



Zavod za zaštitu prirode Crne Gore



Ministarstvo održivog razvoja i turizma

NAUČNI SKUP SA MEĐUNARODNIM UČEŠĆEM | INTERNATIONAL CONFERENCE



ZAŠTITA PRIRODE U XXI VIJEKU

NATURE PROTECTION IN XXIST CENTURY

ZBORNIK REFERATA, REZIMEA REFERATA I POSTER PREZENTACIJA (KNJIGA **BR 1)**

Radovi su objavljeni u obliku dobijenom od autora



PROCEEDINGS OF THE CONFERENCE (BOOK **No 1)**

Articles published in the Proceedings are given with the content received from the authors

20 – 23 Septembar 2011.
Žabljak, Crna Gora / Montenegro

GENERALNI POKROVITELJ

**Ministarstvo održivog razvoja i turizma, Vlada Crne Gore
Ministar Predrag Sekulić**

ORGANIZATOR

Zavod za zaštitu prirode Crne Gore

REDAKCIONI ODBOR

Dr Zlatko Bulić, direktor Zavoda za zaštitu prirode Crne Gore

Akademik Vukić Pulević, DANU

Prof. dr Sreten Mandić, Institut za biologiju mora, Kotor

Mr Luka Mitrović, direktor Hidrometeorološkog zavoda Crne Gore

Mr Vasilije Bušković, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore

Mr Ivana Vojinović, Ministarstvo održivog razvoja i turizma

Dr Dragan Roganović, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore

Dr Gojko Nikolić, Filozofski fakultet Nikšić – Odsjek za Geografiju

Kompjuterski slog

Milica Jovanović, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore

ŠTAMPA

AP Print, Podgorica

TIRAŽ

250 komada

ORGANIZACIONI ODBOR

PREDSJEDNIK

Dr Zlatko Bulić, direktor Zavoda za zaštitu prirode Crne Gore

ČLANOVI:

Mr Ivana Vojinović, pomoćnik Ministra održivog razvoja i turizma
Dr Aleksandar Joksimović, direktor Instituta za biologiju mora
Mr Luka Mitrović, direktor Hidrometeorološkog zavoda Crne Gore
Daliborka Pejović, direktorica Agencije za zaštitu životne sredine
Rade Gregović, direktor JP „Nacionalni parkovi Crne Gore“
Branko Žugić, direktor Geološkog zavoda Crne Gore
Rajko Barović, direktor JP „Morsko dobro“
Nada Medenica, direktor JU „CETI“, Podgorica
Prof. dr Vladimir Pešić, Šef odsjeka za biologiju – PMF, Podgorica
Ondrej Vizi, direktor Prirodnačkog muzeja Crne Gore
Zoran Janković, direktor Uprave za vode
Tomo Pajović, direktor NP „Durmitor“
Mr Darko Brajušković, direktor NP „Biogradska gora“
Mr Zoran Mrdak, direktor NP „Skadarsko jezero“
Baćko Uskoković, direktor NP „Lovćen“
Dr Dragan Roganović, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore
Mr Vasilije Bušković, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore
Dr Vesna Mačić, Institut za biologiju mora Kotor
Dr Ruža Čirović, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore
Mr Sead Hadžiablahović, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore
Dr Goran Barović, Filozofski fakultet Nikšić – Odsjek za Geografiju
Dr Gojko Nikolić, Filozofski fakultet Nikšić – Odsjek za Geografiju
Mr Gordana Kasom, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore
Milenko Damjanović, direktor Centra za savremenu umjetnost Crne Gore
Miroje Džabasan, direktor Centra za kulturu, Žabljak

POČASNI ODBOR

ČLANOVI:

Prof. dr Predrag Miranović, rektor UCG
Akademik Perko Vukotić, CANU
Akademik Božidar Nikolić, DANU

Akademik Milorad Mijušković, CANU

Akademik Branko Radojičić, DANU
Akademik Ljubomir Berberović, ANUBiH, Sarajevo i CANU
Podgorica

