

# Imobilizacija enzima na ugljenične nanocevi

Nevena Ž. Prlainović, Dejan I. Bezbradica, Zorica D. Knežević-Jugović, Aleksandar D. Marinković, Petar S. Uskoković, Dušan Ž. Mijin

Tehnološko–metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

## Izvod

Nanocevi poseduju veliki potencijal primene u raznim oblastima nauke i inženjerstva. Velika mehanička čvrstoća, odlična termička i električna provodljivost, veliki odnos površine prema zapremini i minimalna difuziona ograničenja čine ih idealnim nosačima za imobilizaciju biomolekula kao što su proteini, antigeni, antitela, vitamini, hormoni, antibiotici i dr. U ovom radu opisane su tehnika adsorpcije i kovalentnog vezivanja enzima na nemodifikovane, oksidovane i amino funkcionalizovane ugljenične nanocevi. Takođe je opisan uticaj površine ugljeničnih nanocevi na strukturne promene enzima, kao i na promene u pogledu aktivnosti i stabilnosti.

**Ključne reči:** ugljenične nanocevi; imobilizacija enzima; adsorpcija; kovalentno vezivanje.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

PREGLEDNI RAD

UDK 66.097.3:546.26

*Hem. Ind.* 65 (4) 423–430 (2011)

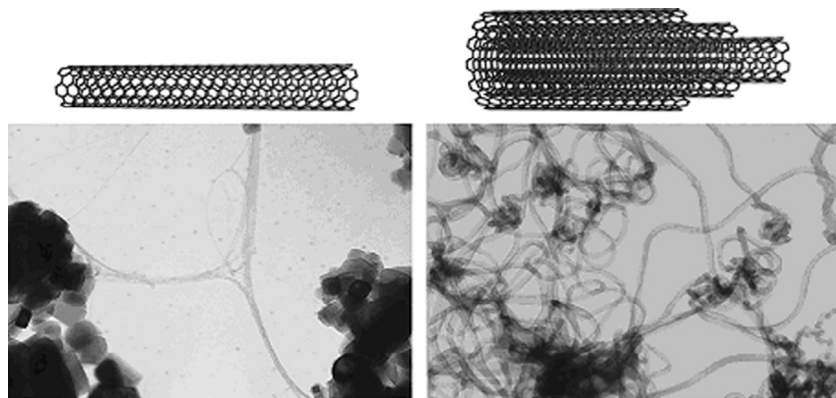
doi: 10.2298/HEMIND110330028P

Poslednjih decenija nanomaterijali, zbog jedinstvenih svojstava koja poseduju i širokog spektra mogućnosti primene, privlače veliku pažnju u mnogim oblastima nauke i inženjerstva. Mogu biti u vidu vlakana, žica, šipki, cevi, spirala ili prstenova. Ugljenične nanocevi (CNT) od njihovog otkrića 1991. godine [1], pa do danas jedan su od najproučavanijih materijala. Zbog svojih nanodimenzija, velike mehaničke čvrstoće, hemijske stabilnosti, termičke i električne provodljivosti nanocevi se koriste za proizvodnju biosenzora [2–4], skladištenje vodonika [5] i kao „nosači“ lekova [6]. Takođe se primenjuju u avio, tekstilnoj, elektronskoj kao i mnogim drugim industrijama [7–10]. Dele se na jednoslojne ugljenične nanocevi (eng. *single walled carbon nanotubes* – SWCNT), dvoslojne ugljenične nanocevi (eng. *double*

*walled carbon nanotubes* – DWCNT) i višeslojne ugljenične nanocevi (eng. *multi walled carbon nanotubes* – MWCNT) (slika 1). Uvid u njihovu strukturu omogućavaju savremeni mikroskopi kao što su transmisioni elektronski (TEM), skenirajući elektronski (SEM) i mikroskop atomskih sila (AFM).

CNT se mogu dobiti sledećim tehnikama: 1) električnim pražnjenjem [11], 2) hemijskom depozicijom iz parne faze (CVD) [12] i 3) laserskom ablacijom (LA) [13,14].

Enzimi su biološki katalizatori. Veoma su raznovrsni i sposobni da katalizuju različite reakcije. Velika specifičnost prema supstratu, kao i sposobnost da katalizuju samo određenu reakciju omogućavaju razdvajanja ravninskih smeša i dobijanje optički čistih jedinjenja [16].



Slika 1. Molekularni prikaz SWCNT (gore levo) i MWCNT (gore desno) sa tipičnim TEM mikrografima ispod [15].  
Figure 1. Molecular presentations of SWCNT (top left) and MWCNT (top right) with typical transmission electron micrographs (below) [15]. (Reprinted with permission from Oxford University Press).

Preписка: N. Prlainović, Tehnološko–metalurški fakultet, Karnegijeva 4, p. pr. 3503, 11120 Beograd, Srbija.  
E-pošta: nprlainovic@tmf.bg.ac.rs  
Rad primljen: 30. mart, 2011  
Rad prihvaćen: 28. maj, 2011

Međutim, visoka cena, nedovoljna stabilnost i nemogućnost ponovnog korišćenja ograničavaju upotrebu nativnih enzima kao katalizatora. Imobilizacija enzima je efikasan način da se, u određenoj meri, prevaziđu

ova ograničenja. Prva istraživanja o imobilizaciji enzima pojavila su se početkom druge polovine dvadesetog veka. Od tada pa do danas imobilisani sistemi našli su široku primenu u mnogim industrijskim granama i koriste se za dobijanje različitih proizvoda [17–19]. Da li će imobilisani enzim naći praktičnu primenu u najvećoj meri zavisi od upotrebljenog nosača [20]. Potrebno je da ima veliki kapacitet vezivanja enzima, da bude hemijski i mikrobiološki stabilan, da omogući lako izdvajanje imobilizata iz reakcione smeše, itd.

