

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Nevena Ž. Prlainović

PROUČAVANJE MEHANIZMA ENZIMSKE
SINTEZE 4,6-DISUPSTITUISANIH-3-
CIJANO-2-PIRIDONA

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Nevena Ž. Prlainović

THE STUDY OF THE ENZYMATIC
SYNTHESIS MECHANISM OF 4,6-
DISUBSTITUTED-3-CYANO-2-
PYRIDONES

Doctoral Disertation

Belgrade, 2012

MENTOR:

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

MENTOR:

Dr Dejan Bezbradica, docent
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

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

Dr Aleksandar Marinković, docent
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Dr Nenad Milosavić, naučni saradnik
Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____

*„Ma kakvim znanjem ovladao tvoj um,
ne zastaj nikad u učenju – ni časa,
jer znaj: da prekidanja u učenju nema.“*

Abulkasim Firdusi

Zahvalnica

Ova disertacija urađena je na Katedri za organsku hemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Dušanu Mijinu na trudu, razumevanju i svesrdnoj pomoći koju mi je pružao tokom izrade ove disertacije.

Sa posebnim zadovoljstvom želim da zahvalim docentu dr Dejanu Bezbradici na aktivnom učestvovanju u planiranju eksperimenata, analizi dobijenih rezultata kao i svim drugim segmentima naučno-istraživačkog rada.

Najtoplije zahvaljujem prof. dr Zorici Knežević-Jugović na značajnim savetima koji su doprineli povećanju kvaliteta ove disertacije.

Takođe, želela bih da zahvalim docentu dr Aleksandru Marinkoviću koji mi je svojim velikim znanjem i iskustvom nesebično pomagao u eksperimentalnom radu i tumačenju rezultata.

Iskreno zahvaljujem dr Nenadu Milosaviću na dobronamernim sugestijama i korisnim savetima koji su značajno poboljšali završnu verziju ove teze.

Od srca zahvaljujem dr Dušanu Veličkoviću na upornosti da izoluje piridone, pomoći koja je značajno ubrzala pisanje teze i velikoj prijateljskoj podršci i ohrabrivanju.

Dr Milki Avramov Ivić i mr Sanji Stevanović zahvaljujem na AFM analizama i prijatnoj saradnji.

Koleginicama Jeleni Mirković, Jeleni Marković i Danijeli Brković i kolegama dr Nemanji Trišoviću i Bojanu Božiću hvala za prijatnu i radnu atmosferu na katedri.

Neizmerno hvala bratu Milošu na pronalaženju rešenja za sve tehničke probleme na koje sam naišla u procesu pisanja disertacije.

Najveće hvala mojim najbližima, mami Divni, ocu Željku, sestri Jeleni i suprugu Banetu što su sve vreme bili uz mene i podržavali me da istrajem u svojim ciljevima i onda kada mi je bilo najteže.

Proučavanje mehanizma enzimske sinteze 4,6-disupstituisanih-3-cijano-2-piridona

IZVOD

U okviru ove teze, pomoću lipaze iz *Candida rugosa*, sintetisani su 4,6-disupstituisani-3-cijano-2-piridoni. Najpre je, kao najprostiji molekul, sintetisan 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridon, a zatim i 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridon, koji predstavlja prekursor vitamina B₆. U cilju određivanja optimalnih uslova za njihovu sintezu metodom odzivnih površina (RSM) ispitan je uticaj tri reakciona faktora i to: temperature, molskog odnosa supstrata i koncentracije enzima. Nakon toga je, na utvrđenim optimalnim uslovima, ispitivana enzimska kinetika i na osnovu dobijenih rezultata, modelovanjem regresionim modelom drugog reda, utvrđeno da se ove reakcije mogu opisati ping-pong bi-ter modelom sa inhibicijom cijanoacetamidom.

U drugom delu disertacije ispitana je imobilizacija lipaze adsorpcijom ili kovalentnim vezivanjem na različite nosače. Imobilizacijom na višeslojne ugljenične nanocevi postignute su izuzetno velike količine vezanog enzima od čak 1,4 mg po 1 mg nosača. Ustanovljeno je da se adsorpcijom na nemodifikovane ugljenične nanocevi dobijaju imobilizati kod kojih je lipaza zadržala najveći procenat aktivnosti, i pri imobilizaciji u puferu veće jonske jačine iznosi i do 85 %. Imobilizati najveće ukupne aktivnosti dobijaju se vezivanjem na oksidovane nanocevi u uslovima koji promovišu kovalentno vezivanje.

Ispitivanjem imobilizata najboljih svojstava u reakciji sinteze 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona ustanovljeno je da se mogu postići visoki prinosi, a najveći s postižu sa lipazom imobilisanom na oksidovane nanocevi.

Ključne reči: lipaza iz *Candida rugosa*, 4,6-disupstituisani-3-cijano-2-piridoni, enzimska kinetika, imobilizacija enzima, višeslojne ugljenične nanocevi, Sephadex[®].

Naučna oblast: Hemija i hemijska tehnologija

Uža naučna oblast: Organska hemija

UDK broj:

The Study of the Enzymatic Synthesis Mechanism of 4,6-Disubstituted-3-cyano-2-pyridones

ABSTRACT

In this thesis, the mechanism of lipase catalyzed synthesis of 4,6-disubstituted-3-cyano-2-pyridones was studied, and for that purpose the simplest molecule, 4,6-dimethyl-3-cyano-2-pyridone, and vitamin B₆ precursor, 4-ethoxymethyl-6-methyl-3-cyano-2-pyridone, were synthesized. In order to find the optimal conditions for their synthesis a response surface methodology (RSM) was applied, and the influence of three reaction factors (temperature, enzyme concentration and substrate molar ratio) was investigated. After that, at determined optimal conditions, the kinetic study was performed and the obtained results showed that these reactions can be described with ping-pong bi-ter model with inhibition by cyanoacetamide.

The second part of the thesis was focused on the development of the immobilized enzyme with the best catalytic properties. Lipase was adsorbed or covalently bonded on different supports, and the highest enzyme loading, of 1.4 mg per 1 mg of support, was achieved with amino functionalized carbon nanotubes. It was found that immobilized preparations with the highest percentage of retained activity were obtained when lipase was adsorbed on unmodified carbon nanotubes in a high ionic strength buffer (up to 85 %). Immobilized enzymes with the highest total activity were obtained by binding lipase on oxidized carbon nanotubes under conditions that promote covalent binding.

Immobilized preparations with the best properties showed high catalytic activity in the synthesis of 4,6-dimethyl-3-cyano-2-pyridone.

Key words: lipase from *Candida rugosa*, 4,6-disubstituted-3-cyano-2-pyridones, enzyme kinetic, immobilization of enzyme, multiwalled carbon nanotubes, Sephadex[®].

Academic Expertise: Chemistry and Chemical Technology

Major in: Organic Chemistry

UDK number:

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO	3
2.1. PIRIDONI.....	3
2.1.1. Struktura i osnovna svojstva.....	3
2.1.2. Sinteza 2-piridona.....	4
2.1.3. Hemijska sinteza 4,6-disupstituisanih-3-cijano-2-piridona.....	6
2.1.4. Enzimaska sinteza 4,6-disupstituisanih-3-cijano-2-piridona	10
2.2. LIPAZE	13
2.2.1. Osnovna svojstva.....	13
2.2.2. Struktura i mehanizam delovanja	14
2.2.3. Lipaza iz <i>Candida rugosa</i>	17
2.2.4. Primena lipaza	19
2.3. KINETIKA VIŠESUPSTRATNIH REAKCIJA.....	22
2.3.1. Sekvencijale dvosupstratne reakcije sa nasumičnim vezivanjem supstrata	22
2.3.2. Sekvencijalne dvosupstratne reakcije sa pravilnim redosledom vezivanja supstrata.....	23
2.3.3. Ping-pong dvosupstratne reakcije.....	24
2.3.4. Razlikovanje mehanizama.....	25
2.3.5. Inhibicija supstratom u višku.....	26
2.4. IMOBILIZACIJA ENZIMA	28
2.4.1. Definicija, značaj i metodi imobilizacije.....	28
2.4.2. Imobilizacija enzima adsorpcijom.....	31
2.4.3. Kovalentna imobilizacija enzima	32
2.4.4. Nosači za imobilizaciju enzima.....	38

2.4.4.1. Višeslojne ugljenične nanocevi (MWCNT) kao nosači za imobilizaciju.....	39
2.4.4.2. SP Sephadex [®] C-25 kao nosač za imobilizaciju lipaze.....	41
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	43
3.1. Materijali, instrumenti i metodi.....	43
3.1.1. Materijali.....	43
3.1.2. Instrumenti.....	44
3.1.3. Metodi.....	45
3.1.3.1. Enzimaska sinteza piridona.....	45
3.1.3.2. Hemijska sinteza piridona.....	45
3.1.3.3. Sinteza etoksiacetilacetona.....	45
3.1.3.4. Sinteza <i>N</i> -supstituisanih cijanoacetamida.....	46
3.1.3.5. Uvođenje karboksilnih grupa na površinu ugljeničnih nanocevi.....	46
3.1.3.6. Uvođenje amino grupa na površinu ugljeničnih nanocevi.....	47
3.1.3.7. Imobilizacija lipaze na nemodifikovane višeslojne ugljenične nanocevi.....	47
3.1.3.8. Imobilizacija lipaze na oksidovane višeslojne ugljenične nanocevi.....	47
3.1.3.9. Imobilizacija lipaze na amino funkcionalizovane višeslojne ugljenične nanocevi.....	48
3.1.3.10. Imobilizacija lipaze na SP Sephadex [®] C-25.....	49
3.1.3.11. Određivanje aktivnosti lipaze pomoću <i>p</i> -nitrofenilpalmitata kao supstrata.....	49
3.1.3.12. Određivanje sadržaja proteina metodom po Bradford-u.....	50
3.1.3.13. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC).....	50
3.1.3.14. Furijeova transformacijska infracrvena spektroskopija (FT-IR).....	51
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	52
4.1. Ispitivanje enzimske sinteze 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona.....	52

4.1.1.	Optimizacija reakcionih parametara	52
4.1.2.	Proučavanje mehanizma enzimske sinteze	57
4.2.	Ispitivanje enzimske sinteze 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona.....	64
4.2.1.	Optimizacija reakcionih parametara	64
4.2.2.	Proučavanje mehanizma enzimske sinteze	70
4.3.	Poređenje kinetike sinteze 4-metil- i 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona	76
4.4.	Uticaj strukture <i>N</i> -alkilcijanoacetamida na sintezu <i>N</i> -alkil-4,6-dimetil-3- cijano-2-piridona	78
4.5.	Imobilizacija lipaze na višeslojne ugljenične nanocevi.....	81
4.5.1.	Adsorpcija lipaze na nemodifikovane MWCNT	81
4.5.1.1.	Adsorpcija u 50 mM fosfatnom puferu	81
4.5.1.2.	Adsorpcija u 500 mM fosfatnom puferu	91
4.5.2.	Poređenje adsorpcije na n-MWCNT u 50 i 500 mM puferu	95
4.5.3.	Imobilizacija lipaze na oksidovane ugljenične nanocevi	97
4.5.4.	Imobilizacija lipaze na amino funkcionalizovane ugljenične nanocevi .	103
4.5.5.	Poređenje efikasnosti primenjenih postupaka imobilizacije lipaze na višeslojne ugljenične nanocevi	111
4.6.	Imobilizacija lipaze na SP Sephadex [®] C-25.....	114
4.7.	Poređenje katalitičke efikasnosti lipaze imobilisane na različite nosače u reakciji sinteze 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona	117
5.	ZAKLJUČAK.....	119
6.	LITERATURA	121
7.	BIOGRAFIJA AUTORA	132
8.	IZJAVA O AUTORSTVU	133
9.	IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE RADA	133

10. IZJAVA O KORIŠĆENJU 135

1. UVOD

Sinteza 2-piridonovog prstena i njegovih derivata je oblast rastućeg interesovanja zbog velikog udela ovih struktura u biološki aktivnim molekulima. Derivati 3-cijano-2-piridona su značajni bilo kao krajnji proizvodi, ili kao intermedijeri u sintezi složenijih jedinjenja. Jedinstvena svojstva koja poseduju pružaju mogućnost njihove upotrebe ne samo u proizvodnji boja, pigmenata, goriva i aditiva za goriva,^[1] već i u sintezi različitih derivata koji imaju širok spektar biološke aktivnosti.^[2-4] Derivatima koji imaju kardiotoničnu, kardiovaskularnu i koronarnu aktivnost pridaje se veliki značaj, i iz ove grupe jedinjenja proistekli su komercijalni lekovi Milrinone[®] i Amrinone[®].^[5, 6]

4,6-Dialkil-3-cijano-2-piridoni, čija će sinteza biti predmet ovog rada, predstavljaju prekursore u sintezi fiziološki aktivnih jedinjenja,^[7-9] kao i aktivne komponente lekova za povećanje snage srčane kontrakcije bez ubrzavanja rada srca i koriste se za lečenje kongestivne srčane insuficijencije.^[10] Do danas su u literaturi opisani različiti načini sinteze ovih jedinjenja i svi se odvijaju u prisustvu hemijskih katalizatora.

Enzimski katalizovane reakcije poslednjih godina privlače sve veću pažnju u organskoj hemiji i sve češće zamenjuju skupe i zametne hemijske metode koji podrazumevaju visoke temperature, toksične katalizatore, veliki utrošak energije i veliku količinu otpadnog materijala. Upravo ovi nedostaci mogu se prevazići upotrebom enzima kao katalizatora koji ubrzavaju hemijske reakcije pod veoma blagim uslovima temperature, pH i pritiska, a kao hiralni katalizatori omogućavaju sintezu optički čistih jedinjenja, pri čemu visoka specifičnost eliminiše nastajanje sporednih proizvoda reakcije.

U prvom delu ove disertacije biće sintetisani 4,6-dialkil-3-cijano-2-piridoni u prisustvu lipaze iz *Candida rugosa* kao katalizatora. Najpre će se ispitati kondenzacija cijanoacetamida i acetilacetona pri čemu se dobija najprostiji, 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridon. Zatim će se, zbog njegovog značaja u biološkim sistemima, sintetisati 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridon, prekursor vitamina B₆. U cilju određivanja optimalnih uslova za njihovu sintezu metodom odzivnih površina (RSM) ispitaće se uticaj tri reakciona faktora i to: temperature, molskog odnosa supstrata i koncentracije enzima. Dalje će se, pod optimalnim uslovima, ispitivati enzimska kinetika i na osnovu dobijenih rezultata izvršiće se modelovanje regresionim modelom drugog reda kako bi se utvrdio kinetički model kojim se mogu opisati ove reakcije. Kinetički parametri i

pretpostavljeni mehanizam nastajanja 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona enzimskim putem biće upoređeni sa parametrima i mehanizmom nastajanja 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona.

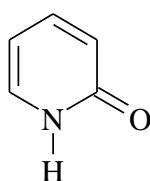
S obzirom na veliki broj poteškoća pri upotrebi nativnih enzima, poput nedovoljne stabilnosti, i nemogućnosti ponovne upotrebe, drugi deo ove disertacije biće posvećen razvoju efikasnog imobilisanog sistema. U tom cilju enzim će se imobilisati adsorpcijom ili kovalentnim vezivanjem na različite nosače. Imobilizati najboljih svojstava biće ispitani u reakciji sinteze 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona i upoređeni sa aspekta prinosa proizvoda i produktivnosti.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. PIRIDONI

2.1.1. Struktura i osnovna svojstva

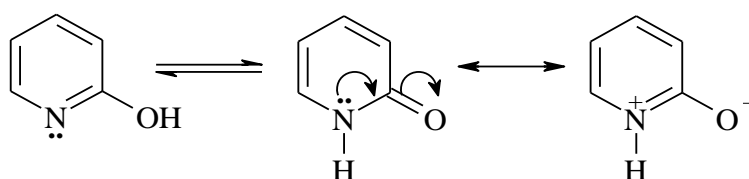
2-Piridon (2-oksopirimidin, α -piridon) je derivat piridina molekulske formule C_6H_5NO .



Slika 2.1. 2-Piridon.

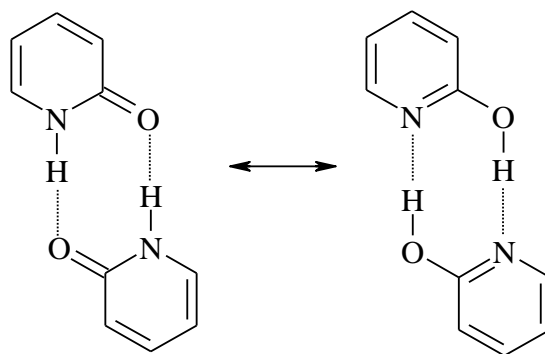
Uzimajući u obzir opšta strukturna svojstva ovih jedinjenja (slika 2.1), prisustvo $-NH-C(=O)-$ grupe u dominantnom, piridon, tautomernom obliku odgovorno je za njihova izuzetna fizička i hemijska svojstva. Amidna veza kojom su, u molekulima proteina, povezane aminokiseline veoma je slična amidnoj grupi u molekulu 2-piridona, i vodonik vezan za azot može graditi snažnu vodoničnu vezu sa drugim molekulima koji sadrže azot ili kiseonik. Stoga je za očekivati da je fiziološka aktivnost velikog broja derivata piridona posledica elektrostatičkih interakcija sa receptorima u tkivima živih organizama.

2-Piridon je klasičan primer molekula koji pokazuje laktam/laktim ravnotežu tautomernih oblika i zbog toga je već dugo predmet ispitivanja brojnih studija.^[11-13] Vodonik koji je u 2-piridonu (laktam oblik) vezan za azot može preći na kiseonik pri čemu se formira tautomer 2-hidroksipiridin (laktim oblik) kao što je prikazano na slici 2.2.



Slika 2.2. Tautomerna ravnoteža 2-piridon/2-hidroksipiridin.^[14]

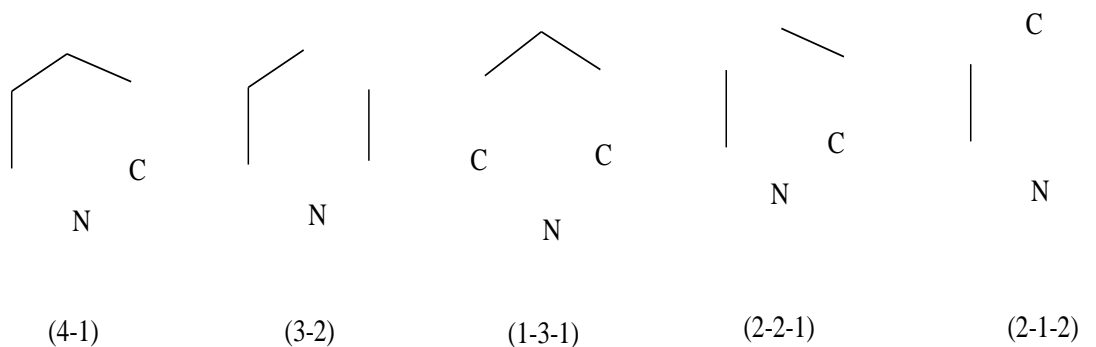
Spektroskopska merenja pokazala su da je u gasnoj fazi uglavnom prisutan laktim (hidroksi) oblik. U nepolarnim rastvaračima, kao što su cikloheksan i hloroform, postoje ravnotežne količine tautomernih oblika, za razliku od polarnih rastvarača, kao što je voda, kada je tautomerna ravnoteža potpuno pomerenjena u korist laktam (okso) oblika. Takođe, u rastvoru dolazi do dimerizacije i njen udeo zavisi od polarnosti rastvarača (slika 2.3).^[15] Kao i u polarnim rastvaračima, u čvrstom stanju dominantan je okso oblik. Ovo je potvrđeno kristalografski i infracrvenom (IR) spektroskopijom. U čvrstoj fazi ne dolazi do dimerizacije, već do formiranja jakih intermolekulskih vodoničnih veza između azota jednog molekula i kiseonika drugog molekula. Na ovaj način se, u čvrstom stanju, molekuli povezuju u beskonačan heliks.^[14]



Slika 2.3. Formiranje dimera uspostavljanjem vodoničnih veza.^[15]

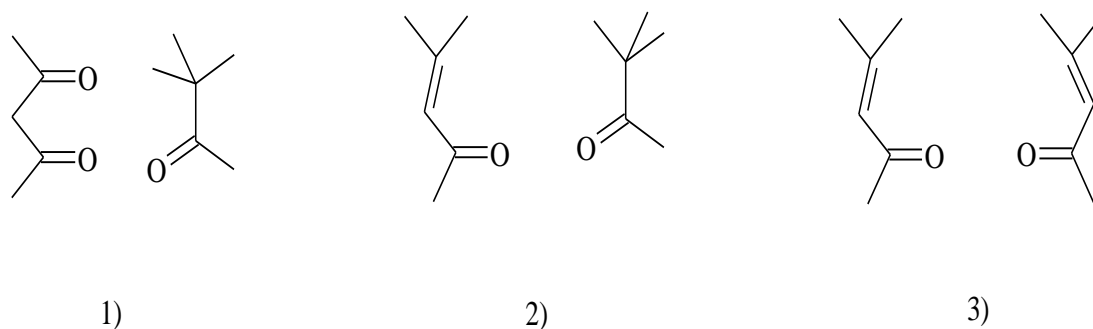
2.1.2. Sintaza 2-piridona

Derivati piridina mogu se sintetisati na različite načine. Mehanizmi sinteze se razvrstavaju prema veličini fragmenata ugljenikovog niza koji ulaze u sastav piridonovog jezgra (slika 2.4), pa tako postoje 4-1, 3-2, 1-3-1, 2-2-1, 2-1-2 kondenzacije.^[16]



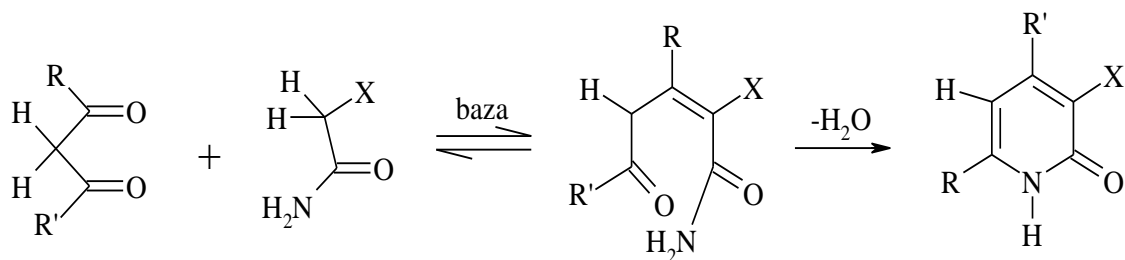
Slika 2.4. Vrste kondenzacije u zavisnosti od veličine ugljenikovih fragmenata.

Derivati 2-piridona se najlakše sintetišu kondenzacijom tipa 3–2 i fragmenti koje je moguće kombinovati prikazani su na slici 2.5.



Slika 2.5. Moguće kombinacije reaktanata za kondenzacije tipa 3–2.^[16]

Molekuli sa tri ugljenikova atoma mogu da budu: β-ketoaldehidi, β-ketoestri, β-diketoni ili njihovi derivati. Molekuli sa dva ugljenikova atoma mogu da sadrže estarske, amidne ili nitrilne funkcionalne grupe. Mehanizam kondenzacije 2-piridona može se uopšteno opisati kao adicija karbanjona na karbonilnu grupu i to podrazumeva reakcije kao što su Knevenagelova (Knoevenagel), Mihaelova (Michael) i Perkinova (Perkin) kondenzacija, pri čemu stepen enolizacije diokso jedinjenja određuje veće učešće Mihaelove adicije.^[17] Opšta šema Knevenagelove adicije prikazana je na slici 2.6.



Slika 2.6. Knevenagelova reakcija pri sintezi 2-piridona.

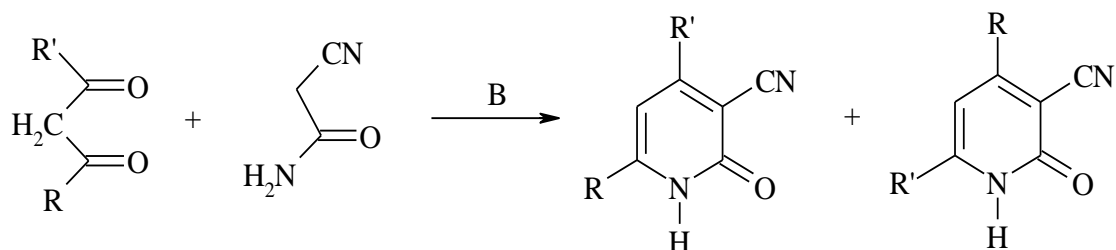
Karbanjon, nastao eliminacijom α -kiselog protona, napada elektrofilni karbonilni ugljenik diketo jedinjenja pri čemu on postaje ugljenikov atom u položaju 4 piridonovog jezgra. Karbanjon sadrži neku elektron akceptorsku grupu koja ga stabilizuje. Ta grupa može biti -CHO, -COR, -COOR, -CN, -CONH₂, -NO₂ i druge.

Sinteza 2-piridona iz cijanoacetamida i 1,3-diketona poznata je kao Guareši-Torpeova (Guareschi-Thorpe) sinteza.

2.1.3. Hemijska sinteza 4,6-disupstituisanih-3-cijano-2-piridona

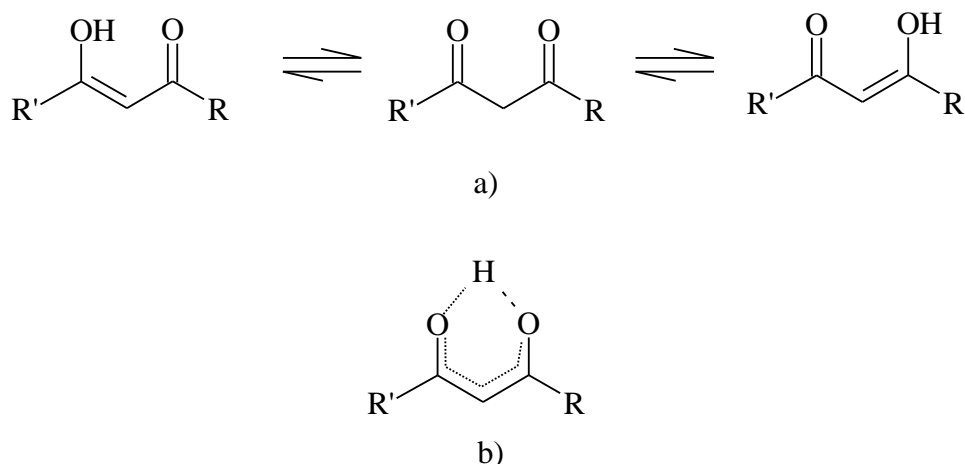
Originalna Guareši-Torpeova sinteza 2-piridona,^[18] primenjena je za sintezu velikog broja piridona. Derivati 2-piridona dobijaju se u reakciji kondenzacije acikličnih jedinjenja, cijanoacetamida i 1,3-dikarbonilnih jedinjenja, u baznoj sredini.^[19-21] Reakcija se može izvoditi u prisustvu različitih katalizatora, rastvarača kao i polaznih 1,3-dikarbonilnih jedinjenja. Kao katalizatori koriste se sekundarni amini (piperidin, dietilamin), alkalni hidroksidi (natrijum-hidroksid, kalijum-hidroksid), alkalni karbonati (natrijum-karbonat, kalijum-karbonat) ili katalizatori za međufaznu katalizu. Slabija baza, kao što je kalijum-karbonat je pogodnija i pri kraćem reakcionom vremenu dobijaju se bolji prinosi i čistiji proizvod. Međufazni katalizatori nisu dali očekivane rezultate u pogledu prinosa i selektivnosti reakcije. Kao rastvarač se obično koristi etanol, mada se mogu koristiti i drugi kao što su voda ili heksan. Kondenzacijom acetilacetona sa cijanoacetamidom u prisustvu kalijum-karbonata u ključalom etanolu, dobija se 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridon u prinosu od 87 %, ^[22] a u heksanu u prisustvu natrijum-hidroksida 81,1%.^[19] Poznato je da se pri kondenzaciji sa simetričnim dikarbonilnim jedinjenjima (R'=R) dobija jedan proizvod, a pri kondenzaciji sa

asimetričnim dikarbonilnim jedinjenjima dobija smeša proizvoda. Opšta šema reakcije data je na slici 2.7.

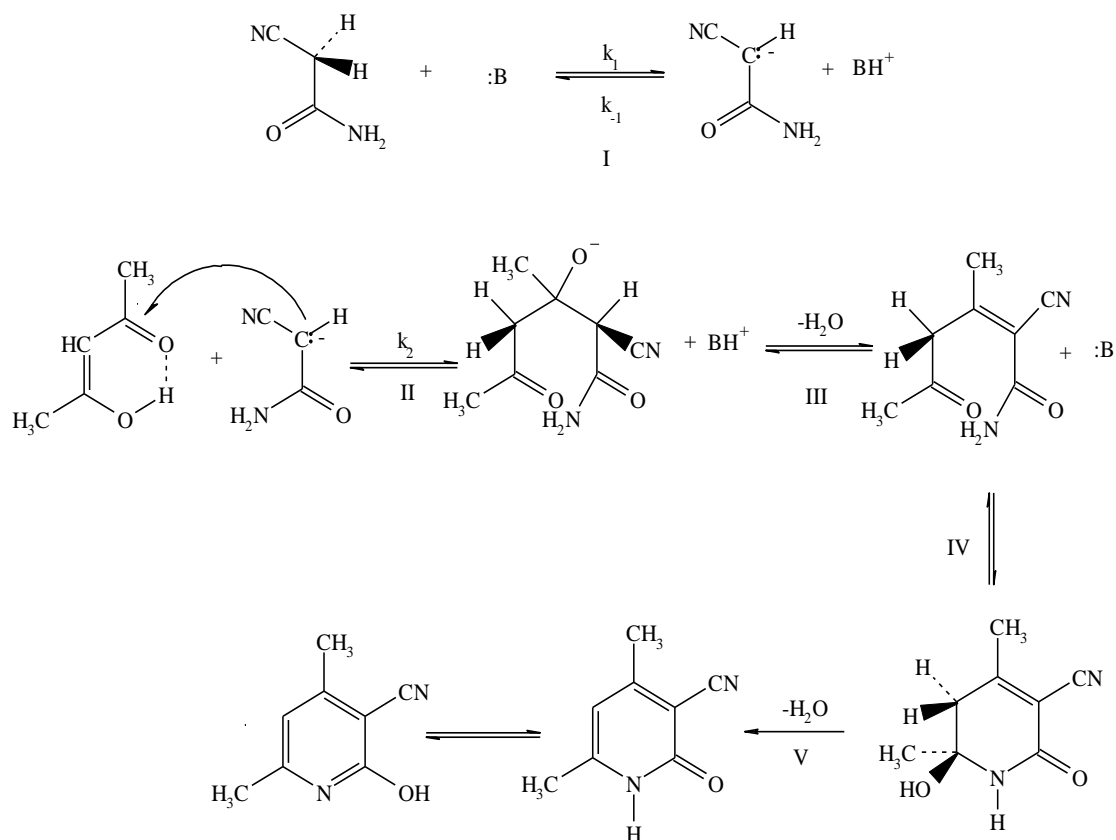


Slika 2.7. Opšta šema reakcije kondenzacije 1,3-diketona i cijanoacetamida katalizovane bazom.

Kako karbanjon, nastao iz cijanoacetamida, u prvom koraku reakcije napada elektronima deficitarniji karbonilni ugljenik, od prirode supstituenata 1,3-dikarbonilnog jedinjenja zavisice orijentacija supstituenata u krajnjem proizvodu. Ugljenikov atom karbonilne grupe napadnute u prvom koraku nalazi se u položaju 4 piridonovog jezgra. U reakcijama nesimetričnih diketona: 2,4-heksandiona, 5-metil-2,4-heksandiona i 5,5-dimeil-2,4-heksandiona sa cijanoacetamidom nastaje isključivo proizvod kod koga se voluminoznija alkil-grupa, etil-, izopropil- i *terc*-butil-, nalazi u položaju 4 piridonovog jezgra,^[23] što nije u skladu sa istraživanjima u kojima je utvrđeno da se voluminoznija grupa, usled sternih efekata, nalazi u položaju 6. Ovakva orijentacija supstituenata u krajnjem proizvodu objašnjava se postojanjem tautomernih oblika 1,3-diketona u rastvorima (slika 2.8 a)). Najpogodnija konformacija 1,3-diketona je ona u kojoj su keto grupe najudaljenije jedna od druge. Ukoliko je prisutan voluminozni supstituent, enolizacija se dešava jako brzo. NMR proučavanja pokazala su da doprinos enolne strukture raste kako se povećava račvanje alkil supstituenta. Infracrveni spektri diketona ne pokazuju normalnu apsorpciju konjugovanih ketona, već nam ukazuju na intramolekulsku vodoničnu vezu, stabilizovanu rezonancijom.^[17] U slučajevima kada je moguće da se nagradi stabilna intramolekulska vodonična veza, vodonikov atom se pojavljuje kao član stabilnog šestočlanog prstena, i gradi vodonične veze sa kiseonicima iz obe karbonilne grupe (slika 2.8. b)). Ovakva pojava može se objasniti i sa stanovišta hiperkonjugacije, jer je metil-grupa bolji elektron donor u odnosu na izopropil- i *terc*-butil-grupu.

Slika 2.8. Keto–enol tautomerija 1,3-dikarbonilnih jedinjenja.^[15]

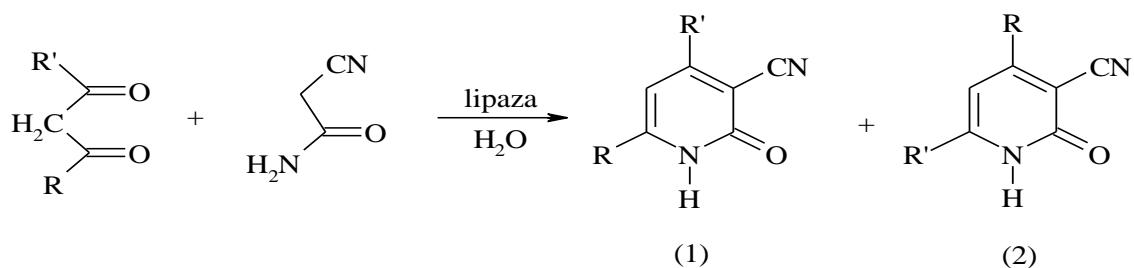
Mehanizam reakcije kondenzacije 1,3-diketona i cijanoacetamida u prisustvu baznih katalizatora ispitivan je primenom UV-vis spektrofotometrije i određivanjem kinetičkih i termodinamičkih parametara u potpunosti je rasvetljen.^[19] Šematski prikaz mehanizma dat je na slici 2.9. Prvi korak reakcije je kiselo-bazna ravnoteža katalizatora i cijanoacetamida u kojoj nastaje nukleofilna čestica. Ravnoteža se odvija veoma brzo i pomerenjena je u stranu nastajanja proizvoda, što potvrđuju vrednosti konstanti brzine $k_1 \ll k_{-1}$. Nakon toga sledi napad nukleofila na diketon. U zavisnosti od toga da li se napad vrši na keto grupu diketone jedinjenja ili na dvostruku vezu enolnog oblika radi se o Knevenagelovoj ili Mihaelovoj kondenzaciji. Na ovo pitanje još uvek nije dat definitivan odgovor. Međutim, bez obzira na moguće mehanizme, reakcija karbanjona cijanoacetamida sa karbonilnom grupom diketona, predstavlja najsporiji stupanj reakcije, što potvrđuje visoka negativna vrednost entropije reakcije aktivacije ($\Delta S = -199 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). Naredni koraci, protonovanje-dehidratacija i ciklizacija (III i IV) su brzi i pomerenjeni u stranu nastajanja proizvoda, a poslednji stupanj (V) u kojem nastaje stabilno piridonovo jezgro je bez sumnje ireverzibilan.^[20]



Slika 2.9. Mehanizam bazno katalizovane kondenzacije 1,3-diketona sa cijanoacetamidom.^[20]

Nedostaci hemijske sinteze su mnogobrojni, a neki od njih su: visoka temperatura, produženo zagrevanje, upotreba veoma jakih baza i generalno dobijanje nečistog čvrstog proizvoda. Upotrebom enzima prevazilaze se ovi problemi i u vodenom rastvoru, na relativno niskoj temperaturi pri neutralnim pH vrednostima dobijaju se čisti piridoni.

2.1.4. Enzimska sinteza 4,6-disupstisuanih-3-cijano-2-piridona



Slika 2.10. Opšta šema reakcije kondenzacije 1,3-diketona i cijanoacetamida katalizovane lipazom.

4,6-Disupstisuani-3-cijano-2-piridoni mogu biti sintetisani i u reakciji kondenzacije 1,3-diketona i cijanoacetamida u prisustvu enzima kao katalizatora. Kao enzim koristi se lipaza, npr. iz *Candida rugosa*, reakcija se odvija u vodenoj sredini i za odigravanje reakcije neophodan je moljski višak cijanoacetamida. U dosadašnjim istraživanjima ispitivana je sinteza različitih dialkil-,^[24] i aril-metil-supstisuanih 1,3-diketona,^[25] uticaj supstisuenata, kao i kinetika enzimski katalizovane reakcije.^[26, 27] Kao što je već rečeno, ukoliko se sinteza izvodi iz asimetričnih 1,3-diketona nastaje smeša izomera. Međutim, ispitivanjem uticaja različitih alkil-supstisuenata 1,3-diketona utvrđeno je da pri enzimskoj sintezi nastaje isključivo jedan izomer i to onaj kod kojeg se voluminoznija alkil-grupa nalazi u položaju 4 piridonovog jezgra. U tabeli 2.1 dat je odnos izomera koji nastaju iz asimetričnih 1,3-diketona, u enzimski katalizovanoj reakciji.

Tabela 2.1. Odnos izomera koji nastaju iz asimetričnih 1,3-diketona

R'	R	Odnos (1)/(2)*
Me	Me	1
Me	Et	0
Me	n-Pr	0
Me	i-Pr	0
Me	n-Bu	0,1
Me	i-Bu	0
Me	i-Bu	0

*Slika 1.10

I u slučaju aril-metil-supstituisanih 1,3-diketona nastaje samo jedan izomer, ali se fenil-grupa nalazi u položaju 6 heterocikličnog prstena. Kada se uporede odnosi izomera nastalih u enzimskoj i hemijskoj sintezi, dati u tabeli 2.2, može se videti da prednost enzimske katalize, u odnosu na hemijsku, leži i u regioselektivnosti i da isključivo nastaje izomer kod kojeg je fenil- ili supstituisana fenil-grupa u položaju 6 piridonskog prstena. Jedini izuzetak je u slučaju jakih elektron akceptorskih grupa vezanih za fenil-grupu (*p*-NO₂ i *m*-NO₂), kada nastaje smeša izomera. Najverovatnije, vezivanje diketona za aktivni centar enzima favorizuje enolizaciju, uobičajenu za 1,3-diketone, i usmerava nukleofilni napad na manje aktivnu metil supstituisanu karbonilnu grupu, što za posledicu ima ovakvu orijentaciju.

Tabela 2.2. Odnos izomera u slučaju aril-metil supstituisanih 1,3-diketona

R'	R	(2)/(1)* odnos pri enzimskoj katalizi	(2)/(1)* odnos pri hemijskoj katalizi
Me	Ph	samo 1	0,66
Me	<i>m</i> -NO ₂ C ₆ H ₄	0,67	0,88
Me	<i>p</i> -NO ₂ C ₆ H ₄	1,5	1,5
Me	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄	samo 1	0,33
Me	<i>p</i> -MeOC ₆ H ₄	samo 1	0,01
Me	<i>p</i> -BrC ₆ H ₄	samo 1	0,01

*Slika 1.10

Poslednjih godina postoji veliko interesovanje za izvođenje enzimskih sinteza u organskim rastvaračima. Kada se reakcija kondenzacije cijanoacetamida i 1,3-diketona izvodi u etil-acetatu, *n*-butil-acetatu, 2-butanonu, *n*-heksanu i hloroformu nema enzimske aktivnost u toku 2 h. Dodatkom vode reakcija je inicirana, što pokazuje da je voda ključna za enzimsku aktivnost i da se ne može izvoditi samo u organskom rastvaraču.^[26]

Ispitivanjem uticaja molskog odnosa cijanoacetamida i diketona utvrđeno je da je za odigravanje reakcije neophodan molski višak cijanoacetamida, kao i da taj odnos raste sa povećanjem broja ugljenikovih atoma u molekulu diketona (tabela 2.3).^[26]

Tabela 2.3. Optimalni moljski odnosi cijanoacetamid/1,3-diketon

1,3-diketon	Odnos cijanoacetamid/1,3-diketon
2,4-pentandion	44
2,4-heptandion	80
5-metil-2,4-heksandion	110
6-metil-2,4-heksandion	240

U cilju boljeg razumevanja kinetike enzimske sinteze 4,6-disupstituisanih-3-cijano-2-piridona izračunate su kinetičke konstante kao i aktivacioni parametri. Kinetičke konstante (V_{\max} i K) ukazale su na alosteričnu enzimsku kinetiku, dok su aktivacioni parametri (E_a , ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger) ukazali na Mihaelis–Menteninu (Michaelis–Menten) kinetiku. Pretpostavljeno je da se diketon, kao slabija kiselina, vodoničnim vezama vezuje za aktivni centar enzima, dok se mnogo kiselijci cijanoacetamid, prethodno aktiviran u reakciji sa baznim delom aktivnog centra enzima, vezuje naknadno. Stoga je pretpostavljeni mehanizam enzimski katalizovane sinteze bio veoma sličan utvrđenom mehanizmu sinteze katalizovane bazama. Ispitivanje uticaja alkil-grupa u seriji 3-alkil-2,4-pentandiona i *N*-alkilcijanoacetamida ukazalo je da je i u slučaju enzimski katalizovane sinteze vezivanje diketona spori stupanj reakcije. Generalno, voluminozne alkil-grupe smanjuju početnu brzinu reakcije i prinos odgovarajućih piridona i u seriji 3-alkil-2,4-pentandiona i *N*-alkilcijanoacetamida. Međutim, početne brzine u seriji *N*-alkilcijanoacetamida su veće u poređenju sa početnim brzinama prilikom variranja alkil-grupe u 3-alkil-2,4-pentandionu.

Enzimska kinetika je veoma slabo proučena i ne postoji definitivan zaključak o mehanizmu enzimski katalizovane reakcije. Većina proračunatih parametara odgovarala je Mihaelis-Menteninoj kinetici, iako je veza početne brzine reakcije sa početnom koncentracijom supstrata ukazivala na alosterično ponašanje.

2.2. LIPAZE

2.2.1. Osnovna svojstva

Lipaze (triacilglicerol-acil hidrolaze, EC 3.1.1.3) su enzimi koji katalizuju hidrolizu triacilglicerola do diacilglicerola, monoacilglicerola, glicerola i masnih kiselina. Iako je njihova primarna funkcija katalizovanje hidrolize estarske veze u estrima glicerola, pod određenim uslovima lipaze mogu da katalizuju i povratnu reakciju esterifikacije. Lipaze su najčešće korišćeni enzimi u sintetskoj organskoj hemiji gde katališu hemo-, regio- i/ili stereoselektivnu hidrolizu i sintezu estara karboksilnih kiselina. Koriste se za razdvajanje racemskih smeša alkohola, kiselina, estara ili amina.^[28-33] Od skora se nekonvencionalni procesi, kao što su aldolna kondenzacija ili Mihaelova adicija izvode pomoću lipaza.^[34, 35] Lipaze mogu biti katalizatori i u reakcijama u kojima učestvuju derivati karboksilnih kiselina, kao što su amidi,^[36] šećerni estri,^[37] ili tioestri.^[38]

Lipaze su svuda prisutne u prirodi i produkuju ih različite biljke, životinje i mikroorganizmi. U biljnom svetu lipaza ima u semenju, plodovima i podzemnim delovima biljaka. U životinjskom organizmu su naročito prisutne u pankreasnom i crevnom soku, gde pomažu digestiju masti. Najpoznatija animalna lipaza je pankreasna lipaza. Lipaze mikrobnog porekla imaju najveći biotehnološki značaj. Produkuju ih bakterije iz rodova *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Staphylococcus*, zatim kvasci iz rodova *Candida* i *Torulopsis*, kao i plesni *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotrichum* i *Mucor*.