Akademik Midhat Ušćuplić, ANUBiH

Slavoljub Stijepović, Ministar prosvjete i sporta
Dr Sonja Vlahović, Ministar nauke
Tarzan Milošević, Ministar poljoprivrede i ruralnog razvoja,
Branislav Mićunović, Ministar kulture i medija,
Branimir Gvozdenović, Podgorica,
Predrag Nenezić, Podgorica
Dr Miodrag Gomilanović, Podgorica
Predrag Jelušić, direktor HTP „Primorje“ Tivat
Prof. dr Blagoje Cerović, dekan, Filozofski fakultet, Nikšić
Prof. dr Radovan Bakić, Filozofski fakultet, Nikšić
Dr Dušan Dragović, naučni savjetnik, Podgorica
Dr Vasilije Radulović, naučni savjetnik
Prof. dr Mihailo Burić, Filozofski fakultet Nikšić
Prof. dr Slobodan Kasalica, Filozofski fakultet, Nikšić
Ana Mišurović, JU „CETI“, Podgorica
Dr Đordije Drecun, Podgorica
Mr Salija Adrović, srednjo-školski centar Berane
Zoran Tomić, sekretar Ministarstva održivog razvoja i turizma
Daniel Vincek, Botanička bašta planinske flore Crne Gore, Kolašin
Isailo Šljivančanin, predsjednik opštine Žabljak

NAUČNI ODBOR

PREDSJEDNIK

Akademik Vukić Pulević

ČLANOVI:

Akademik Gordan Karaman – CANU, Podgorica
Akademik Vladimir Stevanović, SANU - Beograd
Akademik Sulejman Redžić, ANUBiH - Sarajevo
Akademik Vlado Matevski, PMF - Skoplje
Prof. dr Sreten Mandić, Institut za biologiju mora Kotor
Prof. dr Miljan Radović, Beograd
Prof. dr Milutin Lješević, Filozofski fakultet, Nikšić
Prof. dr Ivica Radović, Beograd
Dr Deni Porej, WWF
Dr Boris Erg, IUCN
Davorin Marković, Državni zavod za zaštitu prirode Hrvatske, Zagreb
Prof. dr Jasenka Topić, PMF, Zagreb
Prof. dr Nenad Stavretović, Zavod za zaštitu prirode Srbije
Prof. dr Ljupče Melovski, PMF - Skoplje
Dr Darij Krajičić, Zavod za zaštitu prirode Slovenije
Dr Boštjan Surina, Prirodoslovni muzej, Rijeka
Dr Biljana Panjković, Zavod za zaštitu prirode Vojvodine
Prof. dr Branislav Glavtović, Seizmološki zavod Crne Gore
Prof. dr Predrag Stanišić, PMF, Univerzitet Crne Gore
Prof. dr Rifat Škrijelj, PMF-Odsjek za biologiju Sarajevo
Dr Zlatko Bulić, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore
Prof. dr Mićko Radulović, Građevinski fakultet Univ. Crne Gore
Prof. dr Milorad Gojković, Institut za biologiju mora Kotor
Prof. dr Zoran Kljajić, Institut za biologiju mora, Kotor
Prof. dr Nenad Vuksanović, Institut za biologiju mora, Kotor
Prof. dr Staniša Ivanović, Filozofski fakultet, Nikšić
Prof. dr Miroslav Doderović, Filozofski fakultet, Nikšić
Mr Dragutin Nedić, Podgorica
Mr Halil Markišić, Rožaje
Prof. dr Milivoje Purić, PMF – Odjek za biologiju UCG
Prof. dr Drago Marić, PMF – Odjek za biologiju UCG
Prof. dr DMITAR Lakušić, PMF – Odsjek za biologiju, Beograd
Prof. dr Vladimir Randelović, PMF, Niš
Prof. dr Marash Rakaj, PMF Skadar, Albanija
Dr Slobodan Vukčević, Podgorica
Prof. dr Natalija Perović, Biotehnički fakultet, Podgorica

SEKRETARIJAT

ČLANOVI:

Mr Nataša Stanišić, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore
Mr Milka Rajković, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore
Vesna Jovović, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore
Mr Rajko Tripić, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore
Mr Sonja Kralj, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore
Jelena Nikčević, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore
Darko Saveljić, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore
Mr Biljana Telebak, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore
Nataša Miličković, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore
Milica Jovanović, Zavod za zaštitu prirode Crne Gore
Mitar Baranin, direktor hotela „Planinka“, Žabljak

GENERALNI SEKRETAR:

