

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Jelena M. Bebić

**IMOBILIZACIJA LAKAZE ZA PRIMENU U
RAZGRADNJI ORGANSKIH ZAGAĐUJUĆIH
MATERIJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Jelena M. Bebić

**LACCASE IMMOBILIZATION FOR
APPLICATION IN ORGANIC POLLUTANTS
DEGRADATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

MENTOR:

Dr Dejan Bezbradica, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Ljiljana Mojović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Aleksandar Marinković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Milica Simović, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Katarina Banjanac, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Inovacioni centar
Tehnološko-metalurškog fakulteta

Dr Jelena Rusmirović, naučni saradnik
Vojnotehnički institut u Beogradu

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova disertacija urađena je na Katedri za Biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, kao i u Direkciji za mere i dragocene metale.

Sa posebnim zadovoljstvom zahvaljujem se svom mentoru, profesoru dr Dejanu Bezbradici na pruženoj pomoći u izboru teme, kao i u velikoj stručnoj pomoći u svim segmentima ovog naučno-istraživačkog rada i konačno, pisanju same disertacije.

Zahvaljujem se kolektivu Direkcije za mere i dragocene metale, na finansijskoj i tehničkoj pomoći u realizaciji ove disertacije i svim kolegama, kako bivšim, tako i sadašnjim, na pruženoj podršci u radu.

Svim koleginicama i kolegama sa Katedre za Biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju, Katedre za organsku hemiju, kao i zaposlenim u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta, zahvaljujem na pomoći u eksperimentalnom radu.

Konačno, prijatna mi je dužnost da se zahvalim svima koji su, svako na svoj način, doprineli izradi ovoga rada, kolegama, prijateljima i porodici, koji su me podržavali i pomogli mi da istrajem u ovoj zamisli, do kraja.

IMOBILIZACIJA LAKAZE ZA PRIMENU U RAZGRADNJI ORGANSKIH ZAGAĐUJUĆIH MATERIJA

REZIME

U okviru ove disertacije, izvršeno je ispitivanje mogućnosti razgradnje različitih organskih zagađujućih materija, od kojih 9 iz klase organohlornih pesticida i 4 industrijske boje, lakazama iz *Myceliophthora thermophila* sa ekspresijom u *Aspergillus oryzae* (Novozym® 51003) i iz *Trametes versicolor*, kako slobodnim, tako i imobilisanim.

Imobilizacija lakaza je vršena na neporozne nanočestice amino-funkcionalizovane nanosilike (AFNS); porozne nekomercijalne organske nosače od prirodnog materijala, odnosno dve vrste amino-modifikovanih ligninskih mikrosfera (A-LMS) i 8 komercijalno dostupnih Lifetech™ organskih, sintetskih, poroznih nosača.

Primenjene metode imobilizacije bile su adsorpcija i kovalentna imobilizacija, a za sve dobijene imobilisane preparate najboljih karakteristika, iz navedenih grupa nosača, izvršena je optimizacija imobilizacije i ispitana je njihova primena u više ponovnih upotreba u razgradnji izabраниh zagađivača.

Kod svih ispitanih pesticida detektovana je razgradnja lakazom, a najveći stepen degradacije postignut je kod lindana, koji je korišćen kao supstrat u daljim ispitivanjima.

Lakaza imobilisana na AFNS razgrađivala je lindan većom brzinom od slobodne, uz očuvanje aktivnosti, a lakaza imobilisana na A-LMS_5 imala je produženu aktivnost i degradacija lindana bila je efikasnija nego u slučaju slobodne lakaze ili lakaze imobilisane na AFNS.

Iz serije Lifetech™ nosača, najbolje karakteristike pokazao je imobilisani preparat sa epoksi/butil metakrilatnim nosačem, koji je uspešno primenjen u razgradnji industrijskih boja, sa postignutim gotovo potpunim obezbojenjem uzoraka.

Svi dobijeni rezultati potvrđuju velike mogućnosti primene imobilizacije lakaze, na različite kategorije nosača, u bioremedijaciji, za razgradnju organskih zagađujućih materija.

Ključne reči: lakaza, organske zagađujuće materije, imobilizacija, pesticidi, industrijske boje, bioremedijacija

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

LACCASE IMMOBILIZATION FOR APPLICATION IN ORGANIC POLLUTANTS DEGRADATION

ABSTRACT

In this thesis, the possibility of various organic pollutants degradation was investigated, 9 belonging to organochlorine pesticides class and 4 industrial dyes, by laccase from *Myceliophthora thermophila* expressed in *Aspergillus oryzae* (Novozym® 51003) and from *Trametes versicolor*, both free and immobilized.

Laccase immobilization was performed onto non-porous amino-functionalized nanosilica (AFNS); porous non-commercial organic supports made of natural material - two types of amino-modified lignin microspheres (A-LMS) and 8 commercial Lifetech™ organic, synthetic, porous supports.

The applied immobilization methods were adsorption and covalent immobilization. For all obtained immobilized preparations of the best characteristics, of different groups of supports, immobilization optimization was performed. Their application in several repeated uses in selected pollutants degradation was examined.

Degradation by laccase was detected for all pesticides investigated. The highest degradation rate was achieved with lindane, which was used as a substrate in following experiments.

Laccase immobilized on AFNS degraded lindane more rapid than free laccase, while preserving activity. Laccase immobilized on A-LMS_5 demonstrated prolonged activity, with more efficient lindane degradation than by free laccase or laccase immobilized onto AFNS.

From the series of Lifetech™ supports, the immobilized preparation with epoxy/butyl methacrylate support demonstrated best characteristics, and was successfully applied in the degradation of industrial dyes, with almost complete decolorization of the samples.

All obtained results confirm the vast possibilities of laccase immobilization onto different types of supports application, in bioremediation, for the organic pollutants degradation.

Keywords: laccase, organic pollutants, immobilization, pesticides, industrial dyes, bioremediation

Scientific field: Technological engineering

Scientific subfield: Biochemical engineering and biotechnology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO.....	4
2.1. Lakaza	4
2.1.1. Otkriće lakaza, prirodni izvori i funkcija u ćeliji.....	4
2.1.2. Svojstva lakaze	7
2.1.2.1. Klasifikacija lakaza	7
2.1.2.2. Strukturne karakteristike lakaza i katalitički mehanizam	8
2.1.2.2.1. Molekulska masa i dimenzije lakaza	8
2.1.2.2.2. Hemijska struktura lakaza.....	9
2.1.2.2.3. Redoks potencijal lakaza.....	14
2.1.2.3. Aktivni centar i katalitički ciklus lakaze	15
2.1.2.4. Katalitičke konstante lakaza.....	19
2.1.2.5. Inhibitori lakaza	20
2.1.3. Medijator sistemi lakaza (LMS)	20
2.1.4. Heterologna proizvodnja lakaza	22
2.1.5. Karakterizacija lakaza	22
2.1.6. Primena lakaza u industriji	23
2.1.6.1. Primena lakaza u tekstilnoj industriji	24
2.1.6.2. Primena lakaza u razgradnji PAH-ova.....	24
2.1.6.3. Primena lakaza u papirnoj industriji	25
2.1.6.4. Primena lakaza u prehrambenoj industriji.....	26
2.1.6.5. Primena lakaza za biosenzore i dijagnostiku.....	26
2.1.6.6. Primena lakaza u medicini i ličnoj nezi	27
2.2. Imobilizacija enzima.....	28
2.2.1. Pojam imobilizacije enzima.....	28
2.2.2. Metode imobilizacije enzima	29
2.2.2.1. Kovalentna imobilizacija	30
2.2.2.2. Adsorpcija enzima na čvrste nosače	31
2.2.3. Karakteristike i klasifikacija nosača za imobilizaciju enzima.....	32

2.2.3.1. Karakteristike nosača	32
2.2.3.2. Morfološka klasifikacija nosača	33
2.2.3.3. Hemijska klasifikacija nosača.....	33
2.2.3.4. Lifetech™ nosači	34
2.2.3.4.1. Epoksi-aktivirane smole	36
2.2.3.4.2. Amino-aktivirane smole	36
2.2.3.4.3. Oktadecil-aktivirani nosači	37
2.2.3.4.4. Smole za jonsku imobilizaciju enzima.....	38
2.2.3.5 Amino-funkcionalizovana nanosilika (AFNS)	38
2.2.3.5.1. Nanočestice silike	39
2.2.3.5.2. Hemijski modifikovane nanočestice silike.....	41
2.2.3.6. Amino-modifikovane ligninske mikrosfere (A-LMS)	43
2.2.3.6.1. Amino-modifikovane ligninske mikrosfere A-LMS_5 i A-LMS_10	46
2.2.4. Osnovne karakteristike slobodnih i imobilisanih enzima	47
2.2.4.1. Aktivnost enzima i jedinice u kojima se izražava	47
2.2.4.2. Specifičnost i stabilnost.....	48
2.2.4.3. Karakteristike imobilisanih enzima	49
2.3. Organske zagađujuće materije i primena lakaza u njihovom uklanjanju	50
2.3.1. Organske zagađujuće materije.....	51
2.3.1.1. Dugotrajne organske zagađujuće supstance (POPs)	52
2.3.1.2. Organohlorni pesticidi.....	54
2.3.1.2.1. Dihlor-difenil-trihloretan (DDT) i dihlor-difenil-dihloretan (DDD)	56
2.3.1.2.2. Metoksihlor.....	57
2.3.1.2.3. Aldrin i dieldrin.....	58
2.3.1.2.4. Endosulfan.....	59
2.3.1.2.5. Heptahlor i heptahlorepoksid.....	60
2.3.1.2.6. Lindan	61
2.3.1.3. Industrijske boje.....	62
2.3.1.3.1. Antrahinonske boje	64
2.3.1.3.2. Sulfonftaleinske boje	65
2.3.2. Primena lakaza u uklanjanju odabranih organskih zagađujućih materija	66

2.3.2.1. Primena lakaza u detoksikaciji i dekontaminaciji otpada i bioremedijaciji	66
2.3.2.2. Primena lakaza u obezbojavanju boja.....	66
3. EKSPERIMENTALNI DEO	68
3.1. Materijali i oprema	68
3.2. Metode.....	72
3.2.1. Modifikacija nosača - pirogenih nanočestica silike.....	72
3.2.2. Imobilizacija lakaze	72
3.2.2.1. Imobilizacija lakaze na amino-funkcionalizovanu nanosiliku (AFNS)	72
3.2.2.2. Imobilizacija lakaze na amino-modifikovane ligninske mikrosfere A-LMS.....	73
3.2.2.3. Imobilizacija lakaze na Lifetech™ nosače	73
3.2.3. Određivanje aktivnosti lakaze	74
3.2.3.1. Određivanje aktivnosti lakaze oksidacijom ABTS-a.....	74
3.2.3.2. Određivanje aktivnosti lakaze oksidacijom siringaldazina.....	77
3.2.4. Određivanje koncentracije proteina.....	79
3.2.4.1. Metoda po Bredfordu.....	79
3.2.4.1.1. Priprema Bredfordovog reagensa i određivanje standardne krive	79
3.2.4.1.2. Određivanje koncentracije proteina kod imobilizacije lakaze na AFNS	81
3.2.4.1.3. Određivanje koncentracije proteina kod imobilizacije lakaze na A-LMS	82
3.2.4.1.4. Određivanje koncentracije proteina kod imobilizacije lakaze na Lifetech™ ECR seriju nosača	82
3.2.5. Desorpcija lakaze	82
3.2.5.1. Desorpcija lakaze imobilisane na A-LMS_5.....	83
3.2.5.2. Desorpcija lakaze imobilisane na Lifetech™ ECR8285F	83
3.2.6. GC-MS analiza razgradnje pesticida.....	83
3.2.6.1. Parametri primenjenih GC-MS metoda.....	84
3.2.6.2. Priprema uzoraka za GC-MS analizu metodom 1	85
3.2.6.3. Priprema uzoraka za GC-MS analizu metodom 2	85
3.2.7. Spektrofotometrijska analiza razgradnje industrijskih boja	86
3.2.8. Ispitivanje ponovne upotrebe imobilisanih preparata lakaze.....	86
3.2.8.1. Ispitivanje ponovne upotrebe lakaze imobilisane na AFNS	87
3.2.8.2. Ispitivanje ponovne upotrebe lakaze imobilisane na ECR8285F	87

4. REZULTATI I DIKUSIJA	87
4.1. Karakterizacija lakaze iz <i>Myceliophthora thermophila</i> sa ekspresijom u <i>Aspergillus oryzae</i> (Novozym® 51003).....	88
4.1.1. Uticaj pH na aktivnost lakaze	88
4.1.2. Određivanje izoelektrične tačke lakaze	89
4.2. Razgradnja organohlornih pesticida slobodnom lakazom.....	90
4.2.1. Razgradnja dihlor-difenil-etana.....	91
4.2.1.1. Razgradnja DDT-a i DDD-a	91
4.2.1.2. Razgradnja metoksilora.....	95
4.2.2. Razgradnja hlorovanih ciklodiena	97
4.2.2.1. Razgradnja aldrina i dieldrina	97
4.2.2.2. Razgradnja endosulfana I i II	100
4.2.2.3. Razgradnja heptahloro i heptahlorepoksida.....	102
4.2.3. Razgradnja hlorovanih cikloheksana.....	106
4.2.3.1. Razgradnja lindana.....	106
4.2.4. Izbor organohlornog pesticida za dalje eksperimente	108
4.3. Imobilizacija lakaze na AFNS	109
4.3.1. Uticaj pH na proces imobilizacije	110
4.3.2. Ispitivanje kinetike adsorpcije	113
4.3.3. Ispitivanje aktivnosti lakaze imobilisane na AFNS	117
4.4. Razgradnja lindana lakazom imobilisanom na AFNS	119
4.4.1. Ispitivanje ponovne upotrebe lakaze imobilisane na AFNS_u razgradnji lindana.....	121
4.5. Imobilizacija lakaze na amino-modifikovane ligninske mikrosfere (A-LMS)	122
4.5.1. Karakterizacija i izbor nosača	123
4.5.2. Imobilizacija lakaze na A-LMS_5	126
4.5.2.1. Ispitivanje kinetike adsorpcije	126
4.5.2.2. Ispitivanje aktivnosti lakaze imobilisane na A-LMS_5	128
4.5.2.3. Analiza mehanizma imobilizacije enzima na A-LMS_5	130
4.6. Razgradnja lindana lakazom imobilisanom na A-LMS_5	132
4.7. Imobilizacija lakaze na Lifetech™ nosače	133
4.7.1. Imobilizacija na amino-funkcionalizovane nosače	134
4.7.1.1. Izbor nosača.....	134

4.7.1.2. Imobilizacija lakaze na Lifetech™ ECR8309F	136
4.7.1.2.1. Uticaj pH na proces imobilizacije	136
4.7.1.2.2. Uticaj vremena imobilizacije	137
4.7.1.2.3. Ispitivanje aktivnosti lakaze imobilisane na Lifetech™ ECR8309F	138
4.7.2. Imobilizacija na hidrofobne i epoksidne nosače	139
4.7.2.1. Izbor nosača	139
4.7.2.1.1. Ispitivanje aktivnosti lakaze imobilisane na Lifetech™ ECR8285F	141
4.7.2.1.2. Analiza mehanizma imobilizacije enzima na Lifetech™ ECR8309F	143
4.8. Razgradnja industrijskih boja lakazom imobilisanom na Lifetech™ ECR8285F	144
4.8.1. Ispitivanje ponovne upotrebe lakaze imobilisane na Lifetech™ ECR8285F u razgradnji industrijskih boja	145
5. ZAKLJUČAK	148
6. LITERATURA	151

1. UVOD

Enzim lakaza (EC 1.10.3.2) iz grupe oksidoreduktaza, katalizuje reakciju oksidacije različitih aromatičnih i nearomatičnih jedinjenja. Producenti lakaza su pretežno gljive, ali se enzim može naći i u nekim bakterijama, insektima, čak i višim biljkama, a njegovo poreklo u velikoj meri definiše i njegove osnovne karakteristike i strukturu.

Osobina lakaza, koja ih čini interesantnim enzimima za potencijalnu industrijsku primenu je njihova niska specifičnost prema supstratu. Lakaze uspešno razgrađuju organske supstrate, odnosno fenole, aromatična tiolna jedinjenja, aniline, i mnoga druga jedinjenja, što pruža mogućnost njihove upotrebe i u bioremedijaciji, odnosno odnošenju uklanjanju organskih zagađujućih materija.

Organske zagađujuće materije su složena hemijska jedinjenja, otporna na biološku, hemijsku i fotolitičku degradaciju veoma široko rasprostranjena u životnoj sredini, usled čega se narušava njen kvalitet, a ulazeći u lanac ishrane, takođe i zdravlje ljudi. Ova jedinjenja podeljena su u više grupa, na osnovu fizičko-hemijskih osobina, a korišćena su u različite svrhe. Najveće koncentracije pomenutih zagađivača mogu se naći u zemljištu i sedimentima, zbog njihove relativno slabe rastvorljivosti u vodi. Toksična su i u vrlo niskim koncentracijama, a usled umerene isparljivosti, mogu se naći na područjima gde nikada nisu ni bila korišćena.

Iako je njihova proizvodnja i upotreba u većini zemalja sveta zabranjena ili kontrolisana i strogo zakonski regulisana, njihovo prisustvo je i dalje dokazano u svim delovima životne sredine, pa i u hrani. Potencijalni izvori organskih zagađivača su: neodgovarajuća primena pesticida, industrijske otpadne vode ili veća izlivanja, deponije, otpadne vode iz naftne industrije i drugi. U zakonskoj regulativi Republike Srbije, većina ovih zagađivača spadaju u dugotrajne organske zagađujuće supstance, odnosno perzistentne organske polutante, od kojih pojedini, kao na primer pesticidi, predstavljaju prioritetne organske zagađujuće supstance.

Da bi se enzimi, pa tako i lakaza, mogli široko primenjivati u bioremedijaciji, mora se obezbediti njihova stabilnost pod najčešće nepovoljnim procesnim uslovima, kao što su jonska jačina rastvora, pH, ili visoka temperatura. Problem nedovoljne stabilnosti enzima, može se prevazići primenom tehnike imobilizacije enzima, kojom se obezbeđuje i višekratna upotreba imobilisanog preparata i bolja fizička separacija iz reakcionog medijuma, kao i druge poboljšane karakteristike enzima. Da bi imobilizacija enzima bila efikasna, potrebno je da budu odgovarajući uslovi imobilizacije i da vrsta nosača i funkcionalne grupe na njegovoj površini budu prilagođeni strukturi enzima koji se imobilizuje. Ovo se postiže optimizacijom procesa imobilizacije, koji je specifičan za svaku pojedinačnu kombinaciju enzima i nosača.

Cilj ove disertacije bio je istraživanje mogućnosti imobilizacije lakaze iz dva izvora, na nekoliko nosača različitih karakteristika, uz optimizaciju procesa imobilizacije, kao i ispitivanje mogućnosti razgradnje odabranih organskih zagađujućih materija, od strane dobijenih enzimskih preparata.

U prvom delu ove doktorske disertacije biće izvršena karakterizacija lakaze iz *Myceliophthora thermophila* sa ekspresijom u *Aspergillus oryzae* (Novozym® 51003), odnosno određivanje pH optimuma i izoelektrične tačke (pI).

Nakon toga, biće izvršeno ispitivanje mogućnosti razgradnje izabranih organskih zagađujućih materija, iz klase organohlornih pesticida (4,4'-DDT, 4,4'-DDD, metoksihlor, aldrin, dieldrin, endosulfan I i II, heptahlor, heptahlor-*endo*-epoksid izomer A i lindan) slobodnom lakazom iz *Myceliophthora thermophila* sa ekspresijom u *Aspergillus oryzae* (Novozym® 51003). Na osnovu rezultata ovog ispitivanja, izvršiće se izbor jednog supstrata iz ove grupe jedinjenja, čija će se razgradnja u sledećem delu disertacije istraživati imobilisanom lakazom.

U sledećoj fazi, biće optimizovana imobilizacija Novozym® 51003 lakaze na jedan modifikovani nosač od pirogene nanosilike i jedan modifikovani nosač sintetisan od biootpada iz procesa prerade drveta, kraft lignina, adsorpcijom. U okviru ovih ispitivanja, posmatraće se uticaj pH i početne koncentracije lakaze, kao i vremena imobilizacije, na aktivnost imobilisane lakaze, koncentraciju imobilisanih proteina i prinos imobilizacije, a ispitaće se i kinetika adsorpcije lakaze na izabrane nosače, kao i vrsta interakcija između enzima i nosača. Kao supstrati, u ovoj fazi ispitivanja, koristiće se 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) ABTS, za imobilizaciju na amino-funkcionalizovanu nanosiliku (AFNS) i siringaldazin za imobilizaciju na amino-modifikovane ligninske mikrosfere A-LMS (A-LMS_5 i A-LMS_10).

Posle optimizovane imobilizacije preparata sa najboljim karakteristikama iz pomenutih grupa nosača, preparati će se upotrebiti u reakciji degradacije izabranog organohlornog pesticida – lindana, ispitivanjem količine razgrađenog lindana i upoređivanjem sa rezultatima dobijenim u ispitivanju slobodnom lakazom, kao i ispitivanjem mogućnosti ponovne upotrebe dobijenih imobilisanih preparata.

Poslednji deo disertacije odnosiće se na imobilizaciju lakaze i primenu u razgradnji još jedne izuzetno bitne grupe organskih zagađujućih materija, industrijskih boja, od kojih su za ispitivanje mogućnosti njihovog uklanjanja, odabrane tekstilne boje.

U ovom delu disertacije, vršiće se imobilizacija lakaze iz *Trametes versicolor* na seriju komercijalno dostupnih Lifetech™ nosača različitih karakteristika: amino-aktivirane, oktadecil-aktivirane i epoksid-aktivirane smole. Imobilizacija na ove nosače biće ispitana sa aspekta koncentracije imobilisane aktivnosti, a zatim optimizovana za dobijene imobilisane preparate sa najvećom aktivnošću imobilisane lakaze, u cilju dobijanja imobilisanog preparata

u kome je lakaza kovalentno vezana za nosač. Kao supstrat za ova ispitivanja koristiće se siringaldazin.

Dobijeni imobilisani preparat biće zatim ispitan u reakciji rezgradnje organskih zagađujućih materija, odabranih antrahinonskih (Lanaset® Violet B, Lanaset® Blue 2R) i sulfonftaleinskih (bromtimol plavo i bromkrezol zeleno) tekstilnih boja.

Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije, će dati značajan doprinos u rasvetljavanju mogućnosti primene imobilizacije lakaze u bioremedijaciji, za uklanjanje različitih vrsta organskih zagađujućih materija.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Lakaza

Lakaza (EC 1.10.3.2) pripada grupi oksidoreduktaza sa više atoma bakra (multi-bakarnim proteinima po hemijskom sastavu), najčešće tri tipa, koji katalizuju reakcije oksidacija različitih aromatičnih i nearomatičnih jedinjenja koristeći molekularni kiseonik, pri čemu se kao sporedni proizvod izdvaja samo voda. Karakteristike samog enzima, kao i njegova struktura, vezani su za poreklo enzima, i mogu da bitno variraju[1,2]. Lakaza poseduje mogućnost oksidacije različitih organskih supstrata, uključujući fenole, aniline, aromatična tiolna jedinjenja, čak i neke neorganske komponente[3,4]. Najveći proizvođač ovog enzima su gljive, ali se ovaj enzim može naći i nekim bakterijama, lišajevima, insektima, prokariotama i višim biljkama[5].

Povećano interesovanje za istraživanja lakaza vezano je upravo za njihovu nisku specifičnost prema supstratu, odnosno za mogućnost oksidacije velikog broja različitih supstrata, među kojima su i organske zagađujuće materije. Ova osobina lakaza čini ih potencijalnim industrijskim enzimima u mnogim primenama, uključujući i bioremedijaciju zemljišta i voda, u proizvodnji hrane, tekstilnih i kozmetičkih proizvoda[6,7].

2.1.1. Otkriće lakaza, prirodni izvori i funkcija u ćeliji

Lakaze su otkrivene 1883. godine, od strane japanskog naučnika Yoshida, kao faktor koji katališe proces brzog očvršćavanja lateksa iz japanskog i kineskog lak-drвета *Rhus vernicifera* u prisustvu vazduha, odnosno proces koji se koristio za dobijanje laka iz ovog drвета. Svoj naziv dobile su po istom ovom procesu, deceniju kasnije, nakon postupka njihove izolacije i prečišćavanja od strane naučnika Bertanda [8,9]. Kasnije, 1896. godine, zajedno sa kolegom Laborde, on je dokazao takođe, da su lakaze enzimi gljiva[10].

Najveći proizvođači lakaza su skoro sve gljive uključene u proces truljenja drвета. Češće se nalaze u gljivama, nego u višim biljkama i izolovane su iz askomiceta, deuteromiceta, i bazidiomiceta. Od gljiva, u razgradnji lignina, što im je i osnovna uloga, najviše učestvuju lakaze koje spadaju u bazidiomicete. Stoga, najveći proizvođači lakaza od bazidiomiceta, su gljive belog truljenja, kao i gljive koje vrše transformaciju đubreta, naročito *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea*, *Trametes villosa*, *Trametes gallica*, *Cerena maxima*, *Coriolopsis polyzona*, *Lentinus tigrinus*, *Phlebia radiata* i *Pleurotus ostreatus*[11–13] kao i *Phanerochaete chrysosporium*, *Theiophora terrestris* i *Lenzites betulina*[14,15].



Slika 1. Gljiva Trametes versicolor, producent lakaze [16]

Mnoge gljive iz roda *Trichoderma* takođe proizvode lakaze, kao što su *T. longibrachiatum*[17] ili *T. atroviride* i *T. harzianum*[18]. U saprofitnim askomicetama lakaze se javljaju, između ostalih, u *Myceliophthora thermophila* i *Chaetomium thermophila*, uključene u proces humifikacije komposta[19]. Lakaza dobijena iz *Monocillium indicum* predstavlja prvu lakazu iz askomiceta koja je bila okarakterisana, sa peroksidaznom aktivnošću[17].

U gljivama, lakaza je uključena u procese razgradnje lignina, sporulacije, proizvodnje pigmentata, formiranja plodonosnog tela (pečurke) kao i u biljnu patogenezu[10]. Neke gljive istog roda proizvode lakazu kao enzim koji učestvuje u različitim procesima, na primer, u razgradnji lignina iz *Pycnoporus cinnabarinus* (Crvena guba) dok lakaza iz *Pycnoporus sanguineus* spada u fenol-oksidadze[20]. Sve gljive u kojima je pronađen enzim lakaza spadaju u više gljive, dok u nižim gljivama kao što su *Zygomycetes* i *Chytridiomycetes*, njihova proizvodnja nikada nije bila dokazana, premda ni ova osobina nižih gljiva nije u potpunosti izučena[5]. Od kvasaca, koji su posebna grupa askomiceta i bazidiomiceta, lakaza je prečišćena iz ljudskog patogena *Cryptococcus (Filobasidiella) neoformans*[21]. Više izoenzima lakaze je detektovano u mnogim vrstama gljiva. Većina gljiva belog truljenja proizvodi po nekoliko izoenzima[22].

Pored gljiva, lakaze se mogu naći i u nekim bakterijama, lišajevima, insektima, prokariotama i višim biljkama[23,24]. U višim biljkama lakaze učestvuju u procesu sinteze lignina, složenog biopolimera koji ulazi u sastav ćelijskog zida, kao i u odgovorima biljke na povrede[22]. Od drveća koje raste na našem podneblju, najzastupljenije su u drvetu breskve, bora i šljive. Pored drveća, lakaze su nađene i u kupusu, repi, rotkvi, jabukama, špargli, krompiru, kajsijama i raznim drugim vrstama povrća[12].

Bakterijske lakaze su prvi put pronađene u *Azospirillum lipoferum*[25], a nakon toga takođe i u *Streptomyes lavendulae*, *Streptomyes cyaneus* i *Marinomonas mediterranea* [26–28] .

Od insekata, lakaza je nađena u više rodova od kojih su neki *Calliphora*, *Drosophila*, *Lucilia*, *Manduca*, *Oryctes*, *Papilo*, *Sacophanga* i drugi[12].

Poslednjih godina, pojedine lakaze iz gljiva koje pripadaju bazidiomicetama, kao što su *Polyporus pinsitus* i *Rhizoctonia solani*, ali i iz askomiceta *Myceliophthora thermophila* i *Scytalidium thermophilum*, se prečišćavaju, kloniraju i njihova ekspresija se vrši u *Aspergillus oryzae* sistemu[1]. Ovako dobijene lakaze imaju poboljšane karakteristike, koje im omogućuju širu industrijsku primenu.

S obzirom na veliku rasprostranjenost mogućih izvora lakaze u prirodi, kao i na to da su osobine lakaze određene prvenstveno njenim poreklom, karakterizacija enzima lakaza potrebna je za svaku lakazu dobijenu iz pojedine vrste njenog izvora. Odnosno, karakteristike lakaze koje je determinišu kao potencijalno pogodan enzim za industrijsku, odnosno biotehnološku primenu, nerazdvojivo su povezane sa poreklom samog enzima. Slična svojstva mogu se naći kod lakaza različitog porekla, ali i različita kod lakaza iz, na primer, istog roda gljiva. Bitno svojstvo enzima koje ga čini lakšim ili težim za izolaciju je i njegova lokalizacija u ćeliji.

Uzevši u obzir činjenicu da lakaze prvenstveno učestvuju u procesu razgradnje lignina, kao supstrata, što i determiniše njihovu lokalizaciju, može se očekivati da su one isključivo ekstracelularni enzimi, proizvedeni pretežno od strane gljiva. Najčešće ispitivani enzimi dobijeni iz gljiva belog truljenja, a koji pripadaju istoj grupi enzima kao lakaze, lignin peroksidaze i mangan peroksidaze, jesu isključivo ekstracelularni. Nasuprot njima, primećeno je da se lakaza kod gljiva belog truljenja proizvodi i ekstracelularno i intracelularno. Ekstracelularno proizvedena količina lakaza predstavlja čak i do 98 % ukupne količine proizvedenog enzima [5]. Mnogi biljni patogeni takođe proizvode lakazu ekstracelularno, čime se gljivama omogućava premošćavanje imunog odgovora domaćina[12]. Aktivnost lakaze je kod kod bazidiomiceta, gljiva belog truljenja, *Irpex lacteus* povezana isključivo sa ćelijskim zidom, kao i kod spora gljiva iz roda *Trichoderma* i kvasca *C. neoformans*[5].

Smatra se da je lokalizacija enzima lakaze u ćeliji povezana sa fiziološkom funkcijom i određena vrstama supstrata koji su dostupni enzimu. Pretpostavlja se da intracelularna lakaza učestvuje u transformaciji pojedinih fenolnih jedinjenja manjih molekulskih masa u ćeliji. Lakaza koja je vezana za ćelijski zid, moguće učestvuje u formiranju zaštitnih komponenti ćelijskog zida, kao što je melanin[5,20]. Do sada, sva izolovana i prečišćena lakaza za industrijsku primenu, je ekstracelularna. Zbog toga je i prednost ovog enzima to što se znatno veća količina proizvedenog enzima od strane njegovih proizvođača, koji su za industrijske primene uglavnom gljive, izlučuje u spoljašnju sredinu.

2.1.2. Svojstva lakaze

Poslednjih godina, lakaza zaokuplja sve veću pažnju naučne javnosti, zbog njenih povoljnih karakteristika, koje je čine pogodnim enzimom za industrijsku primenu. Široki spektar supstrata na koje lakaze mogu da deluju kao što su orto- i para-difenoli, poliamini, aminofenoli, polifenoli i arildiamini, kao i blagi optimalni uslovi, ispoljavanje aktivnosti bez prisustva kofaktora, upotreba kiseonika kao krajnjeg akceptora elektrona, bez formiranja štetnih proizvoda katalize, razlozi su za proučavanje mogućnosti primene lakaza u različitim biotehnološkim procesima i bioremedijaciji, odnosno razgradnji toksičnih supstanci iz zemljišta i otpadnih voda. Sa porastom zagađenja životne sredine, istraživanja se razvijaju u pravcu "zelenih tehnologija", odnosno mogućnosti prečišćavanja ili uklanjanja zagađujućih materija bez negativnih pratećih posledica.

S obzirom da je jedno od najvažnijih svojstava lakaze njena niska specifičnost ka supstratu, uključujući i organske zagađujuće materije, ovaj enzim, dobijen iz različitih izvora, je do sada u literaturi opsežno okarakterisan. Međutim, zbog svojih specifičnih osobina vezanih za poreklo, samo neke njegove osobine se mogu navesti kao opšte za sve lakaze. Kao posledica toga je i dalje veliko interesovanje i traganje za genetski modifikovanim proizvođačima enzima lakaze sa optimalnim karakteristikama za predviđenu namenu enzima.

2.1.2.1. Klasifikacija lakaza

Lakaze (EC 1.10.3.2) spadaju u klasu oksidoreduktaza, preciznije u grupu enzima polifenoloksidaze. Polifenoloksidaze su enzimi koji u svom sastavu imaju atome bakra, što ih čini metalo-proteinskim enzimima, odnosno metaloenzimima, a zajednička im je osobina sposobnost da oksidišu aromatična jedinjenja pri čemu je molekulski kiseonik konačni akceptor elektrona. Ova grupa enzima je dalje klasifikovana prema tri vrste aktivnosti:

- Katehol-oksidaze ili *o*-difenol: kiseonik-oksidoreduktaze (EC 1.10.3.1)
- Lakaze ili *p*-difenol: kiseonik-oksidoreduktaze (EC 1.10.3.2) ili *p*-benzendiol: kiseonik oksidoreduktaze (EC 1.10.3.2)
- Krezolaze ili monofenol-monooksigenaze (EC 1.14.18.1)

Ako se uzme u obzir aktivnost prema supstratu, treba napomenuti da enzimi tirozinaze poseduju aktivnost i krezolaza i katehol-oksidaza, te su stoga široko rasprostranjeni u prirodi i proizvode ih organizmi od bakterija do sisara. Ovi enzimi učestvuju u formiranju melanina.

Preklapanje u opsegu difenolnih jedinjenja koje mogu da oksidišu i lakaze i tirozinaze, otežava razdvajanje i njihovu klasifikaciju, s obzirom da se klasifikacija vrši prema specifičnosti enzima u odnosu na supstrat, a oba enzima imaju nisku specifičnost ka supstratu[29]. Katehol-oksidade ili tirozinaze imaju i *o*-difenolnu i aktivnost krezolaze, odnosno mogućnost oksidacije L-tirozina. Lakaze poseduju orto- i para-difenolnu aktivnost, jače izraženu ka drugoj grupi. I pored toga, razlikovanje ovih enzima zasniva se na specifičnosti u odnosu na supstrat i osetljivosti u odnosu na pojedine inhibitore. Najvažnija razlika je u tome što samo tirozinaze poseduju aktivnost krezolaza, a samo lakaze mogu da oksidišu metoksi-aktivirane fenole kao što je siringaldazin. Po pitanju inhibitora, tirozinaze su jako inhibisane od strane tropolona i cimetne i salicilhidroksilne kiseline[10].

Lakaze se značajno razlikuju od drugih enzima po tome što mogu da oksidišu širok spektar supstrata, u koje spadaju difenoli (hidrohinon, katehol, 2,6- dimetoksifenol), para-fenilendiamin, koji je jedinstveni supstrat samo za lakazu, polifenoli, diamini i ostala jedinjenja, u zavisnosti od organizma koji proizvodi lakazu[5].

2.1.2.2. Strukturne karakteristike lakaza i katalitički mehanizam

Poznato je da je struktura enzima najznačajnija za njegovu biološku funkciju. U tom smislu, razvoj u oblasti načina dobijanja proteina vrši se da bi se povećala njegova stabilnost u najčešće nepovoljnim industrijskim uslovima, koji su često značajno različiti od biološke okoline samog enzima.

Strukturne karakteristike lakaza, izvedene su na osnovu karakterizacije prečišćenih enzima većinom iz gljiva belog truljenja, koje spadaju u bazidiomicete. U literaturi se mogu naći podaci o strukturi enzima na osnovu ispitanih više od stotinu vrsta iz različitih izvora[5].

2.1.2.2.1. Molekulska masa i dimenzije lakaza

Tipična lakaza dobijena iz gljiva predstavlja protein od približno 60 kDa do 70 kDa molekulske mase. Lakaze se često pojavljuju i kao izoenzimi koji oligomerizuju, formirajući tako multimerne komplekse. Značajne varijacije u molekulskoj masi javljaju se kod lakaza dobijenih iz askomiceta[5]. Većina lakaza su monomerni proteini, ali postoje slučajevi i homodimerne strukture, gde dve identične jedinice koje čine enzim imaju molekulska težinu karakterističnu za monomernu lakazu. Ovakvi slučajevi zabeleženi su kod lakaza iz gljiva truljenja drveta *Phellinus ribis*, *Pleurotus pulmonarius* i *Trametes villosa* kao i kod askomiceta *Rhizoctonia solani* [30–32]. Pojedine lakaze iz askomiceta takođe su oligomeri, čije strukturne jedinice imaju mase približno 60 kDa.

Po svojoj strukturi, lakaze iz gljiva su pretežno ekstracelularni glikoproteini, odnosno sadrže ugljenohidratnu frakciju [9,33]. Nakon prečišćavanja lakaza, mogu se zapaziti značajne razlike u masama molekula, koje mogu da se povežu i sa stepenom glikozilacije specifične lakaze iz određenog prirodnog izvora [9]. Većina lakaza predstavljaju glikozilovani monomer, ali pojedine imaju homodimernu, heterodimernu ili oligomernu strukturu. Molekulska masa lakaza može da se kreće od 50 kDa do 130 kDa, od čega 10 % do 50 % može da se pripiše glikozilaciji.

Dimenzije molekula lakaza takođe zavise od njegovog porekla. Tako su dimenzije lakaze iz *M. thermophila* 6,74 nm x 12,84 nm x 16,36 nm[34] dok su dimenzije lakaze iz *T. versicolor* 6,5 nm x 5,5 nm x 4,5 nm[35]. Poznavanje tačnih dimenzija molekula lakaza, od velikog je značaja pri izboru nosača za proces imobilizacije enzima, odnosno za njegovu predviđenu biotehnošku namenu.

2.1.2.2.2. Hemijska struktura lakaza

Lakaza predstavlja protein koji sadrži bakar (kuproprotein) iz grupe enzima poznatih po nazivu plave oksidaze. Kao većina ekstracelularnih enzima, kako je već navedeno, lakaze su glikoproteini. Molekul lakaze, kao aktivni holoenzim, je najčešće monomerni, dimerni ili tetramerni glikoprotein. Saharidna jedinjenja u ugljenohidratnoj frakciji mogu da čine od 10 % do 25 %, u lakazama koje proizvode gljive i bakterije, ili mogu biti zastupljena u većem procentu u enzimu koji proizvode biljke. Zabeleženi su i primeri lakaze sa saharidnim sadržajem od 49 % dobijene iz *Botrytis cinerea*, a među ostalim preparatima izolovanim iz iste vrste postoje oni sa čak do 80 % saharida među kojima su arabinoza, ksiloza, manoza, galaktoza i glukoza[9,36].

Ugljeni hidrati koji ulaze u sastav lakaze sastoje se od monosaharida kao što je glukoza, manoza, galaktoza, fukoza i arabinoza, koje učestvuju u sekreciji enzima, njegovoj proteolitičkoj osetljivosti, aktivnosti i termostabilnosti. Od svih pomenutih ugljenih hidrata, manoza je u lakazama zastupljena u najvećoj meri[37]. Nasuprot navedenim primerima, postoje i lakaze, kao one pronađene iz *Pleurotus eryngii*, od kojih jedna sadrži 7 % a druga svega 1 % vezanih šećera[38]. Smatra se da glikozilacija učestvuje u zaštiti lakaze od proteolitičke razgradnje, odnosno da je odgovorna za stabilnost enzima. Međutim, glikozilacija lakaza poreklom iz gljiva, koje se najčešće koriste za heterolognu ekspresiju, predstavlja teško premostiv problem u proizvodnji heterolognih enzima[5].

Generalno se za lakaze može reći da u svojoj strukturi poseduju četiri jona bakra po monomeru. Ovi atomi bakra vezani su za tri redoks mesta u enzimu i igraju bitnu ulogu u katalitičkom mehanizmu enzima. Iz tog razloga, lakaze se svrstavaju u grupu metaloenzima. Ovi bakarni joni su podeljeni u 3 tipa, raspoređeni su na različitim mestima u samom enzimu, a njihova klasifikacija izvršena je prema njihovim karakteristikama utvrđenim UV/VIS i

elektron paramagnetnom rezonantnom (EPR) spektroskopijom, kada se nalaze u svom oksidovanom (Cu^{2+}) obliku, na sledeći način[39]:

- bakar tipa I (T1, povezan barem jednim cisteinskim i sa dva histidinska liganda) zaslužan je za intenzivno plavu boju enzima, sa elektronskom apsorpcijom na približno 600 nm i može da se detektuje EPR metodom;
- bakar tipa II (T2, povezan sa dva histidinska liganda) je bezbojan i ne pokazuje apsorpciju u VIS delu spektra, ali se može detektovati EPR metodom;
- bakar tipa III čini par anti-feromagnetno kuplovanih atoma bakra (T3, svaki povezan sa tri histidina) koji pokazuju blagu apsorpciju na 330 nm, u oksidovanom obliku, ali se ne mogu detektovati EPR metodom[12,40].

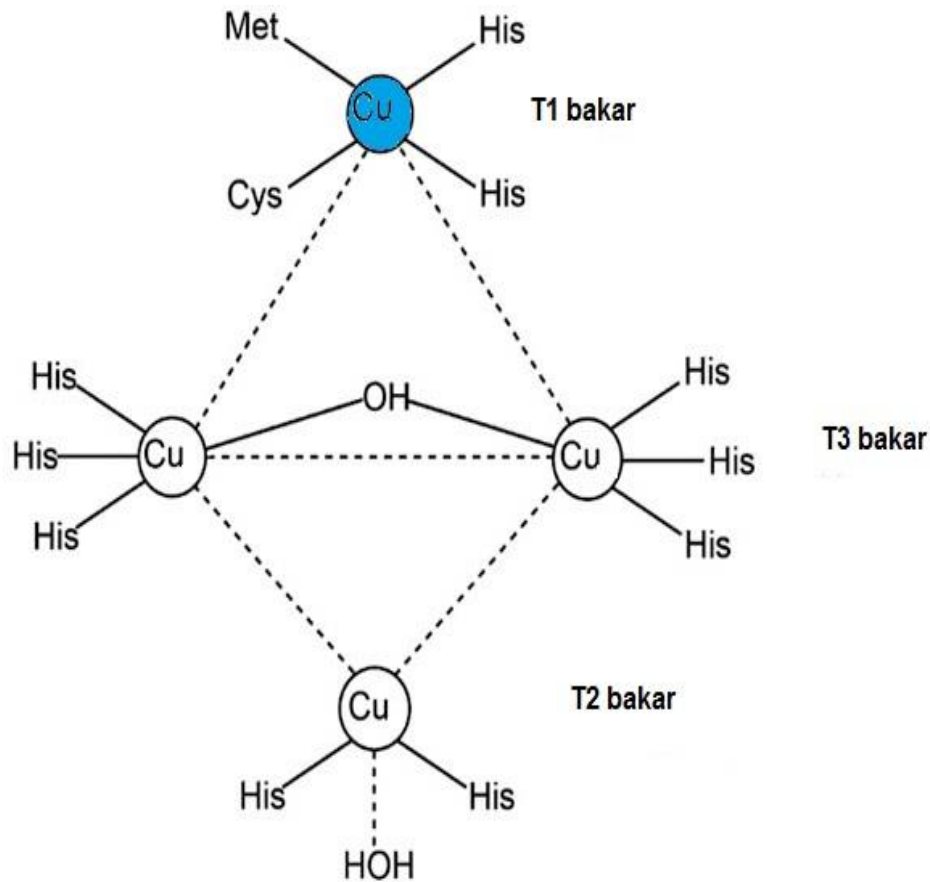


Slika 2. Eppendorf® tuba sa rastvorom lakaze

Raspored atoma bakra u molekulu lakaze prikazan je na slici 3. T2 i T3 atomi bakra su po svom položaju blizu u molekulu lakaze, najdalje 0,4 nm i čine trinuklearni klaster bakra gde se odvija redukcija molekuskog kiseonika uz osobađanje vode. Međusobno su povezani hidroksidnim mostom. Dok su kod većine lakaza, koordinacije T2 i T3 centara slične za sve oksidaze sa više atoma bakra, postoje razlike u ligandima. U aksijalnom položaju, kod lakaza izolovanih iz gljiva, češće se pojavljuje leucin (Leu) ili fenilalanin (Phe) nego metionin u aksijalnom položaju bakra T1. Međutim, ove aminokiseline ne sadrže funkcionalne grupe kojima bi se vezale za bakar T1 i suviše su velike da bi bilo moguće vezivanje i molekula vode na ovom mestu.

Najnovije studije ipak potvrđuju da jon bakra u T1 položaju ima trigonalnu orijentaciju, sa ekvatorijalnim ligandima koji su manji molekuli, odnosno dva histidina i jedan cistein, dok se u aksijalnom položaju na udaljenosti manjoj od 0,4 nm nalaze nepolarni ostaci, ligandi koji

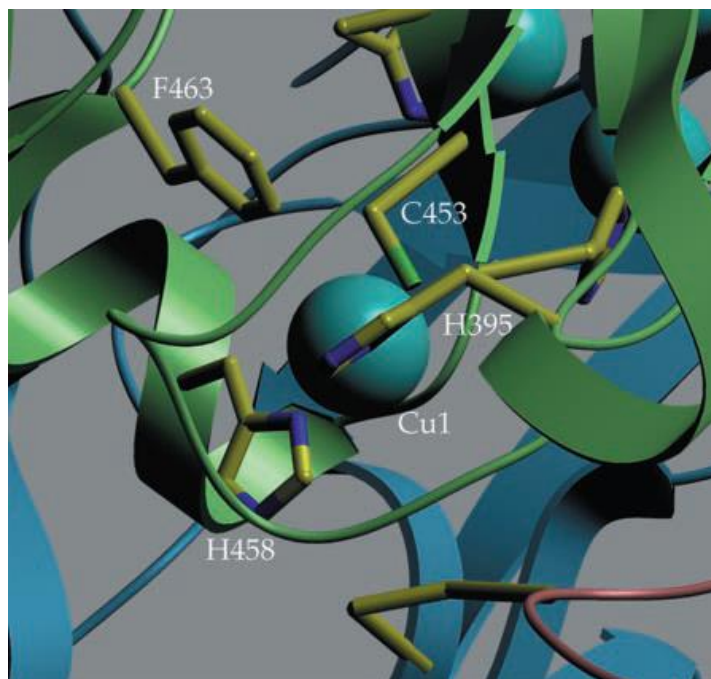
moгу biti različiti, za lakaze iz gljiva kako je već rečeno, a kod lakaza iz bakterija i biljaka, u ovom položaju se nalazi obično metionin [41,42].



Slika 3. Prikaz položaja četiri atoma bakra u molekulu lakaze CotA iz *Bacillus subtilis*: T1 - plavi, T2 - bezbojan i T3 - kuplovani binuklearni bakarni centar (modifikovan[43])

Prostorna geometrija bakra T1 centra kod lakaze iz *T. versicolor* prikazana je na slici 4. Atom bakra prikazan je kao velika sfera, dok je proteinski kostur prikazan kao traka. Na slici su štapićasto prikazane jedino pomenute aminokiseline koje su ekvatorijalni ligandi bakra, i ostatak fenilalanina (Phe-463) kao aksijalni ligand [35].

Kod pojedinih vrsta lakaza nisu prisutna sva četiri atoma bakra, već su identifikovane i vrste kao što je ona dobijena iz *Corinus cinereus*, koja nema T2 atom bakra, samim tim je i njena katalitička aktivnost nepotpuna[44].

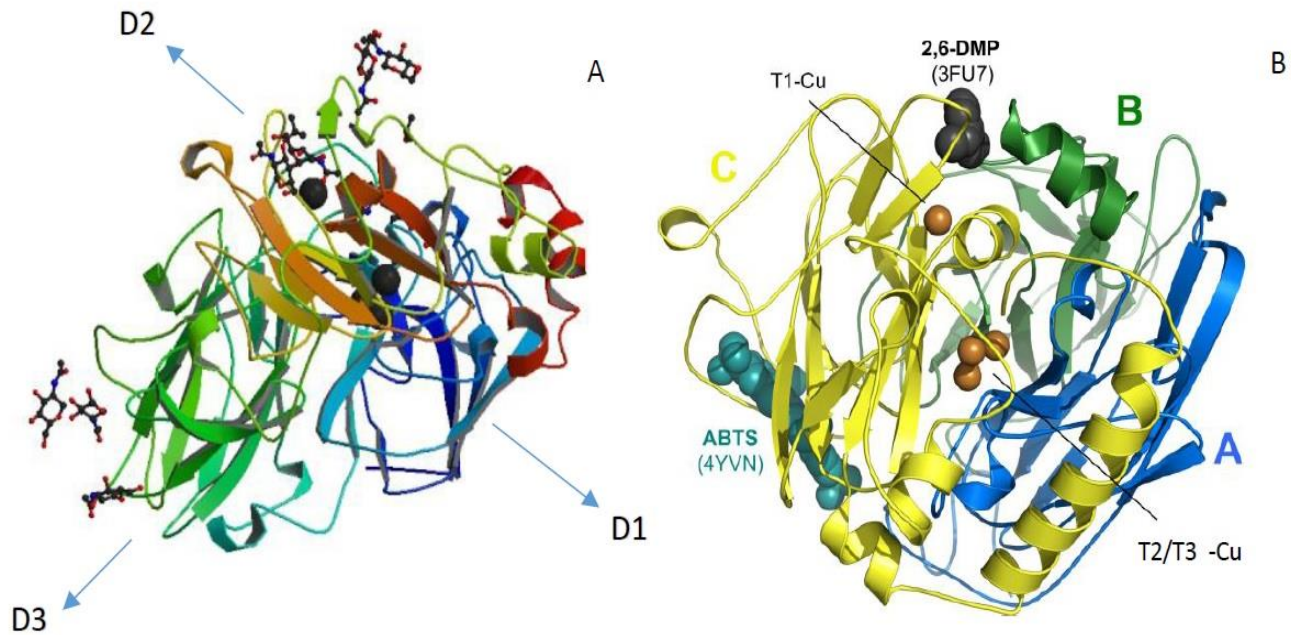


Slika 4. Uvećan izgled T1 centra kod lakaze iz *T. versicolor* [35].

Lakaza iz *Pleurotus ostreatus* nema karakterističnu plavu boju i u literaturi se spominje kao “bela lakaza”. Atomskom apsorpcijom je utvrđeno da se ona sastoji od jednog atoma bakra, jednog atoma cinka i 2 atoma gvožđa, umesto od četiri atoma bakra kako je uobičajeno [45]. Za potpunu katalitičku aktivnost enzima, neophodna su sva četiri atoma bakra po jednoj aktivnoj jedinici proteina.

Trodimenzionalna struktura enzima lakaze objavljena je za lakaze iz više izvora. Tehnike koje su se koristile za dobijanje ovih podataka su spektroskopija kombinovana sa kristalografijom, kao i apsorpciona spektroskopija X-zraka. Na slici 5 prikazani su molekuli lakaze iz *Trametes versicolor* i *Myceliophthora thermophila* u kristalizovanoj aktivnoj formi.

Na slici 5A, po pitanju strukture kristalne lakaze iz *Trametes versicolor*, enzima u aktivnom stanju, može se sagledati ceo peptid, sa sva četiri atoma bakra i ukupno sedam N-acetil glukozaminskih delova na pet udaljenih N-glikozilacionih mesta. Prema strukturi, to je monomer, organizovan u tri sekvencionisana domena ili oblasti, od kojih svaki ima sličnu β -bure prostornu strukturu, sličnu malim plavim bakarnim proteinima, kao što su azurin, ili plastocijanin.



Slika 5. Prostorna struktura lakaze iz: A) *Trametes versicolor*[35] i B) *Myceliophthora thermophila*[34]

Domen D1 sastoji se od dve četverostruke β -naborane pločice i četiri α -spirale, od kojih su 3 u vezujućim peptidima između β -naboranih pločica, a jedan je u segmentu između D1 i D2. Oblast D2 sastoji se od jedne šestostruke i jedne petostruke β -naborane pločice i takođe α -spirale u peptidima koji povezuju pojedinačne β -naborane pločice, kao i D1 i D3. α -spirala koja povezuje D2 i D3 formira region petlje od 40 ostataka. Oblast D3 sastoji se od β -bure strukture koja je formirana od dve petostruke β -naborane pločice i dvostruke β -naborane pločice, koji zajedno sa α -spiralom i β -pločom formiraju udubljenje u kome se nalazi bakar tipa I, odnosno T1 bakar.

Trinuklearni klaster koji formiraju T2 i T3 atomi bakra nalazi se između delova D1 i D3, pri čemu oba domena daju ostatke koji omogućavaju koordinaciju između atoma bakra. Domen D3 ima najveći sadržaj spirala, sa jednim 3_{10} -heliksom i dva α -heliksa koji se nalaze u spojenim regionima između različitih β -naboranih pločica. Na C-kraju D3 nalaze se 3 sekvencijalno organizovana α -heliksa, koji završavaju prevoj. Jedan od ovih α -heliksa se sastoji od 13 aminokiselina, stabilizovan je disulfidnim mostom za D1 (Cys85-Cys488) a drugi disulfidni most (Cys117-Cys205) spaja D1 i D3. Raspodela elektrostatičkog potencijala površine lakaze iz *T. versicolor* pokazuje dominanciju negativnog naelektrisanja[35].

Kristalna struktura lakaze iz *Myceliophthora thermophila*[34] prilazana je na slici 5B. U njen sastav ulazi 559 aminokiselinskih ostataka. Sastoji se iz tri domena, kao i lakaza iz *T. versicolor*. Bakar tipa T1 se nalazi u posebnom domenu, na slici označenom kao domen C, dok su tri atoma bakra tipa T2 i T3 takođe smeštena između ostataka domena A i C.

Iako naizgled postoji dosta sličnosti u građi enzima iz različitih izvora, detaljnijim analizama se utvrđuje da su mnogobrojne i specifičnosti, naročito u pogledu aktivnog centra lakaza dobijenih iz različitih izvora, kao što su bazidiomicete i askomicete[34].

2.1.2.2.3. Redoks potencijal lakaza

Redoks potencijal E_0 je pokazatelj oksidacione moći enzima, određuje se u odnosu na referentnu elektrodu, odnosno standardnu vodoničnu elektrodu i izražava u jedinicama mV, a njegova veća vrednost označava i veću oksidacionu sposobnost. Lakaze imaju veliku sposobnost oksidacije, a redoks potencijal E_0 im se kreće od 450 mV do 480 mV za lakazu iz *Myceliophthora thermophila*, do 760 mV - 790 mV kod lakaze iz *Polyporus pinsitus*[1]. Ovako velike razlike u redoks potencijalu kod lakaza dobijenih iz različitih izvora, pretpostavlja se da se mogu pripisati strukturalnim razlikama u koordinaciji atoma bakra u T1 položaju. Ipak, ove pretpostavke nisu potvrđene, već se istraživanja i dalje vrše u cilju rasvetljavanja mehanizma katalize lakaza iz različitih izvora[5]. Ono što ostaje nerazjašnjeno je kako različite lakaze menjaju svoj redoks potencijal na T1 tipu bakra, uzevši u obzir činjenicu da je prostorna geometrija oko ovog atoma veoma slična kod svih lakaza. Ovako širok opseg redoks potencijala doveo je i do podele lakaza na one sa niskim E_0 od 500 mV i one sa visokim E_0 koji se kreće od 700 mV do 800 mV, pošto ovo njihovo svojstvo ima veliki značaj za biotehnološku primenu lakaza kao i na strategije njihove primene [35].

Neke hipoteze pretpostavljaju postojanje povezanosti između koordinativnih rastojanja oko Cu T1 atoma i njegovog redoks potencijala, pri čemu E_0 raste sa porastom rastojanja. Takvim izduživanjem Cu-N veze, doprinos slobodnog elektronskog para azota atomu bakra bi bio smanjen, na taj način čineći Cu T1 više elektron-deficitarnim[35], povećavajući njegov redoks potencijal. Za lakazu iz *T. versicolor* postoje rezultati koji se mogu naći u literaturi, gde je Cu1-N δ 2 (His458) razdaljina 0,017 nm duža nego u slučaju lakaze iz *Coprinus cinereus*, koji potvrđuju datu pretpostavku. Posledica toga bi bila destabilizacija viših oksidacionih stanja, odnosno povećanje redoks potencijala bakra[35]. Ovo razvlačenje veze Cu-N može da bude posledica prostornog razmeštanja aminokiselina koje se nalaze u okolini T1 i stvaranja vodoničnih veza među njima. Međutim, ova pojava je objašnjena i postojanjem dva hidrofobna ostatka Phe460 i Ile452 u bliskoj okolini Cu T1, s tim da je ostatak Phe460 bio okružen sa velikim brojem drugih hidrofobnih ostataka, koji bi svi zajedno doprineli povećanju redoks potencijala Cu T1[46].

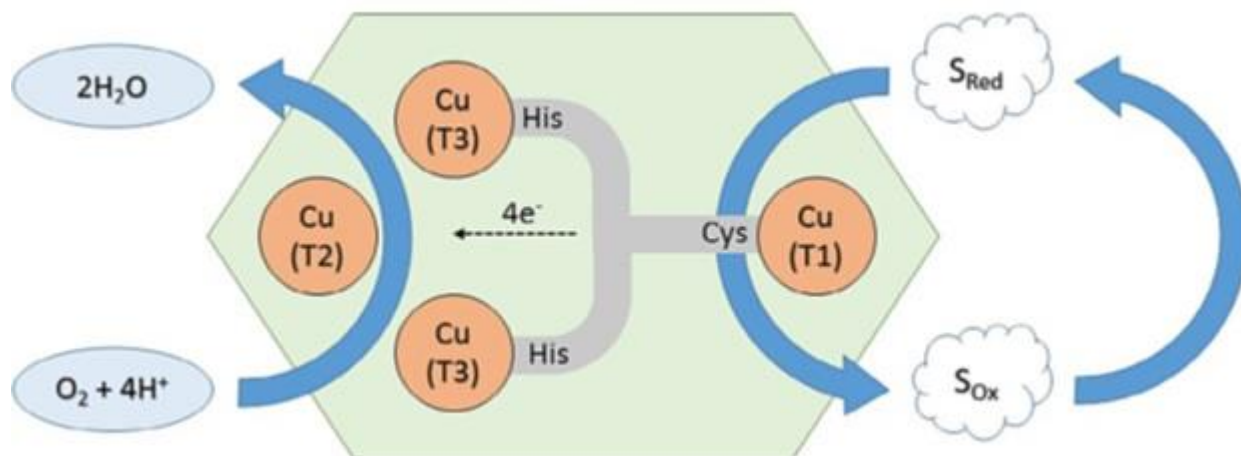
Svi ovi navodi u literaturi potvrđuju da varijacije u redoks potencijalu Cu T1 koje su zabeležene kod lakaza iz različitih izvora, nisu posledica samo jedne strukturne karakteristike,

već mnogobrojnih faktora kao što je T1 koordinativna geometrija i priroda ostataka u omotaču T1 udubljenja, koja utiče na pristupačnost za supstrat ili vodonične veze. Pored ovih uticaja vezanih za sam molekul lakaza, stereo smetnje pri vezivanju supstrata imaju veliki uticaj na oksidativnu sposobnost lakaza [47].

2.1.2.3. Aktivni centar i katalitički ciklus lakaze

Za potpunu katalitičku aktivnost enzima lakaze, neophodna su sva četiri atoma bakra po jednoj aktivnoj jedinici proteina, svaki od njih povezan sa jednim polipeptidnim lancem. Lakaze katalizuju redukciju molekula kiseonika u vodu koristeći širok spektar fenolnih i drugih jedinjenja kao donore vodonika. Ova kataliza obuhvata četiri elektrona, tako da je potrebno da se izvrše četiri jednoelektronske oksidacije supstrata (odnosno četiri koraka oksidacije), da bi se izvršila redukcija vode sa 4 elektrona. U katalitičkom dejstvu lakaza, atomi bakra unutar molekula igraju ključnu ulogu.

U oksidacionim procesima u kojima je lakaza katalizator, primarni akceptor elektrona je Cu atom unutar T1 zone pri čemu se on redukuje. Elektroni zatim prelaze na T2 i T3 zonu, te nakon što je ceo enzim redukovano, dolazi do vezivanja dva atoma kiseonika (molekul kiseonika) i to jednog za jone bakra između T2 i T3 zone i drugog za preostalu T3 zonu, pri čemu se kao intermedijer formira peroksid. U poslednjem koraku dolazi do raskidanja O-O veze unutar peroksida čime se intermedijer potpuno oksiduje, a katalitički ciklus se završava redukcijom kiseonika do molekula vode (slika 6)[48].



Slika 6. Uprošćen prikaz mehanizma reakcije oksidacije odgovarajućeg supstrata lakazom[39]

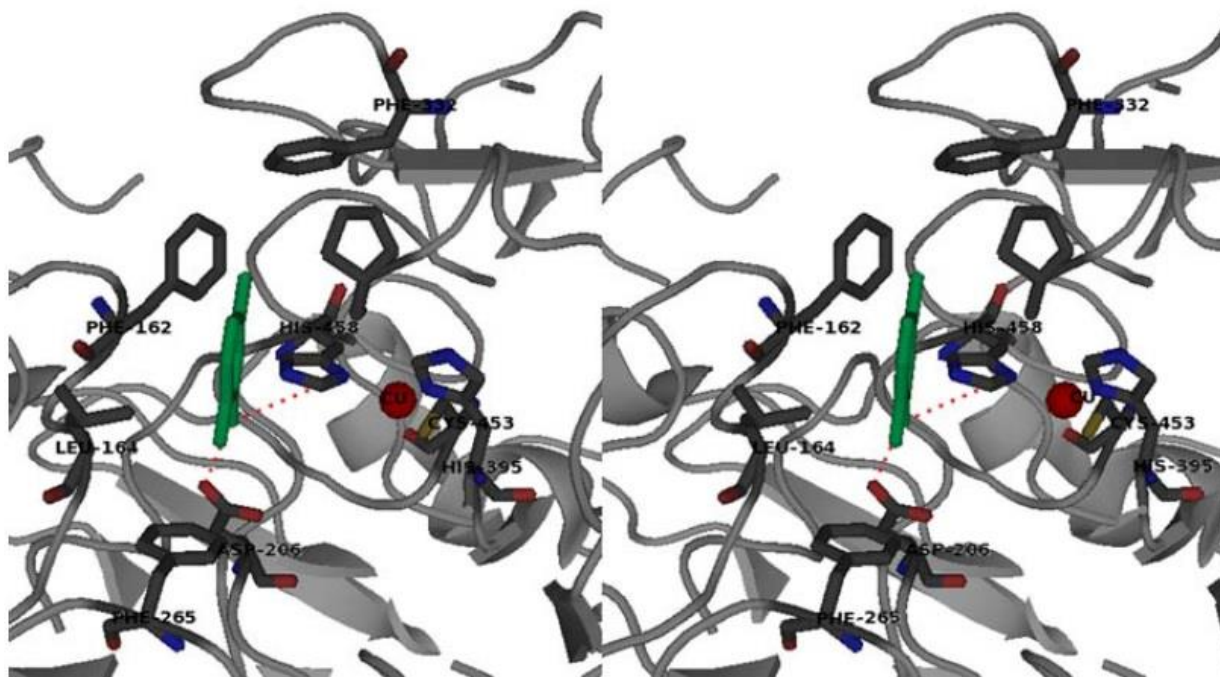
Oksidacija katalizovana lakazom započinje prijemom elektrona na Cu T1 atom. Elektroni se zatim prenose preko zaštićenog His-Cys-His tripeptida do trinuklearnog klastera koga sačinjavaju Cu T2 i T3 atomi. Proces se završava, kako je navedeno, redukcijom kiseonika u vodu. Lakaze u suštini kupluju četiri pojedinačne jednoelektronske oksidacije redukujućeg supstrata sa četvoroelektronskim redukcionim raskidanjem veze u molekulu kiseonika, u čemu učestvuju sva četiri atoma bakra u aktivnom centru lakaze.