U zavisnosti od porekla, lipaze imaju različita fizičko-hemijska svojstva. Generalno, lipaze mikrobnog porekla imaju pH optimum u neutralnoj,^[39, 40] ili blago alkalnoj sredini,^[41, 42] mada mogu biti aktivne u širokom opsegu pH vrednosti od 3–12.^[43, 44] Tako lipaze iz *Pseudomonas* vrsta ispoljavaju najveću aktivnost u alkalnoj sredini pri pH vrednosti od 8,5 do 9,5, dok fungalne lipaze iz *A. niger* i *R. delemar* ispoljavaju maksimalnu aktivnost u kiseloj sredini. Animalne i biljne lipaze su obično manje termostabilne od ekstracelularnih mikrobnih lipaza,^[45] čiji se temperaturni optimum kreće između 30–60°C.^[46] Međutim, postoje i lipaze sa znatno nižim i višim temperaturnim optimumom. Nekoliko lipaza iz roda *Pseudomonas* stabilno je nekoliko

sekundi na temperaturi preko 150 °C,^[47] a visoko termostabilna lipaza izolovana iz *Bacillus stearothermophilus* ima poluvreme života od 15–25 minuta na 100 °C.^[48-51]

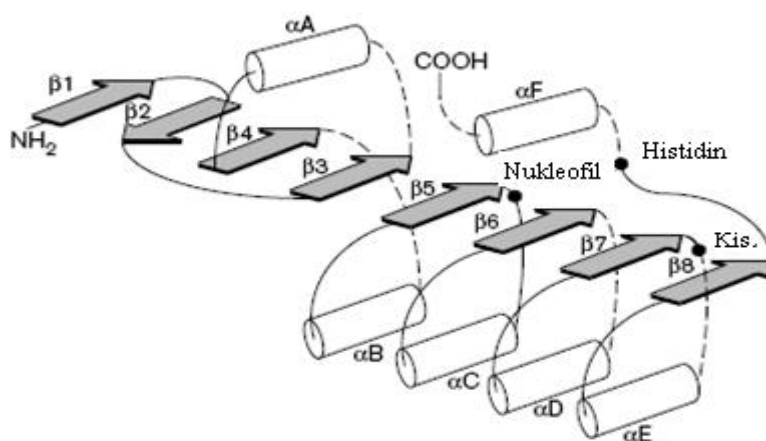
Za ispoljavanje katalitičke aktivnosti lipaze ne zahtevaju prisustvo kofaktora, ali dvovalentni katjoni, kao što je kalcijum, obično imaju pozitivan uticaj.^[52] Nasuprot tome teški metali kao što su Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} i Sn^{2+} drastično, a Zn^{2+} i Mg^{2+} blago inhibiraju katalitičku aktivnost lipaze.^[53]

2.2.2. Struktura i mehanizam delovanja

Lipaze spadaju u klasu hidrolaza i njihova primarna funkcija je hidroliza estarske veze u molekulu triacilglicerola i drugih supstrata. Osnovna karakteristika koja ih razdvaja od esteraza je svojstvo da su lipaze aktivne na granici hidrofilne i hidrofobne faze, zbog čega pokazuju karakteristično ponašanje i mehanizam delovanja. Imaju veoma složen katalitički mehanizam i dobijanjem trodimenzionalnih slika i određivanjem kristalne strukture lipaza omogućeno je njegovo rasvetljavanje.^[54-56] Naime, najveći broj enzima koji pripadaju ovoj grupi poseduje peptidni lanac (u formi α -heliksa) koji u vodenom rastvoru zaklanja aktivni centar što ga čini nedostupnim za molekule supstrata. Ovaj peptidni lanac ima amfifilne osobine i u vodenoj sredini polarne grupe su okrenute ka medijumu dok su nepolarne grupe okrenute ka unutrašnjosti enzima i stvaraju interakcije sa nepolarnim grupama aktivnog centra. Ovo se naziva neaktivna ili zatvorena konformacija. U prisustvu nepolarne supstance dolazi do konformacionih promena tj. do povlačenja peptidnog lanca i otvaranja aktivnog centra, koji postaje dostupan molekulima supstrata. Ovo je otvorena, odnosno aktivna konformacija. Položaj poklopca, njegov sastav, dužina i oblik razlikuju se kod lipaza različitog porekla. Postoje lipaze kod kojih peptidni lanac samo u određenoj meri prekriva aktivni centar,^[57] i lipaze koje ne poseduju peptidni lanac i ne podležu aktivaciji na granici faza.^[58]

Molarna masa do sada poznatih lipaza kreće se u opsegu od 20 kDa (lipaza iz *Bacillus subtilis*) do 60 kDa (lipaza iz *Geotrichum candidum*).^[35] Primarna struktura lipaza određena je sekvencionom analizom samog proteina ili odgovarajućeg gena. Broj aminokiselinskih ostataka u molekulu lipaze varira u vrlo širokom opsegu između 270 i 640.^[59] Uprkos razlici u primarnoj strukturi, sve poznate lipaze imaju isti strukturni

obrazac, identičan katalitički mehanizam i svrstavaju se u α/β hidrolaze. Centralni deo α/β hidrolaza čine β -nabrane ploče. Najčešće ih je osam (mada se broj može kretati od 5 do 10), uglavnom su paralelne (samo je $\beta 2$ ploča antiparalelna) i sa obe strane su okružene α -heliksima. Aktivni centar α/β hidrolaza se uvek sastoji od sledeće trijade: **nukleofila** (serin, cistein ili asparaginska kiselina), koji je smešten posle $\beta 5$ ploče, **ostatka kiseline** (asparaginska ili glutaminska), gotovo uvek smeštenog posle $\beta 7$ ploče i **histidina** lociranog nakon poslednje β ploče.^[60]

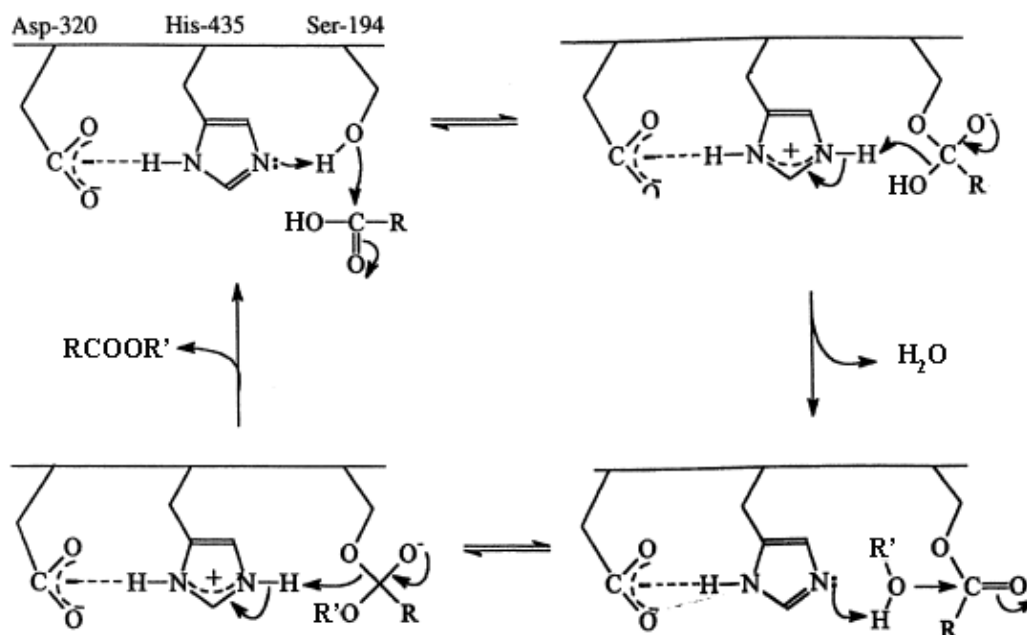


Slika 2.11. Sekundarna struktura α/β hidrolaza.^[60]

Nukleofil je uvek lociran u takozvanom „laktu“, gde je lako dostupan molekulima supstrata. Kod većine lipaza to je ostatak serina pa se lipaze svrstavaju u serin hidrolaze. Nukleofilni lakat je identifikovan kao niz Gly-X-Ser-X-Gly (u retkim slučajevima ostatak glicina može biti zamenjen nekim drugim ostatkom). Ostatak kiseline iz aktivnog centra lociran je obično nakon $\beta 7$ ploče, mada su kristalografska proučavanja pokazala da može biti lociran i nakon $\beta 6$ ploče.^[61, 62] Takođe je zapaženo da se kod α/β hidrolaza umesto asparaginske može naći glutaminska kiselina kao kod lipaza iz *Candida rugosa* i *Geotrichum candidum*. Ostatak histidina je član katalitičke trijade koji uvek postoji, iako se oblik i dužina lanca na kojem je smešten razlikuju među različitim članovima familije.^[60]

Mehanizam reakcije katalizovane lipazama prikazan je na slici 2.12. Prvi korak je formiranje oksianjona, eliminacijom protona sa molekula serina na histidin, koji napada karbonilni ugljenik u molekulu supstrata. Tetraedarski intermedijer koji se formira nosi negativno naelektrisanje na kiseoniku i stabilizovan je vodoničnim vezama sa susednim

aminokiselinama. Nakon toga, elektroni sa atoma kiseonika prelaze na karbonilni ugljenikov atom, a proton sa histidina prelazi na kiseonik i formira molekul vode koji napušta aktivni centar kao prvi proizvod reakcije. Formirani estar serina sada reaguje sa molekulom drugog supstrata koji se po ulasku u aktivni centar aktivira.

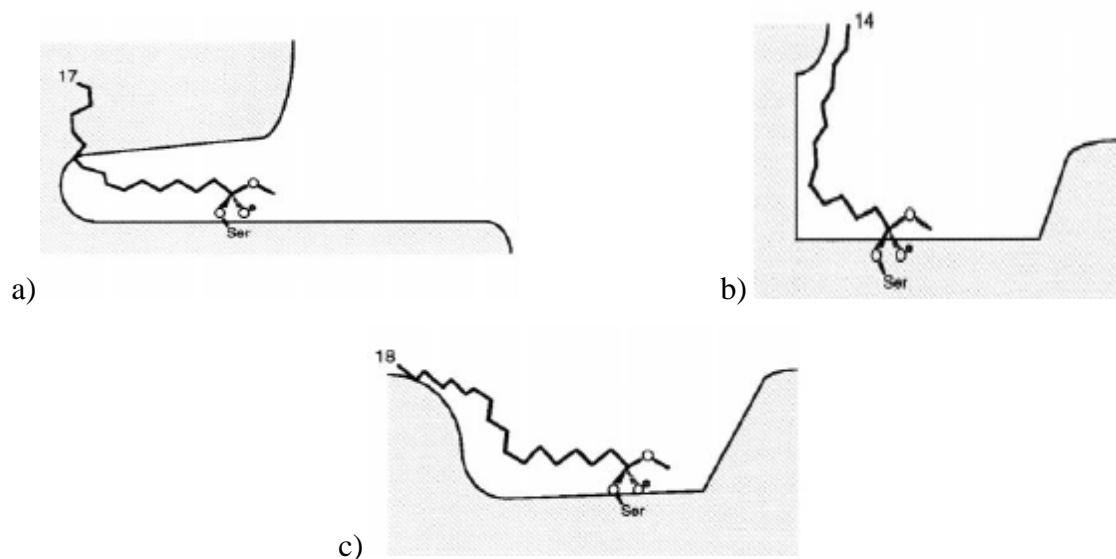


Slika 2.12. Mehanizam reakcije katalizovane lipazama na primeru reakcije esterifikacije.^[63]

Bazni atom azota iz imidazolovog prstena histidina izdvaja vodonik iz molekula supstrata i prevodi ovaj molekul u nukleofilni oblik – anjon. Ovaj anjon napada karbonilni ugljenikov atom pri čemu nastaje drugi tetraedarski intermedijerni oksianjon koji je stabilisan uspostavljanjem vodoničnih veza. Bitnu ulogu ovde ima i ostatak asparaginske kiseline jer njena negativno naelektrisanu karboksilna grupa stabilizuje prelazno stanje privlačenjem pozitivnog naelektrisanja sa histidina. Nakon toga, elektronski par sa kiseonika prelazi na karbonilni ugljenik i izdvaja se drugi proizvod reakcije.

Veliku ulogu u reakcijama katalizovanim lipazama igra brzina stvaranja enzim–supstrat kompleksa koja zavisi od afiniteta enzima prema supstratu. Afinitet enzima prema supstratu u velikoj meri zavisi od oblika aktivnog centra enzima. Prema obliku aktivnog centra lipaze se mogu podeliti u tri grupe: lipaze sa aktivnim centrom oblika tunela

(lipaza iz *C. rugosa*), lipaze sa aktivnim centrom oblika levka (lipaze iz *C. antarctica* i *Pseudomonas sp.*, pankreasne lipaze) i lipaze sa otvorenim aktivnim centrom (lipaze iz *Rhizomucor* i *Rhizopus sp.*).^[62] Šematski prikaz vezivanja supstrata za lipaze iz različitih podgrupa prikazan je na slici 2.13.



Slika 2.13. Poređenje oblika aktivnih centara za lipaze iz različitih podgrupa. A) lipaza iz *C. rugosa*, b) lipaza iz *P. cepacia*, b) lipaza iz *R. miehei*.^[64]

2.2.3. Lipaza iz *Candida rugosa*

Lipaza iz *C. rugosa* je biokatalizator koji se široko primenjuje u različitim biotehnološkim procesima kao što je proizvodnja šećernih estara masnih kiselina, stereoselektivna sinteza lekova i u velikom broju procesa u industriji hrane.^[65] *C. rugosa* je jednoćelijski, nesporogeni i nepatogeni kvasac koji se ranije zvao *Candida cylindracea*. Lipazu produkuje kao ekstracelularni enzim. Upravo ova lipaza predstavlja jedan od najpristupačnijih enzima pa je samim tim i jedna od najbolje proučenih lipaza. Utvrđeno je da ne produkuje samo jedan enzim već smešu izoenzima koji se mogu razdvojiti metodom elektroforeze. Izoenzimi su enzimi koji katalizuju istu reakciju i međusobno se razlikuju samo u primarnoj strukturi. Sve ih produkuje isti mikroorganizam, ali u različitim tipovima ćelija.^[66] Lipaza iz *C. rugosa* je glikoprotein, i pored proteinske sadrži i ugljenohidratnu komponentu. *C. rugosa* produkuje smešu od

najmanje sedam izoenzima (lip1–lip7). Kompletna genetska sekvenca utvrđena je za pet (lip1–lip5) izoformi koje poseduju 85-90 % sličnosti u aminokiselinskim ostacima. Određena je kristalna struktura izoenzima A čija je sinteza kodirana genom označenim sa lip3 i izoenzima B čija je struktura kodirana genom označenim sa lip1.^[67-69] Podudarnost u sastavu i redosledu vezivanja aminokiselina je 88 %, ali se specifičnost, hidrofobnost, izoelektrične tačke, temperaturni i pH optimumi razlikuju. Izoenzim B čini 70 % ukupne aktivnosti lipaze iz *C. rugosa*.

Lipaza iz *C. rugosa* sadrži 534 ostatka amino kiseline. Aktivni centar čine Ser u položaju 209, His u položaju 449 i Glu u položaju 341 i smešten je u otvoru oblika tunela dužine 2,2 nm i širine 0,4 nm. Tunel formira 25 aminokiselinskih ostataka: sedam fenilalanina, pet leucina, tri valina i serina, dva glicina i po jedan alanin, arginin, metionin, prolin i tirozin i prekriven je poklopcem. Poklopac se sastoji iz iskrivljene spirale koju čine aminokiselinski ostaci 69-72 i α -heliksa koji čine aminokiselinski ostaci 75-84.^[70] Ovaj poklopac ima amfifilni karakter i njegova hidrofobna strana okrenuta je ka unutrašnjosti molekula pri čemu dolazi do interakcija sa hidrofobnim ostacima koji okružuju aktivni centar. Gornja strana je izrazito hidrofilna i formira deo molekula koji je izložen rastvaraču. Deo poklopca koji učestvuje u premeštanju obuhvata region od 66. do 92. aminokiselinskog ostatka. Aktivacija, prelazak iz zatvorene u otvorenu konformaciju, podrazumeva pomeranje ovog poklopca dužine 1,9 nm za 90° i cis-trans izomerizaciju peptidne veze prolina u položaju 92. Prilikom transformacije dolazi do značajnih promena u sekundarnoj strukturi. Deo molekula između 69. i 72. amino kiseline, koji ima spiralnu strukturu, se izdužuje, a region između 86. i 90. amino kiseline se uvija u kratki α -heliks.^[71] Ova lipaza je jedinstvena po tome što u stabilizaciji otvorene konformacije učestvuje ugljenohidratna komponenta molekula, stvaranjem vodoničnih veza sa aminokiselinskim ostacima iz poklopca.

Ispitivanja masnokiselinske specifičnosti lipaze iz *C. rugosa* u reakciji esterifikacije upućuju na postojanje još jednog aktivnog centra, međutim njegov položaj kao ni bilo koji od nivoa strukture nisu utvrđeni.^[65]

2.2.4. Primena lipaza

Upotreba enzima kao biodegradabilnih i stereospecifičnih katalizatora iz godine u godinu se značajno povećava. 75 % od ukupne količine enzima koji se koriste u industriji čine hidrolaze. Posle proteaza i enzima koji katalizuju hidrolizu ugljenih hidrata lipaze zauzimaju treće mesto u industrijskoj upotrebi.^[72] Lipaze imaju veliku primenu u hemijskoj, oleohemijskoj, mlečnoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Takođe se koriste u proizvodnji papira, sintezi površinski aktivnih materija, deterdženata, polimera i proizvoda za ličnu negu (tabela 2.5).

Tabela 2.4. Važne oblasti u industrijskoj primeni lipaza.^[73]

INDUSTRIJA	DEJSTVO	PROIZVOD
PEKARSKA	poboljšanje arome	pekarski proizvodi
PIĆA	poboljšanje arome	pića
HEMIJSKA	enantioselektivnost, sinteza	optički čista jedinjenja
KOZMETIČKA	sinteza	emulzije
MLEČNA	hidroliza mlečnih masti	aromatični sastojci
	zrenje sira	sir
	modifikacija masti butera	buter
MASTI I ULJA	transesterifikacija	kakao buter
	hidroliza	margarin
KOŽNA	hidroliza	kožni proizvodi
MESA I RIBE	razvoj arome	proizvodi od mesa i ribe
	uklanjanje masti	
PAPIRNA	hidroliza	papirni proizvodi
FARMACEUTSKA	transesterifikacija	specifični lipidi
	hidroliza	digestivne kiseline
PRELIVA ZA HRANU	poboljšanje kvaliteta	majonez, prelive, kremovi

Lipaze se koriste u mlečnoj industriji za hidrolizu mlečnih masti. Dosadašnja upotreba podrazumeva pojačanje ukusa i arome sira, ubrzavanje zrenja i proizvodnju produkata od sira. U zavisnosti od masnih kiselina koje nastaju u procesu hidrolize mogu nastati proizvodi različitog ukusa. Masne kiseline kratkog lanca (C_4 - C_6) dovode do razvoja oštrog, nakiselog ukusa, dok oslobađanje masnih kiselina srednje dužine lanca (C_{12} - C_{14}) proizvodima daje sapunast ukus. Nastale masne kiseline stupaju u reakciju sa drugim sastojcima sireva i dolazi do sinteze različitih aromatičnih jedinjenja kao što su aceto-

acetat, β -keto kiseline, metil ketoni, aromatični estri i laktoni koji značajno utiču na ukus sireva.^[59]

U skorije vreme čitav niz mikrobioloških lipaza razvijen je u cilju upotrebe u industriji sira, kao što su lipaze iz *Mucor miehei*, *Aspergillus niger* i *Aaspergillus oryzae*. Niz sireva dobrog kvaliteta dobijen je upotrebom pojedinačnih lipaza mikrobiološkog porekla ili mešavinom nekoliko preparata. Lipaze su široko korišćene za proizvodnju sira „imitatora“. Naime, dodatak lipaze kravljem mleku dovodi do produkcije aroma koje su slične ovčjem i kozjem mleku. Tako se lipaze koriste za pravljenje imitatora sireva kao što su Feta, Manchego i Romano. Dodavanjem lipaza u plave sireve dobija se ukus Roquefort sireva, koji se originalno prave od ovčjeg mleka. Slično tome dodatkom lipaze pasterizovanom mleku razvija se Ras ili Konpanisti ukus koji se tradicionalno proizvode od sirovog mleka.^[74]

Lipaze takođe imaju ključnu ulogu u pripremi tzv. enzimski modifikovanog sira (EMC). On se dobija u prisustvu enzima na povišenoj temperaturi. U ovako dobijenim sirevima koncentracija slobodnih masnih kiselina je 10 puta veća nego u odgovarajućim mladim sirevima. Ovakvi proizvodi se najviše koriste kao sastojci u drugim proizvodima kao što su različiti sosovi, prelive i drugo. Ova tehnologija ima široku primenu u SAD.^[74]

Lipaze se koriste i u industriji deterdženata. Koriste se u proizvodnji deterdženata za ručno i mašinsko pranje. U ovom slučaju lipaze su sastojak industrijskog proizvoda, a nisu katalizator u procesu proizvodnje. Zahvaljujući velikoj aktivnosti enzima, njihovim dodatkom u malim količinama postižu se izuzetni efekti u procesu pranja bez dodatka agresivnih supstanci.^[75] Upotrebom enzima procesi pranja mogu se odvijati na znatno nižim temperaturama od uobičajenih i na taj način se smanjuje potrošnja energije kao i koncentracija nepoželjnih jedinjenja koja nastaju na povišenim temperaturama. Kompanija Novo Nordisk prva je 1992. godine plasirala rekombinantnu lipazu iz plesni *Thermomyces lanuginose* pod komercijalnim nazivom „Lipolase“. Kasnije, 1995. godine na tržištu su se pojavila još dva proizvoda. Jedan od njih sa lipazom iz *Pseudomonas menducian* i komercijalnim nazivom "Lumafast", a drugi sa lipazom iz *Pseudomonas alcaligenes* i komercijalnim nazivom "Lipomax".^[76]

Lipaze se u oleohemijskoj industriji upotrebljavaju sa ciljem da se sačuva energija i da se degradacija toplotom za vreme hidrolize, glicerolize i alkoholize smanji na minimum. Trenutni trend u oleohemijskoj industriji je prestanak korišćenja organskih rastvarača.

Različite reakcije (hidrolize, glicerolize, alkoholize) odigravaju se direktno na supstratima, koristeći imobilisane lipaze.^[74]

Kompanija Unichem lipaze koristi za dobijanje izopropil-palmitata, izopropil-miristata i 2-etilheksil-palmitata koji ulaze u sastav proizvoda za ličnu negu, kao što su kreme za kožu i sunčanje i ulja za kupanje. Kompanija Croda Universal proizvodi voskove (estre velike molekulske mase) koji imaju sličnu upotrebu u proizvodima za ličnu negu i dobijaju se pomoću lipaze iz *Candida rugosa* u šaržnom reaktoru.^[74]

Mogućnost razdvajanja racemskih smeša i dobijanje optički čistih jedinjenja usled stereoselektivnog dejstva je svojstvo koje je omogućilo primenu lipaza u farmaceutskoj industriji. Razdvajanje enantiomera flurbiprofena, naproksena, ibuprofena i suprofena vrši se pomoću lipaza iz *C. rugosa*, *C. antarctica* kao i pankreasne lipaze.^[77-79] Tako na primer, (S)-izomer flurbiprofena poseduje najveći deo antiinflamatorne aktivnosti, dok (R)-izomer deluje kao toksin u gastro interstinalnom traktu, pa je njihovo razdvajanje od izuzetne važnosti.^[80] Holandska kompanija DSM-Andeno razvila je tehnologiju za selektivnu sintezu glicil-butirata pomoću lipaze. Dobijeni (R)-estar glicidola i (S)-glicidol se koriste kao prekursori za sintezu (R)- i (S)-glicidil-tosilata, koji se primenjuju u sintezi optički aktivnih β -blokatora.^[81] Razdvajanje (2*S*, 3*S*)-metil-*p*-metoksifenil-glicidata od željenog (2*R*, 3*S*) izomera pomoću lipaze iz *S. marcenscens* je ključni korak u proizvodnji Diltiazema.^[82, 83]

U hemijskoj industriji lipaze su našle veliku primenu u proizvodnji raznih pesticida, herbicida, fungicida ili njihovih prekursora. Enzimskim razdvajanjem racemske smeše vinilglicina u vodenoj ili dvofaznoj sredini dobija se jedan vrlo značajan intermedijar za dobijanje herbicida, fungicida i antivirusnih agenasa. Esterifikacijom uz pomoć lipaza dobija se ivermicin koji je značajan sastojak mnogih pesticida, ali i lekova.^[74]

Kvantitativno određivanje triacilglicerola je od velike važnosti u kliničkoj dijagnostici pa su lipaze našle primenu i u proizvodnji biosenzora. Biosenzori na bazi lipaza su mnogo jeftiniji i jednostavniji od hemijskih metoda za određivanje sadržaja triacilglicerola i do sada je razvijen biosenzor sa lipazom iz *C. rugosa*.^[84]

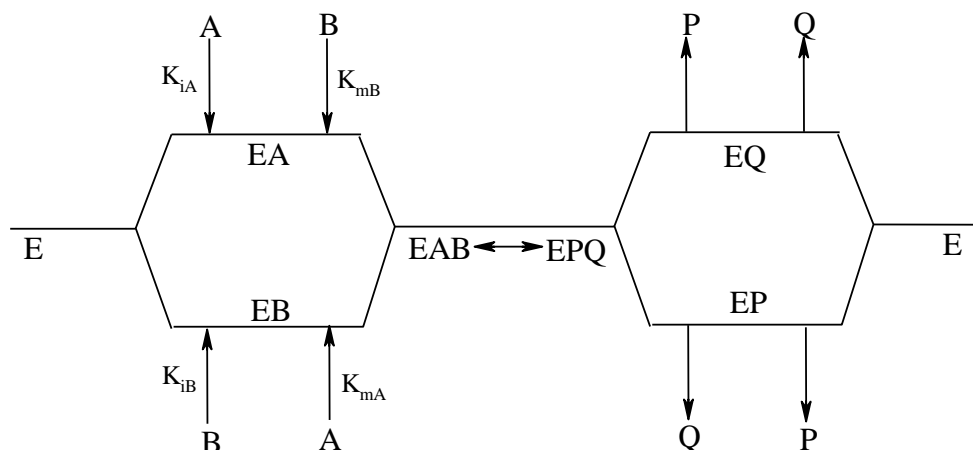
Lipaze su prvi enzimi u svetu koji su uspešno upotrebljeni u procesu proizvodnje papira.^[85] Nippon papirna industrija iz Japana je koristila lipazu iz *C. rugosa* i razvila metod pomoću kojeg je moguće hidrolizovati 90 % triglicerida iz drveta.^[86]

2.3. KINETIKA VIŠESUPSTRATNIH REAKCIJA

Najveći broj enzimskih reakcija odvija se sa dva ili više supstrata, što utvrđivanje mehanizma po kojem se reakcija odvija i određivanje kinetičkih parametara čini težim u odnosu na proste jednosupstratne reakcije. Prema najviše korišćenoj nomenklaturi Klivlenda (Cleveland) za označavanje broja supstrata i proizvoda u reakciji koriste se prefiksi *uni*, *bi*, *ter*, *quad* itd.^[87] Tako se na primer reakcija u kojoj učestvuju dva supstrata i nastaju dva proizvoda obeležava kao *bi-bi*, ili reakcija u kojoj učestvuju dva supstrata i nastaju tri proizvoda obeležava kao *bi-ter*. Dvosupstratne reakcije mogu se podeliti u dve grupe: sekvencijalne i ping-pong reakcije. Kod sekvencijalnih reakcija oba supstrata se vežu za aktivni centar enzima, a zatim se oslobađa proizvod, dok vezivanje supstrata može biti nasumično ili uvek istim redom. Za ping-pong reakcije karakteristično je oslobađanje jednog ili više proizvoda pre nego što se svi supstrati vežu za aktivni centar enzima. U ovom odeljku biće opisani samo mehanizmi dvosupstratnih reakcija jer su karakteristični za enzimski katalizovanu sintezu piridona lipazama.

2.3.1. Sekvencijale dvosupstratne reakcije sa nasumičnim vezivanjem supstrata

Na slici 2.14. prikazan je najjednostavniji sekvencijalni model sa nasumičnim vezivanjem dva supstrata i nastajanjem dva proizvoda. Oba supstrata se vežu za aktivni centar enzima pre oslobađanja ijednog proizvoda, ali se supstrati ne vezuju uvek istim redom.

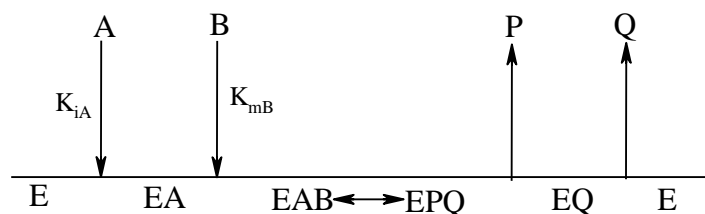


Slika 2.14. Šema sekvencijalnog modela sa nasumičnim vezivanjem supstrata.^[88]

Kinetički model se izvodi uz pretpostavku o brznoj ravnoteži pri vezivanju jednog od supstrata u odnosu na relativno sporu konverziju ternarnog kompleksa EAB i dobija se sledeća jednačina:^[88]

$$v = \frac{V_{max}[A][B]}{K_{iA}K_{mB} + K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]} \quad (2.1)$$

2.3.2. Sekvencijalne dvosupstratne reakcije sa pravilnim redosledom vezivanja supstrata



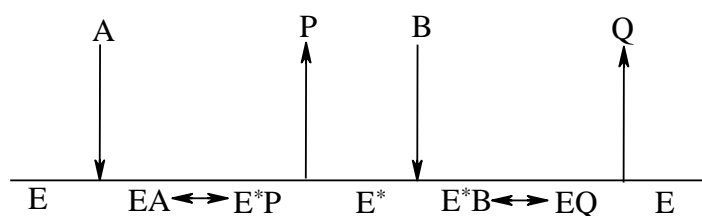
Slika 2.15. Šema sekvencijalnog modela sa pravilnim redosledom vezivanja supstrata.^[88]

Na slici 2.15 prikazan je sekvencijalni model sa pravilnim redosledom vezivanja dva supstrata i oslobađanjem dva proizvoda. Ovaj mehanizam podrazumeva striktan redosled vezivanja supstrata. Enzim ima veći afinitet prema supstratu A i on se uvek vezuje prvi, a zatim supstrat B i nastaje ternarni kompleks EAB. Za ovu vrstu reakcionog mehanizma izveden je sledeći model:

$$v = \frac{V_{max}[A][B]}{K_{iA}K_{mB} + K_{mB}[A] + [A][B]} \quad (2.2)$$

2.3.3. Ping-pong dvosupstratne reakcije

Samo ime ovog mehanizma govori o naizmeničnom vezivanju supstrata i otpuštanju proizvoda. Šematski prikaz ping-pong mehanizma sa dva supstrata i dva proizvoda dat je na slici 2.16.



Slika 2.16. Šema ping-pong dvosupstratne reakcije.^[88]

Naime, za aktivni centar enzima se prvo vezuje supstrat A, a zatim se otpušta prvi proizvod. Nakon toga se vezuje drugi supstrat i nastaje binarni kompleks E*B koji se razlaže na slobodan enzim i drugi proizvod. U ovom slučaju ne nastaje ternarni kompleks, već dva binarna kompleksa.

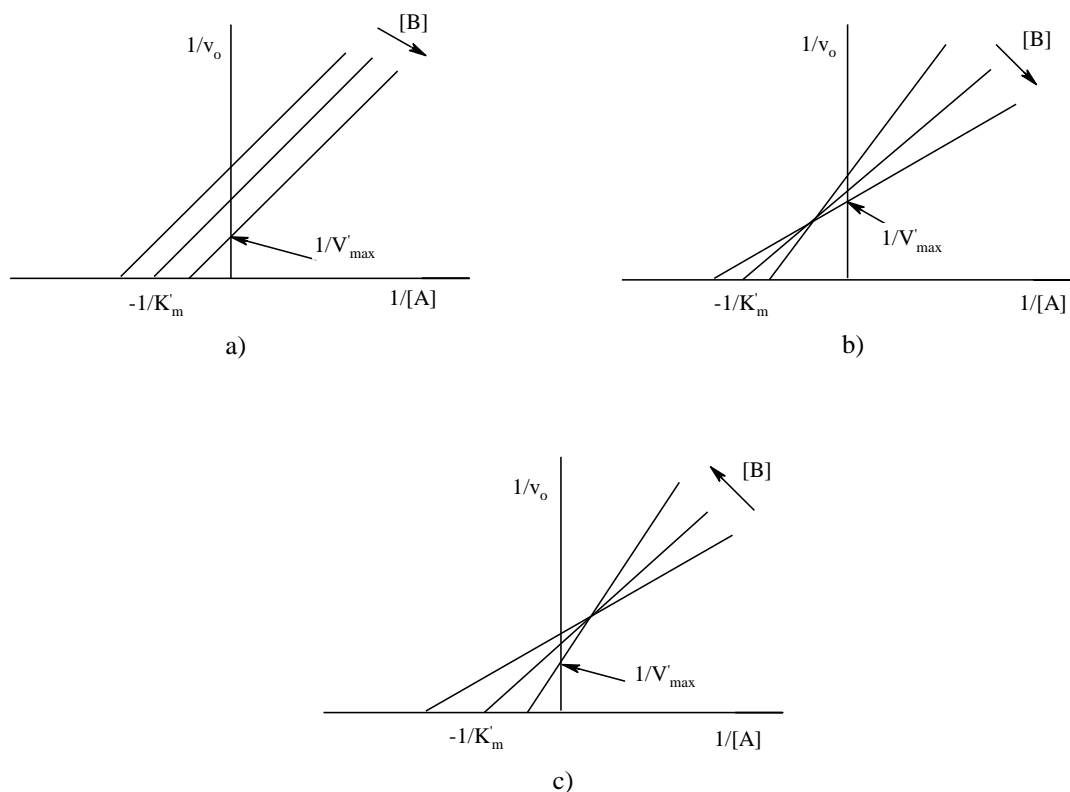
Kinetički model izveden je uz pretpostavku o stacionarnom stanju za oba kompleksa i predstavljen je sledećom jednačinom:

$$v = \frac{V_{max}[A][B]}{K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]} \quad (2.3)$$

gde su : $K_{mA} = \frac{k_{-1}+k_2}{k_1}$, $K_{mB} = \frac{k_{-3}+k_4}{k_3}$ i $\alpha = \frac{k_4}{k_2}$

2.3.4. Razlikovanje mehanizama

Ako se koncentracija jednog od supstrata održava konstantnom jednačine (2.1), (2.2) i (2.3) se svode na klasične Mihaelis-Mentenine jednačine. Konstante koje se dobijaju pri konstantnoj koncentraciji jednog od supstrata dok se koncentracija drugog supstrata varira su „prividne“ vrednosti Mihaelisove konstante (K_m') i maksimalne brzine reakcije (V_{max}'). Ako se na primer koncentracija supstrata A varira dok se koncentracija supstrata B održava konstantnom u dijagramu $1/v - 1/[A]$ dobiće se pravolinijska zavisnost. Ponavljanjem ovog postupka, pri čemu se svaki put druga koncentracija supstrata B održava konstantnom, dobiće se karakterističan raspored pravih linija na osnovu kojeg se može utvrditi mehanizam po kojem se posmatrana reakcija odigrava. Ping-pong mehanizam se lako razlikuje od sekvencijalnih po jednakom nagibu pravih dobijenih pri različitim koncentracijama supstrata B (slika 2.17. a)). Dva podtipa sekvencijalnog mehanizma se razlikuju po uticaju koncentracije supstrata B na prividnu Mihaelisovu konstantu. Ukoliko sa povećanjem koncentracije supstrata B dolazi do povećanja Mihaelisove konstante radi se o sekvencijalnom mehanizmu sa nasumičnim vezivanjem supstrata (slika 2.17. b)), i obrnuto ukoliko sa povećanjem koncentracije supstrata B dolazi do smanjenja prividne Mihaelisove konstante radi se o sekvencijalnom mehanizmu sa pravilnim redosledom vezivanja supstrata (slika 2.17. c)).



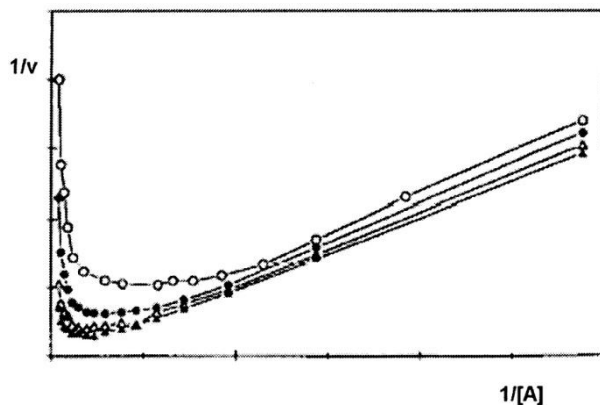
Slika 2.17. Karakteristični dijagrami po Lajnviveru (Lineweaver) i Burku (Burk) za a) ping-pong mehanizam, b) pravilni sekvencijalni mehanizam i c) nasumični sekvencijalni mehanizam.

2.3.5. Inhibicija supstratom u višku

Prilikom ispitivanja enzimske sinteze 2-piridona potrebno je razmotriti i fenomen inhibicije supstratom u višku jer je u dosadašnjim istraživanja utvrđeno da je za odigravanje reakcije neophodan višak cijanoacetamida.^[24] U v -[S] dijagramu ne javlja se plato usled dostizanja maksimalne brzine, koja ostaje nepromenjena pri daljem povećanju koncentracije supstrata, već početna brzina nakon dostizanja maksimalne vrednosti počinje da opada. Ovo ukazuje na postojanje neke optimalne koncentracije supstrata pri kojoj je početna brzina reakcije maksimalna.

Mehanizam inhibicije supstratom može biti različit. Kod jednosupstratnih reakcija se smatra da dolazi do vezivanja više od jednog molekula supstrata za aktivni centar enzima.

Kada se eksperimenti izvode pri konstantnoj koncentraciji jednog supstrata, a varira se koncentracija supstrata koji inhibira enzim, zavisnost u Lajnviveru i Burku nije pravolinijska, već dolazi do zakrivljenja pri velikim koncentracijama inhibirajućeg supstrata kao što je prikazano na slici 2.18.



Slika 2.18. Karakterističan izgled Lajnviver-Burkovog dijagrama pri inhibiciji supstratom A.^[59]

U slučaju inhibicije supstratom u višku Lajnviver-Burkov dijagram se ne može koristiti za izračunavanje kinetičkih konstanti određivanjem nagiba i odsečaka na osama. Konstante se određuju računskim putem, primenom metoda najmanjih kvadrata.

2.4. IMOBILIZACIJA ENZIMA

2.4.1. Definicija, značaj i metodi imobilizacije

Kako bi upotreba enzima kao katalizatora bila ekonomski isplativa neophodno je da se enzim nakon upotrebe može izdvojiti iz reakcione smeše i ponovo koristiti. Takođe, da bi mogli da se upotrebljavaju kao katalizatori u industriji, potrebno je da imaju veliku operativnu stabilnost i da omogućavaju laku kontrolu procesa. Ovi zahtevi mogu se ispuniti korišćenjem imobilisanih enzima.

Imobilizacija enzima je proces kojim se enzim fizički ili hemijski lokalizuje ili vezuje u određenom prostoru pri čemu on zadržava svoju katalitičku aktivnost. Pored termina „imobilisani enzim“ koriste se i drugi termini kao što su „nerastvorljivi enzim“ ili „matični enzim“ koji označavaju enzim vezan za nerastvoran nosač.^[66] Postoji više razloga zbog kojih imobilisani enzimi imaju prednost u odnosu na slobodne a neki od njih su:

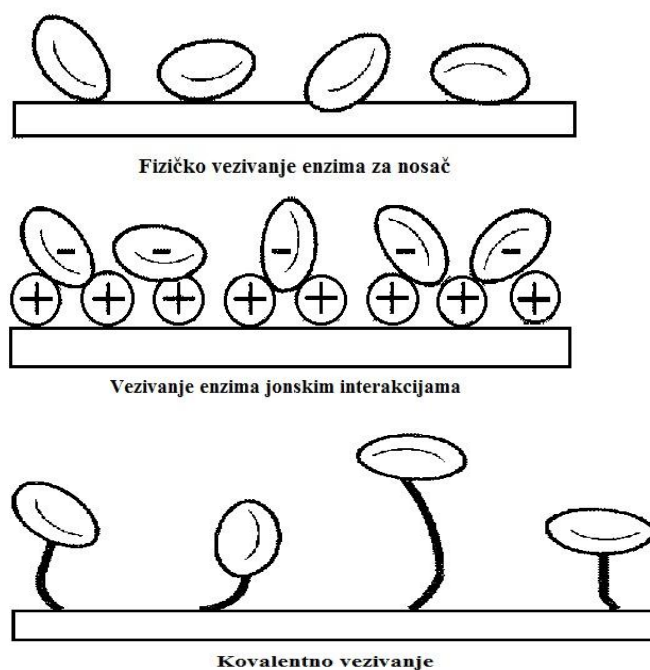
- višekratna upotreba katalizatora - imobilisani enzim se može izdvojiti iz smeše i ponovo koristiti, dok se slobodan enzim može koristiti samo jednom i potom gubi vrednost, što je veoma skupo,
- reakcija se može lako kontrolisati i zaustaviti u bilo kom trenutku izdvajanjem biokatalizatora,
- povećana stabilnost biokatalizatora (operativna i stabilnost pri skladištenju),
- smanjena cena tehnološkog postupka,
- lako izdvajanje iz reakcione smeše (filtracijom ili centrifugiranjem) tako da u proizvodima reakcije nema zaostalih proteina pa nema kontaminacije proizvoda,
- mogućnost kontinualnog vođenja procesa u različitim reaktorima što omogućava automatizovanje katalitičkih procesa,
- imobilisani enzimi mogu poslužiti kao model sistem za proučavanje prirodnih *in vivo* enzima vezanih za membrane i
- poboljšanjem svojstava kao što su stabilnost i mogućnost ponovne upotrebe u velikoj meri utiče na povećanje produktivnosti procesa (kg proizvoda/kg enzima), a time i na smanjenje troškova enzima po kg proizvoda.

Imobilisani enzim mora da poseduje dve osnovne funkcije: katalitičku i nekatalitičku. Nekatalitička funkcija dizajnirana je tako da pomaže pri separaciji, a katalitička funkcija ima za cilj konverziju željenog jedinjenja. Iako postoji na stotine opisanih protokola za imobilizaciju, raznovrsnost enzima, nosača i ostalih faktora onemogućava razvoj univerzalnog metoda za imobilizaciju enzima.

Da bi se dizajnirao imobilisani enzim glavni zadatak je da se odabere pogodan nosač (definisan kao nekatalitički deo imobilisanog enzima, na kome je smešten katalitički deo), uslovi (pH, temperatura, priroda medijuma) i sam enzim (izvor, priroda i čistoća). Odabrani metod treba da ujedini dva osnovna elementa: katalitičke potrebe (produktivnost, prinos, stabilnost i selektivnost) i nekatalitičke potrebe (odvajanje enzima, kontrola procesa, separacioni procesi).^[89]

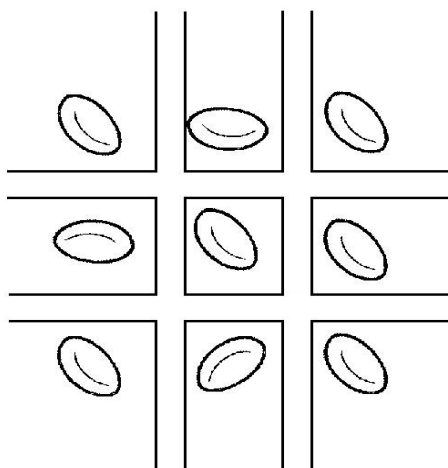
Metodi imobilizacije mogu se grubo podeliti na fizičke i hemijske.^[90] Fizički metodi zasnovani su na nekovalentnom vezivanju enzima za nosač vezama koje mogu biti tipa dipol-dipol, elektrostatička privlačenja, vodonične veze ili mehaničko postavljanje enzima unutar dela prostora, dok hemijski metodi podrazumevaju stvaranje bar jedne ireverzibilne hemijske veze između molekula enzima i nosača.^[59] Uža podela je dosta složenija i na osnovu jedne od njih metodi imobilizacije mogu se podeliti u tri velike grupe:

1. vezivanje enzima za nosač,
 2. obuhvatanje enzima nosačem i
 3. umrežavanje enzima.^[91]
-
1. Enzim se za nosač može adsorbovati fizički (hidrofobnim i Van der Waals-ovim interakcijama) ili jonskim interakcijama, i može se vezati stvaranjem kovalentne veze. Za razliku od čvrsto, kovalentno, vezanog enzima, enzim vezan fizičkim i jonskim interakcijama, zbog mogućnosti „curenja“ sa nosača često nije pogodan za upotrebu u industrijskim uslovima. Međutim, u procesu kovalentnog vezivanja enzim najčešće gubi veliki deo svoje katalitičke aktivnosti, što predstavlja i glavni nedostatak ovog imobilizacionog metoda. Na slici 2.19 dat je šematski prikaz tri pomenuta načina vezivanja enzima za nosač.



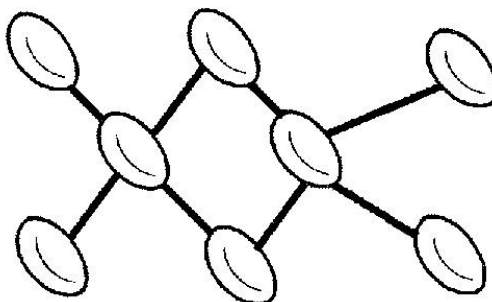
Slika 2.19. Šematski prikaz različitog vezivanja enzima za nosač.

2. Obuhvatanje enzima nosačem predstavlja smeštanje enzima unutar polimerne matrice, kao i smeštanje enzima unutar ili iza polupropustljive membrane. Kod ove tehnike imobilizacije veliki nedostatak predstavlja otežana difuzija supstrata i proizvoda. Takođe je, zbog mogućeg ispiranja, enzim najčešće potrebno dodatno kovalentno vezati.



Slika 2.20. Šematski prikaz obuhvatanja enzima nosačem.

3. Uz pomoć bifunkcionalnog agensa pojedinačni molekuli ili agregati enzima se mogu umrežiti pri čemu se dobija imobilisani enzim bez nosača. Ovaj pristup pruža brojne prednosti kao što su velika koncentracija enzimske aktivnosti u katalizatoru, visoka stabilnost i mali troškovi proizvodnje.^[91]



Slika 2.21. Šematski prikaz umrežavanja enzima.

Bitno je istaći da u literaturi postoji izuzetno veliki broj radova vezanih za imobilizaciju enzima i svaki od pomenutih metoda ima svoje prednosti i nedostatke. Kako će se u ovoj disertaciji enzim imobilisati adsorpcijom i kovalentim vezivanjem za čvrste nosače osnovni principi ovih imobilizacionih tehnika biće detaljnije opisani.

2.4.2. Imobilizacija enzima adsorpcijom

Imobilizacija enzima adsorpcijom zasniva se na slabim privlačnim silama između molekula enzima i nosača. Interakcije koje se uspostavljaju mogu biti fizičke, kao što su Van der Waals-ove i hidrofobne interakcije ili mogu biti jonske, između različito naelektrisanih grupa u molekulu enzima i sa površine nosača. Prednosti ovog metoda imobilizacije su pristupačnost i niska cena adsorbenasa koji se koriste kao čvrsti nosači, jednostavnost postupka koji ne zahteva prisustvo skupih i toksičnih hemikalija, blagi reakcioni uslovi i u većini slučajeva očuvanje enzimske specifičnosti i aktivnosti. Međutim, veliki nedostatak imobilizacije enzima adsorpcijom je mogućnost desorpcije enzima sa čvrstog nosača, što predstavlja i najveći problem u industrijskim uslovima jer dovodi do gubitka skupih biokatalizatora i do kontaminacije proizvoda samim enzimom. U nekim slučajevima enzim se može desorbovati istom brzinom kojom se adsorbuje, ali postoje i slučajevi kada je enzim toliko čvrsto vezan da desorpcija

praktično i ne postoji.^[59] Brzina i stepen desorpcije zavise od vrste i jačine interakcija između molekula enzima i nosača, koje se menjaju promenom temperature, pH ili jonske jačine rastvora. U rastvorima velike jonske jačine enzim vezan jonskim interakcijama se desorbuje, dok se maksimalna adsorpcija hidrofobnim interakcijama postiže upravo u ovakvim rastvorima. Takođe, pri pH vrednostima koje su blizu izoelektrične tačke enzim se adsorbuje isključivo hidrofobnim interakcijama, a za vezivanje jonskim vezama potrebno je da se imobilizacija odvija u rastvorima čija je pH vrednost iznad ili ispod vrednosti izoelektrične tačke.