Mr Vasilije Bušković

OPTIMIZACIJA USLOVA ZA GLUTARALDEHIDNU IMOBILIZACIJU PEROKSIDAZE IZ SOJE

MILOŠ PROKOPIJEVIĆ¹, OLIVERA PRODANOVIĆ¹, DRAGICA SPASOJEVIĆ¹,
RADIVOJE PRODANOVIĆ², ŽELJKO STOJANOVIĆ³, KSENIJA RADOTIĆ HADŽI-
MANIĆ¹

Rezime

Fenoli se smatraju najvećim zagađivačima otpadnih voda, konstantno prisutni u životnoj sredini i njihovo uklanjanje se može izvesti i enzimskim metodama. Iako je primena enzima, kao što su peroksidaze, bio predmet velikog broja istraživanja, glavni nedostatak i dalje predstavlja visoka cena prečišćenog enzima. Imobilizovani enzimi, sa druge strane, imaju neke prednosti, kao što su povećana stabilnost i lako odvajanje iz reakcionog medijuma, što omogućava višestruku upotrebu. Cilj ovog rada bio je optimizacija uslova za imobilizaciju peroksidaze iz soje na makroporozni glicidil metakrilat aktiviran glutaraldehidom.

Imobilizacija je rađena u malim tubama, mešanjem 1 ml rastvora enzima (0,034-1,25 mg/ml) sa 50 mg matriksa (makroporozni glicidil-metakrilat prethodno sintetisan u našoj laboratoriji) na rotacionoj mešalici (24h na 25°C, 250 rpm). Enzimska aktivnost merena je koristeći pirogalol i vodonik peroksid kao supstrate (13 mM i 10 mM, redom), a reakcioni proizvodi praćeni su merenjem apsorbancije na 420 nm, tokom 3 minuta.

Naši podaci pokazuju da peroksidaza iz soje može uspešno da se imobilizuje na glutaraldehidno aktiviran makroporozni glicidil-metakrilatni nosač i najbolji imobilizat je imao specifičnu aktivnost od 229 U/g nosača.

Ključne reči: peroksidaza iz soje, glicidil-metakrilat, imobilizacija, pirogalol, glutaraldehid.

Abstract

Phenols are considered priority pollutants of wastewaters, persistently present in the environment and its conventional treatment could be overcome using enzymatic methods. Although the application of enzymes, such as peroxidases, has been investigated widely, its main disadvantage is the cost of purified enzymes. Immobilized enzymes, on the other hand, have the advantage of greater stability and easy separation from the reaction medium, which makes them reusable. The aim of this study was to optimize the conditions for soyabean peroxidase glutaraldehyde immobilization technique.

Immobilization was done in small tubes, by mixing 1 ml of enzyme solution (0.034-1.25 mg/ml) with 50 mg of support matrix (macroporous glycidyl methacrylates previously synthesized in our lab) on a rotary shaker (24h at 25°C, 250 rpm). Enzyme activity was measured using pyrogallol and H₂O₂ as substrates (13 mM and 10 mM, respectively), and the reaction products were measured following absorbance at 420 nm, for 3 min using a spectrophotometer.

Our data demonstrate that soyabean peroxidase can be successfully immobilized on macroporous glycidyl methacrylate using glutaraldehyde activation and highest specific activity of immobilized enzyme obtained was 229 U/g of carrier.

Key words: soyabean peroxidase, glycidyl methacrylate, immobilization, pyrogallol, glutaraldehyde.

Uvod

Fenoli predstavljaju ozbiljne zagađivače životne sredine u koju dospevaju pre svega putem otpadnih voda raznih industrijskih postrojenja kao što su rafinerije nafte, industrije smole, plastike, tekstilne industrije itd. Konvencionalno tretiranje ovih otpadnih voda fizičkim i hemijskim tehnikama je efikasno, ali su te metode vrlo kompleksne i skupe. U poslednje vreme, mnoga istraživanja idu u pravcu razvoja mikrobioloških i enzimskih metoda koje su se pokazale kao znatno efikasnije i jeftinije rešenje. Pored toga, enzimska metoda lako se kontroliše, ima male

¹ Institute for Multidisciplinary Research, University of Belgrade, Kneza Visešlava 1, 11030 Belgrade, Serbia, milos.prokopijevic@imsi.rs

² Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12-16, 11000 Belgrade, Serbia, rprodano@chem.bg.ac.rs

³ Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, Njegoševa 12, 11001 Belgrade, Serbia.

energetske zahteve, može se koristiti u širokom opsegu radnih uslova i ostavlja minimalan uticaj na životnu sredinu BÓDALO et al. (2006).

