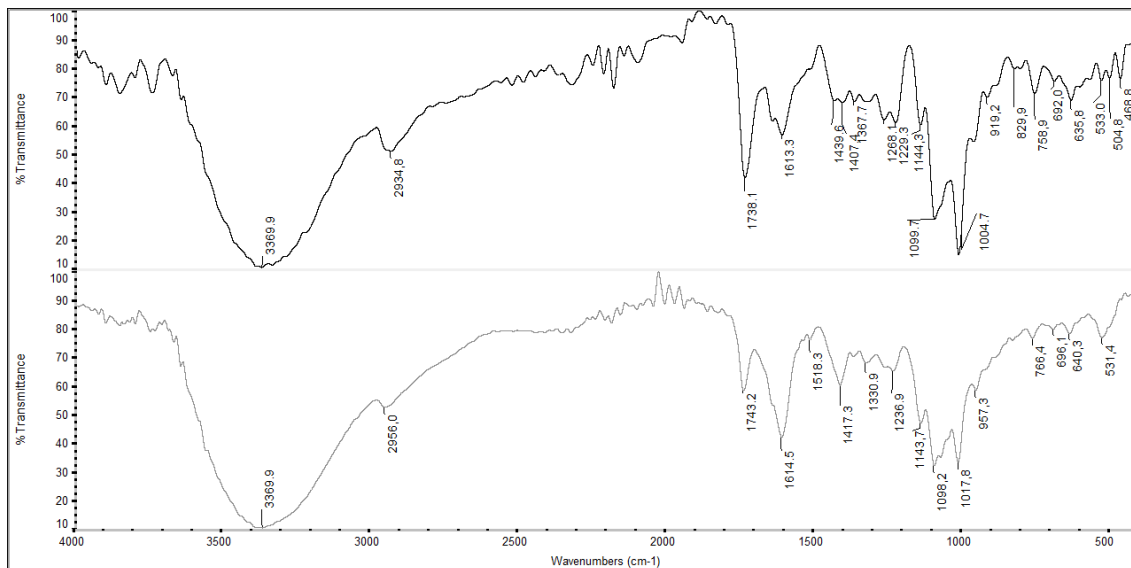
Slika 32: Struktura tiramina sa obeleženim simetričnim protonima na fenolnom jezgru.

Tiramin na protonskom NMR spektru daje hemijsko pomeranje koje potiče od četiri aromatična protona vidljiva kao dva pika, od kojih je prvi na oko 6,8 (poreklom od para protona bližih alifatičnom lancu, označenih sa br. 2), odnosno drugi na 7,2 ppm-a (od para protona bližih fenolnoj grupi, označenih sa br. 1). Druga grupacija pikova tiramina nalazi se na oko 2,7 i 3,0 ppm-a i potiče od protona iz alifatičnog bočnog lanca. Dobijeni ^1H NMR spektar tiramin-pektina pokazuje karakterističan signal koji potiče od oba para protona sa aromatičnog prstena na oko 7 ppm-a, kao i slabiji signal alifatičnih protona na 2,7-3,0 ppm-a, što potvrđuje da je došlo do modifikacije jer ovi signali izostaju na spektru čistog pektina (Slika 33).¹⁰⁷



Slika 33: ^1H NMR spektar tiramin-pektina snimljen u deuterijum oksidu (500 MHz)

Prisustvo modifikacije potvrđeno je i poređenjem FTIR spektara nemodifikovanog pektina sa tiramin-pektinom (*Slika 34*). Pošto je najveća razlika primećena u opsegu talasnih dužina od 1800-1200 cm^{-1} , taj deo spektra je uvećan i preklopljen na istom grafiku (*Slika 35*).

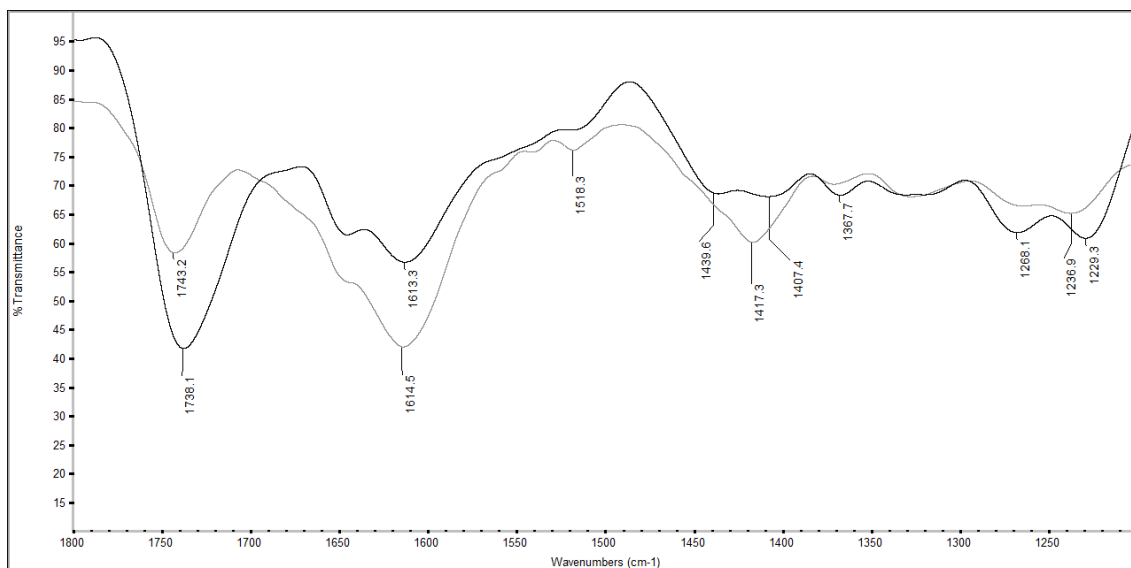


Slika 34: FTIR spektar nemodifikovanog pektina (crna) i modifikovanog tiramin-pektina (siva) dobijenog oksidacijom sa 20% perjodata.

Na osnovu FTIR spektara može se zaključiti da je došlo do velike promene u intenzitetu pikova na 1740 cm^{-1} , za koji je zaslužna estarska veza, kao i na 1614 cm^{-1} koji potiče od slobodne karboksilne grupe. Takođe u oblasti oko 1600 cm^{-1} javljaju se C=C strečing vibracije aromatičnog prstena. Poređenjem površine ispod pikova može se zaključiti da je intenzitet signala koji potiče od estarske veze znatno slabiji kod modifikovanog pektina, dok se pik karboksilne grupe povećao u odnosu na nativni pektin. Znači da prilikom modifikacije pektina najverovatnije dolazi do hidrolize estarskih veza i stvaranja novih karboksilnih grupa na položaju C3 galakturonske kiseline, oksidacijom nastalih aldehidnih grupa. Povećanje broja slobodnih karboksilnih grupa utiče i na različite osobine novog polimera uključujući poboljšanu sposobnost geliranja.

Promene u intenzitetu pikova FTIR spektra modifikovanog u odnosu na nativni pektin na 1518 i 1417 cm^{-1} , koji potiču od vibracija C-C veza unutar prstena, potvrđuju prisustvo aromatičnog jezgra tiramina kod derivata pektina. Kod modifikovanog pektina primećuje se i smanjenje intenziteta pika na 1229 cm^{-1} koji je dodeljen strečing vibracijama C-O-C veze kod piranoznog prstena, što je logično obzirom da prilikom

oksidacije dolazi do cepanja prstena i oksidacije vicinalnih OH grupa na pozicijama C2-C3.¹⁰⁸



Slika 35: FTIR spektar nemodifikovanog pektina (crna) i modifikovanog tiramin-pektina (siva) dobijenog oksidacijom sa 20% perodata (deo spektra od 1800-1200 cm^{-1}).

Povećan udeo azota, odnosno uvođenje amino grupa unutar tiramin-pektina u odnosu na nemodifikovani pektin, pokazala je i elementalna analiza (Tabela 4).

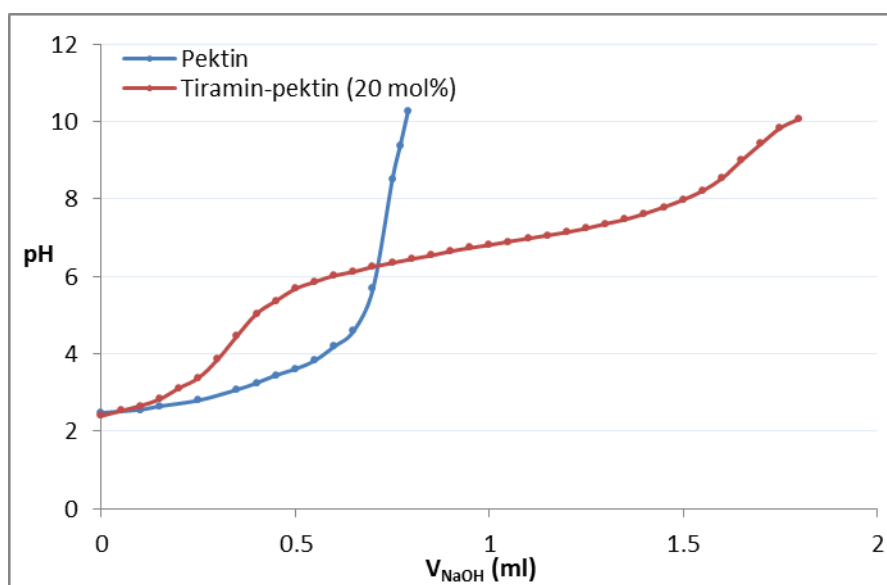
Tabela 4: Elementalna analiza nativnog pektina i tiramin-pektina.

| Kopolimer | Azot (N) % | Ugljenik (C) % | Vodonik (H) % |
|-----------------------|---------------|-------------------|------------------|
| Pektin | 0,37 | 35,04 | 5,72 |
| Tiramin-pektin | 0,96 | 21,05 | 4,81 |

Kiselo baznom titracijom 1% rastvora pektina i modifikovanog pektina određene su približne pK_a vrednosti i koncentracije jonizabilnih grupa prema suvoj masi polimera. Tiramin-pektin ima veću koncentraciju jonizabilnih grupa od nativnog pektina i sa povećanjem stepena oksidacije pektina postepeno se povećava i koncentracija jonizabilnih grupa po gramu suvog polimera (Tabela 5).

Tabela 5: Koncentracija jonizabilnih grupa kod nativnog pektina i tiramin-pektina.

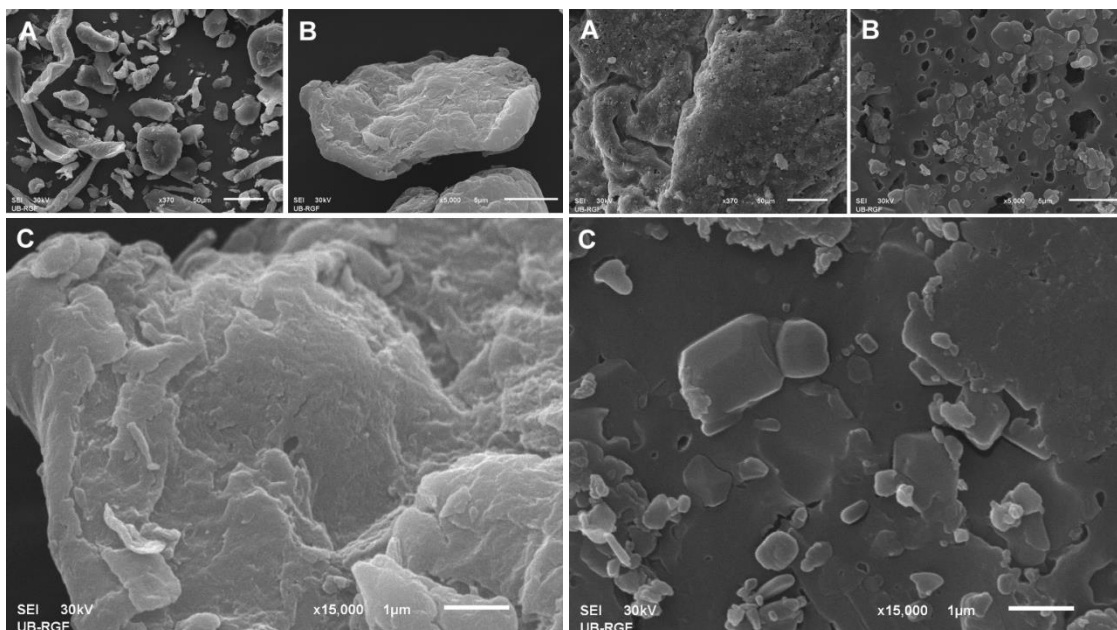
| Molarni odnos perjodata (mol%) | 0 | 2,5 | 5 | 10 | 15 | 20 |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Jonizabilne grupe (mmol/g _{polimera}) | 1,5 | 3,0 | 3,3 | 3,5 | 3,7 | 4,0 |



Slika 36: Titracione krive 1% (w/v) rastvora pektina i tiramin-pektina (20 mol%).