Specifična struktura lipaze omogućava veoma uspešnu imobilizaciju hidrofobnim interakcijama i našla je primenu u biokonverziji masti i ulja. Iako su lipaze hidrofilni enzimi, zbog velikog procenta hidrofobnih aminokiselinskih ostataka imaju veliki afinitet prema hidrofobnim nosačima.^[92] Kristalografske analize trodimenzionalne strukture lipaze pokazale su da je najveći broj hidrofobnih ostataka smešten u unutrašnjosti molekula.^[69, 93] Prilikom vezivanja, konformacione promene do kojih dolazi, otvaraju tunel u kojem je smešten aktivni centar i čine ga dostupnim molekulima supstrata. Upravo zbog ovog fenomena ne iznenađuje činjenica da često nakon imobilizacije lipaze na hidrofobne nosače dolazi do povećanja aktivnosti u odnosu na slobodan enzim.^[92, 94, 95]

Veliki broj prirodnih i sintetskih materijala se koriste kao nosači za adsorpciju lipaze. Neki od njih su celit,^[96-98] porozno staklo,^[99] zeolit,^[100] derivati agaroze,^[92, 101] derivati dekstrana,^[102] derivati celuloze,^[103] propilen,^[104] a u novije vreme sve veći broj istraživanja fokusiran je na adsorpciju lipaza na ugljenične nanomaterijale.^[105-110]

2.4.3. Kovalentna imobilizacija enzima

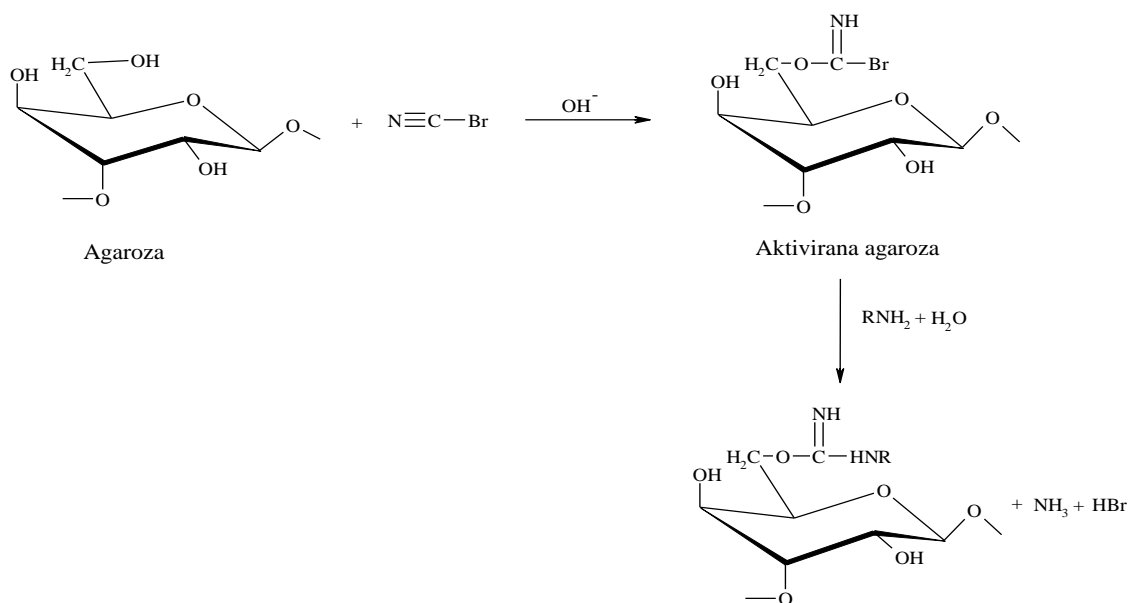
Kovalentno vezivanje enzima zasniva se na stvaranju bar jedne hemijske veze između funkcionalnih grupa enzima i čvrstog nosača. Kao nosači mogu da se koriste različiti materijali. Oni mogu biti neorganski (staklo, keramika, alumosilikati, oksidi metala), prirodni polimeri (celuloza, hitin, agaroz, škrob i drugi polisaharidi), sintetički polimeri i kopolimeri (polimeri na bazi derivata akrilne kiseline, poliamidi, poliuretani i drugi). Za kovalentnu imobilizaciju važne su sledeće osobine nosača: hemijska i mehanička stabilnost, struktura površine, elektrostatički naboj, rastvorljivost, hidrofobnost i

hidrofilnost, rezistentnost na mikroorganizme i dr. Nosač ne sme imati nikakve reaktivne grupe koje bi vezivale molekule supstrata ili neko drugo jedinjenje iz rastvora. Enzimi se obično imobilišu preko amino grupe (α - i ϵ -lizin), karboksilne grupe, sulfhidrilne grupe cisteina, hidroksilne grupe (serin, treonin), imidazolne grupe (histidin) ili fenolnog jezgra tirozina.^[59] Nosač se najčešće pre upotrebe aktivira pošto je mali broj grupa koje su toliko aktivne da se mogu odmah vezati za enzim. Nosači se aktiviraju izvođenjem hemijske reakcije između nosača i aktivatora, pri čemu se na njegovoj površini stvaraju nove grupe koje pokazuju veliku reaktivnost prema funkcionalnim grupama u molekulu enzima.

Najčešće korišćeni metodi za aktivaciju nosača su:

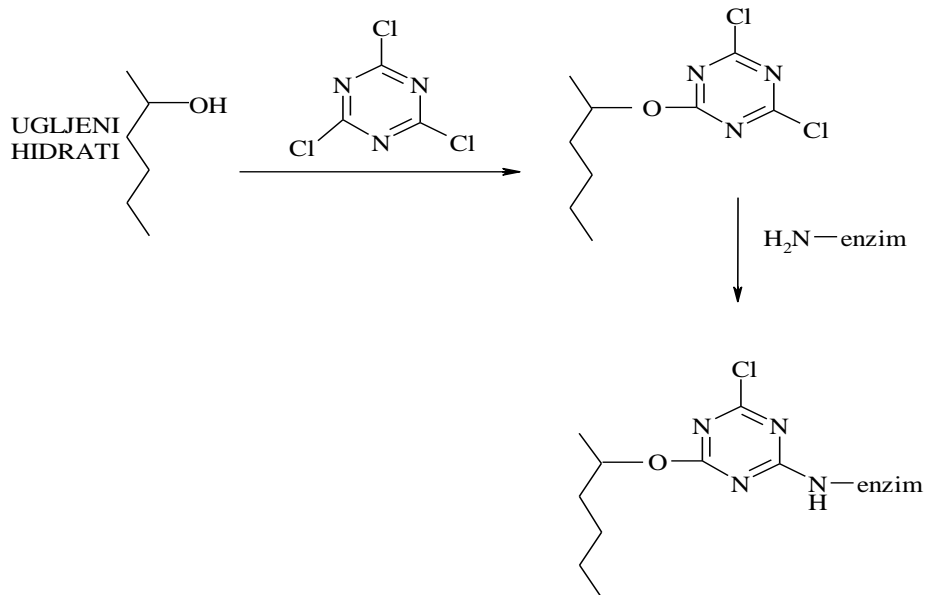
- aktivacija bromcijanom,
- aktivacija hlortriazinima,
- aktivacija trezil-hloridom,
- aktivacija uvođenjem oksiranskog prstena,
- aktivacija uvođenjem diazo grupe,
- aktivacija uvođenjem karbonilne grupe.

AKTIVACIJA BROMCIJANOM se zasniva na reakciji bromcijana sa dve susedne hidroksilne grupe u vodenoj sredini pri čemu nastaju reaktivni imidokarbonati. U isto vreme, pored imidokarbonata, nastaju i nestabilni cijanati koji prelaze u neaktivne karbamate. Nakon toga, enzim se lako preko α -amino grupe vezuje za nosač pri čemu se grade izokarbamidi i uretani. Reakcija se odvija na temperaturi od 20 °C i u jako alkalnoj sredini (pH=11-12). U ovakvoj sredini nagrađeni ester je nestabilan i lako podleže hidrolizi u neaktivni oblik. Efikasnost reakcije se može povećati ukoliko se koristi trietilamin koji u reakciji sa bromcijanom gradi trietilamonijumnitril. Ovim metodom se uglavnom aktiviraju prirodni polisaharidi na bazi dekstrana,^[111] agaroze,^[112] i celuloza.^[113]



Slika 2.22. Šematski prikaz imobilizacije bromcijanskim metodom.^[114]

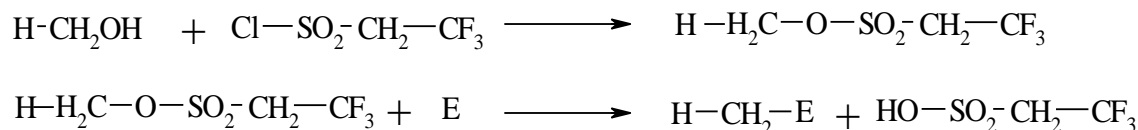
AKTIVACIJA HLORTRIAZINIMA zasniva se na njihovoj reakciji sa hidroksilnom ili amino grupom polimera u alkalnoj sredini uz prisustvo organskog rastvarača. Nakon ove reakcije enzim se lako vezuje za nosač.



Slika 2.23. Šematski prikaz imobilizacije enzima na polihidroksilnenosače aktivirane hlortriazinima.^[66]

Ovim postupkom aktiviraju se polisaharidi i njihovi amino derivati, proteinski nosači (kolagen, keratin), neorganski nosači poput aluminata i silikata.^[115]

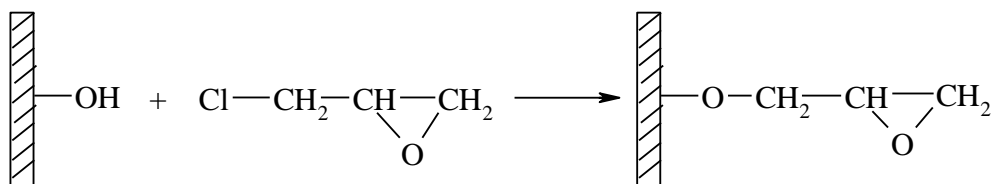
AKTIVACIJA TREZIL-HLORIDOM koristi se za aktivaciju nosača koji imaju hidroksilne grupe. Pogodna je jer se odvija pod blagim reakcionim uslovima.



Slika 2.24. Šematski prikaz aktivacije nosača trezil-hloridom.

Na ovaj način se obično aktiviraju neorganski nosači kao što su sefaroze, silikati i dr.

AKTIVACIJA UVOĐENJEM OKSIRANSKOG PRSTENA izvodi se tako što se na nosač deluje epihlorhidrinom ili diepoksidnim jedinjenjima. Jedinjenja sa više ugljenikovih atoma su pogodnija za aktivaciju zato što omogućavaju stvaranje „nožica“ pa je vezani enzim udaljen od površine nosača, čime se smanjuje neželjeni uticaj nosača na enzim, a imobilisani enzim je stabilniji.

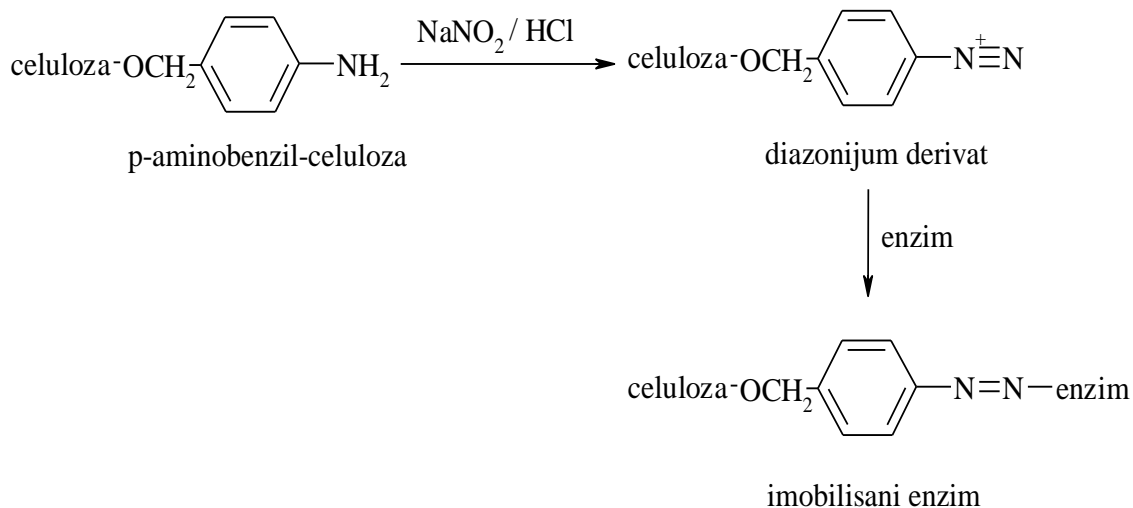


Slika 2.25. Aktivacija prirodnih polisaharida tretiranjem nosača sa epihlorhidrinom i sa epoksidnim jedinjenjima.^[116]

Nosači sa epoksi grupama imaju veliku prednost zbog svoje stabilnosti čak i u uslovima velike vlažnosti i veoma su pogodni za komercijalnu primenu jer ostaju nepromenjeni tokom dugotrajnog skladištenja.^[117]

AKTIVACIJA UVOĐENJEM DIAZO GRUPE koristi se za nosače koji sadrže amino grupe na aromatičnom prstenu (to su poli-*p*-aminostirol, *p*-monobenzilceluloza, aromatični amino derivati svile, vune, hitina). Na ovaj način nastaju diazonijum derivati

za koje se enzim vezuje preko α - ili ε -amino grupe, sulfhidrilne, hidroksilne, imidazolove ili karboksilne grupe.

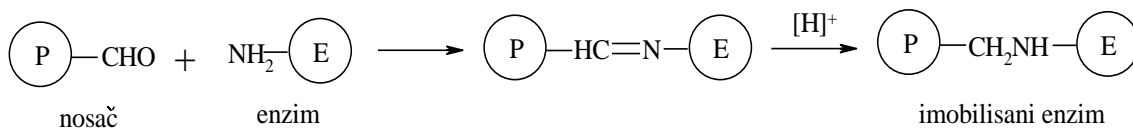


Slika 2.26. Šematski prikaz aktivacije polimera uvođenjem diazo grupe.^[66]

Ovim metodom se mogu aktivirati polimeri koji nemaju aril-amino grupu, ali je u tom slučaju aktivacija složena i skupa.^[118]

AKTIVACIJA UVOĐENJEM KARBONILNE GRUPE se koristi za nosače koji imaju amino grupu. Karbonilna grupa se uvodi pomoću dialdehida, najčešće je to aldehid glutarne kiseline. Uslovi pod kojima se odvija vezivanje glutaraldehida za nosač moraju biti pažljivo kontrolisani da ne bi došlo do nekontrolisane polimerizacije i vezivanja više molekula glutaraldehida na amino grupe.^[119]

Karbonilna grupa aktiviranog nosača reaguje sa amino grupom molekula enzima pri čemu nastaje *Shiff*-ova (Šifova) baza:

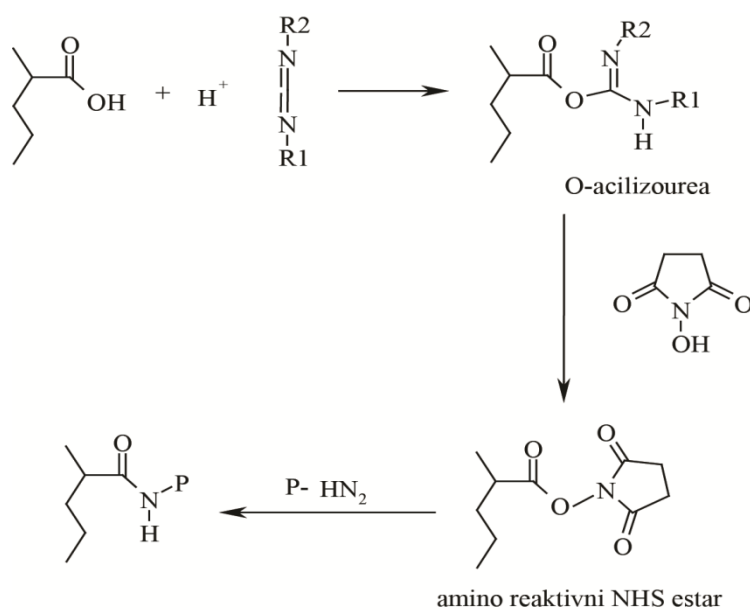


Slika 2.27. Vezivanje enzima za nosač sa karbonilnim grupama.

Na ovaj način najčešće se aktiviraju neorganski nosači (staklo, keramika, alumosilikati, oksidi metala i dr.).^[120-124] Ukoliko nosač ne sadrži amino grupu, potrebno ju je uvesti.

Uvođenje amino grupe vrši se u reakciji nosača i alkildiamina. Nakon toga se uvodi karbonilna grupa u reakciji amino derivata nosača i aldehida glutarne kiseline.

Imobilizacija enzima na nosač koji ima karboksilnu grupu ostvaruje se stvaranjem amidne veze sa amino grupom enzima. Međutim, formiranje amidne veze se na sobnoj temperaturi ne odvija spontano i potrebne su temperature više od 200 °C.^[125] Ovako visoke temperature narušavaju strukturu i aktivnost enzima pa se karboksilna grupa prethodno aktivira karbodiimidom. Najčešće se koristi 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid-hidroklorid (EDC), ali je njegova upotreba ograničena malim prinosom kuplovanja, jer je intermedijer koji nastaje (O-acilizourea) veoma nestabilan i prelazi u neaktivni oblik (*N*-alkilurea intermedijer). Nestabilnost ovog intermedijera se može smanjiti izvođenjem reakcije na niskoj temperaturi (0 °C),^[126] ili dodatkom *N*-hidroksisukcinimida (NHS) koji nestabilni O-acilizourea kompleks prevodi u stabilniji amino reaktivni NHS estar.^[127, 128] Prinos kuplovanja se na ovaj način povećava 10–20 puta. Šematski prikaz dat je na slici 2.28.



Slika 2.28. Šematski prikaz imobilizacije enzima na nosače koji imaju karboksilnu grupu u prisustvu aktivirajućeg agensa.

Dobijanje aktivnog imobilisanog preparata pri blagim reakcionim uslovima, predstavlja veliki problem u svim, prethodno opisanim, metodima. Aktivacija nosača se najčešće obavlja u ekstremnim uslovima pH i temperature i pomoću toksičnih i agresivnih reaktanata što dovodi do smanjenja enzimske aktivnosti. Zbog toga je razvijen veliki broj nosača koji na svojoj površini imaju veoma reaktivnu epoksi grupu, koja bez prethodne aktivacije reaguje sa različitim nukleofilnim grupama aminokiselinskih ostataka i formira čvrste veze (sekundarne amino, etarske i tioetarske). Ovaj metod je posebno interesantan jer omogućava dodatnu stabilizaciju imobilisanog preparata stvaranjem kovalentnih veza između više amino grupa sa istog molekula enzima i epoksidnih grupa sa površine nosača. Ovaj fenomen nazvan je višestruka kovalentna imobilizacija (engl. Multipoint Covalent Attachment) i čvrstim fiksiranjem molekula enzima za površinu nosača povećava se stabilnost.^[129, 130] Ukoliko enzim ima mali broj ostataka lizina, aminacijom uz pomoć etilendiamina može se povećati broj amino grupa u molekulu enzima.^[131] Nedostatak ovih nosača predstavlja malo rastojanje epoksidne grupe od površine nosača koja može negativno uticati na enzim. U cilju povećanja rastojanja nosači se mogu modifikovati drugim aktivirajućim reagensima i na taj način se neželjeni uticaj površine nosača smanjuje.^[132]

Kovalentno imobilisani enzimi su stabilni u širokom opsegu spoljnih uslova i nalaze veliku primenu u medicini i prehrambenoj industriji gde ne sme doći do kontaminacije proizvoda proteinima. Veoma je važno da pri hemijskom vezivanju enzima za nosač učestvuju samo one funkcionalne grupe u molekulu enzima koje nisu bitne za njegovu aktivnost. Bitno je da ove grupe budu reaktivne da bi imobilizacija bila selektivna i da bi se odvijala pri blagim reakcionim uslovima, da ne bi došlo do denaturacije enzima.^[66]

2.4.4. Nosači za imobilizaciju enzima

Svojstva nosača imaju veliki uticaj na svojstva imobilisanog enzima. Pri odabiru pogodnog nosača potrebno je dobro proučiti sledeća svojstva:

- vrstu i koncentraciju prisutnih funkcionalnih grupa,
- permeabilnost i specifičnu površinu nosača,
- hidrofilitnost/hidrofobnost nosača,
- nerastvorljivost,

- mehaničku stabilnost,
- oblik i veličinu čestica,
- otpornost na mikrobiološku kontaminaciju i
- mogućnost regeneracije.

Detaljna klasifikacija nosača data je u literaturi,^[133] a dalje u tekstu će biti data svojstva nosača koji su u ovom radu korišćeni (višeslojne ugljenične nanocevi (MWCNT), i SP Sephadex[®] C-25) i kratak pregled radova vezanih za imobilizaciju lipaze.

2.4.4.1. Višeslojne ugljenične nanocevi (MWCNT) kao nosači za imobilizaciju

Ugljenične nanocevi otkrio je Iijima 1991. godine.^[134] Predstavljaju alotropsku modifikaciju ugljenika sa cilindričnom nanostrukturom i imaju veliki odnos dužine prema prečniku (132,000,000:1).^[135] Mogu se sastojati od jednog savijenog lista grafita (SWCNT), od dva savijena lista smeštena jedan u drugi (DWCNT) i više listova koncentrično respoređenih jedan u drugi (MWCNT). Pokazuju izuzetna termička, mehanička i električna svojstva koja potiču od toga što je svaki atom ugljenika sp^2 hibridizovan.^[136] Svojstva, kao što su maksimalna površina po jedinici mase, minimalna difuziona ograničenja, maksimalna količina vezanog enzima i visoka mehanička stabilnost, koje nanocevi poseduju, čine ih idealnim nosačima za imobilizaciju enzima. Od pomenutih vrsta, višeslojne ugljenične nanocevi su komercijalno dostupne po najpristupačnijoj ceni i najpogodnije su za industrijsku proizvodnju.^[137] Njihov prečnik kreće se od 5 – 50 nm, dužina je obično mnogo veća od 1 μ m, a razmak između slojeva blizak je razmaku slojeva grafena u grafitu (0,34 – 0,36 nm).^[136]

Izrazito hidrofobna površina nemodifikovanih MWCNT (n-MWCNT) pogodna je za adsorpciju enzima, a interakcije između površine CNT i enzima mogu biti veoma snažne. Pretežno su hidrofobne,^[138, 139] kao posledica polarnih i aromatičnih aminokiselinskih ostataka, zatim mogu biti elektrostatičke,^[110] kao i vodonične veze.^[140] Glavni tehnički problem za praktičnu primenu ugljeničnih nanocevi u biomedicini i biotehnologiji je nedostatak rastvorljivosti u vodenoj sredini. Mogućnost hemijske modifikacije i funkcionalizacije njihove površine omogućava povećanje disperzibilnosti u vodi, a time i primenu u fiziološkom okruženju. Najčešći procesi modifikacije površine CNT su uvođenje karboksilnih grupa oksidacijom (o-MWCNT),^[141-143] ili

njihova dalja modifikacija do amino grupa (a-MWCNT).^[144] Kontrolom reaktanata i/ili reakcionih uslova može se kontrolisati položaj i gustina grupa na površini CNT, što se može iskoristiti za kontrolisanje položaja i gustine vezanog enzima.^[145] Vuković i saradnici ispitali su fizička svojstva n-MWCNT, o-MWCNT i a-MWCNT korišćenih u ovoj disertaciji i odredili sadržaj funkcionalnih grupa na njihovoj površini (tabele 2.5 i 2.6).^[146]

Tabela 2.5. Fizička svojstva n-MWCNT, o-MWCNT i a-MWCNT.

Nosač	Spec. površina, m ² g ⁻¹	Zapr. pora, cm ³ g ⁻¹	Sr. prečnik pora, nm	pH _{PZC}	Zeta potencijal, mV
n-MWCNT	187,58	0,755	16,09	4,98	-13,7 (pH 5,30)
o-MWCNT	78,49	0,328	16,72	2,43	-50,0 (pH 3,98)
a-MWCNT	101,24	0,538	21,25	5,91	-26,9 (pH 6,60)

Tabela 2.6. Sadržaj funkcionalnih grupa.

Nosač	Karboksilne grupe, mmol g ⁻¹	Laktoni, mmol g ⁻¹	Fenoli, mmol g ⁻¹	Uk. kis. mesta, mmol g ⁻¹	Uk. bazna mesta, mmol g ⁻¹
n-MWCNT	0,066	0,279	0,235	0,584	0,197
o-MWCNT	0,87	1,78	1,43	4,09	0,415
a-MWCNT	0,15	1,24	1,83	3,22	1,15

Modifikacija površine ugljeničnih nanocevi otvara mogućnosti i kovalentnog vezivanja enzima za njihovu površinu. Prva ispitivanja o imobilizaciji enzima na ugljenične nanocevi počela su pre 15-ak godina,^[140, 147] i od tada su u velikom broju radova opisane raznovrsne tehnike imobilizacije raznih enzima.^[139, 148-170] Kada je reč o imobilizaciji lipaze, adsorpcijom na n-MWCNT u prisustvu albumina iz goveđeg seruma (BSA) dobijen je preparat sa visokim procentom zadržane aktivnosti (97 %),^[161] dok su adsorpcijom na tri vrste različito funkcionalizovanih MWCNT dobijeni preparati sa visokom operacionom stabilnošću i stabilnošću pri skladištenju.^[164] Imobilizati su nakon 6 meseci skladištenja na 4 °C zadržali i do 80 % od svoje početne aktivnosti, a čak 25 % nakon 30 dana inkubacije u heksanu na 60 °C.

Na oksidovane višeslojne ugljenične nanocevi Shi i saradnici su, u cilju povećanja disperzibilnosti nanocevi, vezali lipazu iz *C. rugosa*, i FT-IR i Raman spektrima potvrdili da se lipaza kovalentno vezala.^[171]

Najnovije istraživanje imobilizacije lipaze na višeslojne ugljenične nanocevi, u kome su Tan i saradnici kovalentno vezali lipazu na o-MWCNT stvaranjem amidne veze, fokusirano je na promene u sekundarnoj strukturi lipaze do kojih dolazi u procesu imobilizacije.

2.4.4.2. SP Sephadex[®] C-25 kao nosač za imobilizaciju lipaze

Nosači pod komercijalnim nazivom Sephadex[®] dobijaju se umrežavanjem prirodnog dekstrana epihlorhidrinom. Kontrolom odnosa dekstrana i umreživača mogu se dobiti nosači različite poroznosti, sposobnosti bubrenja i hidrofилности. Uvođenjem grupa na površinu, stvaranjem stabilne etarske veze, dobijaju se različiti jonoizmenjivači na bazi Sephadex-a. U tabeli 2.7 date su vrste jonoizmenjivača i funkcionalnih grupa na njihovoj površini.

Tabela 2.7. Vrste nosača na bazi Sephadex-a.

Glavna funkcionalna grupa	Oznaka nosača
Dietilaminoetil-	DEAE Sephadex
	A-25 A-50
Dietil-(2-hidroksipropil)-aminoetil-	QAE Sephadex
	A-25 A-50
Karboksimetil-	CM Sephadex
	C-25 C-50
Sulfopropil-	SP Sephadex
	C-25 C-50

Čestice nosača su sfernog oblika, a dimenzije se kreću u opsegu od 40–125 μm. Stabilne su u vodi, rastvorima soli, organskim rastvaračima, alkalnim i slabo kiselim rastvorima. Nosači sa manjim porama (A-25 i C-25) imaju bolja protočna svojstva i ne dolazi do promene zapremine pri naglim promenama pH vrednosti i jonske jačine rastvora. SP Sephadex[®] C-25, korišćen za imobilizaciju lipaze u ovoj disertaciji, spada u jake katjonske izmenjivače i stabilan je u opsegu pH vrednosti od 2–10.^[172]

Enzimi se na Sephadex nosače uglavnom imobilisu adsorpcijom elektrostatičkim interakcijama. U nekoliko istraživanja lipaza je imobilisana na 5 različitih jonoizmenjivača i najveću aktivnost imali su preparati na bazi sefadeksa.^[173-175]

Liu i saradnici koristili su SP Sephadex[®] C-50 za selektivnu adsorpciju izoenzima lipaze iz *C. rugosa*, i u procesu imobilizacije vezali su čak 200 mg proteina po mg suvog nosača, i dobili imobilisani enzim sa visokom operativnom stabilnošću.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali, instrumenti i metodi

3.1.1. Materijali

Kao reaktanti za sintezu piridona korišćeni su:

- acetilaceton, 99% (Acros Organics) i
- cijanoacetamid, $\geq 98,0$ (Fluka).

Kao katalizator za enzimsku sintezu korišćena je lipaza iz *Candida rugosa* (EC 3.1.1.3), tip VII (Sigma, St. Louis, SAD).

Kao nosači za imobilizaciju lipaze korišćeni su:

- višeslojne ugljenične nanocevi (MWCNT) (Sigma Aldrich) i
- SP-Sefadex[®] C-25 (Pharmacia).

Ostale korišćene hemikalije su:

- etil-etoksiacetat, 98% (Acros Organics),
- metalni natrijum, 99,95% (Sigma Aldrich, Nemačka),
- benzen (Acros Organics),
- anhidrovani aceton (Zorka Pharma, Šabac),
- dietiletar (La Chema),
- koncentrovana sumporna kiselina, 98 % (Sigma Aldrich),
- koncentrovana hlorovodonična kiselina, 36 % (Lach-Ner, Republika Češka),
- koncentrovana azotna kiselina (Zorka Pharma, Šabac),
- anhidrovani magnezijum-sulfat, 99 % (Zdravlje, Leskovac),
- metilamin 33 % u vodi (Fluka AG, Buchs SG),
- etilamin 70 % u vodi (Fluka),
- *n*-propilamin 99 % (Fluka),
- *i*-propilamin 99 % (Fluka),
- *n*-butilamin 99 % (Fluka),

- *i*-butilamin 99 % (Fluka AG, Buchs SG),
- piperidin 99 % (Merck Darmstat),
- etanol (Zorka Pharma, Šabac),
- tris-(hidroksimetil)-aminoetan, p.a. (Centrohem),
- NaH₂PO₄ · H₂O (Merck-Alkaloid),
- Na₂HPO₄ · 12H₂O (NRK Inženjering),
- natrijum-acetat (Zdravlje Leskovac),
- *N*-hidroksisukcinimid, 99 % (Sigma-Aldrich),
- *N*-etil-*N*-(3-dimetil-aminopropil)karbodiimid-hidrohlorid (EDC), 99 % (Acros Organics),
- kalijum-perjodat, 99 % (Sigma Aldrics),
- etilen-glikol, 99 % (Kemika Zagreb),
- Comassie Brilliant Blue G-250, 99,9 %, (Sigma-Aldrich),
- orto-fosforna kiselina, 85 %, (Centrohem),
- metanol (Acros Organics), *HPLC* čistoće,
- *p*-nitrofenilpalmitat (Sigma-Aldrich),
- natrijum-dodecilsulfat, (Sigma-Aldrich),
- triton-X-100, 99 % (Merck),
- O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronijum-heksafluorofosfat *N*-HATU, 99,5 %, (Fluka) i
- etilendiamin anhidrovani, ≥ 99,5 %, (Fluka).

Za filtraciju višeslojnih ugljeničnih nanocevi korišćeni su PTFE filteri sa porama veličine 0,05 μm (Carl Roth).

3.1.2. Instrumenti

- vodeno kupatilo sa mešanjem, (Memmert),
- UV-spektrofotometar, UV-1700 (Shimadzu, Kyoto, Japan),
- NMR spektrometar (GEMINI-200) Varian Gemini 200 MHz,
- Infracrveni spektrometar (Bomem MB 100),
- Tečni-hromatografski uređaj Akta Purifier (Pharmacia).

3.1.3. Metodi

3.1.3.1. Enzimska sinteza piridona

Sinteza 4,6-disupstituisanih-3-cijano-2-piridona izvođena je u balonima zapremine 100 cm³, na temperaturi predviđenoj eksperimentalnim planom. U balon se odmere željene količine reaktanata i enzima, a zatim se reakciona smeša dopuni dejonizovanom vodom (5 ili 10 cm³). Nakon toga se uzorci ostave na termostatanom vodenom kupatilu uz stalno mešanje (150 rpm). Posle određenih vremenskih intervala (0,5, 1, 2, 3 i 24 h) alikvoti od 0,2 cm³ se uzimaju, razblažuju vodom do 25 cm³ i analiziraju spektrofotometrijski. Za svaki uzorak rađeni su kontrolni testovi, pod istim reakcionim uslovima, ali bez prisustva enzima.

3.1.3.2. Hemijska sinteza piridona

Ekvimolarne količine 1,3-diketona i odgovarajućeg cijanoacetamida (10 mmol) zagrevaju su uz refluks u smeši voda/etanol (20 cm³) u prisustvu nekoliko kapi piperidina kao katalizatora u trajanju od 4 h. Piridon je prečišćen kristalizacijom iz etanola, a dobijeni su sledeći 1,4,6-trisupstituisani-3-cijano-2-piridoni:

- N*-metil-4,6-dimetil-3-cijano-2-piridon,
- N*-etil-4,6-dimetil-3-cijano-2-piridon,
- N-n*-propil-4,6-dimetil-3-cijano-2-piridon,
- N-i*-propil-4,6-dimetil-3-cijano-2-piridon,
- N-n*-butil-4,6-dimetil-3-cijano-2-piridon i
- N-i*-butil-4,6-dimetil-3-cijano-2-piridon.

3.1.3.3. Sinteza etoksiacetilacetona

U trogri balon stavi se metalni natrijum (25 g, 1,1 mol) i 300 cm³ apsolutnog benzena. Smeša se zatim ohladi na -5 do -7 °C i uz mešanje na magnetnoj mešalici doda se etil-etoksiacetat (125 g, 0,95 mol). Zatim se anhidrovani aceton (destilisan nad

fosforpentoksidom) (60 g, 1,03 mol) dodaje polako u periodu od 3 h uz mešanje i nakon toga mešanje se nastavi još 2 h. Smeša postaje viskozna i crveno-smeđa. Nakon 12 h na sobnoj temperaturi doda se 300 cm³ etra i nastala natrijumova so se odvaja filtracijom. Nakon rastvaranja u 200 cm³ 20 % sumporne kiseline, ekstrahuje se sa 400 cm³ etra, a zatim suši magnezijum-sulfatom. Proizvod se izdvaja vakuum destilacijom (frakcija na 83-84 °C/13 mm Hg stuba).^[176]

3.1.3.4. Sinteza *N*-supstituisanih cijanoacetamida

U balon sa povratnim hladnjakom sipaju se metanol, etilcijanoacetat i odgovarajući alkilamin. Smeša se zagreva na vodenom kupatilu na 50 °C uz refluks u trajanju 4 h. Nakon zagrevanja smeša se ohladi do sobne temperature, a nastali talog se filtrira. Dobijeni *N*-alkilcijanoacetamid se dalje prečišćava prekrizacijom iz etanola.^[177], a sintetisani su:

- N*-metilcijanoacetamid,
- N*-etilcijanoacetamid,
- N*-*n*-propilcijanoacetamid,
- N*-*i*-propilcijanoacetamid,
- N*-*n*-butilcijanoacetamid,
- N*-*i*-butilcijanoacetamid.

3.1.3.5. Uvođenje karboksilnih grupa na površinu ugljeničnih nanocevi

100 mg nemodifikovanih MWCNT tretira se smešom koncentrovane H₂SO₄ i HNO₃ (3:1 v/v). Ova smeša se zatim, radi uvođenja karboksilnih grupa, tretira na ultrazvučnom kupatilu 3 h na 40 °C. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu oksidovane nanocevi (o-MWCNT) se polako dodaju u 300 cm³ hladne dejonizovane vode, a zatim filtriraju. Nanocevi se ispiraju dejonizovanom vodom sve dok se ne dostigne neutralna pH vrednost filtrata. Kada je filtracija završena o-MWCNT se 8 h suše u vakuum sušnici na 80 °C.

3.1.3.6. Uvođenje amino grupa na površinu ugljeničnih nanocevi

100 mg o-MWCNT se disperguje u 50 cm³ etilendiamina uz dodatak 10 mg *N*-HATU kao agensa za kuplovanje. Ova smeša se sonifikuje 4 h na 40 °C, zatim hladi i filtrira, a potom ispira dejonizovanom vodom. Dobijene nanocevi sa amino grupom (a-MWCNT) se na kraju dobro isperu viškom metanola, a zatim suše 8 h u vakuum sušnici na 60 °C.

3.1.3.7. Imobilizacija lipaze na nemodifikovane višeslojne ugljenične nanocevi

3 mg nemodifikovanih ugljeničnih nanocevi, se najpre sonifikuje 30 min u 1,5 cm³ fosfatnog pufera (50 ili 500 mM, pH 7) da se dobije uniformna disperzija. Nakon toga se doda 1,5 cm³ rastvora enzima, željene koncentracije, u istom puferu. Imobilizacija se odvija u vodenom kupatilu na 25 °C uz konstantno mešanje (150 rpm). U cilju ispitivanja kinetike adsorpcije imobilizacija traje 0,25, 0,5, 1, 2 h. Nakon završene imobilizacije imobilisani enzim se odvoji filtracijom i ispere tri puta sa po 3 cm³ fosfatnog pufera. Imobilizatu, supernatantu i filtratima se dalje određuje lipolitička aktivnost, a supernatant i filtrati se još koriste i za određivanje sadržaja proteina.

3.1.3.8. Imobilizacija lipaze na oksidovane višeslojne ugljenične nanocevi

3.1.3.8.1. Adsorpcija na oksidovane ugljenične nanocevi

3 mg o-MWCNT se doda u 3 cm³ rastvora enzima u puferu (50 mM, pH 7,0) i sonifikuju 1 min da se nanocevi redisperguju. Imobilizacija se odvija u vodenom kupatilu na 25 °C uz konstantno mešanje (150 rpm). U cilju ispitivanja kinetike adsorpcije imobilizacija traje 0,25, 0,5, 1, 2 h. Nakon završene imobilizacije imobilisani enzim se odvoji filtracijom i ispere tri puta sa po 3 cm³ fosfatnog pufera. Imobilizatu, supernatantu i filtratima se dalje određuje aktivnost, a supernatant i filtrati se još koriste i za određivanje sadržaja proteina.

3.1.3.8.2. Kovalentno vezivanje za oksidovane ugljenične nanocevi

3 mg o-MWCNT se disperguje u 1,5 cm³ fosfatnog pufera (50 mM pH 6,2) i 1,5 cm³ 400 mM NHS-a u fosfatnom puferu (50 mM pH 6,2). Ostavi se na ultrazvučno kupatilo 30 min, a zatim doda 20 mM EDC-a. Smeša se zatim ostavi 30 min na 400 rpm, a zatim filtrira i dobro ispere puferom, kako bi se uklonio neproreagovali NHS i EDC. Nanocevi se zatim prebace u 3 cm³ rastvora enzima u puferu (50 mM pH 6,2) i sonifikuju 1 min da se nanocevi redisperguju. Imobilizacija se odvija na vodenom kupatilu na 25 °C uz konstantno mešanje (150 rpm). U cilju ispitivanja kinetike adsorpcije imobilizacija traje 0,25, 0,5, 1, 2 h. Nakon završene imobilizacije imobilisani enzim se odvoji filtracijom i ispere tri puta sa po 3 cm³ fosfatnog pufera. Imobilizatu, supernatantu i filtratima se dalje određuje aktivnost, a supernatant i filtrati se još koriste i za određivanje sadržaja proteina.

3.1.3.9. Imobilizacija lipaze na amino funkcionalizovane višeslojne ugljenične nanocevi

3.1.3.9.1. Oksidacija lipaze

200 mg enzima se rastvori u 100 cm³ acetatnog pufera (50 mM pH 5,0) i doda se 115 mg KIO₄ (2,5 μmol KIO₄/mg enzima). Smeša se ostavi u frižideru 6 h uz povremeno mešanje. Nakon 6 h u rastvor se doda 300 μl etilenglikola i ostavi još 30 min. Rastvor se potom prebaci u creva za dijalizu i ostavi da dijalizuje 12 h u destilovanoj vodi, a zatim nekoliko sati u 50 mM acetatnom puferu (pH 5,0).

3.1.3.9.2. Imobilizacija oksidovanog enzima

U 3 cm³ rastvora oksidovanog enzima, željene koncentracije, doda se 3 mg a-MWCNT, a zatim se, uz mešanje, ostavi na 4 °C da se enzim imobilizuje. Nakon završene imobilizacije nevezani enzim se odvoji filtracijom, a imobilizat ispere tri puta sa po 3 cm³ acetatnog pufera (50 mM pH 5,0). Supernatant i filtrati se dalje koriste za

određivanje sadržaja proteina, i imobilizatu se standardnim metodom određuje lipolitička aktivnost.

3.1.3.10. Imobilizacija lipaze na SP Sephadex® C-25

U 10 cm³ rastvora enzima, željene koncentracije, u acetatnom puferu (10 mM, pH 3,5) doda se 20 mg nosača. Smeša se zatim ostavi na vodenom kupatilu na 25 °C uz konstantno mešanje (150 rpm) u periodu od 2h. Nakon završene imobilizacije imobilisani enzim se odvoji filtracijom i ispere tri puta sa po 10 cm³ acetatnog pufera. Imobilizatu, supernatantu i filtratima se dalje određuje lipolitička aktivnost, a supernatant i filtrati se još koriste i za određivanje sadržaja proteina.

3.1.3.11. Određivanje aktivnosti lipaze pomoću p-nitrofenilpalmitata kao supstrata

Lipolitička aktivnost enzima određivana je spektrofotometrijski korišćenjem p-nitrofenilpalmitata (p-NPP) kao supstrata. Rastvor supstrata se priprema na sledeći način: 0,01589 g (420 µmol) p-NPP, 0,017 g dodecil-sulfata (SDS) i 1,00 g Triton-a X-100 se odmeri u normalni sud od 100 cm³ i dopuni destilovanom vodom. Smeša se zatim zagreva 15 min na vodenom kupatilu na 65 °C, dobro promeša i ostavi da se ohladi na sobnoj temperaturi pre upotrebe.

Postupak ispitivanja aktivnosti je sledeći:

Za svaki uzorak u kivetu se odmeri 1,25 cm³ 0,1 M Tris·Cl pufera (pH 8,2) i 1,25 cm³ rastvora supstrata. Za test probu se doda 0,5 cm³ rastvora enzima, a za slepu probu 0,5 cm³ vode.

Za čvrste uzorke se u kivetu odmeri 1,5cm³ 0,1 M Tris·Cl pufera (pH 8,2) i 1,5 cm³ rastvora supstrata, a zatim se doda 2 mg čvrstog uzorka.

Na spektrofotometru se u toku 3 min, na svakih 30 sekundi, očitava vrednost apsorbance na talasnoj dužini od 410 nm.

Aktivnost lipaze izražena je u IU. 1 IU definiše se kao količina enzima potrebna za nastajanje 1 µmol proizvoda u toku 1 minuta, pod određenim uslovima.

3.1.3.12. *Određivanje sadržaja proteina metodom po Bradford-u*^[178]

Određivanje sadržaja proteina ovom tehnikom se bazira na promeni maksimuma apsorpcije kiselog rastvora Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G 250) boje sa 465 nm na 595 nm pri vezivanju za proteine. Anjonski (plavi) oblik boje stabilizuju hidrofobne i jonske interakcije sa proteinom, što prouzrokuje vidljivu promenu boje. Boja se menja iz crveno-smeđe u plavu. Boja prvenstveno reaguje sa ostacima arginina, ali reaguje i sa ostacima histidina, lizina, tirozina, triptofana i fenilalanina. Osetljivost metoda je oko 5 – 200 µg proteina, u zavisnosti od kvaliteta boje, a linearna zavisnost postoji u opsegu od 0 – 2000 µg proteina.

Priprema reagensa:

Odmeri se 100 mg CBB G 250 u normalni sud od 1 dm³. U njega se doda 100 cm³ 85 % orto-fosforne kiselina, 50 cm³ 95 % metanola, oko 300 cm³ destilovane vode i meša 2h na sobnoj temperaturi. Normalni sud se zatim odloži na tamno mesto preko noći. Sutradan se dopuni vodom do zapremine 1 dm³ i profiltrira kroz grubi filter papir u tamnu bocu. Reagens je stabilan više meseci. Čuva se na tamnom i hladnom mestu.

Procedura:

Odmeri se 5 cm³ Bradford-ovog reagensa i 1 cm³ rastvora enzima u epruvetu. Dobro promućkati i ostavi 5 minuta da se razvije plava boja. Nakon toga se meri apsorbanca na 595 nm.

Određivanje standardna krive:

Pre svake serije eksperimenata određena je standardna kriva. Kao standard korišćen je preparat lipaze. Standardni rastvori u opsegu 0,1 do 0,5 mg cm⁻³ dobijeni su razblaživanjem osnovnog rastvora koncentracije 1 mg cm⁻³, a sadržaj proteina u rastvorima poznate koncentracije određivan je po već opisanoj proceduri.

3.1.3.13. *Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)*

4-Etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridon izolovan je filtracijom iz reakcione smeše, a zatim prečišćen od zaostalih molekula pomoću tečne hromatografije visokih performansi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) na AKTA Purifier uređaju opremljenim frakcionim kolektorom. Hromatografija je izvedena na semi

preparativnoj reverzno faznoj C18 koloni (HYPERSIL GOLD 5 μm ODS, 10 x 250 mm). Kao mobilne faze korišćeni su: A (voda + 0,1 % (v/v) mravlja kiselina) i B (acetonitril + 0,1 % (v/v) mravlja kiselina). Nakon ekvibracije kolone u 20 %-tnoj mobilnoj fazi B (1 zapremina kolone), uzorak je nanesen i bez prethodnog ispiranja nevezanih molekula eluiran linearnim gradijentom mobilne faze B od 20 do 100% u trajnju od 1 zapremine kolone. Nakon toga elucija je nastavljena sa 100 %-tnom mobilnom fazom B još jednu zapreminu kolone. Protok tokom celog trajanja hromatografije je iznosio $6\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$. Pikovi su detektovani na 320 nm. Frakcije ispod pika piridona su sakupljane i spojene, a zatim uparene do konstantne mase.