Bakar T1 ima planarnu trougaomu prostornu orijentaciju, kako je prikazano na slici 3, a koordinativnim vezama je povezan sa atomom sumpora iz cisteina i sa N δ 1 azotom iz dva histidina. Na taj način se formira udubljenje u strukturi molekula. Ovo udubljenje u T1 položaju je dovoljno veliko da omogućava pristup velikom broju različitih molekula supstrata, i predstavlja ulaz za elektrone supstrata u katalitičko mesto enzima, pri čemu molekuli supstrata ne moraju da se pozicioniraju duboko u ovom udubljenju[47]. Na slici 5B, prikazan je prilaz supstrata 2,6-dimetoksifenola (DMP) atomu bakra u položaju T1, odnosno ovom udubljenju, kao i mogući alternativni prilaz supstrata 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), ABTS-a, aktivnom centru molekula lakaza iz *Myceliophthora thermophila*[34].

Atom bakra u položaju T1 takođe određuje i brzinu katalize tokom celog procesa[47]. Dokazano je da se stvaraju mnoge hidrofobne protein - ligand interakcije, u udubljenju na površini molekula u kome je smešten bakar T1, između ostataka koji oivičavaju ovo udubljenje, i pripadaju strukturama β -bure ili α -spirala u domenima D3 ili C, kako je ranije prikazano (slika 5). Prsten histidina His458 (slika 4) koji je vezan za Cu T1 koordinativnom vezom, je dobro sačuvan i zaklonjen u molekulu lakaze, a nalazi se blizu atoma azota u 2,5-dimetilalaninu, koji je ispitivan kao supstrat, povezan vodoničnom vezom dužine 0,32 nm, što ukazuje na mogućnost da je upravo histidin His 458 "ulaz" za prenos elektrona ka Cu T1 (slika 7). Molekul 2,5-dimetilalanina je na slici 7. zelene boje, dok je atom bakra prikazan kao crvena sfera [47].

Amino grupa 2,5-dimetilalanina je takođe povezana vodoničnim vezama sa poslednjim atomom kiseonika iz bočnog lanca Asp206, koji se nalazi na "zadnjem zidu" mesta za vezivanje u molekulu lakaze. Kod lakaza iz gljiva, ova asparaganska kiselina je takođe dobro zaštićena [47].

Mesto redukcije kiseonika u T2/T3 klasteru ima pristup rastvaraču kroz dva kanala, koja vode do mesta oba bakra T3 i bakra T2. T2 položaj je izloženiji i labilniji u odnosu na dva bakra u položaju T3. Iz tog razloga, u lakazama u kojima nedostaje jedan atom bakra, upravo nedostaje atom bakra u položaju T2. Tri atoma bakra u položajima T2 i T3 su raspoređeni u obliku gotovo potpuno jednakostraničnog trougla. Molekuli vode nađeni u ovim kanalima formiraju mnogobrojne vodonične veze sa okolnim ostacima, a ovi molekuli vode i aminokiseline koje formiraju kanale su veoma zaštićeni.

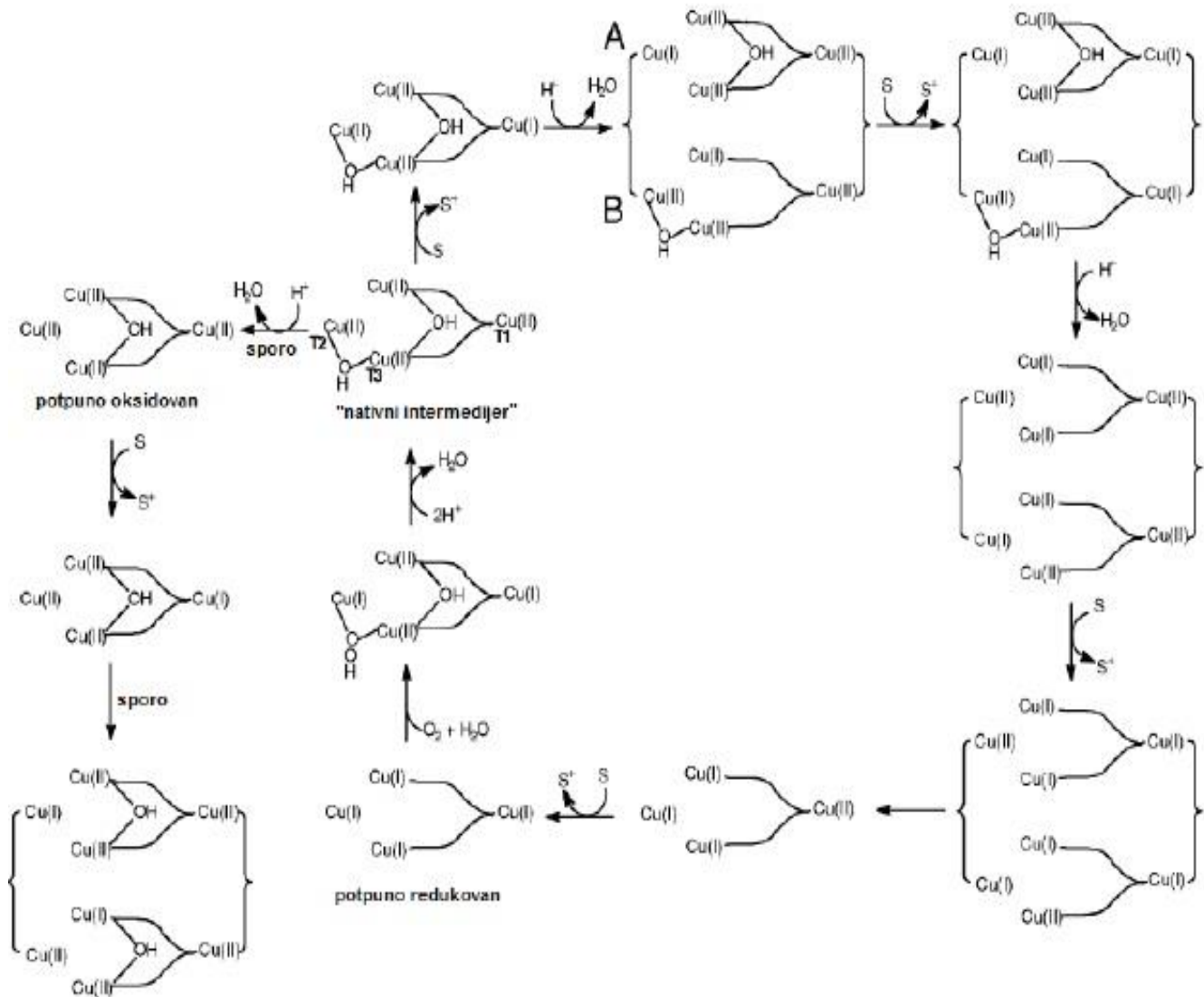


Slika 7. Prikaz aktivnog centra lakaze iz *T. versicolor*, koja vezuje supstrat 2,5-dimetilalanin [47]

Prenos naelektrisanja preko sumpora iz cisteina ka bakru tipa T2 odgovoran je za izuzetno intenzivnu apsorpciju na 614 nm, sa molekulskim apsorpcionim koeficijentom ϵ , od $5300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ usled čega enzim ima tamnoplavu boju[47]. Smatra se da se reakcija oksidoredukcije odvija tako što se proizvodi reakcije ispuštaju pre nego što dolazi do vezivanja novog supstrata. Pretpostavlja se da su kanali rastvarača plavih bakar oksidaza tako postavljeni, da omogućavaju brzi pristup po dva molekula kiseonika trinuklearnom klasteru i prateće lako otpuštanje vode[35]. Trinuklearni klaster redukuje molekulski kiseonik nakon prijema četiri elektrona prosleđena iz mononuklearnog centra Cu T1 ka dva His na Cu T3 jonima bakra.

Lakaze katališu direktnu oksidaciju orto- i para-difenola, polifenola, aminofenola, poliamina, aril-diamina kao i nekih neorganskih jona.

Jedan od predloženih mehanizama po kome se odvija katalitički ciklus lakaze, prikazan je na slici 8. Počevši od „nativnog intermedijera“, supstrat redukuje centar u kome je bakar T1, koji za uzvrat prenosi elektron trinuklearnom centru. Prikazana su dva moguća mehanizma za redukciju trinuklearnog centra: (A) T1 i T2 centri zajedno redukuju par atoma bakra T3 ili (B) svaki bakarni jon u trinuklearnom centru je uzastopno redukovan prenosom elektrona od bakra T1, u kom slučaju T3 centar više ne deluje kao dvoelektronski akceptor. Spori raspad „nativnog intermedijera“ vodi do potpuno oksidovane forme. U ovom stanju, T1 centar i dalje može da bude redukovan supstratom, ali elektronski transfer ka trinuklearnom centru je previše spor da bi bio katalitički značajan[49].



Slika 8. Katalitički ciklus lakaze, modifikovan[49]

Upravo zbog činjenice da lakaze kupluju jednoelektronsku oksidaciju supstrata, sa redukcijom molekula kiseonika u kojoj učestvuju četiri elektrona, može se pretpostaviti da lakaze deluju kao neka vrsta baterije, kao i to da sam mehanizam dejstva ne može biti jednostavan i jednoznačno lako objašnjiv[10].

Jasno je da lakaze koriste kiseonik kao akceptor elektrona da bi uklonile protone iz fenolnih hidrosilnih grupa. Usled ove reakcije, formiraju se radikali, koji mogu spontano da se preuređuju, što dovodi do raskidanja C-C ili C-O veza alkilnih bočnih lanaca, ili do cepanja aromatičnog prstena[22].

2.1.2.4. Katalitičke konstante lakaza

Iako je utvđena katalitička aktivnost lakaza za veoma veliki broj supstrata, katalitičke konstante, odnosno aktivnost lakaza ispitana je na relativno malom broju supstrata, kao što su, na primer, ABTS, i fenolna jedinjenja gvajakol, 2,6-dimetoksifenol (2,6-DMP) i siringaldazin. Ove konstante određene su za veoma veliki broj lakaza iz različitih izvora, a neke od njih, za supstrat ABTS su prikazane u tabeli 1[22].

Vrednosti za Mihaelis-Mentenovu konstantu K_m su u opsegu od 2 μM do 5000 μM , međutim velike razlike u vrednostima i po nekoliko hiljada puta, mogu se videti u vrednostima k_{cat} za različite lakaze i isti supstrat.

Tabela 1. Kinetičke konstante lakaza kao i pH vrednosti na kojima su konstante merene, za supstrat ABTS[22]

Supstrat	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	K_s ($\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	pH	Izvor lakaze
ABTS	106	1000	9,43	4,0	<i>Bacillus subtilis</i>
	23	1090	47,39	5,5	<i>Coprinus cinereus</i> Lcc1
	270	4690	17,37	4,5	<i>Melanocarpus albomyces</i>
	290	790	2,72	6,0	<i>Myceliophthora thermophile</i> Lcc1
	45	620	2,14	5,5	<i>Trichophyton rubrum</i>
	58	2700	46,51	5,3	<i>Trametes villosa</i> Lcc1
	30	198	6,6	3,4	<i>Trametes trogii</i> POXL3
	14	41400	2957,14	3,0	<i>Trametes pubescens</i> LAP2
	75	4130	50,1	4,5	<i>Thielavia arenaria</i> Lcc1
	90	350000	3888,9	3,0	<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA1

Upoređivanjem konstanti specifičnosti, koje predstavljaju odnos k_{cat} i K_m , kao merila ukupne enzimske katalitičke efikasnosti, može se videti da su razlike među njihovim vrednostima manje, ali da ipak postoje. To ukazuje na činjenicu da lakaze iz različitih izvora imaju različite preference u odnosu na supstrat, što je i prethodno bilo konstatovano.

Generalno, lakaze pokazuju veliki afinitet prema ABTS-u i siringaldazinu kao supstratu, za koje se podaci mogu naći u literaturi i što se vidi na osnovu većih konstanti specifičnosti, koje idu i do vrednosti od 3888,9 $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ za ABTS (tabela 1) i 3623 $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ za

siringaldazin kao supstrat i lakazu iz *Melanocarpus albomyces*, dok su oksidacije gvajakola i DMP znatno sporije, odgovarajuće K_m konstante su veće, a najveće vrednosti K_s dobijene su kod oksidacije 2,6-DMP-a takođe lakazom iz *Melanocarpus albomyces*, $832 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ i K_s oksidacije gvajakola lakazom iz *Trametes pubescens* LAP2 bila je $300 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ [22].

Nasuprot ovome, iz literaturnih podataka, može se uočiti da k_{cat} vrednosti za pojedinu lakazu ne variraju više od nekoliko puta za različite supstrate, što se može objasniti činjenicom da k_{cat} opisuje brzinu prenosa elektrona koji se dešava unutar enzima nakon vezivanja supstrata[22]. Ipak, na samo određivanje katalitičkih konstanti utiču i uslovi sredine kao što su pH, jonska jačina rastvora i temperatura, kao i različite koncentracije enzima. Svi ovi parametri moraju se navesti da bi rezultati istraživanja bili uporedivi.

2.1.2.5. Inhibitori lakaza

Neki anjoni kao što su halidni, azidni, cijanidni i hidroksidni se vezuju za atom bakra u centru T2 i T3, čime se remeti sistem prenosa elektrona unutar aktivnog centra enzima, što za posledicu ima inhibiciju lakaza[50]. Inhibicija hidroksidnim jonom uglavnom sprečava oksidaciju supstrata u alkalnoj sredini. Inhibicija halidnim jonima varira čak i kod različitih izoenzima lakaze i verovatno je povezana sa veličinom kanala trinuklearnog centra gde se vezuje kiseonik.

Drugi inhibitori mogu biti joni metala kao što je živa (Hg^{2+}), masne kiseline, hidroksiglicin, kojična kiselina i kvarternarni amonijumski deterdženti. Ova jedinjenja mogu da inhibiraju lakazu tako što vrše helaciju Cu (II) atoma, modifikuju aminokiselinske ostatke ili mogu da izazovu konformacione promene u glikoproteinu[22].

2.1.3. Medijator sistemi lakaza (LMS)

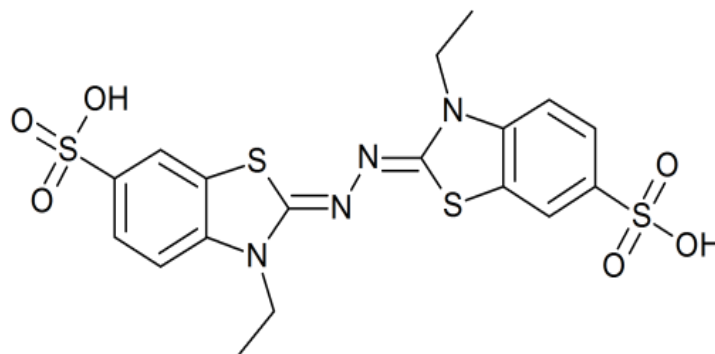
Često se supstrati koji su od interesa, ne mogu oksidovati direktno lakazama, bilo da je to zbog toga što predstavljaju suviše velike molekule koji ne mogu da uđu u aktivni centar enzima, ili zbog toga što imaju izuzetno visok redoks potencijal. Ova ograničenja mogu da se premoste dodavanjem takozvanih "hemijskih medijatora", koji su odgovarajuća jedinjenja koja deluju kao posredni supstrati za lakaze, čiji oksidovani radikali mogu da reaguju sa velikim jedinjenjima ili sa jedinjenjima supstrata, ili sa jedinjenjima sa visokim redoks potencijalom[22].

Mehanizam dejstva LMS prikazan je na slici 9.



Slika 9. Šematski prikaz redoks ciklusa oksidacije supstrata katalizovanih lakazom bez LMS i u prisustvu hemijskih medijatora (modifikovano) [22]

Prva pretpostavka o postojanju ovih medijator sistema lakaza javila se tokom istraživanja procesa razgradnje lignina. Poznato je da gljive belog truljenja razgrađuju lignin uz pomoć velikog broja oksidativnih enzima koji deluju zajedno, a među kojima je izdvojena i lakaza, uprkos činjenici da lignin predstavlja glomazan polimer, sa kojim je nemoguća interakcija enzima. Kasnije je i dokazano da tretman pulpe samo lakazom, ne dovodi do razgradnje lignina, već samo do njegovih manjih strukturnih promena i do repolimerizacije[51]. Daljim istraživanjima potvrđene su hipoteze da mali redoks molekuli deluju kao neka vrsta transportera elektrona između enzima i lignina i pri tome izazivaju cepanje grana polimera i njegovu razgradnju. Prvi veštački medijator koji je bio korišćen kao LMS za delignifikaciju pulpe bio je ABTS[52].



Slika 10. Medijator lakaza: 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) ABTS

Do sada je istraživano preko stotinu mogućih LMS sa ciljem optimizacije razgradnje lignina, od kojih su se neki pokazali kao izuzetno efikasni, kao što su: 3-hidroksiantranilna kiselina (HAA); *N*-hidroksibenzotriazol (HBT); *N*-hidroksiftalimid (HPI); violurinska kiselina (VLA); *N*-hidroksi-acetanilid (NHA); metil ester 4-hidroksi-3,5-dimetoksi-benzojeve kiseline (siringinska kiselina); 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPO)[22]. Najefikasniji medijatori korišćeni pri razgradnji lignina su *n*-heterociklična jedinjenja, sa *N*-OH grupama.

Pored sintetičkih, otkriveni su i mnogi prirodni medijatori, među koje spadaju i fenolna jedinjenja koja su prirodni supstrati za lakaze, a predstavljaju supstance koje se ekstrahuju iz drveta.

Kao što izvor, odnosno poreklo lakaza određuje njenu specifičnost prema određenim supstratima, kao i katalitičku aktivnost, isto važi i za LMS sisteme. Iz tog razloga, neophodno je ispitati kombinacije različitih lakaza sa različitim medijator sistemima, da bi se pronašla optimalna kombinacija za željenu namenu.

Koncept LMS je uspešno primenjen na oksidaciju aromatičnih metil grupa, benzil alkohola, policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH-ova) i u procesu izbeljivanja tekstilnih boja. Međutim, pored prednosti upotrebe LMS, koja se svodi na proširenje industrijske primene lakaza, dva osnovna nedostatka ograničavaju upotrebu ovih sistema, a to je njihova visoka cena i najčešće toksičnost[4].

2.1.4. Heterologna proizvodnja lakaza

U većini gljiva, lakaze koje su proizvedene od strane prirodnih domaćina, proizvode se u malim koncentracijama, nedovoljnim za komercijalnu svrhu. Iz tog razloga, poslednjih godina pribegava se kloniranju gena lakaza a zatim heterolognoj ekspresiji gena, u cilju povećavanja prinosa enzima. Na taj način se poboljšava proizvodnja lakaza i smanjuju njeni troškovi. Lakaze iz gljiva su do sada imale heterolognu ekspresiju u *Aspegillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, dok su bakterijske lakaze do sada imale ekspresiju u *Escherichia coli*[22]. Iako se ekspresijom u heterolognim domaćinima znatno povećao nivo proizvodnje lakaza, on je i dalje prilično nizak za veću industrijsku primenu.

Mapiranje gena lakaza vrši se od 1990. godine. Do sada, nekoliko stotina gena lakaza je sekvencionirano i može se naći u bazama sekvenci proteina i gena. Većina njih predstavlja samo manje nizove pretpostavljenih gena lakaze koji su nađeni u okviru velikih projekata sekvencioniranja gena i dodeljeni su lakazama na osnovu homologije sekvenci sa poznatim lakazama. Broj gena lakaza za koje su odgovarajući proteinski proizvodi eksperimentalno okarakterisani je znatno manji i iznosi nešto više od 20 enzima, pretežno lakaza iz gljiva[22].

2.1.5. Karakterizacija lakaza

Jedna od osnovnih osobina enzima je njegova izoelektrična tačka (pI), koja predstavlja vrednost pH sredine pri kojoj je enzim nenaelektrisan, odnosno ne kreće se u električnom polju. Tipične lakaze iz gljiva imaju pI vrednosti od pH 3 do pH 7, u zavisnosti od vrste prirodnog

izvora lakaza, pretežno oko vrednosti pH 4 [5,12]. Ovaj podatak ukazuje na činjenicu da postoji prevladavanje kiselih aminokiselina u primarnoj strukturi enzima. Kod pH rastvora iznad pI, površina enzima je pretežno negativno naelektrisana. Ova karakteristika važna je za izbor i ako je potrebno, modifikaciju nosača za imobilizaciju koja će biti optimizovana, kao i za određivanje optimalne pH sredine u kojoj se vrši imobilizacija.

Optimalna pH vrednost sredine za lakaze je veoma zavisna od supstrata. Tako se ove vrednosti kreću u rasponu od pH 3 do pH 7 za fenole kao supstrate i lakaze iz gljiva, dok za lakaze iz biljaka pH optimum može biti i pH 9 [12]. Generalno se može konstatovati da pH optimum za različite lakaze i supstrate varira znatno, usled promena u reakcijama izazvanim supstratom, kiseonikom ili samim enzimom. Pri višim pH vrednostima, povećava se razlika u redoks potencijalu između T1 bakra i fenola kao supstrata čime se povećava mogućnost oksidacije supstrata, ali pri visokoj koncentraciji hidroksidnog anjona (OH^-) dolazi do njegovog vezivanja za T2/T3 atome bakra što kao posledicu ima inhibiciju lakaza, zbog poremećaja u transferu elektrona od bakra T1 do T2/T3 klastera. Prilikom utvrđivanja pH optimuma, ova dva suprotna uticaja imaju ključnu ulogu[37].

Temperaturni optimum kod lakaza može takođe da znatno varira za lakaze iz različitih izvora. Primeri za to su lakaze iz *Ganoderma lucidum*, sa temperaturnim optimumom od 20 °C do 25 °C [12], lakaza iz *Trematosphaeria mangrovei* sa temperaturnim optimumom od 65 °C [53], dok je za bakterijsku lakazu izolovanu iz *Bacillus tequilensis* SN4, temperaturni optimum od 85 °C [54]. Bakterijske lakaze inače imaju više vrednosti i pH optimuma i temperaturnog optimuma od lakaza koje proizvode gljive, kao i tolerantnost na soli u rastvoru, ali su kod bakterija uglavnom intracelularni enzimi, samim tim teži za izolaciju da bi imali širu industrijsku primenu i da bi ove njihove povoljne osobine mogle da budu adekvatno iskorišćene.

2.1.6. Primena lakaza u industriji

Sposobnost lakaza da katalizuju oksidaciju fenola, kao i nekih organskih supstanci koje se smatraju dugotrajnim organskim zagađivačima (POPs) predstavlja razlog za sve veće interesovanje za njih, kao potencijalne industrijske enzime u raznim primenama, među kojima su zaštita životne sredine, biosenzorska ispitivanja, papirna i prehrambena industrija [5,12]. Takođe, kao uglavnom ekstracelularni enzimi mogu podneti visoke koncentracije zagađujućih materija u supstratu [6,50].

Moguće industrijske primene lakaza, koje su do sada ispitivane uključuju: upotrebu enzima kao sredstva za izbeljivanje pulpe u industriji proizvodnje papira degradacijom lignina; oksidativnu detoksikaciju ili uklanjanje različitih ksenobiotika i zagađivača iz industrijskih otpadnih voda i kontaminiranog zemljišta, razgradnju policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH-ova) ili raskidanje aromatičnih prstenova; obezbojavanje boja kao što su azo,

heterociklične, reaktivne i polimerne, u tekstilnoj industriji, kozmetici; bioremedijaciju otpadnih voda iz prehrambene industrije (destilerija, pivara, bezalkoholnih pića i sokova ili proizvodnje maslinovog ulja); kao biosenzori za detekciju fenolnih jedinjenja i druge [4,7,14,22,39,40].

Za razvoj održivih biokatalitičkih procesa za široku industrijsku primenu potrebna je imobilizacija enzima. Imobilisani enzimi, sa povećanom stabilnošću, u većini nepovoljnih uslova procesa, mogu se kontinuirano koristiti i fizički odvojiti od reakcionog medijuma.

Od široke moguće primene lakaza, u daljem tekstu biće više reči o najznačajnijim, koje obuhvataju i uklanjanje organskih zagađujućih materija. Detaljnije će o konkretnoj mogućoj primeni lakaza u bioremedijaciji, odnosno u uklanjanju organskih zagađujućih materija koje su ispitivane u ovoj disertaciji, biti reči u poglavlju 2.3.

2.1.6.1. Primena lakaza u tekstilnoj industriji

Do sada se u tekstilnoj industriji lakaze koriste u različite svrhe. Jedna od namena je za sprečavanje stvaranja bojenih fleka ("back-staining") na obojenim ili štampanim tekstilima. Ove fleke stvaraju se usled taloženja isprane boje u toku pranja tekstila, na mestima koja nisu bila bojena (unutrašnjosti džepova, pregibi, šavovi) usled mogućeg lošeg kvaliteta procesa bojenja ili iz drugih razloga.

U tekstilnoj industriji, lakaze se dodaju u sredstvo za pranje tekstila i na taj način one brzo obezbojavaju vodu u toku pranja, štedeći vreme, energiju i vodu za taj proces. Moguća je primena lakaza u sprečavanju skupljanja proizvoda od vune [22].

U obradi teksasa, lakaze su našle primenu i u izbeljivanju sintetičke indigo boje, čime se postižu različiti efekti izbeljivanja na materijalu. Za ovaj proces, potreban je i medijator (LMS). Proizvod reakcije je oksidacija indigo do isatina i dalje do antranilne kiseline, uz prateću redukciju kiseonika do vode. Ovako kombinovani medijator sistem lakaza obezbeđuje da se ne razgrađuju sumpor-crna boja ni bež boje teksasa, čime se dobija prirodni izgled izbledeog teksasa. Reakcija se sama zaustavlja kada se utroši medijator u sistemu, te se na taj način proces može lako kontrolisati do željenog efekta. Danas su za ovu namenu na tržištu raspoložive gotove formulacije lakaza [12].

2.1.6.2. Primena lakaza u razgradnji PAH-ova

Policiklični aromatični ugljovodonici predstavljaju organska jedinjenja koja se sastoje od benzenovih prstenova vezanih redno, pod uglom ili u klasterima. Oni spadaju u perzistentne organske zagađivače životne sredine rasprostranjene u vazduhu, zemljištu i vodi, kao i

morskim sredinama. Javljaju se u otpadima iz industrije prerade nafte, ulja, maslinovog ulja i vina kao i iz proizvodnje boja, tekstila i drugih [39].

PAH-ovi se smatraju toksičnim za vodene organizme pa su stoga predmet regulative kao organske zagađujuće materije od strane Evropske komisije, kao i regulative SAD-a, ali i u Republici Srbiji. Hlorovani fenoli i njihovi derivati su hemikalije koje podražavaju dejstvo hormona kod divljih životinja i ljudi, time proizvodeći negativan uticaj na reproduktivnu funkciju [55]. Većina aromatičnih ugljovodonika toksična je za žive organizme, a neki od njih kao i njihovi metaboliti imaju mutageno i karcinogeno dejstvo na ljude.

PAH-ovi se u prirodi ne razlažu, već se akumuliraju u zemljištu i sedimentima, a upravo njihova nerastvorljivost u vodi otežava proces bioremedijacije sredina u kojima su se oni zadržali u većim koncentracijama. Lignolitički enzimi gljiva belog truljenja, u koje spada i lakaza, oksidišu PAH-ove do odgovarajućih hinona i dalje do ugljen-dioksida. Lakaze imaju sposobnost oksidacije većine od 16 PAH-ova koji su navedeni od Agencije za zaštitu životne sredine SAD (US EPA), kao prioritetni zagađivači [12]. Dokazano je da je lakaza iz *T. versicolor* oksidovala PAH-ove sa 3-5 prstenova u prisustvu medijatora HBT i ABTS-a [56].

2.1.6.3. Primena lakaza u papirnoj industriji

Proizvodnja papira iz drveta zahteva međusobno razdvajanje vlakana drveta, i njihovo izvlačenje u listove. Jedinjenje koje spaja ova vlakna u drvetu je lignin, tako da je neophodna njegova razgradnja i uklanjanje (hemijским procesom pulpovanja ili fizičkim razdvajanjem vlakana, mehaničkim pulpovanjem). Pošto je drvo, kao i ostali prirodni materijali, podložno prirodnom procesu truljenja, pojavljuju se nove mogućnosti primene biološke razgradnje lignina u procesu dobijanja papira.

Hemijška struktura lignina je veoma složena, kako je objašnjeno u poglavlju 2.2.3.6, a procesom pulpovanja se ukloni oko 90 % lignina, dok se preostali neuklonjeni lignin, koji je uzročnik obojenosti pulpe, uklanja oksidativnom razgradnjom ili izbeljivanjem. Proces izbeljivanja, iako veoma efikasan, podrazumeva upotrebu jakih hlorovanih oksidanasa, koji prelaze u otpad iz industrije papira. Upravo u ovom delu procesa u papirnoj industriji, lakaza nalazi svoju primenu. Smatra se da lakaza u procesu bio-izbeljivanja odnosno razgradnje lignina, deluje na male fenolne fragmente lignina, nastale njegovom delimičnom razgradnjom, koji zatim deluju na sam polimer lignin i razgrađuju ga. Na taj način se pulpa obezbojava, a proces je već ispitan sa lakazom iz *T. versicolor*, uz korišćenje *N*-hidroksi jedinjenja kao LMS, za delignifikaciju pulpe dobijene kraft pulpovanjem, u pilot postrojenju [12].

2.1.6.4. Primena lakaza u prehrambenoj industriji

Primena lakaza u prehrambenoj industriji obuhvata bioremedijaciju otpadnih voda, primenu u proizvodnji pića, dobijanju voćnih sokova, pekarskoj industriji i drugom.

Aromatična jedinjenja, čije je prisustvo u pijaćoj vodi i vodi za navodnjavanje, regulisano u većini zemalja, predstavljaju značajan rizik po zdravlje. Dokazano je da lakaze imobilisane na organogel nosač uklanjaju aromatična jedinjenja i ksenobiotike iz vodenih suspenzija [57]. Polifenoli se mogu naći u otpadnim vodama iz pivarske industrije, koja ima i tamnobraon boju. Lakaza iz *Corioloopsis gallica* razgradila je tanin koji se u ovim vodama nalazio u velikoj količini, a smanjena je i količina fenola i gvajakola. Otpadana voda iz destilerija takođe sadrži velike količine organskih jedinjenja i tamnobraon boju. Dekolorizacija ovog efluenta je postignuta primenom lakaze iz *Trametes sp.* i ostvareno je obezbojavanje od 73,3 % za 7 dana [58].

Otpadne vode iz procesa dobijanja maslinovog ulja predstavljaju veliki problem u oblasti zaštitne sredine u mediteranskoj oblasti. Dokazana je značajna aktivnost lakaze iz *T. versicolor* u polimerizaciji fenola iz ovih voda [59].

Jedna od osnovnih primena lakaza u prehrambenoj industriji je u stabilizaciji vina. Poznato je da boja i ukus vina zavise od fenolnih jedinjenja u njegovom sastavu. Tokom stajanja vina, dolazi do raznih procesa oksidacije koji uključuju polifenole, usled čega se javlja zamućenje, promena boje, arome i ukusa vina, odnosno do pojave maderizacije vina. Uklanjanje uzročnika ove pojave, polifenola, moguće je upotrebom lakaze, koja pored toga što dokazano razgrađuje polifenole, ima i prednost pH optimuma u kiseloj sredini i reverzne inhibicije sulfitom. Rizling vina pripremljena iz šire, iz koje su uklonjeni polifenoli upotrebom lakaze, dokazuju da je moguće dobiti stabilna i visokokvalitetna vina i bez upotrebe SO₂, kako je najčešće u praksi [40].

Ispitivan je i uticaj lakaze na testo u pekarskoj industriji, gde je njena upotreba dovela do povećane zapremine, poboljšane strukture kore kao i mekoće pekarskog proizvoda, naročito kada se za njegovu pripremu koristi brašno lošijeg kvaliteta. Smatra se da lakaza oksidišući sastojke testa, ojačava strukture glutena u testu ili pekarskim proizvodima [60].

2.1.6.5. Primena lakaza za biosenzore i dijagnostiku

Široku primenu lakaze imaju i u oblasti nanobiotehnologija. Kataliza lakazom, zajedno sa drugim instrumentima, može se koristiti kao biosenzor za detekciju kiseonika, ili velikog broja supstrata (fenola, anilina i drugih jedinjenja). Razvijeni su biosenzori koji prate promene spektra kod lakaza, u VIS oblasti na 600 nm, koje nastaju usled ponovne oksidacije bakra T1 kiseonikom. Druga vrsta biosenzora prati promene struje ili napona od modifikovane

kiseonične elektrode, na kojoj se pojačava redukcija kiseonika elektrokatalizom imobilisane lakaze. Više vrsta biosenzora postoji za detekciju fenolnih jedinjenja i anilina, za koje se koriste slobodne ili imobilisane lakaze, zajedno sa pretvaračem (optičkim, amperometrijskim ili na bazi piezo efekta) [37].

Lakaze kovalentno vezane sa biovezujućim molekulima (antitela, antigeni, DNK, RNK, biotin), mogu se koristiti kao biomarkeri za enzime za imunohemijska, histohemijska, citohemijska ispitivanja i detekciju[12].

2.1.6.6. Primena lakaza u medicini i ličnoj nezi

U medicini, lakaze se koriste za ublažavanje simptoma dermatitisa nastalog kontaktom sa otrovnim bršljenom, koji u sebi sadrži toksin urušiol. Lakaze ovaj derivat katehola oksidišu, polimerizuju i uklanjaju.

Druga moguća primena je u dobijanju joda *in situ*, oksidacijom jodida, koji se primenjuje kao dezinfekciono sredstvo. Jodidi kao soli su mnogo pogodniji za čuvanje od samog joda, tako da se na ovaj način mogu proizvesti samo potrebne količine joda, koje se kontrolišu koncentracijom korišćene lakaze. Na ovaj način i uz korišćenje ovog sistema, može da se vrši sterilizacija i dezinfekcija bazena i pijaće vode, kao i manjih rana na telu [12].

Lakaze mogu naći primenu i u bojama za kosu, kao i u sredstvima za trajno kovrdžanje kose, oksidacijom, transformacijom i povezivanjem različitih prekursora[37].

Zbog svoje sposobnosti da oksidišu različite tiole kao i druga sumporna jedinjenja, koji su uzročnici neprijatnih mirisa, lakaze su istraživane za moguću primenu kao osveživači vazduha, odnosno za uklanjanje neprijatnih mirisa (u dezodoransima). U tom smislu, lakaze ne bi samo maskirale neprijatne mirise aromama, kao što to danas čini većina dezodoranasa, već bi razgrađivale molekule koji ih izazivaju, a moguće i delovale na mikrobe koji ih uzrokuju[12].

Lakaze se primenjuju i kao katalizatori u proizvodnji lekova protiv kancera, i kao sastojci nekih kozmetičkih proizvoda [22].

2.2. Imobilizacija enzima

Enzimi kao biološki katalizatori imaju veliki značaj u industrijskim procesima. Međutim, za njihovu široku industrijsku primenu, koja obuhvata i bioremedijaciju, enzimi moraju da su stabilni i višekratno upotrebljivi, pod obično ekstremnim procesnim uslovima [22]. Slobodni enzimi su podložni denaturisanju pri visokim temperaturama, a na njih veoma utiču parametri kao što su pH, jonska jačina ili prisustvo određenih hemikalija u rastvoru [6].

Da bi se prevazišli ovi problemi, pribegava se imobilizaciji enzima, kao jednoj od tehnika nepohodnoj za većinu industrijskih primena enzima. Na taj način, odnosno smanjenjem pokretljivosti enzima, smanjuju se moguća ograničenja u upotrebi enzima, povećavanjem njihove stabilnosti, otpornosti i omogućavanjem kontinualne upotrebe. Imobilizacija enzima obezbeđuje njihovu višekratnu upotrebu, olakšanu fizičku separaciju iz reakcionog medijuma, višu selektivnost i prevenciju kontaminacije proizvoda proteinima [3,24,61]. Dva najvažnija kriterijuma za izbor nosača za imobilizaciju su imobilizacioni kapacitet i prinos aktivnosti.

2.2.1. Pojam imobilizacije enzima

Pod pojmom "imobilizacija enzima" podrazumeva se fizičko lokalizovanje enzima ili hemijsko vezivanje u određenom prostoru pri čemu enzim ne gubi svoju katalitičku aktivnost, odnosno fizičko ili hemijsko vezivanje na površinu nosača ili „zarobljavanje“ unutar strukture nosača [62].

Prvu imobilizaciju enzima izvršili su Nelson i Griffin 1916. godine, dokazavši da invertaza ima istu katalitičku aktivnost kada je adsorbovana na čvrstoj materiji, kao što je aktivni ugalj ili aluminijum hidroksid istaložen na dnu reakcionog suda, kao i enzim uniformno raspoređen u rastvoru [63].

Polovinom prošlog veka, otkrivene su mnoge tehnike imobilizacije enzima. Razvoj tehnologije imobilizacije enzima je od tada kontinuiran, sa više od 5000 objavljenih radova o patentiranim tehnikama imobilizacije enzima, što je pokazatelj razvoja novih procesa, nosača i metoda imobilizacije [63].

Imobilisani enzimi imaju mnoge prednosti u odnosu na native enzime, kao što su: povećana stabilnost a neretko i katalitička aktivnost enzima, višekratna upotreba, olakšano izolovanje enzima iz reakcione smeše centrifugiranjem ili filtracijom, veća produktivnost, mogućnost automatizacije procesa i bolja kontrola reakcija [64]. Pored ovih prednosti, postoje i pojedini nedostaci imobilizacije enzima u odnosu na slobodne enzime, u koje spada najčešće smanjena katalitička aktivnost i generalno veća Mihaelis-Mentenova konstanta zbog relativno otežanog pristupa supstratu, velika cena nosača i visoki troškovi imobilizacije [65].

Imobilizacijom se menjaju i osobine enzima koje ga karakterišu, kao što je pH i temperaturni optimum, kinetički parametri i fleksibilnost enzimske strukture [66]. Prednost imobilizacije je takođe činjenica da povećana termostabilnost enzima omogućava vršenje procesa na višim temperaturama čime se smanjuje reakciono vreme.

Za kreiranje efikasnog imobilisanog sistema ne postoje opšta pravila, već je za svaku reakciju potrebno optimizovati uslove, odnosno empirijski odrediti dizajn potrebnog sistema [64].

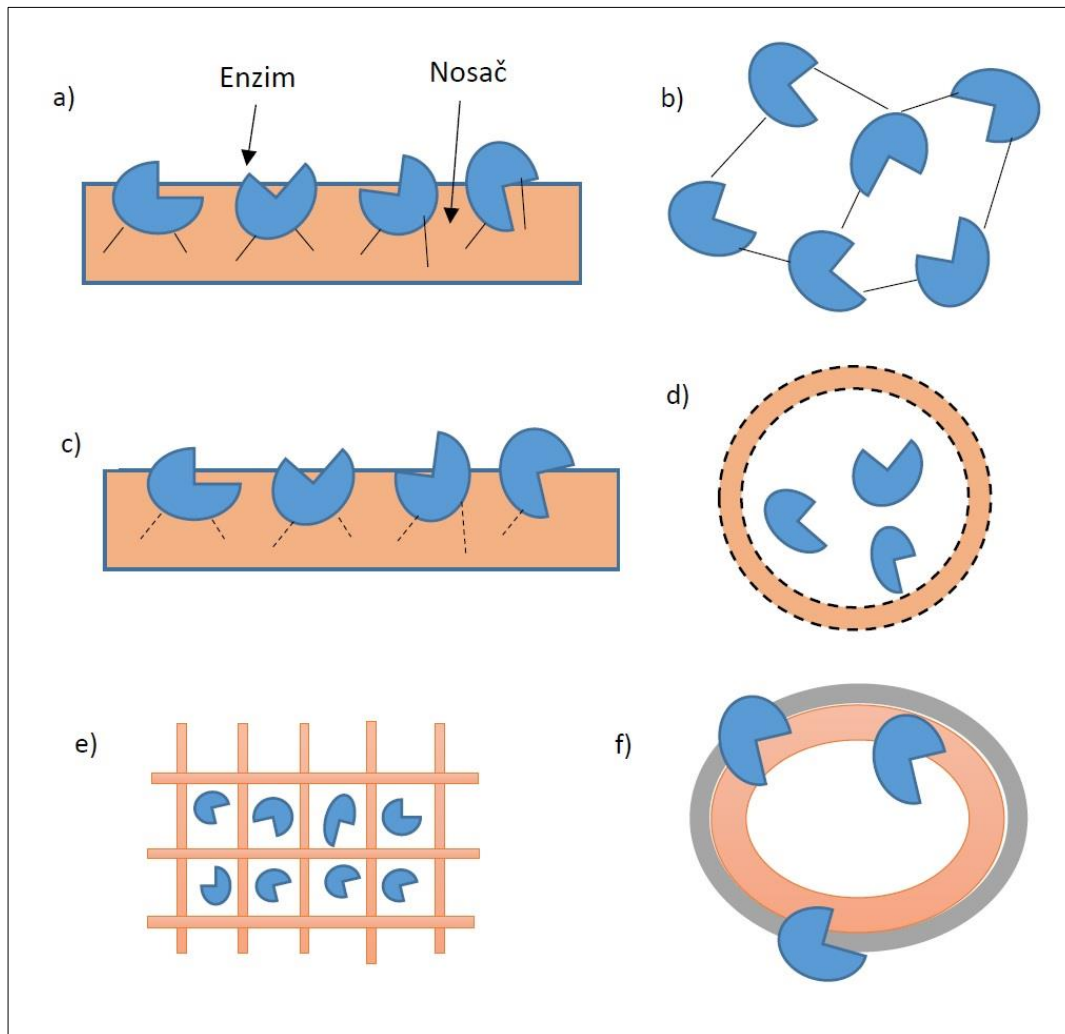
2.2.2. Metode imobilizacije enzima

Izbor metode imobilizacije značajno utiče na svojstva dobijenog imobilisanog preparata, tako da je za pravilan izbor metode neophodno poznavati strukturu samog enzima, pravilno izabrati nosač kao i definisati predviđenu namenu dobijenog preparata. Metode imobilizacije enzima mogu se klasifikovati u dve grupe na osnovu tipa veza koje se javljaju između nosača i enzima: fizičke, koje se zasnivaju na nekovalentnim interakcijama između enzima i nosača i hemijske, koje podrazumevaju formiranje najmanje jedne hemijske veze između enzima i nosača i uglavnom su ireverzibilne. Hemijski vezan enzim za nosač, ne može se ukloniti a da ne dođe do narušavanja njegove molekulske strukture, samim tim i katalitičke sposobnosti. Za razliku od njih, enzim vezan za nosač fizičkim metodama, može lako da se ukloni nakon što mu opadne aktivnost usled upotrebe, dok se na nosač može vezati nova količina enzima. Ove metode sa ekonomskog stanovišta imaju znatne prednosti, zbog visokih cena samih nosača, koji su korišćeni na ovaj način, a mogu se višekratno upotrebljavati.

Metode imobilizacije moguće je dalje klasifikovati u više grupa (slika 11):

1. kovalentna imobilizacija (povezivanje molekula enzima sa nosačem kovalentnim vezama),
2. kovalentno vezivanje enzima međusobno (cross-linking),
3. adsorpcija enzima na čvrste nosače,
4. zarobljavanje enzima nosačem (imobilizacija enzima u polimerne matrice i umrežavanje enzima),
5. uključivanje enzima u jednu od faza dvofaznog sistema i
6. mikroinkapsulacija enzima (smeštanje enzima u polupropustljivu membranu ili iza nje).

Od svih navedenih metoda imobilizacije, u eksperimentalnom delu ove disertacije biće primenjene metode kovalentne imobilizacije enzima i adsorpcija enzima na čvrste nosače.



Slika 11. Šematski prikaz metoda imobilizacije: a) kovalentna imobilizacija; b) kovalentno vezivanje enzima međusobno (cross-linking); c) adsorpcija na čvrstim nosačima; d) mikroinkapsulacija; e) zarobljavanje enzima; f) imobilizacija površinski aktivnim materijama na granici faza.

2.2.2.1. Kovalentna imobilizacija

Ova metoda zasniva se na uspostavljanju kovalentnih veza između funkcionalnih grupa na površini molekula enzima i na površini čvrstog nosača. Velika prednost kovalentne imobilizacije enzima je formiranje pravih hemijskih veza između enzima i nosača, čime se onemogućava spiranje enzima sa nosača, zbog čega je i ova metoda najviše u upotrebi. Ostale prednosti ove metode su moguća ciljna promena svojstava imobilisanog enzima, mali gubici aktivnosti usled difuzionih ograničenja, a metoda je podesna za sve vrste reakcija. Neki od

nedostataka ove metode su značajni troškovi, potreba za regeneracijom enzima i složeni postupci regeneracije nosača [62,64].

Postupak kovalentne imobilizacije enzima se uglavnom sastoji od dva koraka, od kojih je prvi aktivacija ili modifikacija nosača, dok je drugi samo kovalentno vezivanje enzima za nosač. Aktivacija određenih funkcionalnih grupa enzima postiže se modifikovanjem površine nosača. Modifikacija nosača podrazumeva uvođenje funkcionalnih grupa na površinu nosača, koje mogu da ostvare kovalentnu vezu sa aminokiselinskim ostacima enzima. Najčešće se uvode elektrofilne grupe na površinu nosača, čime se ostvaruje mogućnost njihovog reagovanja sa jakim nukleofilnim grupama enzima. Kao agensi za modifikaciju površine nosača koriste se: epihlorhidrin, glutaraldehid, sulfonil-hlorid, cijanogen-bromid, epoksidi i drugi [67]. Vezivanje se može ostvariti preko amino grupa enzima (α - i ϵ -lizin), karboksilnih grupa (C-terminalnih, asparaginske i glutaminske kiseline), sulfhidrilnih grupa ostataka cisteina, imidazolnih grupa ostataka histidina, hidroksilnih grupa (ostaci serina, treonina) ili fenolnog jezgra tirozina [68].

U postupku kovalentne imobilizacije enzima mora se voditi računa da se ne formiraju kovalentne veze između aminokiselinskih ostataka koji se nalaze u sklopu aktivnog centra enzima i nosača, pošto bi to za posledicu imalo smanjenu aktivnost enzima.

2.2.2.2. Adsorpcija enzima na čvrste nosače

Ova metoda imobilizacije bazira se na formiranju slabih privlačnih sila između enzima i nosača. Njene prednosti su pristupačnost i uglavnom niska cena adsorbenasa, kao i jednostavni postupci i mogućnosti regeneracija nosača. Metoda se odvija u blagim uslovima uz očuvanje enzimske aktivnosti i specifičnosti. Neki od nedostataka adsorpcije na čvrste nosače su gubici enzima usled desorpcije i otežana standardizacija [64]. Adsorpcija se može podeliti prema vezama koje se ostvaruju između molekula enzima i nosača:

1. *Nespecifična fizička adsorpcija*, na bilo koji nosač, bez predtretmana i modifikacija, formiranjem slabih vodoničnih veza, Van der Vals-ovih sila i hidrofobnih interakcija.
2. *Jonska adsorpcija*, u uslovima suprotnog naelektrisanja površina enzima i nosača, ima najčešću primenu u industriji.
3. *Afinitetna adsorpcija*, koja se ostvaruje uvođenjem afinitetnog liganda (jona prelaznih metala, antitela, koenzima, analoga supstrata ili specifičnih boja) u nosač radi jačeg vezivanja specifičnog enzima, a zasniva se na vezivanju molekula na osnovu biokompatibilnosti.
4. *Hidrofobna adsorpcija*, usled stvaranja hidrofobnih interakcija između hidrofobnih grupa u skeletu nosača i hidrofobnih oblasti molekula enzima. Na formiranje hidrofobnih interakcija utiče se optimizovanjem uslova sredine: pH, jonske jačine i temperature [64].

2.2.3. Karakteristike i klasifikacija nosača za imobilizaciju enzima

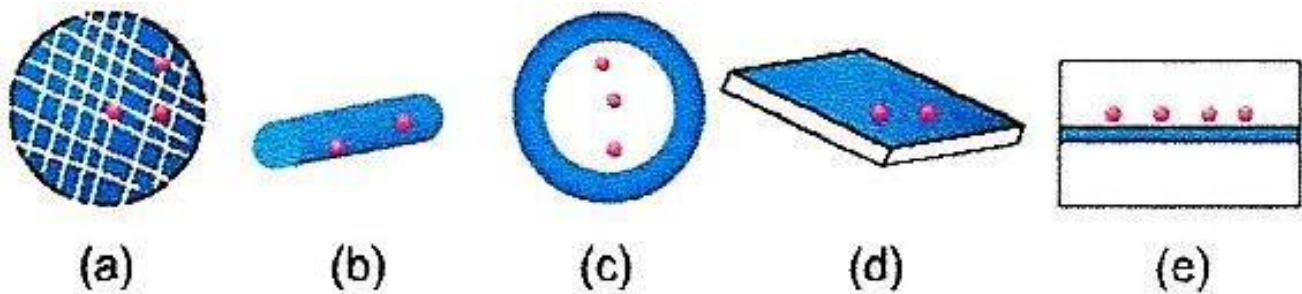
Svojstva imobilisanog enzimskog preparata zavise od svojstava enzima i materijala nosača. Njihova međusobna interakcija obezbeđuje imobilisani enzim sa specifičnim hemijskim, biohemijskim, mehaničkim i kinetičkim osobinama [63].

2.2.3.1. Karakteristike nosača

Fizičke karakteristike nosača koje imaju značaja za imobilizaciju enzima su: geometrija nosača (oblik i veličina), unutrašnja struktura (prečnik, zapremina, raspodela i veličina pora) i specifična površina. Bitna hemijska svojstva nosača su hemijski sastav i inertnost skeleta, gustina i raspodela funkcionalnih grupa na površini samog nosača koje omogućavaju interakciju sa molekulima enzima, kao i njihova dostupnost i udaljenost od površine nosača. Nosač koji bi bio pogodan za imobilizaciju enzima na više mesta na površini nosača, potrebno je da ispunjava određene karakteristike[64,69]:

- da ima odgovarajuću hidrofilitnost/hidrofobnost u zavisnosti od enzima,
- da poseduje veliku hemijsku i mikrobiološku stabilnost i nerastvorljivost,
- da ima idealno sferičan oblik čestica,
- da ima veliku specifičnu površinu, dobru otpornost na pritisak, elastičnost i malu kompresibilnost,
- da ima veliku unutrašnju površinu koja će imati dobro geometrijsko slaganje sa površinom enzima,
- da ima veliku površinsku gustinu reaktivnih grupa,
- reaktivne grupe enzima i nosača treba da imaju minimalne sterne smetnje u reakciji, zato što nakon početne imobilizacije, kovalentno vezivanje zahteva formiranje nefleksibilnih struktura,
- reaktivne grupe na nosaču treba da reaguju sa grupama koje su dominantne na površini enzima, a njihova veza treba da je postojana,
- da je moguće dobijanje inertne površine nosača nakon imobilizacije, razaranjem ili blokiranjem preostalih reaktivnih grupa nosača, bez negativnog uticaja na enzim i
- biokompatibilnost i netoksičnost uz nisku cenu.

Geometrija nosača u velikoj meri definiše način izvođenja enzimskog procesa, tip samog bioreaktora kao i njegov režim rada, kontrolu procesa i postupak separacije. Geometrijske karakteristike nosača kao što su veličina čestica, prečnik i dužina vlakana, debljina filma, diska ili membrane, šuplje sfere, znatno utiču na prenos mase u sistemu. Nosači se sintetišu u obliku zrna, vlakana membrana, cevi ili kapsula različitih veličina, a prikaz najčešće korišćenih nosača različitih oblika dat je na slici 12 [64,70].



Slika 12. Geometrije različitih nosača (a) sfere (b) vlakna (c) kapsule (d) filmovi (e) membrane[70]

2.2.3.2. Morfološka klasifikacija nosača

Nosače za imobilizaciju enzima na osnovu morfoloških karakteristika delimo na porozne i neporozne. U industriji je češća primena poroznih nosača koji imaju sposobnost da uniformno vezuju veću količinu enzima, čime se ostvaruje velika aktivnost po jedinici mase enzima, a sam enzim biva zaštićen od štetnih uticaja okoline unutar pora nosača. Porozni nosači se takođe karakterišu velikom specifičnom površinom, ali imaju i svoja ograničenja u primeni. Velika unutrašnja površina često je nedostupna enzimu u toku imobilizacije kao i supstratu za vreme odigravanja samog procesa, javlja se problem ograničene difuzije i mogućnost spiranja enzima[64].

Neporozne nosače karakteriše znatno manji otpor prenosu mase kao i mala specifična površina, zbog čega su oni ređe u upotrebi. Mala površina za vezivanje enzima se povećava geometrijom ovih nosača, koji su najčešće u obliku vlakana ili finih čestica. Takve njihove dimenzije dalje otežavaju separaciju i kontinualnu reakciju u industrijskoj primeni[64].

2.2.3.3. Hemijska klasifikacija nosača

Prema hemijskom sastavu, nosače možemo klasifikovati na neorganske i organske.

Neorganski nosači su prvi korišćeni za imobilizaciju enzima. Njih karakterišu velika mehanička i termička stabilnost, hemijska stabilnost u organskim rastvaračima, otpornost na dejstvo mikroorganizama, jednostavnost rukovanja njima i mogućnost regeneracije pirolitičkim postupcima. Neke od mana ovih nosača su mala poroznost, nejednakost raspodele veličine pora, nespecifična adsorpcija i velika hemijska inertnost. Zbog njihove poslednje navedene osobine, da bi se ostvarila zadovoljavajuća imobilizacija, površina ovih nosača često se hemijski modifikuje, čime se povećava njihova cena[64,71]. U neorganske nosače spadaju

prirodni materijali kao što su bentonit, silika, plavi kamen, pesak i sintetski među kojima su staklo, zeolit, keramika, aktivni ugalj, oksidi metala, metali i drugi [72,73].

Za izradu organskih nosača, najčešće se koriste polimeri, bilo da se imobilizacija vrši ugrađivanjem enzima u matricu ili kovalentnim vezivanjem. Organski nosači dele se, kao i neorganski, na prirodne i sintetske. Prirodni nosači su uglavnom polisaharidi (celuloza, agaroza, skrob, dekstran, agar, hitin, hitozan, pektin, sefadeski, sunderasti skrob, alginat i drugi), proteini (kazein, kolagen, albumin, želatin i drugi) i ugljenik. Polisaharidi se odlikuju makroporoznom strukturom molekula kao i velikim brojem hidroksilnih grupa koje, po potrebi mogu da se aktiviraju različitim hemijskim agensima [73].

Najveću grupu nosača čine sintetski polimeri, zbog velike mogućnosti modifikacije njihovih kako fizičkih, tako i hemijskih osobina, uvođenjem različitih funkcionalnih grupa u skelet polimera. U njih spadaju poliakrilati i polimetakrilati, polistiren, poliakrilamid, vinil- i alil-polimeri, poliamidi i drugi.

Još jedna podela na osnovu hemijske strukture bi bila prema sposobnosti kvašenja površine nosača, na hidrofobne i hidrofilne nosače.

Iz svega navedenog može se zaključiti da je potrebno izvršiti izbor nosača na osnovu strukture i karakteristika enzima, kao i predviđene namene imobilisanog preparata. Imobilisani enzim predstavlja sistem sa karakteristikama koje su u potpunosti određene pravilnim izborom tri osnovne komponente: enzima, nosača i metode vezivanja enzima za nosač, odnosno metode imobilizacije.

U nastavku disertacije detaljnije će biti opisani nosači koji su korišćeni u eksperimentalnom delu. Ovi nosači su iz grupe komercijalno dostupnih nosača Lifetech™, kao i funkcionalizovanih komercijalno dostupnih nosača (amino-funkcionalizovana nanosilika) i specijalno sintetisanih i funkcionalizovanih, nekomercijalnih nosača od prirodnih materijala (amino-modifikovani kraft lignin).

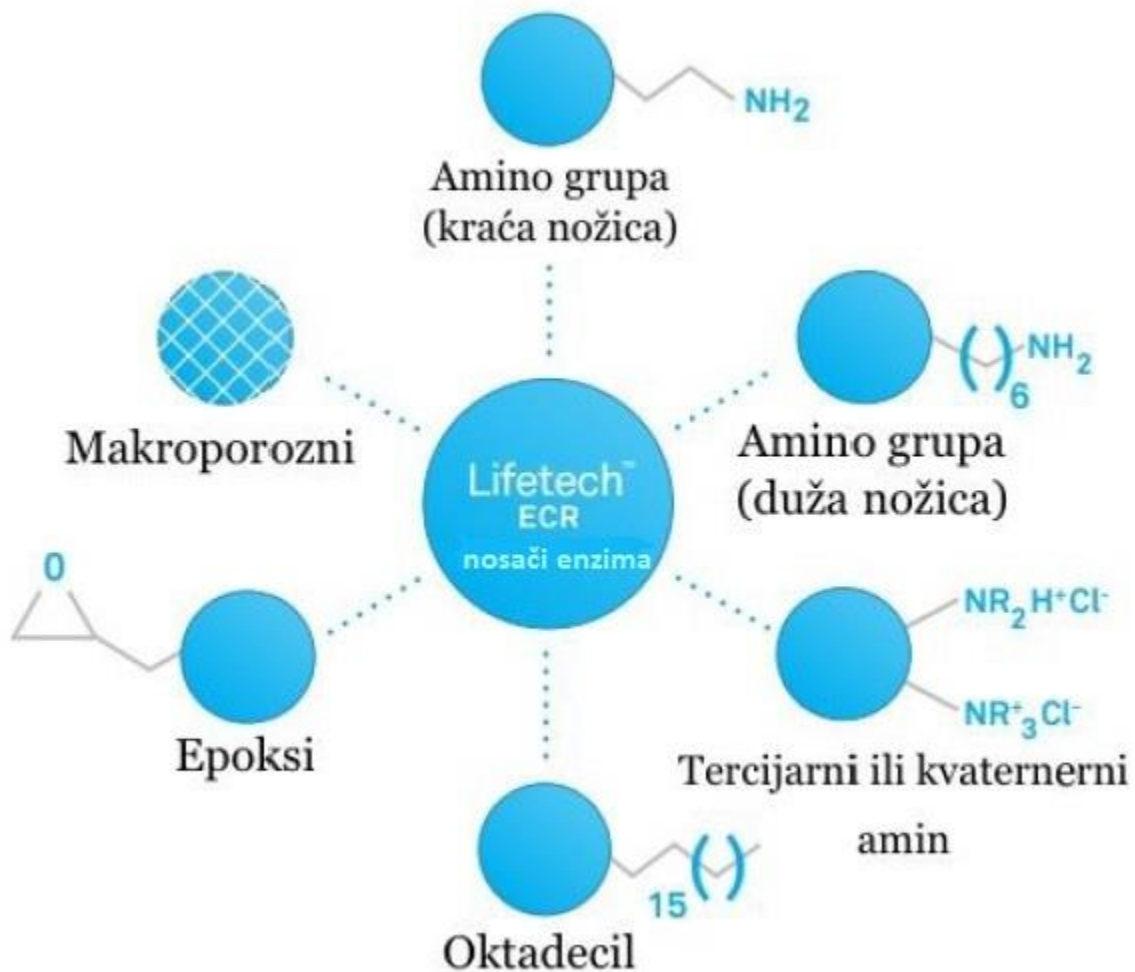
2.2.3.4. Lifetech™ nosači

Proizvođač Purolite®, osnovan 1981. godine, sa sedištem u SAD, jedan je od najvećih svetskih proizvođača smola za razne tehnologije koje ih koriste. Svoju seriju nosača za imobilizaciju enzima Lifetech™ kreirao je sa ciljem pokrivanja mogućnosti imobilizacije širokog spektra enzima u različitim reakcionim uslovima. U ovoj seriji nosači su izrađeni od smola, u obliku sfernih, čvrstih čestica idealnih za šaržne procese ili kolone. Nosači prema navedenim podelama spadaju u organske, sintetske, porozne nosače. Njihove dobre mehaničke osobine i stabilnost omogućavaju upotrebu u nekoliko proizvodnih ciklusa, a moguće je

izabrati željene funkcionalne grupe na nosačima, hidrofobnost ili hidrofilnost kao i poroznost iz široke ponude.

Smole se izrađuju u različitim veličinama, u rasponu prečnika od 150 μm do 710 μm , dok se za industrijske primene izrađuju i do dimenzija sfera od 1200 μm . U njih spadaju epoksi-aktivirane smole, amino-aktivirane smole, oktadecil-aktivirani nosači, makroporozni nosači i nosači za jonsku imobilizaciju.

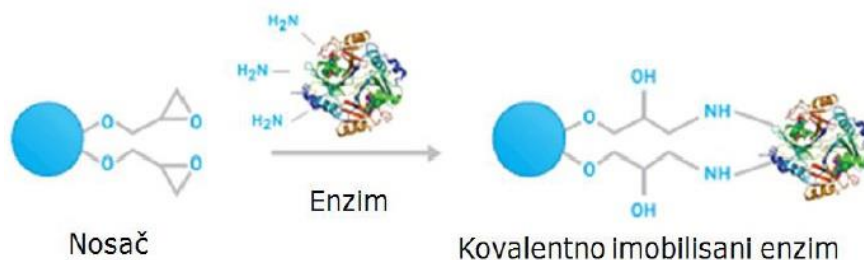
U daljem tekstu biće bliže objašnjene vrste nosača koje su korišćene u eksperimentalnom delu disertacije [74]. Na slici 13. prikazane su vrste nosača iz serije Lifetech™.



Slika 13. Šematski prikaz nosača sa odgovarajućim funkcionalnim grupama iz Lifetech™ serije [74]

2.2.3.4.1. Epoksi-aktivirane smole

Epoksi-aktivirane smole predstavljaju gotovo idealne nosače, za jednostavno izvođenje imobilizacije enzima, omogućavajući formiranje kovalentne veze između enzima i nosača. Ovi nosači proizvođača Purolite® predstavljaju metakrilatne porozne smole, sa izuzetnom mehaničkom izdržljivošću i do stotinu operativnih ciklusa[74]. Način ostvarivanja kovalentne imobilizacije prikazan je na slici 14.

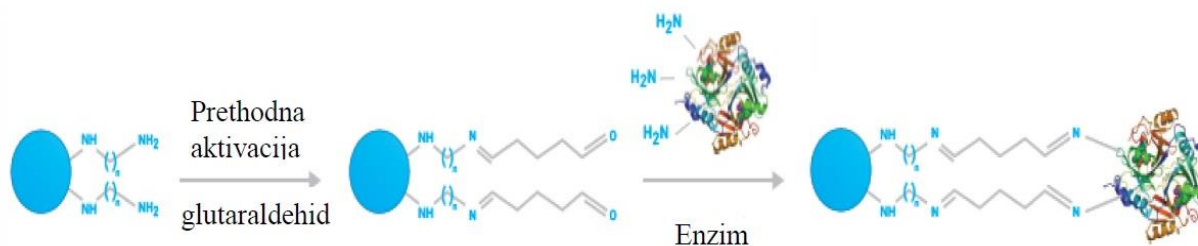


Slika 14. Imobilizacija enzima na epoksidne nosače[74]

Ovi nosači su dizajnirani da omogućavaju stabilno kovalentno vezivanje sa različitim proteinskim grupama (amino, tiol, fenolnim), pod blagim uslovima temperature i pH sredine. Iz ove serije nosača, izdvaja se epoksi/butil metakrilatna smola, koja je sintetisana sa primarnim ciljem imobilizacije lipaza i primenom tako dobijenih imobilisanih preparata u vodenim/dvofaznim sistemima u prisustvu hidrofobnih supstrata. Njena specifičnost je u mogućnosti vezivanja enzima kovalentnim vezama sa funkcionalnim grupama na površini nosača, kao i hidrofobnim interakcijama sa matriksom samog nosača [74].

2.2.3.4.2. Amino-aktivirane smole

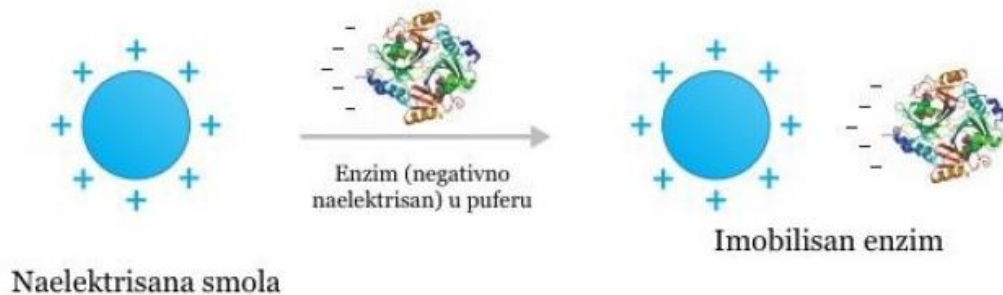
Amino-aktivirane metakrilatne smole takođe pružaju mogućnost kovalentne imobilizacije enzima, ukoliko se izvrši prethodna aktivacija sa glutaraldehidom. Na taj način aldehidne grupe reagujući sa amino grupama enzima formiraju Šifove baze, čime se postiže brza i efikasna kovalentna imobilizacija (slika 15).