Na osnovu titracionih krivih (Slika 36) određene su pK_a vrednosti jonizabilnih grupa. Dok kod pektina postoji jedna karboksilna grupa sa pK_a oko 3, kod tiramin-pektina pored ove karboksilne grupe vidi se i prisustvo još jedne jonizabilne grupe sa vrednošću pK_a oko 7. Tako je na još jedan način potvrđeno prisustvo pozitivno naelektrisane bazne amino grupe kod modifikovanog pektina, koja je nastala u reakciji reduktivne aminacije.

Poređene su površinske morfologije nativnog pektina i pektina modifikovanog tiraminom nakon oksidacije sa 10 mol% perjodata na skenirajućem elektronskom mikroskopu pri tri različita uveličanja. Mogu se uočiti razlike između nativnog i modifikovanog pektina kako u veličini čestica tako i u površinskoj strukturi. (Slika 37)



Slika 37: Mikrografije pektina (levo) i modificiranog pektina (desno) snimljene na skenirajućem elektronskom mikroskopu (SEM-EDS) pri uveličanju od: A) 350 puta; B) 5000 puta; C) 15000 puta.

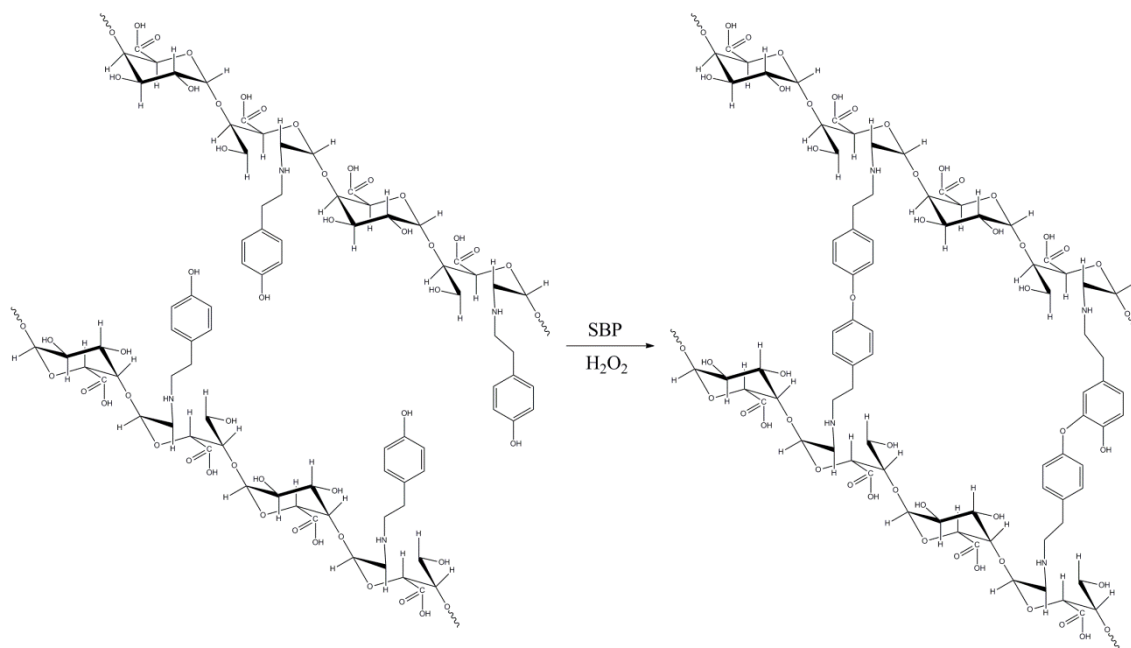
Pektin sa svojom razgranatom strukturom i velikom molekulskom masom, zbog jednostavnog gelirajućeg mehanizma lako može da pravi citokompatibilne i biorazgradive hidrogelove sa širokom biomedicinskom primenom od dostave lekova i gena, zarastanja rana do matriksa za tkivni inženjering.⁹² Hidrogelovi predstavljaju unakrsno umreženu polimernu strukturu sa visokim sadržajem vode zbog čega su pogodni i kao nosači za imobilizaciju. U poslednje vreme veliki broj naučnih istraživanja ide u pravcu dobijanja novih ili modifikovanja prirodnih biopolimera u cilju poboljšanja njihovih funkcionalnih karakteristika koje su od značaja za željenu primenu.

Modifikacijom pektina perjodatom i tiraminom predstavljenom u ovom radu uvedene su fenolne i amino funkcionalne grupe kao što je potvrđeno raznim strukturnim analizama, sa ciljem dobijanja pektina sa poboljšanim gelirajućim osobinama. Tiramin-pektin je dizajniran za lakše pravljenje hidrogelova geliranjem u prisustvu kalcijuma ili kovalentnim umrežavanjem u prisustvu peroksidaze i vodonik peroksida. Pored očuvanja postojećih karboksilnih grupa, uvođenje dodatne pozitivno naelektrisane jonizabilne grupe u polimernu strukturu pektina povećava rastvorljivost i hidrataciju makromolekula, kao i sposobnost adsorpcije malih molekula, enzima i ćelija što je od velikog značaja za primenu pektinskih hidrogelova. Nove funkcionalne grupe povećavaju mogućnost višestrukih interakcija između polimerne mreže i zarobljenih molekula proteina. Pošto su očuvane slobodne karboksilne grupe, mehanička stabilnost nastalog hidrogela dodatno je ojačana jonotropnim umrežavanjem preko kalcijumovih jona. Sve navedene osobine utiču na poboljšanje stabilnosti hidrogela,

odnosno efikasnosti imobilizacije poboljšanjem zadržavanja. Sintetisani materijal je testiran za imobilizaciju peroksidaze iz soje unutar mikrokuglica hidrogela dobijenih polimerizacijom tiramin-pektina u prisustvu vodonik peroksida.

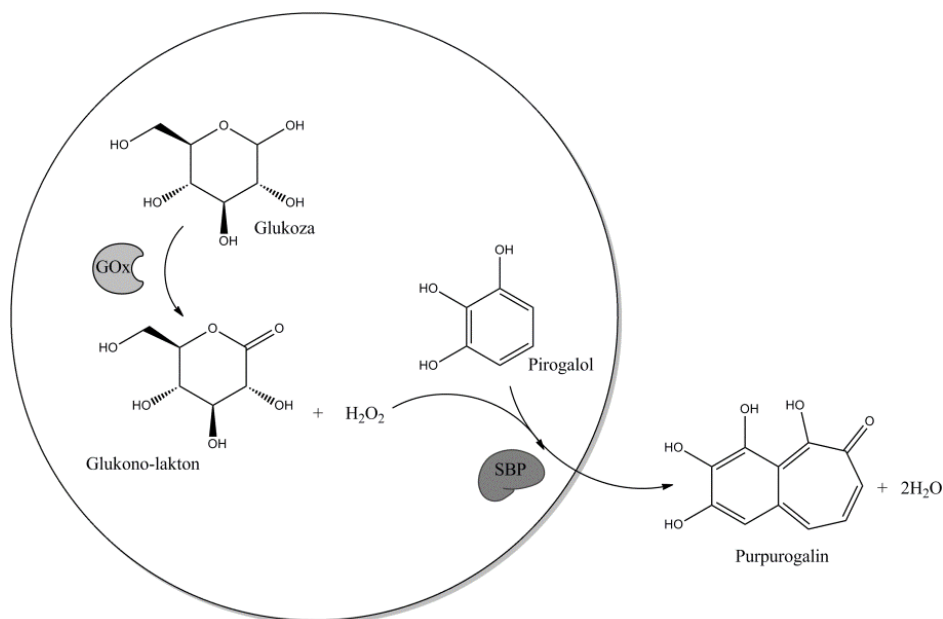
3.3.2. Imobilizacija peroksidaze iz soje na tiramin-pektinu

Modifikovani pektin korišćen je za pravljenje hidrogelova. Pektinski lanci su preko uvedenih fenolnih grupa poreklom od tiramina umrežavani u enzimskoj reakciji u prisustvu vodonik peroksida i peroksidaze iz soje (*Slika 38*).



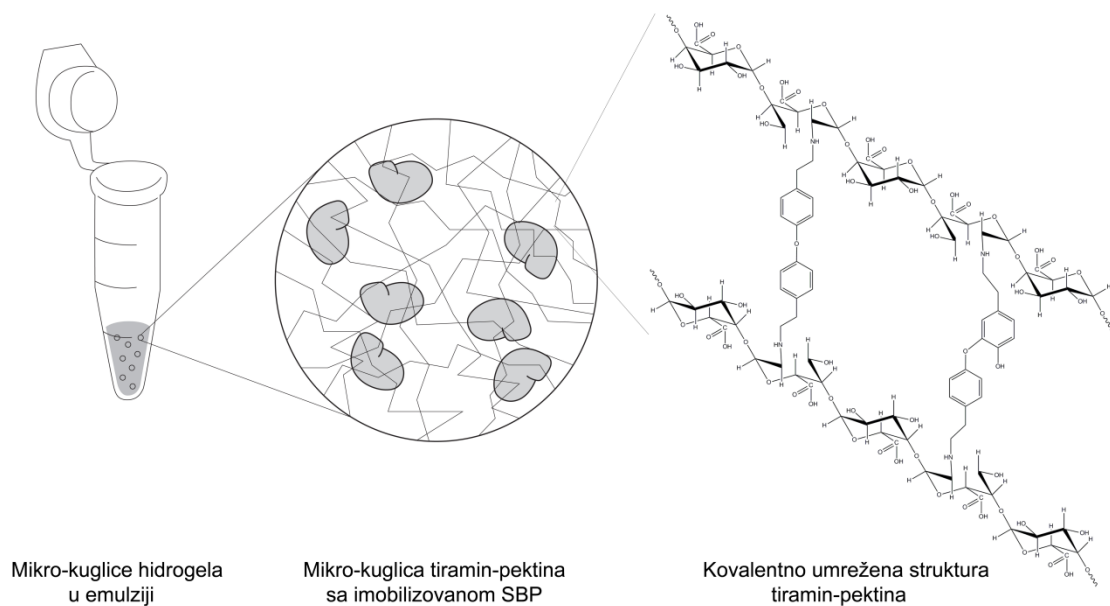
Slika 38: Reakcija enzimskog umrežavanja tiramin-pektina u prisustvu vodonik peroksida i peroksidaze iz soje.

Da bi se izbegla inaktivacija enzima u prisustvu veće koncentracije vodonik peroksida, umesto direktnog dodavanja ovog supstrata u reakciju, on je dobijen oksidacijom glukoze u prisustvu enzima glukoza oksidaze (GOx). Na taj način dolazi do interne dostave vodonik peroksida u manjim koncentracijama koja je kontrolisana količinom jedinica aktivnosti glukoza oksidaze (*Slika 39*).



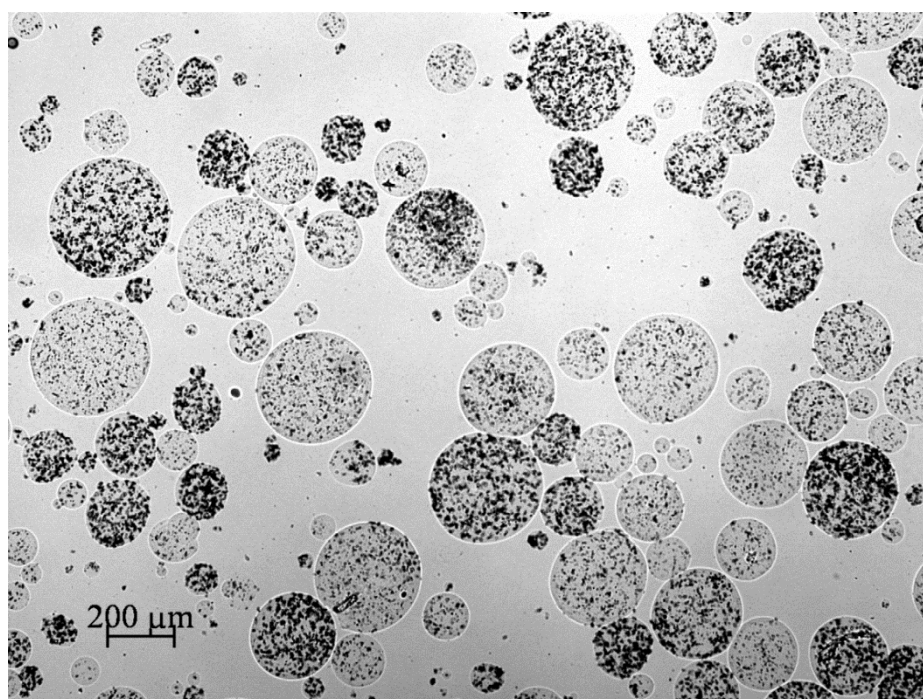
Slika 39: Sistem interne dostave vodonik peroksida (H_2O_2) i polimerizacija pirogalola do purpurogalina unutar mikro-kuglica tiramin-pektinskog hidrogela.