Širok dijapazon materijala, organskog ili neorganskog porekla, do sada je upotrebljavan kao nosač za imobilizaciju različitih enzima [21–34]. Poslednjih godina nanomaterijali postaju sve interesantniji u ovoj oblasti i veliki broj biomolekula je vezivan za nanocevi [35], nanočestice [36,37] i nanovlakna [38–40]. Svojsstva, kao što su maksimalna površina po jedinici mase, minimalna difuziona ograničenja, maksimalna količina vezanog enzima i visoka mehanička stabilnost, koje nanocevi poseduju, čine ih idealnim nosačima. Osim toga, dužina nanocevi omogućava njihovo lako odvajanje jednostavnom filtracijom, a to je svojstvo koje ostali nanomaterijali ne poseduju.

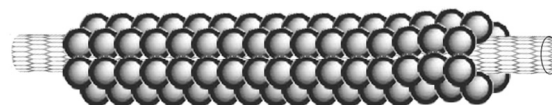
Glavni tehnički problem za praktičnu primenu ugljeničnih nanocevi u biomedicini i biotehnologiji je nedostatak rastvorljivosti u vodenoj sredini. Mogućnost hemijske modifikacije i funkcionalizacije njihove površine omogućava povećanje disperzibilnosti CNT u vodi, a time i primenu u fiziološkom okruženju. Pored disperzije oksidacijom pomoću kiselina, nekovalentne disperzije pomoću površinski aktivnih materija ili polimera, i funkcionalizacije hidrofobnim polimerima, modifikacija biološkim i bioaktivnim vrstama, kao što su ugljeni hidrati, nukleinske kiseline i proteini, predstavljaju načine kojima se povećava rastvorljivost CNT [41].

Cilj ovog rada je da se sumira dosadašnji napredak upotrebe ugljeničnih nanocevi kao nosača za imobilizaciju enzima, kao i da se predoče određeni nedostaci i prednosti kako adsorpcije tako i kovalentnog vezivanja.

## IMOBILIZACIJA ENZIMA ADSORPCIJOM NA UGLJENIČNE NANOCEVI

Adsorpcija enzima, pa i ostalih proteina, na ugljenične nanocevi je relativno jednostavan i jeftin način imobilizacije pri kojem ne dolazi do hemijske promene proteina i narušavanja jedinstvenih svojstava nanocevi (slika 2). Međutim, veliki problem pri projektovanju procesa predstavlja relativno mala stabilnost tako nastalih imobilizata zbog moguće desorpcije proteina sa nosača.

Tsang i saradnici su pre petnaestak godina prvi objavili mogućnost da se mali proteini kao što su metalotionein, citohrom C i  $\beta$ -laktamaza mogu adsorbovati na unutrašnje i spoljašnje strane ugljeničnih nanocevi [42,43]. Od tada je adsorpcija različitih proteina razmatrana u velikom broju radova [44–67] i razvijene su različite tehnike adsorpcije. Pregled enzima imobilisanih adsorpcijom na nanocevi dat je u tabeli 1.



Slika 2. Fizička adsorpcija enzima na ugljenične nanocevi.  
Figure 2. Physical adsorption of enzymes around CNTs.

$\beta$ -Laktamaza, kao prvi korišćeni enzim, adsorbovana je i na nemodifikovane i na oksidovane nanocevi [43]. Istraživanja su pokazala da je veća aktivnost enzima (19%) zadržana u slučaju adsorpcije na oksidovanu površinu. Ovo je najverovatnije posledica stvaranja vodoničnih veza karboksilnih grupa CNT sa polarnim amino-kiselinskim grupama enzima koje utiču na očuvanje strukture aktivnog centra. Nemodifikovana površina CNT znatno je hidrofobnija pa interakcije sa nepolarnim aminokiselinskim ostacima enzima dovode do strukturnih promena i inaktivacije.

Električna svojstva CNT čine ove materijale pogodnim za proizvodnju biosenzora. Radi toga veliki broj naučnika uspešno je adsorbovao glukozo-oksidadu (GOx)

Tabela 1. Enzimi imobilisani adsorpcijom na ugljenične nanocevi  
Table 1. Enzymes immobilized by adsorption onto carbon nanotubes

Enzim	Referenca	Masa vezanog enzima ( $\mu\text{g}$ enzima $\text{mg}^{-1}$ CNT)	Relativna aktivnost imobilizata, %
Amiloglukozidaza	60	564	–
$\alpha$ -Himotropsin	50	673	1
Citohrom C	42, 43, 45, 67	–	–
Glukozo oksidaza	46, 47, 63, 64	–	–
$\alpha$ -Glukozidaza	48	–	–
$\beta$ -Glukozidaza	51	630	20
Peroksidaza iz rena	57, 66	2250	98
Peroksidaza iz soje	50	575	28
Hidrogenaza	59	–	–
$\beta$ -Laktamaza	43	–	19
Lipaza	55, 58, 61	53,9	42
Lizozim	52	–	–

[46,47,63,64]. Azamian i saradnici su utvrdili da se posredstvom CNT značajno povećava prenos elektrona između GOx i elektrode i da se fizičkim vezivanjem, bilo na nemodifikovane ili oksidovane nanocevi, zadržava zadovoljavajuća aktivnost enzima [46]. Kasnije su Wang i saradnici utvrdili da se imobilizacijom GOx znatno poboljšava njena stabilnost i da je imobilisani enzim nakon mesec dana skladištenja zadržao 96,3% početne aktivnosti [47].

