

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Nevena M. Surudžić

(rođena Pantić)

**Uklanjanje fenola i tekstilnih boja iz  
otpadnih voda imobilizovanim peroksidazama  
iz rena (*Armoracia rusticana*) i gljive bele  
truleži (*Phanerochaete chrysosporium*)**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Nevena M. Surudžić

(born Pantić)

**Phenol and textile dye removal from wastewater  
with immobilized peroxidases from Horseradish  
(*Armoracia rusticana*) and white rot fungi  
(*Phanerochaete chrysosporium*)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

## Komisija za odbranu doktorske disertacije:

### Mentori:

---

dr Olivera Prodanović  
Viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu -  
Institut za multidisciplinarna istraživanja

---

dr Natalija Polović  
Redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu –  
Hemijski fakultet

### Članovi komisije:

---

dr Radivoje Prodanović  
Redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu –  
Hemijski fakultet

---

dr Marija Gavrović Jankulović  
Redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu –  
Hemijski fakultet

---

dr Milica Spasojević Savković  
Viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu –  
Inovacioni centar Hemijskog fakulteta

---

dr Zorica Knežević Jugović  
Redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu –  
Tehnološko-metalurški fakultet

---

dr Nataša Božić  
Naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu –  
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju

**Datum odbrane:**

**U Beogradu,** \_\_\_\_\_ 2024. godine

# Zahvalnica

Zahvaljujem se mentorkama ove doktorske disertacije dr Oliveri Prodanović, višem naučnom saradniku Univerziteta u Beogradu – Instituta za multidisciplinarna istraživanja i dr Nataliji Polović, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta. Veliku zahvalnost dugujem dr Oliveri Prodanović na korisnim savetima, neizmernoj pomoći, iskustvu i veštinama koje ste mi preneli, a bez kojih ova disertacija ne bi imala oblik kakav ima danas. Hvala Vam za svaki zajednički trenutak proveden u laboratoriji, ali pre svega što ste zajedno sa mnom veoma emotivno prolazili kroz sve uspone i padove koje smo imali na putu tokom izrade ove doktorske disertacije. Dr Nataliji Polović se zahvaljujem na prenesenom znanju tokom master i doktorskih studija na Hemijskom fakultetu, na nesebičnoj pomoći, savetima i sugestijama, ali i na divnim rečima podrške, kojih ću se uvek rado sećati.

Dr Radivoju Prodanović, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, mentoru sa diplomskih i master studija, dugujem posebnu zahvalnost, pre svega zbog toga što me je uveo u magični svet biohemije, u meni probudio ljubav prema ovoj oblasti i omogućio mi da se baš tu pronađem. Hvala Vam za svaki savet, ideju, sugestiju, ali i konstruktivnu kritiku koju ste mi uputili, jer bez njih danas ne bi bilo ni doktorske disertacije u ovakvom obliku.

Redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, dr Mariji Gavrović Jankulović, dugujem posebnu zahvalnost što se odazvala pozivu da bude član komisije za ocenu i odbranu ove doktorske disertacije i što je svojim konstruktivnim savetima doprinela njenoj poboljšanoj krajnjoj formi.

Dr Milici Spasojević Savković, višem naučnom saradniku Univerziteta u Beogradu – Inovacionog centra Hemijskog fakulteta, hvala na nesebičnoj pomoći prilikom izrade ove doktorske disertacije, prenesenom znanju i izdvojenom vremenu, kao i na divnom prijateljstvu koje se rodilo tokom zajedničkog rada na realizaciji ove teze.

Veliku zahvalnost što se odazvala pozivu da bude član komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije dugujem redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu – Tehnološko-metalurškog fakulteta, dr Zorici Knežević Jugović.

Dr Nataši Božić, naučnom savetniku Univerziteta u Beogradu – Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju dugujem posebnu zahvalnost što je pristala da bude član komisije za ocenu i odbranu ove doktorske disertacije.

Dr Kseniji Radotić Hadži-Manić dugujem posebnu zahvalnost što mi je otvorila vrata svoje laboratorije i omogućila da budem deo tima okupljenog oko nje. Kolegama sa Odseka za nauku o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja hvala na nesebičnoj podršci, kolegijalnosti i divnim savetima. Dr Milošu Prokopijeviću i dr Dragici Spasojević dugujem posebnu zahvalnost za svaki prodiskutovani problem, svaku nedoumicu koju ste mi razrešili. Dr Miri Stanković i dr Dragani Bartolić hvala što sam se zahvaljujući vašem prethodnom iskustvu i savetima osećala sigurnije dok sam koračala ka odbrani ove doktorske teze.

Veliku zahvalnost na zajedničkom radu i nesebičnoj pomoći dugujem i kolegama iz Laboratorije za bioinženjering (Lab 434) na Hemijskom fakultetu.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima! Vaša podrška, saveti i nesebična ljubav meni su bili vetar u leđa, gurajući me uvek napred i ne dozvoljavajući mi da posustanem. Nama nikada za razumevanje nije bilo potrebno previše reči, dovoljan je bio samo pogled i naša povezanost, koja mi je govorila da si ti iza mene, da mi čuvaš leđa i bodriš me, hvala ti na tome Duxas moj. Sigurna sam da bi danas jako ponosne bile moje bake i deke, zbog vas sam jedino tužna što se ovaj trenutak nije desio samo malo ranije.

Hvala ti što sam te upoznala u za mene pravom trenutku, što si bio i ostao moj glas razuma i što mi svako novo jutro bojiš vedrim bojama. Gagi ti si onaj delić slagalice koji je nedostajao!

# Uklanjanje fenola i tekstilnih boja iz otpadnih voda imobilizovanim peroksidazama iz rena (*Armoracia rusticana*) i gljive bele truleži (*Phanerochaete chrysosporium*)

## Sažetak

Sve veći globalni problem predstavlja zagađenje vodenih sistema različitim otpadnim materijama, pre svega fenolnim jedinjenjima i organskim bojama ispuštenim iz mnogobrojnih industrijskih postrojenja. S obzirom da su fenoli označeni kao najčešći zagađivači voda širom sveta, pronalazak metoda za njihovo uklanjanje predstavlja jedan od najvećih izazova savremene naučne zajednice. Različiti biokatalizatori su pronašli primenu u ove svrhe, a među njima je posebno mesto zauzela peroksidaza iz rena (HRP). Kao najveće ograničenje ove metode navodi se inaktivacija enzima, koja se može prevazići njegovom imobilizacijom na različitim nosačima.

U ovom radu su razvijene metode za uklanjanje fenola i degradaciju tekstilnih boja imobilizovanom peroksidazom iz rena i ćelijskim zidovima sa lignin-peroksidazom (LiP). Kao nosači za imobilizaciju su korišćeni oksidovani alginati modifikovani tiraminom, makroporozni kopolimeri različite veličine pora, kao i neorganski glineni nosač – sepiolit.

Tiramin-alginatne mikro-kuglice su iskorišćene za enkapsulaciju peroksidaze iz rena primenom kuplovane emulziono-polimerizacione reakcije. Ispitan je uticaj stepena modifikacije alginata tiraminom na specifičnu aktivnost enzima. Ustanovljeno je da sa povećanjem koncentracije perijodata korišćenog za oksidaciju alginata od 2,5 do 20 mol% pre modifikacije tiraminom dolazi do postepenog povećanja specifične aktivnosti.

Imobilizovana HRP je potom upotrebljena za uklanjanje fenola u šaržnom reaktoru. Optimizovani su reakcioni uslovi sa ciljem postizanja visokog stepena efikasnosti i poboljšane kontinualne primene. Za interno generisanje vodonik-peroksida ( $H_2O_2$ ) tokom oksidacije fenola primenjen je sistem sastavljen od glukoze i glukoza-oksidge. Znatno veći stepen uklanjanja fenola (96%) iz reakcionog sistema za 6 h je postignut primenom interne dostave  $H_2O_2$ , dok se njegovim direktnim dodavanjem značajno smanjuje efikasnost uklanjanja fenola na 42%. Primenom glukoza-oksidge u koncentraciji od 0,187 U/mL i 4 mmol/L glukoze postiže se najveća efikasnost, kao i korišćenjem 20 mol% oksidovanog i modifikovanog tiramin-alginata za enkapsulaciju HRP.

Degradacija tekstilnih boja ostvarena je i primenom ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom (LiP) zarobljenih u kalcijum-alginatnom hidrogelu. LiP je imobilizovana na tiramin-alginatne mikro-kuglice. Inkubacijom enkapsuliranih ćelijskih zidova u rastvorima boja Evans Blue i Amido Black 10B tokom 48 h i merenjem njihove aktivnosti u određenim vremenskim intervalima uočeno je postepeno povećanje procenta degradacije sa periodom inkubacije. Nakon maksimalne inkubacije 86% boje Evans Blue se dekolorizuje, dok taj procenat za Amido Black 10B iznosi 84%. Ponovnom upotrebom ćelijskih zidova sa LiP ostvarena je efikasna degradacija navedenih boja tokom 12 uzastopnih ciklusa.

Makroporozni kopolimeri sastavljeni od glicidil metakrilata i etilen glikol dimetakrilata veličine čestica od približno 2  $\mu m$  i različite veličine pora (150–310 nm) su sintetisani disperzionom polimerizacijom i modifikovani etilendiaminom. Dve različite metode, perijodatna i glutaraldehidna, su korišćene za imobilizaciju peroksidaze iz rena na ovim polimerima.

Aktivnost imobilizovanog enzima je u direktnoj vezi sa veličinom pora na nosaču korišćenom za imobilizaciju. Imobilizacijom HRP perjodatnom metodom na poli(GMA-co-EGDMA) veličine pora od 234 nm dobijena je specifična aktivnost od 9,65 U/g nosača, dok je HRP na kopolimeru sa porama od 297 nm imala specifičnu aktivnost 8,94 U/g nosača. Takođe je došlo i do povećanja stabilnosti imobilizovane peroksidaze na 65 °C u vodenom rastvoru kao i u organskom rastvaraču.

Dobru stabilnost na različitim pH vrednostima, kao i povećanu  $K_m$  vrednost tokom oksidacije pirogalola, pokazala je peroksidaza imobilizovana na makroporoznom kopolimeru sa veličinom pora od 234 nm, koja je imala i najveću specifičnu aktivnost. Nakon 5 ciklusa ponovne upotrebe za oksidaciju pirogalola zadržano je 80% inicijalne aktivnosti. Imobilizovani enzim skladišten 14 dana u odgovarajućem puferu zadržao je 98% aktivnosti. Značajna efikasnost uklanjanja fenola pri optimizovanim uslovima za dostavu vodonik-peroksida u reakcionu sistem je postignuta primenom HRP imobilizovane na kopolimeru sa porama veličine 234 nm.

Sepiolit je primenjen za adsorpciju native HRP i HRP oksidovane natrijum-perjodatom. Dodate su različite količine oba enzima po gramu sepiolitnog nosača. Sa povećanjem količine peroksidaze povećava se specifična aktivnost imobilizovanog enzima. Najveća aktivnost je postignuta pri imobilizaciji 15 mg perjodatno-oksidovane peroksidaze po gramu sepiolita. Testirane su temperaturna i operativna stabilnost imobilizovanih peroksidaza, kao i stabilnosti na različitim pH vrednostima. Oksidovana peroksidaza je zadržala 42% inicijalne aktivnosti nakon 4 uzastopna ciklusa oksidacije pirogalola.

**Ključne reči:** Alginat, fenol, peroksidaza, degradacija boja, sepiolit, makroporozni, imobilizacija

**Naučna oblast:** Hemija

**Uža naučna oblast:** Biohemija

# **Phenol and textile dye removal from wastewater with immobilized peroxidases from Horseradish (*Armoracia rusticana*) and white rot fungi (*Phanerochaete chrysosporium*)**

## **Abstract**

A growing global concern is the pollution of water courses with various waste materials, primarily phenolic compounds and organic dyes released from numerous industrial plants. Since phenols are designated as the most common water pollutants worldwide, finding methods for their removal is nowadays one of the biggest challenges for the broad scientific community. To this end, various biocatalysts have been used, among them Horseradish peroxidase (HRP) has been in prime position. The main limitation of this method is an enzyme inactivation, which can be overcome by its immobilization on different carriers.

In this study, various methods for the removal of phenol and degradation of textile dyes by immobilized Horseradish peroxidase and cell walls with lignin peroxidase (LiP) were developed. Oxidized alginates modified with tyramine, macroporous copolymers with different pore characteristics, as well as inorganic clay mineral – sepiolite, were used as carriers in immobilization.

Tyramine-alginate micro-beads were used for the encapsulation of peroxidase by coupled emulsion polymerization reaction. An effect of a degree of the alginate modification by tyramine on the specific activity of enzyme was examined. A gradual increase in the specific activity, with an increase in the concentration of periodate used for oxidation of alginate from 2.5 to 20 mol% prior to modification by tyramine, was observed.

Immobilized HRP was then used for the removal of phenol in a batch reactor. Reaction conditions were optimized with an aim of achieving a high degree of efficiency and improved reusability. A system composed of glucose and glucose oxidase was used for internal generation of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). When internal delivery of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was employed, 96% of phenol was removed from the reaction system in 6 h, whereas its straightforward addition significantly reduced the efficiency of phenol removal (42%). The highest efficiency was achieved by using glucose oxidase at the concentration of 0.187 U/mL and 4 mmol/L of glucose, as well as by using 20 mol% periodate-oxidized and modified tyramine-alginate for HRP encapsulation.

Degradation of textile dyes was performed by employing cell walls with lignin peroxidase (LiP) entrapped in a calcium-alginate hydrogel. LiP was also immobilized on tyramine-alginate micro-beads. By incubating encapsulated cell walls in Evans Blue and Amido Black 10B dye solutions for 48 h and measuring their activity in certain time intervals, a gradual increase in the degree of degradation with incubation period was observed. Maximal incubation in Evans Blue dye leads to 86% decolorization, whereas that percent for Amido Black 10B is 84%. Efficient degradation of previously mentioned dyes was achieved within 12 consecutive cycles by reusing cell walls with LiP.

Macroporous copolymers composed of glycidyl methacrylate and ethylene glycol dimethacrylate with a particle size of approximately 2 μm and different pore sizes (150–310 nm) were synthesized by dispersion polymerization and modified with ethylenediamine. Two methods, periodate and glutaraldehyde method, were used for the immobilization of horseradish peroxidase onto these polymers.

The activity of immobilized enzyme is affected by the pore size of the carrier used for immobilization. By immobilizing HRP using the periodate method onto poly (GMA-co-EGDMA) copolymers with the pore size diameter of 234 nm specific activity of 9.65 U/g of carrier was obtained, whereas HRP immobilized onto carrier with the pore size diameter of 297 nm showed specific activity of 8.94 U/g of carrier. Also, the stability of immobilized peroxidase at 65 °C, as well as in an organic solvent, was increased.

Peroxidase immobilized onto macroporous copolymer with a pore size diameter of 234 nm and the highest specific activity also showed a good stability at different pH values, as well as the increased  $K_m$  value during the oxidation of pyrogallol. Eighty percent of the initial activity was retained after 5 consecutive cycles of pyrogallol oxidation. After storing the immobilized enzyme for 14 days in appropriate buffer, 98% of its activity was preserved. A significant efficiency of phenol removal under optimized conditions for the delivery of hydrogen peroxide into the reaction mixture was achieved by applying HRP immobilized onto copolymer with the pore diameter of 234 nm.

Sepiolite was used for the adsorption of native HRP and HRP oxidized with sodium periodate. Different amounts of both enzymes were added per gram of sepiolite carrier. Increase in the amount of peroxidase leads to the increase in the specific activity of immobilized enzyme. The highest activity was achieved when 15 mg of periodate-oxidized peroxidase was immobilized per gram of sepiolite. Temperature and operational stabilities of immobilized peroxidases were tested. Oxidized peroxidase retained 42% of initial activity after 4 consecutive cycles of pyrogallol oxidation.

**Keywords:** Alginate, phenol, peroxidase, dye degradation, sepiolite, macroporous, immobilization

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific subfield:** Biochemistry



## LISTA SKRAĆENICA I AKRONIMA

<b>ABTS</b>	2,2'-azo-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
<b>AC</b>	aktivni ugalj
<b>AIBN</b>	azobisisobutironitril
<b>BDD</b>	dijamant dopiran borom
<b>CHP</b>	kumen-hidroperoksida
<b>CLEs</b>	umreženi rastvorni enzimi (cross-linked dissolved enzymes)
<b>CLECs</b>	umreženi enzimski kristali (cross-linked enzyme crystals)
<b>CLEAs</b>	umreženi enzimski agregati (cross-linked enzyme aggregates)
<b>DCIP</b>	dihlorofenolindofenol
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoksida
<b>EDC-HCl</b>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrohloridom
<b>EGDMA</b>	etilen glikol dimetakrilata
<b>ELISA</b>	enzimski imunosorbentski test
<b>EO</b>	elektrohemijska elektrooksidacija
<b>EPA</b>	Agencija za zaštitu životne sredine (Environmental Protection Agency)
<b>GC/MS</b>	gasni hromatograf sa masenim detektorom
<b>GMA</b>	glicidil metakrilata
<b>HPLC</b>	tečna hromatografija pod visokim pritiskom
<b>HRP</b>	peroksidaza iz rena
<b>KMB</b>	2-keto-4-metiol buterna kiselina
<b>LiP</b>	lignin-peroksidaza
<b>MnP</b>	mangan-peroksidaza
<b>O<sub>3</sub>-EO</b>	kuplovani proces ozonizacije i elektrooksidacije
<b>PEBA</b>	polietarski-poliamidni blok kopolimer
<b>PGA</b>	propenglikolni estar alginata
<b>PVP</b>	polivinilpirolidon
<b>RB</b>	Reactive Blue 160
<b>RBBR</b>	Remazol Brilliant Blue R
<b>SEM</b>	skenirajući elektronski mikroskop
<b>UV-VIS</b>	ultravidljiva spektroskopija
<b>VA</b>	veratril-alkohol

# SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>TEORIJSKI DEO</b>	<b>3</b>
2.1.	FENOLI I FENOLNI ZAGAĐIVAČI ŽIVOTNE SREDINE	3
2.1.1.	Osobine fenolnih jedinjenja.....	4
2.1.2.	Proizvodnja fenola.....	5
2.1.3.	Uticaj fenola na zdravlje ljudi.....	5
2.1.4.	Primena fenola.....	5
2.2.	UKLANJANJE FENOLA I FENOLNIH JEDINJENJA	6
2.3.	METODE ZA UKLANJANJE FENOLA	6
2.3.1.	Fizičke metode za uklanjanje fenola.....	6
2.3.1.1.	Destilacija vodenom parom.....	7
2.3.1.1.1.	Ekstrakcija.....	7
2.3.1.1.2.	Adsorpcija.....	8
2.3.1.2.	Membranska pervaporacija.....	9
2.3.2.	Hemijske metode za uklanjanje fenola.....	9
2.3.2.1.	Hemijska oksidacija.....	9
2.3.2.2.	Elektrohemijska oksidacija.....	10
2.3.2.3.	Fotokatalitička oksidacija.....	11
2.3.3.	Biološke metode za uklanjanje fenola.....	11
2.3.4.	Enzimске metode za uklanjanje fenola.....	12
2.4.	ORGANSKE BOJE	13
2.4.1.	Azo boje.....	15
2.5.	UKLANJANJE ORGANSKIH BOJA	15
2.6.	METODE ZA DEGRADACIJU ORGANSKIH BOJA	16
2.6.1.	Biološke metode za degradaciju boja.....	17
2.6.2.	Hemijske metode za degradaciju boja.....	17
2.6.3.	Fizičke metode za uklanjanje boja.....	17
2.6.4.	Enzimске metode za degradaciju boja.....	18
2.7.	PEROKSIDAZE ZA OKSIDACIJE FENOLA I DEGRADACIJE SINTETSKIH BOJA	18
2.7.1.	Mehanizam delovanja peroksidaza prilikom uklanjanja fenola.....	18
2.7.2.	Mehanizam delovanja peroksidaza prilikom degradacije boja.....	19
2.8.	PEROKSIDAZE	20
2.8.1.	Peroksidaza iz rena.....	21
2.8.1.1.	Strukturne karakteristike peroksidaze iz rena.....	21
2.8.1.2.	Karakteristike peroksidaze iz rena.....	22
2.8.1.3.	Katalitički mehanizam peroksidaze iz rena.....	23
2.8.1.4.	Eseji za određivanje aktivnosti peroksidaze iz rena.....	24
2.8.1.5.	Primena peroksidaze iz rena.....	25
2.8.2.	Peroksidaze iz gljive bele truleži.....	26
2.8.2.1.	Lignin-peroksidaza iz gljive bele truleži.....	26
2.8.2.2.	Strukturne karakteristike lignin-peroksidaze.....	27
2.8.2.3.	Osobine lignin-peroksidaze.....	28
2.8.2.4.	Katalitički mehanizam lignin-peroksidaze.....	28
2.8.2.5.	Eseji za određivanje aktivnosti lignin-peroksidaze.....	29

2.8.2.6.	Primena lignin-peroksidaze.....	30
2.9.	IMOBILIZACIJE ENZIMA	30
2.9.1.	<i>Aktivnost enzima.....</i>	31
2.9.2.	<i>Stabilnost enzima.....</i>	32
2.9.3.	<i>Selektivnost enzima.....</i>	32
2.9.4.	<i>Metode imobilizacije.....</i>	32
2.9.4.1.	Adsorpcija.....	33
2.9.4.2.	Kovalentno vezivanje.....	34
2.9.4.3.	Zarobljavanje unutar matriksa .....	34
2.9.4.4.	Umrežavanje.....	34
2.9.5.	<i>Nosači za imobilizaciju enzima.....</i>	35
2.9.5.1.	Organski nosači .....	36
2.9.5.2.	Biopolimeri .....	36
2.9.5.2.1.	Alginat.....	36
2.9.5.2.2.	Hemijska struktura alginata .....	36
2.9.5.2.3.	Fizičko-hemijske osobine alginata.....	37
2.9.5.2.4.	Hidrogelovi .....	38
2.9.5.2.5.	Modifikacija alginata.....	39
2.9.5.2.6.	Primena alginata.....	41
2.9.5.3.	Sintetski organski polimeri .....	43
2.9.5.4.	Neorganski nosači .....	45
2.9.5.4.1.	Sepiolit.....	46
2.9.6.	<i>Kinetika imobilizovanih enzima.....</i>	47
2.9.7.	<i>Primena imobilizovanih enzima .....</i>	49

### 3. MATERIJALI I METODE 50

3.1.	MATERIJAL	50
3.1.1.	<i>Oprema.....</i>	50
3.1.2.	<i>Hemikalije.....</i>	51
3.2.	ANALITIČKE METODE	51
3.2.1.	<i>Određivanje aktivnosti slobodne peroksidaze iz rena u slučaju imobilizacije na modifikovanom alginatu.....</i>	51
3.2.2.	<i>Određivanje aktivnosti peroksidaze iz rena imobilizovane na modifikovanom alginatu.....</i>	51
3.2.3.	<i>Određivanje aktivnosti slobodne peroksidaze iz rena u slučaju imobilizacije na makroporoznom kopolimeru .....</i>	51
3.2.4.	<i>Određivanje aktivnosti peroksidaze iz rena imobilizovane na makroporoznom kopolimeru</i> 52	
3.2.5.	<i>Određivanje aktivnosti slobodne peroksidaze iz rena u slučaju imobilizacije na sepiolitu..</i>	52
3.2.6.	<i>Određivanje aktivnosti imobilizovane peroksidaze iz rena na sepiolitu.....</i>	52
3.2.7.	<i>Određivanje aktivnosti ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom imobilizovanih na modifikovanom alginatu.....</i>	52
3.3.	KARAKTERIZACIJA PEROKSIDAZE IZ RENA	52
3.3.1.	<i>Određivanje pH optimuma.....</i>	52
3.3.2.	<i>Ispitivanje temperaturne stabilnosti.....</i>	52
3.3.3.	<i>Ispitivanje stabilnosti u organskom rastvaraču .....</i>	53
3.3.4.	<i>Određivanje kinetičkih parametara .....</i>	53
3.3.5.	<i>Određivanje temperaturnog optimuma .....</i>	53
3.3.6.	<i>Studije višestruke upotrebe i stabilnosti imobilizovanog enzima tokom skladištenja .....</i>	53
3.4.	OKSIDACIJA PEROKSIDAZE IZ RENA	53

3.5.	KARAKTERIZACIJA LIGNIN-PEROKSIDAZE	53
3.5.1.	<i>Određivanje pH optimuma</i> .....	54
3.6.	MODIFIKACIJA ALGINATA	54
3.6.1.	<i>Perjodatna oksidacija</i> .....	54
3.6.2.	<i>Reduktivna aminacija</i> .....	54
3.7.	KARAKTERIZACIJA MODIFIKOVANOG ALGINATA	54
3.7.1.	<i>Snimanje UV-VIS spektara</i> .....	54
3.7.2.	<i>Snimanje FTIR spektara</i> .....	54
3.8.	SINTEZA MAKROPOROZNIH KOPOLIMERA	55
3.8.1.	<i>Aktivacija kopolimera</i> .....	55
3.8.2.	<i>Titracija amino grupa</i> .....	55
3.8.3.	<i>Karakterizacija kopolimera</i> .....	55
3.9.	SEPIOLIT	55
3.9.1.	<i>Priprema sepiolita</i> .....	56
3.10.	IMOBILIZACIJA PEROKSIDAZE IZ RENA NA MODIFIKOVANOM ALGINATU	56
3.11.	IMOBILIZACIJA ČELIJSKIH ZIDOVA SA LIGNIN-PEROKSIDAZOM NA MODIFIKOVANOM ALGINATU	56
3.12.	IMOBILIZACIJA PEROKSIDAZE IZ RENA NA MAKROPOROZNIH KOPOLIMERIMA	56
3.12.1.	<i>Imobilizacija na kopolimeru aktiviranom glutaraldehydom</i> .....	56
3.12.2.	<i>Imobilizacija peroksidaze iz rena oksidovane natrijum-perjodatom na kopolimeru</i> .....	57
3.13.	IMOBILIZACIJA OKSIDOVANE PEROKSIDAZE IZ RENA NA SEPIOLITU	57
3.14.	UKLANJANJE FENOLA	57
3.15.	DEGRADACIJA ORGANSKIH BOJA	58
<b>4.</b>	<b>CILJEVI DOKTORSKE DISERTACIJE</b>	<b>58</b>
<b>5.</b>	<b>REZULTATI I DISKUSIJA</b>	<b>59</b>
5.1.	MODIFIKACIJA ALGINATA	59
5.2.	IMOBILIZACIJA PEROKSIDAZE IZ RENA U MODIFIKOVANOM ALGINATU	61
5.3.	OPTIMIZACIJA USLOVA ZA UKLANJANJE FENOLA KORIŠĆENJEM PEROKSIDAZE IZ RENA IMOBILIZOVANE U MODIFIKOVANOM ALGINATU	62
5.4.	IMOBILIZACIJA ČELIJSKIH ZIDOVA SA LIGNIN-PEROKSIDAZOM NA MODIFIKOVANOM ALGINATU	70
5.4.1.	<i>Određivanje specifične aktivnosti imobilizovanih čelijskih zidova sa lignin-peroksidazom u modifikovanom alginatu</i> .....	71
5.4.2.	<i>Određivanje optimalne pH vrednosti imobilizovanih čelijskih zidova sa lignin-peroksidazom u modifikovanom alginatu</i> .....	71
5.5.	DEKOLORIZACIJA BOJA KORIŠĆENJEM ČELIJSKIH ZIDOVA SA LIGNIN-PEROKSIDAZOM IMOBILIZOVANIH U MODIFIKOVANOM ALGINATU	72
5.6.	PONOVNA UPOTREBA ČELIJSKIH ZIDOVA SA LIGNIN-PEROKSIDAZOM IMOBILIZOVANIH NA MODIFIKOVANOM ALGINATU ZA DEKOLORIZACIJU BOJA	73
5.7.	SINTEZA I KARAKTERIZACIJA MAKROPOROZNIH KOPOLIMERA	75
5.8.	IMOBILIZACIJA PEROKSIDAZE IZ RENA NA MAKROPOROZNIH KOPOLIMERIMA	77
5.9.	ISPITIVANJE STABILNOSTI PEROKSIDAZE IZ RENA IMOBILIZOVANE NA MAKROPOROZNIH KOPOLIMERIMA	80
5.10.	KINETIČKE STUDIJE PEROKSIDAZE IZ RENA IMOBILIZOVANE NA MAKROPOROZNIH KOPOLIMERIMA	82
5.11.	OPERATIVNA STABILNOST PEROKSIDAZE IZ RENA IMOBILIZOVANE NA MAKROPOROZNIH KOPOLIMERIMA	83
5.12.	UKLANJANJE FENOLA IZ ŠARŽNOG REAKTORA PEROKSIDAZOM IZ RENA IMOBILIZOVANOM NA MAKROPOROZNIH KOPOLIMERIMA	85
5.13.	IMOBILIZACIJA PEROKSIDAZE IZ RENA NA SEPIOLITU	88
5.14.	ISPITIVANJE STABILNOSTI PEROKSIDAZE IZ RENA IMOBILIZOVANE NA SEPIOLITU	90
5.14.1.	<i>Temperaturni optimum</i> .....	90

5.14.2.	<i>Termostabilnost</i> .....	90
5.14.3.	<i>pH optimum</i> .....	92
5.15.	OPERATIVNA STABILNOST PEROKSIDAZE IZ RENA IMOBILIZOVANE NA SEPIOLITU	93
6.	<b>ZAKLJUČAK</b>	<b>95</b>
7.	<b>LITERATURA</b>	<b>98</b>

# 1. Uvod

U oblasti zaštite životne sredine još uvek je najveći izazov tretiranje industrijskih otpadnih voda pre njihovog ispuštanja u okolinu. Povećana industrijska proizvodnja dovodi do stvaranja velike količine otpadnih materija koje se direktno ispuštaju u vodene tokove, čime ih zagađuju i onesposobljavaju razvoj vodenih ekosistema. Ukoliko zagađene vode bez prethodnog tretiranja završe u prirodnom okruženju, ozbiljne ekološke posledice osetiće pre svega živi svet koji nastanjuje vodena prostranstva, a u velikoj meri će se odraziti i na ljudsku populaciju i njihovo zdravlje (1). Povećana industrijska proizvodnja (proizvodnja uglja, goriva, plastike i papira, zatim drvna, metalna, tekstilna i hemijska industrija, kao i industrija boja i lakova) dovodi do generisanja velike količine hemijskog otpada, koji može sadržati različite tipove zagađivača (2,3). Među pomenutim zagađivačima značajno mesto zauzimaju aromatična jedinjenja, pre svega fenoli, aromatični amini i halogeni (1,4).

Fenolna jedinjenja smatraju se jednim od najvećih zagađivača vodenih prostranstava. U vodene ekosisteme se svakodnevno ispuštaju velike količine fenola, koje su toksične čak i u veoma niskim koncentracijama (manjim od 0,005 mg/L) (2). Upravo zbog velike toksičnosti, mutagenih i kancerogenih osobina, pažnja velikog dela naučne zajednice je usmerena pre svega na fenole i njihovo uklanjanje iz vodenih sistema. Agencija za zaštitu životne sredine je propisala striktno uslove pod kojima se ovi zagađivači mogu ispuštati u prirodnu okolinu i označila fenol kao jedan od prioritarnih zagađivača, čije se koncentracije moraju strogo kontrolisati (4).

Pored fenola veliki zagađivači životne sredine su i sintetske boje, čija se koncentracija povećava sa razvojem pre svega tekstilne industrije. Njihovo nekontrolisano i neefikasno ispuštanje doprinosi dodatnom zagađenju već kontaminiranih vodenih tokova. Tekstilne boje je neophodno tretirati pre ispuštanja u vodenu sredinu, zbog njihove složene hemijske strukture i lakog prevođenja u opasne proizvode (5,6).

U cilju eliminacije ovih opasnih zagađivača iz otpadnih voda razvijene su različite metode koje su klasifikovane u tri velike grupe: fizičke, hemijske i biološke metode (1,7-9). Konvencionalne metode su pokazale brojne mane u pogledu niske efikasnosti, visoke cene samog procesa, primenljivosti na visokom nivou, kao i postizanja zadovoljavajućeg kvaliteta prečišćenih otpadnih voda (7,8). Upravo iz navedenih razloga se sve više radi na razvoju enzimskih metoda koje bi se mogle efikasno primeniti za procese uklanjanja fenola i fenolnih jedinjenja iz industrijskih otpadnih tokova (8,9). Prednosti pomenute metode se ogledaju u velikoj selektivnosti i efikasnosti, ali se kao najveći nedostatak za široku primenu navodi cena samog procesa, kao i dostupnost enzima za korišćenje na industrijskom nivou (10).

Mnoge istraživačke grupe su radile na razvijanju metoda za otklanjanje fenolnih zagađivača iz otpadnih voda i tom prilikom koristile široki spektar enzima. Najznačajnije mesto zauzele su su peroksidaze, pre svega peroksidaza iz rena (*Armoracia rusticana*, HRP) (3,11,12). Ona je pokazala visoku efikasnost prilikom uklanjanja velikog broja aromatičnih jedinjenja (3). Njena katalitička aktivnost zasniva se na oksidaciji fenolnih jedinjenja u prisustvu vodonik-peroksida. Kao proizvodi ove oksidacije formiraju se fenoksi radikali, koji mogu da se agregiraju na različite načine gradeći u vodi nerastvorne polimere. Daljom filtracijom ili sedimentacijom vrši se lako izdvajanje dobijenih agregata (3).

Peroksidaza iz rena je pokazala specifičnost prema čak 30 različitih aromatičnih jedinjenja, bilo da su oni fenolne prirode ili da su u pitanju drugačiji oblici aromatičnih amina, pri čemu je efikasnost njihove eliminacije iz vodenih sistema iznosila oko 99% (2,9). Primena ovog enzima je ograničena zbog njegove visoke cene, male stabilnosti tokom dužeg vremenskog perioda i mogućnosti regeneracije (3).

Za uklanjanje sintetskih boja primenu su, pored peroksidaze iz rena, pronašle i peroksidaze izolovane iz gljiva: mangan- i lignin-peroksidaza. Obe peroksidaze su pokazale odlične rezultate prilikom degradacije različitih tekstilnih boja (13–15).

Pri upotrebi peroksidaza u uklanjanju tekstilnih boja dolazi do inaktivacije enzima, koja nastaje kao posledica interakcije fenoksi radikala i aktivnog mesta na molekulu enzima. Poboljšana aktivnost enzima i smanjenje cene celokupnog procesa se može postići primenom različitih pristupa, među kojima je najznačajnije mesto zauzela imobilizacija enzima. Kao glavne prednosti imobilizacije enzima mogu se navesti povećana stabilnost, lako odvajanje iz reakcione smeše, mogućnost ponovne upotrebe, kao i povećana katalitička aktivnost i smanjena verovatnoća kontaminacije (16). Biokatalizatori dobijeni imobilizacijom mogu da se upotrebljavaju više puta u reakcijama oksidacije fenolnih jedinjenja, čime se smanjuje i cena celokupnog procesa (3).

Metode koje se mogu koristiti za imobilizaciju enzima su podeljene u četiri grupe: adsorpcija, kovalentno vezivanje, umrežavanje i zarobljavanje unutar čvrstog matriksa (17). Svaka od ovih metoda ima svoje prednosti i mane, i može se sa većom ili manjom efikasnošću primeniti u ove svrhe. Kao nosači u enzimskim imobilizacijama koriste se prirodni polimeri, kao što su alginat, pektin, hitozan i agaroz (18–21), zatim magnetne kuglice (22), poliakrilamidni i silika gelovi (23,24), aminopropilne staklene kuglice (25) itd.

Prvi nosači primenjeni za imobilizaciju enzima su bili neorganski nosači. Kao njihove najveće prednosti pri upotrebi u industrijskim procesima mogu se navesti dobra mehanička tvrdoća, stabilnost na povišenim temperaturama i otpornost prema organskim rastvaračima. Među mnogobrojnim neorganskim nosačima ističu se silika gelovi, aktivni ugalj, magnetit, kaolinit i sepiolit. Svi su uspešno iskorišćeni kao adsorbenti zahvaljujući njihovoj niskoj ceni, širokoj rasprostranjenosti i svojstvima pogodnim za ovu primenu. Nosači bazirani na silikatu su najviše upotrebljeni u procesima enzimske imobilizacije, zbog njihove porozne strukture i odgovarajuće morfologije koja omogućuje ostvarivanje enzim-ligand interakcija (26). Uz sve navedeno, oni su hemijski inertni i mehanički stabilni, pa su pogodni za industrijske procese (26,27). Sepiolit, neorganski prirodni mineral silikatne prirode, može se vrlo efikasno koristiti za imobilizaciju enzima, ali je njegova glavna mana curenje enzima sa površine nosača (27).

Biopolimeri, polimeri prirodnog porekla, pokazuju veliki potencijal u procesima imobilizacije enzima. Biodegradabilnost, biokompatibilnost i netoksičnost su samo neke od osobina koje se navode kao glavne prednosti prirodnih polimera (17). Na površini ovih materijala prisutne su različite funkcionalne grupe, najčešće hidrosilna, amino ili keto grupa (17). One omogućuju, na prvom mestu, modifikaciju polimera, a potom i imobilizaciju mnogobrojnih enzima putem adsorpcije ili kovalentnog vezivanja (17). Najčešće korišćeni biopolimer je alginat, polisaharid izolovan iz braon algi, koji pokazuje veliki potencijal za formiranje hidrogelova (28). Trodimenzionalne mreže sastavljene od hidrofilnih polimera sa velikim procentom vode predstavljaju gradivne jedinice svakog hidrogela. Primenom hemijskih ili enzimskih metoda, hidrogelovi su veoma uspešno iskorišćeni za enkapsulacije enzima (29).

Makroporozni kopolimeri dobijeni umrežavanjem glicidil metakrilata (GMA) i etilen glikol dimetakrilata (EGDMA) su uspešno korišćeni kao nosači za imobilizaciju enzima (21,30). Velika specifična površina i prisustvo epoksi grupa olakšavaju vezivanje enzima, smanjujući time mogućnost njegove difuzije sa površine matriksa (31). Poroznost se ističe kao jedna od glavnih prednosti ovih nosača, a može se kontrolisati podešavanjem uslova prilikom njihove sinteze.

## 2. Teorijski deo

Smatra se da je jedan od najbitnijih ekoloških problema, kojima je danas izloženo celokupno čovečanstvo, zagađenje vodenih ekosistema (32). Uprkos velikoj rasprostranjenosti vodenih površina na planeti, najveći procenat voda se nalazi u obliku morske vode u okeanima (97,2%) ili je zarobljeno u glečerima (2,15%), dok samo jedan mali procenat (0,65%) koristi čovek (33). Povećana industrijska proizvodnja dovodi do generisanja velikih količina toksičnih organskih materija koje ulaze u vodene tokove, zagađujući i ugrožavajući vodene resurse širom sveta. Znatna procenat različitih zagađivača ispušta se kao industrijski otpad iz postrojenja bez prethodnog tretiranja direktno u vodene sisteme ili pronalazi svoj put do njih. Najvećim industrijskim zagađivačima smatraju se fenoli, fenolna jedinjenja sa azotom i njihovi derivati, kao i različite organske boje (34). Ova jedinjenja spadaju u grupu toksičnih, štetnih zagađivača, koji se jako teško mogu eliminisati kada jednom uđu u vodene tokove.

Procena toksičnosti otpadnih voda, izvora, kao i zagađenih područja i samih hemikalija koje su u upotrebi je od velikog značaja, kako bi se izbegli negativni uticaji pre svega na žive organizme, a potom i na celokupno zagađenje životne sredine. U cilju procene ekoloških rizika razvijene su različite metode (analitičke metode – HPLC i GC/MS) koje se sa većom ili manjom efikasnošću mogu koristiti u ove svrhe (35). Pored navedenih metoda, koje su jako skupe i čija je upotreba ograničena, u poslednje vreme sve veću primenu pronalaze i različiti bioeseji, čijom se upotrebom ubrzavaju procesi procene ekoloških rizika i otklanjaju sve prethodno navedene mane analitičkih metoda. Pomoću ovih metoda ustanovljeno je da su antibiotici, teški metali, nanočestice, pesticidi i insekticidi, kao i industrijske otpadne vode i mikotoksini među najčešćim oblicima zagađenja. Svi oni su organske prirode ili u svom sastavu mogu imati neki oblik fenolnog jedinjenja.

### 2.1. Fenoli i fenolni zagađivači životne sredine

Hemijska, tekstilna, petrohemijska i farmaceutska industrija generišu otpadne vode sa visokim procentom različitih fenolnih komponenti, čije koncentracije u vodi mogu dostizati i nekoliko hiljada ppm, u zavisnosti od izvora iz kog je otpadna voda ispuštena (16). Procenjeno je da 10 miliona tona različitih fenolnih zagađivača godišnje završi u prirodi (16).

Hlorovana fenolna jedinjenja kao što su hlorofenol, 2,4-dihlorofenol i 2,4,6-trihlorofenol smatraju se najčešćim zagađivačima voda. Fenol, hlorofenol, katehol, nitrofenol, hlorokatehol, kao i različiti alkil-fenoli navode se kao najčešće prisutni oblici fenolnih jedinjenja u industrijskim otpadnim vodama (5). Ovi derivati fenola se koriste kao intermedijeri u sintezi petrohemijskih proizvoda, pesticida, eksploziva, insekticida, boja, tekstila itd., a njihovo ispuštanje u životnu sredinu može da ostavi posledice ne samo na celokupnu floru i faunu, već i na kompletno čovečanstvo (5).

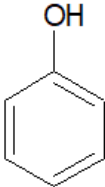


Nekontrolisano ispuštanje fenolnih otpadnih voda u životnu sredinu može da dovede do zagađenja zemljišta, kako površinskih tako i i podzemnih voda, a samim tim može da ugrozi i život na Zemlji. Ukoliko se fenolne otpadne vode ispuste u životnu sredinu bez prethodnog tretiranja, uzrokuju pojavu mnogobrojnih zdravstvenih problema. Izloženost fenolnim jedinjenjima u velikim dozama može da dovede do respiratornog zastoja, kome, slabosti u mišićima i tremora (5). Iz navedenih razloga, Agencija za zaštitu životne sredine (Environmental Protection Agency, EPA) je propisala maksimalnu dozvoljenu koncentraciju fenolnih jedinjenja u vodenim sistemima (1 ppm) (5,16). Koncentracija fenola u pijaćoj vodi ne sme da pređe 1 ppb, a sve koncentracije veće od navedene mogu da izazovu ozbiljne zdravstvene probleme kod svih živih organizama (16). Sva jedinjenja fenolne prirode označena su kao prioritetni zagađivači, i upravo iz tih razloga zaokupljaju posebnu pažnju velikog dela naučne zajednice.

### 2.1.1. Osobine fenolnih jedinjenja

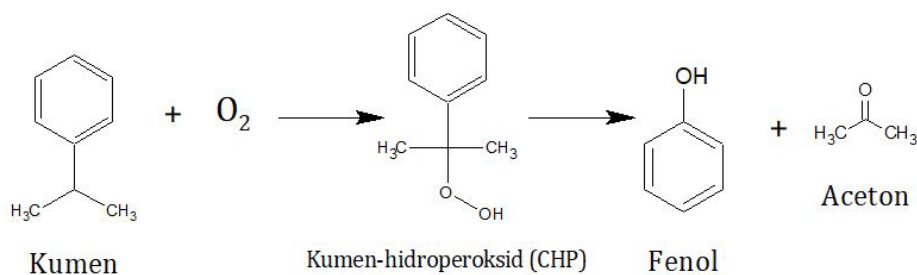
Nemački hemičar Runge je prvi izolovao fenol iz katrana davne 1834. godine (36). Fenol spada u grupu aromatičnih jedinjenja. Na sobnoj temperaturi i normalnom pritisku nalazi se u obliku kristala bele boje, koji zbog prisustva nečistoća za veoma kratko vreme potamne. Rastvara se u organskim rastvaračima kao što su etil alkohol, etar ili benzen, dok u vodi pokazuje ograničenu rastvorljivost i ponaša se kao slaba kiselina (36). U Tabeli 1 prikazane su neke fizičke i hemijske osobine fenola.

**Tabela 1.** Fizičke i hemijske osobine fenola

Strukturna formula	
Molekulska formula	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH
Molekulska masa (g/mol)	94,11
Temperatura topljenja (°C)	40,9
Temperatura ključanja (°C)	181,75
Rastvorljivost u vodi (g/100 mL)	9,3 g (fenola) / 100 mL (H <sub>2</sub> O)
pKa	9,89
Gustina (g/mL)	1,07

### 2.1.2. Proizvodnja fenola

Godišnja proizvodnja fenola iznosi oko 6 miliona tona, a taj broj se konstantno uvećava (36). Oko 95% ukupnog fenola na svetu proizvede se primenom Hokovog procesa – procesa koji se sastoji od tri koraka i podrazumeva simultanu sintezu fenola i acetona iz benzena (Slika 1). U prvom koraku se odvija alkilovanje benzena i građenje kumena kao intermedijernog proizvoda (36). Dalja oksidacija kumena kiseonikom iz vazduha, dovodi do formiranja kumenhidroperoksida (CHP), posredstvom slobodno-radikalskog mehanizma. Cepanje dobijenog hidroperoksida na fenol i aceton odvija se u prisustvu sumporne kiseline kao katalizatora (36,37).



*Slika 1.* Reakcija proizvodnje fenola iz kumena

Industrijsku sintezu fenola je moguće ostvariti i korišćenjem hlوروبenzena ili toluena, a može se dobiti i prilikom prerade uglja (36). Fenol se emituje sagorevanjem duvana i fosilnih goriva, dok je zajedno sa svojim mnogobrojnim derivatim prisutan i u različitim proizvodima, kao što su čaj, vino, dimljena hrana itd. (36). Razgradnjom otpada životinjskog porekla i fotooksidacijom benzena nastaju određene količine isparljivog fenola, koje najčešće završavaju u vazduhu (36).

Bakterije imaju veliku sposobnost razgradnje fenolnih jedinjenja, što značajno smanjuje vreme njegovog zadržavanja u okolini. Procenjeno je da se u zemljištu fenol može zadržati do 5 dana, u vodi 9 dana, dok je period njegove prisutnosti u vazduhu mali i iznosi svega 1–2 dana (36).

### 2.1.3. Uticaj fenola na zdravlje ljudi

Fenol značajno utiče na zdravlje ljudi koji dolaze u kontakt sa ovom supstancom tokom proizvodnje ili transporta. Ukoliko se osoba tokom dugotrajne upotrebe izloži dejstvu fenolnog jedinjenja, bilo udisanjem, kontaktom sa očima ili kožom, može doći do pojave ozbiljnih opekotina, dok cijanoza, konvulzije, koma, a u nekim slučajevima čak i smrt, mogu uslediti prekomernim izlaganjem (36). Fenol ostavlja posledice i utiče na funkciju brojnih unutrašnjih organa, pre svega jetre, bubrega, pluća i vaskularnog sistema (36). Ustanovljeno je da doza od 1 g fenola uneta u ljudski organizam može biti fatalna (36).

### 2.1.4. Primena fenola

Još je 1865. godine otkrivena dezinfekciona sposobnost čistog fenola, dok je njegovo germicidno dejstvo povezano sa mogućnošću denaturacije proteina (36). Fenol se koristi u proizvodnji različitih krema, u veterini kao antiseptik i želudačni anestetik. Može se koristiti kao reagens u hemijskim analizama, u rafinerijama kao ekstrakciono sredstvo, a u petrohemijskoj industriji kao primarni intermedijer (36). Čak 35% fenola se upotrebi prilikom proizvodnje fenolnih smola, kao što su fenol-formaldehidne smole (Bakelit) – jeftine, termoreaktivne smole koje su našle primenu u građevinskoj, automobilskoj industriji, kao i u proizvodnji različitih uređaja (36).

Derivati fenola, kao što su anilin, različiti alkilfenoli, hlorofenoli, mogu se primeniti u proizvodnji eksploziva, đubriva, boja, tekstila, plastike, antioksidanata i u mnoge druge svrhe (36). U farmaceutskoj industriji koristi se kao jedna od komponenti za sintezu nekih farmaceutskih proizvoda, npr. aspirina (36).

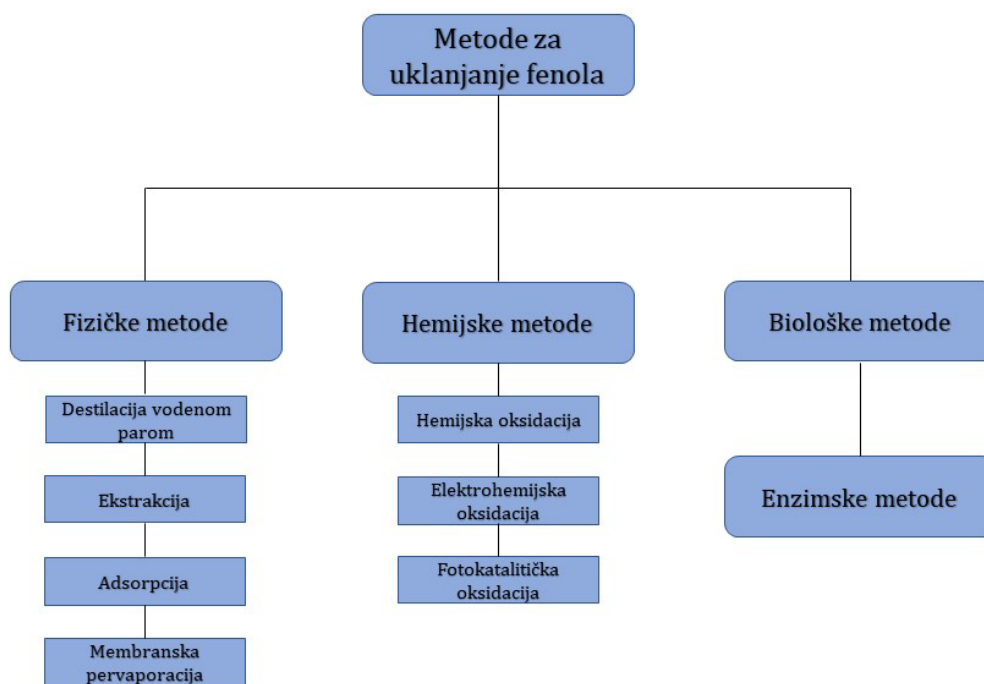
## 2.2. Uklanjanje fenola i fenolnih jedinjenja

Fenolna jedinjenja su u industrijskim otpadnim vodama prisutna u različitim koncentracijama.

Otpadne vode iz rafinerija mogu da sadrže 6–500 mg/L fenola, iz industrije prerade uglja 9–6800 mg/L, dok one iz petrohemijske industrije mogu imati 2,8–1220 mg/L fenola (36). Od 0,1 do 1600 mg/L fenolnih zagađivača potiče iz drugih industrijskih izvora (farmaceutska, drvena i papirna industrija, industrija boja i tekstila) (36). Fenolom zagađene otpadne vode ne smeju se bez prethodnog tretiranja ispustiti u životnu sredinu, pre svega zbog velike toksičnosti ovog jedinjenja. Upravo iz tog razloga neophodno je razviti procese za uklanjanje fenola i fenolnih jedinjenja iz otpadnih tokova.

## 2.3. Metode za uklanjanje fenola

Eliminacija toksičnih fenolnih zagađivača iz otpadnih voda se može ostvariti primenom različitih metoda koje su klasifikovane u tri velike grupe: fizičke, hemijske i biološke metode (Slika 2).



Slika 2. Metode za uklanjanje fenolnih jedinjenja

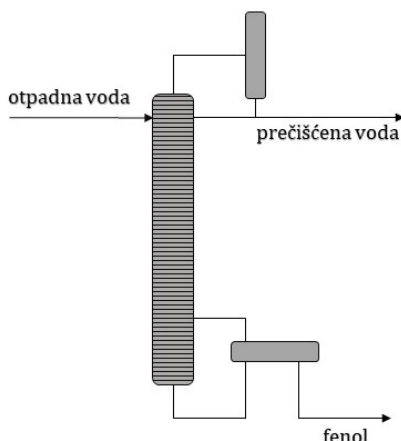
### 2.3.1. Fizičke metode za uklanjanje fenola

Tradicionalne metode koje se najviše koriste u procesu uklanjanja fenola su adsorpcija, destilacija i ekstrakcija. Izbor metode uglavnom zavisi od koncentracije fenola prisutnog u vodi.

### 2.3.1.1. Destilacija vodenom parom

Kada je fenol prisutan u vodi u tečnom obliku, on se u odgovarajućoj meri meša sa njom, što isključivo zavisi od temperature. Na sobnoj temperaturi 10–70% (w/w) fenola se meša sa vodom, dok je fenol u potpunosti rastvoran na povišenim temperaturama (preko 68 °C). Ukoliko se poveća udeo soli prisutnih u vodi, povećaće se i mešljivost fenola sa vodom (36).

Za eliminaciju fenolnih jedinjenja iz vodenih tokova može se primeniti metoda destilacije vodenom parom, koja se pre svega bazira na isparljivosti fenola (Slika 3) (38). Nedostatak ovog postupka je često isušivanje voda koje su bogate ovim jedinjenjem (36).



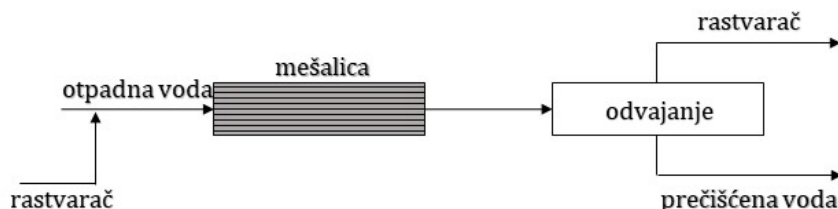
Slika 3. Kolona za destilaciju vodenom parom

Azeotropni sadržaj fenola u vodama, koje sadrže njegove visoke koncentracije, je oko 9,2% (w/w) (38). Zbog toga se za prečišćavanje voda bogatih fenolnim zagađivačima može koristiti i metoda azeotropne destilacije. Azeotropna frakcija se može odvojiti od vodene frakcije, koja se potom može reflukotovati do kolone (36,38).

Za praćenje zastupljenosti fenola u vodi i zemljištu može se primeniti istovremeno destilacija i ekstrakcija (38). Mana ove metode je koncentrovanje rastvora, bogatog fenolnim jedinjenjem, koje je neophodno, a nije primenljivo prilikom široke upotrebe u industrijskim procesima za prečišćavanje otpadnih voda (38).

#### 2.3.1.1.1. Ekstrakcija

Tradicionalna metoda koja se još uvek veoma intenzivno koristi prilikom eliminacije fenolnih jedinjenja iz vodenih sistema je ekstrakcija (Slika 4). Najčešće korišćeni rastvarači prilikom ekstrakcije su 1-heksanol, 1-heptanol i 1-oktanol, od kojih se poslednji pokazao kao najmanje efikasan prilikom uklanjanja fenola (39). Prednost ove metode je što može da se koristi za prečišćavanje voda u kojima je koncentracija fenola 1000 mg/L (38).



Slika 4. Šema ekstrakcione metode

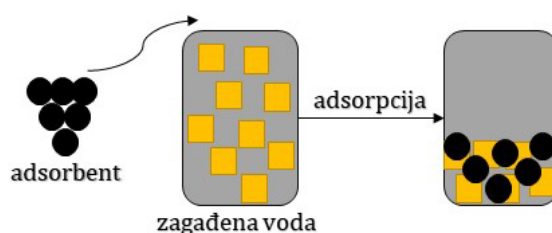
Pored klasične ekstrakcije, često korišćena metoda je i kontrastrujna ekstrakcija. Kao ekstrakciono sredstvo u ovom slučaju se koristi kumen (38). U ovom procesu za ekstrakcije se koristi kolona, na kojoj može zaostati 20–500 mg/L fenolnog jedinjenja (38).

Ekstrakciju fenola je moguće ostvariti i primenom mešavina različitih rastvarača kao što su tributil-fosfat i heksan, 2-oktanol ili kerozin. Korišćenjem tributil-fenola može da se ukloni čak 90% fenola (38). Kada se u metodi tečno-tečne ekstrakcije za prečišćavanje vodenog sistema koji sadrži od 100 do 500 mg/L fenola, kao ekstrakciono sredstvo koristi kerozin, postiže se efikasnost uklanjanja fenola od 70% (38).