Polimerizacija modifikovanog pektina odvija se u emulziji tako što se smeša rastvorenog polimera u puferu sa dodatim enzimima (SBP i GOx) i glukozom ukapava u lako mineralno ulje na magnetnoj mešalici pri konstantnom mešanju. Tako se dobija emulzija vodenog rastvora polimera u ulju. Veličina vodenih kapljica zavisi pre svega od gustine pektinskog rastvora, ali i od brzine mešanja magneta na mešalici pri čemu se sa povećanjem brzine smanjuje veličina kapljica. Brzina mešanja optimizovana je na početku eksperimenta i zadržana je konstantnom do kraja. Reakcija polimerizacije počinje trenutno čim se u reakciju doda glukoza koja služi kao izvor peroksida. Međutim, pošto se peroksid postepeno oslobađa postoji dovoljno vremena da se prvo formira emulzija. Tako polimerizacijom unutar vodenih kapljica nastaju mikro kuglice umreženog tiramin-pektina sa imobilizovanom peroksidazom iz soje. Prednost ove metode je u tome što u vodi rastvorna glukoza, rasuta unutar vodenih kapljica, služi kao interni izvor peroksida koji je neophodan za proces geliranja. Ovaj proces grafički je prikazan na *Slici 40*.



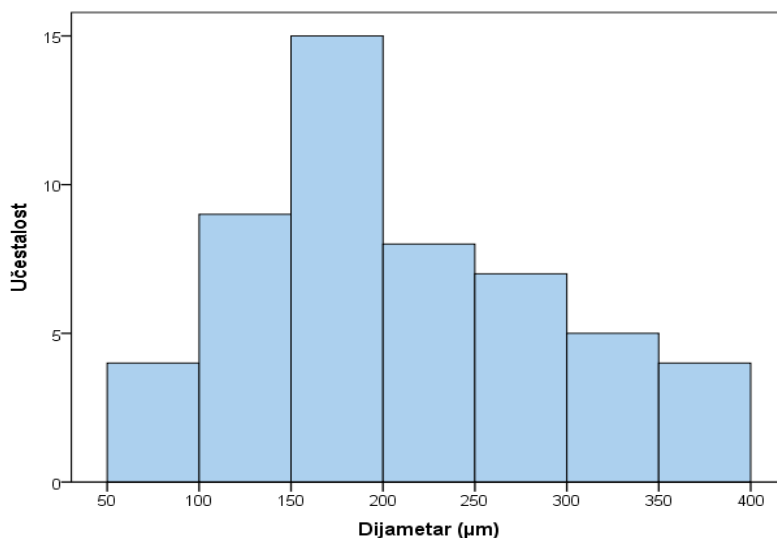
Slika 40: Mikro kuglice od umreženog tiramin-pektina sa imobilizovanom SBP.

Kuglice napravljene od 10% oksidovanog pektina sa imobilizovanom SBP posmatrane su pod optičkim mikroskopom (Carl Zeiss, Axio Observer.Z1) pri uveličanju od 5 puta u cilju određivanja dimenzija i oblika kuglica (Slika 41).



Slika 41: Kuglice od tiramin-pektina sa imobilizovanom SBP posmatrane pod optičkim mikroskopom.

Sa slike se vidi da su kuglice sfernog oblika, a distribucija dijametra se kreće od 90,9 μm do 375,84 μm sa prosečnom veličinom od 212,09 μm . Raspodela veličine kuglica na uzorku od 50 komada prikazana je na histogramu (Slika 42).



Slika 42: Histogram raspodele dijametra kuglica.

3.3.3. Optimizacija imobilizacije SBP

U cilju optimizacije uslova imobilizacije prvo su testirane različite koncentracije tiramin-pektina oksidovanog sa 2,5 mol% perjodata na sposobnost geliranja. Kako od koncentracije polimera zavise mnoge osobine mikro kuglica, kao što su stepen umreženosti (veličina pora), brzina geliranja i veličina kuglica, ali i parametri imobilizovane SBP, poput specifične aktivnosti i prinosa, svi ovi faktori su posmatrani u odabiru najbolje koncentracije. Brzina geliranja mora biti optimalna jer sa većom koncentracijom polimera prebrzo dolazi do geliranja, proces polimerizacije počinje pre nego što se rastvor ukaplje u ulje i ne dolazi do pravljenja dobre emulzije, odnosno kasnije mikro kuglica, već većih čestica amorfne oblika i većih dimenzija. Pored toga stepen umreženosti je veći, pa su pore manje i dolazi do određenih difuzionih ograničenja koja utiču na aktivnost. Ukoliko je brzina geliranja, sa druge strane, previše spora, pri manjim koncentracijama pektina dolazi do manje umreženosti hidrogela, pore su veće, a samim tim i „curenje“ enzima je veće, dok su mehanička svojstva dobijenog hidrogela lošija.

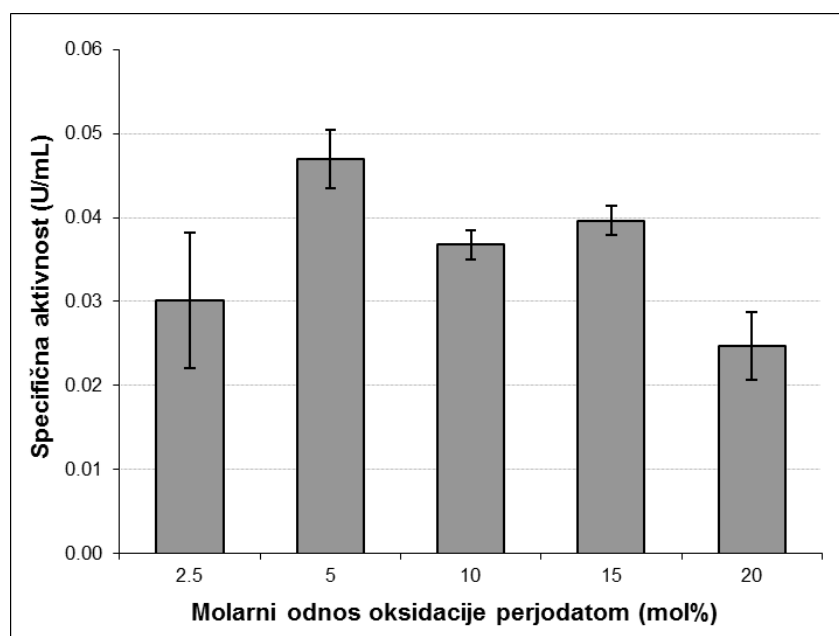
Pripremljeni su rastvori tiramin-pektina koncentracija 5,0, 7,5 i 10,0% (w/v) i posmatrani su parametri imobilizovane SBP (Tabela 6).

Tabela 6: Uticaj koncentracije 2,5% perjodatom oksidovanog tiramin-pektina na specifičnu aktivnost imobilizovane SBP i prinos imobilizacije.

| Koncentracija polimera (%) | 5,0% | 7,5% | 10% |
|----------------------------|--------|--------|--------|
| Sp [IU/mL] | 0,0467 | 0,0431 | 0,0504 |
| Prinos [%] | 3,16 | 5,45 | 4,18 |

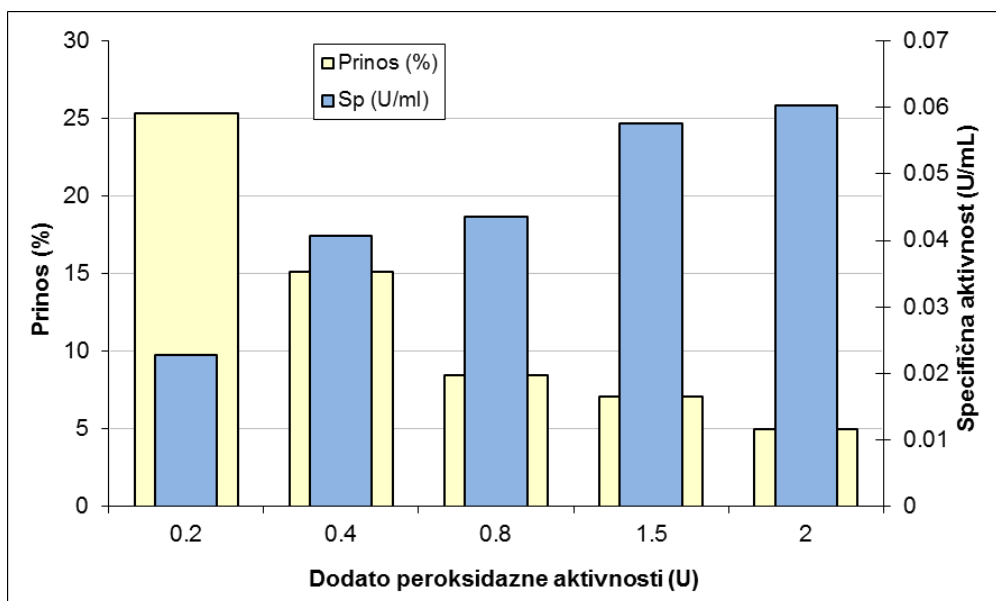
Koncentracija pektina 7,5% (w/v) odabrana je kao optimalna u pogledu specifične aktivnosti i prinosa imobilizacije.

Testirana je imobilizacija SBP na tiramin-pektin različitog stepena oksidacije perjodatom (od 2,5% do 20 mol%) u cilju optimizacije uticaja modifikacije pektina na specifičnu aktivnost (*Slika 43*). Najveća specifična aktivnost imobilizovane peroksidaze iz soje od 0,047 IU/mL dobijena je sa 5 mol% oksidovanim tiramin-pektinom.



Slika 43: Uticaj molarnog odnosa oksidacije perjodatom na specifičnu aktivnost imobilizovanog enzima na tiramin-pektin koncentracije 7,5% i 0,4 IU dodate SBP.

U cilju određivanja optimalne količine enzima za imobilizaciju praćen je uticaj količine dodate enzimске aktivnosti peroksidaze iz soje na specifičnu aktivnost i prinos imobilizacije u mikrookuglicama na 5 mol% tiramin-pektinu (*Slika 44*).



Slika 44: Zavisnost prinosa imobilizacije i specifične aktivnosti imobilizovanog enzima od količine dodatih jedinica peroksidazne aktivnosti za 7,5% tiramin-pektin oksidovan 5 mol% perjodatom.

Sa povećanjem količine dodatog enzima od 0,2 IU do 2,0 IU specifična aktivnost imobilizata raste ali prinos imobilizacije istovremeno značajno opada. Kao kompromis između ova dva efekta izabrana je količina SBP od 0,8 IU kao optimalna za dalji rad.

