

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO–METALURŠKI FAKULTET

Nataša Ž. Šekuljica

**ENZIMSKO OBEZBOJAVANJE
ANTRAHINONSKIH BOJA IZ OTPADNIH
VODA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Nataša Ž. Šekuljica

**ENZYMATIC DECOLORIZATION OF
ANTHRAQUINONE DYES FROM
WASTEWATERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

MENTOR:

Dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor,
Tehnološko-metalurški fakultet
Univerzitet u Beogradu

MENTOR:

Dr Dušan Mijin, redovni profesor,
Tehnološko-metalurški fakultet
Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Nevena Prlainović, naučni saradnik,
Inovacioni Centar, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Branimir Grgur, redovni profesor,
Tehnološko-metalurški fakultet
Univerzitet u Beogradu

Dr Radivoje Prodanović, vanredni profesor,
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE:

*"Velika dela nastala su pomoću genijalnosti,
a dovršena su marljivošću." Joseph Joubert*

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija urađena je u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije "Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti", "Proučavanje sinteze, strukture i aktivnosti organskih jedinjenja prirodnog i sintetskog porekla" i "Elektrohemijska sinteza i karakterizacija nanostrukturiranih funkcionalnih materijala za primenu u novom tehnologijama" na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju.

Doktorska disertacija je urađena pod mentorstvom prof. dr Zorice Knežević-Jugović kojoj se posebno zahvaljujem pre svega na omogućenim uslovima bez kojih ova doktorska disertacija ne bi mogla da se realizuje. Takođe, zahvaljujem se na uloženom trudu, pruženom vremenu, strpljenju, poverenju i podršci tokom izrade ove teze.

Prof. dr Dušanu Mijinu se najtoplije zahvaljujem na strpljenju, vremenu, korisnim savetima, podršci koju mi je pružio od samog početka pa do kraja izrade ove disertacije. Ogromnu zahvalnost dugujem prof. dr Dušanu Mijinu na korisnim sugestijama i smernicama zahvaljujući kojima je kvalitet ove doktorske disertacije podignut na znatno viši nivo.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Neveni Prlainović koja je svojim vremenom i znanjem značajno pomogla pri izradi ove disertacije. Zahvaljujem se na prijatnoj saradnji, na svim korisnim savetima koji su umnogome doprineli da se kvalitet ove disertacije podigne na viši nivo. Zahvaljujem se dr Neveni Prlainović na mogućnosti postavljanja bezbroj pitanja i na pronalaženju odgovora na iste u svakom trenutku u toku izrade ove disertacije.

Takođe, zahvaljujem se prof. dr Branimiru Grgur, dr Branimiru Jugović i dr Milici Gvozdrenović što su me prihvatili i pomogli mi kao članu svoga tima prilikom izvođenja

eksperimentalne serije vezane za elektrohemijski deo ove disertacije i tumačenja dobijenih rezultata.

Najveći deo ove disertacije je urađen na katedri za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta i ovom prilikom se zahvaljujem svim kolegama koji su mi pomogli u toku izrade ove teze, posebno mojim prijateljicama Jeleni Jovanović i Andrei Stefanović.

Veliku zahvalnost dugujem i Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije koje je finansijskom podrškom u vidu stipendije potpomogla realizaciju ove disertacije.

Najveću zahvalnost dugujem onima koji su sve vreme bili uz mene i bodrili me-moj porodici!

Enzimsko obezbojavanje antrahinonskih boja iz otpadnih voda

Rezime

Osnovni predmet istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je mogućnost primene peroksidaze iz rena, komercijalnog i neprečišćenog preparata, u obezbojavanju sintetičkih, antrahinonskih boja. Strukturno, ova doktorska disertacija se može podeliti u četiri dela. Prvi deo odnosi se na ispitivanje mogućnosti obezbojavanja AV 109 boje slobodnim enzimom (komercijalnim, neprečišćenim iz ekstrakta). Slobodni enzimski preparati su okarakterisani sa aspekta primene u reakciji obezbojavanja AV 109 boje. Utvrđeno je optimalno vreme kontakta, koncentracije enzima, koncentracije boje, koncentracije vodonik-peroksida, pH i temperature. Kinetička ispitivanja u početnom periodu reakcije pokazala su najbolje slaganje sa ping pong bi-bi dvosupstratnim modelom koji uzima u obzir inhibiciju bojom i supstratom. Navedeni kinetički model model je korišćen za modelovanje dobijenih eksperimentalnih podataka u cilju određivanja kinetičkih konstanti.

Drugi deo ove doktorske disertacije odnosi se na unapređenje svojstava primenjenih preparata peroksidaze različitim tehnikama imobilizacije. U tu svrhu komercijalni preparat peroksidaze je imobilisan na neorganski nosač, kaolin metodom adsorpcije. U narednom koraku istraživanja kaolin aktiviran glutaraldehidom je upotrebljen kao nosač za imobilizaciju komercijalne peroksidaze. Optimalni uslovi obe tehnike imobilizacije su detaljno ispitani. Kovalentna imobilizacije peroksidaze iz rena izvršena je metodom imobilizacije u obliku umreženih enzimskih agregata. Ispitani su optimalni uslovi imobilizacije poput uticaja taložnog reagensa, koncentracije umrežavajućeg reagensa kao i dodatka inertnog proteina. Dobijeni imobilisani preparati su primarno ispitani u reakciji oksidacije pirogalola, a najbolji su okarakterisani u reakciji obezbojavanja AV 109 boje.

Glavni nedostatak tradicionalnih metoda uklanjanja sintetičkih boja je nastanak sekundarnih zagađenja. Shodno tome, treći deo ove doktorske disertacije je posvećen ispitivanju efikasnosti peroksidaze iz rena (slobodne, imobilisane) sa aspekta toksičnosti enzimski tretiranog rastvora. U tu svrhu urađene su analize: hemijska potrošnja kiseonika (HPK), ukupan organski ugljenik (UOU) i akutna toksičnost korišćenjem *A. salina* cisti u uzorcima pre i nakon enzimskog tretmana.

U poslednjem delu ove doktorske disertacije, ispitana je mogućnost konstruisanja biogorivne ćelije na bazi imobilisane peroksidaze. AV 109 boja je iskorišćena kao supstrat u

biogorivnoj ćeliji peroksidaze imobilisane na bakar-sulfidnu elektrodu. Na ovaj način se postiže obezbojavanje sintetičkih boja uz simultano generisanje struje.

Ključne reči: peroksidaza iz rena, imobilizacija, kaolin, umreženi enzimski agregati, otpadne vode, kinetika, toksikologija, enzimske gorivne ćelije

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

UDK broj: 577.15:66.099.72:667.282:628.3

Enzymatic decolorization of anthraquinone dyes from wastewaters

Abstract

The main object of this thesis is the examination of anthraquinone dyes' decolorization catalyzed by horseradish peroxidase. Structurally, this thesis can be divided into four parts. The first part refers to the anthraquinone dye decolorization catalyzed by free horseradish peroxidase (commercial and unpurified preparation). Free enzyme preparations have been characterized in terms of the: contact time, enzyme concentration, dye concentration, hydrogen peroxide concentration, pH and temperature in the AV 109 dye decolorization. The experimental data were fitted using the kinetic ping pong bi-bi model and the kinetic parameters were evaluated.

The second part of this thesis is directed towards the horseradish peroxidase property improvement using different immobilization techniques. For that purpose, the commercial horseradish peroxidase was immobilized on an inorganic support, kaolin by adsorption. Thereafter, kaolin was modified using glutaraldehyde and used for the horseradish peroxidase immobilization. The optimal conditions for both immobilization techniques were thoroughly examined. Covalent immobilization was performed as a carrier free immobilization method. Herein, horseradish peroxidase preparations were immobilized in a form of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). The impact of key immobilization efficiency parameters like precipitation reagent, cross-linking reagent and protein feeder was examined. The obtained immobilized preparations were primarily examined in the pyrogallol oxidation reaction, and the best were characterized in the AV 109 dye decolorization reaction.

The main drawback of the traditional dye removal techniques from the wastewater is the secondary pollution emergence. Consequently, the third part of this thesis focused on the efficacy examination of the horseradish peroxidase preparations viewed from the aspect of toxicity of enzymatically treated dye solution. For that purpose, chemical oxygen demand (COD), total organic carbon (TOC) and *A.salina* toxicity testing of the solution before and after enzymatic treatment were performed.

The last part of this thesis was the possibility of biofuel cell construction examination. Biofuel cell of horseradish peroxidase immobilized on the copper-sulfide electrode used AV 109 dye as the substrate. In this way, in parallel with the synthetic dye removal electrical energy was generated.

Keywords: horseradish peroxidase, immobilization, kaolin, cross-linked enzyme aggregates, wastewaters, kinetics, toxicology, enzymatic fuel cells

Scientific area: Engineering technology

Major area: Biochemical Engineering and Biotechnology

UDC number: 577.15:66.099.72:667.282:628.3

Sadržaj	
UVOD	1
I TEORIJSKI DEO	3
1.BOJE	4
1.1.Definicija i istorijski značaj.....	4
1.2.Klasifikacija sintetičkih boja.....	6
1.3.Antrahinonske boje	9
1.3.1.Struktura antrahinonskih boja	9
1.3.2.C. I. Acid Violet 109 (AV 109).....	13
1.4.Uticaj obojenih otpadnih voda na čoveka i životnu sredinu.....	14
1.5.Metode uklanjanja sintetičkih boja iz otpadnih voda.....	16
1.5.1.Fizičke metode uklanjanja sintetičkih boja iz otpadnih voda.....	16
1.5.2.Hemijske metode uklanjanja sintetičkih boja iz otpadnih voda	17
1.5.3.Biološke metode uklanjanja sintetičkih boja iz otpadnih voda	20
1.5.3.1.Enzimsko uklanjanje sintetičkih boja iz otpadnih voda	21
2.PEROKSIDAZE	26
2.1.Peroksidaza iz rena.....	27
2.2.Struktura HRP-C	28
2.3.Katalitički mehanizam peroksidaze HRP–C	41
2.4.Primena peroksidaze iz rena.....	45
3.ENZIMSKA KINETIKA	47
3.1.Kinetika sekvencijalnih reakcija sa nasumičnim vezivanjem supstrata	47
3.2.Kinetika sekvencijalnih reakcija sa pravilnim vezivanjem supstrata	48
3.3.Kinetika reakcija po ping pong bi-bi mehanizmu	49
3.4.Inhibicija supstratom u višku u bisupstratnim reakcijama	50
4. IMOBILIZACIJA ENZIMA	54
4.1. Definicija, pojam, značaj.....	54
4.2.Nosači za imobilizaciju enzima.....	55
4.3.Tehnike imobilizacije enzima	59
4.3.1.Imobilizacija enzima vezivanjem za nosač	59
4.3.2.Obuhvatanje enzima nosačem	62
4.3.3.Umrežavanje enzima	63
4.4.Imobilisana HRP u tretmanu sintetičkih boja iz otpadnih voda.....	67

5.ENZIMSKE GORIVNE ĆELIJE	71
II EKSPERIMENTALNI DEO	77
6.Materijali, instrumenti, metode	78
6.1.Materijali i instrumenti.....	78
6.2.Metode.....	81
6.2.1.Izolovanje peroksidaze iz korena rena	81
6.2.2.Određivanje aktivnosti peroksidaze pirogalolom kao standardnim supstratom.....	81
6.2.3.Određivanje sadržaja proteina modifikovanom metodom po Lowry–ju.....	82
6.3. Određivanje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje slobodnom (komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena) u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	84
6.3.1. Ispitivanje uticaja vremena kontakta na reakciju obezbojavanja AV 109 boje slobodnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	84
6.3.2.Ispitivanje uticaja početne koncentracije enzima na obezbojavanje AV 109 boje slobodnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem.....	85
6.3.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje slobodnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem.....	85
6.3.4. Ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na obezbojavanje AV 109 boje slobodnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	85
6.3.5. Ispitivanje uticaja pH na obezbojavanje AV 109 boje slobodnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem.....	86
6.3.6. Ispitivanje uticaja temperature na obezbojavanje AV 109 boje slobodnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem.....	86
6.3.7. Određivanje kinetičkih konstanti slobodne peroksidaze u reakciji obezbojavanja AV 109 boje u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	87
6.4. Imobilizacija komercijalne peroksidaze na kaolin	88
6.4.1. Određivanje aktivnosti imobilisane peroksidaze pirogalolom kao standardnim supstratom	88
6.4.2. Imobilizacija komercijalne peroksidaze na kaolin adsorpcijom	89
6.4.2.1. Aktivacija kaolina za imobilizaciju komercijalne peroksidaze adsorpcijom	89
6.4.2.2. Ispitivanje uticaja pH na imobilizaciju peroksidaze adsorpcijom na metakaolin	89
6.4.2.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije enzima na imobilizaciju peroksidaze adsorpcijom na metakaolin (adsorpciona izoterma).....	90
6.4.2.4. Ispitivanje desorpcije peroksidaze imobilisane adsorpcijom na metakaolin.....	90
6.4.3. Karakterizacija metakaolina i imobilisanog preparata dobijenog adsorpcijom peroksidaze na metakaolin	90

6.4.3.1. Furijeova transformacijska infracrvena spektroskopija (FT–IR)	90
6.4.3.2. Određivanje specifične površine i veličine pora (BET)	90
6.4.3.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM).....	91
6.4.4. Imobilizacija komercijalne peroksidaze na kaolin aktiviran glutaraldehydom.....	91
6.4.4.1. Aktivacija metakaolina glutaraldehydom za imobilizaciju peroksidaze	91
6.4.4.2. Imobilizacija peroksidaze na metakaolin aktiviran glutaraldehydom	91
6.4.5. Određivanje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	92
6.4.5.1. Ispitivanje uticaja pH na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	92
6.4.5.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem.....	92
6.4.5.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	93
6.4.5.4. Određivanje kinetičkih konstanti za reakciju obezbojavanja AV 109 boje katalizovanu peroksidazom imobilisanom na metakaolin adsorpcijom	93
6.4.5.5. Ispitivanje operativne stabilnosti peroksidaze imobilisane na metakaolin u reakciji obezbojavanja AV 109 boje u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	94
6.5. Kovalentna imobilizacija komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena u obliku umreženih enzimskih agregata	95
6.5.1. Određivanje optimalnih uslova imobilizacije komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena u obliku umreženih enzimskih agregata.....	95
6.5.2. Određivanje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena imobilisanom u obliku umreženih ezimskih agregata u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem.....	96
6.5.2.1. Ispitivanje uticaja pH na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena imobilisanom u obliku umreženih ezimskih agregata u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	96
6.5.2.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena imobilisanom u obliku umreženih ezimskih agregata u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem.....	96
6.5.2.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena imobilisanom u obliku umreženih ezimskih agregata u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	96

6.5.2.4. Ispitivanje operativne stabilnosti peroksidaze imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata.....	97
6.6. Ispitivanje toksičnosti rastvora AV 109 boje pre i posle enzimskog tretmana	98
6.6.1. Ispitivanje hemijske potrošnje kiseonika (HPK) i ukupnog organskog ugljenika (UOU) rastvora AV 109 boje pre i nakon enzimskog tretmana	98
6.6.2. Ispitivanje akutne toksičnosti rastvora AV 109 boje pre i nakon enzimskog tretmana korišćenjem <i>Artemia salina</i> cisti	98
6.7. Enzimaska gorivna ćelija komercijalne peroksidaze imobilisane na bakarnu elektrodu presvučenu slojem slufida	100
6.7.1. Priprema bakar–sulfidne elektrode.....	100
6.7.2. Modifikacije komercijalne peroksidaze iz rena za imobilizaciju na bakar–sulfidnu elektrodu	100
6.7.3. Imobilizacija modifikovane komercijalne peroksidaze na bakar–sulfidnu elektrodu ...	100
6.7.4. Konstrukcija enzimske gorivne ćelije	101
REZULTATI I DISKUSIJA	102
7. Određivanje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje komercijalnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem.....	103
7.1. Ispitivanje uticaja vremena kontakta na reakciju obezbojavanja AV 109 boje komercijalnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	104
7.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije enzima na reakciju obezbojavanja AV 109 boje komercijalnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	105
7.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem.....	107
7.4. Ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	109
7.5. Ispitivanje uticaja pH na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem.....	110
7.6. Ispitivanje uticaja temperature na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	111
7.7. Određivanje kinetičkih konstanti komercijalne peroksidaze u reakciji obezbojavanja AV 109 boje u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	112
8. Određivanje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem.....	116

8.1. Ispitivanje uticaja pH na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom iz svežeg ekstakta rena u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	116
8.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom iz svežeg ekstakta rena u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	118
8.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom iz svežeg ekstakta rena u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	119
8.4. Određivanje kinetičkih konstanti peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena u reakciji obezbojavanja AV 109 boje u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	120
9. Imobilizacija peroksidaze iz rena na metakaolin	124
9.1. Imobilizacija peroksidaze iz rena na metakaolin adsorpcijom	124
9.1.1. Karakterizacija nosača za imobilizaciju peroksidaze pre i posle termičkog tretmana ..	124
9.1.2. Ispitivanje uticaja pH na imobilizaciju peroksidaze adsorpcijom na metakaolin	127
9.1.3. Ispitivanje desorpcije peroksidaze sa metakaolina	129
9.1.4. Ispitivanje uticaja početne koncentracije enzima na imobilizaciju peroksidaze adsorpcijom na metakaolin (adsorpciona izoterma)	131
9.1.5. Karakterizacija imobilizata dobjenog adsorpcijom peroksidaze na metakaolin	132
9.2. Određivanje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin adsorpcijom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	135
9.2.1. Ispitivanje uticaja pH na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin adsorpcijom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	135
9.2.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin adsorpcijom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	137
9.2.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin adsorpcijom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	139
9.2.4. Određivanje kinetičkih konstanti peroksidaze imobilisane adsorpcijom na metakaolin u reakciji obezbojavanja AV 109 boje u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	140
9.3. Imobilizacija peroksidaze iz rena na metakaolin aktiviran glutaraldehidom	146
9.3.1. Ispitivanje uticaja početne koncentracije glutaraldehida na masu vezanih proteina i aktivnost imobilisane peroksidaze	146
9.3.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije enzima na masu vezanih proteina i aktivnost imobilisane peroksidaze	148
9.4. Određivanje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin aktiviran glutaraldehidom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem	150

9.4.1. Ispitivanje uticaja pH na reakciju obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin aktiviran glutaraldehidom u šaržnom reaktoru sa orbitanim mešanjem.....	150
9.4.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na reakciju obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin aktiviran glutaraldehidom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem.....	154
10. Kovalentna imobilizacija komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena u obliku umreženih enzimskih agregata.....	159
10.1. Ispitivanje uticaja taložnog reagensa na karakteristike komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata.....	159
10.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije glutaraldehida na karakteristike komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata ...	162
10.3. Ispitivanje uticaja dodatka inertnog proteina BSA na karakteristike komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata ...	165
10.4. Određivanje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena imobilisanom u obliku umreženih ezimskih agregata u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem.....	169
10.4.1. Ispitivanje uticaja pH na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena imobilisanom u obliku umreženih ezimskih agregata u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem.....	169
10.4.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena imobilisanom u obliku umreženih ezimskih agregata u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem.....	172
10.4.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena imobilisanom u obliku umreženih ezimskih agregata u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem.....	174
10.4.4. Ispitivanje operativne stabilnosti peroksidaze imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata.....	179
11. Ispitivanje hemijske potrošnje kiseonika (HPK) i ukupnog organskog ugljenika (UOU) rastvora AV 109 boje pre i nakon enzimskog tretmana	184
11.1. Ispitivanje akutne toksičnosti rastvora AV 109 boje pre i nakon enzimskog tretmana korišćenjem <i>Artemia salina</i> cisti	186
12. Enzimaska gorivna ćelija peroksidaze iz rena imobilisane na bakar–sulfidnu elektrodu ...	189
12.1. Priprema bakar–sulfidne elektrode.....	189

12.2. Karakteristike biogorivne ćelije	191
12.3. Pretpostavljeni mehanizam obezbojavanja u biogorivnoj ćeliji	198
13. ZAKLJUČAK	200
14. LITERATURA	205
SPISAK SIMBOLA	236

UVOD

Voda pokriva 71 % zemljine površine i čini 65 % našeg tela. Zagađenjem, ona gubi estetsku i ekonomsku vrednost, a postaje i opasnost po zdravlje ljudi, rast i razvoj vodenih organizama i životnu sredinu. Jedan od vodećih ekoloških problema današnjice je zagađenje reka i vodotokova otpadnim vodama i iscrpljivanje vodenih resursa.

Do sredine 18-tog veka zagađenje voda je bilo lokalizovano i karakteristično za mali broj područja. Sa industrijskom revolucijom, naglim razvojem brojnih grana industrije, voda kao sirovina počinje da se koristi od proizvodnih procesa pa sve do sistema za hlađenje. Na ovaj način otpadna voda predstavlja nus proizvod moderne industrije i jedan je od glavnih izvora zagađenja životne sredine jer se u većini slučajeva ispušta u vodotokove bez tretmana ili uz blagi tretman. U proizvodnim procesima brojnih grana industrije (čelika, papira, tekstilne, petrohemijske, kozmetičke, farmaceutske) generišu se velike količine otpadne vode karakterističnog sastava i zagađenosti. Najveći problem u otpadnim vodama je veliko opterećenje različitim organskim materijama, agensima uzročnicima bolesti, nutrijentima koji stimuliraju rast biljaka, neorganskim materijama, mineralima i sedimentima kao i brojnim toksičnim jedinjenjima.¹ Ispuštanjem ovih voda u životnu sredinu i vodene tokove dolazi do porasta problema javnog zdravlja, ograničenog i smanjenog poljoprivrednog i ekonomskog razvoja i širenja negativnog uticaja na ekosisteme.²

Svaki korak obrade tkanine zahteva velike količine vode, pa je tekstilna industrija vodeća grana industrije po količini i zagađenosti otpadnih voda.³ Dokaz je i činjenica da je za obradu 1 kg pamuka potrebno 70–150 l vode.⁴ Fluktuacije u vrednostima parametara kvaliteta vode tekstilne industrije (pH, boja, salinitet, hemijska potrošnja kiseonika (HPK), biohemijska potrošnja kiseonika (BPK)) potiču od brojnih jedinjenja organskog i neorganskog porekla kao što su: površinski aktivne materije, inhibitori, soli, jedinjenja hlora, fosfor, sintetičke boje, koja se primenjuju u velikim količinama u obradi tkanine.³ Od navedenih jedinjenja, prisustvo sintetičkih boja u otpadnim vodama izaziva najveću zabrinutost. Utvrđeno je da godišnja proizvodnja sintetičkih boja premašuje milion tona, od čega se 50 % utroši u tekstilnoj industriji. U Etiopiji je samo u toku 2011-te godine u okviru tekstilne industrije procesuirano 14,250,406 kg

različitih sintetičkih boja. Dodatna zabrinutost istraživača proizilazi iz činjenice da od navedene količine, 10–40 % rastvorenih boja napušta proizvodni proces kao sastavni deo otpadnih voda, koje je neophodno tretirati pre ispuštanja u vodotokove.⁴ Sintetičke boje i njihovi proizvodi razgradnje su toksični, kancerogeni i mutageni za žive organizme.⁵ U pogledu stabilnosti, sintetičke boje spadaju u grupu izuzetno stabilnih jedinjenja zbog čega se zadržavaju u vodi dug vremenski period, pa mogu ispoljiti akutne i hronične efekte na izložene organizme. Prisutne čak i u malim koncentracijama, daju intenzivno obojenje otpadnim vodama, ometajući apsorpciju i refleksiju sunčeve svetlosti, što u velikoj meri utiče na rast, razvoj i reprodukciju vodenih organizama.⁷

Uklanjanje sintetičkih boja iz otpadnih voda tradicionalnim metodama je izuzetno složen i u velikom broju slučajeva neefikasan proces. U novije vreme se teži ka primeni ekološki prihvatljivih metoda uklanjanja sintetičkih boja iz otpadnih voda. Iz tog razloga glavni predmet izučavanja ove doktorske disertacije je primena enzima, peroksidaze iz rena u obezbojavanju voda obojenih sintetičkim bojama. Kao model izabrana je sintetička antrahinonska boja C. I. Acid Violet 109 (AV 109). Prvo će se ispitati mogućnost primene slobodne, komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena u obezbojavanju AV 109 boje. Nakon toga biće ispitana mogućnost povećanja stabilnosti peroksidaze različitim tehnikama imobilizacije i efikasnost dobijene imobilisane peroksidaze u reakciji obezbojavanja AV 109 boje. Pored efikasnosti u obezbojavanju, biće ispitan učinak biokatalizatora i u pogledu toksičnosti rastvora pre i posle enzimskog tretmana. Na kraju, imobilizacijom peroksidaze na bakar-sulfidnu elektrodu ispitaće se mogućnost konstruisanja biogorivne ćelije, gde će se kao gorivo koristiti boja AV 109 u cilju dobijanje električne energije.

I TEORIJSKI DEO

1. BOJE

1.1. Definicija i istorijski značaj

Boja se može definisati kao obojeno organsko jedinjenje ili smeša koja ima afinitet prema supstratu (tkanina, koža, papir, polimer) na koji se primenjuje. Boje se uglavnom primenjuju kao vodeni rastvori i vrlo često zahtevaju prisustvo sredstava za fiksiranje koji joj daju postojanost na supstratu. To su molekuli koji apsorbuju i reflektuju svetlost na određenim talasnim dužinama i ljudskom oku daju osećaj obojenosti.⁸



Slika 1.1. Sintetičke boje

Iako se za boje vezuje termin "obojeno jedinjenje", nije svako obojeno jedinjenje boja. Da bi se neko obojeno jedinjenje klasifikovalo kao boja, mora da zadovolji sledeće uslove:

- 1) Mora da ima stabilno obojenje,
- 2) Ne sme biti lako podložna strukturnim promenama,
- 3) Mora da ima sposobnost vezivanja za određeni supstrat,
- 4) Mora biti rastvorljiva u vodi ili da formira stabilnu disperziju,
- 5) Mora lako da se apsorbuje iz rastvora na supstratu,
- 6) Mora da bude stabilna na supstratu, tj. da bude otporna na dejstvo kiselina, baza, izbeljivača.

Zapažanje obojenja zasniva se na različitim fizičkim, hemijskim, fiziološkim i psihološkim procesima. Deo elektromagnetnog spektra, vidljivog ljudskom oku, nalazi se u oblasti talasnih dužina 400–700 nm. Svetlost koju emituje izvor (talasnih dužina

400–700 nm) prenosi se do rožnjače u ljudskom oku gde započinje fotohemijsku reakciju, odakle se prenose informacije do mozga i celokupan proces rezultuje vizualnom percepcijom.

Bela svetlost, tj. zračenje koje se manje više jednako prostire u oblasti 400–800 nm, može se razložiti u boje spektra pomoću prizme ili difrakcione rešetke. Tako kada zrak sunčeve svetlosti prođe kroz prizmu razlaže se u spektar sledećih boja:

Tabela 1.2. Spektralne boje i njihove talasne dužine⁹

Boja	Opseg talasnih dužina, λ
Ljubičasta	400-435
Plava	435-480
Sivoplava	480-500
Zelena	500-580
Žuta	580-595
Narandžasta	595-605
Crvena	605-750

Predloženi su različiti sistemi za utvrđivanje i reprodukovanje vizualnog utiska koji daje neka boja. Jedan od takvih sistema je sistem C.I.E. (Commission International de l'Eclairage) koji je još 1931. godine dobio međunarodno priznanje i danas ima široku primenu. Indeks boja (Colour Index, CI) predstavlja seriju od nekoliko knjiga (pet knjiga, treće izdanje, 1973.) koje obuhvataju ogroman broj obojenih supstanci (preko 4000 klasifikovanih), tako da svaka boja i pigment imaju dva referentna broja, prema primeni tj. načinu upotrebe i prema hemijskoj strukturi. Prvi broj se odnosi na primenu i način bojenja i zove se Generic Name (GI). Drugi broj označava se kao CI Constitution Number.⁸⁻¹⁰

Upotreba boja datira još iz praistorijskih vremena kada su se koristile u svrhu crtanja po pećinama (Evropa, Afrika, Kina, Egipat). Sve do 1850. godine boje su izolovane uglavnom iz prirodnih izvora kao što su biljke, drveće, minerali i insekti.¹² Glavni problem prilikom izolovanja boja iz prirodnih izvora je nemogućnost izolovanja u obliku čistih supstanci zbog njihove nestabilnosti, nedovoljnog poznavanja i razvijenosti tehnika prečišćavanja. Iako su pokušaji izolovanja često bili neuspešni, želja za izolovanjem boja i njihovom primenom je bila izuzetno velika, što ukazuje na

to da su boje imale i imaju antropološki, psihološki, estetski, funkcionalni i ekonomski značaj za društvo.^{8, 11}

Prva sintetička boja napravljena je davne 1771. godine, pikrinska kiselina, korišćenjem prirodnog pigmenta indiga. Međutim, komercijalna proizvodnja sintetičkih boja počinje hiljadu godina kasnije.¹³ 1856. godine Perkin (Perkin) otkriva prvu sintetički boju, muvein. Vrlo brzo, za svega nekoliko godina primenu prirodnih boja je u potpunosti potisnula primena sintetičkih. Nove boje su pružile ono što gotovo nikako nije bilo moguće sa prirodnim bojama: različite nijanse, izuzetna moć bojenja gotovo svih vrsta tkanine, reproduktivnost.^{12, 13} Sve navedene karakteristike, navele su brojne istraživače da izvode slične eksperimente u cilju sinteze novih boja. Poznavanje organskih sinteza, reakcionih mehanizama i tehnika, nesumnjivo je uticalo na činjenicu da je danas poznatno više stotina hiljada komercijalnih boja.⁹

U zavisnosti od porekla boje se mogu klasifikovati u dve grupe: prirodne i sintetičke boje. Prirodne boje se izoluju iz prirodnih izvora: biljke, insekti, minerali. Sintetičke boje se dobijaju organskim sintezama i smatra se da su sve, uz par izuzetaka, aromatična jedinjenja. U okviru ove disertacije upotrebljena je sintetička, antrahinonska boja pa će naredna poglavlja biti prvenstveno posvećena sintetičkim bojama, opštoj klasifikaciji i karakteristikama.

1.2. Klasifikacija sintetičkih boja

Boje se mogu klasifikovati u tri kategorije:¹³

I Prema hemijskoj strukturi:

- 1) Azo,
- 2) Antrahinonske,
- 3) Trifenilmetanske,
- 4) Nitro i nitrozo,
- 5) Indigoidne.

II Prema materijalu koji se boji:

- 1) Tekstilne boje,
- 2) Boje za papir,
- 3) Boje za kožu,
- 4) Boje za plastične ambalaže.

III Prema rastvorljivosti:***1) Rastvorne u vodi:***

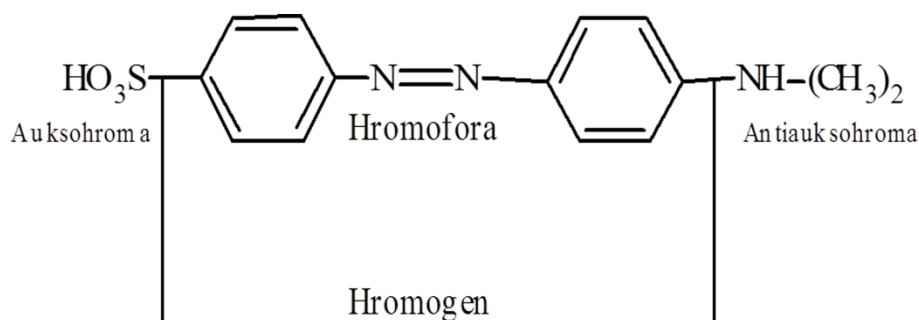
- a) Kisele,
- b) Bazne,
- c) Reaktivne,
- d) Direktne,
- e) Metal–kompleksne.

2) Nerastvorne u vodi:

- a) Boje rastvorne u alkoholu i ulju,
- b) Redukcione,
- c) Disperzione,
- d) Azoične.

Opšta klasifikacija boja je na: jonske i nejonske boje. Molekuli jonskih boja (katjonske, anjonske) sastoje se iz dva glavna dela, od kojih je jedan kompleksni aril-radikal. Ovaj deo molekula se smatra i nosiocem boje. Ukoliko je na ovom delu molekula ukupno naelektrisanje negativno onda se boja klasifikuje kao anjonska, ukoliko je celokupno naelektrisanje na ovom delu molekula pozitivno, boja se smatra katjonskom. Drugi deo molekula jonskih boja je neorganski jon, koji je po pravilu suprotnog naelektrisanja od aril jona.

Nejonske boje se sastoje od tri glavna dela: 1) hromogen, 2) hromofora i 3) auksohroma.



Slika 1.2. Struktura nejonske boje

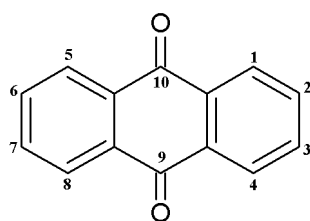
Hromogen je nenaelektrisana aril supstanca koja je obojena zahvaljujući tome što kao deo svoje strukture ima hromoforu. Hromofore su linearni ili ciklični sistemi konjugovanih dvostrukih veza.¹³ Grupe ili atomi koji su vezani za hromogen se nazivaju auksohrome. Auksohrome mogu biti kisele ili bazne, pozitivno ili negativno naelektrisane. U nejonskim bojama, auksohrome su nenaelektrisane. Osnovna funkcija naelektrisane auksohrome je da hromogen transformiše u jon na osnovu čega je moguća reakcija sa supstancama suprotnog naelektrisanja. Glavni oblici interakcija između boja i drugih supstanci su kondenzacije, vodonično vezivanje ili formiranje soli. Najpoznatije kisele auksohrome su: $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{Na}$, $-\text{COOH}$, $-\text{COONa}$, $-\text{OH}$, $-\text{ONa}$ ili $-\text{OK}$. Bazne auksohrome su H^+ , $-\text{NH}_2$ i $-\text{NH}$. U zavisnosti od vrste auksohromne grupe vezane za hromoforu može da dođe do pomeranja apsorpcionih maksimuma ka većim talasnim dužinama (batohromni efekat) ili ka manjim talasnim dužinama (hipsohromni efekat).¹³

1.3. Antrahinonske boje

U pogledu zastupljenosti antrahinonske boje se nalaze na drugom mestu odmah nakon azo boja.¹⁴ Za razliku od azo boja koje u svojoj strukturi ne sadrže delove karakteristične za prirodne boje, sve prirodne boje u svojoj strukturi sadrže antrahinon.¹⁵ Jedini razlog zbog kojeg se antrahinonske boje manje primenjuju od azo boja je manja isplativost. Ovo je posledica sledećeg: antrahinonske boje imaju manju snagu bojenja u poređenju sa azo bojama i uži je spektar mogućnosti sinteze različitih nijansi jer se antrahinonske boje sintetišu uvođenjem supstituenata u antrahinonsko jezgro. I pored ovih nedostataka, ove boje se intenzivno primenjuju zbog sjaja i postojanosti boje.¹⁶ Postojanje delokalizovanog π -sistema ne samo u jezgru već i u supstituentima, dobra optička svojstva i velika termička stabilnost čini ih veoma interesantnom grupom boja.¹⁷ Za antrahinonske boje je karakteristično da sadrže sulfonsku grupu, što ih čini rastvornim u vodi. Zbog velikog afiniteta ka pomoćnim agensima za bojenje koriste se za bojenje vune i svile. Takođe, postoje i posebne grupe antrahinonskih boja namenjene bojenju proteinskih vlakana i najlona na visokim temperaturama i bojenju proteinskih vlakana na bazi formiranja kovalentnih veza sa supstratom.¹⁸ Različite nijanse plavih i ljubičastih su spektar koji obuhvataju antrahinonske boje.

1.3.1. Struktura antrahinonskih boja

Antrahinonske boje su po strukturi derivati 9,10-antrahinona (slika 1.3.).



Slika 1.3. Antrahinon²⁰

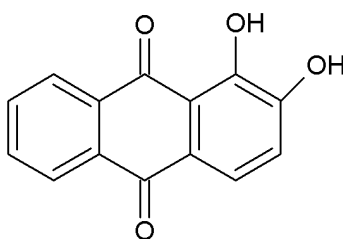
Njihova osnovna strukturna jedinica, antrahinon, je u osnovi bezbojan. To je policiklično aromatično jedinjenje koje sadrži dve karbonilne grupe ($-C=O$) na položajima 9 i 10. Prirodni izvori antrahinona su biljke (sena, aloja), gljive, lišajevi i insekti.

Antrahinon je derivat antracena, osnovne gradivne jedinice antrahinonskih boja i polazna komponenta za sintezu antioksidanasa i inhibitora polimerizacije. Za antrahinon je karakteristično da je izuzetno stabilan kako u kiselim tako i u baznim uslovima.¹⁹ Komercijalno korisne antrahinonske boje se proizvode uvođenjem snažnih elektron-donorske grupe ($-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$) u jedan ili više alfa položaja (1, 4, 5 i 8). Supstitucije se najčešće dešavaju u položajima 1,4, 1,2,4 i 1,4,5,8. Maksimalno preklapanje π -orbitala pojačano intramolekulskim vodoničnim vezama sa minimalnim sternim smetnjama postiže se uvođenjem primarne i sekundarne amino i hidroksilne grupe. Jačina elektron-donorskih grupa raste u sledećem nizu: $\text{OH} < \text{NH}_2 < \text{NHR} < \text{NHAr}$. Pravilnim izborom supstituenteneta i mesta supstitucije dobijaju se različite nijanse boja.^{20,21}

Antrahinonske boje se mogu podeliti u četiri grupe:

- 1) Močilske,
- 2) Kisele,
- 3) Disperzne,
- 4) Redukcione antrahinonske boje.

Močilske antrahinonske boje predstavljaju derivate antrahinona koji se dobijaju uvođenjem hidroksilne ili karboksilne grupe u strukturu antrahinona.



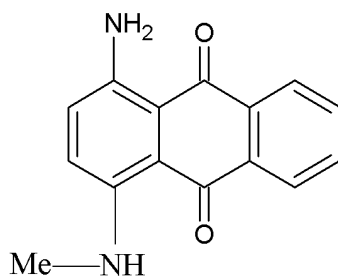
Slika 1.4. Alizarin (1,2-dihidroksiantrahinon)²⁰

Prva antrahinonska boja je alizarin (slika 1.4.), izolovana je iz korena biljke broć (*Rubia tinctorium*) u kome se nalazi u obliku glukozida. 1868. godine Grebe i Liberman (Graebe, Liebermann) su pronašli način da sintetišu alizarin.²⁰ Alizarin, sa solima polivalentnih metala formira obojena kompleksna jedinjenja (pojava tzv. poligeničnosti).^{20, 21}

Kisele antrahinonske boje su sulfonovani proizvodi antrahinona. Spadaju u grupu boja rastvornih u vodi i sadrže natrijum–sulfonatne grupe ($-\text{SO}_3\text{Na}$) koje im povećavaju rastvorljivost. Najviše se primenjuju za bojenje zidova, papira, kože i vune, a utvrđeno je da su izuzetno postojane pri pranju.²¹

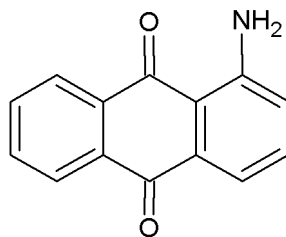
Disperzne antrahinonske boje su boje koje se koriste za bojenje acetatne svile i sintetskih vlakana (slika 1.5.). Nerastvorne su u vodi jer u svom molekulu ne sadrže ni sulfo ni karboksilnu grupu. U njihovu strukturu ulaze amino grupa, mono– i dialkilamino grupa i posebno hidoksiamino grupa.

U zavisnosti od supstituenata disperzne antrahinonske boje imaju narandžastu, crvenu, roze ili ljubičastu boju. Za ove boje je karakteristično da su izuzetno postojane na svetlosti, međutim pod dejstvom para gasa dolazi do beljenja. Ovaj problem se prevazilazi supstitucijom prstena halogenim, hidroksi, alkoksinitro i cijano grupama.²⁰⁻²²



Slika 1.5. 1–amino–4–(metilamino)antracen–9,10–dion²²

Redukcione antrahinonske boje su nerastvorne u vodi i ne mogu se direktno naneti na vlakno. Po redukciji se dobija leuko oblik, koji je rastvoran u vodi i koji se može koristiti za bojenje celuloze. Izlaganjem obojenih vlakana atmosferskom vazduhu leuko oblik se oksidiše, u polazni, u vodi nerastvoran oblik. Zbog toga poseduju tako dobru postojanost na pranje. Ove boje su uglavnom derivati aminoantrahinona, čija je struktura prikazana na slici 1.6.²⁰⁻²³

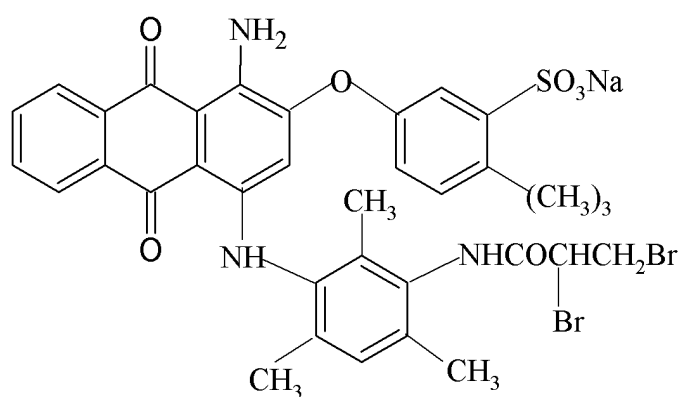


Slika 1.6. Aminoantrahinon²³

1.3.2. C. I. Acid Violet 109 (AV 109)

U prethodnim poglavljima prikazana je podela i karakteristike sintetičkih boja. S obzirom na to da je u okviru ove doktorske disertacije korišćena antrahinonska boja AV 109, u nastavku teksta pažnja će biti usmerena na osnovne karakteristike i strukturu boje.

AV 109 je predstavnik grupe antrahinonskih boja. Spada u grupu kiselih boja rastvornih u vodi zbog sulfonske grupe prisutne u strukturi (Slika 1.7.). Koristi se za bojenje svile, vune i poliamida.²⁴ U Tabeli 1.8. nalaze se osnovne karakteristike ove boje.



Slika 1.7. Struktura boje AV 109

Tabela 1.8. Karakteristike boje AV 109

<i>Molekulska formula</i>	$C_{35}H_{34}Br_2N_3NaO_7S$
<i>Molekulska masa ($g\ mol^{-1}$)</i>	823, 52
<i>CAS broj</i>	12220-63-2
<i>Svojstva i primena</i>	Plava do ljubičasta boja. Koristi se za štampanje i bojenje svile, vune i poliamida.
<i>Sinonimi</i>	Lanaset Violet B, Acid Violet B, Erionyl Violet A-B

1.4. Uticaj obojenih otpadnih voda na čoveka i životnu sredinu

Kao što je rečeno ranije u tekstu sintetičke boje se najviše primenjuju u tekstilnoj industriji. Povećanim obimom primene sintetičkih boja u ovoj grani industrije uočen je negativan uticaj boja na zdravlje čoveka i na životnu sredinu. Prvo što je primećeno jeste porast broja radnika angažovanih na procesima bojenja koji su oboljevali od kancera. Glavni uzrok tome je kancerogenost i štetnost polaznih jedinjenja za sintezu boja (benzidin, toluen i drugi). S obzirom na štetnost polaznih jedinjenja koja se koriste za sintezu, očekivano je da novosintetisano jedinjenja bude istog ako ne i većeg stepena štetnosti. Praćenjem i analizom, potvrđeno je da izlaganje tekstilnim bojama prouzrokuje i iritacije kože i pluća, glavobolje, krvarenja, mučnine, dermatitis. Povećan broj obolelih od kancera bešike i jetre nakon intenzivnog izlaganja uticaju boja ukazuje na to da su pojedine sintetičke boje mutagene i genotoksične. Kod osoba izloženih uticaju reaktivnih boja, dijagnostifikovan je dermatitis, astma, nazalni problemi i rinitis.²⁴⁻²⁷

Sintetičke boje ispoljavaju negativne efekte u tekstilnoj industriji u toku obrade tkanine na radnike koji dolaze u kontak sa njima. Napuštanjem proizvodnog procesa postaju sastavni deo otpadnih voda koje negativan uticaj ispoljavaju na životnu sredinu a potom i na čoveka. Metode uklanjanja sintetičkih boja su raznovrsne i u velikom broju slučajeva neefikasne. Zahvaljujući strukturi, sintetičke boje su izuzetno stabilna jedinjenja, otporna na biodegradaciju. Jedan od primera degradacije sintetičkih boja je anaerobna degradacija u toku koje nastaju kancerogeni primarni amini koji su dodatna opasnost za čoveka i životnu sredinu. Stabilnost strukture omogućava zadržavanje boja u vodama dug vremenski period. Zadržavanjem u vodama ispoljavaju toksične akutne ili hronične efekte na žive organizme. Prisutne u malim koncentracijama boje dovode do intenzivnog obojenja otpadnih voda što otežava prodor sunčeve svetlosti i narušava se proces fotosinteze. Na taj način se usporavaju ili inhibiraju procesi reoksigenacije što ima najveće negativne posledice na rast fotoautotrofnih organizama. U strukturu sintetičkih boja često ulaze metali Cr, As, Cu i Zn koji na taj način postaju sastavni deo otpadnih voda tekstilne industrije, a njihov negativan uticaj na zdravlje čoveka i životnu sredinu je dobro poznat.²⁵⁻²⁷

Poznavajući štetne efekte koje sintetičke boje prisutne u otpadnim vodama ispoljavaju na čoveka i životnu sredinu i zakonske regulative koje se odnose na stepen prečišćenosti otpadnih voda, razvijene su brojne metode uklanjanja boja pre ispuštanja u vodotokove. U narednom poglavlju biće prikazane i ukratko objašnjene najčešće primenjivane metode uklanjanja boja iz obojenih otpadnih voda.

1.5. Metode uklanjanja sintetičkih boja iz otpadnih voda

Tipične karakteristike otpadne vode tekstilne industrije su: hemijska potrošnja kiseonika (HPK) 150–12000 mg l⁻¹, ukupne suspendovane čestice 2900–3100 mg l⁻¹, ukupan azot 70–80 mg l⁻¹, biohemijska potrošnja kiseonika (BPK) 80–6000 mg l⁻¹, BPK/HPK 0,25 što sve zajedno ukazuje na velike količine nebiodegradabilne organske materije. Pored toga dodatne hemikalije koje se koriste u pripremi tkanine za bojenje su nejonski (etoksalat) i anjonski (aril–sulfonat) detergentski koji dodatno opterećuju otpadnu vodu.²⁸ Pre ispuštanja u vodotokove, u cilju zaštite zdravlja čoveka i životne sredine, otpadnu vodu je potrebno tretirati do stepena čistoće koji ne ugrožava zdravlje čoveka i životnu sredinu. U tu svrhu razvijene su brojne metode tretmana koje se mogu klasifikovati u nekoliko grupa:

1. Fizičke (mehaničke),
2. Hemijske,
3. Biološke.

Kombinacijom navedenih metoda u sistemima za prečišćavanje otpadnih voda postiže se zadovoljavajući stepen uklanjanja zagađujućih materija.²⁹

1.5.1. Fizičke metode uklanjanja sintetičkih boja iz otpadnih voda

Fizičke metode uklanjanja boja iz otpadnih voda zasnivaju se na primeni fizičkih sila (gravitacija, elektrostatičko privlačenje, van der Valsove sile) i korišćenju fizičkih barijera u cilju uklanjanja čvrstih zagađujućih materija iz otpadne vode.²⁹ Za fizički tretman je karakteristično da ne nastaju strukturne promene u ciljanoj supstanci ali može doći do promene fizičkog stanja kao što je slučaj kod uparavanja ili aglomeracija dispergovanih supstanci tokom filtracije. Fizički tretman otpadnih voda obuhvata: sedimentaciju, flotaciju, adsorpciju, flokulaciju, filtraciju, centrifugiranje, separaciju ulja i primenu fizičkih barijera (sita, rešetke i membrane).²⁹⁻³¹

Koagulacija–flokulacija je fizička metoda koja može da se primeni samo za uklanjanje sumpornih i disperznih boja. Ograničena primena na samo određenu grupu boja je prvi nedostatak ove metode. U toku uklanjanja pomenutih boja ovom metodom postiže se mala efikasnost (nizak procenat uklanjanja boja), generišu se velike količine

aktivnog mulja i nastaje sekundarni problem zagađenja. Od fizičkih metoda pored koagulacije–flokulacije često se primenjuje i adsorpcija. Adsorpcija je fizička metoda uklanjanja boja i zasniva se na pravilnom izboru adsorbenta koji u zavisnosti od svojstava može da adsorbuje različite strukture boja u velikoj meri i lako može da se regeneriše. Iako se aktivni ugalj pokazao kao najefikasniji adsorbent, zbog izuzetno visoke cene, retko se primenjuje. Iz tog razloga se biraju adsorbenti, gline (bentonit), polimerne smole, jonoizmenjivači ali i biološki materijal kao što je kukuruzna trska, pšenična slama. Najveći nedostaci koji su vezani za primenu adsorbentata su problemi regeneracije i odlaganja, proizvodnja velikih količina aktivnog mulja, visoka cena i mala efikasnost u pogledu uklanjanja boja. Filtracija, ultrafiltracija, nanofiltracija i reverzna osmoza su takođe fizičke metode koje se primenjuju u uklanjanju sintetičkih boja.^{5,32}

1.5.2. Hemijske metode uklanjanja sintetičkih boja iz otpadnih voda

Hemijske metode uklanjanja boja iz otpadnih voda podrazumevaju interakciju zagađujućih materija i hemikalija koje se dodaju u cilju izdvajanja zagađujućih materija iz otpadne vode ili služe za neutralizaciju štetnih efekata koje u njoj izazivaju. Opšte govoreći, otpadna voda se sastoji od brojnih čestica različite veličine. Čestice veličine < 1 μm se nazivaju koloidne, veoma su stabilne i ne mogu se ukloniti klasičnim fizičkim metodama. Pored toga, one imaju negativno naelektrisanu površinu i zbog odbijanja ne postoji mogućnost njihove agregacije i taloženja. Jedini način uklanjanja ovakvih čestica je dodatak određenih hemijskih reagenasa (koagulanata, flokulanata) koji omogućavaju njihovo izdvajanje. Hemijski tretman se primenjuje odvojeno ili u kombinaciji sa fizičkim tretmanom.³⁰ Najčešće primenjivane hemijske metode su: neutralizacija, precipitacija, oksidacija/redukcija i dezinfekcija.³¹⁻³³

Vrlo često primenjivana hemijska metoda uklanjanja sintetičkih boja jesu hemijske oksidacije. Hemijske oksidacije zasnivaju se na narušavanju strukture boje primenom oksidacionih agenasa kao što su ozon (O₃), vodonik–peroksid (H₂O₂) i permanganat (MnO₄).³⁴

Najveći nedostaci primene fizičko/hemijskih metoda uklanjanja sintetičkih boja su visoka cena procesa i generisanje velike količine aktivnog mulja koji je neophodno pravilno skladištiti i tretirati. Postoje brojni podaci u literaturi o primeni različitih fizičko/hemijskih metoda u tretmanu obojenih otpadnih voda, međutim ove metode imaju ograničenu primenu zbog novonastalih sekundarnih zagađenja.^{35,36} U tabeli 1.9. prikazane su najčešće fizičke i hemijske metode uklanjanja sintetičkih boja iz otpadnih voda kao i prednosti i nedostaci njihove primene.

Tabela 1.9. Najčešće primenjivane fizičke i hemijske metode uklanjanja sintetičkih boja iz otpadnih voda i prednosti i nedostaci njihove primene³²

<i>Metod</i>	<i>Prednosti</i>	<i>Nedostaci</i>
<i>Fentonov reagens</i>	Efikasno uklanjanje rastvornih i nerastvornih boja	Generisanje velikih količina mulja
<i>Ozonizacija</i>	Primenjuje se u gasovitom stanju: Nema promena zapremine	Kratak životni vek (20 min)
<i>Fotohemijski tretman</i>	Ne nastaje mulj	Nastanak sporednih proizvoda
<i>Hipohlorit</i>	Inicira i ubrzava cepanje azo veze	Nastanak toksičnih amina
<i>Elektrohemijska degradacija</i>	Nastali proizvodi nisu štetni	Veliki utrošak električne energije
<i>Aktivni ugalj</i>	Dobro uklanjanje širokog spektra boja	Veoma skupa metoda
<i>Silika gel</i>	Efikasan u uklanjanju baznih boja	Sporedne reakcije su ograničenje za komercijalnu proizvodnju
<i>Membranske filtracije</i>	Uklanjanje svih vrsta boja	Proizvodnja koncentrovanog mulja
<i>Jono-izmenjivanje</i>	Regeneracija: nema utroška adsorbenta	Nije efikasno za sve vrste boja
<i>Zračenje</i>	Efikasna oksidacija na laboratorijskom nivou	Zahteva velike količine rastvorenog O ₂
<i>Elektrokinetička koagulacija</i>	Ekonomski prihvatljivo	Proizvodnja velike količine mulja

1.5.3. Biološke metode uklanjanja sintetičkih boja iz otpadnih voda

Nasuprot fizičko/hemijskim metodama uklanjanja sintetičkih boja razvijene su brojne biološke kao efikasnije i ekološki prihvatljivije metode. Biološki tretman podrazumeva uklanjanje zagađujućih materija biološkom aktivnošću. Na ovaj način se prvo uklanjaju biodegradabilne organske materije u otpadnoj vodi.³⁸ Biološki tretman podrazumeva primenu određenih mikroorganizama (bakterija) aerobnih ili anaerobnih, a vrlo često se ova dva kombinuju u kaskadne procese. Postoje brojne bakterije koje se primenjuju u svrhu uklanjanja sintetičkih boja, kao što su *Brevibacillus* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Acetobacter liquefaciens* i *Pseudomonas desmolticum*.³⁹ Pored bakterija, u literaturi postoje brojni podaci vezani za primenu kvasaca i filamentoznih plesni u tretmanu obojenih voda. Bakterije, kvasci i filamentozne plesni su mikroorganizmi izbora kada je u pitanju tretman obojenih otpadnih voda zato što brzo rastu, imaju sposobnost da dobro podnose ekstremne promene uslova sredine u kojoj se nalaze i svojom aktivnošću uklanjaju sintetičke boje u visokom procentu. Načini na koje navedeni mikroorganizmi uklanjaju sintetičke boje su raznoliki.

Vezivanje boja jonskim, hidrofobnim i kovalentnim vezama za površinu ćelije je jedan od mogućih puteva uklanjanja boja. Potom sledi transport boja u unutrašnjost ćelije gde se dešava interakcija sa enzimima koji menjaju redoks svojstva boje, interakcija sa enzimima koji razgrađuju boju i na kraju transport boje ili proizvoda razgradnje iz ćelije.³⁹ Ključnu ulogu u uklanjanju sintetičkih boja od navedenih mikroorganizama imaju plesni. Mehanizam uklanjanja boja plesnima zavisi pre svega od njihovog stanja, tj. da li su u pitanju žive ili uginule ćelije. Plesni imaju sposobnost biodegradacije sintetičkih boja zahvaljujući proizvodnji enzima: lakaze, mangan–peroksidaze (MnP) i lignin–peroksidaze (LiP). Sa druge strane, glavni mehanizam uklanjanja boja uginulim ćelijama plesni je biosorpcija, koja podrazumeva fizičko/hemijske interakcije adsorpciju, depoziciju i jono–izmenjivanje.³⁹ Biološki tretman se intenzivno primenjuje i za uklanjanje nutrijenata–azota i fosfora iz otpadnih voda.³¹ Najčešće se kombinuje sa fizičkim i hemijskim tretmanom i smatra se obećavajućom metodom tretmana otpadnih voda.

1.5.3.1. Enzimsko uklanjanje sintetičkih boja iz otpadnih voda

Tradicionalne metode su se pokazale kao neefikasne u uklanjanju sintetičkih boja naročito zbog hemijske stabilnosti ovih zagađivača. U poslednjih nekoliko decenija velika pažnja istraživača je usmerena ka izučavanju svojstava enzima mikrobnog i biljnog porekla i mogućnosti primene u uklanjanju sintetičkih boja. 1930-ih je prvi put pokrenuta ideja o primeni enzima u uklanjanju sintetičkih boja, a prvi pisani dokumenti nastaju 1970-ih.⁴⁰ Naročiti naponi uloženi su u cilju separacije, izolacije i testiranja ovih enzima.⁴¹ Enzimski tretmani obojenih otpadnih voda privlače sve više pažnje iz razloga što su jeftiniji, ekološki prihvatljiviji i efikasniji u poređenju sa tradicionalnim metodama. Iako se boje karakterišu velikom raznolikošću u strukturi, do sada je poznato samo nekoliko enzima koji mogu da ih razgrađuju. Zajednička odlika ovih biokatalizatora je da su to redoks-aktivni biokatalizatori koji imaju svojstvo široke specifičnosti prema supstratu.^{42,43} Enzimi koji katalizuju uklanjanje sintetičkih boja su: azo-reduktaze, lakaze, lignin-peroksidaze, polifenol-oksidaze, peroksidaze iz rena i soje.⁴⁴ Mikroorganizmi producenti enzima koji se koriste u uklanjanju boja imaju ograničenu primenu. Često se dešava da su reakcije katalizovane mikroorganizmima manje efikasne jer sa povećanjem koncentracije ispitivanog zagađivača, dolazi do inhibicije rasta mikroorganizma. Enzimska degradacija je metod izbora kada je u pitanju uklanjanje boja koje inhibiraju rast mikroorganizama.

Enzimi kao katalizatori uklanjanja sintetičkih boja se ponašaju kao redoks-aktivni molekuli koji stvaraju reaktivne slobodne radikale odgovorne za niz kompleksnih reakcija raskidanja veza u molekulu boja.⁴⁴ Transformacija brojnih zagađivača (fenoli, halogenovani fenoli, policiklični aromatični ugljovodonici, sintetičke boje) katalizovana enzimima-peroksidazama odigrava se mehanizmom slobodnih radikala pri čemu nastaju oksidovani ili polimerizovani proizvodi. Peroksidaze (EC 1.11.1.X) su oksido-redukujući enzimi koji u prisustvu oksidacionih reagenasa: vodonik-peroksida (H_2O_2), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske) kiseline (ABTS) i 3,5,3',5'-tetrametilbenzidina (TMB) oksiduju brojna organska i neorganska jedinjenja.⁴⁵ Najznačajniji oksido-redukcionni enzimi u tretmanu obojenih otpadnih voda su azo-reduktaze, lakaze i peroksidaza iz rena.

Bakterije razgradjuju boje iz obojenih otpadnih voda posredstvom enzima azo–reduktaza koji katalizuju reduktivno raskidanje azo veza u molekulu boje uz pomoć redukujućih ekvivalenata nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) nastalih metabolizmom organskih jedinjenja. Supstrat koji se koristi za sintezu redukujućih ekvivalenata je ili sam molekul boje ili ko–supstrat, a to je najčešće dodatni izvor ugljenika koji se dodaje u podlogu i neophodan je za rast bakterije.⁴⁶ Podaci o uklanjanju sintetičkih boja azo–reduktazama u literaturi su brojni, a kratak pregled nalazi se u tabeli 1.10.

Tabela 1.10. Uklanjanje sintetičkih boja katalizovano bakterijskim kulturama producentima azo–reduktaza

Bakterijska vrsta	Ispitivana boja	Vreme trajanja reakcije	Obezbojavanje, (%)	Referenca
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Acid Red	48	>70	[47]
<i>Alcaligenes sp. AA09</i>	Reactive Red BL	24	100	[48]
<i>Bacillus lentus BI377</i>	Reactive Red 141	6	99,11	[49]
<i>Bacillus strain SF</i>	Reactive Black 5	6	86	[50]
	Mordant Black 9	24	38	
<i>Bacillus subtilis ORB7106</i>	Methyl Red	48	40–98	[51]
<i>Brevibacterium sp. strain VN-15</i>	Reactive Yellow 107	96	98	[52]
<i>Escherichia coli JM109 (pGEX-AZR)</i>	Direct Blue 71	12	100	[53]
<i>Enterococcus gallinarum</i>	Direct Black 38	20	100	[54]
<i>Mutant Bacillus sp. ACT2</i>	Congo Red	37–48	12–30	[55]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Remazol Orange	24	94	[56]
<i>Proteus sp.</i>	Congo Red	48	67	[57]

Pored azo–reduktaza, veliku primenu u tretmanu obojenih otpadnih voda imaju lakaze. Lakaze (EC 1.10.3.2) se oksido–redukujući enzimi koji ima karakterističnu strukturu zbog atoma bakra. Primenuju se u brojnim biotehnološkim postupcima, jedan

od njih je bioremedijacija, zahvaljujući nespecifičnom oksidacionom kapacitetu. Katalizuju reakcije uklanjanja sintetičkih boja u prisustvu molekula malih molekulskih masa, redoks medijatora koji prenose elektrone od enzima do drugih jedinjenja.⁵⁸ Spektar jedinjenja koja oksiduju lakaze je širok, a kratak pregled literature je dat u tabeli 1.11.

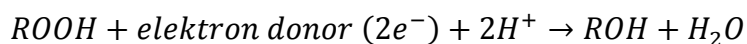
Tabela 1.11. Obezbojavanje sintetičkih boja plesnima producentima lakaze

Kultura plesni	Ispitivana boja	Vreme trajanja reakcije, h	Obezbojavanje, (%)	Referenca
<i>Armillaria sp. F022</i>	Reactive Black 5	96	80	[59]
<i>Cerrena unicolor</i>	Acid Red 27	24	100	[60]
<i>Coprinopsis cineria</i>	Methyl Orange	4	47	[61]
<i>Ganoderma sp.</i>	Methyl Orange	72	>90	[62]
<i>Geobacillus catenulatus MS5</i>	Congo Red	32	99	[63]
<i>Immobilized Trametes pubescens</i>	Remazol Brilliant Blue R, Reactive Blue 49	10 dana	>95	[64]
<i>Lentinus Polychrous</i>	Congo Red	3	75	[65]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Remazol Brilliant Blue R	72	80	[66]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Synazol Red HF6BN	24 dana	96	[67]
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Trypan Blue	24	70	[68]
<i>Thelephora sp.</i>	Orange G	-	19	[69]

Pored lakaza i azo–reduktaza koje su najbrojnije u literaturi kada je u pitanju tretman obojenih otpadnih voda, peroksidaza iz rena je privukla pažnju istraživača zbog specifičnosti, efikasnosti, stabilnosti i lake dostupnosti po pristupačnoj ceni. U okviru ove disertacije ispitana je mogućnost oksidacije antrahinonskih boja peroksidazom iz rena kao katalizatorom pa je u narednom poglavlju detaljno prikazana i objašnjena struktura i katalitički mehanizam ovog enzima.

2. PEROKSIDAZE

Peroksidaze (EC 1.11.1.X) su velika grupa enzima koji koriste različite perokside ROOH kao elektron akceptore u katalizi brojnih reakcija oksidacije. Do sada je utvrđeno preko 30 različitih enzima koji pripadaju ovoj grupi.⁷⁰ Reakcije katalizovane peroksidazama mogu da se prikažu na sledeći način:⁷⁰



Za većinu enzima koji pripadaju ovoj grupi, standardni supstrat je vodonik-peroksid, dok neki ispoljavaju maksimalnu aktivnost u prisustvu organskih hidro-peroksida kao što su lipidni peroksidi ili alkil hidro-peroksidi (terc-butilhidro-peroksid).⁷² Peroksidaze mogu sadržati u aktivnom centru hem, redoks-aktivni cistein ili selenocistein ostatke. Molarna masa peroksidaza kreće se u opsegu 30–150 kDa. Na osnovu izvora iz kojeg se izoluju, peroksidaze se mogu klasifikovati u sledeće klase:⁷³

1. Intracelularne peroksidaze prokariotskog porekla (klasa I),
2. Peroksidaze izolovane iz gljiva (klasa II),
3. Biljne peroksidaze (Klasa III).

Klasu I peroksidaza čine intracelularne peroksidaze i to: citohrom C peroksidaza iz kvasaca (CcP), hloroplast i citozol-askorbat peroksidaza iz graška (APX), gen-duplirana peroksidaza iz bakterija i katalaza-peroksidaze iz plesni. Pripadnici druge klase su mangan peroksidaza (MnP) izolovana iz *Phanerochaete cryosporium*, lignin peroksidaza (LiP) kao i peroksidaze izolovane iz gljiva *Coprinus cinereus* ili *Arthromyces ramosus*. Klasu III čine ekstracelularne peroksidaze koje se izoluju iz kikirikija, ječma, soje, brokolija, celera, rena. Među nabrojanima, koren rena je najznačajniji izvor peroksidaze.^{73,74} Bez obzira na izvor iz kojeg se izoluju peroksidaze imaju ulogu u očuvanju funkcija i strukturnog integriteta organizama iz kojih se izoluju. Tako na primer, utvrđeno je da peroksidaze učestvuju u mehanizmima zaštite biljnog tkiva od fizičkih oštećenja, infekcija, elongaciji, konstrukciji ćelijskog zida, diferencijaciji, a značajnu ulogu imaju i u procesima lignifikacije.⁷⁵⁻⁷⁷

2.1. Peroksidaza iz rena

Ren, *Armoracia rusticana* pripada familiji *Cruciferae*, je višegodišnja biljka koja se kultiviše uglavnom zbog velike primene u kulinarstvu (slika 2.1.).



Slika 2.1. *Armoracia rusticana* (ren).

Koren rena sadrži veliki broj izoenzima, mada se smatra da je najzastupljeniji i sa najvećim komercijalnim značajem, izoenzim C (HRP-C). Glavne uloge HRP-C su metabolizam indol-3-sirćetne kiseline, lignifikacija, umrežavanje polimera ćelijskog zida kao i zaštita tkiva od infekcije.^{78,79} Klasifikacija izoenzima prisutnih u korenu rena izvršena je na osnovu vrednosti izoelektrične tačke (pI). Izoenzimi izolovani iz rena se na osnovu pI mogu klasifikovati u sledeće grupe:

- 1) Kiseli (grupa A),
- 2) Neutralni (grupe B i C),
- 3) Bazni (grupe D i E).

Kiselih izoenzima ima tri, označavaju se kao A_1 , A_2 , A_3 i izoelektrična tačka se kreće u opsegu 3,5–5,0.⁸⁰ Neutralnih izoenzima ima pet, označavaju se kao B_1 , B_2 , B_3 , C_1 , C_2 i izoelektrična tačka im se kreće u opsegu 5,0–10,0. Baznih izoenzima ima šest, označavaju se slovima E_1 – E_6 i vrednost izoelektrične tačke im je iznad 10,6. Izoenzimi E_1 – E_2 sadrže 12,8–14,1 %, dok E_3 – E_6 sadrže 0,8–4,2 % ugljenohidratne komponente.⁸¹ Kiseli izoenzimi nazivaju se još i anjonskim izoenzimima, dok se izoenzimi označeni kao B, D, C nazivaju i katjonskim. Anjonski izoenzimi se karakterišu većim udelom ugljenohidratne komponente u strukturi molekula, koji znatno opada u slučaju

katjonskih izoenzima. Izoenzim C (pI 8,7–9,0; apoprotein pI 6,8) je dominantan katjonski oblik i čini 50 % od ukupne količine peroksidaza u korenu rena. Udeo pojedinog oblika izoenzima u preparatu može da se odredi na osnovu RZ vrednosti (Reinheitszahl vrednost) koja predstavlja odnos A_{403}/A_{275} . Na osnovu RZ vrednosti se može utvrditi i stepen prečišćenosti preparata (tabela 2.2.).

Tabela 2.2. RZ vrednosti za izoenzime izolovane iz korena rena

Izoenzim	RZ
A ₁	4,19
A ₂	4,12
A ₃	3,71
B	3,37
C	3,42
D	2,57
E	2,50

Preparat visokog stepena prečišćenosti koji sadrži HRP–C ima RZ vrednosti u opsegu 3,0–3,4.^{79, 82-85}

2.2. Struktura HRP-C

U molekulu HRP–C se razlikuje nekoliko strukturnih segmenata:

- ❖ Primarna struktura,
- ❖ Aminokiseline u strukturi HRP–C od esencijalnog značaja,
- ❖ Sekundarna i tercijarna struktura molekula HRP–C,
- ❖ Hem grupa u molekulu HRP–C,
- ❖ Ugljenohidratna komponenta u molekulu HRP–C,
- ❖ Kalcijum vezujuća mesta u molekulu HRP–C.

