

Srpsko hemijsko društvo
Serbian Chemical Society



50. JUBILARNO
SAVETOVANJE
SRPSKOG HEMIJSKOG
DRUŠTVA

KNJIGA RADOVA

Golden Jubilee Meeting of
the Serbian Chemical Society

Proceedings

Beograd, 14-15. juni 2012.
Belgrade, April 14-15, 2012

CIP - Каталогизacija у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

54(082) (0.034.2)

66(048) (0.034.2)

СРПСКО хемијско друштво (Београд). Саветовање (50 ; 2010 ; НОВИ САД)

Knjiga radova [Elektronski izvor] = Proceedings / XLVIII savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 17-18 april 2010. = 48th Meeting of the Serbian Chemical Society, Novi Sad, April 17-18, 2010 ; [organizator] Srpsko hemijsko društvo = [organized by] Serbian Chemical Society ; [urednici, editors Rade Marković, Goran Bošković, Aleksandar Dekanski]. - Beograd : Srpsko hemijsko društvo, 2010 (Novi Sad : Srpsko hemijsko društvo) . - 1 elektronski optički disk (CD-ROM) : slika, tekst. ; 12 cm

Radovi na srp. i engl. jeziku. - Tiraž 180. - Nasl. sa naslovnog ekrana. - Bibliografija uz većinu radova. - Registar.

ISBN 978-86-7132-037-

1. Српско хемијско друштво (Београд)

а) Хемија – Зборници б) Технологија –Зборници

COBISS. SR-ID 137069324

XL SAVETOVANJE SRPSKOG HEMIJSKOG DRUŠTVA, BEOGRAD 14-15. JUNI 2012.

Knjiga radova

50th Meeting of the Serbian Chemical Society, Belgrade, Serbia, June 14-15, 2012

Proceedings

Izdaje / Published by

Srpsko hemijsko društvo / Serbian Chemical Society

Karnegijeva 4/III, Beograd, Srbija

tel./fax: 011 3370 467; www.shd.org.rs, E-mail: Office@shd.org.rs

Za izdavača / For Publisher

Ivanka POPOVIĆ, predsednik Društva

Urednici / Editors

Živoslav ***TEŠIĆ***

Aleksandar ***DEKANSKI***

Dizajn, slog i kompjuterska obrada teksta / Design, Page Making and Computer Layout

Aleksandar ***DEKANSKI***

Tiraž / Circulation

200 primeraka / 200 Copy

Umnožavanje / Copying

Srpsko hemijsko društvo / Serbian Chemical Society - Karnegijeva 4/III, Beograd, Srbija

ISBN 978-86-7132-049-8

Poređenje četiri metode za imobilizaciju HRP u alginatu radi potencijalne primene u prečišćavanju otpadnih voda

Dragica Spasojević, Miloš Prokopijević, Olivera Prodanović, Ksenija Radotić, Radivoje Prodanović*

*Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu, Kneza Višeslava 1, Beograd,
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Studentski trg 12-16, Beograd

Uvod

Uklanjanje fenola i fenolnih derivata iz spoljašnje sredine predstavlja značajan ekološki problem. Naftna, hemijska i industrija plastičnih masa, samo su neki od izvora otpadnih voda u kojima se nalaze fenol i njegovi derivati. Kao jedan od mogućih načina za uklanjanje ovih toksičnih jedinjenja nameće se njihova enzimaska degradacija. Peroksidaza iz rena (HRP) oksiduje fenole u prisustvu vodonik-peroksida, proizvodeći nestabilne fenoksi radikale, koji onda spontano međusobno reaguju i grade nerastvorne polimere velikih molekulskih masa. Ovi polimeri mogu jednostavno da se uklone iz vode sedimentacijom ili filtracijom.¹

Glavni nedostatak ovog procesa predstavlja inaktivacija enzima. Zbog toga je dosta pažnje usmereno na imobilizaciju HRP u cilju procesovanja velikih količina otpadnih voda. Imobilizacijom enzima prevazilaze se inhibicija krajnjim proizvodom, nemogućnost ponovne upotrebe, nestabilnost, visoka cena i sl.^{2,3}