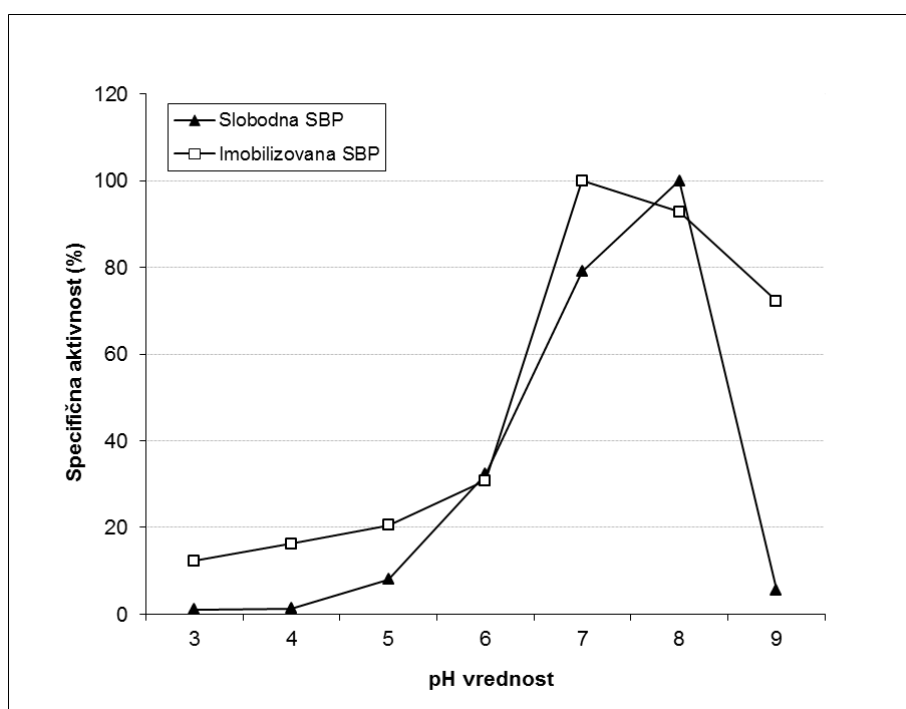
Vodonik peroksid nije dodavan direktno u reakciju, već je *in situ* generisan u reakciji oksidacije glukoze pomoću enzima glukoza oksidaze. Za optimalnu koncentraciju glukoza oksidaze uzeta je 0,1 IU. Uticaj količine glukoze na parametre imobilizacije SBP u mikrokuglicama tiramin-pektina ispitan je korišćenjem rastvora ovog šećera koncentracija 1 M, 0,1 M i 0,01 M, pri konstantnim koncentracijama ostalih učesnika u reakciji. Najveća specifična aktivnost od 0,0435 IU/mL i prinos imobilizacije od 8,46% dobijena je sa najmanjom koncentracijom glukoze (0,01 M).

Optimizacijom uslova za dalji rad odabran je tiramin-pektin oksidovan 5 mol%, finalne koncentracije od 7,5% (w/v), sa 0,8 IU jedinica SBP, 0,1 IU jedinica GOx i koncentracijom glukoze od 0,01 M. Merenjem zadržavanja enzimske aktivnosti nakon 24h dobijena je vrednost od 97,6% rezidualne aktivnosti u odnosu na početnu, što znači da je „curenje“ enzima, koje često predstavlja veliki problem imobilizacije u hidrogelu, svedeno na minimum. Pri istim uslovima, imobilizacijom SBP u nativnom, nemodifikovanom pektinu uz jonotropno geliranje u prisustvu dvovalentnih katjona (Ca^{2+}), ne dolazi do zadržavanja enzima unutar kuglica.

To znači da enzimskom polimerizacijom fenolnih ostataka i kovalentnim umrežavanjem lanaca pektina modifikovanog tiraminom dolazi do nastanka gušće mreže koja pospešuje zadržavanje imobilizovanog enzima. Pored toga, enzim ostvaruje brojne kovalentne i nekovalentne interakcije sa tiramin-pektinom koje nisu prisutne kod nativnog pektina. Prilikom enzimске polimerizacije dolazi do formiranja tiramin radikala koji može napasti tirozin ostatke na površini molekula proteina i tako kovalentno imobilizovati SBP. Jačem vezivanju pomažu i hidrofobne interakcije fenolnih aromatičnih prstenova iz pektina i molekula enzima.

3.3.4. pH optimum

Uticaj pH vrednosti na enzimsku aktivnost rastvorne SBP, odnosno na specifičnu aktivnost imobilizovane SBP u kuglicama 5% oksidovanog tiramin-pektina određen je nalaženjem pH optimuma (*Slika 45*). Relativna aktivnost izražena je procentualno u odnosu na maksimum aktivnosti pri optimalnoj pH. Rastvorni enzim pokazuje najveću aktivnost na pH 8,0, dok imobilizovani ima nešto niži optimum na pH 7,0. Pored toga, imobilizovana SBP pokazuje širi optimum pH vrednosti sa znatno većom aktivnošću na pH 9.

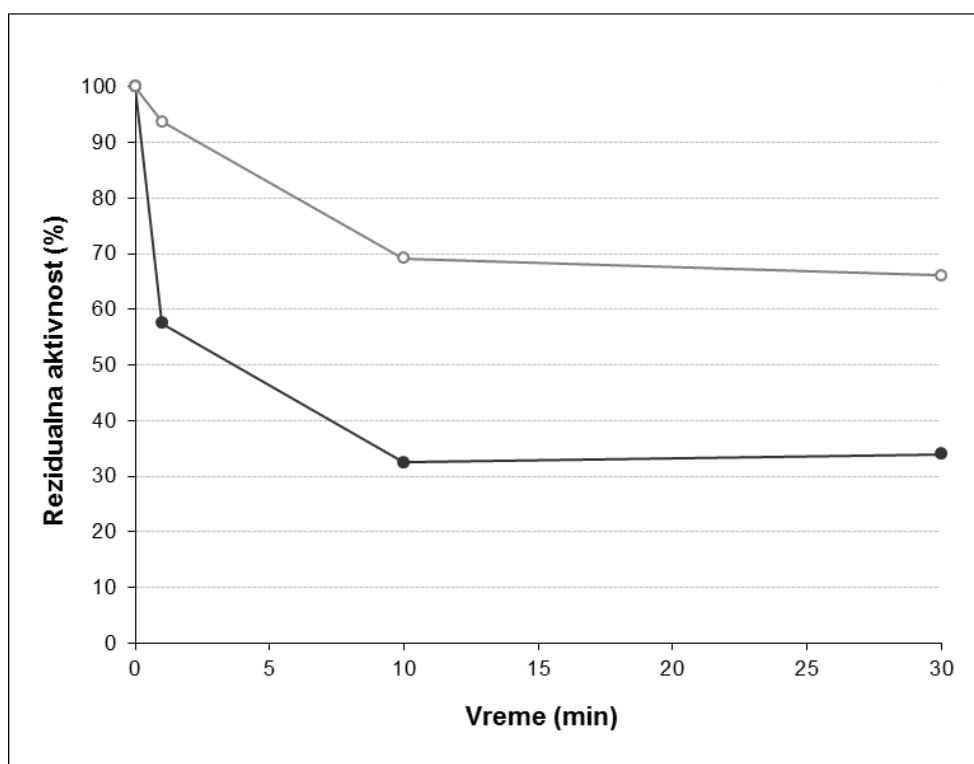


Slika 45: Zavisnost relativne enzimске aktivnosti rastvorne i imobilizovane SBP u funkciji pH vrednosti rastvora.

Razlika u pH optimumu imobilizovanog i solubilnog enzima može se objasniti particionim efektom. Mikrookolina unutar imobilizata, u blizini aktivnog centra, donekle štiti enzim od uticaja spoljašnjeg rastvora, pa se i pH vrednost u oblasti oko enzima može razlikovati od pH vrednosti okolnog rastvora.

3.3.5. Termostabilnost

Poređena je termostabilnost peroksidaze iz soje imobilizovane u kuglicama hidrogela tiramin-pektina (5 mol%) sa termalnom inaktivacijom rastvornog enzima pod istim uslovima. Za temperaturu na kojoj je rađena inaktivacija odabrano je visokih 85°C, pošto SBP spada u izuzetno termostabilne enzime. Grafički su prikazane rezidualne aktivnosti nakon inkubacionih perioda od 1, 10 i 30 minuta (*Slika 46*).



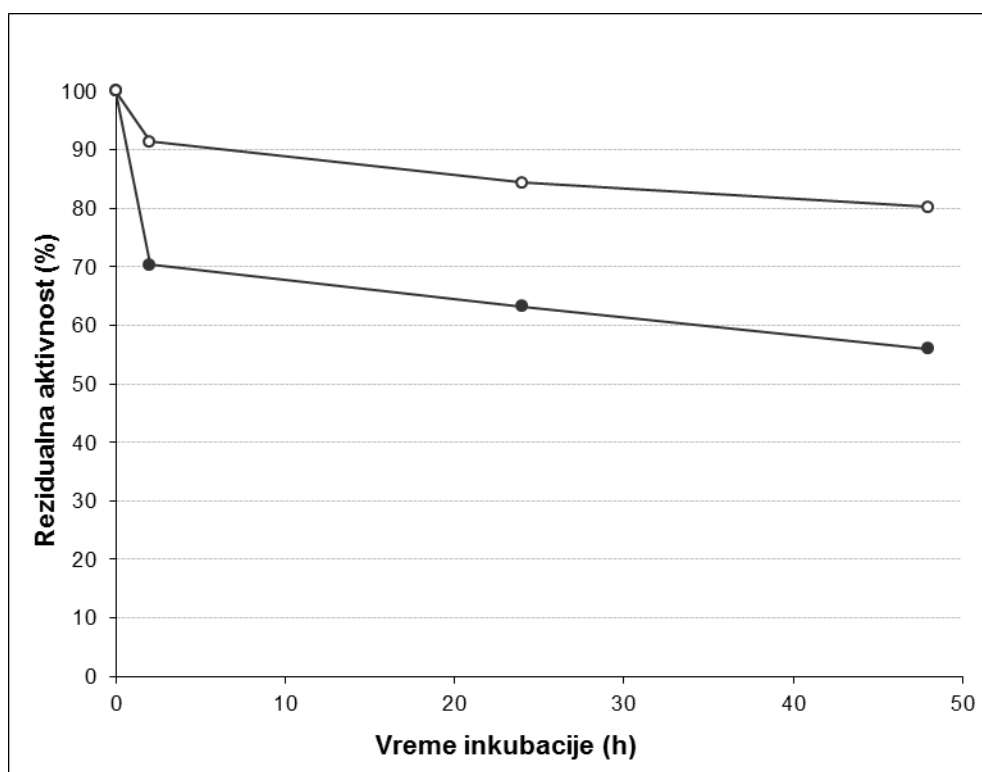
Slika 46: Zavisnost rezidualne aktivnosti od vremena inkubacije rastvorne (●) i imobilizovane (o) SBP na 85°C u 0,1 M Tris puferu.

Imobilizovana SBP pokazala se otpornijom na termalnu inaktivaciju (66%) u odnosu na rastvorni enzim (34%) sa skoro dva puta većom vrednošću rezidualne aktivnosti nakon 30 minuta inkubacije na 85°C. Peroksidaza iz soje spada u termostabilne enzime, pa svaka dodatna stabilizacija u tom pogledu predstavlja veliki uspeh. Određen je polu-život ($t_{1/2}$) imobilizovanog enzima na 85°C (54 min) koji pokazuje 1,38 puta veću vrednost od $t_{1/2}$ za slobodan enzim (39 min). Povećana

termalna stabilnost SBP na 85°C unutar pektinskih mikro-kuglica može biti rezultat višestrukih kovalentnih veza koje se ostvaruju preko tirozin radikala nastalih tokom reakcije polimerizacije i nekovalentnih hidrofobnih interakcija između enzima i tiramin-pektina ostvarenih „stacking“ interakcijama aromatičnih prstenova.

3.3.6. Stabilnost u organskom rastvaraču

Stabilnost u organskom rastvaraču je važna karakteristika svakog biokatalizatora zbog potencijalne primene u hemijskim sintezama koje se odvijaju u nevodnim sredinama. Merenje stabilnosti imobilizovane i slobodne SBP u organskom rastvaraču izvedeno je u 80% rastvoru 1,4-dioksana (v/v). Nakon inkubacionog perioda od 2, 24 i 48h merena je rezidualna enzimaska aktivnost u alikvotima. Poređeni su rezultati dobijeni za imobilizovan i rastvoran enzim (*Slika 47*).



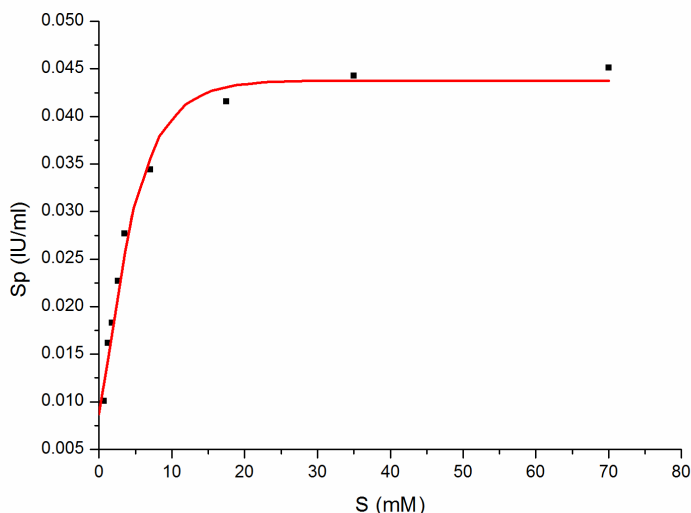
Slika 47: Zavisnost rezidualne aktivnosti od vremena inkubacije rastvorne (●) i imobilizovane (o) SBP u rastvoru 80% dioksana u 0,1 M Tris puferu.