Primarna struktura HRP–C

1976. godine Velinder (Welinder) je otkrio kompletnu sekvencu aminokiselina. Peroksidaza iz rena, izoenzim C je glikohemoprotein koji se sastoji od 308 aminokiselinskih ostataka lokalizovanih u jednom polipeptidnom lancu (slika 2.3).⁸⁶

	5	10	carb	15	20	25	
	Glu-Leu-Thr-Pro-Thr-Phe-Tyr-Asp-Asn-Ser-Cys-Pro-Asn-Val-Ser-Asn-Ile-Val-Arg-Asp-Thr-Ile-Val-Asn-Glu-						
	30	35	40	45	50		
	Leu-Arg-Ser-Asp-Pro-Arg-Ile-Ala-Ala-Ser-Ile-Leu-Arg-Leu-His-Phe-His-Asp-Cys-Phe-Val-Asn-Gly-Cys-Asp-						
	55	carb	60	65	70	75	
	Ala-Ser-Ile-Leu-Leu-Asp-Asn-Thr-Thr-Ser-Phe-Arg-Thr-Glu-Lys-Asp-Ala-Phe-Gly-Asn-Ala-Asn-Ser-Ala-Arg-						
	80	85	90	95	100		
	Gly-Phe-Pro-Val-Ile-Asp-Arg-Met-Lys-Ala-Ala-Val-Glu-Ser-Ala-Cys-Pro-Arg-Thr-Val-Ser-Cys-Ala-Asp-Leu-						
	105	110	115	120	125		
	Leu-Thr-Ile-Ala-Ala-Gln-Gln-Ser-Val-Thr-Leu-Ala-Gly-Gly-Pro-Ser-Trp-Arg-Val-Pro-Leu-Gly-Arg-Arg-Asp-						
	130	135	140	145	150		
	Ser-Leu-Gln-Ala-Phe-Leu-Asp-Leu-Ala-Asn-Ala-Asn-Leu-Pro-Ala-Pro-Phe-Phe-Thr-Leu-Pro-Gln-Leu-Lys-Asp-						
	155	carb	160	165	170	175	
	Ser-Phe-Arg-Asn-Val-Gly-Leu-Asn-Arg-Ser-Ser-Asp-Leu-Val-Ala-Leu-Ser-Gly-Gly-His-Thr-Phe-Gly-Lys-Asn-						
	180	185	carb	190	195	carb	200
	Gln-Cys-Arg-Phe-Ile-Met-Asp-Arg-Leu-Tyr-Asn-Phe-Ser-Asn-Thr-Gly-Leu-Pro-Asp-Pro-Thr-Leu-Asn-Thr-Thr-						
	205	210	carb	215	220	225	
	Tyr-Leu-Gln-Thr-Leu-Arg-Gly-Leu-Cys-Pro-Leu-Asn-Gly-Asn-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Asp-Phe-Asp-Leu-Arg-Thr-						
	230	235	240	245	250		
	Pro-Thr-Ile-Phe-Asp-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Val-Asn-Leu-Glu-Glu-Gln-Lys-Gly-Leu-Ile-Gln-Ser-Asp-Gln-Glu-Leu-						
	carb	260	265	carb	270	275	
	Phe-Ser-Ser-Pro-Asn-Ala-Thr-Asp-Thr-Ile-Pro-Leu-Val-Arg-Ser-Phe-Ala-Asn-Ser-Thr-Gln-Thr-Phe-Phe-Asn-						
	280	285	290	295	300		
	Ala-Phe-Val-Glu-Ala-Met-Asp-Arg-Met-Gly-Asn-Ile-Thr-Pro-Leu-Thr-Gly-Thr-Gln-Gly-Gln-Ile-Arg-Leu-Asn-						
	305						
	Cys-Arg-Val-Val-Asn-Ser-Asn-Ser						

Slika 2.3. Sekvenca aminokiselina u molekulu HRP–C⁸⁶

Aktivni centar proteina čini hem grupa–gvožđe (III)–protoporfirin IX, (feriprotoporfirin IX). N–terminalni kraj polipeptidnog lanca je blokiran piroliden–karboksilnim ostatkom, koji se nalazi "ukopan" u polipeptidni lanac. C–terminalni kraj postoji u obliku sa ostatkom serina (Ser₃₀₈) i bez ovog ostatka, što ukazuje na labilnost peptidne Asn–Ser veze. U okviru polipeptidnog lanca HRP–C nalaze se četiri disulfidna mosta lokalizovana između ostataka cisteina na položajima: Cys₁₁–Cys₉₁, Cys₄₄–Cys₄₉, Cys₉₇–Cys₃₀₁ i Cys₁₇₇–Cys₂₀₉, kao i ukopani soni most između ostataka Asp₉₉ i Arg₁₂₃. U oba dela molekula, tj. distalnom (region iznad hem ravni) i proksimalnom (region ispod hem ravni), nalazi se po jedan jon kalcijuma (Ca²⁺). Pored navedenog u strukturi peroksidaze (HRP–C) nalazi se i osam neutralnih bočnih ugljenohidratnih lanaca koji su sa ostatkom molekula povezani preko ostataka asparagina. Polipeptidni lanac ima

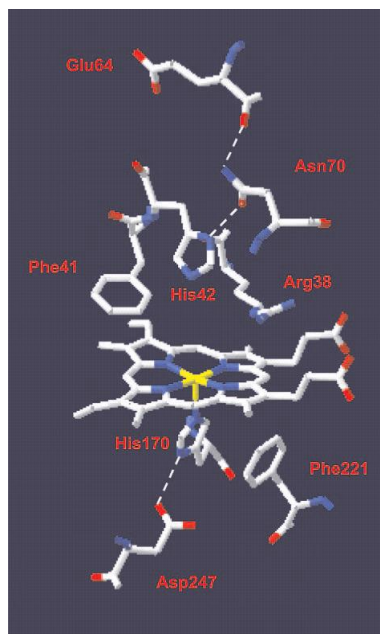
molekulsku masu od 33890 Da, hem grupa 572 Da, dva jona kalcijuma oko 80 Da i ugljenohidratna komponenta molekula peroksidaze čini 18–22 % od ukupne mase, tako da je molekulska masa peroksidaze ~ 44000 Da.^{78,81,87} Sumarno, karakteristike HRP–C su prikazane u tabeli 2.4.

Tabela 2.4. Karakteristike peroksidaze iz rena (HRP–C)⁸⁸

<i>Broj aminokiselina</i>	308
<i>Klasifikacija enzima</i>	1.11.1.7
<i>Molekulska masa</i>	44100 Da
<i>Ugljenohidratna komponenta</i>	7580 Da
<i>Hem grupa</i>	572 Da
<i>Mesta glikozilacije</i>	Asn: 13, 57, 158, 186, 198, 214, 255, 268, 316
<i>pI</i>	9,0
<i>Opseg pH aktivnosti</i>	4,0–8,0
<i>Sekundarna struktura</i>	13 α -heliksa, 3 β -lista
<i>Disulfidni mostovi</i>	11–91, 44–49, 97–301, 177–209
<i>Lokalizacija in vivo</i>	Koren, ćelijski zid, vakuole

Aminokiseline od esencijalnog značaja u strukturi HRP–C

HRP–C molekul sadrži ostatke aminokiselina u distalnom i proksimalnom regionu koji su od esencijalnog značaja za katalitičku funkciju (slika 2.5.).



Slika 2.5. Aktivni centar peroksidaze iz rena⁸¹

Najznačajniji aminokiselinski ostatak u distalnom regionu hema jeste svakako distalni histidin, His₄₂. His₄₂ se smatra najznačajnijim kiselo–baznim katalizatorom u reakciji formiranja jedinjenja I (E–I). Značaj His₄₂ u navedenoj reakciji je pomaganje formiranja inicijalnog Fe–OOH kompleksa deprotonovanjem dolazećeg molekula H₂O₂ i heterolitičkog raskidanja O–O veze uz protonovanje odlazećeg distalnog kiseonika.

Utvrđeno je da i najmanje strukturne promene u okolini His₄₂ značajno smanjuju aktivnost HRP–C peroksidaze. Tako je na primer, zamenom histidina (His₄₂) leucinom ili alaninom brzina formiranja E–I smanjena pet do šest puta.^{89,90} Modifikacijom His₄₂ dolazi do inaktivacije enzima, iako je i dalje moguće vezivanje aromatičnog donora i nastank E–I, što ukazuje na ulogu His₄₂ u transferu energije od supstrata do prostetične grupe.⁹¹ U nastanku E–I, od esencijalnog značaja, pored His₄₂, je Arg₃₈ koji se takođe nalazi u distalnom regionu. Arg₃₈ svojim pozitivnim naelektrisanjem stabilizuje prelazno stanje u formiranju E–I tako što smanjuje negativno naelektrisanje kiseonika koje nastaje heterolitičkim cepanjem O–O veze peroksida.⁹²

Pored toga, Arg₃₈ ima i značajnu ulogu u olakšavanju bržeg vezivanja vodonik-peroksida za HRP–C molekul, kao i u prilagođavanju p*K*_a distalnog histidina. Supstitucijom distalnog arginina, leucinom ili glicinom brzina formiranja E–I opada čak 1000 puta, dok izostanak arginina na ovoj poziciji dovodi do usporavanja raskidanja O–

kontrolira dostupnost feril–kiseonika u E–I i prilagođava specifičnost prema supstratu.^{91,95}

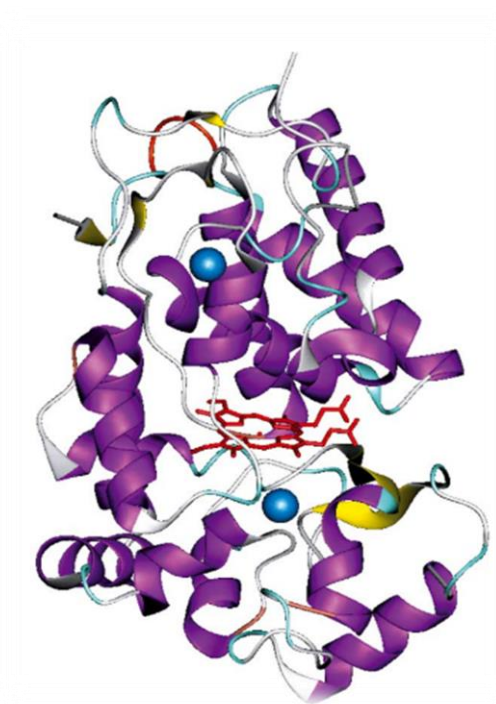
Bočni karboksilatni lanac Asp₂₄₇ pomaže u kontroli imidazolnog karaktera prstena His₁₇₀. U proksimalnom džepu hema se nalazi His₁₇₀ koji se smatra mestom vezivanja hema za polipeptidni lanac.⁹⁶ Jačina vezivanja hem grupe u aktivnom centru zavisi od koordinativne veze His₁₇₀ i gvožđa hema. Asp₂₄₇ održava baznost His₁₇₀ što je značajno za održanje peto–koordinativne veze hema.⁹¹ Pored navedenih, značajan aminokiselinski ostatak je takođe i Pro₁₃₉. U HRP–C peroksidazi je utvrđeno da je ovaj aminokiselinski ostatak, na poziciji 139 deo strukturne osnove Pro–X–Pro, u HRP–C peroksidazi to je osnova Pro₁₃₉–Ala₁₄₀–Pro₁₄₁, i učestvuje u oksidaciji i vezivanju supstrata.

Karbonilna grupa Pro₁₃₉ se ponaša kao akceptor vodonične veze molekula vode koji takođe predstavlja i kanal za proces transfera protona, koji je kuplovan sa procesom transfera elektrona od supstrata do isturene ivice hema.^{78,97} Thr₁₇₁ je aminokiselinski ostatak koji ima ulogu u održavanju pravilne konformacije proteina, s obzirom na to da povezuje hem i proksimalni Ca²⁺. Trp₁₁₇ posreduje u migraciji energije u molekulu i ima ulogu u očuvanju stabilnosti enzima.

Zamenom određenih aminokiselinskih ostataka u pojedinim regionima molekula HRP–C utvrđeno je da pored navedenih postoji još značajnih aminokiselinskih ostataka. Tako supstitucijom aminokiselina u regionima Thr₁₀₂Ala, Gln₁₀₆Arg, Gln₁₀₇Asp, Thr₁₁₀Val, Ile₁₈₀Phe dobijen je enzim manje termostabilnosti, dok supstitucije Asn₁₃ i Asn₂₆₈ dovode do povećanja termostabilnosti i rezistentnosti na inaktivaciju vodonik–peroksidom.⁹¹

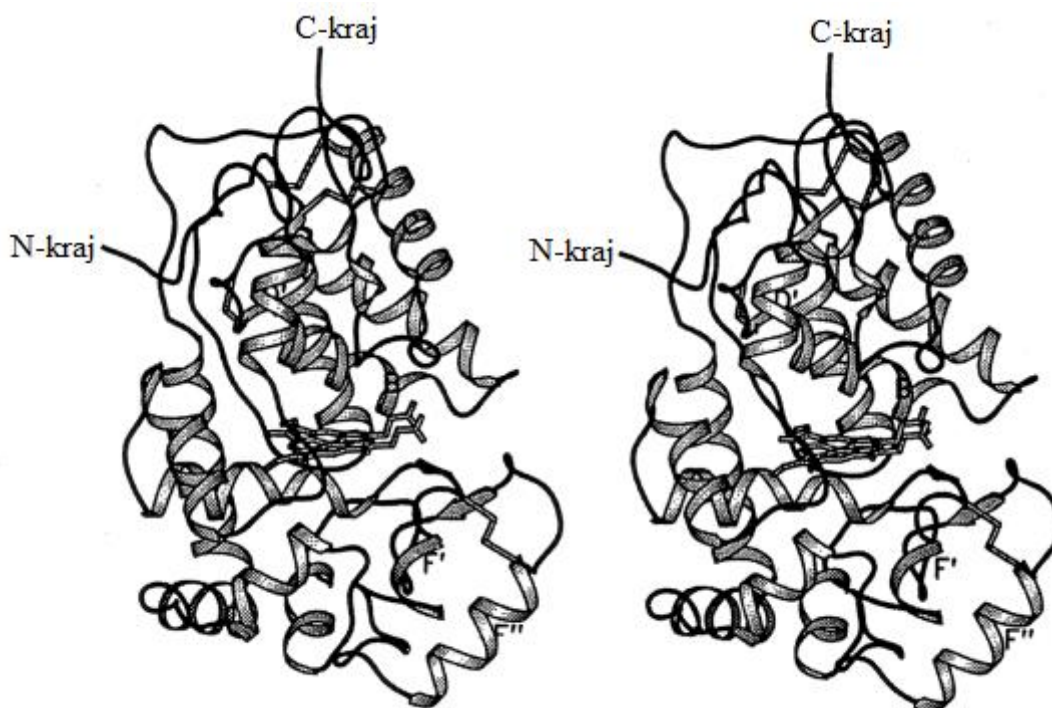
Sekundarna i tercijarna struktura molekula HRP-C

Polipeptidni lanac HRP-C peroksidaze je organizovan u obliku α heliksa i manjim delom β ploča (slika 2.7.).



Slika 2.7. 3D struktura HRP-C; Hem grupa označena je crvenom bojom i smeštena je između dva domena, distalnog i proksimalnog pri čemu se u svakom nalazi po jedan Ca^{2+} obojen plavom bojom; α -heliksi su označeni ljubičastom bojom, β -ploče su označene žutom bojom; F' i F'' heliksi su smešteni u donjem desnom kvadrantu molekula⁷⁸

HRP-C sadrži trinaest α -heliksa označenih slovima A-J: 14–28 (A), 32–44 (B), 77–90 (C), 97–111 (D), 131–137 (D'), 145–153 (E), 160–171 (F), 181–185 (F'), 199–208 (F''), 232–238 (G), 245–252 (H), 260–267 (I), 270–284 (J). Pored navedenih α -heliksa, u strukturi HRP-C se između heliksa F i G nalaze umetnutne dve antiparalelne β -ploče, na pozicijama 174–176 (β_1) i 218–220 (β_2) kao i heliksi F' i F'' (slika 2.8.).⁹⁸



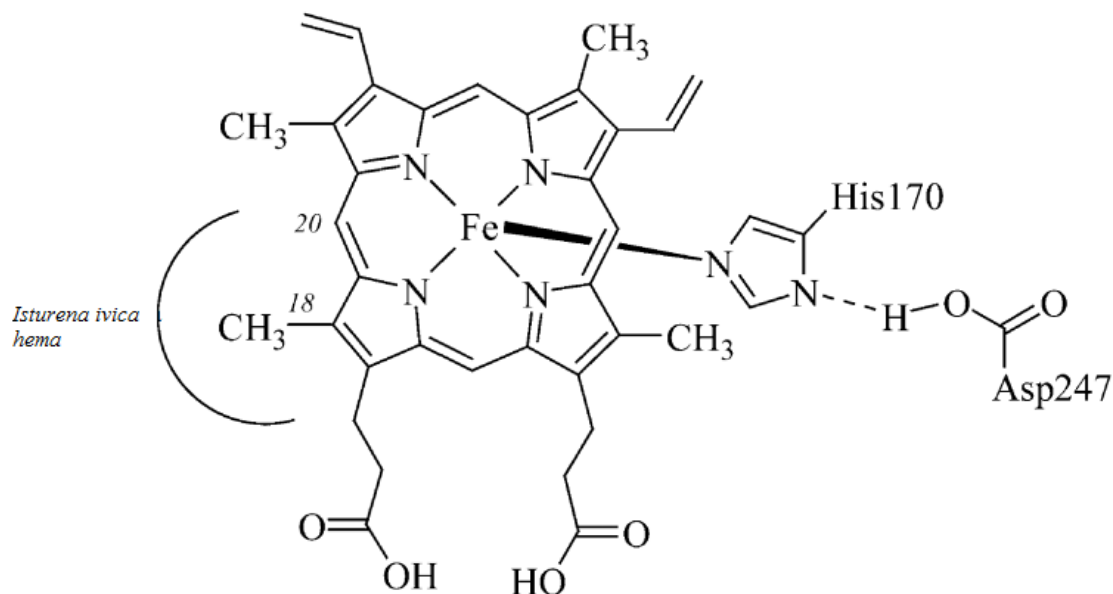
Slika 2.8. Položaj heliksa F' i F'' u HRP-C⁷³

Za peroksidaze klase I i II nije karakteristično prisustvo heliksa D' , F' i F'' . Izduženi umetak između heliksa F i G, gde su smešteni pomenuti heliksi, karakteristično je da se značajno razlikuje kako u sekvenci tako i u broju aminokiselina u zavisnosti od vrste peroksidaze klase III. Strukturni integritet ovog regiona se održava disulfidnim mostom između ostataka cisteina na poziciji Cys₁₇₇ i Cys₂₀₉. Smatra se da aminokiselinski ostaci u heliksu F' imaju uticaj na stabilizaciju i zadržavanje različitih radikalnih vrsta koje nastaju u reakcijama katalizovanim peroksidazama.^{70,78,99,100}

Hem grupa u molekulu HRP-C

Ono što je karakteristično za sve izoenzime izolovane iz korena rena jeste da sadrže hem grupu, koja predstavlja gvožđe-(III)-protoporfirin IX (slika 2.9.). Kao što može da se vidi sa slike gvožđe je koordinativnim vezama povezan sa četiri atoma azota u pirollovom prstenu, ali i na pozicijama pet i šest postoji mogućnost vezivanja gvožđa koordinativnom vezom. Hem grupa je za protein vezana petom koordinativnom vezom formiranom između gvožđa (Fe^{3+}) i Nε2 atoma His₁₇₀ na proksimalnoj strani.⁹⁵ Gvožđe može da formira još jednu koordinativnu vezu u poziciji šest, ali je to mesto prazno

kada je enzim u stanju mirovanja. Između hem grupe i ostatka strukture HRP-C molekula postoji mreža vodoničnih veza formirana između grupa propionata i bočnih lanaca aminokiselina Glu₁₇₆, Ser₇₃, Ser₃₅ i Arg₃₁.



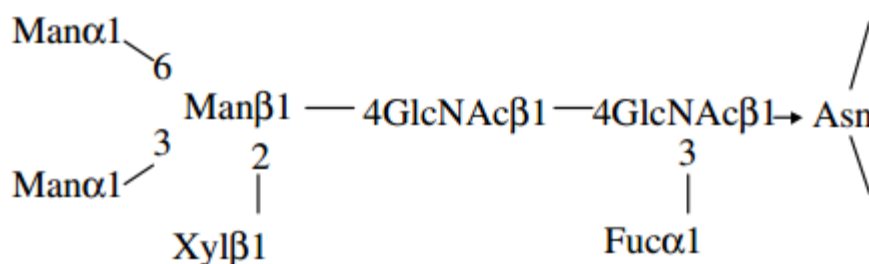
Slika 2.9. Hem grupa⁷⁸

His₁₇₀ je, pored koordinativne veze koju formira sa gvožđem, na proksimalnoj strani vodoničnom vezom vezan sa Asp₂₄₇ i ova veza je esencijalna za održanje geometrije gvožđa sa pet koordinativnih veza. Ova vodonična veza regulacijom baznosti aksijalnog liganda utiče na redoks potencijal viših oksidacionih stanja enzima.¹⁰¹ Gvožđe-(III) se u stanju mirovanja u hem grupi nalazi u visokospinskom stanju koje se karakteriše sa pet nesparenih elektrona u *d*-orbitali (5C–HS). Kada dođe do vezivanja liganda na šestoj koordinativnoj poziciji, dolazi do promene spin stanja zbog uticaja polja liganda na distribuciju elektrona u *d*-orbitali (sparenih i nesparenih). Ukoliko ligand koji se veže ima "slabo" polje, kao što je slučaj sa fluoridnim ligandom, ono neće narušiti spin stanje gvožđa, tj. elektroni u *d*-orbitali će i dalje ostati nespareni, tako da će rezultujuće stanje biti označeno kao 6C–HS (6C–šesto–koordinativno, HS–visokospinsko). Međutim, ukoliko ligand koji se vezuje ima "jako" polje kao što je to slučaj sa cijanidima, polje liganda će favorizovati sparivanje elektrona u *d*-orbitali, tako da će ostati samo jedan elektron nesparen i nastaje stanje 6C–LS (6C–šestokoordinativno, LS–niskospinsko).^{79,98} Koordinativno i spinsko stanje HRP-C molekula zavisi u velikoj

meri od pH rastvora. Naime, najmanje izražene ili neznačajne promene se dešavaju u opsegu pH 4,0–10,0. Međutim, na pH 3,1 u stanju mirovanja HRP–C je u petokoordinativnom visokospinskom stanju u kojem je His₁₇₀ zamenjen molekulom vode. Na visokim pH vrednostima tj. u alkalnoj sredini enzim podleže tzv. alkalnoj polimerizaciji kada prelazi u šestokoordinativne niskospinske oblike. Ovaj prelaz se dešava kao posledica stabilizacije vodonične veze između hidroksidnog liganda i bočnog lanca Arg₃₈.^{102,103} Na slici 2.9. je označena i isturena ivica hema, kao mesto vezivanja aromatičnog liganda.⁷⁸

Ugljenohidratna komponenta u molekulu HRP–C

HRP–C peroksidaza je hemoglikoprotein koji u svojoj strukturi pored navedenih segmentata sadrži i ugljenohidratnu komponentu. Utvrđeno je da u strukturi HRP–C postoji devet *N*-glikozilacionih mesta, od kojih je osam zauzeto. Mesta glikozilacije se mogu prepoznati preko ponavljajuće strukturne jedinice Asn–X–Ser/Thr, gde je X bilo koji aminokiselinski ostatak. Svaki od navedenih ugljenohidratnih lanaca se za strukturu HRP–C povezuje preko ostataka asparagina na pozicijama: 57, 13, 158, 168, 198, 214 i 215. Detaljnom analizom ugljenohidratne komponente utvrđeno je postojanje (Xyl)Man₃(Fuc)GlcNAc glukana koji čini većinski deo, potom manjih glukana (Xyl)Man₂(Fuc)GlcNAc₂, (Xyl)Man₃GlcNAc₂ i Man₃GlcNAc₂ koji zajedno čine 95 % svih ugljenih hidrata u strukturi HRP–C. Iz navedenog može da se zaključi da ugljenohidratnu komponentu HRP–C molekula čine pretežno monosaharidi manosa (Man), *N*-acetilglukozamin (GlcNAc), ksiloza (Xyl) i fukoza (Fuc). Sumarno, većinski heptasaharid se može predstaviti kao: α -Man-(1→6)[α -Man-(1→3)][β -Xyl-(1→2)]- β -Man—(1→4)- β -GlcNAc-(1→4)[α -Fuc-(1→3)]-GlcNAc (slika 2.10.), dok se manji glukani mogu predstaviti kao: (Xyl)_{*x*}Man_{*m*}(Fuc)_{*f*}GlcNAc₂ (*m*=2, 4, 5, 6; *f*= 0 ili 1; *x*=0 ili 1). Glukani sa visokim sadržajem manoze mogu se naći samo u tragovima i za njih je karakteristično da su povezani uglavnom 1→3, dok postoje i segmenti povezani 1→2 vezom.¹⁰⁴



Slika 2.10. Struktura oligosaharida u ugljenohidratnoj komponenti HRP-C¹⁰⁴

Dva mesta glikozilacije, na pozicijama Asn₅₇ i Asn₂₆₇ imaju heterogeniji sastav nego što je to slučaj sa pozicijama Asn₁₃, Asn₁₅₈, Asn₁₆₈, Asn₁₉₈ (dvostruko glikozilovani peptid), Asn₂₁₄ i Asn₂₁₅.^{78,87,105,106} Glukani se nalaze na površini na mestima na kojima dolazi do formiranja petlji u konformaciji molekula HRP-C i relativno su pokretljivi.^{79,87}

Deglikozilacijom HRP-C peroksidaze hemijskim tretmanom otkrivena je potencijalna uloga ugljenohidratne komponente. Prvobitnim istraživanjima zaključeno je da ugljenohidratna komponenta nema nikakvog uticaja na katalitičku funkciju enzima jer postoje brojne peroksidaze koje su katalitički aktivne bez ovog strukturnog segmenta. Dalje, nakon hemijskog tretmana utvrđeno je da nativna i deglikozilovana HRP imaju identičan apsorpcioni spektar, što ukazuje da nakon uklanjanja ugljenohidratne komponente okolina hema nije promenjena. Sva mesta glikozilacije HRP su orijentisana od površine enzima ka okolnoj sredini i ravnomerno su raspoređena po celokupnoj površini, te se stoga izvodi zaključak da je glavna uloga ugljenohidratne komponente zapravo povećanje rastvorljivosti molekula HRP-C. Neglikozilovane rekombinantne HRP su se pokazale znatno osetljivijim na dejstvo peroksida kao i na umrežavanje proteina prouzrokovano slobodnim radikalima, ali i na dejstvo proteolitičkih enzima. Pored toga, povećanjem sadržaja ugljenohidratne komponente, HRP-C molekul je termostabilniji.^{83,107,108}

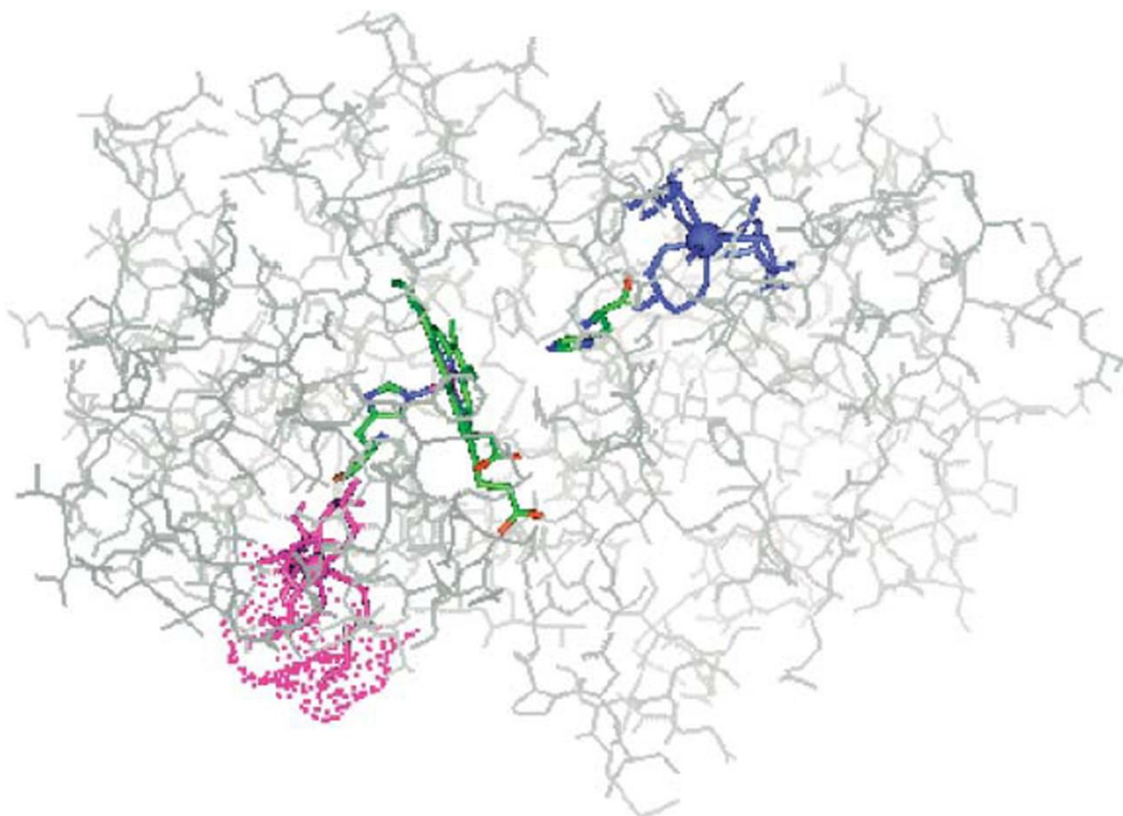
Kalcijum vezujuća mesta u molekulu HRP-C

Sa slike 2.11. jasno se uočava još jedna strukturna komponenta koja je od izuzetnog značaja za funkcionisanje HRP-C. Naime, u proksimalnoj i distalnoj ravni u odnosu na hem nalazi se po jedan jon kalcijuma (Ca^{2+}) koji je mrežom vodoničnih veza povezan sa hem grupom. Svaki jon kalcijuma je sa sedam koordinativnih veza povezan sa ligandima donorima kiseonika kako na proksimalnoj tako i na distalnoj strani hem ravni. Distalni ligand donori su Asp₄₃, Asp₅₀, Ser₅₂ (bočni lanaci), Asp₄₃, Val₄₆, Gly₄₈ (karbonilne grupe) i jedan strukturni molekul vode. Na proksimalnoj strani kao ligandi donori kiseonika uočeni su Thr₁₇₁, Asp₂₂₂, Thr₂₂₅, Asp₂₃₀ (bočni lanci), Thr₁₇₁, Thr₂₂₅ i Ile₂₂₈ (karbonilne grupe). Strukturni molekul vode Wat₁₅ sa kojim je povezan Ca^{2+} na distalnoj strani vodoničnom vezom je povezan sa Gln₆₄ koji deli dodatnu vodoničnu vezu sa drugim strukturnim molekulom vode Wat₁₄. Wat₁₄ i bočna karbonilna grupa Gln₆₄ su vodoničnom vezom vezani sa Asn₇₀ koji je dalje vezan za His₄₂. Na proksimalnoj strani bočne karbonilne grupe Thr₁₇₁, Thr₂₂₅ i Ile₂₂₈, karboksilatne grupe bočnih lanaca Asp₂₂₂, Asp₂₃₀ i hidroksilne grupe bočnih lanaca Thr₁₇₁ i Thr₂₂₅ su ligandi donori kiseonika. Thr₁₇₁ je ligand Ca^{2+} jona na proksimalnoj strani i indirektno spreže jon kalcijuma za hem grupu povezujući ga sa His₁₇₀.

Iako u strukturi HRP-C postoje dva jona Ca^{2+} utvrđeno je da nemaju isti uticaj na funkcionalni i strukturni integritet enzima. Detaljnom analizom utvrđeno je da je samo jedan jon Ca^{2+} esencijalan za održanje strukture proteina u blizini hema.¹⁰⁹ Uklanjanjem jona Ca^{2+} prvo što je zapaženo jeste povećanje radijusa okretanja u odnosu na nativnu HRP-C. Povećanje radijusa okretanja pripisuje se blagom širenju matrice proteina koja je posledica promena u sekundarnoj strukturi. Uklanjanje Ca^{2+} na distalnoj strani ne utiče u značajnoj meri na sekundarnu strukturu čemu doprinose disulfidni mostovi na pozicijama Cys₁₁-Cys₉₁, Cys₄₄-Cys₄₉, Cys₉₇-Cys₃₀₁ i Cys₁₇₇-Cys₂₀₉ za koje se pokazalo da stabilizuju helikse A, B, C, D, F₁ i F₂. Regioni u kojima je uočena najveća reorganizacija u strukturi su bočni lanci na proksimalnoj strani hema tj. kratki umetak heliks F' koji čine aminokiselinski ostaci Met₁₈₁, Asp₁₈₂, Arg₁₈₃, Leu₁₈₄ i deo heliksa H koji čine ostaci Asp₂₄₇ i Ser₂₄₆.

Uklanjanje Ca^{2+} na distalnoj strani smanjuje udaljenost distalnog histidina His₄₂ i molekula vode koji se u nativnoj strukturi HRP-C nalazi u blizini hema pomera se prema Arg₃₈. Specifična aktivnost nativne HRP-C nakon uklanjanja jona Ca^{2+} redukovana je na 50 % od početne aktivnosti enzima. Za razliku od HRP-C peroksidaze koja pripada klasi III, peroksidaze klase II gubitkom bilo jednog bilo oba jona Ca^{2+} se transformišu u katalitički neaktivne vrste. Ovakvo ponašanje se može pripisati različitom položaju disulfidnih mostova u strukturi enzima. Naime, cistein prisutan u β heliksi HRP-C peroksidaze nakon uklanjanja Ca^{2+} može da formira disulfidni most, na taj način ograniči fleksibilnost, i promene u strukturi svede na minimum.

Sa druge strane, ovakav disulfidni most ne može da se formira npr. kod LiP (lignin-peroksidaze) jer se gubitkom distalnog Ca^{2+} favorizuje vezivanje distalnog histidina za gvožđe hema, pri čemu nastaju neaktivni niskospinski oblici enzima. Takođe, blizina disulfidnog mosta Cys₄₄-Cys₄₉ distalnom Ca^{2+} HRP-C daje dodatni stabilizujući efekat.



Slika 2.11. Položaj proksimalnog i distalnog jona Ca^{2+} u strukturi HRP-C¹¹⁰

Pored toga, sa slike 2.11. se jasno vidi položaj Ca^{2+} jona u strukturi HRP–C. Naime, distalni kalcijum koji je označen plavom bojom se nalazi ukopan u strukturu proteina, dok proksimalni kalcijum (crvene isprekidane linije) je direktno povezan za hem grupu, a pored toga se nalazi na znatno fleksibilnijem mestu i parcijalno je izložen uticaju okolnog rastvora. Sve navedeno ukazuje na znatno veći značaj proksimalnog u odnosu na distalni jon Ca^{2+} čijim gubitkom dolazi i do pada odnosno gubitka katalitičke funkcije nastale zbog promena u okolnoj strukturi aktivnog centra.^{78,110-113}

2.3. Katalitički mehanizam peroksidaze HRP–C

Katalitički mehanizam HRP peroksidaze, naročito izoenzima C (HRP–C) poslednjih decenija je intenzivno proučavan. To je trostepeni ciklični proces u kojem je enzim prvo oksidovan ko–supstratom, vodonik-peroksidom, a potom redukovano nazad do nativnog oblika kroz dva sekvencijalna koraka koja uključuju formiranje dva enzimska intermedijara, jedinjenja I i jedinjenja II (E–I i E–II, respektivno). Katalitički mehanizam se može prikazati sledećim nizom reakcija:¹¹⁴

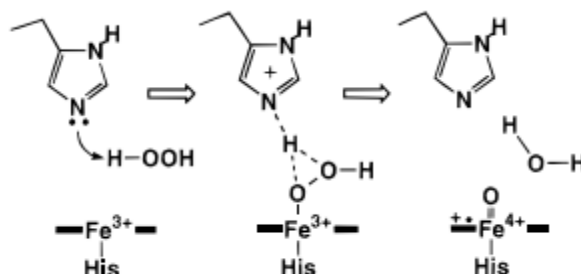


Sumarno, reakcija katalizovana HRP–C peroksidazom se može prikazati na sledeći način:



Prvi korak u katalitičkom mehanizmu jeste prevođenje nativnog oblika enzima u intermedijarno jedinjenje koje se ponaša kao izuzetno snažan oksidans sa redoks potencijalom $\approx +1$ V.⁷⁸ Kako bi se enzim preveo u intermedijarno jedinjenje višeg oksidacionog stanja neophodno je prisustvo ko–supstrata, vodonik-peroksida. Vezivanje vodonik-peroksida se dešava na distalnoj strani hema u regionu sačinjenom od aminokiselinskih ostataka His₄₂, Arg₃₈ i Phe₄₁. Katalitički ciklus HRP–C peroksidaze započinje dolaskom molekula vodonik–peroksida u distalni region hema gde se formira hidroperoksidni kompleks. Ovaj reakcioni korak je moguć zahvaljujući prisustvu His₄₂

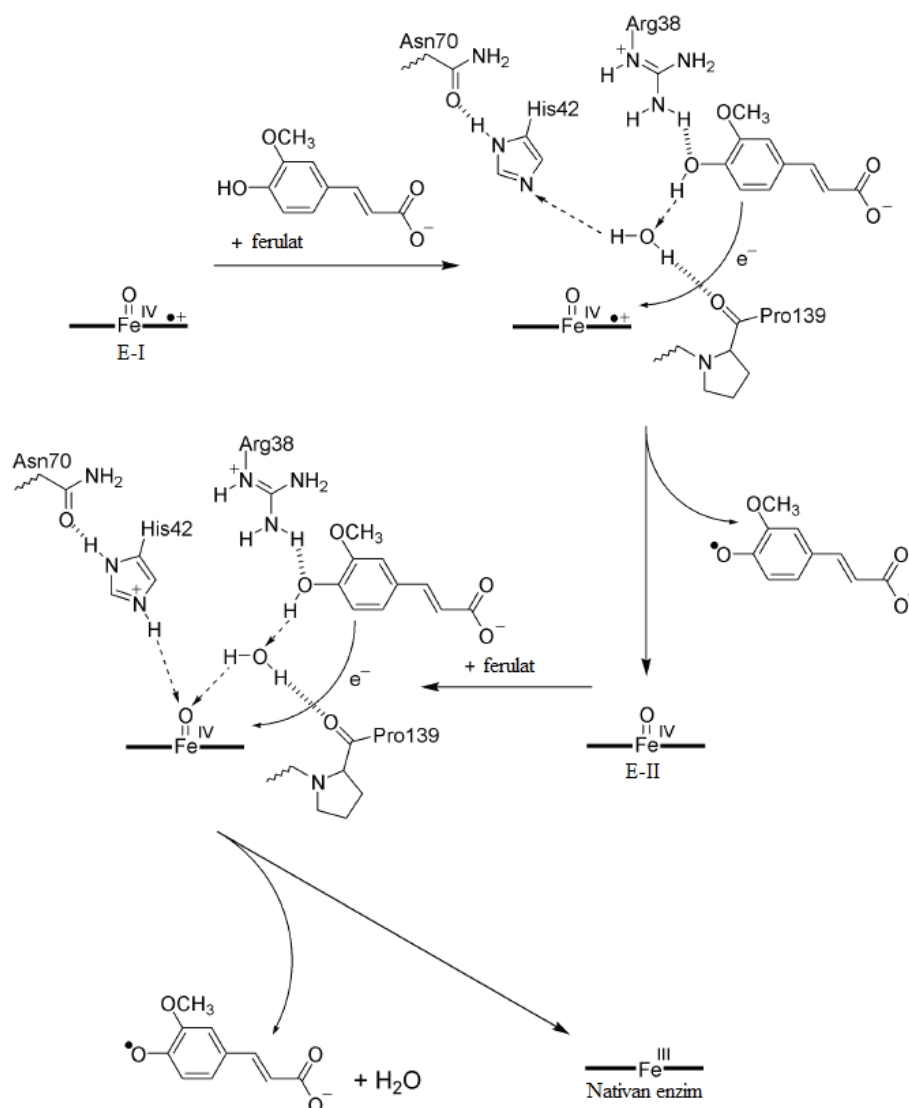
koji oduzima α -H vodonik-peroksida (H_{α} -O $_{\alpha}$ -O $_{\beta}$ -H $_{\beta}$) pri čemu se formira kovalentna veza između O $_{\alpha}$ i gvožđa hema, a novoprotonovani His $_{42}$ ostvaruje vodoničnu vezu sa O $_{\beta}$ hidroperoksidnog kompleksa (šema 2.12.).



Šema 2.12. Formiranje prvog intermedijara u katalitičkom ciklusu HRP-C⁸⁹

Drugi esencijalni aminokiselinski ostatak u formiranju jedinjenja I je Arg $_{38}$. Arg $_{38}$ utiče dvojako na vezivanje vodonik-peroksida; polarni karakter ovog aminokiselinskog ostatka olakšava pristup molekulu vodonik-peroksida hem grupi ili ostvaruje elektrostatičke interakcije sa dolazećim molekulom vodonik-peroksida koje mogu da dovedu do deprotonovanja istog u neutralnom pH.¹¹⁴ Heterolitičko cepanje O $_{\alpha}$ -O $_{\beta}$ veze nastaje transferom jednog elektrona od gvožđa hema i drugog od porfirinskog prstena. Rezultat ove reakcije jeste prvo prelazno jedinjenje E-I. Struktura E-I se najbolje opisuje kao nisko-spinski okso-feril π -katjon radikal. Karakteristika ovog jedinjenja jeste da se nalazi dva oksidaciona ekvivalenta iznad osnovnog stanja (HRP u stanju mirovanja), jedno je ($Fe^{IV}=O$) nisko-spinsko feril gvožđe, a drugo π -katjon radikal. Pored E-I kao proizvod ove reakcije jeste i odlazeći molekul vode koji se formira od zaostalih O $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ i α -H prethodno doniranog His $_{42}$.

E-I jedinjenje nastalo u prvom koraku katalitičkog ciklusa je nestabilno i brzo se transformiše u jedinjenje II, drugi intermedijar u katalitičkom ciklusu deljenjem atoma vodonika (H^+ , e^-) redukujućeg supstrata. Redukcija E-I preko E-II do nativnog enzima se može prikazati na primeru ferulinske kiseline (šema 2.13.).

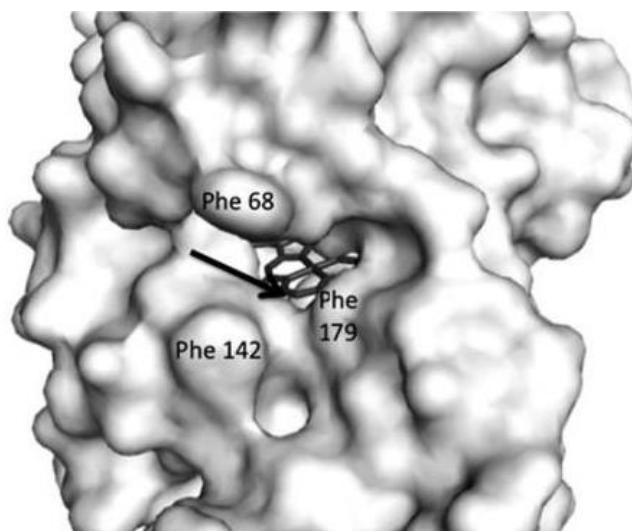


Šema 2.13. Redukcija E-I i E-II ferulinskom kiselinom^{115,116}

Kao što se može videti sa šeme, karbonilna grupa Pro₁₃₉ se ponaša kao akceptor vodonične veze za strukturni molekul vode koji se nalazi u ovom regionu, koji se ponaša kao provodnik za prenos protona od hidroksilne grupe ferulinske kiseline do Nε2 atoma His₄₂. Ovaj proces transfera protona je kuplovan procesom transfera elektrona od ferulata do isturene ivice hema. Pored Pro₁₃₉ i His₄₂ u redukciji E-I učestvuje i Arg₃₈. Ostaci arginina u proteinima često služe kao katjonsko mesto vezivanja negativno naelektrisanih grupa u supstratu ili kofaktoru. U ovom slučaju polarni karakter guanidijum grupe arginina interaguje sa negativnim naelektrisanjem supstrata, pri čemu se ovakvom interakcijom supstrat orijentiše u aktivnom centru pre transfera protona i elektrona. Na taj način polarni karakter arginina olakšava pristup

redukujućem supstratu na svom mestu vezivanja u E–I.¹¹⁶ Vodonična veza formirana je između Arg₃₈ i kiseonika hidroksilne grupe ferulinske kiseline do His₄₂. Kao proizvod ove reakcije oslobađa se radikal ferulinske kiseline (redukujućeg supstrata), molekul vode i drugo intermedijarno jedinjenje E–II. E–II sadrži oksoferil gvožđe (Fe^{IV}=O), dok transferom elektrona sa supstrata na intermedijar nestaje π –katjon radikal. Redukcija E–II se ostvaruje sličnim mehanizmom ali je krajnje odredište protona i elektrona feril–kiseonik koji se redukuje do nativnog oblika enzima. Feril–gvožđe prihvata dva protona, jedan od dolazećeg supstrata a drugi od distalnog histidina His₄₂ kako bi nastao molekul vode koji se oslobađa od gvožđa hema.^{73,116-120}

Vezivanje aromatičnog donora u molekulu HRP–C se dešava u fleksibilnom, rastvoru dostupnom regionu koji omogućava brzu razmenu molekula rastvarača i aromatičnih jedinjenja (slika 2.14.).



Slika 2.14. Dolazni kanal za supstrat HRP–C peroksidaze. Bočni aromatični ostaci oko dolaznog kanala Phe₆₈, Phe₁₇₉, Phe₁₄₂ su označeni. Strelica ukazuje na položaj δ –mezo atoma ugljenika⁷⁷

Utvrđeno je da potrebno rastojanje između HRP–C molekula i aromatičnog donora treba da bude u opsegu 8–11 Å što isključuje mogućnost da se aromatični donor veže za gvožđe hema. Inaktivacijom HRP–C molekula alkil, fenil–hidrazinima i nitroalkanima, utvrđeno je da se oksidacija supstrata dešava na isturenoj ivici hema, regionu koji čine metil grupa C₁₈ atoma hema i δ –mezo protoni C₂₀ hema koji su okrenuti prema dolaznom kanalu za supstrat. Opšte prihvaćena činjenica je da

aromatični supstrati lakše interaguju sa peroksidazom preko isturene ivice hema nego direktno preko feril-kiseonika E-I i E-II. Na isturenoj ivici hema nalaze se tri periferna hidrofobna ostatka fenilalanina Phe₆₈, Phe₁₄₂, Phe₁₇₉ koji čuvaju ulaz i čine hidrofobni region vezivanja aromatičnog supstrata. Dolazni kanal za supstrat pored navedenih okružuju i Leu₁₃₈, Pro₁₃₉, Ala₁₄₀, Pro₁₄₁ i Gly₆₉. Phe₆₈ i Gly₆₉ i nalaze se na vrhu dolaznog kanala obezbeđujući hidrofobni kontakt sa distalnom ravni hema. Aminokiselinski ostaci između Leu₁₃₈ i Pro₁₄₂ formiraju hidrofobni plato na dnu dolaznog kanala za supstrat, dok Leu₁₃₈ i Pro₁₃₉ formiraju hidrofobne zidove, levo i desno od supstrata.^{81,115}

2.4. Primena peroksidaze iz rena

Oblasti primene peroksidaze iz rena su raznovrsne. Peroksidaza oksiduje brojne hromogene supstrate što se detektuje spektrofotometrijskim metodama kao što su fluorescencija i luminiscencija, što otvara mogućnosti primene HRP u različitim procedurama. Priroda oksido/redukcionih reakcija koje katalizuje HRP daje mogućnost primene elektrohemijskih metoda detekcije i razvoj električnih biosenzora. Specifičnost u reakcijama, fleksibilnost prilikom izvođenja eksperimenata, senzitivnost u opsegu detekcije analita i laka dostupnost u visokom stepenu čistoće po prihvatljivoj ceni su karakteristike peroksidaze iz rena zbog čega je ona vodeći enzim kada je u pitanju primena u analitičke svrhe.⁸¹ Oblast analitičke detekcije gde su postignuti izuzetni rezultati peroksidazom iz rena su biosenzori i imunodetekcija.

Biosenzori iz dana u dan postaju neizostavne alatke u medicini, kontroli kvaliteta, ispitivanju i praćenju životne sredine. Biosenzori su analitički uređaji koji čine biološka komponenta i odgovarajući transducer za prevođenje biološkog signala u električni. Prilikom konstruisanja biosenzora, enzimi se imobilisu na površinu transducera adsorpcijom, kovalentnim vezivanjem, obuhvatanjem u gel ili elektrohemijski generisani polimer, u bilipidne membrane ili u rastvoru iza selektivne membrane. Često se enzimi kupuju sa elektrohemijskim i transducerima optičkih vlakana.⁸¹ Za optimalan rad biosenzora najznačajniji je uspešan prenos elektrona, tj. što bolja komunikacija enzima i elektrode. Elektrode modifikovane peroksidazom iz rena za primenu u biosenzorima omogućavaju direktan i prenos elektrona posredstvom medijatora, ali naročitu pažnju privlače zbog mogućnosti primene bez posredstva medijatora.¹²¹ Dobro

je poznata sposobnost HRP–C da redukuje H_2O_2 što je iskorišćeno za konstrukciju HRP– H_2O_2 biosenzora. Ovi biosenzori se koriste u različitim oblastima praćenja životne sredine, konkretno detekciji brojnih zagađivača životne sredine: aromatičnih amina i fenola, cijanida, teških metala, paladijuma.¹²²⁻¹²⁵ Pored životne sredine, HRP–biosenzori su našli veliku primenu i u procesima izbeljivanja u tekstilnoj i industriji papira, u procesima ozonizacije vazduha i vode, kao i u prehrambenoj industriji.^{126,127} Ukoliko se HRP kupluje sa oksidazama producentima H_2O_2 nastaju biosenzori za praćenje i kontrolu supstrata kao što su glukoza, etanol, holesterol i mnogi drugi.¹²⁸⁻¹³⁰ Kovalentnim konjugovanjem proteina, antitela ili drugih molekula sa HRP razvijaju se ultra–senzitivne metode detekcije sa primenom u imunoanalizi, u detekciji aminokiselina, cito– i histohemijskim analizama.¹³¹⁻¹³³

HRP privlači veliku pažnju istraživača zbog mogućnosti primene u raznovrsnim reakcijama organskih sinteza, gde katalizuje brojne potencijalno interesantne reakcije dehidrogenizacije, polimerizacije aromatičnih jedinjenja, oksidacije heteroatoma i epoksidacije, hidroksilacije kao i enzimsko nitrovanje, sulfonovanje i kuplovanje. Na ovaj način, otvara se mogućnost sinteze novih biološki i industrijski aktivnih molekula pod uslovima koji su ekološki prihvatljiviji od uslova koji vladaju u reakcijama klasičnih organskih sinteza.^{134,135}

Prehrambena industrija je još jedna oblast u kojoj je zahaljujući svojoj specifičnosti, HRP našla primenu. Naime, enzimaska modifikacija funkcionalnih svojstava proteina hrane je interesantna zbog blagih reakcionih uslova, ne nastaju toksični proizvodi što daje potvrdu nastanka sigurnog finalnog prizvoda. Jedan od primera primene HRP u ovu svrhu jeste umrežavanje kazeina oksidativnim fenolnim kuplovanjem ostataka tirozina u prisustvu H_2O_2 , pri čemu nastaju umreženi proteini.^{136,137}

Sposobnost HRP da katalizuje reakcije polimerizacije slobodnih radikala je primenjena u uklanjanju brojnih aromatičnih jedinjenja, zagađivača životne sredine. U ovoj oblasti se pokazala kao izuzetan biokatalizator zbog uklanjanja sintetičkih boja, fenola, farmaceutika u visokom procentu pod blagim reakcionim uslovima.¹³⁸⁻¹⁴²

3. ENZIMSKA KINETIKA

Enzimi katalizuju konverziju različitih molekula, supstrata u proizvode reakcije, a reakcioni ciklus napuštaju nepromenjeni. Kao biokatalizatori izuzetno su efikasni, ubrzavaju reakcije u biološkim sistemima do 10^6 puta, strogo su specifični što umanjuje verovatnoću za nastanak sporednih proizvoda i u većini slučajeva su regulisani različitim pozitivnim i negativnim "feedback" sistemima, što olakšava praćenje brzine reakcije. Promenu brzine enzimski katalizovane reakcije i faktore (koncentracija enzima, koncentracija supstrata, pH, temperatura, aktivatori, inhibitori) koji utiču na promenu brzine izučava grana enzimologije, enzimska kinetika. Enzimskom kinetikom utvrđuju se mehanizmi enzimski katalizovane reakcije, afinitet supstrata i proizvoda reakcije prema enzimu.^{143,144}

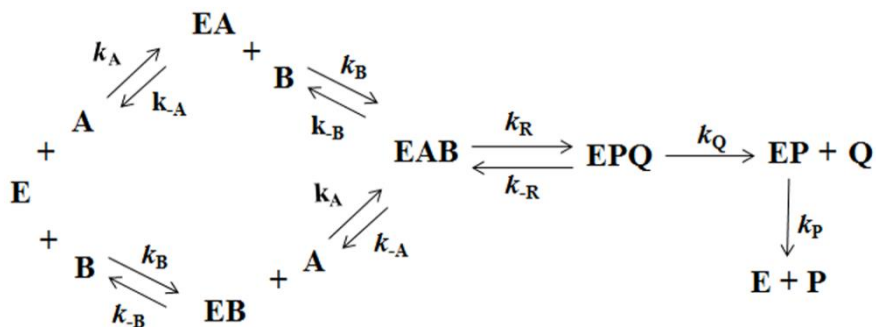
Većina enzimski katalizovanih reakcija uključuje dva ili tri supstrata i proizvoda.¹⁴⁵ U slučaju monosupstratnih reakcija, na početku reakcije u reakcionoj smeši nalaze se enzim i supstrat, koji formiraju enzim–supstrat kompleks, koji se dalje razlaže na enzim i proizvod reakcije. U reakcijama gde postoji više supstrata, npr. dva, mehanizam se znatno usložnjava. Dvosupstratne reakcije se mogu podeliti u dve osnovne grupe:

- Sekvencijalne – nasumične i pravilne,
- Ping pong reakcije.

3.1. Kinetika sekvencijalnih reakcija sa nasumičnim vezivanjem supstrata

Sekvencijalni mehanizam sa nasumičnim vezivanjem supstrata podrazumeva da se supstrat A ili B mogu vezati za enzim bez ikakvog redosleda (slika 3.1.). Ukoliko se prvo veže supstrat A, nastaje EA kompleks, pri čemu dolazi do konformacionih promena u molekulu enzima, koje omogućavaju vezivanje supstrata B i formiranje EAB, tercijarnog kompleksa. Formirani EAB kompleks se dalje transformiše do EPQ kompleksa, čijom disocijacijom nastaju proizvodi reakcije. Da li će se prvo vezati supstrat A ili supstrat B za enzim, zavisi pre svega od vrednosti konstante K_m . Tako, ukoliko supstrat A ima nižu vrednost konstante K_m nego supstrat B, supstrat A će se prvo vezati za enzim i obrnuto.

Sekvencijalni mehanizam sa nasumičnim vezivanjem supstrata može da se prikaže na sledeći način:



Slika 3.1. Nasumičan sekvencijalni mehanizam

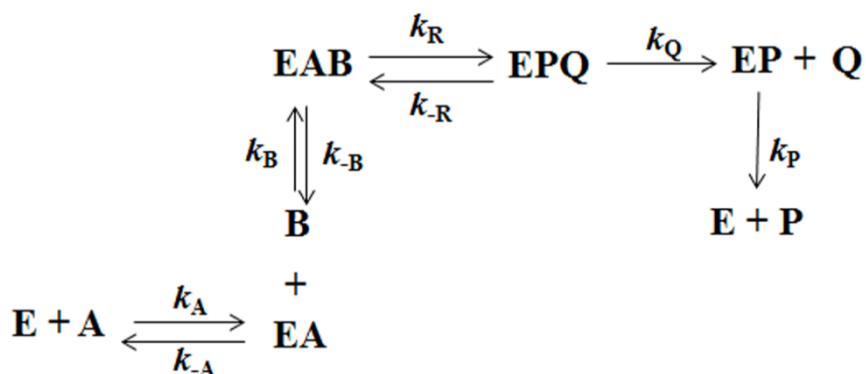
Za sekvencijalni mehanizam je karakteristično da se još zove i mehanizam *tercijarnog kompleksa*. Izraz za brzinu reakcije u ovom slučaju se može prikazati na sledeći način:

$$v = \frac{V_{max}[A][B]}{K_A K_B + K_B [B] + K_A [A] + [A][B]} \quad (5)$$

gde su K_A i K_B konstante disocijacije supstrata A i B, V_m maksimalna brzina reakcije¹⁴⁶⁻¹⁴⁸

3.2. Kinetika sekvencijalnih reakcija sa pravilnim vezivanjem supstrata

Kod sekvencijalnog mehanizma sa pravilnim vezivanjem supstrata, situacija je obrnuta (slika 3.2.). U ovom slučaju, vezivanje jednog supstrata, uslovljava vezivanje drugog. Postoji tačno definisan redosled, jer vezivanje prvog supstrata omogućava vezivanje drugog.

Slika 3.2. Sekvencijalni mehanizam sa pravilnim vezivanjem supstrata¹⁴⁶⁻¹⁴⁸

Kako postoji tačno definisan redosled vezivanja supstrata, tako postoji i definisan redosled oslobađanja proizvoda reakcije. Izraz za brzinu reakcije u tom slučaju je:

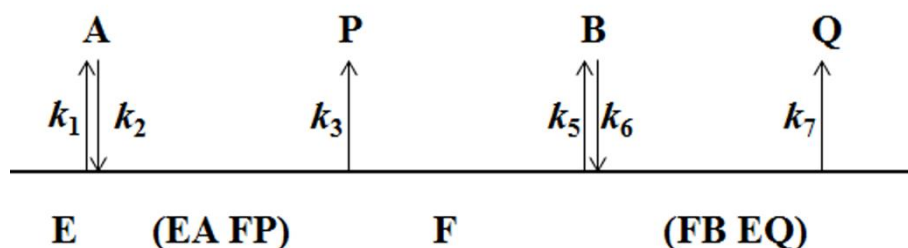
$$v = \frac{V_{max}[A][B]}{K_A K_B K_R + K_B K_R [A] + K_R [A][B]} \quad (6)$$

gde uz pretpostavku da su svi ES kompleksi u ravnoteži:

$$K_A = \frac{k_{-A}}{k_A}, K_B = \frac{k_{-B}}{k_B}, K_R = \frac{k_{-R}}{k_R}.$$

3.3. Kinetika reakcija po ping pong bi-bi mehanizmu

Reakcije u kojima se jedan ili više proizvoda reakcije oslobađa pre vezivanja svih supstrata naziva se ping pong reakcija (slika 3.3.). U tom slučaju dolazi do promene enzimskog oblika tako da je ovaj mehanizam karakterističan po formiranju intermedijarnog oblika enzima nakon izdvajanja prvog proizvoda u kome on ima nešto drugačiju strukturu.



Slika 3.3. Šematski prikaz Ping Pong mehanizma

Kada se reakcioni mehanizam sastoji od dva supstrata i formiraju se dva proizvoda, kao što je slučaj na slici 3.3. to se naziva *ping pong bi-bi* mehanizam. Ukoliko se od jednog supstrata formiraju dva proizvoda, takav reakcioni mehanizam se naziva *ping pong uni-bi* mehanizam. Jednačina za brzinu reakcije, ukoliko se pretpostavi stacionarno stanje za oba prelazna kompleksa, može da se prikaže na sledeći način:

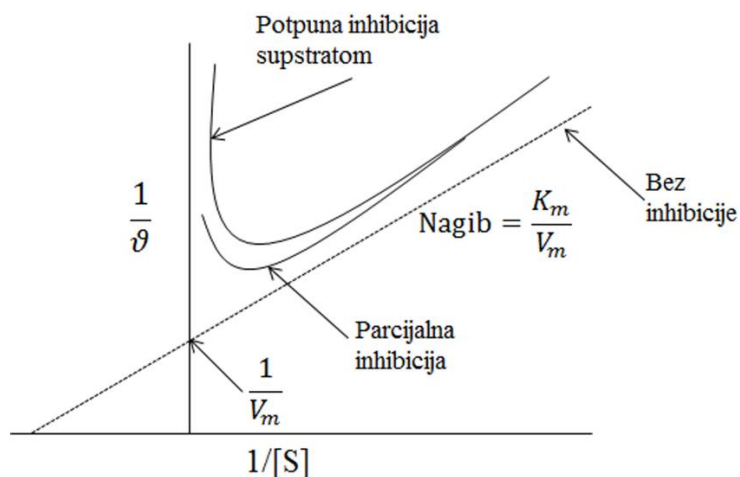
$$v = \frac{V_{max}[A][B]}{K_{mb}[A] + K_{ma}[B] + [A][B]} \quad (7)$$

gde je K_{ma} koncentracija supstrata A pri kojoj se dostiže polovina maksimalne brzine reakcije, pri koncentraciji zasićenja supstrata B. Analogno K_{mb} je koncentracija supstrata B pri kojoj se dostiže polovina maksimalne brzine reakcije, pri koncentraciji zasićenja supstrata A.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸

3.4. Inhibicija supstratom u višku u bisupstratnim reakcijama

Ukoliko zavisnost brzine enzimski katalizovane reakcije od koncentracije supstrata ne prati karakterističan oblik hiperbole kao što je to slučaj kod reakcija bez inhibicije, već dostizanjem maksimalne brzine reakcije, daljim povećanjem koncentracije supstrata [S] nastaje nagli pad brzine reakcije, onda je to slučaj inhibicije supstratom u višku (slika 3.4.).

Pri visokim koncentracijama supstrata [S] formira se neaktivni kompleks $E \cdot S \cdot S$, što dovodi do smanjenja brzine reakcije. Razlozi za formiranje neaktivnog kompleksa su ti što supstrat A može da se veže za aktivno mesto enzima, tako da onemogućuje vezivanje drugog supstrata (Slika 3.4. a) i tako inaktivira enzim, ili da se za aktivno mesto enzima vežu dva molekula supstrata A i tako inaktiviraju enzim (slika 3.4. b).



Slika 3.5. Lajnviver–Berkovi dijagrami za inhibiciju supstratom i za slučaj bez inhibicije^{149,150}

Kada je u pitanju obezbojavanje sintetičkih boja peroksidazom iz rena u literaturi postoji mali broj radova koji opisuju kinetiku pomenute reakcije. U reakciji obezbojavanja sintetičkih boja, jedan supstrat je boja, dok je drugi supstrat vodonik–peroksid. Na osnovu eksperimentalnih podataka, potvrđeno je najbolje slaganje sa ping pong bi–bi mehanizmom. U tabeli 3.6. prikazane su jednačine koje opisuju pomenute mehanizme.¹⁴⁷⁻¹⁵⁰

Tabela 3.6. Kinetički modeli ping pong bi–bi mehanizma bez inhibicije, sa inhibicijom bojom/peroksidom

Ping pong mehanizam, inhibicija peroksidom, H_2O_2	$v_0 = \frac{V_{max}[H_2O_2]_0[D]_0}{K_{mD}[H_2O_2]_0 \left(1 + \frac{[H_2O_2]_0}{K_{i,H_2O_2}}\right) + K_{m,H_2O_2}[D]_0 + [H_2O_2]_0[D]_0} \quad (9)$
Ping pong mehanizam, inhibicija bojom, D	$v_0 = \frac{V_{max}[H_2O_2]_0[D]_0}{K_{mD}[H_2O_2]_0 + K_{m,H_2O_2}[D]_0 \left(1 + \frac{[D]_0}{K_{iD}}\right) + [H_2O_2]_0[D]_0} \quad (10)$
Ping pong mehanizam bez inhibicije	$v_0 = \frac{V_{max}[H_2O_2]_0[D]_0}{K_{mD}[H_2O_2]_0 + K_{m,H_2O_2}[D]_0 + [H_2O_2]_0[D]_0} \quad (11)$

gde je v_0 – početna brzina reakcije, V_{max} – maksimalna brzina, $[H_2O_2]_0$, $[D]_0$ – početne koncentracije boje i peroksida, K_{mD} , K_{m,H_2O_2} – Mihaelisove konstante za boju i peroksid, K_{i,H_2O_2} , K_{iD} – konstante inhibicije za peroksid i boju.

4. IMOBILIZACIJA ENZIMA

4.1. Definicija, pojam, značaj

Reakcije katalizovane enzimima odigravaju se u blagim reakcionim uslovima (pH, temperatura) pri čemu ne nastaju sporedni proizvodi pa se primenjuju u brojnim granama industrije kao: kozmetička, industriji papira, farmaceutska, tekstilna, prehrambena, industrija detergenata.¹⁵¹ Enzimi katalizuju reakcije u ekološki prihvatljivim rastvaračima (najčešće voda), biodegradabilni su, aktivni, hemo-, regio- i stereoselektivni.¹⁵² Enzimi kao biokatalizatori su veoma nestabilni, često inhibirani supstratima ili proizvodima reakcije što dodatno umanjuje njihovu primenu u agresivnim reakcionim uslovima koji vladaju u industrijskim procesima.¹⁵³ Pored toga, biotehnološka proizvodnja enzima je izuzetno skupa, pa njihova primena u slobodnom obliku u velikom broju slučajeva nije ekonomski opravdana.

Primena enzima na industrijskom nivou podrazumeva: odabir enzima određenih svojstava, unapređenje svojstava enzima tehnikama molekularne biologije, imobilizacije i primenu post-imobilizacionih tehnika.¹⁵³ Industrijska primena enzima zahteva, stabilnost enzima u cilju primene istog katalizatora u više uzastupnih ciklusa posmatrane reakcije i rezistentnost enzima na agresivne reakcione uslove. Ova ograničenja za primenu enzima u industrijskim procesima se prevazilaze imobilizacijom enzima.¹⁵¹ Pod pojmom imobilisan enzim podrazumeva se katalitički aktivan enzim fizički zadržan ili lokalizovan u određenom delu prostora, koji je moguće primeniti više puta i kontinualno u željenoj reakciji.¹⁴³ Prvi put imobilisan enzim je primenjen 1916. godine. Danas, sinergističkim dejstvom biotehnologije i nanotehnologije razvijene su brojne reverzibilne i ireverzibilne tehnike imobilizacije enzima.¹⁵¹

Postoje brojni razlozi zbog kojih se imobilisani enzimi primenjuju više od slobodnih. Prvi razlog je mogućnost primene istog biokatalizatora više puta u željenoj reakciji. Tako, kroz mogućnost ponovne upotrebe povećava se produktivnost primenjenog biokatalizatora. Primenom imobilisanog biokatalizatora olakšava se kontrola procesa što se ogleda u lakšoj manipulaciji i izdvajanju biokatalizatora iz reakcione smeše. Samim tim smanjena je na minimum ili sprečena mogućnost kontaminacije proizvoda, što je od izuzetnog značaja pre svega u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Imobilizacijom, enzimi postaju tolerantniji na agresivne

reakcione uslove, pH, temperaturu, organske rastvarače, kontaminaciju, nečistoće, a izdvajanjem biokatalizatora iz reakcione smeše moguće je zaustaviti reakciju u željenom trenutku. Dakle imobilizacijom se povećavaju operativna, skladištena stabilnost i olakšava se kontrola procesa. Takođe, primenom imobilisanih biokatalizatora multienzimski kaskadni procesi postaju mogući za realizaciju što nije slučaj sa procesima katalizovanim slobodnim enzimima.^{151,154}

Očuvanje katalitički aktivne tercijarne strukture enzima prilikom imobilizacije je preduslov za dobijanje imobilisanog biokatalizatora maksimalne stabilnosti i aktivnosti. Da bi se ovaj preduslov ispunio potrebno je obratiti pažnju na izbor nosača za imobilizaciju, uslova i tehnike imobilizacije.¹⁵¹

4.2. Nosači za imobilizaciju enzima

Izbor nosača za imobilizaciju predstavlja jedan od limitirajućih faktora koji definišu performanse dobijenog imobilisanog biokatalizatora. Iako ne postoji univerzalni nosač za imobilizaciju enzima, postoje određeni zahtevi koje izabrani materijal mora da ispuni da bi se mogao upotrebiti kao nosač za imobilizaciju enzima:

- Mora biti ekološki prihvatljiv i relativno jeftin da bi proces bio ekonomski opravdan,
- Potrebna je velika specifična površina, jasno definisane dimenzije čestica da bi mogla da se veže velika masa biokatalizatora po jedinici mase nosača,
- Mora da obezbedi biokatalizatoru mikrookolinu koja će unaprediti svojstva imobilisanog biokatalizatora, uz izostanak hidrofobnosti koja favorizuje neželjene adsorpcije proteina i denaturacije,
- Potrebno je da poseduje veliki broj funkcionalnih grupa raspoređenih na površini tako da su sterne smetnje među njima minimalne,
- Nakon imobilizacije, mora biti potpuno inertan u operativnim uslovima enzima da bi se izbegle neželjene interakcije nosača sa supstratima/proizvodima reakcije,
- Mikrobna rezistencija je izuzetno bitna naročito u slučaju komercijalnih enzima,
- Termalna i mehanička rezistentnost je od izuzetne važnosti, zbog mogućnosti primene imobilisanog biokatalizatora u različitim operativnim uslovima.

Takođe, značajna je rezistentnost na abraziju i pritisak u kontinualnim, protočnim reaktorima.

- Bitno je da postoji mogućnost regeneracije,
- Smetnje zbog nespecifičnih protein/nosač interakcija je potrebno minimizovati, izuzev u specifičnim slučajevima ciljane multifunkcionalne imobilizacije,
- Mora da bude stabilan, da pri promenama npr. pH ne bi došlo da narušavanja stabilnosti što je karakteristično za neorganske nosača.^{143,151,154}

Generalno, nosači za imobilizaciju se mogu podeliti na: prirodne, sintetičke polimere i neorganske nosače za imobilizaciju. Prirodni polimeri koji se koriste za imobilizaciju su: alginati, hitozan i hitin, kolagen, karagenan, želatin, celuloza, škrob. Sintetički polimeri najčešće primenjeni za imobilizaciju enzima su: dietilaminoetil celuloza (DEAE), polivinil-hlorid (PVC), polietilen-glikol (PEG). Od neorganskih materijala najčešće se za imobilizaciju enzima primenjuju: zeoliti, keramika, celit, silika, staklo, aktivni ugalj, ugalj.¹⁵⁵

Kaolin kao nosač za imobilizaciju enzima

U okviru ove doktorske disertacije kao nosač za imobilizaciju peroksidaze iz rena upotrebljen je kaolin. Kaolin pripada grupi neorganskih nosača, široko je rasprostranjen u prirodi što ga čini lako dostupnim materijalom. Zahvaljujući svojim fizičko-hemijskim karakteristikama, kaolin je i industrijski značajan mineral. Molekulska formula kaolina je $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Teorijski, kaolin se sastoji od 46,55 wt % SiO_2 39,46 Al_2O_3 i ostale nečistoće čine 13,96 wt %. U praksi je vrlo teško naći čist kaolin (odnos $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ je 1,18) uglavnom su tu brojne primese u vidu nečistoća koje mogu biti površinski ili strukturno prisutne. Osnovna fizička svojstva kaolina su: belina, glatkost, hemijska inertnost u širokom opsegu pH, niska provodljivost toplote i električne energije i nemogućnost bubrenja.