Peroksidaze (oksidoreduktaze, EC 1.11.1.7) katalizuju oksidaciju velikog broja različitih supstrata pomoću vodonik peroksida. Peroksidaza iz ljuspica soje (SHP) pripada klasi III biljne superfamilije peroksidaza zajedno sa peroksidazom iz rena (HRP), ječma (BPI) i kikirikija (PNP) LAKSHMI (2010). Peroksidaze danas imaju široku primenu kao sastavni delovi analitičkih i dijagnostičkih kitova koji se koriste za kvantifikaciju raznih metabolita. Pored toga, neke od novijih primena peroksidaza uključuju tretman otpadnih voda i uklanjanje fenolnih jedinjenja GHAEMMAGHAMI et al. (2010). Peroksidaza iz soje sa vodonik peroksidom katalizuje oksidaciju aromatičnih jedinjenja i proizvodi slobodne radikale, usled čega dolazi do spontanane polimerizacije i nastanka oligomera i polimera velike molekulske mase. Ovi proizvodi precipitiraju zbog niske rastvorljivosti i mogu se lako ukloniti iz sredine BÓDALO et al. (2006).

Međutim, upotreba rastvorne peroksidaze ima nekoliko mana, enzimaska aktivnost može se izgubiti usled inhibicije ili deaktivacije, može doći do koprecipitacije enzima sa nastalim polimerom, odvajanje enzima od reakcione smeše nije ni malo lako i ponovna upotreba već korišćenog enzima je nemoguća BÓDALO et al. (2006). Imobilizacijom enzima na makroporozni nosač dobija se enzim povećane stabilnosti, koji se nakon tretmana lako može odvojiti iz reakcione sredine i ponovo koristiti.

U ovom radu izvršena je optimizacija uslova za imobilizaciju peroksidaze iz soje na glutaraldehidno aktivirani makroporozni nosač glicidil-metakrilat.

Materijal i metode

Materijal

Peroksidaza je izolovana iz ljuski soje koprecipitacijom sa 75% zasićenjem amonijum sulfata i acetonom LIU J. et al. (2007). Ljuske soje dobili smo na poklon od kompanije "Sojaprotein" A.D. (Bečej, Srbija). Polimer glicidil metakrilat sa veličinom pora od 120 nm (EDA 20/12) je sintetisan po publikovanoj proceduri JOVANOVIĆ et al. (1996). Glutaraldehid i pirogalol su proizvodi Sigma-Aldrich (SAD), a amonijum sulfat i natrijum dihidrogen fosfat Lach-Ner (Republika Češka).

Imobilizacija

Isprani i dezaerisani polimer (50,0 mg) je prvo aktiviran 2,5 % glutaraldehidom, 2h na rotacionoj mešalici. Aktivirani polimer inkubiran je sa različitim koncentracijama peroksidaze iz soje (0,034; 0,168; 0,625 i 1,25 mg/ml što odgovara količini od dodatih 0,68; 3,36; 12,5 i 25,0 mg enzima na 1 g suvog polimera) tokom 48h. Nakon toga polimer je ispiran 2 puta sa 100 mM natrijum fosfatnim puferom pH 7,0 i čuvan u istom do upotrebe na temperaturi od 5±3°C.

Enzimaska aktivnost

U 3 ml, 13 mM pirogalola u 100 mM natrijum fosfatnom puferu pH 7,0 dodato je 2 – 10 mg imobilizata. Reakcionoj smesi dodato je 30 µl 0,97 M vodonik peroksida. Tokom 3 minuta u filtriranim alikvotima praćena je promena apsorbancije na 420 nm na spektrofotometru. Merena je i aktivnost rastvorne peroksidaze iz soje a jedna jedinica enzimske aktivnosti [IU] definisana je kao ona količina enzima koja oksiduje 1 µmol pirogalola za 1 minut, na 25°C i pH 7 i računata po formuli:

$$\text{Aktivnost peroksidaze (IU / ml)} = \frac{\Delta A_{420} \times V_{RS} \times df}{\varepsilon \times \Delta t \times V_U}$$

gde su V_{RS} i V_U zapremine reakcione smese odnosno uzorka, ε ekstencioni koeficijent za pirogalol, df faktor razblaženja. Specifična aktivnost imobilizata (IU/g) dobijena je po istom principu samo umesto V_U jednačina je deljena sa masom suvog polimera (g).