Od velikog značaja za aktivnost i stabilnost adsorbovanog enzima je uticaj površine ugljeničnih nanocevi na njegovu strukturu. Interakcije između površine CNT i enzima mogu biti veoma snažne. Pretežno su hidrofobne [52,55], kao posledica polarnih i aromatičnih aminokiselinskih ostataka, zatim mogu biti elektrostatičke [51], kao i vodonične veze [54]. Karajanagi i saradnici su bili prvi koji su proučavali uticaj površine CNT na strukturu i aktivnost enzima [50]. Adsorbovali su strukturno i funkcionalno različite enzime ( $\alpha$ -himotripsin, CT i peroksidazu iz soje, SBP) i utvrdili da je, kada enzim i CNT dođu u kontakt, adsorpcija spontana, da prati krivu prividnog zasićenja i da se gotovo maksimalna moguća količina enzima ( $575 \mu\text{g SBP mg}^{-1}$  CNT i  $673 \mu\text{g CT mg}^{-1}$  CNT) adsorbuje već posle jednog minuta. Međutim, FTIR spektroskopija je pokazala da postoje značajne promene u sekundarnoj strukturi ( $\alpha$ -heliks i  $\beta$ -nabrane ploče) što ima za posledicu veliki gubitak enzimске aktivnosti, od 99% za CT i 72% za SBP. Ove rezultate je interesantno uporediti za rezultatima do kojih su, nešto kasnije, došli Palwai i saradnici [57]. Oni su adsorbovali peroksidazu iz rena, HRP, pri čemu je vezano  $2250 \mu\text{g HRP mg}^{-1}$  CNT uz 98% zadržane biološke aktivnosti. Ove razlike mogu biti posledica različitih tehnika adsorpcije koje su primenjene, ali i razlika u karakteristikama samih enzima.

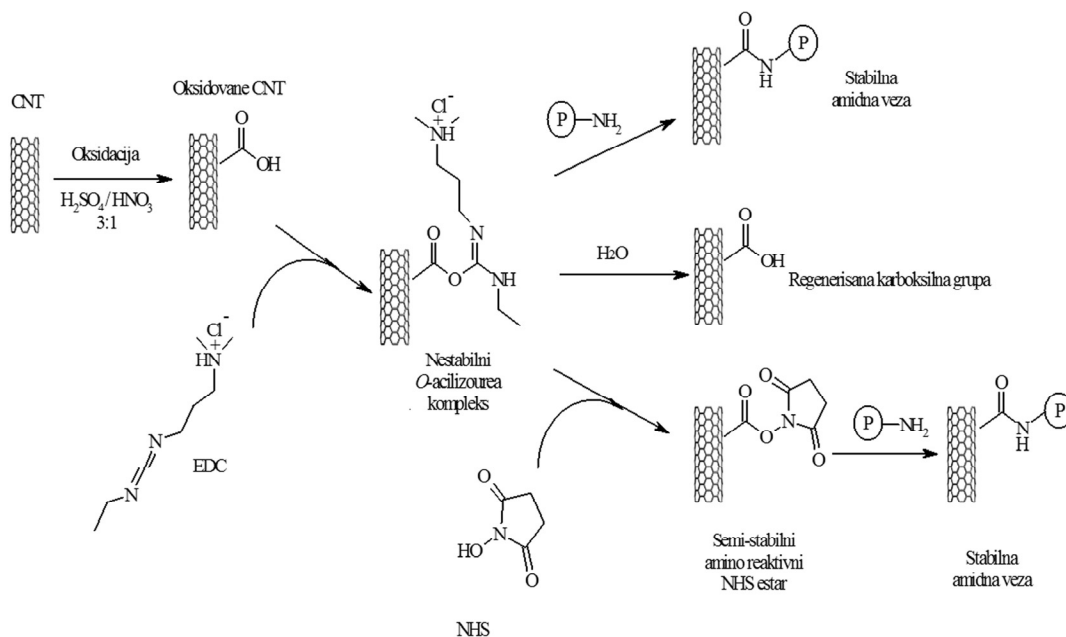
Hidrolitički enzimi, kao što su lipaze, uspešno su adsorbovane na ugljenične nanocevi [55,58,61]. Shah i saradnici [58] ustanovili su da je lipaza iz *Candida rugosa* nakon adsorpcije na CNT, u prisustvu goveđeg seruma albumina zadržala 97% biološke aktivnosti, dok su Pavlidis i saradnici [61] adsorpcijom lipaze na funkcionalizovane CNT, pored aktivnog, dobili i izuzetno stabilan imobilizat. Struktura aktivnog centra i specifičan mehanizam delovanja lipaza omogućavaju imobilizaciju na ugljenične nanocevi ne samo u vodenim rastvorima, već i u organskim rastvaračima i jonskim tečnostima. Najnovija istraživanja [62] pokazuju da se adsorpcijom u jonskim tečnostima na sobnoj temperaturi aktivnost imobilisane lipaze u odnosu na aktivnost nativne lipaze može povećati čak 6 puta.

#### IMOBILIZACIJA ENZIMA NA UGLJENIČNE NANOCEVI KOVALENTNIM VEZIVANJEM

Nedostatak jakih vezivnih sila može dovesti do desorpcije molekula enzima sa površine nosača. Na taj na-