Osnovna gradivna jedinica kaolina je tetraedalni list silicijum-dioksida (SiO_2) i oktaedralni list aluminijum-hidroksida ($\text{Al}(\text{OH}_3)$) koji su međusobno povezani preko zajedničkog atoma kiseonika. Listovi su postavljeni jedan blizu drugog pa su vodonične veze između listova izuzetno jake. Klasifikuje se kao 1:1 oktaedralni kaolin jer su dve trećine praznih mesta u oktaedralnom listu popunjene. Slaganje listova kaolina je

kontrolisano odbijanjem jako naelektrisanih katjona Si i Al koji teže da izbegnu superpozicioniranje. Fizičko–hemijska svojstva kaolina su prikazana u tabeli 4.1.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸

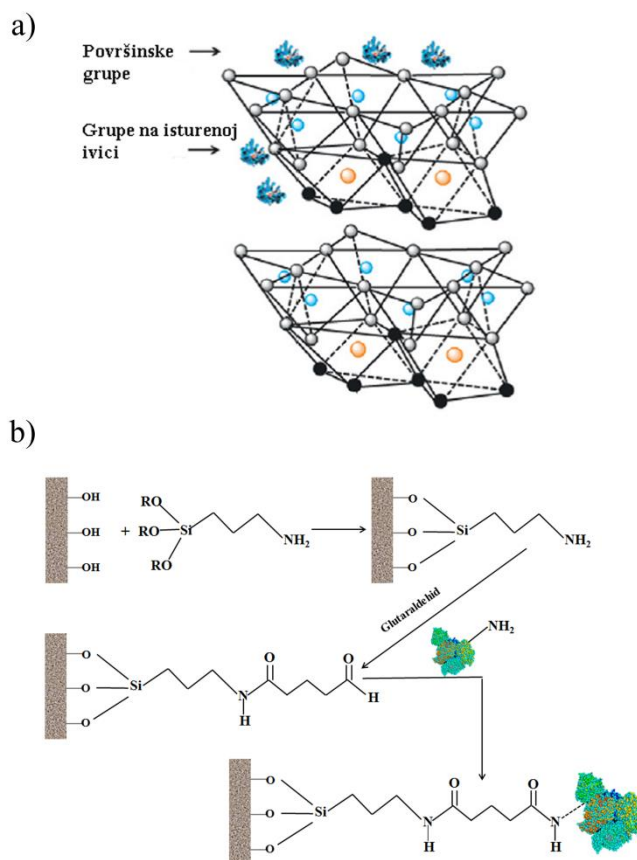
Tabela 4.1. Fizičko-hemijska svojstva kaolina¹⁵⁶

<u>Parametar</u>	<u>Kaolin</u>
pH vrednost	6,8–7,3
Oblik čestica	Pseudoheksagonalne kristalne ploče
Veličina čestica	60 wt %–90 wt % > 2 μm
Prirodna boja	Bela, sivobela
Tvrdoća	2–2,5
Relativna gustina	2,67
Tačka topljenja (° C)	1850
Specifična površina (m ² /g)	10–18

Kaolin je privukao veliku pažnju istraživača u oblasti imobilizacije enzima, zahvaljujući pojedinim fizičko/hemijskim karakteristikama koje ovaj nosač izdvajaju od drugih nosača. Prvo je to da je kaolin široko rasprostranjen u prirodi što je od izuzetnog značaja zbog lake dostupnosti nosača. Potom, kaolin je dvodimenzionalne lisnate strukture nanometarskih veličina što ovakvim nosačima daje karakteristične velike specifične površine, izuzetni su jono-izmenjivači kod kojih ne postoji mogućnost bubrenja. Velika specifična površina ovog minerala potiče od –Si–O–Si–, –Si–O–OH– i Al–OH funkcionalnih grupa.

Vezivanje enzima za kaolin postiže se različitim fizičkim (van der Waals-ove interakcije, hidrofobno vezivanje, elektrostatičko privlačenje, vodonične veze) i hemijskim (kovalentno vezivanje) interakcijama. U gusto pakovanje između listova kaolina gotovo je nemoguće ubaciti bilo kakav molekul zbog jakih vodoničnih veza koji povezuju listove u strukturi. Tako, glavni mehanizmi vezivanja enzima na kaolin su

hidrofobne interakcije i elektrostatičko privlačenje na spoljašnjim kristalnim strukturama i ivicama kaolina (slika 4.2. a).



Slika 4.2. Imobilizacija enzima na kaolin mehanizmom a) fizičkog vezivanja, b) hemijskog vezivanja¹⁵⁷

Hidrofobne $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ grupe na tetraedralnim $\text{Si}-\text{O}$ listovima doprinose hidrofobnim interakcijama ovih delova strukture nosača i hidrofobnih delova u molekulu enzima. $-\text{OH}$ grupe na isturenim ivicama tetraedralnih i oktaedralnih listova interaguju sa molekulima enzima preko vodoničnih veza. Pored toga, postoji širok spektar mogućnosti modifikacija organskim, biološkim molekulima i polimerima zahvaljujući funkcionalnim grupama koje postoje u strukturi kaolina.

Modifikacijom kaolina, uvode se dodatne funkcionalne grupe u strukturu, povećava se hidrofobnost, broj mesta za vezivanje molekula i smanjuju se sterne smetnje. Dodatna prednost primene kaolina kao nosača za imobilizaciju jeste sprečavanje kontaminacije enzima mikroorganizmima zahvaljujući slojevitoj

strukturi.¹⁵⁷ U poslednjih nekoliko decenija kaolin se uspešno koristi kao nosač za imobilizaciju enzima sa ciljem primene u biosenzorima, kliničkim ispitivanjima i zaštiti životne sredine.^{157,159}

Kovalentno vezivanje enzima za kaolin moguće je nakon određenih modifikacija (slika 4.2. b). Postoji mali broj primera u literaturi gde se kovalentna veza ostvaruje između funkcionalnih grupa nosača i enzima i enzima i specifičnih delova u strukturi nosača bez prethodnog tretmana.^{160,161} U većini slučajeva kovalentna veza se ostvaruje prethodnim tretmanom površine molekulima kao što su silani (3-aminopropil, 3-etoksisilan, APTES).¹⁵⁸ U literaturi postoje brojni podaci imobilizacije lipaza iz različitih izvora, peroksidaze iz rena kao i beta-glukozidaze mehanizmom adsorpcije ali i kovalentnim vezivanjem na kaolin.^{159,162,163}

4.3. Tehnike imobilizacije enzima

Tehnike imobilizacije enzima se mogu podeliti na sledeći način:¹⁶⁴

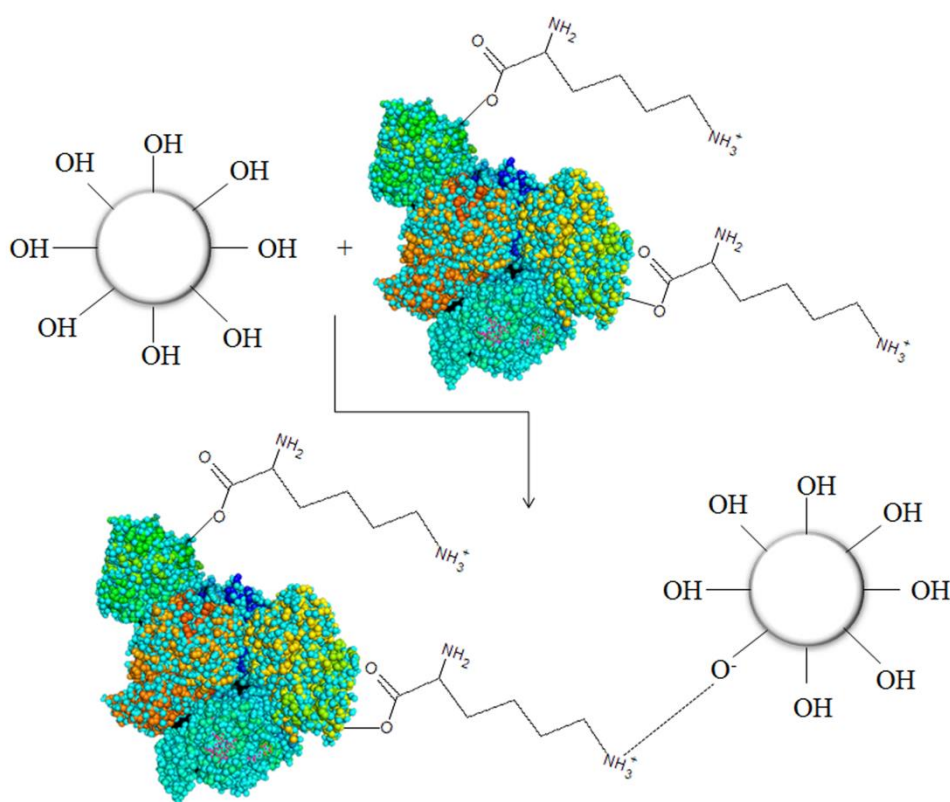
- 1) Vezivanje za nosač
 - Adsorpcija,
 - Kovalentno vezivanje,
 - Jonsko vezivanje.
- 2) Obuhvatanje enzima nosačem,
 - Mikroinkapsulacija,
 - Okluzija unutar gela,
 - Umrežavanje.

4.3.1. Imobilizacija enzima vezivanjem za nosač

Tehnika imobilizacije enzima vezivanjem za nosač je najstarija tehnika imobilizacije enzima. Kod ove metode imobilizacije, masa enzima vezanog za nosač i aktivnost dobijenog imobilisanog preparata prvenstveno zavisi od izbora nosača. Izbor nosača za imobilizaciju zavisi od hemijske strukture enzima, veličine supstrata, površine nosača, hemijskog sastava i udela hidrofobnih/hidrofilnih grupa u strukturi nosača.¹⁶⁴

Imobilizacija enzima adsorpcijom

Adsorpcija je najstarija i najjednostavnija metoda imobilizacije enzima. Enzim se fizički učvrsti na nosač posredstvom nespecifičnih interakcija kao što su hidrofobne interakcije, vodonične veze i Van der Waals-ove interakcije. Pored toga, fizička veza između nosača i enzima može da se ostvari i jonskim interakcijama između naelektrisanih grupa na površini nosača i enzima. Adsorpcija može da se izvede na nekoliko načina. Prvi način podrazumeva kontakt nosača i rastvora enzima koji se inkubira određeno vreme bez mešanja. Adsorpcija se odvija inkubacijom nosača u rastvoru enzima uz mešanje. Treći način je smeštanje elektrode u kupatilo enzima gde puštanjem struje, pod dejstvom električnog polja molekuli enzima se kreću ka i raspoređuju na površini elektrode.



Slika 4.3. Šematski prikaz adsorpcije HRP na kaolin

Adsorpcijom ne dolazi do narušavanja strukture aktivnog centra enzima i ne nastaju konformacione promene u strukturi enzima. Postupak adsorpcije enzima je jednostavan što ovoj metodi daje prednost u odnosu na druge metode imobilizacije. Komercijalni

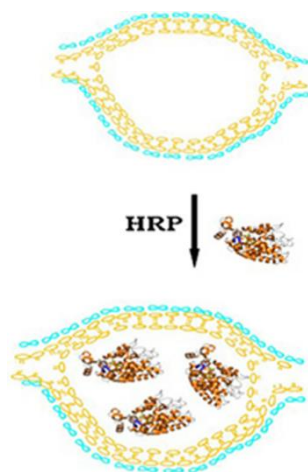
potencijal adsorpcije kao tehnike imobilizacije se pored jednostavnosti, ogleda i u niskoj ceni postupka, ne postoji potreba za agresivnim hemikalijama tako da enzim ne gubi ili vrlo malo izgubi aktivnosti u toku imobilizacije. Slabe veze između nosača i enzima olakšavaju regeneraciju i nosača i enzima. Desorpcija enzima sa površine nosača se lako postiže pravilnim izborom uslova sredine: pH, temperatura, jonska jačina rastvora, vreme, polarnost rastvarača i koncentracija supstrata. Ponekad nije moguće izvršiti potpunu a ni delimičnu desorpciju jer je u toku adsorpcije došlo do izvesnih nepredviđenih ireverzibilnih interakcija ili nisu pronađeni uslovi da bi se molekul desorbovao. Međutim, laka regeneracija znači i da se enzim lako desorbuje sa nosača što može da dovede do kontaminacije proizvoda što je pored nespecifične adsorpcije nedostatak ove tehnike imobilizacije.^{143,165,166}

Kovalentna imobilizacija enzima

Uspostavljanje veze između aktiviranih grupa nosača i snažnih nukleofilnih grupa aminokiselinskih ostataka enzima predstavlja kovalentnu imobilizaciju enzima.¹⁵³ Aminokiseline u molekulu enzima, lizin ($\epsilon\text{-NH}_2$), cistein (-SH), asparaginska i glutaminska kiselina (-COOH), fenolni prsten tirozina, serin i treonin (-OH), histidin (imidazolna) i triptofan (indolna) su nosioci grupa koje učestvuju u kovalentnom vezivanju za nosač. Kovalentna imobilizacija je jedna od najčešće primenjivanih ireverzibilnih metoda imobilizacije.^{153,166} Kovalentno imobilisan biokatalizator je ono čemu se teži kada su industrijski procesi u pitanju zbog: operativne stabilnosti enzima (minimalna je šansa za spiranje enzima sa nosača), unapređenih svojstava u pogledu tolerancije na promenu pH, temperature, organske rastvarače i skladištene stabilnosti. Glavni nedostaci ove metode imobilizacije su: gubitak aktivnosti, narušavanje 3-D strukture enzima, a često je aktivni centar enzima orijentisan tako da ne postoji dobra komunikacija enzima i supstrata. Iako se između enzima i supstrata ostvaruje čvrsta veza što se navodi kao prednost, iz ovoga proizilazi još jedan nedostatak, a to je nemogućnost regeneracije nosača.^{154,166} Kovalentna imobilizacija zahteva aktivaciju nosača različitim agresivnim reagensima i u krajnjem slučaju enzima.¹⁶⁷

4.3.2. Obuhvatanje enzima nosačem

Obuhvatanje enzima nosačem (slika 4.4.) je još jedna tehnika imobilizacije enzima koja se smatra ireverzibilnom. U ovoj tehnici enzim se imobilizuje obuhvatanjem u odgovarajuće nosače, mrežaste strukture vlakana ili polimernih membrana. Pravilnim izborom materijala i njegovom modifikacijom može se napraviti idealna mikrookolina (pH, polarnost, amfifilnost) za enzim koji se imobilizuje. Najjednostavniji način obuhvatanja enzima je geliranje polikatjonskih/polianjonskih polimera dodatkom ceter jona.



Slika 4.4. Imobilizacija HRP obuhvatanjem u fosfolipidne matrice¹⁶⁸

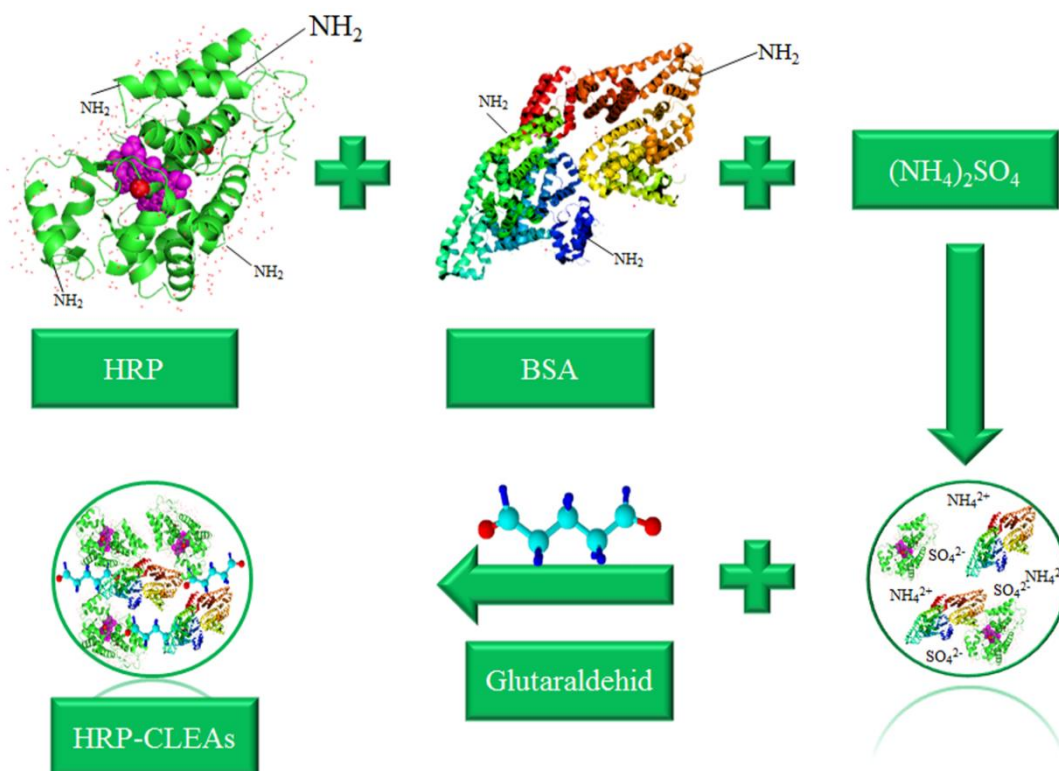
Kao materijal za imobilizaciju najviše se koristi alginat zbog blagih gelirajućih svojstava i netoksičnosti. Glavni nedostaci ove tehnike imobilizacije su mogućnost difuzionih limitacija, spiranje enzima ukoliko su pore na površini matriksa suviše velike, denaturacija u toku imobilizacije, mali kapacitet vezivanja i oštećenje matriksa tokom upotrebe.^{166,168}

4.3.3. Umrežavanje enzima

Poslednjih decenija pažnju istraživača privlači nova tehnika imobilizacije enzima, bez primene nosača. Imobilizacijom enzima primenom nosača, dobijeni biokatalizator sadrži 90–99 % nekatalitički aktivne mase, dok imobilizacijom enzima bez nosača nekada je i celokupna masa biokatalizatora (100 %) katalitički aktivna. Tehnika imobilizacije enzima, bez nosača pojavljuje se prvi put 1990–tih kada je umrežavanjem enzima bifunkcionalnim reagensima dobijen imobilisani biokatalizator u obliku umreženih enzimskih kristala (*na engleskom cross-linked enzyme crystals, CLECs*). Povećana rezistentnost na denaturaciju organskim rastvaračima, pH, toplotom, operativna i skladištena stabilnost, laka kontrola veličine čestica imobilisanog biokatalizatora kuplovana sa velikom aktivnosti, reproduktivnosti i jednostavnom ponovnom upotrebom, činilo je ove imobilisane biokatalizatore idealnim za primenu u industriji. Međutim, za dobijanje umreženih enzimskih kristala potrebni su visoko prečišćeni enzimski preparati, kristalizacija u procesu dobijanja, što je činilo celokupan proces komplikovanim i skupim. Kao rešenje za ovaj problem, razvijena je nova tehnika

imobilizacije enzima u obliku umreženih enzimskih agregata (*na engleskom cross-linked enzyme aggregates, CLEAs*).

Postupak dobijanja umreženih agregata sastoji se iz dva koraka: taloženje i umrežavanje istaloženih proteina. Dodatkom soli, organskih rastvarača i nejonskih polimera u rastvor proteina dolazi do formiranja fizičkih agregata, u kojima se proteini međusobno drže nekovalentnim vezama, a terciarna struktura je nenarušena. Nastali agregati su fizički nestabilni i lako se rastvaraju dodatkom vode. Kada $-NH_2$ grupe enzima iz agregata stupe u kontakt sa aldehidnim grupama umrežavajućeg reagensa, nastaju nerastvorni umreženi enzimski agregati. U pripremi umreženih agregata enzima često se koriste i neprečišćeni enzimi, jer je prvi korak u pripremi taloženje koje predstavlja i korak u prečišćavanju proteina.



Slika 4.5. Dobijanje umreženih enzimskih agregata peroksidaze iz rena

Za dobijanje biokatalizatora velike aktivnosti metodom umreženih enzimskih agregata potrebno je izabrati sredstvo za taloženje, vrstu i koncentraciju umrežavajućeg

reagensa kao limitirajuće faktore. Kao sredstva za taloženje uglavnom se koriste organski rastvarači (acetone, izopropanol), soli (amonijum–sulfat) i polimeri (polietilen–glikol, PEG). Prilikom taloženja može doći do gubitka aktivnosti enzima što se uspešno prevazilazi dodatkom polisaharida u koraku taloženja.¹⁶⁹

Izbor i koncentracija umrežavajućeg reagensa je drugi limitirajući faktor kada je u pitanju priprema umreženih enzimskih agregata. Prvobitno, glutaraldehid (GA) se koristio kao umrežavajući reagens. GA je bifunkcionalni umrežavajući reagens koji je našao veliku primenu zbog lake dostupnosti, niske cene, velike efikasnosti (reaguje sa većinom enzima). Umrežavanje se postiže interakcijom slobodnih $-NH_2$ grupa lizina i oligomera i polimera nastalih aldolnom kondenzacijom GA. Tačan postupak umrežavanja i ponašanja GA u rastvoru zavisi od pH reakcione smeše.

Koncentracija GA u velikoj meri utiče na stepen umrežavanja. Ukoliko ima nedovoljno GA, neće doći do formiranja agregata ili će se enzimi labavo vezati, tako da u toku primene dobijenog biokatalizatora može lako doći do spiranja i enzima i GA. Ukoliko pak ima prevše GA, dolazi do višestepenog umrežavanja koje narušava fleksibilnost i aktivnost enzima. Koncentracija umrežavajućeg reagensa je bitna i sa aspekta veličine čestica nastalih umreženih agregata. Do sada je potvrđeno da je veličina čestica umreženih enzimskih agregata oko 10 μm .¹⁷⁰ Izdvajanje umreženih agregata iz reakcione smeše se postiže centrifugiranjem ili filtriranjem, gde ova veličina čestica može da napravi dodatne probleme naročito ako je veličina supstrata približna kao veličina čestica. Prilikom centrifugiranja ili filtriranja često dolazi do nastanka amorfnih klastera što dovodi do: difuzionih limitacija (veći klasteri-agregacija, slepljivanje), smanjenja katalitičke aktivnosti, dok je problem sa manjim klasterima, teško izdvajanje.¹⁷¹ Za kontinualne procese, potrebne su veće čestice kako bi se smanjio pad pritiska kroz kolonu, pa se kao jedno od rešenja primenilo obuhvatanje umreženih čestica polivinilalkoholom za dobijanje većih čestica koje mogu da se primene u reaktoru sa pakovanim slojem.¹⁷² U fluidizovanom reaktoru mogu da se primene manje čestice, ali gustina čestica i brzina fluidizacije moraju biti podešene tako da čestice ne bi bile odnesene iz reaktora.¹⁷² Iako je GA jedan od najčešće primenjivanih umrežavajućih reagenasa, postoje i enzimi na koje se ne može primeniti. Tako na primer, nakon imobilizacije nitrilaze u obliku umreženih enzimskih agregata dobijeni biokatalizator je

bio potpuno katalitički neaktivan. GA, kao mali molekul prodire u unutrašnjost enzima, reaguje sa ostacima lizina u aktivnom centru nitrilaze i dovodi do inaktivacije. Pored toga, GA je poznat kao toksičan pa spiranje iz enzimskih agregata može imati negativne efekte na zdravlje ljudi i životnu sredinu, zato je primena GA u zaštiti životne sredine i prehrambenoj industriji ograničena.^{153,173,174} Iz tog razloga danas se sve više teži ka primeni umrežavajućih reagenasa koji su prihvatljiviji i za zdravlje ljudi i životnu sredinu kao što su: dialdehidi prirodnih polisaharida, dekstrana, agara, hitozana, pektina, L-lizin.¹⁷⁵⁻¹⁷⁸

Pored nedovoljne količine umrežavajućeg reagensa, loše umrežavanje može biti posledica malog broja $-NH_2$ grupa lizina, odnosno ostataka lizina u molekulu enzima. Da bi se povećao sadržaj lizina u reakcionoj smeši, često se dodaju inertni proteini kao što je goveđi serum albumin (BSA), proteini belanceta ili jedinjenja kao što je PEHA (penta-etilenheksamin), poli-L-lizin, polietilenimin (PEI).¹⁷⁸⁻¹⁸¹ Dodatkom inertnih proteina u reakcionu smešu povećava se sadržaj amino grupa lizina i stepen umrežavanja, a samim tim i mehanička stabilnost dobijenih agregata.

Glavni nedostatak ove tehnike imobilizacije je mehanička nestabilnost dobijenih agregata i problemi sa izdvajanjem iz reakcione smeše zbog neodgovarajuće viskoznosti, oblika i veličine čestica. Pripremom umreženih enzimskih agregata u emulziji u/v a ne u rastvoru znatno je lakše kontrolisati oblik i veličinu čestica. Celokupan postupak se izvodi na sledeći način: taloženje proteina se izvodi u rastvoru kao kod tradicionalne metode, potom se mešaju vodena i uljana faza i enzim se hemijski umrežava u kapljicama emulzije. Na ovaj način se dobijaju čestice pravilnog sfernog oblika, tačno definisanih veličina što znatno olakšava izdvajanje i ponovnu upotrebu dobijenog biokatalizatora.¹⁷¹ Drugi način za povećanje mehaničke stabilnosti i olakšano izdvajanje umreženih agregata je primena magnetnih nanočestica u toku pripreme. Na ovaj način dobijeni umreženi agregati, zajedno sa magnetnim nanočesticama se lako izdvajaju iz reakcione smeše pod uticajem magnetnog polja.¹⁸²⁻¹⁸⁴ Pored primene magnetnih čestica, stabilizacija i olakšano izdvajanje umreženih agregata se postiže i taloženjem i umrežavanjem u mikro- i makroporozne nosače kao što su polimerne membrane i silika gel.^{169,185}

Kombinovanjem enzima različitih svojstava, a sličnih supstrata dobijaju se mešoviti umreženi enzimski agregati sa velikim potencijalom primene u katalizi kaskadnih reakcija. Na ovaj način sinergističkim dejstvom više različitih enzima umreženih zajedno moguće je postići znatno veću produktivnost sistema nego u slučaju primene jednog enzima.¹⁸⁶

Da je imobilizacija enzima u obliku umreženih enzimskih agregata tehnika sa velikim potencijalom svedoče i podaci o imobilizaciji brojnih enzima ovom tehnikom: lipaza, tirozinaza, peroksidaza, glukoza-oksidade, alkohol-dehidrogenaze, amilaza, lakaza, glukoamilaza i primeni u različite svrhe, od sinteze biodizela do razgradnje zagađivača otpadnih voda.^{180,181,185,186}

4.4. Imobilisana HRP u tretmanu sintetičkih boja iz otpadnih voda

Peroksidaza iz rena zbog svoje lake dostupnosti i efikasnosti postaje predmet istraživanja brojnih istraživača koji se bave enzimskim uklanjanjem sintetičkih boja. Procesi koji su katalizovani enzimima smatraju se ekonomičnim u slučajevima mogućnosti primene istog enzima više puta u željenoj reakciji, tj. povećanjem produktivnosti biokatalizatora. Povećanje produktivnosti biokatalizatora ostvaruje se imobilizacijom enzima i do sada postoje dostupni podaci o imobilizaciji HRP različitim tehnikama i primeni dobijenog biokatalizatora u uklanjanju sintetičkih boja.

Ciklodekstrin–hitozan kompleks je jedan od nosača koji je upotrebljen za imobilizaciju HRP. Ciklodekstrini nastaju degradacijom skroba katalizovanom bakterijskim enzimima. Smatraju se atraktivnim materijalom zbog toroidalnog oblika strukture, sa hidrofobnom unutrašnjosti i hidrofilnom spoljašnosti. Dobijeni ciklodekstrin-hitozan kompleks je primenjen za dobijanje ciklodekstrin-hitozan-HRP kompleksa i ciklodekstrin-hitozan-HRP kompleksa umreženog glutaraldehidom. Umreženi i neumreženi ciklodekstrin-hitozan–HRP kompleks su pokazali različiti afinitet prema ispitivanoj smeši boja (98 % C. I. Indigo Blue, 1,5 % C. I. Sultan Red, 0,5 % C. I. Cypress Green). Naime, primenom umrežene i neumrežene ciklodekstrin-hitozan-HRP, uklonjeno je 84 % i 72 % ispitivane smeše boja, respektivno, na pH 7 i pri početnoj koncentraciji vodonik–peroksida 0,6 mM. Ispitivanjem mogućnosti reciklacije,

utvrđeno je da u datom sistemu umreženi kompleks nakon 5–og ciklusa zadrži 69 %, a neumreženi 52 % od početne aktivnosti.¹⁸⁸

Kao model za ispitivanje efikasnost HRP imobilisane u akrilamid i alginat upotrebljena je azo boja C. I. Acid Black 10 BX. Ispitani su optimalni uslovi (pH, koncentracija boje, koncentracija vodonik-peroksida i enzima) za slobodnu HRP i operativna stabilnost imobilisane HRP pod optimalnim uslovima utvrđenim za slobodnu HRP. Pod optimalnim uslovima (pH 2, koncentracija boje 20 mg L⁻¹, koncentracija vodonik-peroksida 0,1 μl L⁻¹, 2,79 U enzima) uklonjeno je 79 % i 54 % ispitivane boje, HRP imobilisanom u akrilamid i alginat, respektivno. U pogledu operativne stabilnosti, HRP imobilisana u alginat se pokazala znatno stabilnijom. Razlika u stepenu obezbojenja pripisuje se strukturi matriksa za imobilizaciju. Smatra se da je nenaelektrisana struktura akrilamida minimalno uticala na strukturu HRP i difuziju naelektrisanog supstrata i proizvoda.¹⁸⁹

HRP je kovalentno imobilisana na različite polisulfonske nosače i primenjena za obezbojavanje di–azo boje C. I. Acid Black 1 i antrahinonske boje C. I. Reactive Blue 19. Polisulfonski materijali su se pokazali izuzetno atraktivnim nosačem zbog niske cene, termalne i mehaničke stabilnosti i rezistentnosti na alkalnu i kiselu sredinu što ih čini idealnim za primenu u postrojenjima za tretman otpadnih voda. Polisulfonske membrane su metakrilovane, a potom je kovalentna veza između –NH₂ grupa asparagina, arginina i histidina u molekulu HRP ostvarena sa akrilatnim grupama modifikovanog nosača Michael–ovom adicijom. Dobijeni imobilisani biokatalizator se pokazao najaktivnijim na pH 5, ali sa promenom pH stepen uklanjanja ispitivanih boja je bio viši u poređenju sa slobodnom HRP. Takođe, imobilisana HRP je pokazala malu operativnu stabilnost (nakon 3 upotrebe stepen obezbojavanja je naglo opao).¹⁹⁰

Izbor nosača ima veliki uticaj na stabilnost i efikasnost imobilisanog enzima, iako je vrlo teško unapred predvideti koji nosač je najpogodniji za specifičan enzim. Arslan je iskoristio jeftina PET vlakna (polietilentereftalat) kao nosač za imobilizaciju HRP zbog njihovih prednosti poput velike specifične površine, rezistentnosti na blage i jake mineralne kiseline, oksidaciona sredstva, sunčevu svetlost i mikroorganizme. Ova vlakna ne sadrže odgovarajuće grupe za interakciju sa HRP, pa je izvršena modifikacija istih. HRP kovalentno imobilisana na modifikovana PET vlakna je upotrebljena za

uklanjanje 98 % metil-oranž boje nakon 45 min. Imobilizacijom pH optimum sa 8 za slobodnu je pomen na 6 za imobilisanu HRP. Mogućnost reciklacije je ispitana sa pirogalolom kao standardnim supstratom. Nakon pet ciklusa PET–HRP je zadržala 64,4 % od početne aktivnosti i narednih pet ciklusa je bila konstantna.¹⁹¹ Modifikovana PET vlakna su se pokazala kao nosač sa velikim potencijalom za imobilizaciju HRP i primenu u uklanjanju sintetičkih boja.

Grupa istraživača je ispitala novi pristup u imobilizaciji HRP obuhvatanjem u titanijumske materijale. Glavni razlog tome je što se titanijumski materijali ponašaju kao amfoterni jonoizmenjivači, a silikatni materijali samo kao katjonski. Na ovaj način, dobijene su kapsule koje su se sastojale od fosfolipidnog sloja u unutrašnjosti i titanijumskog sloja na površini. HRP imobilisana na ovaj način se pokazala kao izuzetan katalizator za uklanjanje boje C. I. Direct Black 38 (79,72 %) i fenola (92,99 %). U pogledu operativne stabilnosti, takođe je pokazala izuzetne rezultate. Naime, nakon petog ciklusa (10 h trajanje svakog) uklonjeno je 51,58 % boje, dok nakon 8-og ciklusa stepen uklanjanja fenola opada na 53,62 %. Izuzetna efikasnost uklanjanja ispitivanih zagađivača imobilisanom HRP nije samo rezultat enzimske katalize, već je zapaženo da je i sam nosač adsorbovao dosta zagađivača (≤ 20 %).¹⁹²

Poliakrilo–nitrilni filmovi dobijeni konvencionalnim postupcima livenja su takođe poslužili grupi istraživača kao nosač za imobilizaciju HRP. Kovalentnom imobilizacijom HRP, dobijen je biokatalizator koji se pokazao kao vrlo efikasan u uklanjanju boja C. I. Direct Blue 53 i C. I. Direct Black 38. Nakon 7 ciklusa primene imobilisana HRP je zadržala 86 % aktivnosti, a aktivnost je održana konstantnom naredna 23 ciklusa.¹⁹³

Alginate čestice su poslužile još jednom za imobilizaciju HRP. U ovom slučaju dobijena imobilisana HRP je primenjena za uklanjanje azo boja iz otpadnih voda štavionice kože. 76 % azo boje je uklonjeno nakon 240 min tretmana. Dobijeni biokatalizator je bilo moguće primeniti u tri uzastopna ciklusa, pa se smatra da ovako imobilisana HRP ima potencijala za industrijsku primenu.¹⁹⁴

Iako poseduje veliki potencijal za primenu u tretmanu obojenih otpadnih voda, povećanje stabilnosti HRP imobilizacijom je oblast ispitivanja u uzlaznoj fazi. HRP je

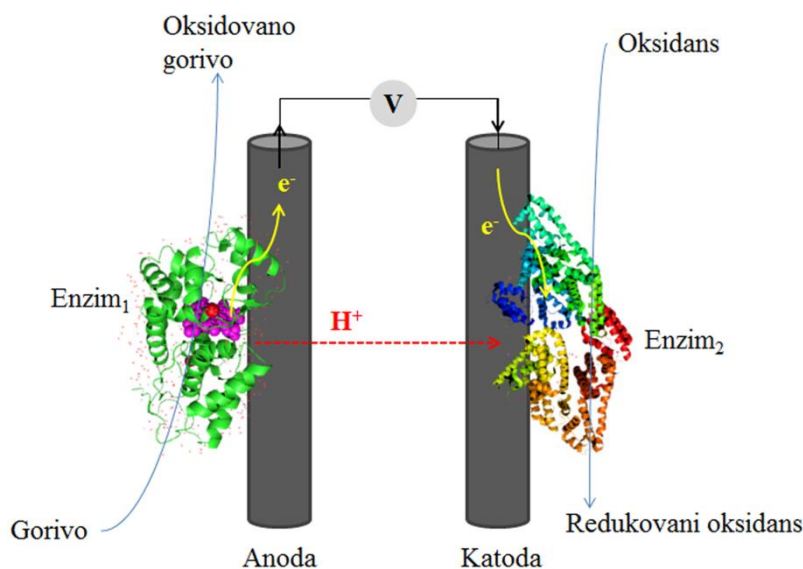
imobilisana različitim tehnikama na različite nosače u cilju tretmana drugih zagađivača osim sintetičkih boja i neki primeri su prikazani u tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Imobilizacija HRP i primena u uklanjanju zagađujućih materija otpadne vode

Zagađivač	Imobilizacija (nosač)	Referenca
<i>2,4-dihlorfenol</i>	Nanocelulozne čestice dobijene sprej sušenjem;	[195]
<i>Halogenovani fenoli</i>	Stakleni nosač obogaćen sa TiO ₂	[196]
	Akrilonitrilna kopolimerna membrana;	[197]
	Hitozanske nanocevi;	[198]
	Magnetne čestice;	[199]
<i>Fenol</i>	Al-glina (AL-PILC);	[200]
	Eupergit [®] C;	[201]
	Ca-alginat	[202]
<i>Hidroksilovana jedinjenja</i>	Mikroporozne polipropilenske membrane	[141]
<i>Paracetamol</i>	Nanofibrozne membrane	[139]
<i>Otpadna voda zagađena uljima</i>	Keramika	[140]
<i>bisfenol A</i>	Mikrofibrozne membrane dobijene elektrospinoivanjem	[203]

5. ENZIMSKE GORIVNE ČELIJE

U cilju smanjenja zavisnosti od fosilnih goriva pronalazak obnovljivih i ekološki prihvatljivih izvora energije postaje jedan od vodećih izazova današnjice. Biogorivne ćelije su uređaji koji konvertuju hemijsku energiju organskih molekula u električnu posredstvom mikroorganizama ili enzima kao katalizatora.²⁰⁴ Enzimske gorivne ćelije (slika 5.1.) koriste redoks enzime za specifične oksidacije goriva (alkoholi, vodonik, laktati, šećeri kao što su glukoza, fruktoza, laktoza i celobioza), a u novije vreme i različite aromatične zagađivače i oksidaciona sredstva (O_2 , H_2O_2) za redukciju na katodi u cilju generisanja električne energije.²⁰⁵ Gorivo (supstrat) se oksiduje na strani anode a elektroni oslobođeni u ovoj reakciji stižu do katode gde se kombinuju sa kiseonikom i protonima do krajnjeg proizvoda, vode.²⁰⁶



Slika 5.1. Šematski prikaz enzimske gorivne ćelije

Enzimske gorivne ćelije imaju brojne prednosti u poređenju sa konvencionalnim gorivnim ćelijama. Prvo, u konvencionalnim gorivnim ćelijama, kao katalizatori se koriste plemeniti metali (nikal, zlato, srebro, rodijum, rutenijum, paladijum, hrom) čija je dostupnost ograničena, dok se u enzimskim gorivnim ćelijama koriste enzimi kao katalizatori koji su dostupniji zbog jeftinijih procesa proizvodnje u poređenju sa procesima dobijanja plemenitih metala.²⁰⁵ Drugo, enzimi su strogo specifični, aktivni i

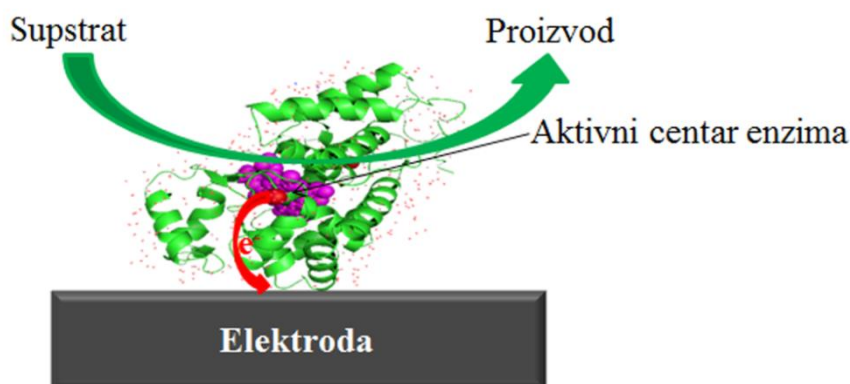
selektivni katalizatori koji maksimum aktivnosti ispoljavaju pri blagim reakcionim uslovima (neutralan pH i telesna temperatura) za razliku od konvencionalnih gorivnih ćelija gde se radne temperature kreću od 45 ° C do 150 °C, a reakciona sredina je jako kisela/bazna.^{206,207}

U enzimskim gorivnim ćelijama se koriste znatno kompleksnija goriva, za razliku od konvencionalnih gde su najčešća goriva vodonik i metanol. Glavni nedostatak koji je neophodno prevazići u enzimskim gorivnim ćelijama jeste nestabilnost sprega enzim–elektroda i mala gustina katalizatora. Za razliku od čestica plemenitih metala, enzimi su veliki molekuli tako da je u istoj zapremini moguće smestiti znatno manje molekula enzima, nego čestica plemenitih metala.²⁰⁶ Ključni faktor koji određuje efikasnost enzimskih gorivnih ćelija je brzina prenosa elektrona u nizu gorivo–enzim–elektroda.²⁰⁸

Transport elektrona od enzima do elektrode u enzimskim gorivnim ćelijama je moguće ostvariti na dva načina: direktno (*na engleskom–direct electron transfer–DET*) i posredno (*na engleskom–mediated electron transfer–MET*).²⁰⁸

Kod direktnog transfera elektrona, supstrat se enzimski oksiduje na anodi dajući protone i elektrone koji se prenose direktno do površine anode. Ključni problem u ovom mehanizmu prenosa elektrona jeste kontakt aktivnog centra enzima i elektrode. Kako bi se efikasno prenosili elektroni zahtevana je udaljenost aktivni centar–elektroda ~ 2 nm.²⁰⁸ Enzimi koji se primenjuju u gorivnim ćelijama sa direktnim transferom elektrona moraju da imaju labavo vezane redoks centre (NADH/NAD⁺, NADPH/NADP⁺) koji mogu da difunduju od aktivnog centra enzima do elektrode prenoseći elektrone ili da su redoks centri primenjenog enzima lokalizovani na periferiji proteinske ljuske gde se prijem i prenos elektrona, a samim tim i komunikacija sa elektrodom ostvaruje kontaktom.^{208,209} Direktni transfer elektrona (slika 5.2.) od enzima do elektrode se vrlo teško ostvaruje jer su elektroaktivni centri često smešteni u unutrašnjost proteina ali i zbog neodgovarajuće orijentacije molekula enzima na površini elektrode. Ključni izazov kada je u pitanju direktan prenos elektrona jeste postizanje pravilne orijentacije enzima na površini elektrode pri čemu se ostvaruje maksimalna aktivnost koja se manifestuje kroz brz i efikasan prenos elektrona i smanjenje difuzionih limitacija supstrat–enzim.²¹⁰ Do sada je poznato 40 redoks enzima kao što su citohrom C, lakaza, dehidrogenaza i

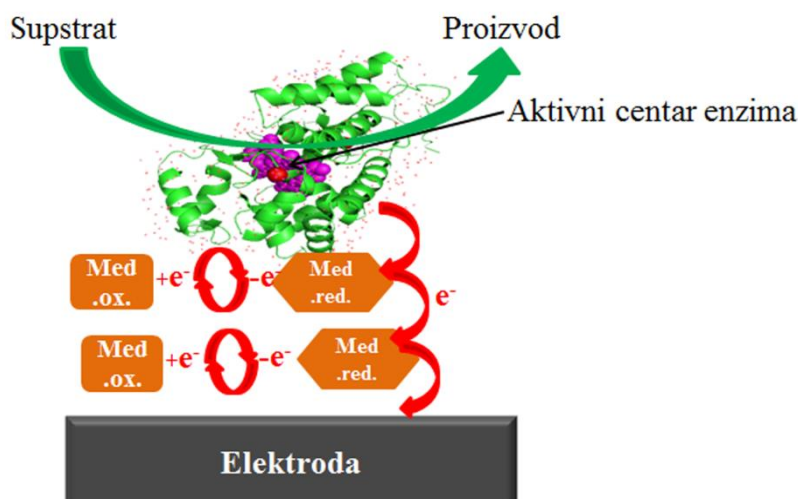
peroksidaza primenjenih u procesu direktnog prenosa elektrona od enzima do elektrode.^{211,212}



Slika 5.2. Direktni prenos elektrona u enzimskoj gorivnoj ćeliji

U velikom broju slučajeva direktni prenos elektrona nije moguć. Brojni enzimi imaju redoks centre smeštene duboko u unutrašnjosti proteina, a često su centri dodatno zaštićeni gluko–proteinskom ljuskom. Primer takvog enzima je glukozo–oksidaza (GOx) koja ima snažno vezan FAD kao redoks centar.²⁰⁹ U ovakvim slučajevima direktni prenos elektrona je ili izuzetno spor ili nemoguć. Kako bi se prevazišao ovaj problem u sistem se uvode molekuli male molekulske mase, medijatori (slika 5.3.) koji prenose elektrone od aktivnog centra enzima do površine elektrode. U ovom slučaju enzim katalizuje transformaciju supstrata (gorivo ili oksidans) i medijatora. Osnovne karakteristike ovakvih sistema su da se medijator ponaša kao ko/supstrat za enzim i da elektrohemijaska transformacija medijatora na elektrodi mora biti reverzibilna.²¹¹

Medijatori mogu da budu slobodni ali mogu i da se fizički zarobe iza membrane, imobilisu u matriks zajedno sa biokatalizatorom ili kovalentno vežu na površini ili u polimernim mrežama, hidrogelovima.^{211,213} Primena medijatora je termodinamički ali ne i kinetički povoljna. Pored toga, kada u sistemu postoje medijatori, enzim ne mora da bude u direktnom kontaktu sa elektrodom što smanjuje verovatnoću denaturacije enzima.²¹²



Slika 5.3. Prenos elektrona pomoću medijatora u enzimskoj gorivnoj ćeliji

Pre komercijalne primene enzimskih gorivnih ćelija neophodno je pažljivo ispitati sve faktore koji utiču na performanse sistema, napon ćelije, gustinu struje, gustinu snage i stabilnost gorivne ćelije. U gorivnim ćelijama na anodi je do sada primenjivana: glukozo–oksidaza (EC 1.1.3.4, Gox), glukozo–dehidrogenaza (EC 1.1.1.47, GDH) i celobioze–dehidrogenaza (EC 1.1.99.18, CDH). U reakcijama katalizovanim pomenutim enzimima kao gorivo su se koristili: etanol, metanol, glicerol, piruvat, glukozna, laktoza, celobioza i fruktoza. Sa druge strane, katodna redukcija kiseonika se postiže pre svega biljnim i fungalnim lakazama, bilirubin–oksidazom, citohrom–oksidazom i citohromom C. Pored kiseonika kao oksidans u enzimskim gorivnim ćelijama se primenjuje i vodonik–peroksid. Kada je katodna reakcija oksidacija–vodonik peroksida, enzim koji je katalizuje je ili peroksidaza iz rena (HRP) ili mikroperoksidaza (MP–11 i MP–8).²⁰⁶

Priroda supstrata koji se koristi kao gorivo u enzimskoj gorivnoj ćeliji je od vitalnog značaja za proizvodnju električne energije.²¹⁴ Uklanjanje toksičnih, kancerogenih i zagađujućih boja iz otpadnih voda koje predstavljaju pretnju po životnu sredinu, predstavlja jedan od imperativa današnjeg vremena. Enzimski tretmani obojenih otpadnih voda kao ekološki prihvatljiva i efikasna metoda danas se sve više primenjuje. Kada se u gorivnoj ćeliji primene enzimi umesto plemenitih metala otpadne vode kao supstrat, dobija se dvostruko ekonomičan i ekološki prihvatljiv proces, uklanjanje boja i generisanje električne energije.

Do sada se u literaturi mogu naći podaci vezani za tretman obojenih otpadnih voda mikroorganizmima kao katalizatorima uz simultano kolektovanje električne energije iz procesa (mikrobne gorivne ćelije). Tako na primer, Sun i saradnici, su uspešno primenili smešu aktivnog aerobnog i anaerobnog mulja u mikrobnoj gorivnoj ćeliji za uklanjanje azo boje C. I. Active Brilliant Red X-3B (ABRX3). Potvrđeno je da je obezbojavanje znatno brže u mikrobnoj gorivnoj ćeliji nego tradicionalnim anaerobnim metodama obezbojavanja. Na ovaj način ne samo da je obezbojeno 90 % ispitivane boje, već je ostvaren napon od $0,5 \pm 0,05$ V, gustina snage 234 mWm^{-2} i gustina struje $0,82 \text{ Am}^{-2}$.²¹⁵ Mikrobna gorivna ćelija za uklanjanje azo boja C. I. Methyl Orange (MO) je konstruisana tako što je u anodnoj ćeliji bio katalizator *Klebsiella pneumoniae* strain L17, a u katodnoj ćeliji azo boja kao oksidans. Na ovaj način, ostvaren napon u toku obezbojavanja azo boje MO $0,25 \pm 0,015$ V, gustina snage $34,77 \text{ mWm}^{-2}$ i gustina struje $158,78 \text{ mAmm}^{-2}$.²¹⁶ Za uklanjanje azo boje C.I. Congo Red (CO) u mikrobnoj gorivnoj ćeliji, upotrebljen je aktivni mulj, skupljen i fabrike za tretman voda u Kini. U ovoj gorivnoj ćeliji postignuto je efikasno obezbojavanje CO boje, ali i napon ćelije $0,4 \pm 2$ V, gustina snage 103 mWm^{-2} i gustina struje $0,66 \text{ Am}^{-2}$.²¹⁷ Za razliku od mikrobnih gorivnih ćelija koje su bile predmet interesovanja istraživača, enzimske gorivne ćelije koje koriste izolovan enzim ili kombinaciju enzima su počele da se primenjuju 1960-ih i do sada su oskudni podaci primene u tretmanu otpadnih voda.²¹⁸

Opšte je poznato da se u tretmanu obojenih otpadnih voda isključivo koriste lakaze i peroksidaza iz rena, pa je za očekivati da se ovi enzimi primene i u enzimskim gorivnim ćelijama. Tretman obojenih voda i generisanje električne energije je oblast istraživanja koja je u uzlaznoj fazi i do sada postoji samo par primera uklanjanja boja enzimima uz simultano generisanje električne energije. Jedan od retkih primera je primena lakaze u enzimskoj gorivnoj ćeliji za tretman reaktivne boje C.I. Reactive Blue 221 (RB 221) i generisanje električne energije. U ovom sistemu, ostvaren napon ćelije u toku obezbojavanja RB 221 je $0,62$ V, gustina snage 27 mWm^{-2} i gustina struje 110 mAmm^{-2} .²¹⁴

U prethodnim poglavljima peroksidaza iz rena je predstavljena kao moćan biokatalizator u uklanjanju raznih zagađivača životne sredine. S obzirom na to da se peroksidaza (HRP) vrlo uspešno primenjuje u obezbojavanju antrahinonskih boja,

ispitana je mogućnost generisanja električne energije iz tog procesa. U tu svrhu HRP je kovalentno imobilisana na bakarnu elektrodu presvučenu slojem sulfida i primenjena je u enzimskoj gorivnoj ćeliji gde se kao supstrat koristi AV 109 boja.

II EKSPERIMENTALNI DEO

6. Materijali, instrumenti, metode

6.1. Materijali i instrumenti

Biokatalizator korišćen u radu je peroksidaza (E. C. 1.11.1.7) iz rena (*Armoracia rusticana*) proizvođača Sigma (St. Louis, SAD) i peroksidaza iz svežeg ekstrakta rena (neprečišćena).

Kaolin je upotrebljen kao nosač za imobilizaciju peroksidaze (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France).

Ostale hemikalije korišćene u radu su:

- antrahinonska boja, Acid Violet 109 (AV 109), (Lanaset),
- pirogalol, (Sigma, St. Louis, SAD),
- glutaralhid, (Sigma, St. Louis, SAD),
- vodonik–peroksid, (Merck–Alkaloid),
- natrijum–acetat (Zdravlje Leskovac),
- sirćetna kiselina, (Beta–Hem, Beograd),
- glicin, (Lach–Ner, Republika Češka),
- natrijum-hidroksid, (NRK Inženjering, Beograd),
- koncentrovana hlorovodonična kiselina, 36 % (Lach–Ner, Republika Češka),
- mononatrijum-fosfat (Merck–Alkaloid),
- dinatrijumhidrogen-fosfat (NRK Inženjering, Beograd),
- triton X–100, 99 % (Merck–Alkaloid),
- kalcijum-hlorid, (Lach–Ner, Republika Češka),
- bakar-II-sulfat, (Zorka Pharma, Šabac),
- kalcijum-karbonat, (Merck–Alkaloid),
- kalijum-natrijum-tartarat, (Merck–Alkaloid),
- Folin & Ciocalteu's reagens, (Sigma, St. Louis, SAD),
- aceton, (Zorka Pharma, Šabac),

- 2–propanol, (Zorka Pharma, Šabac),
- amonijum–sulfat, (Centrohem, Stara Pazova),
- koncentrovana sumporna kiselina, 98 % (Sigma, St. Louis, SAD),
- živa-sulfat, (Centrohem, Stara Pazova),
- srebro-sulfat, (Centrohem, Stara Pazova),
- natrijum-hlorid, (Zorka Pharma, Šabac),
- kalijum-dihromat, (Kemika, Zagreb),
- goveđi serum albumin, (Sigma, St. Louis, SAD),
- *Artemia salina* ciste, (Dajana Pet, Czech Republic).

Instrumenti korišćeni u radu su:

- UV–spektrofotometar, UV–1700 (Shimadzu, Kyoto, Japan),
- UV–spektrofotometar, (Ultrospec 3300 pro, Ameris Cham Bioscience),
- LLG uniSPEC–2 UV spektrofotometar,
- Potenciostat/galvanostat, Gamray PC3,
- Digitalni multimetar, PEAKTECH 4390 USB DMM,
- R– kutija MA 2200, 1 M Ω –3 Ω (Iskra–Kranj, Slovenija),
- Optički mikroskop, (Olympus CX41),
- Spektrofotometar (EDS) ISIS 3.2 sa SiLi X–ray detektorom, (Oxford Instruments, UK),
- Infracrveni spektrometar (Bomem MB 100),
- UV–spektrofotometar, (HANNA, HI 83099),
- Vodeno kupatilo sa mešanjem, (Memmert),
- Roler mikser, (Stuart SRT6 & SRT6 D Rollers, Keison International Ltd, United Kingdom),

- Magnetna Mešalica, (Thermo Scientific, Cimareci Multipoint),
- Pumpa, (Laborschlauchpumpe PLP 33, Behr Labor Technik),
- Centrifuga, (SIGMA 2–16, rotor 12 141, Germany),
- Skenirajuće elektronski mikroskop (SEM), (TESCAN MIRA3),
- Accelerated surface area and porosimetry system – ASAP 2020 (Micromeritics, USA),
- Vakuum uparivač, (Buchi Rotary Evaporator R210/215, Canada),
- Vortex, (Ika Vortex, Nemačka).

6.2. Metode

6.2.1. Izolovanje peroksidaze iz korena rena

Da bi se dobio svež ekstrakt rena, potrebno je usitiniti koren rena (100 g) i prelići destilovanom vodom (500 mL). Ekstrakcija se odvija 2 h na 4 °C. Nakon ekstrakcije čvrsti deo se odvaja ceđenjem kroz gazu. Dobijeni mutni rastvor se inkubira 3 min na 65 °C, da bi se inaktivirala katalaza prisutna u korenu rena.²¹⁹ Nakon inkubacije, rastvor se bistri centrifugiranjem 10 min na 10,000 o min⁻¹ (4°C). Dobijeni izbistreni ekstrakt se čuva na 4 °C do korišćenja.

6.2.2. Određivanje aktivnosti peroksidaze pirogalolom kao standardnim supstratom

Aktivnost peroksidaze se određuje spektrofotometrijski na 420 nm, korišćenjem pirogalola kao standardnog supstrata. Za određivanje aktivnosti peroksidaze pripremi se 13 mM rastvor pirogalola u puferu (fosfatni, 0,1 M, pH 7), rastvor vodonik-peroksida (0,97 mM) i rastvor enzima željene koncentracije. Postupak merenja aktivnosti je sledeći: u prvu kivetu se odmeri 1 mL pufera (slepa proba), u drugu kivetu se odmeri 1 mL pirogalola pripremljenog u puferu (fosfatni, pH 7, 0,1 M) i 10 µL vodonik-peroksida, u treću kivetu se odmeri 1 mL pirogalola pripremljenog u puferu (fosfatni, pH 7, 0,1 M), 10 µL vodonik-peroksida i 10 µL rastvora enzima. U trenutku kada se doda enzim, uključuje se štoperica i beleži promena apsorbance svakih 30 s narednih 3 min. Aktivnost peroksidaze se izražava u U. 1 U se definiše kao količina peroksidaze koja katalizuje konverziju pirogalola do 1 mg purpurogalina za 20 s na 20 °C i pH 7,0. Ova purpurogalin jedinica je ekvivalentna ~18 µM jedinica po minuti na 25 °C.²²⁰

$$\text{Aktivnost peroksidaze (UmL}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta A \times V_t \times d_f}{(\Delta t \times 12 \times 3 \times 0,01)} \quad (12)$$

gde je:

$\Delta A/\Delta t$ (min⁻¹)- početna brzina reakcije;

V_t (mL)-ukupna zapremina reakcione smeše;

12 (mmol⁻¹ L)- molarni ekstincioni koeficijent pirogalola;

d_f - faktor razblaženja;

0,01 (mL)- zapremina uzorka za određivanje aktivnosti;

3- koeficijent proporcionalnosti.

6.2.3. Određivanje sadržaja proteina modifikovanom metodom po Lowry–ju

Određivanje sadržaja proteina metodom po Loriju (Lowry) zasniva se na dve konsekutivne reakcije. Prva reakcija u reakcionom mehanizmu jeste redukcija jona Cu^{2+} u alkalnoj sredini koji grade kompleks sa peptidnim vezama. Druga reakcija se sastoji od redukcije Folin–ovog reagensa nastalim Cu^{2+} –peptidna veza kompleksom koja boji rastvor u plavo što se detektuje spektrofotometrijski u opsegu talasnih dužina 650–750 nm. Sadržaj proteina u uzorku određuje se pomoću standardne krive konstruisane sa goveđim serum albuminom (BSA). Za određivanje proteina metodom po Lowry–ju pripremaju se sledeći reagensi:

Reagens A: 2 g $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ i 100 g Na_2CO_3 se rastvori u 500 mL 1 N NaOH i razblaži sa destilovanom vodom do 1 L.

Reagens B: 2 g $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ i 1 g $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ se rastvori u 90 mL destilovane vode i dopuni do 100 mL sa 1 N NaOH.

Reagens C: 1 zapremina Folin–ovog reagensa (2 M) se razblaži sa 15 zapremina destilovane vode. Ovaj rastvor koji se priprema svež bi trebalo da bude koncentracije 0,15–0,18 N kada se titriše 1 N NaOH do pH 10. Ukoliko je koncentracija veća od 0,18 N podeljava se sa 1 N NaOH.

Procedura:

Postupak određivanja sadržaja proteina je sledeći: u 1 mL uzorka doda se 0,9 mL reagensa A. Dobijena smeša se inkubira u vodenom kupatilu 10 min na 50 °C. Nakon inkubacije, rastvori se hlade do sobne temperature. Nakon hlađenja, doda se 0,1 mL rastvora B uz intenzivno mešanje na vorteksu i rastvori se inkubiraju 10 minuta na sobnoj temperaturi. Posle inkubacije doda se 3 mL rastvora C uz intenzivno mešanje i rastvori se inkubiraju još 10 minuta na 50 °C. Posle hlađenja do sobne temperature meri se promena apsorbanca na 650 nm. Slepa proba umesto 1 mL uzorka sadrži 1 mL pufera.

Standardna kriva:

Standardna kriva se konstruiše na osnovu vrednosti apsorbanci dobijenih za rastvore BSA koncentracije 0,1–0,5 mg mL⁻¹ u kojima se sadržaj proteina određuje po gore navedenoj proceduri.²²¹

6.3. Određivanje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje slobodnom (komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena) u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

U okviru prve eksperimentalne serije ispitana je mogućnost primene slobodne peroksidaze (komercijalni preparat i sveži ekstrakt) u cilju obezbojavanja AV 109 boje. U tu svrhu ispitan je uticaj parametara: vreme kontakta, koncentracija boje, koncentracija vodonik-peroksida, koncentracija enzima, pH i temperatura na stepen obezbojavanja AV 109 boje. Metode na osnovu kojih su vođeni eksperimenti su detaljno opisane u narednim poglavljima.

6.3.1. Ispitivanje uticaja vremena kontakta na reakciju obezbojavanja AV 109 boje slobodnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Za određivanje optimalnog vremena kontakta, rastvor ispitivane AV 109 boje, koncentracije 30 mg L^{-1} pripremljen je u destilovanoj vodi. Reakcija je izvođena u šaržnom reaktoru sa konstantnim brojem obrtaja orbitalne mešalice, 200 o min^{-1} . Po uspostavljanju temperaturne ravnoteže reakcija je započeta dodatkom vodonik-peroksida do postizanja koncentracije od 2 mM i enzima (komercijalnog, neprečišćenog) do postizanja koncentracije od $0,15 \text{ U mL}^{-1}$. Alikvoti zapremine 3 mL se uzimaju u tačno definisanim vremenskim intervalima, 5 min i promena apsorbance se prati spektrofotometrijski na maksimalnoj talasnoj dužini za ispitivanu boju, $\lambda_{\text{max}}=590 \text{ nm}$. Nakon dostizanja zasićenja reakcija se prekida a dobijeno optimalno vreme kontakta je konstantan parametar u narednim eksperimentima.

Stepen obezbojavanja se računa pomoću sledećeg matematičkog obrasca:¹¹⁴

$$\text{Obezbojavanje}(\%) = \left[\left(\frac{A_0 - A_t}{A_0} \right) \right] \times 100 \quad (13)$$

gde je A_0 apsorbance u polaznom rastvoru pre početka reakcije, A_t apsorbance u rastvoru izmerena u određenom trenutku (t).

6.3.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije enzima na obezbojavanje AV 109 boje slobodnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Uticaj početne koncentracije komercijalnog enzima potrebnog za postizanje maksimalnog obezbojavanja AV 109 boje ispitan je variranjem početne koncentracije enzima u opsegu 0,25–2 U mL⁻¹. U rastvoru boje koncentracije 30 mg L⁻¹ pripremljenom u destilovanoj vodi varirana je koncentracija enzima, pri konstantnoj koncentraciji vodonik-peroksida, 2 mM, temperaturi 24 °C i vremenu kontakta, 15 min. Alikvoti zapremine 3 mL se uzimaju u tačno definisanim vremenskim intervalima, 5 min i promena apsorbance se prati spektrofotometrijski na maksimalnoj talasnoj dužini za ispitivanu boju, $\lambda_{\max}=590$ nm. Za izračunavanje postignutog stepena obezbojavanja primenjuje se j -na (13).

6.3.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje slobodnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Uticaj vodonik-peroksida na reakciju obezbojavanja ispituje se variranjem početne koncentracije vodonik-peroksida u opsegu 0,02–1,0 mM za komercijalnu peroksidazu i 0,05–0,6 mM za peroksidazu iz svežeg ekstrakta rena pri konstantnoj koncentraciji boje 30 mg L⁻¹, peroksidaze 0,15 U mL⁻¹, temperaturi 24 °C i vremenu kontakta 15 min za reakciju katalizovanu komercijalnom peroksidazom i 35 min za reakciju katalizovanu peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena. Alikvoti zapremine 3 mL se uzimaju u tačno definisanim vremenskim intervalima, 5 min i promena apsorbance se prati spektrofotometrijski na maksimalnoj talasnoj dužini za ispitivanu boju, $\lambda_{\max}=590$ nm. Matematički obrazac iz poglavlja 6.3.1 se primenjuje za izračunavanje postignutog stepena obezbojavanja.

6.3.4. Ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na obezbojavanje AV 109 boje slobodnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Variranjem početne koncentracije boje u opsegu 10–50 mg L⁻¹ ispitan je uticaj boje na stepen obezbojavanja AV 109 pod datim uslovima. Razblaživanjem osnovnog stok rastvora koncentracije 50 mg L⁻¹ pripremljeni su rastvori boje željenih koncentracija. Reakciona smeša za reakciju katalizovanu komercijalnom peroksidazom se sastoji od:

rastvora boje određenih koncentracija, $0,15 \text{ U mL}^{-1}$ enzima, vodonik-peroksida $0,4 \text{ mM}$. U reakciji katalizovanoj peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena konstantnom je održavana koncentracija enzima $0,15 \text{ U mL}^{-1}$ i vodonik-peroksida $0,1 \text{ mM}$. Promena apsorbance praćena je svakih 5 min, 15 min za reakciju katalizovanu komercijalnom peroksidazom i 35 min za reakciju katalizovanu peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena, na $24 \text{ }^\circ\text{C}$ i 590 nm . Za izračunavanje postignutog stepena obezbojavanja primenjuje se j -na (13).

6.3.5. Ispitivanje uticaja pH na obezbojavanje AV 109 boje slobodnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Uticaj pH na obezbojavanje AV 109 boje ispitan je variranjem pH reakcione smeše u opsegu 3–9. Rastvor boje pH 3–6 pripreman je u $0,1 \text{ M}$ acetatnom puferu; pH 6–8 u $0,1 \text{ M}$ fosfatnom puferu i pH 9 u $0,1 \text{ M}$ glicin–NaOH puferu. U rastvor boje određenog pH, dodat je enzim pripremljen u istom puferu ($0,15 \text{ U mL}^{-1}$) kao i boja (30 mg L^{-1}) i vodonik-peroksid do postizanja finalne koncentracije od $0,4 \text{ mM}$ i $0,1 \text{ mM}$ za reakciju katalizovanu komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena, redom. Reakcija katalizovana komercijalnom peroksidazom je praćena 15 min, dok je reakcija katalizovana peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena praćena 35 min na $24 \text{ }^\circ\text{C}$. Alikvoti su uzimani svakih 5 min i beležena je promena apsorbance na 590 nm . Stepenn obezbojavanja se izračunava po j -ni (13).

6.3.6. Ispitivanje uticaja temperature na obezbojavanje AV 109 boje slobodnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Uticaj temperature na reakciju obezbojavanja AV 109 boje, komercijalnom peroksidazom ispitan je variranjem temperature na kojoj se izvodi reakcija u opsegu $24\text{--}55 \text{ }^\circ\text{C}$. Dodatkom enzima ($0,15 \text{ U mL}^{-1}$) i vodonik-peroksida ($0,4 \text{ mM}$) reakcija je započeta i praćena 15 min. Promena apsorbance praćena je u alikvotima skupljenim svakih 5 min, na 590 nm , a stepenn obezbojavanja se izračunava po matematičkom obrascu prikazanom u poglavlju 6.3.1. U cilju poređenja eksperimentalnih podataka dobijenih za reakciju katalizovanu komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena, temperatura usvojena u ovoj eksperimentalnoj seriji je održavana kao konstantan

parameter u reakciji katalizovanoj peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena.

6.3.7. Određivanje kinetičkih konstanti slobodne peroksidaze u reakciji obezbojavanja AV 109 boje u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

U okviru ove eksperimentalne serije ispitana je početna kinetika obezbojavanja AV 109 boje slobodnom komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena. Početna kinetika je ispitana variranjem koncentracije jednog supstrata, dok je konstantnom održavana koncentracija drugog supstrata. U prvoj seriji eksperimenata, konstantnom je održavana koncentracija boje 0,018 mM, dok je varirana koncentracija H₂O₂ u opsegu 0,1–0,4 mM za reakciju katalizovanu komercijalnom peroksidazom. U drugoj seriji eksperimenata, koncentracija boje je varirana u opsegu 0,005–0,04 mM za reakciju katalizovanu komercijalnom peroksidazom (konstantna koncentracija H₂O₂, 0,4 mM).

Za reakciju katalizovanu peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena, prvo je konstantnom održavana koncentracija boje 0,018 mM, dok je varirana koncentracija H₂O₂ u opsegu 0,01–0,6 mM. Potom, koncentracija boje je varirana u opsegu 0,005–0,04 mM za reakciju katalizovanu peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena pri konstantnoj koncentraciji H₂O₂, 0,1 mM.

6.4. Imobilizacija komercijalne peroksidaze na kaolin

Industrijska primena enzima zasniva se na mogućnosti primene istog biokatalizatora više puta u željenoj reakciji da bi process bio ekonomski opravdan. Glavni način prevođenja rastvornih enzima u nerastvorne biokatalizatore jeste imobilizacija enzima. Imobilizacijom peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena na kaolin, nisu dobijeni zadovoljavajući rezultati, pretpostavka je da su nečistoće prisutne u ekstraktu imale veći afinitet vezivanja na nosač od enzima, što je onemogućilo vezivanje peroksidaze. Shodno tome, ovo poglavlje je posvećeno:

1. *Imobilizaciji komercijalne peroksidaze na kaolin adsorpcijom;*
2. *Imobilizaciji komercijalne peroksidaze na kaolin aktiviran glutaraldehidom;*
3. *Ispitivanju efikasnosti dobijenog imobilisanog biokatalizatora u reakciji obezbojavanja AV 109 boje.*

6.4.1. Određivanje aktivnosti imobilisane peroksidaze pirogalolom kao standardnim supstratom

Aktivnost imobilisane peroksidaze se određuje spektrofotometrijski na 420 nm, korišćenjem pirogalola kao standardnog supstrata. Za određivanje aktivnosti peroksidaze pripremi se 13 mM rastvor pirogalola u puferu (fosfatni, 0,1 M, pH 7), rastvor vodonik-peroksida (0,97 mM) i rastvor enzima željene koncentracije. Aktivnost imobilisane peroksidaze se određuje u reakcionoj smeši zapremine 3 mL. Reakciona smeša se sastoji od 3 mL pirogalola (13 mM) pripremljenog u fosfatnom puferu, 30 μ l peroksida (0,97 mM) i par miligrama imobilisane peroksidaze. Postupak određivanja aktivnosti je sledeći: u kivetu se odmeri 3 mL pirogalola u puferu, doda se odmerena količina imobilisane peroksidaze i vodonik-peroksid, 30 μ l. Nakon dodatka peroksida, uključi se štoperica, magnetna mešalica se podesi na maksimum i svakih 1 min se uzima alikvot i meri promena apsorbance na 420 nm, 3 minuta. Pre merenja apsorbance uzorci se centrifugiraju 30 s na 13000 rpm. Paralelno se pripremi i jedna kiveta pirogalola u puferu (slepa proba) i kiveta sa 3 mL pirogalola u puferu i odmerena imobilisana peroksidaza (kontrola) u kojima se takođe prati promena apsorbance. Ukupna aktivnost enzima izražena u U se određuje na osnovu sledećeg izraza:

$$A_{IE}(U) = \frac{\Delta A \times V_t}{\Delta t \times \varepsilon} \quad (14)$$

gde je $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ promena apsorbanca po minuti, ε – molarni apsorpcioni koeficijent koji iznosi $12 \text{ mmol}^{-1} \text{ L}$, V_t – ukupna zapremina reakcione smeše, $3,03 \text{ mL}$. Specifična aktivnost imobilisanog enzima ($U \text{ g}^{-1}$) izražena je po gramu nosača.