Slika 15. Šematski prikaz kovalentne imobilizacije enzima amino nosačima uz prethodnu aktivaciju[74]

Stabilnija veza može da se postigne prethodnom redukcijom smole borhidridima[74].

Ukoliko se ne izvrši prethodna aktivacija amino nosača, imobilizacija se može ostvariti adsorpcijom na nosač, pod odgovarajućim uslovima, kao što je prikazano na slici 16.



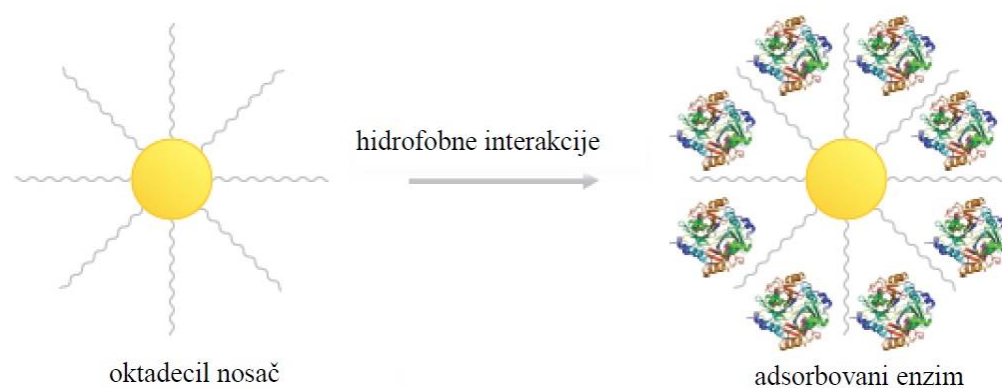
Slika 16. Šematski prikaz adsorpcije enzima na amino nosače [74]

Amino nosači iz ove serije proizvođača Purolite® mogu biti sa kraćom (C2 ili etilen) ili dužom (C6 ili heksametilen) nožicom, različite poroznosti sa prečnicima pora u rasponu od 30 nm do 180 nm.

2.2.3.4.3. Oktadecil-aktivirani nosači

Ova vrsta nosača namenjena je za imobilizaciju enzima, zasnovanu na fizičkoj adsorpciji, na površinu nosača nerastvornog u vodi. Zbog formiranja ovakvih veza, ovom metodom ne dolazi do promene konformacije enzima, a metoda je prilagođena primenama u organskim rastvaračima ili hidrofobnim medijumima, kao što je ulje [74].

Oktadecil-aktivirane smole ipak omogućuju jaku i reverzibilnu adsorpciju putem hidrofobnih interakcija, kako je prikazano na slici 17.



Slika 17. Šematski prikaz adsorpcije enzima na oktadecil-aktivisan nosač [74]

Adsorpcija na ove nosače odigrava se najčešće u rastvorima male jonske jačine. Ove metakrilatne smole su oktadecil (C18) aktivirane i proizvedene procesom umrežavanja u prisustvu porogenog agensa koji omogućava kontrolu poroznosti. Optimizacija gustine oktadecil grupa na matriksu omogućava veoma uspešnu imobilizaciju u organskim rastvaračima, dok dobre mehaničke osobine olakšavaju njegovo korišćenje u bioreaktorima sa mešanjem ili kolonskim bioreaktorima [74].

2.2.3.4.4. Smole za jonsku imobilizaciju enzima

U ovu vrstu Lifetech™ nosača spadaju makroporozne polistirenske smole sa tercijarnim ili kvarternim amino funkcionalnim grupama. Metoda jonske imobilizacije je najjednostavnija metoda koja u velikoj meri ne utiče na aktivnost enzima, a adsorpcija i desorpcija enzima zavise od baznosti jonoizmenjivača. Dinamička ravnoteža između nosača i enzima zavisi od izoelektrične tačke enzima, njegovog pH optimuma i jonske jačine pufera u kome se vrši imobilizacija. Nosač se može ponovo regenerisati i koristiti nakon što imobilisani enzim izgubi željenu aktivnost u procesu.

Pre početka imobilizacije, ove smole u rastvoru HCl dobijaju pozitivno naelektrisanje, a uobičajeni pH imobilizacije je u rasponu od 4 do 5. Pozitivno naelektrisana površina nosača privlači negativno naelektrisane grupe na površini molekula enzima i na taj način se ostvaruju jonske interakcije. Šematski prikaz ovog postupka imobilizacije dat je na slici 16 [74].

2.2.3.5 Amino-funkcionalizovana nanosilika (AFNS)

Pod nanomaterijalima podrazumevaju se čestice dimenzija manjih od 100 nm, proizvedene nanotehnologijama. Enzimaska nanoimobilizacija predstavlja novu i obećavajuću oblast istraživanja, sa velikim mogućnostima primene. Neke od prednosti nanomaterijala u poređenju sa konvencionalnim nosačima za imobilizaciju enzima su: lakoća sinteze visokog sadržaja čvrste supstance bez korišćenja toksičnih agenasa ili površinski aktivnih materija, homogeni premazi, dobro definisane lako podesive veličine čestica [23].

Od neorganskih materijala za izradu nosača, među najčešće korišćenima je silikagel, zbog povoljnih osobina u koje spadaju velika specifična površina, mehanička i termička stabilnost, otpornost na mikrobiološko zagađenje i organsko okruženje kao i biokompatibilnost [75].

Kao nosači za imobilizaciju enzima više tipova nanomaterijala mogu da se pronađu u literaturi, kao što su nanočestice (porozne i neporozne), nanokompozitni materijali, nanocevi, nanovlakna, sol-gel transformacijom dobijeni materijali sa nanočesticama i drugi. Jedna od

povoljnih karakteristika ovih čestica su i njihove magnetne osobine, koja je veoma eksploatisana u postupcima imobilizacije enzima [76].

Imobilisani preparati dobijeni korišćenjem nanomaterijala su pokazali prednosti u odnosu na preparate sa konvencionalnim nosačima. Neke od njih su veća aktivnost imobilisanog enzima, modifikovana selektivnost i znatno bolja stabilnost. Zbog navedenih osobina, sve je šira primena nanobiokatalizatora u farmaciji, medicini, biosenzorima, tekstilnoj industriji, zaštiti životne sredine i dr [62]. Neki od nedostataka ovakvog metoda imobilizacije su visoki troškovi nosača kao i njegova kompleksna sinteza i otežana separacija iz reacionog medijuma.

Od pomenutih nanomaterijala, kao nosači najčešće su korišćene nanočestice, zbog svojih dobrih osobina za imobilizaciju: hemijske stabilnosti, uniformnosti i dobre disperzije u tečnom medijumu.

Nanočestice delimo na osnovu materijala od koga su izrađene, na nanočestice koje sadrže neorganske elemente, najčešće metale ili njihove okside (srebro, cirkonijum, zlato, poluprovodnici, Fe_3O_4 , TiO_2 , SiO_2 i drugi) i nanočestice koje sadrže organske molekule, a u njih spadaju ugljenične nanocevi, razgranati organski polimerni molekuli (dendrimeri) ili lipozomi [77].

U eksperimentalnom delu ove disertacije, kao nosač je korišćena amino-funkcionalizovana nanosilika, koja spada u nanočestice sa neorganskim elementima, tako da će u daljem tekstu biti više reči o ovoj vrsti nanočestica.

2.2.3.5.1. Nanočestice silike

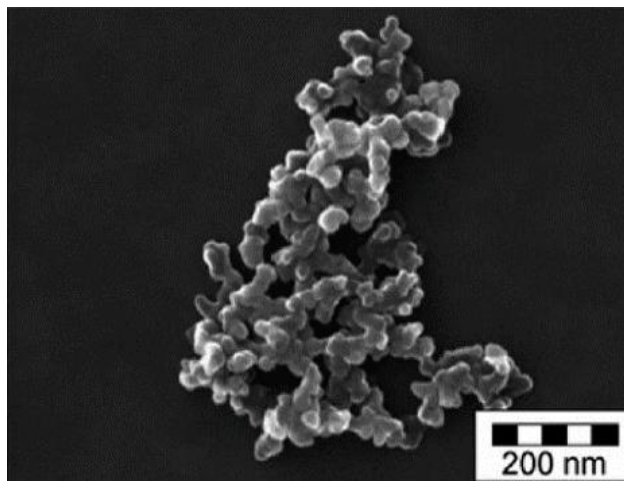
Silicijum–dioksid ili silika (SiO_2) nanočestice na svojoj površini imaju silanol grupe (Si-OH), koje omogućavaju laku modifikaciju površine čestica različitim agensima, čime se uvode željene funkcionalne grupe kao što su karboksilne, amino, aldehidne, tiolne i druge. Ova vrsta nanočestica je komercijalno dostupna sa različitim morfološkim karakteristikama, ali se po potrebi može i sintetisati u laboratoriji. Za imobilizaciju enzima najčešće se koriste neporozne, porozne i mezoporozne nanočestice silike, čija će veličina pora zavisi od uslova i načina sinteze [78].

Nanočestice silike se mogu dobiti industrijskim procesima sinteze i to: vlažnim postupkom (sol-gel procesi ili taloženje) i termičkim postupkom (piro-hidrogenizacijom ili plazmom). Čestice koje su košćene u eksperimentalnom delu doktorske disertacije spadaju u pirogene nanočestice silike.

Pirogene nanočestice silike izgrađene su od nepravilno grupisanih tetraedara SiO_4 , u kojima je jedan atom silicijuma okružen sa 4 atoma kiseonika formirajući tetraedar u čijem

centru je atom silicijuma, dok se atomi kiseonika nalaze u uglovima tetraedra. Veza između osnovnih gradivnih jedinica, tetraedara, ostvaruje se preko kiseoničnih atoma, odnosno Si-O-Si kovalentnim vezama. Ukoliko dođe do raskidanja Si-O-Si veze, kiseonik može da veže atom vodonika ukoliko je prisutna voda u rastvoru, čime se stvaraju silanol grupe na površini nosača (Si-OH). Silanolne grupe na površini imaju tendenciju da se, prilikom građenja vodoničnih veza, ponašaju kao donori protona. Ove silanolne grupe mogu biti izolovane silanol grupe (85% od ukupnog broja silanol grupa), geminalne (dve silanol grupe vezane za jedan atom Si) i vicinalne silanol grupe (dve susedne silanol grupe međusobno povezane vodoničnim vezama). Reaktivnost silike kao nosača zavisi od koncentracije Si-OH grupa na površini [67].

Cilj sinteze nanočestica silike postupkom piro-hidrogenizacije je da se dobiju pojedinačne pravilne sferne čestice odgovarajućih dimenzija. S obzirom da se u postupku javlja aglomeracija čestica, neophodno je da se izvrši karakterizacija čestica, odnosno odredi njihova veličina, stepen aglomeracije, karakter i veličina površine, nekom od odgovarajućih analitičkih tehnika. Na slici 18. prikazan je snimak nanosilike dobijene postupkom piro-hidrogenizacije, snimljen elektronskim mikroskopom, skenirajućom tehnikom (SEM)[79].



Slika 18. SEM snimak pirogene silike sa otvorenim fraktalnim agregatima [79].

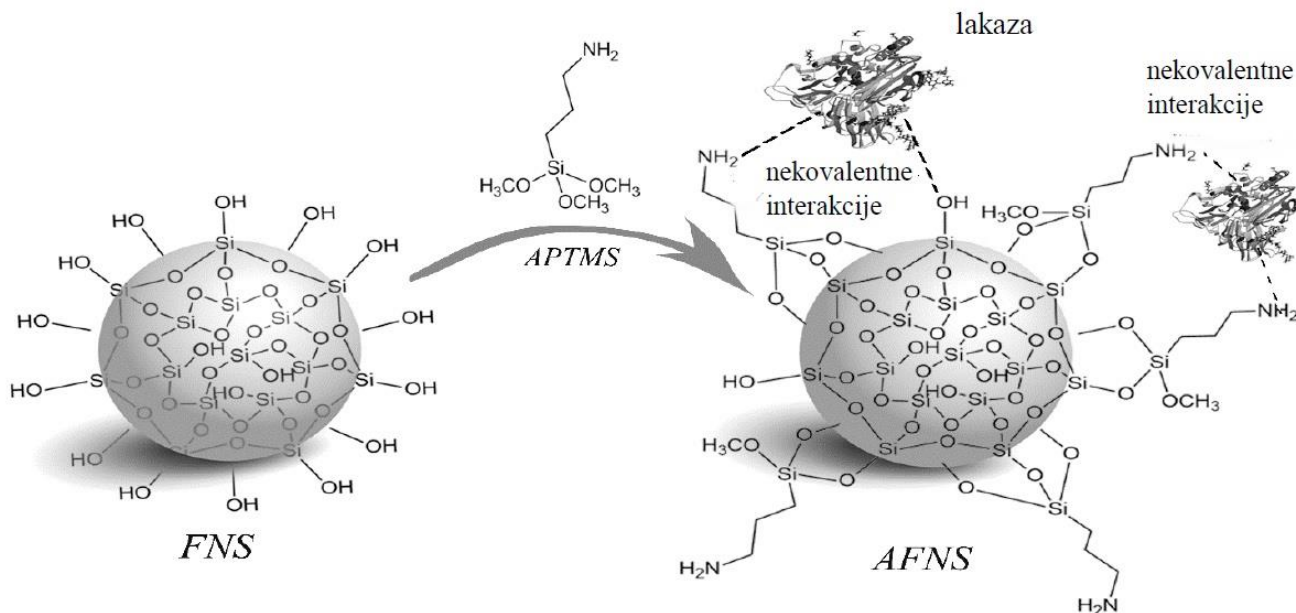
Neke od prednosti pirogenih nanočestica silike su niska cena, termostabilnost, velika mehanička otpornost zbog stabilnosti hemijske strukture, biokompatibilnost, stabilnost u koncentrovanim rastvorima soli velika specifična površina ($> 200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) i hemijska inertnost, zbog čega se sve više primenjuju u procesima adsorpcije biomolekula (DNK, antitela, protein i drugi), u katalitičkim i separacionim procesima i biomedicini u vidu biosenzora[67].

U eksperimentalnom delu ove disertacije, korišćena je komercijalno dostupna neporozna pirogena silika AEROSIL® 380, jednog od najvećih proizvođača ove vrste silike na svetu, Evonik Industries iz Esena, Nemačka. Ona pripada grupi hidrofobnih prahova SiO_2 , sa mogućnošću hemijske modifikacije površine, što je u eksperimentalnom delu disertacije i iskorišćeno.

2.2.3.5.2. Hemijski modifikovane nanočestice silike

Hemijskom modifikacijom površine nanočestica, kao što je prethodno spomenuto, uvode se željene funkcionalne grupe na površinu nosača, čime se postiže veća mogućnost vezivanja supstrata, sprečava se moguća aglomeracija čestica kao posledica njihovih malih dimenzija i velike specifične površine i poboljšavaju se mehaničke i fizičke osobine, čime one dobijaju širu moguću primenu [80]. Modifikacija površine nanočestica se može vršiti organskim molekulima, ili neorganskim, ili organsko-neorganskim agensima, kovalentnim vezivanjem ili adsorpcijom na površinu nanočestica. Tehnika modifikacije i modifikator određuju vrstu, i gustinu uvedenih funkcionalnih grupa, potencijal, kao i debljinu filma na površini nosača i odnos između hidrofилности i hidrofobnosti površine [67].

Modifikacija površine nanočestica silike koje su korišćene kao nosač u ovoj disertaciji, vršena je reakcijom silanizacije, kojom se površina nanočestica oksida metala modifikuje pomoću organosilana, u vodenoj sredini ili u prisustvu organskih rastvarača, kovalentnim vezivanjem. Organosilani mogu da sadrže različite funkcionalne grupe na krajevima molekula (slobodnu hloridnu, tiolnu, karboksilnu, amino ili cijano grupu), te se na taj način ove terminalne grupe i uvode na površinu nosača. U modifikaciji nanočestica silike za potrebe ove disertacije, korišćen je 3-aminopropiltrimetoksisilan (APTMS), odnosno aminosilan, kojim se dobijaju amino-modifikovane nanočestice, sa većom mogućnošću vezivanja enzima. Šematski prikaz modifikacije površine silika nanočestica aminosilanom dat je na slici 19.



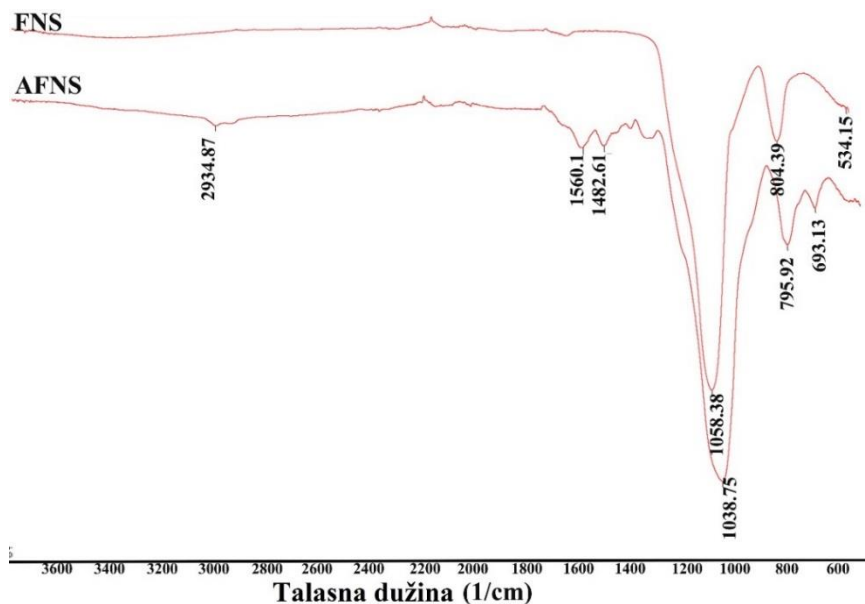
Slika 19. Šematski prikaz modifikacije površine nanočestica silike pomoću APTMS-a i mogućnost imobilizacije lakaze na dobijeni nosač

Proces silanizacije izvršen je "grafting" metodom, koja predstavlja kovalentno vezivanje krajnjih funkcionalnih grupa organskih polimera na površinu nosača, a odvija se složenim mehanizmom u više koraka. Sam proces je podložan uticajima mnogih faktora, kao što su temperatura, vrsta rastvora u kome se proces odvija, broj grupa koje mogu hidrolizovati u molekulu organosilana, kao i vodeni film koji može da se formira na površini silike [67].

Nemodifikovane neporozne nanočestice silike pokazale su se kao dobar nosač za imobilizaciju enzima adsorpcijom, pri čemu dolazi do formiranja nekovalentnih interakcija između terminalnih silanol grupa na površini nanočestica i funkcionalnih grupa prisutnih u enzimu, pretežno elektrostatičkih interakcija i vodoničnih veza usled razlike u naelektrisanju površina enzima i nosača [61]. Adsorpcija enzima na ove nanočestice zavisi od strukture i koncentracije enzima koji se adsorbuje, pH sredine u kojoj se vrši adsorpcija, jonske jačine vodenog rastvora i same morfologije kao i koncentracije nosača, odnosno nanočestica.

Modifikovane nanočestice organosilanima pružaju mogućnost kovalentnog vezivanja enzima, ukoliko se modifikuju odgovarajućim organosilanima, kao što su epoksi-silani ili merkapto-silani.

Aminosilani kao modifikujući agensi imaju širu upotrebu zbog svoje lake dostupnosti i niske cene. Uvedene amino grupe na površini nosača, kao i kod nemodifikovanih neporoznih nanočestica silike, omogućavaju imobilisanje enzima takođe uglavnom adsorpcijom[81]. Uspešna modifikacija FNS-a u AFNS potvrđena je snimljenim FT-IR spektrima FNS-a i AFNS-a, gde su se na AFNS spektru pojavila još dva pika na 1560 cm^{-1} i 1482 cm^{-1} kao rezultat valencionih vibracija $-\text{NH}_2$ grupe, kako je prikazano na slici 20.



Slika 20. FT-IR spektar FNS-a i AFNS-a[75]

Ova promena na FT-IR spektru ukazuje na prisustvo slobodnih amino grupa na površini AFNS-a [76].

2.2.3.6. Amino-modifikovane ligninske mikrosfere (A-LMS)

Pod mikrosferama se podrazumevaju sferne čestice, u rasponu prečnika uobičajeno od 1 μm do 1000 μm (1 mm). Mikrosfere se mogu proizvesti od različitih prirodnih i sintetičkih materijala. Komercijalno su dostupne staklene mikrosfere, polimerne mikrosfere, metalne mikrosfere, keramičke i druge. Čvrste i porozne mikrosfere koriste za različite primene. Porozne mikrosfere se obično koriste kao aditivi za smanjivanje gustine materijala ili kao adsorbensi, dok čvrste mikrosfere imaju brojne primene u zavisnosti od materijala od koga su izgrađene i veličine.

Najnovija istraživanja u oblasti imobilizacije enzima zasnovana su na novim materijalima, kao nosačima za imobilizaciji enzima, koji su prirodni, netoksični i jeftini, kao što su materijali organskog porekla, hibridni i kompozitni materijali [82].

Mikrosfere od biorazgradivih materijala kao što je poliakrildekstran, ali takođe i od komercijalno dostupnih, kao što je već spominjana silika, zatim PVC i drugi, uspešno su korišćeni za imobilizaciju, kao nosači enzima [83–85]. Morfološke i fizičke karakteristike nosača imaju značajan uticaj na proces imobilizacije enzima, kao i njegova katalitička svojstva, jer su tokom procesa imobilizacije nosač i enzim u direktnom kontaktu. Jedno od željenih svojstava nosača je poroznost, zbog toga što će veće površine i veći broj pora dovesti do većih koncentracija imobilisanog enzima, a sam enzim biće zaštićeniji od uticaja sredine.

Ono što razlikuje porozne mikrosfere od uobičajenog poimanja mikrosfera, su pore kako na površini, tako i unutar mikrosfera. Porozne mikrosfere imaju spoljne pore, na svojoj površini ili unutrašnje pore u svom jezgru, obično međusobno povezane, a biološki aktivne materije se mogu rastvoriti ili dispergovati na površini ili u jezgru mikrosfera. Poroznost igra važnu ulogu u određivanju kapaciteta nosača i kinetike imobilizacije. Prečnik, količina i struktura pora, su presudni faktori koji utiču na svojstva poroznih mikrosfera. Većina primena poroznih mikrosfera se zasniva na poroznoj strukturi i njenim karakteristikama, kao što su poroznost, veličina pora, specifična površina i slične. Zbog toga je kontrola strukture pora od posebnog značaja [86].

U smislu imobilizacije enzima, veličina pora trebalo bi da je dovoljna da omogući nesmetan prilaz supstrata do aktivnog centra enzima, kao i veću fleksibilnost enzima unutar pora [87]. Na osnovu IUPAC klasifikacije, porozni materijali mogu da se klasifikuju na osnovu veličine pora na: mikroporozne materijale (manje od 2 nm), mezoporozne materijale (od 2 nm do 50 nm), makroporozne materijale (od 50 nm do 200 nm), i gigaporozne materijale (veće od 200 nm). Po pitanju imobilizacije enzima, mnoge studije su pokazale da je veličina pora

heterogenog nosača, verovatno jedna od njegovih najvažnijih karakteristika, sa preporukom da je idealna veličina pora tri do pet puta veća od veličine proteina koji se imobilize [86].

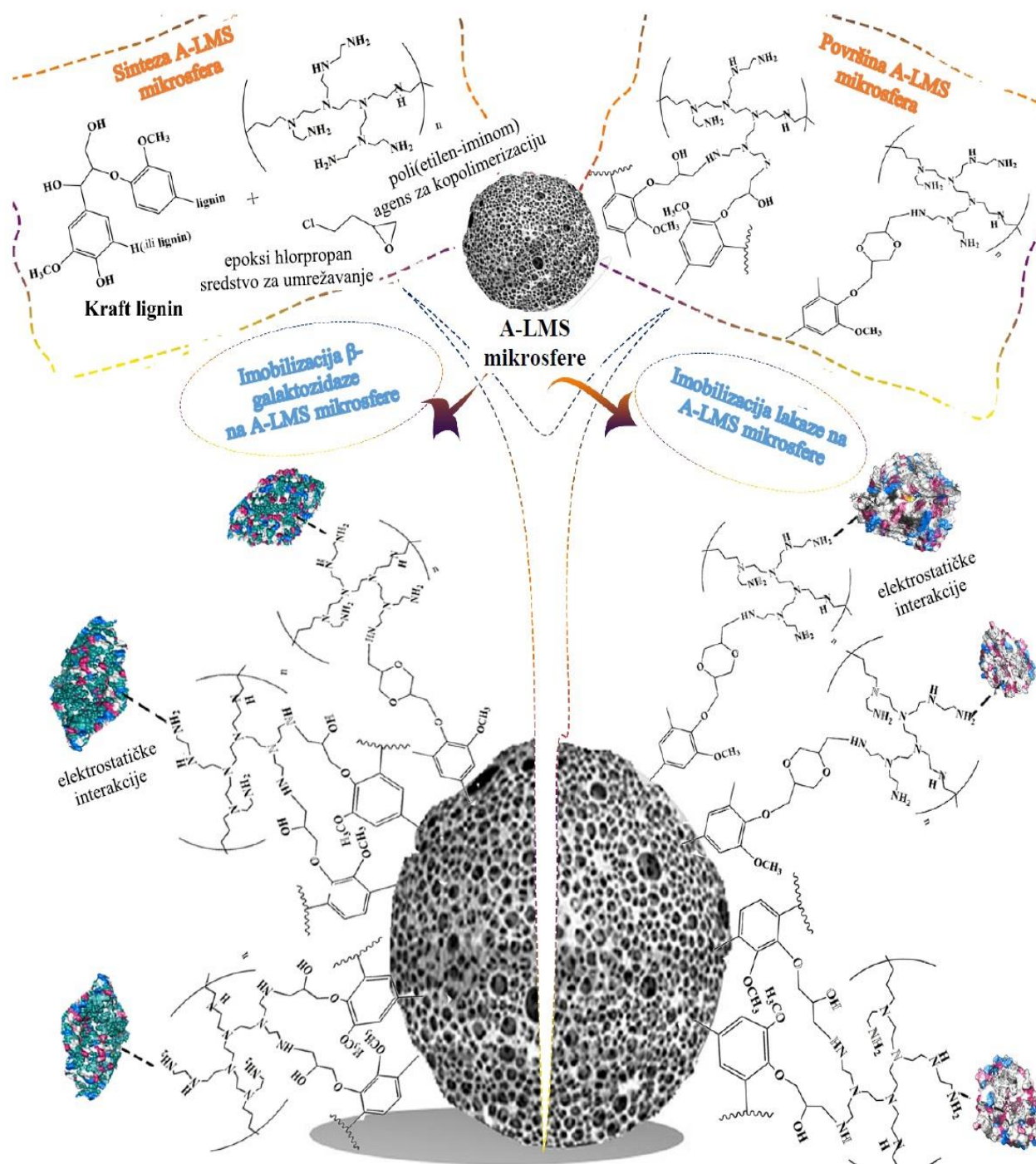
U ovoj disertaciji, imobilizacija lakaze će biti vršena i na amino-modifikovane ligninske mikrosfere (A-LMS) bogate amino funkcionalnim grupama. Prema ranije pomenutoj klasifikaciji, ovaj nosač spada u porozne nosače, izrađene od organskih molekula. Lignin, od koga su napravljene korišćene mikrosfere, predstavlja glavni strukturni polimer u ćelijskom zidu i drugi po zastupljenosti prirodni polimer na Zemlji. Kao prekursor za sintezu A-LMS koristi se kraft lignin.

Kraft lignin je vrsta industrijskog lignina koji se dobija kao ostatak iz kraft procesa pulpovanja. U procesu dobijanja celuloze makromolekuli lignina se razgrađuju, što rezultira smanjenjem molekulske težine, rastvaranjem lignina u alkalnom rastvoru, čineći rastvor tamno smeđim („crni lug“). Molekuli kraft lignina su izolovani taloženjem iz crnog luga pod kontrolisanim pH uslovima. Pošto je hemijska struktura prirodnog lignina složena i zavisi od biljnih vrsta iz kojih je izolovan, složenost njegove hemijske strukture postaje izraženija primenjivanjem postupka delignifikacije, pri čemu proces kraftnog pulpovanja nije izuzetak.

Generalno, u pogledu hemijske strukture, prirodni lignin sastoji se od veoma složenih fenil-propanoidnih (C9) polifenolnih oligomera, koji su povezani arilglicerol etarskim vezama između jedinica fenolnih alkohola: para-kumarila (H-tip), koniferila (G-tip) i sinapila (tipa S) [88]. Hemijska struktura upotrebljenog uzorka kraft lignina predstavljena je na slici 21.

S obzirom na to da je 70 % do 75 % hidroksilnih grupa kraft lignina sulfonovano, kraft lignin ima veliku rastvorljivost u polarnim organskim rastvaračima, kao i u bazama i alkalnim rastvorima. Treba naglasiti da je kraft lignin relativno jeftin, prirodni materijal, dobijen iz organskog otpada industrijske prerade celuloze, što je jedna od prednosti njegove upotrebe za sintezu A-LMS, sa ekonomskog aspekta.

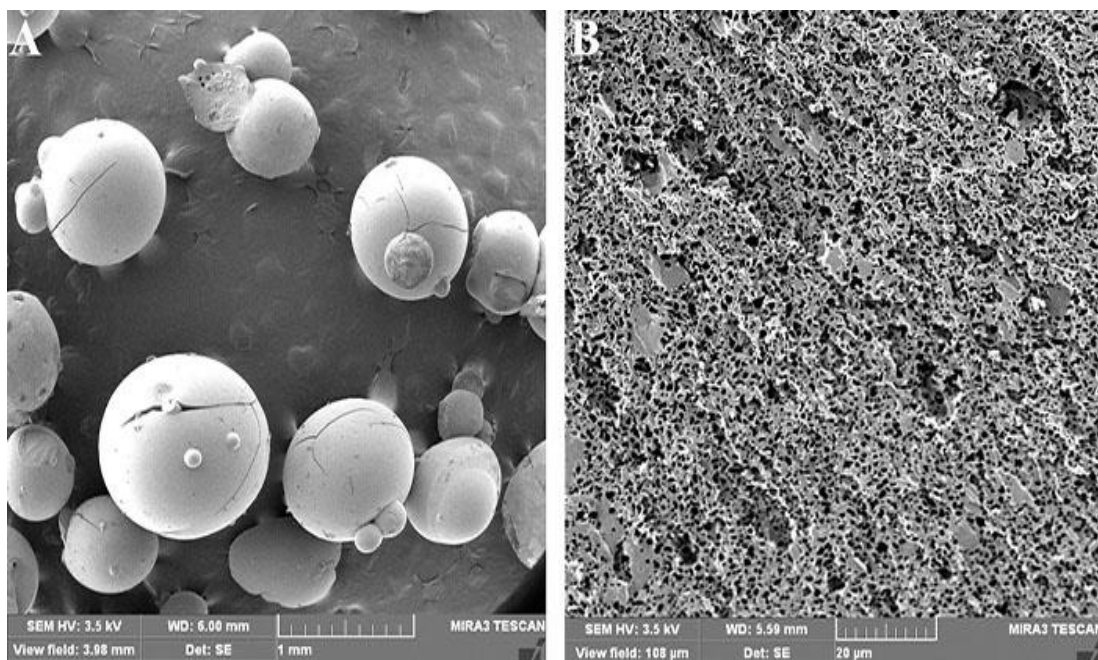
Tokom dobijanja A-LMS mikrosfera, za proces inverzne suspenzije kopolimerizacije, poli(etilen-imin) korišćen je kao agens za kopolimerizaciju, a epoksi hlorpropan je korišćen kao sredstvo za umrežavanje. Proces je optimizovan i opisan u studiji Popović *et al.* [89], kolega sa Katedre za organsku hemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koji su sintetisali A-LMS i ljubazno ih ustupili za ispitivanja u svojstvu nosača za imobilizaciju enzima, što je i ispitano u eksperimentalnom delu ove disertacije. U njihovoj studiji strukturalna karakterizacija (veličina, distribucija i morfologija čestica) sintetisanog A-LMS urađena je korišćenjem elektronskog mikroskopskog skeniranja polja (FESEM), Tescan Mira 3 FEG uređajem, specifična površina čestica izračunata je prema Brunauer-Emmett-Teller (BET), dok je za proračun zapremine pora korišćena Barrett-Joiner-Halenda (BJH) metoda [89]. Izgled A-LMS prikazan je na slici 22.



Slika 21. Struktura amino-modifikovanih ligninskih mikrosfera (A-LMS) i imobilizacija enzima adsorpcijom

Do sada su ove mikrosfere, proizvedene od prirodnog materijala, kraft lignina, pokazale dobra adsorpciona svojstva za potencijalnu upotrebu u bioremedijaciji, za uklanjanje jona teških metala, ali nisu ispitivane u svojstvu nosača za imobilizaciju enzima [89,90]. Na ovaj način sintetisane A-LMS mikrosfere sa definisanim svojstvima daju mogućnost kombinovanja nesumnjivih prednosti prekursora kraft lignina, kao što su biokompatibilnost i netoksičnost, u procesu imobilizacije enzima. Prisustvo amino funkcionalnih grupa na površini A-LMS povećava njihov afinitet prema biomolekulima.

Kao nosač za imobilizaciju, lignin se do sada koristio u matriksu hitin-lignin za imobilizaciju lipaze adsorpcijom, a silika-ligninski matriks kao stabilan i višekратно upotrebljiv biokatalitički sistem, korišćen je takođe za imobilizaciju enzima [91,92].



Slika 22. TESEM snimak A-LMS: A) veličina i oblik čestica, B) izgled površine čestica

2.2.3.6.1. Amino-modifikovane ligninske mikrosfere A-LMS_5 i A-LMS_10

Dobro je poznato da su raspoloživa površina za vezivanje enzima i sile interakcije, formirane između funkcionalnih grupa prisutnih na površini nosača i površini molekula enzima, presudne za imobilizaciju enzima na čvrste nosače [93].

Zbog ovih činjenica, za ispitivanje potencijalne primene u svojstvu nosača za imobilizaciju enzima, izabrane su dve vrste A-LMS mikrosfera (A-LMS_5 i A-LMS_10), različite morfologije, poroznosti i sadržaja amino grupa. Njihove karakteristike date su Tabeli 2.

Tabela 2. Strukturne karakteristike A-LMS 5 %_(m/m) i 10 %_(m/m) rastvora natrijum-alginata, kao emulgatora, određenih BET/BJH metodom[89]

Uzorak	Specifična površina SBET, m ² /g	Srednji prečnik, μm	Srednji prečnik pora, D_{mn} , nm	Najveći prečnik pora D_{max} , nm	Sadržaj amino grupa, mmol/g
A-LMS_5	7,68	800±80	12,36	25-50	7,7
A-LMS_10	2,38	800±80	22,22	20,32-59,77	6,5

U prethodno izvršenoj i objavljenoj studiji Popović *et al.* dokazano je da glavni uticaj na teksturalna, odnosno morfološka svojstva A-LMS, ima početna količina emulgatora (rastvor natrijum-alginata) dodata u smešu za polimerizaciju. Takođe, dokazano je da će emulgator stabilizovati rast novih čestica, dok će, s druge strane, emulgator sprečiti agregaciju, flokulaciju i koalescenciju. Kao rezultat ovog nalaza, za sintezu A-LMS_5 i A-LMS_10 primenjen je isti postupak, jedina razlika je bila u količini korišćenog rastvora alginatnog emulgatora: A-LMS_5 je dobijen upotrebom rastvora sa 5 %_(m/m) emulgatora, dok je tokom sinteze A-LMS_10 korišćen rastvor sa 10 %_(m/m) emulgatora[89].

2.2.4. Osnovne karakteristike slobodnih i imobilisanih enzima

Enzimi kao bikatalizatori u industriji imaju široku primenu, bilo da su u vidu dela žive ćelije ili izolovani iz nje, u slobodnoj ili imobilisanoj formi. Mogu se okarakterisati preko tri kvantitativne veličine, a to su: njihova aktivnost, specifičnost i selektivnost.

2.2.4.1. Aktivnost enzima i jedinice u kojima se izražava

Aktivnost enzima predstavlja brzinu reakcije koju enzimi katalizuju, što je u slučaju lakaze, brzina reakcije oksidacije supstrata. Za određivanje aktivnosti enzima koriste se različite instrumenatalne metode. Neke od najčešće korišćenih su: spektrofotometrijske, hemijske, polarimetrijske, viskozimetrijske, fluorimetrijske i druge. Izbor metode zavisi od prirode merene veličine, odnosno od fizičko-hemijske promene koja se ispituje i prati.

Za izražavanje enzimske aktivnosti najčešće se koristi enzimska jedinica koja se obeležava simbolom U ("unit", engleski), odnosno jedinica koja predstavlja onu količinu enzima koja, pod strogo određenim uslovima sredine (pH, temperatura), za vreme od jednog minuta katalizuju transformaciju jednog mikromola supstrata, a izražava se u jedinicama $\mu\text{mol min}^{-1}$. Enzimsku jedinicu definisala je Međunarodna unija za biohemiju i molekularnu biologiju (IUBMB) 1964. godine.

Generalna konferencija za tegove i mere (CGPM) je 1978. godine preporučila uvođenje nove jedinice za aktivnost enzima, pošto minut koji je u definiciji enzimske jedinice, nije SI jedinica. Tom preporukom, koja je 1999. godine i zvanično prihvaćena, uvodi se nova SI jedinica za katalitičku aktivnost enzima, katal, sa oznakom kat. Katal je količina enzima koja konvertuje 1 mol supstrata po sekundi. Odnos između U i kat uspostavljen je tako što enzimska jedinica 1U ima vrednost od 0,017 μ kat, odnosno 16,67 nkat. Međutim, danas je i dalje u širokoj upotrebi enzimska jedinica, U, koja se često u literature naziva i internacionalna ili međunarodna jedinica, IU ("international unit", engleski) ili internacionalna jedinica IJ. Međunarodna jedinica IU koristi se pretežno u farmaciji a predstavlja jedinicu mere za količinu supstance koja se zasniva na merenju bioloških efekata. Ova jedinica se koristi za vitamine, hormone, enzime, lekove, vakcine i druge biološki aktivne supstance. Ona može imati isto značenje kao i enzimska jedinica, ali u većini slučajeva nema. Precizna definicija IU ili IJ se razlikuje od supstance do supstance i predstavlja međunarodni dogovor za svaku supstancu.

Aktivnost enzima se može preciznije izraziti kao ukupna aktivnost (U), aktivnost po jedinici mase ($U\text{ mg}^{-1}$) ili kao aktivnost po jedinici zapremine (zapreminska aktivnost ili koncentracija enzimske aktivnosti – $U\text{ ml}^{-1}$).

Specifična aktivnost enzima je veličina koja predstavlja broj jedinica aktivnosti po jednom miligramu proteina u enzimskom preparatu ($SA [U\text{ mg}^{-1}\text{ proteina}] = A/SP$, gde je SA specifična aktivnost, A aktivnost izražena u enzimskim jedinicama a SP sadržaj proteina u enzimskom preparatu u miligramima), pri čemu enzimski preparati predstavljaju proizvode dobijene iz životinjskih, biljnih ili mikrobioloških izvora koji sadrže jedan ili više enzima. Enzimski preparati su komercijalno dostupni kao tečnosti, u obliku koncentrata ili praha i kao imobilizovani enzimski preparati. Da bi rezultati različitih ispitivanja bili uporedivi, neophodno je navesti uslove okoline pod kojima su ona vršena, kao što su pH vrednost, temperature, organski rastvarači i dr.

2.2.4.2. Specifičnost i stabilnost

Specifičnost enzima, ili selektivnost, izražava sposobnost enzima da od niza mogućih reakcija katalizuje samo jednu. U tom smislu, specifičnost može biti: stroga ili apsolutna (enzim katalizuje određenu reakciju samo jednog supstrata), grupna (enzim deluje na više supstrata sa određenom atomskom grupom ili vezom u molekulu), prema vrsti reakcije (enzim katalizuje određene reakcije bez obzira na hemijsku strukturu supstrata), stereohemijska specifičnost (enzim deluje samo na jedan od dva moguća stereohemijska oblika supstrata), regiospecifičnost (katalitičke promene nastaju samo u određenoj regiji supstrata) i enantiospecifičnost (specifičnost prema optički aktivnim supstancama) [64]. Već je ranije spomenuto da lakaze katališu reakciju oksidacije mnogobrojnih supstrata, odnosno da poseduju nisku specifičnost prema supstratu, čime je i velika mogućnost njihove industrijske primene.

Najvažnija karakteristika enzima za njegovu primenu je stabilnost. Enzim, koji svoju katalitičku aktivnost ispoljava u nativnoj konformaciji i prirodnom okruženju, najčešće je osetljiv na veoma male promene parametara okoline (pH, temperature, jonske jačine rastvora, koncentracija organskih rastvarača). Promene ovih parametara mogu izazvati i promene u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi enzima, pri tome izazivajući denaturaciju i gubitak katalitičke moći.

Imobilizacijom enzima može se u velikoj meri uticati na povećanje stabilnosti enzima, čime se znatno proširuje mogućnost industrijske primene enzima, u inače nepovoljnim uslovima sredine za slobodan enzim (povišena temperatura, pritisak, prisustvo deterdženata i slično) [64,94].

2.2.4.3. Karakteristike imobilisanih enzima

Isti parametri koji karakterišu slobodne enzime (aktivnost, specifičnost i stabilnost) karakterišu i imobilisane enzime. Da bi se pratila uspešnost izvršene imobilizacije enzima, definišu se posebni parametri koji se prate. U ovoj disertaciji, za procenu uspešnosti imobilizacije prateće se parametri:

- Koncentracija imobilisanih proteina (mg/g).
- Prinos imobilizacije proteina (%) - odnos mase imobilisanog enzima i mase slobodnog enzima na početku imobilizacije.
- Koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g nosača) - ukupna aktivnost imobilisanog enzima, drugačije nazivana "aktivnost imobilisanog enzima" ili "izražena aktivnost imobilisanog enzima" po jedinici mase suvog nosača unetog u imobilizaciju.
- Prinos imobilizacije aktivnosti (%) - predstavlja odnos aktivnosti imobilisanog enzima i aktivnosti slobodnog enzima na početku imobilizacije.
- Operativna stabilnost imobilisanih enzima.

Od koncentracije imobilisanih proteina zavise aktivnost i stabilnost imobilisanog enzima. Maksimalna aktivnost imobilisanog enzima postiže se kada je koncentracija imobilisanog enzima jednaka koncentraciji potrebnoj da se formira monosloj na površini nosača, kod imobilizacije adsorpcijom.

Koncentracija enzima u rastvoru na početku imobilizacije utiče u velikoj meri na obim imobilizacije i aktivnost imobilisanog enzima.

Prinos imobilizacije aktivnosti kvantativno određuje koliko je aktivnosti enzim zadržao od početne aktivnosti u toku samog postupka imobilizacije.

Operativna stabilnost imobilisanih enzima ispituje se primenom dobijenog imobilisanog preparata u više uzastopnih reakcionih ciklusa. Za svaki od ciklusa određuje se koncentracija imobilisane aktivnosti, odnosno aktivnost imobilisanog enzima (IU/g) i iskazuje u odnosu na aktivnost imobilisanog enzima u nultom ciklusu. Na taj način se, prateći pad aktivnosti imobilisanog enzima, procenjuje stabilnost dobijenog imobilisanog preparata.

2.3. Organske zagađujuće materije i primena lakaza u njihovom uklanjanju

Zagađenja predstavljaju neželjene promene fizičkih, hemijskih i bioloških svojstava životne sredine (vazduha, vode i zemljišta), koje mogu da nepovoljno deluju na živa bića ili narušavaju njihove ekosisteme. Zagađivanje životne sredine je unošenje zagađujućih materija u životnu sredinu, izazvano ljudskom delatnošću ili prirodnim procesima, koje ima ili može imati štetne posledice po životnu sredinu i zdravlje ljudi.

Zagađujuće materije ili supstance su ostaci onoga što proizvodimo, koristimo i odbacujemo. Materija (ili energija) postaje zagađujuća, kada se pojavi u nepoželjnim količinama na nepoželjnom mestu i u nepoželjno vreme.

Problem zagađenja životne sredine se poslednjih godina veoma aktuelizuje, usled konstantnog i delimično nekontrolisanog zagađenja. Uzroci ove pojave su prvenstveno porast svetske populacije, smanjenje životnog prostora i povećano korišćenje prirodnih resursa da bi se zadovoljile potrebe stanovništva. Usled povećanja potrošnje, kako prirodnih resursa, tako i materijalnih dobara, povećava se i proizvodnja otpada. Da bi se ovaj problem stavio pod kontrolu i postepeno rešavao, bez sporednih negativnih pratećih pojava i stvaranja novog otpada, svetska i naučna javnost se sve više okreće ka zelenim tehnologijama, čiji je cilj očuvanje životne sredine kroz održivi razvoj i primenu rešenja za prečišćavanje vode, reciklažu otpada, obnovljive izvore energije i druge.

Primena enzima u mnogim industrijskim procesima, kao i procesima bioremedijacije, je dobro poznata, ali se i dalje njene mogućnosti istražuju. Lakaza kao enzim, ima širok potencijal za primenu u obe navedene svrhe.

2.3.1. Organske zagađujuće materije

Organske zagađujuće supstance su veoma široko rasprostranjene i predstavljaju sveprisutna jedinjenja koja narušavaju kvalitet životne sredine. Postoji više grupa ovih jedinjenja, sa specifičnim fizičko-hemijskim osobinama, koja su proizvedena i korišćena u različite svrhe, na raznim lokacijama. Najčešće su to složena jedinjenja velikih molekulskih masa, koja često u svom sastavu imaju halogene elemente, otporna na biološku, hemijsku i fotolitičku degradaciju. Zbog relativno slabe rasvorljivosti u vodi, veće količine organskih zagađivača mogu se naći u zemljištu i sedimentima, iako je njihova toksičnost izražena i pri vrlo niskim koncentracijama. Njihova umerena isparljivost omogućuje im prenošenje putem vazduha na veće razdaljine, usled čega se mogu naći u sredinama u kojima nisu ni bile korišćene.

Proizvodnja i upotreba ovih jedinjenja u većini zemalja sveta je zabranjena ili strogo regulisana i kontrolisana. Međutim, mnoga istraživanja dokazuju da su ova jedinjenja i dalje prisutna u svim delovima životne sredine, te se mogu naći i u hrani, čime dospevaju u lanac ishrane i mogu negativno uticati na zdravlje ljudi [95]. Neki od potencijalnih izvora organskih zagađivača u prirodi su: industrijske otpadne vode ili izlivanja, izlivanja iz rezervoara nafte ili

hemikalija, neodgovarajuća primena pesticida, nepropisno odlaganje sredstava za čišćenje, ulja ili antifrizna, kao i urbanog otpada, deponije, curenja iz naftovoda kao i akcidenti [96].

Organski zagađivači su nastali pretežno kao posledica ljudske delatnosti i u prirodi se mogu naći u neizmenjenom obliku ili u vidu proizvoda delimične degradacije ili izmenjenom obliku. Ove hemikalije su svrstane u grupe:

- pesticidi: aldrin, dieldrin, hlordan, toksafen, mireks, endrin, heptahlor, heksahlorobenzen (HCB), hlordekon, dihlor-difenil-trihloretan (DDT), heksabrombifenil i heksahlorcikloheksan (lindan HCH);
- organski halogeni derivati: polihlorovani bifenili (PCBs), polihlorovani dibenzo-*p*-dioksini /dioksini/ (PCDDs), polihlorovani dibenzo-*p*-furani /furani/ (PCDFs);
- Policiklični aromatični ugljovodonici (PAHs)

Većina ovih jedinjenja, kao što su pesticidi, spadaju u dugotrajne organske zagađujuće supstance, koje su u podzakonskoj regulativi prepoznate kao prioritetne organske zagađujuće supstance. Pored njih, pod organskim zagađivačima, podrazumevaju se i organska jedinjenja koja ulaze u sastav industrijskih otpadnih voda, kao što su industrijske boje.

2.3.1.1. Dugotrajne organske zagađujuće supstance (POPs)

POPs hemikalije ("Persistent Organic Pollutants", engleski) su dugotrajne organske zagađujuće supstance (u literaturi se mogu naći i pod nazivom „perzistentni organski polutanti“) odnosno organska jedinjenja, toksična po ljude i živi svet, bioakumulativna i perzistentna u životnoj sredini. POPs hemikalije su slabo rastvorne u vodi, a veoma dobro u mastima, usled čega lako prolaze kroz fosfolipidne strukture bioloških membrane i deponuju se u masnom tkivu i drugim tkivima koja sadrže lipide [97].

Zbog svojih svojstava, ove hemikalije su postale jedna od prioritetnih tema u oblasti zaštite životne sredine, sa prepoznatom potrebom za strateškom, sistematskom akcijom na globalnom nivou. Stokholmska konvencija o POPs hemikalijama, usvojena na konferenciji održanoj 22. maja 2001. u Stokholmu, u Švedskoj, koja je stupila na snagu 17. maja 2004. godine, predstavlja međunarodni sporazum o zaštiti zdravlja ljudi i životne sredine od ovih hemikalija. Države potpisnice pomenute Konvencije obavezuju se da utvrde, zabrane ili ograniče proizvodnju, promet i korišćenje POPs, i preuzimaju obavezu da smanje, odnosno eliminišu emisije 12 određenih POPs hemikalija u životnu sredinu. Stokholmska konvencija ima 152 zemlje potpisnice i 179 strana ugovornica. Ova lista od 12 POPs hemikalija je kasnije dopunjena,

tako da sada obuhvata 22 organska jedinjenja, kako je prikazano u tabeli 3. Država Srbija je jedna od potpisnica Stokholmske konvencije.

Tabela 3. Prvobitne i nove POPs hemikalije prema Stokholmskoj konvenciji[98]

Grupa POPs jedinjenja	12 prvobitnih POPs	10 novih POPs
POPs pesticidi	aldrin, hlordan, DDT, dieldrin, endrin, heptahlor, heksahlorbenzen (HCB), mireks i toksafen	lindan (γ - HCH), hlordekon, pentahlorbenzen, α -HCH, β -HCH i endosulfan
Industrijske POPs	PCBs	PFOS, heksabrombifenil, PBDEs (tetrabromdifenil etar i pentabromdifenil etar; heksabromdifenil etar i heptabromdifenil etar)
Nenamerno proizvedene POPs	PCDDs, PCDFs, PCB i heksahlorbenzen (HCB)	α -HCH, β -HCH i pentahlorbenzen

Narodna skupština Republike Srbije usvojila je 2009. godine Zakon o potvrđivanju Stokholmske konvencije ("Sl. glasnik RS" br. 42/09), a u ovoj oblasti nadležni organ u Republici Srbiji je Ministarstvo zaštite životne sredine, kao i Agencija za zaštitu životne sredine, koji prate i harmonizuju zakonodavstvo Evropske unije, iz ove oblasti.

Ovo ministarstvo donelo je Pravilnik o listi POPs materija načinu i postupku za upravljanje POPs otpadom i graničnim vrednostima koncentracija POPs materija koje se odnose na odlaganje otpada koji sadrži ili je kontaminiran POPs materijama ("Sl. glasnik RS" br. 65/2011 i 17/2017) koji definiše listu zagađujućih jedinjenja, načine i postupke upravljanja otpadom koji je došao u kontakt sa ovim jedinjenjima kao i granične vrednosti za ove zagađujuće supstance [99].

Po pitanju zaštite voda, pravni okvir predstavlja Okvirna direktiva Evropske unije za vode 2000/60/EC doneta 2000. godine koja u članu 16. postavlja temelje za nacionalne strategije protiv zagađenja voda, odnosno, uspostavljanje liste prioriternih jedinjenja, koja je objavljena u Aneksu X Direktive. Lista je formirana na osnovu rizika koji neka hemikalija predstavlja za vodenu sredinu, prema datoj metodologiji za procenu rizika. Ova lista je 2008. godine zamenjena Aneksom II Direktive Evropskih standarda kvaliteta (2008/105/EC - EQSD) koja je kasnije izmenjena i dopunjena (Directive 2013/39/EU).

Kao rezultat harmonizovanja srpskog zakonodavstva, sa zakonodavstvom Evropske unije po pitanju kvaliteta voda, a u skladu sa pomenutim aktima, 2014. godine je doneta Uredba o graničnim vrednostima prioriternih i prioriternih hazardnih supstanci koje zagađuju

površinske vode i rokovima za njihovo dostizanje ("Sl. glasnik RS" br. 24/2014) kojom se definišu prioritetne kao i prioritetne hazardne supstance i njihove maksimalno dozvoljene i prosečne godišnje koncentracije u cilju određivanja kvaliteta životne sredine.

S obzirom na to, da će neke od ispitivanih supstanci u okviru ove distertacije biti organohlorni pesticidi, bitno je napomenuti da je njihova koncentracija u prirodi strogo regulisana, a pesticidi iz ove grupe prepoznati su kao prioritetna organska zagađujuća jedinjenja, u okviru kompletne zakonske regulative u Republici Srbiji, vezanoj za zaštitu životne sredine.

2.3.1.2. Organohlorni pesticidi

Pesticidi su proizvodi hemijskog ili biološkog porekla namenjeni za sprečavanje, suzbijanje i uništavanje organizama štetnih za bilje, biljne proizvode i plodove, drvo i proizvode od drveta na otvorenom i u zatvorenom prostoru, kao i suzbijanje ili uništavanje nepoželjnih vrsta biljaka i drugih organizama. Slabo se razlažu u vodi i zemljištu, poseduju sposobnost akumulacije u organizmima biljaka i životinja, zbog čega njihova dugotrajna primena u neograničnim količinama ispoljava značajna negativna dejstva na biocenoze.

Njihovom akumulacijom u organizmima, oni postepeno ulaze u lanac ishrane, što predstavlja veliku opasnost za sve učesnike lanca ishrane. [100]. U Republici Srbiji, pesticidi se u zakonskoj regulativi nazivaju terminom "sredstva za zaštitu bilja". Njihova registracija, kontrola, promet, uvoz i primena u poljoprivrednoj proizvodnji i šumarstvu, regulisana je Zakonom o sredstvima za zaštitu bilja ("Službeni glasnik RS", broj 41/2009 i 17/2019).

U zemljištu se vremenom, bez obzira na njihovu perzistentnost, vrši degradacija pesticida. Dva najzastupljenija hemijska procesa kojima se ova jedinjenja razgrađuju su hidroliza i redoks reakcije. Pored njih, od fizičko-hemijskih procesa, odigrava se fotohemijska transformacija pesticida, kod onih koji se nalaze na površini zemljišta, izloženi sunčevoj svetlosti, a njen doprinos ukupnoj razgradnji je najmanji. Jedna od najznačajnijih degradacija pesticida u zemljištu je mikrobiološka degradacija, koja je najzastupljenija u površinskom sloju zemljišta, a manje u dubljim slojevima, gde je dominantna hemijska degradacija [101].

Organohlorni pesticidi ("Organochlorine pesticides", engleski, OCPs) su sintetska organska jedinjenja koja deluju kao stimulatori nervnog sistema. Predstavljaju antagoniste γ -aminobuterne kiseline, onemogućavaju transport jona K^+ i Na^+ kroz membrane nervnih ćelija, čime i prenos nervnih impulsa, izazivajući tremore, konvulzije i hiperaktivnost, što konačno rezultira smrću organizama. Takođe vrše inhibiciju ATP-aze koja učestvuje u transformaciji i transportu jona kroz membranu, a vrše i inhibiciju centralnog i perifernog nervnog sistema.

Glavni sistem na koji deluju je nervni, poseduju nisku početnu toksičnost, ali su zato izuzetno perzistentni i bioakumuliraju se u masnim tkivima. Većina njih predstavljaju i

endokrine disruptore [102]. Smatraju se za kancerogena jedinjenja i jedinjenja koja mogu da izazovu neurološka oboljenja ili smrt [103].

U odnosu na podelu prema načinu delovanja, OCP spadaju pretežno u insekticide, koji su otrovna jedinjenja za insekte, ali i za ljude.

Pod nazivom "organohlorni pesticidi" podrazumevaju se različite grupe hemikalija koje međusobno imaju slične hemijske karakteristike i strukturalne formacije. Njihova tipična struktura je ciklična, alifatična ili aromatična, supstituisana hlorom. Kao posledica toga, većina OCP-a je umereno rastvorljiva i poluisparljiva.

Kao i ostali perzistentni organski zagađivači, poseduju veliku stabilnost, te ostaju nepromenjeni u životnoj sredini u veoma dugim vremenskim periodima [104]. Organohlorni pesticidi su slabo polarna jedinjenja, koja su slabo rastvorljiva u vodi, a dobro u mastima. Njihova perzistentnost se definiše kao polu-život duži od dva meseca u vodi, ili šest meseci u zemljištu i sedimentima. Vreme poluživota OCP-a iznosi od 60 dana pa do 10-15 godina [105].

Svoju široku primenu OCP su imali sve od 1940. godine, zbog svoje visoke efikasnosti u suzbijanju štetočina i bolesti, a primenjivali su se u poljoprivredi, domaćinstvima, baštama i javnim mestima [106]. Većina ovih jedinjenja predstavljaju insekticide.

U ovu klasu pesticida spadaju: dihlor-difenil-etani (DDT i njegovi derivati DDD i DDE, metoksihlor), hlorovani ciklodieni, odnosno derivati heksahlorciklopentadiena (aldrin, dieldrin, endosulfan, heptahlor, heptahlorepoksid i ostali) i hlorovana jedinjenja cikloheksana i benzena (heksahlorcikloheksan (HCH, lindan), heksahlorbenzen/benzenheksahlorid (HCB/BHC), mireks i drugi) [103].

U eksperimentalnom delu ove disertacije, ispitićće se pojedini pesticidi koji pripadaju klasi OCP-a, iz sve tri grupe jedinjenja u okviru ove klase. Njihove osnovne karakteristike date su u tabeli 4.

U daljem tekstu, detaljnije će biti opisani izabrani pesticidi: 4,4'-DDT, 4,4'-DDD, metoksihlor, aldrin, dieldrin, endosulfan I i II, heptahlor, heptahlor-*endo*-epoksid izomer A i lindan.

Tabela 4. Osnovne karakteristike izabranih organohlornih pesticida

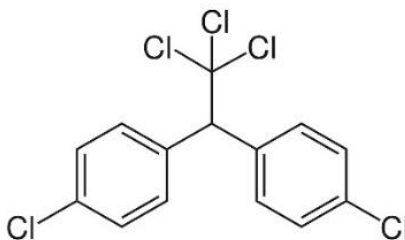
Naziv	Hemijska formula	M (g/mol)	CAS broj
4,4'-DDT	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	354,49	50-29-3

4,4'-DDD	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	320,05	72-54-8
Metoksihlor	C ₁₆ H ₁₅ Cl ₃ O ₂	345,65	72-43-5
Aldrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	364,91	309-00-2
Dieldrin	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	380,91	60-57-1
Endosulfan I + II	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	406,93	115-29-7
Heptahlor	C ₁₀ H ₅ Cl ₇	373,32	76-44-8
Heptahlor-<i>endo</i>-epoksid izomer A	C ₁₀ H ₅ Cl ₇ O	389,32	1024-57-3
Lindan	C ₆ H ₆ Cl ₆	290.83	58-89-9

2.3.1.2.1. Dihlor-difenil-trihloretan (DDT) i dihlor-difenil-dihloretan (DDD)

DDT predstavlja jedan od najviše korišćenih pesticida. Njegove značajne hemijske karakteristike insekticida, otkrio je Pol Herman Miler, 1939. godine. Za vreme Drugog svetskog rata intenzivno je korišćen u borbi protiv malarije, tifusa i žute groznice, zahvaljujući čemu je malarija iskorenjena u Evropi i Severnoj Americi. Pored upotrebe u medicinske svrhe, našao je primenu i u uništavanju štetočina u poljoprivrednoj proizvodnji.

Njegova proizvodnja i upotreba zabranjena je još od 1970-ih godina skoro u celom svetu, ali se njegovi tragovi i dalje mogu pronaći u životnoj sredini, pretežno u zemljištu. S obzirom na to da se koristio i u lečenju malarije, u pojedinim zemljama, kao što je Kina, njegova proizvodnja je nastavljena znatno duže [107].



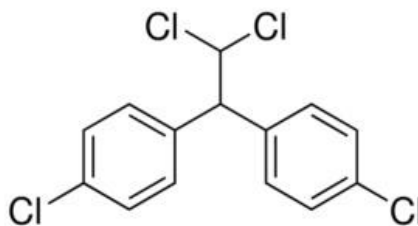
Slika 23. Hemijska struktura 4,4'-DDT-a

DDT je bezbojni kristal ili beli prah, bez mirisa ili blago-aromatičnog mirisa, nerastvorljiv u vodi, ali rastvorljiv u acetonu ili etru, kao i u skoro svim organskim rastvaračima. Kao insekticid deluje kontaktno, a akumulira se u kostima i mišićima. Poluživot DDT-a je između 2 i 15 godina, u zavisnosti od sredine (u slanoj vodi period poluživota iznosi oko 56, a u slatkoj vodi oko 28 dana)[105].

Pod pojmom DDT se podrazumeva 4,4'-DDT (1,1,1-trihlor-2,2-bis(*p*-hlor-fenil)etan), iako tehnički DDT predstavlja smešu izomera, u kojoj je aktivna komponenta *p,p'*-DDT, sa 65 % do 80 % zastupljenosti. Produkti razgradnje DDT-a su DDE i DDD koji kao i DDT, pokazuju veliku rezistentnost i poseduju slične hemijske osobine i fiziološko dejstvo kao DDT.

Njegovo štetno dejstvo na ljudski organizam manifestuje su osećajem peckanja u ustima, mučninom, nesvesicom, glavoboljom, povraćanjem, tremorom u ekstremitetima, anoreksijom, slabošću mišića, anksioznošću i nevnom napetošću. U slučajevima veće izloženosti, dovodi do ozbiljnijih oboljenja, kao što su karcinom i poremećaji endokrinog sistema [105].

Pesticid 4,4'-DDD ili 1,1-dihlor-2,2-bis(*p*-hlor-fenil)etan je jedan od derivata, odnosno metabolita 4,4'-DDT-a, koji se stvara u anaerobnim uslovima razgradnje, zamenom jednog atoma hlora atomom vodonika.



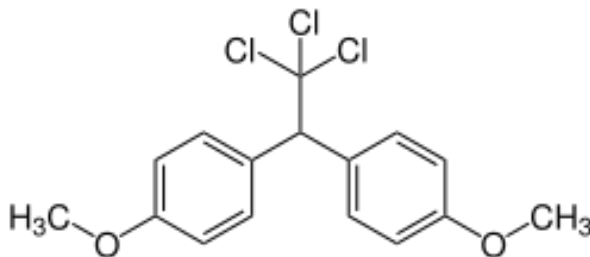
Slika 24. Hemijska struktura 4,4'-DDD-a

On sam može da se dalje razgrađuje do manje toksičnih metabolita, kao što su 1-hlor-2,2-bis(*p*-hlor-fenil)etan (DDMU) ili 1,1-bis(*p*-hlor-fenil)-2-hlorethan (DDMS) [108]. Hemijske osobine DDD-a su veoma slične DDT-u, sa takođe velikom rastvorljivošću u mastima i organskim rastvaračima, a slaboj u vodi. To je bela, kristalna supstanca, koristi se pretežno kao insekticid, a kao takav, smatra se da ima blaže dejstvo od DDT-a.

DDD, kao i DDT, predstavlja potencijalno kancerogeno jedinjenje, koje može da izazove poremećaj rada endokrinih žlezda, kao i imunog i reproduktivnog sistema ljudi [104].

2.3.1.2.2. Metoksihlor

Insekticid metoksihlor je ušao u komercijalnu upotrebu 1946. godine kao zamena za DDT. Korišćen je u suzbijanju raznih vrsta buba i insekata, kako u poljoprivredi tako i u objektima u kojima je čuvana stoka i usevi.



Slika 25. Hemijska struktura metoksihlora

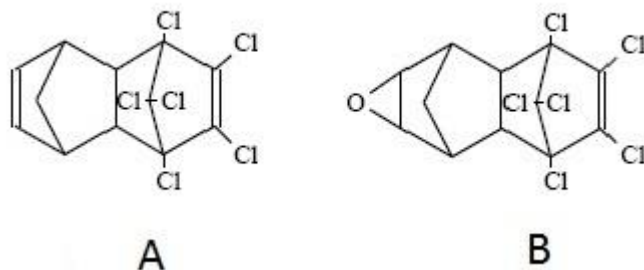
Metoksihlor (1-metoksi-4-[2,2,2-trihlor-1-(4-metoksifenil)etil]benzen) pripada istoj grupi OCP-a kao i DDT i DDD, odnosno dihlor-difenil-etanima. To je beli prah sa blago voćnim mirisom, neisparljiv i nerastvorljiv u vodi. Većinom se nalazi u zemljištu gde je i primenjivan, za koje se vezuje, tako da se i u rečnim sredinama može naći pretežno u sedimentima. Uglavnom nema veliku sposobnost bioakumulacije kao drugi organohlorni pesticidi ove grupe, ali se u živim organizmima ipak može naći u algama, puževima i nekim vrstama ribe.