Među fizičkim metodama za eliminaciju fenolnih jedinjenja iz vodenih tokova, tečno-tečna ekstrakcija se može izdvojiti kao jedna od finansijski najpristupačnijih metoda (38). Takođe, ona ne spada u red destruktivnih metoda i omogućuje efikasnu regeneraciju fenola, ukoliko je on prisutan u koncentracijama većim od 50 mg/L (38).

### 2.3.1.1.2. Adsorpcija

U slučajevima kada je potrebno ukloniti veliku koncentraciju fenolnih jedinjenja u malim zapreminama vode, fizička tehnika koja se najviše koristi i pokazuje najveću efikasnost je adsorpcija (Slika 5) (1). Za prečišćavanje vode se najčešće kao adsorbens koristi aktivni uglj (AC). Postoje dve kategorije ovog adsorbensa: granularni i praškasti (1). Razlika između ova dva tipa aktivnog uglja je u tome što se nakon tretiranja granularni može lako regenerisati, dok se praškasti uglj ispušta zajedno sa vodom (38). Najveće prednosti adsorpcije na aktivnom uglju su: dobra efikasnost, visok kapacitet adsorpcije i niska operativna cena procesa. Mehanizam adsorpcije na aktivnom uglju može se podeliti na nekoliko koraka: adsorpcija u rastvoru, popunjavanje mikropora i adsorpcija u većim mikro- i mezoporama (38). Regeneraciju adsorbenta je moguće ostvariti ispiranjem etanolom, nakon uklanjanja fenola (38). Kao najveće mane ove konvencionalne metode za eliminaciju zagađivača navode se niska efikasnost, upravo zbog korišćenja samo jednog adsorbenta, i problemi novog zagađenja nastali akumulacijom otpada (38).



Slika 5. Šema adsorpcione metode

Efikasnost uklanjanja aromatičnih jedinjenja pomoću aktivnog uglja zavisi od mnogobrojnih faktora. Na prvom mestu nalazi se fizička priroda adsorbenta – struktura pora, prisustvo odgovarajućih funkcionalnih grupa, tip prekursora koji je korišćen za adsorpciju, kao i metoda koja je primenjena za pripremu uzorka. Drugi faktor koji značajno utiče na efikasnost uklanjanja fenola je priroda adsorbata, pre svega njegova rastvorljivost, pKa, polarnost, molekulska masa, veličina i prisustvo odgovarajućih funkcionalnih grupa na površini molekula. Koliko dobro će se odvijati sam proces adsorpcije nekog aromatičnog jedinjenja zavisi i od uslova (pH vrednosti sredine, jonske sile, koncentracije rastvora itd.) (36,38).

Primena adsorpcije na komercijalno dostupnom aktivnom uglju je ograničena zbog visoke cene ovog adsorbenta (1). U cilju postizanja veće ekonomičnosti procesa uklanjanja fenola adsorpcijom, primenjuju se adsorbenti na bazi aktivnog uglja, koji su dobijeni kao agrikulturni međuproizvodi iz palminog semena, pirinčane ljuske, drvenog uglja itd.

Veoma je važno obezbediti i efikasnu regeneraciju aktivnog uglja nakon procesa prečišćavanja otpadnih voda, upravo iz razloga što je adsorpcija fenola sama po sebi ireverzibilna.

Time bi se smanjila i cena samog procesa, a on učinio pogodnijim za širu upotrebu. Termalna regeneracija je vremenski vrlo ograničena i skupa, a konstantno izlaganje adsorbenta visokim temperaturama i čestim promenama temperature tokom zagrevanja i hlađenja može da dovede do gubitka uglja, čime se narušava struktura adsorbenta i on postaje nepogodan za nove reakcije adsorpcije (1).

### 2.3.1.2. Membranska pervaporacija

Uklanjanje organskih jedinjenja iz voda može da se ostvari i primenom relativno nove tehnike koja se bazira na razdvajanju višekomponentne tečne smeše isparavanjem kroz gustu, neporoznu membranu (36). Ova tehnika se zove membranska pervaporacija. Često se kao membrana za razdvajanje aromatičnih jedinjenja koristi polietarski-poliamidni blok kopolimer (PEBA) (36). Membrana odvaja vodu sa jedne strane i paru sa druge strane (36).

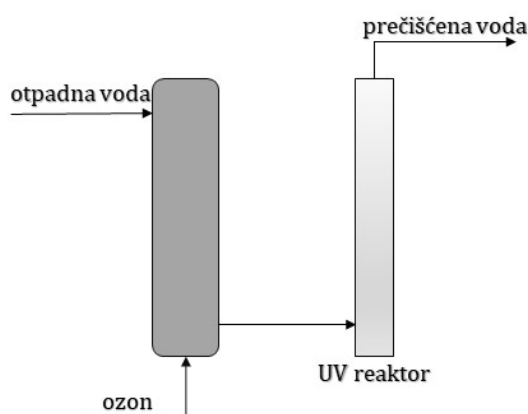
### 2.3.2. Hemijske metode za uklanjanje fenola

Eliminacija fenolnih zagađivača iz otpadnih voda se može ostvariti i primenom mnogobrojnih hemijskih metoda, među kojima se posebno izdvajaju oksidacione metode. Proces koji se sa visokom efikasnošću može koristiti za tretiranje fenolom zagađenih otpadnih voda je ozonizacija (1).

Iako se u poslednje vreme sve više pažnje posvećuje razvoju novih, unapređenih metoda za oksidaciju organskih jedinjenja, veliki problem predstavljaju štetni produkti koji nastaju tim putem. Efikasno uklanjanje ovih proizvoda je takođe od velikog značaja za očuvanje životne sredine. Upravo iz tog razloga, oksidacija se može smatrati samo jednom metodom u nizu složenih procesa eliminacije opasnih fenolnih zagađivača.

#### 2.3.2.1. Hemijska oksidacija

U procesima hemijske oksidacije najčešće se kao oksidaciona sredstva koriste ozon i vodonik-peroksid. Veliki potencijal za oksidaciju kako organskih, tako i neorganskih jedinjenja, pokazao je ozon, najjače oksidaciono sredstvo sa potencijalom primene u širokom opsegu pH vrednosti (Slika 6) (36). Katalitička ozonizacija ima ograničenu upotrebu pre svega zbog visoke cene proizvodnog procesa samog ozona, a potom i zbog njegove male rastvorljivosti u vodi i slabog oksidacionog potencijala kada su u pitanju stabilna organska jedinjenja (38). Bolja efikasnost u pogledu procenta uklonjenog fenola se može postići ukoliko se iskombinuju ozonizacija i zračenje (bilo UV-VIS ili korišćenjem titanijum-dioksida,  $TiO_2$ ) (1).



Slika 6. Šematski prikaz reaktora za ozonizaciju

Danas se sve više pažnje poklanja nano-katalizatorima na bazi metalnih oksida koji su pokazali visoku efikasnost uklanjanja fenolnih jedinjenja (40).

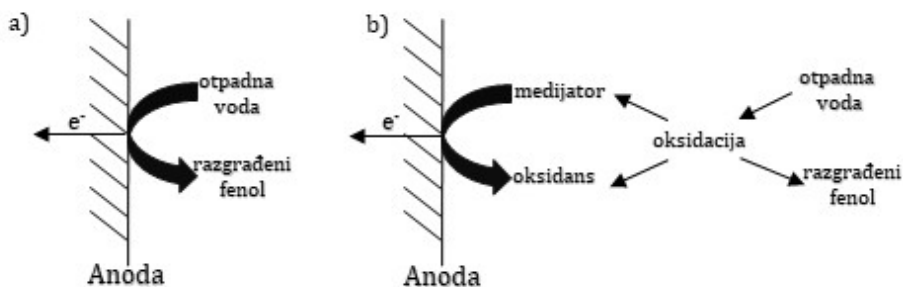
Ukoliko se za katalitičke ozonizacije upotrebe heterogeni katalizatori, kao što je na primer katalizator na bazi mangan- i aluminijum-oksida, oko 96% fenolnih zagađivača se može eliminisati iz otpadnih vodenih sistema (40,41).

Oksidaciono sredstvo, koje se pored ozona može koristiti za efikasno uklanjanje aromatičnih jedinjenja, je vodonik-peroksid. Ovaj hemijski agens ima mogućnost primene kako u baznim, tako i u kiselim uslovima (42). S obzirom da je reaktivnost vodonik-peroksida ograničena, da je oksidacija vrlo spora i nepotpuna, u cilju poboljšanja njegove oksidacione sposobnosti neophodno je kuplovati ga sa nekim katalizatorom (bilo homogenim ili heterogenim) (42). U pogledu ekonomičnosti samog procesa oksidacije, kao i jednostavnosti opreme i primene blagih reakcionih uslova, može se istaći Fentonova reakcija, koja je zasnovana na oksidaciji organskih jedinjenja u prisustvu vodonik-peroksida i neke soli gvožđa (II) (1). Ovaj konvencionalni pristup oksidacije u kiseloj sredini vodi građenju feri jona i OH• radikala, koji mogu dalje da oksiduju različita organska jedinjenja kao što je fenol (42).

Ukoliko se reakcija oksidacije odvija na sobnoj temperaturi, za reakciju sa fenolom neophodno je dodati višak  $H_2O_2$ , dok je na povišenim temperaturama (preko  $140\text{ }^\circ\text{C}$ ) potrebno obezbediti njegovo kontinualno dovodenje u sistem, kao i povišeni pritisak (42). Maciel sa saradnicima je pokazao da se fenol može potpuno oksidovati u Fentonovom procesu uz dodatak natrijum-hlorida (43). U poslednje vreme se oksidacija Fentonovom reakcijom više koristi kao predtretman u reakcijama mikrobne transformacije, kako bi se povećala produktivnost i smanjili troškovi samog procesa (41).

### 2.3.2.2. Elektrohemijaska oksidacija

Metoda slična hemijskoj oksidaciji fenolnih jedinjenja, koja se može primeniti pod istim ili sličnim uslovima je elektrohemijaska oksidacija (Slika 7). Ova metoda, za razliku od hemijske oksidacije, ne zahteva nikakve dodatne reagense, ali je neophodno obezbediti posebnu opremu čime se povećavaju kako ekonomski, tako i energetske troškovi procesa (42). Elektrohemijaska oksidacija obuhvata dva tipa procesa: direktne i indirektne anodne elektrooksidacione procese (44). Adsorpcija zagađivača na anodi predstavlja direktan proces elektrooksidacije, a kao materijali koji se koriste za izradu anode izdvajaju se dijamant dopiran borom (BDD), platina (Pt), olovo(IV)-oksid ( $PbO_2$ ) i kalaj(IV)-oksid ( $SnO_2$ ) (42). Kod indirektne elektrooksidacije organska jedinjenja se uklanjaju dejstvom hlora ili hipohlorita generisanih na anodi (42). Kada se uporede navedene metode, za primenu je pogodnija direktna anodna oksidacija jer ne zahteva velike količine hemikalija za anodne oksidacione procese niti je potrebno dodavanje kiseonika na katodama (41). Amado-Pina sa saradnicima je upoređivao dva procesa za konverziju fenolnih jedinjenja – elektrohemijasku elektrooksidaciju (EO) i kuplovani proces ozonizacije i elektrooksidacije ( $O_3$ -EO). Dobijeni rezultati su pokazali da je kuplovani proces dva puta brži od procesa EO (45).



Slika 7. Šematski prikaz elektrohemijske oksidacije: a) direktne i b) indirektne

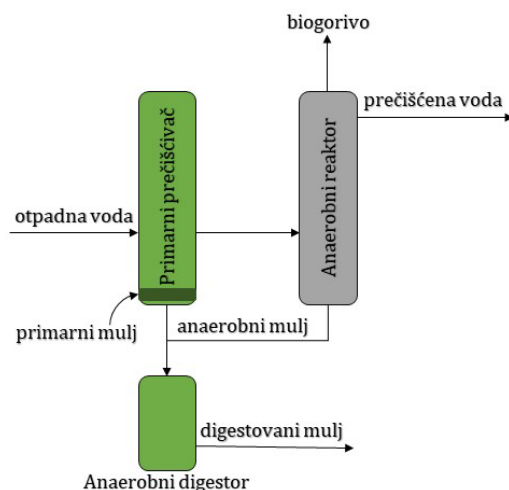
### 2.3.2.3. Fotokatalitička oksidacija

Proces fotokatalitičke oksidacije zasniva se na potpunoj degradaciji zagađivača, što nije slučaj kod drugih konvencionalnih metoda, gde se oni prevode u drugačije oblike. Kao poluprovodnici u fotokatalitičkim oksidacijama koriste se metalni oksidi i sulfidni materijali, među kojima se najčešće koristi titanijum-dioksid ( $\text{TiO}_2$ ) (41). Mala toksičnost, visoka fotostabilnost i niska cena samo su neke od osobina koje  $\text{TiO}_2$  čine dobrim poluprovodnikom u reakcijama oksidacije (41). Mane ovog fotokatalizatora su niska aktivnost i mala dodirna površina, a njegova ponovna upotreba je ograničena (46). U cilju prevazilaženja navedenih problema, istraživanja su usmerena ka modifikaciji kako same strukture  $\text{TiO}_2$ , tako i njegove površine (47). Rezultati ovih studija su pokazali da modifikovanje  $\text{TiO}_2$  obezbeđuje povećanu efikasnost prilikom konverzije fenolnih jedinjenja.

### 2.3.3. Biološke metode za uklanjanje fenola

Metode za eliminaciju zagađujućih organskih materija iz industrijskih otpadnih voda, koje su jeftine, lako dostupne i pre svega ekološke, su biološke metode (Slika 8) (41).

S obzirom da su visoke koncentracije fenola i fenolnih jedinjenja toksične za gotovo sve mikroorganizme, ove metode imaju ograničenu upotrebu (41). Mogu se sa zadovoljavajućom efikasnošću primeniti samo kada su fenolna jedinjenja prisutna u niskim koncentracijama (48). Najčešće se za uklanjanje aromatičnih jedinjenja upotrebljavaju različite bakterije, kvasci i gljive. Ovi organizmi koriste aromate kao izvor ugljenika i energije, kroz mehanizam zasnovan na dvostrukoj hidrosilaciji benzenovog prstena (1,41,49). Na ovaj način se formiraju kateholi, čijim daljim reakcijama orto- i meta-oksidativnog cepanja dolazi do stvaranja jedinjenja ugljenika – glavnog izvora energije kako u slučaju aerobnih tako i u slučaju anaerobnih organizama (1,49). Opisani proces predstavlja konvencionalni metod za biološko tretiranje zagađenih vodenih sistema sa jako dugim vremenskim periodom primene upravo zbog jednostavnosti samog procesa i prirodne mikrobiološke raspodele (41).



**Slika 8.** Šematski prikaz anaerobnog biološkog procesa

Prema do sada dostupnim podacima iz mnogobrojnih istraživanja, za biodegradaciju fenola mogu se koristiti različiti tipovi bioreaktora, ali je takođe moguća i upotreba specifičnih vidova biomase (50). Visoka efikasnost uklanjanja fenola (99%) postignuta je kada je za eliminaciju ovog jedinjenja iz otpadnih voda upotrebljen šaržni reaktor sa pokretnim slojem (51).

Iako su ograničenja bioloških metoda za tretiranje fenolom zagađenih otpadnih voda mnogobrojna različite studije su pokazale da se njihovom primenom može obezbediti uklanjanje fenola sa efikasnošću od približno 100% (52,53).

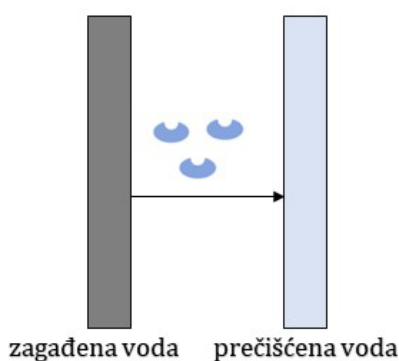


Neke od mana ovog procesa su: a) dugačak je vremenski period rasta mikrobne populacije kako bi se ona mogla primeniti za višestruku upotrebu prilikom uklanjanja fenola, b) što je zagađivač toksičniji, manja je stopa mikrobne degradacije i c) ukoliko su fenolna jedinjenja prisutna u visokim koncentracijama, dolazi do inhibicije rasta mikroorganizama (54–56).

#### 2.3.4. Enzimske metode za uklanjanje fenola

Još jedan tip metoda koje se mogu primeniti za eliminacije fenolnih zagađivača su enzimske metode, koje zaokupljaju sve veću pažnju široke naučne zajednice (Slika 9).

Enzimske metode nisu u potpunosti ni hemijske niti biološke, već pripadaju negde između. U ovim reakcijama za uklanjanje fenola iz otpadnih voda koriste se biokatalizatori, jedinjenja prirodnog porekla sa velikim potencijalom primene u ove svrhe (57).



**Slika 9.** Šematski prikaz enzimskog prečišćavanja otpadnih voda

Klibanov sa saradnicima je bio prvi koji je 1983. godine ukazao da se oksidacione reakcije u prisustvu enzima mogu iskoristiti kao dobra polazna tačka za razvoj metoda za uklanjanje toksičnih zagađivača iz otpadnih vodenih sistema (11,12). Pošto su gotovo sve do tad poznate metode za eliminaciju organskih jedinjenja iz otpadnih voda pokazale značajna ograničenja, radilo se na razvijanju tehnike koja bi se mogla primeniti na visokom nivou, a da se pri tome jako slabo ili nikako ne utiče na životnu sredinu (1). Pojavila se ideja da se u ovu svrhu iskoriste enzimi, koji imaju sposobnost da deluju na određene zagađivače dovodeći do njihovog taloženja ili transformacije u druge produkte (57). Enzimi katalizuju hemijske reakcije povećavajući brzinu reakcije preko milion puta. U tome se i ogleda važnost biokatalizatora u bilo kojoj biohemijskoj reakciji, uključujući i biodegradaciju fenola i fenolnih derivata (58). S obzirom da enzim katalizuje samo specifičnu reakciju pod određenim uslovima, ova njegova osobina može se iskoristiti za selektivno uklanjanje zagađivača iz otpadnih voda (59). Tretiranje otpadnih voda enzimskim metodama ima brojne prednosti kao što su uklanjanje veće količine fenolnog jedinjenja iz zagađene vode, primena u širokom opsegu pH vrednosti, kao i na različitim temperaturama, jednostavnost samog procesa i lakoća njegovog kontrolisanja (1,57). Visoka specifičnost, jednostavna upotreba i lako skladištenje samo su neke od osobina biokatalizatora koje su pogodne za efikasnu eliminaciju određenog zagađivača iz vodenog sistema (1). Neki enzimi kao što su lakaze ili peroksidaze mogu, pre svega zbog svoje visoke selektivnosti i efikasnosti, da se primene kao katalizatori procesa oksidacije aromatičnih jedinjenja, čak i kad su prisutna samo u tragovima (4).

## 2.4. Organske boje

Još u drevnom Egiptu su za bojenje tkanina korišćene različite boje dobijene iz prirodnih izvora. Uglavnom su to bile boje poreklom iz lekovitih biljaka. Npr. plava boja je dobijana od indigotina iz biljke sač (*Isatis tinctorum*), a crvena od mreke iz biljke broć (*Rubia tinctorum*) (60). Egipćani su posedovali izuzetno razumevanje u pogledu načina na koji su se te boje vezivale za odgovarajuće tkanine, pa su tako ustanovili da je za vezivanje crvene boje bilo potrebno dodati neku metalnu so. Njihova otkrića su ljudi upotrebljavali hiljadama godina kako bi ekstrahovali boje iz prirodnih izvora (insekti ili biljke) i koristili ih u različite svrhe (61). S obzirom da su se ove boje mogle dobiti u jako malim količinama, da im je intenzitet vremenom slabio, a da je sve veći napredak dovodio do rastuće potrebe za njihovim izolovanjem, pristupilo se razvoju sintetskih boja (62,63).

Otkriće prve sintetske boje može se pripisati hemičaru W. H. Perkinu koji je 1856. godine pokušavajući da pronađe antimalarični lek otkrio boju mauvein, poznatu još pod nazivom anilinska ljubičasta. Oksidacijom anilina i reakcijom sa etanolom dobio je ljubičasti rastvor, za koji je utvrdio da se bolje vezuje za svilu nego do tada dostupne prirodne boje. Bio je to početak razvoja industrijskih postrojenja za proizvodnju organskih boja (60).

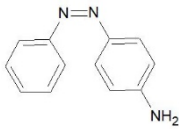
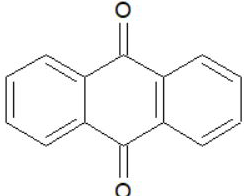
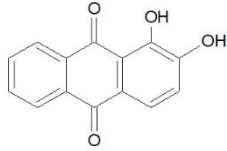
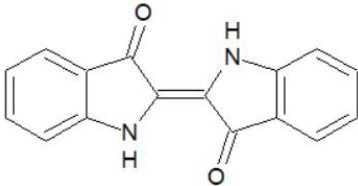
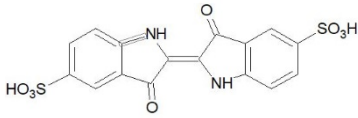
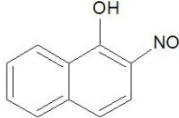
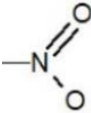
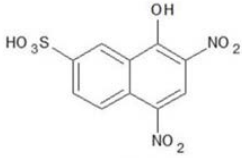
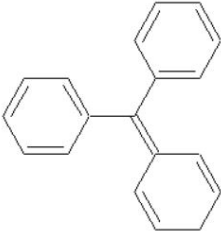
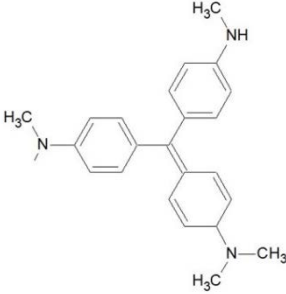
Rastuća industrijska proizvodnja i povećana potreba za bojama doveli su do masovne proizvodnje ovih složenih hemijskih jedinjenja koja u svojoj strukturi imaju zastupljene dve celine: auksohrome (deo molekula koji je rastvoran u vodi i za koji se vezuje materijal) i hromofore (deo molekula koji je odgovoran za obojenost jedinjenja) (64,65). Ova jedinjenja su napravljena tako da se odupiru razgradnji u dodiru sa vodom, deterdžentima i sličnim sredstvima, ali i pod uticajem visokih temperatura, UV svetlosti ili oksidacionih agenasa (66).

Sinteza boja je jako složen proces. Najčešće se kao polazna jedinjenja koriste primarni proizvodi dobijeni destilacijom katrana (60). Nastala aromatična jedinjenja se dalje podvrgavaju reakcijama oksidacije, redukcije, kondenzacije, nitrovanja ili sulfonovanja, a sve u zavisnosti od tipa boje koja se želi dobiti (60). Najveći procenat danas pristunih boja spada u grupu azo boja, a sve se mogu sintetisati reakcijama diazotovanja. Prva komercijalna boja dobijena sintetskim procesima bila je bizmark braon (60).

Sintetske boje se mogu klasifikovati na različite načine, nekada prema molekularnoj strukturi, a nekada prema njihovoj primeni. Na osnovu rastvorljivosti dele se na rastvorne (direktne, kisele, bazne, reaktivne) i nerastvorne (azo, disperzne i sumporne) boje (67). Čak 70% proizvodnje svih boja zauzima proizvodnja azo boja, koje spadaju u grupu najviše korišćenih sintetskih boja širom sveta (68).

Podela boja na osnovu hemijske strukture, odnosno prema prisustvu odgovarajuće hromofore prikazana je u Tabeli 2.

**Tabela 2.** Podela organskih boja

Naziv grupe boja	Hromofora	Primer boje
Azo boje	$\text{—N=N—}$	 <i>p</i> -aminoazobenzen
Antrahinonske boje		 alizarin
Indigo boje		 indigo karmin
Nitrozo boje	$\text{—N=O}$	 gambin R
Nitro boje		 naftol žuto S
Triarilmetanske boje		 metilensko ljubičasto

### 2.4.1. Azo boje

Hemijska jedinjenja veoma rasprostranjena u hrani, tekstilu, farmaceutskim proizvodima, kao i u kozmetičkim preparatima, a koja pripadaju najvećoj grupi boja poznata su kao azo boje (69). Svaku boju iz ove grupe karakteriše prisustvo jedne ili više azo grupa ( $-N=N-$ ) (70). Više od polovine svetske proizvodnje boja odlazi na azo boje, tako da se sa razlogom može reći da ove boje spadaju u grupu najrasprostranjenijih i najviše korišćenih boja u svetu (70). Više od 2000 boja iz ove grupe je trenutno u upotrebi u različitim oblastima industrije (70).

Prema broju azo veza ove boje se mogu klasifikovati u nekoliko grupa: monoazo, diazo, trisazo i poliazoo boje (71). Sulfonovane azo boje, koje u svojoj hemijskoj strukturi imaju i  $-SO_3H$  grupu, su često prisutne u otpadnim vodama (60,71).

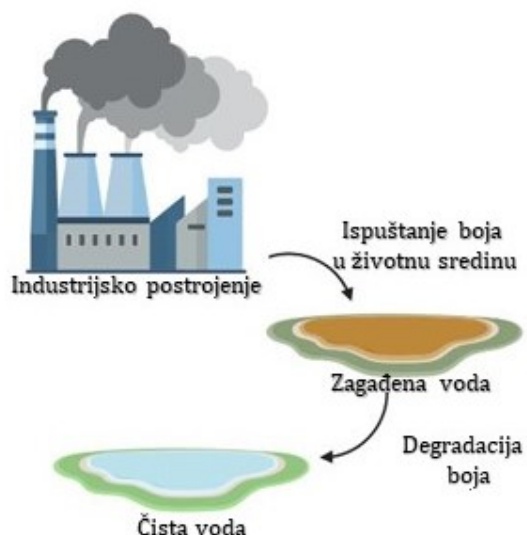
Od nekoliko hiljada azo boja prisutnih na tržištu, 500 je označeno kao potencijalno kancerogeno (72). Ukoliko čovek dođe u kontakt sa ovim obojenim jedinjenjima, bilo oralno ili neposrednim kontaktom, azoreduktaze – enzimi odgovorni za njihovu degradaciju, se aktiviraju razlažući ih do aromatičnih amina. Sumnja se da kancerogenost većine azo boja potiče upravo od proizvoda prethodno opisane reakcije (72,73).

Redukcija dvostruke  $-N=N-$  veze, vodi nastanku aromatičnih amina, a odvija se primenom enzimskog mehanizma (74). Elektronska gustina oko dvostruke veze utiče na stepen redukcije. Ukoliko su elektron akceptorske grupe prisutne u okruženju azo grupe, lakše će doći do raskidanja veze i otpuštanja amina (75). Kada je u orto položaju prisutna neka elektron donorska grupa, dolazi do formiranja vodoničnih veza na azotima azo grupe (75). Sličan efekat se javlja i ukoliko se  $-SO_3Na$  i  $-COOH$  grupe nalaze u okruženju ove funkcionalne grupe (76).

Na degradaciju boja uticaće pre svega broj grupa prisutnih u odgovarajućem obojenom molekulu, zatim vrsta funkcionalne grupe, kao i njen položaj u samom molekulu. Postoje razlike u efikasnosti degradacije u zavisnosti od uslova pod kojima se ona odvija, tj. da li su aerobni ili anaerobni. Prvi otežavaju razlaganje azo boja, i upravo su iz tog razloga ova jedinjenja označena kao jako uporni zagađivači životne sredine (77). Drugi, anaerobni uslovi, omogućuju lakšu redukciju boja u prisustvu nekih bakterija i mikroorganizama do amina. Nastali produkti nisu obojeni, za razliku od samih boja, ali mogu imati toksični i mutageni uticaj kako na čoveka, tako i na druge žive organizme (78). Ustanovljeno je da, u zavisnosti od dužine izloženosti, sintetske boje mogu da dovedu do stanja koja karakterišu blaži simptomi, kao što su alergija, dermatitis, groznica, mučnina, ali i do trajnih oštećenja nekih organa. Ukoliko se osoba u dužem vremenskom periodu nalazi pod uticajem ovih boja može doći do totalnog zastoja u radu srca, mozga, bubrega, kao i kompletnog nervnog sistema (73,79).

## 2.5. Uklanjanje organskih boja

U različitim oblastima industrije (industrija tekstila, plastike i boja, prehrambena i farmaceutska industrija) koriste se makromolekuli odgovarajuće strukture i obojenosti – boje (80). Oko 50% od ukupnog sadržaja boja se gubi iz tekstilne industrije tokom proizvodnog procesa, ali i pored toga u otpadnim vodama završi 10–15% (81). S obzirom da su ova jedinjenja obojena, ukoliko se nađu u vodenim sistemima, zadržavaju se u površinskim slojevima, ograničavajući time prodor svetlosti u dublje slojeve, čime se direktno utiče na uslove života biljnih i životinjskih vrsta (Slika 10).

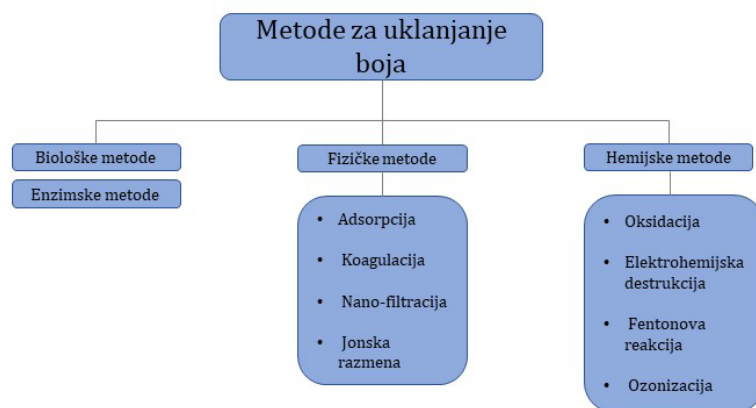


**Slika 10.** Zagađenje vodenih tokova organskim bojama

Osobine, zbog kojih je eliminacija ovih boja iz otpadnih voda veoma važna za zaštitu životne sredine, su pre svega njihova toksičnost, potencijalna kancerogenost i mutagenost, kao i jako slaba sposobnost degradacije (82). Dodatnom modifikacijom boja dolazi do formiranja jako štetnih derivata, koji mogu da ostave ozbiljne posledice pre svega na celokupan biodiverzitet u vodenim ekosistemima, ali i na zdravlje ljudi, a sve kao posledica njihove složene hemijske strukture.

## 2.6. Metode za degradaciju organskih boja

Konvencionalne metode za uklanjanje fenola koje su prethodno navedene i opisane (adsorpcija, ozonizacija, hemijska oksidacija, ekstrakcija, destilacija itd.) pored primene u eliminaciji fenola i njegovih derivata, mogu se upotrebiti i za degradaciju sintetskih tekstilnih boja (Slika 11) (83,84). Ograničenja u korišćenju ovih metoda za degradaciju boja se ogledaju u niskoj efikasnosti, visokoj ceni samih procesa, ali i lošoj stabilnosti i formiranju štetnih produkata, koji se jako teško mogu ukloniti iz prečišćenih vodenih sistema (85,86). Složena hemijska struktura, ali i hidrofилna priroda boja podložna čestim promenama, mane su, koje pored prethodno navedenih, otežavaju primenu kako fizičkih i hemijskih, tako i bioloških metoda za degradaciju boja (87).



**Slika 11.** Metode za uklanjanje organskih boja

### **2.6.1. Biološke metode za degradaciju boja**

Pre ispuštanja otpadnih voda u životnu sredinu, ona se može prečistiti najčešće korišćenom metodom za uklanjanje boja – biološkom metodom (66). Prednosti ove metode su njena jednostavna primena, ali i izuzetno niska cena samog procesa (88). Vrlo često biološka degradacija nije dovoljna za potpuno uklanjanje boja iz vodenih sistema i eliminaciju toksičnih komponenti, već je potrebno primeniti i neke dodatne metode, kao što su degradacije enzimima, algama ili gljivama, kako bi se poboljšala njena efikasnost (61). Pored brojnih prednosti, ovaj metod ima i jednu manu – brzina rasta živih organizama. Navedena činjenica je osnova za primenu ove metode prilikom degradacije boja, ali je ujedno i njen najveći nedostatak, s obzirom da ograničava njenu primenu na visokom nivou.

### **2.6.2. Hemijske metode za degradaciju boja**

Za degradaciju boja mogu se upotrebiti mnogobrojne hemijske metode (oksidacije, elektrohemijske destrukcije, Fentonova reakcija, ozonizacija itd.), koje su pokazale brojne prednosti i mane (61). U poređenju sa biološkim ili fizičkim metodama, ove metode ne spadaju u red ekonomičnih metoda, s obzirom da zahtevaju posebnu opremu i potrošnju velikih količina električne energije (89). Stoga se može zaključiti da hemijske metode nisu praktične za širu komercijalnu upotrebu (89). Ukoliko bi se pak sve ovo zanemarilo i pristupilo primeni ove metode na višem nivou, javila bi se potreba za jako velikom potrošnjom hemijskih reagenasa, čijom upotrebom se generišu nova toksična jedinjenja, što bi predstavljalo dodatni ekološki problem (90).

### **2.6.3. Fizičke metode za uklanjanje boja**

Adsorpcija, koagulacija, nano-filtracija i jonska izmena, samo su neke od fizičkih metoda koje se mogu primeniti za uklanjanje organskih boja (61). Adsorpcija se zasniva na sposobnosti adsorbenta da veže obojene molekule. Ova metoda je jeftina i regenerabilna, a može se primeniti na različite tipove boja (npr. za sumporne ili disperzne boje) (63,91). Metoda koja se zasniva na koncentrisanju boja i formiranju grudvica, koje se mogu ukloniti filtracijom, naziva se koagulacija (91). Ova metoda ima iste prednosti kao i adsorpcija, ali kao ni ona, nije efikasna prilikom uklanjanja azo boja, niti reaktivnih, baznih ili kiselih boja (91,92). I jedna i druga metoda generišu velike količine mulja, koji se jako teško može odvojiti od prečišćene vode (92).

Jonska izmena spada u reverzibilne metode, a podrazumeva izmenu jona između otpadnih voda koje sadrže sintetske boje i sličnih jona prisutnih na čvrstoj stacionarnoj fazi (92). Istraživanja su pokazala uspešnost ove metode, kao i zadovoljavajuću efikasnost koja se postiže njenom primenom u prečišćavanju otpadnih voda (63,92). Međutim, glavni nedostatak ove metode je ograničena upotreba samo na određene tipove sintetskih boja (63,92).

Pristup odvajanja čestica boje od čiste vode propuštanjem zagađene vode kroz tanku membranu, koja na sebi ima pore odgovarajuće veličine, poznat je kao nano-filtracija (61). Ograničenja ove metode, kao što su njena cena, energetska zahtevnost, kao i rad pod visokim pritiskom, se mogu zanemariti kada se sagleda njena osnovna prednost – primena na gotovo sve do sad poznate sintetske boje (61). Ipak, može da dođe i do zapušavanja pora na membrani, čime se ograničava njena šira upotreba (61).

Ukoliko se uporede efikasnosti svih navedenih metoda u uklanjanju sintetskih organskih boja, najveći procenat uklonjenih boja se postiže primenom hemijskih metoda (88–99%). Efikasnost bioloških metoda se kreće od 76 do 90,1%, s tim što se enzimске metode mogu izdvojiti kao jedne od najefikasnijih.

#### 2.6.4. Enzimske metode za degradaciju boja

Primena enzimskih metoda za tretiranje otpadnih voda otvorila je potpuno novo poglavlje u celokupnoj oblasti koja se bavi prečišćavanjem vodenih sistema. Kada se ovaj metod uporedi sa konvencionalnim metodama, ističu se njegove mnogobrojne prednosti: biodegradabilnost, specifičnost i selektivnost samo su neke od njih (93). Ovaj metod se može primeniti u širokom opsegu pH vrednosti, na različitim temperaturama, kao i pri različitim koncentracijama supstrata i enzima (82,93). Za razliku od hemijskih, enzimske metode pokazuju visoku efikasnost prilikom tretiranja kompleksnih organskih jedinjenja kao što su boje, a pri relativno blagim reakcionim uslovima.

Za eliminaciju kako boja tako i mnogobrojnih fenolnih jedinjenja mogu se primeniti neki od sledećih enzima: glukoza-oksidadaza, lakaza, katalaza, tirozinaza, kao i različiti tipovi peroksidaza (14,82,94–96).

### 2.7. Peroksidaze za oksidacije fenola i degradacije sintetskih boja

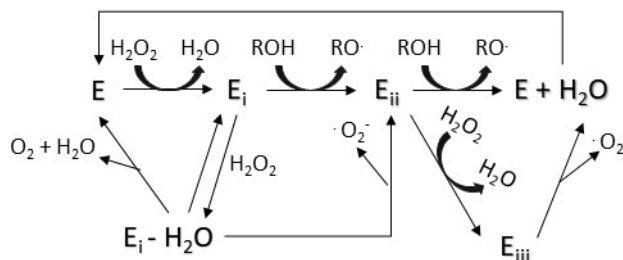
S obzirom da su konvencionalne metode pokazale brojne poteškoće u procesu uklanjanja fenolnih jedinjenja i degradaciji boja, bilo je potrebno razviti alternativne metode koje bi se mogle primeniti u širem opsegu reakcionih uslova. Enzimsko tretiranje otpadnih voda je pokazalo veliki potencijal s obzirom da je ustanovljeno da se uklanjanje neželjenih materija može ostvariti sa visokom efikasnošću (1). Enzimi deluju na tačno određene zagađivače tako što ih talože ili prevode u neke druge produkte. Menjanjem odgovarajućih karakteristika otpadnih materija, dobijaju se proizvodi koji su manje štetni ili pogodniji za skladištenje.

Ovaj metod se može primeniti u jako kratkom vremenskom periodu bez potrebe za prethodnim razblaživanjem otpadnih voda, pa je zbog toga pogodan za tretiranje voda sa visokim procentom zagađivača, bilo da su u pitanju fenolna jedinjenja ili tekstilne boje. Pored navedene prednosti, postoje i druge pogodnosti enzimske metode kao što su:

- Dejstvo u širokom opsegu pH vrednosti
- Jednostavnost čuvanja
- Efikasnost na različitim temperaturama
- Podjednaka efikasnost u vodama različitog saliniteta, ali i u onim vodama koje su slatkovodne
- Jako jednostavna primena
- Izuzetno laka kontrola procesa degradacije enzimima
- Izuzetna specifičnost i efikasnost prilikom uklanjanja ciljanog molekula (97).

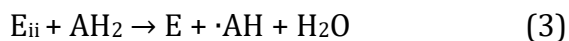
#### 2.7.1. Mehanizam delovanja peroksidaza prilikom uklanjanja fenola

Za uklanjanje različitih tipova fenolnih jedinjenja mogu se primeniti brojni enzimi, ali se u ove svrhe najčešće koriste oni iz grupe peroksidaza. Na Slici 12 je prikazan mehanizam dejstva peroksidaza, zajedno sa sporednim reakcijama (98).



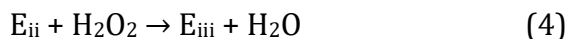
Slika 12. Mehanizam dejstva peroksidaza

Mehanizam dejstva peroksidaza prilikom uklanjanja fenola može se prikazati sledećim reakcijama (97):



Reakcija oksidacije nekog aromatičnog jedinjenja ( $AH_2$ ) opisana je datim mehanizmom. U prvom koraku (1) dolazi do oksidacije prvobitnog enzima (E) u prisustvu vodonik-peroksida ( $H_2O_2$ ) i formiranja oksidujućeg agensa –jedinjenja I ( $E_i$ ). U ovom obliku enzim može da primi u svoje aktivno mesto aromatični molekul i da ga oksiduje. Nakon toga se oksidovano aromatično jedinjenje u obliku radikala otpušta sa katalitičkog mesta enzima (2), ostavljajući ga u obliku jedinjenja II ( $E_{ii}$ ). Katalitički ciklus se završava oksidacijom sledećeg aromatičnog molekula posredstvom jedinjenja II (3), uz oslobađanje još jednog slobodnog radikala u rastvor i vraćanje enzima u prvobitni oblik. Formirani slobodni radikali difunduju sa enzima u rastvor gde se spontano udružuju gradeći poliaromatične proizvode. Ova jedinjenja su manje rastvorna nego monomeri od kojih su oni potekli, pa imaju tendenciju taloženja (97). Ukoliko to nije slučaj, oksidacija će se nastaviti sve dok se ne ngrade polimerna jedinjenja dovoljno velike molekulske mase, koja su manje rastvorna u odgovarajućem rastvaraču.

Do inaktivacije enzima može da dođe ukoliko se na aktivnom mestu enzima ili u njegovoj blizini vežu molekuli slobodnih radikala, koji ga blokiraju ili menjaju njegovu konformaciju, čime inhibiraju dalju katalitičku aktivnost enzima. Pored navedenog, prisustvo vodonik-peroksida u višku može da dovede do oksidacije jedinjenja II ( $E_{ii}$ ) u jedinjenje III ( $E_{iii}$ ) prema sledećoj hemijskoj jednačini (4):



Nastalo jedinjenje III ( $E_{iii}$ ) nije katalitički aktivno, ali ne dovodi ni do totalne inaktivacije, pošto se spontano razlaže do prvobitnog enzima prema jednačini (5) (97):



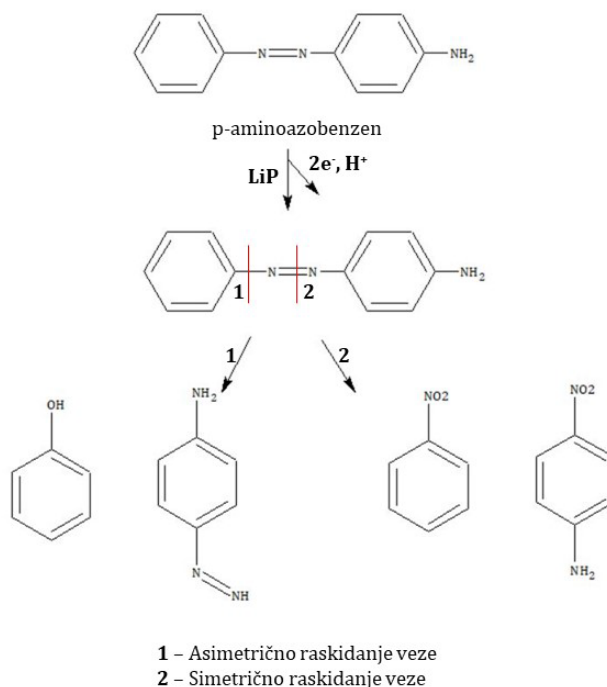
S obzirom da se reakcija (5) odvija jako sporo, moguće je nagomilavanje jedinjenja III ( $E_{iii}$ ), čime se ograničava katalitička aktivnost HRP u procesu oksidacije aromatičnih jedinjenja, a samim tim i smanjuje efikasnost celokupnog procesa.

### 2.7.2. Mehanizam delovanja peroksidaza prilikom degradacije boja

Istraživanja su pokazala da se azo boje mogu vrlo efikasno tretirati primenom enzima izolovanih iz gljiva (peroksidazama ili fenol-oksidadzama) (99). Enzimi iz grupe peroksidaza katalizuju reakcije degradacije tekstilnih boja u prisustvu vodonik-peroksida. Dekolorizacija vodenih rastvora azo boja može se katalizovati hloroperoksidazama u oksidativnom procesu koji podrazumeva prisustvo vodonik-peroksida. Za prirodnu degradaciju reaktivne plave boje 160 (Reactive Blue 160, RB) koriste se enzimi izolovani iz korena *Tagetes patula* – lignin-peroksidaza, lakaza, tirozinaza i dihlorofenolindofenol (DCIP)-reduktaza (100). Dekolorizacija bromfenol plave se odvija na pH 4,0, u prisustvu mangan-peroksidaze (MnP) izolovane iz gljive bele truleži *Pleurotus ostreatus*. Mehanizam dejstva podrazumeva oksidaciju  $Mn^{2+}$  do  $Mn^{3+}$  jona, koji se nakon toga heliraju u prisustvu organskog jedinjenja (101). Ovaj helirani kompleks potom difunduje sa aktivnog mesta enzima, tako da ono dalje može da prihvati sekundarne supstrate.



Prvi mehanizam dejstva dekolorizacije boja u prisustvu lignolitičkih enzima izolovanih iz gljive bele truleži prikazan je na Slici 13.



**Slika 13.** Primer degradacije azo boje lignin-peroksidazom

Pored sposobnosti uklanjanja aromatičnih amina i fenolnih jedinjenja, peroksidaza iz rena ima potencijal i za degradaciju tekstilnih boja. HRP može da ukloni tirkizno plavu G i lanset plavu 2R boju sa efikasnošću dekolorizacije od 59% odnosno 94% (102). Pored navedenih enzima i lignin-peroksidaza se primenjuje u procesu degradacije tekstilnih boja kao što je npr. metilensko plavo, a efikasnost ovog procesa je oko 90% (103).

## 2.8. Peroksidaze

Peroksidaze spadaju u najrasprostranjeniju grupu enzima u prirodi. Mogu se izolovati iz različitih biljnih i nekih životinjskih vrsta. Ovi enzimi se u literaturi pominju još od 19. veka, a 1855. godine uočena je njihova sposobnost oksidacije organskih jedinjenja u prisustvu vodonik-peroksida (104). Pod ovim imenom, peroksidaze se prvi put pominju od 1898. godine. To su enzimi koji koriste vodonik-peroksid kako bi katalizovali oksidacije određenih organskih i nekih neorganskih jedinjenja (105). Iako mogu da budu izolovane iz različitih organizama, skoro sve do sad poznate peroksidaze kao prostetičnu grupu sadrže hem (protoporfirin IX) (105,106).

Mogu se podeliti u dve superfamilije: životinjske i biljne peroksidaze. U prvu spadaju laktoperoksidaze i mieloperoksidaze, dok druga, za koju se smatra da ima evolutivni značaj, obuhvata tri klase (105):

1. Klasa I – intracelularne peroksidaze
2. Klasa II – ekstracelularne peroksidaze iz gljiva
3. Klasa III – ekstracelularne peroksidaze iz biljaka.

U klasu I spadaju citohrom C-peroksidaza iz kvasaca, hloroplast- i citosol askorbat-peroksidaze, kao i bakterijske peroksidaze (104,105).

Lignin- (Lignin peroxidase, LiP) i mangan- (Manganese peroxidase, MnP) peroksidaze iz gljive bele truleži *Phanerochaete chrysosporium*, koje su uključene u procese razgradnje lignina, spadaju u klasu II peroksidaza, dok klasa III obuhvata biljne peroksidaze kao što je peroksidaza iz rena *Armoracia rusticana* (Horseradish peroxidase, HRP) (104,105).

Izvan ove klasifikacije postoje i haloperoksidaze, enzimi koji katalizuju oksidacije halida vodonik-peroksidom. One mogu da sadrže hem, vanadijum ili da uopšte ne sadrže hetero grupu, pri čemu ni jedan od ova tri tipa ne pokazuje sličnost u homologiji sa prethodno opisanim vrstama peroksidaza (105).

### **2.8.1. Peroksidaza iz rena**

Plank je prvi primetio da natapanje korena rena u tinkturu smole gvajakuma dovodi do pojave jake boje. To je bio početak otkrića peroksidaze iz rena (EC 1.11.1.7), njene funkcije i primene u različitim oblastima. Danas je HRP najviše proučavana peroksidaza, čija proizvodnja mora biti masovna i na jako visokom nivou kako bi se zadovoljile velike potrebe za ovim enzimom, pre svega u medicini za kliničke dijagnostičke kitove i imunoezije (107).

U korenu rena nalaze se različite izoenzimske forme peroksidaze, među kojima je najzastupljenija označena kao peroksidaza C (HRP C) (107). Do danas je izolovano 5 različitih formi ovog enzima (A, B, C, D i E) (108). Svaka od njih predstavlja drugačiji molekulski oblik, koji može da katalizuje istu reakciju. Kao posledica razlike u aminokiselinskoj sekvenci javljaju se drugačije osobine izoenzima (fizičke, hemijske i katalitičke) (104).

#### **2.8.1.1. Strukturne karakteristike peroksidaze iz rena**

Struktura peroksidaze iz rena je prvi put određena 1976. godine, kada je ustanovljeno da se sastoji od jednonlančanog polipeptidnog lanca koji čini 308 aminokiselinskih ostataka (109).

N-terminalni kraj polipeptidnog lanca je blokiran piroglutamatom, dok je C-terminalni kraj heterogen i može ali i ne mora da sadrži krajnji Ser308 ostatak. Između Cys ostataka nalaze se 4 disulfidna mosta (Cys11–Cys91; Cys44–Cys49; Cys97–Cys301; Cys177–Cys209), kao i jedan soni most između Asp99 i Arg123 (107). U primarnoj strukturi molekula enzima nalazi se 9 potencijalnih N-glikozilovanih mesta, od kojih je 8 zauzeto. Uglavnom su prisutna dva terminalna N-acetilglukozna ostatka i nekoliko manoznih ostataka (110). Tip prisutnog glikana zavisi od mnogo faktora, pre svega od izvora samog enzima. Generalno gledano jedna HRP u svojoj strukturi sadrži od 18 do 22% različitih ugljenih hidrata (107).

Peroksidaza iz rena poseduje dva metalna centra: gvožđe(III)-protoporfirin IX (hem) i dva kalcijumova jona. Oba imaju veliki, kako strukturni, tako i funkcionalni značaj. Hem je vezan koordinativno za enzim na His170 (proksimalni histidin), čiji se atom azota na histidinskom bočnom ostatku vezuje za gvožđe na hemu. Drugo koordinativno mesto na distalnoj strani hema u normalnim uslovima nije zauzeto, ali ostaje dostupno za vezivanje vodonik-peroksida tokom katalitičkog procesa enzima. Dva kalcijumova jona ( $Ca^{2+}$ ) vezana su za molekul enzima, jedan sa distalne, a drugi sa proksimalne strane hema. S obzirom da je gvožđe u hemu vezano za 4 pirola i da se za njega vezuje His na peto koordinaciono mesto, vezivanjem vodonik-peroksida u procesu oksido-redukcije ostvaruje se stabilna oktaedarska struktura oko metalnog jona. Moguće je i vezivanje nekih malih molekula (ugljen-monoksida, cijanida, fluorida itd.) za aktivno mesto enzima, čime se takođe upotpunjuje svih šest koordinativnih mesta (107).

Trodimenzionalna struktura peroksidaze iz rena, prvi put je dobijena 1997. godine kristalografijom X zracima, a prikazana je na Slici 14 (111).



**Slika 14.** Trodimenzionalna struktura peroksidaze iz rena C1A1.  
PDB broj enzima 1HCH (<https://www.rcsb.org/>)

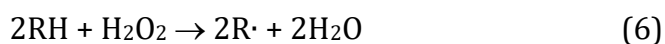
U strukturi ovog enzima preovlađuju  $\alpha$ -heliksi, dok su u nešto manjem obimu zastupljeni i regioni  $\beta$ -ploča. Postoje dva jasno definisana domena, distalni i proksimalni, između kojih je smeštena hem grupa (107). Ispitivanja su pokazala da su strukture peroksidaze iz rena i drugih peroksidaza iz biljaka koje pripadaju klasi III iste i da dominiraju još tri dodatna  $\alpha$ -heliksa. Od njih se dva nalaze u dugačkom lancu, koji se sastoji od 34 aminokiselinska ostatka (107).

Struktura ovog regiona je očuvana zahvaljujući disulfidnom mostu između Cys177 i Cys209 ostataka (111). Jedan od ova dva regiona je direktno uključen u vezivanje supstrata. Smatra se krucijalnim delom enzima odgovornim za njegovu stabilizaciju, ali i prihvatanje slobodnih radikala nastalih tokom oksidacionih reakcija katalizovanih ovim enzimima (111).

### 2.8.1.2. Karakteristike peroksidaze iz rena

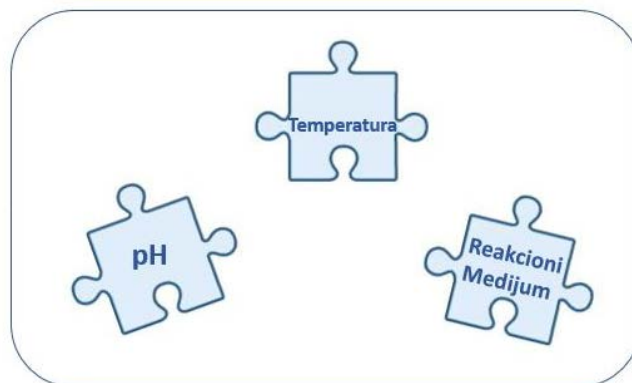
Na osnovu aminokiselinske sekvence je određeno da molekulska masa polipeptidnog lanca peroksidaze iznosi 33.890 Da (109). Molekulska masa enzima je veća za molekulske mase hema i dva kalcijumova jona, koje iznose 572 odnosno 80 Da. Ukoliko se uzme u obzir da peroksidaza sadrži u proseku 20% ugljeno-hidratnih ostataka i na ukupnu masu doda još i njihova masa, krajnja molekulska masa enzima iznosi oko 42 kDa.

Sumirana reakcija oksidacije nekog supstrata peroksidazom je predstavljena sledećom hemijskom reakcijom (6):



Gde RH predstavlja supstrat koji se može oksidovati peroksidazom, a  $R\cdot$  slobodni radikal nastao ovom reakcijom. Proizvodi ove reakcije (slobodni radikali) udruživanjem formiraju oligomerne strukture, koje u sledećim reakcionim koracima preuzimaju ulogu supstrata (112). Da bi se enzim primenio na industrijskom nivou neophodno je poboljšati proces oksidacije katalizovan enzimom. To se ostvaruje kontrolisanim otpuštanjem vodonik-peroksida u reakcionu smešu, čime se povećava njegova efikasnost i stabilnost.

Stabilnost enzima je veoma bitan faktor u svakom procesu tokom njihove upotrebe, koji se može ostvariti kontrolisanjem parametara kao što su vrsta rastvarača, pH sredine i temperatura (Slika 15). Sami enzimi mogu da imaju zadovoljavajuću stabilnost pri povišenim temperaturama, na ekstremnim pH vrednostima, kao i pri visokim koncentracijama organskih rastvarača, ali samo u određenom vremenskom periodu (tokom nekoliko minuta ili sati, u zavisnosti od uslova).



**Slika 15.** Parametri koji utiču na stabilnost enzima

Za industrijsku primenu neophodno je obezbediti nepromenjenu enzimsku stabilnost, ali u nešto dužem vremenskom periodu. Ukoliko se umesto vode kao reakcionog medijuma koristi neki organski rastvarač, primećeno je očuvanje enzimске aktivnosti. Bitniji uticaj na aktivnost peroksidaze neće ostaviti ni korišćenje dimetilsulfoksida (DMSO) kao rastvarača (113). Primenom nekog drugog organskog rastvarača može da se naruši struktura samog enzima, čime se direktno utiče na njegovu stabilnost i aktivnost (113). Ponašanje enzima u nekom organskom rastvaraču objašnjava se raskidanjem vodoničnih veza unutar hema, oslobađanjem prostetične grupe i denaturacijom proteina, što vodi gubitku enzimске aktivnosti.

Jako važan faktor, koji je neophodno kontrolisati prilikom svih enzimski katalizovanih reakcija, jeste temperatura. Ona je bitan preduslov za očuvanje native strukture samog enzima, a od nje u velikoj meri zavisi i rastvorljivost kako supstrata, tako i proizvoda reakcije. Posmatrano za peroksidazu iz rena, maksimalna aktivnost je primećena na 45 °C, dok enzim zadržava oko 80% aktivnosti u temperaturnom opsegu od 30 do 50 °C (24).