6.4.2. Imobilizacija komercijalne peroksidaze na kaolin adsorpcijom

6.4.2.1. Aktivacija kaolina za imobilizaciju komercijalne peroksidaze adsorpcijom

Za neorganski nosač kao što je kaolin karakteristično je da može doći do povećanja kapaciteta vezivanja termičkom obradom. U toku termičke obrade u kaolinu se dešava fazna transformacija i nastaje metakaolin. Kaolin prah (5 g) se meša sa destilovanom vodom da se dobije pasta koja sadrži 50 % vlage. Dobijena pasta se termički obrađuje 2 h na $550 \text{ }^\circ\text{C}$ u peći za žarenje. Nakon termičke obrade, dobijeni nosač se pomoću avana i tučka ponovo usitni do praha i koristi za imobilizaciju peroksidaze.

6.4.2.2. Ispitivanje uticaja pH na imobilizaciju peroksidaze adsorpcijom na metakaolin

100 mg metakaolina se doda u $0,5 \text{ mL}$ rastvora peroksidaze koncentracije $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$, pripremljenog u odgovarajućem $0,1 \text{ M}$ puferu (pH 2, 5, 7, 9). Za pH 2 upotrebljen je HCl–KCl $0,1 \text{ M}$ pufer, za pH 5 $0,1 \text{ M}$ acetatni pufer, za pH 7 $0,1 \text{ M}$ fosfatni pufer i za pH 9 $0,1 \text{ M}$ glicin–NaOH pufer. Dobijena suspenzija se meša na roler mikseru (150 o min^{-1}) 2 h na sobnoj temperaturi, $24 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon završene imobilizacije, centrifugiranjem $13,000 \text{ o min}^{-1}$, 2 min odvaja se supernatant od imobilisanog biokatalizatora. Potom se imobilisani biokatalizator ispira puferom za imobilizaciju dok ne izostane aktivnost peroksidaze u filtratima. Dobijeni supernatant kao i filtrati se skupe da bi se u njima pored aktivnosti odredio i sadržaj proteina po metodama opisanim u poglavljima 6.4.1. i 6.2.3.

6.4.2.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije enzima na imobilizaciju peroksidaze adsorpcijom na metakaolin (adsorpciona izoterma)

100 mg metakaolina se dodaje u 0,5 mL rastvora enzima različitih koncentracija 0,5–3 mg mL⁻¹, pripremljenih u 0,1 M acetatnom puferu pH 5. Dobijena suspenzija se meša na roler mikseru (150 o min⁻¹) 2 h na sobnoj temperaturi, 24 °C. Supernatant se nakon završene imobilizacije odvaja od imobilisanog biokatalizatora centrifugiranjem 2 min na 13,000 o min⁻¹. Potom se imobilisani biokatalizator, puferom za imobilizaciju ispira dok ne izostane aktivnost peroksidaze u filtratima. U dobijenom supernatantu i filtratima određuje se aktivnost i sadržaj proteina (metode 6.4.1. i 6.2.3.).

6.4.2.4. Ispitivanje desorpcije peroksidaze imobilisane adsorpcijom na metakaolin

Vrsta interakcija peroksidaze iz rena sa metakaolinom ispitana je korišćenjem 1 M rastvora CaCl₂ i nejonskog surfaktanta TRITON X-100 (1% w/v). Dobijeni imobilisani biokatalizator se inkubira u rastvoru CaCl₂ (1 M) 30 min, a potom se ispira puferom za imobilizaciju (acetatni, 0,1 M, pH 5). Aktivnost uzorka se odredi po metodi iz poglavlja 6.4.1. Nakon inkubacije u rastvoru CaCl₂, uzorak se inkubira u rastvoru TRITON-a, 30 min, ispere puferom za imobilizaciju i aktivnost se odredi po metodi iz poglavlja 6.4.1.

6.4.3. Karakterizacija metakaolina i imobilisanog preparata dobijenog adsorpcijom peroksidaze na metakaolin

6.4.3.1. Furijeova transformacijska infracrvena spektroskopija (FT-IR)

Za FT-IR analizu 3 mg uzorka se pomeša i sprži sa 150 mg kalijum-bromida. Dobijena smeša se komprimuje pod pritiskom od 11 t u trajanju oko 2 min da bi se dobile providne tablete. FT-IR spektar je sniman u rasponu talasnog broja od 400–4000 cm⁻¹, i na rezoluciji spektra od 4 cm⁻¹ korišćenjem BOMEM spektrofotometra (Hartmann and Braun).

6.4.3.2. Određivanje specifične površine i veličine pora (BET)

Specifična površina i parametri pora (zapremina i veličina) u uzorcima pre i nakon adsorpcije peroksidaze određeni su Brunauer-Emmett-Teller (BET) i Barrett-Joyner-Halenda (BJH) metodama, korišćenjem ASAP 2020 (Micrometrics, USA) sistema. Prethodno je pod vakuumom na 150 °C, 6 h uklanjan gas iz uzoraka.

6.4.3.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Snimanje uzoraka skenirajućim elektronskim mikroskopom (FEG–SEM) je izvedena korišćenjem TESCAN MIRA3 elektronskog mikroskopa pri naponu ubrzanja od 20 kV. Pre snimanja, uklonjen je gas i prevučen je sloj zlata na površini uzoraka korišćenjem Polaron SC502 Sputter Coater instrumenta (Fison Instruments, United Kingdom). Srednji prečnik i standardna devijacija veličine čestica određen je u uzorku koji se sastoji od 250 čestica pomoću MIRA TESCAN softvera.

6.4.4. Imobilizacija komercijalne peroksidaze na kaolin aktiviran glutaraldehydom

6.4.4.1. Aktivacija metakaolina glutaraldehydom za imobilizaciju peroksidaze

Nosač pripremljen po proceduri opisanoj u poglavlju 6.4.2.1. se inkubira u 0,5 mL rastvora glutaraldehyda različitih koncentracija 0,12–1 % pripremljenih u fosfatnom puferu pH 7, 0,1 M. Dobijena smeša se inkubira 1 h uz konstatno mešanje na roler–mikseru (150 o min^{-1}) na sobnoj temperaturi. Nakon završene inkubacije, aktivirani nosač se izdvoji centrifugiranjem (2 min , $10,000 \text{ o min}^{-1}$) iz reakcione smeše, ispere 5–6 puta destilovanom vodom da se ukloni neproreagovali glutaraldehyd i osuši u vakuum sušnici. Tako pripremljen metakaolin aktiviran glutaraldehydom koristi se za imobilizaciju peroksidaze.

6.4.4.2. Imobilizacija peroksidaze na metakaolin aktiviran glutaraldehydom

100 mg metakaolina aktiviranog glutaraldehydom se dodaje u rastvor peroksidaze, 0,5 mL različitih početnih koncentracija $0,5\text{--}5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ pripremljen u fosfatnom puferu, pH 7, 0,1 M. Suspenzija se meša 4 h na sobnoj temperaturi, pri konstatnom mešanju 150 o min^{-1} . Nakon završene imobilizacije, centrifugiranjem 2 min na $10,000 \text{ o min}^{-1}$, imobilizat se odvoji od supernatanta. Dobijeni imobilisani biokatalizator se dodatno ispira puferom za imobilizaciju (0,5 mL, fosfatni, pH 7, 0,1 M). U odvojenim filtratima i supernatantu aktivnost i sadržaj proteina se odrede po metodama opisanim u poglavljima 6.4.1. i 6.2.3.

6.4.5. Određivanje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Imobilisani preparat peroksidaze iz rena (0,1 U) primenjen je u reakciji obezbojavanja AV 109 boje. Reakcija je posmatrana sa aspekta uticaja: pH, koncentracije boje, koncentracije vodonik-peroksida na stepen obezbojavanja AV 109 boje. Pored toga, ispitana je i operativna stabilnost dobijenih imobilisanih biokatalizatora. Eksperimentalni postupak je opisan u narednim poglavljima.

6.4.5.1. Ispitivanje uticaja pH na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Uticaj pH na reakciju obezbojavanja AV 109 boje imobilisanom peroksidazom ispitan je u rastvorima boje koncentracije 30 mg L⁻¹ pripremljenim u puferima odgovarajućeg pH. Za pH 3 korišćen je 0,1 M glicin-HCl pufer; za pH 4–5 0,1 M acetatni pufer; za pH 7–8 0,1 M fosfatni pufer; za pH 9 i 12 korišćen je 0,1 M KCl-NaOH pufer. U pripremljene rastvore boje, doda se 0,1 U imobilisanog biokatalizatora, vodonik-peroksid do postizanja koncentracije od 0,4 mM i reakcija se prati spektrofotometrijski na 590 nm do postizanja zasićenja. Stepen obezbojavanja se izračunava po j -ni (13).

6.4.5.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Uticaj vodonik-peroksida na reakciju obezbojavanja AV 109 boje katalizovanu peroksidazom imobilisanom adsorpcijom na metakaolin ispitan je variranjem početne koncentracije vodonik-peroksida u opsegu 0,05–1,0 mM. U rastvor boje koncentracije 30 mg L⁻¹ pripremljen u 0,1 M acetatnom puferu (pH 4) dodat je enzim, 0,1 U i reakcija je praćena spektrofotometrijski na 590 nm. Uticaj vodonik-peroksida na reakciju obezbojavanja AV 109 boje katalizovanu peroksidazom imobilisanom na metakaolin aktiviran glutaraldehydom ispitan je variranjem početne koncentracije peroksida u opsegu 0,05–2,0 mM na način opisan u tekstu iznad.

Promene apsorbance su beležene u određenim vremenskim intervalima (5 min) i

efikasnost primenjenog biokatalizatora određen je sa aspekta stepena obezbojenja proračunatog primenom j -ne (13) iz poglavlja 6.3.1.

6.4.5.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Za ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na stepen obezbojavanja AV 109 boje pripremljen je stok rastvor boje 100 mg L^{-1} u $0,1 \text{ M}$ acetatnom puferu pH 4. Rastvori koncentracija $10\text{--}100 \text{ mg L}^{-1}$ dobijeni su razblaživanjem osnovnog–stok rastvora. Uticaj boje u reakciji katalizovanoj peroksidazom imobilisanom adsorpcijom na metakaolin je ispitan kada je u rastvor boje željene koncentracije dodat enzim $0,1 \text{ U}$ i $0,2 \text{ mM}$ vodonik-peroksid.

Reakciona smeša u kojoj je kao katalizator korišćena peroksidaza imobilisana na metakaolin aktiviran glutaraldehidom ($0,1 \text{ U}$) se sastojala iz: rastvora boje željene koncentracije pripremljenog u $0,1 \text{ M}$ acetatnom puferu pH 4 i $0,6 \text{ mM}$ vodonik-peroksida. Reakcija je praćena spektrofotometrijski na 590 nm do postizanja zasićenja. Maksimalan stepen obezbojenja izračunava se po j -ni (13) iz poglavlja 6.3.1.

6.4.5.4. Određivanje kinetičkih konstanti za reakciju obezbojavanja AV 109 boje katalizovanu peroksidazom imobilisanom na metakaolin adsorpcijom

U ovoj eksperimentalnoj seriji ispitana je početna kinetika obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom imobilisanom adsorpcijom na kaolin. Početna kinetika je ispitana variranjem koncentracije jednog supstrata, dok je konstantnom održavana koncentracija drugog supstrata. U prvoj seriji eksperimenata, koncentracija boje je varirana u opsegu $0,005\text{--}0,12 \text{ mM}$ pri konstantnoj početnoj koncentraciji vodonik–peroksida $0,2 \text{ mM}$. U drugoj seriji eksperimenata, konstantnom je održavana koncentracija boje $0,024 \text{ mM}$, dok je varirana koncentracija H_2O_2 u opsegu $0,005\text{--}1 \text{ mM}$. Dobijeni eksperimentalni podaci su modelovani odgovarajućim matematičkim modelom korišćenjem Origin 8.5 softverskog programa.

6.4.5.5. Ispitivanje operativne stabilnosti peroksidaze imobilisane na metakaolin u reakciji obezbojavanja AV 109 boje u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Operativna stabilnost peroksidaze imobilisane adsorpcijom na metakaolin ispitana je u izotermnom šaržnom reaktoru zapremine 5 mL pri konstatnim reakcionim uslovima: pH 5, koncentracije vodonik-peroksida 0,2 mM, koncentracija boje 40 mg L⁻¹ korišćenjem 0,1 U imobilisanog biokatalizatora.

Operativna stabilnost peroksidaze imobilisane na metakaolin aktiviran glutaraldehydom ispitana je u izotermnom šaržnom reaktoru zapremine 5 mL pri konstatnim reakcionim uslovima: pH 4, koncentracija vodonik-peroksida 0,6 mM, koncentracija boje 30 mg L⁻¹, 0,1 U imobilisanog biokatalizatora.

Nakon svakog ciklusa, imobilisana peroksidaza se izdvoji iz reakcione smeše centrifugiranjem (13,000 o min⁻¹, 2 min), ispere 2x puferom korišćenim za imobilizaciju da bi se uklonili proizvodi reakcije ili zaostali supstrat i ponovo primeni u novom ciklusu obezbojavanja. Ciklusi su ponavljani dok je beleženo obezbojavanje AV 109 boje.

6.5. Kovalentna imobilizacija komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena u obliku umreženih enzimskih agregata

U ovoj eksperimentalnoj seriji ispitana je mogućnost imobilizacije komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena u obliku umreženih enzimskih agregata. U prvoj eksperimentalnoj seriji određeni su optimalni uslovi imobilizacije, dok su u drugoj eksperimentalnoj seriji imobilisani biokatalizatori primenjeni u obezbojavanju AV 109 boje. Metode po kojima su izvođeni eksperimenti će biti detaljno opisane u narednim poglavljima.

6.5.1. Određivanje optimalnih uslova imobilizacije komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena u obliku umreženih enzimskih agregata

Peroksidaza izolovana iz svežeg ekstrakta rena po proceduri opisanoj u poglavlju 6.2.1. i komercijalna peroksidaza su kovalentno imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata. Umrežena peroksidaza je pripremljena u dva koraka: 1) taloženje i 2) umrežavanje. Taložni reagens (acetone, amonijum-sulfat, 2-propanol) je dodat u rastvor enzima u odnosu 1:3 v/v u kojem se nalazi 1, 5, 10 mg BSA. Dobijena smeša se inkubira 45 min uz konstantno mešanje (200 o min^{-1}) na 4°C .

Po završetku taloženja u reakcionu smešu se doda rastvor glutaraldehida (25 %) do postizanja finalne koncentracije 0,5; 1; 2; 3 i 6 %. Smeša se uz konstantno mešanje (4°C , 200 o min^{-1}) inkubira dodatnih 3 h. Dobijeni biokatalizator se odvaja od supernatanta filtriranjem (Win lab filter paper, prečnik 125 mm) i ispira puferom (0,1 M fosfatni, pH 7). Supernatant i filtrati se skupljaju i u njima se određuje sadržaj proteina i aktivnost na način opisan u poglavljima 6.2.3. i 6.4.1.

Uspešnost imobilizacije je opisana sa dva parametra:¹⁷³

Zadržana aktivnost (%)

$$= \frac{\text{Ukupna aktivnost dobijenog biokatalizatora (U)}}{\text{Aktivnost peroksidaze unete u sistem (U)}} \times 100 \quad (15)$$

Stepen umrežavanja (%)

$$= \left[1 - \frac{\text{Sadržaj proteina u supernatantu (mg)}}{\text{Uneta masa proteina (mg)}} \right] \times 100 \quad (16)$$

6.5.2. Određivanje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena imobilisanom u obliku umreženih ezimskih agregata u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

6.5.2.1. Ispitivanje uticaja pH na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena imobilisanom u obliku umreženih ezimskih agregata u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Uticaj pH na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom imobilisanom u obliku umreženih agregata se ispituje na način opisan u poglavlju 6.4.5.1.

6.5.2.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena imobilisanom u obliku umreženih ezimskih agregata u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Uticaj vodonik-peroksida na reakciju obezbojavanja AV 109 boje katalizovanu peroksidazom imobilisanom u obliku umreženih enzimskih agregata ispitan je na način opisan u poglavlju 6.4.5.2.

6.5.2.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena imobilisanom u obliku umreženih ezimskih agregata u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Uticaj početne koncentracije boje na obezbojavanje AV 109 ispituje se variranjem početne koncentracije boje u opsegu 10–100 mg L⁻¹. Pripremi se osnovni rastvor boje koncentracije 100 mg L⁻¹ u acetatnom puferu (0,1 M, pH 4), a željene koncentracije boje se dobiju razblaživanjem osnovnog rastvora. Prilikom variranja početne koncentracije boje, koncentracija vodonik-peroksida 0,1 mM, pH 4 i 0,1 U

imobilisanog biokatalizatora dobijenog umrežavanjem komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena se održavaju konstantnim. Uticaj boje na stepen obezbojavanja se prati spektrofotometrijski na 590 nm, a dobijeni rezultati se preračunavaju po j -ni (13) iz poglavlja 6.3.1.

6.5.2.4. Ispitivanje operativne stabilnosti peroksidaze imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata

Operativna stabilnost peroksidaze imobilisane u obliku umreženih agregata ispitana je u izotermnom šaržnom reaktoru zapremine 5 mL pri konstantnim reakcionim uslovima: pH 4, koncentracija vodonik-peroksida 0,1 mM, koncentracija boje 30 mg L⁻¹, 0,1 U imobilisanog biokatalizatora, na način opisan u poglavlju 6.4.5.5.

Operativna stabilnost umrežene neprečišćene peroksidaze ispitana je i u reaktoru sa pakovanim slojem sa recirkulacijom napojne smeše. Kao reaktor u ovom eksperimentu koristi se cilindrična staklena cev dužine 90 mm i prečnika 5 mm. Na dno se postavi vata da bi sprečio gubitak biokatalizatora iz reaktora. Reakciona smeša (25 mL) sledećeg sastava: boja 30 mg L⁻¹, vodonik-peroksid 0,1 mM, biokatalizator 0,1 U, pH 4 se protokom 6,25 mL min⁻¹ se pumpa kroz pakovani sloj imobilisanog biokatalizatora. Napredovanje reakcije se prati spektrofotometrijski na 590 nm, periodičnim uzimanjem uzorka i snimanjem promene apsorbance. Nakon završenog ciklusa, reaktor se ispira puferom (0,1 M acetatni, pH 4) i dodaje se sveža napojna smeša. Ciklusi se ponavljaju dok se detektuje obezbojavanje AV 109 boje.

6.6. Ispitivanje toksičnosti rastvora AV 109 boje pre i posle enzimskog tretmana

6.6.1. Ispitivanje hemijske potrošnje kiseonika (HPK) i ukupnog organskog ugljenika (UOU) rastvora AV 109 boje pre i nakon enzimskog tretmana

Hemijska potrošnja kiseonika u uzorcima pre i posle enzimskog tretmana je određena zatvorenom refluksnom metodom. 2 mL testiranog uzorka se pipetira u vijale (10 mL zapremina, 19 mm prečnik) koje sadrže 0,9 mL digestivnog rastvora i 2,1 mL kiselog rastvora sumporne kiseline. Digestivni rastvor se priprema na sledeći način: 10,216 g K_2CrO_7 , 167 mL koncentrovane H_2SO_4 i 33,3 g $HgSO_4$ se rastvori u 1 L destilovane vode. Kiseli rastvor sumporne kiseline se dobija rastvaranjem 5,5 g Ag_2SO_4 u 1 kg koncentrovane H_2SO_4 i ostavi da stoji preko noći kako bi se Ag_2SO_4 rastvorio u potpunosti. Slepa proba je pripremana na isti način samo je umesto 2 mL uzorka dodavana destilovana voda. U refluksnom HPK reaktoru rastvori se zagrevaju 2 h na 148–150 °C, a potom hlade 45 min na sobnoj temperaturi. HPK ($mg\ O_2\ L^{-1}$) u uzorcima je određivan spektrofotometrijski korišćenjem HANNA, HI 83099 spektrofotometra.

Ukupan organski ugljenik (UOU) u uzorcima pre i nakon enzimskog tretmana određen je standardnom metodom SRPS ISO 8245:2007 korišćenjem TOC–VCPA analizatora (Shimadzu Corporation).

6.6.2. Ispitivanje akutne toksičnosti rastvora AV 109 boje pre i nakon enzimskog tretmana korišćenjem *Artemia salina* cisti

Akutna toksičnost u uzorcima pre i posle enzimskog tretmana određena je korišćenjem račića *Artemia salina*. Račići, zrele jedinke dobijaju se izleganjem iz cisti koje se inkubiraju 24 h u slanom konstantno aerisanom rastvoru, na temperaturi 26–28 °C. Uzorci pre i posle enzimskog tretmana sa odgovarajućim razblaženjima (10–100 %) korišćeni su za određivanje akutne toksičnosti. U uzorke odgovarajućih razblaženja zapremine 10 mL se dodaje 10 zrelih jedinki račića i inkubiraju se 24 h na temperaturi 26–28 °C uz konstantnu aeraciju. U toku inkubacije račići nisu hranjeni. Paralelno sa testiranim uzorcima, pripremaju se i kontrole: negativna (veštačka slana voda–32 g L^{-1} NaCl i račići) i pozitivna ($K_2Cr_2O_7$, 100 mg L^{-1} i račići) sa odgovarajućim

razblaženjima. Pre dodavanja račića u svim uzorcima je potrebno podesiti pH na 8, korišćenjem 0,1 M NaOH. Nakon 24 h inkubacije upoređuje se broj pokretnih i nepokretnih (uginulih) jedinki i određuje akutna toksičnost.

6.7. Enzimaska gorivna ćelija komercijalne peroksidaze imobilisane na bakarnu elektrodu presvučenu slojem slufida

6.7.1. Priprema bakar–sulfidne elektrode

Bakar(II)sulfid je sintetisan galvanostatski ($j = 1 \text{ mA cm}^{-2}$, 600 s) sa obe strane bakarnih pločica (99,99%, Alfa–Aesar) dimenzija 2 cm x 4 cm iz rastvora 0,1 M Na₂S i 0,1 M Na₂SO₄ kao elektrolita. Pre pripreme bakar–sulfidne elektrode, bakarne pločice su uronjene u aceton u ultrazvučnom kupatilu da se uklone masnoće, potom inkubirane 10 s u 5 M rastvor HNO₃ i isprane destilovanom vodom. Ovako pripremljene elektrode su korišćene za imobilizaciju komercijalne peroksidaze.

6.7.2. Modifikacije komercijalne peroksidaze iz rena za imobilizaciju na bakar–sulfidnu elektrodu

U cilju reverzibilne imobilizacije peroksidaze iz rena na bakar–sulfidnu elektrodu, prvo je redukovani enzim ditiotreitolum (DTT). DTT–om se postiže raskidanje disulfidnih mostova u molekulu enzima i oslobađaju tiol grupe za interakciju sa bakar–sulfidnom elektrodom. 1 mL alikvota enzima (1 mg mL⁻¹) se inkubira 30 min sa 1 mL DTT–a (200 mM) pripremljenog u 20 mM fosfatnom puferu, pH 8, na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, višak DTT–a se uklanja dijalizom. Za dijalizu je upotrebljena celulozna membrana (cutt–off 12 kDa) i pufer. Pufer za dijalizu se menja dva puta nakon inkubacije 2 h na 4 °C. Nakon dve izmene pufera, dijaliza se nastavi preko noći na 4 °C. Po završetku dijalize dobijenu rastvor sa redukovanim enzimom se čuva na 4 °C do upotrebe.

6.7.3. Imobilizacija modifikovane komercijalne peroksidaze na bakar–sulfidnu elektrodu

U rastvor enzima (12 mL) dobijen nakon redukcije koncentracije 1 mg mL⁻¹ uroni se pripremljena bakar–sulfidna elektroda. Elektroda se inkubira u rastvoru enzima 24 h na 4 °C. Nakon završene imobilizacije, odvoji se supernatant i elektroda uroni u rastvor 1 M CaCl₂ da se uklone adsorbovani molekuli enzima. Dobijena elektroda sa imobilisanom peroksidazom se čuva u puferu (fosfatni, pH 7, 0,1 M) na 4 °C do upotrebe u enzimskoj gorivnoj ćeliji.

6.7.4. Konstrukcija enzimske gorivne ćelije

HRP–gorivna ćelija je konstruisana od dve staklene čaše zapremine 150 mL, povezane staklenom U–cevi prečnika 0,8 cm, napunjenu sa 0,1 L elektrolita (0,1 M H₂SO₄ u 0,05 M kalijum–biftalatom puferu pH 4,1). Čaša sa anodom (HRP–imobilisana na bakar–sulfidnu elektrodu) i rastvorom AV 109 boje koncentracije 30 mg L⁻¹ pripremljena u K–biftalatom puferu pH 4, 0,1 M, je postavljena na magnetnu mešalicu, dok se u drugoj čaši sa čistim elektrolitom nalazila Pt–katoda (1 cm x 10 cm uronjena u čašu) sa dotokom mehurića vazduha ~ 10 mL s⁻¹. Zasićena kalomelova elektroda se koristi kao referentna.

REZULTATI I DISKUSIJA

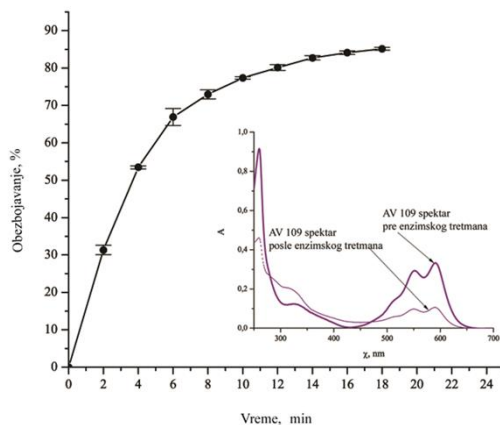
7. Određivanje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje komercijalnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Sintetičke boje predstavljaju grupu organskih jedinjenja koje se primenjuju u svim granama industrije. Problem zagađenja sintetičkim bojama je izuzetno kompleksan zbog obojenja koje u velikoj meri sprečava procese fotosinteze u vodenoj sredini kao i zbog proizvoda razgradnje koji vrlo često mogu biti znatno toksičniji i štetniji od polaznih jedinjenja.¹¹⁴ Pored toga, zagađena voda može da prouzrokuje brojne infekcije i oboljenja kod ljudi.

Enzimski tretman otpadnih voda se pokazalo kao efikasan i ekološki prihvatljiv metod. Primena takvog tretmana podrazumeva poznavanje mehanizma kako bi se mogla kontrolisati reakcija i dobiti efluenti koji su ekološki prihvatljivi, a procesi ekonomski opravdani. Mehanizam konkretne reakcije uklanjanja boje se utvrđuje ispitivanjem uticaja: vremena kontakta, koncentracije supstrata boje i vodonik-peroksida, pH reakcione smeše, temperature i koncentracije biokatalizatora na stepen uklanjanja boja.

7.1. Ispitivanje uticaja vremena kontakta na reakciju obezbojavanja AV 109 boje komercijalnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Vreme kontakta enzim–supstrat potrebno za postizanje maksimalnog stepena obezbojavanja pod datim reakcionim uslovima određeno je na način opisan u poglavlju 6.3.1. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 7.1.



Slika 7.1. Zavisnost stepena obezbojavanja AV 109 boje od vremena kontakta (uslovi: pH 5,25, koncentracija H_2O_2 2 mM, koncentracija boje 30 mg L^{-1} , koncentracija enzima $0,15 \text{ U mL}^{-1}$, temperatura $24 \text{ }^\circ\text{C}$)

Sa slike 7.1. jasno se vidi porast obezbojavanja boje AV 109 sa produženjem vremena kontakta. Ovakav trend se može zapaziti u prvih 15 min reakcije. Nakon toga, može se uočiti da povećanje vremena kontakta ne dovodi do značajnog povećanja obezbojavanja ispitivane boje. Za 15 min uklonjeno je $85 \pm 0,8 \%$ ispitivane boje pod datim uslovima. U literaturi postoji mali broj radova koji se bave problematikom uklanjanja sintetičkih boja, naročito antrahinonskih. Pored peroksidaze iz rena, enzim koji se koristi u cilju uklanjanja sintetičkih boja je i lakaza. Glavna prednost primene peroksidaze iz rena u odnosu na lakazu jeste što peroksidaza ne zahteva prisustvo malih molekula tzv. redoks medijatora u katalizi reakcija obezbojavanja sintetičkih boja.²²²

Lakaza iz *Polyporus* sp. S133 je korišćena kao biokatalizator za uklanjanje antrahinonske boje, a reakcija obezbojavanja je trajala znatno duže i uz manju

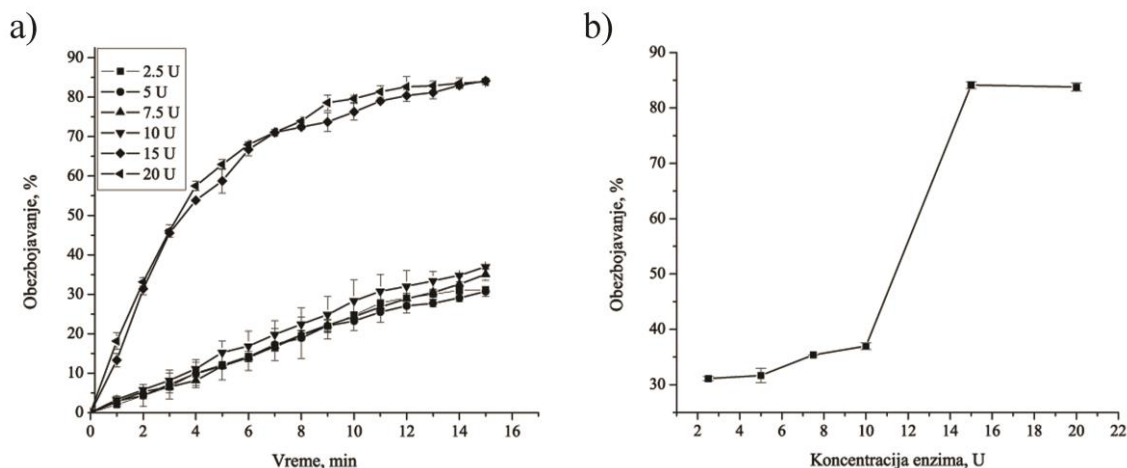
efikasnost u poređenju sa reakcijom obezbojavanja AV 109 boje katalizovanom peroksidazom iz rena. Naime, 26 % i 60 % obezbojavanja ispitivane boje je postignuto nakon 24 h i 48 h trajanja reakcije, a povećanje stepena obezbojavanja od 20 % je postignuto tek nakon dodatka *N*-hidroksibenzotriazola kao redoks medijatora.⁵⁹

Potpuno uklanjanje di-azo boje C. I. Acid Black 10 BX (20 mg L^{-1}) je zabeleženo nakon 45 min kontakta pri koncentraciji enzima od $2,20 \text{ IU mL}^{-1}$.¹⁸⁹ Afinitet enzima prema supstratu zavisi od oblika u kojem se supstrat nalazi pod datim uslovima (pozitivno, negativno naelektrisan, neutralan) samim tim i na stepen obezbojavanja. U ovom radu, s obzirom na visok stepen obezbojavanja koji je postignut za relativno kratko vreme može se zaključiti da je struktura boje kompatibilna sa strukturom aktivnog centra peroksidaze pod datim uslovima. U narednoj eksperimentalnoj seriji ispitana je mogućnost povećanja stepena obezbojavanja ispitivanjem uticaja početne koncentracije enzima.

7.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije enzima na reakciju obezbojavanja AV 109 boje komercijalnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Koncentracija enzima pri kojoj se postiže maksimalno obezbojavanje pri konstantnom vremenu kontakta 15 min je određena variranjem koncentracije enzima u opsegu $0,025\text{--}0,2 \text{ U mL}^{-1}$ (to odgovara ukupnim jedinicama u rastvoru od 2,5 do 20 U). Dobijeni rezultati su prikazani na slici 7.2.

Sa slike 7.2. sa porastom koncentracije enzima jasno se vidi povećanje stepena obezbojavanja. Pri početnoj koncentraciji enzima od $0,15 \text{ U mL}^{-1}$ postignuto je maksimalno obezbojavanje ispitivane boje od $86,3 \pm 0,9 \%$. Za uklanjanje di-azo boje Acid Black 10 BX bilo je potrebno uneti u sistem $2,20 \text{ IU mL}^{-1}$ peroksidaze što je 15 puta više nego što je to slučaj sa ispitivanom antrahinonskom bojom.¹⁸⁹



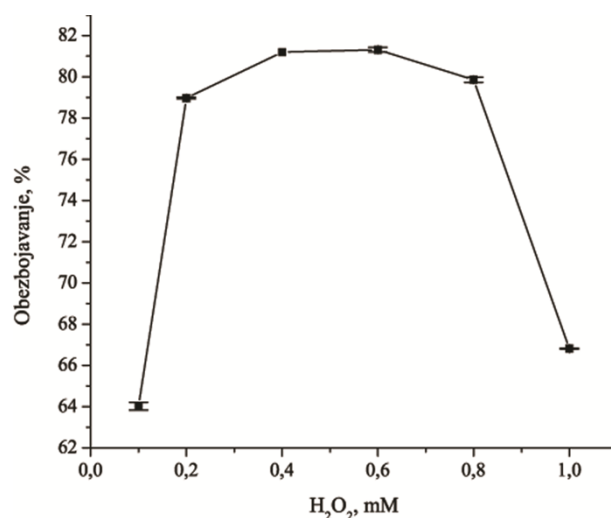
Slika 7.2. Uticaj početne koncentracije enzima na obezbojavanje AV 109 boje (uslovi: pH 5,25, koncentracija H_2O_2 2 mM, koncentracija boje 30 mg L^{-1} , vreme kontakta 15 min, temperatura $24 \text{ }^\circ\text{C}$)

Sa druge strane, za uklanjanje reaktivne boje C. I. Remazol Brilliant Blue R (RBBR) peroksidazom izolovanom iz soje primenom 70 IU mL^{-1} postignuto je isto obezbojavanje (86 %) nakon 13 min.²²³ Peroksidaza iz bundeve (*Cucurbita pepo*) takođe je upotrebljena u reakciji obezbojavanja sintetičkih boja, konkretno azo boja. Za uklanjanje približno 90 % ispitivane boje bilo je potrebno $2,5 \text{ IU mL}^{-1}$ peroksidaze što je približno 16 puta više enzima u poređenju sa količinom enzima potrebnom za obezbojavanja 83,6 % antrahinonske boje AV 109, peroksidazom iz rena.²²⁴ Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da peroksidaza iz rena ima veliki potencijal za uklanjanje sintetičkih boja u poređenju sa peroksidazama izolovanim iz drugih izvora (soja, bundeva).

7.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Uticaj početne koncentracije H_2O_2 na stepen obezbojavanja AV 109 boje ispitan je variranjem početne koncentracije H_2O_2 u opsegu 0,1–1,0 mM. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 7.3.

Porast obezbojavanja AV 109 sa porastom koncentracije H_2O_2 u opsegu 0,1–0,4 mM je očigledan sa slike 7.3. Porastom koncentracije H_2O_2 iznad 0,6 mM, stepen obezbojavanja značajno opada. Na osnovu ovoga može se zaključiti da H_2O_2 ima inhibitorni uticaj na peroksidazu iz rena. Negativan uticaj većih koncentracija H_2O_2 na aktivnost oksidoredukujućih enzima a samim tim i na postignuto obezbojavanje sintetičkih boja potvrđen je i kod drugih istraživača. Naime, za uklanjanje sintetičke boje C. I. Acid Orange 7 iz vodenog rastvora bilo je potrebno uneti u sistem H_2O_2 u koncentraciji od 0,8 mM.²²⁵



Slika 7.3. Uticaj H_2O_2 na obezbojavanje AV 109 (uslovi: pH 5,25, koncentracija enzima $0,15 \text{ U mL}^{-1}$, koncentracija boje 30 mg L^{-1} , vreme kontakta 15 min, temperatura $24 \text{ }^\circ\text{C}$)

Određivanjem optimalne koncentracije H_2O_2 za uklanjanje azo boje C. I. Acid Blue 25, utvrđeno je da je optimalna koncentracija peroksida neophodna za njeno uklanjanje 0,8 mM. U oba navedena slučaja, snažan inhibitorni uticaj peroksida zapažen je pri koncentracijama iznad 0,8 mM.²²⁶ Jedan od mogućih načina da se izbegne inhibicija

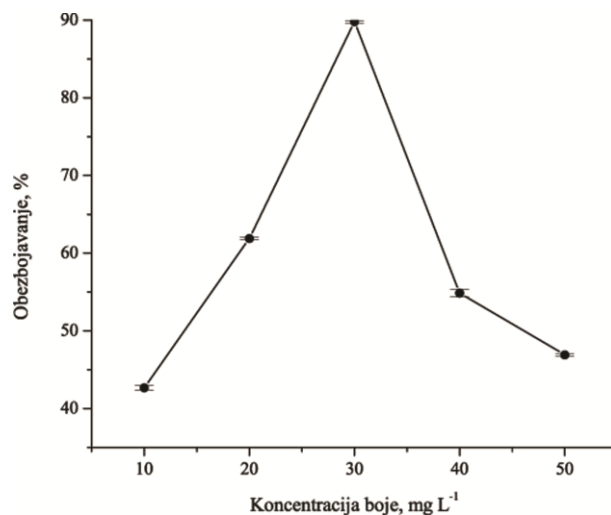
ko-supstratom jeste sinergizam između glukozo–oksidaze i peroksidaze iz rena. Primenom glukozo–oksidaze sprečava se inhibicija ko-supstratom, zbog toga što glukozo–oksidaza oksidujući glukozu proizvodi samo količinu peroksida koja je neophodna za katalitički mehanizam peroksidaze.²²⁶

7.4. Ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom perokidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Značajan parametar koji je potrebno ispitati prilikom određivanja optimalnih uslova obezbojavanja jeste uticaj početne koncentracije boje na tok reakcije. Uticaj boje na obezbojavanje AV 109 ispituje se na način opisan u poglavlju 6.3.3.

U prethodnim istraživanjima je pokazano da struktura supstrata-boje u velikoj meri utiče na brzinu odigravanja reakcije. Naime, brzina obezbojavanja u velikoj meri zavisi od supstituenata prisutnih na aromatičnom prstenu. Na primer, elektron-akceptorske grupe, *m*-NO₂, smanjuju brzinu reakcije, dok elektron-donorske grupe, *p*-CH₃, znatno povećavaju osetljivost boje prema oksidativnom napadu, povećavajući i stepen obezbojavanja.²²⁷

Uticaj boje na brzinu obezbojavanja ispitan je variranjem početne koncentracije boje u opsegu 10–50 mg L⁻¹ (slika 7.4.).



Slika 7.4. Uticaj boje na obezbojavanje AV 109 (uslovi: pH 5,25, koncentracija H₂O₂ 0,4 mM, koncentracija enzima 0,15 U mL⁻¹, vreme kontakta 15 min, temperatura 24 °C)

Porast obezbojavanja ispitivane boje od 42,4±0,9 % na 61,5±1,1 % se jasno vidi sa slike 7.4. pri početnim koncentracijama boje od 10 i 20 mg L⁻¹. Isti trend se nastavlja sve do postizanja obezbojavanja od 90,0±0,5 % pri početnoj koncentraciji AV 109 boje

od 30 mg L^{-1} . Dalji porast koncentracije boje negativno utiče na obezbojavanje, kao najverovatnije posledica inhibicije peroksidaze supstratom u višku.

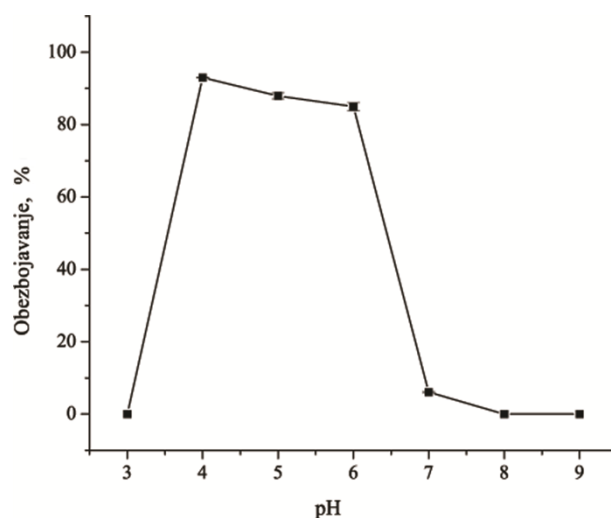
7.5. Ispitivanje uticaja pH na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

pH rastvora u kome se odigrava reakcija obezbojavanja utiče na naelektrisanje boje, enzima kao i na njihove međusobne interakcije.²²⁸ Iz tog razloga ispitan je uticaj pH na posmatranu reakciju po metodi opisanoj u poglavlju 6.3.4.

Sa slike 7.5. jasno može da se uoči veliki uticaj pH na reakciju obezbojavanja. U reakcionoj smeši pH 4 postignuto je obezbojavanje od $92,8 \pm 0,5$ % nakon 15 min kontakta. Stoga pH 4 se može smatrati optimalnim za posmatranu reakciju. Sposobnost peroksidaze da katalizuje reakciju obezbojavanja u kiseloj sredini je prednost sa aspekta primene, jer su efluenti obojeni sintetičkim bojama uglavnom blago kiseli.⁴⁵ Sa druge strane, sredine u kojima je $\text{pH} < 3,6$ i $\text{pH} > 6$ nisu pogodne za ispitivanu reakciju zbog malog stepena obezbojavanja koji se postiže, pa se ova pojava može povezati sa uticajem pH reakcionog medijuma na aktivnost peroksidaze.²²⁹

Za većinu supstrata je karakteristično da poseduju jonizujuće grupe, pri čemu je samo jedno jonizujuće stanje kompatibilno sa aktivnim centrom enzima i tada enzim ispoljava maksimalnu aktivnost. Jedan od razloga niskog stepena obezbojavanja u reakcionoj smeši $\text{pH} < 3,6$ i $\text{pH} > 6$ jeste taj da je pod tim uslovima supstrat u takvom obliku da enzim ne može da ispolji svoju katalitičku funkciju.

Drugi razlog može biti i taj da se u pomenutim pH opsezima u strukturi enzima iniciraju brojne strukturne promene koje mogu dovesti i do gubitka same katalitičke funkcije enzima. Poznato je da u uslovima $\text{pH} < 4$ vrlo lako dolazi do gubitka hem-a iz aktivnog centra peroksidaze, što naravno dovodi i do gubitka aktivnosti enzima.

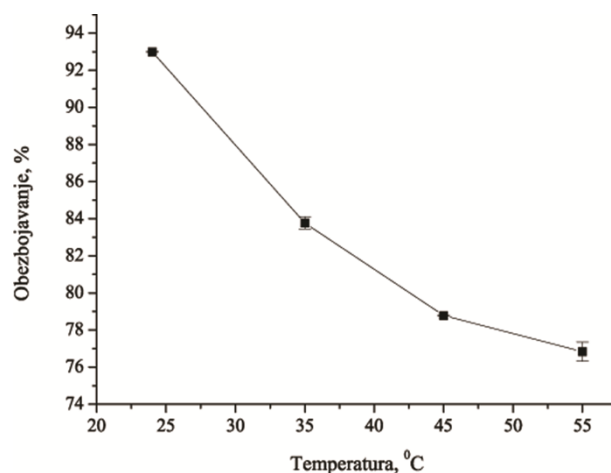


Slika 7.5. Uticaj pH na obezbojavanje AV 109 (uslovi: koncentracija H_2O_2 0,4 mM, koncentracija boje 30 mg L^{-1} , koncentracija enzima $0,15 \text{ U mL}^{-1}$, vreme kontakta 15 min, temperatura $24 \text{ }^\circ\text{C}$)

Međutim, dobijeni rezultati su u suprotnosti sa pojedinim rezultatim pronađenim u literaturi. Naime, optimalan pH za uklanjanje boje C. I. Remazol Blue je 2,0, ukazujući na to da je na pH 6 ova boja snažan kompetitivni inhibitor peroksidazi. Slično, najveći stepen uklanjanja boje metil-oranž je zapažen pri vrednostima $\text{pH} < 3$, dok je na višim pH vrednostima zabeležen znatno niži stepen obezbojavanja.²³¹

7.6. Ispitivanje uticaja temperature na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom peroksidazom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Peroksidaza iz rena je izuzetno osetljiva na povišene temperature. Kako bi se ispitala optimalna temperatura za reakciju obezbojavanja AV 109 boje, temperatura smeše na kojoj je izvođena reakcija je varirana u opsegu $24\text{--}55 \text{ }^\circ\text{C}$, Dobijeni rezultati prikazani su na slici 7.6.



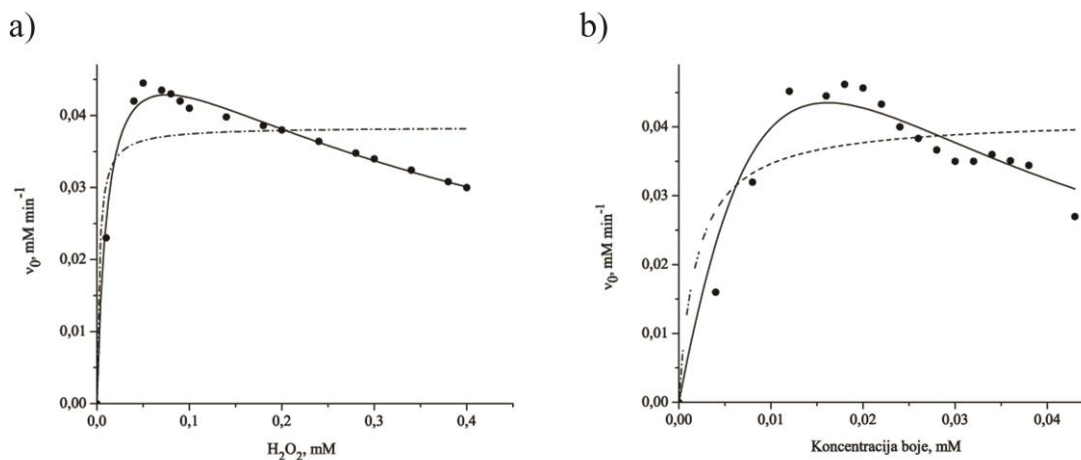
Slika 7.6. Uticaj temperature na obezbojavanje AV 109 boje (uslovi: koncentracija H_2O_2 0,4 mM, koncentracija boje 30 mg L^{-1} , koncentracija enzima 0,15 U mL^{-1} , pH 4, vreme kontakta 15 min)

Kao što može da se zaključi sa slike 7.6. tipičan profil krive zavisnosti aktivnosti enzima od temperature nije dobijen. Naime, porast temperature dovodi do naglog pada aktivnosti enzima i stepena obezbojavanja. Na osnovu dobijenih rezultata, 24 °C je temperatura koja je usvojena za reakciju obezbojavanja AV 109 boje katalizovanu komercijalnom peroksidazom. Pod eksperimentalno utvrđenim optimalnim uslovima: koncentracija H_2O_2 0,4 mM, koncentracija boje 30 mg L^{-1} , koncentracija enzima 0,15 U mL^{-1} , pH 4, vreme kontakta 15 min, temperatura 24 °C postignuto je obezbojavanje od $94,7 \pm 1,4 \%$ AV 109 boje komercijalnom peroksidazom.

7.7. Određivanje kinetičkih konstanti komercijalne peroksidaze u reakciji obezbojavanja AV 109 boje u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Reakcija oksidacije brojnih aromatičnih supstrata peroksidazom iz rena u prisustvu vodonik-peroksida opisuje se dvosupstratnim ping pong bi–bi kinetičkim modelom. Katalitički mehanizam peroksidaze iz rena detaljno je objašnjen u poglavlju 2.3. Validnost predloženog dvosupstratnog modela za reakciju obezbojavanja antrahinonske boje peroksidazom iz rena, ispitana je praćenjem početne kinetike reakcije obezbojavanja AV 109 boje pod optimalnim uslovima. Dobijeni eksperimentalni podaci su fitovani modelom bisupstratnih enzimskih reakcija, ping pong bi bi modelom bez inhibicije, sa inhibicijom peroksidom i bojom (detaljno

objašnjenje modela dato je u poglavlju 3.3.) i rezultati su prikazani na slici 7.7. i u tabeli 7.8.



Slika 7.7. a) Zavisnost početne brzine od koncentracije H_2O_2 pri konstantnoj koncentraciji AV 109 boje (0,018 mM); b) Zavisnost početne brzine reakcije od koncentracije boje pri konstantnoj koncentraciji H_2O_2 (0,4 mM). Simboli predstavljaju eksperimentalne podatke, linije kinetički model inhibicije sa supstratom, isprekidane linije kinetički model bez inhibicije

Na osnovu vrednosti koeficijenata linearnosti prikazanih u tabeli 7.8., zaključak je da je u ispitivanoj reakciji prisutna inhibicija sa oba supstrata ($R^2=0,9225$ za inhibiciju bojom i $R^2=0,9902$ za inhibiciju peroksidom). Dalje, na osnovu vrednosti konstanti inhibicije koje iznose 0,0080 mM za boju i 0,4436 mM za H_2O_2 , očigledno je da boja ima znatno izraženiji inhibitorni uticaj na enzim nego H_2O_2 .

Dobijeni podaci su potvrda već dobijenih rezultata prilikom određivanja optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje, gde se mogao zapaziti snažan inhibitorni uticaj ispitivane boje na enzim.

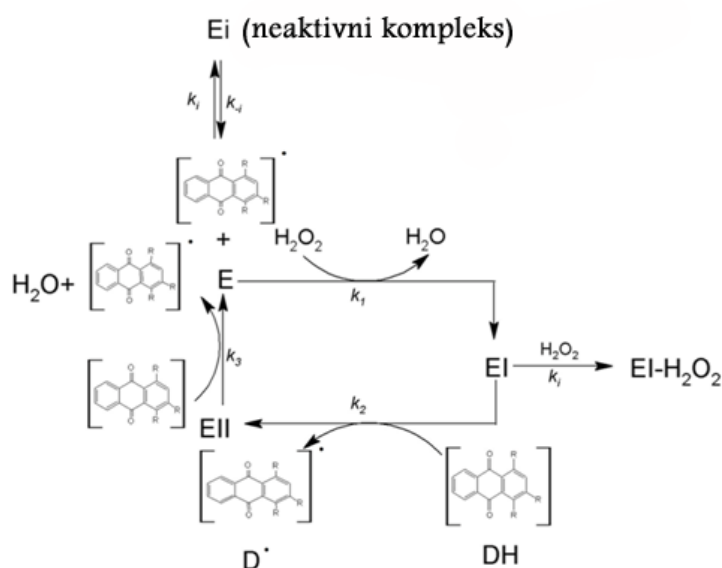
Tabela 7.8. Vrednosti kinetičkih parametara dobijenih fitovanjem eksperimentalnih podataka ping pong bi–bi modelom bez inhibicije, sa inhibicijom H₂O₂ i inhibicijom AV 109 bojom

<u>Kinetički parametri</u>	<u>Inhibicija bojom</u>	<u>Bez inhibicije bojom</u>	<u>Inhibicija sa H₂O₂</u>	<u>Bez inhibicije sa H₂O₂</u>
V_{\max} (mM min ⁻¹)	1,638	0,5178	1,097	1,185
K_{mD} (mM)	0,2374	0,0245	0,3302	0,5373
K_i (mM)	0,0080	/	0,4436	/
K_{m,H_2O_2} (mM)	0,4372	0,6908	0,2356	0,8081
R^2	0,9225	0,6456	0,9902	0,7520

gde je V_{\max} – maksimalna brzina, $[H_2O_2]_0$ i $[D]_0$ – početne koncentracije peroksida i boje, K_{mD} i K_{m,H_2O_2} –Mihaelisove konstante za boju i peroksid, K_i –konstante inhibicije boje i peroksida.

Pored toga, poređenjem vrednosti Mihaelis–ovih konstanti za boju i peroksid potvrđuje se izraženiji inhibitorni uticaj boje nego peroksida na peroksidazu. Mihaelis–ova konstanta dobijena fitovanjem eksperimentalnih podataka za peroksid je 0,2356 mM, dok je Mihaelis–ova konstanta za boju 0,3302 mM što ukazuje na manji afinitet enzima prema boji, a to je u skladu sa podatkom o jače izraženom inhibitornom uticaju boje u poređenju sa inhibitornim uticajem vodonik-peroksida na enzim.

Na osnovu svega navedenog, katalitički mehanizam obezbojavanja AV 109 boje se može prikazati šematski na sledeći način:



Slika 7.9. Šematski prikaz ping pong bi–bi mehanizma sa inhibicijom bojom i peroksidom

Rezultati dobijeni nakon prve eksperimentalne serije ukazuju na veliki potencijal primene peroksidaze u obezbojavanju sintetičkih, konkretno antrahinonskih, boja. Takođe, ova serija eksperimenata je pokazala koji su to značajni parametri koje je potrebno pratiti u narednom toku istraživanja što je u velikoj meri pomoglo u organizaciji i izvođenju naredne serije eksperimenata. Vrednost pH, odnos koncentracija supstrata boje/H₂O₂ su parametri na koje će se staviti akcenat u narednim eksperimentima kada je u pitanju optimizacija obezbojavanja rastvora AV 109 boje. Vreme kontakta je direktno zavisno od pH reakcione sredine, tako da će se ispitivanjem pH usvajati i vreme kontakta. S obzirom na to da se peroksidaza pokazala kao izuzetno osetljiva na povišene temperature, svi eksperimenti će biti izvođeni na sobnoj temperaturi.

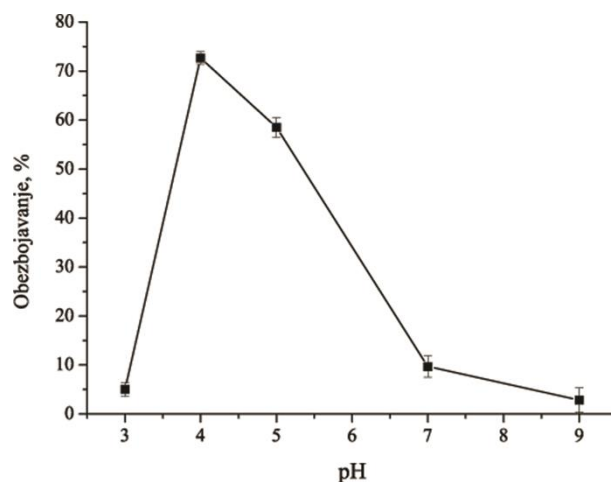
8. Određivanje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Izolovanje i prečišćavanje je komplikovan i skup proces, pa je primena enzima u slobodnom obliku često ekonomski neopravdana. U cilju povećanja ekonomičnosti procesa, ispitana je i mogućnosti obezbojavanja AV 109 boje neprečišćenom, peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena dobijenom na način opisan u poglavlju 6.2.1. Reakcija obezbojavanja katalizovana neprečišćenom peroksidazom vođena je na osnovu podataka dobijenih optimizacijom uslova obezbojavanja AV 109 boje komercijalnom peroksidazom. Reakcija katalizovana komercijalnom peroksidazom je poslužila kao putokaz za bolje planiranje, organizaciju i vođenje eksperimenata sa neprečišćenom peroksidazom u cilju maksimalne iskorišćenosti primenjenog biokatalizatora i efikasnosti procesa. Optimalni uslovi određeni su ispitivanjem uticaja pH, koncentracije supstrata, boje i vodonik-peroksida, na obezbojavanje AV 109 boje, pri konstantnoj koncentraciji enzima (0,1 U) i konstantnoj temperaturi 24 °C.

8.1. Ispitivanje uticaja pH na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

U prethodnoj seriji eksperimenata potvrđeno je da je parametar od najvećeg značaja za reakciju obezbojavanja AV 109 boje pH reakcione smeše. pH reakcione smeše diktira naelektrisanje supstrata (boje), enzima i afinitet enzima prema supstratu. Shodno tome, u cilju maksimalne iskorišćenosti biokatalizatora koja se ogleda u efikasnosti i postizanju što većeg stepena obezbojavanja, prvi parametar koji je potrebno ispitati jeste pH.

Optimalan pH za obezbojavanje AV 109 boje katalizovano peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena određuje se po metodi iz poglavlja 6.3.5. Dobijeni eksperimentalni podaci o uticaju pH na stepen obezbojavanja prikazani su grafički na slici 8.1.



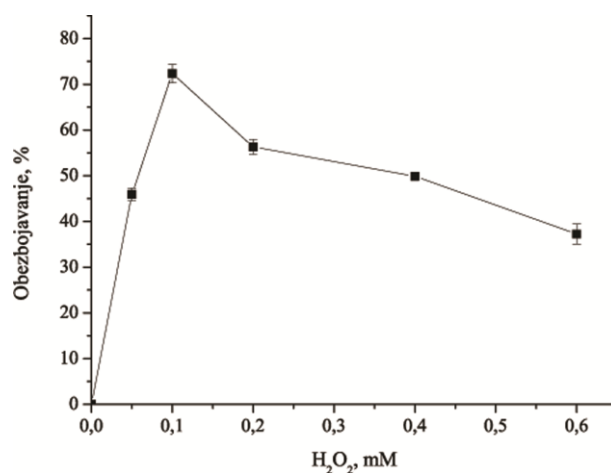
Slika 8.1. Uticaj pH na obezbojavanje AV 109 boje neprečišćenom peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena (uslovi: vreme kontakta 35 min, koncentracija boje 30 mg L⁻¹, koncentracija H₂O₂ 0,1 mM, enzim 0,1 U)

Na slici 8.1. je prikazano tipično ponašanje peroksidaze u reakcionoj smeši različitih pH vrednosti u ispitivanoj reakciji obezbojavanja. U kiseloj sredini (pH 3) i pH 7–9 zapaža se mala aktivnost peroksidaze, dok najveća aktivnost se detektuje u pH sredini 4–5. Najmanji stepen obezbojavanja postignut na pH 3 iznosi 8,25±1,2 % dok je u opsegu pH 7–9 maksimalan postignut stepen obezbojavanja ~9,67±0,9. Narušavanje mreže vodoničnih veza u kiseloj sredini pH ≤3 koja štiti aktivni centar je potvrđen i u ovom slučaju.²³² Najveći stepen obezbojavanja postignut je u reakcionoj smeši gde je pH u opsegu 4–5 i iznosio je 72,7 % na pH 4 i 58,5 % na pH 5.

U literaturi se nalaze podaci o uklanjanju azo boja peroksidazom izolovanom iz svežeg ekstrakta tikvica (*Cucurbita pepo*). U okviru ovog ispitivanja, iz rastvora boje koncentracije 50 mg L⁻¹ pripremljenog u puferu pH 2, uklonjeno je 73,71 % ispitivane boje primenom 0,20 IU jedinica enzimske aktivnosti i H₂O₂ koncentracije 0,1 mM.²²⁴ Takođe, zapaženo je da obezbojavanje sa porastom pH opada, tj. da se peroksidaza iz tikvica pokazala kao najaktivnija u jako kiseloj sredini. Optimalan pH za obezbojavanje AV 109 boje katalizovano peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena se poklapa sa onim dobijenim za reakciju katalizovanu komercijalnom peroksidazom.

8.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Uticaj H_2O_2 na obezbojavanje AV 109 ispitan je u reakcionoj smeši AV 109 boje pripremljenoj u acetatnom puferu (0,1 M) pH 4. Variranjem početne koncentracije H_2O_2 u opsegu 0,05–0,6 mM dobijene su informacije o uticaju ko-supstrata na neprečišćenu peroksidazu u posmatranoj reakciji. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 8.2.



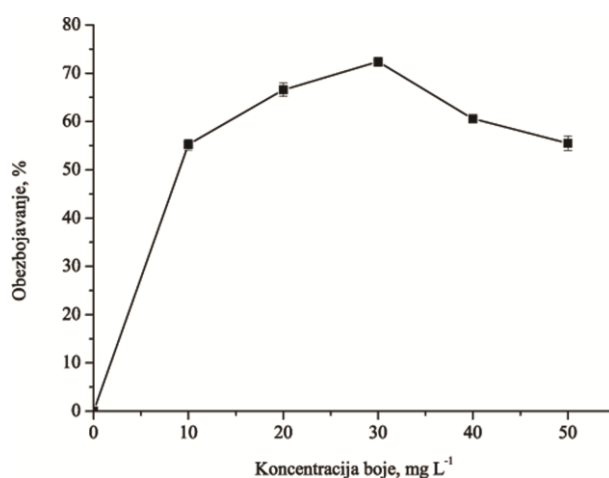
Slika 8.2. Uticaj H_2O_2 na obezbojavanje AV 109 (uslovi: vreme kontakta 35 min, koncentracija boje 30 mg L^{-1} , pH 4, enzim $0,1 \text{ U}$)

Inhibitorni uticaj H_2O_2 na peroksidazu iz svežeg ekstrakta rena je potvrđen i nakon ove serije eksperimenata. Porast obezbojavanja u opsegu H_2O_2 koncentracija 0,05–0,1 mM sa $45,9 \pm 1,4$ na $72,35 \pm 2,0$ % je evidentan sa slike 8.2. Porast koncentracije vodonik-peroksida u opsegu 0,1–0,6 mM je imao negativan uticaj na obezbojavanje AV 109 boje. Pri koncentraciji vodonik-peroksida od 0,6 mM postignuto je obezbojavanje AV 109 boje od $37,24 \pm 2,2$ %. Takođe, može se uočiti da je peroksidaza iz svežeg ekstrakata rena (optimalna koncentracija H_2O_2 0,1 mM) čak i osetljivija na povećane koncentracije H_2O_2 nego što je to slučaj sa komercijalnom peroksidazom (optimalna koncentracija H_2O_2 0,4 mM). Nečistoće prisutne u ekstraktu i njihovo sinergističko dejstvo sa H_2O_2 , najverovatniji su razlog ovakvog rezultata. Takođe, pod datim uslovima postignuto je manje obezbojenje nego sa komercijalnom peroksidazom, a vreme potrebno za to je 35 min što je duže u poređenju sa 15 min koliko je trajala reakcija katalizovana komercijalnom peroksidazom. Ovakvo ponašanje se može

pripisati difuzionim limitacijama kojima su doprinele nečistoće prisutne u svežem ekstraktu.

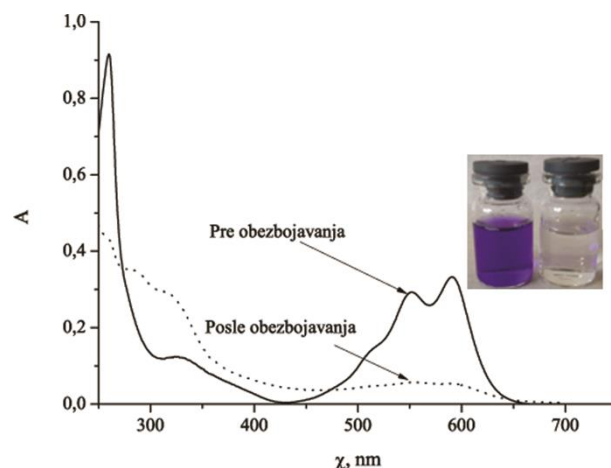
8.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Uticaj boje na obezbojavanje katalizovano peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena ispitan je variranjem početne koncentracije boje u opsegu 10–50 mg L⁻¹.



Slika 8.3. Uticaj boje na obezbojavanje AV 109 (uslovi: vreme kontakta 35 min, koncentracija H₂O₂ 0,1 mM, pH 4, enzim 0,1 U)

Optimalna koncentracija boje pri kojoj se postiže maksimalno obezbojavanje pod datim uslovima je 30 mg L⁻¹. Pri utvrđenoj početnoj koncentraciji boje peroksidaza iz rena obezboji 72,35±0,9 % AV 109 boje. Porast početne koncentracije boje iznad 30 mg L⁻¹ značajno umanjuje aktivnost peroksidaze, pa se pri početnoj koncentraciji boje od 50 mg L⁻¹ obezboji 55,54±1,5 % ispitivane boje.

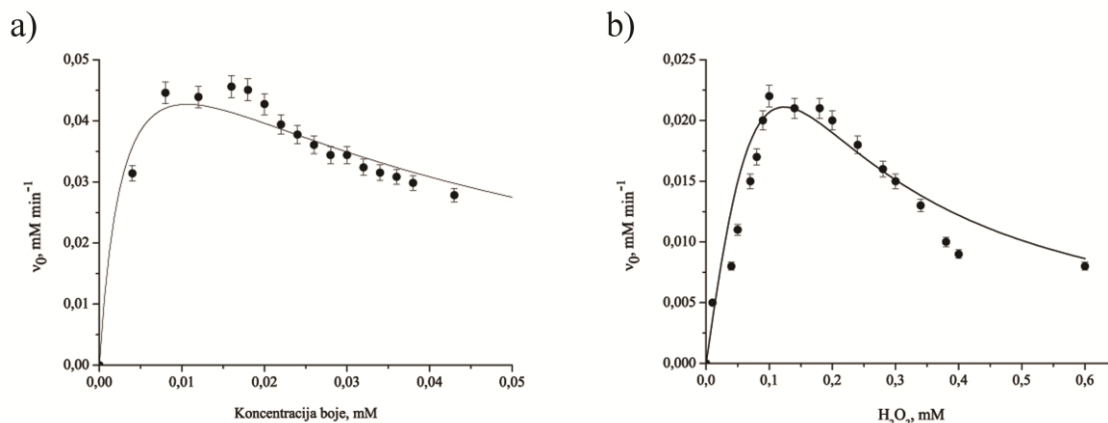


Slika 8.4. Apсорpcioni spektri AV 109 boje pre i posle obezbojavanja peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena

8.4. Određivanje kinetičkih konstanti peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena u reakciji obezbojavanja AV 109 boje u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Već je pokazano u poglavlju 7.7. da reakciju obezbojavanja antrahinonskih boja najbolje opisuje matematički model bisupstratnih reakcija ping pong bi–bi pri čemu uzima u obzir inhibiciju bojom i/ili peroksidom. Modelovanjem eksperimentalnih podataka (slika 8.5.) sa navedenim modelom dobijene su vrednosti kinetičkih konstantni i prikazane u tabeli 8.6.

Dobijeni eksperimentalni podaci pokazuju dobro slaganje sa pretpostavljenim modelom inhibicijom bojom ($R^2=0,9488$) i vodonik-peroksidom ($R^2=0,9096$). Na osnovu vrednosti Mihaelis–ovih konstanti za boju 0,0483 mM i vodonik-peroksid 1,4970 mM, može se zaključiti da peroksidaza iz svežeg ekstrakta ima veći afinitet prema boji nego prema vodonik-peroksidu. Ovakvo ponašanje je očekivano s obzirom na to da su konstate inhibicije za boju 0,0325 mM, a za vodonik-peroksid 0,0031 mM, pokazujući da je vodonik-peroksid snažniji inhibitor u konkretnom slučaju nego boja.



Slika 8.5. a) Zavisnost početne brzine od koncentracije boje pri konstantnoj koncentraciji H_2O_2 (0,1 mM); b) Zavisnost početne brzine reakcije od koncentracije H_2O_2 pri konstantnoj koncentraciji boje (0,018 mM)

Tabela 8.6. Vrednosti kinetičkih parametara dobijenih za fitovanje eksperimentalnih podataka ping pong bi–bi modelom sa inhibicijom H_2O_2 i bojom

<u>Kinetički parametri</u>	<u>Inhibicija bojom</u>	<u>Inhibicija sa H_2O_2</u>
V_{max} (mM min ⁻¹)	1,026	0,4830
K_{mD} (mM)	0,0483	0,0048
K_i (mM)	0,0325	0,0031
$K_{mH_2O_2}$ (mM)	1,393	1,4970
R^2	0,9488	0,9096

gde je V_{max} – maksimalna brzina, $[H_2O_2]_0$, $[D]_0$ – početne koncentracije peroksida i boje, K_{mD} , $K_{mH_2O_2}$ –Mihaelisove konstante za boju i peroksid, K_i – konstanta inhibicije.

Poređenje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje i efikasnosti komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena

U okviru poglavlja 7. i 8. ispitani su optimalni uslovi obezbojavanja AV 109 boje katalizovanog komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena. Broj

enzimskih jedinica peroksidaze održavan je konstantnim u svim eksperimentima 0,1 U kao i temperatura na kojoj je izvođena reakcija 24 °C. U tabeli 8.7. dat je pregled dobijenih optimalnih uslova.

Tabela 8.7. Optimalni uslovi i efikasnost komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena u obezbojavanju AV 109 boje

<u>Parametar</u>	<u>Komercijalna peroksidaza</u>	<u>Peroksidaza iz svežeg ekstrakta rena</u>
pH	4	4
Koncentracija boje, mg L ⁻¹	30	30
Koncentracija H ₂ O ₂ , mM	0,4	0,1
Vreme kontakta, min	15	35
Obezbojavanje, %	94,7±1,4	72,35±0,9

Slično ponašanje komercijalne i neprečišćene peroksidaze je očigledno na osnovu tabele 8.7. Iako je pod datim optimalnim uslovima postignut manji stepen obezbojavanja sa neprečišćenom peroksidazom u poređenju sa stepenom obezbojavanja postignutim u reakciji katalizovanoj komercijalnom peroksidazom, neosporiv je veliki potencijal primene neprečišćene peroksidaze u posmatranoj reakciji. U cilju poređenja dobijenih rezultata u ova dva sistema (reakcija katalizovana komercijalnom i neprečišćenom peroksidazom) količina enzima je održavana konstantnom. Potencijal primene neprečišćene peroksidaze se ogleda upravo u ekonomičnosti procesa. Naime, povećanjem količine unetog enzima u sistem moguće je postići znatno veći stepen obezbojavanja. Ukoliko se uzme u obzir znatno niža cena neprečišćenog u poređenju sa komercijalnim enzimom, jasno je da obezbojavanje katalizovano neprečišćenom peroksidazom ima potencijal za primenu u sistemima većih razmera jer se uz niže troškove može dostići efikasnost komercijalne peroksidaze.