U ljudski organizam može da dospe putem udisanja ili unosom zagađene hrane. Ne smatra se za kancerogeno jedinjenje, iako u većim koncentracijama izaziva poremećaje nervnog i reproduktivnog sistema [109].

2.3.1.2.3. Aldrin i dieldrin

Aldrin i dieldrin predstavljaju sintetičke organohlorne pesticide, koji su prvi put primenjeni u poljoprivredi kao insekticidi 1950. godine i sve do 1970. godine intenzivno korišćeni. Upotrebljavali su se za uništavanje skakavaca, termita i drugih insekata, kao i prenosilaca zaraznih bolesti. Tokom eksploatacije pokazali su se kao veoma toksični za akvatičan živi svet, ali i za sisare, uključujući i ljude, a unos u organizam čoveka je pretežno putem hrane. Njihova upotreba je vremenom zabranjena u većini zemalja sveta, do 80-ih godina prošlog veka [110].

Po pitanju hemijske strukture, aldrin i dieldrin imaju mnogo sličnosti. Spadaju u grupu hlorovanih ciklodiena, zajedno sa endosulfanom, heptahlorom i heptahlorepoksidom. Njihove hemijske strukture prikazane su na slici 26.



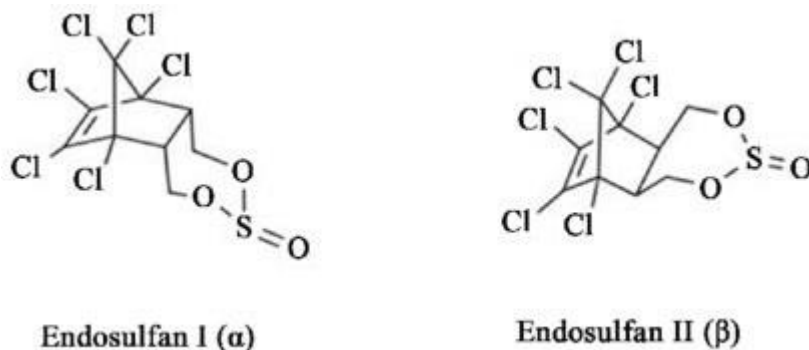
Slika 26. Hemijske strukture aldrina (A) i dieldrina (B)

U životnoj sredini se aldrin veoma lako transformiše u dieldrin, koji se smatra za jednu od naperzistentnijih organskih zagađujućih supstanci. Predstavljaju bele praškaste supstance, blagog hemijskog mirisa.

U Srbiji su aldrin i dieldrin zabranjeni za upotrebu 1991. godine. Njihov poluživot u zemljištu iznosi od 2 do 15 godina. Smatra se da će dieldrin, koji se upotrebljavao 1950. godine biti prisutan u životnoj sredini i 2030. godine [111]. Posledice izloženosti aldrinu i dieldrinu, po zdravlje ljudi, manifestuju se od pojave konvulzija do mogućeg tumora, kao i oštećenja nervnog, imunog i reproduktivnog sistema [112].

2.3.1.2.4. Endosulfan

Endosulfan je prvi put registrovan 1954. godine, kao insekticid koji se upotrebljavao za zaštitu useva i duvana. Lako isparava, pa se prenosi na velike udaljenosti u atmosferi [113]. Mikroorganizmi mogu da ga metabolišu, usled čega nastaje niz jedinjenja, a takođe je podložan i hidrolizi.



Slika 27. Hemijska struktura izomera endosulfana

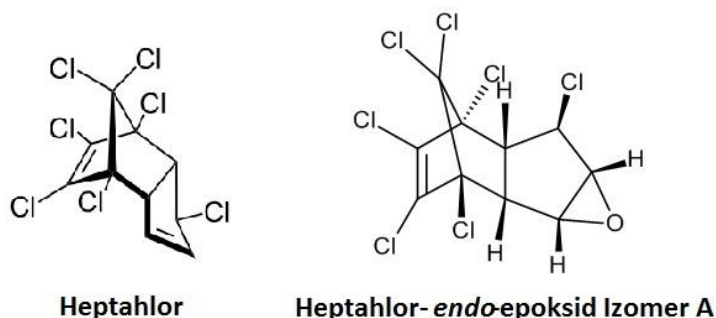
To je bezbojan kristal, ili beli prah, mirisa na terpene. Javlja se u formi dva izomera, α - i β -, koji se češće obeležavaju kao endosulfan I i endosulfan II i zastupljeni su u odnosu 7:3. Njihova hemijska struktura prikazana je na slici 27. Ovi izomeri imaju velike razlike u tačkama

topljenja i drugim hemijskim svojstvima, kao što je isparljivost (α -endosulfan je znatno isparljiviji). Vremenom se β -endosulfan spontano transformiše u α - oblik. Endosulfan podleže hidrolizi u rastvorima blagih kiselina i baza, uz oslobađanje sumpor-dioksida i formiranje odgovarajućeg diola [114].

U odnosu na ostale pesticide ove grupe, ima manju sposobnost akumulacije u životinjskim organizmima, ali ima izraženo akutno toksično dejstvo. U organizmu čoveka, kao i kod životinja deluje kao endokrini desruptor, negativno utičući na reproduktivni sistem, a može da negativno utiče i na druge sisteme u organizmu, kao što je nervni. Njegovo kancerogeno dejstvo nije dokazano[115].

2.3.1.2.5. Heptahlor i heptahlorepoxid

Heptahlor je prvi put sintetisan 1946. godine, a kao insekticid svoju primenu je našao u suzbijanju zemljišnih insekata, poljskih štetočina i skakavaca. Predstavlja belu kristalnu supstancu blagog mirisa na kamfor. Lako se rastvara u skoro svim organskim rastvaračima, ali i u vodi.



Slika 28. Hemijska struktura heptahlor i heptahlor-endo-epoksida izomera A

Veoma se lako transformiše u prirodi u heptahlorepoxid, koji je slabo rastvorljiv u vodi a primenjivao se isto kao insekticid u suzbijanju štetočina [116]. Heptahlor-endo-epoxid izomer A (trans)(trans-HCE), kao i heptahlor, mogu se naći u akvatičnim organizmima, a detektovani su i u dve vrste riba u Dunavu, u delu koji protiče kroz Srbiju [117].

Kao i ostali organohlorni pesticidi iz ove grupe hlorovanih diena, imaju negativan uticaj na zdravlje ljudi. Smatraju se uzročnicima poremećaja endokrinog i nervnog sistema, a i potencijalnim uzročnicima kancera. Za razliku od ostalih pesticida iz ove grupe, gde se prvo kod trovanja javljaju blaži simptomi, kod heptahlor manifestacija započinje iznenadnim konvulzijama. Osnovni način izlaganja ljudi ovim pesticidima je unosom hrane u organizam [110].

2.3.1.2.6. Lindan

Lindan je opšte ime za gama (γ) izomer 1,2,3,4,5,6-heksahlorcikloheksana, koji jedini od svih izomera ovog jedinjenja ispoljava insekticidnu aktivnost, a još se javlja i pod nazivom γ -HCH. Lindan se koristi u suzbijanju štetnih organizama, zaštiti bilja, u medicini i za smanjenje gubitaka useva tokom skladištenja.

Kao insekticid nalazi se u upotrebi još od polovine prošlog veka. Studija pokazuje da je od 1950. godine pa do 2000. godine njegova ukupna upotreba u sve pomenute svrhe iznosila 600.000 tona, od čega je samo u Evropi iskorišćeno 287.160 tona. Smatralo se da lindan proizvode još samo pojedine zemlje, kao što su Rumunija, Rusija, Kina, i Indija, mada najnovije studije ističu da su neke od ovih zemalja, kao na primer Rusija, prestale sa njegovom proizvodnjom [118]. Pored toga, ima i značajnu primenu u medicini, kao antiparazitni proizvod u malim koncentracijama od 0,3% lindana, u obliku gela i emulzija, ili u obliku šampona, za lečenje šuge, vaši i drugih parazita. Njegova primena u ove svrhe je lokalna i kratkotrajna.

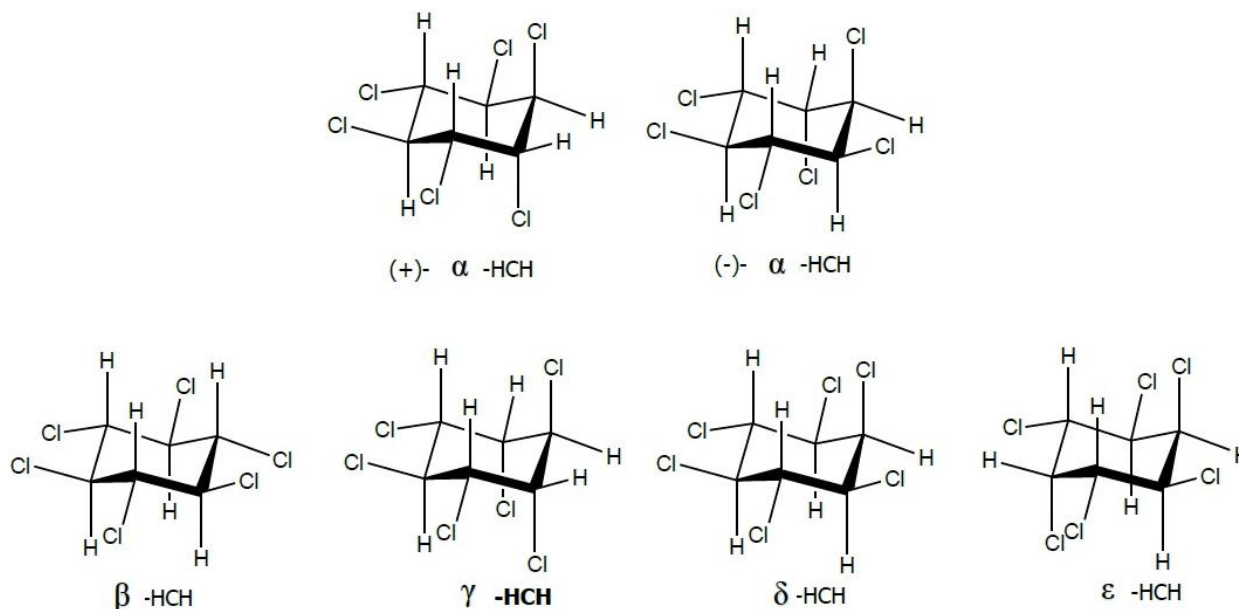
Heksahlorcikloheksan javlja se u vidu pet osnovnih izomera koji se međusobno razlikuju samo po orijentaciji atoma hlora (aksijalna ili ekvatorijalna orijentacija) oko cikloheksanskog prstena. Alfa izomer se javlja u vidu dva enantiomera, i on je najzastupljeniji izomer (53 % do 73 %), dok se ostali izomeri javljaju u znatno manjem procentu [119].

Lindan je pod normalnim uslovima, čvrst beo prah, bezbojnih isparenja i blagog mirisa na zemlju. Nije samozapaljivo ili gorivo jedinjenje i ima veoma slabu rastvorljivost u vodi (7 mg/L do 17 mg/L) ali i u organskim rastvaračima (od 6,40 g/100 g etanola do 28,9 g/100 g benzena).

Degradacija lindana u zemljištu se vrši pod aerobnim uslovima i poluživot može biti od 88 do 1146 dana. Najčešći proizvodi raspada su γ -pentahlorcikloheksan, heksa-, penta-, tetra- i trihlorbenzeni i penta- i tetrahlorfenoli. Anaerobnom degradacijom u laboratorijskim uslovima znatno se skraćuje vreme poluživota i iznosi od 12 do 174 dana, sa istim proizvodima razgradnje, osim fenola [120].

Toksičnost lindana se ogleda u njegovom kontaktnom uticaju na imunološki i nervni sistem. Kod ljudi u slučaju akutnog trovanja, izaziva mučninu i gubitak svesti. Takođe utiče na smanjenje broja limfocita, leukopeniju, a u koncentracijama od 7 $\mu\text{g/ml}$ u krvi može da indukuje epileptični napad [121].

Hemijske strukture svih izomera heksahlorcikloheksana, prikazane su na slici 29.



Slika 29. Hemijske strukture izomera heksahlorcikloheksana

2.3.1.3. Industrijske boje

Industrijske boje predstavljaju organske zagađujuće materije koje dospevaju u životnu sredinu prvenstveno u vidu industrijskih otpadnih voda. Industrijska otpadna voda nastaje u procesima proizvodnje, promjenljivih je karakteristika i samim tim teža za preradu.

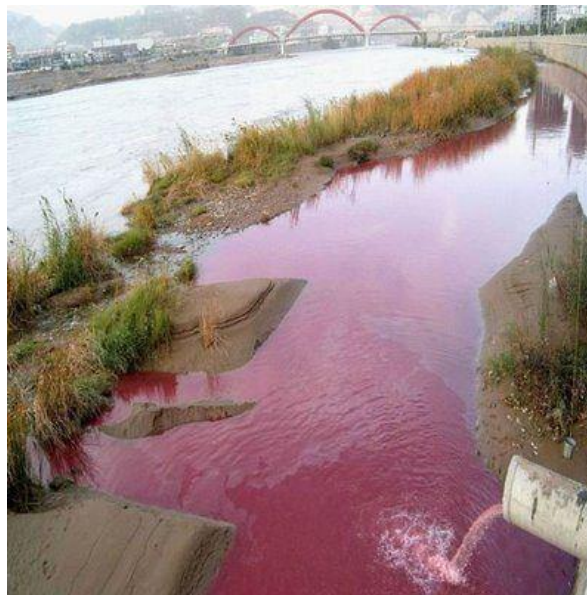
Za industrijske otpadne vode postoji čitav niz parametara koji se određuju, i čije su granice strogo definisane, zbog različitog sastava otpadnih voda iz pojedinih industrija, kako organskih tako i neorganskih. Kvalitet industrijske i komunalne otpadne vode je od velikog značaja i za postrojenja za preradu. Neki od opštih parametara koji se određuju u otpadnim vodama su: protok, količina vode (po smeni, na dan), temperatura vode, boja, miris, pH, suvi ostatak, biološka i hemijska potrošnja kiseonika i druge.

Parametri koji se određuju da bi se procenio sastav, a time i kvalitet otpadnih voda, propisani su zakonskim i podzakonskim aktima. Na nivou Evropske unije, oni su dati u direktivi 91/271/EEC i njenoj dopuni 98/15 EEC o tretmanu otpadnih voda iz naselja i postavljaju norme kvaliteta efluenata, odnosno daju granične vrednosti najvažnijih parametara.

U Republici Srbiji na snazi je Zakon o vodama ("Sl. glasnik RS", br. 30/2010 i 93/2012), Uredba o izmenama i dopunama uredbe o graničnim vrednostima emisije zagađujućih materija u vode i rokovima za njihovo dostizanje ("Sl. glasnik RS", br. 1/2016) i Pravilnik o načinu i uslovima za merenje količine i ispitivanje kvaliteta otpadnih voda i sadržini izveštaja o izvršenim merenjima ("Sl. glasnik RS", br. 33/2016), koji se takođe oslanjaju na zakonodavstvo Evropske unije.

Zbog svojih složenih aromatičnih struktura, industrijske boje su otporne na dejstvo svetlosti, vlagu i oksidanse, što je povoljna industrijska karakteristika, ali su i kancerogene, mutagene i toksične, ili se njihovom degradacijom mogu stvoriti produkti takvih karakteristika, te su stoga opasne po životnu sredinu. Sintetičke boje prisutne u vodi uzrokuju smanjenje biološkog diverziteta vode, sprečavajući prostiranje sunčeve svetlosti kroz vodu i time stvarajući prepreke fotosintetskim vodenim biljkama i algama. Boje se takođe mogu akumulirati u sedimentima i ispiranjem dopiru do sistema podzemnih voda [122].

U upotrebi u svetu, a za potrebe raznih industrija, dostupno je preko 20 000 boja koje se koriste u tekstilnoj industriji, kozmetici, preradi papira, štamparskoj i prehrambenoj industriji, farmaciji i drugim industrijama [123]. Procenjuje se da je godišnja svetska proizvodnja sintetičkih boja oko 7×10^5 tona [124]. U tekstilnoj idustriji se u procesima potroše velike količine vode, za obradu materijala i do 100 litara vode za 1 kg tekstilnog materijala, stoga je i količina otpadnih voda iz ove industrije značajna [125]. Smatra se da od 10 % do 15 % boja tokom procesa bojenja dospeva u efluente iz industrije i vrlo ih je teško ukloniti uobičajenim procesima prerade otpadne vode, primarnom mehaničkom obradom (filtriranjem, taloženjem i sličnim) ili sekundarnom obradom (aeracijom i biološkim tretmanom) [125].



Slika 30. Izgled reke nakon ispuštanja otpadne vode iz tekstilne industrije

Sintetičke industrijske boje su aromatična jedinjenja, rastvorna u vodi, disperzivna i klasifikovana kao azo-, antrahinonske, heterociklične, trifenilmetanske ili ftalocijaninske boje [126].

Veliki industrijski značaj imaju reaktivne boje koje se mogu kovalentnim vezama fiksirati za vlakna tekstila [127]. Međutim, neke od njih su dokazano štetne za respiratorni sistem, sa mogućnošću pojave alergije, ispoljene od svraba i iritacije kože, do osećaja nedostatka vazduha i spazma. Mali broj boja, kao što je Benzedrin, smatraju se za potencijalne kancerogene supstance. Dugotrajno izlaganje, međutim, dovodi do ozbiljnijih pojava kao što su kancer, velika oštećenja kože, hronična opstruktivna plućna oboljenja i drugo. Ova stanja se nažalost teško pravovremeno detektuju, pošto su za njihova ispoljavanja potrebne godine izloženosti uticaju boja [124].

U eksperimentalnom delu ove disertacije ispitivane su odabrane antrahinonske (Lanaset® Violet B, Lanaset® Blue 2R), i sulfonftaleinske boje (bromtimol plavo i bromkrezol zeleno) pa će o njima biti više reči u daljem tekstu.

2.3.1.3.1. Antrahinonske boje

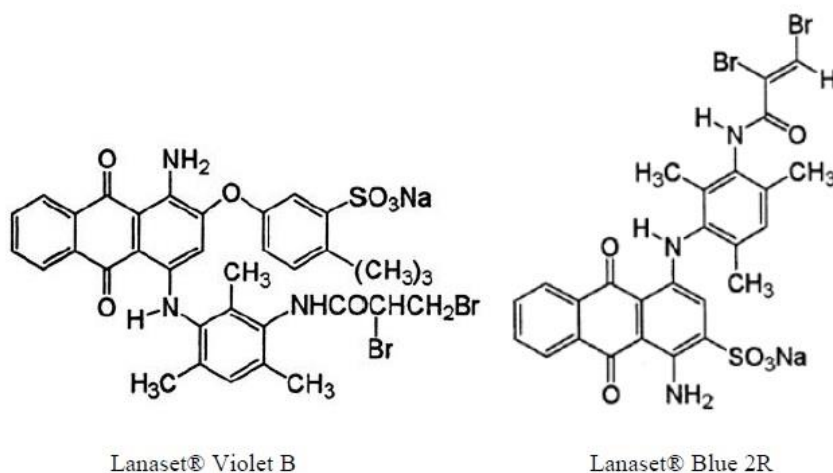
Antrahinonske boje se po komercijalnom značaju nalaze odmah iza azo boja. One predstavljaju uglavnom derivate 9,10-antrahinona. Uvođenjem elektron donorskih supstituenata na jedno ili na više mesta u molekul antrahinona, naročito u položajima 1, 4, 5 i 8, dobijaju se boje koje u svom sastavu mogu imati amino, hidroksi, alkil i arilamino grupe, dok je sam antrahinon bezbojan.

Mogu biti prirodne ili sintetičke, a njihov spektar je od crvene do plave boje. Sintetičke antrahinonske boje zasnovane su na antrahinon sulfonskoj kiselini ili na nitroantrahinonu, iz kojih se dalje dobija aminoantrahinon kao prekursor za ostale boje [128].

Složena aromatična struktura antrahinonskih boja, obezbeđuje im veliku otpornost na uticaj svetlosti, vlage i oksidanasa zbog čega postaju potencijalni problem kada se nađu u prirodnim vodama.

Boje korišćene u eksperimentalnom delu disertacije su marke Lanaset®, proizvođača Huntsman Textile Effects (Germany) GmbH iz Nemačke. Prvenstveno su namenjene bojenju vune, mada se mogu primeniti i na tekstilne mešavine koje u svom sastavu imaju vunu. Bojenje se vrši pri pH od 4,5, čime se ne remeti prirodna struktura vlakana vune [129].

Hemijske strukture izabranih antrahinonskih boja prikazane su na slici 31.



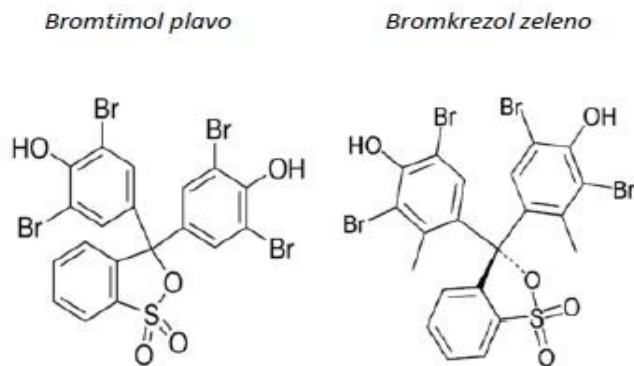
Slika 31. Hemijske strukture boja Lanaset® Violet B i Lanaset® Blue 2R

2.3.1.3.2. Sulfonftaleinske boje

Sulfonftaleinske boje korišćene u eksperimentalnom delu ove disertacije su bromtimol plavo i bromkrezol zeleno, a njihova hemijska struktura prikazana je na slici 32.

Bromtimol plavo (BTB) ili 3,3'-dibromtimolsulfonftalein, je derivat tekstilne boje koji se često koristi kao pH indikator, zbog svog svojstva da menja boju u zavisnosti od pH sredine. Do sada je njegova razgradnja ispitivana jedino mineralizacijom, sa ciljem smanjivanja njegove toksičnosti u vodi [130].

Bromkrezol zeleno (BCG) pripada anjonskim bojama, koji kao i bromtimol plavo ima svojstvo da menja boju u zavisnosti od pH sredine, pa se i ona primenjuje najčešće kao indikator. Osim u tu svrhu, takođe se koristi i u tekstilnoj industriji [131].



Slika 32. Hemijske strukture boja bromtimol plavo i bromkrezol zeleno

2.3.2. Primena lakaza u uklanjanju odabranih organskih zagađujućih materija

U oblasti zaštite životne sredine, lakaze do sada imaju značajnu primenu, kako je već navedeno. U daljem tekstu biće istaknuta njihova dosadašnja primena u uklanjanju organskih zagađujućih materija, koje su bile predmet ispitivanja u ovoj disertaciji. Pregled dosadašnje uspešne primene ovog enzima u uklanjanju pesticida i industrijskih boja predstavlja osnovu za izvršena istraživanja u okviru eksperimentalnog dela disertacije, ali i otvara mogućnost šire primene, koja će biti istražena.

2.3.2.1. Primena lakaza u detoksikaciji i dekontaminaciji otpada i bioremedijaciji

Lakaze su našle najveću primenu u oksidativnoj detoksikaciji i uklanjanju različitih aromatičnih ksenobiotika i zagađivača iz industrijskog otpada kao i zagađenog zemljišta, sedimenata ili voda. Njihovo dejstvo obezbeđuje ili direktnu razgradnju jedinjenja ili njihovu polimerizaciju. Zabeležena je aktivnost lakaza u direktnom uklanjanju hloridnih jona, cepanju aromatičnog prstena, mineralizaciji PAH-ova i druge. U procesu polimerizacije u prisustvu lakaze, stvaraju se polimeri zagađujućih materija, koji postaju nerastvorni i nepokretni, tako da se mogu lakše ukloniti fizičkim putem [12].

Fenolna jedinjenja se mogu naći u otpadnim vodama industrije prerade uglja, nafte, ili proizvodnje organskih hemikalija. Ispitivana je mogućnost uklanjanja naftnih mrlja na vodenim površinama, kao posledice izlivanja iz brodova, pomoću lakaza. Takođe, dokazano je da mogu da smanjuju i koncentracije sintetičkih heterocikličnih jedinjenja, kao što su halogenovani organski pesticidi u zemljištu [22].

Lakaze mogu da razgrađuju plastični otpad sa olefinskim jedinicama, njihovom oksidacijom uz pomoć medijatora. Takođe mogu i da uklanjaju neprijatne mirise sa deponija ili stočnih farmi[9].

2.3.2.2. Primena lakaza u obezbojavanju boja

Fizičko-hemijske metode uklanjanja boja iz otpada su veoma skupe i složene. Za eliminaciju sintetičkih, industrijskih boja, poput azo, trifenilmetana i antrahinona, poželjni procesi se zasnivaju na biološkoj metodi koristeći mikroorganizme ili njihove enzime (lakaze, peroksidaze ili azoreduktaze). Zbog svojih složenih aromatičnih struktura, ove boje su otporne

na dejstvo svetlosti, vlagu i oksidante, usled čega se akumuliraju u životnoj sredini, kako je već ranije naglašeno [122,132].

Primena gljiva belog truljenja u razgradnji i obezbojavanju boja kao što su azo, heterociklične, reaktivne i polimerne, dokazano je efikasna. Međutim, za industrijsku primenu za istu svrhu, mnogo je podesnija upotreba njihovih enzima, u koje spadaju i lakaza, zbog mogućnosti katalize oksidacije i fenolnih i nefenolnih jedinjenja, pa samim tim i širokog spektra sintetičkih boja. Upravo zbog sve strože regulative koja se odnosi na otpadne vode iz tekstilne industrije, ovakav vid tehnologija njihove bioremedijacije poslednjih godina sve se više istražuje [12].

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali i oprema

U ovoj doktorskoj disertaciji, za eksperimentalni rad, korišćeni su sledeći materijali i oprema:

➤ Lakaze:

- Komercijalna lakaza iz *Myceliophthora thermophila* sa ekspresijom u *Aspergillus oryzae* (Novozym® 51003), proizvođača Novozymes (Bagsvaerd, Danska). Novozym® 51003 lakaza je proizvedena submerznom fermentacijom genetski modifikovane *Aspergillus oryzae*.
- Lakaza iz *Trametes versicolor* (praškasta, $\geq 0,5$ U/mg) proizvođača Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka.

➤ Nosači za imobilizaciju lakaze:

- Komercijalna pirogena nanosilika Aerosil® 380, proizvođača Evonik Industries (Essen, Nemačka).
- Komercijalna Lifetech™ ECR serija nosača (ECR8305F, ECR8309F, ECR8404F, ECR8409F, ECR1508F, ECR1604F, ECR8806M, ECR8285F) proizvođača Purolite®, Južni Vels, Velika Britanija.
- Amino-modifikovane ligninske mikrosfere A-LMS (A-LMS_5 i A-LMS_10), sintetizovane su modifikovanim postupkom kopolimerizacije inverznih suspenzija, razvijenim od strane Katedre za organsku hemiju TMF-a, iz epihlorohidrina, proizvođača Merck Schuchardt, Nemačka; kraft lignina proizvođača Sigma-Aldrich, Nemačka; tečnog parafinskog ulja i poli(etilen imin) PEI, proizvođača Sigma-Aldrich, Nemačka, natrijum-alginata, lokalno sintetizovanog, i natrijumlaurilsulfata, proizvođača Centrohchem, Srbija [90].

➤ Agens za modifikaciju pirogene silike:

- 3-aminopropiltrimetoksisilan, APTMS, proizvođača Fluka Analytical, SAD.

➤ Pufferi:

- Za pripremu rastvora lakaze korišćen je 500 mM natrijum-citratni puffer, za opseg pH 4,00-5,00, rastvor pripremljen mešanjem natrijum-citrat dihidrata (99 %), proizvođača Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika i limunske kiseline-1-hidrat (99 %), proizvođača NRK inženjering, Beograd, Srbija.
- Za pripremu rastvora lakaze korišćen je 500 mM natrijum-fosfatni puffer, za opseg pH 6,00-8,00, pripremljen mešanjem rastvora soli $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ i $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ u odgovarajućoj razmeri proizvođača Centrohema (Stara Pazova, Srbija).

➤ Organske zagađujuće materije:

- 4,4'-DDT PESTANAL® CRM, 99,3 %, nabavljen od Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka, a proizveden od Riedel-de Haën, Nemačka.
- 4,4'-DDD (TDE) PESTANAL® CRM, 98,9 %, nabavljen od Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka, a proizveden od Riedel-de Haën, Nemačka.
- Metoksihlor PESTANAL® CRM, 98,7 %, nabavljen od Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka, a proizveden od Riedel-de Haën, Nemačka.
- Aldrin PESTANAL® CRM, 98,1 %, nabavljen od Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka, a proizveden od Riedel-de Haën, Nemačka.
- Dieldrin PESTANAL® CRM, 97,9 %, nabavljen od Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka, a proizveden od Riedel-de Haën, Nemačka.
- Endosulfan ($\alpha+\beta=2+1$) PESTANAL® CRM, 99,9 %, nabavljen od Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka, a proizveden od Riedel-de Haën, Nemačka.
- Heptahlor CRM, >99 %, proizvođača SUPELCO, SAD.
- Heptahlor-endo-epoksid izomer A PESTANAL® CRM, $\geq 98,0$ %, nabavljen od Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka, a proizveden od Riedel-de Haën, Nemačka.
- Lindan PESTANAL® CRM, 99,8 %, nabavljen od Sigma-Aldrich GmbH, Nemačka, a proizveden od Riedel-de Haën, Nemačka.

- Lanaset® Violet B i Lanaset® Blue 2R, proizvođača Huntsman Textile Effects, Langweid am Lech, Nemačka.
 - Bromtimol plavo i bromkrezol zeleno, proizvođača Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka.
- Ostale korišćene hemikalije:
- Siringaldazin, proizvođača Sigma-Aldrich Chemicals GmbH.
 - ABTS, proizvođača Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
 - Heksan, proizvođača Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka.
 - Aceton, proizvođača Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka.
 - Etanol, proizvođača Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka.
 - Toluen, proizvođača Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka.
 - Coomassie brilliant blue CBB G-250 (Fluka Analytical, SAD).
 - Albumin iz goveđeg seruma (BSA, praškast, ≥96%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemačka).
 - Triton™ X-100 (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD).
 - Kalijum-dihidrogen fosfat KH_2PO_4 (99 %), proizvođača Sigma-Aldrich Chemicals GmbH, Nemačka.
 - Metanol HPLC (Zorka Pharma, Šabac, Srbija).
 - Kalcijum-hlorid CaCl_2 , proizvođača Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika.
 - Dejonizovana voda.
- Oprema korišćena u ovom radu:
- Neautomatska analitička i tehnička vaga (Kern&Sohn GmbH, Nemačka).
 - Neautomatska analitička vaga (JL-180, Chio, Japan).

- Centrifuga, MiniSpin Eppendorf, (Eppendorf, SAD).
- Magnetna mešalica (Thermo Fischer Scientific, Voltam, Masačusets, SAD).
- Roler mikser (Stuart, Pariz, Francuska).
- UV-spektrofotometar, Ultrospec™ 3300 pro, (Biochrom Ltd, Frajburg, Nemačka).
- pH metar (inoLab 720, WHW, Nemačka).
- Gasni hromatograf sa masenim detektorom, QP2010 GC-MS (Shimadzu, Japan).
- Automatske mikropipete (Dragon-Lab, Kingdao, Kina).
- Automatska merila zapremine sa klipom (Eppendorf, SAD).
- Automatska merila zapremine sa klipom (Brand GmbH, Nemačka).
- Klimatska komora/frižider BK 6160 (Thermo SCIENTIFIC, SAD).
- Ostali pomoćni laboratorijski pribor (čase, menzure, kivete, vialo, stakleni štapići, epruvete i drugo).

3.2. Metode

3.2.1. Modifikacija nosača - pirogenih nanočestica silike

Amino-modifikovana pirogena nanosilika (AFNS) je pripremljena korišćenjem komercijalne pirogene nano-silike Aerosil® 380 (FNS) kao polaznog materijala, a postupak modifikacije je predstavljen na slici 19. Da bi se uvele amino grupe, 300 mg FNS je mešano sa 1,18 ml APTMS-a u 36 ml anhidrovanog toluena tokom 48 sati na 25 °C u inertoj atmosferi, uz mešanje na magnetnoj mešalici brzinom od 600 obrtaja u minutu. Amino funkcionalizovana silica (AFNS) je filtrirana, isprana dva puta svežim toluenom i tretirana u ultrazvučnom kupatilu tokom 5 minuta radi uklanjanja fizički adsorbovanih APTMS.

Prečišćeni AFNS je dispergovan u etanolu i čuvan do upotrebe. FT-IR spektri dobijeni su korišćenjem BOMEM (Hartmann & Braun) spektrofotometra. Uzorak od 1% (masenih) temeljno je usitnjen sa kalijum-bromidom, a dobijeni prah je hidrauličnom presom presovan u prozirni pelet. FT-IR spektri prikupljeni su između 400 cm^{-1} i 4000 cm^{-1} pri rezoluciji 4 cm^{-1} . Ovakva metoda ranije je korišćena, a rezultati su dokazali uspešnost modifikacije FNS [67].

Određivanje količine amino-grupa koje su unete na površinu nosača, odnosno njihova kvantifikacija, vrešena je metodom preuzetom od Jung *et al.* [133]. Za početak, 10 mg AFNS-a je suspendovano u 10 mM rastvoru HCl. Nakon 30 minuta, suspenzija je centrifugirana na 6000 o/min u vremenu od 10 minuta. Nakon toga, prikupljeni supernatant je titrisan standardizovanim 10 mmol L^{-1} rastvorom NaOH. Indikator za ovu titraciju, bio je fenolftalein.

3.2.2. Imobilizacija lakaze

3.2.2.1. Imobilizacija lakaze na amino-funkcionalizovanu nanosiliku (AFNS)

Na ovaj nosač vršena je imobilizacija lakaze iz *Myceliophthora thermophila* sa ekspresijom u *Aspergillus oryzae* (Novozym® 51003).

Za sve eksperimente, 2 mg nanočestica AFNS inkubirano je sa 1 ml rastvora enzima u puferu, uz rotaciono mešanje na 180 o/min i pri temperaturi od 30 °C. Imobilizacija lakaza je izvedena sa različitim koncentracijama enzima, u rasponu od 0,064 mg mL^{-1} do 0,64 mg mL^{-1} i različitim puferskim rastvorima, u rasponu od pH 4,00 do pH 8,00, kao i različitom vremenu imobilizacije (0 h - 3 h). Nakon imobilizacije, uzorci su centrifugirani pri 13 000 o/min tokom 3 min, kako bi se odvojila imobilisana lakaza. Imobilisani enzimi su isprani dva puta sa 1 ml pufera za imobilizaciju.

3.2.2.2. Imobilizacija lakaze na amino-modifikovane ligninske mikrosfere A-LMS

Od amino-modifikovanih ligninskih mikrosfera, korišćena su dva nosača, A-LMS_5 i A-LMS_10, a na njih je vršena imobilizacija lakaze iz *Myceliophthora thermophila* sa ekspresijom u *Aspergillus oryzae* (Novozym® 51003).

Da bi se izabrao optimalniji nosač za imobilizaciju lakaze, od dva ispitivana, 10 mg A-LMS_5 i A-LMS_10 je pomešano sa 1 ml enzimskog preparata rastvorenog u puferu. Upotrebljeni su različiti puferi u opsegu od pH 4,0 do pH 7,0. Za pH 4,0 i 5,5 primenjen je 0,1 M Na-acetatni pufer, dok je za pH 6,0 i 7,0 korišćen 0,1 M Na-fosfatni pufer.

Imobilizacija na ova dva nosača izvedena je uz mešanje u centrifugalnoj mešalici brzinom od 150 o/min i na temperaturi od 25 °C. Imobilisani enzimi su tri puta isprani upotrebljenim puferom.

Nakon izbora pogodnijeg nosača od dva ispitivana, ispitivani su parametri imobilizacije, variranjem početne koncentracije ponuđenih proteina od 28 mg proteina po g nosača do 140 mg po gramu nosača, a vršeno je određivanje optimalnog vremena imobilizacije (1 h -7 h) i pH imobilizacije. Svi eksperimenti u vezi sa imobilizacijom lakaze vršeni su u duplikatu.

3.2.2.3. Imobilizacija lakaze na Lifetech™ nosače

Komercijalna Lifetech™ ECR serija nosača (ECR8305F, ECR8309F ECR8404F ECR8409F ECR1508F ECR1604F ECR8806M ECR8285F) proizvođača Purolite® korišćena je za ispitivanje mogućnosti imobilizacije lakaze iz *Trametes versicolor*. Karakteristike izabranih nosača date su u tabeli 5. Različitim nijansama redova u tabeli su označeni nosači koji pripadaju istoj grupi nosača, prema klasifikaciji koja je data u poglavlju 2.2.3.4.

Tabela 5. Izabrani Lifetech™ ECR nosači i njihove osnovne karakteristike[74]

Br.	Lifetech™ proizvod	Vrsta nosača	Prečnik pora (nm)
1.	ECR8305F	Amino C2 metakrilat	30-60
2.	ECR8309F	Amino C2 metakrilat	60-120
3.	ECR8404F	Amino C6 metakrilat	30-60
4.	ECR8409F	Amino C6 metakrilat	60-120
5.	ECR1508F	Stiren tercijarni amin	n.p.

Br.	Lifetech™ proizvod	Vrsta nosača	Prečnik pora (nm)
6.	ECR1604F	Stiren kvarternerni amin	n.a.
7.	ECR8806M	Oktadecil metakrilat	50-70
8.	ECR8285F	Epoksi/butil metakrilat	40-60

Da bi se izvršila metoda imobilizacije lakaze na ove nosače, prvo je izvršena njihova priprema. Svi izabrani Lifetech™ ECR nosači, navedeni u tabeli 5 su kondicionirani, korišćenjem pufera za imobilizaciju u skladu sa preporukom proizvođača.

Imobilizacija lakaze je izvedena u Eppendorf® tubama od 2 ml na roler mikseru (Stuart, Pariz, Francuska) na 25 °C u trajanju od 24 h. Za sve eksperimente, 20 mg nosača je inkubirano sa 1 ml rastvora enzima (unapred definisana koncentracija enzima u puferu za imobilizaciju). Za sve amino funkcionalizovane nosače (tabela 5, nosači pod brojevima od 1. do 6.) korišćen je 0,1 M kalijum-fosfatni pufer pH 5,0, dok je imobilizacija na oktadecil (tabela 5, nosač pod brojem 7.) i epoksi/butil funkcionalizovani nosač (tabela 5, nosač pod brojem 8.) izvedena u 1 M puferu. Posle predviđenog vremena, supernatant je odvojen od čestica nosača i ispitivana je koncentracija zaostalih proteina koji se nisu vezali na nosač kao i uspešnost imobilizacije. Imobilisana lakaza dva puta je isprana sa 1 ml pufera za imobilizaciju i podvrgnuta određivanju aktivnosti enzima.

3.2.3. Određivanje aktivnosti lakaze

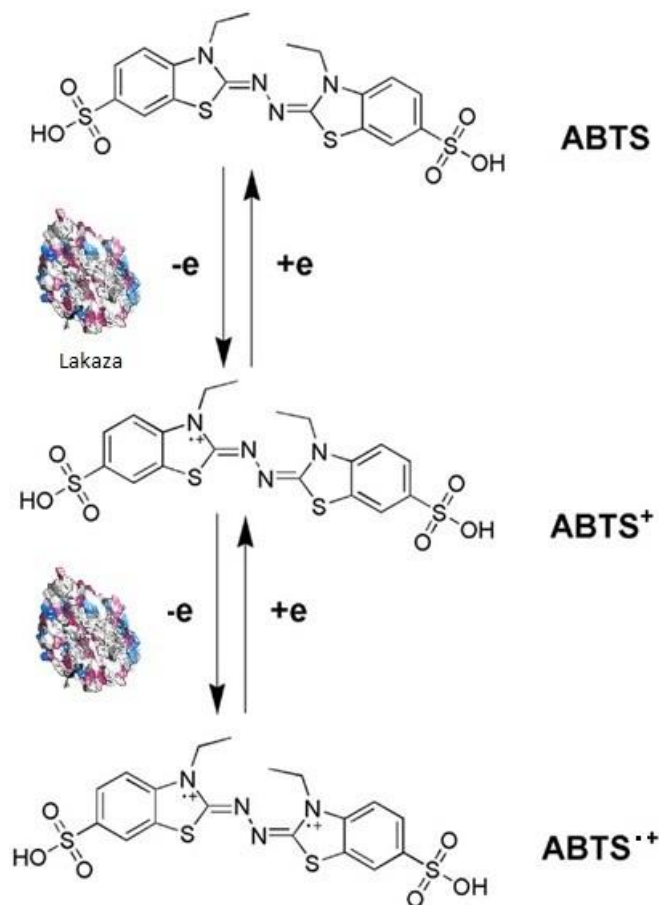
U eksperimentalnom delu ove disertacije, aktivnost lakaze određivana je korišćenjem dva različita supstrata, siringaldazina i ABTS. Siringaldazin je korišćen kao supstrat za ispitivanje aktivnosti Novozym® 51003 lakaze, kao i lakaze iz *Trametes versicolor*, dok je ABTS korišćen za ispitivanje aktivnosti samo Novozym® 51003 lakaze.

3.2.3.1. Određivanje aktivnosti lakaze oksidacijom ABTS-a

Jedna od korišćenih metoda za određivanje oksidativne aktivnosti lakaze zasniva se na oksidaciji 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline), ABTS-a, koji se često koristi i kao LMS za lakazu.

ABTS se dejstvom lakaze oksidiše do svog katjonskog radikala do (ABTS⁺) koji je veoma stabilan. Ovaj proces dešava se u dva uzastopna koraka, a obe reakcije su povratne[134].

Prikaz oksidacije ABTS-a lakazom dat je na slici 33. ABTS ima apsorpcioni maksimum na 420 nm, te se koristi i za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima.



Slika 33. Šematski prikaz oksidacije ABTS-a lakazom

ABTS je korišćen kao supstrat za ispitivanje aktivnosti Novozym[®] 51003 lakaze, slobodne i imobilisane.

Reakciona smeša u kojoj je određivana oksidativna aktivnost lakaze korišćenjem ABTS kao supstrata, sastojala se od 100 μ L supstrata (ABTS rastvoren u 0,5 M Na-citratnog pufera pH 4,5), 400 μ L 0,5 M Na-fosfatnog pufera pH 6,5 i i 0,5 μ l enzima. Ispitivanja su vršena na temperaturi od 25 °C. Prilikom ispitivanja aktivnosti slobodne lakaze, reakciona smeša je stavljena u plastičnu spektrofotometrijsku kivetu od 1,5 ml. ApSORBANCA je očitavana na 420 nm, svakih 10 s tokom 3 minuta. Aktivnost enzima računa se prema formuli:

$$A(IU/ml_{enzima}) = R \cdot \frac{dA}{dT} \cdot \frac{V_{rs}}{V_e \cdot \varepsilon} \quad (1)$$

gde je A - oksidativna aktivnost enzima (slobodnog ili u supernatantu), R - razblaženje, V_{rs} - zapremina reakcione smeše (ml), V_e - zapremina slobodnog enzima ili supernatanta (ml), dA/dt - promena apsorbance u vremenu, ε - molarni ekstincioni koeficijent (mM^{-1}). Vrednost molarnog ekstincionog koeficijenta za ABTS određuje se iz konstruisane kalibracione krive, funkcionalne zavisnosti apsorbance od koncentracije, koja se konstruiše u definisanom opsegu koncentracija ABTS-a. Vrednost ε može se uzeti i iz dostupnih podataka u literaturi, a iznosi za ABTS $36000 M^{-1} cm^{-1}$ [127].

Jedna jedinica (IU) enzimske aktivnosti je definisana kao količina lakaze koja je potrebna za oksidaciju 1 μ mol ABTS u minutu.

Pošto je aktivnost slobodne lakaze u reakciji sa ABTS-om ispitivana u širokom pH opsegu (od pH 4,00 do pH 8,00), korišćena su dva pufera: 500 mM Na-citratni pufer za pH opseg 4,00 - 5,00 i 500 mM Na-fosfatni pufer za opseg 6,00 - 8,00.

Za ispitivanje koncentracija imobilisane aktivnosti, vršena je inkubacija 2 mg suvog imobilisanog enzima sa 4 ml supstrata i 36 ml 0,5 M Na-fosfatnog pufera pH 6,5, uz magnetno mešanje od 300 obrtaja u minutu. Tečni uzorci su uzimani u plastične spektrofotometarske kivete, dužine optičkog puta od 1 cm i apsorbancija je očitavana na 420 nm, svakih 30 s tokom 3 min. Iz dobijenih izmerenih vrednosti apsorbanci u vremenu, koncentracija imobilisane aktivnosti je izračunata korišćenjem formule 2, a izražena je u jedinicama (IU) aktivnosti po gramu nosača (IU/g).

$$A(IU/g_{nosača}) = R \cdot \frac{dA}{dT} \cdot \frac{V_{rs}}{m \cdot \varepsilon} \quad (2)$$

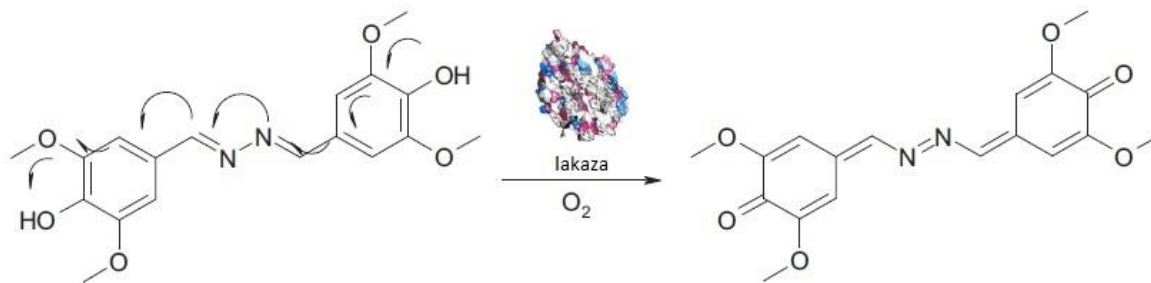
gde je A -oksidoredukciona aktivnost imobilisanog enzima, R - razblaženje, V_{rs} - zapremina reakcione smeše (ml), dA/dt - promena apsorbance u vremenu, ε - molarni ekstincioni koeficijent (mM^{-1}) vrednosti za ABTS od $36000 M^{-1} cm^{-1}$ [127], m - masa imobilisanog enzima (g).

Prinos imobilizacije aktivnosti je izračunat kao procentni odnos aktivnosti imobilisanog enzima (IU/g) i aktivnosti slobodnog enzima (IU/ml) određene pre početka procesa imobilizacije, odnosno unete aktivnosti slobodnog enzima, korišćenjem jednačine 3:

$$\text{Prinos imobilizacije aktivnosti (\%)} = \frac{\text{Aktivnost imobilisanog enzima } \left(\frac{IU}{g}\right) \cdot \text{masa imb enzima (g)}}{\text{Uneta aktivnost slobodnog enzima } \left(\frac{IU}{ml}\right) \cdot V \text{ sl enzima (ml)}} \cdot 100 \quad (3)$$

3.2.3.2. Određivanje aktivnosti lakaze oksidacijom siringaldazina

Druga korišćena metoda za određivanje oksidativne aktivnosti lakaze se zasniva na oksidaciji siringaldazina (4-hidroksi-3,5-dimetoksi-benzaldehid-azin) kao supstrata, uz prisustvo kiseonika. Kao proizvod reakcije dobija se tetrametoksi-azo-bis-metilen hinon, usled dvostruke fenolne dehidrogenacije siringaldazina, i unutarmolekulskog sparivanja slobodnih radikala, uz prateći nastanak molekula vode [135]. Ovaj proces prikazan je na slici 34.



Slika 34. Šematski prikaz oksidacije siringaldazina lakazom

Ispitna smeša sastojala se od 300 μL supstrata (0,216 mM rastvor siringaldazina u metanolu), 2,2 ml 0,1 M pufer kalijum-fosfata, pH 6,5 i 0,5 ml sveže pripremljenog rastvora enzima u hladnoj dejonizovanoj vodi (25 U/mL - 50 U/mL) u slučaju slobodne lakaze ili odgovarajuće količine imobilisane lakaze. Slepna proba je sadržala dejonizovanu vodu umesto rastvora enzima.

Nakon provere da u uzorcima bez supstrata ne dolazi do promene apsorbance na 530 nm u vremenu, dodavano je po 300 μL pripremljenog rastvora supstrata. Oksidacija siringaldazina slobodnom ili imobilisanom lakazom je vršena na 30 $^{\circ}\text{C}$. Kivete sa izmešanim sadržajem su postavljene u spektrofotometar, a dužina puta svetlosti je iznosila 1 cm. Promena apsorbancije u odnosu na slepu probu je praćena na 530 nm svakih 30 s tokom vremena u rasponu od 3 min do 10 minuta.

Jedna jedinica (U) će proizvesti promenu apsorbancije pri 530 nm od 0,001 u minutu pri pH 6,5 na 30 $^{\circ}\text{C}$ u reakcionoj zapremini od 3 ml koristeći siringaldazin kao supstrat.

Aktivnost lakaze izračunata je prema sledećoj formuli [136]:

$$A(U/ml_{enzima}) = \frac{R \cdot \frac{dA(530\text{ nm})}{dt}}{0,001 \cdot V_e(ml)} \quad (4)$$

gde su: R - razblaženje; 0,001 - promena $A_{530 \text{ nm}}/\text{min}$ po jedinici lakaze, pod navedim reakcionim uslovima, $V_e(\text{ml})$ - zapremina enzima. Rezultat može da se prikaže i na drugi način, uz pomoć formule 5:

$$A(U/mg_{preparata}) = \frac{A(U/ml \text{ enzima})}{mg_{preparata}/ml \text{ enzima}} \quad (5)$$

Aktivnost imobilisane lakaze u slučaju lakaze iz *T. versicolor* računata je korišćenjem jednačine:

$$A_i(U/g_{nosača}) = \frac{dA(530 \text{ nm})}{dt} \cdot \frac{1}{0,001 \cdot m \cdot \omega} \quad (6)$$

gde je A_i - koncentracija imobilisane aktivnosti, m - masa imobilisanog enzima (g), ω - udeo suve mase u vlažnom nosaču, dA/dt - promena apsorbance u vremenu. Po pravilu, u toku eksperimenata je rađeno sa suvim nosačem, tako da se u tom slučaju procenat vlage u njemu ne uzima u obzir.

Specifična aktivnost enzima određivana je prema formuli:

$$SA_i(U/mg \text{ proteina}) = \frac{A(U/g \text{ nosača})}{C(mg \text{ vezanih proteina} / g \text{ nosača}) \cdot \% \text{ vezanih proteina}} \quad (7)$$

Prinos imobilizacije aktivnosti je izračunat prema formuli:

$$\text{Prinos imobilizacije aktivnosti (\%)} = \frac{\text{Aktivnost imobilisanog enzima } \left(\frac{U}{g}\right) \cdot \text{masa imb enzima (g)}}{\text{Početna aktivnost slobodnog enzima } \left(\frac{U}{ml}\right) \cdot V \text{ sl enzima (ml)}} \cdot 100 \quad (8)$$

U slučaju imobilizacije Novozym® 51003 lakaze na amino-modifikovane ligninske mikrosfere A-LMS (A-LMS_5 i A-LMS_10), i ispitivanje aktivnosti sa siringaldazinom kao supstratom, 10 mg imobilisanog preparata je suspendovano u 40,5 mL 0,1 M Na-fosfatnog pufera (pH 6,5), a zatim je dodato 4,5 mL rastvora supstrata. Reakciona smeša (ukupna zapremina 50 mL) je stavljena na magnetnu mešalicu.

Aktivnost imobilisane lakaze (IU/g nosača) je praćena uzorkovanjem 1 ml reakcione smeše i merenjem apsorbance na 530 nm svakih 15 sekundi tokom 2 min. Nakon svakog merenja, uzorak je vraćan u reakcionu smešu kako bi se izbegao potencijalni uticaj smanjenja zapremine reakcione smeše, na rezultate merenja. Specifična aktivnost (IU/mg) u ovom slučaju iskazana je kao aktivnost enzima po stvarnoj masi vezanog enzima.

3.2.4. Određivanje koncentracije proteina

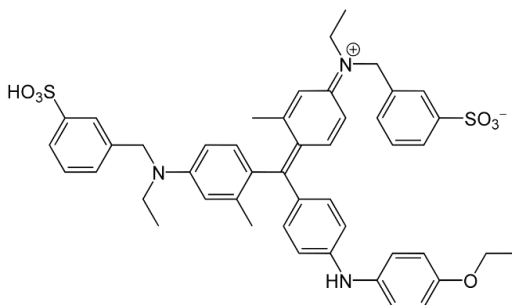
3.2.4.1. Metoda po Bredfordu

Za potrebe određivanja sadržaja, odnosno koncentracije proteina koji su uključeni u proces imobilizacije, korišćena je metoda po Bredfordu koja se zasniva na vezivanju specifične boje Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250), u kiselj sredini u kojoj je ona u anjonskom obliku, sa amino grupama proteina koje se nalaze u rastvoru koji se ispituje. U toku ove reakcije, apsorpcioni maksimum za datu boju se pomera od 465 nm na 595 nm, pri čemu se javlja vidljiva promena boje rastvora od braon do plave. Boja reaguje sa aminokiselinama ostacima, prvenstveno arginina, ali reaguje i sa ostacima tirozina, histidina, lizina, triptofana i fenilalanina. Promena boje uzoraka sa Bredfordovim reagensom u zavisnosti od koncentracije prisutnih proteina prikazana je na slici 35.



Slika 35. Različite nijanse uzoraka sa formiranim protein-boja kompleksom za boju CBB G-250

Granica kvantifikacije metode kreće se od 5 μg proteina do 200 μg proteina, u zavisnosti od kvaliteta boje, a linearna zavisnost uspostavlja se u opsegu od 0 μg – 2000 μg proteina[137]. Bredfordov reagens se čuva u tamnim bocama, zbog osetljivosti na svetlost, a priprema se mešanjem dejonizovane vode i koncentrovane boje. Hemijska struktura Coomassie Brilliant Blue G-250 prikazana je na slici 36.

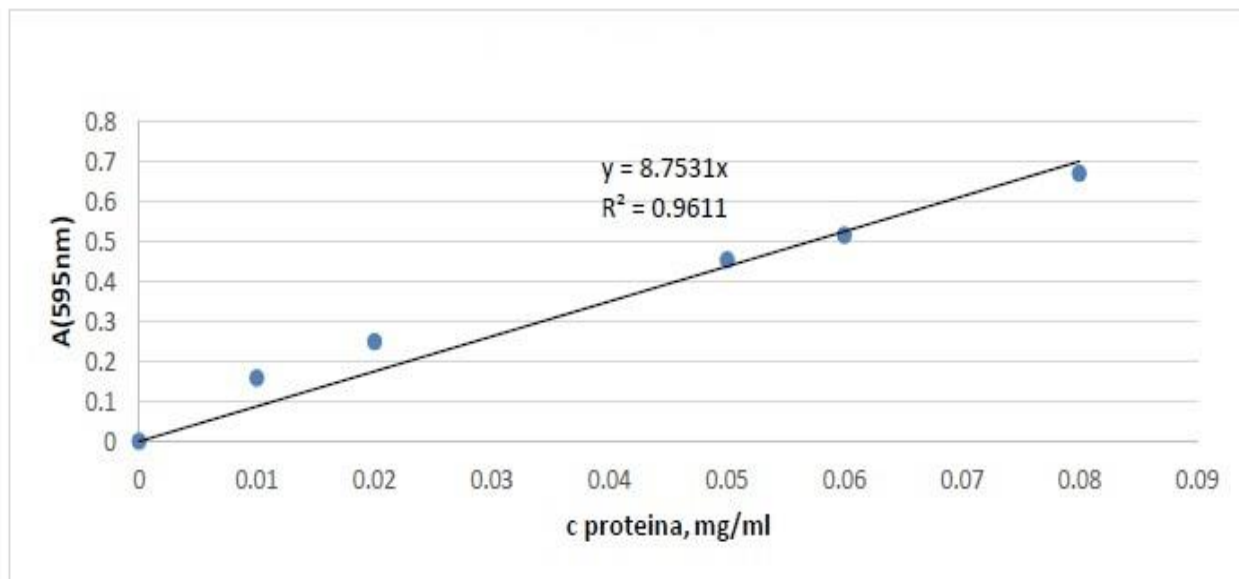


Slika 36. Hemijska struktura boje Coomassie Brilliant Blue (CBB G-250)

3.2.4.1.1. Priprema Bredfordovog reagensa i određivanje standardne krive

Da bi se pripremio Bredfordov reagens potrebno je odmeriti 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 u normalni sud od 1 L. U njega se zatim doda 100 ml 85 % orto-fosforne kiseline, 50 ml 95 % metanola, 300 ml dejonizovane vode i vrši se mešanje, u vremenu od 2 h, na sobnoj temperaturi. Normalni sud se potom odloži na tamno mesto preko noći. Sutradan se dopuni dejonizovanom vodom do zapremine od 1 L i profiltrira kroz grubi filter papir u tamnu bocu. Reagens se čuva na tamnom i hladnom mestu, a stabilan je nekoliko meseci.

Da bi se izračunala koncentracija proteina u nekom uzorku, pre svake serije eksperimenata određuje se standardna kriva, merenjem apsorbanci prethodno pripremljenih uzoraka u kojima se nalazi Bredfordov reagens i poznata koncentracija proteina. U tu svrhu, kao standard, odnosno protein čija je koncentracija poznata, korišćen je albumin iz goveđeg seruma (BSA), a rezultati izmerenih apsorbanci za različite koncentracije standarda koriste se za konstruisanje krive, prikazane na slici 37.



Slika 37. Primer standardne krive za određivanje koncentracije proteina metodom po Bredfordu

Na osnovu standardne, ili kalibracione krive, koncentracija proteina se računa prema sledećoj formuli:

$$c_{\text{proteina}} (\text{mg/ml}) = \frac{A_{595 \text{ nm}}}{\text{nagib standardne krive}} = \frac{A_{595 \text{ nm}}}{8,753} \quad (9)$$

Standardna ili kalibraciona kriva, koja u suštini predstavlja pravu liniju, odnosno linearnu zavisnost apsorbance od koncentracije proteina u datom opsegu koncentracija, konstruisana je za svaku novu šaržu pripremljenog Bredfordovog reagensa korišćenjem albumina iz goveđeg seruma (BSA), tako da su i njeni parametri promenljivi, odnosno vrednost nagiba data u jednačini 9 će se menjati u zavisnosti od korišćene krive.

Pošto je zapremina uzorka poznata, masa proteina računa se prema jednačini 10:

$$m_{\text{proteina}}(\text{mg}) = c_{\text{proteina}}(\text{mg/ml}) \cdot V_{\text{uzorka}}(\text{ml}) \quad (10)$$

Koncentracija proteina po gramu nosača izračunava se na osnovu jednačine 11:

$$c(\text{mg/g nosača}) = \frac{m_{\text{proteina}}(\text{mg})}{m_{\text{vlažnog nosača}} \cdot \% \text{ suve mase nosača}} \quad (11)$$

gde je % suve mase nosača eksperimentalno dobijena vrednost za svaki od korišćenih nosača.

Koncentracija imobilisanih proteina računata je prema formuli 12:

$$c_{\text{imobilisanih proteina}} = \frac{c_0 - c}{m_{\text{nosača}}} \quad (12)$$

gde je c_0 - početna koncentracija proteina u rastvoru za imobilizaciju, c - koncentracija proteina koja zaostaje u supernatnu nakon imobilizacije. Masa nosača takođe se odnosi na suhu masu nosača, odnosno masu nakon sušenja, tako da u formulu nije uključen udeo vlage u nosaču.

Prinos imobilizacije računat je korišćenjem formule 13:

$$\text{Prinos imobilizacije (\%)} = \frac{c_{\text{imobilisanih proteina}}}{c_0} \cdot 100 \quad (13)$$

3.2.4.1.2. Određivanje koncentracije proteina kod imobilizacije lakaze na AFNS

Bredfordov reagens u zapremini od 980 μl pomešan je sa 20 μl pripremljenog rastvora Novozym[®] 51003 lakaze (koncentracija od 0,064 mg/ml do 0,64 mg/ml u Na-acetatnom puferu (50 mM, pH 5,0)) ili 20 μl supernatanta (razdvojenih centrifugiranjem pri 1300 o/min). Nakon 5 minuta, kivete su postavljane u spektrofotometar i apsorbancija je očitavana na 595 nm.

Iz razlike između koncentracije ponuđenih proteina (mg/ml), odnosno početne koncentracije proteina i koncentracije proteina preostalih u supernatantu (mg/ml), izračunava

se koncentracija imobilisanih proteina (masa imobilisanog enzima (mg) po g nosača), prema jednačini 12.

Prinos imobilizacije proteina izračunat je i iskazan kao procentni odnos koncentracije imobilisanih proteina (mg/g nosača) i koncentracije ponuđenih proteina, odnosno početne koncentracije proteina (mg/ml), prema jednačinama 12 i 13.

3.2.4.1.3. Određivanje koncentracije proteina kod imobilizacije lakaze na A-LMS

Koncentracija proteina u rastvorima Novozym® 51003 lakaze i supernatantima određena je po već utvrđenoj proceduri Bradforda, koristeći isti standard, odnosno albumin iz goveđeg seruma, kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.4.1.1. Zapremina uzorka ili supernatanta iznosila je 20 µl u 980 µl Bradfordovog reagensa.

Količina imobilisane lakaze određena je indirektno, na osnovu razlike između količine enzima koji je unet u reakcionu smešu, odnosno početne količine enzima i količine enzima u supernatantu nakon imobilizacije. Prinos imobilizacije proteina je izračunat korišćenjem jednačine 13.

3.2.4.1.4. Određivanje koncentracije proteina kod imobilizacije lakaze na Lifetech™ ECR seriju nosača

Prilikom određivanja koncentracija proteina u rastvorima lakaze iz *T. versicolor* kao i u supernatantima prilikom ispitivanja imobilizacije lakaze na Lifetech™ ECR seriju nosača, korišćena je takođe metoda po Bradfordu. Zapremina uzorka ili supernatanta je iznosila 200 µL, uz dodavanje 800 µL Bradfordovog reagensa, tako da je ukupna zapremina uzorka iznosila 1 mL.

Dobijene vrednosti za koncentracije proteina, koncentracije proteina preostalih u supernatantu, koncentracije imobilisanih proteina i prinos imobilizacije računane su na prethodno objašnjen način i prema datim formulama 9-13.

3.2.5. Desorpcija lakaze

Eksperiment desorpcije vršen je u cilju određivanja vrsta uspostavljenih veza između enzima i nosača. Na ovaj način ispitivane su veze koje se uspostavljene prilikom imobilizacije lakaze na nosače A-LMS_5 i Lifetech™ ECR8285F.

3.2.5.1. Desorpcija lakaze imobilisane na A-LMS_5

Da bi se ispitao tip interakcije koja je formirana između Novozym® 51003 lakaze i izabranog nosača (A-LMS_5), imobilisani preparat dobijen pod prethodno utvrđenim optimalnim uslovima tertian je odvojeno sa 1 % rastvorom Triton™ X-100 i 1 M rastvorom CaCl₂.

Primenjena procedura bila je sledeća: 20 mg imobilisanog enzima suspendovano je u 1 ml rastvora za desorpciju (Triton™ X-100 ili CaCl₂) i inkubirano u vremenu od jednog sata, uz mešanje u centrifugalnoj mešalici, brzinom od 150 o/min i na temperaturi od 25 °C. Nakon izvršene desorpcije, imobilisani preparat je temeljno ispran sa puferom za imobilizaciju i nakon toga je određena preostala aktivnost (%).

3.2.5.2. Desorpcija lakaze imobilisane na Lifetech™ ECR8285F

Za ispitivanje vrste interakcija uspostavljenih između lakaze iz *T. versicolor* i Lifetech™ ECR8285F nosača sa epoksi/butil funkcionalnim grupama, izvršena je desorpcija lakaze u dva koraka.