Nakon 48 sati inkubacije imobilizovani enzim pokazao je 1,43 puta veću otpornost na denaturišući efekat organskog rastvarača zadržavanjem 80% početne aktivnosti, u poređenju sa 56% za slobodni enzim. Dodatna stabilizacija imobilizata u organskom rastvaraču (diokasanu), kao i u ispitivanju termalne inaktivacije, potvrđuje

stabilizaciju enzima ostvarivanjem višestrukih interakcija sa polimernom mrežom tiramin-pektina.

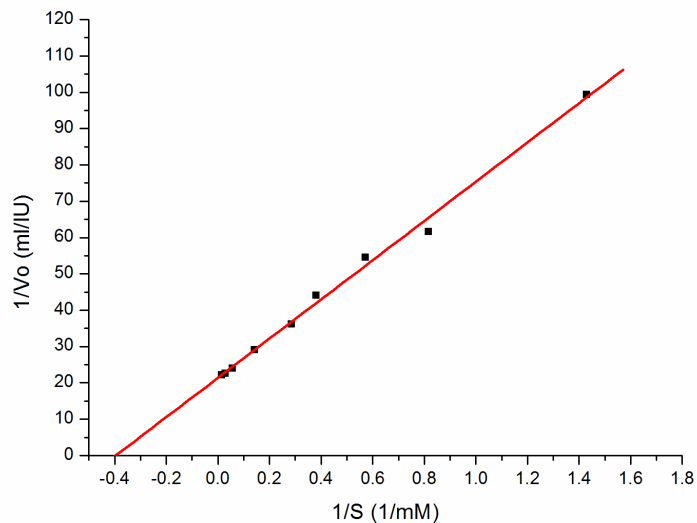
3.3.7. Kinetičke studije

Vrednost Michaelis-Menten-ine konstante rastvorne peroksidaze iz soje iznosi 3,46 mM za pirogalol kao supstrat pri zasićujućim koncentracijama peroksida. Za određivanje kinetičkih parametara K_m i V_{max} imobilizovane SBP u kuglicama pektinskog hidrogela (5 mol% modifikovanog), varirana je koncentracija pirogalola u odnosu na vrednost kinetičke konstante rastvornog enzima od 0,2 do 20 K_m pri zasićujućim koncentracijama vodonik peroksida. Imobilizovana peroksidaza iz soje se ponaša u skladu sa Michaelis-Menteninom kinetikom (*Slika 48*).



Slika 48: Michaelis-Mentenina kriva zavisnosti početne brzine reakcije od koncentracije supstrata SBP imobilizovane na tiramin-pektinu.

Na osnovu dobijenih početnih brzina reakcije pristupilo se linearizaciji Michaelis-Menteninog grafika prema Lineweaver-Burk-ovoj metodi. Po ovoj metodi linearizacije pravi se grafik zavisnosti recipročne vrednosti koncentracija supstrata od recipročne vrednosti početne brzine enzimske reakcije (*Slika 49*).

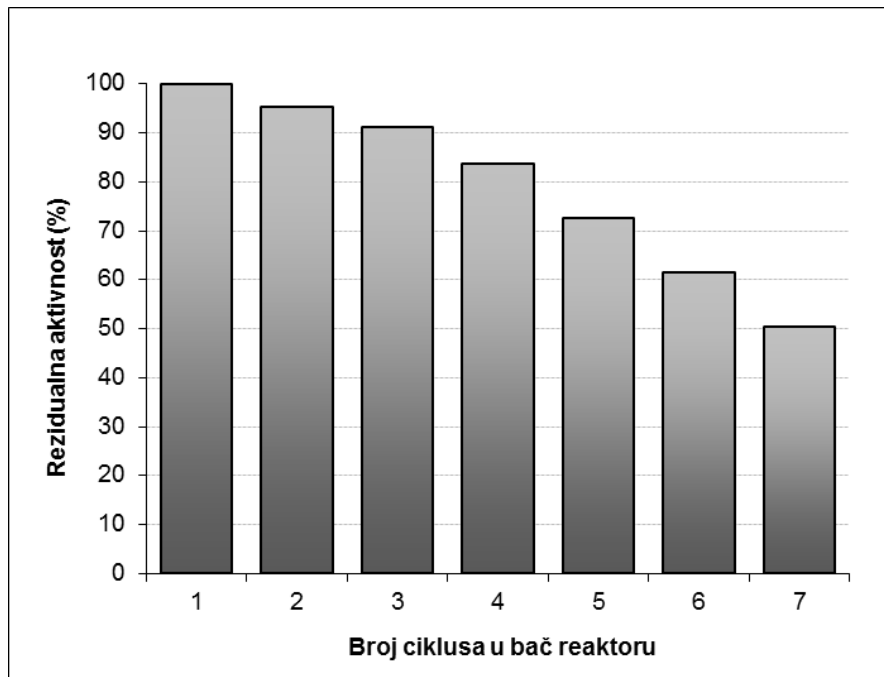


Slika 49: Lineweaver-Burk-ov grafik SBP imobilizovane na 5 mol% tiramin-pektinu.

Dobijena vrednost K_m za imobilizovanu SBP iznosi 2,53 mM, što je nešto niže od vrednosti za rastvorni enzim. Niža katalitička konstanta znači veći afinitet enzima ka supstratu. Prilikom imobilizacije, usled particionog efekta, može doći do različite raspodele supstrata unutar čestice hidrogela u odnosu na okolni rastvor, odnosno pirogalol može biti delimično adsobovan hidrofobnim interakcijama sa fenolnim prstenom tiramina u unutrašnjosti mikro-kuglica, što može uticati na lokalno povećanje njegove koncentracije i smanjenje vrednosti K_m .

3.3.8. Operativna stabilnost imobilizovane SBP

Imobilizovana SBP na tiramin-pektinu je testirana za potencijalnu višekratnu upotrebu u bač reaktoru. Operativna stabilnost merena je sa istom šaržom najboljeg imobilizata u nekoliko ciklusa oksidacije pirogalola. Rezidualna specifična aktivnost je merena nakon svakog završenog ciklusa i izražena procentualno u odnosu na početnu aktivnost (*Slika 50*).



Slika 50: Aktivnost imobilizovane SBP na tiramin-pektinu 5 mol% pri ponovnoj upotrebi u bač reaktoru. Rezidualna aktivnost izražena u procentima od početne.

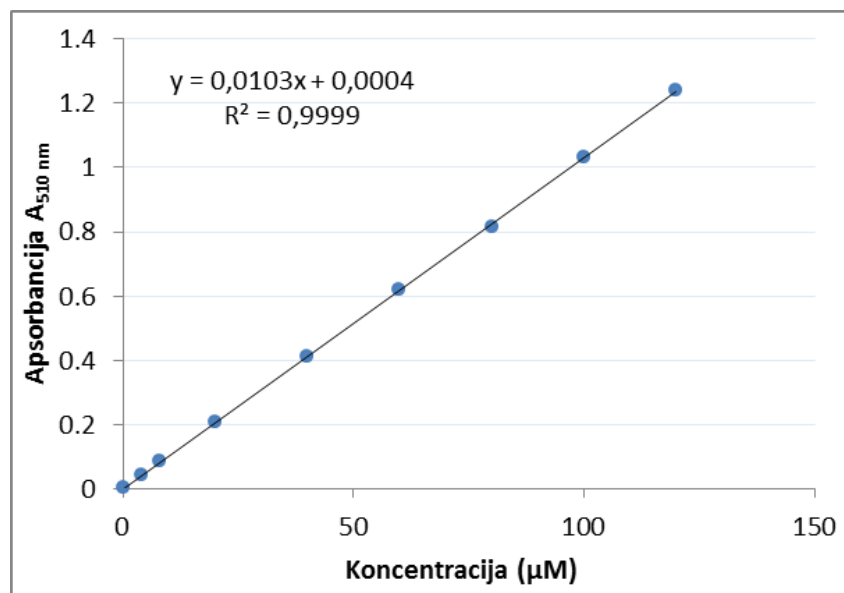
Nakon prvih 4 ciklusa ponovne upotrebe rezidualna aktivnost imobilizovane peroksidaze iz soje je iznad 85%, a nakon 7 ciklusa aktivnost se zadržava iznad 50% od početne. Ovaj rezultat je značajno bolji u poređenju sa operativnom stabilnošću istog enzima imobilizovanog na nosač na bazi makroporoznog glicidil metakrilata gde je aktivnost nakon 6 ciklusa pala na 22%.

3.4. Uklanjanje fenola iz otpadnih voda pomoću peroksidaze iz soje

Jedan od ciljeva ove teze bio je razvijanje novih biokatalizatora za rešavanje problema uklanjanja aromatičnih fenolnih zagađivača iz otpadnih voda. Optimizacija uslova reakcije u pogledu količine enzimskih jedinica, koncentracije vodonik peroksida i sistema za njegovu internu dostavu određena je sa rastvornim enzimom. U cilju primene dobijenih imobilizata peroksidaze iz soje koji su pokazali najbolje karakteristike, testirane su njihove sposobnosti u bač reaktoru pri optimalnim uslovima. Ispitana je efikasnost imobilizata SBP na kopolimeru poli(GMA-co-EGDMA) označenom SGE 20/12 i u mikro-kuglicama hidrogela od 5 mol% oksidovanog tiramin-pektina.

3.4.1. Optimizacija uslova za uklanjanje fenola rastvornom SBP

Na osnovu vrednosti poznatih koncentracija rastvora fenola konstruisana je kalibraciona prava (*Slika 51*).

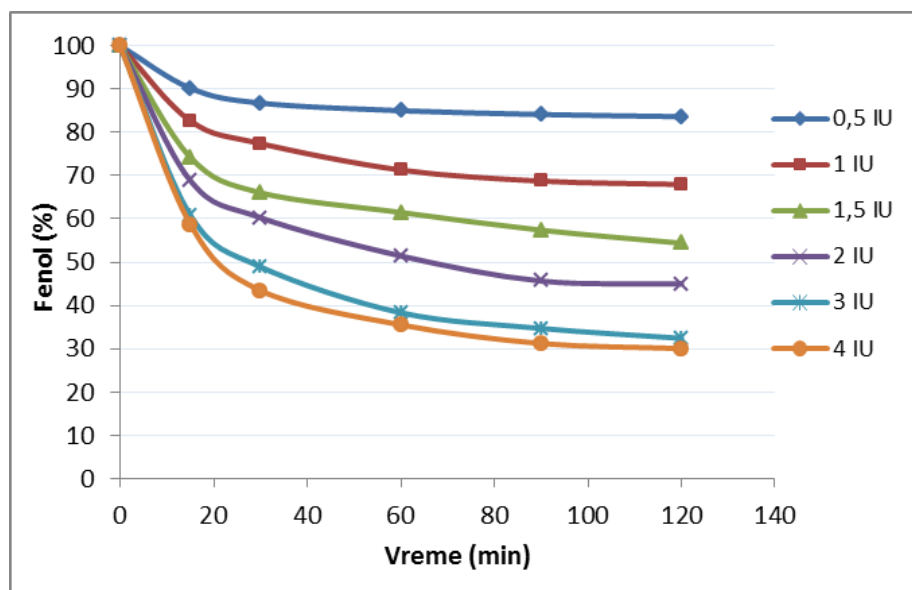


Slika 51: Kalibraciona prava za fenole

Ispitivana je sposobnost rastvorne peroksidaze iz soje za primenu u uklanjanju fenola iz vodenog rastvora. Pripremljen je rastvor fenola zapremine 3 mL poznate početne koncentracije (2 mM) i praćena je zaostala koncentracija nakon određenih vremenskih intervala enzimskog tretmana u prisustvu finalne koncentracije vodonik

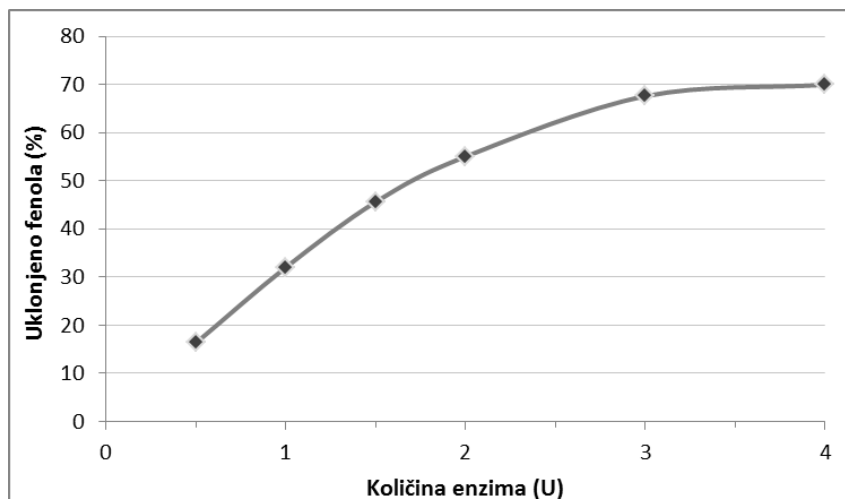
peroksida od 2 mM merenjem apsorbancije na 512 nm u alikvotima. Koncentracija zaostalog fenola preračunata je na osnovu zavisnosti apsorbancije na 512 nm od koncentracije fenola iz kalibracione prave.

