

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 - Каталогizacija u publikaciji
Nародна 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 imobilizacije peroksidaze iz soje na različite glicidil metakrilat polimere

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

Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu, Kneza Visešlava 1, Beograd;

**Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Studentski trg 12-16, Beograd;*

***Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Njegoševa 12, Beograd*

Uvod

Peroksidaze (oksidoreduktaze, EC 1.11.1.7) katalizuju oksidaciju velikog broja različitih supstrata pomoću vodonik-peroksida, široko su rasprostranjene u biljnim, mikrobnim i životinjskim tkivima a na osnovu homologije mogu se klasifikovati u tri grupe (klasa I, klasa II i klasa III).¹ Peroksidaza iz ljuspica soje (Soybean Hull Peroxidase - SHP) pripada klasi III biljne superfamilije peroksidaza zajedno sa peroksidazom iz rena (HRP), ječma (BPI) i kikirikija (PNP). SHP je glikoprotein sastavljen od 326 aminokiselina molekulske mase od ~ 37 kDa.² Široka primena peroksidaze iz rena (HRP) ograničena je visokom cenom njene komercijalizacije i dovela je do potrage za alternativnim jeftinijim izvorima biljnih peroksidaza koje bi zamenile HRP.¹ Ljuske soje su jeftin poljoprivredni otpadni proizvod koji se koristi u ishrani životinja kao izvor vlakana u cilju poboljšanja nutritivne vrednosti. Peroksidaza izolovana iz ljuski soje stoga nudi jeftin izvor velike količine sirovog enzima koji se može koristiti u razne svrhe. Zahvaljujući tome, SHP ima potencijalno upotrebu kao biokatalizator i biosenzor, kao i primenu u nefiziološkim procesima koji uključuju tretman otpadnih voda, uklanjanje fenolnih jedinjenja i sinteza fenolnih smola. Enzim se takođe može koristiti za proizvodnju nekih hemikalija, transformaciju lekova, degradaciju aromatičnih jedinjenja, kao sastavni deo analitičkih, dijagnostičkih kitova i imunoeseja koji se koriste za kvantifikaciju raznih metabolita.²

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.³ Poznato je da ovi zagađivači nisu biorazgradivi i da imaju kancerogeno, mutageno i akutno toksično dejstvo. Metode uklanjanja fenola enzimskim putem donose brojne prednosti u odnosu na konvencionalne biološke i fizikohemijske tehike. Biološke metode najčešće koriste mulj za smanjenje organskog sadržaja otpadnih voda, ali nisu efikasne u smanjenju toksičnog dejstva zagađivača. Fizičko-hemijske metode pokazuju malu selektivnost prema ciljanim zagađivačima i efikasnost opada sa povećanjem njihove koncentracije. Procesi hemijske oksidacije su skupi za tretman visokog nivoa zagađenja, ali su efikasni u slučaju razblaženih otpadnih voda. Nasuprot tome, enzimске metode deluju sa visokom specifičnošću, lako se kontrolišu, jeftine su i veoma efikasne za uklanjanje ciljnih jedinjenja ostavljajući minimalan uticaj na životnu sredinu a u poređenju sa mikroorganizmima, enzimi su lakši za rukovanje i skladištenje.⁴

Enzimski tretman uklanjanja fenola iz otpadnih voda pomoću peroksidaze i vodonik-peroksida predložen je početkom 80-ih godina prošlog veka kao veoma efikasan i selektivan metod.⁵ Peroksidaza iz soje sa vodonik-peroksidom katalizuje oksidaciju aromatičnih jedinjenja i proizvodi slobodne radikale, usled čega dolazi do spontane polimerizacije i nastanka oligomera i polimera velike molekulske mase. Ovi proizvodi precipitiraju zbog niske rastvorljivosti i mogu se lako ukloniti iz sredine.³ Međutim, upotreba rastvorne peroksidaze ima nekoliko mana, enzimska 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.³ Enzimi se mogu imobilizovati na različite nosače stičući time neke prednosti u odnosu na rastvorni oblik, uključujući povećanje stabilnosti, mogućnost ponovne upotrebe, kontrolu formiranja proizvoda i lako odvajanje iz reakcionog medijuma sa mogućnošću ponovne upotrebe.⁶ Kada je potrebno obraditi velike količine otpadnih voda, najbolje rezultate daju medijumi koji sadrže imobilizovane enzime.⁷

U ovom radu izvršeno je poređenje imobilizacije peroksidaze iz soje na različite glutaraldehidno aktivirane makroporozne nosače na bazi glicidilmetakrilata. Poređene su specifične aktivnosti i prinosi imobilizata SHP vezanih za polimere različitih dijametara pora kao i uticaj količine dodatog enzima po gramu suve mase polimera na specifičnu aktivnost i prinos imobilizacije. Ispitana je i skladišna stabilnost imobilizata nakon tri meseca od završene imobilizacije.