U početku je imobilisani enzim inkubiran u 1 M rastvoru CaCl₂ na 25 °C u vremenu od 1 h, a na kraju je određena koncentracija proteina u supernatantu, dok su čestice nosača isprane dva puta sa 1 ml pufera za imobilizaciju.

Nakon toga, imobilisana lakaza je tretirana sa 1 % rastvorom Triton™ X-100 na 25 °C tokom jednog sata i nakon završenog postupka desorpcije određena je koncentracija desorbovanih proteina.

3.2.6. GC-MS analiza razgradnje pesticida

Gasno-hromatografska analitička metoda sa masenom spektrometrijom, kao metodom detekcije, korišćena je za analizu količine pesticida u ispitnom uzorku. Korišćene koncentracije pesticida za ispitivanja su bile veoma niske i kretale su se u opsegu od 60 µM do manje od 10 µM.

Za ispitivanje svih organohlornih pesticida ovom tehnikom korišćene su dve metode. Metoda 1 primenjena je na sve pesticide, dok je metoda 2 primenjena samo za ispitivanje pesticida lindana i to u slučajevima kada je praćena njegova razgradnja slobodnom lakazom i lakazom imobilisanom na nosače AFNS kao i na A-LMS_5. Osnovna razlika u metodama je dužina trajanja, tako da je metoda 2 znatno kraća od metode 1 i optimizovana samo za pesticid lindan, čime se omogućava vršenje analiza većeg broja uzoraka za kraće vreme.

Metoda 1 je znatno duža, ali primenljiva na sve ispitivane organohlorne pesticide, odnosno predstavlja modifikovanu metodu koja se standardno koristi za paralelno ispitivanje svih eventualno prisutnih organohlornih pesticida u uzorku. U tom smislu, iako je u eksperimentalnom delu disertacije, svaki pesticid ispitivan posebno, podešeni parametri metode na gasnom gromatografu nisu morali da se menjaju za vreme vršenja svih analiza, što je znatno olakšalo eksperimente i skratilo njihovo vreme trajanja.

Obe primenjene metode su validovane, i dobijena ponovljivost imala je najveću vrednost od 5 %, u zavisnosti od analiziranog jedinjenja i njegove koncentracije u uzorku.

3.2.6.1. Parametri primenjenih GC-MS metoda

Za analize svih ispitivanih organohlornih pesticida korišćena je Zebron™, ZB-5 kapilarna kolona, dimenzija 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm proizvođača Phenomenex, SAD. Primljena metoda 1 je preuzeta iz literature i modifikovana prema korišćenoj opremi [138]. Primljena metoda 2 je takođe delimično modifikovana metoda iz literature [139].

Kao noseći gas korišćen je helijum, čistoće 5.0. Zapremina injektovanih uzoraka bila je 1 µl, a korišćena oprema za uzorkovanje je bila autosempler AOC 20i, Shimadzu, Japan. Temperatura injektora bila je 280 °C. Analize su vršene u Scan i SIM režimu rada, odnosno kontinualnim snimanjem svih spektara, kao i selektivnim praćenjem spektara izabranih jona, sa skeniranim opsezima masa od 50 m/z do 650 m/z. Vreme trajanja Metode 1 iznosilo je 35 minuta, a vreme trajanja metode 2 je bilo 11 min.

Za integraciju površine pikova, korišćena je automatska integracija u softveru GCMS Solution. Analize uzoraka metodom 1 ponavljane su po tri puta. Relativna standardna devijacija dobijenih rezultata kretala se u opsegu od 1,5 % do 5 %, u zavisnosti od analiziranog jedinjenja. Ostali parametri metoda dati su u tabeli 6.

Tabela 6. Parametri korišćenih GC-MS metoda

<i>Parametar</i>	<i>Metoda 1</i>	<i>Metoda 2</i>
------------------	-----------------	-----------------

Temperaturni program	Korak (°C/min)	Temperatura (°C)	Vreme zadržavanja (min)	Korak (°C/min)	Temperatura (°C)	Vreme zadržavanja (min)
	/	100	2,0	/	150	2
	15	160	5,0	20	290	2
	5	270	2,0			
Vreme uzorkovanja		2 min		1 min		
Ukupni protok		71,0 ml/min		14,9 ml/min		
Protok u koloni		1,33 ml/min		3,0 ml/min		
Linearna brzina		43,0 cm/s		39,5 cm/s		
Split odnos		50,0		10,0		
Temperatura jonskog izvora		250 °C		200 °C		
Temperatura interfejsa		270 °C		280 °C		
Vreme izlaska rastvarača		5,0 min		2,5 min		

3.2.6.2. Priprema uzoraka za GC-MS analizu metodom 1

Za ispitivanja razgradnje izabranih organohlorinih pesticida lakazom štok rastvor ispitivanih pesticida (50 mM) pripremljen je u acetonu. Konačna koncentracija svih pesticida u reakcionoj smeši bila je 50 µM. Reakciona smeša (2 ml) sadržala je Na-fosfatni pufer (50 mM, pH 6,5), 15 µl lakaze, i izabrani pesticid. Pripremljene su i reakcione smeše bez lakaze, kao kontrolni uzorci, odnosno slepe probe. Sve reakcione smeše su sve vreme ispitivanja bile podvrgnute mešanju na magnetnoj mešalici i održavane na temperaturi od 25 °C.

Dve reakcione smeše (jedna reakciona smeša sa lakazom i jedna kontrolna) su uzimane u različitim vremenskim periodima (1,2,3,4,5,6 i 7 dana) za svaki ispitivani pesticid posebno, koji je ekstrahovan takođe sa 2 ml heksana. Gornja organska faza je analizirana na gasnom hromatografu sa masenim detektorom. Sve analize su vršene sa 3 ponovljena merenja u jednoj tački, metodom 1.

3.2.6.3. Priprema uzoraka za GC-MS analizu metodom 2

Standardni, štok rastvor lindana (15 mM) pripremljen je takođe u acetonu. Reakciona smeša (2 ml) sadržala je Na-fosfatni pufer (50 mM, pH 6,5), 15 µl slobodne lakaze ili 2 mg lakaze imobilisane na AFNS ili A-LMS_5 i lindan. Konačna koncentracija lindana u reakcionoj smeši bila je 30 µM. Pripremljene su i reakcione smeše bez lakaze, kao kontrolni uzorci.

Tri reakcione smeše (jedna reakciona smeša sa lakazom, jedna sa lakazom imobilisanom na AFNS ili A-LMS_5 i jedna kontrolna) su uzete u različitim vremenskim

periodima (1,2,3,4,5 i 6 dana) a lindan je iz njih ekstrahovan sa 2 ml heksana. Pre ekstrakcije heksanom, u slučaju uzoraka sa imobilisanim enzimom, isti je uklonjen centrifugiranjem brzinom od 13 000 o/min u trajanju od 3 minuta. Gornja organska faza je uklonjena i analizirana na gasnom hromatografu sa masenim detektorom. Sve analize vršene su u duplikatu, metodom 2.

3.2.7. Spektrofotometrijska analiza razgradnje industrijskih boja

Obezbojavanje industrijskih, tekstilnih boja ispitano je lakazom iz *T. versicolor*, imobilisanom na epoksi/butil funkcionalizovanom nosaču Lifetech™ ECR8285F.

Nakon prethodno opisanog postupka imobilizacije pod optimizovanim uslovima, supernatant je odvojen i imobilisani enzim je ispran dva puta sa 1 ml dejonizovane vode. Svaki rastvor pojedinačne boje u zapremini od 1,5 mL (40 mg/L u 0,1 M citratnom puferu pH 5,0) dodat je u svaku od četiri epruvete sa imobilisanom lakazom. Pripremljeni su kontrolni uzorci koji sadrže istu količinu nosača bez enzima i rastvora boje kako bi se ispitaio uticaj adsorpcije boje na nosač.

U određenim vremenskim intervalima, promena boje uzorka je praćena spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na λ_{max} za svaku boju, kao što je dato u tabeli 7. Ukupni procenat obezbojenja izračunat je kao odnos promene apsorbancije i početne apsorbancije rastvora boje, izražen u procentima.

Tabela 7. Karakteristike izabranih boja

Boja	Vrsta	λ_{max}, nm	$M, g mol^{-1}$
Lanaset® Violet B	antrahinonska	590	823,52
Lanaset® Blue 2R	antrahinonska	628	685,32
Bromtimol plavo	sulfonftaleinska	440	624,38
Bromkrezol zeleno	sulfonftaleinska	614	698,01

3.2.8. Ispitivanje ponovne upotrebe imobilisanih preparata lakaze

Mogućnost višekratne upotrebe imobilisanog preparata ispitana je u slučaju Novozym® 51003 lakaze imobilisane na AFNS, za razgradnju pesticida lindana, kao i u slučaju lakaze iz *T. versicolor* imobilisane na Lifetech™ ECR8285F nosač za obezbojavanje industrijskih boja.

3.2.8.1. Ispitivanje ponovne upotrebe lakaze imobilisane na AFNS

Ponovna upotreba Novozym® 51003 lakaze koja je imobilisana na AFNS-u ispitivana je u degradaciji pesticida lindana. Za svaku ponovnu upotrebu 2 mg imobilisanog enzima inkubirano je sa 2 ml reakcione smeše koja sadrži Na-fosfatni pufer (50 mM, pH 6,5) i lindan (krajnja koncentracija 30 µM) tokom 24 h. Nakon 24 sata, reakciona smeša je centrifugirana u vremenu od 3 minuta kako bi se odvojio imobilisani enzim. Iz reakcione smeše se ekstrahuje lindan sa 2 ml heksana.

Gornja organska faza je uklonjena i analizirana na GC-MS-u, kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.6.3. metodom 2. Izdvojeni imobilisani enzim je ispran sa 1 ml Na-fosfatnog pufera i zatim korišćen za sledeću ponovnu upotrebu na isti način. Za svaku mernu tačku, merenja su ponavljana dva puta.

3.2.8.2. Ispitivanje ponovne upotrebe lakaze imobilisane na ECR8285F

Da bi se istražili potencijali za ponovnu upotrebu imobilisane lakaze iz *T. versicolor* na Lifetech™ ECR8285F nosač sa epoksi/butil funkcionalnim grupama, imobilisani preparat je korišćen u 7 uzastopnih reakcionih ciklusa, u trajanju od jednog sata, u obezbojavanju izabranih industrijskih boja.

Nakon svakog ciklusa, rastvor boje je uklanjan i merena je apsorbanacija, dok je imobilisani enzim ispran dva puta puferom za imobilizaciju. Ista količina početnog, štok rastvora boje dodata je u epruvete sa imobilisanim enzimom, čime je započinjan sledeći ciklus.

4. REZULTATI I DIKUSIJA

Cilj ove disertacije, je da se doprinese ispitivanju mogućnosti razgradnje organskih zagađujućih materija imobilisanom lakazom. U tu svrhu, izvršeno je ispitivanje prvenstveno slobodne lakaze, odnosno njena katakterizacija. Zatim su ispitane mogućnosti razgradnje organskih zagađivača slobodnom lakazom. Ispitana je konačno, mogućnost imobilizacije lakaze na različite nosače, uz optimizaciju uslova imobilizacije. Dobijeni imobilisani preparati sa najboljim karakteristikama su zatim testirani na mogućnost višekratne upotrebe u reakcijama razgradnje prethodno izabranih organskih zagađujućih materija.

4.1. Karakterizacija lakaze iz *Myceliophthora thermophila* sa ekspresijom u *Aspergillus oryzae* (Novozym® 51003)

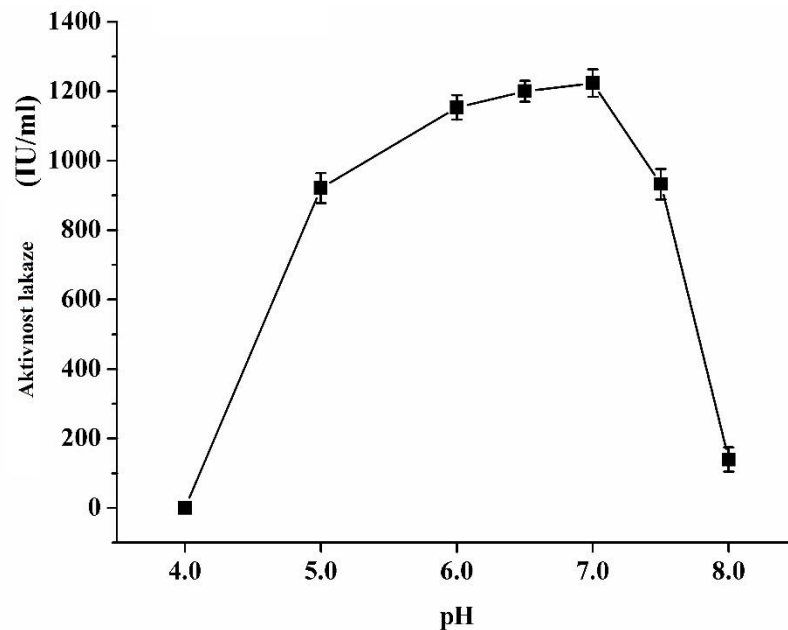
U okviru ove disertacije, izvršena je karakterizacija lakaze iz *Myceliophthora thermophila* sa ekspresijom u *Aspergillus oryzae* (Novozym® 51003). Ispitan je uticaj pH rastvora na aktivnost lakaze i određena je izoelektrična tačka navedenog enzima.

Lakaza iz *T. versicolor*, koja je takođe korišćena u eksperimentalnom delu disertacije, je jedna od najčešće korišćenih lakaza, i za nju se podaci o karakterizaciji mogu naći u literaturi, za razliku od Novozym® 51003 lakaze, koja je kao preparat, još uvek nedovoljno ispitana u smislu svojih karakteristika i potencijalne primene.

4.1.1. Uticaj pH na aktivnost lakaze

Optimalna pH vrednost rastvora za aktivnost lakaze je veoma zavisna od supstrata, i najčešće ima zvonasti profil aktivnosti lakaze. Na osnovu podataka dostupnih u objavljenim studijama, koje se odnose na lakaze iz gljiva belog truljenja, familije *Coprinaceae*, u kojima su ispitivane lakaze iz *Panaeolus sphinctrinus*, *Panaeolus papilionaceus*, *Coprinus friesii* i *Polyporus pinsitus*, u zavisnosti od producenta lakaze, očekivano je da će pH optimum biti u opsegu između pH 3,0 i pH 5,0, za ABTS kao supstrat [12,140]. Međutim, pH optimum može značajno da varira, usled promena reakcije koju izaziva prisutan kiseonik, supstrat ili sam enzim u zavisnosti od njegovog porekla.

Dobijeni rezultati pokazuju da je pH optimum za Novozym® 51003 lakazu u ovom istraživanju bio oko pH 6,8 (1220 IU/ml), kako je prikazano na slici 38.



Slika 38. pH optimum lakaze iz *Myceliophthora thermophila* sa ekspresijom u *Aspergillus oryzae* (Novozym® 51003)

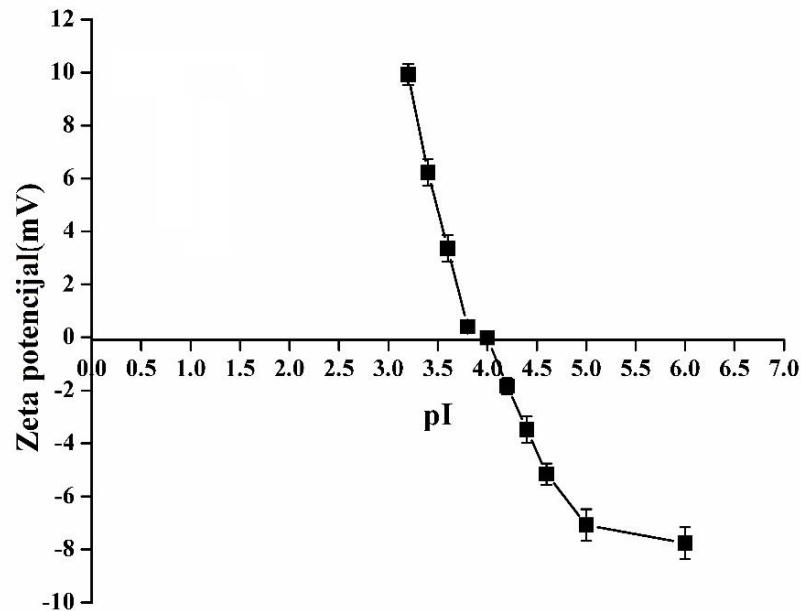
Međutim, enzim je pokazao veliku aktivnost u širokom opsegu pH vrednosti, od pH 5,0 do pH 7,5. Ovi rezultati odgovaraju literaturnim podacima, pošto je već zabeležen ovakav pH optimum za fenole, aniline i druge supstrate čiju oksidaciju lakazom prati oslobađanje H^+ jona. Usled oksidativnog otpuštanja H^+ jona, dolazi do snižavanja redoks potencijala, E_0 , ovih supstrata, kako se povećava pH. Usled toga, dolazi do povećanja razlike u redoks potencijalima lakaze i supstrata, što pospešuje enzimsku oksidaciju, odnosno na krivoj pH optimuma, to je oblast porasta aktivnosti lakaze sa porastom pH vrednosti [39]. Međutim, značajan pad aktivnosti primećen je ispod pH 5,0 (920 IU/ml) i iznad pH 7,5 (930 IU/ml), kao rezultat inhibicije enzima.

Visoka aktivnost lakaze koja je korišćena u ovom ispitivanju u širokom rasponu pH vrednosti, mogla bi biti od koristi za razne industrijske primene, uključujući procese bioremedijacije. Ova ispitana karakteristika takođe omogućava imobilizaciju enzima u širem pH opsegu.

4.1.2. Određivanje izoelektrične tačke lakaze

Tipična lakaza iz gljiva predstavlja protein od približno (60–70) kDa, kako je već navedeno, sa izoelektričnom tačkom (pI) u kiseljoj oblasti, u rasponu od pH 3,0 do 7,0, najčešće

oko pH 4,0 [5,12,141]. Izoelektrična tačka lakaze, dobijena u ovom istraživanju je u skladu sa podacima iz literature, sa vrednošću pI od 4,0, kako je prikazano na slici 39.



Slika 39. Izoelektrična tačka lakaze iz *Myceliophthora thermophila* sa ekspresijom u *Aspergillus oryzae* (Novozym® 51003)

Vrednost koja je dobijena ispitivanjem ukazuje da postoji prevladavanje kiselih aminokiselina u primarnoj strukturi enzima. Kod pH rastvora iznad pI, površina enzima je pretežno negativno naelektrisan. Razlika u vrednostima pI i pH optimuma pokazuje da enzim ima ukupno negativno naelektrisanje u aktivnoj konformaciji.

Utvrđena karakteristika lakaze koja je korišćena u ovoj studiji važan je podatak, koji će biti korišćen prilikom izbora i po potrebi, modifikacije nosača za imobilizaciju, kao i za optimizaciju same imobilizacije.

4.2. Razgradnja organohlornih pesticida slobodnom lakazom

Nakon ispitivanja pH optimuma Novozym® 51003 lakaze i utvrđivanja optimalne vrednosti, sledeći eksperimenti degradacije izabranih organohlornih pesticida vršeni su u Nafosfatnom puferu (50 mM, pH 6,5). Iako su primenjivani različiti supstrati, u svim analizama ispitani uzorci su pripremani na isti način uz jednaku početnu aktivnost lakaze (3,5 IU). Cilj ovako osmišljenih eksperimenata bio je dobijanje odgovarajuće procene specifičnosti lakaze u odnosu na razgradnju pojedinog supstrata, odnosno pesticida.

Posle utvrđivanja mogućnosti razgradnje izabranih pesticida slobodnom Novozym® 51003 lakazom, odabran je jedan predstavnik, koji će se kao supstrat koristiti za dalje eksperimente razgradnje imobilisanom lakazom. Za procenu razgradnje svih izabranih pesticida korišćena analitička tehnika bila je gasna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektroskopijom (GC-MS) kako je opisano u poglavlju 3.2.6. a primenjena je metoda 1, čiji su parametri navedeni u tabeli 6.

Uporedo sa analizama degradacije pesticida, vršene su i analize kontrolnih uzoraka (slepih proba), kako je navedeno u opisanim metodama, sa ciljem praćenja razgradnje pesticida tokom vremena u puferu pH 6,5, bez prisustva lakaze. Analiza pesticida vršena je za svako jedinjenje posebno, osim u slučaju endosulfana, gde se dva izomera, I i II nalaze u smeši, pa je njihova razgradnja praćena paralelno u jednom uzorku, uz sve ostale parametre metode iste kao i za druga jedinjenja.

4.2.1. Razgradnja dihlor-difenil-etana

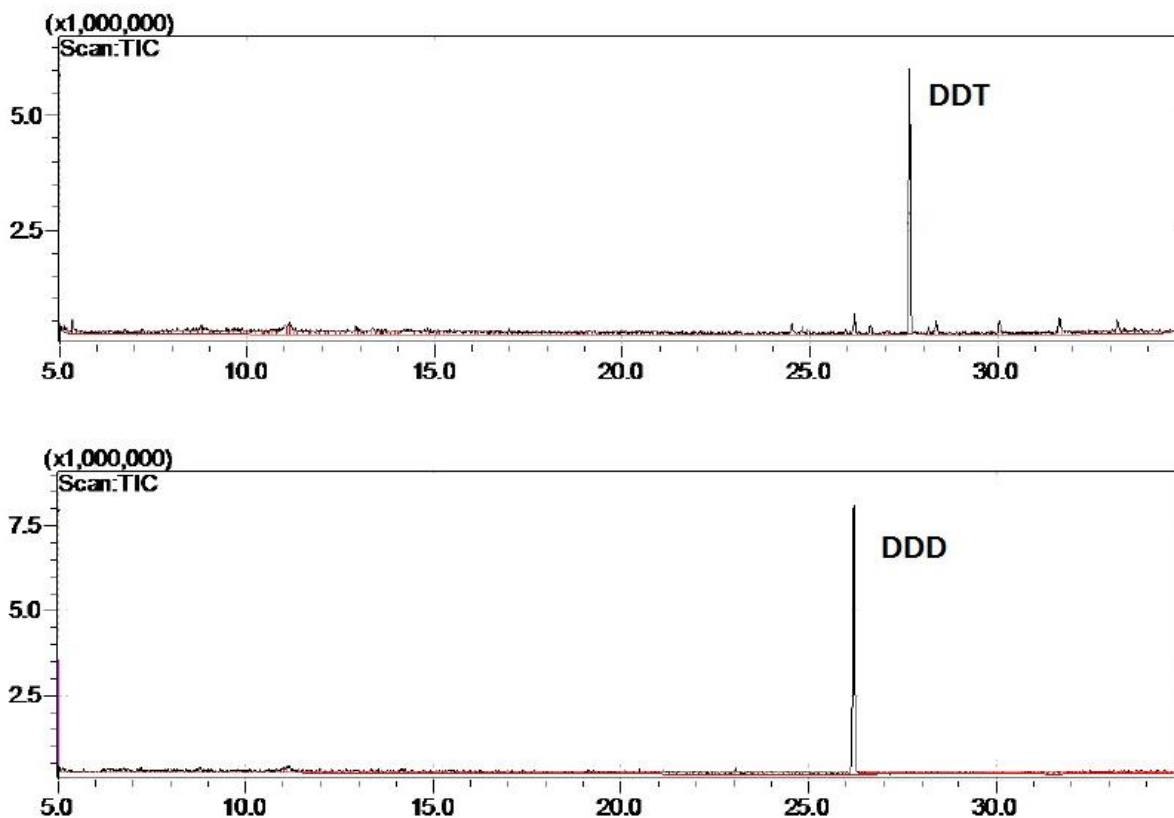
Pesticidi koji pripadaju ovoj grupi organohlornih pesticida, a čija je degradacija ispitivana, su 4,4'-DDT, 4,4'-DDD i metoksihlor. Ova grupa organohlornih pesticida je najčešće korišćena u svojstvu insekticida, od svih OCP-a. U tom smislu, u dostupnoj literaturi, detaljno su istraživane mogućnosti uklanjanja ovih hemikalija zaostalih u životnoj sredini, kako hemijskim, tako i mikrobiloškim načinima i primenom enzima.

Istraživanja ukazuju na mogućnost lakaze da razgradi predstavnike ovih OCP-a, ali nema još uvek dostupnih studija u kojima je korišćena lakaza iz *Myceliophthora thermophila* sa ekspresijom u *Aspergillus oryzae* (Novozym® 51003) u ovu svrhu. Stoga je u nastavku eksperimentalnog dela ispitana mogućnost enzimske razgradnje ove vrste pesticida izabranom slobodnom lakazom.

4.2.1.1. Razgradnja DDT-a i DDD-a

Prilikom GC-MS analize 4,4'-DDT-a i 4,4'-DDD-a, kvantitativna analiza kontrolnog uzorka vršena je korišćenjem SIM (Selected Ion Monitoring) moda snimanja spektara, odnosno praćenja samo prethodno odabranih jona. Kvantifikacija je vršena na osnovu određivanja površine hromatografskog pika u kontrolnom uzorku, koji se mogao detektovati na retencionim vremenima od 27,7 min za DDT i 26,2 min za DDD, kako je prikazano na slici 49. Utvrđeno retenciono vreme i prisustvo izabranih karakterističnih jona za kontrolni uzorak

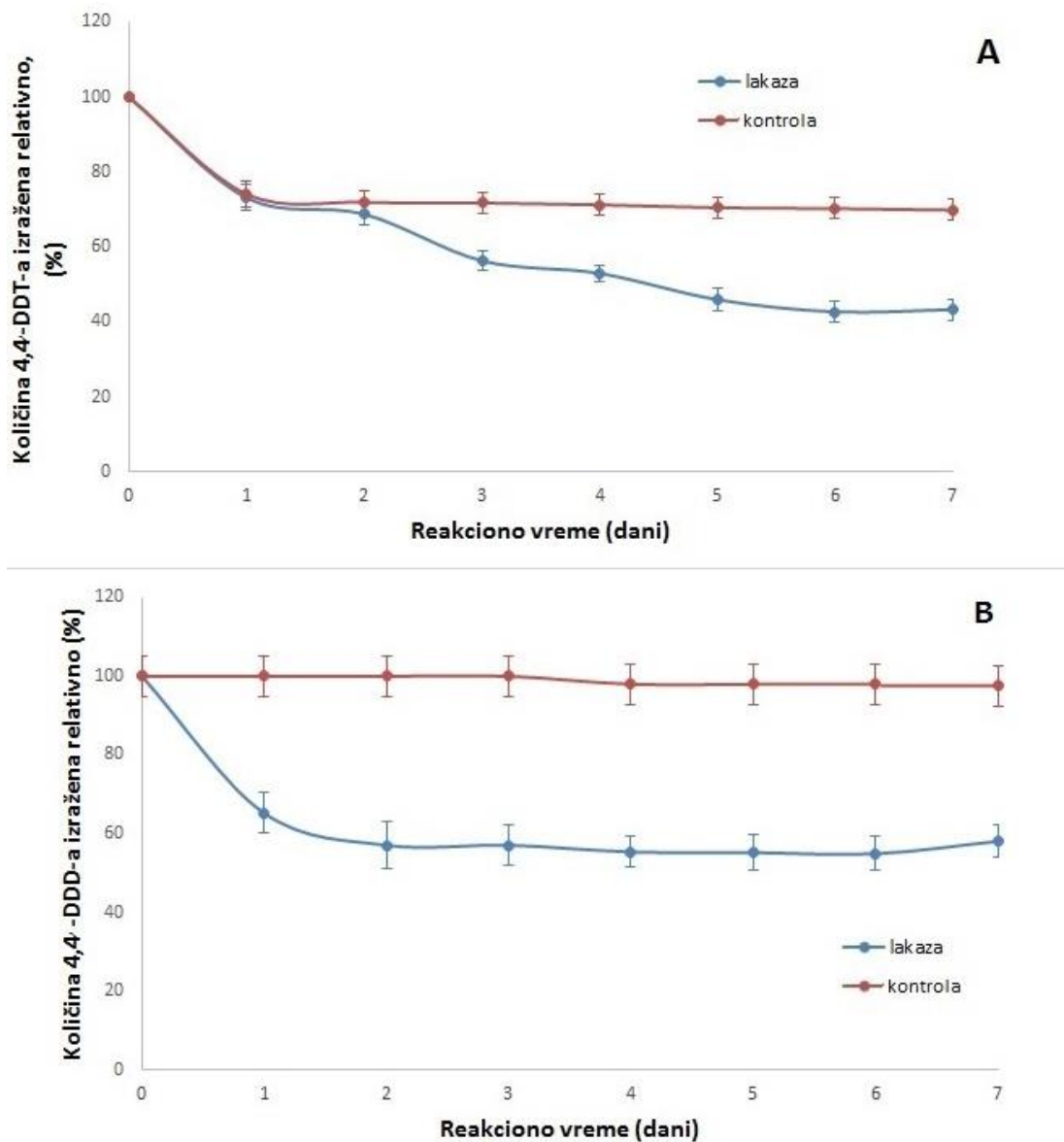
korišćeni su kao identifikacioni kriterijumi za prisustvo DDT-a i DDD-a u svim analiziranim ekstraktima uzoraka reakcionih smeša u heksanu. Dobijeni hromatogrami prikazani su na slici 40.



Slika 40. Gasni hromatogrami kontrolnog uzorka 4,4'-DDT-a i 4,4'-DDD-a

Joni za potvrđivanje prisustva 4,4'-DDT-a bili su 235 m/z, 237 m/z, 165 m/z, i 236 m/z, a za potvrđivanje prisustva 4,4'-DDD-a izabrani joni su bili 235 m/z, 237 m/z, 165 m/z, i 199 m/z. Izabrani karakteristični joni, koji dokazuju prisustvo DDT-a i DDD-a u uzorku, su u skladu sa masenim spektrima oba jedinjenja koji se nalazi u referentnoj bazi Nacionalnog instituta za etalone i tehnologiju, poznatijoj kao NIST biblioteka masenih spektara.

Dobijeni rezultati razgradnje ova dva pesticida predstavljani su na slici 41, kao relativan odnos početne količine DDT-a i DDD-a i količine DDT-a i DDD-a u smeši u momentu pojedinih uzorkovanja, odnosno nakon određenog broja dana, izraženo u procentima (%).



Slika 41. Relativna količina 4,4'-DDT-a (A) i 4,4'-DDD-a (B) u odnosu na početnu količinu nakon reakcije sa Novozym® 51003 lakazom i u kontrolnom uzorku (kontrola)

Prilikom vršenja analiza, utvrđeno je da dolazi do razgradnje pojedinih pesticida, kao što je slučaj sa insekticidom 4,4'-DDT, u izabranom puferu, tokom vremena. Iz tog razloga, na slici 41A, prikazana je i razgradnja DDT-a u puferu, odnosno u kontrolnom uzorku (kriva "kontrola"), kao i u uzorku u kome se nalazila lakaza u puferu pH 6,5 (kriva "lakaza"). Isti način prikaza rezultata primenjen je i u ostalim slučajevima pesticida kod kojih je detektovana razgradnja u korišćenom Na-fosfatnom puferu.

Posle prvog dana reakcije, preostala koncentracija DDT-a u uzorku sa lakazom bila je 73,1 % od početne koncentracije. Međutim, isti procenat razgradnje DDT-a nakon prvog dana zabeležen je i u slepoj probi (slika 41A). Stoga se može zaključiti, da se razgradnja u toku prvog dana vršila usled mešanja uzorka u puferu, odnosno prvenstveno hidrolizom, odnosno hemijskom razgradnjom i moguće nekim udelom i termičkom i fotolitičkom degradacijom, a ne dejstvom enzima. Nakon drugog dana, razgradnja je nastavljena do preostalih 68,8 % slobodnom lakazom, a procenat DDT-a u kontrolnom uzorku bio je 72,1 % od početne koncentracije. Ovaj procenat razgradnje DDT-a u kontrolnom uzorku ostao je gotovo nepromenjen svih narednih dana ispitivanja, dostigavši najmanju vrednost od preostalih 69,9 % DDT-a nakon 7. dana analize.

U uzorku sa lakazom, degradacija je nastavljena i posle 2. dana, dostigavši vrednost od 56,4 % preostalog pesticida u uzorku nakon 3. dana, da bi nakon 6. dana 42,7 % DDT-a preostalo u uzorku, a ova vrednost se zadržala do kraja ispitivanog perioda. Iz rezultata se može zaključiti da se razgradnja DDT-a slobodnom Novozym® 51003 lakazom, odigravala znatno brže tek nakon 2. dana reakcije. Uzevši u obzir rezultate prikazane na slici 41A, može se zaključiti da je nakon 6. dana doprinos lakaze razgradnji DDT-a, nakon prestanka degradacije u puferu, bio 27,2 %.

Prilikom praćenja razgradnje 4,4'-DDD-a, nije primećen uticaj pufera na razgradnju, odnosno koncentracija ovog pesticida u kontrolnom uzorku ostala je ista tokom celog eksperimenta. Dobijeni podaci mogu se objasniti činjenicom, da je DDD-a kao derivat DDT-a, stabilnije jedinjenje, koje teže podleže hidrolizi u kraćim vremenskim periodima, odnosno za vreme trajanja ovog eksperimenta. Moguće da se njegova hemijska degradacija nije mogla detektovati u periodu od 7 dana, u granicama tačnosti korišćene metode analize. Njegovo vreme poluživota, pri pH 5 i na temperaturi od 27 °C, kako je objavljeno u studiji Wolfe *et al.* iznosilo je 190 dana, za razliku od DDT-a, kome je ovo vreme bilo 12 dana pod datim reakcionim uslovima[142].

Pošto je u prethodnom eksperimentu dokazana razgradnja DDT-a, može se očekivati da dolazi i do razgradnje njegovog derivata, *p,p'*-DDD-a od strane lakaze, s obzirom na sličnost u hemijskoj strukturi ova dva jedinjenja. Dobijeni rezultati potvrdili su datu pretpostavku.

Nakon prvog dana reakcije, preostalo je 65,2 % DDD-a u uzorku, a sledećeg dana razgradnja je nastavljena do 57 % DDD-a prisutnog u uzorku, nakon čega ostaje gotovo konstantna do kraja eksperimenta (slika 41B), ostavši na vrednosti od približno 52 %. Ovi rezultati ukazuju na to da se enzimaska razgradnja DDD-a dešava brzo u toku prvog dana reakcije, za razliku od rezultata dobijenih razgradnjom DDT-a.

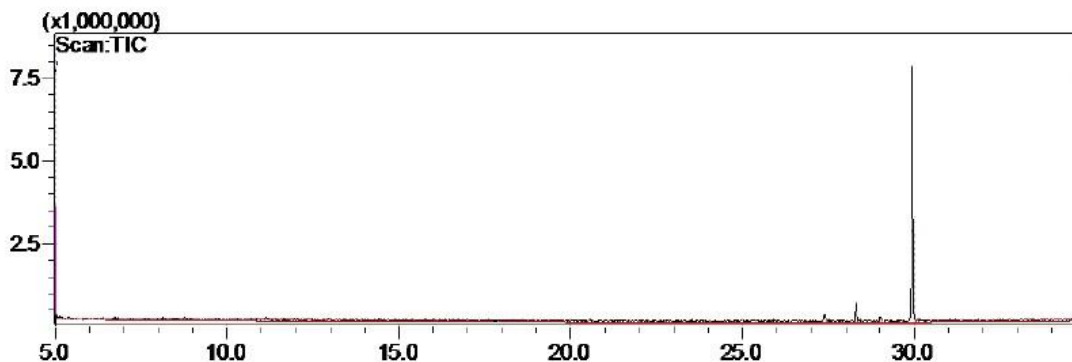
Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodno objavljenom studijom, u kojoj je ispitivana degradacija DDT-a i njegovih produkata razgradnje u zemljištu, a među njima i 4,4'-DDD-a, lakazom izolovanom iz gljiva belog truljenja, kinetikom pseudo-prvog reda [107]. U pomenutoj studiji, takođe je primećena razgradnja DDT-a koja se dešava usled različitih pH zemljišta, i

nakon 5 dana iznosila je približno 20 % od prvobitne koncentracije, a nakon 10 dana približno 30 % od početne koncentracije. Rezidui DDT-a i njegovih degradacionih proizvoda smanjili su se u zemljištu za 21% do 32 % nakon 5 dana, odnosno 29 % - 45 % nakon 10 dana reakcije, u zavisnosti od primenjenih koncentracija lakaze. U pomenutoj studiji, takođe je konstatovana brža i efikasnija razgradnja DDD-a od strane lakaze [107]. Uticaj temperature na razgradnju DDT-a je takođe ispitivan u drugoj objavljenoj studiji, a procenjen je kao neznatan, sa maksimumom razgradnje u pH 7, od 1,5 % na 35 °C [143].

Iz svega navedenog, može se zaključiti da je u ovoj studiji potvrđeno da slobodna Novozym® 51003 lakaza uspešno razgrađuje kako 4,4'-DDT, tako i njegov derivat 4,4'-DDD. Od ova dva ispitana pesticida, ukupan enzimski doprinos razgradnji bio je znatno veći kod 4,4'-DDD-a u odnosu na 4,4'-DDT.

4.2.1.2. Razgradnja metoksihlora

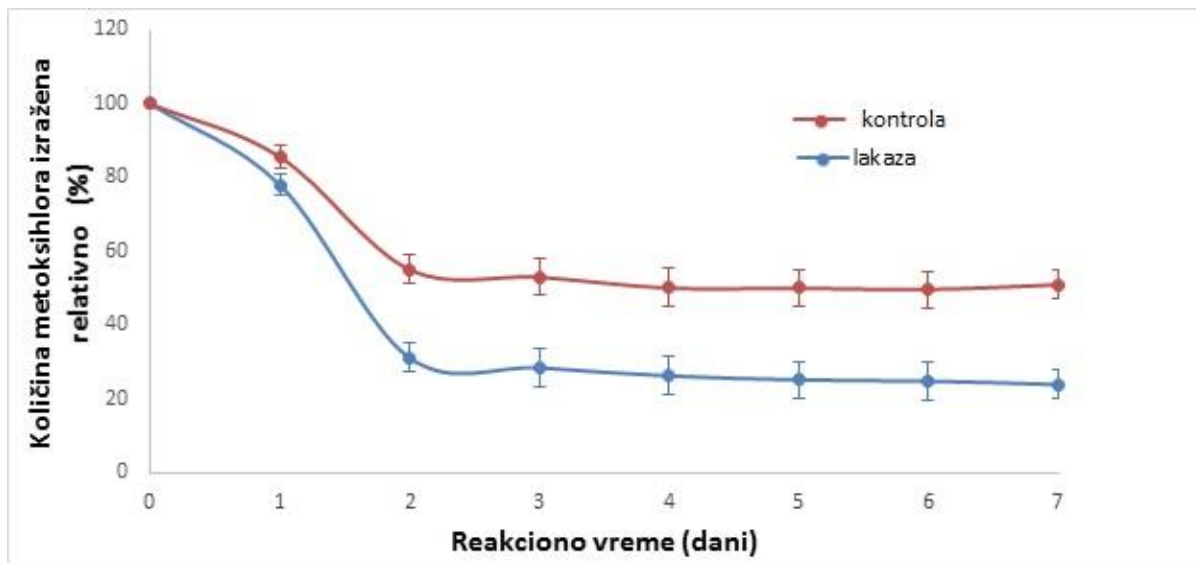
Gasno-hromatografska analiza metoksihlora rađena je na isti način kao i u slučaju prethodno ispitivanih pesticida, metodom 1. Kvantifikacije je vršena na osnovu određivanje površine pika metoksihlora u kontrolnom uzorku, koji se mogao uočiti na retencionom vremenu od 29,9 min, a dobijeni hromatogram prikazan je na slici 42.



Slika 42. Gasni hromatogram kontrolnog uzorka metoksihlora

Joni, karakteristični za potvrđivanje prisustva metoksihlora su bili 227 m/z, 228 m/z, 15 m/z i 152 m/z, izabrani takođe na osnovu NIST biblioteke masenih spektara.

Način prikaza rezultata razgradnje metoksihlora slobodnom lakazom je relativan u odnosu na početnu koncentraciju. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 43.



Slika 43. Relativna količina metoksihlora u odnosu na početnu količinu nakon reakcije sa Novozym® 51003 lakazom i u kontrolnom uzorku (kontrola)

Nakon prvog dana reakcije, količina preostalog metoksihlora iznosila je 78,0 % početne koncentracije, u uzorku sa slobodnom lakazom. Međutim, gotovo isti procenat razgradnje posle prvog dana, od 85,6 % zabeležen je i u kontrolnom uzorku (slika 43). Stoga se može zaključiti, da se razgradnja u toku prvog dana, kao i u slučaju DDT-a, vršila prvenstveno usled hidrolize metoksihlora u puferu.

Nakon drugog dana, nastavljen je slični trend razgradnje, do 31,1 % slobodnom lakazom, a procenat metoksihlora u slepoj probi bio je 55,0 % od početne koncentracije. Ovi procenti razgradnje metoksihlora ostali su gotovo nepromenjeni tokom narednih dana vršenja eksperimenta, naročito nakon 3. dana, dostigavši najveći procenat razgradnje od 76,1 % slobodnom lakazom i 49,05 % hemijskom razgradnjom u puferu. Prikazani rezultati ukazuju na to da se razgradnja metoksihlora odigravala paralelno, dejstvom Novozym® 51003 lakaze i hemijski u puferu, veoma sličnim trendom, i relativno brzo, u prva 3 dana reakcije. Na osnovu dobijenih rezultata, prikazanih na slici 43, može se zaključiti da je nakon izvršenog eksperimenta, doprinos lakaze razgradnji metoksihlora, iznosio 27,1 %, što je veoma sličan rezultat kao i u slučaju razgradnje DDT-a.

Na osnovu podataka iz literature, razgradnja metoksihlora u blago kiseloj sredini, na temperaturi od 25 °C, mogla se pretpostaviti. U objavljenoj studiji dokazano je da se hidroliza metoksihlora vrši kinetikom pseudo-prvog reda, i pri 27 °C i pH 5, brzina hidrolitičke degradacije metoksihlora je približno 12 puta veća od hidrolize DDT-a pod istim uslovima [142]. Pri pH 6,5, prema podacima iz iste studije, razgradnje oba pesticida se dešavaju sporije, ali u istom međusobnom odnosu brzina reakcija. U studiji u kojoj je ispitivana razgradnja metoksihlora gljivama belog truljenja *Stereum hirsutum*, detektovani su proizvodi razgradnje

metoksihlora: 2-dihlor-1,1-bis(4-metoksifenil)etan, 2,2-dihlor-1,1-bis(4-metoksifenil)etilen, 2-hlor-1,1-bis(4-metoksifenil)etan, 2-hlor-1,1-bis(4-metoksifenil)etilen, i 1,1-bis(4-metoksifenil)etilen, što ukazuje na to da se razgradnja metoksihlora vrši prevashodno dehlorinacijom i dehidrohenizacijom. U istoj studiji, nakon 14 dana inkubacije, gljiva *S. hirsutum* je u potpunosti razgradila metoksihlor.

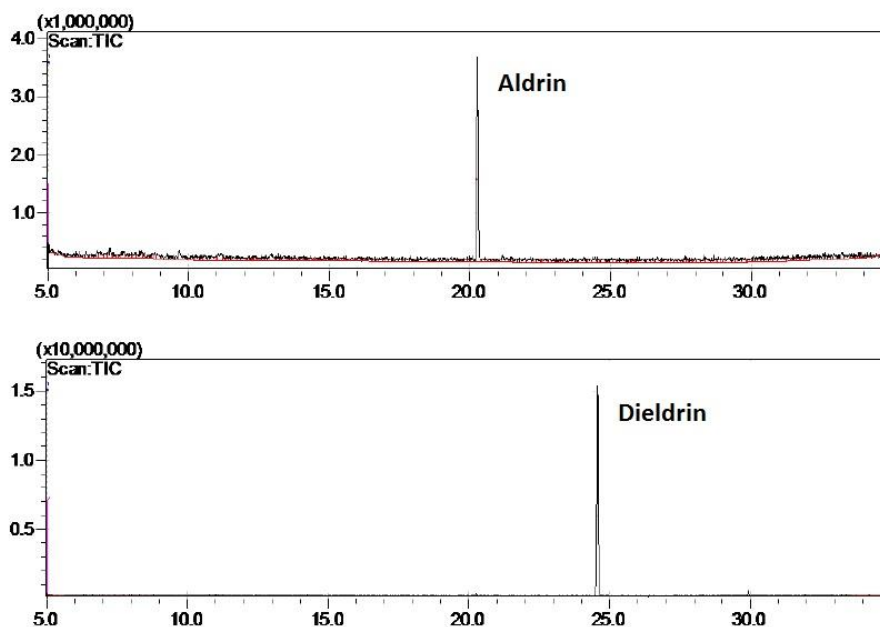
Rezultati dobijeni u ovom istraživanju potvrđuju da Novozym® 51003 lakaza takođe uspješno razgrađuje metoksihlor, u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

4.2.2. Razgradnja hlorovanih ciklodiena

U okviru ove grupe OCP-a, derivata heksahlorciklopentadiena, ispitana je mogućnost razgradnje aldrina, dieldrina, endosulfana I i II, heptahlor i heptahlorepoksida Novozym® 51003 lakazom.

4.2.2.1. Razgradnja aldrina i dieldrina

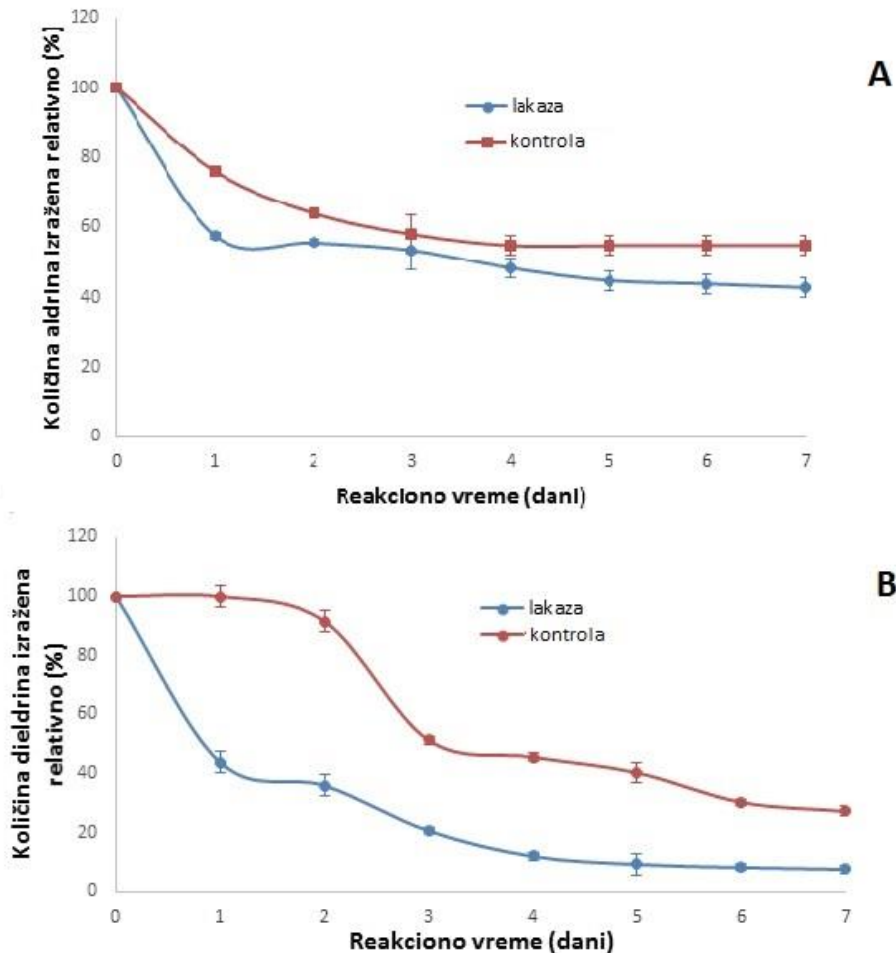
Gasno-hromatografskom metodom sa masenom spektrometrijom vršena je kvantifikacija uzoraka aldrina i dieldrina, prema prethodno opisanoj metodi 1, na osnovu površine pikova u uzorku slepe probe, koji su se mogli detektovati na retencionim vremenima od 20,3 min za aldrin i 24,6 min za dieldrin, a dobijeni hromatogrami prikazani su na slici 44.



Slika 44. Gasni hromatogrami kontrolnih uzoraka aldrina i dieldrina

Joni za potvrđivanje prisustva aldrina bili su 66 m/z, 263 m/z, 79 m/z i 91 m/z, a kao potvrdu za prisustvo dieldrina u ispitivanom uzorku, korišćeni su joni 79 m/z, 81 m/z, 82 m/z i 263 m/z, takođe preuzeti iz referentne NIST baze spektara.

Rezultati koji su dobijeni u ovom eksperimentu razgradnje aldrina i dieldrina slobodnom lakazom, predstavljeni su relativno u odnosu na početne koncentracije u procentima (%) (slika 45).



Slika 45. Relativna količina aldrina (A) i dieldrina (B) u odnosu na početnu količinu nakon reakcije sa *Novozym*[®] 51003 lakazom i u kontrolnom uzorku (kontrola)

Na osnovu prikazanih rezultata, uočljivo je da je u slučaju oba ispitivana pesticida, vremenom došlo do njihove razgradnje u puferu pH 6,5, prikazano kao "kontrola" na graficima. Međutim, ova razgradnja nije išla istim tokom kod aldrina i dieldrina. Već je ranije naglašeno da se u prirodi aldrin transformiše u dieldrin, koji je jedan od najperzistentnijih organskih polutanata.

Razgradnja aldrina započeta je prvog dana, nakon koga je razgrađeno 24 % i 42, 45 % u kontrolnom uzorku i u uzorku sa lakazom, redom. To je ujedno bio i najveći postignuti doprinos enzimske razgradnje ukupnoj, sa 18,5 %. Razgradnja se nastavila manjom brzinom i narednih dana, tako da je preostalog aldrina u uzorku sa lakazom bilo 53,5 % nakon 3. dana, a u slepoj probi 58,1 % od početne koncentracije. Ovaj stepen degradacije aldrina ostao je približan i do kraja eksperimenta, pošto je na kraju 7. dana procenat razgrađenog aldrina Novozym® 51003 lakazom iznosio 57,2 %, dok se 45,2 % aldrina razgradilo u uzorku slepe probe, iz čega se nakon konačnog reakcionog vremena vidi doprinos lakaze razgradnji pesticida od 12,5 % (slika 45A).

Rezultati ovog ispitivanja pokazuju da se dieldrin nije razgrađivao u velikoj meri tokom prva 2 dana, u kontrolnom uzorku, nakon čega je preostala količina dieldrina u odnosu na početnu iznosila 91,6 % (slika 45B). Nakon drugog dana, dolazi do njegove nagle razgradnje u puferu, tako da su preostale količine dieldrina posle 3., 4. i 5. dana iznosile 51,3 %, 45,6 % i 40,3 % redom. Nakon 7. dana ispitivanja, u uzorku slepe probe, odnosno kontrolnom uzorku, preostalo je 30,3 % dieldrina. S obzirom da je dieldrin relativno stabilan pri pH 4-7, otporan na dejstvo kiselina i baza, kao i svetlost, a skoro nerastvoran u vodi, moguće je da je do njegove razgradnje tokom vremena došlo usled izloženosti kombinaciji reakcionih uslova, od kojih je svaki imao veći ili manji doprinos, nakon perioda od 2 dana.

Razgradnja lakazom, nasuprot degradaciji u puferu, započela je već prvog dana, tako da je preostala koncentracija dieldrina iznosila 43,8 % i nastavila se tokom sledećih dana, dostigavši vrednost od 9,23 % preostalog dieldrina u uzorku nakon 5. dana reakcije. Ovaj procenat razgradnje nije se bitno promenio ni do kraja 7. dana, kada je iznosio 7,6 %.

Na osnovu prikazanih rezultata, očigledno je da je tokom prva dva dana reakcije, gotovo sva razgradnja dieldrina bila usled dejstva lakaze, a procenat razgrađenog dieldrina koji se može pripisati samo dejstvu lakaze iznosio je 55,6 %. Produžavanjem vremena reakcije, usled degradacije pesticida u puferu, na kraju 7. dana, ovaj doprinos je smanjen na svega 19,7 %. Može se zaključiti da lakaza ima sklonost ka ovom supstratu, u datim reakcionim uslovima, razgrađujući ga u relativno kratkom vremenskom periodu, u odnosu na proces njegove degradacije u puferu.

Rezultati biodegradacije aldrina i dieldrina mogu se naći i u literaturi. Prilikom ispitivanja njihove razgradnje gljivama belog truljenja *Pleurotus ostreatus*, nakon inkubacije od 14 dana, aldrin je eliminisan u potpunosti iz medijuma, dok je dieldrin razgrađen samo 18 %. Pretpostavlja se da u degradaciji aldrina i njegovog metabolita učestvuju enzimi koje ove gljive proizvode, među kojima i lakaza [144]. Razgradnja ova dva pesticida dokazana je i gljivama belog truljenja roda *Phlebia* [145].

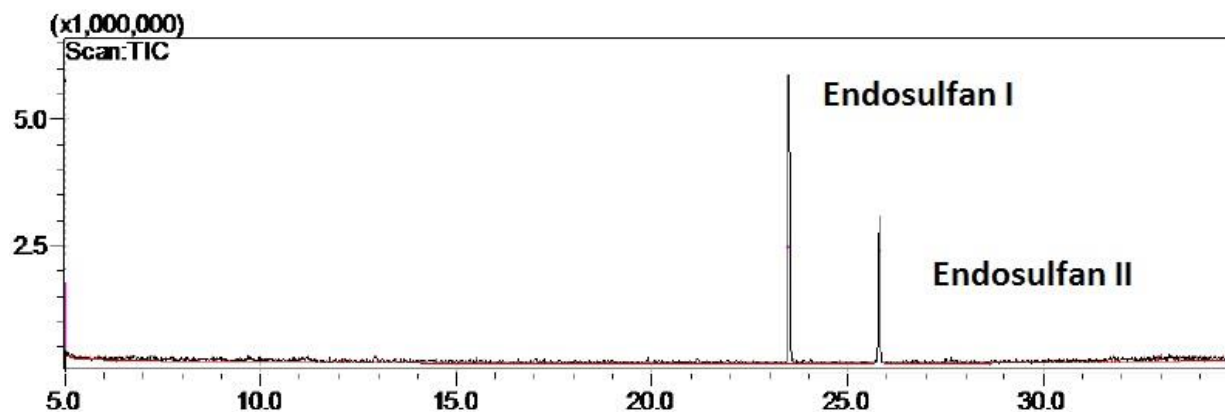
Nakon izvršenih eksperimenata, može se uočiti sličan trend razgradnje pojedinog jedinjenja iz ove grupe OCP-a i njegovog derivata, Novozym® 51003 lakazom, kao i sličan trend njihove razgradnje u puferu, odnosno u kontrolnom uzorku. Ovakvi parovi jedinjenja (DDT i

DDD, aldrin i dieldrin) razgrađivani su na sličan način lakazom, tako što je osnovni pesticid razgrađivan relativno postupno, dok je njegov derivat razgrađivan mnogo brže, u prva 2 ili 3 dana reakcije (slike 41 i 45).

Rezultati dokazuju da su i ova dva ispitivana insekticida, aldrin i dieldrin, pogodni supstrati za Novozym® 51003 lakazu.

4.2.2.2. Razgradnja endosulfana I i II

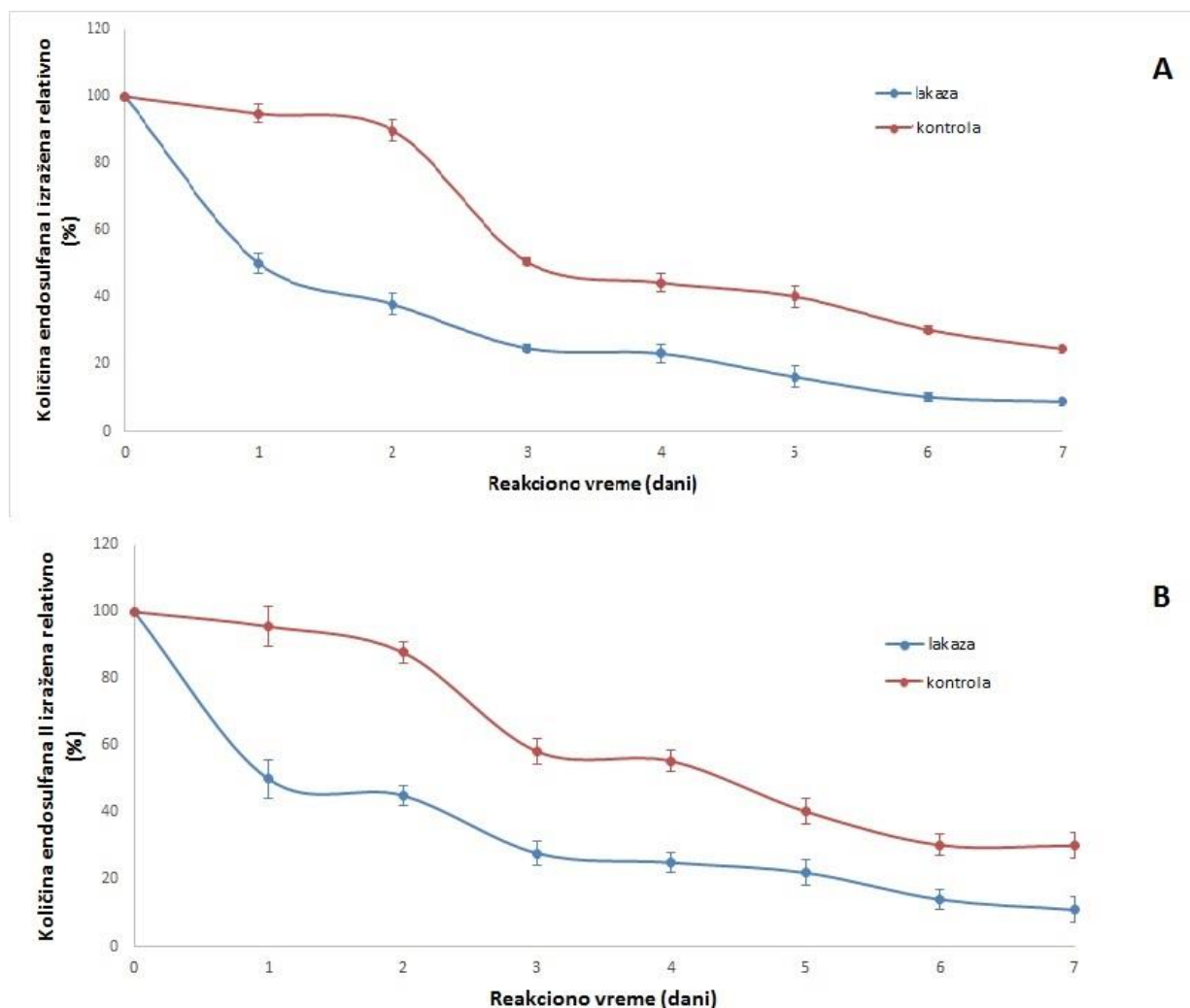
Praćenje promene količina endosulfana I i II vršeno je paralelno u uzorcima u kojima su se nalazila oba izomera, a na osnovu površine pikova u uzorku slepe probe, koji su se detektovali GC-MS metodom na retencionim vremenima od 23,5 min za endosulfan I i 25,8 min za endosulfan II. Hromatogram dobijen prilikom analize endosulfana prikazan je na slici 46.



Slika 46. Gasni hromatogram kontrolnog uzorka endosulfana I i endosulfana II

Karakteristični joni za potvrđivanje prisustva endosulfana I bili su 195 m/z, 241 m/z, 197 m/z i 239 m/z, a za potvrđivanje prisustva endosulfana II konfirmacioni joni bili su 195 m/z, 241 m/z, 159 m/z i 237 m/z, preuzeti iz NIST biblioteke spektara.

Rezultati koji su dobijeni u ovom eksperimentu, predstavljeni su na slici 47, na isti način kao i za prethodno ispitivane pesticide.



Slika 47. Relativna količina endosulfana I (A) i endosulfana II (B) u odnosu na početnu količinu nakon reakcije sa Novozym[®] 51003 lakazom i u kontrolnom uzorku (kontrola)

Na osnovu prikazanih rezultata, uočava se da je razgradnja, slobodnom Novozym[®] 51003 lakazom, oba izomera tekla na gotovo identičan način. Razgradnja endosulfana se događala vremenom i u puferu, na sličan način kao i u slučaju razgradnje dieldrina. Za dva dana reakcije, u puferu je preostalo 89,9 % endosulfana I i 87,9 % endosulfana II, dok je lakaza u puferu u istom periodu razgradila 62,0 % endosulfana I i 54,8 % endosulfana II. Stoga se može zaključiti da je za prva dva dana u uzorku vršena prvenstveno enzimaska razgradnja oba ispitivana supstrata.

Nakon 7. dana količina preostalog endosulfana I iznosila je 8,8 %, u uzorku sa lakazom i 24,5 % u slepoj probi, u odnosu na početnu. Količina endosulfana II na kraju 7. dana ispitivanja bila je 10,9 % a u kontrolnom uzorku 30,1 %. Najveći doprinos lakaze razgradnji endosulfana I

bio je 2. dana reakcije, 51,9 %, dok je na kraju reakcije bio 15,7 %. U slučaju endosulfana II, najveći doprinos lakaze degradaciji bio je 1. dana, 45,6 %, a na kraju 7. dana bio je 19,2 %.

S obzirom na dobijene rezultate, koji se neznatno razlikuju u slučaju ova dva izomera, može se zaključiti da lakaza nema izraženu stereohemijsku specifičnost u odnosu na ovaj supstrat.

Podataka o razgradnji endosulfana od strane lakaze ima u naučnoj literaturi. Lakaza izolovana iz *B. subtilis* razgradila je približno 60 % endosulfana I i II u odnosu na početnu koncentraciju, a obe ispitivane kulture gljiva belog truljenja, *T. versicolor* i *P. ostreatus* razgrađivale su endosulfan, dok je efikasnost zavisila od perioda izlaganja. Kao produkti razgradnje endosulfana, u spomenutoj studiji, identifikovani su endosulfan sulfat i manje količine endosulfan etra [146]. Takođe u literaturi postoje podaci o razgradnji endosulfana lakazom iz *Ganoderma lucidum*, gde je nakon 15 dana inkubacije koncentracija endosulfana smanjena na 75 % od početne, a nakon 45 dana izloženosti na 24,7 % [147].

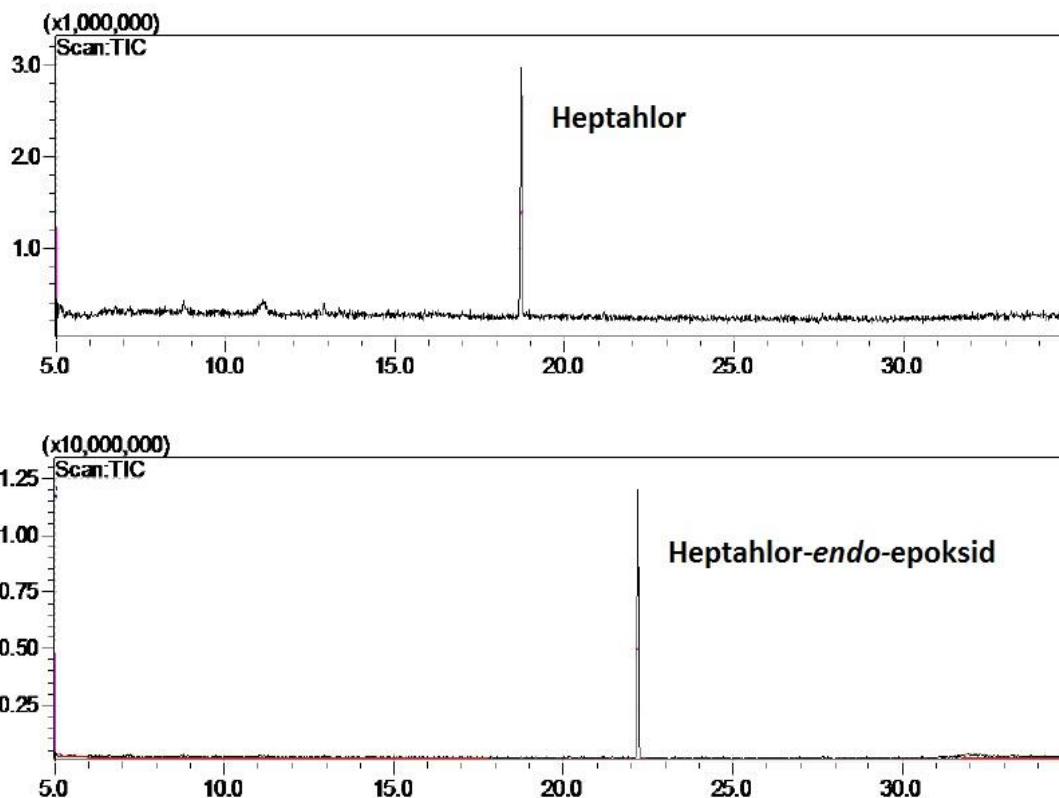
Na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju, može se zaključiti da Novozym® 51003 lakaza uspešno razgrađuje oba ispitivana izomera endosulfana.

