



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

POREĐENJE DVE METODE ZA IMOBILIZACIJU HRP U ALGINATU ZA PREČIŠĆAVANJE OTPADNIH VODA

DRAGICA SPASOJEVIĆ¹, MILOŠ PROKOPIJEVIĆ¹, OLIVERA PRODANOVIĆ¹,
KSENIIJA RADOTIĆ HADŽI-MANIĆ¹, RADIVOJE PRODANOVIĆ²

Rezime

Poznato je da peroksidaze iz rena (HRP) reaguju sa fenolima iz vode gradeći nerastvorna jedinjenja, koja onda mogu jednostavno da se uklone iz vodene faze. Glavni nedostatak ovog procesa predstavlja inaktivacija enzima te je stoga dosta pažnje usmereno na imobilizaciju peroksidaze u cilju uklanjanja fenolnih jedinjenja. Cilj našeg rada bio je da uporedimo dve metode za imobilizaciju HRP na alginatnom matriksu i nađemo imobilizat sa najboljim osobinama. HRP je imobilisana na nativnom i perjodatno oksidovanom alginatu. Nakon imobilizacije u alginatnim kuglicama, enzimska aktivnost je određivana spektrofotometrijski sa pirogalolom i H₂O₂ kao supstratima.

Rezultati koje smo dobili ukazuju da HRP imobilisana na perjodatno oksidovanom alginatu ima veći stepen vezane aktivnosti, i nižu specifičnu aktivnost u odnosu na imobilizaciju na nativnom alginatu nakon imobilizacije. Nakon pet dana ispiranja imobilizat HRP u perjodatno oksidovanom alginatu je imao veću i specifičnu aktivnost i stoga je bolji kandidat za uklanjanje fenola iz otpadnih voda u protočnom reaktoru.

Ključne reči: imobilizacija, HRP, alginat, perjodatna oksidacija, uklanjanje fenola

Comparison of two methods for the immobilization of HRP in alginate for wastewater treatment

Abstract

It has been shown that horseradish peroxidase (HRP) is able to react with aqueous phenolic compounds and form non-soluble materials that could be easily removed from the aqueous phase. The main disadvantage of this process is the inactivation of the enzyme and therefore attentions came into immobilization of peroxidase for the purpose of phenolic compound removal.

The aim of our work was to compare the two methods for the immobilization of HRP on alginate matrix and to find the immobilisate with the better properties. Immobilization was performed on native and periodate oxidized alginate. After alginate matrix beading, enzyme activity was determined spectrophotometrically using pyrogallol and H₂O₂ as substrates.

From the results we obtained, points that HRP immobilized on periodate oxidized alginate had a higher percentage of retained activity and lower of specific activity in comparison with HRP immobilized on native alginate beads. After 5 days of rinsing HRP immobilized within periodate oxidized alginate showed higher specific activity than the one immobilized within native alginate and therefore could be better candidate for phenol removal from wastewater in bed packed reactor.

Key words: immobilization, HRP, alginate, periodate oxidation, phenol removal

Uvod

Fenol i fenolni derivati su glavni industrijski zagadivači, (naftne, hemijske, industrije plastičnih masa) koji otpadnim vodama dospevaju u spoljašnju sredinu. 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 sedimentacijom i filtracijom ISPAS et al (2010).

¹ Institute for Multidisciplinary Research, University of Belgrade, Kneza Višeslava 1, 11030 Belgrade, Serbia, office@imsi.rs

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

Upotreba rastvornih enzima ograničena je inhibicijom krajnjim proizvodom, visokom cenom, nestabilnošću, nemogućnošću ponovne upotrebe i sl. Ova ograničenja mogu se prevazići imobilizacijom enzima na odgovarajućim matriksima SATAR et al (2008). 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. Međutim, usled visoke poroznosti, tokom vremena dolazi do curenja enzima inkapsuliranog u alginat MATTO et al (2009). 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 kovalentnu imobilizaciju na perjodatno aktiviranom alginatu uz formiranje kuglica jonotropnim geliranjem.

Materijali i metode

Hemikalije i reagensi

Natrijum-alginat (iz braon algi, niske viskoznosti), natrijum-perjodat, peroksidaza iz rena (tip II), pirogalol, kalijum-HEPES so i ostale hemikalije nabavljeni su od firme Sigma-Aldrich, SAD.

Aktivacija alginata oksidacijom

1 g Na-alginata je dodat u 10 ml 50 mM rastvora Na-perjodata i ostavljen na 4°C na tamnom. Reakcija je stopirana nakon 24 h dodatkom ekvimolarne količine glicerola. Precipitacija je izvršena dodatkom etanola u višku (3 zapremine) i NaCl (2 g). Precipitat je prikupljen filtracijom, a potom rastvoren u što manjoj količini vode i stavljen na dijalizu. Nakon dijalize, polimer je precipitiran apsolutnim etanolom i osušen acetonom. Ovako aktivirani alginat čuvan je u tamnim bočicama na sobnoj temperaturi LE-TIEN et al (2004).

Imobilizacija enzima

Pripremljen je 2 % (w/v) rastvor Na-alginata u vodi, koji je čuvan na 4 °C do upotrebe. U ovaj rastvor dodata je peroksidaza, tako da njena koncentracija u alginatu bude 0,01 mg/ml. 1 ml ovog rastvora sipan je u špric sa iglom, odakle je ukapavan u 5,5 % rastvor CaCl₂, u kome su formirane kuglice. Kuglice su "starile" sat vremena uz blago mešanje na magnetnoj mešalici, nakon čega su isprane rastvorom CaCl₂ i čuvane u HEPES puferu (10 mM, pH 7,0) sa 5 mM CaCl₂ na 4 °C.