Poređenjem vrednosti kinetičkih konstanti (tabela 8.8.) potvrđene su vrednosti optimalnih parametara i objašnjeno je ponašanje obe primenjene peroksidaze u datoj reakciji.

Tabela 8.8. Vrednosti kinetičkih konstanti dobijenih fitovanjem eksperimentalnih podataka za reakciju obezbojavanja AV 109 boje katalizovanu komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena

<i>Kinetičke konstante</i>	<i>Komercijalna peroksidaza</i>	<i>Peroksidaza iz svežeg ekstrakta rena</i>
K_{iD} (mM)	0,0080	0,0325
K_{i,H_2O_2} (mM)	0,4436	1,497
V_{max} (mM min ⁻¹)	1,638	1,026
R^2	0,9225	0,9096

gde je V_{max} – maksimalna brzina, K_{i,H_2O_2} , K_{iD} – konstante inhibicije za peroksid i boju.

Poređenjem vrednosti konstanti inhibicije boje za reakciju katalizovanu komercijalnom peroksidazom 0,0080 mM i za reakciju katalizovanu neprečišćenom peroksidazom 0,0325 mM jasno je da boja ispoljava znatno jači inhibitorni uticaj na komercijalnu peroksidazu. Na osnovu navedenih podataka može se zaključiti da je peroksidaza iz ekstrakta zahvaljujući prisutnim nečistoćama zaštićenija od inhibitornog uticaja boje. Vrednosti konstanti inhibicije peroksida potvrđuju isto (tabela 8.8.). Manji stepen obezbojavanja postignut u reakciji katalizovanoj neprečišćenom peroksidazom može biti posledica sternih smetnji nečistoća prisutnih u ekstraktu. Nečistoće prisutne u ekstraktu izazivaju sterne smetnje, smanjuju brzinu reakcije (1,026 mM min⁻¹) ali i umanjuju inhibitorni uticaj oba supstrata na peroksidazu. Navedeni podaci daju prednosti primeni neprečišćene peroksidaze u posmatranoj reakciji.

9. Imobilizacija peroksidaze iz rena na metakaolin

Glavna prepreka za primenu enzima na industrijskom nivou su velika ekonomska ulaganja vezana za primenu skupih enzima, koju je potrebno prevazići da bi se enzimi primenjivali u većim razmerama. S obzirom na činjenicu da su enzimi strogo specifični i efikasni ali i izuzetno osetljivi biokatalizatori, prvi problem koji je potrebno rešiti odnosi se na povećanje stabilnosti. Povećanje stabilnosti enzima koja vodi ka većoj ekonomičnosti procesa, a ogleda se u mogućnosti primene istog enzima više puta u željenoj reakciji omogućeno je imobilizacijom enzima. U okviru ovog poglavlja ispitana je mogućnost imobilizacije komercijalne peroksidaze iz rena na:

- 1) *termički tretiran kaolin (metakaolin) adsorpcijom i*
- 2) *na metakaolin aktiviran glutaraldehidom.*

9.1. Imobilizacija peroksidaze iz rena na metakaolin adsorpcijom

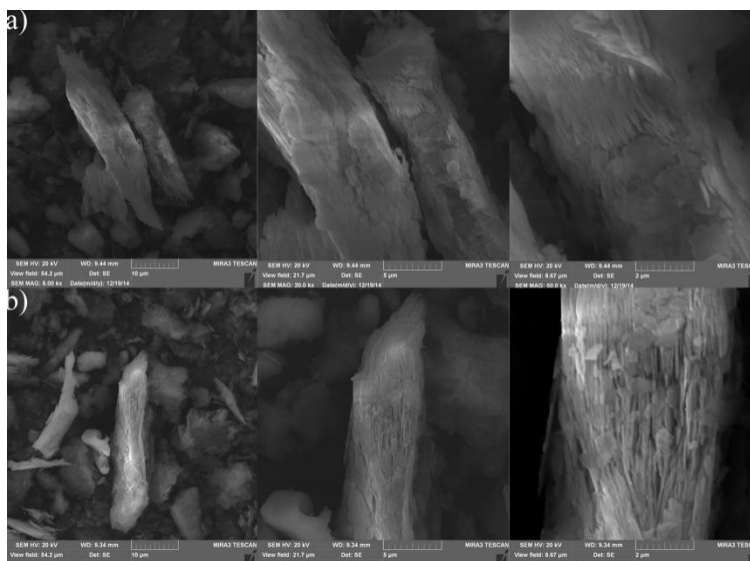
U okviru ovog poglavlja detaljno će biti objašnjeni i prikazani postupci aktivacije nosača, određivanja optimalnih uslova imobilizacije, karakterizacije nosača i dobijenih imobilisanih preparata kao i efikasnost imobilizata u reakciji obezbojavanja antrahinonske AV 109 boje.

9.1.1. Karakterizacija nosača za imobilizaciju peroksidaze pre i posle termičkog tretmana

Pre primene kaolina kao nosača za imobilizaciju u cilju povećanja specifične površine, kaolin pasta (50 % sadržaj vlage) je termički tretirana 2 h na 550 °C u peći. Nakon termičkog tretmana izvršena je fazna transformacija kaolina u metakolin koji je u daljim eksperimentima korišćen kao nosač za imobilizaciju peroksidaze adsorpcijom. Kako bi se potvrdila fazna transformacija kaolina u metakaolin SEM, BET i FT-IR analize su urađene.

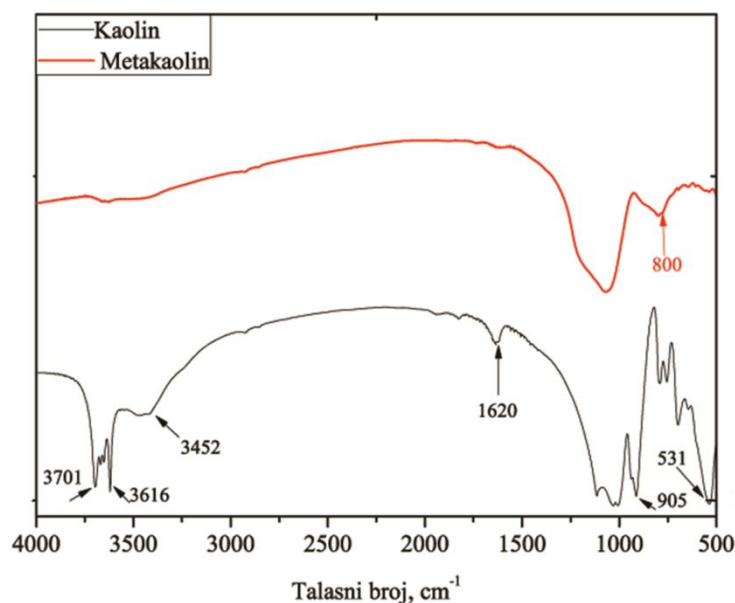
Pored povećanja specifične površine, fazna transformacija kaolina u metakaolin je izvršena i u cilju povećanja reaktivnosti koja je posledica prisustva silike (SiO₂) i amorfnog aluminijuma (Al₂O₃) u reaktivnom obliku.²³³⁻²³⁵ Povećanje specifične površine nosača nakon termičkog tretmana sa 8,08 m² g⁻¹ na 9,26 m² g⁻¹ potvrđeno je

korišćenjem BET metode. Specifična površina kaolina $8,08 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ dobijena BET analizom je u skladu sa literaturnim podacima koje se dobili Huertas i saradnici.²³⁶ Poroznost nosača za imobilizaciju nakon termičkog tretmana je u značajnoj meri povećana, a samim tim i broj mogućih mesta za vezivanje peroksidaze. Ukupna zapremina pora kaolina, pre fazne transformacije je iznosila $0,041 \text{ mL g}^{-1}$, dok nakon fazne transformacije ta vrednost dostiže $0,054 \text{ mL g}^{-1}$.



Slika 9.1. SEM slika a) kaolina; b) termički tretiranog kaolina (metakaolina)

Sa slike 9.1. koja prikazuje morfologiju kaolina i metakaolina mogu jasno da se uoče novonastale promene u strukturi. Slika 9.1a prikazuje strukturu kaolina na kojoj se uočavaju heksagonalne do pseudo–heksagonalne ploče koje su blago izdužene na jednom kraju što je u skladu sa dosadašnjim podacima iz literature.²³⁷ Brojnim istraživanjima je potvrđeno da se čestice kaolina nalaze u obliku agregata i međusobno su orijentisane lice–ivica ili lice–lice. Pojedine čestice kaolina koje su u obliku ploča imaju jasno definisane ivice, dok kod pojedinih ploča mogu da se uoče i nepravilnosti ivica. Takođe, na jasno definisanim česticama kaolina može se primetiti parcijalna pokrivenost površine čestica kaolina (neravnine) što se pripisuje nečistoćama prisutnim u uzorku.²³⁸ Orijentacija lice–lice čestica kaolina daje utisak lisnate strukture kaolina. Sa slike 9.1.b povećanje poroznosti lisnate strukture metakaolina je očigledno. Promene u strukturi kaolina prilikom fazne transformacije potvrđene su i FT–IR analizom (slika 9.2).



Slika 9.2. FT-IR spektri a) kaolina; b) metakaolina

Tipičan spektar kaolina ima četiri izražene trake, na 3697, 3669, 3645 i 3620 cm^{-1} . Traka koja se pojavljuje na 3620 cm^{-1} se pripisuje vibracijama unutrašnjih OH grupam, dok se smatra da preostale tri potiču od vibracija -OH grupa na spoljašnjim stranama. Traka u oblasti od 1620–1642 cm^{-1} potiče od H-O-H savijanja molekula vode, dok se u regionu od 1000 cm^{-1} i 500 cm^{-1} pojavljuju trake vibracija Si-O i Al-OH grupa.

FT-IR spektar za kaolin korišćen u ovom radu je u saglasnosti sa gore navedenim literaturnim podacima vezanim za FT-IR analizu kaolina. Naime, traka koja se javlja na 3701 cm^{-1} potiče od istezanja slobodnih OH grupa.²³⁹ Traka na 3616 cm^{-1} odgovara unutrašnjem sloju OH grupa (Al-O-H). Pomeranje trake koja odgovara istezanjima H-O-H sa 3542 cm^{-1} na 3452 cm^{-1} je verovatno posledica isparavanja vode koja se adsorbuje na kaolin u toku pripreme uzoraka. Zatim, traka koja potiče od vibracija savijanja molekula vode se javlja na 1620 cm^{-1} .²⁴⁰ Takođe, trake koje se pojavljuju na 1007, 1032 i 1033 cm^{-1} se povezuju sa Si-O deformacijama. Pik koji se pojavljuje na 905 cm^{-1} potiče od Al-OH vibracija. Intenzivan pik prisutan na 531 cm^{-1} potiče od Si-O-Al istezanja.²⁴¹

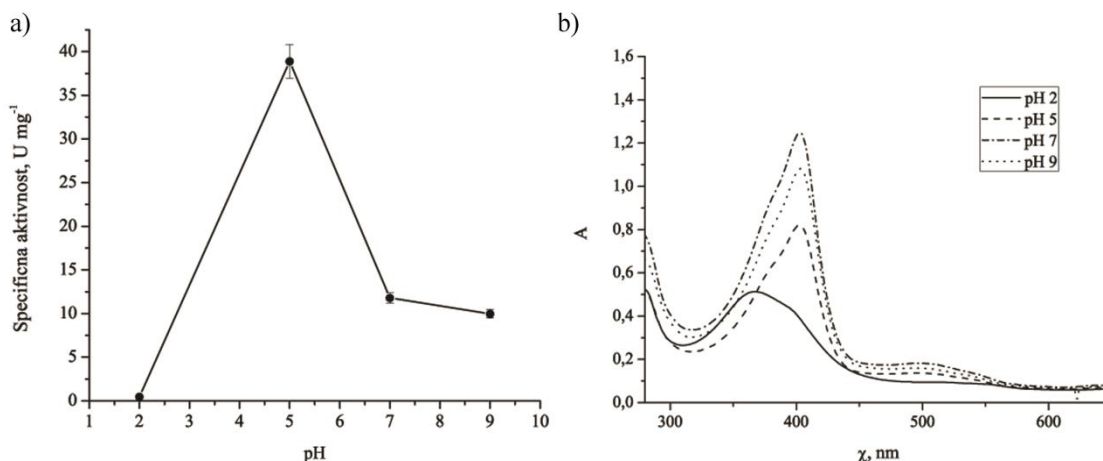
Termičkim tretmanom kaolina, fazna transformacija dovodi do promena u strukturi ispitivanog nosača za imobilizaciju. Na slici 9.2. prikazan je FT-IR spektar metakaolina

nastalog termičkim tretmanom kaolina kojim se potvrđuje promena u strukturi kaolina nakon dehidroksilacije izazvane termičkim tretmanom. Prva jasno uočljiva razlika jeste izostanak trake u opsegu $3701\text{--}3452\text{ cm}^{-1}$ koja odgovara istezanjima nastalim od slobodnih --OH grupa, što ukazuje na izostanak slabo vezanih molekula vode koji su adsorbovani na površini ili zarobljeni u veće šupljine materijala. Prvi pikovi koji se pojavljuju su u regiji $1250\text{--}500\text{ cm}^{-1}$. Intenzivna traka koja se javlja na 1072 cm^{-1} potiče od simetričnih vibracija Si--O veze, trake na 800 i 460 cm^{-1} potiču od Si--O--Al i Si--O vibracija, respektivno.²⁴² Izostanak traka na 905 i 530 cm^{-1} paralelno sa nastankom nove trake na 800 cm^{-1} ukazuje na promenu koordinatnog broja aluminijuma i potvrđuje dehidroksilaciju kaolina. Na osnovu svega navedenog, zaključak koji se može izvesti jeste da termičkim tretmanom dolazi do povećanja specifične površine kao i do izvesnih promena u strukturi kao što je dehidroksilacija. Dobijeni metakaolin je dalje primenjen za imobilizaciju peroksidaze iz rena.

Korišćenjem MIRA TESCANA softvera određen je i srednji prečnik čestica pre i posle termičkog tretmana. Veličina čestica kaolina pre termičkog tretmana iznosila je $12,6\text{ }\mu\text{m} \pm 6,8\text{ }\mu\text{m}$, dok je veličina čestica u uzorku nakon termičkog tretmana iznosila $10,1\text{ }\mu\text{m} \pm 5,7\text{ }\mu\text{m}$. Ovaj podatak je još jedna potvrda da je termički tretman u doprineo povećanju poroznosti, a samim tim i povećanju specifične površine dostupne za imobilizaciju peroksidaze.

9.1.2. Ispitivanje uticaja pH na imobilizaciju peroksidaze adsorpcijom na metakaolin

Zbog suštinskog uticaja na gustinu i vrstu naelektrisanja na nosaču i na površini enzima ali i na strukturu i konformaciju enzima pH reakcione smeše na kojoj se odvija adsorpcija je jedan od izuzetno važnih parametara koji je potrebno optimizovati za imobilizaciju enzima adsorpcijom. Dakle, pH može da određuje vrstu i intenzitet interakcija nosač–enzim. U cilju ispitivanja uticaja pH na aktivnost dobijenog imobilisanog preparata, pH reakcione smeše za imobilizaciju je variran i to pH 2, 5, 7 i 9 pri konstantnoj jonskoj jačini 0,1 M. Adsorpcija peroksidaze na različitim pH vrednostima na metakaolin prikazana je na slici 9.3.



Slika 9.3. a) Uticaj pH na specifičnu aktivnost peroksidaze imobilisane adsorpcijom na kaolin; b) uticaj pH na apsorpcioni spektar peroksidaze (strukturu peroksidaze).

Kao što može da se zaključi sa slike 9.3a specifična aktivnost imobilisane peroksidaze je u velikoj meri kontrolisana pH vrednošću rastvora. Naime, porast aktivnosti u sredini pH vrednosti 2,0–5,0 je evidentan sa slike 9.3. Maksimalna aktivnost od $38,89 \pm 0,05 \text{ U mg}^{-1}$ postignuta je na pH 5,0 da bi se primetio značajan pad u aktivnosti pri povećanju pH iznad 5. Imobilisani preparat sa aktivnošću od $0,45 \pm 0,02 \text{ U mg}^{-1}$ dobijen je u uslovima pH 2,0, ukazujući na činjenicu da pri $\text{pH} \leq 3$, $\text{pH} > 9$ u molekulu peroksidaze nastaju strukturne promene prouzrokovane kiselim sredinom. Potvrđeno je da je ovaj proces praćen razaranjem mreže vodoničnih veza koje okružuju hem i štite aktivni centar peroksidaze što dovodi do uklanjanja hema iz šupljine i gubitka katalitičke aktivnosti.²³²

Pomenute strukturne promene potvrđene su snimanjem apsorpcionog spektra peroksidaze u rastvorima različitih pH vrednosti (slika 9.3b). Peroksidaza je specifičan enzim zahvaljujući gvožđu koje apsorbuje na $\sim 405 \text{ nm}$, tako da promene u strukturi vrlo lako mogu da se detektuju snimanjem UV spektra. Narušavanje strukture peroksidaze se potvrđuje pomeranjem ili izostankom Soretovog pika, kao što se može primetiti na slici 9.3b. S obzirom na najveću dostignutu aktivnost, pretpostavka je da pH 5 omogućava vezivanje na takav način u kome se ne narušava katalitička aktivnost peroksidaze. U opsegu $\text{pH} \geq 7$, aktivnost dobijenog imobilisanog preparata je značajno smanjena. Eksperimentalno je utvrđeno da je izoelektrična tačka metakaolina korišćenog u ovom radu 1,36 ukazujući da je na pH 5 i 7 površina nosača negativno naelektrisana.

Uzimajući u obzir da je izoelektrična tačka peroksidaze korišćene u ovom radu 7,2 može se zaključiti da elektrostatičke interakcije značajno doprinose u ukupnim interakcijama enzim–nosač jer je peroksidaza na pomenutim pH pozitivno naelektrisana, što je u skladu sa literaturom.²⁴³

9.1.3. Ispitivanje desorpcije peroksidaze sa metakaolina

Nakon ispitivanja uticaja pH na aktivnost imobilisanih preparata, postavlja se pitanje vrste interakcija ostvarenih između nosača i enzima. Iako se pretpostavlja da su dominantna elektrostatička privlačenja, potrebno je naći potvrdu za takvu pretpostavku. Dominantna vrsta interakcija enzim–nosač ispitana je desorpcijom peroksidaze sa rastvorom CaCl₂ i TRITON–om. Desorpcija je ispitana za svaki uzorak dobijen nakon imobilizacije na različitim pH. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 9.4.

Tabela 9.4. Aktivnosti imobilisanih biokatalizatora nakon desorpcije

pH	Početna aktivnost, U g ⁻¹	Aktivnosti nakon CaCl ₂ , U g ⁻¹	Aktivnosti nakon TRITON–a X– 100, U g ⁻¹
2	1,8±0,7	0	0
5	102,0±0,3	12,3±0,1	17,1±1,1
7	27,2±0,7	10,3±1	4,9±0,7
9	33,8±0,6	0	42,5±0,05

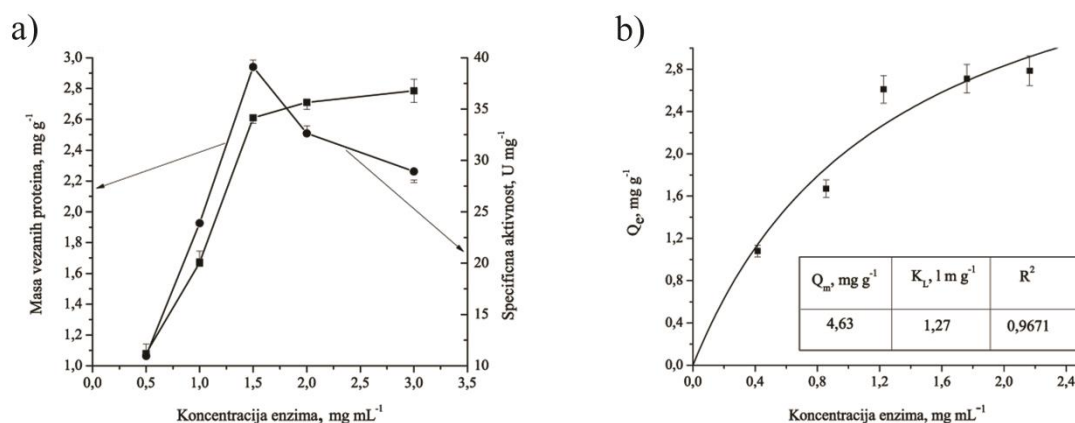
U prethodnoj eksperimentalnoj seriji imobilisani preparat sa najvećom specifičnom aktivnosti dobijen je u reakcionoj sredini pH 5. Inkubacijom u 1 M rastvoru CaCl₂, 30 min 88 % proteina vezanih na nosač se desorbuje. Na osnovu ovog podatka može se zaključiti da su na pH 5 dominantne elektrostatičke interakcije. Na pH 7 molekuli proteina su blago neutralno do pozitivno naelektrisani, dok je nosač negativno naelektrisan, tako da je doprinos elektrostatičkih interakcija manje izražen (oko 62 % vezanih proteina je desorbovano nakon inkubacije u 1 M rastvoru CaCl₂) što ima za posledicu dobijanje imobilizata sa smanjenom aktivnosti. Sa druge strane, na pH 9 ukupno naelektrisanje proteina i nosača je negativno, tako da se može očekivati da će elektrostatička odbijanja dovesti do smanjenja prinosa imobilizacije. Neznatno slabija

adsorpcija proteina na gline u slučaju kada je pH rastvora iznad izoelektrične tačke je već dokumentovano u literaturi.²⁴³

Iako na pH iznad izoelektrične tačke molekul proteina i nosača nose negativno naelektrisanje, postoji mali udeo površine nosača sa pozitivnim naelektrisanjem dostupne za određene interakcije. Pored toga, enzimi su fleksibilni i mogu da zauzmu položaj u prostoru tako da popune određene šupljine na nosaču pa se odbijanja koja su posledica istoimenog naelektrisanja mogu svesti na minimum i adsorpcija proteina postaje moguća verovatno usled vodoničnih vezivanja.²⁴⁴ Vrednost pH 5 je izabran za imobilizaciju peroksidaze jer dobijeni imobilisani preparat poseduje četiri puta veću aktivnost nego imobilizati dobijeni adsorpcijom peroksidaze na pH 7 i 9, dok na pH 2 dolazi do narušavanja strukture peroksidaze i gubitka katalitičke aktivnosti u toku imobilizacije.

9.1.4. Ispitivanje uticaja početne koncentracije enzima na imobilizaciju peroksidaze adsorpcijom na metakaolin (adsorpciona izoterma)

U cilju ispitivanja maksimalnog kapaciteta nosača adsorpciona izoterma za imobilizaciju peroksidaze na termički obrađen kaolin je ispitana na pH 5. Početna koncentracija enzima uneta u sistem varirana je u opsegu 0,5–3,0 mg mL⁻¹ i dobijeni rezultati su prikazani na slici 9.5.



Slika 9.5. a) Uticaj početne koncentracije enzima na specifičnu aktivnost i masu vezanih proteina; b) Lengmirova adsorpciona izoterma

Kako bi se odredio teorijski, maksimalni kapacitet nosača za adsorpciju, dobijeni eksperimentalni podaci fitovani su pomoću Lengmirove (Langmuir) adsorpcione izoterme. Na osnovu linearnog koeficijenta regresije dobijenog modelovanjem eksperimentalnih podataka dokazano je slaganje sa Lengmirovim modelom ($R^2 \approx 0,97$). Polazna pretpostavka lengmirove adsorpcione izoterme je da se na površini nosača nalazi konačan broj mesta gde su adsorpcija i desorpcija u ravnoteži. Kada se na jedno mesto veže molekul, ne postoji mogućnost vezivanja novog molekula jer na osnovu ove izoterme na površini nosača može da dođe samo do formiranja monosloja. Maksimalan kapacitet nosača primenjenog za imobilizaciju peroksidaze u konkretnom slučaju, na osnovu eksperimentalnih podataka je $4,63 \pm 0,01$ mg g⁻¹ (slika 9.5b).

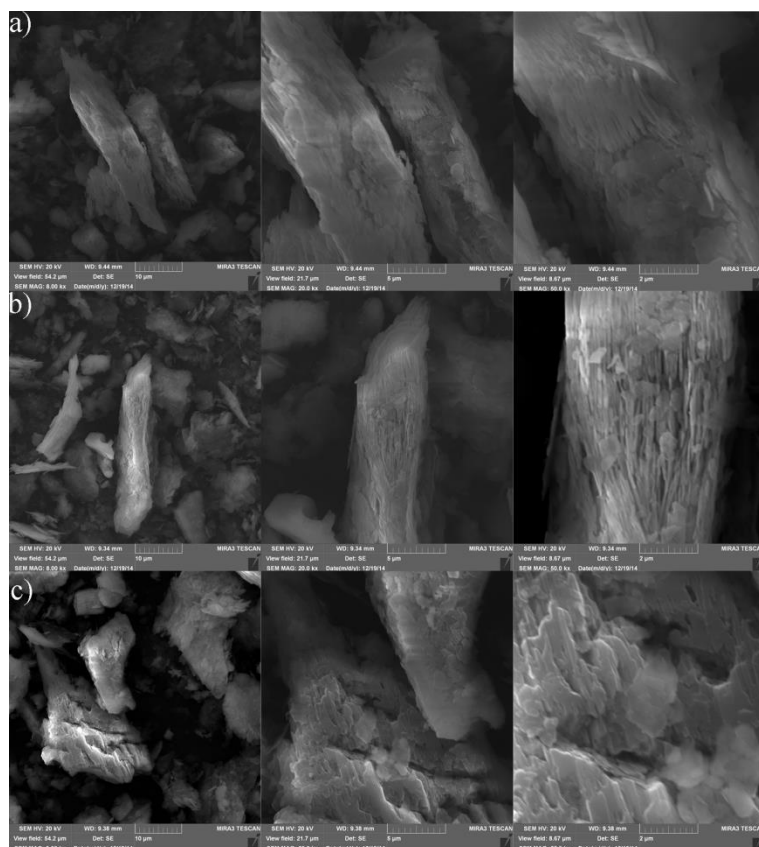
Formiranje monosloja na površini glina mehanizmom adsorpcije potvrđeno je i od strane drugih istraživača. Povećanjem koncentracije enzima do 1,5 mg mL⁻¹ maksimalna masa proteina vezanih na nosač iznosi $2,61 \pm 0,03$ mg g⁻¹. Imobilizacijom

peroksidaze na metakaolin, maksimalna masa vezanih proteina iznosila je $1,67 \text{ mg g}^{-1}$.²⁴⁵ Pri većim početnim koncentracijama dolazi do zasićenja površine nosača, postiže se dinamička ravnoteža između adsorbovanih i desorbovanih molekula. Vrlo često je kapacitet nosača manji od predviđenog, i to se dešava zbog toga što molekul enzima prilikom vezivanja često zauzme neodgovarajući položaj. Zauzimanjem neodgovarajućeg položaja enzim zauzima više mesta za vezivanje pa se kapacitet nosača znatno smanjuje.²⁴⁶ Jedan od mogućih razloga zašto je na nosač adsorbovao maksimalno $2,61 \pm 0,03 \text{ mg g}^{-1}$ a ne teorijski predviđenih $4,63 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ proteina može biti i taj, neadekvatna orijentacija proteina na površini nosača.

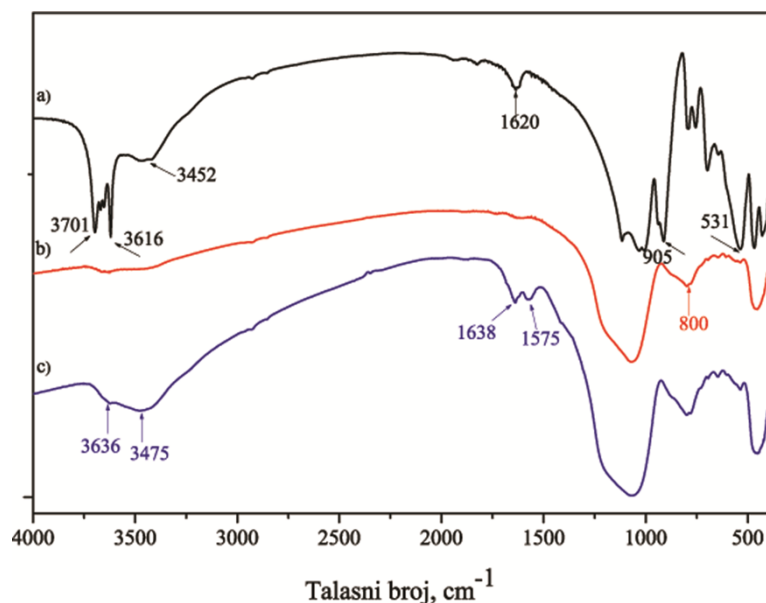
Na osnovu vrednosti bezdimenzionog parametra R_L dobijenog modelovanjem eksperimentalnih podataka Lengmirovom izotermom može se zaključiti i da li je adsorpcija povoljan proces. U konkretnom slučaju vrednost R_L od 0,391 nalazi se u opsegu $0 < R_L < 1$, pa se adsorpcija smatra favorizovanim procesom. Za razliku od mase vezanih proteina, specifična aktivnost imobilisanog preparata opada sa daljim porastom koncentracije enzima (slika 9.5a). Naime, povećanje specifične aktivnosti imobilisanog preparata se uočava sve do početne koncentracije enzima od $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Dobijeni podatak može da se objasni činjenicom da povećanje mase vezanih proteina dovodi do intenzivnijih protein–protein interakcija koje iniciraju izvesne reorganizacije u strukturi proteina i smanjenje aktivnosti.²⁴⁷ Iz tog razloga imobilisani preprat dobijen pri početnoj koncentraciji enzima od $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$, specifične aktivnosti $39,1 \text{ U mg}^{-1}$ je korišćen u narednim eksperimentima.

9.1.5. Karakterizacija imobilizata dobjenog adsorpcijom peroksidaze na metakaolin

Promene nastale u strukturi i morfologiji nosača na koji je adsorbovana peroksidaza su jasno prikazane na slikama 9.6. i 9.7. Kako bi se jasnije uočile razlike na slikama je prikazana struktura nosača pre termičkog tretmana, nakon termičkog tretmana i imobilisanog preparata.



Slika 9.6. SEM slike a) kaolina (uvećanje x 8 k; 20 k; 50 k); b) metakaolina (uvećanje x 8 k; 20 k; 50 k); c) imobilisanog preparata (uvećanje x 8 k; 20 k; 50 k)



Slika 9.7. FT-IR spektar a) kaolina; b) metakaolina; c) imobilisanog preparata

Značajne promene nastale u strukturi metakaolina nakon adsorpcije peroksidaze se jasno uočavaju na slici 9.6. Naime, na slici 9.6. c) se jasno uočavaju neravnine i gruba površina imobilisanog preparata koja je dokaz adsorpcije peroksidaze na površinu metakaolina. Takođe, popunjavanje prostora između lisnatih struktura metakaolina i kompaktni aglomerati koji su evidentni sa slike mogu biti posledica adsorpcije peroksidaze. Značajno smanjenje specifične površine nakon adsorpcije peroksidaze je potvrđeno BET analizom. Specifična površina metakaolina sa $9,259 \pm 0,048 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ se nakon adsorpcije smanjuje na $7,1471 \pm 0,278 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Takođe, nakon snimanja FT-IR uzorka adsorpcija peroksidaze je potvrđena. Glavna potvrda je pojava traka na 1638 cm^{-1} i 1575 cm^{-1} koje ne postoje u spektru metakaolina, a potiču od $-\text{C}=\text{O}$ istežanja i $-\text{NH}$ vibracija savijanja peptidne veze.¹⁵⁹

Tabela 9.8. BET analiza kaolina, metakaolina i imobilisanog preparata

Parametar	Kaolin	Metakaolin	Adsorpcija (pH 5)
Specifična površina, $S_{\text{BET}} (\text{m}^2 \text{ g}^{-1})$	8,084	9,259	7,1471
	($\pm 0,048$)	($\pm 0,048$)	($\pm 0,278$)
Ukupna zapremina pora, $V_{\text{total}} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1})$	0,0407	0,0538	0,0313
Zapremina mezopora, $V_{\text{meso}} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1})$	0,0397	0,0532	0,0296
Srednji prečnik mezopora, $D_{\text{mean}} (\text{nm})$	16,631	19,054	25,769

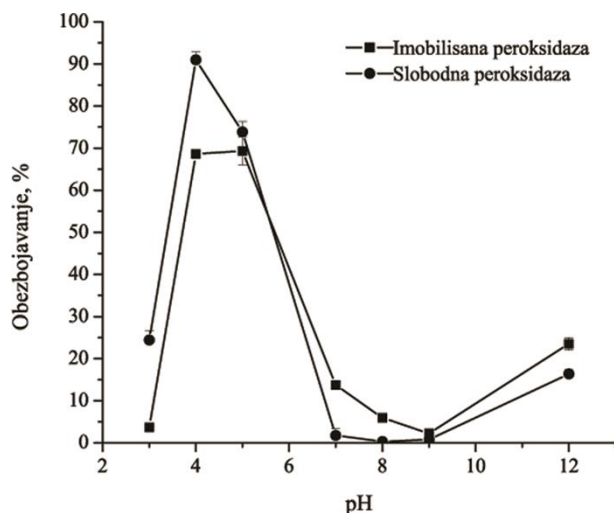
9.2. Određivanje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin adsorpcijomu šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Pre svega potrebno je naglasiti da do sada u literaturi ne postoje podaci o adsorpciji peroksidaze na metakaolin i primeni dobijenog imobilisanog preparata u obezbojavanju sintetičkih boja. Pre primene imobilisanog preparata u reakciji obezbojavanja bitno je ispitati afinitet boje prema nosaču izabranom za imobilizaciju da se ne bi stvorila lažna slika o efikasnosti imobilisanog enzima. Kako bi se ispitalo da li postoji adsorpcija boje na površini nosača, prvobitni eksperiment je izveden u reakcionoj smeši istog sastava i pod istim uslovima kao i reakcija sa imobilisanim enzimom samo bez dodatka peroksida. Rezultat ovog eksperimenta je bio negativan, ukazujući na to da je obezbojavanje strogo enzimski kontrolisana reakcija sa neznatnim udelom adsorpcije boje nosačem za imobilizaciju (2 %). Efikasnost dobijenog imobilisanog preparata je ispitana u reakciji obezbojavanja AV 109 boje korišćenjem 0,1 U enzimske aktivnosti imobilisanog preparata i upoređena sa efikasnosti istog broja jedinica slobodne peroksidaze u posmatranoj reakciji.

9.2.1. Ispitivanje uticaja pH na na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin adsorpcijom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

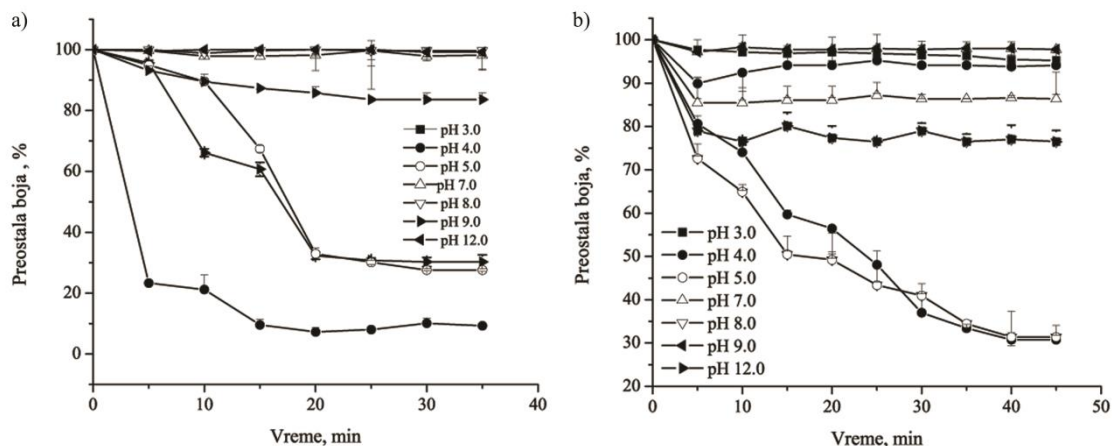
Na slici 9.9. prikazano je da adsorpcijom peroksidaze na metakaolin dolazi do blagog pomeranja i proširenja pH optimuma. Ova pojava može da se poveže sa izvesnim promenama u naelektrisanju u okolini aktivnog centra enzima nastalih u toku imobilizacije enzima. Činjenica da imobilisani enzim pokazuje konstantnu moć obezbojavanja u opsegu čak jedne pH jedinice u kiseloj sredini je od izuzetnog značaja sa aspekta primene. Primarna namena peroksidaze imobilisane adsorpcijom na metakaolin jeste uklanjanje sintetičkih boja iz otpadnih voda koje su po pravilu blago kisele.¹⁶⁰ Iako je maksimalno obezbojavanje AV 109 boje postignuto upravo sa slobodnom peroksidazom, sa slike se može zapaziti značajan pad obezbojavanja sa malim promenama pH u reakciji katalizovanoj slobodnom peroksidazom. Sa druge strane, primenom imobilisane peroksidaze obezbojavanje ostaje nepromenjeno u opsegu

pH 4 do 5, ukazujući na to da imobilizacija ima zaštitni i stabilizirajući uticaj na enzim. Nakon 40 min inkubacije na pH 5, imobilisana peroksidaza uklanja $69,3 \pm 3,3$ % ispitivane boje.



Slika 9.9. Uticaj pH na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom imobilisanom adsorpcijom na metakaolin u šaržnom reaktoru (uslovi: 0,1 U enzimske aktivnosti, koncentracija boje 30 mg L^{-1} , koncentracija H_2O_2 0,1 mM, temperatura $24 \text{ }^\circ\text{C}$)

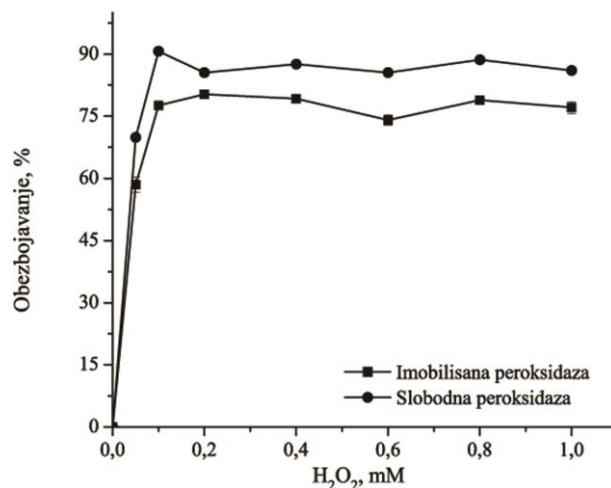
Slobodna peroksidaza pod istim uslovima na pH 4, nakon 15 min kontakta boja–enzim uklanja $90,9 \pm 0,82$ % AV 109 boje. Jedan od retkih primera uklanjanja antrahinonskih boja pronađenih u literaturi jeste uklanjanje boje C. I. Reactive Blue 19 (RB 19) peroksidazom imobilisanom na različite polisulfonske nosače. Ispitivanjem optimalnih uslova obezbojavanja boje RB 19 pH 5 je utvrđen kao optimalan za uklanjanje ove boje, kao i u slučaju uklanjanja AV 109 boje.¹⁸⁰ Takođe, pH 5 se pokazao kao optimalan za peroksidazu imobilisanu na mikrofibrozne membrane dobijene elektrospinoivanjem.²⁰³ Na osnovu svega navedenog, zaključak je da je aktivnost slobodne i imobilisane peroksidaze pH kontrolisana. pH utiče na kiselo–bazno ponašanje supstrata što znači da je za ispoljavanje maksimalne aktivnosti enzima neophodno pronaći optimalan pH za izvođenje željene reakcije, kako bi enzimski katalizovana reakcija bila maksimalno efikasna.²⁰³



Slika 9.10. Uticaj pH na brzinu obezbojavanja AV 109 boje u šaržnom reaktoru katalizovane a) slobodnom peroksidazom; b) peroksidazom imobilisanom adsorpcijom na metakaolin (uslovi: 0,1 U enzimске aktivnosti, koncentracija boje 30 mg L⁻¹, koncentracija H₂O₂ 0,1 mM, temperatura 24 °C)

9.2.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin adsorpcijom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Nakon određivanja optimalnog pH za izvođenje reakcije obezbojavanja boje AV 109, ispitan je uticaj koncentracije vodonik-peroksida na stepen obezbojavanja AV 109 boje. Peroksidaza iz rena je izuzetno osetljiva na dejstvo slobodnih radikalnih vrsta nastalih u katalitičkom ciklusu, fenoksi radikala kao i polimerizovanih fenola koji pokrivaju aktivni centar enzima. Pored navedenih vrsta koji imaju inhibitorski uticaj na peroksidazu iz rena pokazalo se brojnim istraživanjima da je i vodonik-peroksid, ko-supstrat, takođe inhibitor peroksidaze.²⁴⁸ Iz tog razloga, javlja se potreba za određivanjem količine vodonik-peroksida koju je pod definisanim reakcionim uslovima potrebno uneti u sistem kako bi se izbegla inhibicija, sa jedne strane, i postigla što veća efikasnost u uklanjanju sintetičkih boja iz obojenih otpadnih voda imobilisanom peroksidazom, sa druge strane. Kako bi se ispitan uticaj vodonik-peroksida na reakciju obezbojavanja AV 109 boje, koncentracija vodonik-peroksida je varirana u opsegu 0,05–1,0 mM i rezultati su prikazani na slici 9.11.



Slika 9.11. Uticaj vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje u šaržnom reaktoru katalizovane a) slobodnom peroksidazom; b) peroksidazom imobilisanom adsorpcijom na metakaolin (uslovi: 0,1 U enzimske aktivnosti, koncentracija boje 30 mg L⁻¹, pH 4 za slobodnu i pH 5 za imobilisanu peroksidazu, temperatura 24 °C)

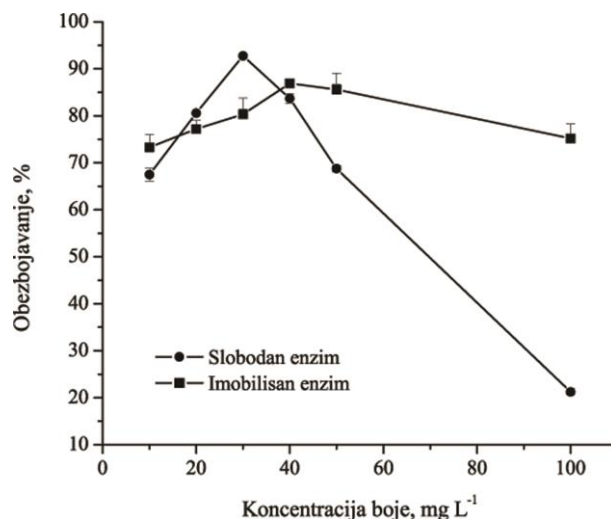
Porast koncentracije vodonik-peroksida u opsegu 0,05–0,2 mM utiče na porast stepena obezbojavanja AV 109 boje. Takođe, sa slike je očigledno da je slobodna peroksidaza znatno osetljivija na porast koncentracije vodonik-peroksida tako da je pri koncentraciji vodonik-peroksida od 0,1 mM postignut stepen obezbojavanja od 90,7±1,1 %. Imobilizacijom peroksidaza postaje manje osetljiva na porast koncentracije ko–supstrata. Naime, maksimalan stepen obezbojavanja od 80,3±0,9 % postiže se pri koncentraciji vodonik-peroksida od 0,2 mM kada je reakcija katalizovana imobilisanom peroksidazom. Dalji porast koncentracije vodonik-peroksida, potvrđuje pretpostavku da imobilizacija ima stabilizujući efekat na enzim. Pri koncentraciji vodonik-peroksida od 1 mM zadržana aktivnost je 96 % za imobilisanu peroksidazu, što je još jedan dokaz da imobilizacija ublažava inhibitorski uticaj vodonik-peroksida. Za peroksidazu imobilisanu u ciklodekstrin–hitozan matrikse zahtevana je koncentracija vodonik–peroksida od 0,6 mM za uklanjanje 61 % azo boje i vreme kontakta od 2 h, pa je jasna prednost peroksidaze imobilisane adsorpcijom na metakaolin koja za 40 min uklanja 80±0,6 % ispitivane boje.¹⁹⁰

9.2.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin adsorpcijom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

I u prethodnim eksperimentima pokazano je da pored vodonik-peroksida i boja ima inhibitorni uticaj na enzim. Iz tog razloga, javlja se potreba za ispitivanjem uticaja boje na peroksidazu imobilisanu adsorpcijom na metakaolin. Spregnuti aromatični prstenovi, glavne strukturne jedinice antrahinonskih boja, antrahinona i rezonancioni efekti prisutni u njima su karakteristika ove grupe boja zahvaljujući čemu su one vrlo stabilne, otporne na biodegradaciju i dugo zadržavaju boju u otpadnim vodama.²⁴⁹ Navedena strukturna karakteristika čini ove boje znatno težim za degradaciju nego azo boje. Antrahinonske boje predstavljaju vrlo otporna jedinjenja koja zahtevaju raskidanje C–C veza, za razliku od –N=N– veza prisutnih u azo bojama zbog veće elektronegativnosti atoma koji učestvuju u izgradnji istih.²⁵⁰ Uticaj boje na stepen obezbojavanja ispitan je variranjem koncentracije boje u opsegu 10–100 mg L⁻¹.

Sa slike 9.12. vrlo lako može da se zapazi da ispitivana boja takođe ima inhibitorni uticaj na enzim. Vrlo bitno je naglasiti da je inhibitorni uticaj znatno izraženiji na slobodnu nego imobilisanu peroksidazu, što znači da je imobilizacija imala uticaj na poboljšanje performansi imobilisanog biokatalizatora. Porast stepena obezbojavanja sa porastom koncentracije boje u opsegu 10–30 mg L⁻¹ u reakciji katalizovanoj slobodnom peroksidazom je evidentan sa slike. Pod definisanim uslovima u rastvoru boje koncentracije 30 mg L⁻¹ slobodna peroksidaza je pokazala stepen obezbojavanja od 92±0,9 %.

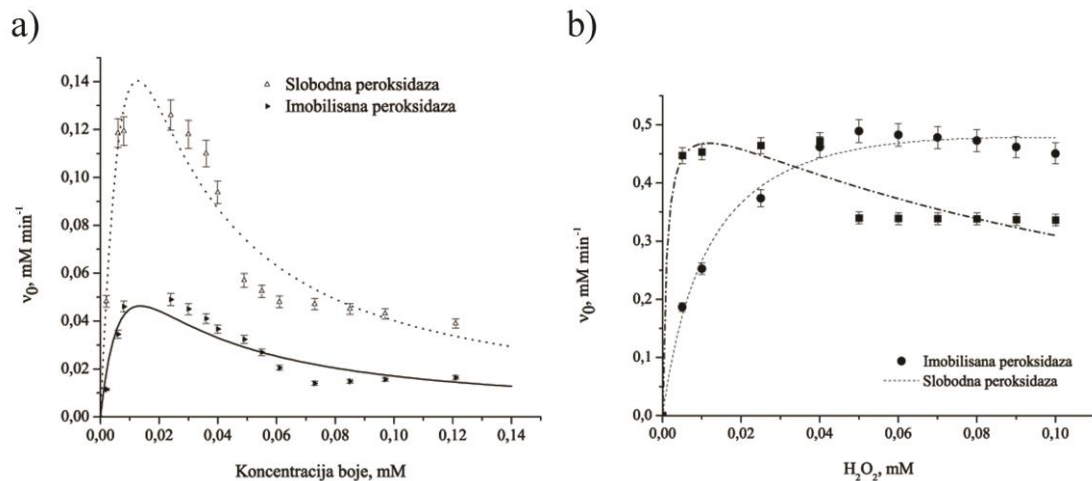
Sa druge strane, maksimalan stepen obezbojavanja od 87±1,1 % postiže se sa imobilisanom peroksidazom pri početnoj koncentraciji boje od 40 mg L⁻¹. Ovo ukazuje na to da je imobilizacija HRP na metakaolin obezbedila kompatibilnu i inertnu sredinu za molekul enzima čiji aktivni centar je manje izložen inhibitornom uticaju ispitivane boje. Dokaz za prethodno navedeno je i činjenica da u rastvoru boje koncentracije 100 mg L⁻¹, je zadržana aktivnost od 86±0,5 % i 23±0,4 % za imobilisanu i slobodnu peroksidazu.



Slika 9.12. Uticaj boje na obezbojavanje AV 109 boje u šaržnom reaktoru katalizovane a) slobodnom peroksidazom; b) peroksidazom imobilisanom adsorpcijom na metakaolin (uslovi: 0,1 U enzimске aktivnosti, pH 4 za slobodnu i pH 5 za imobilisanu peroksidazu, koncentracija H₂O₂ za slobodnu peroksidazu 0,1 mM, za imobilisanu peroksidazu 0,2 mM, temperatura 24 °C)

9.2.4. Određivanje kinetičkih konstanti peroksidaze imobilisane adsorpcijom na metakaolin u reakciji obezbojavanja AV 109 boje u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Katalitička efikasnost slobodne i imobilisane peroksidaze u posmatranoj reakciji je definisana u pogledu tri parametra: Mihaelis–ovom konstantom K_m , konstantom inhibicije, K_i i maksimalnom brzinom reakcije, V_{max} . Eksperimentalni podaci su modelovani ping pong bi–bi modelom koji uzima u obzir inhibiciju supstratom kao što je opisano u poglavlju 3.3. Rezultati modelovanja eksperimentalnih podataka navedenim kinetičkim modelom, prikazani su na slici 9.13. i tabelama 9.14. i 9.15.



Slika 9.13. a) Zavisnost početne brzine od koncentracije boje pri konstantnoj koncentraciji H₂O₂ (0,2 mM); b) Zavisnost početne brzine reakcije od koncentracije H₂O₂ pri konstantnoj koncentraciji boje (0,024 mM)

Tabela 9.14. Vrednosti kinetičkih parametara (boja) za reakciju obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin adsorpcijom i slobodnom peroksidazom

<i>Inhibicija bojom</i>	<i>Slobodna peroksidaza</i>	<i>Imobilisana peroksidaza</i>
V_{\max} (mM min ⁻¹)	1,272	0,8711
K_{m,H_2O_2} (mM)	0,0281	1,211
K_{mD} (mM)	0,0472	0,0791
K_{iD} (mM)	0,0020	0,0139
R^2	0,9326	0,9762

gde je V_{\max} – maksimalna brzina, K_{mD} , K_{m,H_2O_2} – Mihaelisove konstante za boju i peroksid, K_{iD} – konstante inhibicije za boju.

Podaci (tabela 9.14.) dobijeni modelovanjem eksperimentalnih vrednosti ping pong bi–bi modelom za slučaj inhibicije bojom jasno ukazuju unapređenje karakteristika peroksidaze nakon imobilizacije u poređenju sa slobodnom peroksidazom u posmatranoj reakciji. Prva razlika u katalizi obezbojavanja slobodnom i imobilisanom peroksidazom je u vrednosti maksimalne brzine reakcije, V_{\max} . Naime, maksimalna brzina reakcije katalizovane slobodnom peroksidazom iznosila je $1,272 \text{ mM min}^{-1}$, za razliku od reakcije katalizovane imobilisanom peroksidazom gde je maksimalna brzina smanjena na $0,8711 \text{ mM min}^{-1}$. Navedeni podatak ukazuje na to da je nakon imobilizacije aktivni centar enzima zaklonjen, što otežava pristup supstrata.

Ukoliko se uporede Mihaelisove konstante za slobodan i imobilisan enzim, nalazi se potvrda gore navedenog. Mihaelisova konstanta za boju u reakciji katalizovanoj imobilisanom peroksidazom iznosi $0,0791 \text{ mM}$, za slobodnu peroksidazu je $0,0472 \text{ mM}$, što znači da je afinitet imobilisanog enzima znatno smanjen u odnosu na afinitet slobodnog enzima prema ispitivanoj boji. Ova pojava može da se objasni sternim smetnjama nastalim zbog prisustva nosača kao i promenama konformacije enzima nakon imobilizacije u smislu orijentacije enzima.²⁵⁰ Sterne smetnje ne moraju biti posledica prisustva nosača, već mogu biti povezane i sa činjenicom da pore metakaolina takođe predstavljaju moguća mesta zarobljavanja enzima. Međutim, imobilizacija peroksidaze u unutrašnjost pora nosača je uticala i na smanjenje inhibitornog uticaja supstrata. Poređenjem konstanti inhibicije (tabela 9.14.) izvodi se zaključak da je imobilizacija značajno smanjila inhibitorni uticaj boje na enzim.

Tabela 9.15. Vrednosti kinetičkih parametara (H_2O_2) za reakciju obezbojavanja AV 109 boje slobodnom i peroksidazom imobilisanom na metakaolin adsorpcijom

<i>Inhibicija peroksidom</i>	<i>Slobodna peroksidaza</i>	<i>Imobilisana peroksidaza</i>
$V_{\max} (\text{mM min}^{-1})$	1,778	0,5759
$K_{m,\text{H}_2\text{O}_2} (\text{mM})$	0,0033	0,1329
$K_{mD} (\text{mM})$	0,0532	0,2246
$K_{i,\text{H}_2\text{O}_2} (\text{mM})$	0,0891	0,5933
R^2	0,9683	0,9913

U tabeli 9.15. nalazi se potvrda da je imobilizacija povećala stabilnost peroksidaze prema vodonik-peroksidu. Ako se uporede konstante inhibicije za vodonik-peroksid, slobodne 0,0891 mM i imobilisane peroksidaze 0,5933 mM, vidi se da je inhibitorni uticaj ko-supstrata u slučaju imobilisane peroksidaze znatno smanjen. Pored toga, zaštitni efekat nosača se odrazio i na maksimalnu brzinu reakcije. Sterne smetnje nosača dovele su do pada maksimalne brzine sa $1,778 \text{ mM min}^{-1}$ na $0,5759 \text{ mM min}^{-1}$ za slobodnu i imobilisanu peroksidazu.

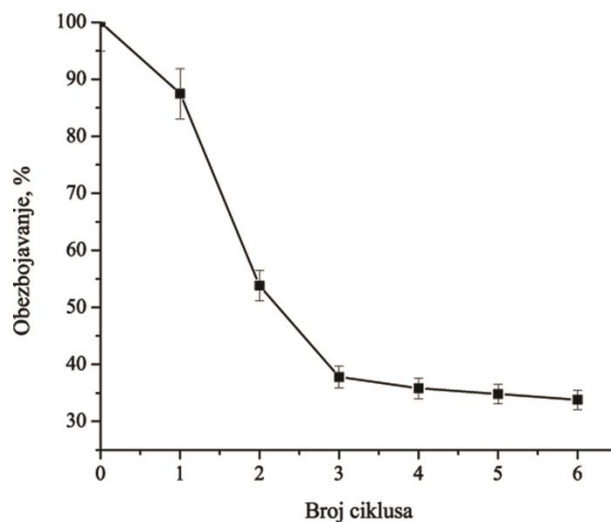
Generalno, u literaturi postoji mali broj radova koji se bave ispitivanjem početne kinetike degradacije sintetičkih boja i svi oni negiraju prisustvo inhibicije. Jedan od retkih primera ispitivanja početne kinetike je uklanjanje bisfenola A peroksidazom imobilisanom na mikrofibrozne membrane, gde se početna kinetika modeluje Mihaelisovim modelom bez inhibicije.²⁰³

9.2.5. Ispitivanje operativne stabilnosti peroksidaze imobilisane na metakaolin adsorpcijom u reakciji obezbojavanja AV 109 boje u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Imobilizacijom se smanjuje sloboda kretanja molekula enzima koja može dovesti do značajnih konformacionih promena i smanjuje se mogućnost denaturacije enzima. Pored toga, imobilizacijom se omogućava primena biokatalizatora više puta u željenoj reakciji. Takođe, imobilizacijom enzima znatno se olakšava separacija iz reakcione smeše što značajno smanjuje cenu praktične primene enzima.^{151,251} Stabilnost peroksidaze adsorbovane na metakaolin ispitana je primenom imobilisane peroksidaze u nekoliko ciklusa u reakciji obezbojavanja AV 109 boje. Reakcija obezbojavanja AV 109 boje je izvođena pod prethodno određenim optimalnim uslovima, gde je nakon svakog završenog ciklusa imobilizat izdvajan, ispiran puferom i ponovo primenjen u sledećem ciklusu obezbojavanja. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 9.16.

Profil stabilnosti imobilisane peroksidaze ukazuje na početni pad aktivnosti nakon četiri ciklusa odakle sledeće tri šarže ostaje skoro konstantan. Na kraju je nakon sedam uzastopnih ciklusa, imobilisani biokatalizator zadržao $35 \pm 0,9$ % od početne aktivnosti. Poređenjem produktivnosti imobilisane i slobodne peroksidaze može se zaključiti da je imobilisana peroksidaza čak 4,2 puta produktivnija. Maksimalna efikasnost je primećena u prvom ciklusu reakcije, gde je zabeleženo obezbojavanje

92±0,9 % i 87±1,1 % slobodnom i imobilisanom peroksidazom. Međutim, imobilisana peroksidaza je upotrebljena u novom ciklusu i postignuto je obezbojavanje od 88±0,3 % u drugom i 53 ±0,04 % u trećem ciklusu primene, nakon 210 minuta.



Slika 9.16. Operativna stabilnost peroksidaze imobilisane adsorpcijom na metakaolin

Naredni ciklusi su trajali još duže ali je postignuto obezbojavanje održavano skoro konstantnim ~35±0,9 %. Na ovaj način slobodnom peroksidazom je obezbojeno 2,7 mg a imobilisanom 11,3 mg AV 109 boje korišćenjem jednakog broja jedinica enzimске aktivnosti (0,1 U). Operativna stabilnost dobijene imobilisane peroksidaze je znatno veća u poređenju sa peroksidazom imobilisanom na druge nosače, gde se značajan pad aktivnosti beleži nakon četvrtog ciklusa.^{142,160}

Prednost primene imobilisane peroksidaze na metakaolin je evidentna, ali je za industrijsku primenu pored stabilnosti biokatalizatora cena postupka od izuzetne važnosti. Shodno tome, pored stabilnosti i efikasnosti nosač koji se primenjuje u industriji mora da bude pristupačne cene. Grubom analizom cena kataloških nosača za imobilizaciju enzima, potvrđeno je da je kaolin upotrebljen kao nosač za imobilizaciju peroksidaze jeftiniji od komercijalnih nosača Diaion[®], 2–hidroksietilmetakrilat (HEMA) ili Eupergit C (8,6, 21,1 i 1464,5 puta redom). Pored toga, pri ovoj analizi nisu uračunati troškovi vezani za rad u laboratoriji, cene laboratorijske opreme, hemikalija za imobilizaciju enzima što je izuzetno važan parametar kada je u pitanju tretman otpadnih voda na industrijskom nivou, jer je na ovaj način umanjeno trošak zbog nepotrebnih

aktivacija nosača ili enzima. U poređenju sa pojedinim podacima kovalentne imobilizacije peroksidaze dostupnim u literaturi, peroksidaza imobilisana na metakaolin ima potencijala u tretmanu obojenih otpadnih voda zbog jednostavnosti proizvodnje, niske cene, efikasnog uklanjanja boje i operativne stabilnosti.

9.3 Imobilizacija peroksidaze iz rena na metakaolin aktiviran glutaraldehidom

Upotreba glutaraldehida u aktivaciji nosača za imobilizaciju enzima je jedan od najčešće primjenjivnih metoda. Razlog za tako učestalu primenu glutaraldehida u imobilizaciji enzima jeste jednostavnost postupka, velika efikasnost i mogućnost primene na brojne prirodne i sintetičke nosače kao što su alginati, hitozan, najlon, silika ili grafit. Glutaraldehid se koristi i za modifikaciju primarnih amino grupa proteina, mada može da reaguje i sa drugim grupama (tiosi, fenoli, imidazoli).²⁵² Glutaraldehidom se enzimi mogu umrežavati ili pak vezivati za nosače.

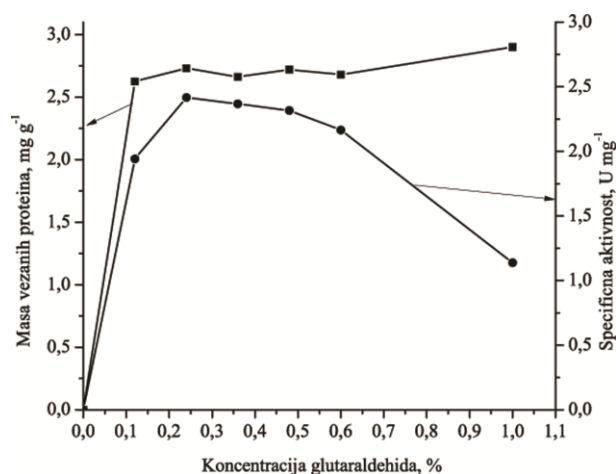
Hemija glutaraldehida nije u potpunosti razjašnjena uglavnom zato što prilikom aktivacije nosača u rastvoru ovaj umrežavajući reagens se pored glutaraldehidnog može naći i u obliku mono- i dihidrata, a česta je i pojava cikličnih hemiacetala i oligomera.²⁵³ Glutaraldehid se u imobilizaciji enzima može primeniti na više načina. Jedan od mogućih načina jeste aktivacija nosača glutaraldehidom, pa potom imobilizacija enzima. Zatim, enzim može da se imobilise na nosač pa potom tretira glutaraldehidom, a nekada u toku imobilizacije istovremeno se u sistem unose glutaraldehid i enzim.²⁵⁴

U okviru ovog poglavlja određeni su optimalni uslovi imobilizacije: uticaj početne koncentracije glutaraldehida i enzima na aktivnost imobilisanog preparata, a potom je dobijeni imobilisani preparat ispitan sa aspekta mogućnosti primene u obezbojavanju AV 109 boje.

9.3.1. Ispitivanje uticaja početne koncentracije glutaraldehida na masu vezanih proteina i aktivnost imobilisane peroksidaze

Glutaraldehid primenjen u aktivaciji nosača ima ulogu "nožice" i na taj način sprečava direktan kontakt enzima i nosača koji može imati negativan uticaj na aktivnost enzima. Međutim, količinu glutaraldehida koja se koristi prilikom aktivacije potrebno je pažljivo optimizovati iz razloga što veće količine ovog reagensa mogu da izazovu višestruko nasumično vezivanje sa amino grupama enzima, što može da dovede do vezivanja enzima preko grupa u oblasti aktivnog centra, pa čak i inaktivacije enzima.²⁵⁵

Glutaraldehyd u vodenom rastvoru ima tendenciju ka umrežavanju kao i formiranju dimera tako da početna koncentracija u rastvoru za aktivaciju ima značajan uticaj kako na prinos imobilizacije tako i na prinos aktivnosti. Iz tog razloga prvi korak u optimizaciji imobilizacije peroksidaze iz rena na metakaolin aktiviran glutaraldehydom je bio određivanje optimalne koncentracije glutaraldehyda kojom će se aktivirati metakaolin za imobilizaciju. Dobijeni rezultati, uticaj početne koncentracije glutaraldehyda na masu vezanih proteina i na aktivnost dobijenog imobilizata prikazani su na slici 9.17.



Slika 9.17. Uticaj početne koncentracije glutaraldehyda na masu vezanih proteina i specifičnu aktivnost imobilisanog preparata

Sa slike 9.17. jasno se može uočiti da je u ispitivanom opsegu koncentracija glutaraldehyda masa vezanih proteina u stalnom porastu sa povećanjem koncentracije glutaraldehyda. Sa druge strane, povećanjem mase vezanih proteina zapaža se pad aktivnosti dobijenog imobilisanog preparata. Povećanje koncentracije glutaraldehyda do 0,24 % dovodi do povećanja aktivnosti imobilisanog preparata do $2,4 \pm 0,07 \text{ U mg}^{-1}$. Dalji porast koncentracije glutaraldehyda dovodi do pada aktivnosti, pa je pri početnoj koncentraciji od 1 % aktivnost imobilisanog preparata dva puta manja u odnosu na aktivnost imobilisanog preparata dobijenog pri početnoj koncentraciji 0,24 % glutaraldehyda. Kao što je već napomenuto, povećana koncentracija glutaraldehyda vrlo često ima negativan uticaj na krajnje performanse imobilisanog preparata. Naime, povećanom koncentracijom glutaraldehyda, koncentracija dostupnih reaktivnih aldehidnih grupa u rastvoru značajno raste što dovodi do formiranja Šifovih baza

višestrukim vezivanjem sa amino grupama enzima. Nastajanje Šifovih baza vrlo često može prouzrokovati promene u konformaciji enzima koje mogu da idu čak do prevođenja enzima u neaktivan oblik. Međutim i pri manjim koncentracijama glutaraldehida može da dođe do smanjenja aktivnosti imobilisanog preparata, kao posledica zaklanjanja aktivnog centra i povećanog otpora prenosu mase.²⁵⁶ Da bi se β -galaktozidaza imobilisala glutaraldehydom početna koncentracija glutaraldehyda od 0,3 % je bila dovoljna za dobijanje najaktivnijeg imobilisanog preparata. Dalji porast koncentracije glutaraldehyda značajno umanjuje aktivnost imobilisanog preparata što se objašnjava višestrukim vezivanjem enzima i nosača.²⁵⁷ Slično ponašanje prilikom imobilizacije lipaze na nanofibrozne membrane prethodno aktivirane glutaraldehydom je opisano u literaturi. Nanofibrozne membrane korišćene za imobilizaciju lipaze takođe sadrže –OH grupe koje se aktivacijom glutaraldehydom prevode u reaktivnije aldehidne grupe koje dalje reaguju sa amino grupama enzima. Kao i u slučaju imobilizacije peroksidaze na metakaolin aktiviran glutaraldehydom, povećanje početne koncentracije glutaraldehyda je dovelo do povećanja mase vezane lipaze, ali i do smanjenja aktivnosti.

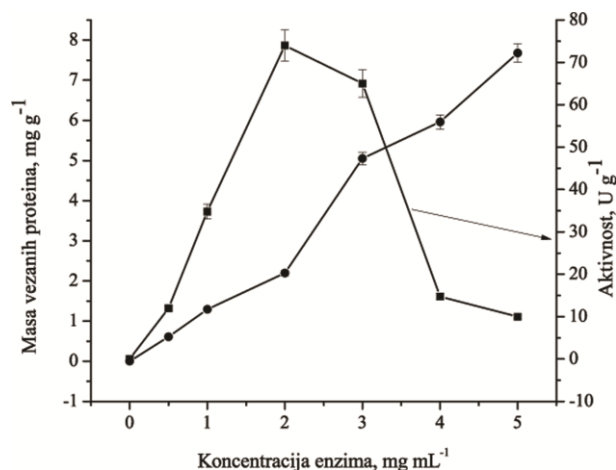
Pad aktivnosti imobilisanog preparata pri većim koncentracijama glutaraldehyda se objašnjava gusto pakovanim molekulima enzima, koji na taj način gube mogućnost zauzimanja konformacije potrebne za katalizu određene reakcije ili intramolekularnim sternim smetnjama koje otežavaju prenos mase.²⁵⁸

9.3.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije enzima na masu vezanih proteina i aktivnost imobilisane peroksidaze

Nakon određivanja optimalne koncentracije glutaraldehyda potrebne za aktivaciju nosača, dobijeni nosač je primenjen za imobilizaciju peroksidaze. Kako bi se ispitali uslovi za dobijanje najaktivnijeg imobilisanog preparata pri definisanim uslovima početne koncentracije glutaraldehyda, varirana je početna koncentracija enzima. Efikasnost imobilizacije je ispitana sa aspekta mase vezanih proteina pri različitim početnim koncentracijama enzima i aktivnosti dobijenog imobilisanog preparata. Dobijeni eksperimentalni podaci su prikazani na slici 9.18.

Slika 9.18. prikazuje skoro linearan uticaj početne koncentracije enzima na masu vezanih proteina u ispitivanom opsegu 0,5–5 mg mL⁻¹. Ovo ukazuje na prisustvo

velikog broja aldehidnih grupa na površini enzima dostupnih za vezivanje. Međutim, povećanje mase vezanih proteina je negativno uticalo na krajnju aktivnost imobilisanog preparata. Tako se u opsegu početnih koncentracija enzima $0,5\text{--}2,0\text{ mg mL}^{-1}$ zapaža porast aktivnosti imobilisanih preparata do $74,2\pm 3,3\text{ U g}^{-1}$.



Slika 9.18. Uticaj početne koncentracije enzima na masu vezanih proteina (krug) i aktivnost imobilisanog preparata (kvadrat) (uslovi: vreme reakcije 4 h, pH 7, koncentracija glutaraldehida 0,24 %, temperatura $24\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Dalji porast početnih koncentracija enzima iznad $2,0\text{ mg mL}^{-1}$ prouzrokuje značajan pad aktivnosti imobilisanih preparata, dok je pri koncentraciji od $5,0\text{ mg mL}^{-1}$ zabeležena aktivnost imobilisanog preparata jako mala. Povećanjem mase vezanih proteina na površini nosača, proteini postaju gušće pakovani što vrlo često dovodi do sternih smetnji i otežava difuziju supstrata do aktivnog centra enzima.²⁵⁸ Zbog izraženih protein–protein interakcija, aktivnost imobilisanih preparata dobijenih pri većim masama vezanih proteina je značajno smanjena. Protein–protein interakcije nastaju upravo zbog smanjenog prostora između vezanih proteina što prouzrokuje brojne strukturne promene i ujedno i pad aktivnosti.²⁴⁷

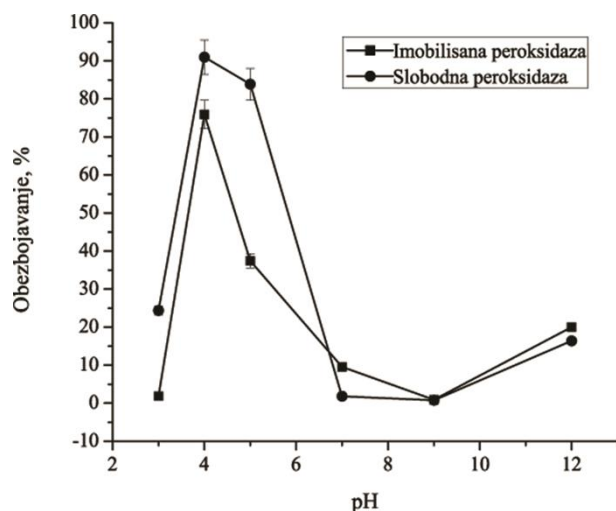
9.4. Određivanje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin aktiviran glutaraldehydom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Imobilisani preparat specifične aktivnosti $2,4 \pm 0,07 \text{ U mg}^{-1}$ je dalje korišćen u reakciji obezbojavanja antrahinonske boje AV 109 u šaržnom reaktoru.