čin dolazi do gubitka mase vezanog enzima i smanjenja stabilnosti imobilisanog preparata. Da bi se rešio ovaj problem enzim se za površinu ugljeničnih nanocevi vezuje stvaranjem pravih hemijskih veza. S obzirom na hemijsku inertnost CNT, bilo kakva kovalentna imobilizacija zahteva prethodnu hemijsku modifikaciju radi uvođenja funkcionalnih grupa na njihovu površinu. Najčešće su to karboksilne grupe zbog lakoće njihovog uvođenja i mogućnosti vezivanja sa amino grupama enzima. Kontrolom reaktanata i/ili reakcionih uslova može se kontrolisati položaj i gustina karboksilnih grupa na površini CNT, što se može iskoristiti za kontrolisanje položaja i gustine vezanog enzima [68]. Univerzalni način za kovalentno vezivanje enzima na oksidovane nanocevi je aktivacija diimidom. *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC) sa karboksilnim grupama CNT formira visoko reaktivni i nestabilni intermedijer koji sa amino grupom enzima formira stabilnu amidnu vezu. Istraživanja su, kao i u slučaju adsorpcije, započela vezivanjem proteina, poput albumina, streptavidina i feritina, kada su Huang i saradnici [69] objavili da posredstvom EDC-a dolazi do njihovog vezivanja. Međutim, u nedostatku kontrolnih eksperimenata ne može se sa sigurnošću tvrditi da se radi isključivo o kovalentnoj imobilizaciji. Lee i saradnici su nakon toga imobilisali peroksidazu i TEM i AFM mikrografima jasno potvrdili uspešnost vezivanja [70]. Utvrdili su da dodatno 10 mM EDC povećava efikasnost vezivanja za oko 20%, kao i da je, kada se on koristi, aktivnost imobilisanog enzima veća za oko 3 puta. Takođe su utvrdili da dolazi do značajnog proširenja pH optimuma, pa tako imobilisana peroksidaza, za razliku od nativne peroksidaze koja je najaktivnija na pH 7, maksimalnu aktivnost ispoljava u širokom pH opsegu od 4–9.

Da bi se povećala stabilnost nastalog intermedijera i sprečile intermolekulske interakcije EDC sa karboksilnim grupama proteina, imobilizacija se vrši u prisustvu *N*-hidroksisukcinimida (NHS) ili njegovog sulfo derivata (sulfo-NHS), u proceduri u dva koraka, kao što je prikazano na šemi 1. Za kovalentnu imobilizaciju enzima na CNT uglavnom se koristi ova tehnika [60,71–76]. Asuri i saradnici [71,74] objavili su da se  $172 \mu\text{g SBP}$ ,  $168 \mu\text{g}$  subtilizina,  $203 \mu\text{g}$  lipaze i čak  $1300 \mu\text{g HRP}$  može vezati na 1 mg CNT. Da bi dokazali da se radi o kovalentnom vezivanju kontrolne eksperimente su radili u odsustvu EDC/NHS i utvrdili da je procenat nespecifičnog vezivanja manji od 5%. Takođe su ispitali uticaj kovalentnog vezivanja na sekundarnu strukturu enzima, pri čemu je CD (cirkularni dihroizam) spektroskopija pokazala da je nakon imobilizacije zadržano oko 50–70% nativne strukture. Kovalentna imobilizacija u ovom slučaju pozitivno je uticala na termalnu i operacionu stabilnost i stabilnost pri skladištenju. Poluvreme života se, na primer, za lipazu produžilo 14 puta, dok je imobilisana SBP nakon stote upotrebe u šaržnom reaktoru



Šema 1. Šematski prikaz vezivanja proteina za oksidovane CNT pomoću EDC u prisustvu NHS.

Scheme 1. Schematic presentation of conjugation of proteins to carboxylated CNT using EDC in the presence of NHS.

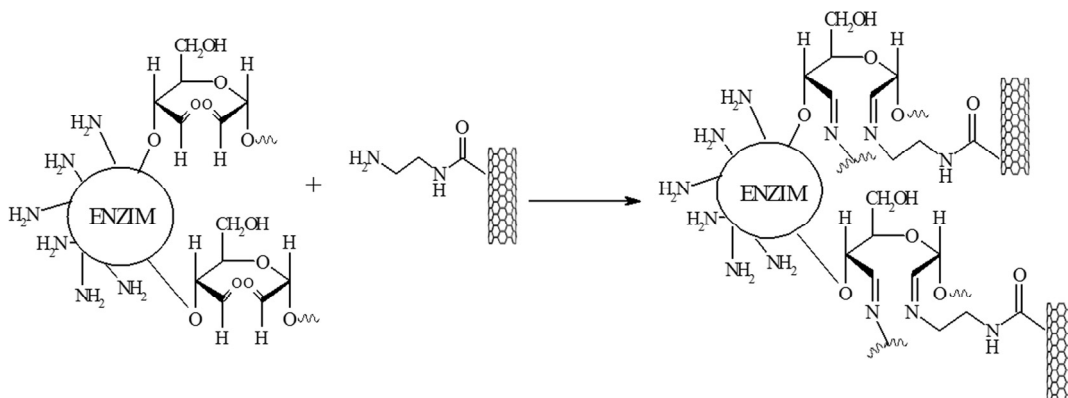
zadržala čak 70% aktivnosti, isto koliko je zadržala i nakon 30 dana skladištenja.

Kovalentnom imobilizacijom amiloglukozidaze na ugljenične nanocevi dolazi do narušavanja strukture i velikog gubitka aktivnosti nativnog enzima (97%). Ovakve promene u strukturi i aktivnosti mogu se objasniti formiranjem amidnih veza. Zbog toga su Cang-Rong i saradnici [60] pokušali da zamene položaj grupa kako bi sam proces imobilizacije imao što manji uticaj na aktivnost enzima (šema 2).

Pre procesa imobilizacije modifikovali su i enzim i oksidovane CNT. Oksidacijom pomoću perjodata uveli su karbonilne grupe na površinu enzima, a karboksilne grupe na površini ugljeničnih nanocevi modifikovali u amino grupe. Ispostavilo se da je ovim metodom došlo

do značajnog povećanja aktivnosti (56%), ali da se vezala manja količina enzima, 142 µg amiloglukozidaze po 1 mg CNT. Međutim, u ovom slučaju se mora uzeti u obzir funkcionalizacija ugljeničnih nanocevi u više koraka i pretpostavka da se sve prisutne karboksilne grupe nisu modifikovale u amino grupu.