Uticaj efikasnosti SBP za polimerizaciju fenola optimizovana je dodavanjem različitih količina enzimskih jedinica u reakciju i praćenjem procenta obrađenog fenola pri konstantnoj koncentraciji vodonik peroksida od 2 mM. Testirane su količine od 0,5; 1; 1,5; 2; 3 i 4 IU SBP i rezultati su grafički prikazani. (Slika 52).



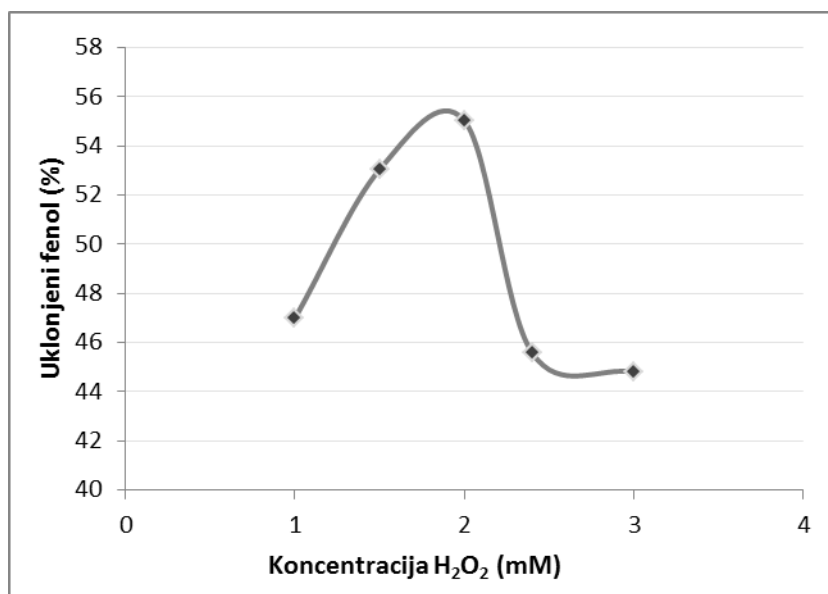
Slika 52: Uticaj vremena reakcije na procenat preostalog fenola za različite količine dodatih enzimskih jedinica

Iz grafika se može zaključiti da se procenat rezidualnog fenola smanjuje sa povećanjem količine enzima u reakciji, ali ta zavisnost nije linearna. Ukoliko bi se konstruisao grafik zavisnosti procenta uklonjenog fenola nakon 2h reakcije u zavisnosti od broja enzimskih jedinica (Slika 53), primećuje se da dolazi do zasićenja pri visokim koncentracijama SBP. Dodavanje veće količine enzimskih jedinica u reakciju iznad optimalne vrednosti ne dovodi do značajnog poboljšanja efikasnosti procesa. Za dalji rad je odabrana količina od 2 IU peroksidaze iz soje kojom je postignuto 55% uklonjenog fenola.



Slika 53: Uticaj količine jedinica enzimske aktivnosti na procenat uklonjenog fenola slobodne SBP

Da bi utvrdili koja koncentracija vodonik peroksida je optimalna za uklanjanje fenola, testirana je reakcija rastvorne SBP pri konstantnim uslovima reakcije variranjem samo koncentracije peroksida od 1,0 do 3,0 mM.



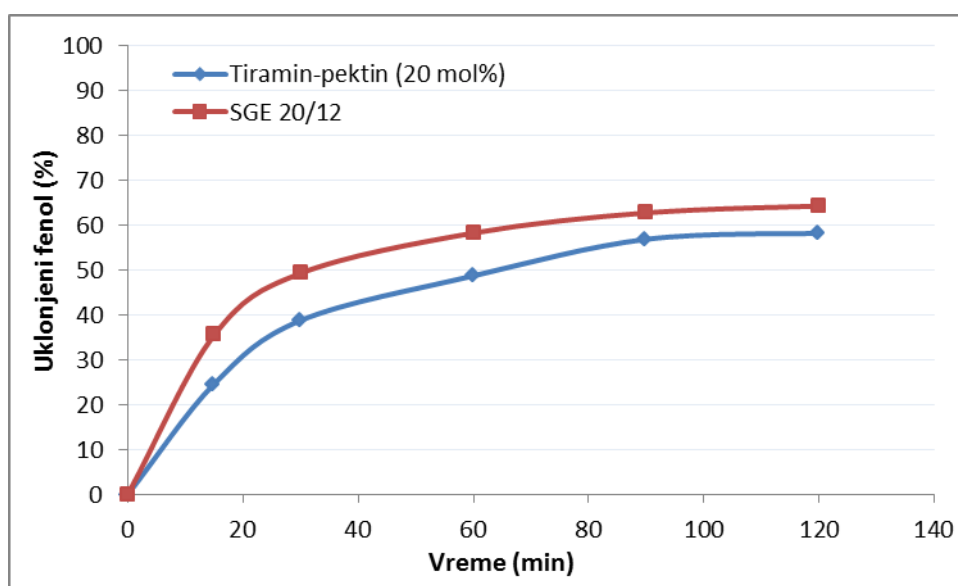
Slika 54: Zavisnost procenta uklanjanja fenola sa 2 IU SBP od finalne koncentracije vodonik peroksida (H₂O₂)

Najveća efikasnost u uklanjanju fenola od 55% dobijena je sa koncentracijom peroksida od 2 mM. Dobijena vrednost optimalne koncentracije peroksida od 2 mM je veća od prethodno određene eksperimentalne vrednosti (1 mM) u studiji uklanjanja fenola iz sintetičkih otpadnih voda od strane Hejri et al.⁴

Kao što se može zaključiti iz prethodnog eksperimenta (*Slika 54*) visoke koncentracije peroksida dovode do inaktivacije peroksidaze. Kako bi se izbegao ovaj efekat i inaktivacija enzima pri visokim početnim koncentracijama peroksida svela na minimum umesto dodavanja ovog supstrata, primenjen je sistem unutrašnje dostave peroksida u enzimskoj reakciji oksidacije glukoze pomoću glukoza oksidaze. Pri optimalnim uslovima od 2 IU peroksidaze iz soje, 0,75 IU glukoza oksidaze i 10 mM glukoze postignuto je uklanjanje fenola od 61%. Podešeni uslovi reakcije koji su dali najbolji rezultat u vidu najmanje koncentracije preostalog fenola primenjeni su prilikom testiranja imobilizovane SBP u reakciji polimerizacije fenola.

3.4.2. Uklanjanje fenola imobilizovanom SBP na glicidil metakrilatu i tiramin-pektinu

Imobilizati peroksidaze iz soje koja je imobilizovana glutaraldehidnom metodom na poli(GMA-co-EGDMA) kopolimer označenim SGE 20/12 i unutar mikrokuglica tiramin-pektina (5 mol%) korišćeni su za polimerizaciju fenola pod optimizovanim uslovima za rastvorni enzim. Rezultati procenta uklonjenog fenola su grafički prikazani (*Slika 55*).



Slika 55: Zavisnost procenta uklonjenog fenola imobilizovanom SBP od vremena reakcije

Najveća efikasnost procesa pomoću SBP imobilizovane na SGE 20/12 kopolimer od 64% postignuta je generisanjem peroksida u toku reakcije čime se smanjuje efekat inaktivacije enzima viškom ovog supstrata. Koncentracija peroksida tokom reakcije se održava na niskom nivou jer paralelno sa njegovim postepenim stvaranjem

istovremeno dolazi do njegovog uklanjanja u peroksidaznoj reakciji. Obzirom na dobijene operativne stabilnosti korišćenih imobilizata, mogućnošću višestruke upotrebe ovih biokatalizatora značajno se poboljšava efikasnost polimerizacije fenola.

IV ZAKLJUČAK

Jednostavnom procedurom je iz semenog omotača soje, koji predstavlja jeftin polazni materijal i industrijski otpadni proizvod, izolovana velika količina peroksidaze iz soje (SBP) zadovoljavajuće čistoće.

Izolovana SBP je uspešno imobilizovana glutaraldehidnom i perjodatnom metodom na nekoliko makroporoznih nosača na bazi glicidil metakrilata i etilenglikol dimetakrilata različitih karakteristika i dimenzija pora. Glutaraldehidni metod imobilizacije pokazao je značajno bolje rezultate, a najveća specifična aktivnost od 22,8 IU/g dobijena je sa kopolimerom označenim SGE 20/12 veličine pora od 120 nm. Iako je SBP izuzetno termostabilan enzim, imobilizacijom na SGE 20/12 dodatno je stabilizovan pokazujući 1,5 puta veću rezidualnu aktivnost nakon 30 minuta inkubacije na 85°C u odnosu na slobodni enzim. Imobilizovana SBP imala je znatno širi pH optimum u odnosu na rastvorni enzim. Upotrebom imobilizata u bač reaktoru nakon 6 ciklusa zadržano je 22% od početne aktivnosti.

Oksidacijom pektina perjodatom u različitim molskim procentima i naknadnom reduktivnom aminacijom sa tiraminom i blagim reduktivnim sredstvom sintetisana je serija tiramin-pektina, modifikata polaznog polisaharida. Brojnim strukturnim analizama (UV-VIS, FTIR, ¹H NMR) potvrđena je modifikacija pektina i prisustvo vezanog tiramina, kao i prisustvo novih funkcionalnih grupa. Tiramin-pektini različitog stepena modifikacije pravili su mehanički stabilne hidrogelove sa jonima kalcijuma, kao i u reakciji sa vodonik peroksidom i peroksidazom iz soje. Novi materijal je uspešno iskorišćen za imobilizaciju SBP unutar mikro-kuglica tiramin-pektina nastalih enzimskom polimerizacijom u emulziji vodenog rastvora polimera u lakom mineralnom ulju. Najveća specifična aktivnost izmerena je u mikro-kuglicama SBP imobilizovane na tiramin-pektin oksidovan 5 mol%. Imobilizovana peroksidaza u mikro-kuglicama tiramin-pektina pokazuje veću otpornost na termalnu inaktivaciju i denaturišući efekat organskih rastvarača. Zadržano je 50,4% rezidualne aktivnosti nakon 7 ciklusa uzastopne upotrebe za oksidaciju pirogalola u bač reaktoru.

Optimizacijom uslova za uklanjanje fenola iz otpadnih voda pomoću rastvorne peroksidaze iz soje (2 IU enzima i 2 mM peroksida) postignuto je 55% efikasnosti. Generisanjem vodonik peroksida u sistemu unutrašnje dostave ovog supstrata dostignuta je efikasnost uklanjanja fenola od 61%. Imobilizat SBP glutaraldehidno vezan na SGE 20/12 kopolimer ostvario je pri optimalnim uslovima uklanjanje fenola od 64% sa mogućnošću ponovne ili kontinualne upotrebe.