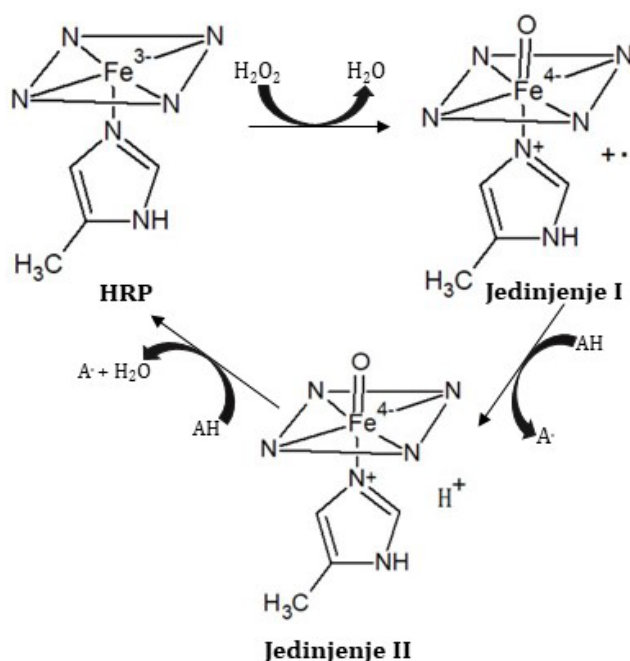
Kontrola pH vrednosti sredine je još jedan bitan preduslov za izvođenje svih enzimski katalizovanih reakcija, jer mikrookolina utiče u velikoj meri na aktivnost enzima. Maksimalna aktivnost peroksidaze na sobnoj temperaturi je između pH vrednosti 6,0 i 8,0, dok se pH vrednosti od 6,0 do 6,5 mogu smatrati optimalnim (24). Na pH vrednostima nižim od 5,0, dolazi do disocijacije prostetične grupe (hema) čime se remeti nativna struktura enzima i utiče na smanjenje njegove aktivnosti (24).

### **2.8.1.3. Katalitički mehanizam peroksidaze iz rena**

Mnogi istraživači su se bavili ispitivanjem mehanizama katalize peroksidaze iz rena. Reakcija koju ovaj enzim katalizuje jeste oksidacija u prisustvu vodonik-peroksida. Veliki broj supstrata, pre svega elektron-donora, kao što su fenoli i aromatični amini, se koriste u ovim reakcijama. Celokupan katalitički proces se odvija u tri koraka (107).

Enzim se prvo oksiduje vodonik-peroksidom, a potom redukuje natrag do svog početnog stanja u dva koraka koji uključuju formiranje dve radikalske forme enzima (jedinjenja I i II) (114).

Na Slici 16 je prikazan katalitički mehanizam ovog enzima u prisustvu supstrata (redukujućeg sredstva) (114):



**Slika 16.** Mehanizam dejstva peroksidaze iz rena

Prvi korak u ovom katalitičkom ciklusu je reakcija Fe(III) sa vodonik-peroksidom ( $H_2O_2$ ) na enzimu, koji se nalazi u stanju katalitičke neaktivnosti. Ovom reakcijom generiše se jedinjenje I, koje sadrži Fe(IV)-oksoferilni centar i katjonski radikal na bazi porfirina (107). Nulto jedinjenje, Fe(III)-hidroksi kompleks, označen je kao jedinjenje koje se formira pre građenja jedinjenja I. Sledeći korak je jednoradikalski redukcion proces koji zahteva prisustvo supstrata i vodi formiranju jedinjenja II – Fe(IV)-oksoferil centra. Oba jedinjenja su veoma jaki oksidacioni agensi. U drugom slobodno-radikalском koraku jedinjenje II se vraća u stanje mirovanja enzima (107).

Reakcijom viška  $H_2O_2$  sa enzimom u stanju mirovanja gradi se jedinjenje III – rezonancioni hibrid Fe(III)-superoksida i Fe(II)-dioksidnog kompleksa (107).

Izučavanjem detaljnog mehanizma reakcije ustanovljen je značaj distalnog hema i ostataka Arg38 i His42 u formiranju jedinjenja I – kiseonik iz oksoferilnog centra je vodoničnom vezom povezan sa N–H grupom Arg38 i molekulom vode, koji se u isto vreme vezuje za ova dva aminokiselinska ostatka (107).

#### 2.8.1.4. Eseji za određivanje aktivnosti peroksidaze iz rena

S obzirom da se peroksidaza iz rena proučava u jako dugom vremenskom periodu, razvijen je veliki broj metoda za određivanje i praćenje njene aktivnosti. Pored vodonik-peroksida, prirodnog supstrata peroksidaze iz rena, postoje i drugi supstrati – mnogobrojni redukujući molekuli koji se koriste za praćenje njene aktivnosti. Za određivanje aktivnosti enzima, kako u kolorimetrijskim, tako i u fluorimetrijskim i spektrofotometrijskim esejima, koriste se jedinjenja, sa izdvojenom hromoforom u strukturi. Ovi supstrati se u reakcijama oksidacije koriste kao donori vodonika, sposobni da grade proizvode – obojena jedinjenja pogodna za odgovorajuću detekciju (spektrofotometrijsku ili fluorimetrijsku) (104).

U Tabeli 3 se nalaze neki od najčešće korišćenih supstrata u esejima za određivanje i praćenje aktivnosti HRP.

**Tabela 3.** Supstrati koji se koriste za određivanje aktivnosti peroksidaze iz rena

Naziv substrata	Skraćeno ime substrata	Metoda detekcije
2,2'-azo-bis (3- etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)	ABTS	Spektrofotometrija
4,4'-Diaminobifenil	Benzidin	Spektrofotometrija
2-Metoksifenol	Gvajakol	Spektrofotometrija
1,2,3-Trihidroksibenzen	Pirogalol	Spektrofotometrija
4-Metilfenol	p-Krezol	Spektrofotometrija
1,3-dihidroksibenzen	Rezorcinol	Spektrofotometrija
4-Amino-2,3-dimetil-1- fenil-3-pirazolinon	4-Aminoantipiren	Spektrofotometrija
3-Aminoftalhidrazid	Luminol	Fluorimetrija
4-Hidroksi-3- metoksicinamična kiseina	Ferulična kiselina	Fluorimetrija

Skoro svi derivati aromatičnih jedinjenja su pokazali sposobnost redukcije intermedijernog stanja enzima. Ovo jedinjenje nastaje oksidacionim procesom i vodi vraćanju enzima u prvobitan oblik.

Za određivanje aktivnosti peroksidaze mogu se koristiti i hemiluminescentne metode, koje podrazumevaju emisiju svetlosti. Najčešće upotrebljivan hemiluminescentni supstrat je luminol, a po potrebi se primenjuju i jedinjenja za poboljšanje emisije svetlosti, kao što je npr. luciferin (104).

### **2.8.1.5. Primena peroksidaze iz rena**

Peroksidaze imaju široku primenu u različitim oblastima, počevši od biotehnologije, preko bioremedijacije (115) do biokatalize (116), zatim u proizvodnji biosenzora (104), dijagnostici (117), proteinskom inženjeringu (118), rekombinantnoj ekspresiji gena (119), pa čak i u terapijske svrhe (120).

Među enzimima koji imaju veliku primenu u analitičke svrhe, na prvom mestu se nalaze oni iz grupe peroksidaza. Široka upotreba ovih enzima je omogućena zahvaljujući njihovim povoljnim osobinama, pre svega dobroj stabilnosti, senzitivnosti, visokoj specifičnosti, ali i fleksibilnosti u pogledu katalitičkog esaja i širokoj dostupnosti (104). S obzirom da katalizuju oksidacije obojenih jedinjenja, koja se lako detektuju spektrofotometrijski ili fluorimetrijski, mogu se primeniti u različitim oblastima. Pored toga, priroda oksido-redukcione reakcije, omogućuje i primenu elektrohemijskih metoda za detekciju, a time i razvoj biosenzora na bazi ovih enzima (104).

Biosenzori su našli primenu u medicini, farmaciji, prehrambenoj industriji, kao i u različitim oblastima zaštite životne sredine (121). Razvojem biosenzora na bazi HRP, galaktoze-oksidge i drugih enzima, omogućena je detekcija laktoze u mleku i mlečnim proizvodima (122). Primena HRP u dijagnostici zasnovana je na njenoj sposobnosti da pri oksidacionim reakcijama emituje niske koncentracije hromogenih produkata, koji su jako stabilni (123). Važnost praćenja nivoa holesterola u krvi čoveka dovela je do razvoja enzimskih metoda na bazi holesterol-oksidge, peroksidaze i holesterol-esteraze, koje su pokazale zadovoljavajuću preciznost, selektivnost i efikasnost (124).

Peroksidaze se mogu koristiti i u imunoesejima, npr. vezivanjem HRP za sekundarno antitelo može se otkriti mutacija koja je odgovorna za pojavu cistične fibroze (125).

Enzimski imunosorbentski testovi (ELISA) u kojima se HRP koristi za obeležavanje antitela, razvijeni su za skrining monoklonskih antitela na mikotoksine, koji mogu biti potencijalno štetni za brojne vrste sisara (126).

Peroksidaza iz rena se može primeniti i u biotransformacijama, u kuplovanim enzimskim i hemiluminescentnim esejima, kao reagens u nekim organskim sintezama (107).

Formiranje slobodnih radikala u reakcijama katalizovanim peroksidazom iz rena, njihovo spontano udruživanje i građenje nerastvornih polimernih agregata, omogućuje primenu ovog enzima u bioremedijaciji i prečišćavanju otpadnih voda. Česti zagađivači otpadnih voda su različiti oblici fenolnih (naftol, hlorofenol, metil-fenol itd.) i obojenih jedinjenja, koji dospevaju u ove sisteme nekontrolisanim ispuštanjem iz industrijskih postrojenja. Sa povećanjem njihove koncentracije, povećava se i potreba za razvojem metoda za njihovu eliminaciju. U te svrhe je razvijen veliki broj metoda na bazi enzima, prevashodno peroksidaze iz rena, koji u prisustvu vodonik-peroksida mogu da oksiduju fenolna jedinjenja kako iz sintetskih tako i iz pravih industrijskih otpadnih voda. Degradacijom fenola nastaju nerastvorni polimeri, koji se lako odvajaju filtracijom ili sedimentacijom od vode, a dodavanje koagulanata može da pomogne njihovom taloženju. Metode na bazi peroksidaze su pokazale veliku efikasnost pri prečišćavanju voda. Međutim, i pored velikog potencijala, postoje brojni problemi. Većina se odnosi na inaktivaciju enzima bilo slobodnim radikalima nastalim u reakcionim procesima, bilo viškom  $H_2O_2$ , a veliko ograničenje je i cena samog enzima (104).

## **2.8.2. Peroksidaze iz gljive bele truleži**

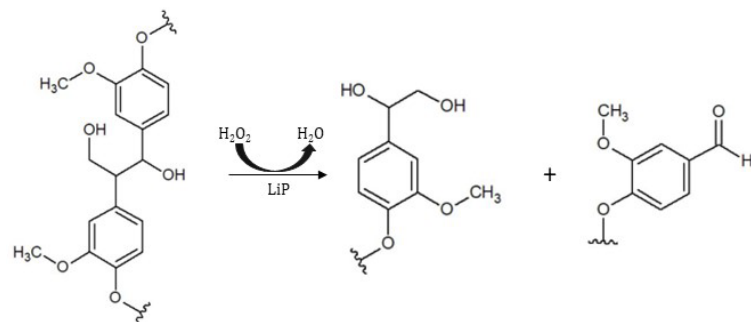
Peroksidaze izolovane iz gljiva, kao što su lignin- i mangan-peroksidaza se, na osnovu molekulske i strukturne sličnosti, svrstavaju u klasu II peroksidaza iz biljaka. Gljive bele truleži oslobađaju zajedno ove dve peroksidaze, tako da one imaju vrlo slične osobine. Lignin- i mangan-peroksidaza učestvuju u degradaciji lignina.

Lignolitičke peroksidaze iz gljiva (mangan- i lignin-peroksidaza) prvi put su otkrivene i izolovane sredinom '80-tih godina iz ekstracelularnog medijuma bazidomiceta *Phanerochaete chrysosporium* (127). Ubrzo nakon njihovog izolovanja, otkriveno je prisustvo ovih enzima i u drugim bazidomicetama gljiva bele truleži (*Trametes versicolor*, *Chrysonila sitophila*, *Phlebia radiata*) (128–130). Pored lakaze i oksidaza, sposobnih za produkciju vodonik-peroksida, i ove dve peroksidaze su pokazale veliki potencijal za razgradnju čak i najtvrdih vrsta drveća (131).

### **2.8.2.1. Lignin-peroksidaza iz gljive bele truleži**

Lignin-peroksidaza (EC 1.11.1.14) – hem peroksidaza sposobna da vrši degradaciju lignina, katalizuje oksidaciju aromatičnih jedinjenja sličnih ligninu, koji u svom hemijskom sastavu nemaju zastupljenu fenolnu grupu. Gljiva bele truleži, pored enzima, luči i veratril-alkohol (VA), koji se ujedno koristi i kao supstrat lignin-peroksidaze. Višak vodonik-peroksida uzrokuje inaktivaciju ovog enzima, a VA, pored toga što učestvuje u katalitičkoj reakciji, zadužen je i da štiti enzim (105). Ranije se smatralo da VA ima ulogu redoks medijatora između enzima i supstrata, koji sprečava da supstrat priđe aktivnom redoks centru na molekulu enzima (105). Tek je u novije vreme ustanovljeno da reakcijom između lignin-peroksidaze i veratril-alkohola dolazi do građenja intermedijernog stanja enzima ( $LiP(II)-VA^+$ ) koje ima redoks potencijal (105).

Iako sekretorni enzimi iz ove grupe imaju jako malu specifičnost prema supstratima, njihova primena je česta u različitim biosintetskim procesima, od lignifikacije ćelijskog zida, preko regulacije ekspresije gena, do katabolizma biljnih hormona (Slika 17) (132).



**Slika 17.** Lignifikacija ćelijskog zida

### 2.8.2.2. Strukturne karakteristike lignin-peroksidaze

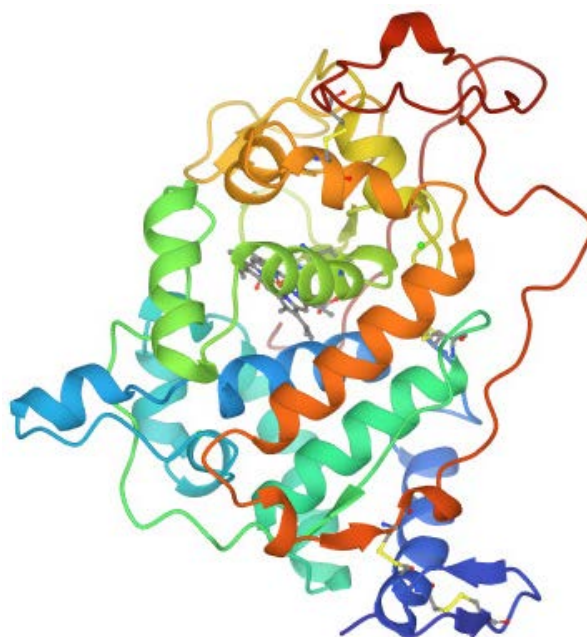
Kristalografskom analizom i modelovanjem je ustanovljena struktura enzima izolovanih iz gljive bele truleži. Svi imaju, kao prostetičnu grupu, protoporfirin IX (hem). Hem grupa je smeštena između N- i C-terminalnog kraja, pri dnu površine koju formiraju ove dve strukture. Gvožđe je pentakoordinovano – vezano je za četiri azota iz pirolskih prstenova na molekulu hema i za azot na imidazolovom prstenu proksimalnog histidina. Drugi, distalni histidin, preko asparaginskih ostataka, učestvuje u samom oksidacionom procesu (132).

Dužina koordinativne veze formirane između Fe i azota u imidazolovom prstenu histidina određuje jačinu redoks potencijala enzima. Povećana baznost imidazola, a samim tim veći redoks potencijal i stabilnije kompleksno jedinjenje posledica su duže veze (105). Proksimalni histidin, sa elektronegativnim uticajem, koji se nalazi u okruženju imidazolnog prstena utiče na njegovu baznost. S obzirom da na redoks potencijal utiče pH vrednost, peroksidaza iz gljive bele truleži ima veći redoks potencijal nego HRP, zbog pH optimuma (2,7, 3,0 ili 4,5) koji je niži u poređenju sa pH optimumom HRP (105).

Zavisnost redoks potencijala od pH se može objasniti jedino učešćem karboksilne grupe na aminokiselinskim ostacima u katalitičkom ciklusu. Kod lignin-peroksidaze utvrđeno je da su Asp183 (vezan je vodoničnom vezom za propionat iz hema) i Glu146 (interaguje sa supstratom) bitni aminokiselinski ostaci koji utiču na reakcioni ciklus enzima (105). Ove osobine nisu primećene ni kod jedne druge peroksidaze izolovane iz biljaka, već su karakteristične isključivo za mangan- i lignin-peroksidazu. Pored toga, lignin-peroksidaza u aminokiselinskoj sekvenci ima prisutna tri triptofana i osam metionina, dok prisustvo tirozinskih ostataka nije potvrđeno (133).

Lignin-peroksidaza je protein, globularnog oblika, koji se sastoji od šest velikih  $\alpha$ -heliksa, 8 manjih i 3 antiparalelne  $\beta$ -ploče (Slika 18) (133).





**Slika 18.** Trodimenzionalna struktura lignin-peroksidaze izolovane iz *Phanerochaete chrysosporium* H8. PDB broj enzima 6A6Q (<https://www.rcsb.org/>)

### 2.8.2.3. Osobine lignin-peroksidaze

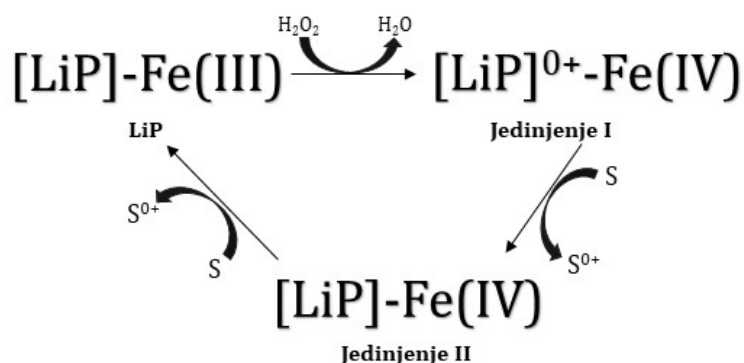
Lignin-peroksidaza je, u poređenju sa drugim peroksidazama izolovanim iz gljiva, nešto veća i sadrži 343 aminokiselinska ostatka. Njena molekulska masa se kreće od 38 do 43 kDa, a izoelektrična tačka varira između 3,3 i 4,7 (134). Ono što je veoma specifično za ovaj enzim i što ga razlikuje od svih ostalih peroksidaza, jeste njegov veoma nizak pH optimum (pH oko 3,0).

Kataliza oksidacije nefenolnih jedinjenja sličnih ligninu smatra se osnovnom ulogom lignin peroksidaze ili kako se drugačije zove diaril-propan-oksigenaze. Oksidativna uloga se odvija u nekoliko koraka. Prvo dolazi do formiranja radikalskog katjona, potom cepanja bočnog lanca, demetilovanja, intramolekulske adicije i na kraju do preuređenja strukture (135). Oksidacija benzil-alkohola i hidrosilacija metilenskih grupa benzena su još neke od reakcija koje se mogu katalizovati u prisustvu lignin-peroksidaze (133).

### 2.8.2.4. Katalitički mehanizam lignin-peroksidaze

Pri degradaciji fenola lignin-peroksidazom kao redoks medijator koristi se veratril-alkohol, supstrat sa jakim redoks potencijalom. Ovo razlaganje se odvija zahvaljujući triptofanskim ostacima na površini molekula enzima, koji grade radikale u reakciji sa hemom. Ovaj deo enzima je takođe veoma bitan za optimizovanje kako aktivnosti, tako i stabilnosti i specifičnosti i enzima i supstrata (133). Dodatna stabilizacija katjonskog radikala je omogućena pre svega prisustvom kiselog okruženja oko Trp171 (133).

Katalitički ciklus lignin-peroksidaze obavlja se u tri koraka (Slika 19).



**Slika 19.** Katalitički mehanizam lignin-peroksidaze

U prvom koraku odvija se oksidacija feri-centra (Fe(III)) na enzimu u stanju mirovanja u prisustvu vodonik-peroksida, pri čemu nastaje okso-ferilno intermedijerno stanje enzima (jedinjenje I). U drugom koraku ovaj kompleks (prelazno jedinjenje kom nedostaju 2e<sup>-</sup>) se redukuje supstratom (aromatične strukture, bez fenolnog centra, S). Supstrat je taj koji donira jedan elektron jedinjenju I i vodi stvaranju jedinjenja II (kome sada nedostaje samo 1e<sup>-</sup>). Treći korak obuhvata doniranje poslednjeg raspoloživog elektrona od strane redukovanog supstrata jedinjenju II, čime se peroksidaza vraća u stanje mirovanja (136).

#### 2.8.2.5. Eseji za određivanje aktivnosti lignin-peroksidaze

Za praćenje i kvantifikaciju aktivnosti lignin-peroksidaze razvijen je veliki broj eseja, a većina uključuje upotrebu kako fenolnih, tako i nefenolnih, ligninu sličnih, jedinjenja. Supstrati, koji su pokazali veliku strukturnu sličnost sa prirodnim ligninom, a nemaju zastupljenu fenolnu komponentu, već su i sami derivati metoksibenzena, mogu da se koriste kao supstrati za lignin-peroksidazu. Među ispitanim supstratima posebno se izdvojio 3,4-dimetoksibenzil alkohol (veratril-alkohol), koji može da se, u prisustvu 2 elektrona, oksiduje do odgovarajućeg aldehida (137). Kao najveća prednost ovog supstrata izdvaja se jednostavnost same reakcije, za razliku od drugih ispitanih supstrata koji su pokazali mnoge sporedne reakcije (137).

Lignin-peroksidaza katalizuje oksidaciju veratril-alkohola do veratraldehida, jedinjenja koje apsorbuje svetlost telesne dužine 310 nm, tako da se ova reakcija može veoma uspešno pratiti spektrofotometrijski (131). Istraživanja su pokazala da je za formiranje jednog mola aldehida neophodno prisustvo 1 mola vodonik-peroksida. Kako bi se odredila stehiometrija ove reakcije ispitane su različite koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (od 2,2 do 260 μmol/L) pri nepromenjenoj koncentraciji alkohola (2 mmol/L) (137). Pri odnosu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i alkohola 2:1, dolazi do formiranja sporednih proizvoda. Reakcija je praćena i na različitim pH vrednostima. Utvrđeno je da je za oksidaciju veratril-alkohola optimalna pH 2,0, dok na pH vrednostima većim od 5,0 nije zapažena značajnija aktivnost enzima (137). Bitno je napomenuti da se vodonik-peroksid ponaša dvojako, i kao supstrat, ali i kao kompetitivni inhibitor kataličke reakcije.

Za kvantifikaciju aktivnosti lignin-peroksidaze, pored prethodno opisanog eseja sa veratril-alkoholom, koriste se i noviji eseji koji se baziraju na oksidaciji mikromolarnih koncentracija enzima azo B bojama (138).

Ukoliko se izuzmu ova dva prethodno opisana eseja za određivanje aktivnosti lignin-peroksidaze, postoje još i oni koji koriste supstrate za oksidaciju kao što su 2-keto-4-metiol buterna kiselina (KMB) (139).

### 2.8.2.6. Primena lignin-peroksidaze

Osnovna uloga ekstracelularnih enzima izolovanih iz gljive bele truleži (mangan- i lignin-peroksidaze) je u razgradnji lignina. Karakteristična struktura lignina omogućuje potencijalnu primenu ovih enzima i u degradaciji drugih, ligninu sličnih jedinjenja. Mogu se koristiti i za degradaciju nekih po životnu sredinu veoma štetnih jedinjenja, kao što su policiklična i hlorovana aromatična jedinjenja, pesticidi, boje, azidi, umreženi polimeri itd. (105). Katabolizam razgradnje lignina iz obrađenog drveta, zaostalog iz industrije celuloze i papira, je jedna od najbitnijih uloga lignin-peroksidaze (133). Ovaj enzim ima potencijal i za degradaciju katrana, ksenobiotika, bisfenola A i sintetskih boja (105,131). Zanimljivo je pomenuti da se lignin-peroksidaza može koristiti i za biodegradaciju plastike, trenutno jednog od najvećih zagađivača životne sredine na planeti (140).

## 2.9. Imobilizacije enzima

Da bi se odgovarajuće reakcije katalizovale enzimima, neophodno je da enzimi budu prisutni u nekom od sledeća tri oblika:

1. kao samostalni molekuli prisutni u rastvoru
2. u obliku agregata sa drugim molekulima
3. vezani za neki nosač odnosno imobilizovani.

Kada se kaže „imobilizovani enzim“ misli se pre svega na onaj enzim kome je ograničeno fizičko kretanje, ili drugačije rečeno enzim koji je lokalizovan u tačno određenom delu prostora. Pored toga što zadržava svoju katalitičku aktivnost, imobilizacijom enzim može da stekne i neke nove karakteristike, kao što je na primer mogućnost kontinuirane upotrebe (141). Od trenutka kada je prvi imobilizovani enzim primenjen u industriji (1966. godine) pa sve do danas, njihova potencijalna primena u različitim oblastima se proširuje, od biotehnologije, preko dijagnostike do hromatografije i proizvodnje biosenzora (141). Veliko interesovanje naučne zajednice za ovaj oblik enzima zasnovano je na njihovim osobinama, koje su poboljšane u odnosu na svojstva rastvornih enzima, kao i na brojnim prednostima imobilizovanih enzima, uočenih prilikom njihove široke primene.

U zavisnosti od prirode kako enzima, tako i nosača, za imobilizacije se mogu koristiti različite metode od adsorpcije preko jonskog do kovalentnog vezivanja. Važno je istaći da, bez obzira na primenjeni metod imobilizacije, interakcija između nosača i enzima dovodi do poboljšanja nekih osobina samog enzima kao što su npr. katalitička moć i stabilnost na povišenim temperaturama.

Prvi slučaj imobilizacije zabeležen je početkom 19. veka kada su imobilizovani mikroorganizami upotrebljeni u industriji za proizvodnju sirćetne kiseline (141). Moderna istorija imobilizacije počela je '60-tih godina, a obeležena je proizvodnjom L-aminokiselina i izomerizacijom glukoze (141). Sve do '90-tih godina imobilizovali su se samo individualni molekuli enzima, dok su nešto kasnije za imobilizacije korišćeni kompleksniji enzimski oblici koji su primenjeni u regeneracijama kao kofaktori i za imobilizacije ćelija (141). Od tada pa sve do danas, imobilizacija enzima se smatra multidisciplinarnom oblašću sa velikim potencijalom primene kako u istraživanjima tako i u različitim oblastima industrijske proizvodnje.

Uprkos širokoj rasprostranjenosti ove teme u naučnim krugovima i razumevanju mnogih bitnih pojmova u enzimskim imobilizacijama, i dalje nije razvijen jedinstven metod koji se može primeniti bez obzira na korišćeni enzim i nosač već je svako novo istraživanje jedinstveno i inovativno, i razvija se po principu probe i greške.

Ono što je zajedničko za svaki imobilizovani biokatalizator jesu njegove poboljšane karakteristike koje zadovoljavaju široke potrebe modernih katalitičkih procesa – blagi reakcioni uslovi, visoka aktivnost i selektivnost, operativna stabilnost i produktivnost, kao i niska cena (142).

Iako se prema definiciji imobilizacija enzima može posmatrati kao vezivanje rastvornih enzima za nerastvornu, inertnu podlogu sa ciljem očuvanja osobina samog enzima, na ovaj način se može ograničiti njegov učinak. Konformacione promene enzimske strukture zajedno sa sternim smetnjama i ograničenjima nastalim kao posledica prenosa mase, samo su neki od nedostataka koji mogu da utiču na smanjenje aktivnosti ili stabilnosti enzima prilikom njihove imobilizacije na odgovarajući nosač (143). Međutim, imobilizacijom biokatalizatora se češće ostvaruju prednosti kao što su: poboljšana efikasnost i stabilnost, mogućnost ponovne upotrebe, kao i sposobnost nadoknađivanja izgubljene katalitičke aktivnosti (144). Pored navedenog tu su još i: smanjenje vremena reakcije, lakoća odvajanja imobilizovanog enzima iz reakcione smeše, mogućnost kontinualne primene i smanjena podložnost mikrobnjoj kontaminaciji (145). Sve navedene prednosti opravdavaju široku primenu imobilizovanih enzima u različitim oblastima (farmaceutska, prehrambena industrija, u biomedicini, proizvodnji biodizela, tretiranju otpadnih voda itd.) (82).

Prilikom izbora metode za imobilizaciju, bitno je obratiti pažnju na planiranu primenu biokatalizatora i u odnosu na to izabrati pogodan metod koji bi obezbedio, pre svega, održivu katalitičku aktivnost enzima. Cilj imobilizacije je poboljšanje karakteristika enzima, jer njegova dalja primena zavisi upravo od toga. Osobine imobilizovanih enzima koje su odgovorne za učinak biokatalizatora prilikom primene u najrazličitijim oblastima i koje je neophodno pratiti tokom procesa imobilizacije jesu aktivnost, stabilnost i selektivnost (142).

### **2.9.1. Aktivnost enzima**

Poboljšanje enzimske aktivnosti imobilizacijom primećeno je još '60-tih godina prošlog veka, prilikom imobilizacije tripsina na naelektrisanom nosaču (142). Od tada pa do danas je ustanovljeno da mnogi enzimi imobilizovani različitim metodama pokazuju povećanu aktivnost u poređenju sa nativnim.

Obično se imobilizacijom zadržava oko 50% aktivnosti solubilnog enzima. Faktori od kojih zavisi koliko će se imobilizacijom očuvati ili poboljšati aktivnost nekog enzima su pH vrednost sredine, tip nosača, količina dodatog enzima za imobilizaciju, kao i odabir metode za vezivanje enzima na nosač. Ukoliko se doda izuzetno velika količina enzima za imobilizaciju na nekom poroznom nosaču, kao rezultat nejednake raspodele enzima unutar nosača nastaju brojne difuzione smetnje koje dovode do smanjenja aktivnosti imobilizovanog enzima (142).

Nešto veći procenat zadržavanja enzimske aktivnosti je primećen kod alosternih enzima, koji prilikom imobilizacije menjaju svoju konformaciju čime se povećava dostupnost aktivnom centru, a samim tim i aktivnost imobilizovanog enzima (142). Ukoliko se posmatra u globalu, za bilo koji enzim i bilo koji nosač, mogu se istaći odgovarajući faktori koji u manjoj ili većoj meri utiču na poboljšanje katalitičke moći imobilizovanog biokatalizatora (142):

1. uticaj okoline
2. uticaj pH vrednosti sredine
3. konformacione promene
4. orijentacija molekula
5. fleksibilnost molekula
6. udeo vode u rastvaraču i
7. način vezivanja.

### 2.9.2. Stabilnost enzima

Za razliku od stabilnosti nativnih enzima, koja je određena isključivo unutrašnjom strukturom, na stabilnost imobilizovanih enzima utiču brojni faktori (142):

1. mikrookolina
2. struktura nosača (hemijska i fizička)
3. priroda interakcije između enzima i nosača
4. mesto vezivanja i broj ostvarenih veza sa enzimom
5. prisustvo „spejsera“, koji povezuje molekul enzima sa nosačem i
6. uslovi pod kojima se odvija reakcija imobilizacije.

Neophodno je posebno naglasiti da bez obzira na to koji enzim ili koji tip nosača se koriste prilikom imobilizacije, sasvim je sigurno da će se kao rezultat njihove interakcije dobiti biokatalizator sa poboljšanom stabilnošću u odnosu na solubilni enzim. Dakle, svaki proces imobilizacije vodi formiranju stabilnijeg proizvoda. Međutim, veoma je teško istaći odgovarajući metod i garantovati da će baš on obezbediti visoku aktivnost biokatalizatora, jer je svaki imobilizacioni proces specifičan. Čak ni ukoliko se primeni isti metod za imobilizaciju enzima, a tom prilikom koriste različiti nosači ili se promene uslovi imobilizacije (pH, temperatura, količina enzima ili nosača i sl.) neće se dobiti imobilizovani enzim iste stabilnosti.

### 2.9.3. Selektivnost enzima

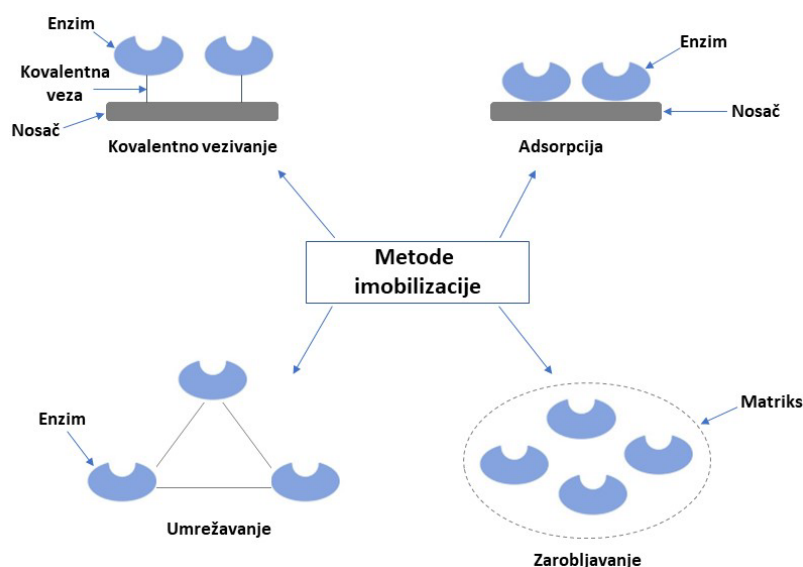
Poboljšanje selektivnosti prilikom imobilizacije enzima je jedan od zahteva koji mora biti ispunjen kako bi se zadovoljile potrebe njihove potencijalne primene pre svega u farmaceutskoj industriji. Mogu se izdvojiti četiri oblika selektivnosti: selektivnost supstrata, regioselektivnost, stereoselektivnost i selektivnost funkcionalnih grupa (142). Regioselektivnost je označena kao sposobnost delovanja samo u jednom određenom delu molekula, dok se sposobnost delovanja samo na odgovarajući enantiomer ili diastereomer naziva stereoselektivnost (142). Ukoliko enzim deluje na odgovarajuća hemijski srodna jedinjenja iz neke grupe, ova selektivnost predstavlja selektivnost supstrata. Selektivnost funkcionalnih grupa je osobina enzima koja podrazumeva sposobnost enzima da obavlja svoju aktivnost u prisustvu samo određenih funkcionalnih grupa (142).

U toku imobilizacije enzim može da zadrži postojeću selektivnost, ili ona može da se promeni tokom vezivanja za nosač, a takođe je uočeno da i neselektivni enzimi nakon imobilizacije mogu da postanu selektivni (142).

Selektivnost enzima tokom imobilizacije se može promeniti na dva načina: pod uticajem nosača ili pod uticajem neke konformacione promene (142). Ukoliko se menja pod uticajem nosača, dva faktora doprinose toj promeni – jedan je veličina pora, a drugi difuzija. Selektivnosti nastale pod uticajem konformacionih promena mogu da potiču od mikrookoline ili od aktivnog centra (142).

### 2.9.4. Metode imobilizacije

Osobine imobilizovanog enzima u najvećoj meri zavise od izbora metode korišćene za imobilizaciju. Stoga je razvijen veliki broj različitih metoda, a svaka od njih ima svoje prednosti i mane. Na Slici 20 su prikazane četiri metode koje se najviše upotrebljavaju prilikom imobilizacije enzima: adsorpcija, kovalentno vezivanje, umrežavanje i zarobljavanje unutar nekog matriksa.



**Slika 20.** Šematski prikaz najčešće korišćenih metoda za imobilizaciju enzima

### 2.9.4.1. Adsorpcija

U zavisnosti od načina na koji se odvija adsorpcija enzima na neki nosač, adsorpcione metode se mogu podeliti prema vrsti ostvarenih interakcija između nosača i enzima na fizičke, elektrostatičke ili hidrofobne interakcije.

Jednostavan i pre svega ekonomičan metod koji se koristi za imobilizaciju enzima je metod fizičke adsorpcije. To je direktan proces, koji podrazumeva uspostavljanje slabih interakcija između enzima i nosača, kao što su Van der Valsove sile ili hidrofobne interakcije (17). Ovaj proces ne zahteva korišćenje opasnih hemikalija, već se imobilizacija odvija jednostavnim mešanjem nosača sa rastvorom enzima u odgovarajućem vremenskom periodu. Višak enzima koji se nije adsorbovao na površini nosača se lako može ukloniti ispiranjem odgovarajućim puferom, čime je obezbeđeno zadržavanje njegove aktivnosti. Metod fizičke adsorpcije spada u reverzibilne procese za imobilizaciju enzima, što omogućava ponovnu upotreba primenjenog nosača [83].

Adsorpcija je jedna od metoda za imobilizaciju enzima koja se veoma često koristi. To je uglavnom posledica izuzetno niske cene, kao i jednostavnosti celokupnog procesa za imobilizaciju. Industrijska primena je ograničena, jer se slabe interakcije formirane između enzima i nosača mogu lako raskinuti promenom temperature, pH vrednosti ili polarnosti rastvarača (146).

Ukoliko se ovaj metod uporedi sa kovalentnom metodom za imobilizaciju, istaći će se brojne prednosti, koje se prvenstveno ogledaju u odsustvu bilo kakvih konformacionih promena na aktivnom mestu enzima (147). Ograničavajući faktori za širu upotrebu adsorpcionih metoda za imobilizacije enzima su pre svega niska operativna stabilnost imobilizovanog enzima, njegova denaturacija, kao i curenje enzima sa površine nosača (82,147).

Pored opisane fizičke metode, enzim se može vezati za neki nosač i pomoću elektrostatičkih interakcija. Kako bi se uspostavile polarne ili jonske interakcije, neophodno je obezbediti da enzim i nosač budu suprotno naelektrisani. pH vrednost rastvora i izoelektrična tačka samog enzima utiču u najvećoj meri na njegovo naelektrisanje (148). Imobilizacija se može ostvariti bilo adsorpcijom enzima na suprotno naelektrisani polimerni nosač, dobijen prethodnim izlaganjem nosača reakcijama oksidacije ili redukcije, bilo formiranjem nosača sastavljenog od suprotno naelektrisanih slojeva, na koji se može adsorbovati odgovarajući enzim (17).

Na ovaj način se smanjuje mogućnost denaturacije enzima, ali se takođe utiče i na njegovu stabilnost na različitim pH vrednostima.

Ukoliko se imobilizacija enzima na nosač vrši posredstvom hidrofobnih interakcija, moguće je uticati na njihovu jačinu menjanjem odgovarajućih parametara. To su pre svega pH, temperatura i koncentracija (149). Enzimi se najčešće adsorbuju na nosačima različitih karakteristika poroznosti, kao što su sepiolit, hitozan, hidroksiapatit i slični.

#### **2.9.4.2. Kovalentno vezivanje**

Imobilizacija enzima se može ostvariti formiranjem kovalentne veza između nosača i molekula enzima. Za ostvarivanje ove veze neophodno je da na enzimu bude prisutna neka od sledećih funkcionalnih grupa: amino, karboksilna, hidroksi, tiolna, fenolna ili imidazolna grupa (150). Ostvarena veza između enzima i nosača je jačeg intenziteta, tako da se smanjuje mogućnost disocijacije i curenja enzima sa površine nosača, a imobilizovani enzim je otporniji na promene reakcionih uslova (151). Tokom imobilizacije može doći do promene konformacione strukture molekula enzima, čime se utiče na smanjenje aktivnosti. Kako bi se prevazišlo ovo ograničenje, predloženo je korišćenje umrežavajućeg agensa (glutaraldehid npr.), koji je odgovoran za održavanje strukturnih i funkcionalnih osobina enzima tokom procesa imobilizacije (148). Proces imobilizacije započinje aktivacijom površine nosača dodatkom nekog umrežavajućeg molekula, čija je osnovna funkcija da povezuje nosač i molekul enzima. Izbor tipa agensa zavisi od matriksa koji se koristi za imobilizaciju (da li je to neki biopolimer, neorganski ili sintetski polimer), kao i od reakcionih uslova tokom procesa imobilizacije. Nakon aktivacije površine nosača ostvaruje se kovalentna veza sa molekulom enzima. Povećana stabilnost enzima i stereospecifičnost, ali i sprečavanje curenja enzima sa površine nosača, samo su neke od brojnih prednosti ove metode za imobilizaciju (152). I pored dugačkog spiska nedostataka ovog procesa (denaturacija, hemijska modifikacija enzima pre imobilizacije, dugačak period inkubacije, samo male količine enzima se mogu imobilizovati itd.), enzimi imobilizovani na ovaj način su pokazali dobru stabilnost i mogućnost ponovne upotrebe, što ih stavlja na vrh liste potencijalne primene u različitim oblastima industrije (153).

#### **2.9.4.3. Zarobljavanje unutar matriksa**

Ireverzibilni metod za imobilizaciju enzima, koji podrazumeva zarobljavanje enzima unutar nekog matriksa, je često korišćen metod. Kada se enzim jednom imobilizuje unutar membrane, omogućen je prolaz supstrata i proizvoda enzimskih reakcija, ali ne i prolaz enzima.

Kao matriksi za ove reakcije imobilizacije najčešće se koriste organski nosači, pre svega različiti polimeri, polisaharidi, želatin itd. (144). S obzirom da imobilizovani enzim ostaje zarobljen unutar polimerne membrane, nema direktnog uticaja okoline na njega, pa je samim tim i njegova stabilnost poboljšana (154,155). Ovakvim načinom imobilizacije značajno je smanjena mogućnost curenja enzima, koja je uglavnom uslovljena veličinom pora na polimeru koji se koristi kao matriks (17). Zahvaljujući zaštićenosti enzima unutar matriksa, omogućena je njegova ponovna upotreba (82).

Zarobljavanje unutar matriksa se ostvaruje primenom različitih tehnika, pri čemu je najčešće korišćena mikroenkapsulacija. Ova metoda za imobilizaciju podrazumeva enkapsulaciju enzima unutar semipermeabilne membrane (polimerne membrane ili mikrokapsule). Poroznost membrane je takva da onemogućava prolaz većih molekula, kao što su enzimi, a obezbeđuje propuštanje manjih. Na ovaj način će se enkapsulacijom očuvati aktivnost enzima, poboljšati njegova stabilnost i osigurati kontinuirana upotreba (148).

#### 2.9.4.4. Umrežavanje

Umrežavanje ili kopolimerizacija, kako se ovaj metod za imobilizaciju drugačije zove, je jednostavan i ireverzibilan metod koji ne uključuje primenu bilo kakvog matriksa ili nosača.

Enzimi se međusobno povezuju kovalentnim vezama, a kao polifunkcionalni reagensi se najčešće koriste glutaraldehyd ili diazonijum soli, koji imaju ulogu mosta između dva molekula enzima (82). Ovime se mogućnost curenja enzima smanjuje na minimum, povećava se enzimski stabilnost, a primenom glutaraldehyda se, kao posledica modifikacije enzima, može javiti smanjena aktivnost (17).

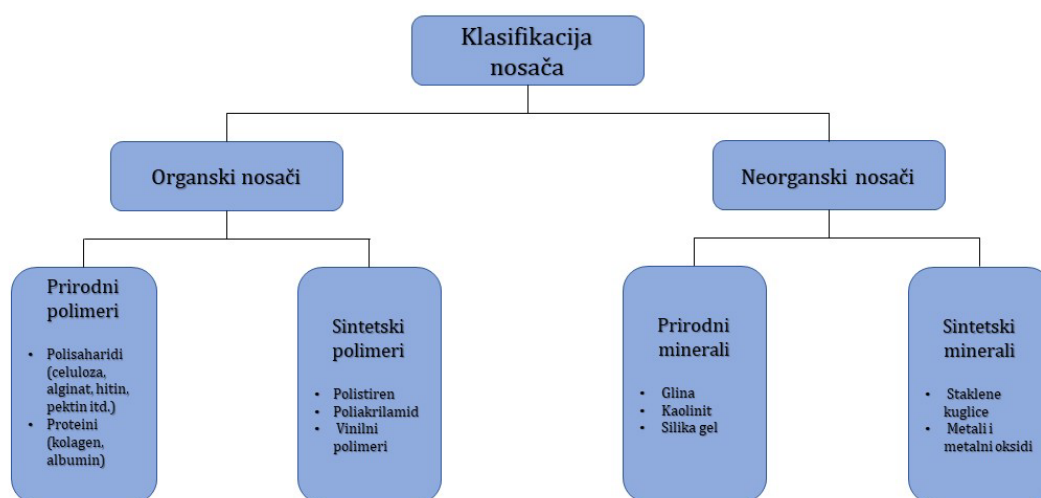
U zavisnosti od pristupa koji se koristi prilikom umrežavanja mogu se razlikovati sledeće metode (17):

1. umreženi rastvorni enzimi (cross-linked dissolved enzymes, CLEs)
2. umreženi enzimski kristali (cross-linked enzyme crystals, CLECs)
3. umreženi enzimski agregati (cross-linked enzyme aggregates, CLEAs)

Ukoliko se umrežavanje rastvornih enzima vrši preko površinskih amino grupa, a u prisustvu bifunkcionalnog hemijskog umreživača kao što je glutaraldehyd, dobijaju su umreženi enzimski agregati (CLEs) (149). Ovi umreženi rastvorni enzimi zadržavaju svoju katalitičku aktivnost, ali imaju lošu stabilnost i reproduktivnost, pa su iz tog razloga korišćeni u jako malom broju istraživanja (149). Njih su ubrzo zamenili umreženi enzimski kristali (CLECs), nastali intermolekulskim umrežavanjem kristalnih enzima glutaraldehydom. Ovakvi enzimski agregati imaju poboljšane mehaničke karakteristike, povećanu stabilnost pri povišenim temperaturama, na različitim pH vrednostima, ali i u prisustvu organskih rastvarača (156). Umreženi enzimski kristali mogu se primeniti na industrijskom nivou, ali je proces dobijanja prečišćenih kristalnih enzima jako skup, čime je i sama primena ovakvih sistema ograničena (156). Čvrste forme nastale umrežavanjem prečišćenih enzimskih agregata, predstavljaju umrežene enzimске agregate (CLEAs), koje na okupu drže izuzetno jake nekovalentne interakcije (156). Na ovaj način se umrežava veliki broj enzima i enzimskih agregata, a njihova stabilnost i aktivnost je slična kao i u slučaju umreženih enzimskih kristala (156).

#### 2.9.5. Nosači za imobilizaciju enzima

Skoro svaki oblik imobilizacije enzima zahteva prisustvo nekog nosača. Nosači koji se najviše koriste u ove svrhe mogu se, na osnovu hemijskog sastava, podeliti na: organske i neorganske nosače (Slika 21).



Slika 21. Klasifikacija nosača za imobilizaciju enzima



### 2.9.5.1. Organski nosači

Organski nosači koji se koriste za reakcije imobilizacije enzima su klasifikovani u dve velike grupe. U prvu grupu spadaju svi biopolimeri odnosno polimeri prirodnog porekla, to su uglavnom u vodi nerastvorni polisaharidi – hitin, hitozan, celuloza itd. Sintetski organski polimeri nalaze se u drugoj grupi i to su npr. polistireni, poliakrilamidi i vinilni polimeri.

### 2.9.5.2. Biopolimeri

Svi prirodni materijali dobijeni iz obnovljivih izvora spadaju u grupu biopolimera. Osobine koje ih izdvajaju među brojnim nosačima su biokompatibilnost, biorazgradivnost i netoksičnost (17). Imaju veliki afinitet za vezivanje različitih enzima, pri čemu njihova struktura ostaje očuvana, a zadržavaju kako svoje karakteristike tako i stabilnost (17).

Strukturne osobine biopolimera, kao što su prisustvo različitih funkcionalnih grupa na površini (amino, hidroksi ili karbonilne grupe) olakšavaju adsorpciju enzima ili nastajanje kovalentnih veza između enzima i nosača. Mogućnost formiranja hidrogelova omogućuje enkapsulaciju enzima unutar biopolimera (17). Najveću primenu među biopolimerima su pronašli alginat, agaroz, celuloza, hitozan, pektin, skrob i brojni drugi polisaharidi.

#### 2.9.5.2.1. Alginat

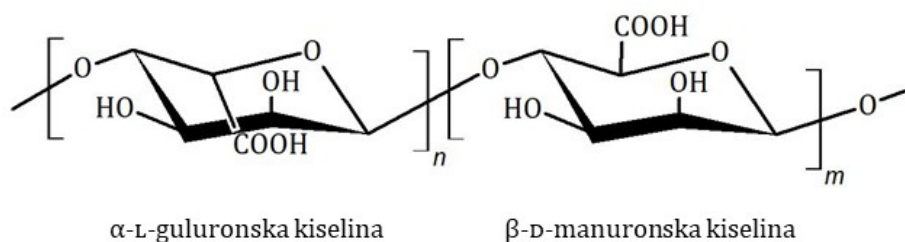
Alginat, prirodni anjonski kopolimer najviše zastupljen u ćelijskim zidovima mrkih algi, izolovan je 1881. godine. Prisustvo alginata je potvrđeno i kod nekih crvenih algi, ali i u bakterijama (*Azotobacter* i *Pseudomonas*) (157). Njegova kompletna struktura je prvi put potvrđena 1955. godine, hromatografskim analizama koje su izveli Fisher i Dorfel. Oni su zaključili da u sastav alginata, pored ranije potvrđene D-manuronske kiseline, ulazi i L-guluronska kiselina. Larsen je pomoću posebnih elektroforetskih metoda potvrdio prisustvo M, G i MG blokova u alginatnom lancu.

Za proizvodnju alginata koriste se najviše mrke alge (*Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* itd.), čije se prečišćavanje vrši u baznim uslovima, na pH vrednostima oko 6, pošto se algininska kiselina taloži na pH 3,6 (158). Najčešće se za prečišćavanje koriste natrijum-karbonat, natrijum-hidroksid i aluminijum-hidroksid (158). Taloženje alginata iz filtrata se vrši dodavanjem etanola, neke kiseline ili kalcijumovih jona (158). Daljim prečišćavanjem i konverzijom, dobija se alginat u obliku natrijumove soli, koji se može koristiti u različite svrhe.

Moguća je i bakterijska sinteza alginata, uz formiranje alginata definisane hemijske strukture i poboljšanih fizičkih osobina. Ovaj metod se sastoji od nekoliko koraka, a karakteriše ga napredak u oblastima regulacije biosinteze alginata, koji omogućuje da se lakom modifikacijom samih bakterija dobijaju derivati alginata željenih svojstava i sa većom potencijalnom primenom u biomedicini (159).

#### 2.9.5.2.2. Hemijska struktura alginata

Alginat je anjonski heteropolisaharid, dugačkog niza, koji se sastoji od dva monomera:  $\alpha$ -L-guluronske kiseline (G blok) i  $\beta$ -D-manuronske kiseline (M blok) (Slika 22).



Slika 22. Hemijska struktura alginata

Ovi ostaci su C5 epimeri, povezani međusobno  $\alpha$ -(1–4) glikozidnim vezama. M i G blokovi u strukturi alginata mogu biti raspoređeni uzastopno (ponavljajući GGGG i MMMM blokovi), naizmenično (MGMGMG) ili nasimično (MMGMGG) (158). Dužina svakog bloka, kao i njihova zastupljenost u alginatnom lancu zavise od tipa izvora iz kog je alginat izolovan. Stoga, postoji veliki broj, preko 200, različitih vrsta alginata (159).

Slobodne hidroksilne i karboksilne grupe u alginatnom lancu omogućuju građenje vodoničnih veza, dok je za alginat izolovane iz nekih bakterija karakteristično i prisustvo acetilnih grupa (157).

Veruje se da u umrežavanju alginata npr. kalcijumovim jonima učestvuju G blokovi, pa će od zastupljenosti ovog bloka zavisiti osobine kako samog alginata, tako i alginatnog hidrogela (160).

Raspored blokova i konformaciona struktura utiču na fizičko-hemijske osobine alginata, a samim tim i na njegovu dalju primenu, kako industrijsku tako i biološku i medicinsku (161).

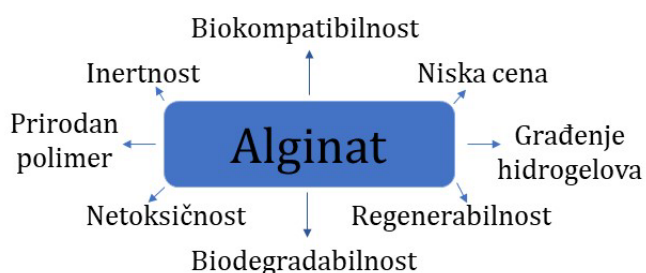
### 2.9.5.2.3. Fizičko-hemijske osobine alginata

Parametri koji utiču na fizičko-hemijske osobine alginata su pre svega priroda izvora iz kog je alginat izolovan, mesta u algama ili bakterijama gde je alginat zastupljen, kao i geografsko poreklo biljke i godišnje doba kad se vršila ekstrakcija alginata iz odgovarajućeg izvora (158).

Molekulska masa alginata se kreće od 32.000 do 400.000 g/mol. Viskoznost alginatnog gela zavisi u najvećoj meri od njegove molekulske mase (162). Što je veća molekulska masa, veća je i viskoznost.

Alginat u obliku kiseline se ne rastvara u vodi i organskim rastvaračima, dok su njegove soli i esterifikovani oblici rastvorni i u vodi formiraju stabilne viskozne rastvore (162). Viskoznost alginatnog rastvora se povećava sa smanjenjem pH vrednosti. Na pH vrednostima od oko 3, karboksilne grupe su protonovane, pa mogu da grade vodonične veze, čime se postiže najveća viskoznost rastvora (159).

Alginat je biokompatibilan i netoksičan, a sa povećanjem udela M blokova raste njegova imunogenost (Slika 23) (162). Biodegradabilnost, netoksičnost, sposobnost geliranja i prisustvo različitih funkcionalnih grupa odgovorni su za veliku primenu alginata u prehrambenoj, kozmetičkoj industriji, kao i u agrikulturni (163).



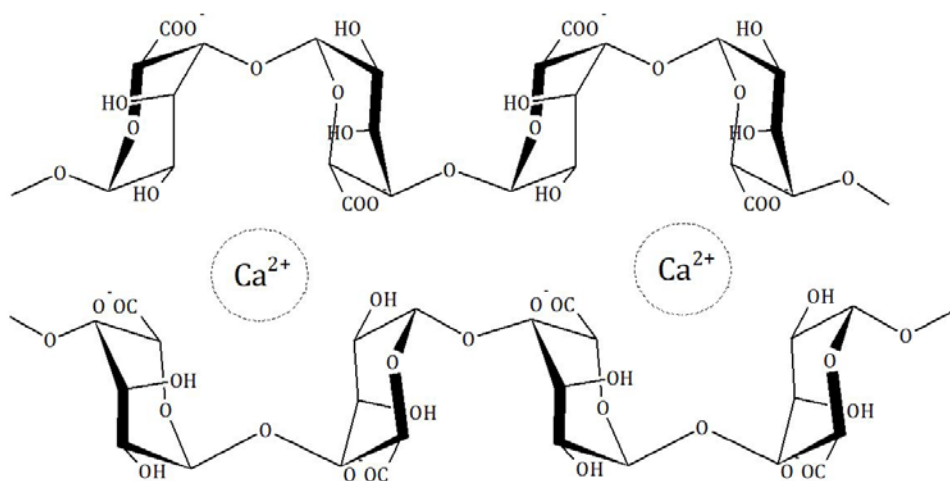
**Slika 23.** Prednosti alginatnog polimera

Ukoliko se neki drugi prirodni polimeri (kolagen, hitozan i sl.) pomešaju sa alginatom u cilju poboljšanja fizičkih i hemijskih osobina, dobijaju se kompozitni alginatni gelovi (162). Kombinovanjem alginata sa drugim materijalima kao što su nanočestice, staklo ili keramika dobijaju se materijali koji se mogu primeniti i za previjanje rana (162).

#### 2.9.5.2.4. Hidrogelovi

Alginat u obliku hidrogela je našao najveću primenu u biomedicini (za dostavu lekova, zarastanje rana ili tkivni inženjering) (159). Osnovna definicija nekog hidrogela jeste da je to umrežena trodimenzionalna forma hidrofилnih polimera, koja sadrži visok procenat vode. Hidrogelovi se najčešće dobijaju fizičkim ili hemijskim metodama umrežavanja, a osobine dobijenog hidrogela zavise od izabrane metode, kao i od svojstava samog polimera (molekulske mase, prisutnih funkcionalnih grupa na površini itd.) (159). Biokompatibilnost je osobina na kojoj se zasniva ovako široka primena hidrogelova u biomedicini.