9.4.1. Ispitivanje uticaja pH na reakciju obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin aktiviran glutaraldehydom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Zbog suštinskog uticaja na kiselo–bazno ponašanje supstrata i naelektrisanje histidina i arginina koji učestvuju u katalitičkom ciklusu peroksidaze, pH je jedan od najznačajnijih parametara za efikasno izvođenje željene reakcije.¹⁰¹ U cilju poređenja performansi slobodne i peroksidaze imobilisane glutaraldehydom na metakaolin, reakcija obezbojavanja AV 109 boje izvođena je sa $0,1 \text{ U}$ enzimske jedinice aktivnosti oba oblika enzima na različitim pH vrednostima. pH opseg $3,0–12,0$ je izabran iz razloga što je u obojenim tekstilnim efluentima ovaj opseg pH zastupljen.²⁵⁹ Step en obezbojavanja AV 109 boje u zavisnosti od pH za reakciju katalizovanu slobodnom i imobilisanom peroksidazom je prikazan na slici 9.19.

Poklapanje pH optimuma (pH 4,0) slobodne i imobilisane peroksidaze se može zapaziti sa slike 9.19. Mali step en obezbojavanja na pH 3,0 se može povezati sa gubitkom hem–a prouzrokovanog razaranjem mreže vodoničnih veza koja štiti aktivni centar i prevođenjem peroksidaze u neaktivan oblik.²³⁰ Za uklanjanje $75,9 \pm 2,4 \%$ AV 109 boje imobilisanom peroksidazom bilo je potrebno 60 min, dok je $90,9 \pm 0,82 \%$ ispitivane boje uklonjeno korišćenjem slobodne peroksidaze nakon 15 min. Smanjen step en obezbojavanja imobilisanom u odnosu na slobodnu peroksidazu može se objasniti sternim smetnjama nosača, nastalim nakon imobilizacije pri čemu je dolazni kanal za supstrat peroksidaze zaklonjen za molekule supstrata.



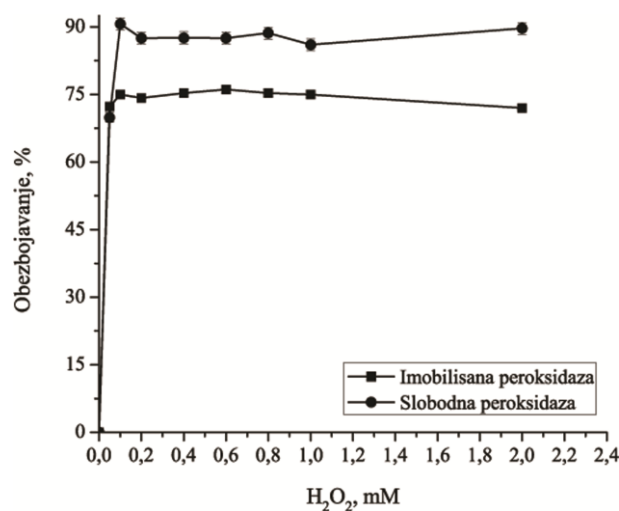
Slika 9.19. Uticaj pH na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin aktiviran glutaraldehydom u šaržnom reaktoru (uslovi: koncentracija boje 30 mg L⁻¹, koncentracija H₂O₂ 0,1 mM, 0,1 U jedinica enzimske aktivnosti, temperatura 24 ° C)

Obezbojavanjem antrahinonske boje C. I. Lanaset Blue 2R slobodnom peroksidazom pod istim uslovima pH 4,0, postignut je stepen obezbojenja od 59 %.²⁶⁰ Takođe, značajan pad stepena obezbojavanja ispitivane boje se zapaža pri pH vrednostima iznad 6,0. Slični rezultati dobijeni su ispitivanjem uklanjanja boje C. I. Remazol Blue i C. I. Red Cibacron, gde je stepen obezbojavanja postignut primenom peroksidaze na pH vrednostima iznad 6,0 znatno smanjen.²⁶¹ Već je dobro poznato da imobilizacija može u velikoj meri da utiče na performanse imobilisanog biokatalizatora. Jedan od suštinskih faktora koji utiču na krajnje performanse imobilisanog biokatalizatora pored metode imobilizacije jeste i izbor nosača za imobilizaciju. Na primer, peroksidaza imobilisana u akrilamidni gel i β-ciklodekstrin–hitozan kompleks pokazuje potpuno drugačije ponašanje u reakcijama obezbojavanja azo boja. Naime, peroksidazom imobilisanom u akrilamidni gel maksimalan stepen obezbojavanja C. I. Acid Black 10 BX boje postiže se na pH 2,0, dok peroksidaza imobilisana u β-ciklodekstrin–hitozan kompleks maksimalnu aktivnost ispoljava u opsegu pH 6,0–8,0 za uklanjanje iste hromoforne grupe boja, azo boja.^{188,189} Sa slike 9.19. može se zapaziti da maksimalnu aktivnost slobodna peroksidaza ispoljava u kiseljoj sredini, dok je imobilisana peroksidaza aktivnija u baznoj sredini za razliku od slobodne čija je aktivnost u ovoj oblasti pH neznatna. U jako alkalnoj sredini 10,0–12,0 nagli skok

aktivnosti se uočava kako za slobodnu tako i za imobilisanu peroksidazu. Ova pojava se objašnjava strukturnim promenama u distalnom regionu u odnosu na hem šupljinu gde pomeranja distalnog histidina dovode do vezivanja za metalni jon, odnosno od promena spin stanja gvožđa iz visokog u nisko.²⁶²

9.4.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije vodonik-peroksida na reakciju obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin aktiviran glutaraldehidom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

U prethodnom setu eksperimenata je pokazano da ko-supstrat vodonik-peroksid ima izraženo inhibitorno dejstvo na peroksidazu. Iz tog razloga je potrebno ispitati uticaj vodonik-peroksida na stepen obezbojavanja ispitivane boje na peroksidazu imobilisanu glutaraldehidom na metakaolin, kako bi se utvrdio uticaj imobilizacije na performanse dobijenog imobilisanog biokatalizatora.



Slika 9.20. Uticaj vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin aktiviran glutaraldehidom u šaržnom reaktoru (uslovi: koncentracija boje 30 mg L⁻¹, pH 4, 0,1 U enzimске jedinice aktivnosti, temperatura 24 ° C)

Kao što može da se vidi sa slike 9.20., obezbojavanje AV 109 boje je favorizovano pri nižim koncentracijama vodonik-peroksida. Povećanje koncentracije peroksida iznad 0,6 mM dovodi do blagog pada aktivnosti imobilisane peroksidaze. Koncentracija peroksida od 0,1 mM se pokazala kao optimalna za reakciju katalizovanu

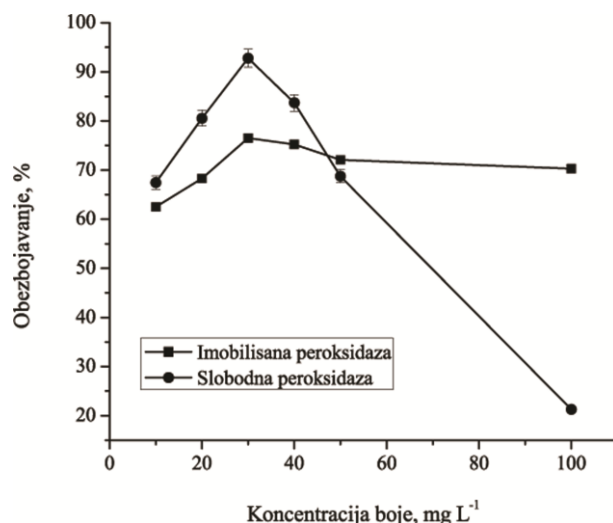
slobodnom peroksidazom pri kojoj se postiže $90,7 \pm 1,4$ % obezbojavanja ispitivane boje. Dalji porast koncentracije vodonik-peroksida dovodni do značajnog pada stepena obezbojenja. Tako, pri koncentraciji peroksida od 0,8 mM pad stepena obezbojenja za 15 % se može zapaziti sa slike 9.20.

Sa druge strane, kriva zavisnosti stepena obezbojenja od početne koncentracije vodonik-peroksida ukazuje da je imobilisana peroksidaza znatno stabilnija. Naime, promena koncentracije vodonik-peroksida dovodi do neznatne promene u stepenu obezbojenja pa je pri 0,6 mM postignut stepen obezbojavanja $76,1 \pm 0,8$ % dok pri koncentraciji od 1 mM postignuto obezbojavanje $75 \pm 0,8$ %. Na osnovu svega navedenog može se izvesti zaključak da je optimalna koncentracija vodonik-peroksida za reakciju obezbojavanja 0,1 mM i 0,6 mM za slobodnu i imobilisanu peroksidazu.

Koncentracija peroksida od 0,6 mM se pokazala kao optimalna i za peroksidazu imobilisanu u β -ciklodekstrin-hitozan kompleks. Pri koncentracijama H_2O_2 iznad 0,6 mM stepen obezbojavanja ispitivane azo boje je značajno smanjen.¹⁸⁸ Ovakvo ponašanje peroksidaze u prisustvu većih koncentracija peroksida se objašnjava generisanjem znatno većih količina intermedijara u katalitičkom ciklusu oksidacije ispitivanog supstrata koje dovode do formiranja neaktivnog kompleksa enzima tj. inaktivacije peroksidaze.²⁵⁰ Dobijeni eksperimentalni podaci ukazuju na to da je u ovom slučaju imobilizacijom postignuta zaštita aktivnog centra peroksidaze koja je manje izložena inhibitornom uticaju peroksida tako da je enzim aktivan u znatno širem opsegu koncentracija vodonik-peroksida. Inhibitorni uticaj vodonik-peroksida na peroksidazu je zapažen i od strane drugih istraživača.

9.4.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na reakciju obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin aktiviran glutaraldehidom u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Uticaj početne koncentracije boje na stepen obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin glutaraldehidom je prikazana na slici 9.21.



Slika 9.21. Uticaj početne koncentracije boje na obezbojavanje AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin aktiviran glutaraldehidom u šaržnom reaktoru (uslovi: pH 4, 0,1 U enzimске jedinice aktivnosti, temperatura 24 ° C koncentracija H₂O₂ 1 mM i 0,6 mM za slobodnu i imobilisanu peroksidazu)

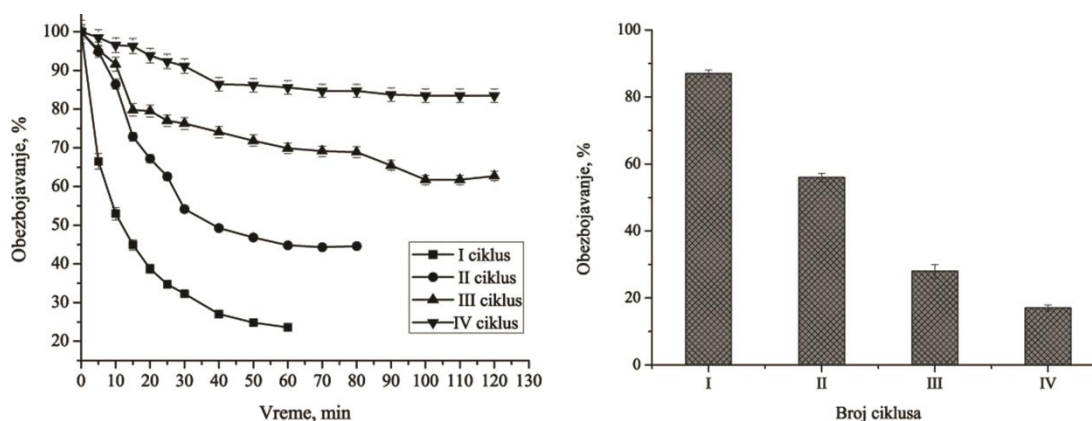
Inhibitorni uticaj boje kako na slobodnu tako i na imobilisanu peroksidazu se jasno uočava sa slike 9.21. Maksimalan stepen obezbojavanja AV 109 boje 92,3±1,9 % i 76,5±0,8 % se postiže slobodnom i imobilisanom peroksidazom redom pri početnoj koncentraciji boje 30 mg L⁻¹. Daljim povećanjem koncentracije boje iznad 30 mg L⁻¹ inhibicija biva izraženija na slobodnu nego na imobilisanu peroksidazu. Pri početnoj koncentraciji 100 mg L⁻¹ postignut stepen obezbojavanja imobilisanom peroksidazom ostaje skoro konstantan ~70±0,7 %, dok stepen obezbojavanja sa slobodnom peroksidazom pada na 23±0,4 % pri istim uslovima. Imobilizacija peroksidaze na metakaolin glutaraldehidom je ispoljila pozitivan uticaj u pogledu rezistentnosti enzima na povišene koncentracije boje. Naime, pod definisanim uslovima, slobodna peroksidaza zadržava 21 % dok imobilisana peroksidaza 92 % početne aktivnosti. Negativan uticaj povećanih koncentracija boje je dokumentovan u literaturi u

reakcijama obezbojavanja sa drugim vrstama peroksidaza.^{250,263} Pri manjim koncentracijama supstrata inhibicija peroksidaze je značajno umanjena što se može objasniti katalitičkim ciklusom peroksidaze. U katalitičkom ciklusu peroksidaze postoje tri slična oblika enzima HRP E, E-I i E-II tako da postoji podjednaka verovatnoća za vezivanje supstrata-boje kako za E-I tako i za E-II i formiranje neaktivnog "dead-end" kompleksa. Sa povećanjem koncentracije boje, verovatnoća za formiranje "dead-end" kompleksa takođe raste.⁹⁵ Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je imobilizacijom peroksidaze glutaraldehydom na metakaolin formiranje neaktivnog kompleksa izostalo. Na osnovu niza eksperimenata utvrđeni su optimalni uslovi za reakciju obezbojavanja boje AV 109 peroksidazom imobilisanom na metakaolin glutaraldehydom: koncentracija boje 30 mg L⁻¹, koncentracija peroksida 0,6 mM, pH 4,0, 0,1 U jedinica enzimske aktivnosti, temperatura 24 °C pri čemu se postiže 76,5±0,8 % obezbojavanja AV 109 boje.

9.4.4. Ispitivanje operativne stabilnosti u reakciji obezbojavanja AV 109 boje u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem peroksidaze imobilisane na metakaolin aktiviran glutaraldehydom

Jedan od glavnih razloga imobilizacije enzima jeste mogućnost primene istog biokatalizatora više puta u željenoj reakciji. Pored toga, separacija imobilisanih biokatalizatora iz reakcione smeše je znatno olakšana a pored toga i troškovi potrebni za ovaj proces.

Operativna stabilnost imobilisane peroksidaze glutaraldehydom na metakaolin ispitiana je u šaržnom reaktoru. Nakon završenog jednog ciklusa reakcije obezbojavanja AV 109 boje, isti imobilisani biokatalizator je primenjen u sledećem ciklusu. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 9.22.



Slika 9.22. Operativna stabilnost peroksidaze imobilisane na metakaolin aktiviran glutaraldehidom u reakciji obezbojavanja AV 109 boje (uslovi: uslovi: koncentracija boje 30 mg L^{-1} , pH 4, 0,1 U enzimske aktivnosti, koncentracija H_2O_2 0,6 mM, temperatura 24°C)

Jedan od osnovnih načina smanjenja troškova vezanih za primenu enzima u industriji jeste imobilizacija kojom se omogućava primena istog biokatalizatora više puta u željenoj reakciji ali i olakšava njegova separacija od supstrata i proizvoda reakcije. Kako bi se ispitala operativna stabilnost peroksidaze imobilisane na kaolin glutaraldehidom, nakon jednog ciklusa primene imobilizat je ispiran puferom i ponovo upotrebljen u reakciji obezbojavanja ispitivane boje. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 9.22.

Kao što može da se zaključi sa slike 9.22., imobilisani preparat gubi aktivnost nakon 4 ciklusa primene u reakciji obezbojavanja. Nakon četvrtog ciklusa primene imobilizat zadržava svega 15 % od početne aktivnosti. Imobilizacija peroksidaze iz rena u fosfolipidne čestice se pokazala kao dobar metod imobilizacije. Ovako imobilisana peroksidaza nakon 6 uzastopnih ciklusa je zadržala 50 % početne aktivnosti.¹⁴² Međutim, peroksidaza imobilisana na mezoporozne materijale se nije pokazala dobra u pogledu operativne stabilnosti zbog mogućnosti primene samo dva puta u reakciji obezbojavanja antrahinonske boje RBBR (C. I. Remazol Brilliant Blue R). Zabeleženi nagli pad aktivnosti se u literaturi objašnjava nagomilavanjem reakcionih proizvoda na površini imobilisanog enzima, pri čemu on postaje nedostupan za supstrat.²⁶⁴ Iako se slobodna peroksidaza pokazala efikasnijom u prvom ciklusu primene, kroz 4 ciklusa imobilisana peroksidaza ipak može da ukloni znatno više ispitivane boje. Naime,

slobodnom peroksidazom je uklonjeno 27,7 mg L⁻¹ dok je imobilisanom peroksidazom uklonjeno 55,7 mg L⁻¹ ispitivane boje sa istom količinom enzima, 0,1 U.

Poređenje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje i efikasnosti slobodne, peroksidaze imobilisane adsorpcijom i glutaraldehidom na metakaolin

U prethodnim poglavljima prikazani su rezultati koji se odnose na imobilizaciju peroksidaze iz rena i ispitivanja optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje dobijenim imobilisanim preparatima. U tabeli 9.23. prikazani su najznačajniji podaci iz prethodne eksperimentalne serije.

Tabela 9.23. Optimalni uslovi obezbojavanja AV 109 boje slobodnom i imobilisanom peroksidazom

<u>Parametar</u>	<u>Slobodna peroksidaza</u>	<u>Peroksidaza imobilisana adsorpcijom na metakaolin</u>	<u>Peroksidaza imobilisana na metakaolin aktiviran glutaraldehidom</u>
pH	4	5	4
Koncentracija boje, mg L ⁻¹	30	40	30
H ₂ O ₂ , mM	0,1	0,2	0,6
Obezbojavanje, %	92±09	87±1,1	76,5±0,8
Operativna stabilnost	1 ciklus	7 ciklusa	4 ciklusa

Tabela 9.23. jasno pokazuje da najveći potencijal za primenu u tretmanu obojenih voda antrahinonskim bojama ima peroksidaza imobilisana na metakaolin adsorpcijom. Na ovaj način je još jednom prikazana prednost adsorpcije kao blage metode imobilizacije u poređenju sa metodama koje zahtevaju aktivacije nosača ili enzima. Iako je najveći stepen obezbojavanja 92±09 % postignut u reakciji katalizovanoj slobodnom peroksidazom, visoke cene su prepreka za primenu slobodnih enzima. Imobilizacijom peroksidaze na metakaolin adsorpcijom dobijen je imobilisani preparat specifične aktivnosti 39,1 U mg⁻¹, dok je imobilizacijom na metakaolin

aktiviran glutaraldehydom dobijen imobilisani preparat specifične aktivnosti od $2,4 \pm 0,1$ U mg^{-1} . Ovaj podatak objašnjava zašto je postignut manji stepen obezbojavanja peroksidazom imobilisanom glutaraldehydom, kao i znatno manju operativnu stabilnost. Pored toga, vrlo je moguće da je u toku ispitivanja operativne stabilnosti došlo do oslobađanja molekula glutaraldehyda koji su dovoljno mali da dospeju do aktivnog centra i dovedu do nasumičnog umrežavanja esencijalnih aminokiselina u strukturi i inaktivacije enzima. Na kraju, primenom slobodne peroksidaze uklonjeno je 2,7 mg, peroksidaze imobilisane adsorpcijom 11,3 mg i peroksidaze imobilisane glutaraldehydom 5,5 mg ispitivane boje. Navedeni podaci ukazuju na to da su imobilizacijom značajno unapređena svojstva peroksidaze.

10. Kovalentna imobilizacija komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena u obliku umreženih enzimskih agregata

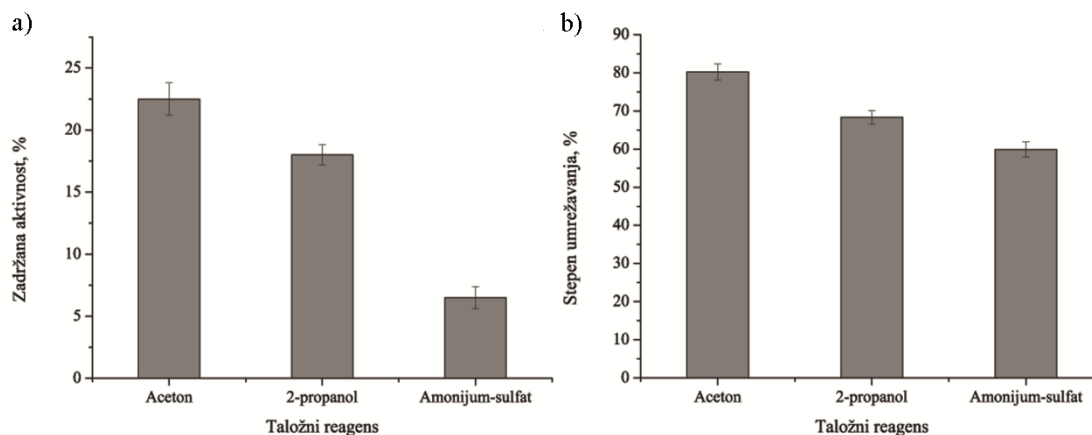
Adsorpcija je jednostavna i blaga metoda imobilizacije, ali glavni nedostaci ove metode su nespecifičnost i desorpcija enzima sa nosača. Iz tog razloga peroksidazu iz svežeg ekstrakta rena nije bilo moguće imobilisati na metakaolin ovom tehnikom, zbog nečistoća za koje se pretpostavlja da su imale veliki afinitet prema nosaču. Shodno tome, bilo je potrebno pronaći odgovarajuću metodu da bi se uspešno imobilisale i komercijalna i peroksidaza iz svežeg ekstrakta rena i međusobno uporedile. Kao metoda kovalentne imobilizacije u ovom slučaju izabrana je metoda bez upotrebe nosača, umrežavanje enzima u obliku agregata. Na ovaj način su imobilisane i komercijalna i peroksidaza iz svežeg ekstrakta rena i primenjene u reakciji obezbojavanja AV 109 boje. Uporedni, detaljan pregled dobijenih rezultata za komercijalnu i peroksidazu iz svežeg ekstrakta rena biće prikazan u narednim poglavljima.

10.1. Ispitivanje uticaja taložnog reagensa na karakteristike komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata

Prvi korak u pripremi umreženih enzimskih agregata jeste taloženje željenog enzima odgovarajućim taložnim reagensom. Kao taložni reagensi ispitivani su aceton, amonijum-sulfat (70 %) i 2-propanol. Odnos enzima i taložnog reagensa 1:3 (v/v) je u toku pripreme imobilisanog preparata peroksidaze održavan konstantnim. Ovaj odnos je izabran kao najpogodniji nakon preliminarnih rezultata koji su pokazali da se pri ovom odnosu dobija preparat najveće zadržane aktivnosti.

Slika 10.1. pokazuje da su se ispitani organski rastvarači, aceton i 2-propanol pokazali kao najbolji za taloženje peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena pri čemu je zadržana aktivnost iznosila $22,5 \pm 1,3$ % i $18 \pm 0,8$ % od početne aktivnosti unete u sistem. Prilikom taloženja organskim rastvaračima, u rastvoru su se jasno mogli videti istaloženi agregati, dok se prilikom taloženja amonijum-sulfatom moglo zapaziti samo blago zamućenje rastvora.

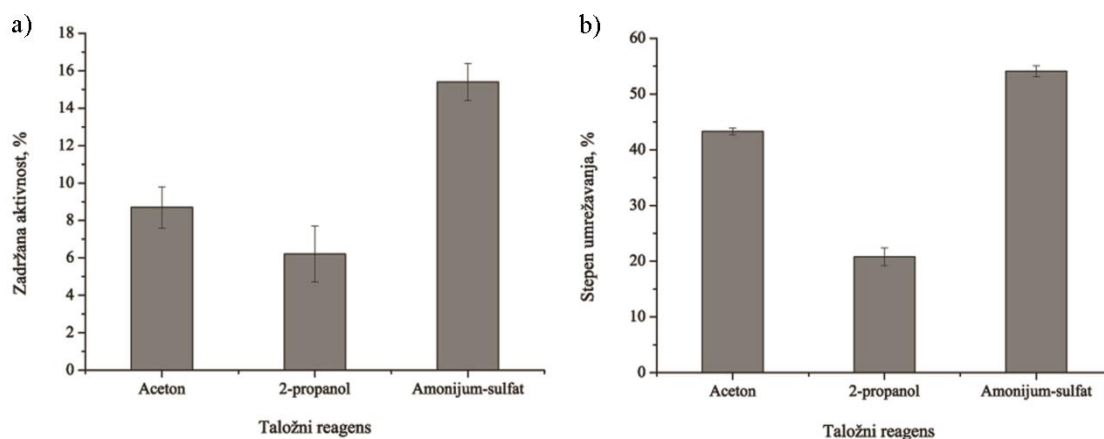
Dobijeni rezultati su se poklopili sa rezultatima ispitivanja Šuleka i saradnika, gde se aceton takođe pokazao kao najbolje sredstvo za taloženje, dok amonijum–sulfat nije istaložio proteine.¹⁸⁰



Slika 10.1. Uticaj taložnog reagensa na: a) zadržanu aktivnost; b) stepen umrežavanja (uslovi: koncentracija glutaraldehida 1 %, temperatura 4 ° C, dužina trajanja imobilizacije 4 h)

Rastvarači kao aceton i 2–propanol talože proteine tako što utiču na dielektričnu konstantu rastvora i smanjuju rastvorljivost proteina postepeno intenzivirajući protein–protein, a ne protein–rastvarač interakcije. Organski rastvarači se ne koriste često zbog visoke cene, zapaljivosti, lake denaturacije proteina zbog čega se taloženje izvodi na niskim temperaturama. Iako postoji opasnost od kompletne denaturacije pri korišćenju organskih rastvarača, u ovom slučaju su se pokazali bolji od amonijum–sulfata. Primenom acetona kao taložnog reagensa postignut je stepen umrežavanja od $80,2 \pm 2,1$ %. Korišćenjem 2–propanola pad stepena umrežavanja ($68,3 \pm 1,8$ %) i zadržane aktivnosti na $18 \pm 0,8$ % je uočen. Iako se amonijum–sulfat najčešće koristi u taloženju enzima u ovom slučaju je zabeležen znatno manji stepen umrežavanja $59,9 \pm 1,9$ %, a zadržana aktivnost iznosila je svega $6,5 \pm 0,9$ %. Na osnovu dobijenih rezultata, aceton je izabran kao taložni reagens u narednim eksperimentima pripreme umreženih agregata peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena.

Sa druge strane, komercijalna peroksidaza se značajno drugačije ponaša u ovom koraku pripreme umreženih agregata. Na slici 10.2. je grafički prikazan uticaj taložnog reagensa na komercijalnu peroksidazu.



Slika 10.2. Uticaj taložnog reagensa na: a) zadržanu aktivnost; b) stepen umrežavanja (uslovi: koncentracija glutaraldehida 1 %, temperatura 4 ° C, dužina trajanja imobilizacije 4 h)

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 10.2. jasno je da se kao najpogodniji taložni reagens u slučaju komercijalne peroksidaze pokazao amonijum–sulfat. Nakon taloženja peroksidaze amonijum–sulfatom dobijeni imobilizat zadržava $15,4 \pm 1,0$ % od početne aktivnosti, dok nakon taloženja organskim rastvaračima, acetonom i 2–propanolom zadržana je aktivnost od $8,7 \pm 1,1$ i $6,2 \pm 1,5$ %, redom. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je komercijalna peroksidaza znatno osetljivija na uticaj taložnih sredstava, a naročito organskih rastvarača. Taložni reagensi koji su primenjeni u prvom koraku pripreme umreženih agregata dovode do konformacionih promena nastalih uklanjanjem molekula vode sa površine molekula enzima neophodnih za njegovu normalnu aktivnost. Povećanjem hidrofobnosti taložnog reagensa, sposobnost hvatanja slobodnih molekula vode, postepeno opada. Ipak, najčešći razlog za gubitak aktivnosti u toku taloženja je prodiranje molekula rastvarača do aktivnog centra enzima, smanjenje fleksibilnosti strukture i smanjenje ili gubitak aktivnosti imobilisanog enzima.¹⁷⁴ Nečistoće prisutne u ekstraktu rena upotrebljenom za pripremu imobilisane peroksidaze u obliku umreženih agregata očigledno zaštitno deluju na peroksidazu. Iako je imobilizacija enzima u obliku umreženih enzimskih agregata metod koji ne zahteva visokoprečišćen enzimski preparat, postoji mali broj primera u literaturi koji prikazuju imobilizaciju enzima iz sirovog ekstrakta–neprečišćenih u obliku umreženih agregata. Jedan od takvih primera je umrežavanje peroksidaze iz repe (*Brassica rapa*). Ispitivanjem uticaja acetona, acetonitrila, etanola i 2–propanola na taloženje

peroksidaze iz repe potvrđeno je da se najveći stepen umrežavanja 78 % i zadržana aktivnost od 28 % postiže sa acetonom kao taložnim reagensom. Ovo je još jedan dokaz, da su enzimi u svom prirodnom okruženju, sirovom ekstraktu, otporniji na dejstvo agresivnih uslova, kao što je taloženje organskim rastvaračem u konkretnom slučaju.¹⁷³

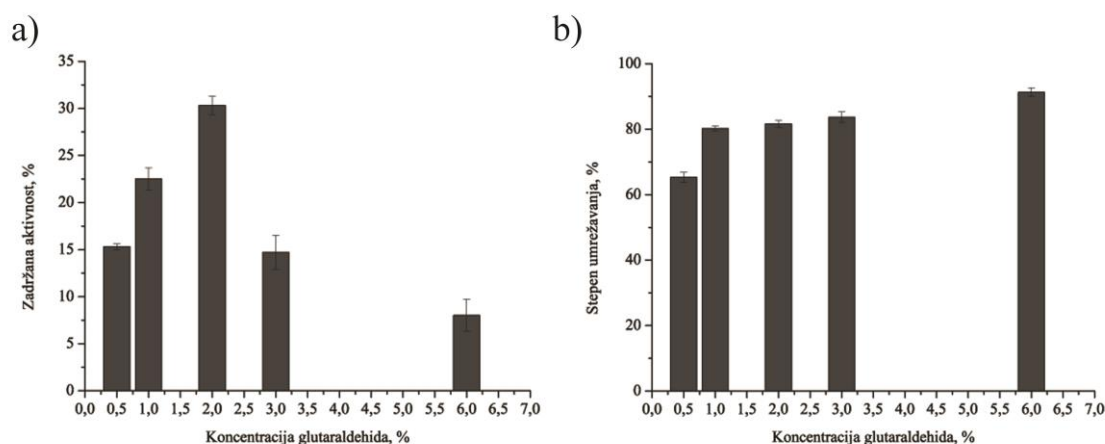
Sirovi ekstrakt mungo pasulja je iskorišćen kao izvor epoksid–hidrolaze, koja je umrežena u obliku agregata. Kao optimalni taložni reagens pokazao se amonijum–sulfat (80 %) pomoću kojeg je dobijen imobilisani preparat sa zadržanom aktivnosti 95 %.²⁶⁵ Umreženi agregati α –amilaze sa zadržanom aktivnosti 98 % dobijeni su primenom amonijum–sulfata kao taložnog reagensa.¹⁷⁴ Na osnovu ove eksperimentalne serije, potvrđeno je da izbor taložnog reagensa značajno utiče na finalne performanse dobijenog imobilisanog preparata, tako da je u svakom konkretnom slučaju potrebno pažljivo ispitati ovaj parametar.

10.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije glutaraldehida na karakteristike komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata

Nakon taloženja, sledeći korak u pripremi umreženih enzimskih agregata jeste umrežavanje enzima. U ovom slučaju glutaraldehyd kao jeftin, lako dostupan i jednostavan za primenu koristi se za umrežavanje istaloženih enzima. Glutaraldehyd može da ispolji pozitivan ali i negativan uticaj na enzim prilikom umrežavanja, shodno tome određivanje optimalne koncentracije za umrežavanja pod definisanim uslovima je od izuzetne važnosti kako bi se izbegao negativan uticaj ovog umrežavajućeg reagensa na krajnje performanse dobijenog imobilisanog enzima. Uticaj glutaraldehida na zadržanu aktivnost i stepen umrežavanja ispitan je variranjem početne koncentracije glutaraldehida u opsegu 0,5–6 % za umrežavanje peroksidaze iz ekstrakta i u opsegu 0,5–2,0 % za umrežavanje komercijalne peroksidaze. Dobijeni rezultati prikazani su na slikama 10.3. i 10.4.

Pozitivno–negativni uticaj na performanse dobijenih umreženih agregata se jasno vidi sa slike slici 10.3. a i b. Pozitivan uticaj glutaraldehid ispoljava na stepen

umrežavanja. Sa povećanjem koncentracije glutaraldehida povećava se i stepen umrežavanja što je posledica prisustva povećane koncentracije aldehidnih grupa dostupnih za vezivanje sa $-NH_2$ grupama enzima. Međutim, povećanje stepena umrežavanja u konkretnom slučaju direktno utiče na smanjenje zadržane aktivnosti dobijenog imobilisanog preparata. Smanjenje aktivnosti sa povećanjem koncentracije glutaraldehida se uglavnom pripisuje povećanju rigidnosti strukture dobijenih agregata koja nastaje višestrukim vezivanjem molekula glutaraldehida i molekula enzima.

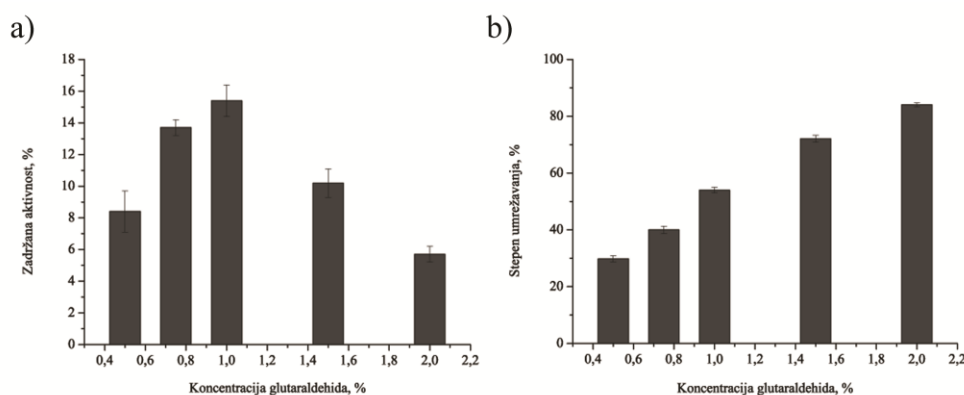


Slika 10.3. Uticaj početne koncentracije glutaraldehida na a) zadržanu aktivnost; b) stepen umrežavanja (uslovi: taložni reagens aceton, temperatura 4 ° C, dužina trajanja imobilizacije 4 h)

Povećane koncentracije glutaraldehida dovode do povećanja otpora pri prenosu mase i smanjenju aktivnosti enzima. Sa druge strane, mala količina glutaraldehida je nedovoljna za umrežavanje enzima i on ostaje slobodan u rastvoru.²⁶⁶ Koncentracija glutaraldehida od 2 % se pokazala kao optimalna za pripremanje umreženih agregata neprečišćene peroksidaze sa zadržanom aktivnosti od $30,3 \pm 0,5$ % i stepenom umrežavanja od $81,6 \pm 1,1$ %. Sve navedeno, navodi na pretpostavku da postoji velika verovatnoća formiranja Šifovih baza između proteina prisutnih u svežem ekstraktu i glutaraldehida, pa je na taj način umanjen inhibitorski uticaj umrežavajućeg reagensa na ciljani enzim iz ekstrakta.¹⁷³

Za razliku od peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena, komercijalna peroksidaza se pokazala znatno osetljivijom na dejstvo glutaraldehida. Povećanjem koncentracije

glutaraldehyda u opsegu od 0,5–1,0 % (slika 10.4.) dobijaju se imobilisani preparati komercijalne peroksidaze sa zadržanom aktivnosti od $8,4 \pm 1,3$ % i $15,4 \pm 1,0$ %.



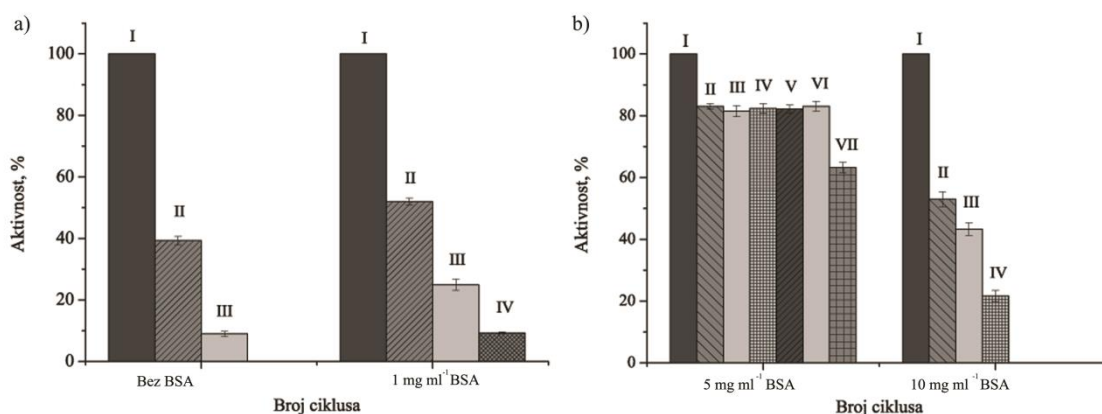
Slika 10.4. Uticaj početne koncentracije glutaraldehyda na a) zadržanu aktivnost; b) stepen umrežavanja (uslovi: taložni reagens amonijum–sulfat, temperatura 4°C , dužina trajanja imobilizacije 4 h)

U istom opsegu raste i stepen umrežavanja sa $29,8 \pm 1,1$ % na $54,0 \pm 1,0$ %. Daljim porastom početne koncentracije glutaraldehyda do 2 % zadržana aktivnost dobijenih agregata naglo opada i dostiže vrednost od $5,7 \pm 0,5$ % ali stepen umrežavanja raste na $84 \pm 0,7$ %. U daljim eksperimentima, početna koncentracija glutaraldehyda za pripremu umreženih agregata komercijalne peroksidaze od 1 % se održava konstantnom.

Smanjenje zadržane aktivnosti sa porastom stepena umrežavanja je u skladu sa podacima iz literature.^{173,180,266} Glavni uzrok smanjenja procenta zadržane aktivnosti dobijenih umreženih agregata sa porastom koncentracije glutaraldehyda je višestepeno umrežavanje. Pored toga i veličina molekula glutaraldehyda može značajno da doprinese ovakvom negativnom ishodu. Glutaraldehyd kao mali molekul vrlo lako može da prodre u unutrašnjost molekula enzima i umreži aminokiselinske ostatke esencijalne za katalitičku aktivnost što se manifestuje padom procenta zadržane aktivnosti dobijenog imobilisanog preparata.¹⁷⁴ Jedan od načina prevazilaženja ovog problema je primena različitih prirodnih polisaharida u oksidovanom obliku: dekstran, pektin, hitozan, agar kao umrežavajućih reagenasa.¹⁷⁵⁻¹⁷⁸

10.3. Ispitivanje uticaja dodatka inertnog proteina BSA na karakteristike komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata

Zbog malog broja amino grupa na površini peroksidaze, može doći do niskog stepena umrežavanja i do otpuštanja enzima u smešu. Peroksidaza iz rena ima samo 6 ostataka lizina dostupnih za vezivanje sa glutaraldehidom.¹⁸⁰ Da bi se prevazišao ovaj problem u smešu za imobilizaciju dodaju se inertni proteini kao što su proteini goveđeg serum albumina, proteini belanceta ili drugi proteini koji imaju veliki sadržaj $-NH_2$ grupa. Povećanje koncentracije slobodnih $-NH_2$ grupa, povećava verovatnoću umrežavanja i daje stabilnije agregate.^{180,266,267} Zato je u narednoj eksperimentalnoj seriji ispitan uticaj BSA na operativnu stabilnost i aktivnost umreženih agregata komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena. Dobijeni rezultati prikazani su na slikama 10.5. i 10.6. kao i u tabeli 10.7.

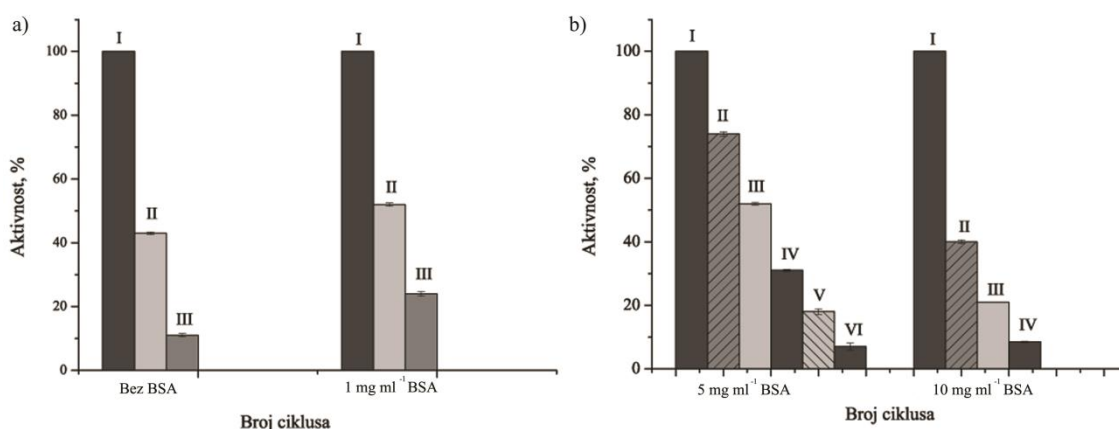


Slika 10.5. Uticaj dodatka inertnog proteina, BSA (0 mg; 1 mg; 5 mg; 10 mg) na aktivnost i operativnu stabilnost umreženih agregata neprečišćene peroksidaze

U ovoj seriji eksperimenata, pod uslovima definisanim prethodnim eksperimentima za dobijanje umreženih agregata ispitan je uticaj dodatka inertnog proteina na aktivnost i operativnu stabilnost imobilisanih preparata. Operativna stabilnost dobijenih preparata ispitana je u reakciji sa standardnim supstratom, pirogalolom. Sa slike 10.5. a i b može se zaključiti da dodatak inertnog proteina značajno utiče na operativnu stabilnost imobilisanog preparata. Dodatak 1 mg BSA nema značajan uticaj na aktivnost i na operativnu stabilnost dobijenog imobilisanog

preparata u poređenju sa umreženim agregatom pripremljenim bez BSA. Povećanje mase BSA na 5 mg uticalo je značajno na povećanje operativne stabilnosti ali i na smanjenje aktivnosti. Naime, aktivnost imobilizata pripremljenog bez BSA pada sa $220 \pm 0,6 \text{ U g}^{-1}$ na $150 \pm 0,2 \text{ U g}^{-1}$ za imobilizat dobijen dodatkom 5 mg BSA. Smanjenje aktivnosti imobilizata dobijenog dodatkom 5 mg BSA je zanemarljivo u poređenju sa tim da se takav imobilizat može primeniti kroz 6 ciklusa reakcije oksidacije pirogalola sa zadržanom aktivnosti od 80 %. Nakon sedmog ciklusa primene, imobilizat je zadržao 63 % od početne aktivnosti. Pad aktivnosti na 60 % nakon sedmog ciklusa se može povezati sa akumulacijom neproreagovalog supstrata i proizvoda reakcije na površini imobilizata koji povećavaju otpor prenosu mase i umanjuju aktivnost. Dalje povećanje količine BSA na 10 mg negativno utiče na finalne karakteristike dobijenog imobilisanog preparata, pri čemu je dostignut stepen umrežavanja od 100 %. Iako je postignut maksimalan stepen umrežavanja, imobilisani preparat gubi aktivnost nakon 4 ciklusa primene i ima manju početnu aktivnost od imobilizata pripremljenog bez BSA. Ova pojava može da se objasni činjenicom da povećana koncentracija molekula BSA dovodi do gušćeg pakovanja BSA, peroksidaze kao i proteina i drugih nečistoća prisutnih u ekstraktu što doprinosi povećanju difuzionih limitacija i smanjenja aktivnosti imobilisanog preparata.²⁶⁴

Uticaj dodatka BSA na komercijalnu peroksidazu prikazan je na slici 10.6., tabeli 10.7.



Slika 10.6. Uticaj dodatka inertnog proteina, BSA (0 mg; 1 mg; 5 mg; 10 mg) na aktivnost i operativnu atabilnost stabilnost umrežene komercijalne peroksidaze

Tabela 10.7. Uticaj BSA na karakteristike komercijalne i peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena imobilisane u obliku umreženih agregata

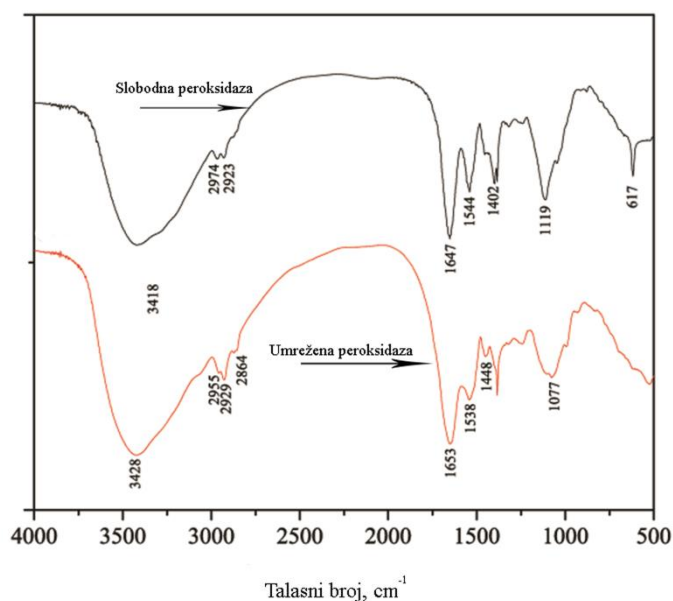
BSA, mg	<u>Komercijalna peroksidaza</u>			<u>Peroksidaza iz ekstrakta</u>		
	Zadržana aktivnost, %	Stepen umrežavanja, %	Aktivnost, U g ⁻¹	Zadržana aktivnost, %	Stepen umrežavanja, %	Aktivnost, U g ⁻¹
0	15,4±1,0	54,1±1,0	570±0,1	30,3±0,5	81,6±1,1	220±0,6
1	15,4±0,4	57,2±0,9	580±0,4	28,4±1,2	79,5±1,0	210±0,4
5	12,4±0,3	69,8±0,8	310±0,05	15,2±0,9	60,4±0,4	150±0,2
10	4,3±0,7	94,2±0,3	140±0,6	10,4±0,4	100±0,1	120±0,4

Uticaj BSA na zadržanu aktivnost i stepen umrežavanja je gotovo isti kao u slučaju peroksidaze iz svežeg ekstrakta. Naime, dodatkom 1 mg BSA operativna stabilnost i aktivnost dobijenog imobilisanog preparata su približno iste, 3 ciklusa i ~ 580 U g⁻¹. Imobilisani biokatalizator dobijen dodatkom 5 mg BSA se pokazao kao preparat koji ima najveću operativnu stabilnost. Ovaj imobilisani biokatalizator je bilo moguće primeniti u 6 ciklusa reakcije oksidacije pirogalola do purpurogalina. Iako nakon šestog ciklusa primene aktivnost imobilisanog preparata pada na 7,0±1,1 %, zapažanje je da je ovakav rezultat posledica pre svega mehaničke nestabilnosti umreženih agregata. Očekivano je da će povećanjem mase BSA na 10 mg doći do povećanja stabilnosti umreženih agregata, međutim to nije bio slučaj. U dostupnim literaturnim podacima pronađeni su isti rezultati. Pored toga, povećanjem stepena umrežavanja usled povećanja mase BSA u reakcionoj smeši, količina ciljanog enzima koji je umrežen u agregat može značajno da se smanji, ili pak da inertni protein okruži ciljani enzim, tako da se on nalazi duboko u unutrašnjosti dobijenih agregata gde nastaje dodatni problem, difuzione limitacije.²⁶⁷

Smanjenje aktivnosti dobijenog imobilisanog preparata sa dodatkom inertnog proteina zabeležen je i prilikom imobilizacije lakaze u obliku umreženih agregata. Dodatkom BSA smanjen je afinitet prema supstratu i samim tim aktivnost, ali je BSA delovao stabilizujuće na dobijene umrežene agregate lakaze.²⁶⁸

Pored BSA, u svrhu povećanja sadržaja eksternih amino grupa lizina dodaje se i polietilenimin (PEI). Prilikom pripreme umreženih agregata lipaze ispitan je uticaj dodatka PEI na umrežavanje i zadržanu aktivnost. Zabeležen je isti trend kao u slučaju dodatka BSA. Dodatkom PEI, stepen umrežavanja raste, ali zadržana aktivnost dobijene imobilisane lipaze se smanjuje.^{179,269}

Imobilizacija peroksidaze korišćenjem glutaraldehida u obliku umreženih enzimskih agregata je potvrđena FT–IR analizom (slika 10.8.).



Slika 10.8. FT–IR spektar slobodne peroksidaze i peroksidaze imobilisane u obliku umreženih agregata

FT–IR spektar slobodne peroksidaze predstavlja tipičan spektar proteina sa najvećim pikovima na 3418 cm⁻¹ koji potiče od –OH istezanja. Amidna traka I i amidna traka II se jasno uočavaju na 1647 cm⁻¹ i 1541 cm⁻¹. Peroksidaza iz rena poseduje i ugljenohidratnu komponentu što je potvrđeno pikom na 1119 cm⁻¹. FT–IR spektar peroksidaze imobilisane u obliku umreženih agregata, takođe sadrži sve trake karakteristične za protein. Glavna razlika u odnosu na FT–IR slobodne peroksidaze je pojava intenzivnih pikova na 2955 cm⁻¹ i 2929 cm⁻¹ kao i pojava novog pika na 1447 cm⁻¹ koji potiče od CH₂ savijanja, što potvrđuje uspešno umrežavanje glutaraldehydom.

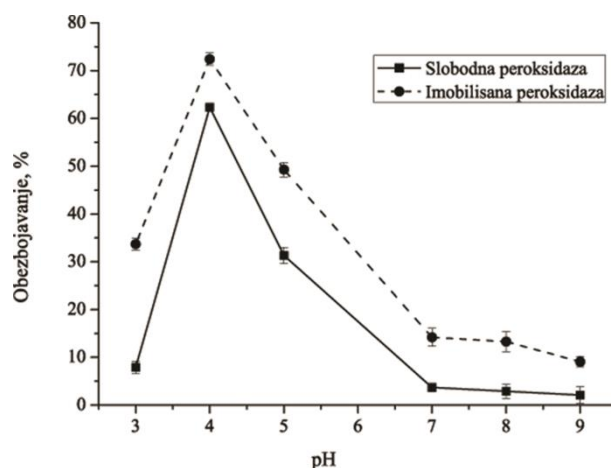
10.4. Određivanje optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena imobilisanom u obliku umreženih ezimskih agregata u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

S obzirom na činjenicu da u dostupnoj literaturi ne postoji nijedan podatak vezan za uklanjanje sintetičkih boja peroksidazom imobilisanom u obliku umreženih enzimskih agregata naredni eksperimenti su usmereni u pravcu primene dobijenog imobilizata u uklanjanju sintetičkih boja. Uklanjanje ispitivane AV 109 boje korišćenjem 0,1 U jedinice enzimske aktivnosti imobilisane peroksidaze (komercijalne i neprečišćene) u šaržnom reaktoru je optimizovano. Ispitan je uticaj: pH reakcione smeše, koncentracije vodonik-peroksida i koncentracije boje. U cilju poređenja, prikazani su rezultati obezbojavanja AV 109 boje slobodnom i imobilisanom peroksidazom pod istim uslovima.

10.4.1. Ispitivanje uticaja pH na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena imobilisanom u obliku umreženih ezimskih agregata u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

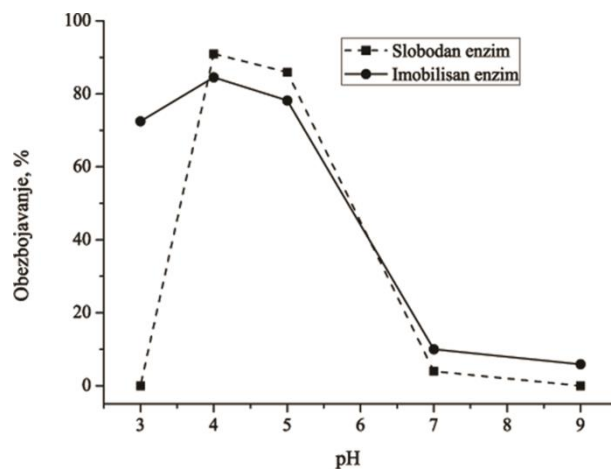
Optimalni pH za reakciju obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena umreženom u obliku enzimskih agregata je određen kao što je opisano u poglavlju 6.4.5.1. i rezultati su prikazani na slici 10.9. Na slici 10.9. može da se uoči da je oblik pH krive za slobodnu i imobilisanu peroksidazu isti sa razlikom da je imobilisana peroksidaza stabilnija i aktivnija. Naime, pod istim reakcionim uslovima imobilisana peroksidaza obezboji $72,4 \pm 1,3$ % dok slobodna peroksidaza obezboji $62,3 \pm 0,5$ % ispitivane AV 109 boje. Takođe, može se uočiti da slobodna peroksidaza ne može da se odupre denaturaciji u izuzetno kiseloj sredini (pH 3) za razliku od imobilisane peroksidaze. Pod pomenutim uslovima (pH 3) zapažena je neznatna aktivnost slobodne peroksidaze koja rezultuje u malom stepenu obezbojenja od $7,9 \pm 1,3$ %. Sa druge strane, moć oksidacije imobilisane peroksidaze je čak 5 puta veća u poređenju sa slobodnom peroksidazom pri čemu je obezbojeno $33,7 \pm 1,2$ % AV 109 boje pod identičnim uslovima. Na osnovu navedenih eksperimentalnih rezultata, vrlo lako se može zaključiti da su nakon umrežavanja konformacione promene prouzrokovane jako kiselim sredinom znatno redukovane što se ogleda u velikom stepenu obezbojenja AV 109 boje.¹¹⁴ Pored očuvane aktivnosti enzima nakon

umrežavanja, visok stepen uklanjanja boje pod ovako ekstremnim uslovima može da se pripíše i činjenici da se supstrat nalazi u takvom stanju koje omogućava da enzim ispolji maksimum katalitičke aktivnosti pod datim uslovima.²³⁰ Maksimalnu aktivnost kako slobodna tako i imobilisana peroksidaza ispoljavaju na pH 4, tako da je u narednim eksperimentima ovaj parametar održavan konstantnim. Pod ovim uslovima, usvojeno vreme kontakta za postizanje maksimalnog stepena obezbojenja je 25 min.



Slika 10.9. Uticaj pH na obezbojavanje AV 109 boje u šaržnom reaktoru peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena imobilisanom u obliku umreženih agregata i slobodnom peroksidazom (uslovi: koncentracija boje 30 mg L^{-1} , $0,1 \text{ U}$ enzimske aktivnosti, koncentracija H_2O_2 $0,1 \text{ mM}$, temperatura $24 \text{ }^\circ\text{C}$)

Uticaj pH na obezbojavanje komercijalnom peroksidazom umreženom u agregate prikazan je na slici 10.10.



Slika 10.10. Uticaj pH na obezbojavanje AV 109 boje u šaržnom reaktoru komercijalnom peroksidazom imobilisanom u obliku umreženih agregata i slobodnom peroksidazom (uslovi: koncentracija boje 30 mg L^{-1} , $0,1 \text{ U}$ enzimske aktivnosti, koncentracija H_2O_2 $0,1 \text{ mM}$, temperatura 24° C)

Jasno je na osnovu slike 10.10. da je imobilizacije u velikoj meri doprinela povećanju stabilnosti komercijalne peroksidaze. Nasuprot slobodnoj peroksidazi, imobilisana komercijalna peroksidaza se pokazala izuzetno aktivnom u kiseljoj sredini u širem opsegu pH, 3–5. Kao optimalan usvojen je pH 4 gde se postiže stepen obezbojavanja AV 109 boje od $84,5 \pm 0,3 \%$. Doprinos imobilizacije potvrđuje se i posmatranjem postignutih stepena obezbojavanja u opsegu pH 7–9. U pomenutom opsegu zabeležena je promena stepena obezbojenja sa $10,0 \pm 0,05 \%$ na $5,9 \pm 0,3 \%$ i sa $4,0 \pm 0,9 \%$ na 0% , za imobilisanu i slobodnu peroksidazu.

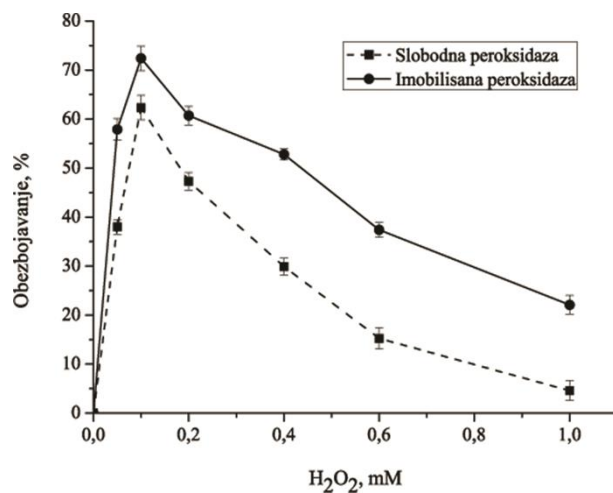
Poređenjem rezultata dobijenih za agregate peroksidaze iz svežeg ekstrakta i komercijalne peroksidaze može se zaključiti da je znatno osetljivija peroksidaza iz ekstrakta od komercijalne umrežene peroksidaze. Dodatne nečistoće u ekstraktu i sinergizam sa supstratima i enzimom su mogući razlozi za to.

Detaljnim pregledom literature vezane za imobilizaciju peroksidaze i primenu u oblasti tretmana otpadnih obojenih voda potvrđeno je da imobilizacija obuhvatanjem u matrice predstavlja najbolji izbor kada je peroksidaza iz rena u pitanju što ukazuje na činjenicu da se aktivnost peroksidaze veoma lako smanjuje pod uticajem faktora iz

spoljašnje sredine. Rezultati dobijeni u ovoj eksperimentalnoj seriji su značajan doprinos za oblast primene peroksidaze imobilisane u obliku umreženih agregata u realnim sistemima sa otpadnim vodama industrije. Za ovakve vode blago kisela sredina je karakteristična. Kako su oba preparata umreženih peroksidaza pokazala izuzetnu aktivnost baš u blago kiseljoj sredini, to ukazuje da se primenom ovako imobilisane peroksidaze dodatni troškovi vezani za podešavanje pH otpadnih voda pre tretmana mogu znatno umanjiti, što je značajno u pogledu ekonomske opravdanosti procesa.¹⁶⁰

10.4.2. Ispitivanje uticaja početne koncentracije vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena imobilisanom u obliku umreženih ezimskih agregata u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

Sledeći parametar u optimizaciji procesa jeste uticaj koncentracije vodonik-peroksida na obezbojavanje rastvora AV 109 boje slobodnom i imobilisanom peroksidazom. Dobijeni eksperimentalni podaci o uticaju vodonik-peroksida na stepen obezbojavanja AV 109 boje prikazani su na slikama 10.11. i 10.12.

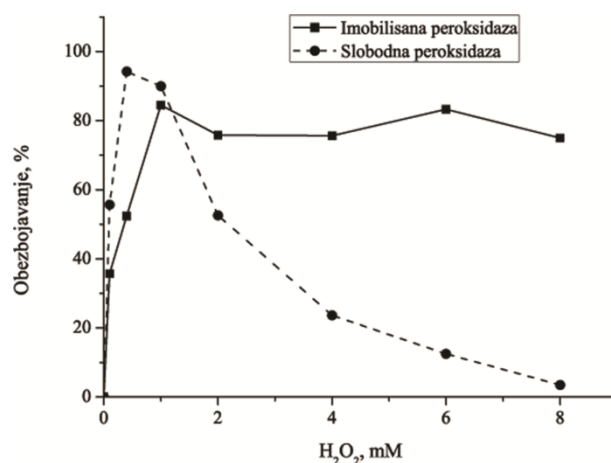


Slika 10.11. Uticaj vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje u šaržnom reaktoru komercijalnom peroksidazom imobilisanom u obliku umreženih agregata i slobodnom peroksidazom (uslovi: koncentracija boje 30 mg L⁻¹, 0,1 U enzimske aktivnosti, pH 4, temperatura 24 ° C)

Sa slike 10.11. se lako uočava izražen inhibitorski uticaj vodonik-peroksida kako na slobodnu tako i na imobilisanu peroksidazu. Povećanje stepena obezbojavanja sa

porastom koncentracije vodonik-peroksida do 0,1 mM se jasno zapaža. Daljim porastom koncentracije peroksida, zapaža se nagli pad stepena obezbojavanja, što dovodi do zaključka da višak vodonik-peroksida povećava afinitet peroksidnog radikala prema enzimu dajući neaktivni enzim–supstrat kompleks.²⁷⁰ Maksimalan stepen obezbojenja primenom imobilisane i slobodne peroksidaze od $72,4 \pm 1,3$ % i $62,3 \pm 0,5$ % redom, postiže se pri početnoj koncentraciji peroksida od 0,1 mM.

Uticaj vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom peroksidazom imobilisanom u obliku umreženih agregata ispitan je variranjem početne koncentracije vodonik-peroksida u opsegu 0,1–8 mM. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 10.12.



Slika 10.12. Uticaj vodonik-peroksida na obezbojavanje AV 109 boje u šaržnom reaktoru komercijalnom peroksidazom imobilisanom u obliku umreženih agregata i slobodnom peroksidazom (uslovi: koncentracija boje 30 mg L^{-1} , 0,1 U enzimске aktivnosti, pH 4, temperatura $24 \text{ }^\circ \text{C}$)

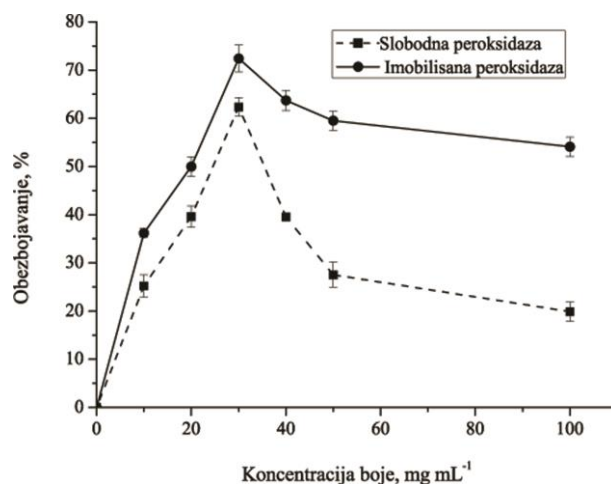
Inhibitorni uticaj povećanih koncentracija vodonik-peroksida koji se manifestuje formiranjem neaktivnog "dead-end" kompleksa i gubitkom aktivnosti peroksidaze izostaje kada je u pitanju komercijalna peroksidaza imobilisana u obliku umreženih agregata. Slika 10.12. jasno pokazuje da je aktivnost umreženih agregata približno konstantna ~ 76 % u ispitivanom opsegu početnih koncentracija vodonik-peroksida. Maksimalni stepen obezbojenja $84,5 \pm 0,3$ % zabeležen je pri početnoj koncentraciji vodonik-peroksida od 1 mM, dok se maksimalno obezbojenje $94,2 \pm 0,2$ % slobodnom

peroksidazom postiže pri početnoj koncentraciji 0,4 mM vodonik-peroksida. Isti ili slični rezultati su retki u literaturi kada je u pitanju primena imobilisane peroksidaze u uklanjanju različitih zagađivača (boja, fenola). Jedan od takvih primera je peroksidaza imobilisana u ciklodekstrin kompleks koja pokazuje rezistentnost na povećane koncentracije vodonik-peroksida. Ovako imobilisana peroksidaza uklanja ~ 84 % ispitivane boje pri početnoj koncentraciji vodonik-peroksida 0,8 mM.¹⁸⁹ Daljim porastom, iznad 0,8 mM–1 mM stepen obezbojavanja je konstantan.

Peroksidaza imobilisana na nanokompozit Fe₃O₄ pokazuje karakteristično ponašanje peroksidaze sa povećanjem koncentracije vodonik-peroksida. Optimalna koncentracije vodonik-peroksida za uklanjanje različitih hlorofenola ovako imobilisanom HRP je 0,5 mM. Daljim porastom koncentracije vodonik-peroksida uklanjanje ispitivanih hlorofenola konstantno opada.²⁷¹

10.4.3. Ispitivanje uticaja početne koncentracije boje na obezbojavanje AV 109 boje komercijalnom i peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena imobilisanom u obliku umreženih ezimskih agregata u šaržnom reaktoru sa orbitalnim mešanjem

S obzirom da se obezbojavanje AV 109 boje odvija po ping pong bi-bi mehanizmu, i da postoji mogućnost nastanka neaktivnog kompleksa pri povećanim koncentracijama boje, potrebno je utvrditi optimalnu koncentraciju boje pri kojoj se postiže maksimalan stepen obezbojavanja pod datim uslovima. Uticaj boje je ispitan pod optimalnim uslovima pH i koncentracije vodonik-peroksida variranjem početne koncentracije boje u opsegu od 10–100 mg L⁻¹.

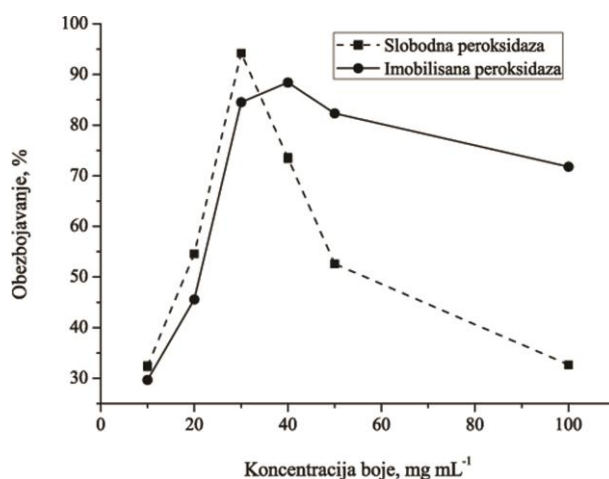


Slika 10.13. Uticaj boje na obezbojavanje AV 109 boje u šaržnom reaktoru peroksidazom iz svežeg ekstrakta imobilisanom u obliku umreženih agregata i slobodnom peroksidazom (uslovi: koncentracija boje 30 mg L⁻¹, 0,1 U enzimske aktivnosti, koncentracija H₂O₂ 0,1 mM, pH 4, temperatura 24 ° C)

Ispitivana boja, AV 109 kao što je prikazano na slici 10.13. takođe ispoljava negativan uticaj na enzim. Sa slike 10.13. se može videti da sa povećanjem početne koncentracije boje do 30 mg L⁻¹ raste i stepen obezbojavanja. Daljim porastom početne koncentracije boje, opada stepen obezbojavanja što se objašnjava inhibitornim uticajem supstrata na enzim. Međutim, ovaj inhibitorni uticaj je znatno manje izražen na umreženu, nego na slobodnu peroksidazu. Na osnovu dobijenih rezultata, početna koncentracija boje 30 mg L⁻¹ je usvojena kao optimalna pri čemu je postignuti stepen obezbojenja 72,4±2,8 % i 62,5±1,9 % imobilisanom i slobodnom peroksidazom, redom. Pored toga, umrežavanjem je peroksidaza značajno stabilizovana što se zaključuje na osnovu podatka da povećanjem početne koncentracije boje do 100 mg L⁻¹ zadržana aktivnost je 74,3 %, dok u je slučaju slobodne 19,9 %. Visok procenat zadržane aktivnosti u poređenju sa slobodnom peroksidazom ukazuje na drugačije efekte raspodele supstrata u sistemu sa slobodnim i imobilisanim enzimom, odnosno umreženom peroksidazom u obliku agregata.