V LITERATURA

1. Guisan JM. Immobilization of Enzymes as the 21st Century Begins. In: M. Guisan J, ed. *Immobilization of Enzymes and Cells*. Second. Humana Press; 2006:1-14.
2. Wilberg K, Assenhaimer C, Rubio J. Removal of aqueous phenol catalysed by a low purity soybean peroxidase. *J Chem Technol Biotechnol*. 2002;77(7):851-857. doi:10.1002/jctb.646.
3. Gomez M, Matafonova G, Gomez JL, Batoev V, Christofi N. Comparison of alternative treatments for 4-chlorophenol removal from aqueous solutions: Use of free and immobilized soybean peroxidase and KrCl excilamp. *J Hazard Mater*. 2009;169(1-3):46-51. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.03.059.
4. Hejri S, Saboora A. Removal of Phenolic Compounds from Synthetic Wastewaters by Enzymatic Treatments. *J Sci (University Tehran)*. 2009;35(1):13-19.
5. Conesa A, Punt PJ, Van Den Hondel CAMJJ. Fungal peroxidases: Molecular aspects and applications. *J Biotechnol*. 2002;93(2):143-158. doi:10.1016/S0168-1656(01)00394-7.
6. Erman JE, Vitello LB. Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1597(2):193-220. doi:10.1016/S0167-4838(02)00317-5.
7. Caverzan A, Passaia G, Rosa SB, Ribeiro CW, Lazzarotto F, Margis-Pinheiro M. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genet Mol Biol*. 2012;35(4):1011-1019. doi:10.1590/S1415-47572012000600016.
8. Vares T, Kalsi M, Hatakka A. Lignin peroxidases, manganese peroxidases, and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(10):3515-3520.
9. Mao L, Huang Q, Luo Q, Lu J, Yang X, Gao S. Ligninase-mediated removal of 17 β -estradiol from water in the presence of natural organic matter: Efficiency and pathways. *Chemosphere*. 2010;80(4):469-473. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.054.
10. Munir IZ, Dordick JS. Soybean peroxidase as an effective bromination catalyst. *Enzyme Microb Technol*. 2000;26(5-6):337-341. doi:10.1016/S0141-0229(99)00180-5.
11. Yazdi MT, Khaleghparast S, Monsef HR. Purification and some partial characterization of peroxidase isoenzyme from *Brassica oleracea capitata* L. *J Sci Islam Repub Iran*. 2002;13(2):107-112.

12. Nahakpam S, Singh P, Shah K. Effect of calcium on immobilization of rice (*Oryza sativa* L.) peroxidase for bioassays in sodium alginate and Agarose gel. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2008;13(5):632-638. doi:10.1007/s12257-008-0051-2.
13. Ryan BJ, Carolan N, Ó'Fágáin C. Horseradish and soybean peroxidases: comparable tools for alternative niches? *Trends Biotechnol.* 2006;24(8):355-363. doi:10.1016/j.tibtech.2006.06.007.
14. Kamal JKA, Behere D V. Steady-state and picosecond time-resolved fluorescence studies on native and apo seed coat soybean peroxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(2):427-433. doi:10.1006/bbrc.2001.6018.
15. Ghaemmaghami F, Alemzadeh I, Motamed S. Seed Coat Soybean Peroxidase: Extraction and Biocatalytic Properties Determination. *Iran J Chem Eng.* 2010;7(2):28-38.
16. Schmitz N, Gijzen M, Van Huystee R. Characterization of anionic soybean (*Glycine max*) seed coat peroxidase. *Can J Bot.* 1997;75(8):1336-1341. <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030784637&partnerID=40&rel=R7.0.0>.
17. Gray JSS, Yang BY, Hull SR, Venzke DP, Montgomery R. The glycans of soybean peroxidase. *Glycobiology.* 1996;6(1):23-32.
18. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Principles of Biochemistry.* Fourth Edi. New York: W.H. Freeman; 2004.
19. Veitch NC. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry.* 2004;65(3):249-259. doi:10.1016/j.phytochem.2003.10.022.
20. Bódalo A, Gómez JL, Gómez E, Hidalgo AM, Gómez M, Yelo AM. Removal of 4-chlorophenol by soybean peroxidase and hydrogen peroxide in a discontinuous tank reactor. *Desalination.* 2006;195(1-3):51-59. doi:10.1016/j.desal.2005.11.017.
21. Silva MC, Torres JA, Nogueira FGE, et al. Immobilization of soybean peroxidase on silica-coated magnetic particles: a magnetically recoverable biocatalyst for pollutants removal. *RSC Adv.* 2016;6(87):83856-83863. doi:10.1039/C6RA17167B.
22. Budnikova LP, Eremin AN. Synthesis and properties of horseradish peroxidase copolymers. *Appl Biochem Microbiol.* 2006;42(2):127-133. doi:10.1134/S0003683806020025.
23. Sessa DJ, Anderson RL. Soybean Peroxidases: Purification and Some Properties. *J Agric Food Chem.* 1981;29(5):960-965.
24. Henriksen a, Mirza O, Indiani C, et al. Structure of soybean seed coat peroxidase: a plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. *Protein Sci.* 2001;10(1):108-115. doi:10.1110/ps.37301.

25. Kamal JKA, Behere D V. Thermal and Conformational Stability of Seed Coat Soybean Peroxidase. *J Inorg Biochem.* 2002;41(29):9034-9042. doi:10.1021/bi025621e.
26. Kamal JKA, Behere D V. Activity, stability and conformational flexibility of seed coat soybean peroxidase. *J Inorg Biochem.* 2003;94(3):236-242. doi:10.1016/S0162-0134(03)00004-7.
27. Liu H-M, Li H-Y. Application and Conversion of Soybean Hulls. In: Kasai M, ed. *Soybean - The Basis of Yield, Biomass and Productivity.* InTech; 2017:111-132. doi:10.5772/66744 113.
28. Gacche RN, Firdaus Q, Sagar AD. Soybean (*Glycine max* L.) seed coat peroxidase immobilized on fibrous aromatic polyamide: A strategy for decreasing phenols from industrial wastewater. *J Sci Ind Res (India).* 2003;62(11):1090-1093.
29. Sessa DJ. Processing of soybean hulls to enhance the distribution and extraction of value-added proteins. *J Sci Food Agric.* 2004;84(1):75-82. doi:10.1002/jsfa.1612.
30. Gillikin JW, Graham JS. Purification and Developmental Analysis of the Major Anionic Peroxidase from the Seed Coat of *Glycine max*. *Plant Physiol.* 1991;96(1):214-220.
31. Mai VC, Tran NT, Nguyen DS. The involvement of peroxidases in soybean seedlings' defense against infestation of cowpea aphid. *Arthropod Plant Interact.* 2016;10(4):283-292. doi:10.1007/s11829-016-9424-1.
32. Steevensz A, Madur S, Al-Ansari MM, Taylor KE, Bewtra JK, Biswas N. A simple lab-scale extraction of soybean hull peroxidase shows wide variation among cultivars. *Ind Crops Prod.* 2013;48:13-18. doi:10.1016/j.indcrop.2013.03.030.
33. Hartman GL, West ED, Herman TK. Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Secur.* 2011;3(1):5-17. doi:10.1007/s12571-010-0108-x.
34. Tsaprailis G, Sze Chan DW, English AM. Conformational states in denaturants of cytochrome c and horseradish peroxidases examined by fluorescence and circular dichroism. *Biochemistry.* 1998;37(7):2004-2016. doi:10.1021/bi971032a.
35. Hailu G, Weersink A, Cahlik F. Examining the prospects for commercialization of soybean peroxidase. *J Agrobiotechnology Manag Econ.* 2010;13(3):263-273.
36. Cruz-Silva R, Romero-García J, Angulo-Sánchez JL, et al. Template-free enzymatic synthesis of electrically conducting polyaniline using soybean peroxidase. *Eur Polym J.* 2005;41(5):1129-1135. doi:10.1016/j.eurpolymj.2004.11.012.
37. Kim YH, An ES, Song BK, Kim DS, Chelikani R. Polymerization of cardanol using soybean peroxidase and its potential application as anti-biofilm coating material. *Biotechnol Lett.* 2003;25(18):1521-1524. doi:10.1023/A:1025486617312.

38. Wang B, Li B, Wang Z, Xu Q, Wang Q, Dong S. Sol-gel thin-film immobilized soybean peroxidase biosensor for the amperometric determination of hydrogen peroxide in acid medium. *Anal Chem.* 1999;71(10):1935-1939. doi:10.1021/ac980940q.
39. Alemzadeh I, Nejati S, Vossoughi M. Removal of Phenols from Wastewater with Encapsulated Horseradish Peroxidase in Calcium Alginate. *Eng Lett.* 2009;17(4):13-16.
40. Zheng H, Jiang X. Immobilization of soybean hulls peroxidase on activated carbon. *Asian J Chem.* 2014;26(3):685-689. doi:10.14233/ajchem.2014.15475.
41. Brena BM, Batista-Viera F. Immobilization of Enzymes. In: Guisan JM, ed. *Immobilization of Enzyme and Cells*. Second. Humana Press; 2006:15-30.
42. Matto M, Husain Q. Decolorization of textile effluent by bitter melon peroxidase immobilized on concanavalin A layered calcium alginate-starch beads. *J Hazard Mater.* 2009;164(2-3):1540-1546. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.09.069.
43. Petrović ĐN. *Osnovi Enzimologije*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 1998.
44. Cao DL. Introduction: Immobilized Enzymes: Past, Present and Prospects. In: *Carrier-Bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design*. Dr. Linqui.; 2006:1-52. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
45. Dwevedi A. *Enzyme Immobilization: Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment*. New Delhi: Springer Nature; 2016. doi:10.1007/978-3-319-41418-8.
46. Palmer T, Bonner P. *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry*. Second Edi. Woodhead Publishing; 2007.
47. Batista-Viera F, Ovsejevi K, Manta C. Reversible Covalent Immobilization of Enzymes. In: Guisan JM, ed. *Immobilization of Enzymes and Cells (Second Edition)*. Second. Humana Press; 2006:185-204.
48. Sheldon RA, Schoevaart R, Langen LM van. Cross-Linked Enzyme Aggregates. In: Guisan JM, ed. *Immobilization of Enzymes and Cells (Second Edition)*. Second. Humana Press; 2006:31-45.
49. Mohamad NR, Marzuki NHC, Buang NA, Huyop F, Wahab RA. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2015;29(2):205-220. doi:10.1080/13102818.2015.1008192.
50. López-Gallego F, M. Guisan J, Betancor L. Glutaraldehyde-Mediated Protein Immobilization. In: M. Guisan J, ed. *Immobilization of Enzymes and Cells (Third Edition)*. Third. Humana Press; 2013:33-41. doi:10.1007/978-1-62703-550-7.
51. Walt DR, Agayn VI. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *TrAC - Trends Anal Chem.* 1994;13(10):425-430.

- doi:10.1016/0165-9936(94)85023-2.
52. Vold IMN, Christensen BE. Periodate oxidation of chitosans with different chemical compositions. *Carbohydr Res*. 2005;340(4):679-684. doi:10.1016/j.carres.2005.01.002.
 53. Sirvio J, Hyvakkö U, Liimatainen H, Niinimäki J, Hormi O. Periodate oxidation of cellulose at elevated temperatures using metal salts as cellulose activators. *Carbohydr Polym*. 2011;83(3):1293-1297. doi:10.1016/j.carbpol.2010.09.036.
 54. Satar R, Matto M, Husain Q. Studies on calcium alginate-pectin gel entrapped concanavalin A-bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase complex. *J Sci Ind Res (India)*. 2008;67(8):609-615.
 55. Ahmad R, Sardar M. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. *Biochem Anal Biochem*. 2015;4(2):1-8. doi:10.4172/2161-1009.1000178.
 56. Chaplin MF, Bucke C. *Enzyme Technology*. First Edit. Cambridge: Cambridge University Press; 1990.
 57. Messing R. Immobilized Enzymes for Industrial Reactors. *Immobil Enzym Ind React*. 1975. doi:10.1016/B978-0-12-492350-8.50001-3.
 58. Santos JCS Dos, Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. *ChemCatChem Rev*. 2015;7(16):2413-2432. doi:10.1002/cctc.201500310.
 59. Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*. 2012;1-9. doi:10.1007/s13205-012-0071-7.
 60. Jovanovic SM, Nastasovic A, Jovanovic NN, Jeremic K, Savic Z. The influence of inert component composition on the porous structure of glycidyl methacrylate/ethylene glycol dimethacrylate copolymers. *Die Angew Makromol Chemie*. 1994;219(3833):161-168. doi:10.1002/apmc.1994.052190113.
 61. Jovanovic SM, Nastasović A, Jovanovic NN, Jeremic K. Targeted Porous Structure of Macroporous Copolymers Based on Glycidyl Methacrylate. *Mater Sci Forum*. 1996;214:155-162. doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.214.155.
 62. Miletić N, Rohandi R, Vuković Z, Nastasović A, Loos K. Surface modification of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins for improved *Candida antarctica* lipase B immobilization. *React Funct Polym*. 2009;69(1):68-75. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2008.11.001.
 63. Jovanovic SM, Nastasović A, Jovanovic NN, Novaković T, Vuković Z, Jeremić K. Synthesis, Properties and Application of crosslinked Macroporous copolymers based on methacrylates. *Chem Ind*. 2000;54(11):471-479.
 64. Hérault D, Saluzzo C, Lemaire M. Preparation of monodisperse enantiomerically