Mnogi materijali se koriste za imobilizaciju HRP: prirodni i sintetički polimeri, staklene kuglice, jonoizmenjivačke smole i nosači sa magnetnim osobinama.² Alginat se pokazao kao jedan od najpogodnijih polimera za imobilizaciju i mikroenkapsulaciju zahvaljujući svojoj hidrofilnoj prirodi, prisustvu karboksilnih grupa, prirodnom poreklu i stabilnosti pri različitim eksperimentalnim uslovima. Dodatak dvovalentnih katjona (Ca^{2+} , Sr^{2+}) u rastvor natrijum-alginata stimuliše umrežavanje polimernih lanaca i ova gelirajuća osobina koristi se u praksi već mnogo godina. Međutim, usled visoke poroznosti, tokom vremena dolazi do curenja enzima inkapsuliranog u alginat.^{4,5} Da bi se ovo izbeglo razvijaju se različite metode za kovalentnu imobilizaciju HRP.

U ovom radu mi smo poredili nekovalentnu imobilizaciju HRP na nativnom alginatu i kovalentne imobilizacije: nemodifikovane HRP na perjodatno aktiviranom alginatu, zatim aminovane HRP na oksidovanom alginatu i oksidovane HRP na aminovanom alginatu.

Rezultati i diskusija

Kako bi pronašli način da što bolje vežemo HRP za alginat, isprobali smo različite metode modifikacije enzima i polimera i uporedili parametre imobilizacije sa klasičnom imobilizacijom nativnog enzima i polimera. Oksidovanje alginata perjodatom rađeno je po proceduri koju je opisao *Le-Tien et al.*⁶ Jedan deo oksidovanog alginata je dalje aminovan etilendiaminom. Postupak oksidovanja i aminovanja je ponovljen i sa HRP po metodi *Husain et al.*⁷ Koncentracija enzima za imobilizacije je iznosila 0,01 mg/ml alginata. 2% rastvor Na-alginata (w/v) koji je korišćen za prvu imobilizaciju je mešan sa modifikovanim alginatima (2%) u odnosu 1:1, da bi se popravile mehaničke osobine imobilizata. Jonotropnim geliranjem u rastvoru CaCl_2 dobijene su kuglice prosečnog prečnika oko 1,5 mm sa imobilisanim enzimima (slike 1 i 2).

Enzimaska aktivnost određivana je spektrofotometrijski na 420 nm, sa pirogalolom kao supstratom uz dodatak vodonik-peroksida.

Količina enzima 1 U je ona koja katalizuje nastanak 1 mol proizvoda za 1 minut na 25 °C i na pH 7,0. Specifična aktivnost predstavlja odnos aktivnosti enzima po masi imobilizata. Vezana aktivnost data je kao razlika nanete i nevezane aktivnosti. Prinos imobilizacije je količnik specifične aktivnosti imobilizata i vezane aktivnosti po jedinici mase kuglica. Zadržana aktivnost u kuglicama imobilizata merena je nakon 5 dana stajanja na 4 °C uz svakodnevno ispiranje kuglica puferom.



Sl. 1. Izgled kuglica sa imobilizovanim enzimom nakon geliranja



Sl. 2. Izgled aparature za ukapavanje i formiranje kuglica imobilizata

Osnovni parametri enzimske aktivnosti imobilizata prikazani su u tabeli 1. Može se videti da svi modifikovani imobilizati imaju veću vezanu aktivnost i veći procenat zadržane specifične aktivnosti (Sp) nakon 5 dana. Imobilizat kod kog je aminovana HRP kovalentno vezana za oksidovani alginat pokazao je najveću specifičnu i vezanu aktivnost, kao i najveći procenat vezivanja enzima i procenat zadržane specifične aktivnosti. Procenat zadržane specifične aktivnosti kod ovog imobilizata je čak 95,56 % u odnosu na početnu aktivnost, što je od posebnog značaja za kontinuiranu upotrebu. Procenat vezivanja enzima od preko 80 % govori u prilog efikasnom iskorišćenju dodatog enzima i time boljoj ekonomičnosti date metode.