Rezultati i diskusija

Koncentracija enzimaska aktivnost izolovane rastvorne peroksidaze iz soje (1 mg/ml) je 426,75 IU/ml. U cilju dobijanja katalizatora povećane stabilnosti i sa mogućnošću višestruke upotrebe, izolovana peroksidaza iz soje imobilizovana je glutaraldehidnom metodom na makroporozni nosač. Imobilizacija na glicidil metakrilat nosač rađena je sa različitim koncentracijama peroksidaze iz soje, u cilju pronalazaženja optimalnog odnosa količine enzima po masi suvog polimera. Korišćene su koncentracije peroksidaze od 0,034; 0,168; 0,625 i 1,25 mg/ml što odgovara količini od 0,68; 3,36; 12,5 i 25,0 mg enzima na 1 g suvog polimera. Dobijeni imobilizati okarakterisani su merenjem specifične aktivnosti kao i prinosa imobilizacije. Vrednost specifične aktivnosti raste sa povećanjem količine dodatog enzima (Tabela 1).

Tabela 1: Zavisnost specične aktivnosti imobilizata [IU/g] od količine dodatog enzima (mg) po gramu suve mase polimera. Table 1: Dependence of specific activity of the immobilized SHP [IU/g] on the amount of added enzyme (mg) per gram of dry polymer.

m _{SHP} (mg)	0,68	3,36	12,5	25,0
Sp [IU/g]	15,2	29,9	81,9	229

Prinos imobilizacije (Y) opada sa rastućom količinom dodatog enzima (Tabela 2), a računat je kao odnos specifične i vezane aktivnosti, izražen u procentima:

$$Y (\%) = \frac{\text{Sp. aktivnost}}{\text{Vezana aktivnost}} \times 100 \%$$

Tabela 2: Zavisnost prinosa imobilizacije [%] od količine dodatog enzima (mg) po gramu suve mase polimera. Table 2: Dependence of yield of immobilization [%] on the amount of added enzyme (mg) per gram of dry polymer.

m _{SHP} (mg)	0,68	3,36	12,5	25,0
Y [%]	8,98	2,30	1,60	2,25

Prinos imobilizacije najveći je pri najmanjoj količini dodate peroksidaze (8,98 %).

Zaključak

Može se zaključiti da smo uspešno imobilizovali peroksidazu iz soje na glutaraldehidno aktiviran makroporozni glicidil metakrilat. Optimizacijom uslova imobilizacije i korišćenjem makroporoznog polimera sa veličinom pora od 120 nm (EDA 20/12) dobijena je visoka specifična aktivnost imobilizata od 229 U/g polimera. Visoka specifična aktivnost imobilizata omogućava primenu imobilizovanog enzima za prečišćavanje fenola iz otpadnih voda i budući eksperimenti u tom pravcu su u planu.

Zahvalnica: Ovaj rad je podržan od strane projekta (br. 173017) Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

Reference

1. BÓDALO, A., GÓMEZ, J.L., GÓMEZ, E., HIDALGO, A.M., GOMEZ, M., YELO, A.M., 2006: Removal of 4-chlorophenol by soybean peroxidase and hydrogen peroxide in a discontinuous reactor. Desalination, V. 195, p. 51-59
2. GHAEMMAGHAMI, F., ALEMZADEH, I., MOTAMED, S., 2010: Seed coat soybean peroxidase: extraction and biocatalytic properties determination. Iranian Journal of Chemical Engineering, V. 7, No. 2.

3. JOVANOVIĆ, S.M., NASTASOVIĆ, A., JOVANOVIĆ, N.N., JEREMIĆ, K., 1996: Targeted porous structure of macroporous copolymers based on glycidyl methacrylate. *Mater. Sci. Forum* V. 214, p. 155-162.
4. LAKSHMI, M.C., RAGHAVARAO, K.S.M.S., 2010: Downstream processing of soy hull peroxidase employing reverse micellar extraction. *Biotechnology and Bioengineering*. V. 15, p. 937-945.
5. LIU, J., LIU, H., ZHANG, Y., QIU, L., SU, F., LI, F., SU, Z., LI, J., 2007: A simple preparation method of crystals of soyabean hull peroxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 74, p. 249-255.