4.2.2.3. Razgradnja heptahlora i heptahlorepoksida

Količine heptahlora i heptahlor-*endo*-epoksid izomera A, u ispitivanim uzorcima sa slobodnom lakazom i u kontrolnim uzorcima, određivane su relativno u odnosu na početnu koncentraciju, na osnovu površine pikova na gasnom hromatogramu, kao i kod svih drugih ispitivanih pesticida. Hromatografski pikovi za ova dva jedinjenja detektovali su se GC-MS metodom na retencionim vremenima od 18,7 min za heptahlor i 22,2 min za heptahlor-*endo*-epoksid izomer A, a na slici 48 su predstavljeni dobijeni hromatogrami.

Konfirmacioni joni za heptahlor bili su 100 m/z, 272 m/z, 274 m/z i 270 m/z. Za heptahlor-*endo*-epoksid izomer A, joni koji potvrđuju njegovo prisustvo, bili su 81 m/z, 353 m/z, 355 m/z i 27 m/z, prema NIST biblioteci spektara.

Dobijeni rezultati u ovom ispitivanju, koji se odnose na ispitivanje razgradnje heptahlora i heptahlor-*endo*-epoksida izomera A, slobodnom Novozym® 51003 lakazom, kao i u puferu, odnosno kontrolnom uzorku, prikazani su na slici 49.

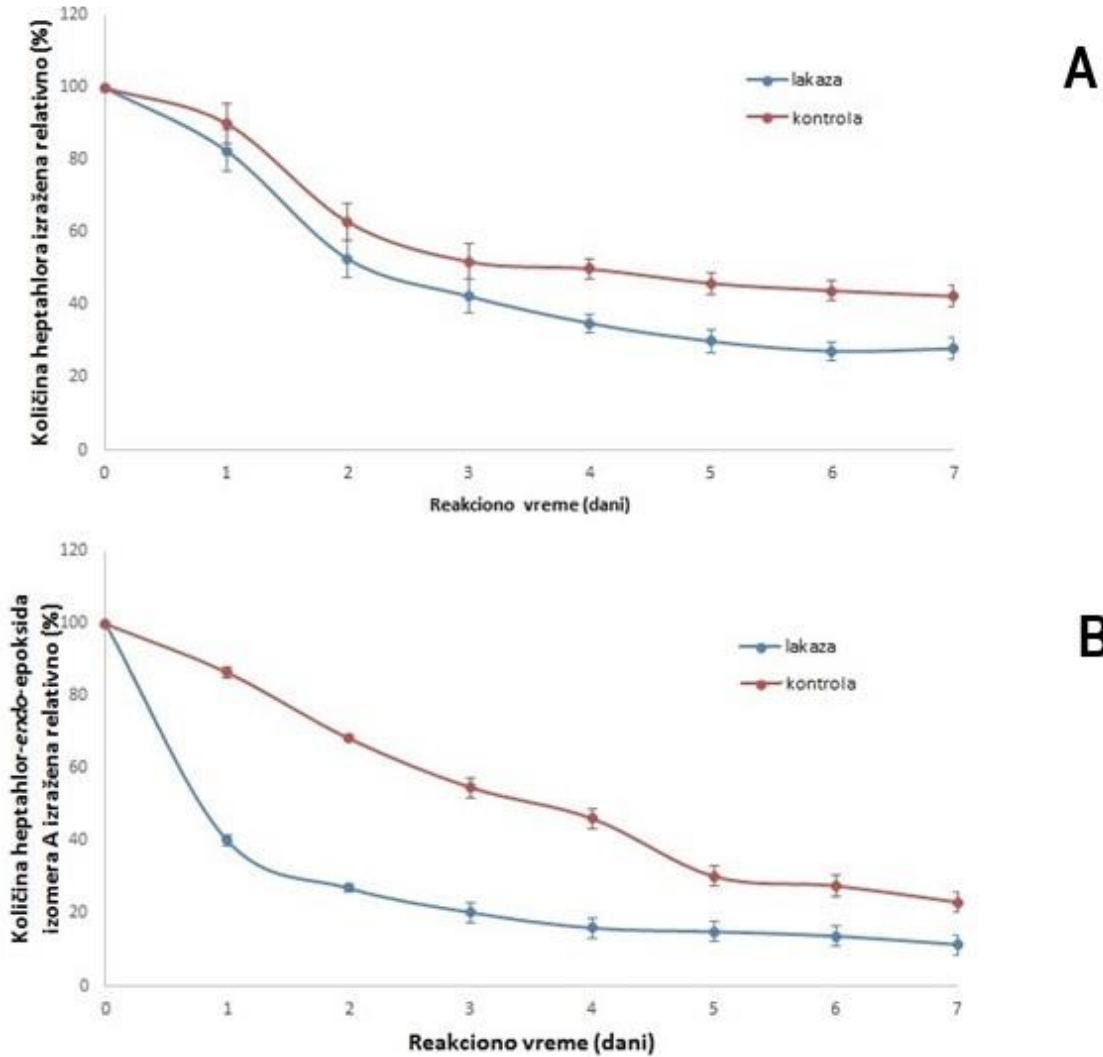


Slika 48. Gasni hromatogrami kontrolnih uzoraka heptahloro i heptahlor-endo-epoksida izomer A

Iz prikazanih rezultata, uočava se da se degradacija oba jedinjenja događala vremenom i u puferu, odnosno u kontrolnom uzorku, na sličan način kod oba jedinjenja.

U slučaju heptahloro, u kontrolnom uzorku je posle 1, 2. i 3. dana preostalo 90,2 %, 63,1 % i 52,3 % pesticida u odnosu na početnu količinu, redom. Nakon trećeg dana, razgradnja u puferu se nastavila, ali sporije, da bi na kraju 7. dana u uzorku preostalo 42,4 % od početne koncentracije heptahloro u uzorku.

Enzimaska razgradnja heptahloro bila je vrlo slična degradaciji u kontrolnom uzorku, po svom toku. Prvog, drugog i trećeg dana razgrađeno je ukupno 17,3 %, 47,2 % i 57,5 % početne količine, redom u uzorku sa slobodnom lakazom.



Slika 49. Relativna količina heptahlor-a (A) i heptahlor-endo-epoksida izomer A (B) u odnosu na početnu količinu nakon reakcije sa Novozym® 51003 lakazom i u kontrolnom uzorku (kontrola)

Nakon 5. dana razgradnje heptahlor-a, u uzorku sa lakazom, dostignut je najveći procenat razgradnje, koji je iznosio 70,0 %. Međutim, imajući u vidu razgradnju kontrolnog uzorka, odnosno hemijsku razgradnju heptahlor-a, može se zaključiti da je najveći enzimski doprinos u toku ukupne razgradnje iznosio blizu 16 %, od 5. dana reakcije pa do kraja eksperimenta.

Kod heptahlor-endo-epoksida izomer A, u kontrolnom uzorku je u nakon 1, 2. i 3. dana preostalo 86,6 %, 68,4 % i 54,8 % u odnosu na početnu količinu pesticida, redom. Imajući u vidu da se heptahlor u prirodi veoma lako prevodi u heptahlorepoksid, koji je gotovo nerastvoran u vodi i kao takav perzistentniji u životnoj sredini, dobijeni rezultati za hemijsku razgradnju u

puferu, koja je tekla sporije nego u slučaju heptahlor, su u skladu sa ovim činjenicama. Nakon trećeg dana, razgradnja u kontrolnom uzorku se nastavila, ali sporije, da bi na kraju 7. dana u uzorku preostalo 23,2 %. Na osnovu prikazane krive toka ove razgradnje (slika 49B), može se zaključiti da bi se razgradnja verovatno nastavila i dalje, sporim tempom, ali cilj eksperimenta bio je praćenje enzimske razgradnje heptahlorepoksida.

Razgradnja heptahlor-*endo*-epoksida izomera A, praćena u uzorku sa lakazom, tekla je brže od razgradnje heptahlor. Tako je prvog dana reakcije razgrađeno 59,8 %, drugog do 73,0 % a trećeg do 79,7 % od početne koncentracije. Nakon tog perioda, nije zabeležen značajniji pad koncentracije ispitivanog pesticida u uzorku, a na kraju 7. dana u ovom uzorku ga je preostalo 11,5 %. Može se zaključiti da je enzimski doprinos razgradnji bio najveći prvog dana, i iznosio je 46,4 %, u kom periodu se najveća količina razgrađenog heptahlor-*endo*-epoksida izomera A može pripisati dejstvu Novozym® 51003 lakaze. Nakon 7. dana reakcije, razlika između preostalih količina ispitivanog supstrata u kontrolnom uzorku i u uzorku sa lakazom iznosila je 11,7 %.

I u slučaju ovog ispitivanja mogućnosti razgradnje izabranih insekticida slobodnom Novozym® 51003 lakazom, radi se o dva supstrata koji predstavljaju osnovno jedinjenje (heptahlor) i njegov metabolit (heptahlorepoxid). Može se uočiti da je razgradnja tekla slično kao i u prethodnim ispitivanim parovima jedinjenja, DDT i DDD (slika 41) i aldrin i dieldrin (slika 45). Primećena je veća sklonost Novozym® 51003 lakaze ka bržoj razgradnji metabolita, u odnosu na osnovno polazno jedinjenje.

Podaci o razgradnji heptahlor, kao i heptahlorepoksida, od strane gljiva belog truljenja mogu se naći u literaturi. U objavljenoj studiji postoje podaci da je 18 vrsta gljiva roda *Phlebia*, nakon 14 dana inkubacije, razgradilo do 90 % heptahlor, i do 25 % heptahlorepoksida. Identifikovani metaboliti heptahlor bili su heptahlorepoxid i manje količine 1-hidroksihlordana i 1-hidroksi-2,3-epoksihlordana, dok su metaboliti heptahlorepoksida bili heptahlordiol i 1-hidroksi-2,3-epoksihlordan, ukazujući na to da se u toku razgradnje dešavaju hidroliza i hidroksilacija u epoksidnom prstenu i u položaju 1 heptahlorepoksida, redom. Ova razgradnja pripisuje se dejstvu lignolitičkih ekstracelularnih enzima, među kojima je i lakaza [148]. Slični rezultati postignuti su i u studiji gde je ispitivana razgradnja ova dva supstrata gljivama iz roda *Pleurotus*, sa postignutom degradacijom od 89 % heptahlor i 32 % heptahlorepoksida nakon inkubacije od 28 dana [149].

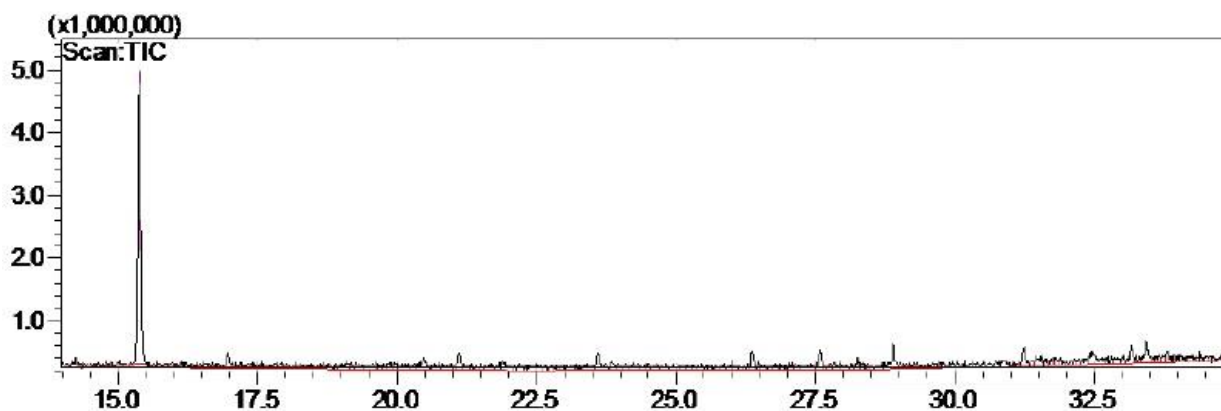
Dobijeni rezultati u izvršenim eksperimentima mogućnosti enzimske razgradnje, potvrđuju da Novozym® 51003 lakaza može uspešno da se koristi za bioremedijaciju zemljišta ili voda zagađenih heptahlorom ili heptahlorepoxidom.

4.2.3. Razgradnja hlorovanih cikloheksana

Iz ove grupe organohlorinih pesticida, ispitivani supstrat za Novozym® 51003 lakazu bio je γ -heksahlorcikloheksan, poznatiji pod komercijalnim nazivom – lindan.

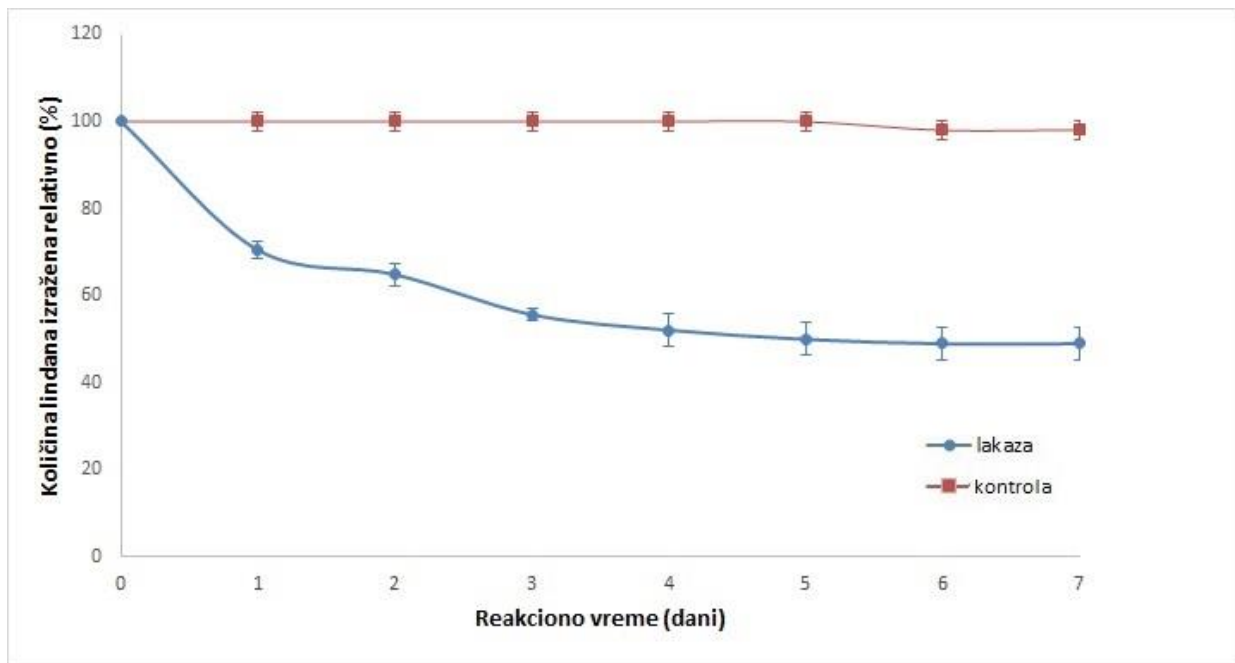
4.2.3.1. Razgradnja lindana

Praćenje uspešnosti razgradnje lindana vršeno je GC-MS analitičkom tehnikom, na isti način kako je opisano i za ostale pesticide. Joni čije je prisustvo dokazivalo lindan u uzorku bili su 181 m/z, 183 m/z, 219 m/z i 217 m/z, prema NIST biblioteci spektara. Dobijeni hromatogram prikazan je na slici 50. Hromatografski pik lindana, na osnovu čije površine je vršena kvantifikacija, detektovan je na retencionom vremenu od 15,4 minuta.



Slika 50. Gasni hromatogram kontrolnog uzorka lindana

Dobijeni rezultati razgradnje lindana predstavljeni su na slici 51, izraženi u procentnom odnosu preostale količine lindana u uzorku, u odnosu na početnu, kao i za sve ostale ispitivane insekticide.



Slika 51. Relativna količina lindana u odnosu na početnu količinu nakon reakcije sa Novozym® 51003 lakazom

Nakon prvog dana reakcije, lindan je bio razgrađen do 70,5 % početne koncentracije, dok je drugog dana, razgradnja nastavljena do 64,9 %. Razgradnja lindana nastavljena je i u sledećim danima, tako da je nakon 3. dana koncentracija lindana u ispitivanom uzorku smanjena na 56,8 % od početne koncentracije, da bi nakon 6. dana bila smanjena na 49,0 % od početne, što je ujedno bila i najmanja koncentracija u uzorku, na kraju eksperimenta. U toku ove analize, nije detektovana promena koncentracije lindana u kontrolnom uzorku, odnosno njegova razgradnja u puferu.

Poslednjih godina su proučavane i razvijene tehnologije za remedijaciju životne sredine, gde je detektovano prisustvo lindana, koje uključuju fizičke, hemijske i biološke tehnike. Jedna od najčešće korišćenih tehnika, a ujedno i preferirana, je biološka razgradnja lindana korišćenjem različitih mikroorganizama kao što su gljive, bakterije, kvasci i alge, kako u aerobnim tako i u anaerobnim uslovima. Među njima su istražene gljive belog truljenja, uobičajeni izvor enzima lakaze [150]. Od proučavanih tehnika za degradaciju lindana, izdvajaju se mikrobni konzorcijum, fitoremedijacija, nanobiotehnologija, kloniranje gena, metagenomika, interakcija biljaka i mikroba ili razgradnja uz učešće biosurfaktanata. Međutim, najbolje izgleda za razvoj ekonomski održivih tehnologija bioremedijacije lindana imaju kombinacije pojedinih navedenih tehnika [151].

Dobijeni rezultati u ovom ekperimentu predstavljaju osnovu za dobre izgledne slobodne, a potencijalno i imobilisane lakaze u bioremedijaciji vode, zemljišta ili sedimenata zagađenih lindanom.

4.2.4. Izbor organohlornog pesticida za dalje eksperimente

Cilj ispitivanja mogućnosti razgradnje različitih grupa organohlornih pesticida, bio je da se definiše jedan model-pesticid, čija će se razgradnja u nastavku eksperimentalnog dela vršiti imobilisanom lakazom. Rezultati istraživanja pokazali su da je u slučaju svih ispitivanih pesticida došlo do razgradnje slobodnom lakazom, u većoj ili manjoj meri.

Najveća ukupna razgradnja postignuta je kod pesticida kod kojih je došlo i do njihove degradacije u puferu, u kom slučaju je posmatran samo enzimski doprinos razgradnji. Na kraju izvršenih eksperimenata, odnosno nakon 7. dana, doprinos slobodne lakaze razgradnji iznosio je: za 4,4'-DDT - 27,2 %, za 4,4'-DDD - 48 %, za metoksihlor - 27,1 %, za aldrin - 12,5 %, za dieldrin - 19,7 %, za endosulfan I - 15,7 % i endosulfan II - 19,2 %, za heptahlor - 16 %, za heptahlor-*endo*-epoksid izomer A - 11,7 % i za lindan - 51 %.

Kinetika reakcija razgradnje nije bila ista kod svih pesticida. Kod nekih je enzimaska degradacija bila dominantna i tekla mnogo brže u odnosu na razgradnju u puferu, u početku reakcije, odnosno u prvih 2 dana reakcije (dieldrin, endosulfan I i II i heptahlor-*endo*-epoksid izomer A). Pesticidi kod kojih je primećen ovakav tok razgradnje predstavljaju uglavnom metabolite osnovnog pesticida, koji su, kao takvi, stabilnija jedinjenja u životnoj sredini i predstavljaju mnogo veći problem zbog svoje izražene perzistentnosti. Moguće je da je ovakav tok reakcije posledica toga što njihova razgradnja u puferu gotovo nije postojala prvih dva dana, ili nije mogla biti detektovana izabranom analitičkom tehnikom pod datim eksperimentalnim uslovima, pa je ukupna količina pesticida bila dostupna molekulima lakaze, kao supstrat. Smanjivanjem dostupne koncentracije pesticida usled razgradnje u puferu koja se kasnije događala, i udeo enzimske razgradnje se smanjivao, najverovatnije zbog smanjivanja količine supstrata i gubitka aktivnosti lakaze.

Kod pesticida 4,4'-DDD i lindana, na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je postignuta najveća razgradnja polaznog jedinjenja lakazom. Razgradnja kontrolnog uzorka u slučaju ova dva pesticida nije detektovana, što je donekle očekivan rezultat, pošto oba pesticida predstavljaju dugotrajne organske zagađujuće supstance, koje se izuzetno teško uklanjaju iz životne sredine i dugo u njoj zadržavaju. Kada se pogleda njihova molekulska masa data u tabeli 4, može se uočiti da ova dva jedinjenja, od svih ispitanih, imaju najmanju molekulska masu i predstavljaju najmanja jedinjenja. Moguće je da je ovo bila presudna karakteristika za izraženu sklonost lakaze degradaciji navedenih pesticida, pošto se može pretpostaviti da su iz grupe OCP-a, oni najlakše mogli da priđu aktivnom centru enzima, bez većih sternih smetnji.

Izbor određenog pesticida za dalja ispitivanja razgradnje imobilisanom lakazom donet je na osnovu nekih zaključaka iz prethodno izvršenih eksperimenata, i definisanih polaznih osnova kao što su:

- činjenica da je utvrđeno da dolazi i do razgradnje velikog broja pesticida u Na-fosfatnom puferu (50 mM, pH 6,5), sa konstantnim magnetnim mešanjem, u providnim epruvetama i na temperature od 25 °C, što je nepovoljna prateća pojava prilikom ispitivanja enzimske razgradnje
- Kod većine ispitanih pesticida, nakon 5. dana nije došlo do promene u procentu razgrađenog supstrata u odnosu na polazni, a kod nekih i znatno ranije
- Izabrani pesticid bi u značajnom procentu trebalo da bude razgrađen, u izvršenim eksperimentima, slobodnom lakazom Novozym® 51003, da bi se bolje utvrdile eventualne prednosti njegove razgradnje imobilisanom lakazom, kao i da bi se reakcije razgradnje mogle lakše i tačnije pratiti odabranom GC-MS analitičkom tehnikom. Takođe, postoji mogućnost pojave adsorpcije pesticida od strane nosača za imobilizaciju, a da bi se i taj proces mogao detektovati i pratiti, procenat razgradnje izabranog pesticida lakazom, u izvršenim eksperimentima, bi trebalo da je što veći.
- Izabrani pesticid treba da pripada grupi pesticida, koja nije do sada u literaturi opsežno istraživana i za koju je već utvrđena i uspešno primenjena bioremedijacija.

Uzevši u obzir navedene polazne osnove, pesticidi koji ispunjavaju gotovo sve uslove bili su 4,4'-DDD i lindan. Procenat njihove razgradnje slobodnom lakazom bio je gotovo isti, međutim, pošto je 4,4'-DDD derivat 4,4'-DDT-a, jednog od najviše komercijalno korišćenog i u naučnoj i stručnoj literaturi najviše istraživanog pesticida, kao model-pesticid za dalje eksperimente izbran je insekticid lindan.

Takođe, s obzirom da je u toku svih izvršenih eksperimenata utvrđeno, da je dovoljno reakciono vreme iznosilo 6 dana, pogotovo u slučaju lindana, gde lakaza nije iskazala produženu aktivnost, za dalje eksperimente u skladu sa tim je i skraćeno reakciono vreme za ispitivanje imobilisane lakaze.

4.3. Imobilizacija lakaze na AFNS

Nakon ispitivanja pH optimuma i pI, kao i izbora pesticida čije će se mogućnosti razgradnje imobilisanim preparatom dalje istraživati, izvršena je imobilizacija Novozym® 51003 lakaze na AFNS.

Pošto se vezivanje enzima na neporoznu piro genu nanosiliku (FNS) obično odvija samo slabim vodoničnim vezama i Van der Valsovim silama, kao i nespecifičnim elektrostatičkim interakcijama, FNS je modifikovan sa aminopropil-trimetilsilanom (APTMS) sa ciljem uvođenja amino grupa na površini FNS-a (slika 19). Na ovaj način mogu se omogućiti stabilnije elektrostatičke interakcije sa nukleofilnim grupama (tiolnim, karboksilnim ili čak hidroksilnim) bočnih lanaca proteina.

Nanočestice silike, posebno pirogene nanosilike (FNS), sa svojim povoljnim fizičkim svojstvima kao što su ujednačena veličina čestica, veći odnos površine i zapremine, termička i mehanička stabilnost, biokompatibilnost i velika otpornost na kontaminaciju od strane mikroba i organsko okruženje, do sada su uspešno korišćene za imobilizaciju enzima [75,152–156]. Čestice pirogene nano-silike, kao i amino-funkcionalizovane čestice pirogene nano-silike, pokazale su se efikasnim nosačima za imobilizaciju lipaze iz *Candida rugosa* i β -galaktozidaze iz *Aspergillus oryzae* [75,157].

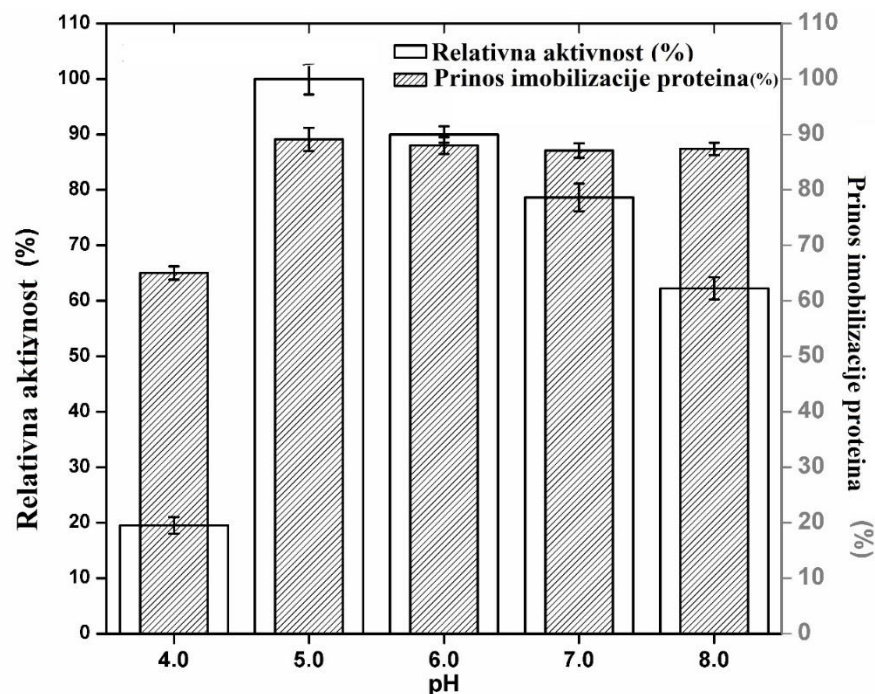
4.3.1. Uticaj pH na proces imobilizacije

Modifikacija nanočestica silike, uvođenjem amino-grupa, izvršena je kako je opisano u metodama, poglavlje 3.2.1. Količina uvedenih amino grupa na površini FNS-a takođe je kvantifikovana postupkom titracije kao što su opisali Jung *et al.* [133]. Dobijeni rezultat pokazao je da se unosi 4,58 mmol/mg amino grupa na površinu FNS nosača, što je znatno više od vrednosti dobijenih u drugim istraživanjima, koja su bila usmerena na funkcionalizaciju velikog broja različitih nosača.

Silanolne grupe (Si-OH) na površini nanočestica silike su deprotonizovane na pH vrednosti iznad 4 i zbog toga se molekuli lakaza sa negativno naelektrisanom površinom na prethodno utvrđenom pH optimumu ne mogu lako vezati, zbog odbojnih sila koje se javljaju između njihovih površina [75]. Da bi se prevazišla ova prepreka i pospešilo vezivanje lakaze na nosač, u ovoj studiji su kao nosač korišćene amino funkcionalizovane čestice nanosilike (AFNS). Kao rezultat aktivacije nosača, velika količina amino grupa je uvedena na površinu FNS-a, koje mogu uspostaviti elektrostatičke interakcije sa površinskim karboksilnim grupama lakaze.

Da bi se odredio optimalni pH za imobilizaciju lakaze na ovako amino-funkcionalizovani nosač AFNS, praćena su dva parametra važna za procenu uspešnosti procesa imobilizacije (aktivnost i prinos imobilizacije proteina) za vrednosti pH u opsegu od 4,0 do 8,0. Aktivnosti su izražene relativno, u odnosu na maksimalnu izmerenu aktivnost. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 52. Imobilizacija na svakoj ispitanoj pH vrednosti vršena je sa 80 mg ponuđenih proteina po gramu nosača tokom jednog sata trajanja eksperimenta, uz upotrebu ABTS-a kao supstrata u ovom ispitivanju.

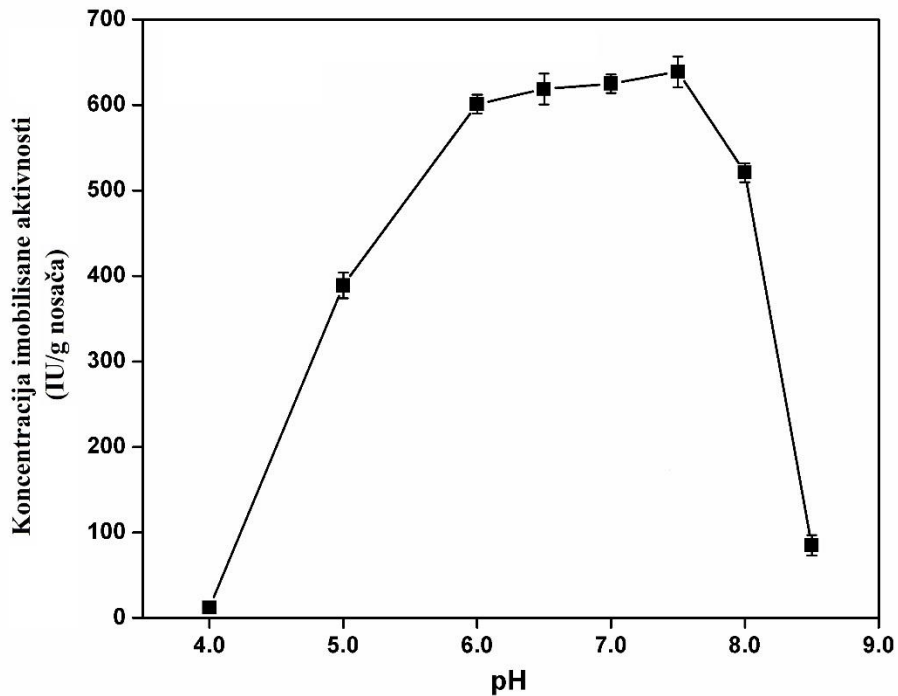
Kao što se može videti sa slike 52, najmanji prinos imobilizacije proteina od 65 % i relativna aktivnost od 18 %, su dobijeni kada se imobilizacija lakaze vrši na pH 4,0. Svi ostali rezultati odnose se na pH vrednosti iznad pI korišćene lakaze, koja je utvrđena da iznosi 4,0. Iako je količina imobilisanih proteina pri pH između 5,0 i 8,0 bila gotovo identična (približno 89 % od ponuđenih proteina bilo je vezano na površini nosača), lakaza imobilisana na AFNS je imala najveću aktivnost na pH 5,0. Ova pH vrednost imobilizacije od 5,0 je unutar opsega pH u kojem slobodna lakaza ispoljava aktivnost, kao što je već prikazano na slici 38, i iznad izoelektrične tačke enzima, određenoj u ovoj studiji. Na slici 52 može se uočiti da dobijeni profil vrednosti za prinos imobilizacije proteina ne odgovara profilu za relativnu aktivnost pošto je nešto strmiji pad aktivnosti sa udaljavanjem od optimalne pH vrednosti.



Slika 52. Optimizacija pH imobilizacije lakaze iz *Myceliophthora thermophila* sa ekspresijom u *Aspergillus oryzae* (Novozym® 51003) na AFNS

Pošto je imobilisana lakaza pokazala značajnu aktivnost na pH vrednosti približno 5,0, a i na istom pH dobijeni prinos imobilizacije proteina je imao najvišu vrednost, ova pH vrednost je usvojena kao optimum za imobilizaciju lakaze iz *Myceliophthora thermophila* na AFNS. Ovaj optimizovani pH korišćen je i za dalja ispitivanja kinetike imobilisane lakaze.

U ovoj studiji ispitan je i uticaj pH na aktivnost lakaze imobilisane na AFNS, u opsegu pH 4,0–8,5, a dobijeni rezultat je predstavljen na slici 53.



Slika 53. pH optimum lakaze imobilisane na AFNS

Optimalni pH za slobodnu lakazu je ranije utvrđen da se nalazi na pH 6,8 (slika 38), dok je optimalni pH u odnosu na koncentraciju imobilisane aktivnosti, za imobilisanu lakazu promeren na pH 7,5 (slika 53). Promena pH optimuma za imobilisanu lakazu na kiseliju oblast nije neuobičajena i može se naći i u literaturi [158]. Ovaj pomak u pH profilu aktivnosti enzima nakon imobilizacije javlja se zbog činjenice da su formirane elektrostatičke interakcije sa matriksom uzrokovale nejednaku raspodelu H^+ i OH^- jona u mikrokruženju imobilisanog enzima i ukupnog rastvora [159-161].

Dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da pri imobilizaciji na pH 5,0 aktivnost lakaze nije smanjena, već naprotiv, ostaje očuvana u širem opsegu. Na osnovu dobijenih profila pH aktivnosti lakaze imobilisane na AFNS, kao i slobodne lakaze, vidi se da se pH optimum slobodne lakaze od 6,8 nalazi unutar vrednosti koje pripadaju platou krive aktivnosti imobilisane lakaze u zavisnosti od pH (slika 53), bliskoj samom utvrđenom optimumu imobilisanog preparata. Metoda za određivanje aktivnosti lakaze, korišćenjem ABTS-a kao supstrata, prilagođena je pH vrednosti od 6,5. Kako se ova vrednost takođe nalazi blisko pH optimumu imobilisane lakaze, a u okviru platoa krive prikazane na slici 53, ova pH vrednost, od 6,5 je izabrana kao optimalna na kojoj će biti merene koncentracije imobilisane aktivnosti, sa ABTS-om kao supstratom.

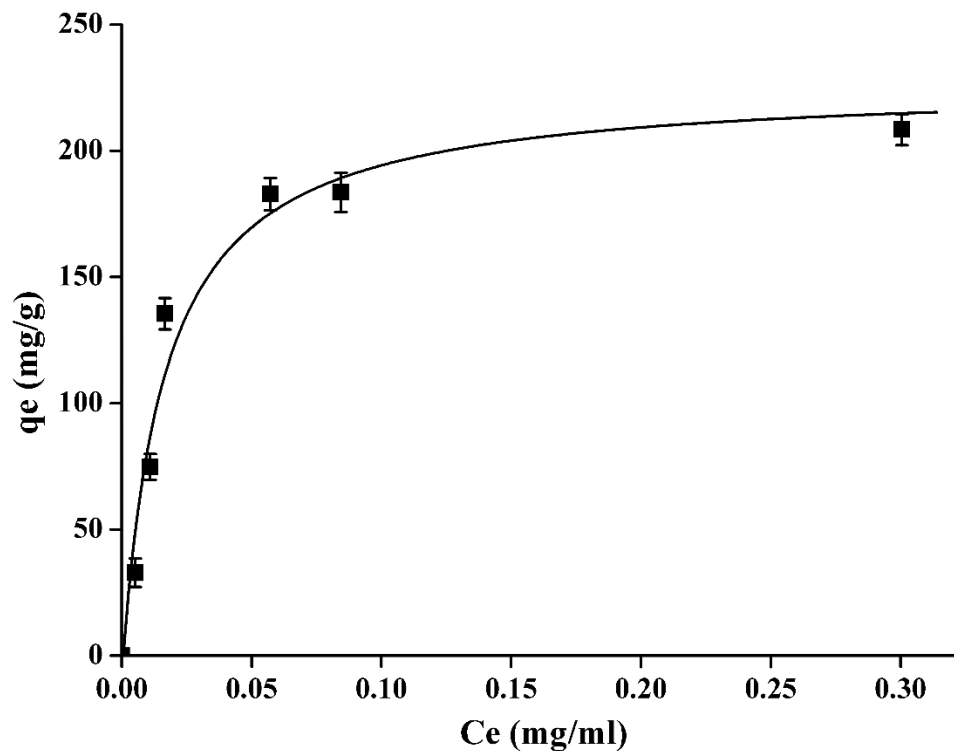
4.3.2. Ispitivanje kinetike adsorpcije

Da bi se istražila veza između količine lakaze koja je adsorbovana na AFNS i ravnotežne koncentracije lakaze, korišćen je model adsorpcione izoterme, odnosno Langmirov model, preuzet iz literature [162]. Modeli adsorpcionih izoterma daju smernice o tome da li se javljaju promene na površini čestica prilikom modifikacije. Langmirova izoterma je zasnovana na pretpostavci o adsorpciji lakaze u jednom sloju na nosač, odnosno o formiranju monosloja na površini AFNS-a, na kome postoji ograničen broj adsorpcionih mesta jednake energije adsorpcije [76]. Adsorpcioni model je opisan jednačinom [162] :

$$q_e = \frac{q_m \cdot b \cdot C_e}{1 + b \cdot C_e} \quad (14)$$

gde je: q_e je koncentracija lakaze adsorbovane na AFNS (mg/g); C_e je ravnotežna koncentracija lakaze u rastvoru (mg/ml); q_m je Langmirov maksimalni adsorpcioni kapacitet za formiranje kompletnog monosloja enzima na površini nanočestica pri uspostavljenoj ravnoteži (mg/g); b je Langmirova ravnotežna konstanta (ml/mg).

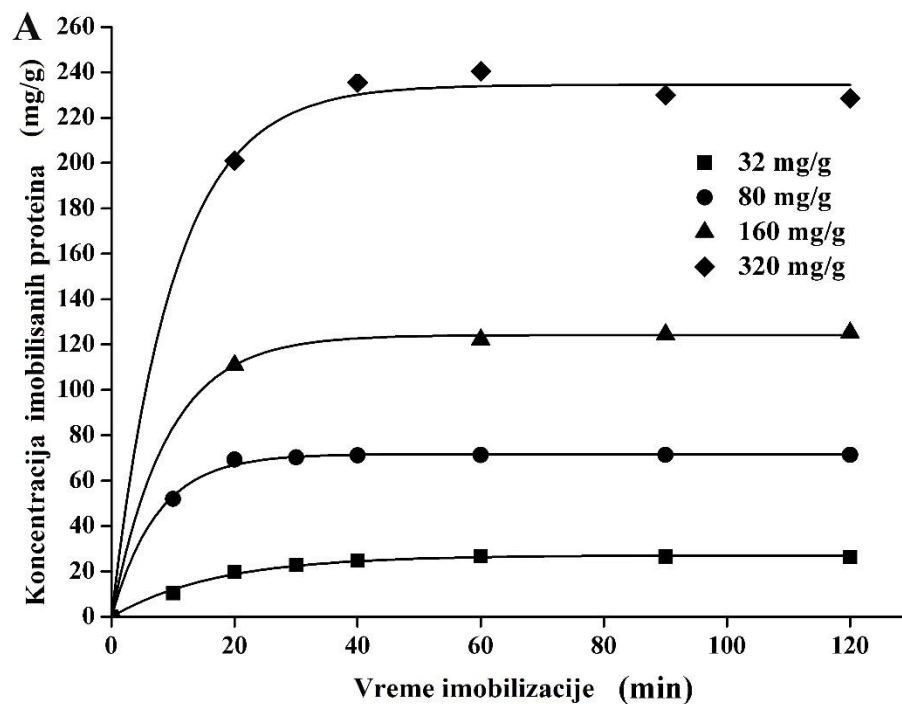
Eksperimentalni podaci su fitovani korišćenjem Langmirove izoterme, a rezultati poklapanja modela prikazani su na slici 54.



Slika 54. Langmirova adsorpciona izoterma za imobilizaciju lakaze na AFNS

Koeficijent regresije R^2 , kao mera slaganja eksperimentalnih podataka sa pretpostavljenim modelom, sa vrednošću od 0,97 što je vrlo blisko vrednosti potpunog poklapanja, potvrđuje da Langmirov model adekvatno predviđa eksperimentalne podatke, pa se može zaključiti da je fizička adsorpcija lakaze na AFNS vezivanje enzima na površinu nosača formiranjem monosloja [159]. Ostale vrednosti parametara u jednačini 14, dobijene ovim ispitivanjem, iznosile su za q_m 226 mg/g, dok je Langmirova ravnotežna konstanta iznosila 58,8 ml/mg.

Kinetika imobilizacije lakaze na AFNS analizirana je izvođenjem imobilizacije sa različitim koncentracijama ponuđenih enzima, od 32 mg, 80 mg, 160 mg i 320 mg ponuđenih proteina po gramu nosača, a koncentracija imobilisanih proteina praćena je tokom dva sata. Dobijeni rezultati u ovom ispitivanju prikazani su na slici 55.



Slika 55. Kinetika adsorpcije lakaze na AFNS za različite koncentracije ponuđenih proteina: 32 mg proteina/g nosača (■), 80 mg proteina/g nosača (●), 160 mg proteina/g nosača (▲), 320 mg proteina/g nosača (◆).

Za početne koncentracije lakaze od 32 mg/g, 80 mg/g i 160 mg/g, koncentracije imobilisanih enzima povećavaju se do 26,8 mg/g, 71,3 mg/g i 122,3 mg/g nosača, redom. Najveća koncentracija imobilisanog enzima bila je 240,5 mg/g nosača, dobijena za početnu koncentraciju lakaze od 320 mg/g. Adsorpcija enzima je veoma brza, budući da se preko 90 % maksimalne koncentracije fizički vezanog enzima za AFNS nosač, dostiže u prvih 20 minuta za niže koncentracije ponuđenih proteina. Za najveću ponuđenu koncentraciju enzima, za isto vreme, dostignuto je preko 80 % najveće koncentracije imobilisanog enzima. Maksimalne koncentracije imobilisanih enzima dostignute su nakon 40 minuta od početka imobilizacije, a

nakon toga se uspostavlja ravnoteža između imobilisanih i slobodnih molekula enzima u rastvoru.

Eksperimentalni podaci dobijeni ovim istraživanjem su fitovani kinetičkim modelom pseudo-prvog reda, koji se zasniva na pretpostavci da je brzina adsorpcije proporcionalna broju slobodnih mesta za vezivanje na adsorbentu. Model se opisuje na osnovu Lagergrenove jednačine:

$$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \quad (15)$$

gde su q_e ravnotežna koncentracija adsorbovanog enzima (mg/g) i q_t koncentracija adsorbovanog enzima (mg/g) u vremenu trajanja adsorpcije t (min) [2,162,163]. k_1 je konstanta brzine procesa adsorpcije pseudo-prvog reda (1/min). Ovaj model je izabran zbog toga što se najčešće povezuje sa fizičkom adsorpcijom, kojom upravljaju slabe sile interakcija između adsorbata i površine adsorbensa. Fitovane krive prikazane su na slici 54, a kinetički parametri izračunati pomoću ovog modela prikazani su u tabeli 8.

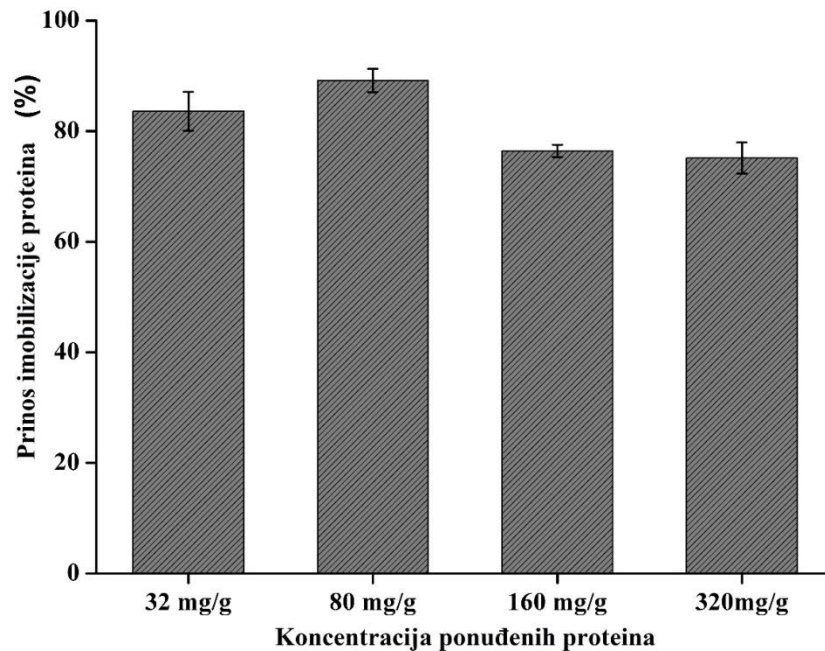
Tabela 8. Parametri kinetičkog modela pseudo-prvog reda za lakazu imobilisanu na AFNS za različite koncentracije ponuđenih proteina (mg/g).

Koncentracija ponuđenih proteina (mg/g)	k_1 (1/min)	q_e (mg/g)	R^2
32	0,059	27,1	0,991
80	0,135	71,7	0,997
160	0,112	124	1,000
320	0,100	234	0,996

Koeficijenti regresije (R^2) za sve početne koncentracije proteina imaju vrednosti veće od 0,991 što ukazuje na dobro slaganje ovog modela sa eksperimentalnim podacima dobijenim u ovom ispitivanju. Dobijene vrednosti potvrđuju da je adsorpcioni proces između AFNS nosača i enzima lakaze kontrolisan slabim silama interakcije, kao što je i ranije pretpostavljeno. Izračunate vrednosti za q_e za ravnotežne koncentracije adsorbovanih enzima, u dobroj su korelaciji sa dobijenim ravnotežnim koncentracijama. Može se zapaziti da je maksimalna vrednost konstantne brzine postignuta pri ponuđenoj koncentraciji proteina od 80 mg/g, dok je dalje povećanje koncentracije proteina rezultiralo neznatnim padom konstantne brzine, prema rezultatima prikazanim u tabeli 8. Moguće je da pri većoj koncentraciji ponuđenih proteina deo zauzetih pozicija vezivanja na površini nosača postane veoma veliki, odnosno da se u početnoj fazi brzo popune slobodna mesta za vezivanje na površini nosača. Usled toga, u daljim fazama imobilizacije učestalost uspešnih interakcija enzima i nosača opada, uprkos

velikoj koncentraciji proteina, a usled niže koncentracije slobodnih mesta za vezivanje na površini AFNS.

Pored navedenih ispitivanja kinetike imobilizacije, ispitan je uticaj koncentracije ponuđenih proteina na prinos imobilizacije proteina, a rezultati su prikazani na slici 56.



Slika 56. Uticaj koncentracije ponuđenih proteina na prinos imobilizacije proteina lakaze imobilisane na AFNS.

Dobijene vrednosti prinosa imobilizacije proteina bile su u opsegu od 75,2 % za najveću koncentraciju ponuđenih proteina, do 89,2 % za koncentraciju ponuđenih proteina od 80 mg po g nosača, a ne za najnižu koncentraciju ponuđenih proteina. Za najnižu koncentraciju ponuđenih proteina od 32 mg po g nosača, prinos imobilizacije proteina bio je 83,6 %. Svi dobijeni rezultati koji se odnose na postignute koncentracije imobilisanih proteina i prinose imobilizacije proteina ukazuju na to da APTMS-om hemijski modifikovana pirogena nanosilika (AFNS) ima dobru perspektivu u primeni kao nosač za imobilizaciju lakaze, u širokom opsegu ponuđenih koncentracija proteina.

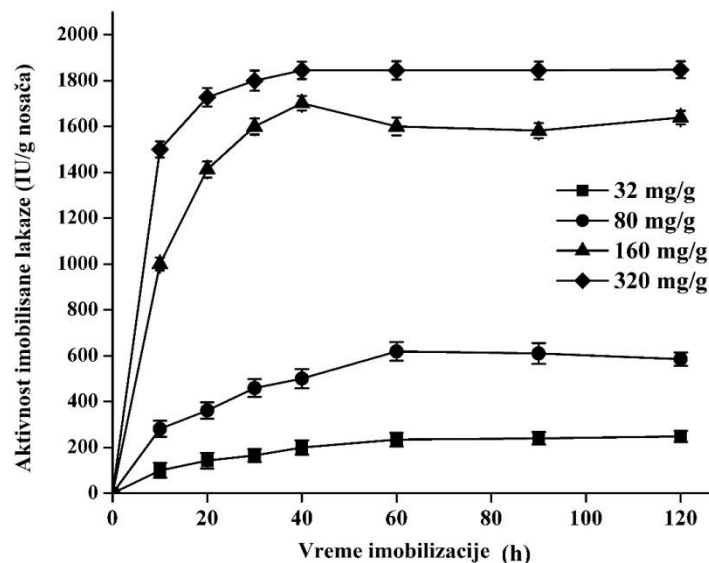
Dobijene koncentracije imobilisanih proteina, u ovom ispitivanju, su veoma visoke u poređenju sa ranije objavljenim rezultatima, u kojima su za imobilizaciju primenjeni komercijalni makroporozni nosači, kao i AFNS [75,164,165]. Istraživanja usmerena na nanomaterijale kao nosače za imobilizaciji enzima, u većini slučajeva imaju rezultate za koncentracije imobilisanih enzima u opsegu do 130 mg po g nosača, sa samo nekoliko izuzetaka u kojima su dobijene veće koncentracije od 250 mg po g nosača, koliko je dobijeno u ovom istraživanju [166-170].

Da bi se izvršila potpuna optimizacija procesa imobilizacije, ispitivan je i uticaj koncentracije ponuđenih proteina na aktivnost imobilisane lakaze, a rezultati su prezentovani u sledećem poglavlju. Ispitivanje je vršeno zbog toga što specifična aktivnost imobilisanog enzima takođe zavisi od njegove konformacione fleksibilnosti i mikrookoline, koja se može izmeniti pri većim koncentracijama imobilisanih proteina.

4.3.3. Ispitivanje aktivnosti lakaze imobilisane na AFNS

Parametri koji su dalje ispitivani bili su: promena aktivnosti imobilisanog enzima tokom vremena trajanja imobilizacije, specifična aktivnost (IU po mg proteina) i prinos imobilizacije aktivnosti (%) pri različitim koncentracijama ponuđenih proteina. Koncentracije ponuđenih proteina, kao i u prethodnoj studiji, iznosile su 32 mg, 80 mg, 160 mg i 320 mg po g nosača.

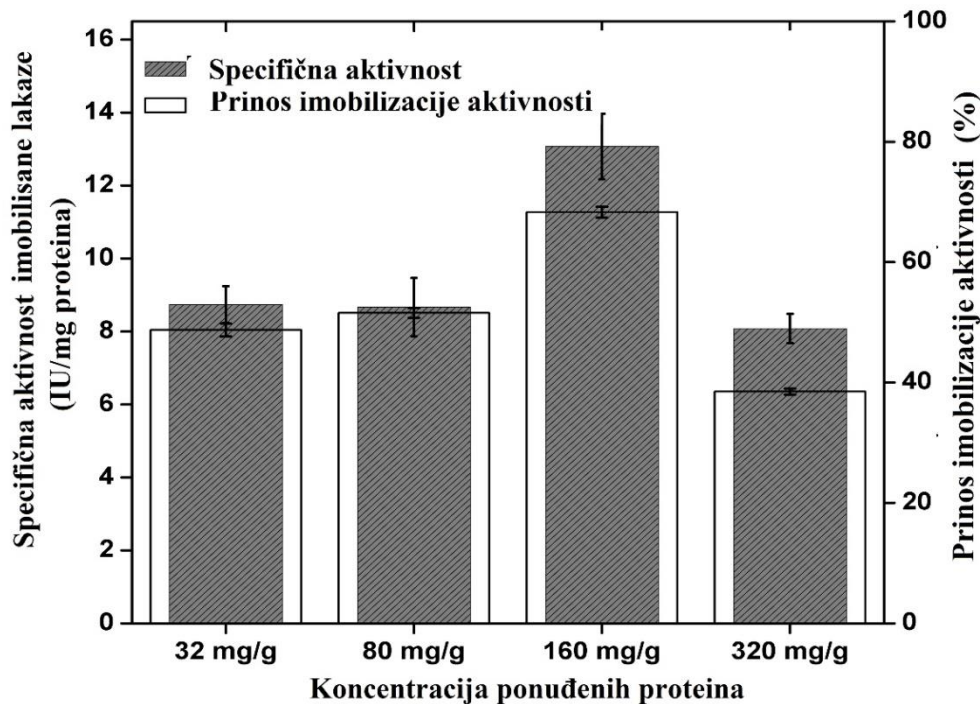
Rezultati koji su dobijeni nakon pomenutih ispitivanja vremena trajanja imobilizacije u zavisnosti od različitih koncentracija ponuđenih proteina, prikazani su na slici 57. Prilikom praćenja aktivnosti imobilisane lakaze, primećen je vrlo sličan trend kao kod praćenja koncentracije imobilisanih proteina (slika 55). Najveća aktivnost lakaze koja je imobilisana na AFNS nosač (1845 IU/g) je dobijena nakon 40 minuta imobilizacije za koncentraciju ponuđenih proteina od 320 mg po g nosača. Pri nižoj koncentraciji ponuđenih proteina kinetika aktivnosti imobilisane lakaze (slika 57) bila je sporija od kinetike imobilizacije proteina (slika 55), pošto je maksimalna aktivnost postignuta nakon 60 minuta.



Slika 57. Uticaj vremena imobilizacije na aktivnost lakaze imobilisane na AFNS pri različitim koncentracijama ponuđenih proteina (32 mg proteina/g-nosača (- ■ -), 80 mg proteina/g nosača (- ● -), 160 mg proteina/g nosača (- ▲ -), 320 mg proteina/g nosača (- ◆ -).

Prezentovani nalazi potvrđeni su i analizom uticaja koncentracije ponuđenih proteina na specifičnu aktivnost lakaze (slika 58), koja pokazuje da se najveća specifična aktivnost (13,1 IU/mg proteina) postiže pri koncentraciji ponuđenih proteina od 160 mg po g nosača.

Zapažen je sličan trend prinosa imobilizacije aktivnosti za različite koncentracije ponuđenih proteina, kako je prikazano na slici 58. Kao što se može videti iz dobijenih rezultata, najveći prinos imobilizacije aktivnosti postignut je za koncentraciju ponuđenih proteina od 160 mg po g nosača, koja je, nakon uspostavljanja ravnoteže između imobilisanih i preostalih rastvorenih molekula enzima, dostigao vrednost od 68,3 %.



Slika 58. Uticaj koncentracije ponuđenih proteina na specifičnu aktivnost (IU/mg proteina) i prinos imobilizacije aktivnosti (%) lakaze imobilisane na AFNS.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da se nakon imobilizacije očuvala velika aktivnost lakaze. Prethodno je potvrđeno da elektrostatičke privlačne sile upravljaju interakcijom između negativno naelektrisanih proteinskih ostataka i pozitivno naelektrisanih amino grupa AFNS-a, pod datim eksperimentalnim uslovima. Velika aktivnost imobilisane lakaze može se objasniti činjenicom da su negativno naelektrisane proteinske grupe, koje učestvuju u adsorpciji enzima na nosač, nasuprot aktivnom centru lakaze, što omogućava lakši pristup supstrata. Pri višim koncentracijama ponuđenih proteina nije zapaženo značajno povećanje aktivnosti enzima (slika 57), pa se može zaključiti da nema bitne promene u koncentraciji aktivnih imobilisanih proteina iznad 160 mg po g nosača.

Takođe, u dodatnom ispitivanju, gde je imobilizacija vršena sa koncentracijom ponuđenih proteina od 800 mg/g, došlo je do naglog pada aktivnosti. Aktivnost imobilisane

lakaze na 800 mg/g bila je približno 1000 IU/g, što je znatno niže od aktivnosti imobilisane lakaze pri koncentracijama ponuđenih proteina od 160 mg/g i 320 mg/g, kada je dobijena najveća vrednost aktivnosti od 1845 IU/g. Stoga se može zaključiti da je koncentracija od 160 mg ponuđenog enzima po g nosača optimalna u svrhu imobilizacije Novozym® 51003 lakaze na AFNS.

Nakon optimizacije imobilizacije lakaze na AFNS, pri čemu je ABTS korišćen kao supstrat, ispitivana je oksido-redukciona aktivnost imobilisane lakaze koristeći kao supstrat organohlorni pesticid lindan (γ -HCH).

4.4. Razgradnja lindana lakazom imobilisanom na AFNS

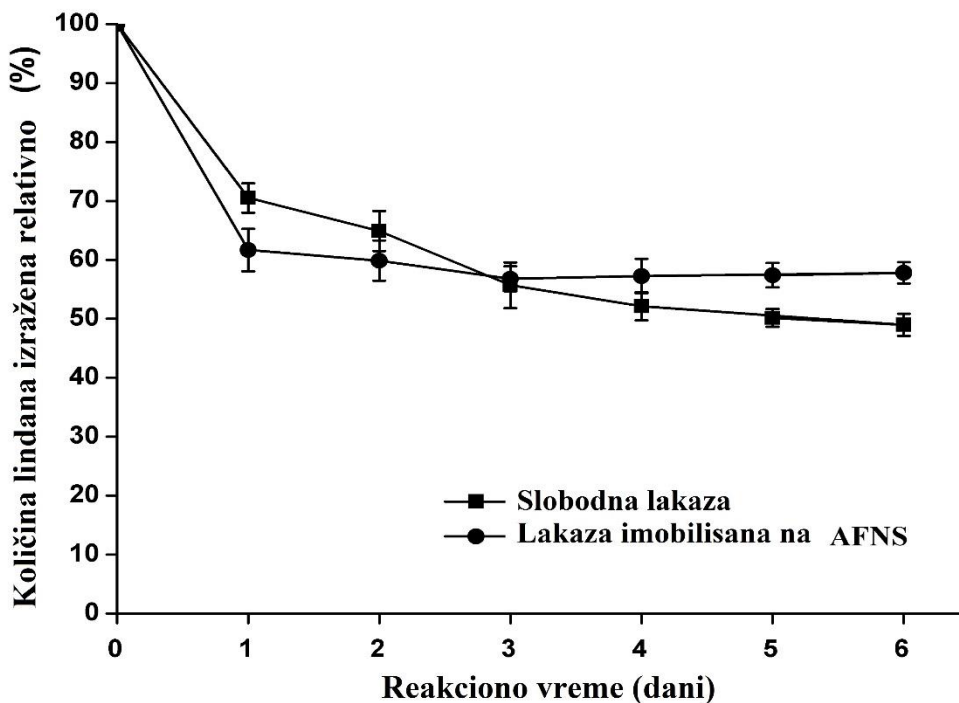
Nakon što je u prethodnim eksperimentima potvrđena razgradnja lindana slobodnom Novozym® 51003 lakazom, u okviru izvršenih eksperimenata, praćena je i degradacija lindana slobodnom lakazom i imobilisanim preparatom, paralelno. Razgradnja je vršena sa početnim koncentracijama koje obezbeđuju jednaku početnu aktivnost (3,5 IU) slobodne lakaze i lakaze imobilisane na AFNS, budući da, tako postavljen eksperiment, omogućava adekvatnu procenu sklonosti imobilisane lakaze ka razgradnji lindana.

Za praćenje uspešnosti razgradnje lindana, kako slobodnom, tako i lakazom imobilisanom na AFNS, korišćena je gasna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektroskopijom (GC-MS). GC-MS studija je izvršena analizom heksanskih ekstrakata uzoraka reakcionih smeša uzetih u različitim vremenskim periodima (1, 2, 3, 4, 5 i 6 dana) tokom razgradnje lindana u oba slučaja (slobodna lakaza i imobilisana na AFNS) i upoređivanjem dobijenih rezultata sa početnim koncentracijama unetim u reakcije. Za ova ispitivanja korišćena je GC-MS metoda 2, kako je opisano u poglavlju 3.2.6.

Skeniranje masenog spektra (m/z u rasponu od 50/650) kontrolnog uzorka omogućilo je da se odrede karakteristični joni za prisustvo lindana. Joni za potvrđivanje su izabrani da budu 111, 145, 183, 219 i 255 (m/z). Izabrani karakteristični joni, koji dokazuju prisustvo lindana u kontrolnom uzorku, su u skladu sa masenim spektrom lindana koji se nalazi u referentnoj bazi masenih spektara, odnosno u NIST biblioteci. Pored toga, kvantitativna analiza kontrolnog uzorka vršena je korišćenjem SIM (Selected Ion Monitoring) moda snimanja spektara, odnosno praćenja samo prethodno odabranih jona.

Kvantifikacija je vršena na osnovu određivanje površine hromatografskog pika lindana u kontrolnom uzorku, koji se mogao detektovati na retencionom vremenu od 6,4 min, korišćenom metodom. Utvrđeno retenciono vreme i prisustvo izabranih karakterističnih jona za kontrolni uzorak bili su identifikacioni kriterijumi za prisustvo lindana u svim analiziranim ekstraktima uzoraka reakcionih smeša u heksanu. Tok razgradnje lindana slobodnom i imobilisanom lakazom je praćen upoređivanjem površine pika lindana uzoraka reakcione smeše i kontrolnog uzorka na utvrđenom retencionom vremenu.

Dobijeni rezultati predstavljeni su na slici 59, kao relativan odnos količine lindana u smeši i početne količine lindana u momentu pojedinih uzorkovanja, izraženo u procentima (%).



Slika 59. Relativna količina lindana u odnosu na početnu količinu (kontrolni uzorak) nakon reakcije sa slobodnom lakazom i lakazom imobilisanom na AFNS.

Razgranja lindana slobodnom lakazom, tekla je na isti način kako je prikazano i objašnjeno u poglavlju 4.2.3.1. Tok ove razgradnje prikazan je i na slici 59, radi lakšeg upoređivanja prvobitno dobijenih rezultata i rezultata iz ovog eksperimenta.

Posle prvog dana reakcije, lindan je bio razgrađen do 61,5 % od početne koncentracije lakazom imobilisanom na AFNS. Posle drugog dana, razgradnja je nastavljena do 59,6 % preostalog lindana u uzorku sa imobilisanom lakazom. Nakon tri dana reakcije, koncentracija lindana smanjena je na 56,8 % od početne koncentracije, pa se može zaključiti da se nivo degradacije nije značajno promenio posle prvog dana.

Rezultati degradacije lindana slobodnom lakazom bili su delimično različiti. Iako je početna brzina razgradnje bila manja nego kod imobilisanog enzima, razgradnja lindana je nastavljena tokom čitavog posmatranog perioda i nakon 6 dana koncentracija lindana smanjena je na 49,0 % od početne.

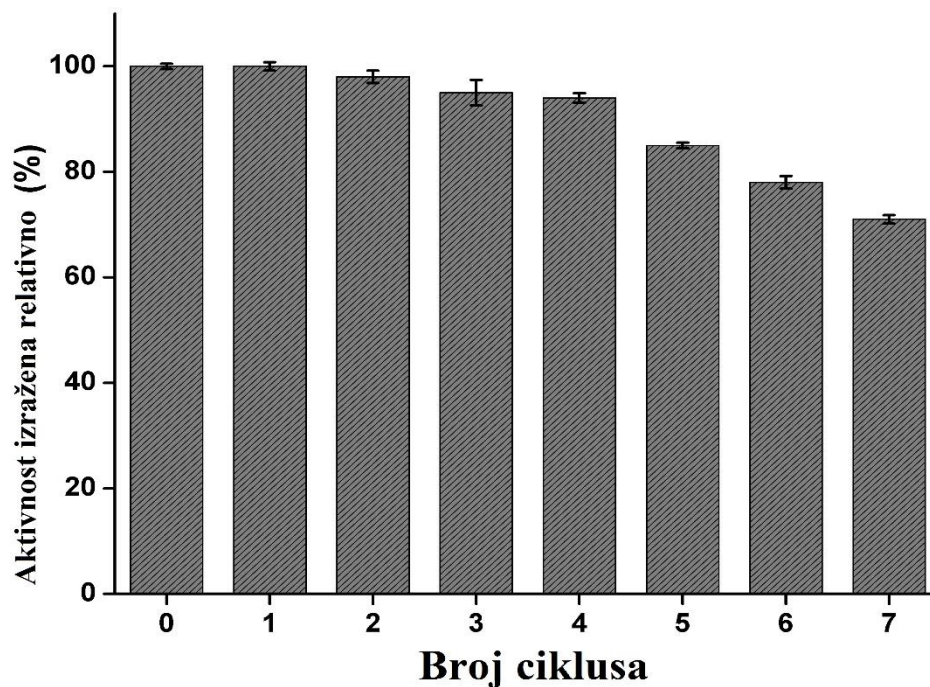
Iz rezultata se može zaključiti da imobilisana lakaza razgrađuje lidan brže nego slobodna lakaza, ali joj nedostaje aktivnost u dužem vremenskom periodu, sa lindanom kao supstratom. Velika aktivnost imobilisane lakaze može se objasniti činjenicom da je aktivni centar lakaze nakon imobilizacije ostao lako dostupan za supstrat, dok je nedostatak produžene

aktivnosti posledica pojave, da imobilizacijom, pojedini molekuli lakaze postaju nedostupniji za molekule lindana u rastvoru, u odnosu na slobodnu lakazu.