Za umrežavanje alginata se uglavnom koristi jonski metod, koji se zasniva na mešanju ovog polimera sa nekim jonskim umrežavajućim agensom, najčešće dvovalentnim katjonom ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ) (159). S obzirom da u alginatnom lancu G blokovi omogućuju koordinaciju sa dvovalentnim jonima, pretpostavlja se da se katjoni vezuju isključivo na ove blokove. Nastali hidrogel ima karakterističan oblik – „kutije sa jajima“ („egg-box“) (Slika 24).



**Slika 24.** Umrežavanje alginata u prisustvu kalcijumovih jona

G blokovi dva susedna polimerna lanca alginata koordinuju se sa dvovalentnim katjonima obrazujući strukturu koja podseća upravo na kutiju sa jajima, pa je iz tog razloga hidrogel i dobio ime (164). Svaki jon kalcijuma se vezuje sa četiri ostatka guluronske kiseline (161). Do formiranja hidrogelova dolazi kao posledica zamene monovalentnih jona na alginatu polivalentnim jonima umrežavajućeg agensa, i postepene koordinacije polivalentnih jona sa karboksilatnim jonima alginatnog makromolekula (161). Kao umrežavajući agens najčešće se koristi kalcijum-hlorid, koji obezbeđuje brzo umrežavanje. Međutim, zbog njegove velike rastvorljivosti teško je kontrolisati sam proces umrežavanja i formiranja hidrogela (159). Iz toga razloga se umesto njega koriste kalcijum-sulfat i kalcijum-karbonat, koji su slabije rastvorni, pa je samim tim i proces geliranja nešto sporiji (159). Ukoliko se geliranje odvija slabijim intenzitetom, pri nešto povišenoj temperaturi, dobijaju se hidrogelovi sa boljim kako mehaničkim, tako i hemijskim osobinama (159). Geliranje alginata je određeno pre svega tipom umrežavajućeg agensa i njegovom koncentracijom, ali i hemijskim osobinama polimera, kao što su molekulska masa, hemijski sastav, stepen polimerizacije, dužina alginatnog lanca i slično (161).

Najbitnije fizičke osobine alginatnog hidrogela su njegova viskoznost i jačina (161). Istraživanja su pokazala da na jačinu gela direktno utiče umrežavajući jon. Zato su svi joni koji se koriste za umrežavanje alginata poređani po njihovom afinitetu prema ovom makromolekulu:  $\text{Mg}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Zn}^{2+}, \text{Ni}^{2+}, \text{Co}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ba}^{2+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Pb}^{2+}$  (161). Najjači hidrogelovi se formiraju ukoliko se za geliranje koriste  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Sr}^{2+}$ .

Pored jonskog, geliranje se može ostvariti i kovalentnim umrežavanjem, u prisustvu umrežavajućeg agensa kao što je polietilen glikol (PEG) (159). Na ovaj način se u većoj meri može kontrolisati proces nastajanja hidrogela, ali i njegove osobine. Mana ove metode za umrežavanje alginata je korišćenje toksičnih supstanci, koje je vrlo teško eliminirati iz nagrađenog hidrogela, čime se automatski ograničava i njegova potencijalna primena (159).

Ograničavajući faktor dalje primene hidrogela je njegova slaba mehanička stabilnost. Glavne mehaničke osobine svakog hidrogela su stabilnost, čvrstoća i elastičnost (163). Osnovna svojstva hidrogela na bazi alginata, koja su važna za potencijalnu primenu u različitim oblastima su, pored prethodno navedenih, još i bubrenje, poroznost, curenje alginata iz gela i njegova imunogenost (165).

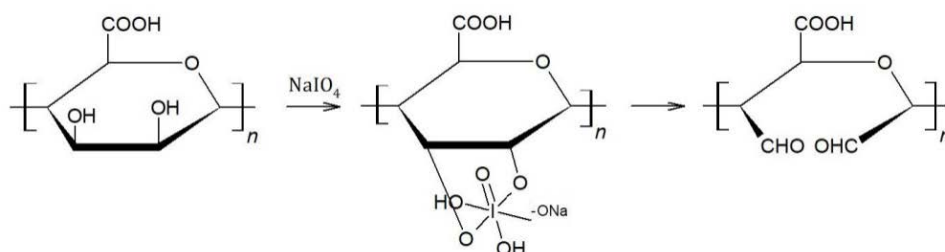
#### 2.9.5.2.5. Modifikacija alginata

Prisustvo funkcionalnih grupa kao što su hidroksilna ili karboksilna grupa u lancu molekula alginata omogućuje njegovu hemijsku modifikaciju. Modifikacijom nagrađeni derivati alginata pokazuju poboljšane biološke i fizičko-hemijske karakteristike u pogledu rastvorljivosti, hidrofobnosti itd. (166). Različiti tipovi modifikacija se mogu primeniti u ove svrhe, a izbor reakcije za modifikaciju će zavisiti pre svega od funkcionalne grupe čija se izmena vrši.

Za hemijske modifikacije hidroksilne grupe mogu se primeniti sledeće reakcije:

1. Oksidacija
2. Reduktivna aminacija
3. Sulfonovanje
4. Kopolimerizacija

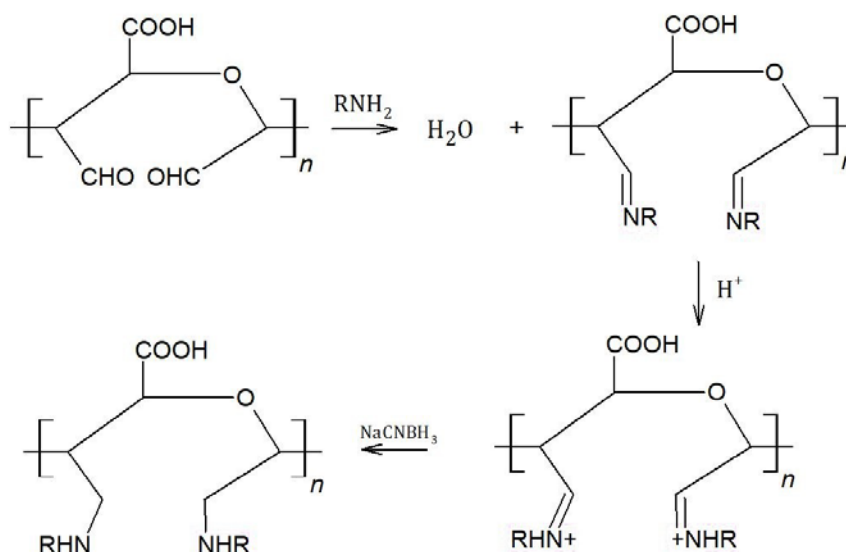
Oksidacija je reakcija kojom se alginat može modifikovati u prisustvu natrijum-perjodata, kao što je prikazano na Slici 25.



**Slika 25.** Reakcija oksidacije alginata

U ovom tipu modifikacije raskida se veza između C2 i C3 atoma na monosahridnom ostatku uronskih kiselina i na tim krajevima se uvode dve aldehidne grupe. Kako bi se izbegle nepoželjne reakcije, oksidaciju je neophodno obavljati u mračnim uslovima (166). Promenom koncentracije oksidujućeg agensa, moguće je kontrolisati stepen oksidacije alginata (166). Prisustvo aldehidnih grupa čini novonastali derivat pogodnijim za dalje reakcije, a s obzirom da dolazi do raskidanja veza unutar ugljeno-hidratnog prstena lakša je i rotacija celog molekula alginata (166). Ukoliko se poveća koncentracija alginata i time promeni odnos natrijum-perjodata prema broju alginatnih ponavljajućih jedinica, prekidi C-C veza duž lanca su učestaliji, a samim tim je broj aldehidnih grupa na nastalom derivatu veći (163). Oksidacijom se smanjuje molekulaska masa alginata (163). Pošto na građenje hidrogela utiče sadržaj aldehidnih jedinica na alginatu, od toga će direktno zavisiti i mehaničke osobine nastalog hidrogela (163). Istraživanja su pokazala da je alginat oksidovan na ovaj način podložan degradaciji pri fiziološkim uslovima (na pH 7,4 i temperaturi od 37 °C) (166).

Oksidovani derivati alginata su podložni daljim modifikacijama u prisustvu nekih alkilamina (Slika 26).

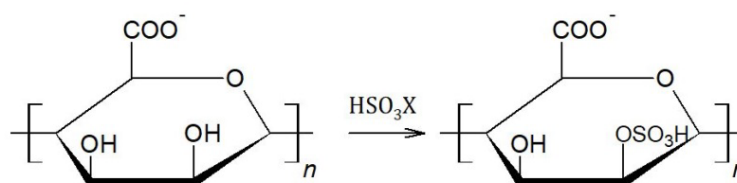


**Slika 26.** Reakcija reduktivne aminacije oksidovanog alginata

Ovaj tip reakcija je označen kao reduktivna aminacija i podrazumeva aminovanje aldehidnih grupa uz obavezno prisustvo nekog redukujućeg agensa (natrijum-cijanoborhidrida, NaCNBH<sub>3</sub> ili natrijum-hidrobora, NaBH<sub>4</sub>) (166).

Na ovaj način se u alginatni lanac mogu uvesti amini različite dužine alkil-niza, čime se dobijaju derivati sa nekim novim karakteristikama i potencijalnim primenama u različitim oblastima. Alginat i polietilenglikol se mogu kuplovati karbodiimidnim reakcijama (167). Dobijeni derivati zadržavaju sposobnost geliranja alginata, ali se povećava veličina pora na samom gelu i poboljšava biokompatibilnost, čime se proširuje i njihova upotreba u enkapsulaciji različitih molekula (167).

Ukoliko se alginatni lanac sulfonuje, njegova struktura postaje slična strukturi heparina, čime se proširuje njegova primena i u terapiji antikoagulansima (Slika 27) (168).



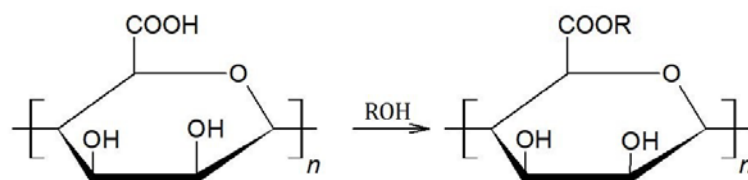
**Slika 27.** Reakcija sulfonovanja alginata

Superabsorbenti se mogu dobiti reakcijama kopolimerizacije sa nekim polimernim lancem kao što je natrijum-poli(akrilat), koji značajno povećava mogućnost bubrenja alginata (169).

Najčešće primenjene reakcije za modifikaciju karboksilne grupe su:

1. Esterifikacija
2. Amidacija
3. Ugi reakcija

Esterifikacija se koristi za uvođenje neke alkil-grupe u lanac nativnog alginata (Slika 28). Na ovaj način se modifikuje alginat i povećava njegova hidrofobna priroda (170).

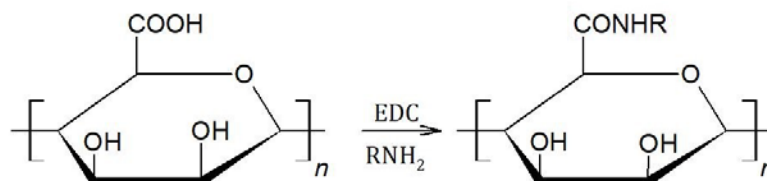


**Slika 28.** Reakcija esterifikacije alginata

Reakcija esterifikacije podrazumeva direktnu reakciju karboksilne grupe na monosaharidnoj jedinici uronske kiseline i nekog alkohola dodatog u višku (166).

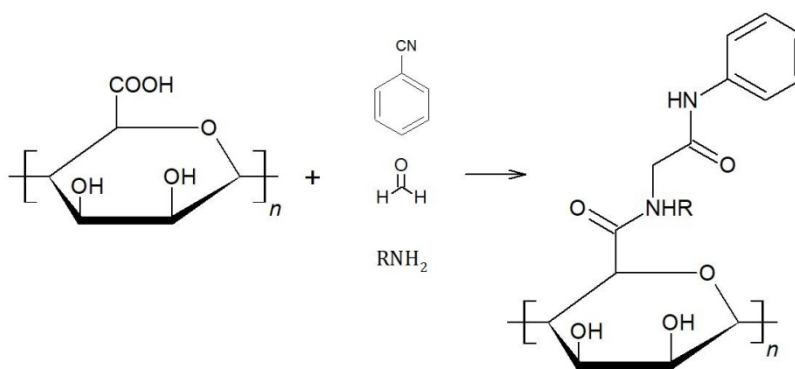
Najveću primenu u različitim oblastima biomedicine od svih esterifikovanih derivata alginata je pronašao jedan od prvih sintetisanih – propenglikolni estar alginata (PGA) (171).

Amidna veza se može nagraditi reakcijom između karboksilne grupe na polimernom lancu alginata i amino grupe na molekulu koji se koristi kao njen donor (Slika 29). Modifikacija alginata 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidrohloridom (EDC-HCl) dovodi do nastanka hidrofobnih derivata alginata sa potencijalnom širokom primenom (172).



**Slika 29.** Reakcija amidacije alginata

Multikomponentna reakcija koja uključuje aldehyd (ili keton), amin, izocijanid i karboksilnu kiselinu na alginatnom molekulu označena je kao Ugi reakcija i vodi stvaranju bis-amidnog derivata alginata (Slika 30) (166).



**Slika 30.** Ugi reakcija

#### 2.9.5.2.6. Primena alginata

Od davnina je poznata masovna primena alginata u farmaceutskoj industriji, medicini i u industriji hrane. Pored toga sve je zastupljenija i upotreba ovog biopolimera u zaštiti životne sredine, najviše prilikom prečišćavanja otpadnih voda.

Prednosti alginata, kao što su biodegradabilnost, netoksičnost i niska cena, kvalifikuju ga za primenu u prehrambenoj industriji, najčešće za proizvodnju jestivih folija ili omota za hranu (173). Upotrebom alginatnih folija smanjuje se kvarljivost hrane i njeno rasipanje, ali se i štite same namirnice i sprečava širenje različitih crevnih bolesti (174). Pored toga, folije su pronašle primenu u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (173).



Alginatni biopolimeri se mogu primeniti i za zarastanje rana, dostave lekova i u tkivnom inženjeringu, a sve kao posledica njegove biodegradabilnosti i biokompatibilnosti. Rane na koži, bilo akutne ili hronične, predstavljaju veliki izazov za medicinu, zbog loše cirkulacije, osetljivosti na proteaze i mikrobne invazije na ranjenom mestu, što sve zajedno usporava proces zarastanja (162). Alginat je jedan od materijala koji ima dobru biokompatibilnost i može da veže visok procenat vode, pa je gotovo idealan za primenu u ove svrhe (162). Ukoliko se postavi na ranjeno mesto na koži, alginat će da održava vlažnost, da pomogne oko zaustavljanja krvarenja i omogući zarastanja rane (162). Zavoji na bazi alginata mogu se praviti u obliku hidrogelova, filmova, sunđera, pene itd. (175). Apsorbicijom tečnosti alginatni zavoji održavaju vlažnost ranjenog mesta, čime se smanjuje mogućnost bakterijske infekcije (175).

Potencijal primene alginata za dostavu lekova je veliki zahvaljujući njegovoj rastvorljivosti i pH senzitivnosti (176).

U alginatne nanočestice se mogu zarobiti odgovarajući lekovi (ibuprofen, ketoprofen, amoksicilin, streptomycin i sl.), čime se omogućuje njihovo postepeno otpuštanje u gastrointestinalnom traktu (173). Primenom nanokristala napravljenih od alginata i celuloze za enkapsulaciju nekih antibiotika, postiže se ciljana dostava lekova putem kontrolisanih mehanizama dejstva (162).

Tkivni inženjering je od velikog značaja u medicini, kao važna alatka za sintezu funkcionalnih tkiva čiji je cilj da se obezbedi regeneracija, održavanje ili poboljšanje funkcija odgovarajućih tkiva i organa (162). U ove svrhe se godinama unazad testiraju različiti biomaterijali, a među njima je posebno mesto pronašao upravo alginat. Struktura alginata je slična strukturi glukozaminoglikana, koji zauzima najveći deo ekstracelularnog matriksa brojnih tkiva (158). Ovaj polimer, međutim, zbog različitog sadržaja M i G blokova, ima loše mehaničke osobine što otežava njegovu primenu u tkivnom inženjeringu (162). Iz tog razloga se u ove svrhe koriste kompozitni biopolimeri, koji pored alginata sadrže i neke druge supstance (npr. hitozan) (162). Alginat i njegovi derivati se mogu primeniti za obnavljanje hrskavice, kostiju, jetre i mnogih drugih tkiva i organa (162,177).

Najčešća bolest današnjice jeste dijabetes (*Diabetes mellitus*). Zbog njene velike zastupljenosti od velikog značaja je razvoj novih metoda za lečenje pacijenata obolelih upravo od ove bolesti. Istraživanja su usmerena ka upotrebi biopolimernih jedinjenja za oralnu dostavu insulina. Među testiranim polimerima primenu su našli natrijum-alginat i hitozan (173). Kako bi se povećala biokompatibilnost korišćeni su agregati ova dva kopolimera, koji ne daju jake antiinflamatorne odgovore, mogu se koristiti i u kiselim sredinama, a nisu pokazali toksičnost ni prilikom in vitro ni tokom in vivo studija (173).

Za tretiranje pacijenata obolelih od kancera koriste se alginatne nanočestice sa enkapsuliranim doksorubicin-hidrohloridom (lekom protiv kancera) ili sa eksprimiranim plazmidom za supresorski tumorski gen.

Alginatni polimeri se mogu koristiti za enkapsulaciju nekih enzima i proteina, povećavajući time njihovu stabilnost (158). Pored toga što su efikasni za dostavu do ciljanih ćelija, oni su biokompatibilni i nešto ekonomičniji u odnosu na konvencionalne metode koje su se koristile u ove svrhe (158). Nanočestice od modifikovanih alginata imaju potencijalnu antiinflamatornu primenu, s obzirom da se mogu koristiti za dostavu gena do ciljanih makrofaga (158).

Zagađenje vodenih sistema teškim metalima ispuštenim iz različitih industrijskih postrojenja je jedan od najvećih ekoloških problema današnjice. Alginatni biopolimeri se mogu koristiti za uklanjanje ovih teških metala (158).

Alginat sadrži negativno naelektrisane karboksilne grupe, koje mogu da heliraju metalne jone, ili se oni mogu adsorbovati na alginatnim hidrogelovima zahvaljujući njihovoj velikoj dodirnoj površini (158).

Ukoliko se za tretiranje otpadnih voda, uklanjanje fenolnih zagađivača ili degradaciju organskih boja, iskoriste imobilizovani enzimi na alginatu (lakaza, peroksidaza ili glukoza-oksidadza) poboljšava se efikasnost prečišćavanja (158).

Ubrzani biotehnološki razvoj pokazao je potencijal alginata u razvoju senzora, uređaja smanjenih dimenzija sa povećanom stabilnošću, osetljivošću, selektivnošću i potencijalnom primenom u različitim oblastima (158).

Kako bi se omogućila primena kako nativnog alginata tako i njegovih derivata, neophodno je da on bude dostupan u nekom od sledećih oblika: hidrogela, kuglica, vlakana itd. Prednosti vlakana se ogledaju u velikoj dodirnoj površini, lakoj upotrebi i sposobnosti zadržavanja mehaničkih osobina čak i u vodenoj sredini (162). Mogu se dobiti metodom elektrospininga, koja omogućuje sintezu veoma tankih vlakana, postavljanjem rastopljene smeše polimera između naelektrisanih elektroda (162).

Ukoliko se alginat ukapava nekom od dostupnih tehnika (upotrebom šprica ili mikrofluidnih sistema) u rastvor koji sadrži umrežavajući agens, formiraju se kuglice alginata (162). Alginat u obliku kuglica se najčešće koristi za dostavu lekova i imobilizaciju enzima i ćelija (178).

### **2.9.5.3. Sintetski organski polimeri**

U ovu grupu spadaju hemijski sintetisani polimeri, koji za razliku od biopolimera imaju definisanu hemijsku strukturu. Mali organski molekuli čine monomerne jedinice, koje se međusobno povezuju gradeći hetero ili homopolimere. Kopolimeri nastaju udruživanjem najmanje dve, ali je moguće i povezivanje više monomernih jedinica (17). Najveća prednost sintetskih polimera se ogleda u mogućnosti kontrole njihovih osobina pravilnim izborom monomernih jedinica, a sve u cilju potencijalne primene u željenoj oblasti. Osobine organskih polimera na koje se najviše može uticati tokom procesa sinteze su poroznost, stabilnost, hidrofilnost, kao i mehaničke osobine (17). Prisustvo određenih funkcionalnih grupa (epoksi, karboksilna, hidroksilna, amino grupa i sl.) omogućuje modifikaciju polimera i proširuje spektar oblasti u kojima se može primeniti. Upravo zbog prisustva različitih funkcionalnih grupa, organski kopolimeri imaju veliki potencijal kao dobri nosači za imobilizaciju enzima (21,30,179). Široku primenu u različitim oblastima su pronašli nosači na bazi polistirena, poliakrilamida, najlona, poliglicidil-metakrilata i drugi.

Makroporozni kopolimeri su prvobitno korišćeni u hromatografiji, kao adsorbenti, a potom i kao nosači u enzimskim imobilizacijama, ali i kao membrane u različitim procesima (180). Prvi kopolimer primenjen u ove svrhe je porozni poli(stiren-co-divinilbenzen), koji svoju zastupljenost i upotrebu duguje najpre velikoj dodirnoj površini (181). Ovaj polimer odgovarajuće poroznosti je nastao slobodno-radikalnim umrežavanjem stirena i divinilbenzena (182). Ova metoda se naziva suspenziona polimerizacija, a podrazumeva mešanje monomera u odgovarajućem odnosu sa nekim inertnim rastvaračem i inicijatorom u prisustvu nerastvarača (vode) i površinski aktivne supstance (stabilizatora) (182). Monomer, rastvarač i inicijator čine uljanu fazu koja se mešanjem disperguje u fine kapljice u vodenoj fazi sa rastvorenom površinski aktivnom supstancom. U tim kapljicama se odvija reakcija polimerizacije i one se pretvaraju u porozne polimerne sfere. Rastvarač se bira tako da monomeri budu rastvorni u njemu, dok je nastali kopolimer u njemu nerastvoran (182). Pored prethodno navedene uloge, inertni rastvarač učestvuje i u formiranju pora tokom procesa kopolimerizacije (182). Kako bi se obezbedila makroporozna struktura neophodno je razdvajanje faza prilikom umrežavanja (182).

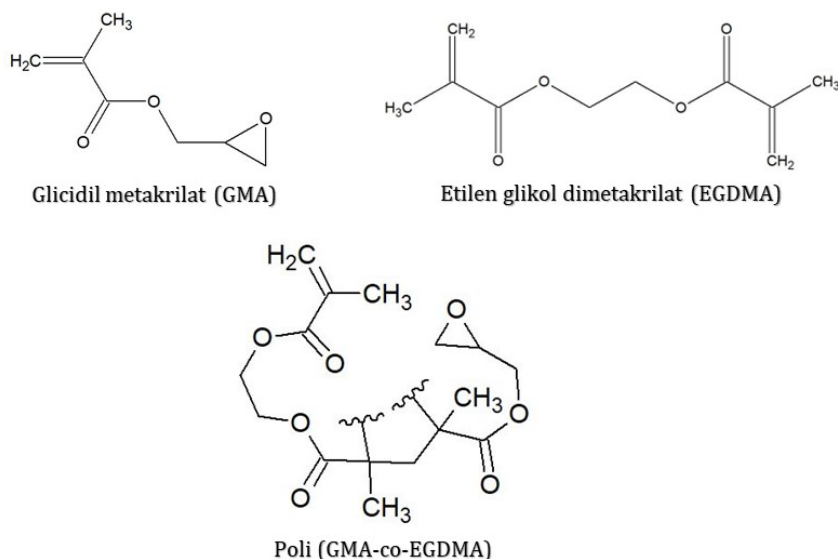


Pore veće od 500 Å, sa distribucijom od  $10^1$  do  $10^4$  Å smatraju se makroporoznim (182). Metodom suspenzione kopolimerizacije se dobijaju makroporozne kuglice čiji je prečnik između 0,1 i 1,5 nm (182).

Pored prethodno opisane metode, može se primeniti i metoda inverzne suspenzione polimerizacije (182). Ovde se koriste monomeri rastvorni u vodi, koji se suspenduju u organskoj fazi i polimerizuju u njoj, sa ciljem dobijanja kuglica kontrolisane veličine pora (182).

Disperzionom polimerizacijom se, za razliku od suspenzione, dobijaju kuglice prečnika u rasponu od 0,1 do 10  $\mu\text{m}$ . Reakcija se odvija u etanolu kao rastvaraču, u kom su rastvorni monomeri, stabilizator, inicijator i inertna komponenta, dok se dobijeni kopolimer taloži u njemu (183).

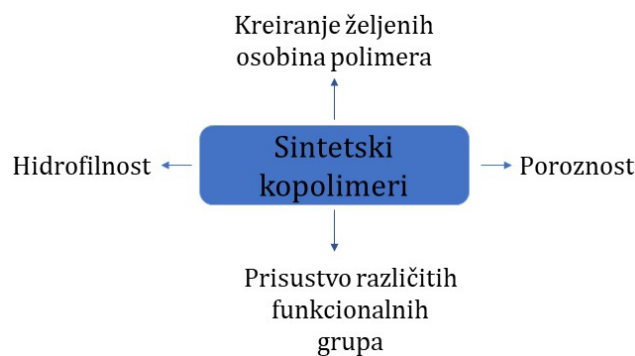
Metodama suspenzione i disperzione polimerizacije mogu da se dobiju nosači koji u svojoj strukturi imaju prisutnu epoksi grupu i sastoje se od dve monomernne jedinice, jedna je glicidil metakrilat (GMA), a druga etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) (Slika 31). Epoksi grupe ovog kopolimera (poli(GMA-co-EGDMA)) se mogu dalje modifikovati i prevesti u keto, amino, karboksilne ili hidrosilne grupe, pa su zato ovi kopolimeri pogodni kao nosači za adsorpciju i kovalento vezivanje različitih enzima (30,184,185).



**Slika 31.** Hemijske strukture monomernih jedinica i kopolimera nastalog njihovim udruživanjem

Zahvaljujući lakoj dostupnosti, hemijskoj i mehaničkoj postojanosti pri različitim spoljnim uticajima, široku primenu su našli komercijalno dostupni kopolimeri Sepabeads i Eupergit (186,187). Kovalentnim vezivanjem nekog enzima za Eupergit ostvaruje se jaka veza između enzima i nosača. Ovaj hidrofilni kopolimer pokazao je dobre fizičke osobine i stabilnost na različitim pH vrednostima, pa se često koristi u mnogobrojnim istraživanjima za imobilizacije (187).

Najveća prednost sintetskih kopolimera je mogućnost kreiranja željenih osobina kopolimera u toku procesa njegove sinteze (Slika 32). Izborom tipa monomera i variranjem njihovih odnosa može se direktno uticati na mehaničke osobine nastalog kopolimera, kao i na njegovu poroznost, hidrofilnost, ali i zastupljenost odgovarajućih funkcionalnih grupa (188,189).



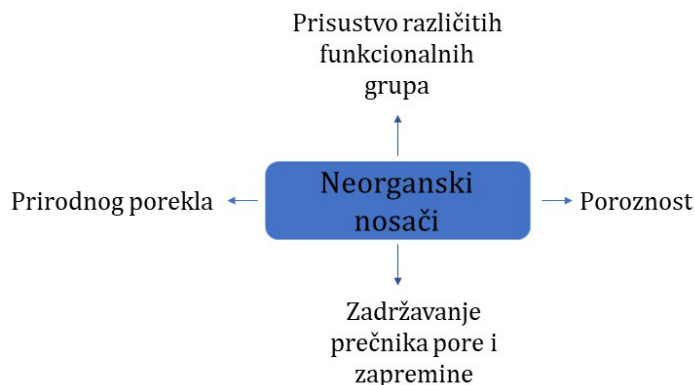
**Slika 32.** Prednosti sintetskih kopolimera

Pri imobilizaciji enzima na neki nosač, veliku ulogu ima poroznost tog nosača, pre svega veličina i distribucija pora, njihova zapremina i specifična dodirna površina (17). Izbor tipa i količine inertne komponente prilikom sinteze kopolimera su parametri koji određuju poroznost nekog kopolimernog nosača (17). Obično se kao inertna komponenta koristi mešavina cikloheksanola i nekog alifatičnog alkohola (180). Upotrebom toluena smanjuje se veličine pora nastalih makroporoznih kopolimera, a samim tim i dodirna površina (182).

Dodatkom *n*-heptana ili nekog alkohola se dobijaju polimeri većih prečnika pora, dok se manje pore mogu obezbediti upotrebom nekog polimernog rastvarača kao što je polistiren (182). Na porozne osobine kopolimera poli(GMA-co-EGDMA) utiče umrežavajući agens i njegova količina. Sa povećanjem količine umrežavajućeg agensa raste zapremina pora sintetisanog kopolimera, kao i poroznost nastalih čestica (183).

#### 2.9.5.4. Neorganski nosači

Među neorganskim nosačima, stabilnim i inertnim materijalima koji se mogu primeniti u različite svrhe, najveću primenu su pronašli nosači na bazi silikata ili ugljenika, metalni oksidi i minerali prirodnog porekla. Neorganski nosači pokazuju povećanu termalnu stabilnost i mehaničku otpornost (Slika 33) (190).



**Slika 33.** Prednosti neorganskih nosača

Ono što ih karakteriše i izdvaja od drugih nosača jeste njihova poroznost. S obzirom da su jako kruti, oblik čestica je nepromenjen kao i prečnik i zapremina pora (190). Komercijalno su dostupni neorganski nosači sa različitim veličinama pora, čime je olakšana njihova primena u imobilizaciji enzima (190).

Među istraživačima najveću pažnju su privukli materijali bazirani na silikatu, ali i različiti metalni oksidi (oksid titanijuma, aluminijuma, cirkonijuma i sl.). Ovi nosači su hemijski stabilni, jako otporni na mehanička dejstva i inertni pri povišenim temperaturama i pritiscima (17).

Imaju hidrofilni karakter, a prisustvo hidroksilnih grupa na površinama omogućuje laku modifikaciju i formiranje jake kovalentne veze između nosača i imobilizovanog enzima (144). Za adsorpciju se dosta koriste i zeoliti ili „molekulska sita“. Ova jedinjenja imaju makroporoznu kristalnu strukturu i mogu da obrazuju odgovarajuće oblike, a zahvaljujući hidroksilnim grupama na površini molekula, grade jake vodonične veze sa enzimima (144).

Velika zastupljenost minerala u prirodi, laka dostupnost i široka upotreba, ali i prisustvo različitih funkcionalnih grupa na površini ovih nosača, čini ih pogodnim za imobilizaciju različitih enzima kao što su invertaza, lipaza, proteaza, tirozinaza itd. (17). Najčešće korišćeni minerali su kaolinit, sepiolit, montmorilonit i hidroksiapatit (17).

Nosači bazirani na ugljeniku su pronašli veliku primenu u reakcijama adsorpcije (17,144). U ove svrhe se može koristiti kako prirodni aktivni ugalj, tako i modifikovani (144). Čestice uglja su mezoporozne i imaju veliku dodirnu površinu za interakciju sa proteinima i ćelijama prilikom reakcija adsorpcije (144).

Neorganski materijali razvijeni u novije vreme su magnetne čestice, grafen, nanočestice i mezoporozni materijali.

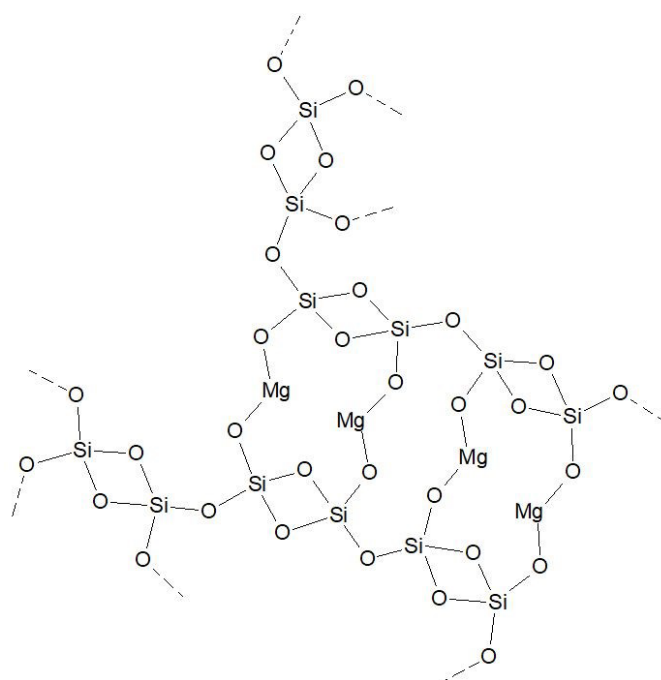
Hidrofilni, hemijski stabilni mezoporozni materijali ili materijali u obliku nanočestica se često koriste u imobilizacijama, pošto je pokazano da jednom imobilizovan enzim na ovim nosačima zadržava aktivnost (17). Čestice na bazi magneta imaju veliki potencijal, zbog izrazite primenljivosti i lakoće odvajanja imobilizovanih enzima od celokupnog sistema (17). Mehanički su stabilne, imaju veliku dodirnu površinu, visok potencijal za ponovnu upotrebu pa su zbog toga korišćene za imobilizaciju enzima u velikom broju istraživanja (17). Neorganski, biodegradabilni materijali sa potencijalom primene u imobilizaciji, su materijali bazirani na grafenu i grafen-oksidu. Korišćenjem u ove svrhe, pomenuta grupa nosača je pokazala potencijalno poboljšanje aktivnosti i stabilnosti imobilizovanih enzima (17).

#### **2.9.5.4.1. Sepiolit**

Kao dobra zamena za sintetske i skupe materijale, za izradu nosača za enzime se mogu koristiti različiti materijali izolovani iz gline, koji mogu biti jednodimenzionalni (sepiolit i halozit) ili dvodimenzionalni (montmorilonit i kaolinit) (191).

Fibrozni materijal izolovan iz gline, sa visokim sadržajem magnezijuma naziva se sepiolit (Slika 34).

Ovaj hidratizirani silikat magnezijuma je jeftin, netoksičan sa velikom dodirnom površinom i odličnom stabilnošću pri povišenim temperaturama (192). Strukturna formula sepiolita je  $\text{Si}_{12}\text{O}_{30}\text{Mg}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (193). Sastoji se od dva tetraedarska bloka silicijuma i centralnog oktaedarskog bloka sa magnezijumom (193). Blokovi su povezani duž ivica i formiraju kanale dimenzija 0,37–1,06 nm<sup>2</sup> (193). Struktura sepiolita podseća na kristal sastavljen od iglica (192). Kalijumovi joni, joni kalcijuma i molekuli vode nalaze se u blokovima, dok su na površini OH grupe, koje omogućuju ostvarivanje jačih adsorpcionih interakcija (192).



**Slika 34.** Hemijska struktura sepiolita

Sepiolit je dobar adsorbent upravo zahvaljujući velikoj dodirnoj površini i poroznosti, ali i povoljnoj površinskoj aktivnosti (27). Prodiranje organskih i neorganskih jona je omogućeno njegovom vlaknastom strukturom (27). S obzirom da ovaj nosač omogućuje jonsku izmenu, idealan je za primene poput uklanjanja boja iz industrijskih otpadnih voda (27).

Sepiolit se može javiti u dva oblika:  $\alpha$ -sepiolit i  $\beta$ -sepiolit.  $\alpha$ -sepiolit je veoma zastupljen u hidrotermalnim područjima, u tercijskim i silicijumskim stenama, posebno onim stenama u kojima su jako prisutni fosfati, sulfati i karbonati (191). U jezerskim i morskim sredinama zastupljen je  $\beta$ -sepiolit (191). Najveći rudnik sepiolita u svetu nalazi se u Španiji, dok za njim slede rudnici u Americi, Turskoj i Kini (191). Procenjeno je da rezerve ovog minerala u svetu iznose oko 8.000 miliona tona (191).

Široka upotreba sepiolita (kozmetička industrija, industrija papira, boja, deterdženata itd.) je moguća pre svega zahvaljujući njegovoj velikoj zastupljenosti, lakoj dostupnosti i niskoj ceni (194). Najveći potencijal, ovaj mineral je pokazao prilikom adsorpcije, koja u velikoj meri zavisi od temperature, pH vrednosti i jonske sile (194). Pored adsorpcione sposobnosti, sepiolit ima katalitičku i reološku funkciju, čime je proširen spektar oblasti u kojima se može primeniti (194). Brojna istraživanja su usmerena ka potencijalnoj upotrebi sepiolita u proizvodnji biosenzora (194).

Budućnost primene sepiolita leži u umrežavanju ovog minerala sa različitim biopolimerima i u modifikaciji njegove površine (194). Do sada je, u cilju poboljšanja njegovih osobina, sepiolit modifikovan nekim kvaternarnim aminima (194). Formiranje nanokompozitnih materijala, koji u svom sastavu pored sepiolita sadrže i neko polimerno jedinjenje, je budućnost u upotrebi glinenih nosača (195). Najčešću primenu u dosadašnjim istraživanjima su pronašli polimeri prirodnog porekla, kao što su hitozan, želatin i sl. Pored interakcija sa silanolnim grupama na površini molekula sepiolita, ova jedinjenja mogu da prodiru u unutrašnjost minerala i tamo nagrađuju odgovarajuće veze (195). Od jačine formirane veze, morfološke strukture nastalog molekula i njegovog hemijskog sastava, zavisiće i u kojoj meri će doći do poboljšanja svih mehaničkih osobina novonastalog hibridnog materijala (195).

### 2.9.6. Kinetika imobilizovanih enzima

Faktori koji mogu uticati na kinetičke osobine enzima prilikom imobilizacije su (196):

- a) mikrookruženje – interakcija imobilizovanog enzima i supstrata odvija se u sredini koja je drugačija od sredine u kojoj se odvija interakcija sa slobodnim enzimom
- b) može doći do raspodele supstrata između nosača na kom je enzim imobilizovan i rastvora
- c) imobilizovani enzimi mogu katalizovati reakcije koje su kontrolisane difuzijom ili prenosom mase
- d) konformacija enzima se može promeniti tokom imobilizacije.

Na ponašanje enzima, u nativnoj i imobilizovanoj formi, uticaće u manjoj ili većoj meri događaji koji se odvijaju u neposrednom okruženju. Kada se enzim imobilizuje na neki polimerni nosač, njegovo okruženje može da se razlikuje od okruženja u kom je enzim resuspendovan. Izbor nosača za imobilizaciju može da utiče na osobine vezanog enzima na dva načina (196). Prvi je razdvajanje, odnosno, u zavisnosti od fizičko-hemijskih osobina polimer može da privlači ili odbija supstrate, inhibitore ili proizvode reakcija. Drugi, podrazumeva način na koji polimer može da utiče na mikrookruženje enzima, tj. da li deluje kao granica koja obezbeđuje slobodnu difuziju molekula ka enzimu ili od njega. Difuzionu ograničenja zavise direktno od veličine pora na matriksu. Ukoliko su pore izuzetno male, onemogućena je difuzija molekula ka enzimu, pa je samim tim i inhibirana reakcija katalize. Direktan uticaj imobilizacije na molekul enzima ogleda se u:

1. konformacionim promenama
2. stabilnosti
3. sternim smetnjama
4. inaktivaciji.

Enzim će obavljati svoju katalitičku aktivnost prevashodno ukoliko mu konformacija nije izmenjena, ali i ako je sposoban da promeni konformaciju tokom katalitičkog procesa. Osobine enzima prilikom imobilizacije mogu u potpunosti da se promene i da se više uopšte ne ponaša kao na primer alosterni enzim.

Promene konformacije na jednoj subjediniči nekog enzima mogu da dovedu do konformacionih promena na nekoj drugoj subjediniči, a često imobilizacijom može doći i do blokiranja aktivnog mesta na molekulu enzima različitim inhibitorima ili aktivatorima.

Ukoliko se nativni i imobilizovani enzimi podvrgnu testiranju u uslovima povišene temperature, uočiće se poboljšana stabilnost imobilizovanog enzima u poređenju sa nativnim. Koncentracija proteina i ograničenja nastala difuzijom supstrata određuju stabilnost jednog enzima. Tako se na primer stabilnost enzima može poboljšati povećanjem njegove koncentracije u rastvoru. Rastojanje koju supstrat može da pređe, pre nego što se transformiše u proizvod, je malo. Kada se enzim imobilizuje, supstrat može da putuje samo do određenog dela imobilizovanog enzima. Na katalitički proces u većoj meri utiče difuzija, a u manjoj meri aktivnost samog enzima. To objašnjava zašto je enzim aktivan u određenom vremenskom periodu, tj. samo dok je dominantni faktor difuzija, a ne koncentracija enzima (196).

Proces imobilizacije enzima sprečava direktan kontakt između enzimskih lanaca, ali isto tako može i da utiče na dostupnost supstrata ili efektoru enzimu (196). Ukoliko je supstrat neki mali molekul, lakše će difundovati do aktivnog mesta na enzimu, a postoji mogućnost i da aktivno mesto bude blokirano od strane matriksa.

Do inaktivacije enzima ne mora da dođe samo kao posledica konformacionih promena, već i pod uticajem pH vrednosti, prisustva slobodnih radikala ili oksidujućih agenasa (196). U tim slučajevima je aktivnost imobilizovanog enzima znatno manja u poređenju sa nativnim enzimom.

Jedan od faktora koji najviše utiče na ponašanje imobilizovanog enzima je pH vrednost (196). Odgovori imobilizovanih enzima mogu značajno da odstupaju od odgovora slobodnih enzima, što se može objasniti:

- a) distribucijom protona i njihovom ograničenom difuzijom
- b) koncentracijama enzima i nastalih produkata
- c) kombinacijom difuzionog efekta i razdvajanja.

Generalno gledano, promene pH vrednosti će ostaviti manje posledice na imobilizovani enzim nego na nativni. Ove posledice se ogledaju kroz širenje krive pH optimuma ili kroz pomeranja ka kiselim ili baznim vrednostima.

Što se tiče kinetičkih parametara,  $K_m$  i  $V_{max}$ , mogu se izdvojiti četiri glavna razloga za promenu ponašanja imobilizovanih enzima (196).  $K_m$  vrednost se može menjati ukoliko dođe do konformacionih promena prilikom vezivanja enzima za nosač. Do razlike u kinetičkim parametrima može da dovede i promena sredine u kojoj se ostvaruje imobilizacija. Supstrat se deli između nosača i rastvora, a reakcija između enzima i polimera može biti difuziono kontrolisana. Koncentracije supstrata i jonske sile mogu da utiču na asocijaciju nosača i enzima, a samim tim i na  $K_m$  vrednost. Parametar  $1/K_m$  predstavlja merilo afiniteta enzima prema supstratu.

### **2.9.7. Primena imobilizovanih enzima**

Potencijalna primena biokatalizatora zavisi kako od osobina nosača koji se koriste za imobilizaciju enzima, tako i od tipa korišćene metode. U početku su se primene imobilizovanih enzima vezivale isključivo za studije njihove stabilnosti (pH, temperaturna, stabilnost u organskom rastvaraču itd.) i poređenja dobijenih rezultata sa rezultatima dobijenim za nativne enzime (197). U poslednje vreme se primena ovih biokatalizatora proširila na različite oblasti medicine, farmaceutske, prehrambene industrije, za bioremedijacije i sl. (197).

U medicini se imobilizovani enzimi koriste još od 1990. godine za dijagnozu i tretiranje različitih bolesti (198). Enzimi imobilizovani na biomaterijalima mogu da se koriste u tkivnom inženjeringu (198). Za razliku od nativnih enzima, imobilizovani enzimi u biomedicini obezbeđuju održanje stabilnosti, stimulaciju rasta i reparaciju oštećenih tkiva ili organa (198). Imobilizacije se mogu koristiti i za razvoj metoda za lečenje raka, ali i za dostavu lekova i drugih terapijskih agenasa (198).

Razvoj biosenzora, električnih, hemijskih ili mehaničkih uređaja koji mogu da detektuju različite biološke vrste, je doprinelo proširenju upotrebe imobilizovanih enzima, antitela ili oligonukleotida (197,199). Biosenzori na bazi imobilizovanih enzima omogućili su prevazilaženje mnogih problema vezanih za stabilnost, aktivnost i curenje enzima kao i laku jednokratnu upotrebu ovih uređaja koji se mogu koristiti kako u stacionarnim, tako i u protočnim sistemima (199). Kod pacijenata obolelih od dijabetesa, veliku primenu su pronašli biosenzori, koji koriste električnu energiju za određivanje direktne koncentracije glukoze u krvi (197,199). Razvoj biosenzora za detekciju toksičnih supstanci pre svega pesticida je, u vremenu ekspanzije poljoprivrede i zagađenja životne sredine, od velikog značaja (199).

U prehrambenoj industriji imobilizovani enzimi su našli široku primenu, pre svega u procesu pravljenja mleka bez laktoze (199). Za proizvodnju visoko fruktoznih sirupa može se koristiti enzim glukoza-izomeraza, dok se imobilizovana pektinaza može primeniti za povećanje količine voćnih sokova, bez ostataka pektina (199).

Imobilizovana  $\beta$ -galaktozidaza vrši hidrolizu laktoze u surutki i učestvuje u produkciji pekarskog kvasca (198).

Biodizel, monoalkilni estar dugačkog niza, može se proizvesti iz triglicerida, esterifikacijom alkohola u prisustvu nekog katalizatora. S obzirom da je ovaj proces energetski vrlo zahtevan, neekološki i obuhvata mnogobrojne sporedne reakcije, sve veći potencijal se ogleda u biološkoj proizvodnji goriva pomoću lipaze (198). U ove svrhe mogu se koristiti različite metode za imobilizaciju lipaze (zarobljavanje, kovalentna metoda, adsorpcija itd.) i razni nosači (zeoliti, hitozan, silika gel, magnetne nanočestice i sl.) (198).

Najveći ekološki problem današnjice je visoka koncentracija ugljen-dioksida u vazduhu. Veliki procenat ovog gasa se ispušta iz termoelektrana, a može se prevazići upotrebom filtera sa imobilizovanim enzimom ugljenik-anhidrazom (199). Ovaj enzim ima sposobnost hidratacije ugljenik(IV)-oksida do bikarbonata ( $\text{HCO}_3^-$ ) i protona ( $\text{H}^+$ ). Na ovaj način se smanjuje emisija štetnog gasa u životnu sredinu (199).

Pored zagađenja vazduha, zagađenje vodenih prostranstava je jedan od ekoloških problema kome je neophodno posvetiti veću pažnju. Industrijska postrojenja svakodnevno ispuštaju velike količine zagađujućih materija, pre svega organskih boja i fenolnih jedinjenja, čije čak i najmanje koncentracije mogu da ostave posledice na celokupan ekosistem (198). Tretiranje zagađenih voda imobilizovanim enzimima (peroksidaze, lakaze, reduktaze itd.) jedan je od potencijalnih načina smanjenja ovog oblika zagađenja životne sredine (198). Pored navedenih enzima, za degradacije različitih masnih kiselina, prisutnih u vodenim sredinama, može se koristiti lipaza (198).

U cilju smanjenja zagađenja, tekstilna industrija se okrenula korišćenju imobilizovanih enzima. Enzimi kao što su celulaza i amilaza mogu se primeniti u tekstilnim procesima kao što su tretiranje vune, dorade teksasa, biopoliranje, smanjenje veličina itd. (198). Kako bi se biokatalizatori primenili u ove svrhe, neophodno je obezbediti njihovu otpornost na visokim temperaturama, kao i na različitim pH vrednostima (198).

Imobilizovani enzimi su pronašli primenu i u proizvodnji deterdženata, s obzirom da se njihovom upotrebom povećava biodegradabilnost, nisu uočene ekološke posledice po životnu sredinu, a enzimi se mogu primeniti i na niskim temperaturama (198). Tako se npr. proteaza može upotrebiti za uklanjanje fleka od jaja ili krvi, amilaza za mrlje od čokolade, krompira, soseva, a lipaza za fleke od masti i ulja (198). Za omekšavanje pamuka i beljenje koriste se sredstva na bazi celulaze (198).

## 3. Materijali i metode

### 3.1. Materijal

#### 3.1.1. Oprema

- Analitička vaga – Sartorius, Göttingen, Nemačka
- Tehnička vaga – Scaltc SBA 41, Göttingen, Nemačka
- pH metar – Mettler Toledo, Kolumbia, Ohio, USA
- Centrifuga – Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Nemačka
- Minifuga – Eppendorf Centrifuge 5415R, Hamburg, Nemačka
- Spektrofotometar – Shimadzu Corporation UV-2501PC, Japan
- ELISA reader – Tecan Infinite M Nano+, Švajcarska
- FT-IR spektrometar – Perkin Elmer 1725X, Waltham, Massachusetts, USA
- Skenirajući elektronski mikroskop – Tescan FE-SEM Mira 3 XMU, Švajcarska
- Živina porozimetrija – Carlo Erba 2000, Francuska

### 3.1.2. Hemikalije

Natrijum-alginat iz smeđih algi (srednje viskoznosti), peroksidaza iz rena (150–250 U/mg), pirogalol (98%) koji je korišćen kao supstrat za reakcije oksidacije peroksidaze, tiramin-hidrochlorid (98%), glukoza-oksidadza tip VII (160 U/mg), Triton X-100, Span 80, kalijum-fericijanid ( $\geq 99\%$ ), natrijum-metaperjodat ( $\geq 99,8\%$ ), glicerol (98%), polivinilpirolidon (PVP,  $M_w = 24000$  g/mol), glicidil metakrilat (GMA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), 1-dodekanol, cikloheksanol, glutaraldehid (25% rastvor u vodi), 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) ( $\geq 98\%$ ) i PIPES pufer su kupljeni od kompanije Sigma-Aldrich (St. Louise, Mo, USA). 4-aminoantipiren (p.a.), natrijum-acetat i natrijum-cijanoborhidrid (95%) su nabavljeni od kompanije Fluka (Buchs, Švajcarska), dok su etilendiamin, natrijum-citrat kristalni (p.a.) i 1,4-dioksan kupljeni od Merck-a (Kenilworth, New Jersey, USA). Od Centrohem kompanije (Stara Pazova, Srbija) nabavljene su hemikalije: fenol (99,5%), natrijum-hlorid (p.a.) i natrijum-dihidrogenfosfat anhidrovani ( $>99\%$ ). Vodonik-peroksid (30% (w/w)) je kupljen od kompanije AppliChem GmbH (Darmstadt, Nemačka). Glukoza (p.a.) i etanol (96%) su nabavljeni od Zorke (Šabac, Srbija), dok su kalcijum-hlorid (p.a.) i Tris pufer kupljeni od Termohemije (Beograd, Srbija) odnosno Serve (Heidelberg, Nemačka).

## 3.2. Analitičke metode

### 3.2.1. Određivanje aktivnosti slobodne peroksidaze iz rena u slučaju imobilizacije na modifikovanom alginatu

Za određivanje aktivnosti slobodne peroksidaze iz rena kao supstrati su korišćeni pirogalol i vodonik-peroksid. 43,3  $\mu\text{L}$  enzima i 10  $\mu\text{L}$  vodonik-peroksida dodati su u 1 mL rastvora pirogalola (13 mmol/L) u 0,1 mol/L natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0.

Apsorbanca je praćena tokom prva tri minuta reakcije oksidacije pirogalola, a aktivnost enzima je preraćunata korišćenjem apsorpcionog koeficijenta purpurogalina ( $\epsilon = 12 \text{ mg}^{-1}\text{cm}^2$  na 420 nm).

### 3.2.2. Određivanje aktivnosti peroksidaze iz rena imobilizovane na modifikovanom alginatu

Za određivanje aktivnosti imobilizovanog enzima, 130  $\mu\text{L}$  suspenzije alginatnih kuglica i 30  $\mu\text{L}$  vodonik-peroksida (9,7 mmol/L) je dodato u 3 mL rastvora pirogalola (13 mmol/L). Reakcija je praćena konstantnim mešanjem u periodu od 7 minuta. Svakih 120 s alikvoti su uzimani iz rastvora, profiltrirani i merena je apsorbanca na 420 nm korišćenjem UV-VIS spektrofotometra. Jedna jedinica enzimske aktivnosti je definisana kao kolićina enzima koja proizvede 1 mg purpurogalina za 20 s.

### 3.2.3. Određivanje aktivnosti slobodne peroksidaze iz rena u slučaju imobilizacije na makroporoznom kopolimeru

Kao supstrati za određivanje aktivnosti peroksidaze iz rena korišćeni su pirogalol i vodonik-peroksid. U najćešće korišćenom eseju, 10  $\mu\text{L}$  rastvornog enzima (iz sakupljenog supernatanta prilikom ispiranja imobilizata, razblažen odgovarajući broj puta) i 10  $\mu\text{L}$  vodonik-peroksida (9,7 mmol/L) su dodati u 1 mL rastvora pirogalola (13 mmol/L) u natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0 (0,1 mol/L). Apsorbanca je merena tokom 3 minuta na 420 nm korišćenjem UV-VIS spektrofotometra. Vrednost enzimske aktivnosti je preraćunata na osnovu apsorpcionog koeficijenta nagrađenog purpurogalina ( $\epsilon = 12 \text{ mg}^{-1}\text{cm}^2$  na 420 nm).



### **3.2.4. Određivanje aktivnosti peroksidaze iz rena imobilizovane na makroporoznom kopolimeru**

Aktivnost imobilizovanog enzima je određena uvođenjem oko 9 mg kopolimera sa imobilizovanom peroksidazom iz rena i 30  $\mu\text{L}$  vodonik-peroksida u 3 mL rastvora pirogalola (13 mmol/L) u natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0 (0,1 mol/L). Svakih 60 s iz smeše su uzimani alikvoti od po 40  $\mu\text{L}$ , profiltrirani i izmerena je apsorbanca na 420 nm. Jedna jedinica enzimske aktivnosti je definisana kao količina enzima koja proizvede 1 mg purpurogalina za 20 s na 20 °C. Specifična aktivnost enzima je preračunata po gramu suve mase kopolimera.

### **3.2.5. Određivanje aktivnosti slobodne peroksidaze iz rena u slučaju imobilizacije na sepiolitu**

Kao supstrati su korišćeni 13 mmol/L pirogalol u natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0 (0,1 mol/L) i vodonik-peroksid (9,7 mmol/L). Pomešan je 1 mL pirogalola sa 10  $\mu\text{L}$  supernatanta (razblažen 10 puta) i 10  $\mu\text{L}$  vodonik-peroksida. Praćena je aktivnost slobodnog enzima tokom 3 min na 420 nm korišćenjem UV-VIS spektrofotometra. Vrednost enzimske aktivnosti je preračunata na osnovu apsorpcionog koeficijenta nagrađenog purpurogalina ( $\epsilon = 12 \text{ mg}^{-1}\text{cm}^2$  na 420 nm).

### **3.2.6. Određivanje aktivnosti imobilizovane peroksidaze iz rena na sepiolitu**

Za određivanje aktivnosti vezane peroksidaze iz rena odmerena je odgovarajuća količina imobilizata (oko 9 mg), dodato je 3 mL supstrata (13 mmol/L pirogalol u 0,1 mol/L natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0) i 30  $\mu\text{L}$  vodonik-peroksida (9,7 mmol/L). Aktivnost je merena na 420 nm u periodu od 3 min. Alikvoti od 1 mL su uzimani na svaki minut, profiltrirani i izmerena je apsorbanca na 420 nm. Jedna jedinica enzimske aktivnosti je definisana kao količina enzima koja proizvede 1 mg purpurogalina za 20 s na 20 °C.