Rezultati i diskusija

Peroksidaza iz ljuski soje (Soybean hull peroxidase) izolovana je i prečišćena iz polaznog materijala.⁸ Izmerena koncentracija enzimske aktivnosti dobijenog rastvora prečišćene peroksidaze (konc. 1 mg/ml) iznosi 142,25 IU/ml. Jedna jedinica enzimske aktivnosti [IU] definisana je kao ona količina enzima koja oksiduje 1 μ mol pirogalola za 1 minut, na 25°C i pH 7 i računata je po formuli:

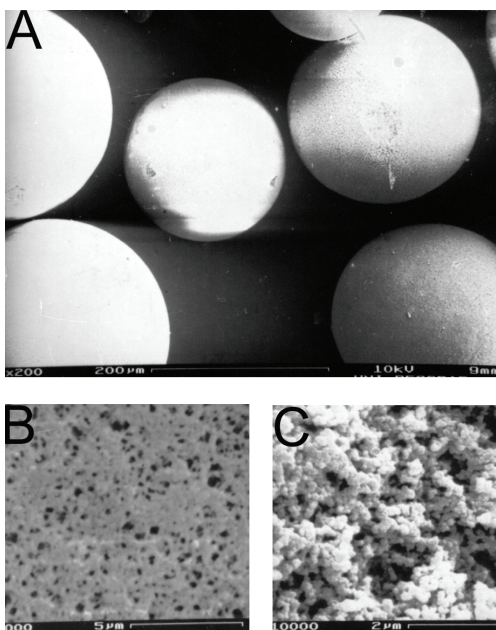
$$\text{Aktivnost peroksidaze (IU / ml)} = \frac{\Delta A_{420} \times V_{RS} \times df}{\epsilon \times \Delta t \times V_U}$$

gde su V_{RS} i V_U zapremine reakcione smeše 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)

U cilju korišćenja ovog enzima za uklanjanje fenola iz otpadnih voda i dobijanja katalizatora povećane stabilnosti sa mogućnošću ponovne upotrebe, peroksidaza iz soje je imobilizovana na glutaraldehidno aktivirane makroporozne nosače. Korišćena su četiri različita glicidil metakrilat nosača raspona pora od 40 – 200 nm:

1. MP3 150-300 (veličina pora od 40 nm),
2. EDA 10/12 (veličina pora od 50 nm),
3. EDA 20/12 (veličina pora od 150 nm) i
4. SGE 15/16 (veličina pora od 200 nm).

Svi korišćeni polimeri sintetisani su po publikovanoj proceduri i modifikovani etilendiaminom kako je prethodno opisano (Slika 1).^{9, 10}



Slika 1. Elektronska mikrografija kuglica makroporoznog nosača glicidilmetakrilata EDA 20/12 (veličine pora od 120 nm). A – kuglice uveličane 200 puta, B – površina kuglica uveličana 5000 puta, C – ispucala površina kuglica uveličana 10000 puta

Imobilizacija na svaki od nosača rađena je sa različitim koncentracijama peroksidaze iz soje u cilju pronalazanja optimalnog odnosa količine enzima po masi suvog polimera. Nanošene 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 kako sa povećanjem količine dodatog enzima po gramu polimera, tako i sa povećanjem veličine pora (Tabela 1). Zato najveću specifičnu aktivnost od 22,8 IU/g odnosno 21,4 IU/g pokazuju imobilizati na nosačima pora veličina 120 odnosno 200 nm.

Tabela 1. Zavisnost specifične aktivnosti imobilizata [IU/g] od količine dodatog enzima (mg) po gramu suve mase polimera i veličine pora nosača.

$m_{\text{SHP}} / \text{mg}$	Veličina pora, nm	0,68	3,36	12,5	25,0
MP3 150-300	40	1,7	3,3	4,2	8,2
EDA 10/12	50	0,7	1,5	2,6	8,4
EDA 20/12	120	1,5	2,9	8,1	22,8
SGE 15/16	200	1,1	2,3	6,4	21,4

Prinos imobilizacije (Y) opada sa rastućom količinom dodatog enzima, ali raste sa povećanjem veličine pora nosača (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 i veličine pora nosača.

$m_{\text{SHP}} / \text{mg}$	Vličina pora, nm	0,68	3,36	12,5	25,0
MP3 150-300	40	13,61	2,61	1,18	1,51
EDA 10/12	50	5,09	1,14	0,48	0,87
EDA 20/12	120	7,37	2,18	1,56	2,45
SGE 15/16	200	7,04	1,72	1,22	2,24

Prinos imobilizacije najveći je pri najmanjoj količini dodate peroksidaze iz soje. Svi imobilizati su posle završene imobilizacije čuvani u 100mM natrijum fosfatnom puferu pH 7 na temperaturi od $5 \pm 3^\circ\text{C}$, nakon tri meseca stajanja određena im je skladišna stabilnost, merenjem specifične aktivnosti i upoređivanjem sa početnom (Tabela 3).

Tabela 3: Procenat preostale specifične aktivnosti imobilizata nakon 3 meseca od imobilizacije u odnosu na početnu.