Prednost dobijenog imobilisanog preparata u odnosu na slobodan enzim je ta, što se lakaza imobilisana na AFNS može ponovo upotrebiti, što je u sledećem eksperimentu i ispitano.

4.4.1. Ispitivanje ponovne upotrebe lakaze imobilisane na AFNS u razgradnji lindana

U okviru izvršenih eksperimenata, ispitana je i mogućnost ponovne upotrebe lakaze imobilisane na AFNS u degradaciji lindana, a dobijeni rezultati predstavljeni su na slici 60. Preostala aktivnost za svaku ponovnu upotrebu prikazana je u odnosu na maksimalnu aktivnost imobilisanog enzima (100 %), a rezultati prikazani kao merne tačke predstavljaju srednje vrednosti ponovljenih merenja.



Slika 60. Ponovna upotreba lakaze imobilisane na AFNS

Nakon četiri ponovne upotrebe, lakaza imobilisana na AFNS, zadržala je više od 95 % svoje prvobitne aktivnosti, dok je nakon sedam ponovnih upotreba zadržala 70 % aktivnosti.

Mali pad aktivnosti imobilisanih preparata, od 5%, primećen je tokom prvih pet ponovnih upotreba što može biti posledica ispiranja enzima, aglomeracije čestica i inaktivacije lakaze u toku ponovnih upotreba.

Bez obzira na primećeno smanjenje, ovaj gubitak aktivnosti u sedam ponovnih upotreba je prilično mali, u poređenju sa, na primer, 41 % i 55 % gubitka aktivnosti nakon pet ponovnih upotreba lakaze koji je imobilisana na amino-funkcionalizovanim magnetnim Fe_3O_4 nanočesticama i amino-funkcionalizovanim magnetnim Fe_3O_4 nanočesticama modifikovanim polietileniminom, redom [158]. U drugoj studiji, lakaza imobilisana na funkcionalizovanim nanočesticama, u ispitivanjima operativne stabilnosti za 10 reakcionih ciklusa, postigla je da se procenat uklonjene fenolne azo boje smanjio do opsega od 79 % do 88 % u zavisnosti od ispitivane boje [171].

Uzevši u obzir rezultate dobijene u ovoj studiji, može se zaključiti da lakaza imobilisana na AFNS ima dobru perspektivu i potencijal za primenu u razgradnji lindana, kao jednog od dugotrajnih organskih zagađivača.

4.5. Imobilizacija lakaze na amino-modifikovane ligninske mikrosfere (A-LMS)

Za imobilizaciju enzima, najčešće korišćeni nosači su čvrste čestice, porozne čestice, kapsule, membrane i gelovi. S obzirom na površinu i oblik nosača, poslednjih godina istražuju se sferni nosači, posebno nano i mikro materijali, sa različitom poroznošću, raspodelom pora, mehaničkim i hemijskim svojstvima. Poželjno je da budu izrađeni od biokompatibilnih materijala, a mogu biti, na primer, porozne mikrosfere, mikrokapsule, nanosfere ili magnetne kuglice [172].

Za mezoporozne i makroporozne mikrosfere, da bi imale veliku koncentraciju imobilisanih enzima i smanjena ograničenja difuzije, poželjnije su pore veće veličine, kao i veća raspoloživa površina unutar sfere. Do sada korišćeni materijali za ove vrste nosača mogu biti organski, neorganski, hibridni ili kompozitni, poput neorganskih čestica (staklene kuglice, zeoliti, mezoporozna silika), materijali na bazi ugljenika, polistiren i polimetil metakrilatne smole, polistiren, biopolimeri i drugi [172]. Budući da su većina komercijalnih nosača koji se koriste za imobilizaciju enzima (akrilne smole, sintetički polimeri, aktivne membrane i izmenjivačke smole) sintetički polimeri, oni nisu uvek bezbedni za upotrebu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji zbog mogućnosti spiranja njihovih hemijskih komponenti.

Najnovija istraživanja u ovoj oblasti zasnivaju se na novim materijalima, kao nosačima za imobilizaciju enzima, koji su prirodni, netoksični i jeftini, poput materijala organskog porekla, hibridnih i kompozitnih materijala. Bez obzira na vrstu materijala, za formiranje

stabilnih i efikasnih biokatalitičkih sistema, optimizacija tehnike vezivanja mora se obavljati pojedinačno, za specifični enzim, specifični materijal i predviđeni biokatalitički proces[82].

U ovoj disertaciji, istraživanje je usmereno na mogućnost upotrebe amino-modifikovanih ligninskih mikrosfera (A-LMS), modifikovanih uvođenjem visoke koncentracije amino grupa, kao nosača za imobilizaciju Novozym® 51003 lakaze.

Dve vrste A-LMS mikrosfera (A-LMS_5 i A-LMS_10), sa različitim karakteristikama, koje su navedene u tabeli 2, izabrane su za ispitivanje mogućnosti imobilizacije lakaze, koja je već u ranijim istraživanjima pokazala afinitet prema nosačima sa slobodnim amino grupama na svojim površinama [93].

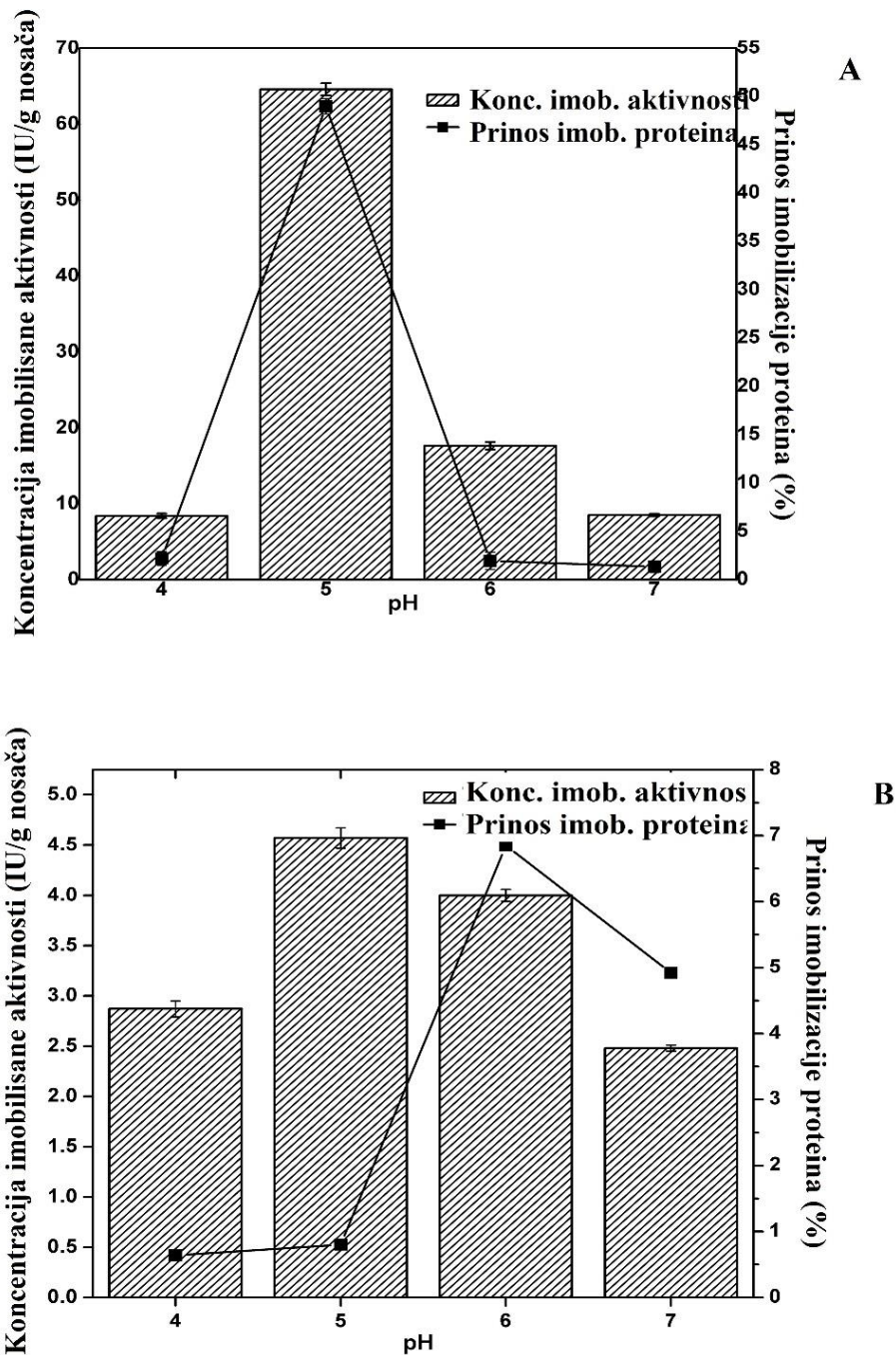
Ispitana je imobilizacija na A-LMS određivanjem najvažnijih parametara imobilizacije, kao što su kinetika adsorpcije, prinos imobilizacije proteina, aktivnost imobilisanih preparata i prinos imobilizacije aktivnosti. Pored toga, ispitivana je i vrsta interakcije između lakaze i A-LMS, u cilju razmatranja potencijala A-LMS kao nosača. Kao i u prethodnom ispitivanju imobilizacije lakaze na AFNS, takođe je ispitana i mogućnost primene imobilisanog preparata u degradaciji pesticida lidana.

4.5.1. Karakterizacija i izbor nosača

Dobro je poznato da su raspoloživa površina za vezivanje enzima i sile interakcije formirane između funkcionalnih grupa prisutnih na površini nosača i na površini molekula enzima presudne za imobilizaciju enzima na čvrste nosače[93]. Pored toga, morfološke i fizičke karakteristike nosača imaju značajan uticaj na proces imobilizacije enzima kao i na njegova katalitička svojstva, jer su tokom postupka imobilizacije nosač i enzim u direktnom kontaktu [62]. Jedno od željenih svojstava nosača je poroznost, jer velike površine i veći broj pora dovode do veće količine imobilisanih proteina po jedinici mase nosača, a imobilisani enzim biva zaštićen od okoline. Međutim, veličina pora trebalo bi da je dovoljna da omogući nesmetan prilaz supstrata na aktivno mesto enzima, kao i veću koncentraciju enzima u porama [171].

Zbog ovih činjenica, za ispitivanje mogućnosti da budu nosač, u preliminarnim eksperimentima, odabrane su dve vrste A-LMS mikrosfera (A-LMS_5 i A-LMS_10), sa različitom morfologijom, poroznošću i sadržajem aminokiselina (tabela 2). Način pripreme korišćenih mikrosfera, koji je izvršen na Katedri za organsku hemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, opisan je u poglavlju 2.2.3.6.1

Preliminarna procena A-LMS_5 i A-LMS_10 kao nosača za imobilizaciju, izvedena je na osnovu parametara efikasnosti imobilizacije (prinos imobilizacije proteina (%) i koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g nosača)) dobijenih kada se vrši imobilizacija pri različitim pH sredine (slika 61).



Slika 61. Preliminarna procena efikasnosti nosača za imobilizaciju lakaze: A-LMS_5 (A) i A-LMS_10 (B).

Na osnovu prikazanih rezultata na slici 61, može se uočiti da se najveći prinosi imobilisanih proteina po masi mikrosfera i aktivnosti imobilisanih preparata postižu se kada se imobilizacija vrši na A-LMS_5 mikrosfere.

Ako uporedimo karakteristike ove dve vrste mikrosfera date u tabeli 2, u pogledu efikasnosti imobilizacije, iako su mikrosfere A-LMS_5 i A-LMS_10 jednake veličine $800 \mu\text{m} \pm 80 \mu\text{m}$, A-LMS_5 imaju 3 puta veću specifičnu površinu od A-LMS_10 što znači da ove mikrosfere imaju veću površinu na raspolaganju za vezivanje enzima, što je rezultiralo većim prinosima imobilizacije proteina. Takođe, A-LMS_5 mikrosfere imaju i veću koncentraciju amino grupa na svojoj površini.

Generalno gledano, može se pretpostaviti da imobilizacija enzima na amino-modifikovane mikrosfere (A-LMS) nastaje adsorpcijom elektrostatičkim interakcijama zbog velike količine amino grupa, kao i vodoničnim vezama, Van der Valsovim silama i hidrofobnim interakcijama.

Sa slike 61 se može uočiti da postoji značajan uticaj pH sredine na proces adsorpcije. Kod pH vrednosti iznad izoelektrične tačke enzima (pI), za koju je u prethodnim ispitivanjima utvrđeno da iznosi 4,0 za Novozim® 51003 lakazu, površina enzima je negativno naelektrisana. Pošto su površine oba nosača (A-LMS_5 i A-LMS_10) pozitivno naelektrisane u ispitivanom opsegu pH, zbog prisustva površinskih $-\text{NH}_2$ funkcionalnih grupa koje u kiseloj sredini mogu biti podvrgnute protonovanju i prelaze u NH_3^+ , može se pretpostaviti da razlika u distribuciji i količini uvedenih amino grupa na A-LMS_5 od $7,7 \text{ mmol} / \text{g}$ i A-LMS_10 od $6,5 \text{ mmol} / \text{g}$, uzrokuje velike razlike u efikasnosti imobilizacije na A-LMS_5 i A-LMS_10.

Dobijeni rezultati za koncentraciju imobilisane aktivnosti enzima nekoliko puta su niži u slučaju A-LMS_10 kao nosača, nego u slučaju imobilizacije na A-LMS_5. Pored uticaja gore navedenih karakteristika mikrosfera na proces imobilizacije, veliki uticaj na uspostavljenu orijentaciju i trodimenzionalnu strukturu imobilisanog enzima ima i raspodela negativno naelektrisanih ostataka kao i osobine ostataka koji se nalaze u njegovoj okolini, što je presudno za obezbeđivanje velike aktivnosti enzima [72]. Poznato je da se, kao posledica procesa imobilizacije, mogu dogoditi značajne promene u mikrookruženju površine enzima i konformaciji molekula enzima [82]. To bi takođe moglo objasniti upadljivo smanjenu aktivnost enzima imobilisanog na A-LMS_10.

Imobilisana lakaza je pokazala značajnu aktivnost i prinos imobilizacije proteina pri pH vrednosti 5,0 za imobilizaciju na A-LMS_5. Izražena aktivnost imobilisane lakaze na pH 5,0 bila je 6 i 3 puta veća nego kod pH 4,0 i pH 6,0, redom. Iz tog razloga, pH vrednost 5,0 je usvojena kao optimalna za imobilizaciju lakaze iz *M. thermophila* na A-LMS_5, što je u skladu s ranije prikazanim rezultatima istraživanja u eksperimentalnom delu ove disertacije, gde je ispitivana imobilizacija lakaze na amino-modifikovanim pirogenim nano-česticama silike.

Na osnovu svih dobijenih rezultata, ostala ispitivanja koja su izvedena, vršena su na pH vrednosti 5,0 za Novozym® 51003 lakazu, za imobilizaciju na A-LMS_5 kao izabrani nosač.

4.5.2. Imobilizacija lakaze na A-LMS_5

Nakon što je dokazano da A-LMS_5 ima bolje izgleda kao nosač za imobilizaciju lakaze od A-LMS_10, u daljim eksperimentima je ispitivana moguća upotreba A-LMS_5 kao nosača za imobilizaciju Novozym® 51003 lakaze iz *M. thermophila*.

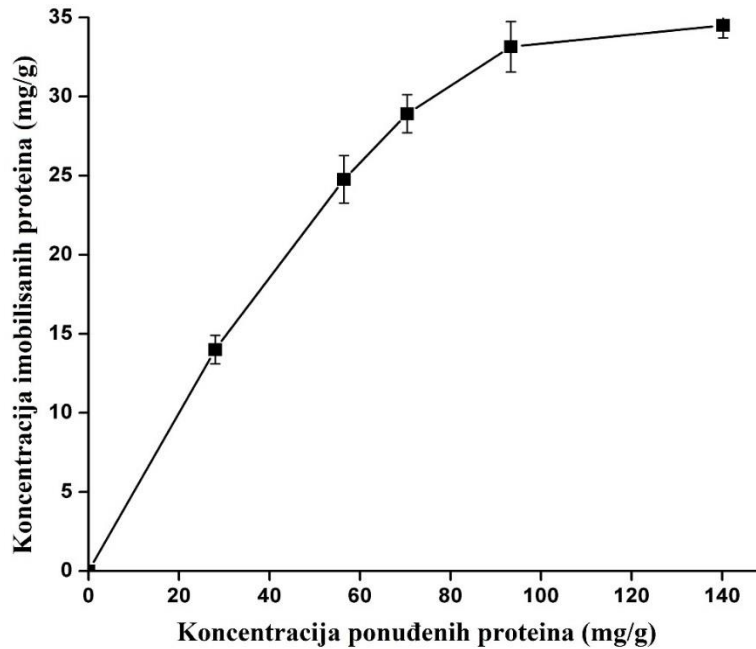
Do sada su lakaze uspešno imobilisane na različite nosače, kako je već i ranije napominjano, uključujući staklene kuglice, nanočestice, molekulska sita, silikagel, mikrosfere, ugljenične nano-cevi, hitozan, grafitni prah, membrane (magnetne ugljenične paste-hitozan/silika), nano-vlakna, glutaraldehid i nanocvetove [3,22,40,61,76,158,173,174].

4.5.2.1. Ispitivanje kinetike adsorpcije

Da bi se ispitala kinetika imobilizacije Novozym® 51003 lakaze na A-LMS_5, imobilizacija je izvedena pri različitim koncentracijama ponuđenih proteina od 28 mg, 56 mg, 70 mg, 93 mg i 140 mg ponuđenih proteina po gramu nosača i koncentracije imobilisanih proteina su praćene tokom jednog sata. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 62.

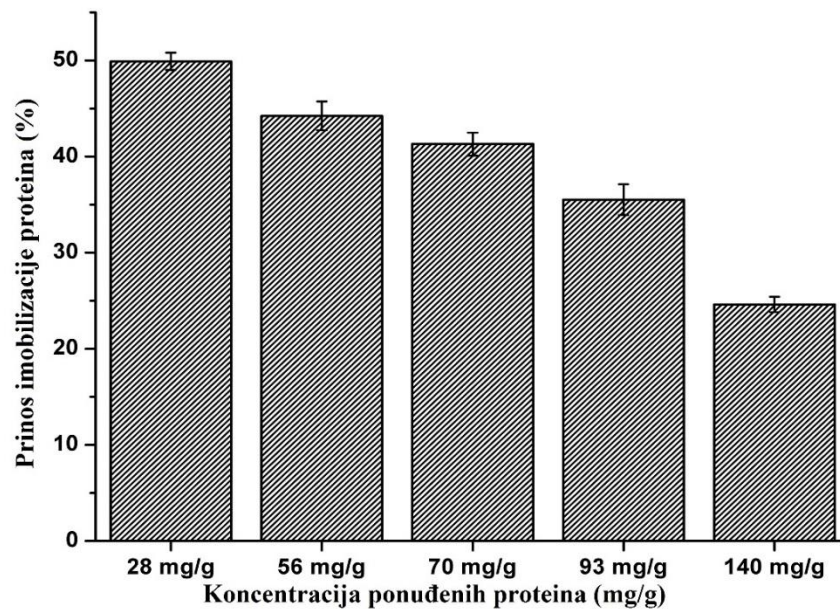
Za početne koncentracije lakaze od 28 mg/g do 140 mg/g, koncentracija imobilisanih proteina se povećava sa 14 mg/g na 34,5 mg/g nosača, redom. Najveća koncentracija imobilisane lakaze, koja je postignuta u ovom eksperimentu, bila je 34,5 mg po gramu nosača, a postignuta je sa koncentracijom ponuđenog enzima od 140 mg/g.

Iz dobijenih rezultata može se primetiti da povećanje koncentracije ponuđenih proteina sa 93 mg/g na 140 mg/g nije dovelo do značajnog povećanja koncentracije imobilisanih proteina. Dakle, može se zaključiti da je maksimalni kapacitet vezivanja A-LMS_5 približno 35 mg/g nosača, za ispitivanu Novozym® 51003 lakazu.



Slika 62. Uticaj koncentracije ponuđenih proteina na koncentraciju lakaze imobilisane na A-LMS_5

Ispitivanjem prinosa imobilizacije proteina, uočen je suprotan trend, sa povećanjem koncentracije ponuđenih proteina, dolazi do kontinualnog pada efikasnosti dobijenih imobilisanih preparata. Rezultati ovog ispitivanja prikazani su na slici 63.



Slika 63. Uticaj koncentracije ponuđenih proteina na prinos imobilizacije lakaze na A-LMS_5

Najveća dobijena vrednost u ovom ispitivanju, za prinos imobilizacije proteina, bila je 50 % za koncentraciju ponuđenih proteina od 20 mg/g, a za najveću koncentraciju ponuđenih proteina dobijen je najniži prinos imobilizacije od 24,6 %. Slični rezultati se mogu naći u literaturi za lakazu koja je imobilisana na mikrosferama, ali za lakazu iz različitog izvora i za različit sastav mikrosfera, uglavnom polimernih, kao i za neke prirodne nosače [40,175,176].

U nekim slučajevima kod imobilizacije na pojedine prirodne nosače, poput nanostrukturne bakterijske celuloze, koncentracija imobilisanih enzima bila je niža nego što je dobijeno u slučaju nosača A-LMS_5 [175]. Više koncentracije imobilisanih enzima se mogu naći u objavljenom radovima za svega nekoliko sličnih nosača po veličini i obliku, poput poroznih kuglica od polivinil-alkohola koje sadrže halojsit nano-tube (PVA/HNT) kod kojih je koncentracija imobilisanih enzima dostigla vrednost od 237,02 mg/g [38], ali ovaj materijal nije poželjan sa ekološkog aspekta, kao nosač ispitivan u ovom istraživanju, koji sadrži prirodnu komponentu (kraft lignin) sa neistraženim mogućnostima upotrebe.

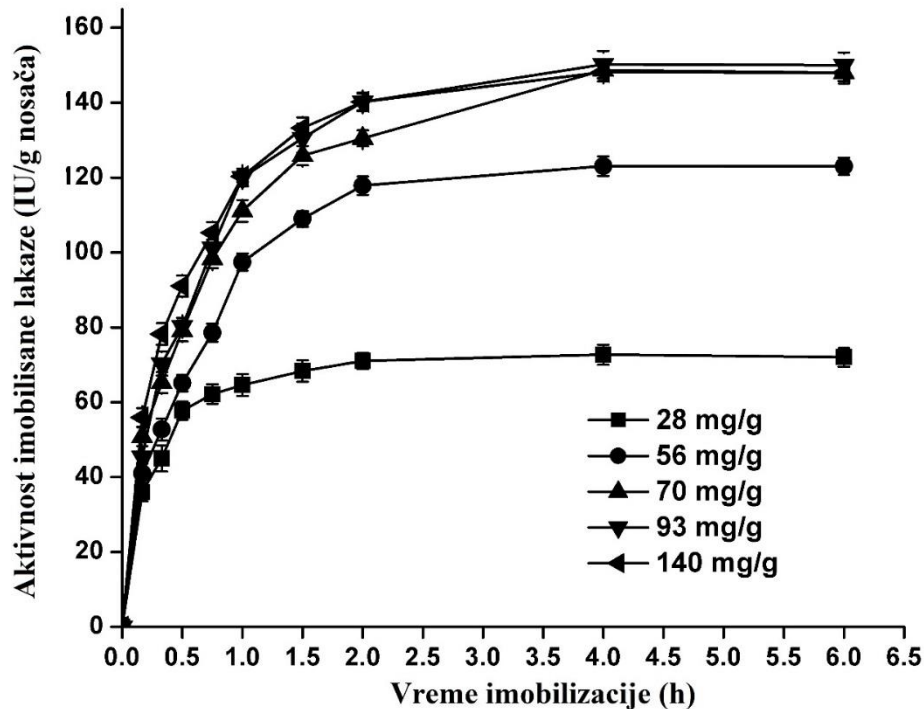
Kao što je ranije objavljeno u literaturi, dimenzije lakaze iz *M. thermophila* su 6,74 nm x 12,84 nm x 16,36 nm, te se može pretpostaviti da se, u određenoj meri, može ostvariti difuzija molekula lakaze u pore, što potvrđuju i velike koncentracije imobilisanih proteina, koje su dobijene u ovom istraživanju [34].

4.5.2.2. Ispitivanje aktivnosti lakaze imobilisane na A-LMS_5

Dobijena visoka koncentracija imobilisanog enzima u izvršenim ispitivanjima, od 35 mg/g ne podrazumeva uvek i adekvatno povećanje aktivnosti imobilisanog enzima. Njegova specifična aktivnost zavisi od njegove mikrookoline i mogućnosti pojave sternih smetnji [175]. Iz tog razloga, u sledećim eksperimentima koji su izvršeni, istražena je aktivnost lakaze imobilisane na A-LMS_5 pri različitim koncentracijama ponuđenih proteina. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 64.

Aktivnost lakaze imobilisane na A-LMS_5 koja je ispitivana sa različitim koncentracijama ponuđenih proteina u vremenu od 4 sata (slika 64), pokazala je sličan trend kao i kod ispitivanja koncentracije imobilisanih proteina (slika 62). Može se uočiti da je isti ovakav trend postojao i u slučaju ovih ispitivanja vršenih u prethodnom eksperimentu, odnosno prilikom ispitivanja aktivnosti lakaze imobilisane na AFNS.

Sa povećanjem koncentracije ponuđenih proteina do 70 mg/g, aktivnost imobilisane lakaze takođe se povećava. Pri koncentraciji ponuđenih proteina od 70 mg/g, lakaza imobilisana na A-LMS_5 je pokazala najveću aktivnost od 149 IU / g nosača posle 4 sata. Više od 90 % maksimalne aktivnosti postignuto je za 2 sata od početka eksperimenta. Veće ponuđene koncentracije proteina od 70 mg/g nisu dovele do većih vrednosti za aktivnost imobilisanih preparata.

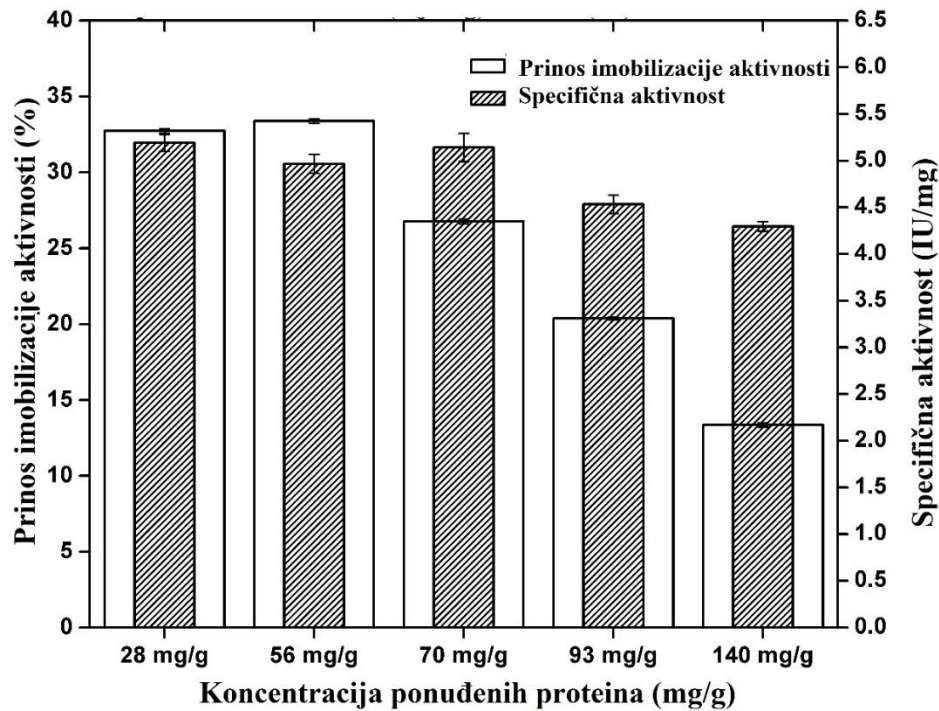


Slika 64. Uticaj vremena imobilizacije na aktivnost lakaze imobilisane na A-LMS_5 pri različitim koncentracijama ponuđenih proteina

Tokom ispitivanja prinosa imobilizacije aktivnosti i specifične aktivnosti lakaze imobilisane na A-LMS_5, dobijena je specifična aktivnost od približno 5 IU po mg vezanih proteina, kada se imobilizacija vrši sa koncentracijama ponuđenih proteina u opsegu od 28 mg/g do 70 mg/g. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 65.

Najveći prinos aktivnosti, koji je iznosio 33,4 % dobijen je kod koncentracije ponuđenih proteina od 56 mg/g, dok je dalje povećanje koncentracije ponuđenih proteina dovelo do smanjenja prinosa aktivnosti do 13,4 %, što je bila i najmanja zabeležena vrednost.

Kao zaključak, s obzirom na dobijene rezultate za sve ispitivane parametre koji opisuju efikasnost primenjene metode imobilizacije, utvrđeno je da je imobilizacija lakaze na A-LMS_5 pokazala najbolje rezultate kada je imobilizacija izvršena na pH 5,0, a koncentracija ponuđenih proteina iznosila je 70 mg/g nosača. Kao optimalno vreme imobilizacije, uzet je period od 4 h.



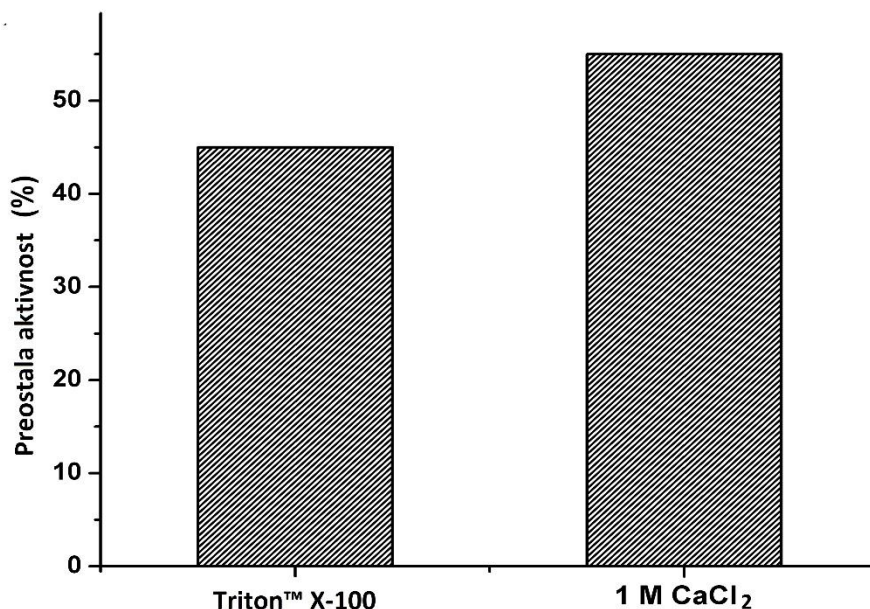
Slika 65. Uticaj koncentracije ponuđenih proteina na specifičnu aktivnost (IU/mg proteina) i prinos imobilizacije aktivnosti (%) lakaze imobilisane na A-LMS₅

4.5.2.3. Analiza mehanizma imobilizacije enzima na A-LMS₅

Da bi se utvrdila vrsta formiranih interakcija između lakaze i A-LMS₅ nosača, dobijeni imobilisani preparati tretirani su odvojeno sa Triton™ X-100 i 1 M CaCl₂. Kao što je već rečeno, može se pretpostaviti da će enzim pri pH iznad svoje pI formirati elektrostatičke interakcije sa pozitivno naelektrisanim amino grupama nosača, jer će biti pretežno negativno naelektrisan. Bez obzira na moguće elektrostatičke interakciju, hidrofobni delovi enzima mogu formirati hidrofobne interakcije sa nosačem. Pored navedena dva tipa interakcija, postoji i mogućnost formiranja vodoničnih veza ili uspostavljanja Van der Valsovih sila između nosača i lakaze [93].

Tretman imobilisanog preparata sa 1 M rastvorom CaCl₂ omogućioće uvid u količinu enzima vezanog za nosač elektrostatičkim interakcijama, jer će one tokom eksperimenta biti raskinute. S druge strane, tretmanom 1 %-nim rastvorom Triton™ X-100, hidrofobno vezani molekuli enzima biće uklonjeni, tako da se može proceniti njihov doprinos aktivnosti imobilisanog enzima.

Nakon 60 minuta inkubacije u desorpcionom rastvoru 1 % Triton™ X-100, lakaza imobilisana na A-LMS_5 zadržala je 45 % inicijalne aktivnosti, odnosno aktivnosti koju je imala pre tretmana, dok je imobilisani preparat tretiran sa 1 M CaCl₂ zadržao 55 % od početne aktivnosti. Rezultati dobijeni u ovom ispitivanju prikazani su na slici 66. Preostala aktivnost imobilisanog preparata nakon tretmana sa Triton™ X-100 ili 1 M CaCl₂ računata je kao aktivnost nakon tretmana u odnosu na aktivnost imobilisanih preparata pre tretmana, i prikazana relativno, izraženo u procentima.



Slika 66. Preostala aktivnost lakaze imobilisane na A-LMS_5 nakon tretmana sa Triton™ X-100 i 1 M CaCl₂.

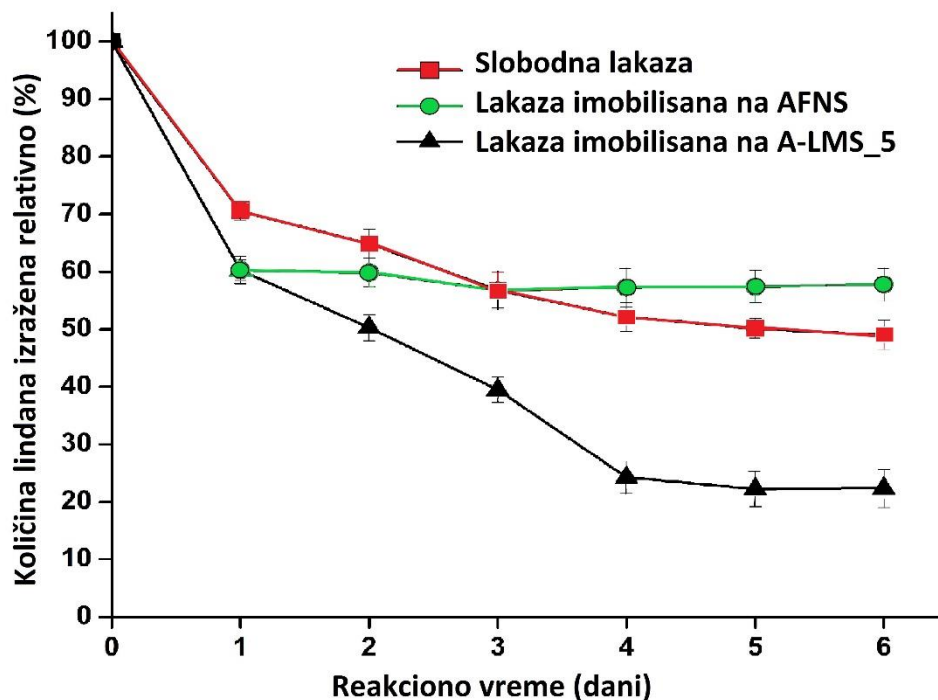
Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da se vezivanje lakaze na mikrosfere A-LMS_5 vrši gotovo podjednako hidrofobnim i elektrostatičkim interakcijama.

Uzevši u obzir visoku koncentraciju imobilisanih proteina (slika 62), može se zaključiti da skelet i struktura samih A-LMS_5 mikročestica pozitivno utiču na adsorpcioni proces. Poznato je iz literature, da lakaze imaju afinitet prema organskim nosačima, značajno veći u poređenju sa neorganskim nosačima [177]. Zbog toga je očigledno da formirane hidrofobne i elektrostatičke interakcije između lakaze i A-LMS_5 omogućavaju adsorpciju regiona enzima koji je suprotan u odnosu na položaj aktivnog centra lakaza. Usled toga, pristup supstrata enzimu je slobodan, što je dokazano visokim aktivnostima imobilisanog preparata.

4.6. Razgradnja lindana lakazom imobilisanom na A-LMS_5

Nakon optimizacije imobilizacije Novozym® 51003 lakaze na A-LMS_5, ispitivana je oksidativna aktivnost imobilisanog preparata koristeći ponovo pesticid lindan kao supstrat.

Za procenu razgradnje lindana slobodnom lakazom i lakazom imobilisanom na A-LMS_5, korišćena je gasna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektroskopijom (GC-MS) kako je opisano u poglavlju 3.2.6.3. korišćenjem metode 2. Degradacija lindana praćena je uz upotrebu količina slobodne lakaze i lakaze imobilisane na A-LMS_5 jednakih početnih aktivnosti od 3,5 IU, kao što je rađeno i u eksperimentu sa AFNS nosačem. Ovako postavljena analiza omogućila je upoređivanje sa rezultatima dobijenim u prethodnim eksperimentima izvršenim u ovom istraživanju gde je razgradnja lindana vršena lakazom imobilisanom na amino-funkcionalizovane nanočestice silike (AFNS). Dobijeni rezultati prikazani su na slici 67.



Slika 67. Relativna količina lindana u odnosu na početnu količinu (kontrolni uzorak) nakon reakcije sa slobodnom lakazom, lakazom imobilisanom na AFNS i lakazom imobilisanom na A-LMS_5

U preliminarnim eksperimentima izvršeno je ispitivanje potencijalne adsorpcije lindana od strane A-LMS_5 mikrosfera, pošto su vrlo dobre adsorpcione karakteristike ovog nosača već dokazane, kako je navedeno u literaturi[89,90]. U cilju ovog eksperimenta, pripremljeni su uzorci koji su sadržali samo A-LMS_5 i lindan iste početne koncentracije, kao koncentracija koja je korišćena i za sve ostale eksperimente. Adsorpcija lindana na A-LMS_5 je praćena

takođe GC-MS metodom, analizom ekstrakata lindana u heksanu. Dobijeni rezultati potvrđuju da je A-LMS_5 nosač adsorbovao 66 % početne koncentracije lindana. Dakle, treba naglasiti da se podaci prikazani na slici 67, odnose na početnu koncentraciju lindana od 34 % u rastvoru, kao početnu tačku razgradnje lindana lakazom imobilisanom na A-LMS_5, koja je na grafiku prikazana kao 100 %. Uzevši u obzir ovakav način prikaza rezultata, svi podaci prikazani na slici 67 odnose se samo na enzimsku razgradnju lindana, slobodnom ili imobilisanom lakazom.

Nakon prvog dana reakcije, lindan je razgrađen do 70,51 % početne koncentracije slobodnom lakazom, do 61,65 % lakazom imobilisanom na AFNS i do 60,29 % lakazom imobilisanom na A-LMS_5. Posle drugog dana, degradacija se nastavila do 64,89 %, 59,85 % i 50,26 %, u ispitivanim uzorcima, redom. U uzorku sa lakazom imobilisanom na A-LMS_5, koncentracija lindana se tokom vremena nastavila smanjivati i nakon četvrtog dana bila je 24,26 %, a u naredna dva dana je ostala gotovo ista, sa minimalnom preostalom koncentracijom lindana od 22,4 %. Međutim, iz dobijenih rezultata može se videti da u slučaju lakaze imobilisane na AFNS, nivo razgradnje nije imao značajniju promenu posle prvog dana.

Dobijeni rezultati potvrđuju da lakaza imobilisana na A-LMS_5 ima produženu aktivnost kada je lindan supstrat i razgrađuje ga efikasnije nego slobodna lakaza ili lakaza koji je imobilisana na AFNS. Visoka aktivnost imobilisane lakaze može se objasniti činjenicom da formirane elektrostatičke interakcije koje omogućavaju adsorpciju enzima na nosač, obezbeđuju takvu orijentaciju enzima, koja omogućava lak pristup supstrata.

Iz svega navedenog, može se zaključiti da A-LMS_5 ima dobre izgleda za upotrebu u svojstvu nosača za imobilizaciju lakaze, kao i za potencijalnu primenu u razgradnji pesticida lindana. Po pitanju degradacije lindana, od dva ispitana nosača, lakaza imobilisana na A-LMS_5, odnosno poroznom nosaču, bila je efikasnija.

4.7. Imobilizacija lakaze na Lifetech™ nosače

U okviru eksperimentalnog dela ove disertacije, ispitivana je primena osam nosača iz serije Lifetech™ za imobilizaciju lakaze iz *Trametes versicolor*. Izabrani su nosači sa različitim polarnostima, poroznošću i funkcionalnim grupama i sa dobrim mehaničkim svojstvima, kao što su otpornost na hemikalije i olakšana separacija iz reakcionog medijuma kao i regeneracija nakon upotrebe.

Vršeno je poređenje šest amino-funkcionalizovanih nosača iz ove serije, koji se razlikuju u prečnicima pora, tipu amino grupa (primarna, tercijarna, kvarternerna) i dužini alkilnih lanaca ("nožići") na koje je amino grupa pričvršćena na površini nosača. Za najperspektivniji nosač iz ove grupe, optimizovani su ključni faktori imobilizacije, kao što su pH, vreme imobilizacije i koncentracija ponuđenih proteina.

Takođe su ispitana i dva porozna nosača, jedan hidrofobni i jedan epoksidno-funkcionalizovani nosač iz serije Lifetech™, radi utvrđivanja mogućnosti imobilizacije putem hidrofobne adsorpcije i kovalentnog vezivanja, kao i moguće primene u razgradnji industrijskih boja. Da bi se optimizovala kovalentna imobilizacija lakaze na epoksidno-funkcionalizovani nosač, ispitana je aktivnost imobilisane lakaze, specifična aktivnost, koncentracija imobilisanih proteina i prinos imobilizacije. Pored toga, ispitivana je i vrsta uspostavljene veze enzima i epoksi nosača.

Imobilisani preparati sa najvećom enzimskom aktivnošću primenjeni su u obezbojavanju 4 odabrane boje: Lanaset® Violet B, Lanaset® Blue 2R, bromtimol plava i bromkrezol zelena. Ove četiri industrijske boje su odabrane zbog njihovog komercijalnog značaja i velike upotrebe u tekstilnoj industriji, budući da su antrahinonske boje, posle azo boja, najčešće korišćene (Lanaset® Violet B, Lanaset® Blue 2R) a sulfoneftaleinske boje (bromtimol plavo i bromkrezol zeleno) imaju različite namene, bilo kao pH indikator, ili tekstilne boje, a kao organski zagađivači značajni su i zbog toga što predstavljaju derivate boja, pa se mogu naći u industrijskim otpadnim vodama.

Sve odabrane boje imaju složenu aromatičnu hemijsku strukturu, a u okruženju predstavljaju organske zagađujuće materije, kako je detaljno objašnjeno u teorijskom delu ove disertacije. Njihova razgradnja je do sada, uglavnom ispitivana drugim metodama, ali nije bilo pokušaja razgradnje konkretno ove četiri boje imobilisanom lakazom [130,131].

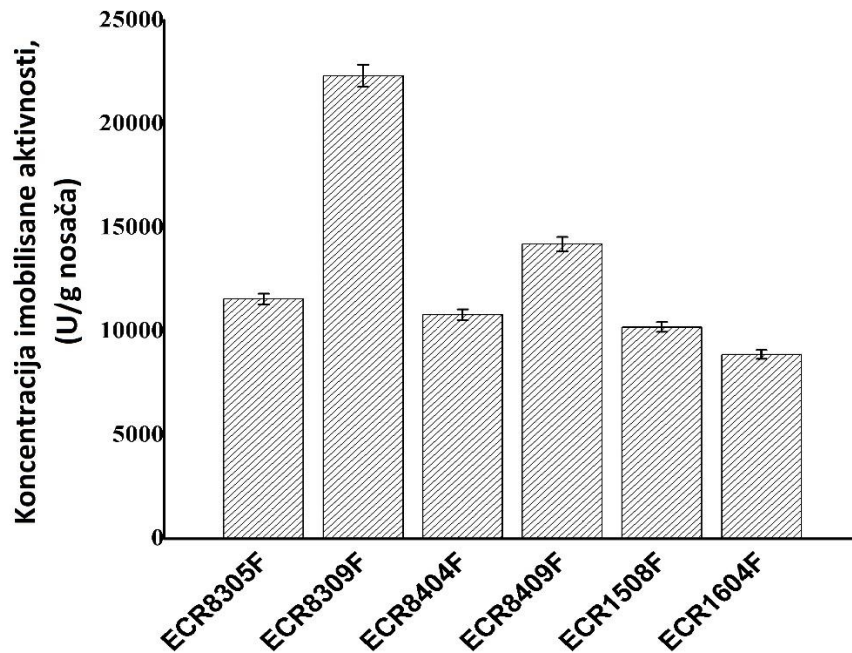
4.7.1. Imobilizacija na amino-funkcionalizovane nosače

Lifetech™ amino-funkcionalizovani nosači su smole, oblika čvrstih sfera, različitih veličina pora i funkcionalnih grupa. Glavne karakteristike odabranih nosača date su u Tabeli 5.

4.7.1.1. Izbor nosača

Za svih 6 ispitanih nosača iz ove grupe, određena je koncentracija imobilisane aktivnosti lakaze iz *T. versicolor*, korišćenjem siringaldazina kao supstrata u izvršenim eksperimentima. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 68.

Na osnovu rezultata do kojih se došlo tokom ove studije, može se zaključiti da postoji značajan uticaj funkcionalnih grupa i polarnosti nosača za imobilizaciju, kao i poroznosti, na katalitičku aktivnost enzima.



Slika 68. Poređenje različitih amino-funkcionalizovanih Lifetech™ nosača prema koncentraciji imobilisane aktivnosti lakaze iz *T. versicolor*.

Najniže aktivnosti su postignute sa umereno hidrofobnim nosačem na bazi neporoznog stirena sa tercijarnim (Lifetech™ ECR1508) i kvarternernim (Lifetech™ ECR1604) amino grupama.

Kod ispitivanja mogućnosti imobilizacije lakaze na porozne nosače, veće aktivnosti su dobijene sa poroznim metakrilatnim nosačima sa primarnim amino grupama. Među njima, na osnovu prikazanih rezultata, uticaj veličine pora na aktivnost bio je izraženiji u odnosu na dužinu nožice (C2 i C6). Pošto je lakaza iz *T. versicolor* protein od približno 70000 Da, prilično malih dimenzija, 6,5 nm x 5,5 nm x 4,5 nm može se pretpostaviti da se javlja i imobilizacija enzima unutar pora, kako kod manjih tako i kod većih pora ispitivanih nosača [35]. Difuzija molekula supstrata u veće pore, verovatno je dovela do olakšanog i efikasnijeg pristupa aktivnom centru molekula lakaze imobilisanih unutar pora, jer su najveće aktivnosti dobijene za nosače čije su veličine pora od 60 nm do 120 nm (Lifetech™ ECR8309F i ECR8409F).

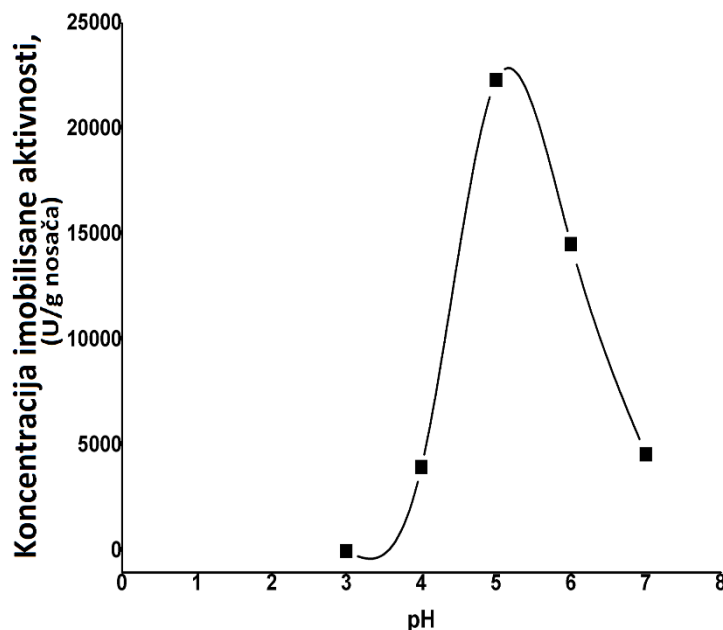
Najveća aktivnost imobilisanih preparata bila je kod kombinacije poroznog nosača, veće veličine pora i kraće C2 "nožice", koja je omogućila kraći razmak između površine nosača i molekula lakaze. Ova kombinacija karakteristika nosača, rezultirala je sa za 40 % većim aktivnostima imobilisane lakaze, u poređenju sa svim ostalim ispitivanim preparatima, dostižući vrednost od 22320 U/g nosača. Na osnovu dobijenih podataka, Lifetech™ ECR8309F nosač je korišćen za dalje ispitivanje, kao najperspektivniji nosač za imobilizaciju lakaze adsorpcijom iz grupe ispitivanih amino-funkcionalizovanih nosača.

4.7.1.2. Imobilizacija lakaze na Lifetech™ ECR8309F

Za odabrani nosač, ispitani su ključni parametri za imobilizaciju lakaze, a to su pH rastvora za imobilizaciju, vreme imobilizacije i početna koncentracija enzima.

4.7.1.2.1. Uticaj pH na proces imobilizacije

Na osnovu dostupnih podataka iz literature, poznato je da lakaze iz gljiva, kao što je *T. versicolor*, imaju izoelektričnu tačku u opsegu pH vrednosti od 3,0 do 7,0, obično oko 4,0 [5]. Imajući na umu činjenicu da izabrani nosač (Lifetech™ ECR8309F) ima primarne amino grupe na površini, pri odgovarajućim pH vrednostima, može se očekivati uspostavljanje elektrostatičkih interakcija između negativno naelektrisanih aminokiselinskih ostataka sa površine molekula lakaze i pozitivno naelektrisanih amino funkcionalnih grupa nosača. Na osnovu ovih pretpostavki, uticaj pH na proces imobilizacije proučavan je u istom pH opsegu, a dobijeni rezultati prikazani su na slici 69.



Slika 69. Uticaj pH na imobilizaciju lakaze na Lifetech™ ECR8309F nosač

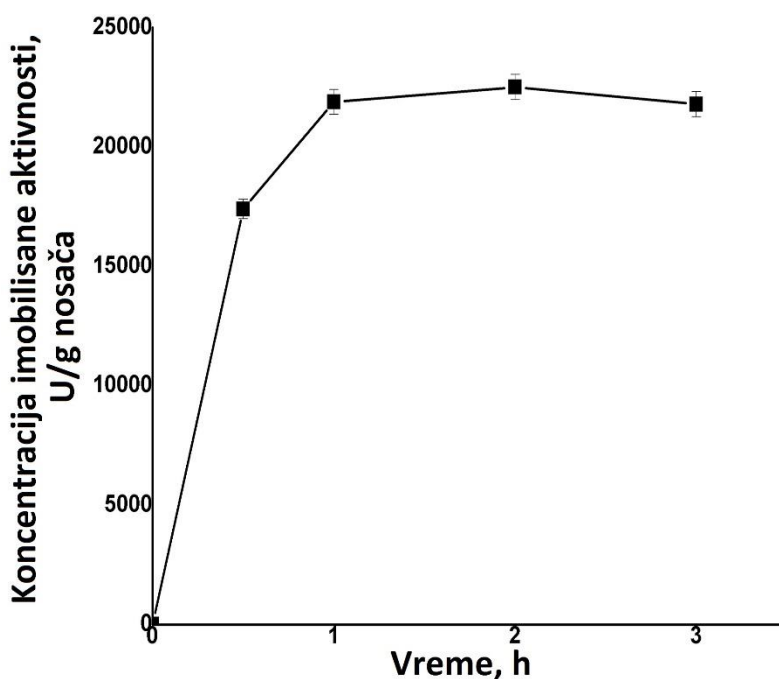
Na osnovu podataka prikazanih na slici 69 uočava se da imobilisana lakaza ima najveću aktivnost kada se imobilizacija vrši na pH 5,0, dok je za niži i viši pH imobilizacije primećen nagli pad aktivnosti. Pošto je poznato da je površina enzima pretežno negativno naelektrisana pri pH rastvora koji je iznad pI enzima, uspostavljanje elektrostatičkih interakcija sa pozitivno naelektrisanim primarnim amino grupama nosača je omogućeno pri odgovarajućim vrednostima pH, kao i vezivanje molekula enzima u njihovoj aktivnoj konformaciji. Za pH vrednosti ispod 5 veoma brzi pad aktivnosti, verovatno je nastao usled dominantnog dejstva

odbojnih elektrostatičkih sila i onemogućenog stvaranja enzim-nosač kompleksa. Kod pH vrednosti iznad 5 primećeno je nešto sporije smanjenje aktivnosti, što se može pripisati manje povoljnom vezivanju molekula lakaze na površinu nosača u poređenju sa pH 5.

Stoga, na osnovu oblika pH profila imobilizacije, koji ukazuje na to da se samo u uskom pH opsegu može postići optimizacija imobilizacije, pod pretpostavkom da su, u tom rasponu pH, elektrostatičke interakcije adekvatno formirane, za sledeća ispitivanja usvojena je pH vrednost 5,0 kao optimalna.

4.7.1.2.2. Uticaj vremena imobilizacije

Drugi ispitivani parametar imobilizacije, bilo je vreme imobilizacije, a dobijeni rezultati predstavljeni su na slici 70.



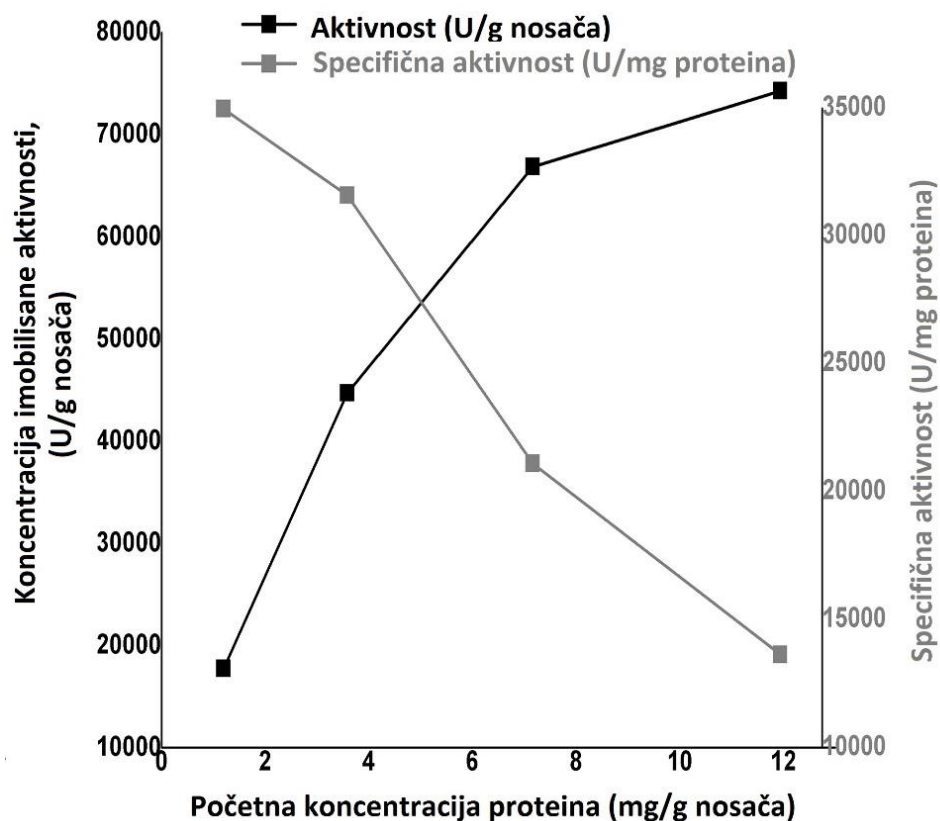
Slika 70. Uticaj vremena imobilizacije lakaze na Lifetech™ ECR8309F nosač pri pH 5,0

Izabrano vreme ispitivanja ove reakcije bilo je 3 sata. Najveća aktivnost imobilisane lakaze od 22320 U / g nosača, postignuta je nakon jednog sata, a 80 % te vrednosti dostignuto je nakon samo 30 min, dok dalje produženje procesa imobilizacije nije rezultiralo većim aktivnostima.

Vreme imobilizacije od jednog sata usvojeno je, na osnovu dobijenih rezultata, kao optimalno i korišćeno je za dalje eksperimente.

4.7.1.2.3. Ispitivanje aktivnosti lakaze imobilisane na Lifetech™ ECR8309F

Za potpunu optimizaciju procesa imobilizacije procenjena je optimalna početna koncentracija proteina (mg/g nosača) praćenjem aktivnosti imobilisane lakaze i specifične aktivnosti. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 71.



Slika 71. Uticaj početne koncentracije proteina na imobilizaciju lakaze na Lifetech™ ECR8309F

Početna koncentracija proteina varirala je u opsegu od 1 mg/g do 12 mg/g nosača. Iz dobijenih rezultata može se videti da sa povećanjem početne koncentracije enzima, aktivnost imobilisane lakaze takođe raste. Međutim, za početne koncentracije proteina niže od 7 mg po g nosača, primećeno je linearno povećanje aktivnosti imobilisanih preparata, dok je za početne koncentracije proteina veće od 7 mg po g nosača porast aktivnosti bio samo 10 %, odnosno od vrednosti 66876 U/g do 74289 U/g nosača, što ukazuje da dalje povećanje početne koncentracije proteina ne dovodi do proporcionalnog povećanja aktivnosti.

Nakon ovog ispitivanja, određena je specifična aktivnost (U/mg vezanih proteina), jer ovaj parametar najbolje opisuje katalitičku efikasnost molekula enzima koji su vezani za nosač. Kao što se može videti sa slike 71, specifična aktivnost lakaze imobilisane na Lifetech™ ECR8309F nosač, konstantno opada sa porastom početne koncentracije proteina. Ovakvi dobijeni rezultati ukazuje na mogućnost, da su molekuli enzima imobilisani duboko u porama, pri većim početnim koncentracijama enzima, manje dostupni molekulima supstrata. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima koji se mogu naći u literaturi, gde je uspešna imobilizacija lakaze izvršena na poroznim i amino-modifikovanim nosačima adsorpcijom, kao što je mezoporozna silika (OMM) ili AFNS [178].

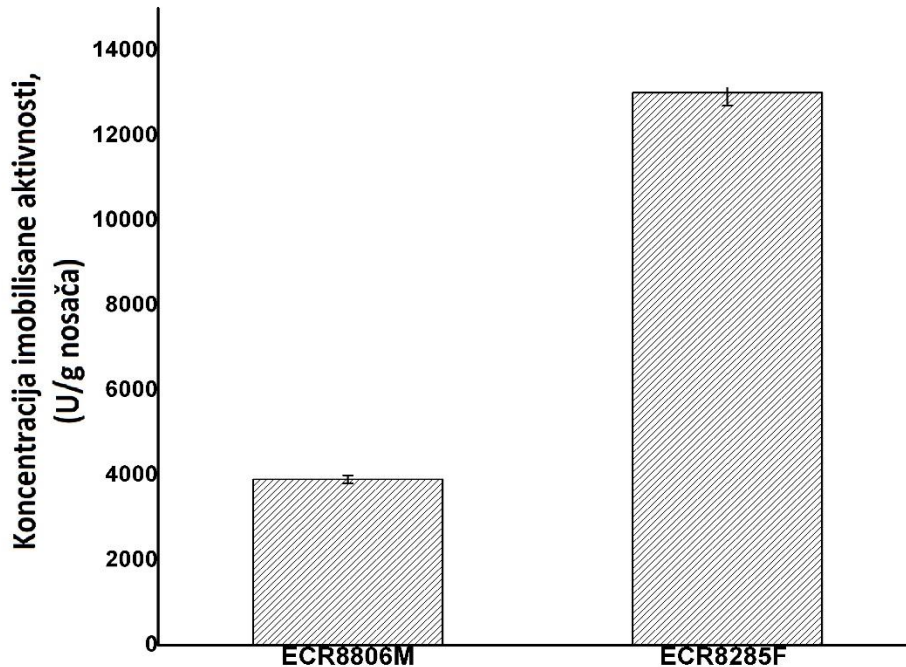
Od svih prikazanih rezultata, imajući u vidu da za industrijsku primenu imobilisani preparati treba da imaju najnižu moguću cenu, početna koncentracija enzima od 7 mg po g nosača je izabrana kao optimalna za imobilizaciju lakaze iz *T. versicolor* na amino funkcionalizovani Lifetech™ ECR8309F nosač.

4.7.2. Imobilizacija na hidrofobne i epoksidne nosače

Nakon ispitivanja i optimizacije imobilizacije lakaze iz *T. versicolor* na amino-aktivirani nosač, Lifetech™ ECR8309F, slični eksperimenti su izvedeni sa dve druge vrste Lifetech™ nosača, epoksidnom i oktadecil-funkcionalizovanim nosaču. Ova dva nosača, koji su po strukturi takođe porozne čvrste sfere, razlikuju se od prethodno ispitivanih u vrsti mogućih interakcija nosač-enzim. Nosač sa oktadecil grupom omogućava vezu enzima pomoću hidrofobnih interakcija, dok umereno hidrofobni epoksidno-aktivirani nosač, pored hidrofobnih interakcija, omogućava formiranje kovalentnih veza što je poželjniji način vezivanja u odnosu na adsorpciju. Glavne karakteristike oba nosača su takođe prikazane u tabeli 5.

4.7.2.1. Izbor nosača

Rezultati dobijeni imobilizacijom lakaze na dva ispitivana nosača prikazani su na slici 72.



*Slika 72. Imobilizacija lakaze iz *T. versicolor* na hidrofobni (ECR8806M) i epoksi-funkcionalizovani (ECR8285F) Lifetech™ nosač*

Od ova dva ispitana nosača, preparat sa lakazom koja je imobilisana na epoksi/butil metakrilatni nosač (Lifetech™ ECR8285F) imala je više od tri puta veću aktivnost od preparata sa enzimom imobilisanim na oktadecil/metakrilatni nosač (Lifetech™ ECR8806M).

Imobilizacija lakaze na oktadecil (C18) aktiviranim nosačima je adsorpcijom, pošto je ovaj nosač visoko hidrofoban i formiraju se hidrofobne interakcije enzima i nosača. Epoksi-funkcionalizovani nosači omogućavaju kovalentno vezivanje enzima u više tačaka, pri čemu se može uspostaviti kovalentna veza sa različitim proteinskim grupama (amino, tiol, fenolne) [71]. Ovaj nosač, međutim, ima jedinstvenu kombinaciju epoksi grupa za kovalentno vezivanje i veoma hidrofobni skelet butil metakrilata, kako je i napomenuto u poglavlju 2.2.3.4.1.

Na osnovu dobijenih podataka iz preliminarnih eksperimenata, za ove dve vrste nosača, visoko hidrofobni i epoksi aktivirani nosač s hidrofobnim skeletom, odnosno umereno hidrofobni, u daljim eksperimentima je optimizovana imobilizacija lakaze na epoksi/butil metakrilatni nosač, Lifetech™ ECR8285F.