### **3.2.7. Određivanje aktivnosti ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom imobilizovanih na modifikovanom alginatu**

Za određivanje aktivnosti imobilizovanih ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom korišćen je 20 mmol/L ABTS (100  $\mu\text{L}$ , finalno u smeši 1 mmol/L), 50 mmol/L vodonik-peroksid (100  $\mu\text{L}$ , finalno u smeši 5 mmol/L) i 0,1 mol/L natrijum-acetatni pufer pH 4,5 (800  $\mu\text{L}$ , finalno 0,1 mol/L). Praćena je promena apsorbanca na 420 nm tokom 15 min korišćenjem Tecan Infinite M Nano+ uređaja. Alikvoti od 200  $\mu\text{L}$  su uzimani svakih 5 min i merena je njihova apsorbanca. Za preračunavanje enzimske aktivnosti korišćen je ekstencioni koeficijent za ABTS ( $\epsilon = 36 \text{ mg}^{-1}\text{cm}^2$  na 420 nm).

## **3.3. Karakterizacija peroksidaze iz rena**

### **3.3.1. Određivanje pH optimuma**

Za određivanje enzimske aktivnosti slobodne i imobilizovane peroksidaze iz rena korišćena je serija 0,1 mol/L fosfatno-citratnog pufera sa pH vrednostima od 2,0 do 8,0. Aktivnost enzima na pH 9,0 je ispitana u natrijum-glicinatnom puferu (0,1 mol/L). Relativna aktivnost imobilizovane peroksidaze iz rena na različitim pH vrednostima je određena prema prethodno opisanoj proceduri (Odeljak 3.2.) korišćenjem 13 mmol/L rastvora pirogalola. Dobijeni rezultati su normalizovani prema maksimalnoj aktivnosti na optimalnoj pH vrednosti tj. relativnoj aktivnosti, izraženi u procentima i prikazani na graficima.

### 3.3.2. Ispitivanje temperaturene stabilnosti

Kako bi se ispitala temperaturna stabilnost imobilizovane peroksidaze iz rena, odgovarajuća količina enzima imobilizovanog na nosaču je suspendovana u natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0 (0,1 mol/L) i inkubirana na 65 °C u određenom vremenskom periodu. Nakon toga je imobilizovani enzim ohlađen do sobne temperature. Rezidualna aktivnost imobilizovanog enzima je određena kao što je prethodno opisano (Odeljak 3.2.) korišćenjem 13 mmol/L pirogalola kao supstrata.

### 3.3.3. Ispitivanje stabilnosti u organskom rastvaraču

Stabilnost enzima u organskom rastvaraču, kao što je 1,4-dioksan, je takođe ispitana. Oba enzima, rastvorni i imobilizovani, su inkubirana na 20 °C u 80% rastvoru 1,4-dioksana (v/v) u natrijum-acetatnom puferu pH 7,0 (0,1 mol/L). Nakon inkubacije u organskom rastvaraču u odgovarajućem vremenskom periodu, specifična aktivnost imobilizovanog i rastvornog enzima je određena korišćenjem prethodno opisanog eseja za praćenje enzimske aktivnosti (Odeljak 3.2.).

### 3.3.4. Određivanje kinetičkih parametara

Uticaj koncentracije pirogalola na početnu aktivnost obe peroksidaze, slobodne i imobilizovane, je ispitan variranjem koncentracije ovog supstrata.

Kinetički parametri ( $K_m$  i  $V_{max}$ ) su direktno određeni iz Mihaelis Mentenovog modela preko nelinearne regresione analize korišćenjem OriginLab softvera i dalje upotrebljeni za preračunavanje katalitičke konstante,  $k_{cat}$ .

### 3.3.5. Određivanje temperaturnog optimuma

Temperaturna stabilnost imobilizovane peroksidaze iz rena na različitim temperaturama (30, 40, 50, 60, 70 i 80 °C) je ispitana inkubiranjem odgovarajuće količine enzima imobilizovanog na nosaču na željenoj temperaturi. Nakon toga je imobilizovani enzim ohlađen do sobne temperature i merena je relativna aktivnost prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.

### 3.3.6. Studije višestruke upotrebe i stabilnosti imobilizovanog enzima tokom skladištenja

Kako bi se odredila operativna stabilnost imobilizovanog enzima, nekoliko uporednih ciklusa oksidacije pirogalola je izvedeno u šaržnom reaktoru. Na kraju svakog ciklusa, nosač sa imobilizovanim enzimom je ispran dva puta 0,1 mol/L natrijum-fosfatnim puferom pH 7,0. Ova procedura je ponovljena nekoliko puta sa svežim alikvotima supstrata (pirogalol i vodonik-peroksid).

Stabilnost tokom skladištenja je takođe ispitana. Imobilizovana peroksidaza iz rena je čuvana u 0,1 mol/L natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0 na 4 °C odgovarajući vremenski period. Specifična aktivnost imobilizovanog enzima je određena u incijalnom trenutku i nakon 14 dana skladištenja korišćenjem metoda za određivanje enzimske aktivnosti prikazanih u Odeljku 3.2. i pirogalola (13 mmol/L).

## 3.4. Oksidacija peroksidaze iz rena

Za oksidaciju peroksidaze iz rena je korišćen rastvor natrijum-perjodata (50 mmol/L) u 50 mmol/L natrijum-acetatnom puferu pH 5,0 tokom 6 h u mraku na 4 °C. Dodatkom glicerola u finalnoj koncentraciji od 0,2% (v/v) prekinut je proces oksidacije. Oksidovani enzim je dijalizovan u natrijum-acetatnom puferu pH 5,0.

### **3.5. Karakterizacija lignin-peroksidaze**

#### **3.5.1. Određivanje pH optimuma**

Za određivanje optimalne pH vrednosti korišćeni su sledeći puferi:

- 0,1 mol/L citratni pufer pH 3,5
- 0,1 mol/L natrijum-acetatni pufer pH 4,0, 4,5 i 5,5
- 0,01 mol/L PIPES pH 6,0 i 7,0

U ovim puferima je rastvaran supstrat – ABTS i određivana je aktivnost imobilizovanih ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom po prethodno opisanom postupku.

### **3.6. Modifikacija alginata**

#### **3.6.1. Perjodatna oksidacija**

Alginat je oksidovan natrijum-perjodatom i hemijski modifikovan tiramin-hidrohloridom po prethodno opisanoj proceduri (28). Ukratko, odgovarajuća količina natrijum-alginata (0,28 g) je rastvorena u vodi do finalne koncentracije od 1,4% (w/v). U ovaj rastvor je dodat natrijum-metaperjodat do finalne koncentracije od 1,25, 2,5, 5, 7,5 i 10 mmol/L.

Na ovaj način je postignuto da odnos perjodata naspram C–6 glikozidnih jedinica u alginatu bude 2,5, 5, 10, 15 i 20 mol%. Reakcija je zaustavljena nakon 24 h dodatkom glicerola do koncentracije od 50 mmol/L. Oksidovani alginat je potom istaložen u etanolu dodatkom čvrstog natrijum-hlorida (1% NaCl (w/v) i dve zapremine 96% etanola naspram jedne zapremine rastvorenog oksidovanog alginata).

#### **3.6.2. Reduktivna aminacija**

Oksidovani alginat je rastvoren u vodi (1% (w/v)), a procedura taloženja, u etanolu natrijum-hloridom, je ponovljena još dva puta. Precipitat je izolovan, osušen i rastvoren u 0,1 mol/L natrijum-fosfatnom puferu pH 6,0. Reduktivna aminacija oksidovanog alginata je ostvarena dodatkom čvrstog tiramin-hidrohlorida do finalne koncentracije od 1,5% (w/v) i dodatnim mešanjem reakcione smeše još oko pola sata.

Na kraju je dodat čvrst natrijum-cijanoborhidrid tako da finalna koncentracija redukcionog sredstva u rastvoru bude 0,5% (w/v).

Modifikovani precipitat je istaložen u etanolu natrijum-hloridom (1% NaCl (w/v) i dve zapremine 96% etanola naspram jedne zapremine rastvorenog oksidovanog alginata). Procedura taloženja je ponovljena još dva puta. Dobijeni tiramin-alginatni polimeri su skladišteni na -20 °C.

### **3.7. Karakterizacija modifikovanog alginata**

#### **3.7.1. Snimanje UV-VIS spektara**

Napravljeni su 0,1% rastvori alginata u vodi. Snimljeni su UV-VIS spektri nativnog alginata i alginata oksidovanih natrijum-perjodatom i modifikovanih tiraminom u opsegu talasnih dužina od 200 do 600 nm korišćenjem UV-VIS spektrofotometra.

#### **3.7.2. Snimanje FTIR spektara**

Snimljeni su FTIR spektri alginata nativnog i oksidovanih natrijum-perjodatom i modifikovanih tiraminom. Uzorci alginata su sprášeni, a za analiziranje je primenjena ATR metoda u opsegu od 400 do 4000 cm<sup>-1</sup>.

### 3.8. Sinteza makroporoznih kopolimera

Kontinualna faza, koju čine 45 mL 2,78 wt% PVP u etanolu, je zagrevana do 70 °C u reaktoru od 250 mL opremljenim sa sidrastom mešalicom. Monomerna faza (po 5 g monomera GMA i umrežavajućeg agensa EGDMA, (GMA/EGDMA = 90/10; 80/20; 60/40; 40/60)), inicijator (0,05 g azobisisobutironitril, AIBN) i inertna faza (2,25 g 1-dodekanola i 2,25 g cikloheksanola) su dodati u kontinualnu fazu uz mešanje (100 rpm). Reakcija je zaustavljena nakon 5 h. Dobijeni kopolimer je ispran 5 puta etanolom i osušen na sobnoj temperaturi. Prinosi su se kretali u opsegu od 70 do 90%.

#### 3.8.1. Aktivacija kopolimera

Uzorci kopolimera, poli(GMA-co-EGDMA), sa različitim sadržajem monomera i umrežavajućeg agensa, su isprani 3 puta u vodi i etanolu. Svaki polimer (0,7 g) je resuspendovan u vodi. Etilendiamin, u višku u odnosu na epoksi grupe (10 puta), je dodat i reakcija je ostavljena da se meša preko noći na 25 °C. Dalje je reakciona smeša zagrevana na 80 °C tokom 7 h i nakon toga ponovo ostavljena preko noći da se meša na 25 °C. Polimerne čestice su uklonjene i isprane prvo etanolom, a nakon toga i vodom korišćenjem metode filtracije dok pH vrednost filtrata nije iznosila 6,0. Uzorci su osušeni u sušnici na 50 °C tokom nekoliko sati. Konverzija je iznosila približno 45%.

#### 3.8.2. Titracija amino grupa

10 mg makroporoznog kopolimera koji je prethodno aminovan etilendiaminom je resuspendovano u 5 mL rastvora kalijum-hlorida (0,5 mol/L). Dodatkom 0,1 mol/L natrijum-hidroksida podešeno je da pH suspenzije bude oko 11, pa je potom rastvor titrovao dodatkom 0,01 mol/L hlorovodonične kiseline u malim porcijama. Titracija je rađena sve dok nije dobijena pH vrednost od oko 6. Kao kontrola je korišćena titracija samog rastvora kalijum-hlorida (0,5 mol/L). Kako bi se dobio broj molova amino grupa u uzorku sintetisanog kopolimera, od utrošene zapremine za titraciju rastvora kalijum-hlorida oduzete su vrednosti utrošene zapremine za titraciju uzorka ( $V$ ), i preračunata je količina amino grupa prema formuli (1):

$$n = 0,01 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times V \quad (1)$$

#### 3.8.3. Karakterizacija kopolimera

Raspodela veličine pora sintetisanih makroporoznih kopolimera je određena korišćenjem živine porozimetrije (Carlo Erba 2000, softver Milestone 200).

Merenje porozimetrije je obavljeno korišćenjem uređaja PASCAL 440 u CD3-P dilalometru u opsegu pritiska od 0,1 do 200 MPa.

Skenirajući elektronski mikroskop (TESCAN FE-SEM Mira 3 XMU) je upotrebljen za morfološku karakterizaciju sintetisanih makroporoznih kopolimera. Pre SEM analize, uzorci su prekriveni tankim slojem zlata korišćenjem uređaja za raspršivanje (Polaron SC503, Fisons Instruments).

Efikasnost transformacije epoksi grupa potvrđena je i elementalnom analizom. Uzorci kopolimera su analizirani na sadržaj ugljenika, vodonika i azota u Laboratoriji za mikroanalizu, Odsek za hemiju, Univerzitet u Beogradu.

### **3.9. Sepiolit**

#### **3.9.1. Priprema sepiolita**

Uzorci sepiolita su prikupljeni u okolini Obrenovca (Srbija) i usitnjeni u avanu sa tučkom do finih čestica veličine oko 0,3 mm. Sepiolit je nakon toga ispran dejonizovanom vodom, a sitnije čestice su uklonjene metodom frakcione sedimentacije. Ispiranje je ponovljeno nekoliko puta.

### **3.10. Imobilizacija peroksidaze iz rena na modifikovanom alginatu**

Alginati modifikovani tiraminom sa različitim stepenom oksidacije su rastvoreni u 50 mmol/L Tris puferu pH 7,0 do finalne koncentracije od 15%. Peroksidaza iz rena (2,89, 13,96 i 34,9  $\mu$ L; 0,5, 2,79 i 6,98 U/mL), glukoza-oksidaza (0,1 U/mL) i glukoza (finalne koncentracije 10 mmol/L) su dodate u rastvor tiramin-alginata. Mikro-kuglice su formirane postepenim ukapavanjem ove smeše u 600  $\mu$ L lakog mineralnog ulja koje sadrži 3% Span 80 deterdžent uz mešanje. Reakcija je stopirana dodatkom Triton X-100 u 5% rastvor kalcijum-hlorida. Dobijene mikro-kuglice sa imobilizovanom peroksidazom iz rena su isprane prvo tri puta 0,5% rastvorom Triton X-100, a nakon toga i tri puta 5% rastvorom kalcijum-hlorida.

### **3.11. Imobilizacija ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom na modifikovanom alginatu**

Ćelijski zidovi *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 sa lignin-peroksidazom su dobijeni iz Laboratorije za bioinženjering (Lab 434), Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet, a proizvedeni po prethodno razvijenom protokolu (15). Ćelijski zidovi sa lignin-peroksidazom su resuspendovani u 0,1 mol/L natrijum-acetatnom puferu pH 4,5 u koncentraciji od 647,5 mg/mL. Pripremljen je 11% alginatni hidrogel, mešanjem odgovarajuće količine rastvora modifikovanog alginata u 0,1 mol/L natrijum-acetatnom puferu pH 4,5 sa vodonik-peroksidom (5 mmol/L). Za pravljenje hidrogela korišćen je 2,5% oksidovani alginat modifikovan tiraminom. Smeša ćelijskih zidova i alginata je pomešana u zapreminskom odnosu 1:2 i ukapavana je iz šprica sa iglom u 6% rastvor kalcijum-hlorida. Formirane su kuglice tamnozeleno boje, koje su ostavljene da se mešaju tokom 2 h u rastvoru kalcijum-hlorida. Pripremljene kuglice su isprane dva puta istim rastvorom kalcijum-hlorida i čuvane su u 5 mmol/L rastvoru kalcijum-hlorida sa 0,1 mol/L natrijum-acetatnim puferom pH 4,5.

Kao kontrola su korišćeni ćelijski zidovi sa lignin-peroksidazom, koji su nakon suspendovanja u natrijum-acetatnom puferu pH 4,5 inkubirani na 80 °C tokom 3 sata, kako bi se enzim inaktivirao. Ćelijski zidovi su potom pomešani sa alginatnim rastvorom i ukapavani u rastvor kalcijum-hlorida, kao što je prethodno opisano. Ćelije sa praznim pCTcon2 vektorom su takođe korišćene kao druga kontrola za imobilizaciju na alginatni polimer.

### **3.12. Imobilizacija peroksidaze iz rena na makroporoznim kopolimerima**

#### **3.12.1. Imobilizacija na kopolimeru aktiviranom glutaraldehidom**

Odgovarajuća količina aminovanog kopolimera sa različitim veličinama pora je prvo deaerizovana 10 minuta u natrijum-fosfatnom puferu pH 8,0 (0,1 mol/L). Nakon toga su kopolimeri isprani dva puta istim puferom i inkubirani 2 sata u rastvoru glutaraldehida u natrijum-fosfatnom puferu pH 8,0 (0,1 mol/L). Zatim su ponovno isprani puferom 3 puta i inkubirani sa različitim količinama peroksidaze iz rena po gramu kopolimera (1, 5, 15 i 25 mg/g) 48 h na sobnoj temperaturi.

Nakon inkubacije kopolimera sa enzimom, imobilizati su isprani dva puta natrijum-fosfatnim puferom pH 7,0 (0,1 mol/L). Odvađeni rastvori prilikom ispiranja su sačuvani za određivanje aktivnosti nevezanog enzima, a nosači sa imobilizovanim enzimom su resuspendovani u istom puferu i skladišteni na 4 °C do dalje upotrebe.

### **3.12.2. Imobilizacija peroksidaze iz rena oksidovane natrijum-perjodatom na kopolimeru**

Peroksidaza iz rena je oksidovana natrijum-perjodatom po prethodno opisanom postupku u Odeljku 3.4. Oksidovana peroksidaza je potom dijalizovana naspram natrijum-acetatnog pufera pH 5,0. Aminovani kopolimeri su prvo deaerizovani 10 minuta u natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0 (0,1 mol/L), isprani u istom puferu i inkubirani 48 h sa različitim količinama oksidovane peroksidaze iz rena po gramu kopolimera (1, 5, 15 i 25 mg/g). Kopolimeri sa imobilizovanim enzimom su isprani dva puta natrijum-fosfatnim puferom pH 7,0 (0,1 mol/L), a nakon toga su suspendovani u istom puferu i skladišteni na 4 °C do dalje upotrebe. Odvađeni rastvori prilikom ispiranja su sačuvani i iskorišćeni za određivanje aktivnosti nevezanog enzima.

### **3.13. Imobilizacija oksidovane peroksidaze iz rena na sepiolitu**

Sepiolit (0,1 g) je ispran natrijum-acetatnim puferom zapremine 5 mL i pH vrednosti 5,0 (50 mmol/L) pa inkubiran tokom 48 h sa različitim količinama nativnog i oksidovanog enzima po gramu neorganskog nosača (1, 5, 15 i 25 mg/g). Peroksidaza iz rena je prvo podvrgnuta oksidaciji po prethodno opisanoj proceduri (Odeljak 3.4.). Nakon toga je nosač sa imobilizovanim enzimima ispran natrijum-acetatnim puferom pH 5,0 (0,1 mmol/L) i čuvan u istom puferu na 4 °C do upotrebe. Odvađeni rastvori prilikom ispiranja su sakupljeni i iskorišćeni prilikom određivanja aktivnosti nevezanog enzima.

### **3.14. Uklanjanje fenola**

Imobilizovana peroksidaza iz rena je iskorišćena za uklanjanje fenola iz rastvora. Reakcija za oksidaciju fenola je izvedena u šaržnom reaktoru mešanjem tiramin-alginatnih mikrokuglica sa 3 mL rastvora fenola (2 mmol/L) u Tris puferu (50 mmol/L). Ispitan je uticaj, na prvom mestu koncentracije oksidovanog tiramin-alginata, a potom i dostavnog sistema za vodonik-peroksid, na operativnu stabilnost procesa uklanjanja fenola imobilizovanom peroksidazom. Vodonik-peroksid je uveden u reakcionu smešu direktno, dodavanjem u koncentraciji od 2,4 mmol/L.

Za njegovo interno generisanje iskorišćen je i prethodno opisani sistem sastavljen od glukoza-oksidaze i glukoze. Varirana je prvo koncentracija glukoza-oksidaze (0,187 U/mL i 0,375 U/mL), a potom i koncentracija glukoze (2, 3 i 4 mmol/L). Reakciona smeša sastavljena od rastvora fenola, glukoza-oksidaze i glukoze je mešana na magnetnoj mešalici tokom 6 h. U prvih 30 minuta, alikvoti su uzimani na 15 minuta, a nakon toga svakih 30 minuta. Kolorimetrijski esej po kom fenol reaguje sa 4-aminoantipirenom u prisustvu kalijum-fericijanida je iskorišćen za određivanje koncentracije fenola u reakcionoj smeši.

U ove svrhe, alikvoti od 40 µL su prebačeni u 760 µL Tris-HCl pufera pH 7,0, a nakon toga je u rastvor dodato 100 µL rastvora kalijum-fericijanida,  $K_3Fe(CN)_6$  (83,4 mmol/L) i 100 µL 4-aminoantipirena (20,8 mmol/L). Nakon 10 minuta razvijanja boje, izmerena je apsorbancija na 510 nm korišćenjem UV-VIS spektrofotometra. Koncentracija uklonjenog fenola je određena korišćenjem kalibracione krive slobodne (rastvorne) peroksidaze.

Proces oksidacije fenola je praćen tokom 24 h. Operativna stabilnost i višestruka upotreba su ispitane kroz cikluse, svaki ciklus je trajao 24 h. Uklanjanje je ponavljano dok nije primećen značajan pad aktivnosti imobilizovanog enzima.

Za uklanjanje fenola je iskorišćena i peroksidaza iz rena imobilizovana na makroporoznim kopolimerima. U ove svrhe su primenjeni prethodno opisani parametri za oksidaciju fenola peroksidazom imobilizovanom na modifikovanom alginatu, ali su u malom procentu prilagođeni novim uslovima. Skraćeno je vreme trajanja dužine jednog ciklusa sa 24 h na 4 h, ali je uvedeno i ispiranje kopolimera 96% etanolom između dva ciklusa. Na taj način je produžena mogućnost primene ovog imobilizovanog sistema za uklanjanje fenola iz šaržnog reaktora.

### 3.15. Degradacija organskih boja

Mikro-kuglice modifikovanog alginata sa imobilizovanim ćelijskim zidovima sa lignin-peroksidazom su iskorišćene za degradaciju tekstilnih boja Evans Blue i Amido Black 10B. Napravljeni su 0,5 mmol/L štok rastvori boja, koji su čuvani u mraku. Kako bi apsorbance na maksimalnoj talasnoj dužini (620 nm) bile između 0,8 i 1, bilo je neophodno prvo razblažiti štok rastvora boja. Oko 20 mg alginatnih kuglica sa imobilizovanim ćelijskim zidovima je pomešano sa rastvorom boje u 0,1 mol/L natrijum-acetatnom puferu pH 4,5 i 5 mmol/L vodonik-peroksidom. Prvo je praćena promena apsorbance na 620 nm u odgovarajućem vremenskom intervalu (0, 1, 2, 4, 8, 24 i 48 h).

Relativna dekolorizacija u procentima je preračunata prema sledećoj formuli (2):

$$\text{Relativna dekolorizacija (\%)} = \frac{A(\text{početna}) - A(\text{u odgovarajućem trenutku})}{A(\text{početna})} \times 100 \quad (2)$$

Ponovna upotreba alginatnih kuglica sa imobilizovanim ćelijskim zidovima sa lignin-peroksidazom prilikom degradacije boja je praćena određivanjem procenta degradacije odgovarajuće boje na 48 h. Nakon 48 h, merena je apsorbance na 620 nm, potom su kuglice isprane 5 mmol/L rastvorom kalcijum-hlorida u 0,1 mol/L natrijum-acetatnom puferu pH 4,5 i iskorišćene za nov ciklus degradacije. Postupak je ponavlján sve dok se procenat degradacije tekstilnih boja nije smanjio na ispod 50%. Relativna dekolorizacija nakon 48 h za svaki ciklus je preračunata korišćenjem sledeće formule (3):

$$\text{Relativna dekolorizacija (\%)} = \frac{A(\text{početna}) - A(\text{finalna})}{A(\text{početna})} \times 100 \quad (3)$$

## 4. Ciljevi doktorske disertacije

Cilj ove doktorske disertacije je uklanjanje fenola i degradacija tekstilnih boja iz vodenih rastvora (sintetičkih otpadnih voda) primenom peroksidaza iz rena (*Armoracia rusticana*) i iz gljive bele truleži (*Phanerochaete chrysosporium*) imobilizovanih na različitim nosačima, korišćenjem tri metode (adsorpcija, kovalentno vezivanje i enkapsulacija) kao i optimizacija uslova ovih procesa. Za imobilizaciju su kao nosači korišćeni hidrogelovi dobijeni umrežavanjem modifikovanih alginata, makroporozni kopolimeri sa veličinom pora od 150 do 310 nm, kao i neorganski glineni mineral – sepiolit. Svi su testirani za imobilizaciju rastvornih enzima i ćelijskih zidova, u cilju dobijanja efikasnih biokatalizatora koji bi se mogli koristiti u kontinualnim reakcijama polimerizacije fenola u šaržnom reaktoru i oksidacije različitih organskih boja u vodenim rastvorima.

Prvi put je primenjeno interno generisanje vodonik-peroksida u reakcionoj smeši oksidacijom glukoze u prisustvu glukoza-oksidaze, a prilikom enkapsulacije peroksidaze u tiramin-alginatne mikro-kuglice. Ovaj sistem je takođe iskorišćen za dostavu vodonik-peroksida u reakcionu smešu tokom oksidacije fenola.

## 5. Rezultati i diskusija

Fenolna jedinjenja su privukla pažnju brojnih istraživača zbog velike toksičnosti i široke rasprostranjenosti u industrijskim otpadnim vodama. Iz tog razloga uloženo je dosta napora da se razvije najefikasniji metod za njihovo uklanjanje iz zagađenih vodenih tokova (33,200–205). Neke istraživačke grupe su se fokusirale na primenu neorganskih nano-čestica (gvožđe-vanadat ili titanijum-dioksid), za koje se pokazalo da mogu da detoksifikuju 2-hlorofenol u prisustvu UV zračenja (33,205).

Modifikovani bentonit je pokazao značajni kapacitet adsorpcije za petrohemijski otpad (toluen, ksilen, fenol i 2,4,6-trihlorofenol) (202,204). Ukpaka sa saradnicima je u svom istraživanju primenio biološki metod (bakterije i gljive) za uklanjanje zagađivača, kao što su benzen, toluen i ksilen, iz zemljišta (206).

Za tretiranje otpadnih voda veliku primenu su pronašle konvencionalne fizičko-hemijske i biološke metode. Međutim, ove metode nisu dovoljno ekonomične, efikasne, potpune niti selektivne. Biološke metode su vrlo spore (izuzetno dugačka vremena aklimatizacije uzrokovana bakterijskim rastom), dok su fizičko-hemijske metode praćene formiranjem štetnih nusprodukata.

U uklanjanju fenola obećavajuće rezultate pokazuju pristupi koji podrazumevaju upotrebu enzima, zbog njihove velike selektivnosti, specifičnosti i efikasnosti na različitim temperaturama i pH vrednostima (1,9,10). Ovaj metod za tretiranje otpadnih voda se čak može smatrati i energetski vrlo efikasnim (207). Među enzimima najveću primenu za tretiranje otpadnih voda su pronašle peroksidaze (4,6,8,59,208–210). Istraživanja su pokazala da peroksidaze imaju veliku specifičnost prema 30 različitih fenolnih jedinjenja i aromatičnih amina sa efikasnošću uklanjanja od 99% (2,3,4,11,12,211,212).

Pored fenola i različitih fenolnih jedinjenja, indikatori zagađenja otpadnih voda, često vidljivi čak i golim okom, su organske boje. Za dekolozaciju se mogu primeniti prethodno navedene metode, koje se koriste za tretiranje fenolom zagađenih otpadnih voda: adsorpcija, hemijske i biološke metode (99). Kako bi se izvršila dekolozacija, i uklonile azo boje, neophodno je obezbediti pre svega raskidanje dvostruke  $-N=N-$  veze, najčešće primenom enzima kao što su lakaze ili azoreduktaze (99).

U cilju postizanja najefikasnijeg uklanjanja fenola i organskih boja iz industrijskih otpadnih tokova, peroksidaza iz rena i ćelijski zidovi sa lignin-peroksidazom imobilizovani na različitim nosačima (makroporozni kopolimeri, sepiolit i prirodni polimer – alginat) su iskorišćeni za tretiranje fenolom ili organskim bojama zagađenom vodom (sintetičkih otpadnih voda).

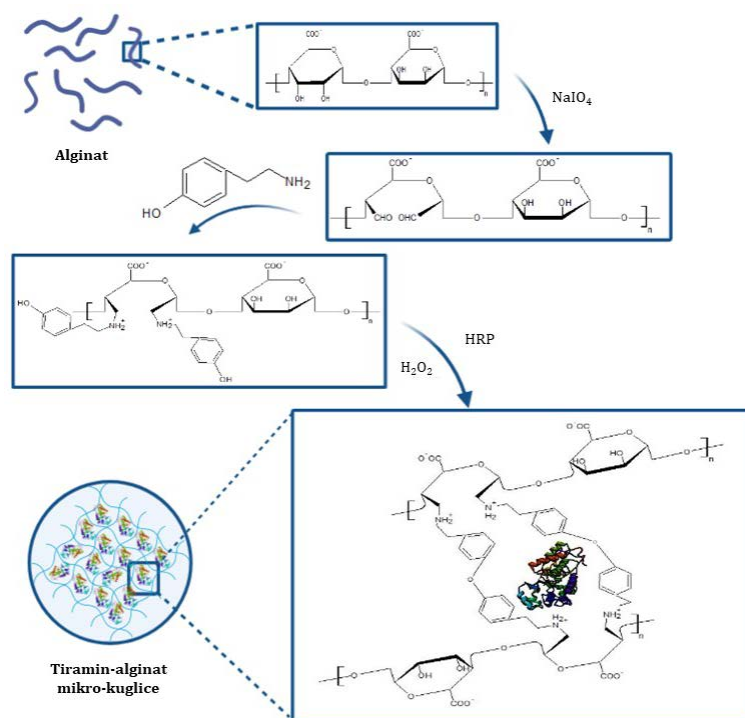
U ove svrhe ispitivane su tri različite metode za imobilizaciju: enkapsulacija, kovalentno vezivanje i adsorpcija, kako bi se uvidele razlike između ovih metoda prilikom uklanjanja fenola i boja iz vodenih rastvora.



## 5.1. Modifikacija alginata

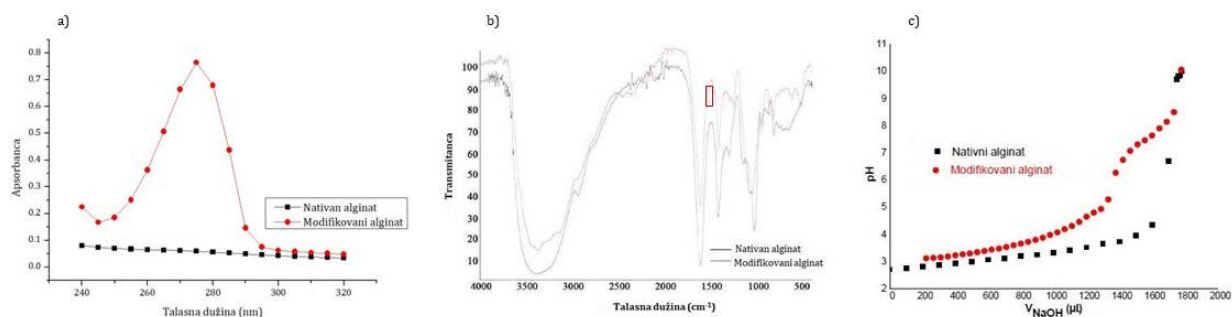
Kako bi se ostvarilo istovremeno zarobljavanje enzima i geliranje alginata, neophodno je bilo prvo modifikovati alginat po prethodno opisanoj proceduri (28). U prvom koraku alginat je oksidovan natrijum-perjodatom. Variran je molarni procenat natrijum-perjodata naspram ponavljajućih glikozidnih jedinica alginata (2,5, 5, 10, 15 i 20 mol%). Dobijene aldehidne grupe u alginatnom lancu su potom dalje podvrgnute reduktivnoj aminaciji tiramin-hidrohloridom u višku, i u prisustvu natrijum-cijanoborhidrida kao redukujućeg agensa (Slika 35).

Kao što se sa šeme može videti, enzim je enkapsuliran u prisustvu vodonik-peroksida unutar mikro-kuglica napravljenih od oksidovanog tiramin-alginata. Vodonik-peroksid se može obezbediti bilo direktnim dodavanjem u reakcionu smešu bilo internim generisanjem u reakciji oksidacije glukoze katalizovanoj glukoza-oksidadom, po prethodno opisanoj proceduri (28).



**Slika 35.** Šematski prikaz modifikacije alginata i imobilizacije peroksidaze iz rena

UV-VIS i FTIR spektroskopija, kao i kiselo-bazne titracione reakcije su iskorišćene za određivanje stepena modifikacije alginata (Slika 36). Sve tri metode su potvrdile prisustvo tiramina u polisaharidnom lancu (pik na 275 nm odgovara tiraminu na UV-VIS spektru, traka na  $1517\text{ cm}^{-1}$  odgovara C-C istežućim vibracijama aromatičnog jedinjenja na FTIR spektru, a kiselo-baznom titracijom je uočeno prisustvo bazne grupe na pKa 7,5). Tako je potvrđeno da su oksidacija i reduktivna aminacija alginata uspešno izvršene. Dobijeni stepeni alginatne modifikacije se mogu uporediti sa literaturnim (28).

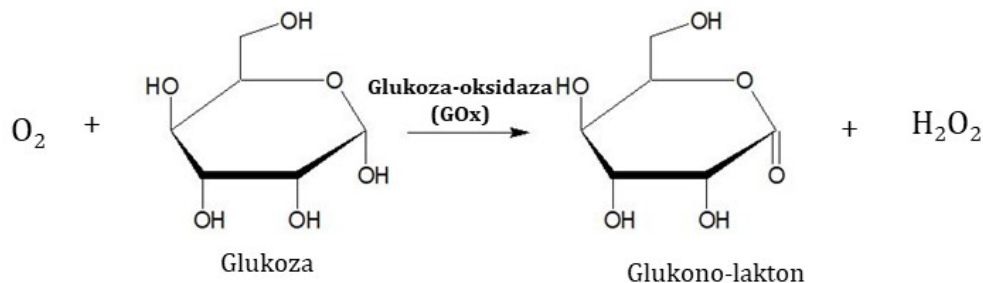


**Slika 36.** a) UV-VIS spektri, b) FTIR spektri i c) titracione krive nativnog i 20 mol% oksidovanog tiramin-alginata

## 5.2. Imobilizacija peroksidaze iz rena u modifikovanom alginatu

Imobilizacija peroksidaze iz rena unutar mikro-kuglica od oksidovanog tiramin-alginata je ostvarena enzimskim emulziono-polimerizacionim reakcijama. U ovim reakcijama do formiranja hidrogela dolazi umrežavanjem tiraminskih ostataka na modifikovanom alginatu u prisustvu vodonik-peroksida, za čije je postepeno otpuštanje u reakcionu smešu korišćen sistem sastavljen od glukoze i glukoza-oksidge (Slika 37), a sve u cilju građenja stabilnijeg hidrogela. Simultano sa ovim procesom odvijao se i proces zarobljavanja HRP unutar ove alginatne mreže, čime je on imobilizovan u modifikovanom biopolimeru sa smanjenom verovatnoćom difuzije. Uloga glukoze i glukoza-oksidge je prethodno opisana (28), a bazira se na oksidaciji glukoze kiseonikom u prisustvu glukoza-oksidge, čime je omogućeno postepeno oslobađanje vodonik-peroksida.

Na ovaj način se takođe utiče i na sprečavanje inaktivacije peroksidaze vodonik-peroksidom, što je vrlo česta pojava u oksidacionim reakcijama katalizovanim ovim enzimom.



**Slika 37.** Reakcija oksidacije glukoze kiseonikom u prisustvu glukoza-oksidge

U cilju ispitivanja uticaja stepena oksidacije tiramin-alginata na efikasnost enkapsulacije peroksidaze iz rena, 0,5 U/mL ovog enzima je imobilizovano u modifikovani alginat, koji je u različitom procentu oksidovan natrijum-perjodatom.

Rezultati prikazani u Tabeli 4 su pokazali da se sa povećanjem stepena oksidacije alginata specifična aktivnost imobilizovanog enzima postepeno povećava. Ukoliko je alginat modifikovan perjodatom u većim procentima, formirano je više potencijalnih mesta za vezivanje enzima, čime je i specifična aktivnost povećana. Ovi zaključci su u korelaciji sa prethodno objavljenim rezultatima, koji su pokazali da najveću specifičnu aktivnost ka pirogalolu imaju one peroksidaze koje su enkapsulirane unutar tiramin-alginata oksidovanog u većem procentu (28).

**Tabela 4.** Ispitivanje uticaja stepena oksidacije alginata na efikasnost enkapsulacije peroksidaze iz rena

<b>Procenat oksidacije tiramin-alginata</b>	<b>2,5 mol%</b>	<b>5 mol%</b>	<b>10 mol%</b>	<b>15 mol%</b>	<b>20 mol%</b>
<b>Specifična aktivnost (U/mL)</b>	0,05 ± 0,01	0,25 ± 0,12	0,34 ± 0,03	0,42 ± 0,09	0,67 ± 0,13

S obzirom da su veće aktivnosti imobilizovanih enzima dobijene kada je HRP imobilizovana na 10, 15 i 20 mol% oksidovanom i modifikovanom tiramin-alginatu, upravo ovi polimeri su iskorišćeni za dalja istraživanja. U prvom koraku su optimizovani parametri za imobilizaciju peroksidaze iz rena korišćenjem 10 mol% modifikovanog tiramin-alginata.

Potom su za reakcije uklanjanja fenola iz šaržnog reaktora upotrebljeni tiramin-alginati dobijeni oksidacijom u 15 i 20 mol% natrijum-perjodata, koji su pokazali bolje rezultate pri primeni u ove svrhe nego 10 mol% modifikovani alginat. Alginati modifikovani u prethodno pomenutim mol% su iskorišćeni za optimizaciju reakcionih uslova za uklanjanje fenola, i za određivanje operativne stabilnosti imobilizovanog enzima tokom višestruke upotrebe za uklanjanje fenola.

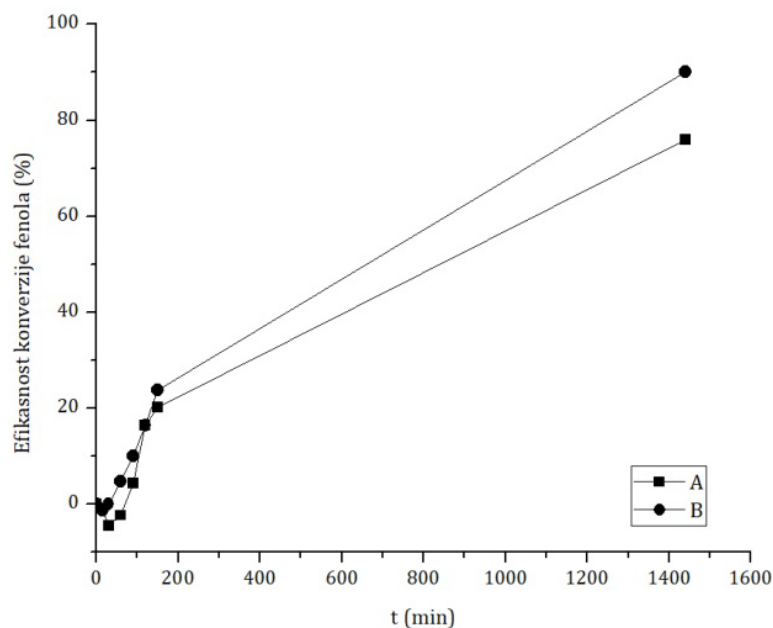
### **5.3. Optimizacija uslova za uklanjanje fenola korišćenjem peroksidaze iz rena imobilizovane u modifikovanom alginatu**

Prvi cilj ovog dela istraživanja je optimizacija reakcionih uslova za proces uklanjanja fenola iz vodenog rastvora (sintetičke otpadne vode) u pogledu koncentracije HRP korišćenog za imobilizaciju, koncentracije vodonik-peroksida i tipa njegove dostave u reakcionu sistem. Takođe, deo zadatka se odnosio i na otkrivanje stepena modifikacije alginata tiraminom koji bi pokazao najbolji ishod u procesu uklanjanja fenola.

Dve različite koncentracije peroksidaze iz rena (2,79 i 6,98 U/mL) su korišćene za enkapsulaciju u tiramin-alginatne mikro-kuglice (Slika 38).

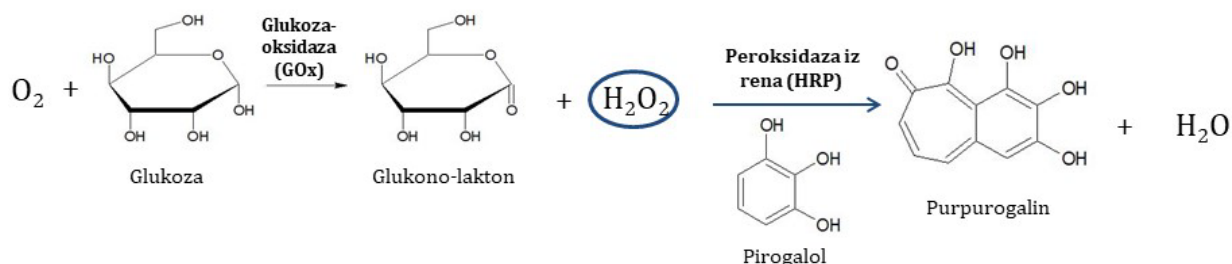
Glavni cilj ovog istraživanja je određivanje optimalne koncentracije HRP, koja bi obezbedila najveću efikasnost prilikom uklanjanja fenola.

Tiramin-alginat sa većom koncentracijom imobilizovane peroksidaze (6,98 U/mL) je imao veću efikasnost konverzije fenola nego biopolimer na kom je imobilizovana manja koncentracija enzima. Za 24 h iz reakcione smeše je uklonjeno 90% fenola, kada je korišćen enzim imobilizovan u koncentraciji od 6,98 U/mL, dok je 76% fenola uklonjeno primenom niže koncentracije enzima (2,79 U/mL) pod istim reakcionim uslovima. Ovime je potvrđeno da se sa povećanjem koncentracije HRP, efikasnost konverzije fenola povećava (214). Monier sa saradnicima je pokazao da se povećana efikasnost imobilizacije dobija dodatkom većih količina HRP (19). Upravo iz ovih razloga je za dalja ispitivanja primenjen alginatni nosač na kome je imobilizovan enzim u koncentraciji od 6,98 U/mL.



**Slika 38.** Uticaj koncentracije peroksidaze iz rena na efikasnost uklanjanja fenola: (A) 2,79 U/mL (B) 6,98 U/mL peroksidaze imobilizovane unutar 10 mol% oksidovanog tiramin-alginata

Za dostavu vodonik-peroksida u reakcioni sistem korišćene su dve metode. Prvi metod je uključivao direktno dodavanje vodonik-peroksida u koncentraciji od 2,4 mmol/L, dok je drugi podrazumevao njegovu internu dostavu, oksidacijom glukoze kiseonikom u prisustvu glukoza-oksidadze. Na Slici 39 je prikazan metod internog generisanja vodonik-peroksida i njegove dalje primene za oksidaciju pirogalola u prisustvu peroksidaze.



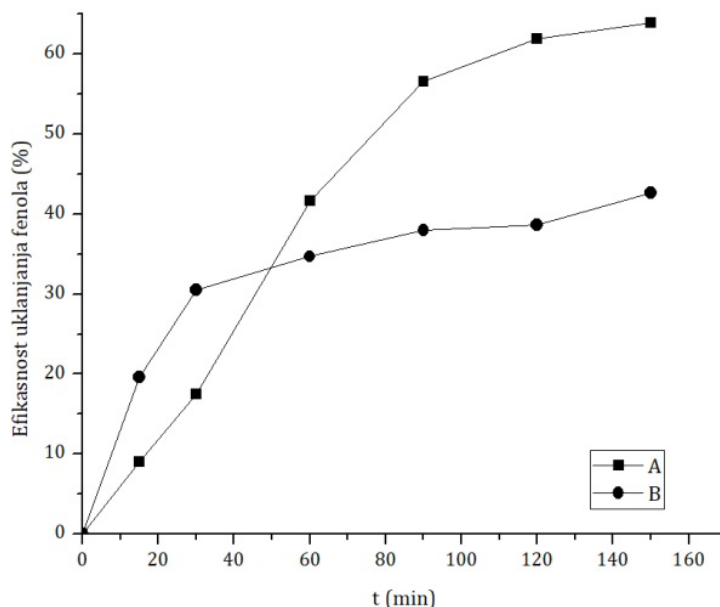
**Slika 39.** Metod za oksidaciju pirogalola u prisustvu peroksidaze iz rena

S obzirom da vodonik-peroksid obezbeđuje oksidaciju fenolnih jedinjenja, njegovo prisustvo je od velikog značaja za reakcije katalizovane peroksidazama. Ovaj reagens je odgovoran za oksidaciju nativnog enzima, koji tako postaje sposoban da u svoje aktivno mesto primi aromatična jedinjenja i izvrši njihovu oksidaciju (215).

U ovom istraživanju 2,4 mmol/L vodonik-peroksida je prvo dodato direktno u reakcioni sistem za uklanjanje fenola. U literaturi je pokazano da sa povećanjem koncentracije vodonik-peroksida raste i efikasnost uklanjanja fenola (216). Kurnik sa saradnicima je uočio da koncentracija vodonik-peroksida u mnogome utiče na efikasnost uklanjanja fenola (efikasnost se povećava pri koncentracijama  $H_2O_2$  2,59 mmol/L ili većim) (217). Potvrđeno je i da se za 150 min može ukloniti 42,6% fenola iz sistema. Naši rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima (214). Pokazano je i da je u prethodno pomenutom vremenskom intervalu moguće postići maksimum uklanjanja fenola (214). S obzirom da je poznato da vodonik-peroksid može dovesti do inaktivacije peroksidaze, ovako niska efikasnost uklanjanja fenola može biti posledica njegove velike koncentracije (215,216,218).

Reakcija uklanjanja fenola je ponovljena, ali pod nešto drugačijim reakcionim uslovima. Direktno dodavanje vodonik-peroksida u reakcionu smešu je zamenjeno dodatkom glukoze i glukoza-oksidadze, čime je obezbeđeno njegovo interno generisanje.

Na Slici 40 uporedno su prikazani rezultati dobijeni kada je za uklanjanje fenola korišćeno direktno dodavanje vodonik-peroksida u reakcionu smešu i kada je ovo jedinjenje interno generisano u reakciji glukoze i glukoza-oksidadze.

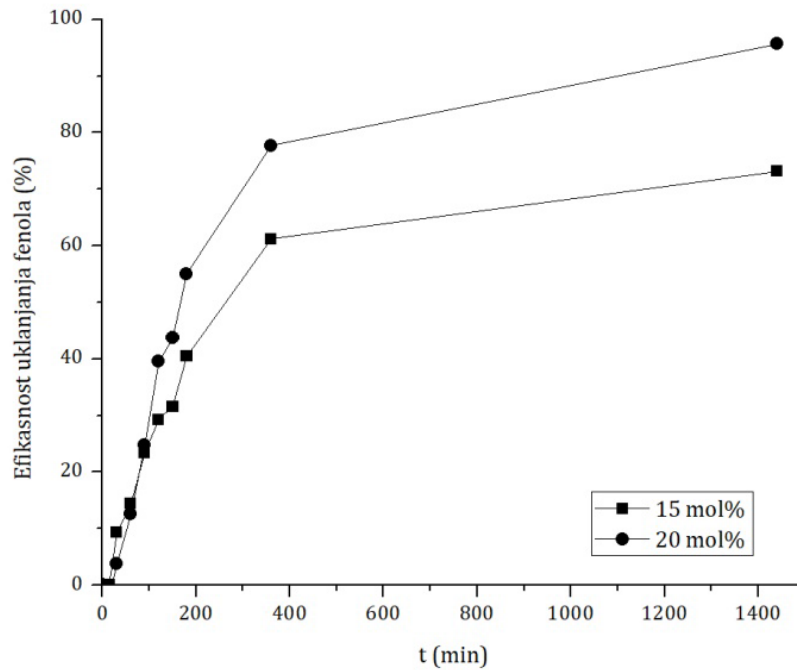


**Slika 40.** Uticaj dostavnog sistema vodonik-peroksida na efikasnost uklanjanja fenola korišćenjem 6,98 U/mL peroksidaze imobilizovane na 10 mol% oksidovanom tiramin-alginatu: (A) 0,375 U/mL glukoza-oksidadze i 4 mmol/L glukoze (B) 2,4 mmol/L vodonik-peroksida

Rezultati prikazani na Slici 40 su pokazali da je čak 64% fenola uklonjeno kada je korišćen sistem za dostavu vodonik-peroksida sačinjen od glukoze i glukoza-oksidadze. Peroksidaze se lako inaktiviraju u prisustvu peroksida, a korišćenjem glukoze i glukoza-oksidadze njegove manje količine se dovode do enzima u istom trenutku, čime se mogućnost njegove inaktivacije svodi na minimum. Iz tog razloga HRP ima veću aktivnost i stabilnost u prisustvu sistema za dostavu vodonik-peroksida nego kada se  $H_2O_2$  direktno dodaje u reakcionu smešu. S obzirom da je veća efikasnost uklanjanja fenola postignuta internom dostavom vodonik-peroksida, ovaj metod je dalje primenjen za uklanjanje fenola u šaržnom reaktoru korišćenjem dva različita tiramin-alginatna polimera (15 i 20 mol% oksidovani alginat).

Na Slici 41 je prikazana promena efikasnosti uklanjanja fenola tokom vremena za oba alginata, 15 i 20 mol% perijodatno oksidovana i modifikovana. Isti sistem za dostavu vodonik-peroksida je iskorišćen za oba alginata kako bi se ispitale razlike između ova dva polimera kada se koriste u procesu uklanjanja fenola.

Efikasnost uklanjanja fenola peroksidazom enkapsuliranom unutar 20 mol% oksidovanog alginata posle 6 h ponovne upotrebe je iznosila 96%, dok je peroksidaza enkapsulirana unutar 15 mol% oksidovanog tiramin-alginata imala efikasnost uklanjanja fenola od 73%. Veća efikasnost uklanjanja sa enzimom enkapsuliranim unutar 20 mol% oksidovanog tiramin-alginata je verovatno posledica ostvarivanja jačih nekovalentnih hidrofobnih interakcija između HRP i aromatičnog fenolnog prstena u 20 mol% u poređenju sa 15 mol% oksidovanim tiramin-alginatom.

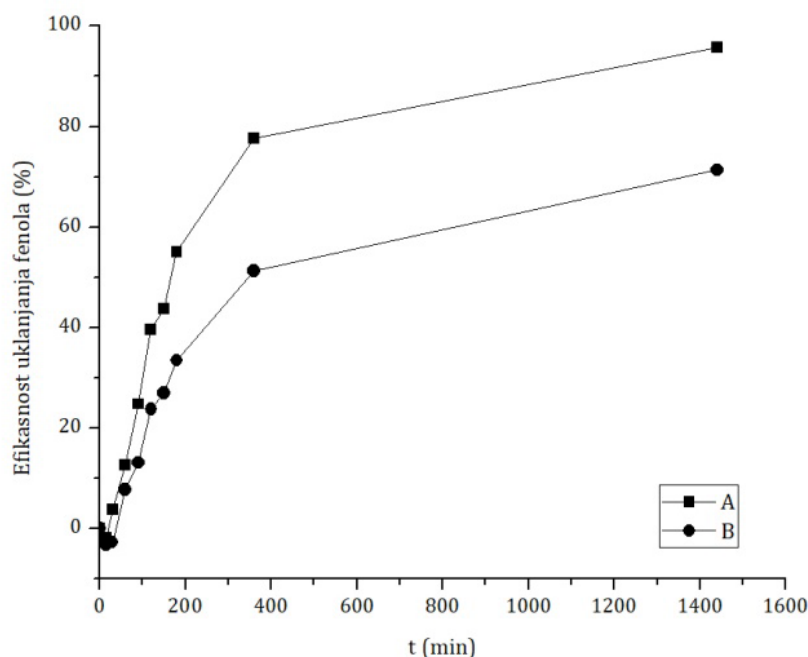


**Slika 41.** Vremenska zavisnost konverzije fenola sa 6,98 U/mL peroksidaze iz rena enkapsulirane unutar 15 i 20 mol% oksidovanog tiramin-alginata

Optimizacija parametara za uklanjanje fenolnih jedinjenja je urađena kako u pogledu količine glukoza-oksidadze (0,187 i 0,375 U/mL), tako i u pogledu koncentracije glukoze (2, 3 i 4 mmol/L). To je imalo za cilj pronalazak najboljeg odnosa između dodate količine glukoza-oksidadze i glukoze tokom procesa uklanjanja fenola.

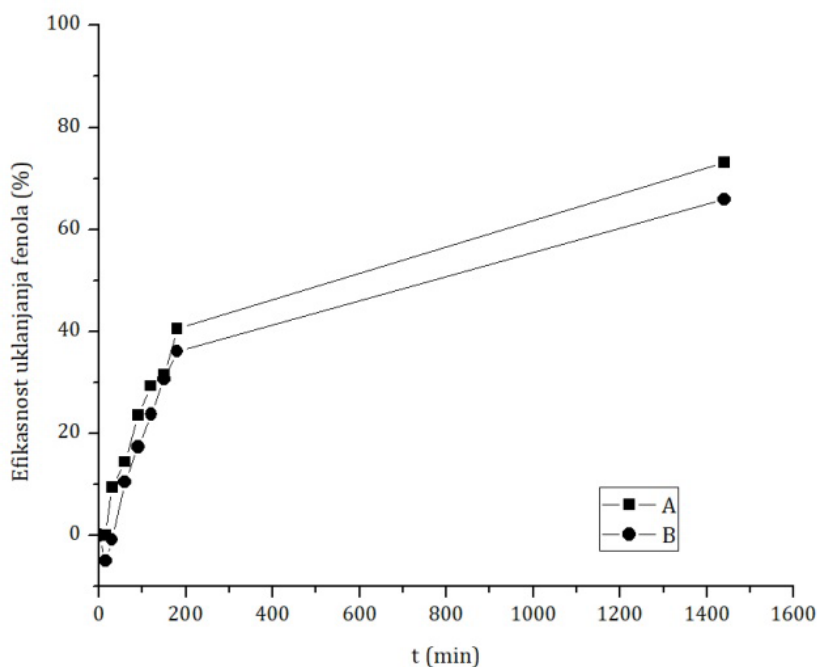
Rezultati prikazani na Slici 42 pokazuju da se veća efikasnost uklanjanja fenola postiže prilikom korišćenja niže koncentracije glukoza-oksidadze.

Koncentracija zaostalog fenola od 44,64 mmol/L je dobijena kada je korišćen sistem sastavljen od 0,375 U/mL glukoza-oksidadze i 4 mmol/L glukoze. Ovaj rezultat je skoro dva puta veći u poređenju sa rezultatom dobijenim kad je korišćena niža koncentracija glukoza-oksidadze. Naime, nakon 6 h upotrebe 20 mol% tiramin-alginatnih mikro-kuglica u šaržnom reaktoru za eliminaciju fenola, sa sistemom za dostavu vodonik-peroksida sastavljenim od 0,187 U/mL glukoza-oksidadze i 4 mmol/L glukoze, koncentracija zaostalog fenola u rastvoru je iznosila 20,73 mmol/L. Sa Slike 42 se može uočiti da se veća efikasnost uklanjanja fenola (skoro 96%) postiže kada se za internu dostavu vodonik-peroksida u reakcionu sistem koristi glukoza-oksidadza u koncentraciji od 0,187 U/mL u poređenju sa 71% uklonjenog fenola, koliko se dobije korišćenjem 0,375 U/mL glukoza-oksidadze.