Imobilizati	Vličina pora, nm	Preostalaaktivnost, %
MP3 150-300	40	46,09
EDA 10/12	50	47,00
EDA 20/12	120	51,91
SGE 15/16	200	53,00

Aktivnost imobilizata je nakon tri meseca ostala na oko 50% od početne, što potvrđuje da su imobilizati stabilni i ukoliko se adekvatno skladište mogu se koristiti duži vremenski period. I u ovom slučaju, najmanji pad aktivnosti zabeležen je kod polimera sa najvećim dimenzijama pora (53% preostale aktivnosti), dok je najveći pad aktivnosti kod polimera sa najmanjim porama (46% preostale aktivnosti).

Tabela 4: Procenat preostale specifične aktivnosti imobilizata nakon 48h inkubacije u 80% dioksanu u odnosu na početnu.

	MP3 150-300	EDA 10/12	EDA 20/12	SGE 15/16
Sp / %	83,3	80,4	57,2	70,0

Merena je i stabilnost imobilizata u organskom rastvaraču, inkubacijom tokom 48h u 80% dioksanu i zatim merenjem aktivnosti u odnosu na početnu. Rezultati stabilnosti imobilizata su poređeni sa rezultatima za rastvorni enzim koji nakon inkubacije od 48h ostaje na 55% od početne aktivnosti (Tabela 4).

Imobilizacijom SHP povećava se stabilnost u organskom rastvaraču sa 55% za rastvorni enzim na preko 80% za imobilizate manjih dimenzija pora (MP3 150-300 i EDA 10/20).

Zaključak

Može se zaključiti da smo uspešno imobilizovali peroksidazu iz soje na glutaraldehidno aktiviran makroporozni glicidilmetakrilat. Analizom dobijenih rezultata i poređenjem imobilizata različitih dimenzija pora vidi se da najveće specifične aktivnosti od 22,8 IU/g i 21,4 IU/g odgovaraju polimerima EDA 20/12 i SGE 15/16 najvećih dimenzija pora od 120 i 200 nm. Stabilnost imobilizata potvrđena je merenjem preostale aktivnosti nakon tri meseca, a u zavisnosti je od veličine pora. Procenat preostale aktivnosti raste sa povećanjem dimenzije pora. Visoka specifična aktivnost i stabilnost imobilizata omogućava primenu imobilizovanog enzima za efikasno uklanjanje fenola iz otpadnih voda.

Zahvalnica: Ovaj rad je podržan od strane projekata (br. 173017 i 172049) Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

Comparison of soybean hull peroxidase immobilized on different glycidyl methacrylate polymers

Phenols are considered priority pollutants of wastewaters, they are non-biodegradable and the problem of their removal is a current and important environmental issue. Enzymatic treatment of wastewaters using peroxidase and H₂O₂ is highly effective and selective method. Soybean hulls offer cheap source of large amounts of crude enzyme (soybean hull peroxidase - SHP), which can be used for this purpose. The aim of this research was to test different macroporous carriers for immobilization of soybean hull peroxidase. Our data demonstrate that SHP immobilization using glutaraldehyde activation is influenced by the pore size of the macroporous glycidyl methacrylate matrix. Both specific activity of the immobilized enzyme and immobilization yield were increased with the increase in pore size, and the highest specific activity obtained was 22,8 U/g of carrier.

Acknowledgment: This work was supported by a grants (No. 173017 and No. 172049) from the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia

Reference

1. F. Ghaemmaghami, I. Alemzadeh, S. Motamed, *Iranian Journal of Chemical Engineering*. **7** (2010) 2.
2. M.C. Lakshmi, K.S.M.S. Raghavarao, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **15** (2010) 937.
3. A. Bódalo, J.L. Gómez, E. Gómez, A.M. Hidalgo, M. Gomez, A.M. Yelo, *Desalination*. **195** (2006) 51.
4. K. Wilberg, C. Assenhaimer, J. Rubio, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **77** (2002) 851.
5. S. Hejri, A. Saboora, *Journal of Science (University of Tehran)*. **35** (2009) 13-18.
6. M. Gomez, G. Matafonova, J.L. Gomez, V. Batoev, N. Christofi, *Journal of Hazardous Materials*. **169** (2009) 46.
7. I. Alemzadeh, S. Nejati, M. Vossoughi, *Engineering Letters*. **17** (2009) 4.
8. J. Liu, H. Liu, Y. Zhang, L. Qiu, F. Su, F. Li, Z. Su, J. Li, *Applied Microbiology and Biotechnology*. **74** (2007) 249.
9. S.M. Jovanović, A. Nastasović, N.N. Jovanović, K. Jeremić, *Mater. Sci. Forum*. **214** (1996) 155.
10. R. Prodanović, N. Milosavić, S. Jovanović, O. Prodanović, T. Ćirković Veličković, Z. Vujčić, R.M. Jankov, *Biocatalysis and Biotransformation*. **24** (2006) 195.