Za imobilizaciju HRP na oksidovani alginat, napravljen je rastvor ovog alginata u 0,2 M NaHCO₃ puferu pH 8,0, u koji je dodat rastvor enzima, pa je ostavljen da se inkubira 24 h na 4 °C. Nakon tog vremena dodato je kap po kap (do ¼ finalne zapremine) 50 mM Tris pufera pH 7,0. Koncentracija enzima u 2 % aktiviranom alginatu iznosila je 0,02 mg/ml, a ovaj rastvor je nakon toga mešan sa 2 % nativnim alginatom u odnosu 1:1, da bi se popravile mehaničke osobine imobilizata LE-TIEN et al (2004). Dalji postupak sa ovim imobilizatom bio je identičan predhodno opisanom za nativni alginat.

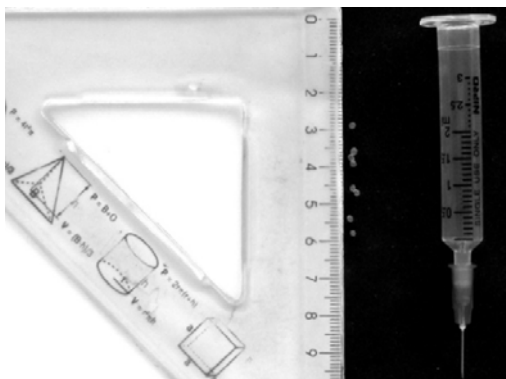
Merenje enzimske aktivnosti

Pripremljen je 13 mM rastvor pirogalola u 10 mM HEPES puferu pH 7,0. U 3 ml ovog rastvora dodavan je enzim imobilizovan u kuglicama (50-80 mg) i po 30 µl 0,97 M rastvora vodonik-peroksida (u vodi). Uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici, uzimani su alikvoti na 0, 5, 10 i 15 min i očitavana je apsorbanca na 420 nm.

1 U je ona količina enzima koja katalizuje nastanak 1 µmol 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. Procenat vezivanja određen je kao odnos nanete i vezane aktivnosti enzima. Prinos imobilizacije je količnik specifične aktivnosti imobilizata i vezane aktivnosti po jedinici mase kuglica.

Rezultati i diskusija

Prinos oksidovanog alginata iznosio je 100 % (iz 1 g alginata dobili smo 1 g perjodatno oksidovanog alginata). Po ukapavanju u CaCl_2 dobijene su kuglice prečnika oko 1,5 mm sa imobilisanim enzimom (slika 1).



Slika 1. Kuglice imobilizata nakon geliranja i špric koji je korišćen za njihovo ukapavanje
Figure 1. Beads with immobilized enzyme after gelation and a syringe that was used for their instillation

Osnovni parametri enzimske aktivnosti imobilizata prikazani su u tabeli 1. Može se videti da je specifična aktivnost enzima imobilizovanog na oksidovan alginat nešto niža u odnosu na imobilizat nativnog alginata, ali da posle 5 dana čuvanja na 4 °C uz svakodnevnu izmenu pufera imobilizat HRP u oksidovanom alginatu zadržava veći procenat specifične aktivnosti (62 % početne Sp). Vezana aktivnost je takođe veća kod oksidovanog alginata.

Tabela 1. Osnovni parametri imobilizacije za imobilizate HRP na običnom i aktiviranom alginatu, izračunati na osnovu enzimske aktivnosti

Table 1. The main immobilization parameters of the HRP immobilizates on ordinary and activated alginate, based on enzymatic activity

Imobilizat:	sp.aktivnost-Sp (U/g)	vezana aktivnost (U/g)	% vezivanja	prinos imobilizacije (%)	Sp posle 5 dana (U/g)	% zadržane Sp
alginat+HRP	0.148	0.803	9.69	18.43	0.063	42.57
oks.alginat+HRP	0.130	1.108	9.69	11.73	0.081	62.31

Zaključak

Razradili smo postupak za imobilizaciju HRP unutar kuglica alginata prethodno oksidovanog perjodatom. Imobilizacijom HRP na oksidovani alginat dobili smo imobilizat koji manje curi i zadržava više enzimske aktivnosti u odnosu na imobilizaciju na nativnom alginatu. Nakon 5 dana modifikovani imobilizat zadržava više od 60 % polazne specifične aktivnosti, što je dobra osobina za upotrebu u kontinualnom uklanjanju fenolnih jedinjenja iz vode. Naši dalji radovi biće usmereni na modifikaciju HRP radi njenog boljeg vezivanja za aktivirani alginat i na upotrebu dobijenog imobilizata u uklanjanju fenola iz otpadnih voda.

Literatura

1. ISPAS C.R., RAVALLI M.T., STEERE A., ANDREESCU S., 2010: Multifunctional biomagnetic capsules for easy removal of phenol and bisphenol A. *Water Research* 44. p. 1961-1969.
2. LE-TIEN C., MILLETTE M., LACROIX M., MATEESCU M. A., 2004: Modified alginate matrice for the immobilization of bioactive agents. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38. p. 1-10.
3. MATTO M., HUSAIN Q., 2009: Calcium alginate–starch hybrid support for both surface immobilization and entrapment of bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57. p. 164–170.
4. SATAR R., MATTO M., HUSAIN Q., 2008: Studies on calcium alginate-pectin gel entrapped concanavalin A-bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase complex. *J. of Scientific & Industrial Research*, V. 67. p. 609-615.