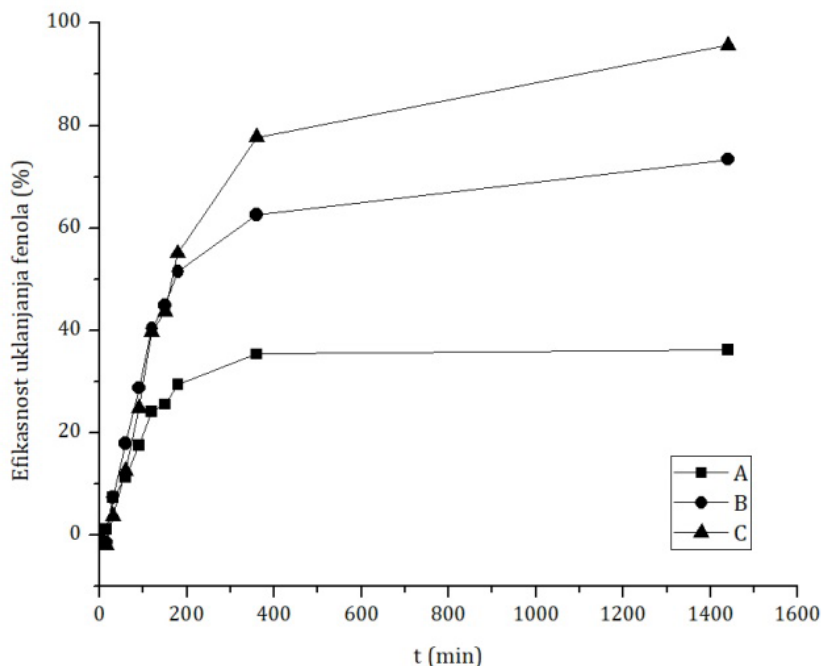
**Slika 42.** Uticaj koncentracije glukoza-oksidadze na efikasnost uklanjanja fenola sa 6,98 U/ml peroksidaze imobilizovane unutar 20 mol% oksidovanog tiramin-alginata: (A) 0,187 U/mL i (B) 0,375 U/mL glukoza-oksidadze, i 4 mmol/L glukoze

Sa peroksidazom enkapsuliranom unutar mikro-kuglica sastavljenih od 15 mol% oksidovanog tiramin-alginata dobijeni su slični rezultati (Slika 43). Manja efikasnost uklanjanja fenola ostvarena je sa većim koncentracijama glukoza-oksidadze, što se može pripisati inaktivaciji enzima, a nastaje kao posledica akumulacije glukono-laktona (219).



**Slika 43.** Uticaj koncentracije glukoza-oksidadze na efikasnost uklanjanja fenola sa 6,98 U/ml peroksidaze imobilizovane unutar 15 mol% oksidovanog tiramin-alginata: (A) 0,187 U/mL i (B) 0,375 U/mL glukoza-oksidadze, i 4 mmol/L glukoze

U daljim eksperimentima je ispitan uticaj koncentracije glukoze na efikasnost uklanjanja fenola upotrebom peroksidaze enkapsulirane unutar 20 mol% oksidovanog tiramin-alginata. U ovom delu istraživanja, korišćena je konstantna koncentracija glukoza-oksidge od 0,187 U/mL, dok je koncentracija glukoze varirana od 2 mmol/L, preko 3 mmol/L do 4 mmol/L. Ustanovljeno je da smanjenje koncentracije glukoze dovodi do smanjenja efikasnosti uklanjanja fenola (Slika 44).



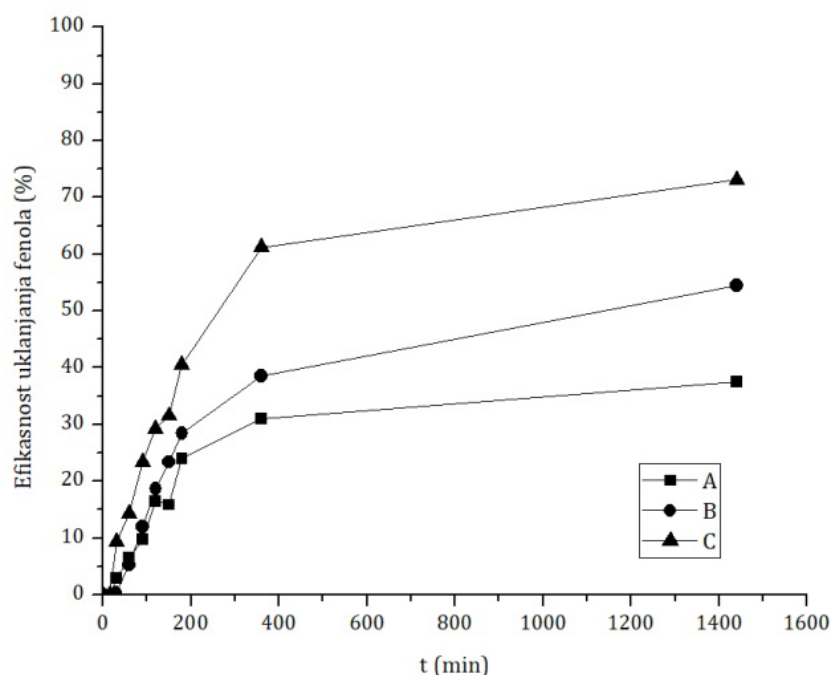
**Slika 44.** Uticaj koncentracije glukoze na efikasnost uklanjanja fenola sa 6,98 U/mL peroksidaze imobilizovane unutar 20 mol% oksidovanog tiramin-alginata: (A) 2 mmol/L, (B) 3 mmol/L i (C) 4 mmol/L glukoze, i 0,187 U/mL glukoza-oksidge

Nakon 24 h upotrebe iz rastvora je uklonjeno 96% fenola, korišćenjem glukoze u koncentraciji od 4 mmol/L. Sa nižim koncentracijama glukoze obezbeđeno je manje efikasno uklanjanje fenola (73% za 3 mmol/L i 36% za 2 mmol/L glukoze).

Kao posledica oksidacije glukoze, a sa povećanjem njene koncentracije, u reakciju se oslobađaju veće količine vodonik-peroksida, što rezultuje povećanjem efikasnosti uklanjanja fenola.

Slični rezultati su dobijeni i za peroksidazu enkapsuliranu unutar 15 mol% oksidovanih tiramin-alginatnih mikro-kuglica (Slika 45). Smanjenje koncentracije glukoze od 4 mmol/L preko 3 mmol/L do 2 mmol/L vodi smanjenju efikasnosti uklanjanja fenola. Nakon 24 h ponovne upotrebe 73% fenola se ukloni iz reakcione smeše kada se koristi sistem za dostavu vodonik-peroksida koji se sastoji od 0,187 U/mL glukoza-oksidge i 4 mmol/L glukoze. Procenat efikasnosti uklonjenog fenola se snižava sa smanjnjem koncentracije dodate glukoze (54,5% za 3 mmol/L glukoze i 37,5% za 2 mmol/L glukoze).

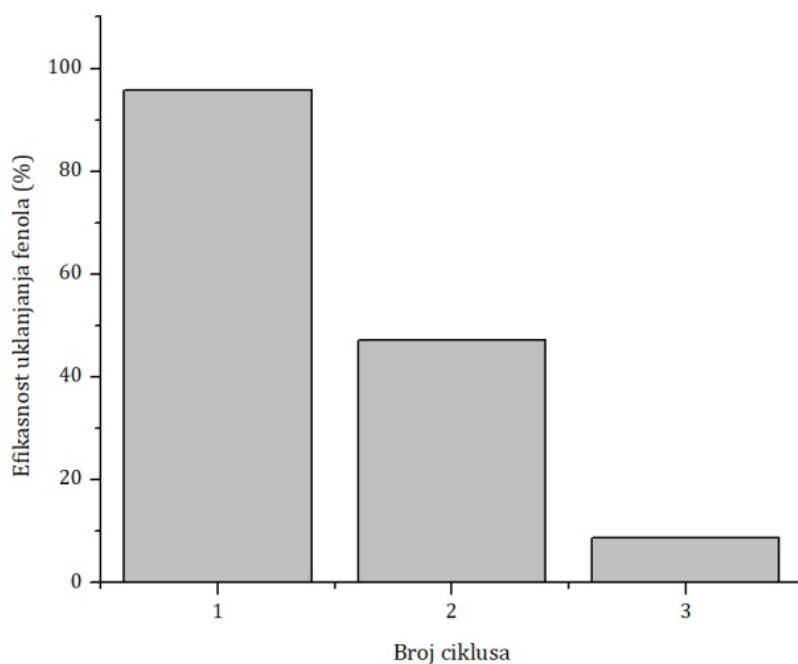




**Slika 45.** Uticaj koncentracije glukoze na efikasnost uklanjanja fenola sa 6,98 U/mL peroksidaze imobilizovane unutar 15 mol% oksidovanog tiramin-alginata: (A) 2 mmol/L, (B) 3 mmol/L i (C) 4 mmol/L glukoze, i 0,187 U/mL glukoza-oksidade

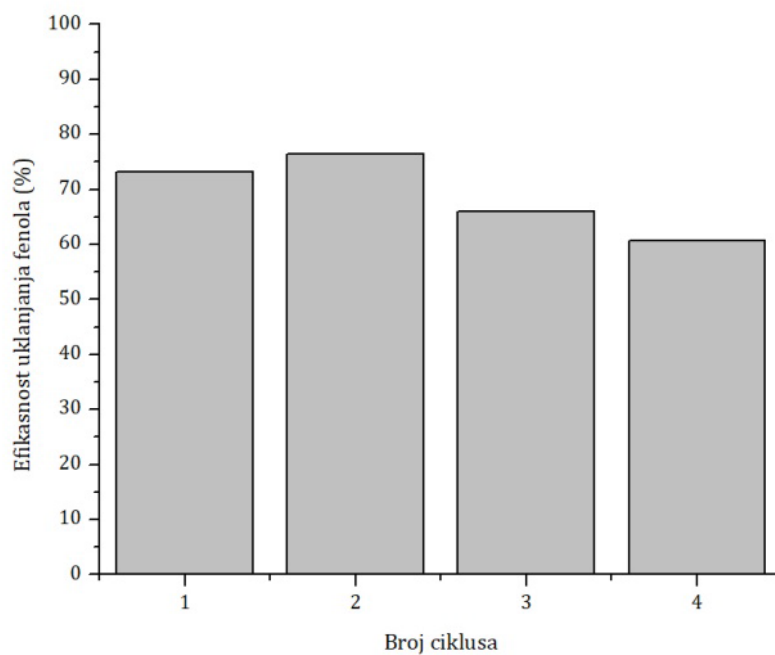
Rezultati optimizacije uslova su pokazali da se najveća efikasnost uklanjanja fenola postiže korišćenjem veće koncentracije glukoze i manje koncentracije glukoza-oksidade.

U cilju ispitivanja operativne stabilnosti imobilizovane HRP, jedna ista šarža enzima je korišćena nekoliko puta u uzastopnim ciklusima uklanjanja fenola. Nakon svakog ciklusa određena je, pre svega, efikasnost uklanjanja fenola, ali i aktivnost enkapsuliranog enzima. HRP imobilizovana na 20 mol% oksidovanom/modifikovanom tiramin-alginatu može se koristiti za uklanjanje fenola najviše tokom 3 uzastopna ciklusa (Slika 46). Iz ciklusa u ciklus dolazilo je do smanjenja efikasnosti degradacije fenola. U prvih 6 h ponovne upotrebe enkapsulirani enzim je pokazao najveću efikasnost. Oko 40% početne efikasnosti je izgubljeno nakon 24 h, dok je dodatni pad u efikasnosti uklanjanja fenola primećen nakon 48 h (za oko 90% se smanjio procenat uklonjenog fenola). Rezultati prikazani na Slici 46 su dobijeni korišćenjem sistema za dostavu vodonik-peroksida sastavljenog od 0,187 U/mL glukoza-oksidade i 4 mmol/L glukoze.



**Slika 46.** Studija ponovne upotrebe peroksidaze iz rena enkapsulirane unutar 20 mol% oksidovanog/modifikovanog tiramin-alginata za uklanjanje fenola

Ispitana je i operativna stabilnost HRP imobilizovane na 15 mol% oksidovanom/modifikovanom tiramin-alginatu (Slika 47). Kada se rezultati dobijeni za imobilizovani sistem sa 15 mol% tiramin-alginatnim mikro-kuglicama (Slika 47) uporede sa prethodnim (za sistem sa 20 mol% oksidovanim alginatom, Slika 46), može se zaključiti da se sistem u kome je HRP imobilizovana na 15 mol% modifikovanom tiramin-alginatu pokazao kao pogodniji. Prilikom ponovne upotrebe imobilizovani enzim je korišćen tokom 4 uzastopna ciklusa, sa blagim padom efikasnosti uklanjanja fenola.



**Slika 47.** Studija ponovne upotrebe peroksidaze iz rena enkapsulirane unutar 15 mol% oksidovanog/modifikovanog tiramin-alginata za uklanjanje fenola

Uprkos tome što se HRP enkapsulirana unutar 15 mol% oksidovanih/modifikovanih tiramin-alginatnih mikro-kuglica može koristiti u dužem vremenskom periodu, HRP imobilizovana na 20 mol% oksidovanom/modifikovanom tiramin-alginatu imala je bolju efikasnost prilikom eliminacije fenola (96% fenola je uklonjeno u prvom ciklusu u poređenju sa 73% koliko je postignuto pod istim uslovima kada je za imobilizaciju korišćen 15 mol% oksidovani/modifikovani tiramin-alginat). Primenom 20 mol% oksidovanih/modifikovanih tiramin-alginatnih mikro-kuglica za imobilizaciju HRP postiže se zadovoljavajuća efikasnost degradacije u prvom ciklusu, dok se pad aktivnosti ovog imobilizovanog sistema za uklanjanje fenola primećuje već u sledećem ciklusu. U drugom ciklusu se iz reakcione smeše ukloni 47% fenola, dok samo 9% u trećem ciklusu. Kada je za uklanjanje fenola korišćena peroksidaza imobilizovana unutar 15 mol% oksidovanih/modifikovanih tiramin-alginatnih kuglica postignuti su niži procenti uklonjenog fenola, međutim njena aktivnost se održala na zavidnom nivou tokom ciklusa. Samo mali pad u pogledu efikasnosti uklanjanja fenola iz šaržnog reaktora primećen je korišćenjem ovog sistema. Enkapsulirana HRP je nakon 4 uzastopna ciklusa zadržala 61% prvobitne aktivnosti. U poređenju sa prethodno objavljenim rezultatom za peroksidazu imobilizovanu u kalcijum-alginatnim mikro-kuglicama (18), rezultat dobijen ovim istraživanjem se pokazao značajnim i vrednim pažnje. Alemzadeh i Nejati su u svom istraživanju pokazali da se sa peroksidazom imobilizovanom u alginatnim kuglicama može postići efikasnost uklanjanja fenola od 50% nakon 5 ciklusa ponovne upotrebe (18).

#### 5.4. Imobilizacija ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom na modifikovanom alginatu

Kako bi se ćelijski zidovi sa lignin-peroksidazom mogli primeniti za degradaciju tekstilnih boja neophodno je bilo prvo ih imobilizovati. Da bi se to ostvarilo ćelijski zidovi sa enzimom su zarobljeni unutar kalcijum-alginatnog hidrogela. U ove svrhe korišćen je perjodatno oksidovani alginat (2,5 mol%) naknadno modifikovan tiraminom. Ukapavanjem smeše ćelijskih zidova i alginata u rastvor kalcijum-hlorida dobijene su kuglice tamnozeleno boje, veličine oko 2 milimetra (Slika 48).



**Slika 48.** Mikro-kuglice tiramin-alginata sa imobilizovanim ćelijskim zidovima sa lignin-peroksidazom

S obzirom da su ćelijski zidovi sa praznim pCTcon2 vektorom pokazali aktivnost, kao kontrola su korišćeni ćelijski zidovi sa lignin-peroksidazom koji su prvo inaktivirani inkubacijom na 80 °C, a potom imobilizovani u modifikovanom alginatu. Na ovaj način smo želeli da osiguramo da su izmerene količine uklonjenih tekstilnih boja isključivo posledica lignin-peroksidazne enzimske aktivnosti.

Dobijeni alginat sa imobilizovanim ćelijskim zidovima je okarakterisan u pogledu specifične aktivnosti imobilizovane lignin-peroksidaze u ćelijskim zidovima i optimalne pH vrednosti, a primenjen je u reakcijama dekolizacije tekstilnih boja.

#### 5.4.1. Određivanje specifične aktivnosti imobilizovanih ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom u modifikovanom alginatu

U cilju ispitivanja specifične aktivnosti lignin-peroksidaze na ćelijskim zidovima imobilizovanih unutar kalcijum-alginatnih kuglica, korišćeni su ABTS i vodonik-peroksid kao supstrati. Ćelijski zidovi sa enzimom su pomešani sa supstratima i praćena je promena apsorbance na 420 nm tokom 15 min.

Vrednosti specifične aktivnosti su preračunate i predstavljene u Tabeli 5. Od vrednosti dobijenih za lignin-peroksidazu imobilizovanu na modifikovanom alginatu oduzete su vrednosti dobijene za inaktivirani enzim, tako da bi prikazane vrednosti za specifične aktivnosti trebalo da potiču samo od imobilizovanog enzima u ćelijskim zidovima.

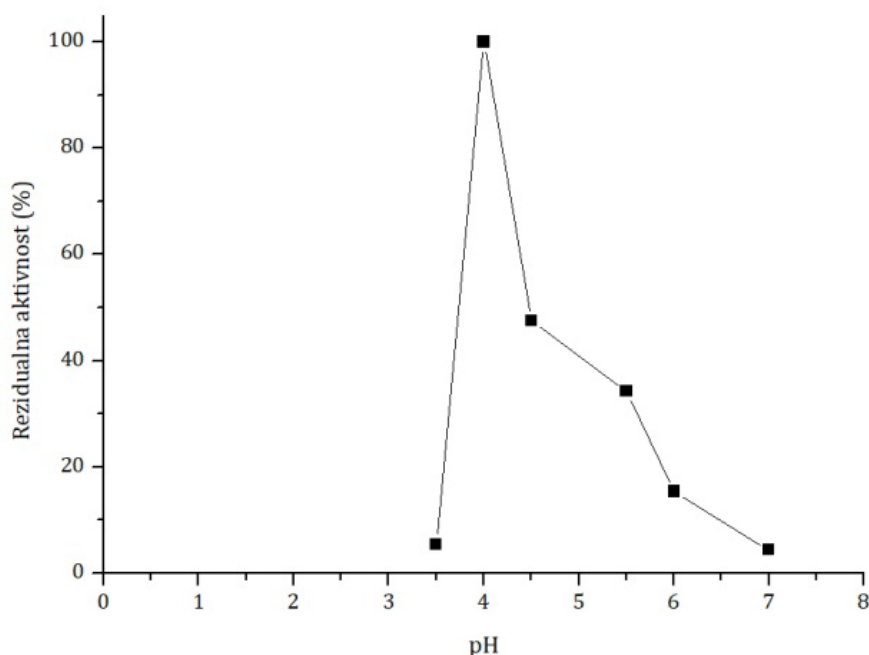
**Tabela 5.** Preračunate vrednosti aktivnosti ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom imobilizovanih na tiramin-alginatnim mikro-kuglicama

Aktivnost ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom	
$\Delta A$	0,2616
Ae (U/mL)	0,0005
Sp (U/mg)	0,0310

Specifična aktivnost ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom imobilizovanih unutar modifikovanog alginata je iznosila 0,0310 U/mg. Da se aktivnost ćelijskih zidova sa invertazom imobilizovanih unutar kalcijum-alginatnog hidrogela zadržava na zadovoljavajućem nivou, pokazala su i istraživanja urađena od strane Milovanović i saradnika (220). Vujičić i saradnici su u svom istraživanju istakli da se zarobljavanjem ćelijskih zidova sa invertazom u hidrogelu od želatina prevazilaze problemi vezani za aktivnost i stabilnost imobilizovanih enzima kako bi se oni mogli primeniti u različitim oblastima industrije (221).

#### 5.4.2. Određivanje optimalne pH vrednosti imobilizovanih ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom u modifikovanom alginatu

Promena aktivnosti imobilizovanih ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom na pH vrednostima od 3,5 do 7,0 (pH 3,5, 4,0, 4,5, 5,5, 6,0 i 7,0) je ispitana. Kao što se može videti sa Slike 49, dobijena optimalna pH vrednost ovog imobilizovanog sistema je 4,0.



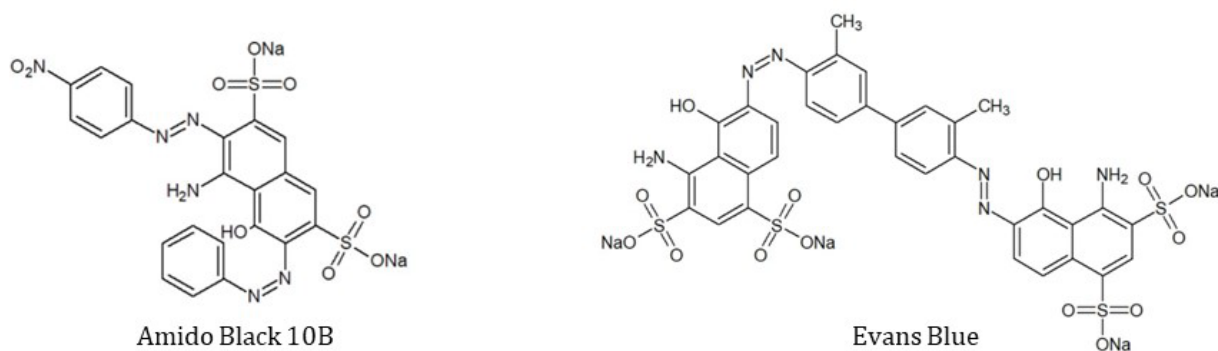
**Slika 49.** Grafički prikaz zavisnosti aktivnosti imobilizovanih ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom od pH vrednosti

Literaturni podaci su pokazali da lignin-peroksidaza ima najveću aktivnost u opsegu pH vrednosti od 3,0 do 6,0 (222). U svojim istraživanjima Shaheen i saradnici su otkrili da slobodna peroksidaza ima maksimum aktivnosti na pH 3,0, dok se zarobljavanjem ovog enzima unutar mikro-kuglica od kalcijum-alginata optimalna pH vrednost pomera ka baznim vrednostima (pH 5,0), zbog promena u mikro-okruženju (223). Nešto drugačiji rezultati dobijeni su imobilizacijom ovog enzima unutar makro-kuglica napravljenih od hitozana aktiviranog glutaraldehydom (224).

Kada se uporede maksimumi aktivnosti za solubilni i imobilizovani enzim može se uočiti pomeranje za jednu pH jedinicu (sa pH 3,0 za solubilni, na pH 4,0 za imobilizovani enzim) (224).

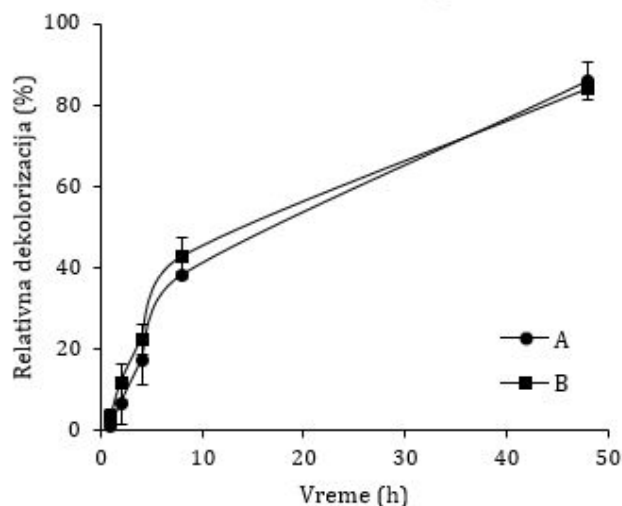
### 5.5. Dekolorizacija boja korišćenjem ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom imobilizovanih u modifikovanom alginatu

Ćelijski zidovi sa lignin-peroksidazom imobilizovani unutar tiramin-alginatnih mikro-kuglica su primenjeni za uklanjanje boja iz vodenog rastvora (sintetičke otpadne vode). U te svrhe su korišćene dve boje: Evans Blue i Amido Black 10B (Slika 50).



**Slika 50.** Hemijske strukture organskih boja korišćenih u reakcijama degradacije

Imobilizovani ćelijski zidovi sa enzimom su inkubirani u rastvoru odgovarajuće boje na pH 4,5 tokom 48 h. U određenim vremenskim intervalima (0, 1, 2, 4, 8 i 48 h) su uzimani alikvoti, merena je apsorbancija zaostale boje u rastvoru na 620 nm i na osnovu toga je preračunat procenat relativne dekolorizacije korišćenjem formule (2) prikazane u Odeljku 3.15. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 51. Isti postupak je odrađen i za kontrolni uzorak (imobilizovane ćelijske zidove sa inaktiviranom lignin-peroksidazom). Vrednost procenta dekolorizacije dobijena za kontrolne kuglice je oduzeta od vrednosti procenta dekolorizacije dobijene za ćelijske zidove sa lignin-peroksidazom imobilizovane unutar tiramin-alginatnih mikro-kuglica. Time smo se osigurali da predstavljeni rezultati potiču isključivo od degradacije boja prouzrokovane imobilizovanim enzimom i da smo eliminisali potencijalno lažnu aktivnost usled adsorpcije boje od strane samog modifikovanog alginata.



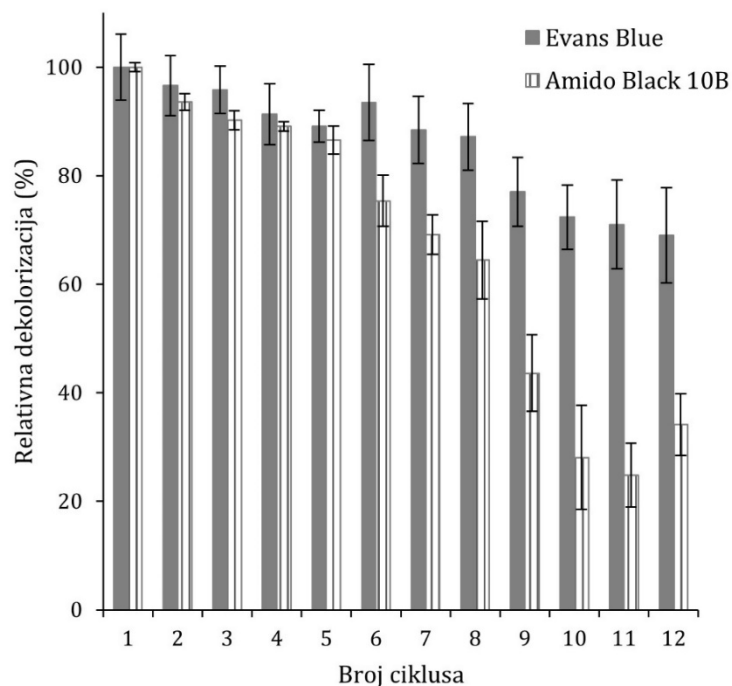
**Slika 51.** Vremenska zavisnost procenta dekolorizacije za (A) Evans Blue i (B) Amido Black 10B boje

Sa povećanjem vremena inkubacije imobilizovanih ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom u rastvoru odgovarajuće boje povećava se i procenat dekolorizacije. Procenat relativne dekolorizacije Evans Blue boje sa imobilizovanim ćelijskim zidovima nakon 8 h je iznosio 38%, a Amido Black 10B 42,7%. Nakon 48 h se dekolorizuje 86% Evans Blue boje, dok je taj procenat za Amido Black 10B nešto manji (84%). Ranije je pokazano da lignin-peroksidaza, slobodna i imobilizovana, može da ukloni različite boje sa efikasnošću od približno 90%, u zavisnosti od metode korišćene za proces dekolorizacije, kao i od prisustva redukujućih agenasa (13). Neke od boja koje su u prethodnim istraživanjima primenjene za testiranje dekolorizacije lignin-peroksidazom su: Remazol Brilliant Blue R (RBBR), Crystal Violet i Sandalove reaktivne boje (13,223,225). Istraživanja Shaheen i saradnika su pokazala da lignin-peroksidaza imobilizovana unutar kalcijum-alginatnog hidrogela može da ukloni različite Sandalove reaktivne boje sa efikasnošću od 70 do 93% (223).

Kada se dobijeni rezultati za dekolorizaciju Evans Blue i Amido Black 10B boja uporede sa prethodnim istraživanjima može se zaključiti da ćelijski zidovi sa lignin-peroksidazom imobilizovani na tiramin-alginatnim hidrogelovima imaju potencijal za masovniju primenu u ovoj oblasti.

## 5.6. Ponovna upotreba ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom imobilizovanih na modifikovanom alginatu za dekolorizaciju boja

Kako bi se ispitala mogućnost ovog biokatalizatora za ponovnu upotrebu prilikom dekolorizacije boja, kuglice sa imobilizovanim ćelijskim zidovima su inkubirane u rastvoru boja (Evans Blue i Amido Black 10B) tokom 48 h, zatim je merena apsorbanca na 620 nm i preračunat procenat relativne dekolorizacije prema formuli (3) prikazanoj u Odeljku 3.15. Nakon svakog ciklusa kuglice su isprane rastvorom kalcijum-hlorida u puferu i iskorišćene za sledeći ciklus dekolorizacije. Praćena je sposobnost dekolorizacije ovih imobilizovanih ćelijskih zidova tokom 12 uzastopnih ciklusa (Slika 52).



**Slika 52.** Ponovna upotreba ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom imobilizovanim na tiramin-alginatnim mikro-kuglicama za dekolorizaciju boja

Nakon 12 ciklusa ponovne upotrebe ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom imobilizovanih na tiramin-alginatu za dekolorizaciju Evans Blue boje, enzim je zadržao 69% svoje efikasnosti. Prilikom dekolorizacije Amido Black 10B boje imobilizovanim ćelijskim zidovima sa lignin-peroksidazom dobijeni su nešto lošiji rezultati – nakon 12 ciklusa ponovne upotrebe, zadržano je svega 34% početne efikasnosti. U oba slučaja može se uočiti postepeni pad efikasnosti imobilizovanih ćelijskih zidova sa svakim novim ciklusom dekolorizacije. Ovaj rezultat se može pripisati curenju enzima sa površine alginata, njegovoj inaktivaciji ili inhibiciji nastalim reakcionim produktima. Lignin-peroksidaza imobilizovana na kalcijum-alginatnom hidrogelu je nakon 6 ciklusa ponovne upotrebe za dekolorizaciju Remazol Brilliant Blue R boje imala efikasnost od oko 70% (13). Efikasnost dekolorizacije Sandalovih boja lignin-peroksidazom imobilizovanom na hitozanu aktiviranom glutaraldehidom je opadala od trećeg do sedmog ciklusa, da bi u poslednjem ciklusa iznosila od 20 do 25% (224). Ovaj rezultat je pripisan smanjenju jačine vezivanja enzima za podlogu (224). Zarobljavanjem ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom unutar kalcijum-tiramin-alginatne mikro-kuglice stvara se zaštitni sloj oko imobilizovanog enzima, čime se omogućuje duža ponovna upotreba biokatalizatora za dekolorizaciju boja.

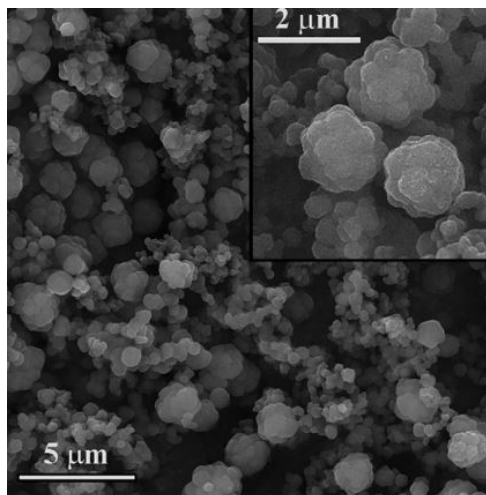
Takođe, treba istaći da je moguća i adsorpcija boja na alginatnoj mikro-kuglici. Ovo je potvrđeno u nekim istraživanjima, koja su pokazala da od 11 do 20% boje može da potiče od njene adsorpcije na samoj kuglici (223). Oduzimanjem vrednosti dobijenih za dekolorizaciju pomoću termalno inaktiviranih ćelijskih zidova, eliminisali smo potencijalnu adsorpciju od samih tiramin-alginatnih mikro-kuglica.

Ispitivanje mogućnosti ponovne upotrebe imobilizovanih ćelijskih zidova sa lignin-peroksidazom za dekolorizaciju organskih boja je od velikog značaja pre svega za širu industrijsku primenu ovakvog sistema. Upotrebom biokatalizatora u većem broju ciklusa smanjuje se cena celokupnog industrijskog procesa i podstiče njegova primena u različitim oblastima.

## 5.7. Sinteza i karakterizacija makroporoznih kopolimera

Materijali koji su izuzetno pogodni za izgradnju nosača za imobilizaciju enzima su sintetski polimeri. Tokom njihove sinteze pažljivim izborom monomerskih jedinica njihova struktura, a samim tim i osobine, se mogu lako modifikovati i prilagoditi primeni. Mnogobrojna istraživanja su pokazala da su makroporozni poli(GMA-co-EGDMA), dobijeni suspenzionom polimerizacijom, izvanredni nosači za imobilizaciju enzima (21,30). Za potrebe ovog istraživanja kopolimeri sastavljeni od GMA i EGDMA sintetisani su primenom disperzione polimerizacije, čime je, za razliku od suspenzione, omogućeno formiranje kuglica, veličine od 0,1 do 10  $\mu\text{m}$  u prečniku. Smanjenjem veličine kuglica smanjuju se i difuziona ograničenja, pre svega zbog manjeg uticaja interne difuzije. Povećanje specifične aktivnosti enzima imobilizovanog na nosaču se javlja kao posledica smanjenog prečnika kuglica.

Kao rastvarač u reakciji disperzione polimerizacije korišćen je etanol, s obzirom da je bilo neophodno obezbediti da stabilizator (PVP), smeša monomera (monomer i umrežavajući agens), inertna smeša (1-dodekanol i cikloheksanol) i inicijator budu rastvorni u njemu, a da se dobijeni kopolimeri talože. Kao što se može videti sa Slike 53, čestice poli(GMA-co-EGDMA) kopolimera su uglavnom sferni agregati, sa dijametrom oko 1,5  $\mu\text{m}$ .



**Slika 53.** SEM prikaz poli(GMA-co-EGDMA) kopolimera dobijenog disperzionom polimerizacijom

Osobine imobilizovanog enzima zavise od karakteristika korišćenih poroznih nosača. Isuviše male pore mogu da uzrokuju inaktivaciju enzima, usled strukturne reorganizacije enzima i difuzionih ograničenja. Sa druge strane, velike pore mogu dovesti do agregiranja enzima, čime takođe dolazi do gubitka njegove aktivnosti. Kopolimeri sa različitim poroznim karakteristikama su sintetisani, a sve u cilju određivanja optimalne veličine pora koja bi obezbedila dobru aktivnost i stabilnost imobilizovanog enzima.



Kako bi se zadovoljili prethodno postavljeni uslovi, tokom sinteze je variran odnos monomera i umrežavajućeg agensa, a ispitano je i na koji način njihov odnos utiče na osobine sintetisanog nosača. U reakcionu smešu su dodata inertna jedinjenja, 1-dodekanol i cikloheksanol, koja bi trebalo da doprinesu formiranju makroporoznih struktura. Eksperimentalni uslovi za sintezu ovih makroporoznih kopolimera su navedeni u Tabeli 6.

**Tabela 6.** Reakcioni parametri za sintezu makroporoznog poli(GMA-co-EGDMA) kopolimera

Uzorak	G9E1	G8E2	G6E4	G4E6
<b>GMA/EGDMA (mas/mas%)</b>	90/10	80/20	60/40	40/60
<b>Dodekanol/cikloheksanol (mas/mas%)</b>	50/50	50/50	50/50	50/50
<b>Inertna komponenta/smeša monomera (mas/mas%)</b>	50/50	50/50	50/50	50/50
<b>PVP/smeša monomera (mas/mas%)</b>	25/75	25/75	25/75	25/75
<b>AIBN/smeša monomera (g/g)</b>	0,1/10	0,1/10	0,1/10	0,1/10
<b>Etanol/smeša monomera (mL/g)</b>	9/1	9/1	9/1	9/1

Da porozne karakteristike poli(GMA-co-EGDMA), dobijenih suspenzionom polimerizacijom, zavise od količine umrežavajućeg agensa ukazala su prethodna istraživanja (188,189).

Kao u slučaju suspenzione polimerizacije, i kod disperzije na povećanje zapremine pora sintetisanog kopolimera utiče količina umrežavajućeg agensa u reakcionoj smeši (Tabela 7).

**Tabela 7.** Porozne osobine uzoraka dobijenih disperzionom polimerizacijom

Uzorak	G9E1	G8E2	G6E4	G4E6
<b>GMA/EGDMA (mas/mas%)</b>	90/10	80/20	60/40	40/60
<b>Prinos (%)</b>	78,02	69,70	89,40	89,87
<b>Kumulativna zapremina, <math>V_p</math> (cm<sup>3</sup>/g)</b>	0,632	1,401	1,751	1,839
<b>Specifična površina, <math>S_p</math> (m<sup>2</sup>/g)</b>	16,9	18,8	29,9	23,9
<b>Poroznost, P (%)</b>	43,6	61,0	68,1	72,3
<b>Prosečna veličina pora, <math>D_p</math> (nm)</b>	150	297	234	308

Sa smanjenjem udela EGDMA u reakcionoj smeši opadaju veličine submikroskopskih čestica koje formiraju kopolimernu sferu (188). Zato se poroznost poli(GMA-co-EGDMA) povećava sa porastom količine umrežavajućeg agensa u reakcionoj smeši, kao što je i prikazano u Tabeli 7. Najmanju veličinu pora ima uzorak sa najmanjim sadržajem EGDMA (G9E1), a dalje povećanje količine umrežavajućeg agensa dovodi do povećanja veličine pora. Slične rezultate je za seriju kopolimera, dobijenih metodom suspenzione polimerizacije, dobio i Horak sa saradnicima (188). Oni su u svojim istraživanjima koristili niže sadržaje umrežavajućeg agensa – udeo EGDMA je bio manji od 75 vol% (188). Do formiranja ne tako krutih čestica dolazi kao posledica nižeg stepena umreženja (188).

Jovanović i saradnici su zabeležili manje promene u veličini pora i povećanje specifične površine sa povećanjem količine EGDMA u reakcionoj smeši (sa 20 na 40 mas%) (189). Ovi rezultati se mogu pripisati sfernoj strukturi kopolimera, koja određuje veličinu pora i poroznost. Na veličinu sferne čestice, a samim tim i na veličinu prečnika pora utiče, pre svega, količina umrežavajućeg agensa u reakcionoj smeši prilikom sinteze kopolimera (189).

## 5.8. Imobilizacija peroksidaze iz rena na makroporoznim kopolimerima

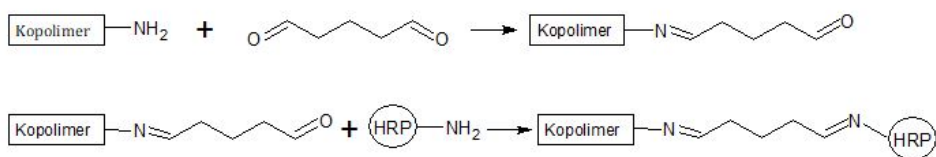
Kako bi se enzim mogao imobilizovati na sintetisani makroporozni kopolimer glutaraldehidnom i perjodatnom metodom, neophodno je prvo uvesti amino grupe u polimerni lanac. Tretiranjem epoksi grupa poli(GMA-co-EGDMA) kopolimera etilendiaminom, ove grupe se prevode u amino grupe. Za aminovane kopolimere su u nastavku teksta korišćene sledeće oznake: G9E1<sub>am</sub>, G8E2<sub>am</sub>, G6E4<sub>am</sub> i G4E6<sub>am</sub>. Uspešnost navedene modifikacije u polimernom lancu potvrđena je elementalnom analizom (Tabela 8).

**Tabela 8.** Elementalna analiza poli(GMA-co-EGDMA) uzoraka

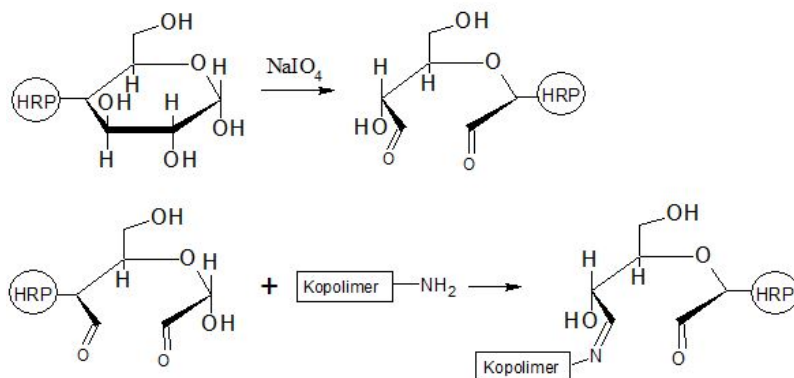
Uzorak	Elementalna analiza					
	Eksperimentalni podaci			Teorijski podaci		
	C (%)	H (%)	N (%)	C (%)	H (%)	N (%)
<b>G9E1<sub>am</sub></b>	53,10	7,64	4,76	54,17	8,73	12,50
<b>G8E2<sub>am</sub></b>	52,75	7,60	4,51	54,87	8,55	11,13
<b>G6E4<sub>am</sub></b>	52,41	8,61	3,80	56,29	8,18	8,38
<b>G4E6<sub>am</sub></b>	54,56	7,36	2,51	57,71	7,82	5,61

Za imobilizaciju HRP na aminovanim kopolimerima korišćene su dve metode: glutaraldehidna i perjodatna metoda. Kovalentno vezivanje enzima za površinu kopolimera preko enzimskog ugljeno-hidratnog ostatka prethodno podvrgnutog oksidaciji natrijum-perjodatom predstavlja perjodatni metod, koje je prvobitno optimizovan za hidrolaze (183, 222, 223). S druge strane, najčešće korišćeni metod za enzimске imobilizacije – glutaraldehidni metod, podrazumeva vezivanje enzima za nosač preko amino grupa prisutnih na površini molekula proteina. Mehanizmi vezivanja enzima za površinu kopolimera korišćenjem ove dve metode, kao i razlike među njima, prikazane su šematski na Slici 54.

### 1) Glutaraldehidni metod



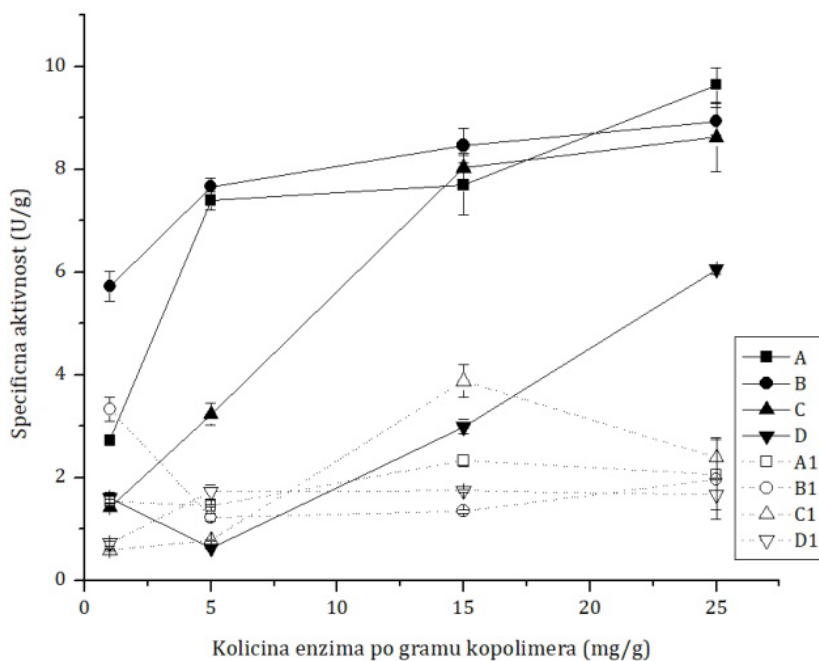
### 2) Perjodatni metod



**Slika 54.** Šematski prikaz dve metode (glutaraldehidne i perjodatne) korišćene za imobilizaciju peroksidaze iz rena na novim makroporoznim kopolimerima

U cilju pronalaska metode koja obezbeđuje bolju imobilizaciju, različite količine enzima su dodate po gramu kopolimera i određena je specifična aktivnost imobilizovanog enzima.

Povećanje specifične aktivnosti enzima imobilizovanih korišćenjem obe metode (perjodatne i glutaraldehidne) posledica je porasta količine dodatog enzima po gramu kopolimera (Slika 55).



**Slika 55.** Uticaj količine dodatog enzima na specifičnu aktivnost imobilizovane peroksidaze iz rena. *Puni simboli* – perjodatni metod *Prazni simboli* – glutaraldehidni metod. Kopolimeri: (A, A1) G6E4<sub>am</sub>, (B, B1) G8E2<sub>am</sub>, (C, C1) G4E6<sub>am</sub> i (D, D1) G9E1<sub>am</sub>

Primenom perjodatne metode za imobilizaciju peroksidaze iz rena postignute su veće specifične enzimске aktivnosti nego korišćenjem glutaraldehidne metode pod istim reakcionim uslovima (isti kopolimer i ista količina imobilizovanog enzima). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima za lipaze (226). Oksidacijom ugljenohidratnog dela molekula proteina se ne narušava struktura samog aktivnog mesta, što za posledicu ima povećanu efikasnost perjodatne metode. Ovom reakcijom oksidacije nastaje veliki broj aldehidnih grupa, pri čemu svaka od njih predstavlja potencijalno vezivno mesto za makroporozne kopolimere. Iz tog razloga se sa povećanjem broja reaktivnih grupa povećava i verovatnoća višestrukog vezivanja enzima za nosač.

Primenom ove dve metode dobijene su različite aktivnosti imobilizovanog enzima, u zavisnosti od količine enzima vezanog po mg kopolimera, kao što se može videti u Tabeli 9. Kada se za imobilizaciju koristi glutaraldehidni metod, manje količine HRP se vezuju za nosač. Knežević sa saradnicima je, za imobilizaciju lipaze na Eupergit C koristila 3 različite metode: perjodatnu, direktno vezivanje preko oksirenskih grupa i vezivanje preko spejsera napravljenog od diamina i glutaraldehida. Ustanovljeno je da se perjodatni metod pokazao kao najefikasniji za imobilizaciju enzima na datom nosaču (226). Slične rezultate su dobili Pramparo i saradnici (187). Oni su HRP imobilizovali na Eupergit C perjodatnom metodom i uporedili je sa druge dve metode, jedna je podrazumevala direktno vezivanje preko oksirenskih grupa, a druga vezivanje HRP na Eupergit C tretiran dihidrazidom adipinske kiseline (187). Enzim se stavlja u pogodniju poziciju za ispoljavanje svoje katalitičke aktivnosti, ukoliko se dodatno, u prisustvu spejsera, udalji od samog nosača. S druge strane, primenom perjodatne metode vezivanje se ostvaruje preko karboksilnih grupa, čime se verovatno uspostavljaju povoljnije interakcije između enzima i nosača, pa se enzim imobilizovan na ovaj način pokazao kao efikasniji.

Imobilizacijom HRP na aminovane makroporozne kopolimere označene sa G6E4<sub>am</sub> i G8E2<sub>am</sub> čije su pore veličine 234 odnosno 297 nm, primenom perjodatne metode, dobijene su najveće specifične aktivnosti (9,65 i 8,94 U/g suve mase). U literaturi je pokazano da sa povećanjem veličine pora na kopolimeru dolazi do povećanja specifične aktivnosti imobilizovanog enzima (21, 30).

Slični rezultati za brojne druge nosače sa različitim poroznim karakteristikama su prikazani u literaturi (224, 225). Pokazano je da su, korišćenjem nosača za imobilizaciju baziranih na silikatima sa većim prečnikom pora, dobijene veće specifične aktivnosti enzima (230).

**Tabela 9.** Uticaj različitih tipova aminovanih kopolimera i metode korišćene za imobilizaciju na specifičnu aktivnost peroksidaze iz rena

Uzorak	Glutaraldehydni metod			Perjodatni metod		
	Aktivnost enzima (U)	Specifična aktivnost enzima (U/g)	Količina vezanog enzima po gramu kopolimera	Aktivnost enzima (U)	Specifična aktivnost enzima (U/g)	Količina vezanog enzima po gramu kopolimera
G9E1 <sub>am</sub>	0,009	0,957	0,048	0,056	6,055	0,303
G8E2 <sub>am</sub>	0,017	1,970	0,098	0,086	8,939	0,446
G6E4 <sub>am</sub>	0,019	2,065	0,103	0,088	9,647	0,482
G4E6 <sub>am</sub>	0,022	2,391	0,119	0,083	8,630	0,431

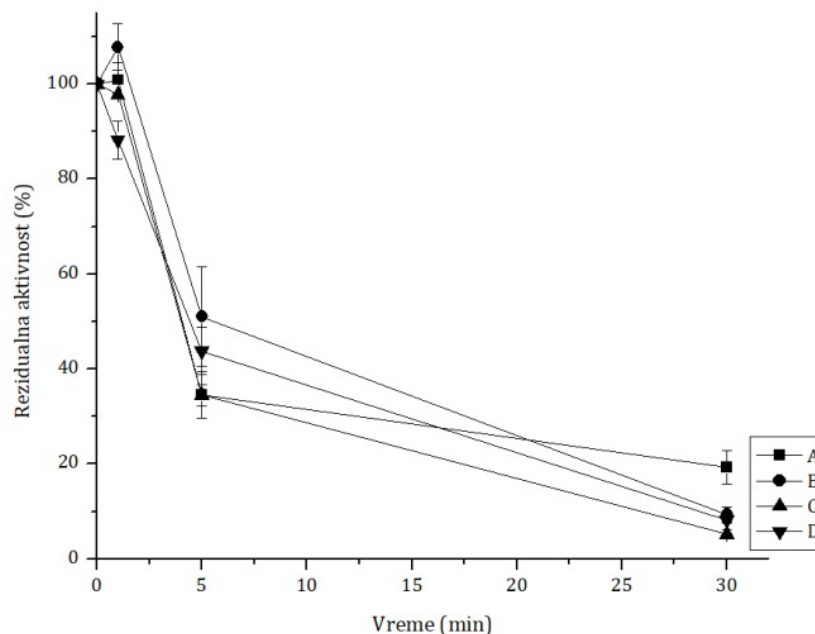
Ukoliko se pogledaju rezultati prikazani u Tabeli 9, može se uočiti da je specifična aktivnost peroksidaze imobilizovane perjodatnom metodom na kopolimeru G4E6<sub>am</sub> (sa porama veličine 308 nm) slična aktivnosti dobijenoj za enzim imobilizovan na kopolimeru G8E2<sub>am</sub>. Ona je 1,1 puta manja od specifične aktivnosti HRP imobilizovane istom metodom na kopolimeru G6E4<sub>am</sub>. Dobijeni rezultati se mogu objasniti formiranjem oligomera HRP i većom dodirnom površinom G6E4<sub>am</sub> kopolimera. Chouyyok sa saradnicima je istakao da sa povećanjem veličine pora raste mogućnost curenja HRP sa površine silikatnog nosača korišćenog za imobilizaciju (229).

Najniža specifična aktivnost (6,05 U/g suve mase) dobijena je za peroksidazu imobilizovanu perjodatnom metodom na kopolimeru sa porama najmanjeg prečnika (G9E1<sub>am</sub>, sa porama veličine 150 nm). Za specifične aktivnosti HRP imobilizovane glutaraldehydnom metodom uočen je sličan trend.

U daljim istraživanjima korišćena je HRP imobilizovana perjodatnom metodom, s obzirom da je upravo ona pokazala značajno bolje rezultate u pogledu količine imobilizovanog enzima na kopolimeru.

## 5.9. Ispitivanje stabilnosti peroksidaze iz rena imobilizovane na makroporoznim kopolimerima

Na stabilnost imobilizovanih enzima (na povišenim temperaturama i u organskom rastvaraču) utiču pre svega površinske osobine nosača koji se koristi za imobilizaciju. Kako bi se uvideo uticaj imobilizacije na termostabilnost peroksidaze, imobilizovani enzim je inkubiran na 65 °C odgovarajući vremenski period (Slika 56).



**Slika 56.** Uticaj perioda inkubacije na 65 °C na rezidualnu aktivnost perijodatno-imobilizovane peroksidaze iz rena. Kopolimeri: (A) G6E4<sub>am</sub>, (B) G8E2<sub>am</sub>, (C) G4E6<sub>am</sub> i (D) G9E1<sub>am</sub>

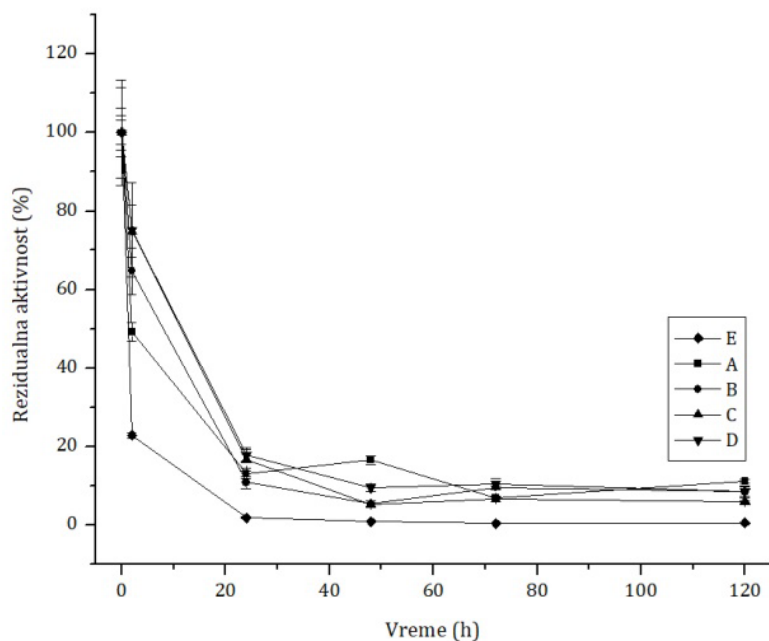
Enzim imobilizovan na kopolimeru G6E4<sub>am</sub> (sa porama veličine 234 nm) je imao najveću stabilnost na povišenim temperaturama, dok je stabilnost HRP imobilizovane na ostalim nosačima (G8E2<sub>am</sub>, G4E6<sub>am</sub> i G9E1<sub>am</sub>) nešto manja. Ova otkrića su pokazala da je termostabilnost enzima u mnogome određena veličinom pora na nosaču korišćenom za imobilizaciju.

Dobijena vrednost rezidualne aktivnosti HRP imobilizovane na G6E4<sub>am</sub> kopolimeru nakon 30 minuta inkubacije na 65 °C (19,3%) je dva puta veća nego rezidualna aktivnost enzima imobilizovanog na ostalim kopolimerima. Kao rezultat višestrukog vezivanja enzima za nosač, ali pre svega kao posledica formiranja stabilnijih 3D struktura javlja se povećana termostabilnost imobilizovanog enzima.

Aktivnost imobilizovanog enzima na makroporoznom kopolimeru se smanjuje kako se produžava vreme inkubacije na 65 °C. Sličan trend uočen je kod peroksidaze iz rena imobilizovane na makroporoznom bakru, veličine pora 100–200 nm (228).

Od velikog značaja, pre svega za sintetske reakcije katalizovane enzimima, je ispitivanje stabilnosti enzima u organskom rastvaraču. U literaturi su prikazani rezultati koji ukazuju na poboljšane stabilnosti imobilizovane peroksidaze iz rena u prisustvu organskih rastvarača, kao što su metanol, aceton ili acetonitril (24).

Imobilizovana i slobodna peroksidaza su inkubirane u 80% dioksanu 120 h na sobnoj temperaturi, kako bi se ispitala stabilnost enzima u ovom organskom rastvaraču. Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 57.