Alonso-Lomillo i saradnici su pri imobilizaciji hidrogenaze imali nešto drugačiji pristup [77]. Najpre su na površini ugljeničnih nanocevi, jakim  $\pi$ - $\pi$  interakcijama, formirali mono sloj 4-nitrofenil grupa, a nitro grupe su u sledećem koraku redukovale u amino grupe. Dalje su imobilizaciju, stvaranjem amidnih veza između karboksilnih grupa enzima i amino grupa sa površine CNT, vršili pomoću EDC/NHS, kao što je ranije opisano.



Šema 2. Kovalentno vezivanje oksidovanog enzima na amino funkcionalizovane ugljenične nanocevi.

Scheme 2. Covalent immobilization of oxidized enzyme on amino-functionalized carbon nanotubes.

Ono što je bitno napomenuti, i što predstavlja prednost u odnosu na veoma jednostavnu tehniku adsorpcije, jeste povećanje termalne, operacione i stabilnosti pri skladištenju u slučaju kovalentnog vezivanja za površinu CNT (tabela 2). Čak i u slučaju velikog gubitka aktivnosti ova tehnika ima prednost jer pruža mogućnost ponovnog korišćenja imobilizata.

Tabela 2. Enzimi imobilisani kovalentnim vezivanjem na ugljenične nanocevi  
Table 2. Enzymes immobilized by covalent attachment onto carbon nanotubes

Enzim	Referenca	Masa vezanog enzima ( $\mu\text{g}$ enzima $\text{mg}^{-1}$ CNT)	Relativna aktivnost imobilizata, %
Amiloglukozidaza	60	290	–
Glukozo oksidaza	72	–	–
Peroksidaza iz rena	66, 70, 71, 73, 75	1300	49
Peroksidaza iz soje	71, 74	172	55
Hidrogenaza	77	–	–
Lipaza	74, 76, 78	203	58
Subtilizin	71, 74	168	54

## ZAKLJUČAK

Ugljenične nanocevi su važna klasa novih materijala. Poseduju brojna svojstva zbog kojih su korisne u tehnologiji i industriji. Pokazale su se kao dobar nosač za imobilizaciju enzima. Veliki odnos površine prema zapremini (oko  $300 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) obezbeđuje veliku količinu vezanog enzima, poseduju mogućnost uvođenja različitih funkcionalnih grupa na površinu i mogućnost formiranja više veza sa molekulom enzima. Aktivnosti imobilisanih enzima su uglavnom manje od aktivnosti nativnih, ali povećanje stabilnosti koje se postiže imobilizacijom kao i mogućnosti reciklacije nadoknađuju ovaj nedostatak. Dalji problemi se ogledaju u poteškoćama vezanim za industrijsku primenu posebno u okviru uvećanja razmera procesa. Uvođenje nosača nano dimenzija proširuje granice imobilizacije i otvara mogućnosti razvoja novih ekonomičnih postupaka. Eksponencijalni napredak u ovoj oblasti vrlo brzo će omogućiti razvoj komercijalnih imobilisanih enzima na bazi ugljeničnih nanocevi.

## Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije na finansijskoj pomoći u toku izrade ovog rada (projekti 172013, III 46010 i III 45019).

## LITERATURA

- [1] S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature* **354** (1991) 56–58.
- [2] B. Qiu, Z. Lin, J. Wang, Z. Chen, J. Chen, G. Chen, An electrochemiluminescent biosensor for glucose based on the electrochemiluminescence of luminol on the nafion/glucose oxidase/poly(nickel(II)tetrakisulfophthal-

cyanine)/multi-walled carbon nanotubes modified electrode, *Talanta* **78** (2009) 76–80.

- [3] J. Wang, Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review, *Electroanalysis* **17** (2005) 7–14.
- [4] S. Sotiropoulou, V. Gavalas, V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, Novel carbon materials in biosensor systems, *Biosens. Bioelectron.* **18** (2003) 211–215.
- [5] S.M. Lee, Y.H. Lee, Hydrogen storage in single-walled carbon nanotubes, *Appl. Phys. Lett.* **76** (2000) 2877–2879.
- [6] G. Pastorin, W. Wu, S. Wieckowski, J. Briand, K. Kostarelos, M. Prato, A. Bianco, Double functionalisation of carbon nanotubes for multimodal drug delivery, *Chem. Commun.* **11** (2006) 1182–1184.
- [7] A.R. Köhler, C. Som, A. Helland, F. Gottschalk, Studying the potential release of carbon nanotubes throughout the application life cycle, *J. Cleaner. Prod.* **16** (2008) 927–937.
- [8] R.H. Baughman, A.A. Zakhidov, W.A. de Heer, Carbon nanotubes—the route toward applications, *Science* **297** (2002) 787–792.
- [9] Z. Wu, Z. Chen, X. Du, J.M. Logan, J. Sippel, M. Nikolou, K. Kamaras, J.R. Reynolds, D.B. Tanner, A.F. Hebard, A.C. Rinzler, Transparent, Conductive carbon nanotube films, *Science* **305** (2004) 1273–1276.
- [10] E. Artukovic, M. Kaempgen, D.S. Hecht, S. Roth, G. Grüner, Transparent and flexible carbon nanotube transistors *Nano. Lett.* **5** (2005) 757–760.
- [11] V.N. Popov, Carbon nanotubes: properties and applications, *Mater. Sci. Eng. R.* **43** (2004) 61–102.
- [12] M. Jose-Yacamán, M. Miki-Yoshida, L. Rendon, J.G. Santiesteban, Catalytic growth of carbon microtubules with fullerene structure, *Appl. Phys. Lett.* **62** (1993) 202–204.
- [13] A. Thess, R. Lee, Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes, *Science* **273** (1996) 483–487.
- [14] H. Dai, Carbon Nanotubes: Synthesis, Integration, and Properties, *Acc. Chem. Res.* **35** (2002) 1035–1044.
- [15] K. Donaldson, R. Aitken, L. Tran, V. Stone, R. Duffin, G. Forrest, A. Alexander, Carbon Nanotubes: A review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety, *Toxicol. Sci.* **92** (2006) 5–22.
- [16] C.H. Wong, G.M. Whitesides, in *Tetrahedron Organic Chemistry Series, Enzymes in Synthetic Organic Chemis-*