3.1.3.14. Furijeova transformacijska infracrvena spektroskopija (FT-IR)

Za FT-IR analize korišćeno je 3 mg uzorka koji se pomeša i sprai sa 147 mg kalijum bromida. Smeša se zatim komprimuje u tablete pod pritiskom od 11 t, u trajanju od oko 2 min. Dobijeni spektri su u rasponu talasnog broja od $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, i na rezoluciji spektra od 4 cm^{-1} .

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Ispitivanje enzimske sinteze 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona

Enzimi predstavljaju izuzetno važne katalizatore u sintezi organskih jedinjenja, i da bi se postigli što veći prinosi neophodno je poznavati mehanizam katalize. Poznavanje enzimske kinetike olakšava rasvetljavanje mehanizma i značajno je za razumevanje načina delovanja enzima. Kinetička merenja je neophodno raditi u uslovima pod kojima enzim ispoljava maksimalnu katalitičku aktivnost i zbog toga je prethodno potrebno ispitati uticaj različitih reakcionih parametara na željenu reakciju. Iz tog razloga, u ovom delu rada, najpre je ispitan uticaj temperature, početne koncentracije enzima i molskog odnosa supstrata na sintezu 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona, a zatim je pod optimalnim uslovima ispitivana enzimska kinetika.

4.1.1. Optimizacija reakcionih parametara

Za određivanje optimalnih uslova može se koristiti konvencionalni metod koji podrazumeva variranje jednog od ispitivanih faktora pri konstantnim vrednostima ostalih faktora. Budući da je jednodimenzionalan, ovaj težak i dugotrajan metod, često ne garantuje određivanje optimalnih uslova.^[179, 180] Sa druge strane, izvođenje eksperimenata za svaku moguću kombinaciju ispitivanih faktora je nepraktično i zahteva dugotrajan rad.

Poslednjih decenija, u svim područjima istraživanja, primećen je sve veći porast statističkog planiranja eksperimenata, a izuzetno je korisna njegova upotreba pri optimizaciji tehnoloških i proizvodnih procesa. Kako je potreban relativno mali broj eksperimentalnih testova smanjuje se utrošak materijala i vremena potrebnog za izvođenje određenog eksperimenta, a takođe je moguće otkriti i međusobnu interakciju između ispitivanih faktora.

Uticaj tri faktora na pet nivoa vrednosti ispitan je pomoću centralnog kompozitnog rotabilnog dizajna. On se sastoji iz tri glavna dela. Prvi deo, faktorski, sastoji se iz dva nivoa vrednosti svakog od faktora i kodiraju se kao -1 i +1. Drugi, aksijalni, koji ima za cilj da poboljša preciznost modela sastoji se iz tačaka podjednako raspoređenih po

obimu kruga čiji je radijus α . Kako se faktorske i aksijalne tačke ne ponavljaju, da bi se obezbedio određeni broj stepeni slobode za procenu eksperimentalne greške i utvrđivanje preciznosti odzivne veličine, kao treću komponentu potrebno je dodati određeni broj centralnih tačaka.^[181]

Plan primenjen u ovom radu sastoji se iz 20 eksperimentalnih tačaka od kojih je 8 faktorskih, 6 aksijalnih i 6 centralnih. Ispitan je uticaj temperature, početne koncentracije enzima i molskog odnosa supstrata na sintezu 4,6-dialkil-3-cijano-2-piridona. Dobijeni rezultati modelovani su jednačinom drugog reda

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 b_{ij} X_i X_j \quad (3.1)$$

gde je Y odzivna površina, b_0 , b_i , b_{ii} i b_{ij} odsečak, linearni, kvadratni i interaktivni koeficijent regresije, a X_i i X_j nezavisne promenljive.

Vrednost koeficijenata i njihov statistički značaj određeni su metodom najmanjih kvadrata pomoću programa Matlab (verzija 6.5) i samo značajni članovi ($p \leq 0,05$) su razmatrani. Za utvrđivanje adekvatnosti modela korišćen je Fišerov test, a za određivanje signifikantnosti koeficijenata Studentov.

Stvarne i kodirane vrednosti faktora ispitivanih u reakciji sinteze 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona dati su tabeli 4.1. Odzivna veličina u ovom eksperimentu bio je prinos piridona, izražen u procentima u odnosu na acetilaceton, s obzirom da je on limitirajući supstrat.^[26] Primenjeni eksperimentalni plan i dobijeni rezultati dati su u tabeli 4.2. Prinosi predstavljeni u tabeli predstavljaju samo doprinos enzimske reakcije jer su dobijeni oduzimanjem prinosa spontane hemijske reakcije od prinosa u enzimski katalizovanim reakcijama.

Tabela 4.1. Kodirane i stvarne vrednosti faktora u eksperimentalnom planu primenjenom u sintezi 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona.

Ispitivani faktori	Kodirane vrednosti				
	-1,682	-1	0	1	1,682
Temperatura, $X_1/ ^\circ\text{C}$	23,2	30	40	50	56,8
Koncentracija enzima, $X_2/ \%(w/v)$	0,0074	0,125	0,2	0,275	0,326
Molski odnos supstrata, X_3	9,8	20	35	50	60,2

Tabela 4.2. Eksperimentalni plan za ispitivanje uticaja tri faktora na pet nivoa vrednosti na sintezu 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona metodom odzivnih površina.

Broj eksp.	Temperatura, $X_1/ ^\circ\text{C}$	Konc. enzima, $X_2/ \%$	Molski odnos supstrata, X_3	Prinos, %	
				Eksp. vrednosti ^b	Predviđene vrednosti
1	-1	-1	-1	41,51 ($\pm 0,08$)	56,61
2	1	-1	-1	73,14 ($\pm 1,57$)	65,57
3	-1	1	-1	41,51 ($\pm 0,47$)	41,95
4	1	1	-1	70,81 ($\pm 0,08$)	65,57
5	-1	-1	1	60,82 ($\pm 2,20$)	52,67
6	1	-1	1	68,60 ($\pm 0,71$)	54,85
7	-1	1	1	59,32 ($\pm 2,34$)	52,67
8	1	1	1	69,60 ($\pm 1,57$)	57,85
9	-1,682	0	0	37,66 ($\pm 0,43$)	33,61
10	1,682	0	0	43,41 ($\pm 2,09$)	55,31
11	0	-1,682	0	69,42 ($\pm 0,78$)	70,18
12	0	1,682	0	70,81 ($\pm 0,98$)	70,18
13 ^a	0	0	0	72,14 ($\pm 3,22$)	70,18
14	0	0	-1,682	43,89 ($\pm 1,29$)	49,44
15	0	0	1,682	42,78 ($\pm 1,84$)	49,44

^aCentralna tačka (6 ponavljanja). ^bSrednje vrednosti

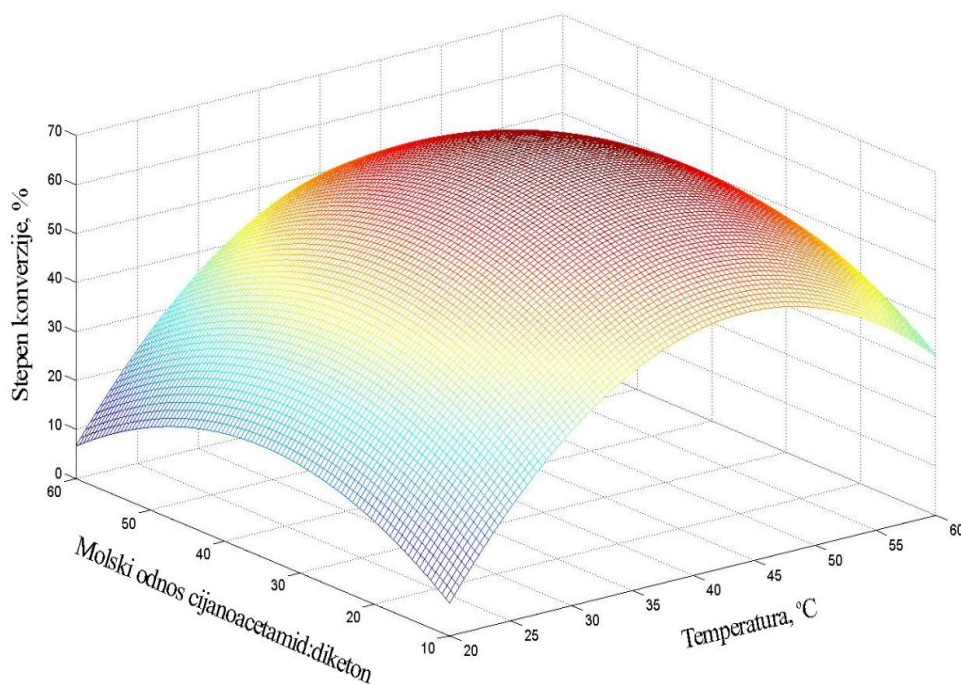
Prinos 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona varirao je između 37,66 i 73,14 %. Najveći molski prinos (73,14 %) postignut je u eksperimentu br. 2 na temperaturi od 50 °C, pri koncentraciji enzima 0,125 % i molskom odnosu supstrata 20, dok je najmanji molski prinos (37,66 %) postignut u eksperimentu br. 9 na temperaturi 23,2 °C, pri koncentraciji enzima 0,2 % i molskom odnosu supstrata 35.

Nakon statističke analize Fišerov test je pokazao da je za opisivanje datog seta eksperimentalnih rezultata adekvatan model drugog reda. Nakon analize Studentovim

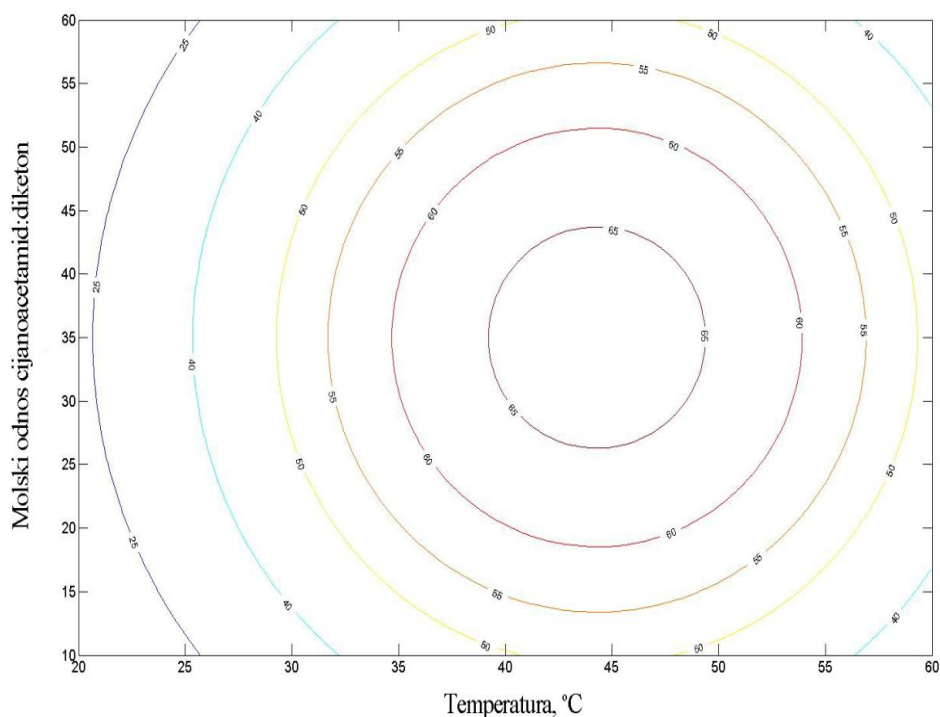
testom i eliminacije koeficijenata koji nemaju uticaj dobijena je jednačina sledećeg oblika:

$$Y = 70,18 + 6,45X_1 - 9,09X_1^2 - 5,36X_1X_3 - 7,33X_3^2 \quad (3.2)$$

Kao što se može videti, pokazalo se da koncentracija enzima u ispitivanom opsegu (0,074 – 0,326 % w/v) nema značajan uticaj na sintezu 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona. Linearni i kvadratni koeficijenti druga dva faktora su značajni i postoji negativna interakcija između njih. Trodimenzionalni i konturni dijagrami koji predstavljaju zavisnost prinosa piridona od temperature i molskog odnosa supstrata dati su na slikama 4.1 i 4.2.



Slika 4.1. Odzivna površina uticaja temperature i molskog odnosa supstrata na sintezu 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona.



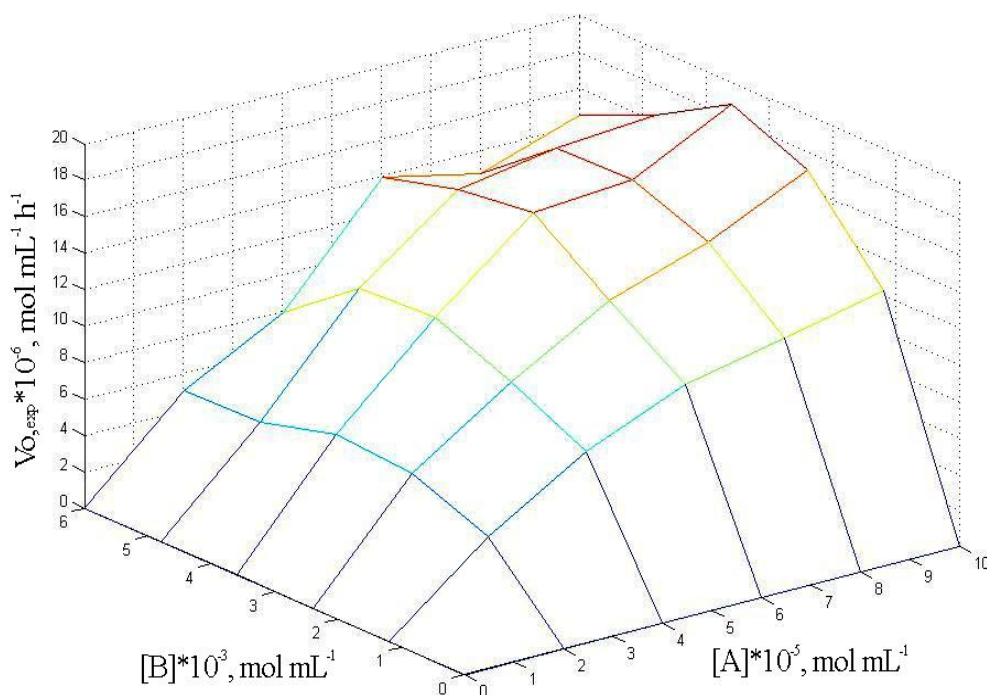
Slika 4.2. Projekcija odzivne površine prinosa 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona pri različitim vrednostima temperature i molskog odnosa supstrata.

Temperatura i molski odnos supstrata pokazuju jak uticaj na sintezu piridona i moguće je da se usled njihovog jakog uticaja, uticaj lipaze u posmatranom opsegu ne može statistički detektovati. Veličina vrednosti kvadratnih koeficijenata temperature i molskog odnosa supstrata ukazuje na intenzivniji uticaj temperature, a negativne vrednosti oba faktora ukazuju da se njihov uticaj na molski prinos piridona može opisati funkcijom koja ima maksimum (konveksnog oblika). To znači da sa povećanjem temperature, do optimalne vrednosti od 44 °C, usled povećanja broja efikasnih sudara između molekula supstrata i enzima u jedinici vremena, prinos 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona raste. Međutim, dalje povećanje temperature najverovatnije dovodi do termičke denaturacije enzima i smanjenja aktivnosti zbog čega se smanjuje i prinos. Isti model ponašanja primećen je i pri ispitivanju molskog odnosa supstrata. Porast molskog odnosa supstrata do 36 dovodi do povećanja prinosa proizvoda, što ukazuje na to da je za formiranje dovoljne količine enzim-supstrat kompleksa potreban značajan višak cijanoacetamida. Smanjenje prinosa pri daljem povećanju molskog odnosa može biti

posledica njegovog inhibitornog dejstva na enzim ili povećanih sternih smetnji u mikrookruženju enzima pa je otežan pristup drugom supstratu. Optimalni uslovi za sintezu 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona su prema tome: temperatura 44 °C i molski odnos supstrata 36.

4.1.2. Proučavanje mehanizma enzimske sinteze

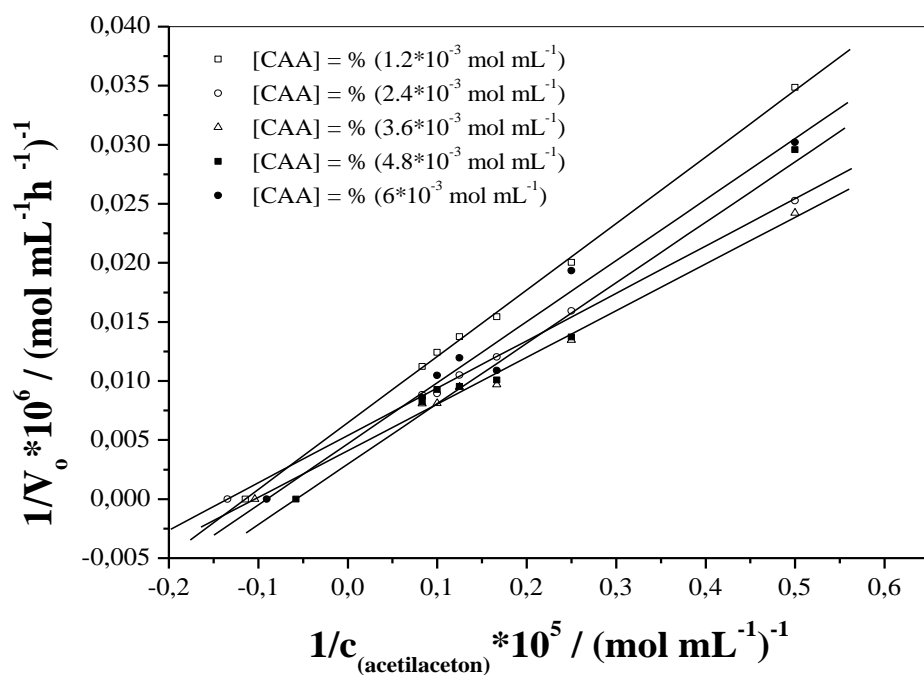
Prethodna ispitivanja pokazala su da je mehanizam reakcije katalizovane enzimom mnogo složeniji u odnosu na reakciju katalizovanu hemijskim katalizatorima. U cilju rasvetljavanja enzimskog mehanizma sinteze 4,6-disupstituisanih-3-cijano-2-piridona najpre je praćena kinetika sinteze najprostijeg, koji nastaje u reakciji kondenzacije cijanoacetamida i acetilacetona. Kinetika je praćena na prethodno određenim optimalnim uslovima: temperatura 44 °C i početna koncentracija enzima $4 \cdot 10^{-3} \text{ mg cm}^{-3}$. Koncentracija acetilacetona varirana je u opsegu od $2 \cdot 10^{-5} - 12 \cdot 10^{-5} \text{ mol cm}^{-3}$, a koncentracija cijanoacetamida u opsegu $1,2 \cdot 10^{-3} - 6 \cdot 10^{-3} \text{ mol cm}^{-3}$. Korišćene su veće koncentracije cijanoacetamida jer je u prethodnim istraživanjima utvrđeno,^[24] a pri optimizaciji reakcionih uslova u ovom radu i potvrđeno, da je za postizanje većih početnih brzina i prinosa 3-cijano-2-piridona neophodan njegov molski višak. Na slici 4.3 dat je trodimenzionalni prikaz zavisnosti početne brzine reakcije od početne koncentracije oba supstrata.



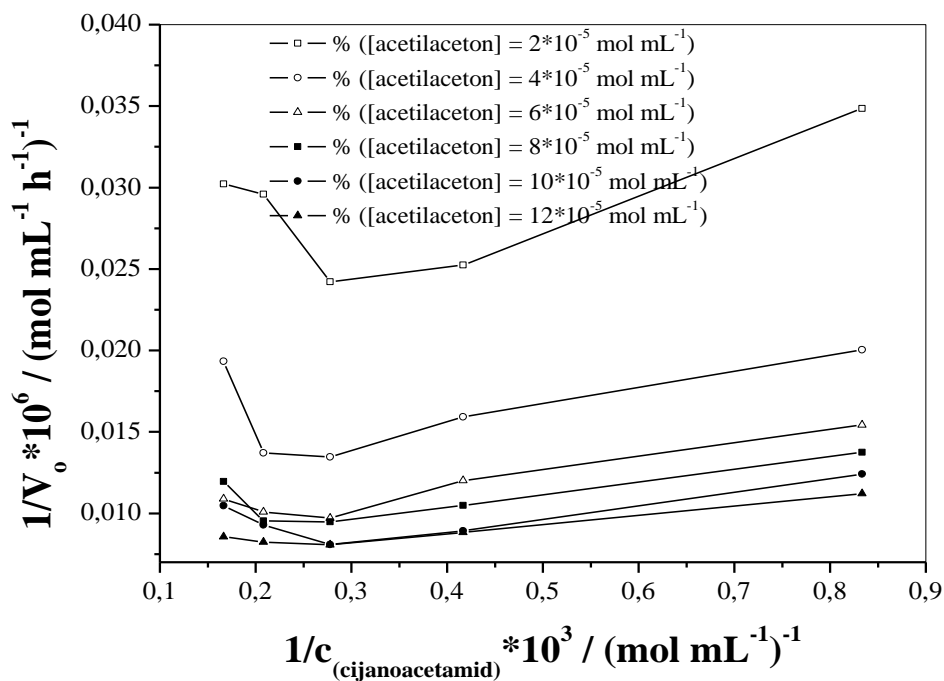
Slika 4.3. Zavisnost početne brzine reakcije sinteze 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona u zavisnosti od početne koncentracije acetilacetona i cijanoacetamida.

Može se videti da se sa povećanjem koncentracije acetilacetona početna brzina reakcije naglo povećava do $\sim 10^{-4} \text{ mol cm}^{-3}$, nakon čega se polako približava lokalnim maksimalnim vrednostima. Stoga, može se zaključiti da uticaj ovog supstrata odgovara klasičnoj Mihaelis-Menteninoj kinetici, što je dodatno potvrđeno Lajnviver-Burkovim dijagramom (slika 4.4).

Sa druge strane, početna brzina reakcije raste sa povećanjem koncentracije cijanoacetamida do $\sim 3,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol cm}^{-3}$. Dalje povećanje koncentracije cijanoacetamida dovodi do pada početne brzine reakcije što ukazuje da postoji inhibicija lipaze cijanoacetamidom. Nelinearna zavisnost u Lajnviver-Burkovom dijagramu potvrđuje ovu pretpostavku (slika 4.5). Maksimalna brzina reakcije od $124 \mu\text{mol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ postignuta je pri početnoj koncentraciji acetilacetona $12 \cdot 10^{-5} \text{ mol cm}^{-3}$ i pri početnoj koncentraciji cijanoacetamida $3,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol cm}^{-3}$.



Slika 4.4. Recipročne zavisnosti početne brzine reakcije od koncentracije acetilacetona.

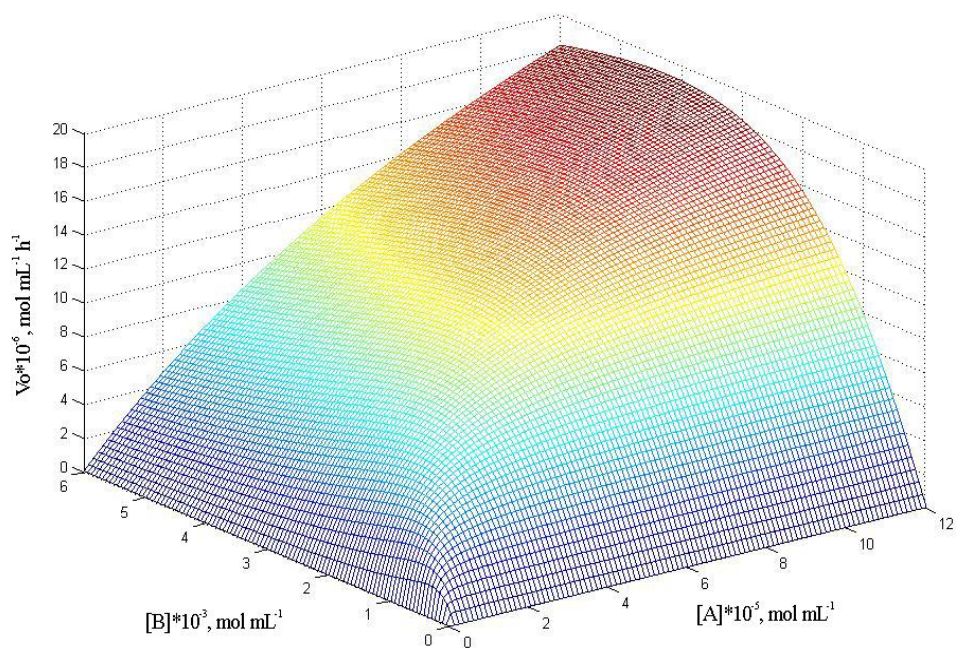


Slika 4.5. Recipročne zavisnosti početne brzine reakcije od koncentracije cijanoacetamida.

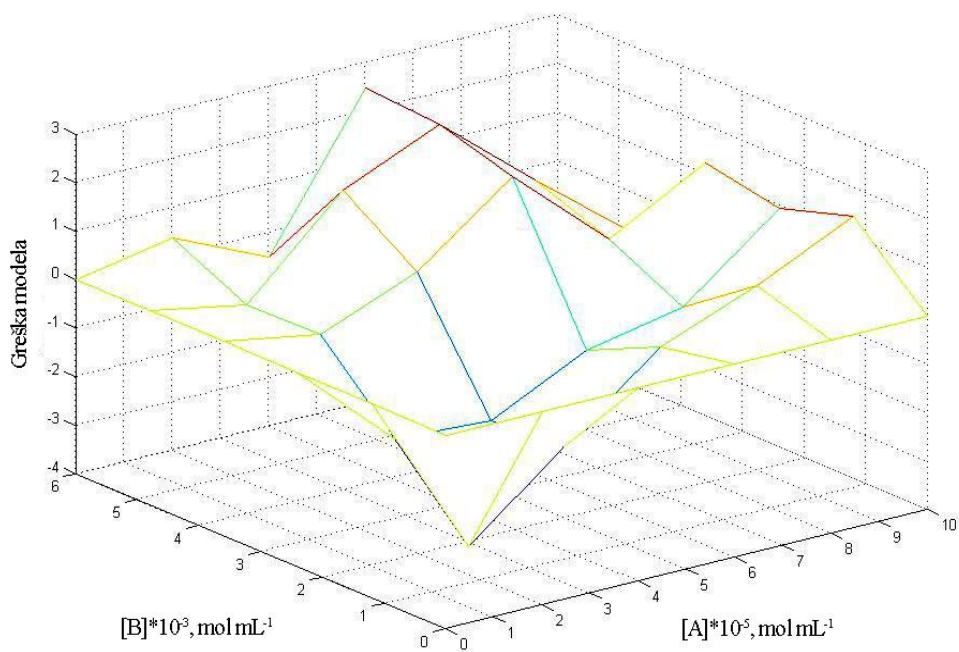
Nakon preliminarne analize eksperimentalnih rezultata testirana su dva kinetička modela: ping-pong model sa inhibicijom cijanoacetamidom i sekvencijalni pravilni mehanizam sa inhibicijom cijanoacetamidom. Statistička analiza je pokazala da je korelacija između početnih brzina izračunatih sekvencijalnim modelom i eksperimentalno dobijenih vrednosti početnih brzina veoma loša sa koeficijentom linearnosti manjim od 0,8. Međutim, drugi testirani model, ping-pong sa inhibicijom cijanoacetamidom, pokazao je veoma dobro slaganje sa eksperimentalnim rezultatima sa koeficijentom linearnosti 0,958. Vrednosti konstanti ping-pong bi-ter modela sa inhibicijom cijanoacetamidom koje ulaze u sastav modela i vrednosti konstanti specifičnosti date se u tabeli 4.3, a grafički prikaz dobijenog modela na slici 4.6.

Tabela 4.3. Vrednosti kinetičkih konstanti ping-pong bi-ter modela za sintezu 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona sa inhibicijom cijanoacetamidom

Konstanta	Vrednost
V_{\max}	$779 (\pm 9.82) \mu\text{mol cm}^{-3} \text{h}^{-1}$
$K_{m,A}$	$2.02 \cdot 10^{-5} (\pm 0.91 \cdot 10^{-6}) \text{ mol cm}^{-3}$
$K_{m,B}$	$10.6 \cdot 10^{-3} (\pm 3.34 \cdot 10^{-4}) \text{ mol cm}^{-3}$
$K_{i,B}$	$0.280 \cdot 10^{-3} (\pm 1.22 \cdot 10^{-4}) \text{ mol cm}^{-3}$

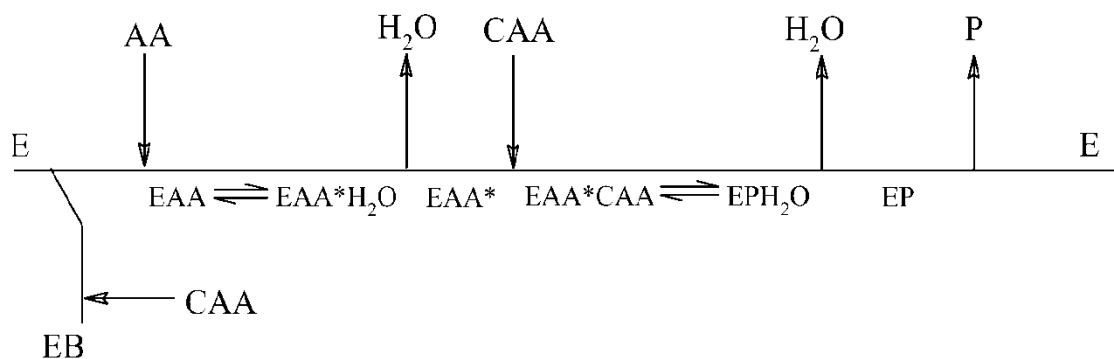


Slika 4.6. Ilustracija dobijenog ping-pong bi-ter modela.

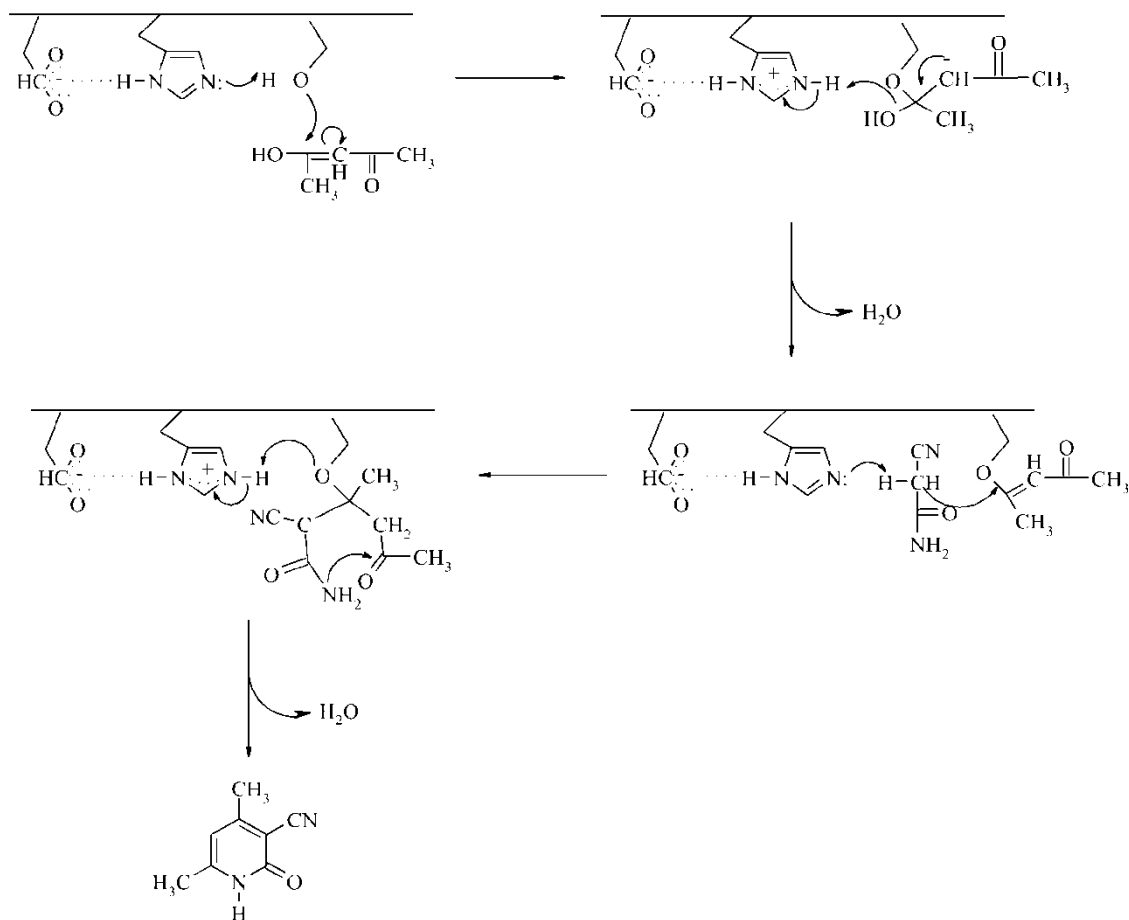


Slika 4.7. Odstupanja eksperimentalnih rezultata od dobijenog kinetičkog modela.

Dakle, rezultati kinetičke analize pokazali su da se reakcija sinteze 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona odvija prema ping-pong bi-ter mehanizmu, što znači da se nakon vezivanja prvog supstrata izdvaja prvi proizvod. Upoređivanjem ovog enzimskog mehanizma sa, od ranije poznatim, hemijskim mehanizmom bazno katalizovane reakcije (slika 2.9) zaključuje se da se međusobno dosta razlikuju. Prethodna ispitivanja uticaja 3-alkil-2,4-pentandiona i *N*-alkilcijanoacetamida na brzinu i prinos sinteze 3-cijano-2-piridona omogućavaju bolji uvid u sam mehanizam. Kako povećanje voluminoznosti *N*-alkil-grupe u cijanoacetamidu ne dovodi do značajnijih promena u brzini reakcije,^[27] može se izvesti zaključak da je deprotonovanje cijanoacetamida brzo. Sa druge strane, sa povećanjem voluminoznosti 3-alkil-grupe u acetilacetonu dolazi do drastičnog pada početnih brzina reakcije, pa vezivanje diketona predstavlja spori korak reakcije. Prilikom rasvetljavanja mehanizma potrebno je uzeti u obzir i katalitička svojstva lipaze i vrednost kinetičkih parametara. Na osnovu vrednosti Mihaelisovih konstanti kao i konstanti specifičnosti može se zaključiti da je acetilaceton prvi supstrat koji se vezuje za molekul lipaze. Pretpostavljeni mehanizam enzimski katalizovane reakcije dat je na slici 4.8 i šemi 4.1.



Slika 4.8. Šematski prikaz ping-pong bi-ter mehanizma: E – lipaza; CAA – cijanoacetamid; AA – acetilaceton; P – piridon; EAA, EP i ECAA – kompleksi lipaze sa AA, P i CAA; EAA* – 1-metil-3-okso-but-1-enil-enzim kompleks i EB – kompleks lipaze i cijanoacetamida.



Šema 4.1 Pretpostavljeni mehanizam enzimski katalizovane sinteze 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona.

U prvom koraku nukleofilni kiseonik iz serina reaguje sa jednom karbonilnom grupom iz molekula diketona. Preostala dva člana katalitičke trijade, histidin i asparaginska kiselina stabilizuju nastali kompleks. Azot sa histidina prima proton iz serina, a asparaginska kiselina delokalizuje naelektrisanje formiranjem vodonične veze sa histidinom. Zatim se, u drugom koraku, oslobađa prvi molekul vode. Nakon toga, nukleofilni α -ugljenikov atom sa cijanoacetamida u napadu na formirani kompleks, koji je olakšan uklanjanjem protona sa histidina, formira drugi enzim-supstrat kompleks. Posle ovoga sledi brza ciklizacija i oslobađanje drugog molekula vode i supstituisanog 3-cijano-2-piridona. Inhibitorni efekat cijanoacetamida može se objasniti tako što nukleofilni kiseonik serina može u prvom koraku da reaguje sa njegovom karbonilnom grupom i formira neaktivni kompleks.

4.2. Ispitivanje enzimske sinteze 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona

Značaj određenih derivata piridona u biološki aktivnim sistemima usmerio je našu pažnju na sintezu 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona, prekursora vitamina B₆. Stoga je, u ovom delu rada, metodom odzivnih površina, ispitan uticaj tri reakciona parametra na kondenzaciju cijanoacetamida i etoksiacetilacetona, a zatim je ispitana kinetika, ove enzimski katalizovane reakcije.

4.2.1. Optimizacija reakcionih parametara

Pri optimizaciji uslova sinteze 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona varirana su tri reakciona parametra: temperatura, u opsegu 23,2 – 56,8 °C; početna koncentracija enzima, u opsegu 0,23 – 1,57 % (w/v); i molski odnos supstrata, u opsegu 9,8 – 60,2. Odzivna veličina u ovom eksperimentu bila je početna brzina sinteze 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona. Stvarne i kodirane vrednosti faktora date su u tabeli 4.4, a primenjeni eksperimentalni plan zajedno sa dobijenim i predviđenim vrednostima početnih brzina u tabeli 4.5.

Tabela 4.4. Kodirane i stvarne vrednosti faktora u eksperimentalnom planu primenjenom u sintezi 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona.

Ispitivani parametri	Kodirane vrednosti				
	-1,682	-1	0	1	1,682
Temperatura, X ₁ / °C	23,2	30	40	50	56,8
Koncentracija enzima, X ₂ / %(w/v)	0,23	0,5	0,9	1,3	1,57
Molski odnos supstrata, X ₃	9,8	20	35	50	60,2

Tabela 4.5. Eksperimentalni plan za ispitivanje uticaja tri faktora na pet nivoa vrednosti na sintezu 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona metodom odzivnih površina.

Broj eksp.	Temp., $X_1 / ^\circ\text{C}$	Konc. enzima, $X_2 / \%$	Molski odnos supstrata, X_3	Početne brzine reakcije		Prinos, %
				Eksp. vrednosti ^b	Predviđene vrednosti	
1	-1	-1	-1	0,194 ($\pm 2,0 \cdot 10^{-3}$)	0,225	17,60
2	1	-1	-1	0,980 ($\pm 9,0 \cdot 10^{-3}$)	0,947	53,06
3	-1	1	-1	0,570 ($\pm 7,1 \cdot 10^{-3}$)	0,391	35,28
4	1	1	-1	2,198 ($\pm 8,3 \cdot 10^{-3}$)	2,223	64,90
5	-1	-1	1	0,306 ($\pm 1,2 \cdot 10^{-3}$)	0,247	26,48
6	1	-1	1	1,268 ($\pm 1,0 \cdot 10^{-3}$)	1,409	52,30
7	-1	1	1	0,831 ($\pm 6,9 \cdot 10^{-4}$)	0,823	51,87
8	1	1	1	3,168 ($\pm 9,0 \cdot 10^{-3}$)	3,096	65,16
9	-1,682	0	0	0,329 ($\pm 9,7 \cdot 10^{-3}$)	0,440	29,41
10	1,682	0	0	3,007 ($\pm 3,0 \cdot 10^{-2}$)	2,958	60,33
11	0	-1,682	0	0,081 ($\pm 1,1 \cdot 10^{-4}$)	0,014	4,57
12	0	1,682	0	1,452 ($\pm 2,1 \cdot 10^{-2}$)	1,572	59,83
13 ^a	0	0	0	1,211 ($\pm 1,2 \cdot 10^{-3}$)	1,225	56,70
14	0	0	-1,682	0,578 ($\pm 9,9 \cdot 10^{-2}$)	0,652	33,93
15	0	0	1,682	1,420 ($\pm 3,5 \cdot 10^{-4}$)	1,404	57,03

^aCentralna tačka (6 ponavljanja). ^bSrednje vrednosti

Najveći molski prinos (65,16 %) i najveća vrednost početne brzine reakcije ($3,168 \mu\text{mol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) postignuti su u eksperimentu br. 8 na temperaturi od $50 ^\circ\text{C}$, pri početnoj koncentraciji enzima 1,3 % i molskom odnosu supstrata 50, dok su najmanji molski prinos (4,57 %) i najmanja vrednost početne brzine reakcije ($0,081 \mu\text{mol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) postignuti u eksperimentu br. 12 na temperaturi od $40 ^\circ\text{C}$, pri početnoj koncentraciji enzima 0,23 % i molskom odnosu supstrata 35. Rezultati statističke analize sumirani su u tabeli 4.6.

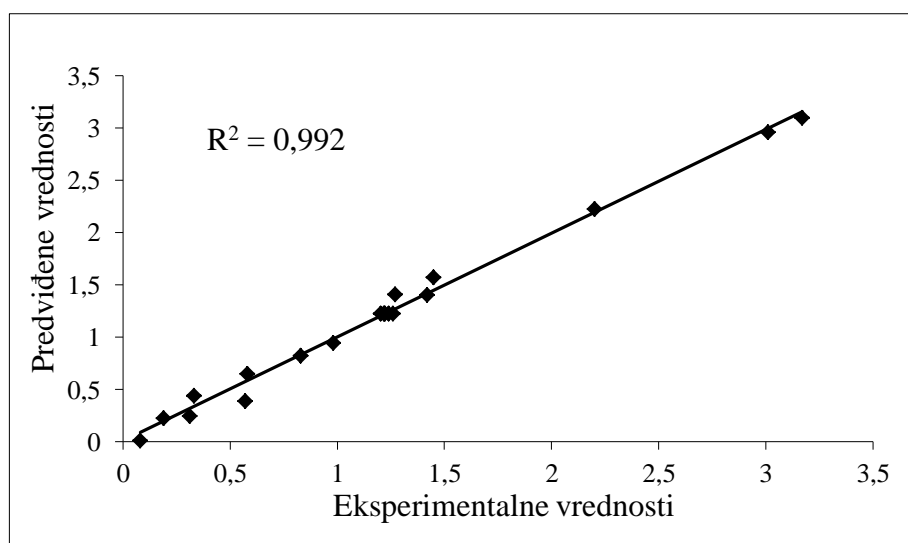
Tabela 4.6. Rezultati statističke analize

Poreklo	Suma kvadrata	df	Srednja vrednost kvadrata	F vrednost	p-vrednost
Model	12,96	9	1,44	136,88	0,0001
Ostatak	0,11	10	0,011		
Greška	1,979E-003	5	3,959E-004		
Ukupno	13,07	19			

$R^2 = 0,9919$; korigovani $R^2 = 0,9847$; predviđeni $R^2 = 0,9354$; preciznost = 42,481; CV = 8,64 %; greška pri fitovanju F-vrednosti = 52,15.

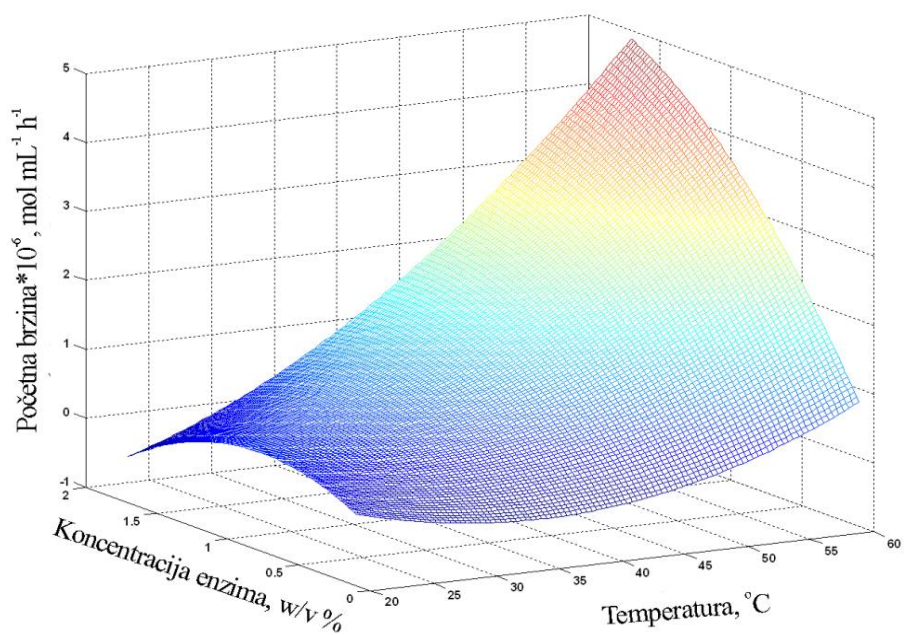
Visoka vrednost koeficijenta regresije prave (0,992) ukazuje na odlično slaganje eksperimentalnih rezultata i rezultata predviđenih na osnovu dobijenog modela, što je ilustrovano na slici 4.9. Takođe, niska vrednost koeficijenta varijacije (8,64 %) jasno govori o preciznosti i reproducibilnosti eksperimentalnih rezultata. Rezultati se mogu opisati jednačinom drugog reda, a dobijena jednačina ima sledeći oblik:

$$Y = 1,22 + 0,75X_1 + 0,46X_2 + 0,22X_3 + 0,17X_1^2 - 0,15X_2^2 + 0,28X_1X_2 - 0,11X_1X_3 + 0,1X_2X_3 \quad (3.3)$$

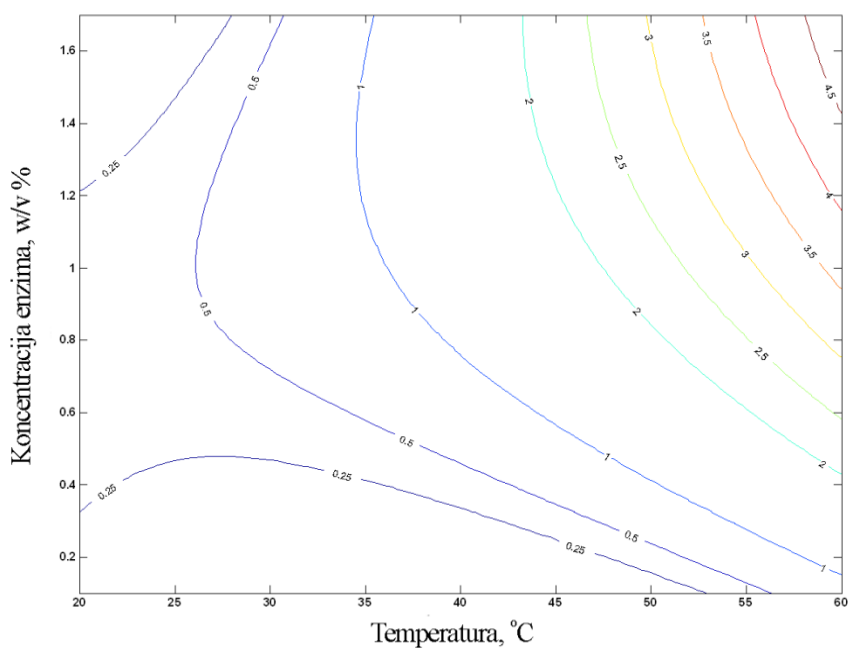


Slika 4.9. Grafički prikaz odstupanja regresionog modela od eksperimentalnih vrednosti.