Tabela 1. Osnovni parametri za imobilizate, izračunati na osnovu enzimske aktivnosti

Imobilizat:	Sp /(U/g)	vezana aktivnost U/g	vezivanj, %	prinos imobilizacije, %	Sp posle 5 dana, U/g	zadržana Sp, %
alginat+HRP	0,148	0,803	9,69	18,43	0,063	42,57
oksidov.alginat+HRP	0,130	1,108	9,69	11,73	0,081	62,31
aminovani alginat+oksidov.HRP	0,154	1,726	14,10	8,92	0,074	48,05
oks.alginat+amin.HRP	0,428	5,76	81,38	7,43	0,409	95,56

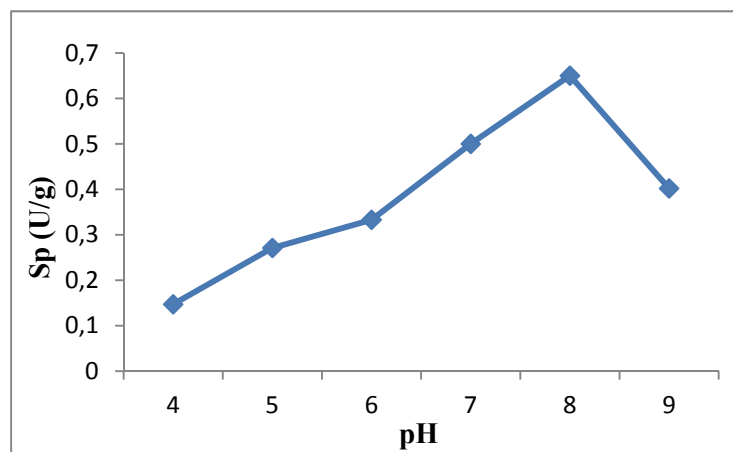
Za najbolji imobilizat – aminovanog enzima na oksidovanom alginatu, odredili smo pH optimum i stabilnost u dioksanu.

pH optimum za naš imobilizat odredili smo koristeći acetatni, HEPES i glicinski pufer za vrednosti pH od 4 do 9 jedinica. Specifična aktivnost na svakom od ovih pH vrednosti prikazana je u tabeli 2.

Tabela 2. Specifična aktivnost imobilizovanog enzima na različitim pH vrednostima

pH	4	5	6	7	8	9
Sp / (U/g)	0,147	0,271	0,333	0,5	0,65	0,402

Sa grafika zavisnosti specifične aktivnosti od pH (slika 3), vidi se da je pH optimum našeg imobilizata na pH 8,0 tj. da naš imobilizat bolje radi u baznijim sredinama u odnosu na nativnu HRP, kojoj je pH optimum 7.⁸



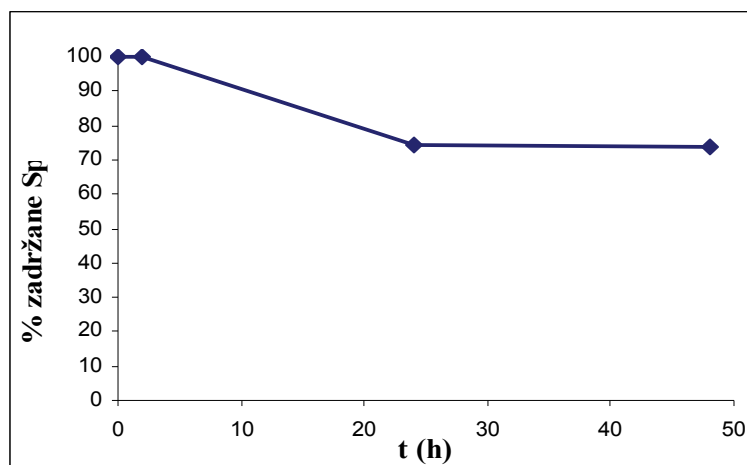
Sl. 3. pH optimum imobilizata

Stabilnost u 80 % dioksanu određena je merenjem specifične aktivnosti imobilizata, nakon inkubacije u ovom organskom rastvaraču, u periodima od 2, 24 i 48 časova.