- try, Vol. 12, 1<sup>st</sup> ed., J.E Baldwin, P.D Magnus (Eds.), Elsevier Science, Oxford, 1994.
- [17] J.F. Liang, Y.T. Li, V.C. Yang, Biomedical application of immobilized enzymes, *J. Pharm. Sci.* **89** (2000) 979–990.
- [18] P. Bajpai, Application of enzymes in the pulp and paper industry, *Biotechnol. Prog.* **15** (1999) 147–157.
- [19] A. Schmid, F. Hollman, J.B. Park, B. Buler, The use of enzymes in the chemical industry in Europe, *Curr. Opin. Biotechnol.* **13** (2002) 359–366.
- [20] E. Emregul, S. Sungur, U. Akbulut, Polyacrylamide–gelatine carrier system used for invertase immobilization, *Food chem.* **97** (2006) 591–597.
- [21] R.M. Blanco, P. Terreros, M. Fernández-Pérez, C. Otero, G. Díaz-González, Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts, *J. Mol. Catal. B* **30** (2004) 83–93.
- [22] G. Bayramoglu, M. Yilmaz, M.Y. Arica, Preparation and characterization of epoxy-functionalized magnetic chitosan beads: laccase immobilized for degradation of reactive dyes, *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **33** (2010) 439–448.
- [23] F.M. Gomes, E.B. Pereira, H.F. de Castro, immobilization of lipase on chitin and its use in nonconventional biocatalysis, *Biomacromolecules* **5** (2004) 17–23.
- [24] D. Mijin, V. Nikolić, M. Mišić-Vuković, D.V. Vuković, The kinetic behaviour of catalase immobilized on Amberlite IRA–410, *J. Serb. Chem. Soc.* **53** (1988) 625–630.
- [25] D.Ž. Mijin, M.M. Mišić-Vuković, G.V. Vunjak-Novaković, D.V. Vuković, Kinetic behaviour of lipase from *Candida cylindracea*, *J. Serb. Chem. Soc.* **58** (1993) 525–531.
- [26] Z. Knežević, Lj. Mojović, B. Adnađević, Immobilization of lipase on a hydrophobic zeolite type Y, *J. Serb. Chem. Soc.* **63** (1998) 257–264.
- [27] Z. Knežević, N. Milosavić, D. Bezbradica, Z. Jakovljević, R. Prodanović, Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment, *Biochem. Eng. J.* **30** (2006) 269–278.
- [28] M.G. Žuža, S.S. Šiler-Marinković, Z.D. Knežević-Jugović, Preparation and characterization of penicillin acylase immobilized on Sepabeads EC-EP carrier, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* **13** (2007) 205–210.
- [29] M.G. Žuža, S.S. Šiler-Marinković, Z.D. Knežević-Jugović, Immobilization of penicillin acylase from *Escherichia coli* on commercial Sepabeads EC-EP carrier, *Acta Per. Tech.* **38** (2007) 173–182.
- [30] Z.D. Knežević-Jugović, J.J. Damjanović, D.I. Bezbradica, D.Ž. Mijin, The immobilization of lipase on Sepabeads: characterization and application in geranyl butyrate synthesis in a low aqueous system, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* **14** (2008) 245–249.
- [31] Z.D. Knežević-Jugović, S.V. Šaponjić, D.I. Bezbradica, D.Ž. Mijin, Immobilization of lipase on Sepabeads and its application in pentyl octanoate synthesis in a low aqueous system, *Acta Per. Tech.* **39** (2008) 139–152.
- [32] D. Bezbradica, D. Mijin, M. Mihailović, Z. Knežević-Jugović, Microwave-assisted immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® supports, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84** (2009) 1642–1648.
- [33] Z. D. Knežević-Jugović, D.I. Bezbradica, D.Ž. Mijin, M.G. Antov, The immobilization of enzyme on Eupergit® supports by covalent attachment, *Methods Mol. Biol.* **679** (2011) 99–111.
- [34] N.Ž. Prlainović, Z.D. Knežević-Jugović, D.Ž. Mijin, D.I. Bezbradica, Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Sepabeads®: the effect of lipase oxidation by periodates, *Bioprocess Biosys. Eng.* **34** (2011) 803–810.
- [35] Y. Gao, I. Kyratzis, covalent immobilization of proteins on carbon nanotubes using the cross-linker 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide – a critical assessment, *Bioconjugate Chem.* **19** (2008) 1945–1950.
- [36] C.P. Govardhan, Crosslinking of enzymes for improved stability and performance, *Curr. Opin. Biotechnol.* **10** (1999) 331–335.
- [37] D. Häring, P. Schreier, Cross-linked enzyme crystals, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3** (1999) 35–38.
- [38] L. Wu, X. Yuan, J. Sheng, Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning, *J. Membr. Sci.* **250** (2005) 167–173.
- [39] B.C. Kim, S. Nair, J. Kim, J.H. Kwak, J.W. Grate, S.H. Kim, M.B. Gu, Preparation of biocatalytic nanofibres with high activity and stability via enzyme aggregate coating on polymer nanofibres, *Nanotechnology* **16** (2005) S382–S388.
- [40] K.N. Chua, W.S. Lim, P. Zhang, H. Lu, J. Wen, S. Ramakrishna, K.W. Leong, H.Q. Mao, Stable immobilization of rat hepatocyte spheroids on galactosylated nanofiber scaffold, *Biomaterials* **26** (2005) 2537–2547.
- [41] Y. Lin, S. Taylor, H. Li, K.A.S. Fernando, L. Qu, W. Wang, L. Gu, B. Zhou, Y.P. Sun, Advances toward bioapplications of carbon nanotubes, *J. Mater. Chem.* **14** (2004) 527–541.
- [42] Z. Guo, P.J. Sadler, S.C. Tsang, Immobilization and visualization of dna and proteins on carbon nanotubes, *Adv. Mater.* **10** (1998) 701–703.
- [43] J.J. Davis, M.L.H. Green, H.A.O. Hill, Y.C. Leung, P.J. Sadler, J. Sloan, A.V. Xavier, S.C. Tsang, The immobilisation of proteins in carbon nanotubes, *Inorg. Chim. Acta.* **272** (1998) 261–266.
- [44] F. Balavoine, P. Schultz, C. Richard, V. Mallouh, T.W. Ebbesen, C. Mioskowski, Helical crystallization of proteins on carbon nanotubes: a first step towards the development of new biosensors, *Angew. Chem., Int. Ed.* **38** (1999) 1912–1915.
- [45] R.J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, H. Dai, Noncovalent Side-wall Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes for Protein Immobilization, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 3838–3839.
- [46] B.R. Azamian, J.J. Davis, K.S. Coleman, C.B. Bagshaw, M.L.H. Green, Bioelectrochemical Single-Walled Carbon Nanotubes, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 12664–12665.
- [47] S.G. Wang, Q. Zhang, R. Wang, S.F. Yoon, J. Ahn, D.J. Yang, J.Z. Tian, J.Q. Li, Q. Zhou, Multi-walled carbon nanotubes for the immobilization of enzyme in glucose biosensors, *Electrochem. Commun.* **5** (2003) 800–803.
- [48] R.J. Chen, S. Bangsaruntip, K.A. Drouvalakis, N.W.S. Kam, M. Shim, Y. Li, W. Kim, P.J. Utz, H. Dai, Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100** (2003) 4984–4989.