**Slika 57.** Uticaj perioda inkubacije u 80% dioksanu na rezidualnu aktivnost peroksidaze iz rena imobilizovane perjodatnom metodom na kopolimerima: (A) G6E4<sub>am</sub>, (B) G8E2<sub>am</sub>, (C) G4E6<sub>am</sub> i (D) G9E1<sub>am</sub>; i (E) slobodne-rastvorne peroksidaze

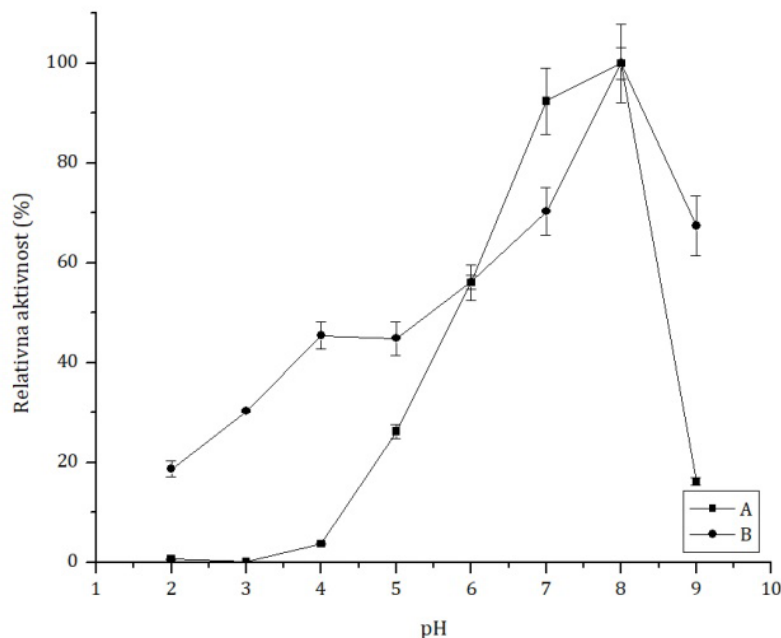
Imobilizovana peroksidaza zadržala je oko 10% inicijalne stabilnosti nakon 5 dana inkubacije u 80% dioksanu, dok je slobodna HRP praktično inaktivirana u istom vremenskom periodu. Na Slici 57 može se uočiti nagli pad enzimske aktivnosti u prva 72 h inkubacije. Na aktivnost imobilizovanog enzima ne utiče značajno dalje povećanje vremena inkubacije. Slični podaci o stabilnosti peroksidaze iz rena su dobijeni i kada je korišćen 20% acetonitril (231). Inkubacijom u ovom organskom rastvaraču imobilizovani enzim zadržava veliki deo svoje aktivnosti, dok je slobodna peroksidaza skoro u potpunosti izgubila aktivnost. Smanjena difuziona ograničenja, nastala adsorpcijom enzima na nosač, su verovatno dovela do poboljšanja stabilnosti imobilizovane peroksidaze u organskim rastvaračima. Prisustvom nosača je obezbeđena favorizovana mikrookolina za katalizu, čime je i povećana aktivnost imobilizovanog enzima.

Sa grafika na Slici 57 se može uočiti da peroksidaza imobilizovana na G6E4<sub>am</sub> kopolimeru ima samo malo bolju rezidualnu aktivnost u poređenju sa HRP imobilizovanom na ostalim nosačima. Ova otkrića su u skladu sa rezultatima drugih istraživača koji su pokazali da veličina pora na nosaču ne utiče u mnogome na stabilnost imobilizovanog enzima u organskom rastvaraču (232).

Obećavajući rezultati u pogledu specifične aktivnosti, termostabilnosti i stabilnosti u organskom rastvaraču su dobijeni za peroksidazu iz rena imobilizovanu na kopolimeru sa porama veličine 234 nm (G6E4<sub>am</sub>), pa je s toga ovaj sistem dalje okarakterisan u pogledu optimalne pH vrednosti, kinetičkih parametara ( $K_m$  i  $V_{max}$ ) i operativne stabilnosti.

## 5.10. Kinetičke studije peroksidaze iz rena imobilizovane na makroporoznim kopolimerima

Uticaj pH vrednosti na aktivnost, kako rastvornog tako i imobilizovanog enzima, je ispitan u opsegu pH od 2,0 do 9,0 (Slika 58).



**Slika 58.** Uticaj pH vrednosti na aktivnosti (A) slobodne-rastvorne peroksidaze i (B) peroksidaze imobilizovane perjodatnom metodom na G6E<sub>4am</sub> kopolimeru

Relativne aktivnosti obe peroksidaze prate sličan trend sa povećanjem pH vrednosti. Promena pH vrednosti između pH 2,0 i pH 8,0 dovodi do povećanja relativne enzimske aktivnosti. Na pH 8,0 postignuta je maksimalna aktivnost obe peroksidaze (imobilizovane i slobodne). Ukoliko se pH vrednost dalje poveća, aktivnosti opadaju (Slika 58). Veće aktivnosti na skoro svim pH vrednostima imala je imobilizovana peroksidaza u poređenju sa solubilnom. Ista je optimalna pH vrednost za obe peroksidaze (pH 8,0). Peroksidaza iz rena imobilizovana na makroporoznim kopolimerima, zadržava povećanu aktivnost, koja ostaje stabilna na različitim pH vrednostima, što je od velikog značaja za praktičnu primenu. U literaturi je prikazano slično ponašanje imobilizovanih enzima (233–235). Imobilizacijom peroksidaze na različitim nosačima uočena je povećana stabilnost u širokom opsegu pH vrednosti.

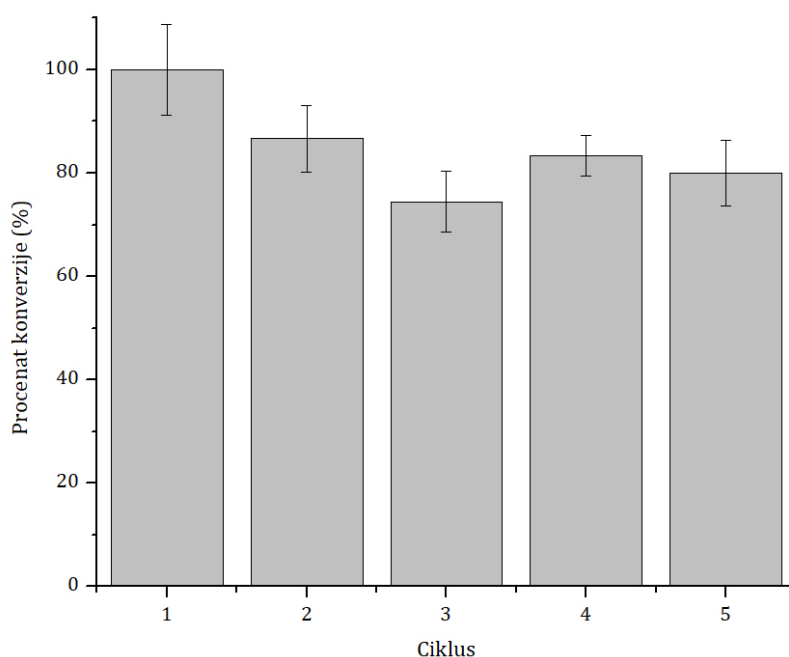
Kinetičke konstante solubilne i imobilizovane peroksidaze iz rena,  $K_m$  i  $V_{max}$ , su određene korišćenjem pirogalola i vodonik-peroksida kao supstrata. Vrednosti prividne konstante  $K_m$  slobodne i imobilizovane HRP su preračunate i iznose 1,62 odnosno 2,06 mmol/L.  $K_m$  imobilizovane peroksidaze je nešto veća nego ona dobijena za slobodnu-rastvornu HRP. Primećeni trend ukazuje na to da rastvorni enzim ima veći afinitet prema supstratu nego imobilizovani, što može biti uzrokovano sternim smetnjama u unutrašnjosti pora makroporoznog nosača, do kojih dolazi tokom imobilizacije. Afinitet enzima prema supstratu se smanjuje imobilizacijom enzima, jer je time smanjena dostupnost supstrata aktivnom mestu enzima (236). Vrednosti  $V_{max}$  slobodne i imobilizovane HRP su 3,16 odnosno 5,18 U/mL, dok su preračunate vrednosti  $k_{cat}$  556,16 odnosno 182,34 min<sup>-1</sup>.



## 5.11. Operativna stabilnost peroksidaze iz rena imobilizovane na makroporoznim kopolimerima

Operativna stabilnost imobilizovane peroksidaze iz rena je ispitana korišćenjem jedne iste šarže imobilizovanog enzima na makroporoznom kopolimeru u nekoliko uzastopnih ciklusa za oksidaciju pirogalola. U periodu od 180 minuta praćena je rezidualna aktivnost imobilizovanog enzima. Kopolimer sa imobilizovanom peroksidazom je nakon toga ispran nekoliko puta puferom i upotrebljen u narednom ciklusu oksidacije.

Uzeto je da je aktivnost enzima u prvom ciklusu 100% (Slika 59).



**Slika 59.** Katalitička aktivnost peroksidaze imobilizovane perjodatom metodom na G6E4<sub>am</sub> kopolimeru tokom ponovne upotrebe u šaržnom reaktoru

Peroksidaza iz rena imobilizovana na makroporoznom kopolimeru zadržala je 80% svoje početne aktivnosti nakon 5 ciklusa višestruke upotrebe. Sa Slike 59 se može uočiti da je enzim imobilizovan na kopolimeru sa porama veličine 234 nm pokazao izvanrednu stabilnost pod ispitanim okolnostima. Nakon 5 uzastopnih ciklusa oksidacije pirogalola, peroksidaza je izgubila samo 20% svoje aktivnosti, što je od krucijalnog značaja za mnogobrojne potencijalne primene ovog imobilizovanog sistema.

Brojna istraživanja vezana za operativnu stabilnost peroksidaze imobilizovane na različitim nosačima su prikazana u literaturi (30, 224, 230). Qiu sa saradnicima je utvrdio da je HRP imobilizovana na makroporoznom bakru posle 5 ciklusa zadržala oko 60% aktivnosti (228). Peroksidaza imobilizovana na kopolimeru baziranom na glicidil metakrilatu (sa porama veličine između 120 i 200 nm), dobijenom suspenzionom polimerizacijom, je nakon 4 ciklusa višestruke upotrebe zadržala samo 45% inicijalne aktivnosti (30). Imobilizacijom HRP na novim makroporoznim kopolimerima, dobijenim disperzionom polimerizacijom, značajno je poboljšana stabilnost enzima koji je nakon 5 ciklusa višestruke upotrebe zadržao znatno veće procenat stabilnosti u poređenju sa podacima dostupnim u literaturi. Iz navedenog se može izvesti zaključak da opisani metod za imobilizaciju enzima na makroporoznim kopolimerima obezbeđuje izrazito bolje rezultate u pogledu stabilnosti i višestruke upotrebe enzima.

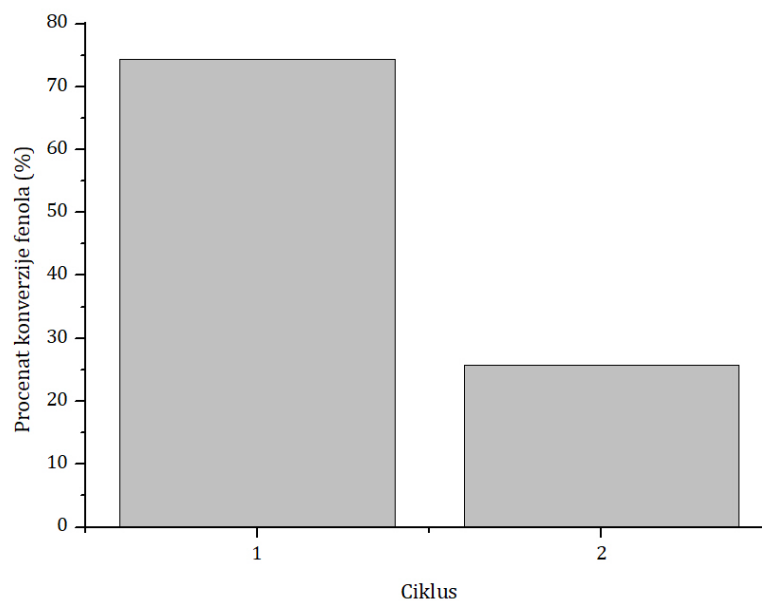
Kako bi se ispitalo koliko dugo imobilizovani enzim zadržava aktivnost, a samim tim i sposobnost da oksiduje pirogolol, kopolimer sa imobilizovanom HRP je skladišten u natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0 na 4 °C tokom 2 nedelje. Rezidualna aktivnost imobilizovanog enzima je izmerena u inicijalnom trenutku, kao i nakon dvonedelnog skladištenja na 4 °C. Specifična aktivnost u inicijalnom trenutku je iznosila 9,65 U/g, dok je nakon 2 nedelje ona samo malo opala, na 9,55 U/g. Dakle, na ovaj način je pokazano da je HRP imobilizovana na novom kopolimeru sintetisanom disperzionom polimerizacijom zadržala više od 98% početne aktivnosti nakon 2 nedelje skladištenja. Chang sa saradnicima je ustanovio da peroksidaza imobilizovana na magnetnim Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanočesticama nakon 15 dana skladištenja zadržava 84% inicijalne aktivnosti (216).

Poređenjem dobijenih rezultata sa onim dostupnim u literaturi za slobodnu peroksidazu iz rena, može se zaključiti da imobilizacija dodatno stabilizuje enzim, produžava vreme poluživota, i povećava verovatnoću ponovne upotrebe tokom dužeg vremenskog perioda. Nakon 15 dana skladištenja rastvorna HRP je zadržala 30% svoje inicijalne aktivnosti (210,216).

## **5.12. Uklanjanje fenola iz šaržnog reaktora peroksidazom iz rena imobilizovanom na makroporoznom kopolimeru**

Peroksidaza iz rena imobilizovana na makroporoznom kopolimeru sa porama veličine 234 nm (G6E4<sub>am</sub>) je iskorišćena za optimizaciju reakcionih uslova za uklanjanje fenola iz vode, s obzirom da je ovaj nosač pokazao obećavajuće rezultate u pogledu količine vezanog enzima, operativne stabilnosti i višestruke upotrebe. Prethodno optimizovani parametri za uklanjanje fenola primenom peroksidaze imobilizovane unutar tiramin-alginatnih mikro-kuglica, iskorišćeni su kao polazna tačka za određivanje optimalnih uslova za novi sistem. Šaržni reaktor za uklanjanje fenola se sastojao od 80 mg kopolimera sa imobilizovanom HRP i 3 mL rastvora fenola (2 mmol/L), dok je vodonik-peroksid generisan direktno u reakcionom sistemu korišćenjem glukoza-oksidaze i glukoze. Postepeno i kontrolisano otpuštanje ovog supstrata je obezbeđeno primenom ovih uslova.

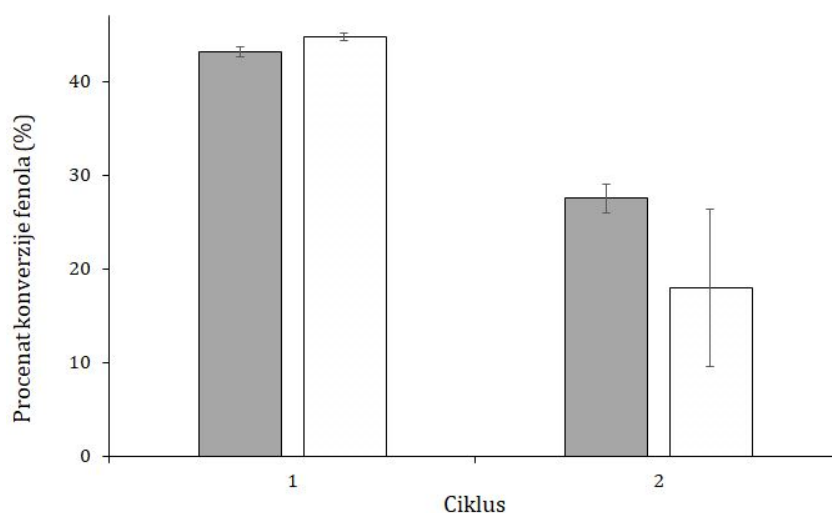
Uzimajući u obzir rezultate dobijene i opisane u Odeljku 4.3., ista koncentracija glukoza-oksidaze (0,187 U/mL) i 3 mmol/L glukoze su korišćene za dostavu vodonik-peroksida u reakcionu smešu za uklanjanje fenola peroksidazom imobilizovanom na makroporoznom kopolimeru G6E4<sub>am</sub>. Uklanjanje fenola je rađeno u ciklusima, a svaki ciklus je trajao 24 h. Na Slici 60 su prikazani dobijeni rezultati, koji su pokazali da u prvom ciklusu imobilizovana peroksidaza može da ukloni značajnu količinu fenola (74,3%). Međutim, već u sledećem ciklusu dolazi do naglog pada procenta uklonjenog fenola – nakon inkubacije tokom narednih 24 h samo 27% fenola je izreagovalo i nagradilo polifenol. Dobijeni stepen konverzije u prvom ciklusu je obećavajući, ali izrazito veliki pad u drugom ciklusu nije poželjan, s obzirom da se time onemogućuje uspešna ponovna upotreba sistema.



**Slika 60.** Ispitivanje potencijala peroksidaze iz rena imobilizovane perjodatnom metodom na makroporoznom kopolimeru za oksidaciju fenola (1 ciklus je trajao 24 h)

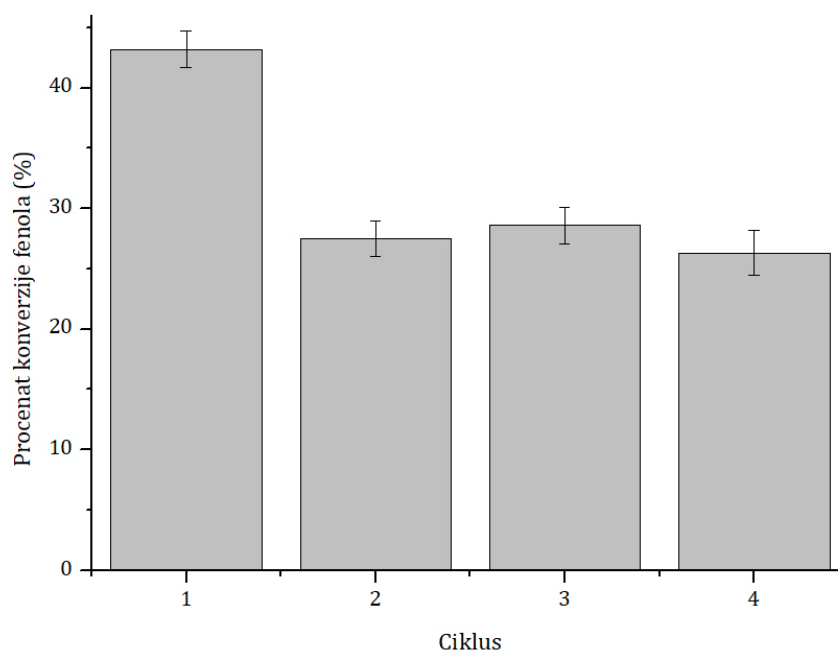
Ograničena višestruka primena HRP imobilizovane na makroporoznom kopolimeru G6E4<sub>am</sub> za uklanjanje fenola može biti posledica blokiranja pora na kopolimeru produktima reakcije oksidacije. U cilju prevazilaženja navedenih problema, između dva ciklusa polimer je ispiran etanolom, a period uklanjanja fenola je smanjen na 4 h po ciklusu. Skraćivanje reakcionog vremena rezultuje smanjenjem procenta konverzije fenola, a samim tim i nižom količinom nastalih oksidacionih proizvoda, što dalje olakšava njihovo otklanjanje sa površine kopolimera ispiranjem etanolom. Odgovarajući reakcioni uslovi za uklanjanje fenola i desorpciju polifenolnih jedinjenja sa površine nosača, su izabrani na osnovu već dostupnih literaturnih podataka. Istraživanja su pokazala da je optimalno reakciono vreme za uklanjanje fenola između 3 i 5 h (237). Nakon tog vremena je uočena smanjena enzimaska aktivnost, a samim tim i niža efikasnost uklanjanja fenola. Neke istraživačke grupe su fokusirale svoja istraživanja na ispitivanje sposobnosti različitih rastvarača, kao što su hloroform, izobutanol i heksan da desorbuju polifenolna jedinjenja akumulirana na površini različitih nosača. Primenom polarnih organskih rastvarača za ispiranje nosača sa imobilizovanim enzimom, čak 90% adsorbovanog fenola je desorbovano (238). Kada se za desorpciju koristi izobutanol, ostvaruje se povećana efikasnost regeneracije. Formiranje vodoničnih veza između ovog rastvarača i amino grupa, prisutnih na površini nosača, omogućuje uklanjanje fenola sa njegove površine, čime se obezbeđuje višestruka upotreba imobilizovanog enzima.

Kao rastvarač za ispiranje je izabran etanol, zato što je polaran, lako dostupan, jeftin i u mnogo manjoj meri zagađuje životnu sredinu nego gore pomenuti rastvarači. Na Slici 61 prikazana je efikasnost ispiranja polimera etanolom. Procenat konverzije fenola u drugom ciklusu je 1,5 puta veći kada se između dva ciklusa imobilizovani sistem, sastavljen od HRP i makroporoznog kopolimera, ispere etanolom, u poređenju sa rezultatima dobijenim u odsustvu postupka ispiranja. Ovo ukazuje da dodatni korak ispiranja uklanja čvrste oksidacione produkte sa površine nosača i samim tim doprinosi dužoj upotrebi imobilizovane HRP u procesu uklanjanja fenola.



**Slika 61.** Ispitivanje uticaja ispiranja nosača etanolom između dva ciklusa na konverziju fenola (1 ciklus je trajao 4 h). (beli stubići) bez ispiranja (sivi stubići) sa ispiranjem

Primenom gore pomenutih uslova za uklanjanje fenola (0,187 U/mL glukoza-oksidadze i 3 mmol/L glukoze) i ispiranjem polifenolnih jedinjenja akumuliranih na površini nosača etanolom, povećava se broj ciklusa za ponovnu upotrebu. Pri novim uslovima ostvarena su 4 ciklusa ponovne upotrebe imobilizovanog enzima. Ispiranjem se ne menja struktura makroporoznog kopolimera, a uticaj na aktivnost HRP je zanimljiv. Imobilizovana HRP je zadržala 26,3% inicijalne aktivnosti nakon 4 uzastopna ciklusa uklanjanja fenola, sa dužinom trajanja ciklusa od 4 h (Slika 62). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima ostvarenim za peroksidazu imobilizovanu na nanočesticama od polivinilalkohola i poliakrilamida napravljenih elektrospiningom (239). Primenom gore izloženih reakcionih uslova uspešno smo povećali broj uzastopnih ciklusa za uklanjanje fenola na 4, sa adekvatnom efikasnošću uklanjanja.



**Slika 62.** Konverzija fenola i ponovna upotreba peroksidaze imobilizovane perijodatnom metodom na makroporoznom kopolimeru pod izmenjenim reakcionim uslovima: 1 ciklus je trajao 4 h uz ispiranje između dva ciklusa

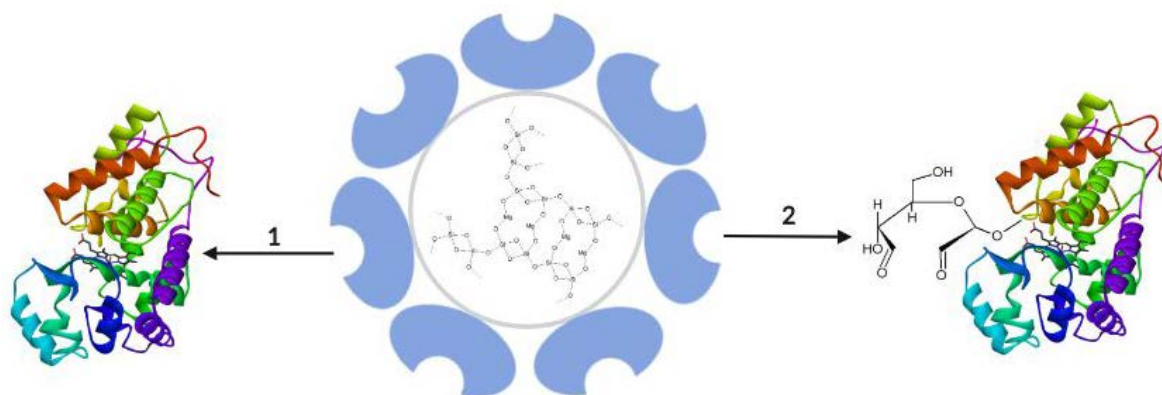
### 5.13. Imobilizacija peroksidaze iz rena na sepiolitu

Kada se za imobilizacije enzima primene glineni minerali iz prirodnih izvora, kao što su sepiolit ili palogorskit, mogu se dobiti zadovoljavajući rezultati u pogledu enzimske aktivnosti i stabilnosti. U ovom istraživanju sepiolit je korišćen kao nosač u reakcijama adsorpcije peroksidaze iz rena (nativne i oksidovane natrijum-perjodatom) (Slika 63). Ispitan je uticaj imobilizacije, pre svega, na aktivnost imobilizovanog enzima, a potom i na njegovu stabilnost (pri povišenim temperaturama, na različitim pH vrednostima itd.).



*Slika 63.* Neorganski glineni nosač sepiolit

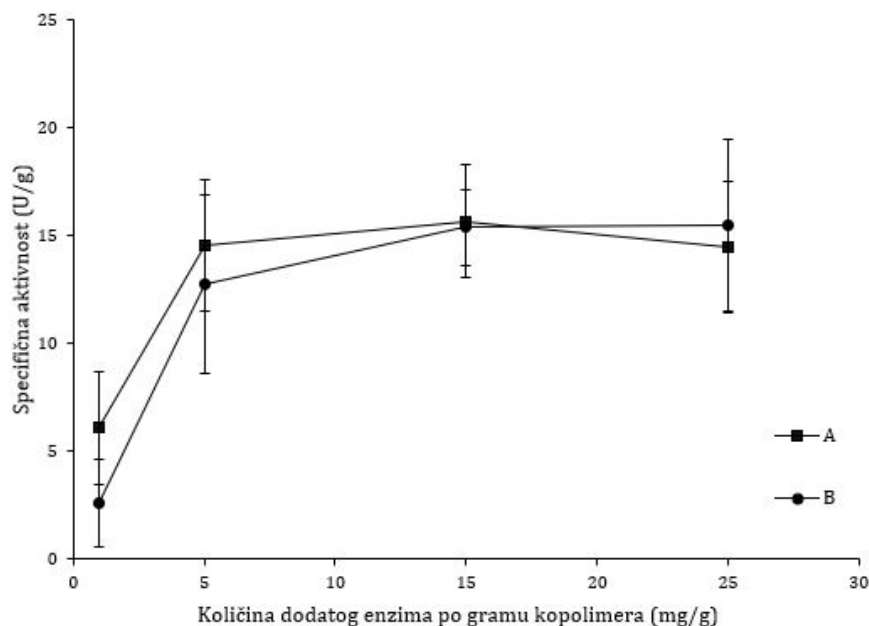
U cilju pronalaska potencijalne razlike u aktivnosti i stabilnosti imobilizovanih enzima, rastvorna peroksidaza i peroksidaza prethodno podvrgnuta oksidaciji u prisustvu natrijum-perjodata su imobilizovane na sepiolitu. Na Slici 64 je šematski prikazana adsorpcija obe peroksidaze (nativne i oksidovane).



*Slika 64.* Šematski prikaz adsorpcije nativne (1) i perjodatno-oksidovane (2) peroksidaze iz rena na sepiolitu

Prvi mehanizam obuhvata adsorpciju solubilnog enzima na površini neorganskog nosača, u ovom slučaju sepiolita. Oksidovanje peroksidaze iz rena i njena dalja adsorpcija na sepiolitu, predstavlja drugi način vezivanja enzima. Perjodatni metod, prethodno optimizovan za hidrolaze i invertaze (183, 222, 223, 236) i korišćen prilikom imobilizacije na modifikovanom alginatu i makroporoznim kopolimerima, opisan je u Odeljku 3.4. Interakcija između enzima i nosača se ostvaruje preko ugljeno-hidratnih ostataka na molekulu HRP, prvobitno oksidovanih natrijum-perjodatom, koji reaguju sa odgovarajućim funkcionalnim grupama prisutnim na površini sepiolita. Na ovaj način omogućeno je uspostavljanje jačih interakcija enzima sa nosačem.

U cilju ispitivanja uticaja količine dodate peroksidaze (nativne i oksidovane) na specifičnu aktivnost, različite količine enzima su dodate po gramu sepiolita (25, 15, 5 i 1 mg/g). Preračunate su specifične aktivnosti imobilizovanih enzima, a dobijeni rezultati su prikazani na Slici 65.



**Slika 65.** Uticaj količine dodatog enzima na specifičnu aktivnost imobilizovane peroksidaze iz rena: (A) nativne i (B) oksidovane

Sa dijagrama prikazanog na Slici 65 se može uočiti da aktivnost imobilizovane nativne peroksidaze raste sa porastom količine dodatog enzima po gramu sepiolita. Maksimalna specifična aktivnost enzima je postignuta kada je količina imobilizovanog enzima po gramu sepiolita iznosila 15 mg, da bi nakon toga aktivnost enzima počela postepeno da opada. Nešto drugačiji rezultati su dobijeni kada je za imobilizaciju korišćena oksidovana peroksidaza iz rena. Specifična aktivnost se sve vreme povećava sa povećanjem količine dodatog enzima po gramu sepiolita.

Dobijene aktivnosti za nativnu HRP su nešto veće, nego one dobijene za HRP oksidovanu natrijum-perjodatom. Poređenjem dobijenih rezultata za nativnu i oksidovanu HRP se može uočiti da je specifična aktivnost oksidovane HRP, pri količini dodatog enzima od 25 mg po gramu sepiolita, veća u odnosu na specifičnu aktivnost dobijenu za nativnu HRP pri istim uslovima (15,5 odnosno 14,4 U/g). Trend je nešto drugačiji za ostale koncentracije enzima pa se stoga ne može izvući nikakvo generalno pravilo.

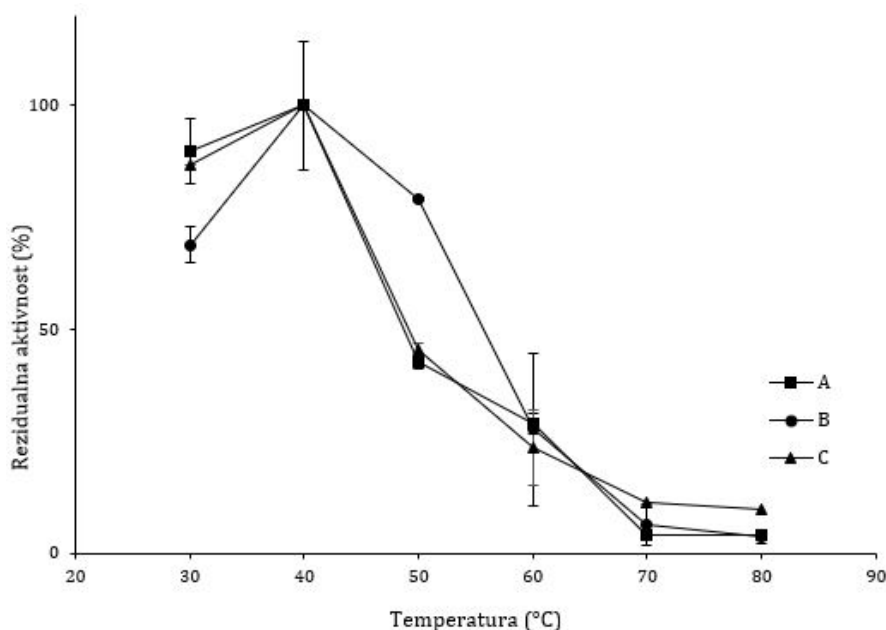
Öztürk sa saradnicima je pokazao da velika gomilanja lipaze na nosačima kao što su sepiolit i montmorilonit rezultuju smanjenom efikasnošću imobilizacije (241). Pronašli su i da je optimalna količina lipaze za imobilizaciju na ova dva neorganska nosača 7,5 mg po gramu nosača (241). Veće količine imobilizovanog enzima vode gubitku aktivnosti zbog smanjene dostupnosti supstrata aktivnom mestu na molekulu enzima (241). U ovom istraživanju je pokazano da se specifična aktivnost nativne HRP povećava sa povećanjem količine enzima, sve do 15 mg/g. Dalje povećanje količine enzima dovodi do zatrpavanja aktivnog mesta viškom enzima i smanjenja specifične aktivnosti. Slične rezultate su objavili Mortazavi i saradnici (192). Oni su smanjenje specifične aktivnosti sa povećanjem količine enzima na površini nosača objasnili međusobnim interakcijama između molekula enzima, koji su prilikom adsorpcije gusto spakovani na površini nosača (192). Njihova interakcija može imati negativni efekat na aktivnost enzima.

U slučaju oksidovane HRP, specifična aktivnost se povećava sa povećanjem količine dodatog enzima, dostiže plato i ostaje konstantna. Moguće je da oksidacija enzima vodi građenju povoljnijih interakcija sa sepiolitom, čime se izbegava negativni uticaj na specifičnu aktivnost imobilizovanog enzima.

## 5.14. Ispitivanje stabilnosti peroksidaze iz rena imobilizovane na sepiolitu

### 5.14.1. Temperaturni optimum

Kako bi se odredila stabilnost imobilizovanog enzima na različitim temperaturama (30, 40, 50, 60, 70 i 80 °C), oksidovana peroksidaza imobilizovana na sepiolitu je inkubirana na svakoj od prethodno navedenih temperatura odgovarajući vremenski period (Slika 66).



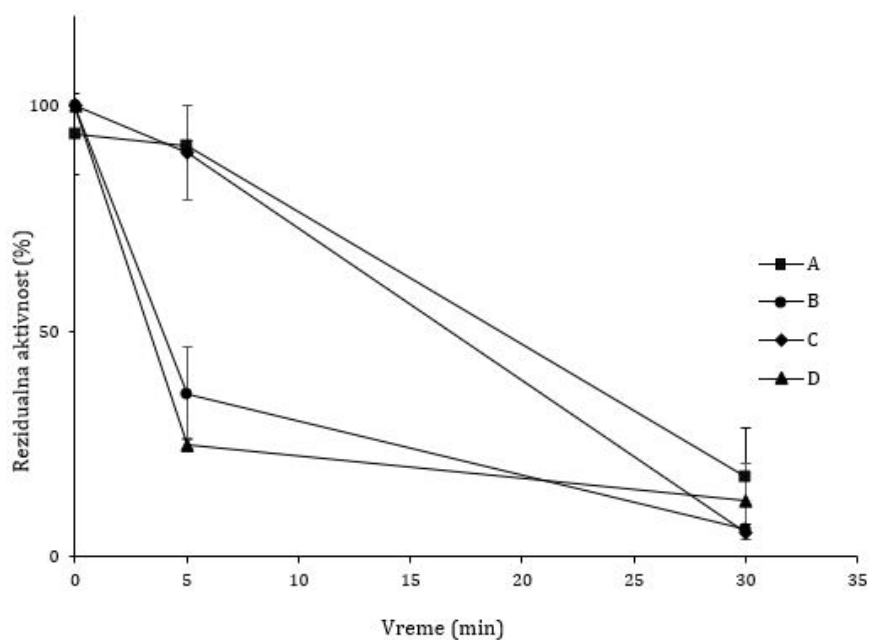
**Slika 66.** Uticaj inkubacije na različitim temperaturama na rezidualnu aktivnost perijodno-oksidovane peroksidaze iz rena imobilizovane na sepiolitu u količini od: (A) 15 mg/g, (B) 5 mg/g i (C) 1 mg/g

Temperaturni optimum za oksidovanu peroksidazu je postignut na 40 °C (Slika 66). Dalje povećanje temperature od 40 do 80 °C, dovodi do postepenog smanjenja stabilnosti imobilizovanog enzima. Na 60 °C oksidovana HRP imobilizovana na sepiolitu je zadržala skoro 30% inicijalne aktivnosti, dok se daljim zagrevanjem aktivnost smanjuje za oko 20%. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim za invertazu imobilizovanu na kompozitnom hidrogelu sačinjenom od sepiolita i akrilamida (242). Imobilizovana invertaza je zadržala skoro 85% aktivnosti tokom inkubacije na 50 °C, dok je slobodna invertaza izgubila 50% inicijalne aktivnosti pod istim uslovima. Nakon inkubacije na 70 °C, slobodan enzim je izgubio skoro celokupnu aktivnost, dok je imobilizovani zadržao 80% svoje aktivnosti. Uočeno je povećanje termostabilnosti na 80 °C peroksidaze imobilizovane na perlitu (243). Ovaj enzim je zadržao 30% inicijalne aktivnosti nakon inkubacije tokom 20 minuta. Niža stabilnost na povišenim temperaturama možda se javlja kao posledica gubitka hem grupe tokom perioda inkubacije.

### 5.14.2. Termostabilnost

Veliki uticaj na stabilnost imobilizovanog enzima imaju površinske osobine nosača korišćenog za adsorpciju. Termostabilnost native i peroksidaze oksidovane natrijum-perijodatom je ispitana inkubiranjem oba enzima na 65 °C odgovarajući vremenski period.

Na ovaj način je istražen uticaj imobilizacije na stabilnost enzima pri povišenim temperaturama. Na Slici 67 su prikazani podaci za oksidovani HRP imobilizovanu na sepiolitu.

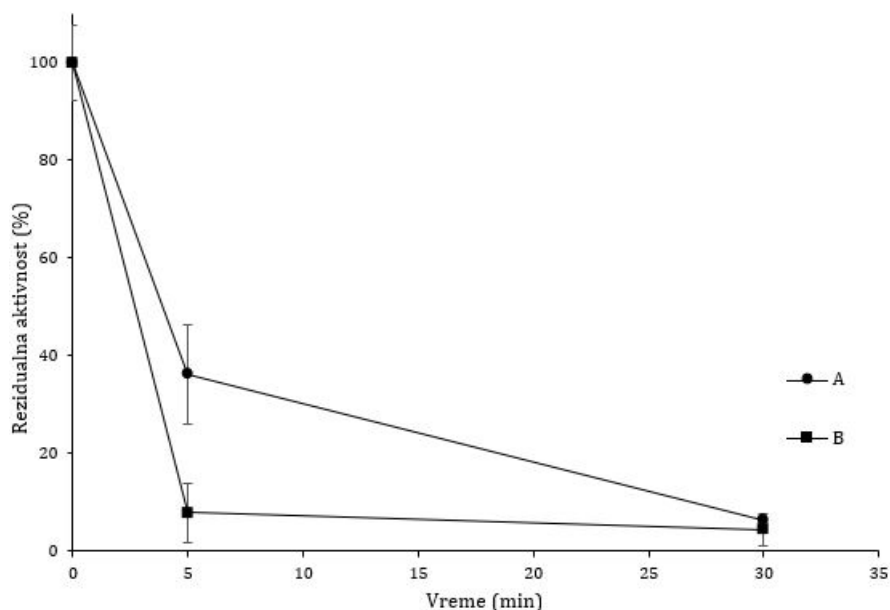


**Slika 67.** Uticaj perioda inkubacije na 65 °C na rezidualnu aktivnost perijodatno-oksidovane peroksidaze iz rena imobilizovane na sepiolitu u količini od: (A) 25 mg/g, (B) 15 mg/g, (C) 5 mg/g i (D) 1 mg/g

Upoređivanjem dobijenih vrednosti za rezidualne aktivnosti izvodi se zaključak da je najstabilniji biokatalizator onaj koji sadrži 25 mg HRP po gramu sepiolita. Nešto niže vrednosti rezidualne aktivnosti dobijene su za enzim imobilizovan u preostalim količinama po gramu nosača (15, 5 i 1 mg/g). Stabilnost HRP imobilizovane na sepiolitu se smanjuje sa povećanjem vremena inkubacije na 65 °C. Nakon inkubacije tokom 30 minuta, 25 mg HRP imobilizovane po gramu sepiolita je zadržalo skoro 18% početne aktivnosti. Slični rezultati dobijeni su i za katalazu imobilizovanu na sepiolitu i bentonitu. Nakon inkubacije na 65 °C tokom 1 h enzim imobilizovan na sepiolitu je zadržao 19,1% incijalne aktivnosti, dok je katalaza imobilizovana na bentonitu zadržala 22,3% aktivnosti (244).

Kako bi se pronašla razlika između native i oksidovane HRP imobilizovane na sepiolitu, 15 mg oba enzima po gramu nosača je inkubirano na 65 °C tokom 30 minuta, a dobijeni rezultati su upoređeni (Slika 68).



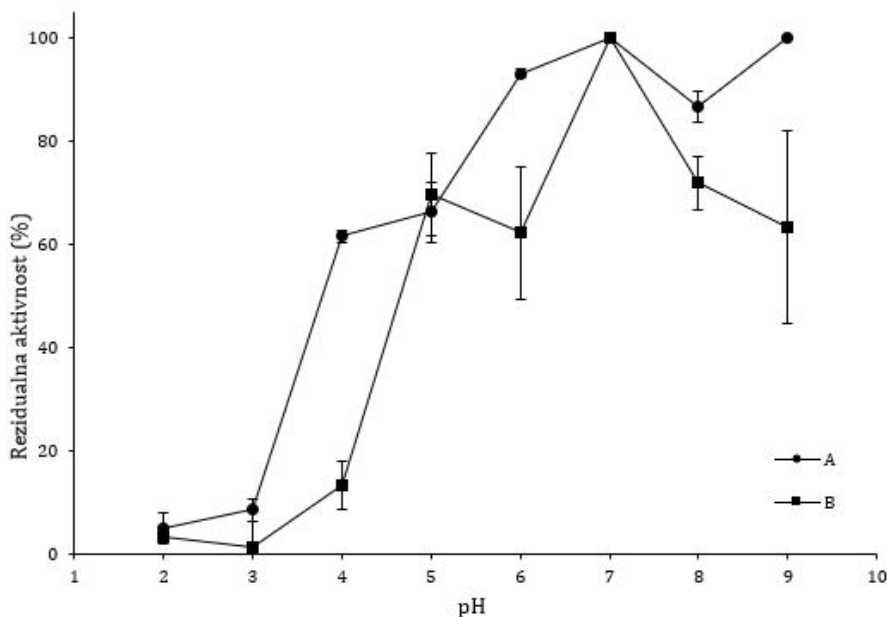


**Slika 68.** Razlike u uticaju perioda inkubacije na 65 °C na rezidualnu aktivnost: (A) oksidovane i (B) native peroksidaze iz rena

Sa grafika prikazanog na Slici 68 može se zaključiti da je oksidovana HRP stabilnija na povišenim temperaturama nego nativna HRP. Nakon inkubacije na 65 °C tokom 5 minuta nativan enzim je izgubio oko 92% inicijalne aktivnosti, dok je taj procenat u slučaju oksidovanog enzima niži (64%). Rezidualna aktivnost dobijena imobilizacijom oksidovane HRP je veća i ukazuje na dodatnu stabilnost enzima ostvarenu primenom ove metode za imobilizaciju peroksidaze.

### 5.14.3. pH optimum

Istražen je i efekat promene pH vrednosti u opsegu od 2,0 do 9,0 na aktivnost obe peroksidaze (nativne i oksidovane). Za ovo ispitivanje je korišćeno 15 mg enzima imobilizovanog po gramu sepiolita (Slika 69).

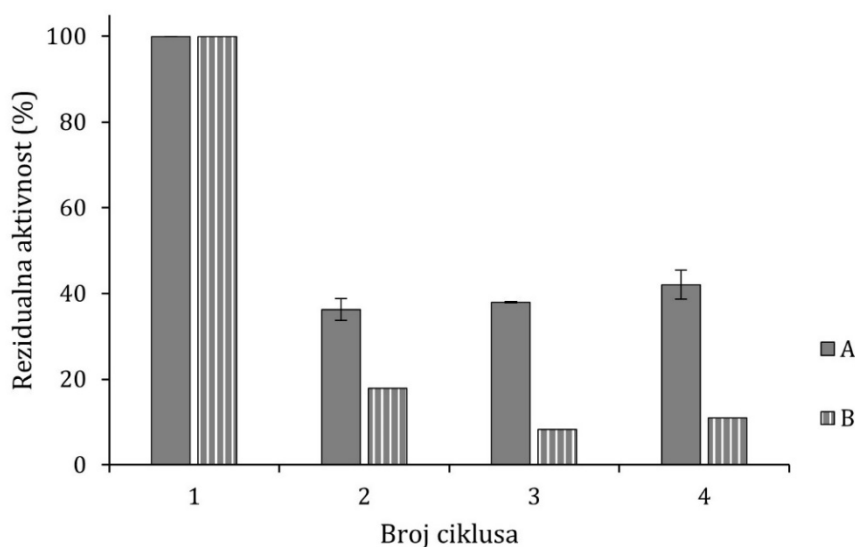


**Slika 69.** Uticaj pH vrednosti na aktivnosti: (A) native i (B) oksidovane peroksidaze iz rena imobilizovane na sepiolitu

Isti trend zavisnosti rezidualne aktivnosti od pH je uočen za obe peroksidaze. Povećanjem pH, od kiselih ka baznim vrednostima, dolazi do postepenog povećanja aktivnosti. Najveća aktivnost je postignuta na pH 7,0 i može se smatrati optimalnom za imobilizaciju HRP na datom nosaču. Nakon toga dolazi do smanjenja rezidualne aktivnosti. Optimalne pH vrednosti za obe peroksidaze (nativnu i oksidovanu) se preklapaju. pH profili krivih u obliku zvona pokazuju veće stabilnosti native HRP u poređenju sa oksidovanom u oba regiona, kako u kiselom, tako i u baznom. Optimalna pH vrednost (pH 7,0) dobijena u ovom istraživanju je potvrđena i rezultatima koje su objavili Torabi i saradnici (243). Peroksidaza imobilizovana na perlitu je pokazala širi opseg pH vrednosti za nativan enzim, u poređenju sa imobilizovanim (243). Ovaj efekat je takođe primećen i u ovom istraživanju i može se objasniti različitim ponašanjima nativnog enzima u blago kiselim uslovima.

### 5.15. Operativna stabilnost peroksidaze iz rena imobilizovane na sepiolitu

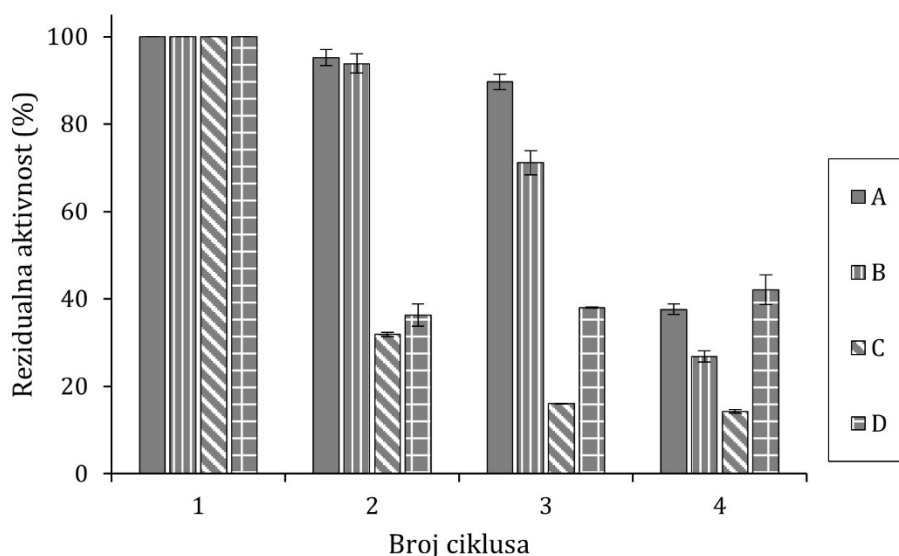
Ista šarža imobilizovanih enzima (nativnog i oksidovanog) je korišćena u nekoliko uzastopnih ciklusa za oksidaciju pirogalola, kako bi se ispitala njihova operativna stabilnost (Slika 70). Rezidualne aktivnosti imobilizovanih enzima su praćene tokom 4 ciklusa, a svaki ciklus je trajao 180 minuta. Između dva ciklusa nosači sa imobilizovanom HRP su isprani nekoliko puta natrijum-fosfatnim puferom, nakon čega su korišćeni u narednom ciklusu oksidacije pirogalola. Uzeto je da je aktivnost enzima dobijena u prvom ciklusu iznosila 100%.



*Slika 70.* Katalitička aktivnost tokom ponovne upotrebe: (A) oksidovane i (B) native peroksidaze iz rena imobilizovane na sepiolitu

Kada se uporede vrednosti rezidualne aktivnosti dobijene za 1 mg peroksidaze (nativne i oksidovane) imobilizovane po gramu sepiolita, može se zaključiti da enzim oksidovan natrijum-perjodatom ima veću operativnu stabilnost. Nativna HRP je zadržala samo 11% svoje incijalne aktivnosti nakon 4 uzastopna ciklusa oksidacije pirogalola, dok je oksidovana HRP pokazala bolje rezultate – 42% aktivnosti je zadržano za isti broj ciklusa ponovne upotrebe. Operativna stabilnost aldehyd-dehidrogenaze (ALDH) imobilizovane na montmorilonitu je praćena tokom 5 ciklusa (245). Aktivnost imobilizovanog enzima je opadala nakon svakog ciklusa za oko 20%, da bi na kraju poslednjeg ciklusa iznosila 24%.

Određene su vrednosti rezidualne aktivnosti oksidovane HRP koja je u različitim količinama imobilizovana po gramu sepiolita, a dobijeni podaci su prikazani grafički na Slici 71.

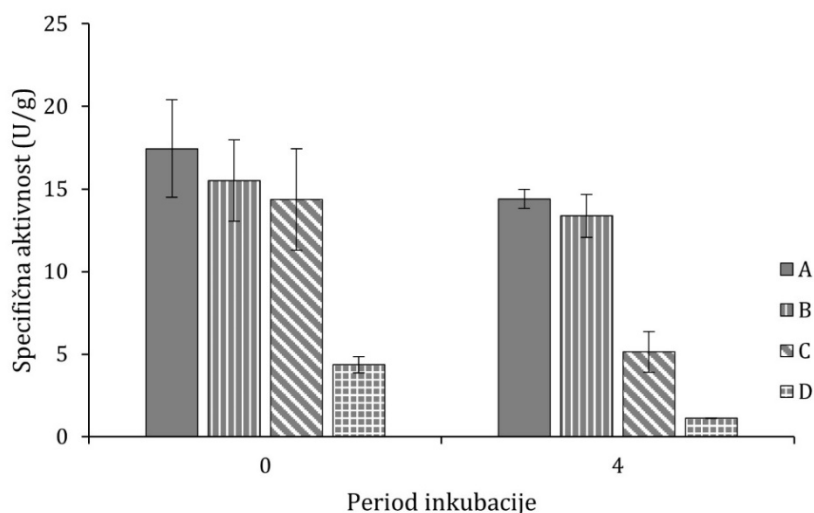


**Slika 71.** Katalitička aktivnost tokom ponovne upotrebe perijodatno-oksidovalane peroksidaze iz rena imobilizovane na sepiolitu u količini od: (A) 25 mg/g, (B) 15 mg/g, (C) 5 mg/g i (D) 1 mg/g

Ponovnom upotrebom ovog sistema za oksidaciju pirogalola u trajanju od 4 ciklusa je utvrđeno da su najbolji rezultati dobijeni korišćenjem enzima imobilizovanog u količini od 1 mg/g nosača. Ovaj biokatalizator zadržao je 42% inicijalne aktivnosti, dok su za ostale količine imobilizovanog enzima zabeleženi nešto drugačiji rezultati.

Nakon 4 ciklusa ponovne upotrebe perijodatno-oksidovalane peroksidaze imobilizovane u količinama od 25 mg/g, 15 mg/g odnosno 5 mg/g enzim je zadržao 37%, 27% odnosno 14% aktivnosti. Generalno, isti trend se može uočiti za sve količine imobilizovanog enzima – povećanje broja ciklusa vodi smanjenju rezidualne aktivnosti. Smanjenje specifične aktivnosti nakon svakog ciklusa upotrebe lipaze i  $\alpha$ -amilaze imobilizovane na sepiolitu je prikazano u literaturi, a pripisano je akumulaciji vode na površini sepiolita ili inaktivaciji samih enzima (192). Peroksidaza koja je pokazala najveću specifičnu aktivnost (ona imobilizovana u količini od 25 mg po gramu sepiolita) je izgubila 63% inicijalne aktivnosti nakon 4 ciklusa ponovne upotrebe. Neophodno je istaći da je enzim imobilizovan u količini od 25 odnosno 15 mg po gramu nosača u prva tri ciklusa zadržao 90% odnosno 71% inicijalne aktivnosti, ali je u četvrtom ciklusu došlo do naglog pada aktivnosti. Inaktivacija enzima može biti posledica blokiranja aktivnog mesta enzima radikalskim produktima formiranim tokom oksidacije.

Kako bi se ispitalo eventualno curenje imobilizovanog enzima (nativnog i oksidovanog), oba enzima su skladištena u rastvoru natrijum-hlorida u natrijum-acetatnom puferu pH 5,0 na 4 °C tokom 4 dana (Slika 72). Rezidualna aktivnost je izmerena u inicijalnom trenutku, kao i nakon inkubacije.



**Slika 72.** Ispitivanje stabilnosti tokom skladištenja perjodatno-oksidovane peroksidaze iz rena imobilizovane na sepiolitu u koncentraciji: (A) 25 mg/g, (B) 15 mg/g, (C) 5 mg/g i (D) 1 mg/g

Enzim imobilizovan u količini od 25 mg po gramu sepiolita je zadržao 85,6% inicijalne aktivnosti. Slični rezultati su zabeleženi i za druge koncentracije peroksidaze imobilizovane na sepiolitu. U literaturi je prikazano da su lipaza i  $\alpha$ -amilaza imobilizovane na modifikovanom sepiolitu sposobne da zadrže 39,8% odnosno 28,1% aktivnosti nakon inkubacije tokom 30 dana (192). Poboljšana stabilnost tokom skladištenja u odgovarajućem vremenskom periodu može biti posledica očuvanja strukture samog enzima tokom imobilizacije i smanjenja mogućnosti denaturacije peroksidaze.

Mogućnost ponovne upotrebe i stabilnost enzima imobilizovanih na sepiolitu je od velikog značaja za njihovu primenu u različitim oblastima. Oksidovana peroksidaza vezana za ovaj neorganski nosač metodom adsorpcije pokazala je bolje rezultate u pogledu aktivnosti i stabilnosti u poređenju sa nativnim enzimom. Ona se može primeniti u različitim oblastima zaštite životne sredine, pre svega za uklanjanje fenola i organskih boja. Ranije primenjeni sistemi imobilizovanih enzima pokazali su lošije rezultate zbog niske stabilnosti adsorbovanih enzima. Novi sistem baziran na oksidaciji enzima i njegovoj daljoj adsorpciji na sepiolitu odlikuje bolja stabilnost enzima što obećava bolje rezultate tokom primene. Pored adsorpcije, enzim ostvaruje dodatne interakcije sa nosačem preko oksidacijom uvedenih aldehidnih grupa. Ova dodatna stabilizacija odgovorna je za pobjašnu aktivnost i stabilnost imobilizovanog enzima i može doprineti njegovoj široj primeni.

## 6. Zaključak

U cilju razvijanja metoda za uklanjanje fenola, peroksidaza iz rena je imobilizovana na različite tipove nosača: a) hemijski modifikovan polimer prirodnog porekla – alginat, b) sintetski makroporozni kopolimer u obliku kuglica prečnika približno 1,5  $\mu$ m i c) neorganski glineni mineral sepiolit.

Prvobitno je alginat oksidovan natrijum-perjodatom i podvrgnut reakciji reduktivne aminacije tiramin-hidrohloridom. Time su u alginatni polimerni lanac uvedene nove fenolne i amino grupe, koje su pokazale potencijal međusobnog udruživanja i formiranja mreže unutar koje je moguće zarobljavanje enzima. Uspešnost oksidacije i reduktivne aminacije je potvrđena FTIR i UV-VIS spektroskopijom, kao i kiselo-baznom titracijom.

Peroksidaza iz rena je enkapsulirana unutar mikro-kuglica tiramin-alginata primenom kuplovane emulziono-polimerizacije reakcije.

Kako bi se tokom geliranja obezbedilo postepeno oslobađanje vodonik-peroksida, uključen je sistem za njegovu internu dostavu sastavljen od glukoze i glukoza-oksidadze.

Variran je stepen oksidacije i modifikacije tiramin-alginata (2,5; 5; 10; 15 i 20 mol%) i ispitan je njegov uticaj na efikasnost imobilizacije HRP. Pokazano je da se sa povećanjem stepena oksidacije povećava specifična aktivnost enkapsulirane peroksidaze.

Peroksidaza imobilizovana unutar tiramin-alginatnih mikro-kuglica je iskorišćena za optimizaciju reakcionih uslova pri oksidaciji fenola u šaržnom reaktoru. Na prvom mestu određena je koncentracija HRP koja obezbeđuje najbolju efikasnost uklanjanja fenola (6,98 U/mL). Ispitan je i uticaj sastava reakcionog sistema za dostavu vodonik-peroksida na potencijal sistema imobilizovanog enzima za uklanjanje fenola.