Tabela 3. Sp imobilizata u 80 % dioksanu

t / h	Sp / (U/g)	zadržana aktivnost, %
0	0,744	100
2	0,743	99,87
24	0,554	74,46
48	0,548	73,66

Vidimo da imobilizovan enzim i nakon 48 časova u organskom rastvaraču zadržava više od 70 % svoje početne aktivnosti. Rastvorna HRP, merena pod istim uslovima, već nakon 2 sata izgubi skoro polovinu početne aktivnosti (zadržana aktivnost je 52,15 %), a nakon 48 časova aktivnost se u potpunosti gubi (zad. aktivnost je 0,15 %).



Sl. 4. Procenat zaostale specifične aktivnosti imobilizata nakon inkubacije u 80 % dioksanu

Zaključak

U ovoj studiji razradili smo jeftinu, jednostavnu i visoko efikasnu metodu za modifikaciju i imobilizaciju HRP na alginatni matriks. Imobilizacijom aminovane HRP na oksidovani alginat dobili smo imobilizat koji pokazuje visoku aktivnost, minimalno curenje i višestruko povećanje procenata vezivanja enzima i zadržane aktivnosti u odnosu na imobilizaciju na nativnom alginatu. Ove osobine predstavljaju dobru osnovu za upotrebu u kontinualnom uklanjanju fenolnih jedinjenja iz vode. Imobilizat je, u odnosu na nativni enzim, pokazao i veću aktivnost u baznoj sredini i mnogo veću aktivnost u dioksanu. Naši budući radovi biće usmereni u pravcu dalje karakterizacije dobijenog imobilizata i pronalaženja optimalnih uslova za rad imobilizovanog enzima, upravo u cilju prečišćavanja otpadnih voda.

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

Comparison of four methods for the immobilization of HRP in alginate for potential application in wastewater treatment

Industrial wastewater often contains toxic phenolic compounds, which have been classified as hazardous pollutants. It has been shown that horseradish peroxidase (HRP) is able to react with phenols in water and form non-soluble compounds that could be easily removed from the aqueous phase. The aim of our work was to compare the four methods for the immobilization of HRP on alginate matrix and to find the immobilisate with the best properties. First, we immobilized HRP on the native and periodate oxidized alginate. Then we modified both the enzyme and the polymer and tried immobilizations of aminated HRP on the oxidized alginate and oxidized HRP on the aminated alginate. Immobilizate of aminated enzyme on oxidized matrix showed the best characteristics and potential for application in the continuous removal of phenol from wastewater.

Acknowledgment: This work was supported by a grant (No. 173017) from the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia

Literatura

1. C. R. Ispas, M. T. Ravalli, A. Steere, S. Andreescu, *Water Research*, **44** (2010) 1961.
2. Alemzadeh, S. Nejati, M. Vossoughi, *Engineering Letters*, **17** (2009) 4.
3. R. Satar, M. Matto, Q. Husain, *J. of Scientific & Industrial Research*, **67** (2008) 609.
4. M. Matto, Q. Husain, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **57** (2009) 164.
5. U. J. Trivedi, A. S. Bassi, J. J. Zhu, *The Canadian Journal of Chemical Engineering* **84** (2006) 239.
6. C. Le-Tien, M. Millette, M. Lacroix, M.-A. Mateescu, *Biotechnology and Applied Biochemistry* **38** (2004) 1.
7. S. Husain, F. Jafri, M. Saleemuddin, *Biochemistry and molecular Biology International* **40** (1996) 1.
8. Alemzadeh, S. Nejati, *Journal of Hazardous Materials*, **166** (2009) 1082.