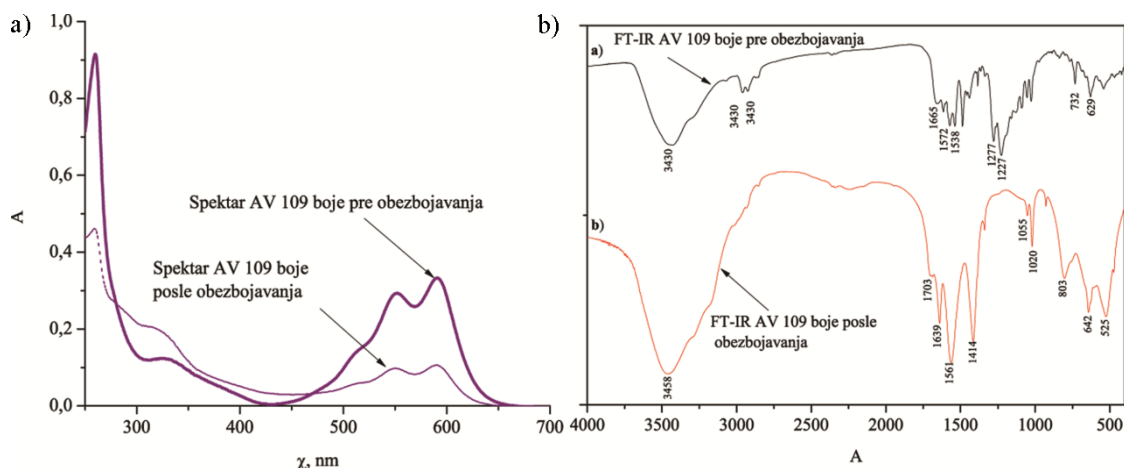
Uticaj početne koncentracije boje na komercijalnu slobodnu i umreženu peroksidazu je prikazan na slici 10.14. Prvo što se može zapaziti sa slike (10.14.) je da je u posmatranoj reakciji znatno aktivnija imobilisana peroksidaza. Porast obezbojavanja u opsegu početnih koncentracija boje 10–30 mg L⁻¹ od 32,4±0,9 % do

94,2±0,2 % je zabeležen u reakciji obezbojavanja katalizovanoj slobodnom peroksidazom. Nakon dostizanja maksimuma, dajim porastom početne koncentracije boje, obezbojavanje naglo opada, što se pripisuje inhibiciji enzima supstratom u višku. Širi opseg početnih koncentracija boje 10–40 mg L⁻¹ u kojem stepen obezbojavanja postepeno raste je zabeležen u reakciji obezbojavanja AV 109 boje imobilisanom peroksidazom. Početna koncentracija boje od 40 mg L⁻¹ je usvojena kao optimalna za reakciju katalizovanu imobilisanom peroksidazom pri kojoj se postiže obezbojavanje od 88,4±0,7 %. Dalji porast početne koncentracije iznad 40 mg L⁻¹ ne utiče značajno na stepen obezbojavanja. Tako, pri početnoj koncentraciji boje od 100 mg L⁻¹ slobodna peroksidaza ukloni 32,7±0,5 %, dok imobilisana obezboji 71,8±0,4 % ispitivane boje. Očigledno je da je imobilizacija doprinela stabilizaciji i zaštiti peroksidaze od inhibitornog uticaja supstrata.



Slika 10.14. Uticaj početne koncentracije boje na obezbojavanje AV 109 boje u šaržnom reaktoru komercijalnom peroksidazom imobilisanom u obliku umreženih agregata i slobodnom peroksidazom (uslovi: koncentracija , 0,1 U enzimske aktivnosti, koncentracija H₂O₂ 1 mM pH 4, temperatura 24 ° C)

Obezbojavanje AV 109 boje potvrđeno je snimanjem UV spektra ispitivane boje, gde promene u spektru ukazuju na uspešno obezbojavanje rastvora boje AV 109 (10.15. a). Takođe, uspešnost obezbojavanja je potvrđena i FT-IR analizom uzorka boje pre obezbojavanja i nakon enzimskog obezbojavanja (10.15 b).



Slika 10.15. a) UV spektar obezbojavanja AV 109 boje imobilisanom peroksidazom; b) FT-IR spektar AV 109 boje pre i posle obezbojavanja imobilisanom peroksidazom

Nakon snimanja FT-IR spektra AV 109 boje pre i posle enzimskog obezbojavanja, zapažena je značajna promena u položaju pikova. Naime, najveće promene su uočene u spektralnom regionu $1050\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, dok je u regionu $1050\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ zabeležen potpuni gubitak traka koje postoje u strukturi boje pre enzimskog obezbojavanja. Gubitak traka na 1277 cm^{-1} i 1227 cm^{-1} koje potiču od vibracija istezanja --C--N-- i --C--O--C-- veza je pokazatelj degradacionog puta ispitivane boje. Drugi indikator jeste generalno pomeranje pikova ka većim talasnim brojevima u spektru enzimski tretirane boje koje nastaje kao posledica prekida delokalizacije. Kao rezultat, pik koji potiče od vibracija istezanja --C=O antrahinonskog dela molekula se pomera sa 1665 na 1730 cm^{-1} kao i pik koji potiče od istezanja --N--H-- vibracija se pomera sa 3430 na 3458 cm^{-1} u spektru enzimski tretirane boje.

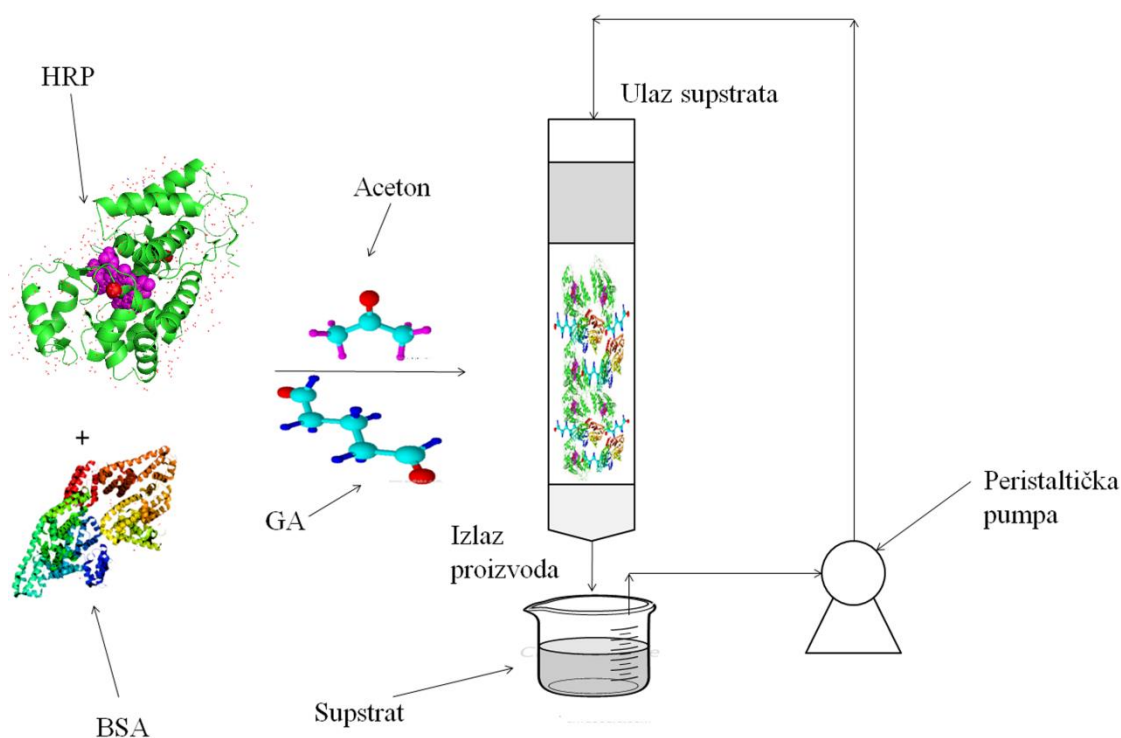
Detaljnim pregledom literature, potvrđeno je da ne postoje podaci o umrežavanju neprečišćene peroksidaze iz rena u cilju primene u obezbojavanju sintetičkih boja. Dostupni podaci vezani za imobilizaciju enzima umrežavanjem odnose se na enzime kao što su: lakaza, tirozinaza iz gljiva, glukozo-oksidaža. Umreženi enzimski preparati tirozinaze iz gljiva uspešno su pripremljeni i primenjeni u uklanjanju fenolnih jedinjenja.²⁷⁰ Umreženim enzimskim agregatom tirozinaze je uklonjeno ispitivano fenolno jedinjenje u periodu $0,5\text{--}3\text{ h}$ sa značajnim procentom smanjenje toksičnosti tretiranog uzorka što je potvrđeno *Hidra synensis* testom toksičnosti. Visok procenat ($\sim 80\%$, $160\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) uklanjanja fenolnog supstrata (acetoaminofen) postignut

je i tzv. kombinovanim umreženim agregatima, u konkretnom slučaju lakazom i tirozinazom.¹⁸⁶ Pored navedenih, u literaturi postoje još dva podatka vezana za pripremu umreženih enzimskih agregata i primenu u tretmanu zagađenih voda. Kombinovani umreženi agregat lakaze, peroksidaze i glukoza–oksidaze uspešno je primenjena u uklanjanju farmaceutski aktivnih jedinjenja.²⁷² Gljiva (*Bjerkandera adusta*) je iskorišćena kao izvor peroksidaze koja je umrežena sa glukoza–oksidazom i primenjena u uklanjanju hemijskih supstanci koje razaraju endokrini sistem.¹⁸⁷

Umrežena lakaza je, do sada, primenjena u obezbojavanju trifenil–metanskih, reaktivnih, azo i antrahinonskih boja. Uklanjanje trifenil–metanskih (2 g L^{-1}) i reaktivnih boja ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) ispitano je u šaržnom reaktoru primenom umreženih agregata lakaze. Za obezbojavanje pomenutih boja u acetatnom puferu, pH 5,0 korišćenjem 10 IU, bilo je neophodno 6 h i 2 h. Poređenjem umreženih agregata lakaze i peroksidaze iz rena, uočava se prednost primene umrežene peroksidaze u obezbojavanju sintetičkih boja. Prva prednost se odnosi na vreme kontakta. Naime, za postizanje približno istog stepena obezbojavanja umreženom peroksidazom bilo je nepohodno 35 min što je značajno manje u poređenju sa vremenom potrebnim za uklanjanje sintetičkih boja (6 i 2 h) umreženom lakazom. Druga prednost peroksidaze odnosi se na količinu enzimskih jedinica koje katalizuju pomenutu reakciju obezbojavanja, gde je za reakciju katalizovanu lakazom bilo potrebno 10 puta više enzimskih jedinica za postizanje približno istog stepena obezbojavanja. Umreženi agregati lakaze su vezani za amino–funktionalane magnetne nanočestice i primenjeni za obezbojavanje antrahinonske boje RBBR (C. I. Remazol Brilliant Blue R). Ispitivana boja obezbojena je u velikom procentu, 96 % korišćenjem $0,2 \text{ IU mL}^{-1}$ nakon 120 min. $72,4 \pm 2,8 \%$ ispitivane boje, AV 109 je uklonjeno nakon 35 min, korišćenjem $0,004 \text{ U mL}^{-1}$ umrežene peroksidaze. Na osnovu svega navedenog dokazano je da umrežena neprečišćena kao i komercijalna peroksidaza imaju veliki potencijal za primenu u reakciji uklanjanja antrahinonskih boja iz otpadnih voda.

10.4.4. Ispitivanje operative stabilnosti peroksidaze imobilisane u obliku umreženih enzimskih agregata

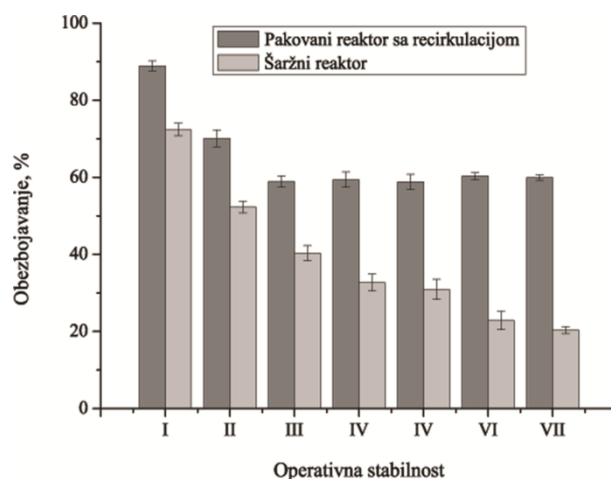
Za industrijsku primenu enzima najznačajnija je stabilnost dobijenog imobilisanog biokatalizatora u cilju smanjenja troškova primene enzima u procesu. Shodno tome ispitana je operativna stabilnost imobilisane peroksidaze u obliku umreženih agregata u reakciji obezbojavanja AV 109 boje pod optimalnim uslovima. Reaktor sa pakovanim slojem sa recirkulacijom (slika 10.16.) upotrebljen je za ispitivanje operative stabilnosti umreženih agregata peroksidaze iz ekstrakta u reakciji obezbojavanja AV 109 boje.



Slika 10.16. Reaktor sa pakovanim slojem umreženih agregata peroksidaze iz ekstrakta sa recirkulacijom

Kroz sloj umreženih agregata peroksidaze kontinualni dotok ($6,25 \text{ mL min}^{-1}$) napojne smeše (koncentracija boje 30 mg L^{-1} , koncentracija vodonik-peroksida $0,1 \text{ mM}$, zapremina reakcione smeše 25 mL) ostvaren je korišćenjem peristaltičke pumpe kao što je prikazano na slici 10.16. U cilju isključenja mogućnosti adsorpcije ispitivane boje imobilisanom peroksidazom, prvi eksperiment je izvođen samo sa supstratom i imobilisanom peroksidazom (10 mg), bez dodatka vodonik-peroksida. Ovim eksperimentom je potvrđen neznatan udeo adsorpcije ispitivane boje imobilisanim preparatom (4%) što se smatra izuzetnim biokatalizatorom ukoliko je procenat adsorpcije manji od 20% .²⁷³ Nakon ispitivanja adsorpcije boje, operativna stabilnost imobilisane peroksidaze ispitana je u oba reaktorska sistema.

Slika 10.17. pokazuje da je imobilisana peroksidaza znatno stabilnija u pakovanom u poređenju sa šaržnim reaktorom.

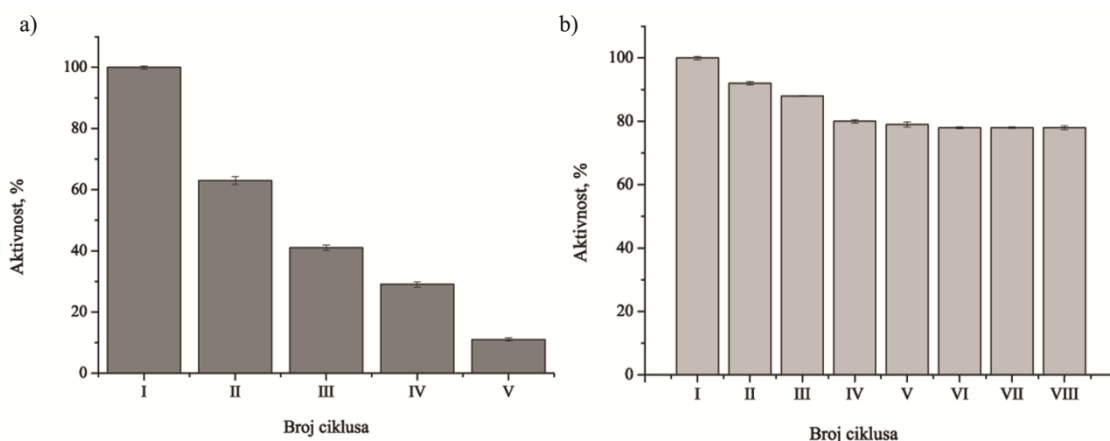


Slika 10.17. Operativna stabilnost peroksidaze iz ekstrakta imobilisane u obliku umreženih agregata u šaržnom i pakovanom reaktoru sa recirkulacijom (uslovi: koncentracija H_2O_2 $0,1 \text{ mM}$, $0,1 \text{ U}$ enzimске aktivnosti, $\text{pH } 4$, koncentracija boje 30 mg L^{-1} , temperatura $24 \text{ }^\circ \text{C}$)

Nakon prvog ciklusa veći procenat obezbojavanja AV 109 boje postignut je u pakovanom reaktoru. Već u drugom i trećem ciklusu primene procenat obezbojavanja opada na $70,1 \pm 2,2 \%$ i $58,9 \pm 1,5 \%$. Zabeleženi pad aktivnosti pripisuje se gubitku peroksidaze iz umreženih agregata. Nakon trećeg ciklusa primene, aktivnost imobilisane peroksidaze ostaje nepromenjena $\sim 60 \%$ što ukazuje da nema više ispiranja i da je imobilisana peroksidaza stabilna. Takođe, smanjenje aktivnosti imobilisane peroksidaze

se često pripisuje i akumulaciji reakcionih proizvoda u oblasti aktivnog centra, pri čemu se otežava prilaz supstratu i smanjuje aktivnost imobilisane enzima. Lakaza imobilisana u obliku umreženih agregata je primenjena za obezbojavanje antrahinonske boje C. I. Reactive Brilliant Blue R (RBBR). Ispitivanjem optimalnih uslova obezbojavanja RBBR boje umreženim agregatom lakaze utvrđeno je da u ovoj reakciji adsorpcija umreženih agregata ima mnogostruko veći udeo nego u slučaju umreženih agregata peroksidaze.²⁷⁴

Operativna stabilnost umreženih agregata komercijalne peroksidaze ispitana je po metodi iz poglavlja 6.5.2.4. Operativna stabilnost umreženih agregata komercijalne peroksidaze ispitana je u reakciji obezbojavanja AV 109 boje pod optimalnim uslovima: pH 4, koncentracija boje 40 mg L⁻¹, koncentracija H₂O₂ 1 mM, temperatura 24 °C. Pored toga, operativna stabilnost imobilisane peroksidaze je ispitana i u standardnoj reakciji, sa pirogalolom kao supstratom. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 10.18a i b.



Slika 10.18. Operativna stabilnost umreženih agregata komercijalne peroksidaze: a) u reakciji obezbojavanja AV 109 boje; b) u standardnoj reakciji sa pirogalolom

Sa slike 10.18a uočava se da umreženi agregat komercijalne peroksidaze značajno gubi aktivnost nakon svakog ciklusa primene. Nakon 5 ciklusa, zadržana aktivnost od 11±0,5 % je zabeležena. Glavni razlog ovakvog ponašanja nalazi se u mehaničkoj nestabilnosti primenjenih imobilizata. Naime, nakon svakog ciklusa bilo je lako uočljivo narušavanje strukture agregata. Narušavanjem strukture može da dođe do prevelike izloženosti aktivnog centra umreženog enzima supstratu, potom do inaktivacije enzima. Drugi

mogući razlog je ispuštanje enzima tj. spiranje enzima iz agregata, što vodi smanjenju aktivnosti. Narušavanjem strukture moglo je da dođe do ispuštanja glutaraldehida u reakcionu smešu, za koji je potvrđeno da deluje inhibitory na peroksidazu umrežavanjem esencijalnih aminokiselinskih ostataka.¹⁷⁴ Gubitak aktivnosti nakon svakog ciklusa znači i produženje vremena trajanja narednog ciklusa, što je u mnogome doprinelo ovakvom konačnom ishodu. Duže vreme trajanja reakcije, veća verovatnoća narušavanja strukture agregata usled dejstva mehaničkih sila (mešanje, centrifugiranje). Sa druge strane, standardna reakcija sa pirogalolom je trajala u svakom ciklusu 3 min. U ovoj eksperimentalnoj seriji pokazana je izuzetna stabilnost umreženih agregata komercijalne peroksidaze. Nakon trećeg ciklusa, aktivnost opada na $80 \pm 0,5$ %, odakle je do sedmog ciklusa gotovo nepromenjena ~ 78 %. Peroksidaza iz rena imobilisana u obliku umreženih enzimskih agregata je neuporedivo operativno stabilnija od npr. peroksidaze imobilisane na fibrozne membrane dobijene elktrospinoivanjem ili na glicidil–metakrilatne kopolimere. Operativna stabilnost peroksidaze imobilisane na fibrozne membrane ispitana je korišćenjem ABTS–a kao standardnog supstrata, gde je nakon 8 ciklusa primene zadržana aktivnost ~ 60 %.²⁰³ Glicidil–metakrilatni kopolimer je upotrebljen za imobilizaciju peroksidaze iz rena, pri čemu je dobijen imobilisani biokatalizator koji nakon 6 ciklusa sa standardnim supstratom, pirogalolom zadrži ~ 45 % aktivnosti.²²⁰

Poređenjem operativne stabilnosti umreženih agregata komercijalne peroksidaze sa dva različita supstrata, pirogalolom i AV 109 bojom potvrđeno je da operativna stabilnost imobilisanog enzima u velikoj meri zavisi od nosača primenjenog za imobilizaciju i supstrata.¹⁹⁸

Peroksidaza iz rena je imobilisana na etil–celulozne čestice i primenjena u reakciji uklanjanja 2,4-dihlorofenola. Dobijeni biokatalizator pokazao je izuzetnu operativnu stabilnost, nakon 10 ciklusa primene zadržana aktivnost je iznosila ~ 60 %. Međutim, nakon ispitivanja afiniteta etil–celuloznih čestica prema 2,4-dihlorofenolu, potvrđeno je da je u prvom 90 %, drugom 80 % i trećem 60 % ciklusu primene uklanjanje ispitivanog zagađivača posledica samo adsorpcije nosača. Tek nakon četvrtog ciklusa, reakcija uklanjanja 2,4-dihlorofenola je enzimski kontrolisana imobilisanom peroksidazom.¹⁹⁵

U većini slučajeva imobilizacije na različite čvrste nosače, peroksidaza nakon pet, a vrlo često i manje, ciklusa gubi aktivnost.^{160,220,275} Ovakvo ponašanje imobilisane peroksidaze se uglavnom povezuje sa prevelikom osetljivošću enzima na supstrat i na proizvode reakcije koji pokrivaju aktivni centar enzima i utiču na aktivnost imobilisane peroksidaze u narednom ciklusu primene.¹⁹⁸ Osetljivost peroksidaze je pre svega posledica prisustva gvožđa u aktivnom centru, koji je podložan oksidaciji/redukciji.

Na osnovu svega, može se zaključiti da umrežavanje u obliku enzimskog agregata ima veliki potencijal kao metoda imobilizacije. Kada je u pitanju ova metoda glavni problem imobilizacije za koji je potrebno pronaći rešenje jeste povećanje mehaničke stabilnosti dobijenog imobilisanog preparata.

11. Ispitivanje hemijske potrošnje kiseonika (HPK) i ukupnog organskog ugljenika (UOU) rastvora AV 109 boje pre i nakon enzimskog tretmana

U prethodnim poglavljima je detaljno prikazana efikasnost HRP u uklanjanju antrahinonske boje AV 109 u pogledu stepena obezbojavanja. Pored obezbojavanja bitno je i da krajnji efluent bude ekološki prihvatljiv. Ovo se dešava zbog nastanka proizvoda koji su čak toksičniji od polaznih jedinjenja što je često slučaj kod razgradnje azo boja i nastanka toksičnih amina kao proizvoda razgradnje. Iz tog razloga potrebno je pratiti određene parametre kvaliteta vode kao što su hemijska potrošnja kiseonika (HPK) i ukupan organski ugljenik (UOU) u uzorcima pre i nakon enzimskog tretmana.

Hemijska potrošnja kiseonika se koristi za procenu zagađenja vode organskim materijama. Shodno tome, HPK se smatra kao dobar pokazatelj biodegradacije.²⁷⁶ Pored hemijske potrošnje kiseonika, poželjno je meriti i ukupan sadržaj organskog ugljenika koji učestvuje u ciklusima ugljenika i kiseonika i uzrokuje trošenje kiseonika.

U okviru ove disertacije, HPK i UOU su određeni u uzorcima pre i posle enzimskog tretmana. Uzorak koji je analiziran posle enzimskog tretmana je uzorak u kojem je postignuto najveće obezbojavanje.

Hemijska potrošnja kiseonika je određena testom koji meri količinu kiseonika potrebnog za oksidaciju organske materija u uzorku do CO₂ i vode. Uzorak za određivanje hemijske potrošnje pre enzimskog tretmana pripremljen je na sledeći način: pH 4, koncentracija boje 30 mg L⁻¹, koncentracija H₂O₂ 0,4 mM, koncentracija enzima 0,15 U mL⁻¹, temperatura 24 °C.

U uzorku pre enzimskog tretmana izmerena je hemijska potrošnja kiseonika 668 mg O₂ L⁻¹, dok nakon enzimskog tretmana ta vrednost opada na 488 mg O₂ L⁻¹. Dobijeni rezultati ukazuju na pad vrednosti hemijske potrošnje kiseonika za 26 %. Određivanjem sadržaja ukupnog organskog ugljenika, potvrđen je pad vrednosti za 14 % nakon enzimskog tretmana. Na ovaj način je dokazana efikasnost primene peroksidaze iz rena u obezbojavanju antrahinonskih boja. Sumarno, nakon enzimskog tretmana dobijen je efluent u kojem je postignuto obezbojavanje ~ 93 % i smanjenje

vrednosti UOU i HPK. Na osnovu ovoga može se zaključiti da molekul enzima ne deluje samo na hromofornu grupu (u tom slučaju je HPK nepromenjen), već dolazi do napada koji dovodi do promena u strukturi molekula boje.²⁶⁰

Porast vrednosti hemijske potrošnje kiseonika u uzorcima nakon tretmana peroksidazom iz rena je takođe primećena. Jedan od takvih primera je obezbojavanje monoazo boje C. I. Orange II peroksidazom iz rena. Obezbojavanjem rastvora pomenute boje, peroksidzom iz rena promena HPK vrednosti od 22,81 O₂ L⁻¹ do 47,93 O₂ L⁻¹.²⁵⁹ Pad HPK i UOU vrednosti je zabeležen i nakon tretmana rastvora boja C. I. Cristal Violet i C. I. Alizarin Red.¹⁴

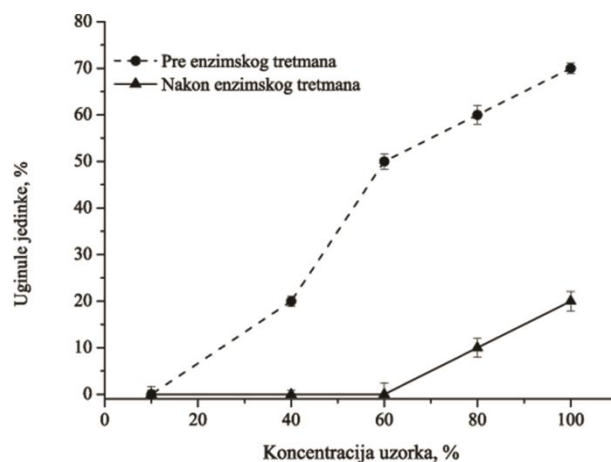
Enzimsko obezbojavanje obojenih otpadnih voda takođe može da se uvede kao pretretman posle kojeg sledi faza bioremedijacije (aktivni mulj) za potpunu dekontaminaciju boja iz otpadne vode.

11.1. Ispitivanje akutne toksičnosti rastvora AV 109 boje pre i nakon enzimskog tretmana korišćenjem *Artemia salina* cisti

Sintetičke boje predstavljaju zabrinjavajuća i izuzetno toksična hemijska jedinjenja, a proizvodi razgradnje boja vrlo često mogu biti toksičniji i štetniji nego polazna jedinjenja. Ekološki prihvatljiv tretman otpadnih voda mora da zadovolji dva kriterijuma: uklanjanje boje u velikom procentu i smanjenje toksičnosti. Toksičnost vode je izuzetno važan parametar kvaliteta vode. Značaj ovog parametra nalazi se u činjenici da testovi toksičnosti pokazuju uticaj zagađivača na žive organizme, dok se hemijskim testovima utvrđuje vrsta i koncentracija zagađivača prisutnih u efluentu. Najbolji način za predviđanje uticaja zagađujućih materija na žive organizme jeste primena živih organizama i biljaka kao bioindikatora u testovima toksičnosti.^{260,277}

U okviru ove doktorske disertacije detaljno su prikazani rezultati dobijeni ispitivanjem efikasnosti peroksidaze iz rena u slobodnom i imobilisanom obliku u reakciji obezbojavanja predstavnika sintetičkih antahinonskih boja, AV 109 boje. Brojnim eksperimentima potvrđena je efikasnost peroksidaze u smislu stepena obezbojavanja. Da bi se ispitala toksičnost, uzorak pre i nakon enzimskog tretmana je podvrgnut testu toksičnosti korišćenjem vodenih račića, *Artemia salina*. Toksičnost je ispitana u uzorku pre enzimskog tretmana i nakon tretmana peroksidazom umreženom u obliku agregata u pakovanom reaktoru sa recirkulacijom. Ovaj uzorak je izabran za određivanje toksičnosti, jer je kontinualna konfiguracija reaktora nešto čemu se teži kada je u pitanju industrijska primena enzima, tj. konfiguracija najbliža realnom sistemu. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 11.1.

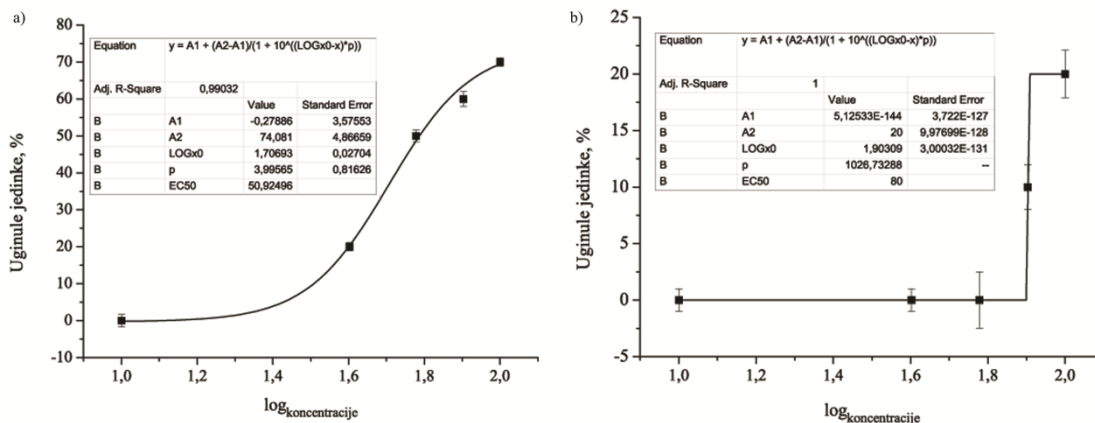
Jasno je uočljivo sa slike 11.1. da najveću toksičnost na *A.salina* ima uzorak pre enzimskog tretmana gde je koncentracija AV 109 boje 100 %. Pod ovim uslovima zabeležena je smrtnost 70 % ispitivanih jedinki. Sa druge strane ispitivanjem toksičnosti u uzorku nakon obezbojavanja u pakovanom reaktoru sa recirkulacijom utvrđeno je da nakon tretmana nije došlo do povećanja toksičnosti. U uzorku nakon enzimskog tretmana koncentracije 100 %, zabeleženo je 20 % uginulih jedinki. Smanjenje toksičnosti nakon enzimskog tretmana je očigledno.



Slika 11.1. Toksičnost u uzorcima pre i nakon enzimskog tretmana određena korišćenjem *Artemia salina* cisti

Podaci iz literature vezani za ispitivanje toksičnosti u uzorcima nakon obezbojavanja katalizovanog peroksidazom iz rena imaju isti trend. Tako na primer, obezbojavanjem boje C. I. Remazol Turquoise Blue G (RTBG) peroksidazom iz rena zabeležen je pad toksičnosti nakon tretmana što je potvrđeno *D. magna* testom.²⁶⁰ Takođe, postoje podaci i o primeni drugih enzima, kao što su lakaze u tretmanu obojenih voda, gde je zabeleženo isto. Tako na primer obezbojavanjem niza sintetičkih boja različitih hromofornih grupa lakazom izolovanom iz plesni (*Paraconiothyrium variabile*) potvrđen je pad toksičnosti u uzorcima nakon enzimskog tretmana, testovima sa nekoliko bakterijskih sojeva (*E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.typhi*, *B.subtilis*, *S.aureus*, *M.luteus*).²⁷⁸ Nasuprot ovome, primenom HRP zabeležen je i porast toksičnosti nakon enzimskog tretmana u uzorku reaktivnih boja.²⁷⁹ Obezbojavanje C. I. Reactive Blue 21 (RB21) boje katalizovano je peroksidazom iz lala, gde je *L. Sativa* testom potvrđeno da je u uzorku nakon enzimskog tretmana došlo do značajnog porasta toksičnosti.²⁸⁰

Na osnovu dobijenih vrednosti toksičnosti određene su vrednosti efektivnih koncentracija, EC_{50} u uzorcima pre i posle enzimskog tretmana. EC_{50} vrednost je koncentracija uzorka pri kojoj nastaje smrtnost 50 % ispitivanih jedinki račića.²⁸¹



Slika 11.2. Grafičko određivanje efektivne koncentracije, EC₅₀ u uzorku: a) pre enzimskog tretmana; b) posle enzimskog tretmana

Slika 11.2. dokazuje podatke prikazane na slici 11.1. da je nakon enzimskog tretmana došlo do značajnog smanjenja toksičnosti. U uzorku pre enzimskog tretmana odeđena je EC₅₀ vrednost ~51 %, što znači da smrtnost 50 % jedinki izaziva polazni uzorak pre enzimskog tretmana koncentracije 51 %. Nakon enzimskog tretmana proračunata je EC₅₀ vrednost 80 % što znači da će smrtnost 50 % jedinki nastati kada se one ikubiraju u rastvoru dobijenom nakon enzimskog tretmana početne koncentracije 80 %. Porast vrednosti EC₅₀ nakon enzimskog tretmana je dokaz smanjenja toksičnosti.²⁸¹ Ukoliko se EC₅₀ vrednosti u ispitanom uzorku nalaze u opsegu $100 > EC_{50} > 75$ % on se klasifikuje kao uzorak niske toksičnosti, što je slučaj sa uzorkom nakon enzimskog tretmana. Uzorak pre enzimskog tretmana se na osnovu dobijene EC₅₀ vrednosti klasifikuje kao toksičan ($25 > EC_{50} < 75$ %).

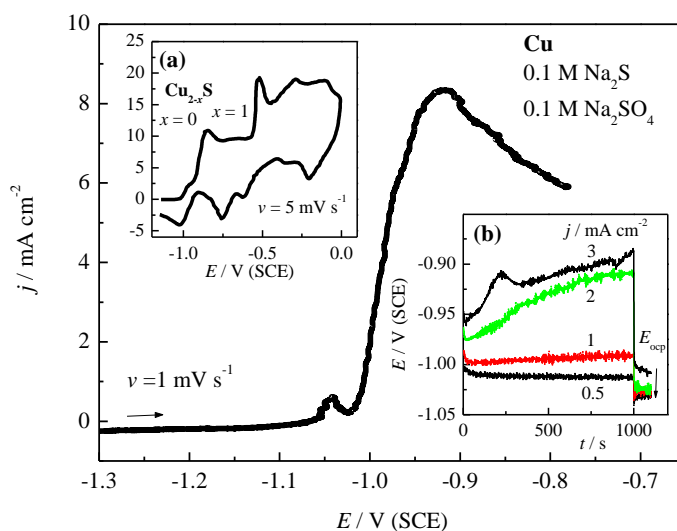
Na osnovu svega ovoga, jasno je da peroksidaza iz rena nije samo efiksna u obezbojavanju AV 109 boje već je i ekološki prihvatljiva, zbog dobijenog efluenta znatno niže toksičnosti u poređenju sa polaznim uzorkom pre enzimskog tretmana.

12. Enzimaska gorivna ćelija peroksidaze iz rena imobilisane na bakar–sulfidnu elektrodu

U prethodnim poglavljima prikazani su rezultati dobijeni nizom eksperimenata, koji dokazuju efikasnost peroksidaze iz rena u reakciji obezbojavanja sintetičkih, u konkretnom slučaju antrahinonskih boja. Kada se enzim kao što je peroksidaza iz rena, primeni u sistemu gorivnih ćelija, nastaje dvostruka korist. Oksidoredukциони enzimi katalizuju obezbojavanjem sintetičkih boja, pri čemu se oslobađaju elektroni koji na kraju ciklusa daju izvesni električni signal. Na osnovu dobijenih rezultata obezbojavanja ispitivane boje peroksidazom iz rena, nastaje mogućnost da se peroksidaza iz rena primeni u enzimskoj gorivnoj ćeliji u kojoj se kao gorivo koristi AV 109 boja u svrhu dobijanja električne struje.

12.1. Priprema bakar–sulfidne elektrode

Bakar-sulfid se formira anodnom oksidacijom čistog bakra u 0,1 M rastvoru H_2SO_4 i 0,1 M rastvoru Na_2S . Anodna polarizaciona kriva prikazana na slici 12.1. ukazuje da se na potencijalima negativnijim od $-1,1$ V ne dešava nikakva reakcija.



Slika 12.1. Anodna polarizaciona kriva i a) ciklični voltamogram metalnog bakra u rastvoru 0,1 M Na_2S i 0,1 M Na_2SO_4 ; b) galvanostatski odgovor bakrane elektrode u istom rastvoru

Mali pik na $-1,05$ i veliki na $-0,75$ V se vidi prilikom snimanja anodnog potencijala do $-0,75$ V. Reverzibilni standardni potencijal za reakciju:²⁸²



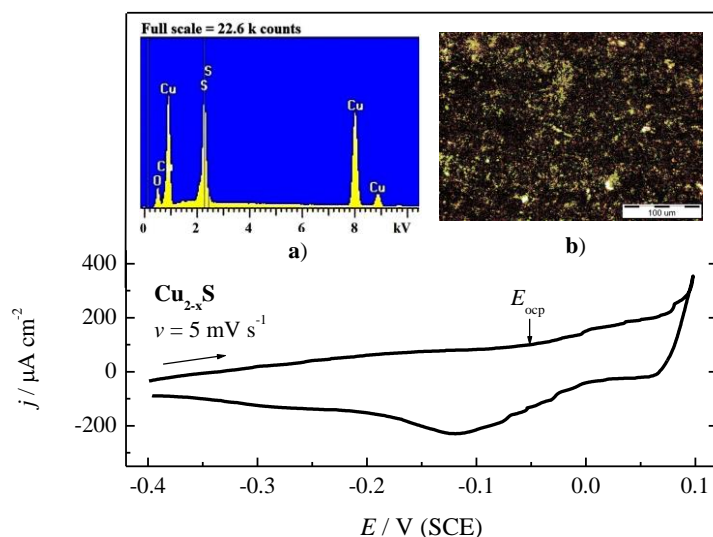
je $-1,133$ V (SCE) tako da pri potencijalu $\sim 0,9$ V oksidacija metalnog bakra do Cu_2S faze je termodinamički moguća. Povećanjem anodnog potencijala, zapažaju se novi pikovi povezani sa anodnom reakcijom slika 12.1.a koji mogu biti povezani sa Cu_2S faznom transformacijom, a pri većim potencijalima sa S^{2-} oksidacijom. Težnja za postojanjem različitih Cu_{2-x}S faza otvara mogućnosti za nastanak brojnih faza pri transformaciji. Najčešće faze bakar-sulfida zabeležene na sobnoj temperaturi su halkocit Cu_2S , djurleit $\text{Cu}_{1,94-1,96}\text{S}$, digenit $\text{CuS}_{1,8}$, $\text{Su}_{1,75}\text{S}$, kovelit CuS i druge.²⁸³⁻²⁸⁶ U skladu sa ovim, u toku anodne polarizacije celokupna reakcija koja može da se odigra na površini je:²⁸⁷



Slika 12.1. pokazuje promenu potencijala tokom vremena, za različite gustine struje u toku formiranja Cu_{2-x}S na metalnoj bakarnoj elektrodi. Za gustine struje 2 i 3 mA cm^{-2} slabo vezane dendritske naslage su primećene. Pri nižim vrednostima gustine struje 1 i 0,5 mA cm^{-2} formirane su glatke naslage. Shodno tome, u narednim eksperimentima za sintezu bakar-sulfida gustina struje 1 mA cm^{-2} u trajanju od 600 s, su primenjene.

Elektronskom disperzionom spektroskopijom, EDS analizom, dobijenih bakar-sulfidnih čestica (slika 12.2.a sintetisanih na isti način potvrđeno je da je Cu:S odnos 2,2:1, što potvrđuje prisustvo Cu_2S faze kao dominantne. Izmerena vrednost potencijala otvorenog strujnog polja od $-1,03$ V je u skladu sa prethodno navedenim podatkom. Na optičkim mikrografima slika 12.2b mogu da se zapaze dentritski embrioni. Na osnovu poznatih uslova sinteze, 1 mA cm^{-1} , 600 s, gustine Cu_2S 5,6 g cm^{-3} proračunata je debljina naslaga, 0,1 μm . Ciklični voltamogram bakar-sulfidne elektrode u rastvoru 0,1 M Na_2SO_4 i 0,05 M kalijum-bifalatu, pH 4,1 u anodnom pravcu se karakteriše blagim

porastom gustine struje iznad potencijala otvorenog strujnog kola i blagi porast u blizini potencijala 0,1 V. Dalji porast gustine struje se može povezati sa faznom transformacijom ili korozijom bakra ispod sulfidnog sloja. U katodnom smeru, jedan široki pik u opsegu potencijala ~ 0 do $-0,2$ V se zapaža što se može povezati sa redukcijom oksidovanog bakar-sulfida, CuS do Cu_{2-x}S .

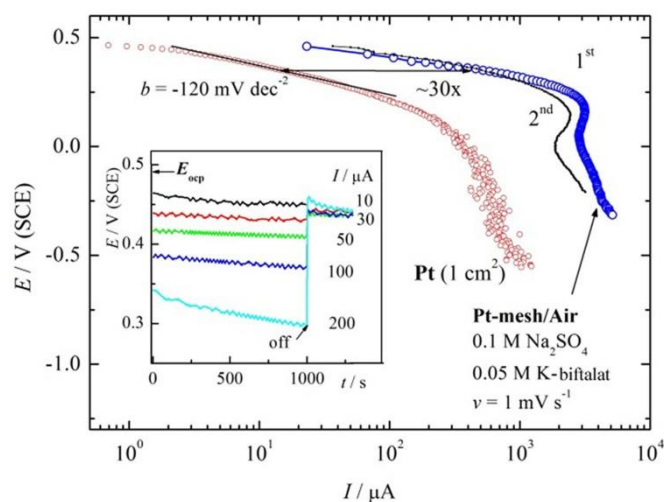


Slika 12.2. Ciklični voltamogram bakar–sulfida u rastvoru 0,1 M Na_2SO_4 i 0,05 M kalijum–biftalatu na $\text{pH}=4,1$, a) EDS spektar sintetisanog bakar–sulfida; b) Optički mikrograf naslaga

12.2. Karakteristike biogorivne ćelije

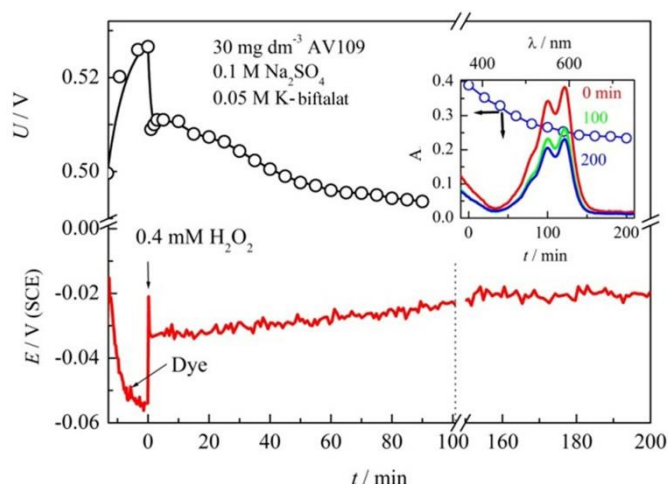
Za što bolji rad gorivne ćelije, potrebno je da karakteristike katode budu što je bolje moguće. Iz tog razloga prvo je ispitana reakcija redukcije kiseonika na glatkoj platinumskoj katodi uz dotok mehurića vazduha, $c(\text{O}_2) \sim 0,2 \text{ mM}$ i rezultati su prikazani na slici 12.3. Određeno je da je napon otvorenog strujnog kola 0,498 V što je $\sim 0,25$ V niže nego teorijskih 0,745 V u poređenju sa zasićenom kalomelovom elektrodom (SCE). Polarizaciona kriva glatke Pt elektrode karakteriše se jednim Tafel–ovim nagibom od -120 mV dec^{-1} sve do struje gustine $\sim 70 \mu\text{A cm}^{-2}$. Nakon dostizanja struje gustine $\sim 70 \mu\text{A cm}^{-2}$ reakcija je kontrolisana mešanim mehanizmom aktivacija–difuzija, a pri limitirajućoj struji gustine $\sim 0,5\text{--}1 \text{ mA cm}^{-2}$ reakcija je kontrolisana čistom difuzijom. Čak pri gustini struje od $10 \mu\text{A cm}^{-2}$ zabeležen je pad napona u ćeliji od 100

mV što je neprihvatljivo za dobar rad gorivne ćelije. Iz tog razloga u narednim eksperimentima primenjena je mrežasta platinumska elektroda velike površine. Ova elektroda se pokazala znatno prihvatljivijom u datom sistemu, što svedoči i činjenica da se pad napona u ćeliji od 100 mV beleži pri struji $\sim 0,4$ mA. Poređenjem struja pri konstantnim naponima utvrđeno je da je površina primenjene mrežaste Pt elektrode ~ 30 cm². U galvanostatskim uslovima (prilog u slici 12.3.) kao posledica nestacionarne difuzije, čak i elektroda velike površine može da radi u uslovima struje manjih od 100 μ A sa prihvatljivim gubitkom napona.



Slika 12.3. Polarizaciona kriva glatke i mrežaste platinumske elektrode. Prilog: Promena napona u vremenu platinumske mrežaste elektrode za različite struje

Karakteristike enzimske gorivne ćelije prvobitno su ispitane u uslovima potencijala otvorenog strujnog kola, E_{ocp} i rezultati su prikazani na slici 12.4. Nakon uranjanja u elektrolit izmeren je potencijal bakar-sulfidne elektrode modifikovane peroksidazom iz rena -55 mV uz odgovarajući napon ćelije $0,53$ V. Dodatak AV 109 boje nije uticao na promenu potencijala i napona ćelije, ali nakon dodatka $0,4$ mM H_2O_2 izmeren je pozitivan andoni potencijal od 25 mV koji izaziva pad napona ćelije do $\sim 0,51$ V. Obezbojavanje AV 109 boje u HRP-gorivnoj ćeliji praćeno je promenom apsorpcionog spektra boje tokom vremena na 590 nm. Na osnovu priloga u slici 12.4. vidi se da je reakcija obezbojavanja praćena tokom 200 min. U toku 200 min reakcije zabeleženo je obezbojavanje ~ 60 % i napon ćelije je stabilizovan na $0,495$ V.



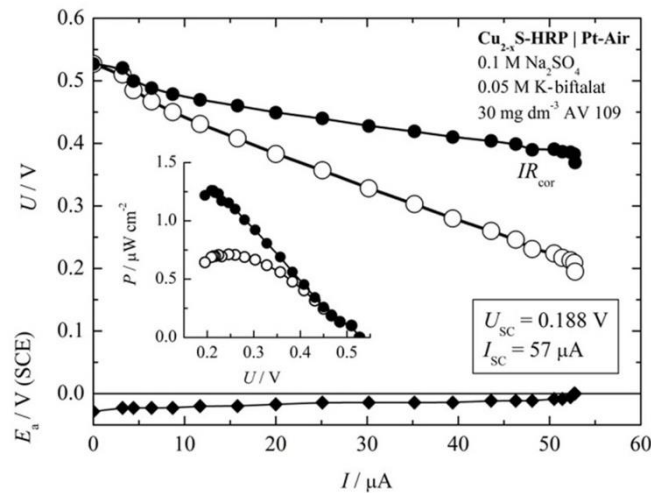
Slika 12.4. Promena napona ćelije i anodnog potencijala sa vremenom. Prilog: UV–spektar AV 109 boje i promena spektra sa vremenom

Zavisnost napona od struje u posmatranoj HRP–gorivnoj ćeliji prikazan je na slici 12.5. Struja u HRP–gorivnoj ćeliji je varirana promenom spoljašnjeg otpora korišćenjem R–kutije a napon i odgovarajuća struja su beleženi nakon 10–15 s. Sa porastom struje, napon praktično linearno opada od 0,525 V do ~ 0,2 V gde je zabeležena maksimalna struja ~ 60 μA .

Napon ćelije, U , se sastoji od:

$$U = U_0 - \Sigma \Delta E_{\pm} - I \Sigma R \quad (19)$$

gde je razlika katodnog i anodnog potencijala gde je struja 0, ΣE_{\pm} polarizacija katode i anode, ΣR suma Omskih otpora u strujnom kolu. S obzirom na to da katodna i anodna polarizacija nisu prešle 0,15 V, veliki pad napona pri struji od 50 μA na ~ 0,32 V je posledica unutrašnjeg otpora ćelije (rastvora). Utvrđeni su napon i struja kratkog spoja 0,188 V i 57 μA , respektivno. Pomoću ovih vrednosti proračunato je da je unutrašnji otpor ćelije 3,3 k Ω . Znajući ovu vrednost, vrednost napona je ispravljen za unutrašnji omski otpor i ispravljena polarizaciona kriva je prikazana na slici 12.4. (puni simboli). U tom slučaju vrednost napona dostiže plato i pri struji od 50 μA dostiže se napon od ~ 0,4 V. U prilogu 12.5. slike prikazana je zavisnosti napon–snaga i proračunata je specifična snaga za korigovani/nekorigovani pad napona omskog otpora, 0,7 i 1,3 $\mu\text{W cm}^{-2}$.



Slika 12.5. Zavisnost napona ćelije od primenjene struje, (○) izmerene i (●) ispravljene vrednosti usled omskih otpora, (◆) zavisnost anodnog potencijala od primenjene struje.

Prilog: Zavisnost specifične snage od napona ćelije

Snaga, P ćelije se definiše kao:

$$P = IU = I^2 R_{\text{ex}} + I^2 R_{\text{in}} \quad (20)$$

gde R_{ex} je spoljašnji otpor kola and R_{in} je unutrašnji otpor ćelije. Izraz $I^2 R_{\text{in}}$ predstavlja gubitke u ćeliji, pa je dostupna snaga:

$$P = UI - I^2 R_{\text{in}} \quad (21)$$

Diferenciranjem jednačine 5:

$$\frac{dP_{\text{max}}}{dI} = U - 2IR_{\text{in}} = 0 \quad (22)$$

i znajući to:

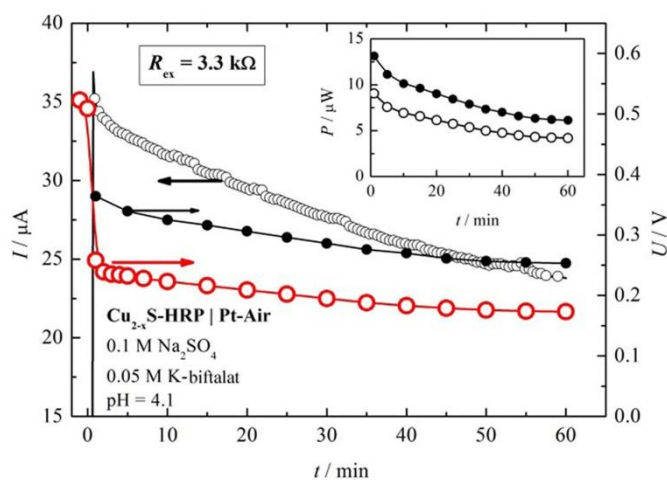
$$I = \frac{U}{R_{\text{in}} + R_{\text{ex}}} \quad (23)$$

može da se pokaže da se maksimalna struja može dobiti pod uslovima $R_{\text{ex}} = R_{\text{in}}$. Iz tog razloga prilikom obezbojavanja u gorivnoj ćeliji spoljašnji otpor od 3,3 k Ω je

primenjen. Zavisnost napon–struja u vremenu praćena je spektrofotometrijski i rezultati su prikazani na slikama 12.6. i 12.7. U toku 60 min koliko je posmatrana reakcija napon ćelije naglo opada od početne 0,52 V do 0,2 V, dok struja opada od 35 μA na 25 μA . U istoj slici ispravljeni napon omskog pada prosečne vrednosti 0,3 V je takođe prikazan. Množenjem izmerenih i napona korigovanih za omski pad sa strujom, izračunate su vrednosti snage ćelije i prikazane u prilogu slike 12.6. U početku snaga ćelije je iznosila 9 (13) W, i lagano opada do 4 (6,3) W. Proračunato je da je energija ćelije, W , koja se u toku obezbojavanja definiše kao:

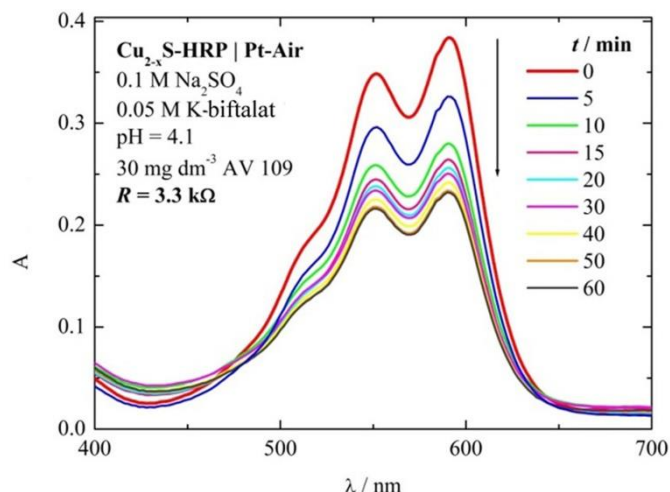
$$W = \int_0^t P dt \quad (24)$$

5.5 (8.1) μWh , što odgovara vrednosti specifične energije ćelije od 3.5 (5.1) mWh m^{-2} .



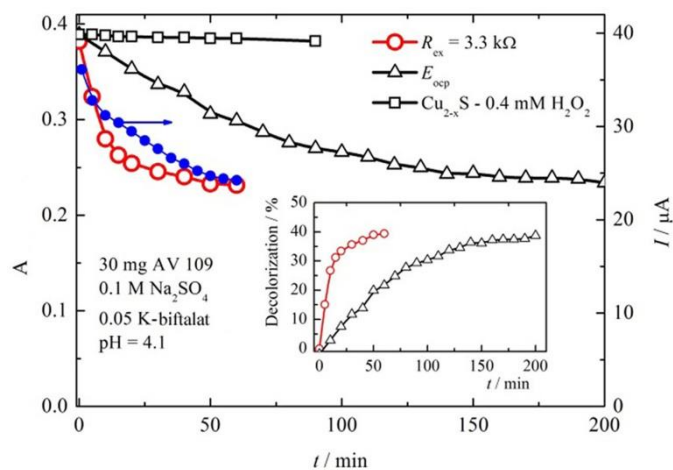
Slika 12.6. Promena struje ćelije i (○) izmerenih i (●) napona korigovanih za omski otpor u toku vremena pri spoljašnjem otporu od 3.3 k Ω . Prilog: Promena snage ćelije u toku vremena.

Na slici 12.7. prikazana je promena UV–spektra AV 109 boje u toku reakcije. Vrlo lako se može uočiti relativno brz pad vrednosti apsorbanci u prvih 10 min reakcije, gde je zabeleženo obezbojavanje oko 30 % od početne vrednosti.



Slika 12.7. Promene UV–spektra AV 109 boje u toku reakcije obezbojavanja u HRP–gorivnoj ćeliji.

Nakon prvih 10 min reakcije, obezbojavanje se usporava, a maksimalno postignuto obezbojavanje u posmatranom sistemu je 60 %. Ono što je interesantno jeste da u uslovima otvorenog strujnog polja postignut identičan stepen obezbojavanja ~40 % (slika 12.4.) ali za znatno duže vreme, 200 min kao što je prikazano na slici 12.8. Jedino logično objašnjenje za ovakav sled događaja je brži prenos elektrona, brža reakcija obezbojavanja. Na slici 12.8. prikazana je promena apsorbance AV 109 boje u enzimskoj gorivnoj ćeliji pri spoljašnjem opterećenju od 3,3 kΩ i u uslovima otvorenog strujnog polja je prikazano zajedno sa strujom u ćeliji.



Slika 12.8. Promena apsorpcionog spektra AV 109 boje na 590 nm tokom vremena tokom različitih uslova obezbojavanja u biogorivnoj ćeliji: (Δ) potencijal otvorenog strujnog polja; (o) spoljašnje opterećenje od 3.3 kΩ; (□) nemodifikovana CuS elektroda pri potencijalu otvorenog strujnog polja; (●) zavisnost struja–vreme pri spoljašnjem opterećenju od 3.3 kΩ

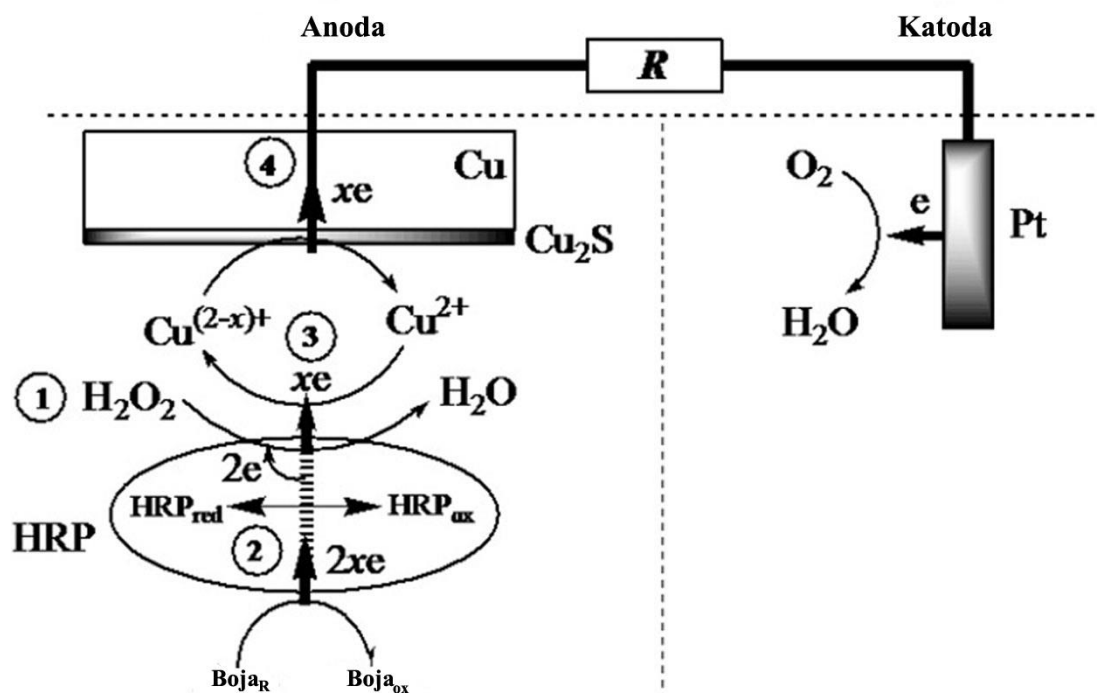
Trend apsorbanca i struje je veoma sličan ukazujući na to da se AV 109 ponaša kao gorivo. Slika 12.8. takođe prikazuje apsorbanca za nemodifikovanu CuS elektrodu jer pojedinačni podaci ukazuju da CuS može da oksiduje na primer glukozu u prisustvu H₂O₂.²⁸⁸ Promena apsorbanca nije primećena u odsustvu HRP ukazujući da čist CuS ne može da oksiduje kompleksna jedinjenja kao što su antrahinonske boje. Potrebno je naglasiti da nakon produženog izlaganja elektrolitu a naročito H₂O₂ može da nastane korozija bakar-sulfida izazivajući gubitak tankog filma na površini elektrode. Tako da u budućem radu optimizaciju anode bi trebalo izvesti korišćenjem ugljeničnih materijala velike specifične površine na koje bi CuS mogao da se nanese jednostavnom uzastopnom metodom adsorpcije jona.²⁸⁹

34 % obezbojavanja AV 109 boje postignuto je u zapremini reakcione smeše 100 ml pri početnoj koncentraciji boje 30 mg L⁻¹ korišćenjem 2,5–10 U enzima. Međutim u HRP gorivnoj ćeliji, korišćenjem ~ 0,08–0,1 U skoro isto obezbojenje je postignuto za znatno kraće vreme sa ~30 do 100 puta manjom koncentracijom enzima. Sve navedeno ukazuje da je u HRP gorivnoj ćeliji ubrzan prenos elektrona pomoću CuS medijatora.

12.3. Pretpostavljeni mehanizam obezbojavanja u biogorivnoj ćeliji

Znatno brža reakcija obezbojavanja u uslovima spoljašnjeg opterećenja, dokaz je da je kretanje elektrona ubrzalo reakciju. Pojednostavljena šema mogućeg mehanizma obezbojavanja AV 109 boje u HRP–gorivnoj ćeliji prikazana je na slici 12.9.

U prvom koraku (1) H_2O_2 se redukuje do H_2O pri čemu se HRP oksiduje istovremeno otpuštajući $2e^-$. Istovremeno, u drugom koraku (2) boja se oksiduje prenoseći $2xe^-$, od kojih $2e^-$ se iskoriste za redukciju HRP do nativnog oblika, a x elektrona se utroši u reakciji redukcije medijatora (3) Cu^{2+} do $\text{Cu}^{(2-x)+}$. Potom se medijator ponovo oksiduje na anodi (4) prenoseći određeni broj elektrona koji se kreću kroz spoljno električno kolo na katodi gde se redukuje kiseonik.



Slika 12.9. Pretpostavljeni mehanizam obezbojavanja AV 109 boje u HRP–gorivnoj ćeliji

Mehanizam oksidacije aromatičnih donora perksidazom iz rena znatno je komplikovaniji od pojednostavljenog mehanizma oksidacije AV 109 boje u HRP–gorivnoj ćeliji prikazanog na slici 12.9. koji su objasnili Degrand (Degrand) i saradnici.²⁹⁰ Prvi korak u rekcionom mehanizmu HRP je oksidacija feri–hem

prostetične grupe dolazećim molekulom H_2O_2 nakon čega nastaje prvi intermedijar u reakcionom ciklusu oksiferyl gvožđe ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) i porfirin π -katjon radikal (oksidaciono stanje gvožđa u HRP_{ox} obliku je +5). U drugom koraku nastaje drugo intermedijarno jedinjenje redukcijom elektron-donora (AV 109 boje) koje sadrži gvožđe oksidacionog stanja +4. U poslednjem koraku, molekul HRP se vraća u nativno stanje (HRP_{red}) prihvatanjem jednog elektrona od donora, AV 109 boje.

13. ZAKLJUČAK

Peroksidaza iz rena se pokazala kao izuzetan biokatalizator reakcije obezbojavanja sintetičkih boja, konkretno antrahinonskih. U okviru ove disertacije prikazan je niz rezultata koji potvrđuju veliki potencijal ekološki prihvatljive i efikasne peroksidaze iz rena u tretmanu otpadnih voda obojenih antahinonskim bojama što je od izuzetnog značaja za zaštitu životne sredine i zdravlja ljudi. Najznačajniji zaključci koji proizilaze iz ove teze su navedeni u nastavku.

Primena peroksidaze iz rena u slobodnom obliku u obezbojavanju AV 109 boje:

- ❖ Komercijalna peroksidaza iz rena se pokazala kao izuzetan biokatalizator kada je u pitanju obezbojavanje AV 109 boje;
- ❖ Pod optimalnim uslovima (koncentracija peroksida 0,4 mM, koncentracija boje 30 mg L⁻¹, koncentracija enzima 0,15 U mL⁻¹, pH 4, vreme kontakta 15 minuta, temperatura 24 °C) postignuto je obezbojavanje od 94,7±1,4 % AV 109 boje, slobodnom komercijalnom peroksidazom;
- ❖ Ispitivanjem početne kinetike reakcije obezbojavanja AV 109 boje katalizovane komercijalnom peroksidazom i modelovanjem dobijenih eksperimentalnih podataka bi–supstratnim ping pong bi–bi modelima, potvrđen je inhibitorski uticaj boje i peroksida na komercijalnu peroksidazu iz rena;
- ❖ Primenom peroksidaze iz svežeg ekstrakta rena u reakciji obezbojavanja dobijeni su rezultati sa neznatnim razlikama u efikasnosti u poređenju sa komercijalnom peroksidazom;
- ❖ Pod optimalnim uslovima (koncentracija peroksida 0,1 mM, koncentracija boje 30 mg L⁻¹, koncentracija enzima 0,1 U mL⁻¹, pH 4, vreme kontakta 35 minuta, temperatura 24 °C) postignuto je obezbojavanje 72,35±0,9 % AV 109 boje, peroksidazom iz svežeg ekstrakta rena;
- ❖ Modelovanjem dobijenih eksperimentalnih podataka ping pong bi–bi modelom potvrđen je izražajni inhibitorski uticaj supstrata na komercijalnu peroksidazu ukazujući da nečistoće prisutne u ekstraktu smanjuju efekte inhibicije boje na enzim.

Imobilizacija peroksidaze iz rena i primena u obezbojavanju AV 109 boje:

- ❖ Termičkim tretmanom kaolina nastaje fazna transformacija i dobija se metakaolin, pri čemu dolazi do povećanja specifične površine sa $8,1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ na $9,3 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$;
- ❖ Metakaolin se pokazao kao dobar izbor nosača kada je u pitanju adsorpcija peroksidaze. Adsorpcijom peroksidaze na metakaolin, na pH 5 dobijen je imobilisani preparat specifične aktivnosti $39,1 \text{ U mg}^{-1}$;
- ❖ Korišćenjem $0,1 \text{ U}$ peroksidaze imobilisane na metakaolin adsorpcijom ispitani su optimalni uslovi za obezbojavanje AV 109 boje. U poređenju sa slobodnim enzimom, imobilisana peroksidaza se pokazala manje osetljivom na inhibitorski uticaj boje i H_2O_2 . Pod optimalnim uslovima pH 5, koncentracija vodonik-peroksida $0,2 \text{ mM}$, temperatura $24 \text{ }^\circ\text{C}$, koncentracija boje 40 mg L^{-1} , zabeleženo je obezbojavanje od $87 \pm 1,1 \%$ nakon 40 min reakcije;
- ❖ Pod optimalnim uslovima obezbojavanja AV 109 boje peroksidazom imobilisanom na metakaolin adsorpcijom, ispitana je početna kinetika. Dobijeni eksperimentalni podaci pokazali su dobro slaganje sa bisupstratnim ping pong bi-bi kinetičkim modelom koji uzima u obzir efekte inhibicije enzima sa oba supstrata. Nakon imobilizacije smanjuje se početna brzina reakcije sa $1,27 \text{ mM min}^{-1}$ na $0,87 \text{ mM min}^{-1}$. Smanjenje brzine reakcije usled sternih smetnji u imobilisanom sistemu, može se nadomestiti smanjenjem inhibicije imobilisanog enzima bojom i H_2O_2 ;
- ❖ Poređenjem produktivnosti imobilisane i slobodne peroksidaze može se zaključiti da je imobilisana peroksidaza čak 4,2 puta produktivnija. Na ovaj način slobodnom peroksidazom je obezbojeno $2,7 \text{ mg}$ a imobilisanom $11,3 \text{ mg}$ AV 109 boje. Peroksidazu imobilisanu na metakaolin adsorpcijom je bilo moguće primeniti u 7 uzastopnih ciklusa obezbojavanja AV 109 boje, gde nakon sedmog ciklusa zadržana aktivnost iznosi $\sim 35 \%$ od početne aktivnosti;
- ❖ Metakaolin aktiviran $0,24 \%$ glutaralhidom upotrebljen je za imobilizaciju peroksidaze, pri čemu je dobijen imobilisani preparat aktivnosti $2,4 \text{ U mg}^{-1}$;
- ❖ Korišćenjem $0,1 \text{ U}$ peroksidaze imobilisane na metakaolin aktiviran glutaralhidom ispitani su optimalni uslovi obezbojavanja AV 109 boje i dobijeni sledeći rezultati: koncentracija boje 30 mg L^{-1} , koncentracija peroksida

- 0,6 mM, pH 4,0, temperatura 24 °C pri čemu se postiže $76,5 \pm 0,8$ % obezbojavanja AV 109 boje;
- ❖ Iako se slobodna peroksidaza pokazala efikasnijom u prvom ciklusu primene, ipak kroz 4 ciklusa peroksidaza imobilisana na metakaolin aktiviran glutaraldehydom može da ukloni znatno više ispitivane boje. Naime, slobodnom peroksidazom može da se ukloni $27,7 \text{ mg L}^{-1}$, dok se imobilisanom peroksidazom ukloni $55,7 \text{ mg L}^{-1}$ ispitivane boje sa istom količinom enzima, 0,1 U;
 - ❖ Peroksidaza iz svežeg ekstrakta rena uspešno je imobilisana u obliku umreženih enzimskih agregata, korišćenjem acetona kao taložnog reagensa i 2 % rastvora glutaraldehyda;
 - ❖ Dodatkom 5 mg BSA u smešu za imobilizaciju, dobijen je imobilisani preparat povećane stabilnosti (6 ciklusa sa zadržanom aktivnosti ~ 80 %), ali smanjene aktivnosti u poređenju sa imobilisanim preparatom dobijenim bez dodatka BSA;
 - ❖ Aktivnost od 0,1 U ovako pripremljenog imobilisanog preparata primenjena je u cilju određivanja optimalnih uslova obezbojavanja AV 109 boje u šaržnom reaktoru. Koncentracija vodonik–peroksida 0,1 mM, pH 4, temperatura 24 °C, koncentracija boje 30 mg L^{-1} , vreme reakcije 25 min su optimalni uslovi za obezbojavanje AV 109 boje pri kojima je postignuto obezbojavanje $72,4 \pm 2,8$ %;
 - ❖ Operativna stabilnost je ispitana u šaržnom i reaktoru sa pakovanim slojem biokatalizatora sa recirkulacijom u reakciji obezbojavanja AV 109 boje pod prethodno utvrđenim optimalnim uslovima. Umrežena peroksidaza iz svežeg ekstrakta pokazala se znatno stabilnijom u reaktoru sa pakovanim slojem gde je nakon sedmog ciklusa zadržana aktivnost ~ 60 %. U šaržnom reaktoru pod istim uslovima, nakon sedmog ciklusa zadržana aktivnost je ~ 20 %;
 - ❖ Tehnika imobilizacije bez nosača u obliku umreženih agregata primenjena je i na komercijalnu peroksidazu. U ovoj tehnici imobilizacije, amonijum–sulfatom (70 %) je istaložena komercijalna peroksidaza, umrežena 1 % glutaraldehydom i uz dodatak 5 mg BSA, iz polaznog rastvora umreženo je $69,8 \pm 0,8$ % peroksidaze, sa zadržanom aktivnosti $12,4 \pm 0,3$;
 - ❖ Početna koncentracija boje od 40 mg L^{-1} je usvojena kao optimalna za reakciju katalizovanu komercijalnom peroksidazom imobilisanom u obliku umreženih

agregata pri kojoj se postiže obezbojavanje od $88,4 \pm 0,7$ % pri konstatnim uslovima: pH 4, temperatura 24°C , koncentracija vodonik–peroksida 1mM);

- ❖ Operativna stabilnost umreženih agregata komercijalne peroksidaze u obliku ispitana je sa pirogalolom i AV 109 bojom. Dobijeni imobilisani preparat je bilo moguće primeniti kroz pet i osam ciklusa u reakciji oksidacije AV 109 boje i pirogalola, redom.