Veće količine fenola su uklonjene iz reakcionog sistema kada je za dostavu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> korišćen metod za interno generisanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sastavljen od glukoze i glukoza-oksidadze, u poređenju sa direktnim dodavanjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Kako bi se odredilo da li postoji razlika prilikom korišćenja 15 i 20 mol% oksidovanog i modifikovanog tiramin-alginata sa enkapsuliranom peroksidazom, oba modifikovana alginata su testirana u reakcijama oksidacije fenola. Nakon šestočasovnog uklanjanja fenola iz rastvora postignuta je efikasnost od 96% sa HRP imobilizovanom unutar 20 mol% modifikovanog tiramin-alginata, dok je procenat uklonjenog fenola sa HRP imobilizovanom na 15 mol% tiramin-alginatu nešto niži (73%).

Zatim su optimizovani parametri za uklanjanje fenola u pogledu koncentracija glukoze i glukoza-oksidadze kako bi se obezbedila najefikasnija dostava H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u reakcionom sistemu. Manja koncentracija zaostalog fenola u reakcionom sistemu je zabeležena kada je korišćena niža koncentracija glukoza-oksidadze (0,187 U/mL). Promena koncentracije glukoze od 2 mmol/L do 4 mmol/L dovela je do porasta efikasnosti uklanjanja fenola iz reaktora. Kao zaključak ove studije može se izvesti sledeće: primenom niže koncentracije glukoza-oksidadze i veće koncentracije glukoze dobija se povećana efikasnost uklanjanja fenola.

Ponovna upotreba HRP enkapsulirane unutar 20 mol% oksidovanih/modifikovanih tiramin-alginata se pokazala efikasnom tokom 3 uzastopna ciklusa degradacije fenola. U prvom ciklusu je uklonjeno 96% fenola, da bi nakon toga došlo do naglog pada u efikasnosti. HRP imobilizovana unutar 15 mol% oksidovanog/modifikovanog tiramin-alginata je bila efikasna tokom 4 ciklusa kontinualne primene u uklanjanju fenola. Nakon pomenutog perioda enzim je zadržao 61% aktivnosti.

Za potrebe degradacije tekstilnih boja, ćelijski zidovi sa lignin-peroksidazom su enkapsulirani unutar kalcijum-alginatnog hidrogela dobijenog umrežavanjem tiraminom modifikovanog alginata, prethodno oksidovanog perjodatom u 2,5 mol% odnosu.

Istraživanje je pokazalo da sa produžavanjem vremena inkubacije imobilizovanih ćelijskih zidova u rastvorima boja Evans Blue i Amido Black 10B dolazi do povećanja procenta dekolorizacije. Nakon 48 h enzim je pokazao sposobnost degradacije 86% Evans Blue boje i 84% Amido Black 10B boje. Potencijal ponovne upotrebe imobilizovanih ćelijskih zidova tokom 12 uzastopnih ciklusa je testiran, a veći stepen dekolorizacije je dobijen za Evans Blue boju (69%) nego za Amido Black 10B (34%).

Disperzionom polimerizacijom su sintetisani i makroporozni kopolimeri sa česticama veličine 1,5 μm i različitom veličinom pora (150–310 nm). Za imobilizaciju HRP na ovim kopolimerima su primenjene dve metode – glutaraldehidna i perjodatna metoda. Ispitivanje uticaja količine dodate HRP po gramu kopolimera na specifičnu aktivnost imobilizovanog enzima je pokazalo da dolazi do porasta aktivnosti primenom obe korišćene metode.

Najveće vrednosti specifične aktivnosti dobijene su korišćenjem perjodatne metode, kao i sa kopolimerom G6E4<sub>am</sub> sa porama veličine 234 nm. Zapažena je povećana temperaturna stabilnost i stabilnost u organskom rastvaraču imobilizovanih enzima na kopolimerima sa svim veličinama pora.

Optimalna pH vrednost, kinetički parametri i operativna stabilnost su ispitane za HRP imobilizovanu na kopolimeru sa porama veličine 234 nm (G6E4<sub>am</sub>). Uočena je povećana stabilnost na svim pH vrednostima, kao i zadržavanje aktivnosti od 80% nakon 5 ciklusa kontinualne primene u oksidaciji pirogalola.

Ukoliko se optimizovani uslovi za uklanjanje fenola primene na ovaj sistem uz male izmene u cilju postizanja veće efikasnosti (smanji se dužina trajanja jednog ciklusa i uvede ispiranje etanolom između dva ciklusa) postiže se adekvatna efikasnost degradacije tokom 4 uzastopna ciklusa od 26,3%.

Sepiolit, neorganski glineni nosač, je takođe primenjen u reakcijama adsorpcije peroksidaze iz rena (nativne i oksidovane natrijum-perjodatom). Specifična aktivnost nativne HRP adsorbovane na sepiolitu raste sa povećanjem količine dodatog enzima, sve do 15 mg/g, nakon čega dolazi do njenog pada. Rezultati dobijeni sa oksidovanom HRP su pokazali sličnu zavisnost, tj. da porast količine enzima vodi povećanju specifične aktivnosti. Najveća aktivnost HRP imobilizovane na sepiolitu je dobijena na 40 °C. Takođe je potvrđena i poboljšana stabilnost oksidovane HRP imobilizovane na sepiolitu u poređenju sa nativnom. Poređenjem stabilnosti nativne i oksidovane HRP na različitim pH vrednostima uočena je poboljšana stabilnost nativne HRP. Međutim, nativna HRP imobilizovana na sepiolitu je zadržala svega 11% početne aktivnosti nakon 4 ciklusa ponovne upotrebe tokom oksidacije pirogalola. Primenom oksidovanog enzima u ove svrhe zadržano je 42% aktivnosti nakon istog broja ciklusa. Imobilizovana perjodatno oksidovana HRP je zadržala 85,6% početne aktivnosti tokom skladištenja u periodu od 4 dana.

Navedeni rezultati ukazuju da su razvijeni imobilizovani biokatalizatori i reakcioni sistemi pokazali potencijal, a samim tim i veliku efikasnost u uklanjanju fenola i tekstilnih boja iz otpadnih voda.

## 7. Literatura

1. Chiong T, Lau J, Khor E, Danquah M. Enzymatic approach to phenol removal from wastewater using peroxidases. *OA Biotechnol.* 2014;3(1).
2. Caza N, Bewtra JK, Biswas N, Taylor KE. Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. *Water Res.* 1999;33(13):3012–8.
3. Cheng J, Ming Yu S, Zuo P. Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. *Water Res.* 2006;40(2):283–90.
4. Liu S, Huang B, Zheng G, Zhang P, Li J, Yang B, et al. Nanocapsulation of horseradish peroxidase (HRP) enhances enzymatic performance in removing phenolic compounds. *Int J Biol Macromol.* 2020;150:814–22.
5. Bhatti HN, Mahmood Z, Kausar A, Yakout SM, Shair OH, Iqbal M. Biocomposites of polypyrrole, polyaniline and sodium alginate with cellulosic biomass: Adsorption-desorption, kinetics and thermodynamic studies for the removal of 2,4-dichlorophenol. *Int J Biol Macromol.* 2020;153:146–57.
6. Bhunia A, Durani S, Wangikar PP. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnol Bioeng.* 2001;72(5):562–7.
7. Bevilaqua J V., Cammarota MC, Freire DMG, Sant’Anna GL. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments. *Brazilian J Chem Eng.* 2002;19(2):151–8.
8. Steevensz A, Cordova Villegas LG, Feng W, Taylor KE, Bewtra JK, Biswas N. Soybean peroxidase for industrial wastewater treatment: a mini review. *J Environ Eng Sci.* 2014;9(3):181–6.
9. Wilberg K, Assenhaimer C, Rubio J. Removal of aqueous phenol catalysed by a low purity soybean peroxidase. *J Chem Technol Biotechnol.* 2002;77(7):851–7.
10. Agarwal P, Gupta R, Agarwal N. A Review on Enzymatic Treatment of Phenols in Wastewater. *J Biotechnol Biomater.* 2016;06(04).
11. Klibanov AM, Morris ED. Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water. *Enzyme Microb Technol.* 1981;3(2):119–22.
12. Klibanov AM, Tu TM, Scott KP. Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste waters. Vol. 221, *Science.* 1983.
13. Bilal M, Iqbal HMN. Lignin peroxidase immobilization on Ca-alginate beads and its dye degradation performance in a packed bed reactor system. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2019;20:101205.
14. Bilal M, Asgher M. Sandal reactive dyes decolorization and cytotoxicity reduction using manganese peroxidase immobilized onto polyvinyl alcohol-alginate beads. *Chem Cent J.* 2015;9(47):1–14.
15. Ilić Đurđić K, Ostafe R, Prodanović O, Đurđević Đelmaš A, Popović N, Fischer R, et al. Improved degradation of azo dyes by lignin peroxidase following mutagenesis at two sites near the catalytic pocket and the application of peroxidase-coated yeast cell walls. *Front Environ Sci Eng.* 2021;15(2):19.
16. Alshabib M, Onaizi SA. A review on phenolic wastewater remediation using homogeneous and heterogeneous enzymatic processes: Current status and potential challenges. *Sep Purif Technol.* 2019;219:186–207.
17. Spasojević M, Prodanović O, Pantić N, Popović N, Balaž AM, Prodanović R. The Enzyme Immobilization: Carriers and Immobilization methods. *J Eng Process Manag.* 2019;11(2):89–105.
18. Alemzadeh I, Nejati S. Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase. *J Hazard Mater.* 2009;166:1082–6.

19. Monier M, Ayad DM, Wei Y, Sarhan AA. Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads. *Int J Biol Macromol*. 2010;46(3):324–30.
20. Bindhu L V., Abraham ET. Immobilization of Horseradish Peroxidase on Chitosan for Use in Nonaqueous Media. *J Appl Polym Sci*. 2003;88:1456–64.
21. Prokopijevic M, Prodanovic O, Spasojevic D, Stojanovic Z, Radotic K, Prodanovic R. Soybean hull peroxidase immobilization on macroporous glycidyl methacrylates with different surface characteristics. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2014;37(5):799–804.
22. Bayramoglu G, Arica MY. Enzymatic removal of phenol and p -chlorophenol in enzyme reactor : Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. *J Hazard Mater*. 2008;156:148–55.
23. Voss R, Brook MA, Thompson J, Chen Y, Pelton RH, Brennan JD. Non-destructive horseradish peroxidase immobilization in porous silica nanoparticles. *J Mater Chem*. 2007;17(46):4854–63.
24. Temoçin Z, Yiğitoğlu M. Studies on the activity and stability of immobilized horseradish peroxidase on poly(ethylene terephthalate) grafted acrylamide fiber. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2009;32(4):467–74.
25. Lai YC, Lin SC. Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p-chlorophenol from aqueous solution. *Process Biochem*. 2005;40:1167–74.
26. Homaei A. Enzyme immobilization and its application in the food industry. In: Rai R, editor. *Advances in Food Biotechnology*. First. John Wiley & Sons, Ltd; 2015. p. 145–64.
27. Largo F, Haounati R, Akhouairi S, Ouachtak H, El R, Jada A, et al. Adsorptive removal of both cationic and anionic dyes by using sepiolite clay mineral as adsorbent: Experimental and molecular dynamic simulation studies. *J Mol Liq*. 2020;318(114247).
28. Prodanovic O, Spasojevic D, Prokopijevic M, Radotic K, Markovic N, Blazic M, et al. Tyramine modified alginates via periodate oxidation for peroxidase induced hydrogel formation and immobilization. *React Funct Polym*. 2015;93:77–83.
29. Spasojevic D, Prokopijevic M, Prodanovic O, Zelenovic N, Polovic N, Radotic K, et al. Peroxidase-Sensitive Tyramine Carboxymethyl Xylan Hydrogels for Enzyme Encapsulation. *Macromol Res*. 2019;27(8):764–71.
30. Prodanović O, Prokopijević M, Spasojević D, Stojanović Ž, Radotić K, Knežević-Jugović ZD, et al. Improved Covalent Immobilization of Horseradish Peroxidase on Macroporous Glycidyl Methacrylate-Based Copolymers. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;168:1288–301.
31. Prodanović RM, Milosavić NB, Jovanović SM, Ćirković-Veličković T, Vujčić ZM, Jankov RM. Stabilization of  $\alpha$ -glucosidase in organic solvents by immobilization on macroporous poly (GMA-co-EGDMA) with different surface characteristics. *J Serb Chem Soc*. 2006;71(4):339–47.
32. Yashas SR, Shahmoradi B, Kitirote W, Shivaraju HP. Potentiality of polymer nanocomposites for sustainable environmental applications: A review of recent advances. *Polymer*. 2021;233:124184.
33. Ahamd MZ, Ehtisham-Ul-haque S, Nisar N, Qureshi K, Ghaffar A, Abbas M, et al. Detoxification of photo-catalytically treated 2-chlorophenol: Optimization through response surface methodology. *Water Sci Technol*. 2017;76(2):323–36.
34. Bakhsh EM, Akhtar K, Fagieh TM, Asiri AM, Khan SB. Sodium alginate nanocomposite based efficient system for the removal of organic and inorganic pollutants from wastewater. *Int J Biol Macromol*. 2021;191:243–54.
35. Abbas M, Adil M, Ehtisham-ul-Haque S, Munir B, Yameen M, Ghaffar A, et al. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Sci Total Environ*. 2018;626:1295–309.



36. Busca G, Berardinelli S, Resini C, Arrighi L. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. *J Hazard Mater.* 2008;160:265–88.
37. Schmidt RJ. Industrial catalytic processes - Phenol production. *Appl Catal A Gen.* 2005;280:89–103.
38. Mohammadi S, Kargari A, Sanaeepur H, Abbassian K, Najafi A, Mofarrah E. Phenol removal from industrial wastewaters: a short review. *Desalin Water Treat.* 2014;53(8):2215–34.
39. Kulkarni SJ, Kaware JP. Review on research for removal of phenol from wastewater. *Int J Sci Res Publ.* 2013;3(4):2250–3153.
40. Moussavi G, Khavanin A, Alizadeh R. The integration of ozonation catalyzed with MgO nanocrystals and the biodegradation for the removal of phenol from saline wastewater. *Appl Catal B Environ.* 2010;97:160–7.
41. Eryilmaz C, Genç A. Review of Treatment Technologies for the Removal of Phenol from Wastewaters. *J Water Chem Technol.* 2021;43(2):145–54.
42. Mohamad Said KA, Ismail AF, Abdul Karim Z, Abdullah MS, Hafeez A. A review of technologies for the phenolic compounds recovery and phenol removal from wastewater. *Process Saf Environ Prot.* 2021;151:257–89.
43. Maciel R, Sant'Anna GL, Dezotti M. Phenol removal from high salinity effluents using Fenton's reagent and photo-Fenton reactions. *Chemosphere.* 2004;57:711–9.
44. Villegas LGC, Mashhadi N, Chen M, Mukherjee D, Taylor KE, Biswas N. A short review of techniques for phenol removal from wastewater. *Curr Pollut Reports.* 2016;2(3):157–67.
45. Amado-Piña D, Roa-Morales G, Barrera-Díaz C, Balderas-Hernandez P, Romero R, Martín del Campo E, et al. Synergic effect of ozonation and electrochemical methods on oxidation and toxicity reduction: Phenol degradation. *Fuel.* 2017;198:82–90.
46. Andrade MA, Carmona RJ, Mestre AS, Matos J, Carvalho AP, Ania CO. Visible light driven photooxidation of phenol on TiO<sub>2</sub>/Cu-loaded carbon catalysts. *Carbon N Y.* 2014;76:183–92.
47. Lin SH, Chiou CH, Chang CK, Juang RS. Photocatalytic degradation of phenol on different phases of TiO<sub>2</sub> particles in aqueous suspensions under UV irradiation. *J Environ Manage.* 2011;92:3098–104.
48. Krastanov A, Alexieva Z, Yemendzhiev H. Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. *Eng Life Sci.* 2013;13:76–87.
49. Melo JS, Kholi S, Patwardhan AW, D'Souza SF. Effect of oxygen transfer limitations in phenol biodegradation. *Process Biochem.* 2005;40:625–8.
50. Su X, Wang Y, Xue B, Zhang Y, Mei R, Zhang Y, et al. Resuscitation of functional bacterial community for enhancing biodegradation of phenol under high salinity conditions based on Rpf. *Bioresour Technol.* 2018;261:394–402.
51. Moussavi G, Mahmoudi M, Barikbin B. Biological removal of phenol from strong wastewaters using a novel MSBR. *Water Res.* 2009;43:1295–302.
52. Ke Q, Zhang Y, Wu X, Su X, Wang Y, Lin H, et al. Sustainable biodegradation of phenol by immobilized *Bacillus* sp. SAS19 with porous carbonaceous gels as carriers. *J Environ Manage.* 2018;222:185–9.
53. Ferrer-Polonio E, Mendoza-Roca JA, Iborra-Clar A, Alonso-Molina JL, Pastor-Alcañiz L. Biological treatment performance of hypersaline wastewaters with high phenols concentration from table olive packaging industry using sequencing batch reactors. *J Ind Eng Chem.* 2016;43:44–52.
54. Steiert JG, Crawford RL. Microbial degradation of chlorinated phenols. *Trends Biotechnol.* 1985;3(12):300–5.

55. Gernjak W, Krutzler T, Glaser A, Malato S, Caceres J, Bauer R, et al. Photo-fenton treatment of water containing natural phenolic pollutants. *Chemosphere*. 2003;50:71–8.
56. Firozjaee TT, Najafpour GD, Asgari A, Khavarpour M. Biological treatment of phenolic wastewater in an anaerobic continuous stirred tank reactor. *Chem Ind Chem Eng Q*. 2013;19(2):173–9.
57. KARAM J, NICELL JA. Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. *J Chem Tech Biotechnol*. 1997;69:141–53.
58. Pradeep N V., Anupama S, Navya K, Shalini HN, Idris M, Hampannavar US. Biological removal of phenol from wastewaters: a mini review. *Appl Water Sci*. 2015;5(2):105–12.
59. Demarche P, Junghanns C, Nair RR, Agathos SN. Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship. *Biotechnol Adv*. 2012;30:933–53.
60. Chengalroyen MD, Dabbs ER. The microbial degradation of azo dyes: Minireview. *World J Microbiol Biotechnol*. 2013;29:389–99.
61. Katheresan V, Kandedo J, Lau SY. Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: A review. *J Environ Chem Eng*. 2018;6(4):4676–97.
62. Solís M, Solís A, Pérez HI, Manjarrez N, Flores M. Microbial decolouration of azo dyes: A review. *Process Biochem*. 2012;47(12):1723–48.
63. Kant R. Textile dyeing industry an environmental hazard. *Nat Sci*. 2012;04(01):22–6.
64. Suteu D, Bilba D, Coseri S. Macroporous polymeric ion exchangers as adsorbents for the removal of cationic dye basic blue 9 from aqueous solutions. *J Appl Polym Sci*. 2013;
65. Chacko JT, Subramaniam K. Enzymatic Degradation of Azo Dyes – A Review. *Int J Environmental Sci*. 2011;1(6):1250–60.
66. Al-Alwani MAM, Ludin NA, Mohamad AB, Kadhum AAH, Mukhlus A. Application of dyes extracted from *Alternanthera dentata* leaves and *Musa acuminata* bracts as natural sensitizers for dye-sensitized solar cells. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2018;192:487–98.
67. Rauf MA, Salman Ashraf S. Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes. *Chem Eng J*. 2012;209:520–30.
68. Cotillas S, Llanos J, Cañizares P, Clematis D, Cerisola G, Rodrigo MA, et al. Removal of Procion Red MX-5B dye from wastewater by conductive-diamond electrochemical oxidation. *Electrochim Acta*. 2018;263:1–7.
69. Rani C, Jana AK, Bansal A. Studies on the Biodegradation of Azo Dyes by White rot Fungi *Daedalea Flavida* in the Absence of External Carbon Source. In: 2nd International Conference on Environmental Science and Technology. 2011. p. 147–50.
70. Stolz A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001;56:69–80.
71. Jeong E, Freeman HS, Claxton LD. Synthesis and characterization of selected 4,4'-diaminoalkoxyazobenzenes. *Dye Pigment*. 2010;87:100–8.
72. Platzek T, Lang C, Grohmann G, Gi US, Baltes W. Formation of a carcinogenic aromatic amine from an azo dye by human skin bacteria in vitro. *Hum Exp Toxicol*. 1999;18(9):552–9.
73. Chung K-T. Azo Dyes and Human Health: A Review. *J Env Sci Heal C Env Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2016;34(4):233–61.
74. Nakayama T, Kimura T, Kodama M, Nagata C. Generation of hydrogen peroxide and superoxide anion from active metabolites of naphthylamines and aminoazo dyes: Its possible role in carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1983;4(6):765–9.
75. Chen H. Recent advances in azo dye degrading enzyme research. *Curr Protein Pept Sci*. 2006;7(2):101–11.

76. Blümel S, Knackmuss HJ, Stolz A. Molecular cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Xenophilus azovorans* KF46F. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(8):3948–55.
77. Zimmermann T, Kullla HG, Leisinger T. Properties of purified orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *Eur J Biochem.* 1982;129(1):197–203.
78. Brown JP. Reduction of polymeric azo and nitro dyes by intestinal bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1981;41(5):1283–6.
79. Arciniega Cano O, Rodríguez González CA, Hernández Paz JF, Amezaga Madrid P, García Casillas PE, Martínez Hernández AL, et al. Catalytic activity of palladium nanocubes/multiwalled carbon nanotubes structures for methyl orange dye removal. *Catal Today* 2017;282(2):168–73.
80. Harazono K, Nakamura K. Decolorization of mixtures of different reactive textile dyes by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and inhibitory effect of polyvinyl alcohol. *Chemosphere.* 2005;59(1):63–8.
81. Forgacs E, Cserháti T, Oros G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. *Environ Int.* 2004;30(7):953–71.
82. Jun LY, Yon LS, Mubarak NM, Bing CH, Pan S, Danquah MK, et al. An overview of immobilized enzyme technologies for dye and phenolic removal from wastewater. *J Environ Chem Eng.* 2019;7(2):102961.
83. Ahmed MB, Zhou JL, Ngo HH, Guo W, Thomaidis NS, Xu J. Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review. *J Hazard Mater.* 2017;323(Part A):274–98.
84. Husain A, Javed I, Khan NA, Section CE, Engg FO, Aligarh UP. Characterization and treatment of electroplating industry wastewater using Fenton's reagent. *J Chem Pharm Res.* 2014;6(1):622–7.
85. Subha R, Sridevi OA, Anitha D, Sudha D, Professors A. Treatment methods for the removal of phenol from water-A Review. In: *International Conference on Systems, Science, Control, Communication, Engineering and Technology.* 2015. p. 199–203.
86. Britos CN, Trelles JA. Development of strong enzymatic biocatalysts for dye decolorization. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2016;7:228–33.
87. Amini M, Arami M, Mahmoodi NM, Akbari A. Dye removal from colored textile wastewater using acrylic grafted nanomembrane. *Desalination.* 2011;267(1):107–13.
88. Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour Technol.* 2001;77:247–55.
89. dos Santos AB, Cervantes FJ, van Lier JB. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresour Technol.* 2007;98(12):2369–85.
90. Crini G. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. *Bioresour Technol.* 2006;97(9):1061–85.
91. Holkar CR, Jadhav AJ, Pinjari D V., Mahamuni NM, Pandit AB. A critical review on textile wastewater treatments: Possible approaches. *J Environ Manage.* 2016;182:351–66.
92. Yagub MT, Sen TK, Afroze S, Ang HM. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review. *Adv Colloid Interface Sci.* 2014;209:172–84.
93. Gholami-borujeni F, Mahvi AH. Enzymatic Treatment and Detoxification of Acid Orange 7 from Textile Wastewater. *Appl Biochem Biotechnol.* 2011;165:1274–84.
94. Daâssi D, Rodríguez-Couto S, Nasri M, Mechichi T. Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Coriolopsis gallica* into Ca-alginate beads. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2014;90:71–8.

95. Husain Q. Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: A review. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2010;9(2):117–40.
96. Durán N, Esposito E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl Catal B Environ*. 2000;28(2):83–99.
97. Nicell JA, Bewtra JK, Biswas N, Taylor E. Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. *Water Res*. 1993;27(11):1629–39.
98. Jožef B. PRIMENA RASTVORNIH I IMOBILIZOVANIH IZOFORMI PEROKSIDAZE IZ RENA U UKLANJANJU OBOJENIH KSENOBIOTIKA IZ OTPADNE VODE. University of Belgrade - Faculty of Chemistry; 2018.
99. Singh RL, Singh PK, Singh RP. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes - A review. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2015;104:21–31.
100. Patil A V., Jadhav JP. Evaluation of phytoremediation potential of *Tagetes patula* L. for the degradation of textile dye Reactive Blue 160 and assessment of the toxicity of degraded metabolites by cytogenotoxicity. *Chemosphere*. 2013;92(2):225–32.
101. Shrivastava R, Christian V, Vyas BRM. Enzymatic decolorization of sulfonphthalein dyes. *Enzyme Microb Technol*. 2005;36(2–3):333–7.
102. Ulson de Souza SMAG, Forgiarini E, Ulson de Souza AA. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *J Hazard Mater*. 2007;147(3):1073–8.
103. Alam Z, Mansor MF, Jalal KCA. Optimization of decolorization of methylene blue by lignin peroxidase enzyme produced from sewage sludge with *Phanerocheate chrysosporium*. *J Hazard Mater*. 2009;162(2–3):708–15.
104. Azevedo AM, Martins VC, Prazeres DMF, Vojinović V, Cabral JMS, Fonseca LP. Horseradish peroxidase: A valuable tool in biotechnology. *Biotechnol Annu Rev*. 2003;9(03):199–247.
105. Conesa A, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ. Fungal peroxidases: Molecular aspects and applications. *J Biotechnol*. 2002;93(2):143–58.
106. Ruiz-Dueñas FJ, Martínez AT. Structural and functional features of peroxidases with a potential as industrial biocatalysts. In: *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. Springer, Berlin, Heidelberg; 2010. p. 1–358.
107. Veitch NC. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. 2004;65(3):249–59.
108. Shannon LM, Kay E, Lew JY. Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots. *J Biol Chem*. 1966;241(9):2166–72.
109. Welinder KG. Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7). *FEBS Lett*. 1976;72(1):19–23.
110. Yang BY, Gray JSS, Montgomery R. The glycans of horseradish peroxidase. *Carbohydr Res*. 1996;287(2):203–12.
111. Gajhede M, Schuller DJ, Henriksen A, Smith AT, Poulos TL. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat Struct Biol*. 1997;4(12):1032–8.
112. Lopes GR, Pinto DCGA, Silva AMS. Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry. *RSC Adv*. 2014;4(70):37244–65.
113. Santucci R, Laurenti E, Sinibaldi F, Ferrari RP. Effect of dimethyl sulfoxide on the structure and the functional properties of horseradish peroxidase as observed by spectroscopy and cyclic voltammetry. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1596(2):225–33.
114. Lončar N. Uklanjanje fenola i boja iz otpadne vode prirodnim i rekombinantnim oksidativnim enzimima. UNIVERSITY OF BELGRADE - FACULTY OF CHEMISTRY; 2012.
115. Wagner M, Nicell JA. Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res*. 2002;36(16):4041–52.
116. Velde F Van De, Rantwijk F Van, Sheldon RA. Improving the catalytic performance of

- peroxidases in organic synthesis. *Trends Biotechnol.* 2001;19(2):73–80.
117. Dotsikas Y, Loukas YL. Employment of 4-(1-imidazolyl)phenol as a luminol signal enhancer in a competitive-type chemiluminescence immunoassay and its comparison with the conventional antigen-horseradish peroxidase conjugate-based assay. *Anal Chim Acta.* 2004;509(1):103–9.
  118. Morawski B, Lin Z, Cirino P, Joo H, Bandara G, Arnold FH. Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Protein Eng.* 2000;13(5):377–84.
  119. Jung Y, Kwak J, Lee Y. High-level production of heme-containing holoproteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;55(2):187–91.
  120. Tupper J, Tozer GM, Dachs GU. Use of horseradish peroxidase for gene-directed enzyme prodrug therapy with paracetamol. *Br J Cancer.* 2004;90(9):1858–62.
  121. Chaubey A, Malhotra BD. Mediated biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2002;17(6–7):441–56.
  122. Sharma SK, Sehgal N, Kumar A. A quick and simple biostrip technique for detection of lactose. *Biotechnol Lett.* 2002;24(20):1737–9.
  123. Hamid M, Khalil-ur-Rehman. Potential applications of peroxidases. *Food Chem.* 2009;115(4):1177–86.
  124. Ragland BD, Konrad RJ, Chaffin C, Robinson A, Hardy RW. Assay in Diabetic Patients: Effect of Glycemic Control. *Clin Chem.* 2000;24(11):1848–51.
  125. Hopfer SM, Makowski GS, Davis EL, Aslanzadeh J. Detection of cystic fibrosis  $\Delta F508$  mutation by anti-double-stranded DNA antibody. *Ann Clin Lab Sci.* 1995;25(6):475–84.
  126. Kawamura O, Sato S, Kajii H, Nagayama S, Ohtani K, Chiba J, et al. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A based on monoclonal antibodies. *Toxicol.* 1989;27(8):887–97.
  127. Tien M, Kirk TK. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. 1988;161(1985):238–49.
  128. Dodson PJ, Evans CS, Harvey PJ, Palmer JM. Production and properties of an extracellular peroxidase from *Coriolus versicolor* which catalyses C $\alpha$ -C $\beta$  cleavage in a lignin model compound. *FEMS Microbiol Lett.* 1987;42(1):17–22.
  129. Durán N, Ferrer I, Rodríguez J. Ligninases from *Chrysonilia sitophila* (TFB-27441 strain). *Appl Biochem Biotechnol.* 1987;16(1):157–67.
  130. Niku-Paavola ML, Karhunen E, Salola P, Raunio V. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochem J.* 1988;254(3):877–84.
  131. Ikehata K, Buchanan ID, Smith DW. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *J Environ Eng Sci.* 2004;3(1):1–19.
  132. Welinder KG. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol.* 1992;2(1):388–93.
  133. Falade AO, Nwodo UU, Iweriebor BC, Green E, Mabinya L V., Okoh AI. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiologyopen.* 2016;6(1):1–14.
  134. GLUMOFF T, HARVEY PJ, MOLINARI S, GOBLE M, FRANK G, PALMER JM, et al. Lignin peroxidase from *Phanerochaete-chrysosporium* Molecular and kinetic characterization of isozymes. *Eur J Biochem.* 1990;187(3):515–20.
  135. Kirk TK, Tien M, Kersten PJ, Mozuch MD, Kalyanaraman B. Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem J.* 1986;236(1):279–87.
  136. Abdel-hamid AM, Solbiati JO, Cann IKO. Chapter One - Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. In: Sima Sariaslani GMG, editor. *Advances in Applied Microbiology.* Academic Press; 2013. p. 1–28.

137. Tien M, Kirk TK, Bulln C, Feell A. Steady-state and Transient-state Kinetic Studies on the Oxidation of 3,4-Dimethoxybenzyl Alcohol Catalyzed by the Ligninase of. *J Biol Chem.* 1986;261(4):1687–93.
138. Arora DS, Gill PK. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzym Microb Technol* 28. 2001;28:602–5.
139. Magalhães DB, Carvalho MEA de, Bon E, Neto JSA, Kling SH. Colorimetric assay for lignin peroxidase activity determination using methylene blue as substrate. *Biotechnol Tech.* 1996;10(4):273–6.
140. Temporiti MEE, Nicola L, Nielsen E, Tosi S. Fungal Enzymes Involved in Plastics Biodegradation. *Microorganisms.* 2022;1180.
141. Brena B, González-Pombo P, Batista-Viera F. Immobilization of Enzymes and Cells. In: *Methods in Molecular Biology Springer Science+Business Media New York*; 2013. p. 15–31.
142. Cao L. *Carrier-bound Immobilized Enzymes.* Wiley-VCH. 2005.
143. Ding S, Cargill AA, Medintz IL, Claussen JC. Increasing the activity of immobilized enzymes with nanoparticle conjugation. *Curr Opin Biotechnol.* 2015;34:242–50.
144. Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech.* 2013;3(1):1–9.
145. Chagas PMB, Torres JA, Silva MC, Corrêa AD. Immobilized soybean hull peroxidase for the oxidation of phenolic compounds in coffee processing wastewater. *Int J Biol Macromol.* 2015;81:568–75.
146. Miletić N, Nastasović A, Loos K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresour Technol.* 2012;115:126–35.
147. Jesionowski T, Zdarta J, Krajewska B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption.* 2014;20(5–6):801–21.
148. Nguyen HH, Kim M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Appl Sci Convergent Technol.* 2017;26(6):157–63.
149. Sheldon RA. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv Synth Catal.* 2007;349(8–9):1289–307.
150. Novick SJ, Rozzell JD. Immobilization of enzymes by covalent attachment. In: *Microbial Enzymes and Biotransformations.* *Meth Biotechnol*; 2005. p. 247–71.
151. Singh RK, Zhang YW, Nguyen NPT, Jeya M, Lee JK. Covalent immobilization of  $\beta$ -1,4-glucosidase from *Agaricus arvensis* onto functionalized silicon oxide nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;89(2):337–44.
152. Fernández-Lorente G, Terreni M, Mateo C, Bastida A, Fernández-Lafuente R, Dalmases P, et al. Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: Enantioselective hydrolysis of a chiral ester by immobilized *Pseudomonas* lipase. *Enzyme Microb Technol.* 2001;28(4–5):389–96.
153. Marrazza G. Piezoelectric biosensors for organophosphate and carbamate pesticides: A review. *Biosensors.* 2014;4(3):301–17.
154. Satar R, Husain Q. Catalyzed degradation of disperse dyes by calcium alginate-pectin entrapped bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase. *J Environ Sci.* 2011;23(7):1135–42.
155. Matto M, Satar R, Husain Q. Application of calcium alginate-starch entrapped bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase for the removal of colored compounds from a textile effluent in batch as well as in continuous reactor. *Appl Biochem Biotechnol.* 2009;158(3):512–23.
156. Velasco-Lozano S, López-Gallego F, Mateos-Díaz JC, Favela-Torres E. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review. *Biocatalysis.* 2015;1(1):166–77.

157. Rehm BHA, Valla S. Bacterial alginates: Biosynthesis and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997;48(3):281–8.
158. Fernando IPS, Lee WW, Han EJ, Ahn G. Alginate-based nanomaterials: Fabrication techniques, properties, and applications. *Chem Eng J.* 2020;391:123823.
159. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci.* 2012;37(1):106–26.
160. George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *J Control Release.* 2006;114(1):1–14.
161. Zhang H, Cheng J, Ao Q. Preparation of alginate-based biomaterials and their applications in biomedicine. *Mar Drugs.* 2021;19(5):1–24.
162. Ahmad Raus R, Wan Nawawi WMF, Nasaruddin RR. Alginate and alginate composites for biomedical applications. *Asian J Pharm Sci.* 2021;16(3):280–306.
163. Emami Z, Ehsani M, Zandi M, Foudazi R. Controlling alginate oxidation conditions for making alginate-gelatin hydrogels. *Carbohydr Polym.* 2018;198(March):509–17.
164. Grant G, Morris E, Rees D, Smith P, Thom D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Lett.* 1973;32(1):195–8.
165. Draget KI, Skjåk-Bræk G, Smidsrød O. Alginate based new materials. *Int J Biol Macromol.* 1997;21(1–2):47–55.
166. Yang JS, Xie YJ, He W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydr Polym.* 2011;84(1):33–9.
167. Laurienzo P, Malinconico M, Motta A, Vicinanza A. Synthesis and characterization of a novel alginate-poly(ethylene glycol) graft copolymer. *Carbohydr Polym.* 2005;62(3):274–82.
168. Alban S, Schauerte A, Franz G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. *Carbohydr Polym.* 2002;47(3):267–76.
169. Tang S, Zhao Y, Wang H, Wang Y, Zhu H, Chen Y, et al. Preparation of the sodium alginate-g-(polyacrylic acid-co-allyltrimethylammonium chloride) polyampholytic superabsorbent polymer and its dye adsorption property. *Mar Drugs.* 2018;16(12):476.
170. Leonard M, De Boisseson MR, Hubert P, Dalençon F, Dellacherie E. Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties. *J Control Release.* 2004;98(3):395–405.
171. Carre M-C, Delestre C, Hubert P, Dellacherie E. Covalent Coupling of a Short Polyether on Sodium Alginate: Synthesis and Characterization of the Resulting Amphiphilic Derivative. *Carbohydr Polym.* 1991;16:367–79.
172. Galant C, Kjøniksen AL, Nguyen GTM, Knudsen KD, Nyström B. Altering associations in aqueous solutions of a hydrophobically modified alginate in the presence of  $\beta$ -cyclodextrin monomers. *J Phys Chem B.* 2006;110(1):190–5.
173. Puscaselu RG, Lobiuc A, Dimian M, Covasa M. Alginate: From food industry to biomedical applications and management of metabolic disorders. *Polymers (Basel).* 2020;12:2417.
174. Zhang H, Fu Y, Xu Y, Niu F, Li Z, Ba C, et al. One-step assembly of zein/caseinate/alginate nanoparticles for encapsulation and improved bioaccessibility of propolis. *Food Funct.* 2019;10(2):635–45.
175. Aderibigbe BA, Buyana B. Alginate in wound dressings. *Pharmaceutics.* 2018;10(2):42.
176. Hariyadi DM, Islam N. Current status of alginate in drug delivery. *Adv Pharmacol Pharm Sci.* 2020;2020:1–16.
177. Sahoo DR, Biswal T. Alginate and its application to tissue engineering. *SN Appl Sci.* 2021;3(30):1–19.
178. Sun J, Tan H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials (Basel).* 2013;6(4):1285–309.
179. Miletić N, Rohandi R, Vuković Z, Nastasović A, Loos K. Surface modification of

- macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins for improved *Candida antarctica* lipase B immobilization. *React Funct Polym.* 2009;69(1):68–75.
180. Miletić N, Vuković Z, Nastasović A, Loos K. Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins-Versatile immobilization supports for biocatalysts. *J Mol Catal B Enzym.* 2009;56(4):196–201.
  181. Hernandez K, Garcia-Galan C, Fernandez-Lafuente R. Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads. *Enzyme Microb Technol.* 2011;49(1):72–8.
  182. Okay O. Macroporous copolymer networks. Vol. 25, *Progress in Polymer Science.* 2000. 711–779 p.
  183. Pantić N, Spasojević M, Stojanović Ž, Veljović Đ, Krstić J, Marija A. Immobilization of Horseradish Peroxidase on Macroporous Glycidyl - Based Copolymers with Different Surface Characteristics for the Removal of Phenol. *J Polym Environ.* 2022;30(7):1–16.
  184. Milosavić N, Prodanović R, Veličković D, Dimitrijević A. Macroporous Poly(GMA-co-EGDMA) for Enzyme Stabilization. In: *Enzyme Stabilization and Immobilization. Methods in molecular biology;* 2017. p. 139–47.
  185. Prodanović R, Jovanović S, Vujčić Z. Immobilization of invertase on a new type of macroporous glycidyl methacrylate. *Biotechnol Lett.* 2001;23(14):1171–4.
  186. 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;34:803–10.
  187. Pramparo L, Stüber F, Font J, Fortuny A, Fabregat A, Bengoa C. Immobilisation of horseradish peroxidase on Eupergit®C for the enzymatic elimination of phenol. *J Hazard Mater.* 2010;177(1–3):990–1000.
  188. Horak D, Svec F, Ilavsky M, Bleha M, Baldrian J, Kalal J. The effect of polymerization conditions on the porosity and mechanical properties of macroporous suspension copolymers from glycidylmethacrylate-ethylenedimethacrylate. *Die Angew Makromol Chemie.* 1981;95(1455):117–27.
  189. Jovanovic SM, Nastasovic A, Jovanovic NN, Jeremic K. Targeted porous structure of macroporous copolymers based on glycidyl methacrylate. *Mater Sci Forum.* 1996;214:155–62.
  190. Zucca P, Sanjust E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. *Molecules.* 2014;19(9):14139–94.
  191. Tian G, Han G, Wang F, Liang J. Sepiolite Nanomaterials: Structure, properties and functional applications. In: *Nanomaterials from Clay Minerals.* Elsevier Inc.; 2019. p. 135–201.
  192. Mortazavi S, Aghaei H. Make proper surfaces for immobilization of enzymes: Immobilization of lipase and  $\alpha$ -amylase on modified Na-sepiolite. *Int J Biol Macromol.* 2020;164:1–12.
  193. Saraydın D, Öztıp HN, Hepokur C. Nanocomposite smart hydrogel based on sepiolite nanochannels/N-isopropyl acrylamide/itaconic acid/acrylamide for invertase immobilization. *Polym Technol Mater.* 2020;00(00):1–12.
  194. Turhan Y, Turan P, Doğan M, Alkan M, Namli H, Demirbaş Ö. Characterization and adsorption properties of chemically modified sepiolite. *Ind Eng Chem Res.* 2008;47(6):1883–95.
  195. Darder M, Lopez-Blanco M, Aranda P, Aznar AJ, Bravo J, Ruiz-Hitzky E. Microfibrillar Chitosan - Sepiolite Nanocomposites. *Chem Mater.* 2006;18:1602–10.
  196. Roig MG, Estevez FB, Velasco FG, Juan M. Evaluation of the Main Factors Determining the Mode of action of Immobilized Enzymes. In: *Biochemical Education.* 1987. p. 33–41.
  197. Ali Khan A, Alzohairy MA. Recent advances and applications of immobilized enzyme



- technologies: A review. Vol. 5, Research Journal of Biological Sciences. 2010. p. 565–75.
198. Nisha S, Arun Karthick S, Gobi N. A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. *Che Sci Rev Lett*. 2012;1(3):148–55.
  199. Sirisha VL, Jain A, Jain A. Enzyme immobilization: An overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. 1st ed. Vol. 79, *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier Inc.; 2016. 179–211 p.
  200. Ashar A, Iqbal M, Bhatti IA, Ahmad MZ, Qureshi K, Nisar J, et al. Synthesis, characterization and photocatalytic activity of ZnO flower and pseudo-sphere: Nonylphenol ethoxylate degradation under UV and solar irradiation. *J Alloys Compd*. 2016;678:126–36.
  201. Bhatti HN, Safa Y, Yakout SM, Shair OH, Iqbal M, Nazir A. Efficient removal of dyes using carboxymethyl cellulose/alginate/polyvinyl alcohol/rice husk composite: Adsorption/desorption, kinetics and recycling studies. *Int J Biol Macromol*. 2020;150:861–70.
  202. Ghezali S, Mahdad-Benzerdjeb A, Ameri M, Bouyakoub AZ. Adsorption of 2,4,6-trichlorophenol on bentonite modified with benzyltrimethyltetradecylammonium chloride. *Chem Int*. 2019;4(1):24–32.
  203. Iqbal M, Bhatti IA. Gamma radiation/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of a nonylphenol ethoxylates: Degradation, cytotoxicity, and mutagenicity evaluation. *J Hazard Mater*. 2015;299:351–60.
  204. Jennifer EC, Ifedi OP. Modification of natural bentonite clay using cetyl trimethylammonium bromide and its adsorption capability on some petrochemical wastes. *Chem Int*. 2019;5(4):269–73.
  205. Shafique A, Bhatti IA, Ashar A, Mohsin M, Ahmad SA, Nisar J, et al. FeVO<sub>4</sub> nanoparticles synthesis, characterization and photocatalytic activity evaluation for the degradation of 2-chlorophenol. *Desalin Water Treat*. 2020;187:399–409.
  206. Ukpaka C. BTX degradation: the concept of microbial integration. *Chem Int*. 2016;3(8):8–18.
  207. Agathos SN, Junghanns C, Nair R, Parra R, Jaouani A, Demarche P. Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship. *J Biotechnol*. 2010;150:57–57.
  208. Feng W, Taylor KE, Biswas N, Bewtra JK. Phenolic precipitates from soybean peroxidase-catalyzed wastewater treatment: Concentrated waste serves to concentrate its progenitor. *J Hazardous, Toxic, Radioact Waste*. 2016;20(2):1–8.
  209. Golunski SM, Scapini T, Modkovski TA, Marques CT, Camargo AF, Preczeski KP, et al. Commercial and noncommercial peroxidases activity under ultrasound and microwave treatment: A pretreatment to improve wastewater treatment. *J Braz Chem Soc*. 2017;28(10):1890–5.
  210. Kumar V, Misra N, Goel NK, Thakar R, Gupta J, Varshney L. A horseradish peroxidase immobilized radiation grafted polymer matrix: A biocatalytic system for dye waste water treatment. *RSC Adv*. 2016;6(4):2974–81.
  211. Cheng W, Harper WF. Chemical kinetics and interactions involved in horseradish peroxidase-mediated oxidative polymerization of phenolic compounds. *Enzyme Microb Technol*. 2012;50(3):204–8.
  212. Colosi LM, Huang Q, Weber WJ. Quantitative structure-activity relationship based quantification of the impacts of enzyme-substrate binding on rates of peroxidase-mediated reactions of estrogenic phenolic chemicals. *J Am Chem Soc*. 2006;128(12):4041–7.
  213. Caza N, Bewtra JK, Biswas N, Taylor KE. Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. *Water Res*. 1999;33(13):3012–8.

214. Kalaiarasan E, Palvannan T. Removal of phenols from acidic environment by horseradish peroxidase (HRP): Aqueous thermostabilization of HRP by polysaccharide additives. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 2014;45(2):625–34.
215. Chiong T, Lau SY, Khor EH, Danquah MK. Peroxidase extraction from jicama skin peels for phenol removal. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 2016;36(1):1–8.
216. Chang Q, Jiang G, Tang H, Li N, Huang J, Wu L. Enzymatic removal of chlorophenols using horseradish peroxidase immobilized on superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/graphene oxide nanocomposite. *Chinese J Catal.* 2015;36(7):961–8.
217. Kurnik K, Treder K, Skorupa-Kłaput M, Tretyn A, Tyburski J. Removal of Phenol from Synthetic and Industrial Wastewater by Potato Pulp Peroxidases. *Water Air Soil Pollut.* 2015;226(8):254.
218. Wang S, Fang H, Yi X, Xu Z, Xie X, Tang Q, et al. Oxidative removal of phenol by HRP-immobilized beads and its environmental toxicology assessment. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2016;130:234–9.
219. Zhang Y, Tsitkov S, Hess H. Proximity does not contribute to activity enhancement in the glucose oxidase-horseradish peroxidase cascade. *Nat Commun.* 2016;7:1–9.
220. Milovanović A, Božić N, Vujčić Z. Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads. *Food Chem.* 2007;104(1):81–6.
221. Vujčić Z, Miloradović Z, Milovanović A, Božić N. Cell wall invertase immobilisation within gelatin gel. *Food Chem.* 2011;126(1):236–40.
222. Li Y, Wang Z, Xu X, Jin L. A Ca-alginate particle co-immobilized with *Phanerochaete chrysosporium* cells and the combined cross-linked enzyme aggregates from *Trametes versicolor*. *Bioresour Technol.* 2015;198:464–9.
223. Shaheen R, Asgher M, Hussain F, Bhatti HN. Immobilized lignin peroxidase from *Ganoderma lucidum* IBL-05 with improved dye decolorization and cytotoxicity reduction properties. *Int J Biol Macromol.* 2017;103:57–64.
224. Sofia P, Asgher M, Shahid M, Randhawa MA. Chitosan beads immobilized *Schizophyllum commune* IBL-06 lignin peroxidase with novel thermo stability, catalytic and dye removal properties. *J Anim Plant Sci.* 2016;26(5):1451–63.
225. Husain Q. Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: A review. *Crit Rev Biotechnol.* 2006;26(4):201–21.
226. Knezevic Z, Milosavic N, Bezbradica D. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment. *Biochem Eng J.* 2006;30:269–78.
227. Milosavić N, Prodanović R, Jovanović S, Vujčić Z. Immobilization of glucoamylase via its carbohydrate moiety on macroporous poly(GMA-co-EGDMA). *Enzyme Microb Technol.* 2007;40(5):1422–6.
228. Qiu H, Lu L, Huang X, Zhang Z, Qu Y. Immobilization of horseradish peroxidase on nanoporous copper and its potential applications. *Bioresour Technol.* 2010;101(24):9415–20.
229. Chouyyok W, Panpranot J, Thanachayanant C, Prichanont S. Effects of pH and pore characters of mesoporous silicas on horseradish peroxidase immobilization. *J Mol Catal B Enzym.* 2009;56(4):246–52.
230. Ferreira L, Ramos MA, Dordick JS, Gil MH. Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg). *J Mol Catal B Enzym.* 2003;21(4–6):189–99.
231. Fishman A, Levy I, Cogan U, Shoseyov O. Stabilization of horseradish peroxidase in aqueous-organic media by immobilization onto cellulose using a cellulose-binding-domain. *J Mol Catal B Enzym.* 2002;18(1–3):121–31.

232. Takahashi H, Li B, Sasaki T, Miyazaki C, Kajino T, Inagaki S. Immobilized enzymes in ordered mesoporous silica materials and improvement of their stability and catalytic activity in an organic solvent. *Microporous Mesoporous Mater.* 2001;44–45:755–62.
233. Fernandes KF, Lima CS, Lopes FM, Collins CH. Properties of horseradish peroxidase immobilised onto polyaniline. *Process Biochem.* 2004;39(8):957–62.
234. Patel AC, Li S, Yuan JM, Wei Y. In situ encapsulation of horseradish peroxidase in electrospun porous silica fibers for potential biosensor applications. *Nano Lett.* 2006;6(5):1042–6.
235. Liu W, Wang WC, Li HS, Zhou X. Immobilization of horseradish peroxidase on silane-modified ceramics and their properties: Potential for oily wastewater treatment. *Water Sci Technol.* 2011;63(8):1621–8.
236. Alshawafi WM, Aldahri M, Almulaiky YQ, Salah N, Moselhy SS, Ibrahim IH, et al. Immobilization of horseradish peroxidase on PMMA nanofibers incorporated with nanodiamond. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 2018;46(sup3):S973–81.
237. Wu J, Taylor KE, Bewtra JK, Biswas N. Optimization of the reaction conditions for enzymatic removal of phenol from wastewater in the presence of polyethylene glycol. *Water Res.* 1993;27(12):1701–6.
238. Ghafari M, Cui Y, Alali A, Atkinson JD. Phenol adsorption and desorption with physically and chemically tailored porous polymers: Mechanistic variability associated with hyper-cross-linking and amination. *J Hazard Mater.* 2019;361(August 2018):162–8.
239. Temoçin Z, İnal M, Gökgöz M, Yiğitoğlu M. Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun poly(vinyl alcohol)–polyacrylamide blend nanofiber membrane and its use in the conversion of phenol. *Polym Bull.* 2018;75(5):1843–65.
240. Prodanović RM, Simić MB, Vujčić ZM. Immobilization of periodate oxidized invertase by adsorption on sepiolite. *J Serbian Chem Soc.* 2003;68(11):819–24.
241. öztürk H, Pollet E, Phalip V, Güvenilir Y, Avérous L. Nanoclays for lipase immobilization: Biocatalyst characterization and activity in polyester synthesis. *Polymers (Basel).* 2016;8(12):1–17.
242. Oztop HN, Hepokur C, Saraydin D. Acrylamide – sepiolite based composite hydrogels for immobilization of invertase. *J Food Sci.* 2009;74(7):N45–9.
243. Torabi SF, Khajeh K, Ghasempur S, Ghaemi N, Siadat SOR. Covalent attachment of cholesterol oxidase and horseradish peroxidase on perlite through silanization: Activity, stability and co-immobilization. *J Biotechnol.* 2007;131(2):111–20.
244. Cengiz S, Çavaş L, Yurdakoç K. Bentonite and sepiolite as supporting media: Immobilization of catalase. *Appl Clay Sci.* 2012;65–66:114–20.
245. Argaman O, Ben-Barak Zelas Z, Fishman A, Rytwo G, Radian A. Immobilization of aldehyde dehydrogenase on montmorillonite using polyethyleneimine as a stabilization and bridging agent. *Appl Clay Sci.* 2021;212:106216.

## BIOGRAFIJA

**Nevena Surudžić** (rođ. Pantić) je rođena 5. maja 1992. godine u Valjevu, gde je i završila osnovnu školu. Maturirala je kao učenik Valjevske gimnazije. Osnovne akademske studije završila je na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu 2015. godine na smeru Hemija, sa prosečnom ocenom 8,65. Odbranom diplomskog rada pod nazivom „Modifikacije alginata fenolnim jedinjenjima u cilju dobijanja hidrogelova“ stekla je zvanje diplomiranog hemičara. Master studije je završila 2016. godine takođe na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu na smeru Biohemija sa prosečnom ocenom 9,40. Master rad pod nazivom „Hemijska modifikacija alginata fenolnim jedinjenjima perjodatnom oksidacijom za dobijanje hidrogelova“ je, kao i diplomski rad, urađen pod stručnim nadzorom dr Radivoja Prodanović, redovnog profesora Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta. U oktobru 2016. godine upisala je doktorske studije na istom fakultetu na smeru Biohemija kod mentora redovnog profesora Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta dr Natalije Polović i višeg naučnog saradnika Univerziteta u Beogradu – Instituta za multidisciplinarna istraživanja dr Olivere Prodanović.

Na Univerzitetu u Beogradu – Institutu za multidisciplinarna istraživanja se od 2016. godine usavršavala iz oblasti imobilizacije enzima na različitim tipovima nosača, kao što su makroporozni kopolimeri različite veličine pora, hemijski modifikovani prirodni polisaharidi i neorganski glineni nosači. Radila je i na optimizaciji uslova za uklanjanje fenola iz otpadnih voda i degradaciju tekstilnih boja korišćenjem imobilizovanih enzima.

Zaposlena je kao istraživač-saradnik na Odseku za nauku o živim sistemima Univerziteta u Beogradu – Instituta za multidisciplinarna istraživanja. Takođe je i istraživač pri Centru za zelene tehnologije (centar izuzetnih vrednosti) Univerziteta u Beogradu – Instituta za multidisciplinarna istraživanja. Do sada je bila angažovana na projektu br. 173017 finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom: „Ispitivanja odnosa struktura-funkcija u ćelijskom zidu biljaka enzimskim inženjeringom“ pod rukovodstvom dr Ksenije Radotić Hadži-Manić.

Doktorand ima prijavljenu temu doktorske disertacije pod nazivom: „Uklanjanje fenola i tekstilnih boja iz otpadnih voda imobilizovanim peroksidazama iz rena (*Armoracia rusticana*) i gljive bele truleži (*Phanerochaete chrysosporium*)“ na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskim fakultetu. Veće naučnih oblasti prirodnih nauka na Univerzitetu u Beogradu, donelo je odluku o saglasnosti na predlog date teme doktorske disertacije.

Prilog 1.

## IZJAVA O AUTORSTVU

Ime i prezime autora: Nevena M. Surudžić (rođ. Pantić)

Broj indeksa: DB02/2016

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

„Uklanjanje fenola i tekstilnih boja iz otpadnih voda imobilizovanim peroksidazama iz rena (*Armoracia rusticana*) i gljive bele truleži (*Phanerochaete chrysosporium*)“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini i u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni;
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 15.4.2024.



Prilog 2.

**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE  
DOKTORSKOG RADA**

Ime i prezime autora: Nevena M. Surudžić (rođ. Pantić)

Broj indeksa: DB02/2016

Studijski program: Doktor biohemijskih nauka

Naslov rada: „Uklanjanje fenola i tekstilnih boja iz otpadnih voda imobilizovanim peroksidazama iz rena (*Armoracia rusticana*) i gljive bele truleži (*Phanerochaete chrysosporium*)“

Mentori: dr Natalija Polović, redovni profesor Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta i dr Olivera Prodanović, viši naučni saradnik Univerziteta u Beogradu – Instituta za multidisciplinarna istraživanja

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

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

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

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 15.4.2024.

  
\_\_\_\_\_

Prilog 3.

### IZJAVA O KORIŠĆENJU

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

„Uklanjanje fenola i tekstilnih boja iz otpadnih voda imobilizovanim peroksidazama iz rena (*Armoracia rusticana*) i gljive bele truleži (*Phanerochaete chrysosporium*)“, koja je moje autorsko delo.

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

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 15.4.2024.