- [49] N.Q. Jia, L.J. Wang, L. Liu, Q. Zhou, Z.Y. Jiang, Bamboo-like CNX nanotubes for the immobilization of hemoglobin and its bioelectrochemistry, *J. Phys. Chem., B* **108** (2004) 3760–3764.
- [50] S.S. Karajanagi, A.A. Vertegel, R.S. Kane, J.S. Dordick, Structure and Function of Enzymes Adsorbed onto Single-Walled Carbon Nanotubes, *Langmuir* **20** (2004) 11594–11599.
- [51] J.M. Gomez, M.D. Romero, T.M. Fernandez, Immobilization of  $\beta$ -Glucosidase on carbon nanotubes, *Catal. Lett.* **101** (2005) 275–278.
- [52] K. Matsuura, T. Sait, T. Okazaki, S. Ohshima, M. Yumura, S. Iijima, Selectivity of water-soluble proteins in single-walled carbon nanotube dispersions, *Chem. Phys. Lett.* **429** (2006) 497–502.
- [53] L. Song, J. Meng, J. Zhong, L.F. Liu, X.Y. Dou, D.F. Liu, X.W. Zhao, S.D. Luo, Z.X. Zhang, Y.J. Xiang, H.Y. Xu, W.Y. Zhou, Z.Y. Wu, S.S. Xie, Human fibrinogen adsorption onto single-walled carbon nanotube films, *Colloids Surf. B* **49** (2006) 66–70.
- [54] X.J. Li, W. Chen, Q.W. Zhan, L.M. Dai, L.Sowards, M. Pender, R.R. Naik, Direct measurements of interactions between polypeptides and carbon nanotubes, *J. Phys. Chem., B* **110** (2006) 12621–12625.
- [55] S.S. Karajanagi, H.C. Yang, P. Asuri, E. Sellitto, J.S. Dordick, R.S. Kane, Protein-assisted solubilization of single-walled carbon nanotubes, *Langmuir* **22** (2006) 1392–1395.
- [56] P. Asuri, S.S. Karajanagi, H. Yang, T.J. Yim, Increasing Protein Stability through Control of the Nanoscale Environment, *Langmuir* **22** (2006) 5833–5836.
- [57] N.R. Palwai, D.E. Martyn, L.F.F. Neves, Y. Tan, D.E. Resasco, R.G. Harrison, Retention of biological activity and near-infrared absorbance upon adsorption of horseradish peroxidase on single-walled carbon nanotubes, *Nanotechnology* **18** (2007) 235601 (5 pp).
- [58] S. Shah, K. Solanki, M.N. Gupta, Enhancement of lipase activity in non-aqueous media upon immobilization on multi-walled carbon nanotubes, *Chem. Cent. J.* **1** (2007) 30–35.
- [59] A.R. Liu, T. Wakayama, C. Nakamura, J. Miyake, N.A. Zorin, D.J. Qian, Electrochemical properties of carbon nanotubes-hydrogenase conjugates *Langmuir-Blodgett* films, *Electrochim. Acta.* **52** (2007) 3222–3228.
- [60] J.T. Cang-Rong, G. Pastorin, The influence of carbon nanotubes on enzyme activity and structure: investigation of different immobilization procedures through enzyme kinetics and circular dichroism studies, *Nanotechnology* **20** (2009) 255102 (20 pp).
- [61] I.V. Pavlidis, T. Tsoufis, A. Enotiadis, D. Gournis, H. Stamatidis, Functionalized Multi-Wall Carbon Nanotubes for Lipase Immobilization, *Adv. Eng. Mater.* **12** (2010) B179–B183.
- [62] H.K. Lee, J.K. Lee, M.J. Kim, C.J. Lee, immobilization of lipase on single walled carbon nanotubes in ionic liquid, *Bull. Korean Chem. Soc.* **31** (2010) 650–652.
- [63] A. Guiseppi-Elie, C.H. Lei, R.H. Baughman, Direct electron transfer of glucose oxidase on carbon nanotubes, *Nanotechnology* **13** (2002) 559–564.
- [64] S. Sotiropoulou, N.A. Chaniotakis, Carbon nanotube array-based biosensor, *Anal. Bioanal. Chem.* **375** (2003) 103–105.
- [65] S. Chen, R. Yuan, Y. Chai, L. Zhang, N. Wang, X. Li, Amperometric third-generation hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of hemoglobin on multiwall carbon nanotubes and gold colloidal nanoparticles, *Biosens. Bioelectron.* **22** (2007) 1268–1274.
- [66] X. Yu, D. Chattopadhyay, I. Galeska, F. Papadimitrakopoulos, J.F. Rusling, Peroxidase activity of enzymes bound to the ends of single-wall carbon nanotube forest electrodes, *Electrochem. Commun.* **5** (2003) 408–411.
- [67] S. Boussaad, N.J. Tao, R. Zhang, T. Hopson, L.A. Nagahara, In situ detection of cytochrome c adsorption with single walled carbon nanotube device, *Chem. Commun.* **13** (2003) 1502–1503.
- [68] K. Jiang, L.S. Schadler, R.W. Siegel, X. Zhang, H. Zhang, M. Terrones, Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation, *J. Mater. Chem.* **14** (2004) 37–39.
- [69] W.J. Huang, S. Taylor, K.F. Fu, Y. Lin, D.H. Zhang, T.W. Hanks, A.M. Rao, Y.P. Sun, Attaching Proteins to Carbon Nanotubes via Diimide-Activated Amidation, *Nano Lett.* **2** (2002) 311–314.
- [70] Y.M. Lee, O.Y. Kwon, Y.J. Yoon, K. Ryu, Immobilization of horseradish peroxidase on multi-wall carbon nanotubes and its electrochemical properties, *Biotechnol. Lett.* **28** (2006) 39–43.
- [71] P. Asuri, S.S. Bale, R.C. Pangule, D.A. Shah, R.S. Kane, J.S. Dordick, Structure, Function, and Stability of Enzymes Covalently Attached to Single-Walled Carbon Nanotubes, *Langmuir* **23** (2007) 12318–12321.
- [72] Y.H. Lin, F. Lu, Y. Tu, Z.F. Ren, Glucose biosensors based on carbon nanotube nanoelectrode ensembles, *Nano Lett.* **4** (2004) 191–195.
- [73] X. Yu, S.N. Kim, F. Papadimitrakopoulos, J.F. Rusling, Protein immunosensor using single-wall carbon nanotube forests with electrochemical detection of enzyme labels, *Mol. Biosyst.* **1** (2005) 70–78.
- [74] P. Asuri, S.S. Karajanagi, E. Sellitto, D.Y. Kim, R.S. Kane, J.S. Dordick, Water-soluble carbon nanotube-enzyme conjugates as functional biocatalytic formulations, *Biotechnol. Bioeng.* **95** (2006) 804–811.
- [75] X. Yu, B. Munge, V. Patel, G. Jensen, A. Bhirde, J.D. Gong, S.N. Kim, J. Gillespie, J.S. Gutkind, F. Papadimitrakopoulos, J.F. Rusling, carbon nanotube amplification strategies for highly sensitive immunodetection of cancer biomarkers, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 11199–11205.
- [76] P. Ji, H. Tan, X. Xu, W. Feng, Lipase Covalently Attached to Multiwalled Carbon nanotubes as an efficient catalyst in organic solvent, *Am. Inst. Chem. Eng. J.* **56** (2010) 3005–3011.
- [77] M.A. Alonso-Lomillo, O. Rudiger, A. Maroto-Valiente, M. Velez, I. Rodriguez-Ramos, F.J. Munoz, V.M. Fernandez, A.L. De Lacey, Hydrogenase-coated carbon nanotubes for efficient H<sub>2</sub> oxidation, *Nano Lett.* **7** (2007) 1603–1608.
- [78] Q. Shi, D. Yang, Y. Su, J. Li, Z. Jiang, Y. Jiang, W. Yuan, Covalent functionalization of multi-walled carbon nanotubes by lipase, *J. Nanopart. Res.* **9** (2007) 1205–1210.