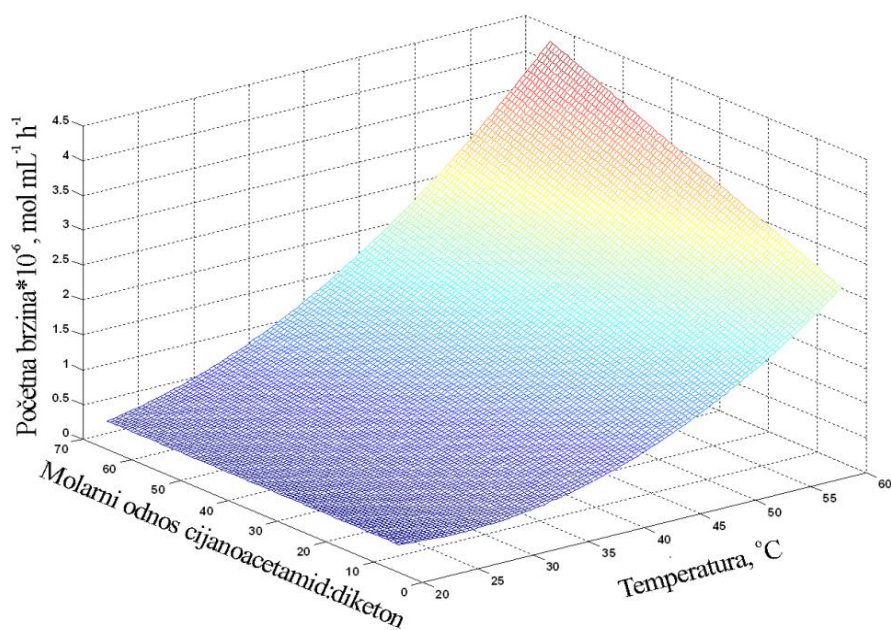
Uticaji parova ispitivanih faktora na početnu brzinu sinteze 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona prikazani su na trodimenzionalnim i konturnim dijagramima (slike 4.10 – 4.15).



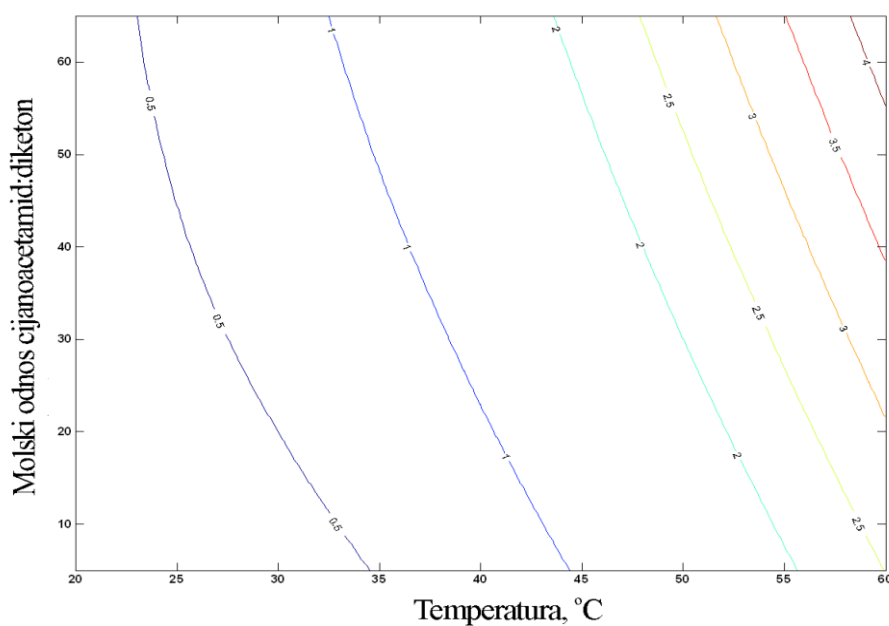
Slika 4.10. Odzivna površina uticaja temperature i početne koncentracije enzima na početnu brzinu sinteze 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona.



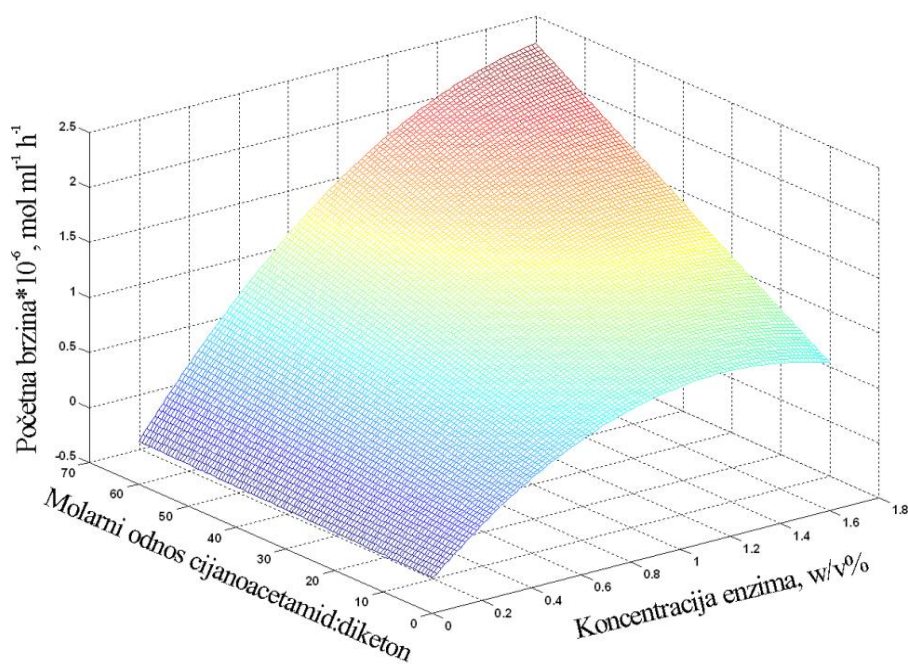
Slika 4.11. Projekcija odzivne površine početne brzine sinteze 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona pri različitim vrednostima temperature i početne koncentracije enzima.



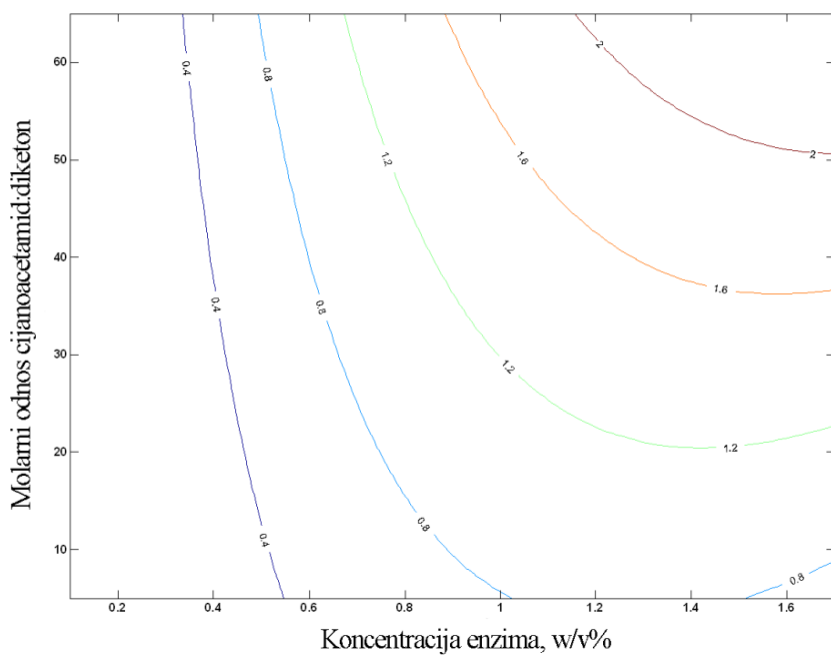
Slika 4.12. Odzivna površina uticaja temperature i molskog odnosa supstrata na početnu brzinu sinteze 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona.



Slika 4.13. Projekcija odzivne površine početne brzine sinteze 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona pri različitim vrednostima temperature i molskog odnosa supstrata.



Slika 4.14. Odzivna površina uticaja početne koncentracije enzima i molskog odnosa supstrata na početnu brzinu sinteze 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona.

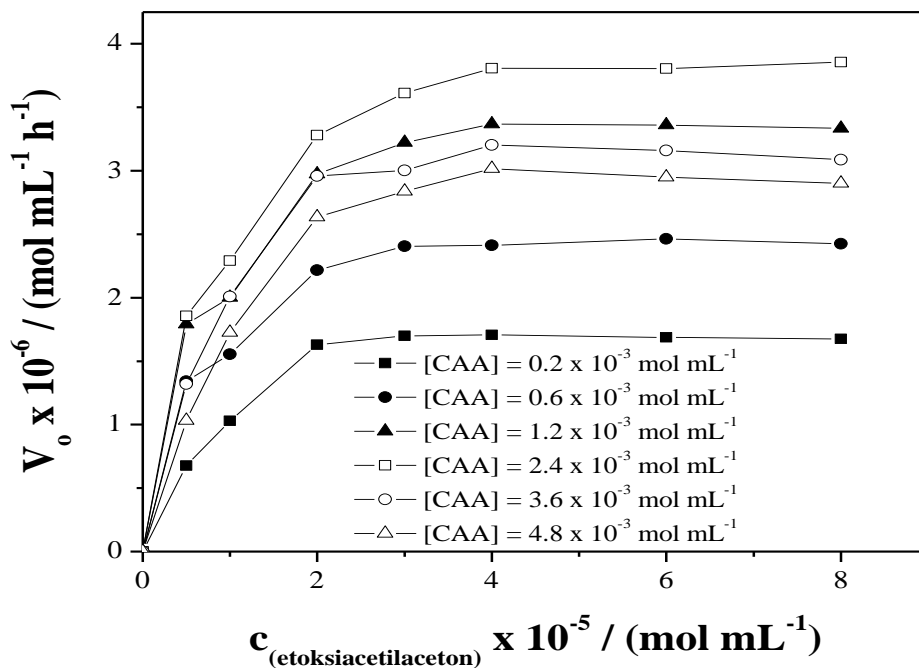


Slika 4.15. Projekcija odzivne površine početne brzine sinteze 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona pri različitim vrednostima početne koncentracije enzima i molskog odnosa supstrata.

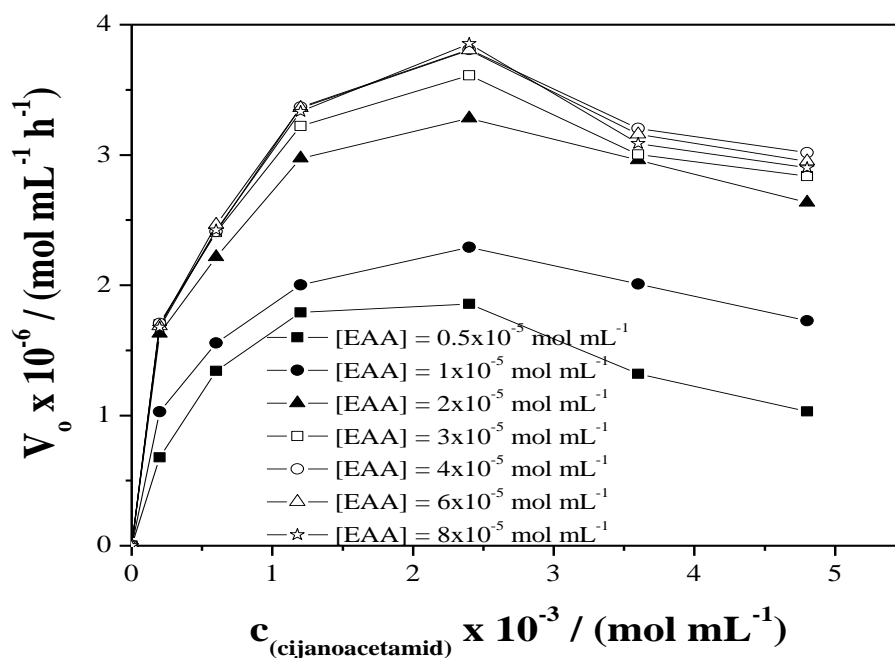
Na osnovu vrednosti linearnog regresionog koeficijenta temperatura je faktor koji pokazuje najveći uticaj na brzinu sinteze 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona i u celom ispitanom opsegu početna brzina reakcije raste. Visoke vrednosti temperature na kojima je enzim zadržao katalitičku aktivnost pomalo iznenađuju u poređenju sa već poznatim temperaturnim optimumom lipaze iz *C. rugosa*. Međutim, kako se najveći deo istraživanja reakcija katalizovanih lipazom obavlja u organskim rastvaračima, smanjena aktivnost na povišenim temperaturama može se pripisati njenoj inaktivaciji u organskom rastvaraču. Vrednosti koeficijenata interakcije ukazuju da najveća interakcija postoji između temperature i početne koncentracije enzima. Uticaj početne koncentracije enzima može se opisati funkcijom sa maksimumom i s obzirom na pozitivnu interakciju ovog faktora sa temperaturom, položaj lokalnih maksimuma se sa porastom temperature pomera ka višim vrednostima. Manje izražena i skoro zanemarljiva interakcija postoji između molskog odnosa supstrata i druga dva faktora sa vrednostima koeficijenata, 0,11 za interakciju sa temperaturom i 0,10 za interakciju sa početnom koncentracijom enzima. Na osnovu male vrednosti kvadratnog koeficijenta za molski odnos supstrata ovaj koeficijent je isključen iz jednačine i uticaj ovog faktora se može opisati linearnom funkcijom sa pozitivnom vrednošću koeficijenta, pa početna brzina sinteze 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona raste u celom ispitanom opsegu molskog odnosa supstrata.

4.2.2. Proučavanje mehanizma enzimske sinteze

Kao i u kinetičkim ispitivanjima sinteze 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona i sinteza 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona praćena je na optimalnim uslovima: na temperaturi 50 °C i pri početnoj koncentraciji enzima od 1,3 % (w/v). Koncentracija etoksiacetilacetona varirana je u opsegu od $0,5 \cdot 10^{-5}$ do $8 \cdot 10^{-5}$ mol cm^{-3} , a koncentracija cijanoacetamida od $0,2 \cdot 10^{-3}$ do $4,8 \cdot 10^{-3}$ mol cm^{-3} . Grafički prikaz zavisnosti početne brzine reakcije od početne koncentracije oba supstrata dat je na slikama 4.16 i 4.17.



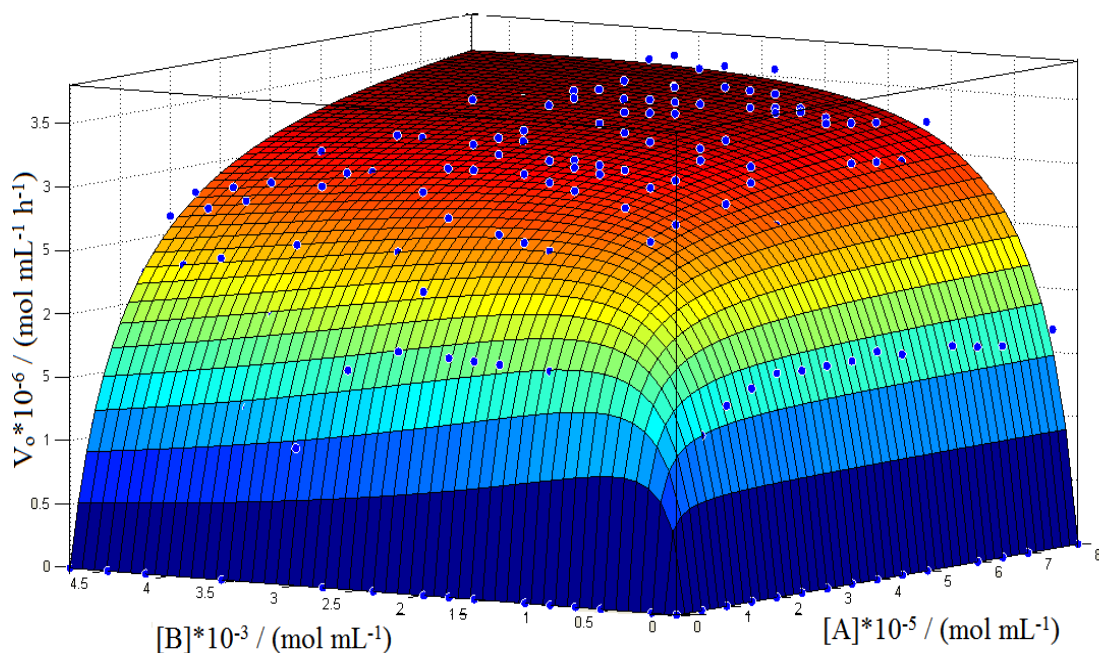
Slika 4.16. Uticaj koncentracije etoksiacetilacetona na početnu brzinu reakcije pri različitim fiksnim vrednostima koncentracije cijanoacetamida.



Slika 4.17. Uticaj koncentracije cijanoacetamida na početnu brzinu reakcije pri različitim fiksnim koncentracijama etoksiacetilacetona.

Variranjem početne koncentracije etoksiacetilacetona dobija se kriva koja odgovara klasičnoj Mihaelis-Menteninoj jednačini. Sa povećanjem koncentracije etoksiacetilacetona raste početna brzina reakcije, polako se približavajući vrednosti lokalnog maksimuma. Interesantno je primetiti da se vrednosti lokalnih maksimuma povećavaju sa povećanjem fiksirane vrednosti cijanoacetamida do $2,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol cm}^{-3}$. U eksperimentalnim serijama sa većom koncentracijom cijanoacetamida se, najverovatnije usled inhibitornih efekata, vrednosti lokalnih maksimuma smanjuju. Variranjem početne koncentracije cijanoacetamida dobija se kriva koja odgovara inhibiciji supstratom u višku. U zavisnosti od fiksirane vrednosti etoksiacetilacetona optimalna koncentracija cijanoacetamida pri kojoj se postiže najveća vrednost početne brzine reakcije raste od $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol cm}^{-3}$ (za niže koncentracije etoksiacetilacetona) do $2,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol cm}^{-3}$ (za više koncentracije etoksiacetilacetona). Maksimalna vrednost početne brzine reakcije od $3,85 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ postiže se pri koncentraciji etoksiacetilacetona od $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol cm}^{-3}$ i koncentraciji cijanoacetamida $2,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol cm}^{-3}$.

Eksperimentalni rezultati fitovani su sa dva modela: ping-pong model sa inhibicijom cijanoacetamidom i sekvencijalni model sa pravilnim redosledom vezivanja sa inhibicijom cijanoacetamidom. Vrednosti koeficijenta linearnosti ($< 0,8$ za sekvencijalni i $0,94$ za ping-pong model) jasno ukazuju da se reakcija sinteze odigrava prema ping-pong mehanizmu. Grafički prikaz dobijenog ping-pong bi-ter modela sa inhibicijom cijanoacetamidom prikazan je na slici 4.18, a konstante koje ulaze u sastav modela i konstante specifičnosti date su u tabeli 4.7.

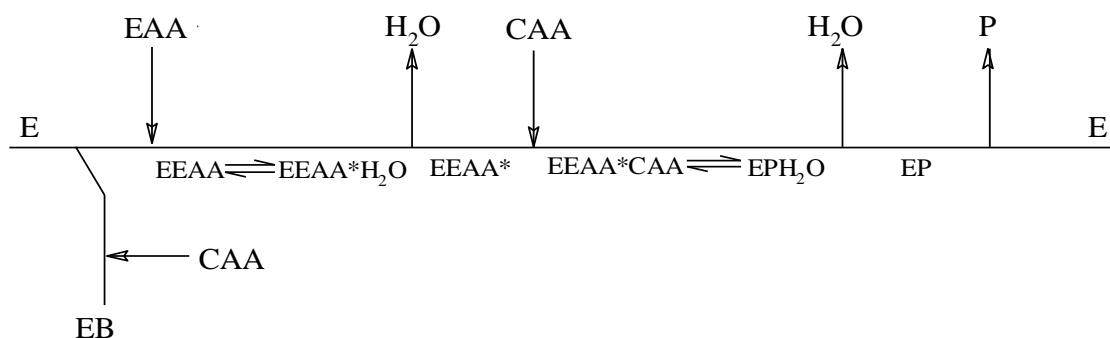


Slika 4.18. Ilustracija dobijenog ping-pong bi-ter modela.

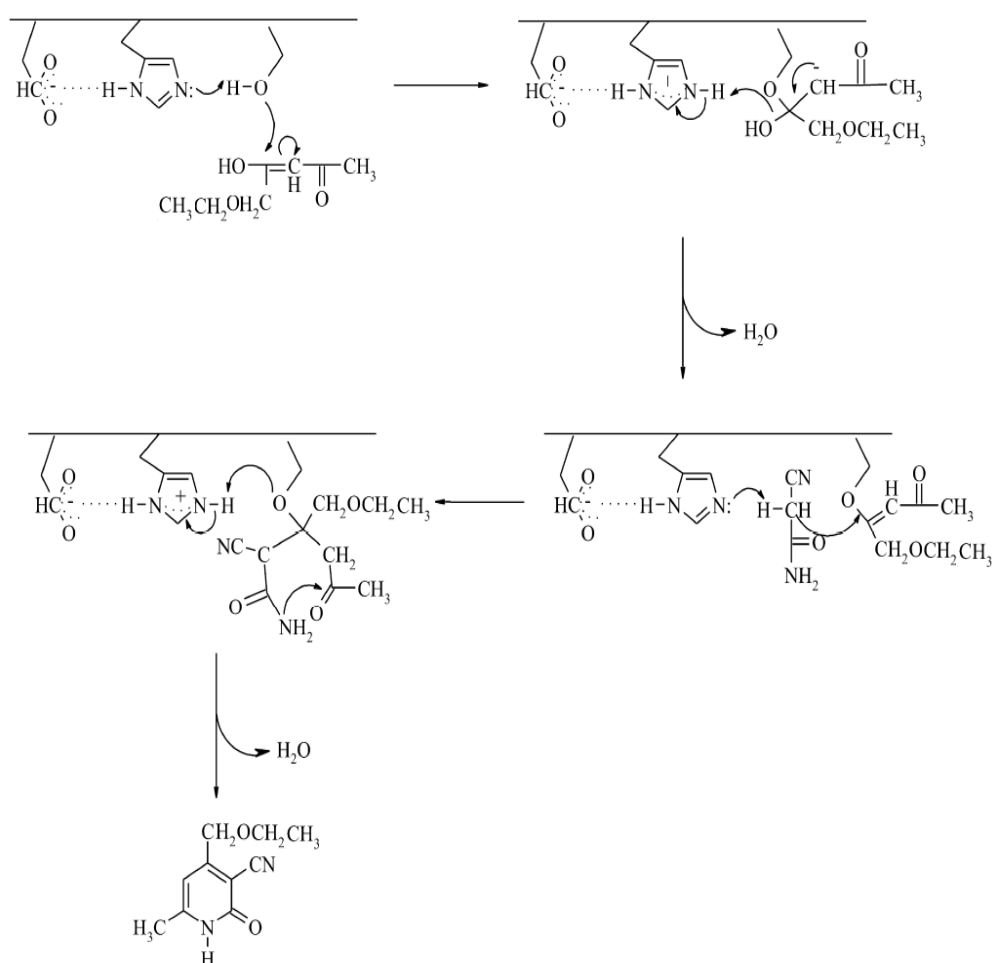
Tabela 4.7. Vrednosti kinetičkih konstanti ping-pong bi-ter modela za sintezu 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona sa inhibicijom cijanoacetamidom.

Konstanta	Vrednost
V_{\max} ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{h}^{-1}$)	4,34
$K_{m,A}$ (mol mL^{-1})	$0,315 \cdot 10^{-5}$
$K_{m,B}$ (mol mL^{-1})	$0,347 \cdot 10^{-3}$
$K_{i,B}$ (mol mL^{-1})	$1,603 \cdot 10^{-3}$
$K_{s,A}$ ($\text{mL g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	$1,06 \cdot 10^2$
$K_{s,B}$ ($\text{mL g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0,963

Vrednosti Mihaelis-Menteninih konstanti, kao i visoka vrednost odnosa konstanti specifičnosti etoksiacetilacetona i cijanoacetamida ($K_{s,A}/K_{s,B} = 109,6$) jasno ukazuju da lipaza iz *C. rugosa* ima veći afinitet prema 1,3-diketonu. Reakcija se odvija prema mehanizmu prikazanom na šemi 4.2. Nukleofilni kiseonik iz serina najpre napada karbonilni ugljenik u molekulu etoksiacetilacetona, a zatim se oslobađa jedan molekul vode i nastaje 1-etoksimetil-3-okso-but-1-enil-enzim kompleks. Nastali enzim-supstrat kompleks dalje reaguje sa cijanoacetamidom i formira binarni kompleks. Zatim se oslobađaju drugi molekul vode i piridon. Šematski prikaz pretpostavljenog mehanizma dat je na slici 4.19.



Slika 4.19. Šematski prikaz ping-pong bi-ter mehanizma sinteze 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona: E – lipaza; CAA – cijanoacetamid; EAA – etoksiacetilaceton; P – piridon; EEAA i EP – kompleksi lipaze sa EAA i P; EEAA* – 1-etoksimetil-3-okso-but-1-enil-enzim kompleks i EB – neaktivni kompleks lipaze i cijanoacetamida.



Šema 4.2. Pretpostavljeni mehanizam enzimske sinteze 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona.

Enzimski sintetisan 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridon je iz reakcione smeše izolovan pomoću tečne hromatografije. Izolovani proizvod je analiziran spektroskopski (FT-IR, ^1H NMR), a rezultati su povrdili njegovu strukturu:

FT-IR (KBr) $\bar{\nu}$ (cm^{-1}) 3290 (ν -NH), 3139, 3098 (δ_s -CH aromatičnog), 2983, 2974 (δ_{as} -CH₃), 2902, 2897 (δ_s -CH₃), 2217 (ν -CN), 1659 (amidna traka I), 1621 (amidna traka II), 1128 (ν -C-O).

^1H NMR (200 MHz DMSO) δ (ppm) 1.18 (t, 3H, J(Hz) 7.0, -CH₂OCH₂CH₃), 2.29 (s, 3H, piridon-CH₃), 3.54 (q, 2H, J(Hz) 7.0, -CH₂OCH₂CH₃), 4.47 (s, 2H, -CH₂OCH₂CH₃), 6.29 (s, 1H, -CH=), 12.51 (s, 1H, NH).

4.3. Poređenje kinetike sinteze 4-metil- i 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona

Vrednosti kinetičkih konstanti dobijenih iz modela i izračunate vrednosti konstanti specifičnosti mogu poslužiti da dobijemo informacije o meri afiniteta lipaze prema različitim supstratima. U tabeli 4.8. dat je uporedni prikaz konstanti.

Tabela 4.8. Uporedni prikaz kinetičkih konstanti enzimske sinteze 4-metil- i 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona.

Konstanta	4,6-dimetil-3-cijano-2-piridon	4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridon
V _{max} (μmol mL ⁻¹ h ⁻¹)	779	4,34
K _{m,A} (mol mL ⁻¹)	2,02·10 ⁻⁵	0,31510 ⁻⁵
K _{m,B} (mol mL ⁻¹)	10,6·10 ⁻³	0,34710 ⁻³
K _{i,B} (mol mL ⁻¹)	0,280·10 ⁻³	1,60310 ⁻³
k _{cat} (mol g ⁻¹ h ⁻¹)	0,195	3,3410 ⁻⁴
K _{S,A} (mL g ⁻¹ h ⁻¹)	9,65·10 ³	1,06·10 ²
K _{S,B} (mL g ⁻¹ h ⁻¹)	18,40	0,963

Upoređivanjem konstanti specifičnosti možemo utvrditi afinitet lipaze iz *C.rugosa* prema različitim 1,3-diketonima. Kako je konstanta specifičnosti acetilacetona oko 90 puta veća od konstante specifičnosti etoksiacetilacetona jasno je da lipaza iz *C. rugosa* ima veći afinitet prema manjem molekulu, acetilacetonu. Ako uporedimo katalitičke konstante za dve ispitivane sinteze može se primetiti da je sinteza 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona oko 500 puta brža od sinteze 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona. Ovaj podatak može izgledati neobično s obzirom na veću polarnost etoksimetil grupe u poređenju sa metil grupom, što olakšava napad na karbonilnu grupu etoksiacetilacetona. Međutim, ako se uzme u obzir karakterističan, u obliku tunela, aktivni centar ove lipaze, jasno je da će voluminoznijem molekulu etoksiacetilacetona biti otežan pristup katalitičkoj trijadi i da će sterni efekti biti izraženiji, pa će se enzim-supstrat kompleks znatno sporije formirati.

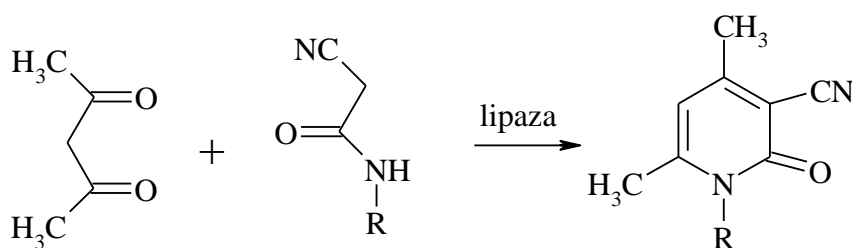
Eksperimentalni rezultati proučavanja enzimske sinteze oba pomenuta piridona mogu se opisati ping-pong bi-ter modelom sa inhibicijom cijanoacetamidom. Vrednosti konstanti inhibicije ukazuju da je sinteza 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona osetljivija na

povećanu koncentraciju cijanoacetamida i da je inhibicija, u ovom slučaju, izraženija. Takođe, ispitivanja su pokazala da se mehanizam enzimske sinteze razlikuje od klasične sinteze katalizovane hemijskim katalizatorima. Za razliku od hemijski katalizovane reakcije, kod koje prvi korak predstavlja nastajanje nukleofilne čestice iz cijanoacetamida, a zatim dolazi do napada na diketon, u enzimski katalizovanoj reakciji se vezivanje supstrata za aktivni centar enzima i oslobađanje proizvoda odvija naizmenično, pri čemu je molekul 1,3-diketona supstrat koji se prvi vezuje.

4.4. Uticaj strukture *N*-alkilcijanoacetamida na sintezu *N*-alkil-4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona

U ovom delu radu ispitan je uticaj dužine i razgranatosti alkil-grupa na enzimsku sintezu *N*-alkil-4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona. Uticaj alkil supstituenata ispitan je u reakciji pet različitih *N*-alkilcijanoacetamida, kao i samog cijanoacetamida, sa acetilacetonom. Reakcije su izvedene na 44 °C, pri početnoj koncentraciji acetilacetona od $2 \cdot 10^{-5}$ g cm⁻³ i početnoj koncentraciji enzima od $4 \cdot 10^{-3}$ g cm⁻³. Paralelno su izvedene dve eksperimentalne serije: sinteza piridona pri ekvimolarnim količinama reaktanata i sinteza piridona pri 36-ostrukum molskom višku *N*-alkilcijanoacetamida.

Strukture sintetisanih piridona prikazane su na slici 4.20.



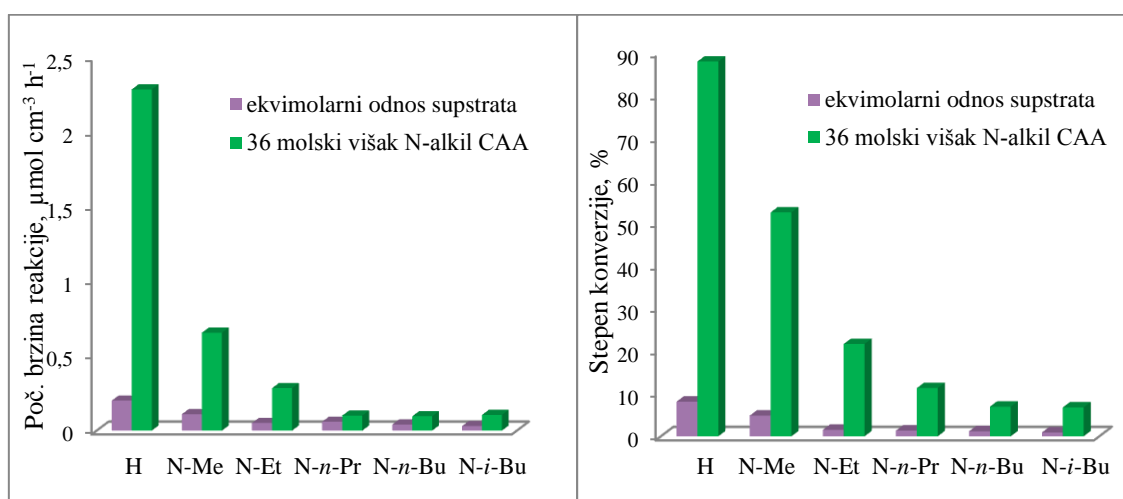
R: Me, Et, n-Pr, n-Bu, i-Bu

Slika 4.20. Reakcija sinteze različitih *N*-alkil-4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona.

U tabeli 4.9 i na slici 4.21 dat je uporedni prikaz prinosa supstituisanih piridona nakon 24 h kao i početnih brzina za različite molske odnose supstrata. U oba slučaja uvođenjem supstituenata prinosi i početne brzine reakcije se smanjuju, što ukazuje na postojanje sternih smetnji. Međutim, kao što je i ranije utvrđeno, za postizanje većih prinosa u enzimski katalizovanoj reakciji neophodan je višak *N*-alkilcijanoacetamida, pa su pri 36-ostrukum molskom višku supstrata prinosi gotovo deset puta veći, a reakcije čak i do 12 puta brže u poređenju sa prinosima i brzinama pri ekvimolarnom odnosu supstrata.

Tabela 4.9. Početne brzine i stepeni konverzije sinteze *N*-alkil-4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona (X-NH-CO-CH₂-CN) pri ekvimolarnom odnosu reaktanata i pri 36-ostrukom molskom višku *N*-alkilcijanoacetamida.

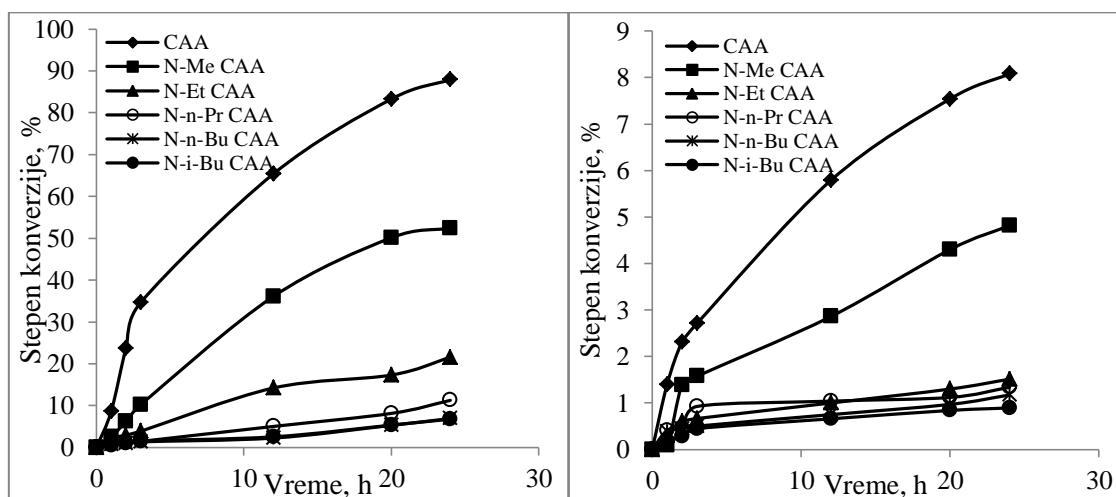
X	Ekvimolarni odnos supstrata		36 molski višak <i>N</i> -alkil CAA	
	V _o , μmol cm ⁻³ h ⁻¹	Prinos, %	V _o , μmol cm ⁻³ h ⁻¹	Prinos, %
H	0,20	8,08	2,29	87,93
Me	0,11	4,81	0,66	52,43
Et	0,051	1,51	0,29	21,55
<i>n</i> -Pr	0,06	1,34	0,10	11,26
<i>n</i> -Bu	0,041	1,17	0,097	6,92
<i>i</i> -Bu	0,03	0,89	0,11	6,76



Slika 4.21. Uporedni prikaz stepena konverzije i prinosa supstituisanih piridona pri ekvimolarnom odnosu supstrata i pri 36 molskom višku *N*-alkil cijanoacetamida.

Na slici 4.22 prikazana je promena stepena konverzije šest različitih *N*-supstituisanih piridona sa vremenom pri a) 36 molskom višku *N*-alkilcijanoacetamida i b) pri ekvimolarnom odnosu supstrata. Na slikama se jasno vidi da se prinosi piridona sa porastom broja ugljenikovih atoma alkil-grupa konstantno smanjuju. Najveći prinos od 87,93 % postignut je u reakciji acetilacetona sa cijanoacetamidom. Uvođenje metil-grupe usporava reakciju i nakon 24 h stepen konverzije se smanjuje skoro dva puta (52,43 %). Daljim povećanjem dužine alkil-grupe dolazi do postepenog smanjenja prinosa pa za *N*-etil- supstituent iznosi 21,55 %, *N*-*n*-propil- supstituent 11,26 %, *N*-*n*-butil- 6,92 % i na kraju za *N*-*i*-butil 6,76 %. Sličan, opadajući, trend primećuje se i za

početne brzine i do najvećeg pada u početnoj brzini reakcije sa $2,29 \mu\text{mol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ na $0,66 \mu\text{mol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ dolazi uvođenjem metil-grupe umesto atoma vodonika. Daljim porastom broja ugljenikovih atoma dolazi do konstantnog pada početne brzine reakcije da bi na kraju dostigla vrednost od samo $0,11 \mu\text{mol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ što je oko 20 puta sporije u odnosu na reakciju sa cijanoacetamidom. Očigledno je da postoji jak uticaj sternog faktora.



Slika 4.22. Tok sinteze *N*-alkil-4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona pri a) 36-ostrukom moljskom višku *N*-alkilcijanoacetamida i b) pri ekvimolarnom odnosu supstrata.

Najveći pad prinosa i početnih brzina primećuje se uvođenjem metil-grupe jer je najveća promena u veličini supstituenta kada se mali atom vodonika zameni znatno voluminoznijom metil-grupom. Daljim povećanjem voluminoznosti primećuje se pad prinosa, ali se sterna uticaj smanjuje pa su razlike sve manje i manje. Takođe se može primetiti da pri ekvimolarnom odnosu supstrata uvođenje grupe sa tri i više ugljenikovih atoma nema značajniji uticaj s obzirom da se već uvođenjem etil-grupe prinosi smanjuju na oko 1 %.

Uticaj razgranatosti alkil-grupa može se videti u reakciji acetilacetona sa *N*-n-butilcijanoacetamidom i *N*-i-butilcijanoacetamidom. Rezultati pokazuju da račvanje nema značajan uticaj na aktivnost lipaze iz *C. rugosa*. Verovatno je već sam *n*-butil-supstituent dovoljno voluminozan pa uticaj sternih efekata pri povećanju razgranatosti supstituenta nije moguće primetiti. Tako pri sintezi *N*-*n*-butil- i *N*-*i*-butil-4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona ne postoje bitne razlike kako u početnim brzinama tako i u prinosima.

4.5. Imobilizacija lipaze na višeslojne ugljenične nanocevi

U cilju povećanja stabilnosti enzima, u ovom radu ispitane su različite tehnike imobilizacije lipaze iz *C. rugosa* na višeslojne ugljenične nanocevi. MWCNT korišćene u ovom radu, čistoće > 95 wt %, dobijene su hemijskom depozicijom iz parne faze. Spoljašnji prečnik kreće se u opsegu od 20 – 30 nm, unutrašnji od 5 – 10 nm, a dužina od 150 – 200 μm . S obzirom na veliku specifičnu površinu i njenu hidrofobnost najpre je ispitana mogućnost adsorpcije. Zatim je, na dve vrste modifikovanih CNT (o-MWCNT i a-MWCNT) sa znatno hidrofilnijom površinom, ispitana mogućnost vezivanja stvaranjem prave kovalentne veze. Vezivanje na o-MWCNT zasniva se na stvaranju peptidne veze između karboksilne grupe sa površine nanocevi i amino grupe iz molekula enzima, dok je za vezivanje na a-MWCNT najpre neophodno oksidovati ugljenohidratni deo lipaze i uvesti karbonilne grupe, koje će se, za amino grupe sa površine enzima, vezati stvaranjem Šifove baze. Za sve pomenute tehnike imobilizacije ispitani su uticaj vremena imobilizacije i početne koncentracije enzima na masu vezanog enzima kao i na aktivnost imobilisanog preparata. Imobilizati najboljih karakteristika ispitani su u reakciji sinteze 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona.

4.5.1. Adsorpcija lipaze na nemodifikovane MWCNT

Kako bi se ispitao uticaj hidrofobnih i jonskih interakcija, adsorpcija je izvedena u 50 i 500 mM fosfatnom puferu pH vrednosti 7,00. Praćena je kinetika adsorpcije u vremenskom periodu od 2 h. Ispitan je uticaj početne koncentracije enzima koja je varirana u opsegu od 0,2 do 1,4 mg cm^{-3} , dok je masa nosača bila konstantna u svim eksperimentima i iznosila je 3 mg. Nakon završene imobilizacije, imobilizati su ispirani tri puta sa po 3 cm^3 pufera i u filtratima nije detektovano prisustvo proteina.

4.5.1.1. Adsorpcija u 50 mM fosfatnom puferu

Kako bi se odredilo optimalno vreme za postizanje maksimalne količine adsorbovanog enzima testiran je uticaj vremena kontakta lipaze i višeslojnih ugljeničnih nanocevi. Dobijeni rezultati promene mase vezanog enzima i stepena imobilizacije sa vremenom,

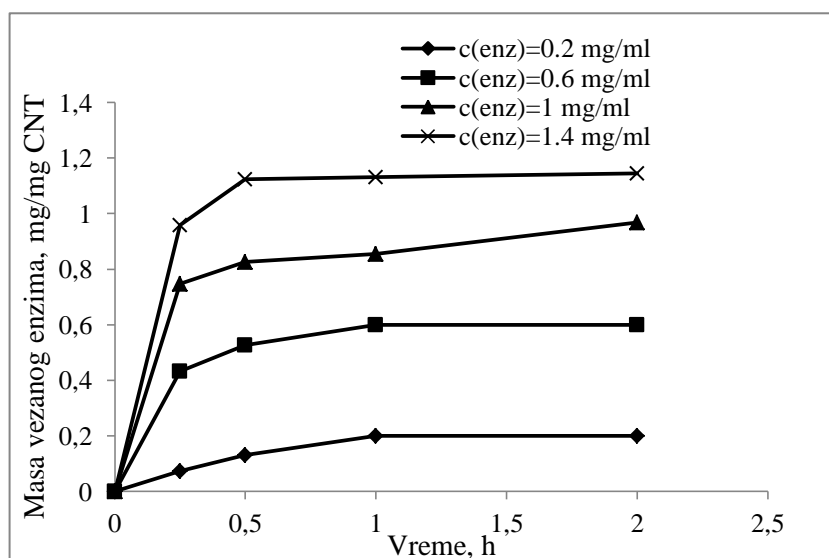
za različite početne koncentracije enzima prikazani su u tabeli 4.10 i na slikama 4.23 i 4.24.

Sa slike 4.23 jasno se vidi da sa povećanjem početne koncentracije raste i masa vezanog enzima, kao i da se povećava brzina imobilizacije. Za najveću ispitanu početnu koncentraciju enzima maksimalna količina enzima vezuje se već nakon 0,5 h, dok se za manje početne koncentracije ravnotežna postiže nakon 1 h. Upoređivanjem stepena imobilizacije, sve do početne koncentracije enzima od 1 mg cm^{-3} , vezuje se skoro celokupna količina enzima iz početnog rastvora, a za najveću koncentraciju enzima, $1,4 \text{ mg cm}^{-3}$, stepen imobilizacije je čak preko 80 %, što odgovara masi vezanog enzima od $\sim 1,2 \text{ mg po mg n-MWCNT}$. Postignuta masa vezanog enzima u ovom radu je izuzetno velika, kako u poređenju sa drugim konvencionalnim nosačima,^[182, 183] tako i u poređenju sa imobilizacijom drugih enzima na n-MWCNT.^[163]

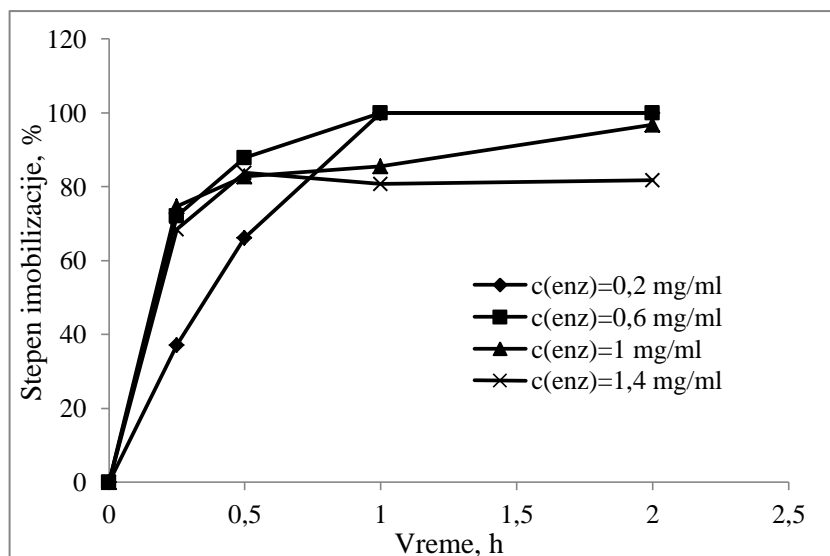
Tabela 4.10 Uticaj početne koncentracije enzima na masu vezanog enzima i stepen imobilizacije, za imobilizaciju u 50 mM puferu.