Ispitivanje toksičnosti rastvora AV 109 boje pre i nakon enzimskog tretmana:

- ❖ U uzorcima pre i posle obezbojavanja katalizovanog peroksidazom izmerena je vrednost hemijske potrošnje (HPK), zatvorenom refluksnom metodom. Na ovaj način zabeležen je pad HPK sa $668\text{ mg O}_2\text{ L}^{-1}$, na $488\text{ mg O}_2\text{ L}^{-1}$ nakon enzimskog tretmana. Pad vrednosti hemijske potrošnje kiseonika za 26 % ukazuje da molekul enzima ne deluje samo na hromofornu grupu (u tom slučaju je HPK nepromenjen) već dolazi do napada koji dovodi do promena u strukturi molekula boje i njene razgradnje na manje toksične derivate;
- ❖ Efikasnost obezbojavanja peroksidazom iz rena potvrđena je i padom vrednosti ukupnog organskog ugljenika (UOU) za 14 % u uzorku nakon enzimskog tretmana u poređenju sa uzorkom pre enzimskog tretmana;
- ❖ Obezbojavanje otpadnih voda peroksidazom iz rena nije samo efikasan već i ekološki prihvatljiv proces. Dobijeni efluent je znatno niže toksičnosti u poređenju sa polaznim uzorkom pre enzimskog tretmana što je potvrđeno testom toksičnosti *A.salina* cistama. Uzorak pre enzimskog tretmana se na osnovu dobijene EC_{50} vrednosti klasifikuje kao toksičan ($25 > EC_{50} < 75$ %), dok je uzorak nakon enzimskog tretmana niske toksičnosti ($100 > EC_{50} > 75$ %).

Enzimski gorivna ćelija peroksidaze iz rena:

- ❖ Komercijalna peroksidaza imobilisana na bakar–sulfidnu elektrodu je uspešno primenjena u enzimskoj gorivnoj ćeliji. Kao gorivo iskorišćen je rastvor AV 109 boje pripremljen u kalijum–biftalatnom puferu (pH 4,1), koncentracije 30 mg L^{-1} . Korišćenjem $\sim 0,08\text{--}0,1\text{ U}$ imobilisane peroksidaze u gorivnoj ćeliji postignuto je obezbojavanje ~ 40 %, specifična energija ćelije $\sim 5\text{ mWh m}^{-2}$,

maksimalna specifična snaga $\sim 1 \mu\text{W cm}^{-2}$ i napon otvorenog strujnog polja 0,51 V.

14. LITERATURA

- [1] A. Sonune, R. Ghate, Developments in wastewater treatment methods, *Desalination* **167** (2004) 55–63.
- [2] J. Dhote, S. Ingole, A. Chavhan, Review on wastewater treatment technologies, *Int. J. Eng. Sci. Technol.* **1** (2012) 1–10.
- [3] V. Khandegar, A. K. Saroha, Electrocoagulation for the treatment of textile industry effluent: A review, *J. Environ. Manage.* **128** (2013) 949–963.
- [4] M. A. R. Bhuiyan, M. M. Rahman, A. Shaid, M. M. Bashar, M. A. Khan, Scope of reusing and recycling the textile wastewater after treatment with gamma radiation, *J. Clean Prod.* **112** (2006) 3063–3071.
- [5] A. Yurtsever, E. Sahinkaya, O. Aktas, D. Ucar, O. Cinar, Z. Wang, Performances of anaerobic and aerobic membrane bioreactors for the treatment of synthetic textile wastewater, *Biores. Technol.* **192** (2015) 564–573.
- [6] A. B. Dos Santos, F. J. Cervantes, J. B. van Lier, Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives of anaerobic biotechnology, *Biores. Technol.* **98** (2008) 2369–2385.
- [7] Y. M. Slokar, A. M. L. Marechal, Methods of decoloration of textile wastewaters, *Dyes Pigments* **37** (1998) 335–356.
- [8] R. M. Christie, *Colour Chemistry*, Royal Society of Chemistry, United Kingdom, 2006.
- [9] H. Zollinger, 2nd ed., *Color Chemistry-Synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments*, VCH, Weinheim, 1987.
- [10] Mirjana Radojković–Veličković, Dušan Mijin, *Organske boje i pigmenti*, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2001.
- [11] M. S. Frey, The chemistry of plant and animal dyes, *J. Chem. Educ.* **58** (1981) 301–305.

- [12] E. Gurr, *Synthetic dyes in biology, medicine and chemistry*, Academic Press, London, 1971.
- [13] V. K. Gupta, Suhas, Application of low-cost adsorbents for dye removal A review, *J. Environ. Manage.* **90** (2008) 2313–2342.
- [14] L. Liu, J. Zhang, Y. Tan, Y. Jiang, M. Hu, S. Li, Q. Zhai, Rapid decolorization of anthraquinone and triphenylmethane dyes using chloroperoxidase: Catalytic mechanism, analysis of products and degradation route, *Chem. Eng. J.* **244** (2014) 9–18.
- [15] D. R. Waring, G. Hallas, *The Chemistry and application of dyes*, Plenum Press, New York, 1990.
- [16] P. F. Gordon, P. Gregory, *Organic Chemistry in colour*, Springer-Verlag, New York, 2012.
- [17] S. Pramodini, P. Poornesh, Effects of conjugation length on nonlinear optical parameters of anthraquinone dyes investigated using He-Ne laser operating in CW mode, *Opt. Laser Technol.* **62** (2014) 12–19.
- [18] A. E. Ghaly, R. Ananthashankar, M. Alhattab, V. V. Ramakrishan, Production, characterization and treatment of textile effluents: a critical review, *Chem. Eng. Process Tech.* **5** (2014) 1–19.
- [19] P. A. Carneiro, N. Boralle, N. R. Stradiotto, M. Furlan, M. V. B. Zanoni, Decolourization of anthraquinone reactive dye by electrochemical reduction on reticulated glassy carbon electrode, *J. Braz. Chem. Soc.* **15** (2004) 587–594.
- [20] Dimitrije Džokić, *Teorija i tehnologija bojenja tekstilnih materijala*, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 1989.
- [21] K. Venkatamaran, *The Chemistry of synthetic dyes*, Academic Press, Cambridge 2012.
- [22] K. Hunger, *Industrial dyes, chemistry, properties, applications*, Wiley, Univerzitet u Mičigenu, 2003.

- [23] C. J. West, A survey of American Chemistry, Reinhold Publishing Corporation, New York, 1931.
- [24] Y. Morikawa, K. Shiomi, Y. Ishihara, N. Matsuura, Triple primary cancers involving kidney, urinary bladder, and liver in a dye worker, *Am. J. Ind. Med.* **31** (1997) 44–49.
- [25] R. Nilsson, R. Nordlinder, U. Wass, B. Meding, L. Belin, Asthma, rhinitis, and dermatitis in workers exposed to reactive dyes, *Brit. J. Ind. Med.* **50** (1993) 65–70.
- [26] R. O. Alves de Lima, A. P. Bazo, D. M. Salvadori, D. Oliverira de Palma, G. De Araçao Umbuzeiro, Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source, *Mutat. Res.* **626** (2006) 53–60.
- [27] N. Mathur, P. Bhatnagar, P. Bakre P, Assessing Mutagenicity of Textile Dyes from Pali (Rajasthan) using AMES Bioassay, *Appl. Ecol. Environ. Res.* **4** (2005) 111–118.
- [28] I. Oller, S. Malato, J. A. S. Perez, Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination – A review, *Sci. Total. Environ.* **409** (2011) 4141–4166.
- [29] Woodard & Curran, Industrial waste treatment handbook, 2nd ed., Butterworth-Heinemann, United Kingdom, 2011.
- [30] N. P. Cheremisinoff, Handbook of water and wastewater treatment technologies, Butterworth-Heinemann, United Kingdom, 2002.
- [31] R. C. Das, D. K. Behera, Environmental Science: Principles and Practice, Prentice Hall of India, New Delhi, 2008.
- [32] T. Robinson, G. McMullan, R. Marchant, P. Nigam, Remediation of dyes in textile effluents: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative, *Biores. Technol.* **77** (2001) 247–255.

- [33] S. L. Prabu, T. N. K. Suriyaprakash, J. A. Kumar, Wastewater Treatment Technologies: A review, *Pharma Times* **43** (2011) 55–62.
- [34] R. G. Saratale, G. D. Saratale, J. S. Chang, S. P. Govindwar, Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review, *J. Taiwan Inst. Chem. E.* **42** (2011) 138–157.
- [35] V. Golab, A. Vinder, M. Simonic, Efficiency of coagulation/flocculation method for the treatment of dye bath effluent, *Dyes Pigm.* **67** (2005) 93–97.
- [36] J. H. Churchley, Removal of dye waste color from sewage effluent the use of a full scale ozone plant, *Water Sci. Technol.* **30** (1994) 275–284.
- [37] J. T. Chacko, K. Subramaniam, Enzymatic degradation of azo dyes– A review, *Int. J. Environ. Sci.* **1** (2011) 1250–1260.
- [38] N.S. Topare, S.J. Attar, M.M.Manfe, Sewage/Wastewater treatment technologies: A review, *Sci. Revs. Chem. Commun.* **1** (2011) 18–24.
- [39] T. A. Nguyen, R. S. Juang, Treatment of waters and wastewaters containing sulphur dyes: A review, *Chem. Eng. J.* **219** (2013) 109–117.
- [40] V. S. F. Leitao, M. E. A de Carvalho, E. P. S. Bon, Lignin peroxidase efficiency for methylene blue decolouration: Comparasion to reported methods, *Dyes Pigm.* **74** (2007) 230–236.
- [41] E. Forgacs, T. Cserhati, G. Oros, Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review, *Environ. Int.* **30** (2004) 953–971.
- [42] T. Mester, M. Tien, Oxidative mechanism of lignolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants, *Int. Biodeter. Biodegr.* **46** (2000) 51–59.
- [43] N. Duran, E. Esposito, Potential applications of oxidative enzymes and phenoxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review, *Appl. Catal. B-Enzym.* **28** (2000) 83–89.
- [44] M. A. Rauf, S. S. Ashraf, Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes, *Chem. Eng. J.* **209** (2012) 520–530.

- [45] N. Bansal, S. S. Kanwar, Peroxidase(s) in Environment protection, Sci.World J. 2013, Article ID 714639, 9 pages.
- [46] M. Imran, M. Arshad, F. Negm, A. Khalid, B. Shaharoon, S. Hussain, S. M. Nadeem, D. E. Crowley, Yeast extract promotes decolorization of azo dyes promoting azoreductase activity in *Shewanella* sp. Strain IFN4, Ecotox. Environ. Safe. **124** (2016) 42–49.
- [47] M. Ramya, S. Iyappan, A. Manju, S. J. Jiffe, Biodegradation and decolorization of Acid Red by *Acinetobacter radioresistens*, J. Biorem. Biodegrad. **1** (2010) 105–111.
- [48] A. K. Pandey, V. Dubey, Biodegradation of azo dye Reactive Red BL by *Alcaligenes* sp. AA09, Int. J. Eng. Sci. **1** (2012) 54–60.
- [49] C. C. Oturkar, M. S. Patole, K. R. Gawai, D. Madamwar, Enzyme based cleavage strategy of *Bacillus lentus* BI377 in response to metabolism of azoic recalcitrant, Biores. Technol. **130** (2013) 360–365.
- [50] J. Marier, A. Kandelbauer, A. Erlacher, A. C. Paulo, G. M. Gubitza, A new alkali thermostable azoreductase from *Bacillus* sp. Strain SF, Appl. Environ. Microbiol. **70** (2004) 837–844.
- [51] M. Leelakriangsak, S. Borisut, Characterization of decolorizing activity of azo dyes by *Bacillus subtilis* azoreductase Azor1, J. Sci. Technol. **34** (2012) 509–516.
- [52] E. Franciscon, M. J. Grossman, J. A. R. Paschoal, F. G. R. Reyes, L. R. Durrant, Decolorization and biodegradation of reactive sulfonated azo dyes by a newly isolated *Brevibacterium* sp. Strain VN-15, Springerplus **1** (2012) 1–10.
- [53] R. Jin, H. Yang, A. Zhang, J. Wang, G. Liu, Bioaugmentation on decolorization of CI Direct Blue 71 by using genetically engineered strain *Escherichia coli* JM109 (pGEX-AZR), J. Hazard. Mater. **163** (2008) 1123–1128.
- [54] A. Bafana, K. Kannan, S. Devi Sivanesan, T. Chakrabarti, Biological decolorization of C.I. Direct Black 38 by *E.gallinarum*, J. Hazard. Mater. **157** (2008) 187–193.

- [55] G. K. Panchamoorthy, S. Murugesan, J. Abraham, K. Muthukumar, *Bacillus sp.* Mutant for improved biodegradation of Congo red: Random mutagenesis approach, *Biores. Technol.* **100** (2009) 6295–6300.
- [56] K. Sarayu, S. Sandhya, Aerobic biodegradation pathway for Remazol Orange by *Pseudomonas aeruginosa*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160** (2010) 1241–1253.
- [57] K. Perumal, R. B. Malleswari, A. Catherin, T. A. S. Moorthy, Decolourization of Congo Red dye by bacterial consortium isolated from dye contaminated soil, Paramakudi, Tamil Nadu, *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* **2** (2012) 475–480.
- [58] R. Moya, M. Hernandez, A. B. Garcia–Martin, A. S. Ball, M. E. Arias, Contributions to a better comprehension of redox-mediated decolouration and detoxification of azo dyes by a laccase produced by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335, *Biores. Technol.* **101** (2010) 2224–2229.
- [59] T. Hadibarata, A. R. M. Yusoff, A. Aris, T. Hidayat, R. A. Kristanti, Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by laccase of a newly isolated *Armillaria sp.* F022, *Water Air Soil Poll.* **223** (2012) 1045–1054.
- [60] A. Michniewicz, S. Ledakowicz, R. Ullrich, M. Hofrichter, Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor*, *Dyes Pigm.* **77** (2008) 295–302.
- [61] Y. S. Tian, H. Xu, R. H. Peng, Q. H. Yao, R. T. Wong, Heterologous expression and characterization laccase 2 from *Coprinopsis cineria* capable of decolorizing different recalcitrant dyes, *Biotechnol. Bioeng.* **28** (2014) 248–258.
- [62] R. Zhao, L. Ma, F. Fan, Y. Gong, X. Wan, M. Jiang, X. Zhang, Y. Yang, Decolorization of different dyes by a newly isolated white-rot fungal strain *Ganoderma sp.* En3 and cloning and functional analysis of its laccase gene, *J. Hazard. Mater.* **192** (2011) 855–873.
- [63] A. Verma, P. Shirkot, Purification and characterization of thermostable laccase from thermophilic *Geobacillus thermocatenulatus* MS5 and its application in removal of textiles dyes, *Scholars Acad. J. Biosci.* **2** (2014) 479–485.

- [64] L. Casieri, G. C. Varese, A. Anastasi, V. Prigione, K. Svobodova, V. F. Marchisio, C. Novotony, Decolorization and detoxication of reactive industrial dyes immobilized fungi *Trametes pubescens* and *Pleurotus ostreatus*, *Folia Microbiol.* **53** (2008) 44–52.
- [65] P. Suwannawong, S. Khammuang, R. Sarnthima, Decolorization of Rhodamine B and Congo Red by partial purified laccase from *Lentinus polychrous*, *J. Biochem. Technol.* **3** (2010) 182–186.
- [66] G. Palmieri, G. Cennamo, G. Sania, Remazol Brilliant Blue R decolorization by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzyme system, *Enzyme Microb. Technol.* **36** (2005) 17–34.
- [67] S. Ilyas, S. Sultan, A. Rehman, Decolorization and degradation of azo dye Synozol Red HF6BN by *Pleurotus ostreatus*, *Afr. J. Biotechnol.* **11** (2012) 15422–15429.
- [68] M. S. M. Annuar, S. Adnan, S. Vikneswari, Y. Chisti, Kinetics and energetic of dye decolorization by *Pycnoporus sanguine*, *Water Air Soil Poll.* **202** (2009) 179–188.
- [69] K. Selvam, K. Swaminathan, K. S. Chae, Decolorization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora sp.*, *Biores. Technol.* **88** (2003) 115–119.
- [70] N. Mogharrab, H. Ghourchian, M. Amininasab, Structural stabilization and functional improvement of horseradish peroxidase upon modification of accessible lysines: Experiments and simulation, *Biophys. J.* **92** (2007) 1192–1203.
- [71] F. Passardi, G. Theiler, M. Zamocky, C. Cosio, N. Rouhier, F. Teixera, M. Margins-Pinheiro, V. Ioannidis, C. Penel, L. Falquet, C. Dunand, PeroxiBase, *Phytochem.* **68** (2007) 1605–1611.
- [72] M. Hamid, Khalil-ur-Rehman, Potential application of peroxidases, *Food Chem.* **115** (2009) 1177–1186.
- [73] H. B. Dundford, *Peroxidases and Catalases: biochemistry, biophysics, biotechnology and physiology*, John Wiley & Sons, United States, 2010.

- [74] Conesa, P. J. Punt, Cees A. M. J. J. van den Hondel, Fungal peroxidases: molecular aspects and applications, *J. Biotechnol.* **93** (2002) 143–158.
- [75] K. Wakamatsku, U. Takahama, Changes in peroxidase activity and in peroxidase isoenzymes in carrot callus, *Physiol. Plant.* **68** (1993) 167–173.
- [76] C. L. Biles, R. D. Martyn, Peroxidase, polyphenol oxidase and shikimate dehydrogenase isoenzymes in relation to the tissue type, maturity and pathogen induction of watermelon seedlings, *Plant Physiol. Bioch.* **31** (1993) 499–506.
- [77] E. Torres, M. Ayala, Biocatalysis based on heme peroxidases, Springer, Heidelberg Dordrecht, London, 2010.
- [78] N. C. Veitch, Horseradish peroxidase: a modern view of classic enzyme, *Phytochem.* **65** (2004) 249–259.
- [79] A. G. Sykes, *Advances in inorganic chemistry*, Academic Press, London, 2001.
- [80] K. L. Nielsen, C. Indiani, A. Henriksen, A. Feis, M. Becucci, M. Gajhede, G. Smulevich, K. G. Welinder, Differential activity and structure of highly similar peroxidases. Spectroscopic, crystallographic and enzymatic analyses of lignifying *Arabidopsis thaliana* peroxidase A2 and horseradish peroxidase A2, *Biochemistry* **40** (2001) 11013–11021.
- [81] A. M. Azevedo, V. C. Martins, D. M. F. Prazeres, V. Vojinović, J. M. S. Cabral, L. P. Foncesa, Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology, *Biotechnol. Annu. Rev.* **9** (2003) 199–247.
- [82] S. S. Deshpande, *Enzyme immunoassays: From concept to product development*, International Thomson Publishing, Florence, 1996.
- [83] L. M. Shannon, E. Kay, J. Y. Lew, Peroxidase isoenzymes from horseradish roots, *J. Biol. Chem.* **241** (1966) 2166–2172.
- [84] S. Aibara, H. Yamashita, E. Mori, M. Kato, Y. Morita. Isolation and characterization of five neutral isoenzymes of horseradish peroxidase, *J. Biochem.* **92** (1982) 531–539.

- [85] S. Aibara, T. Kobayashi, Y. Morita, Isolation and properties of basic isoenzymes of horseradish peroxidase, *J. Biochem.* **90** (1981) 489–496.
- [86] D. Dolphin, *The porphyrins*, Academic Press, London, 2012.
- [87] K. G. Welinder, Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7), *Febs Lett.* **72** (1976) 19–23.
- [88] B. J. Ryan, N. Carolan, C. O. Fagain, Horseradish and soyabean peroxidase: comparable tools for alternative niches, *Trends Biotechnol.* **24** (2006) 355–363.
- [89] M. Tanaka, K. Ishimori, M. Mukai, T. Kitagawa, I. Morishima, Catalytic activities and structural properties of horseradish peroxidase distal His42→Glu or Gln mutant, *Biochemistry* **36** (1997) 9889–9898.
- [90] A. N. P. Hiner, E. L. Raven, R. N. F. Thorneley, F. Garcia–Canovas, J. N. Rodriguez–Lopez, Mechanisms of compound I formation in heme peroxidases, *J. Inorg. Biochem.* **91** (2002) 27–34.
- [91] G. S. Zakharova, I. V. Uporov, V. I. Tishkov, Horseradish peroxidase: Modulation of properties by chemical modification of protein and heme, *Biochemistry* **76** (2011) 1391–1401.
- [92] M. J. R. Maranon, R. B. van Huystee, Plant peroxidases: Interaction between their prosthetic groups, *Phytochem.* **37** (1994) 1217–1225.
- [93] P. Vidossich, G. Fiorini, M. Alfonso–Prieto, E. Derat, S. Shaik, C. Rovira, On the role of water in peroxidase catalysis: A theoretical investigation of HRP compound I formation, *J. Phys. Chem.* **114** (2010) 5161–5169.
- [94] M. Gajhede, D. J. Schuller, A. Henriksen, A. T. Smith, T. L. Poulos, Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution, *Nat. Struct. Biol.* **4** (1997) 1032–1038.
- [95] U. Bandyopadhyay, S. Adak, R. K. Banerjee, Role of active site residues in peroxidase catalysis: studies on horseradish peroxidase, *Pinsa B65* **5** (1999) 315–330.

- [96] V. Thanabal, J. S. de Ropp, G. N. La Mar, Identification of the catalytically important amino acid residue resonances in ferric low-spin horseradish peroxidase with nuclear Overhauser Effect Measurements, *J. Amer. Chem. Soc.* **109** (1987) 7516–7525.
- [97] N. C. Veitch, A. T. Smith, Horseradish peroxidase, *Adv. Inorg. Chem.* **51** (2001) 107–162.
- [98] H. B. Dunford, Peroxidases and catalases: Biochemistry, Biophysics, Biotechnology and Physiology, John Wiley, United States, 1999.
- [99] N. C. Veitch, Y. Gao, A. T. Smith, C. G. White, Identification of a critical phenylalanine residue in horseradish peroxidase, Phe179, by site-directed mutagenesis and ¹H-NMR: Implications for complex formation with aromatic donor molecules, *Biochemistry* **36** (1997) 14751–14761.
- [100] N. C. Veitch, Structural determinants of plant peroxidase function, *Phytochem.* **3** (2004) 3–18.
- [101] E. Laurenti, G. Suriano, E. M. Ghibaudi, R. P. Ferrari, Ionic strength and pH effect on the Fe(III)-imidazole bond in the heme pocket of horseradish peroxidase: an EPR and UV-visible combined approach, *J. Inorg. Biochem.* **81** (2000) 259–266.
- [102] G. Smulevich, M. Paoli, G. De Sanctis, A. R. Mantini, F. Ascoli, M. Colletta, Spectroscopic evidence for a conformational transition in horseradish peroxidase at very low pH, *Biochemistry* **36** (1997) 640–649.
- [103] A. Feis, M. P. Marzocchi, M. Paoli, G. Smulevich, Spin state and axial ligand bonding in the hydroxide complexes of metmyoglobin, methemoglobin and horseradish peroxidase at room and low temperatures, *Biochemistry* **33** (1994) 4577–4583.
- [104] B. S. Lee, S. Krisnanchettiar, S. S. Lateef, N. S. Lateef, S. Gupta, Oligosaccharide analyses of glycopeptides of horseradish peroxidase by thermal-assisted partial acid hydrolysis and mass spectrometry, *Carbohydr. Res.* **340** (2005) 1859–1865.

- [105] J. S. S. Gray, B. Y. Yang, R. Montgomery, Heterogeneity of glucans at each *N*-glycosylation site of horseradish peroxidase, *Carbohydr. Res.* **311** (1998) 61–69.
- [106] Y. Yang, J. S. S. Gray, R. Montgomery, The glycans of horseradish peroxidase, *Carbohydr. Res.* **287** (1996) 203–212.
- [107] E. Silva, A. M. Edwards, A. F. Alario, Enzymatic generation of triplet acetone by deglycosylated horseradish peroxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* **276** (1990) 527–530.
- [108] J. W. Tams, K. G. Welinder, Mild chemical deglycosylation of horseradish peroxidase yields a fully active, homogenous enzyme, *Anal. Biochem.* **228** (1995) 48–55.
- [109] S. Ogawa, Y. Shiro, I. Morishima, Calcium binding by horseradish C and the heme environmental structure, *Biochem. Biophys. Commun.* **90** (1979) 674–678.
- [110] J. W. Tams, K. G. Welinder, Glycosylation and thermodynamic versus kinetic stability of horseradish peroxidase, *FEBS Lett.* **421** (1998) 234–236.
- [111] M. Laberge, Q. Huang, R. Schweitzer–Stenner, J. Fidy, The endogenous calcium ions of horseradish peroxidase C are required to maintain functional nonplanarity of the heme, *Biophys. J.* **84** (2003) 2542–2552.
- [112] K. Szigeti, L. Smeller, S. Osvath, Z. Majer, J. Fidy, The structure of horseradish peroxidase C characterized as a molten globule state after Ca^{2+} depletion, *Biochim. Biophys. Acta* **1784** (2008) 1965–1974.
- [113] B. D. Howes, A. Feis, L. Raimondi, C. Indiani, G. Smulevich, The critical role of the proximal calcium ion in the structural properties of horseradish peroxidase, *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 40704–40711.
- [114] N. Ž. Šekuljica, N. Ž. Prlainović, A. B. Stefanović, M. G. Žuža, D. Z. Čičkarić, D. Ž. Mijin, Z. D. Knežević-Jugović, *The Scientific World Journal*, 2015, 2015, 12 pages, Article ID 371625.

- [115] J. N. R. Lopez, A. T. Smith, R. N. F. Thorneley, Role of arginine 38 in horseradish peroxidase, *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 4023–4030.
- [116] P. H. Hynninen, V. Kaartinen, E. Kolehmainen, Horseradish peroxidase–catalyzed oxidation of chlorophyll a with hydrogen peroxide, Characterization of the products and mechanism of the reaction, *Biochim. Biophys. Acta* **1797** (2010) 531–542.
- [117] S. O. Malomo, R. I. Adeoye, L. Banbatunde, I. A. Saheed, M. O. Iniaghe, F. J. Olorunniji, Suicide inactivation of horseradish peroxidase by excess of hydrogen peroxide: The effects of reaction pH, buffer ion concentration and redox mediator, *Biokemistri* **23** (2011) 124–128.
- [118] S. Adak, A. Mazumder, R. K. Banerjee, Probing the active site residues in aromatic donor oxidation in horseradish peroxidase: involvement of an arginine and tyrosine residue in aromatic donor binding, *Biochem. J.* **314** (1996) 985–991.
- [119] K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard, *The porphyrin handbook: Biochemistry and binding: Activation of small molecules*, Academic Press, London, 2000.
- [120] A. Mahmoudi, K. Nazari, M. Khosraneh, B. Mohajerani, V. Kelay, A. A. M. Movahedi, Can amino acids protect horseradish peroxidase against its suicide–peroxide substrate, *Enzyme Microb. Tech.* **43** (2008) 329–335.
- [121] A. Erdem, A. Pabuccuoglu, B. Meric, K. Kerman, M. Ozsoz, Electrochemical biosensor based on horseradish peroxidase for determination of oxidizable drugs, *Turk. J. Med. Sci.* **30** (2000) 349–354.
- [122] C. Wu, Z. Liu, H. Sun, X. Wang, P. Xu, Selective determination of phenols and aromatic amines based on horseradish peroxidase–nanoporous gold co–catalytic strategy, *Biosens. Bioelectron.* **79** (2016) 843–849.
- [123] A. Attar, L. C. Aguilera, I. N. Rodriguez, J. L. H. Hidalgo de Cisneros, J. M. P. Santander, A. Amine, Amperometric inhibition biosensors based on horseradish peroxidase and gold sononanoparticles immobilized onto different electrodes for cyanide measurements, *Bioelectrochemistry* **101** (2015) 84–91.

- [124] M. Moyo, J. O. Okonkwo, N. M. Agyei, An amperometric biosensor based on horseradish peroxidase immobilized onto maize tassel–multi–walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode for determination of heavy metal ions in aqueous solution, *Enzyme Microb. Technol.* **56** (2014) 28–34.
- [125] S. Nandini, S. Nalini, R. Manjunatha, S. Shanmugam, J. S. Melo, G. S. Suresh, Electrochemical biosensor for the selective determination of hydrogen peroxide based on the co–deposition of palladium, horseradish peroxidase on functionalized–graphene modified graphite electrode as composite, *J. Electroanal. Biochem.* **689** (2013) 233–242.
- [126] M. G. Paul, S. Celebi, H. Ozyoruk, A. Yildiz, Amperometric enzyme electrode for organic peroxides determination prepared from horseradish peroxidase immobilized in poly(vinylferrocenium) film, *Biosens. Bioelectron.* **17** (2002) 875–881.
- [127] A. Mulchandani, D. D. Rudolph, Amperometric determination of lipid hydroperoxides, *Anal. Biochem.* **225** (1995) 277–282.
- [128] A. M. Pisoschi, A. Pop, A. I. Serban, G. P. Negulescu, Ethanol determination by an amperometric bienzyme sensor based a Clark–type transducer, *J. Electroanal. Chem.* **671** (2012) 85–91.
- [129] C. Bongiovanni, T. Ferri, A. Poscia, M. Varalli, R. Santucci, A. Desideri, An electrochemical multienzymatic biosensor for determination of cholesterol, *Bioelectrochemistry* **54** (2001) 17–22.
- [130] S. Xu, H. Qi, S. Zhou, X. Zhang, C. Zhang, Mediatorless amperometric bienzyme glucose biosensor based on horseradish peroxidase and glucose oxidase cross–linked to multiwall carbon nanotubes, *Microchim. Acta* **181** (2014) 535–541.
- [131] Y. Zhuo, W. J. Yi, W. B. Lian, R. Yuan, Y. Q. Chai, A. Chen, C. M. Hu, Ultrasensitive electrochemical strategy for NT-proBNP detection with gold nanochains and horseradish peroxidase complex amplification, *Biosens. Bioelectron.* **26** (2011) 2188–2193.

- [132] E. E. Ferapontova, V. G. Grigorenko, A. M. Egorov, P-chip and P-chip bienzyme electrodes based on recombinant forms of horseradish peroxidase immobilized on gold electrodes, *Biochemistry* **66** (2001) 832–839.
- [133] M. Renz, C. Kurz, A colorimetric method for DNA hybridization, *Nucleic Acids Res.* **12** (1984) 3435–3444.
- [134] G. R. Lopes, D. C. G. A. Pinto, A. M. S. Silva, Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry, *RSC Adv.* **4** (2014) 37244–37265.
- [135] A. Morawski, S. Quan, F. H. Arnold, Functional expression and stabilization of horseradish peroxidase by directed evolution in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.* **76** (2001) 99–107.
- [136] J. Li, X. Zhao, Oxidative cross-linking of casein by horseradish peroxidase and its impact on emulsifying properties and the microstructure of acidified gel, *Afr. J. Biotechnol.* **8** (2009) 5508–5515.
- [137] J. Bucherit, D. E. Cura, H. Ma, C. Gasparetti, E. Monogioudi, G. Facco, M. Mattinen, H. Boer, R. Partanen, E. Selinheino, R. Lantto, K. Kruus, Crosslinking food proteins for improved functionality, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **1** (2010) 113–138.
- [138] M. Arslan, Immobilization horseradish peroxidase on amine-functionalized glycidyl methacrylate-g-poly(ethylene terephtalate) fibers for use in azo dye decolorization, *Polym. Bull.* **66** (2011) 865–879.
- [139] R. Xu, Y. Si, F. Li, B. Zhang, Enzymatic removal of paacetamol from aqueous phase: Horseradish peroxidase immobilized on nanofibrous membranes, *Environ. Sci. Poll. Res.* **22** (2015) 3838–3846.
- [140] W. Wang, Z. Li, W. Liu, J. Wu, Horseradish peroxidase immobilized on the silane-modified ceramics for the catalytic oxidation of simulated oily water, *Sep. Purif. Technol.* **89** (2012) 206–211.

- [141] M. Moeder, C. Martin, G. Koeller, Degradation of hydroxylated compounds using lacasse and horseradish peroxidase immobilized in microporous polypropylene hollow fiber membranes, *J. Membr. Sci.* **245** (2004) 183–190.
- [142] X. Jiang, W. Tang, J. Gao, L. Zhou, Y. He, Immobilization of horseradish peroxidase in phospholipid-templated titania and its application in phenolic compounds and dye removal, *Enzyme Microb. Technol.* **55** (2014) 1–6.
- [143] Z. Knežević–Jugović, *Enzimsko inženjerstvo, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2008.*
- [144] P. A. Frey, A. D. Hegeman, *Enzymatic Reaction Mechanisms, Oxford University Press, New York, 2007.*
- [145] K. Wilson, J. Walker, *Principles and Techniques of Practical Biochemistry, Academic Press, London, 2005.*
- [146] W.W. Cleland, The kinetics of enzyme–catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations, *Biochim. Biophys. Acta* **67** (1963) 104–137.
- [147] P. Cook, W. W. Cleland, *Enzyme kinetics and Mechanism, Garland Science, New York, 2007.*
- [148] M. C. Reed, A. Lieb, H. F. Nijhout, The biological significance of substrate inhibition: A mechanism with diverse functions, *Bioessays* **32** (2010) 422–429.
- [149] L. Q. Wang, H. L. Lehmler, L. W. Robertson, C. N. Falany, M. O. James, *In Vitro* inhibition of human hepatic and cDNA –expressed sulfotransferase activity with 3–hydroxybenzo[*a*]pyrene by polychlorobiphenyls, *Environ. Health Persp.* **113** (2005) 680–687.
- [150] J. M. Coulson, J. F. Richardson, D. G. Peacock, *Coulson & Richardson's Chemical Engineering: Chemical & Biochemical Reactors & Process Control, Butterworth-Heinemann, United Kingdom, 1994.*

- [151] S. Nisha, A. Kartichk, N. Gobi, A review of methods, application and properties of immobilized enzyme, *Chem. Sci. Rev. Lett.* **1** (2012) 148–155.
- [152] R. A. Sheldon, *Enzyme Immobilization: The quest for optimum performance*, *Adv. Synth. Catal.* **349** (2007) 1289–1307.
- [153] J. M. Guisan, *Immobilization of enzymes and cells*, Humana Press, New York, 2006.
- [154] P. Zucca, E. Sanjust, Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and Mechanisms, *Molecules* **19** (2014) 14139–14194.
- [155] S. Datta, R. L. Christena, Y. R. S. Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *3Biotech* **3** (2013) 1–9.
- [156] Z. Huang, V. Orbović, *Kaolinite: occurrences, characteristics and applications*, Nova Science Publishers, New York, 2012.
- [157] N. An, C. H. Zhou, X. Y. Zhuang, D. S. Tong, W. H. Yu, Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors, *App. Clay Sci.* **114** (2015) 283–296.
- [158] H. He, Q. Tao, J. Zhu, P. Yuan, W. Shen, S. Yang, Silylation of clay mineral surfaces, *App. Clay Sci.* **71** (2013) 15–20.
- [159] N. Ž. Šekuljica, N. Ž. Prlainović, J. R. Jovanović, A. B. Stefanović, V. R. Đokić, D. Ž. Mijin, Z. Knežević-Jugović, Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin, *Bioproc. Biosyst. Eng.* **39** (2016) 461–472.
- [160] J. Cheng, S. M. Yu, P. Zuo, Horseradish peroxidase immobilized on aluminium-pillared clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater, *Water Res.* **40** (2006) 283–290.
- [161] U. Anđelković, A. Milutinović-Nikolić, N. Jović-Jovičić, P. Banoković, T. Bajt, Z. Mojović, Z. Vujčić, D. Jovanović, Efficient stabilization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase by immobilization on modified bidellite nanoclays, *Food Chem.* **168** (2015) 262–269.

- [162] M. B. A. Rahman, S. M. Tajudin, M. Z. Hussein, R. N. Z. R. A. Rahman, A. B. Salleh, M. Basri, Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification, *App. Clay. Sci.* **29** (2005) 111–116.
- [163] H. K. Karagulyan, V. K. Gasparyan, S. R. Decker, Immobilization of fungal beta-glucosidase on silica gel and kaolin carriers, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **146** (2008) 39–47.
- [164] S. Shanmigam, *Enzyme Technology*, I. K. International Publishing House, New Delhi, 2009.
- [165] T. Ming, S. Chang, *Biomedical applications of immobilized enzymes and proteins*, Plenum Press, New York, 2013.
- [166] N. R. Mohamad, N. H. C. Marzuki, N. A. Buang, F. Huyop, R. A. Wahab, An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **29** (2015) 205–220.
- [167] S.S. Wong, *Chemistry of protein Conjugation and cross-linking*, CRS Press, United States, 1991.
- [168] X. Jiang, W. Tang, J. Gao, L. Zhou, Y. He, Immobilization of horseradish peroxidase in phospholipid-templated titania and its application in phenolic compounds and dye removal, *Enzyme Microb. Technol.* **55** (2014) 1–6.
- [169] M. Wang, W. Qi, C. Jia, Y. Ren, R. Su, Z. He, Enhancement of activity of cross-linked enzyme aggregates by a sugar assisted precipitation strategy: Technical development and molecular mechanism, *J. Biotechnol.* **156** (2011) 30–38.
- [170] M. Wang, W. Qi, Q. Yu, R. Su, Z. He, Cross-linking enzyme aggregates in the pores of silica gel: A practical and efficient method for enzyme atabilization, *Biochem. Eng. J.* **52** (2010) 168–174.

- [171] Y. Chen, C. P. Xiao, X. Y. Chen, L. W. Yang, X. Qi, J. F. Zheng, M. C. Li, J. Zhang, Preparation of cross-linked enzyme aggregates in water-in-oil emulsion: Application in trehalose synthase, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **100** (2014) 84–90.
- [172] T. Shioiri, K. Izawa, T. Konoike, *Pharmaceutical Process Chemistry*, Wiley VCH, Germany, 2010.
- [173] N. Tandjaoui, A. Tassist, M. Abouseoud, A. Couvert, A. Amrane, Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Brassica rapa* peroxidase, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **4** (2015) 208–213.
- [174] S. S. Nadar, A. B. Muley, M. R. Ladole, P. U. Joshi, Macromolecular cross-linked enzyme aggregates (M-CLEAs) of α -amylase, *Int. J. Biol. Macromol.* **84** (2016) 69–78.
- [175] C. Mateo, J. Palomo, L. Langen, F. Rantwijk, R. Sheldon, A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates, *Biotechnol. Bioeng.* **86** (2004) 273–276.
- [176] A. Arsenault, H. Cabana, J. Jones, Laccase-Based CLEAs: Chitosan as a Novel Cross-Linking Agent, *Enzyme Res.* (2011) 1–10.
- [177] H. Ayhan, F. Ayhan, A. Gulsu, Highly biocompatible enzyme aggregates crosslinked by L-lysine, *Turk. J. Biochem.* **37** (2012) 14–20.
- [178] S. Talekar, S. Nadar, A. Joshi, G. Joshi, Pectin cross-linked enzyme aggregates (pectin-CLEAs) of glucoamylase, *RSC Adv.* **4** (2014) 59444–59453.
- [179] J. J. Karimpil, J. S. Melo, S. F. De Souza, Hen egg white as a feeder protein for lipase immobilization, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **71** (2011) 113–118.
- [180] F. Šulek, D. P. Fernandez, Ž. Knez, M. Habulin, R. A. Sheldon, Immobilization of horseradish peroxidase as cross-linked enzyme aggregates (CLEAs), *Proc. Biochem.* **46** (2011) 765–769.

- [181] S. Talekar, V. Ghodake, T. Ghotage, P. Rathod, P. Deshmukh, S. Nadar. M. Mulla, M. Ladole, Novel magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of alpha amylase, *Biores. Technol.* **123** (2012) 542–547.
- [182] W. W. Zhang, X. L. Yang, J. Q. Jia, C. L. Hu, X. Q. Yu, Surfactant-activated magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of *Thermomyces lanuginosus* lipase for biodiesel production, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 115, 2015, 83–89.
- [183] A. Bhattacharya, B. I. Pletschke, Magnetic cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel concept towards carrier free immobilization of lignocellulolytic enzymes, *Enzyme and Microbial Technology* 61–62, 2014, 17–27.
- [184] W. Kopp, T. P. Da Costa, S. C. Pereira, M. J. Jr, R. C. Giordano, R. F. C. Marques, F. M. A. Moreira, R. L. C. Giordano, Easy handling penicilin G acylase magnetic cross-linked enzyme aggregates: Catalytic and morphological studies, *Process Biochemistry* 49, 2014, 38–46.
- [185] N. Hilal, R. Nigmatullin, A. Alpatova, Immobilization of cross-linked lipase aggregates within macroporous polymeric membranes, *Journal of Membrane Science* 238, 2004, 131–141.
- [186] S. Ba, L. Haroune, C. C. Morato, C. Jacquet, I. E. Touahar, J. P. Bellenger, C. Y. Legault, L. P. Jones, H. Cabana, Synthesis and characterization of combined cross-linked laccase and tyrosinase aggregates transforming acetaminophen as a model phenolic compound in wastewater, *Sci. Total Environ.* **487** (2014) 748–755.
- [187] R. T. Puig, C. Junghanns, P. Demarche, M. T. Moreira, G. Feijoo, J. M. Lema, S. N. Agathos, Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose-oxidase: Production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors, *Biores. Technol.* **102** (2011) 6593–6599.
- [188] Z. Karim, R. Adnan, Q. Hussain, A β -cyclodextrin-chitosan complex as the immobilization matrix for horseradish peroxidase and its application for the

- removal of azo dyes from textile effluent, *Inter. Biodeteor. Biodegr.* **72** (2012) 10–17.
- [189] S. V. Mohan, K. K. Prasad, N. C. Rao, P. N. Sarma, Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process, *Chemosphere* **58** (2005) 1097–1105.
- [190] M. Celebi, M. A. Kaya, M. Altikatoglu, H. Yildirim, Enzymatic decolorization of anthraquinone and diazo dyes using horseradish peroxidase enzyme immobilized onto various polysulfone supports, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **171** (2013) 716–730.
- [191] M. Arslan, Immobilization horseradish peroxidase on amine-functionalized glycidyl methacrylate-*g*-poly(ethylene terephthalate) fibers for use in azo dye decolorization, *Polym. Bull.* **66** (2011) 865–879.
- [192] X. Jiang, W. Tang, J. Gao, L. Zhou, Y. He, Immobilization of horseradish peroxidase in phospholipid-templated titania and its application in phenolic compounds and dye removal, *Enzyme Microb. Technol.* **55** (2014) 1–6.
- [193] G. Bayramoglu, B. Altinas, M. Y. Arica, Cross-linking of horseradish peroxidase adsorbed on polycationic films: utilization for direct dye degradation, *Bioproc. Biosyst. Eng.* **35** (2012) 1355–1365.
- [194] S. Preethi, A. Anumary, M. Ashokkumar, P. Thanikaivelan, Probing horseradish peroxidase catalyzed degradation of azo dye from tannery wastewater, *Springer Plus* **2** (2013) 341.
- [195] L. A. Dahili, I. K. Horvath, T. Feczko, 2,4-dichlorophenol removal by purified horseradish peroxidase enzyme and crude extract from horseradish peroxidase immobilized to nano spray dried ethyl cellulose particles, *Proc. Biochem.* **50** (2015) 1835–1842.
- [196] A. Meizler, F. Roddick, N. Porter, A novel class support for the immobilization and UV-activation of horseradish peroxidase for treatment of halogenated phenols, *Chem. Eng. J.* **172** (2011) 792–798.

- [197] N. Vasileva, T. Godjevargova, D. Ivanova, K. Gabrovska, Application of immobilized horseradish peroxidase onto modified acrylonitrile copolymer membrane in removing of phenol from water, *Int. J. Macromol.* **44** (2009) 190–194.
- [198] R. Zhai, B. Zhang, Y. Wan, C. Li, J. Wang, J. Liu, Chitosan-hallosite hybrid-nanotubes: Horseradish peroxidase immobilization and applications in phenol removal, *Chem. Eng. J.* **214** (2013) 304–309.
- [199] G. Bayramoglu, M. Y. Arica, Enzymatic removal of phenol and *p*-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads, *J. Hazard. Mater.* **156** (2008) 148–155.
- [200] N. Ž. Šekuljica, N. Ž. Prlainović, N. M. Lukić, A. M. Jakovljević, S. Ž. Grbavčić, D. Ž. Mijin, Z. D. Knežević-Jugović, Immobilization of peroxidase from fresh horseradish extract for anthraquinone dye decolorization, *Zašt. Mat.* **3** (2015) 335–339.
- [201] R. Pramparo, F. Stuber, J. Font, A. Fortuny, A. Fabregat, C. Bengoa, Immobilisation of horseradish peroxidase on Eupergit[®] C for the enzymatic elimination of phenol, *J. Hazard. Mater.* **177** (2010) 990–1000.
- [202] I. Alemzadeh, S. Nejati, Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase, *J. Hazard. Mater.* **166** (2009) 1082–1086.
- [203] R. Xu, C. Chi, F. Li, B. Zhang, Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun microfibrillar membranes for biodegradation and adsorption of bisphenol A, *Biores. Technol.* **149** (2013) 111–1116.
- [204] I. S. P. Savizi, H. R. Karminia, S. Bakhshian, Simultaneous decolorization and bioelectricity generation in a dual chamber microbial fuel cell using electropolymerized enzymatic cathode, *Environ. Sci. Technol.* **46** (2012) 6584–6593.
- [205] S. Cosnier, M. Holzinger, A. L. Goff, Recent advances in carbon nanotube-based enzymatic fuel cells, *Bioeng. Biotechnol.* **2** (2014) 1–6.

- [206] I. Ivanov, T. V. Koch, K. Sundmacher, Recent Advances in enzymatic fuel cells: Experiments and Modeling, *Energies* **3** (2010) 803–846.
- [207] M. Rasmussen, S. Abdellaoui, S. D. Minteer, Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements, *Biosens. Bioelectron.* **75** (2016) 91–102.
- [208] N. Ž. Šekuljica, M. M. Gvozdrenović, Z. D. Knežević–Jugović, B. Z. Jugović, B. N. Grgur, Biofuel cell based on horseradish peroxidase immobilized on copper-sulfide as anode for decolorization of anthraquinone AV109 dye, *J. Energy Chem.* **25** (2016) 403–408.
- [209] F. Shi, W. Zheng, W. Wang, F. Hou, B. Lei, Z. Sun, W. Sun, Application of graphene-copper sulfide nanocomposite modified electrode for electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin, *Biosens. Bioelectron.* **64** (2015) 131–137.
- [210] R. A. Bullen, T. C. Arnot, J. B. Lakeman, F. C. Walsh, Biofuel cells and their development, *Biosens. Bioelectron.* **21** (2006) 2015–2045.
- [211] S. C. Barton, J. Gallaway, P. Atanassov, Enzymatic Biofuel cells for implantable and microscale devices, *Chem. Rev.* **104** (2004) 4867–4886.
- [212] X. D. Benetton, S. Srikanth, Y. Satyawali, K. Vanbroekhoven, D. Pant, Enzymatic electrosynthesis: An overview on the progress in enzyme–electrodes for the production of electricity, fuels and chemicals, *J. Microb. Biochem. Technol.* 2013, doi:10.4172/1948-5948.S6-007.
- [213] P. Jenkins, S. Tuurala, A. Vaari, M. Valkianinen, M. Smolander, D. Leech, A comparison of glucose oxidase and aldolase dehydrogenase as mediated anodes in printed glucose/oxygen enzymatic fuel cells using ABTS/laccase cathodes, *Bioelectrochemistry* **87** (2012) 172–177.
- [214] S. Bakhshian, H. R. Karminia, R. Roshandel, Bioelectricity generation enhancement in a dual chamber microbial fuel cell under cathodic enzyme catalyzed dye decolorization, *Biores. Technol.* **102** (2011) 6761–6765.

- [215] J. Sun, Y. Y. Hu, Z. Bi, Y. Q. Cao, Simultaneous decolorization of azo dye and bioelectricity generation using a microfiltration membrane air–cathode single–chamber microbial fuel cell, *Biores. Technol.* **100** (2009) 3185–3192.
- [216] L. Liu, F. B. Li, C. H. Feng, X. Z. Li, Microbial fuel cell with an azo-dye-feeding cathode, *App. Microbiol. Biotechnol.* **85** (2009) 175–183.
- [217] Y. Cao, Y. Hu, J. Sun, B. Hou, Explore various co-substrate for simultaneous electricity generation and Congo Red degradation in air–cathode single–chamber microbial fuel cell, *Bioelectrochemistry* **79** (2010) 71–76.
- [218] M. Minteer, Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements, *Biosens. Bioelectron.* **75** (2016) 91–102.
- [219] S. Khurshid, M. Z. Qureshi, A. Ibrahim, Z. Nawaz, A. Sajid, M. Ikram, Production and purification of horseradish peroxidase in Pakistan, *Int. J. Phys. Sci.* **7** (2012) 2706–2712.
- [220] O. Prodanović, M. Prokopijević, D. Spasojević, Ž. Stojanović, K. Radotić, Z. Knežević–Jugović, R. Prodanović, Improved covalent immobilization of horseradish peroxidase on macroporous glycidyl methacrylate–based copolymers, *App. Biochem. Biotechnol.* **168** (2012) 1288–1301.
- [221] E. F. Hartree, Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response, *Anal. Biochem.* **48** (1972) 422–427.
- [222] P. P. Zamora, C. M. Pereira, E. R. L. Tiburtius, S. G. Moraes, M. A. Rosa, R. C. Minussi, N. Duran, Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase, *App. Catal. B: Environ.* **42** (2003) 131–144.
- [223] M. C. Silva, J. A. Torres, L. R. Vasconcelos de Sa, P. M. B. Chagas, V. S. F. Leitaó, A. D. Correa, The use of soybean peroxidase in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R and toxicological evaluation of its degradation products, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **89** (2013) 122–129.

- [224] N. Boucherit, M. Abouseoud, L. Adour, Degradation of direct azo dye by *Cucurbita pepo* free and immobilized peroxidase, *J. Environ. Sci.* **25** (2013) 1235–1244.
- [225] F. G. Borujeni, A. H. Mahvi, S. Nasser, M. A. Faramarzi, R. Nabizadeh, M. Alimohammadi, Enzymatic treatment and detoxification of Acid Orange 7 from textile wastewater, *App. Biochem. Biotechnol.* **165** (2011) 1274–1284.
- [226] J. Lan, X. Huang, M. Hu, Y. Li, Y. Qu, P. Gao, D. Wu, High efficient degradation of dyes with lignin peroxidase coupled with glucose oxidase, *J. Biotechnol.* **123** (2006) 483–490.
- [227] E. Almansa, A. Kandelbauer, L. Pereira, A. Cavaco–Paulo, G. M. Guebitz, Influence of structure on dye degradation on lacasse mediator systems, *Biocatal. Biotransform.* **22** (2004) 315–324.
- [228] C. H. Jie, H. H. Zheng, Y. Baoling, F. M. Lai, Decolorization of RhB dye by manganese oxides: effect of crystal type and solution pH, *Geochem. Trans.* **16** (2015).
- [229] Y. Wu, K. E. Taylor, N. Biswas, and J. K. Bewtra, Comparison of additives in the removal of phenolic compounds by peroxidase catalyzed polymerization, *Water Res.* **31** (1997) 2699–2704.
- [230] T. Thongsook and D. M. Barrett, Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) peroxidases, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 3206–3214.
- [231] A. Bhunia, S. Durani, and P. P. Wangikar, Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes, *Biotechnol. Bioeng.* **72** (2001) 562–567.
- [232] K. Chattopadhyay, S. Mazumdar, Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: Effect of pH and temperature, *Biochemistry* **39** (2000) 263–270.

- [233] A. M. Rahad, Metakaolin as cementitious material: History, scours, production and composition – A comprehensive overview, *Constr. Build. Mater.* **41** (2013) 303–318.
- [234] G. Kakali, T. Perraki, S. Tsilvis, E. Badogiannis, Thermal treatment of kaolin: the effect on mineralogy on the pozzolanic activity, *App. Clay Sci.* **20** (2001) 73–80.
- [235] B. Plešingerova, G. Sučik, M. Fabian, Surface area change of kaolin causing annealing, *Acta Metall. Slovaca* **17** (2011) 169–176.
- [236] F. J. Huertas, L. Chou, R. Wollast, Mechanism of Kaolinite dissolution at room temperature and pressure, *Geochim. Cosmochim. Acta* **63** (1999) 3261–3275.
- [237] M. Zbik, R. St. C. Smart, Nanomorphology of kaolinites: Comparative SEM and AFM studies, *Clay. Clay Miner.* **46** (1998) 153–160.
- [238] P. Sengupta, P. C. Saikia, P. C. Borthakur, SEM–EDX characterization of an iron–rich kaolinite clay, *J. Sci. Ind. Res.* **67** (2008) 812–818.
- [239] O. U. Aroke, U. A. El–Nafaty, O. A. Osha, Properties and characterization of kaolin clay fom Alkaleri North–Eastern Nigeria, *Int. J. Emerg. Technol. Adv. Eng.* **3** (2011) 387–392.
- [240] D. Burhan, C. Emin, Investigation of Central Anatolian Clays by FTIR Spectroscopy, *Int. J. Nat. Eng. Sci.* **3** (2009) 154–161.
- [241] L. Vaculikova, E. Plevova, S. Vallova, I. Koutnik, Characterization and differentiation of kaolinites from selected Czech deposits using infrared spectroscopy and differential thermal analysis, *Acta Geodyn. Geomater.* **8** (2011) 59–67.
- [242] M. Asadi, R. Nagizadeh, A. Nemati, K. Arzani, R. Nassiri, Synthesis and microstructural properties of a geopolymer cement with high silica materials, *J. Ceram. Process. Res.* **13** (2012) 425–428.
- [243] B. K. G. Theng, Clay–Polimer interactions: Summary and perspectives, *Clay. Clay Miner.* **30** (1982) 1–10.

- [243] A. D. McLaren, G. H. Peterson, I. Barshad, The adsorption and reactions of enzymes and proteins on clay minerals, *Soil Sci. Soc. Amer. J.* **22** (1958) 239–244.
- [244] J. Luklema, Proteins at solid–liquid interfaces A colloid–chemical review, *Colloids Surf.* **10** (1984) 33–42.
- [245] H. J. Kim, Y. Suma, S. H. Lee, J. A. Kim, H. S. Kim, Immobilization of horseradish peroxidase using soil organic matter for phenol removal, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **83** (2012) 8–15.
- [246] P. Roach, D. Farrar, C. C. Perry, Interpretation of protein adsorption: surface–induced conformational changes, *Amer. Chem. Soc.* **127** (2005) 8168–8173.
- [247] A. Sethuraman, G. Belfort, Protein structural perturbation and aggregation on homogenous surfaces, *Biophys. J.* **88** (2005) 1322–1333.
- [248] F. R. Melgarejo, J. N. R. Lopez, F. G. Canovas, P. A. G. Ruiz, Immobilization of horseradish peroxidase on cinnamic carbohydrate esters. *Proc. Biochem.* **39** (2004) 1455–1464.
- [249] P. A. Carneiro, N. Boralle, N. R. Stradiotto, M. Furlan, M. V. B. Zanoni, Decolourization of anthraquinone reactive dye by electrochemical reduction on reticulated glassy carbon electrode, *J. Brazil. Chem. Soc.* **15** (2004) 587–594.
- [250] F. Jamal, T. Qidwal, P. K. Pandey, R. Singh, S. Singh, Azo and anthraquinone dye decolorization in relation to its molecular structure using soluble *Trichosantesdioica* peroxidase supplemented with redox mediator, *Catal. Commun.* **12** (2011) 1218–1233.
- [251] M. Monier, D. M. Ayad, Y. Wei, A. A. Sarhan, Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads, *Inter. J. Biol. Macromol.* **46** (2010) 324–330.
- [252] O. Barbosa, R. Torres, C. Ortiz, R. F. Lafuente, Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effects of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*, *Proc. Biochem.* **47** (2012) 1220–1227.

- [253] D. I. Bezbradica, C. Mateo, J. M. Guisan, Novel support for enzyme immobilization prepared by chemical activation with cysteine and glutaraldehyde, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **102** (2014) 218–224.
- [254] H. C.B. Coste, B. B. Romao, E. J. Ribeiro, M. M. Resende, Glutaraldehyde effect in the immobilization process of α -galactosidase from *Aspergillus niger* in the ion exchange resin duolite A–568, *Chem. Eng. Trans.* **32** (2013) 1105–1110.
- [255] H. J. Chae, E. Y. Kim, Man–Jin In, Improved immobilization yields by addition of protecting agents in glutaraldehyde induced immobilization of protease, *J. Biosci. Bioeng.* **89** (2000) 377–379.
- [256] J. L. House, E. M. Anderson, W. K. Ward, Immobilization techniques to avoid enzyme loss from oxidase–based biosensors: A one year study, *J. Diabetes Sci. Technol.* **1** (2007) 18–27.
- [257] H. Chen, Q. Zhang, Y. Dang, G. Shu, The effect of glutaraldehyde cross–linking on the enzyme activity of immobilized β -galactosidase on chitosan bed, *Adv. J. Food Sci. Technol.* **5** (2013) 932–935.
- [258] J. Zhu, G. Sun, Lipase immobilization on glutaraldehyde–activated nanofibrous membranes for improved enzyme stabilities and activities, *React. Funct. Polym.* **72** (2012) 839–845.
- [259] A. Cordoba, I. Magario, M. L. Ferreira, Evaluation of hematin–catalyzed Orange II degradation as a potential alternative to horseradish peroxidase, *Inter. Biodeter. Biodegr.* **73** (2013) 60–72.
- [260] S. M. A. G. U. de Souza, E. Forgiarini, A. A. U. de Souza, Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP), *J. Hazard. Mater.* **147** (2007) 1073–1078.
- [261] K. Knutson, S. Kirzan, A. Ragauskas, Enzymatic biobleaching of two recalcitrant paper dyes with horseradish and soybean peroxidase, *Biotechnol. Lett.* **27** (2005) 753–758.

- [262] A. Mandan, S. Modi, A. Saxena, D. V. Behere, S. Mitra, Nature of distal amino acid residue responsible for acid–alkaline transition in HRP: Circular dichroism studies, *Proc. Indian Acad. Sci.* **102** (1990) 431–503.
- [263] S. Akhtar, Q. Husain, Potential applications of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase in the removal of phenols from polluted water, *Chemosphere* **65** (2006) 1228–1235.
- [264] M. Guo, L. Fuping, L. Minyao, L. Tuoping, P. Jun, N. Wang, P. Liang, C. Zhang, Purification of recombinant lacasse from *Trametes Versicolor* in *Pichia methanolica* and its use for the decolorization of anthraquinone dye, *Biotechnol. Lett.* **30** (2008) 2091–2096.
- [265] C. Y. Yu, X. F. Li, W. Y. Lou, M. H. Zong, Cross–linked enzyme aggregates of Mung bean epoxide hydrolases: A highly active, stable and recycable biocatalyst for asymmetric hydrolysis epoxides, *J. Biotechnol.* **166** (2013) 12–19.
- [266] S. Khanahmadi, F. Yusof, A. Amid, S. S. Mahmud, M. K. Mahat, Optimized preparation and characterization of CLEA–lipase from cocoa pod husk, *J. Biotechnol.* **202** (2015) 153–161.
- [267] M. P. G. Torres, M. L. Foresti, M. L. Ferreira, CLEAs of *Candida Antartica* lipase B (CALB) with a bovine serum albumin (BSA) cofeeder core: Study of their catalytic activity, *Biochem. Eng. J.* **90** (2014) 36–43.
- [268] H. Cabana, J. P. Jones, S. N. Agathos, Preparation and characterization of cross–linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals, *J. Biotechnol.* **132** (2007) 23–31.
- [269] L. Wilson, G. F. Lorente, R. F. Lafuente, A. Illanes, J. M. Guisan, J. M. Palomo, CLEAs of lipases and poly–ionic polymers: A simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties, *Enzym. Microb. Technol.* **39** (2006) 750–755.
- [270] D. Y. Xu, Z. Yang, Cross–linked tyrosinase aggregates for elimination of phenolic compounds from wastewater, *Chemosphere* **92** (2013) 391–398.

- [271] Q. Chang, G. Jiang, H. Tang, N. Li, J. Huang, L. Wu, Enzymatic removal of chlorophenols using horseradish peroxidase immobilized on superparamagnetic Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposite, *Chin. J. Catal.* **36** (2015) 961–968.
- [272] I. E. Touahar, L. Haroune, S. Ba, J. P. Bellenger, H. Cabana, Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of the pharmaceuticals, *Sci. Tot. Environ.* **481** (2014) 80–99.
- [273] Y. Liu, Z. Zeng, G. Zeng, L. Tang, Y. Pang, Z. Li, C. Liu, X. Lei, M. Wu, P. Ren, Z. Liu, M. Chen, G. Xie, Immobilisation of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and application in the removal of phenolic compounds, *Biores. Tehnol.* **115** (2012) 21–26.
- [274] V. V. Kumar, M. P. P. Kumar, K. V. Thiruvankadaravi, P. S. Kumar, S. Sivanesan, Preparation and characterization of porous cross-linked laccase aggregates for the decolorization of triphenyl and reactive dyes, *Biores. Technol.* **119** (2012) 28–34.
- [275] N. Ž. Šekuljica, N. Ž. Prlainović, J. R. Jovanović, A. B. Stefanović, S. Ž. Grbavčić, D. Ž. Mijin, Z. D. Knežević-Jugović, Immobilization of horseradish peroxidase by glutaraldehyde method and its application in decolorization of anthraquinone dye, *Hem. Ind.* doi:10.2298/HEMIND150220028S (2015).
- [276] M. Bilal, M. Asgher, M. Shahid, H. N. Bhatti, Characteristic features and dye degrading capability of agar-agar gel immobilized manganese peroxidase, *Int. J. Biol. Macromol.* doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.014 (2014).
- [277] A. M. Deshpande, S. Satyanarayan, Toxicity evaluation of through fish bioassay raw bulk drug industry wastewater after electrochemical treatment, *Iran. J. Environ. Health Sci. Eng.* **8** (2011) 373–380.
- [278] S. D. Ashrafi, S. Rezaei, H. Forootanfar, A. H. Mahvi, M. A. Faramarzi, The enzymatic decolorization and detoxification of synthetic dyes by the laccase from a soil-isolated ascomycete, *Paraconiothyrium variable*, *Inter. Biodeter. Biodegrad.* **85** (2013) 173–181.

- [279] M. R. da Silva, L. R. V. de Sa, C. Russo, E. Scio, V. S. F. Leitao, The use of the HRP in decolorization of reactive dyes and toxicological evaluation of their products, *Enzym. Res.* doi:10.4061/2010/703824 (2010).
- [280] M. C. Silva, A. D. Correa, M. T. S. P. Amorim, P. Parpot, J. A. Torres, P. M. B. Chagas, Decolorization of the phthalocyanine dye reactive blue 21 by turnip peroxidase and assessment of its oxidation products, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **77** (2012) 9–14.
- [281] Y. Verma, Acute toxicity assessment of textile dyes and textile and dye containing industrial effluents using *Daphnia magna* bioassay, *Toxicol. Ind. Health* **24** (2008) 491–500.
- [282] G. Milazzo, S. Caroli, *Tables of Standard Electrode Potentials*, John Wiley & Sons, Chichester, New York 1978.
- [283] M. Page, O. Niitsoo, Y. Itzhaik, D. Cahen, G. Hodes, Copper sulfide as a light absorber in wet-chemical synthesized extremely thin absorber (ETA) solar cells, *Energy Environ. Sci.* **2** (2009) 220–223.
- [284] S. B. Gadgil, R. Thangaraj, O. P. Agnihotri, Optical and solar selective properties of chemically sprayed copper sulphide films, *J. Phys. D: App. Phys.* **20** (1987) 112–115.
- [285] Y. Zhao, H. Pan, Y. Lou, X. Qiu, J. J. Zhu, C. Burda, Plasmonic Cu_{2-x}S nanocrystals: Optical and structural properties of copper-deficient copper(I) sulfides, *J. Amer. Chem. Soc.* **131** (2009) 4253–4261.
- [286] X. Zhenga, Z. Jin, H. Liu, Y. Wang, X. Wang, H. Du Single-phase and well-dispersed Cu_{1.75}S nanocrystals by ambient pressure diethylene glycol solution synthesis, *App. Surf. Sci.* **266** (2013) 39–45.
- [287] M. Lamache, D. Bauer, Anodic oxidation of cuprous sulfide and the preparation of nonstoichiometric copper sulfide, *Anal. Chem.* **51** (1979) 1320–1322.

- [288] Yu J. Yang, J. Zi, W. Li, Enzyme-free sensing of hydrogen peroxide and glucose at a CuS nanoflowers modified glassy carbon electrode, *Electrochim. Acta* **115** (2014) 126–130.
- [289] H. M Pathan, C. D Lokhand, Deposition of metal chalcogenide thin films by successive ionic layer adsorption and reaction (SILAR) method, *Bullet. Mater. Sci.* 27 (2004) 85–111.
- [290] C. Degrand, B. Limoges, A. M. Martre, B. Schöllhorn, Determination of horseradish peroxidase and a peroxidase-like iron porphyrin at a Nafion-modified electrode, *Analyst* **126** (2001) 887–891.

SPISAK SIMBOLA

A_0	apsorbanca u polaznom rastvoru pre početka reakcije	-
A_t	apsorbanca u rastvoru izmerena u određenom trenutku (t)	-
$\Delta A/\Delta t$	početna brzina reakcije	min^{-1}
A_{IE}	Aktivnost imobilisanog enzima	U
d_f	faktor razblaženja	-
$[D]_0$	početna koncentracije boje	mM
D_{mean}	srednji prečnik mezopora	nm
ΣE_{\pm}	polarizacija katode i anode	-
$[H_2O_2]_0$	početna koncentracije peroksida	mM
I	Jačina struje u kolu	A
K_{mD}	Mihaelisova konstanta za boju	mM
K_{m,H_2O_2}	Mihaelisova konstanta za peroksid	mM
K_{iD}	konstanta inhibicije za boju	mM
K_{i,H_2O_2}	konstanta inhibicije za peroksid	mM
P	snaga ćelije	W
Q_m	maksimalan kapacitet nosača za imobilizaciju	mg g^{-1}
ΣR	suma Omskih otpora u strujnom kolu	$\text{k}\Omega$
R_{ex}	spoljašnji otpor kola	$\text{k}\Omega$
R_{in}	unutrašnji otpor ćelije	$\text{k}\Omega$
S_{BET}	specifična površina	$\text{m}^2 \text{g}^{-1}$
U	napon ćelije	V
V_{max}	maksimalna brzina	mM min^{-1}
V_t	ukupna zapremina reakcione smeše	mL
V_{total}	ukupna zapremina pora	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
V_{meso}	zapremina mezopora	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$

v_0	početna brzina reakcije	mM min^{-1}
ε	molarni apsorpcioni koeficijent pirogalola	$\text{mmol}^{-1} \text{ L}$

BIOGRAFIJA AUTORA

Nataša Šekuljica rođena je 02.10.1987. godine u Zadru. Osnovu školu "Boško Palkovljević Pinki" završila je u Staroj Pazovi, a srednju medicinsku školu je završila u Zemunu 2006. godine. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2006/2007. godine. Diplomirala je na Tehnološko-metalurškom fakultetu, na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju 24.09.2010.godine, sa prosečnom ocenom studiranja 8,42. Završni rad na temu "Proizvodnja proteaze iz *Pseudomonas san-ai* i njena primena u detergentima" pod rukovodstvom mentora prof. Dr Zorice Knežević-Jugović odbranila je ocenom 10. Master rad na temu "Karakterizacija lipaza iz *Rhizopus oryzae* gajenim submerznim postupkom fermentacije" pod rukovodstvom istog mentora odbranila je 19.07.2011.godine ocenom 10. Po završetku redovnih studija, 25.10.2011. godine upisala je doktorske studije Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju. Položila je sve ispite predviđenim planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 9,45, kao i završni rad sa temom "Uklanjanje sintetičkih boja iz otpadnih voda peroksidazom iz rena" ocenom 10. Na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu u maju 2013. godine položila je ispit i stekla licencu Savetnik za hemikalije.

Od marta 2012. godine do oktobra 2014. godine angažovana je kao stipendista na projektu Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije br. III 46010, pod nazivom "Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti". Od oktobra 2014.godine zaposlena je u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta kao istraživač pripravnik na projektu "Elektrohemijska sinteza i karakterizacija nanostrukturiranih funkcionalnih materijala za primenu u novim tehnologijama" (ON 172046). U zvanje istraživač saradnik izabrana je 09.04.2015. godine.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а НАТАША ШЕКУЊИЋ
број индекса 4063/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ЕНЗИМСКО ОБЕЗБОЈАВАЊЕ АНТРАХИНОНСКИХ
БОЈА ИЗ ОТПАДНИХ ВОДА

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

Потпис докторанда

У Београду, 22.8.2016.

НШЕКУЊИЋ

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора Наташа Шекуљича
Број индекса 4063/2011
Студијски програм БИОХЕМИЈСКО ИНЖЕЊЕРСТВО И БИОТЕХНОЛОГИЈА
Наслов рада ЕНЗИМСКО ОБЕЗБОЈАЊАЊЕ АНТРАХИНОНСКИХ БОЈА
ИЗ ОТПАДНИХ ВОДА
Ментор Зорика Кнежевић-Јуковић

Потписани/а Наташа Шекуљича

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

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 22.8.2016.

Шекуљича

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Ензимско обезбољављање антрахинонских боја из отпадних вода

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 22.8.2016.

Жељко Ђукић