- pure glycidyl methacrylate-ethylene glycol dimethacrylate copolymers in dispersion copolymerization: Functionalization. *React Funct Polym.* 2006;66(5):567-577. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2005.10.010.
65. Stefanović IS, Ekmešćić BM, Maksin DD, et al. Structure, Thermal, and Morphological Properties of Novel Macroporous Amino-Functionalized Glycidyl Methacrylate Based Copolymers. *Ind Eng Chem Res.* 2015;54(27):6902-6911. doi:10.1021/acs.iecr.5b01285.
 66. Ferreira A, Bigan M, Blondeau D. Optimization of a polymeric HPLC phase: poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) Influence of the polymerization conditions on the pore structure of macroporous beads. *React Funct Polym.* 2003;56:123-136. doi:10.1016/S1381-5184(03)00049-X.
 67. Nastasović A, Jovanović S, Đorđević D, Onjia A, Jakovljević D, Novaković T. Metal sorption on macroporous poly(GMA-co-EGDMA) modified with ethylene diamine. *React Funct Polym.* 2004;58(2):139-147. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2003.11.015.
 68. Terborg L, Masini JC, Lin M, Lipponen K, Riekolla ML, Svec F. Porous polymer monolithic columns with gold nanoparticles as an intermediate ligand for the separation of proteins in reverse phase-ion exchange mixed mode. *J Adv Res.* 2015;6(3):441-448. doi:10.1016/j.jare.2014.10.004.
 69. Petro M, Svec F, Fréchet MJM. Immobilization of trypsin onto "molded" macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) rods and use of the conjugates as bioreactors and for affinity chromatography. *Biotechnol Bioeng.* 1996;49(4):355-363. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19960220)49:4<355::AID-BIT1>3.0.CO;2-O.
 70. Prodanović R, Jovanović S, Vujčić Z. Immobilization of invertase on a new type of macroporous glycidyl methacrylate. *Biotechnol Lett.* 2001;23(14):1171-1174. doi:10.1023/A:1010560911400.
 71. Milosavić N, Prodanović R, Jovanović S, Novaković I, Vujčić Z. Preparation and characterization of two types of covalently immobilized amyloglucosidase. *J Serbian Chem Soc.* 2005;70(5):713-719. doi:10.2298/JSC0505713M.
 72. Prodanović RM, Milosavić NB, Jovanović SM, Ćirković-Velicković T, Vujčić ZM, Jankov RM. Stabilization of α -glucosidase in organic solvents by immobilization on macroporous poly(GMA-co-EGDMA) with different surface characteristics. *J Serbian Chem Soc.* 2006;71(4):339-347. doi:10.2298/JSC0604339P.
 73. Milosavić NB, Prodanović RM, Velićković D, Dimitrijević A. Macroporous Poly(GMA-co-EGDMA) for Enzyme Stabilization. In: Minteer SD, ed. *Enzyme Stabilization and Immobilization, Methods and Protocols*. Vol 1504. Springer Nature; 2017:139-147. doi:10.1007/978-1-4939-6499-4.
 74. Lopes da Silva JA, Rao MA. Pectins: Structure, Functionality, and Uses. In: *Food Polysaccharides and Their Applications*. Second Edi. Taylor & Francis Group; 2006:1-712.

doi:doi:10.1201/9781420015164.ch6\r10.1201/9781420015164.ch6.

75. Van Buren JP. Function of Pectin in Plant Tissue Structure and Firmness. In: Walter RH, ed. *The Chemistry And Technology of Pectin*. Vol 45. Academic Press, Inc.; 1991:1-22. doi:10.1016/b978-0-08-092644-5.50006-6.
76. Sundeen KE. Pectin: The Miracle Molecule. *Univ Pennsylvania*. 2009:1-35.
77. Willats WGT, Knox JP, Mikkelsen JD. Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci Technol*. 2006;17(3):97-104. doi:10.1016/j.tifs.2005.10.008.
78. Srivastava P, Malviya R. Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry - An overview. *Indian J Nat Prod Resour*. 2011;2(1):10-18.
79. Mishra RK, Datt M, Pal K, Banthia AK. Preparation and characterization of amidated pectin based hydrogels for drug delivery system. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(6):2275-2280. doi:10.1007/s10856-007-3310-4.
80. Urias-Orona V, Rascón-Chu A, Lizardi-Mendoza J, Carvajal-Millán E, Gardea AA, Ramírez-Wong B. A novel pectin material: Extraction, characterization and gelling properties. *Int J Mol Sci*. 2010;11(10):3686-3695. doi:10.3390/ijms11103686.
81. Sriamornsak P. Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses : A Review. *Silpakorn Univ J Soc Sci Humanit Arts*. 2003;3(1-2):206-228. doi:10.5458/jag.54.211.
82. Voragen AGJ, Coenen GJ, Verhoef RP, Schols H a. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct Chem*. 2009;20(2):263-275. doi:10.1007/s11224-009-9442-z.
83. Caffall KH, Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr Res*. 2009;344(14):1879-1900. doi:10.1016/j.carres.2009.05.021.
84. Lau JM, McNeil M, Darvill AG, Albersheim P. Treatment Of Rhamnogalacturonan I With Lithium In Ethylenediamine. *Carbohydr Res*. 1987;168:245-274. doi:10.1016/0008-6215(87)80029-0 51.
85. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:18-23. doi:10.1016/j.addr.2012.09.010.
86. Rother C, Nidetzky B. Enzyme Immobilization by Microencapsulation: Methods, Materials, and Technological Applications. In: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*.; 2014:1-21. doi:10.1002/9780470054581.eib275.
87. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials*. 2003;24(24):4337-4351. doi:10.1016/S0142-9612(03)00340-5.

88. Rowley J a., Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*. 1999;20(1):45-53. doi:10.1016/S0142-9612(98)00107-0.
89. Caló E, Khutoryanskiy V V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur Polym J*. 2015;65:252-267. doi:10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024.
90. Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev*. 2001;101(7):1869-1879. doi:10.1021/cr000108x.
91. Qiu Y, Park K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery ☆. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:49-60. doi:10.1016/j.addr.2012.09.024.
92. Munarin F, Tanzi MC, Petrini P. Advances in biomedical applications of pectin gels. *Int J Biol Macromol*. 2012;51(4):681-689. doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.07.002.
93. Luppi B, Bigucci F, Abruzzo A, Corace G, Cerchiara T, Zecchi V. Freeze-dried chitosan/pectin nasal inserts for antipsychotic drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010;75(3):381-387. doi:10.1016/j.ejpb.2010.04.013.
94. Liu L, Fishman ML, Kost J, Hicks KB. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*. 2003;24(19):3333-3343. doi:10.1016/S0142-9612(03)00213-8.
95. Opanasopit P, Apirakaramwong A, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Ruktanonchai U. Development and Characterization of Pectinate Micro/Nanoparticles for Gene Delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(1):67-74. doi:10.1208/s12249-007-9007-7.
96. Katav T, Liu L, Traitel T, Goldbart R, Wolfson M, Kost J. Modified pectin-based carrier for gene delivery: Cellular barriers in gene delivery course. *J Control Release*. 2008;130(2):183-191. doi:10.1016/j.jconrel.2008.06.002.
97. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM. Wound healing dressing and drug delivery systems: A review. *J Pharm Sci*. 2008;97(8):2892–2923. doi:10.1002/jps.21210.
98. Gómez L, Ramírez HL, Neira-Carrillo A, Villalonga R. Polyelectrolyte complex formation mediated immobilization of chitosan-invertase neoglycoconjugate on pectin-coated chitin. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2006;28(6):387-395. doi:10.1007/s00449-005-0043-y.
99. Chang R. Enzyme Kinetics. In: *Physical Chemistry for the Biosciences*. First. Sausalito, CA: University Science Books; 2005:363-400. doi:10.1002/9780470940020.
100. Copeland RA. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. Second. New York: Wiley-VCH, Inc.; 2000. doi:10.1021/jm020467f.

101. Fersht A. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. Second. New York: W. H. Freeman and Company; 1999. doi:10.1016/S0307-4412(99)00114-4.
102. Roig MG, Estevez FB, Velasco FG, Cachaza JM. Evaluation of the Main Factors Determining the Mode of action of Immobilized Enzymes. *Biochem Educ*. 1987;15(1):33-41. doi:10.1016/0307-4412(87)90147-6.
103. Hartmeier W. *Immobilized Biocatalysts - An Introduction*. Springer; 1988. doi:10.1007/978-3-642-73364-2.
104. Hartmeier W. *Immobilized Biocatalysts - An Introduction*. Berlin: Springer-Verlag; 1988. doi:10.1007/978-3-642-73364-2.
105. Liu J, Liu H, Zhang Y, et al. A simple preparation method of crystals of soybean hull peroxidase. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;74(1):249-255. doi:10.1007/s00253-006-0639-4.
106. Rosenbohm C, Lundt I, Christensen TMIE, Young NWG. Chemically methylated and reduced pectins: Preparation, characterisation by ¹H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties. *Carbohydr Res*. 2003;338(7):637-649. doi:10.1016/S0008-6215(02)00440-8.
107. Kim KS, Park SJ, Yang JA, et al. Injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogels for the treatment of rheumatoid arthritis. *Acta Biomater*. 2011;7(2):666-674. doi:10.1016/j.actbio.2010.09.030.
108. Cheng S, Huang A, Wang S, Zhang Q. Effect of different heat treatment temperatures on the chemical composition and structure of chinese fir wood. *BioResources*. 2016;11(2):4006-4016. doi:10.15376/biores.11.2.4006-4016.

Biografija autora

Miloš Prokopijević rođen je 15.04.1982. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Beogradu a Hemijski fakultet, Univerziteta u Beogradu upisao je 2001. godine na studijskoj grupi Biohemija. Diplomirao je 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,06 i ocenom 10 na diplomskom ispitu i stekao zvanje diplomirani biohemičar. Doktorske akademske studije upisao je 2010 godine na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu na studijskom programu doktor biohemijskih nauka.

Od januara 2011. godine zaposlen je kao istraživač pripravnik na Institutu za multidisciplinarna istraživanja, na odseku za nauke o živim sistemima. Iste godine u decembru prelazi u zvanje istraživač saradnik.

Od januara 2011. godine angažovan je na projektu „Ispitivanja odnosa struktura-funkcija u ćelijskom zidu biljaka i izmene strukture zida enzimskim inženjeringom“ pod brojem OI173017, finansiranom od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

Autor je pet radova štampanih u naučnim časopisima međunarodnog značaja od kojih su 3 iz kategorije M21 i po jedan u časopisima kategorija M22 i M23, 3 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima i jedno na skupu nacionalnog značaja.

Član je Srpskog hemijskog društva, Biohemijskog društva Srbije i Društva za fiziologiju biljaka Srbije.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani/a Miloš Prokopijević

Broj indeksa DB 29/2010

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Imobilizacija peroksidaze iz soje (Glycine max) na makroporoznom glicidil-metakrilatu i hemijski modifikovanom pektinu“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,

Potpis doktoranda



Miloš Prokopijević

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Miloš Prokopijević
Broj upisa DB 29/2010
Studijski program Doktor biohemijskih nauka
Naslov rada „**Imobilizacija peroksidaze iz soje (Glycine max) na makroporoznom glicidil-metakrilatu i hemijski modifikovanom pektinu**“
Mentor dr Radivoje Prodanović, vanredni profesor Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
Potpisani/a Miloš Prokopijević

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci, vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,

Potpis doktoranda



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Imobilizacija peroksidaze iz soje (Glycine max) na makroporoznom glicidil-metakrilatu i hemijski modifikovanom pektinu“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu, pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu, mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci).

U Beogradu,

Potpis doktoranda



1. Autorstvo – Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.