		Masa vezanog enzima, mg/mg CNT	Stepen imobilizacije, %
0,25 h	MWCNT-E _{0.2}	0,074	37,15
	MWCNT-E _{0.6}	0,432	72,08
	MWCNT-E _{1.0}	0,747	74,75
	MWCNT-E _{1.4}	0,958	68,46
0,5 h	MWCNT-E _{0.2}	0,132	66,10
	MWCNT-E _{0.6}	0,527	87,85
	MWCNT-E _{1.0}	0,827	82,70
	MWCNT-E _{1.4}	1,123	83,86
1 h	MWCNT-E _{0.2}	0,2	100
	MWCNT-E _{0.6}	0,6	100
	MWCNT-E _{1.0}	0,855	85,49
	MWCNT-E _{1.4}	1,13	80,82
2 h	MWCNT-E _{0.2}	0,2	100
	MWCNT-E _{0.6}	0,6	100
	MWCNT-E _{1.0}	0,967	96,74
	MWCNT-E _{1.4}	1,144	81,74

Kao što se može videti, adsorpcija se odvija u dve faze. Prva faza je brza, traje do 0,25 h i u ovoj fazi se adsorbuje najveći deo enzima. Druga faza je sporija i masa vezanog enzima se polako približava ravnotežnoj vrednosti. Uzimajući u obzir činjenicu da čak i na površini nemodifikovanih nanocevi postoji određena količina karboksilnih grupa, laktona i fenola,^[146] može se pretpostaviti da se osim, dominantnim, hidrofobnim interakcijama enzim može adsorbovati i elektrostatičkim privlačenjima i vodoničnim vezama. S obzirom na izrazitu hidrofobnost površine nemodifikovanih MWCNT i veliku hidrofobnost lipaze u prvoj fazi se enzim najverovatnije adsorbuje hidrofobnim interakcijama, dok tek u drugoj fazi dolazi do elektrostatičkih interakcija sa naelektrisanim grupama sa površine. Kako je količina naelektrisanih grupa na površini nemodifikovanih MWCNT mala, u ovoj fazi se vezuje i mala količina enzima.

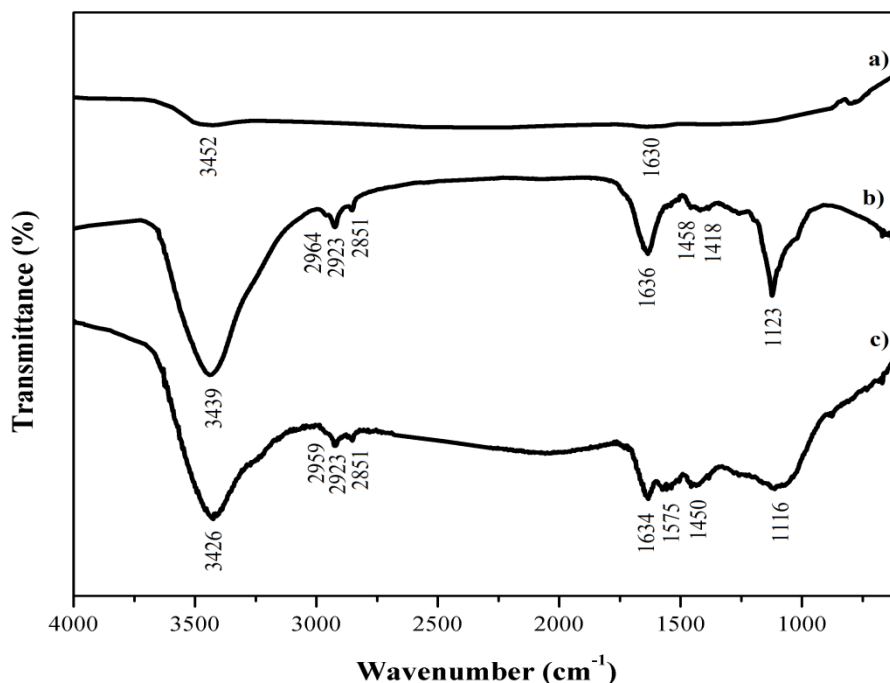


Slika 4.23. Promena mase vezanog enzima po jedinici mase nosača, za različite početne koncentracije enzima, u funkciji vremena imobilizacije.



Slika 4.24. Uticaj vremena inkubacije na stepen imobilizacije za različite početne koncentracije enzima.

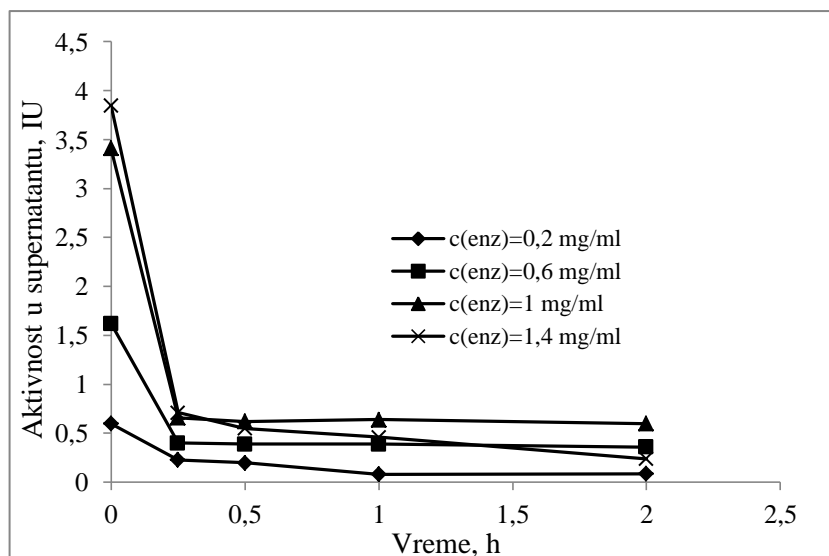
Da je lipaza uspešno imobilisana na n-MWCNT potvrđeno je FTIR spektroskopijom. FTIR spektri nemodifikovanih MWCNT, slobodne lipaze iz *C. rugosa* i lipaze imobilisane na n-MWCNT prikazani su na slici 4.25.



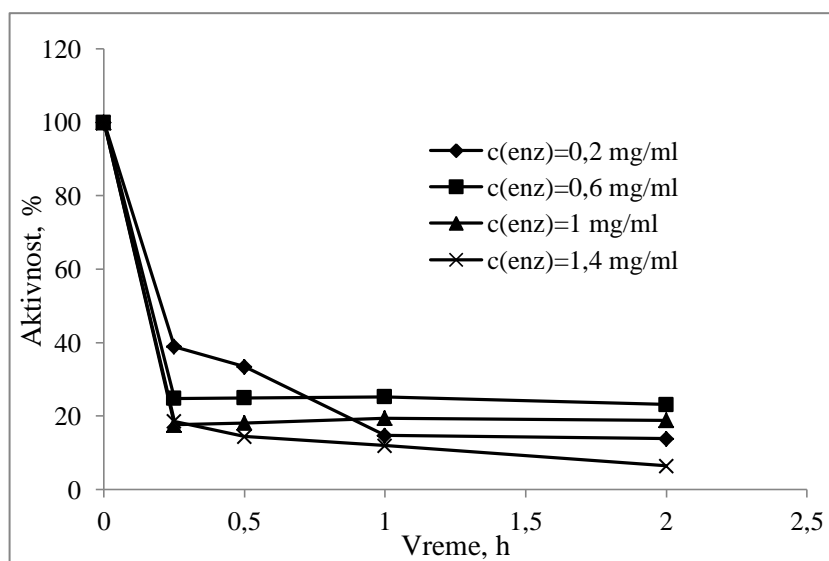
Slika 4.25. FT-IR spektri n-MWCNT (a); slobodne lipaze (b) i imobilisane lipaze (c).

Spektar n-MWCNT (slika 4.25 a) pokazuje samo dve slabe apsorpcione trake, jednu na 3448 cm^{-1} koja potiče od vibracija –OH grupa sa površine i drugu na 1634 cm^{-1} koja potiče od konjugovanih –C=C– veza. U spektru imobilisane lipaze (slika 4.25 c) jasno se uočavaju sve trake karakteristične za prisustvo proteina, što nesumnjivo potvrđuje uspešnost imobilizacije. Trake na 2950 , 2923 i 2851 cm^{-1} pripisuju se –CH valencionim vibracijama iz –CH₂ i –CH₃ grupa. Traka na 1640 cm^{-1} , ujedno i najistaknutija traka proteina, posledica je –C=O valencionih i –NH deformacionih vibracija amidne veze. Razlike u spektrima imobilisane (slika 4.25 b) i slobodne lipaze (slika 4.25 c) izražene su u oblasti spektra $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$, u kojoj apsorbuje ugljenohidratna komponenta lipaze.^[184] Oštri pik srednjeg intenziteta na 1123 cm^{-1} u spektru slobodne lipaze, koji potiče od –CO vibracija iz ugljenohidratne komponente enzima, se smanjuje, širi i pomera na nižu frekvenciju, 1116 cm^{-1} . Takođe, traka koja potiče od vibracija –OH grupe se nakon imobilizacije pomera sa 3439 cm^{-1} na 3426 cm^{-1} . Ovo ukazuje da su hidroksilne grupe iz ugljenohidratne komponente uspostavile vodonične veze. Jedan deo ovih veza se može uspostaviti prilikom aktivacije lipaze. Naime, dve šećerne jedinice u položajima Asn²⁹¹ i Asn³⁵¹, koje se nalaze u blizini aktivnog centra, formiraju vodonične veze sa susednim aminokiselinskim ostacima i na taj način stabilizuju otvorenu konformaciju.^[185, 186] Ovo potvrđuje i pretpostavku da se lipaza na hidrofobne nosače veže u aktivnoj konformaciji.^[187] Sa druge strane, u molekulu lipaze postoji još jedna šećerna komponenta u položaju Asn³¹⁴ koja je udaljena od aktivnog centra i u kontaktu sa površinom ugljeničnih nanocevi može doći do –OH- π interakcija.^[188] Osim toga, trake na 1575 i 1534 cm^{-1} koje su izraženije u spektru imobilisane lipaze i potiču od deformacionih –CH₂ i –CH₃ vibracija mogu se tumačiti upravo prelaskom lipaze u aktivnu konformaciju. Hidrofobni aminokiselinski lanci koji su se nalazili u unutrašnjosti molekula aktivacijom dospevaju na površinu molekula enzima, dobijaju veći stepen slobode i jasnije se vide u spektru.

Radi odabira najboljeg imobilisanog preparata i njegove upotrebe u reakciji sinteze 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona ispitana je aktivnost svih imobilizata. Na osnovu merenja preostale aktivnosti u rastvoru nakon imobilizacije (slike 4.26 i 4.27) može se očekivati da imobilisani preparati imaju između 70 i 90 % od aktivnosti početnog rastvora enzima.



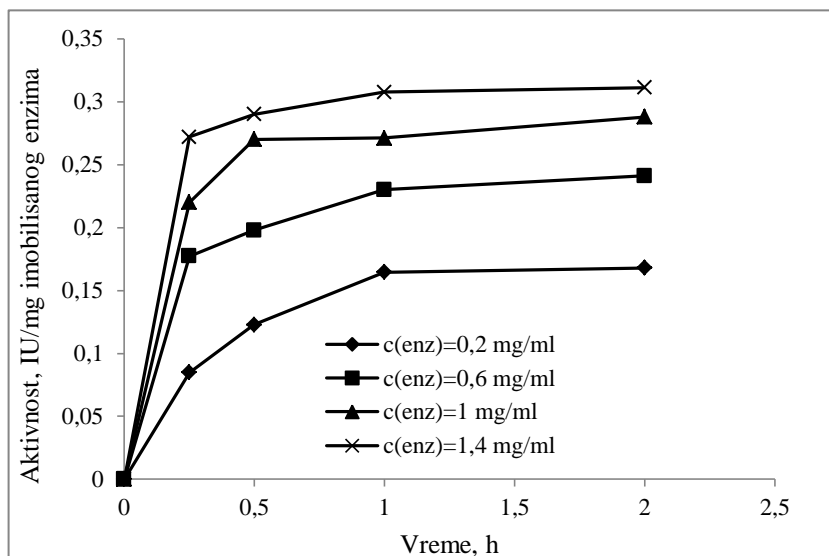
Slika 4.26. Pad aktivnosti u supernatantu nakon imobilizacije prikazan za različite početne koncentracije enzima.



Slika 4.27. Procenat zadržane aktivnosti u supernatantu prikazan za različite početne koncentracije enzima.

Međutim, kao što se obično i dešava, enzim je u procesu imobilizacije na čvrstu površinu izgubio deo početne aktivnosti, ali je trend rasta aktivnosti imobilizata sa porastom mase vezanog enzima ostao isti (slika 4.28). Gubitak aktivnosti može biti posledica više faktora. Naime, za vreme imobilizacije može doći do promena u strukturi enzima i vezivanja preko dela koje je od važnosti za ispoljavanje maksimalne aktivnosti. Takođe, moguće je da sama površina nanocevi može imati negativan uticaj i

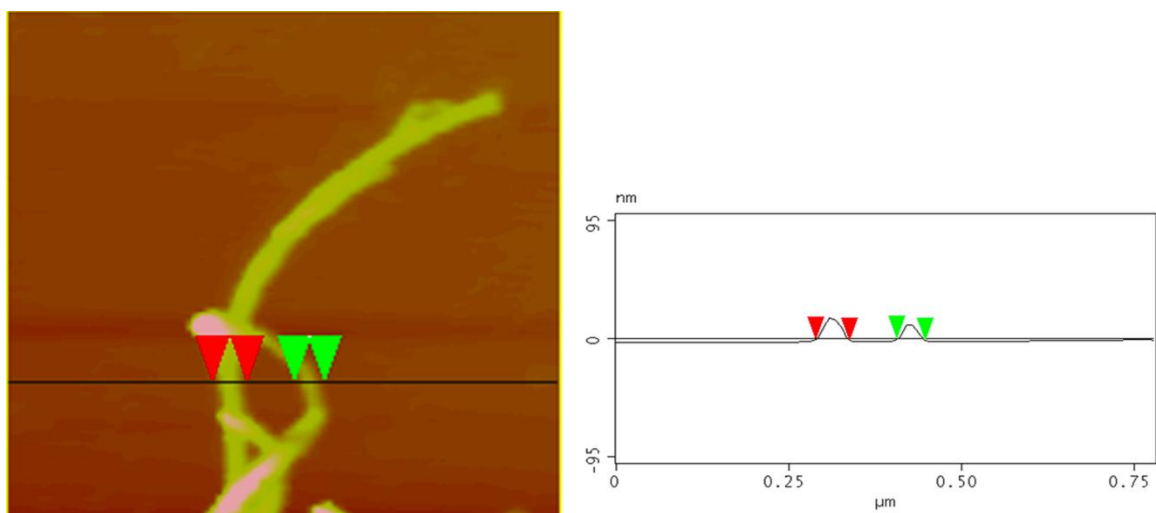
može dovesti do smanjenja aktivnosti enzima. Dodatno, veći gubitak aktivnosti sa povećanjem mase vezanog enzima povezan je i sa porastom difuzionih limitacija.



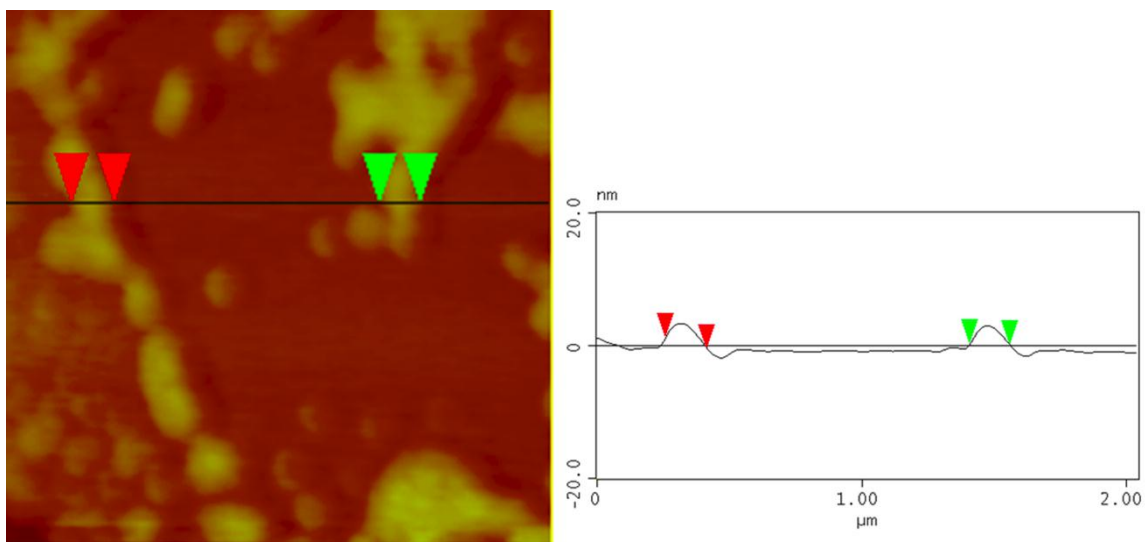
Slika 4.28. Zavisnost aktivnosti imobilisanog enzima od vremena imobilizacije za različite početne koncentracije enzima.

Povećanjem mase enzima vezanog na površinu ugljeničnih nanocevi dolazi do porasta aktivnosti imobilisanog preparata. Aktivnosti imobilizata kreću se u rasponu od 0,085 do 0,311 IU. Do najvećeg skoka u aktivnosti dolazi kada je početna koncentracija enzima $0,6 \text{ mg cm}^{-3}$. Ako se uzmu u obzir dimenzije molekula lipaze ($5 \times 5 \times 7 \text{ nm}$) i specifična površina n-MWCNT moguće je izračunati da je za formiranje monosloja potrebno upravo oko $0,6 \text{ mg lipaze po mg CNT}$. Difuzione limitacije su minimalne, a enzim verovatno zauzima pogodnu konformaciju za ispoljavanje maksimalne katalitičke aktivnosti. Daljim porastom početne koncentracije enzima rast aktivnosti imobilizata je dosta sporiji i nije proporcionalan porastu mase vezanog enzima. Stoga, nema potrebe vezivati preveliku količinu enzima za površinu ugljeničnih nanocevi, jer iako se vezuje veća količina enzima se samo nagomilava na površini nosača i katalitički je neaktivan. Poznato je da je lipaza iz *C. rugosa* sklona agregaciji, do čega najverovatnije i dolazi pri većim koncentracijama enzima. Na slikama 4.29, 4.30 i 4.31 prikazani su AFM mikrografi nemodifikovanih MWCNT i imobilizata dobijenih pri najmanjoj i najvećoj ispitanoj početnoj koncentraciji enzima. Prosečna vrednost prečnika n-MWCNT kreće se oko 60 nm , i on se nakon adsorpcije enzima povećava na 100 nm za početnu

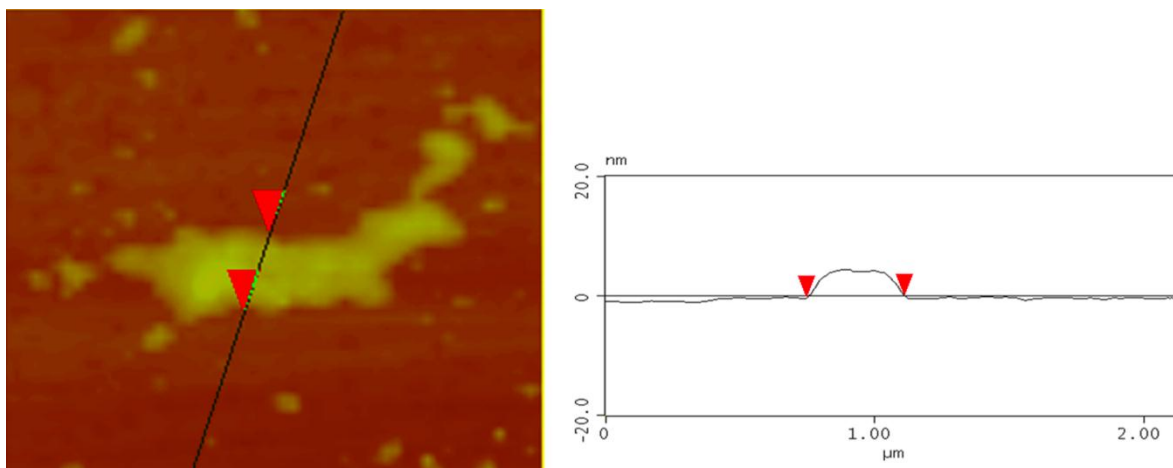
koncentraciju $0,2 \text{ mg cm}^{-3}$ i na 300 nm za početnu koncentraciju $1,4 \text{ mg cm}^{-3}$. Očigledno je da u procesu imobilizacije na površinu ugljeničnih nanocevi dolazi do agregacije lipaze, i da smanjivanje početne koncentracije enzima u rastvoru za imobilizaciju ima za posledicu homogenije pokrivenu površinu i nestanak velikih agregata.



Slika 4.29. 2D AFM mikrograf nemodifikovanih MWCNT.

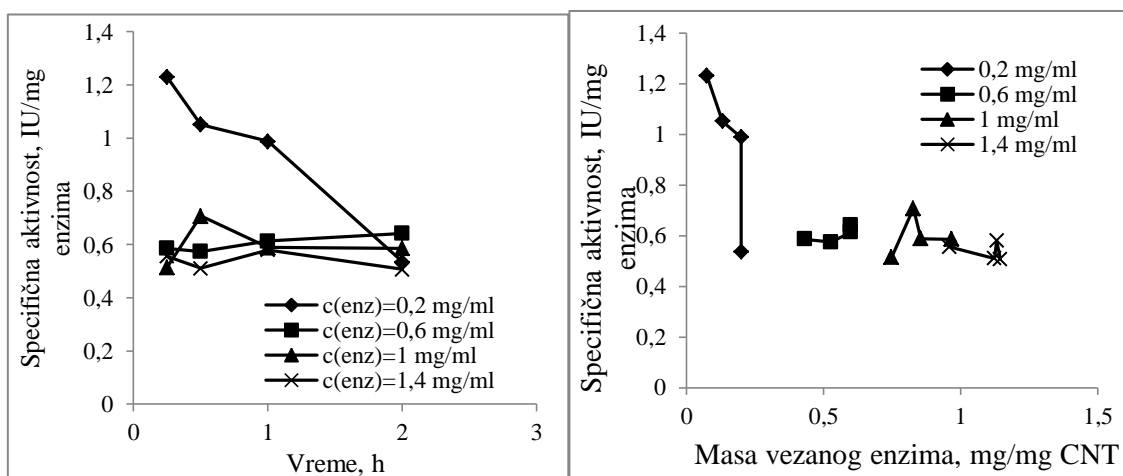


Slika 4.30. 2D AFM mikrograf imobilizata dobijenog pri početnoj koncentraciji enzima od $0,2 \text{ mg cm}^{-3}$ nakon $0,25 \text{ h}$ imobilizacije.



Slika 4.31. 2D AFM mikrograf imobilizata dobijenog pri početnoj koncentraciji enzima od $1,4 \text{ mg cm}^{-3}$ nakon 0,25 h imobilizacije.

Uticaj vremena imobilizacije i mase vezanog enzima na specifičnu aktivnost imobilisanog preparata prikazana je na slici 4.32. Najveća specifična aktivnost enzimskog preparata od $1,23 \text{ IU mg}^{-1}$ enzima, što predstavlja 20,6 % od aktivnosti slobodnog enzima, postiže se pri najmanjoj početnoj količini enzima i nakon 0,25 h imobilizacije. Svako povećano vezivanje dovodi do pada specifične aktivnosti do minimalne vrednosti od $0,53 \text{ IU mg}^{-1}$ enzima. Za veće početne koncentracije enzima, bez obzira na masu vezanog enzima, specifične aktivnosti su približno konstantne i kreću se oko $0,5 \text{ IU mg}^{-1}$ enzima što predstavlja oko 10 % od aktivnosti slobodnog enzima.



Slika 4.32. Zavisnost specifične aktivnosti imobilisanog enzima od a) vremena imobilizacije i b) mase vezanog enzima, za različite početne koncentracije enzima.

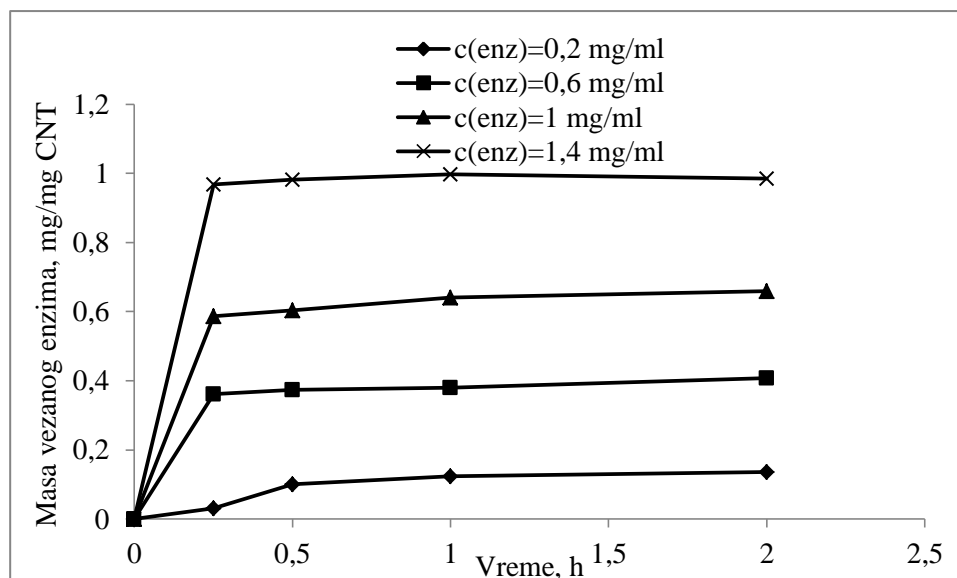
U skladu sa prikazanim rezultatima imobilizat najboljih svojstava može se odabrati posmatrano sa dva aspekta. Za maksimalno iskorišćenje katalitičkog potencijala enzima najpogodnije je odabrati imobilizat sa najmanjom masom vezanog enzima (0,074 mg po mg CNT) dobijenog nakon 0,25 h imobilizacije pri početnoj koncentraciji enzima od 0,2 mg cm⁻³. Sa druge strane, ukoliko se posmatra ukupna aktivnost imobilisanog enzima u odnosu na masu nosača i vezanog enzima najpogodniji imobilizat se dobija pri početnoj koncentraciji enzima od 0,6 mg cm⁻³ nakon 2 h.

4.5.1.2. Adsorpcija u 500 mM fosfatnom puferu

Kao što je već rečeno, iako izrazito hidrofobna, površina nemodifikovanih MWCNT sadrži određenu količinu karboksilnih, laktonskih, fenolnih i baznih grupa. Stoga se, osim hidrofobnim interakcijama, lipaza može adsorbovati elektrostatičkim interakcijama ili formiranjem vodoničnih veza. U ovom delu rada je, u cilju boljeg razumevanja mehanizma vezivanja lipaze na MWCNT ispitana adsorpcija u 500 mM puferu, jer je u rastvoru veće jonske jačine vezivanje elektrostatičkim interakcijama dosta otežano.^[189] U tabeli 4.11 date su mase vezanog enzima po mg CNT i stepeni imobilizacije u zavisnosti od vremena imobilizacije i početne koncentracije enzima, a na slici 4.33 dat je grafički prikaz promene mase vezanog enzima sa vremenom.

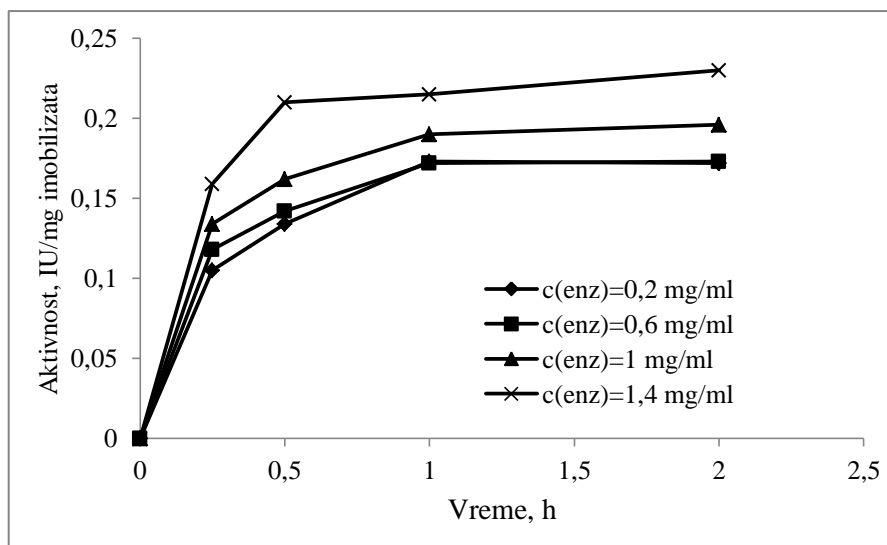
Tabela 4.11. Uticaj početne koncentracije enzima i vremena imobilizacije na masu vezanog enzima i stepen imobilizacije, za imobilizaciju u 500 mM puferu.

		Masa vezanog enzima, mg/mg CNT	Stepen imobilizacije, %
0,25 h	MWCNT-E _{0.2}	0,031	15,5
	MWCNT-E _{0.6}	0,361	60,22
	MWCNT-E _{1.0}	0,586	58,6
	MWCNT-E _{1.4}	0,968	69,14
0,5 h	MWCNT-E _{0.2}	0,099	49,88
	MWCNT-E _{0.6}	0,374	62,41
	MWCNT-E _{1.0}	0,603	60,28
	MWCNT-E _{1.4}	0,981	70,12
1 h	MWCNT-E _{0.2}	0,125	62,25
	MWCNT-E _{0.6}	0,380	63,30
	MWCNT-E _{1.0}	0,641	64,11
	MWCNT-E _{1.4}	0,997	71,25
2 h	MWCNT-E _{0.2}	0,136	67,80
	MWCNT-E _{0.6}	0,408	67,96
	MWCNT-E _{1.0}	0,660	66,03
	MWCNT-E _{1.4}	0,985	70,36



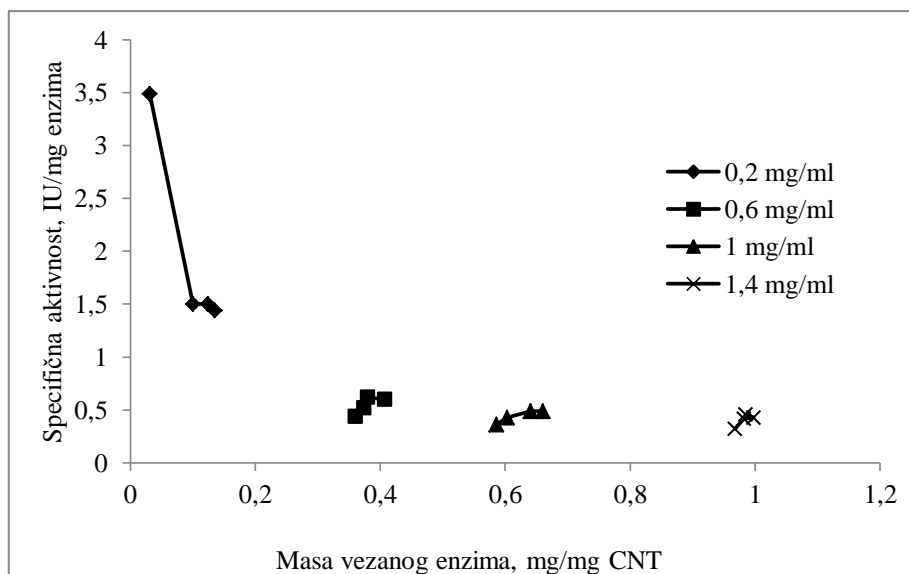
Slika 4.33. Promena mase vezanog enzima po jedinici mase nosača u funkciji vremena imobilizacije.

Adsorpcija je, i u 500 mM puferu, veoma brza i sa povećanjem mase enzima u početnom rastvoru za imobilizaciju povećava se i masa vezanog enzima. Ravnotežna koncentracija postiže se već nakon 0,25 h, osim za najmanju početnu koncentraciju enzima kada je za uspostavljanje ravnoteže potrebno nešto duže vreme (0,5 h). Takođe, sa povećanjem početne koncentracije enzima raste i stepen imobilizacije, ali se u svim eksperimentima kreće oko 70 %. Upravo ova vrednost stepena imobilizacije postiže se u rastvoru male jonske jačine u prvoj fazi adsorpcije, što je i u skladu sa pretpostavkom da se u ovoj fazi adsorpcija odvija samo hidrofobnim interakcijama. Shodno tome se u 500 mM puferu vezuje nešto manja količina enzima, pa je maksimalni kapacitet n-MWCNT u ovakvim uslovima ~1 mg enzima po 1 mg CNT.



Slika 4.34. Aktivnosti imobilisanih enzima u funkciji vremena imobilizacije, za različite početne koncentracije enzima.

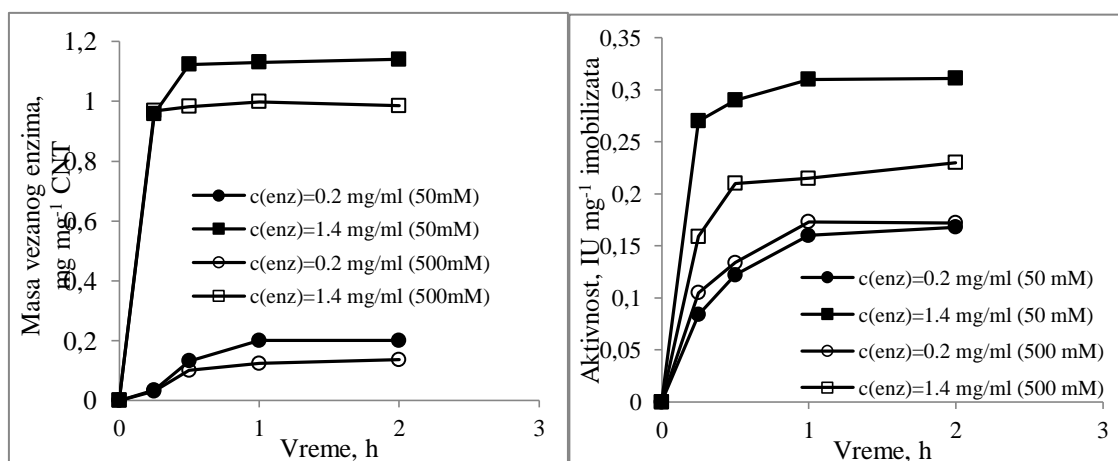
Ispitivanjem aktivnosti imobilisanih preparata ustanovljeno je da, kao i u slučaju adsorpcije u 50 mM puferu, sa povećanjem mase vezanog enzima raste i aktivnost (slika 4.34). Najaktivniji imobilizat (0,23 IU) dobija se pri početnoj koncentraciji enzima od 1,4 mg cm⁻³. Kada se aktivnosti imobilisanih enzima izraze u odnosu na masu vezanog enzima (slika 4.35), može se videti da se najveća specifična aktivnost imobilizata od 3,5 IU mg⁻¹ enzima, što iznosi čak 85 % od aktivnosti slobodnog enzima, dobija pri najmanjoj masi vezanog enzima za početnu koncentraciju enzima 0,2 mg cm⁻³. Daljim povećanjem mase vezanog enzima dolazi do naglog pada specifične aktivnosti. Specifične aktivnosti imobilizata dobijenih pri većim početnim koncentracijama enzima malo se menjaju i kreću se između 0,4 i 0,6 IU mg⁻¹ enzima. Visoka vrednost specifične aktivnosti za imobilizat sa najmanjom količinom vezanog enzima ukazuje da je enzim vezan u povoljnoj, otvorenoj konformaciji. S obzirom na veliki broj hidrofobnih aminokiselinskih ostataka u blizini aktivnog centra i postojanje amfifilnog peptidnog lanca koji ga prekriva, kao i na uslove u kojima se odvija imobilizacija enzim se najverovatnije na hidrofobnu površinu n-MWCNT vezuje na način koji otvara aktivni centar i čini ga dostupnim molekulima supstrata.



Slika 4.35. Specifične aktivnosti imobilisanih enzima u zavisnosti od mase vezanog enzima.

4.5.2. Poređenje adsorpcije na n-MWCNT u 50 i 500 mM puferu

Rezultati adsorpcije enzima na n-MWCNT u 50 i 500 mM puferu grafički su upoređeni na slici 4.36 a) i b). Radi preglednosti prikazani su samo rezultati za najmanju i najveću početnu koncentraciju enzima.



Slika 4.36. Poređenje a) mase vezanog enzima i b) aktivnosti imobilizata dobijenih adsorpcijom lipaze na n-MWCNT u 50 i 500 mM puferu.

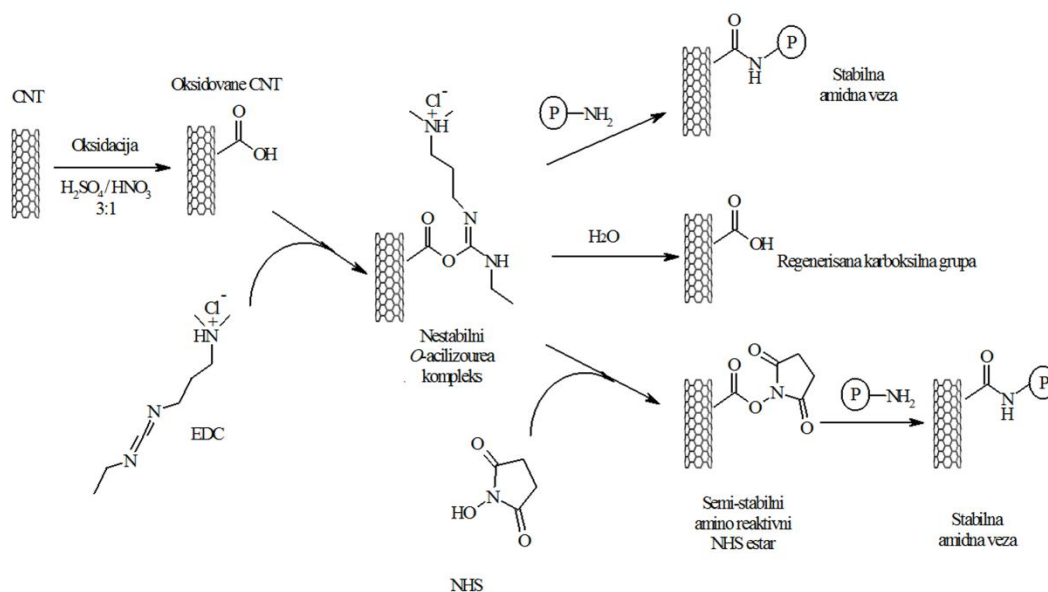
Sa aspekta mase vezanog enzima, vezivanje u rastvoru manje jonske jačine ima prednost jer se pri svim ispitanim vrednostima početne koncentracije vezuje veća količina enzima. Na osnovu praćenja kinetike adsorpcije utvrđeno je da ova razlika zaista potiče od nemogućnosti formiranja elektrostatičkih interakcija u rastvoru veće jonske jačine, a u zavisnosti od vremena imobilizacije i početne koncentracije enzima, doprinos elektrostatičkih interakcija prilikom vezivanja u 50 mM rastvoru kreće se između 20 i 30 % od početne mase enzima u rastvoru.

Zavisnost aktivnosti imobilisanih preparata od vremena imobilizacije je ista u oba slučaja i u početku naglo raste, a zatim se približava ravnotežnoj vrednosti. Najveća aktivnost dobija se u 50 mM puferu pri koncentraciji enzima od $1,4 \text{ mg cm}^{-3}$. Sa druge strane postoji izuzetak kada su u pitanju aktivnosti imobilisanih preparata u funkciji mase vezanog enzima. Naime, za sve početne koncentracije enzima osim za najmanju u puferu veće jonske jačine dobijaju se aktivniji imobilizati. Ovo se može objasniti kada se dodatno uporede i specifične aktivnosti imobilizata za najmanje početne koncentracije enzima u oba pufera ($1,23 \text{ IU mg}^{-1}$ enzima u 50 mM i $3,5 \text{ IU mg}^{-1}$ enzima u 500 mM). Imajući u vidu prirodu lipaze i da se u 500 mM rastvoru vezuje isključivo hidrofobnim interakcijama prilikom adsorpcije dolazi do njene aktivacije. Kako je dodatno i mala količina enzima vezana ne dolazi do nagomilavanja enzima i može se vezati u najpogodnijoj konformaciji. Međutim, u rastvoru manje jonske jačine postoji mogućnost da sa naelektrisanim grupama sa površine nanocevi dođe do formiranja elektrostatičkih interakcija. Kako je najveća gustina naelektrisanih grupa na površini enzima locirana u regionu koji je udaljen od aktivnog centra, vezivanjem u takvoj orijentaciji do aktivacije ili dolazi delimično ili uopšte ne dolazi pa pristup aktivnom centru nije slobodan.

Generalno, može se zaključiti da ukoliko je cilj velika specifična aktivnost potrebno je raditi sa najmanjom početnom koncentracijom enzima u rastvoru veće jonske jačine, a ukoliko se želi dobiti preparat sa većom ukupnom aktivnošću potrebno je raditi sa većom početnom koncentracijom enzima i u rastvoru manje jonske jačine.

4.5.3. Imobilizacija lipaze na oksidovane ugljenične nanocevi

Nedostatak jakih vezivnih sila između nosača i enzima kada je enzim adsorbovan na njegovu površinu veoma često dovodi do desorpcije, što se odražava na gubitak aktivnosti i stabilnosti imobilisanog enzima. Da bi se rešio ovaj problem enzim se za površinu ugljeničnih nanocevi vezuje stvaranjem pravih hemijskih veza. S obzirom na hemijsku inertnost CNT, bilo kakva kovalentna imobilizacija zahteva prethodnu hemijsku modifikaciju njihove površine i uvođenje funkcionalnih grupa. U ovom delu rada, oksidacijom pomoću kiselina na površinu MWCNT uvedene su karboksilne grupe, a zatim je na ove grupe, aktivirane karbodiimidom u prisustvu N-hidroksisukcinimida, kovalentno, stvaranjem peptidnih veza, vezana lipaza. Šematski prikaz imobilizacije na o-MWCNT dat je na slici 4.37.

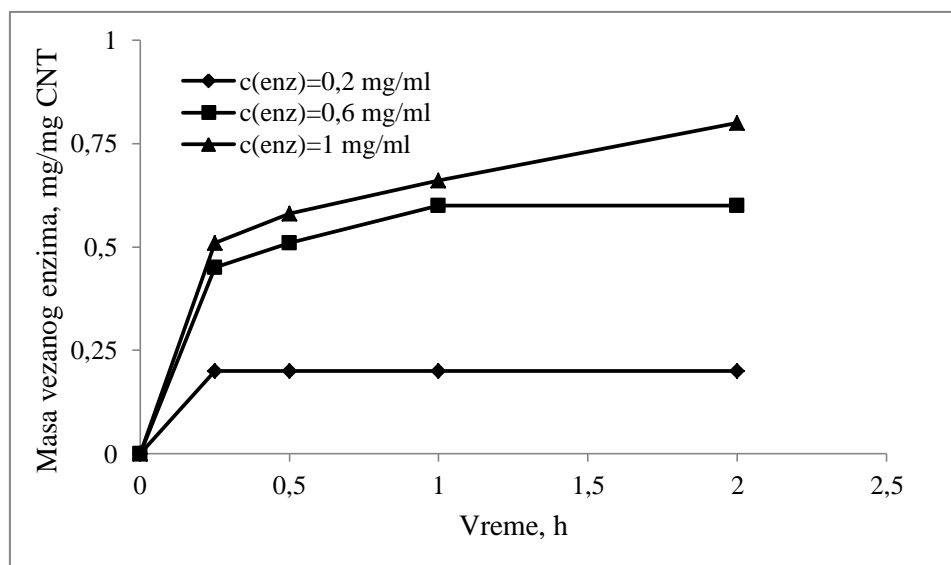


Slika 4.37. Šematski prikaz vezivanja proteina za oksidovane CNT pomoću EDC u prisustvu NHS.

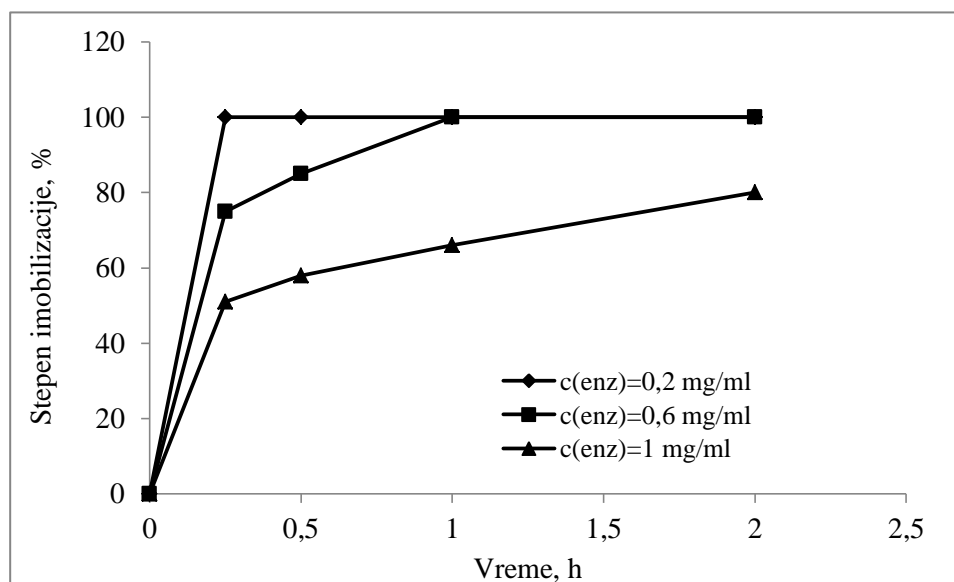
Ispitan je uticaj vremena imobilizacije i početne koncentracije enzima na masu vezanog enzima i stepen imobilizacije (slike 4.38 i 4.39). Početna koncentracija enzima varirana je u opsegu od 0,2 do 1 mg cm^{-3} , a vreme imobilizacije u opsegu od 0,25 do 2 h.

Kao što se vidi na slici 4.38, sa povećanjem početne koncentracije enzima povećava se masa vezanog enzima, a takođe se i produžava vreme potrebno da se veže maksimalna količina. Za najmanju početnu koncentraciju, celokupna količina veže se već nakon 0,25

h, za koncentraciju od $0,6 \text{ mg cm}^{-3}$ nakon 1 h, a za koncentraciju enzima od 1 mg cm^{-3} masa vezanog enzima raste u celom ispitanom vremenskom intervalu. Najveća masa vezanog enzima od $0,8 \text{ mg po mg o-MWCNT}$ predstavlja stepen imobilizacije od 80 %.