## SUMMARY

### IMMOBILIZATION OF ENZYMES ONTO CARBON NANOTUBES

Nevena Ž. Prlainović, Dejan I. Bezbradica, Zorica D. Knežević-Jugović, Aleksandar D. Marinković, Dušan Ž. Mijin

*Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia*

(Review paper)

The discovery of carbon nanotubes (CNTs) has opened a new door in nanotechnology. With their high surface area, unique electronic, thermal and mechanical properties, CNTs have been widely used as carriers for protein immobilization. In fact, carbon nanotubes present an ideal support system without diffusional limitations, and also have the possibility of surface covalent functionalization. It is usually the oxidation process that introduces carboxylic acid groups. Enzymes and other proteins could be adsorbed or covalently attached onto carbon nanotubes. Adsorption of enzyme is a very simple and inexpensive immobilization method and there are no chemical changes of the protein. It has also been found that this technique does not alter structure and unique properties of nanotubes. However, a major problem in process designing is the relatively low stability of immobilized protein and desorption from the carrier. On the other hand, while covalent immobilization provides durable attachment, the oxidation process can reduce mechanical and electronic properties of carbon nanotubes. It can also affect the active site of enzyme and cause the loss of enzyme activity. Bioimmobilization studies have showed that there are strong interactions between carbon nanotubes surface and protein. The retention of enzyme structure and activity is critical for their application and it is of fundamental interest to understand the nature of these interactions. Atomic force microscopy (AFM), transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM) and circular dichroism (CD) spectroscopy provide an insight into the structural changes that occur during the immobilization. The aim of this paper is to summarize progress of protein immobilization onto carbon nanotubes.

*Keywords:* Carbon nanotubes • Enzyme immobilization • Adsorption • Covalent attachment