4.7.2.2. Imobilizacija lakaze na Lifetech™ ECR8285F

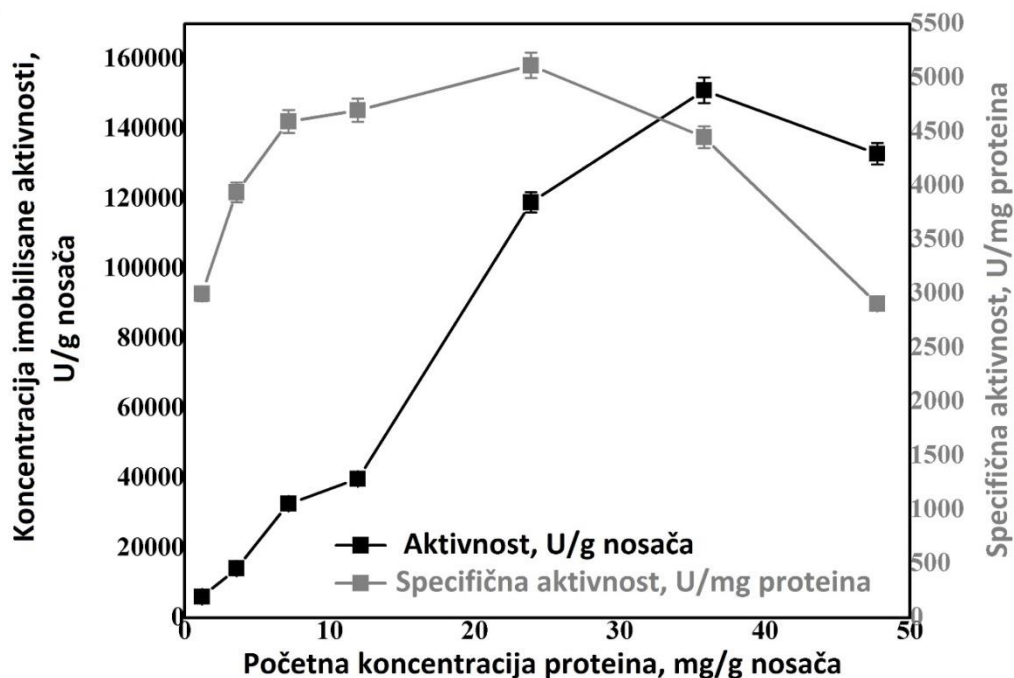
Osnovna ideja prezentovanog istraživanja bila je da se pokuša dobijanje preparata u kome će lakaza biti kovalentno vezana za nosač, zbog činjenica da se molekuli lakaze mogu stabilizovati kovalentnim vezivanjem i može se sprečiti spiranje enzima. Ujedno, to su i razlozi zbog kojih je ova vrsta interakcije nosača i enzima poželjnija u poređenju sa adsorpcijom.

Takođe, ovo su ključne karakteristike, bitne za kontinuiranu industrijsku primenu imobilisanog preparata.

Rezultati prikazani na slikama 68 i 72 pokazali su da moguća kovalentna imobilizacija lakaze na Lifetech™ ECR8285F nosač može biti povoljna, jer je enzim zadržao najveću aktivnost nakon imobilizacije u poređenju sa ostalim ispitanim nosačima na kojima je lakaza imobilisana samo adsorpcijom. Ovi rezultati su takođe u skladu sa drugim sličnim studijama gde je lakaza kovalentno vezana za nosač [159,179].

4.7.2.1.1. Ispitivanje aktivnosti lakaze imobilisane na Lifetech™ ECR8285F

Za potpunu optimizaciju imobilizacije lakaze na ovaj nosač, procenjena je optimalna početna koncentracija enzima praćenjem aktivnosti imobilisane lakaze i specifične aktivnosti (slika 73) kao i koncentracije imobilisanih proteina i prinosa imobilizacije proteina (slika 74), kao što je rađeno i u slučaju optimizacije imobilizacije lakaze na amino-aktivirani nosač.



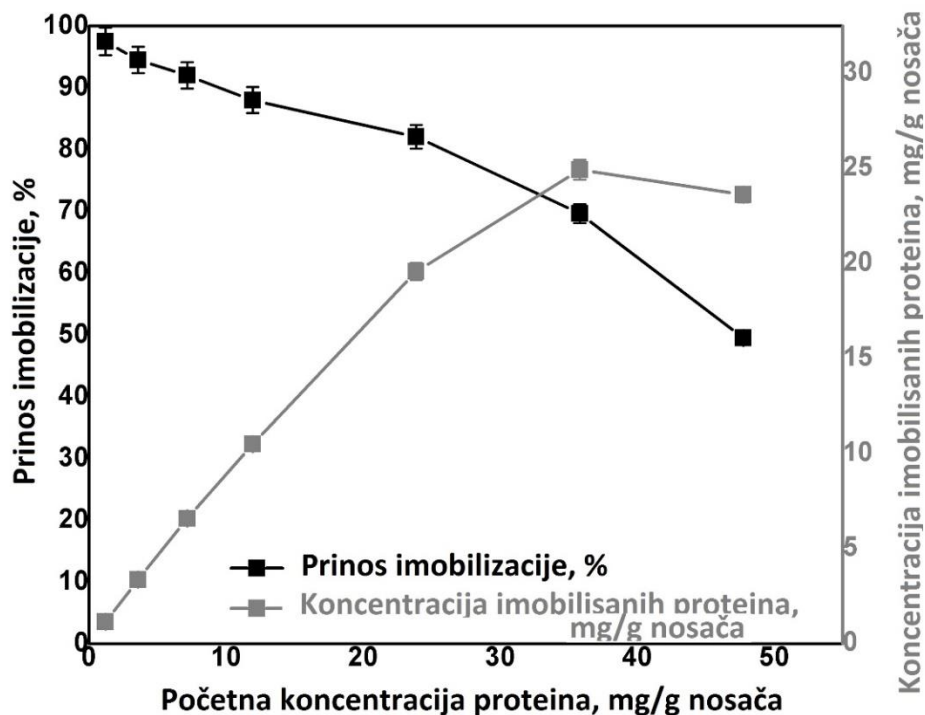
Slika 73. Uticaj početne koncentracije proteina na aktivnost lakaze imobilisane na Lifetech™ ECR8285F nosač

Početna koncentracija proteina je varirana u širokom opsegu, od 1 mg/g nosača do 48 mg/g nosača. Iz dobijenih rezultata, prikazanih na slici 73, može se primetiti nagli porast aktivnosti imobilisanih preparata za početne koncentracije enzima do 24 mg/g. Dalje povećanje koncentracije ponuđenih proteina rezultira manjim povećanjem aktivnosti

imobilisane lakaze, pošto je povećanje početne koncentracije enzima za 50 % (sa 24 mg/g na 36 mg/g nosača) dovelo do povećanja aktivnosti od 26 %. Povećanje početne koncentracije proteina do 48 mg/g čak je dovelo do malog smanjenja aktivnosti preparata.

Sličan trend se može primetiti kod ispitivanja specifične aktivnosti, budući da se sa porastom početne koncentracije proteina, specifična aktivnost povećava, do početne koncentracije lakaza od 24 mg/g, dostižući maksimum, a za veću početnu koncentraciju proteina, specifična aktivnost nadalje opada.

Izvršeno je i ispitivanje uticaja koncentracije ponuđenih proteina, odnosno početne koncentracije proteina, za isti opseg koncentracija proteina od 1 mg/g nosača do 48 mg/g nosača, na koncentraciju imobilisanih proteina i na prinos imobilizacije, a dobijeni rezultati su prikazani na slici 74.



Slika 74. Uticaj početne koncentracije proteina na prinos imobilizacije i koncentraciju imobilisanih proteina na Lifetech™ ECR8285F nosač

Iz dobijenih rezultata može se primetiti da povećanje početne koncentracije proteina ima suprotan uticaj na prinos imobilizacije u poređenju sa uticajem na koncentraciju imobilisanih proteina.

Do početne koncentracije proteina od 8 mg/g nosača, procenat vezanih molekula enzima na Lifetech™ ECR8285F je bio veoma visok, preko 90 %. U opsegu početnih

koncentracija proteina od 12 mg/g - 36 mg/g, prinosi imobilizacije proteina su bili od 88,0 % do 69,6 %, dok je dalji porast koncentracije ponuđenih proteina doveo do smanjenja prinosa imobilizacije proteina do vrednosti od 50 %.

Što se tiče odnosa početne koncentracije proteina i koncentracije imobilisanih proteina, odnosno dobijenih rezultata koji su prikazani na slici 74, vidljivo je da se koncentracija imobilisanih proteina konstantno povećavala sa povećanjem koncentracije ponuđenih proteina do 36 mg/g nosača. Dalji porast koncentracija ponuđenih proteina do 48 mg/g nosača, nije doveo do povećanja koncentracije imobilisanih proteina. Stoga se može proceniti da je maksimalni kapacitet vezivanja za Lifetech™ ECR8285F nosač iznosio 25 mg proteina po g nosača.

Na osnovu svih prikazanih rezultata može se uočiti da početna koncentracija enzima od 24 mg/g nosača, daje optimalni imobilisani preparat. U ovim optimizovanim uslovima, dobijen je preparat imobilisane lakaze sa aktivnošću od 118929 U/g nosača, što je značajno više, u poređenju sa maksimalnom aktivnošću dobijenom sa amino funkcionalizovanim Lifetech™ ECR8309F nosačem, za koga su rezultati prikazani na slici 71.

4.7.2.1.2. Analiza mehanizma imobilizacije enzima na Lifetech™ ECR8309F

Da bi se potvrdio pretpostavljeni tip interakcije između enzima i nosača, izveden je i desorpcioni eksperiment, sa 1 M rastvorom CaCl_2 i 1 %-nim rasvorom Triton™ X-100. Kako je i ranije objašnjeno, tretiranjem imobilisanog preparata 1 M rastvorom CaCl_2 , svi enzimi vezani elektrostatičkim interakcijama biće uklonjeni, te će preostala aktivnost imobilisanog preparata biti rezultat molekula enzima vezanih hidrofobnim interakcijama i kovalentnim vezama za nosač.

Dobijeni rezultati pokazali su da nakon tretiranja imobilisanog preparata sa 1 M rastvorom CaCl_2 nije registrovano smanjenje aktivnosti preparata i da nije došlo do desorpcije proteina, što znači da nisu formirane elektrostatičke interakcije između lakaze i Lifetech™ ECR8285F nosača.

Nakon tretmana rastvorom Triton™ X-100, desorbovano je 68 % imobilisanih proteina. Pošto je dokazano odsustvo elektrostatičkih interakcija, može se zaključiti da je 68 % molekula lakaze vezano na Lifetech™ ECR8285F nosač hidrofobnim interakcijama, dok je preostalih 32 % molekula enzima kovalentno vezano na površinu nosača.

S obzirom na činjenicu da je potvrđeno uspostavljanje hidrofobnih interakcija i kovalentnih veza, koje su i preferirane u odnosu na elektrostatičke interakcije, zbog veće stabilnosti u procesnim uslovima i veće ostvarene aktivnosti u poređenju sa amino funkcionalizovanim nosačem, na koga je imobilizacija lakaze prethodno izvršena i

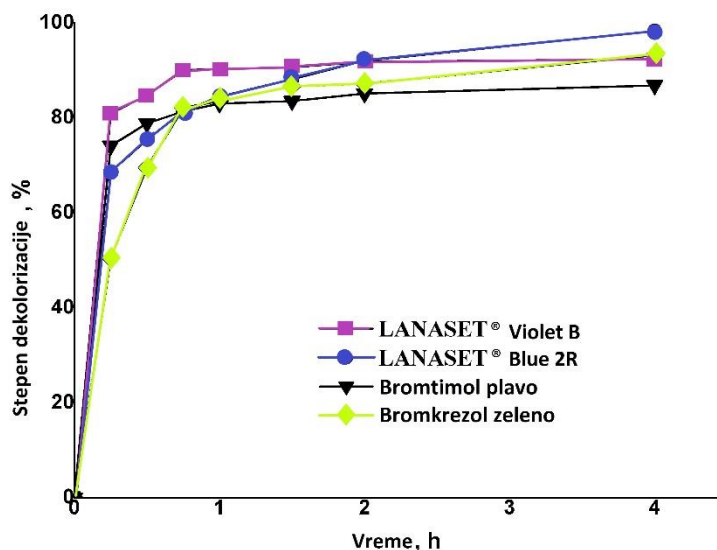
optimizovana (Lifetech™ ECR8309F), dalji eksperimenti su sprovedeni korišćenjem lakaze imobilisane na epoksi-butil metakrilatni nosač - Lifetech™ ECR8285F.

4.8. Razgradnja industrijskih boja lakazom imobilisanom na Lifetech™ ECR8285F

Nakon optimizacije imobilizacije lakaze iz *T. versicolor* na Lifetech™ ECR8285F nosač, ispitivana je aktivnost imobilisane lakaze u obezbojavanju različitih industrijskih boja.

Ispitivanje moguće primene u obezbojavanju industrijskih boja imobilisanim preparatom ispitano je korišćenjem rastvora četiri tekstilne boje različitih hemijskih struktura prikazanih na slikama 31 i 32, a osnovne karakteristike boja date su u tabeli Tabeli 7. Odabrani supstrati lakaze su predstavnici dveju složenih klasa sa bitno različitom hemijskom strukturom. Dok Lanaset® boje imaju antrahinonsku strukturu, ostale dve boje pripadaju sufonftaleinskim bojama. U dostupnoj literaturi, razgradnja ovih boja je istraživana različitim metodama, ali ne i lakazom iz *T. versicolor* imobilisanom na Lifetech™ ECR8285F nosač [130,131].

Obezbojavanje odabranih boja praćeno je u vremenskom periodu od četiri sata, a dobijeni rezultati su predstavljene na slici 75.



Slika 75. Ostvareni stepeni dekolorizacije odabranih boja lakazom imobilisanom na Lifetech™ ECR8285F nosač

Iz prikazanih rezultata može se uočiti da je imobilisani preparat bio vrlo aktivan, jer je stepen dekolorizacije bio u opsegu od 88 % do 96 % nakon 4 sata. Više od 80% obezbojenja se postiže nakon samo 45 min. Tokom izvođenja ovih eksperimenata bilo je vidljivo da do

dekolorizacije ne dolazi samo zbog enzimske razgradnje već dolazi i do adsorpcije boja na Lifetech™ ECR8285F nosač.

Izbeljivanje uzoraka boje lakazom imobilisanom na Lifetech™ ECR8285F nosač prikazano na slici 76.

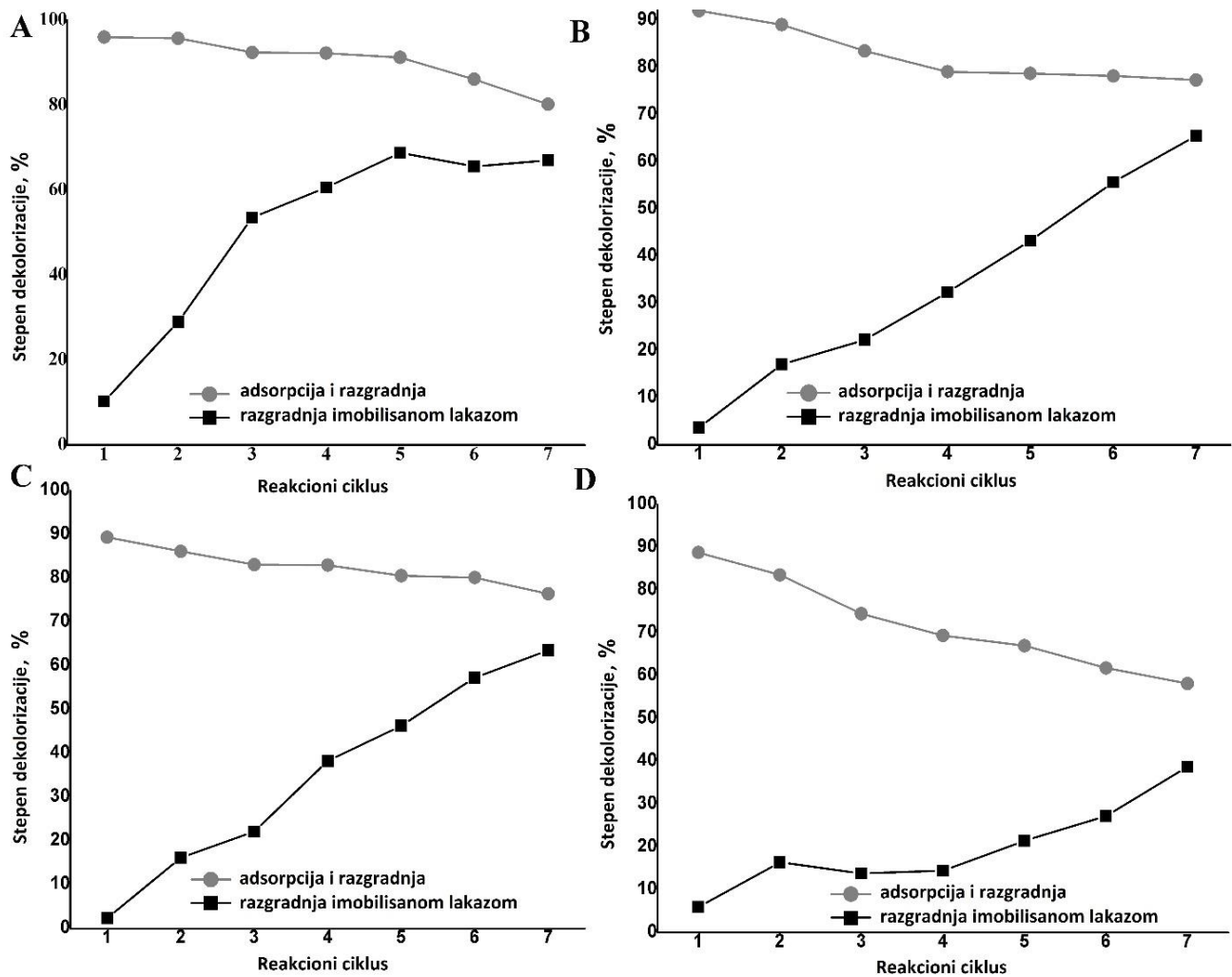


*Slika 76. Promena boje u kivetama sa odabranim bojama i lakazom iz *T. versicolor* imobilisanom na Lifetech™ ECR8285F nosač*

Dobijeni rezultati ovog ispitivanja ukazuju na činjenicu da se imobilisani preparati mogu uspešno primeniti u obezbojavanju četiri odabrane industrijske boje, ali i da je rezultat dva paralelna procesa – adsorpcije i enzimske degradacije. U narednoj fazi istraživanja ispitana je mogućnost ponovljene upotrebe imobilisanog enzima. Pored očiglednog motiva – činjenice da je to ključna aplikativna karakteristika imobilisanog enzima – ovo je i pogodan način da se izoluje efekat enzimske razgradnje jer se u ponovljenim ciklusima adsorpcija boje drastično smanjuje.

4.8.1. Ispitivanje ponovne upotrebe lakaze imobilisane na Lifetech™ ECR8285F u razgradnji industrijskih boja

Ispitivanje ponovne upotrebe dobijenog imobilisanog preparata, vršeno je po metodi opisanoj u poglavlju 3.2.8.2. Nakon 7 reakcionih ciklusa, dobijeni su rezultati koji su predstavljeni na slici 77.



Slika 77. Razgradnja ispitivanih boja praćena adsorpcijom boja na čestice nosača: A) Lanaset® Violet B, B) Lanaset® Blue 2R, C) bromtimol plavo i D) bromkrezol zeleno

Procenat dekolorizacije boja, kao rezultat adsorpcije i razgradnje, posle sedam ciklusa ostao je vrlo visok, s obzirom da je najmanja dekolorizacija postignuta za bromkrezol zeleno 58 % (slika 77D), a najviša 80 % za Lanaset® Violet B (slika 77A).

Adsorpcija boja na nosač brzo se smanjivala nakon svakog ciklusa, kao rezultat ograničene površine nosača dostupne za adsorpciju. Kada je doprinos adsorpcije praćen tokom sedam ponovnih upotreba u dekolorizaciji Lanaset® Violet B, Lanaset® Blue 2R, bromotimol plavo i bromkrezol zeleno, primećeno je smanjenje od 85,71 %, 88,38 %, 87,00 % i 82,77 % na 13,14 %, 11,81 %, 12,86 % i 19,38 % u četiri ispitivana sistema, redom. Imajući u vidu da je ukupni efekat adsorpcije boja na čestice i njihove razgradnje enzimom ostao visok (58% do 80% nakon sedmog reakcionog ciklusa), evidentno je da je enzim održao visoku katalitičku aktivnost tokom ponovnih upotreba.

Na osnovu dobijenih rezultata, efekat dekolorizacije u sva četiri sistema tokom ponovne primene imobilisanog preparata može se skoro u potpunosti pripisati enzimskoj degradaciji. U literaturi se takođe mogu naći dobri postignuti rezultati u obezbojavanju boja bilo gljivama belog truljenja ili njihovim enzimima, slobodnim ili imobilisanim. Dekolorizacija boje malahit zeleno od strane *T. versicolor* f. *antarcticus* je realizovana u bioreaktoru i nakon 5 uzastopnih ciklusa stepen dekolorizacije dostigao je vrednost od 82 % [180]. Sa lakazom imobilisanom na porozne PVA / HNT-ove hibridne kuglice i reaktivno plavo bojom kao uzorkom za obezbojavanje, dekolorizacija usled adsorpcije i degradacije iznosila je 40,97 % [181].

Ovi rezultati potvrđuju da dobijeni preparat ima značajnu operativnu stabilnost i dobre izgleda za ekonomski održivu upotrebu u prečišćavanju industrijskih otpadnih voda.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata prikazanih u okviru eksperimentalnog dela ove disertacije mogu se izvesti sledeći najvažniji zaključci:

- Izvršena je karakterizacija lakaze iz *Myceliophthora thermophila* sa ekspresijom u *Aspergillus oryzae* (Novozym® 51003), u kojoj je utvrđen pH optimum na približno 6,8, uz aktivnost lakaze od 1220 IU/ml, a izoelektrična tačka lakaze, pI, imala je vrednost od 4,0. Visoka aktivnost Novozym® 51003 lakaze, u širokom rasponu pH vrednosti, predstavlja dobar preduslov za moguću industrijsku primenu lakaze, a ujedno imobilizacija enzima može da se vrši u većem rasponu pH vrednosti.
- Ispitana je izglednost primene ovog enzima u degradaciji velikog broj organohlornih pesticida. Lakaza je pokazala mogućnost razgradnje svih analiziranih zagađivača, što pruža potvrdu njene potencijalne primene u bioremedijaciji. Pesticid kod koga je postignut najviši stepen razgradnje od 51 % bio je lindan, a utvrđeno je i da je optimalno reakciono vreme 6 dana.
- Ispitana je i optimizovana imobilizacija Novozym® 51003 lakaze na amino-funkcionalizovanu nanosiliku (AFNS). Za imobilizaciju su dobijeni optimizovani uslovi pH 5,0, i koncentracija ponuđenih proteina od 160 mg po g nosača. Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da se imobilizacijom očuvala velika aktivnost lakaze, što ukazuje na činjenicu da pri fizičkoj adsorpciji enzima na nosač, aktivni centar enzima ostaje lako dostupan supstratu.
- Fizička adsorpcija lakaze na AFNS predstavlja vezivanje enzima u jednom sloju na površinu nosača, koje se odigrava veoma brzo, sa preko 90 % maksimalne koncentracije imobilisanih proteina dostignute posle 40 minuta od početka imobilizacije i može se prikazati kinetičkim modelom pseudo-prvog reda.
- Dobijeni imobilisani preparat korišćen je u razgradnji pesticida lindana, gde je nakon 6 dana reakcije, razgrađeno 43,2 % lindana, računato relativno u odnosu na početnu koncentraciju, većom brzinom nego slobodna lakaza. Prilikom ispitivanja mogućnosti ponovne upotrebe ovog preparata, nakon 7 ponovnih upotreba, imobilisana Novozym® 51003 lakaza zadržala je 70 % početne aktivnosti, što predstavlja potvrdu da dobijeni imobilisani preparat ima dobar potencijal za višekratnu primenu u razgradnji lindana, kao izabranog predstavnika organskih zagađujućih materija iz grupe organohlornih pesticida.

- Prilikom ispitivanja mogućnosti za korišćenje amino-modifikovanih ligninskih mikrosfera (A-LMS), kao nosača za imobilizaciju Novozym® 51003 lakaze, od dve ispitane vrste A-LMS mikrosfera (A-LMS_5 i A-LMS_10), sa različitim karakteristikama, na osnovu parametara efikasnosti imobilizacije (prinos imobilizacije proteina (%) i koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g nosača)), najveće vrednosti parametara dobijaju se u slučaju imobilizacije lakaze na A-LMS_5 mikrosfere. pH optimum za imobilizaciju lakaze na A-LMS_5 bio je 5,0, najveća koncentracija imobilisanih proteina, nakon jednog sata, iznosila je približno 35 mg/g. Najbolji rezultati imobilizacije lakaze na A-LMS_5, po pitanju prinosa imobilizacije proteina, prinosa imobilizacije aktivnosti i specifične aktivnosti, dobijeni su za koncentraciju ponuđenih proteina od 70 mg/g nosača, za vreme imobilizacije od 4 h. Vezivanje lakaze na ovaj nosač vrši se, u podjednako meri, elektrostatičkim i hidrofobnim interakcijama.
- Prilikom ispitivanja dobijenog preparata u razgradnji lindana, posle šestog dana reakcije, preostala koncentracija lindana u uzorku, u odnosu na početnu, iznosila je 22,4 % . Lakaza imobilisana na A-LMS_5, u odnosu na lindan kao supstrat, ima produženu aktivnost a sama degradacija je efikasnija nego u slučaju slobodne lakaze ili lakaze imobilisane na AFNS. Od ova dva ispitana nosača, A-LMS_5 ima bolje izgleda za primenu u imobilizaciji Novozym® 51003 lakaze, za potencijalnu primenu u razgradnji insekticida lindana.
- Ispitana je primena osam komercijalnih nosača iz serije Lifetech™, sa različitim karakteristikama za imobilizaciju lakaze iz *Trametes versicolor*. Iz ovih ispitivanja mogu se izvući najvažniji zaključci:
 - Najveća aktivnost imobilisanog preparata iz grupe amino-funkcionalizovanih nosača, od 6 ispitanih nosača, bila je kod poroznog Lifetech™ ECR8309F nosača, većih pora i kraće C2 nožice, kod koje je dobijena aktivnost imobilisane lakaze iznosila 22320 U/g nosača. Optimizacijom imobilizacije, utvrđeno je da je pH optimum 5,0, a optimalno vreme imobilizacije jedan sat. Praćenjem koncentracije imobilisane aktivnosti i specifične aktivnosti, utvrđeno je da je optimalna početna koncentracija proteina 7 mg po g nosača.
 - Od druga dva ispitana Lifetech™ nosača, od kojih je jedan hidrofobni i jedan epoksidno-funkcionalizovani nosač, preparat sa lakazom imobilisanom na epoksi/butil metakrilatni nosač (Lifetech™ ECR8285F) pokazao je preko tri puta veću aktivnost. Optimizacijom imobilizacije lakaze na Lifetech™ ECR8285F, dobijen je optimalni imobilisani preparat sa aktivnošću od 118929 U/g nosača. Na ovaj nosač, 68 % molekula lakaze vezano je hidrofobnim interakcijama, dok je preostalih 32 % molekula enzima vezano kovalentnim vezama. Potvrda uspostavljenih kovalentnih veza između enzima i nosača, kao i velike dobijene aktivnosti imobilisanog preparata, izdvojili su ga od ostalih, kao

najperspektivnijeg za ispitivanje njegove primene u razgradnji organskih zagađujućih materija.

- Dobijeni imobilisani preparat je ispitan u razgradnji četiri industrijske boje. Reakcija razgradnje boja bila je veoma brza, a postignuti stepen dekolorizacije bio u opsegu od 88 % do 96 % nakon 4 sata, sa više od 80% obezbojenja posle prvih 45 minuta. Primećeno je da se osim enzimske razgradnje ispitivanih boja, javlja i njihova adsorpcija na nosač. Ispitivanjem ponovne upotrebe imobilisanih preparata, nakon 7 reakcionih ciklusa, procenat obezbojenja ostao je visok (od 58% do 80%), a nakon 4. ciklusa utvrđeno je da se gotovo sav učinak u obezbojavanju može pripisati enzimskoj degradaciji. Ovi rezultati potvrđuju da dobijeni preparat ima značajnu operativnu stabilnost i dobre izgleda za ekonomski održivu upotrebu u prečišćavanju industrijskih otpadnih voda.

6. LITERATURA

- [1] Xu F, Shin W, Brown SH, Wahleithner JA, Sundaram UM, Solomon EI. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol*. 1996;1292(2):303-311.
- [2] Tavares APM, Silva CG, Dražić G, Silva AMT, Loureiro JM, Faria JL. Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes: Kinetic, thermodynamic and stability studies. *J Colloid Interface Sci*. 2015;454:52-60.
- [3] Fernández-Fernández M, Sanromán MÁ, Moldes D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol Adv*. 2013;31(8):1808-1825.
- [4] Johannes C, Majcherczyk A, Hüttermann A. Oxidation of acenaphthene and acenaphthylene by laccase of *Trametes versicolor* in a laccase-mediator system. *J Biotechnol*. 1998;61(2):151-156.
- [5] P. Baldrian. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev*. 2006;30:215-242.
- [6] Minussi RC, Pastore GM, Durán N. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci Technol*. 2002;13(6-7):205-216.
- [7] Ilyas S, Rehman A. Decolorization and detoxification of synozol red HF-6BN azo dye, by *Aspergillus niger* and *Nigrospora* sp. *Iran J Environ Heal Sci Eng*. 2013;10(12).
- [8] Yoshida H. Chemistry of Lacquer (Urushi). *J Chem Soc Trans*. 1883;43(43):472-486.
- [9] Strong PJ, Claus H. Laccase: A review of its past and its future in bioremediation. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 2011;41(4):373-434.
- [10] Christopher F. Thurston Tel: The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. 1994;1(1 994):19-26.
- [11] Niku-Paavola ML, Karhunen E, Salola P, Raunio V. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochem J*. 1988;254(3):877-883.
- [12] Madhavi V, Lele SS. Laccase: Properties and applications. *BioResources*. 2009;4(4):1694-1717.
- [13] Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Adv*. 2003;22(1-2):161-187.
- [14] Viswanath B, Rajesh B, Janardhan A, Kumar AP, Narasimha G. Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Res*. 2014;2014.

- [15] Viswanath B, Subhosh Chandra M, Pallavi H, Rajasekhar Reddy B. Screening and assessment of laccase producing fungi isolated from different environmental samples. *African J Biotechnol.* 2008;7(8):1129-1133.
- [16] Dou H, Chang Y, Zhang L. *Coriolus versicolor* polysaccharopeptide as an immunotherapeutic in China. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2019;163:361-381.
- [17] Velázquez-Cedeño MA, Farnet AM, Ferré E, Savoie JM. Variations of lignocellulosic activities in dual cultures of *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma longibrachiatum* on unsterilized wheat straw. *Mycologia.* 2004;96(4):712-719.
- [18] Hölker U, Dohse J, Höfer M. Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiol (Praha).* 2002;47(4):423-427.
- [19] Morozova O V., Shumakovich GP, Shleev S V., Yaropolov YI. Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Appl Biochem Microbiol.* 2007;43(5):523-535.
- [20] Eggert C, Temp U, Eriksson KEL. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(4):1151-1158.
- [21] Williamson PR. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: Identification as a laccase. *J Bacteriol.* 1994;176(3):656-664.
- [22] Kunamneni A, Plou F, Ballesteros A, Alcalde M. Laccases and Their Applications: A Patent Review. *Recent Pat Biotechnol.* 2008;2(1):10-24.
- [23] Cipolatti EP, Silva MJA, Klein M, Feddern V, Feltes MMC, Oliveira JV, Ninow JL, De Oliveira D. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. *J Mol Catal B Enzym.* 2014;99:56-67.
- [24] Sheldon RA. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv Synth Catal.* 2007;349(8-9):1289-1307.
- [25] Givaudan A, Effosse A, Faure D, Potier P, Bouillant ML, Bally R. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: Evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol Lett.* 1993;108(2):205-210.
- [26] Arias ME, Arenas M, Rodríguez J, Soliveri J, Ball AS, Hernández M. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(4):1953-1958.
- [27] Thakker GD, Evans CS, Rao KK. Purification and characterization of laccase from *Monocillium indicum* Saxena. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1992;37(3):321-323.
- [28] Jimenez-Juarez N, Roman-Miranda R, Baeza A, Sánchez-Amat A, Vazquez-Duhalt R, Valderrama B. Alkali and halide-resistant catalysis by the multipotent oxidase from

- Marinomonas mediterranea. *J Biotechnol.* 2005;117(1):73-82.
- [29] Suzuki T, Endo K, Ito M, Tsujibo H, Miyamoto K, Inamori Y. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003;67(10):2167-2175.
- [30] Min KL, Kim YH, Kim YW, Jung HS, Hah YC. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. *Arch Biochem Biophys.* 2001;392(2):279-286.
- [31] Wahleithner JA, Xu F, Brown KM, Brown SH, Golightly EJ, Halkier T, Kauppinen S, Pederson A, Schneider P. The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet.* 1996;29(4):395-403.
- [32] Yaver DS, Xu F, Golightly EJ, Brown KM, Brown SH, Rey MW, Schneider P, Halkier T, Mondorf K, Dalbøge H. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(3):834-841.
- [33] Wood DA. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *J Gen Microbiol.* 1980;117(2):327-338.
- [34] Ernst HA, Jørgensen LJ, Bukh C, Piontek K, Plattner DA, Østergaard LH, Larsen S, Bjerrum MJ. A comparative structural analysis of the surface properties of asco-laccases. *PLoS One.* 2018;13(11).
- [35] Piontek K, Antorini M, Choinowski T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J Biol Chem.* 2002;277(40):37663-37669.
- [36] Zouari N, Romette JL, Thomas D. Purification and properties of two laccase isoenzymes produced by *Botrytis cinerea*. *Appl Biochem Biotechnol.* 1987;15(3):213-225.
- [37] Xu F. Laccase. *Encycl Bioprocess Technol.* 2002.
- [38] Muñoz C, Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Curr Microbiol.* 1997;34(1):1-5.
- [39] Rodríguez-Delgado MM, Alemán-Nava GS, Rodríguez-Delgado JM, Dieck-Assad G, Martínez-Chapa SO, Barceló D, Parra R. Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2015;74:21-45.
- [40] Durán N, Rosa MA, D'Annibale A, Gianfreda L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: A review. *Enzyme Microb Technol.* 2002;31(7):907-931.
- [41] Palmer AE, Randall DW, Xu F, Solomon EI. Spectroscopic studies and electronic

- structure description of the high potential type 1 copper site in fungal laccase: Insight into the effect of the axial ligand. *J Am Chem Soc.* 1999;121(30):7138-7149.
- [42] Arregui L, Ayala M, Gómez-Gil X, Gutiérrez-Soto G, Hernández-Luna CE, Herrera De Los Santos M, Levin L, Rojo-Domínguez A, Romero-Martínez D, Saparrat MCN, Trujillo-Roldán MA, Valdez-Cruz NA. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microb Cell Fact.* 2019;18(1).
- [43] Enguita FJ, Martins LO, Henriques AO, Carrondo MA. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: A laccase with enhanced thermostability properties. *J Biol Chem.* 2003;278(21):19416-19425.
- [44] Ducros V, Brzozowski AM, Wilson KS, Brown SH, Østergaard P, Schneider P, Yaver DS, Pedersen AH, Davies GJ. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nat Struct Biol.* 1998;5(4):310-316.
- [45] Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, Sannia G. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J Biol Chem.* 1997;272(50):31301-31307.
- [46] Matera I, Gullotto A, Tilli S, Ferraroni M, Scozzafava A, Briganti F. Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with p-toluate. *Inorganica Chim Acta.* 2008;361(14-15):4129-4137.
- [47] Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. Laccases: A never-ending story. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(3):369-385.
- [48] Alcalde M. Laccases: Biological functions, molecular structure and industrial applications. *Ind Enzym Struct Funct Appl.* 2007:461-476.
- [49] Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev.* 1996;96(7):2563-2605.
- [50] Xu F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry.* 1996;35(23):7608-7614.
- [51] Lisov A V, Belova O V, Andreeva-Kovalevskaya ZI, Budarina ZI, Solonin AA, Vinokurova NG, Leontievsky AA. Application of enzymes in the pulp and paper industry. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014;30(3):147-157.
- [52] Kawai S. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *J wood Sci.* 2006;52(4):99-102.
- [53] Atalla MM, Zeinab HK, Eman RH, Amani AY, Abeer AAEEA. Characterization and kinetic properties of the purified *Trematosphaeria mangrovei* laccase enzyme. *Saudi J Biol Sci.* 2013;20(4):373-381.

- [54] Sondhi S, Sharma P, Saini S, Puri N, Gupta N. Purification and characterization of an extracellular, thermo-alkali- stable, metal tolerant laccase from *Bacillus tequilensis* SN4. *PLoS One*. 2014;9(5).
- [55] Alcalde M, Ferrer M, Plou FJ, Ballesteros A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends Biotechnol*. 2006;24(6):281-287.
- [56] Majcherczyk A, Johannes C, Hüttermann A. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb Technol*. 1998;22(5):335-341.
- [57] Crecchio C, Ruggiero P, Pizzigallo MDR. Polyphenoloxidases immobilized in organic gels: Properties and applications in the detoxification of aromatic compounds. *Biotechnol Bioeng*. 1995;48(6):585-591.
- [58] González T, Terrón MC, Yagüe S, Zapico E, Galletti GC, González AE. Pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry monitoring of fungal- biotreated distillery wastewater using *Trametes* sp. I-62 (CECT 20197). *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2000;14(15):1417-1424.
- [59] Minussi RC, Miranda MA, Silva JA, Ferreira C V., Aoyama H, Marangoni S, Rotilio D, Pastore GM, Durán N. Purification, characterization and application of laccase from *Trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *African J Biotechnol*. 2007;6(10):1248-1254.
- [60] Use of laccase in baking. *Trends Food Sci Technol*. 1995;6(11):379.
- [61] Hartmann M, Kostrov X. Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges. *Chem Soc Rev*. 2013;42(15):6277-6289.
- [62] Mohamad NR, Marzuki NHC, Buang NA, Huyop F, Wahab RA. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2015;29(2):205-220.
- [63] Homaei AA, Sariri R, Vianello F, Stevanato R. Enzyme immobilization: An update. *J Chem Biol*. 2013;6(4):185-205.
- [64] Knežević-Jugović Z. *Enzimsko Inženjerstvo*. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Tehnološkometalurški fakultet, Beograd; 2008.
- [65] Kress J, Zanaletti R, Amour A, Ladlow M, Frey JG, Bradley M. Enzyme accessibility and solid supports: Which molecular weight enzymes can be used on solid supports? An investigation using confocal raman microscopy. *Chem - A Eur J*. 2002;8(16):3769-3772.
- [66] Cao L, van Langen L, Sheldon RA. Immobilised enzymes: Carrier-bound or carrier-free? *Curr Opin Biotechnol*. 2003;14(4):387-394.

- [67] Banjanac K. IMOBILIZACIJA ENZIMA NA NANOČESTICE SiO₂ MODIFIKOVANE ORGANOSILANIMA, Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet Univerzitet u Beogradu. 2017.
- [68] Brena B, González-Pombo P, Batista-Viera F. Immobilization of Enzymes and cells. *Immobil Enzym Cells Third Ed Methods Mol Biol*. 2013;1051(May):1-11.
- [69] Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol*. 2007;40(6):1451-1463.
- [70] A. Abdelmajeed N. Immobilization technology for enhancing bio-products industry. *African J Biotechnol*. 2012;11(71).
- [71] Nur Royhaila Mohamad, Nur Haziqah Che Marzuki, Nor Aziah Buang, Fahrul Huyop RAW. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2015;29(2):205-220.
- [72] Tischer W WF. Immobilized enzymes: methods and application. In: Fessner WD, ed. *Topics in Chemistry*. Berlin: Springer Verlag; 1999:100-108.
- [73] Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*. 2013;3(1).
- [74] Purolite. Purolite Lifetech™ ECR Enzyme Immobilization Resins. 2014:13.
- [75] Banjanac K, Mihailović M, Prlainović N, Stojanović M, Carević M, Marinković A, Bezbradica D. Cyanuric chloride functionalized silica nanoparticles for covalent immobilization of lipase. *J Chem Technol Biotechnol*. 2016;91(2):439-448.
- [76] Dyal A, Loos K, Noto M, Chang SW, Spagnoli C, Shafi KVPM, Ulman A, Cowman M, Gross RA. Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on γ -Fe₂O₃ magnetic nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2003;125(7):1684-1685.
- [77] de Dios AS, Díaz-García ME. Multifunctional nanoparticles: Analytical prospects. *Anal Chim Acta*. 2010;666(1-2):1-22.
- [78] Popat A, Hartono SB, Stahr F, Liu J, Qiao SZ, Lu GQ. Mesoporous silica nanoparticles for bioadsorption, enzyme immobilisation, and delivery carriers. *Nanoscale*. 2011;3(7):2801-2818.
- [79] Retamal Marín RR, Babick F, Lindner GG, Wiemann M, Stintz M. Effects of sample preparation on particle size distributions of different types of silica in suspensions. *Nanomaterials*. 2018;8(7).
- [80] Bagwe RP, Hilliard LR, Tan W. Surface modification of silica nanoparticles to reduce aggregation and nonspecific binding. *Langmuir*. 2006;22(9):4357-4362.

- [81] Galliker P, Hommes G, Schlosser D, Corvini PFX, Shahgaldian P. Laccase-modified silica nanoparticles efficiently catalyze the transformation of phenolic compounds. *J Colloid Interface Sci.* 2010;349(1):98-105.
- [82] Zdarta J, Meyer AS, Jesionowski T, Pinelo M. A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. *Catalysts.* 2018;8(2):1-27.
- [83] Mohy Eldin MS, Elaassar MR, Elzatahry AA, Al-Sabah MMB, Hassan EA. Covalent immobilization of β -galactosidase onto amino-functionalized PVC microspheres. *J Appl Polym Sci.* 2012;125(3):1724-1735.
- [84] Edman P, Ekman B, Sjöholm I. Immobilization of proteins in microspheres of biodegradable polyacryldextran. *J Pharm Sci.* 1980;69(7):838-842.
- [85] Snoch W, Tataruch M, Zastawny O, Cichoń E, Gosselin M, Cabana H, Guzik M. Hollow silica microspheres as robust immobilization carriers. *Bioorg Chem.* 2019;93.
- [86] Cai Y, Chen Y, Hong X, Liu Z, Yuan W HZ. Porous microsphere and its applications. *Int J Nanomedicine.* 2013;Volume 201(1):1111 – 1120.
- [87] Wang A, Wang H, Zhu S, Zhou C, Du Z, Shen S. An efficient immobilizing technique of penicillin acylase with combining mesocellular silica foams support and p-benzoquinone cross linker. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2008;31(5):509-517.
- [88] Chakar FS, Ragauskas AJ. Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. *Ind Crops Prod.* 2004;20(2):131-141.
- [89] Popovic AL, Rusmirovic JD, Velickovic Z, Radovanovic Z, Ristic M, Pavlovic VP, Marinkovic AD. Novel amino-functionalized lignin microspheres: High performance biosorbent with enhanced capacity for heavy metal ion removal. *Int J Biol Macromol.* 2019;(in press).
- [90] Popovic A, Rusmirovic J, Levic S, Bozic A, Kovacevic T. Amino-functionalized lignin microspheres: Synthesis and characterization of high-performance adsorbent for effective nickel(II) ion removal. In: *31st International Congress on Process Industry.* ; 2018:235-239.
- [91] Jakub Zdarta, Łukasz Kłapiszewski, Marcin Wysokowski, Małgorzata Norman, Agnieszka Kołodziejczak-Radzimska, Dariusz Moszyński, Hermann Ehrlich, Hieronim Maciejewski, Allison L. Stelling TJ. Chitin-Lignin Material as a Novel Matrix for Enzyme Immobilization. *Mar Drugs.* 2015;13(4):2424–2446.
- [92] Zdarta J, Kłapiszewski L, Jedrzak A, Nowicki M, Moszynski D, Jesionowski T. Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on a silica-lignin matrix as a stable and reusable biocatalytic system. *Catalysts.* 2017;7(1).
- [93] Zhang DH, Yuwen LX, Peng LJ. Parameters affecting the performance of immobilized

- enzyme. *J Chem.* 2013.
- [94] Rodrigues RC, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Fernández-Lafuente R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem Soc Rev.* 2013;42(15):6290-6307.
- [95] Turrio-Baldassarri L, Abate V, Alivernini S, Battistelli CL, Carasi S, Casella M, Iacovella N, Iamiceli AL, Indelicato L, Scarcella C, La Rocca C. A study on PCB, PCDD/PCDF industrial contamination in a mixed urban-agricultural area significantly affecting the food chain and the human exposure. Part I: soil and feed. *Chemosphere.* 2007;67:1822-1830.
- [96] Snousy MG. An Overview on the Organic Contaminants. *SDRP J Earth Sci Environ Stud.* 2017;1(2).
- [97] Veljković N, Vidojević D, Jovičić M. Uticaji zagađujućih materija iz urbanih otpadnih voda na životnu sredinu i zdravlje. *Otpad vode, Komunaln čvrsti otpad i opasan otpad.* 2010;(april):1-7.
- [98] Ministarstvo zaštite životne sredine i prostornog planiranja, GEF, UNEP. *Nacionalni Implementacioni Plan Za Sprovođenje Stokholmske Konvencije o Dugotrajnim Organskim Zagađujućim Supstancama (POPs).*; 2009.
- [99] *Pravilnik o Listi POPs Materija Načinu i Postupku Za Upravljanje POPs Otpadom i Graničnim Vrednostima Koncentracija POPs Materija Koje Se Odnose Na Odlaganje Otpada Koji Sadrži Ili Je Kontaminiran POPs Materijama.*
- [100] Janjić V, Mitrić S. Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu. In: Društvo za zaštitu bilja Srbije; 2004.
- [101] Đurović R. Proces koji određuju sudbinu pesticida u zemljištu. *Pestic i fitomedicina.* 2011;26(1):9-22.
- [102] Zgomba M. *INSEKTICIDI U ZAŠTITI BILJA.* (Sanja Lazić, ed.). Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet; 2014.
- [103] Taiwo AM. A review of environmental and health effects of organochlorine pesticide residues in Africa. *Chemosphere.* 2019;220:1126-1140.
- [104] Zeljković J, Turk Sekulić M. Vremenski Trend Koncentracionih Nivoa Ddt/Metabolita (Dde, Ddd) Na Background Lokalitetu Ap Vojvodine. *Zb Rad Fak Teh Nauk u Novom Sadu.* 2019;34(05):938-941.
- [105] Jayaraj R, Megha P, Sreedev P. Review Article. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdiscip Toxicol.* 2016;9(3-4):90-100.

- [106] Zhao Z, Zeng H, Wu J, Zhang L. Organochlorine pesticide (OCP) residues in mountain soils from Tajikistan. *Environ Sci Process Impacts*. 2013;15(3):608-616.
- [107] Zhao YC, Yi XY, Zhang M, Liu L, Ma WJ. Fundamental study of degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane in soil by laccase from white rot fungi. *Int J Environ Sci Technol*. 2010;7(2):359-366.
- [108] Aislabie JM, Richards NK, Boul HL. Microbial degradation of DDT and its residues – A review. *New Zeal J Agric Res*. 1997;40(2):269-282.
- [109] Toxicological Profile: Tetrachloroethylene. 2019, <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=265&tid=48>, pristupljeno 5.4.2020.
- [110] Sparling DW. Ecotoxicology essentials. Environmental contaminants and their biological effects on animals and plants. In: *Ecotoxicology Essentials*. ; 2016:490.
- [111] Jorgenson JL. Aldrin and dieldrin: A review of research on their production, environmental deposition and fate, bioaccumulation, toxicology, and epidemiology in the United States. *Environ Health Perspect*. 2001;109(SUPPL. 1):113-139.
- [112] Raun Andersen H, Vinggaard AM, Høj Rasmussen T, Gjermandsen IM, Cecilie Bonefeld-Jørgensen E. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002;179(1):1-12.
- [113] Vetter W, Bester K. Gas chromatographic enantioseparation of chiral pollutants- techniques and results. *Chiral Anal*. 2006:131-213.
- [114] Toxicological Profile for Endosulfan. *ATSDR's Toxicol Profiles*. 2002, <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp41-c4.pdf>, pristupljeno 5.4.2020.
- [115] Menezes RG, Qadir TF, Moin A, Fatima H, Hussain SA, Madadin M, Pasha SB, Al Rubaish FA, Senthilkumaran S. Endosulfan poisoning: An overview. *J Forensic Leg Med*. 2017;51:27-33.
- [116] <https://Monographs.Iarc.Fr/Wp-Content/Uploads/2018/06/Mono5.Pdf>, pristupljeno 8.3.2020.
- [117] Đinović-Stojanović J, Spasić J, Popović A, Vranić D, Nikčević M, Hegediš A, Nikolić D. Distribution of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in two species of fish from Danube. *Tehnol mesa*. 2013;54(1):69-78.
- [118] Li YF, Zhulidov A V., Robarts RD, Korotova LG. Hexachlorocyclohexane use in the former Soviet Union. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2004;48(1):10-15.
- [119] UNEP. *Report of the Persistent Organic Pollutants Review Committee on the Work of Its Third Meeting*; 2007.
- [120] USEPA. *Lindane (Gamma-Hexachlorocyclohexane)*; 2000., <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/lindane.pdf>,

pristupljeno 3.2.2019.

- [121] Sang S, Petrovic S, Cuddeford V. *Lindane - a Review of Toxicity and Environmental Fate*. Vol 162.; 1999.
- [122] Przysaś W, Zabłocka-Godlewska E, Grabińska-Sota E. Efficiency of decolorization of different dyes using fungal biomass immobilized on different solid supports. *Brazilian J Microbiol*. 2018;49(2):285-295.
- [123] Forootanfar H, Moezzi A, Aghaie-Khozani M, Mahmoudjanlou Y, Ameri A, Niknejad F, Ali Faramarzi M. Synthetic dye decolorization by three sources of fungal laccase. *Iran J Environ Heal Sci Eng*. 2012;9(27).
- [124] Starovoitova D, Odido D. Assessment of toxicity of textile dyes and chemicals via materials safety data sheets.
- [125] Shaul GM, Holdsworth TJ, Dempsey CR, Dostal KA. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. *Chemosphere*. 1991;22(1-2):107-119.
- [126] Chairin T, Nitheranont T, Watanabe A, Asada Y, Khanongnuch C, Lumyong S. Biodegradation of bisphenol A and decolorization of synthetic dyes by laccase from white-rot fungus, *trametes polyzona*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013;169(2):539-545.
- [127] Kenzom T, Srivastava P, Mishra S. Structural insights into 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)-mediated degradation of reactive blue 21 by engineered *Cyathus bulleri* laccase and characterization of degradation products. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(24):7484-7495.
- [128] Radojković-Veličković M, Mijin D. *Organske Boje i Pigmenti*.; TMF, Beograd, 2001.
- [129] Textile Effects LANASET® dyes Dyeing system for wool and wool blends. <https://www.textile-dyes.co.uk/lanaset.pdf>, pristupljeno 12.9.2019.
- [130] Maamar M, Naimi I, Mkaem Y, Souissi N, Bellakhal N. Electrochemical oxidation of Bromothymol blue: Application to textile industrial wastewater treatment. *J Adv Oxid Technol*. 2015;18(1):105-113.
- [131] Chijioke Elijah O, Nonso Collins O, Callistus Obumneme O, Jessica N-B. Application of Modified Agricultural Waste in the Adsorption of Bromocresol Green Dye. *Asian J Chem Sci*. 2020:15-24.
- [132] Legerská B, Chmelová D, Ondrejovič M. Decolourization and detoxification of monoazo dyes by laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *J Biotechnol*. 2018;285:84-90.
- [133] Jung HS, Moon DS, Lee JK. Quantitative analysis and efficient surface modification of silica nanoparticles. *J Nanomater*. 2012;2012.

- [134] Collins PJ, Dobson ADW, Field JA. Reduction of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) cation radical by physiological organic acids in the absence and presence of Manganese. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(6):2026-2031.
- [135] Michota-Kaminska A, Wrzosek B, Bukowska J. Resonance raman evidence of immobilization of laccase on self-assembled monolayers of thiols on Ag and Au surfaces. *Appl Spectrosc.* 2006;60(7):752-757.
- [136] <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-laccase.html>.
- [137] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
- [138] Cds C, Connect I, Saver H, Scientific T, Connect I, Saver H, Dionex TS, Scientific TF, Connect I, Saver H. Determination of Organochlorine Pesticides Using GC-MS with a Helium-conserving Injector. :0-3.
- [139] Bańka K, Buszewicz G, Listos P, Madro R. Usefulness of GC-MS method for the determination of DDT, DMDT, AND γ -HCH in bees (bodies) for legal purposes. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2010;54(4):655-659.
- [140] Kumar R, Kaur J, Jain S, Kumar A. Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization. *J Genet Eng Biotechnol.* 2016;14(1):125-131.
- [141] Kiiskinen LL, Viikari L, Kruus K. Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;59(2-3):198-204.
- [142] Wolfe NL, Zepp RG, Paris DF, Baughman GL, Hollis RC. Methoxychlor and DDT Degradation in Water: Rates and Products. *Environ Sci Technol.* 1977;11(12):1077-1081.
- [143] Pan X, Lin D, Zheng Y, Zhang Q, Yin Y, Cai L, Fang H, Yu Y. Biodegradation of DDT by *Stenotrophomonas* sp. DDT-1: Characterization and genome functional analysis. *Sci Rep.* 2016;6.
- [144] Purnomo AS, Nawfa R, Martak F, Shimizu K, Kamei I. Biodegradation of Aldrin and Dieldrin by the White-Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr Microbiol.* 2017;74(3):320-324.
- [145] Xiao P, Mori T, Kamei I, Kiyota H, Takagi K, Kondo R. Novel metabolic pathways of organochlorine pesticides dieldrin and aldrin by the white rot fungi of the genus *Phlebia*. *Chemosphere.* 2011;85(2):218-224.
- [146] Ulčnik A, Kralj Cigić I, Pohleven F. Degradation of lindane and endosulfan by fungi, fungal and bacterial laccases. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013;29(12):2239-2247.

- [147] Cholarajan A, S AJ. Laccase Mediated Degradation of Cypermethrin and Endosulfan by Using *Ganoderma lucidum*. 1(1):49-55.
- [148] Xiao P, Mori T, Kamei I, Kondo R. Metabolism of organochlorine pesticide heptachlor and its metabolite heptachlor epoxide by white rot fungi, belonging to genus *Phlebia*. *FEMS Microbiol Lett*. 2011;314(2):140-146.
- [149] Purnomo AS, Putra SR, Shimizu K, Kondo R. Biodegradation of heptachlor and heptachlor epoxide-contaminated soils by white-rot fungal inocula. *Environ Sci Pollut Res*. 2014;21(19):11305-11312.
- [150] Saez JM, Alvarez A, Fuentes MS, Amoroso MJ, Benimeli CS. An overview on microbial degradation of lindane. *Environ Sci Eng (Subseries Environ Sci)*. 2017;(9783319451558):191-212.
- [151] Kumar D, Pannu R. Perspectives of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) biodegradation from the environment: a review. *Bioresour Bioprocess*. 2018;5(1).
- [152] Bernal C, Illanes A, Wilson L. Heterofunctional hydrophilic-hydrophobic porous silica as support for multipoint covalent immobilization of lipases: Application to lactulose palmitate synthesis. *Langmuir*. 2014;30(12):3557-3566.
- [153] Cao S, Fang L, Zhao Z, Ge Y, Piletsky S, Turner APF. Hierarchically structured hollow silica spheres for high efficiency immobilization of enzymes. *Adv Funct Mater*. 2013;23(17):2162-2167.
- [154] Cruz JC, Pfromm PH, Rezac ME. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on fumed silica. *Process Biochem*. 2009;44(1):62-69.
- [155] Falahati M, Saboury AA, Ma'mani L, Shafiee A, Rafieepour HA. The effect of functionalization of mesoporous silica nanoparticles on the interaction and stability of confined enzyme. *Int J Biol Macromol*. 2012;50(4):1048-1054.
- [156] Ranjbakhsh E, Bordbar AK, Abbasi M, Khosropour AR, Shams E. Enhancement of stability and catalytic activity of immobilized lipase on silica-coated modified magnetite nanoparticles. *Chem Eng J*. 2012;179:272-276.
- [157] Banjanac K, Carević M, Ćorović M, Milivojević A, Prlainović N, Marinković A, Bezbradica D. Novel β -galactosidase nanobiocatalyst systems for application in the synthesis of bioactive galactosides. *RSC Adv*. 2016;6(99):97216-97225.
- [158] Xia TT, Liu CZ, Hu JH, Guo C. Improved performance of immobilized laccase on amine-functioned magnetic Fe_3O_4 nanoparticles modified with polyethylenimine. *Chem Eng J*. 2016;295:201-206.
- [159] Mazlan SZ, Hanifah SA. Effects of Temperature and pH on Immobilized Laccase Activity in Conjugated Methacrylate-Acrylate Microspheres. *Int J Polym Sci*. 2017;2017.

- [160] Wang HS, Pan QX, Wang GX. A biosensor based on immobilization of horseradish peroxidase in chitosan matrix cross-linked with glyoxal for amperometric determination of hydrogen peroxide. *Sensors*. 2005;5(4-5):266-276.
- [161] Abdullah J, Ahmad M, Lee YH, Karuppiyah N, Sidek H. An optical biosensor based on immobilization of laccase and MBTH in stacked films for the detection of catechol. *Sensors*. 2007;7(10):2238-2250.
- [162] Gilani SL, Najafpour GD, Moghadamnia A, Kamaruddin AH. Kinetics and isotherm studies of the immobilized lipase on chitosan support. *Int J Eng Trans A Basics*. 2016;29(10):1319-1331.
- [163] Tseng RL, Wu FC, Juang RS. Characteristics and applications of the Lagergren's first-order equation for adsorption kinetics. *J Taiwan Inst Chem Eng*. 2010;41(6):661-669.
- [164] Li Y, Gao F, Wei W, Qu JB, Ma GH, Zhou WQ. Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization. *J Mol Catal B Enzym*. 2010;66(1-2):182-189.
- [165] Prlainović NŽ, Knežević-Jugović ZD, Mijin DŽ, Bezbradica DI. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Sepabeads®: The effect of lipase oxidation by periodates. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2011;34(7):803-810.
- [166] Bellezza F, Cipiciani A, Latterini L, Posati T, Sassi P. Structure and catalytic behavior of myoglobin adsorbed onto nanosized hydrotalcites. *Langmuir*. 2009;25(18):10918-10924.
- [167] Gao S, Wang Y, Wang T, Luo G, Dai Y. Immobilization of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption. *Bioresour Technol*. 2009;100(2):996-999.
- [168] Liu X, Lei L, Li Y, Zhu H, Cui Y, Hu H. Preparation of carriers based on magnetic nanoparticles grafted polymer and immobilization for lipase. *Biochem Eng J*. 2011;56(3):142-149.
- [169] Palocci C, Chronopoulou L, Venditti I, Cernia E, Diociaiuti M, Fratoddi I, Russo MV. Lipolytic enzymes with improved activity and selectivity upon adsorption on polymeric nanoparticles. *Biomacromolecules*. 2007;8(10):3047-3053.
- [170] Ponvel KM, Lee DG, Woo EJ, Ahn IS, Lee CH. Immobilization of lipase on surface modified magnetic nanoparticles using alkyl benzenesulfonate. *Korean J Chem Eng*. 2009;26(1):127-130.
- [171] Wang H, Zhang W, Zhao J, Xu L, Zhou C, Chang L, Wang L. Rapid decolorization of phenolic azo dyes by immobilized laccase with Fe₃O₄/SiO₂ nanoparticles as support. *Ind Eng Chem Res*. 2013;52(12):4401-4407.
- [172] Janson JC. Microspheres for the separation and refolding of proteins with an emphasis on particles made of agarose. In: *Microspheres and Microcapsules in Biotechnology: Design, Preparation and Applications*. 1st Editio. Jenny Stanford Publishing; 2013:123-152.

- [173] Dean Brady · Justin Jordaan. Microbial and Enzyme Technology. In: *Advances in Enzyme Immobilisation.* ; 2009:1-36.
- [174] Zhu L, Gong L, Zhang Y, Wang R, Ge J, Liu Z, Zare RN. Rapid detection of phenol using a membrane containing laccase nanoflowers. *Chem - An Asian J.* 2013;8(10):2358-2360.
- [175] Chen L, Zou M, Hong FF. Evaluation of fungal laccase immobilized on natural nanostructured bacterial cellulose. *Front Microbiol.* 2015;6(NOV).
- [176] Pezzella C, Russo ME, Marzocchella A, Salatino P, Sannia G. Immobilization of a pleurotus ostreatus laccase mixture on perlite and its application to dye decolourisation. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
- [177] Jesionowski T, Zdarta J, Krajewska B. Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption.* 2014;20(5-6):801-821.
- [178] Gascón V, Díaz I, Márquez-Álvarez C, Blanco RM. Mesoporous silicas with tunable morphology for the immobilization of laccase. *Molecules.* 2014;19(6):7057-7071.
- [179] Yinghui D, Qiuling W, Shiyu F. Laccase stabilization by covalent binding immobilization on activated polyvinyl alcohol carrier. *Lett Appl Microbiol.* 2002;35(6):451-456.
- [180] Diorio LA, Mercuri AA, Nahabedian DE, Forchiassin F. Development of a bioreactor system for the decolorization of dyes by *Coriolus versicolor* f. antarcticus. *Chemosphere.* 2008;72(2):150-156.
- [181] Chao C, Guan H, Zhang J, Liu Y, Zhao Y, Zhang B. Immobilization of laccase onto porous polyvinyl alcohol/halloysite hybrid beads for dye removal. *Water Sci Technol.* 2018;77(3):809-818.

BIOGRAFIJA

Jelena Bebić, rođena Tomović, u Beogradu, gde je završila Osnovnu školu "Starina Novak" i gimnaziju "Dr Dušica Stefanović". Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 1993/1994. godine. Diplomirala je na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju 13.12.2000. godine, sa ocenom 10 na diplomskom radu i sa prosečnom ocenom u toku studija 8,81. Doktorske studije na katedri za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju upisala je 2007. godine, sa mentorom dr Slavicom Šiler-Marinković, redovni profesor, a 2016. godine ponovo se upisuje na 3. godinu doktorskih studija, mentor dr Dejan Bezbradica, redovni profesor.

Od 1. novembra 2001. godine zaposlena je kao metrolog u Saveznom zavodu za mere i dragocene metale, Grupa za fizičko-hemijske veličine. 2004. godine stiče zvanje savetnika, 2009. godine zvanje samostalnog savetnika, a trenutno je zaposlena na mestu rukovodioca Grupe za metrologiju u hemiji, Direkcija za mere i dragocene metale, Ministarstvo privrede, u zvanju višeg savetnika.

Predstavnik je Srbije u više međunarodnih i evropskih organizacija iz oblasti metrologije. Član je četiri stručne komisije za standarde Instituta za standardizaciju Srbije. Tehnički je rukovodilac dva Evropska metrološka projekta za istraživanje i razvoj na nacionalnom nivou u okviru Horizon 2020 programa Evropske komisije. Ima više završenih kurseva za ocenjivača sistema kvaliteta i sertifikaciju, a kao tehnički ocenjivač angažovana je od strane četiri nacionalna akreditaciona tela.

Jelena Bebić je koautor jednog poglavlja u knjizi od međunarodnog značaja (M14), u pet radova u međunarodnim časopisima (jedan M21, tri M22, jedan M23), kao i u trinaest saopštenja sa međunarodnih i nacionalnih skupova (tri M33, jedan M34, devet M63).

образац изјаве о ауторству

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора ЈЕЛЕНА БЕБИЋ
Број индекса 4029/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ИМОБИЛИЗАЦИЈА ЛАКАЗЕ ЗА ПРИМЕНУ У
РАЗГРАДЊИ ОРГАНСКИХ ЗАГАЂУЈУЋИХ МАТЕРИЈА

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

Потпис аутора

У Београду, 16.6.2020.

Јелена Бебић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора ЈЕЛЕНА БЕБИЋ

Број индекса 4029/2016

Студијски програм БИОХЕМИЈСКИ ИНЖЕЊЕРИНГ И БИОТЕХНОЛОГИЈА

Наслов рада ИМОБИЛИЗАЦИЈА ЛАКАЗЕ ЗА ПРИМЕЧУ У РАЗГРАДЊИ ОРГАНСКИХ ЗАГАЂУЈУЋИХ МАТЕРИЈА

Ментор Проф. др. ДЕЈАН БЕЗГРАДИЋА

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

у Београду, 16. 6. 2016

Јелена Бебић

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство - некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство - некомерцијално - без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство - без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Имобилизација лаказе за примену у разградњи органских загађујућих материја”, аутора Јелене Бебић, мастер инж. технологије, констатујемо да утврђено подударање текста износи 7 %. Овај степен подударности претежно је последица употребљених личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из њене дисертације што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

15.07.2020. године

Ментор:

D. Bezbradića

Др Дејан Безбрадица, редовни професор
Универзитет у Београду,
Технолошко-металуршки факултет