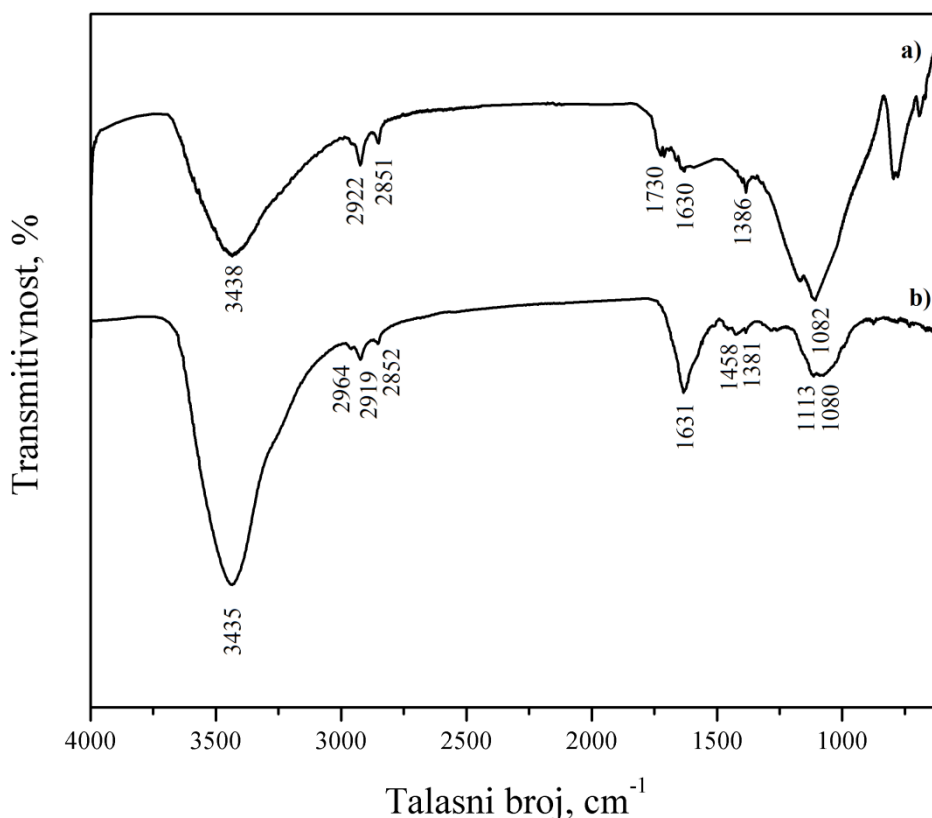


Slika 4.38. Promena mase vezanog enzima sa vremenom imobilizacije za različite početne koncentracije enzima.



Slika 4.39. Uticaj vremena inkubacije na stepen imobilizacije enzima za različite početne koncentracije enzima.

Pod pretpostavkom da se lipaza za o-MWCNT u prisustvu EDC i NHS vezuje isključivo kovalentno, gustina funkcionalnih grupa na površini uslovljava njihov vezivni kapacitet. Na osnovu podataka o gustini karboksilnih grupa nosača ($0,87 \text{ mmol g}^{-1}$ CNT) i maksimalne količine vezanog enzima ($0,8 \text{ mg enzima mg}^{-1}$ CNT) može se izračunati da je iskorišćeno samo 1,53 % od ukupnog vezivnog kapaciteta nosača. Čak i ovako mala iskorišćenost kapaciteta predstavlja samo teorijsku vrednost i u praksi je još manja, jer se i na površinu oksidovanih nanocevi deo lipaze adsorbuje. Naime, pored eksperimenata izvedenih u uslovima koji promovišu kovalentno vezivanje, izveden je i set eksperimenata bez prisustva aktivirajućeg agensa i rezultati su pokazali da postoji nespecifično vezivanje. Činjenica da se enzim adsorbuje i na površinu o-MWCNT ne iznenađuje jer su različite grupe naučnika potvrdile adsorpciju feritina, citohroma C i peroksidaze.^[149, 152, 190] Međutim, u literaturi postoje dosta različiti rezultati, pa pojedine grupe naučnika tvrde da do nespecifičnog vezivanja na o-MWCNT ne dolazi ili da je njegov procenat manji od 5 %.^[149, 191] Različiti rezultati samo potvrđuju da su interakcije između enzima i nanocevi veoma složene. One zavise od različitih faktora kao što su metod sinteze nanocevi, način uvođenja karboksilnih grupa, poreklo i priroda enzima i dr., i teško ih je kontrolisati.



Slika 4.40. FT-IR spektri a) oksidovanih MWCNT i b) imobilisanog enzima.

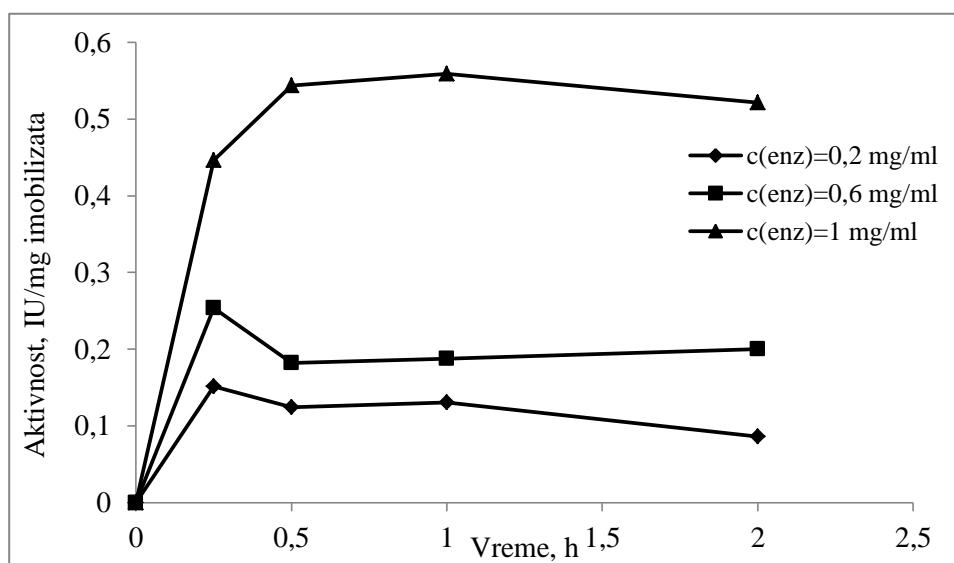
Na slici 4.40 predstavljeni su FTIR spektri o-MWCNT pre i nakon imobilizacije lipaze. Karakteristični pikovi u spektru o-MWCNT javljaju se na 3438 i 1730 cm⁻¹, a potiču od valencionih $\nu(\text{OH})$ i $\nu(\text{C}=\text{O})$ vibracija iz karboksilne grupe.^[146] Pored toga pik na 1386 cm⁻¹ potiče od valencionih $-\text{OSO}_3\text{H}$, a pik na 1082 cm⁻¹ od valencionih $-\text{CO}$ vibracija. U spektru imobilisanog enzima pik na 1730cm⁻¹ se izgubio, dok je pik na 1630 cm⁻¹, koji potiče od $-\text{C}=\text{O}$ valencionih i $-\text{NH}$ deformacionih vibracija amidne veze, drastično porastao. Takođe, trake na 2964, 2919 i 2851 cm⁻¹ pripisuju se valencionim vibracijama iz $-\text{CH}_2$ i $-\text{CH}_3$ grupa, a pik na 1458 cm⁻¹ deformacionim vibracijama ovih grupa i one nesumnjivo potiču iz molekula enzima.

Ispitana je aktivnost imobilizata dobijenih i u uslovima koji favorizuju kovalentno vezivanje, kao i u uslovima u kojima se enzim samo adsorbuje na površinu o-MWCNT. Vrednosti aktivnosti izražene po masi imobilizata u zavisnosti od vremena imobilizacije

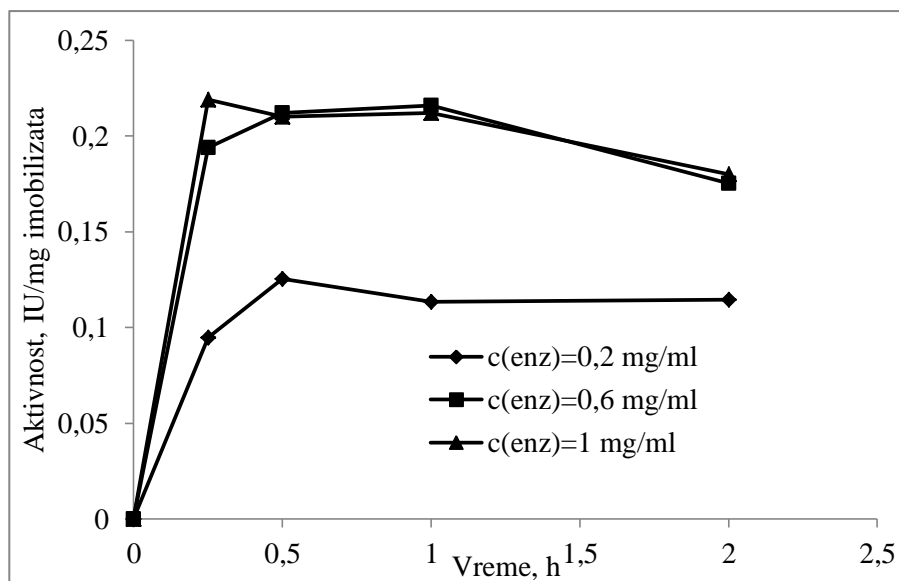
za ispitane početne koncentracije enzima date su u tabeli 4.12 i grafički su prikazane na slikama 4.41 i 4.42.

Tabela 4.12. Aktivnosti imobilisanih enzima za različite početne koncentracije enzima

Vreme, h	IU/mg imobilizata					
	0,2 mg cm ⁻³		0,6 mg cm ⁻³		1 mg cm ⁻³	
	Kov.	Ads.	Kov.	Ads.	Kov.	Ads.
0,25	0,15	0,10	0,26	0,19	0,45	0,22
0,5	0,12	0,12	0,18	0,21	0,54	0,21
1	0,13	0,11	0,19	0,22	0,56	0,21
2	0,09	0,11	0,20	0,18	0,52	0,18

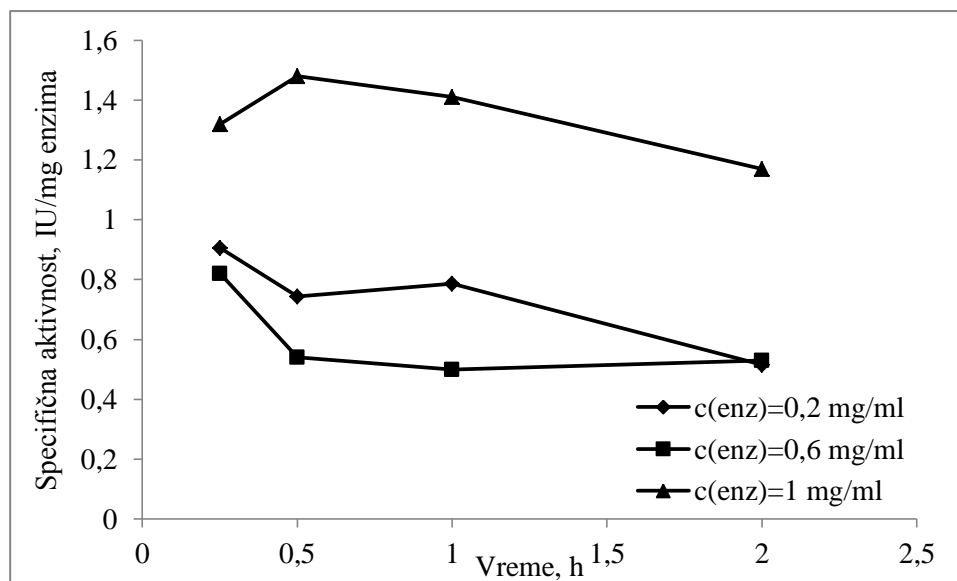


Slika 4.41. Aktivnosti imobilizata kada se imobilizacija odvija u uslovima koji promovisu kovalentno vezivanje.



Slika 4.42. Aktivnosti imobilizata kada se imobilizacija odvija adsorpcijom.

Jasno se uočava da početna koncentracija enzima, a sa tim i masa vezanog enzima različito utiču na aktivnosti imobilizata koji su dobijeni u uslovima koji promovišu stvaranje kovalentne veze i u uslovima u kojima se enzim samo adsorbuje na površinu o-MWCNT. Pri manjim početnim koncentracijama imobilizacija je brža i adsorpcija enzima je najverovatnije dominantan proces u oba slučaja. Ovu pretpostavku potvrđuju i aktivnosti dobijenih preparata koje su, za koncentracije enzima od 0,2 i 0,6 mg cm⁻³ približno jednake (tabela 4.12). Međutim, aktivnosti imobilizata dobijenih pri početnoj koncentraciji enzima od 1 mg cm⁻³ u prisustvu EDC i NHS trostruko se uvećavaju, dok se aktivnost enzima adsorbovanog na o-MWCNT sa porastom mase vezanog enzima dalje ne menja. Prilikom adsorpcije postigao se maksimum vezivanja, pa dalje nagomilavanje enzima ne dovodi do povećanja aktivnosti. Sa druge strane, u uslovima u kojima može doći do formiranja amidne veze, pri većoj koncentraciji enzima u rastvoru za imobilizaciju povećana je verovatnoća da će se amino grupa sa enzima naći u blizini aktivirane karboksilne grupe sa površine CNT i da će se kovalentno vezati. Na ovaj način se enzim verovatno veže u povoljnijoj konformaciji, i pri tome dodatno fiksira enzim prethodno adsorbovan u porama o-MWCNT, što pozitivno utiče na aktivnost imobilisanog enzima.



Slika 4.43. Zavisnost specifične aktivnosti enzima imobilisanog u prisustvu EDC i NHS u funkciji vremena, za različite početne koncentracije enzima.

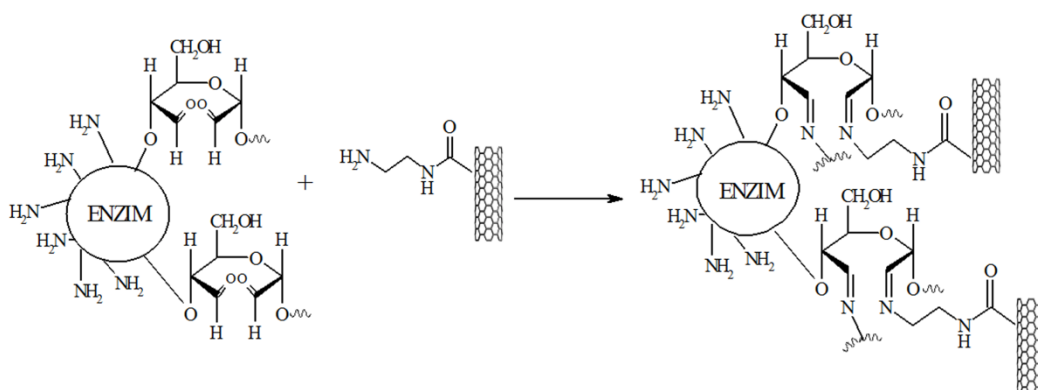
Da se enzim pri najvećoj koncentraciji, u prisustvu EDC i NHS, zaista veže u povoljnijoj konformaciji pokazuje i nagli porast specifične aktivnosti dobijenih imobilizata. Na slici 4.43 prikazana je promena specifične aktivnosti imobilisanog enzima sa vremenom imobilizacije za različite testirane početne koncentracije enzima. Najveća specifična aktivnost dobija se pri kratkom vremenu imobilizacije. Pri dužem vremenu imobilizacije, u uslovima konstantnog mešanja, može doći do narušavanja sekundarne strukture enzima što dovodi do smanjenja katalitičkog potencijala.

Optimalni uslovi za postizanje najboljeg imobilisanog enzima na o-MWCNT, u uslovima koji favorizuju kovalentno vezivanje, kako sa stanovišta ukupne tako i sa stanovišta specifične aktivnosti imobilisanog enzima su vreme imobilizacije 0,5 h i 1 mg cm⁻³ enzima u rastvoru za imobilizaciju.

4.5.4. Imobilizacija lipaze na amino funkcionalizovane ugljenične nanocevi

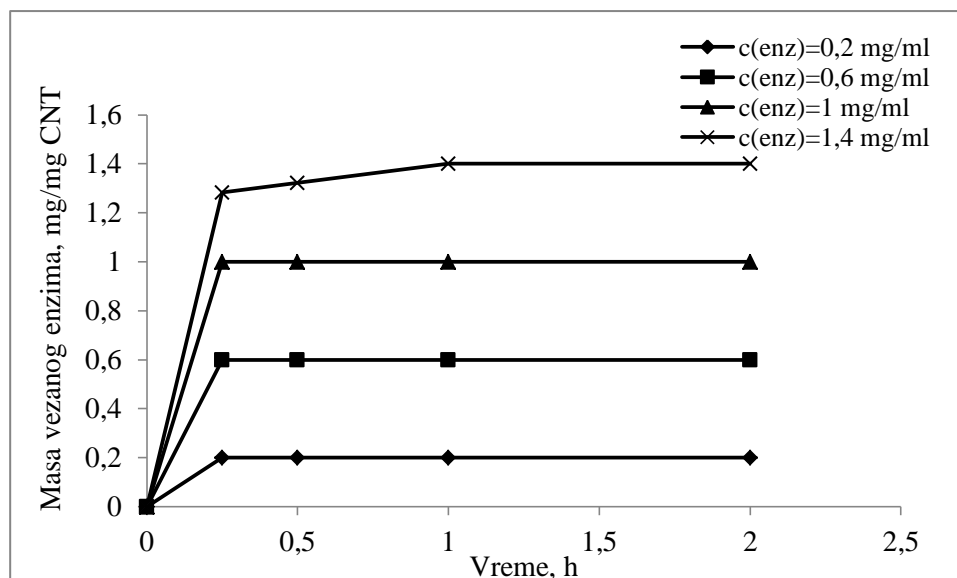
Imobilizacija prethodno oksidovanog enzima je od ranije poznat i ispitan metod. Veliki gubici enzimske aktivnosti prilikom vezivanja preko amino grupa enzima podstakli su razvoj ove tehnike. Naime, enzimi koji poseduju ugljenohidratnu komponentu pružaju mogućnost oksidacije hidroksilnih grupa do karbonilnih, koje je zatim moguće vezati za

amino grupe sa površine nosača. Lipaza iz *C. rugosa* je ovim postupkom imobilisana na različite polimetakrilatne nosače kao što su Eupergit[®] C, Eupergit[®] C 250 L i Sepabeads[®], a dobijeni su imobilisani preparati odličnih karakteristika. Da bismo ovim metodom imobilisali lipazu na ugljenične nanocevi na njihovu površinu su najpre uvedene amino grupe, a zatim se pod blagim reakcionim uslovima enzim vezao stvaranjem Šifove baze. Šematski prikaz kovalentnog vezivanja oksidovanog enzima na amino funkcionalizovane ugljenične nanocevi data je na slici 4.44.



Slika 4.44. Kovalentno vezivanje oksidovanog enzima na α -MWCNT.

Ispitivanje vezivnog kapaciteta enzima rađeno je na isti način kao i pri ispitivanju adsorpcije. Varirana je početna koncentracija enzima od 0,2 do 1,4 mg cm⁻³, a masa α -MWCNT bila je konstantna i iznosila je 3 mg. Promena mase vezanog enzima u funkciji vremena imobilizacije za ispitane početne koncentracije enzima prikazana je na slici 4.45.

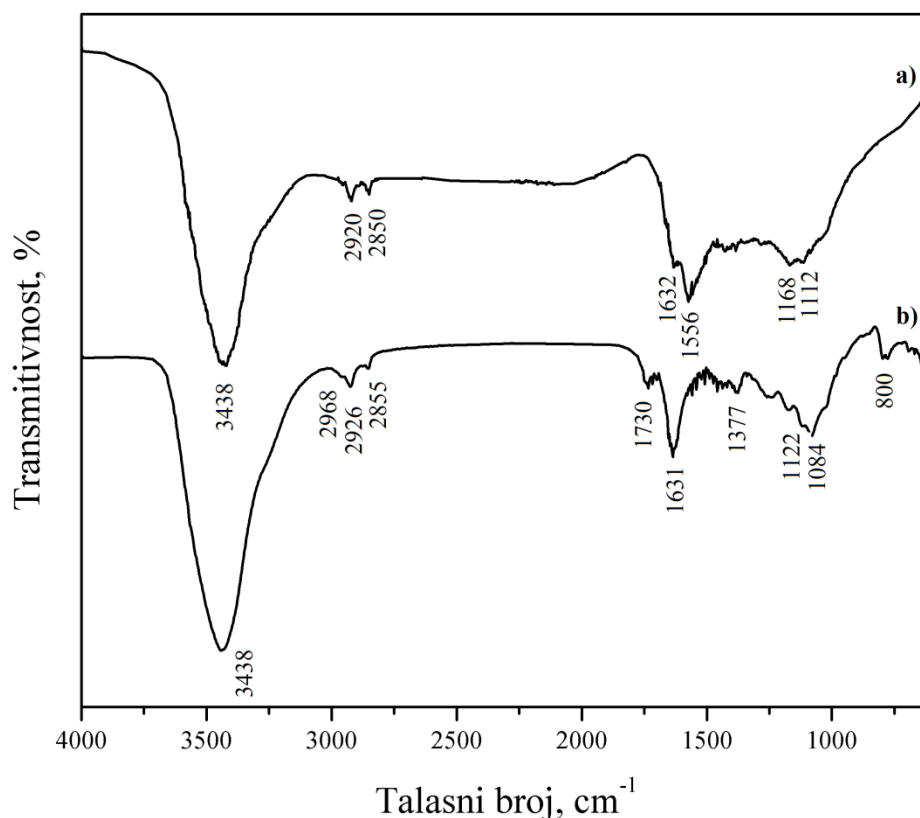


Slika 4.45. Promena mase vezanog enzima u zavisnosti od početne koncentracije enzima.

Imobilizacija je veoma brza, potpuna je već nakon 0,25 h, osim za najveću ispitanu koncentraciju pri kojoj je za vezivanje celokupne količine enzima potreban 1h. Sa povećanjem početne koncentracije lipaze u rastvoru masa vezanog enzima linearno raste. Maksimalna količina vezanog enzima iznosi $1,4 \text{ mg mg}^{-1}$ nosača, što odgovara stepenu imobilizacije od 100 % i predstavlja najveću vrednost imobilisanog enzima od svih ispitanih tehnika u ovom radu. Poznavajući gustinu amino grupa na nosaču,^[146] može se izračunati da čak i ovako visoka vrednost mase vezanog enzima predstavlja tek oko 3,5 % vezivnog kapaciteta nosača i da je veliki broj grupa neiskorišćen. U tabeli 4.13 date su vrednosti dobijenih masa vezanog enzima kao i stepeni imobilizacije.

Tabela 4.13. Uticaj početne koncentracije enzima na masu vezanog enzima i stepen imobilizacije

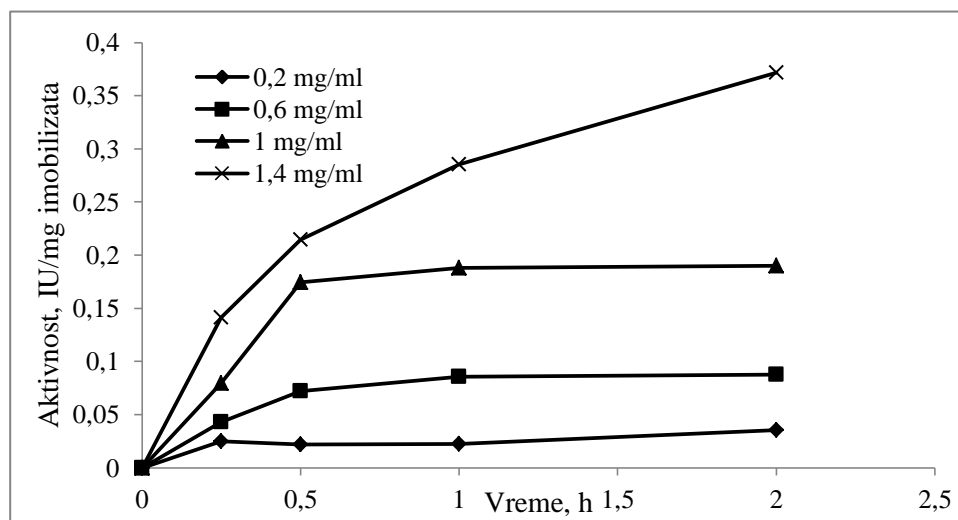
		Masa vezanog enzima, mg mg ⁻¹ CNT	Stepen imobilizacije, %
0.25 h	MWCNT-E _{0.2}	0,2	100
	MWCNT-E _{0.6}	0,6	100
	MWCNT-E _{1.0}	1,0	100
	MWCNT-E _{1.4}	1,28	91,97
0.5 h	MWCNT-E _{0.2}	0,2	100
	MWCNT-E _{0.6}	0,6	100
	MWCNT-E _{1.0}	1,0	100
	MWCNT-E _{1.4}	1,32	94,46
1 h	MWCNT-E _{0.2}	0,2	100
	MWCNT-E _{0.6}	0,6	100
	MWCNT-E _{1.0}	1,0	100
	MWCNT-E _{1.4}	1,4	100
2 h	MWCNT-E _{0.2}	0,2	100
	MWCNT-E _{0.6}	0,6	100
	MWCNT-E _{1.0}	1,0	100
	MWCNT-E _{1.4}	1,4	100



Slika 4.46. FT-IR spektri a) a-MWCNT i b) imobilisanog enzima.

FT-IR spektri a-MWCNT i lipaze imobilisane na a-MWCNT prikazani su na slici 4.46. U spektru a-MWCNT postoje sve trake karakteristične za prisustvo amino grupe i to na 3438 i 1556 cm⁻¹ koje potiču od vibracija amino grupe. Takođe, u spektru postoje i trake na 1632, 1168 i 1112 cm⁻¹ koje potiču od –C=O i –NH vibracija amidne veze, formirane pri uvođenju amino grupa. S obzirom da se ove trake preklapaju sa karakterističnim trakama enzima prisustvo lipaze nakon imobilizacije se može dokazati na osnovu povećanja intenziteta ovih traka, kao i pojave trake na 1377 i 2968 cm⁻¹ koje potiču od –CH vibracija metilenske grupe, a koje se mogu videti samo ukoliko je vezan enzim. Takođe, pojava trake na 1730 cm⁻¹ potiče od karbonilnih grupa oksidovanog enzima. Povećanjem mase vezanog enzima rastu i aktivnosti svih imobilisanih preparata (slika 4.47). Sa porastom početne koncentracije enzima na a-MWCNT povećava se i vreme potrebno za postizanje maksimalne aktivnosti imobilizata. Za najmanju vrednost koncentracije enzima najaktivniji imobilizat postiže se već nakon 0,25 h, za koncentracije 0,6 i 1 mg cm⁻³ potrebno je 0,5h, a aktivnost imobilizata dobijenog pri

najvećoj početnoj koncentraciji raste u celom ispitanom vremenskom intervalu. Gotovo konstantne vrednosti aktivnosti nakon 0,5h, za niže vrednosti početne koncentracije enzima, ukazuju da se u reakcionom sistemu uspostavila ravnoteža i da je stabilan. Produžavanje vremena imobilizacije za najveću početnu koncentraciju enzima pozitivno utiče na aktivnost jer omogućava većem broju molekula enzima da se vežu u najpovoljnijoj konformaciji.

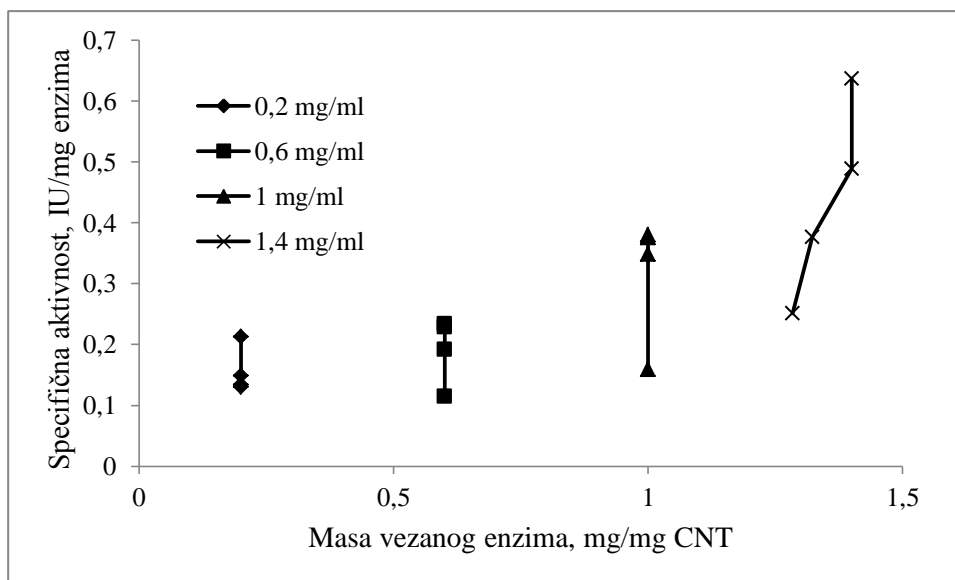


Slika 4.47. Aktivnosti imobilisanog enzima u funkciji vremena za različite početne koncentracije enzima.

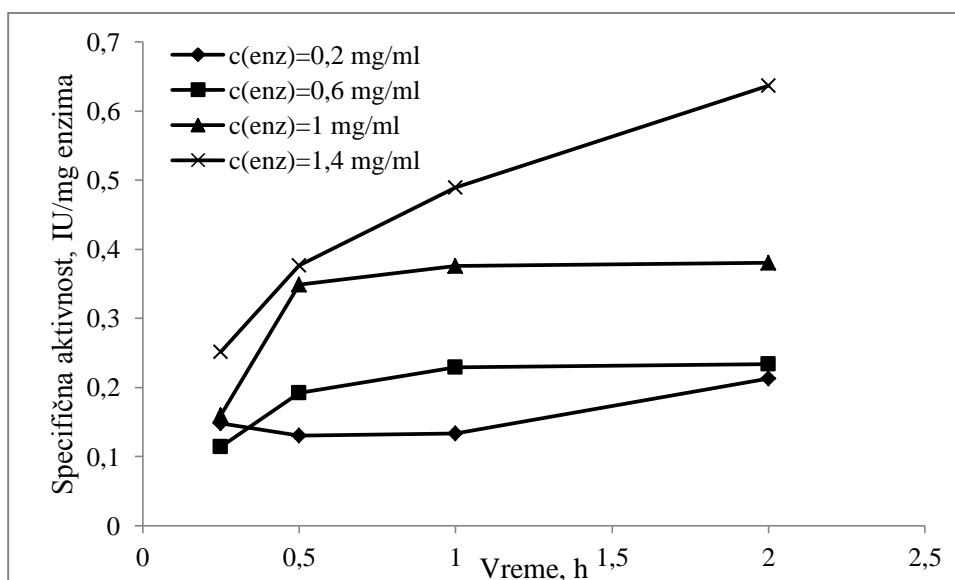
Aktivnosti imobilizata nakon 2 h imobilizacije kreću se 0,035 do 0,37 IU mg⁻¹ imobilizata. Specifične aktivnosti imobilizata imaju isti trend kao i ukupna aktivnost imobilizata. Promene specifične aktivnosti imobilizata u zavisnosti od vremena imobilizacije i u zavisnosti od mase vezanog enzima prikazane su na slikama 4.48 i 4.49. Najveća vrednost iznosi 0,64 IU mg⁻¹ enzima, što predstavlja oko 12 % od aktivnosti slobodnog enzima. Poznato je da u molekulu lipaze iz *C. rugosa* postoje tri aminokiselinska ostatka na kojima su vezane ugljenohidratne jedinice. Dve šećerne jedinice, u položajima Asn²⁹¹ i Asn³⁵¹, nalaze su u blizini aktivnog centra. Ukoliko se vezivanje za nosač odvija preko karbonilnih grupa iz ovog regiona postoji verovatnoća da se molekul orijentiše tako da je pristup aktivnom centru delimično blokiran. Međutim, ukoliko se enzim vezuje preko karbonilne grupe iz treće ugljenohidratne jedinice, koja se nalazi sa suprotne strane molekula, u položaju Asn³¹⁴, enzim se vezuje tako da aktivni centar bude okrenut ka reakcionoj smeši pa je olakšan pristup supstrata.

Što je veća masa vezanog enzima, veći je broj povoljnije vezanih molekula, što ima za posledicu povećanje i ukupne i specifične aktivnosti imobilisanog preparata.

Optimalni uslov za dobijanje imobilizata najboljih karakteristika su vreme imobilizacije 2 h i početna koncentracija enzima $1,4 \text{ mg cm}^{-3}$.

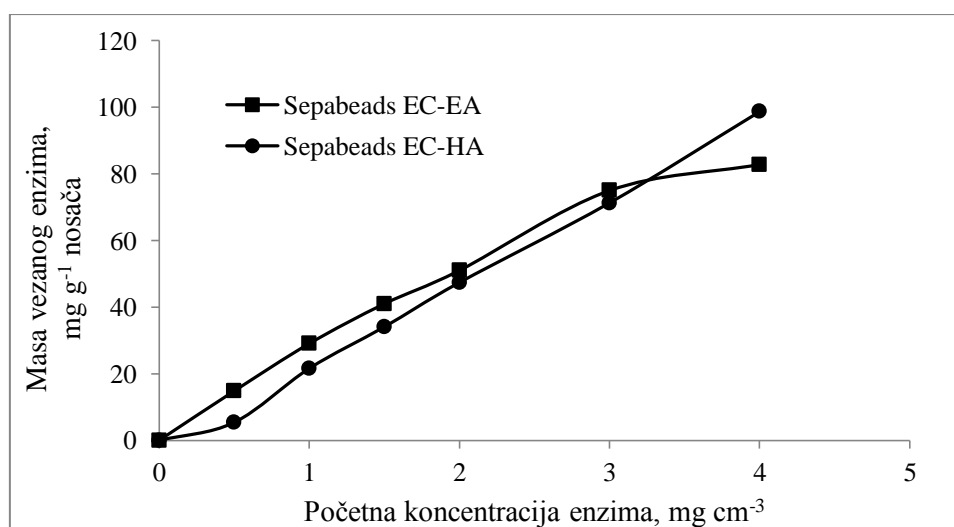


Slika 4.48. Specifična aktivnost imobilizata, za različite početne koncentracije enzima, u funkciji mase vezanog enzima.

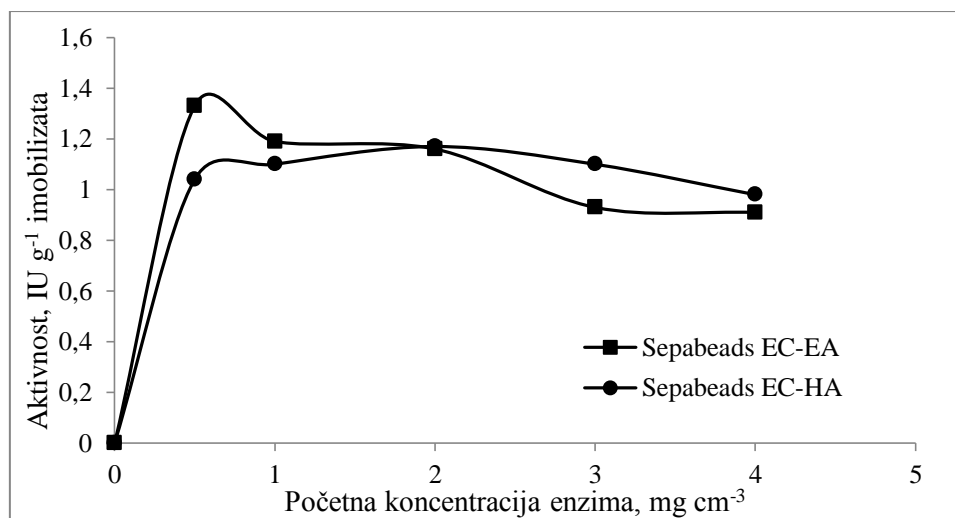


Slika 4.49. Specifična aktivnosti imobilisanog enzima u funkciji vremena za različite početne koncentracije enzima.

Ako se pogledaju prinosi aktivnosti imobilizata dobijenih u ovom eksperimentu zaključuje se da lipaza prilikom imobilizacije gubi veliki deo početne aktivnosti. Pri imobilizaciji istog enzima na komercijalne Sepabeads[®] EC-EA i Sepabeads[®] EC-HA nosače vezuje se mnogo manja količina enzima i povećanje mase vezanog enzima sa porastom početne koncentracije enzima grafički je prikazano na slici 4.50. Najveća masa vezanog enzima iznosi 98,7 mg po 1 g nosača i daleko je manja od mase koja se vezuje za ugljenične nanocevi, a koja iznosi 1400 mg po 1 g a-MWCNT. U skladu sa time veće su i ukupne aktivnosti imobilizata (slika 4.51). Najveća aktivnost lipaze imobilisane na komercijalne nosače iznosi 1,33 IU g⁻¹ imobilizata dok je najveća aktivnost lipaze na amino-funkcionalizovanim MWCNT veća oko 270 puta, i iznosi 370 IU g⁻¹ imobilizata. Međutim, poređenjem aktivnosti koju je enzim zadržao nakon imobilizacije, a koja iznosi 11,75 % za imobilizaciju na a-MWCNT, 40,95 % za imobilizaciju na Sepabeads[®] EC-EA, i čak 87,6 % za imobilizaciju na Sepabeads[®] EC-HA nameće se zaključak da površina nanocevi ima veći negativan uticaj na enzim. Moguće je da su strukturne promene u molekulu enzima, do kojih dolazi oksidacijom pomoću perjodata, učinile enzim osetljivijim na negativan uticaj površine nanocevi. Bez obzira na male vrednosti specifičnih aktivnosti enzima imobilisanog na a-MWCNT, ukupna aktivnost imobilizata je velika, što nanocevi, kao nosač za imobilizaciju enzima, čini konkurentnim u poređenju sa komercijalnim nosačima.



Slika 4.50. Uticaj početne koncentracije enzima na masu vezanog enzima na komercijalne Sepabeads[®] nosače.

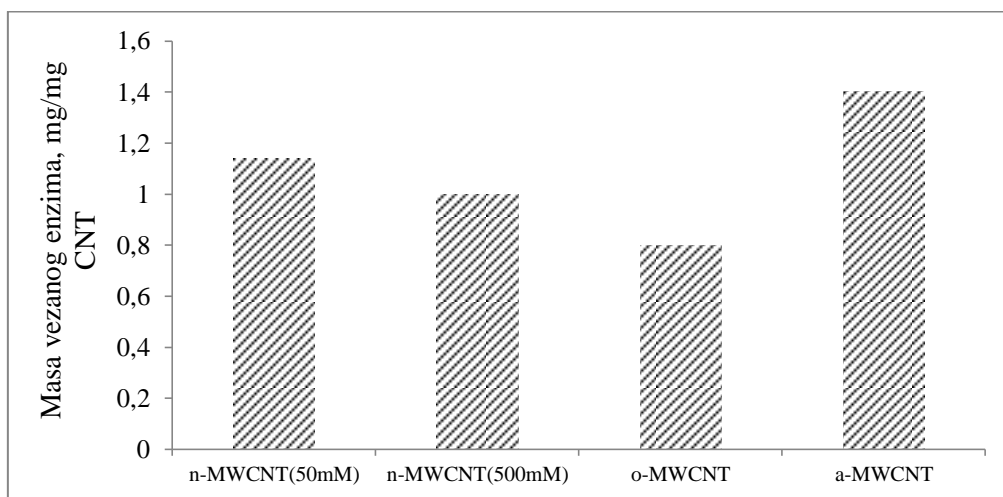


Slika 4.51. Uticaj početne koncentracije enzima na aktivnost imobilizata dobijenih vezivanjem lipaze na komercijalne Sepabeads[®] nosače.

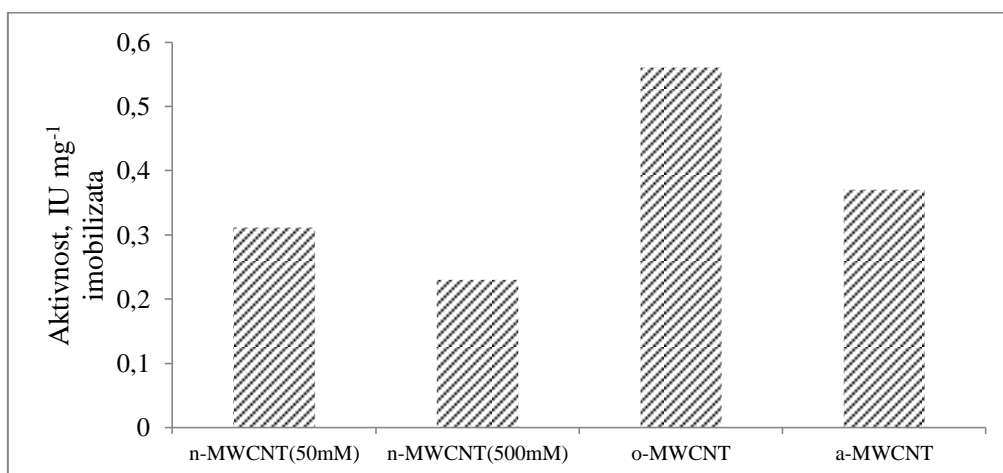
4.5.5. Poređenje efikasnosti primenjenih postupaka imobilizacije lipaze na višeslojne ugljenične nanocevi

Mogućnost uvođenja različitih funkcionalnih grupa na ugljenične nanocevi omogućava ispitivanje različitih tehnika imobilizacije lipaze na njihovu površinu. U cilju iznalaženja najboljeg metoda za imobilizaciju lipaze iz *C. rugosa* ispitali smo tri različita pristupa. Najpre je ispitana adsorpcija lipaze na površinu nemodifikovanih MWCNT pri čemu je varirana jonska jačina rastvora za imobilizaciju. Nakon toga su na površinu CNT uvedene karboksilne grupe i ispitana je mogućnost imobilizacije formiranjem peptidne veze sa amino grupama enzima. I na kraju, kao treći metod, ispitana je imobilizacija na amino funkcionalizovane nanocevi pri čemu se vezivanje odvija stvaranjem Šifove baze sa karbonilnim grupama oksidovanog enzima. Efikasnost imobilizacije upoređena je na osnovu mase i aktivnosti vezanog enzima. Na slici 4.52 upoređena je masa vezanog enzima za različite ispitane tehnike imobilizacije. Očigledno je da se najveća masa enzima veže na amino funkcionalizovane nanocevi, zatim na nemodifikovane, a najmanja na oksidovane. Interesantno je primetiti da se, iako o-MWCNT imaju veću gustinu funkcionalnih grupa, na a-MWCNT veže veća količina enzima, što može biti posledica njihove bolje disperzibilnosti u vodenoj sredini.

Međutim, bilo da je reč o oksidovanim ili nanocevima sa amino grupa masa vezanog enzima je daleko manja od njihovog nominalnog vezivnog kapaciteta.



Slika 4.52. Poređenje mase vezanog enzima za imobilizaciju na nemodifikovane, oksidovane i amino funkcionalizovane CNT.

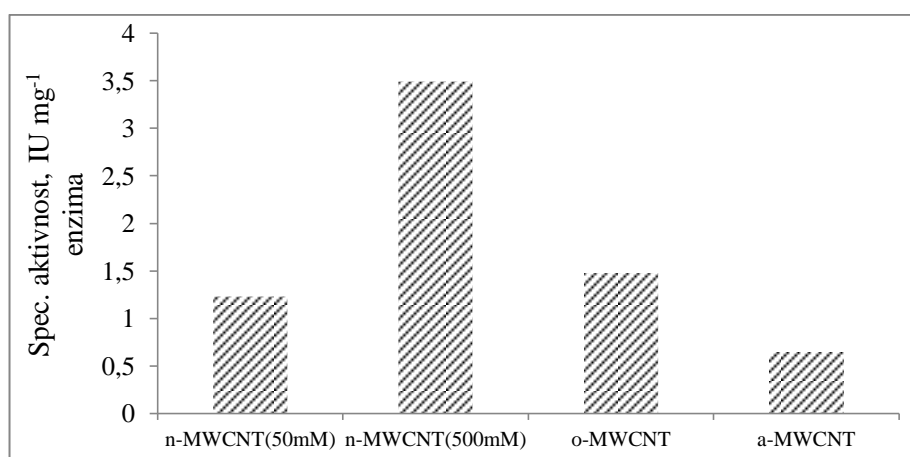


Slika 4.53. Poređenje aktivnosti imobilizata dobijenih različitim tehnikama imobilizacije.

Za primenu imobilisanih sistema od velike je važnosti njihova aktivnost. Na slici 4.53 prikazane su ukupne aktivnosti imobilizata. Sa aspekta aktivnosti najpovoljnija tehnika imobilizacije je vezivanje na oksidovane MWCNT, i iako se vezuje najmanja količina enzima dobija se oko 2 puta aktivniji imobilizat. Ovo je verovatno posledica postojanja,

pored kovalentno vezanog, i adsorbovanog enzima. Enzim se na njihovu površinu adsorbovao u aktivnoj konformaciji, a dodatno je učvršćen kovalentno vezanim molekulima, koji onemogućavaju desorpciju ili neke druge, nepovoljnije, konformacione promene.

Posebno je interesantno uporediti aktivnosti imobilisanih enzima izražene u odnosu na masu vezanog enzima (slika 4.54). Daleko najveći procenat katalitičke aktivnosti zadržala je lipaza imobilisana na nemodifikovane MWCNT u uslovima u kojima se adsorpcija vrši isključivo hidrofobnim interakcijama i pri najmanjoj koncentraciji enzima. Ovaj podatak je i očekivan s obzirom da je veliki broj dosadašnjih istraživanja pokazao da se na hidrofobne nosače lipaza veže u aktivnoj konformaciji. Pored toga pri maloj koncentraciji enzima u rastvoru, on se najverovatnije orijentiše tako da su nepovoljne konformacione promene minimalne, što se odražava na visok procenat zadržane stabilnosti.

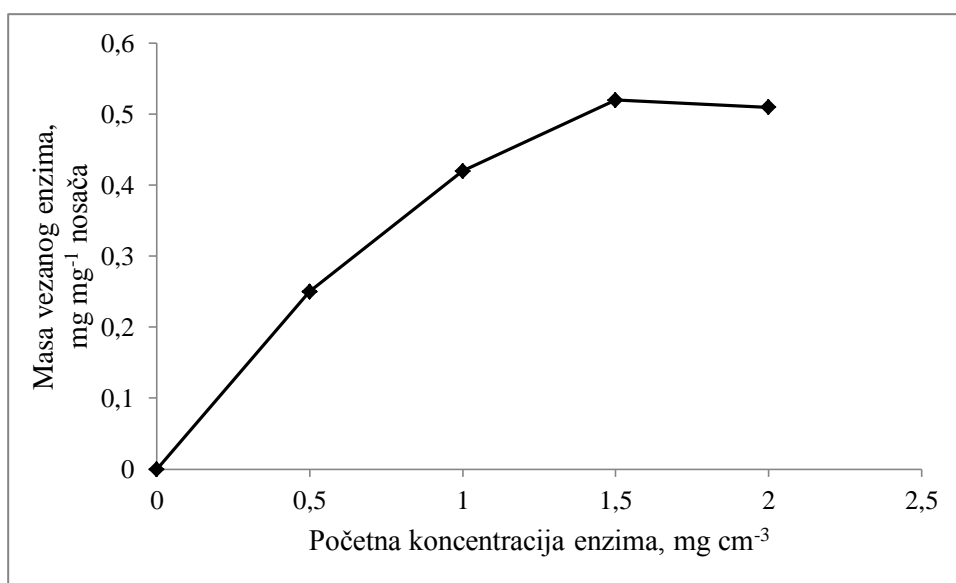


Slika 4.54. Maksimalne specifične aktivnosti lipaze nakon imobilizacije na različite vrste višeslojnih ugljeničnih nanocevi.

Generalno se može zaključiti da ukoliko je glavni cilj imobilizacije visoka specifična aktivnost imobilizata najbolje je enzim adsorbovati na nemodifikovanu površinu višeslojnih ugljeničnih nanocevi u puferu velike jonske jačine. Sa druge strane ukoliko je cilj imobilizacije dobijanje imobilizata koji ima najveću ukupnu aktivnost, što je s obzirom na visoku cenu nanocevi, ekonomski najisplativije, najpogodnije je lipazu imobilisati na oksidovane nanocevi u uslovima koji promovisu kovalentno vezivanje.

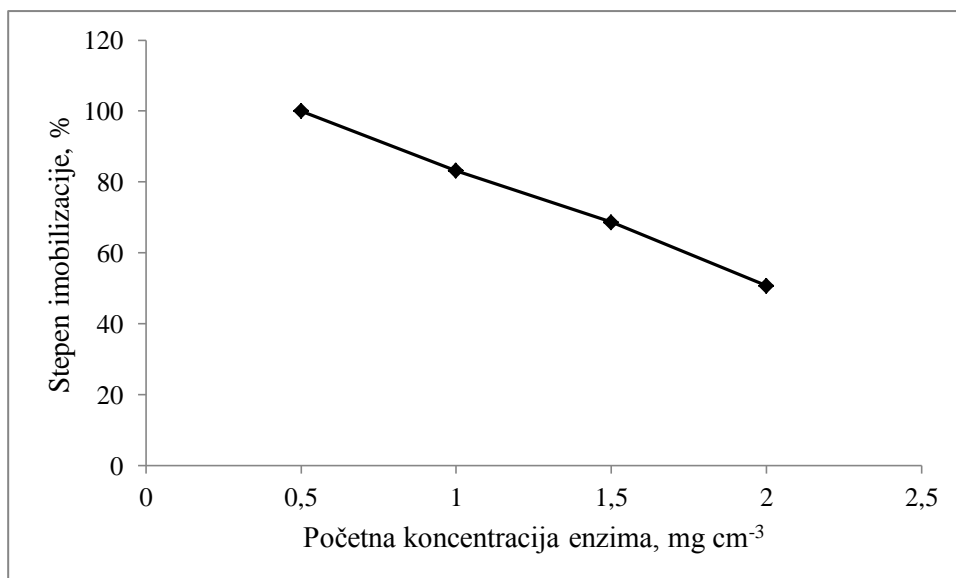
4.6. Imobilizacija lipaze na SP Sephadex[®] C-25

Ispitana je adsorpcija lipaze na katjonski jonoizmenjivač komercijalno dostupan kao SP Sephadex[®] C-25. Kako bi se ispitaio kapacitet nosača varirana je početna koncentracija enzima u rastvoru u opsegu od 0,5 – 2 mg cm⁻³. Masa nosača u svim eksperimentima bila je konstantna i iznosila je 20 mg. Imobilizacija je trajala 2 h i odvijala se u acetatnom puferu (pH 3,5). Uticaj početne koncentracije enzima na masu vezanog enzima i stepen imobilizacije prikazan je na slikama 4.55 i 4.56.



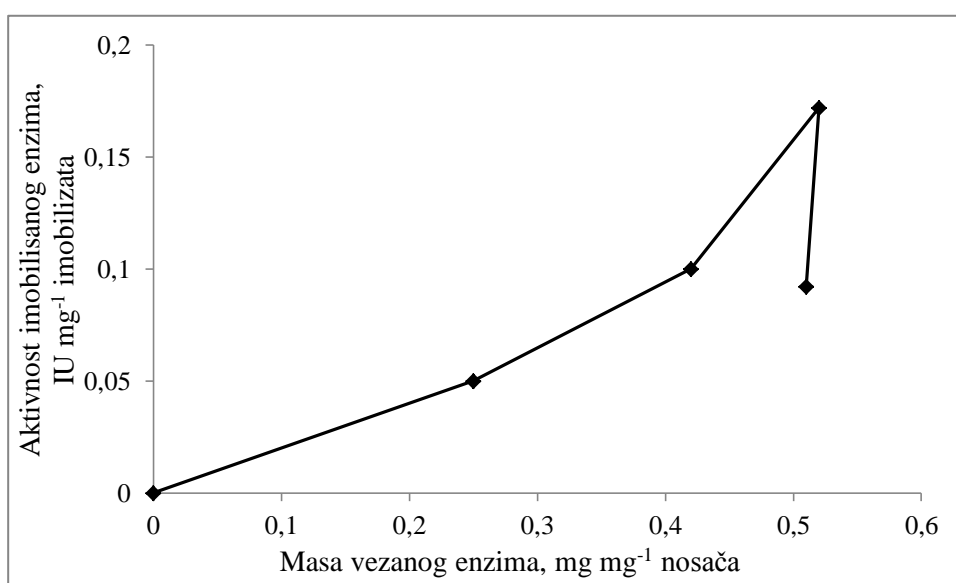
Slika 4.55. Uticaj početne koncentracije enzima na masu vezanog enzima.

Sa povećanjem početne koncentracije enzima u rastvoru do 1,5 mg cm⁻³ povećava se i masa adsorbovanog enzima i dostiže maksimalnu vrednost od 0,52 mg mg⁻¹ nosača. Dalje povećanje koncentracije ne dovodi do povećanja mase vezanog enzima i može se pretpostaviti da je došlo do zasićenja nosača enzimom.

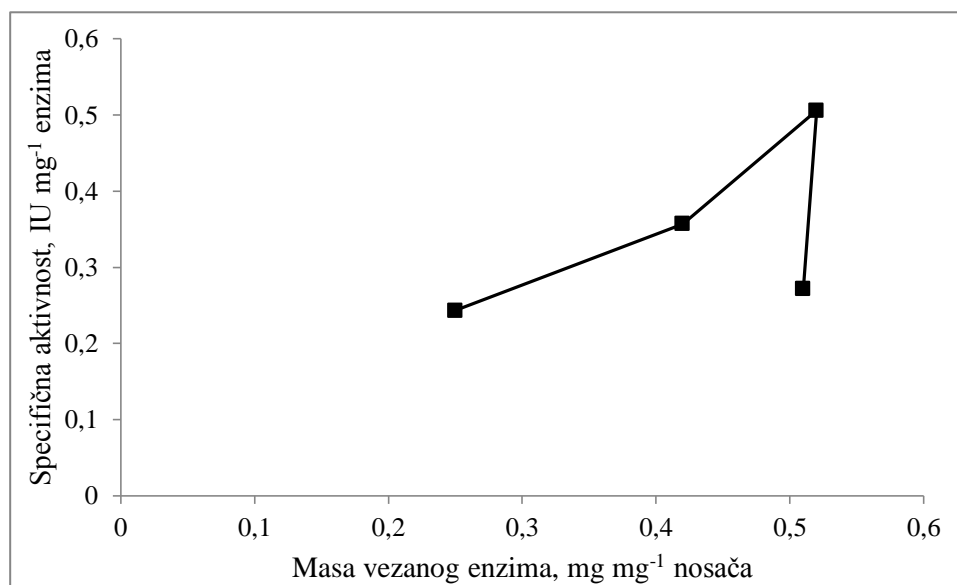


Slika 4.56. Uticaj početne koncentracije enzima na stepen imobilizacije.

Na slikama 4.57 i 4.58 prikazan je uticaj mase vezanog enzima na aktivnost i specifičnu aktivnost imobilisanog enzima. Primetan je rast aktivnosti imobilizata do 0,52 mg enzima i tada se dostiže maksimalna vrednost aktivnosti od 0,172 IU mg⁻¹ imobilizata. Takođe, pri istoj masi vezanog enzima se postiže i najveća specifična aktivnost i iznosi 0,506 IU mg⁻¹ enzima. Ova vrednost predstavlja oko 20 % od aktivnosti nativnog enzima. Upravo ovaj preparat je dalje korišćen u reakciji sinteze 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona.



Slika 4.57. Uticaj mase vezanog enzima na aktivnost imobilisanog enzima.



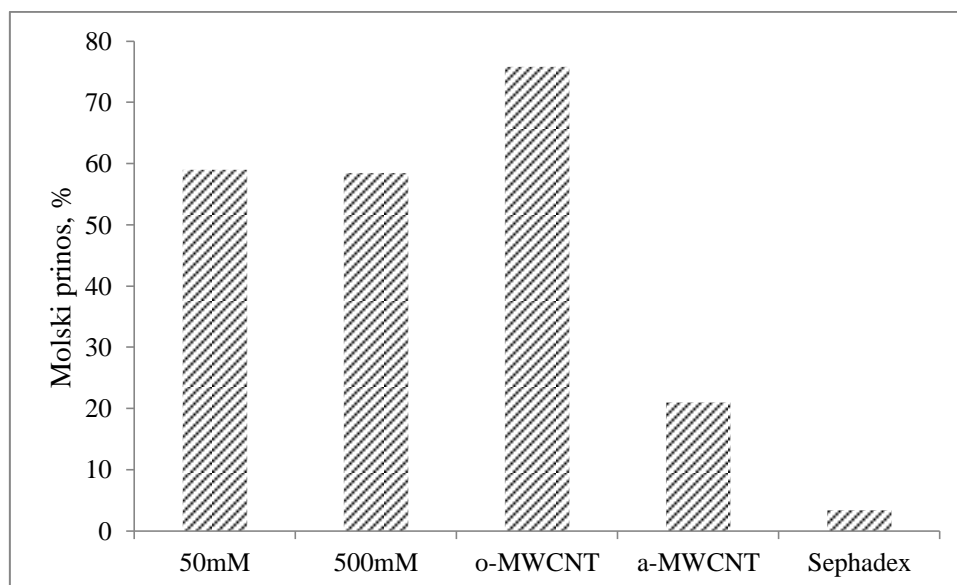
Slika 4.58 Uticaj mase vezanog enzima na specifičnu aktivnost imobilisanog enzima.

4.7. Poređenje katalitičke efikasnosti lipaze imobilisane na različite nosače u reakciji sinteze 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona

U ovoj disertaciji lipaza iz *C. rugosa* imobilisana je adsorpcijom na nemodifikovane MWCNT, kovalentnim vezivanjem na oksidovane i amino-funkcionalizovane MWCNT, kao i adsorpcijom na SP Sephadex[®] C-25. U ovom poglavlju su imobilizati najboljih karakteristika testirani u reakciji sinteze 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona, a njihova efikasnost upoređena je sa aspekta molskog prinosa proizvoda i produktivnosti. Produktivnost enzima predstavlja odnos mase ostvarenog proizvoda i broja enzimskih jedinica aktivnosti unetih u sistem u jedinici vremena,^[75] i jedan je od najznačajnijih kriterijuma za ocenu efikasnosti imobilisanog enzima

$$P = \frac{m_{\text{proizvoda}}}{IU * t} \quad (3.4)$$

Na slici 4.59 upoređeni su prinosi 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona nakon 24 h. Sve reakcije su izvedene sa količinama imobilisanih enzimskih preparata koji sadrže 1 IU aktivnosti. Rezultati pokazuju da enzim imobilisan na MWCNT ima veliki potencijal u sintezi piridona, posebno kada je imobilisan na nemodifikovane ili oksidovane nanocevi. Imobilizacijom na o-MWCNT postiže se najveći prinos od 75,8 %. Najmanje aktivni imobilizat, sa prinosom od svega 3,4 %, dobija se pri imobilizaciji na Sephadex.



Slika 4.59. Poređenje maksimalnih prinosa 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona nakon 24 h pomoću različitih imobilizata.

Tabela 4.14. Produktivnosti različitih preparata imobilisane lipaze u reakciji sinteze 4,6-dimetil-6-cijano-2-piridona.

Imobilizant	P ($\mu\text{mol piridona}/\text{IU}\cdot\text{h}$)
MWCNT (ads u 500 mM puferu)	18,4
MWCNT (ads u 50 mM puferu)	4,96
o-MWCNT	6,7
a-MWCNT	0,15
SP Sephadex [®] C-25	0,01

U tabeli 4.14 prikazane su produktivnosti različitih imobilisanih preparata i može se videti da je najveća produktivnost ($18,4 \mu\text{mol piridona IU}^{-1} \text{h}^{-1}$) postignuta lipazom koja je na nemodifikovane višeslojne ugljenične nanocevi imobilisana adsorpcijom u rastvoru veće jonske jačine. Manje, ali prihvatljive, produktivnosti dobijaju se lipazom imobilisanom na oksidovane MWCNT u uslovima koji favorizuju kovalentno vezivanje ($6,7 \mu\text{mol piridona IU}^{-1} \text{h}^{-1}$) i adsorpcijom na n-MWCNT u puferu manje jonske jačine ($4,96 \mu\text{mol piridona IU}^{-1} \text{h}^{-1}$). Ostale vrednosti su znatno manje i u posmatranoj reakciji se mogu zanemariti.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu eksperimentalnih rezultata u ovoj disertaciji proizilaze sledeći zaključci:

- Hemijskim i enzimskim putem sintetisani su 4,6-disupstituisani-3-cijano-2-piridoni, kao i *N*-alkilsubstituisani 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridoni.
- Po prvi put sintetisan je 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridon enzimskim putem u prisustvu lipaze iz *C. rugosa*, koji je zatim izolovan i okarakterisan.
- Metodom odzivnih površina na reakciju enzimske sinteze ispitan je uticaj tri najvažnija reaciona parametra: temperatura, početna koncentracija enzima i molski odnos supstrata.
- Na utvrđenim optimalnim uslovima ispitana je kinetika enzimske sinteze 4,6-disupstituisanih-3-cijano-2-piridona i ustanovljeno je da se reakcija odvija prema ping-pong bi-ter mehanizmu sa inhibicijom sa cijanoacetamidom.
- Ispitivanja su pokazala da se mehanizam enzimske sinteze razlikuje od mehanizma klasične sinteze hemijskim putem.
- Izračunate kinetičke konstante u reakciji kondenzacije cijanoacetamida, kako sa acetilacetonom, tako i sa etoksiacetilacetonom, pokazale su da lipaza iz *C. rugosa* ima veći afinitet prema 1,3-diketonu. 90 puta manja konstanta specifičnosti za etoksiacetilaceton ukazuje da enzim ima veći afinitet prema manjem 1,3-diketonu, acetilacetonu.
- Upoređivanjem katalitičkih konstanti za dve ispitane sinteze može se zaključiti da je sinteza 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona oko 500 puta brža od sinteze 4-etoksimetil-6-metil-3-cijano-2-piridona.
- Ispitivanjem uticaja veličine alkil-grupa u reakciji kondenzacije acetilacetona i različitih *N*-alkilcijanoacetamida ustanovljeno je da do najvećeg pada u brzini reakcije i prinosu piridona dolazi u reakciji sa *N*-metilcijanoacetamidom.
- Ustanovljeno je da se lipaza iz *C. rugosa* može imobilisati na površinu nemodifikovanih višeslojnih ugljeničnih nanocevi. U puferu manje jonske jačine adsorbuje se veća količina enzima i dobijaju se aktivniji imobilizati, ali se u puferu veće jonske jačine dobija imobilizat sa visokom specifičnom aktivnošću, čak 85 % od aktivnosti slobodnog enzima.

- Lipaza iz *C. rugosa* imobilisana je na oksidovane višeslojne ugljenične nanocevi u uslovima koji promovišu stvaranje kovalentne veze. Ovako imobilisana lipaza, i pored najmanje količine vezanog enzima, pokazala je najveću ukupnu aktivnost od svih ispitanih tehnika imobilizacije na MWCNT. Ustanovljeno je da se na ovako modifikovane nanocevi ne može izbeći nespecifično vezivanje lipaze.
- Imobilizacijom lipaze na amino funkcionalizovane višeslojne ugljenične nanocevi vezuje se čak 1,4 mg enzima po 1 mg nosača, ali enzim gubi veliki deo svoje aktivnosti.
- Adsorpcijom na SP Sephadex[®] C-25 vezuje se maksimalno 0,52 mg lipaze po mg nosača. Nakon imobilizacije lipaza je zadržala 20 % od početne aktivnosti.
- Ispitivanjem imobilisanih enzima najboljih karakteristika u reakciji sinteze 4,6-dimetil-3-cijano-2-piridona utvrđeno je da lipaza imobilisana na n-MWCNT i o-MWCNT pokazuje značajnu aktivnost sa prinosom piridona i do 75 %.

6. LITERATURA

1. S. Haifeng, C. Kongchang, T. He, *Dyes Pigments* **53** (2002) 257–262.
2. G. A. Younadale, U.S. Patent 4,220,648, 1980.
3. G. A. Younadale, T. F. Oglia, *Journal of Medicinal Chemistry* **28** (1985) 1790–1796.
4. T. N. Wheeler, T. P. Kenakin, J. E. Shaffer, U.S. Patent 5,051,431, 1991.
5. A. A. Bekhit, A. M. Baraka, *European Journal of Medicinal Chemistry* **40** (2005) 1405–1413.
6. H. Satoh, M. Endoh, *The Japanese Journal of Pharmacology* **52** (1990) 215–224.
7. S. Harris, K. Folkers, *Journal of the American Chemical Society* **61** (1939) 1245–1249.
8. S. Harris, E. Stiller, K. Folkers, *Journal of the American Chemical Society* **61** (1939) 1242–1244
9. S. Harris, K. Folkers, *Journal of the American Chemical Society* **61** (1939) 3307–3310.
10. B. Singh, G. Z. Leshner, U.S. Patent 4,451,469, 1984.
11. M. Kuzuya, A. Noguchi, T. Okuda, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **57** (1984) 3545–3460.
12. S. Millefiori, A. Millefiori, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **63** (1990) 2981–2984.
13. G. G. Hammes, P. J. Lillford, *Journal of the American Chemical Society* **92** (1970) 7578–7585.
14. E. Klingsberg, Pyridine and its Derivatives, In: (1962) Part III, Interscience, New York, 620–623.
15. C. Reichardt, Solvents and Solvent effect in organic chemistry, In: (2003) Wiley, Weinheim, 114.
16. E. Klingsberg, Pyridine and its Derivatives, In: (1960) Part I, Interscience, New York, 272–273, 362–364.
17. R. M. Silverstein, G. C. Bassler, T. C. Morill, Spectrophotometric Identification of Organic Compounds, In: (1981) Wiley, New York, 195, 316.
18. J. J. Li, Name Reactions: a collection of detailed reaction mechanisms, In: (2006) 3rd expanded Ed., Springer Berlin Heidelberg, New York, 168.

19. D. Ž. Mijin, M. Mišić-Vuković, *Journal of the Serbian Chemical Society* **59** (1994) 959–965.
20. M. Mišić-Vuković, M. Radojković-Veličković, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* (1992) 1965–1970.
21. V. Krstić, M. Mišić-Vuković, M. Radojković-Veličković, *Journal of Chemical Research (S)* **82 (M)** (1991) 783–792.
22. M. Mišić-Vuković, M. Radojković-Veličković, B. Stojković, *Fourth Yugoslav Symposium on Organic Chemistry* (1987) Belgrade, PO 83, 240.
23. M. Mišić-Vuković, M. Radojković-Veličković, B. Ilić, *Balkan Chemistry Days* (1980) Athene, Ap-258, 304.
24. D. Mijin, D. Antonović, M. Mišić-Vuković, *Indian Journal of Chemistry* **33B** (1994) 309–311.
25. D. Mijin, M. Mišić-Vuković, *Indian Journal of Chemistry* **34B** (1995) 348–350.
26. D. Mijin, M. Mišić-Vuković, *Indian Journal of Chemistry* **37B** (1998) 988–994.
27. D. Mijin, B. Milić, M. Mišić-Vuković, *Indian Journal of Chemistry* **45B** (2006) 61–71.
28. R. D. Schmidt, R. Verger, *Angewandte Chemie International Edition* **37** (1998) 1608–1633.
29. K. E. Jaeger, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, *Annual Review of Microbiology* **53** (1999) 315–351.
30. P. Villeneuve, J. M. Muderhwa, J. Graille, M. J. Haas, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **9** (2000) 113–148.
31. K. M. Koeller, C. H. Wong, *Nature* **409** (2001) 232–240.
32. A. Schmid, J. S. Dordic, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolst, B. Witholt, *Nature* **409** (2001) 258–268.
33. A. M. Klivanov, *Nature* **409** (2001) 241–246.
34. A. B. Majumder, N. G. Remesh, M. N. Gupta, *Tetrahedron Letters* **50** (2009) 5190–5193.
35. J. Polaina, A. P. MacCabe, Use of lipases in organic synthesis, In: *Industrial enzymes* (2007) Springer Netherlands, 301–315.
36. M. S. d. Castro, J. V. S. Gago, *Tetrahedron* **54** (1998) 2877–2892.

37. S. Sultani, J. M. Engasser, M. Ghoul, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **11** (2001) 725–731.
38. M. Caussette, A. Marty, D. Combes, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **68** (1997) 257–262.
39. S. Dharmsthiti, J. Pratuangdejkul, G. T. Theeragool, S. Luchai, *The Journal of General and Applied Microbiology* **44** (1998) 139–145.
40. D.-W. Lee, Y.-S. Koh, K.-J. Kim, B.-C. Kim, H.-J. Choi, D.-S. Kim, M. T. Suhartono, Y.-R. Pyun, *FEMS Microbiology Letters* **179** (1999) 393-400.
41. C. Schmidt-Dannert, H. Sztajer, W. Stocklein, U. Menge, R. D. Schmid, *Biochimica et Biophysica Acta* **1214** (1994) 43–53.
42. L. Kanwar, B. K. Gogoi, P. Goswami, *Bioresource Technology* **84** (2002) 207–211.
43. Y. Kojima, M. Yokoe, T. Mase, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **58** (1994) 1564–1568.
44. H. Dong, S. Gao, S. Han, S. Cao, *Applied Microbiology and Biotechnology* **30** (1999) 251–256.
45. T. M. Kuo, H. W. Gardner, Lipid biotechnology, In: (2002) 1st edition, Marcel Dekker, Inc., New York,
46. R. Gupta, N. Gupta, P. Rathi, *Applied Microbiology and Biotechnology* **64** (2004) 763-781.
47. P. Rathi, R. K. Saxena, R. Gupta, *Process Biochemistry* **37** (2001) 187–192.
48. S. Bradoo, R. K. Saxena, R. Gupta, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **15** (1999) 87–91.
49. W. N. Niu, Z. P. Li, D. W. Zhang, M. R. Yu, T. W. Tan, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **43** (2006) 33-39.
50. N. Kulkarni, R. V. Garde, *Biotechnology Letters* **21** (1999) 897-899.
51. K. A. Gulyamova, K. D. Davranov, *Chemistry of Natural Compounds* **31** (1995) 372-375.
52. A. R. Macrae, R. C. Hammond, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* **3** (1985) 193-217.
53. S. A. Patkar, F. Bjorkling, Lipase inhibitors, (1994) U: P. Woolley, S. B. Petersen (editor/i) Lipases-their structure, biochemistry and application, Cambridge University Press, Cambridge, 207-224.

54. U. Derewenda, L. Swenson, Y. Wei, R. Green, P. M. Kobos, R. Joerger, M. J. Haas, Z. S. Derewend, *The Journal of Lipid Research* **35** (1994) 524-534.
55. A. M. Brzozowski, U. Derewenda, *Nature* **351** (1991) 491-494.
56. M. Jensen, T. R. Jensen, K. Kjaer, T. Bjornholm, O. G. Mouritsen, G. H. Peters, *Biophysical Journal* **83** (2002) 98-111.
57. M. Martinelle, M. Holmquist, K. Hult, *Biochimica et Biophysica Acta* **1258** (1995) 272-276.
58. C. M. d. Rio, P. D. Geus, *Nature* **356** (1992) 615-618.
59. D. Bezbradica, "Sinteza estara katalizovana slobodnom lipazom i lipazom imobilisanom na polimernim nosačima" (2007) Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu.
60. M. Nardini, B. W. Dijkstra, *Current Opinion in Structural Biology* **9** (1999) 732-737.
61. G. H. Krooshof, E. M. Kwant, J. Damborsky, J. Koča, D. B. Janssen, *Biochemistry* **36** (1997) 9571-9580.
62. K. Hynkova, Y. Nagata, M. Takagi, J. Damborsky, *FEBS Letters* **446** (1999) 177-181.
63. R. V. Muralidhar, R. R. Chirumamilla, R. Marchant, V. N. Ramachandran, O. P. Ward, P. Nigam, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **18** (2002) 81-97.
64. J. Pleiss, M. Fischer, R. D. Schmidt, *Chemistry and Physics of Lipids* **93** (1998) 67-80.
65. J. Schmitt, S. Brocca, R. D. Schmid, J. Pleiss, *Protein Engineering* **15** (2002) 595-601.
66. Z. Knežević, "Imobilizacija lipaze iz *C. rugosa* na polimernim nosačima i na vlaknima od regenerisane celuloze" (2003) Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu.
67. C. Otero, M. L. Rua, L. Robledo, *FEBS Letters* **360** (1995) 202-206.
68. M. A. Pernas, C. Lopez, M. L. Rua, J. Hermoso, *FEBS Letters* **501** (2001) 87-91.
69. M. Cygler, J. D. Schrag, *Biochimica et Biophysica Acta* **1441** (1999) 205-214.
70. P. Grochulski, Y. Li, J. D. Schrag, M. Cygler, *Protein Science* **3** (1994) 82-91.
71. M. L. Foresti, M. L. Ferreira, *Biomacromolecules* **5** (2004) 2366-2375.
72. D. A. Lang, B. W. Dijkstra, *Chemistry and Physics of Lipids* **93** (1998) 115-122.

73. R. K. Saxena, P. K. Ghosh, R. Gupta, W. S. Davidson, S. Bradoo, R. Gulati, *Current Science* **77** (1999) 101-116.
74. <http://www.au-kbc.org/beta/bioproj2/uses.html>
75. Z. D. Knežević–Jugović, Enzimsko inženjerstvo, In: (2008) Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd,
76. J. Reetz, *Trends in Biotechnology* **16** (1998) 396-403.
77. P. Mertoli, G. Nicoloci, A. Patti, M. Piattelli, *Chirality* **8** (1996) 377-380.
78. A. Mustranta, *Applied Microbiology and Biotechnology* **38** (1992) 61-66.
79. S. D. Petrović, M. M. Mišić–Vuković, D. Ž. Mijin, *Hemijska Industrija* **56** (2002) 10-16.
80. W. J. Wechter, A. E. Bigoria, *Chirality* **5** (1993) 492-494.
81. Y. Y. Lio, J. H. Xu, H. Y. Wu, *Jornal of Biotechnology* **110** (2004) 209-217.
82. R. D. Schmid, R. Veger, *Angewandte Chemie International Edition (English)* **37** (1998) 1608-1633.
83. H. Matsumae, K. Nakamicni, T. Shibatani, EP 362556, 1990.
84. S. Benjamin, A. Pandey, *Brazilian Archives of Biology and Technology* **44** (2001) 213-221.
85. P. Bajpai, *Biotechnology Progress* **15** (1999) 147-157.
86. J. Reetz, *Chemistry and Physics of Lipids* **93** (1998) 3-14.
87. P. A. Frey, A. D. Hegeman, Enzymatic reaction mechanisms, In: (2007) Oxford University Press, Inc., New York,
88. H. Bisswanger, Enzyme kinetics: Principles and methods, In: (2008) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, Germany,
89. L. Cao, *Current Opinion in Chemical Biology* **9** (2005) 217-226.
90. B. Krajewska, *Enzyme and Microbial Technology* **35** (2004) 126-139.
91. R. A. Sheldon, *Advanced Synthesis and Catalysis* **349** (2007) 1289-1307.
92. R. Fernandez-Lafuente, P. Armisen, P. Sabuquillo, G. Fernández-Lorente, J. M. Guisán, *Chemistry and Physics of Lipids* **93** (1998) 185-197.
93. P. Grochulski, Y. Li, J. D. Schrag, F. Bouthillier, P. Smith, D. Harrison, B. Rubin, M. Cygler, *Journal of Biological Chemistry* **268** (1993) 12843-12847.
94. A. Bastida, P. Sabuquillo, P. Armisen, R. Fernández-Lafuente, J. Huguet, J. M. Guisán, *Biotechnology and Bioengineering* **58** (1998) 486-493.

95. A. Kobayashi, Y. Sato, F. Mizutani, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **65** (2001) 2392-2396.
96. T. Yamane, T. Ichiryu, M. Nagata, A. Ueno, S. Shimizu, *Biotechnology and Bioengineering* **36** (1990) 1063-1069.
97. M. M. Soumanou, U. T. Bornscheuer, *Enzyme and Microbial Technology* **33** (2003) 97-103.
98. A. Akova, G. Ustun, *Biotechnology Letters* **22** (2000) 355-359.
99. M. Norin, J. Boutelje, E. Holmberg, K. Hult, *Applied Microbiology and Biotechnology* **28** (1998) 527-530.
100. Z. Knežević, L. Mojović, B. Adnađević, *Enzyme and Microbial Technology* **22** (1998) 275-280.
101. A. A. Mendes, L. Freitas, A. K. F. d. Carvalho, P. C. d. Oliveira, H. F. d. Castro, *Enzyme Research* **2011** (2011) ID 967239, 8 strana.
102. M. N. Tahir, A. Adnan, E. Strömberg, P. Mischnick, (2011) DOI 10.1007/s00449-011-0626-8.
103. M. Karra-Châabouni, I. Bouaziz, S. Boufi, A. M. B. d. Rego, Y. Gargouri, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **66** (2008) 168-177.
104. T. Gitlesen, M. Bauer, P. Adlercreutz, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1345** (1997) 188-196.
105. Y. Gao, I. Kyratzis, *Bioconjugate Chemistry* **19** (2008) 1945-1950.
106. C. P. Govardhan, *Current Opinion in Biotechnology* **10** (1999) 331-335.
107. D. Häring, P. Schreier, *Current Opinion in Chemical Biology* **3** (1999) 35-38.
108. L. Wu, X. Yuan, J. Sheng, *Journal of Membrane Science* **250** (2005) 167-173.
109. B. C. Kim, S. Nair, J. Kim, J. H. Kwak, J. W. Grate, S. H. Kim, M. B. Gu, *Nanotechnology* **16** (2005) S382-S388.
110. K. N. Chua, W. S. Lim, P. Zhang, H. Lu, J. Wen, S. Ramakrishna, K. W. Leong, H. Q. Mao, *Biomaterials* **26** (2005) 2537-2347.
111. R. Axen, J. Porath, S. Ernback, *Nature* **214** (1967) 1302-1304.
112. J. M. Palomo, R. Segura, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Tetrahedron: Asymmetry* **15** (2004) 1157-1161.
113. L. F. Chen, G. T. Tsao, *Biotechnology and Bioengineering* **19** (1977) 1463-1473.

114. Z. Knežević, Imobilisane lipaze kao biokatalizatori, In: (2004) Zaduzbina Andrejević, Beograd,
115. J. M. Moreno, J. V. Sinisterra, *Journal of Molecular Catalysis* **93** (1994) 357-369.
116. J. M. Guisan, Immobilization of enzymes and cells, In: (2006) Humana Press Inc., Totowa, New Jersey,
117. C. Mateo, G. Fernandez-Lorente, O. Abian, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Guisan, *Biomacromolecules* **1** (2000) 739-745.
118. H. H. Weetall, *Methods in Enzymology* **44** (1976) 134-148.
119. P. Monsan, *Journal of Molecular Catalysis* **3** (1978) 371-384.
120. J. F. Shaw, R. C. Chang, F. F. Wang, Y. J. Wang, *Biotechnology and Bioengineering* **35** (1990) 132-137.
121. J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, C. Mateo, C. Ortiz, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Guisan, *Enzyme and Microbial Technology* **31** (2002) 775-783.
122. R. Fernandez-Lafuente, C. M. Rosell, V. Rodriguez, C. Santana, G. Soler, A. Bastida, J. M. Guisan, *Enzyme and Microbial Technology* **17** (1993) 517-523.
123. L. Wilson, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, A. Illanes, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme and Microbial Technology* **38** (2006) 975-980.
124. A. Zaidi, J. L. Gainer, G. Carta, A. Mrani, T. Kadiri, Y. Belarbi, A. Miir, *Jornal of Biotechnology* **93** (2002) 209-216.
125. E. Valeur, M. Bradley, *Chemical Society Reviews* **38** (2009) 606-631.
126. J. M. Carter, Conjugation of Peptides to Carrier Protein via Carbodiimide, (1996) U: J. M. Walker (editor/i) *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 693-694.
127. J. V. Staros, R. W. Wright, D. M. Swingle, *Analytical Biochemistry* **156** (1986) 220-222.
128. D. Sehgal, I. K. Vijay, *Analytical Biochemistry* **218** (1994) 87-91.
129. C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme and Microbial Technology* **40** (2007) 1451-1463.
130. W. S. Adriano, D. B. Mendonça, D. S. Rodrigues, E. J. Mammarella, R. L. C. Giordano, *Biomacromolecules* **9** (2008) 2170-2179.
131. A. Manrich, A. Komesu, W. S. Adriano, P. W. Tardioli, R. L. C. Giordano, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **161** (2010) 455-467.

132. G. Bayaramoglu, B. Kaya, M. Y. Aryca, *Food Chemistry* **92** (2005) 261-268.
133. K. Buchholz, DEHEMA Monograph Vol. 84, In: (1979) Verlag Chemie,
134. S. Iijima, *Nature* **354** (1991) 56-58.
135. X. Wang, Q. Li, J. Xie, Z. Jin, J. Wang, Y. Li, K. Jiang, S. Fan, *Nano Lettres* **9** (2009) 3137-3141.
136. P. M. Ajayan, *Chemical Reviews* **99** (1999) 1787-1799.
137. A. Jorio, G. Dresselhaus, M. S. E. Dresselhaus, Carbon Nanotubes: Advanced Topics in the Synthesis, Structure, Properties and Applications, In: Topics in Applied Physics Vol. 111 (2008) Springer-Verlag, Berlin,
138. Y. Lin, S. Taylor, H. Li, K. A. S. Fernando, L. Qu, W. Wang, L. Gu, B. Zhou, Y. P. Sun, *Journal of Materials Chemistry* **14** (2004) 527-541.
139. F. Balavoine, P. Schultz, C. Richard, V. Mallouh, T. W. Ebbesen, C. Mioskowski, *Angewandte Chemie International Edition* **38** (1999) 1912-1915.
140. J. J. Davis, M. L. H. Green, H. A. O. Hill, Y. C. Leung, P. J. Sadler, J. Sloan, A. V. Xavier, S. C. Tsang, *Inorganica Chimica Acta* **272** (1998) 261-266.
141. Y. Liu, Y. Li, X. P. Yan, *Advanced Functional Materials* **18** (2008) 1536-1543.
142. Z. Gao, T. J. Bandosz, Z. Zhao, M. Han, J. Qiu, *Journal of Hazardous Materials* **167** (2009) 357-365.
143. C. Lu, H. Chiu, *Chemical Engineering Journal* **139** (2008) 462-446.
144. G. Vuković, A. Marinković, M. Obradović, V. Radmilović, M. Čolić, R. Aleksić, P. S. Uskoković, *Applied Surface Science* **255** (2009) 8067-8075.
145. K. Jiang, L. S. Schadler, R. W. Siegel, X. Zhang, H. Zhangc, M. Terronesd, *Journal of Materials Chemistry* **14** (2004) 37-39.
146. G. D. Vuković, A. D. Marinković, M. Čolić, M. Đ. Ristić, R. Aleksić, A. A. Perić-Grujić, P. S. Uskokovic, *Chemical Engineering Journal* **157** (2010) 238-248.
147. Z. Guo, P. J. Sadler, S. C. Tsang, *Advanced Materials* **10** (1998) 701-703.
148. R. J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, H. Dai, *Journal of the American Chemical Society* **123** (2001) 3838-3839.
149. B. R. Azamian, J. J. Davis, K. S. Coleman, C. B. Bagshaw, M. L. Green, *Journal of the American Chemical Society* **124** (2002) 12664-12665.
150. S. G. Wang, Q. Zhang, R. Wang, S. F. Yoon, J. Ahn, D. J. Yang, J. Z. Tian, J. Q. Li, Q. Zhou, *Electrochemistry Communication* **5** (2003) 800-803.

151. R. J. Chen, S. Bangsaruntip, K. A. Drouvalakis, N. W. Kam, M. Shim, Y. Li, W. Kim, P. J. Utz, H. Dai, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100** (2003) 4984-4989.
152. N. Q. Jia, L. J. Wang, L. Liu, Q. Zhou, Z. Y. Jiang, *The Journal of Physical Chemistry B* **108** (2004) 3760-3764.
153. S. S. Karajanagi, A. A. Vertegel, R. S. Kane, J. S. Dordick, *Langmuir* **20** (2004) 11594-11599.
154. J. M. Gomez, M. D. Romero, T. M. Fernandez, *Catalysis Letters* **101** (2005) 275-278.
155. K. Matsuura, T. Sait, T. Okazaki, S. Ohshima, M. Yumura, S. Iijima, *Chemical Physics Letters* **429** (2006) 497-502.
156. L. Song, J. Meng, J. Zhong, L. Liu, X. Dou, D. Liu, X. Zhao, S. Luo, Z. Zhang, Y. Xiang, H. Xu, W. Zhou, Z. Wu, S. Xie, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **49** (2006) 66-70.
157. X. J. Li, W. Chen, Q. W. Zhan, L. M. Dai, L. Sowards, M. Pender, R. R. Naik, *Journal of Physical Chemistry B* **110** (2006) 12621-12625.
158. S. S. Karajanagi, H. Yang, P. Asuri, E. Sellitto, J. S. Dordick, R. S. Kane, *Langmuir* **22** (2006) 1392-1395.
159. P. Asuri, S. S. Karajanagi, H. Yang, T. J. Yim, R. S. Kane, J. S. Dordick, *Langmuir* **22** (2006) 5833-5836.
160. N. R. Palwai, D. E. Martyn, L. F. F. Neves, Y. Tan, D. E. Resasco, R. G. Harrison, *Nanotechnology* **18** (2007) 235601 (5 str).
161. S. Shah, K. Solanki, M. N. Gupta, *Chemistry Central Journal* **1** (2007) 30-35.
162. A. R. Liu, T. Wakayama, C. Nakamura, J. Miyake, N. A. Zorin, D. J. Qian, *Electrochimica Acta* **52** (2007) 3222-3228.
163. J. T. Cang-Rong, G. Pastorin, *Nanotechnology* **20** (2009) 255102 (20 str).
164. I. V. Pavlidis, T. Tsoufis, A. Enotiadis, D. Gournis, H. Stamatis, *Advanced Engineering Materials* **12** (2010) B179-B183.
165. H. K. Lee, J. K. Lee, M. J. Kim, C. J. Lee, *Bulletin of the Korean Chemical Society* **31** (2010) 650-652.
166. A. Guiseppi-Elie, C. H. Lei, R. H. Baughman, *Nanotechnology* **13** (2002) 559-564.

167. S. Sotiropoulou, N. A. Chaniotakis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **375** (2003) 103-105.
168. S. Chen, R. Yuan, Y. Chai, L. Zhang, N. Wang, X. Li, *Biosensors & Bioelectronics* **22** (2007) 1268-1274.
169. X. Yu, D. Chattopadhyay, I. Galeska, F. Papadimitrakopoulos, J. F. Rusling, *Electrochemistry Communication* **5** (2003) 408-411.
170. S. Boussaad, N. J. Tao, R. Zhang, T. Hopson, L. A. Nagahara, *Chemistry Communication* (2003) 1502-1503.
171. Q. Shi, D. Yang, Y. Su, J. Li, Z. Jiang, Y. Jiang, W. Yuan, *Journal of Nanoparticle Research* **9** (2007) 1205–1210.
172. <http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm357/sephadex.pdf>
173. K. T. Lee, C. C. Akoh, *Biotechnology Techniques* **12** (1998) 381-384.
174. D. Yang, J. S. Rhee, *Biotechnology and Bioengineering* **40** (1992) 748-752.
175. H. Ghamgui, M. Karra-Chaabouni, Y. Gargouri, *Enzyme and Microbial Technology* **35** (2004) 355-363.
176. W. F. Bruce, H. W. J. Coover, *Journal of the American Chemical Society* **66** (1994) 2092-2094.
177. R. Schroder, K. Lurssen, US 4261731, 1981.
178. M. M. Bradford, *Analytical Biochemistry* **72** (1976) 248-254.
179. G. E. P. Box, W. G. Hunter, J. S. Hunter, *Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*, In: (1978) Wiley-Interscience, New York, USA, 9–14.
180. G. T. Wernimont, *Use of Statistics to Develop and Evaluate Analytical Methods*, In: (1995) AOAC International, Arlington, Teksas. USA, 96.
181. G. Sudarjanto, B. Keller-Lehmann, J. Keller, *Journal of Hazardous Materials* **138B** (2006) 160-168.
182. M. Persson, E. Wehtje, P. Adlercreutz, *Biotechnology Letters* **22** (2000) 1571-1575.
183. R. M. Blanco, P. Terreros, M. Fernández-Pérez, C. Otero, G. Díaz-González, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **30** (2004) 83-93.
184. A. Natalello, D. Ami, S. Brocca, M. Lotti, S. M. Doglia, *Biochemical Journal* **385** (2005) 511-517.

185. P. Grochulski, Y. Li, J. D. Schrag, M. Cygler, *Protein Science* **3** (1994) 82-89.
186. S. Brocca, M. Persson, E. Wehtje, P. Adlercreutz, L. Alberghina, M. Lotti, *Protein Science* **9** (2000) 985-990.
187. J. M. Palomo, G. Munoz, G. Fernandez-Lorente, C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Guisan, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **19** (2002) 279-286.
188. B. G. Davis, J. P. Simons, *Angewandte Chemie International Edition* **46** (2007) 3644-3648.
189. J. M. Bolivar, C. Mateo, C. Godoy, B. C. C. Pessela, D. S. Rodrigues, R. L. C. Giordano, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Guisan, *Process Biochemistry* **44** (2009) 757-763.
190. Y. M. Lee, O. Y. Kwon, Y. J. Yoon, K. Ryu, *Biotechnology Letters* **28** (2006) 39-43.
191. P. Asuri, S. S. Bale, R. C. Pangule, D. A. Shah, R. S. Kane, J. S. Dordick, *Langmuir* **23** (2007) 12318-12321.

7. BIOGRAFIJA AUTORA

Nevena Prlainović (rođ. Vučijak), dipl. inž. rođena je 15.12.1982. godine u Mostaru. Osnovnu školu završila je u Beogradu, kao i IV beogradsku gimnaziju. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu započela je školske 2001./02. godine, a diplomirala na smeru Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija 2007. godine sa prosečnom ocenom 9,00. Diplomski rad pod nazivom "Sinteza estara lipazom imobilisanom na polimetakrilatu" odbranila je sa ocenom 10,00.

Školske 2007./08. godine upisala je doktorske studije na smeru: Hemija i hemijska tehnologija, odsek: Organska hemijska tehnologija, i položila 11/11 ispita sa prosečnom ocenom 10,00. Od januara 2008. do februara 2010. godine bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, posle čega, kao istraživač pripravnik, prelazi na rad u Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta d.o.o. u okviru projekta br. 142063 Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. U zvanje istraživač pripravnik izabrana je 25. 06. 2009. godine.

Od 01.01.2011. godine je zaposlena kao istraživač pripravnik u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije br. 172013 pod nazivom "Proučavanje sinteze, strukture i aktivnosti organskih jedinjenja prirodnog i sintetskog porekla", a od 17.03.2011. stiče zvanje istraživač-saradnik.

8. IZJAVA O AUTORSTVU

Doktorska disertacija

Nevena Prlainović

8. IZJAVA O AUTORSTVU

Potpisani-a PRLAINOVIĆ NEVENAbroj upisa DS-1/2007 (studenti upisuju br. indeksa, a doktoranti koji su direktno prijavili doktorsku disertaciju ostavljaju prazno)

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

PROUČAVANJE MEKANIZMA ENZIMSKE SINTEZE4,6-DISUPSTITUISANIH 3-CIJANO-2-PIRIDINA

- 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.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 27.04.2012.Prlainović Nevena

9. IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE RADA

Doktorska disertacija

Nevena Prlainović

9. IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE RADA

Ime i prezime autora NEVENA PRLAINOVIĆBroj upisa AG-1/2007Studijski program HEMIJA I HEMIJSKA TEHNOLOGIJANaslov rada PROUČAVANJE MEHANIZMA ENZIMSKE SINTEZE 4,6-DIRUPSTIVISANIH-3-CIJANO-2-PIRIDINAMentor DR DUŠAN MIJIN, DR DEJAN BEZBRADICAPotpisani NEVENA PRLAINOVIĆ

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.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 27.04.2012.Ilprlainovic Nevena

10. IZJAVA O KORIŠĆENJU

Doktorska disertacija

Nevena Prlainović

10. IZJAVA O KORIŠĆENJU

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

PROUČAVANJE MEHANIŽMA ENZIMSKE SINTEZE

4,6-DISUPSTITUISANIH-3-CIJANO-2-PIRIDONA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la 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, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 27.04.2012.

Dr Prlainović Nevena